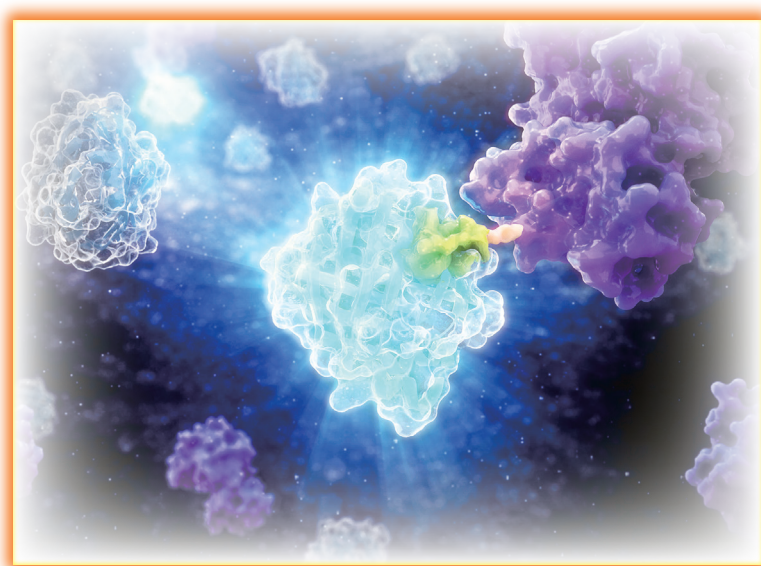
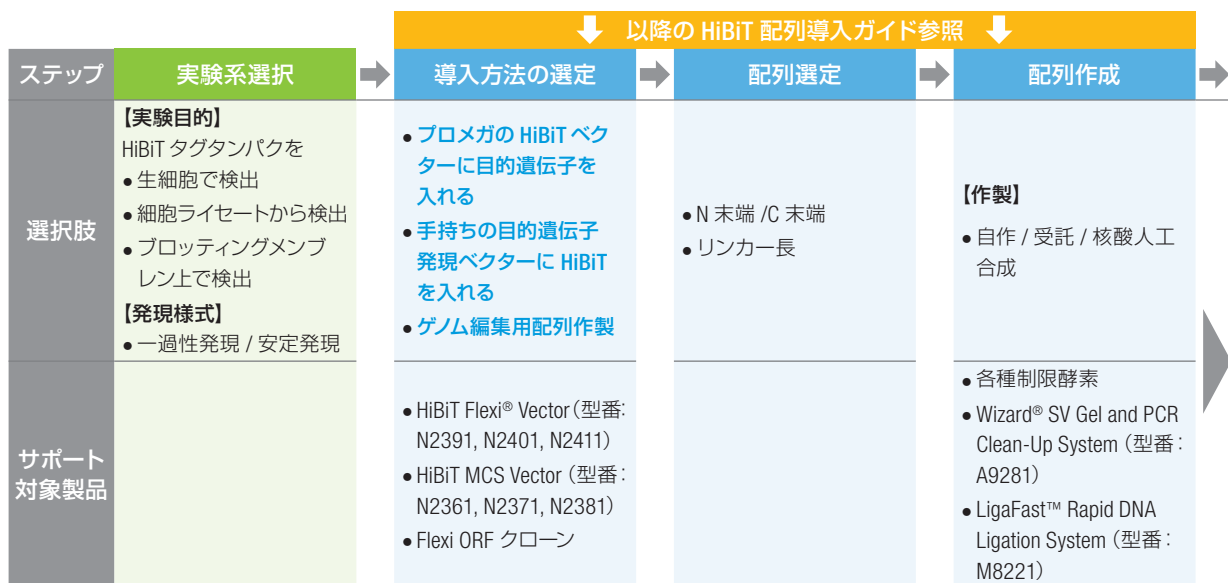


HiBiT 実験 クイックスタートガイド



HiBiT 実験のワークフロー



自作

1 ~ 2 週間

ベクター代金 + 1 万円 ~

受託

クローニング受託サービス

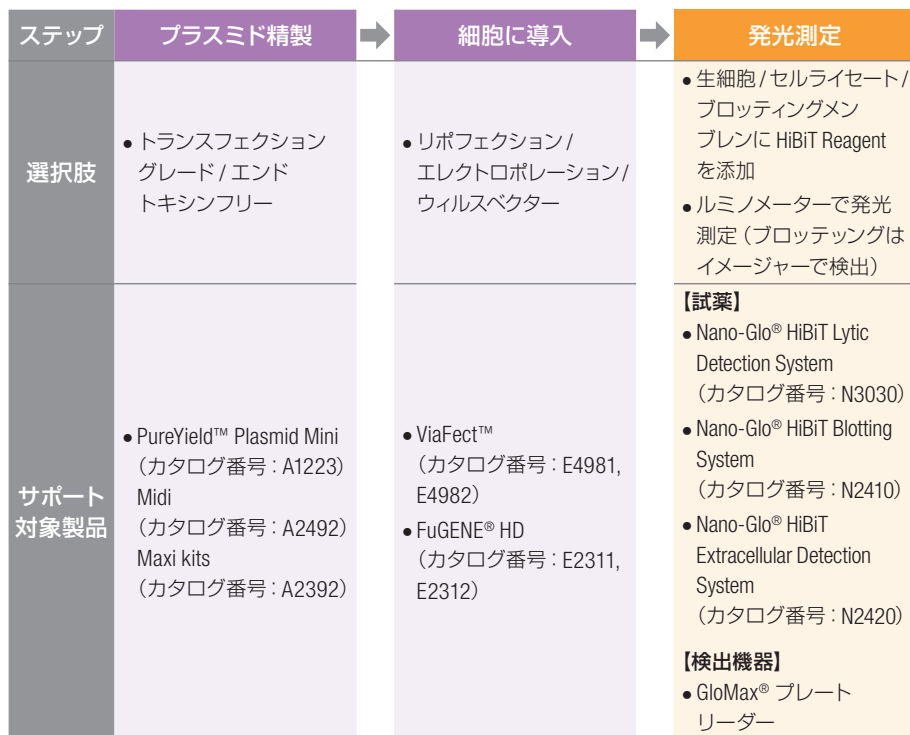
約 1 ヶ月 10 万円 ~

核酸人工合成受託

約 1 週間 数千円 ~

ゲノム編集用 核酸合成受託

約 1 ヶ月 10 万円 ~



2 ~ 3 日

2 ~ 3 日

① HiBiT 発現ベクターへの標的遺伝子の組み込み

クローニングビギナー向け

a) Flexi® クローニング

HiBiT Flexi® Vector
カタログ番号：N2391, N2401, N2411

ORF

- ORF クローン購入
- HiBiT ベクター購入
- Flexi® クローニング
- サブクローニング受託*

Flexi® ORF Clone

約 20,000 ヒト遺伝子

or

標的遺伝子 (自作の場合)

※オプション

コスト	○	ベクター代金 + ORF クローン代金 約 6 万円～ (またはクローニング費用 約 1 万円～ [自作の場合])
容易性	◎	
作業時間	◎	1～2 週間

b) MCS クローニング

HiBiT MCS Vector
カタログ番号：N2361, N2371, N2381

ORF

- HiBiT ベクター購入
- PCR, 制限酵素処理、ライゲーション

標的遺伝子 (自作の場合)

コスト	◎	ベクター代金 + クローニング費用 約 1 万円～
容易性	◎	
作業時間	◎	1～2 週間

② 保有する標的遺伝子発現クローンへの HiBiT の組み込み

クローニングに慣れている方向け

標的遺伝子
発現クローン

HiBiT

- 配列の人工合成 / PCR
- アニーリング, 制限酵素処理、ライゲーション

HiBiT配列

コスト	◎	核酸合成 約 1 万円～ + クローニング 約 1 万円～
容易性	○	
作業時間	◎	約 1 週間

③ ゲノム編集による内在遺伝子への HiBiT の組み込み

ゲノム編集 (内在レベルの発現を希望する方)

ゲノム

HiBiT

- 配列の人工合成
- CRISPR / Cas9 法

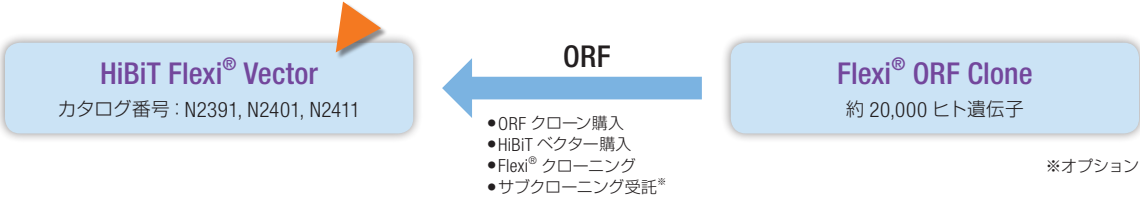
HiBiT配列

コスト	○	核酸人工合成費用 約 10 万円～
容易性	○	
作業時間	○	受託約 1 か月

ライセンスについて：▶ ラベルライセンスの内容を承認いただく必要があります (従来のレポーターベクター等と同様)。

▶ ラベルライセンスの内容を承認、登録していただく必要があります (1 分で終了する配列利用に関する簡単な登録です)。タグ配列の合成については www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/ でご登録ください。

(A) Flexi® クローニング (Flexi® ORF クローンを利用する場合)



▶ ラベルライセンスの内容を承認いただく必要があります (従来のレポーターベクター等と同様)。

手 順

- ① 目的遺伝子の選択
- ② HiBiT Flexi® Vector (カタログ番号: N2391, N2401, N2411) および Flexi® ORF Clone を購入
- ③ Flexi® Cloning System (カタログ番号: C8640, C9320, C8820) で Flexi クローニング (N 末端 and/or C 末端付加) *
- ④ HiBiT 付加遺伝子発現クローン完成

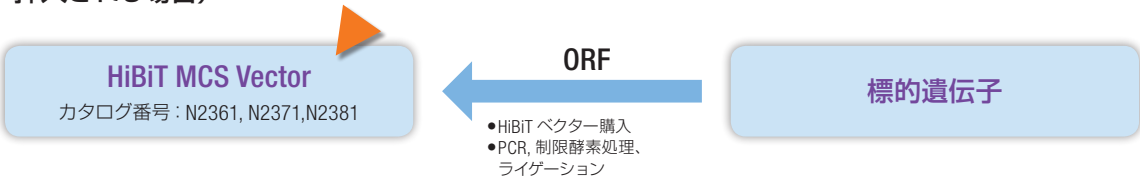
※リンカーは下図の配列が付加される。

HiBiT Flexi® Vector のリンカー配列

ベクター名	融合タンパク質
pFC37K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	POI-VSQGSSGGSSG-HiBiT
pFN38K HiBiT CMV-neo Flexi® Vector	HiBiT-GSSGGSSGAIA-POI
pFN39K secHiBiT CMV-neo Flexi® Vector	IL6-HiBiT-GSSGGSSGAIA-POI

POI: protein of interest

(B) MCS クローニング (ご自身で準備された遺伝子をマルチクローニングサイト [MCS] より挿入される場合)



▶ ラベルライセンスの内容を承認いただく必要があります (従来のレポーターベクター等と同様)。

手 順

- ① 目的遺伝子の選択
- ② ご自身の遺伝子クローンや cDNA を準備
- ③ PCR and/or 制限酵素処理により目的遺伝子 ORF を単離*
- ④ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (カタログ番号: A9281) で精製
- ⑤ HiBiT MCS Vector (カタログ番号: N2361, N2371, N2381) と ORF を LigaFast™ Rapid DNA Ligation System (カタログ番号: M8221, M8225) ライゲーション、クローニング
- ⑥ HiBiT 付加遺伝子発現クローン完成

※右図の制限酵素サイト、下図のリンカー配列を参照。

pBiT3.1 Vector の SacI, XhoI, EcoRI, BamHI サイトでのリンカー配列

ベクター名	融合タンパク質	MCS 制限酵素サイト
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector	HiBiT-GSSG-POI	SacI
	HiBiT-GSSGGSSG-POI	XhoI
	HiBiT-GSSGGSSGGNS-POI	EcoRI
	HiBiT-GSSGGSSGGNSGGGS-POI	BamHI
pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector	POI-GSSG-HiBiT	SacI
	POI-GSSGGSSG-HiBiT	XhoI
	POI-GNSGGSSGGSSG-HiBiT	EcoRI
	POI-GSGGNSGSSGGSSG-HiBiT	BamHI
pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector	IL6-HiBiT-GSSG-POI	SacI
	IL6-HiBiT-GSSGGSSG-POI	XhoI
	IL6-HiBiT-GSSGGSSGGNS-POI	EcoRI
	IL6-HiBiT-GSSGGSSGGNSGGGS-POI	BamHI

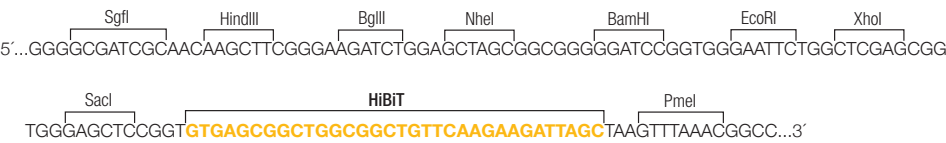
POI: protein of interest

pBiT3.1 Vector の MCS で利用できる制限酵素サイト

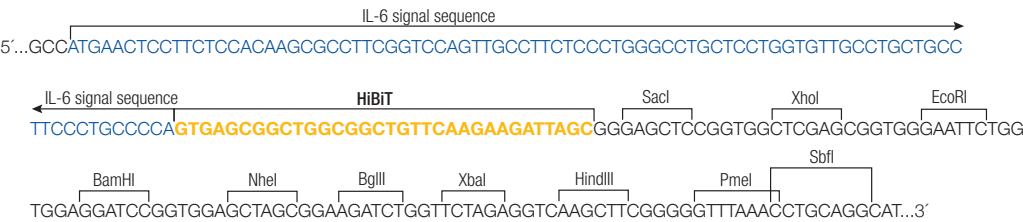
pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector



pBiT3.1-C [CMV/HiBiT/Blast] Vector



pBiT3.1-secN [CMV/HiBiT/Blast] Vector

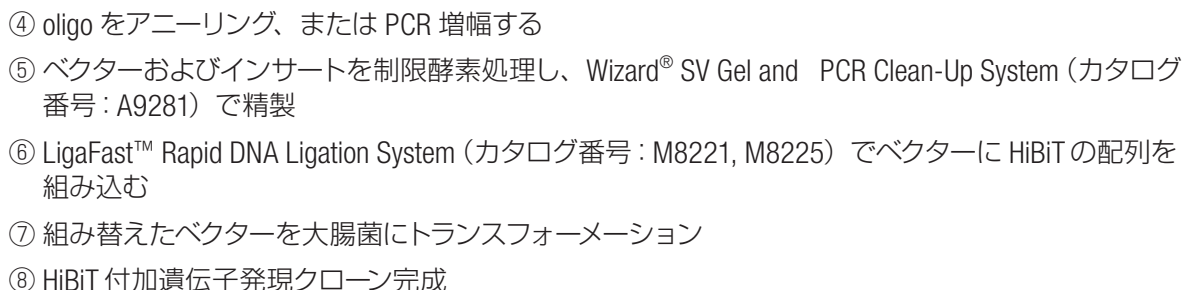


142808A



手順

- ### 〈oligo のデザイン例〉



(B) HiBiT 挿入予定位置に制限酵素切断配列がない場合

In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社) を使用する例

手 順

- ① ライセンス承認登録 www.promega.co.jp/nanobitsynthesis/
- ② 手持ちの目的遺伝子発現ベクターへの HiBiT の挿入位置を決定
- ③ インサート作製用 oligo のデザインおよび発注※

※ PCR で増幅の場合はプライマー発注。

〈例〉

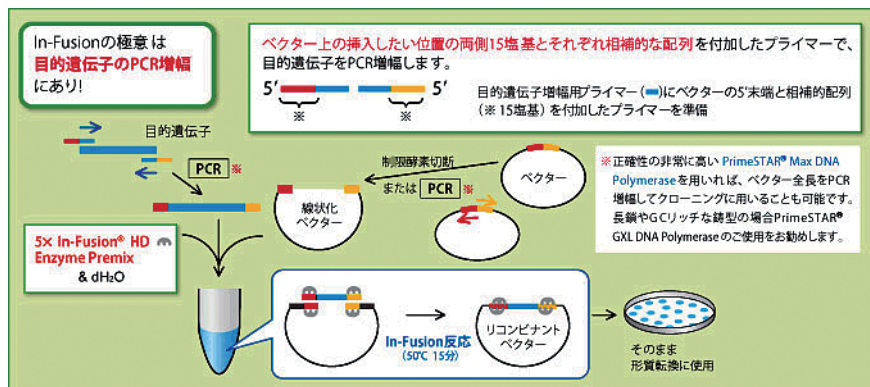
HiBiT 配列

Forward : NNNNNNNNNNNNNNNNNXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXNNNNNNNNNNNNNNNN

Reverse : NNNNNNNNNNNNNNNNNXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXNNNNNNNNNNNNNNNN

※ N はベクターと相同な 15 塩基。Linker は考慮していない。

- ④ oligo をアニーリング、または PCR 増幅する
- ⑤ ds-oligo として、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (カタログ番号 : A9281) で精製
- ⑥ In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ社) でベクターに HiBiT の配列を組み込む
- ⑦ 組み替えたベクターを大腸菌にトランスフォーメーション



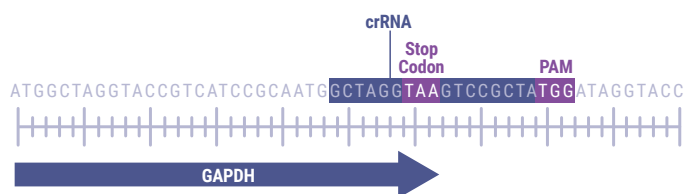
タカラバイオ社 HP より



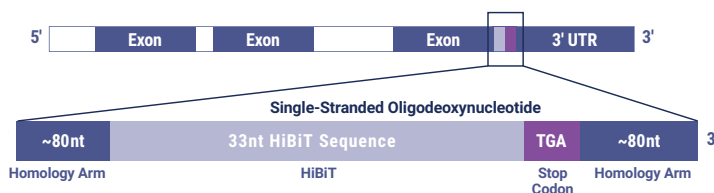
CRISPR/Cas9 ゲノム編集による HiBiT ノックインプロトコルを参照ください。 www.promega.co.jp/hibitcrispr/

手 順

- ① ライセンス確認登録
- ② ゲノム上のターゲット配列確認
- ③ crRNA のデザインおよびガイド RNA (crRNA + tracrRNA) のデザインおよび発注



- ④ HiBiT Donor DNA template のデザインおよび発注



●ゲノム編集用の試薬・核酸等 約 10 万円～

※以下は（他社）参考例です。

- CRISPR/Cas RNA セット
crRNA と tracrRNA のセット
価格：30,000 円
納期：1 週間 ～
- sgRNA
3 種：70,000 円
納期：1 週間 ～
- Cas9 タンパク質
価格：100 µg / 22,000 円
- Donor DNA
塩基数：201 ～ 500 nt
価格：50,000 円
納期：20 営業日

日本語 Web site : www.promega.jp

テクニカルサービス • Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 • E-Mail : prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本 社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモトビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

※製品の仕様、価格については2017年9月現在のものであり予告なしに変更することがあります。

販売店