

**MC3T3-E1**  
**(小鼠颅顶前骨细胞)**

**细胞描述**

从克隆的但是表型各异的MC3T3-E1细胞系中分离出一系列亚克隆。从含抗坏血酸培养基生长的成骨细胞中选择高或低成骨细胞分化、矿化的亚克隆。MC3T3亚克隆4 (ATCC CRL-2593) 和MC3T3亚克隆14 (ATCC CRL-2594) 在抗坏血酸和3到4mM无机磷酸盐中生长表现出高水平的成骨细胞分化。它们10天后形成一个矿化良好的细胞外基质 (ECM)。MC3T3亚克隆24 (ATCC CRL-2595) 和MC3T3亚克隆30 (ATCC CRL-2596) 在抗坏血酸中生长表现出很差的成骨细胞分化。不形成ECM, 可以作为亚克隆4和14的阴性对照。矿化的亚克隆选择的表达作为成骨细胞标记的mRNA, 及唾液酸糖蛋白 (BSP), 骨钙素 (OCN), 和甲状旁腺激素/甲状旁腺激素相关蛋白受体的mRNA。高或者低分化潜能的亚克隆在培养中生产出相似数量的胶原质, 表达可比较的基本水平的mRNA编码Osf2/Cbfa1, 一种成骨细胞相关转录因子。植入免疫缺陷小鼠以后, 高分化性的亚克隆形成与骨类似的形成小骨的编织骨, 低分化细胞只是产生纤维组织。这些细胞系是研究体外成骨细胞分化的好模型, 尤其是ECM信号。它们和原代培养颅顶成骨细胞的行为类似。

**细胞特性**

- 1) **来源:** 小鼠, 头骨, 颅骨
- 2) **形态:** 成纤维细胞样, 贴壁生长
- 3) **含量:**  $>1 \times 10^6$  细胞数
- 4) **规格:** T25 瓶或者 1mL 冻存管包装
- 5) **用途:** 仅供科研使用。

**运输和保存:** 干冰运输及复苏好存活细胞: (1) 1mL 冻存管包装干冰运输, 收到后-80 度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏, 若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染, 请立即与我们联系。(2) T25 瓶复苏的存活细胞常温发货, 收到后按照细胞接收后的处理方法操作。

**细胞接收后的处理:**

- 1) 收到细胞后, 75%酒精消毒瓶壁将T25瓶置于37℃培养箱放置约2-3h, 若发现培养瓶破损、有液溢出及细胞有污染, 请拍照后及时联系我们。
- 2) 请在4或5X显微镜下确认细胞状态, 同时给刚收到的细胞拍照 (10×, 20×) 各2-3张以及培养瓶外观照片一张留存, 作为售后时收到时细胞状态的依据。
- 3) 贴壁细胞: T25瓶置于37℃培养箱中约2-3h, 显微镜下观察细胞的情况, 若细胞密度在70%-80%左右, 可进行传代, 首次传代建议1:2(也可根据情况调整), 若细胞生长不足70%, 建议消化处理后, 转移到新的T25培养瓶 (1: 1) 继续培养。
- 4) 半贴细胞或贴壁不牢 (悬浮) 细胞: T25瓶置于37℃培养箱中约2-3h, 显微镜下观察细胞的情况, 若细胞密度在60%以下, 客户需收集T25瓶中的悬浮细胞离心后用完全培养基重悬后打回到原培养瓶中继续培养, 若细胞生长70%-90%对细胞进行传代, 传代时需要收集培养基中悬浮的细胞离心后回收。
- 5) 备注: 运输用的培养基 (灌注培养基) 不能再用来培养细胞, 请换用按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基来培养细胞。收到细胞后第一次传代建议T25培养瓶1: 2传代。

## 细胞培养步骤

### 一. 培养基及培养冻存条件准备:

- 1) 准备培养基: MEM  $\alpha$  +10%FBS+1% P/S。
- 2) 培养条件: 气相: 空气, 95%; 二氧化碳, 5%。 温度: 37 摄氏度, 培养箱湿度为 70%-80%。
- 3) 冻存液: 基础培养基+10%DMSO+20%FBS, 现用现配

### 二. 细胞处理:

#### 1) 冻存细胞的复苏:

将含有 1mL 细胞悬液的冻存管在 37℃ 水浴中迅速摇晃解冻, 加入到含 4-6mL 完全培养基的离心管中混合均匀。在 1000RPM 条件下离心 3-5min, 弃去上清液, 完全培养基重悬细胞。然后将细胞悬液加入含 6-8ml 完全培养基的培养瓶 (或皿) 中 37℃ 培养过夜。第二天显微镜下观察细胞生长情况和细胞密度。

#### 2) 细胞传代: 如果细胞密度达 80%-90%, 即可进行传代培养。

对于贴壁细胞传代可以参考以下方法:

1. 弃去培养上清, 用不含钙、镁离子的 PBS 润洗细胞 1-2 次。
2. 加入 0.25% (w/v) 胰蛋白酶-0.53 mM EDTA 于培养瓶中 (T25 瓶 1-2mL, T75 瓶 2-3mL), 置于 37℃ 培养箱中消化 1-2 分钟 (难消化的细胞可以适当延长消化时间), 然后在显微镜下观察细胞消化情况, 若细胞大部分变圆并脱落, 迅速拿回操作台, 轻敲几下培养瓶后加入 3-4ml 含 10%FBS 的培养基来终止消化。
3. 轻轻打匀后吸出, 在 1000RPM 条件下离心 3-5min, 弃去上清液, 补加 1-2mL 培养液后吹匀。将细胞悬液按 1: 2 的比例分到新 T25 瓶中, 添加 6-8ml 按照说明书要求配置的新的完全培养基以保持细胞的生长活力, 后续传代根据实际情况按 1:2~1:5 的比例进行。

#### 3) 细胞冻存: 收到细胞后建议在培养前 3 代时冻存一批细胞种子以备后续实验使用。下面 T25 瓶为例:

1. 细胞冻存时按照细胞传代的过程收集消化好的细胞到离心管中, 可使用血球计数板计数, 来决定细胞的冻存密度。一般细胞的推荐冻存密度为  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个活细胞/ml。
2. 1000rpm 离心 3-5min, 去掉上清。用配制好的细胞冻存液重悬细胞, 按每 1ml 冻存液含  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  个活细胞/ml 分配到一个冻存管中将细胞分配到冻存管中, 标注好名称、代数、日期等信息。
3. 将要冻存的细胞置于程序降温盒中, -80 度冰箱中过夜, 之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

### 注意事项:

1. 所有动物细胞均视为有潜在的生物危害性, 必须在二级生物安全台内操作, 并注意防护, 所有废液及接触过此细胞的器皿需要灭菌后方能丢弃。
2. 建议在复苏冻存细胞时始终使用防护手套、衣服和戴上防护面罩。注意: 冻存管浸没在液氮中会泄漏, 并会慢慢充满液氮。解冻时, 液氮转化成气相可能导致容器爆炸或用危险力吹掉其盖子, 从而产生飞扬的碎屑造成人员伤害