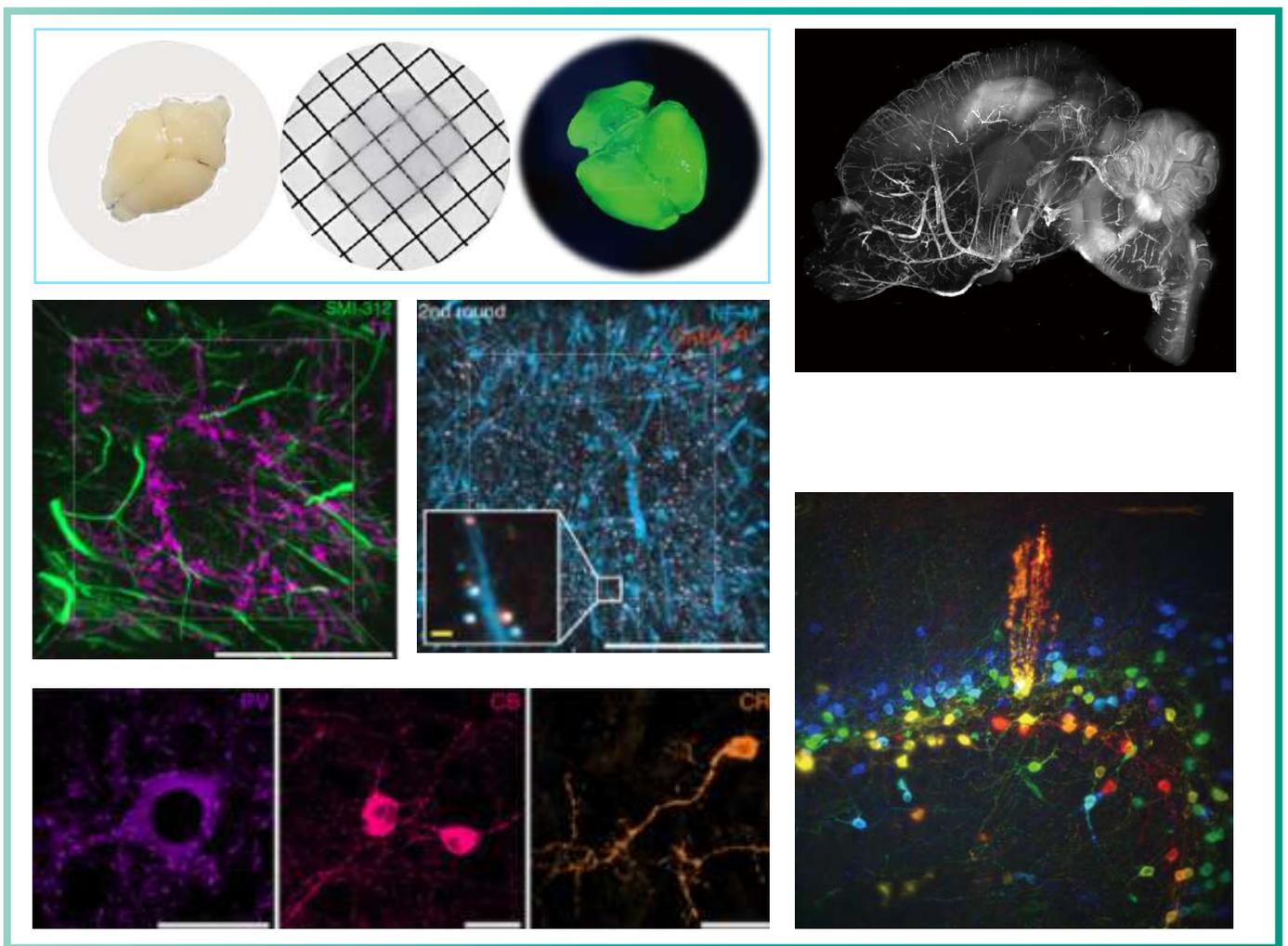


# CLARITY組織透明化カタログ

-組織を透明にしてハイクオリティな画像の取得に-

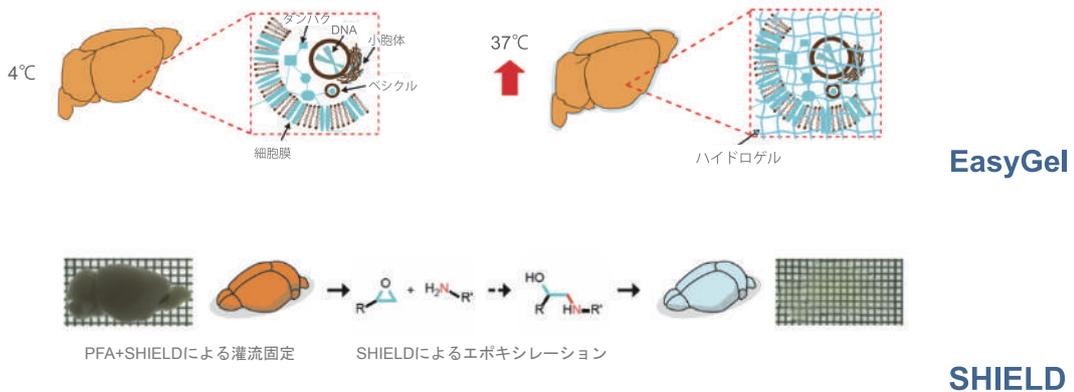


# CLARITYとは

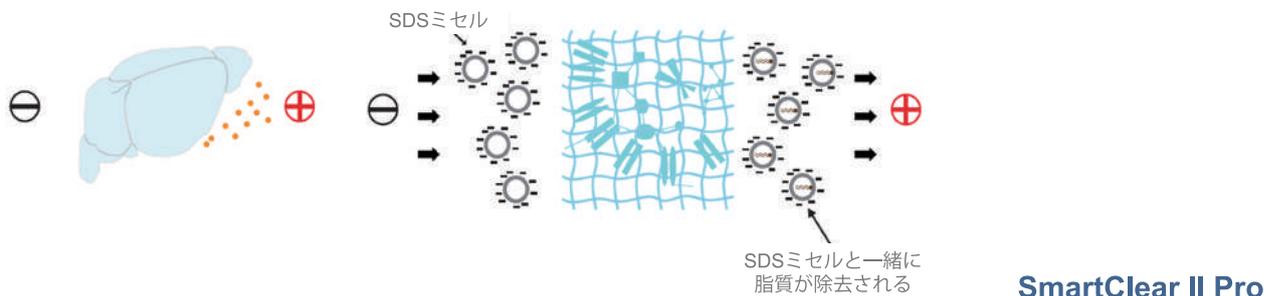
アクリルアミドベースのハイドロゲルを使い組織を透明化する技術です。CLARITYは脳や臓器などの組織をまるごと透明なハイブリッドゲルに変換することで可視光および蛍光マーカーのアクセスを向上します。それにより、分子ラベリングの技術と組み合わせてまるごとの臓器内のタンパク質や核酸の分布を高精度にイメージングすることが可能です。この新技術は2013年にスタンフォード大学のKwanghun Chung博士、Karl Deisseroth博士らによりNature誌に発表されました。

## CLARITYのステップ

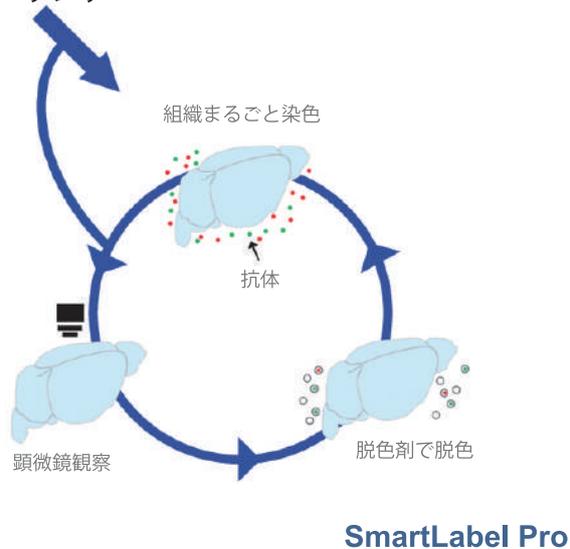
### 1. ハイドロゲルの組織重合またはSHEILDによるタンパク質架橋



### 2. SDS溶液中での電気泳動により組織の脂質を除去



### 3. ラベリング



### 4. 3次元イメージング



EasyIndex  
SmartSPIM

# オリジナルCLARITYの問題点

## ● 組織へのダメージ

- ・ 強い電気化学反応により重要な生物組織サンプルが損傷するリスクがある
- ・ SDSの電気分解によりpHが下がり、蛍光タンパク質のクエンチング（消光）が起こる
- ・ 電極付近で発生するカーボンが組織表面に吸着して黒くなり、イメージングの妨げになる
- ・ 1方向の電気泳動では電場にムラができ、組織が部分的に透明化されないなどのことが起こる
- ・ 熱により蛍光タンパク質のシグナルのロスが起こる

## ● コスト

- ・ 高価な高濃度SDSバッファを大量に使う必要がある
- ・ pH低下およびカーボン発生のためにSDSバッファを頻繁に交換する必要がある

## ● スピード

- ・ 組織へのダメージを回避するために低電圧を使わざるを得ず、透明化に時間がかかる

CLARITYは世界で最も効率的な透明化手法として認識されながら、上記の問題点により使用が制限されてきました。そこで、オリジナルCLARITYの開発者であるKwanghun Chung博士(現MIT)とLifeCanvas社の共同開発によりこれらの問題点を解決した製品「SmartClear II」が開発されました。

シリーズの中核である高速・オールインワン組織透明化システム「SmartClear II」は電気化学反応による組織損傷の防止 / SDSバッファ使用量の大幅な削減 / 安定した温度制御による蛍光シグナルロスの抑制等を実現しています。LifeCanvas社はCLARITYの各ステップを高速かつスムーズに行うための装置・試薬がそろっています。この技術は特許申請済みで、PNAS誌に論文発表されました。

Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules.

Sung-Yon Kim ... Kwanghun Chung et al., PNAS 2015 112(46):E6274-83



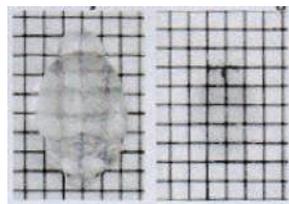
CLARITYの透明化ではSDSバッファに電極を浸したチャンバーで電気泳動を行います。この方式だと電極で黒いカーボン粒子が発生し組織に付着します。加えて、電気泳動によるSDSの漸増的な酸化でpHが低下し、サンプル内の蛍光分子やタンパク質が破壊されます。この問題を避けるためにSDSバッファを頻繁に交換する試みは、完全に問題を解決できないばかりかSDS溶液の大量消費につながります。

Smart-Clearはカーボン粒子対策、pH低下防止、組織損傷の防止、といった機構を備え、蛍光シグナルとタンパク質のロスを防ぎ、それでいてSDSバッファの消費を最小限に抑えます。

このシステムでは電極で発生した熱を効果的に除去できるので高電圧をかけることができ、それにより高速に透明化できます。また、電気泳動中の自動サンプル回転機能により電場のムラをなくし、サンプル全体を均一に透明化することができます。

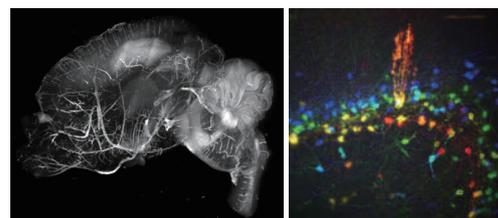


マウス全脳



透明化・全脳

(Smart-Clear と Easy-Index を使用)



3D イメージの撮像

データ提供：慶応義塾大学 矢野竜太郎氏、田中謙二先生  
撮像協力：カールツァイスマイクロスコピー株式会社 佐藤朗氏  
使用顕微鏡：ライトシート顕微鏡 Lightsheet Z.1

○透明化ギャラリー BRC ウェブサイトから透明化映像をご覧ください。

マウス全脳 3D イメージ：<https://product.brck.co.jp/index.php/maker/l/lifecanvastechologies/smartclearii>

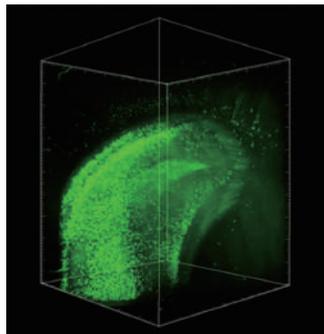
他組織の 3D イメージ：<https://support.brck.co.jp/index.php/support/lci>

- オールインワンの高速透明化システム
- シンプルで使いやすい
- LCDタッチスクリーンで簡単操作
- サンプルバッファ（バッファA）と電極バッファ（バッファB）を使用

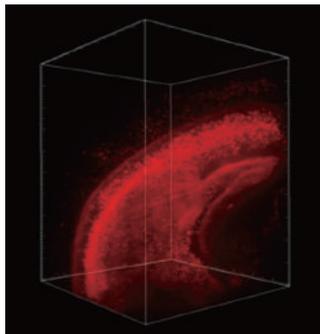
# SmartClear II Proの特長

## 共通

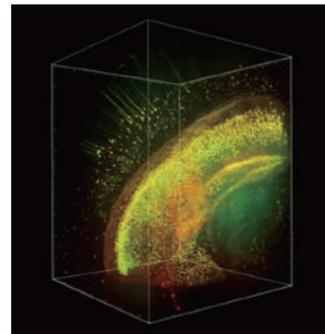
透明化前に導入した蛍光マーカーの観察はもちろん、抗体の浸透がよいので透明化後の染色もきれいにできます。



GFP (前標識)

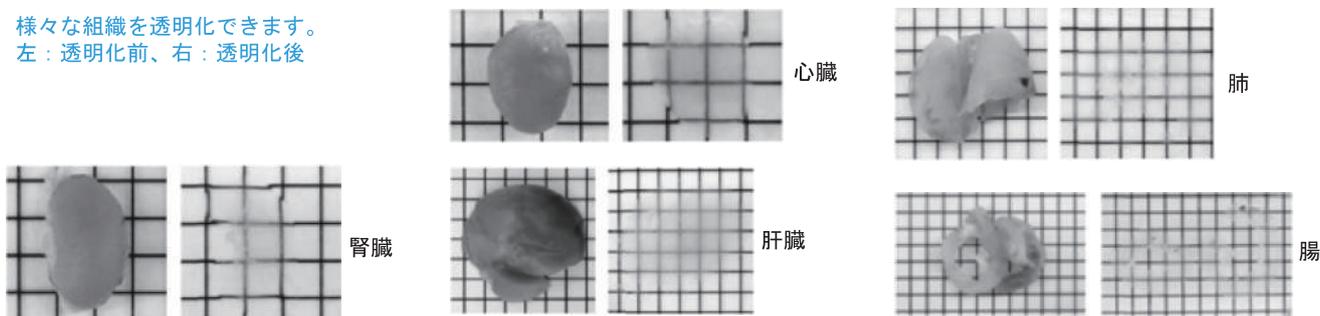


Anti-GFP (後標識)



マージ

様々な組織を透明化できます。  
左：透明化前、右：透明化後

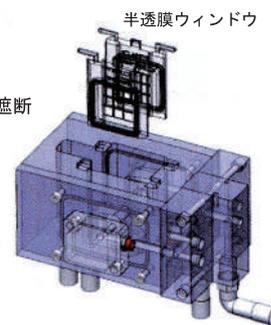


SmartBox モジュール：  
タッチスクリーンつき制御デバイス

- ✓ タッチパネルで装置をコントロール
- ✓ チャンバーに印加する電圧を設定
- ✓ サンプルに合わせバッファ温度を調整
- ✓ サンプルの電気的特性に合わせ自動回転を調整
- ✓ サンプルバッファ (A) と電極バッファ (B) の循環ポンプを制御
- ✓ 透明化チェックおよび電気泳動停止のためのプリセットタイマー
- ✓ 電極極性転換機能
- ✓ バッファオーバーフローのアラーム機能

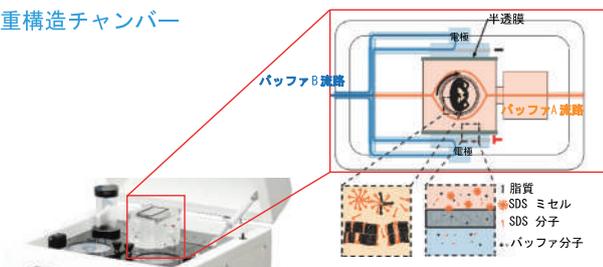
### 半透膜を使用する透明化用チャンバー

- ✓ 電極と組織の間に設置
- ✓ 組織側に流れるSDSを遮断
- ✓ 電極で発生したカーボンを遮断



透明化チャンバー

### 2重構造チャンバー



- ✓ 電極側と組織側にそれぞれ濃度の異なるSDSバッファをフロー
- ✓ 熱をためないため、常時高速かん流
- ✓ SDSのpH低下を抑制
- ✓ サンプルホルダーは回転式
- ✓ 透明化のムラを抑える
- ✓ クーリング機能付き、温度の上がり過ぎを防ぐ

Kim et al., PNAS 2015

SmartClear II Proはラージチャンバーが内蔵されており、マウスやラットの組織を複数同時に透明化することが可能です。また、様々なタイプのサンプルホルダーを準備しておりますので、スライスやスフェロイドなどのサンプルを大量に透明化することもできます。



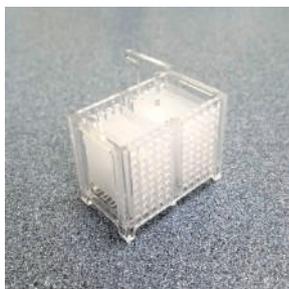
スタンダードサンプルホルダー



ラット全脳用2連ホルダー  
(シリンダー)



ラット全脳用2連ホルダー  
(カップ)



スライス用10連ホルダー



スフェロイド用18ポケットホルダー

- ✓ マウスの全脳を最大4個同時に透明化
- ✓ ラットの全脳を最大2個同時に透明化
- ✓ ランニングコストの削減
- ✓ 1-2 mmのスライスを10枚同時に処理可能
- ✓ スフェロイドも透明化可能

## 仕様

透明化手法	半透膜によるSDS電気泳動
電圧レンジ	DC 0 - 90 V
電流レンジ	0~1.5 A
サンプルの回転速度	0~10 rpm
リザーバー	バッファA, B : 500 mL
外形寸法 (W x D x H, mm) *SmartClear II モジュール	366 x 375 x 410
外形寸法 (W x D x H, mm) *SmartBox モジュール	210 x 375 x 265
温度制御レンジ	室温~50°C
サンプル数 (SmartClear II Pro)	マウス全脳4サンプル、ラット全脳2サンプル
クリーニングモード	Beginerモード : セミオートでの透明化処理 Expertモード : 電圧、電流などのパラメータを手動で設定

- ✓ オールインワンでコンパクト
- ✓ 超高速透明化
- ✓ サンプルへの安全性
- ✓ 低SDS消費量
- ✓ pH低下せず
- ✓ 簡単操作
- ✓ カーボン発生せず
- ✓ 全自動システム
- ✓ 国際特許取得 PCT/US2015/024297

# 3次元高速免疫染色システム

# SmartLabel Pro

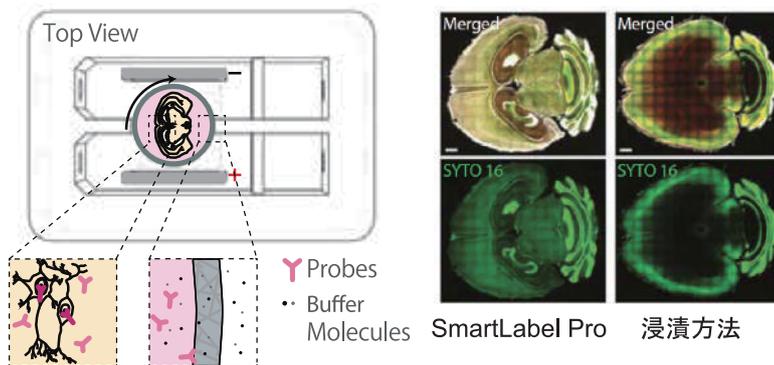


SMARTLABEL

SmartLabel ProはSDS電気泳動技術を応用した免疫染色システムです。通常の浸漬法では数週間から1ヶ月程度染色に係るのに対して、SmartLabelでは1-3日で染色が可能です。電気泳動によって強制的に抗体分子を組織深部へ押し込むことができるの世界初の3Dイムノラベリングシステムです。

また、新しい染色方法のアプローチとして、Switch法と組み合わせることで組織表面と深部を均一に染色することができます。

## 電気泳動技術の応用

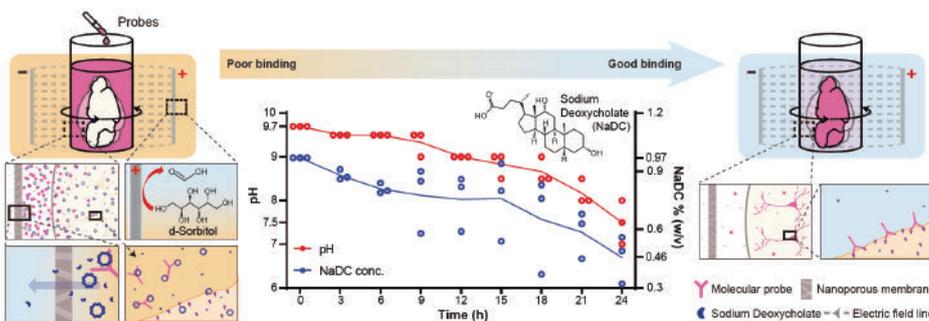


SmartLabel Proのチャンバー上面図です。両サイドに電極が設置されており、中心にサンプルをセットします。電極とサンプルの間に半透膜が認識されカーボン付着を抑制します。

- ✓ 半透膜を用いた電気泳動技術
- ✓ 抗体の高速染色が可能
- ✓ サンプルへの安全性
- ✓ カーボン付着を抑制
- ✓ 国際特許取得 PCT/US2015/024297

Stochastic electrotransport selectively enhances the transport of highly electromobile molecules. Kim et al., PNAS 2015 112(46) E6274-83

## eFLASH法に基づく染色プロトコルを採用



- ✓ 24時間染色に適応したプロトコール
- ✓ 煩雑な操作なく、染色可能
- ✓ 抗体の浸潤と結合を同時に制御

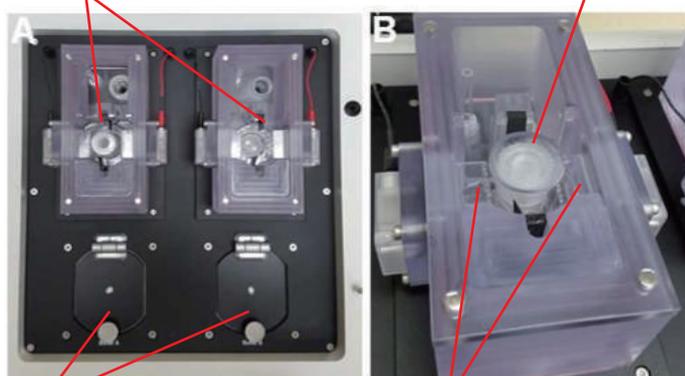
SmartLabel Proは、eFLASH技術に基づいたプロトコールを用いた染色方法を採用しています。専用のバッファーにはNaDC (デオキシコール酸ナトリウム) が含まれており、高濃度およびアルカリ性pH条件では抗体と強い親和性を示すため、抗原抗体反応を抑制します。電気泳動によって、バッファーのpHが中性側にシフトすると、NaDCの抗体への親和性が低下するため、抗原抗体反応が進むようになります。

このような原理を利用して、電気泳動しながら効率よく高速に染色することが可能になりました。

Ultrafast immunostaining of organ-scale tissues for scalable proteomic phenotyping., BioRxiv, 2019

サンプルチャンバー

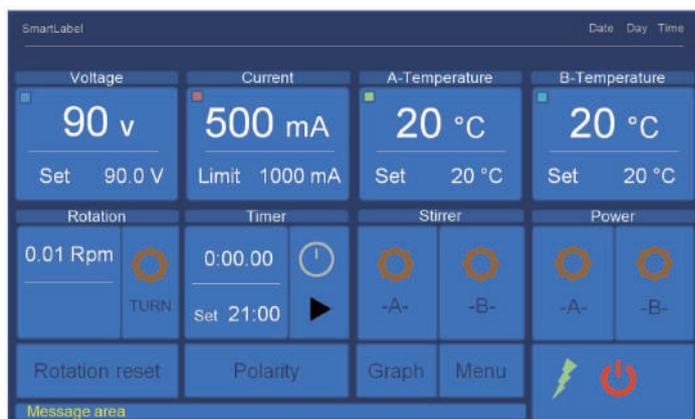
半透膜サンプルホルダー



リザーバー

ワイヤー電極

- ✓ サンプルホルダー周りと電極を常時灌流
- ✓ サンプルホルダー内の攪拌子を利用して常時攪拌
- ✓ サンプルホルダーの常時回転
- ✓ 抗体の使用量を抑える
- ✓ タイマー設定で安全に電気泳動



- ✓ 定電圧/定電流制御
- ✓ ペルチェ素子を使用した温度制御
- ✓ スターラー機能
- ✓ タイマー機能
- ✓ 回転機構
- ✓ 電気泳動の極性変換

## 仕様

染色手法	半透膜による電気泳動とeFLASH技術を併用
電圧レンジ	DC 0~90 V
電流レンジ	0 - 1500 mA
サンプルの回転速度	0~10 rpm
リザーバー	Labeling Buffer : 460 mL
外形寸法 (W x D x H, mm) *SmartLabel Pro モジュール	363 x 370 x 335
外形寸法 (W x D x H, mm) *SmartBox モジュール	210 x 376 x 264
外形寸法 (W x D x H, mm) *SmartBox 冷却モジュール	210 x 376 x 76
温度制御レンジ	室温~30°C
サンプル数	最大2サンプル (マウス全脳サイズ)

# ライトシート顕微鏡

# SmartSPIM

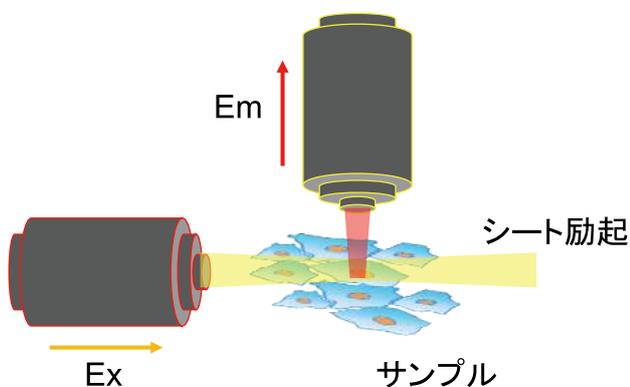
- マウス全脳サイズのサンプルを丸ごと撮像可能
- サンプル全体で均一な軸方向分解能
- 高速3次元撮像 (マウス半脳 15分、全脳 25分)
- RI mismatches と色収差の焦点補正
- 水溶性溶媒 (CUBIC, SeeDB)、油性溶媒 (DISCO) どちらも対応可能

SmartSPIM は、大きな組織サンプルを高速かつ高分解能でイメージングすることができるライトシート顕微鏡です。このシステムは、大きいサンプルをスライスせずに観察するためゼロから設計されました。SmartSPIM 独自の光学系は、横方向に対してフラットな illumination profile を持つシート励起光を作成します。FOV 全体で均一な PSFz を達成するために、励起光学系は CMOS カメラのローリングシャッター検出と同期しながら、励起光を軸方向にスキャンしていきます。

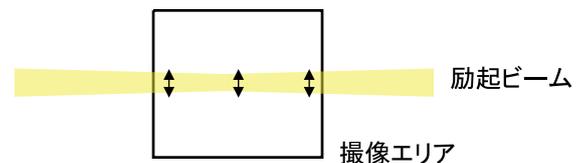


## SmartSPIM のシート励起

### ライトシート蛍光顕微鏡



### SmartSPIMシート励起

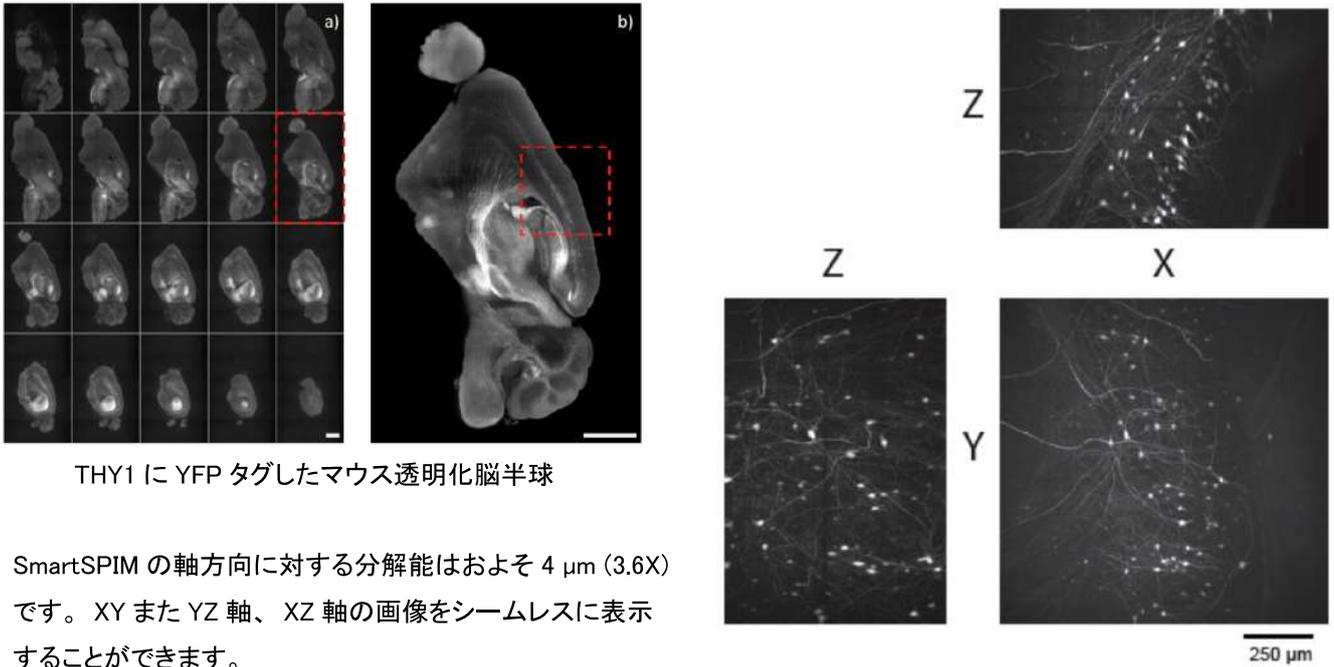


中心から端にかけて、Z軸の分解能が安定

↓  
全体的に安定したデータ高品質

↓  
大きいサンプルに対応できる

## 撮像のクオリティー



## 仕様

励起・光学系 (Illumination Optics)	広帯域対応レンズ (NA = 0.20)
サンプルサイズ (Specimen Size)	2 cm x 3.5 cm x 1.2 cm (標準) 3 cm x 5.5 cm x 1.2 cm (カスタム)
検出・光学系 (Detection Optics)	180 mm 無限補正チューブレンズ
サンプリング距離 (Lateral Sampling)	3.6 x = $1.8 \mu\text{m}/\text{pix}$ 10 x = $0.64 \mu\text{m}/\text{pix}$ 15 x = $0.41 \mu\text{m}/\text{pix}$
軸方向分解能 (Axial Resolution)	3.6 x : NA 0.2, Z 軸分解能 3.2 - 4.0 $\mu\text{m}$ 10 x : NA 0.6, Z 軸分解能 1.2 - 2.2 $\mu\text{m}$ 15 x : NA 0.4, Z 軸分解能 1.4 - 2.4 $\mu\text{m}$
視野 (Field of View)	3.6 x = 3650 $\mu\text{m}$ 10 x = 1300 $\mu\text{m}$ 15 x = 850 $\mu\text{m}$
イメージング速度 (imaging Speed)	20 FPS (Z-スタック)
イメージング分解能 (Camera)	2048 x 2048 sCMOS
光源 (Laser Lines)	最大 6 色 (488 - 785 nm)

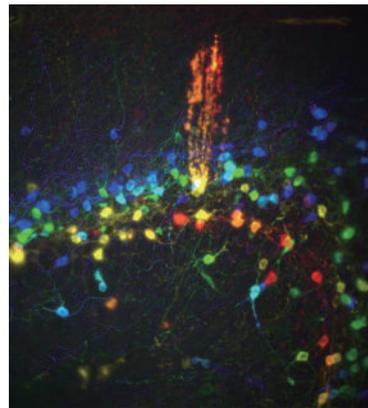
## 透明化ギャラリー

### SmartClear II Pro アプリケーション

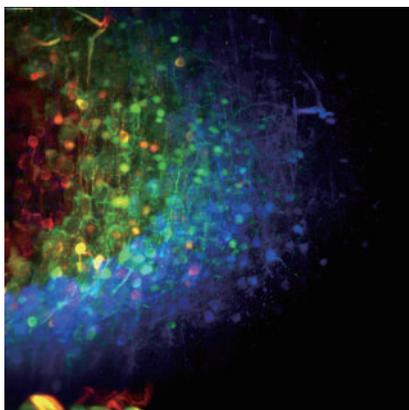
SmartClear IIで透明化したマウスの臓器をライトシート顕微鏡で撮像した結果です。このサンプルはパルプアルブミンをYFPタグ下遺伝子改変マウスを使用しています。



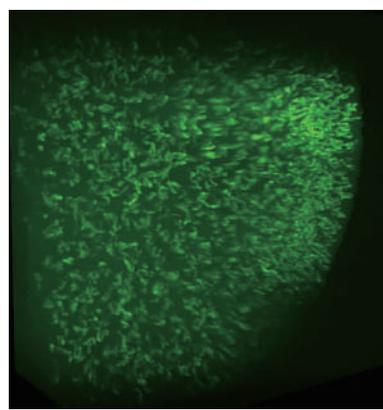
マウス透明化脳半球



マウス小脳のインターニューロンとバークマングリア細胞(疑似カラー表示画像)



視床網様核のGABAニューロン

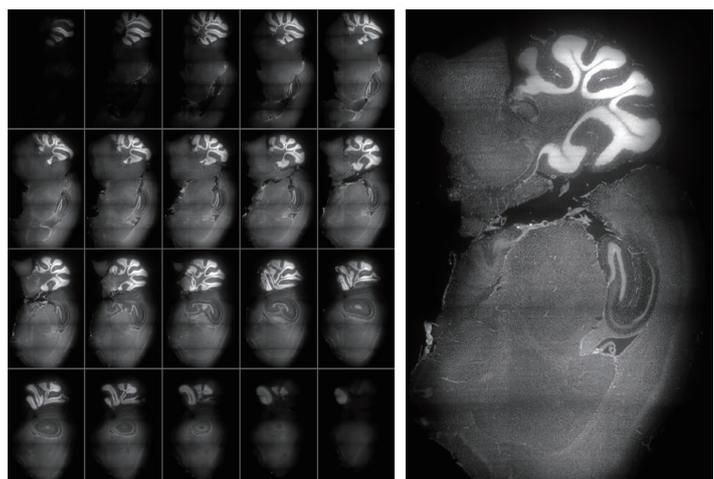


腎臓の皮質内の血管分布

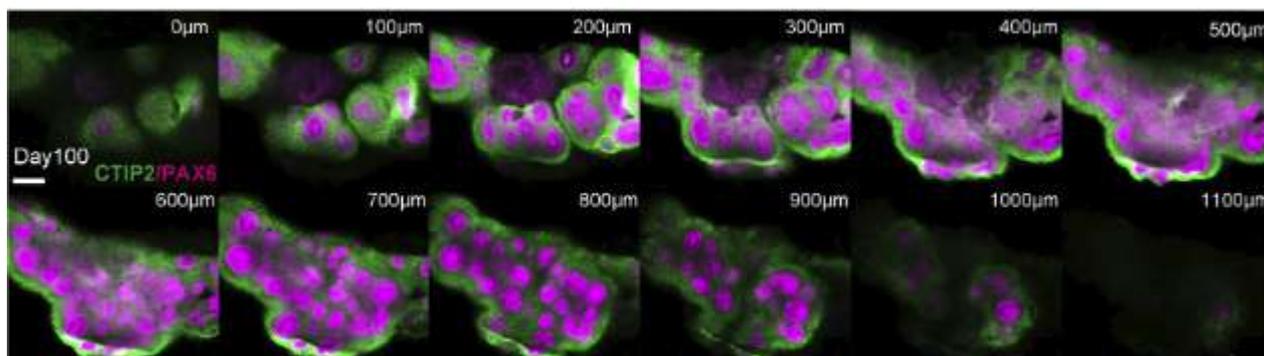
### SmartLabel アプリケーション

マウス脳半球をSmartClear II Proで透明化しました。その後、SmartLabelでTopro3を使用し、高速染色したサンプルになります。

顕微鏡はライトシート顕微鏡(SmartSPIM)で撮像しました。



## アプリケーション



100 日培養した大脳オルガノイドを SmartClear II Pro で透明化し、カールツァイス社のライトシート顕微鏡で Z 軸方向にスタッキングしていき厚みを撮像した結果です。投射性神経細胞のマーカである CTIP2 の蛍光が神経前駆細胞マーカーである PAX6 の球状構造を囲うように位置されていることが確認できます。

Self-Organized Synchronous Calcium Transients in a Cultured Human Neural Network Derived from Cerebral Organoids.,  
Stem Cell Reports, 2019, 13, 1-16

## 文献

- Sakaguchi, *et al.*, "Self-Organized Synchronous Calcium Transients in a Cultured Human Neural Network Derived from Cerebral Organoids." *Stem Cell Reports*, 2019.
- Roy, *et al.* "Brain-Wide Mapping of Contextual Fear Memory Engram Ensembles Supports the Dispersed Engram Complex Hypothesis." *bioRxiv*, 2019.
- Yun, *et al.* "Ultrafast Immunostaining of Organ-Scale Tissues for Scalable Proteomic Phenotyping." *bioRxiv*, 2019.
- Wong, *et al.* "Biomaterial Substrate-Derived Compact Cellular Spheroids Mimicking the Behavior of Pancreatic Cancer and Microenvironment." *Biomaterials*, 2019.
- Martorell, *et al.* "Multi-sensory Gamma Stimulation Ameliorates Alzheimer's-Associated Pathology and Improves Cognition." *Cell*, 2019
- Park, *et al.* "Protection of Tissue Physicochemical Properties Using Polyfunctional Crosslinkers." *Nature Biotechnology*, 2019
- Saritas, *et al.* "Optical Clearing in the Kidney Reveals Potassium-Mediated Tubule Remodeling." *Cell Reports*, 2019
- Allen, *et al.* "Thirst-Associated Preoptic Neurons Encode an Aversive Motivational Drive." *Science*, 2018.
- Kim, *et al.* "Integration of Optogenetics with Complementary Methodologies in Systems Neuroscience." *Nature Reviews Neuroscience*, 2017.
- Ku, *et al.* "Multiplexed and Scalable Super-Resolution Imaging of Three-Dimensional Protein Localization in Size-Adjustable Tissues." *Nature Biotechnology*, 2016.

## より組織への浸潤、タンパク質・核酸の固定を考慮した新しい組織固定液

SHIELD はポリエポキシ化合物をベースとした新しい組織固定液です。このポリエポキシ化合物は、タンパク質の複数のアミノ基と結合・架橋することができ、非常に安定に組織内の分子位置を保存することができます。



SHIELD-Off



SHIELD-epoxy

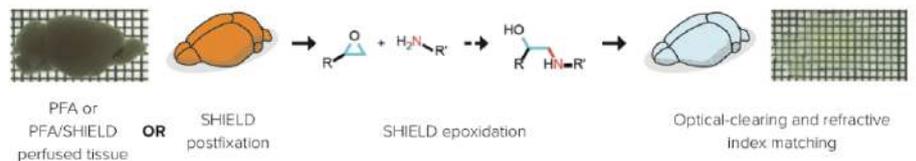


SHIELD-On

※SHIELD は 3 本セット販売です。

- ① 低温による灌流固定
- ② 低温による後固定
- ③ 生理条件下 (37°C) での架橋反応

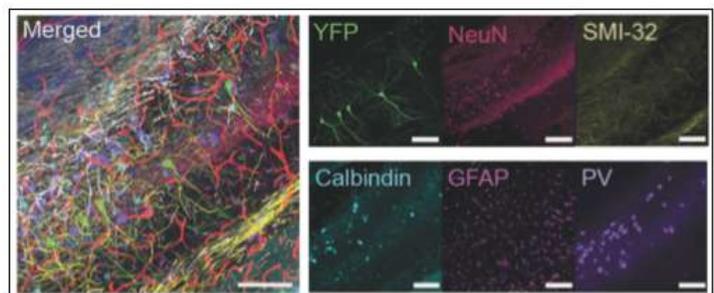
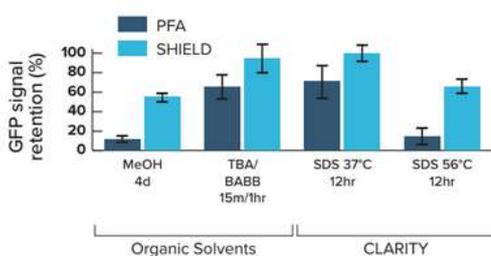
### SHIELD WORKFLOW: EFFECTIVE FOR BOTH UN-FIXED AND FIXED TISSUES



SHIELD を用いての組織の固定と透明化

### Facilitates antibody multiplexing across rounds

#### Improves signal in both CLARITY & organic solvent processed tissues



Images & data from Park et al. 2018, Nature Biotech.

高温での透明化処理においてタンパク質のロスを軽減！

抗体染色においてもタンパク質情報が維持されているため、多重染色に容易に適用できます。

#### 仕様

溶液量	250 mL (マウス 8 匹分)
	500 mL (マウス 16 匹分)

## ハイドロゲル重合システム



CLARITYでは組織から脂質を除去してもタンパク質などの分子は固定されたままです。これにはハイドロゲルと組織の重合が必要です。しかしながら、このステップの成功には安定した温度管理、適切な振とう、十分な脱気が不可欠です。技術的な問題でこれを正しく行えないと満足な実験結果につながりません。

EasyGel はこれをシンプルに実行します。Easy-Gel は重合開始剤VA-044によるゲル化を50 mLチューブ内で行うために温度を正確に制御します。サンプルにより振とうのスピードを調整できます。最も重要な点は、EasyGel では各サンプルチューブが吸引ポンプに接続されており、

完全な脱気を継続的に、確実に行うことができます。また、EasyGel はハイドロゲル重合の他に、ウォッシングや免疫染色といったステップにも使うことが可能です。

### 仕様

温度範囲	室温 ~ 50 °C
振とうスピード	0 ~ 60 RPM
脱気	0 ~ -70 kPa
チューブ	コニカル, 8 x 50 mL

- ✓ 窒素ガス不要
- ✓ 個別温度制御
- ✓ 個別脱気制御
- ✓ 振とう制御
- ✓ 任意の50 mLコニカルチューブ使用可
- ✓ タッチスクリーン
- ✓ 特許申請中

## 簡易組織透明化システム

Passive CLARITY法を行うために開発されたシステムです。SDS電気泳動を行わずに、SDSバッファーに浸けた組織を長期間浸透・攪拌することで透明化することができます。



- ✓ 個別に温度制御
- ✓ 一度に10本の50mlチューブを使用可
- ✓ 振とう制御
- ✓ 簡単操作

### 仕様

温度範囲	室温 ~ 90 °C
振とうスピード	0 ~ 60 RPM
チューブ	コニカル, 10 x 50 mL

# CLARITY用SDSバッファ

SmartClear II用に調製されたSDSバッファです。一度の使用に5-10サンプルまで可能です。非常にコストパフォーマンスに優れたバッファです。バッファ2本1組で使します。



- ✓ 一度に使用できるサンプル：5～10サンプル
- ✓ 優れたコストパフォーマンス
- ✓ サンプルの変色なし

仕様	
容量	500 mL x2
使用期限	10日の透明化プロセス

## 屈折率調整透明化試薬

# EasyIndex

サンプルから脂質を除去した段階では屈折率のミスマッチにより完全に透明ではありません。Easy-Index に浸すことで屈折率を均一にし、サンプルをより透明にしてイメージングに最適な状態にします。



- ✓ リーズナブルな価格
- ✓ 浸けたままイメージング
- ✓ CLARITYサンプルの屈折率調整に最適
- ✓ CLARITY用レンズに使用可能
- ✓ 無害

仕様	
内容量	500 mL または 100 mL
屈折率	1.52

# オーダーインフォメーション

## SmartClear II Pro ラージチャンバー対応高速組織透明化システム

STM-SC2P SmartClear II Pro ラージチャンバー対応高速組織透明化システム (1式)

SmartClear II Pro モジュール x1  
SmartBox モジュール x1  
バッファセット x1組  
半透膜ウィンドウ x2組  
サンプルホルダーセット Type-A x4  
ウィンドウスペーサーType-A x4

SC-2P01 SmartClear II Pro モジュール

SB-2001 SmartBox モジュール

SC-BK1-A/B バッファ1本 (1L; ご注文時にAかBをご指定下さい)

SC-BK023 バッファトリプルセット(A&B 3セット、半透膜3セット)

SB-L2P10 多目的サンプルホルダーセット

SC-L2P11 ウィンドウスペーサーType-P (3mm)

SC-L2P12 サンプルホルダーセットType-Rat (ラット脳2個対応)

SC-L2P13 マルチパンチサンプルホルダー (18ホール)

SC-L2P14 サンプルホルダーType-B

SC-L2P15 サンプルホルダー1式 (SC-L2P11, SC-L2P12, SC-L2P13, SC-L2P14)

SC-L2P20 ウィンドウスペーサーType-P

## SmartLabel Pro 高速免疫染色システム

STM-SL2P SmartLabel Pro 2ch高速免疫染色システム (1式)

SmartLabel Pro モジュール x1  
SmartBox SLコントロールモジュール x1  
SmartBox SLパワーモジュール x1  
染色用バッファセット x5組

SL-1P01 SmartLabel Pro モジュール x1

SB-1C01 SmartBox SLコントロールモジュール x1

SB-1P01 SmartBox SLパワーモジュール x1

BF-1L01 染色用バッファセット x5組

SL-A1P01 SmartLabel用サンプルカップ (Lサイズ)

SL-A1P02 SmartLabel用サンプルカップ (Mサイズ)

## SHIELD 組織固定用試薬キット

SH-250 SHIELD 組織固定用試薬キット (250 mL)

SH-500 SHIELD 組織固定用試薬キット (500 mL)

## Easy-Gel ハイドロゲル重合システム

EG-1001 EasyGel ハイドロゲル重合システム (1式)

Easy-Gel モジュール x1  
シリコンチューブ x1

EG-Z1002 シリコンチューブ

## EasyClear 簡易組織透明化システム

EC-1001 EasyClear 簡易組織透明化システム (1式)

EasyClear メインシステム x1

## EasyIndex 屈折率調整透明化試薬

EI-Z1001 Easy-Index 屈折率調整透明化試薬 (500 mL)

EI-Z1011 Easy-Index 屈折率調整透明化試薬 (100 mL)

## SmartClear II Pro 導入保守サポート費用

SmartClear II Pro 初年度導入保守サポート費用  
SmartClear II Pro 次年度以降保守サポート費用

## SmartLabel Pro 導入保守サポート費用

SmartClear II Pro 初年度導入保守サポート費用  
SmartClear II Pro 次年度以降保守サポート費用



## バイオリサーチセンター株式会社

www.brck.co.jp

mail: sales@brck.co.jp

本社/〒461-0001 名古屋市東区泉2-28-24 東和高岳ビル4F

東京/〒101-0032 東京都千代田区岩本町1-7-1 瀬木ビル2F

大阪/〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル2F

福岡/〒813-6591 福岡市東区多の津1-14-1 FRCビル6F

仙台/〒983-0023 仙台市宮城野区福田町3-6-18 あさのコーポ104

TEL: 052-932-6421 FAX: 052-932-6755

TEL: 03-3861-7021 FAX: 03-3861-7022

TEL: 06-6305-2130 FAX: 06-6305-2132

TEL: 092-626-7211 FAX: 092-626-7315

TEL: 022-786-1411 FAX: 022-786-1412

