

RAW 264.7 Polarized M1 Macrophage Induction and Identification Kit

Cat. No: XJM004**Size: 20 Assays/100 Assays**

试剂盒组分

产品编号	试剂名称	20 Assays	100 Assays	Storage
XJM004A	RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×)	20 µL	100 µL	-20°C, shading light
XJM004B	RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Cocktail	100 µL	500 µL	2-8°C, shading light
XJM004C	RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Isotype Cocktail	100 µL	500 µL	2-8°C, shading light
E-AB-F0997A	Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody[2.4G2]	25 µg	100 µg	2-8°C, shading light
	说明书		1 份	

组分组成

试剂名称	产品名称
RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Cocktail	FITC Anti-Mouse F4/80 Antibody [CI:A3-1]
	PerCP/Cyanine5.5 Anti-Mouse/Human CD11b Antibody[M1/70]
	PE Anti-Mouse CD86 Antibody [GL-1]
RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Isotype Cocktail	FITC Rat IgG2b,κ Isotype Control [LTF-2]
	PerCP/Cyanine5.5 Rat IgG2b,κ Isotype Control [LTF-2]
	PE Rat IgG2a, κ Isotype Control[2A3]

注：不同批次试剂盒中Cocktail组分不建议混合使用。

保存条件

RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×)可在 -20°C 避光保存 1 年有效。RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Cocktail、RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Isotype Cocktail 和 Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody[2.4G2]可在 2-8°C 避光保存 1 年有效，避免冻存和反复冻融。

For Research Use Only

产品简介

巨噬细胞作为具有异质性和多样性的免疫细胞，具有独特的形态和功能特性，参与炎症反应、自身免疫和损伤修复。巨噬细胞的极化在消灭病原体或维持组织稳态中起着至关重要的作用。近年来，人们普遍认为各种免疫相关疾病的发生发展受巨噬细胞极化的影响。在复杂多变的微环境下，巨噬细胞可以转化为不同的表型。一般来说，巨噬细胞至少有两种不同的极化：M1 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞。巨噬细胞在脂多糖(LPS)、干扰素- γ (IFN- γ)等物质的刺激下转化为 M1 型巨噬细胞。这类巨噬细胞可产生高水平的一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)，从而促进炎症反应。

RAW 264.7(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞)是破骨细胞、炎症研究最常用的体外模型之一，被广泛用于研究风湿性关节炎、骨质疏松症、骨质溶解、牙周炎等骨骼疾病。

本试剂盒提供完整的 RAW 264.7 极化为 M1 型巨噬细胞的诱导分化和鉴定方案，包括 M1 型巨噬细胞分化培养试剂、鉴定试剂，为 RAW 264.7 极化为 M1 型巨噬细胞提供稳定可靠的支持，提高了 RAW 264.7 极化为 M1 型巨噬细胞的培养和鉴定的效率及稳定性。

本试剂盒 1 assay 可配制 1 mL RAW 264.7 分化培养基（24 孔板 1 mL/孔）。100 assays 约可培养 2×10^7 个 RAW 264.7 细胞，经过 48h 分化培养之后，可获得约 $1-2 \times 10^7$ 个纯度为 70-90% 的 M1 型巨噬细胞。

自备试剂耗材及仪器

➤ 试剂

DMEM 高糖基础培养基，优质胎牛血清，青霉素-链霉素溶液(双抗)，无菌去离子水，无菌 PBS，0.25% 胰蛋白酶溶液(含 EDTA，溶于 PBS)。

➤ 仪器

水平离心机，CO₂ 培养箱，显微镜，流式细胞仪，生物安全柜，水浴锅，移液器。

➤ 耗材

细胞培养皿，移液器吸头，无菌 15mL/50 mL 离心管，无菌 2mL 离心管。

相关试剂推荐货号

名称	货号	厂家
Cell Staining Buffer	E-CK-A107	Elabscience
DMEM 高糖	PM150210	Procell
Penicillin-Streptomycin Solution	PB180120	Procell
特级胎牛血清	164210	Procell
0.25%胰蛋白酶溶液(含 EDTA，溶于 PBS)	PB180225	Procell

其它相关检测产品

名称	货号	厂家
Cell Stimulation and Protein Transport Inhibitor Kit	E-CK-A091	Elabscience
APC Anti-Mouse CD206/MMR Antibody[C068C2]	E-AB-F1135E	Elabscience
APC Anti-Mouse CD163 Antibody[S15049F]	E-AB-F1295E	Elabscience
APC Anti-Mouse IL-6 Antibody[MP5-20F3]	E-AB-F1207E	Elabscience

实验操作指南

以下操作需在无菌条件进行。

➤ 试剂准备

- 20%灭活 FBS- DMEM 完全培养基的配制:** 在 DMEM 高糖基础培养基中(PM150210, Procell), 加入终浓度为 100 U/mL 的青霉素溶液和终浓度为 100 µg/mL 的链霉素溶液, 终浓度为 20%的灭活特优级胎牛血清(60°C 水浴锅中灭活 1 小时), 配制好后 4°C 分装保存, 1 个月内使用完毕。
- RAW 264.7 分化培养基的配制:** 使用 20%灭活 FBS- DMEM 全培养基稀释 RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×)到 1×, 即 50 mL 20%灭活 FBS- DMEM 全培养基中加入 50 µL RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×), 轻轻吹打混匀, 即为 RAW 264.7 分化培养基, 配制好的 RAW 264.7 分化培养基 4°C 保存, 2 周内使用完毕。

➤ RAW 264.7 的分化培养

- 收集细胞, 150g 离心 5 min, 小心弃去上清, 用 2 mL RAW 264.7 分化培养基重悬, 细胞计数, 用 RAW 264.7 分化培养基调整细胞密度到 2×10^5 /mL, 接种细胞到细胞培养皿中, 于 37°C 5% CO₂ 培养箱培养 48h。每日在显微镜下观察细胞状态并拍照。

注意: RAW 264.7 细胞生长较快, 建议铺板细胞密度不超过 4×10^5 /mL, 可根据细胞生长状态调整细胞密度, 使培养 48h 后细胞密度达到 90%左右为佳。细胞密度过高, 极化的 M1 巨噬细胞比例会有所降低。

- 在培养 48h 后, 将培养皿中的细胞培养液转移至 15mL 离心管, 加入 0.25%胰蛋白酶溶液(含 EDTA, 溶于 PBS)到培养皿中消化细胞 1-2 min(胰蛋白酶需将细胞完全覆盖), 加入 DMEM 完全培养基终止消化, 轻轻将贴壁细胞吹下来, 转移到 15 mL 离心管中, 即为 M1 型巨噬细胞。

注意: 此步骤结束后可在显微镜下观察培养皿中是否有细胞, 当细胞密度在 10%左右, 不再进行消化, 否则可再次消化。

- 250g 离心 5 min, 小心弃去上清, 使用 DMEM 完全培养基重悬, 细胞计数, 进行表型鉴定或进入下游实验。

➤ RAW 264.7 的 M1 型巨噬细胞的鉴定

以下操作可在非无菌条件下进行。

- 按照下表分组标记好离心管, 每管加入 100 µL RAW 264.7 细胞($2-5 \times 10^5$ 个细胞), 加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 PBS 缓冲液轻轻吹打混匀, 250g 离心 5 min, 弃上清, 加入 100 µL Cell Staining Buffer 或 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 每组加入 1 µL Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody(1mg/mL), 轻轻吹打混匀, 室温避光孵育 15 min 以封闭细胞表面的 FCR 受体, 再按照下表加入各流式抗体, 轻轻吹打混匀, 4°C 避光孵育 30 min;

目的	样本编号	染色设置
调电压	1-空白对照	Blank(空白管, 不加任何抗体)
Full Panel	2-同型对照	5 µL RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Isotype Cocktail
	3-检测管	5 µL RAW 264.7 Cell M1 Differentiation Detection Antibody Cocktail

- 孵育完成后, 每管加入 1 mL Cell Staining Buffer 轻轻吹打混匀, 250g 离心 5 min, 弃上清。
- 200 µL Cell Staining Buffer 重悬细胞沉淀, 上机检测。

For Research Use Only

结果展示

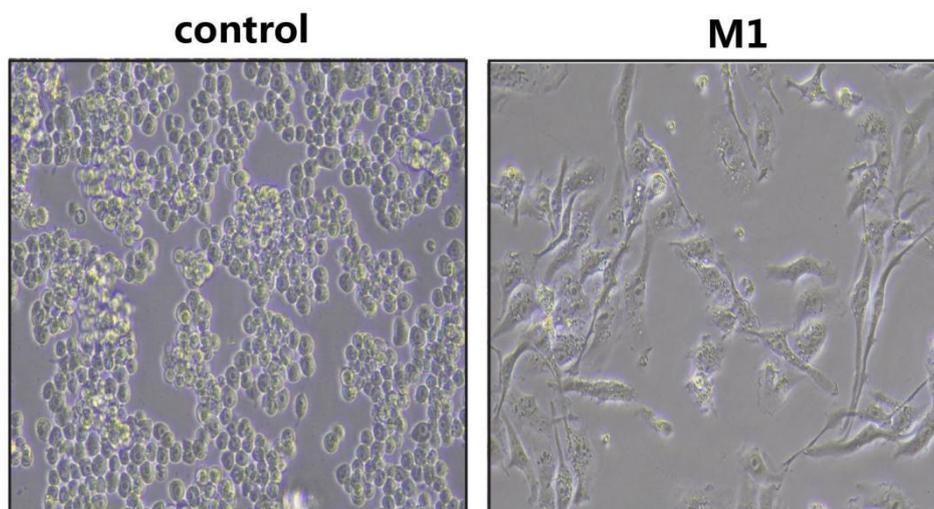
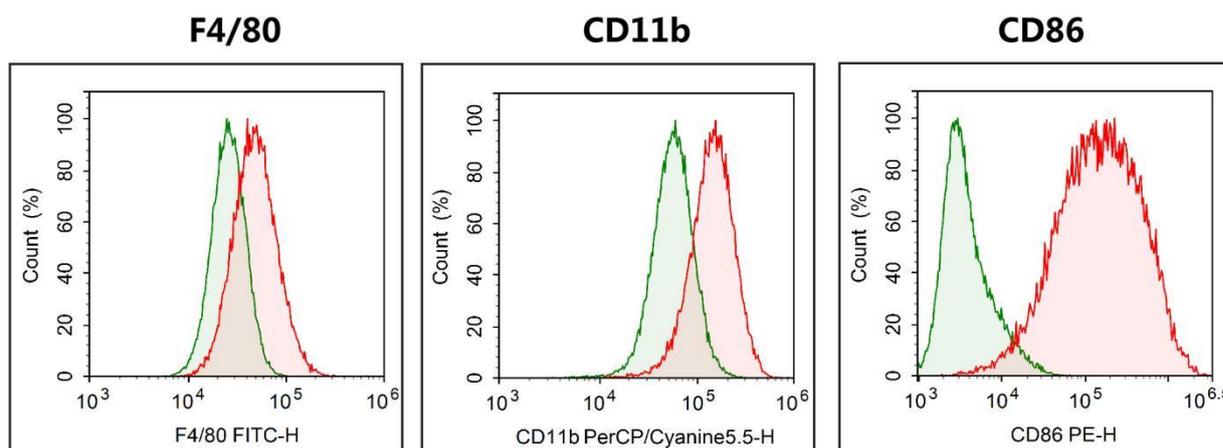


图 1. RAW 264.7 形态学观察：未处理的 RAW 264.7 (左) 细胞呈现出圆形或椭圆形的形态；RAW 264.7 分化的 M1 型巨噬细胞 (右) 呈现不规则形态，细胞质中含有颗粒状物质。



control: RAW 264.7 cells were cultured for 48h.

M1: RAW 264.7 Cells were cultured with RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX for 48h.

图 2. RAW 264.7 的 M1 型巨噬细胞表型分析：RAW 264.7 细胞用 RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×) 极化诱导 48h (M1-48h) 和未极化处理的空白 RAW 264.7 细胞 (control-48h) 培养 48h，流式细胞仪检测分析。

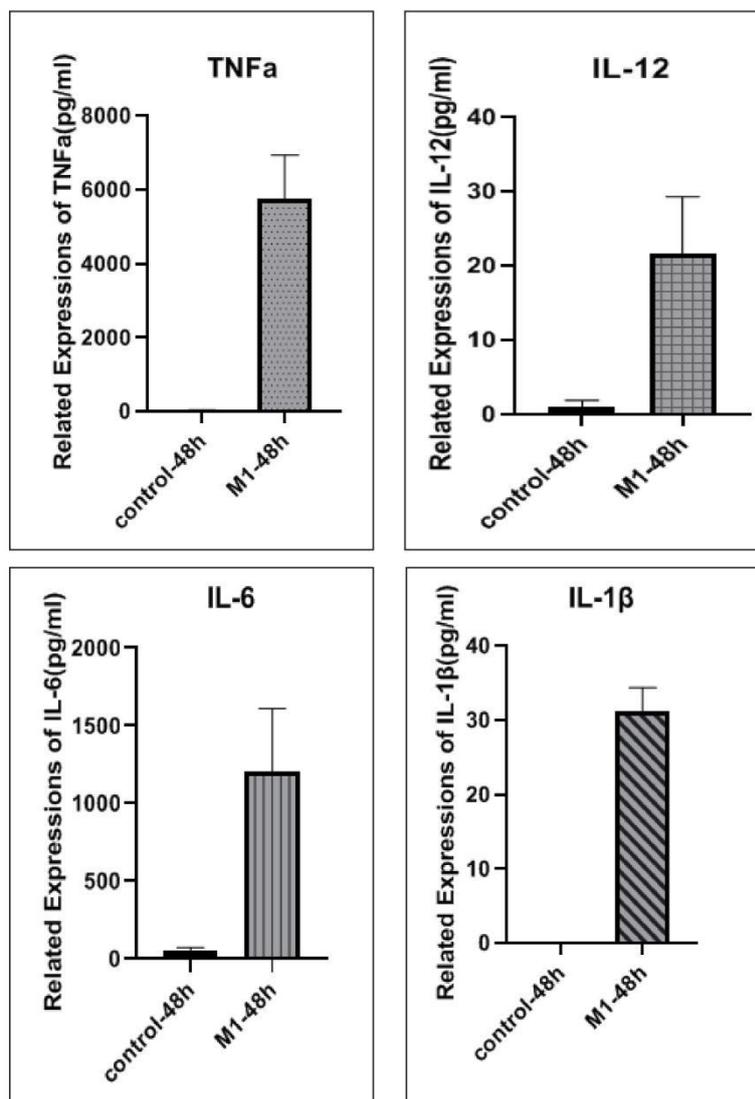


图 3. RAW 264.7 的 M1 型巨噬细胞的细胞因子表达分析：RAW 264.7 细胞使用 RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×)极化诱导 48h (M1-48h)和未极化处理的空白 RAW 264.7 细胞(control-48h)培养 48h 后收集上清，使用 Mouse TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha) ELISA Kit(E-EL-M3063)/Mouse IL-12(Interleukin 12) ELISA Kit(E-EL-M3062)/Mouse IL-6(Interleukin 6) ELISA Kit(E-EL-M0044)/Mouse IL-1 β (Interleukin 1 Beta) ELISA Kit(E-EL-M0037)检测并分析结果。

注意事项

1. 本产品仅供科研使用。
2. 为了您的安全与健康，请穿戴实验室工作服和一次性手套进行操作，并遵守实验室试剂操作规程。
3. 细胞的分化培养基不要长期保存，配制完成后建议 2 周内使用完毕，以避免培养基中某些成分失效。
4. RAW 264.7 Cell M1 Differentiation MIX(1000×)可稳定保存 1 年有效，若长期不用或者需要多次重复使用，建议分装后-80℃避光保存，以保证试剂更好的稳定性和有效性。
5. 离心机升速和降速过高会引起细胞的损失，为保证细胞的得率和状态，建议离心时调整离心机升速不大于 3，降速不大于 2，即 $Acc \leq 3$ ， $Dec \leq 2$ 。

For Research Use Only