

# 权 利 要 求 书

1、蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞的培养方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

步骤 1，将蛋鸡处死后，在无菌条件下取出整段输卵管浸泡于 PBS 中，  
5 并去除系膜、结缔组织和血液；

步骤 2，将输卵管的膨大部剪下，用 PBS 清洗后剪碎成组织块，并用 PBS 清洗组织块；

步骤 3，将清洗后的组织块转移至胶原酶 IV 中，于 37℃消化一定时间；

步骤 4，将消化后的消化液过滤，滤液进行离心，离心后弃上清液得细  
10 胞，向细胞中加入完全培养基，使细胞重悬，最后将细胞转移至培养瓶中，置于体积浓度为 5%的二氧化碳、37℃的条件下培养；

还包括：在培养 2.5~3h 后，采用差数贴壁法，将培养瓶中的液体转移至新的培养瓶中，重复此操作 1~2 次；

所述胶原酶 IV 的浓度为 1mg/ml；所述消化的时间为 70min。

15 2、如权利要求 1 所述的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞的培养方法，其特征在于，所述组织块的大小为 1mm<sup>3</sup>；所述离心的转速为 700 rpm、时间为 20min；所述培养的时间优选 72h。

3、如权利要求 1 所述的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞的培养方法，其特征在于，所述完全培养基组成为：91%的 DMEM/F12 基础培养基，5%胎牛血清，2%鸡血清，1%非必需氨基酸，5ug/ml 胰岛素，20IU/ml 的肝素，2mM  
20 的 L-谷氨酰胺，15ng/ml 表皮生长因子，1%青链霉素。

4、蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞氧化应激模型的建立方法，其特征在于，具体包括以下步骤：

步骤 1，培养蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞；

25 步骤 1.1，将蛋鸡处死后，在无菌条件下取出整段输卵管浸泡于 PBS 中，并去除系膜、结缔组织和血液；

步骤 1.2，将输卵管的膨大部剪下，用 PBS 清洗后剪碎成组织块，并用

PBS 清洗组织块；

步骤 1.3，将清洗后的组织块转移至胶原酶 IV 中，于 37℃消化一定时间；

5 步骤 1.4，将消化后的消化液过滤，滤液进行离心，离心后弃上清液得细胞，向细胞中加入完全培养基，使细胞重悬，最后将细胞转移至培养瓶中，置于体积浓度为 5%的二氧化碳、37℃的条件下培养。

步骤 2，采用培养的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞，通过 MTT 法分别测试不同浓度的重金属和不同的作用时间下的细胞活力，根据测试结果确定重金属作用时间点；

10 步骤 3，以步骤 2 确定的时间点，设计不同的重金属浓度梯度，测定细胞凋亡、胞内活性氧的生成、细胞超氧化物歧化酶、乳酸脱氢酶的释放情况，选取最适合的重金属浓度，从而建立细胞氧化应激模型。

15 5、如权利要求 4 所述的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞氧化应激模型的建立方法，其特征在于，所述步骤 1 还包括：在培养 2.5~3h 后，采用差数贴壁法，将培养瓶中的液体转移至新的培养瓶中，重复此操作 1~2 次。

6、如权利要求 4 所述的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞氧化应激模型的建立方法，其特征在于，所述胶原酶 IV 的浓度为 1mg/ml；所述消化的时间为 70min。

20 7、如权利要求 4 所述的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞氧化应激模型的建立方法，其特征在于，所述组织块的大小为  $1\text{mm}^3$ ；所述离心的转速为 700 rpm、时间为 20min；所述培养的时间优选 72h。

25 8、如权利要求 4 所述的蛋鸡输卵管膨大部上皮细胞氧化应激模型的建立方法，其特征在于，所述完全培养基组成为：91%的 DMEM/F12 基础培养基，5%胎牛血清，2%鸡血清，1%非必需氨基酸，5ug/ml 胰岛素，20IU/ml 的肝素，2mM 的 L-谷氨酰胺，15ng/ml 表皮生长因子，1%青链霉素。