

说明书

发明名称: 一种用于细胞培养肉生产的 微流控仿生纤维及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞培养肉领域，具体涉及用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 肉类含有丰富的蛋白质、维生素和矿物质等人体必需营养物质，已成为世界各国居民膳食宝塔的重要组成部分。随着世界人口数目与肉类需求的逐年上升，依赖畜牧养殖业的肉类生产方式同生态资源禀赋、公共卫生安全以及伦理道德等方面的矛盾日益突出，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] 在此背景下，细胞培养肉脱颖而出，它是一种依托组织工程，基于动物肌肉组织自愈再生能力，对相关细胞、组织进行体外培养而获取的肉类，有望通过体外培养的方式解决未来肉类供给难题。现阶段，生产细胞培养肉的方式一般是给予种子细胞适当的载体，并诱导种子细胞在载体上进行增殖、分化至成熟，最终收获即得到细胞培养肉。常见的用于细胞培养肉生产的载体材料主要有动物蛋白支架、植物蛋白支架、脱细胞植物支架和块状水凝胶等。尽管有不错的研究和应用进展，但支架材料在种子细胞贴壁、迁移和融合效率方面仍存在不足，且无法准确模拟天然骨骼肌中肌纤维的纤维状基本生理结构，致使种子细胞在支架上分化形成成熟肌肉组织的能力受到限制，从而生产效率低下。微流控是一项组织工程领域内的经典技术，其能够在微尺寸通道中操控微量液体，被认为是制备纤维载体的有力手段。然而，微流控技术在细胞培养肉生产方面的应用还未见报道。

[0004] 发明内容

- [0005] 发明目的：针对现有技术存在的问题，本发明提供一种用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，本发明制备的微流控仿生纤维有效解决了现有细胞培养肉生产方式周期长、过程繁琐，且无法准确模拟种子细胞的体内生长环境，相关蛋白合成少，细胞培养肉生产效率低的问题。
- [0006] 本发明还提供所述微流控仿生纤维的制备方法和应用。
- [0007] 技术方案：为了实现上述目的，本发明所述微流控仿生纤维具有“壳-核”结构；所述微流控仿生纤维的外壳由具有细胞非粘附性的高聚物交联后形成，所述外壳包裹的内核为混有种子细胞的水凝胶溶液。
- [0008] 其中，所述具有细胞非粘附性的高聚物溶液包括但不限于海藻酸钠、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高聚物溶液的浓度为10–50mg/mL。
- [0009] 其中，所述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。
- [0010] 其中，所述种子细胞来源包括但不限于猪、牛、羊、鸡、鸭、兔、鱼类、虾类和蟹类中的任意一种或者多种。
- [0011] 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。
- [0012] 其中，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、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。
- [0013] 作为优选，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。
- [0014] 其中，所述水凝胶溶液中的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粘附位点的材料均可。

[0015] 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。

[0016] 其中，所述基础培养基为F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12、DMEM/F-12GlutamMAX™、F-12K、RPMI 1640、IMDM、L-15、199、MCDB 131、LHC、McCoy's 5A中的一种或者多种。

[0017] 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。

[0018] 其中，步骤(1)中所述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、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、京尼平等化学交联剂中的一种或者多种。

[0019] 作为优选，所述交联剂包括NaOH、KOH、NaHCO₃中的一种或者多种。

[0020] 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 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。

- [0021] 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。
- [0022] 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。
- [0023] 本发明所述的一种用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维的制备方法，包括如下步骤：
- [0024] (1)配制微流控内、外相流体：配制具有细胞非粘附性的高聚物溶液作为外相流体，配制含有种子细胞的水凝胶溶液为内相流体；
- [0025] (2)制备仿生纤维：将步骤(1)配制好的内、外相流体分别通入微流控装置的内、外相通道中，通过调节内、外相流速使两相流体在微流控装置的通道中形成稳定的层流结构，再由微流控装置挤出后经过收集液处理，获得仿生纤维。
- [0026] 其中，步骤(2)中所述微流控装置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。
- [0027] 其中，步骤(2)中所述微流控装置的通道结构可以是简易的内相通道与外相通道共轴嵌套的形式；或者在内相通道与外相通道共轴嵌套的基础上，再加上收集相通道和观察相通道构建的共轴嵌套的形式。
- [0028] 作为优选，步骤(2)中所述的微流控装置内相通道管径尺寸范围为50–300 μ m，外相通道出口管径尺寸范围为200–800 μ m。
- [0029] 进一步的，步骤(2)中内相溶液流速范围为0.5–10mL/h，外相溶液流速范围为0.5–10mL/h。

- [0030] 其中，步骤(2)中通过调节内、外相流速使两相流体在微流控装置通道中形成稳定的层流结构，再挤入到收集液中，洗去残余的收集液后获得仿生纤维；或者步骤(2)中通过调节内、外相流速使两相流体在微流控装置通道中形成稳定的层流结构，挤出的仿生纤维直接进行组织化集成，再浸泡在收集液中形成仿生纤维三维组织。
- [0031] 进一步地，步骤(2)中所述收集液包括但不限于钙盐、钠盐、钾盐、镁盐溶液中的一种或者多种。
- [0032] 具体制备时，将内、外相流体分别装填进注射器中，然后使用聚乙烯塑料管连接注射器出口和微流控装置内、外相通道入口，再将注射器固定到蠕动泵上；蠕动泵推动注射器活塞，内、外相流体经聚乙烯塑料管流入微流控装置，并在所述装置的出口处直接成型为仿生纤维，用于后续的组织化集成。
- [0033] 作为优选，制备仿生纤维时，选择将微流控装置的出口伸入装有收集液的培养皿中，两相流体经装置出口直接挤入到收集液中交联成型，仿生纤维形态、结构在收集液中进一步得到稳定，还可以在转移至清洗液和培养液之前为仿生纤维提供暂存的容器，便于后续生产操作。而直接进行仿生纤维的组织化集成时，可以在组织化集成过程中不使用收集液，选择在成型后使用收集液对三维组织进行整体交联和形状固定。
- [0034] 作为优选，可将仿生纤维置于漂洗液中清洗以充分去除残余的收集液，所述漂洗液包括但不限于含血清培养液、基础培养基、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、生理盐水、葡萄糖溶液、无菌水。
- [0035] 本发明所述制备方法所制备的微流控仿生纤维在细胞培养肉生产中的应用。
- [0036] 其中，所述细胞培养肉生产包括如下步骤：
- [0037] 将仿生纤维转移至增殖培养液中进行增殖培养，待种子细胞在仿生纤维中自发融合形成纤维结构后，将增殖培养液替换为分化培养液；收集上述增殖、分化培养至成熟的仿生纤维，经组织化集成和食品化处理后用于细胞培养肉生产。
- [0038] 作为优选，直接将生成的仿生纤维清洗后，转移至装有增殖培液的培养皿中，保证仿生纤维被培养液完全浸没，放入37℃、5%CO₂培养箱中培养，两天换一次培养液。

- [0039] 进一步地，仿生纤维增殖培养2天后，将增殖培养液换成分化培养液继续进行分化培养，每两天替换1/2体积的分化培养液；分化7天后，将仿生纤维收获。
- [0040] 本发明中为了保证待种子细胞在仿生纤维中融合形成纤维结构：第一，优选微流控装置通道尺寸和细胞使用量，使生成的纤维内核中细胞紧密排列；第二，所生成的仿生纤维外壳具有细胞非粘附特性，细胞被约束于内核中生长；第三，在空间约束和紧密排列的情况下，细胞在培养过程中有倾向于互相融合形成整体的生理特性。
- [0041] 其中，所述增殖培养液的成分为体积分数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(bFGF)。
- [0042] 其中，所述分化培养液的成分为体积分数94–97%基础培养基、2–5%马血清和1%青霉素–链霉素。
- [0043] 作为优选，所述增殖培养液和分化培养液中的基础培养基包括但不限于F-10、DMEM、MEM、F-12、DMEM/F-12、DMEM/F-12GlutamMAX™、F-12K、RPMI 1640、IMDM、L-15、199、MCDB 131、LHC、McCoy's 5A。
- [0044] 进一步的，可去除微流控仿生纤维的高聚物部分来获取单纯的细胞纤维，具体方法为使用藻酸盐裂解酶、柠檬酸钠、乙二胺四乙酸、壳聚糖酶、果胶酶、卡拉胶酶中的一种或多种。
- [0045] 其中，所述组织化集成方式包括但不限于堆叠、编制、缠绕、捆绑、折叠等。
- [0046] 其中，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和烹饪包括煎、炸、煮、蒸、烤等。
- [0047] 进一步地，可去除所述成熟的仿生纤维的高聚物部分来获取单纯的细胞纤维，所述去除方法采用裂解液，所述裂解液包括藻酸盐裂解酶、柠檬酸钠、乙二胺四乙酸、壳聚糖酶、果胶酶或者卡拉胶酶。本发明仿生纤维可以在分化成熟后去除外壳，用于后续加工，获得纯细胞纤维，相对蛋白含量更高，营养更丰富。

- [0048] 本发明利用天然骨骼肌组织基本单元——肌纤维结构仿生的原理，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。
- [0049] 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。受天然骨骼肌组织中肌纤维这一基本单元纤维状结构的启发，本发明以肌纤维仿生为设计原理，提出一种基于微流控技术的用于细胞培养肉生产的仿生纤维载体的制备方法，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的高聚物外壳中，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。
- [0050] 具体而言，本发明中重点为微流控仿生纤维的制备，本发明首先设计并搭建如共轴嵌套式微流控装置；然后准备内、外相流体材料，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的高聚物外壳中，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。
- [0051] 本发明通过特定的“壳-核”结构、内外相组分调配以及整体方案设计，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。

[0052] 有益效果：与现有技术相比，本发明具有如下优点：

[0053] (1)本发明基于微流控技术制备得到连续、规模化、结构均匀以及尺寸可控的仿生纤维，所涉及的设备装置成本低廉，制备条件温和、操作简单、成型迅速；

[0054] (2)本发明受天然骨骼肌组织中肌纤维结构的启发，制备的仿生纤维可为种子细胞提供良好的纤维载体，进一步模拟种子细胞在体内的三维生长环境，具有较好的仿生性；

[0055] (3)本发明制备的仿生纤维外壳不具有细胞贴附性，从而可诱导种子细胞在纤维载体内核空间中定向排列、迁移和融合生长，进而使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，提高了细胞培养肉生产效率；

[0056] (4)本发明制备的仿生纤维具有纤维材料良好的组织化集成特性，可进一步用于编制、缠绕、堆叠等精深加工操作，实现大块培养肉的构建。

附图说明

[0057] 图1为本发明用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维的制备示意图；

[0058] 图2为本发明用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维的制备过程实时图像以及微流控装置通道结构图；

[0059] 图3为本发明用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维尺寸灵活调整的可行性验证数据图，其中，(a)为不同内核尺寸的仿生纤维明场图，比例尺为200 μm ；(b)和(c)为外壳、内核尺寸随流速改变的变化图；

[0060] 图4为本发明用于组织化集成的微流控装置通道结构示意图和显微照片，比例尺为200 μm ；

[0061] 图5为用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维培养过程的显微镜明场视野图，其中，(a)为制备后孵育2小时仿生纤维显微镜明场视野图，(b)为增殖培养2天后仿生纤维显微镜明场视野图，(c)为分化培养3天后仿生纤维显微镜明场视野图，(d)为分化培养7天后仿生纤维显微镜明场视野图，比例尺为200 μm ；

[0062] 图6为用于细胞培养肉生产的微流控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。

[0063] 图7为用于细胞培养肉生产的微流控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;

[0064] 图8为用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维培养成熟后与市售猪肉的电镜对比图, 其中, (a)为培养成熟的仿生纤维, 比例尺为40 μm ; (b)为市售猪肉, 比例尺为100 μm ;

[0065] 图9为用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维培养成熟后与市售猪肉的H&E染色对比图, 其中, (a)为培养成熟的仿生纤维纵切图, (b)为市售猪肉纵切图, (c)为培养成熟的仿生纤维横切图, (d)为市售猪肉横切图, 比例尺为100 μm ;

[0066] 图10为用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维组织化集成所用装置示意图;

[0067] 图11为用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维组织化集成过程(a)及成品图(b), 比例尺为1000 μm ;

[0068] 图12为用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维培养成熟后各类氨基酸含量与对照组和市售猪肉对比数据图;

[0069] 图13为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;

[0070] 图14为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。

具体实施方式

[0071] 以下结合附图和实施例对本发明做进一步说明。

[0072] 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。

[0073] 实施例1

[0074] 微流控内、外相流体的配制

[0075] (1)外相流体的配制

[0076] 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℃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， $3000 \times g$ 离心5min去除海藻酸钠溶液中的气泡，备用。

[0077] (2)内相流体的配制

[0078] 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 μm 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 μm 滤膜过滤除菌后，冰上保存备用。

[0079] 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， $300 \times g$ 离心5min，去除上清，将细胞沉淀置于冰上保存备用。用300 μL 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 μL 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 μL 1mol/L NaOH溶液的2mL离心管中，再加入97 μL 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。

[0080] 实施例2

[0081] 微流控仿生纤维的制备

[0082] 微流控仿生纤维制备过程如图1所示，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 μm ，作内相通道；再选取一根内径为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200 μm ，作外相通道。此外，选取一根圆形玻璃毛细管，毛细管内径为0.8mm，外径为1mm，作收集相通道；选取一根方形玻璃毛细管，内棱长为1.05mm，作观察相通道。将观察相方管通道固定在载玻片平面正中间的位置上(载玻片的厚度为1mm；载玻片的长为30mm，宽为25mm)，可以通过连接C

CD摄像头，观察纤维在通道内的形成情况，然后将外相通道的拉制端和收集相通道分别经由方管通道两段插入，保证外相通道插入到收集相通道中并互不阻塞，在体式显微镜下调节外相通道和收集相通道至同一轴线(与玻璃毛细管长平行的横轴)，固定两管；接着将内相通道的拉制端从外相通道一边插入到外相通道中并固定，同样保证互不阻塞，调整四根玻璃毛细管的位置使其轴线(与玻璃毛细管长平行的横轴)重合。最后，在所有通道的接头处固定20G点胶针头，用AB胶粘连后即组装一种具有共轴嵌套形式的微流控装置，其结构如图2所示。

[0083] 配制10mg/mL氯化钙溶液，灭菌，用作收集液。将上述收集液加入到注射器内，用一段聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控装置的收集相通道的入口；将实施例1中配制的海藻酸钠溶液加入到注射器内，用一段聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控装置的外相通道的入口；将实施例1配制的含有猪肌肉干细胞的水凝胶溶液加入到注射器内，聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控装置的内相通道的入口。然后，再将装有各相流体的注射器分别固定在蠕动泵上，调节收集相氯化钙溶液流速为15mL/h，内相水凝胶溶液流速为1.8mL/h，外相海藻酸钠溶液流速为2mL/h，启动蠕动泵。“壳-核”型仿生纤维在微流控装置内的生成过程可分为两个阶段。第一阶段，内相流体和外相流体首先在内相通道出口与外相通道出口之间汇聚形成同轴层流流体，然后进入收集相通道和收集相溶液再次汇聚形成三层同轴层流流体；第二阶段，三层流体形成后，外相海藻酸钠溶液在收集相和内相溶液钙离子的存在下开始形成海藻酸钙水凝胶并不断向内层扩散，“壳-核”型仿生纤维不断被固化挤出进入收集液。三相流体在装置中接触并形成稳定的层流结构(图2，显微观察可见收集相流体、内相流体和外相流体间明显的分界线，即为层流结构现象)，然后通过收集相通道挤入收集液中，即得到仿生纤维。所制备的仿生纤维尺寸可控，并且连续、可规模化，可通过改变流速来灵活调控(图3)。其中，图3中(a)为不同内核尺寸的仿生纤维明场图，如图3中(b)所示，随着内相溶液流速的增加，“壳-核”仿生纤维的内相直径也增加，而外相直径略微上升，受内相溶液流速的影响较小；如图3中(c)所示，随着外相溶液流速的增加，“壳-核”仿生纤维的内相直径随之减小，而外相直径同样略微上升，受外

相溶液流速的影响较小。由此得出，“壳-核”仿生纤维内相的直径受各相流速影响，与内相溶液流速成正比，与外相溶液流速成反比；仿生纤维外相的直径几乎不受各相流速影响，受微流控装置出口口径的限制。

[0084] 本实施例在保证内、外相流体充足的情况下，仿生纤维可从微流控装置出口处快速、持续生成；通过简单的调节微流控装置出口口径，内、外相流速的方式即可控制所制备的仿生纤维的尺寸；搭建微流控装置所使用的是玻璃毛细管、玻璃片、点胶针头等均为成本低廉的的常见耗材。此外，在制备时需要先通入外相溶液再通入内相溶液，如顺序相反无法形成纤维。

[0085] 实施例3

[0086] 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 μm ，作内相通道；再选取一根内径为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200 μm ，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4所示，作为微流控装置用于实施例5三维组织的打印。

[0087] 本实施例中搭建的微流控装置为实施例2中所搭建的微流控装置的简易版，不含有收集相通道和观察相通道，为内相通道与外相通道共轴嵌套的形式，可以直接用于仿生纤维的组织化集成；而实施例2中所搭建的微流控装置主要用于仿生纤维制备时通道内的流体状态和纤维生成过程的实时观察。此外，基于上述两种微流控装置制备的仿生纤维在结构、形态、功能上并无区别。

[0088] 实施例4

[0089] 微流控仿生纤维的培养

[0090] 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2制得的3根20cm左右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(C11995500CP,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。

[0091] 如图5所示,培养后2小时,种子细胞在“壳-核”仿生纤维的内核中依旧保持成球状并紧密排列(图5中(a));增殖培养2天后,种子细胞在内核中完成迁移并相互融合形成纤维状结构(图5中(b));分化培养3天后,细胞纤维相较于增殖培养2天时变细,并能看到细胞纤维中的肌管结构,说明种子细胞逐步开始分化(图5中(c));分化培养7天后,细胞纤维相较于分化培养3天时进一步变细,细胞纤维中的肌管变长,种子细胞分化成熟(图5中(d))。如图5说明可观察到种子细胞融合形成纤维状结构,并被包裹于透明的高聚物外壳内。

[0092] 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6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(Day7)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6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(day7)，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。

[0093] 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7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。

[0094] 实施例5

[0095] 微流控仿生纤维高聚物外壳的去除

[0096] 称取4mg藻酸盐裂解酶干粉，加入1mL超纯水溶解后制得4mg/mL藻酸盐裂解酶溶液，使用0.22 μ m滤膜过滤除菌，并置于37℃水浴锅中备用。将实施例4中分化培养7天后得到成熟的仿生纤维的培养皿中的分化培养液吸去，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10mL不含血清的DMEM基础培养基，再向培养基中加入200 μ L藻酸盐裂解酶溶液，将培养皿置于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育20min。裂解完毕后，用弯头镊子将细胞纤维取出，PBS清洗后使用4%多聚甲醛和2.5%戊二醛进行组织固定。取2.5%戊二醛固定后的样品，置于50%，70%，80%，90%和无水乙醇中梯度脱水；将脱水后的样品浸入叔丁醇中置换，而后将样品冻干去除叔丁醇；使用离子溅射仪给样品表面喷金后用扫描电子显微镜进行观察拍照并与市售猪肉对比(图8中(a)和(b))。此外，取4%多聚甲醛固定后的样品，置于70%，80%，90%和无水乙醇中梯度脱水后，使用二甲苯梯度置换样品中的乙醇；再使用包埋剂石蜡置换样品中的二甲苯，用新鲜石蜡包埋样品，切片机切片后使用苏木精和伊红染色液进行染色，倒置显微镜观察拍照并与市售猪肉对比(图9中(a)-(d))。从图8和9可以看出仿生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。

[0097] 实施例6

[0098] 微流控仿生纤维的组织化集成

[0099] 将实施例3构建的共轴嵌套形式的微流控装置集成到3D打印机喷头移动系统中作为打印喷头，改装得到微流控3D打印装置，其结构示意图如图10所示。

[0100] 打印装置包括打印喷头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。

[0101] 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，移动光轴一般是铝合金，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。打印喷头1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

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。

[0102] 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，进样泵42采用注射泵为Longer Pump LSP01-1A微量注射泵，装样器41可采用注射器，导管43可采用聚乙烯塑料管。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。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。

[0103] 用Auto CAD 2021软件建立打印模型，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。将实施例1中配制的海藻酸钠溶液加入到注射器内，用一段聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控装置的外相入口；将实施例1配制的含有猪肌肉干细胞的水凝胶溶液加入到注射器内，聚乙烯塑料管一端连接注射器针头，一端连接微流控装置的内相入口。然后，再将装有两相流体的注射器分别固定在两个Longer Pump LSP01-1A微量注射泵上，调节内相水凝胶溶液流速为1.8mL/h，外相海藻酸钠溶液流速为2mL/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装置。待纤维在装置出口(即外相通道出口)处生成后，选定打印程序并启动3D打印装置，随后3D打印机喷头移动系统带动微流控装置在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，使生成的纤维沉积于载物平台3并遵循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，用作收集液，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，组织化集成过程如图11中(a)，处理后的三维组织如图11中(b)。此外，组织化集成也可以采用堆叠、编制、缠绕、捆绑或者折叠等其他方式。

[0104] 将三维组织转移至增殖培养液(体积分数84%DMEM/F-12、15%胎牛血清、1%青霉素-链霉素和5ng/mL成纤维细胞生长因子)中清洗、浸润10min，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；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15mL分化培养液(体积分数97%DMEM、2%马血清、1%青霉素-链霉素)，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天后进行三维组织的食品化处理，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，氨基酸分析结果(图12)显示细胞培养肉的各类氨基酸含量明显高于对照组(使用不含种子细胞的内核水凝胶溶液，其他制备方法和实施例1和2一致)，在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。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13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。

[0105] 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。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。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14)。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。

- [0106] 本发明制备的微纤维在经过增殖、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、组装成大块组织即可得到体外培养的一块由肌纤维组成的细胞培养肉。
- [0107] 实施例7
- [0108] 实施例7与实施例1制备方法相同，不同之处在于：所述具有细胞非粘附性的高聚物溶液为壳聚糖，浓度为10mg/mL。
- [0109] 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%的含硫酸钙、含 5×10^6 个/mL牛肌肉干细胞F-10培养基。
- [0110] 实施例8
- [0111] 实施例8与实施例1制备方法相同，不同之处在于：所述具有细胞非粘附性的高聚物溶液为果胶，浓度为50mg/mL。
- [0112] 水凝胶溶液的成分为体积分数70%的透明质酸，体积分数1%的碳二亚胺酶溶液，体积分数29%的含乳酸钙、 5×10^8 个/mL鸡肌肉干细胞MEM培养基。
- [0113] 实施例9
- [0114] 实施例9与实施例1制备方法相同，不同之处在于：所述具有细胞非粘附性的高聚物溶液为卡拉胶，浓度为25mg/mL。
- [0115] 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。
- [0116] 在本发明特定的微流控仿生纤维所具有的“壳-核”结构培养条件下，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上述效果。
- 。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，所述微流控仿生纤维具有“壳-核”结构；所述微流控仿生纤维的外壳由具有细胞非粘附性的高聚物交联后形成，所述外壳包裹的内核为混有种子细胞的水凝胶溶液。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，所述具有细胞非粘附性的高聚物溶液为海藻酸钠、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高聚物溶液的浓度为10–50mg/mL。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，所述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 4] 根据权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，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。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，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 6] 根据权利要求3所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，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。

[权利要求 7]

根据权利要求3所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，所述基础培养基为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。

[权利要求 8]

根据权利要求3所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，所述交联剂为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 9]

根据权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维，其特征在于，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。

- [权利要求 10] 一种权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：
- (1)配制微流控内、外相流体：配制具有细胞非粘附性的高聚物溶液作为外相流体，配制含有种子细胞的水凝胶溶液为内相流体；
- (2)制备仿生纤维：将步骤(1)配制好的内、外相流体分别通入微流控装置的内、外相通道中，通过调节内、外相流速使两相流体在微流控装置的通道中形成稳定的层流结构，再由微流控装置挤出后经过收集液处理，获得仿生纤维。
- [权利要求 11] 根据权利要求10所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中所述微流控装置的制作材料为晶体硅、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。
- [权利要求 12] 根据权利要求10所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中所述微流控装置的通道结构为内相通道与外相通道共轴嵌套的形式；或者在内相通道与外相通道共轴嵌套的基础上，再加上收集相通道和观察相通道构建的共轴嵌套的形式。
- [权利要求 13] 根据权利要求10所述的制备方法，其特征在于，步骤(2)中通过调节内、外相流速使两相流体在微流控装置通道中形成稳定的层流结构，再挤入到收集液中，洗去残余的收集液后获得仿生纤维；或者步骤(2)中通过调节内、外相流速使两相流体在微流控装置通道中形成稳定的层流结构，挤出的仿生纤维直接进行组织化集成，再浸泡在收集液中形成仿生纤维三维组织；所述收集液为钙盐、钠盐、钾盐、镁盐溶液中的一种或者多种。
- [权利要求 14] 一种权利要求1所述的用于细胞培养肉生产的微流控仿生纤维在细胞培养肉生产中的应用。
- [权利要求 15] 根据权利要求14所述的应用，其特征在于，所述细胞培养肉生产包括如下步骤：

将仿生纤维转移至增殖培养液中进行增殖培养，待种子细胞在仿生纤维中融合形成纤维结构后，将增殖培养液替换为分化培养液；收集上述经过增殖、分化培养至成熟的仿生纤维，经组织化集成和食品化处理后用于细胞培养肉生产。

- [权利要求 16] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，所述增殖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；所述分化培养液的包括体积分数94–97%基础培养基、2–5%马血清和1%青霉素–链霉素。
- [权利要求 17] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，所述组织化集成采用堆叠、编制、缠绕、捆绑或者折叠方式。
- [权利要求 18] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，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。
- [权利要求 19] 根据权利要求15所述的应用，其特征在于，可去除所述成熟的仿生纤维的高聚物部分来获取单纯的细胞纤维，所述去除方法采用裂解液，所述裂解液包括藻酸盐裂解酶、柠檬酸钠、乙二胺四乙酸、壳聚糖酶、果胶酶或者卡拉胶酶。