

1. whole mount ISH ストック溶液

4% PFA

- 1) 2g paraformaldehyde (Nakalai 電子顕微鏡用)を 50 ml PBS に加える
- 2) 70C に加温して溶解 (30min~1h)
- 3) 完全に溶解したら冷却
- 4) 4ul 1N NaOH を加える
- 5) 5-10ml に分注。-20C 保存

吸収抗体

- 1) MtOH 保存した胚、組織を 1.5ml tube に移す
- 2) PBSTw に置換
- 3) ペッスルでホモゲナイズし、PBSTw で 1.0ml
- 4) 10ul anti-DIG AP を加え、1 晩攪拌
- 5) 遠心して、上澄みを別のチューブに移す
- 6) ペレットに 1 ml PBSTw を加え攪拌
- 7) 遠心して、上澄みを集める
- 8) 4C, 保存 (x200 吸収抗体)

HB4 buffer

ホルムアミド	5 ml
20xSSC	2.5 ml
yeast RNA ストック液	1 ml
heparin ストック液	10 ul
1/2 Tween-20	60 ul
DDW	1.43 ml
	(10 ml)

Blocking solution

Normal sheep serum	250 ul	50ul
10x blocking solution	500 ul	100ul
DMSO	50 ul	10ul
PBSTw	4.2 ml	840ul
	5.0ml	1,0ml

AP buffer (prepare at use)

1M Tris/HCl, pH9.5	1 ml
0.5M MgCl ₂	1 ml
1M NaCl	1 ml
DDW	7 ml

1/2 Tween 20 ul

Yeast RNA ストック液

- 1) 0.5g Torula RNA (Sigma R-6625 or R6875)を 10ml DDW に加える
- 2) 80C に加温して激しく攪拌、溶解(-20C 保存)

PBSTw: 50ml PBS + 100ul 1/2 Tween-20

2xSSCTw: 50ml 2xSSC + 100ul 1/2 Tween-20

0.2xSSCTw: 50ml 0.2xSSC + 100ul 1/2 Tween-20

ヘパリン・ストック液: 50mg heparin/1ml DDW (-20C 保存)

2. section ISH ストック溶液

プレハイブリ液

ホルムアミド	500 ul	(50%)
20X SSC	200 ul	(4x)
50X Denhardt's solution (WAKO 043-21871)	20 ul	(1x)
<u>DEPC DW</u>	<u>280 ul</u>	

Total 1000 ul

-20C で保存

ハイブリ液

ホルムアミド	500 ul	(50%)
20X SSC	200 ul	(4x)
10% SDSC	2 ul	(0.02%)
yeast RNA ストック液	50 ul	
50X Denhardt's solution (WAKO 043-21871)	20 ul	(1 x)
0.5M EDTA (pH8.0 by NaOH)	10 ul	(5mM)
50% 硫酸デキストラン	200 ul	(10%)
<u>DEPC DW</u>	<u>18 ul</u>	

Total 1000 ul

-20C で保存

