

SeeDB Protocol 与 Q&A

TIPS (更新于12-24-2015)

1. 样品制备

1-1. 样品大小:

将样品修剪到能够让SeeB有效渗透样品(最大不要超过物镜的工作距离,通常3-4mm厚)。
不要制作非常厚的样品,以致超过您物镜的工作距离,因为这样做是没有用的。

1-2. 对小而脆弱的样品进行琼脂糖包埋处理;不建议使用大的样品。

1-3. 对于子宫上皮细胞不要使用Fast Green染液
(可使用alex647作为替代)。

2. 方法和不同情况下的选择

2-1. 新生脑和胚胎脑: SeeDBp

2-2. 年幼的脑(例如三周): SeeDB

2-3. 用于切片和半脑的成年脑: SeeDB37

2-4. 成年全脑: SeeDB37ht (可能会出现轻微的样品膨胀和部分淬灭)

3. 显微镜和物镜

3-1. confocal (共聚焦)

空气物镜与水浸物镜相比,水浸镜头要比空气镜头更好;定制的物镜不是必需的。
油/甘油物镜同样适用,不过其工作距离会有所限制。

3-2. 2P 成像

水物镜、Scale物镜、定制物镜都是可用的,但是定制物镜对于SeeDB的性能表现是最好的。

3-3. 空气物镜的轴向校准为真实深度1.49×;而水浸物镜则为1.12× (1.49/1.33)。

4. 可能的成像深度 (成年小鼠脑部)

4-1. confocal (水浸物镜)

在脊柱分辨率下~500μm;在纤维分辨率下~1mm;细胞分辨率下~2mm。

4-2. 2P (水浸/scale浸物镜)

在脊柱分辨率下~1mm;在纤维分辨率下~3-4mm。

5. 样品在室温下或37°C下保存最多一个星期(不要保存在冰箱里!)。我们强烈推荐您在透明化后立即成像;

延长保存期也许会导致染色的淬灭和/或自体荧光的积累。

对于长期保存,您应该把样品保存在PBS中。

6. 抗体染色

使用Triton-X处理的标准全胚胎免疫组织化学染色法(whole-mount IHC),成像时的最大深度仅仅为100um。

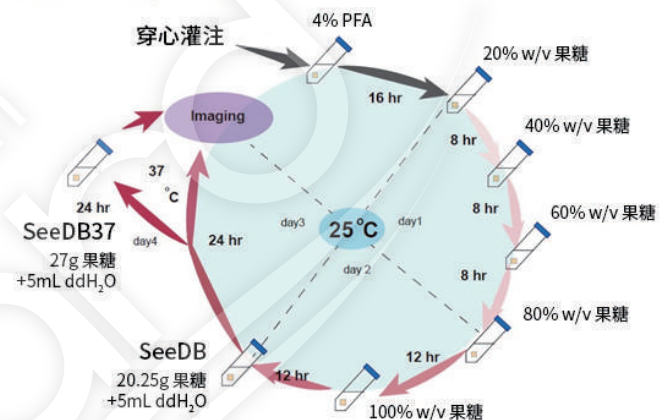
改进的用于SeeDB的抗体染色法同样被报道了(点击阅读)。

如果全胚胎免疫组织化学染色法是主要的方法,你也可以选择其他的透明化试剂,如BABB和TDE。

尽管荧光蛋白会淬灭,但这些透明化试剂能防止Alexa染料发生荧光。

CLARITY在全胚胎免疫组织化学染色法中表现也很不错。

Standard SeeDB protocol



7. 我们通常使用MBF公司的Neurolucida来作为重构软件。Bitplane的Imaris也同样支持三维渲染以及神经示踪。

同样也可以使用开源软来进行重构(如Vaa3d、neuTube、Simple Neurite Tracer)

我们强烈推荐在重构时使用high-spec workstation这个软件。

RAM格式会比数据的本身大好几倍。Windows7 Pro 支持的最大容量为192GB。

FAQ(更新于12-24-2015)

Q1. 实验的关键?成功率和可重复性如何?

实验中并没有什么困难的步骤。最重要的是确保果糖溶液能有效地渗入到样品。当您使用过厚的样品时(如成年大鼠的全脑或全身样品),透明化效果就会很差。由于SeeDB是具有粘性的,强烈建议您将其置于涡旋仪上剧烈震荡(在50mL锥形管总装大约20mL溶液,以约4rpm速度运行)。对于比较厚的样品,避免使用琼脂糖包埋。应在室温下进行孵育(25°C或以上,但是不要在4°C下)。由于物镜的工作距离通常限制着最大的深度(2-3mm),因此不要去选择厚度大于您物镜的工作距离的样品。骨骼、皮肤、纤维化的组织是很难透明化的,因此在一开始就不应考虑对其进行透明化。通常来说,有一定年龄的动物会更难进行透明化。对于不易透明化的样品,我们强烈建议其切片厚度设为1-2mm。如果未涉及荧光蛋白,您可以考虑前文列出的其他透明化试剂。

Q2. 实验时间呢?我应该延长孵化时间直到样品浸没在溶液里面吗?

样品应该浸泡在果糖浓度最大为60%的溶液中,不超过此浓度。您可以使用涡旋仪以便SeeDB渗入较大的样品中。您也可以在更高的温度下(如37°C或50°C)孵育样品来促进渗透。不要孵化过长时间,因为自体荧光会逐渐积累。在低浓度下延长孵化的时间会引起样品的膨胀。

Q3. 固定剂的选择

推荐使用含4%多聚甲醛(PFA)的PBS溶液。如果可能的话,推荐您进行穿心灌注。PFA应现配现用。使用戊二醛的话可能会产生更多的自体荧光。使用乙醇固定的话会使荧光蛋白淬灭,从而导致样品的收缩。

Q4. 我能把固定好的样品直接放到最高浓度下的SeeDB吗?

不能。逐步的孵化(从低浓度到高浓度)对透明化来说是必要的。

Q5. 温度的选择

对于标准的SeeDB/SeeDBp法,我们强烈建议在室温下进行孵化(25°C)。SeeDB37和SeeDB37ht应该分别在37和50°C下进行。

Q6. 对于其他物种呢?其他器官呢?

对于昆虫样品,选择FocusClear会更好。我们仅仅测试了小鼠的脑部样品。但是某程度上SeeDB应该可以适用于其他脊椎动物(如斑马鱼)和其他器官(如肝部)。纤维组织(如心脏)会更难去透明化。如果您选择了较大的样品,重要的是将其厚度修剪到3-4mm厚(不要超过您物镜的工作距离),因为这样才能让SeeDB有效地渗透。例如,对大鼠全脑进行透明化是很困难的。

Q7. 对于成像来说,定制的物镜是必要的吗?

对于共聚焦显微镜来说是不必要的。在共聚焦成像中,最大的成像深度为1-2mm。在这个范围内,浸水物镜足提供合适的分辨率。而在双光子显微镜中,定制的物镜在深度大于3mm的高分辨率成像中有着一定优势。详见表格3中Nature Neuroscience的关于分辨率定量分析的文章。

Q8. 定制物镜如何入手呢?(新)

Olympus推出了用于SeeDB(和其他高折射率的透明化试剂)的定制物镜。XLSLPLN25XGMP(25x, NA 0.9, WD 8mm)覆盖了1.41-1.52的RI值。XLPLN10XSVMP(10x, NA 0.6, WD 8mm)覆盖了1.33-1.52的RI值。如果您感兴趣的话,请联系Olympus。

Q9. 我能对全脑成像吗？

在标准SeeDB/SeeDB37下，最大只能对P21小鼠的全脑进行透明化。对于年龄更大的样品，我们建议使用半脑样品。如果在您的研究中必须进行全脑的成像，您可以使用SeeDB37ht法，尽管这会导致样品轻微地膨胀并且荧光蛋白会部分淬灭。以下几点也是需要考虑的。

Q10. 成像时间的长短

成像时间取决于您显微镜的扫描速度以及您所需的分辨率。在我们的成像中，需要6-24小时的成像时间。因此，想要获得成年小鼠全脑的高分辨率图像，会需要大约一周的时间来成像。

Q11. 数据大小？

开发人员得到的原始数据大约为2-20GB。我们使用high-spec workstation进行数据处理。对于成年小鼠的全脑的数据大小约为100G-1TB。

Q12. 激光片层扫描显微镜怎么样？

我们测试了LaVisionBioTec的Ultramicroscopy显微镜。因为激光片层扫描显微镜不使用针孔，所以它对于发射光的散射会更加敏感。因此，其成像的分辨率不如传统的共聚焦/2P显微镜。如果您使用Zeiss激光片层扫描显微镜，您需要修剪样品的大小使其适合样品室。值得注意的是，Zeiss激光片层扫描显微镜并不是为SeeDB这种高折射率的溶液而设计的。例如，激光片层扫描显微镜的光学参数（如激光片层的厚度），对于SeeDB样品的成像来说都不是最优的。

Q13. 切片的最小值和最大值？

请您需要根据您物镜的工作距离来决定厚度。我们推荐切片的厚度不要超过3mm。对于非常薄且脆弱的切片，您可以使用琼脂糖包埋。

Q14. 我应该使用哪种级别的试剂？

我们使用>99%的D(-)-果糖和>95% α -硫代甘油（详情请咨询当地Wako试剂分销商）。

Q15. 我可以不使用硫代甘油吗？我能改变其浓度吗？

对于年幼的脑部样品，可不使用硫代甘油。对于成年样品以及SeeDB37/SeeDB37ht法，我们推荐使用硫代甘油，因为会在较高的温度下会促进Maillard反应的发生。对于所有方法，我们推荐0.5%的浓度；更高的浓度可能会导致样品轻微地膨胀。

Q16. 我应该在镶嵌时使用SeeDB吗？

是的。您应该在样品镶嵌到样品室时使用与样品平衡的SeeDB/SeeDB37。不要使用新鲜制备的SeeDB/SeeDB37进行镶嵌，因为2P成像对于折射率的细微差别很敏感。

Q17. 我能使用SeeDB来进行物镜的浸泡吗？

不推荐使用SeeDB来进行浸泡，因为它具有粘性。首先，在粘性溶液中，物镜本身会造成运动伪影。第二，SeeDB样品的成像通常需要长的成像时间。在成像的过程中，SeeDB表面的水蒸气会导致折射率的不均匀，使得成像分辨率的降低。我们通常会将SeeDB样品封闭在样品室中（夹着玻璃片），然后用水（对于水浸物镜），或30%甘油（对于Scale浸物镜），或80-90%的2,2'-硫代甘油（对于SeeDB物镜）来浸泡。

Q18. SeeDB能和EM一起使用吗？

可以的，因为质膜和超微结构可以保持完整。

Q19. 追踪单神经元的最低荧光密度为？

化学染色（如右旋糖苷和Dil）会比荧光蛋白更亮。对于荧光蛋白，子宫内电穿孔和病毒（AAV或sindbis）是表达足量荧光蛋白的理想选择。我们不能追踪带有敲入cre报告系，mT/mG的单突触。

Q20. 处理自体荧光

有很多因素影响着自体荧光。引起自体荧光的一主要原因是醛-胺化合物。对于样品的固定，您应该使用新鲜配制的PFA/PBS以最小化自体荧光。果糖是一种还原糖并倾向于与各种胺，包括氨基酸发生反应(如Maillard反应)，从而产生自体荧光。因此，固定前进行穿心灌注可能降低自发荧光。引入额外的化学物质(去垢剂和盐类)也可能导致自体荧光。FastGreen染液通常用于子宫内电穿孔，但不应该用于SeeDB样本。它在动物的整个生命过程中都会保留在大脑中，并且经常在SeeDB处理后产生强烈的荧光。果糖溶液不应含有其他化学物质，如去垢剂，因为它们也可能影响着自体荧光。通过使用硼氢化钠(NaBH₄)或CuSO₄预处理可以减少内源性的自体荧光。根据我们的经验，双光子成像对自发荧光的敏感度低于单光子成像;较长的波长(例如，Alexa647)的敏感度低于较短波长。我们正在开发一种新版本的SeeDB，它能克服自体荧光的问题(未发表)。

Q21. 荧光蛋白的淬灭

荧光蛋白的淬灭可能会发生在PFA过度固定，在SeeDB中延长孵化(>几天)或在高温下孵化。最好遵循建议中透明化的步骤，并在透明化后的不久(几天内)进行成像。一些荧光蛋白(例如，tdTomato)会在SeeDB中逐渐淬灭，因此应在成像后立即成像(在一天内)。由于淬灭的问题，ECFP不适合用于SeeDB。

Q22. 复染和抗体染色(新)

渗透处理可以改善核染色和/或抗体(例如，Triton-X100或皂苷，0.5-2%)的渗透。如果DAPI荧光的散射在您的样品中存在问题，NeuroTrace®640/660会是另外一种选择，因为红光散射的光会比蓝光少得多，因此您可以预期得到更好的图像质量。经过改进的用于福尔马林固定(iSeeDB)组织和石蜡包埋(piSeeDB)组织的抗体染色法，同样也有报道。

Q23. 与CLARITY法结合(新)

此法在此处被报道。在这个方法中，SeeDB被用作FocusClear的替代物。然而，我们并不推荐在SeeDB中长期储存CLARITY样品。

上述试剂仅供实验研究用，不可用作“医药品”、“食品”、“临床诊断”等。

Listed products are intended for laboratory research use only, and not to be used for drug, food or human use. / Please visit our online catalog to search for other products from Wako; <http://www.e-reagent.com> / This leaflet may contain products that cannot be exported to your country due to regulations. / Bulk quote requests for some products are welcomed. Please contact us.

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

www.wako-chem.co.jp
1-2, Doshomachi 3-Chome
Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Tel.: +81 6 6203 3741
Fax: +81 6 6203 1999
ffwk-cservice@fujifilm.com
Online Catalog: www.e-reagent.com



宝柏·中国

北京 Tel: 010 64136388
上海 Tel: 021 62884751
广州 Tel: 020 87326381
香港 Tel: 852 27999019
info@boppard.cn
www.boppard.cn

宝柏官微



产品数据库

