

® 诺海生物科学仪器(上海)有限公司
Nuohai Life Science (Shanghai) Co., Ltd



实验操作视频

胚胎透明化试剂盒 使用说明书



CAT#: NH-CR-230601

产品简介:

该试剂盒提供一种可快速、高效透明厘米量级组织样品的亲水型透明化方法。该方法主要是通过水化作用增加细胞膜流动性结合去垢剂对细胞膜的通透作用实现对样品进行去脂的目的,之后通过高折射率匹配使样品透明。该方法适用于低龄胚胎(小鼠胚胎孕龄不大于15天)及类器官的透明化。透明后的样本可采用激光共聚焦显微镜或光片显微镜进行三维成像。该产品具有快速、高效;内源荧光蛋白保留效果好;生物安全性高等特点。

试剂盒内容: (生产日期及批次详见试剂盒外包装)

名 称	8T	2T
溶液A	225 ml	60 ml
溶液B	25 ml	7ml
溶液C	240 ml	60 ml
成像液	100 ml	100 ml
琼脂糖	16g	4g
30 ml离心管	8	2
硅胶模具	1	1
磁性冲孔板	1套	1套

自备物品:

4%多聚甲醛 (PFA)、0.01M PBS、50 ml离心管、手术器械等用于实验动物灌注取材;底透台(诺海, Cat#:NH210901)等用于透明程度判断;封闭液、抗体、核染料、Triton X-100等用于样本标记。



使用限制:

本产品属科研专用,不用于诊断、治疗。

步骤:

固定后的样品经过去脂、折射率匹配后变得透明,建议琼脂糖包埋后在配套的成像液中进行成像。**详细步骤以小鼠胚胎(E10)为例(如图1):**

1.取材及后固定(1天)

孕鼠颈椎脱臼后,剪开腹壁,暴露胚胎。去掉胚胎外围的胎盘等组织后将其置于50ml离心管中,加入预冷4% PFA与4℃摇床上缓慢摇动进行后固定。4% PFA的体积不小于样本体积的20倍。固定过夜,第二天去除PFA后,使用0.01M PBS清洗组织三次,每次2小时,清洗过程在摇床上进行,彻底残留PFA(转速不可过快,以防损伤样本)。

2.去脂溶液配制(2分钟)

溶液A和溶液B以质量比9:1配制去脂溶液,配置后的去脂溶液可在室温保存2个月。建议去脂溶液体积为样品体积的20倍以上。

3.去脂(0.5~4天)

清洗后的小鼠胚胎置于30 ml离心管中并加入15ml去脂溶液。将离心管置于37℃摇床内,以60rpm的转速缓慢摇动去脂。孕龄小于E10小鼠胚胎一般0.5天即可完成去脂。E14.5小鼠胚胎约需4天,需在去脂第二天更换一次新鲜的去脂溶液。

去脂完成的标准:将盛有样品的离心管放在底透台(诺海, Cat#:NH210901)的刻度线(或任意图案)上,透过样品观察刻度线,清晰则表明去脂过程已完成,可进行下一步(如图2)。





5.免疫后固定(可选)

不带有内源荧光蛋白标记的样本,可在免疫标记后采用1%PFA再次固定样本,加固抗体标记。固定可在4℃摇床上缓慢摇动过夜。固定完成后使用0.01M PBS清洗组织三次,每次2小时。

6.折射率匹配(2天)

去脂或免疫染色后,将样本置于20ml溶液C中室温进行折射率匹配,匹配过程缓慢摇动24~48小时至样本完全透明。

匹配完成的标准是:将样品及溶液C一起倒入干净的培养皿中,并置于底透台(诺海, Cat#:NH210901)的刻度线(或任意图案)上,保证样品没入溶液C中,透过样品观察黑色刻度线清晰且无扭曲,则表明匹配过程已完成(如图2)。采用共聚焦显微镜等非光片显微镜成像,在折射率匹配完成后即可成像,使用溶液C作为封片剂进行封片固定组织。

7.凝胶溶液配制(约1小时)

取9.8 g溶液C于50 ml离心管中,加入0.2 g琼脂糖,涡旋混匀后微波加热至沸腾后立刻关闭微波炉,将离心管转移至37℃培养箱或烘箱中静置,待琼脂糖缓慢溶解。配制好的凝胶溶液为淡黄色澄清液体。凝胶溶液可在37℃保存1-2周,凝胶溶液颜色会随时间变深,变成深黄色或棕色后不建议使用,建议现用现配。

8.凝胶包埋(约5小时)

采用三明治夹心法包埋透明后的样本。先在合适大小的模具孔位中加入2mm深37℃凝胶溶液(放入冲孔板并使其沉到模具底部),于4℃冰箱中冷却约30分钟,使模具中的凝胶溶液处于半凝固状态。之后将折射率匹配后的样品放入模具中,加入凝胶溶液与样品高度齐平或略低于样品顶部,调整样品的位置于模具中间后,再次将模具放入4℃冰箱中2小时。最后加入凝胶溶液与模具表面齐平,盖上盖玻片,并于4℃冰箱中加速固化约2小时。包埋后的样品可于4℃冰箱中过夜保存,建议尽快成像。





9.透明组织整体成像

成像前去除盖玻片,并将样品块儿从凝胶模具中取出。包埋有冲孔板的样品块儿可直接磁吸到LS18光片显微镜的样品架上,调整样品位置使其与激发光垂直。成像样品仓中填充配套成像液作为成像介质,以保证成像质量。

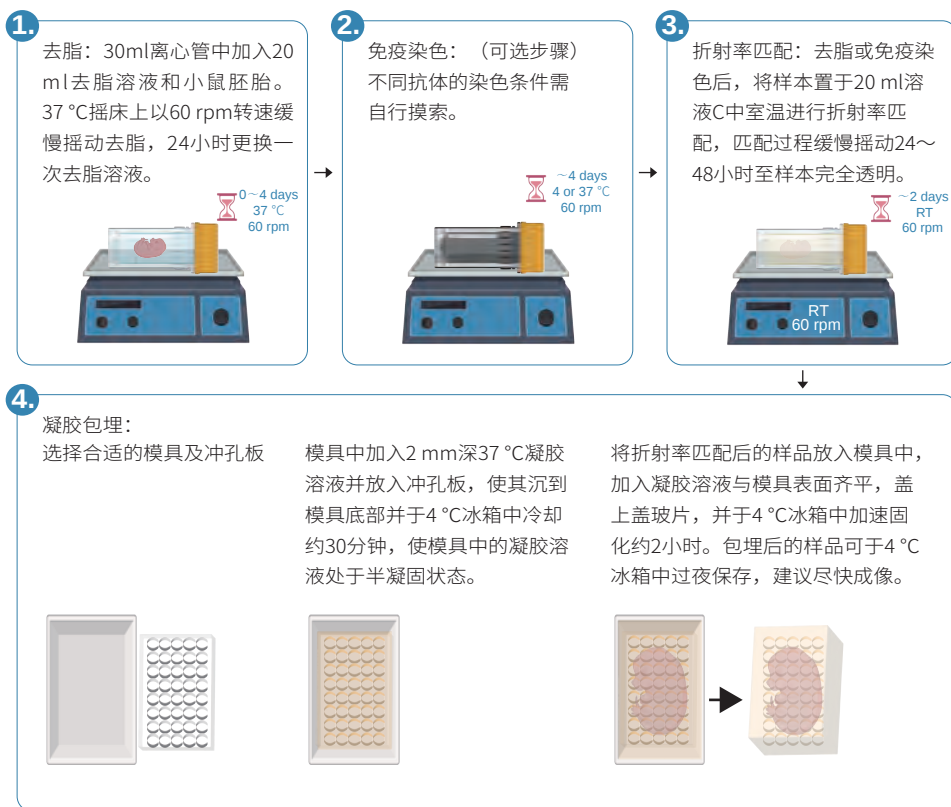


图1:小鼠胚胎透明化及凝胶包埋流程



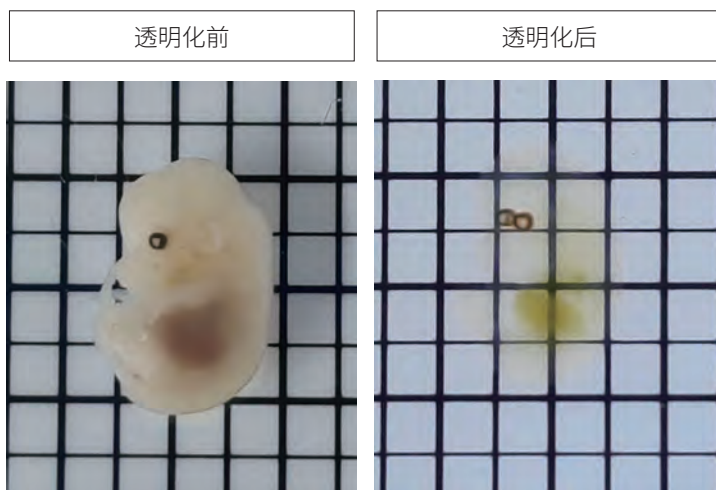
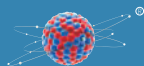


图2: E14.5天小鼠胚胎透明化前后对比图埋流程



诺海生物科学仪器(上海)有限公司
Nuohai Life Science (Shanghai) Co., Ltd



· 微信公众号 ·



· 视频号 ·



· 已发文章 ·

诺海生物科学仪器(上海)有限公司

地址:上海市松江区九亭镇云凯路66号科技绿洲二期10号楼2层

电话:86-21-37827858、13818273779 (微信同号)

邮件:info@nuohailifescience.com

网址:www.nuohailifescience.com