

緑藻ボトリオコッカスのリブローズビスフォスフェート

1100065 正岡祥吾

カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子 (*rbcS*) の PCR による増幅

Syougo Masaoka

Isolation of ribulose biphosphate carboxylase small subunit gene (*rbcS*) from a green alga

*Botriococcus braunii* by PCR amplification

群体性微細藻類のボトリオコッカス (*Botriococcus braunii*) は、二次代謝産物である炭化水素を細胞外マトリックスに放出・蓄積する。ボトリオコッカスの炭化水素生産能力を向上させるためには形質転換が有効であり、外来遺伝子を発現させるプロモーターを単離することを最終目標とし、本研究では恒常的に発現すると予想される遺伝子 *rbcS* の cDNA クローンの増幅・単離を試みた。

まず CTAB 法により抽出した total DNA では増幅が見られなかったため、RNA から RTPCR により得た cDNA を、ネスト PCR 処理した。1stPCR で、2つのデジェネレートプライマー 53F(5'-AAAYAARHWITWYgARACITT-3')と 128R(5'-RCAICCRAACATlgyIARYTTCC-3')、2ndPCR で、2つのデジェネレートプライマー 9F2(5'-aaYaaYaaRIItWYgaRacNttYWSNtWYtNcc-3')と 83R(5'-aacatIggIaRYttccaItDISWccaRtaNc-3')を鋳型にし、PCR サイクル(45°C、40 サイクル)を行い、*rbcS*を増幅させた。これにより得られた産物の長さは 0.22kb(電気泳動、Gel and PCR Clean-Up System でバンド回収)である。

次に、増幅部分を ligation mighty kit でベクター(pT7blue)にライゲートし、大腸菌(DH5α)に導入した。

大腸菌よりアルカリ-SDS 法により plasmid を精製、PCR 制限酵素(EcoR I と HindIII)で 12h インキュベート後、電気泳動(ゲル濃度 0.8%、40 分)で確認した。

ダイデオキシ法によるシーケンス解析を行った後、BLAST を使用し *rbcS* とホモロジーのある配列であることを確認した。

今後は、プロモーター配列の解析を行い、particle gun 法・glass beads 法により遺伝子導入を行う予定である。