

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



增强型组织透明化 试剂盒

使用说明书

CAT#: NH-CR-230701



▶ 产品简介:

该试剂盒采用有机溶剂进行去脂, 亲水型匹配溶液进行高折射率匹配。可以在快速透明组织器官的同时, 保护内源性荧光蛋白; 该试剂盒兼具疏水性透明化方法快速透明组织器官, 以及亲水性透明化方法的高生物安全性和高内源荧光蛋白保留的特性。该方法适用于各类软组织的透明化, 结合脱钙试剂处理亦可对骨骼等硬组织进行透明化, 同时兼容内源荧光蛋白及荧光染色标记。

▶ 试剂盒内容: (生产日期及批次详见试剂盒外包装)

名称	L	S
Solution A	160 ml x 3	60 ml x 2
Solution B	240 ml	60 ml
成像液	100 ml	100 ml
琼脂糖	4 g	1 g
30 ml 离心管	8 个	2 个

备注: 琼脂糖用于包被透明后的样品以便组织整体成像时进行上样, 若透明后采用共聚焦显微镜进行成像, 则可不进行包被。

▶ 自备物品:

4%多聚甲醛 (PFA)、0.01M PBS、50 ml离心管、蠕动泵、手术器械等用于实验动物灌注取材; 恒温水平摇床、底透台 (诺海: Cat#NH-210901) 等用于透明化实验及透明程度判断; 封闭液、抗体、核染料、Triton X-100、低温冰箱等用于样本标记; 模具和磁性冲孔板用于样品包埋 (诺海: Cat#NH-230420-MM)。

▶ 使用限制:

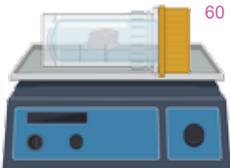
本产品属科研专用, 不用于诊断、治疗; 该试剂盒仅提供组织透明化所需试剂, 不提供组织标记等所需物品及试剂。



▶ 简易流程:

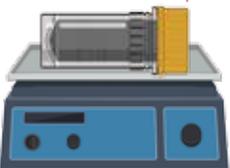
a. 去脂: 30 ml离心管中加入20 ml去脂 Solution A和待透明组织器官, 4 °C 摇床中缓慢震荡。

1~4 days
4 or 37 °C
60 rpm



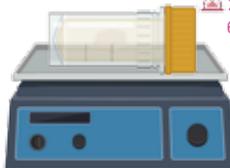
b. 免疫染色: (可选)
不同抗体的染色条件需自行摸索。

~4 days
4 or 37 °C
60 rpm



c. 折射率匹配: 洗涤后将组织样本转移至 Solution B, 室温或 37°C摇床上缓慢摇动进行折射率匹配, 2 d 可完成匹配。

~2 days
25 or 37°C
60 rpm



d. 凝胶包埋:
选择合适的模具及冲孔板

模具中加入2 mm深37 °C凝胶溶液并放入冲孔板, 使其沉到模具底部并于冰上冷却约30 min, 使模具中的凝胶溶液处于半凝固状态。

将折射率匹配后的样品放入模具中, 然后加入37 °C凝胶溶液与样品齐平, 冰上凝固2 h, 加入凝胶溶液与模具齐平, 盖上盖玻片并于冰上加速固化约2 h。包埋后的样品可用于后期光片显微镜成像。

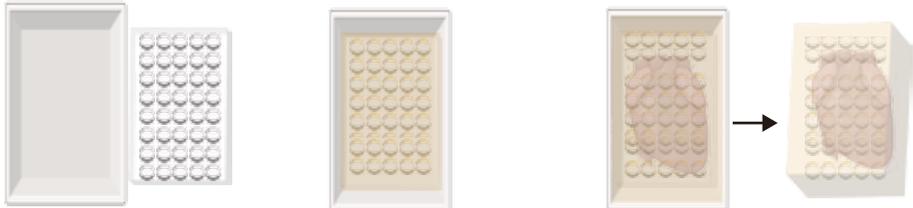


图1. 组织透明化及包埋步骤

▶ 操作步骤:

本产品含有机试剂,实验前请正确佩戴口罩和手套及相应防护用品,避免沾染皮肤、眼睛及衣物,防止口鼻吸入。实验过程中所产生的废弃物请按照实验室安全管理条例处理。

固定后的样品经过脱色(可选)、脱钙(可选)、去脂、折射率匹配后可达到透明状态。采用光片显微镜进行成像,建议凝胶包埋后在配套的成像液中进行;若采用诺海LS18平铺光片显微镜进行成像,建议样品包埋时加入磁性冲孔板(诺海:Cat#NH-230420-M2)方便后期上样。

实验废弃物按照实验室安全处理。详细步骤以成年小鼠(2月龄)器官为例:

1.取材及后固定(1 d)

2%戊巴比妥钠腹腔注射深度麻醉成年小鼠(2月龄),通过蠕动泵进行心脏灌注,首先以10 ml/min速度灌注常温0.01M PBS至小鼠血液完全清除(肝脏完全变白为参考标准),之后灌注预冷的4% PFA至肝脏变硬。灌注4% PFA期间可观察到小鼠尾巴翘起,肌肉抽搐等。灌注完成后解剖出目标组织器官置于50 ml离心管中,加入4% PFA于4 °C摇床上缓慢摇动进行后固定。

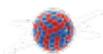
4% PFA的体积应不小于样本体积的20倍,后固定过夜。随即去除4% PFA,即使用0.01M PBS室温清洗组织3次,每次清洗2 h,清洗过程在室温摇床上进行(转速不可过快,以防损伤样品),以彻底去除残留PFA。

2.脱色(可选)

若组织为心脏、肾脏、脾脏等富含色素的组织可先进行脱色。将组织置于10倍体积的脱色液(诺海: Cat#NH-230701-Dep)中,于37 °C摇床内60 rpm的转速缓慢摇动脱色24 h,可根据样本色素残留状态适当减少或延长脱色时间。无需洗涤可直接进行下一步。

3.脱钙(可选)

若组织含有骨骼,可选用组织透明化专用脱钙液(诺海: Cat#NH-230701-Dec)进行脱钙。如:小鼠颅骨可置于50 ml离心管中加满脱钙液,室温摇床脱钙1周,具体时间以骨骼变软



为标准。脱钙后的组织使用0.01M PBS于摇床上室温清洗三次，每次清洗2 h，以彻底去除残留脱钙液。

4.去脂 (1~4 d)

Solution A有刺激性气味，请于通风橱中换取该试剂！

将洗涤后的组织转移至30 ml离心管中，加入20 ml Solution A，若组织有内源性荧光，建议水平放置于4 °C摇床内，以60 rpm的转速缓慢摇动去脂。若组织无内源荧光，可在37 °C摇床上进行缓慢摇动去脂，转速为60 rpm。一般成年小鼠内脏及神经组织24 h可完成去脂，老年动物组织可延长Solution A的孵育时间，可48 h后更换新鲜的Solution A。胚胎及新生动物组织建议采用胚胎透明化试剂盒进行透明（诺海：Cat#NH-CR-230601）。

去脂完成后，弃去Solution A，用0.01M PBS室温洗涤组织三次，每次洗涤2 h，最后一次洗涤可过夜，以彻底清除去脂溶液，清洗过程在摇床上进行。

***注意：**若溶液浑浊可更换Solution A，一般常见样本1 d可完成去脂；建议致密组织、硬组织和老年生物样本适当增加Solution A体积或延长去脂时间。

5.细胞核染色 (可选参考步骤)

将细胞核染料按以下比例稀释到4 ml 0.2% PBST (Triton X-100) 中，浸入样品后，摇床缓慢摇动室温孵育5~7 d。染色完成后0.01M PBS洗涤三次，每次清洗2 h。

染料名称	品牌	货号	稀释比例
SYTO-Green	Thermo Fisher Scientific	#S7020	1:2500
BOBO-1	Thermo Fisher Scientific	#B3582	1:400
RedDot2	Biotium	#40061	1:150

6.免疫染色 (可选参考步骤)

洗涤后的样品封闭1.5 h后进行一抗孵育。采用封闭液进行稀释一抗，样品需要完全浸入一抗稀释液中，4 °C或37 °C孵育4~14 d，由于具体孵育时长受抗体类型及样本大小等因素影响，因此需自行摸索。一抗孵育结束后0.01M PBS洗涤组织3次，每次清洗2 h。随即进行二抗孵育，二抗同样采用封闭液进行稀释，孵育时长及温度同样需要摸索，一般可4 °C或37 °C孵



育 4~7 d (封闭液: 0.01M PBS, 0.1% Triton X-100, 2% BSA, 0.05% sodiumazide)。
免疫标记后的样本采用 0.01M PBS 配制的 10% (v/v) Triton X-100 室温清洗 15 min, 以去除
样品表面非特异结合抗体, 之后用 0.01M PBS 室温清洗 3 次, 每次清洗 2 h, 注意避光。

7. 折射率匹配 (2 d)

将去脂完成或免疫染色后的样本置于 15 ml Solution B 中, 于 25 °C 摇床上以 60 rpm
的速度进行折射率匹配, 直至样品完全透明。成年小鼠组织一般 2 d 即可完成折射率匹配。

匹配完成标准: 将盛有组织样品的培养皿于底透台 (诺海: Cat#NH-210901) 的刻度
线 (或任意图案) 上, 保证 Solution B 没过样品, 若透过样品可观察到黑色刻度线清晰且无
扭曲, 则表明样品去脂成功且匹配完成 (如图 2)。

***注意:** Solution B 低温会出现结晶, 可于 37°C 摇床溶解; 若样品还未完全透明, 可
重新用 0.01M PBS 洗涤 3 次, 每次洗涤 2 h 后再次进行去脂步骤。

8. 凝胶溶液配制 (约 1 h)

凝胶溶液为 Solution B 配制的 2% 琼脂糖溶液。配制过程如下: 取 19.6 g Solution B 于
50 ml 离心管中, 加入 0.4 g 琼脂糖, 涡旋混匀后微波加热, 沸腾后立刻关闭微波炉, 随即
将溶液转移至 37 °C~45 °C 培养箱或烘箱中静置, 待琼脂糖溶解并消泡。配制好的凝胶溶液为淡
黄澄清液体。

***注意:** 凝胶溶液可在 37 °C 保存 1~2 周, 凝胶溶液颜色会随时间增加变深, 变成深
黄色或棕色后不建议使用, 建议现用现配。

9. 凝胶包埋 (约 5 h, 可选步骤)

采用三明治夹心法包埋透明后的样本。先在合适大小的模具孔位中加入 2 mm 深 37 °C 凝
胶溶液, 若采用诺海 LS18 光片显微镜成像, 建议先放入冲孔板并使其沉到模具底部并排除
气泡, 于冰上冷却约 30 min, 使其处于半凝固状态。之后将折射率匹配成功后的样品放入模
具中, 继续加入 37 °C 凝胶溶液与样品高度齐平或略低于样品顶部, 调整样品于模具中间位置



后,再次将模具放入 4 °C 冰箱或冰上约 2 h。最后加入凝胶溶液与模具表面齐平,盖上盖玻片,并于 4 °C 冰箱或冰上加速固化,约需 2 h。包埋后的样品可于配套成像液中室温避光保存,建议尽快成像。

***注意:** 包埋后的样品可于 4 °C 冰箱中过夜保存,若凝胶出现结晶,可于室温放至结晶消失;若样品包埋后凝胶中仍有细小气泡,可将凝胶样品于 37 °C 摇床中缓慢震荡去除气泡,建议尽快成像。

10. 光片显微镜整体成像 (可选步骤)

成像前去除盖玻片,并将凝胶样品从硅胶模具中取出。成像样品仓中填充配套的成像液作为成像介质,以保证成像质量。包埋有冲孔板的样品块儿可直接磁吸到诺海 LS18 光片显微镜的样品架上,调整样品位置使其与激发光垂直。悬吊式上样的光片显微镜在凝胶包埋时不需要放入冲孔板,需在后期上样时根据相应仪器要求进行上样。

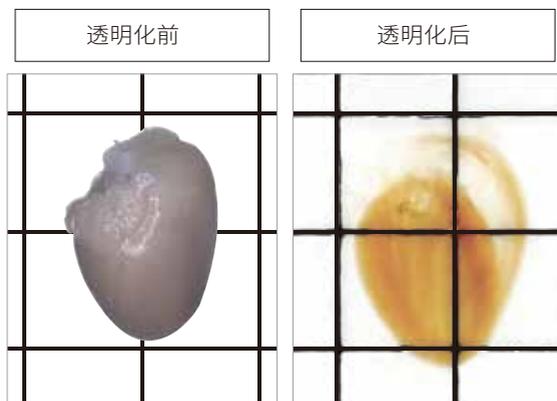
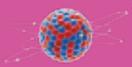


图2:心脏透明前后对比图



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