

## 動物の全身・組織・細胞を透明化する CUBIC 試薬

理化学研究所生命システム研究センター、ならびに東京大学大学院医学系研究科の上田泰己教授らによって開発された組織透明化技術「CUBIC」は、マウス全脳や全身の透明化により、1細胞解像度で細胞の働きを網羅的に解析できる技術です。当社では、この組織透明化に使用する CUBIC 試薬（TCI 製品コード：T3740, T3741）を提供しています。

### ● CUBIC 試薬による透明化の特長

- ・マウス全身の透明化が可能（脱脂・脱色用：T3740 CUBIC-L, 透明化用：T3741 CUBIC-R+）
- ・蛍光シグナルを保持
- ・操作時間をより短く
- ・光シート顕微鏡（LSFM）や共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）と組み合わせることにより、細胞解像度でのイメージングが可能

### ● 使用例：マウス全身透明化

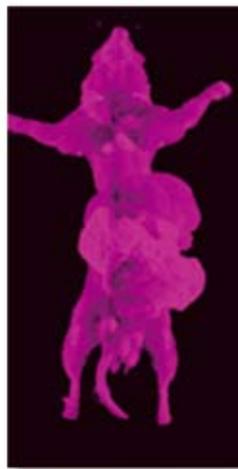
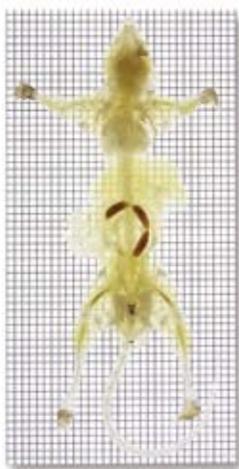


図 1. CUBIC により透明化したマウス全身 (左), 透明化とヨウ化プロビジウム (PI) による染色したマウス全身 (右)

## マウス全身透明化の流れ

前置換 50% CUBIC-L > 6 hr	脱脂 CUBIC-L > 5 days	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℃	> 6 hr	全身を漬けて穏やかに振とう(以下の工程も同様)。この工程は省略可
脱脂	CUBIC-L	37℃	> 5 days	CUBIC-Lは1日目, 2日目, 以降は2日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日程度
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	

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

## マウス全身透明化と染色の流れ

### 1) 簡易染色 (脱脂中に染色) の場合 使用例: ヨウ化プロピジウム (PI) による核染色

前置換 50% CUBIC-L > 6 hr	脱脂 / 染色 in CUBIC-L > 7 days	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℃	> 6 hr	全身を漬けて穏やかに振とう(以下の工程も同様)。
脱脂 / 染色	5 µg/mL PI in CUBIC-L	37℃	> 7 days	CUBIC-Lは1日目, 2日目, 以降は2日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日程度
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	

### 2) 後染色 (脱脂後に染色) の場合 使用例: RedDot2 による核染色

前置換 50% CUBIC-L > 6 hr	脱脂 in CUBIC-L > 5 days	洗浄 x 3 PBS > 2 hr x 3	染色 RedDot2 in PBS > 3 days	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℃	> 6 hr	全身を漬けて穏やかに振とう(以下の工程も同様)。
脱脂	CUBIC-L	37℃	> 5 days	CUBIC-Lは1日目, 2日目, 以降は2日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日程度
染色	100倍希釈 RedDot2 in PBS*	RT	> 3 days	*PBSには0.5% Triton X-100, 0.25% カゼインを含む
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	計1日程度
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	

●使用例：マウス臓器透明化



図 2. CUBIC により透明化したマウス全脳（左）、透明化と核染色・免疫組織染色したマウス全脳（右）

マウス臓器透明化の流れ

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℃	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℃	6 - 24 hr	CUBIC-Lと水を等量混合したもの。この工程は省略可
脱脂	CUBIC-L	37℃	> 2 days	CUBIC-Lは1日目, 2日目, 以降は2日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日程度
前置換	50% CUBIC-R+	RT	6 - 24 hr	CUBIC-R+と水を等量混合したもの
透明化	CUBIC-R+	RT	> 2 days	

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。

マウス臓器透明化と染色の流れ

使用例：免疫組織染色

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℃	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℃	6 - 24 hr	CUBIC-Lと水を等量混合したもの。この工程は省略可
脱脂	CUBIC-L	37℃	> 2 days	CUBIC-Lは1日目, 2日目, 以降は2日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日程度
染色	抗体*1 in PBS*2	RT	> 3 days	*1 直接蛍光ラベルされた一次抗体 *2 PBSには0.01%アジ化ナトリウム, 0.5% Triton X-100, 0.25% カゼインを含む
洗浄 x 3	PBS	RT	> 2 hr x 3	計1日程度
前置換	50% CUBIC-R+	RT	6 - 24 hr	CUBIC-R+と水を等量混合したもの
透明化	CUBIC-R+	RT	> 2 days	

プロトコルは一例です。最新の論文をご確認ください。

## 文献

- 1) 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 Reports* **2017**, *20*, 236.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 理化学研究所生命システム研究センター上田研究室 CUBIC のプロトコール等  
<http://cubic.riken.jp/>

掲載した画像は上田泰己教授よりご提供頂いたものです。

## CUBIC 試薬

T3740	Tissue-Clearing Reagent CUBIC-L [for Animals]	25mL 4,000 円	100mL 13,000 円
T3741	Tissue-Clearing Reagent CUBIC-R+ [for Animals]	25mL 5,500 円	100mL 16,500 円

本製品は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。  
透明化には、CUBIC-L と CUBIC-R+ の両製品が必要です。

## 関連製品

T3530	Tissue-Clearing Reagent TOMEI [for Plants]	100mL 9,000 円
-------	--	---------------