

For Tissue Optical Clearing Reagent CUBIC Trial Kit

【Introduction】

Dr. Etsuo A. Susaki *et al.* developed a simple, efficient, and scalable brain / body clearing method and imaging / computational analysis pipeline, CUBIC (clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis). CUBIC offers a fluorescent-preserving, high-performance and device-free tissue clearing method based on hydrophilic Solutions (ScaleCUBIC Solutions). It enables reproducible whole-organ and whole-body clearing and rapid 3D imaging with LSFM. CUBIC also provides processing and analysis of 3D images for extracting biological information.

Therefore, CUBIC presents a platform of whole-organ/body imaging with single-cell resolution and image informatics, which enables a wide range of users to perform experiments targeting cellular and organ layers with multiple samples.

【Kit contents】

This kit includes 4 components.

(1) ScaleCUBIC-1 Solution	125 mL×2 bottles
(2) ScaleCUBIC-2 Solution	125 mL×2 bottles
(3) Mounting Solution 1	40 mL×1 bottle
(4) Mounting Solution 2	40 mL×1 bottle

【Storage】

Stored in the dark

【Additional required materials】

Reagents :

- 1) Paraformaldehyde (Code No.160-16061)
- 2) 1×PBS (-) (Code No. 164-25511)

Equipment :

- 1) 5 mL / 15 mL / 30 mL / 50 mL conical centrifuge tubes
- 2) Seesaw shaker

【Procedure】

(Solution preparation)

1. 50% ScaleCUBIC-1 Solution (1:1 mixture)
Dissolve ScaleCUBIC-1 Solution in distilled water.
2. 50% ScaleCUBIC-2 Solution (1:1 mixture)
Dissolve ScaleCUBIC-2 Solution in distilled water.

(Fixation)

A case for making mouse organs transparent according to reference 1), 2) and 3).

- 1) Transcardially perfuse an anesthetized mouse with 10 mL ~ of cold PBS with Heparin (10 U/mL) followed by 20 mL ~ of cold 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS (pH 7.4).

- 2) Dissect the organs and subject them to post-fixation in 4% PFA/PBS at 4°C for 18-24 hrs.
- 3) Wash the samples in PBS.
- 4) Prepare thick tissue sections (optional, 2 mm thick for example).

【Clearing】 (2 mm section samples)

Delipidation and decolorization

- 1) Transfer the sample into 2.5 mL of 50% ScaleCUBIC-1 Solution in 5 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at RT for 6-24 hrs.
- 2) Transfer the sample into 2.5 mL of ScaleCUBIC-1 Solution and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at 37°C for 2 days.
If needed, transfer the sample into 2.5 mL of fresh ScaleCUBIC-1 Solution and continue to incubate it with gentle shaking (30 rpm) at 37°C for an additional few days until the samples sufficiently cleared (dependent on tissue and sample size). Replace the ScaleCUBIC-1 Solution every 2 days.
- 3) Transfer the sample into 25 mL of PBS in 30 or 50 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at RT to 37°C at least for 2 hrs ×3 times (dependent on sample size).
- 4) Transfer the sample into 2.5 mL of 50% ScaleCUBIC-2 Solution in 5 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at RT for 1 day.
*The sample will become swollen.

RI match

- 5) Transfer the sample into 2.5 mL of ScaleCUBIC-2 Solution in 5 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at RT to 37°C for 1-2 days. *Because ScaleCUBIC-2 Solution is highly viscous, manual mixing with inversion of the tube will be occasionally needed several times.

**Sample size will be recovered to the original size.

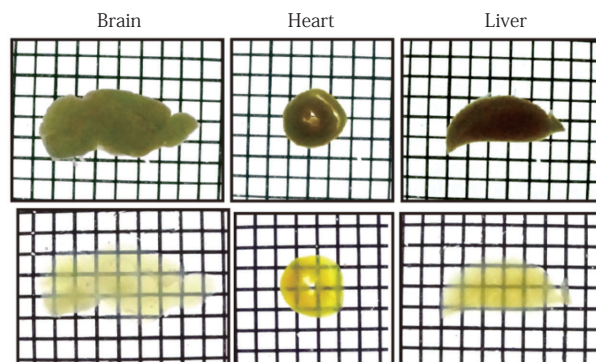


Figure 1. Transmittance images of mouse 2 mm slices before and after clearing with ScaleCUBIC Solutions.

【Clearing】 (whole organ samples)

Delipidation and decolorization

- 1) Transfer the sample into 12-15 mL of 50% ScaleCUBIC-1 Solution in 30 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at RT for 1 day.
- 2) Transfer the sample into 12-15 mL of ScaleCUBIC-1 Solution in 30 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at 37°C for 2 days.
- 3) Transfer the sample into 12-15 mL of fresh ScaleCUBIC-1 Solution in 30 mL tube and continue to incubate it with gentle shaking (30 rpm)

at 37°C for additional 6-8 days (dependent on tissue and sample size).
Replace the ScaleCUBIC-1 Solution every 2 days.

- 4) Transfer the sample into ~ 50 mL of PBS in 50 mL tube and incubate it with gentle shaking (30 rpm) at RT to 37°C at least for 2 hrs × 3 times. It is recommended to wash the sample once for 2 hrs, once overnight and again once for 2 hrs.
- 5) Transfer the sample into 12-15 mL of 50% ScaleCUBIC-2 Solution in 30 mL tube at RT for 1 day. *The sample will become swollen.

RI match

- 6) Transfer the sample into 12-15 mL of ScaleCUBIC-2 Solution in 30 mL tube at RT to 37°C for 2 days. *Because ScaleCUBIC-2 Solution is highly viscous, manual mixing with inversion of the tube will be occasionally needed several times.

**Sample size will be recovered to the original size.

Note :

- For thicker slices (>2 mm) or whole organs, incubation time in each step can become longer and ScaleCUBIC Solutions in each step can increase the amount.

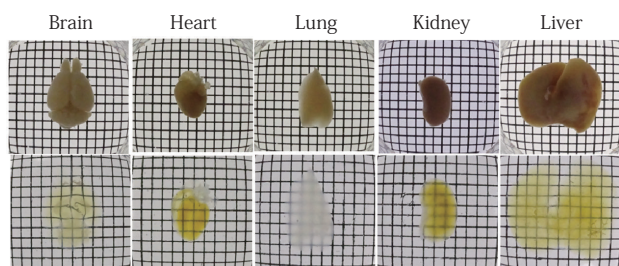


Figure 2. Transmittance images of mouse whole organs before and after clearing with ScaleCUBIC Solutions.

(Imaging)

- 1) The RI-matched sample is immersed in a mixture of Mounting Solution 1 and Mounting Solution 2. Observe the CUBIC-cleared samples using fluorescence microscopy.

<Note>

The optimal ratio of Mounting Solution 1 and Mounting Solution 2 for transparency observation depending on the sample, so it is recommended to optimize the ratio according to the sample. Typically, 7:3 mixture of Mounting Solution 1 and 2 (RI ~ 1.49) can be used.

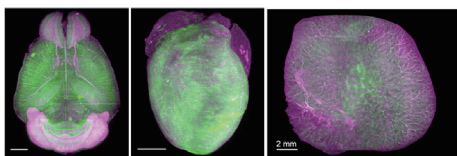


Figure 3. LSFM imaging of CAG-EGFP Tg Mouse (8 w Male) whole brain, whole heart and dissected liver.

【References】

- 1) E. A. Susaki. *et al.* : *Cell*, **157**, 726 (2014).
- 2) K. Tainaka. *et al.* : *Cell*, **159**, 911 (2014).
- 3) E. A. Susaki. *et al.* : *Nature Protocols*, **10**, 1709 (2015).

【Related Products】

Code No.	Description	Size
160-16061	Paraformaldehyde	100 g
164-25511	1 × PBS (-)	5 L

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. 290-80801

組織透明化用 CUBIC Trial Kit

【はじめに】

CUBIC (clear, unobstructed brain / body imaging cocktails and computational analysis) は、洲崎悦生博士らにより開発された、組織透明化・3次元イメージング・画像解析の組み合わせによる網羅的細胞解析技術です。CUBIC で使用する組織透明化試薬 (ScaleCUBIC 試薬) は尿素にアミノアルコールを加えた水溶性透明化試薬であり、サンプルを試薬に浸すだけの簡便かつ効果的で再現性の良い手法になります。CUBIC は動物等の全身・臓器丸ごと透明化することが可能です。さらに、シート照明型蛍光顕微鏡 (LSFM) を用いることで、全身の細胞を1細胞解像度で3次元イメージとして取得することが可能です。

CUBIC は、1個体の生命現象とその原理を解明できることから、生物学だけでなく、多くの分野においても大きな貢献が期待できます。

本キットは、1) ScaleCUBIC-1 Solution、2) ScaleCUBIC-2 Solution、3) Mounting Solution 1、4) Mounting Solution 2 の4成分で構成されています。キット成分を調整し、透明化を行うことが可能です。

【キット内容】

本キットは4つの構成部材からなります。

(1) ScaleCUBIC-1 Solution	125 mL×2 本
(2) ScaleCUBIC-2 Solution	125 mL×2 本
(3) Mounting Solution 1	40 mL×1 本
(4) Mounting Solution 2	40 mL×1 本

【保存条件】

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)

器具：

- 1) 5 mL / 15 mL / 30 mL / 50 mL コニカルチューブ (サンプルに合わせて使用)
- 2) シーソーシェーカー

【操作方法】

(試薬調製)

1. 50% ScaleCUBIC-1 Solution (1:1 mixture)
ScaleCUBIC-1 Solution を DW で 1:1 の比率で溶解します。
2. 50% ScaleCUBIC-2 Solution (1:1 mixture)
ScaleCUBIC-2 Solution を DW で 1:1 の比率で溶解します。

(固定)

以下の内容は、参考文献 1)、2) および 3) における組織スライスおよび臓器まるごとの透明化実験の概略です。

- 1) 麻醉下マウスにヘパリン (10 U/mL) を添加し冷却した PBS を 10 mL 以上流し脱血する。その後、冷却した 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS (pH 7.4) を 20 mL 以上流し、灌流固定する。
- 2) 臓器を取り出した後、4%PFA/PBS で固定 (4℃、18-24 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 (必要に応じて 2 mm 厚以上等)。

(スライスサンプル (2 mm) の透明化例)

●脱脂・脱色

- 1) 2.5 mL の 50% ScaleCUBIC-1 Solution が入った 5 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温、6-24 時間振とうする。
- 2) 2.5 mL の ScaleCUBIC-1 Solution が入った 5 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で 37℃、2 日間振とうする。
サンプルサイズ、組織により、透明になるまで時間を要する場合があります。必要に応じて、新しい 2.5 mL の ScaleCUBIC-1 Solution が入った 5 mL チューブにサンプルを移し、数日間、同じ工程を行って下さい。その際は、2 日に 1 回新しい ScaleCUBIC-1 Solution に置換して下さい。
- 3) 25 mL の PBS が入った 30 mL 若しくは 50 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温から 37℃の間で、2 時間×3 回振とうする (サンプルサイズにより時間を調整して下さい)。
- 4) 2.5 mL の 50% ScaleCUBIC-2 Solution が入った 5 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温、1 日間振とうする。
* この工程で、サンプルサイズが一時的に膨張します。

●屈折率調整

- 5) 2.5 mL の ScaleCUBIC-2 Solution が入った 5 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温から 37℃の間で、1-2 日間振とうする。
ScaleCUBIC-2 Solution は非常に粘性が高い為、工程中、サンプルの入ったチューブを反転する必要があります。
** この工程で、サンプルサイズは元の大きさに戻ります。

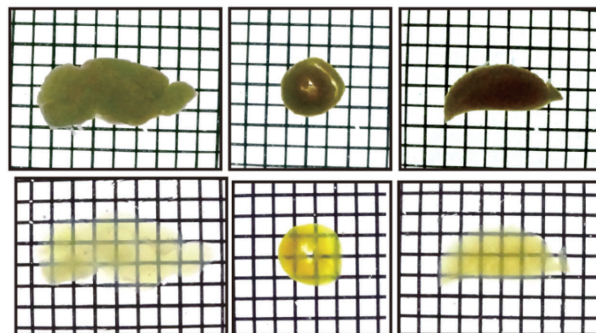


図1. マウス 2 mm スライスサンプルを ScaleCUBIC 処理した例
(左：脳、真中：心臓、右：肝臓)

(臓器丸ごとの透明化例)

●脱脂・脱色

- 1) 12-15 mL の 50% ScaleCUBIC-1 Solution が入った 30 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で室温、1 日間振とうする。
- 2) 12-15 mL の ScaleCUBIC-1 Solution が入った 30 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー (30 rpm) で 37℃、2 日間振とうする。

- 3) 12-15 mL の ScaleCUBIC-1 Solution が入った 30 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー（30 rpm）で 37℃、6-8 日間振とうする。
サンプルサイズ、組織により、透明になるまで時間を要する場合があります。
2 日に 1 回新しい ScaleCUBIC-1 Solution に置換して下さい。
- 4) 約 50 mL の PBS が入った 50 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー（30 rpm）で室温から 37℃の間で、2 時間×3 回振とうする。
2 時間振とう、1 晩振とう、さらに 2 時間振とうすることを推奨します。
- 5) 12-15 mL の 50%ScaleCUBIC-2 Solution が入った 30 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー（30 rpm）で室温、1 日間振とうする。
* この工程で、サンプルサイズが一時的に膨張します。

●屈折率調整

- 6) 12-15 mL の ScaleCUBIC-2 Solution が入った 30 mL チューブにサンプルを移し、シェーカー（30 rpm）で室温から 37℃の間で、2 日間振とうする。
ScaleCUBIC-2 Solution は非常に粘性が高い為、工程中、サンプルの入ったチューブを反転する必要があります。
** この工程で、サンプルサイズは元の大きさに戻ります。

注意事項：

2 mm 以上のスライスサンプルや組織まるごと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 ScaleCUBIC の試薬使用量も増えます。

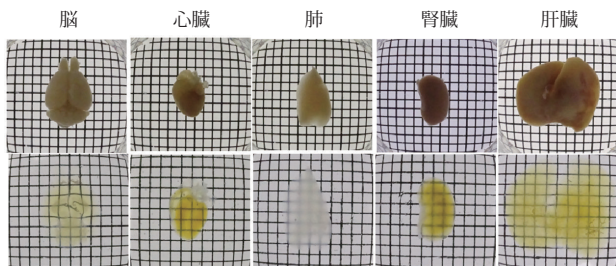


図 2. マウス臓器まるごとを ScaleCUBIC 処理した例

(観察)

- 1) 屈折率調整したサンプルを Mounting Solution 1 と Mounting Solution 2 の混合マウント溶液で浸漬する。マウント溶液に浸した状態で蛍光顕微鏡を用いて観察する。

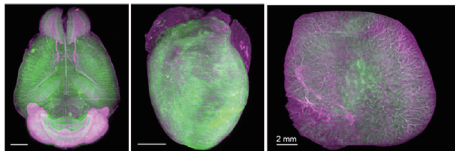


図 3. LSFM を用いて取得した CAG-EGFP Tg マウス（8 週齢）のイメージング画像
（左：脳、真中：心臓、右：肝臓（部分））

注意事項：

Mounting Solution 1 と Mounting Solution 2 の混合マウント溶液の最適な比率は、サンプルに依ります。一般的には、Mounting Solution 1 と Mounting Solution 2 を 7 : 3 の比率で混合し、使用することを推奨します。

【参考文献】

- 1) E. A. Susaki. *et al.* : *Cell*, **157**, 726 (2014).
- 2) K. Tainaka. *et al.* : *Cell*, **159**, 911 (2014).
- 3) E. A. Susaki. *et al.* : *Nature Protocols*, **10**, 1709 (2015).

【関連製品】

Code No.	Description	Size
160-16061	Paraformaldehyde	100 g
164-25511	1×PBS (-)	5 L

製造発売元

富士フイルム 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

1807KA1