

製品コード 3243
3244

研究用

Takara

pBApo-EF1 α Neo DNA (製品コード 3243)

pBApo-EF1 α Pur DNA (製品コード 3244)

説明書

pBApo-EF1 α は哺乳類細胞用のシンプルな遺伝子発現ベクターです。ヒトポリペプチド鎖伸長因子遺伝子のプロモーター (EF1 α promoter) および単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼのポリ A シグナルを搭載しており、クローニングサイトに目的遺伝子の ORF を挿入することにより、目的遺伝子の発現プラスミドが得られます。通常の遺伝子以外に、microRNA 前駆体などの転写産物の発現にも利用できます。さらに、「プロモーター + ORF + ポリ A シグナル」を切り出して、容易にアデノウイルスベクターに寄せ換えることも可能です。アデノウイルスベクターは高い感染効率と広い感染域を持っているため、*in vitro* あるいは *in vivo* での遺伝子導入に適しています。組換えアデノウイルスの作製には、Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170) をご利用ください。

pBApo-EF1 α シリーズには、動物細胞での選択マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子またはピューロマイシン耐性遺伝子を搭載したベクターがあります。実験目的に応じたベクターを選択してください。

I. 内容

pBApo-EF1 α Neo DNA (製品コード 3243) 20 μ g (500 ng/ μ l)
ネオマイシン耐性遺伝子を搭載しています。

pBApo-EF1 α Pur DNA (製品コード 3244) 20 μ g (500 ng/ μ l)
ピューロマイシン耐性遺伝子を搭載しています。

[形状] 10 mM Tris-HCl, pH8.0、1 mM EDTA

II. 保存

− 20°C

※ 適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

IV. 使用方法

IV-1. 遺伝子の挿入

プラスミドベクターのクローニングサイトに目的遺伝子の ORF を挿入してください。アンピシリン耐性遺伝子が搭載されているため、組換え大腸菌を選択できます。

IV-2. 細胞への導入

TransIT シリーズ、*Xfect*™ シリーズなどの導入試薬を用いて、プラスミドを細胞に導入します。条件は導入試薬のプロトコールに従ってください。

IV-3. 遺伝子導入細胞の選択

pBApo-EF1 α Neo DNA はネオマイシン耐性遺伝子を、pBApo-EF1 α Pur DNA はピューロマイシン耐性遺伝子を搭載しているため、導入細胞を薬剤で選択することが可能です。

薬剤選択はプラスミド導入後 24 時間以上経過してから開始します。細胞密度が高い場合は適宜希釈して播きなおし、3～4 日ごとに薬剤入りの培地を交換します。通常、1～2 週間で導入細胞のクローンを得ることができます。

細胞によって薬剤に対する感受性は異なりますので、あらかじめ使用する細胞に適した濃度を検討してください。G418 は 500～1,000 μ g/ml、ピューロマイシンは 1～3 μ g/ml が目安になります。

IV-4. 発現ユニットの乗せ換え

pBApo-EF1 α シリーズは、*Cla*I または *Eco*RV で消化することにより、発現ユニット (EF1 α プロモーター+挿入遺伝子+ポリ A シグナル) を切り出すことができ、容易に他のベクターに乗せ換えることが可能です。

特に Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170) のコスミドベクターは、クローニングサイトとして *Cla*I および *Smi*I を持っているため、容易にアデノウイルスベクターに乗せ換えることが可能です。

(*Eco*RV と *Smi*I はともに平滑末端であるため、ライゲーションが可能です。)

V. 実験例

V-1. 蛍光タンパク質 (AcGFP1) 発現ベクターの構築

1. pBApo-EF1 α Neo DNA を *Hind* III 消化後、切断末端の平滑化を行い、さらに *Xba* I で消化を行った。その後、アガロースゲル電気泳動を行い、約 5.1 kb の DNA 断片を回収した。
2. pAcGFP1-C1 Vector (製品コード 632470) から *Nhe* I と *Ssp* I 消化により切り出した pAcGFP1 遺伝子の DNA 断片と消化済み pBApo-EF1 α Neo を、DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023) を用いてライゲーションした。
3. *E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052) に導入し、アンピシリンを含む LB プレートにまいた。
4. 得られたコロニーを 2 ~ 5 ml の LB Amp 液体培地に培養し、プラスミドを調製後、正しいクローンを選択した。
5. トランスフェクション用にプラスミド pBApo-EF1 α Neo/AcGFP1 を精製した。

<ヒト培養細胞での EF1 α プロモーターによる遺伝子発現>

- 1) あらかじめ培養しておいた HeLa 細胞に、遺伝子導入試薬 Xfect Transfection Reagent (製品コード 631317) を使用してプラスミドを導入した。
- 2) 24 時間後に蛍光顕微鏡で観察し、AcGFP1 の発現を確認した。(下図参照)

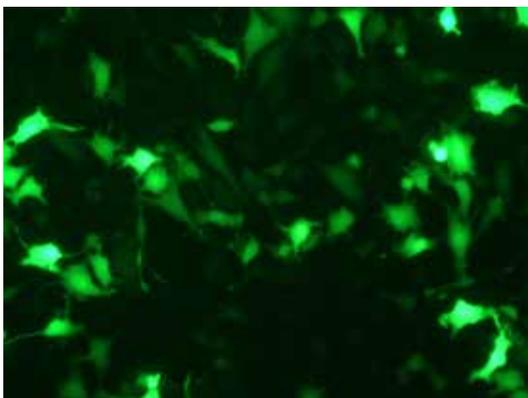


図 1. 蛍光顕微鏡画像
pBApo-EF1 α Neo/AcGFP1
トランスフェクションの 24 時間後

V-2. マウス ES 細胞での EF1 α プロモーターと CMV-IE プロモーターの遺伝子発現比較

1. E14TG2a マウス ES 細胞に、遺伝子導入試薬 Xfect mESC Transfection Reagent (製品コード 631320) を使用して AcGFP1 遺伝子を挿入したプラスミド (pBApo-EF1 α Neo DNA、pBApo-CMV Neo DNA 使用) を導入した。
2. 48 時間後に細胞を回収し、フローサイトメーターを用いて AcGFP1 陽性細胞を解析した (図 2. 一過性発現)。
3. 培地に 250 μ g/ml で G418 を添加して薬剤選択を行い、耐性となった細胞をフローサイトメーターにより解析した (図 2. 安定発現)。

その結果、マウス ES 細胞においては一過性、安定発現ともに EF1 α プロモーターを用いた方が AcGFP1 陽性細胞の割合が高く、発現も強いことが示された。

一過性発現

安定発現

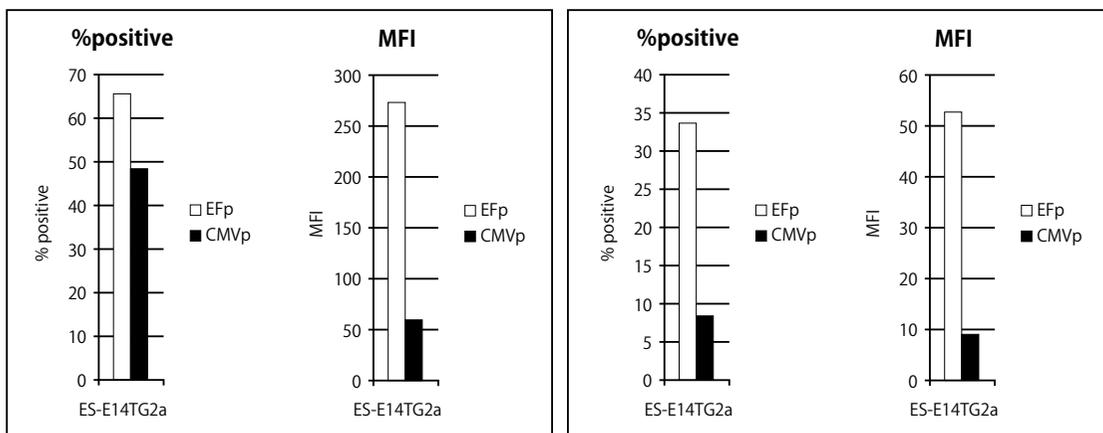


図 2. フローサイトメーター解析結果

EFp : pBApo-EF1 α Neo / AcGFP1、CMVp : pBApo-CMV Neo / AcGFP1

一過性発現 : トランスフェクションの 48 時間後の細胞、安定発現 : 選択薬剤耐性となった細胞

%positive : AcGFP1 陽性細胞の割合、MFI : 陽性細胞の蛍光強度の Mean 値

VI. 関連製品

pBApo-CMV ベクターシリーズ (製品コード 3240 ~ 3242)
DNA Ligation Kit < Mighty Mix > (製品コード 6023)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)
Xfect™ Transfection Reagent (製品コード 631317 ほか)
Xfect™ mESC Transfection Reagent (製品コード 631320)
TransIT-X2 Dynamic Delivery System (製品コード MIR6003 ほか)
TransIT-LT1 Transfection Reagent (製品コード MIR2304 ほか)
Adenovirus Dual Expression Kit (製品コード 6170)
G418 (製品コード 631307、631308)
Puromycin (製品コード 631305、631306)

VII. 注意

- ・ 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・ タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・ Xfect は Takara Bio USA, Inc. の商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社