

# 生物発光タンパク質を用いた

## 唾液中グルコースセンサーの開発

奈良女子大学附属中等教育学校

### 研究背景

**糖尿病** 血中グルコース濃度（血糖値）が慢性的に高くなる病気



重大な疾患のトリガー

血糖測定に痛みが伴う  
測定デバイスが高価



生体非侵襲型  
血糖測定デバイス

安価で高性能



### 1. 遺伝子設計

#### 配列を調査

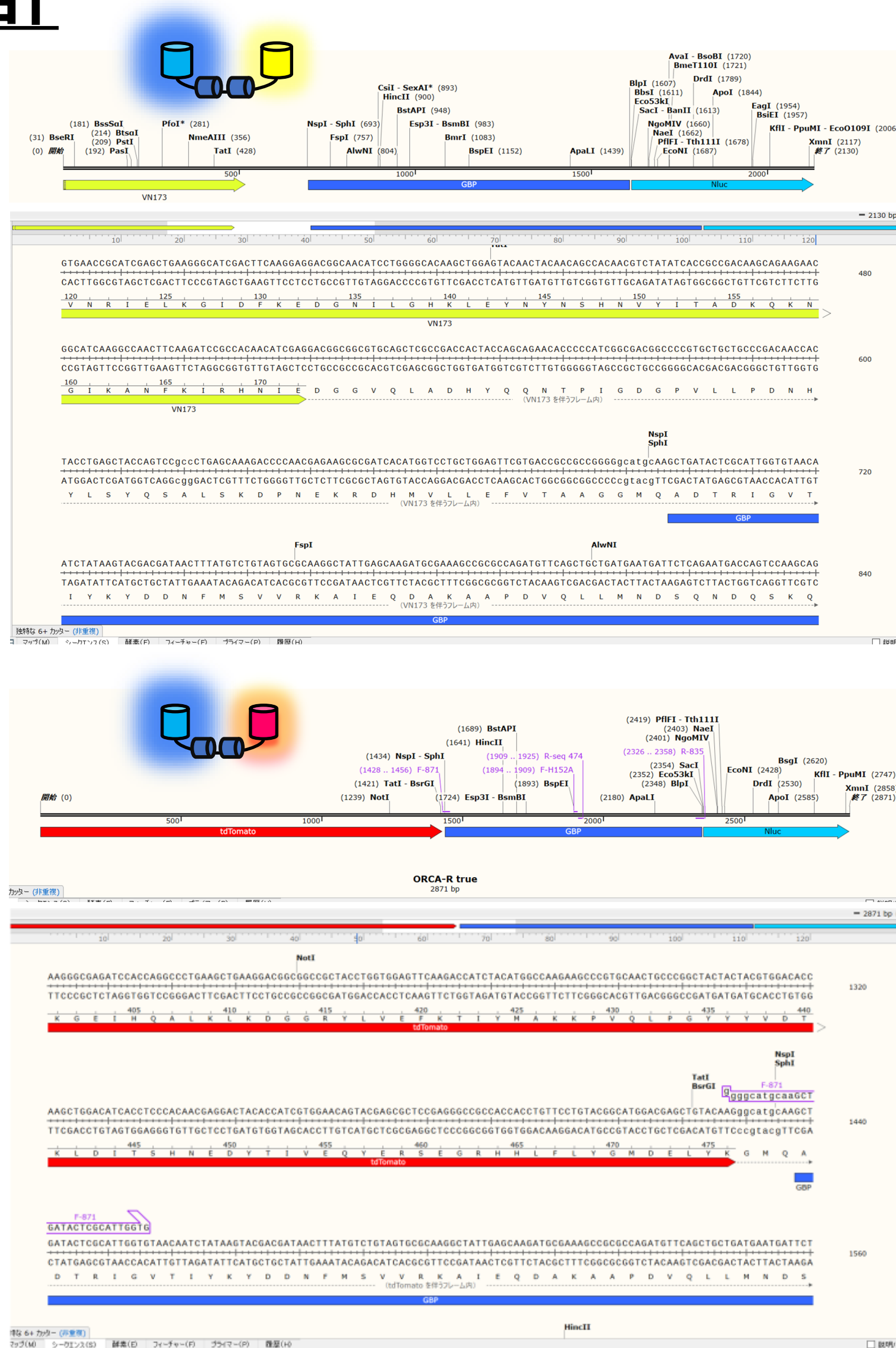
Nanoluc, GBP, Venus Δ10 (tdTomato)の配列を調査

#### 配列を計算

遺伝子配列に基づいて最適なリンカーアミノ酸の塩基配列を計算

#### 制限酵素を決定

遺伝子設計に基づいて用いる制限酵素, DNA Ligaseを決定



### 2. DNA合成

#### PCR

With tag  
1x Reagent  
Primer F,R 1.5μL, ddH2O 11μL  
1 × 94°C 2min  
30 × 96°C 10sec  
55°C 30sec  
68°C 1min  
1 × 68°C 5min

#### Miniprep

#### 制限酵素処理

Sph I 0.5μL Sac I 0.5μL

#### ゲル purification

#### ライゲーション

#### Colony PCR

With Go taq  
1x Reagent  
2x Go Taq mixture 65μL, 10μM primer 1, 2.4μL, ddH2O 57μL  
1 × 96°C 5min  
50 × 96°C 30sec  
50°C 30sec  
72°C 1.5min

#### Sequencing

Miniprep grade plasmid DNA(100-200ng)1.0μL  
1.6μM primer 1.0μL, Big Pye 0.5μL,  
5x reaction buffer 1.5μL, ddH2O 6.0μL  
1 × 96°C 2min  
30 × 96°C 10sec  
50°C 5sec  
60°C 4min

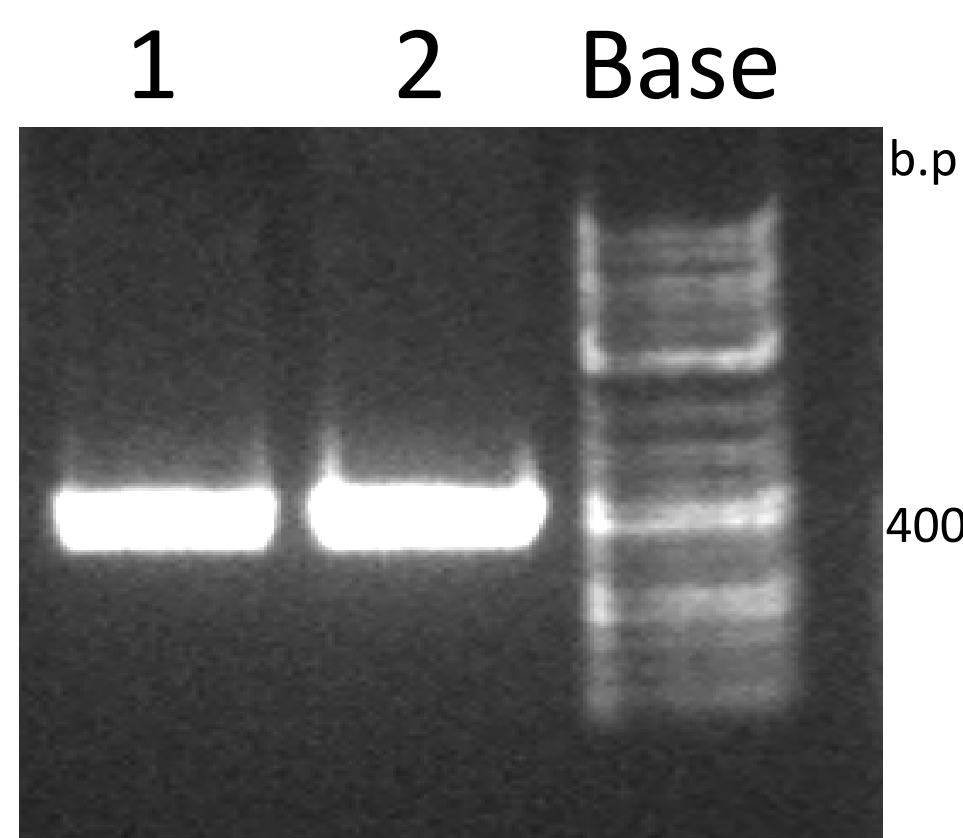
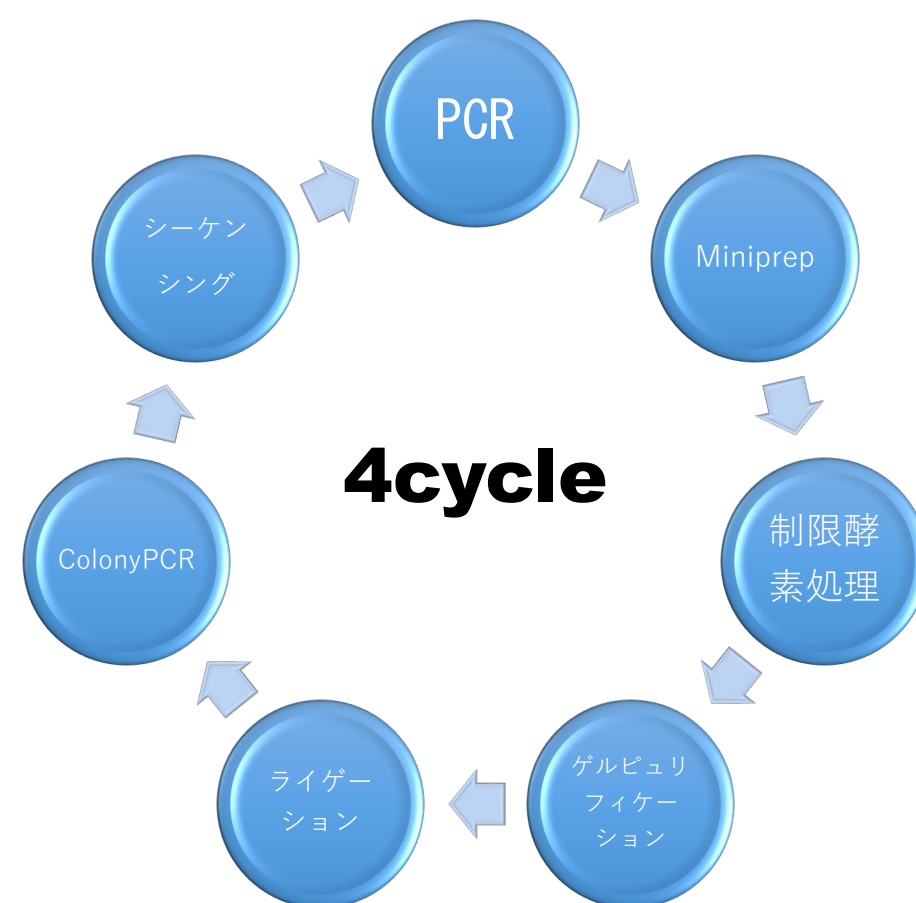


Fig. GBPの電気泳動結果

### 3. DNA導入とタンパク質合成

#### ベクターを細胞に添加

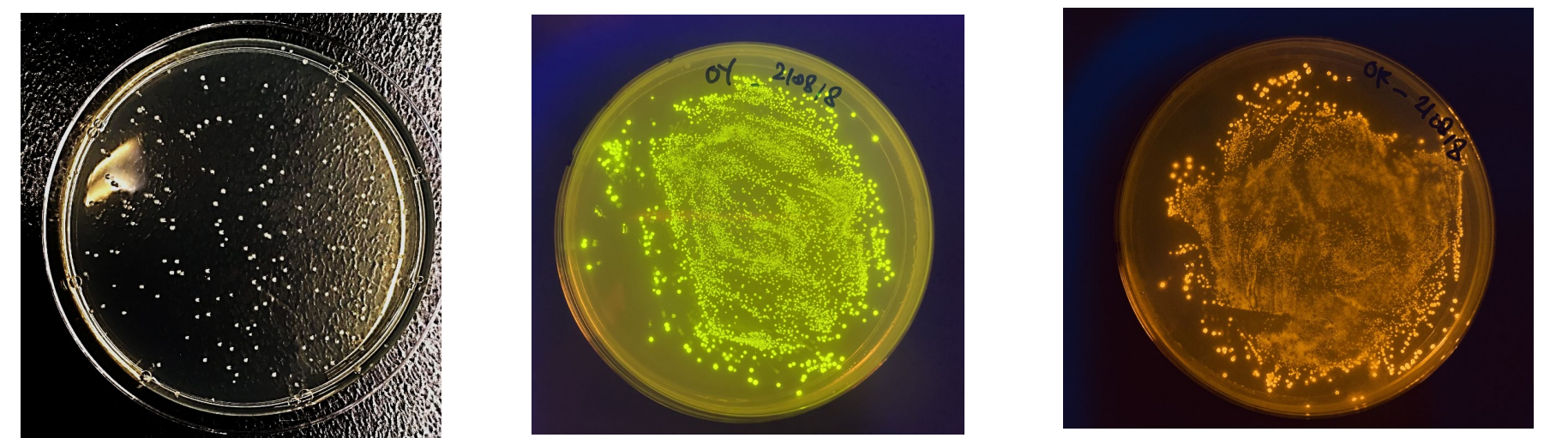
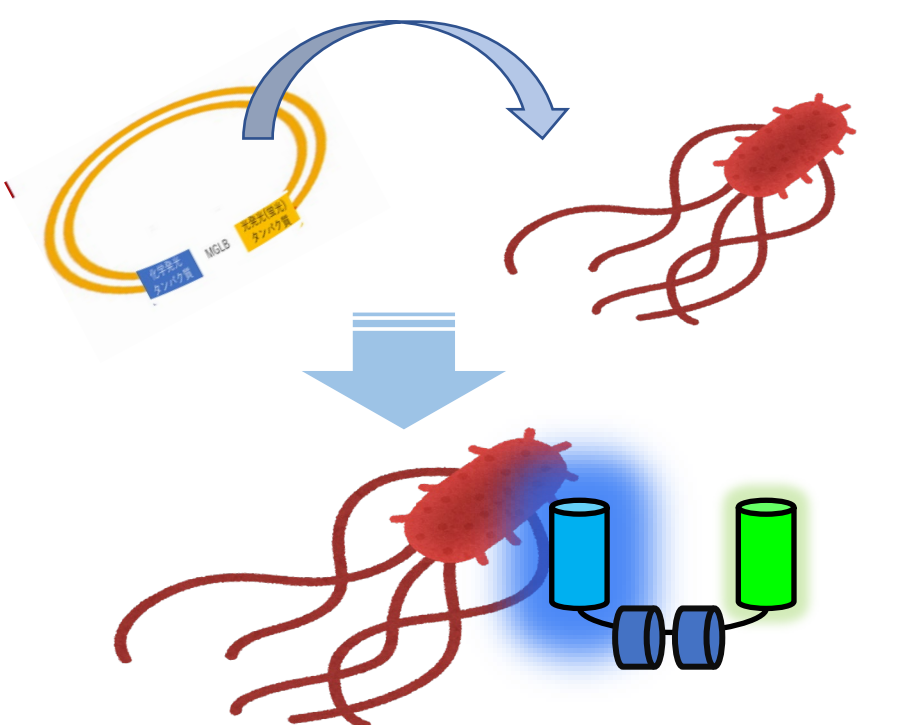
30分間氷上でインキュベート

#### ヒートショック

42°C, 45sec

#### 培養

37°Cで24時間培養 (Glucose添加)



センサータンパク質の大腸菌内での合成に成功

### 4. センサータンパク質の精製

#### 集菌

8000rpm 15min 遠心分離

#### 粉砕

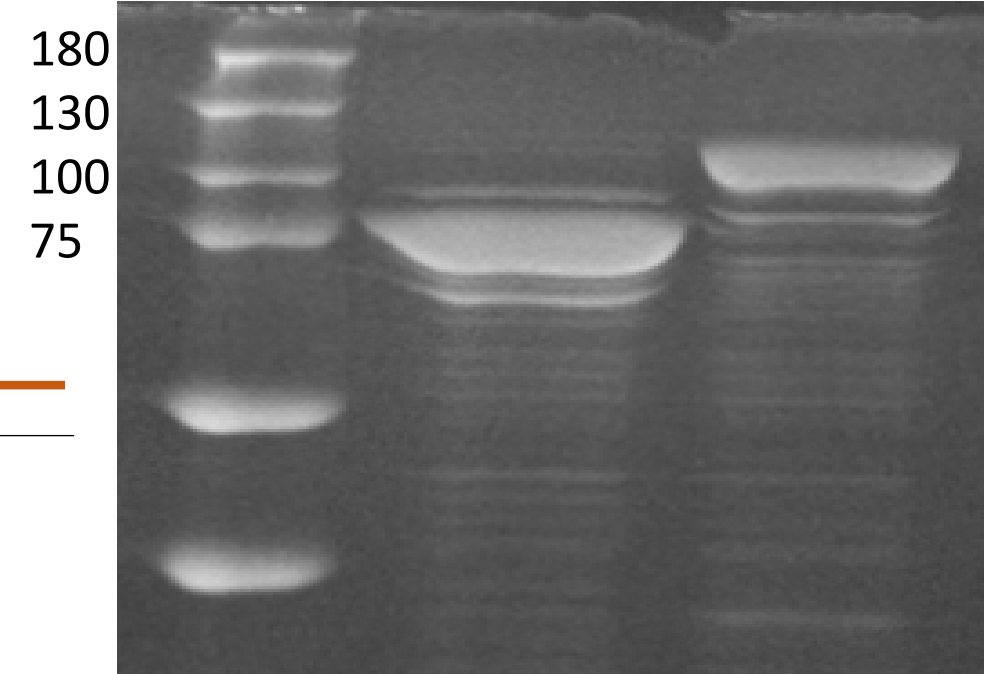
超音波処理(タンパク質を菌体外へ)  
8000rpm 20min 遠心分離

#### タンパク質クロマトグラフィー

不要物の除去  
Ni+カラム使用

#### SDS - PAGE

Base 1 2



理論値  
Yellow sensor protein:78kDa  
Red Sensor protein:100kDa

結果  
Rane1 : 75kDa  
Rane 2 :100kDa

センサータンパク質の精製に成功!

### 5. タンパク質の濃度測定 (bradford法)

#### BSA溶液(検量線)を作成

BSA standard溶液の作成

#### 吸光度測定

波長 595nm

#### タンパク質濃度算出

結果  
Yellow sensor protein:0.75mg/mL  
Red Sensor protein:1.57mg/mL