

(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 2 月 9 日 (09.02.2012)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2012/016427 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 5/071 (2010.01) C12R 1/91 (2006.01)
C12N 5/075 (2010.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/001253
- (22) 国际申请日: 2011 年 8 月 1 日 (01.08.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201010242482.3 2010 年 8 月 2 日 (02.08.2010) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业园区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **深圳华大方舟生物技术有限公司 (BGI ARK BIOTECHNOLOGY CO., LTD)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业园区综合楼 10 楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (72) 发明人; 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **李巍 (LI, Wei)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业园区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **梁颜 (LIANG, Yan)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业园区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **刘欢 (LIU, Huan)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业园区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。
- (74) 代理人: 北京北翔知识产权代理有限公司 (PEKSUNG INTELLECTUAL PROPERTY LTD.); 中国北京市海淀区学院路 35 号世宁大厦 908 室, Beijing 100191 (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)。
- 本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: CULTURE MEDIUM OF PIG CELLS

(54) 发明名称: 一种猪细胞培养基

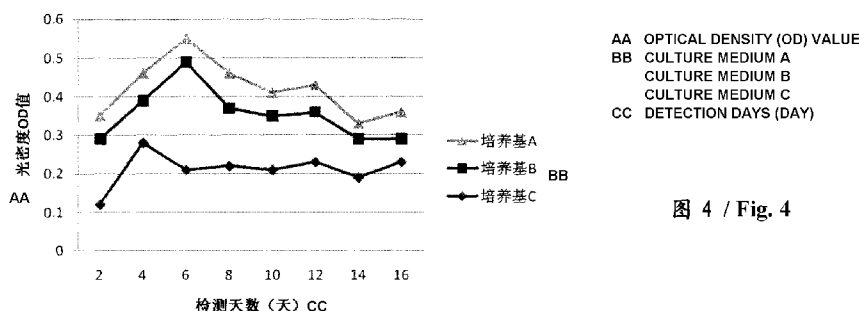


图 4 / Fig. 4

(57) Abstract: A culture medium of pig cells is provided, which comprises a basic culture medium and fetal pig serum. A method for culturing pig cells, fetal pig serum, and a use of the fetal pig serum in culturing pig cells or preparing the culture medium of pig cells are further provided.

(57) 摘要:

提供了一种猪细胞培养基, 其包括基础培养基和胎猪血清。还提供了一种培养猪细胞的方法, 一种胎猪血清以及所述胎猪血清在培养猪细胞或者制备猪细胞培养基中的用途。

WO 2012/016427 A1

一种猪细胞培养基

技术领域

本发明属于细胞生物学领域，涉及一种猪细胞培养基，其包括基础培养基和胎猪血清。本发明还涉及一种培养猪细胞的方法，一种胎猪血清以及所述胎猪血清在培养猪细胞或者制备猪细胞培养基中的用途。

背景技术

培养基既是细胞培养中供给细胞营养和促使细胞生殖增殖的基础物质，也是细胞生长和繁殖的生存环境。培养基的种类很多，按其物质状态分为半固体培养基和培养基两类；按其来源分为合成培养基和天然培养基。目前主要使用的是在合成培养基中加入天然成分而成的完全培养基。

完全培养基由基础培养基（如 MEM）和添加成分（如血清，或对于无血清的培养基，使用激素及生长因子）组成。

基础培养基常常要添加血清，血清终浓度多为 5%-20%（v/v）。特殊用途的血清来源须用经验确定，广泛应用的血清种类有马血清与胎牛血清。胎牛血清中富含丝分裂因子，常选其作细胞增殖用，也用于细胞系和原代培养，而马血清常常用来作有丝分裂后的神经元培养。

目前，猪细胞培养基主要是由基础培养基 DMEM 和/或 F12 与胎牛血清构成的完全培养基，同时，这种培养基也广泛应用于其它种类细胞的培养。胎牛血清来源较为容易，产量较大，是普遍使用的血清。但猪细胞在此种培养基上培养时细胞生长状态和细胞的增殖速度都较为有限，细胞的传代次数也受到了很大的影响。目前在猪的细胞培养方面依然缺少较为理想合适的培养基。

对此，本发明人研制了一种猪细胞培养基，其中在基础培养基中加入胎猪血清替代胎牛血清，以排除使用胎牛血清导致的异种成分引起

的排斥现象。本发明，所述猪细胞中还可以加入选自如下至少一种的添加因子：表皮生长因子（EGF）、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）、人绒毛膜促性腺激素（HCG）、孕马血清促性腺激素（PMSG）。

采用本发明所述的猪细胞培养基可以显著改善猪细胞的培养状态
5 和提高猪细胞的增殖水平，有利于用猪的细胞进行转基因克隆和诱导性多能干细胞的相关研究和应用。

发明内容

本发明的一个方面涉及一种猪细胞培养基，其包括基础培养基和
10 胎猪血清，并且按照培养基的总体积，所述胎猪血清的含量为 5% - 25%（v/v）。在本发明的一个实施方案中，猪细胞培养基中所述胎猪血清的含量为 8-12%（v/v）。在本发明的又一个实施方案中，猪细胞培养基中所述胎猪血清的含量为 10-12%（v/v）。

在本发明中，猪细胞是指来源于猪个体的各种部位不同生长时期
15 的细胞。本发明的猪细胞培养基适用于来自猪个体不同生长时期的各种细胞，包括但不限于：原代猪成纤维细胞、猪肾细胞、猪心肌细胞、猪卵母细胞、猪血管内皮细胞等等。其中，所述“猪细胞”和“胎猪血清”中的猪的品系并不特别限定，常见的是家猪。

所述胎猪血清可以按照如下方法制得：

- 20 1) 血清分离：将获自猪胎的血样进行离心，获得血清；
2) 冷冻脱纤：将步骤 1) 中离心分离得到的血清在-20℃下冷冻脱纤（即脱去纤维）；
3) 澄清过滤：将步骤 2) 中得到样品使用蔡氏纤维素深度滤器进行过滤；
25 4) 血清透析：将步骤 3) 得到的样品用分子量 12000-14000 的透析膜在 0.15M NaCl 溶液中透析，直至样品的葡萄糖含量 < 0.5 mg/mL；
5) γ 射线照射：将步骤 4) 得到的样品进行 γ 射线照射，照射剂量为 1.2 - 4 Gy，得到粗制血清；和

6) 除菌过滤: 先后使用 0.2 微米和 0.1 微米滤膜, 将步骤 5) 中得到的粗制血清再进行滤膜除菌过滤。

上述步骤 1) 中, 所述猪胎优选 3-4 周龄的猪胎。

在本发明的一个实施方案中, 所述胎猪血清的制备方法还包括步骤 7) 和 8):

7) 紫外线照射: 装瓶前用紫外线照射;

8) 封装保存: 将前面步骤 7) 制得的胎猪血清装瓶密封, -20°C 低温保存, 使用之前 4°C 过夜解冻。

在本发明的一个实施方案中, 所述猪细胞培养基中的基础培养基为 DMEM、或 F12、或者是如下面的表 1 所示组成的人工培养基:

表 1: 人工培养基配方

化合物名称	含量 (mg/L)
无水氯化钙	200.00 - 240.00
L-丝氨酸	42.00 - 55.00
L-色氨酸	16.00 - 20.00
L-苏氨酸	95.00 - 110.00
L-酪氨酸钠盐	104.00 - 123.00
硝酸铁	0.10 - 0.40
氯化钾	400.00 - 600.00
L-缬氨酸	94.00 - 112.00
L-盐酸精氨酸	84.00 - 98.00
L-谷氨酰胺	584.00 - 628.00
L-盐酸胱氨酸	63.00 - 72.00
L-亮氨酸	95.00 - 110.00
L-异亮氨酸	93.00 - 105.00
L-盐酸组氨酸	32.00 - 52.00
L-盐酸赖氨酸	126.00 - 156.00
L-甲硫氨酸	25.00 - 40.00
L-苯丙氨酸	46.00 - 78.00
无水硫酸镁	87.67 - 99.60
氯化钠	4400.00 - 6700.00
无水磷酸二氢钠	105.00 - 145.00
D-泛酸钙	2.00 - 6.00
氯化胆碱	2.00 - 5.50
叶酸	3.00 - 5.50

肌醇	5.20 - 8.30
甘氨酸	20.00 - 40.00
烟酰胺	3.00 - 5.00
核黄素	0.20 - 0.60
盐酸硫胺	2.00 - 5.00
盐酸吡哆辛	3.00 - 6.00
葡萄糖	3500.00 - 5500.00
丙酮酸钠	100.00 - 120.00
酚红	14.00 - 16.00

在本发明的一个实施方案中,所述猪细胞培养基还包括添加因子。在本发明中,术语“添加因子”是指选自如下的至少一种: 1) 表皮生长因子(EGF), 例如鼠表皮生长因子(如: Sigma E1257); 2) 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 例如牛碱性成纤维细胞生长因子(如 Sigma F5392); 人绒毛膜促性腺激素(HCG)(如 Sigma C0684)、以及孕马血清促性腺激素(PMSG)(如 Sigma G4877)。

在本发明的一个实施方案中,所述猪细胞培养基中添加因子的种类与含量各自独立地如表2所示。

10 表2 添加因子的种类及其含量:

名称	含量
表皮生长因子(EGF)	3 - 15 ng/ mL
碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)	2 - 15 ng/ mL
人绒毛膜促性腺激素(HCG)	4 - 30 IU/ mL
孕马血清促性腺激素(PMSG)	2 - 28 IU/ mL

在本发明的一个实施方案中,所述猪细胞培养基中添加因子的种类与含量各自独立地如表3所示。

表3 添加因子的种类及其含量

名称	含量
表皮生长因子(EGF)	8.5-12.6 ng/ mL
碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)	6.6-11.8 ng/ mL
人绒毛膜促性腺激素(HCG)	16.7-23.4 IU/ mL
孕马血清促性腺激素(PMSG)	17.3-22.6 IU/ mL

在本发明中,所述猪细胞可以是选自如下细胞中的一种: 原代猪

成纤维细胞、猪肾细胞、猪心肌细胞、猪卵母细胞、猪血管内皮细胞。

本发明的猪细胞培养基可以参照常规的细胞培养基（例如 DMEM 细胞培养基）的方法进行配制，例如可以参考下面的步骤：

1) 配制溶液

- 5 向基础培养基粉末（例如 DMEM 培养基），加入所需水量（无菌超纯水）的一部分，进行先行溶解，然后按照最终的培养基的体积，再加入 5%-25% 的胎猪血清，最后补足所需水量。

如果是液体 DMEM 培养基，直接向容器内加入终体积 5%-25% 的胎猪血清，混匀即可。例如：配置 100mL DMEM 完全培养基，可以在 90mL
10 DMEM 培养基中加入 10mL 胎猪血清，混匀。

然后按照培养基的终体积，加入添加因子，其选自如下物质中的至少一种：

- 3-15 ng/ mL 表皮生长因子（EGF）、2-15 ng/ mL 碱性成纤维细胞生长因子（FGF）、4-30 IU/ mL 人绒毛膜促性腺激素（HCG）、
15 2-28 IU/ mL 孕马血清促性腺激素（PMSG），混匀。

2) 调节 pH 值

用 pH 试纸（或 pH 电位计、氢离子浓度比色计）测试培养基的 pH 值，如不符合需要，可用 10% HCl 或 10% NaOH 进行调节，直到调节到配方要求的 pH 值为止，一般在 6.9-7.5 之间。

- 20 可选的，本发明所述猪细胞培养基的配制方法还包括如下步骤：

3) 分装

- 对于配置好的培养基应按照实验具体需求情况进行分装，一般分装到 50mL 离心管中。分装后从每一离心管中抽取 1mL 置于 35mm 细胞培养皿中，将其放入细胞培养箱中培养两天观察是否有污染出现，如
25 果没有，即可使用；如果出现污染，需要重新配置。

4) 封口

用封口膜将装有培养基的 50mL 离心管管口封闭。

本发明的另一个方面涉及一种培养猪细胞的方法，其特征在于使

用本发明所述的猪细胞培养基。其中，所述猪细胞包括但不限于：原代猪成纤维细胞、猪肾细胞、猪心肌细胞、猪卵母细胞、猪血管内皮细胞等。

5 本发明的再一个方面涉及一种按照如下方法制备的胎猪血清：

1) 血清分离：将获自猪胎的血样进行离心，获得血清；

2) 冷冻脱纤：将步骤 1) 中离心分离得到的血清在 -20°C 下冷冻脱纤（即脱去纤维）；

10 3) 澄清过滤：将步骤 2) 中得到样品使用蔡氏纤维素深度滤器进行过滤；

4) 血清透析：将步骤 3) 得到的样品用分子量 12000 - 14000 的透析膜在 0.15M NaCl 溶液中透析，直至样品的葡萄糖含量 $< 0.5 \text{ mg/mL}$ ；

15 5) γ 射线照射：将步骤 4) 得到的样品进行 γ 射线照射，照射剂量为 1.2 - 4 Gy，得到粗制血清；和

6) 除菌过滤：先后使用 0.2 微米和 0.1 微米滤膜，将步骤 5) 中得到的粗制血清再进行滤膜除菌过滤。

在本发明的一个实施方案中，所述胎猪血清的制备方法还包括步骤 7) 和 8)：

20 7) 紫外线照射：装瓶前用紫外线照射；

8) 封装保存：将前面步骤 7) 制得的胎猪血清装瓶密封， -20°C 低温保存，使用之前 4°C 过夜解冻。

在本发明中，所述猪胎是处死的猪胎，并且优选 3 - 4 周龄的猪胎，血样可以参照常规胎牛血清的采集方式收集。

25 本发明的还一方面涉及如上述方法制备的胎猪血清在猪细胞培养和/或制备猪细胞培养基中的用途。其中，所述猪细胞包括但不限于：原代猪成纤维细胞、猪肾细胞、猪心肌细胞、猪卵母细胞、猪血管内皮细胞等。

发明的有益效果

1) 改善细胞生长状态:

无论是否使用添加因子, 采用本发明所述猪细胞培养基(含有基础培养基与胎猪血清)培养猪细胞, 猪细胞的生长形态明显优于采用含有基础培养基与胎牛血清的传统培养基的情形。

2) 提高细胞增殖速度:

无论是否使用添加因子, 采用本发明所述猪细胞培养基(含有基础培养基与胎猪血清)培养猪细胞, 猪细胞的增殖速度明显优于采用含有基础培养基与胎牛血清的传统培养基的情形。

这说明本发明所述的猪细胞培养基在提高猪细胞的增殖速度方面好于含有基础培养基与胎牛血清的传统培养基。

附图说明

图 1: 培养基 A 培养的原代猪成纤维细胞的形态图 (200 X)。

图 2: 培养基 B 培养的原代猪成纤维细胞的形态图 (200 X)。

图 3: 培养基 C 培养的原代猪成纤维细胞的形态图 (200 X)。

图 4: 培养基 A-C 培养的原代猪成纤维细胞的生长曲线图。

图 5: 培养基 A 培养的原代猪成纤维细胞的核型分析图 (200 X)

图 6: 培养基 B 培养的原代猪成纤维细胞的核型分析图 (200 X)

图 7: 培养基 C 培养的原代猪成纤维细胞的核型分析图 (200 X)

图 8: 培养基 D-G 培养的原代猪成纤维细胞的生长曲线图。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解, 下面的实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件(例如参考 J. 萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译的《分子克隆实验指南》, 第三版, 科学出版社)或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得

的常规产品。

实施例 1: 猪细胞培养基 A、B、C 的配方

1) 猪细胞培养基 A 的配方:

5 猪细胞培养基 A 由人工培养基 1 (组分如表 4 所示)、5% (v/v) 胎猪血清和添加因子组合 1 (组分如表 5 所示) 组成。

表 4 人工培养基 1 配方:

名称	含量 (mg/L)
无水氯化钙	200.00
L-丝氨酸	42.00
L-色氨酸	16.00
L-苏氨酸	95.00
L-酪氨酸钠盐	104.00
硝酸铁	0.10
氯化钾	400.00
L-缬氨酸	94.00
L-盐酸精氨酸	84.00
L-谷氨酰胺	584.00
L-盐酸胱氨酸	63.00
L-亮氨酸	95.00
L-异亮氨酸	93.00
L-盐酸组氨酸	32.00
L-盐酸赖氨酸	126.00
L-甲硫氨酸	25.00
L-苯丙氨酸	46.00
无水硫酸镁	87.67
氯化钠	4400.00
无水磷酸二氢钠	105.00
D-泛酸钙	2.00
氯化胆碱	2.00
叶酸	3.00
肌醇	5.20
甘氨酸	20.00
烟酰胺	3.00
核黄素	0.20
盐酸硫胺	2.00

盐酸吡哆辛	3.00
葡萄糖	3500.00
丙酮酸钠	100.00
酚红	14.00

表 5 添加因子组合 1 配方

名称	含量
鼠表皮生长因子 (EGF) (Sigma E1257)	3 ng/ mL
牛碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) (Sigma F5392)	2 ng/ mL
人绒毛膜促性腺激素 (HCG) (Sigma C0684)	4 IU/ mL
孕马血清促性腺激素 (PMSG) (Sigma G4877)	2 IU/ mL

根据说明书发明内容部分介绍的制备方法, 将人工培养基 1 用无
5 菌纯净水溶解, 按照配方比例加入胎猪血清, 加入无菌纯净水至所需
体积后, 再加入添加因子组合 1。如此制得猪细胞培养基 A。

2) 猪细胞培养基 B 的配方:

猪细胞培养基 B 的组成与培养基 A 基本相同, 只是其中使用相同
浓度的胎牛血清代替胎猪血清。

10 3) 猪细胞培养基 C 的配方:

猪细胞培养基 C 的配方与培养基 A 基本相同, 只是其中不含有添
加因子 EGF、bFGF、HCG、和 PMSG。

实施例 2: 猪细胞培养基 D、E、F、G 的配方

15 1) 猪细胞培养基 D 的配方:

猪细胞培养基 D 由人工培养基 2 (组分如表 6 所示)、25% (v/v)
胎猪血清和添加因子组合 2 (组分如表 7 所示) 组成。

表 6 人工培养基 2 配方:

化合物名称	含量 (mg/L)
无水氯化钙	240.00
L-丝氨酸	55.00
L-色氨酸	20.00
L-苏氨酸	110.00
L-酪氨酸钠盐	123.00

硝酸铁	0.40
氯化钾	600.00
L-缬氨酸	112.00
L-盐酸精氨酸	98.00
L-谷氨酰胺	628.00
L-盐酸胱氨酸	72.00
L-亮氨酸	110.00
L-异亮氨酸	105.00
L-盐酸组氨酸	52.00
L-盐酸赖氨酸	156.00
L-甲硫氨酸	40.00
L-苯丙氨酸	78.00
无水硫酸镁	99.60
氯化钠	6700.00
无水磷酸二氢钠	145.00
D-泛酸钙	6.00
氯化胆碱	5.50
叶酸	5.50
肌醇	8.30
甘氨酸	40.00
烟酰胺	5.00
核黄素	0.60
盐酸硫胺	5.00
盐酸吡哆辛	6.00
葡萄糖	5500.00
丙酮酸钠	120.00
酚红	16.00

表 7 添加因子组合 2 配方

名称	含量
鼠表皮生长因子 (EGF) (Sigma E1257)	15 ng/ mL
牛碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) (Sigma F5392)	15 ng/ mL
人绒毛膜促性腺激素 (HCG) (Sigma C0684)	18 IU/ mL
孕马血清促性腺激素 (PMSG) (Sigma G4877)	20 IU/ mL

2) 培养基 E 的配方:

培养基 E 的配方与培养基 D 基本相同, 只是其中使用相同浓度的胎牛血清代替胎猪血清。

3) 培养基 F 的配方:

培养基 F 的配方与培养基 D 基本相同, 只是其中不含有添加因子
5 EGF、bFGF、HCG、和 PMSG。

4) 培养基 G 的配方:

培养基 G 的配方与培养基 F 相同, 只是其中使用相同浓度的胎牛血清代替胎猪血清。

10 实施例 3: 原代猪成纤维细胞的制备

原代猪成纤维细胞可以用传统的酶消化法制备, 步骤如下:

1) 将处死(处死后 10 小时内)的猪胎, 快速用 70%的酒精擦洗三遍, 放入 PBS+双抗溶液中;

15 2) 在超净工作台中将猪胎用 PBS 漂洗干净, 除去猪胎的头、四肢及内脏;

3) 在直径 60 mm 平皿中将步骤 2) 处理后的猪胎组织切碎, 转移组织碎块至 50 mL 三角烧瓶中, 进一步剪碎成为 1 mm^3 大小的碎块, 取少量组织碎块平铺于 100 mm 培养皿, 加入 10 mL 培养液 (DMEM+15%FBS+双抗), 放入 CO_2 培养箱培养(组织块贴附法); 其余
20 组织碎块加入 3-5 mL 39°C 预热的 0.25%胰蛋白酶消化液, 放入 CO_2 培养箱消化 15-30 分钟, 每隔 5 分钟取出搅拌, 并取少量于显微镜下观察消化情况;

4) 消化完毕后加 15 mL DMEM+15%FBS+双抗终止消化, 1000 rpm, 离心 10 分钟, 弃上清;

25 5) 用 DMEM 重悬消化下来的细胞和未消化的组织块;

6) 用 100 目筛网或用二层无菌纱布过滤消化产物, 收集过滤物于 50 mL 离心管中, 1000 rpm, 离心 5 分钟, 收集细胞;

7) 再用培养液 (DMEM + 15 % FBS) 离心洗涤一次, 稀释细胞至浓度约为 10^7 个细胞/mL。

本实施例中，所述双抗均指浓度 100 IU/mL 青霉素 + 100 mg/mL 链霉素。

5 实施例 4：猪细胞培养基 A、B、C 培养的猪原代成纤维细胞的形态、生长曲线和核型分析

分别使用实施例 1 中制备的培养基 A、B、C 培养实施例 3 中制备的原代猪成纤维细胞，以相同接种密度将细胞接种到直径 100mm 的培养皿中，置于 39℃，5% CO₂ 培养箱中培养。除了培养基不同，其它培养条件均相同。

10 当猪细胞汇合至 80% 后传代，传代 15 次，并对各细胞系（即分别用培养基 A、B、C 培养的猪原代成纤维细胞）进行形态、生长曲线和核型分析。

结论如下：

1) 形态分析：

15 培养结果显示：在相同的培养条件下，采用猪细胞培养基 A 培养的细胞密度高于传统培养基 B 培养的细胞密度，说明采用本发明所述猪细胞培养基优于传统猪细胞培养基。

20 同时，采用猪细胞培养基 A 培养的细胞呈长梭形，贴壁能力较好，生长状态明显好于采用猪细胞培养基 C 培养的细胞，说明采用胎猪血清和添加因子的本发明猪细胞培养基的细胞效果好于只采用胎猪血清的本发明猪细胞培养基（参见附图 1-3）。

2) 生长曲线分析（MTT 比色法检测）：

25 对于采用上述三种猪细胞培养基培养猪细胞 0-16 天的生长曲线如附图 4 所述，其中 MTT 法检测猪细胞培养基 A、B、C 培养的细胞的生长状态光密度值如表 8 所示。

表 8：MTT 法检测猪细胞培养基 A、B、C 培养的细胞的生长状态光密度值

	第2天	第4天	第6天	第8天	第10天	第12天	第14天	第16天
培养基A	0.35	0.46	0.55	0.46	0.41	0.43	0.33	0.36

培养基B	0.29	0.39	0.49	0.37	0.35	0.36	0.29	0.29
培养基C	0.12	0.28	0.21	0.22	0.21	0.23	0.19	0.23

备注：从细胞培养开始每 2 天检测一次，共检测 8 次。

由图 4 可见：

采用猪细胞培养基 C 培养的原代猪成纤维细胞，其生长状态光密度值均低于采用猪细胞培养基 A、B 培养的细胞，说明仅采用胎猪血清而不采用添加因子的本发明所述猪细胞培养基，其对猪细胞的生长效果不如采用胎牛血清和添加因子的传统培养基；

而采用猪细胞培养基 A 培养的细胞与猪细胞培养基 B 培养的细胞生长曲线的生长趋势虽然相似，但采用猪细胞培养基 A 培养的原代猪成纤维细胞，其生长状态光密度值均在相同的时间均高于培养基 B 培养的细胞（参见附图 4）。说明采用胎猪血清和添加因子的本发明所述猪细胞培养基，其对猪细胞的生长效果优于采用胎牛血清和添加因子的传统培养基。

3) 核型分析：

采用猪细胞培养基 A、B、C 培养的原代猪成纤维细胞，其核型均较为正常，没有出现缩短、粘连等现象（参见附图 5-7）。

综上，采用猪细胞培养基 A 培养的细胞生长状态良好、生长速度较快、贴壁率较高，细胞染色体核型正常，本发明所述猪细胞培养基 A 是优于传统培养基的新型改良培养基。

实施例 5：猪细胞培养基 D、E、F、G 培养的猪原代成纤维细胞的形态、生长曲线和核型分析

分别使用实施例 2 中制备的培养基 D、E、F、G 培养实施例 3 中制备的原代猪成纤维细胞，除了培养基不同，4 个细胞培养样品的其它条件完全相同。当细胞汇合至 80% 后传代，传代 15 次，并对各细胞系进行形态、生长曲线和核型分析。

实验步骤参考实施例 4，除了所用培养基不同，其余操作完全相同。

结果如下表 9 所示。

表 9: MTT 法检测培养基 D、E、F、G 培养的细胞的生长状态光密度值

	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天	第 10 天	第 12 天	第 14 天	第 16 天
培养基 D	0.36	0.48	0.56	0.42	0.38	0.33	0.315	0.31
培养基 E	0.31	0.41	0.51	0.39	0.32	0.31	0.28	0.25
培养基 F	0.11	0.35	0.22	0.12	0.18	0.19	0.16	0.21
培养基 G	0.15	0.28	0.21	0.15	0.17	0.13	0.12	0.18

备注: 从细胞培养开始每 2 天检测一次, 共检测 8 次。

在相同的培养条件下, 猪细胞培养基 D 培养的细胞, 其生长状态光密度值均高于培养基 E 的细胞的生长曲线, 说明采用胎猪血清和添加因子的本发明所述猪细胞培养基, 其对猪细胞的生长效果优于采用胎牛血清和添加因子的传统培养基。

综上, 采用猪细胞培养基 D 培养的细胞生长状态良好、生长速度较快 (参见附图 8)、贴壁率较高, 细胞染色体核型正常, 猪细胞培养基 D 是优于传统培养基的新型改良培养基。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导, 可以对那些细节进行各种修改和替换, 这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 一种猪细胞培养基,其包括基础培养基和胎猪血清,并且按照猪细胞培养基的总体积,所述胎猪血清的含量为5% - 25% (v/v);
具体地,所述胎猪血清的含量为8%-12% (v/v); 更具体地,所述胎猪
5 血清的含量为10%-12% (v/v)。

2. 根据权利要求1所述的猪细胞培养基,其中,所述胎猪血清按照如下方法制得:

1) 血清分离: 将获自猪胎的血样进行离心,获得血清;

10 2) 冷冻脱纤: 将步骤 1) 中离心分离得到的血清在-20℃下冷冻脱纤;

3) 澄清过滤: 将步骤 2) 中得到样品使用蔡氏纤维素深度滤器进行过滤;

4) 血清透析: 将步骤 3) 得到的样品用分子量 12000 - 14000 的
15 透析膜在 0.15M NaCl 溶液中透析,直至样品的葡萄糖含量 < 0.5 mg/mL;

5) γ 射线照射: 将步骤 4) 得到的样品进行 γ 射线照射,照射剂量为 1.2 - 4 Gy,得到粗制血清; 和

6) 除菌过滤: 先后使用 0.2 微米和 0.1 微米滤膜,将步骤 5)
20 中得到的粗制血清再进行滤膜除菌过滤。

3. 根据权利要求1所述的猪细胞培养基,其中,所述基础培养基为 DMEM、或 F12、或者是如下组成的人工培养基 (mg/L):

	无水氯化钙	200.00 -240.00
25	L-丝氨酸	42.00-55.00
	L-色氨酸	16.00-20.00
	L-苏氨酸	95.00-110.00
	L-酪氨酸钠盐	104.00-123.00
	硝酸铁	0.10-0.40

	氯化钾	400.00-600.00	
	L-缬氨酸	94.00-112.00	
	L-盐酸精氨酸	84.00-98.00	
	L-谷氨酰胺	584.00-628.00	
5	L-盐酸胱氨酸	63.00-72.00	
	L-亮氨酸	95.00-110.00	
	L-异亮氨酸	93.00-105.00	
	L-盐酸组氨酸	32.00-52.00	
	L-盐酸赖氨酸	126.00-156.00	
10	L-甲硫氨酸	25.00-40.00	
	L-苯丙氨酸	46.00-78.00	
	无水硫酸镁	87.67-99.60	
	氯化钠	4400.00-6700.00	
	无水磷酸二氢钠	105.00-145.00	
15	D-泛酸钙	2.00-6.00	
	氯化胆碱	2.00-5.50	
	叶酸	3.00-5.50	
	肌醇	5.20-8.30	
	甘氨酸	20.00-40.00	
20	烟酰胺	3.00-5.00	
	核黄素	0.20-0.60	
	盐酸硫胺	2.00-5.00	
	盐酸吡哆辛	3.00-6.00	
	葡萄糖	3500.00-5500.00	
25	丙酮酸钠	100.00-120.00	以及
	酚红	14.00-16.00。	

4. 根据权利要求 1 所述的猪细胞培养基, 其中, 还含有如下添加因子中的至少一种:

表皮生长因子、
碱性成纤维细胞生长因子、
人绒毛膜促性腺激素、以及
孕马血清促性腺激素。

5

5. 根据权利要求 4 所述的猪细胞培养基, 其中, 按照猪细胞培养基的体积, 添加因子的含量各自独立地为:

表皮生长因子	3 - 15 ng/ mL
碱性成纤维细胞生长因子	2 - 15 ng/ mL
人绒毛膜促性腺激素	4 - 30 IU/ mL
孕马血清促性腺激素	2 - 28 IU/ mL;

10

具体地, 添加因子的含量各自独立地为:

表皮生长因子	8.5-12.6 ng/ mL
碱性成纤维细胞生长因子	6.6-11.8 ng/ mL
人绒毛膜促性腺激素	16.7-23.4 IU/ mL
孕马血清促性腺激素	17.3-22.6 IU/ mL。

15

6. 一种培养猪细胞的方法, 其特征在于, 使用权利要求 1-5 中任一项所述的猪细胞培养基, 其中, 所述猪细胞选自: 原代猪成纤维细胞、猪肾细胞、猪心肌细胞、猪卵母细胞、和猪血管内皮细胞。

20

7. 一种按照如下方法制备的胎猪血清:

1) 血清分离: 将获自猪胎的血样进行离心, 获得血清;

2) 冷冻脱纤: 将步骤 1) 中离心分离得到的血清在 -20℃ 下冷冻

25 脱纤;

3) 澄清过滤: 将步骤 2) 中得到样品使用蔡氏纤维素深度滤器进行过滤;

4) 血清透析: 将步骤 3) 得到的样品用分子量 12000-14000 的透析膜在 0.15M NaCl 溶液中透析, 直至样品的葡萄糖含量 < 0.5

mg/mL;

5) γ 射线照射: 将步骤 4) 得到的样品进行 γ 射线照射, 照射剂量为 1.2 - 4 Gy, 得到粗制血清; 和

6) 除菌过滤: 先后使用 0.2 微米和 0.1 微米滤膜, 将步骤 5) 中得到的粗制血清再进行滤膜除菌过滤。

8. 权利要求7所述的胎猪血清在猪细胞培养和/或制备猪细胞培养基中的用途。

10 9. 根据权利要求8所述的用途, 其中, 所述猪细胞选自: 原代猪成纤维细胞、猪肾细胞、猪心肌细胞、猪卵母细胞、和猪血管内皮细胞。



图 1

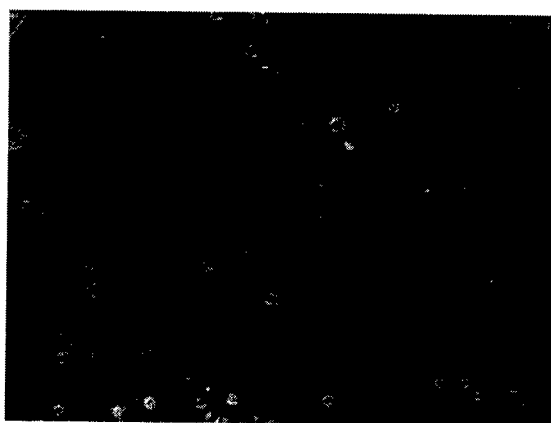


图 2

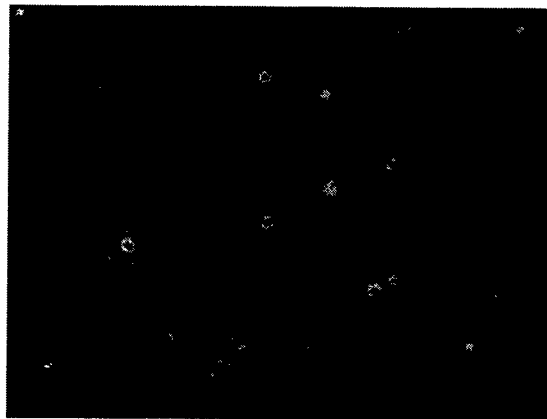


图 3

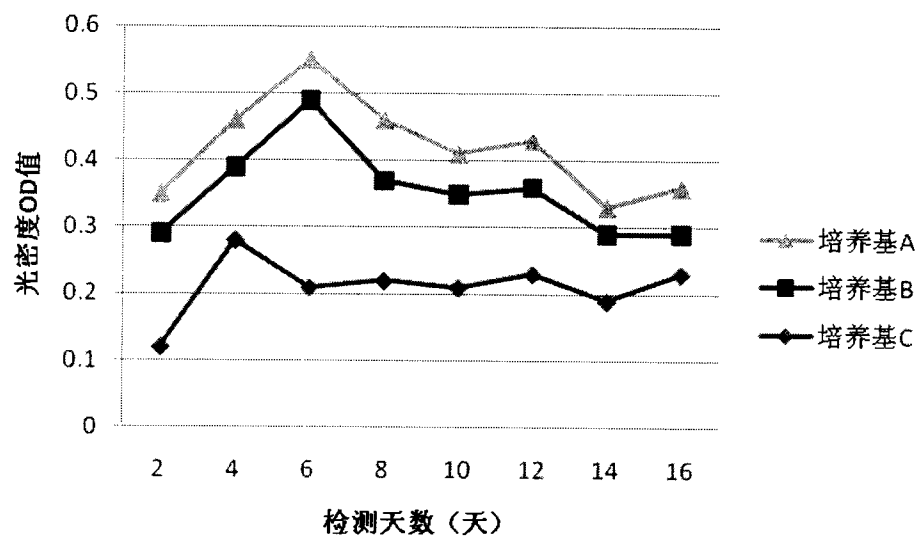


图 4

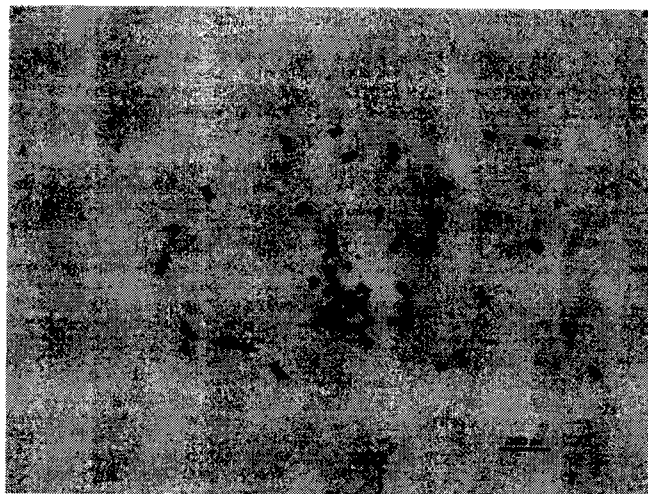


图 5

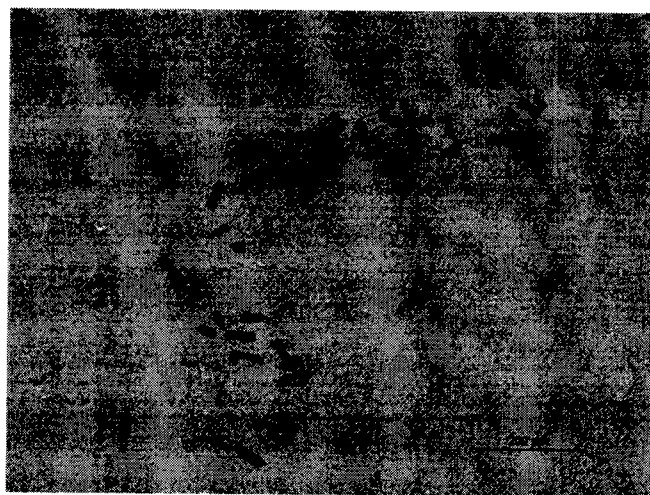


图 6

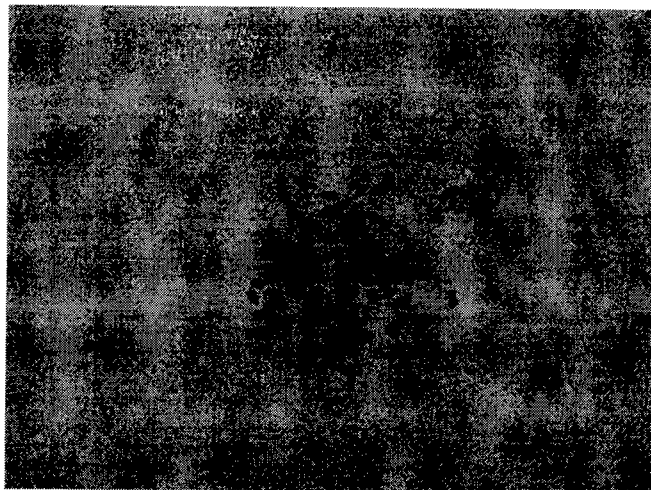


图 7

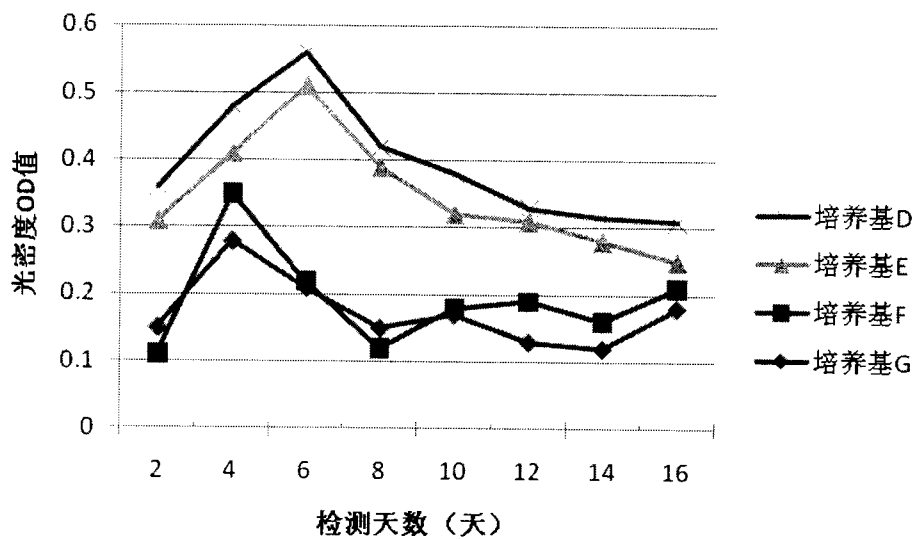


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001253**A.CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the 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, C12R

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)

Data base: CNABS, CNTXT, CJFD, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, EMBASE, MEDLINE, PUBMED

Search terms: fetal porcine serum, porcine serum, porcine cell?, porcine fibroblast, porcine renal cell?, porcine myocardial cell?, porcine oocyte?, porcine vascular endothelial cell, culture medium, culture, porcine cardiac muscle cell?, porcine fibroblast?, cultur+, medium, media

C.DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims
X	WO0210337A2 (INFIGEN, INC.), 7 February 2002 (07.02.2002), see the description, page 69, lines 13 to 21.	1, 3-6
X	WO9924556A1 (VTS HOLDINGS LLC), 20 May 1999 (20.05.1999), see the description, pages 9 to 10, and embodiment 1.	1
A	CN1212009A (THE BOARD OF UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 24 March 1999 (24.03.1999), see the whole document.	1-9

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the prior 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
9 October 2011 (09.10.2011)Date of mailing of the international search report
27 October 2011 (27.10.2011)Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the People's Republic of China
No.6 Xituchenglu, Jimenqiao, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No.:(86-10)62019451

Authorized officer

ZHAO, Shuo

Telephone No.: (86-10)62411070

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001253**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claims
A	LI, Mengbin et al., Influence of Xeno-Serum on Accommodation Model of Porcine Aortic Endothelial Cell, Shanxi Medical Journal, 30 November 2006 (30.11.2006), pp.1403 to 1404, 1410, no. 11, vol. 35, ISSN 1000-7377, see the whole document.	1-9
A	LIU, Peng et al., Proliferation of Dermal Fibroblasts from Human, Yorkshire Pigs or SD Rats Cultured in DMEM with Different Concentrations of Serum, Journal of Practical Stomatology, 31 January 2004 (31.01.2004), no. 1, vol. 20, pp. 16 to 19, ISSN 1001-3733, see the whole document.	1-9
A	DAEN, Ferdinand P. et al., Serum factor(s) stimulating cumulus expansion in porcine oocyte-cumulus complexes matured and fertilized in vitro. Cell Structure and Function, 31 January 1995 (31.01.1995), no. 3, vol. 20, pp. 223 to 231, ISSN 0386-7196, see the whole document.	1-9
A	WEINGARTL, H. M. et al., Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: Partial characterization and virus susceptibility. Journal of Virological Methods, 13 June 2002 (13.06.2002), pp. 203 to 216, no. 2, vol. 104, ISSN 0166-0934, see the whole document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2011/001253

Column II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of Page 1)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Column III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of Page 1)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-6 relate to a porcine cell culture medium containing fetal porcine serum, and a method for culturing porcine cell using porcine cell culture medium;

Invention 2: Claims 7-9 relate to a fetal porcine serum and a purpose of fetal porcine serum in culturing porcine cell and/or preparing porcine cell culture medium.

The same technical feature in two groups of claims is fetal porcine serum. However, the technical feature is disclosed in D1 (WO0210337A2), and therefore is not a special technical feature that makes a contribution to the prior art. Two groups of claims do not share a same or corresponding special technical feature. These claims are not so technically linked as to belong to a single general inventive concept. The claims therefore do not meet the requirement of unity of invention, nor conform to the specification of PCT Rule 13.1.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims:

Remark on protest: ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/001253

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO0210337 A2	07.02.2002	US2002013957 A1	31.01.2002
		EP1320292 A2	25.06.2003
		AU7806201 A	13.02.2002
		US6700037 B2	02.03.2004
WO9924556 A1	20.05.1999	AU1144299 A	31.05.1999
CN1212009 A	24.03.1999	US6545199 B1	08.04.2003
		AU1570697 A	01.08.1997
		NZ326996 A	25.11.1998
		AU4353696 A	01.08.1997
		EP0882127 A1	09.12.1998
		JP2000502910T T	14.03.2000
		WO9725412 A1	17.07.1997
		AU721375B B2	29.06.2000
		US6194635 B1	27.02.2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/001253

A.CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071 (2010.01)i

C12N 5/075 (2010.01)n

C12R 1/91 (2006.01)n

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, C12R

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: CNABS, CNTXT, CJFD, CNKI, DWPI, SIPOABS, CPEA, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, EMBASE, MEDLINE, PUBMED

检索词: 胎猪血清, 猪血清, 猪细胞, 猪成纤维细胞, 猪肾细胞, 猪心肌细胞, 猪卵母细胞, 猪血管内皮细胞, 培养基, 培养, fetal porcine serum, porcine serum, porcine cell?, porcine renal cell?, porcine myocardial cell?, porcine cardiac muscle cell?, porcine oocyte?, porcine vascular endothelial cell?, porcine fibroblast?, cultur+, medium, media

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
X	WO0210337A2 (INFIGEN, INC.), 07.2 月 2002 (07.02.2002), 参见说明书第 69 页第 13-21 行	1,3-6
X	WO9924556A1 (VTS HOLDINGS LLC), 20.5 月 1999 (20.05.1999), 参见说明书第 9-10 页实施例 1	1
A	CN1212009A (加利福尼亚大学董事会), 24.3 月 1999 (24.03.1999), 参见全文	1-9

☒ 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

09.10 月 2011 (09.10.2011)

国际检索报告邮寄日期

27.10 月 2011 (27.10.2011)

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

赵硕

电话号码: (86-10) 62411070

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	李孟彬等, 异种血清对猪血管内皮细胞适应模型的影响. 陕西医学杂志, 30.11月 2006 (30.11.2006), 第35卷, 第11期, 第1403-1404,1410页, ISSN 1000-7377, 参见全文	1-9
A	刘鹏等, 不同种属真皮成纤维细胞在不同血清浓度培养基中生长的比较观察. 实用口腔医学杂志, 31.1月 2004 (31.01.2004), 第20卷, 第1期, 第16-19页, ISSN 1001-3733, 参见全文	1-9
A	DAEN, Ferdinand P.等, Serum factor(s) stimulating cumulus expansion in porcine oocyte-cumulus complexes matured and fertilized in vitro. Cell Structure and Function, 31.1月 1995 (31.01.1995), 第20卷, 第3期, 第223-231页, ISSN 0386-7196, 参见全文	1-9
A	WEINGARTL, H. M.等, Continuous porcine cell lines developed from alveolar macrophages: Partial characterization and virus susceptibility. Journal of Virological Methods, 13.6月 2002 (13.06.2002), 第104卷, 第2期, 第203-216页, ISSN 0166-0934, 参见全文	1-9

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

发明1：权利要求1-6，涉及含有胎猪血清的猪细胞培养基，以及使用该猪细胞培养基培养猪细胞的方法；

发明2：权利要求7-9，涉及一种胎猪血清，以及该胎猪血清在猪细胞培养和/或制备猪细胞培养基中的用途。

两组权利要求之间的共同技术特征是胎猪血清，然而该技术特征已在D1（WO0210337A2）中公开，因此其不是对现有技术作出贡献的特定技术特征，两组权利要求之间没有相同或相应的特定技术特征，不存在技术关联，不属于一个总的发明构思，因而不满足发明单一性的要求，不符合细则13.1的规定。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/001253

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO0210337 A2	07.02.2002	US2002013957 A1	31.01.2002
		EP1320292 A2	25.06.2003
		AU7806201 A	13.02.2002
		US6700037 B2	02.03.2004
WO9924556 A1	20.05.1999	AU1144299 A	31.05.1999
CN1212009 A	24.03.1999	US6545199 B1	08.04.2003
		AU1570697 A	01.08.1997
		NZ326996 A	25.11.1998
		AU4353696 A	01.08.1997
		EP0882127 A1	09.12.1998
		JP2000502910T T	14.03.2000
		WO9725412 A1	17.07.1997
		AU721375B B2	29.06.2000
		US6194635 B1	27.02.2001

A. 主题的分类

C12N 5/071 (2010.01)i

C12N 5/075 (2010.01)n

C12R 1/91 (2006.01)n