

## In situ hybridization サンプルの固定と保存

### Whole mount ISH

1. 4%PFA にサンプルを入れ（サンプルの 20 倍量以上の固定液が必要）、4C で1夜固定  
（フグ胚のように卵膜が厚い胚の場合、氷冷下で4時間ほど攪拌し、冷蔵庫に移す）  
↓
2. 固定液を適当量除去し、等量の MtOH を加え(50% MtOH の状態)、10分軽く攪拌  
↓
3. 液を半分除き、等量の MtOH を加え(75% MtOH の状態)、10分軽く攪拌  
↓
4. 液を半分除き、等量の MtOH を加え(92.5% MtOH の状態)、10分軽く攪拌  
↓
5. 液を半分除き、等量の MtOH を加え(96.25% MtOH の状態)、10分軽く攪拌  
↓
6. 100%MtOH に置換、10分軽く攪拌  
↓
7. もう一度 100%MtOH に置換し、-20~40C で保存  
（2年間は、ISH に使用可能）

### Section ISH

ブアン固定液を使用（薄切過程での mRNA の保存性がよいため）  
（ブアン固定液=飽和ピクリン酸：ホルマリン：酢酸（75：15：10））

1. 組織を切り出し、ブアン固定液に入れる（20倍量以上の固定液が必要）。4C で1夜固定  
↓
2. 100% EtOH で3回洗浄（各15分以上）  
↓
3. -20~40C で保存