

<凍結組織 固定方法>

以下の要領で固定、置換したサンプルをお持ち下さい。

固定条件：4%パラホルムアルデヒド\*3、4℃、2hr～

固定後、Sucrose 置換\*4をして O.C.T compound\*5に包埋して下さい

マウス胎児	割の有無	固定液・sucrose 液量
E10.5 以下	そのまま固定して下さい	1ml
E11.5～13.5	頭部または腹部に穴を開けて下さい	5ml
E14.5～18.5	不要な部分に割を入れ固定液の浸透を良くして下さい	10ml

上記以外のサンプル(Adult 等)は厚さを **5mm 以下**にして **10～20 倍量**の固定液を使用して下さい

臓器をまるごと固定される時は、**割**を入れて固定した後に厚さを調整(**5mm 以下**)して下さい

固定容器はエッペン tube を避け、口の大きい瓶(または tube)を使用して下さい

\*3：【4%パラホルムアルデヒドの作製】**揮発性が高いので注意！** ドラフト内で調製して下さい

1. 50ml tube に PBS\*2を 40ml ぐらい入れ、パラホルムアルデヒド(wako 162-16065, Paraformaldehyde)を 2g 入れる。
2. ウォーターバスにて 56～60℃で溶かす。溶けにくい場合は 1N NaOH を少量加える。
3. PBS\*2で 50ml までメスアップする。
4. 適量に小分けし、-30℃で保存。溶解させた後は 4℃、1ヶ月内で使用する。再凍結保存はしない。

\*4-1：【sucrose 液の作製】**用時調製！**

1. 50ml tube に sucrose (wako 196-00015) 10%→5g, 20%→10g, 30%→15g を直接入れ秤量する。
2. PBS\*2を加え 50ml にする。
3. 室温、転倒混和で溶かして 4℃に入れる。

\*4-2：【sucrose 置換】以下の作業は 10～15ml tube 内で行います

- a. 4%パラホルムアルデヒドを捨て、PBS で 1 回洗う。
- b. PBS を捨て、10% sucrose 液 7ml をゆっくり入れる。
- c. Tube を傾けて、管壁を sucrose 液で洗う。
- d. 4℃にサンプルを入れ、沈むのを待つ。
- e. 沈んだら、10% sucrose 液を捨て、20%～を入れる。後は同様に 30%～まで行う。

\*5：【O.C.T compound 包埋】 a,b の作業は Dish を使用して行います。

O.C.T compound (サクラファインテックジャパン 4583)

Tissue-Tek クリオモルド(サクラファインテックジャパン 1号 4565、2号 4566)

- a. Dish に少量とった O.C.T compound にサンプルを入れ、余分な sucrose を除くように compound をまぶす
- b. 新しい O.C.T compound に移し、a を繰り返す
- c. クリオモルドにサンプルを薄切面が下になるように入れ、compound を追加する
- d. 液体窒素で凍結、完全に凍る前(中央部は透明)に -80℃へ移し完全に凍結させる。(ブロックのひびを防ぐ為)
- d. 凍ったらサランラップで 1 つずつ包み、ジップロック等の袋に入れ -80℃で保存する。