

Тирамидная амплификация сигнала (TSA)

Данный протокол тирамидной амплификации сигнала (TSA) можно использовать для обнаружения сигнала в образцах, меченных пероксидазой, как при иммуноокрашивании, так и при гибридизации *in situ*. Все инкубации осуществляются на шейкере.

Реактивы:

- 2-4% формальдегид, pH 7,4
- фосфатный буфер (PBS), pH 7,4
- PBT: 0,1% Твин-20; PBS, pH 7,4
- 1мМ азид натрия в PBT
- 30% H₂O₂
- 1 мг/мл сток [флуоресцентно меченного тирамида](#) в [ДМСО для мечения](#)

Опционально:

- декстрансульфат (DS)
- 4-йодфенол
- кислый глициновый буфер: 0,1 М глицин; pH 2,0; 0,1% Твин-20

Протокол:

1. Фиксируйте образец необходимым способом. В большинстве случаев фиксацию осуществляют холодным 2-4% формальдегидом (pH 7,4). Отмойте образец от фиксатора фосфатным буфером (PBS, pH 7,4) и **PBT** (0,1% Твин-20; PBS, pH 7,4).
2. Ингибируйте эндогенные пероксидазы инкубацией образца в **ингибирующем растворе** (1мМ азид натрия в PBT) в течение 30-60 мин при комнатной температуре.

Опционально. Вместо 1мМ азида натрия для ингибирования можно использовать 3% H₂O₂ в PBT, либо 0,02 N HCl. Для последующей иммунохимии данный этап может быть совмещен с блокированием неспецифического связывания антител. Для этого в растворы азида или H₂O₂ необходимо добавить блокирующую сыворотку или 1% БСА.

При низком фоне или для гибридизации *in situ* данный этап можно пропустить и напрямую перейти к п.4.

3. Тщательно отмойте образец от ингибирующего раствора тремя инкубациями в PBT по 10 мин при комнатной температуре.
4. Проведите все этапы иммунохимии и гибридизации *in situ* для мечения образцов конъюгированными с пероксидазой антителами.
5. Тщательно отмойте образец от антител тремя инкубациями в PBT по 10 мин при комнатной температуре.
6. Приготовьте **реакционный буфер** непосредственно перед использованием. Для этого 30% H₂O₂ дважды разбавьте PBT, 1:100 каждый раз, до концентрации 0,003% (1:10000).

Опционально. Для повышения чувствительности метода в реакционную смесь можно добавить следующие компоненты (отдельно или в комбинации):

- 2% декстрансульфат (DS), используют для увеличения вязкости реакционной смеси.
 - 500 мкг/мл 4-йодфенола, используют для усиления пероксидазной реакции. Удобнее использовать как разведение 1:200 стокового раствора (100 мг/мл в этаноле).
7. Добавьте в реакционный буфер от 1 до 10 мкг/мл меченного тирамида (оптимальную концентрацию необходимо определять опытным путем). Перемешайте встряхиванием.
 8. Инкубируйте образец с реакционным буфером в темноте при комнатной температуре в течение 5–30 мин (точное время определяется опытным путем, 15 мин можно взять за отправную точку).
 9. Остановите реакцию инкубацией образца в ингибирующем растворе (1мМ азид натрия; PBT) 10 мин при комнатной температуре в темноте.
 10. Отмойте образец с помощью PBS три раза по 10 мин.
 11. Для повторного цикла мечения антителами и TSA, обработайте образец **кислым глициновым буфером** (0,1% Твин-20; 0,1 М глицин, pH 2,0) в течение 10 мин при комнатной температуре. Данная процедура открепляет связанные с антигеном антитела, не затрагивая при этом связанный ковалентно с белками тирамид.
 12. Заключите образец под покрывное стекло при помощи монтажной среды.

Проблемы и их устранение

ПРОБЛЕМА	РЕКОМЕНДУЕМОЕ ДЕЙСТВИЕ
Слабый сигнал	<ul style="list-style-type: none"> • Оптимизируйте концентрацию пробы / антител • Оптимизируйте концентрацию конъюгата пероксидазы хрена • Добавьте этап пермеабилзации для облегчения проникновения реагентов • Увеличьте время инкубации с раствором тирамида • Добавьте этап демаскирования антигена
Избыточный сигнал	<ul style="list-style-type: none"> • Оптимизируйте концентрацию пробы / антител • Уменьшите концентрацию конъюгата пероксидазы хрена • Уменьшите концентрацию тирамида в красящем растворе • Уменьшите время инкубации в красящем растворе тирамида
Низкое разрешение или размытый сигнал	<ul style="list-style-type: none"> • Уменьшите время инкубации в красящем растворе тирамида • Оптимизируйте концентрацию ингибирующего раствора
Высокий фон	<ul style="list-style-type: none"> • Уменьшите концентрацию пробы / антител • Используйте меньшую концентрацию вторичных антител • Уменьшите концентрацию конъюгата пероксидазы хрена • Высокий уровень эндогенного биотина (при использовании конъюгатов стрептавидина) • Проверьте специфичность антител • Уменьшите время инкубации в красящем растворе тирамида • Удлините время ингибирования эндогенных пероксидаз • Увеличьте число и/или длительность отмывок • Некачественный или загрязненный блокирующий реагент • Профильтруйте буферы
Яркие точки на фоне	<ul style="list-style-type: none"> • Отцентрифугируйте пробирку с антителами перед использованием

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
 Hunt Valley, Maryland 21030
 USA
 Phone: +1 888 973 6353
 Fax: +1 888 973 6354
 Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
 30625 Hannover
 Germany
 Phone: +49 511 16596811
 Fax: +49 511 16596815
 Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
 121351 Moscow
 Russian Federation
 Phone: +7 800 775 3271
 Email: ru@lumiprobe.com