

Emulsion PCR を用いた酵素遺伝子のビーズ上固定化

Immobilization of enzyme gene on beads by emulsion PCR

東大院工¹⁾, 東大院薬²⁾, JST-CREST³⁾○平井辰典¹⁾, 佐藤秀介¹⁾, 上野真吾^{1),3)}, マニッシュビヤニ^{1),3)}, 飯塚怜^{2),3)}, 船津高志^{2),3)}, 一木隆範^{1),3)}Sch. Eng. Univ. of Tokyo¹⁾, Sch. Pharm. Univ. of Tokyo²⁾, JST-CREST³⁾,○T. Hirai¹⁾, S. Sato¹⁾, S. Ueno^{1),2)}, M. Biyani^{1),2)}, R. Iizuka^{2),3)}, T. Funatsu^{2),3)}, and T. Ichiki^{1),2)}

E-mail: hirai@bionano.t.u-tokyo.ac.jp

【緒言】当研究室では、進化分子工学を利用した高機能タンパク質の創出法として、大規模 DNA 変異体ライブラリーをマイクロアレイチップ化し高効率スクリーニングを行う高速分子進化システムの開発に取り組んでいる。このシステムでは、変異体 DNA ライブラリーを変異体種別に磁気ビーズ上へ固定化するために emulsion PCR を利用している。ビーズ上に固定化できる DNA 量は DNA 鎖長の増大に伴い著しく低下することが知られており[1]、酵素の全長遺伝子のような長鎖長の DNA は固定化の対象となっていなかった。しかしながら、マイクロリアクターを用いた分析の場合、酵素遺伝子をコードする DNA の固定化量が少なくても酵素活性の測定は可能と考えられる。本研究ではオリゴ糖分解酵素 β -グルコシダーゼ (BGL) をコードする DNA を emulsion PCR によって磁気ビーズ上へ固定化し、その固定化 DNA から発現した BGL の活性を確認した。

【実験および結果】粘性の異なる 2 種類のオイルと界面活性剤を混合した油層 125 μ L に対して、プライマー-DNA を固定化した磁気ビーズと BGL をコードする鋳型 DNA (1648 base pair) を含む PCR 溶液を 25 μ L 加え、30 分間攪拌し鋳型 DNA と磁気ビーズを内包した w/o emulsion を作製し、PCR により磁気ビーズ上に BGL をコードする DNA を固定化した。固定化反応後の磁気ビーズを鋳型として PCR を行い、その産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析することによりビーズ上への DNA 固定化を確認した (Fig.1)。次に、DNA 固定化磁気ビーズを酵素活性測定用蛍光基質を含む無細胞転写翻訳系と混合することで BGL を発現させ、酵素活性を測定した (Fig.2)。この結果より、磁気ビーズに固定化した DNA から BGL が正常に発現することが確認された。

【謝辞】BGL 遺伝子を提供して頂きました東京大学農学部五十嵐圭日子准教授、鮫島正浩教授に感謝いたします。

[1] F. Diehl et al., *Nature Methods*, 2006, 3, 551-559

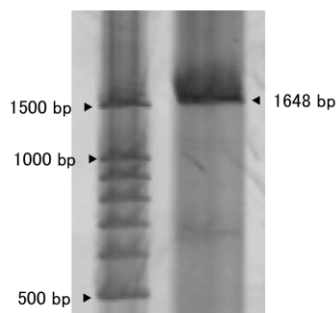


Fig.1 PAGE analysis of DNA amplified from bead-immobilized DNA.

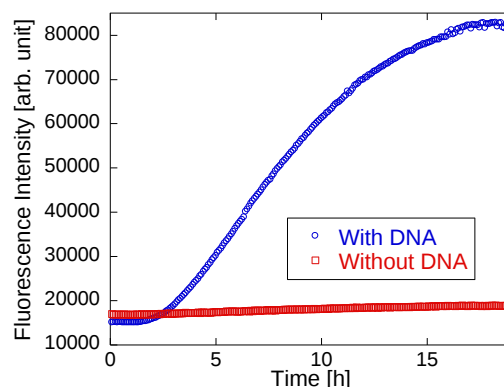


Fig.2 Enzymatic activity of BGL expressed from bead-immobilized DNA