

2021年2月9日 丹羽

TIRFによる1分子アッセイ

バックグラウンドを下げるためにガラスをPEG化する方法が広く行われているが、とても面倒くさい。PLL-g-PEGを用いると、PLL(ポリリジン)がガラス表面に吸着するため簡便にガラス表面をPEGでコーティング出来る。さらにPEGの部分をbiotin化しておけば、ガラス-(PLL-g-PEG-biotin)-avidin-(biotin化した微小管)というように、PEGでコーティングしたガラス表面に微小管を固定できる(avidinには複数のbiotinが結合出来ることを利用する)。

試薬

SRP90 バッファー

60 mM Hepes pH 7.4,
50 mM K-acetate
2 mM MgCl₂
1 mM EGTA
10 % glycerol

10% Pluronic-F127

Pluronic-F127(Sigma,
10%になるようにBRB80に溶かしておく。

0.5mg/ml PLL-g-PEG-biotin

SuSoS(<https://susos.com>)から50%のものを通販で購入して、BRB80で0.5mg/mlにして溶解。-20°C保存。

(以下は忘れないためのメモ)

・SuSoSのは結構高い(10mgで約5万円)なので、大量に使うならBiotin-PEG-Succinimidyl Carboxymethyl Ester(Biochempeg社。フナコシが代理店)にPLLを混ぜて自分で合成することも可能。その場合、PEGのサイズは3Kから5Kくらいがバックが低いらしい。

・海外通販で買うと後でFedexから関税の請求が来る。

- ・自分で作った場合はロットチェックが必要。濃度を降って微小管の結合具合を見ながら使用する濃度を決定する。
- ・自作する場合は PLL-PEG に biotin の代わりに Halo tag や SNAP tag のリガンドを付けるのも応用として面白いかも、と思った。
- ・でも、PLL-PEG を biotin ラベルして biotin-Halo リガンドなどを使えばいいだけか？

0.5mg/ml Streptoavidin

- ・和光から購入して、BRB80 で溶解。 -20°C 保存。
- ・Neutroavidin の方が非特異的結合が少ないらしいが、まだ試していない。

50mg/ml casein

- ・自力で溶かすと安上がりだが可溶性が低いためとても面倒くさい。50mg/ml 溶液がシグマで売ってる。
- ・自力で溶かす場合は KOH で pH を合わせながら少しずつ溶かす。

10mg/ml k-casein

- ・普通の casein と違って簡単に BRB80 に溶解する。5mg/ml で溶かして-20°C 保存。でも高い。

5mg/ml biotin-BSA

50mg/ml BSA

10mM taxol

100mM Trolox

Trolox 100mg

メタノール 430ul

1M NaOH 345ul

(または、5M NaOH 69 ul)

DDW で 4ml にする (15ml チューブの目盛りでいい)

溶けにくいので一晩ローターで回しておく
→フィルターで溶け残りを除く。

手順

1. Assay Buffer を調整する。

使うバッファー (SRP や BRB80 など)	880 ul
10% Pluronic F-127	50ul
10mM taxol	1ul
5mg/ml Biotin-BSA	20ul
(普通の) BSA	20ul
10mg/ml k-casein	20ul

注：(1) SRP90 の塩強度は細胞内とほぼ同程度になっている。活性型のモーターであればキネシンであれダイニンであれこれで運動が見られた。この条件で動かない場合、「活性化のための何かが足りていない」と考える方がいいような気がする（個人的な見解）。

(2) IME バッファー(10mM Imidazole, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA)のような塩強度が極端に低いバッファーを用いると、自己阻害がかかったような不活性型モーターであっても微小管につきやすくなり、一見、活発に運動しているようにみえたケースがあった。その場合も活性化因子を入れるとさらによく動く。

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. SRP90 や BRB80(Assay バッファーではない) を 20ul x 2 回流す。

注：ここで Assay Buffer で wash すると、Biotin-BSA によって avidin がブロックされて微小管がつかなくなる

5. あらかじめ重合しておいた蛍光微小管を 1/50 で希釈して流す。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	45 ul
モーター溶液	1 ul
100 mM ATP	1 ul
Trolox	1 ul
PCD	1 ul
PCA	1 ul

注：モーターの終濃度はとりあえず、1or10nM 程度を試す。活性があるモーターなら何らかの運動が見えるはず。100nM 入れるとバックに埋もれてなんだかわからなくなる。KIF1A(1-393)-forced dimer などは 1nM でも微小管上で飽和するので、10pM でもいい。

8. 観察用バッファーを流し込んで TIRF で観察