

TIRF による微小管動態の観察

1 分子アッセイのプロトコルも合わせて目を通すとよい。

試薬

- ・精製した GFP-CAMSAP2 (仁田研からもらった)
- ・ビオチンラベルした抗 GFP 抗体 (MBL で買った)

・観察用バッファー

100mM PIPES, 4mM MgCl₂, 1mM EGTA, 200 mM KCl

Methyl Cellulose(#4000)をあらかじめ使うバッファーに 0.1%になるように溶かしておくで微小管が振動するのを抑制できる。メチルセルロースは入れなくても重合は起こるし、観察もできる。

- ・ 10% Pluronic-F127
- ・ 0.5mg/ml PLL-g-PEG-biotin
- ・ 0.5mg/ml Streptoavidin
- ・ 10mg/ml k-casein
- ・ 5mg/ml biotin-BSA
- ・ 50mg/ml BSA

必要な道具

・ TIRF

・ 自作する人もいるが、ニコンやオリンパスの市販のもので十分。Vale ラボや McKenney ラボもニコン。

・ 微小管の重合のためにステージを 30°C以上にできると便利。室温でも重合は進む。

・ iXon Life 以上の EMCCD。iXon Ultra の必要性は感じていない。

・フローチャンバー

- ・長時間観察になるので流路は一つだけ作ればいい。

手順

0. 顕微鏡を立ち上げてステージを温める。

1. Assay Buffer を調整する。

| | |
|--------------------|--------|
| 観察用バッファー | 880 ul |
| 10% Pluronic F-127 | 50ul |
| 5mg/ml Biotin-BSA | 20ul |
| (普通の) BSA | 20ul |
| 10mg/ml k-casein | 20ul |
| 100mM GTP | 20 ul |

2. PLL-PEG-biotin をフローチャンバーに入れて 5 分以上放置。

3. Streptoavidin を入れて、1 分以上放置

4. BRB80 を 20ul x 2 回流す。

5. BRB80 で 1/10~1/50 希釈した biotin-labelled anti-GFP antibody を入れて 5 分放置

6. Assay Buffer で 20ul x 2 回流して未反応の streptoavidin をブロッキング

7. CAMSAP2 を Assay buffer で希釈して流す。抗体と CAMSAP2 が結合してガラス表面に固定される。

8. Assay buffer 20ul x 2 回で洗う。

9. 観察用バッファーを調整する

| | | | |
|--------------|------|----|---|
| Assay Buffer | X | ul | |
| Trolox | 0.5 | ul | |
| PCA | 0.5 | ul | |
| PCD | 0.5 | ul | |
| チューブリン溶液 | Y | ul | (1mg/ml くらいに調整。TMR ラベルしたチューブリンを 1/20 混ぜる) |
| CAMSAP2 | Z | ul | (50-500nM くらいに調整) |
| <hr/> | | | |
| 合計 | 21.5 | ul | |

10. 観察用バッファーを流し込んで TIRF で観察。CAMSAP2 から微小管が生えるのが見える。