

# Yamamoto lab TALEN construction & evaluation protocol

Ver. 1.4

Apr. 2013

広島大学大学院 理学研究科 数理分子生命理学専攻  
分子遺伝学研究室 (山本卓研究室)  
〒739-8526 東広島市鏡山 1-3-1

佐久間哲史

E-mail: [tetsushi-sakuma@hiroshima-u.ac.jp](mailto:tetsushi-sakuma@hiroshima-u.ac.jp)

TEL: 082-424-7448

本書では、「Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0」および「Yamamoto Lab TALEN Accessory Pack」(共に Addgene より入手可能) を利用した、効率的な TALEN の作製法及び切断活性の評価法 (Sakuma *et al.*, Genes to Cells, 2013; <http://dx.doi.org/10.1111/gtc.12037>) について記す。

本実験を行う際には、Voytas ラボの原著論文 (<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr218>) 及びオリジナルのプロトコール (Addgene のウェブサイト (<http://www.addgene.org/TALeffector/goldengateV2/>) から pdf ファイルをダウンロードできる) にも予め目を通しておくこと。

## ■目次

概要	.....	2
必要なもの	.....	4
方法		
1. TALEN の設計	.....	6
2. 6-module assembly -STEP 1-	.....	6
3. 6-module assembly -STEP 2-	.....	8
4. SSA assay	.....	10

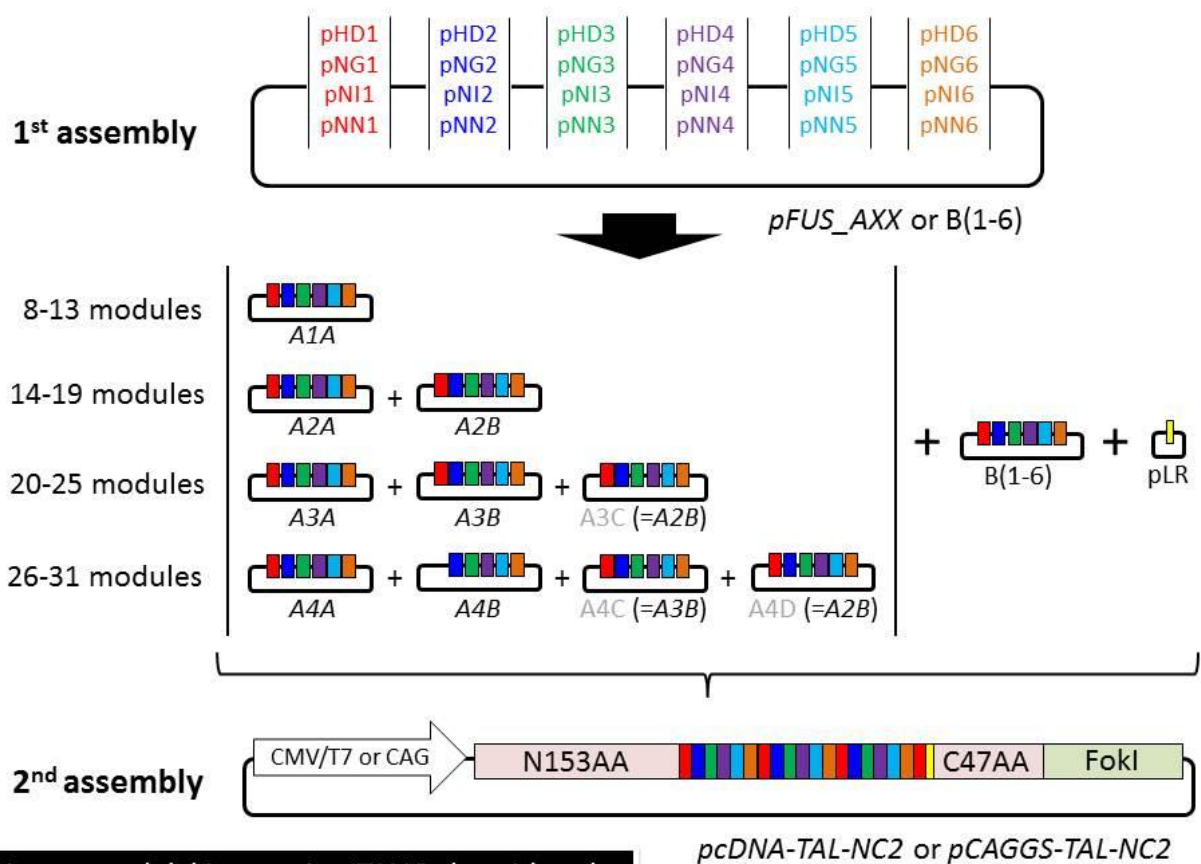
## ■概要

○オリジナルの手法との主な相違点

### アセンブリーの効率化

本法では、効率的かつ再現性良く TALE のアセンブリーを行うため、一度に連結するリピートの数を **最大で6つまで**に制限している（オリジナルの方法は最大で10）。また、オリジナルの Golden Gate 法で用いられる single reaction での digestion & ligation 法に加え、予めフラグメント化した断片を繋ぎ合わせる手法を採用することで、更なるアセンブリーの効率化に成功している。更に2段階目のアセンブリーに用いる backbone vector を pcDNA (Invitrogen) ベースにすることで、**TALE のアセンブリーが完了すると同時に CMV promoter を有する哺乳動物発現ベクターが完成し、mRNA 合成にもそのまま使用することができる。**

### 6-module assembly 法の概略



Yamamoto lab kit contains *ITALIC* plasmids only.  
Others are included in the Voytas lab kit.

### 哺乳動物培養細胞を用いた活性測定

作製した TALEN の評価については、オリジナルでは酵母のアッセイ系を用いているが、本法では当研究室で ZFN の活性測定において実績のある **哺乳動物培養細胞**での **single-strand annealing (SSA) アッセイ**を採用している。これにより、作業効率の改善と大幅な時間短縮を実現した。加えて本法で評価される TALEN の切断活性は、酵母での活性スコアと比して、**動物個体ならびに動物培養細胞への用途においてより信頼性の高い評価基準**となり得る。

### TALE の N 末・C 末欠失による切断活性の向上

本法では、オリジナルの TALEN scaffold から N 末・C 末ドメインを部分的に欠失させた **deletion scaffold** を利用する。この **deletion scaffold** を用いることで、特定のスペーサー長を有する標的配列に対する**切断活性が劇的に上昇**することが明らかとなっている。なお **deletion scaffold** の TALEN を作製する場合にも、追加でベクターの移し替え等を行う必要はなく、専用の **backbone vector** を用いることで**通常の 2 段階のアセンブリーによって作製が完了**する。

## ■必要なもの

○Plasmid

### TALEN construction

#### 1. Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0

(<http://www.addgene.org/TALeffector/goldengateV2/>)

本法で TALEN を構築する場合、キットに含まれるプラスミドの中で必要なものは下記の 34 種類である。

Module plasmids: **pHD1-6, pNG1-6, pNI1-6, pNN1-6\***

\*pNN1-6 の代わりに pNK1-6 あるいは pNH1-6 を使用することもできる。

Array plasmids: **pFUS\_B1-6**

Last repeat plasmids: **pLR-HD, NG, NI, NN**

#### 2. Yamamoto Lab TALEN Accessory Pack

(<http://www.addgene.org/TALEN/Yamamotolab/>)

以下のプラスミドが含まれる。

Array plasmids: **pFUS\_A1A, A2A, A2B, A3A, A3B, A4A, A4B**

Destination vector plasmids: **pcDNA-TAL-NC2, pCAGGS-TAL-NC2\***

\*pcDNA-TAL-NC2 は、Sakuma et al., 2013 の pcDNA-TAL-NC の FokI を ZFN 由来のもの（アミノ酸配列は Voytas kit と全く同じだが、codon usage が植物に寄っていないもの）に置換し、N 末端付近に Flag tag を付加したベクターである。pcDNA バージョンは CMV/T7 プロモーターを有し、pCAGGS バージョンは CAG プロモーターを有している。

### SSA assay

pGL4-SSA（「Yamamoto Lab TALEN Accessory Pack」に含まれる）

pRL-CMV（Promega）

○試薬類（一般的な PCR 酵素、培養細胞関連試薬等は除く）

#### TALEN construction

メーカー	品名	カタログ番号	unit, 個数など
NEB	Quick Ligation Kit	M2200S	30 回分
		M2200L	150 回分
NEB	BsaI-HF	R3535S	1000 units
		R3535L	5000 units
Fermentas	Esp3I	ER0452	1000 units
NEB	BspEI	R0540S	1000 units
NEB	NarI	R0191S	500 units
Invitrogen	ChargeSwitch-Pro Plasmid Mini Kit	CS30250	250 回分
Promega	Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	A9282	250 回分

### SSA assay

メーカー	品名	カタログ番号	unit, 個数など
Promega	Dual-Glo Luciferase Assay System	E2920	10ml
Invitrogen	Lipofectamine LTX	15338-100	1ml

### ○Primer

#### TALEN constructon

pCR8\_F1, pCR8\_R1, TAL\_F1, TAL\_R2 (オリジナルのプロトコールに記載のプライマー)

### SSA assay

Luc2-up-F: ctcagcaaggagtaggtgagg

Luc2-down-R: tgatecgtagcttcttttgcac

(SSA レポーターベクターのシーケンスに使用)

## ■方法

### 1. TALEN の設計

TALEN の標的配列の検索には、Cornell University のウェブサイト上で利用できるオンラインツール「TALEN Targeter」を使用する。

TALEN Targeter

<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>

※ 「TALEN Targeter (old version with design guidelines)」を選択する。

広島大・山本研におけるこれまでの評価実績から、pcDNA/pCAGGS-TAL-NC2 ベクターを用いる場合、Spacer は 15 bp 周辺に設定 (12-16 程度)、Repeat Array は 16-20 程度に設定するのが好ましいと思われる。また「Require a T at position N」のチェックボックスは外しても構わない。

### 2. 6-module assembly -STEP 1-

1 で選定した標的配列に対応する RVD リピートの連結を行う。本法では、最終的に 8~31 モジュールを有する TALEN を作製することが可能であり (オリジナルは 12~31)、目的のモジュール数に応じて STEP 1 で選択するベクターの組み合わせを変える必要がある。モジュール数とベクター構成の対応表を以下に示す。

8-13 modules :		pFUS_A1A		pFUS_B1-B6		pLR-NG**
		6	+	(1-6)	+	1
14-19 modules :		pFUS_A2A		_A2B		
		6	+	6	+	(1-6) + 1
20-25 modules :		pFUS_A3A		_A3B		_A3C*
		6	+	6	+	6 + (1-6) + 1
26-31 modules :		pFUS_A4A		_A4B		_A4C* _A4D*
		6	+	6	+	6 + 6 + (1-6) + 1

\* A3C, A4C, A4Dは便宜上の名称であり、実際にはA3C=A2B, A4C=A3B, A4D=A2Bである。

\*\* 「Require a T at position N」のチェックボックスを外した場合は、配列に応じて pLR-HD, NG, NI, NNのいずれかを選択する。

一例として、ヒトの HPRT1 遺伝子を標的とした TALEN を作製する場合の手順を記載する。標的配列は下記の通りであり、モジュール数は Left TALEN が 20, Right TALEN が 17 である。

Left TALEN

5' -CCATTCCTATGACTGTAGAT TTTATCAGACTGAAG AGCTATTGTGTGAGTAT-3'

3' -GGTAAGGATACTGACATCTA AAATAGTCTGACTTC TCGATAACACACTCATA-5'

Right TALEN

この場合、STEP 1 のベクター・インサートの組み合わせは次表の通りとなる。なお最終モジュールは STEP 2 で Last repeat として加えることとなるため、ここでは考慮に入れない。

## HPRT1 TALEN 作製時のベクター・インサートの組み合わせ (STEP 1)

Left	vector	pFUS_A3A	pFUS_A3B	pFUS_A3C	pFUS_B1
	insert	HD HD NI NG NG HD	HD NG NI NG NN NI	HD NG NN NG NI NN	NI
Right	vector	pFUS_A2A	pFUS_A2B	pFUS_B4	
	insert	NI NG NI HD NG HD	NI HD NI HD NI NI	NG NI NN HD	

連結には 2 通りの方法を使用することができる。1 つはオリジナルのプロトコールの通りに、**Golden Gate reaction** によって連結する方法である。こちらの手法ではプラスミドを直接反応液に加えるため、下準備が不要であるが、反応時間が長い、酵素の活性の低下による影響を受けやすいなどの問題点がある。そのため当研究室では、予め **BsaI** 処理したインサートとベクターを調製しておき、単純なライゲーション反応によって STEP 1 のモジュール連結を行っている。本書では後者のライゲーション法について記載する。

### 2-1. BsaI 処理済み pFUS vector、モジュールフラグメントの調製

STEP 1 に使用するベクターとモジュールの **BsaI** 処理を行う。この処理は毎回個別に行う必要はなく、最初に全ベクター (13 種) と全モジュール (24 種) について行い、精製産物を  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存しておけば、その全量を使い切るまで繰り返し使用可能である。

Plasmid	5-10 $\mu\text{g}$		
BsaI-HF	0.5-1 $\mu\text{l}$		
NEBuffer 4	2 $\mu\text{l}$		
SDW	up to 20 $\mu\text{l}$	37°C, O/N	(※ベクターのみ脱リン酸化処理も同時に行う)

反応液をアガロースゲル電気泳動により分離し、目的の産物を切り出し、マイクロチューブに回収する。これを Promega のゲル抽出キット (Wizard SV Gel and PCR Clean-up System) で抽出し、溶出液を  $-20^{\circ}\text{C}$  保存する。溶出は 30-40  $\mu\text{l}$  で行うとよい。

### 2-2. ライゲーション法による 6 モジュールの連結

2-1 で調整した **BsaI** 処理済みベクターとモジュールを混合し、下記の組成でライゲーション反応を行う。なお下記の反応は、total 1.5  $\mu\text{l}$  までスケールダウンしても問題なく動くことを確認している。

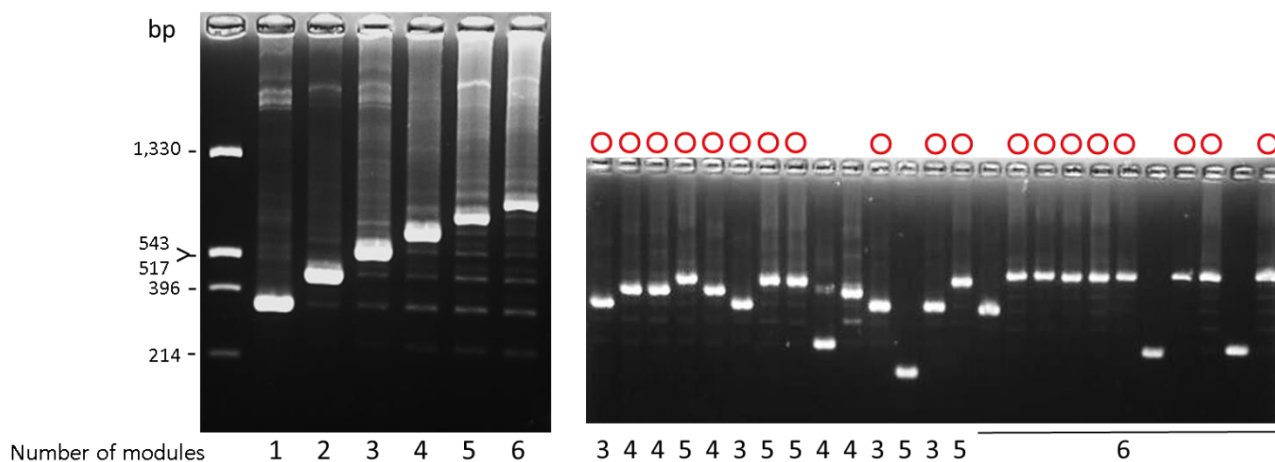
Vector	0.6 $\mu\text{l}$		
Module	0.6 $\mu\text{l}$ × 1-6		
Quick ligase	0.3 $\mu\text{l}$		
10X T4 DNA ligase buffer *	0.5 $\mu\text{l}$		
SDW	up to 5 $\mu\text{l}$	16°C, 30 分	

\* T4 DNA ligase (NEB) に付属のバッファー

反応産物の一部 (0.5-1  $\mu\text{l}$  程度) を直接大腸菌 (当研究室では XL1-Blue を使用) に形質転換し、X-gal を含む Spectinomycin プレートで 37°C, O/N 培養。オリジナルのプロトコールに記載されている Plasmid-Safe nuclease 処理は不要である。

### 2-3. コロニーPCR による STEP 1 クローンのスクリーニング

2-2 で得られたプレートからコロニーPCR を行い、目的のクローンを選別する。用いるプライマーはオリジナルのプロトコールの通りであり、pCR8\_F1 と pCR8\_R1 の組み合わせで増幅する。下図の左に 1-6 モジュールを有するクローンの PCR 産物の泳動像を、右に実際のスクリーニングの結果を示す。



PCR program: Anneal at 55°C, extend 40 sec., cycle 28.

左図のように、目的のサイズに濃いバンドが出現し、およそ 100 bp 単位で薄いラダーバンドが出現すれば OK である。また右図のように 1 つのコロニーを拾って当たらないものがあつた場合は、同じプレートから別のクローンを複数拾い直して再度コロニーPCR を行えばよい。実験系が安定していれば、ライゲーションからやり直す必要はまずない。

正しいサイズにバンドが出たクローンをつずつ O/N でミニカルチャーする。

### 3. 6-module assembly -STEP 2-

2-3 で得られた 6 モジュール連結クローンを用いて、2 段階目のアセンブリーを行う。このステップでも STEP 1 と同様 2 通りの方法を選択できるが、ここではプラスミドをそのまま反応系に使用できる Golden Gate 法を採用する方が手間も少なく確実である。以下はその手法について述べる。

#### 3-1. 6 モジュール連結プラスミドの調製

2-3 で得られた各クローンの大腸菌液から Miniprep kit を用いてプラスミドを抽出・精製する。この際各クローンを個別に抽出しても構わないが、当研究室ではコストと手間を極力抑えるため、6 モジュール連結分はまとめて抽出している（カルチャーは別々に行い、等量の菌液を混合して 1 つのカラムで Miniprep する）。例えば下表の組み合わせの場合、同一色で示したクローンをそれぞれ一つのカラムで抽出する。

Left	vector	pFUS_A3A	pFUS_A3B	pFUS_A3C	pFUS_B1
	insert	HD HD NI NG NG HD	HD NG NI NG NN NI	HD NG NN NG NI NN	NI
Right	vector	pFUS_A2A	pFUS_A2B		pFUS_B4
	insert	NI NG NI HD NG HD	NI HD NI HD NI NI		NG NI NN HD



pFUS\_B1-6 のクローンもまとめてしまうことは可能であるが、これらは使い回しが利くため、個別に抽出しておいた方が後々便利である。なおカルチャーの段階で混ぜてしまう（別々のコロニーを一つの培地中に混在させて増やす）のは、各クローンの増え方の違いによって最終的な収量に極めて大きな差が出るのが予想されるため、推奨されない。

カラム精製プラスミドは、定量後 100 ng/μl に合わせておく。

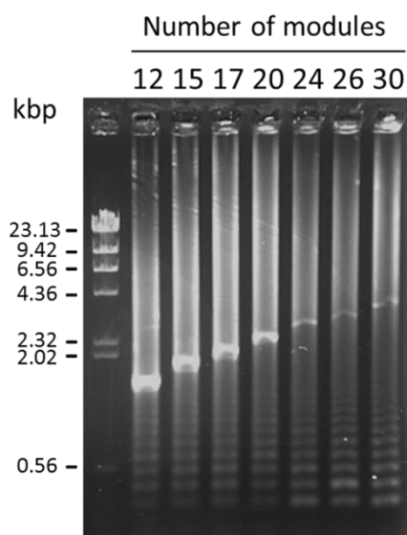
### 3-2. Golden Gate 法による pcDNA/pCAGGS-TAL-NC2 ベクターへのモジュール連結

上記のプラスミドを用いて、オリジナルのプロトコールの通りの組成で Golden Gate 反応を行う。但し当研究室では ligase は Quick ligase を使用し、バッファーは 10×T4 DNA ligase buffer を使用している。また反応スケールは total 4 μl までスケールダウンしても問題なく動くことを確認している。

サイクル数を 6 サイクルに設定した場合、反応産物を 10 倍希釈して 0.5 μl を形質転換に使用するぐらいでちょうど良いコロニー数となる。ブルーコロニーが大量に生える場合（主には酵素活性が低下している場合は）、Golden Gate 反応後の産物を追加で 1 時間ほど Esp3I 処理することで改善が見られる。この場合、Golden Gate 産物に直接 Esp3I のみを加えて反応させるよりも、Tango buffer (Esp3I に付属、final 1×) ならびに DTT (final 1 mM) を添加した方がより効率よく切断される。またこの処理を行うと、生えてくるコロニー数が顕著に少なくなるため、希釈せずに形質転換に使用するとよい。

### 3-3. コロニー-PCR による STEP 2 クローンのスクリーニング

STEP 1 と同様に、コロニー-PCR によってうまく連結されたクローンをスクリーニングする。使用するプライマーは、pcDNA-TAL-NC2 ベクター、pCAGGS-TAL-NC2 ベクターのいずれの場合でもオリジナルのプロトコールと同様 TAL\_F1/TAL\_R2 の組み合わせでよい。但しアニーリング温度は 63°C 程度まで上げた方が良好な結果が得られる。以下に結果の実例を示す。



PCR program: Anneal at 63°C, extend 1.5 min., cycle 28.

STEP 1 と同様ラダーバンドが出現し、目的の位置に濃いバンドが出るパターンになれば OK である。通常ほぼ 100 %に近い確率で成功するが、酵素の活性が下がっているとうまくいかない。Esp3I と Quick ligase はなるべくフレッシュな状態のものを使用するのが良い。

正しいサイズにバンドが出たクローンを一つずつ O/N でミニカルチャーし、トランスフェクショングレードの Miniprep kit (Invitrogen 社の ChargeSwitch-Pro Plasmid Miniprep Kit など) を用いてプラスミドを精製し、濃度を定量、150-300 ng/μl に合わせておく。

### 3-4. BspEI によるモジュール連結のチェック (optional)

通常、3-3 のコロニーPCR で目的の位置にバンドが出れば、モジュールがうまく連結されていると判断して活性測定に進んでしまっても構わないが、初めて実験を行う場合や活性測定の結果が信頼性に欠ける場合などには、オリジナルのプロトコールに記載されている BspEI でのインサートチェックを行うとよい。この酵素でプラスミドを消化すると、HD モジュールの存在する位置で切断されるため、連結パターンを確認することができる。但し last repeat 及び HD1 には BspEI site が存在しないため、6-module assembly で作製したプラスミドでは 1 番目や 7 番目、13 番目、19 番目、25 番目の HD は切断されない点に注意されたい。下表の例では赤字で示した HD が切断され、青字で示した HD は切断されない。

Left	vector	pFUS_A3A	pFUS_A3B	pFUS_A3C	pFUS_B1
	insert	HD HD NI NG NG HD	HD NG NI NG NN NI	HD NG NN NG NI NN	NI
Right	vector	pFUS_A2A	pFUS_A2B		pFUS_B4
	insert	NI NG NI HD NG HD	NI HD NI HD NI NI		NG NI NN HD

なおシーケンスによる確認では、せいぜい両端の数モジュール分しか読めないため、全長の配列を読むことはほぼ不可能である。

## 4. SSA assay

3 で作製した TALEN プラスミドは、直接培養細胞での活性評価に使用することができる。本項では、予め構築した標的配列を有するレポーターベクターと TALEN 発現ベクターを共導入し、レポーター活性から切断活性を測定する SSA アッセイの手法について記す。

### 4-1. SSA レポーターベクターの作製

SSA アッセイに用いるレポーターベクターは、pGL4-SSA vector にアニーリングした合成オリゴを挿入することで作製する。

pGL4-SSA ベクターの TALEN ターゲット配列クローニングサイト

```

          BsaI                      BsaI
5' - CTAGGGTCTCTGTCGTGCCGGGTACTGATGTACCGTGAGACCTAGGA -3'
3' - GATCCCAGAGACAGCAGCGGGCCATGACTACATGGCACTCTGGATCCT -5'

```

pGL4-SSA を BsaI 処理し、電気泳動、切り出ししておく (**脱リン酸化は行わない**)。

合成オリゴの設計法は下記の通りである。

**sense 鎖 :**

5'-gtcggat . . . (標的配列の sense 鎖) . . . aggt-3'

**antisense 鎖 :**

5'-cggtacct . . . (標的配列の antisense 鎖) . . . atc-3'

この2本のオリゴをアニーリング<sup>※1</sup>すると、下記のような構造となる。

- KpnI -

5' - GTCGGAtNNNNNNNNN · · · NNNNNNNNNaGGT -3'  
3' - CTaNNNNNNNNN · · · NNNNNNNNNtCCATGGC -5'

アニーリングした断片が pGL4-SSA ベクターにうまく挿入されると、KpnI site が出現する設計になっている。このベクターを KpnI で処理すると、3800, 1800 bp の2本のバンドが出現し、うまく挿入されていることが確認できる。

#### ※1. 合成オリゴのアニーリング

以下の組成の溶液を調製する。

10× buffer	1 µl (400 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM MgCl <sub>2</sub> , 500 mM NaCl)
sense oligo (50 µM)	1 µl
antisense oligo (50 µM)	1 µl
SDW	7 µl

以下の条件でアニールさせる。

↓ 95 °C, 5 min

↓ 25 °Cまで 90 分かけて冷ます(サーマルサイクラーの機能を利用しても良いし、(サーマルサイクラーで 95 °C処理をしてから)高温のウォーターバスに入れ、徐々に室温に戻しても問題ない)。

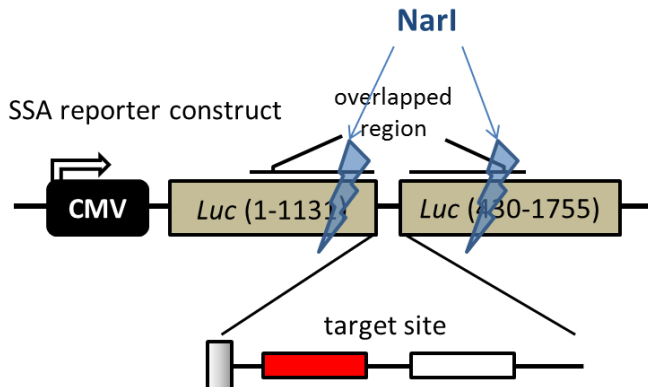
アニールさせたオリゴを BsaI 処理した pGL4-SSA に挿入する。

サブクローニングしたものをスモールカルチャーし、KpnI で断片が挿入されたかを確認する。

#### 4-2. SSA レポータープラスミドのシーケンス解析

TALEN 標的配列の合成オリゴは、しばしば 50 base を超える長いオリゴとなるため、ある確率で合成エラー (あるいはアニーリングエラー) が起こるようである。そのため完成したレポータープラスミドのシーケンス解析が必須と言える。

しかしながら pGL4-SSA のターゲット配列挿入部位は Luc 配列のオーバーラップ部位に挟まれており、直接の sequence 解析には不向きである。よってオーバーラップ部位 (TALEN ターゲット配列の両外側) に存在する配列を認識する制限酵素 NarI で処理し、切り出された断片をダイレクトシーケンスに用いる。



SSA レポータープラスミドを NarI 処理後、電気泳動・ゲルの切り出し（大きく切りすぎないように注意）を行い、マイクロチューブにゲル断片を回収する。これをディープフリーザーに 10 分程度置き、完全に凍らせた後、指で温めて融かし（この時点でアガロースゲルのメッシュ構造から DNA が遊離する）、最高速でスピンドウンする。こうしてしみ出された液体を 6~8  $\mu\text{l}$  ほど取り、シーケンスのテンプレートとして使用する<sup>※2</sup>。

#### ※2. ゲルからの DNA のしみ出し

上記の手法で得られる DNA の量はさほど多くないが、ダイレクトシーケンスに用いるにはこのぐらいが適量なようである。逆に抽出キットを用いて精製すると、テンプレート量が多すぎてうまく読めない場合がある。ただし 2%以上の固いゲルになると、凍結融解をしても液体成分が殆ど出てこないため、その場合は低融点のアガロースを使用する。

シーケンスのプライマーには、Luc2-up-F か Luc2-down-R のいずれかを用いればよい。なお、プラスミドを鋳型として Luc2-up-F と Luc2-down-R で PCR 増幅し、産物を切り出して F or R プライマーでシーケンスする方法を用いることもできる。プライマー配列はオーバーラップ部位に位置するが、増幅は可能である。但しコロニーPCR ではうまく増えないようである。

経験的に、同じ Lot のオリゴ由来でもクローン間で塩基欠失の有無に差があるため、シーケンスの際には複数クローンを同時に読むことを推奨する。正しい配列が挿入されたことを確認した後、トランスフェクショングレードの Miniprep kit を用いてプラスミドを精製し、濃度を定量、150 ng/ $\mu\text{l}$  に合わせておく。

### 4-3. トランスフェクション

以下の 4 種類のプラスミドを混合した DNA 溶液を HEK293T 細胞にトランスフェクションする。

Left TALEN expression vector	200 ng
Right TALEN expression vector	200 ng
SSA reporter vector	100 ng
pRL-CMV (reference vector)	20 ng

筆者が DNA 溶液を調製する際には、TALEN expression vector の濃度に応じて下記のように各プラスミドを混合する。

TALEN plasmid の濃度	150 ng/ $\mu\text{l}$	200 ng/ $\mu\text{l}$	300 ng/ $\mu\text{l}$
TALEN expression vector	2 $\mu\text{l}$ × 2	1.5 $\mu\text{l}$ × 2	1 $\mu\text{l}$ × 2
SSA reporter vector (150 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
pRL-CMV (30 ng/ $\mu\text{l}$ )	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Nuclease-free water	6 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
	↓ 8 $\mu\text{l}$ を使用	↓ 6 $\mu\text{l}$ を使用	↓ 4 $\mu\text{l}$ を使用

以下に当研究室で行っているトランスフェクションのプロトコルを記す。

DNA 溶液、HEK293T 細胞（10 cm dish, 70～80 % confluent）、96-well プレートを用意しておく。

↓

DNA 希釈用、Lipofectamine LTX 希釈用の無血清 DMEM を必要量ずつマイクロチューブに分注する。

※LTX は希釈すると時間経過と共に形質転換効率が下がっていくため、一度に大量に希釈しない方が  
良い。5 分以内に処理できる程度が好ましく、目安としては 20 サンプル前後分であれば良い。

↓

DNA 希釈用に準備した無血清培地 25  $\mu$ l を 96-well プレートの各ウェルに加え、DNA 溶液を各ウェル  
に 4～8  $\mu$ l ずつ加えて混合する。

↓

LTX 希釈用無血清培地に、1 ウェル（25  $\mu$ l）当たり 0.7  $\mu$ l となるように LTX を加えて懸濁し、素早く  
25  $\mu$ l ずつ各ウェルへ加えて混合する。これを必要本数分繰り返す。

※最初のウェルへ LTX 希釈液を加えた時点でインキュベーション時間の計測を開始する。

↓

10 cm dish の細胞からメディアムを除き、15% FBS/DMEM（抗生物質を含んでも構わない）を加えて  
ディッシュ上で直接ピペティングし、細胞を懸濁する。血球計算盤で細胞数を計測し、 $6 \times 10^5$  cells/ml  
に合わせる。

↓

LTX を加えてから 30 分経過後、準備した細胞を 100  $\mu$ l ずつ各ウェルへ加え、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベ  
ーターでインキュベート。

↓

トランスフェクションの 24 時間後にルシフェラーゼの活性測定を行う。

#### 4-4. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼアッセイは、Promega の Dual-Glo Luciferase Assay System を用いて、キットの取  
扱説明書の通りに行う。