



Alkaline Phosphatase Staining Kit

Catalog No. AK20

July 1, 2024

Introduction

The Alkaline Phosphatase Staining Kit (Cat.No. AK20) 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, Cat.No. AK04F) are used as markers for osteoblasts and osteoclasts, respectively.

Components

Component Quantity Storage

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

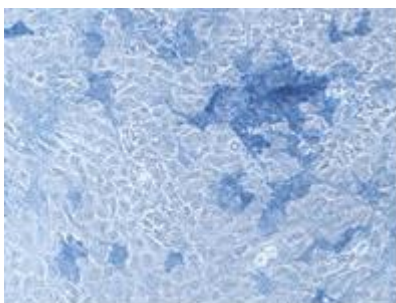


Figure 1: ALP staining of 3T3-E1

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)



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, 品番 : AK20)

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。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）であるに対して、骨芽細胞のマーカー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
基質緩衝液 Substrate-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、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 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4 g
りん酸水素 2 ナトリウム・無水 (Na_2HPO_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。

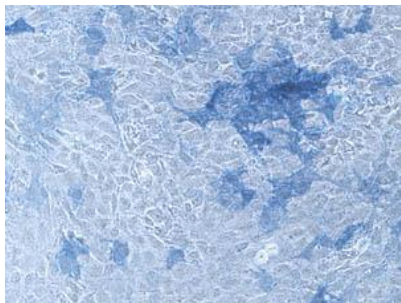


図1. 3T3-E1 細胞をアルカリホスファターゼ染色キットで染色

《Ⅳ. 参考文献》

- (1) 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)