

## Whole mount ISH - Hybridization と検出

- 1) MtOH 保存サンプル (1 試験区に 5 サンプル程度) を PBSTw に置換  
MtOH に等量の PBSTw を加える。5 分後、PBSTw で倍に希釈 (計 4 回、5min 間隔)。最後に PBSTw に置換 (卵膜がある場合、PBSTw 置換後にピンセットで除去)  
(色素を除く必要がある場合、6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBSTw で漂白 (30min~6h)。漂白後、PBSTw で洗浄, 5min x 3)  
↓
- 2) Proteinase K (PK) 消化  
PK 原液 (20mg/ml) を PBSTw で 2,000 倍希釈して使用 (各チューブ 500ul)  
37C, 5-20min (体節期胚は 5min、孵化胚は 10min、仔魚は 15min)  
↓
- 3) 4%PFA, 10min 固定 (PK の不活化) (各チューブ 500ul)  
↓
- 4) PBSTw で洗浄. 5min x 4  
↓
- 5) プレハイブリ  
200~500ul HB4. 65C, 1-5h  
↓
- 6) ハイブリ  
1ul probe/200ul HB4. 65C, O.N.  
↓
- 7) 50% formamide in 2xSSCTw で洗浄. 30min x 2 at 65C (各チューブ 1000ul)  
↓
- 8) 2xSSCTw で洗浄. 15min x 1 at 65C  
↓
- 9) 0.2xSSCTw で洗浄. 30min x 2 at 65C  
↓
- 10) Blocking solution でインキュベート. 200~400ul/tube, 1h at RT  
↓
- 11) 吸収抗体を 10 の液 400ul に対して 16ul 加える (最終抗体濃度= x 5,000) . 2h at RT or O.N. at 4C  
↓
- 12) PBSTw で洗浄. 15min x 8 (各チューブ 1000ul)  
↓
- 13) AP buffer でインキュベート. 5min x 2  
↓
- 14) AP substrate で発色. 遮光、室温 or 25 C, 30min ~O.N. depending on coloration  
20 ul NBT/BCIP stock solution + 1ml AP buffer (各チューブ 500ul)  
or  
BM purple 原液 500ul  
↓
- 15) PBSTw で洗浄, 5min x 2
- 16) 4%PFA, 10min 固定
- 17) PBSTw で洗浄, 10min x 3
- 18) 等量の MtOH を加え置換していく。 x 4, 100%MtOH x 1
- 19) 50% glycerole/CMEF
- 20) 80% glycerole/CMEF