

## lacI-GFP による染色体の特定部位の可視化

by Ayumu Yamamoto, 7/15/02

[1] 染色体への *ura4* 部分遺伝子を挿入するための DNA フラグメントの作成  
(PCR 法による作成) ----(参考文献 1: Bähler, J. et al. 1998. *Yeast* **14**: 943-951.)

### 1. PCR プライマーのデザイン

約 20bp 程度の pCT33-6 に相補的な配列と 80bp 以上の染色体の組みこみたい部位に相補的な配列を持つプライマーを作成する。具体的には pCT33-6 に相補的な配列としては以下の2つの配列を使用して成功している。

(>80bp の染色体に相補的な配列)-CGGATCCCCGGGTTAATTAA

(>80bp の染色体に相補的な配列)-GAATTCGAGCTCGTTTAAAC

### 1. PCR による DNA フラグメントの増幅

[Reaction mixture]

Template DNA (pCT33-6, 10 ng/μl)	0.4 μl
10 mM dNTPs	8 μl
primer 1 (100 pmol/μl)	0.4 μl
primer 2 (100 pmol/μl)	0.4 μl
10xZ-taq buffer	10 μl
DDW	80 μl
Z-taq polymerase	1 μl

[Reaction]

(1) 95C, 2'

(2) 95C, 30"

(3) 50C, 15"

(4) 72C, 90"

(2) to (4), 40 cycles

(5) 72C, 3'

(6) 25C

PCR 産物は QuiaQuick column で精製後、適当な量の TE に溶かす。

(PCR 法以外による作成)

通常の方法により、*ura4* 部分遺伝子と *kanr* 遺伝子を含む DNA 断片を制限酵素によって切り出し、組み込みたい染色体部位を含む染色体断片に挿入する。これにより両端に組み込みたい染色体部位と相補的な配列をもつ *ura4* 部分遺伝子と *kanr* 遺伝子を含む DNA 断片を作成する。

### [2] 染色体への *ura4* 部分遺伝子の挿入

(1)作成した DNA 断片を LiCl 等による形質転換法よって *lacI-GFP* 細胞(CT021-1C: *h90 ade6-216 leu1 ura4 lys1 his7+::lacI-GFP*)に導入する。

(2)形質転換後、YES 培地にまく。

(3)33C で 2 日培養後、YES+G418 (100μg/ml)の培地にレプリカし、33C でさらにコロニーが出るまで培養する。

(4)コロニーを培養し、サザン、コロニーPCR などによって正しく DNA 断片が挿入されたものを選択する。

### [3] *lac operator* 配列の挿入

(1)pCT31-13 を *StuI* で切断し、直鎖 DNA 断片を作成する。

(2)この断片を形質転換により、*ura4* 部分遺伝子が挿入された株に導入する。

(3)*ura+*のコロニーを選択し、*lac operator* 配列が、正しく挿入されたものをサザン、コロニーPCR によって選択する。

[補足]

1. pCT33-6

pFA6a-kanMX6(参考文献 1)の BglII サイトに ura4 部分遺伝子を含む BamHI 断片を挿入して作成。  
(pCT33-6、pFA6a-kanMX6 のシーケンスデータは、「lacI-GFP Labeling.suppl」フォルダにあり)

2. pCT31-13

pBluescript の NaeI サイトを BglIII に改変したものを使用し、この BglIII サイトに ura4 全遺伝子を含む DNA 断片を挿入し、さらに XhoI サイトに lac OP repeats (プラスミド pSV2-dhfr8.32 より切り出し。参考文献 2: Robinett, C.C. et al. 1996. *J. Cell Biol.* **135**: 1685-1700)を持つ約 10kb の XhoI-SalI 断片を挿入して作成。このプラスミドは組み換えし易いのでこの増幅には組み換えの起こりにくい大腸菌株、STBL2(GIBCO, BRL)を使用するのが良い。形質転換後、液培せずにプレート上に 30C で lawn 状に生育させ、それをかきとってプラスミド調製を行えば、組み換え体はほとんどでない。

3. プラスミド構築にもちいた Ura4 DNA 断片の DNA 配列

Sequence of Ura4 DNA fragments used for constructing pCT33-6 or pCT31-13

```
1 / 1                               31 / 11
|a a g   c t t   a g c   t a c   a a a   t c c   c a c   t g g   c t a   t a t   g t a   t g c   a t t   t g t   g t t   a a a   a a a

21 / 41                               51 / 51
a a a   a t g   t t t   c g a   t t t   a c c   t a g   t g t   a t t   t g t   t t g   t a t   a c t   c a c   g t t   t a a   t t t

241 / 81                               271 / 91
a a a   g t a   a g a   a a t   t c t   g t a   a a t   a a g   c c t   t a a   t g c   c c t   t g c   t t t   a a a   t t a   a a a

361 / 121                               391 / 131
g a t   g t t   t t a   g a g   a c t   t a t   a c a   a t t   t t g   t c t   t t a   t a a   a t t   c t t   a a t   t g a   t t t

481 / 161                               511 / 171
a c c   a a g   a a c   c t c   t t t   t t t   g c t   t g g   a t c   g a a   a t t   a a a   g g t   t t a   a a a   (g g c a a a

M           D           A           R           V           F           Q           S           Y           S

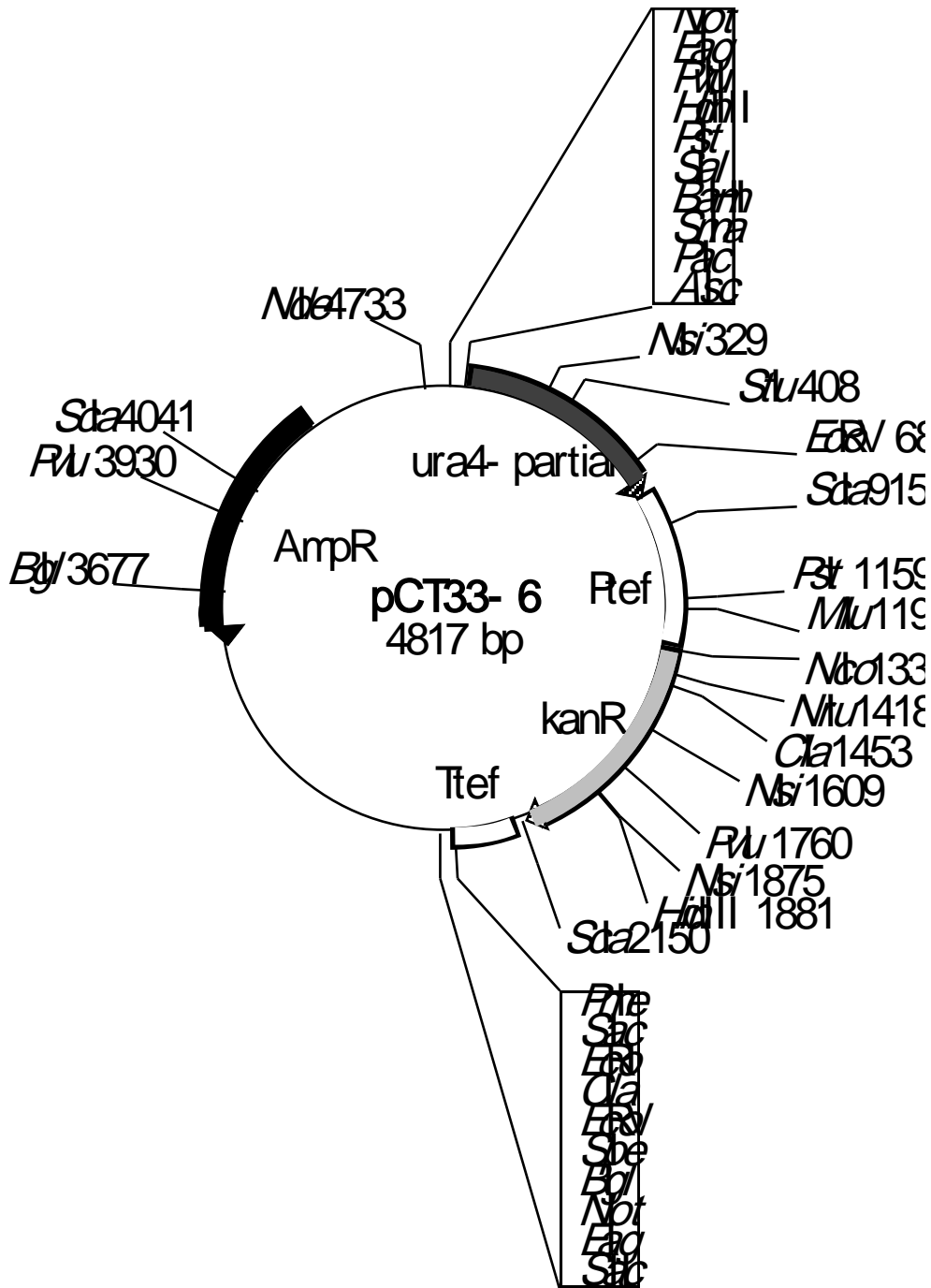
601 / 201                               631 / 211
a a t   t g t   t g g   c t t   t g a   t g g   a a g   a a a   a g c   a a a   g c a   a c t   t g t   c a g   t c g   c g g   t c c
L           L           A           M           E           E           K           Q           S           N           L           S           V           A           V           c
721 / 241                               751 / 251
c a c   a t a   t t g   a c g   t t g   t c g   a g g   a t t   t c g   a c c   a g g   a t a   t g g   t a g   a a a   a a c   t g
H           I           D           V           V           E           D           F           D           Q           D           V           E           K           L           g
841 / 281                               871 / 291
t c a   a g c   t a c   a a t   a t g   c a t   c t g   g t g   t g t   a c a   a a a   t t g   c t t   c t t   g g g   c t c   a t
K           L           Q           Y           A           S           G           V           Y           K           I           A           S           W           A           H           a
961 / 321                               991 / 331
g a c   g t g   g t c   t c t   t g c   t t t   t g g   c t g   a a a   t g t   c t t   c c a   a a g   g c t   c t t   t g g   c t
R           G           L           L           L           A           E           M           S           S           S           K           G           S           L           A           c
1081 / 361                               1111 / 371
c t g   g t c   g t c   g a t   t t c   c t a   a c c   t t c   a a a   g c g   a c t   a c a   I   t a a   c t a   t g t   c c c   c t
G           R           R           F           P           N           L           Q           S           D           Y           I           T           M           S           P           P           c
1201 / 401                               1231 / 411
a c t   g c g   g t a   g c g   a t a   t c a   t c a   t t g   t t g   g t c   1 2 3 1 / 4 1 1   t c t   a t g   g a g   c t g   g t
G           G           S           D           I           I           I           V           G           R           g t g   g a g   V   Y   G   A   G   A   G   G
1321 / 441                               1351 / 451
a g c   a t t   a a a   a a a   a g a   c t a   a t g   t a a   a a t   |gt t t t t t t t t c cg g t t a gt g g g c gt t t a t t t t g a t a a g a t c a a
H           *

1441 / 481                               1471 / 491
t a c   t c t   t t g   g t a   |a a a e n t t a t t t t a a t a c g t a n t g c g a t a n c t g a n t a a a a c a c c t t t g g g a a t a a a

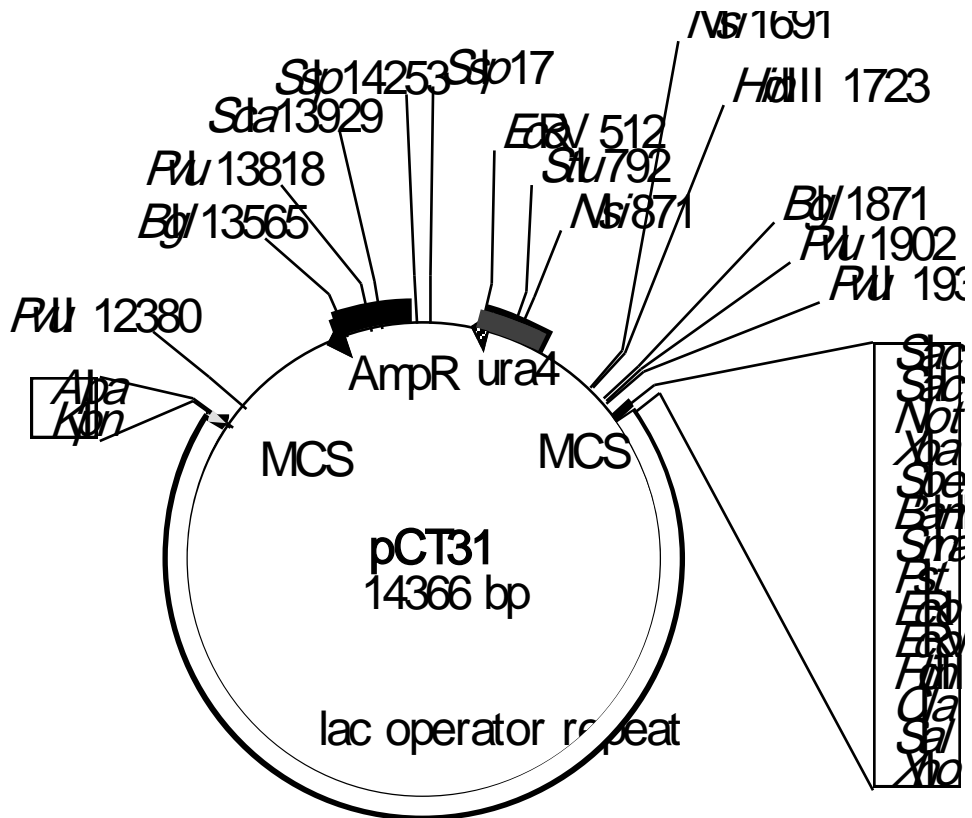
1561 / 521                               1591 / 531
a t c   t t t   t c t   c t t   g g a   t t g   a c a   t t g   a a t   a a g   a a a   a g a   g t g   a a t   t t t   t t t   a g

1681 / 561                               1711 / 571
a a a   c a a   g a t   a a a   a c t   t g g   t t a   t a a   a c a   t t g   g t g   t t g   g a a   c a g   a a t   a a a   t t
```

[ ] indicates the region used for constructing pC T 3 1 - 1 3 . # 1 - 1 3 9 1 .  
( ) indicates the region used for constructing pC T 3 3 - 6 . # 6 0 0 - 1 4 7 2 .  
U r a 4 a m i n o a c i d s e q u e n c e i s s h o w n b y s i n g l e l e t t e r s .



AmpR: アンピシリン耐性遺伝子  
 ura4-partial: ura4遺伝子部分断片  
 kanR: カナマイシン耐性遺伝子  
 Ptef: *A. gossypii* TEF遺伝子プロモーター  
 Tef: *A. gossypii* TEF遺伝子ターミネーター



AmpR: アンピシリン耐性遺伝子  
 ura4: ウラシル代謝系遺伝子  
 MCS: マルチクローニングサイト  
 lac operator repeat: lacオペレーター反復配列