

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580029937.0

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 10 月 10 日

[11] 公开号 CN 101052712A

[22] 申请日 2005.9.8

[21] 申请号 200580029937.0

[30] 优先权

[32] 2004.9.8 [33] US [31] 60/608,040

[32] 2005.6.29 [33] US [31] 60/695,100

[86] 国际申请 PCT/US2005/031839 2005.9.8

[87] 国际公布 WO2006/029198 英 2006.3.16

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.7

[71] 申请人 威斯康星校友研究基金会

地址 美国威斯康星州

[72] 发明人 J·A·汤姆森 T·路德维格

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 2 页

[54] 发明名称

培养人胚胎干细胞

[57] 摘要

以前培养人胚胎干细胞的方法需要成纤维细胞饲养细胞或曾经接触成纤维细胞饲养细胞的培养基以将干细胞维持在未分化状态。现在发现，如果在含有 γ 氨基丁酸、2-嘧啶酸、锂和脂类的培养基中采用高成纤维细胞生长因子水平，即便没有饲养细胞或调理培养基，干细胞也将在多次传代中无限期地维持未分化。人蛋白质的人源化基质可用作培养细胞的基底基质。用这些培养条件、培养基和基质制造的新的人胚胎干细胞系将从未接触过动物细胞、动物产品、饲养细胞或调理培养基。

1. 一种不使用饲养细胞或调理培养基启动新的培养的人胚胎干细胞系的方法,所述方法包括以下步骤:

将来自胚泡的细胞平铺在含有含量足以产生并维持新的增殖干细胞系处于未分化状态的维生素、氨基酸、葡萄糖、成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸、锂和脂类的培养基中。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述培养基含有浓度至少为 40 ng/ml 的成纤维细胞生长因子。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述培养基还含有运铁蛋白和胰岛素。

4. 一种体外细胞培养物, 包含处于培养容器中的:

人胚胎干细胞;

培养基, 所述培养基含有盐、维生素、氨基酸、葡萄糖、成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸、锂和脂类, 它们的含量足以将所述干细胞历经多次培养传代而维持未分化状态, 所述培养基不含饲养细胞且从未接触饲养细胞; 和

从人胶原蛋白和选自纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白中至少其二的至少两种人蛋白质制造的人源化基质。

5. 如权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述基质含有胶原蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白。

6. 如权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述培养基含有浓度至少为 40 ng/ml 的成纤维细胞生长因子。

7. 如权利要求4所述的方法, 其特征在于, 所述培养基还含有运铁蛋白和胰岛素。

8. 一种体外细胞培养物, 包含处于培养容器中的:

人胚胎干细胞;

从人胶原蛋白和选自胶原蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白中至少其二的至少两种人蛋白质制造的人源化基质; 和

培养基, 所述培养基含有维生素、氨基酸、葡萄糖、成纤维细胞生长因子和脂类, 它们的含量足以将所述干细胞历经多次培养传代而维持未分化状态, 所述培养基不含饲养细胞且从未接触饲养细胞。

9. 一种培养新的人胚胎干细胞的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 从处于胚泡状态的胚胎分离内细胞团；

(b) 在含有含量足以将所述干细胞历经多次培养传代而维持未分化状态的维生素、氨基酸、葡萄糖、成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸、锂和脂类的培养基中培养步骤(a)的细胞；；

(c) 所述培养步骤在人蛋白质基质上进行；和

(d) 连续扩增在培养基上增殖的细胞。

10. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述培养基中的人蛋白质包括至少 3 种选自下组的蛋白质：胶原蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白。

11. 一种包含生长在人蛋白质基质上的人胚胎干细胞的细胞培养物，所述干细胞来自从未接触过动物细胞、动物蛋白、饲养细胞或调理培养基的谱系，所述细胞培养基能够将所述细胞历经 20 次以上传代培养而维持其未分化状态、多能性和正常核型。

12. 一种包含人胚胎干细胞的细胞培养物，所述人胚胎干细胞不展示唾液酸 Neu5Gc。

培养人胚胎干细胞

相关申请的交叉参考

本申请要求 2005 年 6 月 29 日提交的美国临时专利申请序列号 60/695,100 以及 2004 年 9 月 8 日提交的美国临时专利申请序列号 60/608,040 的优先权。

关于联邦政府资助研究或开发的声明

本说明书中描述的一些工作受到美国政府拨款资助，而一些工作未获得资助。本说明书中所述的关于衍生新的人胚胎干细胞系的方法的工作未受到美国政府任何拨款资助。本发明在一定程度上是利用下述机构授予的美国政府资助下完成的：NIH RR017721。美国政府对本发明享有一定权利。

发明背景

干细胞被定义为能够分化成许多其它分化细胞类型的细胞。胚胎干细胞是来自胚胎的干细胞，能够分化成大多数，如果不是全部，成熟机体的分化细胞类型。干细胞被称为是多能的，这是指它能够分化成许多细胞类型。一类受到研究机构高度关注的多能干细胞是人胚胎干细胞，这里简称为人 ES 细胞，这是一种来自人胚胎来源的胚胎干细胞。人胚胎干细胞由于能够在培养基中无限增殖并由此而能够(至少原则上能够)提供细胞和组织以替代缺陷或受损的人组织而受到极大科学关注。人胚胎干细胞培养物的存在有可能提供无限量的人细胞和组织以用于各种有助于人体健康的治疗方案和研究计划。可以想像，在未来，将能够增殖人胚胎干细胞并使其定向分化成特定谱系以产生出于治疗目的可移植入人体的分化的细胞或组织。

已经描述了产生和培养人胚胎干细胞的基础技术。现有技术的确有效，但一些目前用来培养人胚胎干细胞的方法有限制和缺点。一种限制意义特别重大。大多数现有人胚胎干细胞系在一定程度上或在其它程度上已经直接暴露于小鼠细胞或暴露于其中已经培养过小鼠细胞的培养基。发现来自现有细胞系的一些人 ES 细胞展示出人类细胞通常不产生的唾液酸残基 Neu5Gc，这一事实倍受关注。最初的产生和培养人胚胎干细胞的技术要使用小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)饲养细胞作为饲养层，在该饲养

层上可培养人胚胎干细胞。成纤维细胞饲养层通过一些仍不十分清除的机制使得干细胞能够保持在未分化状态。随后发现,如果使干细胞接触“调理培养基(conditioned medium)”也能获得相同的现象。调理培养基无非就是已经培养过饲养细胞(如MEF)的干细胞培养基。无论饲养细胞是能赋予培养基某些因子还是能从培养基中除去某些因子,其结果都是调理培养基可用来培养干细胞使其不发生分化。任何一种培养条件,即人ES细胞直接在鼠饲养细胞上生长或使用调理培养基都涉及这样的问题,即一种或多种试剂如病毒能从小鼠细胞传递到人ES细胞。如果培养人胚胎干细胞的一个目的是产生最终可植入人体的组织,就高度需要干细胞从未暴露于其它物种的细胞或者暴露于曾用来培养其它物种的细胞的培养基。因此,在长期培养人胚胎干细胞技术的持续发展中最感兴趣的是找到能增殖和培养人胚胎干细胞但不含成纤维细胞饲养层的培养条件。

一些培养基配方能够在一段时间内使人ES细胞维持未分化状态,但长期培养时将不能维持这种状态。具体地说,我们定义来自最初的种子培养物的人ES细胞培养板上生长至细胞铺满该相同的培养容器为一个“传代”。我们发现一些培养基配方允许培养人ES细胞一或两个传代不发生严重分化,但在随后的传代中细胞迅速分化。我们已经开始相信,为得到确实能够支持人ES细胞无限增殖而不分化且不含饲养细胞或调理培养基的培养基,培养基必需支持培养人ES细胞处于基本均匀且未分化状态至少5代。培养物在培养期间维持相对同质和未分化并保留人ES细胞所有重要特征也是重要的。

培养中的人胚胎干细胞的一个特有性状是,如果条件不够理想,这种细胞则有分化趋势。当在培养时过分要求维持人ES细胞处于未分化状态时则容易诱导人ES细胞分化。大多数培养条件将导致一定水平不希望的分化,尤其是在正在生长的ES细胞集落边缘周围。尽管培养ES细胞时可以有一定程度不希望的分化,但目的是定义能够尽可能使培养物维持未分化即得到尽可能少的分化细胞的培养条件。我们认为,我们已经采用特别严格的标准来定义将支持无限培养未分化的ES细胞培养物的条件。

可通过形态学特征评价干细胞培养物的分化状态。未分化的干细胞具有特征形态,即具有清晰细胞边界的小且致密的细胞,通过在显微镜下检测干细胞培养物可容易观察到这种形态。相反,已经分化的细胞看上去较大且更加散开,并具有不明显的边界。尽管一些分化的细胞可能会在未分化细胞集落边缘出现(通常是这样),

但最理想的干细胞培养物是这样一种细胞培养物，它在培养容器中增殖，在似乎分化的培养物周围仅具有最少量的细胞。根据经验可以在视觉上准确判断人 ES 细胞培养物的分化状况和健康状况。

此外，培养基要支持衍生出新的人 ES 细胞系是干细胞培养条件要满足的一个更加严格的标准。一些支持现有干细胞系扩展和生长的培养条件未能证实能足以用于衍生新的人 ES 细胞系。支持引发新的干细胞系的能力似乎不是所有干细胞培养条件都具有的能力。

发明概述

本发明可概述为一种不需要饲养细胞或调理培养基的培养人胚胎干细胞的方法，该方法包括在含有各物质含量足以在多次传代培养中维持干细胞处于未分化状态的盐、维生素、氨基酸、葡萄糖、成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸(pipecholic acid)、锂盐和脂类的培养基中培养人胚胎干细胞的步骤。

本发明还涉及一种人胚胎干细胞的体外细胞培养物，该人胚胎干细胞在含有高水平成纤维细胞生长因子、 γ 氨基丁酸、2-哌啶酸、锂盐和脂类的培养基中培养，因此干细胞在不需成纤维细胞饲养细胞或调理培养基的情况下便可以未分化状态无限期地培养。

本发明还可概述为一种新的未接触过动物产品、饲养细胞或调理培养基的人胚胎干细胞系的产生。

本发明的一个目的是定义人胚胎干细胞的长期培养条件，该培养条件避免使用动物细胞，不论是饲养细胞还是用于调理要培养干细胞的培养基的其它动物细胞。

本发明的另一个目的是定义用于人胚胎干细胞的培养条件，该培养条件尽可能地确定，同时避免接触动物细胞或动物蛋白。

通过以下描述将了解本发明的其它目的、特征和优点。

附图简述

图 1 是来自下面的实施例的一些数据的图示。

图 2 是来自下面的实施例的数据的另一图示。

发明详述

我们已经鉴定了许多能够无限期地培养和增殖处于未分化状态的人胚胎干细胞且同时完全不需要饲养细胞和调理培养基的培养条件和培养基。这里所述的培养条件和培养基完全不含动物产品，所有蛋白质都是人来源的。开发这些培养基和培养条件能够无需直接或间接接触任何种类的动物细胞而在确定的和受控的条件下衍生和维持人 ES 细胞系，并且还能够衍生出新的从未接触过动物细胞或培养过动物细胞的培养基的人 ES 细胞系。该培养基不含动物产品或蛋白质。该培养基已被证实能支持未分化的 ES 细胞增殖至少 25 代，这是它将无限期地支持这种培养物的有力证据。优选的培养基现在也已经被证实足以支持衍生出新的人 ES 细胞系，这些新细胞系已培养传代 10 代以上。

过去有时习惯于将使用调理培养基称为形成“不含饲养细胞”的培养条件。这一表述是错误的，因为仍需要某些类型的饲养细胞来调理“调理培养基”。本文中，培养条件被描述为允许“不依赖于饲养细胞”地培养人 ES 细胞。“不依赖于饲养细胞”指在处理的任何阶段都不需要任何类型的人或动物的饲养细胞，并且在培养和调节培养基时也不需要。不依赖于饲养细胞的条件根本不需要饲养细胞用于任何目的。

用来培养和增殖人 ES 细胞的确定的（defined）人源化培养基通常包含盐、维生素、诸如葡萄糖的能量、矿物质和氨基酸。为补充培养基和提供支持细胞生长的条件，最初的干细胞培养基含有来自一种来源或另一种来源的血清。之前还报道加入成纤维细胞生长因子和替代血清添加物可在不需要血清的情况下培养人 ES 细胞。可通过商业获得用于此目的的替代血清，或者替代血清可以用蛋白质如血清白蛋白、维生素、矿物质、运铁蛋白或运铁蛋白替代品、以及胰岛素或胰岛素替代品配制的混合物。也可在这种替代血清组分中添加硒和脂类混合物。这里优选确定的替代血清添加物混合物来代替培养人 ES 细胞的任何来源的血清，以便避免血清组成变化的问题以及使用尽可能确定的培养基。已发现可有利地加入培养基中的其它生长因子是 GABA、2-哌啶酸、氯化锂和转化生长因子 β (TGF β)，尽管随着加到培养基中的 FGF 的水平升高 TGF β 可能是不需要的。

为避免对之前认为是维持人 ES 细胞处于未分化状态所必需的成纤维细胞饲养层的需要，这里报道将高浓度的 FGF(10-1000 ng/ml)和 γ -氨基丁酸(GABA)、2-哌啶酸、氯化锂和 TGF β 组合使用将能够使培养基支持未分化的干细胞生长。已经发现这些添加物的组合足以维持人 ES 细胞培养物无限期地处于未分化状态而不需接触饲养细胞或调理培养基。这些添加物被证实是足够的。然而并不是每一种培养基配方都需

要它们中的全部。如果它们中的一种或多种不是给定培养基为获得这种结果所需的,则可根据经验有选择地删除这些添加物。然而,显然这种组合足以使各种培养基能支持在不含饲养细胞或调理培养基的情况下长期培养和增殖未分化的人 ES 细胞。

对这些成分做出一些变化。例如,由于 LiCl 能刺激 wnt 途径而将其用于该培养基。Wnt 自身或该途径的其它刺激物如活化素可作为 LiCl 的等效物,用于代替 LiCl,虽然 LiCl 是用于此目的的更加经济的试剂。类似地,GABA 被认为与 GABA 受体反应,科学文献中鉴定了一些作为该相同受体的激动剂的分子,这些分子也可作为等效物,用于代替培养基中的 GABA。还认为 PA 也与 GABA 受体反应。虽然发现 PA 和 GABA 在这里所用浓度下都对培养基有帮助,但也可以想像,可以显著升高这些成分中的一种成分或其它成分的浓度而避免对其它成分的需要。

较高浓度(40-100 ng/ml)的成纤维细胞生长因子似乎可以排除对饲养细胞的需要。优选的 FGF 是碱性 FGF,也称为 bFGF 和 FGF2,但至少包括 FGF4、FGF9、FGF17 和 FGF18 的其它 FGF 也足以满足该目的。其它 FGF 即便是在更高浓度可能也是有效的。

对人 ES 细胞的培养条件而言,在培养容器中含有生物基质也是有益的。之前使用的一种此类材料是 Matrigel™,这是来自小鼠细胞的人造基底膜,它以不含小鼠细胞的市售产品提供。然而,使用 Matrigel 会在培养物中引入未充分定义的且含有鼠源物质的物质。这里还描述了如何产生可以完全替代 Matrigel 的人蛋白质生物基质。这种基质由四种人蛋白质构成:分离自人胎盘的胶原蛋白、分离自人血浆的纤连蛋白、分离自人血浆的玻连蛋白和分离自人胎盘的层粘连蛋白。这四种蛋白质的组合足以支持人 ES 细胞的生长和培养,但并不一定要使用所有四种蛋白质。使用不含玻连蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白中的一种但含有其它三种蛋白质的基质确实支持培养 ES 细胞,但 ES 细胞培养物分化状态的纯度有所降低。下面的实施例描述了制造供 ES 细胞生长的基质的方法。

在系统地测试了超过 80 种生长因子之后得到了上面列出的培养基添加物。虽然这些添加物中的一些在至少几次传代中支持培养中的人 ES 细胞生长,但许多在随后的传代中无法维持 ES 细胞处于未分化状态。我们能够鉴定这些其它因子的组合,这些组合产生了下面的实施例中描述的培养基添加物的结果。

之前只有在存在成纤维细胞饲养细胞时或在调理培养基中培养人胚胎干(ES)细胞培养物时才能使其维持在未分化状态的这一观察结果导致人们推测成纤维细胞将

某种能抑制 ES 细胞分化的因子释放到培养基中。下面的数据证实不是这样。然而，无论由成纤维细胞饲养细胞介导的对培养基的效应如何，现在将清楚下面描述的培养基将代替这种效应。下面描述的培养基是确定的，不含动物细胞，并能长期培养未分化的人 ES 细胞。提供了一个培养基例子，其中培养基中的蛋白质都是人蛋白质，具有“人源化”培养基和基质，从而避免任何可能的涉及动物来源的亚细胞产品的问题。

下面还描述了用这种培养基衍生新的人胚胎干细胞系。这些人 ES 细胞系因此从未接触过饲养细胞、调理培养基、动物产品或动物蛋白质。之前已经报道，先前的人 ES 细胞系展示在培养的或体内的人类细胞中天然未发现的唾液酸形式(Neu5Gc)。由于先前的人 ES 细胞系从包含鼠类组分的培养条件中获得 Neu5Gc，因此这里描述的新的人 ES 细胞系将完全不含 Neu5Gc，事实也是如此。

实施例

除非另有说明，用于这里描述的所有培养 TeSR1 培养基的组成列于下面的表 1。我们预备试验提示，未分化的人 ES 细胞在 pH 7.2、同渗容摩(osmolality) 350 mOsmol 和 10%CO₂/5%O₂ 大气下最适宜增殖。这些条件被用于这里所述的所有随后的培养。

虽然含有所有上述成分的培养基是足够且优选的，但并非所有组分都是成功培养人 ES 细胞所必需的。根据个人所能接受的分化的细胞的量，可以在培养基中省略培养基的一些组分，尤其是当该培养基仅用于少数传代时。为研究哪些组分可以省略，在省略了不同组分的上述培养基的变化形式中培养人 ES 细胞。在试验培养基中平铺 200,000 个细胞并使其生长 7 天，每次试验有两个孔。然后测定细胞未分化细胞的识别标记——转录因子 Oct4 的表达。试验数据示于图 1，各试验培养基中表达 Oct4 的细胞数表示为优选培养基 TeSR1 中表达 Oct4 的细胞数的分数。注意到至少在存在高水平 FGF 以进行短期培养时，TGFβ 似乎是最不必需组分。还注意到省略其它组分的确导致未分化细胞的比例增加，但这种差别是定量的，且在没有那些组分时培养基至少在一定程度上在有限的细胞传代中有效。

该培养基也被用来用新的人源基质材料培养人 ES 细胞。所述新基质由以下四种蛋白质构成：

1. 胶原蛋白(分离自人胎盘)，终浓度为 10 μg/100μl/cm²。
2. 纤连蛋白(分离自人血浆)，终浓度为 5 μg/100μl/cm²。

3. 玻连蛋白(分离自人血浆), 终浓度为 $0.2 \mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

4. 层粘连蛋白(分离自人胎盘), 终浓度为 $5 \mu\text{g}/100\mu\text{l}/\text{cm}^2$.

为调配这种基质, 胶原蛋白用 6M GuHCl(盐酸胍)变性, 通过 0.45 微米滤器过滤并冷冻成等分量。解冻后将变性的胶原蛋白稀释入不含 Ca 和 Mg 的 PBS 以得到合适的终浓度, 并铺板。涂布好的平板室温孵育至少 1 小时然后再铺上其它基质组分。初次孵育之后将其它的基质组分(纤连蛋白、玻连蛋白和层粘连蛋白)稀释入不含 Ca 和 Mg 的 PBS 以得到合适的终浓度, 并铺板。涂布好的平板室温孵育至少 1 小时然后再铺上人 ES 细胞。

采用新的基质材料已经将现有人 ES 细胞系培养至少 10 代并维持未分化和增殖。

为测试人源化基质组分的严格必要性, 配制了省略一种或多种组分的基质变化形式。试验数据示于图 2。各试验条件字母缩写代表了基质中存在的蛋白质(C-胶原蛋白、F-纤连蛋白、V-玻连蛋白和 L-层粘连蛋白)。注意到 CFV、CVL 和 CFL 膜的确效果较好并维持 ES 细胞处于未分化状态, 但不像 CVFL 基质条件那样有益于细胞培养物生长。

已经证实这种培养基能够支持启动新的人胚胎干细胞系。新细胞系的衍生过程对于培养基配方来说是一个有困难的测试, 但使用确定的培养基能够产生未接触过动物蛋白或基质(matrices)且从未接触过饲养细胞或培养过饲养细胞的培养基的新的人胚胎干细胞系。这被认为是一种新的成就。

该工作仅在获得现有制度批准并在得到供体同意之后进行。通过捐赠得到了为进行人体外受精而形成的但超过临床需要的冷冻人胚胎。将胚胎解冻并用市售连续胚胎培养系统(Vitrolife-GUI 系列)培养至胚泡阶段。除去透明带, 之后通过免疫外科方法(Solter 和 Knowles, 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:5099-5102)或者作为培养的整装制片(whole mount)(Evans 和 Kaufman, 1981, Nature, 292:154-156)分离人胚泡的内细胞团(ICM), 并铺到 4 孔培养平板中上述确定的人源化基质(CVFL)的确定的 TeSR1 培养基上。培养最初的 48 小时之后, 每天更换 TeSR1 培养基。14-21 天后, 机械分离细胞块并重铺到新鲜的 CVFL 平板上。对于随后的 2-3 次传代继续机械分离, 之后用分散酶处理集落。新的集落被证实是新的人胚胎干细胞系。

采用基于上面定义的四种人基质组分的 TeSR1 培养基, 我们从培养的 5 个胚泡衍生出了两种新的人 ES 细胞系。如上所述, 现在已将这两种人 ES 细胞系通过连续传代连续培养了 6 个月。两种细胞系都是稳定的, 且在形态上类似于先前的干细胞系。

FACS 分析、RT-PCR 以及 Western 印迹证实, 这些细胞表达人 ES 细胞的一系列特征标记。衍生自这些细胞系的胚状体表达所有三个胚层的标记, 当被注射入 SCID 米色小鼠时这两个细胞系都形成畸胎瘤。培养 4 个月后, 一个细胞系是 XXY(克兰费尔特综合征, Klinefelter Syndrome)而另一个的核型正常。克兰费尔特综合征是一种最常见的人染色体异常, 说明胚胎本身可能已经出现这种异常而不是由于启动干细胞培养过程人为诱导的。

表 1 TeSR1 培养基的完整配方

无机盐	mM	氨基酸	mM
氯化钙(无水)	0.8232	L-丙氨酸	0.1392
HEPES	11.76	盐酸 L-精氨酸	0.5488
氯化镁(无水)	0.2352	L-天冬酰胺-H ₂ O	0.1392
硫酸镁(MgSO ₄)	0.319088	L-天冬氨酸	0.1392
氯化钾(KCl)	3.26144	L-半胱氨酸-HCl-H ₂ O	0.0784
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	11.2112	L-胱氨酸 2HCl	0.0784
氯化钠(NaCl)	94.55824	L-谷氨酸	0.1392
磷酸氢二钠(无水)	0.392	L-谷氨酰胺	2.96
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O)	0.355152	甘氨酸	0.296
		L-组氨酸-HCl-H ₂ O	0.1176
痕量矿物质		L-异亮氨酸	0.326144
硝酸铁(Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	0.00009408	L-亮氨酸	0.353584
硫酸铁(FeSO ₄ -7H ₂ O)	0.001176	盐酸 L-赖氨酸	0.391216
硫酸铜(CuSO ₄ -5H ₂ O)	4.0768E-06	L-甲硫氨酸	0.090944
硫酸锌(ZnSO ₄ -7H ₂ O)	0.001176	L-苯丙氨酸	0.16856
偏钒酸铵 NH ₄ VO ₃	0.000056	L-脯氨酸	0.2176
硫酸锰 MnSO ₄ H ₂ O	1.00592E-05	L-丝氨酸	0.296
钼酸铵	1.00404E-05	L-苏氨酸	0.352016
NiSO ₄ 6H ₂ O	4.94861E-06	L-色氨酸	0.0346528
偏硅酸钠 Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	0.004926108	L-酪氨酸 2Na 2H ₂ O	0.167776
SnCl ₂	5.32544E-06	L-缬氨酸	0.354368

CdCl ₂	6.21931E-05		
CrCl ₃	9.41176E-06	维生素	
AgNO ₃	5.00293E-06	抗坏血酸	0.375
AlCl ₃ 6H ₂ O	2.4855E-05	生物素	1.12112E-05
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	4.99217E-05	胆碱盐酸盐	0.0502544
CoCl ₂ 6H ₂ O	5.0021E-05	D-泛酸钙	0.0036064
GeO ₂	2.5337E-05	叶酸	0.004704
KBr	5.04202E-06	i-肌醇	0.05488
KI	5.12048E-06	烟酰胺	0.012936
NaF	0.000500119	盐酸吡哆素	0.0076048
RbCl	5.00414E-05	核黄素	0.0004704
ZrOCl ₂ 8H ₂ O	9.03834E-05	盐酸硫胺素	0.02460217
		维生素 B12	0.000392
生长因子			
GABA	0.979	能量物质	
2-哌啶酸	0.000984	D-葡萄糖	13.72784
bFGF	5.80E-06	丙酮酸钠	0.392
LiCl	0.979		
TGFβ 1	2.35E-08	蛋白质	
		人胰岛素	0.0034438
脂类		人全运铁蛋白(Holo-Transferrin)	0.14
亚油酸	0.0070976	人血清白蛋白	199.7
硫辛酸	0.00039984		
花生四烯酸	0.001312	其它组分	
胆固醇	0.0113798	谷胱甘肽(还原型)	0.00592996
DL-α 生育酚-醋酸盐	0.02962	次黄嘌呤 Na	0.01176
亚麻酸	0.007184	酚红	0.0159936
肉豆蔻酸	0.008758	腐胺-2HCl	0.000394352
油酸	0.00708	胸苷	0.001176

棕榈油酸	0.007862	2-巯基乙醇	0.1
硬脂酸	0.00703	硒	0.000177304
		Pluronic F-68	0.238
		Tween 80	0.3358

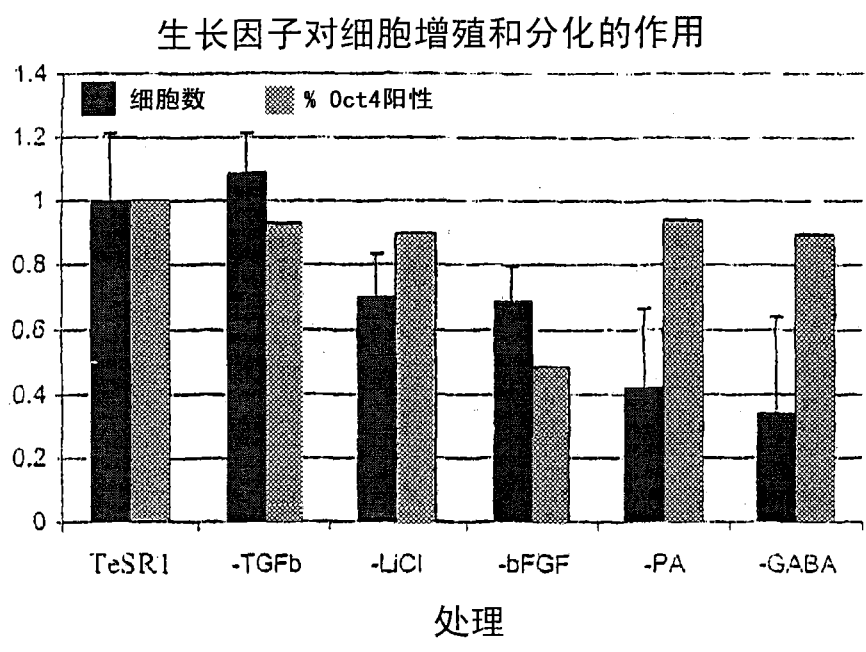


图 1

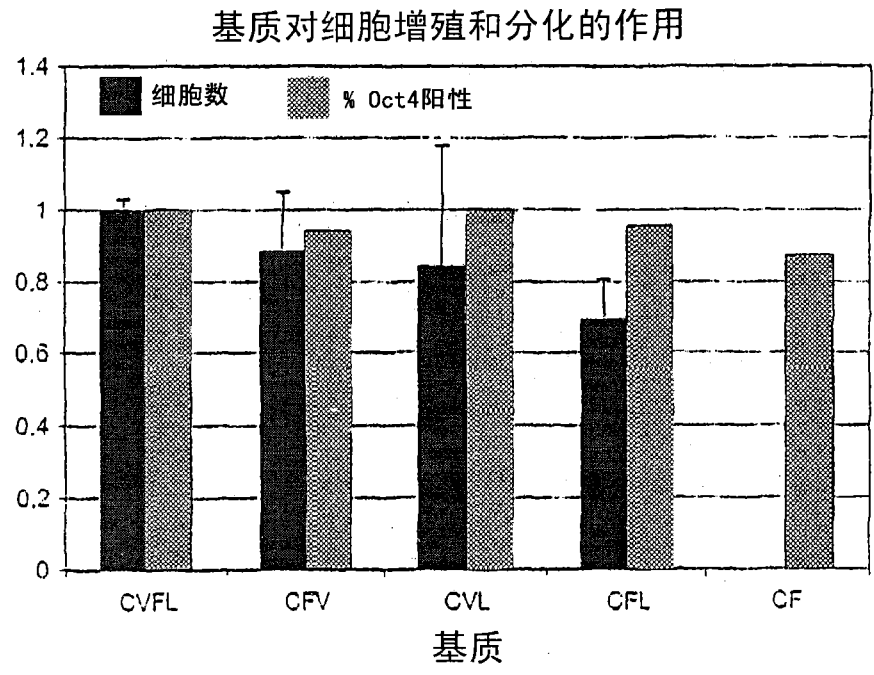


图 1