

Code No. 294-83501 (10 tests)

Human ES/iPS Cell Staining Kit-BF

This kit is the product which can check the undifferentiated state of human ES/iPS cells under bright-field using the recombinant lectin rBC2LCN, which has a high affinity for undifferentiated human ES/iPS cells.

rBC2LCN is the recombinant lectin of the N-terminal domain of BC2L-C, which derived from *Burkholderia cenocepasia*. rBC2LCN has a high affinity for H type 3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc), which is the mucin-like O-type sugar chain on podocalyxin present in the cell membrane of human ES/iPS cells, so rBC2LCN is reported as an undifferentiated marker of human ES/iPS cells.

Peroxidase-labeled rBC2LCN staining procedures that produce a colored human ES/iPS cells can be visualized under bright-field microscopy. Because peroxidase-labeled rBC2LCN is used, undifferentiated human ES/iPS cells can be stained with a very simple procedure, and the undifferentiated state of human ES/iPS cells can be confirmed under bright-field without using a fluorescence microscope.

This product is for laboratory use only.

[Kit Components]

	Code No.	Components	Volume/Quantity
1	291-83511	rBC2LCN-POD	100 μ L/1 tube
2	298-83521	DAB Buffer	15 mL/1 bottle
3	295-83531	DAB Reagent	600 μ L/1 tube
4	292-83541	Washing Buffer (10 \times)	10 mL/1 bottle

[Reagents Required, not Supplied]

- Purified Water (Distilled Water)
- D-PBS (-)
- Hydrogen Peroxide Solution (if necessary)

[Reagents Preparation]

Please prepare each reagent according to the following procedures before use. Also, please prepare only the required volume at the time of use.

Preparation of rBC2LCN-POD Reaction Solution

Add 1/100 volume of rBC2LCN-POD to D-PBS (-) and mix well. After mixing, store in the dark and use within 2 hours.

Preparation of DAB Reaction Solution

Add 40 μ L of DAB Reagent to 1 mL of DAB Buffer, and mix well. After mixing, store in the dark and use within the day.

Preparation of Washing Buffer (1 \times)

Dilute the Washing Buffer (10 \times)^{**1} 10-fold with purified water (distilled water) and mix well.

[Procedures]

Please prepare the reagents according to [Reagents Preparation].

- (1). Prepare the vessels containing cells to be stained.^{**2, 3}
- (2). Discard the solution in the vessels^{**4}, and add the rBC2LCN-POD Reaction Solution to the vessels by referring to the Table 1.

Table 1

Vessel	rBC2LCN-POD Reaction Solution (mL)
6 well plate	1
12 well plate	0.5
24 well plate	0.25
96 well plate	0.1
35 mm dish	1
60 mm dish	2
100 mm dish	5

- (3). Incubate for 1 hour at room temperature in the dark.
- (4). Wash 3 times with Washing Buffer (1 \times).
- (5). Discard the Washing Buffer (1 \times) from the vessels, and add DAB Reaction Solution to the vessels by referring to the Table 2.

Table 2

Vessel	DAB Reaction Solution (mL)
6 well plate	1
12 well plate	0.5
24 well plate	0.25
96 well plate	0.1
35 mm dish	1
60 mm dish	2
100 mm dish	5

- (6). Incubate vessels at room temperature until staining develops. 2-10 minutes generally provides an acceptable staining intensity.
- (7). Wash the samples in Purified Water.

※1 The components of the Washing Buffer (10 \times) may precipitate when stored in a refrigerator. Therefore, after returning to room temperature, check that there are no precipitates before using. If there are precipitates, please use it after dissolution.

※2 If the cells are in culture, please fix the cells with 4% Paraformaldehyde.

※3 When cells with endogenous peroxidase are included, a non-specific reaction occurs. Please inactivate endogenous peroxidase with 3% Hydrogen Peroxidase Solution according to following procedures.

〈Procedures to inactivate peroxidase〉

- 1). Dilute the Hydrogen Peroxide Solution with D-PBS (-) to prepare a 3% Hydrogen Peroxidase Solution.
- 2). After discarding the solution in the vessels containing cells, add 3% Hydrogen Peroxide Solution.
- 3). Incubate at temperature for 5 minutes.
- 4). Wash 3 times with D-PBS (-).

※4 If the solution in which the cells are stored is not buffer solution such as D-PBS (-), please wash them before adding rBC2LCN-POD Reaction Solution.

【Package】

10 tests

【Storage】

Store at 2-10°C in the dark (Don't freeze)

Please use opened reagents as soon as possible since they may be affected by storage conditions. The remained solution should be stored at 2-10°C, in the dark, with the cap tightened.

【References】

1. Watanabe, T., Yasuda, S., Kusakawa, S., Kuroda, T., Futamura, M., Ogawa, M., Mochizuki, H., Kikkawa, E., Furukawa, H., Nagaoka, M. and Sato, Y.: *Cytotherapy* (2020). DOI:https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.07.009
2. Onuma, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J., Ito, Y. and Asashima, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524 (2013).
3. Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. and Hirabayashi, J.: *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265 (2013).
4. Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J. and Asashima, M.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345 (2011).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
http://www.wako-chem.co.jp

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : +1-804-271-7677
Facsimile : +1-804-271-7791
http://www.wakousa.com

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggelstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
http://www.wako-chemicals.de

Code No. 294-83501 (10回用)

ヒト ES/iPS 細胞染色キット -BF

本キットは、未分化なヒト ES/iPS 細胞に高い親和性を持つ組換え体レクチン rBC2LCN を用いた可視光下でヒト ES/iPS 細胞の未分化性を確認することができる製品です。

rBC2LCN は、*Burkholderia cenocepasia* 由来のレクチンである BC2L-C の N 末端ドメインの組換えレクチンです。rBC2LCN は、未分化なヒト ES/iPS 細胞の細胞膜に存在するポドカリキシン上のムチン様 O 型糖鎖である H タイプ 3 (Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc) に高い親和性を持つため、ヒト ES/iPS 細胞の未分化マーカーとして報告されています。

本キットでは、ペルオキシダーゼ標識した rBC2LCN を用いて、非常に簡便な操作で未分化細胞を染色し、蛍光顕微鏡を用いずに、可視光下でヒト ES/iPS 細胞の未分化性を確認することができます。

本製品は、試験研究用です。

【キット構成】

	コード No.	構成成分	容量
1	291-83511	rBC2LCN-POD	100 μ L/1 本
2	298-83521	DAB 緩衝液	15mL/1 本
3	295-83531	DAB 試薬	600 μ L/1 本
4	292-83541	洗浄液 (10 \times)	10mL/1 本

【キット構成成分以外に必要な試薬】

- ・精製水 (蒸留水)
- ・D-PBS (-)
- ・過酸化水素水 (必要に応じて)

【試薬の調製】

各試薬は、下記の要領で調製してからご使用ください。また、必要な分だけを用時調製してください。

rBC2LCN-POD 反応液の調製

D-PBS (-) に対して 1/100 量の rBC2LCN-POD を添加し、よく混合する。混合後は遮光保管し、2 時間以内にご使用ください。

DAB 反応液の調製

DAB 緩衝液 1mL に対し、DAB 試薬 40 μ L を添加しよく混合する。混合後は遮光保存し、当日中にご使用ください。

洗浄液 (1 \times) の調製

洗浄液 (10 \times)^{※1} を精製水 (蒸留水) で 10 倍希釈した後、よく混合する。

【操作方法】

使用する試薬を【試薬の調製】に従って用意してください。

- (1). 染色を行う細胞を準備する^{※2, 3}。
- (2). 培養容器中の溶液を捨て^{※4}、表 1 を参考に rBC2LCN-POD 反応液を培養容器に添加する。

表1

容器	rBC2LCN-POD 反応液 (mL)
6well plate	1
12well plate	0.5
24well plate	0.25
96well plate	0.1
35mm dish	1
60mm dish	2
100mm dish	5

- (3). 室温、遮光条件下で1時間静置し反応させる。
- (4). 洗浄液 (1×) で3回洗浄する。
- (5). 洗浄液 (1×) を捨てた後、表2を参考にDAB反応液を培養容器に添加する。

表2

容器	DAB 反応液 (mL)
6well plate	1
12well plate	0.5
24well plate	0.25
96well plate	0.1
35mm dish	1
60mm dish	2
100mm dish	5

- (6). 室温で2～10分程度発色させる。
- (7). 精製水で洗浄後、観察する。

※1 洗浄液 (10×) は冷蔵保管で成分が析出することがあります。そのため、室温に戻した後、析出物がないことを確認してからご使用ください。析出物があった場合には、溶解後にご使用ください。

※2 培養中の細胞を染色する場合は、4% パラホルムアルデヒドを用いて細胞の固定をおこなって下さい。

※3 内因性ペルオキシダーゼを有する細胞がサンプルに含まれる場合は、非特異的の反応が起こります。3% 過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ不活化処理を行った後に本キットをご使用ください。

〈ペルオキシダーゼ不活化方法〉

- 1). 過酸化水素水をD-PBS (-) を用いて希釈し、3% 過酸化水素水を調製する。
- 2). 細胞を保存していた溶液を除去後、3% 過酸化水素水を添加する。
- 3). 室温で5分間静置する。
- 4). D-PBS (-) で3回洗浄する。

※4 細胞を保存していた溶液がD-PBS (-) 等の緩衝液でない場合、D-PBS (-) で洗浄後、操作してください。

【包装】

10回用

【保存】

2～10℃ (凍結厳禁)

開封された試薬は、保管状態に影響を受ける可能性がありますので、できるだけ早くご使用ください。開封後、試薬は容器の蓋をしっかりと締め、2～10℃で遮光保存してください。

【参考文献】

1. Watanabe, T., Yasuda, S., Kusakawa, S., Kuroda, T., Futamura, M., Ogawa, M., Mochizuki, H., Kikkawa, E., Furukawa, H., Nagaoka, M. and Sato, Y. : *Cytotherapy* (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.07.009>
2. Onuma, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J., Ito, Y. and Asashima, M. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524 (2013).
3. Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M. and Hirabayashi, J. : *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265 (2013).
4. Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J. and Asashima, M. : *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345 (2011).

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