



° 诺海生物科学仪器(上海)有限公司
Nuohai Life Science (Shanghai) Co., Ltd



实验操作视频



组织切片膨胀 试剂盒 使用说明书

Cat#: NH230315-S50



产品简介：

该试剂盒提供一种可快速透明并膨胀厘米量级组织样品的亲水型组织膨胀方法。该方法主要是通过去脂溶液去除组织内部的脂类，同时使组织疏松，以便于单体在组织中均匀分布。单体浸泡后的组织通过UV照射诱发单体聚合将生物大分子固定在组织原位。聚合后的样品遇水可在单方向上膨大约4倍，体积膨大约64倍。该试剂盒具有快速、高效；内源荧光蛋白保留效果好；同时兼容免疫染色；样品机械强度高；多场景适用，可在各种类型荧光显微镜上进行成像的特点，如：光片显微镜、共聚焦显微镜等荧光显微镜。该方法常用于提高光学成像分辨率。如：采用诺海光片显微镜LS18 6.3X物镜对膨胀组织进行成像即可获得亚微米级分辨率，若采用高数值孔径介质物镜即可获得百纳米级分辨率。

试剂盒内容：

名称	数量
溶液A	180 ml
溶液B	20 ml
溶液C	100 ml
溶液D	3 ml
透明5 ml EP管	50 个
棕色5 ml EP管	50 个
方格尺	1份
UV灯	1个
说明书	一份

注意 | 溶液A和B 室温保存，溶液C和D 需在4或-20 °C避光保存。



自备物品：

4%多聚甲醛 (PFA)、0.01MPBS、50ml离心管、蠕动泵、手术器械等用于实验动物灌注取材；方格尺或底透台（诺海，Cat#: NH210901）等用于透明程度判断；封闭液、抗体、核染料、Triton X-100、甲醛 (FA) 等用于免疫样本标记。

使用限制：

本产品属科研专用，不用于诊断、治疗。

步骤：

组织切片经过去脂后变得疏松透明，单体浸泡后通过UV诱发单体聚合，充分吸水后样品可膨大约4倍。膨胀过程稳定后进行成像。详细步骤以小鼠脑切片为例：

小鼠脑切片透明膨大步骤：

1.免疫染色（选做）

组织切片经0.01MPBS洗涤3次，每次5分钟，彻底去除残留固定液，之后采用常规免疫染色步骤进行染色，染色后的样本首先采用0.01M PBS配制的10%(v/v) Triton X-100室温清洗15分钟，之后用0.01MPBS室温清洗1小时，注意避光。清洗后的样本于1%PFA（或FA，0.01MPBS配制）中室温固定1小时，固定过程中缓慢摇动。固定完成后使用0.01MPBS缓慢摇动清洗3次，每次20分钟。

2.去脂溶液配制（2分钟）

溶液A和溶液B以质量比9:1配制去脂溶液，根据需求现用现配，建议去脂溶液体积为样品体积的20倍以上。



3.去脂 (2分钟, 注意避光)

选取目标切片转移至5mlEP管中, 加入4ml上述去脂溶液, 37°C摇床孵育等待组织透明。100 μ m厚小鼠脑切片约需2~5分钟即可完成去脂, 样品在去脂溶液中可保存长达一周的时间, 一般不影响荧光蛋白信号强度。

【更厚脑切片或较致密的组织如心脏切片建议采用37°C摇床孵育, 并延长去脂时间以保证样品透明度(可过夜孵育)。】

去脂程度判断: 将样品和去脂溶液一起倒入培养皿中, 并置于方格尺或底透台(诺海, Cat#: NH210901)的刻度线上, 若透过样品可观察到黑色刻度线清晰且无扭曲, 则表明去脂过程已完成,

4.单体配制 (2分钟)

单体溶液由溶液C和溶液D以40:1的比例在冰上进行配制, 尽量现用现配。如将盛有溶液C和D的棕色瓶从4或-20°C冰箱中取出完全溶解后插入冰(湿冰)中预冷, 并取5ml棕色离心管插入冰中预冷。移液器吸取预冷后的4ml溶液C和100 μ l溶液D加入5ml棕色离心管中, 移液器吹打混匀, 冰上静置消泡。

注意 | 配制好的单体溶液可在4°C冰箱避光保存2周左右。

5.单体浸泡 (1—2小时)

去脂后的组织切片使用0.01M PBS清洗三次, 每次1小时, 彻底去除去脂溶液。之后将切片移入新的5 ml EP管中并置于冰上, 加入4 ml单体溶液没过样品表面。将EP管转移至4°C水平摇床上缓慢摇动2小时(速度不可过快, 以防损伤样品)确保单体溶液充分进入组织内部。单体浸泡时长可根据需求延长至2天。



6. 单体聚合 (5分钟)

单体浸泡完成后取出EP管，置于冰上。使用毛笔或其他工具移出单体浸泡后的样本置于在冰盒预冷的玻底皿内（如图1.4）。并在玻底皿底部加入单体溶液，盖上盖玻片。使用UV灯于盖玻片上方15~20厘米处持续照射约1分钟，诱发凝胶单体分子聚合。聚合完成的标准是：样品变成富有弹性的胶体状态。UV诱导单体完全聚合的时间与模具中单体溶液的体积及温度有关，体积越大，时间越久，具体时长以单体完全聚合成胶体为准。

注意

单体聚合过程释放大量的热，因此一定要在冰上进行，保证快速散热，从而保护内源荧光蛋白。其次单体聚合过程稳定过高会导致整体聚合反应过快，容易在胶体内产生大量气泡，降低样品的机械强度，不利于后期成像。必要时可将模具浸入冰水中，以便散热。

7. 膨胀(1~2小时)

单体聚合完成后去除盖玻片，将玻底皿连带样本一起放入盛有足量的去离子水（大于50 ml）的避光容器中，或将样本从玻底皿上取下后放入足量的去离子水中。凝胶后的组织切片吸水膨胀。单方向膨胀到原来的3~4倍，样品在膨胀稳定后即可进行成像。100 μm厚小鼠脑切片约需2小时可达到膨胀稳定，不再变大。

8. 成像

倒置显微镜成像需采用玻底培养皿进行封片。将膨胀后的组织小心转移至玻底皿中，加入适量去离子水防止长时间成像样品干燥缩小，但去离子水不可过多，以防成像过程中样品滑动，盖上盖玻片和培养皿盖，即可成像。

正置显微镜成像建议采用100 mm玻底培养皿或普通培养皿，将膨胀后的组织小心转移至培养皿中后，加入适量去离子水，盖上盖玻片即可成像，成像时建议选择长工作距离物镜（如Nikon CFI Super Fluor MRF00201）。



注意 膨胀样品进行高倍成像时, 需采用折射率为1.33的物镜。

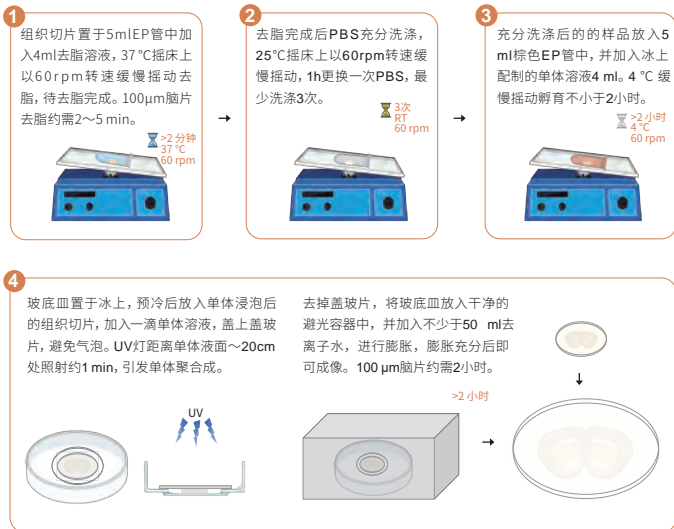


图1小鼠脑切片膨胀样本制备过程



° 诺海生物科学仪器(上海)有限公司
Nuohai Life Science (Shanghai) Co.,Ltd



· 微信公众号 ·



· 视频号 ·



· 已发文章 ·

诺海生物科学仪器(上海)有限公司

地址:上海市松江区九亭镇云凯路66号科技绿洲二期10号楼2层

电话:86-21-37827858、13818273779(微信同号)

邮件:info@nuohailifescience.com

网址:www.nuohailifescience.com