



For research use only. Not for clinical diagnosis.

Calcification Staining Kit (Alizarin Red S)

Catalog No. AK21R

June 11, 2026

Introduction

Osteoblasts, the cells responsible for bone formation, are known to increase the expression of markers such as alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin over time as differentiation progresses, eventually forming calcified nodules. Alizarin Red S, an anthraquinone derivative, binds to calcium and has long been used as a standard staining method for the direct detection of calcium deposits.

This kit consists of an Alizarin Red S-based staining substrate and buffer, alongside a newly included extraction solution. This configuration not only allows for the simple staining and visual confirmation of calcified nodules but also enables quantitative evaluation through absorbance measurement by using the extraction solution to elute the calcium-bound Alizarin Red S.

Components/Storage

Component	Quantity	Storage
Buffer (×100)	60 mL	Room temperature (Protect from light)
Chromogenic Substrate	10 vials (for 10 mL each)	
Extraction solution	80 mL	

One kit contains reagents for 10 × 24-well plates

Materials required but not provided

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

Preparation of reagents

- Buffer

Dilute Buffer (×100) with distilled water to a 1x concentrated solution.

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

Staining Protocol (For 24-well plates)

1. Prepare cells cultured in a 24-well plate.
2. Remove the culture medium. Wash each well with 1 mL of PBS(-) for a total of 3 times.
3. Add 500 µL of methanol per well, and fix the cells at 4 °C for 20 minutes.
4. Note: Methanol should be pre-cooled to -20 °C before use.
5. Remove the methanol. Wash each well with 1 mL of distilled water for a total of 3 times.
6. Add 1 vial of Chromogenic Substrate to 10 mL of Buffer and mix to dissolve completely. Dispense 400 µL of this working solution to each well.
7. Note: The prepared working solution cannot be stored. Prepare immediately before use (ready-to-use).
8. Incubate the plate at room temperature for 5 minutes.
9. Wash each well with 1 mL of Buffer. Repeat washing until the discarded wash buffer becomes clear (transparent).
10. Calcium-deposited areas will be stained red.

Extraction Protocol (For 24-well plates)

1. After staining and washing, completely remove the wash buffer from each well, and add 300 μ L of Extraction Solution.
2. Ensure the Extraction Solution covers the entire surface of the well.
3. Incubate at room temperature for 15 minutes.
4. Collect the supernatant from each well into a microtube.
5. Dispense 100 μ L of the collected sample into each well of a 96-well plate.
6. Measure the absorbance at 560 nm using a microplate reader.

Application example

1. Staining Example

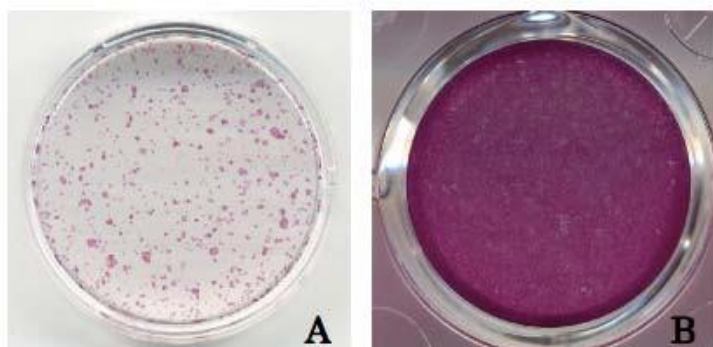


Fig. 1 Cells detected by Calcification Staining Kit

A: 3T3-E1 cells are cultured using Osteogenesis Culture Medium (Cat No. OGCMO) (35 mm dish)

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

2. Extraction Example

Inhibition of calcification in cardiac fibroblasts by the addition of pyrophosphate
Pyrophosphate concentration: ① 0 μ M (Control) / ② 0.2 μ M / ③ 1 μ M

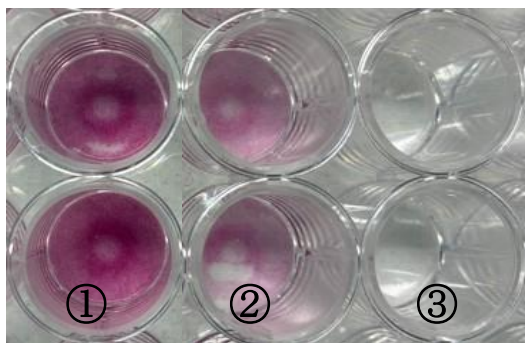


Figure 2. Stained images of calcified cardiac fibroblasts



Figure 3. Extraction solution collected in tubes

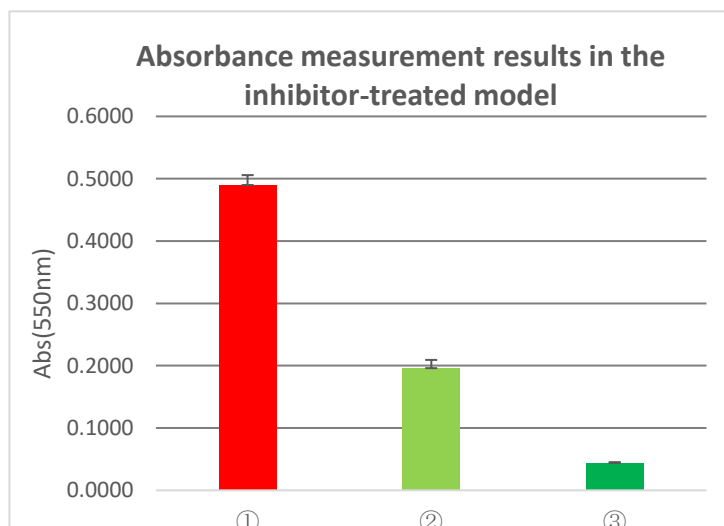
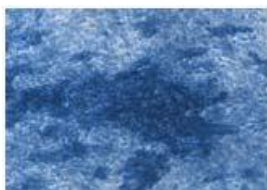


Figure 4. Quantitative evaluation of calcified nodules using the extraction solution

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 a marker for osteoblasts.



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

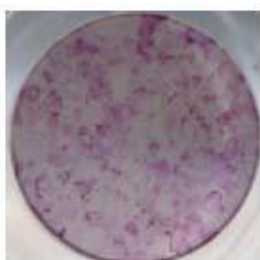
Components

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 phosphatase is used as a marker for osteoclasts.



Rat Osteoclasts (Cat. No. OSC12C) cultured in a 96-well 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

(Calcification Staining Kit, 品番 : AK21R)

2026年6月11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。

骨形成を担う骨芽細胞は、分化の進行に伴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の発現が経時的に増加し、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、カルシウムと結合する性質を持ち、この作用を利用して古くからカルシウム沈着を直接検出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に加え、新たに抽出液をセットにした構成となっています。これにより、石灰化した骨結節を簡便に染色して視覚的に確認できるだけでなく、抽出液を用いてカルシウムに結合したアリザリンレッドSを溶出させることで、吸光度測定による定量評価を行うことも可能です。

《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	10 mL用	10本	
抽出液 Extraction solution	80 mL	1本	

※本製品は、24-well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》

- ・カルシウムが沈着した部位を簡便に染色し、定量評価することが可能です。

《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 —24-wellプレートを使用した場合—》

- (1) 24-well 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、1 well あたり PBS (-) 1 mL で3回洗浄してください。
- (3) 1 well あたりメタノール 500 μ L 加え、4℃で20分間固定してください。
※メタノールは、予め冷凍 (-20℃) で冷却した状態にしてください。
- (4) メタノールを除去し、1 well あたり精製水 1 mL 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 10 mL を加え溶解し、1 well あたり 400 μ 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。用時調製です。
- (6) 室温で5分間静置してください。
- (7) 1 well あたり緩衝液 1 mL 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. 抽出方法 —24-wellプレートを使用した場合—》

- (1) 染色・洗浄後の各wellから洗浄液を完全に除去した後に、抽出液を300 μ L加えてください。
※抽出液を添加後、液の色が赤色から紫色に変化します。
- (2) well全体に抽出液が行き渡るように静置してください。
- (3) 室温で15分間静置します。
- (4) 各wellの上清をマイクロチューブに回収してください。
- (5) 96-well プレートに、回収したサンプルを100 μ Lずつ分注します。
- (6) プレートリーダーを用い、波長560 nmで吸光度を測定してください。

《Ⅴ-1. 染色例》

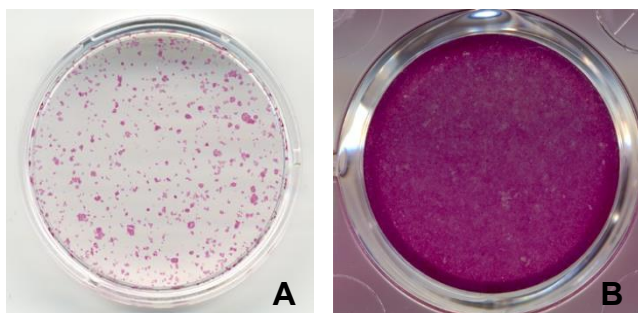


図1. 培養細胞を石灰化染色キットで検出
A. 骨形成メディウム(品番：OGCMO)で培養した3T3-E1細胞（35 mm Dishで培養）
B. 骨形成培養キット(品番：OGC11)で培養した細胞（24-wellプレートで培養）

《Ⅴ-2. 抽出例》

ピロリン酸添加による心線維芽細胞の石灰化抑制試験

ピロリン酸添加濃度：①0 μ M（コントロール）②0.2 μ M ③1 μ M

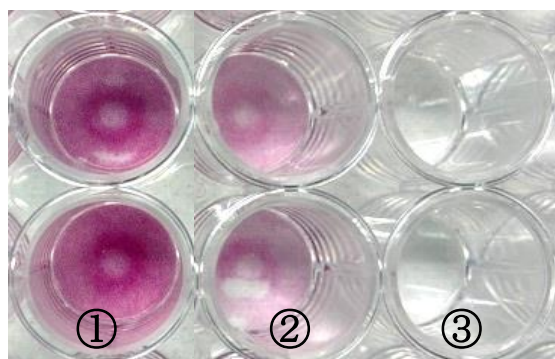


図2. 心線維芽細胞の石灰化染色画像



図3. チューブに回収した抽出液

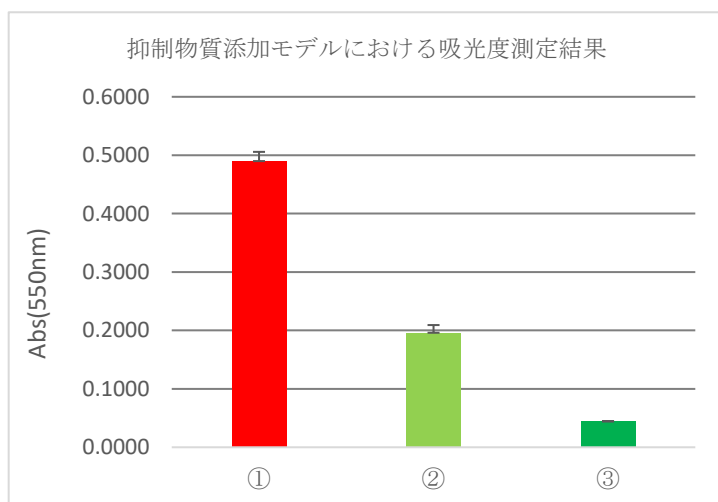


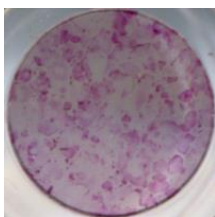
図4. 抽出液を用いた石灰化結節の定量評価

《VI. 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。



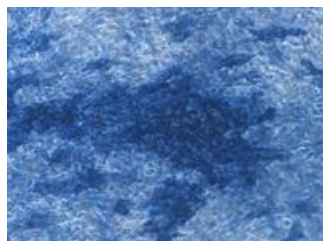
96-wellプレートで培養させたラット破骨細胞（品番：OSC12C）をTRAP染色キットで染色した。

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	96-well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	12-wellプレート×10回分

《VII. 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)