

<For research Use Only>

Code No. 293-71501 (40 reactions)

For apoptosis research

Apoptosis *in situ* Detection Kit Wako**1. The principle of Apoptosis *in situ* Detection Kit** Wako

Apoptosis *in situ* Detection Kit is designed for detection of apoptotic cells appearing in paraffin-embedded sections, frozen sections of tissue and neutralized formalin-fixed culture cells, enabling an easy and speedy assay.

The kit is based on TUNEL [Terminal deoxynucleotidyl Transferase(TdT)-mediated dUTP nick end labeling] procedure, that is the addition of fluorescein -dUTP to 3'-terminals of apoptotically fragmented DNA with TdT followed by immunochemical detection using anti-fluorescein antibody conjugated with horseradish peroxidase (POD) and DAB as a substrate.

2. Features

- Rapid detection can be performed.
The whole process from the de-paraffinizing step to the microscopic examination can be completed in about 2 hours.
- Complicated preparations of various reagent are not needed.
The kit contains the essential reagents required for detection of apoptosis.
- The kit shows a clear positive image with low background.

3. Applicable samples

- paraffin-embedded tissue sections
- frozen tissue sections
- neutralized formalin-fixed culture cells

The specimen should be mounted on a silane-coated glass slide, preferably pre-treated with a reagent for protection of detachment of the section from the glass slide.

4. The contents of the kit (approx. 1cm² × 40 reactions)

- | | |
|-----------------------------------|------------|
| (1) Protein Digestion Enzyme | 1 mL |
| (2) TdT | 40 μ L |
| (3) TdT Substrate Solution | 4.4 mL |
| (4) 100 × POD-Conjugated Antibody | 44 μ L |
| (5) DNase I | 4 μ L |
| (6) 10 × DNase I Reaction Buffer | 40 μ L |

5. Storage

Store the kit at -20 °C
Store the remaining components at indicated temperatures below.

Reagents (2), (3), (5), (6) : -20 °C
Reagents (1), (4) : 2~10 °C
For long term storage, Reagent (3) should be aliquoted and stored at -80 °C.

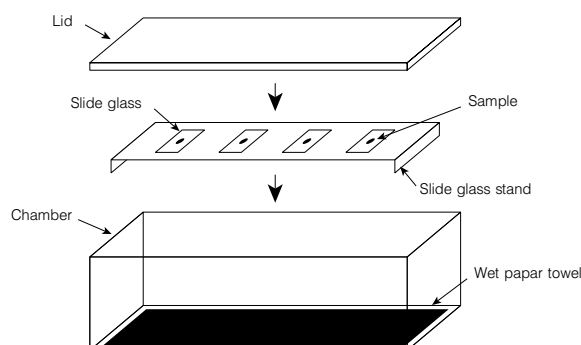
6. Apparatuses and reagents to be prepared

[Apparatuses]

- (1) 12 to 19 Coplin-staining jars (for protein digestion, counter staining, washing steps, etc.)
- (2) A moist chamber, shown below, which is pre-warmed with an incubator maintained at 37 °C before starting the experiment.

- (3) A water bath and an incubator maintained at 37°C
- (4) Vortex mixer
- (5) Microscope furnished with a camera.

Moist Chamber



[Reagents]

<For approximately 10 specimens using 100 mL Coplin-staining jar>

	Paraffin-embedded section	Cultured cell (or frozen section)
(1) Lemosol [®] , Lemosol [®] A or xylene	400 mL	200 mL
(2) Ethanol (for hydration and dehydration)	620 mL	260 mL
(3) 30% hydrogen peroxide solution	10 mL	10 mL
(4) PBS(-) at pH 7.2~7.4	1,300 mL	1,300 mL
(5) Counter staining solution (methyl green solution etc.)	100 mL	100 mL
(6) 99% 1-butanol (for a substitute of dehydration by ethanol)	200 mL	200 mL
(7) Permanent mounting medium	several mL	several mL
(8) 10% Formalin neutral buffer solution for fixation	—	necessary volume for sample numbers
(9) Chromogenic substrate (DAB Solution)	1 mL	1 mL

We recommend DAB Immunohistochemistry Substrate.

(Genway Biotech Inc. Code No. 517-88601)

This product includes Reagent A (3 mL) and Reagent B (100 mL).

7. Preparation of working solutions

(1) Preparation of the reagents for pre-treatment of the specimen

(a) Protease solution (for paraffin-embedded section)

Just before dehydration of specimen, dilute Protein Digestion Enzyme with distilled deionized water (DDW) in a Coplin-staining jar, and warm the jar in a water bath at 37°C.

<Working solution>

Protein Digestion Enzyme 50 μ L
DDW 100 mL

(b) Permeabilizing solution (for frozen section and formalin-fixed culture cells)

Prepare a permeabilizing solution of 0.1% sodium citrate and 0.1% Triton X-100 in a Coplin-staining jar, and cool it on ice.

<Working solution>

Sodium citrate, anhydrate 0.1 g
Triton X-100 0.1 mL
DDW 100 mL

(2) Preparation of TdT reaction solution

Prepare TdT reaction solution just before use, and store it on ice until use.

(a) For the standard procedure

<Working solution for a single assay>

TdT	1 μ L
TdT Substrate Solution	99 μ L

(b) For the enhanced procedure

<Working solution for a single assay>

TdT	1 μ L
TdT Substrate Solution	49 μ L

(3) Preparation of 3% hydrogen peroxide solution

Just before use, prepare 3% hydrogen peroxide solution in a Coplin-staining jar.

<Working solution>

30% hydrogen peroxide solution	10 mL
PBS(-)	90 mL

(4) Preparation of POD-conjugated antibody solution

Dilute 100 $\times$ POD-Conjugated Antibody with PBS(-) just before use, and store it on ice until use.

<Working solution for a single assay>

100 $\times$ POD-Conjugated Antibody	1 μ L
PBS(-)	99 μ L

(5) Preparation of Chromogenic Solution

Prepare DAB Solution just before use, and store it at room temperature until use.

When use DAB Immunohistochemistry Substrate (Genway Biotech Inc. Code No. 517-88601)

<Working solution for a single assay>

Reagent A	3 μ L
Reagent B	100 μ L

(6) Preparation of DNase I Solution for the positive control

Prepare DNase I solution just before use, and store it on ice until use.

<Working solution for a single assay>

10 $\times$ DNase I Reaction Buffer	10 μ L
DNase I	1 μ L
DDW	89 μ L

8. Procedures

For frozen section

- (1) Immerse the specimen on the glass slide into a 4% formalin neutral buffer solution (made by dilution of 10% formalin neutral buffer solution with PBS, as an example) in a Coplin-staining jar, and leave it for 5 minutes at room temperature.
- (2) Immerse the glass slide into PBS, and leave it for 5 minutes as a washing step, which is repeated once.
- (3) Proceed to the step (4) for cultured cells.

For cultured cells

- (1) Suspend cultured cells in 4% formalin neutral buffer solution (made by dilution of 10% formalin neutral buffer solution with PBS, as an example) at a concentration of about 2×10^6 cells/mL, and leave them for 10 min at room temperature.
- (2) Drop 50 μ L of the cell suspension onto a slide glass, and dry it well.

Note : The suspension should be mounted on a silane-coated glass slide, preferably, pre-coated with a reagent for protection of detachment of cells from the glass slide.

- (3) Wash the glass slide twice by immersing it into PBS for 5 min.
- (4) Immerse the glass slide into the cold Permeabilizing solution, and leave it for 2 minutes on ice.
- (5) Repeat a brief wash (for about 10 seconds) of the glass slide by PBS(–) twice, then wipe the residual solution from around the specimen and the back of the glass slide using a paper tissue (e.g. Kimwipe).
- (6) Proceed to the step (4) for paraffin-embedded section described below.

For paraffin-embedded section

- (1) Deparaffinize and hydrate the specimen with distilled water by transfer of the glass slide among a series of the solvent/distilled water in Coplin-staining jars as follows.

Lemosol[®] or Lemosol[®] A : 5 min. $\times$ 2 times
ethanol (99.5% or more) : 5 min. $\times$ 2 times
90% ethanol : 3 min.
70% ethanol : 3 min.
DDW : 3 min.

- (2) Immerse the glass slide into the pre-warmed Protease solution in a Coplin-staining jar, and digest protein of the specimen by incubation at 37°C for 5 minutes.

Note : The factors of the reaction time and temperature will greatly affect the result, so the reliability of the method is dependent on optimizing the reaction time in your specimen.

- (3) Prepare 4 Coplin-staining jars, each containing an appropriate volume of PBS, and wash the glass slide with PBS every 2 minutes at room temperature by transferring the slide from one Coplin-staining jar to the other. After washing, wipe the residual solution around the specimen and the back of the slide with a paper tissue (e.g. Kimwipe).
- (4) Drop 100 μ L (or 50 μ L for the enhanced procedure, mentioned above) of TdT reaction solution onto the specimen on the glass slide, and label 3'-terminals of DNA by incubation for 10 minutes in a moist chamber at 37°C.

Note : This reaction time and temperature are critical, so optimize the reaction time in your specimen.

- (5) Prepare 3 Coplin-staining jars, each containing an appropriate volume of PBS. After removing TdT reaction solution on the specimen, as much as possible, wash the glass slide with PBS every 5 minutes at room temperature by transferring the slide glass from one Coplin-staining jar to the other.

Note : Collect the TdT reaction solution used as the buffer solution containing potassium cacodylate, which is hazardous, and discard properly.

- (6) Eliminate intrinsic peroxidase activity of the specimen by incubating the glass slide in a Coplin-staining jar containing 3% hydrogen peroxide solution for 5 minutes at room temperature.

- (7) Prepare 2 Coplin-staining jars, each containing an appropriate volume of PBS, and wash the glass slide with PBS as described in step (5). After washing, wipe the residual solution around the specimen and the back of the slide with a paper tissue.
- (8) Drop 100 μ L of POD-conjugated antibody solution onto the specimen on the glass slide, and incubate it for 10 minutes in a moist chamber at 37 °C.
- (9) After removing the antibody solution, wash the glass slide with PBS using 3 Coplin-staining jars and wipe the residual solution as described in step (7).

Note : Prepare DAB Solution during washing in step (9), and store it at room temperature until use.

- (10) Drop 100 μ L DAB Solution onto the specimen, and incubate it for 5 minutes at room temperature.
- (11) After removing the substrate solution, wash the specimen by moving the slide up and down 10 times in DDW, and repeat twice in fresh DDW.

Note : If the background arises, adjust the incubation time, observing the specimen under a microscope.

- (12) Counter-stain the specimen by immersing the glass slide in an appropriate staining solution, such as methyl green solution, in a Coplin-staining jar for 5 minutes at room temperature.
- (13) Dehydrate the specimen by either method according to the following:
 - a) Immerse the glass slide in the order of 70%, 90%, and anhydrous (99.5% or more) ethanol every 10 seconds.
 - b) Immerse the glass slide in 1-butanol (99% or more) for about 10 seconds until the specimen changes from a deep blue to light green. Otherwise, repeat in the same manner with fresh solvent until the specimen becomes light green.
- (14) Immerse the specimen into either fresh Lemosol[®], Lemosol[®] A or xylene for 10 seconds, and repeat.
- (15) Drop an appropriate permanent mounting medium, such as Softmount, onto the specimen, cover it with a cover glass, and inspect it under a microscope after the mounting medium hardens.

Note : Make sure the specimen is not observed by fluorescent microscope because fluorescein is used as a tag for the antibody but not for signaling.

For Controls

Negative and positive controls are essential for an accurate judgment.

- 1) Positive control
 1. Drop 100 μ L of DNase I solution onto the specimen after step (3) for paraffin-embedded section or step (5) for cultured cells, and incubate for 15 minutes in a moist chamber at 37 °C.
 2. After removal of the enzyme solution, wash the glass slide with PBS and wipe off the residual solution as described in step (7) for paraffin-embedded section.
 3. Proceed to step (4) for paraffin-embedded sections.
- 2) Negative control
 1. Incubate the specimen with TdT Substrate Solution without TdT at step (4) for paraffin-embedded section.
 2. Proceed to the next step.

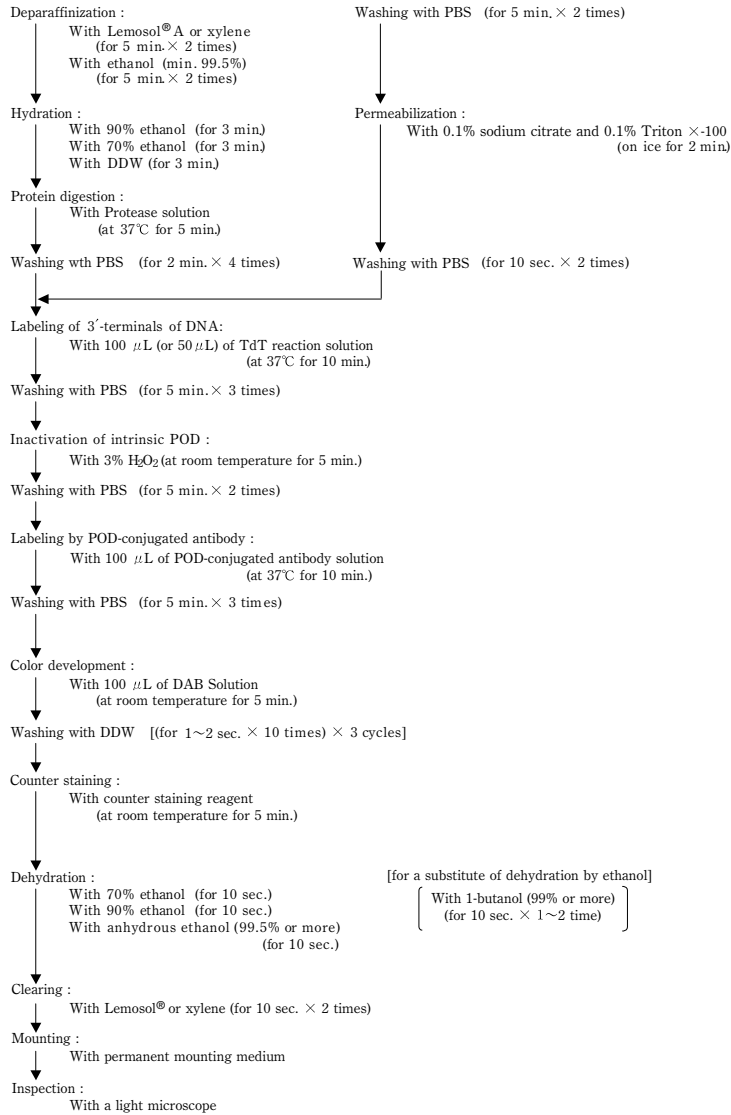
9. Reference

- (1) Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. : *J. Cell Biology*, **119**, 493 (1992).
- (2) Funaki, N., Sasano, H., Shizawa, S., Nio, M., Iwami, D., Ohi, R. and Nagura, H. : *J. pathol.*, **186**, 429 (1998).
- (3) Li, H. C., Yashiki, S., Sonoda, J., Lou, H., Ghosh, S. K., Byrnes, J. J., Lema, C., Fujiyoshi, T., Karasuyama, M. and Sonoda, S. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 34 (2000).
- (4) Shibata, MA., Morimoto, J. and Otsuki, Y. : *Cancer Gene Therapy.*, **9**, 16 (2002).
- (5) Doi, H., Shibata, MA., Shibata, E., Morimoto, J., Akao, Y., Inuma, M., Tanigawa, N. and Otsuki, Y. : *Anticancer Res.*, **29**, 2485 (2009).

10. Appendix(Flow Chart of the Experiments)

Paraffin-embedded tissue section

Neutralized 4% formalin-fixed culture cells (Neutralized 4% formalin-fixed frozen section)



Allied products

Wako catalog No.	Description	Package Size
122-03991	Lemosol [®]	1 L
128-03993	Lemosol [®]	3 L
120-04411	Lemosol [®] A	1 L
126-04413	Lemosol [®] A	3 L
192-16301	Softmount	250 mL
162-19321	Phosphate Buffered Saline Powder (0.01 mol/L, pH 7.2–7.4)	1 L × 20
138-12701	Methyl Green Solution (0.5 v/w%)	100 mL
293-71403	Apoptosis Ladder Detection Kit <i>Wako</i>	96 reactions
297-71401		24 reactions
297-55901	Annexin V-Fluorescein Staining Kit	50 reactions
517-88601	DAB Immunohistochemistry Substrate	1 set

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://fwk.fujifilm.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

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

Code No. 293 - 71501 (40 回用)

アポトーシス研究用

アポトーシス *in situ* 検出キットワコー

【はじめに】

アポトーシスの研究は生命の本質を理解するとともに、そこで生起する様々な疾病の本態を解明し、適切な治療薬の開発や治療法を確立する上からも重要な意義を持っています。最近になり、アポトーシスを人為的にコントロールする新しい医薬品や医療技術の開発に期待が高まってきています。

一方、アポトーシスの研究の基本となる形態学の一手段として、組織中での細胞がアポトーシスを起こしているかどうかを検出する方法に TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) を利用しています。DNA の 3'-OH 末端をターミナルトランスフェラーゼ (TdT) を用いフルオレセイン- dUTP (または biotin-dUTP など) で標識することによって、組織並びに培養細胞中のアポトーシス細胞が検出できます。また、組織中のどの部位にどれぐらいのアポトーシス細胞が存在するかを知ることができます。

アポトーシス *in situ* 検出キットは、簡便、迅速にアポトーシスを検出できます。

【特 長】

1. 迅速な検出ができます。
例えばパラフィン包埋組織切片の場合、脱パラフィンから検鏡までの一連の作業時間は、約 2 時間です。
2. 操作が簡単です。
各ステップの主な反応試薬を全てセット化。わずらわしい試薬の調製は不要です。
3. バックグラウンドが低く、きれいなシグナルを得ることができます。

【適用する主な試料】

- 1) パラフィン包埋組織切片
- 2) 培養細胞 (中性緩衝ホルマリン固定)
- 3) 凍結切片

【キット内容】 (約 1 cm² × 40 回分)

1) Protein Digestion Enzyme	1 mL	1 本
2) TdT	40 μ L	1 本
3) TdT Substrate Solution	4.4 mL	1 本
4) 100 × POD-Conjugated Antibody	44 μ L	1 本
5) DNase I	4 μ L	1 本
6) 10 × DNase I Reaction Buffer	40 μ L	1 本

【保 存】 - 20 °C 保存*

* 開封後は各々下記の温度で保存して下さい。
- 20 °C 保存 : 2), 3), 5), 6)
2 ~ 10 °C 保存 : 1), 4)
3) は、所要の反応分を小分けし、- 80 °C で保存することを推奨します。

〔使用方法〕

〈キット以外に準備する物〉

試料：

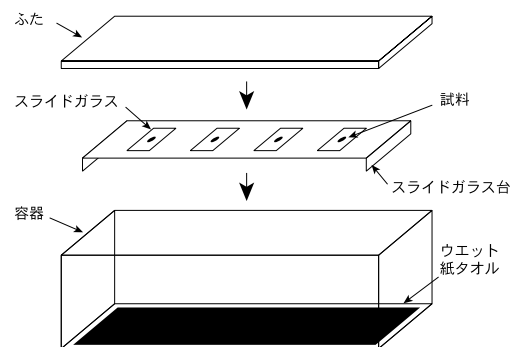
シランコートスライドガラスに張り付けたパラフィン包埋組織切片（または 4 v/v% 中性緩衝ホルマリンで固定した細胞試料）を用意して下さい*。

* 試料の固定が弱いと操作中に試料標本が剥離することがあります。
剥がれ落ちないように、切片脱落防止用表面処理剤での固定強化をお奨めします。

器具：

- 1) コプリンジャー（100 mL = 約 10 サンプル分）
12～19個
- 2) 密閉できる湿潤箱*（下図参照）を作業開始の前に 37 ℃ のエアークューバーに入れ、予め安定化させておいて下さい。

* 密閉できる箱であれば何でもかまいません。（例えばふたにクリップのついた市販のランチボックスなど）



- 3) 37℃ 水浴槽、エアークューバー 各 1 台
- 4) ボルテックスミキサー 1 台
- 5) 光学顕微鏡（写真撮影装置の付いたものをお奨めします。） 1 台

〈試薬の準備、調製〉

	パラフィン包埋組織切片	培養細胞
【10 サンプル(コプリンジャー 100 mL 使用)の場合】		
(1) レモゾール® (Code No. 122-03991)、レモゾール® A (Code No. 120-04411) またはキシレン	400 mL	200 mL
(2) エタノール（無水、90 v/v%、70 v/v%、脱水処理用も含む量）	620 mL	260 mL
(3) 30 v/v% H ₂ O ₂	10 mL	10 mL
(4) PBS(-)〔PBS(-)粉末 pH7.2～7.4 (Code No. 162-19321)〕	1300 mL	1300 mL
(5) 対比染色液（メチルグリーン溶液 (Code No. 138-12701)）	100 mL	100 mL
(6) 99 v/v% 以上 1-ブタノール（エタノールで脱水しない場合）	200 mL	200 mL
(7) 封入剤（Softmount (Code No. 199-11311) または同等品）	数 mL	数 mL
(8) 組織固定用 10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (Code No. 062-01661)	——	—— 試料数にあわせて調製して下さい。
(9) 発色基質（DAB 溶液） DAB Immunohistochemistry Substrate (Genway Biotech Inc. Code No. 517-88601) を推奨します。 本品には Reagent A（3 mL）と Reagent B（100 mL）が含まれています。	1 mL	1 mL

1. 試料の前処理用試薬の調製

a. パラフィン包埋組織切片の場合（タンパク質分解酵素溶液）

脱水処理に入る直前に Protein Digestion Enzyme Solution を希釈して、コプリンジャーに入れ、37℃ 水浴槽で温めます。

調液法：

Protein Digestion Enzyme	50 μ L
蒸留水	100 mL

よく混合して下さい。

b. 凍結切片および培養細胞の場合（浸透化溶液）

0.1 v/v% くえん酸ナトリウム/ 0.1 v/v% Triton X-100 の浸透化溶液を調製して、コプリンジャーに入れた後、氷上に置いて氷冷します。

調液法：

くえん酸ナトリウム（無水）	0.1 g
Triton X-100	0.1 mL
蒸留水	100 mL

よく混合して下さい。

2. TdT 反応液を操作直前に調製*して、使用するまで水中で保存します。

a. 標準処方（フロー）に準ずる場合

調液法：（1 回分）

TdT	1 μ L
TdT Substrate Solution	99 μ L

b. より感度を必要とする場合

調液法：（1 回分）

TdT	1 μ L
TdT Substrate Solution	49 μ L

* 調液の際はボルテックスミキサーなどでよく混合して下さい。なお、混合の際、壁、ふたについた試薬は軽く遠心機にかけ、落とすようにして下さい。

3. 3% H₂O₂ 溶液を操作直前に調製しコプリンジャーに入れます。

調液法：

30 v/v% H ₂ O ₂	10 mL
PBS(-)	90 mL

よく混合して下さい。

4. 100 × POD-Conjugated Antibody を操作直前に希釈*します。

調液法：（1 回分）

100 × POD-Conjugated Antibody	1 μ L
PBS(-)	99 μ L

よく混合して下さい。

* 調液の際はボルテックスミキサーなどでよく混合して下さい。なお、混合の際、壁、ふたについた試薬は軽く遠心機にかけ、落とすようにして下さい。

5. 染色液の調製

DAB 溶液を操作直前に用時調製します。

DAB Immunohistochemistry Substrate (Genway Biotech Inc. Code No. 517-88601) を使用する場合

調製法：(1 回分)

Reagent A	3 μ L
Reagent B	100 μ L

よく混合して下さい。

* 調液の際はボルテックスミキサーなどでよく混合して下さい。なお、混合の際、壁、ふたについた試薬は軽く遠心機にかけ、落とすようにして下さい。

6. 陽性コントロールサンプルを作製するため DNase I 反応液を調製*します。

調液法：(1 回分)

10 $\times$ DNase I Reaction Buffer	10 μ L
DNase I	1 μ L
蒸留水	89 μ L

よく混合して下さい。

* 調液の際はボルテックスミキサーなどでよく混合して下さい。なお、混合の際、壁、ふたについた試薬は軽く遠心機にかけ、落とすようにして下さい。

<操 作 法>

(凍結切片の場合)

1. 固定：適当量の 4 v/v% 中性緩衝ホルマリン溶液 (10 v/v% 中性緩衝ホルマリン溶液を PBS(-) で希釈する) を入れたコプリンジャーの中にスライドガラスを浸し、室温で 5 分間固定処理を行います。
2. 洗浄：PBS(-) に浸し、5 分間 2 回洗浄します。
3. 以下、「培養細胞の場合」のステップ 4 へ進みます。

(培養細胞の場合)

1. 約 2×10^6 個/ mL になるように細胞を 4 v/v% 中性緩衝ホルマリン溶液 (10 v/v% 中性緩衝ホルマリン溶液を PBS(-) で希釈する) の中に懸濁し、室温で 10 分間固定します。
2. 50 μ L の細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下し、室温で乾燥させます。
3. 洗浄：PBS(-) に浸し、5 分間 2 回洗浄します。
4. 浸透化処理：予め氷冷しておいた浸透化溶液に浸し、氷冷下、2 分間浸透化させます。
5. 洗浄：PBS(-) に浸し、10 秒 2 回洗浄した後、キムワイプなどでスライドの裏と試料の周りの液を吸い取ります。
6. 以下、「パラフィン包埋組織切片の場合」のステップ 4 へ進みます。

(パラフィン包埋組織切片の場合)

1. **脱パラフィン、親水化処理** : 下記の手順でコプリンジャー中の各々の溶液 (順次新しい溶液に変えながら) にスライドガラスを浸し、脱パラフィン、親水化処理をします。

レモゾール® (レモゾール®A またはキシレン)	5 分間× 2 回
↓	
エタノール (99.5 v/v% 以上)	5 分間× 2 回
↓	
90 v/v% エタノール	3 分間× 1 回
↓	
70 v/v% エタノール	3 分間× 1 回
↓	
蒸留水	3 分間× 1 回

2. **タンパク質分解処理** : コプリンジャーに入れ予め 37 ℃ 水浴槽で温めたタンパク質分解酵素溶液に浸し、そのまま 37 ℃ で 5 分間* 処理します。

* 酵素反応ですので反応時間×温度により染色性に大きな影響を与えます。
最終染色の結果により反応時間を短縮または延長して下さい。

3. **洗浄** : 適当量の PBS(-) を入れたコプリンジャーを 4 個準備します。室温で各 2 分間順次新しい PBS(-) に変えながら 4 回洗浄した後、キムワイブなどでスライドガラスの裏と試料の周りの液を吸い取ります。

4. **DNA3' 末端の標識** : TdT 反応液 100 μ L (〈試薬の準備、調製〉2b を選択した場合は 50 μ L) を試料面に滴下し、37 ℃ に安定化した湿潤箱中 (〈器具の準備〉2) 参照) で 10 分間* DNA を標識します。

* 酵素反応ですので反応時間×温度により染色性に大きな影響を与えます。
最終染色の結果により反応時間を短縮または延長して下さい。

5. **洗浄** : 適当量の PBS(-) を入れたコプリンジャーを 3 個準備します。試料上の溶液を捨て* PBS(-) につけて、各 5 分間順次新しい PBS(-) に変えながら 3 回洗浄します。

* 反応液には、カوجレイト (毒物) を 3.6 w/v% 含みますので廃液は回収して、適切な処置のもとに廃棄して下さい。

6. **内因性 POD の不活化処理** : 適当量の 3 v/v% H_2O_2 溶液を入れたコプリンジャーの中に浸し、室温で 5 分間内因性 POD を不活化処理します。

7. **洗浄** : 適当量の PBS(-) を入れたコプリンジャーを 2 個準備します。各 5 分間順次新しい PBS(-) に変えながら 2 回洗浄した後、キムワイブなどでスライドガラスの裏と試料の周りの液を吸い取ります。

8. **標識抗体反応** : POD-Conjugated Antibody 希釈液 100 μ L を試料面に滴下し、37 ℃ に安定化した湿潤箱中で 10 分間反応させます。

9. **洗浄** : 試料上の溶液を捨て、PBS(-) に浸し、各 5 分間順次新しい PBS(-) に変えながら 3 回洗浄した後、キムワイブなどでスライドガラスの裏と試料の周りの液を吸い取ります。

10. **発色反応**：ステップ9の洗浄の間に、DAB 溶液を調製します。用時調製した DAB 溶液 100 μL を試料面に滴下し、室温で **5 分間***発色させます。

* 酵素反応ですので反応時間×温度により染色性に大きな影響を与えます。最終染色により反応時間を短縮または延長して下さい。なお、より至適な発色を得るためには顕微鏡下にて観察しながら、発色程度調節することを推奨します。

11. **洗浄**：試料上の溶液を捨て、蒸留水に上下 10 回出し入れして洗浄します。さらにこの操作を新しい蒸留水に変え 2 回繰り返します。
12. **対比染色**：コプリンジャーに入れた対比染色液（0.5 v/v% メチルグリーン溶液など）に浸し、室温で 5 分間対比染色します。
13. **脱水処理**：

a. エタノールによる脱水

70 v/v%、90 v/v%、無水エタノールの順序* で約10秒ずつ洗浄、脱水します。

* エタノールで脱水する場合陽性沈澱の一部が溶出することがありますので、より鮮明に陽性シグナルを得たい場合は *n*-ブタノールによる脱水をお奨めします。

b. *n*-ブタノールによる脱水

100 v/v% *n*-ブタノールにつけて、約 10 秒間洗浄、脱水します。試料が淡緑色になりましたら、ステップ14に進めて下さい。もし試料が依然青色になったままなら、新しい 100 v/v% *n*-ブタノールにもう 1 回浸し、約 5 秒間洗浄します（淡緑色になるまで行います）。

14. **透徹処理**：レモゾール[®]・レモゾール[®]A またはキシレンに浸し、約 10 秒間順次新しいものに変え 2 回透徹します。
15. **封入、検鏡**：Softmount のような封入剤 1 滴を試料面に滴下し、その上にカバーガラスをのせ、固定した後、光学顕微鏡で観察します。

注意：フルオレセイン標識ですが、標識量が少ないため、蛍光顕微鏡では観察できません。

〈コントロールサンプルの作製〉

得られた結果をより正確に判断するためにコントロールサンプルを作製します。

1. **陽性コントロール**

- ① 「パラフィン包埋組織切片の場合」のステップ3、または「培養細胞の場合」のステップ5の後に、DNase I 反応液 100 μL を試料面に滴下し、37 $^{\circ}\text{C}$ に安定化した湿潤箱中で 15 分間反応します。
- ② 試料上の溶液を捨て、PBS に浸し、5 分間 2 回洗浄した後、キムワイブなどでスライドの裏と試料の周りの液を吸い取ります。
- ③ 以下、「パラフィン包埋組織切片の場合」のステップ4へ進みます。

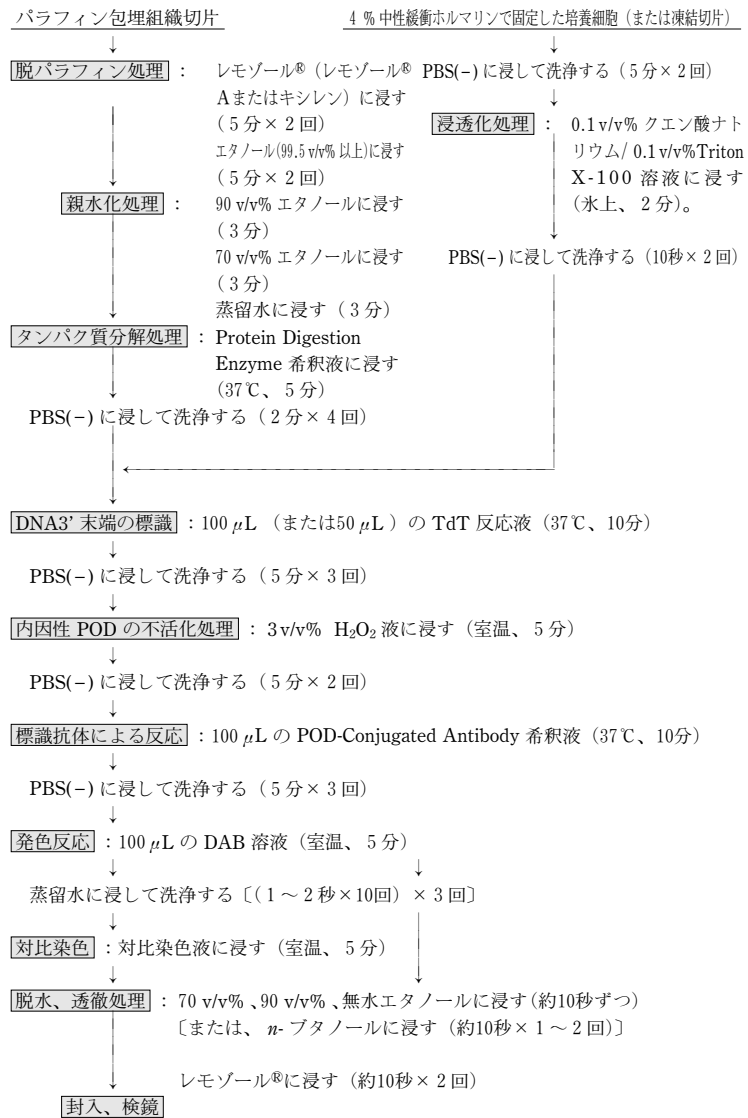
2. **陰性コントロールの作製**

ステップ4の DNA 末端標識を行う際、TdT Substrate Solution 100 μL のみの反応を行う（TdT だけ含まない）。

〔参考文献〕

- 1) Gavrieli, Y., Sherman, Y. and Ben-Sasson, S. A. : *J. Cell Biology*, **119**, 493 (1992).
- 2) Funaki, N., Sasano, H., Shizawa, S., Nio, M., Iwami, D., Ohi, R. and Nagura, H. : *J pathol.*, **186**, 429 (1998).
- 3) Li, H.C., Yashiki, S., Sonoda, J., Lou, H., Ghosh, S. K., Byrnes, J. J., Lema, C., Fujiyoshi, T., Karasuyama, M. and Sonoda, S. : *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 34 (2000).
- 4) Shibata, MA., Morimoto, J. and Otsuki, Y. : *Cancer Gene Therapy.*, **9**, 16 (2002).
- 5) 柴田雅朗, 森本純司, 伊藤裕子, 大槻勝紀 : 第12回乳癌基礎研究会, **12**, 17 (2003).
- 6) Doi, H., Shibata, MA., Shibata, E., Morimoto, J., Akao, Y., Inuma, M., Tanigawa, N. and Otsuki, Y. : *Anticancer Res.*, **29**, 2485 (2009).

〔キット操作法（フロー）〕 所要時間：約120分



関連製品

Code No.	品 名	容 量
122-03991	レモゾール [®] 病理研究用	1 L
128-03993	レモゾール [®] 病理研究用	3 L
120-04411	レモゾール [®] A 病理研究用	1 L
126-04413	レモゾール [®] A 病理研究用	3 L
192-16301	ソフトマウント 病理研究用	250 mL
162-19321	りん酸緩衝生理食塩粉末（0.01 mol/L pH 7.2 ～ 7.4）	1 L 用 × 20
138-12701	メチルグリーン（0.5 v/v%）アポトーシス研究用	100 mL
293-71403	Apoptosis Ladder Detection Kit <i>Wako</i>	96 レーン用
297-71401		24 レーン用
297-55901	Annexin V-Fluorescein Staining Kit	50 回用
517-88601	DAB Immunohistochemistry Substrate	1 セット

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
 Tel : 06-6203-3741

2304KA2