



Alkaline Phosphatase Staining Kit

Catalog No. AK20

March 31, 2020

Introduction

The Alkaline Phosphatase Staining Kit (Cat.No. PMC-AK20-COS) is used for the staining of alkaline phosphatase in osteoblasts. Bone mass is controlled by the balance between the activity of osteoblasts bone formation and the activity of osteoclasts.

Alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphate (TRAP: TRAP staining kit, # PMC-AK04F-COS) are used as markers for osteoblasts and osteoclasts, respectively.

Components

Component Quantity Storage

Substrate-containing Buffer 50mL 4°C

Chromogenic Substrate 10vials 4°C

One kit contains reagents for 10 × 12-well plates

Additional Materials Required

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

Protocol (12-well plate format)

1. Remove culture medium. Wash each well three times with 1mL of PBS.
2. Add 500uL of the 10% Formalin Neutral Buffer Solution to each well and fix for 20 minutes at room temperature.
3. Remove 10% Formalin Neutral Buffer Solution. Wash each well with 2mL of deionized water. (× 3 times)
4. Dissolve 1 vial of Chromogenic Substrate with 5mL of Substrate-containing Buffer.
5. Add 400uL of Chromogenic Substrates to each well.
6. Incubate at 37_ for 5-20 minutes. Adjust incubation time until stained ALP is clearly showing the result
7. in figure 1.
8. Wash with deionized water to stop the reaction.

Note: Excess incubation will be cause of over stained.

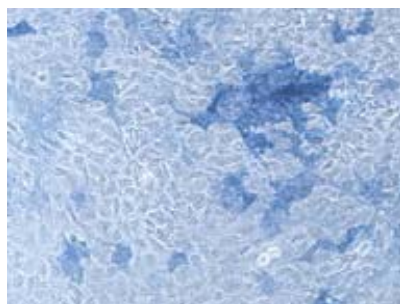


Figure 1: ALP staining of 3T3-E1

References

(1) A. S. H. De Jong, M. Van Kessel-Van Vark and A. K. Raap.

Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. The Histochemical Journal Volume 17, 1119-1130 (1985)

Notice to Purchaser

This product is to be used for Research Purposes Only. It is not to be used for Drug or Diagnostic Purposes, nor is it intended for Human Use. Primary cell products may not be resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products without the express written consent of Primary Cell Co., Ltd.

Except as otherwise expressly set forth in this use manual, Primary Cell does not make any representation or warranties or conditions of any kind, either express or implied, with respect to the products, or information disclosed hereunder, including, but not limited to, the implied warranties of merchantability, fit for a particular purpose, or noninfringement of the intellectual property rights of third parties.



COSMO BIO Co., LTD.

[JAPAN]

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN

Phone: +81-3-5632-9610

FAX: 81-3-5632-9619

URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>



COSMO BIO USA

[Outside Japan]

2792 Loker Ave West, Suite 101
Carlsbad, CA 92010, USA

email: info@cosmobiousa.com

Phone/FAX: (+1) 760-431-4600

URL: www.cosmobiousa.com

[For research use only. Not for clinical diagnosis.]



一般研究用キット

アルカリホスファターゼ染色キット (Alkaline Phosphatase Staining kit, Code No. AK20)

2020年3月31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。破骨細胞のマーカ酵素は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Tartrate-Resistant Acid Phosphatase ; TRAP）であるに対して、骨芽細胞のマーカ酵素はアルカリホスファターゼ(Alkaline phosphatase, ALP)です。

本キットは、アルカリ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、骨芽細胞などの検出に用いてください。

《I-1. キット構成》

内 容	容量	本数	保存温度	取扱上の注意
基質緩衝液 Substrate-containing Buffer	50 mL	1 本	4~10°C (禁凍結)	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
発色基質 Chromogenic Substrate	5mL 用	10 本	4~10°C	

※本製品は、12well 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》

- ・簡便にアルカリホスファターゼを細胞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 -12well プレートを使用した場合-》

- (1) 12well プレートで培養した細胞をご用意ください。
- (2) 培養液を除去後、1well あたり PBS 1mL で3回洗浄してください。
- (3) 1 well あたり固定液 500 μ L 加え、室温で20分間固定してください。
- (4) 固定液を除去し、1 well あたり精製水 2mL で3回洗浄してください。
- (5) 発色基質 1本に対して基質緩衝液 5mL を加え溶解し、1well あたり 400 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 $^{\circ}$ C で5~20分加温してください。ALP 活性がある部分は図1に示したように青く染色されます。
- (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。

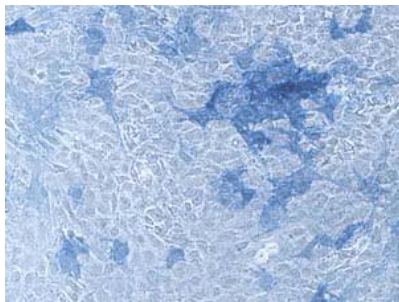


図1. 3T3-E1 細胞をアルカリホスファターゼ染色キットで染色

《Ⅳ. 関連製品の紹介》表に記載した製品は一部になります。詳しくは web からご覧ください。

石灰化染色キット

特徴

- ・石灰化した骨結節を赤く染色できる。
- ・骨芽細胞、3T3-E1 細胞などから形成されたカルシウム沈着を検出するのに最適。

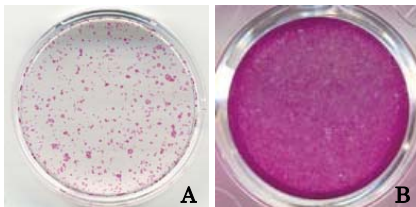


図 培養細胞を石灰化染色キットで検出した写真

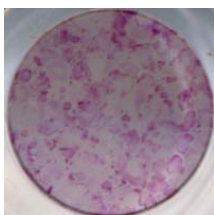
- A. 骨形成メディウム(Code: OGCMO)で培養した 3T3-E1 細胞 (35mm Dish で培養)
- B. 骨形成培養キット(Code: OGC11)で培養した細胞 (24well プレートで培養)

品名	商品コード	内容	包装
石灰化染色キット	AK21	・緩衝液 ・染色基質	24well プレート×10 回分

TRAP 染色キット

特徴

- ・酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase)を赤く染色できる。
- ・TRAP を酵素マーカーとする破骨細胞の検出に最適。



破骨細胞 (Code: OSC02)を TRAP 染色キットで染色 (96well プレートで培養)

品名	商品コード	内容	包装
TRAP 染色キット	AK04F	・50mM 酒石酸含有緩衝液 ・発色基質	96well プレート×10 回分

骨関連培養細胞キット

品名	商品コード	キット構成
破骨細胞培養キット V-4 (ラット) ※凍結細胞で発送	OSC01	破骨前駆細胞 (4本)、洗浄用メディウム、 培養用メディウム、象牙質切片
破骨細胞培養キット V-2 (ラット) ※凍結細胞で発送	OSC02	破骨前駆細胞(2本)、洗浄用メディウム、 培養用メディウム、象牙質切片
破骨細胞培養キット V-2 (マウス) ※凍結細胞で発送	OSC03	破骨前駆細胞(2本)、洗浄用メディウム、 培養用メディウム、象牙質切片
破骨細胞培養キット V-1 (マウス) ※凍結細胞で発送	OSC04	破骨前駆細胞(1本)、洗浄用メディウム、 培養用メディウム、象牙質切片
頭蓋由来骨芽細胞培養キット V-1 (ラット) ※凍結細胞で発送	OBC02	骨芽細胞 (凍結細胞) 培養用メディウム
頭蓋由来骨芽細胞培養キット F-2 (マウス) ※フラスコに細胞を播種し発送	OBC11	骨芽細胞 (25cm フラスコ×2個) 培養用メディウム
骨形成培養キット (マウス) ※凍結細胞で発送	OGC11	凍結細胞、増殖用メディウム、 骨形成メディウム
骨形成メディウム	OGCMO	250mL

《V. 参考文献》

(1) A. S. H. De Jong, M. Van Kessel-Van Vark and A. K. Raap.

Sensitivity of various visualization methods for peroxidase and alkaline phosphatase activity in immunoenzyme histochemistry. The Histochemical Journal Volume 17, 1119-1130(1985)

《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2
コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部 あて郵送
または primarycell@cosmobio.co.jp あて PDF ファイル送信



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部 (技術的なお問い合わせ)
TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp