

Code No. 031-25151 (50 mL)

For Plant Optical Clearing Reagent

ClearSee™**【Introduction】**

Dr. Daisuke Kurihara *et al.*¹⁾ developed the clearing solution, termed ClearSee™, to diminish chlorophyll autofluorescence while maintaining fluorescent protein stability and tissue structures of plant samples. ClearSee™ is applicable to multicolor deep imaging of various plant samples without sectioning.

【Features】

- Procedures are only 3 steps.
- Every fluorescence microscopes can be used.
- ClearSee™-treated samples can be store for long term (at least 6 months).
- The ClearSee™-treated samples can be observed for many times.

【Additional required materials】**Reagents :**

- 1) Ultra pure water
- 2) Paraformaldehyde (Code No.160-16061)
- 3) 2 mol/L Sodium Hydroxide Solution (Code No.194-05631)
- 4) 10 × PBS(-) (Code No. 163-25265)
- 5) 1 × PBS(-) (Code No. 164-25511)

(Equipment)

- 1) Autoclave
- 2) Draft chamber
- 3) Vacuum pump
- 4) Desiccator
- 5) Incubator for 60 °C
- 6) Fluorescence microscopes
- 7) Conical tubes (50 mL)
- 8) Microtubes (1.5 mL)
- 9) Parafilm
- 10) Needle
- 11) Forcep
- 12) Cover glass
- 13) Slide glass
- 14) Vaseline

【Procedures】**· Fixative solution**

1. Add 8 mL of sterilized water in a conical tube.
2. Add 0.4 g of paraformaldehyde (in the draft chamber).
3. After adding 50 μ L of 2 mol/L Sodium Hydroxide Solution, close and seal a tube with parafilm (in the draft chamber).
4. Incubate at 60 °C until clearing with occasionally inversion.
5. After dissolving and cooling, add 1 mL of 10 × PBS to adjust pH (in the draft chamber).
6. Adjust 10 mL by sterilized water (in the draft chamber). (Preparation freshly is better.)

(Fixation)

1. Put plant samples in a microtube and add 1.3 mL of fixative solution (in the draft chamber).

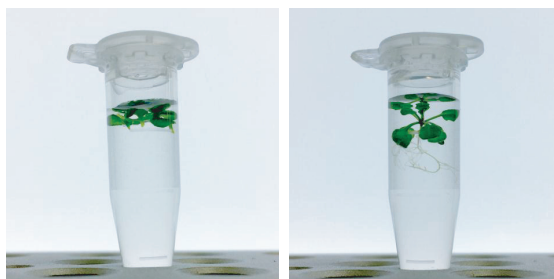


Fig.1 Arabidopsis leaves and seedling in fixative solution

< Notes >

The sample volume should not exceed 20% of the volume of fixative solution. If the sample volume is larger, prepare large centrifuge tube and increase fixative solution. Because the samples are floated, soak the samples into fixative solution as possible.

2. To prevent the escape of samples, seal the microtube with parafilm and open holes by a needle.

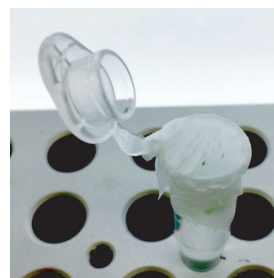


Fig.2 Open holes on the parafilm

- Put the samples in the desiccator and turn on the vacuum pump. After closing a desiccator and turn off the vacuum pump, fix for 30 minutes at room temperature.

< Notes >

Vacuum degree depends on plant species and tissue type (eg. -90 kPa for Arabidopsis). Strong vacuum induces the damage of the samples. Adjust vacuum degree to appear slowly bubbles from the samples.



Fig.3 Bubbles from the samples in a microtube

- Slowly open the desiccator and turn on again the vacuum pump. After closing a desiccator and turn off the vacuum pump, fix for 30 minutes at room temperature.

< Notes >

Take care to prevent the damage of samples by open the desiccator. Two times of vacuum treatment enhance the penetration of fixative solution into the samples. When fixative solution penetrates into the samples, the samples are soaked after brief centrifugation (Fig.4). If the samples are floated even after centrifugation, additional vacuum treatment are required.



Fig.4 Arabidopsis leaves and seedling after fixative treatment

(Wash)

- Slowly open the desiccator. After removing the fixative solution, add 1 mL of 1 × PBS and store for 1 minute (in the draft chamber).
- After removing 1 × PBS, add new 1 mL of 1 × PBS and store for 1 minute.

(Clearing)

- After removing 1 × PBS, add 1.3 mL of ClearSee™.
- Seal the microtube with parafilm and open holes by a needle. Put the samples in the desiccator and turn on the vacuum pump. After closing a desiccator and turn off the vacuum pump, store for 1 hour at room temperature.

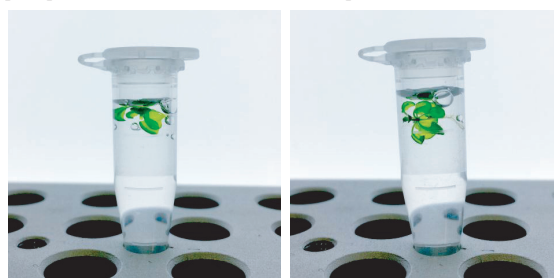


Fig.5 Arabidopsis leaves and seedling in ClearSee™ solution

- Slowly open the desiccator. After removing the parafilm and close the microtube, store at room temperature in the dark for clearing.

< Notes >

Invert the microtube every 1~2 days to diffuse the chlorophyll. Required incubation times depends on plant species and tissue type. For examples, the incubation times for clearing are 1~2 days for roots, 4~7 days for leaves and seedlings, 2 weeks for pistils, and 4 weeks for mature tissues.

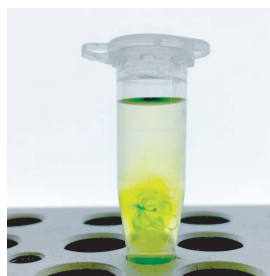


Fig.6 Chlorophyll are observed around the samples (1~2 days incubation)



Fig.7 Invert the tube



Fig.8 Substitute new ClearSee™

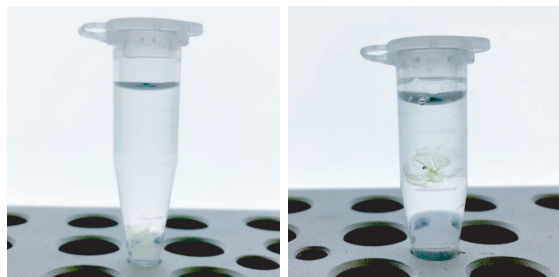


Fig.9 Cleared Arabidopsis leaves and seedling (3~5 days incubation)

(Observation)

10. Put vaseline on a slide glass.
11. Transfer the ClearSee™-treated samples into ClearSee™ on a slide glass.
12. Cover with a cover glass and seal with the cover glass with vaseline.
13. Observe the ClearSee™-treated samples under a fluorescence microscope.

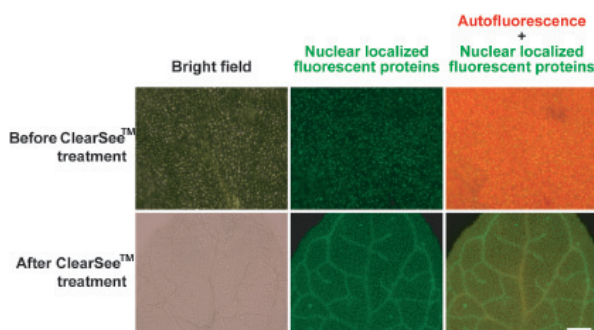


Fig.10 The ClearSee™-treated samples are cleared under a bright field. Autofluorescence of chlorophyll are diminished. The fluorescent proteins are detected even in the vascular bundles. Scale bar : 200 μ m.

< Notes >

Take care to prevent the damage of samples by transfer the samples. To prevent the evaporation of ClearSee™ by vaseline because of deposition. The samples can be stored into ClearSee™ in a microtube after observation.

【Points】

(Fixation)

Fixation step is important for clearing without the damage of samples. To investigate the fixation conditions of plant samples for the first time, observe the fluorescent proteins in the samples after fixation.

(Various plant species)

ClearSee™ is applicable to various plant species other than Arabidopsis. Fig.11 shows ClearSee™-treated leaves of torenia, petunia, tobacco, tomato, cucumber, and rice after 6-days incubation. In the case of rice, removal of cuticular wax are required for penetration of solution. Immerse the rice samples into organic solvents such as chloroform for 10~30 seconds and then fix with a fixative solution.

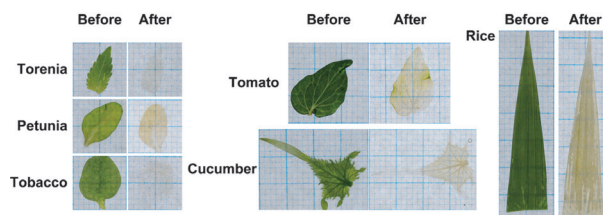


Fig.11 ClearSee™-treated leaves of various plant species (6-days incubation)

(Fluorescent dye staining)

ClearSee™ is compatible with staining by fluorescent dyes. Add Hoechst 33342 or DAPI to a final concentration of 10 μ g/mL for nuclear staining, or Calcofluor White to a final concentration of 1 mg/mL for cell wall staining for 1 hour. After washing with new ClearSee™ solution for 1 hour, observe the samples under a fluorescence microscope.

【Caution】

Waste each solution with compliance to regulations of institutions and governments.

【Storage】

Stored in the dark.

【Package】

50 mL

【Related Product】

Code No.	Description	Size
160-16061	Paraformaldehyde	100 g
194-05631	2 mol/L Sodium Hydroxide Solution	100 mL
163-25265	10 $\times$ PBS(-)	500 mL
164-25511	1 $\times$ PBS(-)	5 L

【Reference】

- 1) Kurihara, D. *et al.* : *Development*, **142**, 4168 (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://fwk.fujifilm.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 : + 49-2131-3111-0
 Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 031-25151 (50 mL)

植物透明化用 ClearSee™

【はじめに】

栗原大輔¹⁾らにより、蛍光タンパク質を壊すことなく、植物生体試料の組織構造を保持したままクロロフィルを取り除き、簡単に丸ごと透明化できる水溶液ClearSee™が開発されました。これまで植物組織の内部構造を観察するためには切片などを作製する必要がありましたが、ClearSee™により透明化した植物生体試料は、切片などを作製することなく、内部の構造を丸ごと蛍光顕微鏡観察できます。

【特 長】

- ・作業手順は固定・洗浄・透明化の3ステップ。
- ・一般的な蛍光顕微鏡からレーザー顕微鏡まで、幅広い蛍光顕微鏡で観察可能。
- ・透明化した試料は長期間（半年以上）保存可能。
- ・試料は何度も観察可能。

【準備する試薬・器具】

試 薬：

- 1) 超純水
- 2) パラホルムアルデヒド（コード No.160-16061）
- 3) 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液（コード No.194-05361）
- 4) 10 × PBS（コード No.163-25265）
- 5) 1 × PBS（コード No.164-25511）

器 具：

- 1) オートクレーブ
- 2) 局所排気装置（ドラフトチャンバーなど）
- 3) 真空ポンプ
- 4) デシケーター
- 5) 60℃恒温器
- 6) 蛍光顕微鏡
- 7) コニカルチューブ
- 8) マイクロチューブ
- 9) パラフィルム
- 10) 針
- 11) ピンセット
- 12) カバーガラス
- 13) スライドガラス
- 14) ワセリン・グリース

【操作方法】

・固定液作製

1. 15 mL 容コニカルチューブに滅菌水を 8 mL 加える。
 2. パラホルムアルデヒドを 0.4 g 加える（ドラフト内作業）。
 3. 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を数滴（50 μ L ほど）加え、フタを締めて、パラフィルムで密封する（ドラフト内作業）。
 4. 60℃恒温槽に入れ、透明になるまで保温する（適時転倒混和）。
 5. 溶解したら冷まし、10 × PBS を 1 mL 加える（ドラフト内作業）。
 6. 滅菌水を加えて全量 10 mL にメスアップする（ドラフト内作業）。
- （用時調製が望まれます。）

以下の操作は、シロイヌナズナの葉や幼植物を例に示します。

（固定）

1. 1.5 mL 容マイクロチューブに植物試料を入れ、固定液を 1.3 mL 加える（ドラフト内作業）。

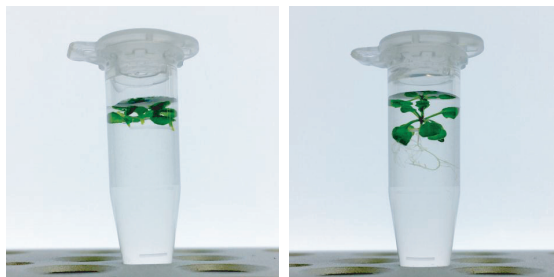


写真 1. 固定液に浸けたシロイヌナズナの葉・幼植物

<注意・ポイント>

処理できる植物試料は 1/5 体積が目安です。それ以上大きな植物試料の場合は、マイクロチューブのサイズ・溶液の量を増やしてください。植物生体試料は空気を含んでいるため、液面に浮きますので、固定液に植物試料ができるだけ浸かるようにしてください。

2. 減圧中に植物試料が飛び出るのを防ぐために、マイクロチューブのフタを開けたままパラフィルムで密封し、針で通気穴を数カ所開ける。

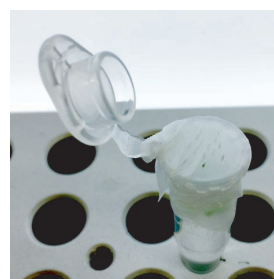


写真 2. 通気穴を開けたパラフィルムの様子

3. デシケーターに入れ、真空ポンプにより減圧する。デシケーターの栓を閉め、ポンプを停止して、室温で30分、静置し、固定する。

<注意・ポイント>

−90 kPa が目安ですが、植物試料によっては減圧が強すぎる場合があります。減圧が強すぎると、植物組織・細胞を破壊してしまいます。減圧を始めると、植物試料から空気が抜けるため、泡がでてきます。泡がゆっくりでる強さに減圧を調整してください。



写真3. マイクロチューブの中に泡が見える様子

4. 栓を少し開き、大気圧にゆっくり戻す。その後、再び真空ポンプにより減圧し、栓を閉め、ポンプを停止して、室温で30分、静置し、固定する。

<注意・ポイント>

急激に大気圧に戻すと、植物組織・細胞を破壊する原因となりますので、ゆっくり戻してください。2回減圧処理をすることにより、植物試料への固定液の浸透を促進します。下の写真は固定処理後の植物試料ですが、きちんと固定液が浸透していると、少し遠心すると固定液中に試料が沈みます。沈まない場合は固定液が浸透していない可能性がありますので、もう一度減圧処理を繰り返してください。



写真4. 固定処理後のシロイヌナズナの葉・幼植物

(洗浄)

5. 栓を少し開き、大気圧にゆっくり戻す。固定液を除き、1 × PBSを1 mL 加えて1分間静置する（ドラフト内作業）。
6. 1 × PBSを除き、新しい1 × PBSを1 mL 加えて1分間静置する。

(透明化)

7. 1 × PBSを除き、ClearSee™ を1.3 mL 加える。
8. マイクロチューブのフタを開けたままパラフィルムで密封し、針で通気穴を数カ所開ける。デシケーターに入れ、真空ポンプにより減圧する。デシケーターの栓を閉め、ポンプを停止して、室温で1時間、静置する。

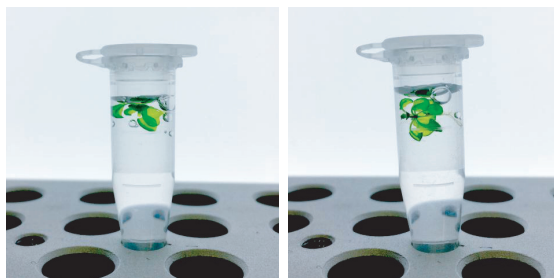


写真5. ClearSee™ 中のシロイヌナズナの葉・幼植物

9. 栓を少し開き、大気圧にゆっくり戻す。パラフィルムを外し、マイクロチューブのフタを閉め、遮光して室温で静置し、透明化する。

<注意・ポイント>

植物試料から取り除かれたクロロフィルが試料のまわりに溜まりますので、1〜2日おきに転倒混和してください。透明化にかかる時間は植物種・組織により異なりますが、目安としては次の通りです（根：1〜2日、葉・幼植物：4〜7日、めしべ：2週間、成熟組織：4週間）。必要に応じてClearSee™ を置換してください。

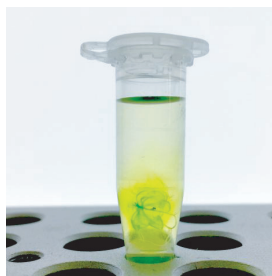


写真6. 試料のまわりに除かれたクロロフィルが見える様子（1〜2日後）



写真7. 転倒混和後



写真8. 新しいClearSee™ に置換後

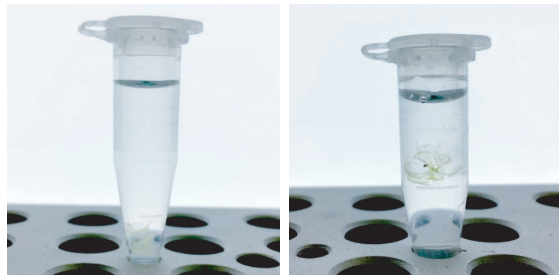


写真 9. 透明になったシロイヌナズナの葉・幼植物（3～5 日後）

（観察）

- スライドガラスの上にワセリンやグリースなどで囲いを作り、ClearSee™ を適量のせる。ピンセットで植物試料を移し、カバーガラスをのせて、蛍光顕微鏡下で観察する。

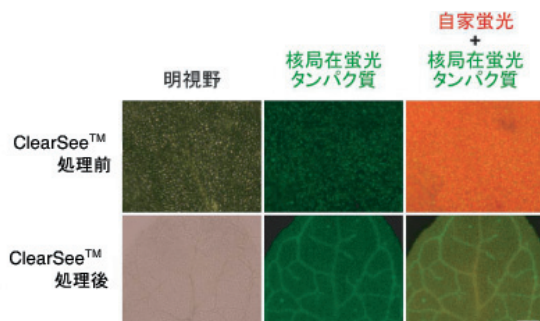


写真 10. 透明化したシロイヌナズナの葉は、明視野では透明に見える。クロロフィルの赤い自家蛍光がなくなる。丸ごと葉が観察できるので、内部にある維管束の蛍光タンパク質も観察できている。スケールバーは 200 μm。

＜注意・ポイント＞

透明化した植物試料は柔らかくなっているので、ピンセットで移すときに試料を壊さないよう注意してください。ClearSee™ は乾燥してしまうと析出しますので、ワセリンやグリースなどで乾燥を防ぎます。観察後は、ClearSee™ が入ったマイクロチューブに植物試料を戻すと、保存できます。

【ポイント】 （固定）

植物試料をダメージなく透明化するためには、固定の手順が重要です。初めての植物種・組織を用いる場合は、固定操作後、蛍光顕微鏡で観察して、蛍光タンパク質が検出できることを確認し、固定条件を検討してください。

（他の植物種）

シロイヌナズナ以外も、いろいろな植物を ClearSee™ で透明化することができます。

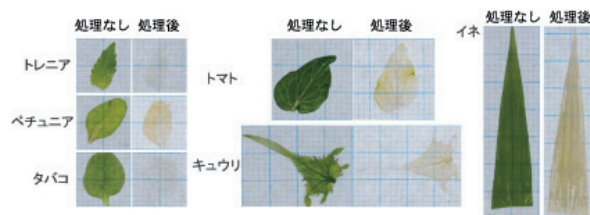


写真 11 ClearSee™ で透明化した植物の葉（6 日後）

写真 11 は ClearSee™ で 6 日間透明化したトレニア、ペチュニア、タバコ、トマト、キュウリ、イネの葉です。イネの場合、葉の表面にワックス層があり、組織の中に溶液を浸透させるのが難しいです。そのため、クロロホルムなどの有機溶媒に 10～30 秒浸けることによりワックスを取り除いた後、固定の手順を始めてください。

（蛍光色素染色）

ClearSee™ で透明化した植物試料は、蛍光色素で染色することもできます。細胞核を染色するときは Hoechst 33342 や DAPI を終濃度 10 μg/mL、細胞壁を染色するときは終濃度 1 mg/mL になるように ClearSee™ の中に加えて、1 時間静置します。その後、新しい ClearSee™ に置換して、1 時間静置後に、蛍光顕微鏡下で観察します。

【廃棄上の注意】

廃棄物は、自治体や国の法規制を遵守して適切に処理してください。

【保管条件】

遮光保存

【包装】

50 mL

【関連製品】

コードNo.	品 名	容 量
160-16061	パラホルムアルデヒド	100 g
194-05361	2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液	100 mL
163-25265	10 × PBS(-)	500 mL
164-25511	1 × PBS(-)	5 L

【参考文献】

- Kurihara, D. *et al.* : *Development*, **142**, 4168 (2015).

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

2305KA2