



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102533642 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 09

(21) 申请号 201110387201. 8

第 26 卷 (第 9 期), 1199-1203.

(22) 申请日 2011. 11. 28

审查员 吴汀晨

(73) 专利权人 李晶

地址 150010 黑龙江省双城市东旭路丽水嘉园 B 栋 3 单元 401 室

专利权人 李庆

(72) 发明人 李晶 李庆

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所 (普通合伙) 11130

代理人 王为

(51) Int. Cl.

C12N 5/075 (2010. 01)

(56) 对比文件

CN 101932331 A, 2010. 12. 29, 全文.

JING LI, ET AL. ACTIVATION OF DORMANT OVARIAN FOLLICLES TO GENERATE MATURE EGGS. 《PNAS》. 2010, 第 107 卷 (第 22 期), 10280-10284 页, 具体参见第 10283 页材料和方法部分第 1 段.

葛东建, 等. PTEN 抑制剂对大鼠内毒素性急性肺损伤的保护作用. 《中国药理学通报》. 2010,

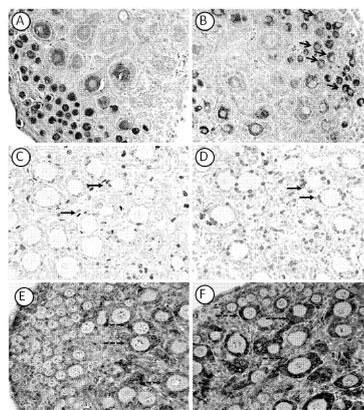
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

(54) 发明名称

原始卵泡体外激活试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种医疗用试剂盒, 特别涉及一种原始卵泡体外激活试剂盒。本发明所述的试剂盒, 包括以下组分: PTEN 抑制剂; PI3K 激活剂; 基本激活细胞培养液; L-15 培养液。



1. 一种原始卵泡体外激活试剂盒,其特征在于,包括溶液 I,溶液 II 和溶液 III:

溶液 I:基本激活细胞培养液 +PTEN 抑制剂 +PI3K 激活剂,

溶液 II:基本激活细胞培养液 +PI3K 激活剂,

溶液 III:L-15 培养液,

其中,PTEN 抑制剂选自:bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 或其它的 PTEN 分子抑制剂,其用量为:1-100 μ M;

其中,PI3K 激活剂选自:740Y-P, 或其它的 PI3K 激活剂,其用量为:50-500 μ g/ml;其中,基本激活细胞培养液为:MEMa 中含有丙酮酸钠 0.23mM,人血清白蛋白 10%,卵泡刺激素 0.03-0.1IU/ml,L-抗坏血酸 50 μ g/ml,链霉素 50mg/l,青霉素 75mg/l 的培养液。

2. 根据权利要求 1 的试剂盒,其特征在于,

溶液 I:含有 1-100 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 50-500 μ g/ml 的 740Y-P 的基本激活细胞培养液;溶液 II:含有 50-500 μ g/ml 的 740Y-P 的基本激活细胞培养液。

3. 根据权利要求 1 的试剂盒,其特征在于,

溶液 I:含有 50 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 150 μ g/ml 740Y-P 的基本激活细胞培养液;溶液 II:含有 150 μ g/ml 的 740Y-P 基本激活细胞培养液。

4. 权利要求 1 的试剂盒的应用方法,步骤如下:

1)取卵巢皮质于 5ml 溶液 III 中将卵巢皮质切割成 1mm³ 左右的小块,用溶液 III 反复清洗三次以上;

2)将卵巢皮质培养于含有悬浮小网的 24-孔板,在小网下方加入 400 μ l 溶液 I 培养 24 小时,培养条件为 37°C,5%CO₂;

3)然后吸出溶液 I,换入 400 μ l 溶液 II 并继续培养 24 小时;

4)24 小时后激活完毕。

5. 权利要求 4 的试剂盒的应用方法,步骤如下:

步骤 1,取卵巢皮质于 5ml 溶液 III 中将卵巢皮质切割成 1mm³ 左右的小块,用溶液 III 反复清洗三次以上;

步骤 2,将卵巢皮质培养于含有悬浮小网的 24-孔板,在小网下方加入 400 μ l 溶液 I 培养 24 小时,培养条件为 37°C,5%CO₂;

步骤 3,然后吸出溶液 I,换入溶液 II 并继续培养 24 小时;

其中,溶液 I:基本激活细胞培养液 +1-100 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic);溶液 II:基本激活细胞培养液 +50-500 μ g/ml 的 740Y-P;

步骤 4,24 小时后激活完毕。

原始卵泡体外激活试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种医疗用试剂盒，特别涉及一种原始卵泡体外激活试剂盒。

背景技术：

[0002] 在哺乳动物中，生殖细胞的生长和成熟是一个受到激素精细调节的过程。这些激素包括来自下丘脑的促性腺激素和生殖器官自身产生的激素和生长因子等。在雌性哺乳动物体内，卵泡是一个卵巢的基本功能单位，由位于中央的卵子及外围一层或多层颗粒细胞构成。按照卵泡中卵母细胞的不同生长发育阶段，可以分为原始卵泡，初级卵泡，次级卵泡，腔卵泡，排卵前卵泡。原始卵泡是卵巢中处于静息状态的卵泡库，在哺乳动物出生前或出生后，其数量是固定的，在人每个卵巢中的原始卵泡大约有 400,000 左右。在卵巢的生长发育过程中，卵巢中的原始卵泡不停的被激活，进入生长期经过初级卵泡和次级卵泡阶段。在次级卵泡阶段，在初情期前没有促性腺激素 (FSH) 分泌的情况下，这些卵泡就会死亡而发生卵泡闭锁，而初情期后，在下丘脑分泌的 FSH 的刺激下，就会有一个或数个次级卵泡周期性的进一步发育长大直至排卵前卵泡。在这个过程中卵母细胞的体积会增长几百倍，周围颗粒细胞数量也会迅速增加，由最初的单层 6-9 个细胞增加至数层上千个细胞。除了下丘脑分泌的促性腺激素外，卵泡的发育也受到卵巢内部产生的激素和生长因子的影响，比如在卵泡内卵母细胞和周围的颗粒细胞就可以通过旁分泌的形式互相影响对方的生长发育。最终在排卵前激素峰的总用下，排卵前卵泡中卵母细胞成熟而排卵，而残留的颗粒细胞和 theca 细胞则发生黄体化，分泌激素为受精卵的发育做准备。

[0003] 在哺乳动物的卵巢中，原始卵泡库中不停有原始卵泡被激活而进入生长期，这个过程被称为初始招募 (initial recruitment)。初始招募并不受 FSH 的调节，而是受卵巢产生的一些生长因子的影响。许多生长因子都被发现参与了这个过程如 PDGF, SDF, EGF 等。在人每个月大约有 1000 个左右的原始卵泡进入生长期，而当原始卵泡库中的原始卵泡不足于 1000 时，卵巢将不再排卵，而此时女性也将进入绝经期。正常女性进入绝经期的年龄都在 50 岁左右，而在一些病理条件下，由于卵巢中原始卵泡库中储备不足而令女性提前进入绝经期 (40 岁之前) 而引起卵巢早衰。卵巢早衰是一种非常常见的不孕不育症，在育龄女性中的发病率大概在 1%。目前，关于原始卵泡激活的机制研究还不是特别清楚，除了上述提到的一些生长因子，科学家们通过基因敲除小鼠的研究，发现信号通路 PTEN-PI3K-FOXO3 在原始卵泡的激活中发挥重要的作用。因此如何找到一个有效的办法调节原始卵泡的激活将具有非常重要的意义。

发明内容：

[0004] 本发明寻找到一种原始卵泡的激活方法，同时根据该方法发明了一种原始卵泡体外激活试剂盒。

[0005] 本发明的原始卵泡体外激活方法，包括以下步骤：

[0006] 步骤 1，取卵巢皮质于 5ml 溶液 III 中将卵巢皮质切割成 1mm^3 左右的小块，用溶液

III 反复清洗三次以上；

[0007] 步骤 2, 将卵巢皮质培养于含有悬浮小网 (Millicell cell culture inserts, Millipore) 的 24-孔板, 在小网下方加入 400 μ l 溶液 I 培养 24 小时, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂; 步骤 3, 然后吸出溶液 I, 换入溶液 II 并继续培养 24 小时;

[0008] 其中, 溶液 I: 基本激活细胞培养液 +1-100 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic); 溶液 II: 基本激活细胞培养液 +50-500 μ g/ml 的 740Y-P;

[0009] 步骤 4, 24 小时后激活完毕;

[0010] 以上方法经过试验证明效果明显, 有关效果试验如下:

[0011] I 小鼠卵巢原始卵泡体外激活培养 48 小时后卵巢的发育

[0012] 小鼠卵巢用原始卵泡体外激活试剂盒激活并培养 48 小时后, 将卵巢固定并进行标志分子的免疫组化检测。如图 1, 左侧 (A, C, E) 为对照, 右侧 (B, D, F) 为激活后的卵巢。A, B, FOXO3 的免疫组化结果, 箭头所指为激活后的原始卵泡, FOXO3 的染色由细胞核 (见对照) 转移至细胞浆。C, D, BrdU 的染色结果表明, 激活后的卵巢组织中大量的细胞处于增殖状态。E, F, AMH 的免疫组化结果表明, 激活后的卵巢在培养 48 小时后, 相较于对照组卵巢, 有更多的卵泡进入次级卵泡阶段。

[0013] II 用原始卵泡体外激活试剂盒激活后小鼠卵巢在肾被膜下迅速发育

[0014] 将用激活试剂盒处理过的卵巢, 移植入受体鼠的肾被膜下, 同时将受体鼠的双侧卵巢切除。术后第二天, 每天给小鼠注射 FSH 至第 14 天, 然后将受体鼠处死, 取卵巢, 如图 2 所示, 在每张图片中上层是对照组卵巢, 下层是激活后的卵巢。与对照组相比各处理组的卵巢都明显偏大 (图 2A, B, C, D), 表明应用激活试剂盒处理后, 能明显促进小鼠卵巢的发育。

[0015] III 应用原始卵泡体外激活试剂盒激活后小鼠卵巢发育正常

[0016] 将用激活试剂盒处理过的卵巢, 移植入受体鼠的肾被膜下, 同时将受体鼠的双侧卵巢切除。术后第二天, 每天给小鼠注射 FSH 至第 18 天, 给予一次性腹腔注射 hCG (10IU/鼠), 7 小时后, 收集卵巢, 准备切片并进行 H&E 染色。如图 3 所示, 与对照组卵巢 (图 3A) 相比, 用原始卵泡体外激活试剂盒激活后的卵巢 (图 3B) 含有更多的排卵前卵泡, 并且对 hCG 刺激发生反应引发 GVBD (生发泡破裂) 现象, 箭头所标示的是正在成熟的卵泡, 可以见到卵子中 GVBD 后所形成的纺锤体以及发生扩展的卵丘细胞。而在对照组卵巢中, 由于绝大多数卵泡并没有发育到排卵前卵泡阶段因此对 hCG 的刺激并不发生反应。

[0017] 由于应用原始卵泡体外激活试剂盒处理后, 小鼠的卵巢可以正常发育并对 hCG 的刺激发生反应, 接下来我们想要看到处理过的卵巢是否会产生功能正常的卵子。在 hCG 处理后 12 小时, 收集卵巢, 用机械法刺破排卵前卵泡并收集成熟的卵子, 进行体外受精并评价早期胚胎体外发育情况。如图 4 所示为体外发育 24、48、72、96 小时后的 2 细胞, 4-8 细胞, 桑椹胚和囊胚。可见, 应用原始卵泡体外激活试剂盒激活后的小鼠卵巢发育和功能完全正常。

[0018] IV 应用原始卵泡体外激活试剂盒激活后可以促进人卵巢皮脂中原始卵泡的发育将新鲜的或复苏的卵巢皮质切割成 1-2mm³ 左右的小块后应用原始卵泡体外激活试剂盒进行处理, 然后将卵巢皮质移植入受体免疫缺陷小鼠的肾被膜下, 同时将受体鼠的卵巢手术切除。术后第二天开始, 隔天给小鼠注射 FSH 至 20 周左右收集卵巢。如图 5A 所示, 同对照组相比, 激活后的人卵巢皮质发育迅速, 在肾被膜下可以看见发育长大的卵巢皮质 (图 5A

右侧肾脏)。将卵巢组织剥出后,进行组织切片可以看到一个直径大约在 3mm 左右的有腔卵泡(图 5B),在卵泡腔中央是一个 COC(卵丘细胞复合物),可以看到处于 GV 期的卵子(图 5C)。

[0019] 总之,应用原始卵泡体外激活试剂盒处理小鼠或人卵巢皮质,可以激活组织中的原始卵泡并促进卵泡的发育,无论是在人或小鼠,卵泡发育完全正常,在小鼠能够得到功能完全正常的卵子,受精后胚胎在体外能够发育到囊胚阶段。

[0020] 本发明根据以上原始卵泡体外激活方法设计了一种试剂盒,该试剂盒可以用于原始卵泡体外激活,通过使用该试剂盒,证明操作简单,省时省力,激活率强,避免了现用现配的繁琐,同时使操作标准化。

[0021] 因此本发明提供一种原始卵泡体外激活试剂盒。

[0022] 本发明的试剂盒,包括以下组分:

[0023] 1, PTEN 抑制剂

[0024] 2, PI3K 激活剂

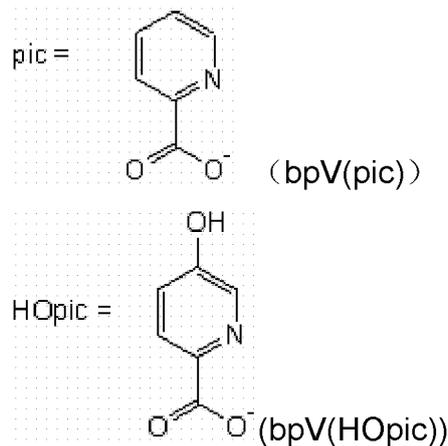
[0025] 3, 基本激活细胞培养液

[0026] 4, L-15 培养液

[0027] 其中, PTEN 抑制剂,为一种小分子化合物,其中 PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)为一新发现的抑癌基因,其中文名为人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因,位于 10q23. 3,转录产物为 515kbmRNA。

[0028] PTEN 抑制剂选自:bpV(pic) (Dipotassium Bisperoxo(picolinato) oxovanadate, 或 bpV(HOpic) (Dipotassium Bisperoxo(5-hydroxypyridine-2-carboxyl) oxovanadate, 或其它的 PTEN 分子抑制剂,这些 PTEN 抑制剂,属于现有技术,可以从市场上购买得到,其用量为:1-100 μ M;其中 bpV(pic) 和 bpV(HOpic) 的结构式如下:

[0029]



[0030] 其中, PI3K 激活剂,为一种人工合成的多肽分子,其中 PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,与 v. sre 和 v. ras 等癌基因的产物相关,且 PI3K 本身具有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶的活性,也具有磷脂酰肌醇激酶的活性。由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 构成。

[0031] PI3K 激活剂选自:740Y-P,或其它的 PI3K 激活剂,这些 PI3K 激活剂,属于现有技术,可以从市场上购买得到,其用量为:50-500 μ g/ml;其中 740Y-P 多肽其氨基酸序列为:R QIKIWFQNRMRKWKSDGGYMDMS((Modifications:Tyr-25 = pTyr))

[0032] 其中,基本激活细胞培养液即 MEMa 中含有丙酮酸钠 0.23mM,人血清白蛋白 10%,

卵泡刺激素 0.03-0.1IU/ml, L- 抗坏血酸 50 μ g/ml, 链霉素 50mg/l, 青霉素 75mg/l 的培养液。

[0033] 其中 MEMa(商品名称, 一种常用的细胞培养液, 英文名称 GIBCO™ Minimum Essential Medium(MEM) Alpha Medium(1X) liquid, 为 Invitrogen 公司生产), MEMa 作为基液, 其中加入以下试剂, 使达到所需浓度, 制备成基本激活细胞培养液:

[0034] 本发明的试剂盒, 是由以上组分制备而成的, 其包括以下试剂:

[0035] 溶液 I : 基本激活细胞培养液 +PTEN 抑制剂 +PI3K 激活剂,

[0036] 优选的溶液 I : 含有 1-100 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 50-500 μ g/ml 740Y-P 的基本激活细胞培养液;

[0037] 更优选的溶液 I : 含有 50 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 150 μ g/ml 740Y-P 的基本激活细胞培养液;

[0038] 溶液 II : 基本激活细胞培养液 +PI3K 激活剂,

[0039] 优选的溶液 II : 含有 50-500 μ g/ml 的 740Y-P 基本激活细胞培养液;

[0040] 更优选的溶液 II : 含有 150 μ g/ml 的 740Y-P 基本激活细胞培养液;

[0041] 溶液 III : L-15 培养液; 溶液 III 为 L-15 培养液, 为现有技术, 也可以从市场上购买得到。

[0042] 其中,

[0043] 基本激活细胞培养液配制方法如下:

[0044] MEMa

[0045] 丙酮酸钠 0.23mM

[0046] 人血清白蛋白 10%

[0047] 卵泡刺激素 0.03-0.1IU/ml

[0048] L- 抗坏血酸 (维生素 C) 50 μ g/m

[0049] 链霉素 50mg/l

[0050] 青霉素 75mg/l

[0051] 将上述原材料按配方比例混合均匀即可。

[0052] 溶液 I 的配制方法如下:

[0053] 基本激活细胞培养液 +PTEN 抑制剂 +PI3K 激活剂

[0054] 将上述原材料按配方比例混合均匀即可。

[0055] 其中, 溶液 II 的配制方法如下:

[0056] 基本激活细胞培养液 +PI3K 激活剂

[0057] 将上述原材料按配方比例混合均匀即可。

[0058] 其中, 溶液 III L-15 可从市场购买 (如 :Invitrogen 公司生产的产品)

[0059] 以上配方方法均为常规技术, 只需要将各种原材料在常温下混合均匀即可, 无需特殊设备和条件。

[0060] 本发明的试剂盒, 是将这三种溶液分别盛装, 再一同包装在同一包装盒内, 使用时根据说明书中描述的原始卵泡体外激活方法进行操作。

[0061] 本发明的试剂盒, 其应用方法如下:

[0062] 1) 取卵巢皮质于 5ml 溶液 III 中将卵巢皮质切割成 1mm³ 左右的小块, 用溶液 III

反复清洗三次以上。

[0063] 2) 将卵巢皮质培养于含有悬浮小网 (Millicell cell culture inserts, Millipore) 的 24-孔板, 在小网下方加入 400 μ l 溶液 I 培养 24 小时, 培养条件为 37°C, 5% CO₂。

[0064] 3) 然后吸出溶液 I, 换入 400 μ l 溶液 II 并继续培养 24 小时。

[0065] 4) 24 小时后激活完毕。

[0066] 在体外激活完毕的卵巢皮质细胞, 经过外科植入术, 可以重新回到母体的卵巢, 继续正常的发育, 直到发育成熟, 因此本发明为不孕不育症提供了一种可靠的治疗方法, 同时提供了一种可供体外培养操作作用的试剂盒, 以使该技术应用于更大的范围。

附图说明:

[0067] 图 1 小鼠卵巢原始卵泡体外激活培养 48 小时后卵巢的发育。小鼠卵巢用原始卵泡体外激活试剂盒激活并培养 48 小时后, 将卵巢固定并进行标志分子的免疫组化检测。左侧 (A, C, E) 为对照, 右侧 (B, D, F) 为激活后的卵巢。A, B, FOXO3 的免疫组化结果, 箭头所指为激活后的原始卵泡, FOXO3 的染色由细胞核 (见对照) 转移至细胞浆。C, D, BrdU 的染色结果表明, 激活后的卵巢组织中大量的细胞处于增殖状态。E, F, AMH 的免疫组化结果表明, 激活后的卵巢在培养 48 小时后, 相较于对照组卵巢, 有更多的卵泡进入次级卵泡阶段。

[0068] 图 2 将培养过的卵巢进行小鼠肾被膜下移植后 14 天卵巢的生长情况。在每张图片中上层是对照组卵巢, 下层是激活后的卵巢。A, B, C, D 不同的处理组。

[0069] 图 3 卵巢移植后 18 天, hCG 诱导卵泡成熟 H&E 染色结果。A, 对照组卵巢, 卵泡对于 hCG 处理没有反应; B, 处理组卵巢, 卵泡在 hCG 的作用下成熟, 箭头所指为卵母细胞正处于减数分裂阶段的成熟卵泡。

[0070] 图 4hCG 处理后, 将成熟的卵子从处理组卵巢中取出, 进行 IVF 后的胚胎发育。A, IVF 后 24h 处于 2 细胞阶段的胚胎; B, 48h 后 4-8 细胞阶段的胚胎; C, 72h 后的桑椹胚; D, 96h 后处于囊胚阶段的胚胎。

[0071] 图 5 人卵巢皮质体外激活后移植入免疫缺陷小鼠肾被膜下 20 周左右卵巢的发育。A, 仍在肾被膜下的人卵巢皮质, 左侧为对照组没有任何处理的卵巢组织; B, 将处理组的卵巢组织取出进行 H&E 染色, 可以见到非常大的有腔卵泡; C, B 图放大, 可以见到被 cumulous 细胞包围的处于 GV 期的卵母细胞。

具体实施方式:

[0072] 下面通过实施例进一步说明本发明, 但不作为对本发明的限制。

[0073] 实施例 1

[0074] 基本激活细胞培养液配制方法如下:

[0075] MEMa

[0076] 丙酮酸钠 0.23mM

[0077] 人血清白蛋白 10%

[0078] 卵泡刺激素 0.03-0.1IU/ml

[0079] L-抗坏血酸 (维生素 C) 50 μ g/ml

- [0080] 链霉素 50mg/l
- [0081] 青霉素 75mg/l
- [0082] 将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0083] 溶液 I 的配制方法如下：
- [0084] 基本激活细胞培养液 +PTEN 抑制剂 +PI3K 激活剂
- [0085] PTEN 抑制剂 :1-100 μ M bpV(pic) 或 bpV(H0pic)
- [0086] PI3K 激活剂 :50-500 μ g/ml 740Y-P
- [0087] 将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0088] 其中,溶液 II 的配制方法如下：
- [0089] 基本激活细胞培养液 +PI3K 激活剂
- [0090] PI3K 激活剂 :50-500 μ g/ml 740Y-P
- [0091] 将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0092] 其中,溶液 III 的配制方法如下 :L-15(GIBCO, Invitrogen)
- [0093] 将这三种溶液分别盛装,再一同包装在同一包装盒内,使用时根据说明书中描述的原始卵泡体外激活方法进行操作。
- [0094] 实施例 2
- [0095] 试剂盒使用方法如下：
- [0096] 1) 取卵巢皮质于 5ml 溶液 III 中将卵巢皮质切割成 1mm^3 左右的小块,用溶液 III 反复清洗三次以上。
- [0097] 2) 将卵巢皮质培养于含有悬浮小网 (Millicell cell culture inserts, Millipore) 的 24-孔板,在小网下方加入 400 μ l 溶液 I 培养 24 小时,培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。
- [0098] 3) 然后吸出溶液 I,换入 400 μ l 溶液 II 并继续培养 24 小时。
- [0099] 4) 24 小时后激活完毕。
- [0100] 实施例 3
- [0101] 溶液 I :含有 1 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 50 μ g/ml 740Y-P 的基本激活细胞培养液的制备 ;将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0102] 实施例 4
- [0103] 溶液 I :含有 50 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 150 μ g/ml 740Y-P 的基本激活细胞培养液的制备 ;将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0104] 实施例 5
- [0105] 溶液 II :基本激活细胞培养液 +PI3K 激活剂,如 :含有 50 μ g/ml 的 740Y-P 基本激活细胞培养液的制备 ;将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0106] 实施例 6
- [0107] 溶液 II :含有 500 μ g/ml 的 740Y-P 基本激活细胞培养液的制备 ;将上述原材料按配方比例混合均匀即可。
- [0108] 实施例 7
- [0109] 溶液 II :含有 150 μ g/ml 的 740Y-P 基本激活细胞培养液的制备 ;将上述原材料按配方比例混合均匀即可。

[0110] 实施例 8

[0111] 溶液 I :含有 100 μ M 的 bpV(pic) 或 bpV(H0pic) 以及 500 μ g/ml 740Y-P 的基本激活细胞培养液的制备 ;将上述原材料按配方比例混合均匀即可。

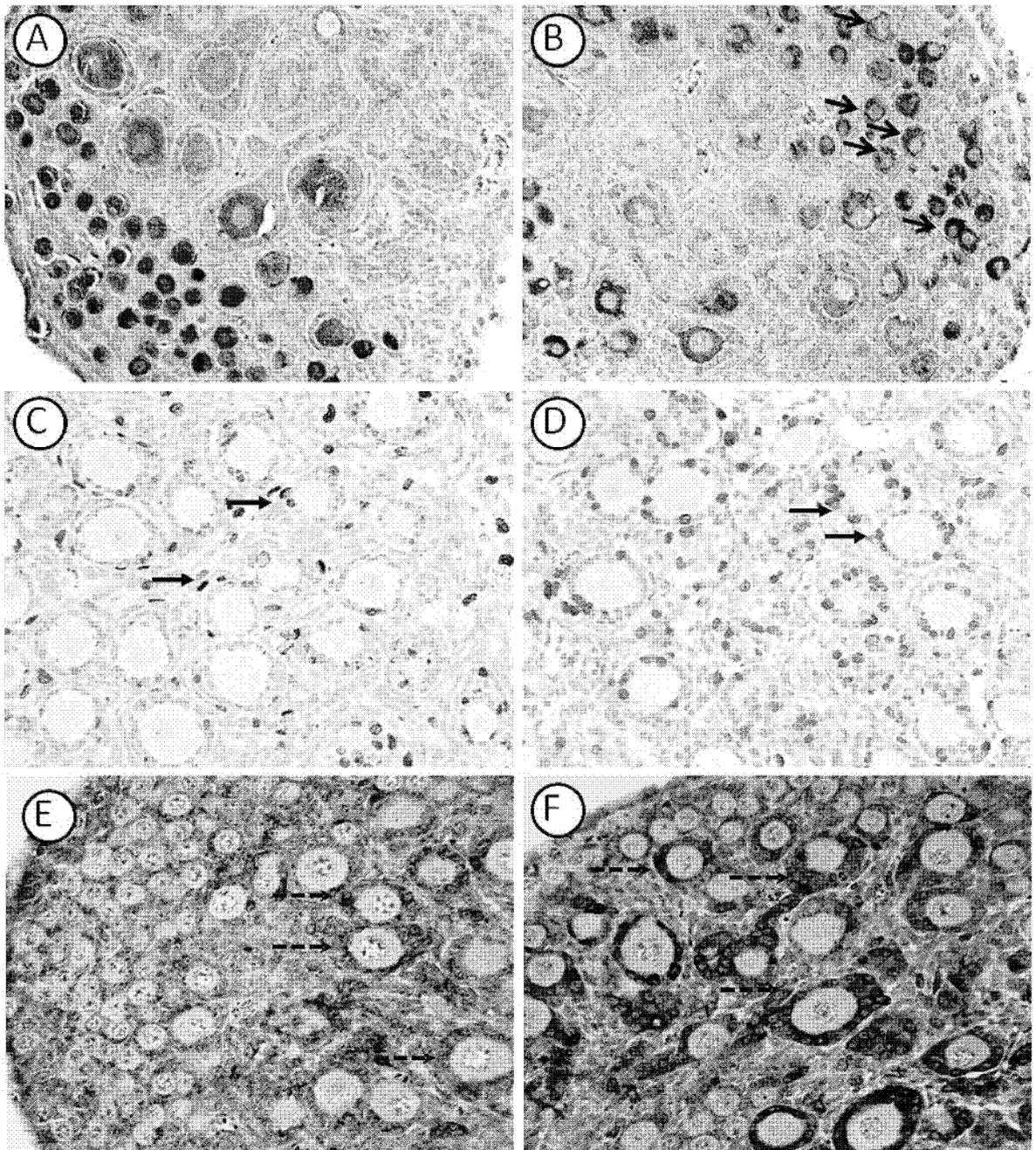


图 1

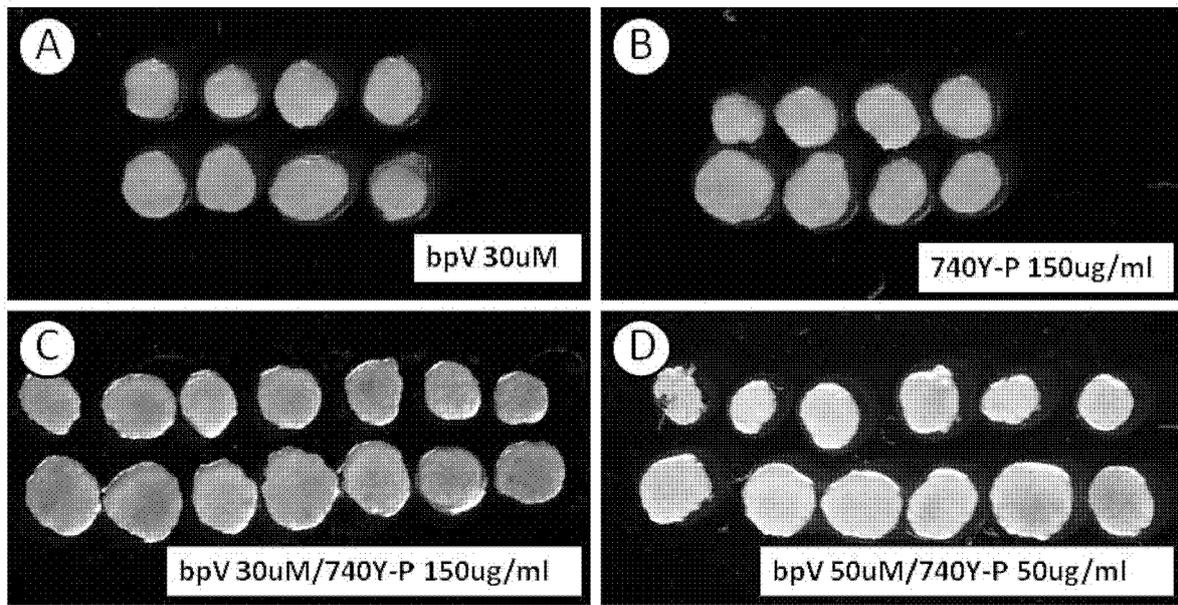


图 2

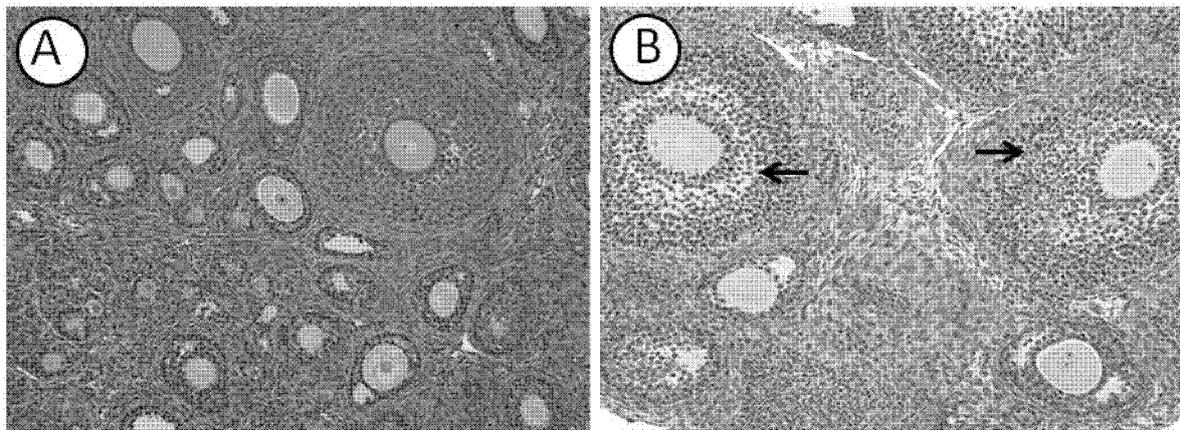


图 3

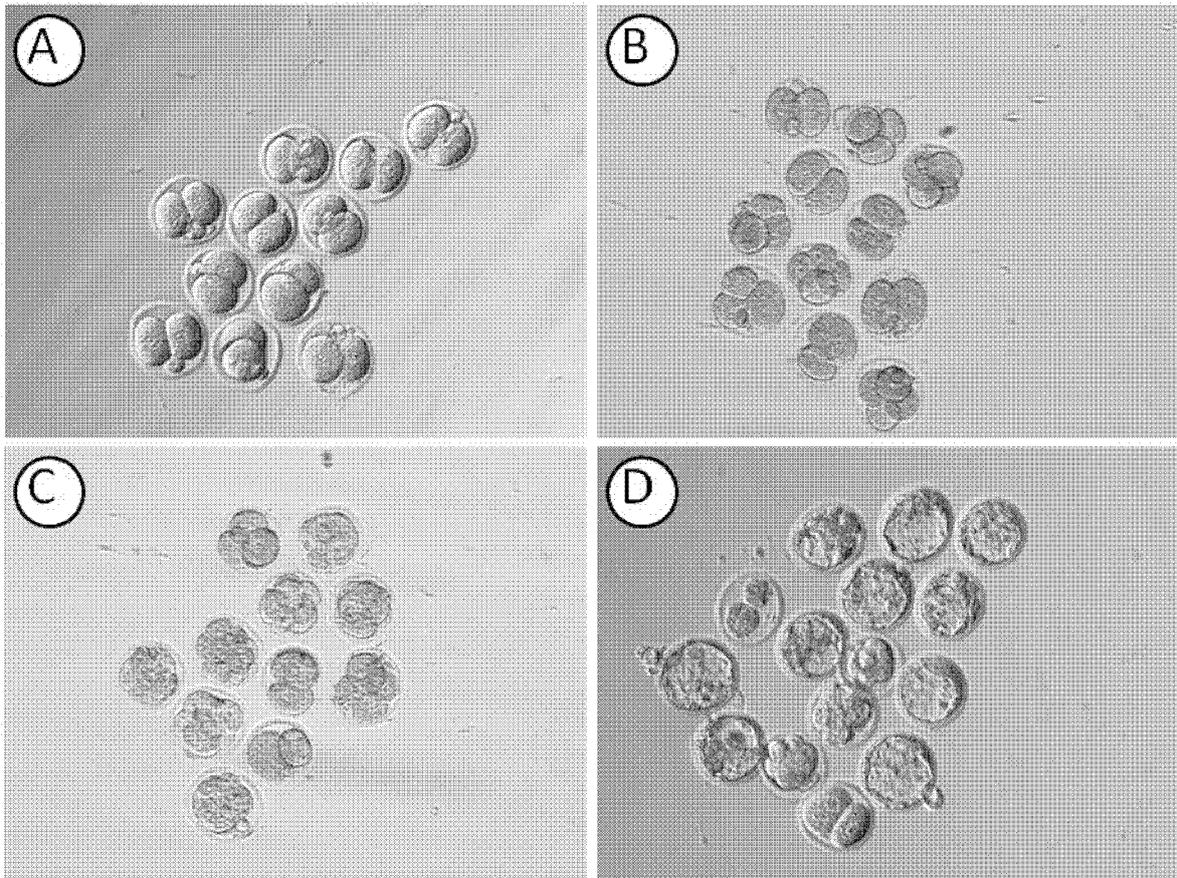


图 4

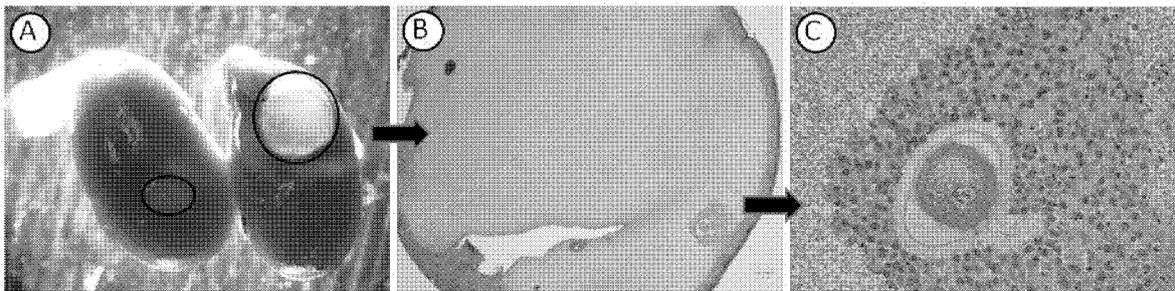


图 5