



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



亲水型组织透明试剂盒 使用说明书

Cat #NH-CR-210701

产品简介:

该试剂盒提供一种可快速、高效透明厘米量级组织样品的亲水型透明化方法。该方法主要是通过水化作用增加细胞膜流动性,结合去垢剂对细胞膜的通透作用实现对样品进行去脂的目的,之后通过高折射率匹配使样品透明。该方法适用于各种生物组织的透明化处理。在样品去脂和折射率匹配后均可进行成像。该试剂盒同样适用于组织切片的透明以及共聚焦显微镜的成像。用于组织切片透明时可减少试剂用量详细方法详见诺海: Cat#NH-CR-210701-50S。



快速、高效

完整成年小鼠脑透明需要5~7d



高荧光保留

内源荧光蛋白保留效果好



多场景适用

可进行大样品及组织切片透明,同时适用于光片显微镜、宽场显微镜、共聚焦显微镜等的成像过程



高生物安全性

具有较高的生物安全性

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	225 ml x 2	112.5 ml
Solution B	50 ml	12.5 ml
Solution C	250 ml x 2	125 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、50ml 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)。

简易流程:

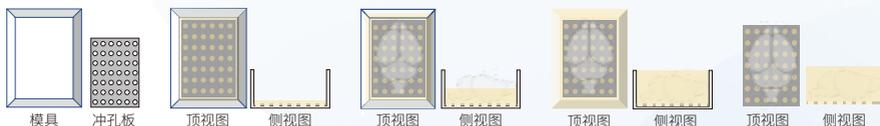
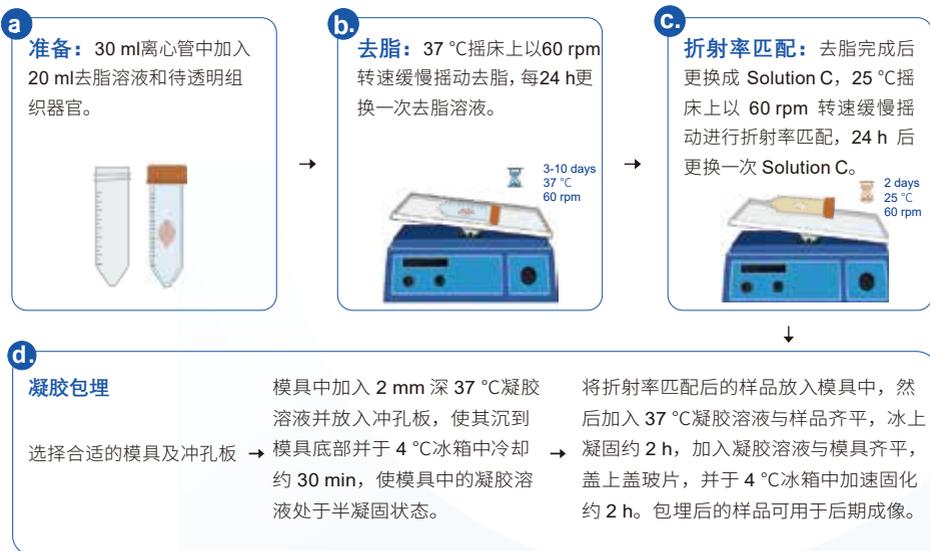


图1: 组织透明及包埋步骤



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。

操作步骤:

固定后的组织样品经脱色(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,建议将组织样品凝胶包埋后于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,建议在组织样品凝胶包埋时,先加入磁性冲孔板(诺海: Cat#NH-230420-M2),方便后期上样。采用共聚焦显微镜进行成像可在样品去脂(成像时将样品浸入去脂溶液中)或折射率匹配后(成像时将样品浸入折射率匹配溶液中)进行,请根据样品情况灵活选择。

详细步骤以成年小鼠器官为例(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 至血液完全清除(肝脏完全变白为标准),随后灌注约 50 ml 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 的体积不小于样本体积的 20 倍。后固定过夜,第二天去除 PFA 后,使用 0.01M PBS 室温清洗组织 3 次,每次 2 h,清洗过程在摇床上进行(注:转速不可过快,以防损伤样品),以彻底去除残留 PFA。

2. 脂溶液配制 (2 min)

Solution A 和 Solution B 以质量比 9:1 配制去脂溶液,配置后的去脂溶液可在室温保存 2 个月。建议去脂溶液体积为样品体积的 20 倍以上。



3.去脂 (3~10 d)

将洗涤后的组织置于 30 ml 离心管，并加入 20 ml 去脂溶液，水平放置于 37°C 摇床内，以 60 rpm 的转速缓慢摇动去脂。小鼠脑、脊髓、肺和脾脏等组织可每天更换一次新鲜的去脂溶液，一般 3~5 d 可完成去脂；小鼠肝脏、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。

去脂完成标准：将盛有样品的离心管放在底透台（诺海：Cat#NH-210901）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（如图 2）。

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 (可选步骤)

去脂完成后，弃去离心管中的去脂溶液，用 PBS 洗涤组织 3 次，每次 2 h，清洗过程在 4 °C 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。染色后的样本先使用含 10%(v/v) Triton X-100 的 PBST 室温清洗 15 min，之后用 PBS 室温洗涤组织 3 次，每次 2 h，注意避光。免疫标记后的样本可选择进行 PFA 固定，加固抗原抗体间的结合，但是 PFA 加固可能影响内源荧光蛋白信号，需谨慎选择。PFA 加固步骤：将免疫标记后的样本于 1% PFA 中 4 °C 缓慢摇动固定 24 h。固定完成后再次用 PBS 洗涤组织 3 次，每次 2 h。

5.折射率匹配 (2 d)

将去脂或免疫染色后的样本置于 20 ml Solution C 中，于 25 °C 摇床上以小于 60 rpm 的速度进行折射率匹配，24 h 更换一次 Solution C。成年小鼠组织器官一般 2 d 即可完成折射率匹配。

匹配完成标准：将盛有样品的培养皿放在底透台的刻度线上，保证样品没入 Solution C 中，透过样品观察黑色刻度线清晰且无扭曲（如图 2）。

6. 凝胶溶液配制 (约1 h, 可选步骤)

凝胶溶液为Solution C配制的2%琼脂糖溶液。配制过程如下: 称取19.6 g Solution C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, 随即将离心管转移至37~45 °C培养箱或烘箱中静置, 待琼脂糖缓慢溶解并消泡。配制好的凝胶溶液为淡黄色澄清液体。

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。

7. 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中加入约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4 °C冰箱或冰上冷却约30 min, 使模具中的凝胶溶液处于半凝固状态。之后将折射率匹配后的样品放入模具中, 加入凝胶溶液与样品高度齐平或略低于样品顶部, 调整样品的位置于模具中间后, 再次将模具放入冰箱或冰上约2 h。最后加入37 °C凝胶溶液与模具表面齐平, 盖上盖玻片, 于4 °C冰箱或冰上固化, 约需2 h。

注意:包埋过程中, 确保凝胶溶液以及样品无气泡残留; 包埋后的样品可于4 °C冰箱中过夜保存, 若样品包埋凝固后仍有细小气泡, 可将凝胶样品放入成像液中, 于室温或37 °C摇床中缓慢震荡, 消除气泡, 建议尽快成像。

8. 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。

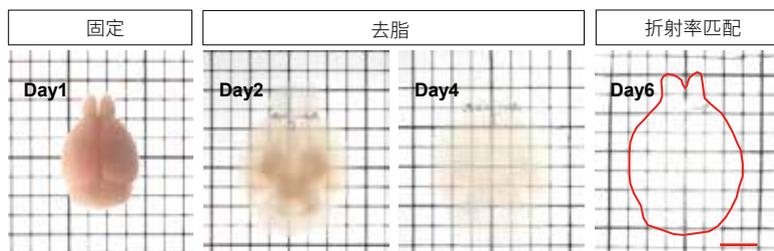


图2: 小鼠脑透明流程图

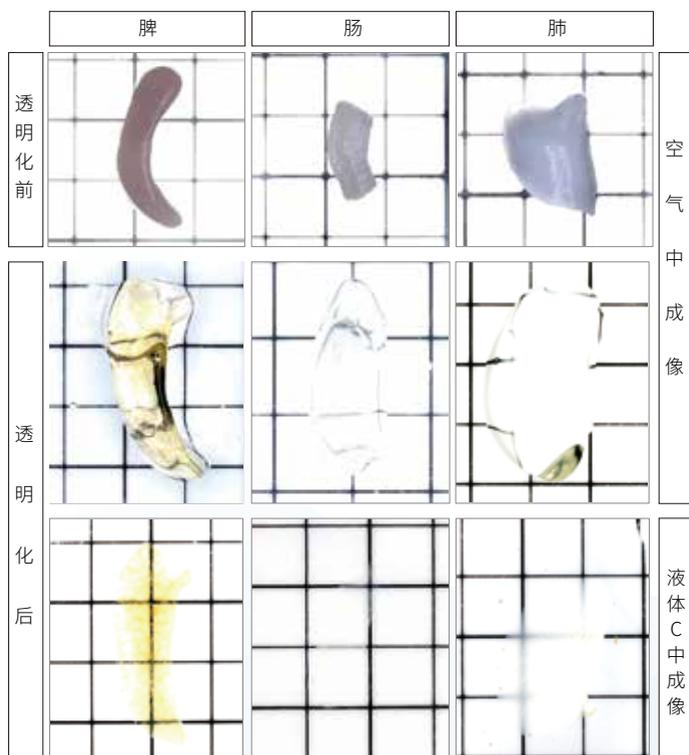


图3: 不同组织器官透明前后对比图



° 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