

Cortical Neuron Primary Culture の固定・染色 初心者用プロトコール (by R.Kawai-Hirai)

準備編

Reagent

封入剤 : (LIPSHAW IMMUNON) PermaFluor Aqueous mountant 30 ml

0.1 % Triton : 10 % Triton H_2O soln. を PBS で希釈。

3.7 % formaldehyde : Formaline を PBS で 10 倍希釈。(用時調製)

PBSA : 3 % BSA (和光 1 級) を PBS で溶解。分注して、冷凍庫に保存。

抗体

1st. ; M2F6 上清 ; 希釈せずに使用、通常は生化学室の緑色の冷蔵庫に使用中のロット有。

2nd ; FITC labeled anti-mouse IgG(H+L) cappel 55514 ; PBSA で 100 倍希釈して使用。

stock soln. (50 μl に分注済み) は - 80 冷凍庫 No.3 - 1 に保存。

希釈した working soln. は個人で保存。(1 回分のみ希釈して使い切った方がよい)

FITC label は光、熱に弱いので取り扱う時は冷暗所が基本。

当日編

[シャーレ中]

1. 処理済み培養細胞をインキュベーターから取り出し、シャーレは P 2 へ。

2. 培地を水流アスピレーターで吸引。

(3. PBS で洗う。

この操作を行うかどうかは使用している細胞・タンパク質に依存。

Dr.Xue は一連の実験でこの部分は省略)

4. 3.7 % ホルマリン、15 min。

5. PBS, 5 min x 1。(Dr.Xue は 5 min x 2)

6. 0.1 % Triton, 15 min。

7. PBS, 5 min x 3。(Dr.Xue は 5 min x 1)

[自作台上]

1. ゴム栓を両面テープで張り付けた台に水道水を張る。

2. ピンセットでカバーガラスを取り出し、ゴム栓上に向きを間違えないようにのせる。

3. 400 μl 3 % BSA / PBS をカバーガラスにのせ、全部のカバーガラスにのせたら、
ふたをする。 30 min 放置。ここで止める場合は 4 で静置。

4. カバーガラス上の PBSA をキムワイプに吸わせる。

5. 250 μl 1 次抗体, amb.temp, 1 hr.

ここで作業を止める場合は 4 で静置。

6. PBS, 5 min. x 3。

7. 250 μl 2 次抗体, amb.temp, 30 min。

2 次抗体以降の操作は遮光して行う。

8. PBS, 5 min. x 3。

9. 封入。アルミホイルで覆い、室温で乾燥させる。(約 1 時間)

10. 乾いたら、ホルダーにはさんで 4 。

11. 1 週間以内に顕微鏡観察。(おそくとも 1 ヶ月以内)