

DIBES (96 well plate) 用固定染色法

Part I 固定法

Part II 染色法

群馬大学大学院 医学系研究科 神経薬理学

DIBES (96 well plate) 用固定染色法...固定液 (パラホルムアルデヒド)

Part I 固定法

1. 6.4%PFA (8%PFA : 0.5MPB = 4 : 1 使用する 30 分前に調製)
2. 培地に 6.4%PFA を「167 μ l to 100 μ l 培地」 or 「150 μ l to 90 μ l 培地」添加...10min
3. 液を抜いて 4%PFA を 100 μ l 添加...15min
4. PBS 250 μ l 洗い 5 min \times 1 回
5. 0.1%PBST(100 μ l)...全部入れ終わってから R.T. 5 min
6. PBS 250 μ l 洗い 5 min \times 3 回
7. Blocking は 3%BSA in PBS (PBSA, 100 μ l)...R.T. 1hr

Part II 染色法

1. 一次抗体添加 (on ice) ...PBSA に希釈
MAb M2F6 1 \times (ハイブリドーマ培養上清) MBL からの購入品は 1:1,000~10,000 倍希釈
Anti-MAP2 polyclonal antibody 1:2000 倍希釈
→70 μ l /well で調製して 60 μ l /well 添加
→4 $^{\circ}$ C over night
→PBS 250 μ l 洗い 5min \times 4 回
2. 二次抗体添加(on ice, 遮光)...PBSA に希釈
Alexa Fluor 488 anti-Mouse IgG 1:250 倍希釈
Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG 1:250 倍希釈
DAPI 1:1000 倍希釈
→70 μ l well で調製して 60 μ l /well 添加
→R.T. 2 hr
→PBS 250 μ l 洗い 5min \times 4 回
3. PBS+0.1% NaN₃ 100 μ l/well 添加で 4 $^{\circ}$ C 保存