

小鼠破骨细胞培养方案

小鼠骨髓细胞的获得

1. 小鼠(6~8周)颈椎脱臼法处死，将处死的小鼠放于含有酒精的小烧杯中浸泡2 min，消毒灭菌，在超净台中手术取出所有的胫骨和股骨，并用剪刀和镊子将骨周围的肌肉组织尽量去除干净；
2. 将取好的骨头转移到装有无菌PBS的培养皿中，涮洗一次后转移至另一个装有无菌PBS的培养皿。
3. 用剪刀剪去骨的两端，再用注射器抽取PBS，针头分别插入两端骨髓腔中，用注射器打入PBS，反复冲洗骨髓至培养皿中，直至骨完全变白；
4. 收集骨髓悬液，用筛网过滤去除小碎片和肌肉组织；
5. 将滤过液500 g/5 min离心，弃去上清；
6. 将离心后的沉淀弹散，加入2 ml红细胞裂解液(1X) (Cat#64010-00-100)，室温裂解5 min。

注：推荐使用BioGems红细胞裂解液，裂解温和，对骨髓细胞损伤小！

7. 加入10 ml完全培养基(α -MEM培养基+10%FBS+双抗)终止裂解，然后500 g/5 min离心，弃去上清；
8. 将离心后的沉淀弹散，用完全培养基(α -MEM培养基+10%FBS+双抗)重悬细胞，至此已获得小鼠骨髓细胞。

破骨细胞诱导分化

1. 将细胞重悬到 1×10^6 /ml，加入终浓度为5 ng/ml的小鼠M-CSF，按10 cm的细胞培养皿中加入10 ml细胞悬液铺板，培养过夜；

注：此步骤主要是去除贴壁较快的骨髓基质细胞

2. 吸取悬浮细胞，离心，用 α -MEM完全培养基重悬到 5×10^5 /ml，加入终浓度为30 ng/ml的小鼠M-CSF，按96孔板每孔加入200 μ l细胞悬液，加入完成后，左右上下摇晃96孔板几下，在超净台中静止10 min，待细胞沉降后于倒置显微镜下观察是否铺板均匀，铺板均匀后放入37 $^{\circ}$ C培养箱中培养分化3天；(若是24孔板，可加入1.5~2 ml诱导分化)；

注：此步骤是培养分化为巨噬细胞

3. 培养3天后，弃去培养孔内悬浮细胞，并用PBS轻洗2次，配置破骨细胞分化培养基(α -MEM完全培养基加入终浓度为30 ng/ml的小鼠M-CSF和50 ng/ml的小鼠RANKL)，96孔板内每孔加入200 μ l配置好的分化培养基，培养分化3~5天，隔天换液并用PBS轻洗2次。

注：细胞因子购买后请按照说明书指示溶解并稀释保存，不可反复冻融，诱导分化培养基请根据每次的用量配置，用多少，配置多少。

4. 分化过程中，每天镜下观察是否有细胞融合，细胞融合70%以上即可固定细胞进行染色鉴定。

培养诱导分化所需的细胞因子:

生产商	产品编号	产品名称	产品规格	推荐浓度
PeproTech	315-02	Recombinant Murine M-CSF	2 μ g/10 μ g/50 μ g/100 μ g/250 μ g/500 μ g/1000 μ g	30 ng/ml
PeproTech	315-11	Recombinant Murine RANKL	2 μ g/10 μ g/50 μ g/100 μ g/250 μ g/500 μ g/1000 μ g	50 ng/ml

参考文献:

1. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423:337-342.
2. Hikata T, Takaishi H, Takito J, et al. PIAS3 negatively regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblasts. *Blood*. 2009;113:2202-2212.
3. Ha J, Choi HS, Lee Y, Kwon HJ, Song YW, Kim HH. CXCL12 chemokine ligand 2 induced by receptor activator of NF- κ B ligand enhances osteoclastogenesis. *J Immunol*. 2010;184:4717-4724.
4. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, et al. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*. 2009;458:524-528.



苏州中维鑫创生物医药科技有限公司
 电话: 0512-6789 5080
 企业QQ: 3440695713
 邮箱: info@zvxcbio.com
 地址: 江苏省苏州市工业园区裕新路168号脉山龙大厦2幢