

人破骨细胞培养方案

人单核细胞获取

1. PBMC分离:

采集外周血于EDTA抗凝采血管中，将血液混匀于无菌50 ml管中，PBS 1:1稀释血液标本；取干净的50 ml管，淋巴细胞分离液、血液、PBS以1:1:1加入，每管15 ml分离液，用10 ml移液管，沿管壁缓缓加入上述血液稀释液至45 ml刻度处，切忌分离液液面波动；室温500 g离心30 min，升降速度分别调至2和0。根据血液中各组成成分密度的不同，离心后，50 ml管内由上而下依次为淡黄色血浆层，单个核细胞白膜层，透明分离液层，及最下方的红细胞层；用移液管轻轻吸去上层血浆层，并将白膜层转移至新的50 ml管中，同时加入PBS至50 ml，300 g离心10 min；离心结束后弃上清，弹散管底沉淀，再加入PBS至50 ml，300 g离心10 min；离心结束后弃上清，将细胞沉淀弹散。

2. 单核细胞纯化

单核细胞纯化采用美天旆生物提供的单核细胞阳选试剂盒或stemcell提供的单核细胞阳性分离试剂盒，具体分离方案参考相应的说明书。

破骨细胞诱导分化

1. 用 α -MEM完全培养基(α -MEM培养基+10%FBS+双抗)重悬细胞至 5×10^5 /ml，加入终浓度为30 ng/ml的Human M-CSF和50 ng/ml的Human RANKL；
2. 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°C培养箱中培养分化；(若是24孔板，可加入1.5~2 ml诱导分化)
3. 每3天更换培养基一次，同时补充新鲜的培养液(含30 ng/ml的Human M-CSF和50 ng/ml的Human RANKL)，诱导分化10天后即可见开始融合的细胞。

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。

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	300-25	Recombinant Human M-CSF	2 µg/10 µg/50 µg/100 µg/250 µg/500 µg/1000 µg	30 ng/ml
PeproTech	310-01	Recombinant Human RANKL	2 µg/10 µg/50 µg/100 µg/250 µg/500 µg/1000 µg	50 ng/ml

参考文献:

1. Soderstrom K, Stein E, Colmenero P, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:13028-13033.
2. Lari R, Kitchener PD, Hamilton JA. The proliferative human monocyte subpopulation contains osteoclast precursors. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R23.
3. Curnow SJ, Fairclough M, Schmutz C, et al. Distinct types of fibrocyte can differentiate from mononuclear cells in the presence and absence of serum. *PLoS One.* 2010;5:e9730.



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

