



TRAP Staining Kit

Catalog No. AK04F

July 1, 2024

Introduction

The TRAP Staining Kit (Cat.No.AK04F) is used for the staining of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase in osteoclasts. Bone mass is controlled by the balance between the activity of osteoblasts bone formation and the activity of osteoclasts. Alkaline phosphatase (ALP: ALP staining kit, Cat.No.AK20) and tartrate-resistant acid phosphate are used as markers for osteoblasts and osteoclasts, respectively.

Components

Component	Quantity	Storage
Tartrate-containing Buffer	50mL	4°C (Do Not Freeze)
Chromogenic Substrate	10vials	4°C

One kit contains reagents for 10 × 96-well plates

Additional Materials Required

- 10% Formalin Neutral Buffer Solution
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Distilled or deionized water

Protocol (96-well plate format)

1. Remove culture medium. Wash each well once with 100uL of PBS.
2. Add 50uL of the 10% Formalin Neutral Buffer Solution to each well and fix for 5 minutes at room temperature.
3. Wash each well with 250uL of deionized water. (× 3 times)
4. Dissolve 1 vial of Chromogenic Substrate with 5mL of Tartrate-containing Buffer.
5. Add 50uL of Chromogenic Substrates to each well.
6. Incubate at 37°C for 20-60 minutes. Adjust incubation time until stained TRAP is clearly showing the result in figure 1.
7. Wash with deionized water to stop the reaction.

Note: Excess incubation will be cause of over stained.

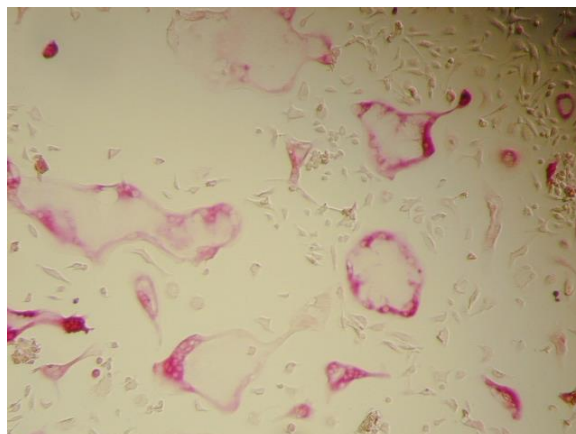


Figure 1: TRAP staining of Osteoclast

References

- (1) Sunao Takesita, Keisuke Kaji, Akira Kudo. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* Volume 15, Number 8 (2000). 1477-1488.
- (2) BEN A. A. SCHEVEN, JONE S. MILNE, SIMON P. ROBINS. A SEQUENTIAL CULTURE APPROACH TO STUDY OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FROM NONADHERENT PORCINE BONE MARROW CELLS. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* July-August (1998). *Animal* 34: 568-577.
- (3) Martha J. Somerman, Janice E. Berry, Zhila Khalkhali-Ellis, Philip Osdoby, Robert U. Simpson. Enhanced Expression of α_v Integrin Subunit and Osteopontin during Differentiation of HL-60 Cells along Monocytic Pathway. *EXPERIMENTAL CELL RESEARCH* 216, 335-341(1995).
- (4) Ichiro Itonaga, Afsie Sabokbar, Susan D. Neale, Nicholas A. Athanasou. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Prostaglandin E₂ Act Directly on Circulating Human Osteoclast Precursors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 590-595(1999).
- (5) Hiroshi Takayanagi, Kouetsu Ogasawara, Shigeaki Hida, Tomoki Chiba, Shigeo Murata, Kojiro Sato, Akinori Takaoka, Taeko Yokochi, Hiromi Oda, Keiji Tanaka, Kozo Nakamura and Tadatsugu Taniguchi. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . *Nature*, Vol. 408, No.6812, 600-605, 30 November 2000.
- (6) Morinobu, A., Biao, W., Tanaka, S., Horiuchi, M., Jun, L., Tsuji, G., Sakai, Y., Kurosaka, M., Kumagai, S. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Osteoclast Differentiation and Ameliorates Experimental Arthritis in Mice. *Arthritis Rheum.* 58, 2012-2018 (2008)
- (7) Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Sakurai, D., Kobata, T. Coculture of Osteoclast Precursors With Rheumatoid Synovial Fibroblasts Induces Osteoclastogenesis via Transforming Growth Factor beta-Mediated Down-Regulation of Osteoprotegerin. *Arthritis Rheum.* 58, 3356-3365 (2008)
- (8) Cao, H., Kuboyama, N. A Biodegradable Porous Composite Scaffold of PGA/beta-TCP for Bone Tissue Engineering. *Bone.* 46, 386-395 (2010)
- (9) Okada, Y., Hamada, N., Kim, Y., Takahashi, Y., Sasaguri, K., Ozono, S., Sato, S. Blockade of Sympathetic beta-receptors Inhibits Porphyromonas Gingivalis-induced Alveolar Bone Loss in an Experimental Rat Periodontitis Model. *Arch. Oral Biol.* 55, 502-508 (2010)
- (10) Okamoto, A., Ohnishi, T., Bandow, K., Kakimoto, K., Chiba, N., Maeda, A., Fukunaga, T., Miyawaki, S., Matsuguchi, T. Reduction of Orthodontic Tooth Movement by Experimentally Induced Periodontal Inflammation in Mice. *Eur. J. Oral Sci.* 117, 238-247 (2009)



一般研究用キット

TRAP 染色キット

(TRAP Staining kit, 品番 : AK04F)

2024年7月1日改訂

※本品は、研究目的にのみご使用ください。

骨の内部では、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収とのバランスによって骨量のコントロールがおこなわれ、常に再構築（リモデリング）しています。骨芽細胞のマーカー酵素はアルカリ性ホスファターゼであるに対して、破骨細胞のマーカー酵素は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Tartrate-Resistant Acid Phosphatase ; TRAP）です。

本キットは、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを簡便に検出できるように構成した染色キットで、破骨細胞の検定等に用いてください。

《I-1. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度
50mM 酒石酸含有緩衝液、pH 5.0 Tartrate-containing Buffer	50 mL	1 本	4~10°C (禁凍結)
発色基質 Chromogenic Substrate	5mL 用	10 本	4~10°C

※本製品は、96well プレート 10 枚分を染色することができます。

※お客様にご用意していただく試薬は、固定液（下記説明）、PBS、精製水を別途にご用意願います。

《I-2. キットの特徴》

- ・培養した破骨細胞を染色するのに必要な試薬類がパッケージングしている。
- ・簡便に破骨細胞を染色することができる。

《II. 固定液の調製》

固定液調整法

37%ホルムアルデヒド液（ホルマリン原液）	100 mL
精製水	900 mL
りん酸 2 水素ナトリウム・1 水和物 (NaH ₂ PO ₄ ・H ₂ O)	4 g
りん酸水素 2 ナトリウム・無水 (Na ₂ HPO ₄)	6.5 g

市販試薬をご購入の場合は、10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業株式会社製、組織固定用 1 L、Cat.No.062-01661 または同等品）にて使用可能です。

《Ⅲ. 染色方法 —96well プレートを使用した場合—》

- (1) 破骨前駆細胞を 96well プレートで培養し、破骨細胞を形成させて下さい
- (2) 培養液を除去後、1well あたり PBS 100 μ L で 1 回洗浄してください。
- (3) 1 well あたり固定液 50 μ L 加え、室温で 5 分間固定してください。
※固定時間を 5 分以上行った場合、検出できなくなる可能性がありますのでご注意ください
- (4) 固定液を除去し、1 well あたり精製水 250 μ L で 3 回洗浄してください。
- (5) 発色基質・1 本に緩衝液 5ml を加え溶解し、1well あたり 50 μ L 加えてください。
※溶解済みの発色基質は保存できません。用時調製です。
※ 発色基質が溶けにくい場合は、ボトルごと超音波洗浄機に数秒間浸けて溶解してください。
沈殿が認められる場合は、ろ過（孔径 0.5 μ m 程度）もしくは溶液を遠心しその上清を使用してください。
- (6) 37°C で 20~60 分加熱してください。図 1 に示したように、破骨細胞の TRAP 活性によって赤く染色されます。
- (7) 十分に発色しましたら、精製水でウェル内を洗浄し反応を止めてください。
※長時間加熱した場合、発色基質に沈殿が生じます。沈殿形成前に反応を止めることをお勧めします。

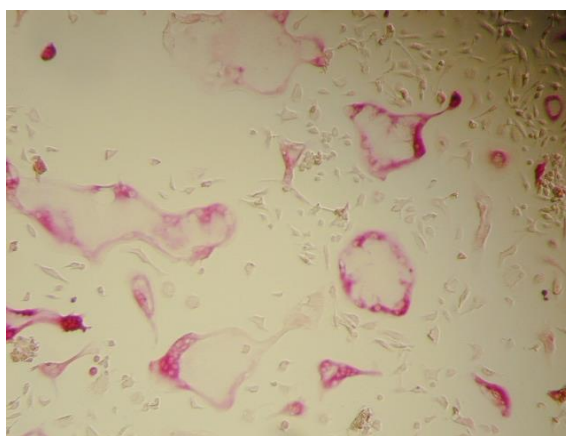


図 1. TRAP 染色による破骨細胞

《IV. 参考文献》

- (1) Sunao Takesita, Keisuke Kaji, Akira Kudo. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH Volume 15, Number 8 (2000). 1477-1488.
- (2) BEN A. A. SCHEVEN, JONE S. MILNE, SIMON P. ROBINS. A SEQUENTIAL CULTURE APPROACH TO STUDY OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FROM NONADHERENT PORCINE BONE MARROW CELLS. In Vitro Cell. Dev. Biol. July-August (1998). Animal 34: 568-577.
- (3) Martha J. Somerman, Janice E. Berry, Zhila Khalkhali-Ellis, Philip Osdoby, Robert U. Simpson. Enhanced Expression of α_v Integrin Subunit and Osteopontin during Differentiation of HL-60 Cells along Monocytic Pathway. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 216, 335-341(1995).
- (4) Ichiro Itonaga, Afsie Sabokbar, Susan D. Neale, Nicholas A. Athanasou. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Prostaglandin E₂ Act Directly on Circulating Human Osteoclast Precursors. Biochemical and Biophysical Research Communications 264, 590-595(1999).
- (5) Hiroshi Takayanagi, Kouetsu Ogasawara, Shigeaki Hida, Tomoki Chiba, Shigeo Murata, Kojiro Sato, Akinori Takaoka, Taeko Yokochi, Hiromi Oda, Keiji Tanaka, Kozo Nakamura and Tadatsugu Taniguchi. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ . Nature, Vol. 408, No.6812, 600-605, 30 November 2000.
- (6) Morinobu, A., Biao, W., Tanaka, S., Horiuchi, M., Jun, L., Tsuji, G., Sakai, Y., Kurosaka, M., Kumagai, S. (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Osteoclast Differentiation and Ameliorates Experimental Arthritis in Mice. Arthritis Rheum. 58, 2012-2018 (2008)
- (7) Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Sakurai, D., Kobata, T. Coculture of Osteoclast Precursors With Rheumatoid Synovial Fibroblasts Induces Osteoclastogenesis via Transforming Growth Factor beta-Mediated Down-Regulation of Osteoprotegerin. Arthritis Rheum. 58, 3356-3365 (2008)
- (8) Cao, H., Kuboyama, N. A Biodegradable Porous Composite Scaffold of PGA/beta-TCP for Bone Tissue Engineering. Bone. 46, 386-395 (2010)
- (9) Okada, Y., Hamada, N., Kim, Y., Takahashi, Y., Sasaguri, K., Ozono, S., Sato, S. Blockade of Sympathetic beta-receptors Inhibits Porphyromonas Gingivalis-induced Alveolar Bone Loss in an Experimental Rat Periodontitis Model. Arch. Oral Biol. 55, 502-508 (2010)
- (10) Okamoto, A., Ohnishi, T., Bandow, K., Kakimoto, K., Chiba, N., Maeda, A., Fukunaga, T., Miyawaki, S., Matsuguchi, T. Reduction of Orthodontic Tooth Movement by Experimentally Induced Periodontal Inflammation in Mice. Eur. J. Oral Sci. 117, 238-247 (2009)