

(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
2019年11月28日(28.11.2019)



(10) 国际公布号
WO 2019/222870 A1

(51) 国际专利分类号:
C12M 3/00 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01) *C12M 1/16* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/087598

(22) 国际申请日: 2018年5月21日(21.05.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院(BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 魏文博(WEI, Wenbo); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 陈娟娟(CHEN, Juanjuan); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 肖亮(XIAO, Liang); 中国广东省深圳市盐田区北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司(DHC IP ATTORNEYS); 中国广东省深圳市福田区金田路与福华路交汇处现代商务大厦2201, Guangdong 518048 (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, 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,

(54) Title: BIONIC INTESTINAL ORGAN-ON-A-CHIP, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种仿生肠道器官芯片及其制备方法和应用

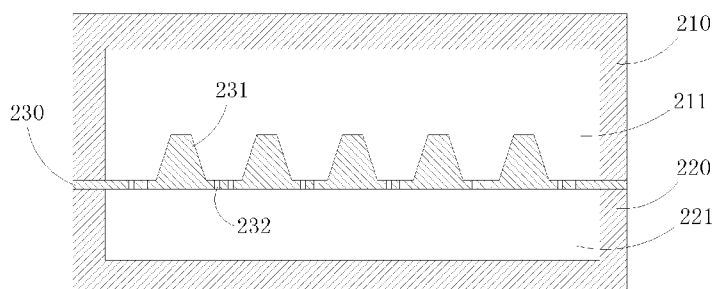


图 2

(57) Abstract: Disclosed are a bionic intestinal organ-on-a-chip, and a preparation method therefor and application thereof. The bionic intestinal organ-on-a-chip has a fluid passage; a porous membrane is provided in the fluid passage; the porous membrane separates the fluid passage into an upper fluid passage and a lower fluid passage; several projections for simulating the intestinal villus structure and several through holes for simulating the intestinal absorption function are distributed on the porous membrane. The upper fluid passage is used for culturing intestinal cells, and the lower fluid passage is used for collecting metabolites; the projections on the porous membrane are used for simulating the intestinal villus structure, and the through holes are used for simulating the intestinal absorption function. Since a three-dimensional stent structure of the several projections is distributed on the porous membrane in the chip, the difference in intestinal tissue structures generated among different batches of chips can be reduced greatly, and the reproducibility is good. The present bionic intestinal organ-on-a-chip can dynamically culture intestinal cells by using perfusion so as to simulate the dynamic intestinal microenvironment, and is applicable to researches in intestinal diseases, drug screening, food safety, and the like.



WO 2019/222870 A1

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：

- 一 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：本申请公开了一种仿生肠道器官芯片及其制备方法和应用，仿生肠道器官芯片具有流体通道，在流体通道内设有多个孔膜，多个孔膜将流体通道分隔成上层流体通道和下层流体通道，多个孔膜上分布有若干个用于模拟肠绒毛结构的凸起和若干个用于模拟肠道吸收功能的通孔。上层流体通道用于培养肠细胞，下层用于收集代谢产物，多个孔膜上的凸起用于模拟肠绒毛结构，通孔用于模拟肠道的吸收功能。由于该芯片内的多个孔膜上分布有若干个凸起的三维支架结构，可极大减小不同批次芯片之间产生的肠道组织结构的差异，具有良好的重现性。本仿生肠道器官芯片可利用灌流对肠细胞进行动态培养，以模拟肠道内动态微环境，适用于肠道疾病、药物筛选、食品安全等研究。

一种仿生肠道器官芯片及其制备方法和应用

技术领域

本申请涉及器官仿生技术领域，具体涉及一种仿生肠道器官芯片及其制备方法和应用。

背景技术

微流控芯片技术 (Microfluidics) 作为 21 世纪重要前沿科学技术之一，为体外模拟人体代谢模型提供了一种重要平台。它主要以微纳加工技术为基础，由微米级通道形成网络，以可控流体贯穿整个系统，可实现生物学与化学实验室的常规功能。因其具有与细胞大小相匹配的微米尺寸构件，可在芯片微通道内进行多种细胞培养与流体刺激，构建与生理环境接近并具有时空分辨特点的三维微环境，已成为组织器官构建、药物筛选、毒理学以及生物医学研究的重要技术。现阶段微流控技术已成功应用于三维细胞共培养、细胞迁移、细胞分选、组织微环境与类器官构建等。其中，人体器官芯片 (Organs-on-a-chip) 是近几年发展起来的一种新兴前沿交叉学科技术，是一种利用微加工技术，在微流控芯片上制造出能够模拟人类器官的主要功能的仿生系统。与传统二维静态细胞培养技术相比，芯片内培养的细胞具有三维结构以及多种细胞的空间分布结构，更重要的是器官芯片可以为细胞提供动态的微环境，这是传统手段无法比拟的。此外，芯片内的细胞大部分都是基于人源的细胞，可以极大的降低动物模型所产生的种间差异。器官芯片的发展将有助于药物研发、疾病研究等。

目前，肠道芯片的设计与制备主要集中在哈佛大学的 Ingber 教授，如图 1 所示。该芯片通过多培养在多孔膜上的 caco-2 细胞进行机械拉伸，使其分化并自发形成绒毛结构。

具体的，现有的肠道芯片由三层 PDMS (聚二甲基硅氧烷) 结构封接而成，如图 1 所示，其中，中间层为多孔多孔膜 101，用于接种肠细胞；上下两层为流体通道 02，用于模拟肠道流体微环境；通道左右两侧为真空腔 103，用于对多孔膜进行拉伸的机械运动。

但现有技术的肠道芯片的缺点在于细胞自发形成绒毛结构的均一性

不能得到保证，使芯片在不同批次间产生较大的差异，不便于实验数据统计和结果对比。

发明内容

本申请提供一种可减少不同批次芯片之间产生的肠道组织结构差异，具有良好的重现性的仿生肠道器官芯片及其制备方法和应用。

根据第一方面，一种实施例中提供一种仿生肠道器官芯片，具有流体通道，在流体通道内设有多孔膜，多孔膜将流体通道分隔成上层流体通道和下层流体通道，多孔膜上分布有若干个用于模拟肠绒毛结构的凸起和若干个用于模拟肠道吸收功能的通孔。

根据第二方面，一种实施例中提供一种仿生肠道器官芯片的制备方法，包括如下步骤：

制备上层芯片和下层芯片；

制备多孔膜模板；

制备多孔膜及封接组装：通过多孔膜模板制备多孔膜，再将多孔膜封接在上层芯片和下层芯片之间，形成仿生肠道器官芯片；

其中，多孔膜上分布有若干个用于模拟肠绒毛结构的凸起和若干个用于模拟肠道吸收功能的通孔。

根据第三方面，一种实施例中提供了一种制备仿生肠道器官的方法，利用上述的仿生肠道器官芯片进行。

依据上述实施例的仿生肠道器官芯片及其制备方法和应用，由于多孔膜上分布有若干个凸起和通孔，上层流体通道用于培养肠细胞，下层用于收集代谢产物，多孔膜上的凸起用于模拟肠绒毛结构，通孔用于模拟肠道的吸收功能，使得多孔膜形成三维支架结构，可极大减小不同批次芯片之间产生的肠道组织结构的差异，具有良好的重现性。本仿生肠道器官芯片可利用灌注对肠细胞进行动态培养，以模拟肠道内动态微环境，适用于肠道疾病、药物筛选、食品安全等研究。

附图说明

图 1 为现有技术中仿生肠道器官芯片的结构示意图；

图 2 为实施例一中仿生肠道器官芯片的结构示意图；

图 3 为实施例二中制备仿生肠道器官芯片的流程图；

- 图 4 为实施例二中制备上层芯片和下层芯片的流程图；
图 5 为实施例二中制备多孔膜模板的流程图；
图 6 为实施例二中多孔膜模板制备过程中的结构示意图；
图 7 为实施例二中制备多孔膜及封接组装的流程图；
图 8 为实施例三中制备仿生肠道器官的流程图。

具体实施方式

下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。

实施例一：

本实施例提供了一种仿生肠道器官芯片，本仿生肠道器官芯片为三层结构，模拟肠道内动态微环境，用于动态培养肠道细胞，适用于肠道疾病、药物筛选、食品安全等研究。

如图 2 所示，本实施例的仿生肠道器官芯片内设有流体通道。具体的，芯片包括上层芯片 210 和下层芯片 220。上层芯片 210 的下表面具有开放的上层流体通道，下层芯片 220 的上表面具有开放的下层流体通道，多孔膜 230 封接在上层芯片 210 和下层芯片 220 之间，多孔膜 230 与上层芯片 210 围合成上层流体通道 211，多孔膜 230 与下层芯片 220 围合成下层流体通道 221。多孔膜 230 上分布有若干个凸起 231 和通孔 232，凸起 231 用于模拟肠绒毛结构，通孔 232 用于模拟肠道吸收功能，通孔 232 将上层流体通道 211 和下层流体通道 221 导通。上层芯片 210 上与上层流体通道 211 两端对应的位置打出入孔，上层芯片 210 上与下层流体通道 221 两端对应的位置打出出入孔。

本实施例中，上层芯片 210、下层芯片 220 和多孔膜 230 均为 PDMS 材质。

凸起 231 为圆锥或圆台结构，若干个凸起 231 阵列分布在多孔膜 230 上，若干个通孔 232 均匀分布在凸起 231 之外的区域内，即凸起 231 和通孔 232 一起布满多孔膜 230。多孔膜 230 形成一个立体的三维支架，从而实现模拟肠道内三维空间结构。

上层流体通道 211 和下层流体通道 221 的长度为 10-15 毫米，宽度为 1-1.5 毫米，高度为 0.3-0.5 毫米。多孔膜 230 的厚度为 30-50 微米。凸起 231 的底面直径为 100-200 微米，高度为 150-200 微米，间距为 150-200 微米。通孔 232 的直径为 10 微米，通孔 232 之间的间距为 50

微米。

例如，上层流体通道 211 和下层流体通道 221 的长度为 15 毫米，宽度为 1 毫米，高度为 0.4 毫米。多孔膜 230 的厚度为 40 微米。凸起 231 的底面直径为 200 微米，高度为 150 微米，间距为 200 微米。在其他实施例中，各组成部分的尺寸可根据模拟需要在上述范围内选取。

本实施例提供的仿生肠道器官芯片，由于多孔膜 230 上分布有若干个凸起 231 和通孔 232，上层流体通道 211 用于培养肠细胞，下层用于收集代谢产物，多孔膜 230 上的凸起 231 用于模拟肠绒毛结构，通孔 232 用于模拟肠道的吸收功能，使得多孔膜 230 形成三维支架结构，可极大减小不同批次芯片之间产生的肠道组织结构的差异，具有良好的重现性。本仿生肠道器官芯片可利用灌流对肠细胞进行动态培养，以模拟肠道内动态微环境，适用于肠道疾病、药物筛选、食品安全等研究。

实施例二：

本实施例提供了一种仿生肠道器官芯片的制备方法，本制备方法主要采用软光刻技术制备上述实施例一中的仿生肠道器官芯片。

如图 3 所示，本实施例的仿生肠道器官芯片的制备方法主要包括如下步骤：

S100：制备上层芯片和下层芯片；

S200：制备多孔膜模板；

S300：制备多孔膜及封接组装。

步骤 S300 中，通过多孔膜模板制备多孔膜，并将所述多孔膜封接在所述上层芯片和下层芯片之间，形成仿生肠道器官芯片。其中，生产的多孔膜上分布有若干个用于模拟肠绒毛结构的凸起和若干个用于模拟肠道吸收功能的通孔。

本制备方法将器官芯片分开成上层芯片和下层芯片两个单体制备，再单独制备多孔膜，最后将三者封接在一起，形成具有上下层流通通道的三层结构芯片。本方法中，步骤 S100 和 S200 无先后顺序，可先后制备，也可同时制备。

具体的，如图 4 所示，步骤 S100（制备上层芯片和下层芯片）包括如下步骤：

S101：在玻璃或硅片的基底表面旋涂光刻胶，并进行前烘；

本实施例中优选 SU-8 光刻胶，SU-8 光刻胶是一种环氧型的、近紫

外光负光刻胶，SU-8 光刻胶在近紫外光范围内光吸收率低，使得在光刻胶厚度上都具有较好的曝光均匀性，能够得到图形边缘近乎垂直的结构。

SU-8 光刻胶光刻的机理如下：光刻胶中的光引发剂吸收光子发生了化学反应，生产一种强酸，其作用是前烘过程中作为酸催化剂促进交联反应。只有在曝光区域的光刻胶中才会产生强酸，故只有在曝光区域内才发生交联反应，未曝光的区域不发生交联反应，而光刻胶发生交联反应后不溶于显影液，而光刻胶未发生交联反应的溶于显影液，因此显影后的光刻胶形成与掩膜图案相反的图形。

本步骤中，旋涂 SU-8 光刻胶的厚度为 300-500 微米，与上层流体通道和下层流体通道的高度对应。前烘的温度为 95℃，时间为 2-8 小时。

S102：将具有上下层流体通道结构图案的掩膜固定于附有光刻胶的基底表面；

掩膜具有上层流体通道结构和下层流体通道结构的图案，掩膜用于隔档紫外光，从而将掩膜上图案复制到 SU-8 光刻胶上。

S103：光源垂直照射附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片进行曝光，并进行后烘；

光源发射的光穿过掩膜上的图案照射到 SU-8 光刻胶上，SU-8 光刻胶被曝光的区域将发生交联，交联后的区域不溶于显影液。本实施例中的光源均为紫外光光源，用于发射紫外光进行曝光。

本步骤中，后烘的温度为 95℃，时间为 10-30 分钟。

S104：自然冷却后，采用乳酸乙酯显影液去除未曝光的光刻胶，形成上下层流体通道结构的模板，并进行坚膜；

本步骤中，通过显影液去除未曝光的 SU-8 光刻胶，显影后的 SU-8 光刻胶形成与掩膜相反的图形结构，再坚膜加固，坚膜的温度为 180℃，时间为 2 小时。

S105：具有上下层流体通道结构的模板制备 PDMS 材质的上层芯片和下层芯片。

本步骤中，通过具有与上层流体通道结构和下层流体通道结构相对应的光刻胶模板制备出 PDMS 材质的上层芯片和下层芯片，并且在上层芯片流体通道的两端打出入孔，并在对应下层流体通道的出入口处打孔，而下层芯片不打孔。最终完成制备成上层芯片和下层芯片。

如图 5 和图 6 所示，步骤 S200（多孔膜模板的制备方法）包括如下

步骤:

S201: 在玻璃或硅片的基底表面旋涂光刻胶, 并进行第一次前烘;

本步骤中, 在玻璃或硅片 301 上旋涂厚度为 150-200 微米的 SU-8 光刻胶 302, 此厚度与多孔膜上的凸起高度对应, 第一前烘的温度为 95℃, 时间为 2-4 小时。

S202: 将具有与多孔膜上凸起对应的圆形阵列图案的掩膜固定于附有光刻胶的基底表面;

掩膜上的圆形阵列图案的直径为 100-200 微米, 间距为 150-200 微米, 与多孔膜上凸起对应, 用于制备多孔膜上凸起的模板。

S203: 将附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片固定于可旋转及可倾斜的平台上, 并置于垂直光源下进行第一次曝光;

本步骤中, 将附有光刻胶的玻璃或硅片固定在平台上, 平台可调节倾斜角度及可自由旋转, 用于调节曝光的光照角度。在曝光前, 先将平台的倾斜 15-45°, 使得紫外光倾斜 15-45° 对 SU-8 光刻胶 302 进行曝光, 在曝光过程中, 平台沿着台面的法向旋转 360°, 曝光后 SU-8 光刻胶 302 具有曝光区域 302a 和未曝光区域 302b, 未曝光区域 302b 用于制备多孔膜上的凸起。

S204: 去除掩膜, 在经过曝光的光刻胶上再旋涂光刻胶, 并进行第二次前烘;

第一曝光后, 在 SU-8 光刻胶 302 上旋涂 SU-8 光刻胶 303, SU-8 光刻胶 303 的厚度为 30-50 微米, 与多孔膜的厚度对应。第二次前烘的温度为 95℃, 时间为 1-2 小时。

S205: 将具有与多孔膜上通孔对应的圆形图案的掩膜固定于附有两层光刻胶的基底表面, 并且圆形图案位于第一次曝光的曝光区域内;

本步骤中, 掩膜的圆形图案的直径为 10 微米, 间距为 50 微米, 与多孔膜上的通孔对应, 掩膜的圆形图案在第一次曝光的区域内。

S206: 光源垂直照射附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片进行第二次曝光, 并进行后烘;

紫外光对光刻胶进行二次曝光后, 曝光成若干个圆柱形 303a, 圆柱形 303a 用于制备多孔膜上的通孔。

S207: 自然冷却后, 采用显影液去除未曝光的光刻胶, 形成多孔膜模板。

本步骤中，制备的多孔膜模板具有与多孔膜相反互补的结构，多孔膜模板制备多孔膜。

如图 7 所示，步骤 S300（制备多孔膜及封接组装）包括如下步骤：

S301：将 PDMS 单体与交联剂混合制成 PDMS 垫板；

将 PDMS 单体与交联剂按照 15:1 的比例混合后，真空除气泡，倒在模具中，置于 80℃ 烘箱内 2-4 小时固化，制成厚度为 5 毫米的 PDMS 垫板。

S302：在多孔膜模板和 PDMS 垫板的表面进行硅烷化修饰；

本步骤中，采用三甲基硅烷在多孔膜模板和 PDMS 垫板的表面进行硅烷化修饰。

S303：在硅烷化修饰后的多孔膜模板上旋涂未交联的 PDMS；

本步骤中，旋涂未交联的 PDMS 的厚度为 30-50 微米。

S304：将硅烷化修饰后的 PDMS 垫板置于旋涂有 PDMS 的多孔膜模板上，并在 PDMS 垫板上放置重物静压；

本步骤中，重物的重量为 3-6kg，重物静压的时间为 8-12 小时，例如置于室温环境下静止过夜。

S305：将多孔膜模板、PDMS 垫板和重物一起加热，固化制成多孔膜；

本步骤中，加热的温度为 80℃，时间为 2-4 小时。

S306：移去重物，从多孔膜模板上揭下多孔膜，多孔膜附着在 PDMS 垫板上；

S307：将上层芯片与 PDMS 垫板上的多孔膜对准封接在一起；

S308：将多孔膜和上层芯片一起从 PDMS 垫板剥离；

S309：将下层芯片与多孔膜对准封接在一起，形成仿生肠道器官芯片。

本实施例提供的仿生肠道器官芯片的制备方法，主要采用软光刻技术制备仿生肠道器官芯片，制备效率高，并选用 SU-8 光刻胶进行制备，能够制备出结构精度高的芯片。

实施例三：

本实施例提供了一种制备仿生肠道器官的方法，本制备方法通过实施例一所述的仿生肠道器官芯片进行，本方法为对仿生肠道器官芯片的应用。

本实施例在仿生肠道器官芯片内构建三维肠道微组织并进行动态培养，如图 8 所示，具体包括如下步骤：

S401：对仿生肠道器官芯片进行灭菌处理；

分别利用 70% 的酒精和紫外线射线对实施例一所述的仿生肠道器官芯片进行灭菌处理；

S402：将细胞外基质溶液注入到流体通道内，对多孔膜进行修饰，修饰后清洗流体通道；

将细胞外基质（I 型胶原、基质胶 matrigel 等）溶液从上层芯片的入口注入到通道内对 PDMS 多孔膜进行修饰，修饰后用无血清的培养基或 PBS 清洗通道；。

S403：将肠细胞悬液注入到上层流体通道内，静止一定时间，以使肠细胞黏附在修饰后的多孔膜上；

将肠细胞（Caco-2）按照 10^6 个/ml 的浓度接种到芯片内的上层流体通道内，静止 2 小时以上，使细胞黏附与修饰后的多孔膜上生长；

S404：再将培养基按照一定的流速连续注入到流体通道内，培育若干天后，肠细胞分化成熟，附着在多孔膜凸起上的肠细胞将具有模拟肠绒毛结构，形成三维肠道微组织。

利用注射泵将培养基注入到芯片的上层流体通道与下层流体通道内，实现对肠细胞进行灌流的动态培养，培养 5-7 天后肠细胞（Caco-2）将分化成熟，附着在三维凸起结构上的肠细胞将（Caco-2）具有模拟肠绒毛结构，形成仿生三维肠道微组织，并可以应用于相关的研究工作。

以上应用了具体个例对本发明进行阐述，只是用于帮助理解本发明，并不用以限制本发明。对于本发明所属技术领域的技术人员，依据本发明的思想，还可以做出若干简单推演、变形或替换。

权 利 要 求

1. 一种仿生肠道器官芯片，具有流体通道，在所述流体通道内设有多孔膜，所述多孔膜将所述流体通道分隔成上层流体通道和下层流体通道，其特征在于，所述多孔膜上分布有若干个用于模拟肠绒毛结构的凸起和若干个用于模拟肠道吸收功能的通孔。

2. 如权利要求 1 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，若干个所述凸起阵列分布在所述多孔膜上，若干个所述通孔均匀分布在所述凸起之外的区域内。

3. 如权利要求 2 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，所述凸起为圆锥或圆台结构。

4. 如权利要求 1 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，所述上层流体通道和下层流体通道的长度为 10-15 毫米，宽度为 1-1.5 毫米，高度为 0.3-0.5 毫米；所述多孔膜的厚度为 30-50 微米。

5. 如权利要求 4 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，所述凸起的底面直径为 100-200 微米，高度为 150-200 微米，间距为 150-200 微米。

6. 如权利要求 4 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，所述通孔的直径为 10 微米，所述通孔之间的间距为 50 微米。

7. 如权利要求 1 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，包括上层芯片和下层芯片，所述上层芯片的下表面具有开放的上层流体通道，所述下层芯片的上表面具有开放的上层流体通道；所述多孔膜封接在所述上层芯片和下层芯片之间，围合成所述上层流体通道和下层流体通道；所述上层芯片上与上层流体通道两端对应的位置以及与下层流体通道两端对应的位置分别打有出入孔。

8. 如权利要求 7 所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，所述上层芯片、下层芯片以及具有凸起结构的多孔膜均为 PDMS 材质。

9. 一种仿生肠道器官芯片的制备方法，用于制备如权利要求 1 至 8 中任一项所述的仿生肠道器官芯片，其特征在于，包括如下步骤：

制备上层芯片和下层芯片；

制备多孔膜模板；

制备多孔膜及封接组装：通过多孔膜模板制备多孔膜，并将所述多孔膜封接在所述上层芯片和下层芯片之间，形成仿生肠道器官芯片；

其中，所述多孔膜上分布有若干个用于模拟肠绒毛结构的凸起和若干个用于模拟肠道吸收功能的通孔。

10. 如权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于，所述制备上层芯片和下层芯片包括如下步骤：

在玻璃或硅片的基底表面旋涂光刻胶，并进行前烘；

将具有上下层流体通道结构图案的掩膜固定于附有光刻胶的基底表面；

光源垂直照射附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片进行曝光，并进行后烘；

自然冷却后，采用显影液去除未曝光的光刻胶，形成具有上下层流体通道结构的模板，并进行坚膜；

通过具有上下层流体通道结构的模板制备 PDMS 材质的上层芯片和下层芯片。

11. 如权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，所述光刻胶的厚度为 300-500 微米。

12. 如权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，所述前烘的温度为 95℃，时间为 2-8 小时。

13. 如权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，所述后烘的温度为 95℃，时间为 10-30 分钟。

14. 如权利要求 10 所述的制备方法，其特征在于，所述坚膜的温度为 180℃，时间为 2 小时。

15. 如权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于，所述制备多孔膜模板包括如下步骤：

在玻璃或硅片的基底表面旋涂光刻胶，并进行第一次前烘；

将具有与多孔膜上凸起对应的圆形阵列图案的掩膜固定于附有光刻胶的基底表面；

将附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片固定于可旋转及可倾斜调节的平台上，并置于垂直光源下进行第一次曝光；

去除掩膜，在经过曝光的光刻胶上再旋涂光刻胶，并进行第二次前烘；

将具有与多孔膜上通孔对应的圆形图案的掩膜固定于附有两层光刻胶的基底表面，并且所述圆形图案位于第一次曝光的曝光区域内；

光源垂直照射附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片进行第二次曝光，并进行后烘；

自然冷却后，采用显影液去除未曝光的光刻胶，形成多孔膜模板。

16. 如权利要求 10 或 15 所述的制备方法，其特征在于，所述光刻胶为 SU-8 光刻胶，所述显影液为乳酸乙酯。

17. 如权利要求 10 或 15 所述的制备方法，其特征在于，所述光源为紫外光光源。

18. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述第一次曝光的过程具体为：将附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片置于可调节倾斜角度及可自由旋转的平台上，调节平台的倾斜角度，使光源以倾斜 15-45° 照射附有掩膜和光刻胶的玻璃或硅片进行第一次曝光，在曝光过程中，平台沿着台面的法向旋转 360°。

19. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述光刻胶的厚度为 150-200 微米。

20. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述第一次前烘的温度为 95℃，时间为 2-4 小时。

21. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述掩膜上的圆形图案的直径为 100-200 微米，间距为 150-200 微米。

22. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述再次旋涂的光刻胶的厚度为 30-50 微米。

23. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述第二次前烘的温度为 95℃，时间为 1-2 小时。

24. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述掩膜上的圆形图案的直径为 10 微米，间距为 50 微米。

25. 如权利要求 15 所述的制备方法，其特征在于，所述后烘的温度为 95℃，时间为 10-30 分钟。

26. 如权利要求 9 所述的制备方法，其特征在于，所述制备多孔膜及封接组装包括如下步骤：

将 PDMS 单体与交联剂混合制成 PDMS 垫板；

在所述多孔膜模板和 PDMS 垫板的表面进行硅烷化修饰；

在硅烷化修饰后的多孔膜模板上旋涂未交联的 PDMS；

将硅烷化修饰后的 PDMS 垫板置于旋涂有 PDMS 的多孔膜模板上，并

在 PDMS 垫板上放置重物静压；

将多孔膜模板、PDMS 垫板和重物一起加热，固化制成多孔膜；

移去重物，从多孔膜模板上揭下多孔膜，所述多孔膜附着在 PDMS 垫板上；

将所述上层流体通道结构与 PDMS 垫板上的多孔膜对准封接在一起；

将多孔膜和上层流体通道结构一起从 PDMS 垫板剥离；

将所述下层流体通道结构与多孔膜对准封接在一起，形成仿生肠道器官芯片。

27. 如权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于，所述 PDMS 单体与交联剂的混合比为 15:1。

28. 如权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于，所述 PDMS 单体与交联剂混合后，真空除气泡，倒在模具中，置于 80℃ 烘箱内 2-4 小时固化，制成厚度为 5 毫米的 PDMS 垫板。

29. 如权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于，所述旋涂未交联的 PDMS 的厚度为 30-50 微米。

30. 如权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于，所述重物的重量为 3-6kg，重物静压的时间为 8-12 小时。

31. 如权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于，所述加热的温度为 80℃，时间为 2-4 小时。

32. 如权利要求 26 所述的制备方法，其特征在于，所述封接方法采用等离子处理，并进行键合。

33. 一种制备仿生肠道器官的方法，其特征在于，利用权利要求 1 至 8 中任一项所述的仿生肠道器官芯片进行。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，包括如下步骤：

对如权利要求 1 至 8 中任一项所述的仿生肠道器官芯片进行灭菌处理；

将细胞外基质溶液注入到流体通道内，对多孔膜进行修饰，修饰后清洗流体通道；

将肠细胞悬液注入到上层流体通道内，静止一定时间，以使肠细胞黏附在修饰后的多孔膜上；

再将培养基以一定的流速连续注入到上层和下层流体通道内，培育若干个天后，肠细胞分化成熟，附着在多孔膜凸起上的肠细胞将具有模

拟肠绒毛结构，形成三维肠道微组织。

35. 如权利要求 34 所述的制备方法，其特征在于，采用浓度为 70% 的酒精和紫外线对仿生肠道器官芯片进行灭菌处理。

36. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述细胞外基质溶液为 I 型胶原或基质胶 matrigel 溶液。

37. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，修饰后采用无血清的培养基或 PBS 清洗流体通道。

38. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述肠细胞浓度为 10^6 个/ml。

39. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，所述肠细胞悬液注入到流体通道内后，静止两小时以上。

40. 如权利要求 34 所述的方法，其特征在于，将培养基以一定的流速连续注入到上层和下层流体通道内，培育肠细胞 5-7 天。

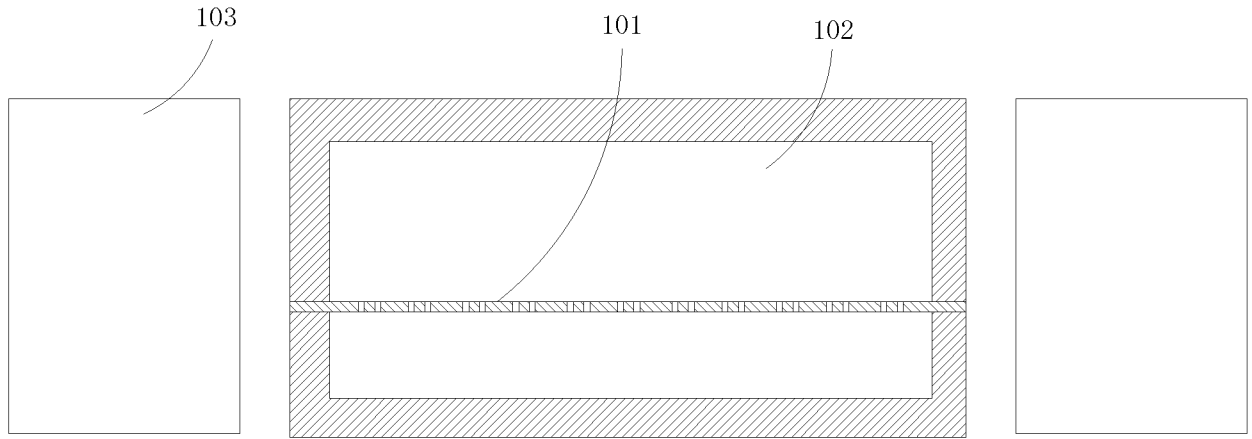


图 1

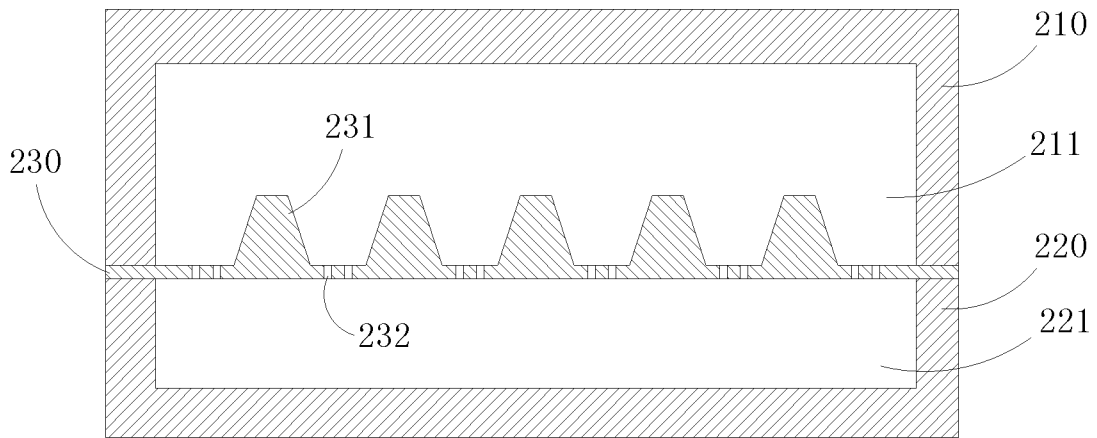


图 2

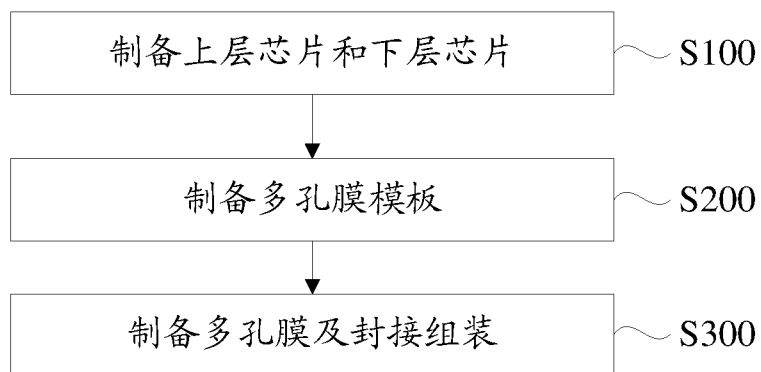


图 3



图 4

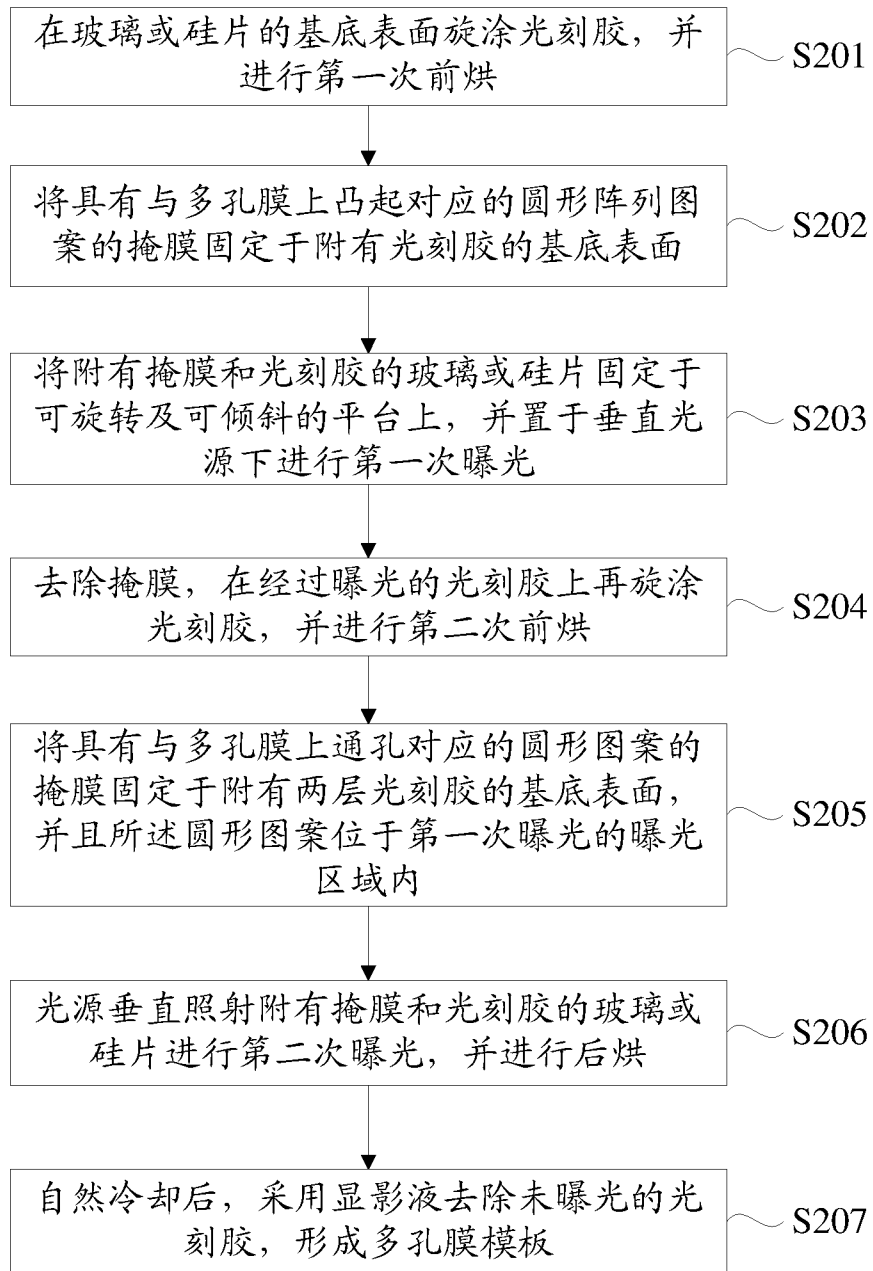


图 5

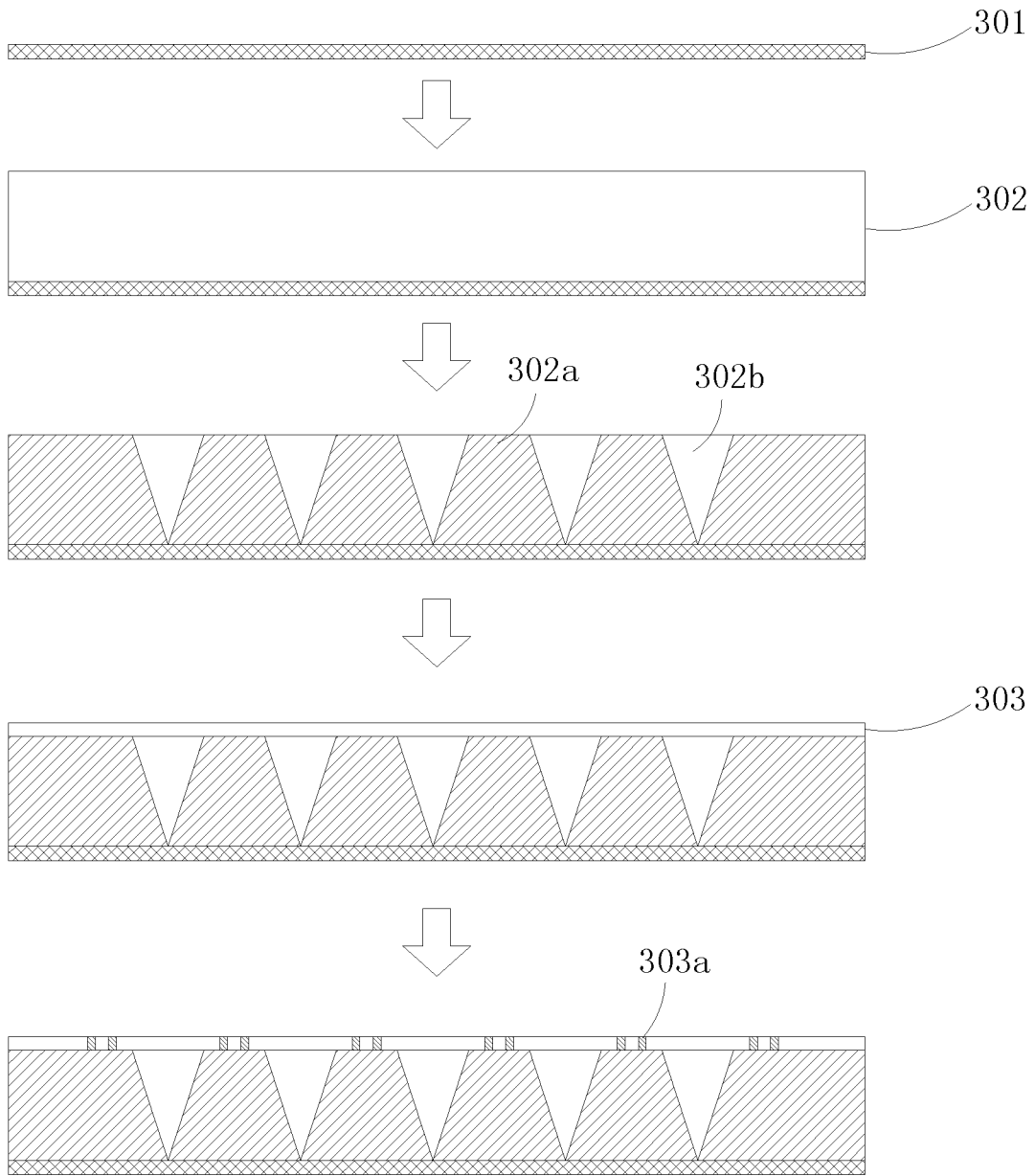


图 6

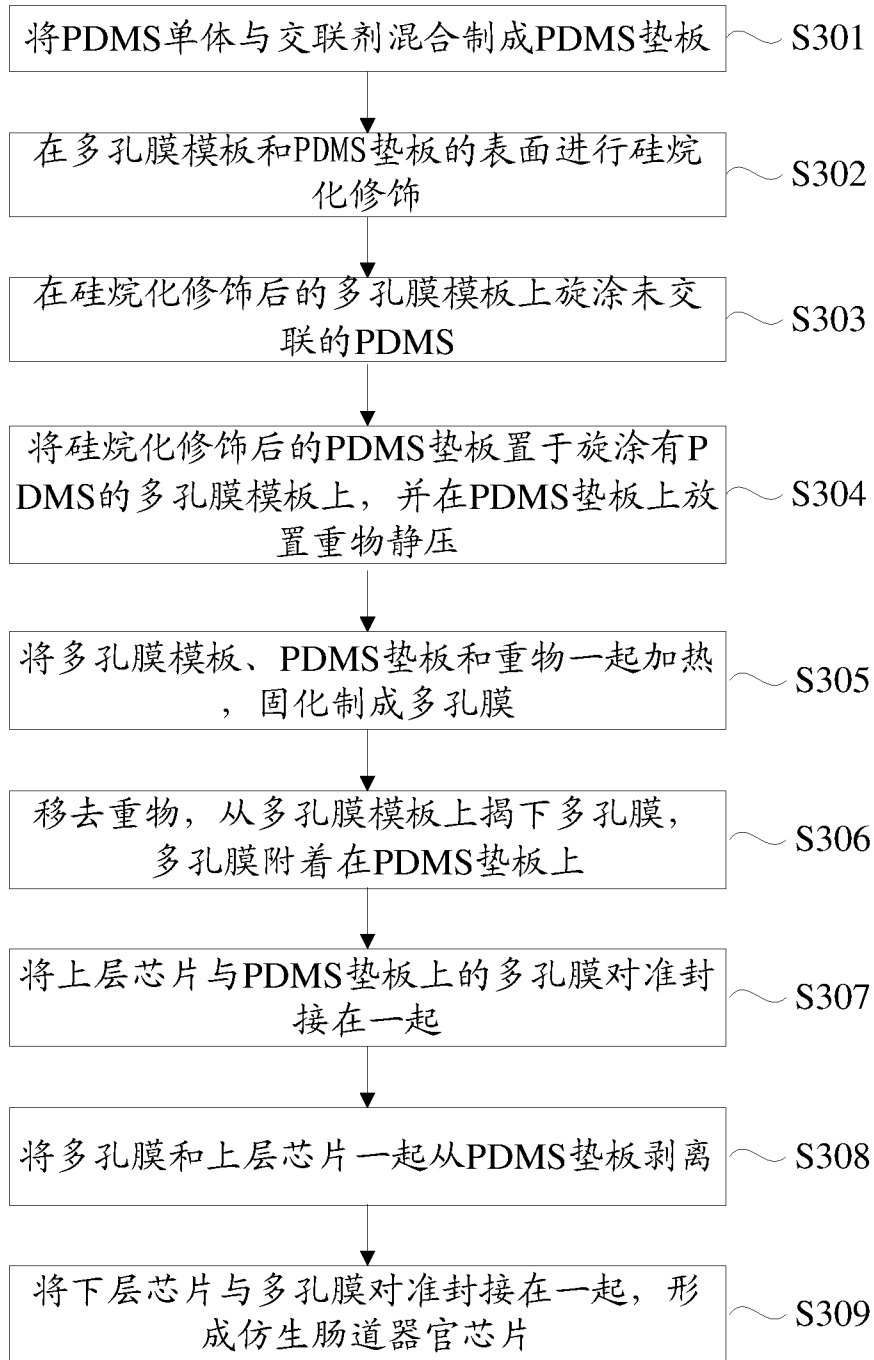


图 7

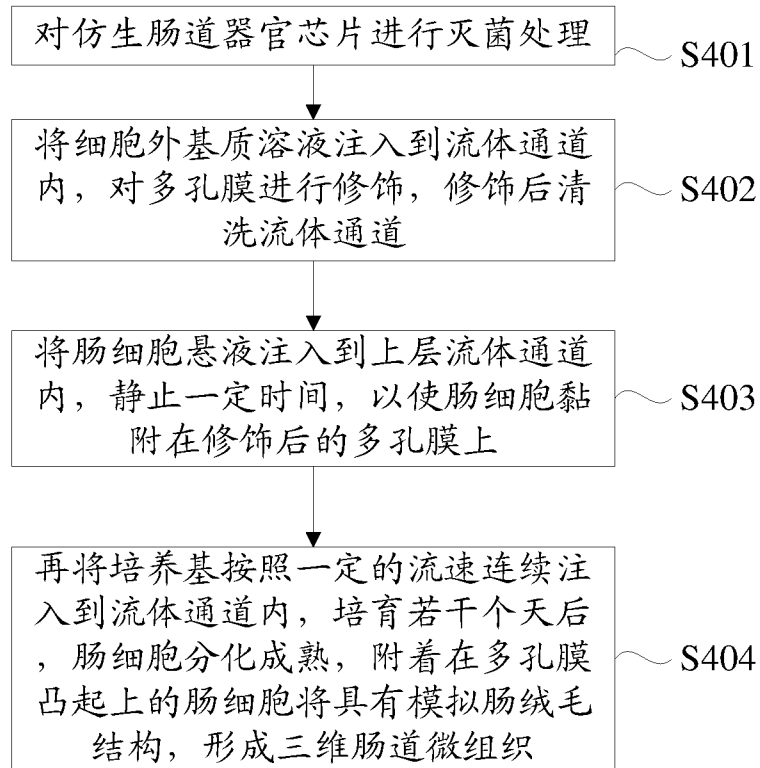


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/087598

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/22(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/16(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) C12M3 C12M1 C12N5		
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) CNTXT, CNABS, CNKI: 芯片, 阵列, 微流控, 肠, 器官, 多孔, 膜, 绒毛, 层, 通道, PDMS, 三维 VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, Pubmed: organ, gut, intestine, intestinal, gastrointestinal, chip, array, microfluid, membrane, porous, 3D, PDMS, villi, villous, layer, channel		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103502426 A (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 08 January 2014 (2014-01-08) description, paragraphs 25-93 and embodiments 1-2, and figures 2, 5 and 13	claims 1-40
Y	US 2015174573 A1 (UNIV. CORNELL) 25 June 2015 (2015-06-25) description, paragraphs 43-60 and embodiments 1-11, and figures 1-19	claims 1-40
Y	WO 2017136462 A2 (EMULATE INC. ET AL.) 10 August 2017 (2017-08-10) claims 1-104	claims 1-40
Y	SUNG, J.H. et al. "Microscale 3-D Hydrogel Scaffold for Biomimetic Gastrointestinal (GI) Tract Model" <i>Lab on a Chip</i> , Vol. 11, 15 December 2010 (2010-12-15), experiment part, and figure 1	claims 1-40
Y	YL, Banya et al. "Three-Dimensional in Vitro Gut Model on a Villi-Shaped Collagen Scaffold" <i>BioChip Journal</i> , 02 June 2017 (2017-06-02), abstract, and figure 1	claims 1-40
A	WO 2018021906 A1 (UNIV. DELFT TECH.) 01 February 2018 (2018-02-01) entire document	claims 1-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "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 23 October 2018		Date of mailing of the international search report 18 December 2018
Name and mailing address of the ISA/CN State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Yuli et al. "Capture and 3D Culture of Colonic Crypts and Colonoids in a Microarray Platform" <i>Lab Chip</i> , Vol. 13, No. (23), 07 December 2013 (2013-12-07), entire document	claims 1-40
A	YU, Jiajie et al. "In Vitro 3D Human Small Intestinal Villous Model for Drug Permeability Determination" <i>Biotechnology and Bioengineering</i> , Vol. 109, No. (9), 17 April 2012 (2012-04-17), entire document	claims 1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/087598

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103502426	A	08 January 2014	RU	2612915	C2	13 March 2017
				JP	2014506801	A	20 March 2014
				US	2017101628	A1	13 April 2017
				EP	2681306	A2	08 January 2014
				JP	6122388	B2	26 April 2017
				AU	2012223526	B2	09 March 2017
				CN	103502426	B	13 March 2018
				RU	2013143537	A	10 April 2015
				SG	192931	A1	30 September 2013
				AU	2017202616	A1	11 May 2017
				JP	2017136082	A	10 August 2017
				WO	2012118799	A2	07 September 2012
				KR	20140040704	A	03 April 2014
				CA	2828110	A1	07 September 2012
				AU	2012223526	A1	12 September 2013
				HK	1191971	A0	08 August 2014
				SG	192931	B	17 March 2016
				IN	201307653	P1	20 May 2016
				US	2014038279	A1	06 February 2014
				SG	10201601434	A1	30 March 2016
<hr/>							
US	2015174573	A1	25 June 2015	US	9821309	B2	21 November 2017
				WO	2014008358	A1	09 January 2014
<hr/>							
WO	2017136462	A2	10 August 2017	CA	3013337	A1	10 August 2017
				WO	2017136479	A1	10 August 2017
				CA	3013357	A1	10 August 2017
				AU	2017214468	A1	13 September 2018
				AU	2017213795	A1	16 August 2018
<hr/>							
WO	2018021906	A1	01 February 2018	NL	2017227	B1	31 January 2018

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12M 3/00(2006.01)i; C12N 5/22(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12M 1/16(2006.01)i</p> <p>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</p>																							
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12M3 C12M1 C12N5</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNXTX, CNABS, CNKI: 芯片, 阵列, 微流控, 肠, 器官, 多孔, 膜, 绒毛, 层, 通道, PDMS, 三维 VEN, USTXT, EPTXT, WOTXT, Pubmed:organ, gut, intestine, intestinal, gastrointestinal, chip, array, microfluid, membrane, porous, 3D, PDMS, villi, villous, layer, channel</p>																							
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 103502426 A (哈佛大学校长及研究员协会) 2014年 1月 8日 (2014 - 01 - 08) 说明书第25-93段, 实施例1-2, 图2、图5、图13</td> <td>权利要求1-40</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2015174573 A1 (UNIV CORNELL) 2015年 6月 25日 (2015 - 06 - 25) 说明书第43-60段, 实施例1-11, 图1-19</td> <td>权利要求1-40</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2017136462 A2 (EMULATE INC等) 2017年 8月 10日 (2017 - 08 - 10) 权利要求1-104</td> <td>权利要求1-40</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Jong Hwan Sung 等. "Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model" Lab on a Chip, 第11卷, 2010年 12月 15日 (2010 - 12 - 15), 实验部分, 图1</td> <td>权利要求1-40</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Banya Yi 等. "Three-dimensional in vitro Gut Model on a Villi-shaped Collagen Scaffold" BioChip J., 2017年 6月 2日 (2017 - 06 - 02), 摘要, 图1</td> <td>权利要求1-40</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2018021906 A1 (UNIV DELFT TECH) 2018年 2月 1日 (2018 - 02 - 01) 全文</td> <td>权利要求1-40</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 103502426 A (哈佛大学校长及研究员协会) 2014年 1月 8日 (2014 - 01 - 08) 说明书第25-93段, 实施例1-2, 图2、图5、图13	权利要求1-40	Y	US 2015174573 A1 (UNIV CORNELL) 2015年 6月 25日 (2015 - 06 - 25) 说明书第43-60段, 实施例1-11, 图1-19	权利要求1-40	Y	WO 2017136462 A2 (EMULATE INC等) 2017年 8月 10日 (2017 - 08 - 10) 权利要求1-104	权利要求1-40	Y	Jong Hwan Sung 等. "Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model" Lab on a Chip, 第11卷, 2010年 12月 15日 (2010 - 12 - 15), 实验部分, 图1	权利要求1-40	Y	Banya Yi 等. "Three-dimensional in vitro Gut Model on a Villi-shaped Collagen Scaffold" BioChip J., 2017年 6月 2日 (2017 - 06 - 02), 摘要, 图1	权利要求1-40	A	WO 2018021906 A1 (UNIV DELFT TECH) 2018年 2月 1日 (2018 - 02 - 01) 全文	权利要求1-40
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
Y	CN 103502426 A (哈佛大学校长及研究员协会) 2014年 1月 8日 (2014 - 01 - 08) 说明书第25-93段, 实施例1-2, 图2、图5、图13	权利要求1-40																					
Y	US 2015174573 A1 (UNIV CORNELL) 2015年 6月 25日 (2015 - 06 - 25) 说明书第43-60段, 实施例1-11, 图1-19	权利要求1-40																					
Y	WO 2017136462 A2 (EMULATE INC等) 2017年 8月 10日 (2017 - 08 - 10) 权利要求1-104	权利要求1-40																					
Y	Jong Hwan Sung 等. "Microscale 3-D hydrogel scaffold for biomimetic gastrointestinal (GI) tract model" Lab on a Chip, 第11卷, 2010年 12月 15日 (2010 - 12 - 15), 实验部分, 图1	权利要求1-40																					
Y	Banya Yi 等. "Three-dimensional in vitro Gut Model on a Villi-shaped Collagen Scaffold" BioChip J., 2017年 6月 2日 (2017 - 06 - 02), 摘要, 图1	权利要求1-40																					
A	WO 2018021906 A1 (UNIV DELFT TECH) 2018年 2月 1日 (2018 - 02 - 01) 全文	权利要求1-40																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																							
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																						
2018年 10月 23日	2018年 12月 18日																						
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																						
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	周洋																						
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(20)-28950579																						

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Yuli Wang 等. "Capture and 3D culture of colonic crypts and colonoids in a microarray platform" Lab Chip, 第13卷, 第23期, 2013年 12月 7日 (2013 - 12 - 07), 全文	权利要求1-40
A	Jiajie Yu 等. "In Vitro 3D Human Small Intestinal Villous Model for Drug Permeability Determination" Biotechnology and Bioengineering, 第109卷, 第9期, 2012年 4月 17日 (2012 - 04 - 17), 全文	权利要求1-40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/087598

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	103502426	A	2014年 1月 8日	RU	2612915	C2	2017年 3月 13日
				JP	2014506801	A	2014年 3月 20日
				US	2017101628	A1	2017年 4月 13日
				EP	2681306	A2	2014年 1月 8日
				JP	6122388	B2	2017年 4月 26日
				AU	2012223526	B2	2017年 3月 9日
				CN	103502426	B	2018年 3月 13日
				RU	2013143537	A	2015年 4月 10日
				SG	192931	A1	2013年 9月 30日
				AU	2017202616	A1	2017年 5月 11日
				JP	2017136082	A	2017年 8月 10日
				WO	2012118799	A2	2012年 9月 7日
				KR	20140040704	A	2014年 4月 3日
				CA	2828110	A1	2012年 9月 7日
				AU	2012223526	A1	2013年 9月 12日
				HK	1191971	A0	2014年 8月 8日
				SG	192931	B	2016年 3月 17日
				IN	201307653	P1	2016年 5月 20日
				US	2014038279	A1	2014年 2月 6日
				SG	10201601434	A1	2016年 3月 30日
US	2015174573	A1	2015年 6月 25日	US	9821309	B2	2017年 11月 21日
				WO	2014008358	A1	2014年 1月 9日
WO	2017136462	A2	2017年 8月 10日	CA	3013337	A1	2017年 8月 10日
				WO	2017136479	A1	2017年 8月 10日
				CA	3013357	A1	2017年 8月 10日
				AU	2017214468	A1	2018年 9月 13日
				AU	2017213795	A1	2018年 8月 16日
WO	2018021906	A1	2018年 2月 1日	NL	2017227	B1	2018年 1月 31日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)