

## MC3T3-E1Subclone 14 小鼠颅顶前骨亚克隆14说明书

### Cat NO.: SC0660

细胞名称	MC3T3-E1Subclone 14 小鼠颅顶前骨亚克隆14	英文名称	MC3T3-E1 SUBCLONE 14
形态特性	贴壁生长	生长特性	成纤维细胞样
种属	小鼠		
组织疾病	小鼠胚胎成骨		
完全培养基配制	MEM $\alpha$ 培养基；10%胎牛血清；1%双抗 气相：空气，95%；二氧化碳，5%。温度：37摄氏度，培养箱湿度为70%-80%。		
传代比例/细胞消化	1:2传代，消化2-3分钟		
细菌真菌支原体检测	阴性		
倍增时间	每周 2 至 3 次		
特征特性	<p>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-E1 Subclone 4和MC3T3-E1 Subclone 14在抗坏血酸和3-4mM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-E1 Subclone 24和MC3T3-E1 Subclone 30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MC3T3-E1 Subclone 4和MC3T3-E1 Subclone 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。高或者低的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。</p>		
细胞图片			
传代步骤	<p>1、吸出原培养液；2、加入2ml左右PBS，轻轻晃动培养瓶润洗细胞,吸出PBS丢弃；3、加入1ml左右0.25%胰蛋白酶溶液（含EDTA），轻轻晃动培养瓶使之浸润所有细胞；4、放入培养箱消化，显微镜下看到细胞块中间的细胞明显变圆有间隙时可终止，全程不要拍打培养瓶；5、加入3ml含血清的培养基终止消化，吹打细胞使之脱壁并在液体里反复吹打使细胞尽量呈单颗细胞的悬浮液；6、收集细胞悬液离心，1200rpm/min 3分钟，离心完吸出上清丢弃；7、加入新鲜培养基，吹打几下混匀细胞即可，按比例接种到新培养瓶，补足培养基，拧松瓶盖或使用透气瓶盖进行培养。</p>		
冻存条件	冻存液：90%FBS，DMSO 10%		
备注			
产品使用	仅限于科学研究，不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。		

## 一、细胞收到后处理

请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。收到细胞回到自己的实验室后，先打开外包装，用75%酒精喷洒整个瓶消毒后放到超净台内，严格无菌操作，不开瓶盖放培养箱静置2-3小时稳定细胞状态。镜下观察：未超过80%汇合度时，重新加入新鲜6ml完全培养基，放入37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱培养；超过80%汇合度时，根据情况传代或者冻存。悬浮细胞需离心收集处理。抽出瓶中的培养基和细胞1000rpm离心3-5分钟，弃去上清重悬后接种到新的培养瓶中（加入按照说明书细胞培养条件新配制的完全培养基）。

**注意发货的是密封培养瓶的话，处理完后放入培养箱培养记得培养瓶盖拧松，初次传代最好使用T25培养瓶或6cm小皿1传2)**

## 二、细胞培养步骤

1. 复苏细胞：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5mL培养基混合均匀。在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加4-6mL完全培养基后吹匀。然后将所有细胞悬液加入培养瓶中培养过夜(或将细胞悬液加入6cm皿中)培养过夜。第二天换液并检查细胞密度。

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1-2mL消化液（0.25%Trypsin-0.53mM EDTA）于培养瓶中，置于37℃培养箱中消化1-2min，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5ml以上含10%血清的完全培养基终止消化。
3. 轻轻吹打细胞，完全脱落后吸出悬液至15ml离心管中，在1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含5-6ml培养液的新皿中或者瓶中。

## 细胞培养说明书

### 三、对于悬浮细胞，传代可参考以下方法：

- 1: 收集细胞，1000RPM条件下离心3-5分钟，弃去上清液，补加1-2mL培养液后吹匀，将细胞悬液按1：2到1：5的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。
- 2: 较脆弱的悬浮细胞可选择半数换液方式将培养瓶竖置1-2小时待大部分细胞沉到底部后，弃去半数培养基后，将剩余细胞悬起，将细胞悬液按1：2到1：3的比例分到新的含8ml培养基的新皿中或者瓶中。
- 3: 细胞冻存：待细胞生长状态良好时，可进行细胞冻存。贴壁细胞冻存时，弃去培养基后加入少量胰酶，细胞变圆脱落后，进行离心收集，1000RPM条件下离心3-5分钟，去除上清，按冻存数量加入血清及DMSO，冻存比例为90%FBS+10%DMSO。

### 特殊细胞收到注意事项

部分细胞由于贴壁不牢在运输过程中发生细胞脱落，这是正常现象正确处理后可以正常生长。

- 1、将培养瓶内所有培养基转入无菌离心管，离心收集细胞（1200rpm 3-5min）去除旧培养基

- 2、用PBS重悬细胞，将所有细胞收集到一个离心管中，再次离心（1200rpm 3~5min）去除PBS；
- 3、加入1ml左右0.25%胰酶重悬细胞，混匀即可，不能吹打太多次，放入培养箱消化，根据细胞特性决定消化时间（约1~2分钟）；
- 4、消化好后，用移液枪轻轻吹打细胞悬液，使细胞团分散，迅速加入3-5ml完全培养基混匀以终止消化，离心（1200rpm 3-5min）去除胰酶；
- 5、加入5ml左右的细胞相应的完全培养基混匀，按比例接入无菌培养瓶/皿中；
- 6、显微镜下观察看细胞是否成均匀分散的单颗细胞，若有3-5个成团的小细胞团可不用重新消化，使之贴壁后待细胞生长稳定后再消散细胞。