

製品コード 3262
3263

研究用

Takara

pRI 101 DNA シリーズ
(植物形質転換用高発現ベクター)

説明書

pRI 101 DNA シリーズは、形質転換植物における外来遺伝子の高発現を目的としたベクターです。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーターの下流に ADH (Alcohol Dehydrogenase) 遺伝子由来の 5' 非翻訳領域 (5'-UTR) を搭載しており、当該領域の持つ翻訳エンハンサー機能により、植物体での目的遺伝子産物の高発現が期待できます¹⁾。シロイヌナズナ ADH 由来 5'-UTR (AtADH 5'-UTR) を搭載した pRI 101-AN DNA とイネ ADH 由来 5' UTR (OsADH 5'-UTR) を搭載した pRI 101-ON DNA の 2 種類があり、双子葉植物には pRI 101-AN DNA を、単子葉植物には pRI 101-ON DNA が使用できます。

また、本シリーズは植物形質転換用バイナリーベクター pRI 910 DNA (製品コード 3261) をバックボーンとしたバイナリーベクターであり、*Rhizobium rhizogenes* の Ri プラスミド由来の変異型複製起点 (Ri ori) を持っています²⁾。さらに pUC 系のプラスミドと同じ複製起点 (ColE1 ori) を持つため、大腸菌で高コピー数のプラスミドとして維持され、また、クローニングサイトが植物の選択マーカーに対して T-DNA の Right Border (RB) 側に配置されているため、目的遺伝子が欠失することなく安定に植物染色体に組み込み可能になる等、pRI 910 DNA の有する特長も保持しています。

※ 本ベクターは、国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学より技術および試料の提供を受けて、タカラバイオ (株) が製品化したしました。

I. 内容

pRI 101-AN DNA (製品コード 3262)	10 μ g
pRI 101-ON DNA (製品コード 3263)	10 μ g
・濃度	0.5 μ g/ μ l
・形状	10 mM Tris-HCl, pH8.0 1 mM EDTA

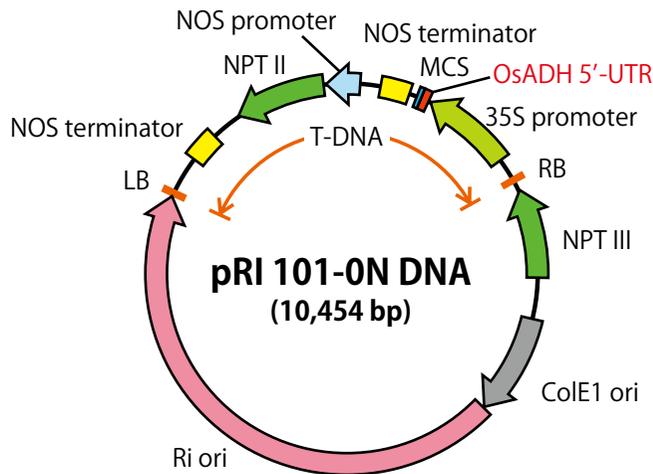
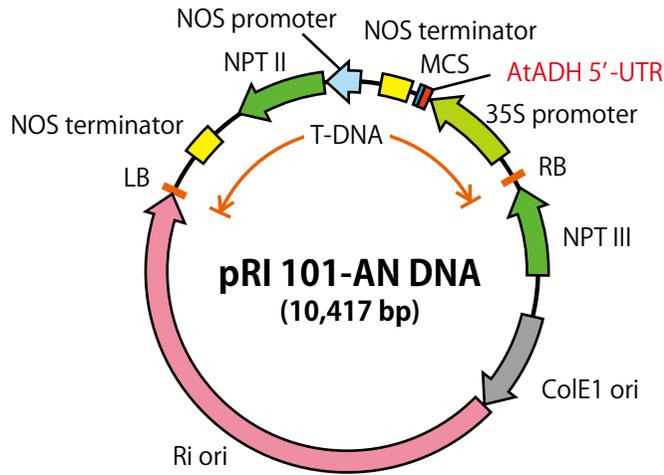
II. 保存

− 20℃

※適切に保存し、受取り後2年を目途にご使用ください。

III. ベクターマップとクローニングサイト

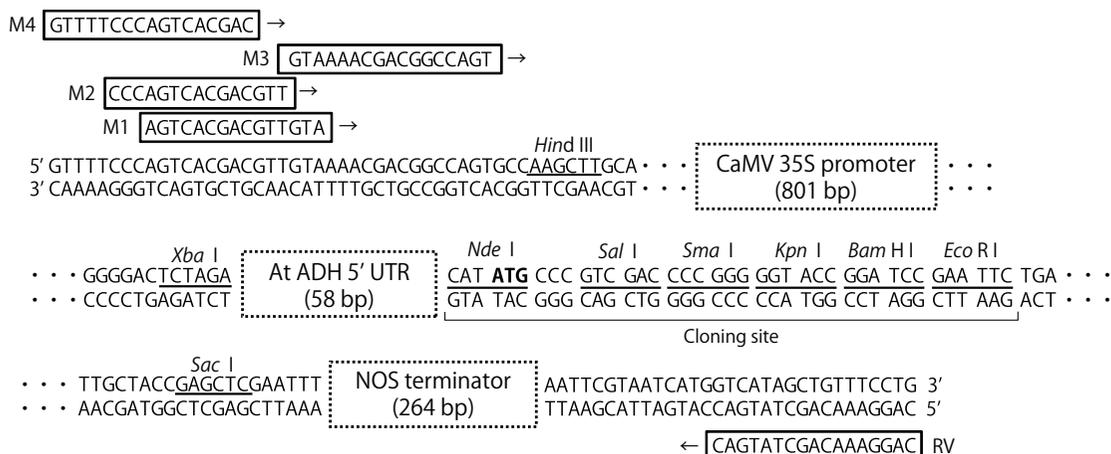
III-1. ベクターマップ



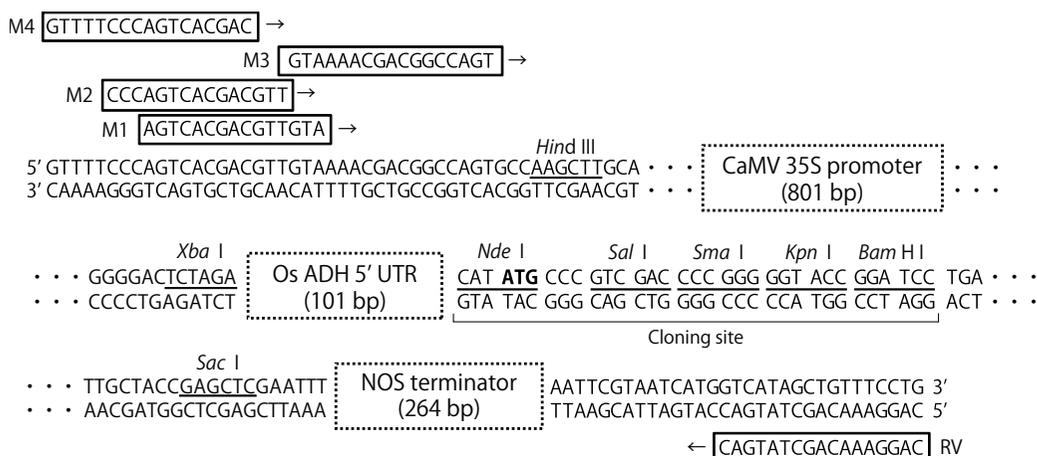
- ColE1 ori : 大腸菌での複製起点 (大腸菌由来)
Ri ori : *Rhizobium* での複製起点
(*Rhizobium rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*) 由来)
RB、LB : 植物体に組み込まれる T-DNA のボーダー配列
(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来)
NOS promoter、NOS terminator : 植物での遺伝子発現のためのプロモーター、ターミネーター
(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来)
NPT II : 植物での選択マーカー遺伝子 (大腸菌由来)
AtADH 5'-UTR、OsADH 5'-UTR : 翻訳エンハンサー領域
(*Arabidopsis thaliana* または *Oryza sativa* 由来)
35S promoter : 植物での遺伝子発現のためのプロモーター (CaMV 由来)
NPT III : 大腸菌および *Rhizobium* (*Agrobacterium*) での選択マーカー遺伝子
(カナマイシン耐性) (*Streptococcus faecalis* 由来)

III-2. クローニングサイト周辺および発現カセットの構造

< pRI 101-AN DNA >



< pRI 101-ON DNA >



注) Os ADH 5'-UTR は内部に *EcoRI* サイトを含みます。

IV. 使用方法

- 1) 翻訳エンハンサー領域 (AtADH 5'-UTR または OsADH 5'-UTR) 下流にあるクローニングサイトと NOS terminator の間に目的タンパク質をコードする DNA を挿入したプラスミドを構築する。その際、ベクターの読み取りフレームを考慮して制限酵素サイトを選択する。エンハンサーと開始コドンの位置は翻訳活性に影響する場合があります^{1,3)}。
- 2) アグロバクテリウムコンピテントセル (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 ElectroCells (製品コード 9115) など) に 1) で構築したプラスミドを導入し、形質転換アグロバクテリウムを作製する。
- 3) 2) の形質転換アグロバクテリウムを用いて目的植物を形質転換する。

V. 実験例

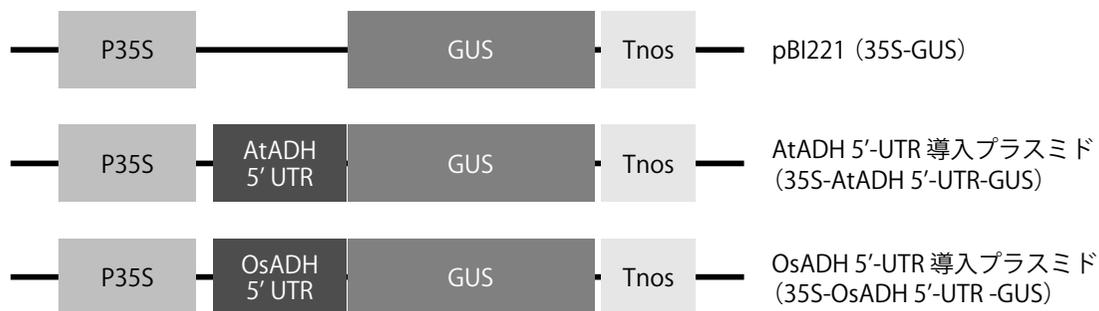
V-1: エンハンサー機能の確認 (pUC 系ベクターを使用した一過性発現確認)

(方法)

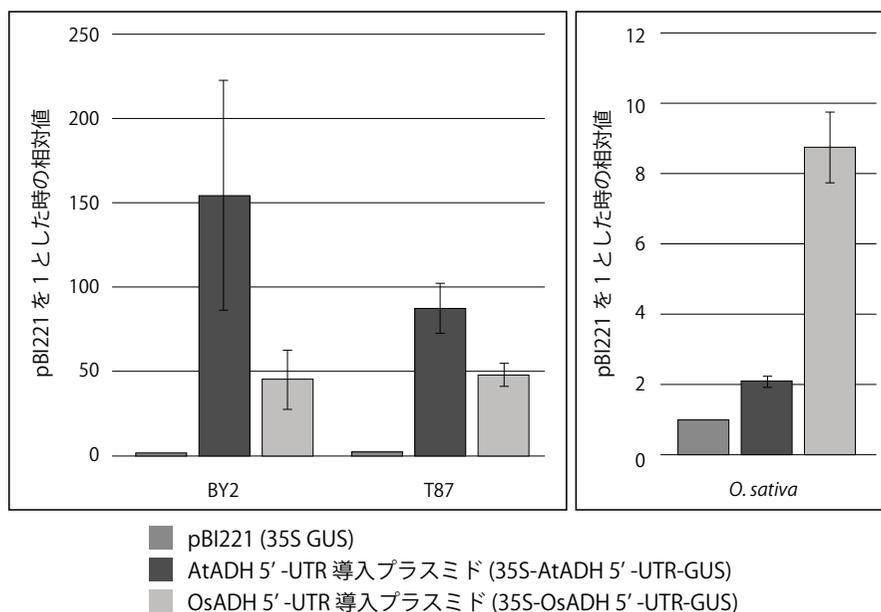
タバコ培養細胞 BY-2、シロイヌナズナ培養細胞 T87 およびイネ (*Oryza sativa*) のプロトプラストを調製し、エレクトロポレーション法により下図に示す β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子配列を持つプラスミドを導入した。プラスミド導入後、16~18 時間培養した後にプロトプラストを破碎し、得られた抽出液中に含まれる GUS 活性を測定した。GUS 活性は、基質である 4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニド (4-MUG) が分解されて生ずる 4-メチルウンベリフェロン (4MU) 量を蛍光強度を指標にして測定した。

(結果)

5' 非翻訳領域 (5'-UTR) を付与したプラスミドを用いた場合、CaMV 35S プロモーター単独の場合に比べて、数 10 倍以上の GUS 活性を示した。シロイヌナズナ ADH 5'-UTR は BY-2 細胞、T87 細胞では高い活性を示すが、イネではほとんど効果はなかった。一方、イネ ADH 5'-UTR は BY-2 細胞、T87 細胞に加え、イネのプロトプラストでも効果を示した。



GUS 活性測定 (一過的発現実験)



Kato, K. et. al (2008) *J. Bioscience and Bioengineering*. **105** (3) 300-302 より引用

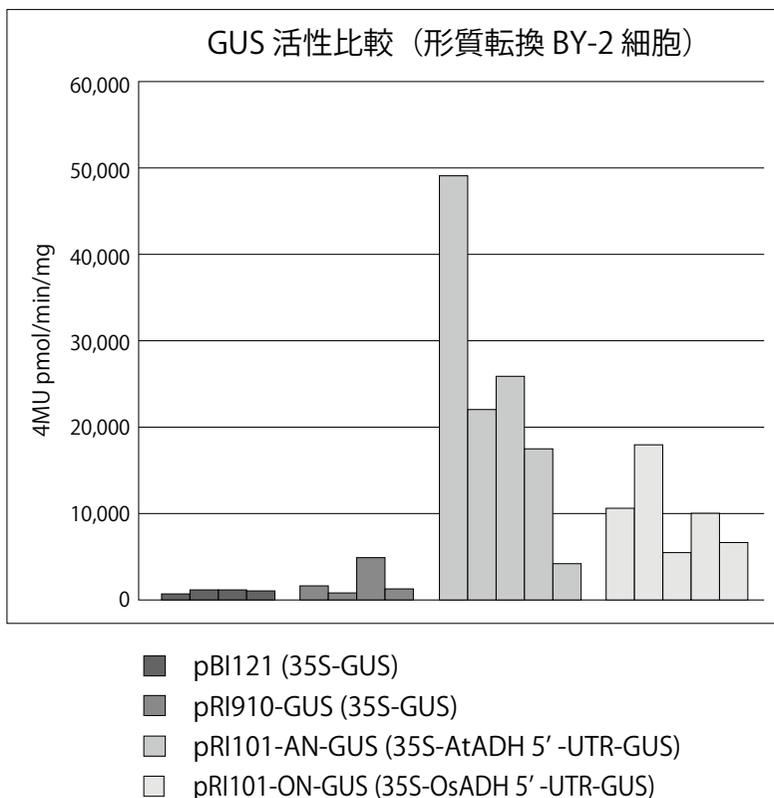
V-2：形質転換体における目的タンパク質の発現確認（バイナリーベクター使用）

(方法)

pRI101-AN および pRI101-ON に V-1. と同じように GUS 遺伝子を搭載し、アグロバクテリウム法によりタバコ培養細胞 BY-2 を形質転換した。得られた形質転換体における GUS 活性を V-1. と同様の方法で測定した。

(結果)

V-1. の pBI221 と同様の構造の 35S-GUS 構造を持つベクター (pBI121 or pRI910-GUS) で形質転換した場合と比較して、ADH 5' UTR を導入したベクターによる形質転換体では高い GUS 活性を示すクローンが多数取得できた。



VI. 参考文献

- 1) T. Sugio, J. Satoh, H. Matsuura, A. Shinmyo, and K. Kato.
J Bioscience and Bioengineering. (2008) **105**(3): 300-302.
- 2) R. Nishiguchi, M. Takanami, and A. Oka. *Molecular and General Genetics*. (1987) **206**: 1-8.
- 3) J. Satoh, K. Kato, and A. Shinmyo. *J Bioscience and Bioengineering*. (2004) **98**(1): 1-8.

VII. 関連製品

pRI 201-AN DNA (製品コード 3264)
pRI 201-ON DNA (製品コード 3265)
pRI 201-AN-GUS DNA (製品コード 3266)
pRI 201-ON-GUS DNA (製品コード 3267)
pRI 909 DNA (製品コード 3260)
pRI 910 DNA (製品コード 3261)
Agrobacterium tumefaciens LBA4404 Electro-Cells (製品コード 9115)

VIII. 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。
- ・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