

研究用

TAKARA

TRACP & ALP double-stain Kit

説明書

Lot. AJG0826A より、キット構成の「細胞固定液」の組成が 45%アセトン、10%エタノール含有クエン酸緩衝液 (pH5.4) からクエン酸緩衝液 (pH5.4) に変更になり、名称が「細胞固定基礎液」へ変更になります。アセトン、エタノールは本製品には含まれていませんので、ご用意をお願いします。調製後の使用方法、性能は変わりません。

I. 製品概要

本製品は、骨芽細胞の酵素マーカーであるアルカリ性ホスファターゼと破骨細胞の酵素マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼの発色性基質に加え、破骨細胞の多核化を可視化するための核染色試薬をセットにした骨関連細胞染色キットです。細胞中の酸性およびアルカリ性ホスファターゼ両方の活性を同時に染色比較することができます。また、基質はプレミックスとなっているため、試薬調製が非常に簡便です。

II. はじめに

ホスファターゼは、脂肪族・芳香族のリン酸エステルに作用して、これを加水分解し、リン酸を遊離させる酵素である。これには、活性の至適 pH がアルカリ域であるアルカリ性ホスファターゼと酸性域である酸性ホスファターゼとが知られている。

酸性ホスファターゼは前立腺や肝臓・腎臓・脾臓・赤血球・血小板・破骨細胞など生体の多くの細胞や組織に存在する。^{1,2)} 1959年、Burstone³⁾は破骨細胞 (Osteoclast) には強い酸性ホスファターゼ活性が認められ、骨芽細胞 (Osteoblast) にはアルカリ性ホスファターゼ活性が認められることを報告している。その後も、骨細胞に関連するホスファターゼ活性についての様々な研究報告がなされ、破骨細胞の酸性ホスファターゼ活性は酒石酸存在下でも活性を失わないタイプ (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ、Tartrate-resistant acid phosphatase : TRACP) であることがわかった。現在では、TRACP 活性を持つことが破骨細胞であることの一つの条件とされている。なお、破骨細胞以外に TRACP 活性を持つものとしては、血液細胞中の hairy cell が知られている。また、酒石酸存在下で活性が失われるタイプは、酒石酸感受性酸性ホスファターゼ (Tartrate-sensitive acid phosphatase : TSACP) と呼ばれている。

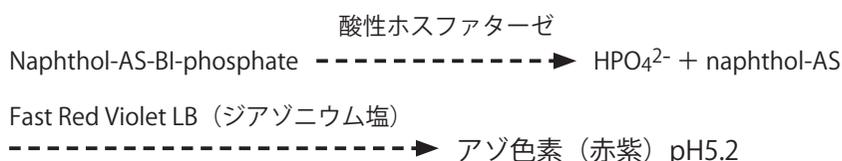
アルカリ性ホスファターゼは、生体膜に結合して存在する糖タンパク質で小腸型、胎盤型、胎盤様型、臓器非特異型の4種類に分類される。臓器非特異型のうち、骨に特異的なアイソザイムは骨型アルカリ性ホスファターゼと呼ばれており、この酵素は骨芽細胞膜に結合して存在し、石灰化部位において結晶形成を阻害するピロリン酸を分解したり、有機リン酸エステルを分解して無機リン酸濃度を上げることにより、骨形成を促進させる働きがある。そのため、骨型アルカリ性ホスファターゼは骨代謝サイクルの中で、特に骨形成マーカーとして認知されている。

骨代謝は骨形成と骨吸収の相互バランスで成り立っており、2つの酵素マーカーで同時評価することが有用であると考えられる。

III. 染色原理⁴⁾

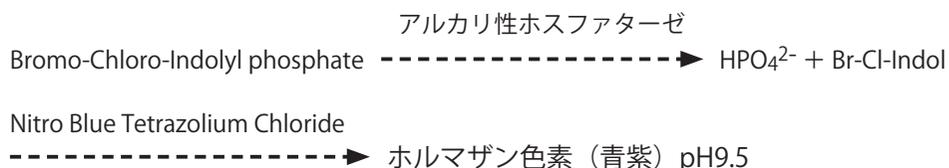
(1) 酸性ホスファターゼ (酒石酸耐性・感受性ホスファターゼ) 染色原理^{1,2)}

マイクロプレートのウェルやスライドガラス上に固定した細胞をサンプルとして用いる。2つの同じ由来のサンプルを用意し、酒石酸を添加した酸性ホスファターゼプレミックス基質液 (NABP/FRVLB) を一方に、酒石酸を添加しないプレミックス基質液を他方に加えて反応を行う。前者の場合は酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRACP) 活性が検出され、後者の場合は酒石酸耐性と感受性のトータルの酸性ホスファターゼ活性が検出される。それぞれの場合において検出対象の酵素が存在すると、プレミックス基質液中に含まれる成分によって以下のような反応が起こり、赤紫色のアゾ色素が生成される。



(2) アルカリ性ホスファターゼ染色原理

アルカリ性ホスファターゼプレミックス基質液 (BCIP/NBT) をマイクロプレートのウェルやスライドガラス上に固定した細胞サンプルに添加して反応を行う。アルカリ性ホスファターゼが存在すると、プレミックス基質液中に含まれる成分によって以下のような反応が起こり、青紫色の色素が生成される。



IV. 内容

- | | |
|---|-------------|
| (1) 細胞固定基礎液【Fixation base solution】
クエン酸緩衝液 pH5.4 (アセトン、エタノール不含)
※使用前にアセトンおよびエタノールの添加が必要です。 | 13.5 ml |
| (2) 酒石酸【Sodium tartrate】
0.5 M 酒石酸ナトリウム緩衝液 pH5.2 | 4 ml |
| (3) 酸性ホスファターゼプレミックス基質【Substrate for ACP】
NABP/FRVLB | 10 ml 用×3 本 |
| (4) アルカリ性ホスファターゼプレミックス基質【Substrate for ALP】
BCIP/NBT | 10 ml 用×3 錠 |
| (5) 核染色試薬【Nuclear stain】
メチルグリーン | 10 ml |

本製品以外に必要な試薬

- ・アセトン 13.5 ml
- ・エタノール 2.7 ml

※ いずれも一般試薬グレードのものを(1)細胞固定基礎液に添加します。
VI. 試薬調製(1)をご参照ください。

V. 保存

− 20℃

開封後はそれぞれの試薬に適正な温度(次ページ参照)で保存してください。

VI. 試薬調製

本製品はそれぞれの酵素のプレミックス基質が 10 ml(相当)×3 回包装となっております。これらの全量で 24 ウェル培養プレート約 5 枚分の染色が可能です。また、2 重染色を実施する場合、必ず酸性ホスファターゼ活性を先に検出し、その後にアルカリ性ホスファターゼ基質に置き換えて染色を行ってください。逆に染色を行うと、酸性ホスファターゼの一部が失活しますのでご注意ください。

(1) 細胞固定基礎液【Fixation base solution】

使用前に室温で融解して、アセトン 13.5 ml とエタノール 2.7 ml を静かに添加する。(以下、アセトンとエタノールを有機溶媒とする。)

添加する有機溶媒は一般的な試薬グレード品が使用できる。

有機溶媒を添加した調製済みの細胞固定基礎液は、以降「固定液」と表記する。

※ アセトンの取扱には、有機溶媒耐性のピペット類 (例：ガラス製) を使用してください。

※ 投入順序は問いませんが、容器の入口付近まで溶液が達するので注意してください。

※ 添加・調製後は有機溶媒を含むため取扱に注意してください。(火気厳禁)

※ 本製品は、調製後 4℃以下で保存可能ですが、- 20℃以下で保存しても凍結しませんので、現状容器のまま保存できます。

※ 保存中に結晶が生じる場合がありますが、そのまま使用できます。(性能に問題ありません)

(2) 酒石酸【Sodium tartrate】

室温で融解して使用する。開封後は 4℃以下で保存可能だが、防腐剤を含んでいないため、凍結保存が望ましい。

(3) 酸性ホスファターゼプレミックス基質【Substrate for ACP】

本品 1 バイアルを 10 ml の滅菌蒸留水に溶解し、これを反応基質液として使用する。溶液は若干、薄黄色を呈している。酒石酸耐性酵素を検出する場合は、(2) 酒石酸 (Sodium tartrate) を本品の 10 分の 1 容量添加して使用する。本品は、NABP/FRVLB と最適緩衝液を含んでいる。溶解前の基質および調製後の基質液は必ず、- 20℃以下で凍結保存する。溶解後は 1 ヶ月を目途に使用する。基質液を凍結保存すると若干の析出物が生じる場合があるが、その場合は 0.22 μm フィルター濾過して使用する。酒石酸添加後の基質液も同様に凍結保存できる。

(4) アルカリ性ホスファターゼプレミックス基質【Substrate for ALP】

本品 1 錠を 10 ml の滅菌蒸留水で十分に溶解し、反応基質液として使用する。溶解に時間がかかるため、使用する 60 分前までに調製を始めるとよい。溶液は薄黄色を呈している。本品は、BCIP/NBT と最適緩衝液を含んでいる。溶解前の基質および溶解後の基質液は必ず、- 20℃以下で凍結保存する。溶解後は 1 ヶ月を目途に使用する。基質液を凍結保存すると若干の析出物が生じる場合があるが、その場合は 0.22 μm フィルター濾過して使用する。

(5) 核染色試薬【Nuclear stain】

室温で融解してそのまま使用する。溶解後は冷所 (20℃以下) で保存する。一般的な核染色や、破骨細胞が分化融合し多核細胞になったかどうかを調べるために使用する。

VII. 使用方法

< 細胞の固定 >

A. 24 ウェルプレートで培養した細胞をサンプルとする場合 (骨髄細胞を固定する場合を例として以下に示します。)

1. 24 ウェルプレート内で細胞を培養する。
2. 培養上清を取り除き、滅菌 PBS で 1 回洗浄する。
3. (1) 固定液を各ウェルに 200 μ l ずつ加えて室温で 5 分間放置し、細胞をウェルに固定する。
4. 滅菌蒸留水を各ウェルに約 2 ml 加えて固定液を希釈し、それから液を吸い出す。再び滅菌蒸留水を約 2 ml 加えてウェルを洗浄し、最終的に液を取り除く。サンプルはこの段階からは乾燥してもよく、 -20°C 以下で 1 週間程度であれば、保管することができる。

※ 調製した固定液で 24 ウェルプレート 5 枚分の固定が可能です。

B. 96 ウェルプレートで培養した細胞をサンプルとする場合

24 ウェルプレートの場合と基本的に操作は同様である。固定液の量は 1 ウェルあたり 50 μ l、洗浄に用いる滅菌蒸留水の量は 250 μ l が適当である。

※ 調製した固定液で 96 ウェルプレート 5 枚分の固定が可能です。

< 活性染色 >

A. 単独染色の場合

1. [VI. 試薬の調製] の方法に従い、酸性ホスファターゼ基質液またはアルカリ性ホスファターゼ基質液を準備する。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の検出には酸性ホスファターゼ基質液に対し、1/10 量の (2) 酒石酸 (Sodium tartrate) を加えておく。
2. 細胞を固定したウェルまたはスライドガラスに基質液を加え、蓋をする。スライドガラスの場合は乾燥を防ぐためパラフィルムで覆う。

基質使用量の目安：	24 ウェルプレート	200 μ l/well
	96 ウェルプレート	50 μ l/well
	スライドガラス	適当量

3. 37°C で 15 ~ 45 分反応させる。
(注) 発色時間は細胞中に存在するホスファターゼ量により左右されます。
4. 反応液を取り除き、滅菌蒸留水で 3 回洗浄して反応を止める。
5. 検鏡する。(滅菌蒸留水を加えて検鏡することも可能)
(注) 染色サンプルを保存する場合は、乾燥を防ぐためグリセロール溶液などを加えてください。

B. 二重染色の場合

注意：酵素の二重染色を実施する場合、必ず酸性ホスファターゼ活性を先に検出して、その後にアルカリ性ホスファターゼ基質に置き換えてください。逆に実施した場合、酸性ホスファターゼの一部が失活します。

1. 酸性ホスファターゼ基質液を準備し、[A. 単独染色の場合] の手順 1. ~ 3. に従って反応を行う。
2. 反応液を取り除き、滅菌蒸留水で 3 回洗浄する。
3. アルカリ性ホスファターゼ基質液を準備し、[A. 単独染色の場合] の手順 1. ~ 3. に従って反応を行う。
4. 反応液を取り除き、滅菌蒸留水で 3 回洗浄する。
5. 検鏡する。(滅菌蒸留水を加えて検鏡することも可能)
(注) 染色サンプルを保存する場合は、乾燥を防ぐためグリセロール溶液などを加えてください。

< 核染色 >

注意： 活性染色後、さらにメチルグリーンで染色をすると、活性染色が見にくくなる場合があります。メチルグリーンによる核染色を実施する前に、必ず一度、検鏡してください。

1. 活性染色のウェルまたはスライドガラスに、細胞を覆う程度の量の (5) 核染色試薬 (Nuclear stain) を加える。
2. 室温で 5 分程度染色する。
3. 滅菌蒸留水で洗浄し、乾燥を防ぐためにグリセロール溶液などを加えてから検鏡する。

• 実施例 1

16 週齢 JW ウサギ (雄) から採取した骨髄細胞を M-CSF、および活性型ビタミン D3 存在下で培養を続け、6 日目に酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性染色を行った。(図 1)

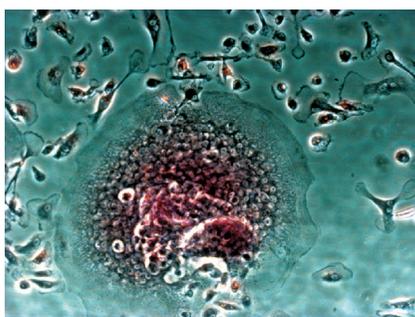


図 1. ウサギ培養骨髄細胞の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性染色

• 実施例 2

24 日齢 SD ラット (雌) から採取した骨髄細胞を M-CSF、および活性型ビタミン D3 存在下で培養を続け、10 日目にアルカリ性ホスファターゼ活性染色を行った。(図 2)



図 2. ラット培養骨髄細胞のアルカリ性ホスファターゼ活性染色

• 実施例 3

ヒト骨髄由来単核細胞 (Human Bone Marrow Mononuclear Cells) を種々の添加因子の存在下で培養し、分化細胞となった時期 (培養 9 日目) に、酒石酸耐性酸性ホスファターゼおよびアルカリ性ホスファターゼの活性染色をそれぞれ実施した。(図 3)

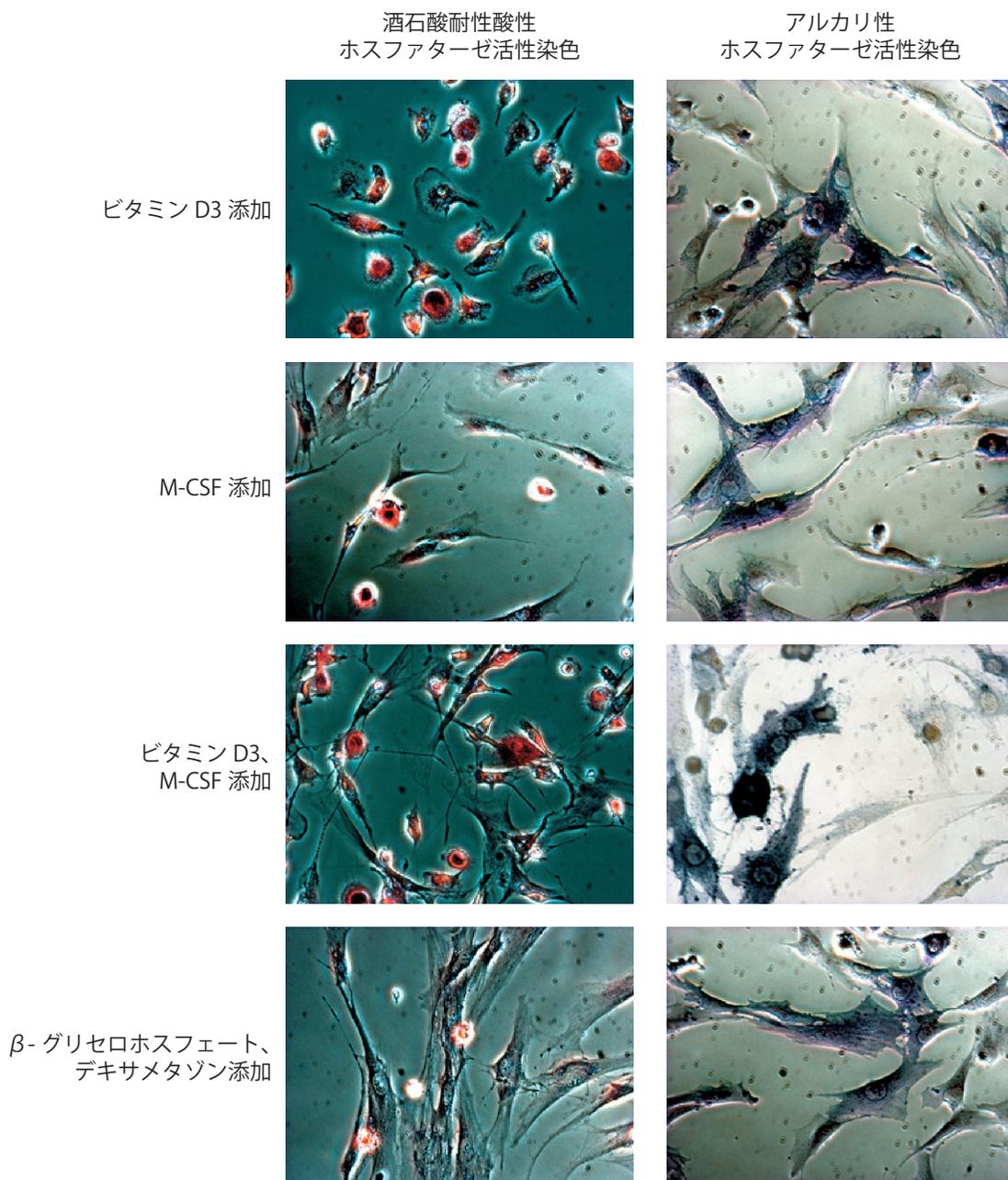


図 3. 酒石酸耐性酸性 ホスファターゼ活性染色とアルカリ性ホスファターゼ活性染色

• **実施例 4**

ラット骨髄細胞を M-CSF、および活性型ビタミン D3 存在下で培養し、分化細胞とした。12 日目に活性二重染色を実施した。(図 4)

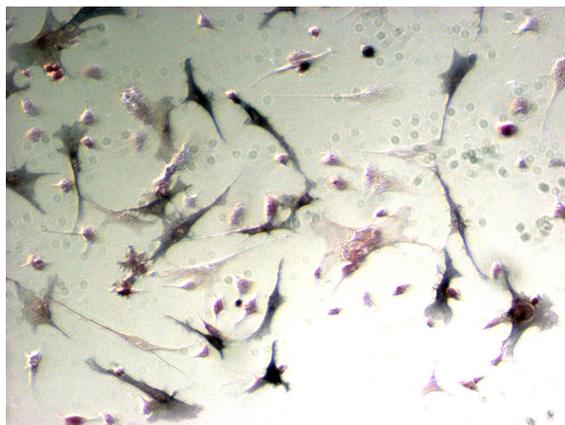


図 4. TRACP と ALP の活性二重染色

• 実施例 5

新生 1 日目マウスの凍結切片を用いて、TRACP 酵素と ALP 酵素のそれぞれの活性染色を実施した。2 枚の凍結スライド上に固定液を各 250 μ l 滴下し、室温 5 分間の固定処理後、純水でよく洗浄し、臓器のまわりの余分な水分をペーパーでふきとった。1 枚には酒石酸を加えた TRACP 基質 250 μ l をスライド上に滴下し、他の 1 枚には ALP 基質 250 μ l を滴下して、37 $^{\circ}$ C インキュベーターに静置した。45 分後に基質液を純水で洗って除き、余分な水分をふきとって、そのまま検鏡した。スライドは薄切後、約 6 ヶ月間 -80 $^{\circ}$ C 保存していたものであったが、酵素活性は、薄切当時に実施した活性染色とほとんど変わらない結果が得られた。(図 5)

ALP 染色



TRACP 染色

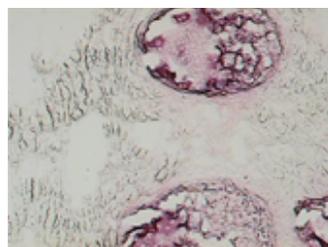
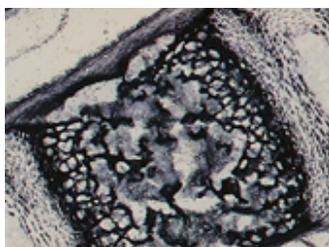
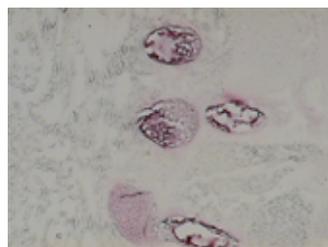
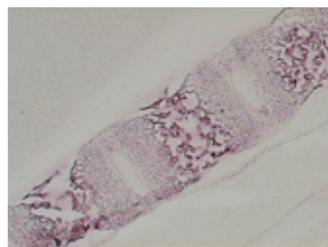
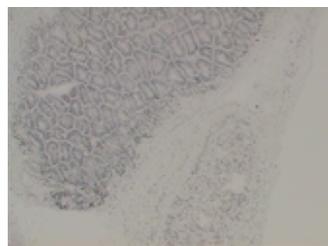


図 5. 新生 1 日目マウス新鮮凍結切片の酵素活性染色

VIII. 参考文献

- 1) Burstone, M. S. *et al. J Natl Cancer Inst.* (1958) **20**: 601-615.
- 2) Burstone, M. S. *et al. J Natl Cancer Inst.* (1958) **21**: 523-539.
- 3) Burstone, M. S. *J Histochem Cytochem.* (1959) **7**: 39-41.
- 4) Harlow and Lane. *Antibodies, A LABORATORY MANUAL.* (1988) 406-407.

IX. 注意

- ・ 固定液の調製に必要な有機溶媒（アセトン・エタノール）の保管および取扱いには充分ご注意ください。
- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社