

CODE No. 8445

Revised: February, 2022 ver. 3

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

In situ detection kit for Programmed Cell Death

MEBSTAIN

Apoptosis TUNEL Kit Direct

CODE No. 8445

FCM: 66 tests/stain: 40 tests

CONTENTS

1. Intended Use -----	1
2. Summary and Explanation-----	1
3. Principle -----	1
4. Materials provided -----	2
5. Storage -----	2
6. Expiration -----	2
7. Precautions -----	2
8. Procedure -----	2
9. References -----	8

Before use, thoroughly read these Instructions.

Intended Use

The **MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct** is intended for the detection of apoptotic cells in research samples. It is suitable for histochemistry, cytospin preparation, and flow cytometry. **For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

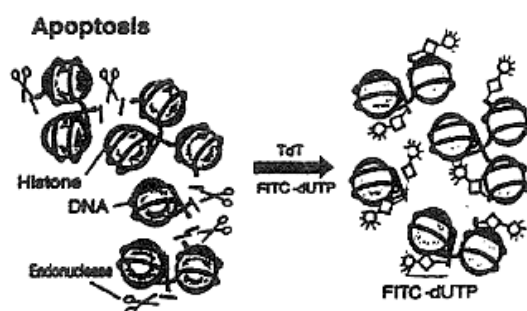
Summary and Explanation

Programmed cell death is a selective process of physiological cell deletion. It plays a major role in developmental biology and in maintenance of homeostasis in vertebrates^{8), 9), 12), 13)}. For example, during maturation, T cells recognizing self antigens are destroyed by programmed cell death¹¹⁾. Programmed cell death is morphologically known as apoptosis. Apoptosis is accompanied by condensation of cytoplasm, loss of plasma membrane microvilli, condensation and fragmentation of nuclei, and extensive degradation of chromosomal DNA into oligomers of about 180 bp. It has been considered that fragmentation of nuclear DNA is a biochemical hallmark of apoptosis. The TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling method (TUNEL method) developed by Gavrieli et al.¹⁴⁾ has enabled *in situ* visualization of DNA fragmentation at the single cell level and is considered to be a more sensitive method than conventional morphological techniques¹⁰⁾.

The MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct is an apoptosis detection kit based on the TUNEL method. The main advantage of this rapid and simple procedure is the use of fluorescein-dUTP to label DNA strand breaks. This allows the direct detection of DNA fragmentation.

Principle

In cells in which apoptosis occurs, the chromatin DNA is cut by endonuclease at linker DNA site between nucleosomes. Then, DNA fragments, which are a number of multimers of nucleosomal units exit in nuclei. In TUNEL method, 3'-OH DNA ends generated by DNA fragmentation is nick end labeled with fluorescein-dUTP, mediated by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). This method allows specific staining.



Materials provided

Each kit contains;

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Proteinase K (PK)	Proteinase K	0.4 mL × 1 vial
TdT	TdT	0.1 mL × 1 vial
TdT buffer II	Buffer for preparing TdT solution	2.0 mL × 3 vials
FITC-dUTP	FITC conjugated dUTP (ready-for-use)	0.1 mL × 1 vial
TB buffer (×10)	TB buffer (×10)	50 mL × 1 bottle

Storage

All kit components must be stored at -20°C.

Expiration

Please see the label of this kit.

Precautions

1. Allow all the components to come to room temperature (20-25°C) before use.
2. **TdT** contains 90 mM sodium cacodylate and 90 mM potassium cacodylate. **TdT buffer II** contains 100 mM potassium cacodylate. As cacodylic acid is arsenic compound, do not dispose materials containing TdT and TdT buffer II into a drain.
3. **TdT** contains 2-mercaptoethanol (0.05%). Handle with care.
4. This kit is intended for research use only. Not for use in diagnostic procedures.

Procedure

◆ Preparation of Reagents

1. Proteinase K (PK) solution

Prepare “**PK solution**” by diluting **Proteinase K, 1:25** with PBS. Warm this solution to 37°C prior to use.

Example: Dilute 10 µL of Proteinase K to 240 µL of PBS.

2. TdT solution

Prepare “**TdT solution**” by mixing the **TdT buffer II, FITC-dUTP, and TdT** at **18:1:1** prior to use.

Example: Mix 45 µL of TdT buffer II, 2.5 µL of FITC-dUTP, and 2.5 µL of TdT.

* Prepare “**TdT solution**” on the ice.

3. TB solution

Prepare “**TB solution**” by diluting **TB buffer, 1:10** with distilled water prior to use.

Example: Dilute 50 mL of TB buffer to 450 mL of distilled water.

* After thawing TB buffer, it should be stored at 4°C.

◆ for Immunohistochemistry

Materials required but not provided.

- Xylen
- Ethanol (100%, 90%, 80%)
- Phosphate buffered saline (PBS)
- Distilled water
- Mounting medium (90% glycerin, 10% PBS)
- 4% paraformaldehyde [0.1M NaH₂PO₄, pH7.4]
- Propidium Iodide (0.5 mg/mL) *It is for counterstaining.
- Cover slip
- Moist chamber
- Adequate test tube
- Adjustable micropipette

STEP 1. (Preparation of tissue sections)

- 1) Use glass slides pretreated with silane.
- 2) Fix the samples with 4% paraformaldehyde.

Note

4% paraformaldehyde is recommended for sensitive detection. Do not use ethanol and acetone because they may cause non-specific staining.

3-5 µm thick of sections are suitable for staining.

a) Paraffin embedded tissue sections

Fix tissue samples in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin.

b) Frozen tissue sections

Post-Fix cryosections in 4% paraformaldehyde. After the fixation, wash the fixed cryosection with PBS 2 times for 5 minutes each.

When using frozen tissue sections, be careful not to allow it to dry. Proceed directly **STEP 4.**

(DNA nick end labeling).

STEP 2. (Deparaffinization)

Be careful not to allow tissue sections to dry at each step.

- 1) Deparaffinize the sections with Xylene 3 times for 3 minutes each.
- 2) Wash the slides with 100% Ethanol 3 times for 3 minutes each.
- 3) Wash the slides with 90% Ethanol 3 times for 3 minutes each.
- 4) Wash the slides with 80% Ethanol 3 times for 3 minutes each.
- 5) Wash the slides with distilled water 4 times for 2 minutes each.

STEP 3. (Treatment with proteinase K (PK))

This step is not required for frozen tissue sections.

- 1) Pipette 500 μ L of PBS on the section and incubate it for 30 minutes at 37°C. (Or put the slide into a jar filled with PBS which is warmed to 37°C, and incubate it for 15-30 minutes at 37°C.)
- 2) After removing PBS buffer by tapping off, pipette 250 μ L of **PK solution** on the section and incubate it for 30 minutes at 37°C.
- 3) Wash the slides with distilled water at 4 times for 2 minutes each.

Note

In the meantime, prepare **TdT solution**. Preparation should be in the ice.

STEP 4. (DNA nick end labeling)

- 1) Pipette 50 μ L of **TdT buffer II** on the section and incubate it for 5-10 minutes at room temperature.
- 2) After removing **TdT buffer II** by tapping off, pipette 50 μ L of **TdT solution** and incubate it for 60 minutes at 37°C.
- 3) After removing **TdT solution** by tapping off, immerse the slides in **TB solution** in a coplin jar and incubate it for 15 minutes at room temperature.
- 4) Wash the slides with distilled water 4 times for 2 minutes each.

STEP 5. (Counterstaining)

- 1) Pipette 50 μ L of Propidium Iodide (0.5 μ g/mL) on the section and incubate it for 15-20 minutes at 4°C.
- 2) Wash the slides with PBS for 3-5 minutes.

STEP 6. (Mounting and microscopy)

- 1) Mount with mounting medium (90% glycerin, 10% PBS) under coverslip.
- 2) View by fluorescent microscopy.

◆ for Flow Cytometry

It is recommended that the positive and negative controls are set.

Example: as a negative control; peripheral blood mono nuclear cell or cultured cells, such as Raji cells etc. (more than 95% viability).

as a positive control; those above cells which are treated with DNase I (1 µg/mL) for 60 minutes at 37°C. DNase I treatment should be done after permeabilization.

Materials required but not provided.

- Phosphate buffered saline (PBS)
- PBS containing 0.2% BSA
- 4% paraformaldehyde [0.1M NaH₂PO₄, pH7.4]
- 70% Ethanol
- Distilled water
- Adequate test tube
- Adjustable micropipette

STEP 1. (Fixation of cells)

- 1) Wash the cells with PBS containing 0.2% BSA several times.
- 2) Fix the cells with 4% paraformaldehyde for 30 minutes at 4°C.
- 3) Wash the cells with PBS containing 0.2% BSA 2 times.

Note

4% paraformaldehyde is recommended for sensitive detection. Do not use ethanol and acetone because they may cause non-specific staining.

STEP 2. (Permeabilization)

Add 200 µL of 70% Ethanol to the cell pellet, and mix it gently. Then incubate it for 30 minutes at -20°C to permeabilize.

Note

In the meantime, prepare TdT solution. Preparation should be done in the ice.

When the next step can't be done right after this step, cells are suspended in 70% Ethanol and stored at -20°C until test. The test should be done within one week.

STEP 3. (DNA nick end labeling)

- 1) After washing with PBS containing 0.2% BSA 2 times, add 30 μL of **TdT solution** to the cell pellet and incubate it for 60 minutes at 37°C. As negative control, add 30 μL of **negative TdT solution (TdT buffer II and FITC-dUTP at 19:1 (28.5 μL : 1.5 μL))** to the cell pellet and incubate it for 60 minutes at 37°C.
- 2) Wash the cells with PBS containing 0.2% BSA 2 times.
- 3) Suspend the cell pellet to 200-500 μL of PBS containing 0.2% BSA and analyze by a flow cytometer.

◆ for Cytospin samples

It is recommended that the positive and negative controls are set.

Example: as a negative control; peripheral blood mono nuclear cell or cultured cells, such as Raji cells etc. (more than 95% viability).

as a positive control; those above cells which are treated with DNase I (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 60 minutes at 37°C. DNase I treatment should be done after permeabilization.

Materials required but not provided.

- PBS containing 2% fetal calf serum (FCS) and 0.09% NaN_3
- Distilled water containing 0.2% BSA
- PBS-T (0.5% Tween-20 and 0.2% BSA in PBS)
- 4% paraformaldehyde [0.1M NaH_2PO_4 , pH7.4]
- Propidium Iodide (0.5 mg/mL) *It is for counterstaining.
- Mounting medium (90% glycerin, 10% PBS)
- Cover slip
- Moist chamber
- Adequate test tube
- Adjustable micropipette

STEP 1. (Cytospin)

Wash the cells with PBS (2% FCS, 0.09% NaN₃) several times and cytopsin according to the normal method.

Condition of cytopsin is depend on the instrument used.

Number of cells: 50-100 μ L of cell suspension (1×10^5 cells/mL) per slide

Rotation: 300-500 \times g

Time: 5-10 minutes

STEP 2. (Fixation of cells)

- 1) Dry the cytopsin slide for about 60 minutes by airing gently.
- 2) Fix the cells with 4% paraformaldehyde for 15 minutes at 4°C.

Note

4% paraformaldehyde is recommended for sensitive detection. Do not use ethanol and acetone because they may cause non-specific staining.

STEP 3. (Permeabilization)

After removing 4% paraformaldehyde by tapping off, pipette PBS-T (0.5% Tween-20 and 0.2% BSA in PBS) onto the cells, and incubate it for about 15 minutes at room temperature.

Note

In the meantime, prepare TdT solution and negative control. Preparation should be done on the ice.

STEP 4. (DNA nick end labeling)

- 1) Wash the slide with distilled water 3 times.
- 2) After removing distilled water by tapping off, pipette 50 μ L of **TdT solution** onto the cells and incubate it for 60 minutes at 37°C. As negative control, add 50 μ L of **negative TdT solution (TdT buffer II and FITC-dUTP at 19:1 (28.5 μ L: 1.5 μ L))** onto the cells and incubate it for 60 minutes at 37°C.
- 3) After removing TdT solution by tapping off, wash the slides with PBS at 3 times.

STEP 5. (Counterstaining)

- 1) Pipette 50 μ L of Propidium Iodide (0.5 μ g/mL) on the section and incubate it for 15-20 minutes at 4°C.
- 2) Wash the slides with PBS 3 minutes.

STEP 6. (Mounting and microscopy)

- 1) Mount with mounting medium (90% glycerin, 10% PBS) under coverslip.
- 2) View by fluorescent microscopy.

References

- 1) Kozaki, K., *et al.*, *Cancer Res.* **68**, 2094-2105 (2008)
- 2) Hara, H., *et al.*, *J. Immunol.* **180**, 7859-7868 (2008)
- 3) Numata, K., *et al.*, *J. Immunol.* **178**, 3777-3785 (2007)
- 4) Yano, T., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4474-4488 (2006)
- 5) Pati, D., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8267-8277 (2002)
- 6) Yoshikawa, R., *et al.*, *Cancer Res.* **61**, 1029-1037 (2001)
- 7) Negoro, S., *et al.*, *Circulation* **103**, 555-561 (2001)
- 8) Steller, H. *Science* **267**, 1445-1449 (1995)
- 9) Mori, C., *et al.*, *Anat. Rec.* **242**, 103-110 (1995)
- 10) Carbonari, M., *et al.*, *Cytometry* **22**, 161-167 (1995)
- 11) Krammer, P. H., *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 279-289 (1994)
- 12) Mori, C., *et al.*, *Anat. & Embryol.* **190**, 21-28 (1994)
- 13) Wyllie, A. H., *et al.*, *Br. J. Cancer* **67**, 205-208 (1993)
- 14) Gavrieli, Y., *et al.*, *J. Cell Biol.* **119**, 493-501 (1992)

For more information, please visit our web site.

<https://ruo.mbl.co.jp/>

Manufacture

MBL A JSR Life Sciences Company
MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.
URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail support@mbi.co.jp

はじめに

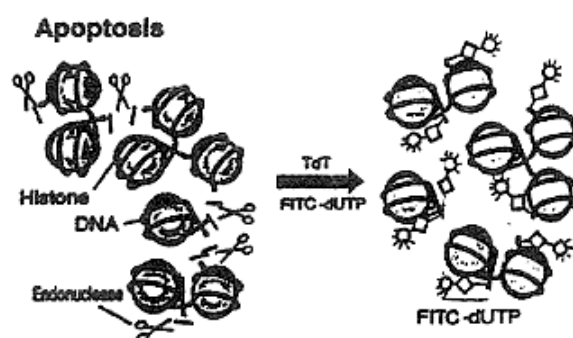
細胞死は、多細胞生物の恒常性の維持のために、生体内において常に制御されています。たとえば、発生過程は多くの細胞死の上に成立し、免疫系においては、胸腺 T 細胞の成熟過程において、自己を認識する細胞が、細胞死によって除去されていきます。また、神経系においても、そのネットワークの形成において多くの細胞死を伴うことが知られています。これらの死は個体にとって不要となった細胞を排除するために起こる積極的な現象であり、あらかじめ予定された死という意味で **programmed cell death** と呼ばれています。

Programmed cell death は、アポトーシスの過程によって引き起こされ、形態学的には細胞核クロモソームの凝集、細胞核の断片化、細胞表面絨毛の欠失が、生化学的にはクロモソーム DNA の断片化が、認められます。細胞や組織でのアポトーシス検出方法として、HE 染色や、DNA ladder をアガロースゲル上で観察する方法もありますが、DNA 断片化を起している細胞を特異的に検出する TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法が、病理学の分野を中心によく利用されています。TUNEL 法は、*in situ* で DNA の断片化を細胞個々に検出できる点で魅力的であり、感度、特異性の点においても優れています。

MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct は、TUNEL 法を原理とした試薬で、DNA の断片化を指標に、*in situ* においてアポトーシスによる細胞死を細胞個々に検出することが可能です。Flow cytometer で使用した場合、他の細胞表面マーカーや抗体などと組み合わせて二重染色することができます。

測定原理

MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct は、TUNEL 法により、DNA の断片化を指標として *in situ* においてアポトーシスによる細胞死を細胞個々に検出する試薬です。組織切片をプロテアーゼ処理した後、細胞内の核における断片化 DNA の 3'-OH 末端部分に fluorescein-dUTP を結合させることにより DNA 断片分解産物に特異的な蛍光が検出できます。



キット構成

Name	Materials	Quantity (for 1 kit)
Proteinase K (PK)	Proteinase K	0.4 mL × 1 vial
TdT	TdT	0.1 mL × 1 vial
TdT buffer II	Buffer for preparing TdT solution	2.0 mL × 3 vials
FITC-dUTP	FITC conjugated dUTP (ready-for-use)	0.1 mL × 1 vial
TB buffer (×10)	TB buffer (×10)	50 mL × 1 bottle

保存

-20°Cにて保存して下さい。

製品有効期限

製品の外箱ラベルをご確認下さい。

操作上の留意点

1. キットの構成は、室温（20-25°C）に戻してから使用して下さい。
2. **TdT**には90 mM カコジル酸ナトリウム、及び、90 mM カコジル酸カリウムが含まれています。**TdT buffer II**には100 mM カコジル酸カリウムが含まれています。TdTやTdT bufferを含んだ液は、専用の廃液入れに入れて下さい。
3. **TdT**には2-メルカプトエタノール（0.05%）が含まれています。取扱いには注意して下さい。
4. 本試薬は研究用試薬です。ヒトの体内に用たり、診断の目的に使用しないで下さい。

操作法**◆ 試薬の調整****1. Proteinase K (PK) solution [PK溶液]**

Proteinase K (PK) を、PBSを用いて**25倍**に希釈することで“**PK solution**”とします。 **PK solution**は使用前に37°Cに温めて下さい。

例) 240 µLのPBSに、Proteinase K 10 µLを加える。

2. TdT solution [TdT溶液]

使用直前に、**TdT buffer II**、**FITC-dUTP**、**TdT**を**18:1:1**の割合で混合することで、“**TdT solution**”とします。

例) 45 µLのTdT buffer II、2.5 µLのFITC-dUTP、2.5 µLのTdTを混合する。

*“**TdT solution**” は、氷中で作製して下さい。

3. TB solution [TB溶液]

使用直前に、TB bufferを、蒸留水を用いて10倍に希釈することで“TB solution”とします。

例) 450 mLの蒸留水に、50 mLのTB bufferを加える。

*TB bufferは、溶解後、4°Cにて保存して下さい。

◆ 免疫組織染色

準備するもの

- ・ キシレン
- ・ エタノール (100%、90%、80%)
- ・ リン酸緩衝液 (PBS)
- ・ 精製水
- ・ 封入剤 (90%グリシン、10% PBS)
- ・ 4% パラホルムアルデヒド[0.1M NaH₂PO₄、pH7.4]
- ・ Propidium Iodide (0.5 mg/mL) * 対比染色用
- ・ カバーガラス
- ・ 湿潤箱
- ・ 試験管/チューブ
- ・ マイクロピペット

STEP 1. (組織切片の準備)

- 1) シランコートしたスライドガラスを使用して下さい。
- 2) 組織を4% パラホルムアルデヒド (4% PFA) で固定します。

注意

10%ホルマリンや中性ホルマリンでの固定も可能ですが、若干、検出感度が落ちますので、4% PFA の使用をお勧めします。エタノールやアセトンは非特異染色の原因となる場合がありますので使用しないで下さい。

組織の厚さは、3-5 μm が適当です。

a) パラフィン包埋切片

4% PFA で固定後、パラフィン包埋します。

b) 凍結切片

凍結切片を4% PFA で固定後、PBS にて5分ずつ2回、洗浄して下さい。

凍結切片を使用する場合は、STEP 4. (DNA nick end labeling)から操作を開始して下さい。また、切片の乾燥に注意して下さい。

STEP 2. (脱パラフィン処理)

各操作ステップにおいて、組織の乾燥に注意して下さい。

- 1) キシレンに3分ずつ3回、浸漬します。
- 2) 100%エタノールに3分ずつ3回、浸漬します。
- 3) 90%エタノールに3分ずつ3回、浸漬します。
- 4) 80%エタノールに3分ずつ3回、浸漬します。
- 5) 精製水に2分ずつ4回、浸漬します。

STEP 3. (proteinase K (PK) 処理)

凍結切片を使用する場合、本操作は不要です。

- 1) 500 μ LのPBSを組織にのせ、37°Cで30分間反応させます。(あるいは、37°Cに温めたPBSを入れた容器にスライドを入れ、15-30分間反応させます。)
- 2) PBSを払い落とし、250 μ LのPK solutionを組織にのせ、37°Cで30分間反応させます。
- 3) 精製水に2分ずつ4回、浸漬して洗浄します。

注意

反応させている間にTdT solutionを準備します。TdT solutionの作製は氷中で行って下さい。

STEP 4. (DNA nick end labeling)

- 1) 50 μ LのTdT buffer IIを組織にのせ、室温で5-10分間反応させます。
- 2) TdT buffer IIを払い落とし、50 μ LのTdT solutionを組織にのせ、37°Cで60分間反応させます。
- 3) TdT solutionを払い落とし、TB solutionを入れた容器に浸漬して、室温で15分間反応させます。
- 4) 精製水に2分ずつ4回、浸漬して洗浄します。

STEP 5. (対比染色)

- 1) 50 μ LのPropidium Iodide (0.5 μ g/mL) を組織にのせ、4°Cで15-20分間反応させます。
- 2) PBSに5分浸漬して洗浄します。

STEP 6. (封入と検鏡)

- 1) 封入剤 (90% グリセリン、10% PBS) で封入し、カバーガラスをかけます。
- 2) 蛍光顕微鏡にて検鏡します。

◆ フローサイトメトリー法

陽性コントロールと陰性コントロールをおいて測定することをお勧めします。

例) 陽性コントロール; 末梢血単核球やRaji細胞などの細胞株 (生存率95%以上) を、DNase I処理 (DNase

I (1 µg/mL)を37°Cで60分間処理) したもの

陰性コントロール; DNase I処理していない上記の細胞

準備するもの

- ・ リン酸緩衝液 (PBS)
- ・ PBS (0.2% BSA含)
- ・ 4% パラホルムアルデヒド [0.1M NaH₂PO₄, pH7.4]
- ・ 70% エタノール
- ・ 精製水
- ・ 試験管/チューブ
- ・ マイクロピペット

STEP 1. (細胞の固定)

- 1) 細胞を PBS (0.2% BSA 含) で数回洗浄します。
- 2) 4% パラホルムアルデヒド (4% PFA) を用いて 4°C で 30 分間固定します。
- 3) 細胞を PBS (0.2% BSA 含) で 2 回洗浄します。

注意 エタノールやアセトンは非特異染色の原因となる場合がありますので、固定に使用しないで下さい。

STEP 2. (細胞の透過性充進処理)

cell pellet に 200 µL の 70% エタノールを加え懸濁し、-20°C で 30 分間処理します。

注意

この処理を行っている間に **TdT solution** を準備します。**TdT solution** の作製は氷中で行って下さい。
以降の操作ステップへ直ちに進めない場合は、細胞を 70% エタノールに懸濁して-20°C にて保存します。保存したサンプルは 1 週間以内に測定して下さい。

STEP 3. (DNA nick end labeling)

- 1) PBS (0.2% BSA含) で2回洗浄後、30 µLの**TdT solution**を加えて細胞を懸濁し、37°Cで60分間反応させます。陰性コントロールに対しては、30 µLの**negative TdT solution (TdT buffer II とFITC-dUTPを19:1の割合 (28.5 µL: 1.5 µL) で混合したもの)**を加えて細胞を懸濁し、37°Cで60分間反応させます。
- 2) PBS (0.2% BSA含) で2回洗浄します。
- 3) cell pelletに200-500 µLのPBS (0.2% BSA含) を加えて懸濁し、フローサイトメーターで測定します。

◆ Cytospin標本の染色

陽性コントロールと陰性コントロールをおいて測定することをお勧めします。

例) 陽性コントロール ; 末梢血単核球やRaji細胞などの細胞株 (生存率95%以上) を、DNase I処理 (DNase

I (1 µg/mL)を37°Cで60分間処理) したもの

陰性コントロール ; DNase I処理していない上記の細胞

準備するもの

- PBS (2% ウシ胎児血清 (FCS) 、 0.09% NaN₃)
- 精製水 (0.2% BSA含)
- PBS-T (0.5% Tween-20、 0.2% BSA)
- 4% パラホルムアルデヒド[0.1M NaH₂PO₄、 pH7.4]
- Propidium Iodide (0.5 µg/mL) * 対比染色用
- 封入剤 (90% glycerin、 10% PBS)
- カバーガラス
- 湿潤箱
- 試験管/チューブ
- マイクロピペット

STEP 1. (Cytospin)

細胞を PBS (2% FCS、 0.09% NaN₃) で数回洗浄し、従来法に基づいて実施します。

Cytospin は使用する機器によって、多少条件が異なりますが、下記の条件がおよその目安です。

細胞数 : スライドガラス 1 枚あたり、 50-100 µL の細胞懸濁液 (1 × 10⁵ cells/mL)

回転数 : 300-500 × g

時間 : 5-10 分間

STEP 2. (細胞の固定)

- 1) 扇風機などの優しい風に当てながら約 60 分間、細胞を風乾します。
- 2) 4% パラホルムアルデヒド (4% PFA) を用いて 4°C で 5 分間固定します。

注意

エタノールやアセトンは非特異染色の原因となる場合がありますので、固定に使用しないで下さい。

STEP 3. (細胞の透過性亢進処理)

4% パラホルムアルデヒドを払い落とし、PBS-T (0.5% Tween-20、 0.2% BSA) を細胞にのせて室温で 15 分間反応させます。

注意 反応させている間に **TdT solution** を準備します。 **TdT solution** の作製は氷中で行って下さい。

STEP 4. (DNA nick end labeling)

- 1) スライドを精製水で3回洗浄します。
- 2) 精製水を払い落とし、50 μ Lの**TdT solution**を細胞にのせて37°Cで60分間反応させます。
陰性コントロールに対しては、50 μ Lの**negative TdT solution (TdT buffer II と FITC-dUTPを19:1の割合 (28.5 μ L: 1.5 μ L) で混合したもの)**を細胞にのせて37°Cで60分間反応させます。
- 3) TdT solutionを払い落とし、スライドをPBSで3回洗浄します。

STEP 5. (対比染色)

- 1) 50 μ LのPropidium Iodide (0.5 μ g/mL) を細胞にのせ、4°Cで15-20分間反応させます。
- 2) スライドをPBSで3回洗浄します。

STEP 6. (封入と検鏡)

- 1) 封入剤 (90% グリセリン、10% PBS) で封入し、カバーガラスをかけます。
- 2) 蛍光顕微鏡にて検鏡します。

参考文献

- 1) Kozaki, K., *et al.*, *Cancer Res.* **68**, 2094-2105 (2008)
- 2) Hara, H., *et al.*, *J. Immunol.* **180**, 7859-7868 (2008)
- 3) Numata, K., *et al.*, *J. Immunol.* **178**, 3777-3785 (2007)
- 4) Yano, T., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4474-4488 (2006)
- 5) Pati, D., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8267-8277 (2002)
- 6) Yoshikawa, R., *et al.*, *Cancer Res.* **61**, 1029-1037 (2001)
- 7) Negoro, S., *et al.*, *Circulation* **103**, 555-561 (2001)
- 8) Steller, H. *Science* **267**, 1445-1449 (1995)
- 9) Mori, C., *et al.*, *Anat. Rec.* **242**, 103-110 (1995)
- 10) Carbonari, M., *et al.*, *Cytometry* **22**, 161-167 (1995)
- 11) Krammer, P. H., *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 279-289 (1994)
- 12) Mori, C., *et al.*, *Anat. & Embryol.* **190**, 21-28 (1994)
- 13) Wyllie, A. H., *et al.*, *Br. J. Cancer* **67**, 205-208 (1993)
- 14) Gavrieli, Y., *et al.*, *J. Cell Biol.* **119**, 493-501 (1992)

ここにご紹介する以外にも多数の文献がございます。
詳細は弊社 Web サイトをご覧ください。 <https://ruo.mbl.co.jp/>

CODE No. 8445

製造元

MBL A JSR Life Sciences Company

株式会社 医学生物学研究所

URL <https://ruo.mbl.co.jp> e-mail support@mbi.co.jp