



For research use only. Not for clinical diagnosis.

Osteoblast from cranial bone

【 Rat Osteoblast from cranial bone, Catalog No. OBC02C 】

July, 1, 2024

I. Product Overview

Bone metabolism is composed of balanced bone formation of osteoblasts and bone resorption of osteoclasts. This product contains frozen osteoblasts isolated from rat calvariae. It is useful for study of osteoblast and osteogenesis.

II. Precautions Before Use

Please make sure to review this manual before using the product.

Product should be used under [aseptic operation]. The biosafety level is [Level 1].

Please use the dedicated medium sold separately for culturing this product.

III. Product Warranty

We guarantee against growth failure after the start of culture only if cells have been properly stored in liquid nitrogen, and cultured according to the manual using the dedicated medium and reagents.

The warranty period is [within 6 months of receiving the product].

Please note that the warranty does not apply if there have been changes to the medium or the method of use, if cells have been subcultured beyond the recommended number of passages, or re-frozen cells have been used.

IV. Components

Product Name	Size	Quantity	Storage Conditions	Expiration date
Osteoblast, cryopreserved	1.0x10 ⁶ cells/vial	1	Liquid Nitrogen vapor phase	6 months

*Shipping: dry ice

V. Cell origin

Derived from the cranial bone of neonatal SD rat

VI. Dedicated Media (Serum Containing Media) (sold separately)

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity	Storage Conditions	Expiration date
Osteoblast Culture Medium	OBCM	500 mL	1	-20°C Freezer	- Written on the bottle
				4°C	3month after thawing

Culture Medium components: α -MEM, FBS, antibiotics, etc.

VII. Materials required but not provided

- ✧ Variable volume pipettes
- ✧ Culture vessels
- ✧ 0.05% Trypsin/EDTA
- ✧ HBSS or PBS(-)

VIII. Protocol

A) Cultured with the 25 cm² flask

- 1) Carefully remove the cryovial from liquid nitrogen and thaw cells in a water bath at 37°C for 120 seconds.
- 2) Transfer thawed cells into a 15 ml centrifuge tube containing 10 ml of culture medium and Transfer 1mL of culture medium in the same conical tube back to the cryovial and pour the contents back to 15mL conical tube.
- 3) Centrifuge for 5 minutes at 4°C at 600 x g for 5 minutes.
- 4) Remove the supernatant, and re-suspend the cell pellet in approximately 5 ml of culture medium.
- 5) Transfer the cell suspension to 25 cm² flask and incubate the flask at 37°C under 5% CO₂ and 100% humidity.
- 6) The next day, Replace the medium with fresh pre-warmed culture medium.
※Approximately 2-3 days of culture, cells become confluent. For subculture, please refer to the protocol below. Subculture of the cells can be performed up to passage 2.

B) Subculture

- 1) When the cells reach 70 - 90% of confluent, they should be subcultured.
- 2) Aspirate the medium. Rinse the flask with 10mL of HBSS or PBS (-). Repeat twice.
- 3) Remove HBSS or PBS (-) and then add 3 ml of trypsin/EDTA solution into flask (25 cm² flask).
- 4) Gently rock the flask to make sure that the cells are covered by trypsin/EDTA solution and then immediately remove trypsin/EDTA solution.
- 5) Incubate the flask in a 37°C incubator until cells are completely rounded up (monitored with inverted microscope). Approximately it takes 2 to 3 minutes.
- 6) Add culture medium to the flask and transfer detached cells to centrifuge tube, and then centrifuge the centrifuge tube at 4°C at 600 x g for 5 minutes.
- 7) After removing the supernatant, re-suspend cells in culture medium and centrifuge .for 5 minutes at 4°C at 600 x g.
- 8) Remove the supernatant, and re-suspend cells in culture medium. Count cells and plate cells in a new plate or flask (Adjust cell density to the desired experiment).
※Approximately 2-3 days of culture, cells become confluent when seeding density is 30,000 cells/ cm².



凍結初代細胞製品

ラット頭蓋由来骨芽細胞

【Rat Osteoblast from cranial bone, 品番：OBC02C】

2024年7月1日改訂

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

I. 製品概要

現在、わが国では高齢化社会の到来に伴い骨粗鬆症等の骨代謝異常疾患が年々増加の一途をたどっています。骨量は、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収とのバランスによってコントロールされています。本製品は、ラット頭蓋由来の骨芽細胞（凍結細胞）です。骨形成や骨代謝等の研究にご利用ください。

II. 使用前注意事項

本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。

本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には別売の専用メディウムをご使用下さい。

III. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用メディウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。

保証期限は【製品お受け取りから6ヶ月以内】です。

メディウムや使用方法に変更を加えられた場合や、推奨継代数以上の細胞や再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

IV. 製品構成

構成	容量	本数	保存方法	使用期限
ラット骨芽細胞 (凍結細胞)	1×10 ⁶ cells/vial	1本	液体窒素保存	6か月

※受け取り後、直ちにご使用にならない場合は凍結細胞を液体窒素にて保存してください

V. 細胞の由来

SDラット新生児の頭蓋由来

VI. 専用メディウム(別売)

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
骨芽細胞用メディウム	OBCM	500 mL	-20℃保存 (解凍後は4℃保存)	ボトル記載(-20℃保存) 解凍後3か月(4℃保存)

培地の主成分：α-MEM、血清、抗生剤、その他

VII. 操作方法

※本製品は【2回まで継代可能】です。

細胞解凍・播種

※下記は、25 cm² フラスコで培養する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】

- ・骨芽細胞用メディウム（品番：OBCM）
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

1. 凍結細胞のバイアルを、37°C温水にて2分間加温して解凍してください。
2. 解凍した細胞液は、予め骨芽細胞用メディウム・10mLが入っている15mL遠心管に移し混和した後、遠沈管内のメディウムを1mL分取し、バイアルを共洗いして細胞液を回収してください。
3. 4°C、600xgで5分間遠心してください。
4. 上清を除去し、骨芽細胞用メディウムを5mL加え細胞浮遊液とします。
5. 細胞浮遊液・5mlを25cm²フラスコ・1個に播種し、5%CO₂存在下の37°Cインキュベーターで培養してください。
6. 翌日、保温した骨芽細胞用メディウムで培地交換し、任意の実験系に供してください。

※播種してから2〜3日後にコンフルエントになります。

細胞継代

【準備するもの】

- ・HBSS(-)もしくはPBS(-)
- ・0.05%トリプシン・0.53mM EDTA 溶液
- ・骨芽細胞用メディウム（品番：OBCM）
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

1. 70〜90%コンフルエントになった細胞をCO₂インキュベーターから取り出して下さい。
2. 上清を吸引除去し、HBSS(-)もしくはPBS(-)を5mL添加し、フラスコを洗浄して下さい。（この操作を2回繰り返して下さい）。
3. HBSS(-)もしくはPBS(-)を吸引除去し、0.05%Trypsin-EDTAを3mL添加して培養表面に行き渡らせた後、直ちにフラスコ内のトリプシン-EDTA溶液を吸引除去して下さい。
フラスコを37°Cインキュベーターに静置して酵素処理をおこなってください。
4. 検鏡で細胞が丸くなるのを確認し、フラスコを軽くたたき培養面から細胞が剥がれるまで酵素処理をおこなって下さい（酵素処理時間は通常2〜3分間程度）。

※トリプシンは細胞を損傷するため、剥離度合いを顕微鏡下で観察しながら、ほぼ全ての細胞が剥離したら速やかに次の処理に移して下さい。

5. フラスコ内に骨芽細胞用メディウムを加えて酵素処理を停止し、分散した細胞を遠心管に回収してください。
6. 4°C、600xgで5分間遠心してください。
7. 上清を除去し、骨芽細胞用メディウムを加えて細胞浮遊液を調製した後に、血球計算盤で細胞数をカウントし、任意の実験系に適切な細胞密度になるように調整し播種してください。

※細胞密度を3.0×10⁴cells/cm²で播種した場合、2〜3日後にコンフルエントになります。