原代破骨诱导培养基说明书

Catalog：CTCC-Y004

一．产品简介

CTCC 自主研发的原代破骨诱导分化培养基（货号：CTCC-Y004），体外诱导原代骨髓单核细胞（BMMs）向破骨方向分化。该培养基包括促进原代骨髓单核细胞向破骨方向分化的基础培养基，优质胎牛血清，细胞因子以及青链霉素。

二．包装组成成分

培养基名称	规格	保存方式	有效期
破骨诱导分化培养基	100mL	避光，4℃	1 个月

三．骨髓单核细胞的分离操作规程：

1. 麻醉动物：向实验动物腹部注射麻醉剂和肝素（防止血液凝固，便于分离更加纯净的破骨前体细胞）。
2. 取腿骨：在超净台中取出 ICR 小鼠双侧股骨和胫骨，置于盛有 PBS 的 10cm 细胞培养皿中，尽量剔除腿骨外侧肌肉。
3. 获取髓系细胞：将腿骨放置于盛有适量α-MEM 完全培养基的新的培养皿中，用剪刀剪掉股骨胫骨两端(股骨中骨髓较多，暴露即可，尽可能少剪一点)，用无菌注射器，吸取 1mL 完全培养基，对准插入到骨髓腔中，冲出骨髓，反复操作至骨髓腔发白。收集吹打下来的细胞，1000rpm，离心 10min，弃上清。
4. 接种细胞：吸取 10mL α-MEM 完全培养基重悬细胞，接种于 10cm 皿中，于 37℃，5%CO_2 培养箱静置培养。
5. 收获单核巨噬细胞：24h 后，侧倾培养皿，轻柔吸取全部上清液至离心管中，1200rpm 离心 10min，弃上清。细胞沉淀即含有单核巨噬细胞，可用于破骨诱导实验。

四．破骨诱导操作规程：

接种密度是原代破骨分化的关键要素，建议铺设 2-3 个密度梯度，综合评判。

1. 细胞接种：向收获的细胞沉淀中加入 1-2mL 破骨诱导分化培养基，轻轻吹打混匀。因细胞沉淀中单核巨噬细胞的数目不确定性，可参照本实验室的做法，在充分获取双腿股骨胫骨骨髓的条件下，按照小鼠体重，每 12g 小鼠收获的细胞混悬液可接种 48 孔板的 20 个孔的比例进行实验。建议 48 孔板接种体积为 400-500μL，24 孔板接种体积为 800-1000μL，以此类推。
2. 换液：细胞接种日记作第 1 天，在第 4 天进行首次换液（**诱导培养基需提前预热**，全量换液），枪头不要伸到孔板底部以避免损失细胞，沿壁轻柔加入试剂。后隔一天换液一次，即第 6 天、第 8 天等。根据细胞纯度、活力及接种密度不同，平均诱导周期在 6-10 天。

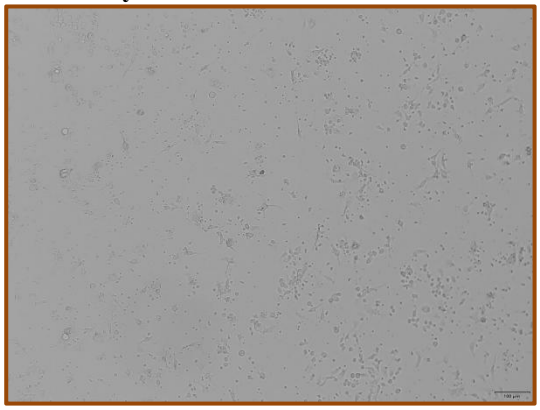
为避免破骨诱导不成功或者分化效率低，请尽量保证 BMMs 纯度和活力；不要将培养板长时间置于培养箱外观察或频繁开关培养箱；诱导培养基一定要预热；尽可能地避免晃动培养板；严格按照上述规程操作。

五．破骨诱导分化实例

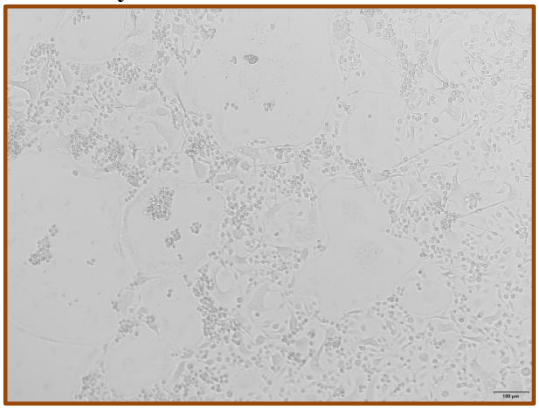
下面展示不同体重的 ICR 小鼠骨髓单核细胞破骨诱导效果。TRAP 染色结果不代表最终诱导分化活性，只与选择染色的时间点有关。

1. *12g ICR 小鼠（48 孔板，单孔 1/20）*

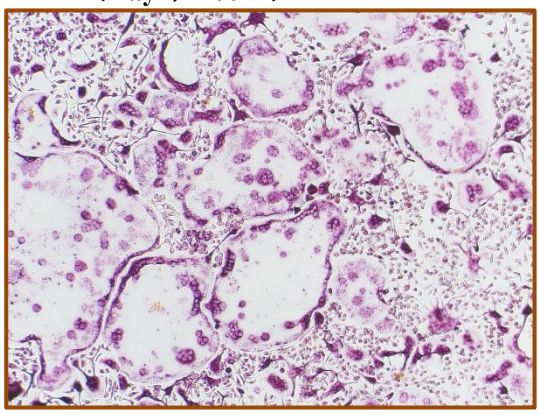
明场（Day4，100×）



明场（Day7，100×）

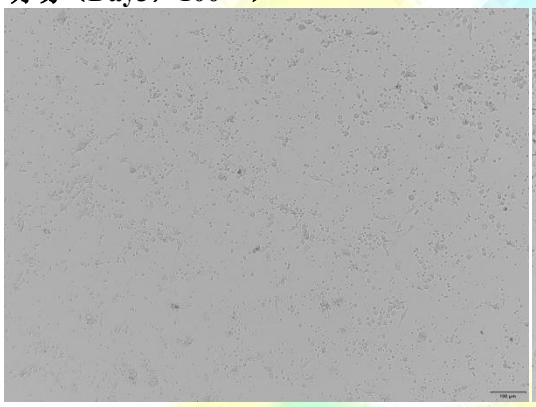


TRAP（Day7，100×）

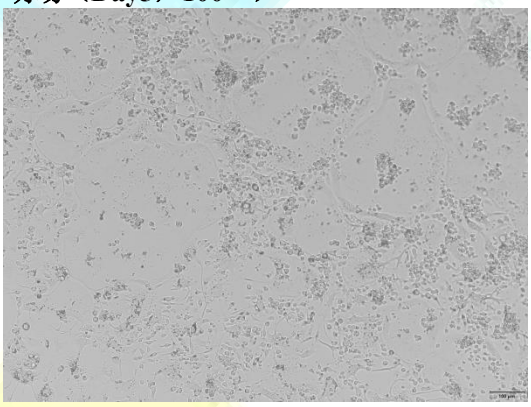


2. *20g ICR 小鼠（48 孔板，单孔 1/35）*

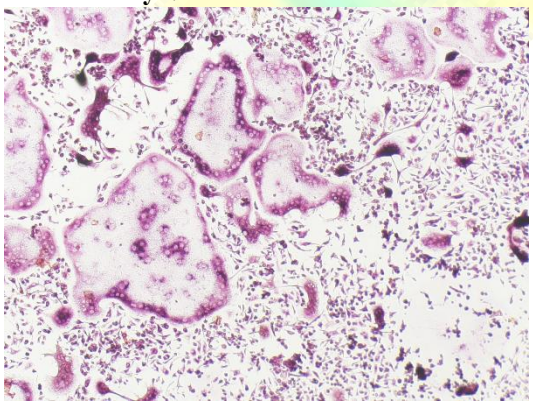
明场（Day3，100×）



明场（Day5，100×）

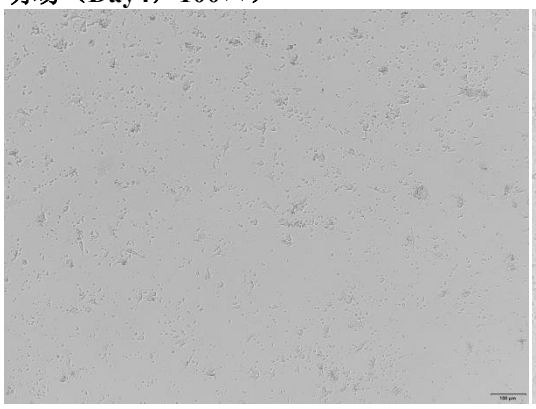


TRAP（Day5，100×）

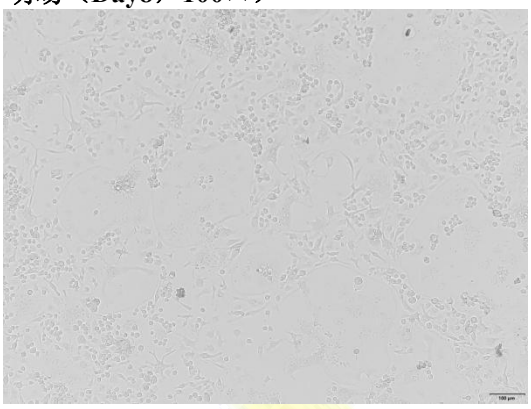


3. *45g ICR 小鼠（48 孔板，单孔 1/75）*

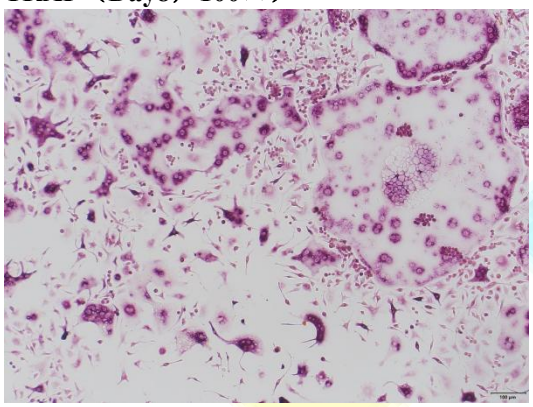
明场（Day4，100×）



明场（Day8，100×）



TRAP（Day8，100×）



六．QC 测试并证明诱导培养基有以下特性：

1. 包含了原代骨髓单核细胞向破骨方向分化需要的所有成分。
2. 实验比较同类产品，TRAP 染色证明其具有最佳诱导破骨能力。
3. 无菌检测证明无细菌、真菌和支原体
4. 证明无内毒素

七．产品使用注意事项：

1. 需避光，2-8℃保存，有效期为 1 个月。
2. 所有产品请于保质期内使用。
3. 产品使用前需 37℃预热。
4. 产品使用时避光操作。

本产品仅用于科研用途，不可用于诊断、 治疗、 临床、 家庭及其他用途。