

製品データ:63

## MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kitを用いた マウス遺伝子 X ジーンターゲティングベクターの作製

2003年7月

データの提供: 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 細胞分化・器官発生研究グループ

池谷 真 先生

川田 正子 先生

### 1.実験の目的

マウス遺伝子Xのノックアウトマウスを作製するためのターゲティングベクターの作製を、MultiSite Gateway®の技術を用いて行った。近年Invitrogen社より発売された、MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kitは3種類のフラグメントを一つの発現ベクターに一気につなげて融合型発現クローンを構築できるシステムである。詳細は下記のURLを参照:

[http://www.invitrogen.co.jp/products/molecular\\_biology/12537001.shtml](http://www.invitrogen.co.jp/products/molecular_biology/12537001.shtml)

### 2.実験方法

1) **3種のエンタリークローンの作製** (Kit 添付の製品マニュアルの *attB* PCR と BP Clonase®組換え反応とを用いる方法とは異なる、下記の別法で作製)

5' エンタリークローン(5'相同遺伝子領域を組み込む)として遺伝子Xの5'側6.5 kbを、3'エンタリークローン(3'相同遺伝子領域を組み込む)として遺伝子Xの3'側4.5 kbを、gene エンタリークローンとして *lacZ* 遺伝子+pgk promoter+ネオマイシン耐性遺伝子(3つのサイズの合計4.8 kb)をサブクローニングした。

5'エンタリークローンと3'エンタリークローンはPCRによるミューテーションを避けるため、BAC クローンから大腸菌内での相同組換えを利用してそれぞれの pENTR™ベクターにサブクローニングした(それぞれ付属の pDONR™P4-P1R, pDONR™P2R-P3を使用)。BAC クローンは BACPAC Resource (Oakland Research Institute の Children's Hospital, HP:

<http://www.chori.org>)から購入し、相同組換えは Red/ET cloning 法 (GENE BRIDGES 社、独: λファージ由来の Red α/Red β タンパク質により BAC のマウス目的遺伝子を pDONR™ plasmid の *att* サイトに組み込む)により添付プロトコールに従って行った。また、このとき5'エンタリークローンの3'端は遺伝子XのATGを含み、pDONR™ P4-P1R の *attR1* 配列に in frame でつながるように設計した。

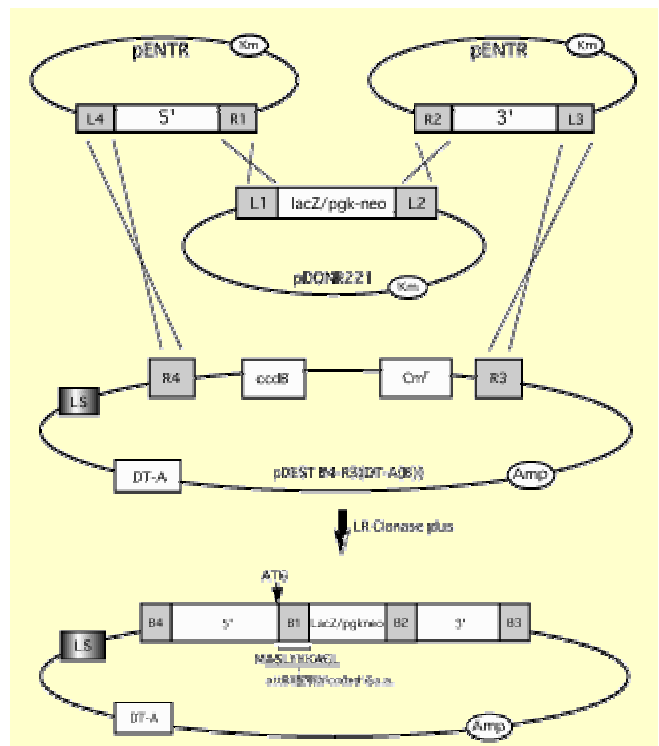
gene エンタリークローンは、制限酵素的に pBluescript™(stratagene 社)にサブクローニングしたプラスミドを用意し、次に *lacZ* 遺伝子+pgk promoter+ネオマイシン耐性遺伝子が in frame で *attL1* 配列につながるように Red/ET cloning 法を用いて gene ENTR™ベクター pDONR™ 221 へサブクローニングした。上記の実験概要は添付のイラスト図(右上)を参照。

### 2) ターゲティングベクターの作製

上記1)で作製した3つのエンタリークローンをそれぞれの組換え大腸菌より調製し、LR Clonase® plus酵素を用いて添付プロトコールに従って反応させた。デスティネーションベクターには、MultiSite Gateway®用の配列 (*attR4-ccdB-CmR-attR3*)、ネガティブ選別用のジフテリア毒素(右上図のDT-A)及びlinearize用の制限酵素サイト(右上図のLS)をpBluescript™にあらかじめサブクローニングしたものをを用いた。

以下の反応を行った(反応 25°C O/N)。

•5' エンタリークローン ( <i>attL4</i> and <i>attR1</i> ), 20 fmol/μl	1 μl
•geneエンタリークローン( <i>attL1</i> and <i>attL2</i> ), 20 fmol/μl	1 μl
•3'エンタリークローン ( <i>attR2</i> and <i>attL3</i> ), 20 fmol/μl	1 μl
•pDEST™ R4-R3ベクター, 60 ng	1 μl
•5X LR Clonase® plus反応バッファ	4 μl
•LR Clonase® plus酵素	4 μl
•TE バッファ, pH 8.0	8 μl
計	20 μl



得られた反応産物は添付のプロトコールに従ってプロテアーゼ K処理をした後、エタノール沈澱により脱塩して30 μlに溶かし、そのうち2 μlをワンショットTOP10エレクトロコンピテントセル 50 μl にエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションしたTOP10菌液に450 μlのSOC培地を加え37°Cで1時間振とう培養し、100 μlをLB(アンピシリン含有)プレートに播いて一晚培養した。

### 3. 結果

生えてきた97個のコロニーのうち8コロニーを選び、プラスミド抽出および制限酵素処理とシーケンスによるチェックを行った。その結果、今回の実験では正しくLR反応を起こしたクローンが2クローン得られた(図1 lane 2及びlane 4は正しくLR反応を起こしたクローン)。また、いくつかの別の遺伝子に対して同様の実験を行ったところ、1/8~6/8で正しいクローンが得られた。

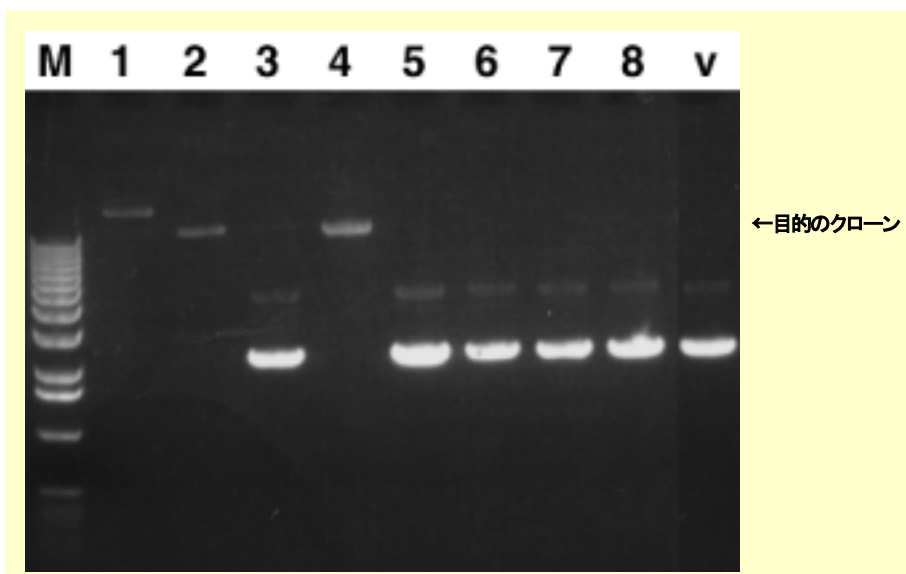
### 4. 考察

- 1) 従来数カ月かけて行ってきたジーンターゲティングベクターの構築が、MultiSite Gateway®のシステムを利用することにより1カ月以内の短期間で完成することができた。
- 2) MultiSite Gateway®システムは制限酵素サイトに依存しない方法であるため、どの遺伝子のターゲティングベクターの作製でも難しさに差がなく、実験自体も容易である。このことから、いくつかの遺伝子のターゲティングベクターの作製を同時に平行して行うことも可能である。
- 3) 今回はマーカー遺伝子として *lacZ* 遺伝子を用いたが、GFPや他のマーカー遺伝子を入れたgeneエンタリークローンをを用いることにより、目的に応じた様々なコンストラクトを作製することも可能である。

図1 得られたプラスミドのアガロースゲル電気泳動写真

精製したプラスミドを制限酵素切断前に泳動した。サイズから1, 2, 4に遺伝子断片が挿入されていることが予想された。

このあと制限酵素処理とシーケンスによるチェックを行い、2, 4が目的のクローン、3, 5~8がデスティネーションベクターのみ(5.8 kb)、1が解析不能のクローンであった。M: KBラダー、v: デスティネーションベクター。



### 製品情報

製品名	カタログ番号	サイズ
MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit 直送できます	12537-023	20 反応分
pDONR™221 Gateway® Vector	12536-017	6 µg

製品名	カタログ番号	サイズ
One Shot® TOP10 Electrocomp™ <i>E. coli</i> 直送できます	C4040-50	10 x 50 µl
1 Kb DNA Ladder	15615-016	250 µg

価格については、  
ウェブをご覧ください。

Limited Use Label License Nos. 19(Cloning Technology Products), 23(GUS), 36(Cellfectin®), 45(Chemically Competent *E. coli*), 48(*araB*).

ラベルライセンスの詳細については当社 WEB サイト<http://www.invitrogen.co.jp/>「ラベルライセンス」をご覧ください。

他の当社製品の国内製品使用データは当社 WEB サイト: [http://www.invitrogen.co.jp/tech/kokunai\\_data.shtml](http://www.invitrogen.co.jp/tech/kokunai_data.shtml)または日経 BP 社 Biotechnology JAPAN: <http://biotech.nikkei.co.jp/netlink/fo/data/>にてご覧いただけます。

2003.7.15

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](http://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](http://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™