

Protocol for construction of conditional targeting vector by using BAC recombineering

作製：遊佐宏介
version: 050507

本プロトコールでは、National cancer institute の Neal G. Copeland らにより開発された defective λ prophage を使った Red system による BAC recombineering を使い、簡便に conditional targeting vector 作製を行う方法を解説しています。Francis Stewart による Red/ET system はすでにフナコシから購入可能ですが、実際に使用したことがないので効率や使用上の感覚の比較はできません。

二つの方法で大きく異なるのは、

Red/ET system : 組換えタンパク発現 plasmid を BAC ホスト菌株に導入し、recombineering を行う。

prophage system : BAC を、専用大腸菌株に移しかえて recombineering を行う。

と言う点です。

reference: Nature Reviews Genetics. 2001. 2: 769-779 --- ET system, Red system を含めた総説

Genomics. 2001. 73: 56-65 --- defective prophage λ -Red system の最初の論文

Genome Res. 2003. 13: 476-84 --- defective prophage λ -Red system を用いた conditional targeting vector 作製の論文

- ここに紹介する defective prophage λ -Red recombineering system は、Neal G. Copeland (NCI) から MTA 手続きの後 free で入手可能です。system の詳細、分与に関する情報は、Recombineering website <http://recombineering.ncifcrf.gov/> を参照してください。MTA では、Recombineering の使用は BAC の改変や targeting vector 他の作製に限定されているようです。大腸菌ゲノムの改変に使用する場合は別途手続きが必要です。
- Protocol 内の URL は web リンクを張ってますのでご利用ください。
- 15-16 ページに記載されている plasmid のうち、PL451 と PL452 を除く plasmid に関しては、大阪大学大学院医学系研究科竹田先生から分与可能です (e-mail: takeda@mr-envi.med.osaka-u.ac.jp)
- 本プロトコールに関する質問は、遊佐まで (e-mail: yusa@mr-envi.med.osaka-u.ac.jp)

目次 :

- 1 Red system を使ってできること
- 2 conditional targeting vector 作製の全体の流れ
- 3-4 modification vector, retrieving vector 作製
- 4 実験スケジュール例
- 5-9 BAC clone の探し方 (Ensembl と NCBI を使った方法)
- 10 BAC clone 購入方法と購入後
- 11 PROTOCOL: BAC DNA mini-preparation
- 12 PROTOCOL: BAC DNA transfer
- 13 PROTOCOL: BAC modification & retrieving
- 14 PROTOCOL: Ara-Cre, Ara-Flpe -mediated neo deletion
- 15 plasmid map
- 16 BAC backbone map & loxZeo map

defective prophage λ - Red recombination system

使用する大腸菌菌株

DY380: DH10B [λ c/857(*cro-bioA*)<>*tef*]

---- homologous recombination と retrieve ができる

EL250: DH10B [λ c/857(*cro-bioA*)<>*araC-P_{BAD}flpe*]

---- homologous recombination と retrieve に加え、アラビノースで Flpe 発現を誘導できる

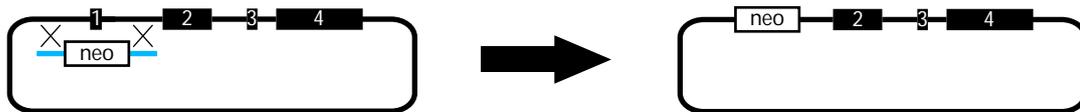
EL350: DH10B [λ c/857(*cro-bioA*)<>*araC-P_{BAD}Cre*]

---- homologous recombination と retrieve に加え、アラビノースで Cre 発現を誘導できる

* いづれの菌株も通常 32 °C で培養する。組換えタンパクは 42 °C, 13-15min で発現誘導する。

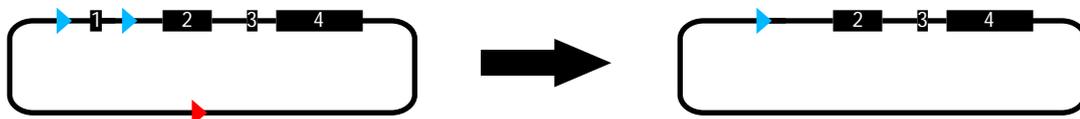
本システムを使ってできること

BAC の modification 1 (homologous recombination)



全ての作業に先立って、BAC を DH10B (general host) から DY380, EL250, EL350 に transfer しておく。homologous recombination では、right arm と left arm に挟まれた領域を BAC に target できる。この時の、arm は 300-500bp で十分。neo などの薬剤マーカーで選択することにより、ほぼ 100% の効率で組換え体を取得できる。target させるフラグメントはプラスミド上に構築し、制限酵素処理、切り出しによって作製する。また、homology arm を 50bp とし PCR primer に持たせておいて、PCR によって targeting fragment を作ることも可能 (この時は、DpnI 処理による template の除去が必要)。ただし、PCR 時に入る変異の考慮を忘れずに。

BAC の modification 2 (loxP, FRT 落とし)



EL250, EL350 では、培養液中にアラビノースを添加することで、各々 Flpe, Cre を発現させることができる。targeting によって導入した FRT, loxP の間をこれらの菌株で、欠失させることができる。**<注意>** loxP 落としをする場合は、BAC backbone にもともと loxP サイト (赤三角) があるので、Cre の発現に先立って Zeo カセットをターゲットさせて、loxP サイトを消しておくこと。deletion 効率は非常によい (~100%)。PCR にて欠失したことを確認する。

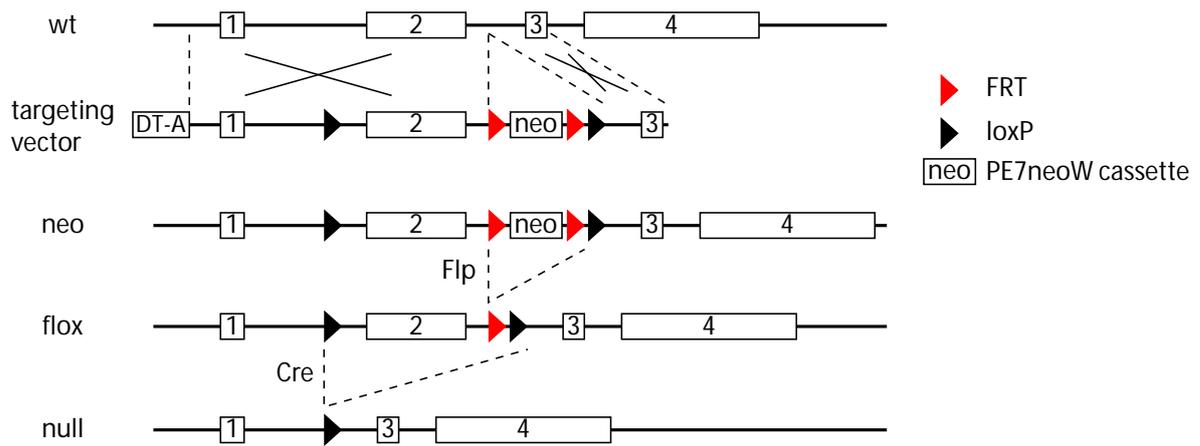
BAC 断片のプラスミドへの retrieve



retrieve は、BAC のある領域をプラスミドに recombineering を用いて大腸菌内でサブクローニングすること。homology arm として、50-500 bp の間が使用できる。50 bp arm の場合は、homology arm をつけたプライマーを用いてプラスミド (pBluescript など) を鋳型に PCR でフラグメントを作製する。長い arm の時は、一度プラスミドを構築した後、制限酵素でリニアライズする。どちらでもうまくいってます。目的に応じて、使い分けを。プラスミドなので、electroporation の後は amp で選択してくる。retrieve できる大きさは、プラスミドに入るサイズならできるはず。15kb くらいは余裕。長い homology arm の方が効率は良いが、retrieve する配列に大きく影響されるようで、20~数% の効率で幅がある。時には、全く retrieve されないこともあるので、この場合は場所を変えてみるとうまくいくこともある。

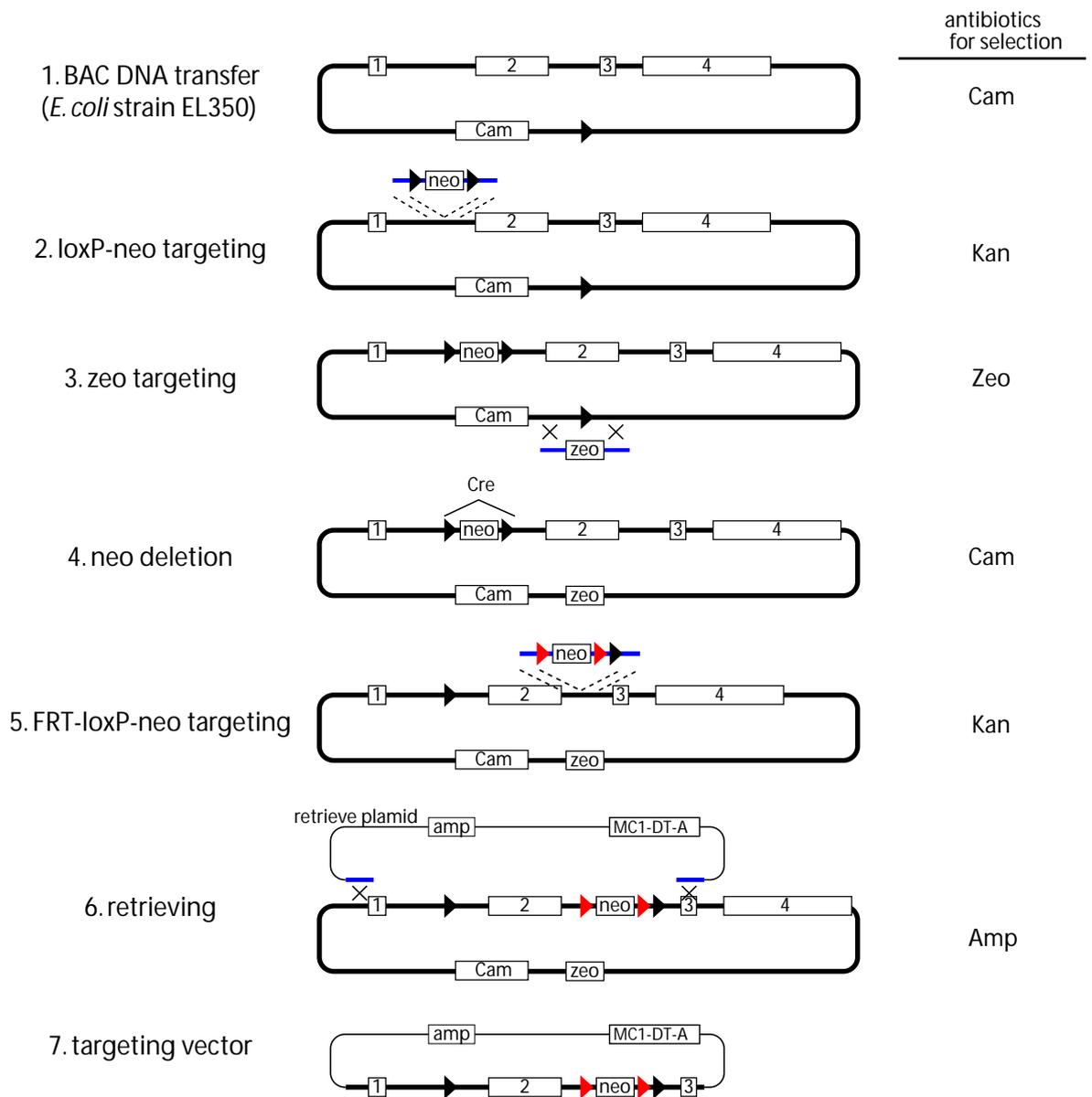
BAC recombineering を利用した conditional targeting vector 作製法

<1> Conditional knock out を行う時に登場する allele



<2> 全体の流れ

ここには BAC に加える modification を図解しました。Genome Res. に解説された方法では、まず retrieve を行い、続いて modification を加えていくという手順になっていますが、plasmid DNA への modification は試したことがなく、うまく行かないということも聞いたことがあります。BAC へ modification を行い、最後に retrieve するのが無難な手順で、こ



<3> modification vector と retrieve vector の作製

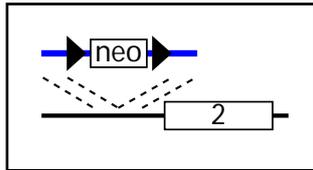
conditional targeting vector を作製するときには、

- (1) loxP-neo cassette targeting vector
- (2) FRT-loxP-neo cassette targeting vector
- (3) retrieving vector

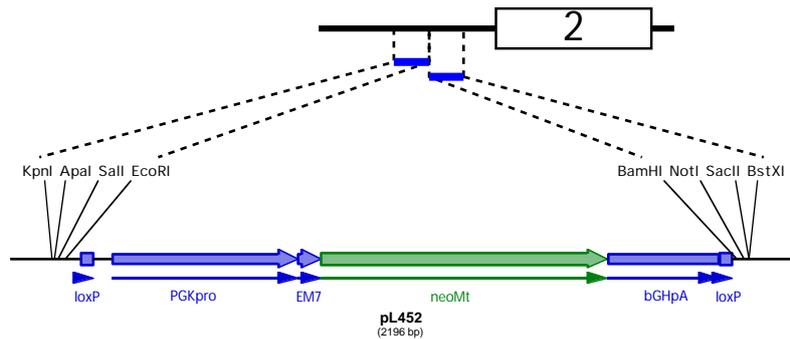
の3種類のプラスミドが必要となるので、予め作製しておく。

Note: targeting fragment に短い homology arm (-50bp) をつけた PCR 産物を使うこともできるが、PCR 時の mutation を考えると避けた方が無難だと思います。

(1) Construction of loxP-neo targeting vector

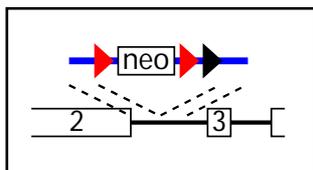


このステップに使用するプラスミド

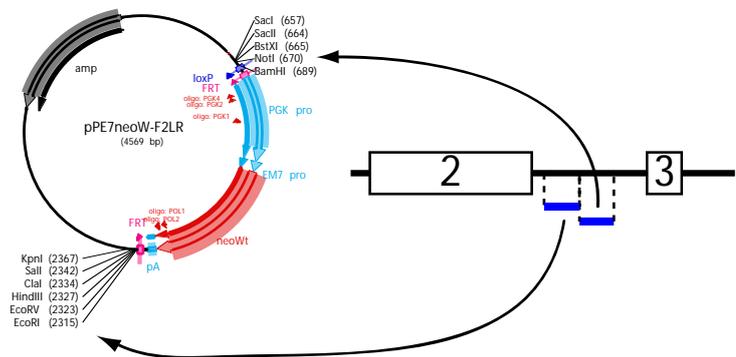


- 1, loxP を挿入するところを決め、両側約 400bp を制限酵素サイト (全て異なる酵素を使用) を付けたプライマーにて増幅する。template は B6 tail DNA や BAC DNA を。
- 2, PCR 断片、pL452、pBluescript を制限酵素処理。
- 3, 4 分子いっぺんにライゲーション。
- 4, PCR 増幅した arm 部分を sequence。database (B6 genome) の配列と比較し確認。
- 5, arm の両端の酵素で neo fragment を切り出す。QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使い精製を行えば、最後の elution で 1mM HEPES, 30-50ul を使い、そのまま electroporation に持っていけるので便利。他のメーカーのカラムは試したことがない。ビーズ方式 (e.g. QIAEXII Gel Extraction Kit) はどうしても塩が混入してしまい、electroporation の時火花が出るので注意。この場合は、エタ沈による脱塩が必須。electroporation に 300-1000ng を使えば、充分当たりクローンを拾うことができる。

(2) Construction of FRT-loxP-neo targeting vector

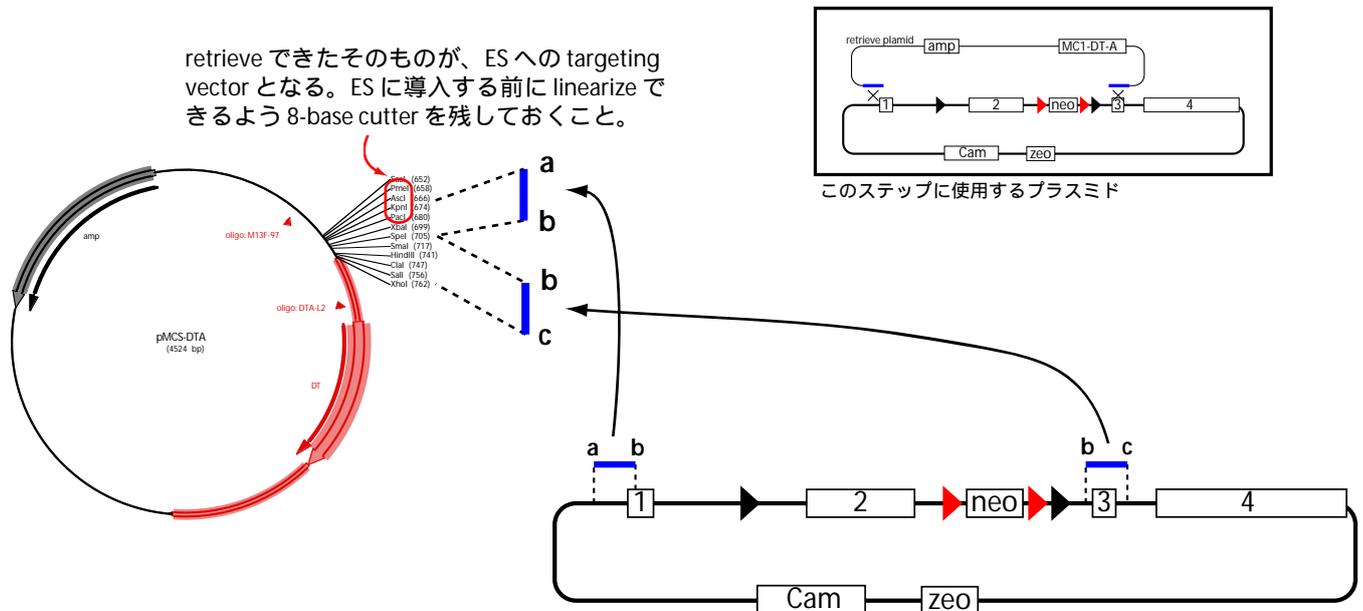


このステップに使用するプラスミド



- 1, もう一つの loxP を挿入するところを決め、両側約 400bp を制限酵素サイト (全て異なる酵素) を使用) を付けたプライマーにて増幅する。template は B6 tail DNA や BAC DNA を。
【注意】 loxP の向きを最初に挿入した向きに合わせる。必須！
【注意】 neo の向きを遺伝子の読み枠と逆に走らせるのが無難。
- 2, PCR 断片、pPE7neoW-F2L(F or R)、pBluescript を制限酵素処理。
- 3, 4 分子いっぺんにライゲーション。
- 4, PCR 増幅した arm 部分を sequence。database (B6 genome) の配列と比較し確認。
- 5, arm の両端の酵素で neo fragment を切り出す。(1) 参照のこと。

(3) Construction of retrieving vector

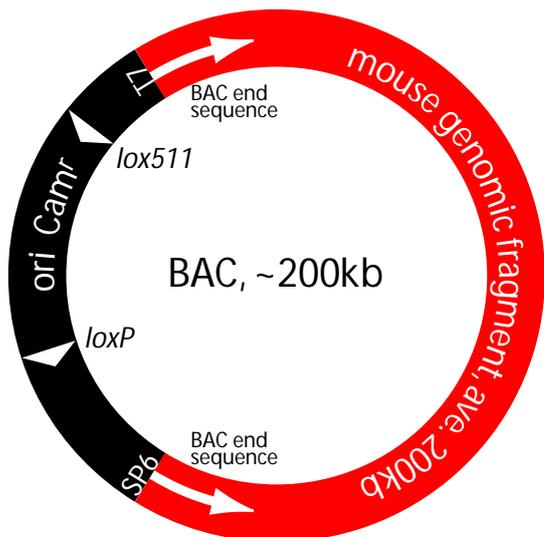


- 1, targeting vector の両端を決め、両側約 400bp を制限酵素サイトを付けたプライマーにて増幅する。
- 2, PCR 断片、pMCS-DTA を制限酵素処理。
- 3, 3 分子いっぺんにライゲーション。
- 4, PCR 増幅した arm 部分を sequence。database (B6 genome) の配列と比較し確認。
- 5, b の制限酵素で linearize し、ゲル精製を行う。このとき、切り残りがあると amp resistant の background となるので、完全消化と、切り出し時の切れ残りのコンタミに気をつける。retrieve は targeting と違い効率が良くて 10% 程度 (悪いと数 %) で、約 1ug の DNA を electroporation に使用する。

<4> かなり急いだ場合の実験スケジュール

day	EL350 culture	DH10B (BAC) culture	Notes
day 1	EL350 culture	DH10B (BAC) culture	
day 2	electroporation	mini-prep	* DH10B (BAC) は 37 °C culture だが、32 °C でも充分増える。EL350 は 32 °C を超えると組換えタンパクが発現しだし、余計な組換えを誘導してしまう恐れがあるので、温度管理は厳密に。
day 3	plate (cam)		** BAC transfer で BAC の再編成が起こることは滅多にないので、3, 4 個を 5ml culture し、翌日ストックするとともに PCR で欠失がないことを確認しておく。チェックが終わったら、余った培養液で 50ml culture をし、最初の electroporation を行う。
day 4	stock, PCR check, electroporation <lox-neo>		
day 5	plate (kan)		*** targeting 効率は非常に良いので、8 個を 5ml culture し、翌日ストックするとともに PCR で homologous recombination を確認する。両方のアームで確認すること。チェックが終わったら、余った培養液で 50ml culture をし、次の操作を行う。
day 6	stock, PCR check, electroporation <zeo>		
day 7	plate (zeo)		
day 8	stock, PCR check, arabinose culture <neo deletion>		
day 9	plate (cam)		
day 10	stock, PCR check, electroporation <FRT-lox-neo>		
day 11	plate (kan)		
day 12	stock, PCR check, electroporation <retrieve>		**** retrieve 効率はあまりよくないので、colony PCR でスクリーニングする。まずは 48 個ほどスクリーニングする。自動ミニブレップを使うなら、ミニブレップ後の電気泳動でも良いかも。当たりクローンが出たら、1.5ml culture (この時の大腸菌はまだ EL350 なので、32 °C での培養です!) し、ミニブレップ、制限酵素パターンを確認して完成とする。最後に、DH5α などラボで通常使用の大腸菌に移して (ここからは、37 °C) ラージブレップする。
day 13	colony PCR screening		
day 14	mini-prep, restriction analysis retransformation into DH5α, JM109 etc.		

BAC, bacterial artificial chromosome <cloneの探し方、入手法>



backbone (10kb) に T7, SP6 promoter, Cam^r, ori, loxP, lox511 他を、インサートとしてマウスのゲノムフラグメント約 200kb を保持している。大腸菌内では、1 molecule/cell で維持されている。ホスト菌株として DH10B が使用されている。

backbone にも様々なベクタ - があるので詳細な情報は、下記 HP 参照のこと <http://bacpac.chori.org/vectorsdet.htm>

mouse BAC library に関しては、RP23 と RP24 シリーズ (いずれも C57BL/6J) の BAC end sequence project が大分進み、genome sequence 上に貼付けられている。よって実験無しで web 上で簡単に検索することができる。発注も web 上で OK。web 上で検索できる 129 ライブラリーは、129S7/SvEvBrd-Hprt^{b-m2} ライブラリー (AB2.2 ES より作製) が Ensembl で検索ができ Sanger institute から利用可能。その他にも BAC library はあるが、end sequence されてないので、PCR などによるスクリーニングを要する。CalTech の 129S1/Sv-+P+ Tyr-cKit^{SI-J/+} ライブラリー (CitbCJ7, CJ7 ES より作製) は Invitrogen からスクリーニングキットが購入可能。

Ensembl が NCBI を利用して、求める BAC clone を探す。NCBI の Clone Finder を使うのが最も簡単。

BAC clone の探し方 - Ensembl を利用した方法 -

Ensembl を利用すると、ブラウザ上に遺伝子構造、位置情報、BAC のマップ等の情報を一度に表示でき、グラフィック的にもわかりやすい。配列のダウンロードも簡単。やや表示に時間がかかります。

Ensembl Mouse Gnome Server http://www.ensembl.org/Mus_musculus/

Blm (Bloom's syndrome gene) を検索。正しい遺伝子名を入力しないと検索されない時がある。このときは、Mouse Genome Informatics で正しい遺伝子名を調べると良い。

Mouse Genome Informatics
<http://www.informatics.jax.org/>

1 matches in the *Mus musculus* Gene index [first 5 matches shown]:

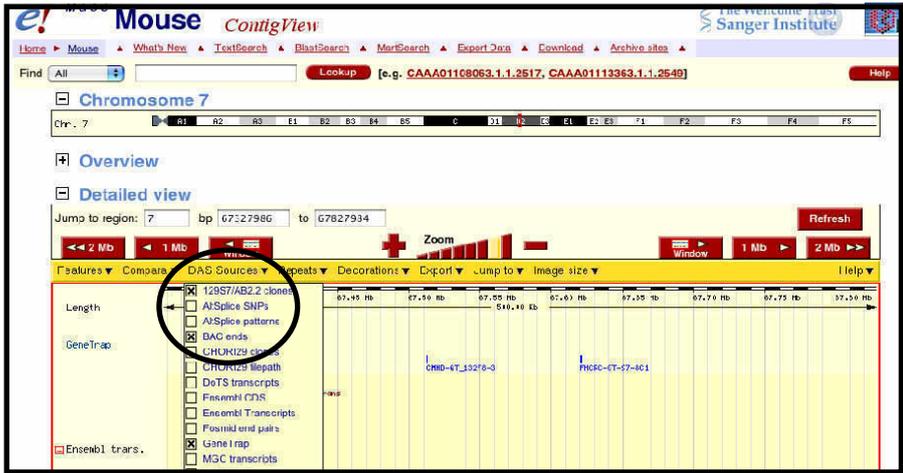
1. Ensembl Gene: [ENSMUSG00000030528](#)
 Ensembl gene ENSMUSG00000030528 has 2 transcripts: ENSMUST00000044831, ENSMUST00000081314
 Bloom's syndrome protein homolog (EC 3.6.1.-) (mBLM). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:O88700]
 The gene has the following external identifiers mapped to it:
 AFFY_MG_U74Av2: 102631_at
 AFFY_Mouse430_2: 1448953_at
 AFFY_Mouse430A_2: 1448953_at
 EMBL: Z98263, AB008674
 EntrezGene: 12144
 GO: GO:0003677, GO:0005634, GO:0005524, GO:0016787, GO:0006260, GO:0006026
 MarkerSymbol: Blm, MGI: 1328362
 protein_id: BAA32001.1, CAB10933.1
 RefSeq_dna: NM_007550
 Uniprot/SWISSPROT: O88700, BLM_MOUSE
http://www.ensembl.org/Mus_musculus/geneview?gene=ENSMUSG00000030528

検索結果。ENSMUS...をクリック。

Ensembl Gene Report	
Gene	Blm (MarkerSymbol ID) (to view all Ensembl genes linked to the name click here)
Ensembl Gene ID	ENSMUSG00000030528
Genomic Location	View gene in genomic location: 67537870 - 67618101 bp (67.5 Mb) on chromosome 7 This gene is located in sequence: CAA01056556.1.1.69298
Description	Bloom's syndrome protein homolog (EC 3.6.1.-) (mBLM). [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:O88700]

遺伝子の詳細情報ページが表示される。

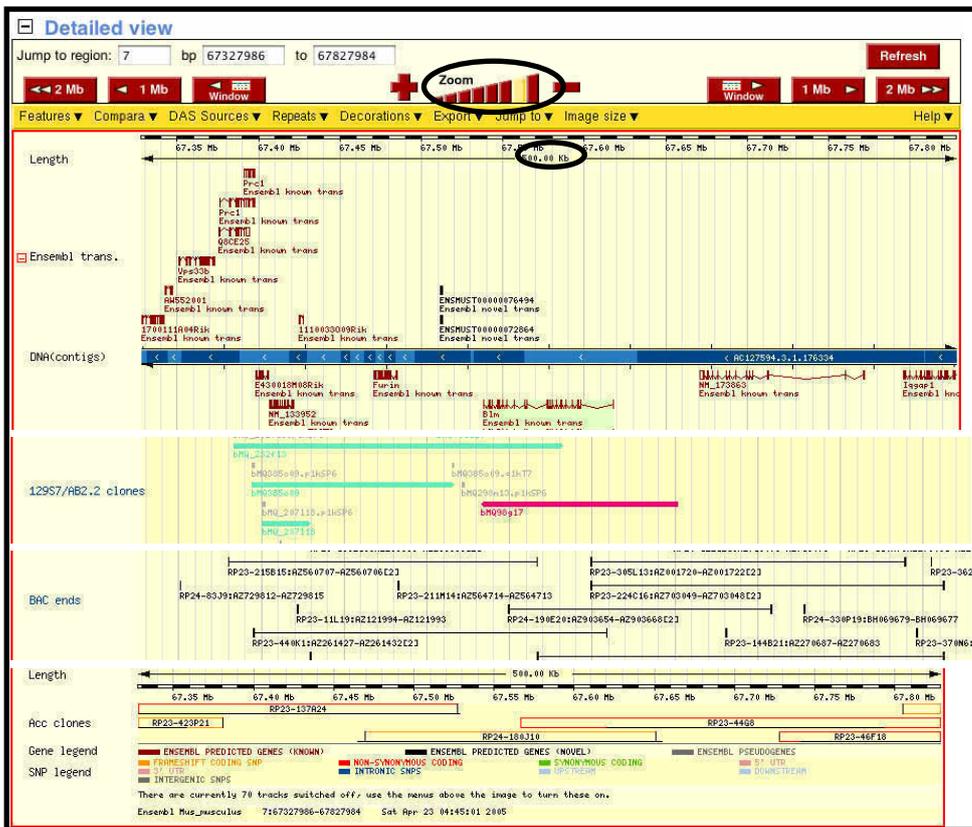
View gene in genomic locationの位置情報をクリック。



Contig Viewが表示される。

FeaturesやDAS sourcesから表示させたい項目にチェックを入れ、popup menuを閉じる。(BAC情報はDAS sources > BAC endsにチェック。)

BAC endsで表示されるBACはRP23やRP24と言ったC57Bl/6Jのライブラリーである。129S7/AB2.2 clonesからはSanger instituteから利用可能な129のBAC endsが表示される。



Contig view
BAC endが見えやすいようにZoomを調整して幅500kbくらいにする

DNAより上部分は転写の向きが右方向の遺伝子について表示されている。

DNAより下部分は転写の向きが左方向の遺伝子について表示されている。

129S7/AB2.2のBAC library

C57Bl/6JのBAC library

Acc clonesは、BAC insertのsequencingが完了またはほぼ完了し、accession numberを持っているCloneが表示されている。



選んだクローンについて、更に詳細な情報を得るため、BAC numberをひかえて、NCBIのclone registryに行く。

BAC clone の探し方 - NCBIを利用した方法 -

NCBIのwebでは、テキストサーチにより簡単にBACを探すことができる。またそのBACの完全sequenceのダウンロードが簡単に行える。

NCBI Mouse Genome Resources <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>

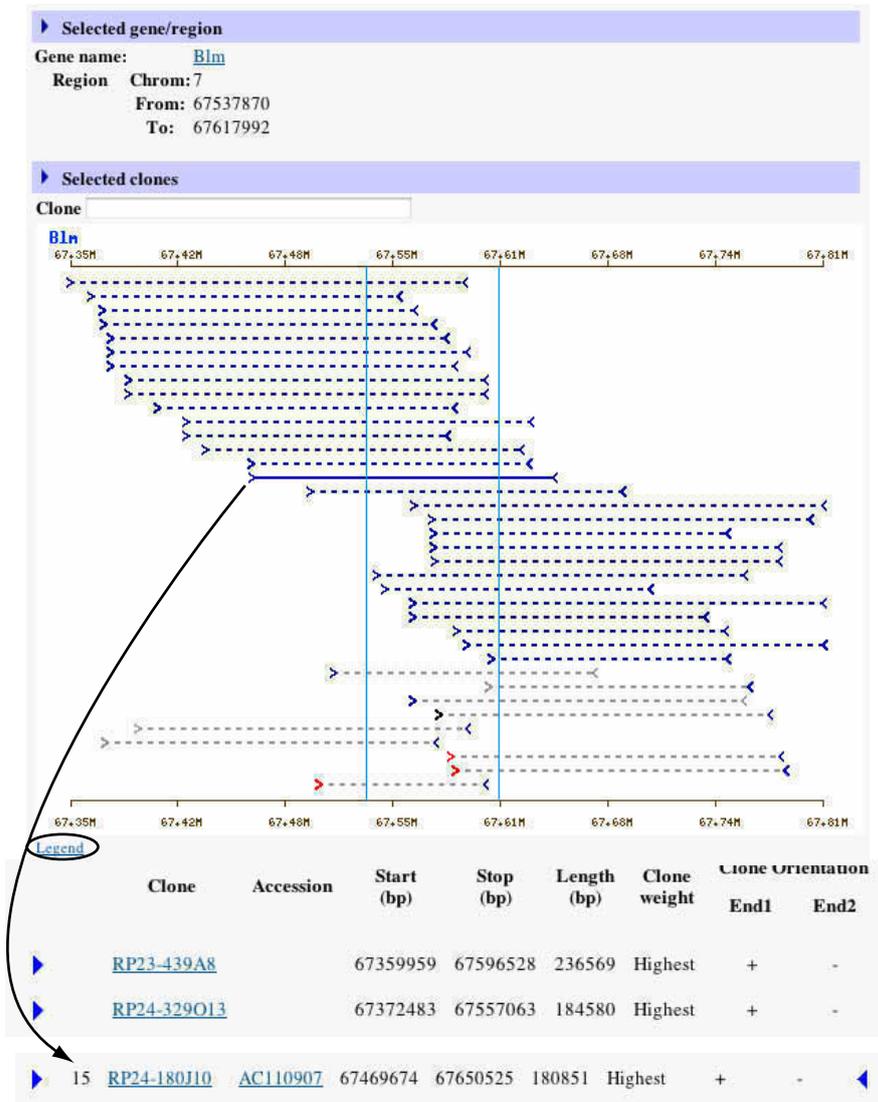
Clone Finder: 遺伝子名あるいはゲノムポジションから該当するBACを探してくれる。

Clone Registry: 各BACの詳細情報を検索することができる。

CloneFinder <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/clonefinder/CloneFinder.html>

遺伝子名を入力し、search開始。

Clone Finder の検索結果



水色の縦線で挟まれた間が検索に使用された region である。

実線は BAC sequence が完全に終了したもの（あるいは accessioned clone）で、点線は BAC end の sequence data をもとにマウスゲノムにアライメントされているものである。よって、実線の BAC を選ぶのが一番良い。

両端の矢頭にはそれぞれ意味がある。

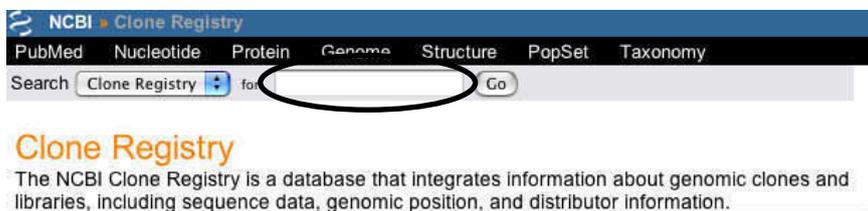
- > : unique, hit in the genome
- > : multiple hits
- > : doesn't hit genome, and is repetitive
- > : doesn't hit genome, and isn't repetitive
- > : hasn't been sequenced
- : end on another chromosome

詳細は、legend 参照。

下には、それぞれの BAC clone number が表示されていて、Clone Registry の BAC 詳細情報へリンクが張られている。

完全、あるいはほぼ sequence を終了したものについては、accession number がついており、sequence がダウンロードできる。

Clone Registry <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/clone/index.html>



Clone Registry では、BAC clone number からその詳細情報を得ることができる。Ensembl から clone を検索した時は、ここから更に情報を得る。

clone number を入力して、go。

NCBI Clone Registry

Search CloneRegistry for rp23-137A24 Go

Clone Registry Home Page

Clone Nomenclature

BAC End Report

Distributor Information

Clone-ID: RP24-180J10 **CurrState:** Accessioned

AC110907 is a component of mouse 7 contig NT_039428

FingerPrint Information: Yes

Sequence Information

Accession	G. Center	State	Seqlen(bp)
AC110907	WIBR	finished	179750

End-Sequence Information

Accession	Seqlen(bp)	Repeat	Hit	End
AZ894176	207	No	No	SP6
AZ894177	188	Yes	No	T7

Library Information

Name: RPCI mouse BAC library 24

Organism: Mus musculus **Type:** BAC

Approved: Unknown **Sex:** Male

Source: spleen/brain **Rsite:** MboI

Distributor Information

Available from clone library

Name: Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI)

Contact: Pieter J. de Jong

Email: BACPACorders@chori.org

Web: <http://bacpac.chori.org>

Phone: 510-450-7917

Clone Registry の検索結果 - 例 1

Accessioned: clone with sequence submitted to the public sequence databases. (UCSC Genome Informatics Terminology より)
よって、BAC insert の sequencing がかけられた clone。

FingerPrint Information : Yes の時は、HindIII digestion pattern の gel image が入手可能。ただし、少し面倒。

finished: BAC insert sequence が完了している。未完の場合、unfinished と出る。この場合、N がある。ただし、Genome database から sequence をダウンロードすることで N を埋められる可能性はある。

BAC end sequence がリンクされている。

RP23 と RP24 シリーズの BAC clone の注文は、BACPAC より購入する。web 上での発注で、約 1 週間で到着する。

NCBI Clone Registry

Search CloneRegistry for for Go

Clone Registry Home Page

Clone Nomenclature

BAC End Report

Distributor Information

Clone-ID: RP23-439A8 **CurrState:** Free

Comment: EndSeqInfo processing

FingerPrint Information: No

End-Sequence Information

Accession	Seqlen(bp)	Repeat	Hit	End
AZ299567	486	No	No	SP6
AZ299569	399	No	No	T7

Library Information

Name: RPCI mouse BAC library 23

Organism: Mus musculus **Type:** BAC

Approved: Unknown **Sex:** Female

Source: kidney/brain **Rsite:** EcoRI

Distributor Information

Available from clone library

Name: Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI)

Contact: Pieter J. de Jong

Email: BACPACorders@chori.org

Web: <http://bacpac.chori.org>

Phone: 510-450-7917

Transaction History

G. Center	Trans-State	Chrom	Result	Submit-date
SERVER	Free		Accept	03/29/2001

Clone Registry の検索結果 - 例 2

Free: Accessioned clone に対して、insert sequencing がなされていない clone。end sequence の情報をもとに genomic sequence に貼付けられている

CurrState が Free でも BAC end sequence がきちんとわかれば、genome sequence から間を埋めることで、便宜的に完全な BAC の配列を作ることは可能。ただし、個々の clone の deletion, insertion などが予測不能なので注意が必要。

BAC を発注する前に。。。

Emsembl 等の情報から BAC を選んでも、これが 100% 正しいかどうかはわからない。送付されて来る紙にもよく間違いがあるので、... といういいわけが書いてある。一つの遺伝子に対して二つは注文することをすすめる。受け取ったらまずグリセロールストックを作って、PCR で目的遺伝子が乗っていることを確認する (必須!!)

BAC の発注

BAC clone が決まれば、RP23 と RP24 シリーズの場合は BACPAC (<http://bacpac.chori.org/>) の web 上で発注する。129S7 BAC clone は、Sanger institute へ分与依頼を行う。詳細は <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/teams/team38/CloneRequest/CloneRequest>

BAC の配送方法

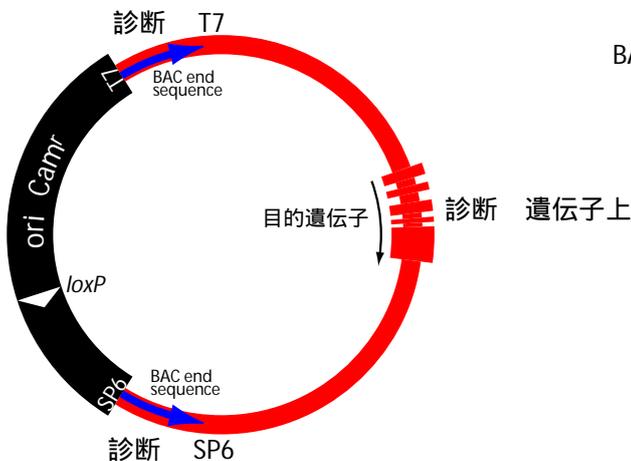
BAC を持った大腸菌は、BACPAC に発注した場合 FedEx にてスラントの状態ですら送られてくる。Invitogen からはグリセロールストックで来る。Sanger からは不明。いずれにせよ、到着したらすぐに起こせるように、LB+Cam(final. 12.5ug/ml、濃度注意。通常より薄め) プレートを作っておくこと。

BAC 取り扱い心得。。。

BAC の取り扱いには、少々注意が必要です。以下の三点は守った方が良い。

- BAC DNA は大腸菌内で保存。つまり、大腸菌のグリセロールストック保存が基本。
- プラスミドのように DNA にして保存し、それを再形質転換するのは厳禁。PCR の鋳型くらいなら OK。
- BAC を持った大腸菌をクローン化する時には、必ず PCR 診断を行う。欠失クローンを拾うのを防ぐ。

経験から言うとは、ほとんど欠失を見たことはありませんが、油断禁物。



BAC 診断

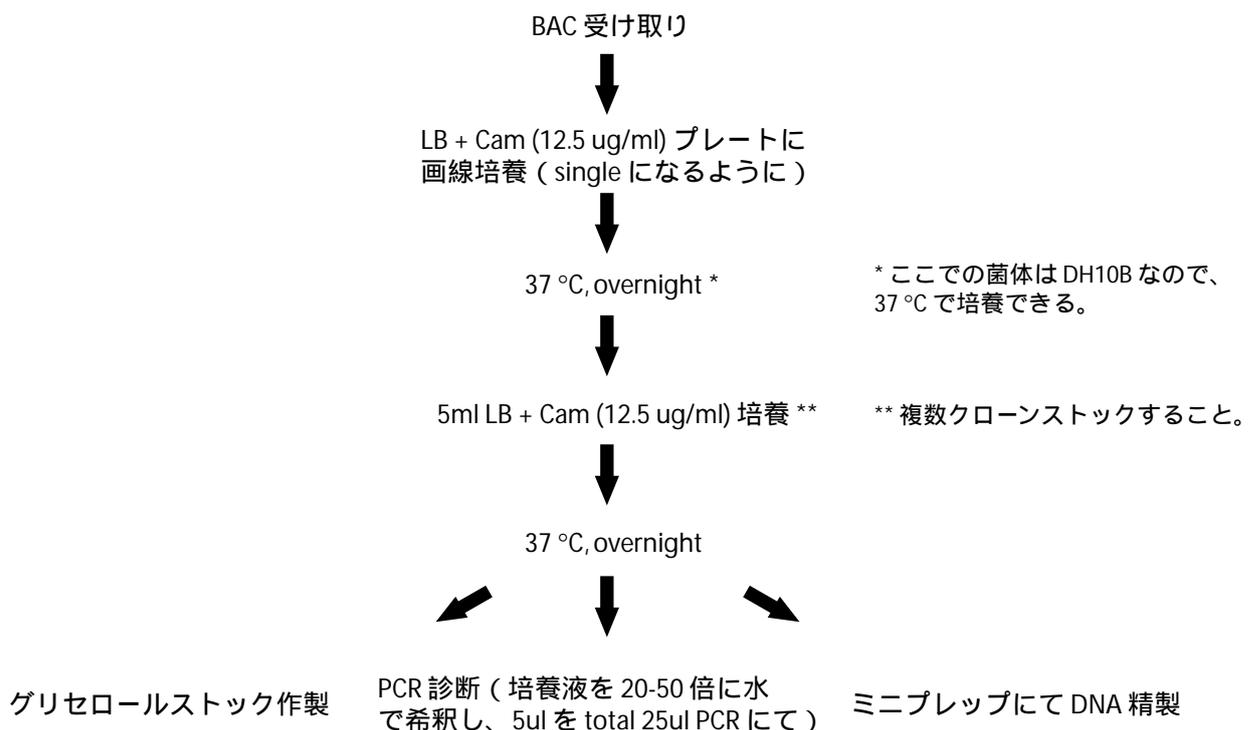
PCR

各 BAC に対し左の 3 箇所 PCR プライマーを各々設定する。サイズは 300-600 bp でよい。positive なら OK という方法で診断を行う。どんな BAC も BAC end-sequence はあるからその配列内に PCR をセットする。しかし、リピート配列とマッチしている場合には、ゲノムデータベースから内側の配列を抽出してリピートのないところに PCR を設定する。遺伝子上の PCR は、後で neo に置き換えるところには作らないように。

Finger print

FingerPrintInformation が "Yes" の時は、HindIII digest gel image がダウンロードできる。ただし、専用アプリケーションをダウンロードして使用するので少々面倒。またラダーパターンが Mupid の泳動程度ではみえにくい。ただし、欠失を調べるには有効な方法。

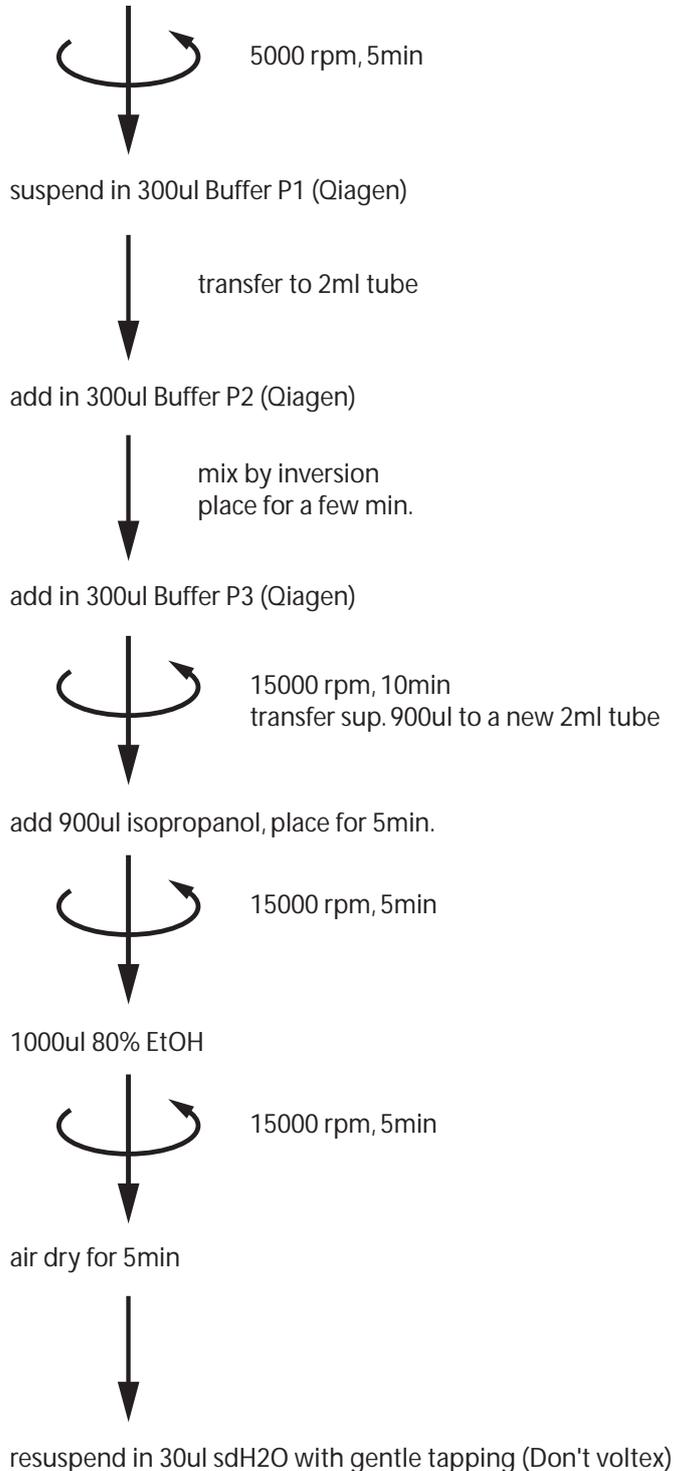
BAC を受け取った後の作業



BAC DNA mini-preparation

- LB media
- Chloramphenical (Cam) stock: 12.5 mg/ml in 100% EtOH, stored at -20 °C
- Buffers from Qiagen large-prep kit (Maxi etc.) (Buffer P1 containing RNase)

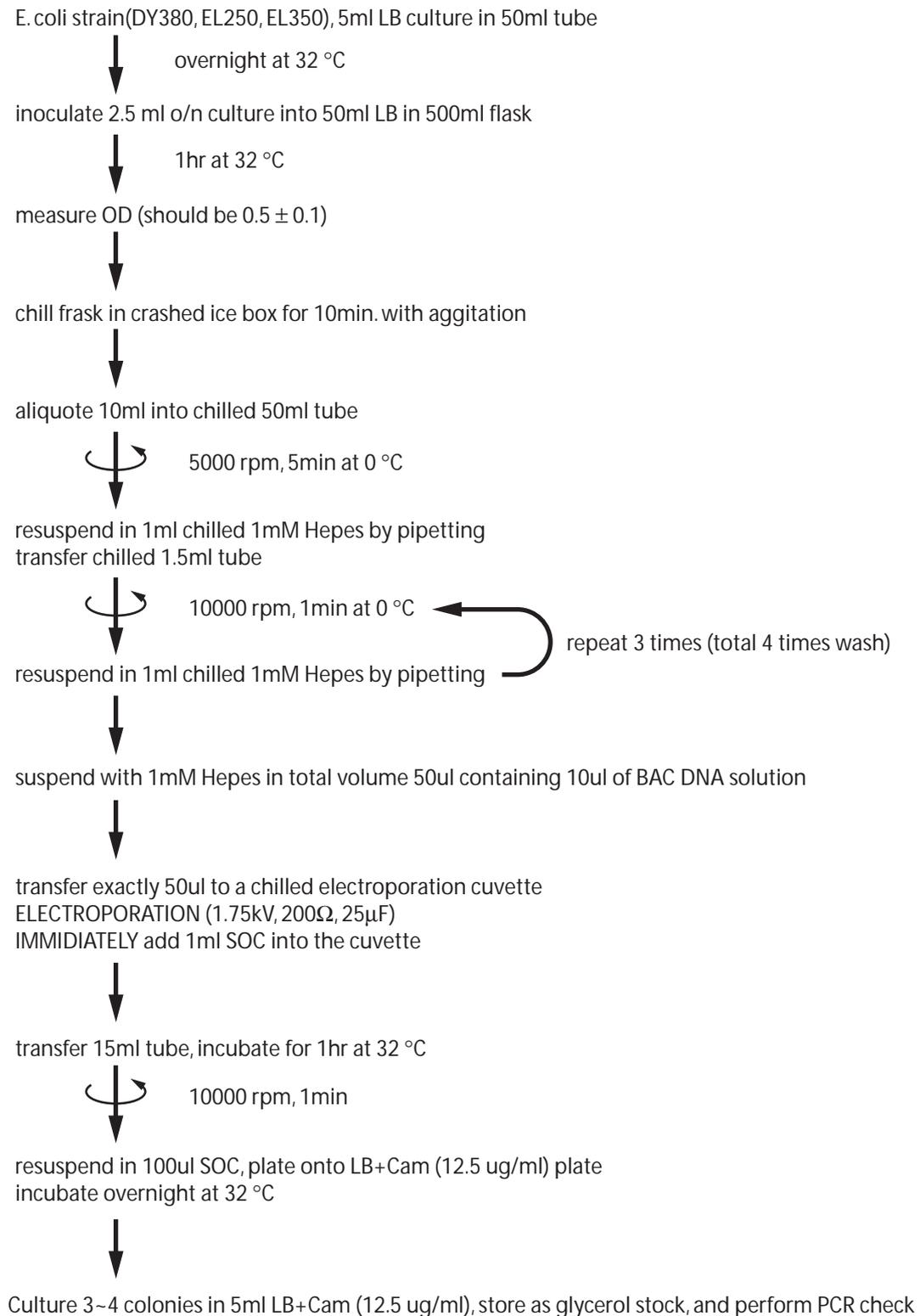
LB+Cam(12.5ug/ml), 5ml culture in 50ml tube
overnight at 37 °C (DH10B) or 32 °C (DY380, EL250, EL350)



BAC DNA transfer

- LB media
- LB plate with Cam(12.5 ug/ml)
- SOC media
- 32 °C incubator
- autoclaved 500ml flask
- 1M Hepes (Gibco 15630-080)
- electroporation cuvette
- electroporation apparatus

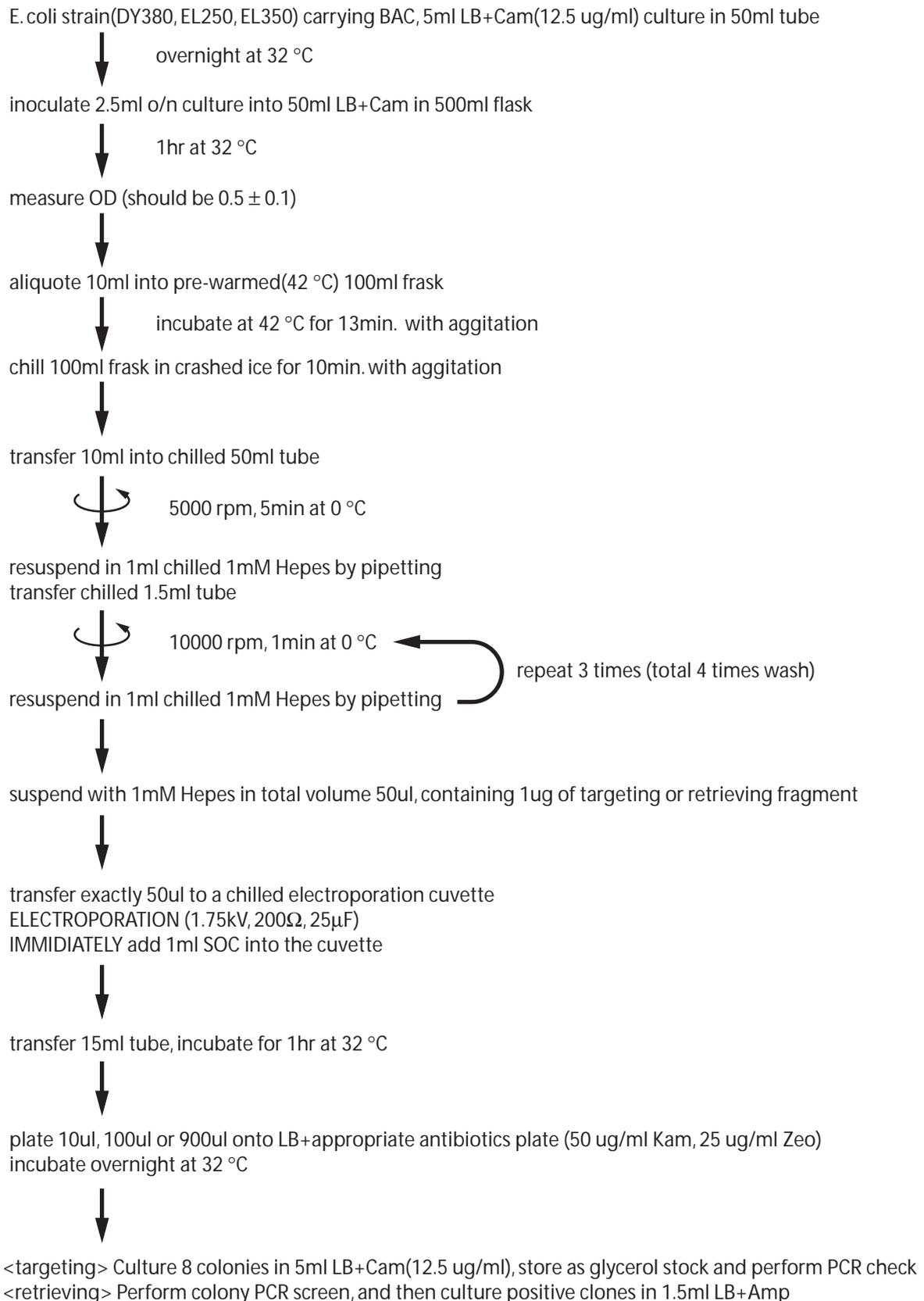
* To keep cold, all prastic material (pipet tips, tubes)should be pre-chilled at 4 °C



BAC DNA modification & retrieving

- LB media
- LB plate with antibiotics
- SOC media
- 32 °C incubator
- 42 °C water bath
- autoclaved 100 and 500 ml flask
- electroporation cuvette
- electroporation apparatus
- 1M Hepes (Gibco 15630-080)

* To keep cold, all prastic material (pipet tips, tubes) should be pre-chilled at 4 °C



Ara-Cre (Ara-Flp)-mediated neo deletion

- LB media
- Chloramphenical (Cam) stock: 12.5mg/ml in 100% EtOH, stored at -20 °C
- 10% L-arabinose (in water) (L-(+)-arabinose, SIGMA, A3256), stored at -20 °C
- LB+Cam plate

E. coli strain(EL250, EL350) carrying BAC, 5ml LB+Cam(12.5ug/ml) culture in 50ml tube



overnight at 32 °C

inoculate 1ml o/n culture into 20ml LB+Cam in 100ml flask



1hr at 32 °C

add 0.2ml 10% arabinose



1hr at 32 °C

dilute 10^{-4} and 10^{-5} with SOC and plate 50 ul onto LB+Cam plate



overnight at 32 °C

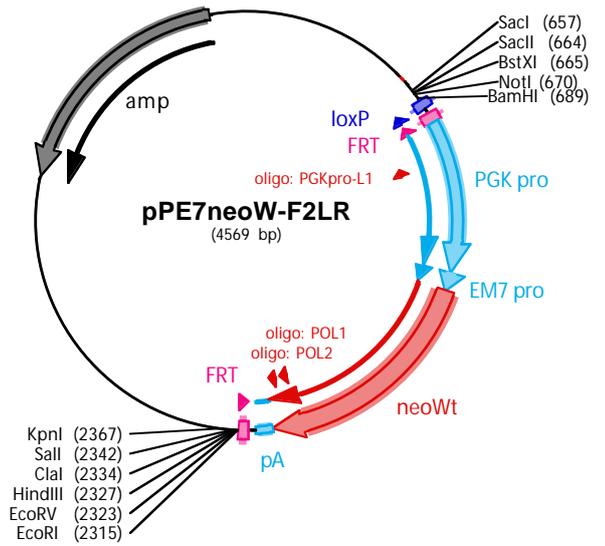
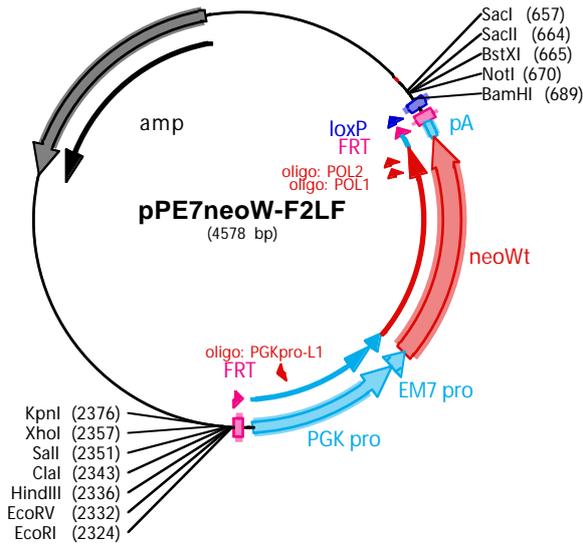
check neo-deletion by colony PCR and inoculate correct clones in 5ml LB+Cam(12.5 ug/ml)



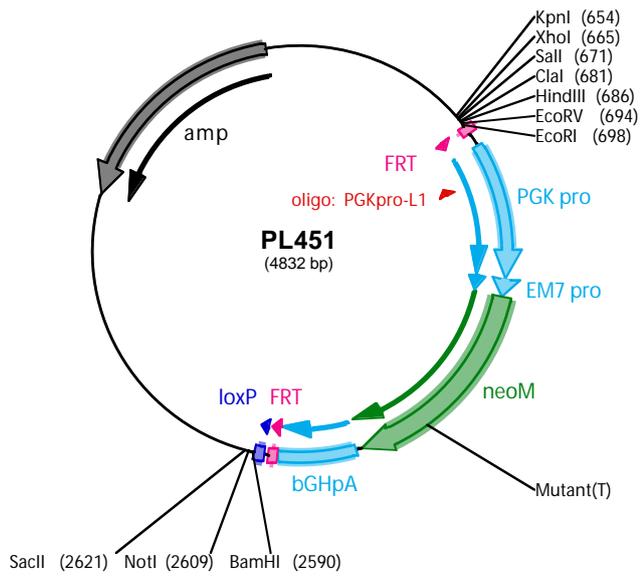
overnight at 32 °C

re-check deletion by PCR (and also perform BAC check) and store as glycerol stock

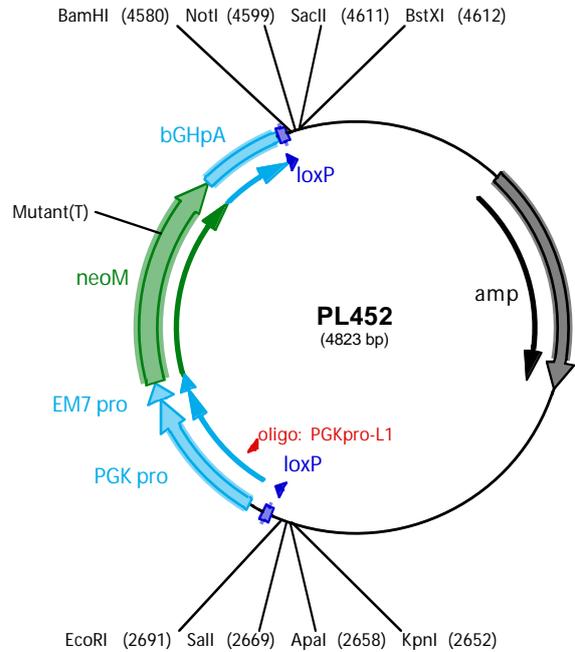
Conditional allele 作製のFRT-loxP-neoカセット



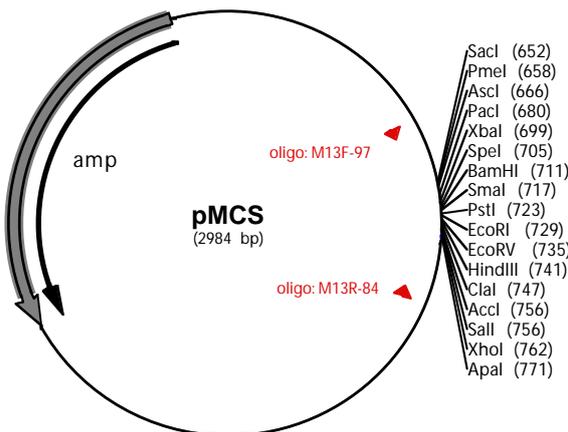
Conditional allele 作製のFRT-loxP-neoカセット (by N. Copeland)



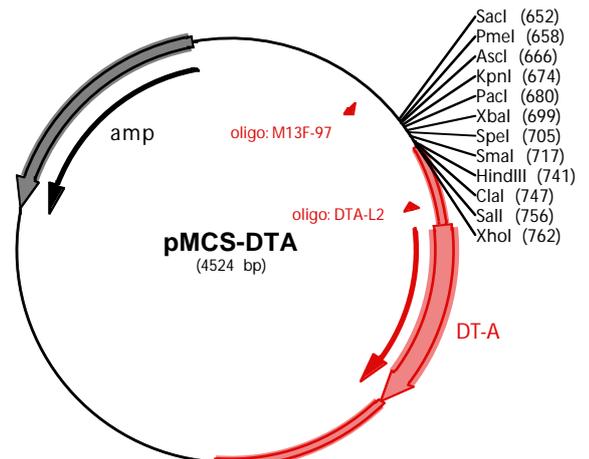
loxP site 挿入用のloxP-neoカセット (by N. Copeland)



retrieve 用プラスミド (control vector)

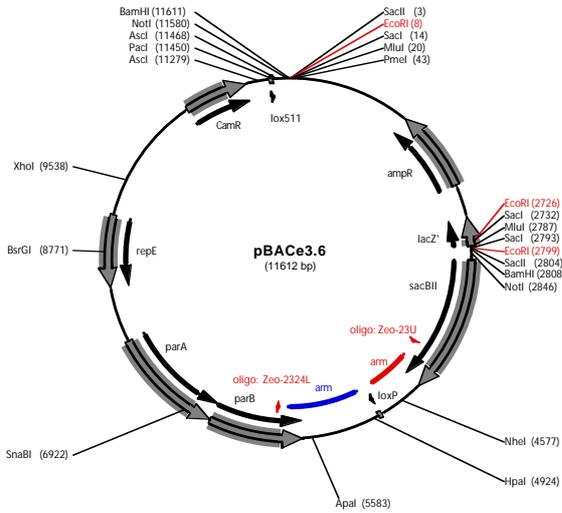


retrieve 用プラスミド (targeting vector)



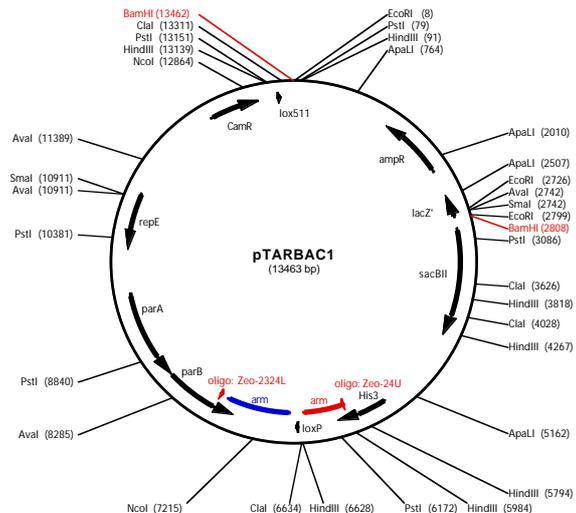
RP23 BAC のbackbone vector

pBACe3.6 の EcoRI(8)-EcoRI(2799) の間に、マウス C57BL/6J の腎臓または脳の DNA を EcoRI 消化した断片がクローニングされている。

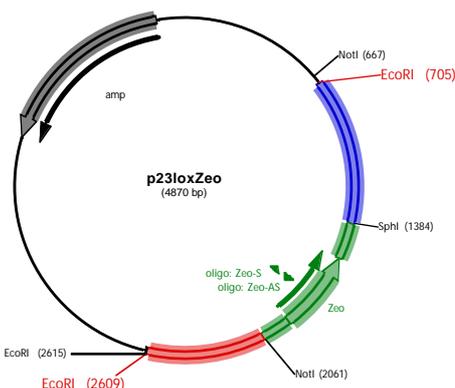


RP24 BAC のbackbone vector

pTARBAC1 の BamHI(13462)-BamHI(2808) の間に、マウス C57BL/6J の腎臓または脳の DNA を MboI 消化した断片がクローニングされている。

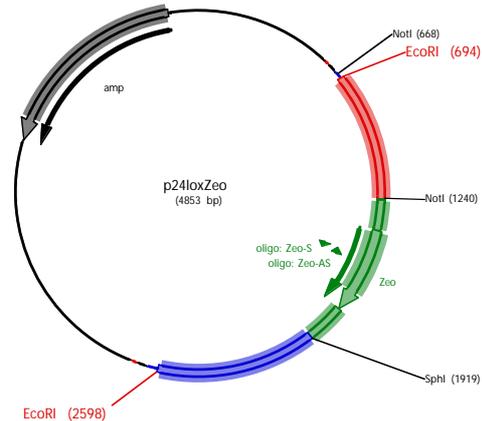


RP23 BAC のloxP siteをZeoに置換するベクター

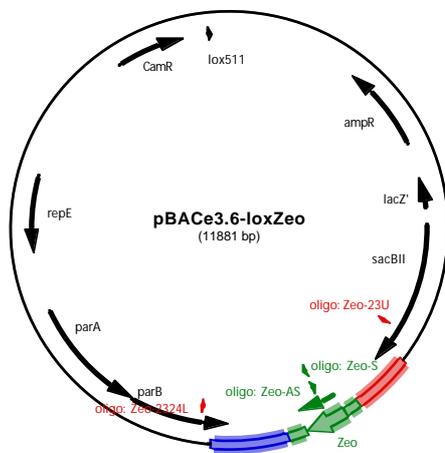


EcoRI 消化により 1.9kb の fragment をゲル精製し、targeting に使用する。

RP24 BAC のloxP siteをZeoに置換するベクター

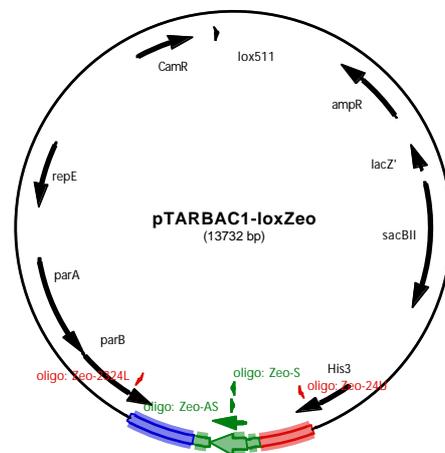


EcoRI 消化により 1.9kb の fragment をゲル精製し、targeting に使用する。



loxZeo exchange of pBACe3.6 backbone

PCR amplicon size
 upper arm (red): Zeo-23U x Zeo-AS amplicon, 1059 bp
 lower arm (blue): Zeo-S x Zeo2324L amplicon, 1215 bp



loxZeo exchange of pTARBAC1 backbone

PCR amplicon size
 upper arm (red): Zeo-24U x Zeo-AS amplicon, 879 bp
 lower arm (blue): Zeo-S x Zeo2324L amplicon, 1215 bp

Primer Sequence List

Primer name	Sequence
POL1	GAATGGGCTGACCGCTCCTCGTGCTTAC
POL2	CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGAG
PGKpro-L1	GTTGGCGCCTACCGGTGGATGTGGAATGTG
M13F-97	TCGGTGCGGGCCTCTCGCTATTAC
M13R-84	ACTCATTAGGCACCCAGGCTTAC
DTA-L2	CGCCGCCCGACTGCATCTGCGTGTC
Zeo-23U	CGGCAAATGGTACTTGTTCACTGATCACG
Zeo-2324L	AGGAATTACTTAAGCAGCAGGCATCTAACC
Zeo-24U	TCCACGTGATTGTCTGCGAGGCAAGAATG
Zeo-S	GGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGT
Zeo-AS	ACCGCGCTGATGAACAGGGTCACGTCGTCC