

Focus-forming assay

2021/6/10 권정원 업데이트

Materials

- Vero cells
- Dengue virus
- 96-well flat plate
- 2% FBS DMEM
- Opti-MEM
- Carboxymethylcellulose overlay
- Phosphate buffered saline
- Methanol
- Primary antibody (mouse anti-Dengue virus)
- Secondary antibody, substrate

Methods

1. Vero cell을 96-well plate 에 3×10^4 cells/well 로 seeding 한다. (90% confluency)
2. Methylcellulose overlay를 37°C water bath에 담가놓는다.
3. Virus를 10-fold로 2% FBS DMEM에 dilution 한다.
4. Vero cell 배지를 버리고 well 당 50 μ l 넣고 1시간 37°C incubation 한다.
5. 상층액은 버리고 PBS로 washing 한다.
6. 1% Methylcellulose overlay (OptiMEM+2% FBS: 2% Methylcellulose = 1:1) 를 200 μ l 넣는다.

7. 48hr 동안 37도 incubator 에서 incubation.
8. Overlay를 제거하고 차가운 PBS로 2번 washing 한다.
9. Methanol 을 100 μ l 넣고 5분 고정.
10. PBS로 2번 washing 한다.
11. Blocking buffer 를 100 μ l 넣고 10분
12. 1차 antibody를 50 μ l 넣고 1시간 incubation 한다.
13. PBS로 2번 washing 한다.
14. 2차 antibody (anti-mouse biotin conjugated antibody)를 50 μ l 넣고 30분 incubation 한다.
15. PBS로 2번 washing 한다.
16. HRP (1:10,000 dilution)를 50 μ l 넣고 10분 incubation 한다.
17. PBS로 2번 washing 한다.
18. substrate (DAB)를 50 μ l 넣는다. 2-10분 정도 기다리면서 발색이 되는지 관찰한다.
19. 현미경으로 관찰하여 적절한 희석배수에서 cell counting 한다.
20. $FFU/ml = (\text{mean foci/well}) \times (\text{dilution factor}) / (\text{ml inoculum})$

(예를 들어 10^6 희석 배수 웰에서 30개 세포가 카운팅 되면 $30 \times 10^6 \times 20 = 6 \times 10^7$ FFU/ml)

