

間接免疫蛍光法

- 1 培養液 5ml をファルコンチューブにサンプリング。
- 2 ホルムアルデヒド 470 μ l(終濃度 3.2%)を添加して固定。
- 3 室温で 30min 攪拌 (ゆーっくり)。
- 4 4°C or 室温 14,000rpm \times 2min で集菌、KPS buffer (100mM KPB(カリウムリン酸 buffer,) 1.2M ソルビトール)1ml で wash。
- 5 20 μ g/ml の Zymolyase 入り KPS buffer で再懸濁してエッペンに移す。
*これを KPS buffer に懸濁して overnight 可能。
- 6 β -メルカプトエタノール 2 μ l 加えて 37°C 10min~60min。
*時間は要検討
- 7 PS buffer で wash、3000rpm で集菌、ピペットで上清捨てる
- 8 濁っているのが分かる程度に KPS に再懸濁
- 9 マルチウェルプレートにポリリジン 10 μ l をスポット、15min 放置してアスピレート。DW をスポット、15min 放置してアスピレート
*以降 20 μ l 程度スポット
- 10 サンプルをスポットし、10min 放置してアスピレート
- 11 冷メタノールをスポットし、6min 放置してアスピレート
- 12 冷アセトンをスポットし、30sec 放置してアスピレート (プレートに菌がはり付いていれば OK)
- 13 15min 程度放置して乾燥
- 14 1mg/ml BSA 入り PBS をスポット、15min 放置してウェルへ固定する。
*ウェットな状態 (例: チップケース上にスライドをおいて、濡らしたキムワイプおいてふたをする) で冷蔵保存可能
- 15 PBS-BSA で 1000 倍希釈した一次抗体 10 μ l 入れて室温 2h 放置
- 16 PBS-BSA で 10 回 wash
- 17 300 倍希釈した二次抗体入れて 1h 放置
- 18 PBS-BSA で 10 回 wash
- 19 PBS で 1 回 wash
- 20 1 μ g/ml DAPI 入り PBS をスポット、30sec~1min 放置
- 21 PBS で 2 回 wash
- 22 Mounting medium スポットし、カバーガラスのせる
- 23 カバーガラスの両端(全辺)をマニキュアでコーティング。

Memo