

# Mouse Bone Marrow-derived Dendritic Cells (BMDC)

## Induction and Identification Kit

**Cat. No: XJM003****Size: 20/200 Assays**

产品编号	产品名称	20 Assays	200 Assays	Storage
XJM003A	Mouse DC Cell Differentiation MIX (1000×)	20 µL	200 µL	-20℃/-80℃,
XJM003B	Mouse DC Cell Maturation MIX (1000×)	10 µL	100 µL	shading light
E-AB-F0990F	PerCP Anti-Mouse MHC II (I-A/I-E)Antibody[M5/114]	250 µL	250 µL	
E-AB-F0991L	Elab Fluor® 488 Anti-Mouse CD11c Antibody[N418]	250 µL	250 µL	
E-AB-F0992H	PE/Cyanine7 Anti-Mouse CD80 Antibody[16-10A1]	250 µL	250 µL	
E-AB-F0994D	PE Anti-Mouse CD86 Antibody[GL-1]	250 µL	250 µL	
E-AB-F1028E	APC Anti-Mouse CD40 Antibody[FGK4.5/FGK45]	250 µL	250 µL	
E-AB-F09842F	PerCP Rat IgG2b,κIsotype Control[LTF-2]	100 µL	100 µL	2~8℃, shading light
E-AB-F09852L	Elab Fluor® 488 Armenian Hamster IgG Isotype Control[PIP]	100 µL	100 µL	
E-AB-F09852H	PE/Cyanine7 Armenian Hamster IgG Isotype Control[PIP]	100 µL	100 µL	
E-AB-F09832D	PE Rat IgG2a,κIsotype Control[2A3]	100 µL	100 µL	
E-AB-F09832E	APC Rat IgG2a,κIsotype Control[2A3]	100 µL	100 µL	
E-AB-F0997A	Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody[2.4G2]	50 µL	200 µL	
	说明书		1 份	

### 保存条件

Mouse DC Cell Differentiation MIX (1000×)和 Mouse DC Cell Maturation MIX (1000×)可在-20℃避光保存1年有效（建议分装避光保存于-80℃以延长有效期）；MHC II (I-A/I-E)和 CD11c 等流式抗体可在 2~8℃避光保存1年有效，避免冻存和反复冻融。

### 产品简介

树突状细胞（DC）是一组不同类型的造血细胞，在先天免疫系统和后天免疫系统之间起着通道的作用。它们起源于淋巴-骨髓造血作用，来源于骨髓。它们是功能最强大的抗原递呈细胞，DC 细胞是唯一能够显著刺激初始 T 细胞（Naive T 细胞）增殖的 APC，其他 APC（B 细胞和单核巨噬细胞等）仅能刺激已活化的或记忆性的 T 细胞。DC 是机体 T 细胞适应性免疫应答的始动者，在肿瘤免疫中也发挥着重要的作用。

虽然 DC 存在于体内多种组织中，但含量很少，无法满足科研和临床治疗的需求，需要在体外培养和扩增 DC，对于小鼠，常用的方法是从骨髓细胞诱导获得 DC，即骨髓来源的 DC，英文为 Bone Marrow-Derived Dendritic Cells。

本试剂盒提供一套完整的小鼠骨髓来源树突状细胞（BMDC）的分化培养和鉴定方案，涵盖小鼠骨髓

### For Research Use Only

细胞 DC 分化培养试剂、DC 促成熟试剂和细胞分型鉴定流式抗体，为小鼠骨髓来源树突状细胞（BMDC）的分化培养和鉴定提供稳定可靠的支持，提高了小鼠骨髓来源树突状细胞（BMDC）的培养和鉴定的效率及稳定性。

本试剂盒 1 assay 可配制 1 mL BMDC 分化培养基（24 孔板 1 mL/孔）和 0.5 mL BMDC 成熟培养基。200 assays 约可培养  $1 \times 10^7$  个小鼠骨髓细胞，经过 7 天纯化培养之后，可获得约  $1 \sim 3 \times 10^7$  个纯度为 70~80% 的未成熟的 DC 细胞，再经过 24h 成熟培养后，约可以获得  $1 \sim 3 \times 10^7$  个纯度为 80% 左右的成熟 DC 细胞。

## 自备试剂耗材及仪器

### ➤ 试剂

75%乙醇，RPMI 1640 基础培养基，优质胎牛血清，青霉素-链霉素溶液（双抗），L-丙氨酰-L-谷氨酰胺溶液，无菌去离子水，无菌 PBS。

### ➤ 仪器

水平离心机，CO<sub>2</sub> 培养箱，显微镜，流式细胞仪，生物安全柜，水浴锅，移液器。

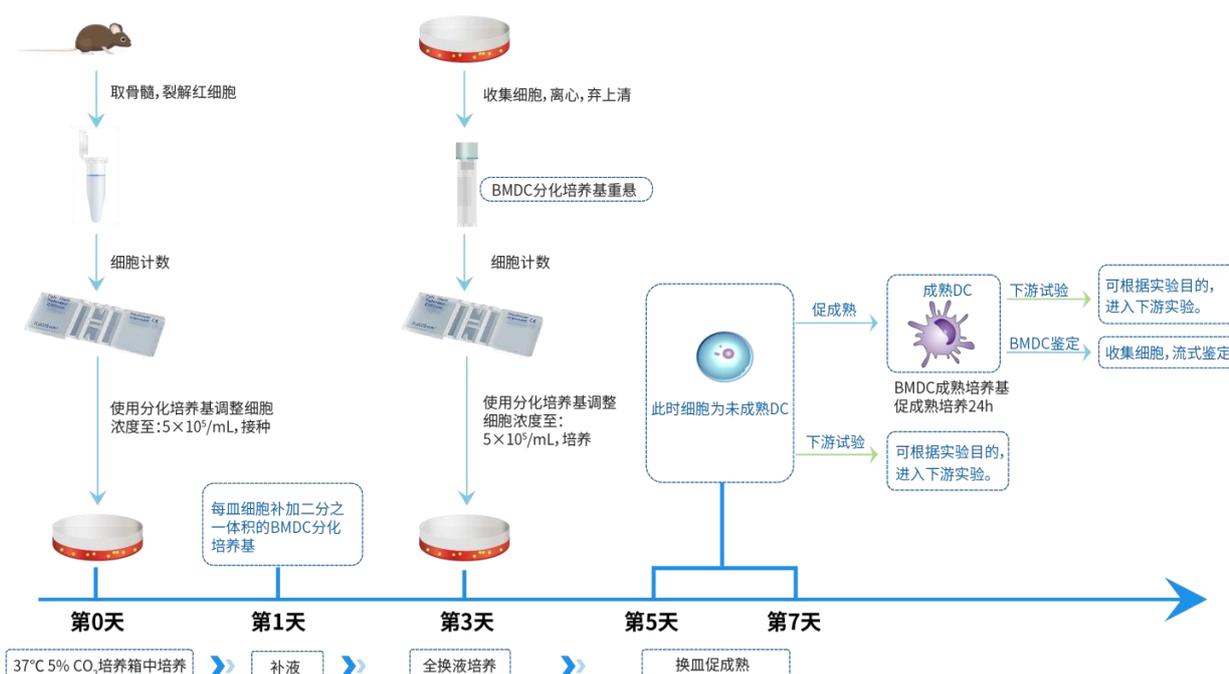
### ➤ 耗材

一次性无菌注射器，细胞培养皿，移液器吸头，实验小鼠，无菌 300 目尼龙滤膜，无菌 15/50 mL 离心管，眼科剪，眼科镊。

## 相关鉴定抗体和试剂参考

名称	货号	厂家
10×ACK Lysis Buffer	E-CK-A105	Elabscience
Cell Staining Buffer	E-CK-A107	Elabscience
RPMI 1640	PM150110	Pricella
L-Alanyl-L-Glutamine Solution	PB180419	Pricella
Penicillin-Streptomycin Solution	PB180120	Pricella
特级胎牛血清	164210	Procell

## 实验流程



For Research Use Only

## 实验操作指南

以下操作需在无菌条件进行。

### ➤ 试剂准备

- a) **BMDC 全培养基的配制**: 在 RPMI 1640 基础培养基中 (PM150114, Procell), 加入终浓度为 2 mM 的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺溶液, 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 10% 的特优级胎牛血清, 配制好后 4°C 分装保存, 1 个月内使用完毕。
- b) **BMDC 分化培养基的配制**: 使用 BMDC 全培养基稀释 Mouse DC cell Differentiation MIX(1000×)到 1×, 即 50 mL BMDC 全培养基中加入 50 µL Mouse DC cell Differentiation MIX(1000×), 轻轻吹打混匀, 即为 BMDC 分化培养基, 配制好的 BMDC 分化培养基 4°C 保存, 2 周内使用完毕。
- c) **BMDC 成熟培养基的配制**: 使用 BMDC 全培养基稀释 Mouse DC Cell Maturation MIX(1000×)到 1×, 即 50 mL BMDC 全培养基中加入 50 µL Mouse DC Cell Maturation MIX(1000×), 轻轻吹打混匀, 即为 BMDC 成熟培养基, 配制好的 BMDC 成熟培养基 4°C 保存, 2 周内使用完毕。
- d) **1× ACK Lysis Buffer 的配制**: 取出 4°C 预冷的 10×ACK Lysis Buffer (预先使用 0.22 µm 滤膜过滤除菌) 和无菌去离子水, 每 900 µL 无菌去离子水中加入 100 µL 10×ACK Lysis Buffer, 轻轻吹打混匀, 即为 1×ACK Lysis Buffer, 每只小鼠骨髓细胞配制 1 mL 1×ACK Lysis Buffer。(配制后 4°C 预冷暂存, 当天使用完毕)

### ➤ 小鼠骨髓单细胞悬液的制备

- a) 采用适当的方法处死小鼠, 75%乙醇浸泡 5 分钟, 无菌条件下, 取出双侧股骨和胫骨, 去除多余的肌肉等组织, 注意避免损伤骨骼。  
**注意: 若在非无菌条件下取骨髓, 则将完整的骨骼在 75%乙醇浸泡 3~5 分钟充分杀菌后进行后续实验。**
- b) 将股骨和胫骨置于盛有无菌 PBS 或 1640 基础培养基的培养皿中, 浸洗 2 次, 弃去洗液, 转移到新的盛有 1640 基础培养基的培养皿中。
- c) 剪断两侧骨髓端, 用 1 mL 注射器抽取 1 mL 1640 基础培养基, 将针头从骨两端插入骨髓腔, 轻轻冲洗出骨髓到培养皿中, 吸取新的培养基, 重复冲洗骨髓腔 2~3 次, 直至骨髓腔完全变白。
- d) 使用 1 mL 注射器吸取骨髓悬液中肉眼可见的细胞团块, 轻轻吹打 2~3 次以充分解离聚团细胞。  
**注意: 避免吹打次数过多引起细胞损伤。**
- e) 将制备好的单细胞骨髓悬液使用无菌 300 目尼龙滤膜过滤到 15 mL 离心管中, 150g 离心 3 分钟, 小心弃去上清。
- f) 每只小鼠骨髓细胞沉淀加入 1 mL 4°C 预冷的 1×ACK Lysis Buffer 重悬, 轻轻吹打混匀, 室温裂红 0.5~1 分钟, 迅速加入 10 mL 无菌 PBS 或 1640 基础培养基, 轻轻吹打混匀, 终止裂红, 150 g 离心 3 分钟, 小心弃去上清。
- g) 加入 5 mL BMDC 全培养基, 重悬细胞沉淀, 150 g 离心 3 分钟, 小心弃去上清。
- h) 加入 10 mL BMDC 分化培养基, 重悬细胞沉淀, 细胞计数, 即为小鼠骨髓单细胞悬液。  
**注: 每只小鼠约可获得  $1\sim 3\times 10^7$  个骨髓细胞。**

For Research Use Only

## ➤ BMDC 的分化培养

- a) **第 0 天:** 使用 BMDC 分化培养基调整细胞密度到  $5 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种细胞到细胞培养皿中, 于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养。
- b) **第 1 天:** 每皿细胞补加二分之一体积的 BMDC 分化培养基, 轻轻晃动培养基, 混匀细胞, 镜下观察细胞状态并拍照。
- c) **第 3 天:** 收集悬浮及疏松贴壁的细胞, 150g 离心 3 分钟, 小心弃去上清, 使用 BMDC 分化培养基重悬细胞沉淀, 调整细胞密度到  $5 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种细胞到新的细胞培养皿中, 于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱继续扩增培养。
- d) **第 5 天:** 收集悬浮及疏松贴壁的细胞, 细胞计数后, 150g 离心 3 分钟, 小心弃去上清, 使用 BMDC 分化培养基重悬细胞沉淀, 调整细胞密度到  $5 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种细胞到新的细胞培养皿中, 于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱继续扩增培养或进行下游实验。
- e) **第 5~7 天:** 细胞培养至第 5~7 天已形成不成熟的 DC 细胞, 可根据实验目的, 收集细胞进行计数, 进入下游实验或继续诱导成熟。

**注:** 在第 5~7 天的细胞扩增培养期, 细胞增殖很快, 若需持续培养, 可观察细胞培养密度和状态, 若培养基变色明显, 细胞聚团较多, 可每 24h 补充二分之一体积的分化培养基, 每 48h 全换液, 为细胞增殖提供充分的营养和生长环境, 延长培养时间有利于增加 DC 细胞的纯度, DC 细胞纯度可达 70~80%。

## ➤ BMDC 的成熟培养

- a) 收集培养第 5~7 天的悬浮及疏松贴壁的细胞, 细胞计数后, 150g 离心 3 分钟, 小心弃去上清, 使用 BMDC 成熟培养基重悬细胞沉淀, 调整细胞密度到  $5 \sim 8 \times 10^5/\text{mL}$ , 接种细胞到新的细胞培养皿中, 于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱继续培养 24h。
- b) 收集悬浮细胞及疏松贴壁的细胞, 即为成熟的 DC 细胞, 细胞计数, 进行表型鉴定或进入下游实验。

## ➤ BMDC 的鉴定

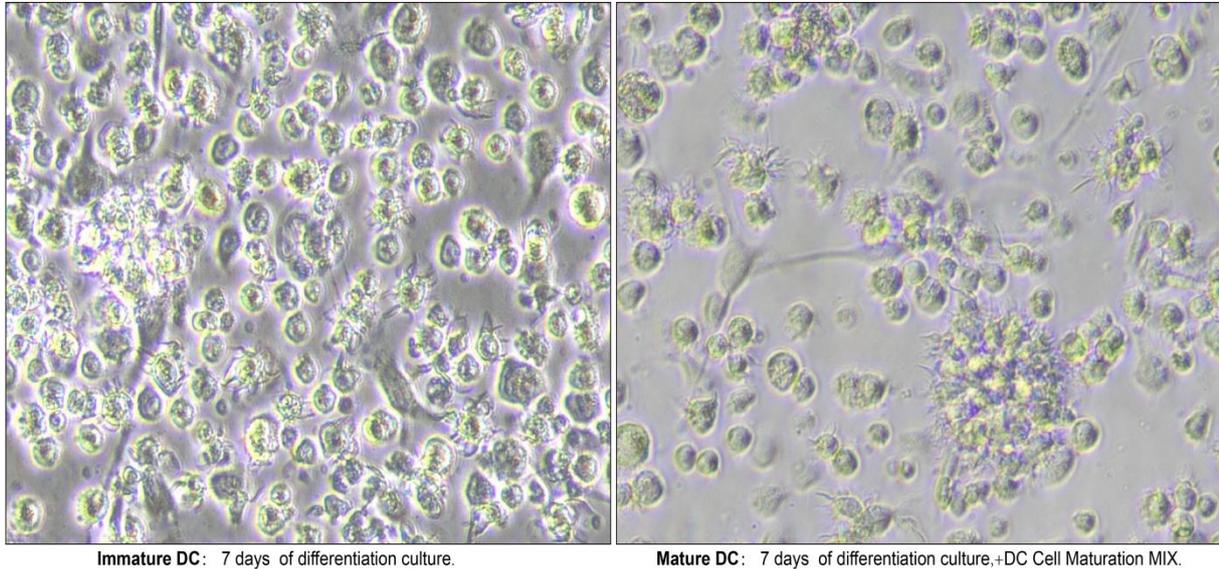
**以下操作可在非无菌条件下进行。**

- a) 按照下表分组标记好离心管, 每管加入 100  $\mu\text{L}$  未成熟或成熟的 DC 细胞 ( $1 \sim 5 \times 10^5$  个细胞), 加入 1 mL Cell Staining Buffer 或 PBS 缓冲液轻轻吹打混匀, 150g 离心 3 分钟, 弃上清, 加入 100  $\mu\text{L}$  Cell Staining Buffer 或 PBS 缓冲液重悬细胞沉淀, 每组加入 2  $\mu\text{L}$  Purified Anti-Mouse CD16/32 Antibody, 轻轻吹打混匀, 室温避光孵育 10 分钟以封闭细胞表面的 FCR 受体, 再按照下表加入各流式抗体 (5  $\mu\text{L}/\text{test}$ ), 轻轻吹打混匀,  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 分钟。

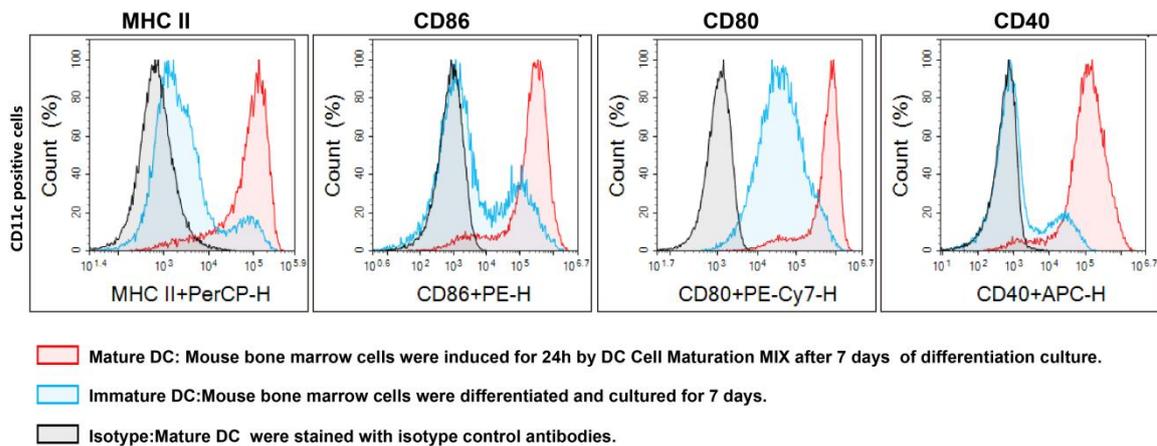
分组目的	样本编号	染色分组
调电压	1	Blank (空白管, 不加任何抗体)
调补偿 (单染管)	2	PerCP-MHC II
	3	Elab Fluor® 488-CD11c
	4	PE/Cyanine7-CD80
	5	PE-CD86
	6	APC-CD40
Full Panel	7-同型对照	PerCP-Rat IgG2b /ElabFluor®488-Armenian Hamster IgG / PE/Cyanine7-Armenian Hamster IgG/PE-Rat IgG2a/ APC-Rat IgG2a
	8-检测管	PerCP-MHC II/ElabFluor®488--CD11c/PE/Cyanine7-CD80/PE-CD86/ APC-CD40

- b) 孵育完成后，每管加入 1 mL Cell Staining Buffer 轻轻吹打混匀，150 g 离心 3 分钟，弃上清。
- c) 200  $\mu$ L Cell Staining Buffer 重悬细胞沉淀，上机检测。

## 结果展示



**图 1. BMDC 形态学观察：**未成熟 DC（左）细胞有少量树枝状突起，细胞聚团较少；成熟的 DC 细胞（右）树枝状突起增多，细胞聚团较多。



**图 2. BMDC 表型分析：**7 周龄雄性 C57/BL6 小鼠骨髓细胞分化培养 7 天和 7 天分化后促成成熟培养 1 天的流式对比检测图。

## 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. 6~8 周龄小鼠约可以获得  $1\sim 3\times 10^7$  个骨髓细胞，经过 7 天纯化培养之后，约可以获得  $3\sim 7\times 10^7$  个纯度为 70~80%左右的未成熟的 DC 细胞。
4. 建议选择 6~8 周龄健康小鼠，骨髓细胞的活性较好，培养的 DC 细胞状态更佳。老龄小鼠的骨髓细胞分化能力较差，获得的 DC 细胞相对纯度较低，细胞数较少。
5. 在第 4~7 天的细胞扩增培养期间，细胞增殖很快，若需持续培养，可观察细胞培养密度和状态，若培养基变色明显，细胞聚团较多，可每 24h 补液二分之一体积，48h 全换液，为细胞增殖提供充分的营养和生长环境，延长培养时间有利于增加 DC 细胞的纯度，DC 细胞纯度可达 70~80%。
6. 细胞促成熟时间不要太久，24h 最佳，促成熟后即可离心洗涤细胞后进行相关实验，避免细胞因过度激活而死亡。
7. 红细胞裂解时间为 0.5~1 分钟，应严格控制裂红时间不超过 1 分钟，避免裂红过度导致细胞损失或损伤，若离心后沉淀中红细胞较少，细胞沉淀为灰白色，则可不进行裂红，以保证收获更多的目的细胞。
8. Mouse DC Cell Differentiation MIX(1000×)和 Mouse DC Cell Maturation MIX(1000×)在 -20℃ 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。
9. 若操作过程导致 10× ACK Lysis Buffer 或者其他红细胞裂解液长菌，可使用无菌的 0.22μm 的滤膜过滤后再使用，不影响会用效果。
10. 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  $Acc \leq 3$ ， $Dec \leq 2$ 。
11. 用于不同细胞培养器皿的 BMDC 细胞培养条件参考下表：

细胞培养器皿	BMDC 分化/成熟培养基体积	细胞数目/孔
96 孔板	100 μL/孔	$5\times 10^4$
24 孔板	1 mL/孔	$5\times 10^5$
12 孔板	2 mL/孔	$1\times 10^6$
6 孔板	3 mL/孔	$1.5\times 10^6$
60 mm 细胞培养皿	5 mL/皿	$2.5\times 10^6$
100 mm 细胞培养皿	10 mL/皿	$5\times 10^6$