

组织透明化研究专题

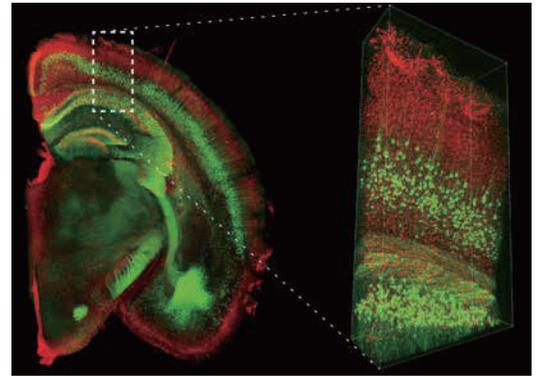
SCALEVIEW-S	2
SCALEVIEW-A2	3
SeeDB	4
SeeDB2	6
CUBIC	7
CLARITY	8
ClearSee™	9
Super Clear Mount	10

支持荧光蛋白、荧光抗体、荧光染料标记的厚标本 SCALEVIEW-S

Sca/e S 是Dr. Atsushi Miyawaki等人研发的一种基于山梨醇的光学透明化方法。

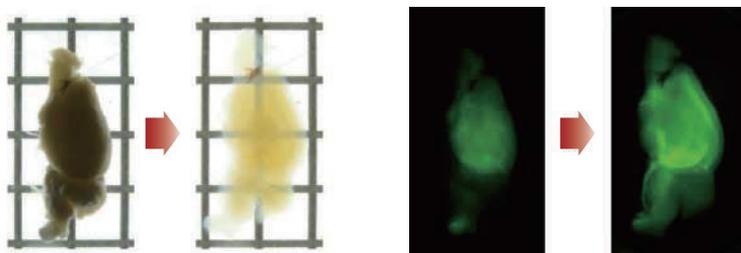
SCALEVIEW-S不仅能有效地对组织样本进行透明化,还能很好地保存组织结构与荧光信号。在电子显微镜水平上的多尺度、连续的可视化过程中,SCALEVIEW-S能让许多蛋白在光学显微镜水平上和和脑组织学上得到高度保存,这点备受关注。

SCALEVIEW-S是对生物组织进行准确可视化的一种简单且可重复的方法。



图像数据由:Hiroshi Hama, Atsushi Miyawaki 细胞功能动力学实验室RIKEN脑科学研究所, Tetsushi Hoshida生物技术光学研究所 RIKEN高级光子学中心团队土工提供,与奥林巴斯公司合作。

成像效果



SCALEVIEW-S 处理

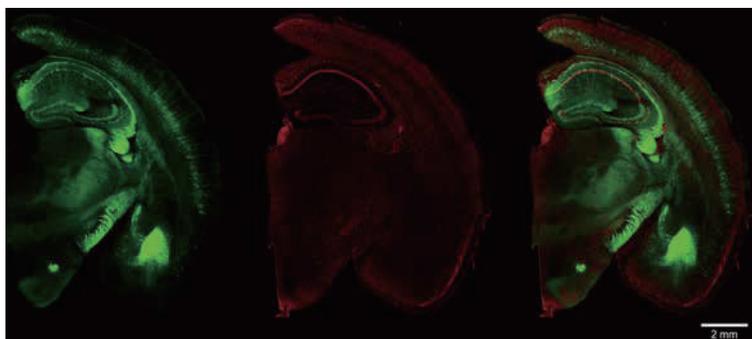
SCALEVIEW-S 处理后的成像图

左:SCALEVIEW-S 处理前的小鼠大脑
右:SCALEVIEW-S 处理后的小鼠大脑

YFP

PI

Merge



小鼠: Thy1-YFP-H line, 42W, ♂
脑部大小: Coronal Slice (t:2 mm)
显微镜 (CLSM): Olympus FV3000 (倒置)
物镜: 10×/N10.40 (UPLSAPO10×)
激光: 488 nm (YFP), 561 nm (PI)
成像深度: 距离表面0-450 μm

步骤

固定

- 1) 用4%多聚甲醛 (PFA) /PBS (pH7.5~8.0) 对经麻醉的小鼠进行心脏灌注;
- 2) 取出全脑并将其置于4%PFA/PBS中,在4°C下固定8~72 h;
- 3) 用PBS溶液洗涤样本;
- 4) 用振动切片机制备切片样本 (可根据实际情况选做,0.2-3 mm厚)。

透明化 (对于1~2 mm的样本)

- 5) 将样品转移到5 mL SCALEVIEW-S0溶液中,并在35-40°C下温和摇动 (70-90 rpm), 孵育12-24 h;
- 6) 将样品转移到5 mL SCALEVIEW-S1溶液中,在35-40°C温和摇动 (70-90 rpm), 孵育12-24 h;
- 7) 将样品转移到5 mL SCALEVIEW-S2溶液中,在35-40°C温和摇动 (70-90 rpm), 孵育12-24 h;
- 8) 将样品转移到5 mL SCALEVIEW-S3溶液中,在35-40°C温和摇动 (70-90 rpm), 孵育12-24 h;
- 9) 将样品转移到5 mL deSca/e溶液中,在4°C温和摇动 (40-50 rpm), 孵育3 h。重复本步骤三次;
- 10) 将样品转移到5 mL SCALEVIEW-S4溶液中,在35-40°C的温度下温和摇动 (40-50 rpm), 孵育24-72 h;
- 11) 本阶段可以通过肉眼来判断样本的透明度。如果样本成功透明化,小鼠大脑样本在光源下会呈现出琥珀色;
- 12) 将样品转移到5 mL SCALEVIEW-SMt solution中,在35-40°C下温和摇动 (40-50 rpm), 孵育24-72 h。

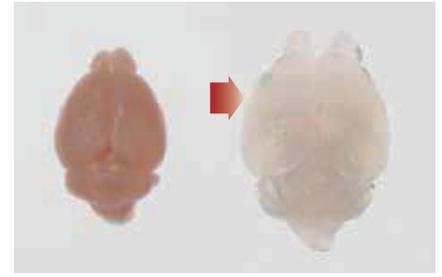
本品提供小包装 (产品编号:299-79901) !

SCALEVIEW-A2

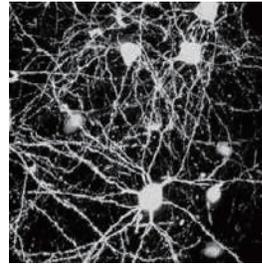
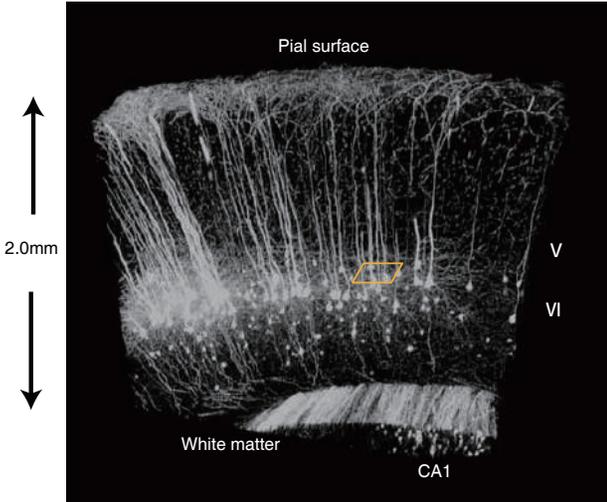
Sca/e为水基光学透明化试剂,它可以对已固定的生物样品进行透明化而不会使荧光蛋白淬灭。使用SCALEVIEW-A2溶液,可以将身体组织进行透明化,得到清晰的图像。可单独使用或与SCALEVIEW-S配合使用。

对于福尔马林固定的样本,SCALEVIEW-A2不破坏其光吸收和荧光,同时可减少光散射的水溶性溶液。仅需将生物体组织浸泡于SCALEVIEW-A2中,即可实现透明化,操作简便。

SCALEVIEW方法与多光子显微镜完美结合,能以前所未有的深度来对形态完整的组织在三维结构上进行可视化。



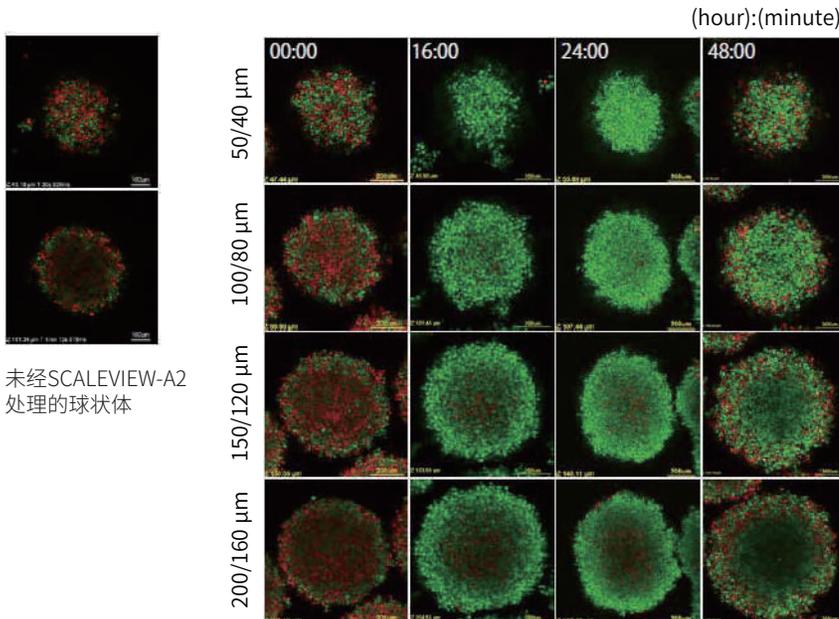
经SCALEVIEW-A2处理后的小鼠脑部
左:未经SCALEVIEW-A2处理的小鼠脑部
右:SCALEVIEW-A2处理后的小鼠脑部



在SCALEVIEW-A2处理后的Thy1-YFP (H Line) 小鼠的脑部成像
(使用多光子显微镜以及多光子显微镜专用物镜:OLYMPUS, 型号:XLPLN10XSVMF. 比例尺,50μm)

步骤

- 1) 用4%多聚甲醛(PFA)/PBS (pH7.5~8.0)对经麻醉的小鼠进行心脏灌注;
- 2) 取出全脑,用4% PFA/PBS在4°C下固定10 h,并在4°C下用20%蔗糖/PBS冷冻保护24 h;
- 3) 用OCT冷冻包埋剂将样本包埋,并用液氮冷冻;
- 4) 用PBS溶液解冻并冲洗样本,并在室温下用4% PFA/PBS再次固定20 min;
- 5) 通过将样本在室温下置于SCALEVIEW-A2溶液中孵育;成年小鼠大脑需要使用超过30 mL的SCALEVIEW-A2溶液。
- 6) 采用合适的浸液物镜对透明化处理后的脑部进行深度成像。以SCALEVIEW-A2溶液作为浸镜介质。如有必要,用琼脂糖将样品固定在成像容器的底部。
- 7) 透明化处理后的大脑可以在4°C下,浸泡在SCALEVIEW-A2溶液中长期保存。



未经SCALEVIEW-A2处理的球状体

经SCALEVIEW-A2处理后的球状体,在照射后的荧光分布。球状体经Sca/e处理一定时间后,在10-Gy照射下,得到成像深度为50、100、150和200 μm的荧光成像。每个球状体都使用SCALEVIEW-A2处理和固定一定的时间。比例尺,100 μm。

参考文献

- [1] Hama, H. *et al.* : *Nature Neuroscience.*, **14**, 1481 (2011).
 [2] Hama, H. *et al.* : *Nature Neuroscience.*, **18**, 1518 (2015).
 [3] Kaida A, Miura M. : *Biochem Biophys Res Commun.*, **439**, 453 (2013).

产品编号	产品名称	包装	保存条件
196-18521	SCALEVIEW-S0	250 mL	2 -10°C
193-18531	SCALEVIEW-S1	250 mL	2 -10°C
190-18541	SCALEVIEW-S2	250 mL	2 -10°C
197-18551	SCALEVIEW-S3	250 mL	2 -10°C
194-18561	SCALEVIEW-S4	250 mL	2 -10°C
191-18571	SCALEVIEW-SMt	250 mL	2 -10°C
041-34425	deScale Solution	500 mL	2 -10°C
299-79901	SCALEVIEW-S Trial Kit	1 kit	2 -10°C
193-18455	SCALEVIEW-A2	500 mL	RT

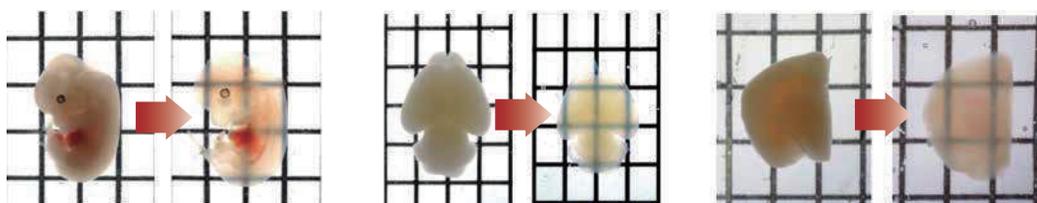
荧光蛋白和神经示踪剂标记的动物样本深层成像

SeeDB

SeeDB (See Deep Brain) 为今井猛博士等人开发的生物体组织透明化的方法, 由水、果糖和还原剂构成。这种方法有助于全面和定量分析, 以了解成鼠和发育中的小鼠大脑中的神经元电路。

SeeDB法使用共聚焦显微镜和双光子激发显微镜可实现深层成像。可利用荧光蛋白和神经示踪剂, 实现对荧光神经回路的全貌阐明和定量分析等各种应用。

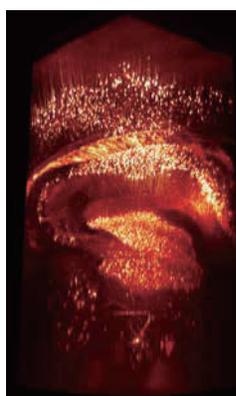
SeeDB处理后的小鼠大脑



SeeDB生物体样本透明化

左起依次为经SeeDB液透明化处理的小鼠胚胎(幼胎12天)、新生鼠(生后3天)的全脑、成鼠大脑(8周龄, 厚度2 mm)

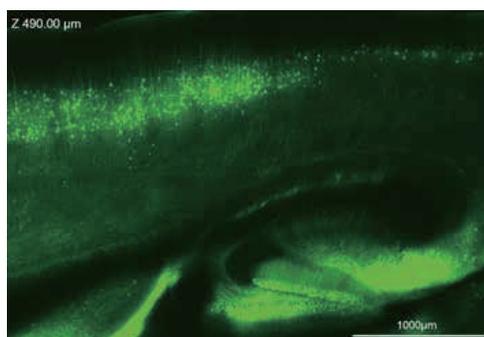
成像效果



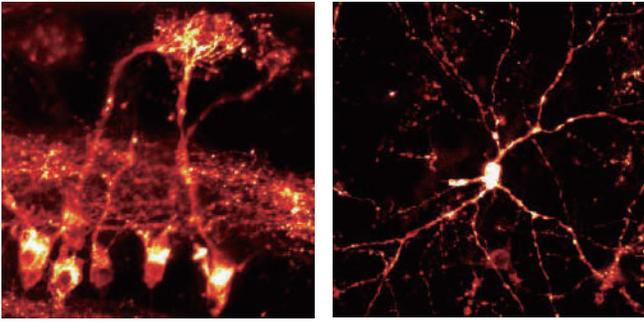
3.000 μm

双光子激发显微镜下的Thy1-YFP-H小鼠(10周龄)大脑荧光成像

使用Olympus公司产品 多光子专用物镜: XLPLN10XSMP观察案例



共聚焦显微镜下的Thy1-YFP-H小鼠(10周龄)大脑荧光成像
 使用Olympus公司产品有机硅浸没式物镜: UPLSAPO 10X2观察案例



小鼠大脑固定后用Dil标记, SeeDB透明化处理案例

左:嗅球僧帽细胞树突(横向观察)

右:嗅球僧帽细胞树突(纵向观察)

使用Olympus公司产品有机硅浸没型物镜:UPLSAPO 20X观察案例。

比例尺:100 μm。

步骤

以小鼠大脑为例:

固定

- 1) 将小鼠大脑在4%多聚甲醛/PBS, 4°C下固定过夜。
- 2) 样本用PBS清洗三次(每次清洗10 min)

透明化处理

- 3) 将样品加入放有20 mL的SeeDB:20w/v%果糖溶液的50 mL锥形瓶中, 在旋转仪中室温旋转4-8 h(约4 rpm);
在脆弱的样本和薄片情况也可以用压板式摇床(约17 rpm)
- 4) 将样本加入放有SeeDB:40w/v%果糖溶液的50 mL锥形管中, 室温下旋转4-8 h。
- 5) 将样本加入放有SeeDB:60w/v%果糖溶液的50 mL锥形管中, 室温下旋转4-8 h。

- 6) 将样本加入放有SeeDB:80w/v%果糖溶液的50 mL锥形管中, 室温下旋转12 h。
- 7) 将样本加入放有SeeDB:100w/v%果糖溶液的50 mL锥形管中, 室温下旋转12 h。
- 8) 将样本加入放有SeeDB的50 mL锥形管中, 室温下旋转24 h。最长可延长至48 h。
- 9) 在透明化成功时, 通过肉眼即可观察到组织透明化。

观察

- 10) 将SeeDB处理过的大脑样本置于共聚焦显微镜或双光子激发显微镜下观察。

本品提供小包装(产品编号:291-79601)!

参考文献

- [1] Ke, M. T., Fujimoto, S. and Imai, T. : *Nat Neurosci* , **16** (8), 1154 (2013).
- [2] Ke, M. T., Fujimoto, S. and Imai, T.: *Bio-protocol* , **4**(3), e1042 (2014).
- [3] Ke, M. T., and Imai, T. : *Curr Protoc Neurosci* , **66**, 2.22.1-2.22.19 (2014).

产品编号	产品名称	包装	保存条件
291-79601	SeeDB Trial Kit	1 kit	RT
193-18391	SeeDB:20w/v% Fructose Solution	250 mL	RT
196-18401	SeeDB:40w/v% Fructose Solution	250 mL	RT
193-18411	SeeDB:60w/v% Fructose Solution	250 mL	RT
190-18421	SeeDB:80w/v% Fructose Solution	250 mL	RT
197-18431	SeeDB:100w/v% Fructose Solution	250 mL	RT
194-18441	SeeDB	250 mL	RT

成像用透明室 相关产品

产品编号	产品名称	包装	保存条件
294-35631	See Through Chamber, 0.3mm thick	10 set	RT
291-35641	See Through Chamber, 0.5mm thick	10 set	RT
295-35661	See Through Chamber, 1.0mm thick	10 set	RT
292-35671	See Through Chamber, 2.0mm thick	10 set	RT
299-35681	See Through Chamber, 3.0mm thick	10 set	RT



深层荧光蛋白的高分辨率分析

SeeDB2

SeeDB2是由柯孟岑、今井猛博士等人开发的一种新型组织透明化试剂。特别适用于通过荧光蛋白标记样本的3D高分辨率成像。

对照SeeDB2G的甘油折射率(1.46)和SeeDB2S的油折射率(1.52),分别用甘油浸没镜头和油浸镜头观察,可见即使在深层部分也没有因为球面像差而引起模糊(分辨率降低)。

此外值得注意的是在SeeDB2中,荧光蛋白的荧光保持非常稳定,并且优于PBS和其他市售的封固剂。因此,SeeDB2十分适合作为荧光蛋白标记样本的封固剂。它不仅可用于厚样本,还可用于细胞生物学的薄样本和组织切片。

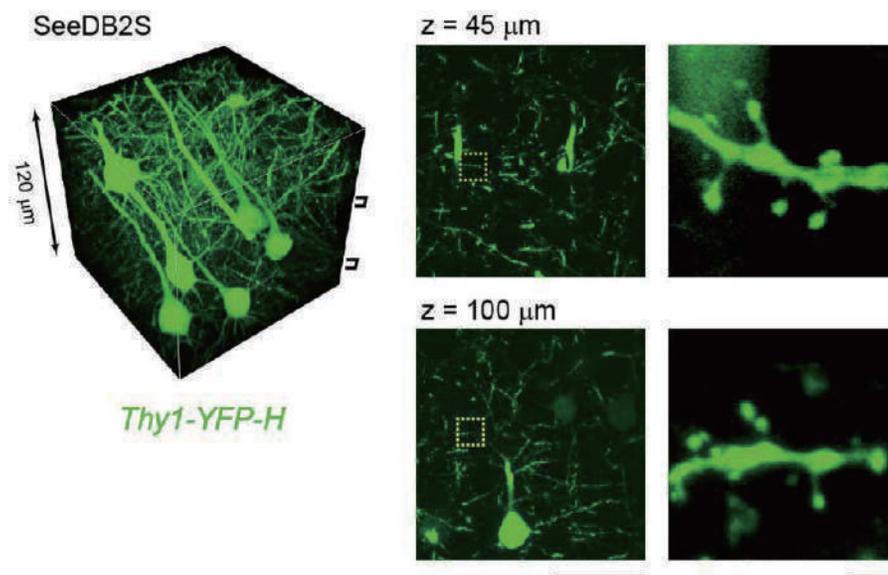
SeeDB2处理后的小鼠大脑



小鼠脑SeeDB透明化案例

小鼠脑切片(1.5 mm厚)的SeeDB2处理前后

SeeDB2应用实例



使用NA 1.4油浸镜头。在不改变激光功率的情况下,从上到下都能获得恒定的亮度。比例尺为2 μm。

本品提供小包装(产品编号:294-80701)!

参考文献

[1] Ke, M. T., and Imai, T. : *Cell Reports.*, **14**(11), 2718 (2016).

产品编号	产品名称	包装	保存条件
294-80701	SeeDB2 Trial Kit	1 kit	RT

全器官/全体透明化 CUBIC

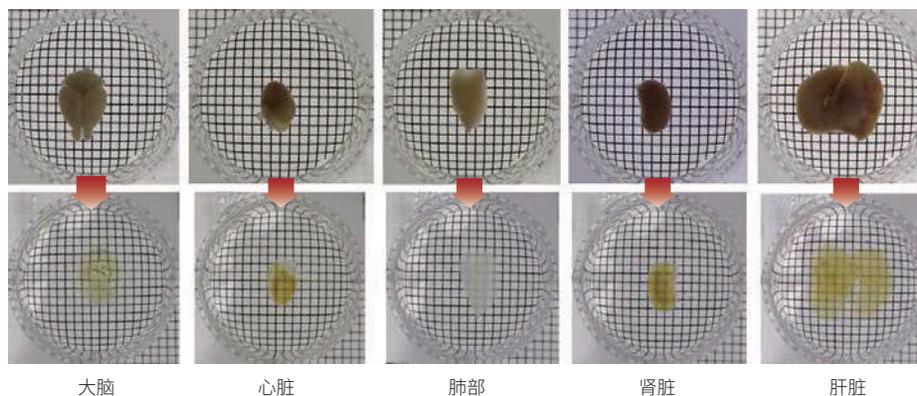
CUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis) 由Hiroki R. Ueda博士等人开发, 是一种简单、高效、可扩展的脑/体透明化方法和成像/计算分析方法。

基于亲水溶液 (ScaleCUBIC Solutions), CUBIC具有荧光保护、高性能及无需特殊设备等特点。

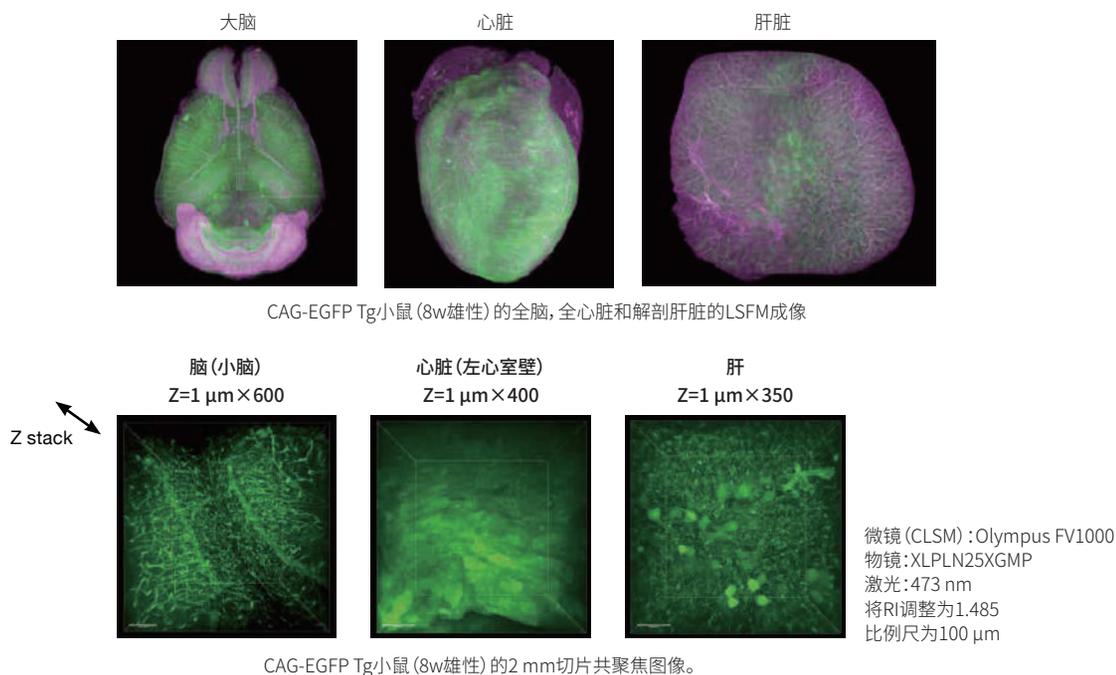
它可利用LSFM技术实现可重复的整个器官和全身的透明化以及快速3D成像。CUBIC还提供3D图像的处理和分析, 以提取生物信息。

所以, CUBIC提供了具有单细胞分辨率和图像信息学的全器官/全身成像平台, 使广大用户能针对细胞和器官层进行多个样品的实验。

使用Scale CUBIC Solution透明化前后小鼠整体器官



CUBIC的应用实例



本品提供小包装(产品编号:290-80801)!

参考文献

[1] E. A. Susaki.*et al.* : *Cell* ,**157**(3),726(2014).

[2] K. Tainaka.*et al.* : *Cell* ,**159**(4),911(2014).

[3] E. A. Susaki.*et al.* : *Nature Protocols* ,**10**,1709(2015).

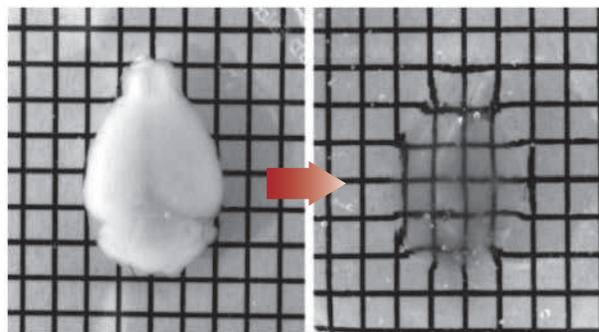
[4] S. Nojima.*et al.* : *Scientific Reports* ,**7**,9269 (2017).

产品编号	产品名称	包装	保存条件
290-80801	CUBIC Trial Kit	1 kit	RT

CLARITY

“CLARITY”技术由斯坦福大学医学院的Dr. Karl Deisseroth等发表于2013年3月的Nature杂志上,是一项组织透明化的新技术。

由于CLARITY可用于荧光蛋白和抗体的免疫染色,可作分析大脑和神经网络的有用工具。VA-044是本透明化方法中的主要试剂。

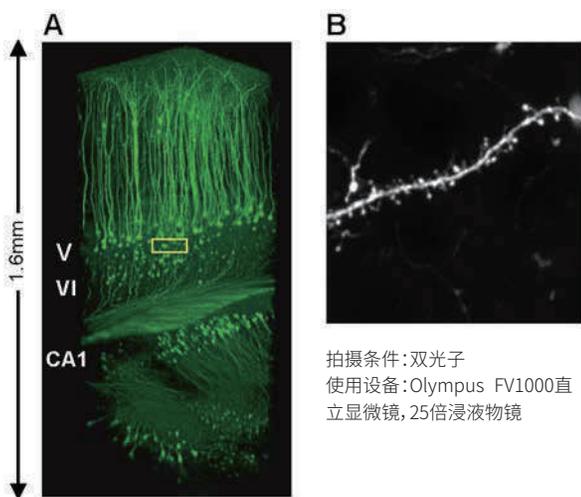


CLARITY处理的小鼠大脑

参考文献

- [1] Chung, K *et al.*: *Nature.*, **497**, 332 (2013).
 [2] Hsueh, B *et al.*: *Nature Protocols.*, **9** (7), 1682 (2014)

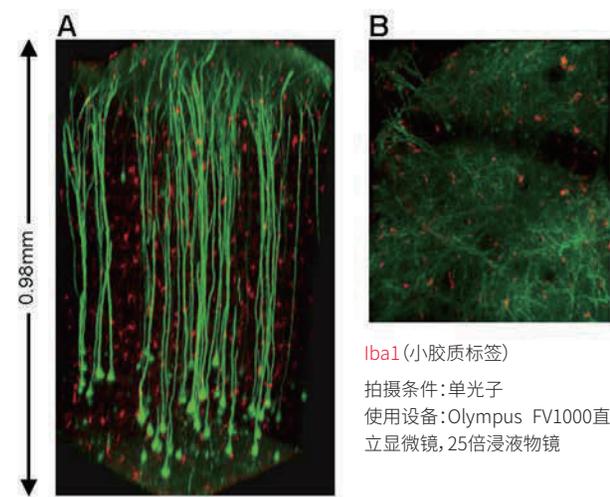
CLARITY处理的小鼠大脑成像



拍摄条件:双光子
 使用设备:Olympus FV1000直
 立显微镜, 25倍浸液物镜

CLARITY处理的Thy1-YFP (H Line) 小鼠大脑的荧光观察
 (A) 从大脑皮质到海马的3-D观察图像
 (B) 大脑皮质V层的锥体细胞的树突图像

CLARITY+抗体处理的小鼠大脑成像



Iba1 (小胶质标签)

拍摄条件:单光子
 使用设备:Olympus FV1000直
 立显微镜, 25倍浸液物镜

CLARITY处理后,用Iba1抗体染色Thy1-YFP (H线) 小鼠大脑的荧光观察
 (A) 在大脑皮质的小胶质细胞的3-D观察图像
 (B) 从表面层观察皮质I层的图像

产品编号	产品名称	包装	保存条件
223-02112	VA-044	25 g	RT
225-02111		100 g	RT
227-02115		500 g	RT

CLARITY脂质除去用电泳槽

新型电泳槽使脑部透明化!NA-1880 型电泳槽,可用于去除脂质。

向样品灌注并使其结合丙烯酰胺后, 37°C 10V~40V电压通电3 h引发聚合, 40°C 10V~60V电压电泳2天, 循环含4%SDS的硼酸盐缓冲液, 去除脂质, 使样品透明化。透明化的样品可用于后续的免疫染色分析。



产品编号	产品名称	包装
631-26271	Electrophoresis Chamber For Lipid Extraction	1 台

植物科学新技术 植物透明化试剂 ClearSee™

ClearSee™, 是一种仅需固定、洗净、透明化三步简单操作便可使植物组织透明化的试剂。作为植物科学的新技术, ClearSee™ 通过结合现有的荧光蛋白和荧光色素的成像技术, 有望用于阐明细胞水平的现象与固态整体之间的连接系统。

(本页记载数据来源: 名古屋大学研究生院理学研究科 栗原大輔老师·水多陽子老师)



未经处理

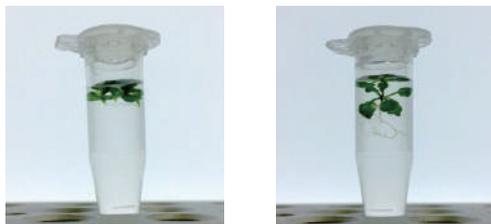
处理后

拟南芥叶透明化

(详细方法请参考随产品附赠的产品说明书。)

1、固定

使用4%甲醛溶液固定样本。



浸泡在固定液中的拟南芥叶·幼株

2、洗净

去除固定液, 加入1 mL的1×PBS缓冲液, 静置1 min。然后去除1×PBS缓冲液, 重新加入1 mL的1×PBS缓冲液, 静置1 min。以上操作重复2次。

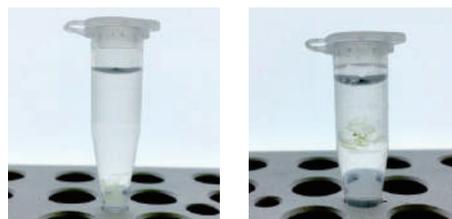
3、透明化处理

去除1×PBS缓冲液, 添加1.3 mL ClearSee™。若有需要可置换新的ClearSee™。



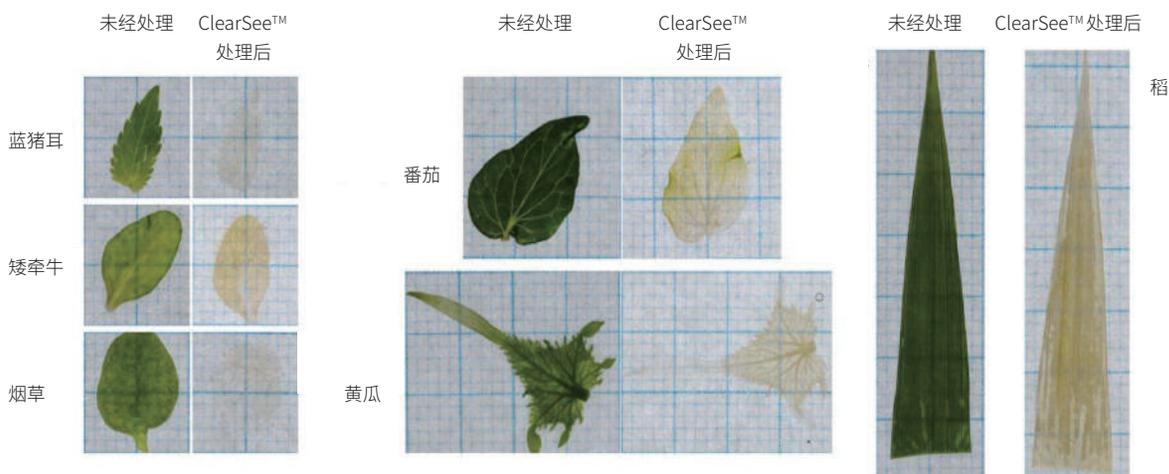
ClearSee™ 中的拟南芥叶·幼株

样本周围被剥离的叶绿素

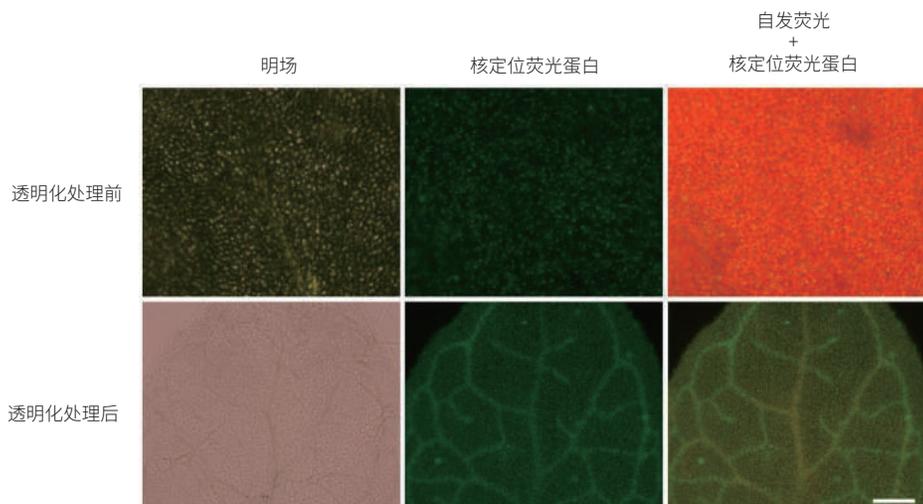


透明化的拟南芥叶·幼株 (3~5 天后)

其他植物的透明化案例



观察案例



经透明化处理的拟南芥叶在明场成像中呈透明状态，叶绿素的红色自发荧光消失。全叶可完整观察，所以能够观察到叶片内维管束的荧光蛋白。比例尺为200 μm 。

参考文献

[1] Kurihara, D. *et al.*: *Development*, **142**, 4168-4179 (2015).

产品编号	产品名称	包装	保存条件
031-25151	ClearSee™	50 mL	RT
160-16061	Paraformaldehyde	100 g	RT
162-16065	Paraformaldehyde	500 g	RT

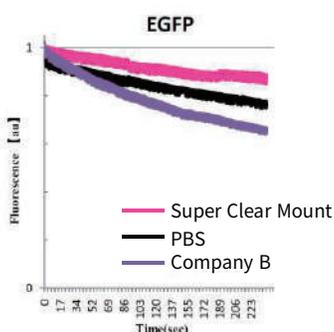
荧光蛋白观察用、油浸物镜适用封固剂 Super Clear Mount

Super Clear Mount (RI:1.52) 是将折射率 (RI) 调整到与浸油 (RI:1.52) 以及盖玻片 (RI:1.52) 折射率完全一致的产品。与传统封固剂相比，Super Clear Mount 提高了深层部位的分辨率，可用于更高分辨率的分析。另外，用油镜观察时，即使在深部也可以维持稳定的亮度与分辨率（尤其是z分辨率），也可用于超分辨率的应用。

(数据来源: 国立研究开发法人理化研究所 柯孟岑老师、今井猛老师 (现九州大学医学研究院))

防止荧光蛋白褪色的效果

在广泛的频谱范围内发挥保持信号与防褪色效果



荧光蛋白	Ex/Em(nm)	荧光亮度
TagBFP	399/454	+++
ECFP	433/475	+++
mTurquoise2	434/474	+++
EGFP	488/509	+++
EYFP	513/527	+++
tdTomato	554/581	+++
tdKatushka2	588/633	+++
CyOFP	497/589	+++

使用 Super Clear Mount 的荧光蛋白防褪色效果数据

(A) 荧光蛋白EGFP光褪色曲线图

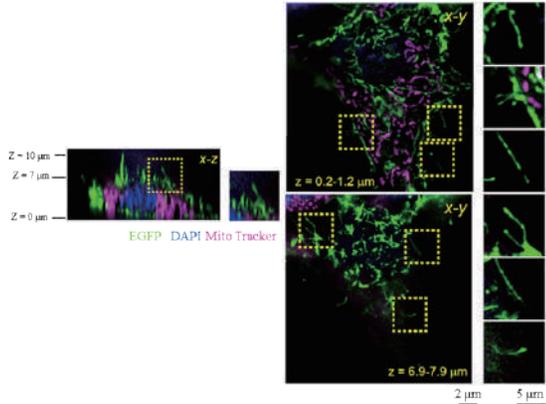
HEK293细胞中的荧光蛋白表达后，分别使用 Super Clear Mount、PBS、其他公司商品 (荧光蛋白适用) 封片。持续使用水银灯照射并检测荧光亮度变化。物镜为20 \times dry (NA 0.4)。将照射开始时的荧光亮度设为1。

(B) 各荧光蛋白荧光亮度的稳定性。

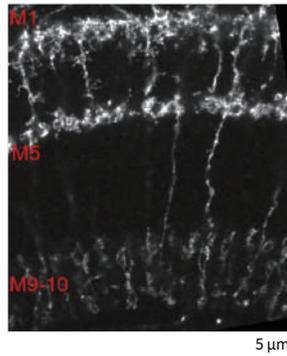
使用超分辨率显微镜的应用实例

使用超分辨率显微镜, 实现深部超分辨率成像

A 使用SR-SIM (ZEISS) 观察



B 使用Airyscan (ZEISS) 观察



使用Super Clear Mount, 并用超分辨率显微镜观察

传统的封固剂会使画面失真, 但使用Super Clear Mount能在深部获得高分辨率图像

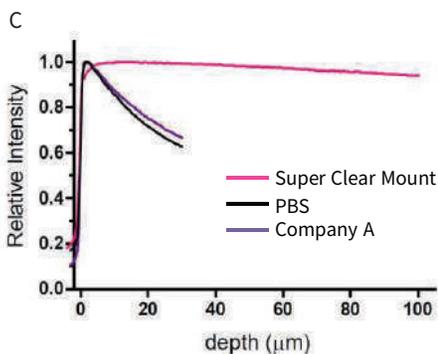
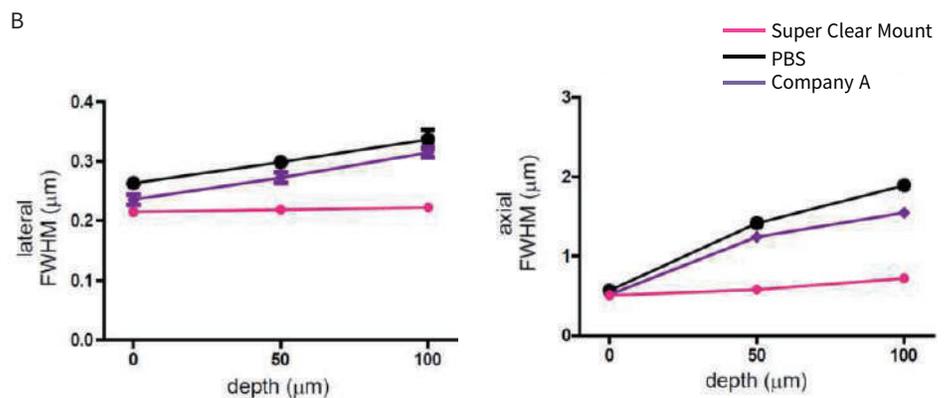
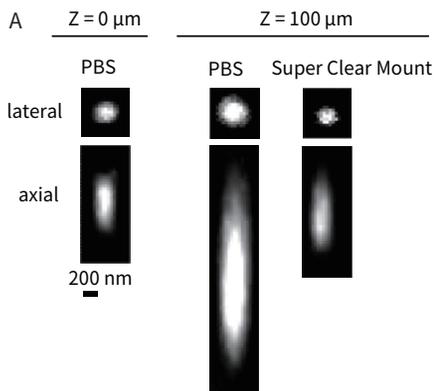
(A) 使用超分辨率显微镜观察细胞膜上的丝状伪足延伸

在HEK293T细胞的细胞膜上表达EGFP后, 使用核染料、线粒体染料进行观察。
通过超分辨显微镜获取细胞膜上的丝状伪足延伸。

(B) 使用超分辨率显微镜观察果蝇大脑

果蝇大脑延髓神经节的神经细胞: 使用荧光蛋白 (GFP) 标记Mi1, 使用超分辨率观察 (深度约为100 μm)。
实现深层部分超分辨率成像。

深层部位的高分辨率、高明亮度



使用Super Clear Mount的深部高分辨率、高明亮度数据

(A) 使用共聚焦显微镜 (pinhole size, 1 AU) 与油浸物镜 (100 ×; NA 1.40; WD 0.13 mm) 进行荧光微球 (diameter, 100 nm) PSF分析。

(B) lateral 以及 axial FWHM (分辨率) 数据
深层部位可维持高分辨率。

(C) 使用罗丹明色素的共聚焦axial scans数据
深层部位可维持高分辨率。

产品编号	产品名称	包装	保存条件
190-18661	Super Clear Mount	10 mL	RT

透明化试剂选择流程

1. 按目标组织选择

包括脑在内的所有组织：CUBIC
脑组织：SCALEVIEW-S, SeeDB或SeeDB2
多细胞球状体：SCALEVIEW-S4

2. 按样品大小选择

全脑：CUBIC
1 mm脑切片~半脑：SCALEVIEW-S
0.5 mm~2 mm脑切片：SeeDB 或SeeDB2

3. 按分析方法选择

综合分析（激光片层扫描显微镜）：CUBIC
高分辨率分析（双光子共聚焦显微镜）：SCALEVIEW-S,
SeeDB或SeeDB2
超高分辨率分析（超分辨显微镜）：SeeDB2

4. 按样品观察时间选择

长期（>3周）：SCALEVIEW-S或SeeDB2
中期（1-3周）：CUBIC（荧光蛋白信号会减弱）
短期（1周）：SeeDB（在处理的一周后会出现自体荧光）

5. 按抗体染色选择

SCALEVIEW-S较好，CUBIC或SeeDB2次之

6. 按透明度选择

CUBIC较好，SCALEVIEW-S次之，最后选择SeeDB2或SeeDB

	CUBIC	SCALEVIEW-S	SeeDB	SeeDB2
组织	所有组织	脑组织，球体组织	脑组织	
样品大小	全脑	脑切片（1 mm）~半脑	脑切片（0.5~2.0 mm）	
分析方法	综合分析 （激光片层扫描显微镜）	高分辨率分析（双光子共聚焦显微镜）		
时间长短	中期（1-3周）	长期（>3周）	短期（1周）	长期（>3周）
透明度	★★★	★★	★	

上述试剂仅供实验研究用，不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from FUJIFILM Wako; <https://labchem-wako.fujifilm.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

富士胶片和光(广州)贸易有限公司

广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼
3002-3003室

北京 Tel: 010 64136388

上海 Tel: 021 62884751

广州 Tel: 020 87326381

香港 Tel: 852 27999019

询价: wkgz.info@fujifilm.com

官网: labchem.fujifilm-wako.com.cn

官方微信



目录价查询

