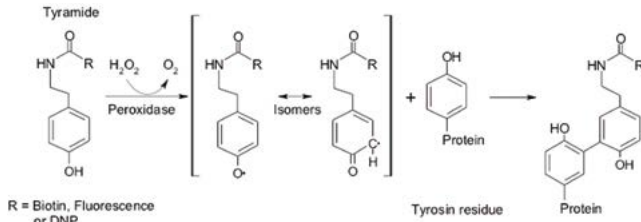


## Q & A

### Q チラミドとは何ですか？

チラミドはアミノ基をもつ p-フェノール誘導体です。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下で、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の触媒作用により生じた水酸化ラジカルが、チラミド分子の水酸基 (-OH) の水素を引き抜きます。水素を失ったラジカル化したチラミドは、近傍に芳香族化合物 (Tyr, Trp などのアミノ酸) が存在すると、それらの芳香族分子と共有結合します。通常、このようなラジカル反応は数分の間に HRP の近傍でのみ生じ、少数の HRP 分子を中心として多数のチラミド分子が共有結合するため、劇的にシグナルが増幅されます。



### Q TSA Plus と TSA の違いは何ですか？

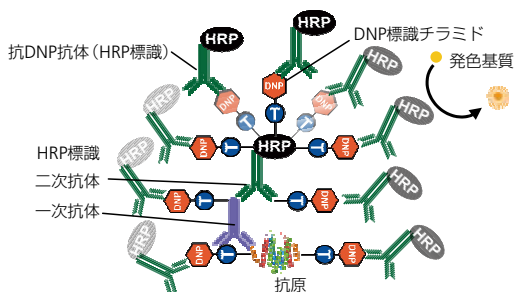
TSA Plus は、高感度な TSA よりもさらに高感度です。チラミドに HRP のエンハンサーを加え、バッファー (Amplification Diluent) の組成を変えることによって、HRP が失活するまでの時間が延長され、TSA よりも多くのチラミドが組織に沈着します。TSA Plus は、キットに Blocking Reagent、HRP 標識ストレプトアビジンが含まれませんので、別途ご購入ください。

### Q TSA と TSA Plus でバッファー (Amplification Diluent) の互換性はありますか？

ありません。TSA と TSA Plus では、キットに付属する Amplification Diluent の組成が異なります。

### Q TSA Plus DNP system とは何ですか？

TSA Plus DNP System では、2,4-dinitrophenyl (DNP) で標識したチラミドを使用し、HRP あるいは AP 標識抗 DNP 抗体を反応させて発色させます。DNP は自然界には殆ど存在しないため、抗 DNP 抗体は、生体材料との非特異的な結合が殆どありません。このキットはビオチン・ストレプトアビジンの結合を利用しないため、**内在ビオチン量の高いサンプルに最適です。**



### Q TSA Plus DNP system で蛍光検出できますか？

蛍光標識された抗 DNP 抗体 (Life technologies 社 Anti-DNP-KLH rabbit IgG fraction Alexa Fluor® 488 Conjugate, #A11097) をご使用ください。

### Q 実験操作の変更が必要ですか？

TSA 増感前の固定・包埋について、実験操作の変更は必要ありません。ただし、抗体などを反応させる操作では、HRP 標識ストレプトアビジンや抗体などを作用させる操作が必要です。詳細は [TSA 製品ページの実験プロトコール](#) をご参照ください。

### Q 時間がかかりますか？

シグナル増幅に必要な時間は 3-10 分程度です。TSA Biotin System や TSA Plus DNP System の場合には、シグナル増幅ステップ以外に 30 分ほど時間が必要ですが、蛍光標識されたチラミドを使用する TSA Fluorescence System (Fluorescein / TMR / Cyanine 3 / Cyanine 5) などは、増幅操作の後、そのままシグナルを検出できます。

### Q どんなタイプのサンプルで使用可能ですか？

ホルマリン固定 / パラフィン包埋切片、パラホルムアルデヒド固定培養細胞、凍結切片、メタクリル酸メチルなどの可塑性樹脂包埋した切片などの IHC や ISH に使用され、良好な結果を残しています。また、whole mount の IHC や ISH も可能です。

### Q どんな標識の抗体・プローブを使用しても IHC や ISH に利用できますか？

TSA には HRP が必須です。例えばビオチン化二次抗体・プローブを使用する時には、HRP 標識ストレプトアビジンが必要です。また Fluorescein や DIG 標識などの一次抗体・プローブを使用する時には、HRP 標識抗 Fluorescein 抗体や、HRP 標識抗 DIG 抗体をご用意ください。そのほか二次抗体として、HRP 標識抗 IgG 抗体も使用できます。

### Q コントロールスライドには何が必要ですか？

IHC の場合、TSA を使用しない非増幅コントロールスライドと、一次抗体を使用しない、あるいは非特異的抗体を使用して、TSA 増感を行った TSA 増幅済ネガティブコントロールスライドが必要です。ISH の場合でも、TSA を使用しない非増幅コントロールスライド、プローブを使用しない、あるいは非特異的なプローブを使って TSA 増感を行った TSA 増幅済ネガティブコントロールスライドが必要です。

### Q HRP 標識二次抗体は専用の物が必要ですか？

市販されている特異性の高い HRP 標識二次抗体であれば、どれでもご利用頂けます。HRP 量が低濃度または高濃度の場合、シグナルが出ないことがありますので、抗体の希釈率の検討を行ってください。

### Q Blocking にはどのようなものが使用可能ですか？

弊社で販売している Blocking Reagent (#FP1012) を推奨しますが、血清や BSA、カゼイン、ドライミルクなどが使用できることが報告されています。

### Q どんな発色基質が使えますか？

TSA ビオチンシステムや、TSA Plus DNP システムを使用する場合には、DAB・AEC など、標準的に使用されている発色基質を使用することができます。

## Q 蛍光検出には、ビオチン化チラミドと蛍光チラミドどちらがお勧めですか？

ビオチン化チラミドを使用して蛍光検出を行うには、蛍光標識ストレプトアビジンを反応させます。蛍光チラミドを使用するよりも、より高いシグナル増強が得られることがあります。蛍光チラミドを使用する場合は、実験操作手順が簡単になります。また、多くの場合、蛍光チラミドでも十分な増感を得ることができます。

## Q バックグラウンドが高くなることはありますか？

バックグラウンドが高い原因には、内在ペルオキシダーゼやビオチンの発現量が高い、二次抗体の非特異的な吸着、ブロッキング操作の欠如・洗浄操作が不十分などが考えられます。内在ペルオキシダーゼを失活させるには、[TSA 製品ページの実験プロトコール](#)注射をご参照ください。TSA の強い増感作用によって、通常の抗体濃度ではバックグラウンドが高くなる場合があります。また、[TSA Plus](#) はさらに高感度なため、[TSA](#) よりもバックグラウンドが高くなる場合があります。このため、抗体をより希釈して使用してください。

## Q 自家蛍光が高い細胞にも使えますか？

赤外域に近い TSA Cyanine 5 System あるいは TSA Plus Cyanine 5 System を使用すれば、自家蛍光の問題は回避される可能性があります。

## Q 解像度が低下することはありますか？

解像度の目立った低下はありません。低下がみられる場合は、抗体やプローブ濃度、チラミドの反応時間を検討します。

## Q 電子顕微鏡用サンプルに利用可能ですか？

IHC, ISH 双方において、シグナルの増幅に成功したという報告がなされています。

## Q FACS に利用可能ですか？

あらかじめ固定・染色した細胞をフローサイトメトリーで解析する場合には使用可能ですが、生きた細胞にはご使用いただけません。

## Q 多重染色は可能ですか？

複数の標的分子に対して、シーケンシャルな多重染色を行うことができます。IHC において、同一生物種由来の一次抗体を使用する場合でも、[Opal™ 法](#)により多重染色が可能です。また ISH では、ACD RNAScope (Biotechne) を用いた多重染色、RI プローブと Non-RI プローブの発色検出、ともに Non-RI プローブを使用した二色検出、2 種以上の Non-RI プローブを使用し、それぞれを異なる蛍光で検出など、様々な組み合わせでの例が報告されています。また、タンパク質の検出 (IHC) と核酸の検出 (ISH) とを同一のサンプルに対して行うことも可能です。

## Q 発色による多重染色も可能ですか？

ISH にて、DAB と BCIP / NBT による発色の二重染色を行った報告があります。

## Q ホルマリン固定・パラフィン包埋では抗原性が失われるため、凍結切片を使っていますが、TSA ではそのような必要がなくなりますか？

パラフィン包埋切片中の抗原性を回復する方法として、スライドをボイルしたり電子レンジで加熱する方法が用いられます。この処理を行う、あるいは行わなくても、TSA の使用によりパラフィン包埋切片で抗原検出が可能となった例があります。

## Q Opal™ で使用する電子レンジは、出力調整可能な 1000W のものが必要ですか？

サンプルの加熱が目的であるため、1000 W である必要はありません。また、電子レンジの出力 20% 調整ができなければ、20-30 秒ごとに最大出力で沸騰させることを繰り返して、適した回数を決めてください。

## Q Opal™ は凍結切片でも使用できますか？

下記、報告があります。  
Simultaneous Visualization of Multiple Antigens With Tyramide Signal Amplification Using Antibodies From the Same Species.  
Tóth ZE, Mezey E.  
J Histochem Cytochem. 2007 Jun;55(6):545-54.  
ただし、電子レンジ処理の影響を受けやすいサンプルでは、処理条件の検討を要する場合や、処理自体が困難な可能性があります。

## Q 保存はどうすればよいですか？

外装箱に表示されている保管方法、有効期限に従ってください。標識チラミドは乾燥品で、目で見えません。チラミドは、キットのマニュアルに従い規定量の DMSO (dimethyl sulfoxide, 分子生物学グレードあるいは HPLC グレード) または精製水 (TSA Cyanine のみ) に溶解させ、4℃にて保存します。溶解済みのチラミド溶液は、分注し -20℃にて凍結保存することも可能です。