

Tyramid-Signalverstärkung (TSA)

Dieses Tyramid-Signalverstärkungs-(TSA)-Protokoll kann verwendet werden, um Signale in mit Peroxidase markierten Proben durch Immunfärbung oder In-situ-Hybridisierung nachzuweisen. Alle Inkubationen werden auf einem Schüttler durchgeführt.

Reagenzien:

- 2-4% Formaldehyd, pH 7,4
- Phosphatpuffer (PBS), pH 7,4
- PBT: 0,1% Tween-20; PBS, pH 7,4
- 1 mM Natriumazid in PBT
- 30% H₂O₂
- 1 mg/ml [fluoreszenzmarkiertes Tyramid](#) in [Laborqualität-DMSO](#)

Optional:

- Dextransulfat (DS)
- 4-Iodophenol
- Saure Glycinpuffer: 0,1 M Glycin; pH 2,0; 0,1% Tween-20

Protokoll:

1. Fixieren Sie die Probe nach Bedarf. In der Regel erfolgt die Fixierung mit kaltem 2-4% Formaldehyd (pH 7,4). Waschen Sie die Probe vom Fixativ mit Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4) und PBT (0,1% Tween-20; PBS, pH 7,4).
2. Hemmen Sie die endogene Peroxidase-Aktivität, indem Sie die Probe 30–60 Minuten bei Raumtemperatur in einer Inhibitorlösung (1 mM Natriumazid in PBT) inkubieren.
Optional: Anstelle von 1 mM Natriumazid können auch 3% H₂O₂ in PBT oder 0,02 N HCl zur Hemmung verwendet werden. Für die anschließende Immunchemie kann dieser Schritt mit der Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen kombiniert werden. Dazu muss Blocking-Serum oder 1% BSA zu den Azid- oder H₂O₂-Lösungen hinzugefügt werden.
Hinweis! Im Falle eines niedrigen Hintergrunds und für die In-situ-Hybridisierung kann dieser Schritt übersprungen werden; fahren Sie direkt mit Schritt 4 fort.
3. Waschen Sie die Probe gründlich von der Inhibitorlösung mit drei 10-minütigen Inkubationen in PBT bei Raumtemperatur.
4. Führen Sie alle Immunchemie- oder In-situ-Hybridisierungsschritte durch, um Proben mit peroxidase-konjugierten Antikörpern zu kennzeichnen.
5. Waschen Sie die Probe gründlich, um Antikörper zu entfernen, mit drei 10-minütigen Inkubationen in PBT bei Raumtemperatur.

6. Reaktionspuffer unmittelbar vor Gebrauch vorbereiten. Dazu PBT zweimal mit 30% H₂O₂ verdünnen, jeweils im Verhältnis 1:100, um eine Endkonzentration von 0,003% (1:10000) zu erreichen.
Optional: Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, können folgende Komponenten einzeln oder in Kombination der Reaktionsmischung hinzugefügt werden:
 - 2% Dextransulfat (DS) wird verwendet, um die Viskosität der Reaktionsmischung zu erhöhen.
 - 500 µg/ml 4-Iodphenol wird verwendet, um die Peroxidase-Reaktion zu verstärken. Es ist praktischer, eine 1:200 Verdünnung der Stammlösung (100 mg/ml in Ethanol) zu verwenden.
7. Fügen Sie 1 bis 10 µg/ml [gekennzeichnetes Tyramid](#) zum Reaktionspuffer hinzu (die optimale Konzentration muss experimentell bestimmt werden). Mischen Sie durch Schütteln.
8. Inkubieren Sie die Probe mit dem Reaktionspuffer im Dunkeln bei Raumtemperatur für 5–30 Minuten (die genaue Zeit muss experimentell bestimmt werden; 15 Minuten können als Ausgangspunkt verwendet werden).
9. Beenden Sie die Reaktion, indem Sie die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln in einer Inhibitorlösung (1 mM Natriumazid in PBT) inkubieren.
10. Waschen Sie die Probe dreimal für je 10 Minuten mit PBS.
11. Um den Antikörper-TSA-Markierungszyklus zu wiederholen, behandeln Sie die Probe für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit einer sauren Glycinpufferlösung (0,1% Tween-20; 0,1 M Glycin, pH 2,0). Dieses Verfahren löst antigengebundene Antikörper ab, ohne das kovalent an Proteine gebundene Tyramid zu beeinträchtigen.
12. Montieren Sie die Probe unter einem Deckglas mit einem [Montagemedium](#).

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

Probleme und deren Behebung

PROBLEM	EMPFOHLENE MASSNAHMEN
Niedriges Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Optimieren Sie die Konzentration von Sonden/Antikörpern. • Titration des HRP-Konjugats zur Bestimmung der optimalen Konzentration für die Signalverstärkung. • Fügen Sie einen Schritt zur Gewebeporöserisierung hinzu, um das Eindringen der Reagenzien zu erleichtern. • Verlängern Sie die Inkubationszeit mit der Tyramid-Arbeitslösung. • Verwenden Sie Antigen-Retrieval-Techniken, um die Ziel-Epitopen freizulegen.
Übermäßiges Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Optimieren Sie die Konzentration von Sonden/Antikörpern. • Reduzieren Sie die Konzentration von HRP. • Verringern Sie die Konzentration der Tyramid-Arbeitslösung. • Verkürzen Sie die Inkubationszeit mit der Tyramid-Arbeitslösung.
Geringe Auflösung oder unscharfes Signal	<ul style="list-style-type: none"> • Verkürzen Sie die Inkubationszeit mit der Tyramid-Arbeitslösung. • Überprüfen Sie die Verdünnung des Stoppreagens.
Hoher Hintergrund	<ul style="list-style-type: none"> • Reduzieren Sie die Konzentration der Sonden/Primärantikörper. • Verwenden Sie eine niedrigere Konzentration des Sekundärantikörpers. • Verringern Sie die Konzentration des HRP-Konjugats. • Überprüfen Sie das Vorhandensein von endogenem Biotin (falls Streptavidin-Konjugate verwendet werden). • Überprüfen Sie die Spezifität der Antikörper. • Verkürzen Sie die Inkubationszeit mit der Tyramid-Arbeitslösung. • Verlängern Sie den Schritt zur Quenchung der endogenen Peroxidase. • Erhöhen Sie die Anzahl und/oder Dauer der Waschschrte. • Verwendetes Blockierungsreagenz ist nicht qualifiziert oder kontaminiert. • Filtern Sie Puffer.
Helle Punkte im Hintergrund	<ul style="list-style-type: none"> • Zentrifugieren Sie das Sekundärantikörperrohrchen vor der Verwendung.