

## TSA Plus System とは

パーオキシダーゼのエンハンサーと反応バッファー(1x Plus Amplification Diluent)の至適化により、酵素の失活までの時間が延び、より多くのチラミド物質の組織への沈着が期待できます。エンハンサーは標識チラミドに添加されていますので、チラミドの再構成には Cyanine 3/5 であっても DMSO を用いてください。通常の TSA System のコンポーネントと互換性は有りませんので、ご注意ください。

### A) TSA Plus DNP と TSA Biotin の差異

ビオチンチラミドを用いる系と DNP チラミド系で得られる感度の差異は、当然のことながら対象となるサンプルや関与する抗体・酵素やその使用条件によって異なってきます。また、それぞれの TSA の系に対してどれだけ至適化してあるのかによっても差が見られます。

NEN の研究者が複数回の *in situ* hybridization を行った限りでは、TSA Plus DNP のほうが 2 倍から 10 倍程度高感度であることが示されました。同じく免疫組織化学染色でも TSA Plus DNP のほうが 2.5 倍から 10 倍高感度でした。主観的な判断ですが、TSA Plus DNP によって得られたシグナルのほうが、TSA Biotin で得られたものよりもよりシャープであることがしばしばありました。

TSA Plus DNP による感度の上昇が 2 倍程度であった場合、TSA Biotin に比した感度の差はほとんど感じられません。期待通りの結果が得られないことがあるため、最初から TSA Plus DNP を使用するメリットは無いように思われます。たとえば、内在性ビオチンの存在が予想され、ストレプトアビジンを介する反応系を回避したい場合や、TSA Biotin でわずかなシグナルしか得られなかった場合に TSA Plus DNP を検討する価値があるものと思われます。

通常の TSA system と同じですが、次の点に配慮して *in situ* hybridization を最適化することをお勧めします。

1. サンプルの内在性パーオキシダーゼのクエンチング
2. 組織への浸透性
3. プロブ濃度などのハイブリダイゼーション条件  
用いるプロブ濃度は通常の非アイソトープハイブリダイゼーションの場合の 10 分の一程度に落とすことにより良い結果が得られています。
4. HRP 標識抗ハプテン抗体の希釈

### B) TSA Plus fluorescence と TSA fluorescence の差異

#### 感度比較

##### a) 免疫組織化学(IHC)

蛍光チラミドの入った TSA Plus は通常の蛍光 TSA システムよりも常に高感度で、多くの場合 10 倍以上の感度を示しました。TSA Plus では、アフィニティーの高い一次抗体の場合、通常使用の最高 100 倍まで希釈して使用できました。

##### b) *in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)

通常の TSA システムに比べ、はっきり表現できる感度の上昇は認められませんでした。TSA Plus で無ければ検出不可能な例も存在しました。通常の TSA システムでシグナルがでていたサンプルで TSA Plus を用いる場合、プロトコールにあるようにプロブ濃度を下げる、あるいは HRP 標識抗ハプテン抗体濃度を下げるが必要となると思われます。

通常の TSA システムでは、蛍光チラミドの反応は 5 分以内に終了し、それ以上インキューベ

ションしても感度の上昇は望めませんでした。

TSA Plus システムではインキュベーション時間を延ばすことにより増幅が望めます。もし室温で 10 分間のインキュベーションによりほとんどバックグラウンドが無く、シグナルがわずかに見えている状態であれば、インキュベーション時間を 20 - 30 分間にすることによりシグナルの増幅が見込まれます。

あるいは、+4°C で最長 24 時間のインキュベーションにより、S/N 比の高い結果が得られることもあります。この場合、チラミド反応前の洗いに冷却バッファ(+4°C)を使い、さらに冷却 1x Plus Amplification Diluent で希釈したチラミド試薬を添加し、+4°C でインキュベーションするというものです。

## TSA Plus の内容

### TSA Plus DNP system

Kit Name	TSA Plus DNP (AP) System		TSA plus DNP (HRP) System	
	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code
Kit Code	NEL746A	NEL746B	NEL747A	NEL747B
Size (slides)	50 to 150	25 to 75	50 to 150	25 to 75
Tyramide stock/vial	300 µL	150 µL	300 µL	150 µL
Anti-DNP antibody	150 µL	75 µL	150 µL	75 µL
1x Plus Amplification diluent	15 mL	7.5 mL	15 mL	7.5 mL
Blocking reagent	3 g	1.5 g	3 g	1.5 g

### TSA Plus 蛍光チラミドシステム

Kit Name	TSA Plus Fluorescein System		TSA plus TMR System		TSA Plus Cyanine 3 System		TSA Plus Cyanine 5 System	
	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code
Kit Code	NEL741	NEL741B	NEL742	NEL742B	NEL744	NEL744B	NEL745	NEL745B
Size (slides)	50 to 150	250 to 750	50 to 150	250 to 750	50 to 150	250 to 750	50 to 150	250 to 750
Tyramide vials/kit	2	10	2	10	2	10	2	10
Tyramide stock/vial	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
1x Plus Amplification diluent	15 mL	5x 15 mL	15 mL	5x 15 mL	15 mL	5x 15 mL	15 mL	5x 15 mL

Kit Name	TSA Plus Cyanine 3 / Cyanine 5 System	TSA Plus Cyanine 3 / Fluorescein System	TSA Plus Cyanine 5 / Fluorescein System	TSA Plus TMR / Fluorescein System
	Kit Code	Kit Code	Kit Code	Kit Code
Kit Code	NEL752	NEL753	NEL754	NEL756
Size (slides)/each tyramide	50-150	50-150	50-150	50-150
Tyramide vials/kit	2 each, Cy3 and Cy5	2 each, Cy3 and FL	2 each, Cy5 and FL	2 each, TMR and FL
Tyramide stock/vial	150 µL	150 µL	150 µL	150 µL
1x Plus Amplification diluent	2x 15 mL	2x 15 mL	2x 15 mL	2x 15 mL

<b>Kit Name</b>	<b>TSA Plus Fluorescein Palette System</b>
Kit Code	NEL760
Tyramide	Fluorescein, TMR, Cyanine 3, Cyanine 5
Size (slides)/ each tyramide	10 to 30
Tyramide vial/ kit	1 each
Tyramide stock/ vial	60 µL
1x Plus Amplification diluent	15 mL

Tyramide stock の量は、DMSO で再構成した後の液量です。TSA Plus 蛍光チラミドシステムには、Blocking reagent が含まれていませんので、別途 FP1020, 3g の購入が必要です。



---

株式会社パーキンエルマージャパン  
ライフサイエンス事業部

〒240-0005 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町 134 横浜ビジネスパーク テクニカルセンター4F  
Phone: 045-339-5862 Fax: 045-339-5872

---

TSA is a trademark of PerkinElmer, Inc.  
Copyright © 2010 by PerkinElmer Japan Co., Ltd.