

## GATEWAY Binary Vector (pGWB)

- 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 と Hygromycin の二重選択が可能です。
- 35S promoter タイプのものと no promoter タイプのものがあります。
- GATEWAY のルール通りにフレームを設定してエントリークローンを作製すれば、どのタグでも自動的にフレームが合います。
- 1つのエントリークローンをもとに、多種類のタグを N 末、C 末どちらにでも簡単に付加することができます。
- PCR、BP、LR、TOPO 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 )

- プライマーは以下のように設定してください(*attB* 12b を付加する場合。 invitrogen のマニュアル参照)。( TOPO の場合はキットのマニュアルをご覧ください )
- N 末側 (*attB*1) AA AAA GCA GGC TNN – forward template-specific primer
- C 末側 (*attB*2) A GAA AGC TGG GTN – reverse template-specific primer
- pGWB の使用に関して以下のことをお願いします。
  - . pGWB の使用は基礎研究に限ります。
  - . pGWB 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)

島根大学遺伝子実験施設

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。
- ・ N-tag とあるものでは Your Clone の N 末に tag が付加されます。C-tag とあるものでは Your Clone の C 末に tag が付加されます。
- ・ ( ) 内のものが、Binary Vector (後出) の *HindIII* – *SacI* の間に入っています。
- ・ pGWB1 はクローニング用、2 は 35S による発現用、3 は promoter-GUS 用、4 以降は tag を付加するためのベクターです。

- (1) pGWB1 : [ ( no promoter, no tag ) ( --R1-CmR-*ccdB*-R2 -- ) ]
- (2) pGWB2 : [ ( 35S promoter, no tag ) ( --35S promoter-R1-CmR-*ccdB*-R2-- ) ]
- (3) pGWB3 : [ ( no promoter, C-GUS ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-GUS-- ) ]
- (4) pGWB4 : [ ( no promoter, C-sGFP ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-sGFP-- ) ]
- (5) pGWB5 : [ ( 35S promoter, C-sGFP ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-sGFP-- ) ]
- (6) pGWB6 : [ ( 35S promoter, N-sGFP ) ( --35S promoter-sGFP-R1- CmR-*ccdB*-R2-- ) ]
- (7) pGWB7 : [ ( no promoter, C-6xHis ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-6xHis-- ) ]
- (8) pGWB8 : [ ( 35S promoter, C-6xHis ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-6xHis-- ) ]
- (9) pGWB9 : [ ( 35S promoter, N-6xHis ) ( --35S promoter-6xHis-R1- CmR-*ccdB*-R2-- ) ]
- (10) pGWB10 : [ ( no promoter, C-FLAG ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-FLAG-- ) ]
- (11) pGBW11 : [ ( 35S promoter, C-FLAG ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-FLAG-- ) ]
- (12) pGWB12 : [ ( 35S promoter, N-FLAG ) ( --35S promoter-FLAG-R1- CmR-*ccdB*-R2-- ) ]
- (13) pGWB13 : [ ( no promoter, C-3xHA ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-3xHA-- ) ]
- (14) pGWB14 : [ ( 35S promoter, C-3xHA ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-3xHA-- ) ]
- (15) pGWB15 : [ ( 35S promoter, N-3xHA ) ( --35S promoter-3xHA-R1- CmR-*ccdB*-R2-- ) ]
- (16) pGWB16 : [ ( no promoter, C-4xMyc ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-4xMyc-- ) ]
- (17) pGWB17 : [ ( 35S promoter, C-4xMyc ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-4xMyc-- ) ]
- (18) pGWB18 : [ ( 35S promoter, N-4xMyc ) ( --35S promoter-4xMyc-R1- CmR-*ccdB*-R2-- ) ]
- (19) pGWB19 : [ ( no promoter, C-10xMyc ) ( - -R1- CmR-*ccdB*-R2-10xMyc ) ]
- (20) pGWB20 : [ ( 35S promoter, C-10xMyc ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-10xMyc ) ]
- (21) pGWB21 : [ ( 35S promoter, N-10xMyc ) ( --35S promoter-10xMyc-R1- CmR-*ccdB*-R2 ) ]
- (22) pGWB22 : [ ( no promoter, C-GST ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-GST-- ) ]
- (23) pGWB23 : [ ( 35S promoter, C-GST ) ( --35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-GST ) ]
- (24) pGWB24 : [ ( 35S promoter, N-GST ) ( --35S promoter-GST-R1- CmR-*ccdB*-R2 ) ]
- (25) pGWB25 : [ ( no promoter, C-T7 ) ( --R1- CmR-*ccdB*-R2-T7-- ) ]

- (26) pGWB26 : [ (35S promoter, C-T7) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-T7) ]
- (27) pGWB27 : [ (35S promoter, N-T7) (--35S promoter-T7-R1- CmR-*ccdB*-R2) ]
- (28) pGWB28 : [ (no promoter, C-TAP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-TAP--)]
- (29) pGWB29 : [ (35S promoter, C-TAP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-TAP) ]
- 
- (35) pGWB35 : [ (no promoter, C-LUC) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-LUC--)]
- 
- (40) pGWB40 : [ (no promoter, C-EYFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-EYFP--)]
- (41) pGWB41 : [ (35S promoter, C-EYFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-EYFP) ]
- (42) pGWB42 : [ (35S promoter, N-EYFP) (--35S promoter-EYFP-R1- CmR-*ccdB*-R2) ]
- (43) pGWB43 : [ (no promoter, C-ECFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-ECFP--)]
- (44) pGWB44 : [ (35S promoter, C-ECFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-ECFP) ]
- (45) pGWB45 : [ (35S promoter, N-ECFP) (--35S promoter-ECFP-R1- CmR-*ccdB*-R2) ]

## 配列

Binary Vector は pABH-Hm1 (Plant Physiol. 107, 895) をベースに用いています。このベクターの b-AmyP-GUS 部分が置き換えられ、以下のようになっています。(約 17kbp)



上の図の構造が LB、RB の間に入っています。(HPT のユニットは逆向きに入っています)

NPTII により Km、HPT により hyg による選択が可能です。

pABH-Hm1 は pBI101 をもとにして作製されています。pBI101 に Beta-amylase promoter と HPT unit がクローニングされたプラスミドです。

HindIII-SacI の間の[GATEWAY]となっている部分に、後述のそれぞれの配列が入っています。

pGWB では R1-(CmR, *ccdB*)-R2 のカセットが入っており、Entry Clone との LR 反応により、B1-(Your Clone)-B2 に入れ換わります。

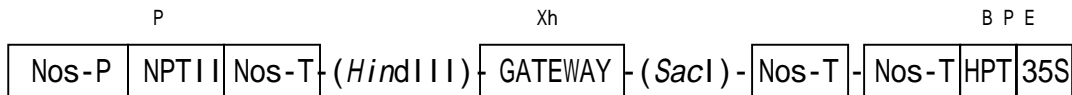
GATEWAY のルールに従ってフレームを合わせたエントリークローンを用いれば、自動的に各ベクターのところに記載されているようにタグとのフレームが合います。各 pGWB へのクローニングにあたっては、フレームを気にする必要はありません。ただし、記載のように *attB* 等のペプチドが加わります。

塩基配列中の N は Your Clone に由来します。対応するアミノ酸は X と記しています。

**重要** pGWB を LR 反応に用いる場合には、まず XhoI で切断してリニアーにして反応に供してください。LR 反応の効率は、

Either or both plasmids linear > both plasmids relaxed >> both plasmids supercoiled  
 です。切断せずに用いてしまったことがあります。形質転換体は得られませんでした。

attR1 の右側の NotI サイトに XhoI リンカーが入っています。この XhoI はユニークです。



P: *Pst*I, B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, Xh: *Xho*I

図は各パーツの大きさを反映していません。

*Hind*III、*Xho*I、*Sac*I はユニークです。

**重要** LR 反応後は hyg + km で選択してください。pDONR201 が kmR のため、hyg は必須です。また、hyg のみの培地を用いた場合バックグラウンドの小さなコロニーが出現するということが観察されていますので、km も必ず併用してください。これによりバックグラウンドがほぼ押さえられるようです。我々は km 50 ug/ml + hyg 50 ug/ml で選択しています。

**重要** 大腸菌は DH5 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

- attB1 primer は --- GGC TNN --- (N は Your Clone) という配列になります。TNN のところで終止コドンにならないように注意してください。
- Adaptor PCR の 2nd PCR は invitrogen のマニュアルでは最初の 5 cycle をアニール 45 C で行うことになっていますが、55 C でも増幅します (最初から 55 C で行う)。バックグラウンドが低減する場合がありますので、最初から 55 C で行う方法をお奨めします。
- 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 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 を用いる方が良いと思います。(エントリークローンは *Agrobacterium* では増えません)

**pGWB1** : [ ( no promoter, no tag) ( --R1-*ccdB*-R2 --) ]

(AAGCTT) --//

(TCTAGA)TC ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*) -- TTC TTG TAC AAA GTG  
GTG ATC TAG AGG (GAG CTC)

(AAGCTT)が *HindIII*、(TCTAGA)が *XbaI*、最後の(GAGCTC)が *SacI* サイトです (以下同様)。

下線が R1-CmR-*ccdB*-R2 です。(以下同様)。

**LR 反応により以下ようになります。**

(AAGCTT) --//

(TCTAGA)TC ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC CCA GCT  
TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATC TAG AGG (GAG CTC)

下線が *attB1*、*attB2* です (以下同様)。一応 *attB2* の後に TAG が in frame で出てくるようになっています。

**pGWB2** : [ ( 35S promoter, no tag) ( --35S promoter-R1-*ccdB*-R2 --) ]

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

(TCTAGA)GTTA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)--TTC TTG TAC AAA GTG  
GTT GAT AAC AGC GCT TA(G AGCTC)

(AAGCTT)が *HindIII*、(TCTAGA)が *XbaI*、最後の(GAGCTC)が *SacI* です。

*XbaI* より 5'は pBI121 と同じです。

**LR 反応により以下のようになります。**

(AAGCTT) -- (no promoter or 35S promoter) --//

(TCTAGA)GTTA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC CCA  
M ----- (X) (P)

GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC GCT TA(G AGCTC)

(A) (F) (L) (Y) (K) (V) (V) (D) (N) (S) (A) \*

Your Clone に ATG を入れてください。この場合、Your Clone のフレームを GATEWAY のルールにあわせてください (GATEWAY の manual 参照)。N は Your Clone に由来します。

Your Clone に終止コドンがある場合はそこで翻訳停止します。ない場合には *attB2* の下流の TAG で停止します。この場合は( )の *attB2* ペプチドが付加されます。

**pGWB3** : [ (no promoter, C-GUS) (--R1-*ccdB*-R2-GUS--) ]

(AAGCTT) --//

(TCTAA)T CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)-- TTC TTG TAC AAA GTG  
GTT CGA TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG of GUS --(GAGCTC)

本来であれば(TCTAA)となっているところは (TCTAGA)の *Xba*I サイトなのですが、fill in ligationの時にGが消えてしまいました。支障はないと思われるのでそのままにしております。GUS 遺伝子のあと、(GAGCTC) *Sac*I サイトになります。ATGはGUSの開始コドンです。

**LR 反応により以下ようになります。**

(AAGCTT) --//

(TCTAA)T CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC CCA GCT  
(X) (P) (A)  
TTC TTG TAC AAA GTG GTT CGA TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG  
(F) (L) (Y) (K) (V) (V) (R) (S) (R) (G) (S) (P) (G) (G) (Q) (S) (V) M  
of GUS --(GAGCTC)

Your Clone に ORF (ATG を含む)が入っていれば、GUS と protein fusion になります。( )  
であらわしたペプチドが間に入ります。この場合、Your Clone のフレームを GATEWAY のルール  
にあわせてください (GATEWAY の manual 参照)。N は Your Clone に由来します。

5'上流のみの場合にはGUSのATGから翻訳されます。

GUS から *Sac*I までは pBI121 のものと同じです。



**pGWB4** : [ (no promoter, C-sGFP) (--R1-*ccdB*-R2-sGFP--) ]

(AAGCTT) --//

(TCTA A)TC ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)-- TTC TTG TAC AAA GTG GTG  
ATC ATG of GFP --(GAGCTC)

これも本来であれば(TCTAA)は(TCTAGA)の *Xba*I サイトのはずなのですが、やはり fill in ligation で G が消えています。これも支障はないと思いますので、そのままにしてあります。ATGは sGFP の開始コドンです。

**LR 反応により以下ようになります。**

(AAGCTT) --//

(TCTA A)TC ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC CCA GCT  
(X) (P) (A)

TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATC ATG of sGFP --(GAGCTC)

(F) (L) (Y) (K) (V) (V) (I) M

Your Clone に ORF (ATG を含む)が入っていれば、GFP との protein fusion になります。( ) であらわしたペプチドが間に入ります。この場合、Your Clone のフレームを GATEWAY のルールにあわせてください(以下同様。GATEWAY の manual 参照)。N は Your Clone に由来します(以下同様)。

5' 上流のみの場合には sGFP の ATG から翻訳されます。

sGFP の終止コドンから *Sac*I までは以下のようになっています。

TAAAGCGGCC(GAGCTC)

TAA:終止コドン、(GAGCTC):*Sac*I。

NotI digest – fill in – *Sac*I linker (8 mer)

**pGWB5** : [(35S promoter, C-sGFP) (--35Spromoter-R1-*ccdB*-R2-sGFP--)]

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

(TCT AA)T CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)—TTC TTG TAC AAA GTG  
GTT CGA TCT AGA GGA TCC ATG of sGFP --(GAGCTC)

これも本来であれば(TCTAA)は(TCTAGA)の *Xba*I サイトのはずなのですが、やはり fill in ligation で G が消えています。これも支障はないと思いますので、そのままにしてあります。  
ATGは sGFP の開始コドンです。

**LR 反応により以下ようになります。**

35S promoter --(TCT AA)T CAA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone)  
NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT CGA TCT AGA GGA TCC ATG of sGFP  
X P A F L Y K V V R S R G S M

Your Clone に必ず開始コドン ATG を入れてください。上記の配列のペプチドを介して sGFP との protein fusion になります。N は Your Clone に由来します。

sGFP 以降は pGWB4 と同じです。

**pGWB6** : [ (35S promoter, N-sGFP) (--35S promoter-sGFP-R1-*ccdB*-R2--) ]

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

sGFP C(TG TAC A)TC ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)—TTC TTG TAC AAA  
GTG GTG ATG TAC AAG TAA AGCGGCCC(GAGCTC)

sGFP の C 末の BsrGI (TGTACA)にカセットが入っています。TAA は sGFP に由来します。終止  
コドン以降は pGWB4 同様に NotI digest – fill in – SacI linker となっています。

**LR 反応により以下のようになります。**

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

sGFP C(TG TAC A)TC ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC  
L Y I T S L Y K K A G X --- --- (X)  
CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATG TAC AAG TAA AGCGGCCC(GAGCTC)  
(P) (A) (F) (L) (Y) (K) (V) (V) (M) (Y) (K) \*

Your Clone に終止コドンが入っている場合にはそこで翻訳停止し、入っていない場合には  
( ) 内のペプチドを介して下流の TAA で停止します。

sGFP の本来の C 末は LYK\* です。

sGFP の 5'側は以下のようになっています。XbaI より 5'は pBI121 と同じです。

TCTAGAGGATCC ATG of sGFP---

XbaI BamHI M

**pGMB7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 35, 40, 41, 43, 44** (no promoter or 35S promoter, C-tag or C-reporter)では以下のようになっています。

No promoter --- 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 35, 40, 43

35S promoter --- 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 41, 44

(AAGCTT) -- (no promoter or 35S promoter) --//  
(TCTAGA)GTTA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)--TTC TTG TAC AAA GTG  
GTT GAT AAC AGC tag GCT TA(G AGCTC)

(AAGCTT)が *HindIII*、(TCTAGA)が *XbaI*、最後の(GAGCTC)が *SacI* です。tag(タグ)については後述。

*XbaI* より 5'は pBI101 あるいは 121 と同じです。

LR 反応により以下ようになります。

(AAGCTT) -- (no promoter or 35S promoter) --//  
(TCTAGA)GTTA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC CCA  
M ----- X P  
GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC tag GCT TA(G AGCTC)  
A F L Y K V V D N S tag A \*

Your Clone に ATG を入れてください。attB2 のペプチドを介して tag に融合し、その下流の TAG で翻訳停止します。

**pGWB9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 42, 45** (35S promoter, N-tag)

では以下のようにになっています。

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

(TCTAGA) ATG AGC **tag** GCT GTT ATC ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, *ccdB*)-  
-TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATA ACC TA(G AGCTC)

最初の(TCTAGA)が *Xba*I、最後の(GAGCTC)が *Sac*I です。tag(タグ)については後述。

*Xba*I より 5'は pBI121 と同じです。

**LR 反応により以下のようになります。**

(AAGCTT) -- 35S promoter --//

(TCTAGA) ATG AGC **tag** GCT GTT ATC ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN

M S **tag** A V I T S L Y K K A G X

(Your Clone) NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATA ACC TA(G AGCTC)

--- --- (X) (P) (A) (F) (L) (Y) (K) (V) (V) (I) (T) \*

Your Clone に終止コドンが入っている場合にはそこで翻訳停止します。入っていない場合には( )内の *attB2* のペプチドの下流の TAG で停止します。

## tag (タグ)

pGWB の tag (タグ) は以下のものを使用しています。

**pGWB4,5,6 (sGFP)** 720bp 丹羽さん (静岡県立大) の sGFP (ATG から TAA まで)。

pGWB6 (35S N-GFP) では C 末が I になります (pGWB6 の項参照)

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTG
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
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCACCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTG
F I C T T G K L P V P W P T L V T T F T Y G V
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
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
GGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
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
CAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATC
L S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I
ACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
T H G M D E L Y K *
```

**pGWB7,8,9 (6xHis)** 18bp

```
CATCATCATCATCATCAT
```

```
H H H H H H
```

**pGWB10,11,12 (FLAG)** 24bp

GACTACAAGGATGACGATGACAAG

D Y K D D D D K

**pGWB13,14,15 (3xHA)** 120bp HA と Myc は<http://pingu.salk.edu/users/forsburg/>より。

GGGTTAATTAACATCTTTTACCCATACGATGTTCCCTGACTATGCGGGCTATCCCTATGACGTCCCGGAC

G L I N I F Y P Y D V P D Y A G Y P Y D V P D

TATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCAGC

Y A G S Y P Y D V P D Y A A Q C S

(19 番目の TAC から 45 番目の GCG まだが 1 ユニット。各ユニットにアンダーライン)

(54 番目の C は上記サイトでは G になっていますが、こちらでシーケンスしたところ確実に C でしたので、ここでは C と記載しています。CCG (P) -> CCC (P) でアミノ酸は変わりません)

**pGWB16,17,18 (4xMyc)** 171bp

GGGTTAATTAACGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTGAACAAAATTAATCTCA

G L I N G E Q K L I S E E D L N G E Q K L I S

GAAGAAGACTTGAACGGACTCGACGGTGAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAAGATTTGAACGGTGAACAA

E E D L N G L D G E Q K L I S E E D L N G E Q

AAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTAGC

K L I S E E D L N G S

(16 番目の GAA から 45 番目の TTG まだが 1 ユニット。各ユニットにアンダーライン)

**pGWB19,20,21 (10xMyc)** 402bp

GGGTTAATTAACGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTGAACAAAATTAATCTCA  
G L I N G E Q K L I S E E D L N G E Q K L I S  
GAAGAAGACTTGAACGGACTCGACGGTGAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAAGATTTGAACGGTGAACAA  
E E D L N G L D G E Q K L I S E E D L N G E Q  
AAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTGAACAAAATTAATCTCAGAAGAAGACTTGAACGGACTC  
K L I S E E D L N G E Q K L I S E E D L N G L  
GACGGTGAACAAAAGTTGATTTCTGAAGAAGATTTGAACGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGAC  
D G E Q K L I S E E D L N G E Q K L I S E E D  
TTGAACGGTGAACAAAATTAATCTCAGAAGAAGACTTGAACGGACTCGACGGTGAACAAAAGTTGATT  
L N G E Q K L I S E E D L N G L D G E Q K L I  
TCTGAAGAAGATTTGAACGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGTAGC  
S E E D L N G E Q K L I S E E D L N G S

(16 番目の GAA から 45 番目の TTG までが 1 ユニット。各ユニットにアンダーライン)

注：pGWB19 および pGWB20 には最後の AGC (Ser)が入っていません。



**pGWB22, 23, 24 (GST)** 678bp

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGAATAT  
M S P I L G Y W K I K G L V Q P T R L L L E Y  
CTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTT  
L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W R N K K F  
GAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATG  
E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M  
GCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGACAGAGATT  
A I I R Y I A D K H N M L G G C P K E R A E I  
TCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTT  
S M L E G A V L D I R Y G V S R I A Y S K D F  
GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCTGAAGATCGTTTATGT  
E T L K V D F L S K L P E M L K M F E D R L C  
CATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTT  
H K T Y L N G D H V T H P D F M L Y D A L D V  
GTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAACGTATTGAA  
V L Y M D P M C L D A F P K L V C F K K R I E  
GCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTAAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAA  
A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L Q G W Q  
GCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCC  
A T F G G G D H P P K S D L V P R G S

(pGEX2T の ATG から BamHI まで)

**pGWB25, 26, 27 (T7)** 33bp

ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGT  
M A S M T G G Q Q M G

PGWB28, 29 (TAP) 546bp

AAGAGAAGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAGAAAATCTCATCCTCC  
K R R W K K N F I A V S A A N R F K K I S S S  
GGGGCACTTGATTATGATATTCCAACACTGCTAGCGAGAATTTGTATTTTCAGGGTGAGCTCAAACC  
G A L D Y D I P T T A S E N L Y F Q G E L K T  
GCGGCTCTTGCGCAACACGATGAAGCCGTGGACAACAAATTCACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTAT  
A A L A Q H D E A V D N K F N K E Q Q N A F Y  
GAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGAC  
E I L H L P N L N E E Q R N A F I Q S L K D D  
CCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGAC  
P S Q S A N L L A E A K K L N D A Q A P K V D  
AACAAATTCAACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAA  
N K F N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E  
CAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCT  
Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E A  
AAAAAGCTAAATGGTGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTCGCGGGGAAGTCAACCTGA  
K K L N G A Q A P K V D A N S A G K S T \*

(アンダーラインはCBP、太いアンダーラインはTEV site、2重アンダーラインはproteinA)

**PGWB35 (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  
ATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTCCGTTGGCAGAAGCTATGAAACGA  
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  
AACAGTATGGGCATTTTCGCAGCCTACCGTGGTTCGTTTCCAAAAAGGGGTTCAAAAAATTTTGAAC  
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  
CAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAG  
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  
ATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACTC  
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  
CTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTCGCCAAAAGCACT  
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

ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTT  
T S A I L I T P E G D D K P G A V G K V V P F  
TTTGAAGCGAAGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGT  
F E A K V V D L D T G K T L G V N Q R G E L C  
GTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAG  
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  
CTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAA  
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  
GTTGTTGTTTTGGAGCACGAAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTA  
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  
CTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAA  
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)

**pGWB40, 41, 42 (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  
TTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTG  
F I C T T G K L P V P W P T L V T T F G Y G L  
CAGTGCTTCGCCCCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC  
Q C F A R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G  
TAGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC  
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  
CAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCC  
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S A  
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC  
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

**pGWB43, 44, 45 (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  
TTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTG  
F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T W G V  
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC  
Q C F S R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G  
TAGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC  
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  
CAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC  
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A  
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC  
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

Entry Clone に (ATG-YourClone-AGC) (AGC は最後のアミノ酸のつもり) をクローニングしておく、35S promoter タイプの pGWB 全てで使用することができます。ただし、後ろに *attB2* ペプチドが付加されます。

C 末に tag を付加する場合、YourClone の最後のアミノ酸の下流から *attB2* ペプチドを介して tag と融合し、その下流のベクターの TAG で翻訳停止します。

(ATG-YourClone-AGC)-*attB2*-tag-TAG

N 末に tag を付加する場合、tag の前の ATG から翻訳開始し、*attB1* ペプチドを介して YourClone の ATG に融合します。YourClone の最後のアミノ酸の下流から *attB* ペプチドとなり、下流のベクターの TAG で翻訳停止します。

ATG-*attB1*-(ATG-YourClone-AGC)-*attB2*-TAG