

送液技術によるオイル封止マイクロウェルを用いた 大規模タンパク質アレイチップの作製

○福田 拓海¹、佐藤 秀介¹、上野 真吾¹、一木 隆範¹ (1. 東大院工)

○Takumi Fukuda¹, Shusuke Sato¹, Shingo Ueno¹, Takanori Ichiki¹

(1. Sch. of Eng. Univ. of Tokyo)

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

[緒言]高機能タンパク質の創出を目的とした、マイクロアレイチップ技術と進化分子工学を組み合わせた高速タンパク質分子進化システムの開発を行っている。マイクロウェルアレイチップ上に大規模な変異タンパク質ライブラリーを配列するためには、大面積チップ上の個々に封止されたマイクロウェル内においてタンパク質をその場合成する必要がある。今回、試作した送液デバイスを用いて無細胞転写翻訳溶液をマイクロウェル内にオイル封止し、ウェル内で β グルコシダーゼ (BGL)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)をそれぞれ合成し、観測したことを報告する。

[方法・結果]はじめに耐薬品性と低自家蛍光性を備えた材料を検討し、低自家蛍ポリカーボネートを切削加工して、送液デバイスを作製した。PDMS 製マイクロウェルアレイチップに、BGL をコードする DNA を固定した磁性ビーズを配列した。上記のデバイスとこのチップを真空チャックにより接着して蛍光顕微鏡上に固定し、デバイスと吸引ポンプをチューブでつないだ (Fig. 1)。ウェル (直径 $4\ \mu\text{m}$, 高さ $4\ \mu\text{m}$)内に高さ $100\ \mu\text{m}$ の流路を通して、エタノールを溶媒としたリン脂質、フルオロセイン水溶液または無細胞転写翻訳溶液、オイルを連続して圧力 $20\ \text{kPa}$ で展開、封止した (Fig. 2)。様々な粘度のオイルを検討し、オイルによる PDMS の膨潤を防いだ。フルオロセイン水溶液 $50\ \mu\text{l}$ で 1.0×10^6 wells をオイル封止できることを確認した。次に、無細胞転写翻訳溶液と基質 (Resorufin- β -D-glycopyranoside)、BGL コード DNA をウェル内にオイル封止することで、酵素マイクロアレイの作製を検討した。時間経過に伴って、合成された BGL の活性により基質から Resorufin が遊離し、蛍光輝度の上昇を確認した (Fig. 3)。また、ウェル内で GFP を合成する実験においても GFP による蛍光輝度の上昇を確認した。送液デバイスによるオイル封止を用いて、大規模タンパク質アレイ作製に必要な隔離反応空間を形成できた。



Fig. 1 Outlook of a fluidic device.

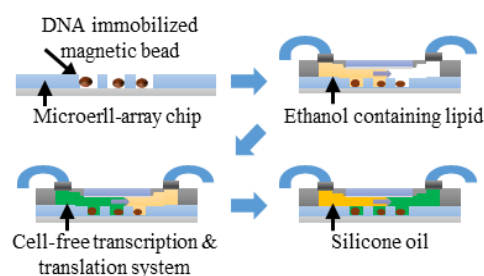


Fig. 2 Schematic illustration of isolating each reactor using oil layer.

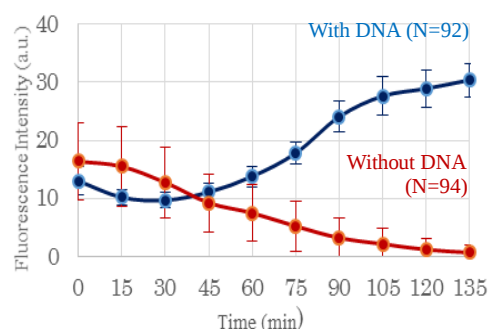


Fig. 3 Time-dependent Fluorescence intensity of individual microwells (error bar: SD).