

小鼠骨髓来源巨噬细胞分化及鉴定

小鼠骨髓细胞的获得

1. 小鼠(6~8周)颈椎脱臼法处死，将处死的小鼠放于含有酒精的小烧杯中浸泡2 min，消毒灭菌，在超净台中手术取出所有的胫骨和股骨，并用剪刀和镊子将骨周围的肌肉组织尽量去除干净；
2. 将取好的骨头转移到装有无菌PBS的培养皿中，涮洗一次后转移至另一个装有无菌PBS的培养皿；
3. 用剪刀剪去骨的两端，再用注射器抽取PBS，针头分别插入两端骨髓腔中，用注射器打入PBS，反复冲洗骨髓至培养皿中，直至骨完全变白；
4. 收集骨髓悬液，用筛网过滤去除小碎片和肌肉组织；
5. 将滤过液500 g/5 min离心，弃去上清；
6. 将离心后的沉淀弹散，加入2 ml红细胞裂解液(1X)(Cat#64010-00-100)，室温裂解5 min。

注：推荐使用BioGems红细胞裂解液，裂解温和，对骨髓细胞损伤小！

小鼠骨髓细胞的分化

1. 用1640完全培养基(1640培养基+10%FBS+双抗)重悬细胞至 1×10^7 /ml，加入终浓度为20 ng/ml的Murine M-CSF，24孔培养板中加入1 ml细胞悬液，此后隔天半量换液，诱导分化6-7天，细胞分化成M0；
2. M1方向分化：分化6-7天后，继续加入100 ng/ml的LPS和20 ng/ml的Murine IFN- γ ，同时还需加入Murine M-CSF，极化24小时；
3. M2方向分化：分化6-7天后，继续加入20 ng/ml的Murine IL-4，同时还需加入Murine M-CSF，极化24小时；
4. 细胞鉴定：购买相应的流式抗体进行染色鉴定。

细胞分化所需的细胞因子:

生产商	产品编号	产品名称	产品规格
PeproTech	315-02	Recombinant Murine M-CSF	2 µg/10 µg/50 µg/100 µg/250 µg/500 µg/1000 µg
PeproTech	214-14	Recombinant Murine IL-4	5 µg/20 µg/50 µg/100 µg/250 µg/500 µg/1000 µg
PeproTech	315-05	Murine IFN-γ	20 µg/100 µg/250 µg/500 µg/1000 µg

细胞鉴定所需抗体:

生产商	产品编号	产品名称	产品规格
BioGems	86212-80	Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) APC	25 µg/100 µg
BioGems	02922-60	Anti-Mouse F4/80 Antigen PE	25 µg/100 µg
BioGems	03212-50	Anti-Mouse CD11c FITC	25 µg/100 µg
BioGems	03221-77	Anti-Human/Mouse CD11b PE-Cy7	25 µg/100 µg
Biolegend	141716	Anti-Mouse CD206 Percp-cy5.5	25 µg/100 µg

参考文献:

1. Zajac E, Schweighofer B, Kupriyanova TA, et al. Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. *Blood*. 2013;122:4054-4067.
2. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41:14-20.

BioGems China
 电话: 0512 6856 7071 · 企业QQ: 80017 7071
 邮箱: china@biogems.com

BioGems International, Inc.
 31255 Cedar Valley Drive · Westlake Village · CA 91362
 Tel: 800 493 5868 or 818 338 3312 Fax: 818 338 3316
 Info@bio-gems.com · www.bio-gems.com

