



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111247237 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 201880068902.5

(22)申请日 2018.10.25

(30)优先权数据

10-2017-0145791 2017.11.03 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.22

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2018/012682 2018.10.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/088560 KO 2019.05.09

(71)申请人 韩国化学研究院

地址 韩国大田广域市

申请人 忠南大学校产学协力团

(72)发明人 姜善雄 许康茂 文盛焕 金多恩

吴惠珉 沈慧恩

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 钟锦舜 姜香丹

(51)Int.Cl.

C12M 1/00(2006.01)

C12M 1/34(2006.01)

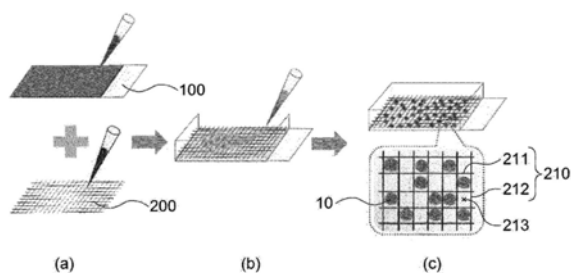
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

球状体形成及计数设备、其制造方法、以及利用该设备及方法的球状体培养方法和计数方法

(57)摘要

本发明的一个实施例公开一种球状体形成及计数设备,可包括基板和网孔部件,所述网孔部件形成可位于所述基板的表面,并具有多个突出部件。所述多个突出部件交错成网孔形态,从而可以形成多个孔隙(pore)。



1. 一种球状体形成及计数设备, 包括:
基板; 以及
网孔部件, 形成为能够位于所述基板的表面, 并具有多个突出部件,
其中, 所述多个突出部件交错成网孔形态, 从而形成多个孔隙。
2. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 所述网孔部件涂覆有己酰乙二醇壳聚糖。
3. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 所述孔隙的宽度为50至500 μm 。
4. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 所述基板的表面涂覆有己酰乙二醇壳聚糖。
5. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 所述基板为载玻片。
6. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 当所述网孔部件位于所述基板的表面时, 所述网孔部件的未形成所述突出部件的一个表面与所述基板的表面相接。
7. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 所述网孔部件与所述基板通过组装部件而彼此结合。
8. 根据权利要求1所述的球状体形成及计数设备, 其中, 所述突出部件包括:
多个第一突出部件, 沿第一方向延伸并彼此隔开布置; 以及
多个第二突出部件, 沿着与所述第一方向交叉的第二方向延伸, 并彼此隔开。
9. 一种球状体形成及计数设备的制造方法, 包括如下步骤:
溶液制造步骤, 制造己酰乙二醇壳聚糖溶液;
基板涂覆步骤, 将所制造的溶液喷射到基板, 然后将所述基板进行干燥, 从而涂覆所述基板;
网孔部件涂覆步骤, 将所制造的溶液喷射到网孔部件, 然后将所述网孔部件进行干燥, 从而涂覆所述网孔部件; 以及
组装步骤, 利用组装部件而将经涂覆的所述基板与网孔部件进行组装。
10. 根据权利要求9所述的球状体形成及计数设备的制造方法, 其中, 在所述网孔部件涂覆步骤中, 在所述网孔部件竖立而固定的状态下将所制造的溶液喷射到所述网孔部件。
11. 根据权利要求9所述的球状体形成及计数设备的制造方法, 其中, 所述己酰乙二醇壳聚糖溶液为0.01至1wt%。
12. 一种利用根据权利要求1至8中的任一项所述的球状体形成及计数设备的球状体培养方法, 包括如下步骤:
将多个细胞播种到所述设备; 以及
在经过数天之后, 获取在所述设备的各个孔隙中观察到的球状体。
13. 一种利用根据权利要求1至8中的任一项所述的球状体形成及计数设备的球状体计数方法, 包括如下步骤:
将球状体喷射到所述设备;
沿着与所述设备的一个表面平行的两个方向摇晃所述设备, 从而将球状体置于所述设备的各个孔隙;
将所述设备置于显微镜的载物台; 以及
在移动所述显微镜的像的位置的同时对视场内的球状体进行计数。

球状体形成及计数设备、其制造方法、以及利用该设备及方法的球状体培养方法和计数方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可将球状体以均匀的大小形成并对其计数的球状体形成及计数设备、以及利用该设备的球状体培养方法和计数方法。

背景技术

[0002] 体内的细胞和组织在以复杂的三维结构彼此作用的同时成长、分化和发展。然而，大部分的细胞培养却在二维的非渗透性的平整的平面上实现。因此，二维细胞培养存在着无法模拟人们体内的细胞环境条件的局限性。近来，作为一种具备有与生物体内同等的功能的三维细胞组织的球状体(spheroid)的培养受到瞩目。为了诱导用于治疗糖尿病的胰岛素的正常分泌，在将胰腺细胞进行移植的过程中，使用到将凝集的细胞进行移植的方法等，因此需要球状体的大量生产。此外，随着干细胞研究的成熟，尝试了将干细胞三维培养而应用于各种分化机制的研究的多种方法。作为现有技术中的三维细胞培养方法，存在着悬滴培养法(hanging-drop method)、旋转式培养法、离心分离法、微成型(micromolding)法等。然而，通过这种现有技术中的培养法来培养大小均匀的球状体存在局限性。

[0003] 进而，迫切需要一种用于更容易和准确地对这种球状体进行计数的设备，但是迄今为止尚不存在这种设备。

发明内容

[0004] 发明要解决的问题

[0005] 本发明的目的在于，解决如前所述的问题及与之相关联的其他问题。

[0006] 本发明的一个示例性目的在于，提供一种用于培养大小均匀的球状体的设备。

[0007] 本发明的另一示例性目的在于，提供一种用于更加简便和准确地计数球状体的设备。

[0008] 解决问题的方案

[0009] 根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备可包括：基板；网孔部件，形成能够位于所述基板的表面，并具有多个突出部件。

[0010] 在实施例中，所述多个突出部件可以交错成网孔形态，从而形成多个孔隙(pore)。

[0011] 在实施例中，所述网孔部件可涂覆有己酰乙二醇壳聚糖(Hexanoyl glycol chitosan)。

[0012] 在实施例中，所述孔隙的宽度可以是50至500 μm 。

[0013] 在实施例中，所述基板的表面可涂覆有己酰乙二醇壳聚糖。

[0014] 在实施例中，所述基板可以是载玻片。

[0015] 在实施例中，当所述网孔部件位于所述基板的表面时，所述网孔部件的未形成所述突出部件的一个表面可与所述基板的表面相接。

[0016] 在实施例中，所述网孔部件与所述基板可通过组装部件而彼此结合。

[0017] 在实施例中,所述突出部件可包括:多个第一突出部件,沿第一方向延伸并彼此隔开布置;多个第二突出部件,沿着与所述第一方向交叉的第二方向延伸,并彼此隔开。

[0018] 根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法可包括如下步骤:溶液制造步骤,制造己酰乙二醇壳聚糖溶液;基板涂覆步骤,将所制造的溶液喷射到基板,然后将所述基板进行干燥,从而涂覆所述基板;网孔部件涂覆步骤,将所制造的溶液喷射到网孔部件,然后将所述网孔部件进行干燥,从而涂覆所述网孔部件;组装步骤,利用组装部件而将经涂覆的所述基板与网孔部件进行组装。

[0019] 在实施例中,在所述网孔部件涂覆步骤中,可以在所述网孔部件竖立而固定的状态下将所制造的溶液喷射到所述网孔部件。

[0020] 在实施例中,所述己酰乙二醇壳聚糖溶液可以是0.01至1wt%。

[0021] 根据本发明的一个实施例的一种利用球状体形成及计数设备的球状体培养方法可包括如下步骤:将多个细胞播种(seeding)到所述设备;在经过数天之后,获取在所述设备的各个孔隙中观察到的球状体。

[0022] 根据本发明的一个实施例的一种利用球状体形成及计数设备的球状体计数方法可包括如下步骤:将球状体喷射到所述设备;沿着与所述设备的一个表面平行的两个方向摇晃所述设备,从而将球状体置于所述设备的各个孔隙;将所述设备置于显微镜的载物台;在移动所述显微镜的像的位置的同时对视场内的球状体进行计数。

[0023] 发明效果

[0024] 如果利用根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备,则无需特别的装备或者追加工序而能够以均匀的尺寸大量培养球状体,从而有望在可再生医疗或人工脏器、生物体有用物质生产、新药筛选、动物替代实验法等多领域的产业中得到利用。

[0025] 并且,由于根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备被己酰乙二醇壳聚糖(HGC:hexanoyl glycol chitosan)涂覆,以最大程度地减少与培养基表面的贴附,因此优点在于,在培养出3D球状体之后,能够简便地进行回收。

[0026] 而且,为了对球状体进行计数,可根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备放置于现有的容器中使用,因此无需配备专门用于计数的设备,所以费用得到节省,并又非常简便。

[0027] 另外,如前所述的技术效果是示例性的,对于本领域技术人员而言,可从本发明的细部构成中预料到或者期望到的效果也可以被附加到本申请发明所固有的技术效果中。

附图说明

[0028] 图1是用于全局性说明根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的图。

[0029] 图2为根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法的顺序图。

[0030] 图3和图4是用于说明根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法的图。

[0031] 图5为根据本发明的一个实施例的利用球状体形成及计数设备的球状体培养方法的顺序图。

[0032] 图6至图9是用于说明根据本发明的一个实施例的利用球状体形成及计数设备的球状体培养方法的图。

[0033] 图10为根据本发明的一个实施例的利用球状体形成及计数设备的球状体计数方法的顺序图。

[0034] 图11和图12是用于说明根据本发明的一个实施例的利用球状体形成及计数设备的球状体计数方法的图。

具体实施方式

[0035] 以下,参考附图详细说明本说明书中所述的实施例,但与附图标记无关地,对相同或类似的构成要素赋予相同的参考标记,并省略其重复说明。仅考虑到撰写说明书的容易性而赋予或者混用与以下说明中使用的构成要素相关的后缀“模块”和“部”,而它们自身不具有彼此区分的含义或作用。并且,在描述本说明书中公开的实施例的过程中,当认为对相关公知技术的具体说明有可能使本说明书中公开的实施例的要旨混淆时,省略其详细说明。此外,附图仅是为了便于理解本说明书中公开的实施例,本说明书中公开的技术思想并不受附图的限制,本发明的思想及技术范围中包含的所有变更、均等物乃至替代物都应该被理解为包含于本发明范围。

[0036] 第一、第二等包含序号的术语可用于说明多种构成要素,然而所述构成要素并不受所述的术语的限制。使用所述术语的目的仅在于将一个构成要素与另一构成要素加以区分。

[0037] 当提到一个构成要素“连接”或者“联接”到另一构成要素时,该构成要素可能直接连接或者联接到该其他构成要素,然而可以理解在中间也可能存在其他构成要素。反之,当提到一个构成要素与其他构成要素“直接连接”、“直接联接”时,应理解为中间不存在其他构成要素。

[0038] 除非上下文另外明确指出,否则单数的表述包括复数的表述。

[0039] 在本申请中,“包括”或者“具有”等术语旨在表明说明书中记载的特征、数字、步骤、操作、构成要素、部件或者其组合的存在性,不能理解为预先排除了一个或一个以上的其他特征或者数字、步骤、操作、构成要素、部件或其组合的可存在性或者可附加性。

[0040] 以下,参考附图而对根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备进行说明。

[0041] 图1是用于全局性说明根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的图。

[0042] 根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备可包括基板100和网孔部件200。

[0043] 基板100可由透光性材料构成。例如,基板100可以是载玻片。

[0044] 网孔部件200可形成为位于基板100的表面。

[0045] 例如,网孔部件200由柔性材料构成,而且可构成为以展开的状态覆盖所述基板100的表面。

[0046] 并且,网孔部件200可具有多个突出部件210。多个突出部件210可交错成网孔形态,从而形成多个孔隙(Pore)213。

[0047] 具体而言,所述突出部件210可包括:多个第一突出部件211,沿第一方向延伸并彼此隔开布置;多个第二突出部件212,沿着与所述第一方向交叉的第二方向延伸,并彼此隔开。多个第一突出部件211相对于彼此而平行,同样地,多个第二突出部件212也可以相对于

彼此而平行。

[0048] 另外,多个孔隙213可构成适于各个孔隙213容纳一个球状体10的大小。例如,孔隙213的宽度可以是50至500 μm ,更为优选地,可约为140 μm 。在孔隙213的宽度为140 μm 的情况下,能够以多样的细胞实验中最适当地使用的大小培养球状体。

[0049] 更加具体地,网孔部件200的一个表面可不形成突出部件210,另一表面可形成突出部件210。在此情况下,当网孔部件200位于基板100的表面时,所述网孔部件200的未形成突出部件210的一个表面可被定位为与基板100的表面相接。

[0050] 如此叠放的基板100和网孔部件200可通过专门的组装部件而彼此结合或者固定。

[0051] 另外,对于根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备而言,其内部表面可涂覆有己酰乙二醇壳聚糖(Hexanoyl glycol chitosan;HGC)。

[0052] 更加具体地,球状体形成及计数设备的基板100和网孔部件200可分别涂覆己酰乙二醇壳聚糖。

[0053] 以下,参考所述附图而对根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法进行详细说明。

[0054] 图2为根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法的顺序图。图3和图4是用于说明根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法的图。

[0055] 根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的制造方法可包括溶液制造步骤S110、基板涂覆步骤S120、网孔部件涂覆步骤S130、基板和网孔部件固定步骤S140。

[0056] 在溶液制造步骤S110中,制造己酰乙二醇壳聚糖(HGC)溶液。在一个实施例中,如下制造HGC溶液。

[0057] 将经加压灭菌处理的蒸馏水(Distilled water;DW)用0.2 μm 过滤器进行过滤,从而执行了去除细菌等的过程。将所述经处理的蒸馏水20ml移入到50ml管中,然后将计量的HGC 0.1g添加到管中。将包含有所述HGC的蒸馏水进行冷藏贮存(4 $^{\circ}\text{C}$),并每隔1小时一次地掺混(vortexing)1至2分钟。直到HGC完全溶解而成为HGC溶液为止,耗用了约为3至4天左右的时间。

[0058] 此时,HGC溶液的浓度可以是0.01至1wt%,优选地,可以约为0.5wt%。

[0059] 然后,在基板涂覆步骤S120中,将制造的HGC溶液喷射到基板100,然后将所述基板100进行干燥而将基板100进行涂覆。

[0060] 根据一个实施例的基板(载玻片;100)涂覆过程如下。将1ml式注射器的针头部分去除,然后将HGC溶液取出400ml。将先前计量的400ml的HGC溶液洒在载玻片(5.6cm $\times$ 2.6cm)以使溶液均匀扩散。将完成上述过程的载玻片在55 $^{\circ}\text{C}$ 的烤箱中干燥一天左右。

[0061] 然后,在网孔部件涂覆步骤S130中,将制造的HGC溶液喷射到网孔部件200,然后将所述网孔部件200进行干燥,从而涂覆网孔部件200。

[0062] 在所述网孔部件涂覆步骤S130中,可在所述网孔部件200竖立而固定的状态下将所制造的溶液喷射到所述网孔部件200。

[0063] 如图3所示,可利用固定架而将网孔竖立而固定。具体而言,所述固定架300可包括主体310、固定部320及固定杆330。网孔部件200可通过固定部320而被固定于主体310。主体310可通过固定杆330而被定位成与地面隔开。另外,所述固定架300可以是铁制干燥架。

[0064] 此时,之所以将网孔部件200竖立而固定,原因是为了当涂覆网孔部件200时,防止

网孔部件200的孔隙213因HGC溶液(涂覆溶液)而堵塞。

[0065] 然后,利用1ml移液管而将HGC溶液均匀地洒在被固定的网孔部件200。

[0066] 将完成了上述过程的网孔部件200在竖立而固定的状态下在清洁实验台中干燥一天。

[0067] 在基板和网孔部件固定步骤S140中,可利用组装部件而将经涂覆的基板100与网孔部件200进行组装。

[0068] 例如,将完成所述涂覆过程的网孔部件200切割成 $5.6\text{cm} \times 2.6\text{cm}$ 的大小,然后放置在完成了上述涂覆过程的载玻片上。如图4所示,它们利用固定部件而被固定。所述固定部件可以是夹子。

[0069] 以下,参考所述附图而对利用如上所述地制造的球状体形成及计数设备的球状体培养方法进行说明。

[0070] 图5为利用根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的球状体培养方法的顺序图。图6至图9是用于说明利用根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的球状体培养方法的图。

[0071] 根据本发明的一个实施例的利用球状体形成及计数设备的球状体培养方法可包括细胞播种(seeding)步骤S210和球状体获取步骤S220。

[0072] 在细胞播种步骤S210中,将多个细胞播种到球状体形成及计数设备。

[0073] 在一个实施例中,将肝癌细胞(HepG2) $1 \times 10^5 \text{cells}/1\text{ml}$ 播种到4个孔细胞培养玻片(孔隙尺寸: $140\mu\text{m}$)中的1个孔中。

[0074] 如图6所示,在细胞接种后,如果经过1天,则细胞们在格栅中以相似的尺寸聚集(aggregate)。在细胞接种后,如果经过2天,则如图7所示,可观察到密集聚集的球状体。

[0075] 在球状体获取步骤S220中,在经过数日后,在所述设备的各个孔隙213中获取观察到的球状体。

[0076] 在一个实施例中,在获取球状体时,通过将尖端末切掉而获取球状体,并可以通过洗涤(washout)过程获取球状体。图8示出经由洗涤过程获取到球状体之后的网孔部件200,图9示出获取到的球状体照片。

[0077] 另外,为了将制作成均匀的大小的细胞(球状体;spheroids)利用于实验,需要准确的计数。以下,参考所述附图,对利用涂覆有HGC的球状体形成及计数设备的与现有技术相比改善的球状体计数方法进行说明。

[0078] 图10为利用根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的球状体计数方法的顺序图,图11和图12是用于说明利用根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的球状体计数方法的图。

[0079] 利用根据本发明的一个实施例的球状体形成及计数设备的球状体计数方法可包括球状体播种步骤S310、球状体置位步骤S320及球状体计数步骤S330。

[0080] 在球状体播种步骤S310中,将球状体播种到球状体形成及计数设备(参见图1的(b))。

[0081] 在球状体置位步骤S320中,沿着与所述设备的一个表面平行的两个方向摇晃所述设备,从而使球状体置于所述设备的各个孔隙213(参见图1的(c))。

[0082] 此时,沿着两个方向摇晃所述设备的过程可通过手动或自动的方式实现。例如,所

述设备可连接到用于使所述设备往返运动的专门的驱动部。

[0083] 然后,将所述设备置于显微镜的载物台,然后可在移动显微镜的像的位置的同时变更视场。

[0084] 在球状体计数步骤S330中,可对视场内的球状体进行计数。例如,球状体的计数可通过手动或者自动的方式实现。例如,在球状体的计数以自动方式实现的情况下,由专门的控制部从视场内的图像中提取球状体的像,从而可以自动计数球状体的数量。

[0085] 以下,对球状体计数方法的一个实验例进行说明。

[0086] 参见图11,为了提高可见性,代替细胞(球状体;spheroids),使用了锥虫蓝染色的微载体(Cytodex)。微载体的直径可以是165~220 μm 。

[0087] 在将20 μL 的锥虫蓝试剂滴落到5 mL的D-PBS中之后,将微载体混合。染色约20分钟后,使用新D-PBS进行洗涤(wash-out),从而制备了样本。

[0088] 对于涂覆有HGC的球状体计数设备,预先使用D-PBS或者以培养基予以充分浸润。在此使用的网孔尺寸可以是约为200 μm 。

[0089] 利用移液管获取包含有微载体的100 μL 的D-PBS,从而播种到涂覆有HGC的球状体计数设备。充分摇晃以使单个微载体能够进入到单个网孔(孔隙,213)中。约等待5分钟左右,以使微载体充分地沉降到底面。

[0090] 在移动光学显微镜相的位置的同时对存在于网孔的微载体进行计数。

[0091] 如图11的(a)所示,将一部分的照片多次拍摄,从而对微载体进行计数,然后计算出微载体的总数量。例如,在照片1、照片2、照片3、照片4及照片5的计数值分别为26、30、31、22及23的情况下,平均计数值为26.4。此时,各个照片内的网孔的孔数为63个,对应于整个设备的网孔的孔数则是2380个。因此,总计微载体数量可算出来是 $26.4 \times 2380 / 63 = 997$ 个。

[0092] 参见图11的(b),计数后,在移动光学显微镜相的位置的同时对网孔中存在的所有微载体进行计数,然后将其移入到新的培养皿(Petri dish)而进行收取。

[0093] 通过与如前所述的方法相同的方法,总共进行了4次计数。如图12所示,准确率被确认为约94%以上。

[0094] 虽然仅仅与限定数量的实施例相关联而详细说明了本发明,但是将会容易理解本发明并不限于那些公开的实施例。更为重要的是,尽管到目前为止尚未说明,但是本发明可变形为包含与本发明的思想及范围相应的任意数量的变形、改造、替代或者均等的排列。另外附加地,虽然说明了本发明的多样的实施例,但是应当理解本发明的方面也可以只包括所述的实施例中的一部分。因此,应当认为本发明并不限于如前所述的说明,只由权利要求书的范围所限定。

[0095] 符号说明

[0096] 100:基板

[0097] 200:网孔部件

[0098] 210:突出部件

[0099] 211:第一突出部件

[0100] 212:第二突出部件

[0101] 213:孔隙(Pore)

[0102] 300:固定架

- [0103] 310:主体
- [0104] 320:固定部
- [0105] 330:固定杆。

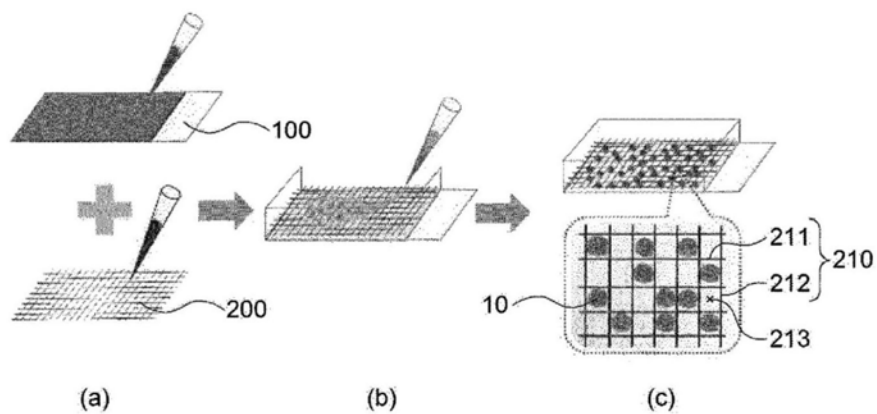


图1

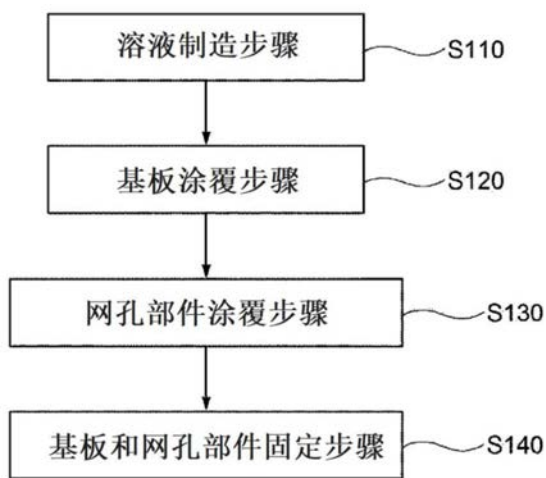


图2

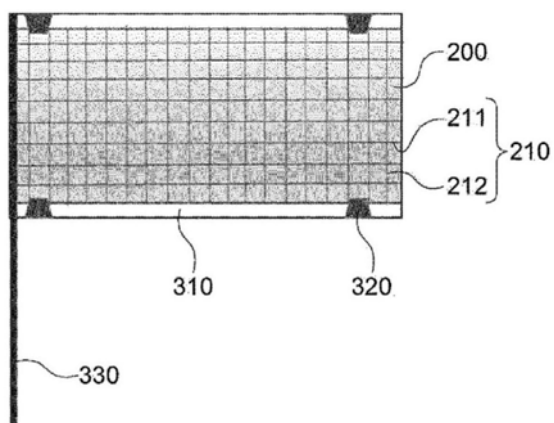


图3

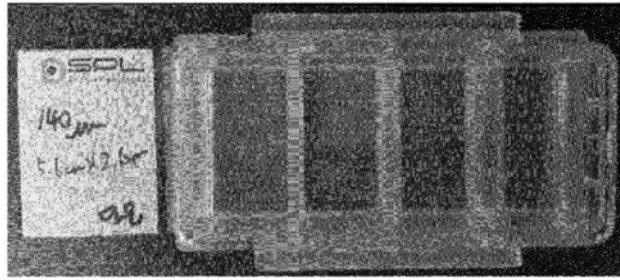


图4

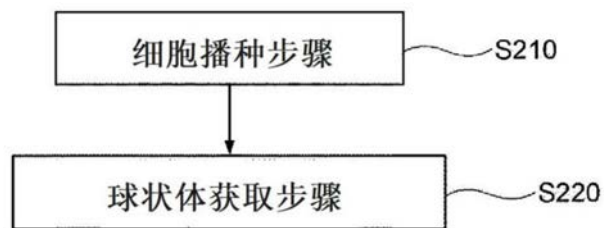


图5

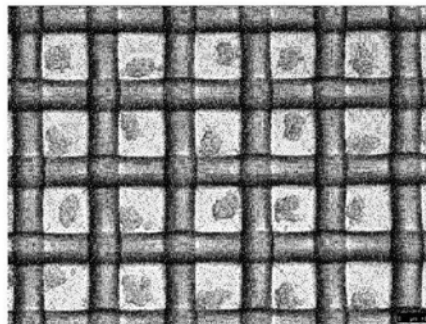


图6

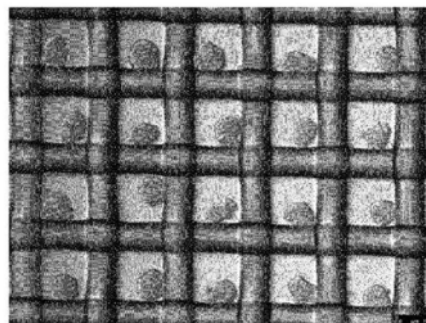


图7

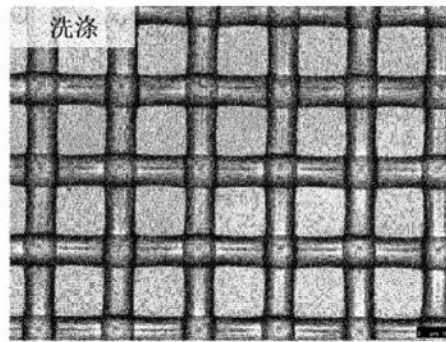


图8

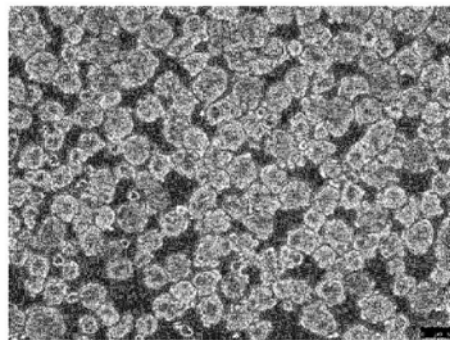


图9

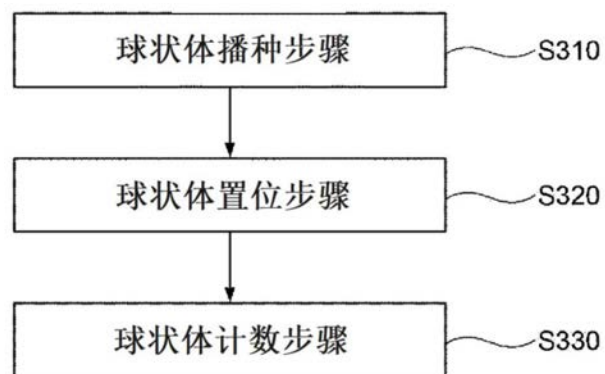


图10

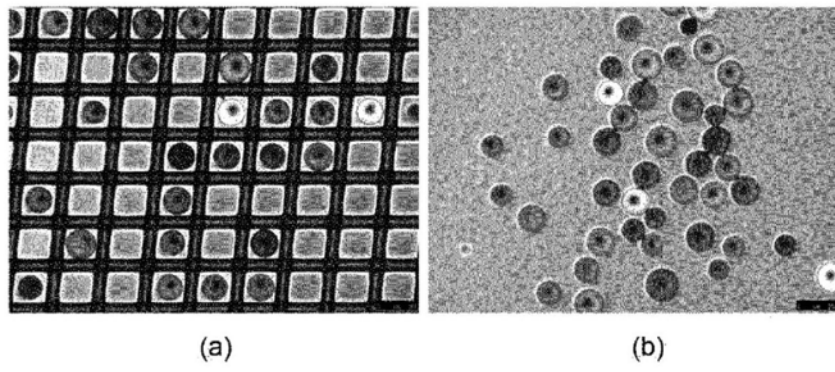


图11

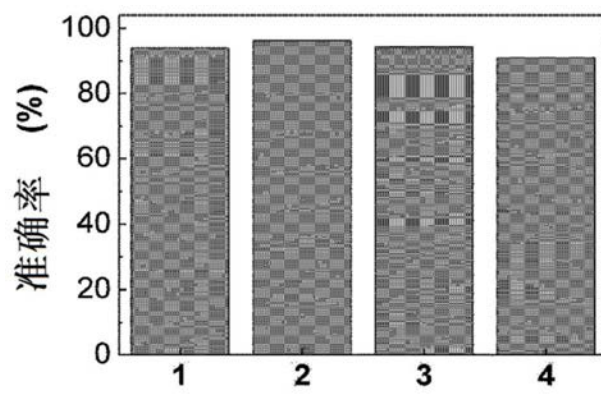


图12