

# 牙质片层培养基使用说明书

## 【产品名称】

通用名称：牙质片层培养基

## 【包装规格】

50 片/包

## 【预期用途】

用于破骨细胞的培养。

骨切片检测能与从实验动物（包括小鼠、大鼠、鸡、兔和猫）的骨分离的破骨细胞同时使用。它已被广泛用于研究通过直接分离于骨或培养自骨髓培养基的人破骨细胞重吸收 (4)。该领域当今主要优势之一是通过RANK配基的增加从外周红细胞诱导破骨细胞形成的技术的发展(9)。利用这项技术，大量功能性破骨细胞能被激活，被激活的功能性破骨细胞将在包括骨位点重吸收的牙质片层在内的矿化底层挖掘出重吸收间隙。重吸收很容易被反射光显微镜方法而量化。

## 【产品简介】

牙质片层以50片一包形式供应，包装于已消毒的旋转盖封容器内。该片层通过紫外线杀菌并且只能在无菌环境（如层流柜）中打开。

失活的牙质片层用作骨重吸收培养基。这些片层以 5 mm 直径的牙质薄片形式提供（正常厚度为 0.3 mm）。每批培养基均经过检测以确保被有功能的破骨细胞重吸收。另可提供预重吸收的样品片层以便于体外重吸收功能鉴定

## 【检验原理】

该产品被设计利用“骨切片检测”以实现体外骨重吸收量化(1,2)，在“骨切片检测”中，培养的破骨细胞在矿化的底层挖掘出真正的骨重吸收间隙。从该检测的第一个表述开始，在过去的16年间(1,2)，该检测已被广泛地应用于研究许多因素对骨重吸收的影响且是当今体外骨重吸收研究使用最广泛的方法。

## 【储存条件及有效期】

该产品可在室温下储存。如果容器不打开且片层保持干燥，在保质期内不会出现变质。

## 【适用仪器】

适用于培养箱使用。

## 【样本要求】

使用前取样。

## 【检验方法】

1. 牙质片层在已消毒的塑料容器中提供。仅允许在无菌环境（如层流柜）中打开。
2. 打开容器后，需使用消毒镊子移开消毒棉塞。然后片层应通过颠倒试管转移至已消毒的皮氏培养皿。
3. 用细镊子将片层移至培养皿备用，注意不要刮到牙质表层。该片层被设计可应用在标准的96孔组织培养盘中，但是它们也能在任何类型的组织培养容器中使用。
4. 在增加细胞之前，牙质片层应被预加湿至少1小时。应使用消毒磷酸盐缓冲液或组织培养方法。
5. 去除预加湿液后，加入细胞悬浊液。加入的细胞数量取决于破骨细胞来源和实验设计。重吸收由光显微镜法进行分析，这样就有可能测量单个破骨细胞的活性。然而，在大部分实验方案中，加入更多的破骨细胞将更合适（但是一般要少于200/牙质片）。
6. 使用的沉淀时间也取决于破骨细胞来源和实验设计。成熟的破骨细胞将在1小时内附在牙质片层，但是在许多方案中将需要更长的沉淀时间。培养基能通过使用包括自动移液管在内的标准组织培养技术和设备而被改变。
7. 由成熟破骨细胞导致的重吸收在培养12小时后可被检测出。培养的时间将取决于实验设计。

8. 如果使用液态固定液，牙质片层可在组织培养容器中固定。撤除受限的培养基且用磷酸盐缓冲液或组织培养基冲洗组织培养孔两次，再加入固定液。常使用的固定液是4%的戊二醛（用0.2M的甲酸钠溶液配成）。
9. 重吸收凹点能在多种标准组织学菌株着色后鉴定。我们推荐1%的甲苯胺蓝（用0.5%四硼酸盐溶液配成）。牙质片层应在此甲苯胺溶液中染色3分钟。多余的染料通过冲洗去除，然后在非蒸馏水中漂洗并风干。已染色的片层可即在室温下长期保存。
10. 重吸收陷窝能通过多种途径鉴定，包括扫描电镜和光学显微镜。我们推荐使用反射光学显微镜。
11. 使用者应考虑一些推荐的方法以确定最合适他们需要的技术。

#### 举例体外产生人破骨细胞的方法

这个方法使用20 mL的外周血细胞可提供适用于近50个牙质片层的足够的破骨细胞。

1. 准备已消毒的牙质片层并置于96孔板的微孔中。每孔一个牙质片层。加入100  $\mu$ L的最低必需培养基（MEM）加10%的小牛胎血清（FCS）到每个预湿的牙质片层孔中。
2. 混合20 mL的肝素抗凝的外周血和20 mL的 MEM。准备有5个5 ml Histopaque9（ $\Sigma$ ）的Falcon试管并加入8 ml的外周血细胞悬浮液。在450 g下离心30分钟并轻轻倒出淡黄色表面层。
3. 在10 mL的 MEM清洗淡黄色表面层并在1500 rpm离心20分钟。重悬浮的细胞小球在4 mL的 MEM加10% FCS并使用血球仪计算细胞数量（注意：细胞的浓度将取决于淡黄色表面层的效率）。
4. 一旦细胞计算出数量加入大约20  $\mu$ L的约500,000细胞介质到96孔板的每个微孔中。放入孵育器并离开1小时。
5. 在孵育期后每孔用抽出的介质清洗3次并加入新鲜的介质。最后用100 $\mu$ L的新制成的 MEM加10% FCS代替，加入RANK ligand (30 ng/mL)和M-CSF (25 ng/mL)。
6. 每2至3天更换介质溶液。破骨细胞将在2周后形成并且这个过程可以用牙质片层的消减和染色进行监测。
7. 在最开始培养的2个星期，潜在催化剂的作用或骨染色体异常转化抑制剂可加入到培养介质中。
8. 在培养的第三个星期在牙质片层上出现广泛的重吸收，在这个时期可以用于评估潜在抑制或催化骨重吸收物质的效果。
9. 牙质片层用甲苯胺蓝染色和用反射显微镜分析重吸收的程度。

#### 【参考文献】

1. Boyde A, Ali N N and Jones S J (1984) Resorption of dentine by isolated osteoclasts *in vitro*. Br. Dent. J. 156:216-220.
2. Chambers T J, Revell P A, Fuller K and Athanasou N (1984) Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. J. Cell Sci. 55:383-399.
3. Walsh C A, Beresford J N, Birch M A, Boothroyd B and Gallagher J A (1991) Application of reflected light microscopy to identify and quantitate resorption by isolated osteoclasts. J. Bone Miner. Res. 6:661-671.
4. Walsh C A, Carron J A and Gallagher J A (1996) The isolation of osteoclasts from human giant cell tumours and long-term marrow cultures. In 'Human Cell Culture Protocols' Ed. G.E. Jones, Humana Press Inc. pp 233-262.
5. Arnett T R and Dempster D W (1987) A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts *in vitro*: Effects of calcitonin and prostaglandins. Endocrinology 120:602-608.
6. Sato M and Grasser W (1990) Effects of bisphosphonates on isolated rat osteoclasts as examined by reflected light microscopy. J. Bone Miner. Res. 5:31-40.
7. Boyde A (1991) Pitfalls in pit measurement. Calcif. Tissue Int. 49:65-70.
8. Tamura T, Takahashi N, Akatsu T, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S and Suda T (1993) New resorption assay with mouse osteoclast-like multinucleated cells formed *in vitro*. J. Bone Miner. Res. 8:953-960.
9. Itonaga I, Sabokbar A, Neale S D, and Athanasou N A (1999) 1, 25 Dihydroxyvitamin D3 and prostaglandin E3 act directly on circulating human osteoclast precursors. Biochem. Biophys. Res. Comm. 264:590-595.

**【生产企业】**

生产者名称：英国 Immunodiagnostic Systems Limited(IDS Ltd)

生产者/生产场所地址：10 Didcot Way,Boldon Business Park,Boldon,Tyne&Wear,NE35 9PD,UK

联系方式：+44 (0) 191 519 0660

传真：+44 (0) 191 519 0760

网址：[www.idsltd.com](http://www.idsltd.com)

售后服务机构：北京荣志海达生物科技有限公司

地址：北京市海淀区永定路 88 号长银大厦 12 层 B12 室

电话：+86 10 58895646 +86 20 32293178

传真：+86 10 58895611 +86 20 32293177

电子邮箱：[info@rz-biotech.com](mailto:info@rz-biotech.com)

网址：[www.rz-biotech.com](http://www.rz-biotech.com)

**【说明书批准及修改日期】**

*仅供参考，请以原版英文说明书为准！*