

说明书

发明名称: 一种基于微流控3D打印 技术的细胞培养肉生产设备及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养肉领域，具体涉及基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备及其应用。

背景技术

[0002] 肉类是世界各国居民膳食中主要的蛋白质来源。随着世界人口的增长和发展中国家居民生活水平的提高，人们对肉类的需求也愈来愈大，这将迫使传统畜牧养殖业扩大生产规模来满足日益增长的肉类需求。然而，作为一种资源密集型产业，传统畜牧养殖会带来严重的水、土地资源占用，排放大量温室气体，同时集约化养殖带来的食源性疾病和动物福利问题也不容小觑。因此，开发能够替代传统畜牧养殖的新型肉类生产技术具有重要意义。

[0003] 细胞培养肉是一项诞生于细胞工程、组织工程和食品工程等学科交叉下的新兴肉类生产技术，其通过对肌肉干细胞进行体外大规模扩增、诱导分化、产物收集和食品化处理而获取肉类。相较于传统畜牧养殖业，细胞培养肉可大幅降低能源消耗、水资源滥用和温室气体排放，并解除约99%的土地资源占用。自2013年荷兰Mark Post教授宣布世界第一块细胞培养肉诞生起，世界范围内便掀起对细胞培养肉研究和产业化的热潮。尽管有不错的研究进展，但是现有已知生产手段在肌纤维形成能力、肉类结构仿真和规模化上仍十分有限。

[0004] 迄今，越来越多组织工程技术被运用于细胞培养肉的生产，比如动、植物蛋白支架、水凝胶、细胞片工程、生物3D打印等。其中，生物3D打印是一种在三维模型指令的驱动下，依据增材制造原理定位装配生物材料或细胞单元，构建组织工程支架和组织器官的先进技术，在细胞培养肉组织构建方面具有重大潜力。现阶段，市面上生物3D打印机设备普遍造价高昂、维护成本高，打印喷头结构、种类单一，喷头更换灵活性差，且在批量打印上存在较大的限制；此

外，目前市场上还未见到针对细胞培养肉生产的专用3D打印设备。因此，开发适用于细胞培养肉生产的专用3D打印设备为实现低成本、定制化、规模化、方便高效生产细胞培养肉值得期待。

[0005] 发明目的

[0006] 发明内容：针对现有技术存在的问题，本发明提供一种基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，有效解决了现有生物3D打印机设备成本高、打印喷头功能单一、灵活性差以及规模化有限的问题，进一步填补了针对细胞培养肉生产领域3D打印设备的空白。

[0007] 本发明还提供所述基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备在制备细胞培养肉中的应用。

[0008] 技术方案：为了实现上述目的，本发明所述一种基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，所述设备包括打印喷头、打印移动系统、载物平台、进样系统、底座；所述打印移动系统置于底座上并由多个可移动光轴组成，所述打印喷头固定在其中一个可移动光轴上，载物平台与另一个可移动光轴相连接；所述进样系统与打印喷头相连接，所述打印喷头为微流控芯片，所述微流控芯片为可在通道中对微量液体或样品在进行操纵、处理与控制的装置。

[0009] 作为优选，所述打印移动系统包括x轴移动光轴、z轴移动光轴和y轴移动光轴，所述z轴移动光轴和y轴移动光轴固定在底座上，x轴移动光轴与z轴移动光轴连接，所述打印喷头固定在x轴移动光轴上，载物平台置于与y轴移动光轴上相连接。

[0010] 其中，所述打印移动系统为可带动打印喷头在x轴移动光轴、z轴移动光轴上两个方向移动，带动载物平台在y轴移动光轴上移动的移动轴，其配置的移动坐标系包括笛卡尔坐标系、三角坐标系、极坐标系和平面关节坐标系中的任意一种。

[0011] 作为优选，所述打印喷头集成于打印移动系统中的x轴移动光轴上，x轴移动光轴又与z轴移动光轴相连接，打印喷头由x、z轴移动光轴带动着在xz平面内移动。

- [0012] 其中，所述打印移动系统上微流控芯片类型可以灵活替换，根据不同生产需求进行集成打印。
- [0013] 进一步地，所述打印移动系统上可集成一个或者多个微流控芯片作打印喷头，进一步开发多喷头并行打印装置，实现多喷头微流控3D打印装置的搭建。
- [0014] 进一步地，所述打印移动系统上集成多个微流控芯片时，可使用通道结构相同或者通道结构各异的微流控芯片。
- [0015] 进一步地，所述微流控芯片通过夹持、扣接、插接、磁吸、榫接、铆合、螺纹连接或者卡口连接集成到打印移动系统上。
- [0016] 其中，所述载物平台为可拆卸结构，装配于打印移动系统中，与y轴移动光轴连接，进行流水线打印；所述载物平台的材质为铜、铝、铁、钢、合金、玻璃、陶瓷或者碳纤维板材。
- [0017] 作为优选，载物平台与打印移动系统中的y轴移动光轴相结合，为可拆卸结构，y轴移动光轴带动载物平台及成型在载物平台上的打印品在y轴方向移动。
- [0018] 进一步地，所述所述载物平台与y轴移动光轴通过卡扣式连接，可灵活拆卸。
- [0019] 作为优选，所述进样系统由装样器、进样泵和导管组成，装样器固定在进样泵上，导管将装样器的出口和打印喷头的进样口连接。
- [0020] 其中，所述进样系统包括装样器、进样泵和导管，所述进样泵置于水平桌面，装样器固定在进样泵上，导管一端连接装样器的出口，一端连接打印喷头的进样口，所述进样系统的进料方式包括活塞式挤入、气动式挤入或者螺杆式挤入。
- [0021] 作为优选，所述装样器通过卡扣固定在进样泵上，可灵活拆卸，导管一端与装样器的出口连接，一端与打印喷头的进口连接。
- [0022] 作为优选，所述底座中嵌入安装打印控制显示系统和数据传输系统；数据传输系统通过无线或者数据线连接至打印控制显示系统，打印控制显示系统通过无线或者数据线连接与打印移动系统连接。其中，所述打印控制显示系统包括控制显示屏，主要用于控制打印调平(调零，让打印喷头复位、归零、调至与打印平台水平等)、打印程序的选择、打印指令的下达、打印移动系统位置调整。

可通过在显示屏上操作，实现选择打印指令文件、调整打印速度、打印喷头位置、载物平台的位置等功能。

[0023] 其中，所述数据传输系统用于将打印指令文件传输进3D打印设备；所述数据传输系统的数据传输形式包括USB传输、内存卡传输或者电脑传输。所述数据传输系统包括USB、储存卡等存储设备的插入口，主要用于向打印机中打印控制显示系统导入打印指令文件。

[0024] 进一步地，打印控制显示系统和数据传输系统与底座为一个整体，底座前方开口后嵌入打印控制显示系统，底座上方打孔后嵌入数据传输系统接口。打印控制显示系统和数据传输系统嵌入底座后，跟随底座一起接电。

[0025] 作为优选，将长方体底座前部和顶部边缘处开口，嵌入固定打印控制显示系统和多种数据传输接口作数据传输系统；然后，将底座置于水平桌面上，使用螺栓将y轴移动光轴和z轴移动光轴固定在底座上，再将x轴移动光轴连接至z轴移动光轴上，即组装成功打印移动系统；然后，将打印喷头固定在x轴移动光轴上，载物平台则连接至y轴移动光轴。进样系统由装样器、进样泵和导管组成，装样器固定在进样泵上，导管将装样器出口和打印喷头进样口连接。打印过程中，打印喷头被x轴移动光轴带动在x轴上移动，x轴移动光轴又可在z轴移动光轴上滑动，载物平台上的打印组织被y轴移动光轴带动在y轴上，3个方向的移动光轴互相配合，将打印喷头生成的纤维在x，y，z轴方向堆叠成型。其中，微流控芯片是一种可在通道中对微量液体或样品(体积一般为 10^{-6} – 10^{-15} L)在微观尺度上进行操纵、处理与控制的装置。在打印过程中，将打印材料装入进样系统的装样器中，并将装样器固定在进样泵上，再用导管将装样器与打印喷头连接，利用进样泵将装样器中的材料泵入打印喷头。而打印指令文件通过数据传输系统导入打印控制显示系统中，在打印控制显示系统中选择目标打印指令文件后，启动整个3D打印生产设备；生成的纤维在载物平台上沉积并依据打印指令文件在x、y、z三个方向堆叠成型，完成后拆卸载物平台，收取打印成品用于后续加工操作。

[0026] 其中，所述微流控芯片的制作材料包括但不限于晶体硅、聚二甲氧基硅氧烷、玻璃、石英、聚酰胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、环氧树脂、

丙烯酸、橡胶和氟塑料中一种或者多种；所述微流控芯片的制作方法包括玻璃毛细管组装法、机械加工法、刻蚀法或者模具法。

[0027] 其中，所述微流控芯片类型为所述微流控芯片类型为单通道型、共轴嵌套型或者多通道并行型。

[0028] 作为优选，所述微流控芯片可基于不同结构的微流控芯片，可生成实心型、“壳-核”型、空心型、多组分型、螺旋形、串珠型纤维用于微流控3D打印。本发明通过搭建不同结构的微流控芯片，对通入的流体种类、流速等进行调整与设计，即可生成不同结构的纤维。

[0029] 作为优选，所述微流控芯片为共轴嵌套型微流控芯片。

[0030] 进一步地，所述微流控芯片出口内径尺寸范围为200–2000 μm 。

[0031] 本发明所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备在制备细胞培养肉中应用，所述制备细胞培养肉的过程为：

[0032] (1)配制微流控3D打印所需的生物墨水，备用；

[0033] (2)将打印指令文件导入打印设备，将步骤(1)配制的生物墨水装填入进样系统；将进样系统连接至打印喷头的进口处，即微流控芯片的通道入口处，将生物墨水经导管挤入打印喷头即微流控芯片；待纤维在微流控芯片出口处生成后，选定需要打印的指令文件，启动整个设备；打印喷头出口生成的纤维在打印移动系统的各个光轴的带动下沉积于载物平台，并遵循打印指令路径堆叠成型；

[0034] (3)将载物平台拆卸，并对步骤(2)打印得到的三维组织进行交联固化处理，然后转移至相应的培养液中进行增殖、分化培养；

[0035] (4)将步骤(3)中培养成熟的三维组织收获，清洗去除培养液后，进行食品化处理即可得到细胞培养肉。

[0036] 作为优选，步骤(2)中将打印指令文件从数据传输系统处导入打印机，将步骤(1)配制的生物墨水装填入装样器中并连接导管，再将装样器固定在进样泵上；将导管另一端连接至打印喷头的进口处，即微流控芯片的通道入口处，使用进样泵将装样器中的生物墨水经导管挤入微流控芯片；待纤维在微流控芯片出口处生成后，在打印控制显示系统中选定需要打印的指令文件，启动3D打印设备，具体可以在打印控制显示系统上点击打印指令文件后，打印控制显示系统会出

现“打印”或者“取消”两个指令，再次点击“打印”即启动整个设备。设备启动后，由打印喷头的出口处生成的纤维在打印移动系统的x轴移动光轴、z轴移动光轴和y轴移动光轴的带动下沉积于载物平台，并遵循打印指令路径堆叠成型；

- [0037] 其中，步骤(1)中所述生物墨水包括具有细胞非粘附性的材料溶液和含有种子细胞的水凝胶溶液；所述含有种子细胞的水凝胶溶液中含体积分数30%–70%生物材料、0.01%–1%交联剂，余量为含钙盐、含 5×10^6 – 5×10^8 个/mL种子细胞的基础培养基。
- [0038] 作为优选，所述生物墨水中所述具有细胞非粘附性材料溶液为海藻酸钠、壳聚糖、果胶、卡拉胶、结冷胶中的任意一种或多种；所述具有细胞非粘附性的材料溶液的浓度为10–50mg/mL。
- [0039] 其中，所述生物墨水中所述种子细胞来源于猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、鱼、虾和蟹中的任意一种或者多种；所述种子细胞为肌肉干细胞、成肌细胞、肌卫星细胞、肌肉前体细胞、骨髓源间充质干细胞、脂肪源间充质干细胞、诱导多能干细胞、心肌细胞、脂肪干细胞、脂肪前体细胞、骨髓源脂肪成体细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞、上皮细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、成骨细胞、软骨细胞、肝脏干细胞、造血干细胞、基质细胞、胚胎干细胞、骨髓干细胞中的一种或者多种。
- [0040] 作为优选，所述种子细胞来源猪、牛、羊、鸡、鸭中的任意一种或者多种；所述种子细胞包括但不限于肌肉干细胞、肌细胞、肌卫星细胞、肌肉前体细胞中的一种或者多种。
- [0041] 其中，步骤(1)所述生物材料为胶原蛋白、重组胶原蛋白、明胶、基质胶、透明质酸、丝素蛋白、弹性蛋白、蛛丝蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、丝纤蛋白、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、整合蛋白、钙粘蛋白、巢蛋白、脱细胞外基质、硫酸软骨素、肝素、硫酸角质素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、角蛋白、硫酸角蛋白、纤维素、聚合素、羧甲基纤维素、聚乳酸、聚乙烯醇、卵磷脂、纳米纤维素、大豆蛋白、豌豆蛋白、面筋蛋白、大米蛋白、花生蛋白、酵母蛋白、真菌蛋白、小麦蛋白、土豆蛋白、玉米蛋白、鹰嘴豆蛋白、绿豆蛋白、海藻蛋

白、杏仁蛋白、藜麦蛋白中的一种或者多种以及其他具有生物相容性和能够为种子细胞提供黏附位点的材料。

- [0042] 作为优选，所述生物材料为胶原蛋白、重组胶原蛋白、明胶、基质胶、透明质酸、丝素蛋白中的一种或者多种。其中，所述生物墨水成分中使用的基础培养基包括但不限于F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12、DMEM/F-12 GlutamMAXTM、F-12K、RPMI 1640、IMDM、L-15、199、MCDB 131、LHC、McCoy's 5A中的一种或者多种。
- [0043] 作为优选，所述基础培养基为F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12中的一种或者多种。其中，所述生物墨水成分中使用的交联剂包括但不限于NaOH、KOH、NaHCO₃、HEPES平衡盐溶液、EBSS平衡盐溶液、HBSS平衡盐溶液、PBS、DPBS等pH调节剂，转谷氨酰胺酶、酪氨酸酶、漆酶、赖氨酰氧化酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶、凝血酶、京尼平中的任意一种或者多种。
- [0044] 作为优选，所述交联剂包括NaOH、KOH、NaHCO₃中的一种或者多种。
- [0045] 作为优选，所述水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂，含钙盐、含种子细胞的基础培养基；每1mL水凝胶溶液中含290–699 μ L 4–8mg/mL的生物材料，1–10 μ L 1–2mol/L交联剂，300–700 μ L含15–25mg/mL钙盐、 1×10^7 – 1×10^8 种子细胞的基础培养基；所述生物材料为胶原蛋白、重组胶原蛋白、明胶、基质胶、透明质酸、丝素蛋白中的一种或者多种；所述交联剂为NaOH、KOH、NaHCO₃中的一种或者多种；所述钙盐为氯化钙、碳酸钙、硫酸钙、硝酸钙中的一种或者多种；所述基础培养基为F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12中的一种或者多种；所述种子细胞为猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉干细胞、成肌细胞、肌卫星细胞、肌肉前体细胞中的一种或者多种。
- [0046] 更为优选地，所述水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂，含钙盐、含种子细胞的基础培养基；每1mL水凝胶溶液中所述生物材料为150–650 μ L 6mg/mL胶原蛋白和40–149 μ L基质胶，交联剂为1–10 μ L 1mol/L碱溶液，含钙盐、种子细胞的基础培养基为300–700 μ L含15–25mg/mL钙盐的DMEM溶液重悬 1.5×10^6 – 1.5×10^8 个肌肉干细胞。

- [0047] 进一步地,所述种子细胞为猪肌肉干细胞;所述水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂,含钙盐、种子细胞的基础培养基;1mL水凝胶溶液中所述生物材料为600 μ L 6mg/mL胶原和97 μ L基质胶,交联剂为3 μ L 1mol/L NaOH溶液,含钙盐、种子细胞的基础培养基为300 μ L含20mg/mL氯化钙的DMEM溶液重悬 1.5×10^7 个猪肌肉干细胞。
- [0048] 作为优选,所述交联剂包括NaOH、KOH、NaHCO₃中的一种或者多种。
- [0049] 作为优选,所述含有种子细胞的水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂,含钙盐、含种子细胞的基础培养基;每1mL水凝胶溶液中含290–699 μ L 4–8mg/mL的生物材料,1–10 μ L 1–2mol/L交联剂,300–700 μ L含15–25mg/mL钙盐、 1×10^7 – 1×10^8 种子细胞的基础培养基;所述生物材料为胶原蛋白、重组胶原蛋白、明胶、基质胶、透明质酸、丝素蛋白中的一种或者多种;所述交联剂为NaOH、KOH、NaHCO₃中的一种或者多种;所述钙盐为氯化钙、碳酸钙、硫酸钙、硝酸钙中的一种或者多种;所述基础培养基为F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12中的一种或者多种;所述种子细胞为猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉干细胞、成肌细胞、肌卫星细胞、肌肉前体细胞中的一种或者多种。
- [0050] 更为优选地,所述含有种子细胞的水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂,含钙盐、含种子细胞的基础培养基;每1mL水凝胶溶液中所述生物材料为150–650 μ L 6mg/mL胶原蛋白和40–149 μ L基质胶,交联剂为1–10 μ L 1mol/L碱溶液,含钙盐、种子细胞的基础培养基为300–700 μ L含15–25mg/mL钙盐的DMEM溶液重悬 1.5×10^6 – 1.5×10^8 个肌肉干细胞。
- [0051] 进一步地,所述种子细胞为猪肌肉干细胞;所述含有种子细胞的水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂,含钙盐、种子细胞的基础培养基;1mL水凝胶溶液中所述生物材料为600 μ L 6mg/mL胶原和97 μ L基质胶,交联剂为3 μ L 1mol/L NaOH溶液,含钙盐、种子细胞的基础培养基为300 μ L含20mg/mL氯化钙的DMEM溶液重悬 1.5×10^7 个猪肌肉干细胞。
- [0052] 其中,进一步的,步骤(2)中打印移动系统中的各个移动光轴的移动速度范围为0.5–50mm/s。

- [0053] 其中，步骤(3)中所述交联固化处理的方式包括但不限于温度诱导交联、静电相互作用交联、离子交联、酶交联中的一种或者几种。
- [0054] 其中，步骤(3)中所述培养液配制时使用的基础培养基包括但不限于F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12、DMEM/F-12GlutamMAXTM、F-12K、RPMI 1640、IMDM、L-15、199、MCDB 131、LHC、McCoy's 5A。
- [0055] 其中，步骤(3)中所述增殖培养液包括体积分数为79-89%基础培养基、10-20%胎牛血清、1%青霉素-链霉素，再向上述溶液中加入1-10ng/mL碱性成纤维细胞生长因子；所述分化培养液的成分为94-97%基础培养基、2-5%马血清和1%青霉素-链霉素。
- [0056] 其中，步骤(4)中所述食品化处理的方法包括前处理和烹饪，所述前处理包括清洗、调味、增色、造型或者感官品质修饰等，所述烹饪包括煎、炸、煮、蒸、烤等。
- [0057] 本发明以纤维材料的3D堆叠成型方式为设计原理，主要思路是对常规的挤出型3D打印机进行改装，使用微流控芯片对挤出型3D打印机的打印喷头进行替换，从而将原本用于堆叠成型的塑料纤维材料变为负载细胞的仿生纤维，进一步构建三维组织。本发明有效解决了现有生物3D打印机设备成本高、打印喷头功能单一、灵活性差以及规模化有限的问题，且填补了针对细胞培养肉生产领域3D打印设备的空白。
- [0058] 本发明使用微流控芯片对挤出型3D打印机的打印喷头进行替换，开发微流控3D打印装置；不同于市场上各类3D打印机上的一体化打印喷头，所述用作打印喷头的微流控芯片的种类、通道结构可灵活设计，用于打印的微流控芯片数量可灵活增减，而且搭建微流控芯片的材料成本低，便捷易得。
- [0059] 本发明基于肌纤维是骨骼肌组织的最基本组成单元，无数条肌纤维经结缔组织膜层层包裹形成大块骨骼肌组织；本发明提出的基于微流控3D打印技术构建的细胞培养肉以仿生纤维为基本单元，层层堆叠后形成三维组织，仿生纤维之于三维组织就像肌纤维之于肌肉，故具有较好的仿生性。相较于仿生纤维，种子细胞在三维组织中生长进一步模拟了其在天然组织中的生长情况，且仿生纤维

维堆叠的方向可通过打印路径调整，有助于体外重现骨骼肌组织的组织各向异性。

[0060] 本发明通过对工业3D打印机喷头进行改进，使用成本低、可定制结构的微流控芯片进行替换，并通过对微流控芯片和3D打印机之间的连接方式进行设计，使打印装置上用作喷头的微流控芯片的数量和形式可灵活改变。本发明依托3D打印技术，打印精度(挤出纤维的最小尺寸)取决于微流控芯片出口大小，所述微流控芯片出口内径尺寸范围为200–2000 μm ，最小尺寸已达到3D打印切片软件标准精度的0.2mm。此外，不同批次打印的细胞培养肉产品在尺寸上几乎无变化，并能准确再现三维模型在切片软件中切片后的打印路径。

[0061] 本发明3D打印时利用天然骨骼肌组织基本单元——肌纤维结构的原理，给予种子细胞适当的纤维载体保证在细胞培养肉高效生产方面具有非常好的效果；并首次在细胞培养肉生产中采用微流控技术，能够在微尺寸通道中操控微量液体。本发明以肌纤维仿生为设计原理，提出一种基于3D打印结合微流控的技术用于细胞培养肉生产的仿生纤维载体，且领域内还未见到相关报道使用该手段生产细胞培养肉。本发明基于3D打印微流控技术制备仿生纤维，并用于细胞培养肉生产，纤维的制备过程连续且快速，所制备的纤维具有良好的仿生性，在纤维内生长的种子细胞定向生长能力和分化能力得到极大的提升。本发明基于微流控技术制备具有“壳-核”结构的仿生纤维，种子细胞被包裹于具有细胞非粘附性材料外壳中，并在外壳的空间约束下呈现高度定向、融合生长特性，体外成肌分化能力也得到显著提升，提高了生产效率，并且不论是形状上，还是生理特性上，制备的纤维与天然骨骼肌纤维都十分相似，因此基于微流控技术制备的纤维具有较好的仿生性。

[0062] 在本发明的3D打印中，本发明首先设计并搭建例如共轴嵌套型微流控芯片；然后准备材料，通过调整内、外相流体的通入顺序、流速等参数，从而稳定生成仿生纤维并进行培养；最后将培养得到的仿生纤维进行组织化集成和食品化处理得到细胞培养肉产品。相较于常见的使用支架、块状水凝胶载体等生产方式，种子细胞被包裹于仿生纤维不具有细胞粘附性材料外壳中，并在外壳的空

间约束下在水凝胶内核中呈现高度定向、融合生长特性，体外成肌分化能力也得到显著提升，提高了生产效率。

- [0063] 在本发明中由3D打印形成的具有特定“壳-核”结构的仿生纤维中进行细胞培养，有效提升了微纤维中畜禽原代细胞如肌肉干细胞的分化能力，使肌肉相关蛋白合成增加，并进一步形成成熟的肌纤维，从而提高细胞培养肉生产效率。本发明制备的微纤维经增殖培养2天、分化培养14天后出现自发性收缩跳动现象，这是原代成肌细胞在海藻酸钙外壳包裹的特定内核中迁移、融合形成多核肌管，多核肌管进一步分化并高度表达肌球蛋白(Myosin)，从而形成成熟肌纤维且展现出一定的生理功能的体现。
- [0064] 本发明形成的仿生纤维在经过增殖、分化培养后，在分化7天时，微纤维和猪肉的扫描电镜和H&E组织染色的对比结果显示，微纤维结构紧实，且表面能观察到明显的肌管结构，组织切片也展现出与猪肉纤维接近的染色特性，整体上与猪肉纤维十分接近；在分化14天时，微纤维下明场观察下还出现自发性收缩跳动现象，这是在体外培养条件下实现从细胞到成熟组织的跨越，说明由种子细胞组成的微纤维已经充分成熟形成肌纤维并具有天然肌纤维的收缩功能，本发明已经具有体外培养出一根肌纤维的能力，将这些体外培养的肌纤维进行收集、组装成大块组织理论上即可得到体外培养的一块由肌纤维组成的细胞培养肉。
- [0065] 有益效果：与现有技术相比，本发明具有如下优点：
- [0066] (1)本发明提出了一种基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，该设备用于细胞培养肉的制备，操作便捷、成型迅速、机械化程度高、所需设备装置成本低，且打印成品精度高、质量稳定；
- [0067] (2)本发明基于微流控3D打印制备的三维组织具有良好的组织各向异性，进一步模拟了种子细胞在天然组织中的生长情况，具有较好的仿生性；
- [0068] (3)本发明制备的细胞培养肉中，种子细胞在三维组织的纤维状基本结构中定向排列并进一步迁移、融合，有助于种子细胞的分化成熟及相关蛋白的合成，进一步提高细胞培养肉的生产效率；

- [0069] (4)本发明开发的基于微流控3D打印技术构建的细胞培养肉具有高度可编程性，其尺寸、形状等特征可在建模软件中随意调整，进一步开发品类各异的细胞培养肉产品，有助于提高细胞培养肉的市场消费者接受度；
- [0070] (5)本发明开发的微流控3D打印装置，用作打印喷头的微流控芯片可灵活替换，在芯片通道结构上还可按生产需求进行定制，从而生产结构、组分各异的细胞培养肉，对细胞培养肉产品的多元化、个性化定制方面具有重大潜力；
- [0071] (6)本发明开发的微流控3D打印装置，其3D打印移动系统上可以按需集成多个微流控芯片，载物平台还可以与传动系统相结合，实现多喷头流水线打印，有助于推动细胞培养肉的规模化、产业化进程。

附图说明

- [0072] 图1为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉的装置示意图；
- [0073] 图2本发明基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备的微流控芯片通道结构示意图和照片，比例标尺为200 μm ；
- [0074] 图3为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉实物图，其中，(a)为打印过程实物图；(b)为成品实物图，比例尺为1000 μm ；
- [0075] 图4为本发明基于微流控3D打印技术构建的不同形状的打印成品，其中，(a)为三角形，(b)为六边形，(c)为圆形，(d)为心形，比例尺为1000 μm ；
- [0076] 图5为本发明基于多喷头微流控3D打印技术生产的细胞培养肉实物图，其中，(a)为打印过程实物图，(b)为成品实物图，比例尺为1000 μm ；
- [0077] 图6为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉培养过程显微镜明场视野图，其中，(a)为打印完成后4小时三维组织显微镜明场视野图，(b)为培养2天后三维组织显微镜明场视野图，比例尺为400 μm ；
- [0078] 图7为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉培养成熟后组织免疫荧光染色图，其中，(a)为细胞核，(b)为细胞骨架蛋白，(c)为肌球蛋白，(d)为融合图像，比例尺为100 μm ；
- [0079] 图8为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉蛋白质组成与市售猪肉的聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶成像图；

- [0080] 图9为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉食品化处理后成品与市售猪肉的外观对比图，其中，猪肉(左)，细胞培养肉(右)，比例尺为2000 μm ；
- [0081] 图10为本发明基于微流控3D打印技术生产的细胞培养肉食品化处理后成品与猪肉的质构特性对比数据图，(a)为硬度，(b)为咀嚼性，(c)为弹性，(d)为凝聚性；
- [0082] 图11为仿生纤维分化培养过程中基于qPCR和Western Blot的细胞分化相关基因和蛋白表达水平变化数据图，其中，(a)为MyoG基因，(b)MyHC-2a基因，(c)为MyHC-slow基因，(d)为相关蛋白Western Blot条带图，(e)MyoG蛋白条带灰度值分析，(f)为Myosin蛋白条带灰度值分析。
- [0083] 图12为仿生纤维培养成熟后免疫荧光染色图及统计图，其中，(a)为免疫荧光染色图，i是细胞核，ii是细胞骨架蛋白，iii是肌球蛋白，iv是融合图像，比例尺为100 μm ；(b)为细胞骨架蛋白定向性统计分析图，(c)为细胞核圆度、纵横比统计分析图，(d)为肌球蛋白阳性细胞和肌管区域统计分析图。

具体实施方式

- [0084] 以下结合附图和实施例对本发明做进一步说明。
- [0085] 实施例中所使用的原料和试剂等都是市售可得。其中种子细胞均采用现有常规分离纯化方法获得或者直接市售获得。
- [0086] 实施例1
- [0087] 基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备示意图如图1所示：
- [0088] 该设备包括打印喷头1、打印移动系统2、载物平台3、进样系统4、打印控制显示系统5、数据传输系统6、底座7。
- [0089] 打印喷头1为微流控芯片，夹持固定于3D打印移动系统2中的x轴移动光轴21上，由x轴移动光轴21带动其在x轴方向上移动；而x轴移动光轴21又与z轴移动光轴22通过螺栓相连接，由z轴移动光轴22带动其在z轴方向上移动。载物平台3通过卡扣装配在打印移动系统2中的y轴移动光轴23上，由y轴移动光轴23带动载物平台3及成型在载物平台3上的打印品在y轴方向移动，载物平台3可拆卸，以便收取样品，移动光轴、载物平台和底座一般是铝合金。
- [0090] 进样系统4包括装样器41、进样泵42和导管43，装样器41固定在进样泵42上，可灵活拆卸以便装填打印材料，导管43一端与装样器41出口连接，一端与打印

喷头1的进口连接。本发明对所述进样泵42的种类无特殊的限制，采用本领域技术人员熟知的能够适用于注射器的注射泵即可，在本实施例中进样泵42为Longer Pump LSP01-1A微量注射泵。装样器41采用本领域技术人员熟知的注射器，并对所述注射器的品牌、种类、尺寸并无特殊的限制；导管43采用本领域技术人员熟知的聚乙烯塑料管，对所述聚乙烯塑料管的品牌、种类、尺寸并无特殊的限制，在本实施例中聚乙烯塑料管外径为1.3mm，内径为0.9mm。

- [0091] 打印控制显示系统5和数据传输系统6与底座7为一个整体，底座7前方开口后嵌入打印控制显示系统5，底座上方打孔后嵌入数据传输系统6接口，数据传输系统6通过数据线连接至打印控制显示系统5，打印控制显示系统5通过数据线连接与打印移动系统2连接。具体而言，长方体底座7前部和顶部边缘处开口，连接打印控制显示系统5和数据传输系统6，打印控制显示系统5主要用于控制打印调平、打印程序的选择、打印指令的下达、打印移动系统2位置调整；数据传输系统6用于将打印指令文件传输进3D打印机；数据传输系统6的数据传输形式包括USB传输、内存卡传输或者电脑传输。将底座7置于水平桌面上，使用螺栓将y轴移动光轴23和z轴移动光轴22固定在底座7上，再将x轴移动光轴21连接至z轴移动光轴22上，即组装成功打印移动系统2。
- [0092] 微流控芯片可以为单通道装置，用于打印实心纤维。将1根玻璃毛细管出口处拉制成外径为200 μm ，内径为100 μm 尺寸，用AB胶将拉制后的玻璃毛细管粘至玻璃片上即搭建成型单通道微流控芯片。微流控芯片也可以为共嵌套装置，用于打印空心型、“壳-核”型纤维、螺旋型纤维、串珠型等。本发明对微流控芯片中导液管的通道个数并无特殊的限制，导液管的通道个数可以为双通道、三通道或四通道。
- [0093] 在本实施例中，具体采用共轴嵌套型微流控芯片，共轴嵌套型微流控芯片包括内相玻璃毛细管用于通入内相溶液，外相玻璃毛细管用于通入外相溶液。共轴嵌套型微流控芯片由玻璃毛细管、点胶针头和玻璃片组成，玻璃毛细管为圆柱形，点胶针头为20G点胶针头；对玻璃片的种类和尺寸并无特殊的限制，玻璃片为市售载玻片，载玻片的厚度为1mm；载玻片的长为30mm，宽为25mm。具体方法为：选取一根内径为580 μm ，外径为1000 μm 的圆柱形玻璃毛细管，

将出口拉制成内径约 $80\mu\text{m}$ ，作内相通道；再选取一根内径为 $580\mu\text{m}$ ，外径为 $1000\mu\text{m}$ 的圆柱形玻璃毛细管，将出口拉制成内径约 $200\mu\text{m}$ ，作外相通道。将所述外相通道固定在载玻片上的正中间位置，然后将内相通道拉制端从外相通道一端插入，保证两相通道互不阻塞，在体式显微镜下调节外相通道和内相通道至同一轴线，固定两管；然后，两相通道的接头处固定20G点胶针头，用AB胶粘连后即组装完成，其结构示意图和显微照片如图2所示，作为微流控芯片用于实施例3三维组织的打印。

- [0094] 将本实施例中的打印喷头1设置成由多个微流控芯片组合而成，进行多喷头微流控3D打印。此外，微流控芯片的制作材料可以替换为晶体硅、聚二甲氧基硅氧烷、石英、聚酰胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、环氧树脂、丙烯酸、橡胶和氟塑料。
- [0095] 实施例2
- [0096] 微流控3D打印材料的配制
- [0097] 微流控外相流体的配制：取适量海藻酸钠粉末，置于超净工作台中紫外照射灭菌，过夜。用移液管量取20mL无菌水于离心管中，在超净工作台内用电子天平称取0.6g海藻酸钠粉末并倒入离心管，使用涡旋仪混匀，再将离心管放入 37°C 恒温水浴锅中，孵育15min后取出再次涡旋，重复上述操作3-5次至海藻酸钠粉末完全溶解后配得30mg/mL海藻酸钠溶液， $3000\times\text{g}$ 离心5min去除海藻酸钠溶液中的气泡，备用(用于实施例3三维组织的打印)。
- [0098] 微流控内相流体的配制：称取0.1g氯化钙于离心管中，加入5mL含酚红的DMEM基础培养基(C11995500CP, Gibco)溶解，配得含20mg/mL氯化钙的DMEM溶液，使用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌，冰上保存备用；称取0.2g NaOH于离心管中，加入5mL超纯水溶解，配得1mol/L NaOH溶液，使用 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌后，冰上保存备用。
- [0099] 以1mL内相流体体系为例，取含 1.5×10^7 个猪肌肉干细胞细胞悬液于离心管中， $300\times\text{g}$ 离心5min，去除上清，将细胞沉淀置于冰上保存备用。用 $300\mu\text{L}$ 含20mg/mL氯化钙的DMEM溶液重悬 1.5×10^7 个猪肌肉干细胞，向细胞悬液中加入 $600\mu\text{L}$ 6mg/mL胶原(来源于牛皮的胶原，Sigma，型号C2124)后，整体转移

至装含有 $3\mu\text{L}$ 1mol/L NaOH溶液的 2mL 离心管中，再加入 $97\mu\text{L}$ 基质胶(标准型 Matrigel, Corning试剂公司)，用 1mL 枪头轻轻吹打混匀，最后将得到的水凝胶溶液置于冰上保存备用(用于实施例3三维组织的打印)。

[0100] 此外，可以采用上述相同的制备方法相同，不同之处在于：所述具有细胞非粘附性材料溶液为壳聚糖，浓度为 10mg/mL ；水凝胶溶液的成分为体积分数30%的明胶，体积分数1%的京尼平溶液，体积分数69%的含氯化钙、含 5×10^6 个/ mL 牛肌肉干细胞F-10培养基。

[0101] 或者不同之处在于：所述具有细胞非粘附性材料溶液为果胶，浓度为 50mg/mL ；水凝胶溶液的成分为体积分数70%的透明质酸，体积分数1%的碳二亚胺溶液，体积分数29%的含氯化钙、 5×10^8 个/ mL 鸡肌肉干细胞MEM培养基。

[0102] 或者不同之处在于：所述具有细胞非粘附性材料溶液为卡拉胶，浓度为 25mg/mL ；水凝胶溶液的成分为体积分数50%的纤维蛋白原，体积分数0.5%的凝血酶溶液，体积分数49.5%的含氯化钙、 5×10^7 个/ mL 羊肌肉干细胞DMEM/F-12培养基。

[0103] 在本发明特定3D打印技术下，采用一定量的猪、牛、羊、鸡、鸭等肌肉干细胞进行培养均可以实现本发明效果。

[0104] 实施例3

[0105] 三维组织的打印

[0106] 用Auto CAD 2021软件建立打印模型，模型的尺寸为 $15\text{mm} \times 20\text{mm} \times 2\text{mm}$ ，将模型导出为.stl模型文件格式；再将.stl模型文件导入Cura切片软件，设置打印间距为 0.7mm ，打印速度为 5mm/s ，运行切片程序得到G-code打印指令文件；将G-code打印指令文件保存至移动盘，经数据传输系统6导入3D打印设备的打印控制显示系统5，备用。

[0107] 采用实施例1构建的共轴嵌套型微流控芯片，将实施例2中制备的海藻酸钠溶液加入到 5mL 注射器内，用一段聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控芯片的外相入口；将实施例2制备的含有猪肌肉干细胞的水凝胶溶液加入到 2mL 注射器内，聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控芯片的内相入口。然后，再将装有两相流体的注射器分别固定在两个泵上，调节内相水

凝胶溶液流速为1.7mL/h，外相海藻酸钠溶液浓度为1.8mL/h。在泵的推动下，内、外相打印材料经聚乙烯塑料管被引入微流控芯片，使两相流体在装置内形成稳定的层流结构从微流控芯片出口处(即外相通道出口)形成“壳-核”结构的仿生纤维。待纤维在打印喷头出口处(外相通道出口)生成后，通过打印控制显示系统5选定打印程序并启动整个微流控3D打印设备，随后微流控3D打印设备的打印移动系统2带动微流控芯片在x、z轴上移动，打印样品在y轴上由载物台带动移动，各个光轴移动速度为5mm/s，使生成的纤维在载物平台上沉积遵循G-code打印指令路径堆叠成型，打印完成后得到三维组织，配制10mg/mL氯化钙溶液，灭菌，用作离子交联剂，将打印完成后的三维组织，取下载物平台，向三维组织上缓慢滴加上述氯化钙溶液直至刚好浸没，交联处理3min后，吸去上述氯化钙溶液，处理后的三维组织如图3所示。

[0108] 此外，利用Auto CAD 2021软件可建立不同形状的三维模型，经切片、打印后得到三角形、六边形、圆形和心形等不同形状的三维组织(图4)。

[0109] 在本实施例中，还可以进一步采用磁吸式集成手段在打印移动系统2的x轴移动光轴上安装多个微流控芯片，并按上述单喷头打印操作进行多喷头微流控3D打印，图5展示了集成4个微流控芯片的多喷头微流控3D打印装置构建细胞培养肉的实时照片和成品照片。

[0110] 实施例4

[0111] 三维组织的培养

[0112] 将实施例3最后打印处理后的三维组织转移至装有增殖培养液的直径10cm的培养皿中(增殖培养液：体积分数84%DMEM/F-12(Gibco, 11550043)、15%胎牛血清(Gibco,10270-106)、1%青霉素-链霉素(Gibco,15140122)，含终浓度5ng/mL成纤维细胞生长因子bFGF(R&D, 233-FB-500/CF))中清洗、浸润10min，培养皿中增殖培养液的量刚好浸没三维组织即可，再将三维组织转移置于37℃、5%CO₂的培养箱中进行增殖培养2天；

[0113] 如图6所示，在显微镜明场视野下观察，当三维组织中猪肌肉干细胞充分迁移、融合形成纤维状结构后，将增殖培养液吸去，然后用不含血清的DMEM 基础培养基清洗三维组织2-3遍。清洗完毕后，向培养皿中加入分化培养液(体积分

数97%DMEM(C11995500CP, Gibco)、2%马血清(Hyclone,SH30074.02)、1%青霉素-链霉素(Gibco,15140122)),其中培养皿中分化培养液的量刚好浸没三维组织即可,置于37℃、5%CO₂条件下继续进行分化培养,之后每隔两天将培养皿中的分化培养液替换1/2,分化7天后进行免疫荧光染色观察,如图7所示,三维组织中猪肌肉干细胞骨架蛋白沿打印纤维方向定向排列(可观察到F-actin方向与纤维走向一致,种子细胞呈高度定向生长),成肌标志蛋白myosin具有较高的表达,说明种子细胞在三维组织中定向排列、迁移和融合生长,且保持着较强的成肌分化能力,有助于种子细胞的分化成熟及相关蛋白的合成。同时经过测试纤维中种子细胞Myosin蛋白明显高出普通二维培养组数倍(其中普通二维培养组为常规的直接采用猪肌肉干细胞分化培养手段,将猪肌肉干细胞进行增殖、分化培养,其细胞使用量、增殖、分化培养时间等与上述组织培养完全一致),进一步说明种子细胞的分化能力得到显著提升,肌肉相关蛋白合成增加,有助于提高细胞培养肉生产效率,通过观测纤维表面可观察到裸露的种子细胞和肌管结构,并展现出与猪肉骨骼肌纤维十分相似的组织结构。

[0114] 实施例5

[0115] 三维组织的食品化处理

[0116] 收获分化成熟的三维组织,用超纯水清洗去除残余的分化培养液得到初步的细胞培养肉,如图8的SDS-PAGE蛋白凝胶电泳凝胶成像图所示,细胞培养肉中肉类相关蛋白(肌球蛋白重链、肌动蛋白和肌球蛋白轻链蛋白等)种类、条带位置与市售猪肉相似;并且通过氨基酸分析,显示细胞培养肉的各类氨基酸含量与市售猪肉差异不大,尤其是Gly(甘氨酸)、Cys(半胱氨酸)和Pro(脯氨酸)含量上十分接近市售猪肉。

[0117] 配制30mg/mL的海藻酸钠溶液,50mg/mL的明胶溶液和100mg/mL的转谷氨酰胺酶溶液,10mg/mL氯化钙溶液备用;将上述明胶溶液和转谷氨酰胺酶溶液按体积比9:1混合,滴加到初步的细胞培养肉上,使其在初步的细胞培养肉表面充分包被,置于37℃孵育2h后,再将其浸入海藻酸钠溶液中3s后捞出,再置于氯化钙溶液中交联3min,清洗去残余的氯化钙溶液即得到塑形成功的细胞培养肉(图9)。塑形处理后进行相应的肉类品质分析,细胞培养肉在硬度、弹性、咀嚼

性和内聚性4个质构指标上与市售猪肉无显著性差异(图10)。塑形处理的细胞培养肉再进行食品前处理(清洗、调味、增色、造型、感官品质修饰等)和煎制处理得到细胞培养肉产品。

[0118] 实施例6

[0119] 微流控仿生纤维的培养

[0120] 向直径10cm无菌细胞培养皿中加入20mL F-10基础培养基作漂洗液，将实施例3制得的3根20cm左右的形成“壳-核”结构的仿生纤维用弯头镊子夹住一端，置于漂洗液中清洗2-3遍以充分去除残余的收集液。清洗完毕后，将仿生纤维转移至盛有增殖培养液(体积分数84% F-10(Gibco, 11550043)、15%胎牛血清(Gibco, 10270-106)、1%青霉素-链霉素(Gibco, 15140122)，含终浓度5ng/mL成纤维细胞生长因子bFGF(R&D, 233-FB-500/CF))的10cm无菌细胞培养皿中，再将培养皿置于37℃、5% CO₂的培养箱中进行增殖培养2天。在显微镜明场视野下观察，当仿生纤维中猪肌肉干细胞充分迁移、融合形成纤维状结构后，将增殖培养液吸去，然后用不含血清的DMEM基础培养基清洗仿生纤维2-3遍。清洗完毕后，向培养皿中加入分化培养液(体积分数97% DMEM(C11 995500CP, Gibco)、2%马血清(Hyclone, SH30074.02)、1%青霉素-链霉素(Gibco, 15140122))置于37℃、5% CO₂条件下继续进行分化培养，之后每隔两天将培养皿中的分化培养液替换1/2，分化培养7天后得到成熟的仿生纤维。

[0121] 在分化第0天、第3天和第7天使用RT-qPCR和Western Blot从分子生物学水平分别评估生长在仿生纤维和二维平皿的种子细胞分化相关基因和蛋白表达的变化情况，其中二维平皿的种子细胞为常规的直接采用猪肌肉干细胞分化培养手段，将猪肌肉干细胞接种至铺有基质胶的无菌直径3.5cm的培养皿上进行增殖、分化培养，其细胞使用量、增殖、分化培养时间等与仿生纤维完全一致。在分化第0天、第3天和第7天，使用Trizol裂解仿生纤维和二维平皿中的细胞，并使用天根生化有限公司的培养细胞总RNA提取试剂盒提取裂解细胞中的RNA；测定样品中RNA浓度后，使用反转录试剂盒对RNA进行逆转录，得到cDNA，反转录程序设为37℃15min，85℃5s；然后，使用RT-qPCR试剂盒对反转录得到的cDNA进行qPCR反应，目的基因为MyoG、MyHC-2a和MyHC-slow，反应

程序为95℃30s、95℃5s、60℃30s。如图11中(a)–(c)所示,培养于仿生纤维的种子细胞在分化开始(Day 0)时肌生成素基因(Myogenin, MyoG)比二维平皿培养对照表达高出300余倍;分化末期(Day 7)时,种子细胞培养于仿生纤维中肌肉成熟标志–myosin合成相关基因MyHC–2a和MyHC–slow表达均显著高于二维平皿培养对照组。进一步的,使用RIPA裂解液冰上裂解仿生纤维和二维平皿中的细胞获取细胞蛋白样品,收集的蛋白样品在4℃12000rpm转速离心5min后收集上清液,使用BCA试剂盒测定样品蛋白浓度,并将样品蛋白浓度稀释到1.25mg/mL,然后加入样品四分之一体积的5×Loading buffer,混匀后在95℃下加热5min使蛋白变性。每个样品取20μL变性蛋白进行SDS–PAGE凝胶电泳,电泳条件为80V 30min, 120V 70min。然后,切取适宜大小的PVDF膜,使用快速湿转移进行转膜,切取对应蛋白分子量的条带(MyHC: 220kDa; MYOG: 34kDa; GAPDH: 36kDa),使用5%脱脂奶粉对膜进行封闭,一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育2h;将显影液A液和B液按1:1混合,将其滴加在条带上,避光孵育5min,然后吸去显影液,使用成像仪显影并拍照,使用imageJ软件进行蛋白条带的灰度值分析。如图11中(d)–(f)所示,种子细胞分化相关蛋白表达与基因表达呈现相同的趋势。综上,种子细胞在仿生纤维中生长时,分化相关基因和蛋白表达(MyoG和Myosin蛋白表达)显著高于二维培养组。在分化初期(day 0)和末期(day 7),仿生纤维中种子细胞MyoG蛋白分别高出二维培养组2.2倍和2.4倍;在分化初期(day 0)、中期(day 3)和末期(day 7),仿生纤维中种子细胞Myosin蛋白分别高出二维培养组2.66、1.78和2倍,说明种子细胞的分化能力得到显著提升,肌肉相关蛋白合成增加,有助于提高细胞培养肉生产效率。

[0122] 此外,在分化7天后对仿生纤维进行免疫荧光染色观察及分析。使用4%多聚甲醛对分化7天仿生纤维进行固定,固定后的样品用0.5% Triton X–100通透30min,通透后用5% BSA溶液封闭30min;一抗4℃孵育过夜,二抗室温孵育2h,并进一步孵育鬼笔环肽对F–actin进行染色30min;最后向样品上滴加含有DAPI细胞核染料的封片剂进行封片,使用激光共聚焦显微镜观察并拍照。如图12中(a)–(d)所示,相较于二维培养组,仿生纤维中的细胞骨架蛋白沿纤维方向定向排列(可观察到F–actin方向与纤维走向一致,种子细胞呈高度定向生长),成肌标志

蛋白myosin具有较高的表达，说明种子细胞在仿生纤维中定向排列、迁移和融合生长，且分化能力得到显著提升，肌肉相关蛋白合成增加。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述设备包括打印喷头(1)、打印移动系统(2)、载物平台(3)、进样系统(4)、底座(7)；所述打印移动系统(2)置于底座(7)上并由多个可移动光轴组成，所述打印喷头(1)固定在其中一个可移动光轴上，载物平台(3)与另一个可移动光轴相连接；所述进样系统(4)与打印喷头(1)相连接，所述打印喷头(1)为微流控芯片，所述微流控芯片为可在通道中对微量液体或样品在进行操纵、处理与控制的装置。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述打印移动系统(2)包括x轴移动光轴(21)、z轴移动光轴(22)和y轴移动光轴(23)，所述z轴移动光轴(22)和y轴移动光轴(23)固定在底座(7)上，x轴移动光轴(21)与z轴移动光轴(22)连接，所述打印喷头(1)固定在x轴移动光轴(21)上，载物平台(3)置于与y轴移动光轴(23)上相连接。
- [权利要求 3] 根据权利要求2所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述打印移动系统(2)由可带动打印喷头(1)在x轴移动光轴(21)、z轴移动光轴(22)上两个方向移动的移动轴和带动载物平台(3)在y轴移动光轴(23)上移动的移动轴组成，其配置的移动坐标系包括笛卡尔坐标系、三角坐标系、极坐标系和平面关节坐标系中的任意一种。
- [权利要求 4] 根据权利要求2所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述载物平台(3)为可拆卸结构，装配于打印移动系统(2)中，与y轴移动光轴(23)连接，进行流水线打印；所述载物平台(3)的材质为铜、铝、铁、钢、合金、玻璃、陶瓷或者碳纤维板材。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述进样系统(4)包括装样器(41)、进样泵(42)和

导管(43)，所述进样泵(42)置于水平桌面，装样器(41)固定在进样泵(42)上，导管(43)一端连接装样器(41)的出口，一端连接打印喷头(1)的进样口，所述进样系统(4)的进料方式包括活塞式挤入、气动式挤入或者螺杆式挤入。

[权利要求 6] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述底座(7)中嵌入安装打印控制显示系统(5)和数据传输系统(6)；数据传输系统(6)通过无线或者有线连接至打印控制显示系统(5)，打印控制显示系统(5)通过无线或者有线连接与打印移动系统(2)连接。

[权利要求 7] 根据权利要求6所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述打印控制显示系统(5)用于控制打印调平、打印程序的选择、打印指令的下达、打印移动系统(2)位置调整；所述数据传输系统(6)用于将打印指令文件传输进3D打印设备；所述数据传输系统(6)的数据传输形式包括USB传输、内存卡传输或者电脑传输。

[权利要求 8] 根据权利要求6所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，打印控制显示系统(5)和数据传输系统(6)嵌入底座(7)后，跟随底座(7)一起接电。

[权利要求 9] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述打印移动系统(2)上微流控芯片类型可以灵活替换，根据不同生产需求进行集成打印。

[权利要求 10] 根据权利要求9所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述打印移动系统(2)上可集成一个或者多个微流控芯片作打印喷头(1)，集成多个微流控芯片时，可使用通道结构相同或者通道结构各异的微流控芯片。

[权利要求 11] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述微流控芯片通过夹持、扣接、插接、磁吸、榫接、铆合、螺纹连接或者卡口连接集成到打印移动系统(2)上。

- [权利要求 12] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述微流控芯片的制作材料包括晶体硅、聚二甲氧基硅氧烷、玻璃、石英、聚酰胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚碳酸酯、聚苯乙烯、环氧树脂、丙烯酸、橡胶和氟塑料中一种或者多种；所述微流控芯片的制作方法包括玻璃毛细管组装法、机械加工法、刻蚀法或者模具法。
- [权利要求 13] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述微流控芯片类型为所述微流控芯片类型为单通道型、共轴嵌套型或者多通道并行型。
- [权利要求 14] 根据权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备，其特征在于，所述微流控芯片基于不同通道结构，可生成实心型、“壳-核”型、空心型、多组分型、螺旋形、串珠型纤维用于微流控3D打印。
- [权利要求 15] 一种权利要求1所述的基于微流控3D打印技术的细胞培养肉生产设备在制备细胞培养肉中应用，所述制备细胞培养肉的过程为：
(1)配制微流控3D打印所需的生物墨水，备用；
(2)将打印指令文件导入打印设备，将步骤(1)配制的生物墨水装填入进样系统(4)；将进样系统(4)连接至打印喷头(1)的进口处，即微流控芯片的通道入口处，将生物墨水经导管(43)挤入打印喷头(1)即微流控芯片；待纤维在微流控芯片出口处生成后，选定需要打印的指令文件，启动整个设备；打印喷头(1)出口生成的纤维在打印移动系统(2)的各个光轴的带动下沉积于载物平台(3)，并遵循打印指令路径堆叠成型；
(3)将载物平台(3)拆卸，并对步骤(2)打印得到的三维组织进行交联固化处理，然后转移至相应的培养液中进行增殖、分化培养；
(4)将步骤(3)中培养成熟的三维组织收获，清洗去除培养液后，进行食品化处理即可得到细胞培养肉。

- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，步骤(1)中所述生物墨水为含有种子细胞的水凝胶溶液、或者为具有细胞非粘附性材料和含有种子细胞的水凝胶溶液组合；所述具有细胞非粘附性材料可以与含有种子细胞的水凝胶溶液直接混合或者所述具有细胞非粘附性材料包裹含有种子细胞的水凝胶溶液；所述含有种子细胞的水凝胶溶液中含体积分数30%–70%生物材料、0.01%–1%交联剂，余量为含钙盐、含 5×10^6 – 5×10^8 个/mL种子细胞的基础培养基。
- [权利要求 17] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述生物墨水中所述具有细胞非粘附性材料为海藻酸钠、壳聚糖、果胶、卡拉胶、结冷胶中的任意一种或多种；所述具有细胞非粘附性的材料溶液的浓度为10–50mg/mL。
- [权利要求 18] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述生物墨水中所述种子细胞来源于猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、鱼、虾和蟹中的任意一种或者多种；所述种子细胞为肌肉干细胞、成肌细胞、肌卫星细胞、肌肉前体细胞、骨髓源间充质干细胞、脂肪源间充质干细胞、诱导多能干细胞、心肌细胞、脂肪干细 胞、脂肪前体细胞、骨髓源脂肪成体细胞、成纤维细胞、平滑肌细胞、血管内皮细胞、上皮细胞、神经干细胞、神经胶质细胞、成骨细胞、软骨细胞、肝脏干细胞、造血干细胞、基质细胞、胚胎干细胞、骨髓干细胞中的一种或者多种。
- [权利要求 19] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述生物材料为胶原蛋白、重组胶原蛋白、明胶、基质胶、透明质酸、丝素蛋白、弹性蛋白、蛛丝蛋白、纤维蛋白、纤维蛋白原、丝纤蛋白、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、整合蛋白、钙粘蛋白、巢蛋白、脱细胞外基质、硫酸软骨素、肝素、硫酸角质素、硫酸皮肤素、硫酸乙酰肝素、角蛋白、硫酸角蛋白、纤维素、聚合素、羧甲基纤维素、聚乳酸、聚乙醇醇、卵磷脂、纳米纤维素、大豆蛋白、豌豆蛋白、面筋蛋白、大米蛋白、花生蛋白、酵母蛋白、真菌蛋白、小麦蛋白、土豆蛋白、

玉米蛋白、鹰嘴豆蛋白、绿豆蛋白、海藻蛋白、杏仁蛋白、藜麦蛋白中的一种或者多种。

[权利要求 20] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述生物墨水成分中使用的基础培养基为F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12、DMEM/F-12 GlutamMAX™、F-12K、RPMI 1640、IMDM、L-15、199、MCDB 131、LHC、McCoy's 5A中的一种或者多种。

[权利要求 21] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述生物墨水成分中使用的交联剂包括NaOH、KOH、NaHCO₃、HEPES平衡盐溶液、EBSS平衡盐溶液、HBSS平衡盐溶液、PBS、DPBS、转谷氨酰胺酶、酪氨酸酶、漆酶、赖氨酰氧化酶、多酚氧化酶、过氧化氢酶、凝血酶、京尼平中的任意一种或者多种。

[权利要求 22] 根据权利要求16所述的应用，其特征在于，所述含有种子细胞的水凝胶溶液中包括生物材料、交联剂，含钙盐、含种子细胞的基础培养基；每1mL水凝胶溶液中含290–699 μL 4–8mg/mL的生物材料，1–10 μL 1–2mol/L交联剂，300–700 μL含15–25mg/mL钙盐、 1×10^7 – 1×10^8 种子细胞的基础培养基；所述生物材料为胶原蛋白、重组胶原蛋白、明胶、基质胶、透明质酸、丝素蛋白中的一种或者多种；所述交联剂为NaOH、KOH、NaHCO₃中的一种或者多种；所述钙盐为氯化钙、碳酸钙、硫酸钙、硝酸钙中的一种或者多种；所述基础培养基为F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12中的一种或者多种；所述种子细胞为猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉干细胞、成肌细胞、肌卫星细胞、肌肉前体细胞中的一种或者多种。

[权利要求 23] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，步骤(3)中所述交联固化处理的方式优选包括温度诱导交联、静电相互作用交联、离子交联、酶交联中的一种或者几种。

- [权利要求 24] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，步骤(3)中所述增殖培养的培养液包括体积分数79–89%基础培养基、10–20%胎牛血清、1%青霉素–链霉素，其中含有1–10ng/mL碱性成纤维细胞生长因子；所述分化培养的培养液包括体积分数94–97%基础培养基、2–5%马血清和1%青霉素–链霉素。
- [权利要求 25] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，步骤(4)中所述食品化处理的方法包括前处理和烹饪，所述前处理包括清洗、调味、增色、造型或者感官品质修饰中的一种或者多种，所述烹饪包括煎、炸、煮、蒸或者烤。