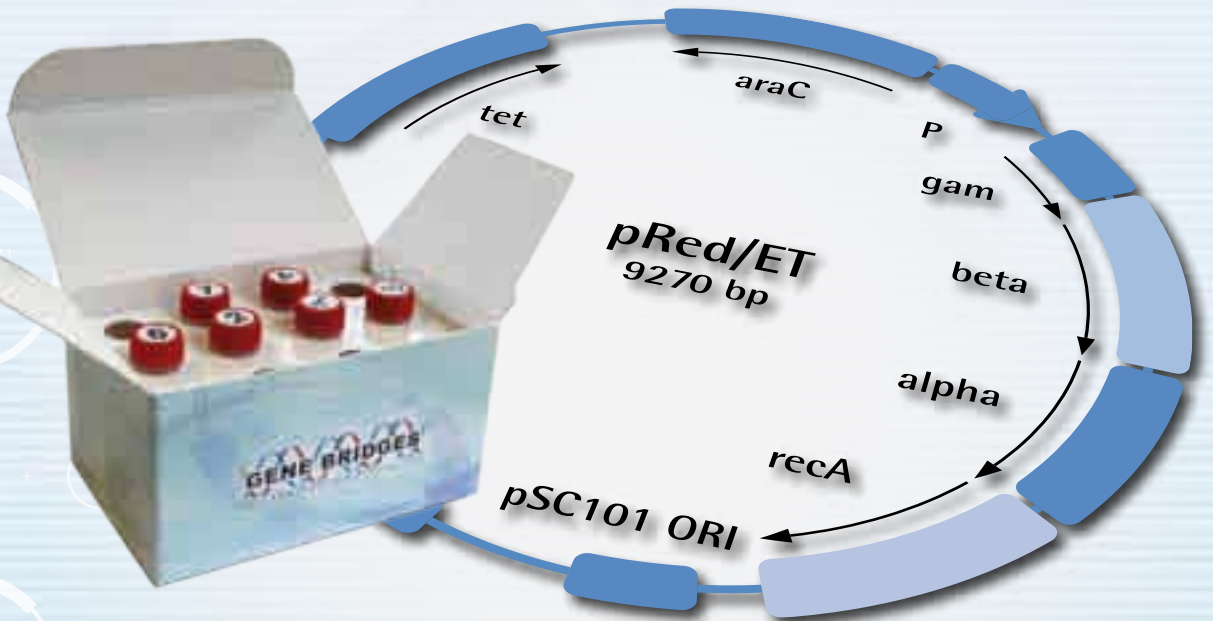


Red/ET Recombination (Red/ET相同組換え法)

制限酵素を使わないクローニング



次世代クローニングの手引き

Red/ET 相同組換え法

正確，迅速なクローニング

目次

| | |
|----------------------------------|----|
| 1. テクノロジー | 3 |
| 2. アプリケーション | |
| ・ターゲティングベクターの構築 | 5 |
| ・ <i>E. coli</i> 株の最適化 | 8 |
| 3. 製品 | 11 |

斬新な組換え DNA 技術である Red / ET 組換え法は Gene Bridges 社の創始者の一人である Prof. A. Francis Stewart により考案されたもので、Gene Bridges 社は EMBL (European Molecular Biology Laboratory) よりその特許の独占的通常実施権を得ています。Red / ET 組換え法は DNA クローニングと変異体作製の分野においてサイズ、精密な操作、改変の点で飛躍的な進歩をもたらす技術です。

Red/ET による相同組換え法は、他の組換え DNA 技術 (例: 制限酵素, PCR, DNA リガーゼを用いた方法) とは下記の点で異なります。

特長

- DNA のサイズによる制約を受けません
- 制限酵素切断部位に依存せずにどんな部位でも改変できます

サイズの大きな配列でもクローニングでき、また、DNA 配列中の任意の位置に目的配列の挿入 / 欠失 / 変異などの改変が行えます。

本カタログでは、Gene Bridges 社が誇る画期的な遺伝子改変ツール Red / ET 組換え法のテクノロジー、アプリケーション、製品および受託サービスをご紹介します。

Red/ET 相同組換え法

Red/ET 相同組換え法とは

Red/ET 相同組換え法は、プラスミド、BAC、*E. coli* ゲノムの改変を従来のクローニング法よりも迅速、自由自在かつ正確に行うことができます。

Red / ET は、*E. coli* 内での λファージによる相同組換え機構を利用しています。制限酵素処理やライゲーション反応、酵素反応後の DNA 精製は不要で、サイズの大きい配列のクローニングに最適です。

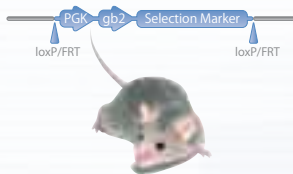
Red/ET 相同組換え法の特長

- 組換えに必要な相同配列はわずか 50 bp だけ
- 特定の DNA 配列に依存しない
- どんな部位にも正確に導入可能
- 制限酵素処理およびライゲーション反応は不要
- 80 kb までのクローニング導入実績

遺伝子ターゲティング動物の構築

Red/ET は、モデル動物作製のためのテラーメイドの遺伝子ターゲティングを可能にします。

- コンディショナルノックアウト／ノックイン
- プロモーターまたはレポーターの融合
- エキソンスワップ
- 点変異の導入



E. coli 株の改変

Red / ET は、*E. coli* のゲノム DNA を簡単に改変できます。

- 遺伝子破壊、挿入または欠失
- レポーター遺伝子やタグの導入
- プロモーターの最適化
- 点変異の導入



Red/ET 相同組換え法関連特許

US Patent Nos. 6,355,412 and 6,509,156B by Stewart *et al.*

European Patent No. EP 1034260 B1

Japanese Patent No. 4139561

Patent Application PCT/EP98/07945, Novel DNA Cloning Method (ET).

U.S. Patent Application No. 09/350,830, Methods And Compositions For Directed Cloning and Sub-cloning Using Homologous Recombination.

Gene Bridges 社は、これらの技術をキット製品としてご提供している他、受託サービスも承っております。

Red/ET による 3 つの簡単なステップ

3 つの簡単ステップ

pRed/ET ベクターを有する *E. coli* では、 λ ファージ由来の Red 遺伝子の発現によって Red α (エクソヌクレアーゼ) と Red β (DNA 結合タンパク質) が生成され、これらにより、両末端にホモロジーアームを持つ直鎖状 DNA 断片の正確な組換えが行われます。

以下の基本的な 3 ステップで遺伝子改変が可能です。

1. ホモロジーアームの付加
2. 相同組換え
3. セレクション

参考文献

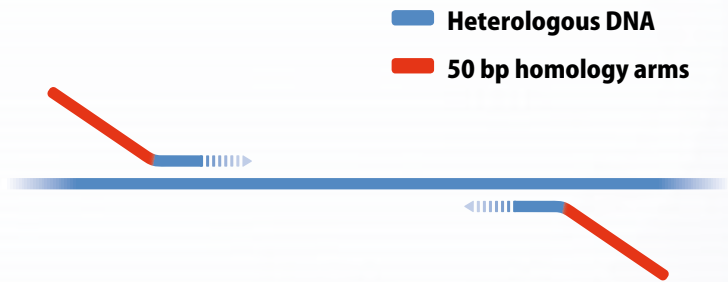
Zhang, Y., Buchholz, F., Muyrers, J.P.P. and Stewart, A.F., "A new logic for DNA engineering using recombination in *E. coli*." **Nature Genetics** 20 (1998) 123-128.

Muyrers, J.P.P., Zhang, Y., Testa, G., Stewart, A.F., "Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination." **Nucleic Acids Res.** 27 (1999) 1555-1557.

Zhang, Y., Muyrers, J.P.P., Testa, G. and Stewart, A.F., "DNA cloning by homologous recombination in *E. coli*." **Nature Biotechnology** 18 (2000) 1314-1317.

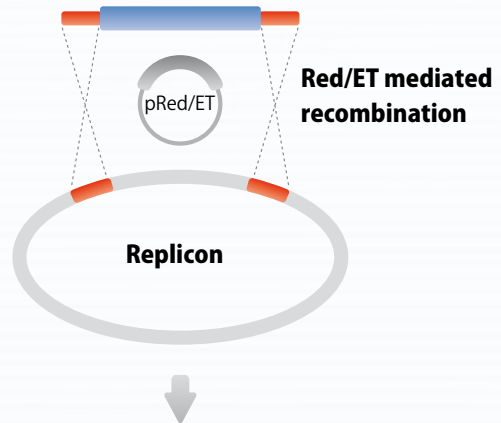
1. ホモロジーアームの付加

Red/ET 相同組換え法では、直鎖 DNA の両末端にわずか 50 bp のホモロジーアームがあれば組換えが可能です。ホモロジーアームは PCR によって簡単にどこにでも付加できます。



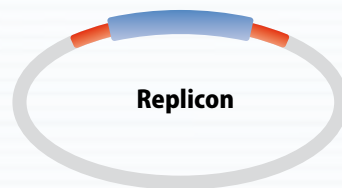
2. 相同組換え

ホモロジーアームを付加した目的 DNA 断片を pRed/ET ベクターを有する *E. coli* に導入します。pRed/ET ベクターの発現を誘導すると相同組換えにより目的の領域が改変されます。



3. セレクション

目的領域が改変された *E. coli* をセレクションする。



ターゲティングベクターの構築 (1)

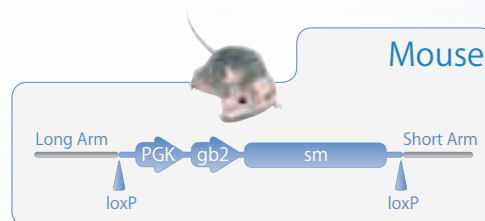
Red/ET 相同組換え法を使用して、モデル動物作製のためのターゲティングベクターが構築できます

Gene Bridges 社のキットおよび、クローニング受託サービスを利用して、組換え DNA 技術の最先端であるテラーメイドターゲティングが行えます。医薬、生物工学、基礎研究分野でのニーズに応えます。

トランスジェニック技術は、発生生物学や遺伝的疾患研究に必須な技術です。

Red / ET 組換え法は、塩基配列やサイズに依存せずに *in vivo* での DNA 改変が可能です。Gene Bridges 社の各種組換えキットにより、迅速で正確なターゲティングベクターの構築が可能です。

また、Gene Bridges 社では以下の受託サービスも承っております。お気軽にご相談下さい。



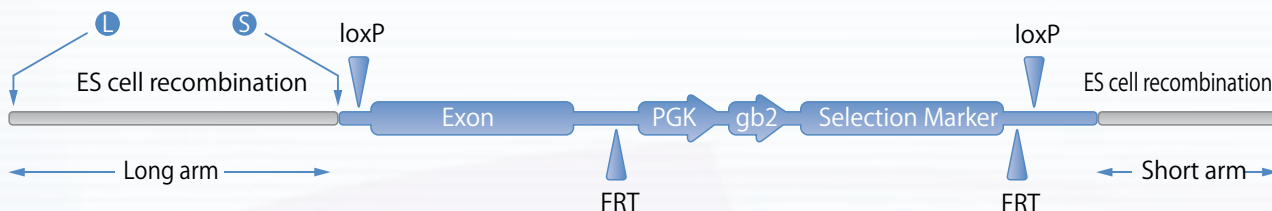
受託サービスの内容

- プロジェクトのデザインと検証方法をサポート
- ES 細胞の相同組換え、または未分化胎芽細胞へのマイクロインジェクションを効率良く行うためのコンストラクトの最適化
- 詳細な報告書の作成

コンストラクトのサイズ

コンストラクトは、高コピープラスミドの場合 30 kb まで、低コピープラスミドの場合 50 kb までのサイズが構築可能です。

基本的なターゲティングコンストラクト



効率的な ES 細胞の相同組換えのためには、ターゲティングコンストラクトのホモロジーアームの長さはそれぞれ 5 kb (Short arm) および 10 kb (Long arm) までデザイン可能です。リアライゼーション (L) とスクリーニング (S) を目的とした制限酵素切断部位を容易に組み込むことができます。

ターゲティングベクターの構築 (2)

ターゲティングベクター構築 受託サービスの作業フロー

1. 遺伝子名 (NCBI Accession No.) と
改変の内容をご提供下さい。
2. コンストラクトデザインをお客様に
提出し、ご確認いただきます。
3. マウス C57/BL6 系統または 129Sv
由来の BAC クローンを用意いたし
ます。
4. 効率よく ES 細胞の組換えが行える
ように、5 kb 以上のホモロジーア
ームを有する 18 kb 未満の配列を組
み込んだ高コピープラスミドを作製
します。ご要望に応じて 20 kb を超
える低コピープラスミドもご用意で
きます。
5. シークエンシングによって最終的な
ターゲティングコンストラクトが正確
であるか確認します。
6. お客様に、構築したプラスミドを含
む *E. coli* のグリセロールストックと
詳細な報告書を納品いたします。

フナコシ株式会社 (日本販売代理店) :

☎ 03-5684-1620

@ reagent@funakoshi.co.jp

Gene Bridges GmbH 日本代理店 :

☎ 03-5794-9730

@ genebridges@eujapan.co.jp

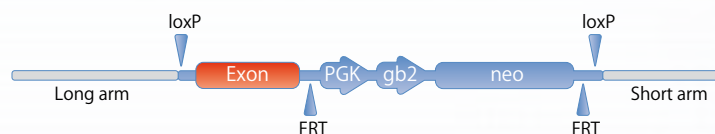
Gene Bridges GmbH 本社 :

☎ +49 6221 13708 11

@ info@genebridges.com

コンディショナルノックアウト用ターゲティングコンストラクト

loxP で挟まれたエクソン部分を Cre recombinase によって欠損させることができ、目的遺伝子の機能解析に使用できます。



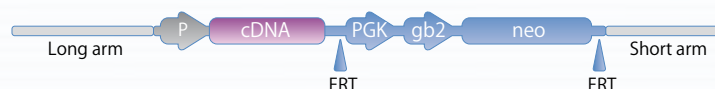
レポーターコンストラクト

発現パターンに影響が出ないように、余分な配列を含まずに染色体上のプロモーターの下流にレポーター遺伝子を組み込むことができ、遺伝子発現解析に使用できます。



プロモーター融合コンストラクト

発現パターンに影響が出ないように、余分な配列を含まずに任意の cDNA を目的プロモーターの下流に組み込めます。



ターゲティングベクターの構築 (3)

点変異導入用ターゲティングコンストラクト

どんな場所にも一塩基置換を導入できるので、モデル動物における SNP の影響を検討できます。



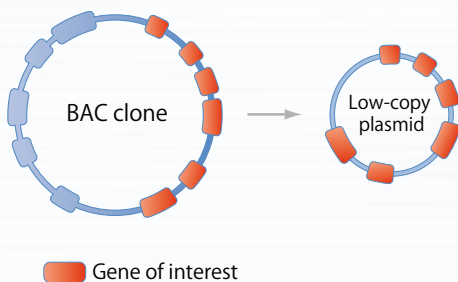
モデル動物作製用ターゲティングコンストラクト

標的のエキソンをヒトエキソンと置き換えることで、ヒトアレルにおける薬剤の影響などを解析できます。



最適化された導入遺伝子コンストラクト

BAC クローン中の 50 kb までの完全長のゲノム遺伝子座を低コピープラスミドに組み込みます。不要な配列が取り除かれ、ターゲティングベクターとして最適なコンストラクトが得られます。



コンストラクト中の導入遺伝子にイントロンが含まれる場合、遺伝子発現の確実性が向上します。

E. coli 株の最適化 (1)

E. coli 株最適化のための 受託サービス作業フロー

1. 配列情報とお手持ちの *E. coli* 株*
をご提供下さい。
2. プロジェクトのデザインを最適化し
て、お客様に提出し、ご確認いた
だきます。
3. シークエンシングによりクローンの
完全性を確認します。
4. お客様に *E. coli* グリセロールストッ
クと詳細な報告書を納品します。

*一般的な *E. coli* 株の場合は
Gene Bridges 社にてご用意できます。

フナコシ株式会社 (日本販売代理店):

☎ 03-5684-1620

@ reagent@funakoshi.co.jp

Gene Bridges GmbH 日本代理店:

☎ 03-5794-9730

@ genebridges@eu-japan.co.jp

Gene Bridges GmbH 本社:

☎ +49 6221 13708 11

@ info@genebridges.com

Red/ET 相同組換え法で、*E. coli* 株を最適化できます

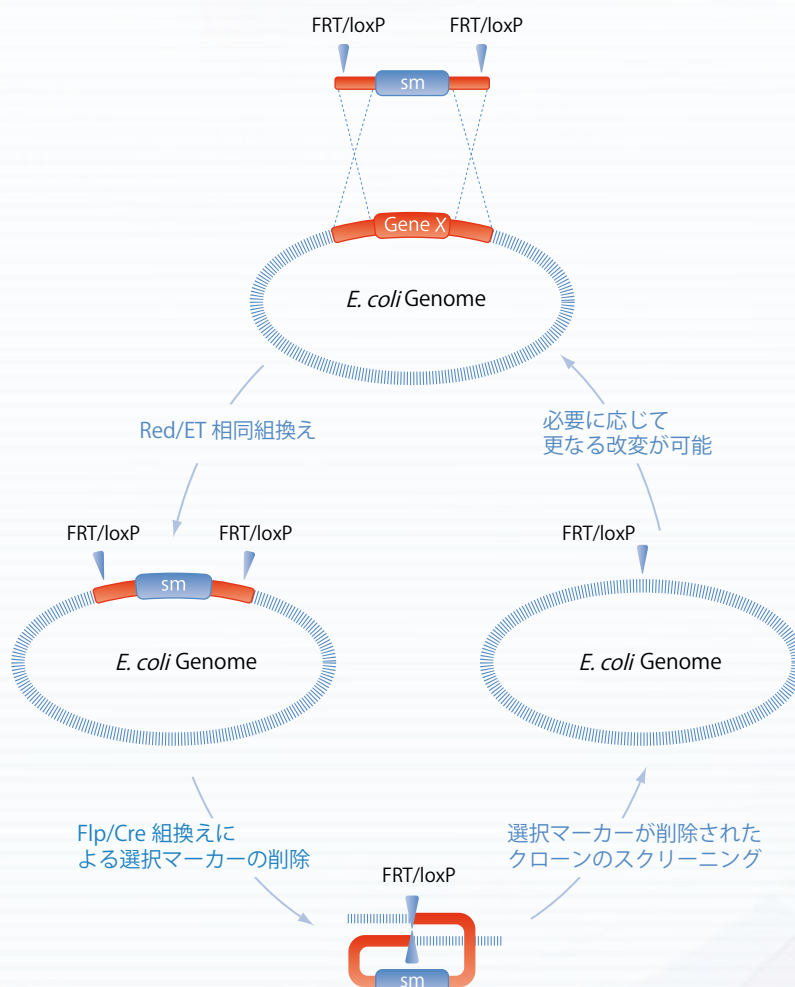
E. coli はモデル生物として用いられているだけでなく、生物工学分野における微生物工場としても多用されています。Red / ET 組換え法により、正確で迅速な *E. coli* 染色体の改変が可能です。

- 遺伝子の破壊、欠失、挿入、改変
- レポーター遺伝子またはタグの導入
- プロモーターの最適化

Gene Bridges 社の組換えキットや機能性力セットにより、改変型の *E. coli* を作製できます。また Gene Bridges 社では、これらの受託サービスも承っております。

マーカー配列なしでの *E. coli* 遺伝子のノックアウト

Flp/Cre テクノロジーを組み合わせることにより、選択マーカーなどの余分な配列を残さずに、複数の遺伝子の改変ができます。



E. coli 株の最適化 (2)

シームレスな改変

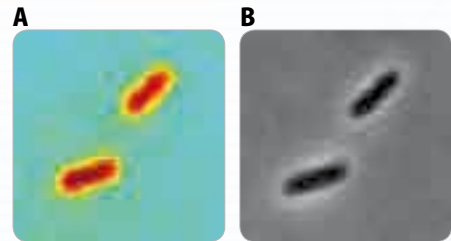


カウンターセクションカセット (rpsL-sm 遺伝子) によって点変異の導入またはシームレスな改変を行うことができます。

レポーター遺伝子またはタグの導入

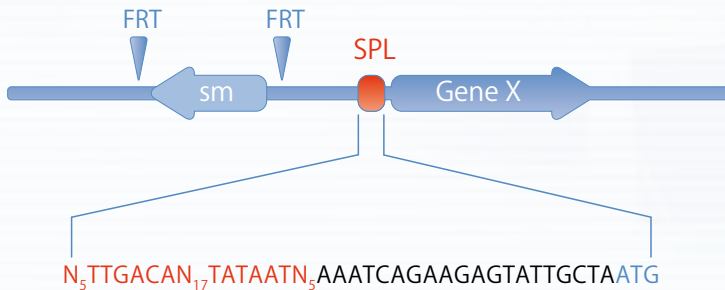


染色体にレポーター遺伝子を組み込んだ株により、シングルコピー遺伝子の発現を解析できます。

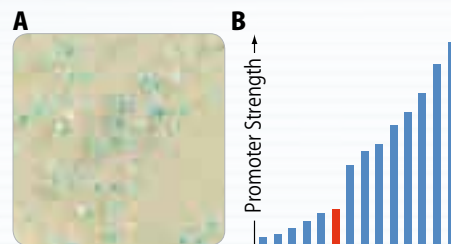


GeneX と cfp (シアン融合タンパク質) を染色体に融合させて標識した *E. coli*
A. 蛍光顕微鏡像 **B.** 暗視野顕微鏡像
 写真提供: Stavans Lab (Weizman Institutes of Science: イスラエル)

プロモーターの最適化



合成プロモーターライブラリー (SPL) を目的遺伝子と融合させ、遺伝子発現を最適化することができます。



合成プロモーターライブラリーの制御下における *pgi-lacZ* の活性
A. 形質転換体は、X-gal の存在下で濃紺色のコロニーを形成します
B. SPL クローンのサブセットのプロモーター活性。赤: 内在性プロモーター (*Biotechniques*, vol 45, No.3, 2008)。

大きな断片のクローニング

BAC クローンリソースセンター

BPRC

BACPAC Resource Center at
Children's Hospital Oakland
Research Institute

<http://bacpac.chori.org>

Geneservice

<http://www.geneservice.co.uk>

AGI

Arizona Genomics Institute
<http://www.genome.arizona.edu>

CUGI

Clemson University Genomics Institute
<http://www.genome.clemson.edu>

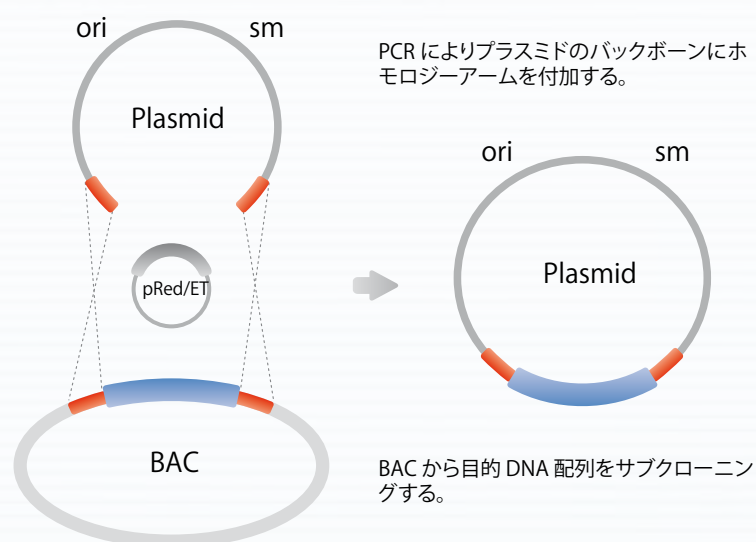
Red/ET 相同組換え法で巨大 BAC ライブラリーが利用できます

現在までに 400 以上の真核生物のゲノムプロジェクトが進行中または終了しています。これらのプロジェクトにより、遺伝子情報が明らかな巨大インサートを有する BAC クローンライブラリーが利用できるようになりました。

Red / ET 相同組換え法は、BAC ライブラリーからのサブクローニングを簡単に行えます。配列の種類に関係なく、大きなゲノム断片でも、ギャップ修復によってクローニングが可能です。この方法は、PCR の fidelity や増幅限界サイズによる制限を受けません。

BAC サブクローニングの特長

- 大きい断片を迅速かつ簡単にクローニング可能。
- 高コピープラスミドの場合、最大 30 kb までクローニング可能。
- 低コピープラスミドの場合、最大 80 kb までクローニング可能。
- 制限酵素部位に関わらずクローニング可能。
- 目的配列の末端に機能性カセットや制限酵素サイトを容易に挿入可能。

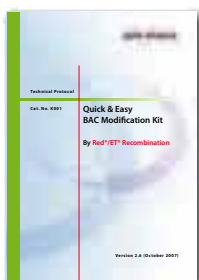


相同組換えキット (1)

Gene Bridges 社では、ご自身で簡単に Red/ET 相同組換えを行える様々なキット、機能性カセットおよびプラスミドを取りそろえています。



Quick & Easy BAC Modification Kit

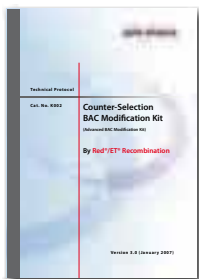


Cat.No. K001

BAC に様々な改変を行うキット。目的遺伝子と置換し、破壊することも可能。

機能性カセット：Tn5-neo^R

Counter - Selection BAC Modification Kit

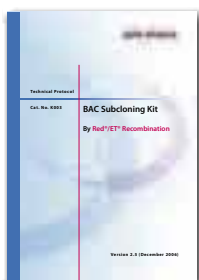


Cat.No. K002

BAC クローンまたは *E. coli* ゲノムへの点変異挿入などのために開発されたキット。

機能性カセット：rpsL-neo^R カウンターセクション

BAC Subcloning Kit



Cat.No. K003

BAC または *E. coli* 染色体から最長 30 kb までの断片をサブクローニングするために開発されたキット。

機能性カセット：直線状ベクター (ColE1 ori-amp^R)

キット内容

- pRed/ET 発現プラスミド
- 機能性カセット
- コントロール
- 詳細なマニュアル、図、シーケンス情報など

大学または官公庁の研究所 (Academic) にご所属の方は、各種キット、機能性カセット、プラスミドをご購入いただけます。Gene Bridges 社のウェブサイトから注文できます。

www.genebridges.com

または、日本の販売代理店からもご購入いただけます。

フナコシ株式会社

☎ 03-5684-1620

reagent@funakoshi.co.jp

営利団体または企業 (Commercial Entity) にご所属の方が Red / ET Recombination 技術を使用するためには、Gene Bridges 社とライセンス契約を締結していただくほか、ライセンス料が別途必要となります。詳細はフナコシ株式会社または下記までお問い合わせ下さい。

Gene Bridges GmbH 日本代理店：

☎ 03-5794-9730

@ genebridges@eujapan.co.jp

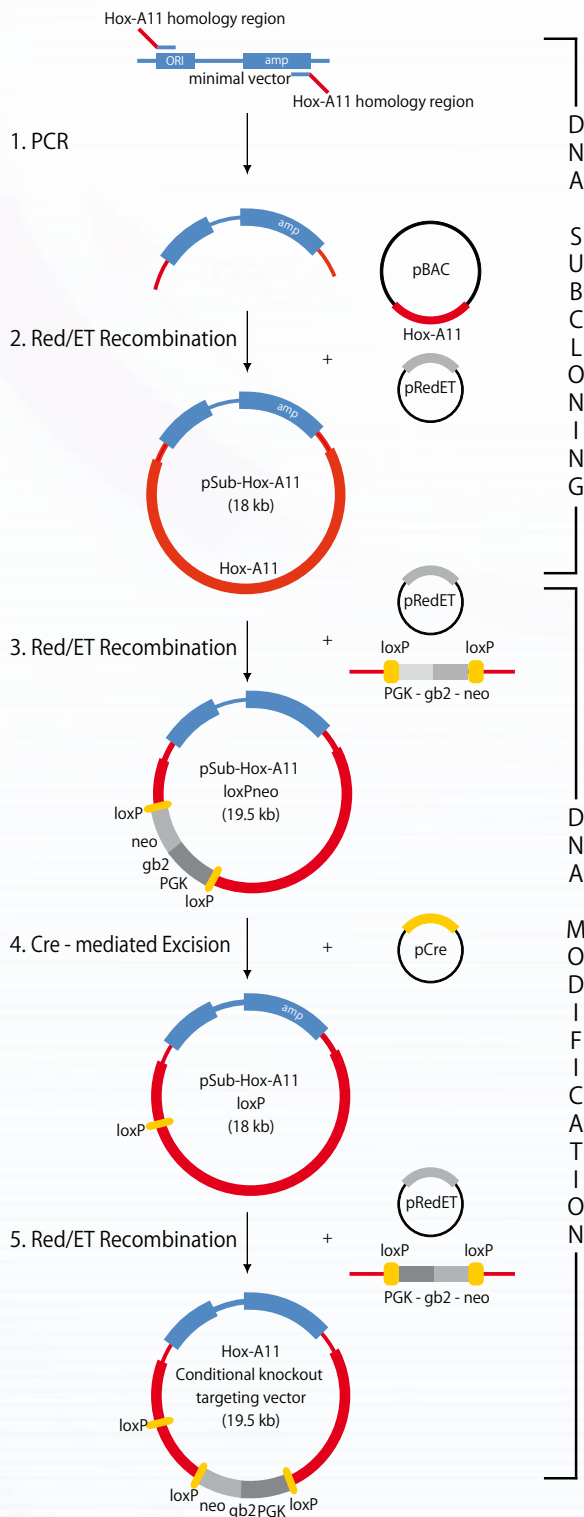
Gene Bridges GmbH 本社：

☎ +49 6221 13708 11

@ info@genebridges.com

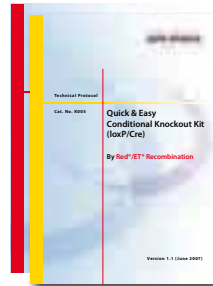
相同組換えキット (2)

コンディショナルノックアウトベクターの構築



BAC Subcloning Kit と Quick & Easy Conditional Knock-Out Kit (loxP/cre) を使用したマウスホメオボックススタンパク質 Hox-A11 に対するコンディショナルノックアウトベクターの構築

Quick & Easy Conditional Knockout Kit



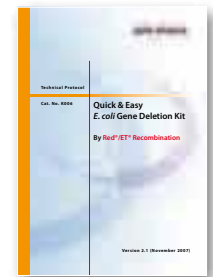
Cat.No. K004 (loxP), K005 (FRT)

FRT または loxP サイトをそれぞれ高コピープラスミドの任意の場所に挿入できるキット。Flp または Cre 発現プラスミドが含まれている。

機能性カセット:

loxP-PGK-gb2-neo-loxP (K004)
FRT-PGK-gb2-neo-FRT (K005)

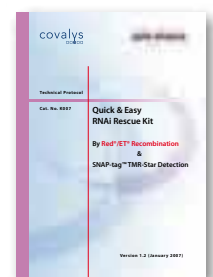
Quick & Easy *E. coli* Gene Detection Kit



Cat.No. K006

E. coli の遺伝子欠損株作製用キット。リコンビナーゼ発現プラスミド A104 または A105 (p.14 参照) と組み合わせて選択マーカを残さずに改変が可能。

Quick & Easy RNAi Rescue Kit



Cat.No. K007

RNAi でノックダウン (Loss of Function: LOF) した細胞の表現型確認のために SNAP- タグカセットを BAC クローンに挿入するキット。BAC に導入した SNAP- タグカセットの発現により、トランスフェクション効率を確認できる。

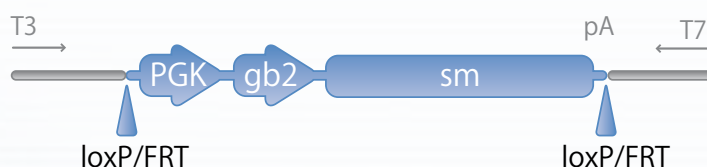
機能性カセット

Red/ET 組換えキットに追加して機能性カセットを用いることにより、様々なアプリケーションに対応できます。

機能性カセットの特長

- 真核細胞のプロモーター（PGK）を有するカセットと、原核細胞のプロモーター（gb2）を有するカセットがあります。
- loxP または FRT- サイトを有するカセットは、必要に応じて Cre または Flp 組換えによって選択マーカーを取り除くことができます。
- 機能性カセットは、マスタープライマーを用いて PCR で増幅できます。
- 機能性カセットは、偽陽性クローンを避けるために自殺プラスミド上にコードされているため、バックグラウンドはほとんど出ません。

機能性カセットの基本的構造

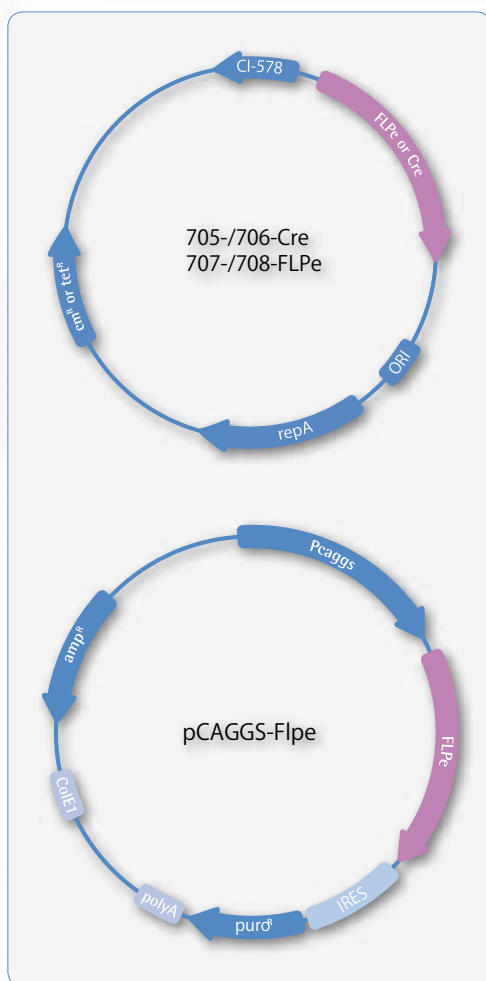


機能性カセットの一覧

| Cat.No. | Cassette | <i>E. coli</i> Selection | Mammalian Selection |
|---------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
| A001 | PGK-gb2-neo | kan ^R | neo ^R |
| A002 | FRT-PGK-gb2-neo-FRT | kan ^R | neo ^R |
| A003 | loxP-PGK-gb2-neo-loxP | kan ^R | neo ^R |
| A004 | FRT-PGK-gb2-neo-FRT-loxP | kan ^R | neo ^R |
| A005 | loxP-FRT-PGK-gb2-neo-FRT | kan ^R | neo ^R |
| A006 | FRT-gb2-cm-FRT | cm ^R | - |
| A007 | loxP-gb2-cm-loxP | cm ^R | - |
| A008 | FRT-gb2-amp-FRT | amp ^R | - |
| A009 | loxP-gb2-amp-loxP | amp ^R | - |
| A010 | FRT-PGK-gb2-hygro-FRT | hyg ^R | hyg ^R |
| A011 | loxP-PGK-gb2-hygro-loxP | hyg ^R | hyg ^R |

PGK：真核細胞プロモーター
 gb2：原核細胞プロモーター
 FRT：Flp 認識ターゲットサイト
 loxP：Cre 認識ターゲットサイト
 neo：ネオマイシンカン
 kan：カナマイシン
 cm：クロラムフェニコール
 amp：アンピシリン
 hyg：ハイグロマイシン

リコンビナーゼ発現プラスミド



Cre, FLPe* リコンビナーゼを発現するプラスミドは、効果的な部位特異的組換えが行えるように最適化されています。

* FLPe は、野生型 FLP から改変された温度安定性のタンパク質で、37 °C で高い活性を示します。(Buchholz, *et al.*, **Nature Biotechnology**, 16:657-662 (1998))

原核細胞用発現プラスミド FLPe / Cre

- FRT または loxP 配列に挟まれた領域の除去に有用です。
- 遺伝子発現とプラスミドの増殖は、温度によって厳密に制御されています。
- 各種抗生物質耐性マーカーを有する製品があります。
- ColE1 ベースのプラスミドと互換性があります。

(例：pUC, pBS あるいは pBR322 派生株, RK2, R6K, コスミド, P1, BAC)

| Cat.No. | Plasmid / Recombinase | Selection |
|---------|-----------------------|------------------|
| A104 | 707-FLPe | tet ^R |
| A105 | 708-FLPe | cm ^R |
| A112 | 705-Cre | cm ^R |
| A113 | 706-Cre | tet ^R |

真核細胞用発現プラスミド FLPe

- FRT 配列に挟まれた領域 (例：哺乳類のネオマイシン耐性マーカー) の除去に有用です。

| Cat.No. | Plasmid / Recombinase | Selection |
|---------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| A201 | pCAGGS-FLPe (for Academic) | puro ^R , amp ^R |
| A202 | pCAGGS-FLPe (for Commercial Entities) | puro ^R , amp ^R |

真核生物用発現プラスミド FLPe をご使用の際は、pCAGGS-FLPe Material Transfer Agreement の契約締結が必要です。詳細は最終ページに記載の連絡先までお問い合わせ下さい。

puro : ピューロマイシン
 CAGGS : 真核生物プロモーター
 CI-578 : 原核プロモーター

お問い合わせ

詳細な情報をご希望の方は、本ページをコピーして下記のフォームにご記入の上、FAXにてお問い合わせ下さい。

FAX : 03-5684-1775 (フナコシ株式会社) または

FAX : 03-5794-9731 (Euro Japan Marketing Limited)

興味のある内容にチェックして下さい。

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> 動物の遺伝子ターゲティングベクター構築 | <input type="checkbox"/> <i>E. coli</i> の遺伝子改変 |
| <input type="checkbox"/> Gene Bridges 社の受託サービス | <input type="checkbox"/> 商用ライセンス |

ご質問あるいはご意見

.....

.....

.....

.....

.....

.....

お名前

企業名/施設名.....

住所.....

.....

.....

電話番号 メールアドレス.....

大学または官公庁の研究所（Academic）にご所属の方は、各種キット、機能性カセット、プラスミドをご購入いただけます。Gene Bridges 社のウェブサイトから注文できます。

www.genebridges.com

または、日本の販売代理店からもご購入いただけます。

フナコシ株式会社

〒 113-0033

東京都文京区本郷 2 丁目 9 番 7 号

E-Mail info@funakoshi.co.jp

Web www.funakoshi.co.jp

試薬に関して:

Phone (03)5684-1620

Fax (03)5684-1775

E-Mail reagent@funakoshi.co.jp

機器に関して:

Phone (03)5684-1619

Fax (03)5684-5643

E-Mail kiki@funakoshi.co.jp

営利団体または企業（Commercial Entity）にご所属の方が Red / ET Recombination 技術を使用するためには、Gene Bridges 社とライセンス契約を締結していただくほか、ライセンス料が別途必要となります。詳細はフナコシ株式会社または下記までお問い合わせ下さい。

Euro Japan Marketing Limited

Gene Bridges GmbH 日本代理店

〒 153-0051

東京都目黒区上目黒2-44-9-702

Phone (03)5794 9730

Fax (03)5794 9731

E-Mail genebridges@eujapan.co.jp

連絡先

代表取締役 Christopher JACKSON

Gene Bridges GmbH

Im Neuenheimer Feld 584

69120 Heidelberg

Germany

Phone +49 (0)6221 13708 10

Fax +49 (0)6221 13708 29

E-Mail contact@genebridges.com

Web www.genebridges.com

Court of Jurisdiction

Amtgericht Mannheim, HRB 338013

VAT ID / Umsatzsteuer-Ident-Nr.

DE 213116680

Authorised to Represent

Gary Stevens, Youming Zhang, Francis Stewart