

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：

5 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，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；

10 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。

~~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，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。~~

15 ~~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，所述胶原酶 IV 的浓度为 1mg/ml；所述消化的时间为 70min。~~

~~4、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 1mm³；所述离心的转速为 700 rpm、时间为 20min；所述培养的时间优选 72h。~~

20 ~~5、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 的 L-谷氨酰胺，15ng/ml 表皮生长因子，1%青链霉素。~~

25 ~~6、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；~~

~~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°C 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°C 的条件下培养。

10 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;

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 **75**、如权利要求 **64** 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。

86、如权利要求 **64** 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 **97**、如权利要求 **64** 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 1mm³; 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 **108**、如权利要求 **64** 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。