



# TRAP Staining Kit

## Catalog No. AK04F

August 25, 2023

### Introduction

The TRAP Staining Kit (Cat.No.PMC-AK04F) is used for the staining of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase in osteoclasts. Bone mass is controlled by the balance between the activity of osteoblasts bone formation and the activity of osteoclasts. Alkaline phosphatase (ALP: ALP staining kit, Cat.No.PMC-AK20) and tartrate-resistant acid phosphate are used as markers for osteoblasts and osteoclasts, respectively.

### Components

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

One kit contains reagents for 10 × 96-well plates

### Additional Materials Required

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

### Protocol (96-well plate format)

1. Remove culture medium. Wash each well once with 100uL of PBS.
2. Add 50uL of the 10% Formalin Neutral Buffer Solution to each well and fix for 5 minutes at room temperature.
3. Wash each well with 250uL of deionized water. (× 3 times)
4. Dissolve 1 vial of Chromogenic Substrate with 5mL of Tartrate-containing Buffer.
5. Add 50uL of Chromogenic Substrates to each well.
6. Incubate at 37°C for 20-60 minutes. Adjust incubation time until stained TRAP is clearly showing the result in figure 1.
7. Wash with deionized water to stop the reaction.

**Note:** Excess incubation will be cause of over stained.

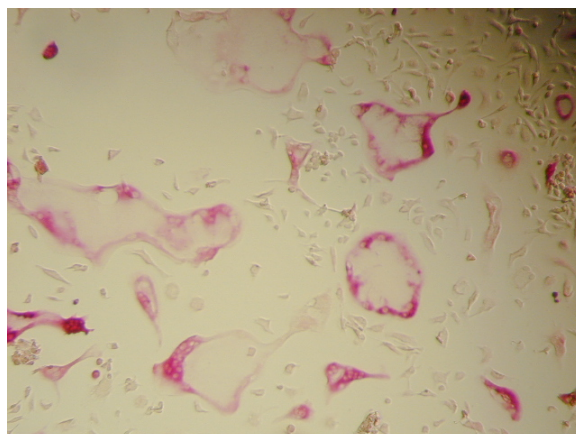


Figure 1: TRAP staining of Osteoclast

## References

- (1) Sunao Takesita, Keisuke Kaji, Akira Kudo. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH Volume 15, Number 8 (2000). 1477-1488.
- (2) BEN A. A. SCHEVEN, JONE S. MILNE, SIMON P. ROBINS. A SEQUENTIAL CULTURE APPROACH TO STUDY OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FROM NONADHERENT PORCINE BONE MARROW CELLS. In Vitro Cell. Dev. Biol. July-August (1998). Animal 34: 568-577.
- (3) Martha J. Somerman, Janice E. Berry, Zhila Khalkhali-Ellis, Philip Osdoby, Robert U. Simpson. Enhanced Expression of  $\alpha_v$  Integrin Subunit and Osteopontin during Differentiation of HL-60 Cells along Monocytic Pathway. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 216, 335-341(1995).
- (4) Ichiro Itonaga, Afsie Sabokbar, Susan D. Neale, Nicholas A. Athanasou. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Prostaglandin E<sub>2</sub> Act Directly on Circulating Human Osteoclast Precursors. Biochemical and Biophysical Research Communications 264, 590-595(1999).
- (5) Hiroshi Takayanagi, Kouetsu Ogasawara, Shigeaki Hida, Tomoki Chiba, Shigeo Murata, Kojiro Sato, Akinori Takaoka, Taeko Yokochi, Hiromi Oda, Keiji Tanaka, Kozo Nakamura and Tadatsugu Taniguchi.  
T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ .  
Nature, Vol. 408, No.6812, 600-605, 30 November 2000.
- (6) Morinobu, A., Biao, W., Tanaka, S., Horiuchi, M., Jun, L., Tsuji, G., Sakai, Y., Kurosaka, M., Kumagai, S.  
(-)-Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Osteoclast Differentiation and Ameliorates Experimental Arthritis in Mice. Arthritis Rheum. 58, 2012-2018 (2008)
- (7) Hase, H., Kanno, Y., Kojima, H., Sakurai, D., Kobata, T. Coculture of Osteoclast Precursors With Rheumatoid Synovial Fibroblasts Induces Osteoclastogenesis via Transforming Growth Factor beta-Mediated Down-Regulation of Osteoprotegerin. Arthritis Rheum. 58, 3356-3365 (2008)
- (8) Cao, H., Kuboyama, N. A Biodegradable Porous Composite Scaffold of PGA/beta-TCP for Bone Tissue Engineering. Bone. 46, 386-395 (2010)
- (9) Okada, Y., Hamada, N., Kim, Y., Takahashi, Y., Sasaguri, K., Ozono, S., Sato, S. Blockade of Sympathetic beta-receptors Inhibits Porphyromonas Gingivalis-induced Alveolar Bone Loss in an Experimental Rat Periodontitis Model. Arch. Oral Biol. 55, 502-508 (2010)
- (10) Okamoto, A., Ohnishi, T., Bandow, K., Kakimoto, K., Chiba, N., Maeda, A., Fukunaga, T., Miyawaki, S., Matsuguchi, T. Reduction of Orthodontic Tooth Movement by Experimentally Induced Periodontal Inflammation in Mice. Eur. J. Oral Sci. 117, 238-247 (2009)

## 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@cosmobioussa.com](mailto:info@cosmobioussa.com)  
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600  
URL: [www.cosmobioussa.com](http://www.cosmobioussa.com)

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



# TRAP 染色キット (TRAP Staining kit, Code No. AK04F)

2023 年 8 月 25 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。骨芽細胞のマーカー酵素はアルカリ性ホスファターゼであるに対して、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）です。

本キットは、酒石酸抵抗性酸性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、破骨細胞の検定等に用いてください。

## 《I-1. キット構成》

| 内 容                                                | 容量    | 本数   | 保存温度           | 取扱上の注意                                             |
|----------------------------------------------------|-------|------|----------------|----------------------------------------------------|
| 50mM 酒石酸含有緩衝液、pH 5.0<br>Tartrate-containing Buffer | 50 mL | 1 本  | 4~10℃<br>(禁凍結) | 取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、<br>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<br>Chromogenic Substrate                      | 3 mg  | 10 本 | 4~10℃          |                                                    |

※本製品は、96well 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》

- ・培養した破骨細胞を染色するのに必要な試薬類がパッケージングしている。
- ・簡便に破骨細胞を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 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )                             | 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 ―96well プレートを使用した場合―》

- (1) 破骨前駆細胞を 96well プレートで培養し、破骨細胞を形成させて下さい
- (2) 培養液を除去後、1well あたり PBS 100  $\mu$  L で 1 回洗浄してください。
- (3) 1 well あたり固定液 50  $\mu$  L 加え、室温で 5 分間固定してください。  
※固定時間を 5 分以上行った場合、検出できなくなる可能性がありますのでご注意ください
- (4) 固定液を除去し、1 well あたり精製水 250  $\mu$  L で 3 回洗浄してください。
- (5) 発色基質・1 本に緩衝液 5ml を加え溶解し、1well あたり 50  $\mu$  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  $\mu$  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℃で 20～60 分加温してください。図 1 に示したように、破骨細胞の TRAP 活性によって赤く染色されます。
- (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。  
※長時間加温した場合、発色基質に沈殿が生じます。沈殿形成前に反応を止めることをお勧めします。

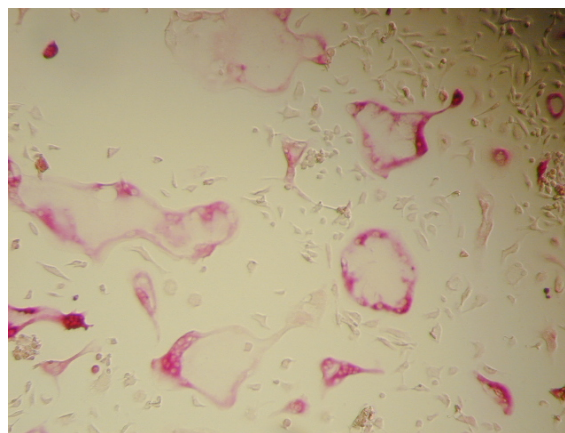


図 1. TRAP 染色による破骨細胞

## 《V. 参考文献》

- (11)Sunao Takesita, Keisuke Kaji, Akira Kudo. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts.JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH Volume 15,Number 8(2000) .1477-1488.
- (12)BEN A. A. SCHEVEN, JONE S. MILNE, SIMON P. ROBINS. A SEQUENTIAL CULTURE APPROACH TO STUDY OSTEOCLAST DIFFERENTIATION FROM NONADHERENT PORCINE BONE MARROW CELLS. In Vitro Cell. Dev. Biol. July-August (1998).Animal 34:568-577.
- (13)Martha J. Somerman, Janice E. Berry, Zhila Khalkhali-Ellis, Philip Osdoby, Robert U. Simpson. Enhanced Expression of  $\alpha_v$  Integrin Subunit and Osteopontin during Differentiation of HL-60 Cells along Monocytic Pathway. EXPERIMENTAL CELL RESEARCH 216, 335-341(1995).
- (14)Ichiro Itonaga, Afsie Sabokbar, Susan D. Neale, Nicholas A. Athanasou. 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Prostaglandin E<sub>2</sub> Act Directly on Circulating Human Osteoclast Precursors. Biochemical and Biophysical Research Communications 264, 590-595(1999).
- (15)Hiroshi Takayanagi, Kouetsu Ogasawara, Shigeaki Hida, Tomoki Chiba, Shigeo Murata, Kojiro Sato, Akinori Takaoka, Taeko Yokochi, Hiromi Oda, Keiji Tanaka, Kozo Nakamura and Tadatsugu Taniguchi. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- $\gamma$ . Nature, Vol. 408, No.6812, 600-605, 30 November 2000.

《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