



## 小鼠破骨细胞培养和鉴定试剂盒(小量)

### I. 产品信息

目录号: CK20201N

规格: 1 kit

保存: 见“试剂盒组分”

效期: 6个月

### II. 背景简介

破骨细胞(OC)是生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性的唯一具有骨质吸收功能的多核巨细胞。破骨细胞来源于骨髓中与单核巨噬细胞克隆形成单位(GM-CFU)不同的骨髓造血干细胞系。破骨细胞前体细胞是单核细胞,含皱折缘,TRAP 阳性。成熟的破骨细胞是一种多核巨细胞,体积大,直径达 30 - 100 $\mu$ m,含 15 - 50 个甚至更多个紧密堆积的核,主要分布在骨质表面和骨内血管通道周围。

目前破骨细胞的获得主要有机械分离法、全骨髓诱导法、脾细胞诱导法和外周血/骨髓单核细胞诱导法。通过机械分离法获得的破骨细胞数量少、寿命短;全骨髓诱导法获得的破骨细胞纯度低;脾细胞诱导法诱导分化效率低;骨髓单核细胞是一种未成熟的单核细胞,在骨髓细胞中约占 0.04%,被认为是破骨细胞的前体细胞。通过巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL)两种细胞因子协同诱导骨髓单核细胞形成破骨细胞是目前常用的破骨细胞诱导培养法。通过这种方法可以获得较高纯度和数量的破骨细胞。

骨髓单核细胞诱导破骨细胞实验由于实验操作步骤、细胞因子的质量和浓度、血清质量等不尽一致,可能造成获得的破骨细胞数量少和纯度低。本产品为小鼠骨髓破骨细胞培养试剂盒,试剂盒通过筛选高质量的细胞因子和血清、优化实验操作步骤,提供一种可有效稳定地诱导破骨细胞的培养体系,并搭配破骨细胞鉴定试剂盒,从而方便进行破骨细胞的培养和鉴定。本产品可以用于一只小鼠获得的一半骨髓细胞(约  $1 - 1.5 \times 10^7$  个细胞)的诱导培养和鉴定。

### III. 试剂盒组分

组分编号	组分名称	规格	储存条件
CK20202A	破骨细胞专用血清(未灭活)	5 ml	-20 $^{\circ}$ C
CK20202B	青霉素-链霉素(100 $\times$ )	2 ml	
CK20202C	L-谷氨酰胺(100 $\times$ )	2 ml	
CK20202D	破骨细胞专用培养基	200 ml	2 - 8 $^{\circ}$ C
CK20202E	破骨细胞专用消化液	30 ml	
CK20202F	红细胞裂解液 (1 $\times$ , 无菌)	30 ml	
CK20202G	Mouse M-CSF (200 $\times$ )	62.5 $\mu$ l	
CK20202H	Mouse RANKL (200 $\times$ )	50 $\mu$ l	
CK20203	破骨细胞染色鉴定试剂盒	50 T	

### IV. 未提供的设备和材料

1. 实验小鼠(以小周龄为佳, 如 4 - 6 周)
2. 水平离心机
3. 一次性无菌注射器
4. 细胞培养皿
5. 细胞培养瓶
6. 移液器及吸头
7. CO<sub>2</sub> 培养箱
8. 无菌 300 目尼龙膜
9. 计数板
10. 显微镜
11. 剪刀、镊子
12. 水浴锅
13. 75% 乙醇
14. 无菌 PBS

Product For Research Use Only Ver: CK20201N-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: info@liankebio.com



## V. 使用方法

### 一、试剂的准备

1. 血清灭活：将破骨细胞专用血清置于 56℃ 水浴锅中热处理 30 分钟，避免血清中的某些组分激活破骨前体细胞使之分化。
2. 完全培养基的配制：在破骨细胞专用培养基中，加入适量青霉素-链霉素(100×)、L-谷氨酰胺(100×)和灭活血清，使青霉素-链霉素和 L-谷氨酰胺的终浓度为 1×，血清浓度为 10%。例如每 9 ml 培养基中加入 100 μl 青霉素-链霉素(100×)、100 μl L-谷氨酰胺(100×)和 1 ml 灭活血清。

### 二、小鼠骨髓单核细胞(BMMs)的提取与培养

1. 用适当的方法将实验小鼠处死，75%乙醇浸泡 5 分钟。无菌条件下，取出双侧股骨和胫骨，将包裹骨骼的肌肉组织尽量去除干净，不要损伤到骨骼。
2. 将股骨和胫骨置于盛有无菌 PBS 的培养皿中，用无菌 PBS 洗涤 2 次。
3. 剪断两侧骨骺端，用 1 ml 注射器抽取 1 ml 完全培养基，将针头从骨两端插入骨髓腔，轻轻冲洗出骨髓至培养皿中。吸取新的培养基，重复冲洗 2 - 3 次，直至骨完全变白。
4. 冲洗后的骨髓悬液用 1 ml 移液器轻轻反复抽吸，以获得单细胞骨髓悬液。用 300 目尼龙膜过滤骨髓悬液于 15 ml 离心管中，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。

**注：吹打细胞时尽量轻柔，避免剧烈地吹打细胞。剧烈吹打会影响 BMMs 的活力，削弱其向破骨细胞分化的能力。**

5. 加入 3 ml 红细胞裂解液，轻轻吹打混匀，室温孵育 3 - 5 分钟。溶血结束后加入 6 ml 完全培养基中和裂解液，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。

**注：溶血时间不宜超过 10 分钟，时间过长对骨髓细胞有一定伤害作用。**

6. 加入 5 ml 完全培养基，轻轻吹打混匀，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。重复洗涤一次。
7. 取 5 ml 完全培养基，加入 2.5 μl Mouse M-CSF (200×)，混匀，重悬细胞沉淀，通常为  $1 - 5 \times 10^6$  个/ml，接种于 T25 培养瓶中，于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养过夜(16 小时左右)。此为培养的第 0 天。

**注：第 0 天时，须使用低浓度的 M-CSF 培养，因此按照 2000 倍稀释。**

8. 第 1 天，收集上清中未贴壁的细胞，并用完全培养基清洗培养瓶 2 次，收集细胞于 15 ml 离心管中，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。
9. 加入适量完全培养基重悬细胞，计数并调整细胞浓度为  $1 - 5 \times 10^6$  个/ml，接种于细胞培养皿中(根据实验所用的量选择不同规格的细胞培养皿)。同时加入 Mouse M-CSF (200×)，使之终浓度为 1×。于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养。
10. 第 3 天，弃上清液，用无血清的专用培养基清洗培养皿 2 次，去除未贴壁的细胞。加入含 1× Mouse M-CSF 的完全培养基继续培养 1 天。

### 三、小鼠骨髓单核细胞(BMMs)诱导分化破骨细胞

1. 第 4 天，弃上清，用无血清的专用培养基清洗 2 次，去除未贴壁的细胞。
2. 加入 1 - 2 ml 专用消化液，于培养箱中消化 10 分钟左右，将细胞轻轻吹打下来。  
**注：若细胞不能完全消化下来，可收集已脱落的细胞，再加入消化液消化一次。避免用胰酶消化，胰酶会激活破骨前体细胞分化。**
3. 加入 3 - 5 ml 完全培养基，将消化下来的细胞收集于 15 ml 离心管中，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。
4. 加入适量完全培养基重悬细胞，计数并调整细胞浓度  $4 - 10 \times 10^4$  个/ml，加入 Mouse M-CSF (200×)，使之终浓度为 1×。按 500 μl/孔接种于 48 孔板中，于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养 2 - 3 小时。待细胞贴壁后，加入 Mouse RANKL (200×)，使之终浓度为 1×。

**注：如接种于其他培养板或培养皿中，可按照  $2 - 5 \times 10^4$  个/cm<sup>2</sup> 进行换算。**

Product For Research Use Only Ver: CK20201N-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: info@liankebio.com



- 每隔 48 小时全量换液，并补足 M-CSF 和 RANKL，继续培养 5 - 6 天后镜下观察有明显的多核融合的破骨细胞。

#### 四、破骨细胞的鉴定

按照破骨细胞染色鉴定试剂盒说明书对细胞进行染色验证。

## VI. 结果示例

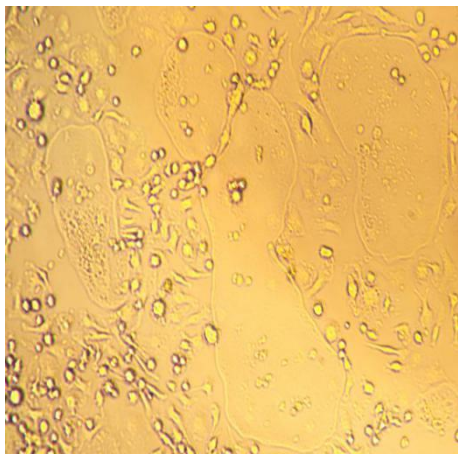


图 1. 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠的骨髓单核细胞诱导培养第 10 天的显微镜形态观察结果。

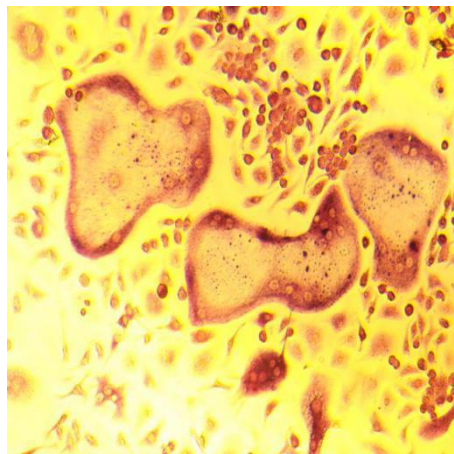


图 2. 6 周龄雄性 C57BL/6 小鼠的骨髓单核细胞诱导培养第 10 天, 使用破骨细胞染色鉴定试剂盒染色的结果。

## VII. 注意事项

- 请在使用本产品前仔细阅读说明书。本产品仅用于科研，不可用于诊断。
- 为了您的安全和健康，请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。
- 更多细胞培养相关产品敬请关注联科生物网站或来电咨询。



### VIII. 步骤概要

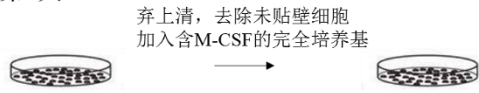
第0天:



第1天:



第3天:



第4天:



第6天、第8天:



第10天前后:



使用鉴定试剂盒进行染色  
显微镜观察破骨细胞形成