

# NEWS CENTER

## 科技进展

## 科技进展

### [\(/a/news/development/\)](/a/news/development/)

- 行业信息  
[\(/a/news/msg/\)](/a/news/msg/)
- 政策法规  
[\(/a/news/fagui/\)](/a/news/fagui/)
- 科技进展  
[\(/a/news/development/\)](/a/news/development/)
- 域外信息  
[\(/a/news/yuwai/\)](/a/news/yuwai/)
- 食品安全  
[\(/a/news/safe/\)](/a/news/safe/)
- 供应商推荐  
[\(/a/news/recommend/\)](/a/news/recommend/)
- 公开信息  
[\(/a/news/zlxz/\)](/a/news/zlxz/)

### 相关新闻

- 中国工程院增选75位院士...  
[\(/a/news/msg/20191201/1610.html\)](/a/news/msg/20191201/1610.html)
- 大连工业大学朱蓓薇院士...  
[\(/a/news/development/20200828/1935.html\)](/a/news/development/20200828/1935.html)
- “益生菌科学研究十大热...”  
[\(/a/news/development/20200820/1932.html\)](/a/news/development/20200820/1932.html)
- 《益生菌的科学共识 (2...  
[\(/a/news/development/20200424/1802.html\)](/a/news/development/20200424/1802.html)
- 为什么植物肉或成未来食...  
[\(/a/news/development/20200602/1841.html\)](/a/news/development/20200602/1841.html)
- 供应玻璃瓶, 香油瓶, 酱...  
[\(/a/news/recommend/20151104/71.html\)](/a/news/recommend/20151104/71.html)
- 中国食品科学技术学会年...  
[\(/a/news/zlxz/20180502/856.html\)](/a/news/zlxz/20180502/856.html)
- 关于疫情防控期间饮食安...  
[\(/a/news/safe/20200208/1645.html\)](/a/news/safe/20200208/1645.html)
- 国家食品安全风险评估中...  
[\(/a/news/fagui/20211028/2288.html\)](/a/news/fagui/20211028/2288.html)
- 中国食品科学技术学会年...  
[\(/a/news/zlxz/20190513/1040.html\)](/a/news/zlxz/20190513/1040.html)

### 《中国食品学报》特约文章推荐——细胞培育肉种子细胞永生化诱导研究

2023-01-16 16:05 新闻来源：中国食品科学技术学会 浏览人次：183 次

本期介绍中国肉类食品综合研究中心首席科学家王守伟（第一作者：杨峰）发表在《中国食品学报》第22卷第12期特约专栏（细胞培养肉专栏）上的文章《细胞培育肉种子细胞永生化诱导研究》。

#### 【研究背景与目的】

种类丰富、高活力的种子细胞是生产细胞培育肉的源头，然而，这些细胞活化后分化为成肌细胞即失去干性，无法永久性持续增长，细胞传代能力仍然面临着诸多挑战，而持续从动物机体获取细胞也违背了动物福利。细胞永生化技术可以使细胞获得持续生长的增殖能力，长期传代，并具有无限增殖的生长特性，克服一般原代细胞有限次传代后即发生衰老和死亡的情况。成体细胞的永生化，包括端粒酶逆转录酶转染、基因敲除类恢复性诱导、四小吉奎琳氧化法以及黄曲霉素刺激法。然而，现存的永生化细胞系多为小鼠或人源细胞，无法直接应用于细胞培育肉体系，更不能用于食品科学的研究。文章通过构建稳定性强的猪成肌细胞永生化诱导载体，为细胞培育肉种子细胞制备提供更高效的技术手段，为细胞培育肉工业化生产种子细胞获取打下基础。

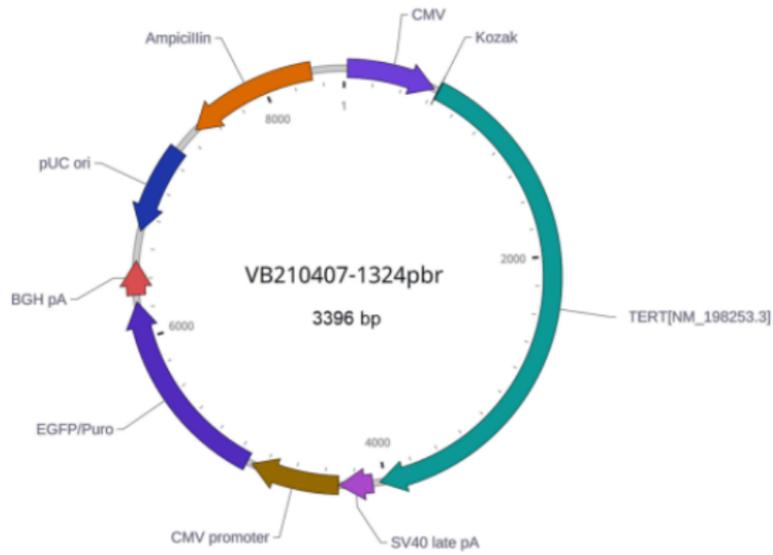
#### 【试验方法】

基于猪成肌细胞，通过端粒酶逆转录酶进行诱导载体的构建，核转染到细胞后分别通过免疫荧光标记、定量PCR、染色体核型分析等方法进行细胞诱导验证。

#### 【结果】

##### 1. 端粒酶逆转录酶过表达载体构建

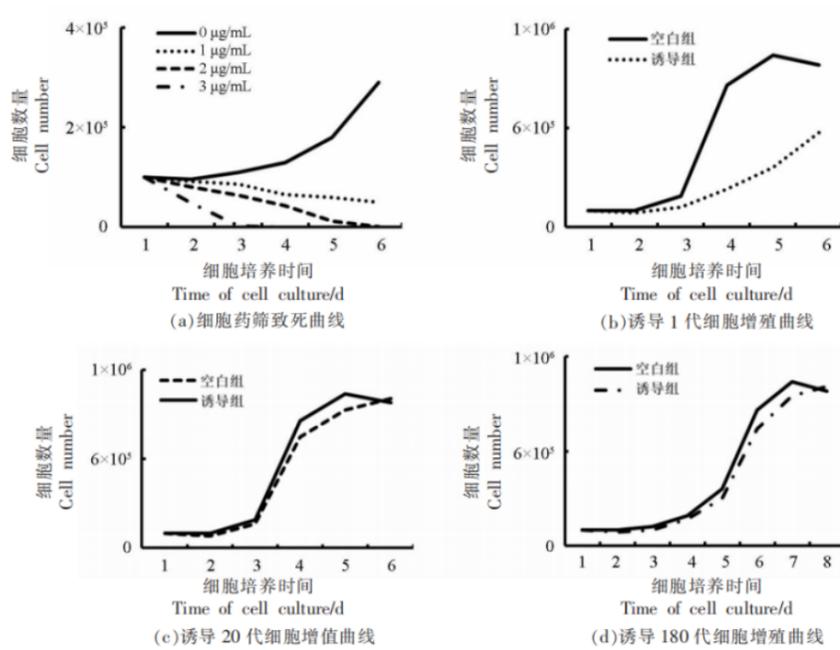
通过脱毒的慢病毒进行过表达载体的构建，构建完成的载体通过多引物PCR验证和测序验证，结果良好，序列无突变发生。



(永生化诱导过表达载体图谱)

## 2. 嘌呤霉素筛选阳性细胞药筛及细胞活力检测

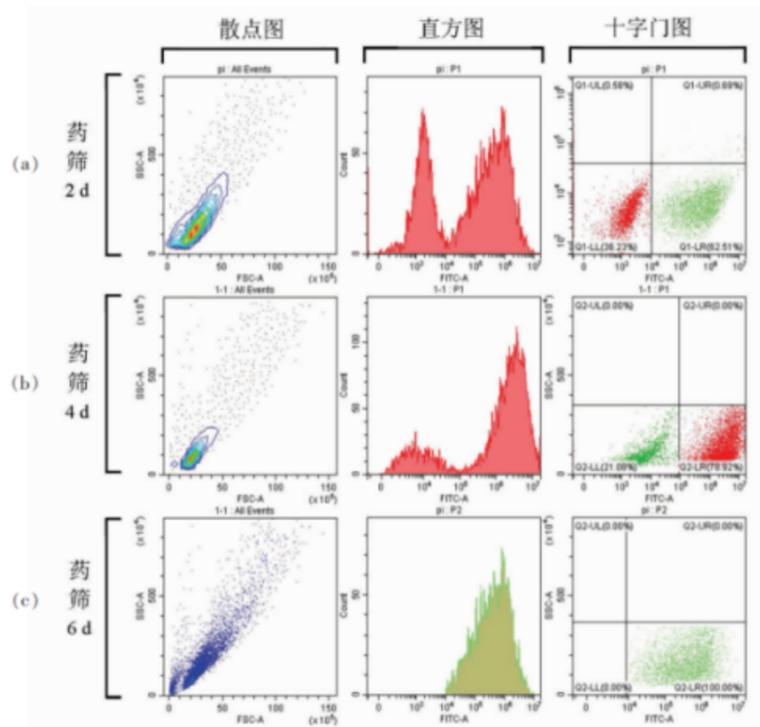
在明确转导滴度为25时转导细胞效率最高的基础上，利用嘌呤霉素进行阳性细胞药筛，去除假阳性细胞。连续传代验证发现诱导组的细胞已经突破生理极限，突破了“Hay flick”界限（细胞最大分裂次数），证明本研究中的细胞永生化诱导取得初步成功。



(细胞凋亡及增殖曲线)

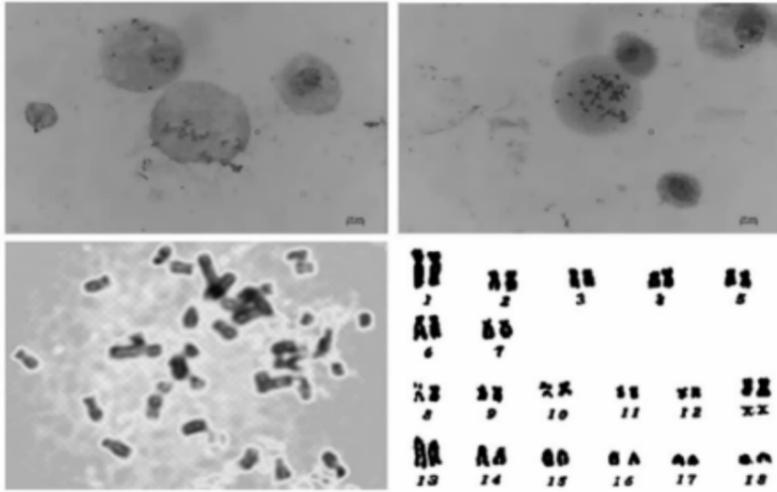
## 3. 流式细胞术纯化阳性细胞及细胞阳性率鉴定

分别在诱导细胞加入嘌呤霉素的第2, 4, 6天时进行流式细胞术的细胞鉴定，检测阳性细胞的药筛效率，发现随着时间的延长，阳性细胞的比例不断上升，第6天时阳性细胞比例为100%（存在极少数的阴性细胞在圈门外，比例接近于0），阴性细胞已通过嘌呤霉素全部筛除。



#### 4. 永生化诱导细胞株遗传稳定性鉴定

对诱导后传代50代的细胞进行染色体核型分析发现，1号染色体中央着丝粒和次缢痕染色深，2号染色体短臂有4条深带，长臂有6~7条深带，分3个区；3号染色体着丝粒染色浓，在短臂和长臂的中端各有1条明显宽阔的浅带；其它染色体从形态、长度和臂比上看均未产生显著的异变。



(细胞核型分析)

#### 5. 端粒酶逆转录酶及端粒四聚体表达鉴定

在永生化诱导的细胞中hnRNP A2蛋白的表达与端粒酶活性呈正相关，hnRNP A2的表达促进了端粒的延长。此外，在成体细胞中，端粒酶是无法被检测到的，而在本诱导细胞株中，可以检测到端粒酶的表达，证明细胞的诱导成效显著。

#### 6. 端粒酶逆转录酶及hnRNP蛋白表达活性鉴定

相较于端粒的长短，端粒变短的速度具有更重要的意义。研究结果表明：永生化诱导的细胞相对端粒酶长度显著高于对照组，从侧面揭示细胞永生化诱导的效率，细胞传代能力和细胞活力显著高于对照组。此外，hnRNP A2基因表达量显著高于对照组，揭示该蛋白在端粒中的活化功能，以及诱导组细胞蛋白活性显著高于对照组，表明永生化细胞诱导取得成功，细胞传代能力得到显著提升。

### 【讨论】

细胞培育肉作为一门新兴科学技术，虽然研究时间相对较短，但是其作为细胞生物学、组织工程学及食品科学等多学科交叉融合的技术已经具备深厚的研究基础。在细胞培育肉研发过程中，获得相应的可以无限增殖的成体细胞，是解决其工业化过程中细胞来源的重要保障。

在基因水平层面，细胞永生化的方法目前主要有SV40大T抗原法、端粒酶逆转录酶法、HPV16 E6法、原癌基因以及抑癌基因等方法。这些细胞永生化的方法各有利弊，作为食品科学研究，细胞培育肉使用的种子细胞首先需要排除人源因素，同时保证细胞的活性及各项功能，更重要的是细胞永生化的诱导不能干扰了各类种子细胞的正常使用，即不能引入不确定因素。

将端粒酶逆转录酶导入细胞后随着细胞分裂过程，同步表达逆转录酶的催化亚基，调节端粒酶的活性。同时与hnRNP A2蛋白发生作用，打开端粒G-四链体结构，暴露端粒3'端碱基，促进其与端粒酶RNA模板配对，从而增强端粒酶的催化活性及进行性，有效维持端粒酶的长度，其意义在于减低（负调控）端粒缩短的速度，使端粒维持一定的长度，从而实现细胞的永生化。该方法得到的永生化细胞除了端粒酶逆转录酶，不再引入新的影响基因，以保证细胞的正常表达水平和功能。细胞在传代180代后仍具有较高的增殖和分化效率，且细胞稳定性较高，没有发生不可预测的突变现象。

### 【结论】

本研究构建猪成肌细胞永生化诱导载体，探索细胞永生化诱导方案和研究材料；通过细胞核转染、阳性细胞流式细胞仪筛选获取阳性细胞株；通过定量PCR、免疫荧光标记、核型分析等验证细胞的稳定性；对阳性细胞进行连续传代培养，验证细胞可传代超过200代。本研究的实施为细胞培育肉种子细胞的开发探索了理论基础，提供了工业化生产的细胞材料，为培育肉工业化生产提供先导条件。

原文链接：[https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=2pc-UOsZbJIK-](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=2pc-UOsZbJIK-ErNadGP6O2PMZrO2eLNzLhpOM2Q9oXziF7SUQFLZOrCRHzDk47SjNzqJizGeFhQBFW9bBsNHxYXTExzj2n2r_ykO2szXnZ2lIMwnsQmgQ=&uniplatform=NZKPT)

[ErNadGP6O2PMZrO2eLNzLhpOM2Q9oXziF7SUQFLZOrCRHzDk47SjNzqJizGeFhQBFW9bBsNHxYXTExzj2n2r\\_ykO2szXnZ2lIMwnsQmgQ=&uniplatform=NZKPT](https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=2pc-UOsZbJIK-ErNadGP6O2PMZrO2eLNzLhpOM2Q9oXziF7SUQFLZOrCRHzDk47SjNzqJizGeFhQBFW9bBsNHxYXTExzj2n2r_ykO2szXnZ2lIMwnsQmgQ=&uniplatform=NZKPT)