

(90×210mm Size)

FUJIFILM

Wako

研究用試薬

コード No. 294-67001 (60 回用)

病理研究用

(酒石酸耐性酸性ホスファターゼ及び
アルカリホスファターゼの酵素活性染色用)
TRAP/ALP 染色キット

【はじめに】

正常な骨代謝は骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立っていますが、このバランスが崩れ、破骨細胞の骨吸収が異常に亢進すると骨量が低下し、骨粗鬆症につながります。そのため、破骨細胞と骨芽細胞の代謝メカニズムを理解し、これらの疾患の治療や有効な薬剤の開発に役立てるため、様々な研究が行われています。

現在、骨芽細胞のマーカー酵素としてはアルカリホスファターゼ(ALP)が、破骨細胞のマーカー酵素としては酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)が知られており、組織切片あるいは培養細胞における、骨芽細胞、破骨細胞の存在を示す一つの指標として用いられています。

本キットは、骨組織切片及び培養骨細胞のALP・TRAP酵素活性を利用し、組織ならびに培養細胞中の骨芽細胞や破骨細胞の染色像を観察する事により、細胞の分化状態や、骨組織における分布を調べる事が可能です。

【特長】

- 1) 使用時に2つの溶液を混合するだけで、酸性ホスファターゼの酵素活性染色に必要な発色基質液が調製できます。(酒石酸耐性評価を行う場合は3液を混合)
- 2) アルカリホスファターゼの酵素活性染色はプレミックス基質液を使用し、簡単に行うことができます。
- 3) 酸性ホスファターゼの活性部位を赤紫色に、アルカリホスファターゼの活性部位を青味がかかった茶色に2重染色することができます。
- 4) 培養細胞、骨組織切片(GMA樹脂包埋切片)について使用することができます。

【キット内容】

(1)	酒石酸溶液(×10)	3mL	1本
(2)	酸性ホスファターゼ基質液A	30mL	1本
(3)	酸性ホスファターゼ基質液B	0.3mL	1本
(4)	核染色試薬	10mL	1本
(5)	アルカリホスファターゼプレミックス基質液	30mL	1本

- (備考) 1. 本品は培養細胞では24ウェルマルチプレート5回用、96ウェルマルチプレート6回用、骨組織スライド(1スライドあたり500µL使用として)で60枚用に相当します。
2. 開封前後の取り扱い注意
開封前は-20℃保存、開封後は下記の取り扱いをしてください。
①酒石酸溶液(×10)、酸性ホスファターゼ基質液A、酸性ホスファターゼ基質液Bは開封後も必ず-20℃で保存してください。
酸性ホスファターゼ基質液Aは凍結融解を繰り返すうちに、若干の沈殿を生じる場合がありますが、そのような場合は約0.2µmのフィルターで、ろ過して使用してください。

-1/6-

②核染色試薬とアルカリホスファターゼプレミックス基質液は解凍後、軽く攪拌し、2～10℃で保存してください。

1. [骨組織切片のALP及びTRAP酵素活性の染色]

[操作キット以外に必要な試薬、機材]

- ・蒸留水
- ・洗浄バッファー(Dulbecco's Phosphate buffered saline; D-PBS (-) (045-29795))
- ・固定液(37%ホルムアルデヒド溶液を、PBSで1/10に希釈した溶液)ホルムアルデヒド(061-00416)
- ・透過液[エタノール/アセトン(50:50v/v)]エタノール(057-00456)、アセトン(016-00346)
- ・0.1mol/L AMPD-HCl buffer, pH9.4(切片でTRAP染色の後、ALP染色を行う場合)AMPD: 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール(015-06411)
- ・37℃インキュベーター
- ・光学顕微鏡
- ・湿潤箱などの容器
- ・マイクロピペット
- ・マイクロチューブ

『GMA包埋薄切切片など』で染色を行う場合

- ・コプリンジャー(スライド洗浄)
- ・キシレン(244-00086)
- ・封入剤 ソフトマウント(192-16301)、マリノール
- ・カバースリップ
- ・カバーガラス

非脱灰骨GMA包埋薄切標本を用いた染色の一例

【標本の準備】

非脱灰骨GMA包埋薄切標本(2µm厚)シランコーティングスライド貼付

【操作前の注意点】

- *TRAP染色とALP染色の2重染色を行う場合は、最初にTRAP染色を行い、顕微鏡で観察した後、ALP染色を行ってください。
- *場合によっては核染色によりTRAP染色像、ALP染色像が見にくくなる場合がありますので、核染色の前に一度、顕微鏡で観察することをお薦めします。

【操作】

- (1) 標本を水洗します。
- (2) TRAP染色液を調製します。
*使用時ごとに下記の割合で調製し、調製後の溶液は保存しないで下さい。

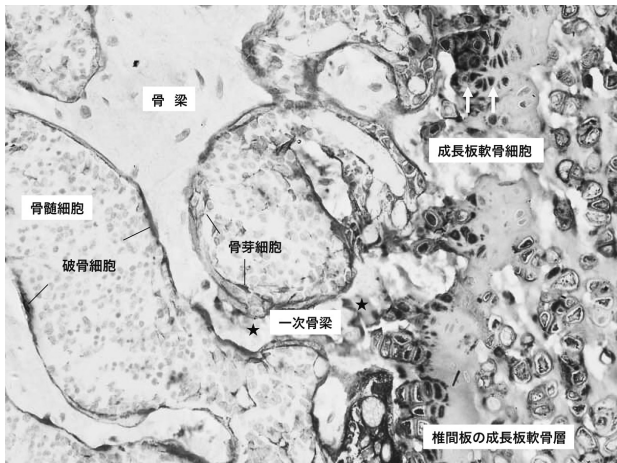
酒石酸溶液(×10)	1mL
酸性ホスファターゼ基質液A	9mL
酸性ホスファターゼ基質液B	0.1mL
- (3) 室温の湿箱で染色液を各切片に0.5mLずつ上乗せし、30分間室温で静置します。
*発色時間はサンプル中に含まれる酒石酸耐性酸性ホスファターゼの量や活性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止してください。ただし、あまり長時間反応させると反応物の沈殿や、破骨細胞以外の細胞に対する非特異的反応が起こる可能性がありますので、ご注意ください。
- (4) コプリンジャー3つに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、各1分間ずつ洗浄します。

-2/6-

- (5) コプリンジャーに切片が十分に浸る量の、0.1mol/L AMPD-HCl buffer (pH9.4) を用意し、10 分間静置します。
- (6) スライドの余分な水分を除去します。
- (7) アルカリホスファターゼプレミックス基質液 0.5mL を各切片に上乘せし、室温の湿箱で 30 分間静置します。
*発色時間はサンプル中に含まれるアルカリホスファターゼの量や活性により変化します。
顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止してください。
- (8) コプリンジャー 3 つに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、各 1 分間ずつ洗浄します。
- (9) コプリンジャーに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、核染色試薬 0.5mL を切片に上乘せします。4-5 秒したら、すぐに蒸留水中にて切片を上下させ、水洗します。
(核染色の工程は、染色液を上乘せした後、直ちに洗浄しますので、複数の切片を染色される際は、一枚ずつ、染色と洗浄の工程を繰り返すことをお勧めします。)
- (10) コプリンジャーに切片が十分に浸る量の蒸留水を用意し、洗浄します。
- (11) 37℃の伸展器上で切片を乾燥させます。
- (12) コプリンジャーに切片が十分に浸る量のキシレンを用意し、切片を浸します。
- (13) ソフトマウントやマリノール封入剤で封入し、観察します。

染色写真および染色法の提供元：河原 元 先生

マウス 脊椎骨 非脱灰 GMA 樹脂包埋 2 ミクロン切片



2. [培養細胞の ALP 及び TRAP 酵素活性の染色]

[操作方法]

24 ウェルプレートで培養した培養細胞の染色例

【操作前の注意点】

- *TRAP 染色と ALP 染色の 2 重染色を行う場合は、最初に TRAP 染色を行い、顕微鏡で観察した後に、ALP 染色を行ってください。
- *場合によっては核染色により TRAP 染色像、ALP 染色像が見にくくなる場合がありますので、核染色の前に一度、顕微鏡で観察することをお勧めします。
- *細胞の固定法、透過処理はこの限りではありません。特に問題が生じなければ、ご使用中のサンプルに適した固定、透過処理を行うこともできます。

キット以外に準備する試薬

- D-PBS (-) (洗浄用)
- 固定液：37% ホルムアルデヒド溶液を、2 ~ 10℃で冷やした PBS で 1/10 に希釈し、氷上に置いてください。(※固定液は使用前に用時調製してください。)
- 透過液：エタノール / アセトン (50 : 50 v/v)

【操作】

24 穴プレートにて細胞を培養する。

[細胞の固定]

- (1) 培養液を取り除き、すみやかに PBS を 3mL 加え軽く細胞をリンスします。
- (2) 加えた PBS を取り除き、予め冷やしておいた固定液 500 μL を細胞が剥がれない様に、ゆっくりと加え、氷上に 10 分間静置します。(以降の作業は室温で行って下さい。)
- (3) 固定液の入ったウェルに PBS を 2mL 加え、固定液を希釈します。
- (4) ウェルの液を取り除き、PBS を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。

[透過処理]

- (5) PBS を除き、エタノール / アセトン (50 : 50 v/v) を 500 μL 加え、-30℃~-20℃で 1 分間インキュベートします。
- (6) ウェルの溶液を静かに取り除き、PBS を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。

[TRAP 染色液の調製]

サンプルの数に合わせて、各試薬を下記の割合で、使用前に調製してください。

*使用時ごとに下記の割合で調製し、調製後の溶液は保存しないで下さい。

酒石酸溶液 (× 10)	100 μL
酸性ホスファターゼ基質液 A	900 μL
酸性ホスファターゼ基質液 B	10 μL

24 ウェルマルチプレート：250 μL/well, 96 ウェルマルチプレート：50 μL/well, スライド 1 枚あたり 500 μL

[TRAP 染色]

- (7) 調製した TRAP 染色液 250 μL を各ウェルに加え、蓋をして乾燥を防ぎ 37℃のインキュベーターで 15 分～ 45 分間反応させます。
*発色時間はサンプル中に含まれる酒石酸耐性酸性ホスファターゼの量や活性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止してください。
ただし、あまり長時間反応させると反応物の沈殿や、破骨細胞以外の細胞に対する非特異的反応が起こる可能性がありますので、ご注意ください。
- (8) ウェルに蒸留水を 2mL 加え、反応液を希釈します。
- (9) ウェルの液を取り除き、蒸留水を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。
- (10) 必要な場合は余分な水分を除き、ALP 染色または核染色に進んでください。

[ALP 染色]

- (11) アルカリホスファターゼプレミックス基質液 250 μL をウェルに加え、蓋をして乾燥を防ぎ 37℃のインキュベーターで 15 分～ 45 分間反応させます。

*発色時間はサンプル中に含まれるアルカリホスファターゼの量や活性により変化します。顕微鏡で観察しながら適度な状態で、反応を停止します。

- (12) ウェルに蒸留水を 2mL 加え、反応液を希釈します。
- (13) 溶液を取り除き、再度ウェルに蒸留水を 2mL 加えます。この操作をさらに 3 度繰り返します。
- (14) 必要な場合は余分な水分を除き、核染色に進んでください。

[核染色]

- (15) 核染色試薬 250 μ L をウェルに加え、室温で 5 ~ 15 分程度染色します。(染色時間はあくまで目安です。お手持ちのサンプルに適した時間で染色を行ってください)
- (16) ウェルに蒸留水を 2mL 加え、核染色試薬液を希釈します。
- (17) 溶液を取り除き、再度ウェルに蒸留水を 2mL 加えます。この操作をさらに 2 度繰り返します。
ウェルに加えた蒸留水が透明になるまで続けてください。

[観察]

- (18) サンプルが乾燥した場合はサンプルに蒸留水を滴下して観察してください。

[染色結果の一例]

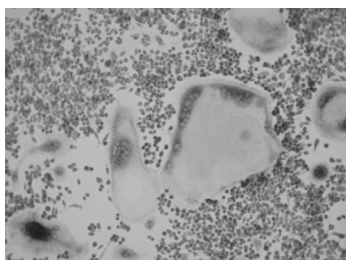


図1 RAW264 細胞の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性染色

RAW264 細胞 (Mouse leukemic monocyte 由来の細胞株、破骨細胞様細胞に分化する) を sRANKL 存在下で培養し、培養 6 日目に中性ホルマリンによる固定、エタノール / アセトン (50 : 50 v/v) による透過処理を行った後、TRAP 染色を行った。

TRAP positive で、多核の破骨細胞様細胞が観察された。



図2 MC3T3-E1 細胞のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色

MC3T3-E1 細胞 (Mouse calvaria 由来の細胞株、骨芽細胞に分化する) を BMP-2 存在下で培養し、培養 7 日目にエタノール / アセトン (50 : 50 v/v) による透過処理を行った後、ALP 染色を行った。

本品は培養細胞では 24 ウェルマルチプレート 5 回用、96 ウェルマルチプレート 6 回用、骨組織スライド (1 スライドあたり 500 μ L 使用として) で 60 枚用に相当します。

[使用期限]

製造後 24 ヶ月 (ラベルに記載)

[保存条件]

開封前 -20 $^{\circ}$ C

[開封後の取り扱い注意]

- ①酒石酸溶液 ($\times 10$)、酸性ホスファターゼ基質液 A および酸性ホスファターゼ基質液 B は開封後も必ず -20 $^{\circ}$ C で保存してください。
*酸性ホスファターゼ基質液 A は凍結融解を繰り返すうちに、若干の沈殿を生じる場合がありますが、そのような場合は約 0.2 μ m のフィルターで、ろ過して使用してください。
- ②核染色試薬とアルカリホスファターゼ プレミックス基質液は解凍後、軽く攪拌し、2 ~ 10 $^{\circ}$ C で保存してください。

[参考文献]

1. 河原 元 「硬組織標本作製法」; 検査と技術, **29**, 1169 (2001)

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741

1801KA1