

製品コード MK500

研究用

TAKARA

***In situ* Apoptosis
Detection Kit**

説明書

v202111Da

アポトーシスとは、個体の生命維持のために不要或いは危険な細胞を自ら死に至らしめる遺伝子に支配された制御機構です。細胞の発生・分化・生理的現象（特に免疫）に深く関わっており、今日では癌細胞の発生過程、放射線や熱といった物理的要因や薬剤などの化学的要因による癌細胞の増殖抑制・消失過程、および分化誘導過程にも重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあり、制癌の観点からもアポトーシスは非常に注目されています。

アポトーシスを起こした細胞の特徴の一つとして挙げられるのがクロマチン DNA のヌクレオソーム単位 (185 bp) での断片化です。本製品はこの断片化 DNA を末端標識法で組織化学的に検出するキットです。アポトーシス検出に関する報告は多種ありますが、*in situ* での標識核酸の取り込みを利用した TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法は、組織学的な局在や個々の細胞の検出を可能にする有効な方法です。

I. 測定原理

TUNEL 法はターミナルトランスフェラーゼ (TdT) を用いて、アポトーシスを起こした細胞の断片化 DNA の遊離 3'-OH 末端にフルオレセイン- dUTP を高感度にかつ特異的に標識した後、直ちに蛍光顕微鏡やフローサイトメトリーで検出する方法です。さらに取り込まれたフルオレセインは、パーオキシダーゼ標識抗フルオレセイン抗体により検出可能で、発色基質の反応後、光学顕微鏡での観察もできます。

II. 特長

- 簡便 Ready-to-Use な試薬です。
- 高感度 初期のアポトーシス細胞を Single Cell レベルで検出できます。
- 特異的 ネクロトーシス細胞に比べ、アポトーシス細胞をより特異的に染色できます。
- 迅速 操作時間は 2～3 時間です。
- フレキシブル 組織切片、固定細胞のどちらにも応用可能です。
蛍光顕微鏡、光学顕微鏡のどちらでの観察も可能です。
単一コンポーネントも入手可能で経済的です。
- 確実性 コントロールスライドの添付により手技、手法の確認や初心者の教育用にも最適です。
- 安全性 カコジル酸（毒劇物に指定）を含まない安全なバッファーです。

III. 内容 (20 回分)

(1) Labeling Safe Buffer	500 μ l \times 2
(2) TdT Enzyme* ¹	50 μ l \times 2
(3) Anti-FITC HRP Conjugate* ²	1.5 ml
(4) Control Slides	2 slides
(5) Permeabilisation Buffer	1.0 ml \times 2

(4) Control Slide はラットの乳腺組織のパラフィン包埋切片です。
Positive Control Slide としてご使用いただく時にまず最初に、脱パラフィンの操作が必要です。本説明書 6 ページ記載の【パラフィン包埋組織切片の場合】に従ってご使用ください。脱パラフィンと Proteinase K 処理を行った後は、観察方法に応じたプロトコール通りに操作を行ってください。

* 1 : 大腸菌で生産された組換え体です。

* 2 : ウサギポリクローナル抗体です。

単一コンポーネントも販売しております。

(1) Labeling Safe Buffer	(製品コード MK501)	500 μ l \times 10
(2) TdT Enzyme	(製品コード MK502)	50 μ l \times 10
(3) Anti-FITC HRP Conjugate	(製品コード MK503)	1.5 ml \times 5
(4) Control Slides	(製品コード MK504)	2 slides \times 5
(5) Permeabilisation Buffer	(製品コード MK505)	1.0 ml \times 10

IV. 保存

- (1)、(2)、(5) : -20°C
- (3) : 4°C *³
- (4) : 室温

* 3 : 一度融解した後は 4°C で保存してください。

V. 使用方法

1. 試料

- ・細胞：接着細胞（チャンバースライドでの培養）
浮遊細胞（スライドガラス上でのサイトスピン、スメアーでの細胞固定・マイクロチューブ収集）
- ・組織切片：凍結切片・パラフィン包埋切片

2. ラベリング反応液の調製

- (1) 1 サンプルにつき45 μ lのLabeling Safe Buffer に5 μ lのTdT Enzymeを入れ調製する。
Labeling Safe Buffer のチューブには2回の陰性コントロール分(50 μ l \times 2)のBuffer も入っている。
- (2) 調製した液は均一になるように静かによく混合する。
ラベリング反応液は使用直前に調製し、使用時まで氷上で保存する。（長時間放置した場合、混合液中の酵素が失活する恐れがあるので使用前に用時調製し、保存しない。）

注意 抗体液はそのまま使用してください。

3. その他必要な試薬および器具

- ・蒸留水
- ・洗浄バッファー（PBS または TBS）
Phosphate Buffered Saline (PBS) Tablets, pH7.4（製品コード T9181）
Tris Buffered Saline (TBS) Tablets, pH7.6（製品コード T9141）
- ・発色基質（DAB）
TaKaRa DAB Substrate（製品コード MK210）
- ・H₂O₂
- ・対比染色液（メチルグリーン）
- ・蛍光対比染色液 PI (Propidium Iodide) など
- ・マイクロピペット
- ・マイクロチューブ
- ・湿潤箱
- ・37°Cインキュベーター
- ・カバースリップ
- ・カバーガラス
- ・スライドガラス（松浪硝子工業）
- ・蛍光顕微鏡または光学顕微鏡

『パラフィン包埋切片』での検出を行う場合

- ・コプリンジャー（スライド染色バット）
- ・キシレン
- ・エタノール（100%、90%、80%）
- ・カバースリップ
- ・Proteinase K（製品コード 9034）
- ・3% H₂O₂ 水溶液（内因性パーオキシダーゼブロッキング）
- ・マウントメディウム（封入剤）

『凍結切片』での検出を行う場合

- ・剥離防止処理済みスライドガラス（ポリ-L-リジン、シランコート）
- ・固定液（10%中性ホルマリン緩衝液、アセトン、4%パラホルムアルデヒド等）
- ・0.3% H₂O₂ 含メタノール（内因性パーオキシダーゼブロッキング）

『細胞』での検出を行う場合

- ・剥離防止処理済みスライドガラス（ポリ-L-リジン、シランコート）
- ・固定液（4% パラホルムアルデヒド、10% 中性ホルマリン緩衝液等）
- ・0.3% H₂O₂ 含メタノール（内因性ペーオキシダーゼブロッキング）
- ・遠心機（サイトスピン）

4. 操作手順

【培養細胞の場合】

- (1) 細胞を採取後 PBS で洗浄し、シランコートスライドガラス上で風乾させる。新しく調製した 4%パラホルムアルデヒド / PBS (pH7.4) を用いて室温で 15 ~ 30 分固定後、PBS で洗浄する。^{*5}

注意 フローサイトメトリーでの検出に使用したい場合は、一連の操作をコニカルチューブまたはマイクロチューブ中で行ってください。細胞は 70% エタノール中で冷凍保存すると 1 ~ 2 ヶ月使用可能です。

- (2) 0.3% H₂O₂ を含むメタノールで、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング^{*6} を室温で 15 ~ 30 分行う。ブロッキング後 PBS で洗浄する。
- (3) 酵素反応液の浸透を良くするため、100 μ l の Permeabilisation Buffer で氷上 2 ~ 5 分反応後 PBS で洗浄する。
- (4) 予め調製後氷冷しておいた 50 μ l のラベリング反応液 (TdT Enzyme 5 μ l + Labeling Safe Buffer 45 μ l) をスライド上にのせ、湿潤箱中で 37°C 60 ~ 90 分反応 [乾燥を防ぐためカバースリップを利用するとよい] させた後、PBS で洗浄して反応を停止させる。

なお、同時に陰性コントロールとして、TdT Enzyme を加えない Labeling Safe Buffer (50 μ l) のみをスライド上に載せ、同様の操作を行うことが望ましい。

注意 チューブ中で反応をする場合は細胞が沈殿するので 15 分に 1 回程度軽く攪拌する。

以上の操作後、蛍光顕微鏡での観察、フローサイトメトリーでの検出を行う。さらに光学顕微鏡による観察を行う場合は以下の操作を行う。

- (5) Anti-FITC HRP Conjugate を 37°C で 30 分反応させ、PBS で洗浄する。DAB・H₂O₂ 反応液で室温 10 ~ 15 分発色させた後蒸留水で反応停止する。

注意 チューブ中で反応をする場合は抗体が均一に細胞へ反応するよう時々軽く攪拌する。

- (6) 3% メチルグリーン染色後、マウントして光学顕微鏡により観察する。

【凍結組織切片の場合】

- (1) 新鮮な組織を直ちに O.C.T. コンパウンド中で凍結し、クリオスタットで薄切後シランコートスライドガラスに切片を張り付ける。新しく調製した 4% パラホルムアルデヒド / PBS (pH7.4) またはアセトンを用いて室温で 15 ~ 30 分固定する。PBS で 20 ~ 30 分洗浄する。
- (2) 0.3% H₂O₂ を含むメタノールで、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング^{*6} を室温で 15 ~ 30 分行う。ブロッキング後 PBS で洗浄する。
- (3) 酵素反応液の浸透を良くするため、100 μ l の Permeabilisation Buffer で氷上 2 ~ 5 分反応後 PBS で洗浄する。

-
- (4) 予め調製後氷冷しておいた 50 μ l のラベリング反応液 (TdT Enzyme 5 μ l + Labeling Safe Buffer 45 μ l) をスライド上にのせ、湿潤箱中で 37°C 60 ~ 90 分反応 [乾燥を防ぐためカバースリップを利用するとよい] させた後、PBS で 5 分 3 回洗浄して反応を停止する。
なお、同時に陰性コントロールとして、TdT Enzyme を加えない Labeling Safe Buffer (50 μ l) のみをスライド上に載せ、同様の操作を行うことが望ましい。

以上の操作で蛍光顕微鏡での観察が可能である。^{*7}

- (5) 70 μ l の Anti-FITC HRP Conjugate を 37°C で 30 分反応 [抗体を均一に組織上へのせる。また、乾燥を防ぐためにカバースリップを用いるとよい] させ、PBS で 5 分 3 回洗浄する。
- (6) DAB \cdot H₂O₂ 反応液で室温 10 ~ 15 分発色させた後蒸留水で反応停止する。
- (7) 3%メチルグリーン染色^{*8}した後、脱水・透徹・封入^{*9}を行い、光学顕微鏡で観察する。

【パラフィン包埋組織切片の場合】

- (1) 脱パラフィン (5. 脱パラフィン操作に関してを参照) 後、蒸留水で洗浄する。Proteinase K 処理 (10 ~ 20 μ g/ml, 15 分)^{*10}の後、PBS で洗浄する。
- (2) 3% H₂O₂ 水溶液で 5 分、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング^{*6}をした後、PBS で洗浄する。
- (3) 予め調製後氷冷しておいた 50 μ l のラベリング反応液 (TdT Enzyme 5 μ l + Labeling Safe Buffer 45 μ l) をスライド上にのせ、湿潤箱中で 37°C 60 ~ 90 分反応 [乾燥を防ぐためカバースリップを利用するとよい] させた後、PBS で 5 分 3 回洗浄して反応を停止する。
なお、同時に陰性コントロールとして、TdT Enzyme を加えない Labeling Safe Buffer (50 μ l) のみをスライド上に載せ、同様の操作を行うことが望ましい。

以上の操作で蛍光顕微鏡での観察が可能である。^{*7}

- (4) 70 μ l の Anti-FITC HRP Conjugate を 37°C で 30 分反応 [抗体を均一に組織上へのせる。また、乾燥を防ぐためにカバースリップを用いるとよい] させ、PBS で 5 分 3 回洗浄する。
なお、同時に陰性コントロールとして、TdT Enzyme を加えない Labeling Safe Buffer (50 μ l) のみをスライド上に載せ、同様の操作を行うことが望ましい。
- (5) DAB \cdot H₂O₂ 反応液で室温 10 ~ 15 分発色させた後、蒸留水で反応停止する。
- (6) 3%メチルグリーン染色^{*8}した後、脱水・透徹・封入^{*9}を行い、光学顕微鏡で観察する。

-
- * 5: この段階で、細胞を-20℃で30分～一晩、70%エタノール中に置くことで浸透性が改善される場合がある。フローサイトメトリーで検出する場合は、一晩置くほうが望ましい。
 - * 6: フローサイトメトリーでの検出および蛍光顕微鏡での観察のみの場合は、この操作を省く。
 - * 7: 組織の場合、自家蛍光があるため、可能であれば発色(DAB染色)まで行い、光学顕微鏡で観察するほうが望ましい。どうしても蛍光で観察する場合は、FITCに適した狭域のフィルターを使用する。
 - * 8: メチルグリーンで染色したあとは、スライド上の余分なメチルグリーンを軽く蒸留水で洗浄したあと、100%エタノールで洗浄し、脱水操作(100%エタノール→キシレン)を行う。ここで、80～90%エタノールを使用すると、メチルグリーンが脱色されやすいので脱水は手早くすること。
 - * 9: 封入剤は不溶性のものを使用する。
 - * 10: アポトーシス細胞の染色が弱い場合、高濃度のProteinase K(400 μg/ml、5分)で処理を行うと、効果がある場合もある。ただし、時間が長すぎると組織の破壊が著しく大きくなる。

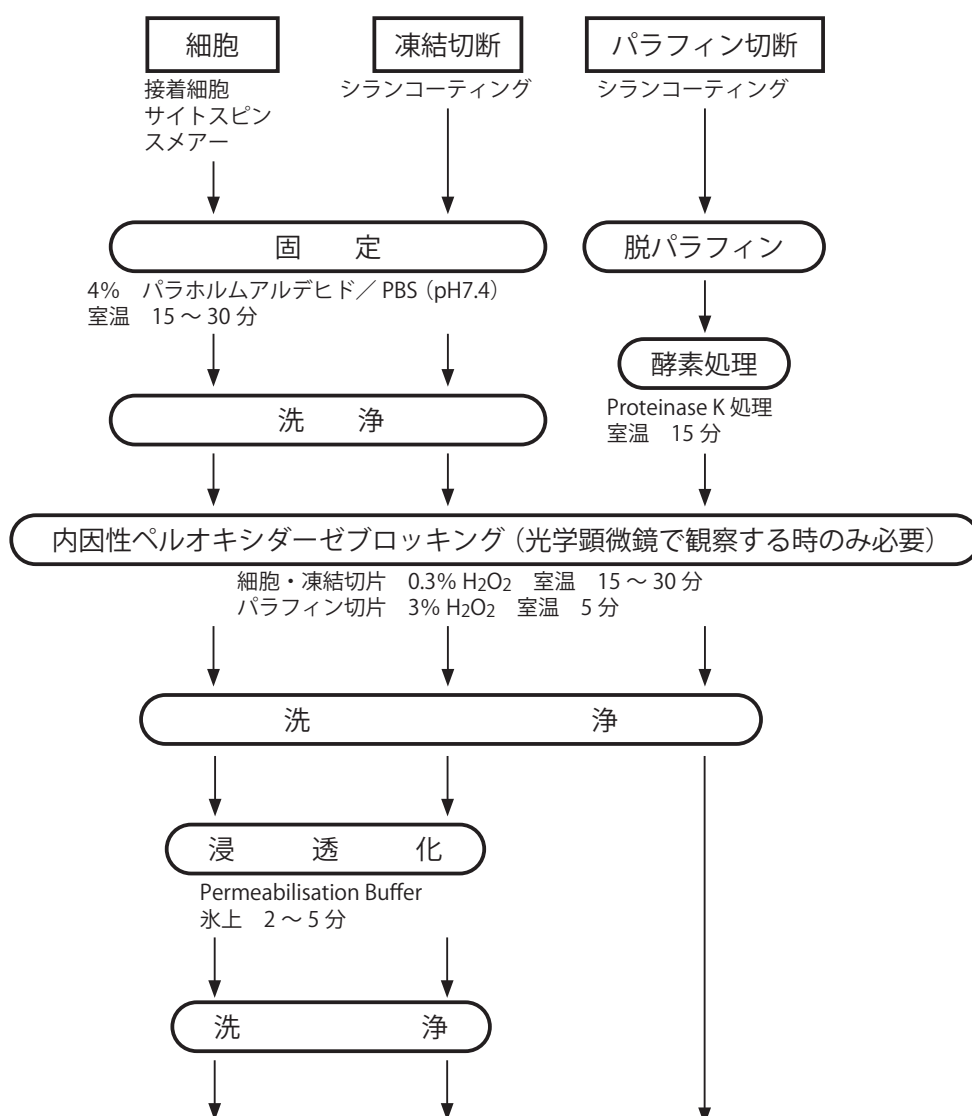
5. 脱パラフィン操作に関して

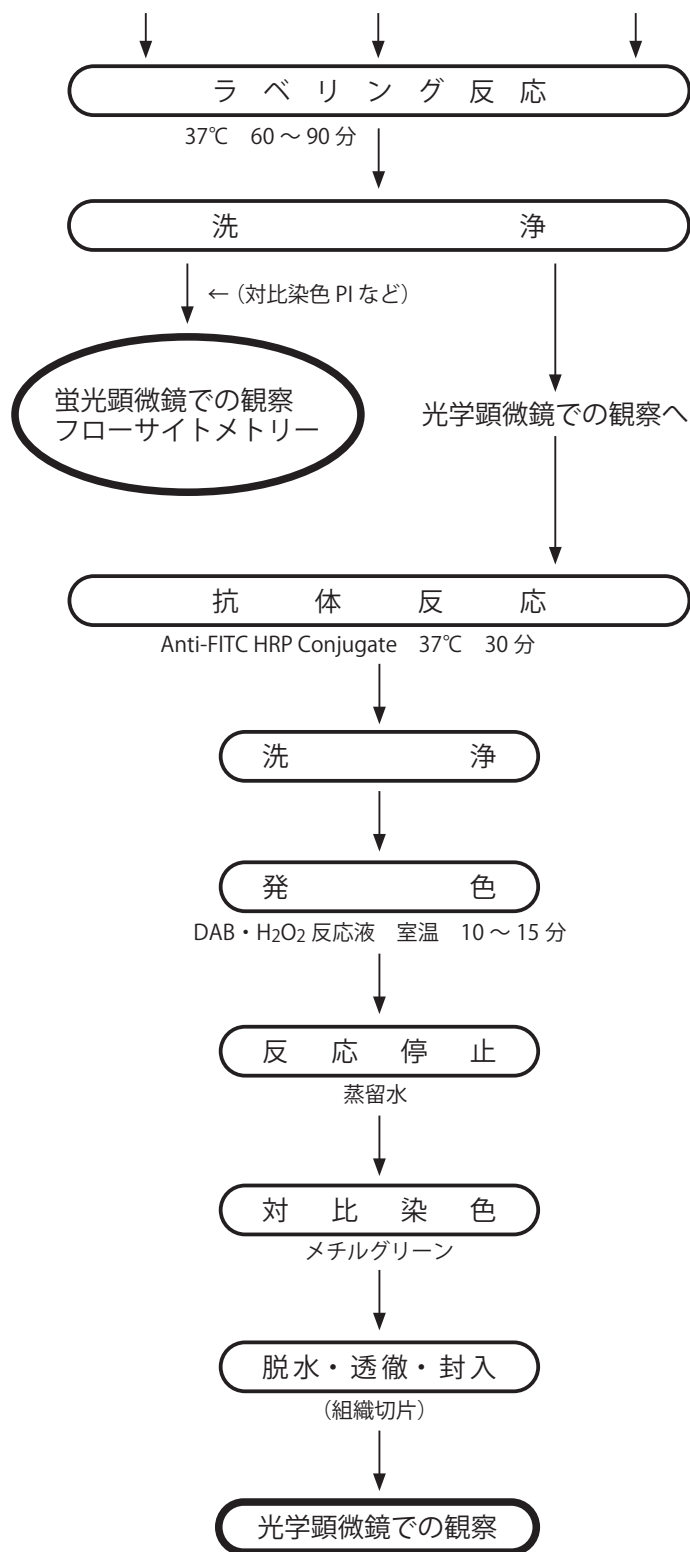
キシレンⅠ	5分
キシレンⅡ	5分
キシレンⅢ	5分
100%エタノール	5分
100%エタノール	5分
90%エタノール	5分
80%エタノール	5分
流水洗	2分
水洗後、蒸留水に浸す。	

VI. 実験に関する注意

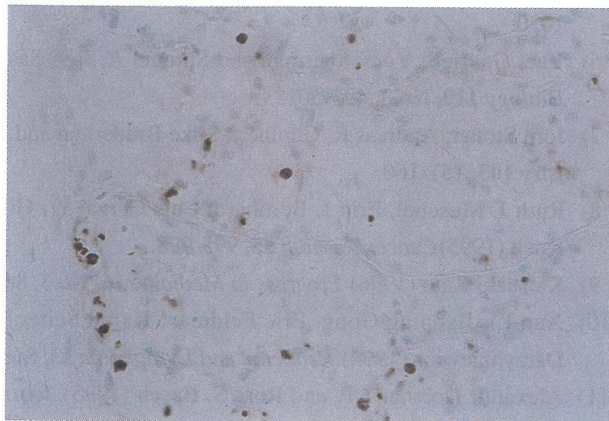
1. スライドガラスは剥離防止のためシランコーティングしてあるものを使用する方がよい。
2. 湿潤箱は予め 37°C でインキュベートしておく。
3. カバースリップまたはパラフィルムを反応時に使用することにより、大きな組織切片でも毛细管現象で反応液が均一に広がるためムラができない。またインキュベートによる蒸発を防ぐことができる。
4. PBS で洗浄した後に反応液をのせる場合は、余分な水分をろ紙またはペーパータオルで除去しておく。
5. PBS での洗浄は、(細胞の場合) は直接細胞に PBS をかけると剥がれてしまうので十分気をつけて濯ぐ。(組織切片の場合) は 5 分間、3 回を目安に行う。

操作フローチャート





パラフィン包埋組織切片の操作法に従って染色した後、光学顕微鏡で観察した。



コントロールスライド (ラット乳腺)
DAB 発色
対比染色 3% メチルグリーン

VII. Q&A

Q1: アポトーシス細胞の染色が弱いのですが。

A1: (1) 立体障害により反応試薬が十分組織や細胞に浸透していない可能性があります。組織や細胞中に酵素反応液がよく浸透するよう Proteinase K や Permeabilisation Buffer の処理濃度、処理時間の検討を行ってください。また、細胞の場合 4%パラホルムアルデヒドで固定洗浄後、70% エタノールで一晩固定すると有効です。

(2) 酵素反応時間を長めに設定してください。

(3) 抗体反応時間を延長するか、または発色基質の反応時間を延長してください。

Q2: 非アポトーシス細胞の染色が観られるのですが。

A2: 非特異的結合が起こっている可能性があります。

洗浄の回数を増やすか、ラベリング反応後、洗浄バッファー中に 1% BSA やスキムミルク等のブロッキング試薬を添加してください。

Q3: 光学顕微鏡で観察する際、メチルグリーン染色は必ず必要ですか？ヘマトキシリン染色でも可能ですか？

A3: メチルグリーン染色は、核染色を行います。核の大きさや位置がわからなければ、アポトーシス細胞が陽性かどうかの正しい判定が行えませんので、メチルグリーン染色を必ず行っていただくことをお勧めします。メチルグリーンは緑に染色されるので、DAB により茶色に染まるアポトーシス陽性細胞と対比がしやすくなります。

ヘマトキシリンでも可能ですが、ヘマトキシリンは青紫色～紺色に染色されるので、濃く染まると DAB 染色と対比が難しくなります。

VIII. 参考文献

- 1) Dawn R Z Tornusciolo, Robert E Schmidt, and Kevin A. Roth.
BioTechniques. (1995) **19**: 800-805.
- 2) Bernard Piqueras, Brigitte Autran, Patrice Debre, and Guy Gorochov.
BioTechniques. (1996) **20**: 634-640.
- 3) Tushar Patel, Amindra Arora, and Gregory J Gores.
Analytical Biochemistry. (1995) **229**: 229-235.
- 4) Jan H Wijsman, Richard R Jonker, Rob Keijer, Cornelis J H Van De Velde, Cees J Cornelisse, and Jan Hein Van Dierendonck.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. (1993) **41**: No.1, 7-12.
- 5) R Gold, M Schmied, G Rothe, H Zischler, H Breitschopf, H Wekerle, and H Lassmann.
The Journal of Histochemistry and Cytochemistry. (1993) **41**: No.7, 1023-1030.
- 6) Yael Gavrieli, Yoav Sherman, and Shmuel A. Ben-Sasson.
The Journal of Cell Biology. (1992) **119**: No.3, 493-501.
- 7) Jorn Strater, Andreas R, Gunthert, Silke Bruderlein, and Peter Moller.
Histochemistry. (1995) **103**: 157-160.
- 8) Ruth J Muschel, Eric J Bernhard, Luis Garza, W Gillies McKenna, and Cameron J Koch.
Cancer Resarch. (1995) **55**: 995-998.
- 9) Katsuaki Kato. *Progress in Medicine*. (1996) **16**: No.3, 867-870.
- 10) Xun Li, Jianping Gong, Eric Feldman, Karen Seiter, Frand Traganos, and Zbigniew Darzynkiewicz. *Leukema and Lymphoma*. (1994) **13**: Suppl. 1, 65-70.
- 11) Alexandr Dolzhanskiy and Ross S Basch.
Journal of Immunological Methods. (1995) **180**: 131-140.
- 12) Gold R, Schmied M, *et al.* *Laboratory Investigation*. (1994) **71**: No.2, 219-225.

IX. 注意

- 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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社