

製品コード 3264 ~ 3267

研究用

TaKaRa

pRI 201 DNA シリーズ
(植物形質転換用高発現ベクター)

説明書

v201703Da

pRI 201 DNA シリーズは、pRI 101 DNA シリーズ（製品コード 3262/3263）よりも更に高い形質転換植物における外来遺伝子の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) (翻訳エンハンサー領域) を搭載した pRI 101 DNA シリーズの骨格¹⁾に加え、従来の NOS (Nopaline Synthase) 遺伝子由来 terminator を HSP (Heat Shock Protein) 遺伝子由来 terminator に換えることにより、pRI 101 DNA シリーズ以上に植物体での目的遺伝子産物の高発現が期待できます²⁾。また、HSP terminator の下流にあるクローニングサイト (MCS2) に他の遺伝子を含む発現カセット (プロモーター+エンハンサー+目的遺伝子+ターミネーター) を導入することにより、一つのベクターで複数の遺伝子を形質転換することが可能です。

pRI 201 シリーズには、シロイヌナズナ ADH 由来 5'-UTR (AtADH 5'-UTR) を搭載した pRI 201-AN DNA とイネ ADH 由来 5'-UTR (OsADH 5'-UTR) を搭載した pRI 201-ON DNA の 2 種類があります。シロイヌナズナ、トマト、タバコなどの双子葉植物には pRI 201-AN DNA が、イネなどの単子葉植物には pRI 201-ON DNA が適しています。また、形質転換時のポジティブコントロールとして汎用される GUS (β -glucuronidase) 遺伝子をそれぞれのベクターに組み込んだコントロールベクター (pRI 201-AN-GUS DNA、pRI 201-ON-GUS DNA) もご用意しました。

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³⁾。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 201-AN DNA	(製品コード 3264)	10 μ g
pRI 201-ON DNA	(製品コード 3265)	10 μ g
pRI 201-AN-GUS DNA	(製品コード 3266)	10 μ g
pRI 201-ON-GUS DNA	(製品コード 3267)	10 μ g

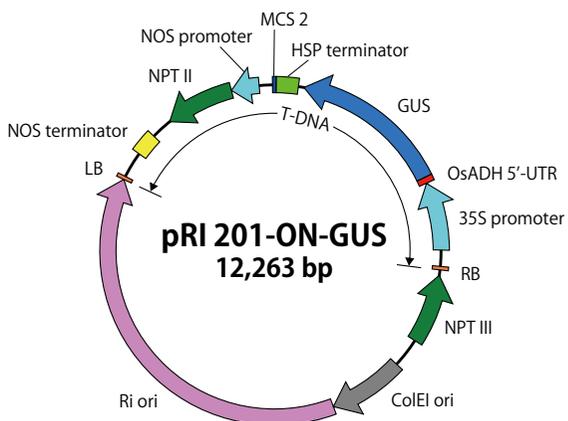
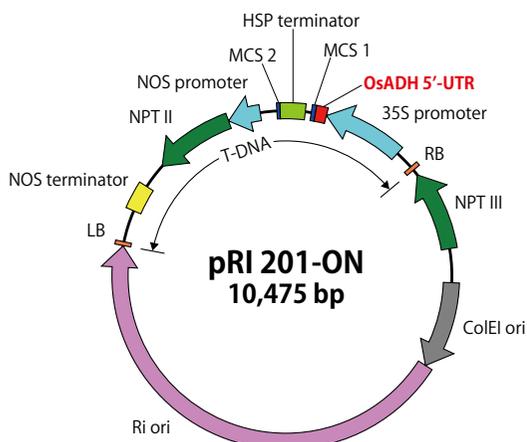
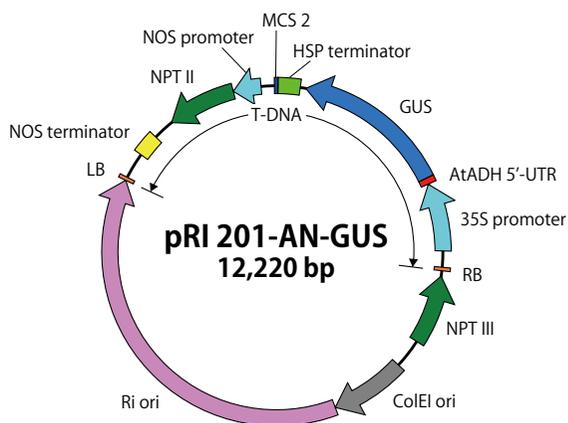
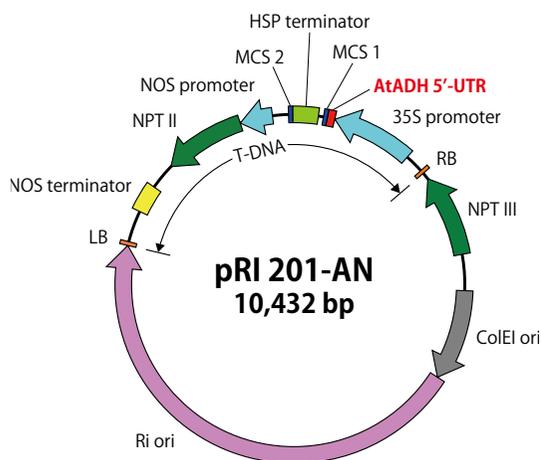
- ・濃度 0.5 μ g/ μ l
- ・形状 10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA

II. 保存

– 20°C

※適切に保存し、受け取り後 2 年を目途にご使用ください。

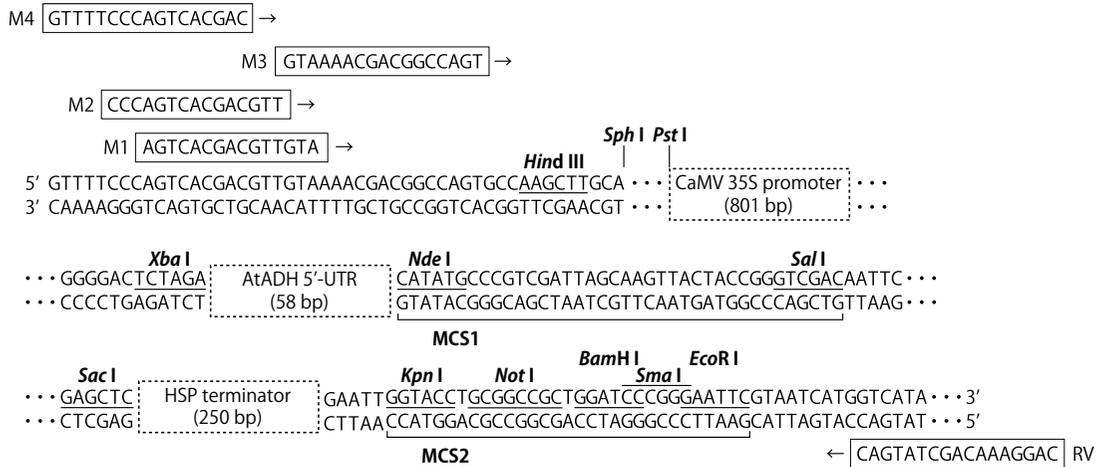
III. ベクターマップ



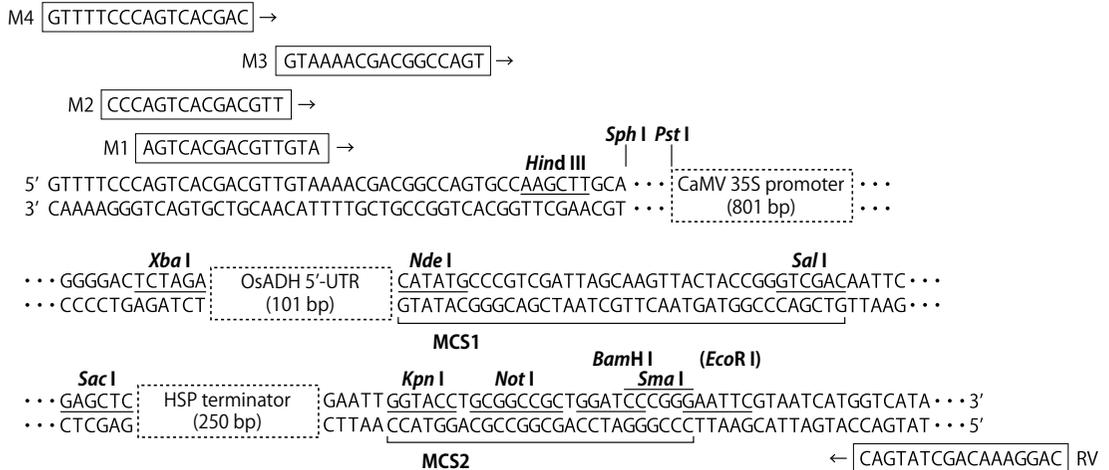
- ColE1 ori : 大腸菌での複製起点 (大腸菌由来)
- Ri ori : *Rhizobium* での複製起点
(*Rhizobium rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*) 由来)
- RB、LB : 植物体に組み込まれる T-DNA のボーダー配列
(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来)
- NOS promoter、NOS terminator : 植物での遺伝子発現のためのプロモーター、ターミネーター
(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来)
- HSP terminator : 植物での遺伝子発現のためのターミネーター (*Arabidopsis thaliana* 由来)
- GUS : β -glucuronidase 遺伝子 (大腸菌由来)
- 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)

【クローニングサイト周辺および発現カセットの構造】

pRI 201-AN DNA

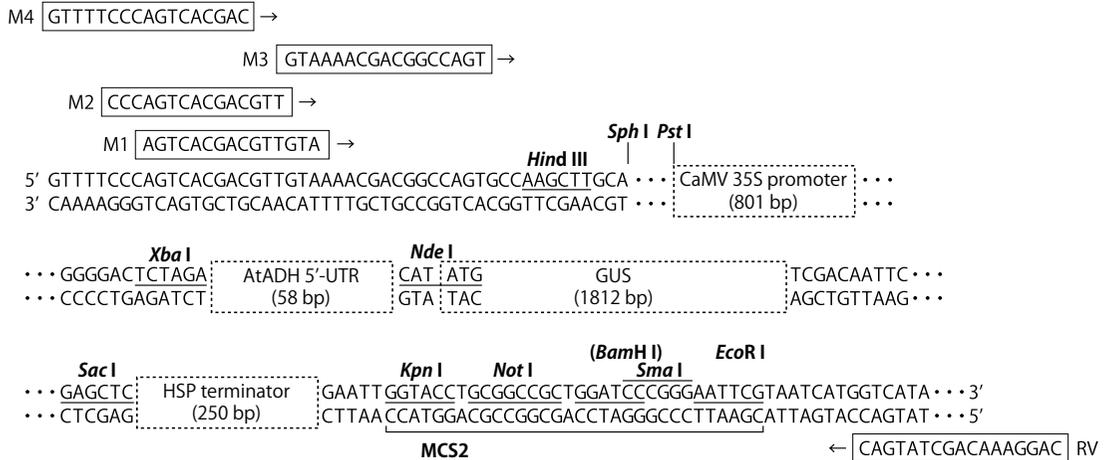


pRI 201-ON DNA

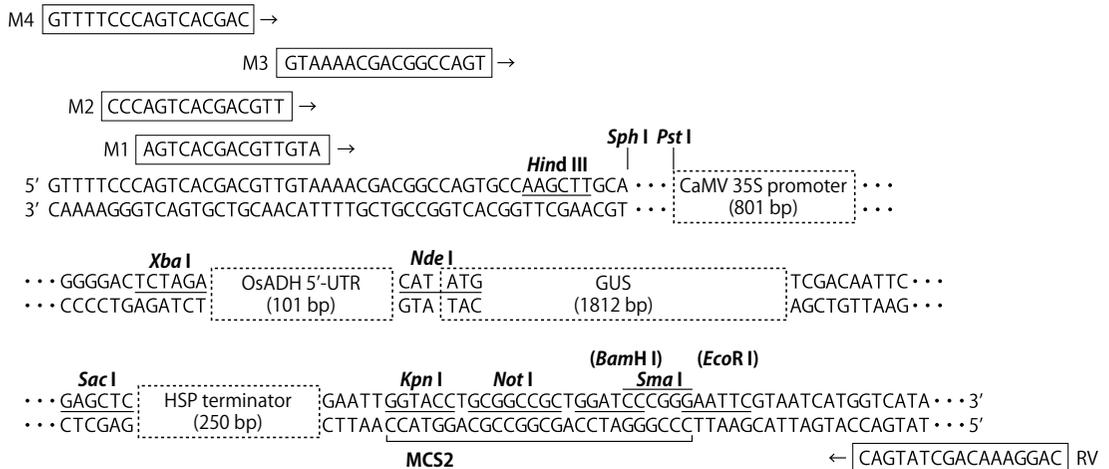


※ OsADH 5'-UTRは内部に*Eco*RIサイトを含む。

pRI 201-AN-GUS DNA



pRI 201-ON-GUS DNA



※ OsADH 5'-UTR は内部に *Eco*R I サイトを、また GUS 遺伝子は内部に *Bam*H I サイトをそれぞれ含む。

IV. 使用方法

1. pRI 201-AN DNA または pRI 201-ON DNA の翻訳エンハンサー領域 (AtADH 5'-UTR または OsADH 5'-UTR) と HSP terminator の間にあるクローニングサイト MCS1 (*Nde* I/*Sal* I) 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大腸菌を用いて構築する。形質転換体は 50 μ g/ml カナマイシンを含む LB プレートで選択する。*Nde* I サイトを利用すると、エンハンサーのごく近傍に容易に目的タンパク質の開始コドンを設置することができる。(In-Fusion[®] クローニングキットを利用すると簡便に *Nde* I/*Sal* I サイトに目的遺伝子を導入することが出来る。*1) 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る^{1,4,5)}。また、*Nde* I サイトに含まれる ATG より下流に開始コドンが来る場合、*Nde* I サイトの ATG から翻訳が開始されるため、読み枠や付加されるアミノ酸などへの注意が必要である。複数の遺伝子を導入したい場合は、MCS1 に目的遺伝子をクローニングし、HSP terminator の下流にあるクローニングサイト MCS2 に発現カセット (プロモーター+エンハンサー+目的遺伝子+ターミネーター) を挿入する。(In-Fusion キットを利用すると簡便に MCS2 に発現カセットを導入することが出来る。*2) クローニング用の宿主には、*E. coli* JM109 Competent Cells (製品コード 9052) または *E. coli* HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128) をお勧めする。
2. アグロバクテリウムコンピテントセル (*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells (製品コード 9115)) 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。形質転換体は、50 μ g/ml カナマイシンおよび 100 μ g/ml ストレptomycinを含む LB プレートで選択する。(植物のプロトプラストに一過性に発現させる場合は、1. で構築したプラスミドをエレクトロポレーション法などにより導入する。)
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。

* 1 : In-Fusion クローニングキットを利用した目的遺伝子のクローニング方法 (一例)

※ In-Fusion 反応については、In-Fusion HD Cloning Kit (製品コード 639648 ほか) のユーザーマニュアルをご参照ください。

1. pRI 201-AN DNA または pRI 201-ON DNA のベクターを *Nde* I および *Sal* I で消化し、精製する。
2. 目的遺伝子の ORF 部分を PCR で増幅する。PCR 用プライマーは、5' 側はベクターの *Nde* I サイト直前の 15 塩基を、3' 側はベクターの *Sal* I サイト直後の 15 塩基をそれぞれ加えたものを使用する。

5' 側 : **CACTGTTGATACATAT**GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (pRI 201-AN 用)

5' 側 : **GAGGGGGATTACATAT**GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN (pRI 201-ON 用)

3' 側 : **ATTCAGAATTGTCG**ANNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

(太字がベクター部分、下線部は ORF の開始点に相当する。N は目的遺伝子により異なる部分を示す。)

3. PCR 産物を用いて In-Fusion キットのプロトコールに従い反応を行った後、大腸菌への形質転換を行う。

* 2 : In-Fusion クローニングキットを利用した複数遺伝子のクローニング方法 (一例)

1. 「* 1: In-Fusion クローニングキットを利用した目的遺伝子のクローニング方法」に従い、目的遺伝子 A、B の ORF を pRI201-AN DNA または pRI201-ON DNA にそれぞれクローニングする。
2. 目的遺伝子 A をクローニングした pRI 201-AN DNA または pRI 201-ON DNA を、目的遺伝子 A の配列中に切断サイトが存在しない MCS2 の 2 種類の制限酵素で消化し、精製する。(例として *Not* I、*Sma* I で切断する。)
3. 目的遺伝子 B をクローニングした pRI 201-AN DNA または pRI 201-ON DNA の発現カセット部分 (CaMV 35S promoter + AtADH (または OsADH) + 目的遺伝子 + HSP terminator) を PCR で増幅する。この時、5' 側は 2. で使用したベクターの *Not* I サイト直前の 15 塩基を、3' 側はベクターの *Sma* I サイト直後の 15 塩基をそれぞれ加えたプライマーを使用する。
4. PCR 産物を用いて In-Fusion キットのプロトコールに従い反応を行った後、大腸菌への形質転換を行う。

V. 使用例

V-1. 種々の植物における HSP terminator の評価 (Rluc を用いた一過性発現)

(方法)

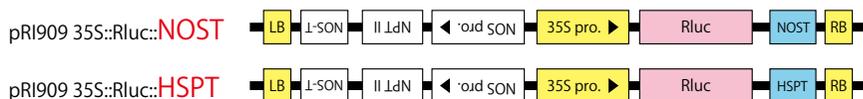
種々の植物からプロトプラストを調製し、*Renilla Luciferase* (Rluc) 遺伝子の下流に NOS terminator または HSP terminator を持つプラスミド (pRI909 ベース) を PEG 法により導入した。この時 pBI221 に組み込んだ Firefly luciferase (Fluc) をコントロールとして co-transfect した。プラスミド導入 6~7 時間後にプロトプラストからタンパク質を回収し、Rluc および Fluc の活性を測定した後、NOS terminator を持つプラスミドを用いた場合の Rluc/Fluc の値を 1 として HSP terminator を持つプラスミドを用いた場合の Rluc/Fluc の相対値を求めた。

Fluc に対する Rluc の相対値を比較した。

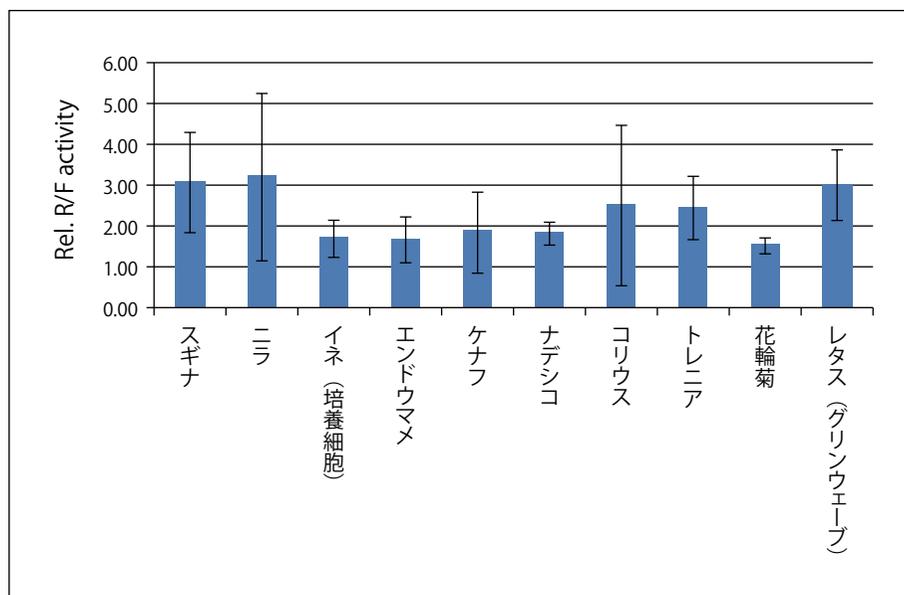
(結果)

どの植物由来プロトプラストにおいても、NOS terminator に比べ HSP terminator をもつプラスミドの方で高い発現が認められた。

テストプラスミド (Rluc)



導入効率補正用プラスミド (Fluc)



(奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座 加藤 晃先生よりデータを供与いただきました。)

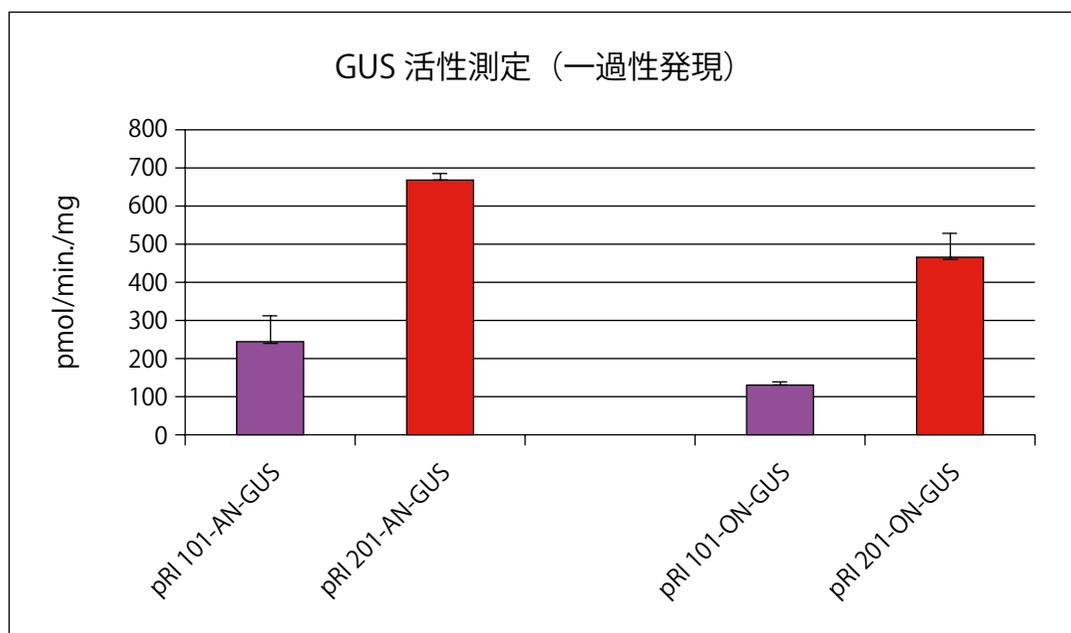
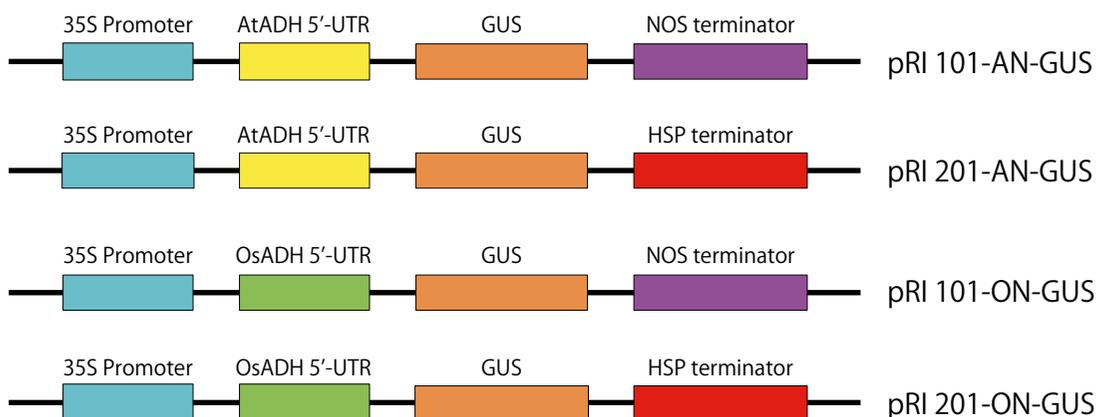
V-2. 植物培養細胞を用いた発現確認 (GUS を用いた一過性発現)

(方法)

タバコ培養細胞 BY-2 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図に示す β -glucuronidase (GUS) 遺伝子配列を持つプラスミド (pRI 101 DNA シリーズおよび pRI 201 シリーズ) を導入した。プラスミドを導入して2日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 (MUG) が分解されて生ずる 4-メチルウンベリフェロン (4MU) の蛍光強度を指標にして測定した。

(結果)

HSP terminator を持つ pRI 201 シリーズを用いた場合、NOS terminator を持つ pRI 101 DNA シリーズに比べて、2~3 倍高い GUS 活性を示した。BY-2 細胞においては、AtADH、OsADH どちらのエンハンサーでも同様の効果が観察された。



V-3. 多重遺伝子発現に対する HSP terminator の評価 (Rluc を用いた一過性発現)

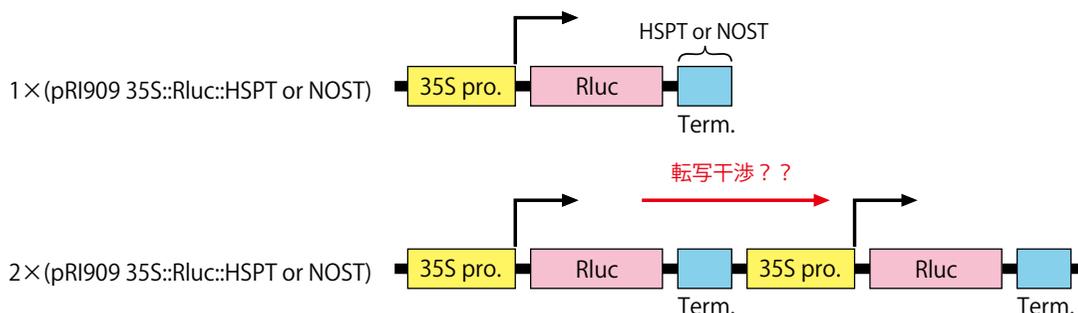
(方法)

35S promoter - Rluc - NOS terminator または 35S promoter - Rluc - HSP terminator で構成される発現カセットを 1 つ (1 ×) または 2 つタンデム (2 ×) に含む各発現プラスミドをタバコ培養細胞 BY-2 およびレタスのプロトプラストに導入した。NOS terminator と HSP terminator において、発現カセットのコピー数の Rluc 発現量への影響を比較した。この時発現カセットのモル数は 1 ×、2 ×ともに同じになるようにプラスミド量を調整した。コントロールとして用いた Fluc に対する Rluc の相対的な発現量を基に、発現カセットが 1 つの場合の発現量を 1 として発現カセットが 2 つの場合の発現量の相対比を求めた。

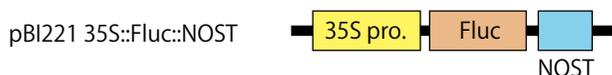
(結果)

1 ×でも 2 ×でも発現カセットの数は同じため、同程度の Rluc の発現が予想される。実際、HSP terminator の方では、発現カセットが 2 つタンデム (2 ×) の場合でも、発現カセットが 1 つ (1 ×) の場合とほぼ同程度の発現量が認められた。一方 NOS terminator の方では、発現カセットが 2 つタンデム (2 ×) になった場合、発現カセットが 1 つ (1 ×) の場合に比べ発現量は低下した。これはすなわち、NOS terminator の方では何らかの転写干渉が生じることを示唆している。一方、HSP terminator の方ではこのような転写干渉がほとんど認められず、発現カセットをタンデムに並べて複数の遺伝子を同時に発現させるのに有効であることが示された。

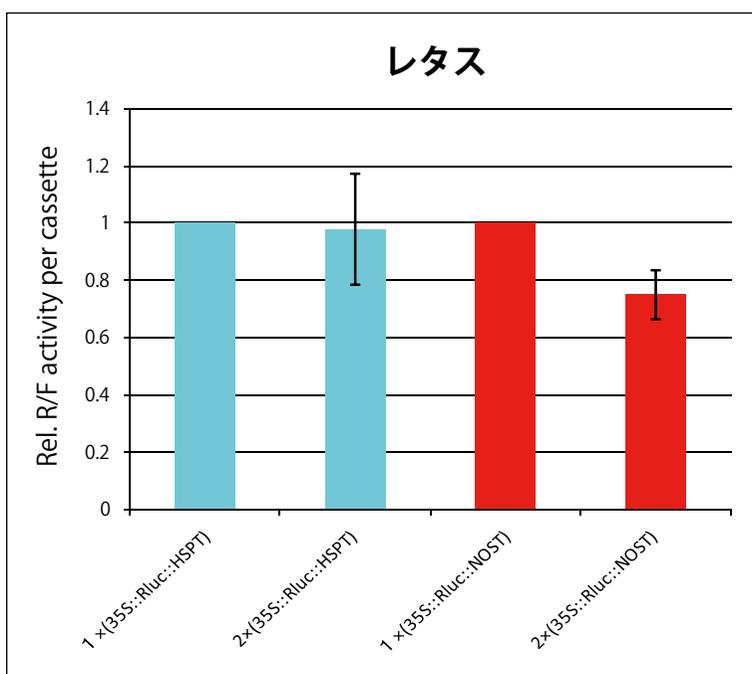
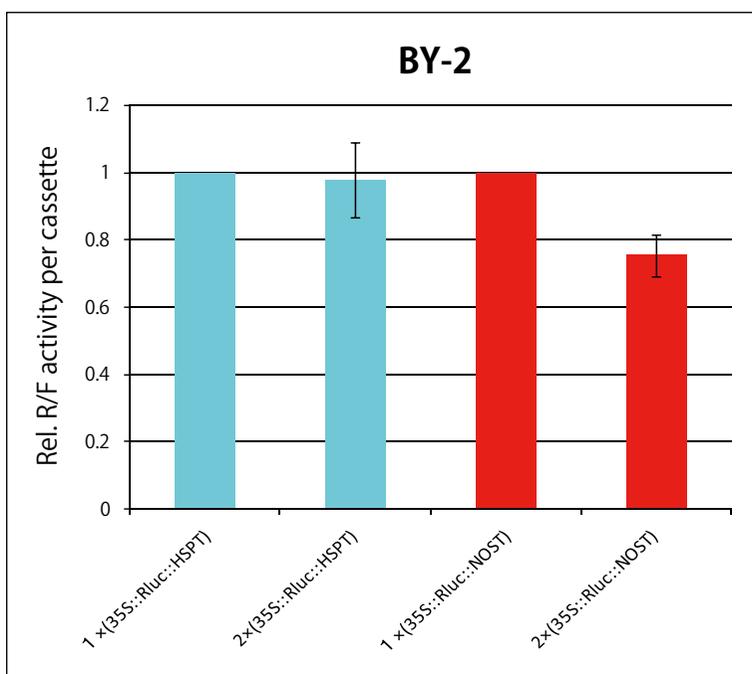
テストプラスミド (Rluc)



導入効率補正用プラスミド (Fluc)



Rluc カセットモル数が 1 × と 2 × で同じになるように
プラスミド量を調整して、テストプラスミドを導入



(奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 植物代謝調節学講座 加藤 晃先生よりデータを供与いただきました。)

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) S. Nagaya, K. Kawamura, A. Shinmyo, and K. Kato. *Plant & Cell Physiology*. (2010) **51**(2): 328-332.
- 3) R. Nishiguchi, M. Takanami, and A. Oka. *Molecular and General Genetics*. (1987) **206**: 1-8.
- 4) J. Satoh, K. Kato and A. Shinmyo. *J Bioscience and Bioengineering*. (2004) **98**(1): 1-8.
- 5) T. Sugio, H. Matsuura, T. Matsui, M. Matsunaga, T. Noshio, S. Kanaya, A. Shinmyo, and K. Kato. *J Bioscience and Bioengineering*. (2010) **109**(2): 170-173.

VII. 関連製品

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 Electro-Cells (製品コード 9115)
pRI 909 DNA (製品コード 3260)
pRI 910 DNA (製品コード 3261)
pRI 101-AN DNA (製品コード 3262)
pRI 101-ON DNA (製品コード 3263)
In-Fusion® HD Cloning Kit (製品コード 639633 ~ 639650)
E. coli JM109 Competent Cells (製品コード 9052)
E. coli HST08 Premium Competent Cells (製品コード 9128)

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。
- ・In-Fusion は Takara Bio USA, Inc. の登録商標です。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