

27.06.22

Zelllinie		Antikörper/ Farbstoff					
Zelllinie COS-7 ATCC CRL-1651 Passage 13+4 Species Cercopithecus aethiops Organ Kidney Morphologie Fibroblast		Antikörper	Spezies	Target	Farbstoff	Ref.Nr.	Hersteller
		1° - mouse anti-acetyl-tubulin	Mouse		-	sc-23950	santa Cruz
		2° - anti mouse Alexa Fluor 568	Mouse	Mouse Antibodies	yellow	A-11031	Thermo Fischer
		2° - anti tubulin- Alexa Fluor 647	goat	Alpha Tubulin 4a	red	TS168	Sigma
		Phalloidin-Atto-488	-	Actin Filaments/NS	green	65906	Sigma
		DAPI	-	DNA	blue		

Compound-Treatment	Notizen
<ul style="list-style-type: none">- Medium absaugen und Zellen mit 1mL Substanz nach dem Platelayout behandeln -> Zellen die nicht behandelt werden, noch nicht absaugen! (zuerst 2 h und nach 1,5h die 30 min Behandlung)- Leere Wells mit Wasser/PBS/Medium auffüllen gegen Kondensation	Immer nur an einer Stelle der Well-platte absaugen (am Boden bzw. Rand), damit man nicht den Zellrasen zerstört
Platelayout	Wenn es kein Absaugmöglichkeit gibt, mit der Pipette einfach das weggpipettieren

Jan			
2 h	DMSO	Taxol	
30 min	DMSO	Taxol	

DMSO-> Control

- Compound**
- Für 3 Wells (Überschuss) herstellen -> 3mL
 - Zellen sind schon im Medium, weshalb man nur DMSO und Taxol jeweils hinzugeben muss

DMSO		Taxol		Medium:	Substanzen jeweils in einem 5mL Eppli herstellen
Stock conc	100 %	Stock conc	4000 nM	10% FCS	
Endconc	0,25 %	Endconc	10 nM	Gibco Medium	
Dilutionfactor	400	Dilutionfactor	400		
DMSO	2,5 uL	DMSO	2,5 uL		
Total	1000 uL	Total	1000 uL		

- Nach Jeder Behandlung in den Inkubator bei 37°C/5% CO2
- nach 2h Medium + Compound absaugen
- 500µL -1 mL mit 4% PFA/4% sucrose in PBS fixieren für 10-15 min

Staining Protocol											
<ul style="list-style-type: none">- Fixierungsmedium absaugen- in PBS waschen -> 5-10 min inkubieren und wieder absaugen (3x insgesamt machen)- Wellplatte vorsichtig auf einem Färbebank überführen- 250 uL 0.2% Triton X 100 für 10 min in PBS inkubieren											
<table><tr><td>Wells</td><td>5</td></tr><tr><td>pro Well</td><td>250 uL</td></tr><tr><td>Stoc conc</td><td>20 %</td></tr><tr><td>End conc</td><td>0,2 %</td></tr><tr><td>Verdünnungsfaktor</td><td>100</td></tr></table>	Wells	5	pro Well	250 uL	Stoc conc	20 %	End conc	0,2 %	Verdünnungsfaktor	100	
Wells	5										
pro Well	250 uL										
Stoc conc	20 %										
End conc	0,2 %										
Verdünnungsfaktor	100										
<table><tr><td>Triton-X</td><td>12,5 uL</td></tr><tr><td>PBS</td><td>1237,5 uL</td></tr><tr><td>Total</td><td>1250 uL</td></tr></table>	Triton-X	12,5 uL	PBS	1237,5 uL	Total	1250 uL	-> gleich für alle Wells mit Überschuss in einem Eppli herstellen				
Triton-X	12,5 uL										
PBS	1237,5 uL										
Total	1250 uL										
<ul style="list-style-type: none">- in PBS waschen -> 5-10 min inkubieren und wieder absaugen (3x insgesamt machen)- in BB-HE bei RT für 1h blocken- Blocklösung absaugen											
1°Antibody											
<ul style="list-style-type: none">- 40 uL pro Well mit 1° Antikörper bei 4°C über Nacht inkubieren -> verkehrtherum abdecken inkubieren (einfach umdrehen)											
<table><tr><td colspan="2">Dilutionfactor</td></tr><tr><td>mouse anit-acetyl</td><td>2000</td></tr></table>	Dilutionfactor		mouse anit-acetyl	2000							
Dilutionfactor											
mouse anit-acetyl	2000										
<table><tr><td>Mouse anti-acetyl</td><td>0,1 uL</td></tr><tr><td>BB-HE</td><td>200 uL</td></tr><tr><td>Total</td><td>200 uL</td></tr></table>	Mouse anti-acetyl	0,1 uL	BB-HE	200 uL	Total	200 uL	-> Bei der kleinen Verdünnung macht das kein unterschied -> Alles in ein Eppli herstellen				
Mouse anti-acetyl	0,1 uL										
BB-HE	200 uL										
Total	200 uL										

28.06.22

- Platte umdrehen
 - in PBS waschen -> 5-10 min inkubieren und wieder absaugen (3x insgesamt machen)
- 2° Antibody**
- 40 uL pro Well mit 2° Antikörper in Blocking für 1h bei RT inkubieren -> verkehrtherum abdecken
- | | |
|----------------|-----|
| Dilutionfactor | |
| Anti-mouse | 400 |
- | | |
|------------|--------|
| Anti-mouse | 0,5 uL |
| BB-HE | 200 uL |
| Total | 200 uL |
- > alles in ein Eppli herstellen
- in PBS waschen -> 5-10 min inkubieren und wieder absaugen (3x insgesamt machen)
- 2° Antibody**
- 40 uL pro Well mit 2° Antikörper und phalloidin-Alexa 488 in Blocksg für **min** 1h bei RT inkubieren -> verkehrtherum abdecken
- | | |
|----------------------|-----|
| Dilutionfactor | |
| Anti-tubulin | 500 |
| phalloidin-Alexa 488 | 100 |
- | | |
|----------------------|--------|
| Anti-tubulin | 0,4 uL |
| phalloidin-Alexa 488 | 2 uL |
| BB-HE | 200 uL |
| Total | 200 uL |
- > alles in ein Eppli herstellen
- in PBS waschen -> 5-10 min inkubieren und wieder absaugen (3x insgesamt machen)
- DAPI**
- 100 uL DAPI (1ug/mL) pro Well für 10 min (bei RT) inkubieren -> NICHT umdrehen
- | | |
|----------------|------------|
| DAPI | |
| Stoc conc | 1000 ug/mL |
| End Conc | 1 ug/mL |
| Dilutionfactor | 1000 |
- | | |
|-------|--------|
| DAPI | 0,5 uL |
| PBS | 500 uL |
| Total | 500 uL |
- > oder gleich 1 mL herstellen
- in PBS waschen -> PBS rauf kurz schwenken und dann absaugen
 - 1 mL Wasser kurz reimpipettieren und absaugen
 - Eindeckeln mit Mowiol (Je nach Fläche 1-2 Tropfen raufgeben und mit einem Deckgläschen raufgeben)
 - Trocknen lassen und dann mikroskopieren