

脳の上清を用いて脱重合と ATP 存在下の重合を繰り返して MAPs を除く。
Castoldi and Popov, Protein Expression and Purification, 2003 を改変してある（大容量の超遠心がないので・・・）。超遠心と大型ローターがある環境であれば、元の通りやればよい。従来は氷冷 PEM で脱重合していたが、この方法では Ca^{2+} が微小管を脱重合する性質を利用して、MES+CaCl₂ を用いている。脱重合に用いた Ca イオンを、高濃度 PEM に入っている大量の EGTA でキレートすることで微小管を重合する。

道具

クーラーボックス

上州屋で買った釣り用

ピンセット

脳表面の膜や血管を除くのに用いる。丹羽は FST の #5 が好きだけど、小学生理科用のピンセットでもいい。

家庭用のミキサー

TM8200（テスコム）

遠心機

- ・ Avanti HP-25（ベックマン）
- ・ ローターは JA-10 と JA-25.50

#超遠心と 45Ti、90Ti があれば Castoldi and Popov の通り 10 万 g で遠心して精製できるが、なくても JA25.50（75000g 程度）で精製できた。収量は減っているのかもしれない。

- ・ 遠心ボトル(ベックマン # 355605)
- ・ 遠心ボトル（ベックマン#357000）

#357000 は 25ml 以上液体が入っている場合のみ 25000rpm で使えるとのメーカーの回答

試薬

注意:試薬に Na イオンは入れないこと。pH を合わせるときは必ず KOH。NaOH を使った微小管は電顕で見るとバレル。

高濃度 PEM (豚脳 4 個なら 1L で十分)

1M PIPES

10mM MgCl₂

20mM EGTA

KOH で pH を 6.9 に合わせる。1 リットルあたり KOH が 90g 以上は必要。通常のバッファーのように水に溶かした KOH を加えると間に合わないので、オススメは秤で 90g 測って一気に投入。そのあと少しずつ投入。

Depolymerization Buffer (DB) (豚脳 4 個なら 1L で十分)

50mM MES

1mM CaCl₂

KOH で pH を 6.6 に合わせる。それなりに必要。

PEM

100 mM PIPES

1mM MgCl₂

1mM EGTA

KOH で pH を 6.9 に合わせる。それなりに必要。

200 mM GTP (豚脳 4 個なら GTP1g で十分)

1g の GTP を 9ml の DDW に溶解。

(注:アバウトだが精製の際のバッファー量は目分量なのでこの程度でよい)

100mM ATP 豚脳 4 個なら GTP1g で十分)

1g の ATP を 20ml の DDW に溶解

(注:GTPと同じ)

#必ずすべての試薬を準備してから豚の脳を注文する。脳を注文してから足りないものがあると大変。

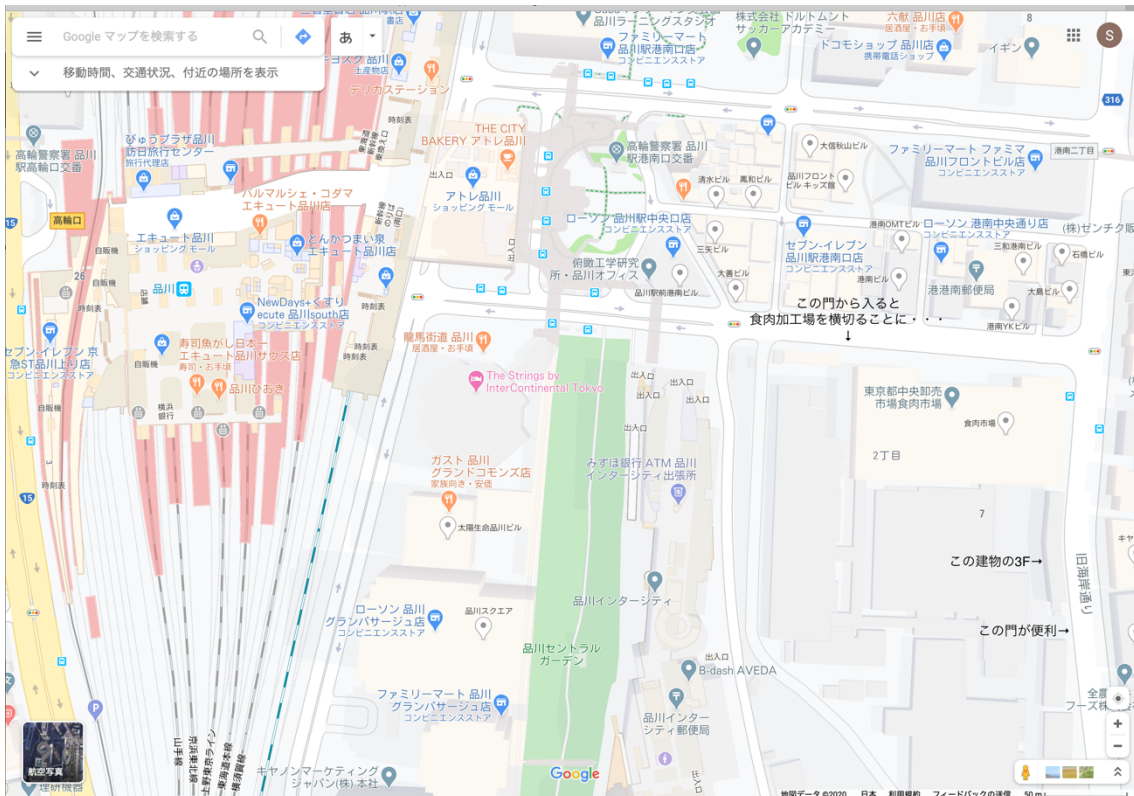
豚の脳の入手

- ・4日前までに品川の芝浦臓器に豚・脳を4個注文。

請求書払いのお願いをして、東北大学を宛名にした見積書、納品書、請求書を準備してもらう。

- ・仙台の食肉加工場は豚の頭ごと渡される。そこから脳を取り出す時間と手間を考えると、交通費2万円だとしても品川まで行った方がいいと思われる。

- ・六時半の「はやぶさ」に乗ると品川に8時半頃到着。品川駅から芝浦臓器まで15分。急げば10分。準備ができるまで事務所で待たせてもらう。



- ・脳は芝浦臓器で9:00前くらいに受け取れる。温かいのが渡されるのですぐに袋ごと氷に突っ込む。急げば9:30の「はやぶさ」に乗って11:00くらいに仙台着。手間取って「やまびこ」に乗ることになっても11:30くらいに仙台着。取り出して3時間くらいで作業を開始できる。

(元の論文には取り出して2時間以内に作業開始しろ、と書いてある)

- ・事務室の会計係で検収印をもらう。

手順

数日前までに

上記のようにバッファー類を作成し、芝浦臓器に注文をしておく。
ミキサーと遠心機の使い方と動作を確認しておく。

前日

帰る前に

高濃度 PEM と JA-25.50 ローターを 37°Cに入れる。

DB (1 リットル)、PBS(5 リットル)、PEM、ミキサー、JA-10 ローターを低温室に入れる。

アイストレーに PBS を注いで冷凍庫に入れておき、PBS 氷を作る。

当日

1. クーラーボックスに氷を詰めて出発。受け取った脳を袋のまま氷に埋める。
水につからないようにする。

2. 急いでラボに戻って作業開始(上記の豚の脳の入手を参照)
ビーカーに (PBS 氷を浮かべた PBS2 リットル) x2 を準備する。
一方のビーカーに脳を漬ける。
もう一方のビーカーは 3 で使う。

3. ピンセットを用いて脳の表面の膜や血管をできる限り除く。冷やしたまま作業する。除いた後で重さを測る。豚脳 1 個あたり 110g くらいのはず。
作業が終わった脳は綺麗な方の PBS 氷+PBS2 リットルに入れておく。

4. ミキサーに脳を移す。PBS は入れない。

5. 脳 100g にたいして DB を 100ml 加える。

6. ミキサーでなめらかになるまですりつぶす。遠心ボトル (500ml)に移す。

7. 低温室の JA-10 を遠心機にセットする。4 度で 10000rpm で 1 時間遠心。

8. 上清 (赤～ピンク色) を 1L のビーカーに移す。豚脳 4 個で 350ml 程度の上清を回収できる。

(注：厳密に測る必要はない。ビーカーのメモリで目分量でいい。最終的な量がこの段階の 3 倍になるのでビーカーのサイズは余裕を持たせる。豚脳 4 個で 350ml 程度の上清を回収できる)

9. 上清と等量の高濃度 PEM を加える。

(注：目分量)

11. 上清と等量の Glycerol を加える。

(注：ということは、ここで液量は 8 の上清の 3 倍になる)

12. 終濃度が 1.5mM ATP と 0.5 mM GTP になるように ATP と GTP を加える。スターラーでよく混ぜる。

13. 37 度のウォーターバスに入れる。1 時間重合する。

(注：豚から脳みそを取り出してからここまでのステップをいかに早くやるかが収量に影響する)

14. 待っている間に JA25.50 を 37 度から出して遠心機にセットし、37°C で運転することで機械を暖める。

(注：たいていの遠心機は温度をセットして放置するより、実際運転した方が加熱、冷却が早い)

15. ボトル (ベックマン # 357000) に温めた上清を移して、25000rpm 30 分遠心。残りの上清はそのまま 37°C に入れておく。

16. 遠心後、白いペレットが見えるはず。遠心ボトル内の上清を捨てて、13 の上清を入れて再遠心する。13 の上清がなくなるまでこの作業を繰り返す。

(注：一番時間がかかるステップ。廣川研のように超遠心が 2 台欲しくなる)

17. 上清を捨てて遠心ボトルを氷水につける。遠心ボトルに冷えた DB (全部のボトルを合わせて 100ml)を入れてピペッティング。白いペレットを溶かす。溶けにくい場合はしばらく冷やしてからもう一度ピペッティングする。

18. すべての懸濁液を 300ml ビーカーにまとめて、30 分間、氷水につけて放置する。

(注：ここで懸濁液を 50ml のチューブに移して、液体窒素で凍結すれば作業を止められる。次の日は氷上で融解して 19 の遠心から再開する。もし最後まで通しでやると、この先あと 4, 5 時間。)

19. 待っている間に JA25.50 をセットした遠心機を 4 度で運転することでローターと遠心機を冷却しておく。

20. 冷却した懸濁液を遠心ボトルに移してバランスをとる。

21. ローターがよく冷えていることを確認してからボトルをセットし、25000rpm、4 度で 30 分遠心。

22. 白いペレットが見えるが、これは不可逆的に重合した微小管や膜成分。必要なのは上清。上清を 300ml のビーカーに移す。ビーカーのメモリで液量を見る。

23. 上清と等量の高濃度 PEM を加える。

24. 上清と等量の Glycerol を加える。

25. 終濃度が 1.5mM ATP と 0.5 mM GTP になるように ATP と GTP を加える。スターラーでよく混ぜる。

26. 37 度のウォーターバスに入れる。1 時間重合する。

27. 待っている間に JA25.50 を 37 度から出して遠心機にセットし、37°Cで運

転することで機械を暖める。

28.遠心 ボトル(ベックマン # 357000)に温めた上清を移して、25000rpm 30分遠心する。

注：50x8=400ml まで遠心可能なので、一度で全部遠心出来るはず

29. 再び重合した微小管が白いペレットになる。上清を捨てる。

30. 適量の冷たい PEM で懸濁する。ピペティングによってペレットを溶かす。30 分間、氷水につけて放置する。

(注 1：ここで間違えて DB で再懸濁しないこと)

(注 2：加える PEM の量は遠心能力に依存する。70000g で回せる機械が JA-25.50 しかない場合は 25ml となる。もし、卓上超遠心などがあれば PEM の量を減らして高濃度チューブリンのストックを作れる)

31. 待っている間に JA25.50 をセットした遠心機を 4 度で運転することでローターと遠心機を冷却しておく。

32. 冷却したチューブリン懸濁液を遠心ボトルに移してバランスをとる。

(注：#357000 を使う場合は必ず 25ml 以上入れる)

33. 25000rpm、4 度で 1 時間遠心

34. 上清は脱重合したチューブリン溶液になっている。上清を新しいチューブに移す。

(注：少しだけ脱重合しない微小管のペレットができるのは正常。これは捨て)

35. PEM で 10 倍、50 倍、100 倍程度に希釈して OD280 を測る。OD280=1 のときに 1.15mg/ml となる。

(注：豚脳 4 個から 100mg は取れるはず。うまくやれば 300mg 以上は取れるが、仙台で超遠心なしの環境では難しいか?)

36. 1ml ずつ分注して液体窒素で凍結して-80度で保存する。

お疲れ様でした。