

BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit

产品编号	产品名称	包装
P0112S	BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit	25ml
P0112M	BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit	100ml
P0112L	BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit	500ml

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit, 即BeyoCUBIC™动物组织透明化试剂盒, 是一种非常有效地对动物整个身体、整个器官、组织块或类器官等非常简单、便捷、快速地进行高质量、高透明度透明化处理的试剂盒。经本试剂盒透明化处理的动物样品, 可以与后续的免疫荧光、免疫组化、常规或荧光染色、生物发光等结合起来, 可以实现组织块、类器官、器官甚至整个动物体的三维成像, 从而广泛用于生物、医学领域的研究。
- CUBIC (Clear, unobstructed brain/body imaging cocktails and computational analysis)是一种简单、有效的动物组织透明化处理方法[1]。碧云天的BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit和常规的CUBIC透明化效果基本一致。
- 本试剂盒提供的BeyoCUBIC™-I Solution不仅可以促使组织、器官脱脂, 还可以使组织、器官中的血红素脱色。BeyoCUBIC™-II Solution可以调节组织的折射率, 使其与溶剂折射率相匹配, 尽量减少了组织中的散射光, 利于光学成像。本产品进行动物组织透明化的实验流程参考图1。

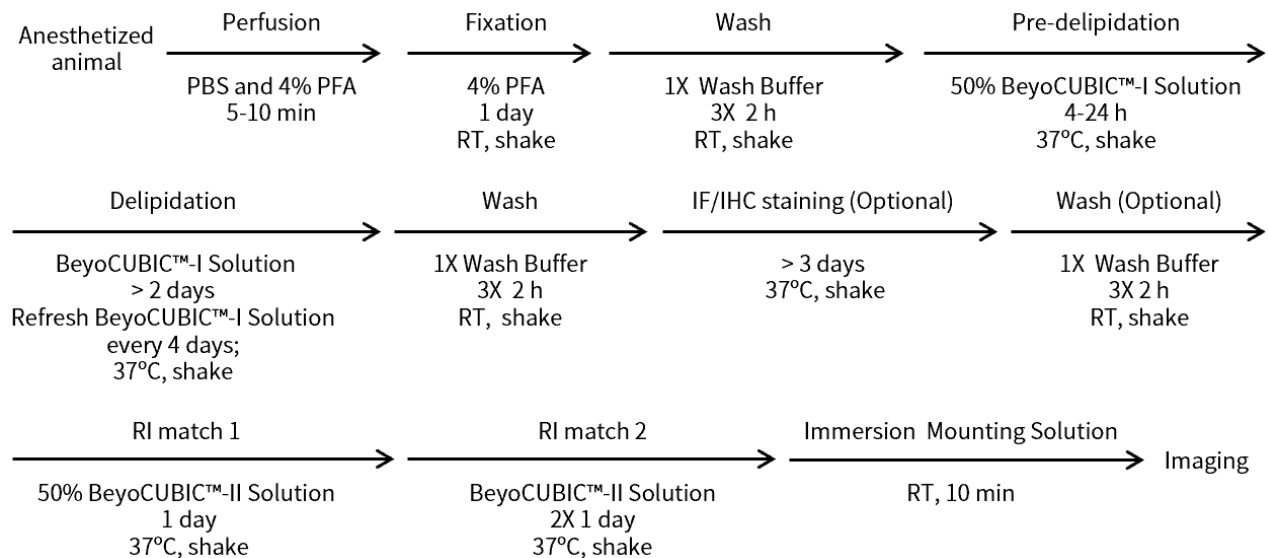


图1. 碧云天的BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit (BeyoCUBIC™动物组织透明化试剂盒)对动物组织、器官等进行透明化处理的实验流程图。

- 本试剂盒实验操作简单便捷。**使用本产品提供的试剂简单浸泡动物组织、器官等样品, 就可以轻松实现组织器官等样品的透明化, 无需使用任何特殊的仪器或设备。
- 本试剂盒处理的组织器官等样品透明度高。**传统的组织透明化方法侧重于均匀化单个组织的不匹配折射率, 导致不透明度降低。本试剂盒所使用的透明化试剂BeyoCUBIC™-I Solution具有很强的脱色和脱脂能力, 再结合BeyoCUBIC™-II Solution有效调节组织器官等的折光率, 使其与溶液的折光率相匹配, 以增加组织透光率, 能有效实现组织器官等的高透明度。本产品处理的组织器官等, 实测透明度通常都优于SCALEVIEW-S、SeeDB2或SeeDB等方法[2]。本产品与Fujifilm/Wako的CUBIC Trial Kit, TCI公司的Tissue Clearing Reagent CUBIC-L [for Animals]与Tissue-Clearing Reagent CUBIC-R+(M) [for Animals]的透明化效果基本一致。本产品与Thermo的CytoVista™ Tissue Clearing Kit与CytoVista™ Tissue Clearing/Staining Kit, Abcam的Tissue Clearing Kit的使用效果相近。
- 本试剂盒透明化时间短。**传统的SCALEVIEW-S或SeeDB2方法组织器官的透明化时间相对都比较长[2]。本试剂盒通常在1-3周就可以轻松实现小鼠组织器官等的透明化。6周龄C57BL/6小鼠不同组织器官透明化实测所需要时间参考下表。实际检测效果会因具体的实验条件不同而存在差异, 下表仅供参考。

Organ	Brain	Heart	Liver	Lung	Intestine	Pancreas	Kidney
Time	2 weeks	2-3 weeks	2-3 weeks	2-3 weeks	1 week	1 week	2-3 weeks

➤ **本试剂盒适用性广。**本试剂盒广泛适用于动物组织器官甚至整体的透明化。本试剂盒用于6周龄C57BL/6小鼠不同组织器官透明化的实测效果请参考图2。

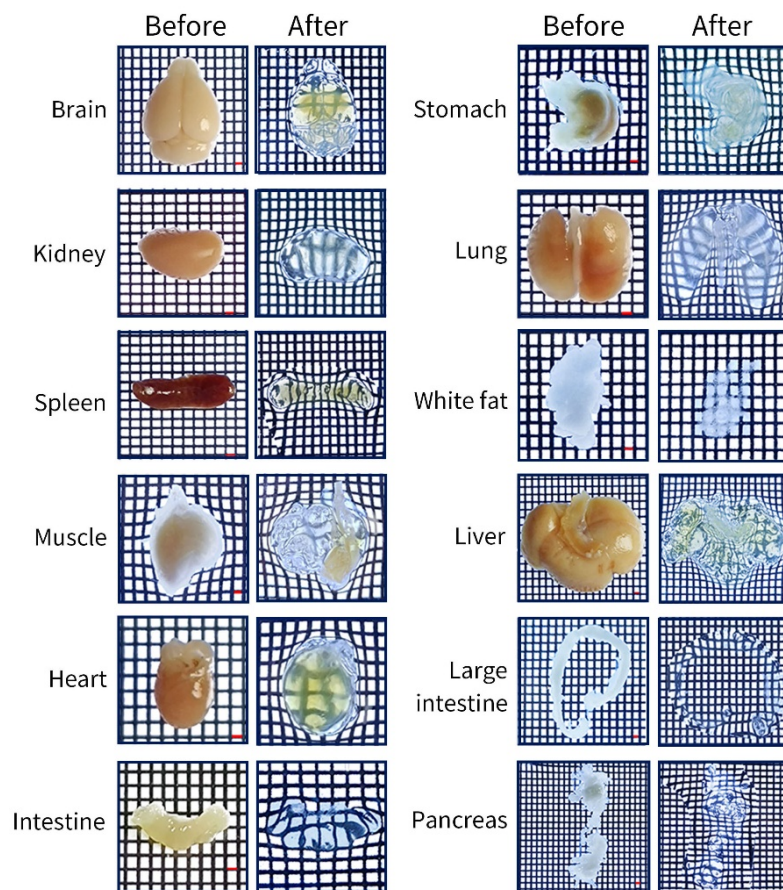


图2. 碧云天生产的BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit用于小鼠组织器官的透明化效果图。本图为6周龄C57BL/6小鼠整脑、肾、脾、腿部肌肉、心脏、小肠截段、胃、肺、白色脂肪、肝、大肠截段、胰腺透明化前后的实拍效果图。图片中每小格的长宽均为1mm，各组织或器官的处理前参数、关键试剂的使用量及时间参考见表1。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

表1. 碧云天生产的BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit对6周龄C57BL/6小鼠组织器官透明化处理前参数、关键试剂的使用量及处理时间参考表。

Organ		Brain	Kidney	Spleen	Muscle	Heart	Small intestine	Stomach	Lung	White fat	Liver	Large intestine	Pancreas
Size	Weight (g)	0.55	0.19	0.10	0.33	0.12	0.03	0.19	0.48	0.09	1.38	0.15	0.36
	Thickness (mm)	~8	~4	~2	~6	~3	~2	~6	~5	~3	~9	~2	~5
50% BeyoCUBIC™-I Solution	Volume (ml)	8	5	5	5	5	1.5	5	5	3	10	3	5
	Time (h)	4											
BeyoCUBIC™-I Solution	Volume (ml)	16	20	5	15	20	1.5	15	20	21	30	1.5	5
	Time (day)	8	14	3	10	14	1.5	10	14	26	14	1.5	3
	Refresh volume (ml)	8	5	5	5	5	1.5	5	5	3	10	3	5
	Refresh time	Refresh BeyoCUBIC™-I Solution every 4 days											
50% BeyoCUBIC™-II Solution	Volume (ml)	8	5	5	5	5	1.5	5	5	3	10	3	5
	Time (day)	1											
BeyoCUBIC™-II Solution	Volume (ml)	16	10	10	10	10	3	10	10	6	20	6	10
	Time (day)	2											
	Refresh volume (ml)	8	5	5	5	5	1.5	5	5	3	10	3	5
	Refresh time	Refresh BeyoCUBIC™-II Solution every day											

- **本试剂盒兼容荧光蛋白和后续的荧光染色。**本试剂盒在使用过程中可以充分保护荧光蛋白的稳定性，不会导致EGFP、EYFP、mCherry等荧光蛋白的变性而失去荧光。用于6周龄C57BL/6小鼠组织器官透明化处理后的DAPI染色效果请参考图3。

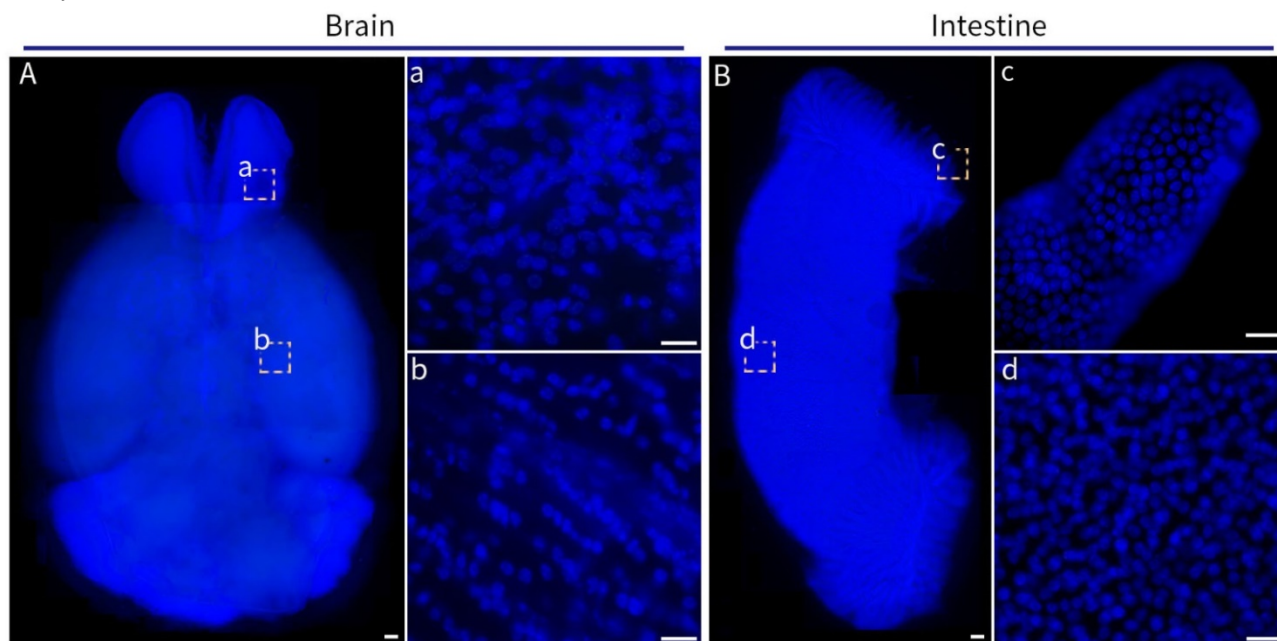


图3. 碧云天BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit用于6周龄小鼠脑和小肠透明化处理后的DAPI染色效果图。图A为6周龄C57BL/6小鼠整脑DAPI染色4倍镜下实拍效果图。图a和b分别为前脑和中脑40倍镜下局部实拍效果图。图B为6周龄C57BL/6小鼠小肠截段DAPI染色4倍镜下实拍效果图。图c和d分别为小肠绒毛和表面40倍镜下实拍效果图。比例尺均为100μm。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异，图片效果仅供参考。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
P0112S-1	BeyoCUBIC™-I Solution	25ml
P0112S-2	BeyoCUBIC™-II Solution	25ml
P0112S-3	100X Wash Buffer	3ml
P0112S-4	Mounting Solution	10ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0112M-1	BeyoCUBIC™-I Solution	100ml
P0112M-2	BeyoCUBIC™-II Solution	100ml
P0112M-3	100X Wash Buffer	12ml
P0112M-4	Mounting Solution	40ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
P0112L-1	BeyoCUBIC™-I Solution	500ml
P0112L-2	BeyoCUBIC™-II Solution	500ml
P0112L-3	100X Wash Buffer	60ml
P0112L-4	Mounting Solution	200ml
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，一年有效。BeyoCUBIC™-I Solution和BeyoCUBIC™-II Solution须-20℃避光保存；100X Wash Buffer可以4℃保存；Mounting Solution可以室温或4℃保存。

注意事项：

- BeyoCUBIC™-I Solution和BeyoCUBIC™-II Solution使用前，需室温静置至完全融化，确保液体透明并且没有沉淀。如果有晶体析出或溶液不透明，可以短时间置于55℃水浴溶解至完全透明并且没有沉淀。
- BeyoCUBIC™-I Solution和BeyoCUBIC™-II Solution在高温(>75℃)下失效，注意不可高温处理。

- BeyoCUBIC™-I Solution处理后组织会变软，请使用勺子小心取样，不要使用镊子，以免损伤组织。
- BeyoCUBIC™-I Solution很容易清除掉油性笔迹。使用时请尽量盖紧盖子，并用Parafilm密封盖子，防止漏液。建议同时在管盖和管体上进行样品标记，以免样品信息丢失。
- BeyoCUBIC™-I Solution处理过程中如果出现浓烈的氨气气味，提示溶液可能已经失效，请及时更换新鲜的BeyoCUBIC™-I Solution，以免影响透明化效果。
- BeyoCUBIC™-II Solution使用时请勿剧烈摇晃，避免产生气泡。如果不慎导致BeyoCUBIC™-II Solution中产生大量气泡，请采用超声波清洗机处理或抽真空处理(~0.1 MPa, ~30min)以去除气泡，或室温静置(至少7-8小时)使气泡自行消除，以免导致组织器官周围或内部出现气泡。
- BeyoCUBIC™-II Solution较粘稠，使用时请使用大口枪头(可自行用剪刀剪去枪头尖端)缓慢吸取，并缓慢加入至样品中，请勿剧烈吹打，避免产生大量气泡。
- 完成照片和视频拍摄后的组织器官样品可以去除Mounting Solution，然后可以浸泡在BeyoCUBIC™-II Solution中室温保存1周。时间越长，样品透明度越高，但也会导致组织膨胀。完成照片和视频拍摄后的样品可以采用1X Wash Buffer清洗，再用30% (w/v)蔗糖溶液脱水，然后用O.C.T化合物包埋，并在-80°C长期保存。
- 对于较厚的切片(>2mm)或整个器官，每一步的孵育时间可以根据实际的透明化效果适当延长。
- 为了保证BeyoCUBIC™-I Solution和BeyoCUBIC™-II Solution长期有效，需要-20°C避光保存。但使用时，为了方便观察组织透明化效果，可以在非严格避光条件下对样品进行透明化处理。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 组织样品的制备。

- a. 试剂和器材的准备。
 - a) 固定液：推荐使用碧云天生产的4%多聚甲醛固定液(P0099)或免疫染色固定液(P0098)。
 - b) 麻醉剂：根据实验需求选择适合麻醉剂，如戊巴比妥钠(Sodium pentobarbital)或氯胺酮(Ketamine)等。
 - c) 灌注液：1X PBS/肝素钠(10U/ml)溶液或1X PBS、4%多聚甲醛固定液。
 - d) 器材：推荐使用碧云天生产的实验手术剪(FS209)、眼科镊(FS229)、止血钳(FS241)、输液器的针头(一般小鼠建议采用6或7号针头，大鼠建议采用10至12号针头)。
- b. 动物麻醉。例如1%戊巴比妥钠(建议按体重计算麻药的使用量：80ml/kg)进行腹腔注射麻醉小鼠。
- c. 沿肋骨下方的体表和腹壁横切口，快速剪开隔膜，抬起胸骨，暴露心脏。
- d. 从心尖部开始由左下方斜向右上方插针直至升主动脉内，若遇阻力，可尝试改变方向重试，切勿蛮力插入。
- e. 用止血钳夹住心室(或手持)，固定针头，防止泄漏，右心耳剪小口。
- f. 灌注1X PBS/肝素钠(10U/ml)，灌注速度先慢后快，冲洗血管，去除血液。一般以从右心耳流出的液体清亮、肝脏呈灰白色为标准。
- g. 灌注4%多聚甲醛固定液进行固定，灌注速度先快后慢，以肌肉变硬为标准，一般用量约相当于实验动物体重。也可以解剖出所需的组织器官后固定。
- h. 解剖出所需组织器官，浸泡在4%多聚甲醛固定液中，在摇床上固定过夜。

2. 透明化试剂的准备。

- a. 50% BeyoCUBIC™-I Solution的配制：将BeyoCUBIC™-I Solution和蒸馏水按1:1的比例混匀，室温下可保存1个月。
- b. 50% BeyoCUBIC™-II Solution的配制：将BeyoCUBIC™-II Solution和1X PBS按1:1的比例混匀，室温下可保存2周。
- c. 1X Wash Buffer的配制：将100X Wash Buffer和1X PBS按1:100比例稀释，室温下可保存数月。

3. 组织器官等的脱脂脱色。

- a. 弃固定液，加1X Wash Buffer，室温摇床(60rpm)洗涤3次，每次2小时。
- b. 加入适量50% BeyoCUBIC™-I Solution浸没样品，37°C摇床(60rpm)孵育4-24小时。可观察到组织边缘逐渐透明。(注：50% BeyoCUBIC™-I Solution使用量可根据样品体积适当调整，确保样品在摇晃过程中完全浸没即可)。
- c. 加入适量的BeyoCUBIC™-I Solution浸没样品，37°C摇床(60rpm)孵育，每4天更换一次新鲜溶液，直至组织器官样品完全透明。(注：BeyoCUBIC™-I Solution使用量可根据样品体积适当调整，确保样品在摇晃过程中完全浸没即可)。
- d. 加入适量1X Wash Buffer浸没样品，室温摇床(60rpm)至少洗涤3次，每次2小时。

4. 免疫荧光染色(选做)。

- a. 一抗孵育：用免疫染色一抗稀释液(P0103)、QuickBlock™免疫染色一抗稀释液(P0262)或其它适当的一抗稀释液按照一抗推荐的稀释比例进行稀释。37°C摇床(60rpm)适当避光孵育3天。注：一抗稀释比例可以根据实际染色效果进行适当调整。
- b. 回收一抗，用1X Wash Buffer，室温洗涤6次，每次2小时。
- c. 二抗孵育：用免疫荧光染色二抗稀释液(P0108)、QuickBlock™免疫荧光染色二抗稀释液(P0265)或其它适当的二抗稀释液按照二抗推荐的稀释比例进行稀释。37°C摇床(60rpm)避光孵育3天。注：二抗稀释比例可以根据实际染色效果进行适当调整。
- d. 回收二抗，用1X Wash Buffer，室温洗涤至少3次，每次2小时。

5. 细胞核染色(选做)。

- a. DAPI孵育：1X Wash Buffer稀释DAPI至0.5-10 μ g/mg工作液，37 $^{\circ}$ C摇床(60rpm)避光孵育2-3天。**注：**稀释比例可以根据实际染色效果进行适当调整。
 - b. 用1X Wash Buffer，室温至少洗涤3次，每次2小时。
- 6. 调节样品折光率。**
- a. 加入适量**50% BeyoCUBICTM-II Solution**浸没样品，竖立放置(水平放置时易产生气泡)，37 $^{\circ}$ C水平摇床(60rpm)孵育6-24小时，直至样品沉底。**注：**50% BeyoCUBICTM-II Solution使用量可根据样品体积适当调整；建议每次使用量至少为样品体积的2-3倍，确保样品在摇晃过程中完全浸没。
 - b. 加入适量**BeyoCUBICTM-II Solution**浸没样品，竖立放置(水平放置时易产生气泡)，37 $^{\circ}$ C水平摇床(60rpm)孵育24小时。**注：**BeyoCUBICTM-II Solution使用量可根据样品体积适当调整；建议每次使用量至少为样品体积的2-3倍，确保样品在摇晃过程中完全浸没。
 - c. 重复步骤6b一次。
 - d. 充分去除BeyoCUBICTM-II Solution，加入Mounting Solution浸没样品10分钟，小心剔除样品表面气泡后即可用于拍照。推荐将浸泡样品放置在BeyoGoldTM 35mm玻底共聚焦培养皿(玻璃直径20mm) (FCFC020)中或常规载玻片上进行拍照。

常见问题：

1. 动物组织透明化过程中是否需要使用特殊类型的容器？

无须使用特殊类型的容器。可以使用实验室常用的聚丙烯或聚乙烯类塑料器皿或玻璃器皿。由于动物组织器官在透明化过程中可能会膨胀，建议使用稍大一点的容器。

2. 样本在透明化过程中会膨胀吗？膨胀对实验有什么负面影响吗？

组织器官等样品在透明化过程中很可能会膨胀。但这种膨胀是接近线性并且比较均匀的，细胞相对位置是保持不变的。除了整体形态会膨胀外，其它不会产生很明显的负面影响。

3. 新鲜组织可以跳过固定步骤直接进行透明化吗？

不可以。在未进行固定的情况下进行组织透明化，可能导致细胞相对位置紊乱，也可能影响后续免疫染色等的效果。因此，在透明化之前需要先固定样本。

4. 是否可以使用长时间保存的固定样品进行透明化处理？

可以的。本产品可以用于已经在固定溶液中浸泡固定数周的样品，以及已经被固定并在-80 $^{\circ}$ C存储数月的样品。但如果计划对样品进行免疫染色，长期保存的固定样品可能会出现目标蛋白免疫染色效果下降的情况。

5. 如何粗略估计样本需要每种试剂的用量？

对于小鼠全身透明化，所用试剂的体积必须足以浸没整个标本(一般需要200-400ml的BeyoCUBICTM-I Solution和100-200ml的BeyoCUBICTM-II Solution)。对于器官透明化来说，样本应浸泡在至少5倍于样本体积的BeyoCUBICTM-I Solution中。例如，对于1cm³的标本，总共需要20-50ml的BeyoCUBICTM-I Solution和10-30ml的BeyoCUBICTM-II Solution。当组织血残存量较多、脂质含量较高或组织较厚时，透明化所需要的试剂总量可能会适当增加。

6. 能否把不同的组织器官或几个相同的组织器官放在一个管子进行透明化？

几个组织器官可以在一个管子里处理。例如，心、肺、肾、脾、胰腺和一块肝脏可放在同一个管子，心、肺、肾、脾、胰腺等几个适当的小器官也可放在同一个管子。但胃和肠应该被分开到不同的管子里，并且应尽可能地清除胃肠道内容物。

7. 透明化后样品观察时是否一定需要浸泡在Mounting Solution中？

由于BeyoCUBICTM-II Solution是水性溶液，在较长时间的观察过程中，可能会蒸发，导致折光率变化和溶质沉积，造成图像采集困难。对于短时间观察和拍照(<1小时)，可以在BeyoCUBICTM-II Solution中浸泡样品。对于较长的观察时间(>1小时)，建议使用Mounting Solution浸泡样品。

8. 透明化后样品观察困难。

建议使用光片荧光显微镜(LSFM)或激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)观察透明化的样品。此外，建议不要将需透明化处理的样品切割太薄，防止凝胶性质导致组织结构扭曲。透明化后的样品推荐在Mounting Solution (Refractive Index/RI = 1.467)中进行拍照观察，并需要使用适合这些RI的物镜进行观察。

9. BeyoCUBICTM-II Solution的折射率(Refractive Index, RI)是多少？

BeyoCUBICTM-II Solution的RI为1.48-1.49。建议使用适合这些折光率的物镜和浸没油。请勿将本试剂盒中的Optical Clearing Reagents试剂与其它溶剂(如水)混合，以免改变其折光率，影响透明化样品的观察。

10. 为什么样本不能充分透明？

a. PFA固定液pH过高。

pH值大于8可能导致过度固定，使样品更难透明。建议试着将pH值调整到7-7.5之间。

b. 脱脂不完全。

尝试延长脱脂时间或更加频繁地更换新鲜的BeyoCUBICTM-I Solution。建议将样品在37 $^{\circ}$ C的BeyoCUBICTM-I Solution中浸泡至少2-5天，每天更换新鲜试剂。

c. 折光率不匹配。

使用时请确保BeyoCUBICTM-II Solution溶解完全且没有沉淀。尝试延长时间和/或更换新鲜的BeyoCUBICTM-II Solution。

d. 使用老龄动物。

年轻的动物透明化效果通常优于年老的动物。

11. 样品需要脱脂处理多久？

对成年小鼠，肠、胰腺和脾脏大约需要2-3天，肺、心脏、大脑、胃、肌肉、肝脏和肾脏大约需要1-2周。

12. 什么样的组织染色试剂可以配合透明化试剂盒一起使用？

例如免疫荧光染色等大分子染色、细胞核荧光染色(例如DAPI、Hoechst、碘化丙啶)等小分子染色都是可以和透明化的样品兼容的。

13. 透明化样品可以使用什么样的核染色试剂？

推荐使用DAPI (C1002/C1005/C1006)、Hoechst 33342染色液(C1025/C1026)、Hoechst 33258染色液(C1017/C1018)、Propidium Iodide (ST511/ST512)等。

14. 是否需要购买特殊的抗体用于透明化处理后的样品？

虽然许多蛋白质在固定、脂肪清除和脱色过程中不会失去其抗原性，但也有例外。建议最好对所使用的抗体进行适当验证。

15. 可以使用荧光标记的二抗吗？

可以。但考虑到样品中每个抗体孵育所需的时间，更建议使用荧光标记一抗，以缩短实验周期。

16. 可以兼容哪些荧光蛋白？

本产品具有较好的荧光蛋白兼容性，可以兼容GFP、EGFP、EYFP、mCherry和mKate2等常见荧光蛋白。

17. 可以使用什么样的荧光染料？

FITC、Rhodamine、Cy3、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647等常见荧光探针都是可以的。

参考文献：

1. Hasegawa S, Susaki E, Tanaka T, Komaba H, Wada T, et al. 2019. 96(1):129-138.
2. Vieites-Prado A and Renier N. Development. 2021. 148(18).

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
P0112S	BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit	25ml
P0112M	BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit	100ml
P0112L	BeyoCUBIC™ Animal Tissue Optical Clearing Kit	500ml
P0115-100ml	BeyoCUBIC™-I Solution	100ml
P0115-500ml	BeyoCUBIC™-I Solution	500ml
P0116-100ml	BeyoCUBIC™-II Solution	100ml
P0116-500ml	BeyoCUBIC™-II Solution	500ml
P0117-100ml	BeyoCUBIC™ 100X Wash Buffer	100ml
P0118-100ml	BeyoCUBIC™ Mounting Solution	100ml
P0118-500ml	BeyoCUBIC™ Mounting Solution	500ml
P0103	免疫染色一抗稀释液	100ml
P0108	免疫荧光染色二抗稀释液	100ml
P0262	QuickBlock™免疫染色一抗稀释液	100ml
P0265	QuickBlock™免疫荧光染色二抗稀释液	100ml
P0098	免疫染色固定液	100ml/500ml
P0099	4%多聚甲醛固定液	100ml/500ml
C0221A	PBS	500ml
ST447	PBS (1X, premixed powder)	1L/5L
ST448-1L	PBS (10X, premixed powder)	1L
C1002	DAPI	5mg/ml×0.2ml
C1006	DAPI染色液	50ml
FS500	小动物手术器械套装	1套/盒
FS003	普通剪刀(12.5cm, 直尖)	1把/袋
FS007	普通剪刀(12.5cm, 弯尖)	1把/袋
FS209	实验手术剪(12.5cm, 直尖头)	1把/袋
FS213	实验手术剪(12.5cm, 弯尖头)	1把/袋
FS225	眼科镊(10cm, 直有勾, 亚光)	1把/袋
FS229	眼科镊(10cm, 弯有勾, 亚光)	1把/袋
FS241	止血钳(14cm, 直全齿)	1把/袋
FS245	止血钳(14cm, 弯全齿)	1把/袋
FCFC020-10pcs	BeyoGold™ 35mm玻底共聚焦培养皿(玻璃直径20mm)	10个/包
FCFC020-150pcs	BeyoGold™ 35mm玻底共聚焦培养皿(玻璃直径20mm)	150个/盒

Version 2022.08.15