

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



组织膨胀试剂盒 使用说明书

Cat: NH-ER-230315

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。该方法通过去脂溶液去除组织内部的脂类,使组织疏松,以便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:采用诺海平铺光片显微镜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可获得百纳米级分辨率。

试剂盒内容:

名称	8T	4T	2T
溶液A	450ml	225 ml	112.5 ml
溶液B	50ml	25 ml	12.5 ml
溶液C	100ml	50 ml	25 ml
溶液D	3ml	1.5 ml	0.75 ml
30ml离心管	8个	4个	2个
UV灯	1个	1个	1个

注意 | 溶液A和B 室温保存, 溶液C和D 于4 °C或-20 °C避光保存。

自备物品:

4%多聚甲醛 (PFA)、0.01M PBS、50 ml离心管、蠕动泵、冰盒、手术器械等用于实验动物灌注取材; 底透台 (诺海: Cat#NH-210901) 等用于透明程度判断; 封闭液、抗体、细胞核染料、Triton X-100、1%甲醛 (FA) 溶液等用于样本标记。

简易流程:

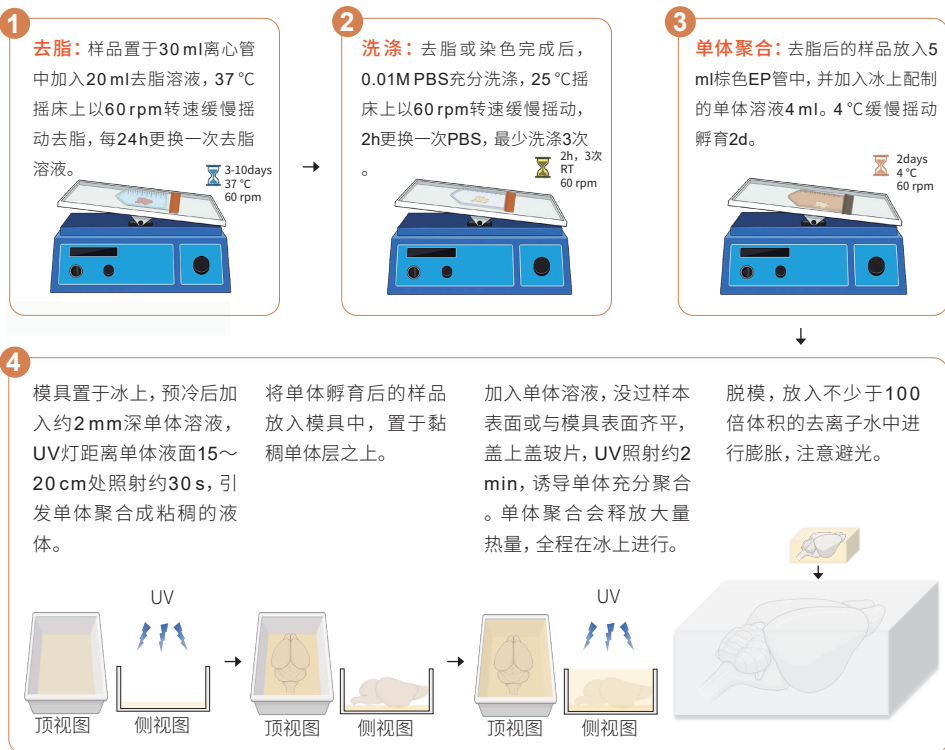


图1. 小鼠脑膨胀样品制备流程

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。

实验步骤：

灌流固定后的样品经过去脂后变得疏松透明，单体浸泡后通过UV诱导单体聚合，充分吸水后样品可膨大约4倍。膨胀过程稳定后进行成像。**详细步骤以小鼠脑为例（如图1）：**

1.取材及后固定（1 d）

2%戊巴比妥钠腹腔注射，深度麻醉小鼠（2月龄），并通过蠕动泵进行心脏灌注首先以~10ml/min的速度灌注常温0.01M PBS至血液完全清除（肝脏变白为参考标准），之后灌注预冷的4% PFA约50 ml至肝脏变硬。灌注PFA期间可观察到小鼠尾巴翘起，肌肉抽搐等现象。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摇床上缓慢摇动过夜进行后固定。4% PFA的体积不小于样本体积的20倍。第二天去除4% PFA并用0.01M PBS清洗组织三次，每次2 h，清洗过程在室温摇床上进行，以彻底去除残留PFA。清洗过程注意控制转速不可过快，以防损伤样品，建议采用60 rpm的转速。

注意

PFA残留会减慢去脂速度，必要时可增加PBS清洗次数。

2.去脂溶液配制（2 min）

去脂溶液由溶液A和溶液B以质量比9:1进行配制，配制完后可在室温保存2个月。对本样进行去脂时，建议去脂溶液体积为样品体积的20倍以上。

3.去脂（3-10 d）

将清洗后的组织置于30 ml离心管中并加入20 ml去脂溶液，并置于37 °C摇床内以，60 rpm的转速去脂。小鼠脑、脊髓、肺和脾脏等可每天更换一次新鲜的去脂溶液，一般3~5 d可



完成去脂；小鼠肝、肾脏和心脏等致密组织建议 2 ~ 3 d 更换一次新鲜的去脂溶液，10 ~ 14 d 可完成去脂。

去脂完成的标准：将盛有样品的培养皿放在底透台（诺海，Cat#: NH210901）的刻度线（或任意图案）上，透过样品观察黑色刻度线清晰且无扭曲，则表明去脂过程已完成，可进行下一步。

注意

较小的或幼年动物的组织可适当减少溶液用量或缩短去脂时间，更大体积的样本或者老年生物样本可以适当增加溶液用量或延长去脂时间，直至样品透明即可。

4. 免疫染色 (可选)

弃去离心管中的去脂溶液，使用 0.01M PBS 清洗组织 3 次，每次 2 h，清洗过程在室温摇床上进行，最后一次洗涤可过夜，以彻底清除去脂溶液，之后采用常规免疫染色步骤进行染色。染色后的样本先用 0.01M PBS 配制的 10% (v/v) Triton X-100 室温清洗 15 min，之后用 0.01M PBS 室温清洗 1 h，注意避光。随后将免疫标记后的样本于 1% FA 或 PFA (0.01M PBS 配制) 中室温固定 24 h，固定过程中缓慢摇动。固定完成后使用 0.01M PBS 室温缓慢摇动清洗 3 次，每次 1 h。

5. 单体配制 (2 min)

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。如将溶液 C 和 D 从 4 °C 或 -20 °C 冰箱中取出完全溶解后插入冰（湿冰）中预冷，并取 5 ml 棕色离心管插入冰中预冷。移液器吸取预冷后的 4 ml 溶液 C 和 100 μl 溶液 D 加入 5 ml 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。

6. 单体浸泡 (2 d)



去脂后或染色后的样品经0.01M PBS充分洗涤（不少于3次，每次2 h，室温摇床缓慢摇动），彻底去除去脂溶液或游离抗体。之后将样品浸没入装有凝胶单体溶液的棕色EP管中，并于4 °C摇床上缓慢摇动2 d，使单体溶液充分进入样品内。单体浸泡时间可根据样本大小灵活调整，小样品可缩短，大样品可延长，以样品充分进入样品内部并均匀分布为准，建议进行预实验，摸索最佳浸泡时长。

注意

单体溶液由溶液C和溶液D以40:1的比例在冰上进行配置，尽量现用现配。配制好的单体溶液可在4 °C冰箱避光保存2周左右。

7. 单体聚合与包被 (20 min)

a) 将凝胶模具置于冰面上，并加入适量的单体溶液覆盖模具底部~2 mm深度。使用紫外光（试剂盒配套UV灯）在模具正上方距离15~20 cm处照射模具内单体溶液约30 s，诱发凝胶单体分子发生聚合反应，形成粘稠但不完全凝固的凝胶层。

b) 将上述步骤6中单体浸泡后的小鼠脑平整放置于模具中半凝固的凝胶层上，加入足量的单体溶液直至没过样品并充满整个模具。若加液过程不小心产生气泡，静置或用移液器去除即可。

c) （可选）盖玻片覆盖模具上表面，并保证盖玻片与模具中的单体溶液间没有气泡。

d) 使用UV灯在距离盖玻片15~20 cm处持续或间断重复照射模具中的样品和单体溶液，照射时长约2 min，诱发凝胶单体分子发生聚合反应，完成单体聚合和包埋过程。**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。其次单体聚合过程温度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。

8. 膨胀(2 d)

将完成凝胶包埋的小鼠脑从模具中剥离, 并放入盛有足量的去离子水的容器中(注意: 去离子水不少于500 ml且始终保持没过样品)。凝胶后的小鼠脑吸水膨胀。期间每24 h更换一次新鲜的去离子水, 直至小鼠脑充分膨胀。该过程约需48 h。

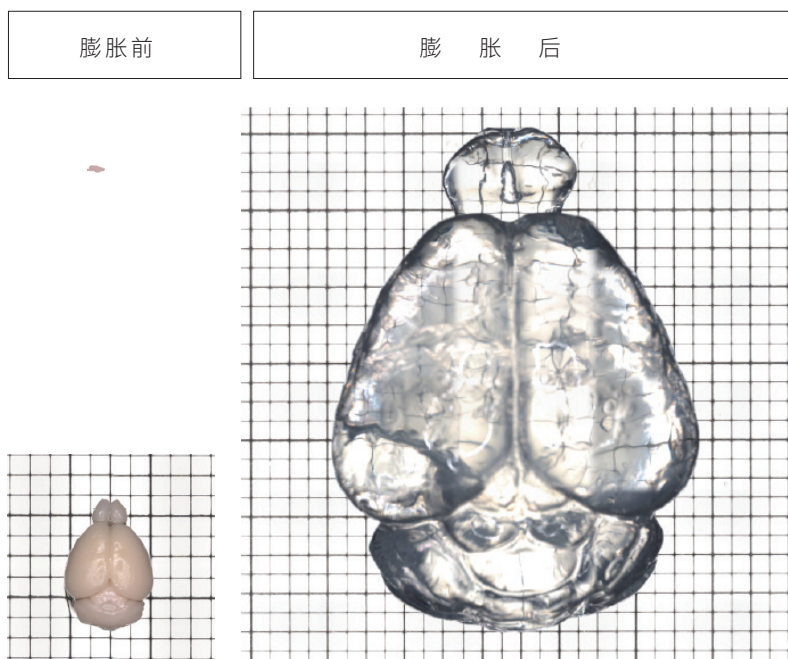
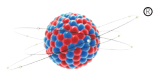


图2. 小鼠脑透明膨胀前后对比图



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