

Tissue Clearing

组织透明化试剂 (第3版)

Tissue Clearing Reagents (Ver.3)

▶ 组织透明化试剂的概要与选择 -----	2
▶ Scale (ScaleS, ScaleA2) -----	4
▶ SeeDB2 -----	6
▶ CLARITY -----	8
▶ ClearSee™ -----	9
▶ 组织透明化相关产品 -----	10
▶ 组织透明化试剂FAQ -----	11

组织透明化试剂的概要与选择

近年, 大脑的三维观察作为了解复杂神经网络的方法备受关注。传统方法的三维观察需要连续切片的拍摄和重建, 这不仅需要花费大量的精力与时间制备和叠加切片, 还会破坏组织形态。

在此背景下, **组织透明化技术**作为大脑三维观察的新策略备受瞩目。该技术迄今已有100多年的历史, 但其性能仍在不断提高, 近年来已逐步成为大脑三维观察的强力技术。

此次, 我们将重点介绍日本开发的透明化技术, 解释透明化的原理及其使用方法。

组织透明化原理

“**减少光散射**”是组织透明化技术的关键。通常, 生物组织与溶剂(浸泡生物组织的液体)的折射率不同, 这种折射率的差异会导致光散射。因此, 去除生物组织中的高折射率成分或更换高折射率的溶剂可使折射率均一, 从而实现组织透明化。

过去也曾基于该原理开发过透明化技术, 但这些技术存在**使荧光蛋白变性**等问题。因此, 使用这些透明化技术进行分析时需要结合多种染色方法。与此同时, 显微镜和荧光蛋白等与成像相关的技术也有了显著发展, 组织三维分析所需的技术基础也在不断完善。在此背景下, 近年, 最新的荧光显微镜技术和荧光蛋白优化组合使用的透明化技术得到了蓬勃发展, **从而实现了组织深部的三维分析**。

Scale (ScaleA2、ScaleS)

传统透明化技术中常使用有机溶剂, 但在发光过程中, 需要水分子的荧光蛋白在此条件下会明显褪色。

针对该问题, 研究者开发了使用水溶液的透明化技术**Scale法**(ScaleA2法和ScaleS法的总称)¹⁾²⁾。

Scale法使用尿素、表面活性剂、甘油(ScaleA2法)或山梨醇(ScaleS法)的混合溶液来抑制光散射, 从而实现组织透明化的同时使荧光蛋白不褪色。此外, 脱脂所需的表面活性剂含量少, 透明化后也可保持良好的超微结构。

初次尝试组织透明化的用户, 推荐使用这种能较好平衡透明度和结构保持的Scale法。

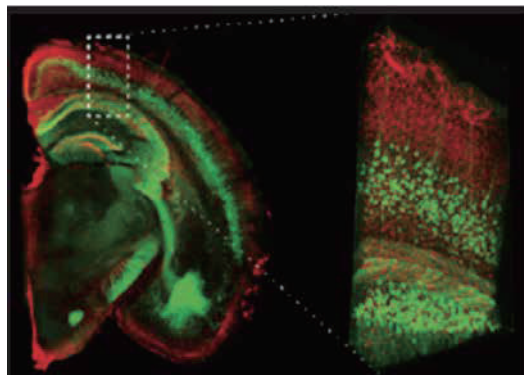


图1. PI染色的YER-H line小鼠大脑半球切片

数据提供: 国立研究开发法人理化学研究所 脑神经科学研究中心细胞机能探索技术研究小组/光量子工学研究中心生命光学技术研究小组 濱裕老师、星田哲志老师、宫脇敦史老师(赞助: 奥林巴斯株式会社)

SeeDB2法

使用CLARITY法进行透明化时, 生物组织的大小会短暂地发生改变, 导致微细组织形态受损。

SeeDB2法通过将生物组织浸泡在含有皂苷的碘海醇溶液中, 在保持超微结构的同时实现组织透明化³⁾。由于使用高折射率的溶液, 尽可能地抑制折射率差造成的影响, 因此可以进行更深入的成像。

溶液中不含表面活性剂, 虽然透明度不如其他方法, 但其具有优异的组织结构保持能力, 可通过共聚焦显微镜和超分辨率显微镜观察树突棘形态。

并且, 荧光蛋白的稳定性高, 适用于抑制褪色。

另一方面, 需要注意DAPI和Alexa等染料容易发生光褪色。

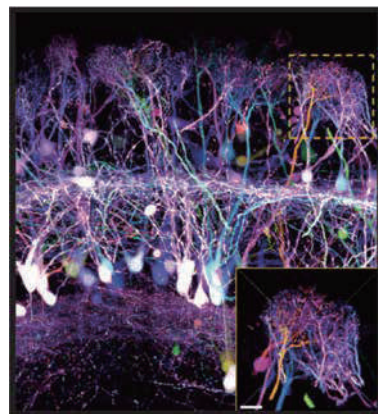


图2. 利用Tetbow技术进行神经元多色荧光成像

数据提供: 九州大学医学研究院 坂口理智老师、今井猛老师

CLARITY法

大脑组织透明化的难点在于去除大量存在于髓鞘等的脂质。**CLARITY法**将脑蛋白与聚丙烯酰胺聚合交联后,在含SDS的缓冲液中通过电泳去除脂质⁴⁾。

虽然操作比其他方法复杂且透明化需要约1周的时间,但它可有效去除细胞膜成分,物质渗透性好,适合用于抗体染色。

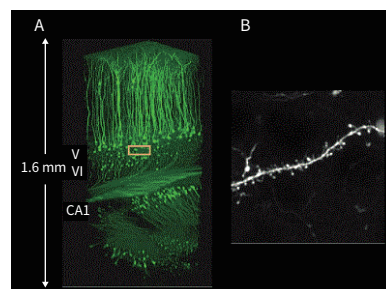


图3. CLARITY法处理后的小鼠大脑成像

组织透明化技术的选择

CLARITY法可有效应对透明化时出现的样品脆弱和透明度不足的问题。但是,CLARITY法在透明化过程中样品会发生膨润,不一定能保持微结构。因此,相比观察微结构,这种方法更适用于细胞水平和轴突束水平的成像。

定量分析各轴突或树突(0.5-数 μm)及观察树突棘等精细的结构(0.2-1 μm)时,推荐使用透明化过程中不会引起样品膨润或收缩的SeeDB2法。但是,深度超过3,4 mm时,则难以观察到单一的轴突。

Scale法的透明度和组织结构保持能力高于SeeDB2法。因此,当无需使用SeeDB2法进行微结构观察时,或尝试进行透明化实验时,可考虑使用Scale法。此外,使用Scale法也可轻松实现类器官和球状体的透明化。

表1 组织透明化技术的特点

组织透明化技术	Scale (ScaleS)	SeeDB2	CLARITY	ClearSee
观察对象	全脑~大脑切片 类器官·球状体	大脑切片 类器官·球状体	全脑~大脑切片 大脑以外的组织 骨骼 (需要进行脱钙处理)	植物组织
结构保持能力	高	非常高 (不伸缩)	暂时性膨润	高
应用	荧光蛋白 荧光染料染色 免疫染色	荧光蛋白 荧光染料 (小心褪色)	荧光蛋白 荧光染料 免疫染色	荧光蛋白 荧光染料
操作复杂性	非常简便	简便	非常复杂	简便
操作时间	约1天 (2 mm厚 大脑切片)	约3~5天 (2 mm厚 大脑切片)	约1周 (2 mm厚 大脑切片)	1-2天 (根) 4-7天 (叶子/幼苗) 2周 (雌蕊) 4周 (成熟组织)
观察时折射率	RI=1.47 (SCALEVIEW-S4) RI=1.49 (SCALEVIEW-SMt)	RI=1.46(SeeDB2G) RI=1.52(SeeDB2S)	RI=1.45	RI=1.41
显微镜使用例	共聚焦/双光子显微镜	电子/超分辨率显微镜	光片显微镜	共聚焦/双光子显微镜

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) Ke, et al. : *Cell Reports*, **14**, 2718 (2016).
- 4) Chung, K. et al. : *Nature*, **497**, 332 (2013).
- 5) 今井猛 : *生化学*, **87**(2), 225 (2015).

SCALEVIEW®-S (SCALEVIEW®-S Trial Kit)

SCALEVIEW®-S是用于ScaleS法的试剂。ScaleS法是一项由国立研究开发法人理化研究所的宫脇敦史老师等人开发的,使用以尿素为主要成分的试剂溶液的透明化技术。将组织依次浸入6种溶液中即可轻松实现透明化及调整折射率。

※ SCALEVIEW® 是奥林巴斯株式会社的注册商标。富士胶片和光纯药株式会社已获得奥林巴斯株式会社的使用许可。

■ 特点

- 只需将组织依次浸入溶液中即可
- 2 mm脑组织块约1天即可透明化
- 可透明化的组织:小鼠大脑、死者大脑、类器官/球状体

■ 所需试剂 ※关于其他所需设备或器材,请前往官网确认

- SCALEVIEW®-S Trial Kit
- deScale Solution (产品编号:041-34425)
- 多聚甲醛 (产品编号:160-16061)
- 1×PBS (产品编号:164-25511)
- 琼脂糖

■ 标准实验Protocol (小鼠大脑半球来源的1-2 mm厚切片)

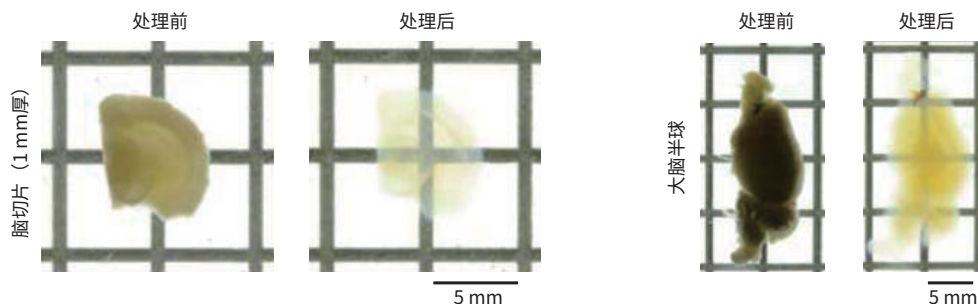
灌注固定+固定	透明化处理				清洗	透明化处理		封片
4%PFA/PBS(-) (pH7.6-7.8)	SCALEVIEW® -S0	SCALEVIEW® -S1	SCALEVIEW® -S2	SCALEVIEW® -S3	deScale Solution	SCALEVIEW® -S4	SCALEVIEW® -SMt	SCALEVIEW® -SMt
4°C	37°C	37°C	37°C	37°C	4°C	37°C	37°C	RT
灌注固定+3天	30 min	30 min	30 min	30 min	3 h×2	12-24 h	1 h	-

※在组织透明化实验中,请注意试剂的使用量、处理的时间会根据样品大小有所改变。

※请尽可能在灌注固定后取出并重新固定样品。

■ 应用数据 数据提供:国立研究开发法人理化研究所脑神经科学研究中心细胞机能探索研究组/光量子工学研究中心生命光学技术研究组
濱裕老师、星田哲志老师、宫脇敦史老师(合作:奥林巴斯株式会社)

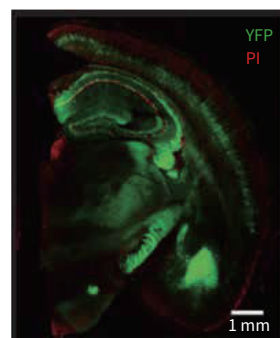
■ 小鼠大脑的透明化



■ 观察使用荧光染料(PI)染色 (ChemScale处理) 的YFP-H line小鼠大脑半球切片

使用共聚焦激光扫描显微镜(倒置)观察经ChemScale (PI染色)处理的YFP-H系小鼠的脑半球切片(2 mm厚)。

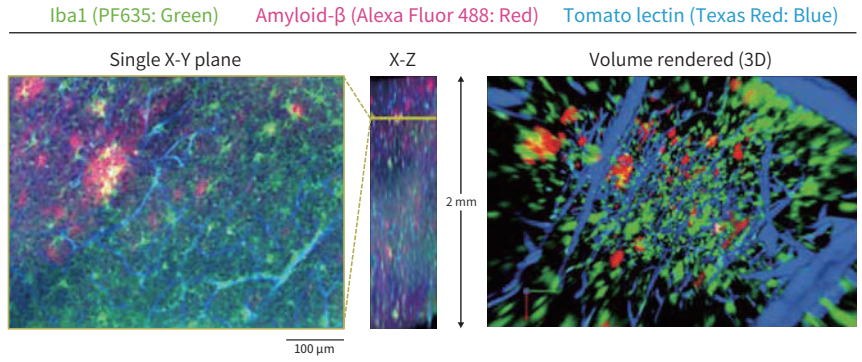
Mouse : Thy1-YFP-H line, 42W, ♂
Size : Coronal Slice (2 mm)
Microscope (CLSM) : Evident FV3000 (Inverted)
Objective lens : UPLSAPO10×2 (NA 0.40)
Laser : 488 nm (for YFP), 561 nm (for PI)



■ 进行免疫组织染色 (AbScale处理) 的阿尔茨海默病模型小鼠大脑切片染色

使用激光扫描共聚焦显微镜观察经AbScale处理的阿尔茨海默病模型小鼠 (17个月) 的脑切片 (2 mm厚)。

Microscope (CLSM): Evident FV1200
Objective lens: XLPLN10XSVM (NA 0.60)



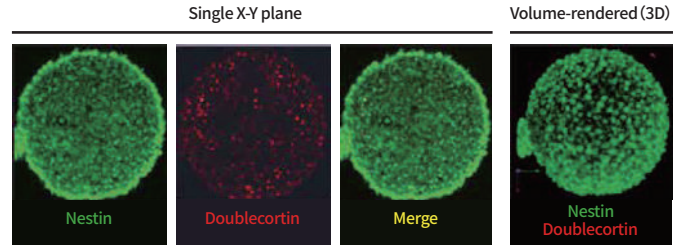
SCALEVIEW®-S4

SCALEVIEW®-S4是SCALEVIEW®-S系列的组成要素之一。只需浸入SCALEVIEW®-S4, 即可实现球状体和类器官的透明化。

应用数据 数据提供: 国立研究开发法人理化研究所脑神经科学研究中心细胞机能探索研究组/量子工学研究中心生命光学技术研究组 濱裕老师、星田哲志老师、宫脇敦史老师 (合作: 奥林巴斯株式会社)

■ 大鼠海马体来源神经干细胞Neurosphere三维免疫染色

对成年大鼠海马体来源神经干细胞Neurosphere (5day *in vitro*) 进行免疫染色, 再使用共聚焦扫描显微镜 (奥林巴斯FV1000) 观察。物镜由奥林巴斯株式会社提供, 使用UMPLFLN10XW (NA 0.3)。



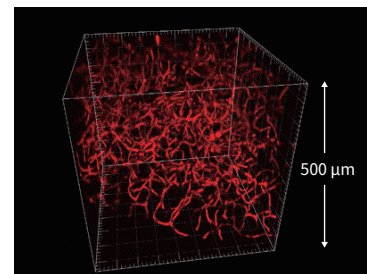
SCALEVIEW®-A2

SCALEVIEW®-A2是一种水溶性溶液, 可消除光散射, 同时不破坏福尔马林固定的生物样品中的光吸收和荧光。只需浸入SCALEVIEW®-A2即可实现哺乳动物的大脑等生物组织的透明化。

应用数据 数据提供: 国立研究开发法人理化研究所脑神经科学研究中心细胞机能探索技术研究组/量子工学研究中心生命光学技术研究组 濱裕老师、星田哲志老师、宫脇敦史老师 (合作: 奥林巴斯株式会社)

■ 小鼠肝脏的透明化

小鼠灌注固定前使用Lectin Texas Red注入血管进行标记处理, 灌注固定后, 取出肝脏, 使用SCALEVIEW®-A2进行处理。使用共聚焦激光显微镜观察, 物镜使用奥林巴斯株式会社的UPLSAPO30XS。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
299-79901	SCALEVIEW®-S Trial Kit	组织透明化用	1 kit
196-18521	SCALEVIEW®-S0	组织透明化用	250 mL
194-18561	SCALEVIEW®-S4	组织透明化用	250 mL
193-18455	SCALEVIEW®-A2	组织透明化用	500 mL
041-34425	deScale Solution	组织透明化用	500 mL

SeeDB2 Trial Kit

SeeDB2 Trial Kit是用于SeeDB2 法的透明化试剂盒。该方法由国立研究开发法人理化研究所柯孟岑老师、九州大学医学研究院今井猛老师等人开发。通过制备试剂盒中的溶液并浸泡脑组织块,即可实现透明化。该方法保留了大脑组织的微结构,可调节高折射率(RI: 1.52),适用于高分辨率成像,也可用于迄今为止难以进行的树突棘定量分析。

■ 特点

- 可保留微结构的同时透明化
- 调整为高折射率,可观察深层部分
- 稳定维持荧光蛋白的荧光 ※Alexa等会出现褪色
- 可透明化的组织:小鼠脑组织块、苍蝇全脑、类器官/球状体

■ 所需试剂 ※关于其他所需设备或器材,请前往官网确认

- SeeDB2 Trial Kit
- 多聚甲醛(产品编号:160-16061)
- 1×PBS(产品编号:164-25511)
- 透镜浸泡液

■ 实验Protocol(小鼠大脑0.5-2 mm厚切片)

固定	透明化处理	透明化处理	透明化处理	透明化处理	透明化处理(选择)	封片
4%PFA/PBS(-)	Permeabilization Solution	Clearing Solution 1	Clearing Solution 2	Clearing Solution 3	Clearing Solution 4	SeeDB2G 或SeeDB2S
4°C	RT	RT	RT-37°C	RT	RT	RT
1天	12-16 h	6-24 h	6-10 h	>12 h	>12 h	-

■ 应用数据

■ 小鼠大脑切片(1.5 mm厚)的透明化

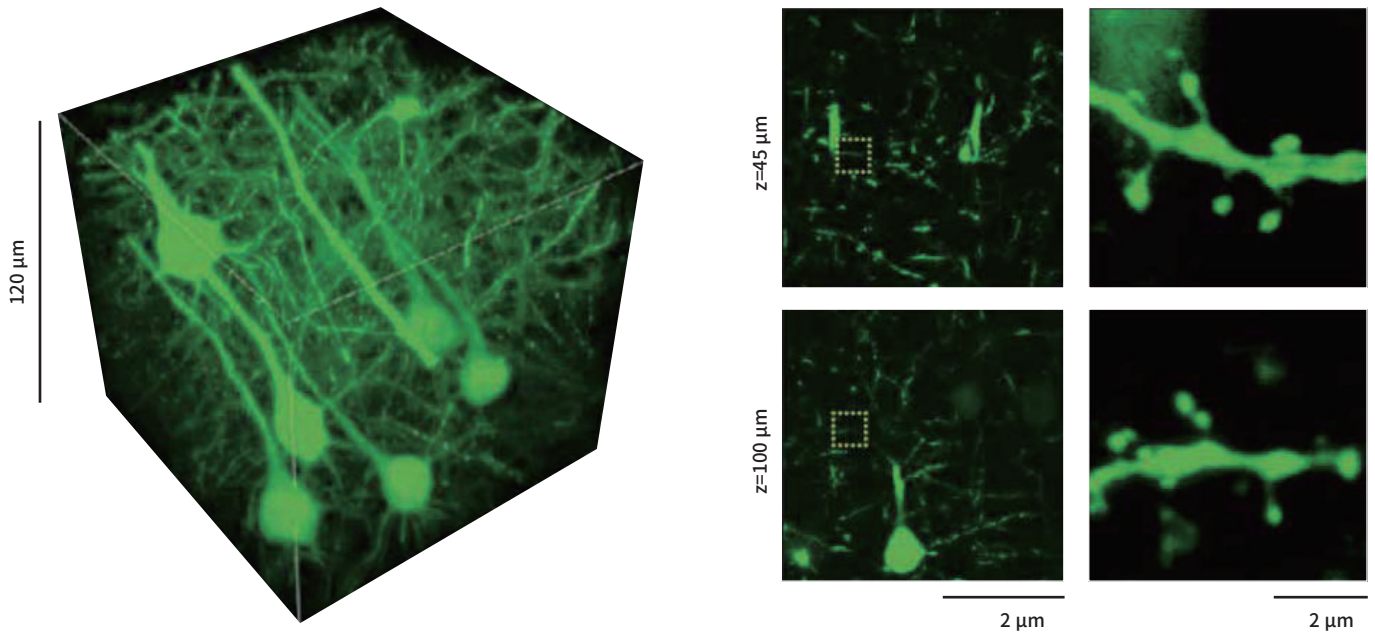
数据提供:国立研究开发法人理化研究所 柯孟岑老师、九州大学医学研究院 坂口理智老师、今井猛老师



■ Thy1-YFP H小鼠大脑的脑切片观察

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

共聚焦显微镜使用NA 1.4油浸镜头。封片剂使用SeeDB2S。
无需调整激光功率, 可从上到下获得几乎恒定的亮度。



■ 神经元的多色荧光成像

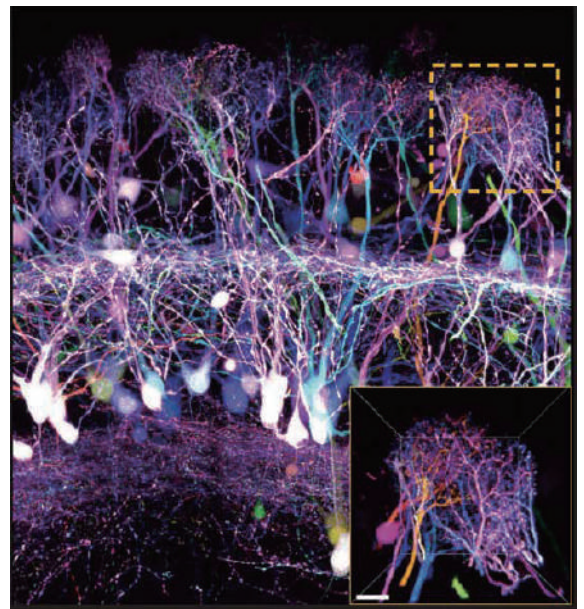
数据提供: 九州大学医学研究院 坂口理智老师、今井猛老师

使用Tetbow技术标记小鼠嗅球僧帽细胞和房饰细胞的数据。
比例尺为20 μm。

<Tetbow技术>

Brainbow技术是通过充分混合三种颜色的荧光蛋白制备出中间色, 并使用不同颜色标记大量神经元的方法。

TetBow技术是Brainbow法的改良版, 可对各个神经元进行不同颜色和高亮度的染色。此外, SeeDB2可保持高荧光亮度对神经元进行三维观察。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
294-80701	SeeDB2 Trial Kit	组织透明化用	1 kit

CLARITY

CLARITY是2013年3月由斯坦福大学的Karl Deisseroth博士等人发表在Nature杂志上的一项新型组织透明化技术¹⁾。CLARITY可使用荧光蛋白和抗体进行免疫染色,是分析大脑神经回路的有效工具。VA-044 是该论文的透明化实验protocol中使用的试剂。

1) Chung, K *et al.* : *Nature*, 497, 332 (2013).

■ 所需试剂 ※另需电泳槽和循环泵

● Hydrogel Monomer Solution

VA-044、40%丙烯酰胺、2%双丙烯酰胺、10×PBS、16%多聚甲醛、皂素、水

● 电泳缓冲液

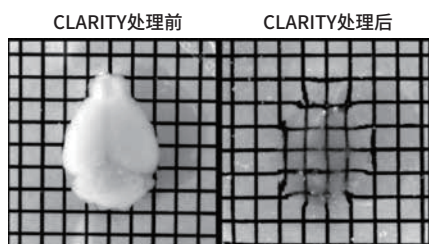
硼酸、十二烷基硫酸钠、氢氧化钠、水

■ 实验Protocol

前处理	电泳	免疫染色	观察
Hydrogel Monomer Solution	电泳缓冲液	各种免疫染色试剂	甘油
4°C→37°C	37°C	RT	-
1-3天	2-5天	2-5天	2天

■ 应用数据

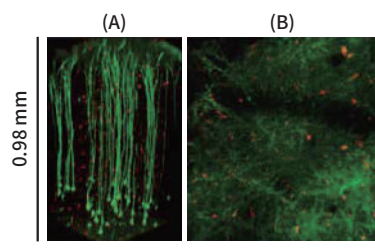
■ 小鼠大脑的透明化



■ CLARITY处理和使用抗体的小鼠大脑成像

CLARITY处理后,用Iba1抗体染色Thy1-YFP (H Line) 小鼠大脑的荧光观察

(A) 在大脑皮层中的小胶质细胞3-D观察图像
(B) 从表层观察皮层 I 层的图像



Iba1 (小胶质细胞标志物)

产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
223-02112	VA-044	细胞生物学用	25 g
225-02111			100 g
017-08012	丙烯酰胺	电泳用	25 g
019-08011			100 g
011-08015			500 g
138-06032	N,N'-亚甲基双(丙烯酰胺)	电泳用	25 g
130-06031			100 g
163-25265	10×PBS (-)	细胞培养用	500 mL
160-16061	多聚甲醛	组织固定用	100 g
162-16065			500 g
027-02192	硼酸	试剂特级	25 g
029-02191			100 g
021-02195			500 g
190-13982	十二烷基硫酸钠	分子生物学用	25 g
192-13981			100 g
194-13985			500 g
631-26271	脂质去除用电泳槽	NIHON EIDO	1 台

ClearSee™

ClearSee™ 是一种仅需固定、清洗、透明化三步简单操作即可实现植物组织透明化的试剂。该方法由名古屋大学大学院栗原大辅老师开发。作为植物科学的研究工具，有望用于阐明细胞水平的现象和整个个体之间的系统联系。

■ 特点

- 无需制备切片，即可荧光观察整个内部结构
- 操作只需①固定、②清洗、③透明化三个步骤
- 可透明化的组织：植物（根、叶、雌蕊、幼株、成熟组织等）

■ 所需试剂 ※关于其他所需设备或器材，请前往官网确认

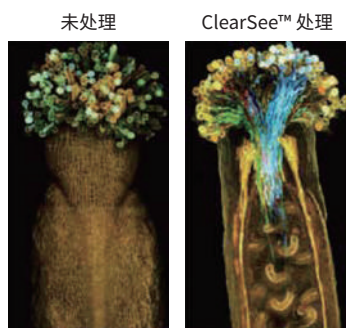
- ClearSee™
- 超纯水
- 多聚甲醛 (产品编号:160-16061)
- 2 mol/L氢氧化钠溶液 (产品编号:194-05361)
- 10×PBS (产品编号:163-25265)
- 1×PBS (产品编号:164-25511)

■ 实验Protocol (拟南芥叶, 幼株)

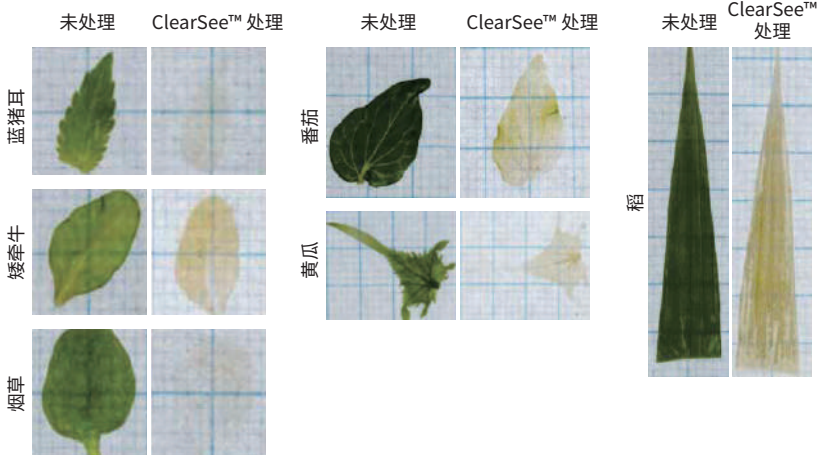
固定	清洗	透明化处理	封片
4%PFA 2 mol/L NaOH	1 × PBS	ClearSee™	ClearSee™
RT	37°C	RT	-
1 h	2 min	4-7 天	-

■ 应用数据 数据提供: 名古屋大学大学院理学研究科 栗原大辅老师、水多阳子PRESTO研究员

■ 拟南芥叶雌蕊的荧光观察



■ 多种植物的透明化

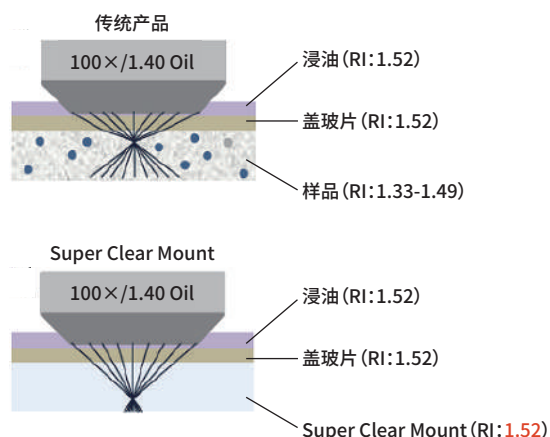


产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
031-25151	ClearSee™	植物透明化用	50 mL
160-16061	多聚甲醛	组织固定用	100 g
162-16065			500 g
194-05631	2 mol/L氢氧化钠溶液	容量分析用	100 mL
196-05635			500 mL
163-25265	10×PBS (-)	细胞培养用	500 mL
164-25511	1×PBS (-)	生物化学用	5 L

组织透明化相关产品

Super Clear Mount

Super Clear Mount是一款将折射率(RI)调整至与浸油和盖玻片折射率一致(RI:1.52)的封片剂。与传统封片剂相比,它能提高深层部位的分辨率,从而实现高分辨率分析。此外,使用油镜观察深部时,也可以维持稳定的亮度与分辨率(尤其是z分辨率),还可用于超分辨率的应用。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
190-18661	Super Clear Mount	细胞生物学用	10 mL

See Through Chamber

See Through Chamber是使用显微镜观察透明化组织样品时的观察容器。该观察容器由10套硅橡胶板、盖玻片和载玻片组成,可更轻松地观察组织透明化后的样品。



产品编号	产品名称	产品等级	产品规格
294-35631	See Through Chamber, 0.3 mm厚	组织透明化用	10 set
291-35641	See Through Chamber, 0.5 mm厚	组织透明化用	10 set
295-35661	See Through Chamber, 1.0 mm厚	组织透明化用	10 set
292-35671	See Through Chamber, 2.0 mm厚	组织透明化用	10 set
299-35681	See Through Chamber, 3.0 mm厚	组织透明化用	10 set

组织透明化试剂FAQ

Q1. 组织透明化时的相关注意事项?

A1. 需注意透明化方法和显微镜物镜的选择。请准备与各透明化方法所用封片剂的折射率相匹配的物镜。建议向显微镜厂家咨询使用试剂的折射率相对应的物镜。

Q2. 透明化处理过程中可以中断吗?

A2. 可在清洗步骤中暂时中断(3天~1周)。

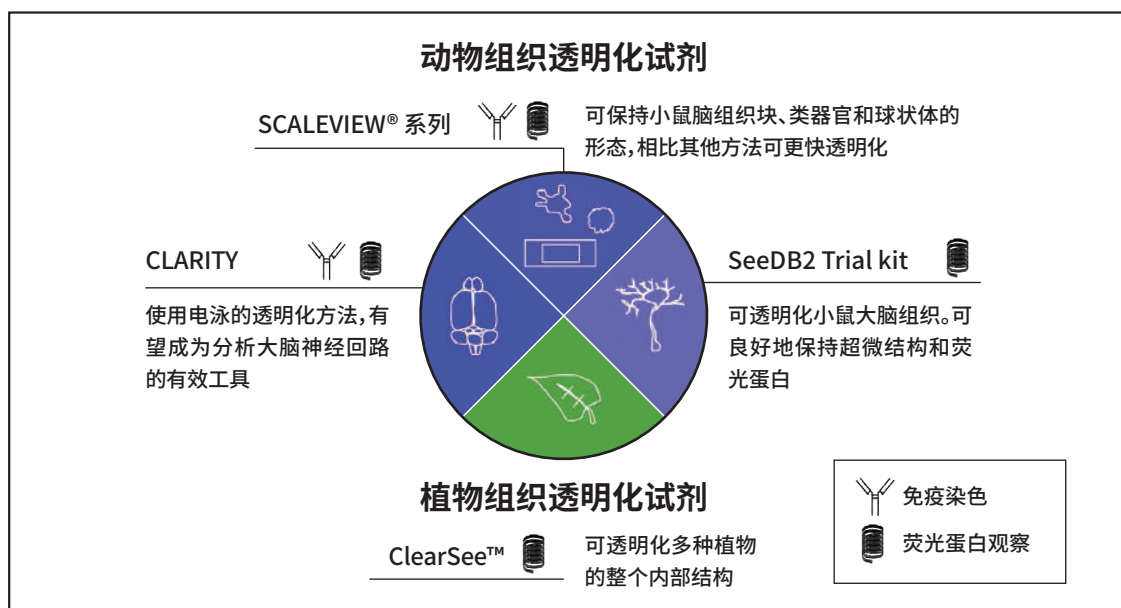
Q3. 透明化样品可以保存吗?

- A3. ● SCALEVIEW: 在SCALEVIEW-S4和SMt溶液中可保存6个月以上。
● SeeDB2: 在SeeDB2S溶液中可保存12个月以上。但注意不要暴露于空气中。
● ClearSee: 在ClearSee溶液中可保存6个月以上。

Q4. 透明化无法顺利进行时,应先检查什么?

- A4. ① 确认是否进行了样品的灌注固定?
② 透明化处理后是否浸入PBS中?透明处理后浸入PBS会使组织恢复不透明的状态。
③ 1~2 mm厚的样品是否成功透明化?可先尝试透明化薄切片。

组织透明化试剂选择



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 and 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: 13611333218

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

