

TRAP Assay Set

酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase : TRAP) は、破骨細胞の分化マーカーとして広く認識されており、破骨細胞の培養においては、分化に伴い培地中に放出されます¹⁾²⁾。本製品は、培養破骨細胞の TRAP 活性を検出する試薬セットで、破骨細胞の分化や骨粗鬆症薬などの評価にご使用いただけます。

培養上清または固定した細胞に、p-ニトロフェニルリン酸を含む基質溶液を加え、TRAP 酵素の反応により生じた p-ニトロフェノールを 405nm の吸光度により検出する簡便な方法です。

1) 試薬セットの構成

- ① TRAP Assay Substrate Solution (製品コード : TRAP-S1、15mL、2本)
p-ニトロフェニルリン酸および酒石酸ナトリウムを含むクエン酸緩衝液(pH5.5)
- ② TRAP Assay Stop Solution (製品コード : TRAP-E1、15mL、2本)
水酸化ナトリウム水溶液 (0.1mol/L)

2) 方法 (使用例)

培養上清の TRAP 活性

- (1) マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を、10%FBS 含有 MEM α にて培養プレートに播種し、同時に RANKL および評価薬剤を添加して培養する。
96well : 2,000cells/0.2mL/well
48well : 5,000cells/0.5mL/well
24well : 10,000cells/1mL/well
- (2) 培養 72 時間後あるいは 96 時間後に、吸光度測定用の 96well プレートに培養上清を 50 μ L ずつ回収する。
- (3) 各 well の上清に TRAP Assay Substrate Solution を 50 μ L ずつ添加、混合した後、37°C で 30 分間~1 時間反応 (遮光) する。
- (4) 各 well に TRAP Assay Stop Solution を 50 μ L ずつ添加して (この時点で発色します)、攪拌する。
- (5) 405nm の吸光度を測定する。

細胞の TRAP 活性

- (1) 培養後、プレートの各 well の培地を除去した後、10%中性緩衝ホルマリン溶液を添加して、室温で 10 分間細胞を固定する。
- (2) 固定液を除き、精製水 (0.2~1mL) にて各 well の細胞を 2 回洗浄する。
- (3) 下記容量の TRAP Assay Substrate Solution を添加、37°C で 30 分間~1 時間反応 (遮光) する。
96well プレート : 100 μ L/well
48well プレート : 250 μ L/well
24well プレート : 500 μ L/well
- (4) TRAP Assay Substrate Solution と同量の TRAP Assay Stop Solution を添加して (この時点で発色します)、軽く攪拌する。
- (5) 反応液を吸光度測定用の 96well プレートに 100 μ L ずつ回収後、405nm の吸光度を測定する。

3) 注意事項

- (1) 本試薬ご使用の際には、必ず眼鏡・手袋等の保護具を着用の上、人体へ接触しないようご注意ください。
- (2) 本試薬の解凍後は、よく攪拌してご使用ください。
- (3) 測定使用後の残余試薬を保存する際は、冷凍 (-20°C) してください。再凍結融解を 3 回実施後も品質に問題ないことを確認しております。
- (4) TRAP 基質との反応の際は遮光し、ご使用の培養系に合わせて反応時間を調節してください。反応停止液を添加した段階で発色します。
- (5) 反応は室温でも可能ですが、37°C での反応と比較して全体的に低い吸光度となります。
- (6) フェノールレッドを含む培養上清にもご使用いただけます。
- (7) リン酸カルシウム固着プレート (骨吸収活性評価プレート) を用い、細胞の TRAP 活性を測定する場合、Stop Solution 添加により白濁しますので、2,000 x g、3 分間遠心した後の上清を使用してください。

4) 文献

- 1) Alatalo SL, Clin Chem, 2000, 46(11):1751-1754.
- 2) Lv Y, Exp Ther Med, 2015, 9(1):143-146.

5) 参考データ

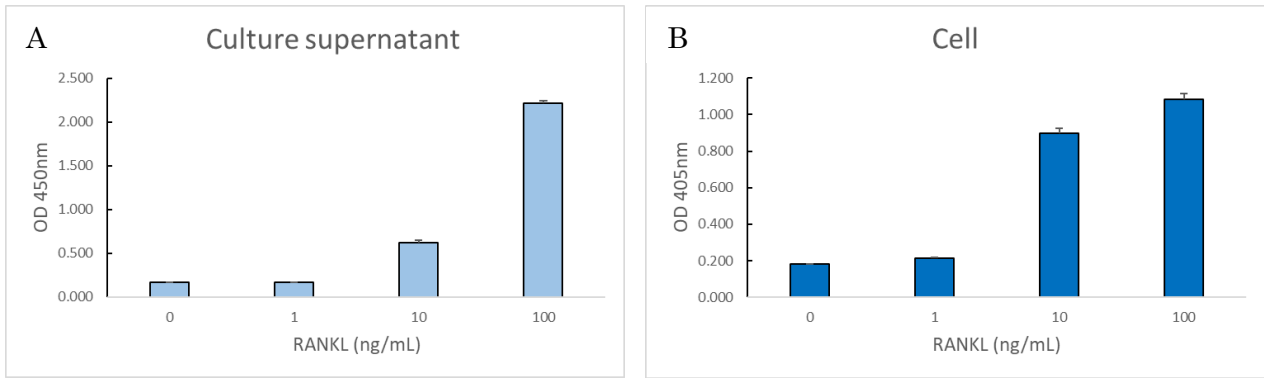


図 1. RAW264.7 細胞(48well プレート、10%FBS/MEM α)を、播種と同時に RANKL を添加して 96 時間培養し、培養上清および細胞を回収した。A: 培養上清 50 μ L に Substrate Solution を 50 μ L、B: 固定/洗浄後の細胞に Substrate Solution を 250 μ L 添加して、37°C で 1 時間反応させた。Stop Solution を加えた後、405nm の吸光度を測定した。(Mean \pm SD、n=4)

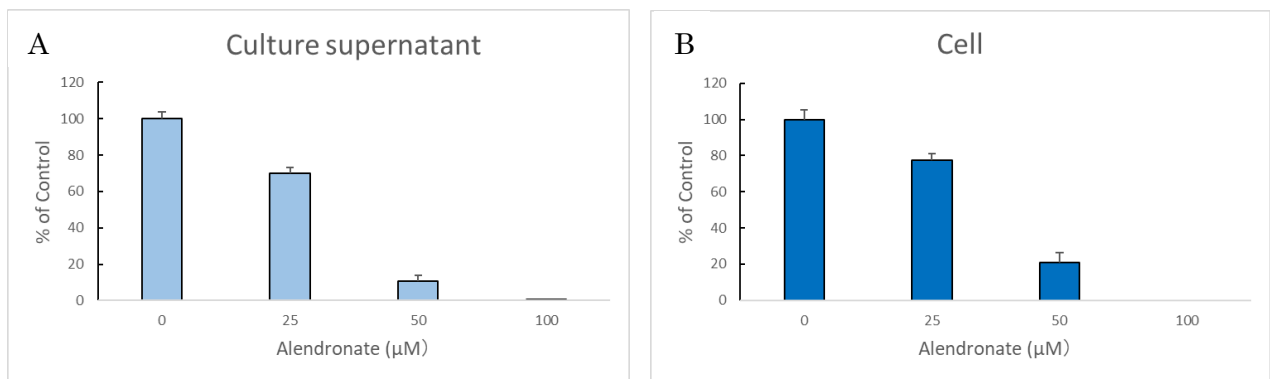


図 2. RAW264.7 細胞(96well プレート、10%FBS/MEM α)を、播種と同時に RANKL(100ng/mL)および Alendronate を添加して 72 時間培養し、培養上清および細胞を回収した。A: 培養上清 50 μ L に Substrate Solution を 50 μ L、B: 固定/洗浄後の細胞に Substrate Solution を 100 μ L 添加して、37°C で 1 時間反応させた。Stop Solution を加えた後、405nm の吸光度を測定した。RANKL により誘導された TRAP 活性を Control (100) とし、%値で示した。(Mean \pm SD、n=6)

6) 製品の価格

製品コード	品名	仕様	価格	備考
TRAP-SET	TRAP Assay Set	1 セット (TRAP-S1、TRAP-E1: 各 2 本)	21,000 円	冷凍保存 (-20°C 以下)

2024 年 9 月 1 日