

## THP-1 成破骨诱导分化与检测试剂盒

### 使用说明书

#### 产品内容

THP-1 成破骨诱导分化与检测试剂盒		
细胞	THP-1	T25*1
成破骨诱导液	THP-1 完全培养基	150mL
	成破骨诱导添加物 A	5μL
	成破骨诱导添加物 B	50μL
	成破骨诱导添加物 C	25μL
TRAP 染色试剂盒	反应缓冲液	20mL
	副品红溶液	1mL
	亚硝酸钠溶液	1mL
	AS-BI 磷酸盐底物溶液	1mL

#### 产品简介

破骨细胞（Osteoclast，OC）是骨吸收的主要功能细胞，在骨发育、生长、修复、重建中具有重要的作用。破骨细胞起源于血系单核-巨噬细胞系统，是一种特殊的终末分化细胞，它可由其单核前体细胞通过多种方式融合形成巨大的多核细胞。破骨细胞活性一旦异常，就会导致平衡被打破，从而引发骨质疏松和骨质增生等代谢性骨疾病。因此，破骨细胞的体外培养与研究对于临床疾病的研究非常重要。

抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate resistant acid phosphatase，TRAP）是破骨细胞的标志性酶，特异性分布于破骨细胞中。TRAP 染色试剂盒即是用于显示组织中的破骨细胞。其中基本原理在于，在含酒石酸的酸性条件下，抗酒石酸酸性磷酸酶 TRAP 能将萘酚 AS-BI 磷酸盐水解，产生的萘酚 AS-BI 与六偶氮副品红结合，形成非水溶性的酒红色物质沉积在酶活性原位，从而实现对抗酒石酸酸性磷酸酶的显色和定位。

#### 特点优势

诱导分化程序简单便捷

成破骨诱导效率高

#### 质量控制

本产品已经过无菌检测、pH 测试、渗透压检测、内毒素检测。

**声明：**本产品供科学研究和生产使用，用于组织和细胞的体外培养；禁止临床使用。

## 成巨噬细胞诱导分化完全培养基液的配制方法

1. 配制前将成破骨诱导添加物 A 放置于室温 ( $>20^{\circ}\text{C}$ ) 冰箱内完全融化。
2. 用 75% 医用酒精擦拭消毒试剂盒中各瓶/管表面。
3. 取 50mL THP-1 完全培养基, 然后将成破骨诱导添加物 A 全部加入 THP-1 完全培养基中。
4. 轻轻颠倒摇晃配制好的成巨噬细胞诱导分化完全培养基, 使其混合均匀。

## 成破骨诱导分化完全培养基液的配制方法

1. 配制前将成破骨诱导添加物 B 和成破骨诱导添加物 C 放置于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱内完全融化。
2. 用 75% 医用酒精擦拭消毒试剂盒中各瓶/管表面。
3. 取 100mL THP-1 完全培养基, 然后将成破骨诱导添加物 B 和成破骨诱导添加物 C 全部加入 THP-1 完全培养基中。
4. 轻轻颠倒摇晃配制好的成破骨诱导分化完全培养基, 使其混合均匀。

**特别建议:** 如短时间内无法使用完全部的培养基, 建议按照上述配方比例分批配制; 剩余成分可以分装为合格规格, 按各自保存条件储存, 切勿反复冻融。

## 成破骨诱导分化操作规程 (以 12 孔板为例)

1. 当 THP-1 细胞融合度达到 80-90% 时, 收集细胞并计数;
2. 使用  $37^{\circ}\text{C}$  预热的成巨噬细胞诱导分化培养基重悬细胞, 按照  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells/孔密度进行铺板, 每孔加入 1mL 成巨噬细胞诱导分化培养基。
3. 将细胞置于  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中进行培养 48h。
4. 48h 换液, 换成  $37^{\circ}\text{C}$  预热的成破骨诱导分化培养基, 每孔 1mL。
5. 成破骨诱导培养过程中, 每隔 1 天, 吸去孔板中的诱导液, 加入预热好的新鲜的成破骨诱导分化完全培养基;
6. 诱导分化 4-10 天, 可观察到成熟的多核破骨细胞。
7. 诱导完成后即可进行染色或者下一步实验。

## TRAP 染色

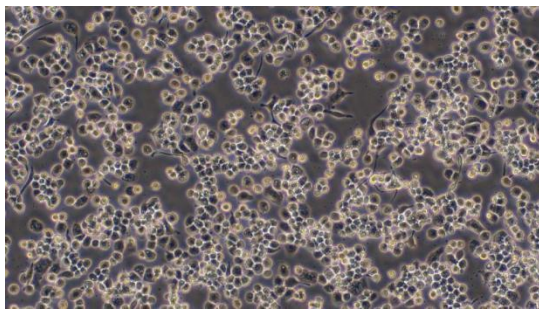
### 配制 TRAP 工作液

1. 取 50  $\mu\text{L}$  副品红溶液与 50  $\mu\text{L}$  亚硝酸钠溶液在洁净离心管中混匀，得到六偶氮副品红溶液；
2. 向第 1 步的 100  $\mu\text{L}$  六偶氮副品红溶液中加入 100  $\mu\text{L}$  AS-BI 磷酸盐底物溶液，吹吸数次充分混匀。
3. 吸取 1.8 mL 反应缓冲液加入到第 2 步的混合液中充分混匀；
4. 第 3 步的混合液经针式滤器过滤（0.45  $\mu\text{m}$  水系滤膜）即得到 TRAP 工作液。

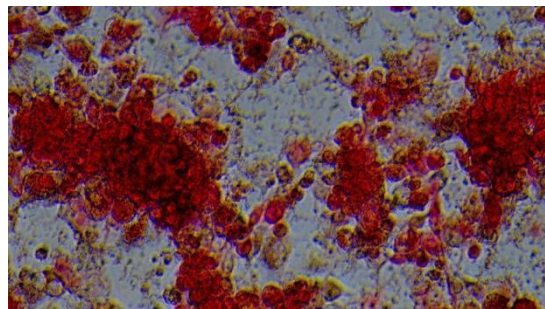
**注意：**务必按照所属顺序配制工作液。每个组织点大约需要 200-300  $\mu\text{L}$  工作液，根据使用量配制，现配现用，避免浪费。

### 染色操作

1. 细胞固定：吸除成破骨诱导培养基，加入 4%多聚甲醛室温固定 15~30 min，蒸馏水洗 3 次。
2. 细胞破膜：（不做细胞核染色，可不作此步骤）以 0.2% Triton X-100 溶液覆盖细胞进行破膜处理 20~30 min，蒸馏水轻洗 3 遍。
3. 孵育染色：将 TRAP 工作液加到细胞孔板内覆盖细胞，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1~2h，蒸馏水洗 3 次。
4. 细胞核复染（可选，自备相关试剂）：吸除孵育液并水洗，以苏木素染液进行染核。
5. 显微镜下观察，拍照。



THP-1成巨噬细胞诱导效果



THP-1成破骨诱导6d染色效果

## 保存条件

试剂名称	保存条件	有效期
THP-1 完全培养基	2-8℃	6 个月
成破骨诱导添加物 A	-20℃	1 年
成破骨诱导添加物 B	-20℃	1 年
成破骨诱导添加物 C	-20℃	1 年
THP-1 成破骨诱导分化完全培养基	2-8℃	1 个月
反应缓冲液	2-8℃	1 年
副品红溶液	2-8℃	1 年
亚硝酸钠溶液	2-8℃	1 年
AS-BI 磷酸盐底物溶液	-20℃	1 年

## 注意事项

- 1、本产品所有组分均为无菌包装，在使用过程中请注意无菌操作，避免微生物污染；若配制过程有污染风险，可将完全培养基过滤除菌。
- 2、本产品发货时使用冰袋运输，若收到货后暂时不使用，请按照保存条件将各组分保存。
- 3、为了您的安全和健康，操作时请穿着实验服并佩戴一次性手套。