

製品データ No. 156

ローダミンファロイジンを用いた分子モーターの運動活性測定

2004 年 10 月

データの提供：群馬大学大学院医学研究科臓器病態薬理学

日野瑞城 先生

1. 実験概要

モーター蛋白質ミオシンによって引き起こされるアクチン繊維の運動をローダミンファロイジン (M.W. 1,250) を用いてアクチン繊維を蛍光標識することで観察した。

2. 実験方法 結果

1) アクチン繊維の蛍光ラベル

ローダミンファロイジン溶液 10 μ l (200 units/ml in methanol, 6.6 μ M) をチューブにとり、凍結乾燥機でメタノールを除く。これに 0.25 mg/ml のアクチン繊維溶液を 10 μ l 加え、遮光し氷上で O/N 静置しアクチンとファロイジンを結合させる。形成されたアクチン - ローダミンファロイジン複合体は氷上保存で約 4 週間使用可能である。

2) ニトロセルロース膜の作成

酢酸イソアミルで 0.1% に希釈したニトロセルロース溶液にカバーガラス (マツナミ No.1) を浸し、引き上げて乾燥させる。要時調製。

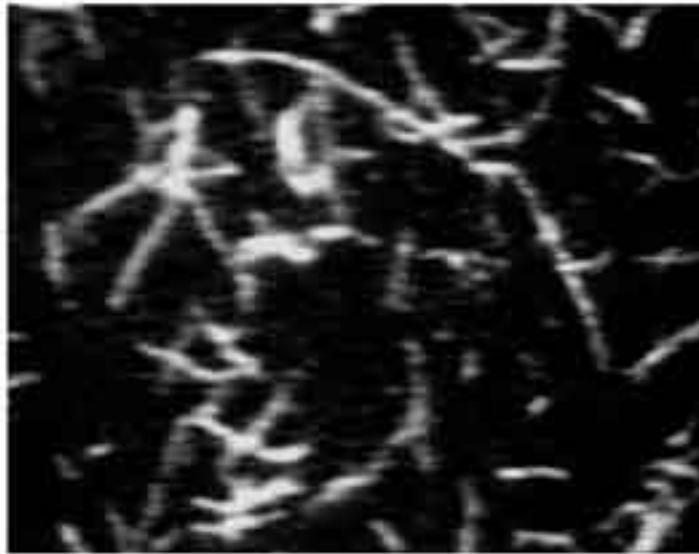
3) アクチン繊維の運動の観察

スライドガラス上に、ワセリンもしくは両面テープをスペーサーにして前述のカバーガラスをかぶせフローチャンバーを作る。チャンバー内に 1) ミオシン溶液 (0.1 mg/ml \times 50 μ l) 2) ブロッキングのための BSA (1 mg/ml \times 50 μ l) 3) アッセイバッファー + 蛍光ラベル化アクチン繊維 (25 mM イミダゾール (pH7.4), 25 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 μ g/ml 蛍光ラベル化アクチン, 50 μ l) の順で液を還流する。観察は蛍光顕微鏡 (Zeiss, Axioplan) を用いて行うが、高倍率・高開口数 (\times 40 倍以上、N.A=1 以上) のレンズが観察に適している。励起フィルターは BP510-550, 吸収フィルターは BA590 を用いた。

4) 結果

図 1 に示すように、ローダミンファロイジンをもちいることでアクチン繊維を可視化できる。この蛍光アクチン繊維を経時的に観察することでアクチンとミオシンのすべり運動の速度を計測できる。通常骨格筋ミオシンでは 5 μ m/sec 前後のすべり運動速度である。

図 1 ローダミンファロイジンでラベルしたアクチン繊維の蛍光顕微鏡像



3. 結論

1. ローダミンファロイジンを用いてアクチン繊維を蛍光ラベルし、可視化できる。
2. ラベルされたアクチンはミオシン分子との間で相互作用させることができ、ミオシンとのすべり運動を観察できる。

製品情報

製品名	カタログ番号	サイズ
Rhodamine phalloidin	R-415	300 unit

価格については、ウェブをご覧ください。

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用は出来ません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 www.lifetechnologies.com/TC

The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation or their respective owners.

© 2012, Life Technologies Japan Ltd. All rights reserved. Printed in Japan.

ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

TEL.03 (6832) 9300 FAX.03 (6832) 9580

www.lifetechnologies.com

大阪：〒564-0052 大阪府吹田市広芝町 10-28

TEL.06 (6339) 8165 FAX.06 (6339) 8138

life
technologies™