

## **R4L1 GATEWAY Binary Vector (R4L1GWB)**

- GATEWAY Cloning 技術が使用可能な植物形質転換用バイナリーベクターです。
- Kanamycin、Hygromycin、Basta、Tunicamycin、単独耐性のシリーズ (4 シリーズ) です。
- *attL4-promoter-attR1* エントリークローンをクローニングするベクターです。  
*attL4-promoter-attR1* エントリークローンを用いたプロモーター：レポーター実験に有用なベクターです。
- PCR、BP、LR、TOP0 等の反応条件、その他の詳細はキット添付の Instruction Manual をご覧下さい。  
(Invitrogen の HP より download 可能)
- プライマーデザインは Invitrogen HP 掲載の Multisite Gateway Three-Fragment Vector Construction Kit のマニュアルをご覧下さい。
- R4L1pGWB の使用に関して以下のことをお願いします。
  - I. R4L1pGWB の使用は基礎研究に限ります。
  - II. R4L1pGWB は第 3 者に譲渡しないでください。
- 問い合わせ等、何かございましたら中川までご連絡下さい。

中川 強 (NAKAGAWA Tsuyoshi)  
島根大学研究機構総合科学研究支援センター  
遺伝子機能解析部門  
松江市西川津町 1060  
TEL 0852-32-6595  
FAX 0852-32-6109  
e-mail [tnakagaw@life.shimane-u.ac.jp](mailto:tnakagaw@life.shimane-u.ac.jp)

## 構成

- ・ 現在以下のようなシリーズとなっています。
- ・ [ ] 内のものが、Binary Vector (後出) の *Hind*III – *Sac*I の間 に入っています。
- ・ R4L1pGWB4xx は kanamycin 耐性、R4L1pGWB5xx は hygromycin 耐性、R4L1pGWB6xx は BASTA 耐性、R4L1pGWB7xx は Tunicamycin 耐性ベクターです。それぞれの選択マーカは Pnos でドライブされます。R4L1pGWB5xx では Pnos 上流に微生物プロモーター配列も追加されているため、大腸菌やアグロバクテリウムで hygromycin 耐性となります。(R4L1pGWB4xx の Pnos には微生物プロモーターが追加されていません。R4L1pGWB4xx は大腸菌ではカナマイシン耐性を付与しません。)

n は 4 (401 etc, kanamycin resistance)、5 (501 etc, hygromycin resistance)、6 (601 etc, BASTA resistance)、7 (701 etc, tunicamycin resistance)のいずれかを示します。

(32) R4L1pGWBn32 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-G3GFP-GUS--]

(33) R4L1pGWBn33 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-GUS--]

(35) R4L1pGWBn35 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-LUC--]

(40) R4L1pGWBn40 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-EYFP--]

(43) R4L1pGWBn43 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-ECFP--]

(50) R4L1pGWBn50 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-G3GFP--]

(59) R4L1pGWBn59 : [--R4- CmR-*ccd*B-L1-tagRFP--]

## 配列

Binary Vector は pPZP221 (Plant Mol. Biol. 25, 989-994, 1994) をベースに用いています。このベクターの aacC1 部分を各選択マーカ (4xx, Pnos:NPTII:Tnos; 5xx, Pnos:HPT:Tnos; 6xx, Pnos:bar:Tnos; 7xx, Pnos:GPT:Tnos) に置き換え、MCS に Gateway カセットやレポーターを組み込んでいます (下図)。

### RB-(*Hind*III)-GATEWAY-(*Sac*I)-Tnos-[Tnos-marker-Pnos]-LB

選択マーカ (Pnos:XXX:Tnos) は逆向きに入っています。

NPTII により Kanamycin、HPT により hygromycin、bar により BASTA、GPT により tunicamycin による選択が可能です。

*Hind*III-*Sac*I の間の GATEWAY のところに、後述のそれぞれの配列が入っています。

例えば R4L1pGWBn32 では R4-(CmR, *ccdB*)-L1-G3GFP-GUS のカセットが入っており、L4-promoter-R1 Entry Clone との LR 反応により、B4-promoter-B1-G3GFP-GUS となります。

塩基配列中の N は Your Clone に由来します。

**重要** R4L1pGWB は ImpGWB と同等の形質転換効率であるため、LR 反応の前に制限酵素切断を行ってリニアーにしておく必要はありません。環状のまま LR 反応に供することができます。

LR 反応の効率は、

Either or both plasmids linear > both plasmids relaxed >> both plasmids supercoiled  
です。R4L1pGWB の場合は both plasmids supercoiled で問題なくクローニング可能です。

**重要** LR 反応後は spectinomycin (100 mg/L) で選択してください。

**重要** 大腸菌は DH5 $\alpha$  を用いてください。

(F' episome を持つ大腸菌を用いると *ccdB* の negative selection が効かないようです)

#### その他

- LR 反応後の形質転換で、「エントリークローン」と「pGWB の組換えプラスミド (目的プラスミド)」の両プラスミドを保持する DH5 $\alpha$  が出現する場合があります。プラスミド構造のチェックのためには混入していない DH5 $\alpha$  を用いる方が良いと思います。(エントリークローンは *Agrobacterium tumefaciens* では増えません)

R4pGWBn32, n33, n35, n40, n43, n50, n59 : [--R4-*ccdB*-L1-tag--]

```
(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC  
ACA ACT TTG TAT AGA AAA --(CmR, ccdB)--ATG CCA ACT TTG TAC AAA AAA GCA GGC  
TCA AGC tag GCT TAG AGCTC
```

(AAGCTT)が *Hind*III、最後の (GAGCTC)が *Sac*I です。tag(タグ)については後述。  
下線が R4-CmR-*ccdB*-L1 です。

LR 反応により以下のようになります。

```
(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC  
ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GNN (promoter) NCA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC  
TCA AGC tag GCT TAG AGCTC
```

下線が *att*B4, *att*B1 です。tag(タグ)自体に終止コドンが入っている場合もありますが、一応後にも TAGが in frame で出てくるようになっています。

## tag (タグ)

R4L1pGWB の tag (タグ) は以下のものを使用しています。

### R4L1pGWBn32 (G3GFP-GUS) 2529bp

```
ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAAT
M S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N
GGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTT
G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F
ATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTTACTACTTTTCGCTTACGGTGTGCAG
I C T T G K L P V P W P T L V T T F A Y G V Q
TGCTTCTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATAC
C F S R Y P D H M K R H D F F K S A M P E G Y
GTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAG
V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E
GGAGACACCCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGC
G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G
CACAAGTTGGAATACAACCTTCAACTCCCACAACGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
H K L E Y N F N S H N V Y I M A D K Q K N G I
AAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAA
K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q
AATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTT
N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L
TCGAAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACA
S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
CATGGCATGGATGAACTATACAAAgc>tagtTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAA
H G M D E L Y K A S L R P V E T P T R E I K K
CTCGACGGCCTGTGGGCATTCACTCTGGATCGCGAAAACCTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAAGC
L D G L W A F S L D R E N C G I D Q R W W E S
GCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATT
A L Q E S R A I A V P G S F N D Q F A D A D I
CGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTATCAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAGGTTGGGCAGGCCAGCGT
R N Y A G N V W Y Q R E V F I P K G W A G Q R
ATCGTGCTGCGTTTTGATGCGGTCACTCATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTGATGGAG
I V L R F D A V T H Y G K V W V N N Q E V M E
CATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAAGCCGATGTCACGCCGTATGTTATTGCCGGGAAAAGTGTACGT
H Q G G Y T P F E A D V T P Y V I A G K S V R
ATCACCGTTTTGTGTGAACAACGAACTGAACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAA
I T V C V N N E L N W Q T I P P G M V I T D E
AACGGCAAGAAAAAGCAGTCTTACTTCCATGATTTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATG
```

N G K K K Q S Y F H D F F N Y A G I H R S V M  
CTCTACACCACGCCAACACCTGGGTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCGCGCAAGACTGTAAC  
L Y T T P N T W V D D I T V V T H V A Q D C N  
CACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAA  
H A S V D W Q V V A N G D V S V E L R D A D Q  
CAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAACCG  
Q V V A T G Q G T S G T L Q V V N P H L W Q P  
GGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGCGTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTT  
G E G Y L Y E L C V T A K S Q T E C D I Y P L  
CGCGTCGGCATCCGGTCACTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTT  
R V G I R S V A V K G E Q F L I N H K P F Y F  
ACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCGGACTTGCCTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCAC  
T G F G R H E D A D L R G K G F D N V L M V H  
GACCACGCATTAATGGACTGGATTGGGGCCAACCTACCTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAG  
D H A L M D W I G A N S Y R T S H Y P Y A E E  
ATGCTCGACTGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTATTGATGAACTGCTGCTGCTGGCTTTAACCTC  
M L D W A D E H G I V V I D E T A A V G F N L  
TCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGG  
S L G I G F E A G N K P K E L Y S E E A V N G  
GAAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCACCCAAGCGTG  
E T Q Q A H L Q A I K E L I A R D K N H P S V  
GTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCCGTCGCAAGGTGCACGGGAATATTTGCGGCCACTG  
V M W S I A N E P D T R P Q G A R E Y F A P L  
GCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCT  
A E A T R K L D P T R P I T C V N V M F C D A  
CACACCGATACCATCAGCGATCTCTTTGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAA  
H T D T I S D L F D V L C L N R Y Y G W Y V Q  
AGCGGCGATTTGAAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAAACTGCAT  
S G D L E T A E K V L E K E L L A W Q E K L H  
CAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATG  
Q P I I I T E Y G V D T L A G L H S M Y T D M  
TGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGGCTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTC  
W S E E Y Q C A W L D M Y H R V F D R V S A V  
GTCGGTGAACAGGTATGGAATTTGCGCGATTTTGGCACCCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAAC  
V G E Q V W N F A D F A T S Q G I L R V G G N  
AAGAAAAGGATCTTCACTCGCGACCCGAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACT  
K K G I F T R D R K P K S A A F L L Q K R W T  
GGCATGAACTTCGGTGA AAAACCGCAGCAGGGAGGCAAACAATGA  
G M N F G E K P Q Q G G K Q \*

(最後に GUS の終始コドンが入れてありますのでここで翻訳停止します)

G3GFP と GUS の連結部は以下のようになっています。

```
---GAT GAA CTA TAC AAA gct agt tta cgt cct ---  
  D  E  L  Y  K  A  S  L  R  P
```

大文字: G3GFP

小文字: GUS



**R4L1pGWBn33 (GUS) 1812bp**

ATGTTACGTCCTGTAGAAAACCCCAACCCCGTAAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCACTCTG  
M L R P V E T P T R E I K K L D G L W A F S L  
GATCGCGAAAACCTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCT  
D R E N C G I D Q R W W E S A L Q E S R A I A  
GTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTAT  
V P G S F N D Q F A D A D I R N Y A G N V W Y  
CAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAAGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTTCGATGCGGTCACT  
Q R E V F I P K G W A G Q R I V L R F D A V T  
CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAA  
H Y G K V W V N N Q E V M E H Q G G Y T P F E  
GCCGATGTCACGCCGATGTTATTGCCGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTG  
A D V T P Y V I A G K S V R I T V C V N N E L  
AACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAGCAGTCTTACTTC  
N W Q T I P P G M V I T D E N G K K K Q S Y F  
CATGATTTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTG  
H D F F N Y A G I H R S V M L Y T T P N T W V  
GACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCGCGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTG  
D D I T V V T H V A Q D C N H A S V D W Q V V  
GCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACT  
A N G D V S V E L R D A D Q Q V V A T G Q G T  
AGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGC  
S G T L Q V V N P H L W Q P G E G Y L Y E L C  
GTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCACTGGCAGTG  
V T A K S Q T E C D I Y P L R V G I R S V A V  
AAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCG  
K G E Q F L I N H K P F Y F T G F G R H E D A  
GACTTGGCTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGG  
D L R G K G F D N V L M V H D H A L M D W I G  
GCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGC  
A N S Y R T S H Y P Y A E E M L D W A D E H G  
ATCGTGGTGATTGATGAAAACCTGCTGCTGCTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTTGAAAGCGGGC  
I V V I D E T A A V G F N L S L G I G F E A G  
AACAAGCCGAAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAAACCTCAGCAAGCGCACTTACAGGCG  
N K P K E L Y S E E A V N G E T Q Q A H L Q A  
ATTAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAACCCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCG  
I K E L I A R D K N H P S V V M W S I A N E P  
GATACCCGTCGCAAGGTGCACGGGAATATTTTCGCCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCG  
D T R P Q G A R E Y F A P L A E A T R K L D P  
ACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTT

T R P I T C V N V M F C D A H T D T I S D L F  
GATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAG  
D V L C L N R Y Y G W Y V Q S G D L E T A E K  
GTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGC  
V L E K E L L A W Q E K L H Q P I I I T E Y G  
GTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGG  
V D T L A G L H S M Y T D M W S E E Y Q C A W  
CTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTCGCC  
L D M Y H R V F D R V S A V V G E Q V W N F A  
GATTTTGCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGC  
D F A T S Q G I L R V G G N K K G I F T R D R  
AAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTAAAAACCGCAG  
K P K S A A F L L Q K R W T G M N F G E K P Q  
CAGGGAGGCAACAATGA  
Q G G K Q \*

(最後に GUS の終始コドンが入れてありますのでここで翻訳停止します)

**R4L1pGWBn35 (LUC) 1653bp**

ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAAGATGGAACCGCTGGA  
M E D A K N I K K G P A P F Y P L E D G T A G  
GAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGGAACAATTGCTTTTACAGATGCACAT  
E Q L H K A M K R Y A L V P G T I A F T D A H  
ATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGA  
I E V D I T Y A E Y F E M S V R L A E A M K R  
TATGGGCTGAATACAAATCACAGAATCGTCGTATGCAGTGAAAACCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTG  
Y G L N T N H R I V V C S E N S L Q F F M P V  
TTGGGCGCGTTATTTATCGGAGTTGCAGTTGCGCCCGCAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTC  
L G A L F I G V A V A P A N D I Y N E R E L L  
AACAGTATGGGCATTTTCGAGCCTACCGTGGTTCGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTTGAAC  
N S M G I S Q P T V V F V S K K G L Q K I L N  
GTGCAAAAAAAGCTCCCAATCATCCAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAGGGATTT  
V Q K K L P I I Q K I I I M D S K T D Y Q G F  
CAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAG  
Q S M Y T F V T S H L P P G F N E Y D F V P E  
TCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTGGATCTACTGGTCTGCCTAAAGGT  
S F D R D K T I A L I M N S S G S T G L P K G  
GTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCTCGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAA  
V A L P H R T A C V R F S H A R D P I F G N Q  
ATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACTCT  
I I P D T A I L S V V P F H H G F G M F T T L  
GGATATTTGATATGTGGATTTTCGAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGC  
G Y L I C G F R V V L M Y R F E E E L F L R S  
CTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACT  
L Q D Y K I Q S A L L V P T L F S F F A K S T  
CTGATTGACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGGAA  
L I D K Y D L S N L H E I A S G G A P L S K E  
GTCGGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGGCTCACTGAGACT  
V G E A V A K R F H L P G I R Q G Y G L T E T  
ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTT  
T S A I L I T P E G D D K P G A V G K V V P F  
TTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGT  
F E A K V V D L D T G K T L G V N Q R G E L C  
GTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAG  
V R G P M I M S G Y V N N P E A T N A L I D K  
GATGGATGGCTACATTCTGGAGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGC  
D G W L H S G D I A Y W D E D E H F F I V D R  
CTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCAA

L K S L I K Y K G Y Q V A P A E L E S I L L Q  
CACCCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTCCCGCCGCC  
H P N I F D A G V A G L P D D D A G E L P A A  
GTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTA  
V V V L E H G K T M T E K E I V D Y V A S Q V  
ACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGAAAA  
T T A K K L R G G V V F V D E V P K G L T G K  
CTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGCCAAGAAGGGCGAAAGATCGCCGTGTAA  
L D A R K I R E I L I K A K K G G K I A V \*

(最後に Luciferase の終始コドンが入れてありますのでここで翻訳停止します)

**R4L1pGWBn40 (EYFP) 717bp**

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA  
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V  
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG  
N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K  
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTG  
F I C T T G K L P V P W P T L V T T F G Y G L  
CAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC  
Q C F A R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G  
TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC  
Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F  
GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG  
E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L  
GGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC  
G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G  
ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG  
I K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q  
CAGAACACCCCATCGGGCAGCGGCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCC  
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S A  
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATC  
L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I  
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG  
T L G M D E L Y K

**R4L1pGWBn43 (ECFP) 717bp**

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA  
M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V  
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG  
N G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K  
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTG  
F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T W G V  
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGC  
Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G  
TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC  
Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F  
GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG  
E G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L  
GGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGC  
G H K L E Y N Y I S H N V Y I T A D K Q K N G  
ATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG  
I K A N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q  
CAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC  
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A  
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATC  
L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I  
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG  
T L G M D E L Y K

R4L1pGWBn50 (G3GFP) 717bp

ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAAT  
M S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N  
GGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTT  
G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F  
ATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTTACTACTTTTCGCTTACGGTGTGCAG  
I C T T G K L P V P W P T L V T T F A Y G V Q  
TGCTTCTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATAC  
C F S R Y P D H M K R H D F F K S A M P E G Y  
GTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAG  
V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E  
GGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGC  
G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G  
CACAAGTTGGAATACAACCTTCAACTCCCACAACGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC  
H K L E Y N F N S H N V Y I M A D K Q K N G I  
AAAGTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAA  
K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q  
AATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTT  
N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L  
TCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACA  
S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T  
CATGGCATGGATGAACTATACAAATAA  
H G M D E L Y K \*

R4L1pGWBn59 (tagRFP) 714bp

ATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTG  
M V S K G E E L I K E N M H M K L Y M E G T V  
AACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGA  
N N H H F K C T S E G E G K P Y E G T Q T M R  
ATCAAGGTGGTTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGC  
I K V V E G G P L P F A F D I L A T S F M Y G  
AGCAGAACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTC  
S R T F I N H T Q G I P D F F K Q S F P E G F  
ACATGGGAGAGAGTCAACACATACGAAGACGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAG  
T W E R V T T Y E D G G V L T A T Q D T S L Q  
GACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAG  
D G C L I Y N V K I R G V N F P S N G P V M Q  
AAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCAACACCGAGATGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGA  
K K T L G W E A N T E M L Y P A D G G L E G R  
AGCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACTTCAAGACCACATACAGATCC  
S D M A L K L V G G G H L I C N F K T T Y R S  
AAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCCGGCGTCTACTATGTGGACCACAGACTGGAAAGAATCAAG  
K K P A K N L K M P G V Y Y V D H R L E R I K  
GAGGCCGACAAAGAGACCTACGTTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGC  
E A D K E T Y V E Q H E V A V A R Y C D L P S  
AAACTGGGGCACAACTTAATTGA  
K L G H K L N \*