

For Tissue Optical Clearing Reagent SeeDB2 Trial Kit

【Introduction】

Drs. Ke and Imai developed a new type of tissue clearing agent, SeeDB2. SeeDB2 is ideal for high-resolution three-dimensional imaging of fluorescent proteins. SeeDB2G and S are designed match the refractive indices of glycerol (1.46) and oil (1.52), minimizing spherical aberrations for high-NA glycerol- and oil- immersion objective lenses, respectively. SeeDB2 is particularly powerful in confocal and super-resolution microscopy using high-NA objective lenses. It is noteworthy that many of fluorescent proteins are highly preserved in SeeDB2, much better than in PBS or other commercialized mounting media optimized for fluorescent dyes. Thus, SeeDB2 is also an ideal mounting medium for samples labeled with fluorescent proteins. SeeDB2 is useful not only for thick brain tissues, but also for thin samples for cell biology or tissue sections.

【Kit contents】

- | | |
|----------------------|------------------|
| (1) SeeDB2G solution | 50 mL × 1 bottle |
| (2) SeeDB2S solution | 50 mL × 1 bottle |
| (3) PBS (-) | 50 mL × 1 bottle |
| (4) Saponin | 5 g × 1 bottle |

【Storage】

Store below 25°C in the dark.

【Additional Required Materials】

Reagents :

- 1) Paraformaldehyde (Code No. 160-16061)
- 2) 1 × PBS (-) (Code No. 164-25511)
- 3) Sodium Azide (Code No. 195-11092)
- 4) 5 mL Eppendorf tube
- 5) Immersion solution :
Immersol 518F (Carl Zeiss) or Immersion oil type F (Leica, Olympus)
for oil-immersion lens ; glycerol (Leica) for glycerol-immersion lens

Equipments :

- 1) Ring forceps (or paint brush for thin slices) or paint brush
- 2) Overhead tube rotator
- 3) Sterilization filter (optional ; for example, Steradisc 0.2 μ m from Kurabo and Millex 0.22 μ m from Merck-Millipore)
- 4) Vibratome (optional ; for example Dosaka MicroSlicer)
- 5) SeeThrough Chamber
- 6) Glass slides and glass coverslips (No. 1.5H, for example, Precision cover glasses from Marienfeld)

Microscope :

Cofocal Microscope with high-NA objective lenses (NA>1.2).
Super-resolution Microscope
(e.g., TCS SP8X STED, LSM880-Airyscan, TCS SP8 Hyvolution2, etc.)
Light-sheet microscope (e.g., TCS SP8 DLS with clearing objective lens)

〈Note〉

- It is highly recommended to use oil-immersion lens for SeeDB2S and glycerol-immersion lens for SeeDB2G. Coverslips should be No. 1.5H (0.170 μ m thick). In light-sheet microscopy, it is recommended to use a specialized objective lens for cleared samples (index optimized).
- White floating matter maybe observed in SeeDB2S Solution, but there is no problem in quality. We recommend that make sure to mix SeeDB2S Solution lightly before you use.

【Procedure】

(Solution preparation)

Clearing reagent preparation (for 3 mL reaction in 5 mL tube)

1. 20% saponin stock solution
Dissolve 0.6 g Saponin in 3 mL distilled water. It is recommended to filter-sterilize the solution for longer storage.
2. Permeabilization solution
300 μ L 20% saponin
2700 μ L PBS
3. Clearing solution 1 (2 : 1 mixture)
300 μ L 20% saponin
1700 μ L distilled water
1000 μ L SeeDB2G solution
4. Clearing solution 2 (1 : 1 mixture)
300 μ L 20% saponin
1200 μ L distilled water
1500 μ L SeeDB2G solution
5. Clearing solution 3 (for SeeDB2G)
Dissolve 60mg saponin in 3 mL SeeDB2G solution
6. Clearing solution 4 (for SeeDB2S, optional) :
Dissolve 60 mg saponin in 3 mL SeeDB2S solution

〈Note〉

- These solutions are stable up to 1 week at room temperature and 4 weeks at 4°C. For longer storage, it is recommended to filter-sterilize the 20% saponin solution and/or add sodium azide to each solution at 0.01% to prevent bacterial contamination. SeeDB2S solution includes sodium azide at 0.01%.
- 3 mL each is sufficient to clear up to 2 mm-thick mouse brain slices.

Procedure (brain slices)

(Sample preparation)

- 1) Fix the dissected sample in 4% PFA in PBS (4°C, o/n).
- 2) Wash the samples in PBS.
- 3) Prepare vibratome sections (optional, 0.2-2 mm thick).

(Clearing)

- 4) Transfer the sample into 3 mL of permeabilization solution and incubate it with gentle rotation (\sim 4 rpm) at room temperature for 12-16 hours.
- 5) Transfer the sample to a new tube filled with 3 mL of clearing solution
1. Place the tube on an overhead rotator at room temperature for 6-10 hours.
- 6) Transfer the sample to a new tube filled with 3 mL of clearing solution
2. Place the tube on an overhead rotator at room temperature for

6-10 hours.

- 7) Transfer the sample to a new tube filled with 3 mL of clearing solution 3. Place the tube on an overhead rotator at room temperature for at least 12 hours.
- 8) (optional for SeeDB2S) Transfer the sample to a new tube filled 3 mL of clearing solution 4. Place the tube on an overhead rotator at room temperature for at least 12 hours.
- 9) Transfer the sample into 3 mL of SeeDB2G solution (from step 7) or SeeDB2S solution (from step 8).

(Imaging)

- 10) Pick the cleared sample with ring forceps or paint brush and mount onto an imaging chamber (e.g., SeeThrough Chamber from Wako) or a glass slide. Use appropriate amount of SeeDB2G/S solution to mount the sample and seal the sample with a glass coverslip. Excess amount of SeeDB2G/S at the edge of the coverslip will be air dried within minutes.
- 11) Observe the SeeDB2G/S-cleared samples using fluorescence microscopy. Use glycerol immersion to image SeeDB2G samples with glycerol-immersion objective lens ; and oil to image SeeDB2S samples with oil-immersion objective lens.

(Note)

- The cleared sample should not be exposed to the air for long term, because the surface may become sticky due to water evaporation. SeeDB2G/S solution cannot be used as an immersion solution.
- For the preparation of imaging chambers, see SeeDB Resources (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>).
- For very thin samples and tissue sections, some steps before mounting can be omitted. However, direct soaking in SeeDB2G/S solution may result in shrinkage and deformation of samples. Serial incubation is recommended to best maintain the morphology.
- For thinner brain slices (<1 mm) or smaller samples (e.g., Drosophila brain), incubation time in each step can be shortened (e.g., 1h or 3h each).
- SeeDB2G/S-mounted samples will not be solidified. If necessary for small samples, 0.1% low-melting agarose (e.g., UltraPure Low Melting Point Agarose from Thermo Fisher) can be added to minimize movement artifacts during imaging.
- While SeeDB2 solution protect fluorescent proteins from photobleaching, some of chemical dyes (e.g., Alexa Fluor dyes) are sensitive to photobleaching in SeeDB2 solution.

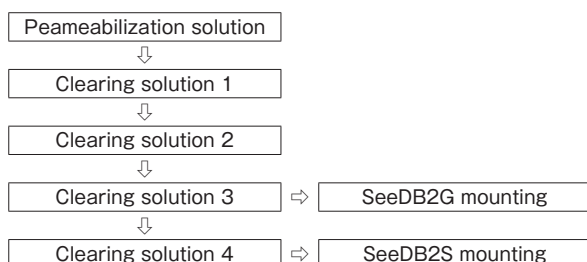


Figure 1. Clearing and mounting procedure

[Example images]

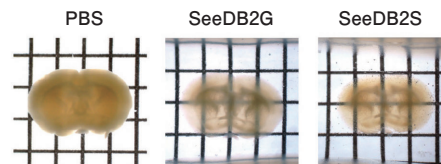


Figure 2. Mouse brain slice (adult, 1.5 mm-thick) before and after clearing with SeeDB2.

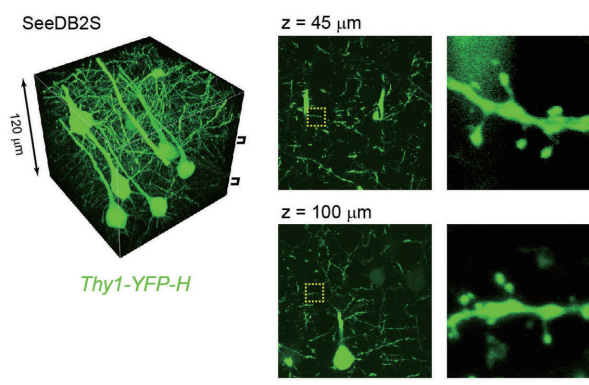


Figure 3. Confocal images of brain slices from a Thy1-YFP (line H) mouse. An oil-immersion objective lens (NA 1.4) was used. Note that fluorescence level did not decrease even though laser power was constant throughout depth. Scale bars are 2 μ m.

[Related products]

Code No.	Description	Size
294-35631	See Through Chamber, 0.3 mm thick	10 set
291-35641	See Through Chamber, 0.5 mm thick	10 set
295-35661	See Through Chamber, 1.0 mm thick	10 set
292-35671	See Through Chamber, 2.0 mm thick	10 set
299-35681	See Through Chamber, 3.0 mm thick	10 set
160-16061	Paraformaldehyde	100 g
164-25511	1 \times PBS (-)	5 L

[References and Notes]

Ke et al., : *Cell Reports* **14**, 2718 (2016)

SeeDB Resources (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>) : updated information and technical TIPS from the authors.

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. 294-80701

組織透明化用

SeeDB2 Trial Kit

【はじめに】

SeeDB2 は柯孟岑、今井猛博士らにより開発された新しいタイプの組織透明化試薬です。SeeDB2 は特に蛍光タンパク質によって標識されたサンプルの 3 次元高解像イメージングに最適です。SeeDB2G はグリセリンの屈折率 (1.46) に、SeeDB2S はオイルの屈折率 (1.52) に合わせてあり、それぞれグリセリン浸レンズ、油浸レンズを用いた観察において球面収差が生じないように最適化されています。また、特筆すべき点として、SeeDB2 においては蛍光タンパク質の蛍光が非常に安定に保持されており、PBS や他の市販のマウント剤よりも優れています。このため、SeeDB2 は蛍光タンパク質で標識されたサンプルのマウント剤としても最適です。厚みのあるサンプルだけでなく、細胞生物学用の薄いサンプルや組織切片のマウントにもお使い頂けます。

【キット内容】

本キットは 4 つの構成部材からなります。

- | | |
|----------------------|------------|
| (1) SeeDB2G solution | 50mL × 1 本 |
| (2) SeeDB2S solution | 50mL × 1 本 |
| (3) PBS (-) | 50mL × 1 本 |
| (4) Saponin | 5g × 1 本 |

【保管条件】

25℃ 以下保存・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) アジ化ナトリウム (コード No.195-11092)
- 4) 5mL チューブ
- 5) イマージョン液：
Immersol 518F (Carl Zeiss) or Immersion oil type F (Leica, Olympus)
for oil-immersion lens; glycerol (Leica) for glycerol-immersion lens

器具：

- 1) リングピンセット (or paint brush for thin slices) もしくは絵筆
- 2) チューブローテーター
- 3) 滅菌フィルター (optional ; for example, Steradisc 0.2 μ m from Kurabo and Millex 0.22 μ m from Merck-Millipore)
- 4) ビプラトーム (optional ; for example Dosaka MicroSlicer)
- 5) See Through Chamber
- 6) スライドガラスおよびカバーガラス (No. 1.5H, for example, Precision cover glasses from Marienfeld)

蛍光顕微鏡：

共焦点顕微鏡および High-NA 対物レンズ (NA>1.2).
超解像顕微鏡
(e.g., TCS SP8X STED, LSM880-Airyscan, TCS SP8 Hyvolution2, etc.)
ライトシート型顕微鏡 (e.g., TCS SP8 DLS with clearing objective lens)

〈注意〉

- ・ SeeDB2S を用いたサンプルには油浸レンズを、SeeDB2G を用いたサンプルにはグリセリン浸レンズを用いて下さい。また、最適な結果を得るためには、カバーガラスは No. 1.5H (0.170 μ m thick) を推奨します。ライトシート型顕微鏡を使う際は、屈折率補正した透明化用の対物レンズを用いることを推奨します。
- ・ SeeDB2S Solution は製品の特性上、保管時に白いもやが観察されることがあります。品質に問題はございませんので、使用前に軽く容器を上下に振り、ご使用下さい。

【操作方法】

(試薬調製)

透明化液の調製 (5mL チューブを用いて 3mL スケールで行う場合)

1. 20% saponin stock solution
0.6g Saponin を 3mL の超純水に溶解する。
試薬を長期保存する場合にはフィルター滅菌する。
2. Permeabilization solution :
300 μ L 20% saponin に 2700 μ L PBS を加え溶解する。
3. Clearing solution 1 (2 : 1 mixture) :
300 μ L 20% saponin に 1700 μ L 超純水、1000 μ L SeeDB2G solution を加え溶解する。
4. Clearing solution 2 (1 : 1 mixture) :
300 μ L 20% saponin に 1200 μ L 超純水、1500 μ L SeeDB2G solution を加え溶解する。
5. Clearing solution 3 (for SeeDB2G) :
60mg saponin を 3mL SeeDB2G solution に溶解する。
6. Clearing solution 4 (for SeeDB2S, optional) :
60mg saponin を 3mL SeeDB2S solution に溶解する。

〈注意、ポイント〉

- 1) 調製した試薬は室温で 1 週間まで、4℃ であれば 4 週間まで安定ですが、長期保存する場合は、雑菌の繁殖を防ぐため、20% saponin についてはフィルター滅菌を行い、各試薬にアジ化ナトリウム (終濃度 0.01%) を添加することを推奨します。SeeDB2S solution にはあらかじめアジ化ナトリウムが添加されています。
- 2) 厚さ 2mm までのマウス脳スライスを透明化する場合、それぞれのステップで 3mL が必要です。

操作方法 (脳スライスを用いる場合の例)

(サンプルの調製)

- 1) 解剖して取り出した脳サンプルを 4% パラホルムアルデヒド / PBS で 4℃ で一晩固定する。
- 2) サンプルを PBS で洗浄する。
- 3) ビプラトームを用いてスライスを作成する (optional, 0.2-2mm thick)。(透明化)
- 4) 3mL の Permeabilization solution が入ったチューブにサンプルを移し、チューブローテーター (～ 4rpm) で室温 12-16 時間転倒回転する。
- 5) 3mL の Clearing solution 1 が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローテーター (～ 4rpm) で室温 6-10 時間転倒回転する。
- 6) 3mL の Clearing solution 2 が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローテーター (～ 4rpm) で室温 6-10 時間転倒回転する。
- 7) 3mL の Clearing solution 3 が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローテーター (～ 4rpm) で室温 12 時間以上転倒回転する。

- 8) (optional for SeeDB2S) 3mL の clearing solution 4 が入った新しいチューブにサンプルを移し、チューブローテーター（～4rpm）で室温 12 時間以上転倒回転する。
- 9) 3mL の SeeDB2G solution (step 7 より) もしくは SeeDB2S solution (step 8 より) が入った新しいチューブにサンプルを移す。
(観察)
- 10) リングピンセットもしくは絵筆を用いて透明化されたサンプルを拾い、イメージングチャンバー (SeeThrough Chamber) もしくはスライドガラス (薄いサンプルの場合) にマウントする。適量の SeeDB2G solution もしくは SeeDB2S solution を滴下し、カバーガラスでシールする。カバーガラスの端からはみ出た SeeDB2G/S solution は数分で固化する。
- 11) 蛍光顕微鏡を用いて透明化されたサンプルの観察を行う。SeeDB2G でマウントした標本はグリセリンでイメージーションし、グリセリン浸レンズで観察する。SeeDB2S でマウントしたサンプルはイメージーションオイルでイメージーションし、油浸レンズで観察する。

〈注意 ポイント〉:

- ・透明化したサンプルを長時間空気に触れさせないでください。水分が蒸発して、表面がべとつくことがあります。SeeDB2G/S solution はイメージーション液として用いることはできません。
- ・イメージングチャンバーを自作する場合は SeeDB Resources を参照して下さい (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>)。
- ・薄いサンプルや組織切片についてはいくつかの透明化ステップをスキップしても構いません。但し、サンプルを直接 SeeDB2G/S solution でマウントすると、組織が収縮・変形する恐れがあります。透明化ステップを経た方が形態は保持されやすくなります。
- ・1mm 以下の脳スライスや小さなサンプル (たとえばショウジョウバエの脳など) を透明化するにはそれぞれのステップの時間を短縮 (たとえば各 1 時間ないし 3 時間) することができます。
- ・SeeDB2G/S solution でマウントしたサンプルは固化しません。小さなサンプルを観察するのに固化させる必要がある場合、SeeDB2G/S solution に 0.1% の低融点アガロース (たとえば、Thermo Fisher 社の UltraPure Low Melting Point Agarose) を添加して固化させることができます。
- ・SeeDB2G/S solution でマウントすると GFP などの蛍光タンパク質は光褪色されにくくなります。但し、いくつかの蛍光色素 (たとえば Alexa Fluor など) は SeeDB2G/S Solution 中では光褪色しやすくなりますので注意が必要です。

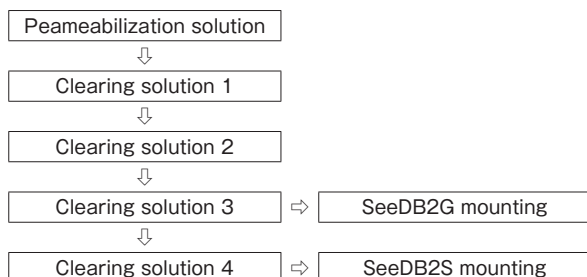


図 1. 透明化およびマウントの手順

【観察例】

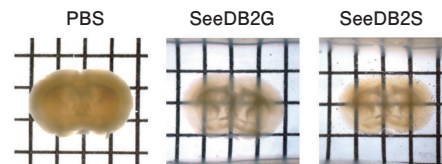


図 2. マウス脳スライス (成体, 厚さ 1.5mm) の透明化前後の透過画像。

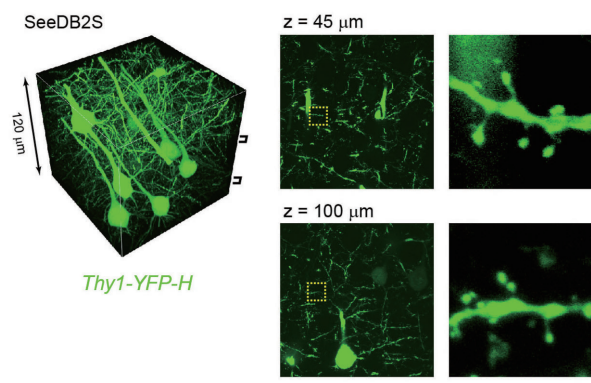


図 3. Thy1-YFP (line H) マウス脳スライスの共焦点画像。NA 1.4 の油浸レンズを使用。レーザーパワーを変えなくても、上から下までほぼ一定の輝度が得られる。スケールバーは 2 μm。

【関連製品】

Code No.	Description	Size
294-35631	See Through Chamber, 0.3mm thick	10set
291-35641	See Through Chamber, 0.5mm thick	10set
295-35661	See Through Chamber, 1.0mm thick	10set
292-35671	See Through Chamber, 2.0mm thick	10set
299-35681	See Through Chamber, 3.0mm thick	10set
160-16061	バラホルムアルデヒド	100g
164-25511	1 × PBS (-)	5L

【参考文献】

Ke et al., : *Cell Reports* **14**, 2718 (2016)

SeeDB Resources (<https://sites.google.com/site/seedbresources/>) : updated information and technical TIPS from the authors.

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

2307KA4