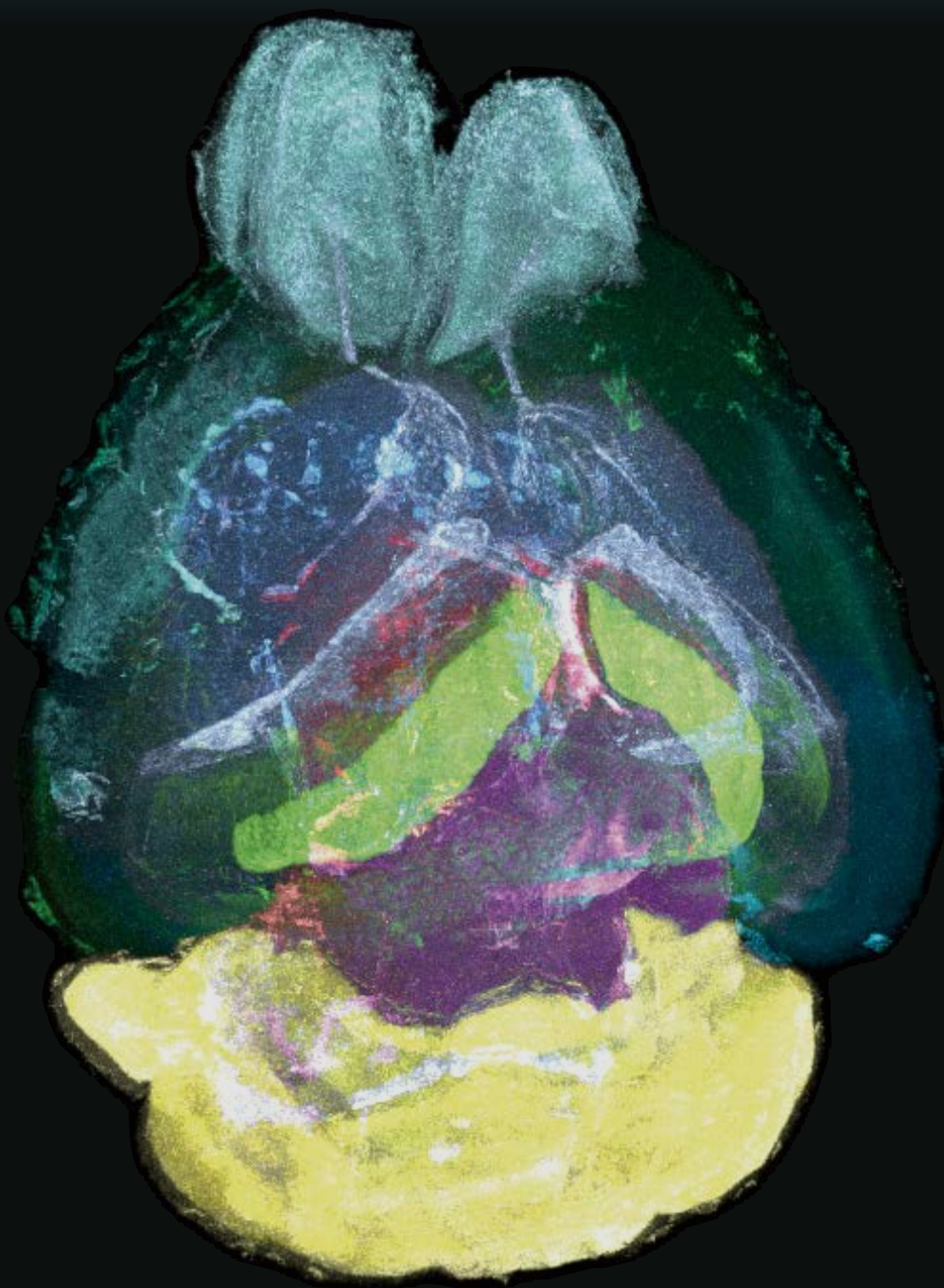


CUBIC

動物透明化試薬 テクニカルガイド



画像提供

東京大学大学院医学系研究科

上田泰己先生および真野智之先生

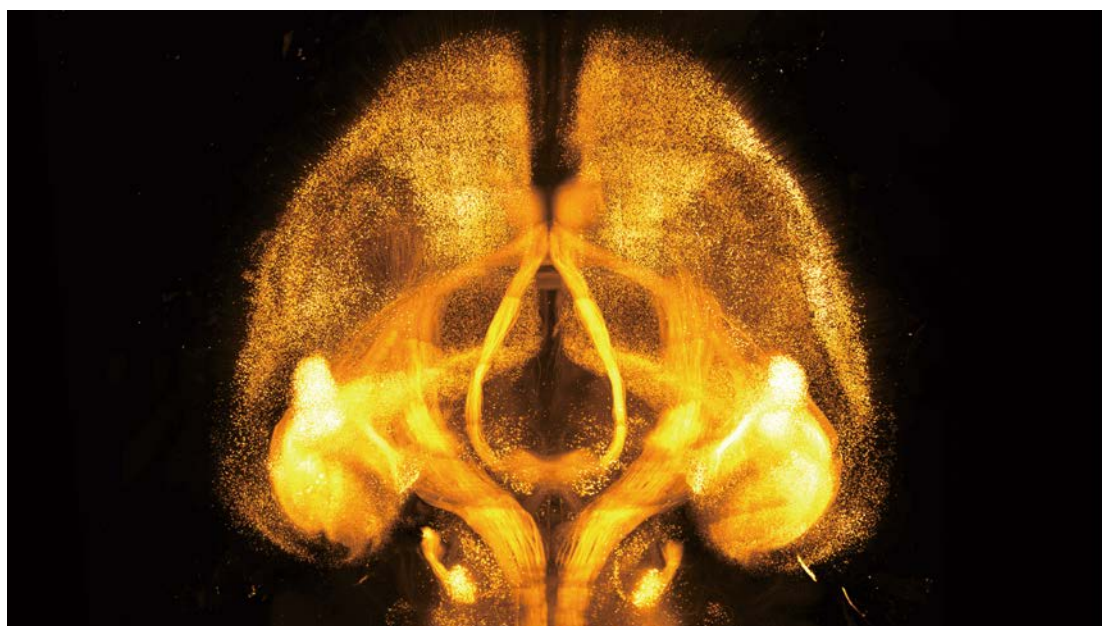
東京化成工業株式会社

What to Clear ?

透明化対象ごとにご紹介しています

- I. とにかく臓器を透明化したい 5
使用試薬 : CUBIC-L, CUBIC-R+, または CUBIC trial kit
- II. マウス全身など大きいサンプルを透明化したい 6
使用試薬 : CUBIC-L, CUBIC-R+
- III. マウスの脳を肥大化させて透明化したい 7
使用試薬 : CUBIC-L, CUBIC-X1, CUBIC-X2
- IV. マウスのより高度な透明化のために灌流から専用の試薬を用いたい 8
使用試薬 : CUBIC-L, CUBIC-R+, CUBIC-P
- V. 骨を含む臓器を透明化したい 9
使用試薬 : CUBIC-L, CUBIC-R+, CUBIC-B
- VI. ヒトの脳を透明化したい 10
使用試薬 : CUBIC-L, CUBIC-R+
- VII. ヒト組織など自家蛍光を落とし強力に脱脂して透明化したい 10
使用試薬 : CUBIC-HL, CUBIC-R+
- VIII. 3次元サンプルを均一に染色したい 11
使用試薬 : CUBIC-HV™1 kit

CUBIC-R+ は、CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] のいずれかをご使用ください。



製品

CUBIC trial kit (including mounting solution)

; CUBIC-L 50mL、CUBIC-R+(M) 50mL、観察用封入剤 (RI =1.520) 50mL の
組織透明化に必要な試薬が揃ったキット

1kit [C3942]

CUBIC-L ; 脱脂, 脱色用

25mL / 100mL / 500mL [T3740]

CUBIC-R+(N) ; 屈折率調整用

25mL / 100mL / 500mL [T3983]

CUBIC-R+(M) ; 屈折率調整用

25mL / 100mL [T3741]

CUBIC-B ; 脱灰用

25mL / 100mL [T3780]

CUBIC-HL ; 自家蛍光を落としての強力脱脂用

25mL / 100mL [T3781]

CUBIC-P ; 灌流用

25mL / 100mL [T3782]

CUBIC-X1 ; 肥大化用

25mL / 100mL [T3866]

CUBIC-X2 ; 肥大化させての屈折率調整用

25mL / 100mL [T3867]

CUBIC-HV™1 3D immunostaining kit

; 3次元サンプルの免疫染色用キット

カゼインが溶解されている調製済みバッファー入り

1kit [C3708]

CUBIC-HV™1 3D immunostaining kit (Casein separately)

; 3次元サンプルの免疫染色用キット

バッファー中のカゼインが小分けにされており長期保存向き

1kit [C3717]

CUBIC-HV™1 3D nuclear staining kit

; 3次元サンプルの核染色用キット

1kit [C3709]

関連製品

観察用封入剤 (RI = 1.520) [CUBIC-R+ 用]

50mL [M3294]

観察用封入剤 (RI = 1.467) [CUBIC-X2 用]

50mL [M3292]

Pig Brain Fragment [for CUBIC]

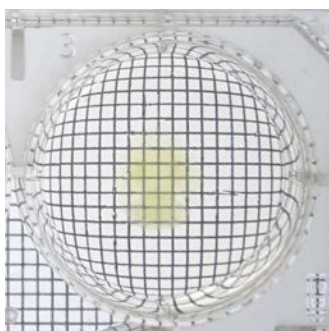
1vial [P2904]

Mouse Anti-NeuN Monoclonal Antibody

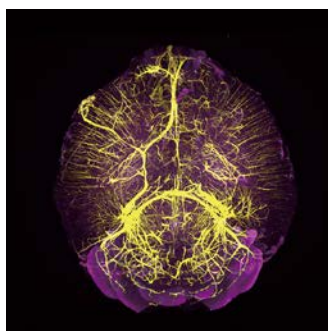
0.1mg/vial [M3586]

Goat Anti-Mouse IgG₁ Fab Fragment Cyanine 3 Conjugate

0.05mg/vial [G0598]



マウス全脳透明化



全脳透明化と核染色、免疫組織染色

本製品は東京大学・理化学研究所の
上田泰己教授らによって開発され、
理化学研究所のライセンスを受けて
製品化したものです。

CUBIC-HV™は株式会社CUBICStarsの
登録商標です。

特長

- CUBIC trial kit [C3942] によって組織透明化が可能。
- 有機溶媒を用いず水系溶媒で完結。廃液処理の手間が削減。蛍光タンパクのシグナルも保持。
- 蛍光タンパク質が発現したトランスジェニック動物の透明化後も、蛍光タンパク質が観察可能。
- 電気泳動装置等の特殊な機器は不要。
- Basic protocol ; 2種類の試薬に浸すだけでマウス全身、動物各臓器の透明化が可能。
 CUBIC-L [T3740] : 脱脂・脱色用
 CUBIC-R+(N) [T3983]、CUBIC-R+(M) [T3741] : 透明化用
 CUBIC-R+(N) [T3983] と CUBIC-R+(M) [T3741] の違いについて……
 CUBIC-R+(N) [T3983] は廉価であり、ハンドリングがしやすいものです。
 蛍光シグナルが減衰することがありますが、浸漬後、数日程度は問題なく観察できます。
 CUBIC-R+(M) [T3741] は蛍光シグナルの保持により優れています。CUBIC-R+(N) [T3983]、CUBIC-R+(M) [T3741] いずれも冬場などの低温時は、稀にサンプル内で析出することがあります。その場合は37°Cに数日間置くと解消します。
 以上から、まずCUBIC-R+(N) [T3983] でお試しの後、蛍光シグナルが観察できないようならCUBIC-R+(M) [T3741] の使用を推奨しております。
- Optional protocol ; 透明化処理の困難であった組織の透明化に適した試薬をご用意。
 CUBIC-B [T3780] : 骨用
 CUBIC-HL [T3781] : 高脂肪組織用
- 灌流固定と合わせて灌流させることで更なる透明化処理の効率化。
 CUBIC-P [T3782]
- Expansion protocol ; 動物組織を肥大化させつつ透明化させることが可能。
 CUBIC-X1 [T3866] : 組織肥大化用
 CUBIC-X2 [T3867] : 肥大化した組織のサイズを維持したまま透明化用
- 3次元サンプルの均一な染色のためのキットをご用意。
 CUBIC-HV™1 3D immunostaining kit [C3708] : 免疫染色用キット
 バッファーにカゼインが溶解されているので、すぐにお使いになれます。
 CUBIC-HV™1 3D immunostaining kit (Casein separately) [C3717] : 免疫染色用キット
 バッファー中のカゼインが小分けにされているので長期保存に向いております。
 CUBIC-HV™1 3D nuclear staining kit [C3709] : 核染色用キット
- 肥大化させることで顕微鏡による画像取得が容易。
- 光シート顕微鏡 (LSFM) や共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により細胞解像度でのイメージングが可能。
- お手持ちの顕微鏡の動作確認用の試験サンプルとしてブタ脳 [P2904] をご用意。
 本製品には4%PFA/PBSで固定したブタの脳が、約1cm立方に切断されて1個入っています。本製品をPBSで室温2時間で2回洗浄した上で、CUBIC-Lによる脱脂工程に入ってください。

使用方法: マウス臓器透明化手順

固定 4% PFA 1 day	洗浄 x 3 PBS > 2 hr x 3	(前置換) 50% CUBIC-L 6 – 24 hr	脱脂 CUBIC-L > 2 days	洗浄 x 3 PBS > 2 hr x 3	(染色) Stains > 3 days	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	(後固定) 1% FA 1 day	(後固定) 1% FA 1 hr	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	前置換 50% CUBIC-R+ 1 day	透明化 CUBIC-R+ > 1 day
-----------------------	-----------------------------	-----------------------------------	---------------------------	-----------------------------	----------------------------	-------------------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------------	------------------------------	----------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
臓器摘出				灌流固定後。
固定	4% PFA in PBS	4°C	1 day	
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	穏やかに振とう(以下の工程も同様)。計1日間程度。
(前置換)	50% CUBIC-L	37°C or RT	6 – 24 hr	CUBIC-Lと水を等量混合したもの。任意工程。
脱脂	CUBIC-L	37°C	> 2 days	CUBIC-Lは1日目、2日目、以降は2日間ごとに新しいものに取り替える。
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	計1日間程度。
(染色)	Stains	RT	> 3 days	任意工程。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	計1日間程度。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	4°C	1 day	37% ホルマリン[F0622]をPBSで希釈したもの。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	37°C	1 hr	4°C 一晩後のものを続いて37°Cに移す。染色した場合に行う。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	染色した場合に行う。
前置換	50% CUBIC-R+(N) or 50% CUBIC-R+(M)	RT	1 day	CUBIC-R+(N)またはCUBIC-R+(M)と水を当量混合したもの。
透明化	CUBIC-R+(N) or CUBIC-R+(M)	RT	> 1 day	

透明化例

●臓器摘出後の成体マウス脳



●4mL 50% CUBIC-Lでの一晩室温振とうによる前置換した後



●4mL CUBIC-Lでの5日間37°C振とうによる脱脂した後(1,2,4日目にCUBIC-Lを入替)



●PBSによる洗浄後、4mL 50% CUBIC-R+(M)での一晩室温振とうによる前置換した後



●4mL CUBIC-R+(M)での一晩室温振とうによる透明化後、観察用封入剤(RI = 1.520)[M3294]に浸しての観察



それぞれの写真は試薬に浸した状態で撮影しております。

透明化の手順には

CUBIC-R+(N) [T3983] もしくは
CUBIC-R+(M) [T3741] を
お使いください。

- 臓器に光が透過する
 - 使用後のCUBIC-Lに色につかない
- 上記の点が脱脂・脱色完了目安

使用試薬量

- CUBIC-L : 14 mL
- CUBIC-R+(M) : 6 mL

左の手順の試薬は5mLチューブの容器を用いた場合の容量です。お使いの容器により必要量は変わります。チューブを横にして臓器がほぼ試薬に浸る程度の液量で、臓器の直径よりやや大きめのチューブを用いてください。

PFA : パラホルムアルデヒド、RT : 室温

使用方法: マウス全身透明化手順

(前置換) 50% CUBIC-L 6 hr	脱脂 CUBIC-L > 5 days	洗浄 x 3 PBS > 2 hr x 3	(染色) Stains > 3 days	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	(後固定) 1% FA 1 day	(後固定) 1% FA 1 hr	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	前置換 50% CUBIC-R+ 1 day	透明化 CUBIC-R+ > 1 day
------------------------------	---------------------------	-----------------------------	----------------------------	-------------------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------------	------------------------------	----------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
灌流固定	PBS			灌流の最後に50% CUBIC-L (CUBIC-Lと水を等量混合したもの)を灌流させる。
	4% PFA in PBS			
灌流	PBS			
	50% CUBIC-L			
(前置換)	50% CUBIC-L	37°C	> 6 hr	全身を漬けて穏やかに振とう(以下の工程も同様)。任意工程。
脱脂	CUBIC-L	37°C	> 5 days	CUBIC-Lは1日目、2日目、以降は2日間ごとに新しいものに取り替える。
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	計1日間程度。
(染色)	Stains	RT	> 3 days	任意工程。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	計1日間程度。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	4°C	1 day	37%ホルマリン [F0622] をPBSで希釈したもの。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	37°C	1 hr	4°C一晩後のものを続いて37°Cに移す。染色した場合に行う。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	染色した場合に行う。
前置換	50% CUBIC-R+	RT	1 day	CUBIC-R+と水を等量混合したもの。
透明化	CUBIC-R+	RT	> 1 day	

CUBIC-R+は、CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] のいずれかをご使用ください。

透明化例

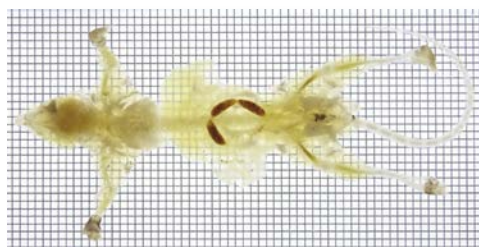
- 灌流固定後の成体マウス
- 200mL 50% CUBIC-Lでの一晩37°C振とうによる前置換
- 200mL CUBIC-Lでの5日間37°C振とうによる脱脂 (1,2,4日目にCUBIC-Lを入替)
 - 臓器に光が透過する
 - 使用後のCUBIC-Lに色につかない
 上記の点が脱脂・脱色完了目安
- PBSによる洗浄後、200mL 50% CUBIC-R+(M)での一晩室温振とうによる前置換
- 200mL CUBIC-R+(M)での5日間室温振とうによる透明化

使用試薬量

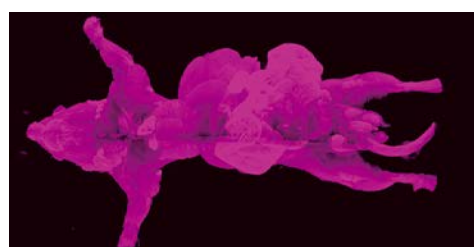
- CUBIC-L : 700 mL
- CUBIC-R+(M) : 300 mL

上記手順の試薬は12cm x 8cm x 6cmの容器を用いた場合の容量です。お使いの容器により必要量は変わります。全身が入るチューブ等の容器に、全身が浸る程度の試薬量でおこなってください。

PFA: パラホルムアルデヒド、RT: 室温



マウス全身透明化



全身透明化とヨウ化プロピジウム (PI) による染色

使用方法: マウス脳の肥大透明化手順

固定 4% PFA 1 day	洗浄 x 3 PBS > 2 hr x 3	前置換 50% CUBIC-L 3 hr	脱脂 CUBIC-L 5 - 14 days	洗浄 PBS 1 day	染色 Stains 3 days	洗浄 PBS 1 day	後固定 1% FA 1 day	後固定 1% FA 1 hr	洗浄 x 3 PBS > 2 hr x 3	肥大化 CUBIC-X1 2.5 days	透明化 CUBIC-X2 1.5 days
-----------------------	-----------------------------	----------------------------	------------------------------	--------------------	------------------------	--------------------	-----------------------	----------------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
臓器摘出				灌流固定後。
固定	4% PFA in PBS	4°C	1 day	
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	穏やかに振とう (以下の工程も同様)。計 1 日程度。
前置換	50% CUBIC-L	37°C	3 hr	CUBIC-L と水を等量混合したもの。
脱脂	CUBIC-L	37°C	5 - 14 days	CUBIC-L は 4 日間ごとに新しいものに取り替える。 1 週齢マウス脳 : 5 days 3 週齢マウス脳 : 7 days 8 週 - 6 月齢マウス脳 : 14 days
洗浄	PBS	RT	1 day	
染色	Stains	RT	3 days	
洗浄	PBS	RT	1 day	
後固定	1% FA	4°C	1 day	37% ホルマリン [F0622] を PBS で希釈したもの。
後固定	1% FA	37°C	1 hr	4°C 一晩後のものを続いて 37°C に移す。
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	
肥大化	CUBIC-X1	4°C	2.5 days	
透明化	CUBIC-X2	RT	1.5 days	CUBIC-X2 は 12 時間ごとに新しいものに取り替える。

透明化例

- 成体マウス脳を洗浄後、3mL 50% CUBIC-L での前置換
- 3mL CUBIC-L での 14 日間 37°C 振とうによる脱脂
(4,8,12 日目に CUBIC-L を入替)
- PBS による洗浄、染色剤による染色、PBS による洗浄後、30mL CUBIC-X1 での 2.5 日間 4°C 振とうによる肥大化
- 40mL CUBIC-X2 での 1.5 日間室温振とうによる透明化
(12,24 時間後に CUBIC-X2 を入替)
- 観察用封入剤 (RI = 1.467) [M3292] に浸しての観察

使用試薬量

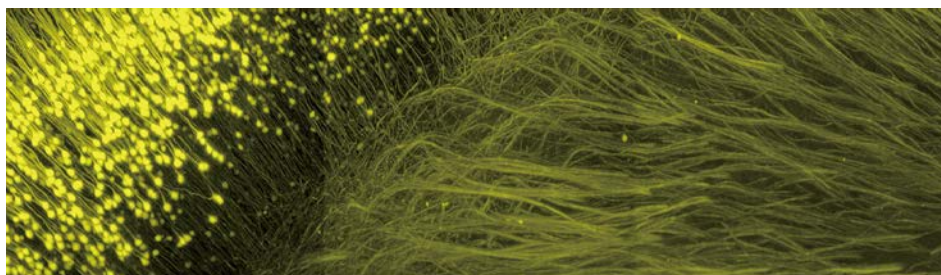
- CUBIC-L : 10.5 mL
- CUBIC-X1 : 30 mL
- CUBIC-X2 : 120 mL

お使いの容器により必要量は変わります。

* 核染色には 30 µg/mL ヨウ化プロビジウム (PI)、1.5 M NaCl を含む PBS でおこなってください。

肥大化した後の臓器はもろいので取扱には注意してください。

PFA : パラホルムアルデヒド、RT : 室温



肥大透明化後の形質転換したマウス脳の拡大図

使用方法: 生後6週以上の成体マウスをよりスムーズに透明化する手順

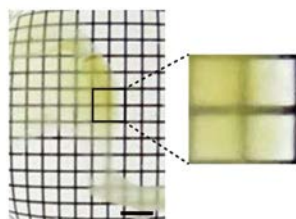
灌流 CUBIC-P	脱脂 CUBIC-L 3 - 7 days*	洗浄 PBS 1 day	(染色) Stains 5 - 7 days	(洗浄) PBS 1 day	(後固定) 1% FA 1 day	(後固定) 1% FA 1 hr	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	前置換 50% CUBIC-R+ 1 day	透明化 CUBIC-R+ 1 - 2 days
---------------	------------------------------	--------------------	------------------------------	----------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------------	------------------------------	-------------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
麻酔	Pentobarbital			Pentobarbital の過服用で麻酔させる。
灌流固定	15mL PBS	4°C		CUBIC-P まで灌流させた後、臓器を摘出する。
	20mL 4% PFA in PBS			
	15mL PBS			
	100mL CUBIC-P			
脱脂	CUBIC-L	37°C	3 - 7 days*	穏やかに振とう (以下の工程も同様)。
洗浄	PBS	RT	1 day	
(染色)	Stains	RT	5 - 7 days	任意工程。
(洗浄)	PBS	RT	1 day	染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	4°C	1 day	37% ホルマリン [F0622] を PBS で希釈したもの。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	37°C	1 hr	4°C 一晩後のものを続いて 37°C に移す。染色した場合に行う。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	染色した場合に行う。
前置換	50% CUBIC-R+	RT	1 day	CUBIC-R+ と水を等量混合したもの。
透明化	CUBIC-R+	RT	1 - 2 days	

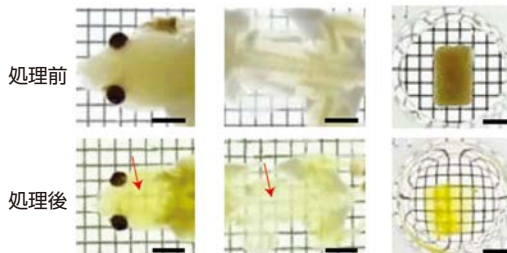
*脱脂に4日間以上かかる場合、CUBIC-L を一度新鮮なものに交換してください。

CUBIC-R+ は、CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] のいずれかをご使用ください。

使用方法: 骨を含むマウスの体や臓器を透明化する手順



マウスの脚の例



処理前

処理後

マウスの頭の例

マウスの体の例

マウスの脊椎例

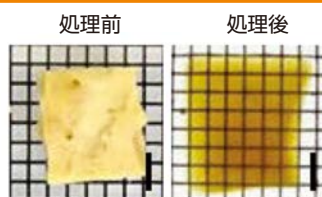
脱脂 CUBIC-L 3 - 7 days*	洗浄 PBS 1 day	脱灰 CUBIC-B 5 - 7 days	洗浄 PBS 1 day	脱脂 CUBIC-L 2 - 4 days	洗浄 PBS 1 day	(染色) Stains 5 - 7 days	(洗浄) PBS 1 day	(後固定) 1% FA 1 day	(後固定) 1% FA 1 hr	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	前置換 50% CUBIC-R+ 1 day	透明化 CUBIC-R+ 1 - 2 days
------------------------------	--------------------	-----------------------------	--------------------	-----------------------------	--------------------	------------------------------	----------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------------	------------------------------	-------------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
固定	4% PFA in PBS	4°C	1 day	
脱脂	CUBIC-L	37°C	3 - 7 days*	穏やかに振とう(以下の工程も同様)。
洗浄	PBS	RT	1 day	
脱灰	CUBIC-B	37°C	5 - 7 days	CUBIC-Bは少なくとも一度、新鮮なものに交換。
洗浄	PBS	RT	1 day	
脱脂	CUBIC-L	37°C	2 - 4 days	
洗浄	PBS	RT	1 day	
(染色)	Stains	RT	5 - 7 days	任意工程。
(洗浄)	PBS	RT	1 day	染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	4°C	1 day	37%ホルマリン [F0622]をPBSで希釈したもの。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	37°C	1 hr	4°C一晩後のものを続いて37°Cに移す。染色した場合に行う。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	染色した場合に行う。
前置換	50% CUBIC-R+	RT	1 day	CUBIC-R+と水を等量混合したもの。
透明化	CUBIC-R+	RT	1 - 2 days	

*脱脂に4日間以上かかる場合、CUBIC-Lを一度新鮮なものに交換してください。

CUBIC-R+は、CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] のいずれかをご使用ください。

使用方法: ヒトの脳の透明化の手順



ヒトの脳の例

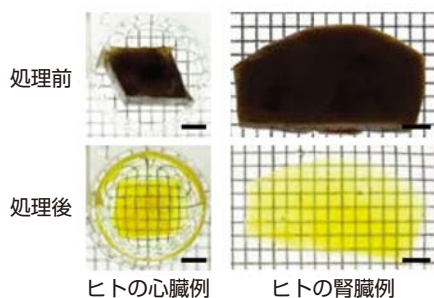
洗浄 PBS 1 day	脱脂 CUBIC-L 1 - 2 weeks	洗浄 PBS 1 day	前置換 50% CUBIC-R+ 1 day	透明化 CUBIC-R+ 1 - 2 days
--------------------	------------------------------	--------------------	------------------------------	-------------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
固定	Formalin	4°C		ヒトの脳は使用時までホルマリンに漬け保存。
洗浄	PBS	RT	1 day	
脱脂	CUBIC-L	45°C	1 - 2 weeks	穏やかに振とう (以下の工程も同様)。CUBIC-Lは少なくとも一度、新鮮なものに交換。
洗浄	PBS	RT	1 day	
前置換	50% CUBIC-R+	RT	1 day	CUBIC-R+ と水を等量混合したもの。
透明化	CUBIC-R+	RT	1 - 2 days	

脳細胞の自家蛍光は脱脂工程が進むにつれ減少します。自家蛍光のシグナルを保持したい場合、脱脂工程は1週間以内を推奨します。

CUBIC-R+は、CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] のいずれかをご使用ください。

使用方法: ヒト組織の強力な透明化の手順



ヒトの心臓例

ヒトの腎臓例

洗浄 PBS 1 day	脱脂 CUBIC-HL 1 - 2 weeks**	洗浄 PBS 1 day	(染色) Stains 5 - 7 days	(洗浄) PBS 1 day	(後固定) 1% FA 1 day	(後固定) 1% FA 1 hr	(洗浄 x 3) PBS > 2 hr x 3	前置換 50% CUBIC-R+ 1 day	透明化 CUBIC-R+ 1 - 2 days
--------------------	---------------------------------	--------------------	------------------------------	----------------------	-------------------------	------------------------	-------------------------------	------------------------------	-------------------------------

工程	試薬	温度	時間	備考
固定	Formalin	4°C		使用時までホルマリンに漬けて保存。
洗浄	PBS	RT	1 day	穏やかに振とう (以下の工程も同様)。
脱脂	CUBIC-HL	37°C or 45°C	1 - 2 weeks**	ヒトの脳、腎臓は 37°C。 ヒトの心臓、肝臓、肺、脾臓は 45°C。
洗浄	PBS	RT	1 day	
(染色)	Stains	RT	5 - 7 days	任意工程。
(洗浄)	PBS	RT	1 day	染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	4°C	1 day	37% ホルマリン [F0622] を PBS で希釈したもの。染色した場合に行う。
(後固定)	1% FA	37°C	1 hr	4°C一晩後のものを続いて 37°C に移す。染色した場合に行う。
(洗浄 x 3)	PBS	RT	> 2 hr x 3	染色した場合に行う。
前置換	50% CUBIC-R+	RT	1 day	CUBIC-R+ と水を等量混合したもの。
透明化	CUBIC-R+	RT	1 - 2 days	

**脱脂工程はサンプルの大きさによって CUBIC-HL に浸す時間が異なります。脱脂が進むと、サンプル内部の不透明部分が減少します。脱脂工程では、CUBIC-HL を少なくとも一度、新鮮なものに交換してください。脱脂工程に2週間以上かける場合、2週間処理後の工程はより低い温度 (室温など) で脱脂するか、CUBIC-L [T3740] で脱脂することを推奨します。

CUBIC-R+は、CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] のいずれかをご使用ください。

3次元サンプルの組織染色

3D組織染色キット CUBIC-HV™

特長

- 3次元サンプルの内外を均一に染色可能なバッファーや核染色剤、抗体入りキットです。
- 本キットだけでは透明化ができないので、透明化には CUBIC-L [T3740] と CUBIC-R+(N) [T3983] または CUBIC-R+(M) [T3741] を別途お買い求めください。

製品とキット内容



CUBIC-HV™1 3D immunostaining kit

1kit [C3708]

- 2 x Immunostaining Buffer (for 10 tests)
- 1 x Immunostaining Washing Buffer (for 10 tests)
- 10 x Immunostaining Additive (for 10 tests)
- Anti NeuN Mouse IgG1 Antibody (1mg/mL) (for 2 tests)
- 10 packs of 15mL tube

CUBIC-HV™1 3D immunostaining kit (Casein separately)

1kit [C3717]

- 2 x Immunostaining Buffer (without Casein) (for 10 tests)
- Casein Sodium from Milk (Subdivided)
- 1 x Immunostaining Washing Buffer (for 10 tests)
- 10 x Immunostaining Additive (for 10 tests)
- Anti NeuN Mouse IgG1 Antibody (1mg/mL) (for 2 tests)
- 10 packs of 15mL tube

(Caseinは使用直前に2 x Immunostaining Bufferに溶解させてください。溶解に2時間ほどかかります。)

CUBIC-HV™1 3D nuclear staining kit

1kit [C3709]

- 1 x 3D Nuclear Staining Buffer (for 10 tests)
- 100 x 3D nuclear staining Washing Buffer (for 10 tests)
- 200 x DAPI 2HCl (1mg/mL in Water) [for Cell Staining] (for 10 tests)
- 100 x Propidium Iodide (1mg/mL in Water) [for Cell Staining] (for 10 tests)
- 10 packs of 5mL tube

上記容量は成体マウス脳を用いた場合です。キットの製品構成は予告なく変更されることがあります。

参考文献 E. A. Susaki, H. R. Ueda, *et al.*, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1982. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15906-5>

※CUBIC-HV™は株式会社CUBICstarsの登録商標です。

成体マウス脳 3D染色プロトコル

試薬量や反応時間は一例です。サンプルの種類や大きさに応じて調整する必要があります。

脱脂

灌流固定後のマウスから脳を切除

後固定	: 4% PFA in PBS (キット外) で振とう。	4°C 一晚
洗浄	: 0.05% NaN ₃ 入り PBS で振とう。	室温 3 時間 x 3
前置換	: 50% CUBIC-L (CUBIC-L [T3740] を超純水でバッファー希釈) で振とう。	室温 一晚
脱脂	: CUBIC-L [T3740] で振とう。	37°C 3-5 日間
洗浄	: 0.05% NaN ₃ 入り PBS で振とう。	37°C 2 時間 x 3

3D 核染色キット [C3709] による核染色

核染色	: 核染色剤を、1x 3D 核染色バッファー (キット内) で希釈し振とう。 キット内の DAPI は 5 日間、Propidium Iodide は 3 日間振とう。	37°C 数日間
洗浄	: 100x 3D 核染色洗浄バッファー (キット内) を超純水で希釈し振とう。	25°C 2 時間 x 3

酵素反応 (任意工程。染色をよりきれいに、より早めたい場合)

前置換	: 酵素反応バッファー (キット外) で振とう。	4°C 一晚
酵素反応	: ヒアルロニダーゼ (キット外) を酵素反応バッファーで希釈し振とう。	37°C 一晚
洗浄	: ヒアルロニダーゼ洗浄バッファー (キット外) で振とう。	37°C 2 時間 x 3

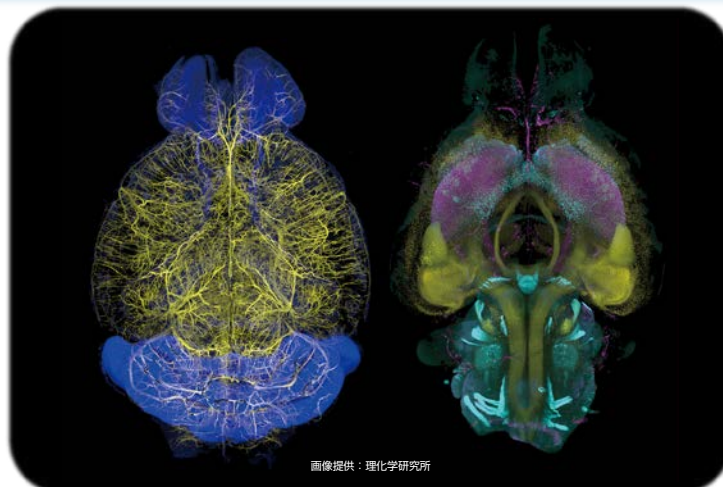
3D 免疫染色キット [C3708] [C3717] による免疫染色 (反応時間は酵素反応を行った場合)

抗体準備	: 一次抗体と二次抗体 (Fab 断片抗体を推奨) の反応。 ポジコン用一次抗体 Anti NeuN antibody はキット内 その他の一次抗体や二次抗体はキット外	37°C 1.5 時間
前置換	: 2x 3D 免疫染色バッファー (キット内) を超純水で希釈し振とう。	32°C 1.5 時間
免疫染色	: 2x 3D 免疫染色バッファーと 10x 免疫染色添加剤 (キット内) を混合し、 超純水で希釈し、そこに抗体反応液を加え 3D 免疫染色溶液を作成。 サンプルを 3D 免疫染色溶液に入れて振とう。 (酵素反応を省略した場合).....	32°C 1 週間 32°C 10 日間 その後 4°C 一晚
洗浄	: 冷やしておいた 1x 3D 免疫染色洗浄バッファー (キット内) で振とう。	4°C 30 分間 x 2
後固定	: 37% ホルマリン [F0622] を 1x 3D 免疫染色洗浄バッファーで 1% ホルマリンに希釈、4°C に冷やしてから振とう。	4°C 一晚 その後 37°C 1 時間
洗浄	: PBS で振とう。	25°C 2 時間

屈折率調整

前置換	: 50% CUBIC-R+ で振とう。 (CUBIC-R+ [T3983] または [T3741] を超純水で等倍希釈したもの)	25°C 一晚
屈折率調整	: CUBIC-R+ [T3983] または [T3741] で振とう。	25°C 2 日間
観察	: お手持ちの顕微鏡で観察。	

取得画像例



画像提供: 理化学研究所

技術情報は株式会社 CUBICstars のウェブサイトでもご覧いただけます。
<https://www.cubicstars.com/cubic-hv/index.html>



Q & A : 染色剤、抗体に関する質問

Q: 染色剤には何が使えますか？

A: 抗体を用いる場合は、直接蛍光ラベルされた抗体を0.5% Triton X™-100と0.01% NaN₃を含むPBSで適切な濃度に希釈、核染色する場合はヨウ化プロピジウム等を用いることができます。ヨウ化プロピジウムは終濃度10μg/mLとなるように0.5M NaClを含む0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4) で希釈して用いてください。

Q: 研究室にある抗体を用いることは可能ですか？

A: 参考文献中において、透明化前後で抗原性が保たれることを確認しているタンパク質もありますが、全てのタンパク質は確認していないため、実際にお持ちの抗体でご検討ください。

Q: CUBIC-HV核染色キットにはどんな核染色剤が使えますか？

A: CUBIC-HV核染色キットに同封されているDAPI、ヨウ化プロピジウムの他、SYTOX-G、RedDot™2も使用可能です。

Q: 通常の免疫組織染色と同様に、一次抗体の後に蛍光ラベル二次抗体を用いることは可能ですか？

A: 二次抗体を用いたプロトコルに関する情報は持ち合わせておりません。一次抗体、二次抗体それぞれの浸透に時間を要するため染色に時間がかかるとお考えください。実際にお試しいただくか、一次抗体の蛍光ラベル化もご検討ください。

Q: どんな蛍光タンパク質が使えますか？

A: 弊社ではGFPを用いた蛍光シグナル保持試験をおこなっております。また参考文献中 (*Cell* **2014**, 157, 726.) ではEGFP、EYFP、mCherry、mKate2の蛍光シグナルの保持について報告されています。

Q & A : 透明化の操作に関する質問

Q: 透明化する際の容器は何を用いればよいですか？

A: マウス全身透明化には全身が入る程度の大きさのタッパーを、組織透明化には組織が若干膨らむことがあるため組織の直径よりやや大きいチューブ、容量30mL以上のチューブを推奨します。CUBICの試薬は水系のためポリプロピレンやポリエチレンの容器に入れても安全に利用できることを確認しております。

Q: 組織が膨らむことがあるとのことですが、実験に影響はありませんか？

A: 各々の細胞が膨らむことはありますが、細胞の位置関係が保たれると報告されております。

Q: 動物から切除した臓器をすぐに透明化するのでサンプルは固定しなくてもよいですか？

A: 固定していないサンプルを透明化すると細胞の位置関係が保たれない場合がありますので、必ず固定操作を行ってください。

Q: 切除、固定してからしばらく時間が経過したサンプルは透明化可能ですか？

A: 固定液に数週間浸しておいたサンプルや、固定後-80℃で保管していたサンプルは透明化可能です。ただし、-80℃で保管していたサンプルは抗原性が失われることがあります。

Q: パラフィン包埋サンプルを切片化して透明化できますか？

A: パラフィン包埋サンプルは熱による脱パラフィン処理の後に透明化が可能です。しかし通常の免疫染色のようにサンプルを数μm厚に切るのをお控えください。透明化するとサンプルがもろくなり、数μm厚では処理ができなくなります。そのためカミソリ等で少なくとも1mm以上の厚さで切り、透明化処理をおこなってください。詳しい透明化方法は以下もご覧ください。

参考文献 CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis

S. Nojima et al., *Sci. Rep.* **2017**, 7, 9269.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09117-0>

Q: 実際に透明化するにはどれくらいの試薬の量が必要ですか？

A: マウス全身透明化の際には全身が浸る程度の量、各臓器透明化にはチューブを横にして臓器の半分がほぼ浸る程度の量を用いてください。用いるサンプルや容器の大きさにもよりますが、一例として一匹の成体マウス全身透明化にはCUBIC-Lが200 – 400mL、CUBIC-R+が100 – 200mL程度、マウスの各臓器透明化(約1cm³)にはCUBIC-Lが20 – 40mL、CUBIC-R+が10 – 20mL程度が必要です。

Q:透明化が進まないのですが、どうすればよいですか？

A: 以下の理由が考えられます。以下の対処法をご検討ください。

- a) 固定に用いた PFA 溶液の pH が高い
pH が 8 を超えると過固定で臓器が黄色くなり透明化が進みにくくなるため、pH を 7 – 7.5 にしてください。
また PFA の pH や処理時間で透明化度が変わるため、なるべく時間を均一にして固定することをおすすめします。
- b) 脱脂が完了していない
脱脂の工程を延長するか、CUBIC-L の交換頻度をご検討ください。1 日ごとに CUBIC-L を新鮮なものにして 37°C で振とうさせることを推奨しております。
- c) 透明化が完了していない
CUBIC-R+ を新鮮なものにして透明化にかかる時間を延ばしてください。

Q: 脱脂に要する時間はどれくらいですか？

A: 成体マウスの心臓、肺、腸、すい臓、脾臓は 3 日間程度、脳、肝臓、腎臓なら 5 日間程度です。

Q & A : 透明化後に関する質問**Q: 実験後の廃液はどうすればよいですか？**

A: 所属機関の廃棄物担当者にご相談の上、所定の処理方法に則って廃液処理をおこなってください。なお基本的には、実験後の生体サンプルとそれを浸すのに用いた試薬は医療用廃棄物、感染性廃棄物として処理し、未使用の CUBIC は水を多く含む有機廃液、難燃性廃液となります。

Q: 透明化後のサンプルの保存はどうすればよいですか？

A: 使用した CUBIC-R+ や CUBIC-X2 に漬けて常温保存可能です。なお CUBIC-R+ や CUBIC-X2 の溶媒である水が蒸発するとサンプルが固化する可能性があるため、パラフィルム等を用いて容器を密閉して保存してください。
また、アガロースゲル中でも常温保存可能です。

＜アガロースゲル保存法＞

適当なチューブに、透明化に使用した CUBIC-R+ に 2% のアガロース粉末を加えたのち加熱し、溶解させます。アガロース溶液が冷えて固まる前に透明化サンプルを中に入れ、十分に冷やしてアガロースゲルを固めます。このまま常温で保存可能です。またチューブの先端を切り取り (右写真) 切り取った先端から押し出すことでアガロースゲルのみの状態にすることも可能ですが、ゲルが表面から乾いて白っぽくなるため観察にはチューブから押し出した直後をおすすめします。刃物をご使用の際には怪我に十分ご注意ください。

**Q: 透明化サンプルがうまく観察できないのですが、どうすればよいですか？**

A: 光シート顕微鏡 (LSFM) や共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) での観察を推奨しております。また透明化後のサンプルはゲル状になるため、薄く切り出すのが難しい場合もございます。観察にはサンプルを観察用封入剤 (RI = 1.520) [M3294] または 観察用封入剤 (RI = 1.467) [M3292] に浸し、それらの屈折率に対応した対物レンズを用いて観察してください。

Q: 試薬の屈折率はいくらですか？

A: CUBIC-R+ の屈折率 (RI) は 1.520 で、CUBIC-X2 の屈折率は 1.467 です。屈折率を変えるために CUBIC-R+ や CUBIC-X2 に水などの溶媒を混ぜることは避けてください。

Q: 論文に CUBIC-1、CUBIC-2 とあるが CUBIC-L、CUBIC-R+(N)、CUBIC-R+(M) と同じものですか？

A: CUBIC-1、CUBIC-2 と CUBIC-L、CUBIC-R+(N)、CUBIC-R+(M) は異なります。CUBIC-1、CUBIC-2 は第一世代の CUBIC で、これを改良した第二世代 CUBIC が CUBIC-L、CUBIC-R+(N)、CUBIC-R+(M) となり透明度が向上しています。役割として、CUBIC-1 は CUBIC-L と同じ脱脂、脱色作用を示し、CUBIC-2 は CUBIC-R+(N)、CUBIC-R+(M) と同じ屈折率調整作用を示します。なお CUBIC-R+(N) は組成に nicotinamide を、CUBIC-R+(M) は組成に N-methylnicotinamide を用いております。CUBIC-R+(M) は CUBIC-R+(N) より蛍光シグナルの保持に優れており、弊社での蛍光シグナル保持試験に合格しております。ただ CUBIC-R+(N) も実用的には蛍光シグナルの保持がなされます。

*いずれの情報も透明化するサンプルやご使用になる染色剤や機器などにより透明化や染色結果が異なります。適宜処理時間や染色剤濃度をご検討ください。

参考文献

CUBIC-X1、CUBIC-X2を用いた、マウス脳の肥大化例

A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using CUBIC-X expansion microscopy and tissue clearing

T. C. Murakami, T. Mano, S. Saikawa, S. A. Horiguchi, D. Shigeta, K. Baba, H. Sekiya, Y. Shimizu, K. F. Tanaka, H. Kiyonari, M. Iino, H. Mochizuki, K. Tainaka, H. R. Ueda, *Nat. Neurosci.* **2018**, 21, 625.

<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0109-1>

CUBIC-L、CUBIC-R+、CUBIC-B、CUBIC-HL、CUBIC-Pを用いた、マウス全身・脳・肺・肝臓・肢・腎臓の透明化、マーモセット脳の透明化、ヒト脳・腎臓・肝臓・肺の透明化例 (CUBICによる透明化後の免疫染色プロトコール)

Chemical Landscape for Tissue Clearing based on Hydrophilic Reagents

K. Tainaka, T. C. Murakami, E. A. Susaki, C. Shimizu, R. Saito, K. Takahashi, A. Hayashi-Takagi, H. Sekiya, Y. Arima, S. Nojima, M. Ikemura, T. Ushiku, Y. Shimizu, M. Murakami, K. F. Tanaka, M. Iino, H. Kasai, T. Sasaoka, K. Kobayashi, K. Miyazono, E. Morii, T. Isa, M. Fukayama, A. Kakita, H. R. Ueda, *Cell Rep.* **2018**, 24, 2196.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.056>

マウス全身・脳・肺の透明化例

Whole-Body Profiling of Cancer Metastasis with Single-Cell Resolution

S. I. Kubota, K. Takahashi, J. Mishida, Y. Morishita, S. Ehata, K. Tainaka, K. Miyazono, H. R. Ueda, *Cell Rep.* **2017**, 20, 236.

<http://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.010>

マウス脳、マーモセット脳の透明化例

Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis

E. A. Susaki, K. Tainaka, D. Perrin, F. Kishino, T. Tawara, T. M. Watanabe, C. Yokoyama, H. Onoe, M. Eguchi, S. Yamaguchi, T. Abe, H. Kiyonari, Y. Shimizu, A. Miyawaki, H. Yokota, H. R. Ueda, *Cell* **2014**, 157, 726.

<http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.042>

CUBIC灌流による、マウス全身・心臓・肺・腎臓・肝臓の透明化例

Whole-Body Imaging with Single-Cell Resolution by Tissue Decolorization

K. Tainaka, S. I. Kubota, T. Q. Suyama, E. A. Susaki, D. Perrin, M. Ukai-Tadenuma, H. Ukai, H. R. Ueda, *Cell* **2014**, 159, 911.

<http://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.034>

CUBICのヒト病理組織診断への応用例

CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis

S. Nojima, E. A. Susaki, K. Yoshida, H. Takemoto, N. Tsujimura, S. Iijima, K. Takachi, Y. Nakahara, S. Tahara, K. Ohshima, M. Kurashige, Y. Hori, N. Wada, J. Ikeda, A. Kumanogoh, E. Morii, H. R. Ueda, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 9269.

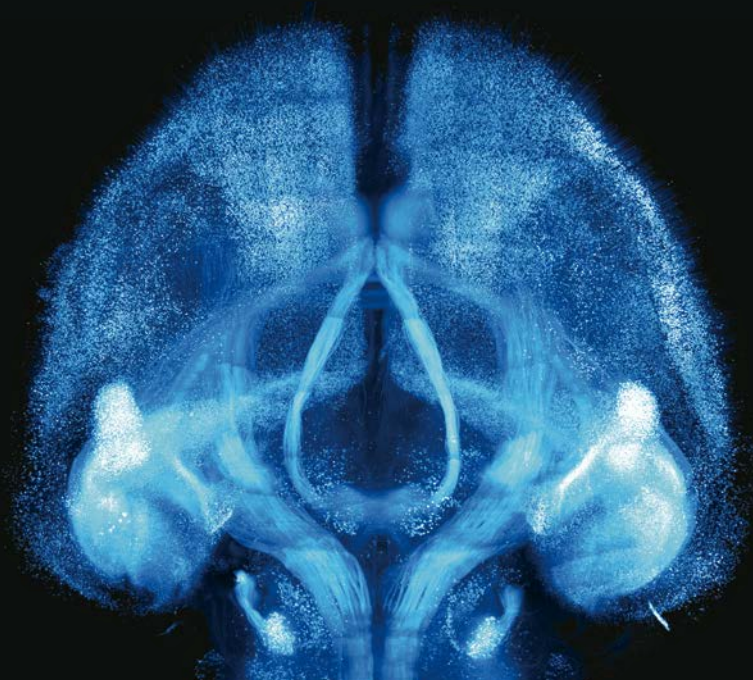
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09117-0>

CUBIC-HV™キットによる全臓器・全身スケールの3次元組織染色・観察

Versatile whole-organ/body staining and imaging based on electrolyte-gel properties of biological tissues

E. A. Susaki, C. Shimizu, A. Kuno, K. Tainaka, X. Li, K. Nishi, K. Morishima, H. Ono, K. L. Ode, Y. Saeki, K. Miyamichi, K. Isa, C. Yokoyama, H. Kitaura, M. Ikemura, T. Ushiku, Y. Shimizu, T. Saito, T. C. Saido, M. Fukayama, H. Onoe, K. Touhara, T. Isa, A. Kakita, M. Shibayama, H. R. Ueda, *Nat. Commun.* **2020**, 11, 1982.

<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15906-5>



画像提供

東京大学大学院医学系研究科
上田泰己先生および真野智之先生

東京化成工業株式会社

試薬製品について

- 本社営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 16-12 T-PLUS 日本橋小伝馬町8階
Tel: 03-3668-0489 Fax: 03-3668-0520 E-mail: Sales-JP@TCIchemicals.com
- 大阪営業部 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜1-1-21 第2中井ビル1階
Tel: 06-6228-1155 Fax: 06-6228-1158 E-mail: osaka-s@TCIchemicals.com

スケールアップ、受託サービス(合成・開発・製造)について

- 化成品営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町 16-12 T-PLUS 日本橋小伝馬町8階
Tel: 03-5651-5171 Fax: 03-5640-8021 E-mail: finechemicals@TCIchemicals.com

弊社製品取扱店

本誌掲載の化学品は試験・研究用にのみ使用するものです。化学知識のある専門家以外の方のご使用はお避けください。品目や製品情報等、掲載内容の変更を予告なく行う場合があります。内容の一部または全部の無断転載・複製はご遠慮ください。