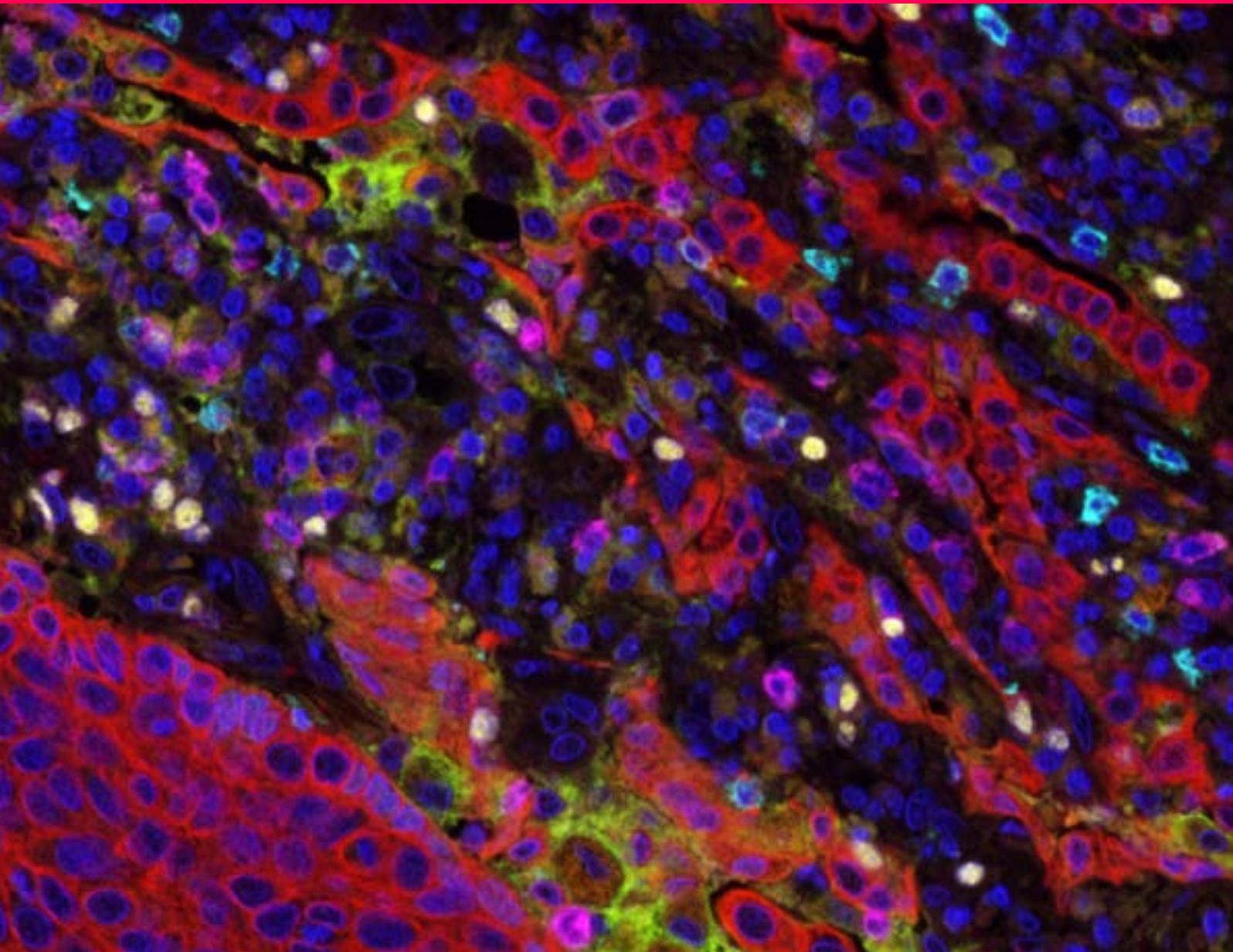


WELCOME TO QUANTITATIVE PATHOLOGY | Unlock the Power of Spatial Biology

Opal Multiplex 組織多重染色システム TSA & TSA Plus シグナル増感システム



Phenolmager Tissue Biomarker Detection Solutions



Opal™ (FFPE 組織切片の多重免疫染色)

Opal 多重免疫染色は、単一切片で最大 8 種類の抗体を用いた蛍光多重免疫染色が可能です。ホスト動物種の制約をなくし多重免疫染色に使用する抗体の選択肢を広げ、FFPE 組織標本を用いた疾患バイオマーカー解析の多重化を実現します。

Opal 染色の特長

● 同一種由来の一次抗体を繰り返し使用可能

標準的な多重染色アッセイでは、抗 IgG 二次抗体のクロストークを避けるため、一次抗体の由来種を標的抗原ごとに変える必要があります。Opal では、各標的抗原を染色後、一次抗体を乖離・洗浄し、次の標的抗原の染色反応を行うため、一次抗体の由来種は制限されません。

● 特殊な標識をした一次抗体は不要

HRP 標識二次抗体を用いた染色のため、従来の組織染色に使用していた抗体を、無加工で活用できます。

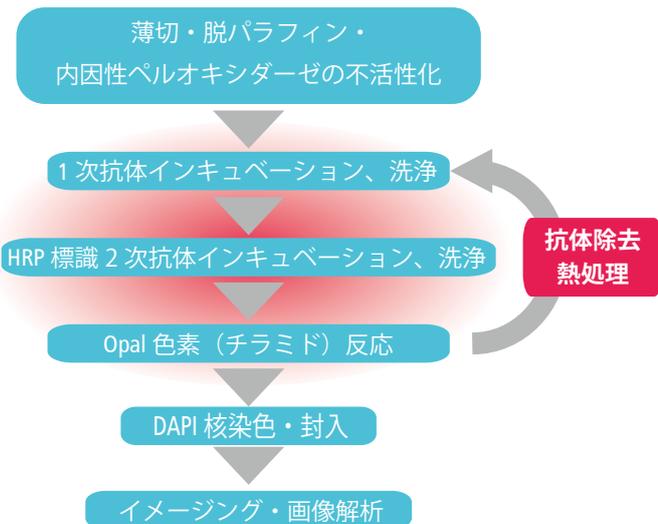
● FFPE 組織切片用のプロトコール

FFPE 組織切片で蛍光多重免疫染色を行うために開発され、キット化された手法です。

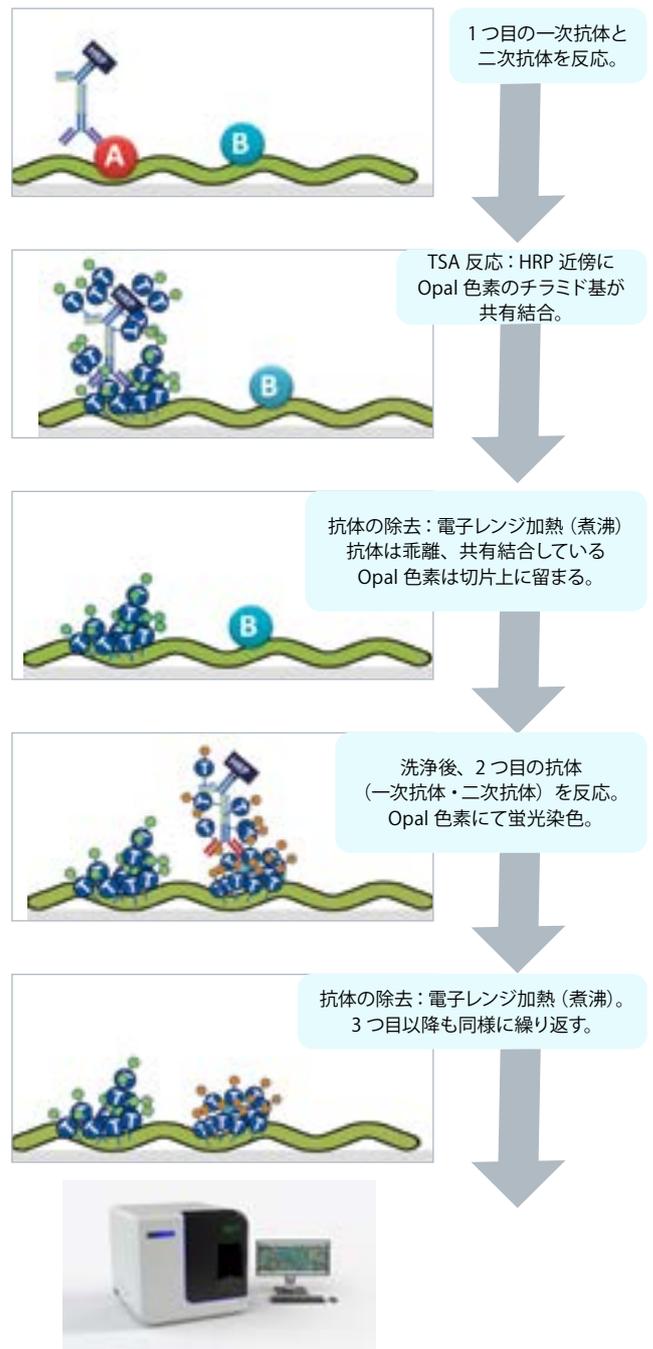
● TSA plus と同等のシグナル増幅

TSA plus の染色技術によってシグナルが増幅されるため、高感度に多重蛍光検出を行うことができます。従来難しかった、蛍光染色標本の長期保管も実現します。(冷蔵・遮光)

Opal 多重染色ワークフロー



アッセイステップ



Phenolmager HT (Vectra polaris) / Phenolmager Fusion / Vectra3 / Mantra

Reference
Toth, Z. E., & Mezey, E. (2007). Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(6), 545-554.

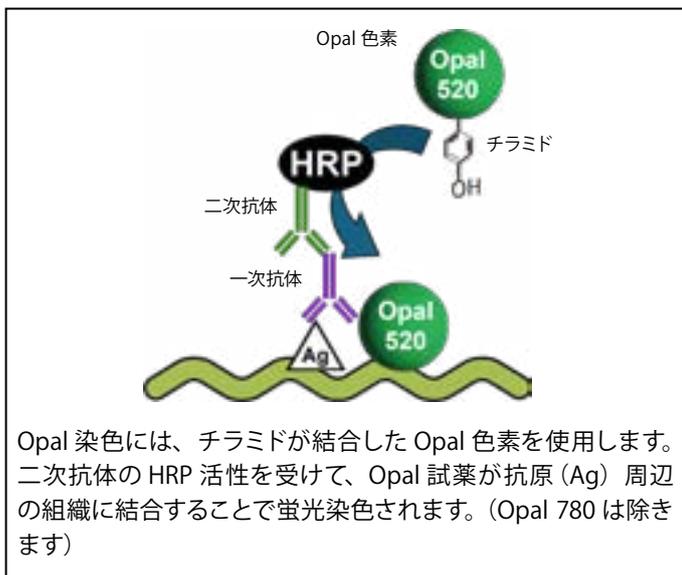
Opal 染色原理と Q&A

Opal 染色試薬は、幅広い波長バリエーションを有する Opal 蛍光色素に、チラミド基を結合した蛍光チラミド試薬です。二次抗体のペルオキシダーゼ活性の周辺でタンパク質に対して共有結合を形成し、組織上に固定されます。この反応は、TSA Plus の反応機序と同一です。

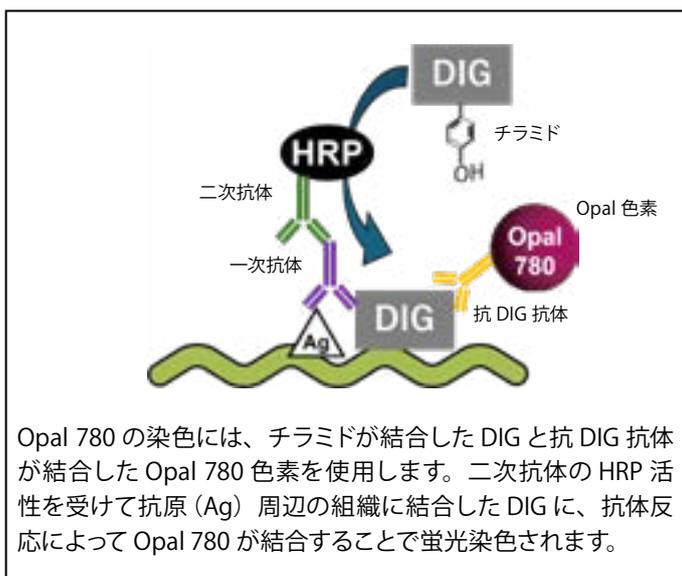


8種類の Opal 色素をラインナップし、短波長から近赤外域まで幅広い波長域をカバーします。

Opal 染色原理 (Opal 780 を除く)



Opal 染色原理 (Opal 780 の場合)



通常の蛍光顕微鏡で観察できますか？

可能です。Opal 3-plex の色素構成で染色した標本は、DAPI、FITC、Cyanine3、Cyanine5 のフィルターと対応する波長の励起光を有する顕微鏡で観察することができます。オールインワンタイプの蛍光顕微鏡、落射蛍光タイプの蛍光顕微鏡での観察が可能です。

Opal 6-plex の色素構成では、Akoya Biosciences 社のイメージングシステム Phenolmager が必要です。

共焦点顕微鏡で観察できますか？

可能です。Opal 染色した標本は強い蛍光を有します。そのため、間接蛍光抗体法で染色した組織ではすぐに退色してしまうシグナルも、継続的に繰り返し観察できる場合があります。

1キットで何回使えますか？

1回1スライド当たり～150 μl の反応溶液を使用した場合、約50枚のスライドの染色が可能です。

家庭用電子レンジを使えますか？

可能です。電子レンジは通常の抗原賦活化に使用されているものをご利用いただけます。

電子レンジ以外の抗体除去法はありますか？

圧力鍋、オートクレーブなど、通常の抗原賦活化に使用されている装置をご利用いただけます。

凍結切片に使用できますか？

抗体除去プロセスの加熱条件の検討が必要ですが、多重染色に使用することは可能です。過度な加熱により組織が損傷する場合があります。

マウス・ラビット以外の一次抗体は使えますか？

ご利用いただけます。Opal 染色は一次抗体の種類を選びません。各一次抗体に合わせた HRP 標識二次抗体をご用意ください。

抗体除去の熱処理にはどのような容器が使えますか？

蓋付き加熱可能な耐熱染色バットをご使用ください。

他社 HRP 標識抗体は使えますか？

可能です。DAB 免疫染色でワークしている抗体など、お手元の二次抗体もご利用いただけます。染色濃度条件はご確認ください。

ABC 法と組み合わせることはできますか？

可能です。Opal 試薬は ABC 法のストレプトアビジン-HRP でもご利用いただけます。



画像はイメージです。実際の商品梱包、色、内容量とは異なります。

Opal Manual Kit (用手法の多重免疫染色)

FFPE 組織切片等を使用した多重蛍光検出のための 組織染色キットです。免疫染色のほか、in situ ハイブリダイゼーションにも利用できます。

Opal Manual Kits (50 スライド分) ^{*1}	
製品名	品番
Opal 3-Plex Manual Detection Kit (Opal 4-Color Manual IHC Kit ^{*2})	NEL810001KT
Opal 6-Plex Manual Detection Kit (Opal 7-Color Manual IHC Kit ^{*2})	NEL811001KT

*1 1 スライドあたり～ 150 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 4-Color, 7-Color はそれぞれ、Opal 色素 3 種または 6 種及び DAPI の計 4 色または計 7 色を示します。

内容		
	Opal 4-Color	Opal 7-Color
Opal 色素	Opal 520, Opal 570, Opal 690	Opal 520, Opal 540, Opal 570, Opal 620, Opal 650, Opal 690
1x Plus Amplification Diluent	1×50 mL	2×50 mL
DMSO	1×500 μL	1×500 μL
Spectral DAPI solution	1×1.5 mL	1×1.5 mL
Opal polymer HRP Ms+Rb	1×50 mL	2×50 mL
Blocking/Ab Diluent	1×100 mL	1×100 mL
10X AR6 buffer	1×250mL	4×250 mL

Opal Automation Kit (自動化 多重免疫染色)

ライカ社製自動免疫染色装置 BOND RX に最適化されたキットです。

Opal Automation Kits (50 スライド分) ^{*1}	
製品名	品番
Opal 3-Plex Detection Kit (for use with an autostainer) (Opal 4-Color Automation IHC Kit ^{*2})	NEL820001KT
Opal 6-Plex Detection Kit (for use with an autostainer) (Opal 7-Color Automation IHC Kit ^{*2})	NEL821001KT

*1 1 スライドあたり～ 150 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 4-Color, 7-Color はそれぞれ、Opal 色素 3 種または 6 種及び DAPI の計 4 色または計 7 色を示します。

内容		
	Opal 4-Color	Opal 7-Color
Opal 色素	Opal 520, Opal 570, Opal 690	Opal 520, Opal 540, Opal 570, Opal 620, Opal 650, Opal 690
1x Plus Automation Amplification Diluent	1×50 mL	2×50 mL
DMSO	1×500 μL	1×500 μL
Spectral DAPI solution	1×1.5 mL	1×1.5 mL
Opal polymer HRP Ms+Rb	1×50 mL	2×50 mL
Blocking/Ab Diluent	1×100 mL	1×100 mL

Opal Polaris 7-color Kit (7 色ホールスライド用)

PhenolMager HT (Vectra Polaris) / Fusion を用いて Opal 色素 6 種 + DAPI の計 7 色のホールスライド撮影を行うための Opal 染色試薬キットです。オプションフィルターを搭載した Mantra / Mantra2 にも使用可能です。Vectra3 では使用できません。

Opal Anti-Rabbit Kits (50 スライド分) ^{*1}	
製品名	品番
Opal 6-Plex Manual Detection Kit - for Whole Slide Imaging (Opal Polaris 7-Color Manual IHC Detection Kit)	NEL861001KT
Opal 6-Plex Detection Kit - for Whole Slide Imaging (for use with an autostainer) (Opal Polaris 7-Color Automation IHC Detection Kit ^{*2})	NEL871001KT

*1 1 スライドあたり～ 150 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 Automation Kit はライカ社製自動免疫染色装置 BOND RX に最適化されたキットです。

内容	
Opal 色素	Opal Polaris 480, Opal 520, Opal 570, Opal 620, Opal 690, Opal Polaris 780
1x Plus Amplification Diluent または 1x Plus Automation Amplification Diluent	2×50 mL
DMSO	1×500 μL
Spectral DAPI solution	1×1.5 mL
Opal polymer HRP Ms+Rb	2×50 mL
Blocking/Ab Diluent	1×100 mL
10X AR6 buffer *	4×250mL

* Automation IHC Kit (NEL871001KT) には含まれません。

Opal Anti-Rabbit Kit (マウス組織 多重免疫染色)

マウス組織においてウサギ由来一次抗体を用いて Opal 色素 3 種 + DAPI の計 4 色の Opal 染色をするためのキットです。本キット付属の二次抗体はマウス一次抗体には交差しません。

Opal Anti-Rabbit Kits (50 スライド分) ^{*1}	
製品名	品番
Opal 3-Plex anti-Rabbit Manual Kit (Opal 4-Color Anti-Rabbit Manual IHC Kit)	NEL840001KT
Opal 3-Plex Anti-Rb Detection Kit (for use with an autostainer) (Opal 4-Color Anti-Rabbit Automation IHC Kit ^{*2})	NEL830001KT

*1 1 スライドあたり～ 150 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 Automation Kit はライカ社製自動免疫染色装置 BOND RX に最適化されたキットです。

内容	
Opal 色素	Opal 520, Opal 570, Opal 690
1x Plus Amplification Diluent または 1x Plus Automation Amplification Diluent	1×50 mL
DMSO	1×500 μL
Spectral DAPI solution	1×1.5 mL
Opal Polymer anti-Rabbit HRP	1×10 mL
Opal Polymer anti-Rabbit Diluent	1×40 mL
Blocking/Ab Diluent	1×100 mL
10X AR6 buffer *	1×250mL

* Automation IHC Kit (NEL830001KT) には含まれません。

Opal 色素試薬

Opal 各種キットのための補充用色素試薬パックです。

Opal 色素試薬パック*	
製品名	品番
Opal 480 Reagent Pack (Opal Polaris 480 Reagent Pack)	FP1500001KT
Opal 520 Reagent Pack	FP1487001KT
Opal 540 Reagent Pack	FP1494001KT
Opal 570 Reagent Pack	FP1488001KT
Opal 620 Reagent Pack	FP1495001KT
Opal 650 Reagent Pack	FP1496001KT
Opal 690 Reagent Pack	FP1497001KT

* Opal 色素試薬の使用には別途 1x Plus Amplification Diluent (FP1135 または FP1498) が必要です。

内容	
各種 Opal 色素	75 μ L DMSO 溶液相当
DMSO	100 μ L

保存：溶解後 4°C (遮光下)

Opal 780 色素試薬

Opal 780 の補充用色素試薬パックです。Opal 780 と Opal TSA DIG 試薬の試薬パックと Opal TSA DIG 試薬のみの試薬パックを選択できます。

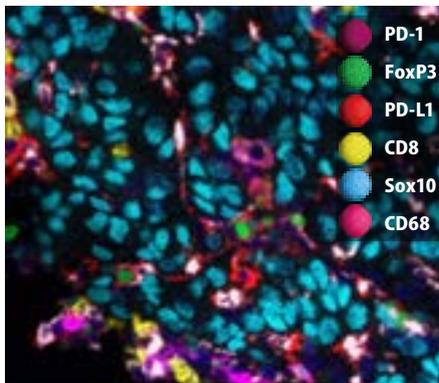
Opal Polaris 780 色素試薬パック	
製品名	品番
Opal 780 Reagent Pack (Opal Polaris 780 Reagent Pack)	FP1501001KT
Opal TSA DIG Reagent Pack	FP1502001KT

内容	
Opal TSA-DIG	75 μ L DMSO 溶液相当
Anti - DIG - Opal 780 - conjugate*	300 μ L 水溶液相当
DMSO	100 μ L

* Opal TSA DIG (FP1502001KT) には含まれません。

保存：溶解後 4°C (遮光下)

染色例 (メラノーマ組織の Opal 7-color 多重免疫染色)



FFPE 組織切片を PD-1, FoxP3, PD-L1, CD8, Sox10, CD68, DAPI (青) にて染色しました。各抗体をインセット内の疑似カラーで表示しています。Courtesy from Paul Tume, MD Assistant Professor in the Department of Medicine, UCLA

Opal 蛍光色素 吸収 / 蛍光波長とキットの構成

色素名	吸収波長	蛍光波長	3-Plex (4-color)	6-Plex (7-color)	6-Plex Whole slide (Polaris 7-color)	近似蛍光色素
DAPI	368 nm	461 nm	●	●	●	
Opal 480	450 nm	500 nm		●	●	
Opal 520	494 nm	525 nm	●	●	●	FITC, Fluorescein
Opal 540	523 nm	536 nm		●		
Opal 570	550 nm	570 nm	●	●	●	Cyanine 3, Alexa Fluor 555, TMR, TRITC
Opal 620	588 nm	616 nm		●	●	Texas Red
Opal 650	627 nm	650 nm		●		Alexa Fluor 647
Opal 690	676 nm	694 nm	●	●	●	Cyanine 5.5
Opal 780	750 nm	788 nm			●	Alexa Fluor 780, Cyanine 7

HRP 標識二次抗体 Ready-to-use タイプ

マウス・ラビット一次抗体用 HRP ポリマーコンジュゲート二次抗体です。希釈済み Ready-To-Use のヒト組織染色向け試薬です。

Opal Polymer HRP Ms + Rb		
製品名	品番	数量
Opal polymer HRP Ms+Rb, 50ML	ARH1001EA	50 mL

保存：溶解後 4°C (遮光下)

HRP 標識二次抗体 濃縮タイプ (New)

二次抗体の染色条件調整のために、濃縮タイプのマウス・ラビット一次抗体用 HRP ポリマーコンジュゲート二次抗体と希釈溶液をセットにしたキットです。

Opal Anti-Ms + Rb HRP Kit	
製品名	品番
Opal Anti-Ms + Rb HRP Kit	ARH3001KT

内容	
Opal Anti-Ms + Rb HRP	1×15 mL
Opal Anti-Ms + Rb HRP Diluent	1×40 mL

保存：溶解後 4°C (遮光下)

マウス組織染色向け HRP 標識二次抗体

ラビット一次抗体を用いたマウス組織染色用 HRP ポリマーコンジュゲート二次抗体です。付属の希釈溶液で希釈して使用します。

Opal Polymer HRP Ms + Rb	
製品名	品番
Opal Polymer anti-Rabbit HRP Secondary Antibody Kit	ARR1001KT

内容	
Opal Polymer anti-Rabbit HRP	1×10 mL
Opal Polymer anti-Rabbit Diluent	1×40 mL

保存：溶解後 4°C (遮光下)

Opal 染色関連製品

製品名	品番	数量
1x Plus Amplification Diluent (15 ML)	FP1135	15 mL
1x Plus Amplification Diluent (50 ML)	FP1498	50 mL
1X Plus Automation Amplification Diluent (50 ML)	FP1609	50 mL
Antibody Diluent / Block, 1X, 100 mL	ARD1001EA	100 mL
Spectral DAPI	FP1490	1.5 mL
AR6 BUFFER, 10X, 250 ML	AR600250ML	250 mL
AR6 BUFFER, 10X, 4 X 250 ML	AR6001KT	4 × 250 mL
AR9 BUFFER, 10X, 250 ML	AR900250ML	250 mL
AR9 BUFFER, 10X, 4 X 250 ML	AR9001KT	4 × 250 mL

保存：4°C



TSA & TSA Plus テクノロジー

TSA (Tyramide Signal Amplification) は、Akoya Biosciences 社が特許を有するシグナル増幅法です。免疫組織染色 (Immunohistochemistry, IHC) や in situ Hybridization (ISH) における発色・蛍光シグナルを、簡便かつ短時間の反応で特異的に増幅するため、検出感度が劇的に向上します。

■ 特長

● 高感度・高解像度

免疫組織染色や in situ ハイブリダイゼーションにおいて、高感度化を実現します。数千倍の増感も可能です。また、局所的な増感を行うため、解像度の低下はほとんど起こりません。

● シンプルなプロトコール

既存の検出プロトコールを大きく変える必要はありません。反応時間も 10 分程度のインキュベーションで、劇的に感度が向上します。

● 多重染色も可能

極めて強い増感作用のため、蛍光色素の退色などの影響を気にすることなく、簡単に多重染色を行うことができます。

● 低コスト

一次抗体やプローブの使用量を減らしても、従来と同等のシグナルが検出できます。

● 露光時間の短縮

ハイコンテンツスクリーニングのスキャン速度が向上します。特に共焦点システムでは顕著です。

■ TSA Plus システム

オリジナルの TSA 試薬の反応組成の改変により、高感度化を実現しました。TSA に比べ十から百倍の増感も可能です。従来通りのシンプルな試薬構成により、高い利便性を維持しています。

● TSA Plus 蛍光チラミドシステム

汎用性の高い蛍光色素標識したチラミドにより染色する蛍光染色システムです。Fluorescein、TMR、各種 Cyanine の試薬キットをラインナップ。使用する顕微鏡の構成に応じて試薬を選択できます。

● TSA Plus ビオチン / DIG チラミドシステム

ビオチン・ジゴキシゲニン (DIG) 標識したチラミドを抗原・抗体周辺に集積・共有結合させます。明視野の免疫染色、DIG 標識プローブを用いた ISH などで広く利用されます。

● TSA DNP (HRP) チラミドシステム

生体内に存在しないジトロフェニル (DNP) 標識したチラミドを抗原・抗体周辺に集積・共有結合させます。集積した DNP は抗 DNP-HRP 標識抗体により酵素抗体法、もしくはさらに蛍光チラミドを反応することで再増感し検出することが可能です。低バックグラウンドで高い増感効率を示します。

■ TSA システム

Bobrow ら (1989) により報告された、標識チラミドを基質とした酵素抗体法に基づくシグナル増感試薬です。一般的な HRP-DAB、ABC 法にくらべ、より多くの HRP 活性や蛍光色素を抗原局在部位に集積することが可能です。発色、蛍光法いずれでも多くの実績を持つシグナル増感技術です。

● TSA ビオチンシステム

抗原・抗体周辺にビオチンを集積・共有結合させます。結合したビオチンはストレプトアビジン-HRP 法による発色検出により可視化されます。

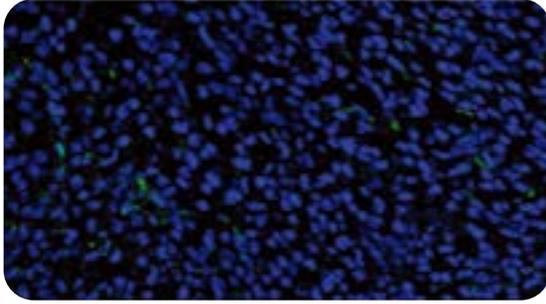
● TSA 蛍光チラミドシステム

汎用性の高い蛍光色素標識したチラミドを抗原・抗体周辺に集積し、蛍光検出するための染色システムです。Fluorescein、TMR、Cyanine の他、クマリン標識も可能なため、UV 励起での蛍光検出と間接蛍光抗体法と併せて多重染色・検出することも可能です。

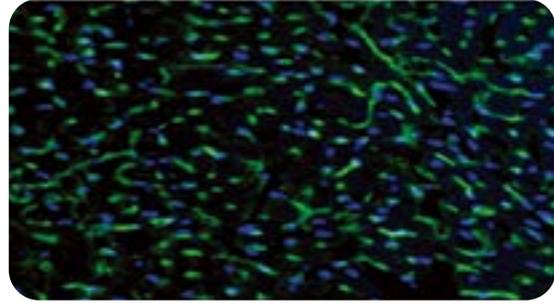
Reference

Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J., & Litt, G. J. (1989). Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification application to immunoassays. *Journal of immunological methods*, 125(1-2), 279-285.

マウス胎仔心臓における CD-31 (PECAM-1) の検出 (FITC・DAPI による二重染色)

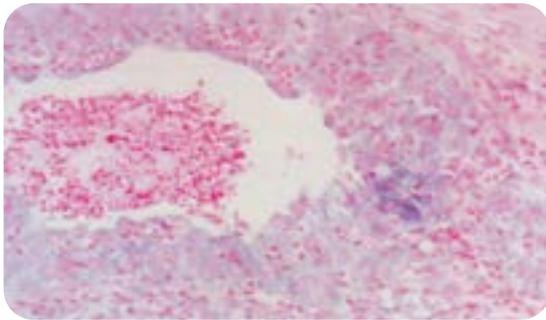


標準的な蛍光染色 (蛍光標識二次抗体を使用)

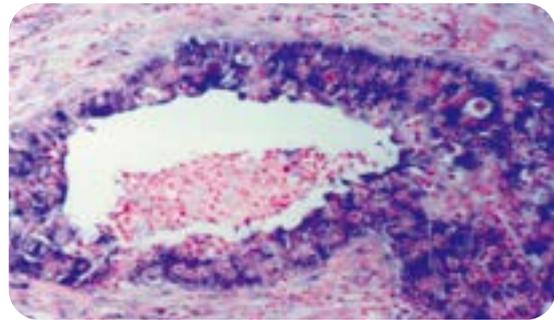


TSA 増幅後 (fluorescein)

ミンク肺 (パラフィン包埋切片) における p53 mRNA の検出 (ISH・DIG プローブ使用・AP / BCIP-NBT 法)



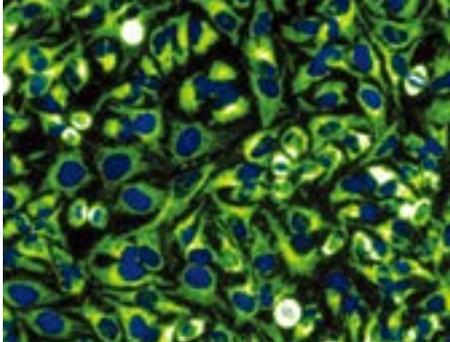
標準的な染色 (60 分発色)



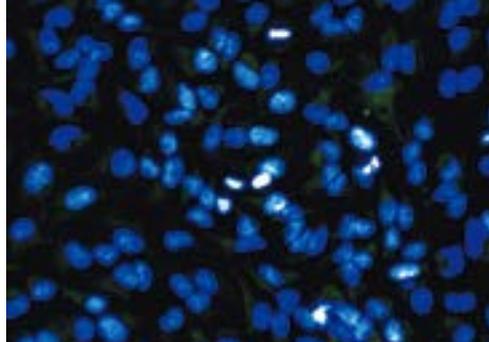
TSA Plus DNP 使用後 (15 分発色)

HeLa 細胞チトクローム C 免疫染色

TSA Plus Fluorescein (Green) , DAPI (Blue)



Alexa Fluor® 488 (Green) , DAPI (Blue)



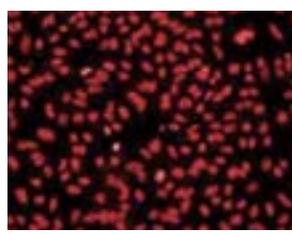
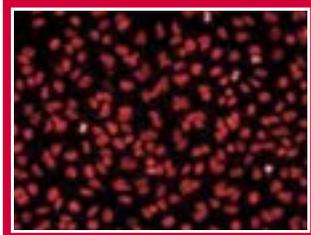
- Cells : HeLa 細胞を CellCarrier-384 plate で一晩培養し、固定
- 一次抗体
0.5 µg/mL 抗 Cytochrome C
- 二次抗体
ImagAmp ; 1 µg/mL HRP
抗マウス IgG (goat)
Alexa Fluor ; 5 µg/mL Alexa Fluor®
488 抗マウス IgG (goat)
- 露光時間 35 msec

DNA 損傷のモニタリング (リン酸化 Histone H2AX) : 一次抗体の節約と露光時間の短縮

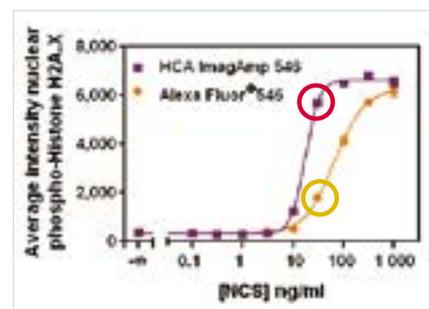
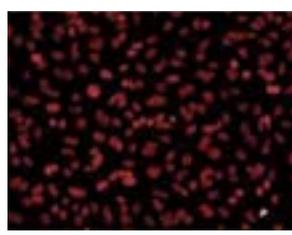
30 ng/mL NCS

100 ng/mL NCS

ImagAmp 546 ;
0.05 µg/mL
anti-phospho-
Histone H2A.X,
50 ms exposure



Alexa Fluor® 546 ;
2 µg/mL
anti-phospho-
Histone H2A.X,
450 ms exposure



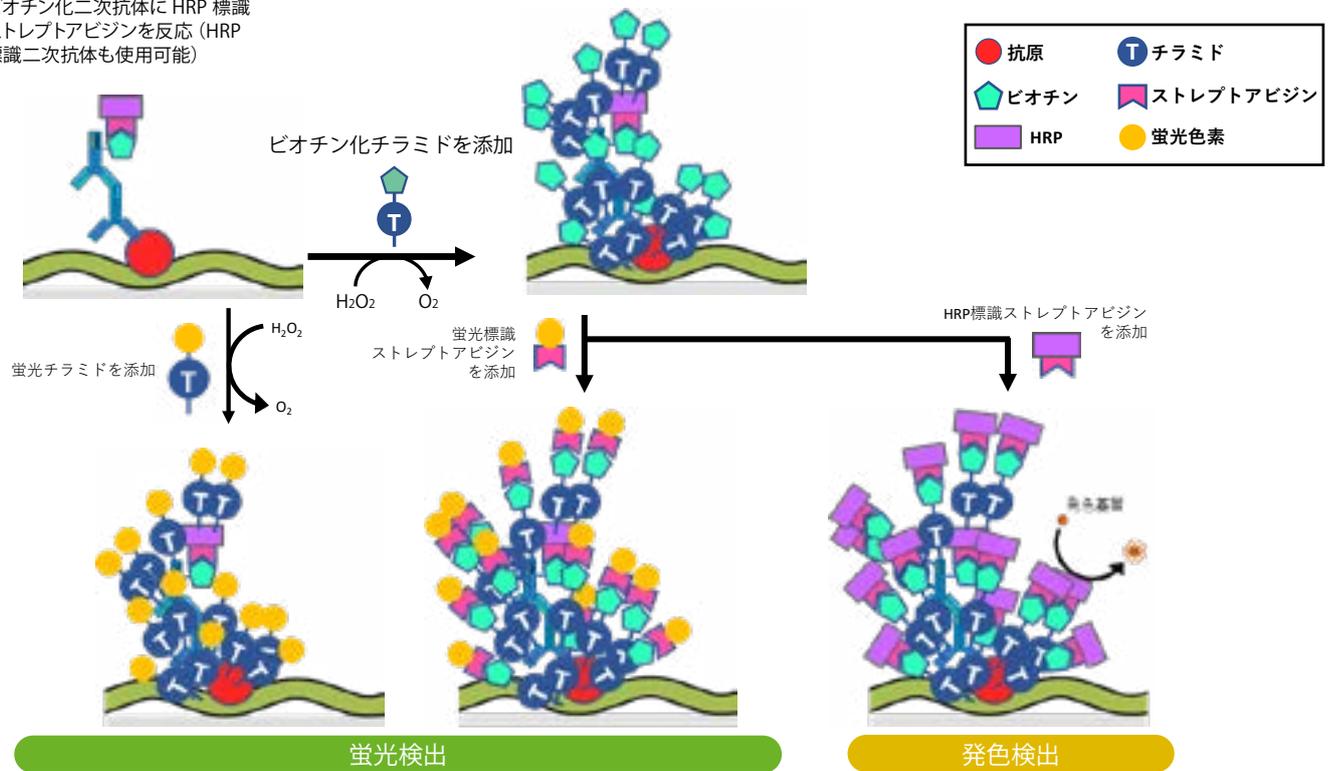
- Cells ; HeLa 細胞を NCS で 1 時間処理し、固定
- 一次抗体
anti-phospho-HistoneA2A.X
- 二次抗体
ImagAmp ; 1 µg/mL HRP 抗マウス IgG (goat)
Alexa Fluor ; 5 µg/mL Alexa Fluor® 488 抗マウス
IgG (goat)

原理

免疫組織染色や in situ ハイブリダイゼーションにおいて、一次抗体を反応させた後に、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識の抗体などを用い、標識チラミドを作用させます。過酸化水素存在下 HRP によりチラミドはラジカル化され、標識の近傍に存在するアミノ酸 (Tyr や Trp) の芳香環と共有結合を形成することで標識が集積します。その後、発色あるいは蛍光でシグナルを検出します。TSA Plus はチラミドに HRP エンハンサーが加えられているため、より多くのチラミドが沈着します。

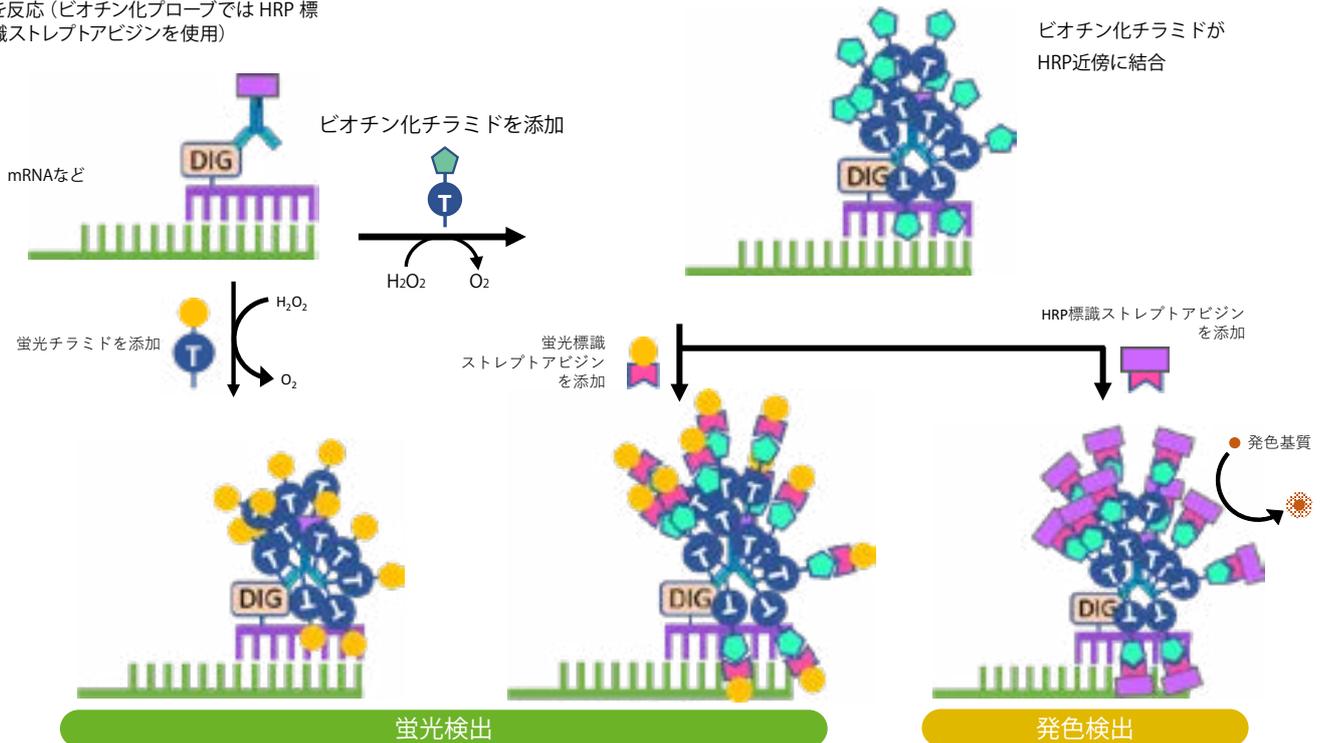
免疫組織染色

ビオチン化二次抗体に HRP 標識ストレプトアビジンを反応 (HRP 標識二次抗体も使用可能)



in situ ハイブリダイゼーション

DIG 標識プローブに HRP 標識抗 DIG 抗体を反応 (ビオチン化プローブでは HRP 標識ストレプトアビジンを使用)



TSA Plus ビオチン / DIG チラミドシステム

製品名	品番	数量 ¹
TSA Plus Biotin kit	NEL749A001KT	for 50 - 150 slides
TSA Plus DIG kit	NEL748001KT	for 50 - 150 slides
内容		
for slides		50 - 150 ¹
ビオチン化チラミドまたは DIG チラミド (Amplification Reagent)		2×150 μL ²
1x Plus Amplification Diluent		15 mL

*1 1 スライドあたり 100 ~ 300 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 DMSO 溶解時 (別途必要)

Blocking reagent (FP1012) は別途ご購入ください。

保存: 4°C (遮光)

TSA DNP (HRP) チラミドシステム

内在性ビオチンを多く含む組織 (肝臓、腎臓、消化管など) では、ビオチン・ストレプトアビジン系を用いずに検出することでバックグラウンドを回避することができます。ビオチンに変わるハプテンとしてジニトロフェノール (DNP) 化チラミドを用いた酵素発色系のシステムです。

製品名	品番	数量
TSA Plus DNP (HRP) System	NEL747A001KT ※	for 50 - 150 slides ¹
anti-DNP HRP (Anti-DNP antibody (rat monoclonal) -HRP)	TS-000400 (FP1129 同等品)	150 μL
内容		
for slides		50 - 150 ¹
DNP チラミド (Amplification Reagent)		300 μL ²
1x Plus Amplification Diluent		15 mL
Anti-DNP antibody (rat monoclonal) -HRP		150 μL
Blocking reagent		3 g

*1 1 スライドあたり 100 ~ 300 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 DMSO 溶解時 (別途必要)

保存: 4°C (遮光)

TSA Plus 蛍光チラミドシステム

製品名	品番	数量 ¹
TSA Plus Fluorescein System	NEL741001KT	for 50 - 150 slides
TSA Plus Tetramethylrhodamine (TMR) System	NEL742001KT	for 50 - 150 slides
TSA Plus Cyanine 3 System	NEL744001KT	for 50 - 150 slides
TSA Plus Cyanine 5 System	NEL745001KT	for 50 - 150 slides
TSA Plus Cyanine 3.5	NEL763001KT	for 50 - 150 slides
TSA Plus Cyanine 5.5	NEL766001KT ※	for 50 - 150 slides
内容		
for slides		50 - 150 ¹
蛍光チラミド (Amplification Reagent)		2×150 μL ²
1x Plus Amplification Diluent		15 mL

*1 1 スライドあたり 100 ~ 300 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 DMSO 溶解時 (別途必要)

Blocking reagent (FP1012) は別途ご購入ください。

保存: 4°C (遮光)

TSA ビオチン / 蛍光チラミドシステム

製品名	品番	数量
TSA Biotin System	NEL700A001KT	for 50 - 150 slides
TSA Fluorescein System	NEL701A001KT	for 50 - 150 slides
TSA TMR System	NEL702001KT	for 100 - 300 slides
TSA Coumarin System	NEL703001KT ※	for 100 - 300 slides
TSA Cyanine 3 System	NEL704A001KT	for 50 - 150 slides
TSA Cyanine 5 System	NEL705A001KT	for 50 - 150 slides

内容		
for slides	50 - 150 ¹	100 - 300 ¹
ビオチン化チラミド または 蛍光標識チラミド	300 μL ²	600 μL ²
1x Amplification Diluent	15 mL	30 mL
Streptavidin-HRP	150 μL	2×150 μL
Blocking reagent	3 g	10 g

*1 1 スライドあたり 100 ~ 300 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 H₂O もしくは DMSO 溶解時 (別途必要)

保存: 4°C (遮光)

TSA チラミドパック (チラミド単品)

チラミドにエンハンサーが含まれないため、TSA Plus system にはご使用頂けません。

製品名	品番	数量
TSA Biotin Reagent Pack	SAT700001EA	for 200 - 600 slides
TSA Fluorescein Reagent Pack	SAT701001EA	for 100 - 300 slides
TSA TMR Reagent Pack	SAT702001EA	for 100 - 300 slides
TSA Cyanine 3 Reagent Pack	SAT704A001EA	for 50 - 150 slides
TSA Cyanine 5 Reagent Pack	SAT705A001EA	for 50 - 150 slides

内容			
for slides	50 - 150 ¹	100 - 300 ¹	200 - 600 ¹
ビオチン化チラミド または 蛍光チラミド	300 μL ²	600 μL ²	1.2 mL ²
1x Amplification Diluent	15 mL	30 mL	60 mL

*1 1 スライドあたり 100 ~ 300 μL の反応溶液を使用した場合の処理可能枚数です。

*2 H₂O もしくは DMSO 溶解時 (別途必要)

保存: 4°C (遮光)

標識ストレプトアビジン

製品名	品番	数量
Streptavidin-HRP Conjugate	NEL750001EA ※	250 μL
SA-HRP	TS-000300 ※	0.15 mL
(Streptavidin-HRP Conjugate)	TS-000301	1.2 mL

保存: 4°C (遮光)

ブロッキング剤 / バッファー

製品名	品番	数量
TSA Blocking reagent (3 GM)	FP1020 ※	3 g
TSA Blocking reagent (10 GM)	FP1012	10 g
1x Plus Amplification Diluent (15 ML) (AMPLIFICATION DIL.)	FP1135	15 mL
1x Plus Amplification Diluent (50 ML) (AMPLIFICATION DIL.)	FP1498	50 mL
1x Amplification Diluent (15 ML)	FP1050 ※	15 mL
1x Amplification Diluent (60 ML)	FP1052 ※	60 mL
AR6 BUFFER, 10X, 125 ML	AR600125ML ※	125 mL
AR6 BUFFER, 10X, 250 ML	AR600250ML	250 mL
AR6 BUFFER, 10X, 4 X 250 ML	AR6001KT	4 × 250 mL
AR9 BUFFER, 10X, 250 ML	AR900250ML	250 mL
AR9 BUFFER, 10X, 4 X 250 ML	AR9001KT	4 × 250 mL

1x Amplification Diluent と 1x Plus Amplification Diluent は組成が異なり、相互に互換性はありません。それぞれ TSA あるいは TSA Plus と共に使用してください。

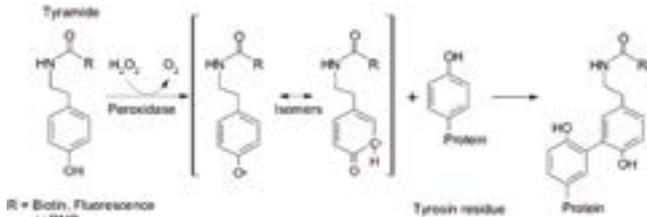
保存: 4°C

※販売終了製品となります。

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。H₂O₂ 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？

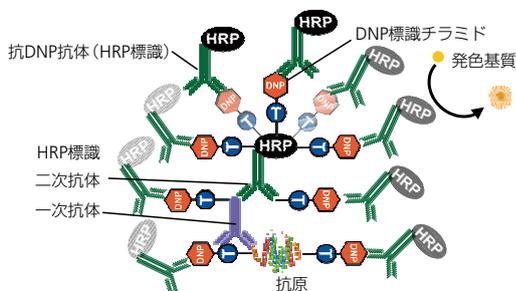
TSA Plus は、高感度な TSA よりもさらに高感度です。チラミドに HRP のエンハンサーを加え、バッファー (Amplification Diluent) の組成を変えることによって、HRP が失活するまでの時間が延長され、TSA よりも多くのチラミドが組織に沈着します。TSA Plus は、キットに Blocking Reagent、HRP 標識ストレプトアビジンが含まれませんので、別途ご購入ください。

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 製品ウェブページの実験プロトコール (<https://kiko-tech.co.jp/products/akoya-bio-tsa/>) 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 製品ウェブページの実験プロトコル注釈 (<https://kiko-tech.co.jp/products/akoya-bio-tsa/>) 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、シークエ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 (p2) 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。

Opal 蛍光色素 吸収 / 蛍光波長

色素名	吸収波長	蛍光波長
DAPI	368 nm	461 nm
Opal 480	450 nm	500 nm
Opal 520	494 nm	525 nm
Opal 540	523 nm	536 nm
Opal 570	550 nm	570 nm
Opal 620	588 nm	616 nm
Opal 650	627 nm	650 nm
Opal 690	676 nm	694 nm
Opal 780	750 nm	788 nm

TSA Plus & TSA 蛍光色素 吸収 / 蛍光波長

色素名	吸収波長	蛍光波長
Fluorescein	494 nm	517 nm
TMR	550 nm	570 nm
Coumarin	402 nm	443 nm
Cyanine 3	550 nm	570 nm
Cyanine 3.5	581 nm	596 nm
Cyanine 5	648 nm	667 nm
Cyanine 5.5	673 nm	692 nm

輸入販売元



本 社 大阪府箕面市船場西三丁目10番3号
〒562-0036 TEL 072(730)6790 FAX 072(730)6795
東 京 支 社 神奈川県川崎市中原区新丸子東三丁目1200番地 KDX武蔵小杉ビル
〒211-0004 TEL 044(430)3245 FAX 044(433)4390

<https://www.kiko-tech.co.jp/>



- ・ 掲載内容は 2025 年 3 月現在のものです。
- ・ 掲載内容は予告なしに変更する場合がありますので予めご了承ください。
- ・ 掲載製品は試験研究目的のみにご使用いただけます。