

試薬**蛍光色素**

色素-SE (色素-NHS と書かれていることもある) を購入して 100mM になるように DMSO で溶かす。無水 DMSO で溶かせばシリカゲル入りタッパーなどで -30°C で保存しておけるが、できれば 1mg 単位で購入して一気に使い切るのが安全。おとなしく Molecular Probes から購入してもよいが、

・Alexa のパチモンの AFDye というのが CLICK CHEMISTRY TOOLS で Alexa の 5 分の 1 の値段で買える。立替払いが可能な大学なら輸入代理店を通すより直販サイトで注文して Fedex で送ってもらうとよい。常温で送られてくるが問題なく使えた (Alexa と直接比較したわけではない)。

・ビオチン化試薬は Biotin-PEG2-NHS (東京化成)、Biotin-LC2-LC2-NHS (東京化成) などの 10~30 Å くらいのスペーサー付きのを使っている (これもダイナミクスなどを比較したわけではない)。

使う蛍光試薬の量の計算

チューブリンの分子量 だいたい 100kDa

蛍光色素の分子量 だいたい 0.5-1kDa

約 100 倍違う。

モル比で 10-20 倍量の色素を入れるので、チューブリンの重さ 10 に対して色素の重さ 1 くらい。1mg の色素でラベルするなら、チューブリンは 10mg。

仮に重合効率が 7 割とすると 1mg の色素を全量使うときに必要なチューブリンの量は 15-20mg。

5xBRB80

400mM PIPES (pH 6.8)

5mM MgCl₂

5mM EGTA

1M HEPES (pH 8.6)

pH は NaOH で調節する。

500 mM MgCl₂

500 mM EGTA

pH を NaOH で 7.5 付近に調整する。(調整しないと EGTA は溶解しない)

2M K-Glutamate

グルタミン酸を 2M で溶かして KOH で pH を 7 に調節する。pH7 くらいになるまで全部溶けない。

100mM GTP

以下はストック溶液を混ぜて作る。

High pH クッション

0.1M HEPES pH8.6

1mM MgCl₂

1mM EGTA

60% グリセロール

ラベリングバッファー

0.1M HEPES pH8.6

1mM MgCl₂

1mM EGTA

40% グリセロール

クエンチバッファー

2x BRB80

100 mM K-Glutamate

40% グリセロール

Low pH クッション

1x BRB80

60% グリセロール

必要なもの

卓上超遠心

TLA100.3 のローター(3.5ml のチューブを回せる)

TLA120.2 のローター(1ml のチューブを回せる)

TLA100 のローター(200 マイクロリットルのチューブを回せる)

TLA100 がない場合は 1.5ml チューブを回せる冷却遠心機

よくある TOMY のやつなど

手順

1. 試薬とローターの温度を調節。

High pH クッションを 37°C に温める。

ラベリングバッファーを 37°C に温める。

クエンチバッファーを 37°C に温める。

Low pH クッションを 37°C に温める。

1xBRB80 を 37°C に温める。

1xBRB80 を氷水で冷やす。

それぞれ、50ml あれば十分。

TLA100.3 のローターを 37°C で温める。

TLA120.2 のローターを冷やす。

TLA100 のローターまたは TOMY の冷却遠心機を冷やす。

2. 20mg のチューブリンを 7ml の BRB80 に懸濁する。

(注：グリセロールを入れた段階で 2-5mg/ml であればいい。濃すぎると粘性高すぎて扱いにくいし、薄すぎると重合したあとの収率が下がる。)

3. 終濃度 3.5mM の MgCl₂ と終濃度 1mM の GTP を加えて、氷上におく。

(注：終濃度はグリセロール加えた後の液量で計算。入れすぎる分にはたいした問題はないのでアバウトでいい)

4. 3.5ml の Glycerol を加える。

チューブリンの濃度は $20/10.5$ (mg/ml) = だいたい 2mg/ml = 20 μ M

5. 37°Cで1時間

6. High PH クッションを TLA100.3 のチューブに 1.4ml 入れる。

これを 6 本用意。

(注：何本必要かは、当然反応量による。)

7. 重合した微小管を 1.7ml~1.9ml くらいずつ High pH クッションの上に重層する。

8. TLA100.3 で 35°C、80000rpm 35 分間 超遠心

9. 界面の上の溶液をすてて、37°Cに温めたラベリングバッファーを載せて捨てるを 2 回繰り返す。

(注：界面は見えにくいので溶液を上から静かに吸い取って捨てる。6 で載せた分くらいの量を捨てたらラベリングバッファーを載せてみる。このときは界面が見える)

10. クッションを捨てる。

11. ペレットを 0.5ml のラベリングバッファー(37°C) で再懸濁。ペレットを壊すのは結構大変。

12. 色素をいれて、素早く軽くボルテックス。チュブリン溶液は粘性が高いので色素を均一にする。均一になったら 37°Cで 10 分反応する。

注：最初のチュブリンが 20mg の場合、

TAMRA の場合は 100mM の溶液を 24 マイクロリットル入れる。

スパーサー付きビオチン化試薬の場合は 100mM の溶液を

36 マイクロリットル入れる。

ともかく色素を 1mg 分入れる。

13. 2 分に一回少しだけボルテックスして混ぜる。

14. クエンチバッファー (37°C) を 530 マイクロリットル加えて 5 分放置。

15. Low pH クッションの上に重層して 35°C 20 分 超遠心
Low pH クッションが 1.5ml でその上に微小管溶液 1ml をのせる。

16. クッションの上の上清を捨てて、温めた 1xBRB80 で 2 回界面を洗う。

17. クッションも捨てる。

18. ペレットを 0.5ml の冷たい BRB80 で再懸濁して、TLA120.2 のチューブ (1ml 用) に移す。1.0ml のチューブは 500 マイクロリットル入っていればよい。

19. TLA120.2 で 80000rpm で 10 分 超遠心。

20. 上清を回収して、

終濃度が 1x になるように 5xBRB80 を加える (=130~140 マイクロリットル)。

終濃度が 4mM になるように MgCl₂ 加える。

終濃度が 1mM になるように GTP を加える。

氷上に放置。

(注: 終濃度はグリセロール加えた後の液量で計算。入れすぎる分にはたいした問題はないのでアバウトでいい)

21. 半分量のグリセロール(=だいたい 330~350 マイクロリットル)を加えて 37°C で 30 分間重合する。

22. TLA100.3 用のチューブ(3.5ml)に温めた Low pH クッションを 1.5ml 入れて、その上に 19 を重層する。

23. TLA100.3 で 35°C、80000rpm 35 分間 超遠心

24. 界面を 37°C の BRB80 で二回洗う。

25. クッションを捨てる。

26. ペレットの表面を **37°Cの BRB80 (重要!)** で2回洗う。ペレットは壊さ
ないで、チューブ内に残っているグリセロールを洗うだけ。

27. 0.2ml の冷たい BRB80 で再懸濁してエッペンドルフチューブに移して氷
上に20分おく。懸濁しにくいときにはムリせず少し冷やしてからピペッティン
グするとよい。

28. TLA100 で4°C、80000rpm, 10min 遠心する。

28'. 28 の代わりに冷却した遠心機で 15000rpm10分遠心
(注: 元プロトコルは超遠心になっているが、このステップで超遠心まではいら
ない気がする)

29. 上清を3マイクロリットルずつ分注して保存する。

テスト

ラベルしていない 3mg/ml のチューブリンに体積比で 1/10、1/20、1/40 を
混ぜて重合する。

↓

顕微鏡で観察する。

ビオチンの場合はアビジンを付けたガラスへの張り付き具合、蛍光ラベルの場
合は明るさをみる。

ラベルされたチューブリンは割合が高いほど本来の性質(重合、脱重合、キネシ
ンの結合・・・など)に悪影響を与える。できる限り蛍光ラベルされたチューブ
リンの割合を下げた方がよい。どこまで下げられるかはラベルしたチューブリンの
ロットや使った色素ごとによって変わる上に、持っているカメラなどにも依存する。