

(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
2020 年 5 月 14 日 (14.05.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/093374 A1

(51) 国际专利分类号:
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 15/06* (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/114845

(22) 国际申请日: 2018 年 11 月 9 日 (09.11.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(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: 王文会 (WANG, Wenhui); 中国北京市
海淀区清华园, Beijing 100084 (CN)。 何伟
华 (HE, Weihua); 中国北京市海淀区清华
园, Beijing 100084 (CN)。 黄亮 (HUANG, Liang);
中国北京市海淀区清华园, Beijing 100084

(CN)。 丁为 (DING, Wei); 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清华
大学照澜院商业楼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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

(54) Title: CELL ELECTROFUSION CULTURE CHIP AND DEVICE, AND CELL ELECTROFUSION METHOD

(54) 发明名称: 细胞电融合培养芯片和装置、细胞电融合的方法

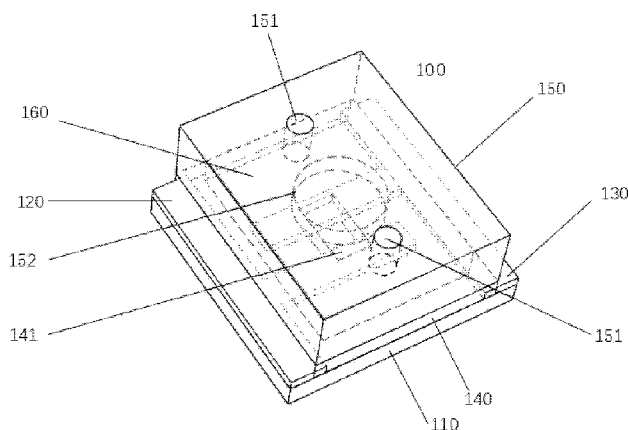


图 1

(57) Abstract: Disclosed are a cell electrofusion culture chip (100), a cell electrofusion culture device and a cell electrofusion method. The cell electrofusion culture chip (100) comprises: a substrate (110); at least one first interdigitated electrode (120) and at least one second interdigitated electrode (130) that are disposed on the upper surface of the substrate (110), each first interdigitated electrode (120) having at least one first protruding electrode (121) and each second interdigitated electrode (130) having at least one second protruding electrode (131); a capture layer (140), covering the at least one first interdigitated electrode (120) and the at least one second interdigitated electrode (130), and having at least one capture hole (141), the capture hole (141) passing through the capture layer (140); and a culture layer (150), covering the capture layer (140), and having a chamber (160) defined between the lower surface of the culture layer (150) and the upper surface of the capture layer (140). The culture layer (150) is configured with two entry and exit ports (151) and at least one culture hole (152). The entry and exit ports (151) pass through the culture layer (150) and enable entry and exit of

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, ST, 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)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

cell suspension. The culture hole (150) is disposed directly opposite the capture hole (141) and does not pass through the culture layer (150). The chamber (160) is connected to part of the first protruding electrode (121) and part of the second protruding electrode (131) via the capture hole (141).

(57) 摘要: 提出了细胞电融合培养芯片(100)、细胞电融合培养装置和细胞电融合的方法。细胞电融合培养芯片(100)包括: 基底(110); 至少一个第一叉指电极(120)和至少一个第二叉指电极(130), 设置在基底(110)的上表面, 且每个第一叉指电极(120)具有至少一个第一凸出电极(121), 每个第二叉指电极(130)具有至少一个第二凸出电极(131); 捕获层(140), 覆盖至少一个第一叉指电极(120)和至少一个第二叉指电极(130)且具有至少一个捕获孔(141), 捕获孔(141)贯穿捕获层(140); 培养层(150), 覆盖捕获层(140), 培养层(150)的下表面与捕获层(140)的上表面之间限定有腔体(160), 且培养层(150)还设置有两个进出口(151)和至少一个培养孔(152), 进出口(151)贯穿培养层(150)且用于细胞悬浮液的进出, 培养孔(152)不贯穿培养层(150)且与捕获孔(141)正对设置; 其中, 腔体(160)通过捕获孔(141)与部分的第一凸出电极(121)和部分的第二凸出电极(131)相连。

细胞电融合培养芯片和装置、细胞电融合的方法

技术领域

本申请涉及细胞融合技术领域，具体的，本申请涉及细胞电融合培养芯片、细胞电融合培养装置和细胞电融合的方法。

背景技术

现阶段，多倍体癌细胞（每个染色体都有两个以上副本的细胞）比大多数其他癌细胞体积更大，对化疗和放疗具有抵抗力，并且与疾病复发有关。这些巨细胞比其他癌细胞更硬，而且能够移动得更远，这可能有助于解释它们与更严重疾病相关的原因。多倍体癌细胞通常来源于癌细胞的异常分裂，也可以通过细胞融合的方式人工制备。

细胞融合，是指在人工诱导或者自发的情况下，两个细胞或者原生质体融合形成一个细胞，在遗传物质的研究方面有着重要的意义。细胞电融合技术是通过外界电场控制两个或多个细胞融合变成一个单核或多核杂合细胞的方法。相较于生物、化学和物理等诱导融合技术而言，细胞电融合技术具有效率较高、操作简便、对细胞无毒害等优点，逐渐成为了生物工程研究领域的重要手段。

微流控芯片具有高通量、消耗试样和试剂极少等特点，因而被广泛应用于生物、化学、医学领域的分析与检测。基于微流控技术的细胞融合器件能够在消耗少量试剂的同时，短时间内实现对大量细胞的稳定融合。

操纵细胞是实现细胞融合的前提，细胞按照需要实现配对。介电泳是电介质在非匀强电场中受力的现象，常被用来操纵流体中的微小颗粒。介电泳力的存在不需要物体本身带电。所有粒子在电场环境里都存在介电泳现象，然而力的大小很大程度取决于物质和粒子的电学性质，粒子的形状和大小，以及场强变化率。因此，特定频率的电场可以有选择性地控制特定粒子。借助介电泳力，我们能够更加方便地实现对细胞的操纵。

单细胞的分析在细胞生物学的研究中越来越占据重要地位。对于细胞融合而言，如果能够追踪融合后单个融合细胞的生长情况，无疑对评价细胞融合的效果与融合细胞的研究有着重大的意义。但现有的基于微流控技术的细胞融合器件大多只能实现原位培养分析，不能有效区分不同细胞生长形成的群落，且融合细胞的生长会受到未融合细胞的干扰。基于此我们提出了一种基于电融合原理的细胞融合器件，使用介电泳力实现高通量高效率的细胞捕获与配对，并能在融合之后实现对单个融合细胞的培养分析。

发明内容

本申请是基于发明人的下列发现而完成的：

本申请人在研究过程中发现，现有的融合技术还存在以下问题：1) 细胞配对的不稳定性：因细胞易受流体力等外力的影响，细胞的分布难以被精确控制。常用的细胞电融合器件都是利用细胞极化后的互相吸引作用使其相连成串。由于细胞极化的效果不一，因此在这种细胞电融合器件中难以精确控制细胞成串的数目，从而对细胞融合的效果产生较大影响。2) 对细胞的不可逆伤害：常用的化学、生物等细胞融合方法融合效率较低且对细胞伤害较大。而常见的细胞电融合器件在工作时，细胞与电极直接接触，易对细胞造成损伤。3) 融合结果分析的不便利性：常用的细胞融合器件需要将融合细胞取出后才能进行后续的培养分析，难以跟踪单个融合细胞的生长状况。

所以，本申请的发明人经过深入研究，设计一种结合介电泳技术和双阱结构的、能够对细胞进行高通量融合的细胞电融合培养芯片和装置，其集电融合细胞和细胞培养两种功能于一体，这两种功能进一步允许对细胞融合之后的情况进行培养分析。本申请设计的细胞电融合培养芯片可利用介电泳原理高效快速阵列化地捕获和配对细胞，使用电脉冲融合已经配对的细胞，并利用双阱结构实现对融合细胞的培养分析。

基于本申请的细胞电融合培养芯片和装置对细胞融合及其后续培养分析在操作上的高通量与集成化，本申请能够在基于细胞融合的细胞遗传研究中发挥重要作用。

在本申请的第一方面，本申请提出了一种细胞电融合培养芯片。

根据本申请的实施例，所述细胞电融合培养芯片包括：基底；至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极，所述至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极设置在所述基底的上表面，且每个所述第一叉指电极具有至少一个第一凸出电极，每个所述第二叉指电极具有至少一个第二凸出电极；捕获层，所述捕获层覆盖所述至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极，且具有至少一个捕获孔，所述捕获孔贯穿所述捕获层；培养层，所述培养层覆盖所述捕获层，所述培养层的下表面与所述捕获层的上表面之间限定有腔体，且所述培养层还设置有两个进出口和至少一个培养孔，所述进出口贯穿所述培养层且用于细胞悬浮液的进出，所述培养孔不贯穿所述培养层且与所述捕获孔正对设置；其中，所述腔体通过所述捕获孔与部分的所述第一凸出电极和部分的所述第二凸出电极相连。

发明人经过研究发现，本申请实施例的细胞电融合培养芯片，其第一叉指电极和第二叉指电极可利用介电泳原理实现高效地捕获细胞并实现精确的两两配对，从而为细胞电融合提供理想的条件，还可利用电脉冲引发电穿孔现象，改变细胞膜通透性，从而实现细胞融合，而且能利用负介电泳原理使细胞在融合时远离电极，从而防止电极对细胞造成损伤，并且能利用捕获孔和培养孔的双阱结构，使融合的细胞在重力的作用下转移到培养孔内，

进而继续后续的培养以分析细胞融合的效果。

另外,根据本申请上述实施例的细胞电融合培养芯片,还可具有如下附加的技术特征:

根据本申请的实施例,形成所述基底的材料为无机玻璃或有机玻璃,形成所述第一叉指电极和所述第二叉指电极的材料为金属或导电聚合物,形成所述捕获层的材料为光刻胶,形成所述培养层的材料包括聚二甲基硅氧烷。

根据本申请的实施例,所述第一叉指电极和所述第二叉指电极的厚度为 50~150 纳米,方形的所述捕获孔的长为 10~100 微米、宽为 5~50 微米,一个所述捕获孔中的所述第一凸出电极与所述第二凸出电极的间距为 20~30 微米。

根据本申请的实施例,所述细胞电融合培养芯片包括相间平行排布的多个所述第一叉指电极和多个所述第二叉指电极,且每个所述第一叉指电极具有多个所述第一凸出电极,每个所述第二叉指电极具有多个所述第二凸出电极;所述捕获层具有多个所述捕获孔,所述培养层具有多个所述培养孔,并且,所述多个捕获孔和所述多个培养孔都呈阵列排布。

根据本申请的实施例,所述捕获孔的个数为 50~1000 个。

根据本申请的实施例,所述捕获层与所述培养层之间可拆开。

在本申请的第二方面,本申请提出了一种细胞电融合培养装置。

根据本申请的实施例,所述细胞电融合培养装置包括:上述的细胞电融合培养芯片;信号发生器,所述信号发生器分别与所述至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极电连接,用于对所述细胞电融合培养芯片发出不同的电信号;微流泵,所述微流泵分别与所述两个进出口相连,用于控制细胞悬浮液的流动。

发明人经过研究发现,本申请实施例的细胞电融合培养装置,通过信号发生器的不同电信号可实现细胞电融合培养装置的细胞捕获、细胞配对和细胞融合的功能,并通过微流泵控制细胞悬浮液的流动。本领域技术人员能够理解的是,前面针对细胞电融合培养芯片所描述的特征和优点,仍适用于该细胞电融合培养装置,在此不再赘述。

在本申请的第三方面,本申请提出了一种细胞电融合的方法。

根据本申请的实施例,所述方法使用上述的细胞电融合培养装置,且所述方法包括:通过微流泵使细胞悬浮液从细胞电融合培养芯片的进出口进入腔体;通过信号发生器对第一叉指电极和第二叉指电极施加正弦电信号,所述细胞悬浮液中的细胞进入捕获孔中,并被吸附到第一凸出电极或第二凸出电极上;通过调节所述信号发生器的信号频率,使所述第一凸出电极吸附的所述细胞与所述第二凸出电极吸附的所述细胞进行接触配对;通过所述调节信号发生器对所述第一叉指电极和所述第二叉指电极施加电脉冲信号,使所述细胞

的接触部分发生电穿孔并融合。

发明人经过研究发现，采用本申请实施例的细胞电融合方法，利用正介电泳原理可精准高效地对细胞进行捕获和配对，提高细胞配对的稳定性和准确性，并利用负介电泳原理使细胞在融合时远离电极，防止融合时的电脉冲信号使电极对细胞造成损伤。本领域技术人员能够理解的是，前面针对细胞电融合培养芯片、细胞电融合培养装置所描述的特征和优点，仍适用于该细胞电融合的方法，在此不再赘述。

另外，根据本申请上述实施例的方法，还可以具有如下附加的技术特征：

根据本申请的实施例，在所述细胞进行融合的步骤之后，所述方法进一步包括：将所述细胞电融合培养芯片翻转 180° ，使所述融合后的细胞落入培养孔；通过所述微流泵使培养基进入所述细胞电融合培养芯片的所述培养孔，对所述融合后的细胞进行培养。

根据本申请的实施例，所述电脉冲信号的个数为 5 个、脉宽为 50 微秒且频率为 1Hz。

本申请的关键点和技术效果在于：

(1) 利用介电泳原理和捕获孔阵列结构有效地解决了细胞捕获和配对的效率问题；提高细胞配对的稳定性和准确性。

(2) 通过捕获孔和培养孔的双阱结构，并利用重力将融合后的细胞从捕获孔转移到培养孔以实现融合结果的培养分析。

(3) 利用负介电泳原理使细胞在融合时远离电极，防止融合时的电脉冲信号使电极对细胞造成损伤；

(4) 利用阵列化的结构，实现高通量的细胞融合与培养分析。

(5) 在同一芯片和装置上实现细胞融合与培养分析。

附图说明

图 1 是本申请一个实施例的细胞电融合培养芯片的斜视结构示意图；

图 2 是本申请一个实施例的细胞电融合培养芯片的俯视结构示意图；

图 3 是本申请一个实施例的细胞电融合培养芯片的横截面结构示意图；

图 4 是本申请另一个实施例的细胞电融合培养芯片的实例图及其放大图：

A：一个实际制作出的细胞电融合培养芯片的照片，

B：细胞电融合培养芯片的微光阵列的局部放大照片，标尺为 100 微米，

C：细胞电融合培养芯片的第一叉指电极和第二叉指电极的局部放大照片，标尺为 100 微米，

D：细胞电融合培养芯片的培养孔阵列的局部放大照片，标尺为 100 微米；

图 5 是本申请一个实施例的细胞电融合的方法流程示意图；

图 6 是本申请另一个实施例的细胞电融合的方法流程示意图；

图 7 是本申请一个实施例的细胞的球壳模型和等效的均一球体模型；

图 8 是本申请一个实施例的克劳休斯-莫索提系数与频率的关系曲线；

5 图 9 是本申请一个实施例的正负介电泳效应的照片；

图 10 是本申请一个实施例的施加电脉冲信号的瞬间捕获孔内电场分布的仿真图；

图 11 是本申请一个实施例的海拉细胞电融合的过程照片

图 12 是本申请一个实施例的融合细胞在培养孔中培养的照片。

10 附图标记

100 细胞电融合培养芯片

110 基底

120 第一叉指电极

121 第一凸出电极

15 130 第二叉指电极

131 第二凸出电极

140 捕获层

141 捕获孔

150 培养层

20 151 进出口

152 培养孔

160 腔体

具体实施方式

25 下面详细描述本申请的实施例，本技术领域人员会理解，下面实施例旨在用于解释本申请，而不应视为对本申请的限制。除非特别说明，在下面实施例中沒有明确描述具体技术或条件的，本领域技术人员可以按照本领域内的常用的技术或条件或按照产品说明书进行。

30 在本申请的一个方面，本申请提出了一种细胞电融合培养芯片。

根据本申请的实施例，参考图 1~3，细胞电融合培养芯片 100 包括基底 110、至少一个第一叉指电极 120、至少一个第二叉指电极 130、捕获层 140 和培养层 150；其中，至少一

个第一叉指电极 120 和至少一个第二叉指电极 130，都设置在基底 110 的上表面，且每个第一叉指电极 120 具有至少一个第一凸出电极 121，每个第二叉指电极 130 具有至少一个第二凸出电极 131；捕获层 140 覆盖至少一个第一叉指电极 120 和至少一个第二叉指电极 130，捕获层 140 具有至少一个捕获孔 141，且捕获孔 141 贯穿捕获层 140；培养层 150 覆盖捕获层 140，培养层 150 的下表面与捕获层 140 的上表面之间限定有腔体 160，且培养层 150 还设置有两个进出口 151 和至少一个培养孔 152，而进出口 151 贯穿培养层 150 且用于细胞悬浮液的进出，培养孔 152 不贯穿培养层 150 且与捕获孔 141 正对设置；其中，腔体 160 通过捕获孔 141 与部分的第一凸出电极 121 和部分的第二凸出电极 131 相连。

根据本申请的实施例，形成基底 110 的材料可以为无机玻璃或有机玻璃，形成第一叉指电极 120 和第二叉指电极 130 的材料可以为金属或导电聚合物，形成捕获层 140 的材料可为光刻胶，形成培养层 150 的材料包括聚二甲基硅氧烷（PDMS）。如此，透明材料的基底 110 方便观察，导电材料的电极更容易将细胞极化为偶极子，选择透明的光刻胶材料可在捕获层 140 上光刻出捕获孔 141，而复杂结构的培养层 150 可通过用聚二甲基硅氧烷材料倒模形成。

根据本申请的实施例，第一叉指电极 120 和第二叉指电极 130 的厚度可为 50~150 纳米，方形的捕获孔 141 的长可为 10~100 微米、宽可为 5~50 微米，一个捕获孔 141 中的第一凸出电极 121 与第二凸出电极 131 之间的距离可为 20~30 微米。如此，采用上述尺寸形成的腔体 160 中露出部分的第一凸出电极 121 与第二凸出电极 131 之间能形成使细胞定向迁移的介电泳效应。在一些具体事例中，第一叉指电极 120 和第二叉指电极 130 可通过溅射并光刻形成 20 纳米厚的铂和 80 纳米厚的金，如此，可使电极的导电效果更好且不易损坏。

根据本申请的实施例，细胞电融合培养芯片 100 可包括相间平行排布的多个第一叉指电极 120 和多个第二叉指电极 130，且每个第一叉指电极 120 可具有多个第一凸出电极 121，每个第二叉指电极 130 可具有多个第二凸出电极 131；而捕获层 140 可具有多个捕获孔 141，培养层 150 可具有多个培养孔 152，并且，多个捕获孔 141 和多个培养孔 152 都呈阵列排布。如此，培养孔阵列中的每个培养孔可与捕获孔阵列中的每个捕获孔正对设置，且每个捕获孔中都会露出部分的第一凸出电极和第二凸出电极，且参考图 4，这种大规模阵列化结构设计的捕获孔和培养孔与叉指电极阵列对应设置，从而可同时捕获和电融合大量的细胞。在本申请的一些实施例中，捕获孔的个数可为 50~1000 个，如此，通过一次电融合过程可获得上千个融合细胞。

根据本申请的实施例，捕获层 140 与培养层 150 之间是可拆开的，具体例如通过可逆的键合作用等组装的，如此，进行电融合前先将培养层 150 的下表面与捕获层 140 的上表面键合，等到捕获测试一批细胞后将捕获层 140 与培养层 150 拆开，进行必要的清洗、消

毒处理以后，再键合成型而用于捕获下一批细胞。

根据本申请的实施例，第一叉指电极 120 和第二叉指电极 130 的宽度尺寸可根据细胞尺寸进行匹配设计，长度则根据所需的通量大小进行设计；腔体 160 的高度尺寸、根据细胞尺寸进行匹配设计；捕获孔 141 的长度、宽度和深度都根据细胞尺寸进行匹配设计。

5 综上所述，根据本申请的实施例，本申请提出了一种细胞电融合培养芯片，其第一叉指电极和第二叉指电极可利用介电泳原理实现高效地捕获细胞并实现精确的两两配对，从而为细胞电融合提供理想的条件，还可利用电脉冲引发电穿孔现象，改变细胞膜通透性，从而实现细胞融合，而且能利用负介电泳原理使细胞在融合时远离电极，从而防止电极对细胞造成损伤，并且能利用捕获孔和培养孔的双阱结构，使融合的细胞在重力的作用下转
10 移到培养孔内，进而继续后续的培养以分析细胞融合的效果。

在本申请的另一个方面，本申请提出了一种细胞电融合培养装置。

根据本申请的实施例，细胞电融合培养装置可包括：上述的细胞电融合培养芯片 100、信号发生器和微流泵；其中，信号发生器分别与至少一个第一叉指电极 120 和至少一个第二叉指电极 130 电连接，用于对细胞电融合培养芯片 100 发出不同的电信号；而微流泵分
15 别与两个进出口 151 相连，用于控制细胞悬浮液的流动。

综上所述，根据本申请的实施例，本申请提出了一种细胞电融合培养装置，通过信号发生器的不同电信号可实现细胞电融合培养装置的细胞捕获、细胞配对和细胞融合的功能，并通过微流泵控制细胞悬浮液的流动。本领域技术人员能够理解的是，前面针对细胞电融
20 合培养芯片所描述的特征和优点，仍适用于该细胞电融合培养装置，在此不再赘述。

在本申请的另一个方面，本申请提出了一种细胞电融合的方法。根据本申请的实施例，该方法使用上述的细胞电融合培养装置，且参考图 5，该方法包括：

S100：通过微流泵使细胞悬浮液从细胞电融合培养芯片的进出口进入腔体。

25 在该步骤中，进行细胞给进，即通过细胞电融合培养装置中的微流泵，使细胞悬浮液从细胞电融合培养芯片 100 的进出口 151 进入腔体 160。根据本申请的实施例，理论上不仅可采用微动台驱动注射器（即微流泵）来推动细胞悬浮液流动，也可以采用重力调节的方式进行推动。

S200：通过信号发生器对第一叉指电极和第二叉指电极施加正弦电信号，所述细胞悬
30 浮液中的细胞进入捕获孔中，并被吸附到第一凸出电极或第二凸出电极上。

在该步骤中，进行细胞捕获，即通过信号发生器对细胞电融合培养芯片 100 的至少一个第一叉指电极 120 和至少一个第二叉指电极 130 施加正弦电信号，可在捕获孔 141 中露

出的第一凸出电极 121 与第二凸出电极 131 之间产生正介电泳效应, 可使悬浮液中的细胞被吸附到捕获孔底部露出的电极上, 即每个捕获孔 141 中露出的第一凸出电极 121 与第二凸出电极 131 分别吸附一个细胞。

需要说明的是, 细胞是由细胞膜、细胞质及多种细胞器构成的, 其电学特性比较复杂。因而假设细胞内部结构均匀, 进而将其等效为球壳模型, 如图 7 所示。其中, 等效后的细胞复介电常数为:

$$\epsilon_c^* = \epsilon_{mem}^* \frac{\left(\frac{R}{d}\right)^2 + \left(\frac{\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*}{\epsilon_{cyto}^* + 2\epsilon_{mem}^*}\right)}{\left(\frac{R}{d}\right)^2 - \left(\frac{\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*}{\epsilon_{cyto}^* + 2\epsilon_{mem}^*}\right)}$$

式中, R 和 d 分别为细胞和细胞膜的半径; ϵ_{cyto}^* 和 ϵ_{mem}^* 分别为细胞质和细胞膜的复介电常数,

$$\epsilon_{cyto}^* = \epsilon_{cyto} - j \frac{\sigma_{cyto}}{\omega}, \quad \epsilon_{mem}^* = \epsilon_{mem} - j \frac{\sigma_{mem}}{\omega}; \quad \epsilon_{cyto} \text{ 和 } \sigma_{cyto} \text{ 分别为细胞质的介电常数和电导率,}$$

ϵ_{mem} 和 σ_{mem} 分别为细胞膜的介电常数和电导率, ω 为电信号的角频率。

所以, 由于细胞膜具有非导电性, 整个细胞可以被简化为一个非带电粒子。介电泳的实质就是细胞在非均匀电场中被外界电场极化为偶极子。当该偶极子处于均匀电场作用下, 它处于平衡状态; 而在非均匀的电场中, 因为两级电荷处所处的电场强度不等, 所以两级所受的作用力不等, 此时, 细胞将受到电场强度较大方向的一个净力推动细胞进行定向迁徙。

介电泳力的公式为:

$$F_{DEP} = 2\pi R^2 \epsilon_m \text{Re}[K_{CM}] \nabla E^2$$

$$K_{CM} = \frac{\epsilon_m^* - \epsilon_c^*}{2\epsilon_m^* + 3\epsilon_c^*}$$

$$\epsilon_m^* = \epsilon_m - j \frac{\sigma_m}{\omega}$$

其中, K_{CM} 是克劳休斯-莫索提系数, ϵ_m 是溶液的介电常数, σ_m 是溶液的电导率。

而克劳休斯-莫索提系数 (K_{CM}) 与频率 (Frequency) 的关系如图 8 所示。介电泳力大小决定于电场梯度大小, 选定参数使介电泳力为正介电泳力, 即在电场作用下细胞将向电场梯度高的区域发生定向迁徙运动。因此, 只要能够精准地控制电场分布与电信号配置, 就可以使电场中的细胞受到不同大小和方向的电场力, 进而能够控制某些特定区域细胞运动。

S300: 通过调节信号发生器的信号频率, 使第一凸出电极吸附的细胞与第二凸出电极捕获的细胞进行接触配对。

在该步骤中, 进行细胞配对, 即通过调节信号发生器的信号频率, 可使步骤 S200 中第

一凸出电极 121 吸附的细胞与第二凸出电极 131 吸附的细胞进行接触配对。

还需要说明的是，当 $\text{Re}[K_{\text{CM}}] > 0$ 时，产生正介电泳效应，微粒被电极吸引；当 $\text{Re}[K_{\text{CM}}] < 0$ 时，产生负介电泳效应，微粒被电极排斥。所以，可以通过调节加载在电极上的信号频率，以实现正负介电泳的切换。具体的，图 9 为一个正介电泳效应（图 9 的(a)）和负介电泳效应（图 9 的(b)）的实例，其标尺的长度为 15 微米。

S400：通过调节信号发生器对第一叉指电极和第二叉指电极施加电脉冲信号，使细胞的接触部分发生电穿孔并融合。

在该步骤中，进行细胞融合，即继续通过调节信号发生器，对至少一个第一叉指电极 120 和至少一个第二叉指电极 130 施加电脉冲信号，可使细胞的接触部分发生电穿孔并融合。

需要说明的是，细胞膜在受高压电脉冲的作用下可以被击穿，并且如果控制脉冲宽度在一定的范围内可使细胞膜在穿孔后恢复，上述的可逆电穿孔过程即为细胞融合的基本原理。由于细胞膜的磷脂双分子层可被近似为绝缘体，而细胞膜两侧的液体（细胞内液和细胞悬浮液）都是电解质溶液，因此在细胞外施加电场引起两侧电解质离子极化即可诱导细胞膜电位差 V_a 的形成。外界电场能够击穿细胞膜的原因在于，施加外界电场将引起细胞膜两边的电解质离子极化，进而诱导形成细胞膜电位差 V_a 。其中，

$$V_a = 1.5aE \cos \theta / [1 + (\omega\tau)^2]^{1/2}$$

式中， θ 是电场方向与指定点法线之间的夹角， ω 是外加交流电场的角频率， τ 是细胞膜电介质的弛豫时间常数。由公式易知细胞膜上的诱导膜电位与外加电场呈正相关。而外加电压会对细胞膜产生一个压力 F ：

$$F = 0.5\epsilon_e\epsilon_0(V/h)^2$$

式中， h 是膜的受电场作用后的厚度， ϵ_e 是缓冲液的介电常数。当外界电场产生的压力施加于一块初始厚度为 h_0 的膜上时，膜就会受压变薄，薄厚的改变程度取决于膜的弹性常数 Y ：

$$Y \ln(h/h_0) = F = 0.5\epsilon_e\epsilon_0(V_e/h)^2$$

$$V_e = \sqrt{\frac{2Y \ln(h/h_0)h}{\epsilon_e\epsilon_0}}$$

式中， V_e 为临界电压。通常，在 $\ln(h/h_0) = -1/2$ 时，即临界厚度 $h = 0.607 h_0$ 时，膜就会因为不稳定而被击穿。图 10 展示了施加电脉冲信号的瞬间捕获孔内电场分布的仿真图，其标尺为 10 微米。

根据本申请的实施例，电脉冲信号的个数可为 5 个、脉宽可为 50 微秒且频率可为 1Hz，如此，采用上述参数的电脉冲信号可使细胞更好地发生电穿孔。而在细胞电融合芯片中，细胞先受介电泳力的作用下吸附到电极处，然后在脉冲电信号作用下发生电击穿。当细胞电位差达到击穿电压时，会发生电穿孔，并实现电融合。图 11 展示了本细胞电融合芯片使用一个海拉细胞融合实例，其标尺为 5 微米。

在本申请的另一一些实施例中，参考图 6，在步骤 S400 之后，该方法可进一步包括：

S500：将细胞电融合培养芯片翻转 180°，使融合后的细胞落入培养孔。

在该步骤中，进行细胞转移，即在步骤 S400 完成细胞融合之后，可将细胞电融合培养芯片翻转 180°，融合细胞会在重力作用下落至培养孔 152 中。

S600：通过微流泵使培养基进入细胞电融合培养芯片的培养孔，对融合后的细胞进行培养。

在该步骤中，进行细胞培养，即待步骤 S500 中融合细胞移至培养孔 152 中后，再向细胞电融合培养芯片通入培养基，即可原位对融合细胞直接进行培养，方便快捷。图 12 展示了一个细胞培养实例，其标尺为 100 微米。

综上所述，根据本申请的实施例，本申请提出了一种细胞电融合方法，利用正介电泳原理可精准高效地对细胞进行捕获和配对，提高细胞配对的稳定性和准确性，并利用负介电泳原理使细胞在融合时远离电极，防止融合时的电脉冲信号对细胞造成损伤。本领域技术人员能够理解的是，前面针对细胞电融合培养芯片、细胞电融合培养装置所描述的特征和优点，仍适用于该细胞电融合的方法，在此不再赘述。

在本申请的描述中，需要理解的是，术语“中心”、“纵向”、“横向”、“长度”、“宽度”、“厚度”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”、“内”、“外”、“顺时针”、“逆时针”、“轴向”、“径向”、“周向”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申请和简化描述，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申请的限制。

在本申请的描述中，除非另有明确的规定和限定，术语“安装”、“相连”、“连接”、“固定”等术语应做广义理解，例如，可以是固定连接，也可以是可拆卸连接，或成一体；可以是机械连接，也可以是电连接；可以是直接相连，也可以通过中间媒介间接相连，可以是两个元件内部的连通或两个元件的相互作用关系。对于本领域的普通技术人员而言，可以根据具体情况理解上述术语在本申请中的具体含义。

此外，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

隐含地包括至少一个该特征。在本申请的描述中，“多个”的含义是至少两个，例如两个，三个等，除非另有明确具体的限定。

在本说明书的描述中，参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“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申请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必须针对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一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外，在不相互矛盾的情况下，本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

尽管上面已经示出和描述了本申请的实施例，可以理解的是，上述实施例是示例性的，不能理解为对本申请的限制，本领域的普通技术人员在本申请的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求书

1、一种细胞电融合培养芯片，包括：

基底；

5 至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极，所述至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极设置在所述基底的上表面，且每个所述第一叉指电极具有至少一个第一凸出电极，每个所述第二叉指电极具有至少一个第二凸出电极；

捕获层，所述捕获层覆盖所述至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极，且具有至少一个捕获孔，所述捕获孔贯穿所述捕获层；

10 培养层，所述培养层覆盖所述捕获层，所述培养层的下表面与所述捕获层的上表面之间限定有腔体，且所述培养层还设置有两个进出口和至少一个培养孔，所述进出口贯穿所述培养层且用于细胞悬浮液的进出，所述培养孔不贯穿所述培养层且与所述捕获孔正对设置；

15 其中，所述腔体通过所述捕获孔与部分的所述第一凸出电极和部分的所述第二凸出电极相连。

2、根据权利要求 1 所述的细胞电融合培养芯片，

形成所述基底的材料为无机玻璃或有机玻璃，

形成所述第一叉指电极和所述第二叉指电极的材料为金属或导电聚合物，

形成所述捕获层的材料为光刻胶，

20 形成所述培养层的材料包括聚二甲基硅氧烷。

3、根据权利要求 1 所述的细胞电融合培养芯片，

所述第一叉指电极和所述第二叉指电极的厚度为 50~150 纳米，

方形的所述捕获孔的长为 10~100 微米、宽为 5~50 微米，

一个所述捕获孔中的所述第一凸出电极与所述第二凸出电极的间距为 20~30 微米。

25 4、根据权利要求 1 所述的细胞电融合培养芯片，

所述细胞电融合培养芯片包括相间平行排布的多个所述第一叉指电极和多个所述第二叉指电极，且每个所述第一叉指电极具有多个所述第一凸出电极，每个所述第二叉指电极具有多个所述第二凸出电极；

30 所述捕获层具有多个所述捕获孔，所述培养层具有多个所述培养孔，并且，所述多个捕获孔和所述多个培养孔都呈阵列排布。

5、根据权利要求 4 所述的细胞电融合培养芯片，所述捕获孔的个数为 50~1000 个。

6、根据权利要求 1 所述的细胞电融合培养芯片，所述捕获层与所述培养层之间可拆开。

7、一种细胞电融合培养装置，包括：

权利要求 1~6 中任一项所述的细胞电融合培养芯片；

信号发生器，所述信号发生器分别与所述至少一个第一叉指电极和至少一个第二叉指电极电连接，用于对所述细胞电融合培养芯片发出不同的电信号；

5 微流泵，所述微流泵分别与所述两个进出口相连，用于控制细胞悬浮液的流动。

8、一种细胞电融合的方法，使用权利要求 7 所述的细胞电融合培养装置，且所述方法包括：

通过微流泵使细胞悬浮液从细胞电融合培养芯片的进出口进入腔体；

10 通过信号发生器对第一叉指电极和第二叉指电极施加正弦电信号，所述细胞悬浮液中的细胞进入捕获孔中，并被吸附到第一凸出电极或第二凸出电极上；

通过调节所述信号发生器的信号频率，使所述第一凸出电极吸附的所述细胞与所述第二凸出电极吸附的所述细胞进行接触配对；

通过所述调节信号发生器对所述第一叉指电极和所述第二叉指电极施加电脉冲信号，使所述细胞的接触部分发生电穿孔并融合。

15 9、根据权利要求 8 所述的方法，在所述细胞进行融合的步骤之后，所述方法进一步包括：

将所述细胞电融合培养芯片翻转 180°，使所述融合后的细胞落入培养孔；

通过所述微流泵使培养基进入所述细胞电融合培养芯片的所述培养孔，对所述融合后的细胞进行培养。

20 10、根据权利要求 8 所述的方法，所述电脉冲信号的个数为 5 个、脉宽为 50 微秒且频率为 1Hz。

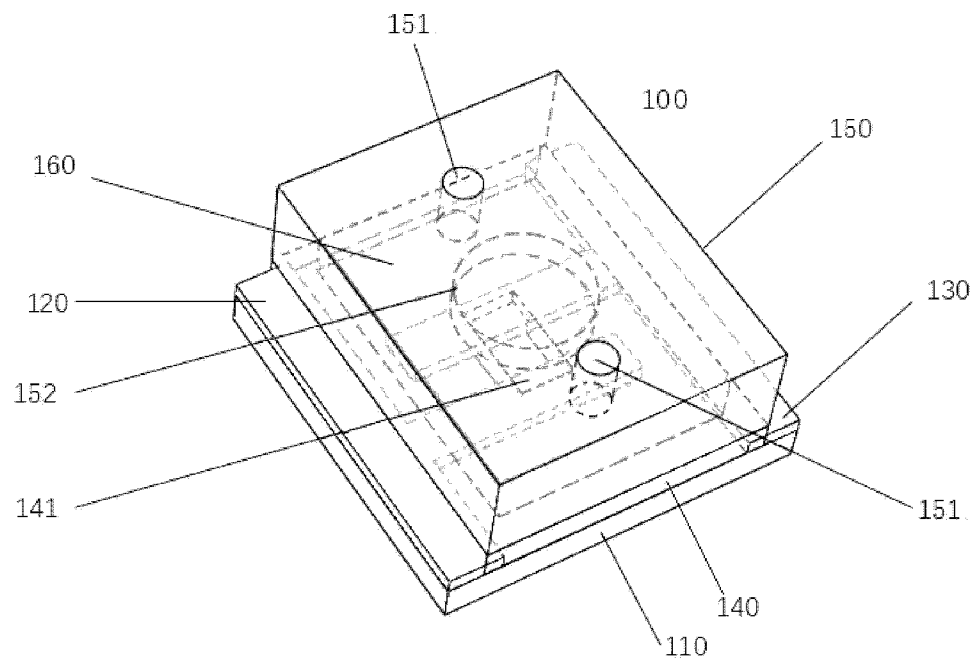


图 1

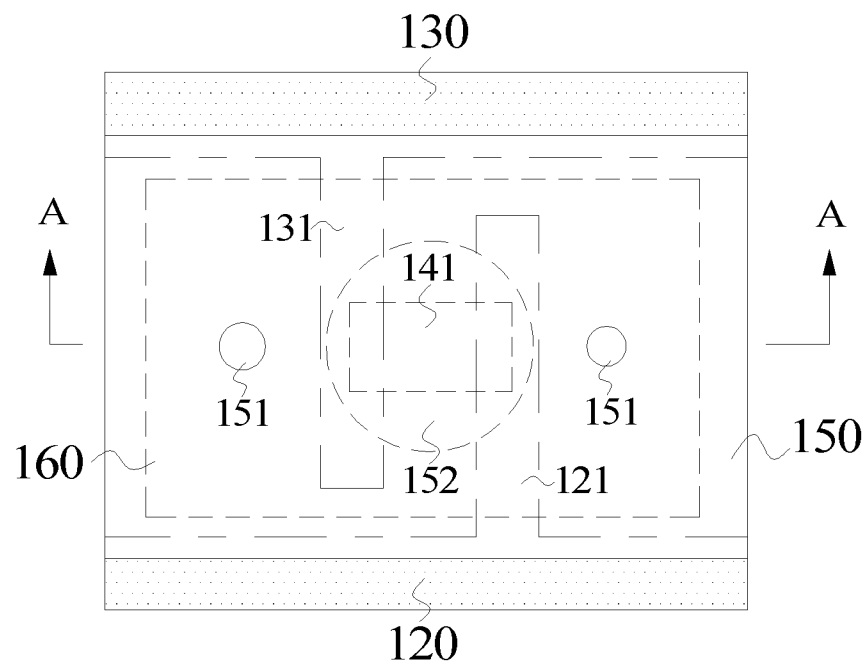


图 2

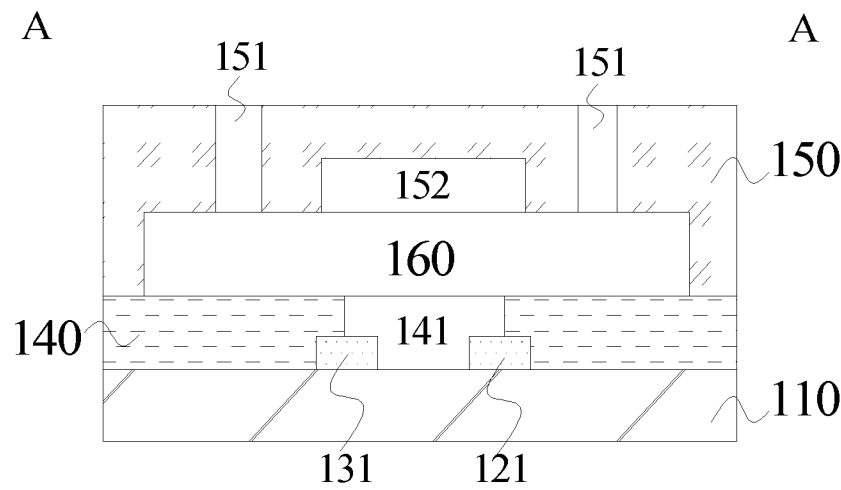


图 3

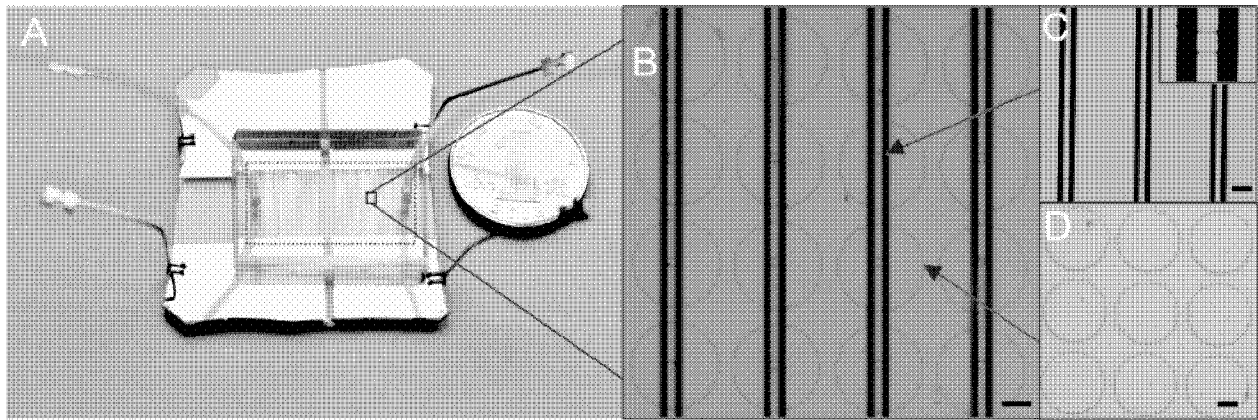


图 4

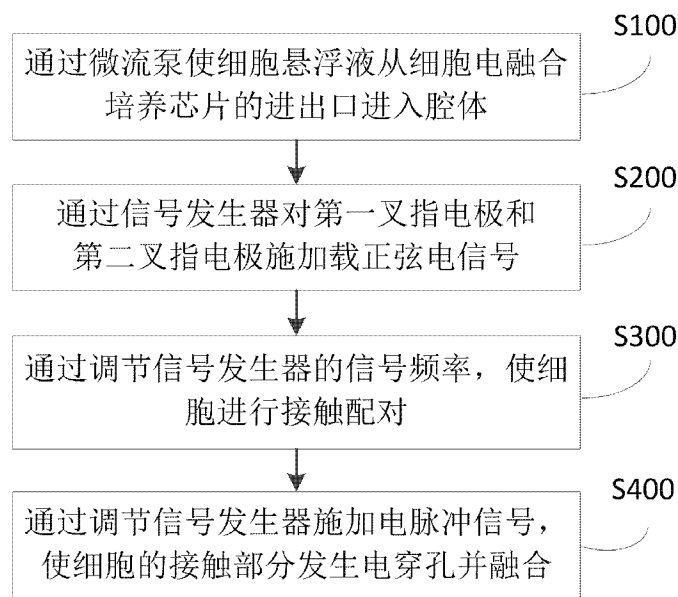


图 5

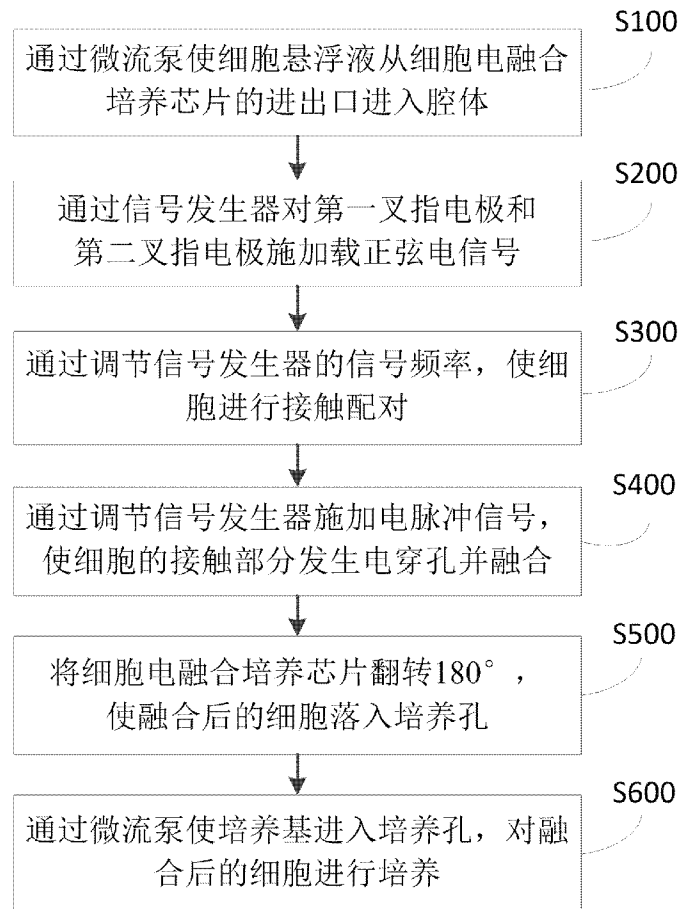


图 6

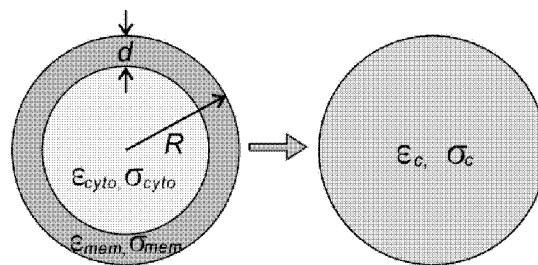


图 7

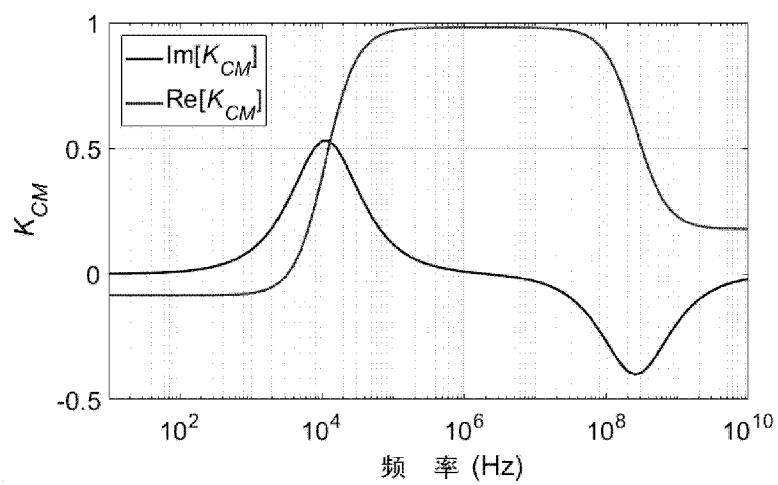


图 8

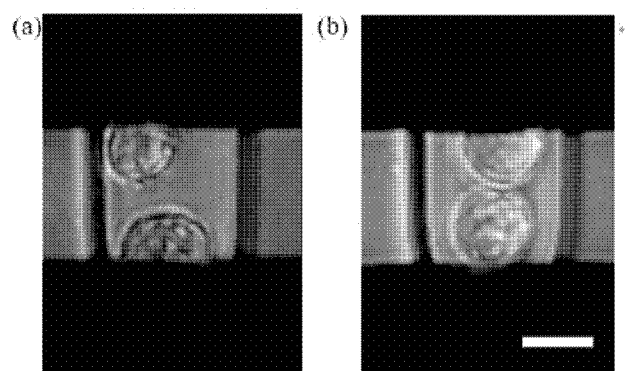


图 9

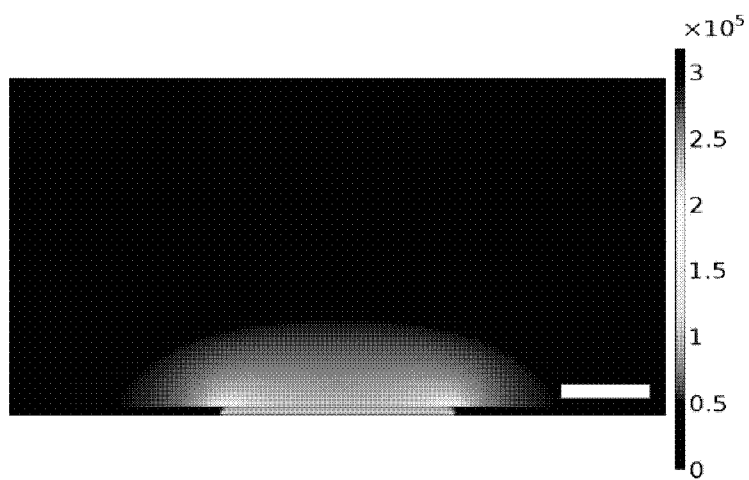


图 10

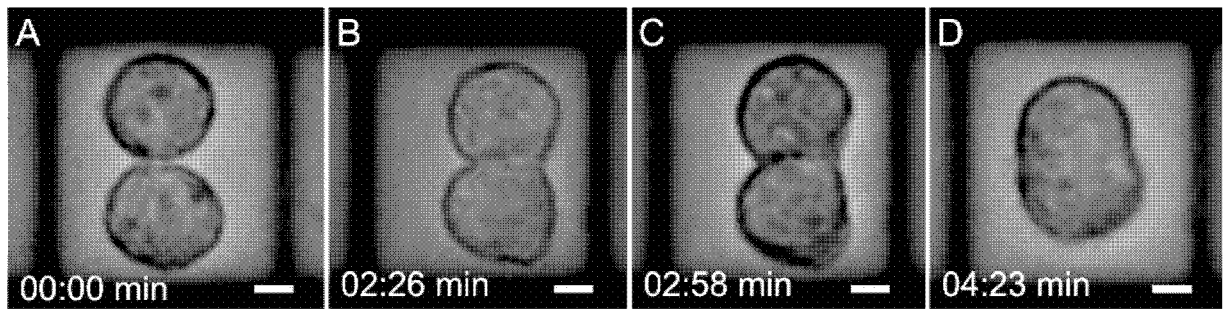


图 11

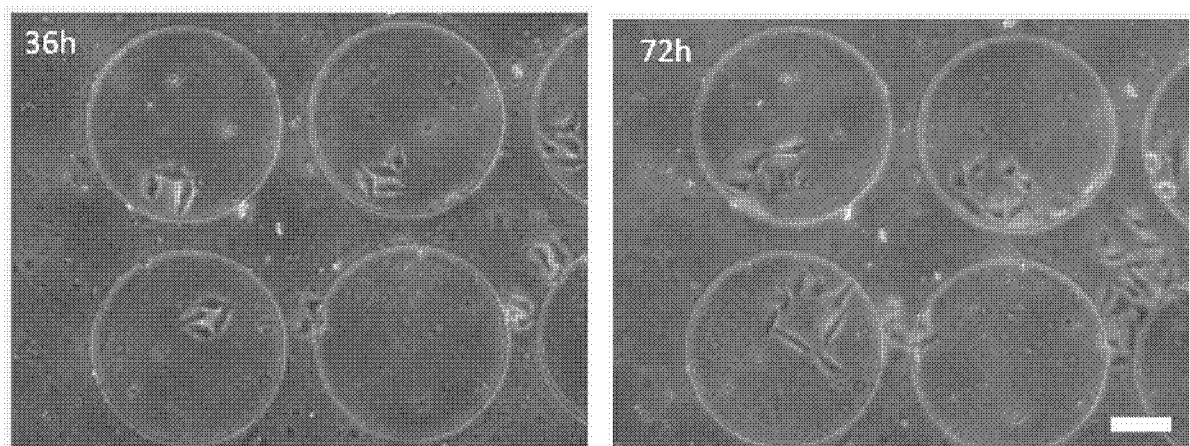


图 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/114845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12N 15/06(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)

C12M; C12N

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, CNKI: 细胞, 芯片, 电极, 捕获, 基底, 腔, 孔, 信号, 频率, 介电泳 cell, chip, electrode, capture, substrate, cavity, hole, signal, frequency, dielectrophoresis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 107267382 A (SOUTH UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 20 October 2017 (2017-10-20) description, paragraphs [0002], [0018], [0023], and [0080]-[0095], and figures 1-6	1-10
Y	CN 106281965 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 04 January 2017 (2017-01-04) description, paragraphs [0031]-[0045], and figures 1 and 2	1-10
A	CN 107338184 A (SUZHOU BOFU BIOMEDICAL LTD.) 10 November 2017 (2017-11-10) entire document	1-10
A	CN 107012067 A (XIAMEN UNIVERSITY) 04 August 2017 (2017-08-04) entire document	1-10
A	CN 103667054 A (SCIENTIFIC RESEARCH TRAINING CENTER FOR CHINESE ASTRONAUTS et al.) 26 March 2014 (2014-03-26) entire document	1-10
A	US 2007105206 A1 (LU, Chang et al.) 10 May 2007 (2007-05-10) entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 July 2019

Date of mailing of the international search report

25 July 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/114845

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	107267382	A	20 October 2017	None			
CN	106281965	A	04 January 2017	CN	106281965	B	31 May 2019
CN	107338184	A	10 November 2017	None			
CN	107012067	A	04 August 2017	CN	107012067	B	29 March 2019
CN	103667054	A	26 March 2014	CN	103667054	B	30 September 2015
US	2007105206	A1	10 May 2007	US	2012276635	A1	01 November 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/114845

A. 主题的分类

C12M 3/00(2006.01)i; C12M 1/42(2006.01)i; C12N 15/06(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)

C12M; C12N

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, CNKI: 细胞, 芯片, 电极, 捕获, 基底, 腔, 孔, 信号, 频率, 介电泳 cell, chip, electrode, capture, substrate, cavity, hole, signal, frequency, dielectrophoresis

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
Y	CN 107267382 A (南方科技大学) 2017年 10月 20日 (2017 - 10 - 20) 说明书第[0002], [0018], [0023], [0080]-[0095]段, 图1-6	1-10
Y	CN 106281965 A (清华大学) 2017年 1月 4日 (2017 - 01 - 04) 说明书第[0031]-[0045]段, 图1-2	1-10
A	CN 107338184 A (苏州博福生物医药科技有限公司) 2017年 11月 10日 (2017 - 11 - 10) 全文	1-10
A	CN 107012067 A (厦门大学) 2017年 8月 4日 (2017 - 08 - 04) 全文	1-10
A	CN 103667054 A (中国航天员科研训练中心 等) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 全文	1-10
A	US 2007105206 A1 (LU CHANG等) 2007年 5月 10日 (2007 - 05 - 10) 全文	1-10

☐ 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

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 7月 9日

国际检索报告邮寄日期

2019年 7月 25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局 (ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

受权官员

何理

传真号 (86-10)62019451

电话号码 86-(10)-53962378

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/114845

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)
CN	107267382	A	2017年 10月 20日	无			
CN	106281965	A	2017年 1月 4日	CN	106281965	B	2019年 5月 31日
CN	107338184	A	2017年 11月 10日	无			
CN	107012067	A	2017年 8月 4日	CN	107012067	B	2019年 3月 29日
CN	103667054	A	2014年 3月 26日	CN	103667054	B	2015年 9月 30日
US	2007105206	A1	2007年 5月 10日	US	2012276635	A1	2012年 11月 1日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)