

Improved GATEWAY Binary Vector (ImpGWB)

- 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、Hygromycin、Basta、Tunicamycin、単独耐性のシリーズ (4 シリーズ) 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下さい)。
- 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。
 - I. pGWB の使用は基礎研究に限ります。
 - II. 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)
島根大学研究機構総合科学研究支援センター
遺伝子機能解析部門
松江市西川津町 1060
TEL 0852-32-6595
FAX 0852-32-6109
e-mail 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 *Hind*III – *Sac*I の間 に入っています。
- ・ pGWB4xx は kanamycin 耐性、pGWB5xx は hygromycin 耐性、pGWB6xx は BASTA 耐性、pGWB7xx は Tunicamycin 耐性ベクターです。それぞれの選択マーカーは Pnos でドライブされます。pGWB5xx では Pnos 上流に微生物プロモーター配列も追加されているため、大腸菌やアグロバクテリウムで hygromycin 耐性となります。(pGWB4xx の Pnos には微生物プロモーターが追加されていません。pGWB4xx は大腸菌ではカナマイシン耐性を付与しません。)
- ・ pGWBn01 はクローニング用、pGWBn02 は 35S による発現用、4 以降は tag を付加するためのベクターです。

n は 4 (401 etc, kanamycin resistance)、5 (501 etc, hygromycin resistance)、6 (601 etc, BASTA resistance)、7 (701 etc, tunicamycin resistance)のいずれかを示します。

- (1) pGWBn01 : [(no promoter, no tag) (--R1-CmR-*ccd*B-R2 --)]
- (2) pGWBn02 : [(35S promoter, no tag) (--35S promoter-R1-CmR-*ccd*B-R2--)]
- (3) pGWBn02-Ω : [(2x35S enhancer-Ω promoter, no tag) (--2x35S-Ω-R1- CmR-*ccd*B-R2-GUS--)]
- (4) pGWBn04 : [(no promoter, C-sGFP) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-sGFP--)]
- (5) pGWBn05 : [(35S promoter, C-sGFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-sGFP--)]
- (6) pGWBn06 : [(35S promoter, N-sGFP) (--35S promoter-sGFP-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]
- (7) pGWBn07 : [(no promoter, C-6xHis) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-6xHis--)]
- (8) pGWBn08 : [(35S promoter, C-6xHis) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-6xHis--)]
- (9) pGWBn09 : [(35S promoter, N-6xHis) (--35S promoter-6xHis-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]
- (10) pGWBn10 : [(no promoter, C-FLAG) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-FLAG--)]
- (11) pGWBn11 : [(35S promoter, C-FLAG) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-FLAG--)]
- (12) pGWBn12 : [(35S promoter, N-FLAG) (--35S promoter-FLAG-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]
- (13) pGWBn13 : [(no promoter, C-3xHA) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-3xHA--)]
- (14) pGWBn14 : [(35S promoter, C-3xHA) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-3xHA--)]
- (15) pGWBn15 : [(35S promoter, N-3xHA) (--35S promoter-3xHA-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]
- (16) pGWBn16 : [(no promoter, C-4xMyc) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-4xMyc--)]
- (17) pGWBn17 : [(35S promoter, C-4xMyc) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-4xMyc--)]
- (18) pGWBn18 : [(35S promoter, N-4xMyc) (--35S promoter-4xMyc-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]
- (19) pGWBn19 : [(no promoter, C-10xMyc) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-10xMyc--)]
- (20) pGWBn20 : [(35S promoter, C-10xMyc) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-10xMyc--)]
- (21) pGWBn21 : [(35S promoter, N-10xMyc) (--35S promoter-10xMyc-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]
- (22) pGWBn22 : [(no promoter, C-GST) (--R1- CmR-*ccd*B-R2-GST--)]
- (23) pGWBn23 : [(35S promoter, C-GST) (--35S promoter-R1- CmR-*ccd*B-R2-GST--)]
- (24) pGWBn24 : [(35S promoter, N-GST) (--35S promoter-GST-R1- CmR-*ccd*B-R2--)]

- (25) pGWBn25 : [(no promoter, C-T7) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-T7--)]
- (26) pGWBn26 : [(35S promoter, C-T7) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-T7--)]
- (27) pGWBn27 : [(35S promoter, N-T7) (--35S promoter-T7-R1- CmR-*ccdB*-R2--)]
- (28) pGWBn28 : [(no promoter, C-TAP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-TAP--)]
- (29) pGWBn29 : [(35S promoter, C-TAP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-TAP--)]
-
- (33) pGWBn33 : [(no promoter, C-GUS) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-GUS--)]
- (35) pGWBn35 : [(no promoter, C-LUC) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-LUC--)]
-
- (40) pGWBn40 : [(no promoter, C-EYFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-EYFP--)]
- (41) pGWBn41 : [(35S promoter, C-EYFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-EYFP--)]
- (42) pGWBn42 : [(35S promoter, N-EYFP) (--35S promoter-EYFP-R1- CmR-*ccdB*-R2--)]
- (43) pGWBn43 : [(no promoter, C-ECFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-ECFP--)]
- (44) pGWBn44 : [(35S promoter, C-ECFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-ECFP--)]
- (45) pGWBn45 : [(35S promoter, N-ECFP) (--35S promoter-ECFP-R1- CmR-*ccdB*-R2--)]
-
- (50) pGWBn50 : [(no promoter, C-G3GFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-G3GFP--)]
- (51) pGWBn51 : [(35S promoter, C-G3GFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-G3GFP--)]
- (52) pGWBn52 : [(35S promoter, N-G3GFP) (--35S promoter-G3GFP-R1- CmR-*ccdB*-R2--)]
- (53) pGWBn53 : [(no promoter, C-mRFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-mRFP--)]
- (54) pGWBn54 : [(35S promoter, C-mRFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-mRFP)]
- (55) pGWBn55 : [(35S promoter, N-mRFP) (--35S promoter-mRFP-R1- CmR-*ccdB*-R2)]
-
- (59) pGWBn59 : [(no promoter, C-tagRFP) (--R1- CmR-*ccdB*-R2-tagRFP--)]
- (60) pGWBn60 : [(35S promoter, C-tagRFP) (--35S promoter-R1- CmR-*ccdB*-R2-tagRFP)]
- (61) pGWBn61 : [(35S promoter, N-tagRFP) (--35S promoter-tagRFP-R1- CmR-*ccdB*-R2)]

配列

Binary Vector は pZP221 (Plant Mol. Biol. 25, 989-994, 1994) をベースに用いています。このベクターの aacC1 部分を各選択マーカー (4xx, Pnos:NPTII:Tnos; 5xx, Pnos:HPT:Tnos; 6xx, Pnos:bar:Tnos; 7xx, Pnos:GPT:Tnos) に置き換え、MCS に Gateway カセットやレポーターを組み込んでいます (下図)。

RB-(*Hind*III)-GATEWAY-(*Sac*I)-Tnos-[Tnos-marker-Pnos]-LB

選択マーカー (Pnos:XXX:Tnos) は逆向きに入っています。

NPTII により Kanamycin、HPT により hygromycin、bar により BASTA、GPT により tunicamycin による選択が可能です。

*Hind*III-*Sac*I の間の GATEWAY のところに、後述のそれぞれの配列が入っています。

pGWBn01 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 ImpGWB では以前の pGWB (pBI バックボーン) に比べて形質転換効率が良いため、LR 反応の前に制限酵素切断を行う必要はありません。環状のままクローニングが可能です。必要であれば、LR 反応の前に XhoI で切断してリニアにして供してください。LR 反応の効率は、
Either or both plasmids linear > both plasmids relaxed >> both plasmids supercoiled
です。

オリジナル Gateway カセットの 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。

XhoI

RB-(*HindIII*)-GATEWAY-(*SacI*)-Tnos-[Tnos-marker-Pnos]

重要 LR 反応後は spectinomycin (100 mg/L) で選択してください。

重要 大腸菌は DH5 α 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 α 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 α を用いる方が良いと思います。(エントリークローンは *Agrobacterium tumefaciens* では増えません)

pGWBn01 : [(no promoter, no tag) (--R1-*ccdB*-R2 --)]

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

(AAGCTT)が *Hind*III、(TCTAGA)が *Xba*I、最後の (GAGCTC)が *Sac*I です。

*Xba*I より 5'は pBI121 と同じです。

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) GCATGCCTGCAGGTCGAC
(TCTAGA)GTTA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TNN (Your Clone) NAC CCA
GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC GCT TAG AGCTC)

下線が *att*B1、*att*B2 です (以下同様)。一応 *att*B2 の後に TAGが in frame で出てくるようになっています。

pGWBn02 : [(35S promoter, no tag) (--35S promoter-R1-*ccdB*-R2 --)]

pGWBn02-Ω : [(2x35S-Ω promoter, no tag) (--2x35S-Ω promoter-R1-*ccdB*-R2 --)]

(AAGCTT) – (35S or 2x35S-Ω promoter) --//

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

(AAGCTT)が *Hind*III、(TCTAGA)が *Xba*I、最後の (GAGCTC)が *Sac*I です。
*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 or 2x35S-Ω 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 TACG 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。

pGWBn04 : [(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 反応により以下のようにになります。

(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)

pGWBn05 : [(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 反応により以下のようにになります。

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。

pGWBn06 : [(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

pGWBn07, n08, n10, n11, n13, n14, n16, n17, n19, n20, n22, n23, n25, n26, n28, n29, n33, n35, n40, n41, n43, n44, n50, n51, n53, n54, n59, n60 (no promoter or 35S promoter, C-tag or C-reporter)では以下のようにになっています。

No promoter --- n07, n10, n13, n16, n19, n22, n25, n28, n33, n35, n40, n43, n50, n53, n59
35S promoter --- n08, n11, n14, n17, n20, n23, n26, n29, n41, n44, n51, n54, n60

(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 TACG 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 tag GCT TACG 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。

pGWBn09, n12, n15, n18, n21, n24, n27, n42, n45, n52, n55, n61
(35S promoter, N-tag)

では以下のようになっています。

```
(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 TAG 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 TAG 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。

pGWBn04, n05, n06 (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)

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
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
TTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGGCCACCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTG
F I C T T G K L P V P W P T L V T T F T Y G V
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGC
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
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
CAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATC
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 *
```

pGWBn07, n08, n09 (6xHis) 18bp

```
CATCATCATCATCATCAT
```

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

pGWBn10, n11, n12 (FLAG) 24bp

```
GACTACAAGGATGACGATGACAAG
```

```
D Y K D D D D K
```

pGWBn13, n14, n15 (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
TATGACGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCAGC
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 までが 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、こちらでシークエ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)

pGWBn16, n17, n18 (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 までが 1 ユニット。各ユニットにアンダーライン)

pGWBn19, n20, n21 (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。

pGWBn22, n23, n24 (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
CTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTT
L E E K Y E E H L Y E R D E G D K W R N K K F
GAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGTAAATTAACACAGTCTATG
E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M
GCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATT
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
GTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAA
V L Y M D P M C L D A F P K L V C F K K R I E
GCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAA
A I P Q I D K Y L K S S K Y I A W P L Q G W Q
GCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCC
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)

pGWBn25, n26, n27 (T7) 33bp

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

pGWBn28, n29 (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)

pGWBn33 (GUS) 1812bp

ATGTTACGTCCTGTAGAAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCACTCTG
M L R P V E T P T R E I K K L D G L W A F S L
GATCGCGAAAACCTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCT
D R E N C G I D Q R W W E S A L Q E S R A I A
GTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGTCTGGTAT
V P G S F N D Q F A D A D I R N Y A G N V W Y
CAGCGCGAAGTCTTTATACCGAAAAGTTGGGCAGGCCAGCGTATCGTGCTGCGTTTTCGATGCGGTCACT
Q R E V F I P K G W A G Q R I V L R F D A V T
CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTATGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAA
H Y G K V W V N N Q E V M E H Q G G Y T P F E
GCCGATGTCACGCCGATGTTATTGCCGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACTG
A D V T P Y V I A G K S V R I T V C V N N E L
AACTGGCAGACTATCCCGCCGGGAATGGTGATTACCGACGAAAACGGCAAGAAAAGCAGTCTTACTTC
N W Q T I P P G M V I T D E N G K K K Q S Y F
CATGATTTCTTTAACTATGCCGGAATCCATCGCAGCGTAATGCTCTACACCACGCCGAACACCTGGGTG
H D F F N Y A G I H R S V M L Y T T P N T W V
GACGATATCACCGTGGTGACGCATGTCGCGCAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTG
D D I T V V T H V A Q D C N H A S V D W Q V V
GCCAATGGTGATGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACT
A N G D V S V E L R D A D Q Q V V A T G Q G T
AGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATCCGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGC
S G T L Q V V N P H L W Q P G E G Y L Y E L C
GTCACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCGCTTCGCGTCGGCATCCGGTCACTGGCAGTG
V T A K S Q T E C D I Y P L R V G I R S V A V
AAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGGTCGTCATGAAGATGCG
K G E Q F L I N H K P F Y F T G F G R H E D A
GACTTGCGTGCCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGG
D L R G K G F D N V L M V H D H A L M D W I G
GCCAACTCCTACCGTACCTCGCATTACCCTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGC
A N S Y R T S H Y P Y A E E M L D W A D E H G
ATCGTGGTGATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGC
I V V I D E T A A V G F N L S L G I G F E A G
AACAAGCCGAAAAGAACTGTACAGCGAAGAGGCAGTCAACGGGGAAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCG
N K P K E L Y S E E A V N G E T Q Q A H L Q A
ATTAAGAGCTGATAGCGGTGACAAAACCCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCG
I K E L I A R D K N H P S V V M W S I A N E P
GATACCCGTCGCAAGGTGCACGGGAATATTTCCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCG
D T R P Q G A R E Y F A P L A E A T R K L D P
ACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTTT

T R P I T C V N V M F C D A H T D T I S D L F
GATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTGGAAACGGCAGAGAAG
D V L C L N R Y Y G W Y V Q S G D L E T A E K
GTACTGGAAAAAGAACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGC
V L E K E L L A W Q E K L H Q P I I I T E Y G
GTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCAATGTACACCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGCATGG
V D T L A G L H S M Y T D M W S E E Y Q C A W
CTGGATATGTATCACCGCGTCTTTGATCGCGTCAGCGCCGTCGTCGGTGAACAGGTATGGAATTCGCC
L D M Y H R V F D R V S A V V G E Q V W N F A
GATTTTGCGACCTCGCAAGGCATATTGCGCGTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCTTCACTCGCGACCGC
D F A T S Q G I L R V G G N K K G I F T R D R
AAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTAAAAACCGCAG
K P K S A A F L L Q K R W T G M N F G E K P Q
CAGGGAGGCAACAATGA
Q G G K Q *

(最後に GUS 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)

pGWBn35 (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
ATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAAATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGA
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
AACAGTATGGGCATTTTCGAGCCTACCGTGGTTCGTTTCCAAAAAGGGTTGCAAAAAATTTTGAAC
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
CAGTCGATGTACACGTTTCGTCACATCTCATCTACCTCCCGGTTTTAATGAATACGATTTTGTGCCAGAG
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
ATCATTCCGGATACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACTCT
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
CTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTGGCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACT
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
ACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGATGATAAACCGGGCGCGGTTCGGTAAAGTTGTTCCATTT
T S A I L I T P E G D D K P G A V G K V V P F
TTTGAAGCGAAGGTTGTGGATCTGGATACCGGAAAACGCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGT
F E A K V V D L D T G K T L G V N Q R G E L C
GTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGTTATGTAAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAG
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
CTGAAGTCTCTGATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCAA

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
GTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTA
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
CTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGGCCAAGAAGGGCGAAAGATCGCCGTGTAA
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)

pGWBn40, n41, n42 (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
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTG
F I C T T G K L P V P W P T L V T T F G Y G L
CAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
Q C F A 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
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
CAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCC
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S A
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATC
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

pGWBn43, n44, n45 (EGFP) 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
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTG
F I C T T G K L P V P W P T L V T T L T W G V
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGC
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
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
CAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGGATC
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

pGWBn50, n51, n52 (G3GFP) 717bp

```
ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGTGATGTTAAT
M S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N
GGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACCTTACCCTTAAATTT
G H K F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F
ATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTTACTACTTTTCGCTTACGGTGTGCAG
I C T T G K L P V P W P T L V T T F A Y G V Q
TGCTTCTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGATAC
C F S R Y P D H M K R H D F F K S A M P E G Y
GTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAG
V Q E R T I F F K D D G N Y K T R A E V K F E
GGAGACACCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATCGATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGC
G D T L V N R I E L K G I D F K E D G N I L G
CACAAGTTGGAATACAACCTTCAACTCCCACAACGTGTACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATC
H K L E Y N F N S H N V Y I M A D K Q K N G I
AAAGTAACTTCAAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAA
K V N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q
AATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTT
N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A L
TCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACA
S K D P N E K R D H M V L L E F V T A A G I T
CATGGCATGGATGAACTATACAAATAA
H G M D E L Y K *
```

pGWBn50 と n51 (C-G3GFP) では終止コドン TAA までが含まれています。pGWBn52 (N-G3GFP) では最後のアミノ酸 K をコードする AAA までが含まれています。

pGWBn53, n54, n55 (mRFP) 678bp

ATGGCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAAC
M A S S E D V I K E F M R F K V R M E G S V N
GGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTG
G H E F E I E G E G E G R P Y E G T Q T A K L
AAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCAGTACGGCTCC
K V T K G G P L P F A W D I L S P Q F Q Y G S
AAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAG
K A Y V K H P A D I P D Y L K L S F P E G F K
TGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGAC
W E R V M N F E D G G V V T V T Q D S S L Q D
GGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAG
G E F I Y K V K L R G T N F P S D G P V M Q K
AAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATC
K T M G W E A S T E R M Y P E D G A L K G E I
AAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACCGGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAG
K M R L K L K D G G H Y D A E V K T T Y M A K
AAGCCCGTGAGCTGCCCCGGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGAC
K P V Q L P G A Y K T D I K L D I T S H N E D
TACACCATCGTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGCCGCACTCCACCGGCGCCTAA
Y T I V E Q Y E R A E G R H S T G A *

pGWBn53 と n54(C-mRFP)では終止コドン TAA までが含まれています。pGWBn55 (N-mRFP) では最後のアミノ酸 A をコードする GCT までが含まれています。

pGWBn59, n60, n61 (tagRFP) 714bp

```
ATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCGTG
M V S K G E E L I K E N M H M K L Y M E G T V
AACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGA
N N H H F K C T S E G E G K P Y E G T Q T M R
ATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGC
I K V V E G G P L P F A F D I L A T S F M Y G
AGCAGAACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTTCTTTAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTC
S R T F I N H T Q G I P D F F K Q S F P E G F
ACATGGGAGAGAGTCAACACATACGAAGACGGGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAG
T W E R V T T Y E D G G V L T A T Q D T S L Q
GACGGCTGCCTCATCTACAACGTCAAGATCAGAGGGGTGAACTTCCCATCCAACGGCCCTGTGATGCAG
D G C L I Y N V K I R G V N F P S N G P V M Q
AAGAAAACACTCGGCTGGGAGGCCAACACCGAGATGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGA
K K T L G W E A N T E M L Y P A D G G L E G R
AGCGACATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGGGCCACCTGATCTGCAACTTCAAGACCACATACAGATCC
S D M A L K L V G G G H L I C N F K T T Y R S
AAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCCCGGCGTCTACTATGTGGACCACAGACTGGAAAGAATCAAG
K K P A K N L K M P G V Y Y V D H R L E R I K
GAGGCCGACAAAGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGC
E A D K E T Y V E Q H E V A V A R Y C D L P S
AAACTGGGGCACAAACTTAATTGA
K L G H K L N *
```

pGWBn59 と n60 (C-tagRFP) では終止コドン TGA までが含まれています。pGWBn61 (N-tagRFP) では最後のアミノ酸 N をコードする AAT までが含まれています。

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