

Protein Expression Application No. 1

動物培養細胞における 1~3 リットルスケールの タンパク質製造ワークフロー

Linda Jacobsen¹, Susan Calvin², Jay Wang³, and Brigitte Hloch³.

1. Berit Biotech LLC, Groveland FL

2. Ball State University, Muncie IN

3. Roche Diagnostics, Indianapolis IN and Penzberg, Germany



1 イントロダクション

タンパク質は、トランジェントにトランスフェクトした細胞や目的タンパク質を発現している安定な細胞株で製造できます。バキュロウイルス発現システムや安定発現細胞株では数週間から数ヶ月は必要な中程度のタンパク質の製造を、トランジェントにトランスフェクトした培養動物細胞では1週間以内に製造することができます。我々は、100mgオーダーの組み換えタンパク質が必要な場合や、開発時間が限られている場合、トランジェントなトランスフェクションが第一選択肢だと信じています。また、100~1000mgのレベルでも、トランジェントなトランスフェクションは効率の高い発現システムとして選択肢となります。

我々はミリグラムオーダーのタンパク質製造のために3種類のシステムを検討しました。2つは哺乳類細胞で、もう1つは昆虫細胞です。ここでは、我々が昆虫細胞をトランスフェクトし、続く実験のために十分な量のタンパク質を製造できたことを報告します。また、哺乳類細胞を用いた実験で得られた情報も報告します。このアプリケーションノートは、トランジェントにトランスフェクトした細胞で、ミリグラムオーダーのタンパク質を製造のためのスケールアップ手順の紹介を目的としています。

昆虫細胞でタンパク質を発現させる実験を始める際、1~3リットルにスケールアップする前に、選択した細胞やベクター、培地、トランスフェクション試薬など、タンパク質の発現条件を検討する必要があります。昆虫細胞に特化したステップは図1に示します。哺乳類細胞に対応する方法は3ページをご参照ください。

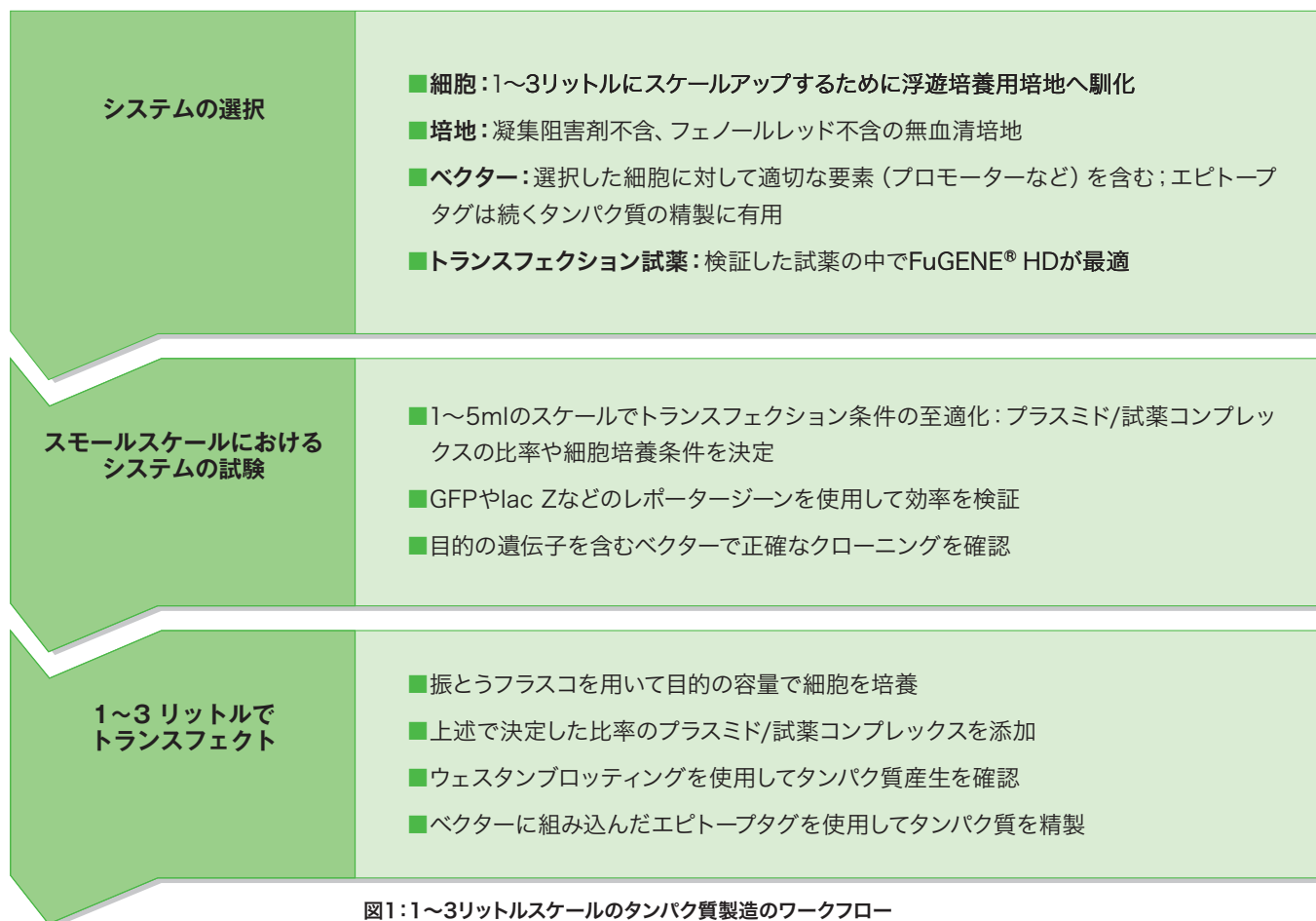


図1: 1~3リットルスケールのタンパク質製造のワークフロー

注記: 同じ操作法は適当なバイオリアクターや培養バッグを使用することで、10~100リットルまで応用できます。

2 細胞システムの決定

最初に、細胞システム (哺乳類細胞か昆虫細胞) を決定し、次に使用する細胞株を決定します。ミディアムからラージスケールのタンパク質発現では、一般的に細胞を浮遊状態で培養します。タンパク質発現に使用されるほとんどの哺乳類細胞は、モノレイヤー (単層) として増殖するので、無血清培地で培養するには、馴化が必要です。このような培地は複数のサプライヤーから供給されています。また、いくつかの培地は、トランスフェクションが可能でタンパク質発現レベルを向上させる成分を含んでいることが確認されています。

ここでは、昆虫細胞に続き、我々になじみの無いCHOとHEK細胞株でのトランジェントなトランスフェクションのステップについて詳述します。哺乳類細胞の実験から得られた結果もこのノートで紹介します。

我々は、バキュロウイルスシステムを用いずに、昆虫細胞がトランジェントにトランスフェクトでき、十分なタンパク質量が得られるかどうか調べました。非常に大規模なタンパク質製造 (10g以上) の場合、バキュロウイルスシステムには優位性があります。ここに述べるワークフローのために、昆虫細胞でのトランジェントなトランスフェクションを評価したプロセスを示します。我々は、文献や細胞のサプライヤーからの情報を参考にした結果、High Five細胞がバキュロシステムを使用する必要が無く、トランジェントなトランスフェクションで多数のタンパク質を高いレベルで製造すると結論付けました。細胞やベクター、培地はInvitrogenから購入しました。

哺乳類細胞

浮遊培養のHEKとCHOは、数リットルスケールでのタンパク質製造に繁用されます。我々は以前にHEKバリエントとCHOを接着及び浮遊細胞として使用し、多くの実験を行ってきました。また、浮遊培養での細胞のタンパク質発現を増加させるためにデザインされた市販の培地と自家調製の培地の両方を使用してきました。HEK細胞に関しては、トランスフェクションに干渉するデキストラン硫酸やヘパリンなどの凝集阻害剤を含まない培地を調製するために、我々は培地のサプライヤーと緊密に協力しました。また、加水分解産物の由来と量が、高いレベルのタンパク質発現に重要であることを見出しました。

HEK細胞変異体株

HEK細胞は、タンパク質発現に一般的に使用されます。我々はHEK EBNA細胞株(293c18 ATCC® CRL-10852™)と、EBNAバリエントを派生するHEK細胞株(293 ATCC® CRL-1573™)の両方を使用しました。我々は、他の研究者(1, 2, 3)と同様に、ベクターによっては、HEK EBNA細胞が親株のHEK細胞より2~3倍高いタンパク質発現を持つことを見出しました。HEK EBNA細胞株はエプスタイン・バーウイルス由来核抗原タンパク質(EBNA-1)を発現しており、これは細胞分裂時に複数コピーのプラスミドの保持を助けるoriPを持つプラスミドのエピソームでの増幅をサポートします(3)。

タンパク質の収量はベクターに依存することが知られていますが、pCEP4やpTTなどのベクターをトランスフェクトしたHEK細胞は同様の収量を示します(3)。pM1シリーズやphCMVのようなエピトープタグとクローニング部位を含むベクターは、より優位性を持ちます。我々は、oriPを含まないpM1シリーズを使用してHEKとHEK EBNAでの高レベルでの発現を確認しました。

3 エピトープタグベクターの調製

エピトープタグgingは、トラッキングと精製の両方を簡便化する有用な技術です(「エピトープタグging」の項を参照)。図2のように、エピトープタグベクターを調製する方法は2つあります。

1. 対象の遺伝子配列にエピトープタグを付加し、選択したベクターに挿入します。
2. あらかじめエピトープタグや必要な要素をすべて含むベクターに、対象の遺伝子配列を挿入します。

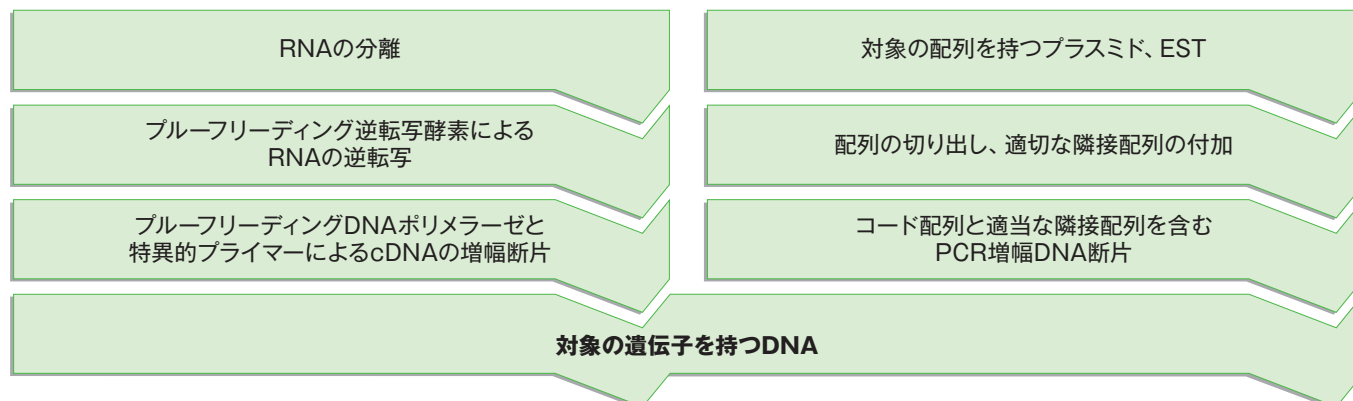
我々のモデルシステムは、レポーター遺伝子と既知のプロテインキナーゼを発現するものです。我々が最初に検証したベクターは、内部タンパク質としてpIB/His、分泌タンパク質としてpMIV/V5-Hisを対象としました。使用したベクターはすでにHisエピトープタグを持っているため、Hisタグを使うことにしました(「エピトープタグging」の項を参照)。

ベクターへの遺伝子配列の挿入には、図2の右側の経路を使用しました。つまり、レポーター遺伝子と2つのプロテインキナーゼ(hAkt 1とMKK6)をPCRマスター(Roche)で増幅しました。コード配列と適当な隣接配列を含むPCR断片を、切断済みのpIB/HisおよびpMIB/V5-Hisの制限酵素切断クローニング部位に挿入しました。Rapid DNA Dephos & Ligation Kit(Roche)のような市販のキットを使用してライゲーションステップを迅速化できます。

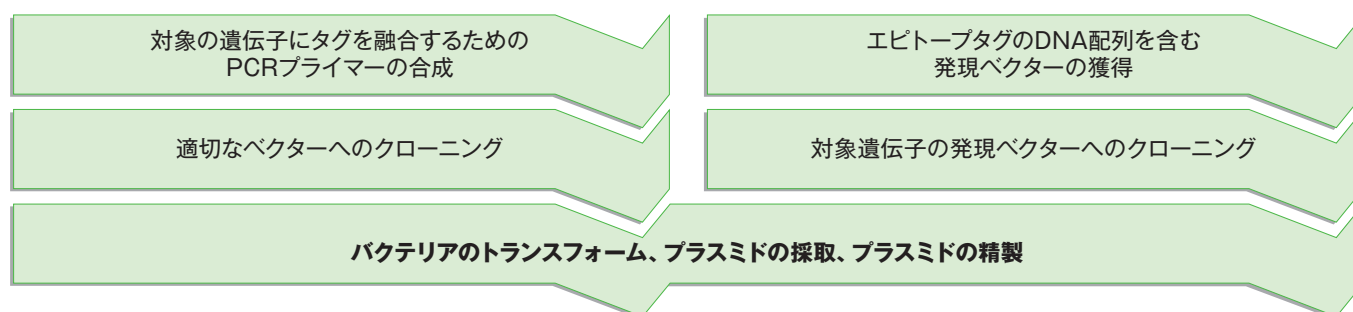
ベクターを*E. coli*にトランスフォームして、大腸菌株を選択し、昆虫細胞のトランスフェクションのためにベクターを分離、精製しました。

図2:対象の遺伝子にエピトープタグを付加する2つの方法

A. mRNA、EST、遺伝子を含む他のベクターからの対象の遺伝子DNAの調製



B. 選択したベクターへの遺伝子配列のクローニング



エピトープタグging

エピトープタグgingは、高価で時間がかかる個々のタンパク質ごとの抗体作成の煩わしさを回避できる方法です。しかし、各実験系に最適なエピトープタグは、タグタンパク質の機能や細胞内での産生に干渉しないだけでなく、ウェスタンブロットティングや免疫蛍光顕微鏡で強いシグナルを示すことが必須です。あるエピトープタグが、あるタンパク質に適することを正確に予測することはできません。タグの局在 (N末端、C末端、あるいはリーディングフレームの中) は機能と発現レベルの両方に影響します。

注記: C末端にタグがあることはタグタンパク質の完全な翻訳を示唆しますが、図3に見られるように、トータルのタンパク質発現レベルはタグの局在に依存します。哺乳類細胞はヒスチジンのラン/リピートや内在性のmycタンパク質をしばしば含み、これらのベースラインレベルが昆虫細胞では知られていませんでしたので、Hisタグは昆虫細胞においては我々の第一選択肢ではありませんでした。通常、我々自身でタグを付加するとき、HA、VSV-G、プロテインCを好みます。

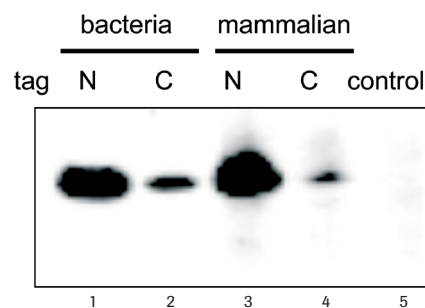


図3:タグの局在の効果 (N末端、C末端の発現タンパク質量)

VSV-Gエピトープタグをタンパク質のN末端とC末端にクローニングしバクテリアと哺乳類細胞で発現させました。タンパク質はウェスタンブロットティングで抗VSV-G抗体を用いて検出しました。バクテリアでのタンパク質発現はレーン1と2、哺乳類細胞での発現はレーン3と4です。レーン1と3はN末端、レーン2と4はC末端エピトープタグタンパク質です。レーン5はトランスフェクトしていないコントロールです。

4 小スケールでのモデルタンパク質のトランスフェクション

トランスフェクション試薬とDNAの至適な比率や細胞、クローニングした遺伝子を検証するために、モデルタンパク質を用いて小スケールでのトランスフェクションを行いました。High Five細胞などの昆虫細胞は緩やかに接着し、室温で増殖するため、FuGENE® HDトランスフェクション試薬の標準プロトコルを以下のように少し改変しました(改変部分を斜体で記載)。

1. 各ウェル当たり400,000個の細胞を播種しました(2mlの無血清培地中に)。
2. オーバーナイトでインキュベーションし、細胞の増殖を促すために、培地を交換しました。無曝気の培養では、培地の深さが重要なことがわかりました。リットルスケールでは、シェイカーフラスコは十分な曝気を提供します。
3. トランスフェクションコンプレックスは、8:1から3:1の間の比率(μ l FuGENE® HD試薬 : μ g DNA)で滅菌水中で形成しました。

4. コンプレックスを細胞に滴下しながら攪拌し、細胞を室温のインキュベーターに戻します。

一度特定のベクターバックボーンでシステムを確立したら、同じバックボーンを用いて目的のタンパク質を発現させます。このプロトコルは、まずレポーター遺伝子でトランスフェクション効率(%)を測定し、次に各プロテインキナーゼコンストラクトで検証しています。我々は、pMIB/V5-HisベクターでGFPを、pIB/Hisベクターでlac Zを発現させました。プロテインキナーゼ遺伝子は、これらレポーター遺伝子の検証で使用したものと同一コンストラクトを用い、スケールアップの前に小スケールで検証しています。ベクターはHisタグを含んでおり、簡単にタンパク質発現を確認できました。

浮遊培養中のHEK EBNAとCHO細胞のためのプロトコル:ベクターの重要性

我々は添付説明書の6ウェルプレートのプロトコルを改変し、2 mlの培地を使用して12ウェルプレートに変更しました。GFPを用いてトランスフェクション効率(%)と発現タンパク質を測定しました。

■ 12ウェルプレート(無組織培養処理)の無血清培地中に細胞を播種し、プラットフォームシェイカーでオーバーナイトでインキュベートした後、あるいは播種直後にトランスフェクトしました。(good培地中、 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個/mlで播種)

■ 数種類の比率でコンプレックスを調製し、細胞に添加します。

■ 細胞をインキュベーターに戻し、プラットフォームシェイカーに静置し、細胞を浮遊状態に保ちます。

■ 細胞毒性を観察するため、細胞を鏡検します。

■ 発現量を測定し、スケールアップのための最適な比率を決定します。

重要なベクターの選択

トランスフェクション後に細胞が増殖しない場合、細胞に有害な異種タンパク質が発現しているか、トランスフェクション試薬に起因すると考えられます。

これはこのケースでは不必要です。いくつかのベクターは試験しても確認できない程度の毒性のあるシークエンスを含んでいます。我々は、3種類のルシフェラーゼ発現ベクターについて、トランスフェクション試薬ではなくベクターに起因する細胞増殖への干渉を試験しました。3種類のルシフェラーゼ発現ベクターを2種類のトランスフェクション試薬を用いてHeLa細胞にトランスフェクトしました。

タンパク質発現は相対的ルミネッセンスユニット(RLU) (ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイ、高感度)をもって測定し、細胞増殖はWST-1アッセイ(細胞増殖試薬WST-1)で測定しました。この実験は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が細胞増殖と相関しないことを明確に示しました。細胞増殖はタンパク質発現やトランスフェクション試薬とは相関せず、ベクター内のエレメント自身と相関しました(図4)。また、遺伝子発現プロファイリングを用いて、ベクターバックボーンの影響も検証しました(4, 5, 6)。これはベクター選択実験の重要性を示しています。

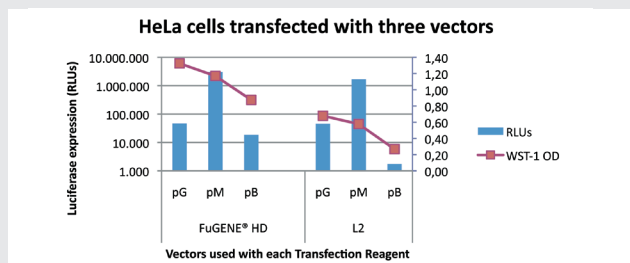


図4: 3種類のベクターを用いた実験において、タンパク質発現と細胞増殖は相関しません。

2種類のトランスフェクション試薬(FuGENE® HDとL2)を用いてルシフェラーゼ遺伝子をトランスフェクトした後、細胞増殖(WST-1)とタンパク質発現(ルシフェラーゼ)を測定しました。異なるバックボーン(pG, pM, pB)を持つ3種類のルシフェラーゼベクターにおいて、細胞増殖と遺伝子発現は相関しませんでした。

5 組織化学染色、フローサイトメトリー、ウェスタンブロットを用いたトランスフェクションの検出

レポーター遺伝子によるトランスフェクション効率の検出

我々は、FuGENE® HDトランスフェクション試薬を使用して、High Five細胞が生存したまま高確率で遺伝子を導入できることを実証しなければなりません。lac Z遺伝子を含むpIB/Hisをトランスフェクトした時、ほぼ100%の細胞がβ-ガラクトシダーゼを発現していることを、β-ガラクトシダーゼ染色セットにより測定しました（データ未掲載）。

分泌タンパク質や細胞内タンパク質を測定するため、GFPをpMIB/V5-Hisプラスミドに組み込みました。フローサイトメトリー（Guava® PCA-96）で細胞の生存活性を算出し、トランスフェクトした細胞の割合を決定しました。トランスフェクションの後、ほとんどの細胞はヨウ化プロピディウム(Propidium Iodide)染色による死細胞の排除により生存が確認され、80%以上の細胞がGFP陽性でした（図5）。

GFPにより検出されたトランスフェクション効率は、β-ガラクトシダーゼ染色により検出された割合ほど高くありませんでしたが、これには2つの理由があります。第1に、蛍光と比べて免疫化学染色はより高感度に検出されることです；酵素検出に基づき、少量のタンパク質を持つ細胞がより多く検出されます。第2に、フローサイトメトリーで陽性と検出されるには、細胞内により多くのGFPタンパク質が必要なことです。GFPは、それが培地中に分泌されるベクターに組み込まれているため細胞内に集積されず、すべてのトランスフェクション細胞を検出することは困難です（図5のGFP発現細胞のヒストグラムに見られる）。我々は蛍光リーダーを使用して培地中に分泌されたGFP量が検出されることを期待しましたが、使用した培地中の蛍光は測定できませんでした。

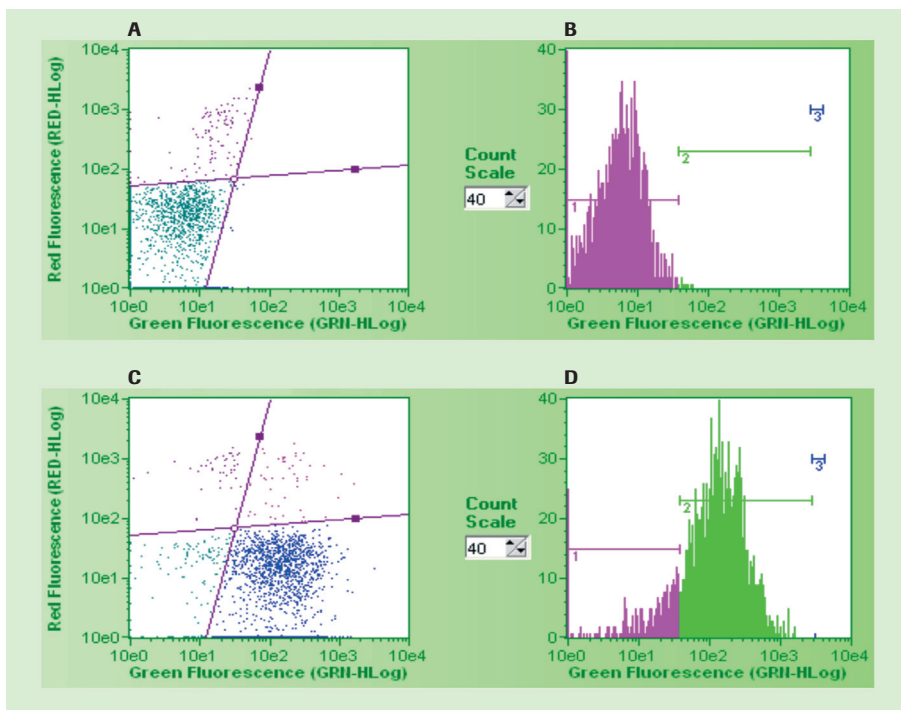


図5: FuGENE® HDでトランスフェクトしたHigh Five細胞の生存活性と発現。

コントロール細胞は上段のパネル(A, B)、GFPをトランスフェクトした細胞は下段のパネル(C, D)です。生存細胞(ヨウ化プロピディウム排除)はパネルAとC(青緑と青の点)の各々4分画の下方の2つ、トランスフェクション細胞(GFP発現)はパネルAとC(青とピンクの点; 青い点は生存しているトランスフェクション細胞)の各々4分画の右の2つです。トランスフェクション効率はパネルBとDのヒストグラムより計算しました。

HEK EBNA細胞での結果

レポーター遺伝子GFPのトランスフェクションは、トランスフェクトした細胞の割合を測定する方法として繁用されています。同じ割合のトランスフェクション細胞を含む培養では、おおよそ同量のタンパク質を発現していると考えられます。上述の12ウェルプレートプロトコルを使用して、GFP発現細胞の割合と、産生された全GFP量を測定しました。図6に見られるように、7:2から4:2の比率でトランスフェクトした細胞のパーセンテージは相対的に一定でしたが、培養細胞からのタンパク質の収量は50%に減少していました。これはトランジェントなトランスフェクションシステムで大量のタンパク質を製造するためのスケールアップで最適な比率を決定するには、一つの方法だけに頼らないことが重要であることを示唆しています。

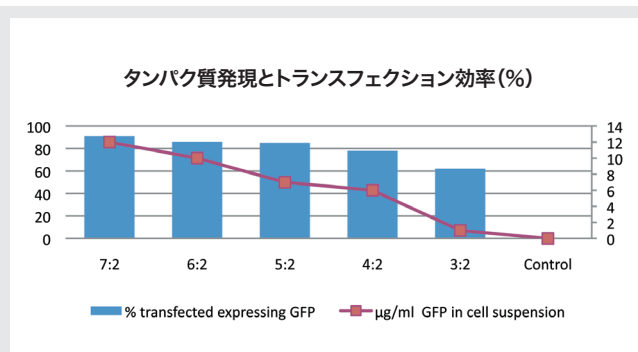


図6:トランスフェクトした細胞のパーセンテージとタンパク質発現の比較
FuGENE® HDでトランスフェクトした後のGFP発現HEK EBNA細胞の割合を、同じ培養細胞の産生するタンパク質量と比較しました。

プロテインキナーゼの特異的発現

レポーター遺伝子で高いトランスフェクション効率を確認した細胞に、プロテインキナーゼを含むベクターをトランスフェクトしました。High Five細胞のキナーゼ発現をウェスタンブロットにより確認しました。

トランスフェクトした細胞を、PVDFメンブレン (Roche) にトランスファーし、Hisタグタンパク質をPOD標識抗Hisタグ抗体とLumi-Light^{PLUS}ウェスタンブロットティング基質 (Roche) を使用して検出しました。

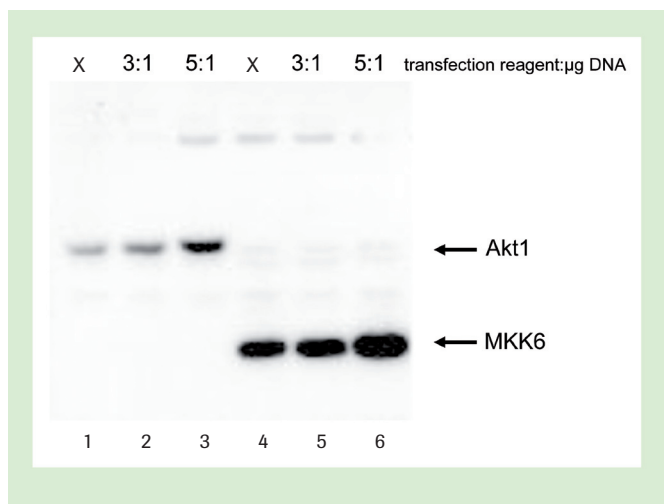


図7:High Five細胞でのキナーゼの発現

Akt1をトランスフェクトした細胞由来のサンプルをレーン1、2、3に、MKK6をトランスフェクトした細胞由来のサンプルをレーン4、5、6にロードしました。レーン1と4はメーカーの説明書に従い、試薬Xでトランスフェクトしました。レーン2と5は、3µlのFuGENE® HD:1µgのDNA、レーン3と6は5µlのFuGENE® HD:1µgのDNAの比率でトランスフェクトしました。

浮遊性CHO細胞での結果

上記の12ウェルプロトコールを使用して、3種類のトランスフェクション試薬を様々な比率で用いて、GFPをCHO細胞にトランスフェクトしました。4ウェルをFuGENE® HDで、3ウェルをL2で、3ウェルをL2-CDでトランスフェクトしました。残りの2ウェルは未トランスフェクションのコントロール細胞としました。プラットフォームシェイカーでインキュベーションした後、タンパク質発現測定に用いました。

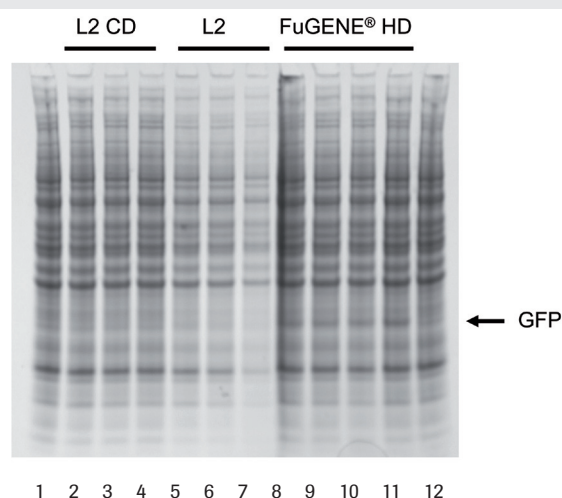


図8: クマシー染色のSDS-PAGEゲル

GFPバンドはFuGENE® HDを使用した4サンプルのみ可視化されました(レーン8~11)。レーン1と12はコントロール細胞ライセートです。レーン2~7は、他の試薬でトランスフェクトした培養細胞のライセートを含んでいます。他のトランスフェクション試薬を用いたサンプルではGFPは確認できませんでした。

浮遊細胞の1ml培地を遠心し、サンプルを調製しました。細胞ペレットを400 μ lの還元サンプルバッファーに再懸濁しました。図8の結果に見られるように、10 μ lのサンプルをゲルにロードしました。

上記のサンプルをPVDFウェスタンブロットティングメンブレンにトランスファーし、一次抗体として抗GFP抗体を使用し、Lumi-Light^{PLUS}ウェスタンブロットティングキット(マウス/ラビット)に含まれる二次抗体のPOD標識抗マウス抗体でプロットしました。

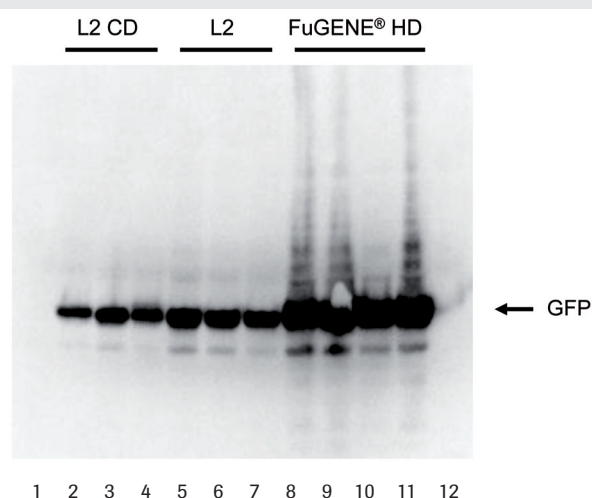


図9: GFPの特異的発現は間接ウェスタンブロット解析を使用して確認しました

すべてのトランスフェクションサンプルでGFPバンドが可視化されましたが、FuGENE® HDを使用したレーン8~11はより顕著に検出されました。

6 1~2リットルへのスケールアップ (High Five 細胞)

Akt1は、図7で見られるように6ウェルスケールでの発現が低かったため、2リットルスケールの浮遊培養での発現のための挑戦的なタンパク質として選択しました。

1. High Five細胞を2リットルの無血清培地を用い、振とうフラスコ中で増殖しました。
2. 細胞に5:1の比率 (FuGENE® HD (μ l) : DNA (μ g)) でAkt1発現プラスミドをトランスフェクトしました。この比率は6ウェルプレートで最大の収量が得られました。

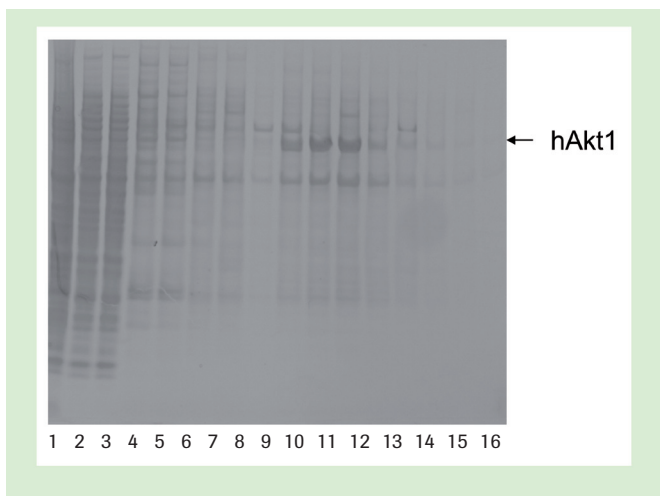
3. 細胞はトランスフェクションの72時間後に採取し、溶解、超音波破碎をしました。

HEKとCHO細胞を使用したスケールアップ

HEKとCHO細胞はしばしば5リットルの振とうフラスコ中、3リットルにスケールアップされ、室温で曝気されます。我々はまた、10リットルスケールのトランスフェクションにロッキング振とうプラットフォーム上のディスプレイザブルのバック (WAVEバックなど) を使用しました。

7 タンパク質の精製

超音波破碎した細胞サンプルの可溶性分画を遠心により清澄化しました。cOmplete プロテアーゼインヒビターカクテル錠を清澄化した上清に加え、目的タンパク質のプロテアーゼによる分解を予防しました。Hisタグタンパク質をNi-NTAアフィニティクロマトグラフィーで、アフィニティゲルのメーカーの推奨に従い、グラビティフローで精製しました。Hisタグタンパク質はイミダゾール溶出液から精製し、SDS-PAGEとクーマシー染色で解析しました(図10)。



Hisタグタンパク質を含む溶出液をプールし、トランジェントなトランスフェクション培養細胞から、5 mg/Lの精製Hisタグタンパク質を得ました。2リットルの培養からは10 mgのタンパク質が精製され、バキュロウイルスシステムでの報告と同等量でした。これは培養細胞およびバキュロウイルスシステムにおいても低発現なタンパク質でした。他のタンパク質はトランジェントなトランスフェクションでより高い収量が得られるでしょう。

図10: HisタグhAkt1の精製とクーマシーブルー染色による検出。

レーン1: トータルのライセート レーン2: 可溶性分画 レーン3: フロースルー
レーン4-7: 洗浄液 レーン8-16: hAkt1タンパク質を含むイミダゾール溶出液

タンパク質の精製と分解

タンパク質がHAタグやプロテインCタグを付加されている場合、アフィニティマトリックスを使用して精製します。

Anti-HAアフィニティマトリックス

■ HAペプチドによる競合的溶出により、生物学的に活性のあるHAタグタンパク質を免疫アフィニティ支持体から穏やかに精製する場合はHAペプチドを使用します。

Anti-プロテインCアフィニティマトリックス

■ プロテインCタグタンパク質を穏やかに回収するにはカルシウムキレート剤を含む溶出バッファーを使用します。

■ この精製法は他のエピトープタグ抗体に対して顕著な優位性をもちます。AntiプロテインCの結合はカルシウムイオンに依存します。カルシウム結合部位は、エピトープタグタンパク質というよりも抗体に存在します。この性質は発現タンパク質の構造や機能を変化させる、カルシウムイオンの存在の可能性を排除します。

細胞を溶解した際、細胞内のプロテアーゼもまた遊離します。これらのプロテアーゼは製造されたタンパク質を分解します。これを回避するために、我々は常にcOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテル錠を使用しています。製造されたタンパク質や使用された細胞に依存して、cOmpleteプロテアーゼインヒビターカクテル錠を選択します。例えば、金属依存性のタンパク質の精製にはEDTAフリーの製品を使用し、タンパク質の安定性を保持します。

cOmplete プロテアーゼインヒビターカクテル錠の詳細はウェブサイトをご確認ください。

www.roche-applied-science.com/proteaseinhibitor

8 結論

リットルスケールでのトランジェントなトランスフェクションによるタンパク質の製造は、FuGENE® HDトランスフェクション試薬を使うことで比較的容易に行えます。適切な細胞とベクターを使用することは、あらゆるトランジェントなトランスフェクションシステムにおいて重要です。同様に、高密度な細胞培養を可能にし、栄養成分の供給や老廃物の除去を行う培地の選択も重要です。また、発現タンパク質の保護も重要です。阻害されていないタンパク質分解活性は数分でタンパク質を分解してしまいます。

トランジェントなトランスフェクションによりタンパク質を製造する場合、まずベクターバックボーン、細胞、培地の選択が重要となります。このレポートで、培地や細胞、ベクターを選択するために考慮すべき条件を議論しました。特定の組み合わせを決定すると、ミリリットルレベルから数リットルレベルへのスケールアップは比較的容易でした。我々はまた、同じベクターを用いた場合、同じ条件で様々なタンパク質を製造できることを確認しまし

た。適切なDNA量と試薬量をミリリットルレベルで決定すると、すべてのファクター（細胞密度、DNAと試薬の量）は正比例でスケールアップできます。例えば、6 μ lのFuGENE® HDと2 μ gのDNAをミリリットル当たり1,000,000個の密度で2 mlの細胞に加えて至適な発現が見られた場合、細胞を同じ密度で2リットル培養に移し（ミリリットル当たり1,000,000個）、6mlのFuGENE® HDと2mgのDNAより構成されるトランスフェクションコンプレックスを細胞に加えます。

特定の細胞、培地、ベクターの組み合わせで、FuGENE® HDを使用してHEK細胞で、50~100 mg/lのモノクローナル抗体を作成したという報告もあります。このタンパク質は、10リットルのトランジェントなトランスフェクション細胞から、10倍以上のタンパク質(500mg~1g)を1週間で容易に製造することができました。

リファレンス

1. Large-Scale Transfection of Mammalian Cells for the Fast Production of Recombinant Protein. Phuong Lan Pham, Amine Kamen, and Yves Durocher. *Molecular Biotechnology* 34: 225–238, 2006.
2. Optimization of transient gene expression in mammalian cells and potential for scale-up using flow electroporation. Janet H. Parham, Marie A. Iannone, Laurie K. Overton. & Jeff T. Hutchins *Cytotechnology* 28: 147–155, 1998.
3. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. Y Durocher, S Perret, A Kamen. *Nucleic Acids Res*, 30, No. 2. 2002.

4. FuGENE® HD Transfection Reagent: Choice of Transfection Reagent with Minimal Off-Target Effect as Analyzed by Microarray Transcriptional Profiling. Susan Calvin, Jay Wang, Jeff Emch, Simone Pitz, and Linda Jacobsen. *Biochemica* 4, 2006.
5. Outstanding Microarray Experimental Results Using FuGENE® HD Transfection Reagent. Linda Jacobsen, Susan Calvin, and Simone Pitz. *Biochemica* 2, 2009.
6. Transcriptional effects of transfection: the potential for misinterpretation of gene expression data generated from transiently transfected cells. Linda Jacobsen, Susan A. Calvin, and Edward K. Lobenhoefer. *BioTechniques* Vol. 47, No. 1: 2009.

COMPLETE is a trademark of Roche.

High Five is a trademark of Invitrogen.

Guava is a trademark of Guava Technologies, Inc.

The ATCC trademark and trade name and any and all ATCC catalog numbers are trademarks of the American Type Culture Collection.

FuGENE is a trademark of Fugent L.L.C., USA

Other brand or product names are trademarks of their respective holders.

製品名	製品番号	包装単位	希望販売価格(税抜)
PCR Master	1 636 103	200回反応	¥38,100
制限酵素	ウェブサイトをご参照ください:		
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	4 898 117	40回反応	¥24,200
	4 898 125	160回反応	¥71,400
FuGENE® HD Transfection Reagent	4 709 691	0.4 ml	¥ 29,800
	4 709 705	1.0 ml	¥ 62,800
	4 709 713	5 x 1 ml	¥252,000
Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity	1 669 893	200アッセイ	¥20,600
	1 814 036	1,000アッセイ	¥82,500
Cell Proliferation Reagent WST-1	5 015 944	8 ml	¥15,000
	1 644 807	25 ml	¥39,000
β-Gal Staining Set	1 828 673	100 テスト	¥34,400
PVDF Western Blotting Membrane	3 010 040	30 cm x 300 cm	¥31,700
cComplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets supplied in <i>EASYpacks</i>	4 693 132	20錠	¥35,900
cComplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets supplied in <i>EASYpacks</i>	4 693 116	20錠	¥35,900
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	2 015 196	100 ml	¥50,600
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit)	2 015 218	1キット	¥88,000
Anti-VSV-G	1 667 351	200 μg	¥48,200
Anti-Green Fluorescent Protein	1 814 460	200 μg	¥44,800
Anti-HA Affinity Matrix	1 815 016	1 ml	¥103,200
HA peptide	1 666 975	5 mg	¥45,400
Anti-Protein C Affinity Matrix	1 815 024	1 ml	¥49,800

Purchaser represents and warrants that it will use FuGENE® HD Transfection Reagent purely for research purposes. Transfected cells, materials produced, and any data derived from the use of FuGENE® HD Transfection Reagent, may be used only for the internal research of Purchaser whether Purchaser is a “for-profit” or a “not-for-profit” organization. Under no circumstances may FuGENE® HD Transfection Reagent be used by Purchaser or any third party for a commercial purpose unless Purchaser has negotiated a license for commercial use with Fugent, LLC (contact information: License@FugentLLC.com). For purposes of the foregoing sentence, “commercial purpose” shall mean use of FuGENE® HD Transfection Reagent for profit or commercial gain. By using FuGENE® HD Transfection Reagent, Purchaser agrees to be bound by the above terms. If Purchaser wishes not to be bound by these terms, Purchaser agrees to return the FuGENE® HD Transfection Reagent to Roche Diagnostics for a full refund.



お問い合わせは…

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

AS事業部 (研究用試薬・機器)

本社：〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号

TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098

E-Mail: tokyo.biochemicals@roche.com

U R L : <http://www.roche-biochem.jp>