

(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
2012 年 5 月 24 日 (24.05.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/065322 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/07 (2010.01) *C12N 5/16* (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01) *C12N 15/12* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2010/079372
- (22) 国际申请日: 2010 年 12 月 2 日 (02.12.2010)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010548193.6 2010 年 11 月 17 日 (17.11.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国广东省广州市广州大学城北三路, Guangdong 510006 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **张雁 (ZHANG, Yan)** [CN/CN]; 中国广东省广州市广州大学城北三路, Guangdong 510006 (CN)。 **王华敏 (WANG, Huamin)** [CN/CN]; 中国广东省广州市广州大学城北三路, Guangdong 510006 (CN)。 **蔡晓青 (CAI, Xiaoqing)** [CN/CN]; 中国广东省广州市广州大学城北三路, Guangdong 510006 (CN)。
- (74) 代理人: 广州新诺专利商标事务所有限公司 (GUANGZHOU SINO PATENT & TRADEMARK AGENT CO., LTD.); 中国广东省广州市越秀区应元路越秀山体育场综合楼七楼华辉, Guangdong 510040 (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

[见续页]

(54) Title: BRANCHIOSTOMA BELCHERI TSINGTAUENSE CELL LINE AND ESTABLISHING METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 一种青岛文昌鱼细胞系及其建立方法

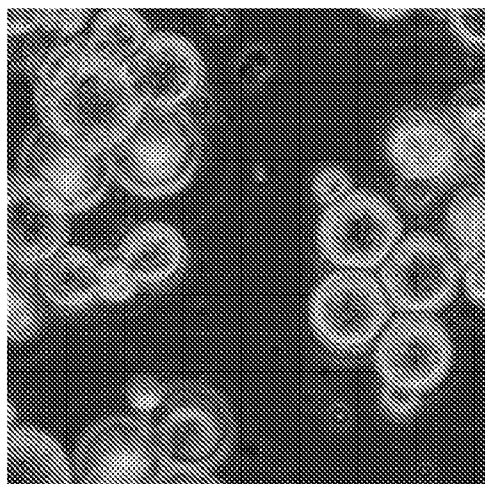


图 5 / Fig. 5

(57) Abstract: A Branchiostoma belcheri tsingtauense cell line is provided. The cell line is established by transfecting primary gill cells of Branchiostoma belcheri tsingtauense with cDNA encoding human telomerase reverse transcriptase (hTERT). The primary cells are lymphocytes. The method for establishing the Branchiostoma belcheri tsingtauense cell line and the culture media specially suitable for using in the method are also provided. The present invention solves the problem of subculturing the Branchiostoma belcheri tsingtauense cells in vitro, and thus is beneficial to promote the further study in the area of heredity, immunity, evolution, development, genomics and so on.

[见续页]

WO 2012/065322 A1



本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(57) 摘要:

提供了一种青岛文昌鱼细胞系。该细胞系是通过将编码人端粒末端转移酶逆转转录酶(hTERT)的 cDNA 转染青岛文昌鱼腮部原代细胞而建立起来的。该原代细胞是淋巴细胞。还提供了用于建立该青岛文昌鱼细胞系的方法以及专门适于在该方法中使用的培养基。本发明解决了体外传代培养文昌鱼细胞系的难题, 因此有利于促进遗传、免疫、进化、发育和基因组学等领域的深入研究。

一种青岛文昌鱼细胞系及其建立方法

技术领域

本发明属于细胞生物学领域，具体涉及一种文昌鱼细胞系及其建系的方法。

背景技术

5 海洋模式动物文昌鱼，拉丁文学名为 *Branchiostoma belcheri*，属于原索动物，既保留了无脊椎动物的一些特性，又具有脊椎动物的特点，是介于无脊椎动物和脊椎动物之间的过渡类型。文昌鱼早在 5 亿年前就已经出现，被认为是现存的脊椎动物始祖代表，素有“活化石”之称。由于其独特的进化地位，被认为是研究动物进化和胚胎发育的典型模式动物，在学术上有很高的进化地
10 位，是国内外近年来遗传、免疫、进化、发育和基因组学研究的热点。但文昌鱼对栖息地生态环境的要求十分严格和苛刻，在世界分布范围很窄，产量很少。它生活在沙质中，要求海水透明度较高，水质洁净，水深在 5-10 米，最适盐度为每升海水中含 14-29 克盐，酸碱度在 8.1-8.2。文昌鱼在我国主要分布在厦门、青岛和烟台沿海。

15 为进一步深化文昌鱼的研究，建立文昌鱼细胞系是至关重要的一个环节。二十世纪八十年代就有人尝试培养文昌鱼细胞，但只局限于原代培养，细胞无法传代。如《厦门大学学报（自然科学版）》2006 年 第 B05 期第 181-183 页《文昌鱼离体细胞原代培养初步研究》一文中就公开了一种原代培养文昌鱼细胞的方法。至今国内外也尚无文昌鱼细胞建系的报道，研究文昌鱼基因功能只能通
20 过其他物种的细胞系来进行。其主要原因是文昌鱼细胞在体外不增殖，迅速进入衰老期，因而无法扩增和传代培养。

 端粒为细胞染色体末端一种有 6kb 串联的短片段重复序列 (TTAGGG)_n 及一些结合蛋白组成的特殊结构。细胞在体外培养过程中进入复制性衰老与端粒有关。每次细胞分裂端粒丢失 30-50 个核苷酸。端粒酶通过维持和延伸细胞染色
25 体末端端粒，避免了染色体末端的不稳定性。目前认为细胞永生化过程中的一

个关键点是维持或延长细胞染色体的端粒，使端粒酶重新表达。端粒酶催化亚单位 TERT 在维持端粒酶的活性中起着至关重要的作用。现有技术中的一个例子是，Choy-Pik Chiu 的研究小组将 hTERT 导入人皮肤成纤维细胞，此转染细胞可以在体外持续传代，而且保持亲本细胞的生物学特性，同样有接触性抑制。

- 5 Carmela P. Morales 等人同样将 hTERT 导入人皮肤成纤维细胞，他们发现高表达 hTERT 的成纤维细胞可以进行 280 次 population doublings (PD)，而亲本细胞则只有 70-80 PD。这些细胞的增殖速度与亲本细胞基本相同。现有技术中的另一个例子是，共济失调毛细血管扩张 Ataxia-telangiectasia (A-T) 患者对离子辐射十分敏感，体外培养 A-T 患者的细胞十分困难，依赖高浓度血清，而
- 10 且很容易衰老。Wood LD 等人将 hTERT 导入 A-T 患者的成纤维细胞，有效地抑制了细胞衰老。

发明内容

本发明的目的是提供一种青岛文昌鱼细胞系以及建立这种细胞系的方法，为文昌鱼的研究建立良好的实验平台，以利于对遗传、免疫、进化、发育和基因组学的进一步深入的研究。

15

本发明采用青岛文昌鱼腮部原代细胞，通过用人端粒酶催化亚单位 hTERT 的 cDNA 转染来实现细胞的成功传代，建立了青岛文昌鱼细胞系。该原代细胞为淋巴细胞。

本发明提供了一种建立青岛文昌鱼细胞系的方法，步骤如下：

- 20 1. 培养青岛文昌鱼腮部原代细胞：将文昌鱼冰浴至昏迷，70～75%酒精消毒体表，无菌解剖，取文昌鱼腮部组织，用含双抗的细胞培养液漂洗后，剪切为细小组织块，将其移至六孔细胞培养板，涂布均匀，25～29℃下恒温静置培养使其贴壁，每日观察细胞生长状态，并补加 0.5～1mL 细胞培养液。3 日后更换 1/2 体积的细胞培养液；
- 25 2. 将人端粒酶催化亚单位 hTERT 的 cDNA 转染青岛文昌鱼腮部原代细胞：转染前 24 小时选择生长状态良好的 293T 细胞，胰酶消化后传代后，接种于 24 孔

培养中，每孔 4×10^5 个细胞，待细胞覆盖率达到 60% 后用于转染；次日换普通培养基。第 5 天收集漂浮层，2000rpm/min 离心 20 分钟，上清液用 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤；病毒感染液 1/4 体积+文昌鱼细胞培养液 3/4 体积，混合后加入原代细胞；

5 3. 获得存活细胞，并进行传代培养：转染 hTERT 的细胞开始增殖后，细胞数目增多，细胞生长密度较大时，用移液管轻轻吸打的方法传代悬浮细胞，传代稀释比例为 1 : 4；以后每次传代视细胞生长状态，3~4 日传代一次；

4. 进行细胞生物学鉴定，验证细胞特征。

10 以上建立青岛文昌鱼细胞系的方法所用人端粒酶催化亚单位 hTERT 的表达载体为逆转录病毒载体 pBABE。

本发明还提供了一种专用于上述建立青岛文昌鱼细胞系方法的细胞培养液，该培养液以 Leibovitz's L-15 (L15) 为基础培养液，并含有以下组分：一种或多种必须氨基酸及非必须氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种盐类、一种或多种微量元素、一种或多种缓冲液及糖类、一种或多种酚类化合物；

15 所述氨基酸为丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸和苯基丙氨酸；

所述的维生素为生物素、氯化胆碱、叶酸、无旋光肌醇、硫胺磷酸酯、维生素 B6、泛酸钙、核黄素、烟酰胺；

20 所述的盐类为氯化钙、氯化钠、氯化钾、氯化镁、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、丙酮酸钠；

所述的糖类为右旋半乳糖；

所述酚类化合物为酚红；

所述培养液的渗透压为 750-800mOsm / kg；

所述培养液的 pH 为 7.2-7.4;

使用前在所述培养液中加入 10% (体积比) 胎牛血清。

其中各组分含量: 甘氨酸为 380-420mg/L, L-丙氨酸为 400-480 mg/L, L-左型精氨酸为 800-1100 mg/L, L-天冬酰胺酸为 450-530 mg/L, L-半胱氨酸 为 200-260 mg/L, L-谷氨酰胺为 570-620 mg/L, L-组氨酸为 480-520 mg/L, L-异亮氨酸为 480-520 mg/L, L-亮氨酸为 220-270 mg/L, L-赖氨酸为 120-170 mg/L, L-蛋氨酸为 120-170 mg/L, L-苯丙氨酸为 230-280 mg/L, L-丝氨酸为 360-420 mg/L, L-苏氨酸为 550-610 mg/L, L-色氨酸为 36-43 mg/L, L-酪氨酸为 530-620 mg/L, L-缬氨酸为 160-220 mg/L, 氯化胆碱为 1.7-2.2 mg/L, D-泛酸钙为 1.8-2.3 mg/L, 叶酸为 1.7-2.2 mg/L, 烟酰胺为 1.6-2.2 mg/L, 维生素 B6 为 1.8-2.3 mg/L, 核黄素为 0.18-0.22 mg/L, 硫胺磷酸酯为 1.9-2.1 mg/L, 无旋光肌醇为 3.6-4.3 mg/L, 氯化钙为 250-300 mg/L, 氯化镁为 170-198 mg/L, 硫酸镁为 180-200 mg/L, 氯化钾为 770-810 mg/L, 磷酸二氢钾为 110-130 mg/L, 氯化钠为 19500-20100 mg/L, 磷酸二氢钠为 370-390 mg/L, 右旋半乳糖为 1650-1900 mg/L, 酚红为 18-21 mg/L, 丙酮酸钠为 1050-1120 mg/L。

本发明通过上述建系方法及其专用培养液提供了一种青岛文昌鱼细胞系, 成功地解决了离体传代培养文昌鱼细胞的技术难题, 有利于促进遗传、免疫、进化、发育和基因组学等领域的深入研究。

附图说明

- 图 1: 将文昌鱼的腮部组织进行原代培养, 12 小时后细胞游离出组织块。
- 图 2: 显示转染 5 天后细胞在贴壁的状态下可以伸出长长的触角。
- 图 3: 利用本发明建立的文昌鱼细胞系的第三代传代细胞。
- 图 4: 利用本发明建立的文昌鱼细胞系的第六代传代细胞。
- 图 5: 利用本发明建立的文昌鱼细胞系的第八代传代细胞。

图 6: Wright-Gimsa 染色结果。

具体实施方式

下面结合具体实施例进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的应用范围。

5 实施例 1

1. 培养青岛文昌鱼腮部原代细胞。将文昌鱼冰浴至昏迷，70～75%酒精消毒体表，无菌解剖，取文昌鱼腮部组织，用含双抗的细胞培养液漂洗后，剪切为细小组织块，将其移至六孔细胞培养板，涂布均匀，25～29℃下恒温静置培养使其贴壁，每日观察细胞生长状态，并补加0.5～1mL细胞培养液。
10 3日后更换1/2体积的细胞培养液。如图1所示，利用文昌鱼腮部组织进行原代培养后，可见贴壁细胞和悬浮细胞从组织中游离出来，悬浮细胞呈圆形，贴壁细胞呈多角形，但原代细胞不分裂。

2. 将人端粒酶催化亚单位hTERT的cDNA转染青岛文昌鱼腮部原代细胞。转染前24小时选择生长状态良好的293T细胞，胰酶消化后传代后，接种于24孔
15 培养中，每孔 4×10^5 个细胞，待细胞覆盖率达到60%后用于转染；次日换普通培养基；第5天收集漂浮层，2000rpm/min离心20分钟，上清液用0.45μm的滤膜过滤；病毒感染液1/4体积+文昌鱼细胞培养液3/4体积，混合后加入原代细胞。

对贴壁细胞和悬浮细胞同时进行hTERT转染5天后，悬浮细胞开始出现分
20 裂，并有大部分细胞逐渐趋于半贴壁状态，少部分细胞贴壁，与细胞培养皿底部粘着紧密。半贴壁和贴壁的细胞形态与原代的悬浮细胞基本相同。在倒置显微镜下观察，细胞虽然大小不一，但均呈圆形，细胞核位于细胞的中央。如图2所示，贴壁细胞有时会伸出长长的触角，但最长持续2天，之后触角会逐渐消失，细胞恢复原状。随着传代次数的增加，细胞的大小差异有逐渐缩小的趋势，
25 但细胞大小不等的现象仍然存在。

3. 获得存活细胞，并进行传代培养。转染hTERT的细胞开始增殖后，细

胞数目增多，细胞生长密度较大时，用移液管轻轻吸打的方法传代悬浮细胞，传代稀释比例为 1：4；以后每次传代视细胞生长状态，3~4 日传代一次。图 3 为第三代传代细胞，图 4 为第六代传代细胞，图 5 为第八代传代细胞。由此可见，第一代至第八代的细胞形态没有十分明显差别，但证明了此细胞成功实现了传代培养，是可以传代培养的文昌鱼细胞系。至目前已传到了第 12 代，细胞增殖旺盛。

4. 进行细胞生物学鉴定，验证细胞特征。将细胞悬浊液滴至载玻片上进行涂片，干燥后进行 Wright-Gimsa 染色。结果如图 6 所示。从染色结果上判断，此细胞系为淋巴细胞。

10 **实施例 2**

1. 优选培养液组分 1

成分	浓度(mg/L)
甘氨酸	380
L-丙氨酸	400
L-左型精氨酸	800
L-天冬酰胺酸	450
L-半胱氨酸	200
L-谷氨酰胺	570
L-组氨酸	480
L-异亮氨酸	480
L-亮氨酸	220
L-赖氨酸	120
成分	浓度(mg/L)

L-蛋氨酸	120
L-苯丙氨酸	230
L-丝氨酸	360
L-苏氨酸	550
L-色氨酸	36
L-酪氨酸	530
L-缬氨酸	160
氯化胆碱	1.7
D-泛酸钙	1.8
叶酸	1.7
烟酰胺	1.6
盐酸吡多辛（维生素 B6）	1.8
核黄素	0.18
硫胺磷酸酯	1.9
无旋光肌醇	3.6
氯化钙（CaCl ₂ ）	250
氯化镁	170
硫酸镁	180
氯化钾	770
磷酸二氢钾	110
氯化钠	19500
磷酸二氢钠	370
成分	浓度(mg/L)

右旋半乳糖	1650
酚红	18
丙酮酸钠	1050

2. 优选培养液组分 2:

成分	浓度(mg/L)
甘氨酸	420
L-丙氨酸	480
L-左型精氨酸	1100
L-天冬酰胺酸	530
L-半胱氨酸	260
L-谷氨酰胺	620
L-组氨酸	520
L-异亮氨酸	520
L-亮氨酸	270
L-赖氨酸	170
L-蛋氨酸	170
L-苯丙氨酸	280
L-丝氨酸	420
L-苏氨酸	610
L-色氨酸	43
L-酪氨酸	620
成分	浓度(mg/L)

L-缬氨酸	220
氯化胆碱	2.2
D-泛酸钙	2.3
叶酸	2.2
烟酰胺	2.2
盐酸吡多辛（维生素 B6）	2.3
核黄素	0.22
硫胺磷酸酯	2.1
无旋光肌醇	4.3
氯化钙（CaCl ₂ ）	300
氯化镁	198
硫酸镁	200
氯化钾	810
磷酸二氢钾	130
氯化钠	20100
磷酸二氢钠	390
右旋半乳糖	1900
酚红	21
丙酮酸钠	1120

3. 优选培养液组分 3:

成分	浓度 (mg/L)
甘氨酸	380-420

L-丙氨酸	400-480
L-左型精氨酸	800-1100
L-天冬酰胺酸	450-530
L-半胱氨酸	200-260
L-谷氨酰胺	570-620
L-组氨酸	480-520
L-异亮氨酸	480-520
L-亮氨酸	220-270
L-赖氨酸	120-170
L-蛋氨酸	120-170
L-苯丙氨酸	230-280
L-丝氨酸	360-420
L-苏氨酸	550-610
L-色氨酸	36-43
L-酪氨酸	530-620
L-缬氨酸	160-220
氯化胆碱	1.7-2.2
D-泛酸钙	1.8-2.3
叶酸	1.7-2.2
烟酰胺	1.6-2.2
成分	浓度(mg/L)
盐酸吡多辛(维生素 B6)	1.8-2.3
核黄素	0.18-0.22

硫胺磷酸酯	1.9-2.1
无旋光肌醇	3.6-4.3
氯化钙 (CaCl ₂)	250-300
氯化镁	170-198
硫酸镁	180-200
氯化钾	770-810
磷酸二氢钾	110-130
氯化钠	19500-20100
磷酸二氢钠	370-390
右旋半乳糖	1650-1900
酚红	18-21
丙酮酸钠	1050-1120

实施例 3

细胞培养液的配制:

以 Leibovitz's L-15 (L15) 为基础培养液, 将其他组分加入 0.8 升的超纯水 (电阻率 18.2 Ω) 中; 将渗透压调配至 750-800mOsm / kg; 将酸碱度调至 5 7.0-7.2; 用超纯水 (电阻率 18.2 Ω) 将培养液的总体积调至 1 升; 充分混匀后过滤灭菌后 4℃ 保存, 过滤后培养液的 pH 值达到 7.2-7.4; 使用前加入 10% (体积比) 胎牛血清。

权 利 要 求 书

1. 一种青岛文昌鱼细胞系，其特征在于用人端粒酶催化亚单位 hTERT 的 cDNA 转染青岛文昌鱼腮部原代细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的青岛文昌鱼细胞系，其特征在于：所述原代细胞
5 为淋巴细胞。

3. 一种建立权利要求 1 所述青岛文昌鱼细胞系的方法，包括以下步骤：

1) 培养青岛文昌鱼腮部原代细胞：将文昌鱼冰浴至昏迷，70～75%酒精消毒体表，无菌解剖，取文昌鱼腮部组织，用含双抗的细胞培养液漂洗后，
剪切为细小组织块，将其移至六孔细胞培养板，涂布均匀，25～29℃下恒
10 温静置培养使其贴壁，每日观察细胞生长状态，并补加 0.5～1mL 细胞培养液；
3 日后更换 1/2 体积的细胞培养液；

2) 将人端粒酶催化亚单位 hTERT 的 cDNA 转染青岛文昌鱼腮部原代细胞：转
染前 24 小时选择生长状态良好的 293T 细胞，胰酶消化后传代后，接种于 24 孔
培养中，每孔 4×10^5 个细胞，待细胞覆盖率达到 60% 后用于转染；次日换普通培
15 养基；第 5 天收集漂浮层，2000rpm/min 离心 20 分钟，上清液用 0.45 μm 的滤
膜过滤；病毒感染液 1/4 体积+文昌鱼细胞培养液 3/4 体积，混合后加入原代细
胞；

3) 获得存活细胞，并进行传代培养：转染 hTERT 的细胞开始增殖后，细胞
数目增多，细胞生长密度较大时，用移液管轻轻吸打的方法传代悬浮细胞，传
20 代稀释比例为 1：4；以后每次传代视细胞生长状态，3～4 日传代一次；

4) 进行细胞生物学鉴定，验证细胞特征。

4. 根据权利要求 3 所述的建立青岛文昌鱼细胞系的方法，其特征在于：所

用人端粒酶催化亚单位 hTERT 的表达载体为逆转录病毒载体 pBABE。

5. 一种专用于权利要求 3 所述建立青岛文昌鱼细胞系的方法的培养液, 以 L15 为基础培养基, 并含有以下组分: 一种或多种必须氨基酸及非必须氨基酸、一种或多种维生素、一种或多种盐类、一种或多种微量元素、一种或多种缓冲液及糖类、一种或多种酚类化合物;

所述氨基酸为丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸、缬氨酸和苯基丙氨酸;

所述的维生素为生物素、氯化胆碱、叶酸、无旋光肌醇、硫胺磷酸酯、维生素 B6、泛酸钙、核黄素、烟酰胺;

所述的盐类为氯化钙、氯化钠、氯化钾、氯化镁、磷酸二氢钠、磷酸二氢钾、硫酸镁、丙酮酸钠;

所述的糖类为右旋半乳糖;

所述酚类化合物为酚红;

所述培养液的渗透压为 750-800mOsm / kg;

所述培养液的 pH 为 7.2-7.4;

使用前在所述培养液中加入 10% (体积比) 胎牛血清。

6. 根据权利要求 5 所述的一种专用于建立青岛文昌鱼细胞系的方法的培养液, 其特征在于各组分含量: 甘氨酸为 380-420mg/L, L-丙氨酸为 400-480 mg/L, L-左型精氨酸为 800-1100 mg/L, L-天冬酰胺酸为 450-530 mg/L, L-半胱氨酸为 200-260 mg/L, L-谷氨酰胺为 570-620 mg/L, L-组氨酸为 480-520 mg/L, L-异亮氨酸为 480-520 mg/L, L-亮氨酸为 220-270 mg/L, L-赖氨酸为 120-170 mg/L, L-蛋氨酸为 120-170 mg/L, L-苯丙氨酸为 230-280 mg/L, L-丝

氨酸为 360-420 mg/L, L-苏氨酸为 550-610 mg/L, L-色氨酸为 36-43 mg/L, L-酪氨酸为 530-620 mg/L, L-缬氨酸为 160-220 mg/L, 氯化胆碱为 1.7-2.2 mg/L, D-泛酸钙为 1.8-2.3 mg/L, 叶酸为 1.7-2.2 mg/L, 烟酰胺为 1.6-2.2 mg/L, 维生素B6为 1.8-2.3 mg/L, 核黄素为 0.18-0.22 mg/L, 硫胺磷酸酯为 1.9-2.1 mg/L, 5 无旋光肌醇为 3.6-4.3 mg/L, 氯化钙为 250-300 mg/L, 氯化镁为 170-198 mg/L, 硫酸镁为 180-200 mg/L, 氯化钾为 770-810 mg/L, 磷酸二氢钾为 110-130 mg/L, 氯化钠为 19500-20100 mg/L, 磷酸二氢钠为 370-390 mg/L, 右旋半乳糖为 1650-1900 mg/L, 酚红为 18-21 mg/L, 丙酮酸钠为 1050-1120 mg/L。

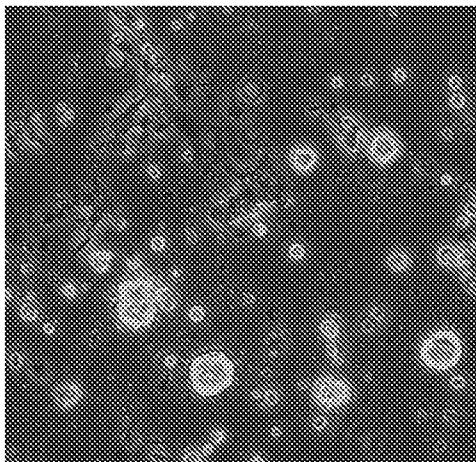


图 1

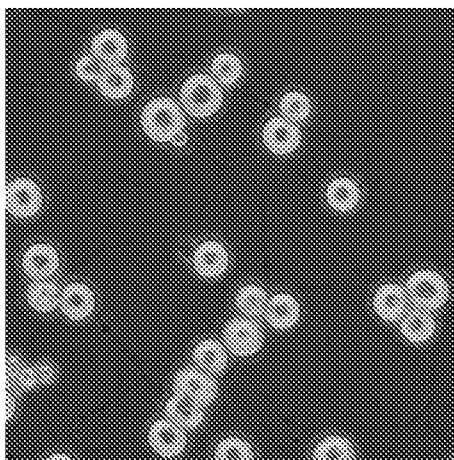


图 2

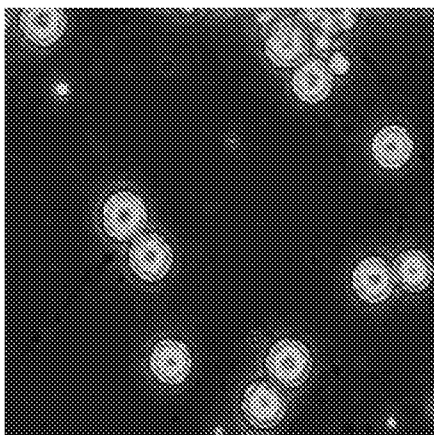


图 3

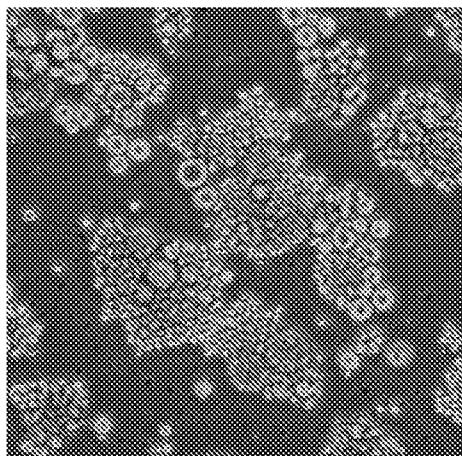


图 4

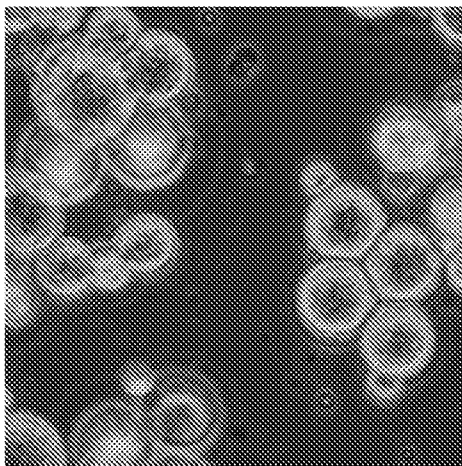


图 5

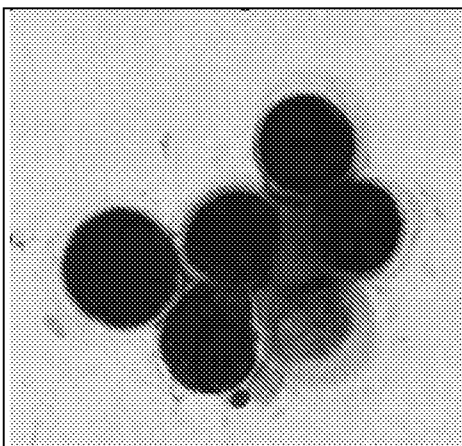


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/079372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CPRSABS,CNABS, DWPI,SIPOABS ,ISI WEB OF KNOWLEDGE, CNKI

Search terms: Branchiostoma belcheri, Branchiostoma belcheri tsingtauense, cell line, lymphocytes, human telomerase reverse transcriptase, hTERT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1644697A (UNIV ZHONGSHAN), 27 Jul. 2005 (27.07.2005), see the whole document	1-6
A	CN1982458A (UNIV ZHONGSHAN), 20 Jun. 2007 (20.06.2007), see the whole document	1-6
A	WO2008094316A2 (STOWERS INST MEDICAL RES), 07 Aug. 2008 (07.08.2008), see the whole document	1-6
A	WO2007142582A1 (INNOVENTUS PROJECT AB), 13 Dec. 2007 (13.12.2007), see the whole document	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 09 Aug. 2011 (09.08.2011)	Date of mailing of the international search report 18 Aug. 2011 (18.08.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer XING,Yunlong Telephone No. (86-10)62411094

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/079372

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHI, Songlin et al., "Primary cell culture from gill explants of amphioxus", Marine Sciences, ISSN: 1000-3096, vol.33, no.3, pages:44-48, 31 Dec. 2009 (31.12.2009), see the whole document	1-6
A	HUANG, Xiaoming et al., "Isolation and Primary Culture of in Vitro Cell from Amphioxus (Branchiostoma belcheri)", Journal of Xiamen University (Natural Science), ISSN: :0438-0479, vol.45, sup., pages:181-183, 31 May 2006 (31.05.2006), see the whole document	1-6
A	Gaowa, Saren et al., "Identification, expression, function and localization of a DUF985 domain-containing hypothetical gene from amphioxus Branchiostoma belcheri", COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B-BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, vol.152, no.1, pages:28-37, 31 Jan. 2009 (31.01.2009), see the whole document	1-6
A	LIANG, Hui et al., "Roles of polysaccharide from Branchiostoma belcheri in anti-DNA oxidation and anti-tumor activity in S180 mice", CHINESE JOURNAL OF OCEANOLOGY AND LIMNOLOGY, ISSN: 0254-4059, vol.27, no.4, pages:845-850, 30 Nov. 2009 (30.11.2009), see the whole document	1-6

International application No.
PCT/CN2010/079372

Form PCT/ISA /210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2010/079372

Continuation of Box A: CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/07(2010.01) i

C12N5/078(2010.01) i

C12N5/16(2006.01) i

C12N15/12(2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/079372

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C12N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CPRSABS,CNABS, DWPI,SIPOABS ,ISI WEB OF KNOWLEDGE, CNKI

检索词: 青岛文昌鱼,细胞系,淋巴细胞,人端粒酶催化亚单位, Branchiostoma belcheri, Branchiostoma belcheri tsingtauense, cell line, lymphocytes, human telomerase reverse transcriptase, hTERT

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	CN1644697A (中山大学), 27.07 月 2005 (27.07.2005), 参见全文	1-6
A	CN1982458A (中山大学), 20.06 月 2007 (20.06.2007), 参见全文	1-6
A	WO2008094316A2 (STOWERS INST MEDICAL RES), 07.08 月 2008 (07.08.2008), 参见全文	1-6
A	WO2007142582A1 (INNOVENTUS PROJECT AB), 13.12 月 2007 (13.12.2007), 参见全文	1-6

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期
09.08 月 2011 (09.08.2011)

国际检索报告邮寄日期
18.8 月 2011 (18.08.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:
中华人民共和国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088
传真号: (86-10)62019451

受权官员
邢云龙
电话号码: (86-10) **62411094**

C(续). 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	石松林等人, “文昌鱼鳃组织原代培养”, 海洋科学, ISSN: 1000-3096, 第 33 卷, 第 3 期, 第 44-48 页, 31.12 月 2009 (31.12.2009), 参见全文	1-6
A	黄晓明等人, “文昌鱼(Branchiostoma belcheri)离体细胞原代培养初步研究”, 厦门大学学报(自然科学版), ISSN: :0438-0479, 第 45 卷, 增刊, 第 181-183 页, 31.05 月 2006 (31.05.2006), 参见全文	1-6
A	Gaowa, Saren 等人, “Identification, expression, function and localization of a DUF985 domain-containing hypothetical gene from amphioxus Branchiostoma belcheri”, COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY B-BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY, 第 152 卷, 第 1 期, 第 28-37 页, 31.01 月 2009 (31.01.2009), 参见全文	1-6
A	LIANG, Hui 等人, “Roles of polysaccharide from Branchiostoma belcheri in anti-DNA oxidation and anti-tumor activity in S180 mice”, CHINESE JOURNAL OF OCEANOLOGY AND LIMNOLOGY, ISSN: 0254-4059, 第 27 卷, 第 4 期, 第 845-850 页, 30.11 月 2009 (30.11.2009), 参见全文	1-6

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/079372

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1644697A	27.07.2005	CN1273599C	06.09.2006
CN1982458A	20.06.2007	CN100535115C	02.09.2009
WO2008094316A2	07.08.2008	WO2008094316A3	12.02.2009
		US2010168396A1	01.07.2010
WO2007142582A1	13.12.2007	EP2021362A1	11.02.2009
		WO2007142582A8	23.07.2009
		US2009286314A1	19.11.2009

续: A. 主题的分类

C12N5/07(2010.01) i

C12N5/078(2010.01) i

C12N5/16(2006.01) i

C12N15/12(2006.01) i