



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118829720 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 22

(21) 申请号 202280092355.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2022.02.23

G12M 1/32 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.22

G12M 1/00 (2006.01)

G12M 1/26 (2006.01)

G12M 1/42 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/054515 2022.02.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/160777 EN 2023.08.31

(71) 申请人 弗劳恩霍夫应用研究促进协会

地址 德国

申请人 萨尔大学

(72) 发明人 H·齐默尔曼 G·R·福尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

专利代理师 张蓉珺 林柏楠

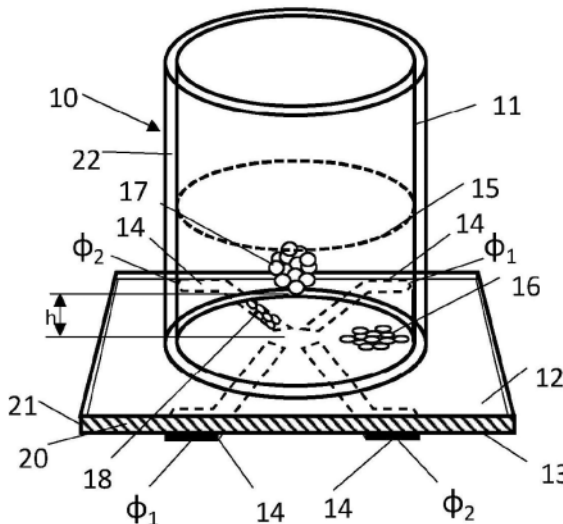
权利要求书5页 说明书23页 附图34页

(54) 发明名称

用于操控生物细胞的装置和方法以及制造
所述装置的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种用于操控生物细胞的装置
(10),所述装置(10)包含:至少一个用于培养生
物细胞的容器(22),所述容器(22)具有内部空间
(11),和至少一个用于操控生物细胞的电极
(14),其中所述装置(10)包含至少一个隔膜层
(20),所述至少一个隔膜层(20)至少布置在所述
至少一个电极(14)和内部空间(11)之间,以使所
述至少一个电极(14)布置在内部空间(11)之外。
本发明进一步涉及操控生物细胞的方法(300)。
本发明提供了在用电场操控细胞的过程中避免
容器(22)中的细胞降解的用于操控生物细胞的
装置(10)和方法(300)。



1. 用于操控生物细胞的装置,所述装置(10)包含:
用于培养生物细胞的至少一个容器(22),所述容器(22)具有内部空间(11),和
用于操控生物细胞的至少一个电极(14),
其特征在于所述装置(10)包含至少一个隔膜层(20),所述至少一个隔膜层(20)至少布置在所述至少一个电极(14)和内部空间(11)之间,以使所述至少一个电极(14)布置在内部空间(11)之外。
2. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于所述至少一个容器(22)的至少一个底部元件(21)包含隔膜层(20),并且所述至少一个电极(14)在底部元件(21)处布置在内部空间(11)之外。
3. 根据权利要求2所述的装置,其特征在于所述至少一个底部元件(21)至少在所述至少一个电极(14)处包含至多200 μm ,优选至多100 μm ,进一步优选至多25 μm 的厚度。
4. 根据权利要求2或3所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)布置在所述底部元件(21)和电绝缘层(144)之间。
5. 根据权利要求1所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)至少部分布置在所述至少一个容器(22)中,并且至少在所述容器(22)内部被隔膜层(20)涂覆。
6. 根据权利要求1至5任一项所述的装置,其特征在于所述隔膜层(20)包含对于频率在1kHz至10MHz的范围内的电压-电流波形,相对介电常数在10至10000,优选10至1000,进一步优选20至500的范围内的材料,并且优选包含铁磁性质。
7. 根据权利要求1至6任一项所述的装置,其特征在于所述隔膜层(20)包含具有晶体结构的粒子(122、123),优选微晶,所述粒子(122、123)具有在100nm至1000nm的范围内,优选300nm的均一尺寸,或者所述粒子(122、123)具有在100nm至1000nm,优选300nm和700nm的范围内的不同尺寸。
8. 根据权利要求7所述的装置,其特征在于所述粒子(122、123)在所述隔膜层(20)的两个相对侧之间以柱状方式布置在所述隔膜层(20)中。
9. 根据权利要求1至8任一项所述的装置,其特征在于所述隔膜层(20)包含碱土金属的钛酸盐,优选 CaTiO_3 、 SrTiO_3 、 BaTiO_3 、 $\text{Ba}_{1-x}\text{Sr}_x\text{TiO}_3$ 和/或其组合,优选以在10体积%至60体积%之间,进一步优选在30体积%至50体积%之间,最优选至多40体积%的比率。
10. 根据权利要求1至9任一项所述的装置,其特征在于所述隔膜层(20)包含至少一种聚合物(121),优选氰基树脂,更优选CRS、CRV和/或CRM,进一步优选具有高于10的相对介电常数。
11. 根据权利要求1至10任一项所述的装置,其特征在于对于频率在1kHz至10MHz的范围内的电压-电流波形,所述隔膜层(20)具有在10至200,优选16至120,更优选20至120的范围内的总相对介电常数。
12. 根据权利要求1至11任一项所述的装置,其特征在于所述隔膜层(20)包含在所述内部空间(11)处的至少一个弯曲表面区域(192)。
13. 根据权利要求12所述的装置,其特征在于所述至少一个弯曲表面区域(192)包含至少一个凸部和/或至少一个凹部。
14. 根据权利要求1至13任一项所述的装置,其特征在于所述隔膜层(20)包含至少两个区域(224、225),所述至少两个区域(224、225)具有不同的相对介电常数,其中所述至少两

个区域(224、225)优选包含不同的材料和/或不同的材料混合比。

15. 根据权利要求1至14任一项所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)包含贱金属,特别是铝或镍;贱金属的合金;或至少一种绘图仪可写性导电墨水或糊料。

16. 根据权利要求1至15任一项所述的装置,其特征在于所述装置(10)包含至少两个电极(14),或包含在四极布置下的至少四个电极(14),或包含在八极布置下的至少八个电极(14)。

17. 根据权利要求15或16之一所述的装置,其特征在于所述电极(14)电连接到多相电压源的不同相位,或者成对电连接到多相电压源的一个相位。

18. 根据权利要求1至17任一项所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)具有至少一个十字形或Y形的横截面。

19. 根据权利要求1至18任一项所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)包含具有圆形、三角形、正方形或T形横截面的端件。

20. 根据权利要求1至19任一项所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)是线性的或Z字形的,和/或具有沿所述底部元件(21)延伸的多个优选三角形的突出部。

21. 根据权利要求1至20任一项所述的装置,其特征在于所述装置(10)包含多个容器(22)和多个电极(14),其中在每个容器(22)上布置所述多个电极(14)的至少一个,其中所述装置(10)优选成形为微孔板。

22. 根据权利要求21所述的装置,其特征在于所述多个电极(14)的第一组经由第一电线(71)电连接到多相电压源的第一相位,并且所述多个电极(14)的第二组经由第二电线(72)电连接到多相电压源的第二相位,其中在每个容器(22)上设置来自每个组的至少一个电极(14)。

23. 根据权利要求1至22任一项所述的装置,其特征在于所述装置(10)进一步包含至少一个能量存储装置(111)和至少一个用于生成频率至少在1kHz和10MHz之间的范围内的电压的电子电路(112),所述至少一个电子电路(112)将所述至少一个电极(14)电连接到所述至少一个能量存储装置(111)。

24. 根据权利要求23所述的装置,其特征在于所述至少一个电极(14)布置在第一模块(106)上,并且所述至少一个电子电路(112)布置在可从第一模块(106)拆卸的第二模块(105)上,所述至少一个电极(14)经由布置在第一模块(106)和第二模块(105)之间的可拆卸电触点电连接到所述至少一个电子电路(112)。

25. 根据权利要求1至24任一项所述的装置,其特征在于所述装置(10)包含至少一个导电或绝缘岛元件(162),其与所述至少一个电极(14)电分离地布置在所述容器(22)上,其中所述隔膜层(20)将所述导电或绝缘岛元件(162)与所述内部空间(11)分隔。

26. 根据权利要求25所述的装置,其特征在于所述至少一个导电或绝缘岛元件(162)具有在 $1\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 的范围内的长度。

27. 根据权利要求1至26之一所述的装置,其特征在于所述内部空间(11)包含至少一个珠粒、管(163)和/或线。

28. 根据权利要求1至27之一所述的装置,其特征在于所述装置(10)的至少一部分包含功能材料表面。

29. 根据权利要求1至28任一项所述的装置,其特征在于所述生物细胞是干细胞,优选

诱导多能干细胞。

30. 通过根据前述权利要求任一项所述的装置操控生物细胞的方法, 其中所述方法(300) 包括以下步骤:

- 将包含至少一个生物细胞的悬浮液引入(301) 所述至少一个容器中;
- 向所述至少一个电极施加(302) 电信号以生成可变电场;
- 通过所述可变电场使所述至少一个生物细胞移动(303) 到所述容器中的预定位置, 由此操控所述至少一个生物细胞。

31. 根据权利要求30所述的方法, 其特征在于所述电信号具有在大于4V至100V, 优选大于10V至100V, 更优选大于10V至50V的范围内的电压峰间值。

32. 根据权利要求30或31所述的方法, 其特征在于所述至少一个电信号以连续方式或以非连续方式馈送, 优选以脉冲方式馈送。

33. 根据权利要求30至32任一项所述的方法, 其特征在于所述装置包含至少两个电极, 其中所述电信号配置为使得所述至少两个电极在所述容器内生成具有最小值和最大值的稳定时间模式的电场。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其特征在于所述电场以10 μ m至5mm之间的距离对所述容器内的细胞施加在1pN至1000pN的范围内的力。

35. 根据权利要求30或34所述的方法, 其特征在于使所述至少一个细胞移动(304) 到所述电场的至少最小值中。

36. 根据权利要求30至35任一项所述的方法, 其特征在于所述至少一个细胞被所述电场极化。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其特征在于所述悬浮液包含至少两个细胞, 其中所述悬浮液中的细胞通过电场形成(305) 为至少一个细胞聚集体。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其特征在于通过降低所述电场的场强而使所述至少一个细胞聚集体沉积(306) 在所述容器的底部。

39. 根据权利要求38所述的方法, 其特征在于一旦所述至少一个细胞聚集体已经沉积, 就切断(307) 所述电信号。

40. 根据权利要求38所述的方法, 其特征在于通过所述电场对所述至少一个沉积的细胞聚集体施加(308) 聚集力。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其特征在于永久地或以具有电场的短施加时间的交替序列施加(309) 所述电信号。

42. 根据权利要求30至41任一项所述的方法, 其特征在于在引入(301) 所述悬浮液的步骤之后, 通过至少一个细胞群调节(310) 所述悬浮液。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其特征在于在调节(310) 所述悬浮液之后, 在所述容器中通过电场分离和聚集(311) 所述至少一个细胞群。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其特征在于将至少一个另外的细胞引入(312) 所述悬浮液, 其中使所述至少一个另外的细胞移动到所述电场的最小值处并在此保持预定的时间。

45. 根据权利要求30至44任一项所述的方法, 其特征在于在所述容器中用显微镜观察所述至少一个细胞, 并且记录所述细胞的行为和增加。

46. 根据权利要求30至45任一项所述的方法,其特征在于所述方法在引入(301)所述悬浮液的步骤之前进一步包括以下步骤:

-通过根据其所需电导率选择所述悬浮液和选择所述可变电信号的频率来生成(313)关于所述至少一个生物细胞的正介电泳或负介电泳。

47. 根据权利要求46所述的方法,其特征在于通过负介电泳使所述至少一个细胞在所述容器中上升(314)和移动。

48. 根据权利要求30至47任一项所述的方法,其特征在于在向所述至少一个电极施加(302)电信号的步骤之后,所述方法进一步包括以下步骤的至少一个:

-在进行所述悬浮液的超低温保存的同时,通过与冷却剂直接接触而冷却(315)所述至少一个电极;和/或

-在将冷冻的悬浮液解冻时通过在1kHz至10MHz的范围内的频率下将至少一个电信号馈送到所述至少一个电极中而加热(316)所述至少一个电极。

49. 根据权利要求30至48任一项所述的方法,其特征在于通过由所述电场诱发的极化电测量和/或介电测量至少一个细胞。

50. 根据权利要求30至49任一项所述的方法,其特征在于所述生物细胞是干细胞,优选诱导多能干细胞。

51. 制造根据权利要求1至29任一项所述的装置的隔膜层的方法,所述方法(310)包括以下步骤:

-提供(311)至少一种具有第一相对介电常数的液体聚合物;

-将具有第二相对介电常数的多个粒子,优选微晶,与所述至少一种液体聚合物混合(312),以获得隔膜层混合物;

-固化(313)所述隔膜材料混合物以获得隔膜层。

52. 根据权利要求51所述的方法,其特征在于在其固化过程的至少一部分的过程中向所述隔膜材料混合物施加电场以使所述粒子在所述液体聚合物中配向、集合和链形成,从而在所述隔膜层中产生有序的、柱状排列的粒子区和/或粒子簇。

53. 根据权利要求51或52所述的方法,其特征在于在将所述多个粒子与所述至少一种液体聚合物混合(312)的步骤中,所述粒子具有均一尺寸,并且优选相对于所述液体聚合物的体积比为至多40%。

54. 根据权利要求51或53之一所述的方法,其特征在于在将所述多个粒子与所述至少一种液体聚合物混合(312)的步骤中,所述粒子具有至少两种不同的尺寸。

55. 根据权利要求51至54任一项所述的方法,其特征在于将所述隔膜材料混合物固化以形成隔膜层,其中在其固化过程中垂直于所述隔膜材料混合物施加电场。

56. 根据权利要求51至55任一项所述的方法,其特征在于在固化(313)所述隔膜材料混合物之前,将所述隔膜材料混合物以封闭层施加(314)在所述至少一个电极上,优选通过溅射、旋涂、丝网印刷和/或以溶胶-凝胶工艺沉积。

57. 制造根据权利要求1至29任一项所述的装置的方法,所述方法(320)包括:

提供(321)用于培养生物细胞的容器,

提供(322)一层分隔层,

提供(323)用于形成和操控生物细胞的所述至少一个电极,其中通过所述隔膜层将所

述电极与所述容器的内部空间分隔。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中根据权利要求51至56任一项所述的方法制造所述隔膜层。

59. 根据权利要求1至29任一项所述的装置用于操控生物细胞的用途。

60. 电容耦合到容器中并从容器向外耦合的变化电场用于操控悬浮液中的所述生物细胞的用途,所述容器包含具有至少一个生物细胞的悬浮液。

用于操控生物细胞的装置和方法以及制造所述装置的方法

[0001] 本发明涉及用于操控 (manipulating) 生物细胞 (biological cells) 的装置和方法以及制造所述装置的方法。

[0002] 为了生成类器官 (organoids) 和表面组织系统, 必须将生物细胞放置在限定的邻域 (defined neighborhoods) 中、分组、适当地维持稳定形成, 或者以可再现和高度并行的方式与表面进行限定接触。在自动化系统或线路中, 孔体积分别为 $100\mu\text{l}$ 至 $300\mu\text{l}$ 、 $30\mu\text{l}$ 至 $100\mu\text{l}$ 和 $5\mu\text{l}$ 至 $15\mu\text{l}$ 的格式 96、384 和 1536 孔的微孔板可用于随机排列的生物细胞的增殖培养。

[0003] 生物技术和医学应用中的细胞密度在 10^5 个细胞/ml (即 10^2 个细胞/ μl) 以上的范围内差异很大。因此, 细胞数可以从 96 微孔板的孔中的数万个细胞至 1536 微孔板的孔中的上千个细胞。这些细胞随机分布在孔中的营养液中, 并且可能沉积在孔的底部。

[0004] 从 G.Fuhr 和 T.Schnelle, Dielektrische **Mikrofeldkäfige**, Physikalische **Blätter** 57 (2001) Nr. 1, 第 49 至 52 页中已知在微孔板的孔中用微电极系统为这些细胞或这些细胞的聚集体生成限定的邻域。微电极系统可以生成电磁场笼, 从而以非接触方式操控孔中的生物细胞。然后可以将细胞形成聚集体。此外, 细胞可以以微米精度定位和/或漂浮在营养液中。

[0005] 但是, 在微电极附近发生的电极过程导致来自电极的金属离子进入溶液、溶液中的碱化和酸化区域以及在 3°C 至 10°C 的范围内的温度梯度, 其在电极表面附近最高并且朝电极之间的场最小值递减。由于这些过程, 哺乳动物或人类细胞在电场连续使用大约 30 分钟后降解。

[0006] 因此, 需要提供一种用于操控生物细胞的装置和方法以及制造该装置的方法, 其避免在用电场操控细胞的过程中孔中的细胞降解。

[0007] 通过独立权利要求的主题解决本发明的目的。进一步的实施方案包括在从属权利要求中。

[0008] 根据本发明, 提供一种用于操控生物细胞的装置, 所述装置包含: 至少一个用于培养生物细胞的容器, 所述容器具有内部空间, 和至少一个用于操控生物细胞的电极, 其中所述装置包含至少一个隔膜层 (separator layer), 所述至少一个隔膜层至少布置在所述至少一个电极和内部空间之间, 以使所述至少一个电极布置在内部空间之外。

[0009] 本发明在所述至少一个用于操控生物细胞的电极和所述至少一个容器的内部空间之间提供隔膜层。将所述至少一个电极分配给所述至少一个容器, 以使该装置的每个容器包含其自己的电极。此外, 将所述至少一个电极布置在该容器的内部空间之外, 并且与内部空间没有任何直接接触。因此, 隔膜层将内部空间隔绝于电极材料, 以使电极与可能布置在所述至少一个容器的内部空间中的悬浮液没有任何物理接触, 其中该悬浮液包含营养液和细胞。因此, 所述至少一个电极也可以被称为干电极。所述至少一个电极将电场电容耦合 (capacitively couples) 到布置在内部空间中的液体中。换言之, 电极将电场间接耦合到液体中, 即在电极和液体之间没有电荷转移或通量。因此, 没有欧姆线贡献的电极中的纯位移电流 (pure displacement current) 足以提供足够强的电场以操控容器中的生物细胞。

在本说明书中,术语细胞是指生物细胞。在电场的这种特殊施加过程中避免了电极过程(Electrode processes)。由于不存在细胞降解,所述至少一个电极可以无限期地对细胞施加电场。

[0010] 在一个实例中,所述至少一个电极可以是微电极。此外,在一个实例中,所述至少一个容器可以是微孔板的微孔的孔。

[0011] 在一个实例中,所述至少一个容器的至少一个底部元件可以包含隔膜层,并且所述至少一个电极可以在底部元件处布置在内部空间之外。

[0012] 所述至少一个容器的底部元件(bottom element)可以附接于容器壁并且以流体密闭方式封闭容器的底部。此外,底部元件可以仅包含隔膜层,以使隔膜层是底部元件。然后将所述至少一个电极布置在底部元件下方。底部元件的一侧可以面向内部空间,其中底部元件的相反侧可以面向所述至少一个电极。这种布置提供了内部空间与电极材料的有效屏蔽。

[0013] 在另一个实例中,所述至少一个底部元件可以至少在所述至少一个电极处包含至多200 μm ,优选至多100 μm ,进一步优选至多25 μm 的厚度。

[0014] 然后减小底部元件的厚度,以使底部元件在较低程度上减轻所述至少一个电极的电场。

[0015] 在一个进一步实例中,所述至少一个电极可以布置在底部元件和电绝缘层之间。

[0016] 电绝缘层(electrically insulating layer)可以将所述至少一个电极隔绝于用户或隔绝于用于操控生物细胞的装置下方的其它装置。此外,绝缘层可以稳定底部元件和用于操控生物细胞的装置。

[0017] 此外,所述至少一个电极可以例如至少部分布置在所述至少一个容器中,并且至少在容器内部被隔膜层涂覆。

[0018] 所述至少一个电极的一部分可以布置在容器内。此外,布置在容器内的电极的整个表面可以被隔膜层涂覆。因此,隔膜层将电极与内部空间隔开。电极的表面既没有与营养液直接接触,也没有与布置在内部空间中的细胞直接接触。

[0019] 在另一个实例中,隔膜层可以包含对于频率在1kHz至10MHz的范围内的电压-电流波形,相对介电常数(relative permittivity)在10至10000,优选10至1000,进一步优选20至500的范围内的材料,并且优选包含铁磁性质。

[0020] 术语相对介电常数也被称为电容率(dielectric constant)。隔膜层的相对介电常数越高,由所述至少一个电极生成的内部空间中的电场越高。此外,相对介电常数越高,隔膜可以是越厚的层,而不改变内部空间内的电场强度。如果相对介电常数高,也可以降低为了生成电场而施加在所述至少一个电极上的电压。

[0021] 隔膜层可以例如包含具有晶体结构的粒子,优选微晶,该粒子具有在100nm至1000nm的范围内,优选300nm的均匀尺寸,或者该粒子具有在100nm至1000nm,优选300nm和700nm的范围内不同尺寸。

[0022] 该粒子可以例如具有大于100且高至10000的高相对介电常数,其中粒子嵌在具有大约10或更高的相对介电常数的隔膜层的主要材料中。因此,粒子可以提高隔膜层的总相对介电常数。

[0023] 在一个进一步实例中,该粒子可以在隔膜层的两个相对侧之间以柱状方式

(columnar manner)布置在隔膜层中。

[0024] 如果该粒子的相对介电常数高于隔膜层的主要材料,粒子在隔膜层中的这种布置可以进一步提高隔膜层的相对介电常数。

[0025] 在另一个实例中,隔膜层可以包含碱土金属的钛酸盐,优选 CaTiO_3 、 SrTiO_3 、 BaTiO_3 、 $\text{Ba}_{1-x}\text{Sr}_x\text{TiO}_3$ 和/或其组合,优选以在10体积%至60体积%之间,进一步优选在30体积%至50体积%之间,最优选至多40体积%的比率。

[0026] 碱土金属的钛酸盐可以例如是上述微晶。这些钛酸盐具有高相对介电常数。钛酸盐的比率提供了具有高相对介电常数的隔膜,其中隔膜材料可以保持光学透明。由于隔膜材料布置在容器的底部,光学透明度使得能够使用光学手段观察容器中的细胞。

[0027] 在一个实例中,隔膜层可以包含至少一种聚合物,优选氰基树脂,更优选氰乙基支链淀粉(cyanoethyl pullulan) (CRS)、氰乙基聚(乙烯醇) (CRV) 和/或M型氰基树脂(CRM),进一步优选具有高于10的相对介电常数。

[0028] 所述至少一种聚合物简化了隔膜层的制造。在制造过程开始时,该聚合物是液体。可以将用于提高总相对介电常数的粒子与液体聚合物混合。聚合物的固化(例如通过用紫外光照射)可以固定粒子在聚合物中的取向和位置。

[0029] 对于频率在1kHz至10MHz的范围内的电压-电流波形,隔膜层可以例如具有在10至200,优选16至120,更优选20至120的范围内的总相对介电常数。

[0030] 然后,来自所述至少一个电极的电场线可以穿过隔膜层而没有显著衰减。这简化了容器中的细胞或细胞群的操控。在本说明书中,术语细胞群、细胞聚集体、细胞簇和类器官同义使用。此外,由于隔膜层的高介电常数,操控电场所需的电压可以保持在对用户无害的范围内。

[0031] 在一个进一步实例中,隔膜层可以包含在内部空间处的至少一个弯曲表面区域。

[0032] 此外,所述至少一个弯曲表面区域可以例如包含至少一个凸部和/或至少一个凹部。

[0033] 隔膜层和内部空间之间的表面区域是具有不同相对介电常数的材料之间的材料边界。来自所述至少一个电极的电场线在该材料边界处折射。可以形成该表面区域的形状/几何以在容器内实现所需电场模式(electric field pattern)。例如,弯曲表面区域可以与平坦表面区域不同地使内部空间中的电场线成形。这可以简化和/或支持细胞或细胞群的形成和/或操控。

[0034] 在另一个实例中,隔膜层可以包含至少两个区域,所述至少两个区域的每一个具有不同的相对介电常数,其中所述至少两个区域优选包含不同的材料和/或不同的材料混合比。

[0035] 不同的区域也可以使内部空间中的电场线成形,以简化和/或支持细胞或细胞群的形成和操控。与具有弯曲表面的区域组合,简化和/或支持效果进一步增加。特别地,可以以这种方式形成具有不同分布模式的细胞或细胞群。

[0036] 所述至少一个电极可以例如包含贱金属,特别是铝或镍;贱金属(base metals)的合金;或至少一种绘图仪可写性(plotter-writable)导电墨水或糊料。

[0037] 由于所述至少一个电极与内部空间,特别是与细胞的营养液没有任何接触,电极的材料不需要具有贵金属的性质。此外,合金或有毒金属也可用于制造该电极。因此,所述

至少一个电极可以由更具成本效益的材料制造。当使用绘图仪可写性导电墨水或糊料时，可以简化电极的制造。

[0038] 在一个进一步实例中，该装置可包含至少两个电极，优选在四极布置下的至少四个电极或在八极布置下的至少八个电极。

[0039] 来自这些电极的电场可以简化和/或支持细胞或细胞群的操控。四极或八极布置的使用使得能够使用电磁场笼。这些笼可用于以非接触方式使容器中的细胞或细胞群分组、成形、定位和漂浮，通常以形成所需的细胞分布模式。

[0040] 此外，电极可以例如电连接到多相电压源的不同相位，或者可以成对电连接到多相电压源的一个相位。

[0041] 如果电极成对电连接到多相电压源的一个相位，每一对可以连接到多相电压源的不同相位。电极成对或独自与不同相位的连接简化了细胞或细胞群的操控，特别是定位和漂浮 (levitation)。

[0042] 在另一个实例中，所述至少一个电极可具有至少一个十字形或Y形的横截面。

[0043] 在一个进一步实例中，所述至少一个电极包含具有圆形、三角形、正方形或T形横截面区域的端件 (end piece)。

[0044] 此外，例如，所述至少一个电极可以是线性的或Z字形的，和/或可以具有沿底部元件延伸的多个优选三角形的突出部 (projections)。

[0045] 电极和/或电极端件的形状影响在内部空间中生成的电场。因此，电极和/或端件的形状可以使得对细胞或细胞群的操控简化。上文提到的形状可以以任何合理的组合进行组合。

[0046] 在一个实例中，该装置可包含多个容器和多个电极，其中在每个容器上布置所述多个电极的至少一个，其中该装置优选可以成形为微孔板。

[0047] 该装置可以同时操控所有容器中的细胞和/或细胞群。因此，可以监测容器中的多个不同的细胞和/或多个不同的条件。

[0048] 在一个进一步实例中，所述多个电极的第一组可以经由第一电线电连接到多相电压源的第一相位，并且所述多个电极的第二组可以经由第二电线电连接到多相电压源的第二相位，其中在每个容器上设置来自每个组的至少一个电极。

[0049] 因此，电极可以在每个容器处生成相同的电场。如果每个容器中的隔膜层包含相同的性质，即相同的表面形状、相同的厚度和相同的相对介电常数等，容器的内部空间中的电场将是相同的。

[0050] 该装置还可以例如包含至少一个能量存储装置和至少一个用于生成频率至少在1kHz和10MHz之间的范围内的电压的电子电路，所述至少一个电子电路将所述至少一个电极电连接到所述至少一个能量存储装置。

[0051] 这在内部空间中带来交变电场。交变电场能够通过正或负介电泳使容器中的细胞或细胞群移动。介电泳 (dielectrophoresis) 的正性或负性取决于电场的施加频率和内部空间中的细胞的生理电导率 (physiological conductivity)。

[0052] 在本说明书中，在1kHz至10MHz的范围内的频率也被称为射频 (radiofrequencies) 或高频 (high frequencies)。这些高频避免在悬浮液中诱导热电流。此外，电场交替的高频率降低由施加电场引起的生物细胞的应力。

[0053] 在另一个实例中,所述至少一个电极可以布置在第一模块上,并且所述至少一个电子电路可以布置在可从第一模块拆卸的第二模块上,所述至少一个电极经由布置在第一模块和第二模块之间的可拆卸电触点(detachable electrical contact)电连接到所述至少一个电子电路。

[0054] 所述至少一个电极和所述至少一个电子电路之间的可拆卸电触点的布置提供了该装置的简单制造。此外,第一模块可以从第二模块拆卸。这提供了电子电路相对于容器的灵活布置。

[0055] 可拆卸电触点可以包含金属材料。此外,可拆卸电触点可以包含弹簧触点(spring contact)。

[0056] 此外,电触点可以包含小型化数字电子元件。

[0057] 例如,该装置可以包含至少一个导电或绝缘岛元件(conductive or insulating island element),其与所述至少一个电极电分离地布置在容器上,其中隔膜层将导电或绝缘岛元件与内部空间分隔。

[0058] 导电岛可以聚焦电场线。因此,当表现出正介电泳的材料在营养液中时,该材料将聚集在聚焦的电场线(具有较高或最高的电场线密度的区域)处。绝缘岛可以使电场线散焦。因此,表现出负介电泳的材料将聚集在散焦的电场线(具有较低或最低的电场线密度的区域)处。这进一步简化了细胞或细胞群的操控。

[0059] 在另一个实例中,所述至少一个导电或绝缘岛元件可具有在 $1\mu\text{m}$ 至 $200\mu\text{m}$ 的范围内的长度。

[0060] 此外,在一个实例中,内部空间可包含至少一个珠粒、管和/或线。

[0061] 细胞可以聚集在珠粒、管和/或线周围。因此,如果细胞聚集体生长,珠粒、管和/或线可以为营养液提供进入细胞聚集体的通道。因此,细胞聚集体的核心中的细胞保持与营养液接触。该珠粒、管和/或线可以例如包含天然或人造半透性材料。

[0062] 在一个进一步实例中,所述至少一个导电或绝缘岛元件的至少一部分可以包含功能材料表面。该生物功能材料表面增强了细胞在营养液中聚集在岛上。

[0063] 生物细胞可以例如是干细胞,优选诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells)。

[0064] 这些类型的细胞可用于在容器中生长组织。该装置可以简化和控制由这些细胞的组织生长。

[0065] 根据本发明另一个方面,提供一种通过根据上述说明的装置操控生物细胞的方法,其中所述方法包括以下步骤:将包含至少一个生物细胞的悬浮液引入所述至少一个容器中;向所述至少一个电极施加电信号以生成可变电场;通过所述可变电场使所述至少一个生物细胞移动到所述容器中的预定位置,由此操控所述至少一个生物细胞。

[0066] 施加到所述至少一个电极的电信号(例如电压)导致生成电场,其延伸穿过该装置的隔膜层并最终进入容器的内部空间。可变电场可以通过正介电泳或负介电泳对内部空间中的所述至少一个生物细胞施加力。该力可以使所述至少一个生物细胞在内部空间中移动。根据在所述至少一个生物细胞的位置处的可变电场的强度、方向和频率,该移动可以在悬浮液内的每个方向上发生。细胞朝电场的场最大值或最小值移动,这取决于存在正介电泳还是负介电泳。因此,通过定位场最大值或最小值,可以将细胞有意地且准确地定位在内

部空间内的某个位置。此外,可以将多个细胞收集在该位置处以形成细胞群。由于隔膜层将至少生成可变电场的电极与内部空间(即细胞和营养液分隔),避免细胞的降解。

[0067] 在一个实例中,该电信号可具有在大于4V至100V,优选大于10V至100V,更优选大于10V至50V的范围内的电压峰间值(voltage peak-to-peak value)。

[0068] 在另一个实例中,所述至少一个电信号可以以连续方式或以非连续方式馈送,优选以脉冲方式馈送。这可以减少电极中的热产生。因此,这减少该装置的发热。

[0069] 在一个进一步实例中,该装置可以包含至少两个电极,其中电信号可以配置为使得所述至少两个电极在容器内生成具有最小值和最大值的稳定时间模式(stable temporal pattern)的电场。具有稳定时间模式的电场的生成可以在悬浮液中的细胞或粒子上产生力,这进一步简化了细胞或细胞群的操控。

[0070] 该电场可以例如以距所述至少一个电极的邻接面(proximal surface)的表面10 μ m至5mm之间的距离对容器内的细胞施加在1pN至1000pN的范围内的力。

[0071] 此外,可以例如使所述至少一个细胞移动到该电场的至少最小值中。

[0072] 例如,所述至少一个细胞可以被该电场极化。

[0073] 所述至少一个细胞的极化导致正介电泳或负介电泳,以使所述至少一个细胞分别朝电场线的最大值或最小值移动。

[0074] 在一个实例中,悬浮液可以包含至少两个细胞,其中悬浮液中的细胞通过电场形成至少一个细胞聚集体。

[0075] 此外,可以例如通过降低电场的场强而使所述至少一个细胞聚集体沉积在容器的底部。因此,可以在细胞漂浮时将细胞聚集体成形。可以使成形的细胞聚集体沉积以将细胞聚集体定位在容器的底部。

[0076] 在一个进一步实例中,一旦所述至少一个细胞聚集体已经沉积,就切断电信号。由此,在细胞聚集体的生物细胞的进一步生长过程中不存在电场。

[0077] 在另一个实例中,可以通过电场对所述至少一个沉积的细胞聚集体施加聚集力(collecting force)。因此,在这些细胞的生长过程中,电场将细胞聚集体的细胞保持在一起。

[0078] 根据另一个实例,可以永久地或以具有电场的总体短施加时间的交替序列施加电信号。短施加时间可以对应于几个小时,优选对应于细胞在孔中维持的时间。电场的短时间施加可具有1ms至1000ms的接通时间范围和1ms至60min的切断时间范围。

[0079] 在一个实例中,在将悬浮液引入容器的步骤之后,可以通过至少一个细胞群调节悬浮液。这可以增强悬浮液的化学以优化细胞生长条件。

[0080] 此外,在调节悬浮液之后,可以例如在容器中通过电场分离和聚集所述至少一个细胞群。在这一实例中,可以将至少一个另外的细胞引入悬浮液,其中使所述至少一个另外的细胞移动到该电场的最小值处并在此保持预定的时间。所述至少一个细胞可以定位在场最大值中,以使所述至少一个细胞和所述至少一个另外的细胞彼此分离。因此能够在用于共培养的一个容器中形成多于一个细胞群。

[0081] 在一个实例中,可以在容器用显微镜观察所述至少一个细胞,并且可以记录细胞的行为和增加。

[0082] 在另一个实例中,该方法可以在引入悬浮液的步骤之前进一步包括以下步骤:通

过选择可变电信号的频率和根据其所需电导率选择悬浮液来生成关于所述至少一个生物细胞的正介电泳或负介电泳。

[0083] 在一个实例中,可以通过负介电泳使所述至少一个细胞在容器中上升和移动。

[0084] 此外,在向所述至少一个电极施加电信号的步骤之后,该方法可以例如进一步包括以下步骤的至少一个:在进行悬浮液的超低温保存(cryopreservation)的同时,通过与冷却剂直接接触而冷却所述至少一个电极;和/或在将冷冻的悬浮液解冻时通过在1kHz至10MHz的范围内的频率下将至少一个电信号馈送到所述至少一个电极中而加热所述至少一个电极。

[0085] 由于隔膜层可以形成为使得其包含高热导率,悬浮液的冷却快速发生。因此,简化了悬浮液的超低温保存。

[0086] 在另一个实例中,可以通过由电场诱发的极化电测量和/或介电测量(measured electrically and/or dielectrically)至少一个细胞。

[0087] 该测量可以包括生成足以诱发所述至少一个细胞的极化的电场。在切换电场之后,所述至少一个电极可以测量诱发极化的衰减。

[0088] 此外,生物细胞可以是干细胞,优选诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells)。

[0089] 根据本发明另一个方面,提供制造根据上述说明的装置的隔膜层的方法,所述方法包括以下步骤:提供至少一种具有第一相对介电常数的液体聚合物;将具有第二相对介电常数的多个粒子(优选微晶)与所述至少一种液体聚合物混合,以获得隔膜层混合物;固化所述隔膜材料混合物以获得隔膜层。

[0090] 所述多个粒子和所述至少一种液体聚合物具有不同的相对介电常数,其中聚合物的相对介电常数低于粒子。将粒子引入聚合物中产生具有在第一和第二介电常数之间的相对介电常数的混合物。因此,该混合物具有高于第一相对介电常数的第三相对介电常数。固化的隔膜材料混合物具有比该聚合物小的电场减轻/衰减。总之,该方法提供了在用电场操控细胞的过程中避免细胞降解的装置。

[0091] 在一个实例中,可以在其固化过程的至少一部分的过程中向隔膜材料混合物施加电场以使粒子在液体聚合物中配向、集合和链形成,从而在隔膜层中产生有序的、柱状排列的粒子区和/或粒子簇。与粒子和液体聚合物的均匀混合物相比,有序的、柱状排列的粒子区和/或粒子簇进一步提高隔膜层的相对介电常数。该电场可以是交变电场(alternating electric field)。

[0092] 在另一个实例中,在将所述多个粒子与所述至少一种液体聚合物混合的步骤中,粒子可具有均一尺寸(uniform size),并且优选相对于液体聚合物的体积比为至多40%。如果在隔膜层材料的固化过程中施加电场,均一尺寸的粒子得到具有均一形状的柱。均一尺寸的粒子沿电场线形成链,以产生柱。

[0093] 在一个进一步实例中,在将所述多个粒子与所述至少一种液体聚合物混合的步骤中,粒子可具有至少两种不同的尺寸。当这两个粒子级分沿着电场线形成链时,粒子形成不一致的柱。在施加电场时,较小的粒子在较大的粒子之间移动,以致形成具有不均一形状的柱。这可以避免细胞的刚性预极化(rigid pre-polarization)。

[0094] 根据一个实例,隔膜材料混合物可以固化以形成隔膜层,其中在其固化过程中垂

直于隔膜材料混合物施加电场。因此,粒子柱垂直于隔膜层延伸。在该装置中,柱的一个端部可以面向电极,其中柱的相反端部可以面向内部空间。

[0095] 在一个实例中,在固化隔膜材料混合物之前,可以将隔膜材料混合物以封闭层施加在所述至少一个电极上,优选通过溅射、旋涂、丝网印刷和/或以溶胶-凝胶工艺沉积。

[0096] 该封闭层覆盖布置在容器中的电极的整个表面部分。在该层完成之后,电极与容器的内部空间隔离,因此表现得好像其布置在容器的内部空间之外。

[0097] 在本发明的进一步方面,提供一种制造根据上述说明的装置的方法,所述方法包括:提供用于培养生物细胞的容器,提供隔膜层,提供所述至少一个用于形成和操控生物细胞的电极,其中通过所述隔膜层将所述电极与所述容器的内部空间分隔。

[0098] 制造装置的方法的优点和效果以及进一步的发展来自上述装置和方法的优点和效果以及进一步的发展。因此,参考说明书的前述部分。

[0099] 在一个实例中,可以根据制造根据上述说明的装置的隔膜层的方法来制造隔膜层。

[0100] 在本发明的再进一步的方面,提供根据上述说明的装置用于操控生物细胞的用途。

[0101] 此外,在本发明的进一步方面,提供电容耦合到容器中并从容器向外耦合(coupled capacitively into and externally from a container)的变化电场(varying electric field)用于操控悬浮液中的所述生物细胞的用途,所述容器包含具有至少一个生物细胞的悬浮液。

[0102] 用于操控生物细胞的装置和/或变化电场的使用开辟了对现有技术装置而言不可行的各种应用。例如,由于在施加电场的同时避免了哺乳动物或人类细胞的降解,电场施加的时间可以延长到无限期。这能够以先前不可能的方式聚集和形成细胞。

[0103] 下面参考以下附图描述本发明的示例性实施方案:

[0104] 图1a、1b显示具有容器的用于操控生物细胞的装置的图解视图。

[0105] 图2a-f显示所述至少一个电极的实例的图解视图。

[0106] 图3a、3b显示该装置的电泳(electrophoresis)和容器的图。

[0107] 图4a-f显示带有细胞聚集体的图2a-f的实例的图解视图。

[0108] 图5a-f显示带有具有正电泳(positive electrophoresis)的细胞聚集体的图2a-f的实例的图解视图。

[0109] 图6a-f显示该至少电极的进一步实例的示意图。

[0110] 图7显示多个容器的连接电极(connecting electrodes)的一个实例的图解视图。

[0111] 图8显示多个容器的连接电极的另一实例的图解视图。

[0112] 图9显示在该装置上用于电极的电触点的一个实例的图解视图。

[0113] 图10a、10b显示该装置的第一和第二模块的一个实例的图解视图。

[0114] 图11a、11b显示具有电子电路的装置的一个实例的图解视图。

[0115] 图12a-d显示隔膜层的内部结构的实例的图解视图。

[0116] 图13a-c显示根据图12b和图12d的柱状结构的形成的图解视图。

[0117] 图14a-c显示该装置的容器中的细胞聚集体形成的图解视图。

[0118] 图15a-d显示容器中的细胞操控的不同状态的图解视图。

- [0119] 图16a-c显示用于由细胞形成血管类器官 (vascular organoids) 并对其进行操控的具有岛元件 (island elements) 的容器的图解视图。
- [0120] 图17a-d显示细胞聚集体的制备和超低温保存性能的图解视图。
- [0121] 图18a-c显示使用捕获粒子由细胞形成类器官的图解视图。
- [0122] 图19a-d显示在内部空间处具有弯曲表面的隔膜层的实例的图解视图。
- [0123] 图20a-d显示隔膜层和内部空间中的材料的相对介电常数的不同比率的实例的图解视图。
- [0124] 图21显示隔膜层和内部空间中的材料具有相同相对介电常数的一个实例的图解视图。
- [0125] 图22a、22b显示与现有技术 (a) 相比, 该装置对细胞的漂浮效应 (b) 的图解视图。
- [0126] 图23a、23b显示隔膜层和电极之间隔离元件 (isolating element between electrodes) 的实例的图解视图。
- [0127] 图24a、24b显示隔膜层和电极之间隔离元件的进一步实例的图解视图。
- [0128] 图25a、25b显示隔膜层和电极之间隔离元件的形状对细胞聚集体的影响的实例的图解视图。
- [0129] 图26a、26b显示容器的在AC电压下工作的四个电极对细胞的影响的实例的图解视图。
- [0130] 图27a、27b显示包含中心捕集体 (central catching body) 的容器的实例的图解视图。
- [0131] 图28显示在电极和隔膜层 (separator layer) 之间具有隔离层 (isolating layer) 的装置的一个实例的图解视图。
- [0132] 图29显示介电各向异性可切换隔膜层 (dielectric anisotropic switchable separator layer) 的一个实例的图解视图。
- [0133] 图30显示操控生物细胞的方法的一个实例。
- [0134] 图31显示制造该装置的隔膜层的方法的一个实例。
- [0135] 图32显示制造装置的方法的一个实例。
- [0136] 在以下描述中, 附图标记10是指用于操控生物细胞的装置的整体。
- [0137] 图1a显示装置10的一个实例的俯视图。该实例的装置10包含具有96个被设计为孔的容器22的微孔板。容器22的数量是示例性的。因此, 容器22的数量可具有任何数值, 例如6、12、24、48、384、1536或3456或任何其它数值。
- [0138] 容器22附接于底部元件21。每个容器22包含内部空间11, 其可以接收包含营养液15和生物细胞的悬浮液。
- [0139] 根据图1b, 底部元件21隔膜层20包含面向内部空间11的顶侧12。细胞可以沉积在顶侧12上。隔膜层20的底侧13背向内部空间11。此外, 底侧13可以接触装置10外部的大气。
- [0140] 隔膜层20包含高相对介电常数, 特别是在电极14的位置处。对于频率在1kHz至10MHz的范围内的电压-电流波形, 相对介电常数可以在10至10000, 优选10至1000, 进一步优选20至500的范围内。隔膜层11可包含具有铁磁性质的材料。
- [0141] 隔膜层20可包含具有高相对介电常数的粒子。这些粒子可以例如包含碱土金属的钛酸盐, 优选 CaTiO_3 、 SrTiO_3 、 BaTiO_3 、 $\text{Ba}_{1-x}\text{Sr}_x\text{TiO}_3$ 和/或其组合。隔膜层20的材料混合物可包

含比率在10体积%至60体积%之间,进一步优选在30体积%至50体积%之间,最优选至多40体积%的那些粒子。

[0142] 下表1显示一组钛酸盐的相对介电常数:

[0143] 钛酸镁	$\epsilon = 17-19$
钛酸钙	$\epsilon = 200-250$
钛酸钡	$\epsilon = 300-1000$
钛酸锶	$\epsilon = 250-334$
BaO-MgO-TiO ₂ -混合物	$\epsilon = 34-1000$ 在1MHz
BaO-CaO-TiO ₂ -混合物	$\epsilon = 34-1400$ 在1MHz

[0144] 表1:钛酸盐及其相对介电常数

[0145] 这些粒子可以嵌在材料混合物的聚合物中。用于容器22的底部元件21的聚合物具有低相对介电常数。因此,这些底部元件21减轻了延伸穿过底部元件21的电场。

[0146] 嵌在聚合物中的具有高相对介电常数的粒子可以提高材料混合物的总相对介电常数。因此,该材料混合物在较低程度上减轻延伸穿过底部元件的电场。

[0147] 在这一实例中,容器22包含四个电极14。电极14不位于容器22的内部空间11中。相反,在隔膜层20的底侧13上加工电极14。因此,隔膜层20布置在电极14和内部空间11之间。

[0148] 在另一个实例中,电极14可以布置在顶侧12上。然后,隔膜层20可以覆盖电极14的毗邻(abut)内部空间11的整个表面部分。因此,在这一实例中,也将隔膜层20布置在内部空间11和电极14之间,以使电极14布置在内部空间11之外。

[0149] 在图1b的四电极实例中,两个电极14可以形成一对。例如,在容器22的相对侧上的两个电极14可以形成一对。可以向每对电极14施加交变电位 Φ_1 、 Φ_2 ,以使电极对14生成两个交变电场。交变电场的频率可以在射频频谱中,这是高频电场,也可以称为射频场。一对电极14的每个电极14的交变电位可以具有相同的相位。 Φ_1 和 Φ_2 之间的相位差可以例如是180°。

[0150] 容器11可以填充有细胞悬浮液15。虚线椭圆表示悬浮液15的弯月面。悬浮液15填充内部空间11的一半。

[0151] 频率、场强和电极布置可以限定高频电场的模式。根据模式,所产生的电场使悬浮液中的生物细胞极化。极化的效果在于电场在细胞上产生力。这些力在没有物理接触的情况下作用于细胞。

[0152] 力使细胞形成聚集体16、17、18。在这一实例中,细胞聚集体17漂浮在容器11中心的高度h处,高度h大致对应于的电极14之间的距离。高度h可以通过场强在1 μ m至几mm之间调节。

[0153] 细胞聚集体16可以在电极14之间积聚在容器11的底部上。细胞聚集体18可以在电极处和电极上被拉动,或者被拉动到最窄的间隙中。

[0154] 为了在细胞上无接触、无机械地产生力,可以在隔膜层20的底侧13上加工宽度在10 μ m至1mm之间的金属电极和相应的馈电线(corresponding feed lines)。该加工可以例如用半导体技术、丝网印刷、点样(spotting)等进行。

[0155] 微孔板的总高度可以例如在5mm至20mm的范围内。内部空间11的深度可以例如在1mm至15mm的范围内。内部空间11的直径可以例如在0.5mm至10mm的范围内。

[0156] 图2a至图2f以底侧13的平面视图显示各种电极形状。圆环指示容器22(例如孔圆筒(well cylinder))的壁相对于电极14的位置。电极14包含在容器22的中心的端部26。

[0157] 图2a显示电极14的线性形状。电极14可以如图2a中所示以多于两个相位 Φ_1 、 Φ_2 、 Φ_3 、 Φ_4 操作。或者,电极14可以如图2b中所示以具有两个相位 Φ_1 、 Φ_2 的纯交变电场操作。图2b中所示的电极14具有十字形形状。图2c中的电极14具有Y形。

[0158] 根据图2d至2f,端部26可包含沿底部元件21延伸的多个圆形、T形和/或三角形突出部。这些突出部可以使由电极14生成的电场成形。

[0159] 所生成的频率范围为1kHz至10MHz的高频电压-电流波形的电磁场最大值和最小值的模式可以通过电极位置、形状和/或表面积来预先确定。

[0160] 根据细胞的诱发极化,电场频率和/或悬浮液,即细胞培养基(cell cultivation medium)的电导率的选择导致正介电泳或负介电泳,其中介电泳描述了通过电场作用于细胞的力和细胞运动的类型。

[0161] 图3a显示细胞谱的图,其显示了力作为以对数方式显示的频率的函数。该图显示三条曲线a)、b)和c),其包括悬浮液15的不同电导率。曲线a)具有最低电导率的悬浮液15,其中曲线c)具有最高电导率的悬浮液15。

[0162] 细胞的极化尤其取决于悬浮液的电导率和电场的频率。箭头31的区域中的极化与箭头32的区域中的极化相反。因此,在曲线a)和b)的情况下,细胞的极化可以根据电场的施加频率进行切换。

[0163] 此外,箭头31的区域中的细胞极化指示正介电泳。箭头32的区域中的细胞极化指示负介电泳。因此,例如如曲线a)或b)所示,如果悬浮液15具有合适的电导率,施加的电场可以设定正介电泳或负介电泳。

[0164] 在1kHz至100kHz的kHz范围内,无一例外地发生负介电泳。在较低的电导率a)和b)下,细胞的极化在100kHz至50MHz之间改变极性,以致导致正介电泳。在50MHz以上,再次发生负介电泳。

[0165] 通过选择高电导率(这是常用的细胞培养基中固有的),可以在整个频率范围内实现负介电泳。负介电泳对于细胞操控是优选的,因为细胞迁移到低场强区域,这也使得最小化暴露于电场。高频率也是优选的,因为快速变化导致电荷载流子,例如离子的较低偏转。因此,进一步减少了不可逆过程。

[0166] 底部元件的介电性质决定截止频率(cut-off frequency)。最多100kHz的频率是可行的。在更高频率下,电场的耦合劣化,因为底部元件的相对介电常数随频率提高而降低。这是由超过的电荷载流子/偶极子(charge carriers/dipoles)的平均弛豫时间(average relaxation time)引起的,即,它们不能再跟随电场的高频变化。

[0167] 如果设置正介电泳,细胞被拉向电磁场最大值的方向。它们总是位于电极14附近,特别是在电极边缘和电极14之间的最近距离处。例如如图2a至2f中所示的电极14的几何形状因此可用于以高精度决定细胞在高细胞密度下作为组或线或甚至簇的排列。

[0168] 如果设置负介电泳,细胞如正介电泳的情况那样反向极化。细胞然后朝场最小值的方向移动,聚集在下方不存在电极的表面上,或者升起。

[0169] 图3b显示细胞的不同行为和感应力(induced forces)的影响的空间表示。电极14设置为四极并通过两个相位 Φ_1 、 Φ_2 控制。在正介电泳中,细胞聚集在最高场强的位置36处

并被吸引到容器22的底部。在本实例中,施加的场在容器22的中心33产生场最小值。场最小值以漏斗形34向上张开。

[0170] 在负介电泳的情况下,在低电压下,细胞聚集在容器22的中心33处的底部。如果提高电压,细胞上的来自电场的电动力(electric force)超过作用于细胞的沉降力。该电动力使细胞聚集体17浮起。因此,这些电动力也可以被称为漂浮力。

[0171] 漂浮力使细胞聚集体17以自由悬浮的方式漂浮在漏斗34中的漂浮力正好等于沉降力的高度处。此外,如图3b中所示,漂浮力将细胞聚集体17保持在电极14上方的中心轴上。

[0172] 如果容器22包含具有不同介电泳谱的不同细胞类型,可以在交变电场的特定频率下发生正介电泳和负介电泳。这是在该装置中共培养的一个条件。

[0173] 图4a至4f显示用于具有负介电泳的细胞的图2a至2f的电极14的布置。可以在负介电泳发生的同时形成细胞聚集体41、42。细胞聚集体42排列在容器22的底部的中心,其中细胞聚集体41在电极14之间的空间中与容器22的底部的中心间隔开。细胞聚集体41和细胞聚集体42可以基于它们的介电泳谱包含不同类型的细胞。

[0174] 细胞聚集体42可以暴露于具有2至4个相位的任何交变电场。

[0175] 细胞聚集体41始终仅暴露于来自相邻电极14(即毗邻细胞聚集体41所占据的空间的电极14)的具有两个相位的一个交变电场。

[0176] 在中心的细胞和细胞聚集体42因此可以缓慢旋转,例如以5转/秒至0.001转/秒。此外,这些细胞聚集体42也可以浮起以使它们可以容易地除去,同时细胞聚集体41留在容器22的底部上。

[0177] 因此,细胞和细胞聚集体41、42可以在电极14的这些阵列中以图案排列。这些阵列能够实现细胞的无障碍共培养。例如,细胞聚集体41的细胞类型可以是针对细胞聚集体42的细胞类型调节营养液的看护培养物(nurse culture)。

[0178] 图4c和4f显示生物技术、医学和药学中所需的在一个容器22中并行形成、繁殖和培养13种类器官或其它组织形成物的实例。因此,这些实例能够在96微孔板中生成高度有序的种类器官/组织/细胞簇,即在96微孔板中 $96 \times 13 = 1,248$ 个类器官。

[0179] 图5a至5f也显示用于具有正介电泳的细胞的图2a至2f的电极14的布置。在正介电泳期间,细胞聚集体51聚集在电极14上方的容器22底部。交变电场无法升起这些细胞聚集体51。因此,使用多少相位是次要的,因为只有在这些细胞正下方的电极的交变电场在细胞聚集体51上施加力。

[0180] 装置10可以仅在从正介电泳到负介电泳的转变点(其根据图3可以在100kHz至1MHz附近)处操作。在这种情况下,悬浮液可以包含至少两种具有不同类型的介电泳的细胞。

[0181] 因此,图4a至4f和5a至5f的组合表明,一种细胞类型被拉向电极14,而另一种细胞类型被推离电极14。

[0182] 在稍后将频率改变为使两者都表现出负介电泳的值之后,细胞群42、51可以解开以例如由不同细胞类型配置类器官。例如,这对于血管化(vascularization)非常重要。

[0183] 图6a至图6f显示电极14的另一个实例。这些实例包含用于两相运行的电极14。一组电极14连接到第一带状电极61,另一组电极14连接到第二带状电极62。带状电极61、62具

有不同的电相。带状电极61、62可以连接到多个容器22的电极。因此,可以使线的数量最小化。图6d、6e和6f中所示的电极14的结构能够生成多于20个电场最小值。因此,这些结构可以提供每个容器22多于20个细胞聚集体/类器官。

[0184] 图7显示具有图6d的电极配置的几个容器22的一个实例。带状电极70是零线(zero conductor),其连接到这一实例中所示的每个容器22的一组电极14。在相位 Φ_1 下运行的带状电极61连接到下排容器22的电极组14。在相位 Φ_2 下运行的带状电极62连接到上排容器22的电极组14。这一实例显示跨过装置10(例如微孔板)的行的电极14阵列的镜像组合。在这种两相运行中不需要多层馈线。

[0185] 为了生成旋转或漂移(rotating or wandering)的多相电场,需要可以用多级加工制造的馈线的交叉点。如果电极14的这些层级布置在内部空间之外的隔膜层20的底侧13上,可以简化电极14的制造。

[0186] 图8显示具有图6f的电极配置的几个容器22的另一个实例。这一实例也显示跨过装置10的行的电极14阵列的镜像组合。这一实例包含两组带状电极61、62。每个容器22包含连接到具有相位 Φ_1 的第一组带状电极61或连接到具有相位 Φ_2 的第二组带状电极62的电极14。第一组带状电极61连接到第一接触元件81。第二组带状电极62连接到第二接触元件82。第一接触元件81和第二接触元件82可以是连接焊盘(connection pads)。

[0187] 图9显示装置10,其包含具有96个孔作为容器22的微孔板。与两个接触元件81、82的电连接在所有容器22中显示两相系统。电极14具有图6a的配置。

[0188] 图10a和10b显示装置10的横截面视图,其包含具有容器22的微孔板103。接触元件81、82布置在隔膜层20的底侧上。装置10进一步包含用于微孔板103的支座101。支座101包含两个弹簧承载式接触销(spring-loaded contact pins)102,其可以电连接到射频发生器(未示出)。盖子105可以覆盖微孔板103。

[0189] 在图10a中,微孔板103与支座101分离。

[0190] 图10b显示微孔板103承接在支座101中。接触销102连接到接触元件81、82并建立接触。当然,可以想到各种其它可拆卸和固定式连接。

[0191] 根据本发明的电极14电容耦合在悬浮液中,因为电极14布置在内部空间和因此营养液之外。与直接接触营养液的现有技术电极相比,根据本发明的电极14在生成交变电场时具有较低的欧姆损耗。大量的容器22使装置10的欧姆损耗的减少倍增。因此,本发明避免了与电容耦合(capacitive coupling)相比直接耦合到悬浮液15的电极的巨大欧姆损耗因子(ohmic loss factor)。较高的电流可以补偿直接耦合在悬浮液15中的电极的欧姆损耗因子。但是,这将导致上文提到的电极过程。

[0192] 图11a和11b显示96微孔板103。图11a以俯视图显示微孔板103,其中图11b显示沿截面A-A的微孔板103。

[0193] 根据图11a,装置10包含能量存储装置111,例如电池组,以及用于在电极14处产生交变电场的电子电路112。能量存储装置111和电子电路112可以集成到微孔板103中。装置10然后可以自主地并且在没有任何外围电子设备的情况下运行。由于低电流和使用最适于诱导介电泳的方波电压波形(square-wave voltage waveforms),可以使用小型化数字电子元件。或者,电子电路可以容纳在盖子105中,例如以非常扁平化的设计,并通过插头-插座或在金属表面上的弹簧承载式触点等进行电连接。

[0194] 图12显示隔膜层(separate layer) 20的内部结构的实例。隔膜层(separate layer) 20包含高相对介电常数,以允许电磁场以足够的力效应耦合到悬浮液15中的细胞上。

[0195] 所有可得的聚合物、树脂、塑料材料都不合适,即在2至4之间的太低的相对介电常数 ϵ_{rel} 。与从电极直接耦合到悬浮液中相比,这导致有效场强降低20至40倍。

[0196] 作用在细胞上的力与场强的平方成比例。为了将与直接耦合在悬浮液中相比的场强弱化减少4倍,隔膜层20需要至少20的总相对介电常数。

[0197] 在直接耦合在悬浮液中的情况下,使用低于 $10V_{pp}$ 的电压(电压峰间值)。否则,施加的电压会加热电极。因此,电极会加热悬浮液以致可能发生气泡形成和电解。

[0198] 由于根据本发明将电极14布置在内部空间11之外,隔膜层20将来自电极14的热与悬浮液15屏蔽。因此,电压的振幅可以提高到 $40V_{pp}$,在底侧13适当热绝缘的情况下甚至更高。

[0199] 由电极14生成的电场的场强的降低通过4倍之高的电压振幅补偿。如果隔膜层20包含大于30的相对介电常数,与常规直接耦合在悬浮液中大致相同的力作用在细胞上。

[0200] 隔膜层20的厚度也使电场减弱并减小电场的所需梯度。因此,隔膜层20的厚度必须比电极14之间的距离小得多。

[0201] 在 $100\mu m$ 至几mm的电极间距下,小于 $100\mu m$,优选 $25\mu m$ 或更低的厚度减少了电场的减轻(mitigation)。

[0202] 这样的材料和膜不可购得。它们可以通过将具有大约10的相对介电常数的氰基树脂121与具有铁磁性质和大约100至1000的高相对介电常数 ϵ_{rel} 的粒子(优选晶体),如钛酸钡($BaTiO_3$) 122或钛酸锶钡($Ba_{1-x}Sr_xTiO_3$) 123混合来制造。

[0203] 氰基树脂与大于40体积%量的晶体的混合物失去透明度。因此,对于容器22中的细胞的倒置显微镜成像(inverted microscope imaging),晶体的量应该保持低于40体积%。

[0204] 图12a和12c显示通过混入小于40体积%的量的具有高相对介电常数的晶体122、123的经典混合物,以得到小于25的总相对介电常数。

[0205] 图12a显示具有均一尺寸的晶体122的混合物,例如在200nm至1000nm之间,优选300nm。

[0206] 图12c显示具有不同尺寸,例如300nm和700nm的小晶体122和大晶体123的混合物。

[0207] 图12b和12d显示晶体122、123在氰基树脂121中的优选配置。晶体122、123的柱状配置可以进一步提高隔膜层20的相对介电常数。隔膜层20可以例如在混入小于40体积%的晶体122、123的情况下实现大于40的总相对介电常数。

[0208] 图13a至13c显示可以如何实现晶体122、123所需配置。

[0209] 图13a显示在混合后晶体123在氰基树脂121中的随机分布。

[0210] 根据图13b,在隔膜层20的固化过程中,例如在退火或紫外线照射过程中,垂直穿过材料混合物施加电场。该电场优选是交变射频场。在kHz至MHz范围内的合适频率下,电场使晶体123的偶极子以图13b中所示的方式对齐并以介电泳方式(dielectrophoretically)形成链。如果晶体122、123具有不同的尺寸,电场形成图13c中所示形状的柱。

[0211] 柱中的对齐可以是模糊的或者可以非常精确。这取决于在固化过程中接通和切断

电场之间的时段。例如,如果将该场接通直至完全固化,则晶体122、123非常精确地对齐。

[0212] 为了避免由于精确对齐的晶体122、123而可能发生的固定预极化(fixed pre-polarization),优选创建晶体122、123的相当不规则布置的柱,即,在固化之前切断电场并允许晶体122、123由于局部热运动而改变位置。

[0213] 图14a至14c显示装置10中的介电泳的效应的另一实例。

[0214] 图14a显示包含细胞146和营养液15的两个容器22的横截面视图。透明底部元件21包含隔膜层20和将电极14与外部绝缘的绝缘层144。添加绝缘层144的优点在于,绝缘层144的厚度不影响电场。即使隔膜层20包含在 μm 范围内的厚度,绝缘层144也使底部元件21稳定。

[0215] 图14b显示如果条件使得发生负介电泳则开启射频场的效果。形成实现类器官或组织形成所需的细胞聚集体147。在左侧容器22中,场强低,以使细胞聚集体147留在地面上。

[0216] 在右侧容器22中,电场包含比左侧容器22中更高的场强。由电场产生的力使细胞聚集体148升起并在场漏斗中保持自由浮动。在这一位置,根据由电极14生成的电场的控制,细胞聚集体148可以旋转和变形。

[0217] 可以例如创建细胞聚集体147以改善超低温保存,因为冷却和加热主要通过微孔板的底部元件21发生。具有良好热导率的电极14和薄的隔膜层20都使得在类器官或细胞聚集体147处能够发生即时温度变化。

[0218] 为了改变细胞聚集体148中的温度,环境营养液的温度必须首先改变。因此,对于超低温保存,必须切断电场或者必须将频率切换到正介电泳以使细胞聚集体148下沉到底部元件21。

[0219] 图14c显示在100kHz四极激励(quadrupole excitation)下在具有指示的相位位置的交变电场激励(alternating electric field excitation)下,在具有大约15的总相对介电常数的隔膜层外侧上的四个电极14之间的中心中的这种粒子形成的显微镜视图。发生负介电泳。底部元件21的围绕电极14的表面部分完全无粒子。作为细胞聚集体147的一部分的细胞149聚集在电极14之间。

[0220] 图15a至15d显示操控系列的一个实例,其代表各种这样的细胞-粒子操控。

[0221] 根据图15a,容器22包含细胞悬浮液15。切断电场。

[0222] 在开启射频场并使用负介电泳之后,如图15b中所示,在溶液中形成细胞聚集体151。

[0223] 根据图15c,场强的减小导致细胞聚集体151下沉到容器22的底部。

[0224] 在细胞贴壁生长(adherently growing cells)的情况下,如图15d中所示,细胞在底部元件21上铺开并生长。

[0225] 通过添加额外的细胞,例如,可以在现有细胞层上沉积额外的细胞层,因为电场的力不足以提离贴壁细胞。

[0226] 根据图15a至15d的序列也可以在完整微孔板的超低温保存开始之前不久使用。

[0227] 图16a至16c示意性显示可以如何生长示例性的血管化类器官。

[0228] 图16a显示连接到用于生成交变电场的射频源的电极14和未连接到射频源的导电岛元件162的示意性俯视图。岛元件162可以例如由电极材料制成。岛元件162可以布置在隔

膜层20的与电极14相同的一侧上。

[0229] 岛元件162也可以是不导电的。但是,以下实例涉及导电岛元件162。

[0230] 根据图16b,可以将天然或人造半透管163添加到溶液中。然后,可以以频率 ν 交替接通电场,其中电场线集束在电极14和导电岛元件162上方。

[0231] 如果管163表现出正介电泳,它们将在导电岛元件162上方和在电极14处集合。

[0232] 在管162已经集合之后,添加到溶液中的细胞将在频率 ν 下表现出负介电泳,因为细胞聚集体164、165中的细胞具有与管163不同的介电性质。细胞将集合在电极14和岛元件162之间的场最小值中。

[0233] 在切断交变电场之后并且在细胞生长时,这两个细胞聚集体164、165迁移并彼此生长在一起,以形成类器官166并包封管163,以使管生长在形成中的类器官166中。即使在较大的类器官166中,营养物仍然可以经由管163到达类器官的内部,这是避免类器官166的中心坏死所需的。

[0234] 根据图16c,类器官166已经生长得足够大以呈现三维形状。然后,通过再次开启交变电场,可以如箭头所示使类器官166升起。可以容易地转移或取出类器官166,因为场力随着该类器官166的半径的三次方而增加。

[0235] 图17a至17d显示支持超低温保存的原理。

[0236] 根据图17a,细胞146显示在悬浮液15中。

[0237] 图17b显示悬浮液15中的初始细胞聚集体173的形成。根据图17c,细胞聚集体173的尺寸增加。

[0238] 图17d显示在超低温保存过程中的冷却。特别地,电极14和隔膜层20显著改进温度传导。

[0239] 图18显示使用人工或生物捕获粒子181设计类器官的实例。这些捕获粒子(capture particles)181可以被设计为类似于细胞的有耗介质(lossy dielectrics)。例如,捕获粒子181可以是直径在 $1\mu\text{m}$ 至 $300\mu\text{m}$ 的范围内,优选 $50\mu\text{m}$ 的官能化葡聚糖凝胶(Sephadex)粒子。为了设计类器官,当在这一实例中通过旋转四个相位而接通电场时,捕获粒子181可以被捕集在电场最小值中。旋转电场使捕获粒子181漂浮在容器22的底部上方的高度 h 处。

[0240] 根据图18b,细胞182以低浓度加入。旋转电场使细胞182极化,以使细胞182移动到中心。在捕获粒子181附近,在细胞182和捕获粒子181之间发生经由更高阶相互作用(例如四极或八极层级)的偶极-偶极相互作用(dipole-dipole interactions)。这些相互作用导致细胞182与捕获粒子181相遇。细胞182被压到捕获粒子181的表面,以使细胞182可以良好附着。

[0241] 由于电场的旋转,与静止交变电场(resting alternating field)不同,捕获粒子181的表面被细胞182均匀覆盖。这是这样的类器官技术中的重要目标。

[0242] 图18b和18c中所示的步骤可以用另外的细胞重复,以使可以在过度生长的捕获粒子181上沉积一层又一层的细胞层。如果将旋转电场改变为交变电场,例如通过向电极14施加两个相位,捕获粒子181上的细胞负载变得不均匀,即,由旋转电场创建的圆形体随后形成细胞突起。

[0243] 所述至少一个电极14不仅可以用于激励和生成力,还可以用于测量诱发的细胞极

化(cell polarizations)。可以使用从超声中已知的激励-回波技术(excitation-echo technique),即在激发后非常快速地切断电场并用相同的电极14将细胞中的诱发极化的衰减记录为电流-电压波形。这需要非常高的放大,放大因数在100至超过1000的范围内,具有大的信噪比。

[0244] 图19a至19d显示可以是玻璃基板的绝缘层144的横截面视图。可以在玻璃基板上加工厚度小于 $1\mu\text{m}$ 的扁平微电极14。电极14的加工可以例如通过蚀刻方法进行。

[0245] 在电极14和绝缘层144之上是在大约 $50\mu\text{m}$ 的厚度下具有高第一相对介电常数 ϵ_1 和低电导率的隔膜层20。隔膜层20被水性细胞悬浮液15覆盖,其中细胞未示出。悬浮液15具有在大约80的范围内的第二相对介电常数 ϵ_2 。由于细胞生物学原因,该相对介电常数 ϵ_2 无法显著改变。电极14通过隔膜层20与悬浮液15完全隔离。

[0246] 图19a至19d进一步显示在隔膜层20的不同几何下并且取决于第一和第二相对介电常数的比率的电场线194。在图19a和图19c中,第二相对介电常数 ϵ_2 大于第一相对介电常数 ϵ_1 。在图19b和图19d中,第二相对介电常数 ϵ_2 小于第一相对介电常数 ϵ_1 。

[0247] 在图19a至图19d中,隔膜层20包含弯曲表面部分192。图19a和19b显示凹形表面部分192。图19c和19d显示凸形表面部分192。电场线194在毗邻悬浮液15的隔膜层20的弯曲表面部分192处折射。这可能影响场线轮廓,和因此对悬浮液15中的细胞的效应。电场线194的变化不仅取决于弯曲表面部分192上的相对介电常数的变化,还取决于隔膜层20的弯曲表面部分192的几何。电场可以朝溶液中压缩或变形。细胞聚集体在形状上适应于电场线194的轮廓,例如通过形成球体、圆盘或纺锤体。这可能是构建类器官的手段。

[0248] 图19a和19c中的情况示例性地对应于 $\epsilon_1 = 40$ 和 $\epsilon_2 = 80$ 的相对介电常数的分布,图19b和19d中的情况对应于 $\epsilon_1 = 120$ 和 $\epsilon_2 = 80$ 的相对介电常数。

[0249] 为了获得弯曲的表面部分,隔膜层20的厚度可以在 $0.5\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 的范围内变化。这可能导致隔膜层20的相对介电常数在10至大于100的范围内变化。

[0250] 图20a至图20d显示隔膜层20的表面201的另外两个几何实例。

[0251] 图20a和20b显示具有平坦表面201的隔膜层20,隔膜层20的厚度在 $1\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 之间的范围内。

[0252] 图20c和20d显示在电极14之间具有开口202的隔膜层20。电极14被隔膜层20完全覆盖。因此,电极14布置在内部空间11之外并且与悬浮液15分隔。特别地,开口202的设计可能导致电场线194的变化的显著变化。相对介电常数的比率可以校准电场线194。由于悬浮液15不应该受到影响,电场线194的校准可以通过改变隔膜层材料的混合比实现。例如,可以通过将钛酸钡添加到隔膜层材料中来确定校准。

[0253] 图21显示隔膜层20的另一个实例。在这一实例中,隔膜层20具有与悬浮液14相同的相对介电常数。在这种情况下,电场线194几乎不受干扰地穿过隔膜层20与悬浮液15之间的边界层。这种组合的优点在于,隔膜层20的几何和表面形貌不影响电场线194的轮廓。此外,隔膜层20仍然将电极14与内部空间11和悬浮液15隔离,并且电场可以无衰减地耦合到悬浮液15中。

[0254] 为了使细胞漂浮以形成类器官,优选与表面相距一定距离,因为几个相关细胞容易附着于表面,以致无法形成三维类器官。细胞和表面之间,尤其是与人造材料的任何接触都会影响细胞生理学和分化,这应该避免。因此,不仅需要细胞的横向集合,还需要通过垂

直定向力 F_z 使它们升起。由于细胞在1kHz至10MHz的范围内使用的频率下表现出负介电泳,细胞被推出电场并提升。在四个电极14的布置中,可以将细胞保持在力漏斗(force funnel)中。

[0255] 图22a显示根据现有技术的常规电极室。电极224与细胞悬浮液15直接接触。落在容器22的底部上的细胞221在横向(lateral direction)上受到很强的力,但是在z方向上的力很小。

[0256] 图22b显示具有相对介电常数为 ϵ_1 的隔膜层20的一个实例。这导致作用于细胞221的力的横向分量以及强z分量。因此,落在容器22的底部上的细胞221也被提升并保持自由浮动。与图22a中所示的现有技术配置相比,即使用厚度在10 μm 至100 μm 的范围内的隔膜层20覆盖电极14也减少场损耗,避免金属表面上的电解过程,并且甚至允许223的表面的生物功能化。

[0257] 通过用具有低相对介电常数的绝缘材料224覆盖电极14和电极14之间的间隙,可以进一步改进装置10。这减少了漏电流(leakage currents)和电容性过耦合(capacitive overcoupling)。

[0258] 图23a和23b显示这种方法的实例。图23a显示具有圆形边缘的平面隔膜层20。电极14仅在小区域中直接连接到隔膜层20。电场线的主要部分源于此处。电极14和隔膜层20之间的其它区域包括厚度为大约1 μm 的绝缘材料224,例如氧化硅、亚硝酸硅、氧化铝。

[0259] 隔膜层20的圆形边缘使得位于此处的细胞234被推离中心区域。这是有意义的,例如,当进行与调节细胞(conditioning cells)的共培养时,其中调节细胞不应该并入中心类器官222中,而是仅在细胞生理方向(cell physiological direction)上调节悬浮液15。

[0260] 图23b显示了一个实例,其中绝缘层231比图23a的实例中更厚。绝缘层231可以改进电场线的聚焦,因为电场线围绕绝缘层231延伸。因此,绝缘层231使得将在绝缘层231的位置处延伸的电场线移位。

[0261] 图24a和24b显示这种类型的进一步实施方案。根据图24a,隔膜层20包含显著的高度和在上表面上的凹坑(depression)241。隔膜层20因此在容器22中限定孤立区域。类器官222漂浮在凹坑241中。这种配置简化了布置在隔膜层20的边缘处的细胞243的转向。此外,隔膜层20的该几何避免了共培养的细胞244与应该添加到类器官222上的细胞242的混合物。

[0262] 图24b显示隔膜层20具有弯曲表面的另一个实例。弯曲表面可以使不应该添加到类器官222上的细胞243转向。

[0263] 图25a-b显示绝缘体层224和隔膜层20的不同几何设计的实例。绝缘体层224、231和隔膜层20的几何设计可以相互作用以定位和成形细胞聚集体222。

[0264] 图25a显示具有厚的中心绝缘层231和在电极14之间中断的平面隔膜层20的一个实例。所产生的电场线然后可以在类器官222上引起弱的横向力。

[0265] 图25b显示具有薄的中心绝缘层231的一个实例,其中隔膜层20具有面向中心绝缘层231的庞大端部(bulky end portions)。这种配置导致在类器官222上引起高的横向力的电场线。因此,类器官222在横向上比图25a的类器官222更压缩。

[0266] 图26a和26b显示四个平面电极14对粒子/细胞的效应的两个实例。电极14以在上限kHz范围(upper kHz range)内的AC电压操作。此外,电极14被具有高相对介电常数的层

覆盖。

[0267] 根据图26a,隔膜层20包含22 μm 厚的oxyphene膜。通过直径为400nm的充满水的孔隙将oxyphene膜的相对介电常数提高到大约30的值。这一实例的电场频率为100kHz,振幅为20V_{pp}。粒子具有20 μm 的尺寸并且布置在水性电解质溶液中。

[0268] 孔隙穿过oxyphene膜。因此,这种类型的层仍然不令人满意,因为经过较长的时间,由于孔隙减弱了电极14与悬浮液15之间的分隔,可能引发电极-电解质过程。

[0269] 根据图26b,隔膜层20具有70 μm 的厚度。隔膜层20包含与一部分30体积%的钛酸钡纳米粒子混合的固化氰基树脂CR5。隔膜层20形成电极14的完全绝缘覆盖物,并且包含大约40的相对介电常数。电场的频率在这一实例中为400kHz,振幅为19V_{pp}。粒子具有20 μm 的尺寸并且在水性电解质溶液15中。

[0270] 在图26a中,该膜足够透明以看到电极14。在图26b中,四个电极14的位置由朝向图像中间的白色倾斜矩形指示。在这两种情况下,都形成大的细胞聚集体222,其在中心区域中以球体形式三维漂浮。

[0271] 可以通过细胞悬浮液的初始浓度从单个细胞至几千个细胞调节捕集的细胞数。为了生产异质类器官,稍后必须添加另外的细胞。这些细胞被拉到现有的类器官上,并在此处通过偶极-偶极和四极-四极相互作用(dipole-dipole and quadrupole-quadrupole interactions)发生直接表面接触,以使它们可以形成分子键。

[0272] 以这种方式,可以生成复杂的细胞群、细胞簇直至具有数百和数千个细胞的类器官,并保持自由漂浮在溶液中。不在中心区域中的细胞262被推离电极14。这些细胞262可以通过悬浮液15的流体与类器官细胞222相互作用,但无法触及它们。这对于共培养以及当某些细胞类型比率应该在类器官中保持恒定时是重要的。

[0273] 图27a和27b显示图25b中所示的结构。

[0274] 根据图27a,将直径为几微米至100 μm 的物体(body) 271添加到悬浮液中。物体271的材料可以是氰基树脂和钛酸钡的混合物。因此,物体271在电场中包含低电导率和强极化率。此外,电场使物体271保持非常稳定地悬浮。

[0275] 在这种极化状态下,物体271通过所有物体(objects) (如中心捕获体(central capture body))上的诱发极化电荷(induced polarization charges)的偶极-偶极相互作用作用于小得多的细胞272。从物体271周围的宽范围中,细胞272朝物体271移动,这由箭头指示。细胞272无法离开物体271的表面。

[0276] 关于类器官,捕获体271的几何可以适应于细胞形成的所需形状,例如形成为星形、椭球形、圆柱形。物体271的材料也可以设计为具有孔隙或通道,以使营养液可以流过物体271的结构。这能够实现更大的类器官和随后的血管化。因此,该物体增强了细胞(尤其是 μm 范围内的小细胞)的收集以及类器官的形成。

[0277] 为了在没有显微镜观察的情况下和非破坏性地测量类器官的生长和尺寸,在一个备选方案中,经由平面电极14生成的电场可以使用一次并与测量信号一起施加。

[0278] 在另一备选方案中,如图27b中所示,捕获体271可以附接于微电极273并从上方引导到电场区中。微电极273可以成型为珠粒。物体271的材料具有相对较高的相对介电常数以及低电导率并覆盖微电极273的金属表面。如果装置10包含多个容器22,这些电极珠粒系统可以从盖子105引入每个容器22中,并且在打开盖子105时容易移除。

[0279] 代替微电极273,可以单独插入光纤或除了微电极273之外还插入光纤以光学测量容器22的内容物。在电极273的情况下,测量信号是阻抗信号。在光学检测的情况下,例如,可以检测散射光。

[0280] 图28显示装置10的另一个实例。电极14彼此非常靠近地布置。为了避免经由杂散电容(stray capacitances)的馈电损耗(feed losses),每个电极14的区段282被绝缘层281覆盖。绝缘层281布置在电极14和隔膜层20之间。因此,绝缘层281将区段282与隔膜层20隔离。

[0281] 图29显示由聚合物和碱土金属钛酸盐的混合物提供介电各向异性层(dielectrically anisotropic layers)作为隔膜层20的一个实例,其中该介电各向异性层是可切换的。电极291在隔膜层20的材料中生成横向电场。在由电极14生成的射频场中的极化变化过程中,这种横向电场阻碍钛酸盐粒子的偶极子292的运动和位移。因此,可以影响通过隔膜层20的位移电流(displacement current),这导致内部空间11中的悬浮液15中的射频场的变化。

[0282] 在另一个实例中,珀耳帖元件(Peltier elements)可以冷却电极或包含电极的底部元件。

[0283] 此外,在另一个实例中,可以进行电流测量以记录类器官的pH值和尺寸。

[0284] 在另一个实例中,介电不同的珠粒/微体可以布置在不同高度处或以不同的频率使用。该珠粒/微体可能受到不同类型的细胞的影响(be afflicted with)。此外,这些珠粒/微体可以操控该场中的细胞,例如,使细胞分开悬浮并通过改变交变电场而将它们合并成聚集体。

[0285] 在一个进一步实例中,可以通过掺杂聚合物和碱土金属钛酸盐的混合物来形成电极。该掺杂可以在混合物中创建传导通路。这些混合物可以例如是钛酸钡和钛酸锶板。

[0286] 此外,在一个实例中,射频场可以诱发细胞中的射频膜电位变化(radiofrequency membrane potential changes)。这可能影响物质摄取和/或递送到细胞中,影响细胞的分化,使心肌细胞或神经元细胞同步化等,或影响细胞的力学转导(mechanotransduction)。

[0287] 装置10的操作温度可以例如在-5°C至100°C的范围内,优选在20°C至37°C的范围内。此外,悬浮液的pH值可以例如在6至8的范围内。

[0288] 上述装置可用于操控生物细胞。

[0289] 此外,电容耦合到包含具有至少一个生物细胞的悬浮液的容器中并从该容器向外耦合的变化电场可用于操控悬浮液中的所述生物细胞。

[0290] 图30显示代表通过根据上述说明的装置操控生物细胞的方法300的流程图。该装置可以包含至少两个电极,其中电信号配置为使得所述至少两个电极在容器内生成具有最小值和最大值的稳定时间模式的电场。

[0291] 方法300可包含第一任选步骤313。在步骤313中,根据其所需电导率选择悬浮液并选择可变电信号的频率以生成关于所述至少一个生物细胞的正介电泳或负介电泳。因此,在为细胞操控做准备时,可以设定悬浮液的条件以优化和简化后续操控过程。此外,可以选择交变电信号的频率,以使介电泳力(dielectrophoretic force)适应细胞操控的要求。可以例如如图3a中所示根据取决于电场频率的细胞极化的已知分布来选择频率。

[0292] 在方法300的步骤301中,将包含至少一个生物细胞的悬浮液引入该装置的所述至

少一个容器中。如果该装置包含多个容器,例如具有1536个孔作为容器的微孔板,每个容器可以接收悬浮液。此外,每个容器中的悬浮液可以不同,例如,细胞的数量或类型可以在每个容器之间不同,或者悬浮液的营养液混合物可以在每个容器之间不同。

[0293] 生物细胞可以是干细胞,优选诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells)。

[0294] 在方法300的另一任选步骤314中,可以通过负介电泳使所述至少一个细胞在容器中上升和移动。因此,在步骤313中,选择悬浮液和频率,以使对要操控的细胞发生负介电泳。

[0295] 在另一任选步骤310中,可以通过至少一个细胞群调节悬浮液。该细胞群可以影响悬浮液的营养液,以使其变得最适于该群的细胞类型或另一类型的细胞的生长。

[0296] 方法300可以包括在任选步骤310之后的另一任选步骤311。在任选步骤311中,容器中的电场可用于分离和聚集所述至少一个细胞群。这可以在悬浮液中为可能引入悬浮液中的另外的细胞创造空间。这些另外的细胞可以生长并形成类器官。

[0297] 在方法300的另一任选步骤312中可以将这样的另外的细胞引入悬浮液。可以使所述至少一个另外的细胞移动到该电场的最小值处并在此保持预定的时间以形成类器官并为细胞生长提供时间。

[0298] 在方法300的步骤302中,向该装置的所述至少一个电极施加电信号以生成可变电场。可变电场也可以称为交变电场。该可变电场可以具有在任选步骤513中选择的频率。

[0299] 该电信号可具有在大于4V至100V,优选大于10V至100V,更优选大于10V至50V的范围内的电压峰间值(voltage peak-to-peak value)。此外,所述至少一个电信号可以以连续方式或以非连续方式馈送,优选以脉冲方式馈送。

[0300] 在步骤303中,可变电场可用于使所述至少一个生物细胞移动到容器中的预定位置。这是对所述至少一个生物细胞的操控。例如,细胞可以布置在容器的底部上。

[0301] 该电场可以以10 μ m至5mm之间的距离对容器内的细胞施加在1pN至1000pN的范围内的力。该电场可以使所述至少一个细胞极化。

[0302] 在另一任选步骤304中,可以使所述至少一个细胞移动到该电场的至少最小值中。

[0303] 在任选步骤305中,悬浮液可以包含至少两个细胞。该电场可以使悬浮液中的至少两个细胞形成至少一个细胞聚集体。

[0304] 根据方法300的任选步骤306,可以降低电场的场强以使所述至少一个细胞聚集体沉积在容器的底部。

[0305] 在另一任选步骤307中,一旦所述至少一个细胞聚集体已经沉积,就切断电信号。

[0306] 或者,方法300可以包含任选步骤308。在步骤308中,电场对所述至少一个沉积的细胞聚集体施加聚集力(collecting force)。这避免细胞聚集体的细胞横向移动,从而避免细胞聚集体变扁。

[0307] 此外,在任选步骤309中,永久地或以具有电场的短时间施加的交替序列施加电信号。

[0308] 在方法300的任选步骤315中,可以通过使冷却剂与所述至少一个电极直接接触来进行悬浮液的超低温保存。优选地,细胞已经布置在容器的底部上。由于电极通常包含金属材料并且隔膜层非常薄,冷却电极可以高效地冷却悬浮液和其中的细胞。

[0309] 方法300可以进一步包含任选步骤316。在步骤316中,可以将步骤315的冷冻悬浮液或另一种冷冻悬浮液解冻。可以通过在1kHz至10MHz的范围内的频率下将至少一个电信号馈送到所述至少一个电极中以加热电极来引发解冻。如在步骤315中类似地描述,电极的金属材料和薄的隔膜层可以向悬浮液和细胞高效传热。

[0310] 可以在容器中用显微镜观察所述至少一个细胞,并且可以记录细胞的行为和增加。

[0311] 此外,可以通过由电场诱发的极化电测量和/或介电测量所述至少一个细胞。

[0312] 上文提到的方法300的步骤可以以合理和符合逻辑的任何顺序进行。

[0313] 图31显示制造上述装置的隔膜层的方法310的流程图。

[0314] 在方法310的第一步骤311中,提供至少一种具有第一相对介电常数的液体聚合物。该液体聚合物可以是选自氰乙基支链淀粉(CRS)、氰乙基聚(乙烯醇)(CRV)、M型氰基树脂(CRM)的氰基树脂。此外,第一相对介电常数可以高于10。

[0315] 在第二步骤312中,将具有第二相对介电常数的多个粒子(优选微晶)与所述至少一种液体聚合物混合,以获得隔膜层混合物。这些粒子可以例如包含碱土金属的钛酸盐,其选自:CaTiO₃、SrTiO₃、BaTiO₃、Ba_{1-x}Sr_xTiO₃和/或其组合。

[0316] 隔膜层的材料混合物可以包含比率在10体积%至60体积%之间,进一步优选在30体积%至50体积%之间,最优选至多40体积%的这些粒子。

[0317] 这些粒子可具有均一尺寸,或者可具有至少两种不同的尺寸。

[0318] 在方法310的任选步骤314中,可以将隔膜材料混合物以封闭层施加在所述至少一个电极上,优选通过溅射、旋涂、丝网印刷和/或以溶胶-凝胶工艺沉积。

[0319] 此外,方法310进一步包括步骤313。在步骤313中,将隔膜材料混合物固化以获得隔膜层。

[0320] 可以在固化过程的至少一部分的过程中向隔膜材料混合物施加电场以使粒子在液体聚合物中配向、集合和链形成。这可以在隔膜层中产生有序的、柱状排列的粒子区和/或粒子簇。

[0321] 此外,隔膜材料混合物可以固化以形成隔膜层,其中在其固化过程中垂直于隔膜材料混合物施加电场。

[0322] 图32显示制造上述装置的方法320的流程图。

[0323] 在第一步骤321中,提供用于培养生物细胞的容器。此外,可以提供多个容器,例如作为微孔板的孔。

[0324] 在第二步骤322中,可以提供一层隔膜层。该层可以根据上述方法310提供。

[0325] 在第三步骤323中,提供所述至少一个电极用于形成和操控生物细胞。隔膜层将该电极与容器的内部空间分隔。

[0326] 上文提到的本发明的一些实施方案涉及方法类型的权利要求,而另一些实施方案涉及装置类型的权利要求。除非另有告知,本领域技术人员会认识到,除了属于一种类型的特征的任何组合之外,本申请也公开了与不同类型相关的特征之间的任何组合。但是,可以组合所有特征,以提供超过特征的简单加和的协同效应。

[0327] 尽管附图和前述说明书详细例示和描述了本发明,但是附图和前述说明书仅提供了不限制本发明的实例。所公开的实施方案不限制本发明。通过对附图、公开内容和从属权

利要求的研究,实践所要求保护的发明的技术人员可以理解并实施对所公开的实施方案的其它变动。

[0328] 权利要求中的任何附图标记不应被解释为将本发明的范围限制于附图中使用的示例性元件。

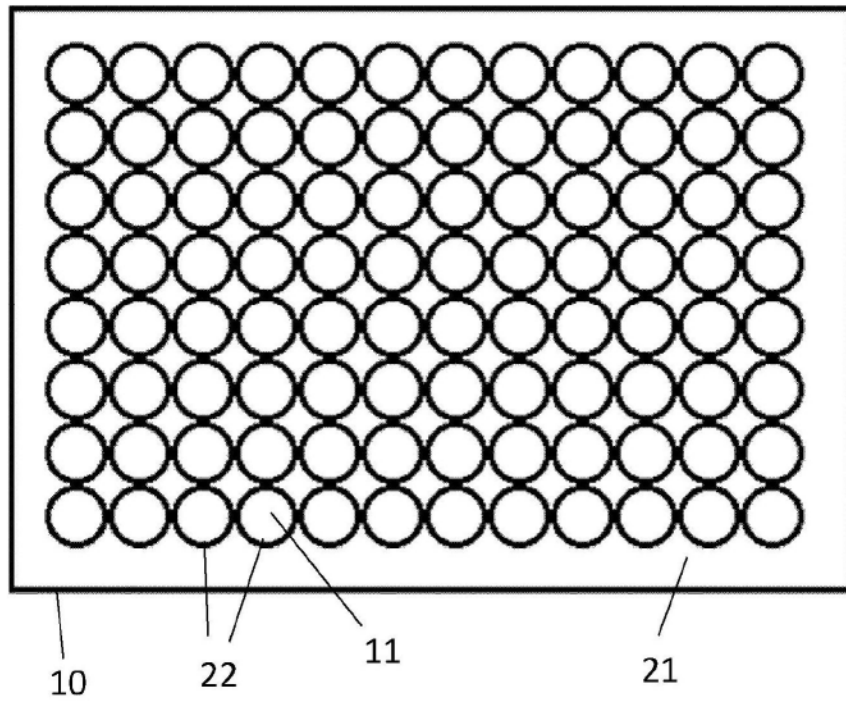


图1a

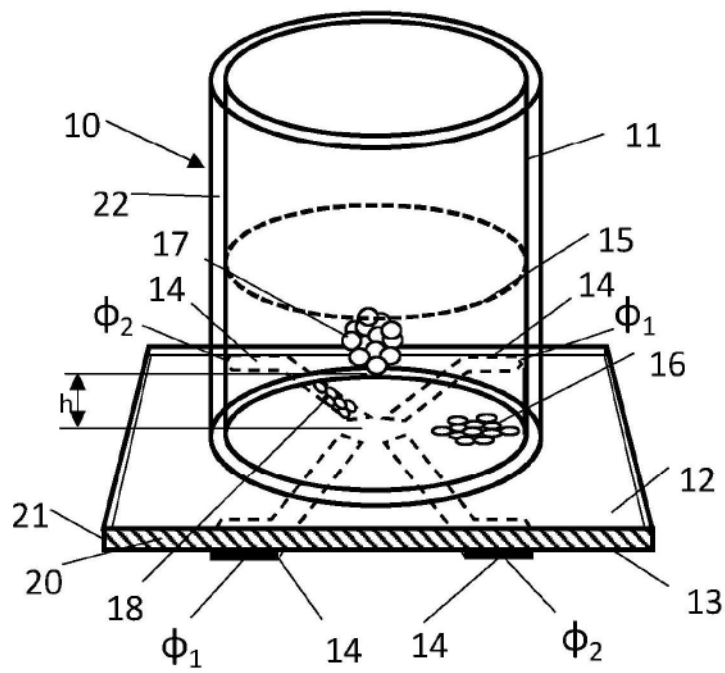


图1b

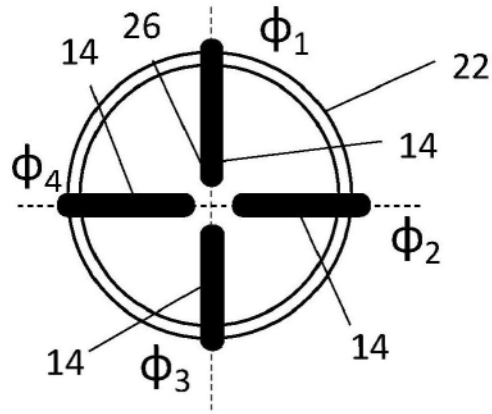


图2a

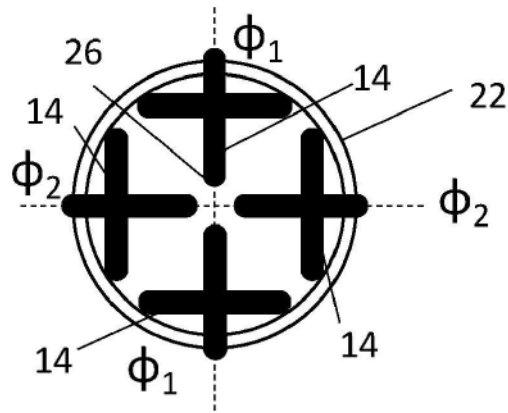


图2b

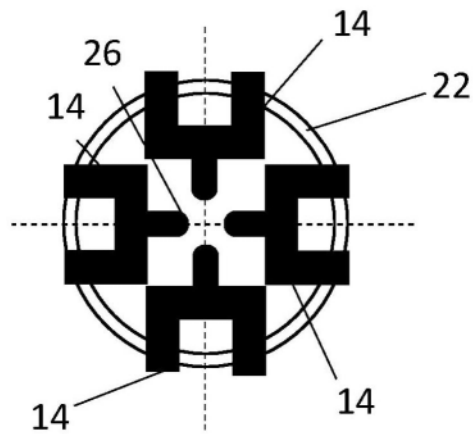


图2c

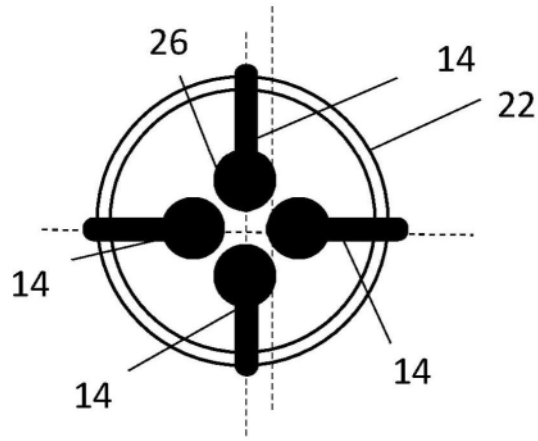


图2d

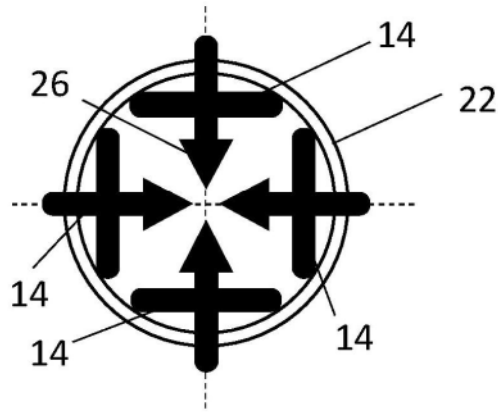


图2e

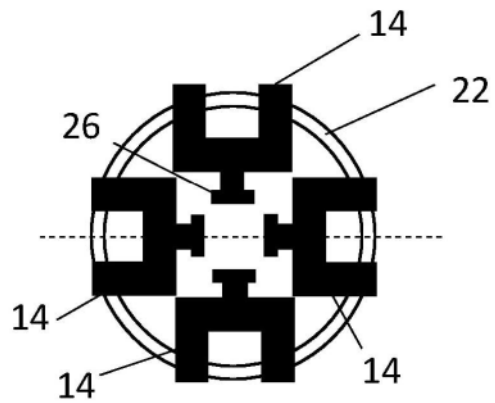


图2f

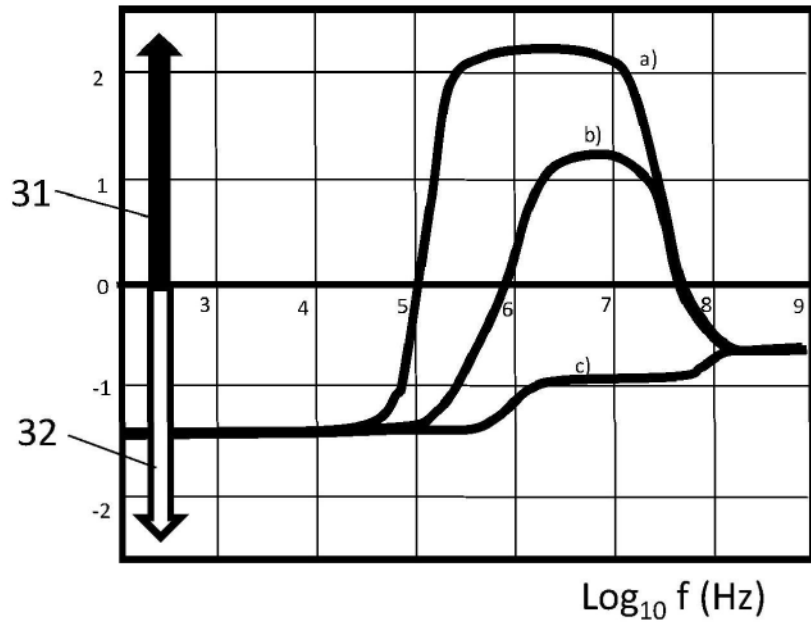


图3a

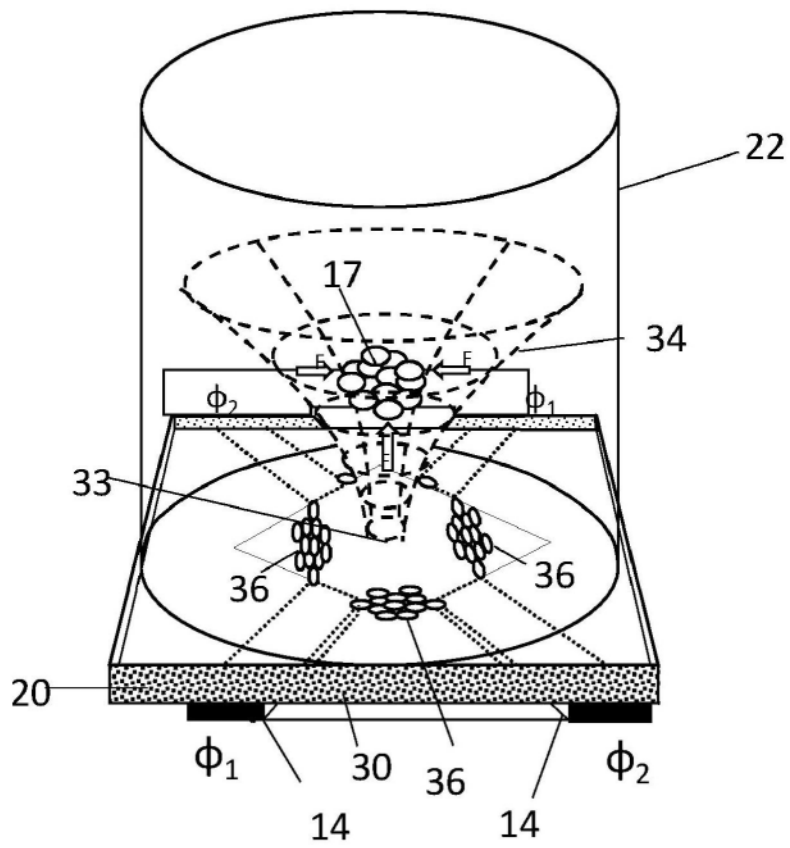
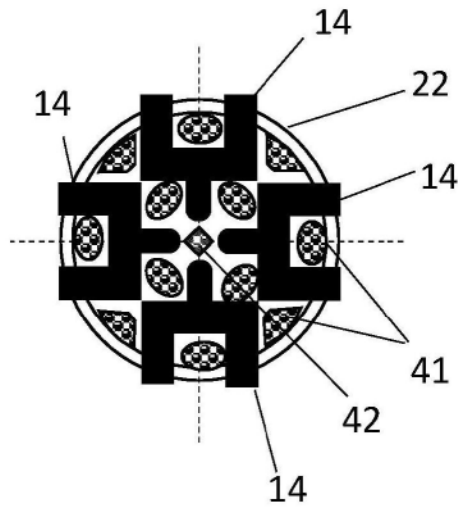
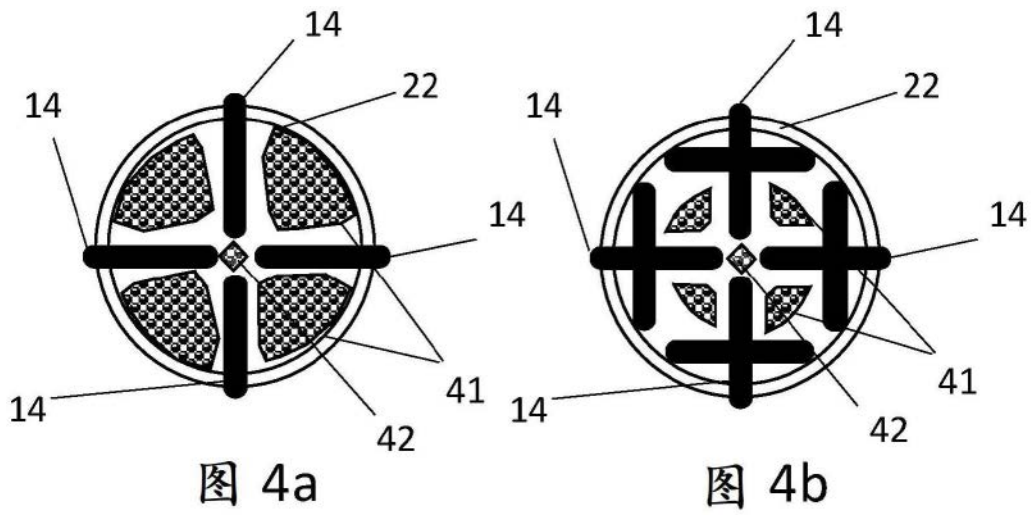


图3b



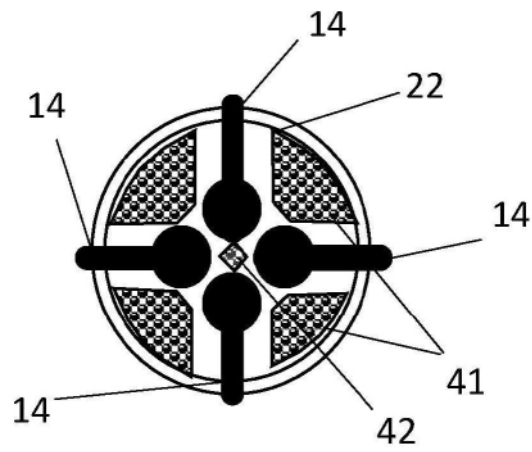


图4d

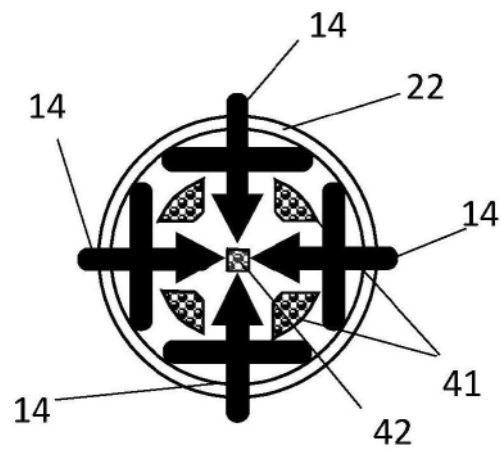


图4e

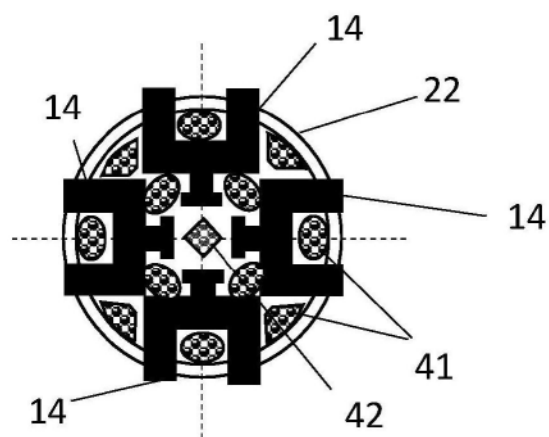


图4f

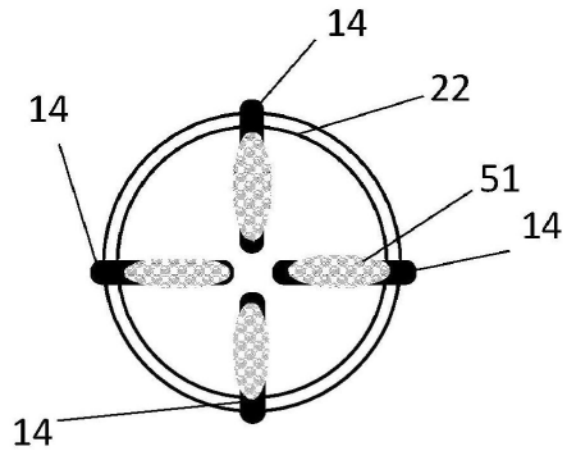


图5a

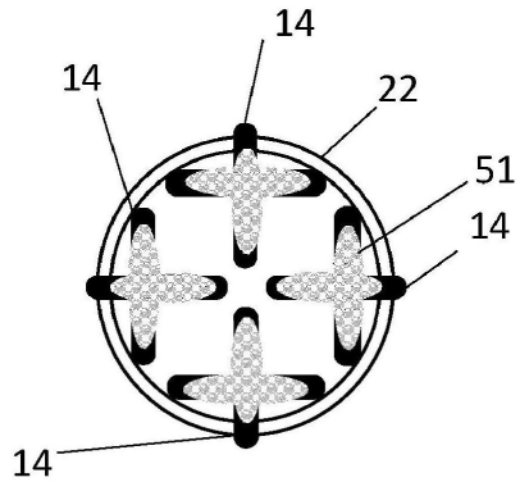


图5b

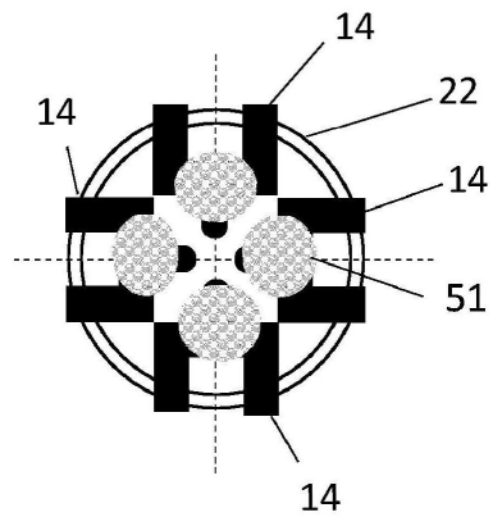


图5c

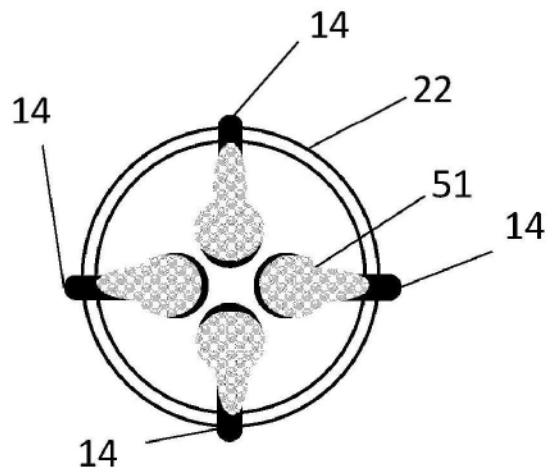


图5d

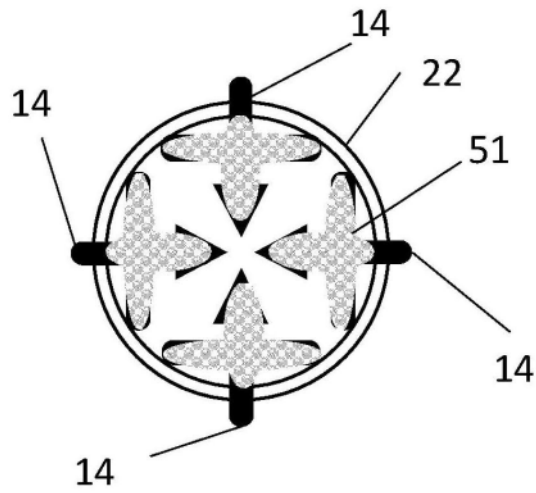


图5e

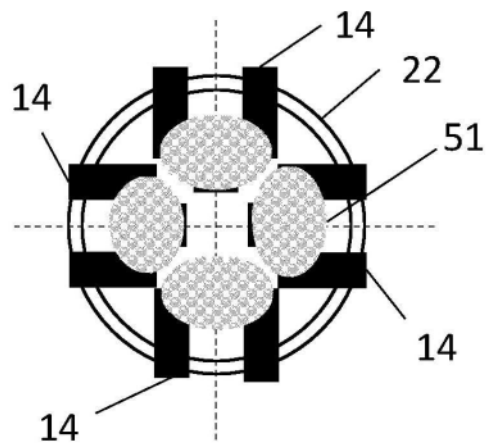


图5f

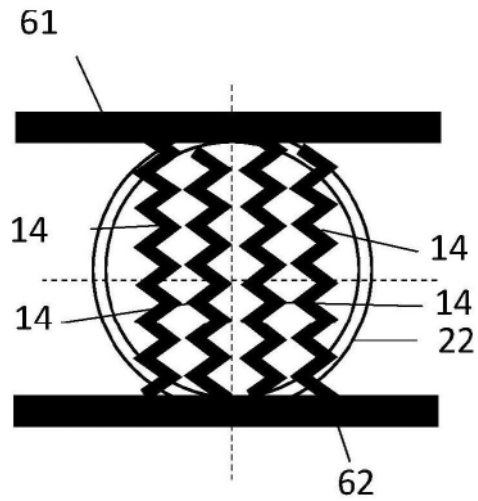
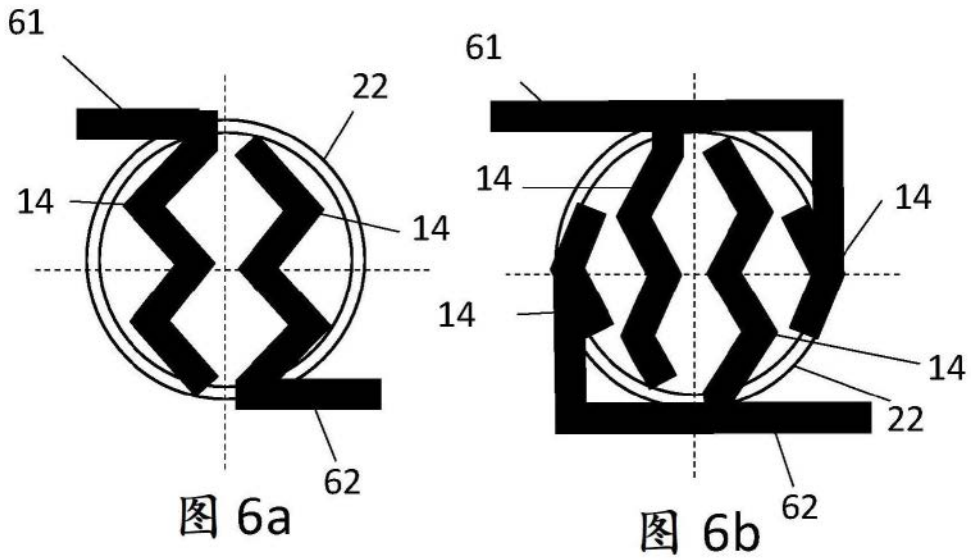


图6c

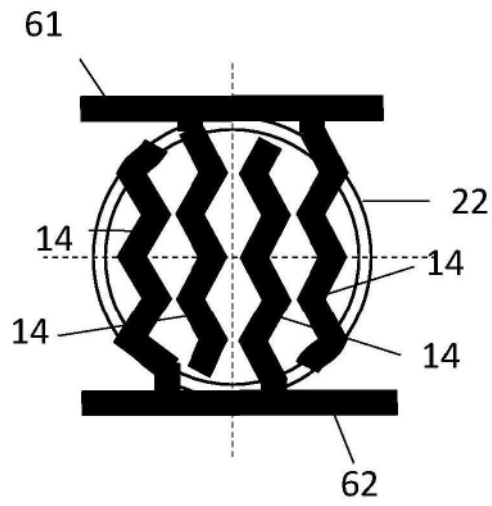


图6d

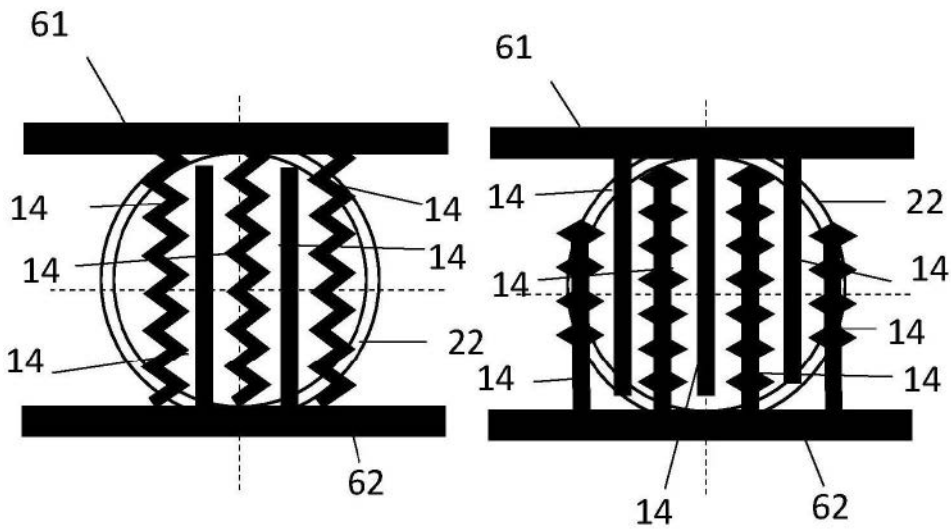


图 6e

图 6f

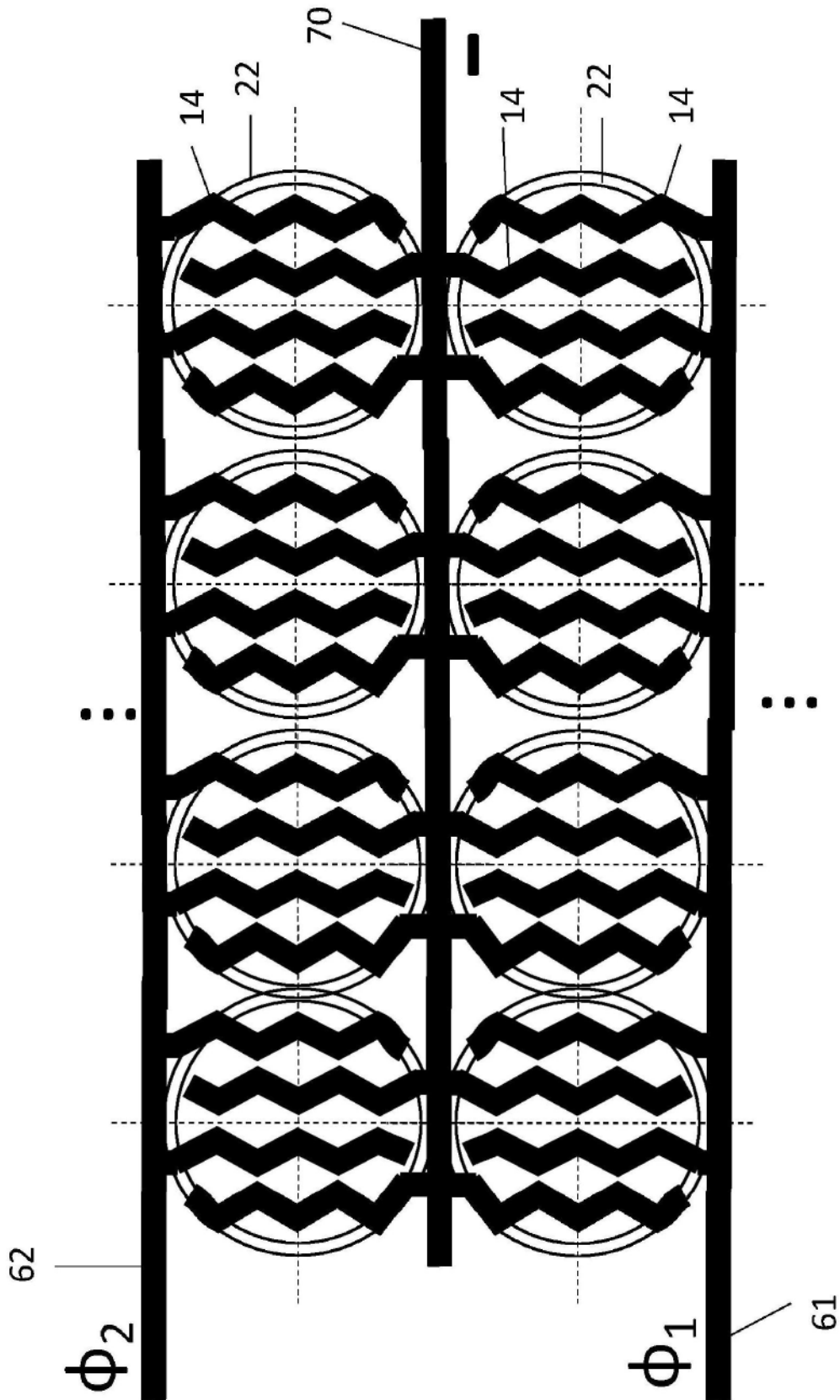


图7

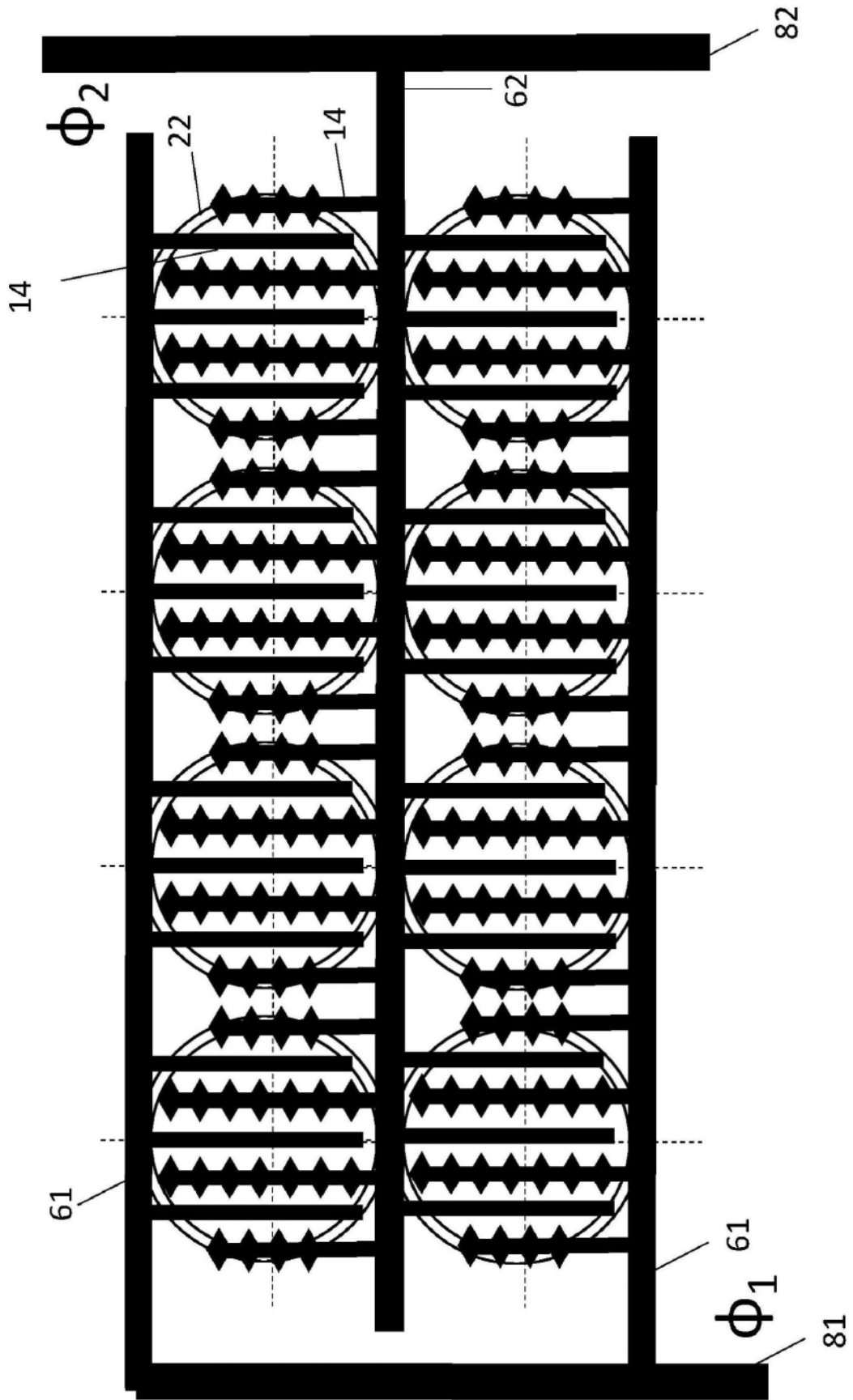


图8

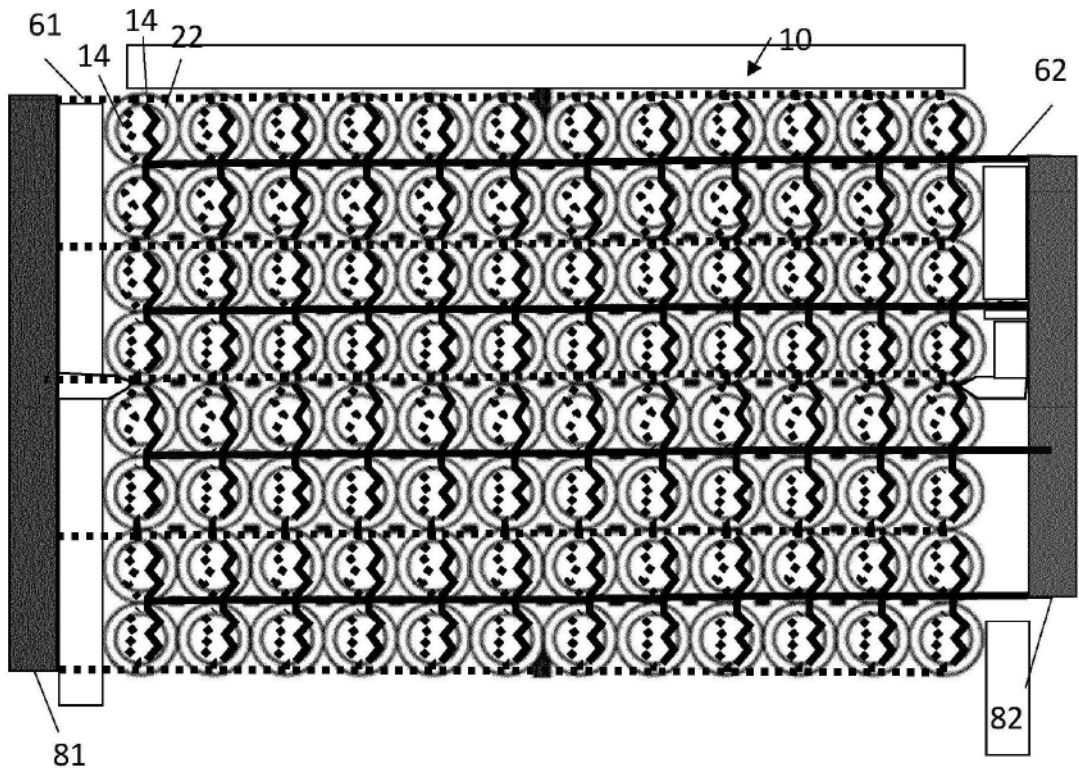


图9

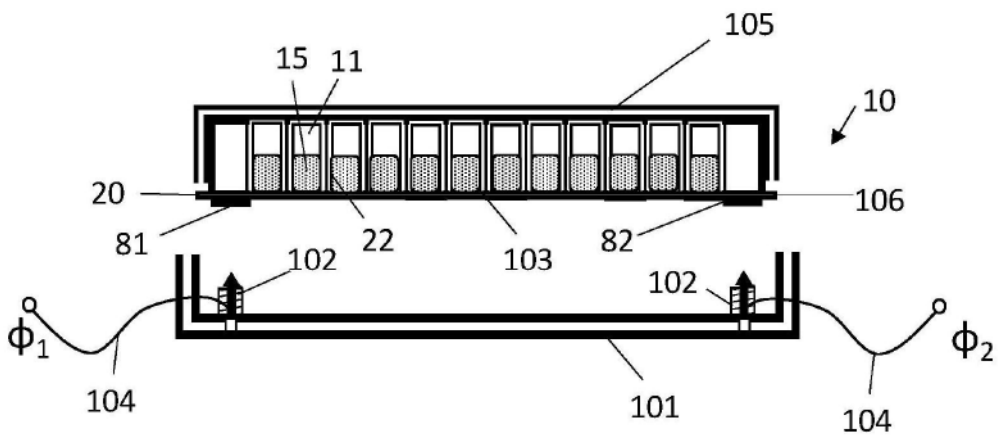


图10a

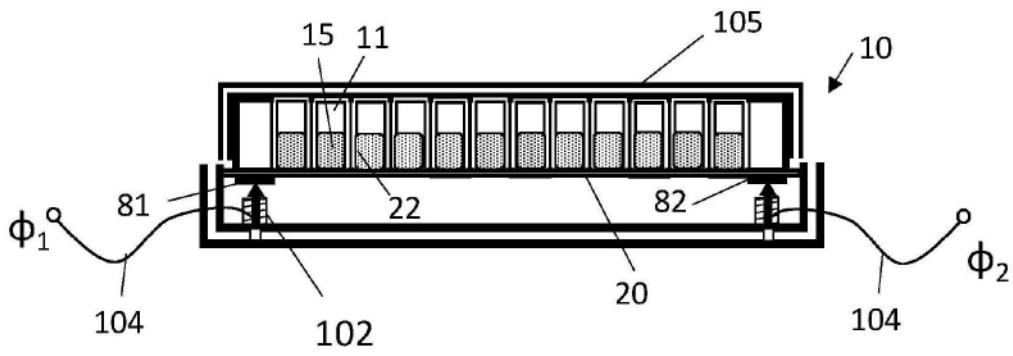


图10b

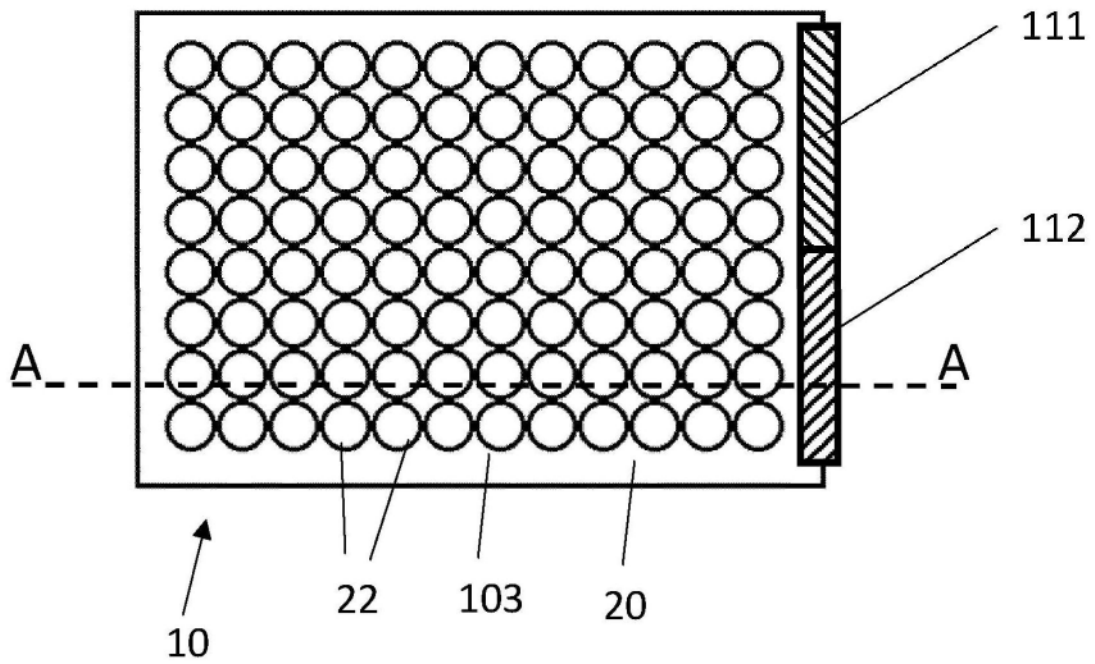


图11a

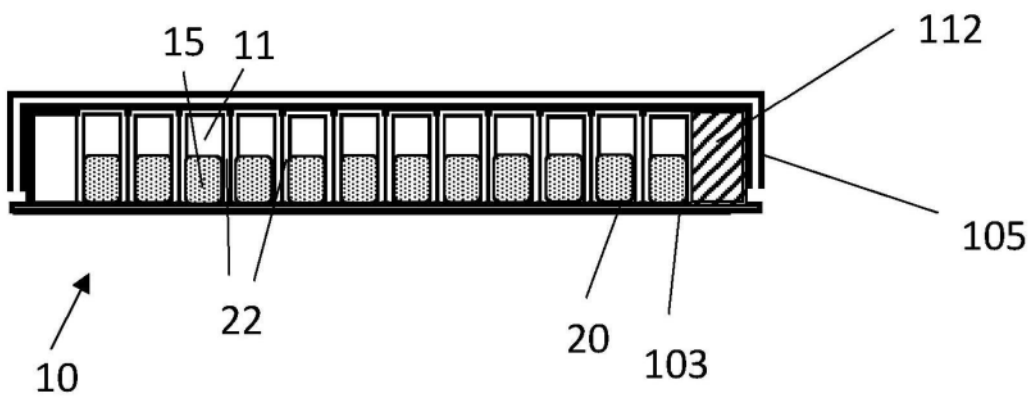


图11b

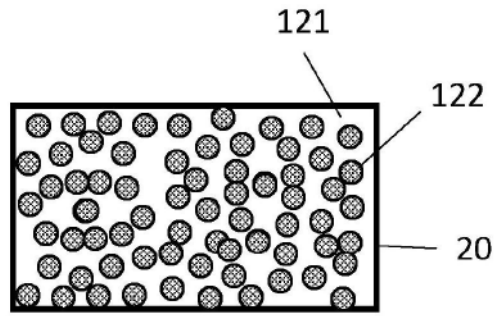


图12a

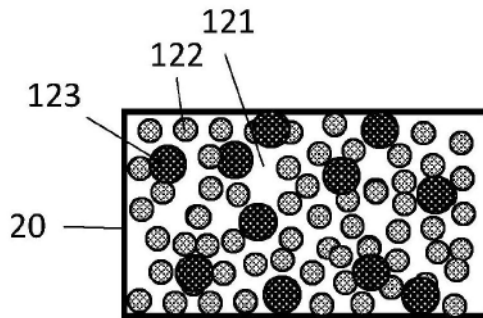


图12b

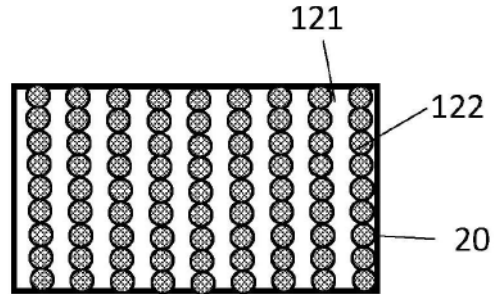


图12c

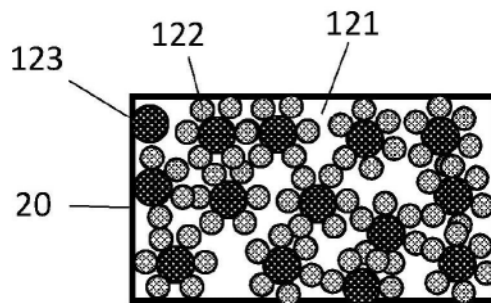


图12d

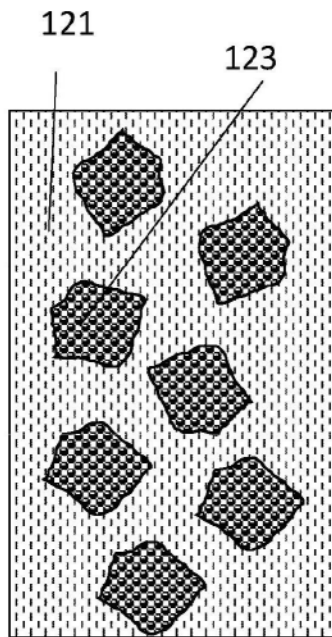


图13a

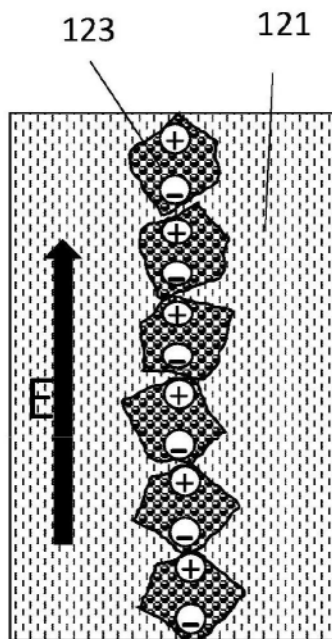


图13b

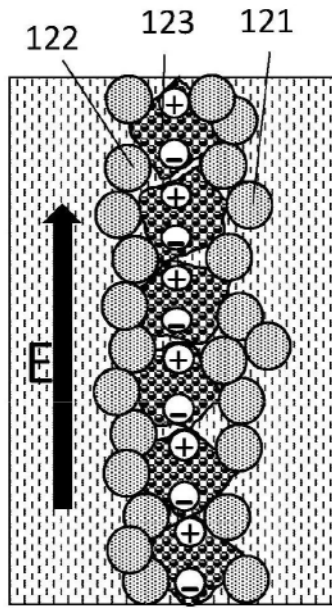


图13c

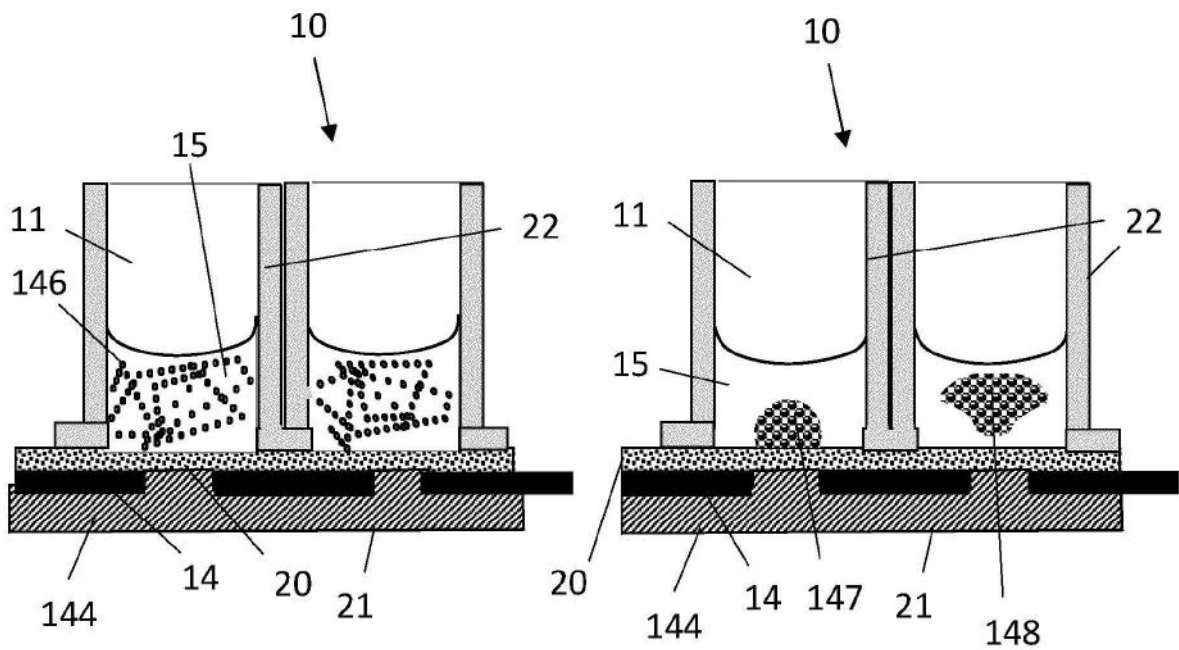


图 14a

图 14b

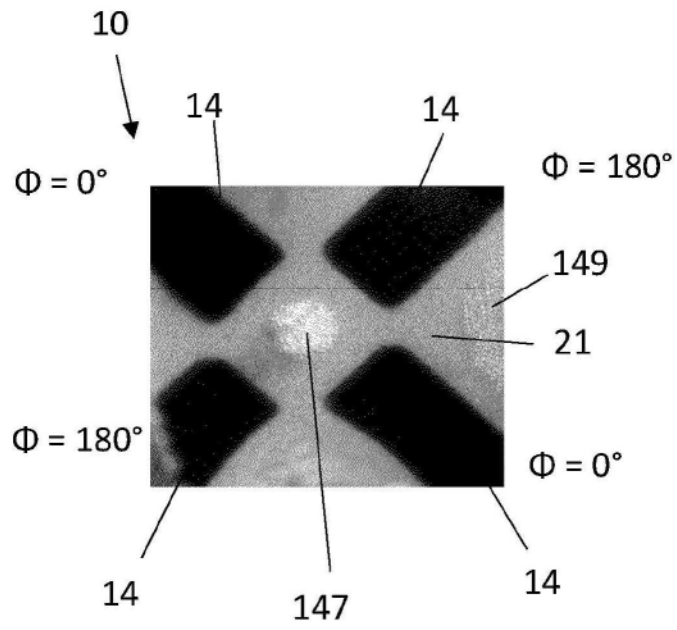


图14c

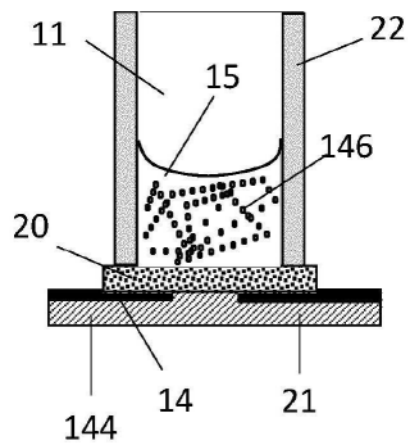


图15a

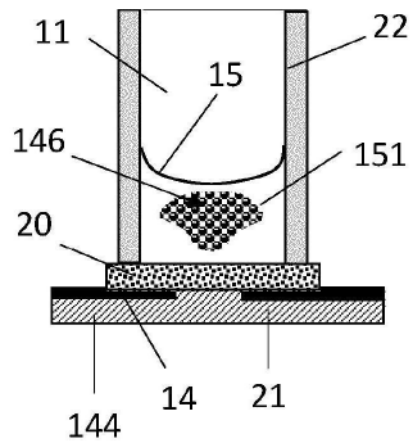


图15b

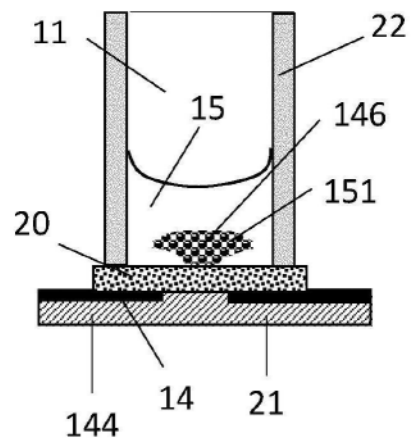


图15c

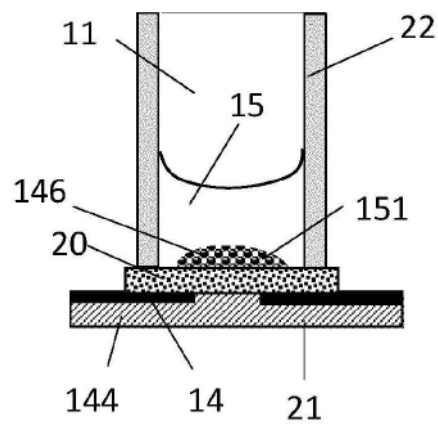


图15d

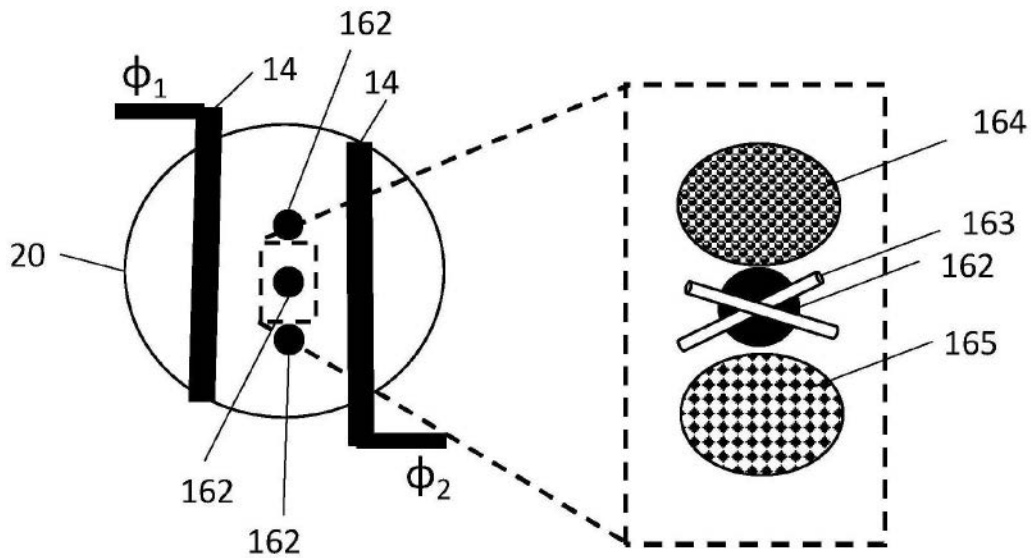


图 16a

图 16b

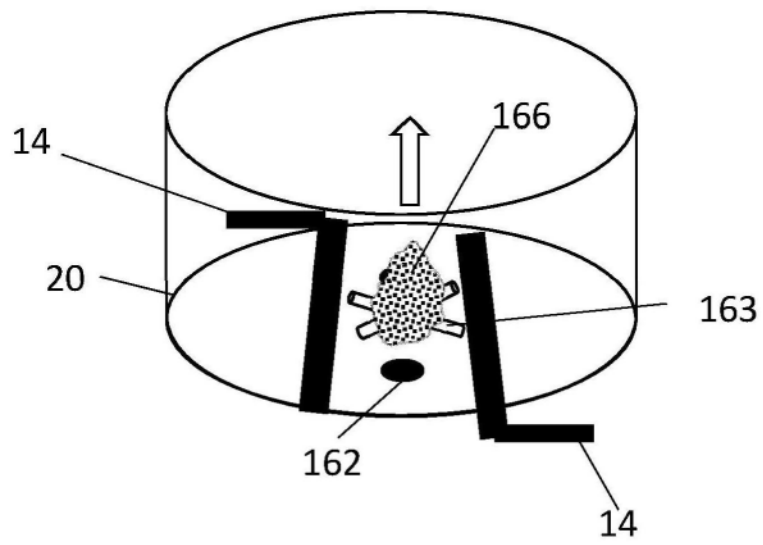


图16c

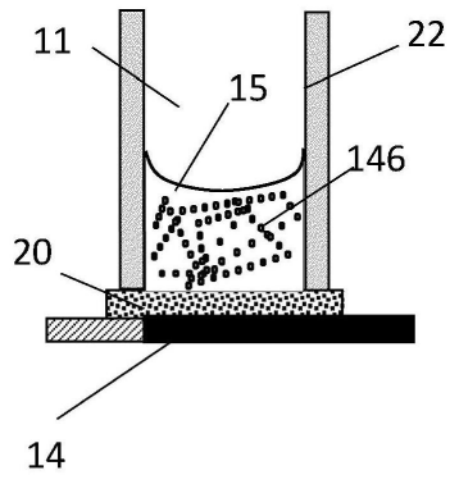


图17a

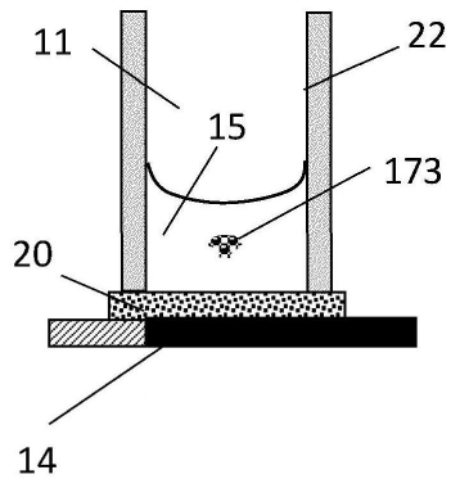


图17b

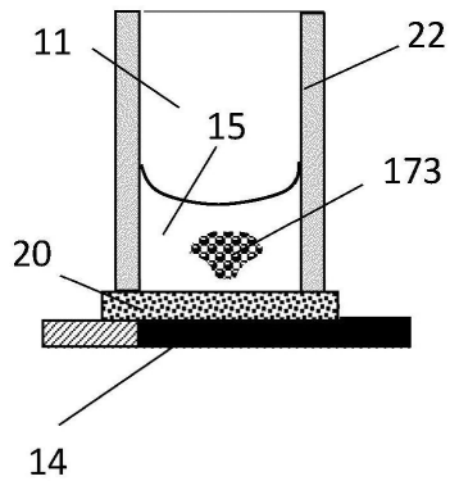


图17c

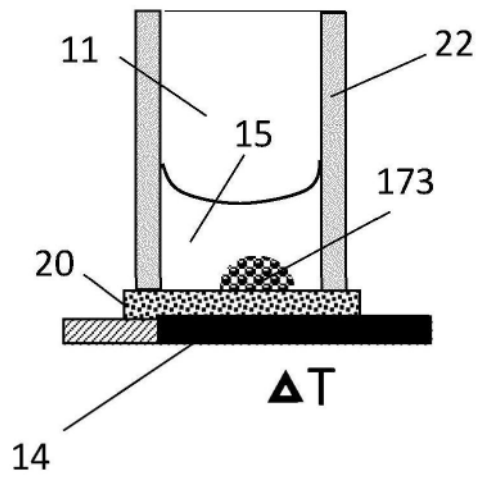


图17d

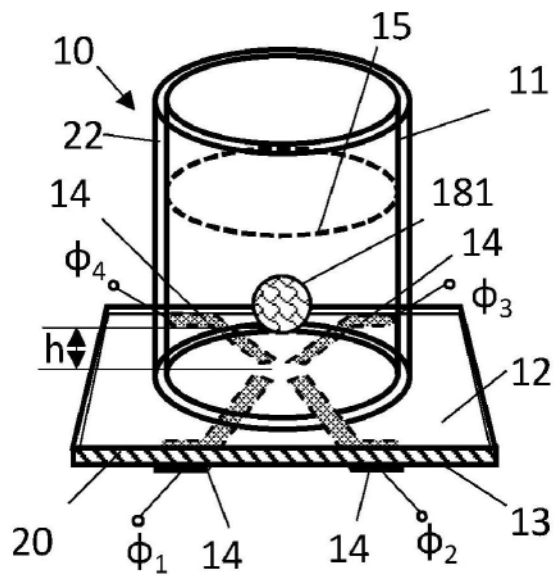


图18a

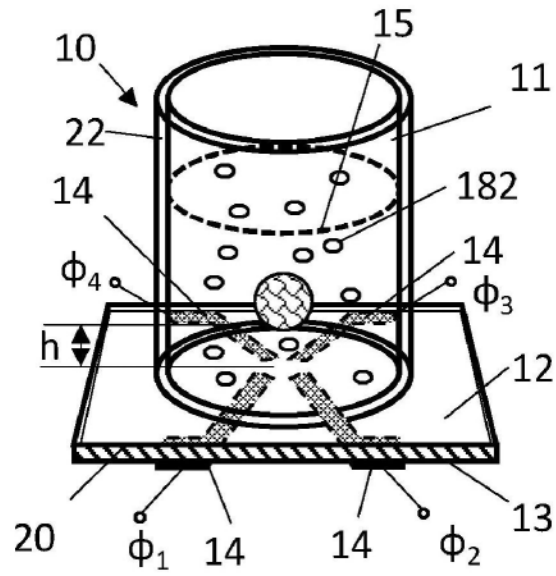


图18b

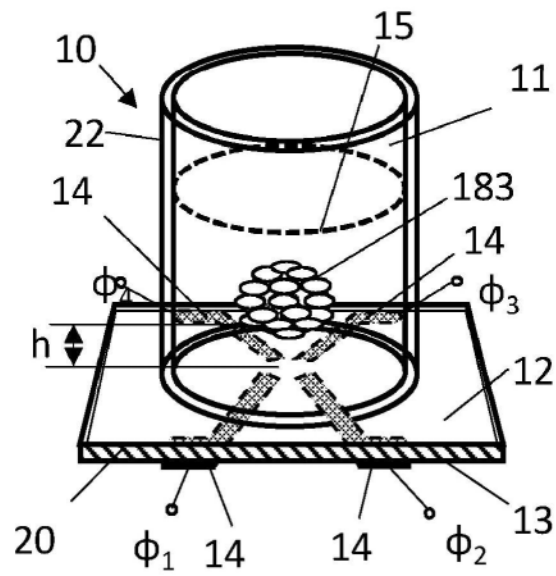


图18c

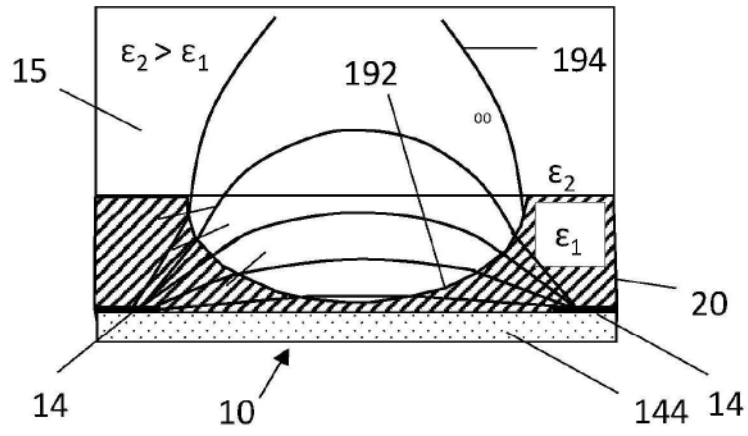


图19a

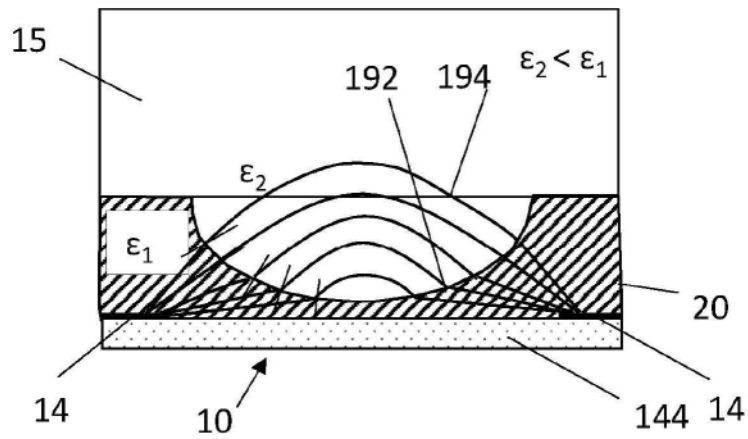
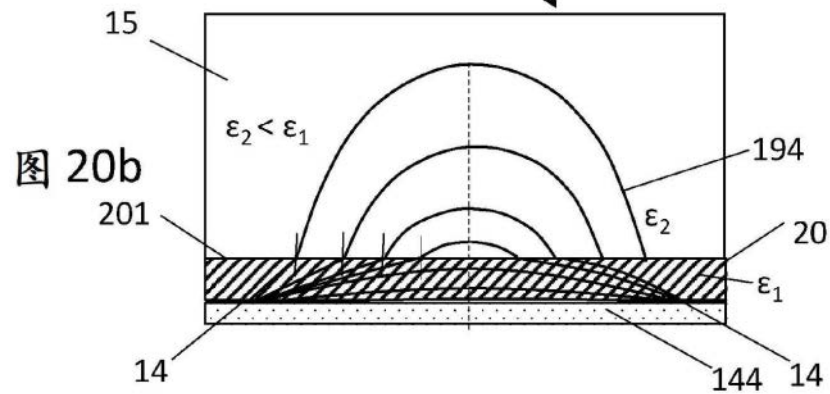
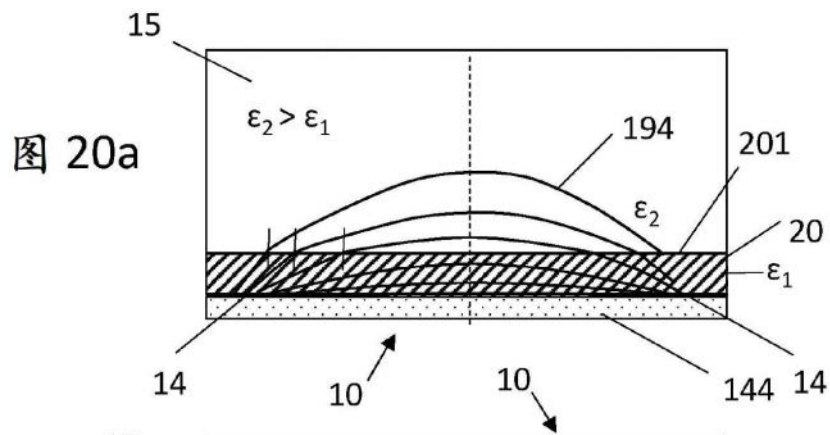
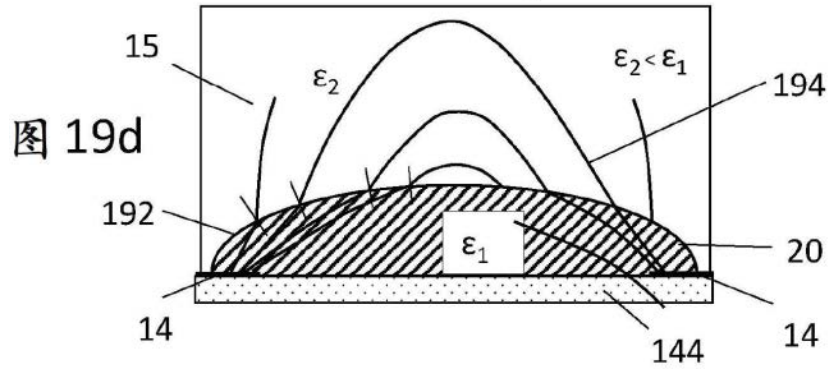
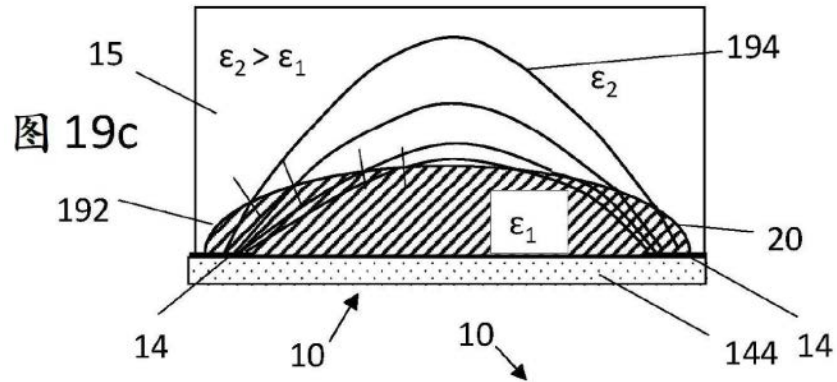


图19b



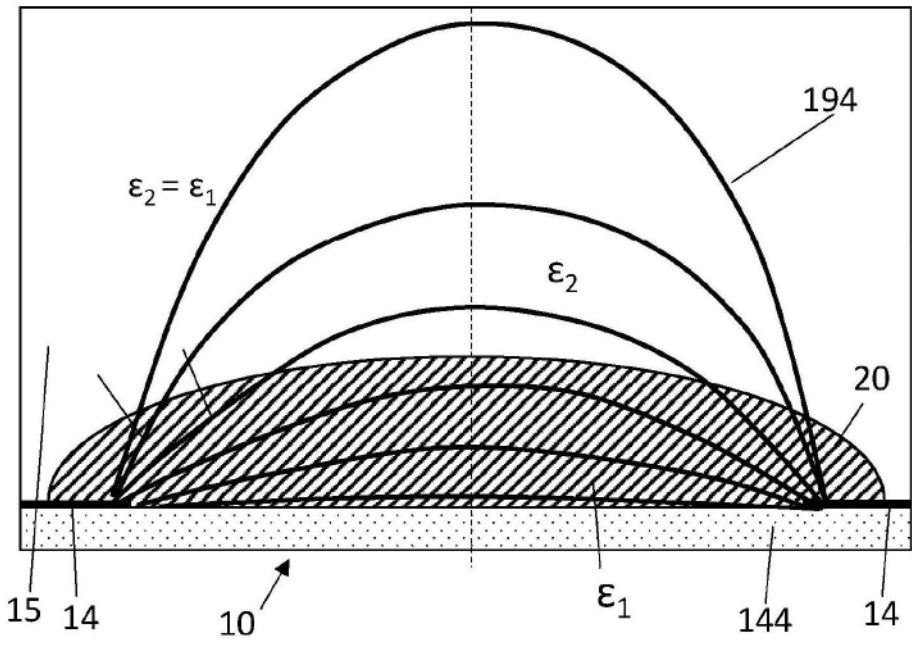
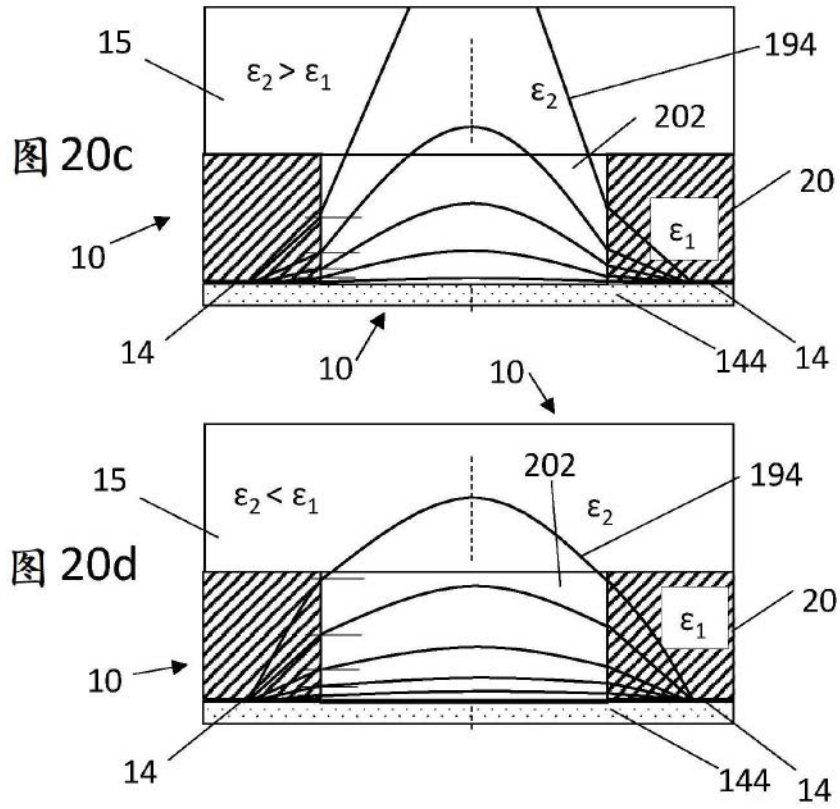


图21

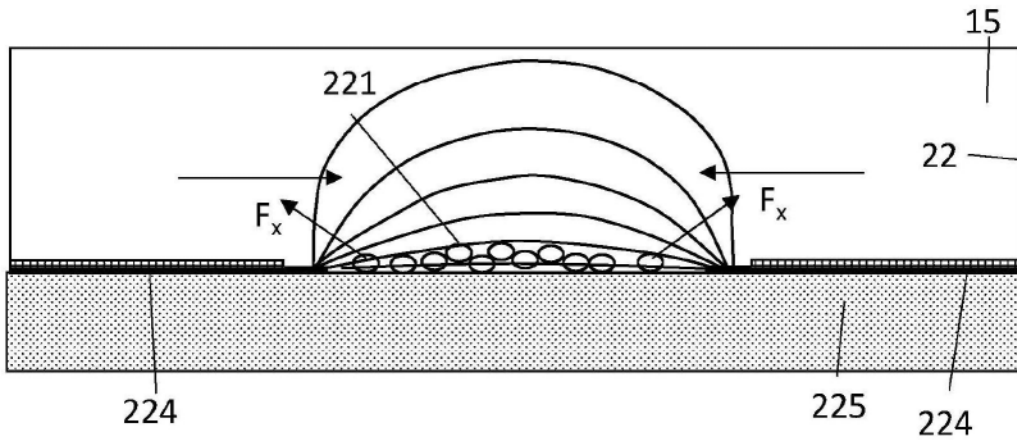


图22a(现有技术)

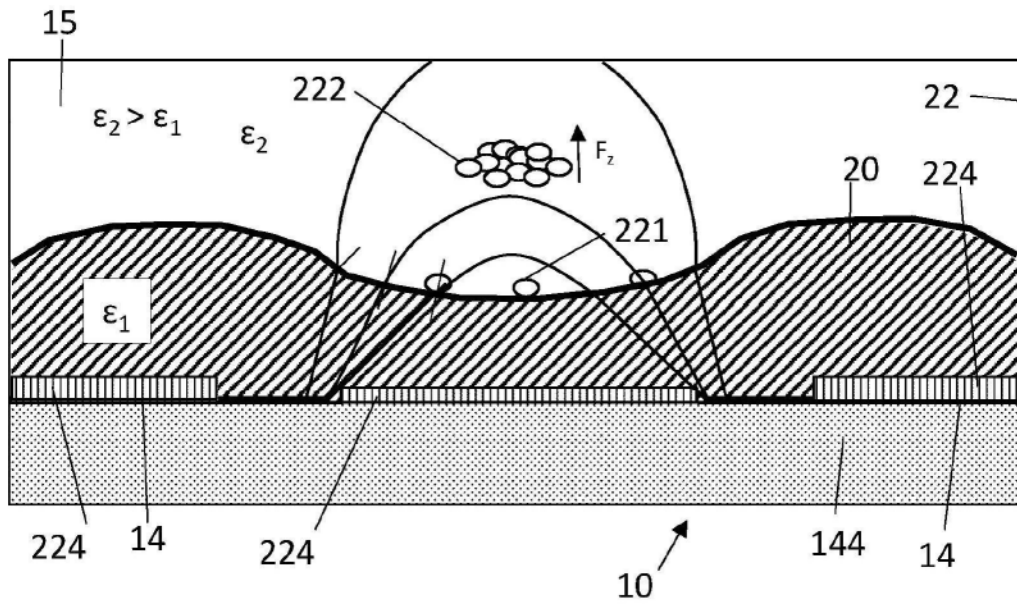


图22b

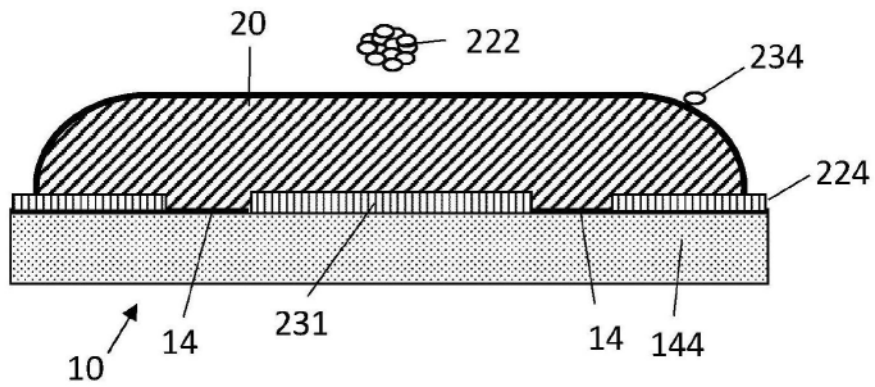


图23a

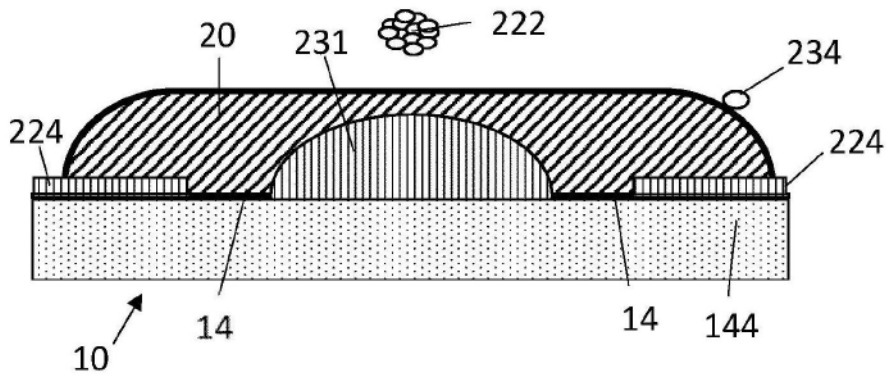


图23b

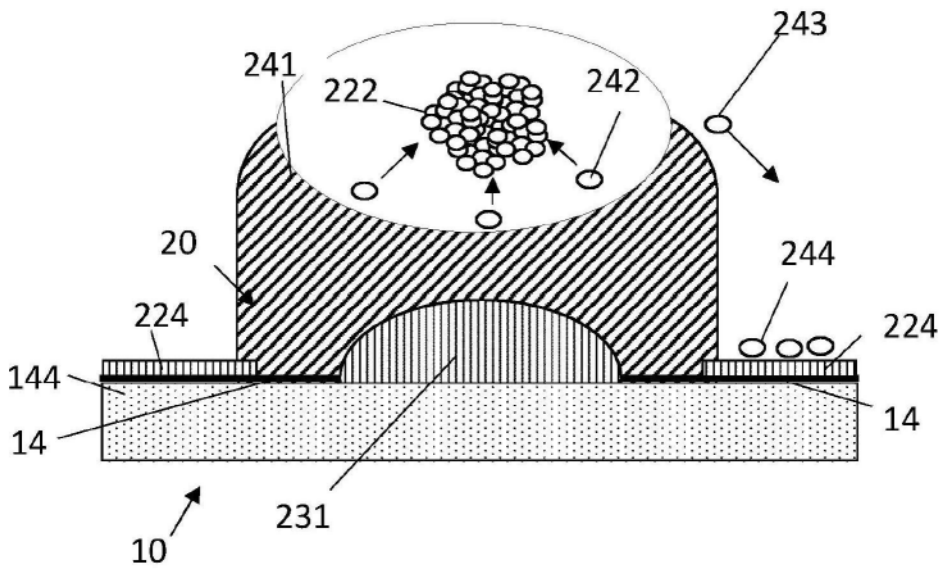


图24a

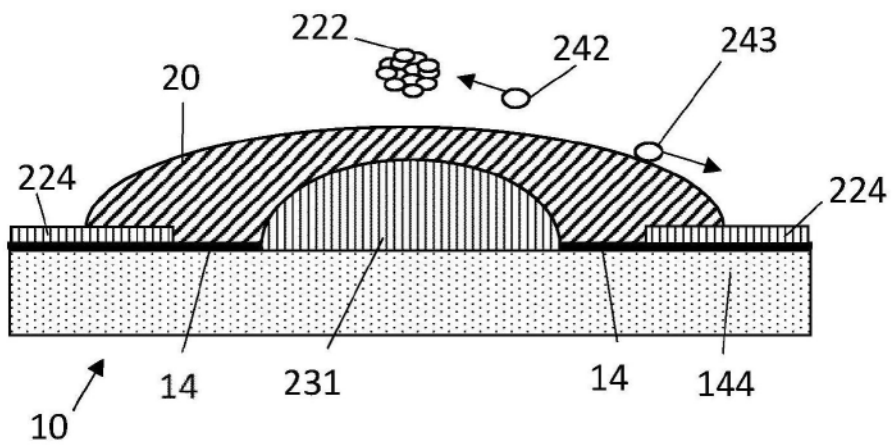


图24b

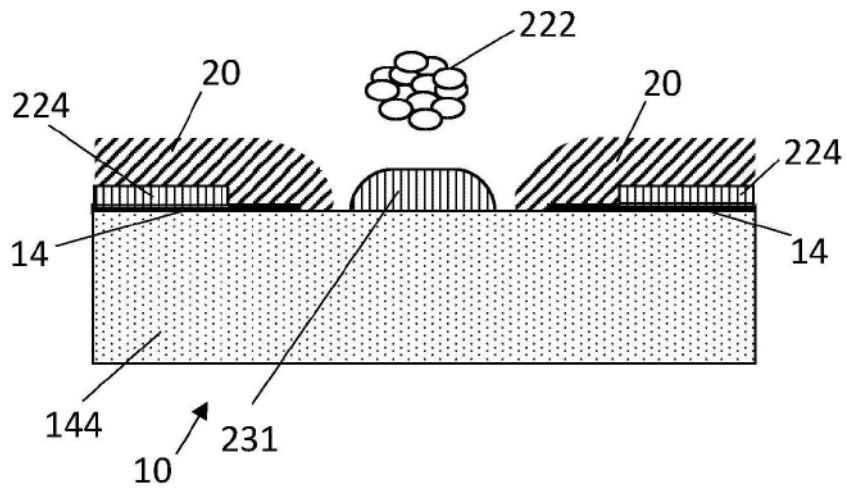


图25a

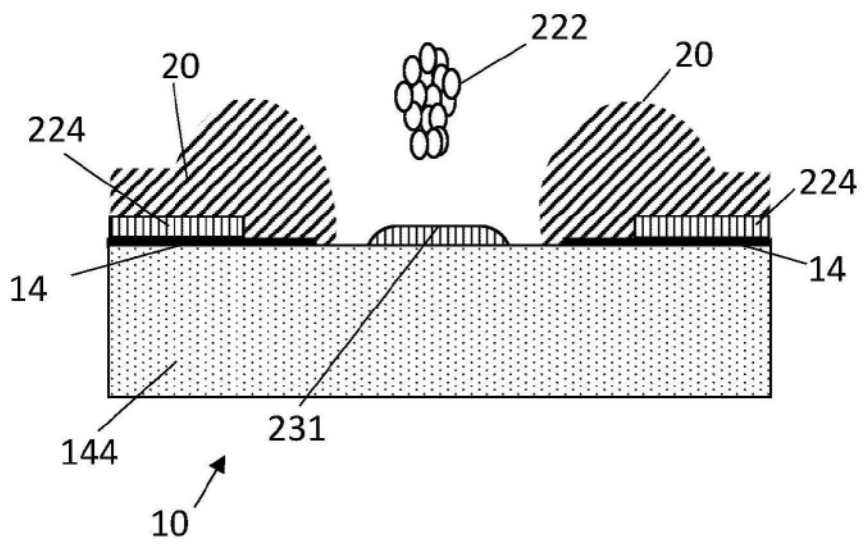


图25b

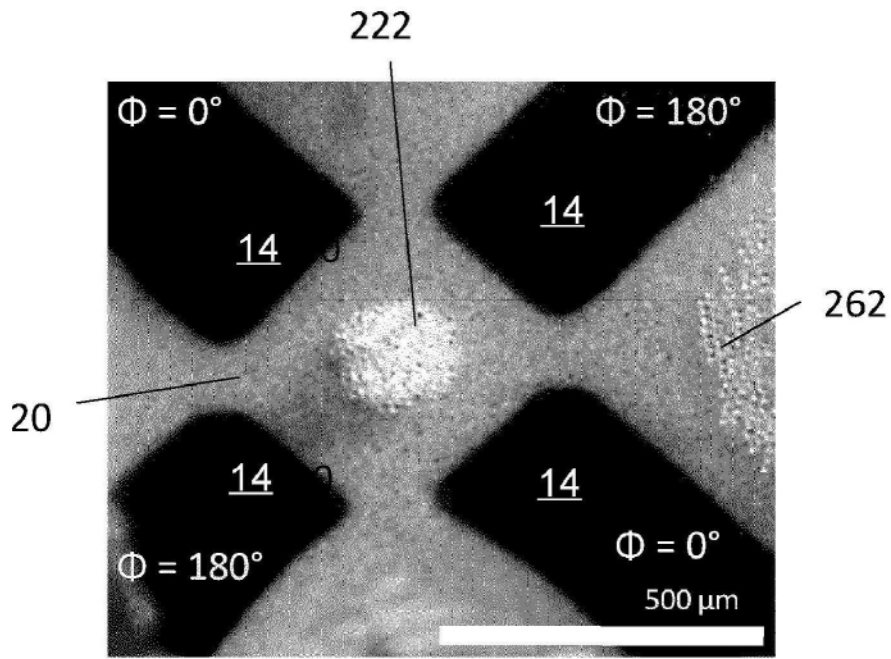


图26a

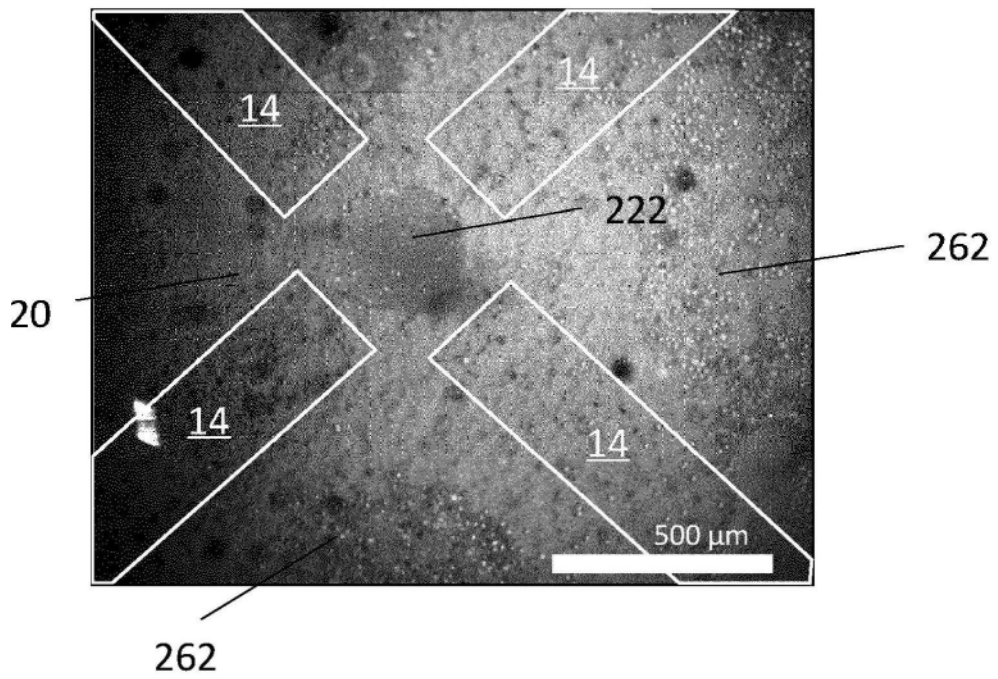


图26b

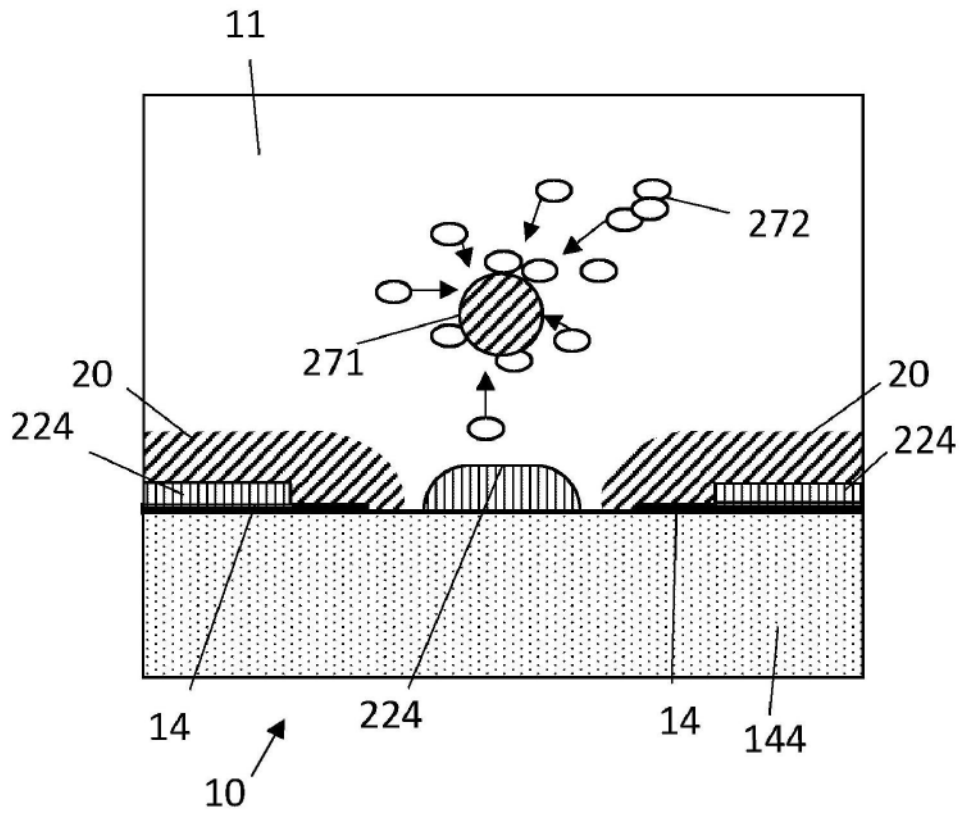


图27a

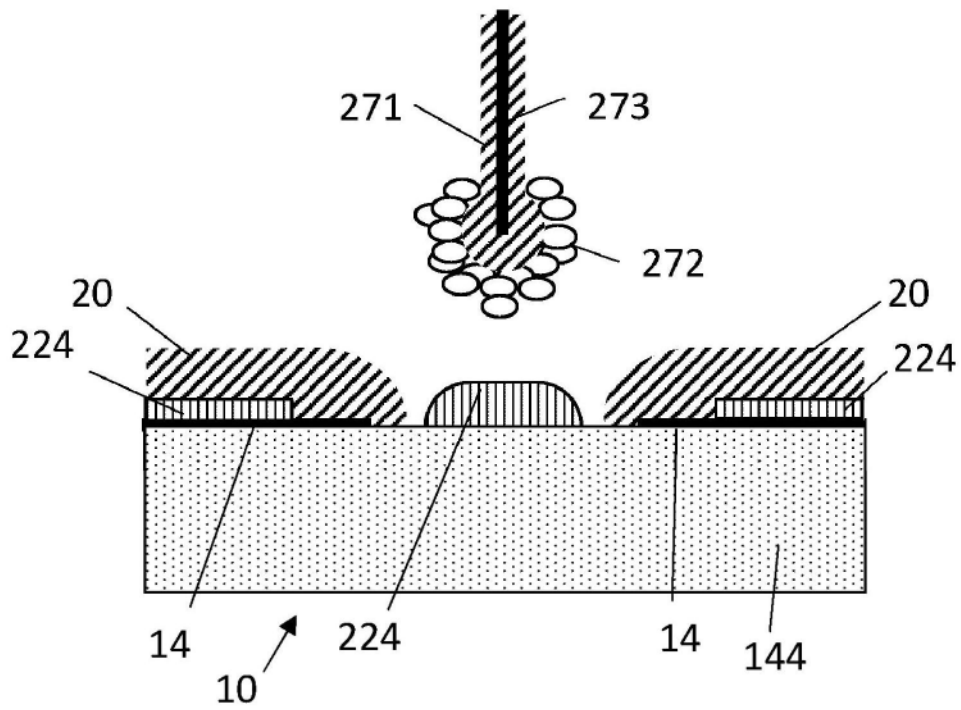


图27b

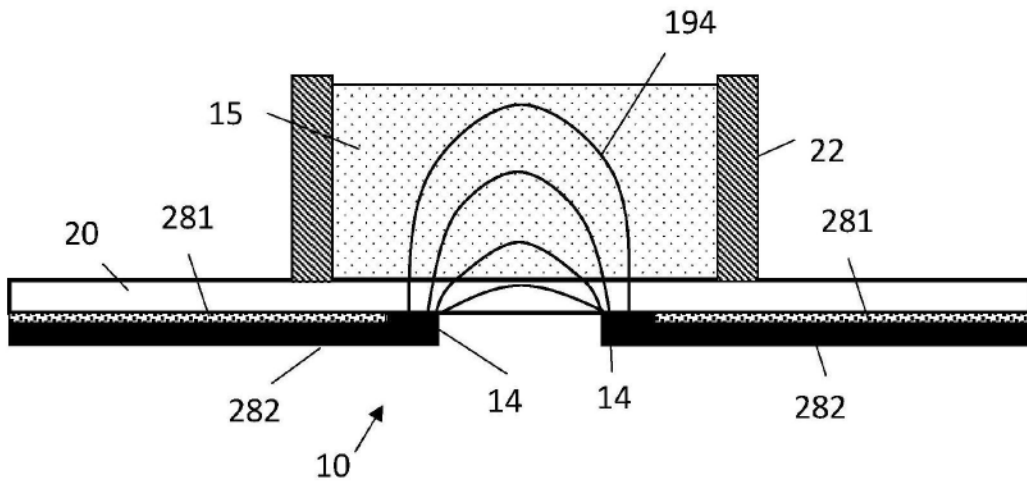


图28

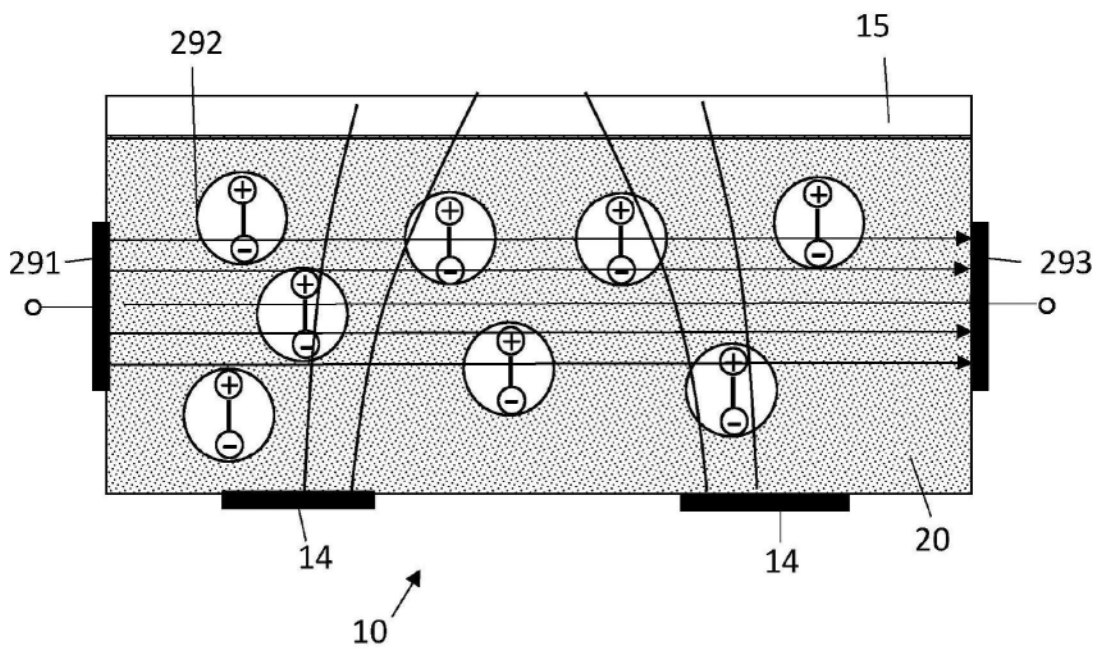


图29

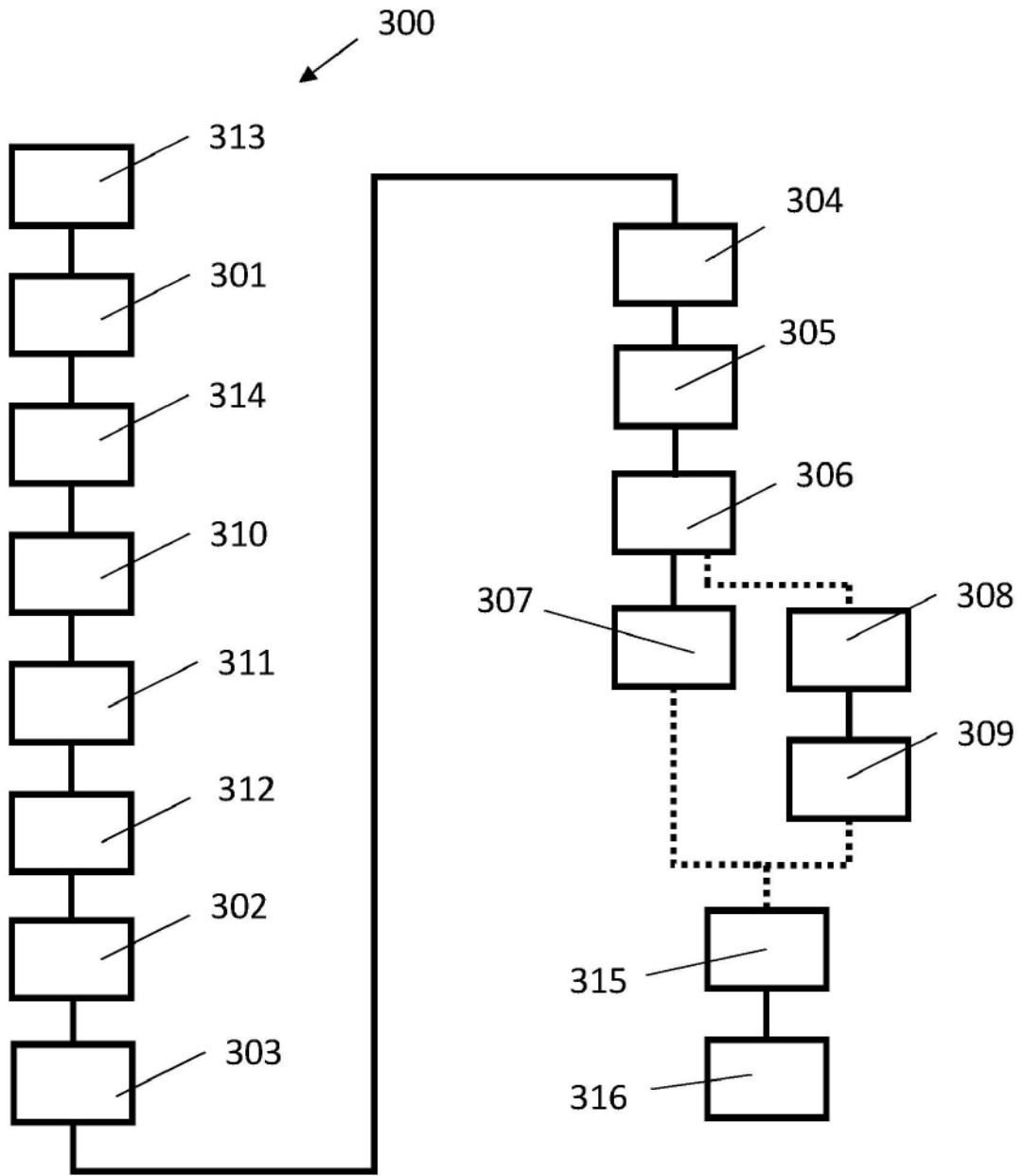


图30

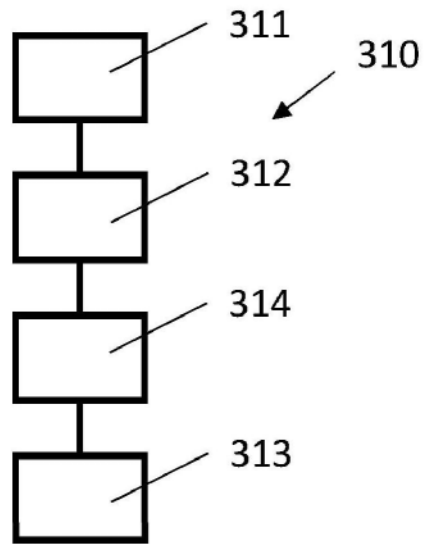


图31

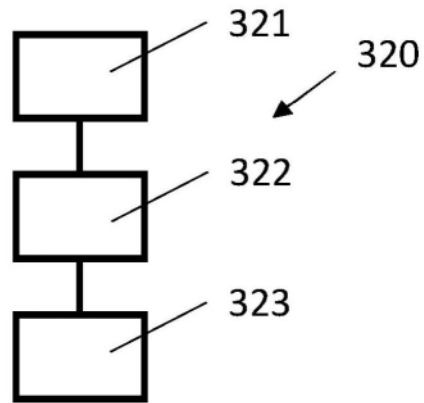


图32