***Sca/e***

**＜材料＞**

・Urea（Wako chemicals）

・Triton X-100（Wako chemicals）

・Glycerol（Sigma）

※濃い濃度のureaとTriton Xをstock solution とし、そこにGlycerolを加え、水で希釈して目的濃度のSca/eを作成する。

**＜組成表＞**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | ***Sca/e A2*** | ***Sca/e U2*** | ***Sca/e B4*** |
| Composition | 4M urea | 4M urea | 8M urea |
| 10% (wt/vol)glycerol | 30% glycerol | - |
| 0.1%(wt/vol) Triton X-100 | 0.1% Triton X-100 | 0.1% Triton X-100 |
| pH | pH 7.7 | ？ | pH 8.7 |
| Incubation time | Day-week | Week-month |  |
|  | ・最も透明化効果が高い | ・浸漬時間が長い  ・膨張率の軽減  ・組織の脆さを軽減  ・soft sampleに適している（ex; embryos） | ・浸漬時間を短縮する  ・膨張率が高い  ・組み合わせることでprotocolの短時間化\*  ・Background抑制 |

* Urea：サンプルのhydrationを促進する。
* Glycerol：過剰なhydrationを抑制し、組織の膨張を最小化する。

\*組み合わせの例

・sca/eA2 (2day)　→　sca/eB4 (2day)　→　Sca/eA2 or U2 (？day)

**＜Sample preparation＞**

・mice were deeply anesthetized with pentobarbital (Nembutal)

・transcardial perfusion with 4% PFA/PBS (wt/vol).

・The whole brains were taken out

・postfixation in 4% PFA/PBS at 4 °C for 10 h

・in 20% sucrose/PBS (wt/vol) at 4 °C for 24 h.

・samples were embedded in OCT compound and frozen.

・They were thawed in PBS and fixed again with 4% PFA/PBS for 20 min at 25 °C.

・the samples were cleared in a ScaleA2 solution (20 ml per 0.5 g tissue) at 4 °C for >2 d.\*

（\*1mmのスライスで、４℃ ５days）