

R4 GATEWAY Binary Vector (R4GWB)

- 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。
- *attL4-promoter-attR1*、*attL1-CDS-attL2* エントリークローンを連結し、*attB4-promoter-attB1-CDS-attB2* の形でクローニングするベクターです。プロモータースワップ実験に有用なベクターです。
- 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。
- プロモーターと CDS を組み合わせ、さらに多種類のタグを C 末簡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)

- プライマーデザインは Invitrogen HP 掲載の Multisite Gateway Three-Fragment Vector Construction Kit のマニュアルをご覧下さい。
- R4pGWB の使用に関して以下のことをお願いします。
 - I. R4pGWB の使用は基礎研究に限ります。
 - II. R4pGWB 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。
- 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。
- R4pGWB4xx は kanamycin 耐性、R4pGWB5xx は hygromycin 耐性、R4pGWB6xx は BASTA 耐性、R4pGWB7xx 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。R4pGWB5xx 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。(R4pGWB4xx の Pnos には微生物プロモーターが追加されていません。R4pGWB4xx は大腸菌ではカナマイシン耐性を付与しません。)

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) R4pGWBn01 : [--R4-CmR-*ccd*B-R2 --]
- (4) R4pGWBn04 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-sGFP--]
- (7) R4pGWBn07 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-6xHis--]
- (10) R4pGWBn10 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-FLAG--]
- (13) R4pGWBn13 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-3xHA--]
- (16) R4pGWBn16 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-4xMyc--]
- (19) R4pGWBn19 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-10xMyc--]
- (22) R4pGWBn22 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-GST--]
- (25) R4pGWBn25 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-T7--]
- (28) R4pGWBn28 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-TAP--]

- (33) R4pGWBn33 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-GUS--]
- (35) R4pGWBn35 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-LUC--]

- (40) R4pGWBn40 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-EYFP--]
- (43) R4pGWBn43 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-ECFP--]

- (50) R4pGWBn50 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-G3GFP--]
- (53) R4pGWBn53 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-mRFP--]

- (59) R4pGWBn59 : [--R4- CmR-*ccd*B-R2-tagRFP--]

配列

Binary Vector は pPZP221 (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。

R4pGWBn01 では R4-(CmR, *ccdB*)-R2 のカセットが入っており、L4-promoter-R1、L1-CDS-L2 Entry Clones との LR 反応により、B4-promoter-B1-CDS-B2 となります。

GATEWAY のルールに従ってフレームを合わせた CDS 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 R4pGWB 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 R4pGWB では 2 種のエントリークローンを用いて LR 反応を行うため、ImpGWB に比べて形質転換効率が低下します。LR 反応の前に SalI あるいは SmaI (R4pGWB6xx は SalI 不可) 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 SmaI リンカーが入れてあります。またオリジナル Gateway カセットの SalI も使用可能です (R4pGWB6xx は SalI 不可)。

SmaI SalI

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

- 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)

R4pGWBn01 : [--R4-*ccdB*-R2 --]

(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC

ACA ACT TTG TAT AGA AAA --(CmR, *ccdB*)--TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC
GCT TAG AGCTC)

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

下線が R4-CmR-*ccdB*-R2 です。

LR 反応により以下のようになります。

(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC

ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GNN (promoter) NCA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TNN (CDS) NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC GCT TAG AGCTC)

下線が *att*B4, *att*B1、*att*B2 です。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。

R4pGWBn04 : [--R4-*ccdB*-R2-sGFP--]

(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC
ACA ACT TTG TAT AGA AAA --(CmR, *ccdB*)-- TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATC ATG
of GFP --(GAGCTC)

ATG は sGFP の開始コドンです。

下線が R4-CmR-*ccdB*-R2 です。

LR 反応により以下のようにになります。

(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC
ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GNN (promoter) NCA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TNN (CDS) NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTG ATC ATG of sGFP --(GAGCTC)
(X) (P) (A) (F) (L) (Y) (K) (V) (V) (I) M

下線が *attB4*, *attB1*, *attB2* です。

CDS と sGFP との間に () であらわしたペプチドが入ります。この場合、CDS 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 Entry Clones に由来します (以下同様)。

sGFP の終止コドンから *SacI* までは以下のようになっています。

TAAAGCGGCC(GAGCTC)

TAA:終止コドン、(GAGCTC):*SacI*。

NotI digest – fill in – *SacI* linker (8 mer)

R4pGWBn07, n10, n13, n16, n19, n22, n25, n28, n33, n35, n40, n43, n50, n53,
n59 : [--R4-*ccdB*-R2-tag--]

(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC
ACA ACT TTG TAT AGA AAA --(CmR, *ccdB*)--TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC
tag GCT TACG AGCTC)

(AAGCTT)が *Hind*III、最後の (GAGCTC)が *Sac*I です。tag(タグ)については後述。
下線が R4-CmR-*ccdB*-R2 です。

LR 反応により以下のようになります。

(AAGCTT) GTGGATCCCCCATC
ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GNN (promoter) NCA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC
TNN (CDS) NAC CCA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC tag GCT TACG AGCTC)
M - X P A F L Y K V V D N S tag A *

下線が *att*B4, *att*B1, *att*B2 です。tag(タグ)自体に終止コドンが入っている場合もありますが、一応後にも TAGが in frame で出てくるようになっています。

*att*B2 のペプチドを介して tag に融合します。

tag (タグ)

R4pGWB の tag (タグ) は以下のものを使用しています。

R4pGWBn04 (sGFP) 720bp 丹羽さん (静岡県立大) の sGFP (ATG から TAA まで)。

```
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
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
TTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCTCACCTACGGCGTG
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
CAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S T Q S A
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
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 *
```

R4pGWBn07 (6xHis) 18bp

```
CATCATCATCATCAT
H H H H H H
```

R4pGWBn10 (FLAG) 24bp

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


R4pGWBn13 (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
TATGCAGGATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCAGC
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 まだが 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、こちらでシーケ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)

R4pGWBn16 (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 まだが 1 ユニット。各ユニットにアンダーライン)

R4pGWBn19 (10xMyc) 399bp

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
TCTGAAGAAGATTTGAACGGTGAACAAAAGCTAATCTCCGAGGAAGACTTGAACGGT
S E E D L N G E Q K L I S E E D L N G

(16 番目の GAA から 45 番目の TTG まだが 1 ユニット。各ユニットにアンダーライン)

R4pGWBn22 (GST) 678bp

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGGAATAT
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
GAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATG
E L G L E F P N L P Y Y I D G D V K L T Q S M
GCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATT
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
GAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAATGTTCGAAGATCGTTTATGT
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)

R4pGWBn25 (T7) 33bp

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

R4pGWBn28 (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)

R4pGWBn33 (GUS) 1812bp

ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTCACTCTG
M L R P V E T P T R E I K K L D G L W A F S L
GATCGCGAAAACGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCGCGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCT
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
CATTACGGCAAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTATGGAGCATCAGGGCGGCTATACGCCATTTGAA
H Y G K V W V N N Q E V M E H Q G G Y T P F E
GCCGATGTCACGCCGATGTTATTGCCGGAAAAGTGTACGTATCACCGTTTGTGTGAACAACGAACGTG
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
GACTTGGCTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTGGG
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
ATCGTGGTGATTGATGAAACTGCTGCTGTCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTTCGAAGCGGGC
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
ATTAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAACCCCAAGCGTGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCG
I K E L I A R D K N H P S V V M W S I A N E P
GATACCCGTCGCAAGGTGCACGGGAATATTTGCGCCACTGGCGGAAGCAACGCGTAAACTCGACCCG
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)

R4pGWBn35 (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
ATCATTCCGATACTGCGATTTTAAGTGTGTTCCATTCCATCACGGTTTTTGAATGTTTACTACTCT
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
CTTCAGGATTACAAGATTCAAAGTGCCTGCTGGTCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACT
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
GTTGTTGTTTTGGAGCACGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGATTACGTCGCCAGTCAAGTA
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
CTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCATAAAGCCAAGAAGGGCGAAAGATCGCCGTGTAA
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)

R4pGWBn40 (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
CAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCC
Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y 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
ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG
T L G M D E L Y K

R4pGWBn43 (ECFP) 717bp

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
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
CAGAACACCCCATCGGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
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

R4pGWBn50 (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
GGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTT
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
AAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAA
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 *

R4pGWBn53 (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
AAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGCCTTCCCCGAGGGCTTCAAG
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
AAGATGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAG
K M R L K L K D G G H Y D A E V K T T Y M A K
AAGCCCGTGACGCTGCCCCGGCGCCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGAC
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 *

R4pGWBn59 (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
AACAACCACCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCCCTACGAGGGCACCCAGACCATGAGA
N N H H F K C T S E G E G K P Y E G T Q T M R
ATCAAGGTGGTTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGCTACCAGCTTCATGTACGGC
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
GAGGCCGACAAAGAGACCTACGTGAGCAGCACGAGGTGGCTGTGGCCAGATACTGCGACCTCCCTAGC
E A D K E T Y V E Q H E V A V A R Y C D L P S
AAACTGGGGCACAACTTAATTGA
K L G H K L N *

C 末に tag を付加する場合、CDS 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、tag に終止コドンが含まれていない場合には、その下流のベクターの TAG で翻訳停止します。

(ATG-YourCDS-AGC)-*attB2*-tag-TAG