

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

- GMPCPP シードや CAMSAP のような微小管形成中心になりうるもの

- バッファー(PEM など)

BRB80 などが普通。グリセロールは微小管の脱重合を妨げる作用がある。**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よい。

手順

0. 顕微鏡の電源を入れて、ステージを 30 度以上に設定

1. Assay Buffer を調整する。

使うバッファー(最後の注を参照)	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. seed を流す。5 分放置。

6. Assay Buffer で 20ul x 2 回流す。

7. 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
<hr/>		
合計	21.5	ul

X と Y の組み合わせは温度によってもかわるので、条件を振るとよい。

30 度なら、1mg/ml の tubulin が入っていれば GMPCPP シードからの重合は

起こせる。

8. 観察用バッファーを流し込んで TIRF で観察