

For Tissue Optical Clearing Reagent SCALEVIEW-S Trial Kit

[Introduction]

Dr. Atsushi Miyawaki et al. developed a sorbitol-based optical clearing method, *Scale S*.

SCALEVIEW-S is a high-performance clearing method that blessed with effective clearing and tissue/signal preservation. It is also noteworthy that this method is able to preserve highly fluorescence signal of fluorescent proteins and ultrastructure of cell membranes.

SCALEVIEW-S is a simple and reproducible method of accurate visualization of biological tissue.

[Kit contents]

This kit includes 6 components.

- | | |
|-------------------|-------------------|
| (1) SCALEVIEW-S0 | 100 ml × 1 bottle |
| (2) SCALEVIEW-S1 | 100 ml × 1 bottle |
| (3) SCALEVIEW-S2 | 100 ml × 1 bottle |
| (4) SCALEVIEW-S3 | 100 ml × 1 bottle |
| (5) SCALEVIEW-S4 | 100 ml × 1 bottle |
| (6) SCALEVIEW-SMt | 100 ml × 1 bottle |

Note : This kit needs an optional deScale solution (Code No. 041-34425).

[Storage]

Store in the dark at 2-10°C

[Additional required materials]

Reagents

- 1) Paraformaldehyde (Code No. 160-16061)
- 2) 1 × PBS (-) (Code No. 164-25511)
- 3) Agarose
- 4) deScale Solution (Code No. 041-34425)

Equipments :

- 1) 5 ml/15 ml/30 ml/50 ml conical centrifuge tube
- 2) Culture dish (100 mm, 60 mm, and 35 mm diameter) (for each sample)
- 3) Seesaw shaker
- 4) Fluorescence microscope and Recommend Objective lenses for SCALEVIEW-S treated samples.
 1. Multiphoton microscope OLYMPUS, model : FVMPE-RS
 - Multiphoton dedicated objectives :
 - OLYMPUS, model : XLPLN10XSVM : 10x, NA=0.6, WD=8 mm
 - OLYMPUS, model : XLSLPLN25XGMP : 25x, NA=1.0, WD=8 mm
 - 2. Confocal microscope : OLYMPUS, model : FV3000
 - Objectives :
 - OLYMPUS, model : UPLSAP010X2 : 10x, NA=0.4, WD=3.1 mm
 - OLYMPUS, model : UCFLFLN20X : 20x, NA=0.7, WD=0.8-1.8 mm

[Procedure]

(Fixation)

A case for making mouse brain transparent according to reference (1).

- 1) Transcardially perfuse an anesthetized mouse with 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS (pH 7.6 ~ 7.8).
- 2) Remove the whole brain and subject it to post-fixation in 4% PFA/PBS at 4°C for 72 hrs.
- 3) Wash the samples in PBS.
- 4) Prepare vibratome sections (optional, 0.2-3 mm thick)

(Clearing) (1-2 mm brain samples)

- 5) Transfer the sample into 5 ml of SCALEVIEW-S0 solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 35-40°C for 30 min.
- 6) Transfer the sample into 5 ml of SCALEVIEW-S1 solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 35-40°C for 30 min.
- 7) Transfer the sample into 5 ml of SCALEVIEW-S2 solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 35-40°C for 30 min.
- 8) Transfer the sample into 5 ml of SCALEVIEW-S3 solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 35-40°C for 30 min.
- 9) Transfer the sample into 5 ml of deScale Solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 4°C for 3 hours × 2 times.
- 10) Transfer the sample into 5 ml of SCALEVIEW-S4 solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 35-40°C for 12-24 hours.
- 11) The transparency can be evaluated by eye at this stage. If the sample is successfully cleared, the brain sample should look amber under a light source.
- 12) Transfer the sample into 5 ml of SCALEVIEW-SMt solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 35-40°C for 1 hour.

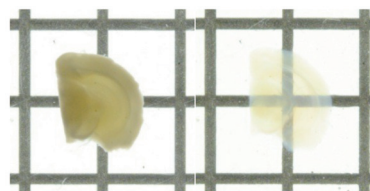


Figure 1. Transmittance images of 1mm brain slice before and after clearing with SCALEVIEW-S.

(Imaging)

- 13) Mount onto an imaging chamber. Use appropriate amount of SCALEVIEW-SMt solution to mount the sample. Observe the SCALEVIEW-S cleared samples using fluorescence microscopy.

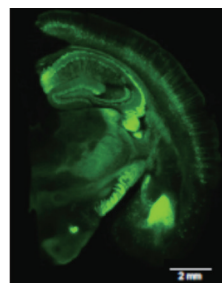


Figure 2. Confocal imaging of adult hemisphere brain (Thy1-YFP-H mouse).

Note :

- For thicker brain slices (>2 mm) or hemisphere mouse brain whole mouse brain, incubation time in each step can become longer and SCALEVIEW-S solutions in each step can increase amount (e.g., hemisphere brain 25 ml, whole brain 40 ml each).
- SCALEVIEW-SMt mounted samples will not be solidified. If necessary for each sample, 1.5-3.0% melting agarose can be added to minimize movement artifacts during imaging.

[References]

- 1) Hama, H. et al. : *Protocol Exchange* (2016).
- 2) Hama, H. et al. : *Nat Neurosci*, **18**, 1518 (2015).

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-311-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 299-79901

**組織透明化用
SCALEVIEW-S Trial Kit**

【はじめに】

Scale S は宮脇敦史博士らにより開発されたソルビトールを主体とした組織透明化試薬です。SCALEVIEW-S Trial Kit は、Scale S の技術に基づいた製品になります。

SCALEVIEW-S は透明化能力を向上させ、さらには構造やシグナルを適切に保持・維持する能力を併せ持つ特長を有します。さらには、組織内に発現する蛍光タンパク質の蛍光は明るく保持することができ、細胞膜などの微細構造も形態維持することが可能です。

SCALEVIEW-S は透明化工程操作が簡便であり、組織中の標識された構造物を再現よく定量的に観察可能な透明化方法になります。

【キット内容】

本キットは6つの構成部材からなります。

- | | |
|-------------------|-------------|
| (1) SCALEVIEW-S0 | 100ml × 1 本 |
| (2) SCALEVIEW-S1 | 100ml × 1 本 |
| (3) SCALEVIEW-S2 | 100ml × 1 本 |
| (4) SCALEVIEW-S3 | 100ml × 1 本 |
| (5) SCALEVIEW-S4 | 100ml × 1 本 |
| (6) SCALEVIEW-SMt | 100ml × 1 本 |

deScale Solution (コード No. 041-34425) が別途必要になります。

【保存条件】

2-10℃・遮光保存

【キット以外に準備するもの】

試薬：

- 1) パラホルムアルデヒド (コード No. 160-16061)
- 2) 1 × PBS (コード No. 164-25511)
- 3) アガロース
- 4) deScale Solution (コード No. 041-34425)

器具：

- 1) 5ml/15ml/30ml/50ml コニカルチューブ (サンプルに合わせて使用)
- 2) プラスチックペトリディッシュ (100mm、60mm 径若しくは 35mm 径) (サンプルに合わせて使用)
- 3) シーソーシェーカー
- 4) SCALEVIEW-S 透明化標本向け蛍光顕微鏡と推奨対物レンズ
 1. 2 光子励起顕微鏡 (オリンパス社製 FVMPE-RS など)
 - 推奨多光子対物レンズ：オリンパス社製 多光子専用対物レンズ
 - OLYMPUS, model : XLPLN10XSVMP : 10x, NA=0.6, WD=8mm
 - OLYMPUS, model : XLSLPLN25XGMP : 25x, NA=1.0, WD=8mm
 2. 共焦点顕微鏡 (オリンパス社製 FV3000 など)
 - 使用可能対物レンズ：オリンパス社製
 - OLYMPUS, model : UPLSAP010X2 : 10x, NA=0.4, WD=3.1mm
 - OLYMPUS, model : UCPLFLN20X : 20x, NA=0.7, WD=0.8-1.8mm

【操作方法】

以下の内容は、参考文献1)におけるマウス脳透明化実験の概略です。
(固定)

- 1) マウスを4% paraformaldehyde (PFA)/PBS (pH 7.6~7.8)で灌流固定する。
- 2) 脳を取り出した後、4%PFA/PBSで固定(4℃、72hrs)する。
- 3) PBSで洗浄する。
- 4) ピプラトームを用いてスライスを作成する(必要に応じて0.2-3mm厚等)

(脳スライスサンプル(1-2mm)の透明化例)

- 5) 5mlのSCALEVIEW-S0が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で35-40℃、30分間振とうする。
- 6) 5mlのSCALEVIEW-S1が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で35-40℃、30分間振とうする。
- 7) 5mlのSCALEVIEW-S2が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で35-40℃、30分間振とうする。
- 8) 5mlのSCALEVIEW-S3が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で35-40℃、30分間振とうする。
- 9) 5mlのdeScale Solutionが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で4℃、3時間×2回振とうする。
- 10) 5mlのSCALEVIEW-S4が入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で35-40℃、12-24時間振とうする。
- 11) この時点で、組織が適度に透明化されていることを確認する。
- 12) 5mlのSCALEVIEW-SMtが入ったチューブにサンプルを移し、シェーカー(10rpm)で35-40℃、1時間振とうする。

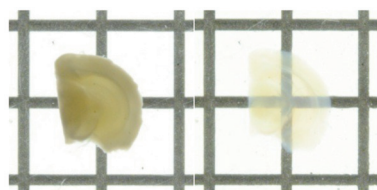


図1. 大人のマウス脳1mmスライス切片を用いてSCALEVIEW-S処理した例

(観察)

- 13) SCALEVIEW-S処理した脳サンプルをSCALEVIEW-SMtに浸した状態で共焦点レーザー顕微鏡若しくは2光子励起顕微鏡を用いて観察する。

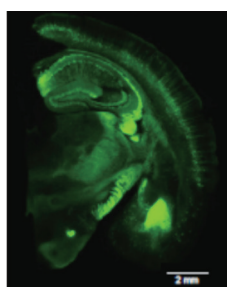


図2. 共焦点顕微鏡を用いて取得したThy1-YFP-Hマウス脳42週齢の蛍光画像

注意事項:

- 2mm以上の脳スライスや脳半球、全脳を透明化する場合にはそれぞれのステップの時間が長くなる可能性があります。また、各ステップの試薬使用量も増えます。(例:脳半球:25ml、全脳:40ml)。
- SCALEVIEW-SMtでマウントしたサンプルは固化しません。観察時、必要に応じて脳が動くことを防ぐために1.5-3.0%アガロースを用いて容器底面にサンプルを固定して下さい。

【参考文献】

- 1) Hama, H. et al.: *Protocol Exchange* (2016).
- 2) Hama, H. et al.: *Nat Neurosci*, **18**, 1518 (2015).
- 3) 濱裕、日置寛之、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史: *生体の科学*, **68** (1), 85 (2017).
- 4) 日置寛之、濱裕、孫在隣、黄晶媛、並木香奈、星田哲志、黒川裕、宮脇敦史: *日本薬理学雑誌*, **149** (4), 173 (2017).

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel: 06-6203-3741

2106KA2