

BRB80(または PEM)

チューブリンの精製を参照。pH は必ず KOH で合わせる。

スクロースクッション

50ml のチューブに 15g のスクロースを入れる

チューブの 50ml の線まで BRB80 を入れる

チューブを降って混ぜる

チューブリン

ラベルしていない 3mg/ml のストック。

ラベルしたチューブリン

入れるチューブリンの量はロットごとに変わるので、新しいロットはロットチェックが必要になる。ラベルフリーのチューブリンに対して重さで 1/10 入れるのが目安。

ベックマンの卓上遠心機と TLA120.2

手順

1. 混ぜる

3mg/ml チューブリン	20 マイクロ
ビオチン化チューブリン	X マイクロ
蛍光チューブリン	Y マイクロ
100 mM GTP	1 マイクロ
BRB80	? マイクロ
<hr/>	
合計	25 マイクロ

チューブリンの濃度が数 mg/ml くらいであればいい。

2. 37°Cで 20 分
3. 1 と等量の 40uM taxol in BRB80 を混ぜる。
4. 37°Cで 15 分以上。
5. 待っている間にスクロースクッションに終濃度 10uM のタキソールを加えたものを 500ul 作って TLA120.2 用のチューブに入れて 37°Cで温める。
6. 微小管をスクロースクッションの上に載せる。
7. 30000rpm、35°Cで 10 分遠心。
バランスはスクロースクッションを 510 マイクロリットル入れたものを用意すれば良い
8. 上清をすてて界面を BRB80 で 2 回洗う。
8. クッションを捨てて、沈殿を 50 マイクロリットルの BRB80(+5uM taxol) で懸濁する。

この微小管は冷やさずに机の上に置いとけば 2, 3 週間は使える。gliding assay や TIRF での 1 分子観察のルールにするなら毎回重合する必要はない。