

## 权 利 要 求 书

1. 一种犊牛瘤胃上皮细胞分离培养的方法，其特征在于：包括以下步骤：

(1) 选取瘤胃腹囊处瘤胃组织，采用温度为 4-8℃ 的灭菌水清洗；

(2) 将瘤胃上皮组织剥离后依次采用灭菌水、PBS 溶液一和 PBS 溶液二清洗，清洗后剪碎并采用消化液多次消化；所述 PBS 溶液一 pH 值为 7.4，含有终浓度为 0.1mol/L 的磷酸二氢钾和 0.1mol/L 的磷酸氢二钠；所述 PBS 溶液二含有体积浓度为 2% 的青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合液（100×三抗），所述青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合液（100×三抗）中青霉素含量 10kU/ml，链霉素含量 10 mg/ml，两性霉素 B 含量 25 μg/ml；所述消化液按照终浓度的组成为：胰蛋白酶 2.5~5%（w/v），CaCl<sub>2</sub> 1.08 mM，HEPES 25mM，ABAM 2%(v/v)，溶剂为 Krebs-Ringer 缓冲液；

(3) 将消化后的瘤胃上皮组织过滤并离心、洗涤，得到瘤胃上皮细胞团；

(4) 将瘤胃上皮细胞团采用完全培养基培养；所述完全培养基为 MEM 基础培养基；所述将瘤胃上皮细胞团采用完全培养基培养的控制参数为：于 37℃、含 5%CO<sub>2</sub>、95%湿度条件下培养 4~5 天，期间每隔 1~3d 更换一次完全培养基继续培养，待完成 85% 以上细胞铺层后即得。

~~2. 根据权利要求 1 所述的一种犊牛瘤胃上皮细胞分离培养的方法，其特征在于：  
所述 PBS 溶液一 pH 值为 7.4，含有终浓度为 0.1mol/L 的磷酸二氢钾和 0.1mol/L 的磷酸氢二钠。~~

~~3. 根据权利要求 1 所述的一种犊牛瘤胃上皮细胞分离培养的方法，其特征在于：  
所述 PBS 溶液二含有体积浓度为 2% 的青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合液（100×三抗），所述青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合液（100×三抗）中青霉素含量 10kU/ml，链霉素含量 10 mg/ml，两性霉素 B 含量 25 μg/ml。~~

~~4. 根据权利要求 1 所述的一种犊牛瘤胃上皮细胞分离培养的方法，其特征在于：~~

## 权 利 要 求 书

~~所述消化液按照终浓度的组成为:胰蛋白酶 2.5~5% (w/v),  $\text{CaCl}_2$  1.08 mM, HEPES 25mM, ABAM 2%(v/v), 溶剂为 Krebs-Ringer 缓冲液。~~

~~5. 根据权利要求 1 所述的一种犊牛瘤胃上皮细胞分离培养的方法, 其特征在于: 所述将瘤胃上皮细胞团采用完全培养基培养的控制参数为: 于 37℃、含 5%  $\text{CO}_2$ 、95% 湿度条件下培养 4~5 天, 期间每隔 1~3d 更换一次完全培养基继续培养, 待完成 85% 以上细胞铺层后即得。~~

~~6. 根据权利要求 1 或 5 所述的一种犊牛瘤胃上皮细胞分离培养的方法, 其特征在于: 所述完全培养基为 MEM 基础培养基。~~