(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113941378 A
(43)申请公布日 2022.01.18

(21)申请号 202111198208.5

(22)申请日 2021.10.14

(71)申请人 浙江大学
地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 庄柳静 姜楠 刘梦雪 魏鑫伟 王平

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200
代理人 刘静

(51)Int.Cl.
B01L 3/00(2006.01)
C12M 1/42(2006.01)
C12M 3/06(2006.01)

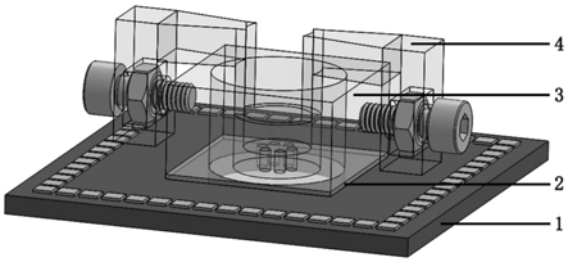
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54)发明名称

基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片及检测方法，神经类器官芯片包括微电极阵列芯片、类器官培养腔，微电极阵列包括6组工作电极和4个参比电极；类器官培养腔包括培养腔本体和多腔式零件，培养腔本体为内部挖去一个圆柱体的方块式结构，封装在传感器芯片上；多腔式零件主体呈桶状，底部具有6个圆柱形通孔，对应微电极阵列的6组工作电极，两侧为悬臂结构，搭配螺钉和螺母调整多腔式零件位置，有效控制类器官聚集分布在电极阵列区域，增加类器官与工作电极的接触概率。本发明可以实现对神经类器官电生理活动的监测，尤其适用于嗅觉类器官气味响应信号的获取和记录，具有实时无损、灵敏度高、稳定性高、重现性好等特点。



CN 113941378 A

1.一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片,其特征在于,由利用微纳加工技术制作的多通道微电极阵列芯片、PCB转接板和多腔室的类器官培养腔组成;

所述微电极阵列芯片以正方形玻璃作为基底,芯片的中间区域为用于检测的微电极阵列,共包括60个圆形的工作电极和4个1/4圆结构的参比电极,每10个所述工作电极为一组,6组工作电极均匀分布在六边形各顶点上,六边形中心即芯片中心,所述参比电极分布在芯片的四角,外围是与PCB转接板转接的金线转接点,与电极之间通过导线连接;所述微电极阵列芯片通过UV胶与所述PCB转接板粘接,并进行金线电焊,构成传感器芯片部分;

所述PCB转接板的中心具有圆形通孔,对应微电极阵列芯片的中间区域,用于观察微电极阵列以及类器官与电极的接触情况;

所述类器官培养腔包括培养腔本体和多腔式零件两部分,所述培养腔本体为内部挖去一个圆柱体的方块式结构,封装在传感器芯片上;所述多腔式零件的主体呈桶状结构,底部具有6个圆柱形通孔,通孔的位置分别对应微电极阵列芯片上的6组工作电极点,两侧为悬臂结构,搭配螺钉和螺母使用,用于调整多腔式零件的位置,当6个圆柱形通孔对准微电极阵列芯片上的6组工作电极点时,旋紧螺母使得所述多腔式零件固定在所述培养腔本体上,有效控制类器官聚集分布在电极阵列区域,增加类器官与工作电极的接触概率。

2.根据权利要求1所述的基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片,其特征在于,所述培养腔本体和多腔式零件均采用亚克力材料。

3.根据权利要求1所述的基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片,其特征在于,所述微电极阵列芯片的边长为12mm,所述工作电极的直径为30μm。

4.根据权利要求1所述的基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片,其特征在于,所述多腔式零件可随时拆卸,方便电极清洗。

5.根据权利要求1所述的基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片,其特征在于,在暴露出的电极表面电镀一层铂黑颗粒,同时结合芯片表面修饰技术提高芯片的生物相容性,修饰物质包括明胶、多聚赖氨酸、层粘连蛋白。

6.根据权利要求1所述的基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片,其特征在于,所述芯片应用于嗅觉类器官气味响应信号的获取和记录。

7.一种基于权利要求1-6任一项所述神经类器官芯片检测电生理信号的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1)将多腔式零件利用悬臂上的螺钉和螺母固定于传感器芯片的培养腔本体上,并在显微镜下观察调整,使得每组10个电极恰好位于每个通孔圆内,然后拧紧螺钉防止多腔式零件发生位移;

(2)在体式显微镜下将类器官转移到微电极阵列上;最开始尽量少的包含培养液,使得类器官落入多腔式零件底部的圆柱形通孔中,必要时需要用微针排出孔中的气泡;在培养箱中静置一段时间,待类器官沉降到底部与微电极阵列贴合,可在显微镜下观察类器官的分布及与电极的接触情况;之后加入适量的类器官培养液以维持类器官的生存状态,在恒温培养箱中培养一段时间后进行电生理信号记录;

(3)刺激类器官并进行电生理记录:在记录到了类器官稳定的自发放信号作为对照后,可以记录类器官对刺激的电生理响应信号;用移液枪吸去培养腔中的类器官培养液,加入新鲜培养液,记录加入不同浓度及种类刺激物后的电生理信号,每次加入刺激物前进行清

洗。

8.根据权利要求7所述的方法，其特征在于，所述神经类器官为嗅觉类器官，通过气味刺激嗅觉类器官，进行电生理记录。

9.根据权利要求8所述的方法，其特征在于，所述嗅觉类器官利用三维培养技术诱导小鼠嗅上皮中的原代嗅觉祖/干细胞培养分化得到，在基质胶和类器官培养液中培养约2周后，会表达成熟的嗅感觉神经元；用cell recovery solution溶解基质胶，释放嗅觉类器官，并在体式显微镜下将嗅觉类器官转移到微电极阵列上，在恒温培养箱中培养12-24h后进行信号记录。

10.根据权利要求8所述的方法，其特征在于，在记录到了嗅觉类器官稳定的自发放信号作为对照后，记录嗅觉类器官对气味刺激的电生理响应信号用于后续分析；刺激物采用6种气味物质的浓度梯度混合溶液，其中包括水杨酸甲酯、乙酰苯、柠檬醛、乙酸异戊酯、香芹酮和正戊醛；开始信号记录时，用移液枪吸去培养腔中的类器官培养液，加入新鲜培养液，随后加入气味混合溶液进行刺激。

基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及仿生传感技术领域，尤其涉及一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片及检测方法。

背景技术

[0002] 类器官是由干细胞在体外分化自组装而成的，一种具有与器官类似生物功能的组织结构。类器官作为一种微型体外培养组织模型，在器官组织发生、疾病病理、药物研发等研究中具有重要意义。生物传感器是一类以细胞，组织等作为敏感元件，将细胞的形态生理变化转变为电信号，实时记录并输出的传感器，具有无需标记，长时间监测，实时监测的特点。生物传感器能够多尺度地对细胞的生理活动进行监测，是一种新兴的，广受研究人员青睐的技术。大部分生物传感器主要还是针对二维培养的细胞进行监测，仍然存在不够接近在体生理状态的局限性，为构建高灵敏度、高特异性、快速响应的更接近在体的传感系统，将三维细胞或类器官与传感器芯片及微流控系统结合所构建的类器官传感芯片应运而生。利用生物传感技术实时定量的监测芯片中类器官的生长状况，实现无标记、非侵入式的记录，在药物研发，组织发生和疾病发生等领域具有重要的应用前景。传统的二维培养的细胞易贴附在传感器芯片表面，且不容易发生移动，但是类器官由于具有三维结构，在种植到传感器芯片表面时不易固定位置，接触电极的概率低，为解决这一问题，本发明提出了一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片及检测方法，并以嗅觉类器官为例验证了其可行性和实用性。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片及相应的检测方法。

[0004] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的：一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片，由利用微纳加工技术制作的多通道微电极阵列芯片、PCB转接板和多腔室的类器官培养腔组成；

[0005] 所述微电极阵列芯片以正方形玻璃作为基底，芯片的中间区域为用于检测的微电极阵列，共包括60个圆形的工作电极和4个1/4圆结构的参比电极，每10个所述工作电极为一组，6组工作电极均匀分布在六边形各顶点上，六边形中心即芯片中心，所述参比电极分布在芯片的四角，外围是与PCB转接板转接的金线转接点，与电极之间通过导线连接；所述微电极阵列芯片通过UV胶与所述PCB转接板粘接，并进行金线电焊，构成传感器芯片部分；

[0006] 所述PCB转接板的中心具有圆形通孔，对应微电极阵列芯片的中间区域，用于观察微电极阵列以及类器官与电极的接触情况；

[0007] 所述类器官培养腔包括培养腔本体和多腔式零件两部分，所述培养腔本体为内部挖去一个圆柱体的方块式结构，封装在传感器芯片上；所述多腔式零件的主体呈桶状结构，底部具有6个圆柱形通孔，通孔的位置分别对应微电极阵列芯片上的6组工作电极点，两侧

为悬臂结构，搭配螺钉和螺母使用，用于调整多腔式零件的位置，当6个圆柱形通孔对准微电极阵列芯片上的6组工作电极点时，旋紧螺母使得所述多腔式零件固定在所述培养腔本体上，有效控制类器官聚集分布在电极阵列区域，增加类器官与工作电极的接触概率。

[0008] 进一步地，所述培养腔本体和多腔式零件均采用亚克力材料。

[0009] 进一步地，所述微电极阵列芯片的边长为12mm，所述工作电极的直径为30μm。

[0010] 进一步地，所述多腔式零件可随时拆卸，方便电极清洗。

[0011] 进一步地，在暴露出的电极表面电镀一层铂黑颗粒，同时结合芯片表面修饰技术提高芯片的生物相容性，修饰物质包括明胶、多聚赖氨酸、层粘连蛋白。

[0012] 本发明还公开一种基于上述神经类器官芯片检测电生理信号的方法，该方法包括步骤：

[0013] (1)将多腔式零件利用悬臂上的螺钉和螺母固定于传感器芯片的培养腔本体上，并在显微镜下观察调整，使得每组10个电极恰好位于每个通孔圆内，然后拧紧螺钉防止多腔式零件发生位移；

[0014] (2)在体式显微镜下将类器官转移到微电极阵列上；最开始尽量少的包含培养液，使得类器官落入多腔式零件底部的圆柱形通孔中，必要时需要用微针排出孔中的气泡；在培养箱中静置一段时间，待类器官沉降到底部与微电极阵列贴合，可在显微镜下观察类器官的分布及与电极的接触情况；之后加入适量的类器官培养液以维持类器官的生存状态，在恒温培养箱中培养一段时间后进行电生理信号记录；

[0015] (3)刺激类器官并进行电生理记录：在记录到了类器官稳定的自发放信号作为对照后，可以记录类器官对刺激的电生理响应信号；用移液枪吸去培养腔中的类器官培养液，加入新鲜培养液，记录加入不同浓度及种类刺激物后的电生理信号，每次加入刺激物前进行清洗。

[0016] 进一步地，所述神经类器官为嗅觉类器官，通过气味刺激嗅觉类器官，进行电生理记录。

[0017] 进一步地，所述嗅觉类器官利用三维培养技术诱导小鼠嗅上皮中的原代嗅觉祖/干细胞培养分化得到，在基质胶和类器官培养液中培养约2周后，会表达成熟的嗅感觉神经元；用cell recovery solution溶解基质胶，释放嗅觉类器官，并在体式显微镜下将嗅觉类器官转移到微电极阵列上，在恒温培养箱中培养12-24h后进行信号记录。

[0018] 进一步地，在记录到了嗅觉类器官稳定的自发放信号作为对照后，记录嗅觉类器官对气味刺激的电生理响应信号用于后续分析；刺激物采用6种气味物质的浓度梯度混合溶液，其中包括水杨酸甲酯、乙酰苯、柠檬醛、乙酸异戊酯、香芹酮和正戊醛；开始信号记录时，用移液枪吸去培养腔中的类器官培养液，加入新鲜培养液，随后加入气味混合溶液进行刺激。

[0019] 本发明相对于目前技术短板具有以下有益效果：本发明提供了一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片，已经成功应用于嗅觉类器官检测，极大地模拟了哺乳动物感知气味的神经机制和生理结构，此外该技术还可以推广应用于各类神经类器官的生理活动监测，具有实时无损、灵敏度高、稳定性高、重现性好等特点。

附图说明

[0020] 图1是本发明多腔式神经类器官芯片的结构示意图；

[0021] 图2是本发明多腔式神经类器官芯片的俯视图；

[0022] 图3是本发明多通道微电极阵列芯片的电极分布示意图；

[0023] 图4是本发明类器官培养腔的多腔式零件结构示意图；

[0024] 图5是本发明实施例嗅觉类器官贴附于芯片表面电极点的显微镜照片；

[0025] 图6是本发明神经类器官芯片用于检测嗅觉类器官对混合气味物质的响应信号；

[0026] 图中：1、PCB转接板，2、微电极阵列芯片，3、方块式培养腔本体，4、多腔式零件，5、圆柱形通孔，6、工作电极，7、参比电极，8、嗅觉类器官。

具体实施方式

[0027] 以下结合附图及具体实施例对本发明作详细描述，但并不是限制本发明。

[0028] 本发明提出了一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片，并以嗅觉类器官为例采集神经活动信号以验证芯片的可行性和实用性。

[0029] 如图1和图2所示，本发明设计制作了一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片，主要由利用微纳加工技术制作的多通道微电极阵列芯片2、PCB转接板1和多腔室的类器官培养腔结构组成，可以对类器官的生理活动进行实时、无损、长时间的监测。例如，可将其应用于嗅觉类器官气味响应信号的获取和记录，并通过神经解码算法完成信号的特征提取和模式识别，构建气味识别模型，从而实现对气味的高敏感性、特异性、稳定性和快速检测与识别。

[0030] 微电极阵列芯片2是以边长12mm的正方形玻璃作为基底，经过薄膜溅射、光刻、湿法腐蚀等工艺流程制作而成的。加工前需要根据实际尺寸在AutoCAD软件中设计光刻掩膜版，包括金属层和绝缘层，其中金属层需要画出电极的形状及空间排布情况。芯片的中间区域为用于检测的微电极阵列(MEA)，共包括60个工作电极6和4个参比电极7，圆形工作电极6的直径为30μm，每10个工作电极6为一组，共6组，均匀分布在六边形的各个顶点上，六边形的中心即芯片中心，而1/4圆大小的参比电极7则分布在芯片的四角，外围是与PCB转接板1转接的金线转接点，与电极之间用线宽10μm的导线连接。微电极阵列芯片2制作完成后需用UV胶与PCB转接板1粘接，并进行金线电焊，构成传感器芯片部分。

[0031] PCB转接板1的中心留有一个圆形通孔，对应芯片的中间区域，便于利用显微镜等观察微电极阵列以及类器官与电极的接触情况。电极的形状及空间排布情况如图3所示，设计是在AutoCAD软件中完成的。

[0032] 类器官培养腔包括两个部分，其中一部分封装在传感器芯片上，是内部挖去了一个圆柱体的方块式培养腔本体3，可以采用亚克力材料，实验时可以在中间加类器官培养液、刺激物质等。另一部分是一个具有悬臂结构的嵌入式的多腔式零件4，可以采用亚克力材料，能够通过螺钉和螺母固定在培养腔内，是在SolidWorks软件中设计完成的。如图4所示，多腔式零件4的主体是一个桶状结构，底部具有6个圆柱形通孔5，通孔的位置分别对应MEA芯片上的6组工作电极点，两侧设计了悬臂结构，搭配螺钉和螺母使用，用于调整多腔式零件的位置，当6个圆柱形通孔对准MEA芯片上的6组工作电极点时，旋紧螺母使得多腔式零件固定在方块式培养腔本体上，可以有效控制类器官聚集分布在电极阵列区域，增加类器

官与工作电极的接触概率，从而提高信号采集率。多腔式零件可以随时拆卸，方便电极清洗。

[0033] 此外，为了提高MEA的信噪比，在暴露出的电极表面电镀上一层铂黑颗粒，通过增大比表面积来降低电极阻抗，从而降低噪声提高信噪比。同时结合芯片表面修饰技术提高芯片的生物相容性，如利用明胶、多聚赖氨酸、层粘连蛋白等修饰芯片表面，以有效提高类器官神经响应信号的信噪比和稳定性。

[0034] 以下以嗅觉类器官为例对本发明提出的基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片进行性能测试。嗅觉类器官是利用三维培养技术诱导小鼠嗅上皮中的原代嗅觉祖/干细胞培养分化得到的，在基质胶和类器官培养液中培养约2周后，会表达成熟的嗅感觉神经元。用cell recovery solution溶解基质胶，释放嗅觉类器官，并在体式显微镜下将嗅觉类器官转移到MEA上，在恒温培养箱中培养12-24h后可进行信号记录。具体步骤如下：

[0035] (1)类器官培养：3周龄的C57小鼠腹腔注射过量麻药乌拉坦致死后，断头，将头部组织剥离去除后快速放入冰水混合的Ringer’s溶液中。用骨科剪沿着中缝将左右头骨分离，暴露鼻中隔的嗅上皮区域，用手术剪将嗅上皮组织剪下，连同鼻中隔一起转移到预冷的Ringer’s溶液中。在显微操作仪下分离stroma和epithelium，并将epithelium转移到装在15mL离心管中的适量0.25％Trypsin&0.02％EDTA中。置于37℃恒温培养箱中消化30-45min，期间每隔5-10min摇晃一次。按110μL/mL加入胎牛血清终止消化，轻轻吹打15min后用过滤筛过滤，期间应尽量防止气泡产生。200g离心5min后，弃去上清液，加入一定量的类器官培养液，轻轻吹打混匀。将其与基质胶以1:2的比例混合，按每孔60μL滴加到24孔板中，在37℃恒温培养箱中倒置15min固化。待凝固后每孔加入约500μL类器官培养液，置于37℃恒温培养箱中培养。每隔1天更换新鲜培养液，并在显微镜下观察类器官的生长状态。

[0036] (2)嗅觉类器官电生理记录：待嗅觉类器官表达成熟的嗅感觉神经元后(约培养2周)，用cell recovery solution溶解基质胶，释放嗅觉类器官，并在体式显微镜下将嗅觉类器官转移到MEA上。在这之前，需要将多腔式零件用悬臂上的螺钉和螺母固定于传感器芯片的培养腔本体上，并在显微镜下观察调整，使得每组10个工作电极恰好位于每个通孔圆内，然后拧紧螺钉防止零件发生位移。在将嗅觉类器官转移到MEA上时，最开始尽量少的包含培养液，使得类器官落入多腔式零件底部的圆柱形通孔中，必要时需要用微针排出孔中的气泡。在培养箱中静置一段时间，待类器官沉降到底部与MEA贴合，可在显微镜下观察嗅觉类器官8的分布及与电极的接触情况，如图5所示。而后加入适量的类器官培养液以维持类器官的生存状态，在恒温培养箱中培养12-24h后可进行信号记录。神经信号采集系统使用德国Multi-Channel System公司的64通道MEA1060系统，单通道采样率40kHz，原始信号存储于计算机，后续使用MATLAB软件进行信号离线分析。信号采集过程中，为了模拟生物体环境，信号采集系统中引入了双通道生物样品温度控制器使类器官培养环境保持在37℃。

[0037] (3)气味刺激嗅觉类器官并进行电生理记录：嗅感觉神经元可以将气味化学信号转换成神经活动信号，当气味与受体特异性结合后会引发神经元动作电位，而微电极阵列可以记录下这些动作电位，用于研究气味刺激对嗅觉类器官的影响。在记录到了嗅觉类器官稳定的自发放信号作为对照之后，可以记录嗅觉类器官对气味刺激的电生理响应信号用于后续分析。刺激物是6种气味物质的浓度梯度混合溶液，其中包括水杨酸甲酯、乙酰苯、柠檬醛、乙酸异戊酯、香芹酮和正戊醛。气味原液先用二甲基亚砜稀释到2M，再用Ringer’s溶

液稀释获得不同浓度梯度的气味混合溶液。开始信号记录时，用移液枪吸去培养腔中的类器官培养液，并加入900μL新鲜培养液，随后加入100μL气味混合溶液进行刺激。结果如图6所示，对嗅觉类器官进行气味刺激后，spike的发放频率明显提高，多次重复实验均获得相同结果。以上结果说明本发明所提出的一种基于多腔式电生理微纳检测的神经类器官芯片可以实现对神经类器官电生理活动的监测，并具有实时无损、灵敏度高、稳定性高、重现性好等特点。

[0038] 上述实施例用来解释说明本发明，而不是对本发明进行限制，在本发明的精神和权利要求的保护范围内，对本发明作出的任何修改和改变，都落入本发明的保护范围。

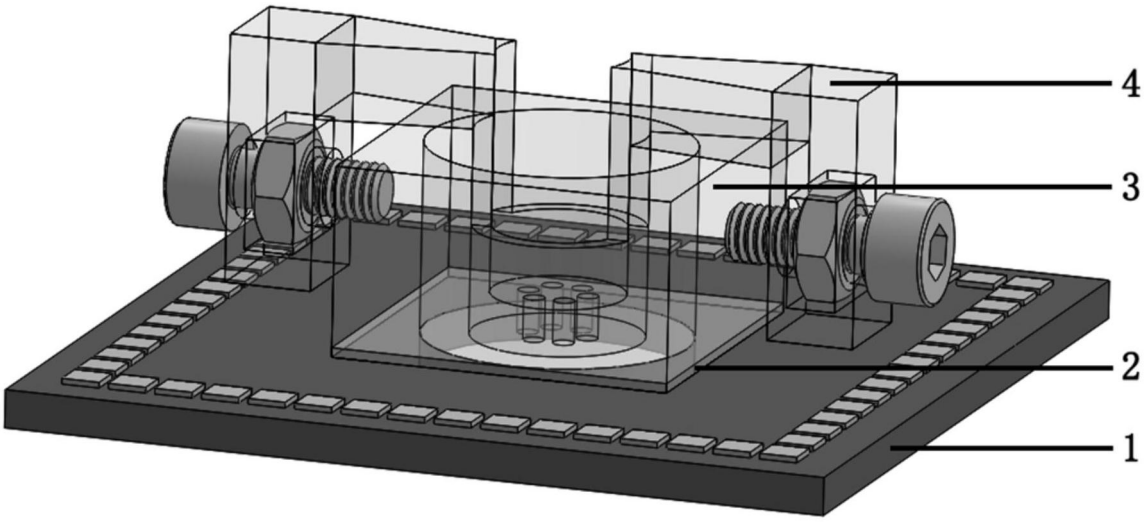


图1

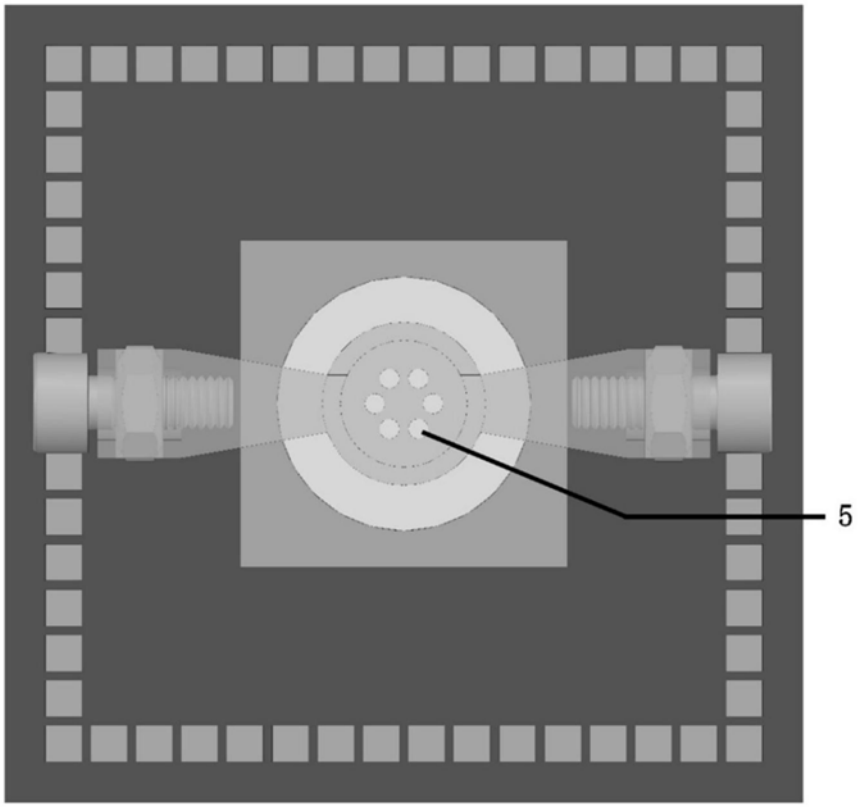


图2

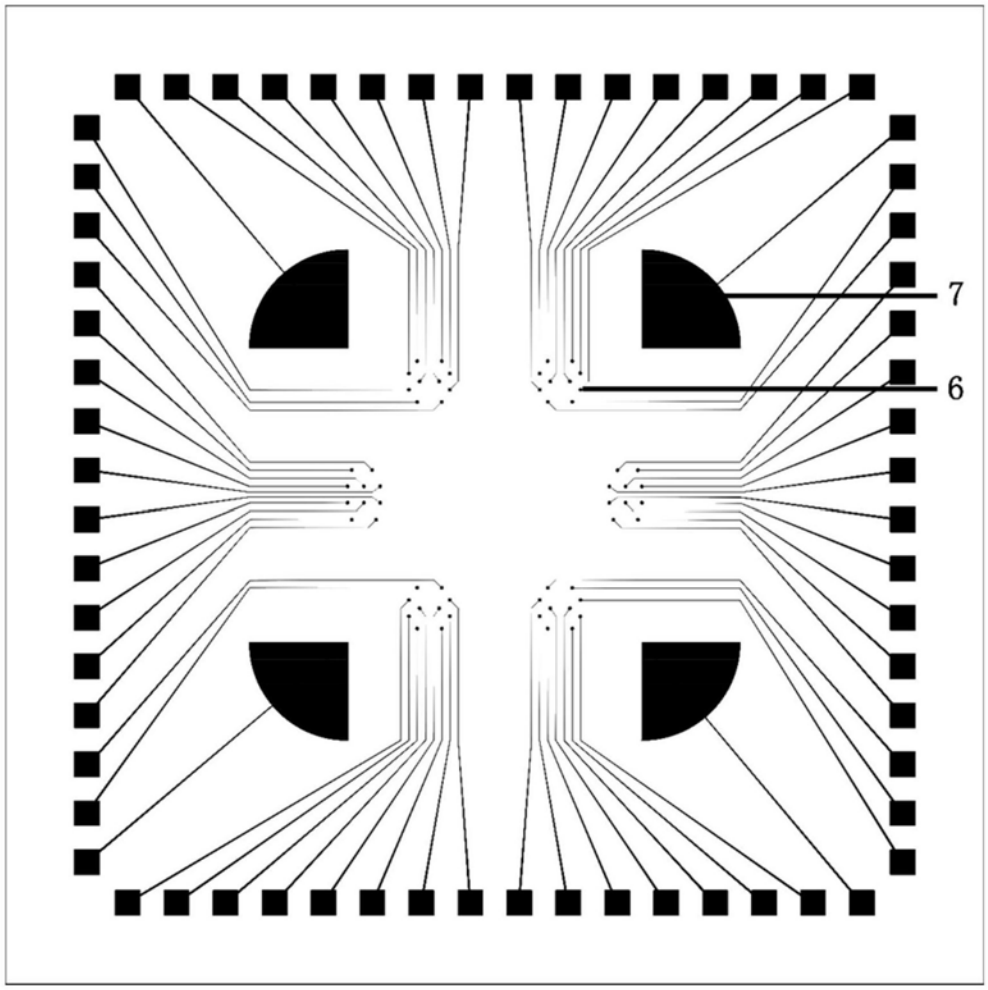


图3

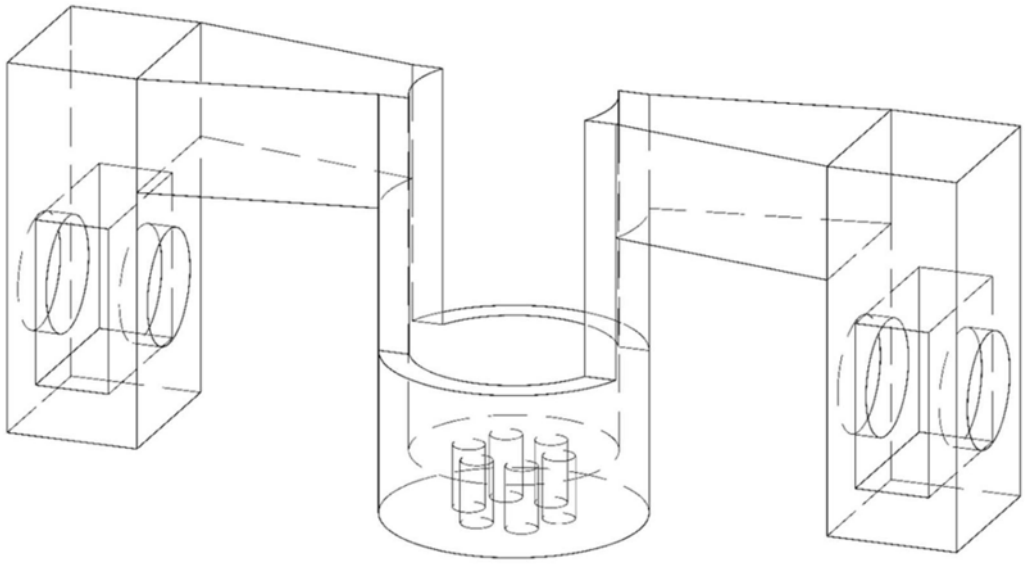


图4

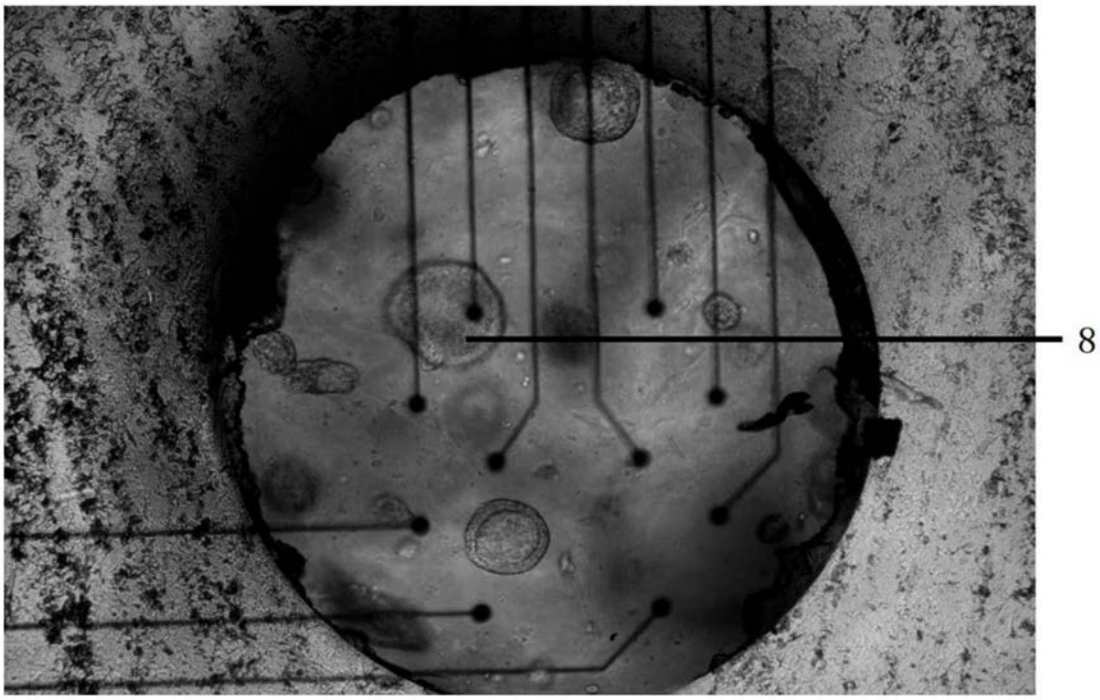


图5

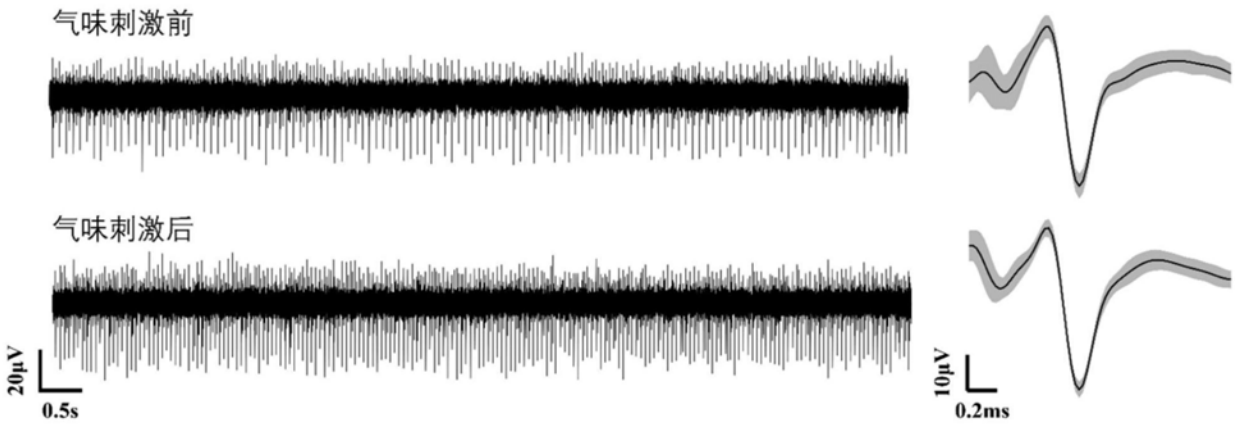


图6