

**LARGE**

Laboratory for  
Animal Resources and  
Genetic Engineering  
RIKEN, Center for Developmental Biology



よくある質問 ~TG編~

Q1. トランスジーンは環状、線状のどちらが良いですか？

A1. プラスミドのサイズ(~20kb)であれば、線状の方がゲノムに挿入される効率が圧倒的に高いです。また、ベクター部分の配列（prokaryote由来）が発現に影響を及ぼすことが多いため、ベクター部分をできる限り除く必要があります。プラスミドの場合、ベクター配列を除いた線状DNAをご用意下さい。

BACのサイズであれば、線状と環状でゲノムに挿入される効率は変わりありません。また、ベクター部分の配列が発現に及ぼす影響は少ないと言われています。従って、線状と環状のどちらでもかまいません。ただし、BACはサイズが大きいためDNAにダメージが生じやすいことから、操作が多い線状化作業時には扱いに特にご注意下さい。

Q2. トランスジーンの調整法を教えてください。

A2. CsCl密度勾配遠心による精製法、各社から販売されているキットを使用する精製法などがあります。

下にキットの一例を列挙します。私たちはPlasmidとBACの精製にはQIAGEN社製品を、アガロースゲルからの精製にはPromega社製品を使用しています。

Plasmidの精製キット

QIAGEN EndoFree plasmid kit (QIAGEN)

(QCによるWashを3回行うなど多めにしたり、ElutionしたDNAをさらにエタノール沈殿させると精製度が上がります。)

NucleoBond® Xtra Midi EF (日本ジェネティクス)

Wizard Plus Maxiprep DNA purification system (Promega)

PureYield Plasmid Maxiprep System (Promega)

PureLink HiPure Plasmid Filter Kits (Invitrogen)

BACの精製キット

QIAGEN Large-Construct kit (QIAGEN)

NucleoBond® BAC 100 Kit (Maxi) (日本ジェネティクス)

\*BACは大変溶けにくいので、溶解は慎重・丁寧に行ってください。

アガロースゲルからのDNA断片の回収

Wizard DNA Clean-Up System (Promega)

(Washの回数を増やしたり、Elution後に遠心して上清のみ回収し、エタノール沈殿などをすれば精製度が上がります。)

QIAGEN QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)

QIAGEN QIAEXII Gel Extraction kit (QIAGEN)

いずれのキットを使用するにしても、キットの使用説明書に従うだけでなく、さらに精製度を上げる工夫を加えた方が産仔数やTg数に良好な結果が得られます。下にあげる文献にも詳しいプロトコルが紹介されていますので参考にして下さい。

<参考文献>

Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (Third Edition)

(Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003)

Q3. 精製したDNAの純度を確認する方法はありますか？

A3. OD260/280 (1.8前後) , OD260/230値 (1.8—2.2) であること、および、電気泳動により、スミア状になっていないこと、切れ残りのプラスミドが残っていないこと、などをご確認下さい。

Q4. 目的の遺伝子を全身でubiquitousに発現させたいのですが、どんなプロモーターが適していますか？

A4. CAG promoter、ROSA26 promoter、 $\beta$ -actin promoter などがよく使われています。私たちの経験では、CAG promoter よりもROSA26 promoter の方がよりubiquitousな活性がある印象をもっています。CAG promoter、 $\beta$ actin promoter は筋肉組織

に強い偏りがある印象です。発現している組織間で比べれば、 ROSA26 promoter よりもCAG promoter の方が強い活性を持ちます。なお、市販のCMV promoter をそのまま使った場合には発現効率が悪く、intronを加えるなどの加工が必要なことが多いです。

<参考文献>

CAG promoter

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J.

Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*. 1991 Dec 15;108(2):193-9

Araki K, Imaizuki T, Okamura K, Oike Y, Yamamura K.

Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters.

*J Biochem*. 1997 Nov;122(5):977-82.

Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A.

Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev*. 1998 Aug;76(1-2):79-90.

ROSA26 promoter

Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P.

Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8):3789-94.

Kisseberth WC, Brettingen NY, Lohse JK, Sandgren EP.

Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats.

*Dev Biol*. 1999 Oct 1;214(1):128-38.

Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM.

Widespread recombinase expression using FLP<sub>eR</sub> (flipper) mice.

*Genesis*. 2000 Nov-Dec;28(3-4):106-10.

$\beta$ -actin promoter

Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymmecki SM.

High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP.

Nat Genet. 2000 Jun;25(2):139-40.

InvivoGen社のHPにも情報があります。参考にして下さい。

[http://www.invivogen.com/family.php?ID=88&ID\\_cat=7&ID\\_sscat=91](http://www.invivogen.com/family.php?ID=88&ID_cat=7&ID_sscat=91)

Q5. トランスジーンを作製するためのベクターは配布していますか？

A5. 配布しておりません。

Q6. トランスジーン of 構築を請け負っていますか？

A6. 請け負っておりません。

Q7. トランスジーン of 送付は冷凍・冷蔵のどちらが良いですか？

A7. 冷蔵でお送り下さい。

BACなどのサイズが大きいトランスジーンの場合はできる限り凍結融解を避けた方が良いとされています。また、送付の際はチューブのふたにパラフィルムを巻いて下さい。さらに、チューブを梱包材でくるむなど、破損を避ける工夫をして下さい。また、平日に届くように送付日を調整して下さい。

Q8. インジェクションする受精卵にはどのマウス系統を選ばよいですか？

A8. 当方では原則としてC57BL/6N、BDF1、CD-1の受精卵を使用しております。インジェクション数に対する出生率は系統間で差があり、C57BL/6N：5%、BDF1：15%、CD-1：20%になっております。出生数に対するTg数が系統間で差があるという明確なデータは今のところありません。従って、出生率が高い系統を選んだ方が得

られるTg数も多くなります。しかし、遺伝的背景を揃える必要性から選択肢が限られる場合もあると思います。実験の目的に応じて系統をお選び下さい。

なお、当方で使用しているBDF1は正確にはBDF 1 (C57B/6×DBA2のF1)♀とC57B/6♂との交配により得られる受精卵を使用しています。よってファウンダーマウスの段階では遺伝的にC57B/6;75%,DBA2;25%になっておりますのでご注意ください。

Q9. 送っていただいたマウステールからどれくらいのゲノムDNAが回収できますか？

A9. おおよそ20ug程度回収できる長さのテールをお送りしています。

Q10. トランスジーンをPCRで検出しようと思うのですが、何か注意することはありますか？

A10. 複数のプライマーペアでPCRを行い、同じ結果になることを確認して下さい。また、PCRにより増幅されたDNA断片がトランスジーン由来かどうか確認するために、direct sequenceなどを行うと確実性が高まります。ただ、PCRではゲノムに挿入されたトランスジーンのコピー数や挿入箇所数を判断することは難しいです。サザンハイブリダイゼーションを合わせて行うことをお勧めいたします。

Q11. トランスジェニックマウスのサザンハイブリダイゼーションはどのように行えば良いですか？

A11. 一般的な方法をご紹介します。トランスジーンを元にして作製したプローブと、下記に挙げる3種類の制限酵素処理されたゲノムDNAを用いたときの実験についてご説明いたします。

1. トランスジーン内に2カ所の切断点をもつ制限酵素（2種類の制限酵素の組み合わせでもよい）で処理したゲノムDNA  
トランスジーンが挿入されたかどうかの確認ができます。  
このとき、トランスジーンと内在性のゲノム配列の両方にハイブリするプローブを使用し、かつ、切り出されるトランスジーンと内在性ゲノム配列のサイズが異

なるように制限酵素を選択すれば、挿入されたトランスジーンのコピー数を推測できます。内在性ゲノム配列は2コピーであることにご注意下さい。

2. トランスジーン内に1カ所の切断点をもつ制限酵素で処理したゲノムDNA  
挿入されたトランスジーンがタンデムになっているか、それとも、head to head、tail to tailの連結型になっているかを区別できます。
3. トランスジーン内に切断点をもたない制限酵素で処理したゲノムDNA  
挿入位置が1カ所なのか複数カ所なのかを区別できます。  
この場合も、トランスジーンと内在性のゲノム配列の両方にハイブリするプローブを使用すれば、挿入されたトランスジーンのコピー数を推測できます。

コントロールDNAにはWTのゲノムDNAにトランスジーンを混ぜたサンプルをご用意して下さい。制限酵素処理は同様に行って下さい。混ぜる量は、トランスジーンが6kbの場合、ゲノムDNA10ugに対してトランスジーン10pgで調整すると1コピー/diploidに相当するようになります。このサンプルをコントロールにすれば何コピー挿入されているかを推測できます。

WTのゲノムDNAにトランスジーンを混ぜたサンプルは、PCRの条件検討をする際の鋳型としても有効です。

制限酵素選択には <http://www.cdb.riken.jp/arg/protocol.html> にアクセスしていただき、「08. サザンに使う制限酵素」を参考にして下さい。表に掲載されていない制限酵素の中にも使用に適した制限酵素はあるかと思しますので、必要に応じてお試しください。

Q12. Tgが得られる効率はどれくらいですか？

A12. トランスジーンによって様々です。1000個程度の卵にインジェクションしても全く得られないケースもあれば、得られた産仔数10匹に対し、Tgが5匹いたケースもあります。一般的には、100-150個の受精卵にインジェクションして、平均して3-6匹のTgが得られると言われています。

Q13. 得られたTgがトランスジーンの挿入により何かの遺伝子を壊している頻度はどれくらいですか？

A13. おおよそ5%－15%だと言われています。