



**For research use only. Not for clinical diagnosis.**

# Calcified Nodule Staining kit

## Catalog No. AK21

July 1, 2024

### Introduction

Alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin are expressed during the differentiation of bone marrow cells into mature osteoblasts and osteoblasts form calcium tubercle. Alizarin Red S, an anthraquinone derivative, has been used to identify Calcified nodule, because Calcium forms an Alizarin Red S-calcium complex, and the products turn (became) red. Calcified Nodule Staining kit (Cat.No. AK21) contains Substrate-containing Buffer composed mainly of Alizarin Red S and Chromogenic Substrate, and provides a convenient system for staining calcified nodule with ease.

### Components/Storage

Component	Quantity	Storage
Substrate-containing Buffer (x100)	60 mL	room temperature
Chromogenic Substrate	10 vials	room temperature

One kit contains reagents for 10 × 24-well plates

### Materials required but not provided

- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Methanol
- Distilled water

### Preparation of reagents

- Substrate-containing Buffer

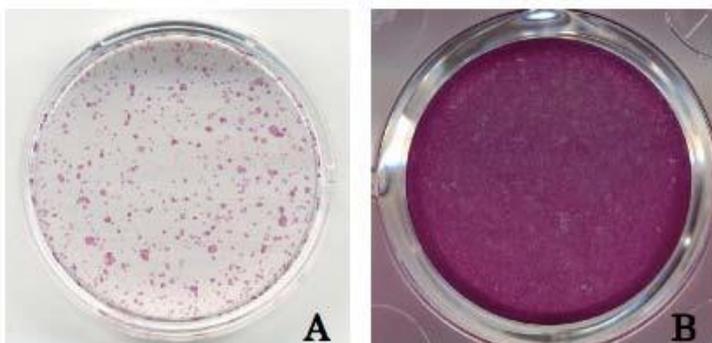
Dilute Substrate-containing Buffer (x100) with distilled water to a 1x concentrated solution.

**Note:** This working solution can be stored at room temperature for one month.

### Protocol < 24well-plate format >

1. Remove culture medium. Wash each well with 1 mL of PBS. (× 3 times)
2. Remove PBS, and fix cells with 500 uL of methanol per well at 4 °C for 20 minutes.  
Methanol should be cooled at -20 °C before use.
3. Remove methanol. Wash each well with 1 mL of distilled water. (× 3 times)
4. Add one vial of Chromogenic Substrate to 10 mL of Substrate-containing Buffer and mix, and then dispense 400 uL of the working solution to each well.  
This working solution should not be stored. Ready to use.
5. Incubate the plate at room temperature for 5 minutes.
6. Wash each well with 1 mL of Substrate-containing Buffer until washing buffer become transparent.

### Application example



**Fig. 1 Cells detected by Calcified Nodule Staining kit**

A: 3T3-E1 cells are cultured using Osteogenesis Culture for Osteogenesis Culture kit (Mouse)

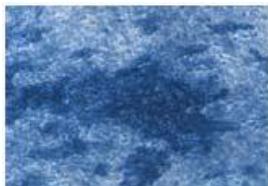
(Cat No. OGCMO) (35 mm dish)

B: Cells in Osteogenesis Culture Kit (Mouse) (OGC11) (24well-plate)

## **Introduction of related kit**

### **1. Alkaline Phosphatase Staining Kit (Cat.No.AK20)**

The Alkaline Phosphatase Staining Kit (Cat. No. AK20) is used for determining Alkaline Phosphatase activity with ease. The activity of alkaline phosphatase is used as markers for osteoblasts.



Rat osteoblasts (Cat. No. OBC02C) are cultured in Osteogenesis Culture for Osteogenesis Culture kit and the activity of alkaline phosphatase is detected by Alkaline Phosphatase Staining kit (Cat No.: AK20).

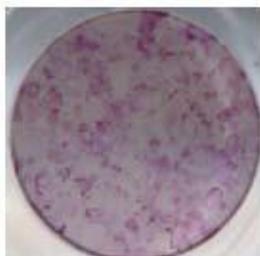
### **Components**

Component	Quantity	Storage
Substrate-containing Buffer	50 mL	4°C
Chromogenic Substrate	10 vials	4°C

**One kit contains reagents for 10 × 12-well plates**

### **2. TRAP Staining Kit (Cat.No.AK04F)**

The TRAP Staining Kit (Cat. No. AK04F) is used for the staining of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase in osteoclasts. Tartrate-resistant acid phosphate is used as markers for osteoclasts.



Rat Osteoclasts (Cat. No. OSC12C) cultured in 96well-plate are detected by TRAP Staining Kit (Cat. No. AK04F).

### **Components**

Component	Quantity	Storage
Tartrate-containing Buffer	50 mL	4°C
Chromogenic Substrate	10 vials	4°C

**One kit contains reagents for 10 × 96-well plates**

## **References**

- (1) Puchtler et.al., On the history and mechanism of alizarin and alizarin red s stains for calcium. J. Histochem. Cytochem. 17(2) , p110-124(1969)



一般研究用キット

# 石灰化染色キット

(Calcified nodule Staining kit, 品番 : AK21)

2024年7月1日改訂

※本マニュアルをご精読の上、研究目的にのみご使用ください。

骨形成を担っている骨芽細胞は、分化の程度によってアルカリホスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンなどが経時的に増加し、カルシウムが沈着した骨結節を形成することが知られています。

アントラキノン誘導体の一つであるアリザリンレッドSは、カルシウムに対し結合することが知られており、この作用を使って古くからカルシウム沈着を直接証明する染色方法として利用されてきました。

本キットは、アリザリンレッドSを成分とした染色基質と緩衝液との組み合わせの染色キットで、簡便に石灰化した骨結節を染色できるようになっています。

## 《I-1. キット構成》

内容	容量	本数	保存温度
緩衝液 (x100) Buffer	60 mL	1本	室温 (遮光保存)
染色基質 Chromogenic Substrate	10mL用	10本	

※本製品は、24well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、メタノール、PBS(-)、精製水になります。

## 《I-2. キットの特徴》

- ・カルシウム沈着した部位を簡便に染色することができる。

## 《II. 試薬の調製および保存温度》

### 緩衝液の調製

緩衝液 (100倍濃縮) を精製水で100倍希釈して使用してください。室温で1か月安定です。

## 《III. 染色方法 -24wellプレートを使用した場合-》

- (1) 24well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) 1wellあたりメタノール 500 $\mu$ L 加え、4 $^{\circ}$ Cで20分間固定してください。  
※メタノールは、予め冷凍 (-20 $^{\circ}$ C) で冷却した状態にしてください。
- (4) メタノールを除去し、1wellあたり精製水 1mL で3回洗浄してください。
- (5) 染色基質 1本に対して緩衝液 10mLを加え溶解し、1wellあたり 400 $\mu$ L加えてください  
※溶解済みの染色基質は保存できません。用事調製です。
- (6) 室温で5分間静置してください。
- (7) 1wellあたり緩衝液 1mL加えて、well内を洗浄してください。洗浄液が透明になるまで洗浄してください。
- (8) カルシウム沈着した場所が赤く染色されます。

#### 《IV. 染色例》

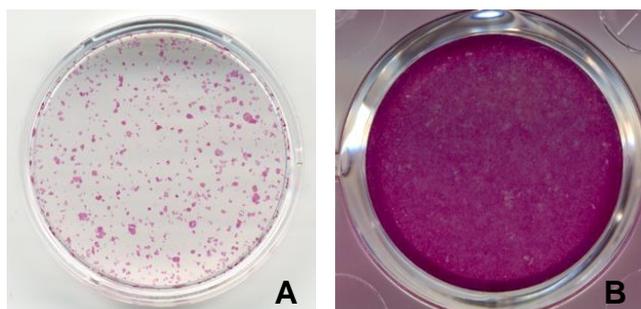


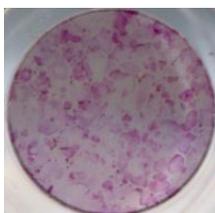
図1. 培養細胞を石灰化染色キットで検出  
 A. 骨形成メディウム(品番：OGCMO)で培養した  
 3T3-E1細胞（35mm Dishで培養）  
 B.骨形成培養キット(品番：OGC11)で培養した細胞  
 (24wellプレートで培養)

《V. 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。

#### 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。



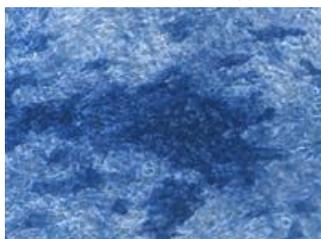
96wellプレートで培養させたラット破骨細胞（品番：OSC12C）をTRAP染色キットで染色した。

品名	品番	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

#### アルカリホスファターゼ染色キット

##### 特徴

- ・ アルカリホスファターゼ（ALP）を青く染色できる。
- ・ ALP活性が高い骨芽細胞などの検出に最適。



骨形成メディウム（品番：OGCMO）で培養させたラット骨芽細胞（品番：OBC02C）をアルカリホスファターゼ染色キットで染色した。

品名	品番	内容	包装
アルカリホスファターゼ染色キット	AK20	・ 基質緩衝液 ・ 発色基質	12wellプレート×10回分

#### 《VI. 参考文献》

- (1) Puchtler et.al., On the history and mechanism of alizarin and alizarin red s stains for calcium. J. Histochem. Cytochem. 17(2), p110-124(1969)