

チラミドシグナル増幅法プロトコル

こちらはチラミドシグナル増幅 (Tyramide Signal Amplification : TSA) 法のプロトコルです。ビオチン標識 ISHpalette® Short hairpin amplifier (特注品) — Avidin-Biotin 結合反応、または、DIG/FAM 標識 ISHpalette® Short hairpin amplifier (特注品) — 抗 DIG/抗 FAM 抗体反応を利用しています。

スライドガラス切片試料の染色では Streptavidin Peroxidase や抗体が浸透しにくい場合があるため、なるべく薄めの切片をご用意ください。染色性が低い場合には、各試薬の濃度や反応時間の最適化をご検討ください。

※ 弊社 HP 掲載の[染色プロトコル \(詳細版\)](#) (通常プロトコル) と合わせてご利用ください。

通常プロトコルに加えて必要な試薬

- ・ Avidin・Biotin ブロッキング試薬 (必要に応じて)
- ・ 30% 過酸化水素水
- ・ 0.3% 過酸化水素水 (30%過酸化水素水を DW で希釈、冷蔵で 1 か月は安定)
- ・ ビオチンまたは DIG、FAM 標識 ISHpalette® Short hairpin amplifier (特注品)
- ・ Streptavidin Peroxidase (#016-030-084, Jackson ImmunoResearch) *
- ・ Mouse Anti-DIG Antibody HRP label (#200-032-156, Jackson ImmunoResearch) *
- ・ Mouse Anti-FITC Antibody HRP label (#200-032-037, Jackson ImmunoResearch) *
- ・ TSA リアクションバッファー

TBS (pH8.0) または PBS に Tween 20 (0.1%) および、4-Iodphenol を終濃度 50µg/mL になるように加えたもの。調製後冷蔵で 1 か月間は安定。4-Iodphenol ストック溶液は 50mg/mL で DMF に溶解して -20°C 保存。

- ・ 蛍光標識チラミドなど

* 他社同等品の使用も可能ですが、最適な反応条件をご検討ください。

内在性 Avidin と Biotin のブロッキングについて

染色に使用する組織や生物種などにより、必要に応じて 9.と 10.の間に内在性の Avidin と Biotin のブロッキングを行ってください。

内在性ペルオキシダーゼの失活

通常プロトコル 2.の脱脂および透過処理の際のメタノールを 0.3-3% 過酸化水素/メタノールに変更する事で内在性ペルオキシダーゼの失活を行えます。通常は 0.3%過酸化水素で処理を行えますが、内在性ペルオキシダーゼ活性が特に強い組織では、過酸化水素濃度を 3% まで上げることができます。

TSA 増幅の手順

通常プロトコルに従って 13.まで染色処理を行う。

※ 必要に応じて、通常プロトコル 9.と 10.の間に内在性 Avidin と Biotin のブロッキングを行ってください。

14. Biotin 標識ヘアピン DNA — HRP 標識 Streptavidin の場合

PBST で Streptavidin Peroxidase を 10,000 倍に希釈して試料に適用し、37°C 60 分間（スライドガラス）もしくは室温 20 分間（浮遊切片など）インキュベートする。

DIG/FAM 標識ヘアピン DNA — 抗 DIG/抗 FAM 抗体の場合

抗体希釈バッファーで抗 DIG または抗 FAM 抗体を 5,000-20,000 倍（抗体により最適化が必要）に希釈して試料に適用し、4°Cで一晩インキュベートする。

※ 抗体希釈バッファーに血清を使用すると HCR 産物が分解される場合があります。BSA やカゼイン系ブロッキング試薬のご使用をお勧めします。

15. 洗浄 : PBST 室温 5 分 × 2 回

PBST にスライドガラスまたは浮遊切片を浸して室温で 5 分間洗浄する。洗浄操作をもう一回繰り返す。

16. TSA 増幅

TSA リアクションバッファー200μL に対して 0.3%過酸化水素を 2μL 加える。

蛍光標識 Tyramide を 2-20μM になるように TSA リアクションバッファーに加えて試料に適用し、室温で 15-30 分間インキュベートする。

※ 最適な反応条件はチラミドにより異なります。

17. 洗浄 : PBS 室温 5 分 × 2 回

18. 封入

多重染色を行う場合には 17.の後に 10%過酸化水素水/PBS で 30 分間処理し、HRP の失活を行った後 PBST で 5 分間 6 回以上洗浄し、再度 14.からの工程を繰り返す。

※ HRP の失活にメタノールや塩酸等を使用すると、HCR 産物が分解される可能性があります。

- ・本プロトコルは製品の改良や仕様変更および改善のため、予告なく変更することがあります。
- ・本製品は他社製品の性能または使用につきましても対応しておりません。
- ・本製品は研究用です。臨床用途には使用できません。
- ・本開発製品は東邦大学 医学部 解剖学講座微細形態学分野 准教授 恒岡洋右先生が開発された技術(特許第 7482506 号)を用いて、東邦大学と共同で開発・製品化を行っております。