

## 三重染色法

### シンプルステインMAX-PO (M)、シンプルステインAP (M) を用いたマウス第一抗体による三重染色法

- ◆目的: 3種類の抗原を同一切片上で検出する。
- ◆材料: 20%緩衝ホルマリン固定・パラフィン包埋切片
- ◆技術アドバイス (抗原検出の順番の決定)
  - ・1回目の抗原検出は微量抗原や抗原量の少ないものを選択し、BCIP/NBT発色 (青色)。
  - ・2回目の抗原検出は細胞質抗原や多量に存在する抗原を選択し、ニューフクシン発色 (赤色)。
  - ・3回目の抗原検出は核内抗原や中等量～多量に存在する抗原を選択し、DAB発色 (茶色)。

\*各ステップでの反応温度、反応時間は厳密に守ること。  
 \*特に温度指定のない場合は、常温 (15～25℃) で操作すること。  
 \*染色結果に影響を及ぼす為、必ず下記の操作手順に従って操作を行うこと。

#### ◆操作手順

##### 1. 脱パラフィン

- 1-1) キシレンに浸す。常温、3分間、3回。
- 1-2) エタノールに浸す。100%エタノール: 常温、3分間、2回。95%エタノール: 常温、3分間、2回。
- 1-3) PBSで洗浄する。 常温、3分間、1回。

##### 1回目の抗原検出

##### 2. 抗原賦活化処理 (1回目の第一抗体の能書に準じ、必要に応じて行う。)

- 2-1) 1回目の第一抗体の能書に準じた抗原賦活化液および時間にて処理を行う。
- 2-2) 常温にて20～60分間自然冷却し、PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。

##### 3. ブロッキング試薬による処理

- 3) 10%正常ヤギ血清 (ニチレイコード: 426041) を滴下する。常温、10分間。

##### 4. 第一抗体の添加・反応 (1回目の抗原検出)

- 4-1) 1回目の第一抗体を滴下する。37℃、1時間。
- 4-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。

##### 5. シンプルステインの添加・反応

- 5-1) シンプルステイン AP (M) (ニチレイコード: 414241) を滴下する。室温、30分間。
- 5-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。
- 5-3) TBSに置換する。TBS溶液中でスライドを5回上下させる。

##### 6. BCIP/NBT基質溶液<sup>※1</sup>の添加・反応

- 6-1) BCIP/NBT発色。BCIP/NBT基質液を滴下し、検鏡しながら発色する。
- 6-2) 精製水で洗浄する。



## 2 回目の抗原検出

|   |
|---|
| <b>7. 1回目の第一抗体と標識酵素の失活 兼 抗原賦活化処理 (2回目の第一抗体の能書に準ずる。)</b>   |
| 7-1) ①または②の処理を行う。<br>①2回目の第一抗体が熱による抗原賦活化処理を必要としない場合<br>:0.01Mクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) を耐熱性バットに入れ95℃で10分間加熱する。<br>②2回目の第一抗体が熱による抗原賦活化処理を必要とする場合<br>:能書に準じた抗原賦活化液を耐熱性バットに入れ95℃で40分間加熱後、常温にて20分~60分間自然冷却する。<br>7-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。 |
| <b>8. ブロッキング試薬による処理</b>   |
| 8) 10%正常ヤギ血清 (ニチレイコード:426041) を滴下する。常温、10分間。  |
| <b>9. 第一抗体の添加・反応 (2回目の抗原検出)</b>   |
| 9-1) 2回目の第一抗体を滴下する。37℃、1時間。<br>9-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。  |
| <b>10. シンプルステインの添加・反応</b>   |
| 10-1) シンプルステイン AP (M) (ニチレイコード:414241) を滴下する。常温、30分間。<br>10-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。<br>10-3) TBSに置換する。TBS溶液中でスライドを5回上下させる。  |
| <b>11. ニューフクシン基質溶液<sup>*2</sup>の添加・反応</b>   |
| 11-1) ニューフクシン発色。ニューフクシン基質溶液を滴下し、検鏡しながら発色する。(ニューフクシン基質キット (ニチレイコード:415161) も使用できます。)<br>11-2) 精製水で洗浄する。  |



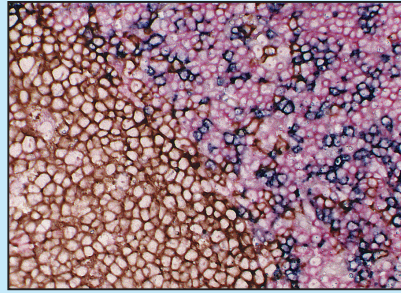
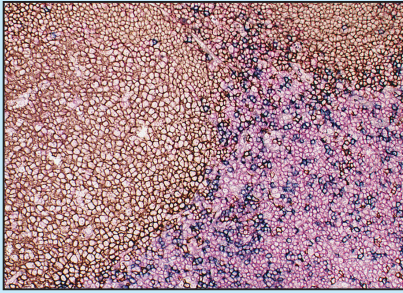
## 3 回目の抗原検出

|  |
|--|
| <b>12. 2回目の第一抗体と標識酵素の失活 兼 抗原賦活化処理 (3回目の第一抗体の能書に準ずる。)</b>   |
| 12-1) ①または②の処理を行う。<br>①3回目の第一抗体が熱による抗原賦活化処理を必要としない場合<br>:0.01Mクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) を耐熱性バットに入れ、95℃で10分間加熱する。<br>②3回目の第一抗体が熱による抗原賦活化処理を必要とする場合<br>:能書に準じた抗原賦活化液を耐熱性バットに入れ95℃で40分間加熱後、常温にて20分~60分間自然冷却する。<br>12-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。 |
| <b>13. 内因性ペルオキシダーゼ除去</b>   |
| 13-1) 3%過酸化水素水に浸す。常温、10分間。<br>13-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。   |
| <b>14. ブロッキング試薬による処理</b>   |
| 14) 10%正常ヤギ血清 (ニチレイコード:426041) を滴下する。常温、10分間。  |
| <b>15. 第一抗体の添加・反応 (3回目の抗原検出)</b>   |
| 15-1) 3回目の第一抗体を滴下する。37℃、1時間。<br>15-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。   |
| <b>16. シンプルステインの添加・反応</b>  |
| 16-1) シンプルステイン MAX-PO (M) (ニチレイコード:424131) を滴下する。常温、30分間。<br>16-2) PBSで洗浄する。 常温、3分間、3回。  |
| <b>17. DAB基質溶液<sup>*3</sup>の添加・反応</b>  |
| 17-1) DAB発色。DAB基質溶液を滴下し、検鏡しながら発色する。(シンプルステインDAB溶液 (ニチレイコード:415171) またはDAB基質キット (ニチレイコード:425011) も使用できます。)<br>17-2) 精製水で洗浄する。   |
| <b>18. 封入</b>  |
| 18) 水溶性封入剤で封入する。(水溶性永久 (長期) 封入剤 (ニチレイコード:415131) も使用できます。)   |

# 染色例

## 染色例 1

- ◆目的：3種類の抗原検出により組織内の3種類の細胞分布を観察する。
- ◆材料：ヒト反応性リンパ節



CD8：CD8陽性細胞の細胞膜がBCIP/NBT発色で青色に染色されている。

CD4：CD4陽性細胞の細胞膜がニューフクシン発色で赤～桃色に染色されている。

CD20 cy：主に胚中心に存在するCD20 cy陽性細胞（B細胞）の細胞膜がDAB発色で茶褐色に染色されている。

### 使用抗体

#### 《1回目の抗原検出》【BCIP/NBT発色（青色）】

- CD8
- 抗原賦活化処理：1mM EDTA緩衝液（pH 8.0）、95℃、40分

#### 《2回目の抗原検出》【ニューフクシン発色（赤～桃色）】

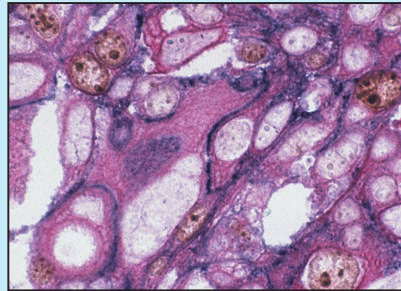
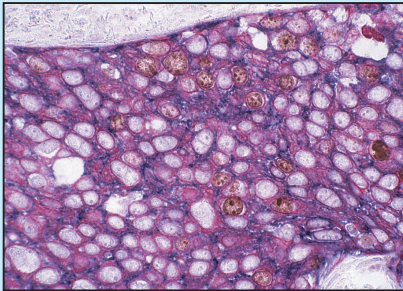
- CD4
- 抗原賦活化処理：1mM EDTA緩衝液（pH 8.0）、95℃、40分

#### 《3回目の抗原検出》【DAB発色（茶褐色）】

- CD 20 cy
- 抗原賦活化処理：10mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）、95℃、40分

## 染色例 2

- ◆目的：同一細胞内において3種類の抗原分布を観察する。
- ◆材料：子宮頸部扁平上皮癌



$\beta$ -catenin：細胞膜に存在する $\beta$ -cateninがBCIP/NBT発色にて青色に染色されている。

Cytokeratin (AE1/AE3)：細胞内の細胞骨格タンパクであるCytokeratinがニューフクシン発色にて赤～桃色に染色されている。

Ki-67抗原：増殖細胞核内のKi-67抗原がDAB発色にて茶褐色に染色されている。

### 使用抗体

#### 《1回目の抗原検出》【BCIP/NBT発色（青色）】

- $\beta$ -catenin
- 抗原賦活化処理：1mM EDTA緩衝液（pH 8.0）、95℃、40分

#### 《2回目の抗原検出》【ニューフクシン発色（赤～桃色）】

- Cytokeratin (AE1/AE3)
- 抗原賦活化処理：10mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）、95℃、40分

#### 《3回目の抗原検出》【DAB発色（茶褐色）】

- Ki-67抗原
- 抗原賦活化処理：10mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）、95℃、40分

## ◆参考文献

池田勝秀, 鈴木孝夫ほか：高感度間接法を用いた酵素抗体法三重染色, 医学検査；52(7)：944-949, 2003

## ◆参考

- 1回目の第一抗体の反応時間を4℃、一晩とし、2回目、3回目の第一抗体の反応時間を37℃、1時間とした場合、本操作全てを2日間で行うことができます。

## ◆試薬

## ※1 BCIP/NBT基質溶液調製法

- 使用時に ii) NBT保存液 6.5  $\mu$ L、iii) BCIP保存液 5  $\mu$ Lを混合し、i) 100mM トリス塩酸緩衝液 1.5mLを加え基質溶液とする。
  - 100mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5, 含 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>) (冷蔵保存)
    - 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.5) : Tris (hydroxy-methyl) amino-methane 6.06gを精製水25mLに溶解させ、塩酸にてpHを9.5に調製し、精製水で50mLにメスアップする。
    - 5M NaCl水溶液 : NaCl 2.93gを精製水10mLに溶解する。
    - 1M MgCl<sub>2</sub>水溶液 : MgCl<sub>2</sub> 3.01gを精製水25mLに溶解する。
    - ①②③を混合し、精製水で500mLにメスアップする。
  - NBT (Nitro Blue Tetrazolium) 保存液 (-20℃保存)
    - NBT (SIGMA) 75mgを70% N,N-ジメチルホルムアミド1mLに攪拌溶解する。
  - BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate-p-Toluidine salt) 保存液 (-20℃保存)
    - BCIP (SIGMA) 50mgをN,N-ジメチルホルムアミド1mLに攪拌溶解。

## ※2 ニューフクシン基質溶液調製法

- ②ニューフクシン溶液、③4% 亜硝酸ナトリウム水溶液を100  $\mu$ Lずつ等量混合し、1分放置。この液に④0.2M トリス塩酸緩衝液 40mLを加え、さらに攪拌しながら、①基質溶液 100  $\mu$ Lを溶解する。濾過後すぐに使用する。(用時調製)
  - 基質溶液(用時調製)
    - naphthol AS-BI phosphoric acid (SIGMA) 10mgをN,N-ジメチルホルムアミド100  $\mu$ Lに溶解する。
  - カップラー液
    - ニューフクシン溶液 : New fuchsin powder (MERCK) 4.0gを2N塩酸 100mLに溶解し、濾過する。(冷蔵保存)
    - 4% 亜硝酸ナトリウム水溶液 : 亜硝酸ナトリウム 40mgを精製水1mLに溶解する。(用時調製)
  - 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.2~8.3) (常温保存)
    - Tris (hydroxy-methyl) amino-methane 12.12gを精製水250mLに溶解し、塩酸にてpHを8.2~8.3に調製し、精製水で500mLにメスアップする。

## ※3 DAB基質溶液調製法

- 下記を溶解、混合、攪拌し、基質溶液とする。(用時調製)
  - 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DOJINDO) 10mg
  - 0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6, 含 15mM NaN<sub>3</sub>) 50mL
  - 5% 過酸化水素水 50  $\mu$ L
  - イミダゾール 34mg