



小鼠骨髓来源树突状细胞(BMDC)培养和鉴定试剂盒

I. 产品信息

目录号: CK20101
保 存: 2 - 8℃

规 格: 1 kit
效 期: 6 个月

II. 背景简介

树突状细胞(dendritic cells, DC), 是由 2011 年诺贝尔奖获得者、加拿大籍科学家 Ralph M. Steinman 于 1973 年首次从小鼠脾脏分离出一群胞质呈星状突起、核极不规则的细胞, 因其具有特征性的树突形态而得名。根据表型和功能的不同, DC 分为髓样树突状细胞和浆细胞样树突状细胞 2 个亚群。DC 细胞是目前发现的功能最强的专职抗原提呈细胞(Antigen Presenting Cells, APC), 它作为免疫反应的始动者, 是唯一能够显著刺激初始 T 细胞增殖的 APC, 而其他种类的 APC(如单核巨噬细胞, B 细胞等)仅能刺激已活化的或记忆性的 T 细胞。

目前 DC 的主要来源包括: 外周血、骨髓和干细胞。虽然 DC 已经能够从体内多种组织中分离, 但含量很少, 无法满足科学研究和临床治疗的需要, 所以尝试多种方法来体外培养和扩增 DC。对于人, 最常用的方法是从人外周血单个核细胞(PBMC)诱导产生 DC; 对于小鼠, 最常用的方法是从小鼠骨髓细胞诱导产生 DC, 即骨髓来源的 DC (Bone Marrow-Derived Dendritic Cells, BMDC)。

本产品为小鼠骨髓来源树突状细胞(BMDC)培养和鉴定试剂盒, 通过筛选高品质的细胞因子、优化细胞因子浓度、提供齐全的培养试剂以及鉴定试剂、优化实验操作步骤, 可有效稳定地获取诱导培养的 DC 细胞。本产品可以用于两只小鼠获得的骨髓细胞(约 $4 - 6 \times 10^7$ 个细胞)的诱导培养和鉴定。

III. 试剂盒组分

组分编号	组分名称	规格
CK20101A	基础培养基	200 ml
CK20101B	培养基添加剂(含双抗) (50×)	4 ml
CK20101C	红细胞裂解液 (1×, 无菌)	30 ml
CK20101D	Mouse GM-CSF (200×)	0.5 ml
CK20101E	Mouse IL-4 (200×)	0.5 ml
CK20101F	Mouse TNF- α (200×)	0.25 ml
AM011C05-50	Anti-Mouse CD11c (N418), APC	50T
CHG05-20	Isotype Control, APC (for Mouse CD11c, APC)	20T
AM0M204-20	Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) (M5/114.15.2), PE	20T
CRG2b04-20	Isotype Control, PE (for Mouse MHC Class II, PE)	20T
AM08004-20	Anti-Mouse CD80 (B7-1) (16-10A1), PE	20T
CHG04-20	Isotype Control, PE (for Mouse CD80, PE)	20T
AM08604-20	Anti-Mouse CD86 (B7-2) (GL-1), PE	20T
CRG2a04-20	Isotype Control, PE (for Mouse CD86, PE)	20T
S1001	Flow Cytometry Staining Buffer	125 ml

Product For Research Use Only Ver: CK20101-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: info@liankebio.com



IV. 未提供的设备和材料

- | | |
|------------------------|-----------------|
| 1. 实验小鼠 | 9. 剪刀、镊子 |
| 2. 水平离心机 | 10. 培养皿 |
| 3. 一次性无菌注射器 | 11. 无菌 300 目尼龙膜 |
| 4. 细胞培养板或培养瓶 | 12. 流式细胞仪 |
| 5. 计数板 | 13. 水浴锅 |
| 6. 显微镜 | 14. 胎牛血清 |
| 7. CO ₂ 培养箱 | 15. 75% 乙醇 |
| 8. 移液器及吸头 | 16. 无菌 PBS |

V. 使用方法

一、试剂的准备

- 血清灭活：将胎牛血清(未提供)置于 56°C 水浴锅中热处理 30 分钟。
- 完全培养基的配制：在基础培养基中，加入适量培养基添加剂(含双抗) (50×)和灭活胎牛血清，使添加剂的终浓度为 1×，血清浓度为 10%。例如每 9 ml 培养基中加入 200 μl 培养基添加剂(含双抗) (50×)和 1 ml 灭活胎牛血清。
- 分化培养基的配制：在完全培养基中，加入适量 Mouse GM-CSF (200×)和 Mouse IL-4 (200×)，使 Mouse GM-CSF 和 Mouse IL-4 的终浓度为 1×。例如每 10 ml 完全培养基中加入 50 μl Mouse GM-CSF (200×)和 50 μl Mouse IL-4 (200×)。

二、小鼠骨髓细胞的制备

- 用适当的方法将实验小鼠处死，75%乙醇浸泡 5 分钟。无菌条件下，取出双侧股骨和胫骨，将包裹骨骼的肌肉组织尽量去除干净，不要损伤骨骼。
- 将股骨和胫骨置于盛有无菌 PBS 的培养皿中，用无菌 PBS 洗涤 2 次，弃去洗液。
- 剪断两侧骨髓端，用 1 ml 注射器抽取 1 ml 培养基(不含添加剂和血清)，将针头从骨两端插入骨髓腔，轻轻冲洗出骨髓至培养皿中。吸取新的培养基，重复冲洗 2 - 3 次，直至骨髓腔完全变白。
- 冲洗后的骨髓悬液用 1 ml 移液器或吸管轻轻反复抽吸，以获得单细胞骨髓悬液。用无菌 300 目尼龙膜过滤骨髓悬液于 15 ml 离心管中，1200 rpm 离心 5 分钟，小心弃去上清。
- 加入 3 ml 红细胞裂解液，轻轻吹打混匀，裂解 5 分钟。裂解结束后加入 6 ml 完全培养基中和裂解，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。
- 加入 5 ml 完全培养基，轻轻吹打混匀，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。
- 加入 5 ml 完全培养基，轻轻吹打混匀，获得的细胞即为小鼠骨髓细胞。

三、BMDC 的诱导分化

- 将上述获取的小鼠骨髓细胞进行计数，用完全培养基调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。
- 取适量上述含骨髓细胞的完全培养基，加入 Mouse GM-CSF (200×)和 Mouse IL-4 (200×)，使 Mouse GM-CSF 和 Mouse IL-4 的终浓度为 1×，用移液器或吸管轻轻吹打混匀。例如每 10 ml 含骨髓细胞的完全培养基中加入 50 μl Mouse GM-CSF (200×)和 50 μl Mouse IL-4 (200×)，用移液器或吸管轻轻吹打混匀。
- 按下表推荐的体积或根据实验方案加入适量细胞，于 37°C、5%CO₂ 培养箱培养，此为培养的第 0 天。

培养板或培养瓶	推荐培养体积
24 孔培养板	1 ml/孔
6 孔培养板	2 - 3 ml/孔
25cm ² 培养瓶(T25)	7.5 ml
75cm ² 培养瓶(T75)	20 ml



- 第 2 天进行 3/4 体积或全量换液。轻轻摇晃培养板，收集上清(勿丢弃)，补足等量分化培养基。
- (可选)将收集的上清，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。加入适量分化培养基重悬细胞沉淀，在新的培养板或培养瓶中按照 1×10^6 个/ml 进行培养。此步骤目的是为了减少 DC 细胞的损失。
- 第 4 天已形成不成熟的 DC 细胞。可根据实验目的，在第 4 天 - 第 8 天，进入下游实验或继续诱导成熟。如培养 4 天，则直接进入步骤 7；如培养 6 天，则在第 4 天半量换液，在第 6 天进入步骤 7；如培养 8 天，则在第 4 天半量换液，在第 6 天收集悬浮细胞及疏松贴壁生长的细胞，用分化培养基调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，重新培养，在第 8 天进入步骤 7。半量换液时，轻轻摇晃培养板，弃去 1/2 体积的培养基，补足等体积的分化培养基。

注：通常培养 6 天可获得满足需求的 DC 细胞，延长至 8 天对提高细胞纯度有一定的帮助。

- 轻柔吹打培养液，收集悬浮细胞及疏松贴壁生长的细胞。

三、BMDC 的完全成熟

- 将上述收集的 BMDC，1200 rpm 离心 5 分钟，弃上清。
- 用完全培养基重悬细胞沉淀，计数后调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml。
- 在上述的细胞悬液中加入适量 Mouse GM-CSF (200 \times)、Mouse IL-4 (200 \times)和 Mouse TNF- α (200 \times)，使终浓度为 1 \times 。例如每 10 ml 含 DC 细胞的完全培养基中加入 50 μ l Mouse GM-CSF (200 \times)、50 μ l Mouse IL-4 (200 \times)和 50 μ l TNF- α (200 \times)，用移液器或吸管轻轻吹打混匀。
- 按“BMDC 的诱导分化”步骤 3 推荐的培养体积重新种入细胞，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 1 - 2 天。诱导时间长，有利于 DC 细胞的进一步成熟。
- 收集悬浮细胞及疏松贴壁生长的细胞即为成熟 DC 细胞。

四、BMDC 的鉴定

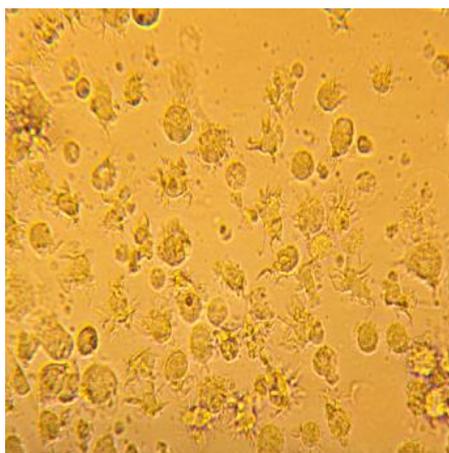
在流式管中加入 100 μ l 含至少 1×10^5 个未成熟或成熟的 DC 细胞悬液，按下表加入流式抗体，室温避光孵育 15 分钟后，每管加入 1 ml Flow Cytometry Staining Buffer，1200 rpm 离心 5 分钟，弃去上清，每管加入 0.5 ml Flow Cytometry Staining Buffer 重悬，上机检测。

待测样本序号	样本类型	抗体	用量
1	未成熟 DC	Isotype Control, APC (for Mouse CD11c, APC)	5 μ l
2		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Isotype Control, PE (for Mouse MHC Class II, PE)	5 μ l
3		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) (M5/114.15.2), PE	5 μ l
4		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Isotype Control, PE (for Mouse CD80, PE)	5 μ l
5		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Anti-Mouse CD80 (B7-1) (16-10A1), PE	5 μ l
6		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Isotype Control, PE (for Mouse CD86, PE)	5 μ l
7		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Anti-Mouse CD86 (B7-2) (GL-1), PE	5 μ l

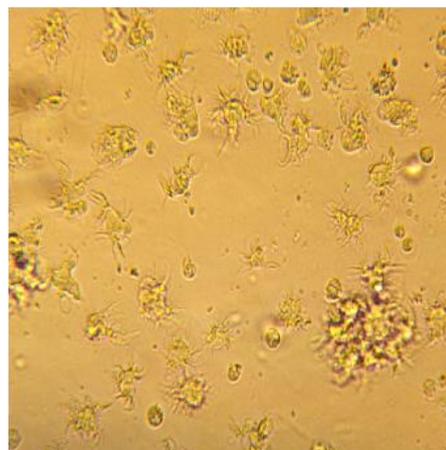


8	成熟 DC	Isotype Control, APC (for Mouse CD11c, APC)	5 μ l
9		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Isotype Control, PE (for Mouse MHC Class II, PE)	5 μ l
10		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Anti-Mouse MHC Class II (I-A/I-E) (M5/114.15.2), PE	5 μ l
11		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
		Isotype Control, PE (for Mouse CD80, PE)	5 μ l
12		Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l
	Anti-Mouse CD80 (B7-1) (16-10A1), PE	5 μ l	
13	Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l	
	Isotype Control, PE (for Mouse CD86, PE)	5 μ l	
14	Anti-Mouse CD11c (N418), APC	5 μ l	
	Anti-Mouse CD86 (B7-2) (GL-1), PE	5 μ l	

V. 结果示例



未成熟DC (Day6, -TNF α)



成熟DC (Day8, +TNF α)

图 1. BMDC 形态学观察: 8 周龄雄性 C57/BL6 小鼠骨髓细胞诱导培养 6 天(左, 未成熟 DC 细胞)和诱导培养 8 天(右, 成熟 DC 细胞)的形态图。

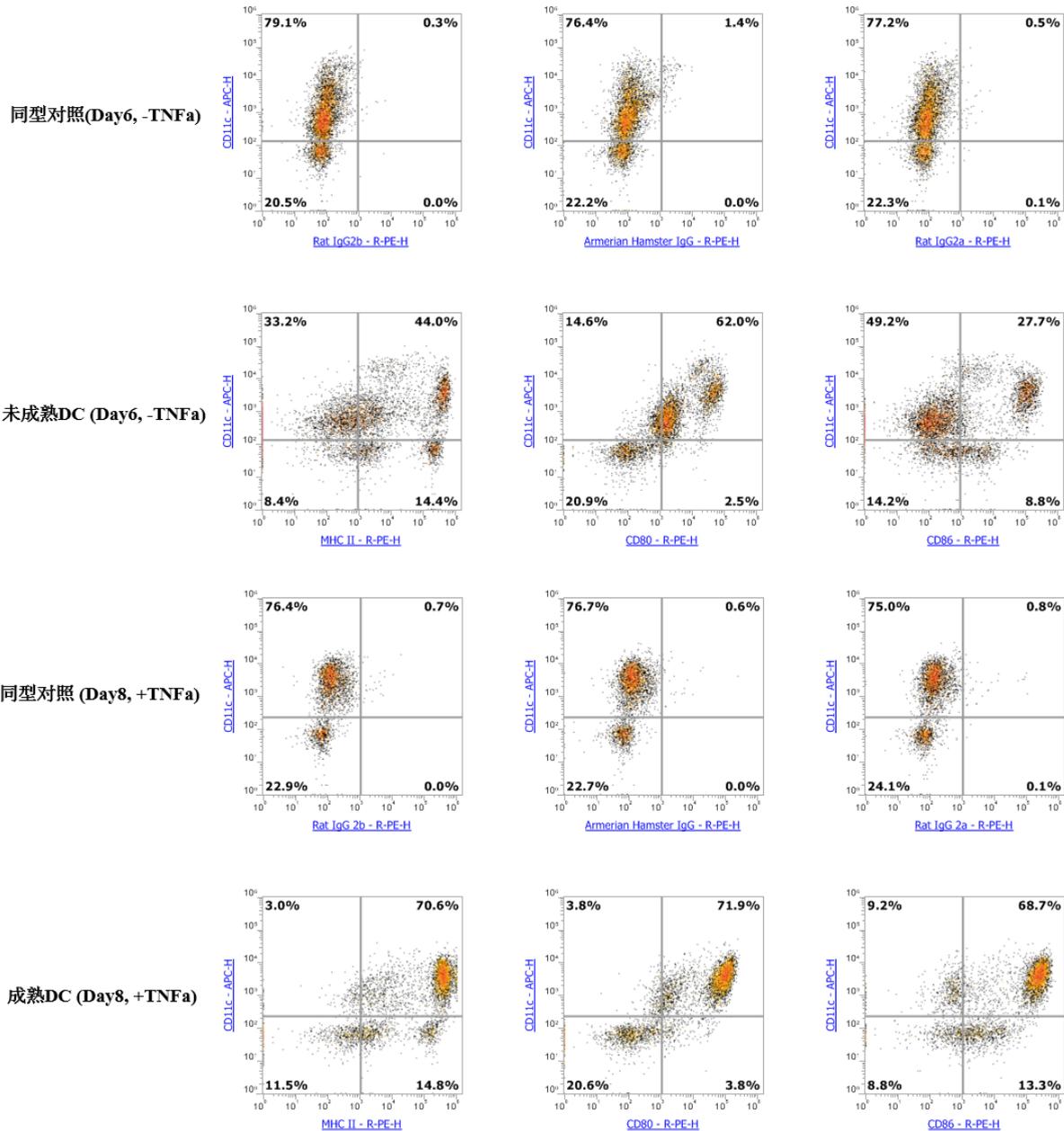


图 2. BMDC 表型分析: 8 周龄雄性 C57/BL6 小鼠骨髓细胞诱导培养 6 天(第一和第二行, 未成熟 DC 细胞)和诱导培养 8 天(第三和第四行, 成熟 DC 细胞)的流式鉴定图。

VI. 注意事项

1. 请在使用本产品前仔细阅读说明书。本产品仅用于科研, 不可用于诊断。
2. 为了您的安全和健康, 请穿戴实验防护服、手套、口罩等必要的防护装备。
3. 更多细胞培养相关产品敬请关注联科生物网站或来电咨询。

Product For Research Use Only Ver: CK20101-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: info@liankebio.com



VII. 步骤概要

第0天:



分离骨髓细胞
裂红, 计数



用分化培养基调整细胞密度,
按 1×10^6 个/ml进行接种



第2天:



3/4量或全量换液
收集上清重新铺板(可选)

第4天:

或

第4天:

或

第4天:



流式鉴定未成熟DC细胞(可选)



用含GM-CSF、IL-4和TNF- α 的
培养基再铺板

第5天或第6天:

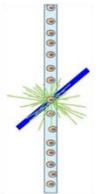


流式鉴定成熟DC细胞



半量换液

第6天:



流式鉴定未成熟DC细胞(可选)



用含GM-CSF、IL-4和TNF- α 的
培养基再铺板

第7天或第8天:



流式鉴定成熟DC细胞



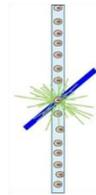
半量换液

第6天:



用分化培养基调整
细胞密度, 按
 1×10^6 个/ml再铺板

第8天:



流式鉴定未成熟DC细胞(可选)



用含GM-CSF、IL-4和TNF- α 的
培养基再铺板

第9天或第10天:



流式鉴定成熟DC细胞

Product For Research Use Only Ver: CK20101-01

MultiSciences Biotech Co., Ltd

Technical Service: tech@liankebio.com

To place an order: info@liankebio.com