

# Bone Marrow Derived Macrophage isolation and differentiation

20210617 Quan HL

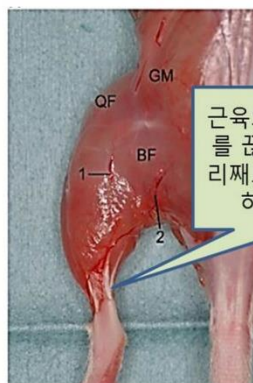
## ➤ Materials

- 부검도구: 포셉, 가위, 부검판, 압정
- 70% ethanol
- Petri dish
- 10mL 주사기, 26G needle
- PBS
- Plain DMEM or RPMI 배지
- 50 mL falcon tube
- Cell strainer
- Water bath
- ACK buffer (RBC lysis buffer): 50mM NH<sub>4</sub>CL 4g + 10mM KHCO<sub>3</sub> 0.5g + 0.1mM EDTA up to 500ml 3차 DW, filtering 하여 사용
- Centrifuge
- Complete growth medium: RPMI-1640 Medium + 10 % FBS (New zealand) + 1% PS (Penicillin – Streptomycin) + 20 mM L-glutamine
- 100 π culture dish

## ➤ Process

### Step 1: BMDMs isolation

- 마우스를 CO<sub>2</sub> chamber 에 넣고 안락사
- 몸통 전체에 70% ethanol 을 충분히 분무하여 적신 후 압정으로 사지를 부검판에 모두 고정
- 다리의 및 복부의 피부를 벗겨 근육과 복막이 드러나게 한 후, tibia 부터 femur 에 붙어 있는 모든 근육을 제거함. 이 때, 아킬레스건에 붙어 있는 인대를 포셉으로 잡고 끊어야 근육을 덩어리째로 통째로 드러내야 깔끔하게 제거할 수 있음. 이 때, tibia 에 붙어 있는 fibula 뼈도 근육과 함께 제거함.

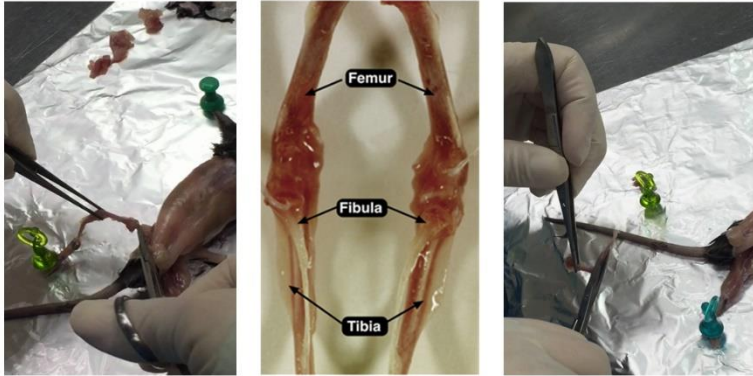


근육의 기시부인 인대를 끊어, 근육을 덩어리째로 드러내야 깔끔하게 제거 가능



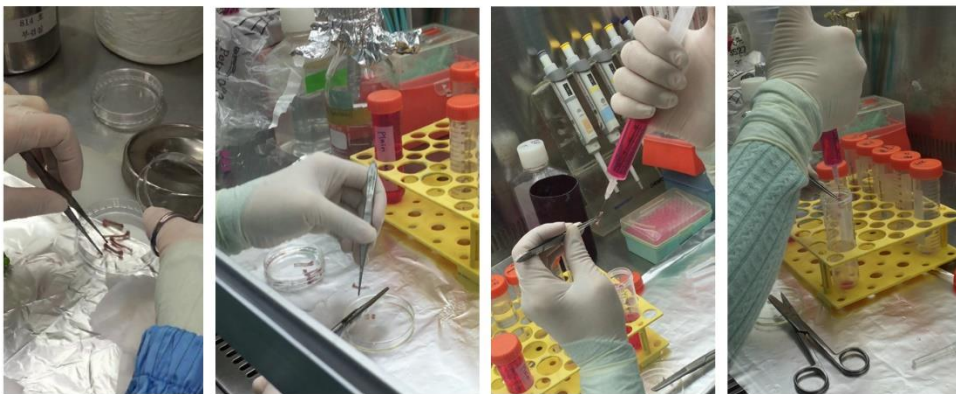
(송주하 작성 한 protocol 에서)

- 고관절 부분이 잘 보일 수 있도록 가위와 포셉으로 근육을 제거한 후, 포셉으로 femur의 골두 부분의 관절을 꺾어 acetabulum에서 분리될 수 있도록 하며, 발목관절도 꺾어 tibia와 femur가 함께 분리될 수 있도록 함. 분리된 tibia와 femur도 관절을 꺾어 분리시킴.



(송주하 작성 한 protocol 에서)

- 분리한 뼈를 작은 petri dish에 넣고 얼음 위에 올려놓은 상태에서 cell bench로 옮김.
- 10ml 주사기에 needle은 26G 짜리 (1ml 주사기용)로 바꾸고 plain DMEM 또는 RPMI 배지를 담아 4-5개 (총 40-50ml)를 준비해 놓음 (마우스 한 마리 당 배지 약 50ml).
- 뼈를 PBS가 든 petri dish에 2번 washing.
- 뼈의 양 단을 가위로 조금씩 잘라주는데, 너무 많이 자르면 골단에 있는 골수가 모두 날라가 버리므로 조금씩만 잘라 줌. Tibia와 관절을 이루고 있던 femur의 digital 부위 머리 부분을 가위로 잡고 뒤집으면 femur의 관절 모양이 드러남.
- 주사기 needle을 뼈에 꽂아 flushing 함. 뼈가 거의 하얀색으로 변할 때까지 뼈를 뒤집어 가며 flushing 해 줌.



(송주하 작성 한 protocol 에서)

- cell strainer (pore size 70 $\mu$ m)를 새로운 50mL falcon tube의 입구에 끼워 넣고, pipette aid를 이용하여 골수 cell을 모아 놓은 배지를 suspension 시킨 후 cell strainer에 통과시켜 뼈 조각이나 결합조직을 거르고 centrifuge 1300 rpm 4 $^{\circ}$ C 5분.

- 상층액을 빨아들여 버리고, cell 과 함께 섞여 있는 RBC 를 없애기 위해 ACK 용액을 6 mL 로 pellet 을 부유시킨 후 37 water bath 에서 3 분간 계속 흔들어서 적혈구를 용해시킴.
- PBS 를 50 mL 까지 넣어 채우고 1300 rpm 5 분 centrifuge.
- Complete medium 10 mL 로 suspension 시켜 모든 cell 을 한 tube 에 모음.
- 100 $\pi$  dish 에 complete medium 으로 희석된 GM-CSF/M-CSF 를 배지를 10 mL 넣음.

- ✓ M1  $\Phi$ 로 분화 위해서는 GM-CSF 25ng/ml
- ✓ M2  $\Phi$ 로 분화 위해서는 M-CSF 20ng/ml or L929배지 20%

- 세포를 10<sup>7</sup> cells/100 $\pi$  개씩 넣어 줌.
- GMM 의 경우 배지를 3 일째에만, MM 의 경우 3 일째, 5 일째에 PBS washing 없이 GM-CSF/M-CSF 가 들어 있는 새로운 배지로 교체해줌.
- 7 일째의 GMM/MM 세포를 PBS washing 두 번 후, PBS 10ml 넣고 37°C 인큐베이터에 10 분 동안 incubation.
- Cell scraper 로 긁어서 세포를 떼어낸 후 실험하고자 하는 세포에 seeding 함
- 실험 컨셉에 따라 5 일째에 세포를 떼어 새로운 GM-CSF/M-CSF 와 함께 seeding 하기도 함.
- 마우스 한 마리당 2~3X10<sup>7</sup>개의 BMDM 을 분리 가능함.