

**FUJIFILM****Wako**

Code No. 293-97001

## For Tissue Optical Clearing Reagent **AbScale-G Solution Set**

### [Introduction]

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

AbScale-G Solution Set is a reagent used for the AbScale-G, an improved version of AbScale, that is Scale S's three-dimensional immunohistochemical staining method.

Compared to AbScale, it has improved antibody staining ability and enables observation using more antibodies and fluorescent dyes. It can be used immediately by mixing the reagents in the contents.

It can also be used for non-tissue transparency samples such as regular tissue sections.

### [Set Contents]

- (1) Solution A 50 mL × 1 bottle
- (2) Solution B 2 mL × 1 bottle

### [Storage]

Store in the dark at 2-10°C.

### [Additional Required Materials]

Reagents :

Code No.	Description	Size
193-18455	SCALEVIEW-A2	500 mL
196-18521	SCALEVIEW-S0	250 mL
194-18561	SCALEVIEW-S4	250 mL
041-34425	deScale Solution	500 mL
160-16061	Paraformaldehyde	100 g
164-25511	1×PBS (-)	5 L
215-00611	Urea	100 g

Equipments :

- 1) 5 mL/15 mL/30 mL/50 mL conical centrifuge tube (for each sample)
- 2) 2 mL microcentrifuge tube (for each sample)
- 3) Culture dish (100 mm, 60 mm, and 35 mm diameter) (for each sample)
- 4) Seesaw shaker
- 5) Fluorescence microscope and Recommend Objective lenses for tissue clearing samples

### [Procedure] (1-2 mm brain samples)

#### (Fixation)

- 1) Transcardially perfuse an anesthetised 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.

#### (Pretreatment)

- 1) Transfer to 15 mL tube <sup>\*1</sup>, add 5 mL of deScale Solution, and rinse it at room temperature × 2 times.
- 2) Replaced with 6 mL of SCALEVIEW-S0 and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 37°C for 6 hrs.
- 3) Replaced with 6 mL of SCALEVIEW-A2 and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 37°C for 6-8 hrs.
- 4) Replaced with 6 mL of 8M Urea Solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 37°C for 6-8 hrs.
- 5) Replaced with 6 mL of SCALEVIEW-A2 and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 37°C for 3-4 hrs.
- 6) Replaced with 10 mL of deScale Solution and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at Room temperature for 6 hrs.

**\*1**…Use tubes that match the size of the sample.

#### (Antibody staining, Re-fixation, Clearing)

- 1) Prepare antibody-diluted AbScale-G Solution.
  - Add 75 μL of Solution B to 1.5 mL of Solution A.
  - Add antibody and mix well.
- 2) Transfer the sample to 2 mL tube, add 1), and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 37°C for 3 days.
- 3) Transfer the sample to 15 mL tube <sup>\*2</sup>, add 5 mL of AbScale-O Solution <sup>\*3</sup>, and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at room temperature for 5 min × 3 times.
- 4) Replaced with 5 mL of 4% PFA/PBS (pH 7.6-7.8) and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at room temperature for 30 min.
- 5) Replaced with 8 mL of SCALEVIEW-S4 and incubate it with gentle shaking (10 rpm) at 37°C for 6 hrs.
- 6) Replaced with flesh SCALEVIEW-S4 and store at room temperature in the dark.

**\*2**…Use tubes that match the size of the sample.

**\*3**…AbScale-O Solution : 0.33 M Urea and 0.1% (wt/vol) Triton X-100 in PBS (-) Solution

#### (Imaging)

- 1) Mount onto an imaging chamber. Use appropriate amount of SCALEVIEW-S4 solution to mount the sample. Observe the SCALEVIEW-S cleared samples using fluorescence microscopy.

#### (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-S4 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).

コードNo. 293-97001

## 組織透明化用 AbScale-G Solution Set

#### 【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。

AbScale-G Solution Set は、AbScale-G 法に使用する試薬で、Scale S の三次元免疫組織染色法である AbScale 法の改良法です。AbScale-G 法は AbScale 法と比較して、抗体染色能の向上が認められ、より多くの抗体や蛍光色素を用いて観察可能になりました。セット内容物の試薬を混ぜ合わせることで、すぐに使用可能です。

また、通常の組織切片など、非組織透明化サンプルにも使用可能です。

#### 【セット内容】

- (1) Solution A 50mL × 1 本
- (2) Solution B 2mL × 1 本

#### 【保存条件】

2-10°C 遮光保存

#### 【本品以外に準備するもの】

試薬 :

Code No.	Description	Size
193-18455	SCALEVIEW-A2	500mL
196-18521	SCALEVIEW-S0	250mL
194-18561	SCALEVIEW-S4	250mL
041-34425	deScale Solution	500mL
160-16061	パラホルムアルデヒド	100g
164-25511	1×PBS (-)	5L
215-00611	尿素	100g

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) 2mL エッペンチューブ (サンプルに合わせて使用)
- 3) 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)
- 4) シーソーシェーカー
- 5) 透明化標本向け蛍光顕微鏡と推奨対物レンズ

#### 【操作方法】 (脳スライスサンプル 1-2mm 厚)

(固定)

- 1) マウスを 4% パラホルムアルデヒド (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°C、72 時間) する。
- 3) PBS で洗浄する。
- 4) ビプラトームを用いてスライスを作成する。

## FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

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

Group Companies



Distributors



(サンプルの前処理)

- 1) 15mL チューブ<sup>\*1</sup> にサンプルを移し、5mL の deScale Solution で室温、2回洗浄する。
- 2) 6mL の SCALEVIEW-S0 に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で 37°C、6 時間振とうする。
- 3) 6mL の SCALEVIEW-A2 に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で 37°C、6-8 時間振とうする。
- 4) 6mL の 8M 尿素水溶液に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で 37°C、6-8 時間振とうする。
- 5) 6mL の SCALEVIEW-A2 に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で 37°C、3-4 時間振とうする。
- 6) 10mL の deScale Solution に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で室温、6 時間振とうする。

※ 1 …サンプルの大きさによってご検討下さい。

(抗体染色、再固定、透明化)

- 1) 抗体希釈 AbScale-eG Solution を調製する。
  - ・ Solution A 1.5mL に対し、Solution B 75 μL を添加して用時調製する。
  - ・ 任意の抗体を添加し、よく攪拌する。
- 2) 2mL マイクロチューブにサンプルを移し、1) を添加し、シェーカー (10rpm) で 37°C、3 日間振とうする。
- 3) 15mL チューブ<sup>\*2</sup> にサンプルを移し、5mL の AbScale-O Solution<sup>\*3</sup> を添加し、シェーカー (10rpm) で室温、5 分×3 回振とうする。
- 4) 5mL の 4% PFA/PBS (pH 7.6-7.8) に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で室温、30 分間振とうする。
- 5) 8mL の SCALEVIEW-S4 に溶液を入れ替え、シェーカー (10rpm) で 37°C、6 時間振とうする。
- 6) 新しい SCALEVIEW-S4 に溶液を入れ替え、アルミホイルで包み、室温で保管する。

※ 2 …サンプルの大きさによってご検討下さい。

※ 3 …AbScale-O Solution : 0.33M 尿素、0.1% (wt/vol) Triton X-100 を含む PBS (-) 溶液

(観察)

- 1) SCALEVIEW-S4 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。

(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)。
- ・ 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).

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目 1 番 2 号

Tel : 06-6203-3741