

LIFE SCIENCE SERIES

ライフサイエンス実験シリーズ Vol.7

PCR実戦技術編 (3)

本シリーズは、市販のノウハウ本や実施例集ではカバーできなかったようなライフサイエンス実験のコツなどについて、弊社研究員の実験ノートなども参考に、生の事例を交えながら紹介させていただいています。前々号から、最もリクエストの多かったPCR関連技術を更に深くご紹介する目的で、「PCR実戦技術編」をお届けしています。

前号では、Sリーダーから難問が出題され、その問題をめぐって、A子さんとライバルのN代さんの間でバトルの予感が漂っていましたが…。

皆さんも、是非、前号で2人の考えた解答を確認してから、本号を読み進めてください。



前号の課題
ダイジェスト

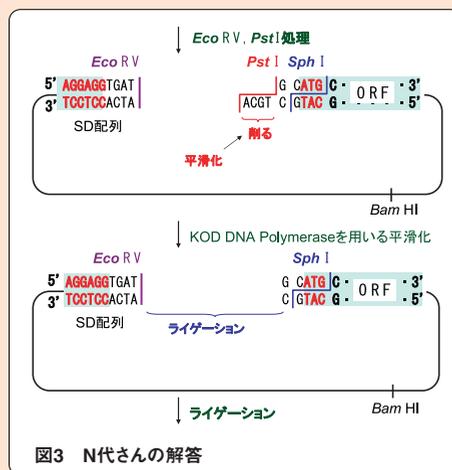
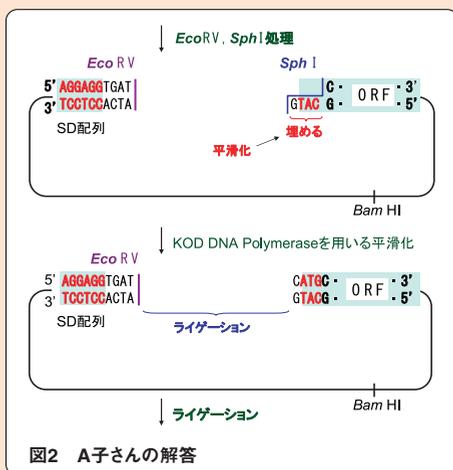
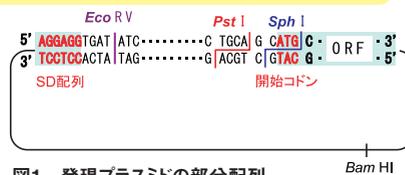
●課題: 次に示す発現ベクターのSD (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンの間にある余分な塩基を、なるべく簡単な方法を用いて取り除き、連結してください。

〈条件〉

- SD配列と開始コドン(ATG)の間の塩基数を5~6塩基にすること。
- 使用できる方法は以下のとおり。
 - ・各制限酵素での切断
 - ・KOD DNA polymerase*を用いる平滑化
 - ・T4 DNA Ligase†による結合
 - ・PCR(任意の場所にプライマーを設計可能)
 - ・T4 Polynucleotide Kinaseを用いるDNAのリン酸化

- 本プラスミド中には、この図に示したEcoRV, PstI, SphI, BamHIの配列はここに示したサイト以外には存在しません。

*5'→3' DNA polymerase活性と
3'→5' Exonuclease活性を有しています。



注意!!

上の二人の解答には間違いが含まれている可能性があります。

今までの
登場人物



Sリーダー
冷静沈着なライフ
サイエンスグルー
プのリーダー



A子さん
今年入社4年目
になる研究員



N代さん
今年入社3年目
になる研究員
(A子さんのライバル)



S本さん
アシスタント

本シリーズは、弊社ウェブサイト(<http://www.toyobo.co.jp/bio/>)の「実験お助けコーナー」でご覧いただけます。

様々な実験に用いられるDNAポリメラーゼですが、意外とその性質をよく理解せずに使われている方もいらっしゃるのではないのでしょうか？今回は、DNAポリメラーゼを中心に、その原理と応用について解説いたします。

1-1 DNA配列の末端によく付いている5'や3'って何の数字？

ポリメラーゼ関連の説明を読んでいると5'や3'などという数字が頻繁にでてきます。この数字に何の意味があるのかと思われた方も多いのではないのでしょうか？

この数字は主に核酸の方向性を示すために付けられています。核酸は、塩基、糖（[デオキシ]リボース、及びリン酸が長く繋がった構造を持ちます。その中で、ヌクレオチド間の結合の方向性に大きく関与しているのは、（デオキシ）リボースであり、その結合を仲介しているのがリン酸基です。RNAに用いられているリボースを例に挙げると、この糖は5単糖（ペントース）であり、それら5つの炭素には1'から5'という番号（塩基にも番号が付いているため、区別するために「'」をつけて表現します）が振られています。リボースは、その2'、3'、5'の位置にOH基を有していると表現されます。DNAに用いられているデオキシリボースでは、2'のOHがH（[デ]無い[オキシ]酸素）になっています。どちらの糖においても3'と5'のOH基が連結に用いられています。

この連結反応を触媒する酵素がDNAポリメラーゼです。図4に、DNAの連結反応を示します。基本的にこの反応は、DNAの3'末端に存在するOH基の酸素の電子が、dNTPの5'OHに結合した α 位のリン酸基を攻撃する、いわゆる「求核反応」です。その反応によって、DNAは5'から3'末端側に向かって伸長します。この反応は原理上、逆へは決して進行することはありません。

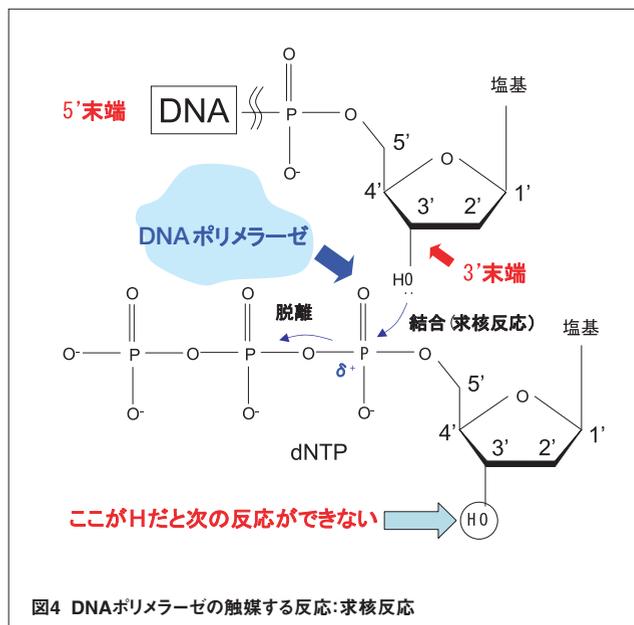


図4 DNAポリメラーゼの触媒する反応:求核反応

1-2 サンガー法（ジデオキシ法）を用いるシーケンス法はポリメラーゼの性質を利用している

dNTPの3'のOHがHになったddNTP（ジデオキシNTP）は、多くのDNAポリメラーゼによって通常のdNTPと区別無くDNAの3'末端に取り込まれます。しかし、このddNTPが取り込まれたDNAの3'末端はOH基を持たないため、伸長反応はこの段階でストップしてしまいます。よって古くから、ddNTPはDNAポリメラーゼの阻害剤として知られていました。

この阻害剤の利用方法をいち早く見出したのが、Frederic Sangerでした。DNAポリメラーゼの反応溶液に微量のddNTPを添加すると、ddNTPはランダムに取り込まれ、様々な所で伸長の止まった産物が生じます。この反応をそれぞれの塩基種について行い、1baseの違いが見分けられる電気泳動法を用いて分離し、ラジオアイソトープなど指標にして検出することにより、DNA配列を知ることができます（図5）。これがいわゆるサンガー法（ジデオキシ法）¹⁾の原理であり、この方法は現在一般的に用いられているシーケンサーにも使われています。

現在のシーケンス解析では、4種類の蛍光色素で標識されたddNTPを用いて一度に反応させることができるようになったため、以前のように巨大なゲル板を作る必要もなくなったため、とても便利になりました。また自動で分析した結果がコンピューターに出力されるため、全くこの原理を意識せずにシーケンス解析を行うことが可能です。皆さんはいかがでしょうか？

ところで、Sanger博士は「核酸の塩基配列の決定」に関して、1980年に2度目のノーベル化学賞を受賞しています（1度目は「インスリンの構造研究（ペプチドの配列決定）」1958年）。Sanger博士は1918年生まれですので、有名なシーケンス法の

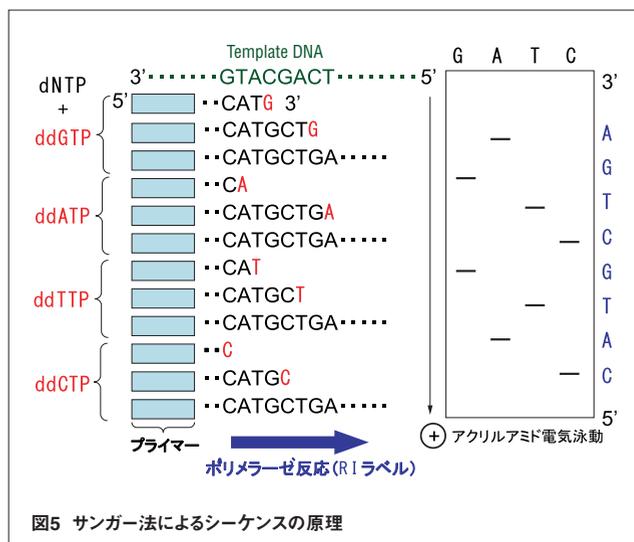


図5 サンガー法によるシーケンスの原理

論文¹⁾が発表された1977年当時、既に60歳に近かったことになります。ちなみに、この論文の筆頭著者はSanger博士です。見習いたいものです。

1) F. Sanger, S. Nicklen and A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467 (1977)

1-3 DNAを削る活性いろいろ

通常DNAポリメラーゼには、DNAを末端から削る活性を有しているものが多く存在します。この削る活性（エキソヌクレアーゼ活性）は5'→3'の活性と3'→5'の活性の2種類が知られています。これらの活性のうち、5'→3'活性はDNA複製時のラギング鎖の合成に用いられた岡崎フラグメントなどのRNAプライマーを分解する活性として、3'→5'活性はDNA合成時の塩基の取り込みエラーの修復に関わる活性として進化してきたものと考えられています。

これらの原理はDNA合成の機構（図4）を考えると良く理解できます。例えば、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって削られ

1-4 制限酵素消化末端の平滑化

3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いて制限酵素切断末端の平滑化が可能です。この用途には従来、T4 DNA polymeraseを用いることが多かったのですが、KOD DNA polymeraseも強い3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有しており、効率よくDNA末端を平滑化することができるため、最近頻繁に用いられるようになりました。

平滑化には、図6に示すようにポリメラーゼ活性と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性が関与します。しかしここで、「では、平滑化された後の末端は3'→5'エキソヌクレアーゼ活性で削られないの?」という疑問が湧き上がってくるかも知れません。確かにその通りで、平滑化された後も多少ですが末端は削られているようです。ただし、dNTPが存在する限りにおいてポリメラーゼ活性と平衡状態が成立しているため、それほど大きく削られることはなく、ほとんどの末端は平均して平滑化されていると考えられます。

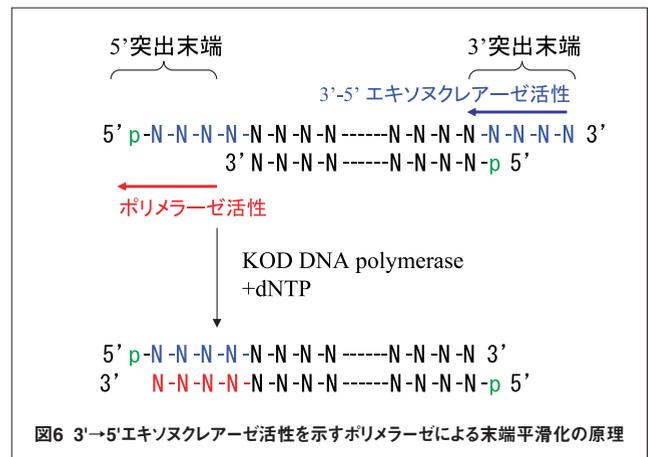
逆に、dNTPが存在しない場合は、大きく末端が削られるということになりますので注意が必要です。ですから、T4やKOD DNA polymeraseを用いて末端平滑化を行う場合、dNTPsを最初に入れることを忘れないようにしなくてはなりません。時々、3'突出部分を削るだけなのでdNTPは入れなくても良いのでは

た部分は、ポリメラーゼ活性によって埋めることができませんので、細かい修復には使えない活性であるといえます。

5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するPCR酵素としてはTaq DNA polymeraseなどがあります。Taq DNA polymeraseのこの活性は、リアルタイムPCRで用いられるTaqMan®プローブを分解する用途などに応用されています。一方、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するPCR酵素としてはKOD DNA polymeraseなどがあり、この活性のおかげでこの酵素はTaqの数十倍という高い正確性を発揮することが可能になっています。

ないかなどと思いがちですので、気をつけてください。

また、制限酵素処理した5'末端にはリン酸基が残っていますが、時々、このリン酸基がポリメラーゼを用いる平滑化によってどのようになるのか心配される方がいるようです。図6を見ていただくと一目瞭然ですが、5'のリン酸基は全く影響を受けませんので、ご安心ください。



1-5 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の無いポリメラーゼでは?

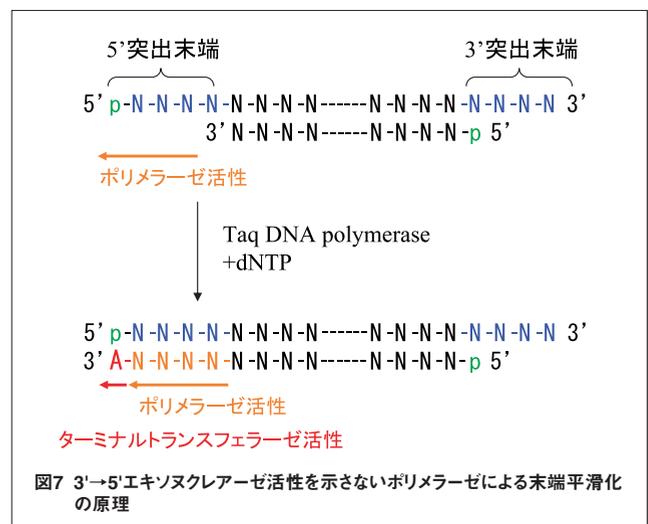
1-4に示したように、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによってDNA末端を平滑化することができます。

それなら、5'突出末端を埋めるだけであれば、「Taq DNA polymeraseなどの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の無い酵素も使用できるのでは?」と思われる方もいらっしゃるかも知れません。しかし、そうまわはいきません。多くのDNAポリメラーゼはターミナルトランスフェラーゼ活性を有しているため、3'末端に1塩基（多くの場合アデニン）の付加が起こってしまいます。この活性を逆手に取ったのが、いわゆるTACローニング法です。

このターミナルトランスフェラーゼ活性は、当然、KOD DNA polymeraseなどにも存在するのですが、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性によって平滑化されるため、見かけ上は、この活性が無いようにみえます。

さらに、Taqなどの酵素は5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有していますが、この活性はそれほど高くないため、大きな問題とはならないようです。しかし、シーケンス解析などを行う際には、

ノイズの原因となるため、一般的にこの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠失させた酵素が用いられているようです。



A子さんとN代さんはT社バイオ研究所のライフサイエンス試薬開発グループの연구원です。先ほどからなにやら、Sリーダーの前で火花を散らしているようです。実は、つい先ほど2人に問題が出され、その解答がSリーダーに提出されたところなのです(表紙参照)。



2-1 A子さんの落とし穴



2人の解答を見終わったSリーダーは、まずA子さんに向かって、DNA鎖の伸長反応を化学式で書いてみるよう指示しました。最初から自信がなかったのかAさんはビクビクしているようです。そして、反応式を描いていたAさんは自分のミスにハタと気づきました(図4参照)。DNA鎖が3'側から5'側へ向かって伸長することはまずありません。よって、A子さんのような実験(図2)を行うと、逆に頭の部分が削られてしまうことになります。

Aさんは、いつもDNAの方向性を考えると頭が混乱してしまいます。しかし、今回のように化学反応を頭の中で考えることで方向性について理解しやすくなることに気づきました。

隣で、N代さんは涼しい顔でやり取りをしています。

2-2 N代さんの落とし穴

次はN代さんの番です。N代さんの平滑化の考え方には特に問題は無いようです(図3)。

しかし、Sリーダーからは、「この前の失敗の反省が生かされていないのでは?」という言葉が投げかけられました。前回、N代さんは、考え方は正しかったのですが、クローニングしたORF中に致命的な制限酵素サイトが含まれていたのです。クローニングされた後の断片の配列を確認しなかったN代さんのケアレスミスでした。

その時、「もしかして、まさか!…」という思いがN代さんの脳裏をかすめました。そして、恐る恐る出来上がった配列を確認してみました。

そして気づきました。あろうことか、SD配列の直下にライゲーションによって予期せぬ開始コドン(ATG)ができてはなりません! 確かに、その下流には今回のORFに由来する開始コドンはありますが、SD配列直下の開始コドンの方が優先的に用いられ、フレームのずれたタンパク質が主にできてしまうことになります(図8)。

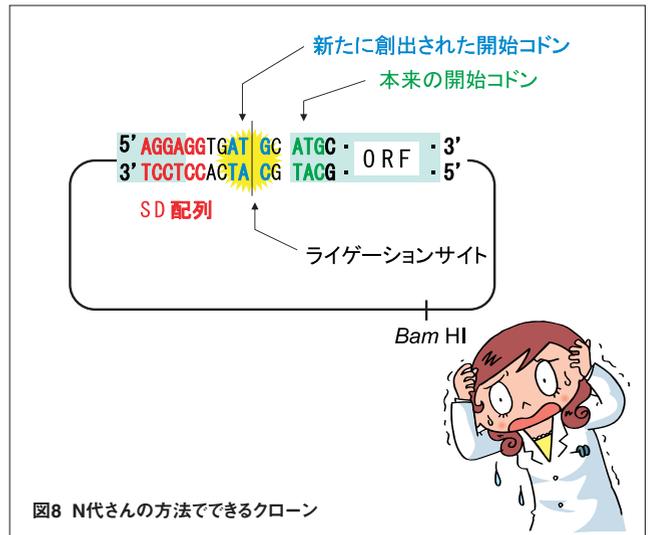


図8 N代さんの方法でできるクローン

ワンポイントアドバイス ①

今回の例では、思わぬところに開始コドンが生じてしまうというミスでしたが、その他にも気づいてみたら思わぬサイトが生じてしまっていたという話もよく聞きます。以下に、ありがちなミスを列挙します。

- 1 $\dots AT + G \dots ATG \dots (ORF) \dots$ 予期せぬ開始コドンの創出
ライゲーション 本当の開始コドン
- 2 $\dots ORF \dots + \dots (\text{タグ配列など}) \dots$ 終止コドン忘れ(N末端の場合、開始コドンを忘れることもあります)
終止コドンを除いたORFのC末端
- 3 $\dots ORF \dots + \text{リンカー配列} \dots (\text{タグ配列など})$
リンカー配列中、接合部での予期せぬ配列の創出
(1) システインなどの特殊アミノの挿入
(2) プロテアーゼ切断配列、リン酸化配列、糖鎖付加配列などの創出

①は今回のN代さんの失敗、②はC末端にタグなどを付加した場合に起きがちな失敗、③は様々な予期せぬ機能を持ったサイトができてしまうという失敗です。この③は、タンパク質にリンカーを介してタグ配列を付加するような場合には特に注意が必要です。システインサイトができて、発現させたタンパク質が2量体化したという笑い話などもあるようですので、ご注意ください!

2-3 種明かし

さて、今回の解析例ですが、どのようなものだったのでしょうか？ 以下、リーダーの示した一例です。

最も簡単な方法の一つはインバースPCRを用いる方法です。インバースPCRとは本来図9に示すように、部分配列しか分かっていないようなDNAの周辺配列を解析する方法の一つです。具体的には、環状DNAの一領域から外に向かってプライマーを設計し、環状化したDNA全体を増幅するのが特徴です。そのPCR産物を解析することで遺伝子全体の配列が分かるという仕組みです。

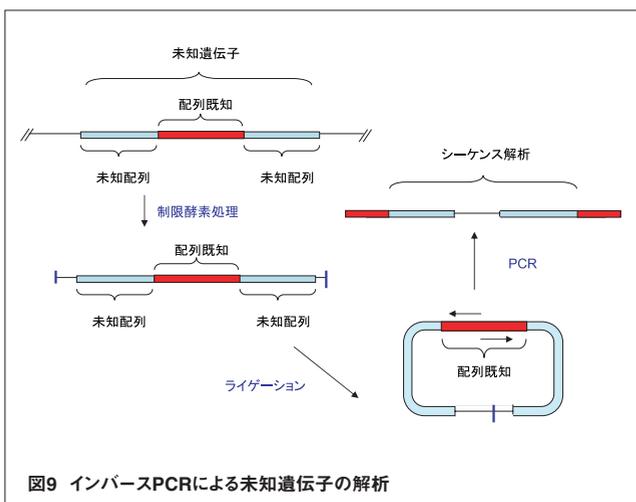


図9 インバースPCRによる未知遺伝子の解析

この方法の、環状化DNAから先の工程を応用することによって、変異導入実験を容易に行うことが可能なのです。以下、インバースPCR法を用いるデリベーション mutant (欠失変異体) の作製方法について説明します。

まず、図10に示すように、プラスミド上の欠失させたい配列を挟んで背中合わせにプライマーを設計します。その後、KOD-Plus-(Code No. KOD-201)などの高正確性PCR酵素を用い

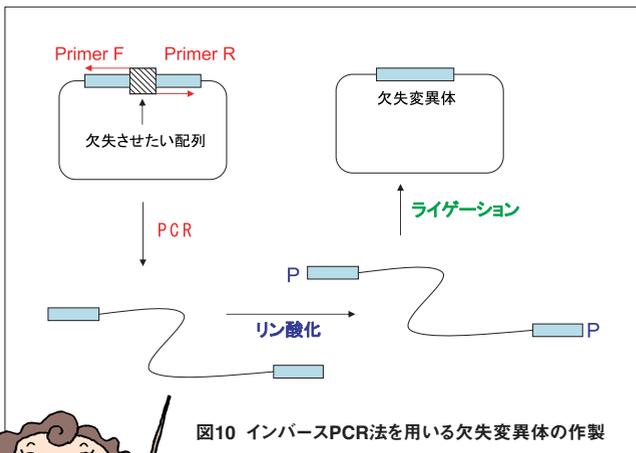


図10 インバースPCR法を用いる欠失変異体の作製



てプラスミド全体を増幅します。その後、増幅産物をリン酸化した後に（最初にプライマーをリン酸化しておくことも可能）、ライゲーション反応（環状化）を行い、その環状化したプラスミドDNAを用いて大腸菌を形質転換します。この方法を用いると、比較的簡単に欠失変異体を作製することができます。ポイントは、高正確性PCR酵素を用いることです。でないと、当然予期せぬ変異（PCRエラー）が導入されますし、増幅末端にAが付加されるため、環状化させることができません。

ところで、インバースPCRはかなり単純な方法なのですが、様々な試薬を用いる必要があるため、弊社ではインバースPCR法を用いる部位特異的変異導入キット『KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Code No. SMK-101)』を開発しました。このキットには、図10にはない、鑄型プラスミドを消去する仕組みなども組み込まれているため、簡便に変異導入実験を行うことができます。この方法については、次号で詳しく説明する予定ですが、この方法は配列置換や配列挿入などにおいても力を発揮する方法です。

図11にインバースPCR法を用いる今回の解答例を示します。方法は、欠損させたい領域を挟んで背中合わせにプライマーを

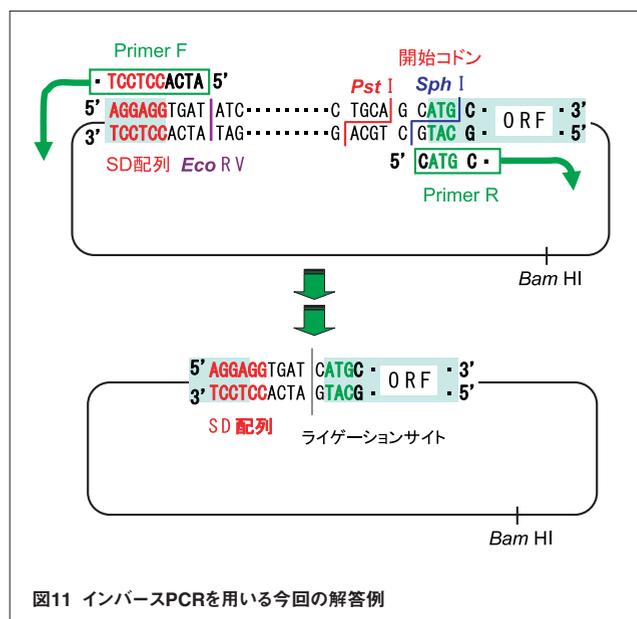


図11 インバースPCRを用いる今回の解答例

設計し、図10のように増幅した後、再環状化します。今回の場合、SD配列と開始コドンの間を5~6塩基にするといいことでしたので、図11のPrimer FとRに示すようなプライマーを設計すると良いと考えられます。この場合も、接合部に開始コドンができないように気をつけてください。

プライマーの設計法は、通常のPCRプライマーの設計方法に従えば問題ありません。注意点としては、ベクターの大きさによってはPCR効率が低くなってしまいます。ですから、あまりにも大きなベクターを用いなくてはならないときは、まずは目的遺伝子を小さなベクターにサブクローニングしておいて、変異導入を行った後に、大きなベクターに移し変えるような対策が必要な場合もできます。

(⇒ 配列置換と挿入については、次号にてご紹介いたします)



KOD FXは、難しい配列のPCRや、クールドサンプルからのPCRなどにおいて力を発揮する高成功率PCR酵素です。

先月は、血液を直接サンプルとして用いるPCR法ご紹介しました。そこで今回は、最近、トランスジェニックマウスなどの解析で頻繁に行われるマウステールをサンプルとしたPCRについて検討を行いました。この方法を用いることによって、煩雑なDNAの精製なしで、高効率にマウステールからのPCRが可能になります。また今回、増幅産物の制限酵素処理についても検討を行いました。

●マウステールの前処理方法

アルカリ溶解法

① マウステール (約3mm) / マイクロチューブへ

② 50 mM NaOH 180 μ l添加
Vortexにて良く攪拌

③ 95 $^{\circ}$ C \cdot 10 min.
1M Tris-HCl (pH8.0) 20 μ l添加
Vortexにて良く攪拌
遠心 (12,000 rpm, 10 min.)

④ 上清0.5~2 μ lをPCR反応液に添加
(マウステールは完全には溶解しません)

※熱アルカリ溶液の取り扱いに十分ご注意ください。

図12 アルカリ溶解法フロー

●結果

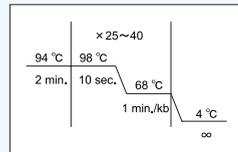
従来、マウステールを用いる遺伝子解析では、Proteinase K処理、及びエタノール沈殿などを用いて精製したDNAを用いることが多く、サンプルの調製に大変な時間を要していました。しかし、今回の検討によって、KOD FXを用いることでアルカリ溶解法などの簡便な方法で調製したクールドなサンプルを用いても効率よく増幅できることが示されました。また、本方法によって増幅したPCR産物は、少なくとも今回試した制限酵素においては精製なしでそのまま制限酵素によって切断可能であることが分かりました。

KOD FXは、夾雑物による阻害に大変強いという特性を有しており、今回の例以外に、植物ライセートや酵母などのサンプルにおいても良好な増幅結果が得られています。

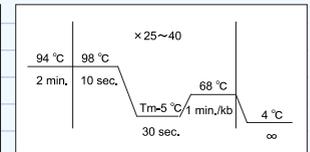
【プロトコル#1】 KOD FXの基本反応条件

試薬	添加量(μ l)	終濃度
2 \times PCR buffer for KOD FX	25	1 \times
2mM dNTPs	10	0.4 mM each
10 μ mol/ μ l Primer #1	1.5	0.3 μ M
10 μ mol/ μ l Primer #2	1.5	0.3 μ M
Template DNA	X	Genomic DNA : ~200 ng/50 μ l Plasmid DNA : ~50 ng/50 μ l cDNA : ~200 ng (RNA相当量)/50 μ l クールドサンプル : ~2 μ l
PCR grade water	Y	
KOD FX (1.0 U/ μ l)	1	1.0 U / 50 μ l
Total	50 (μ l)	

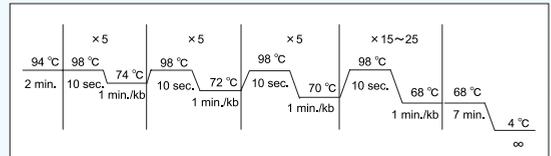
2ステップサイクル



3ステップサイクル



ステップダウンサイクル



※プライマーのTm値が73 $^{\circ}$ C未満の場合は、3ステップサイクルで行います。

【PCR、制限酵素切断条件】

Primer F :5'-CCACAGAATCCAAGTCGGAAGCTTTG-3' (26 mer)
Primer R :5'-GTAGCAGTGGTGGTATTATACATGGTG-3' (27 mer)
ターゲット :Mouse membrane glycoprotein (Thy-1) gene (M10246) (約2.6kb)

上記プライマーを用い、2ステップサイクル(伸長時間2.5min、30サイクル、サンプル0.5 μ l使用)にてPCRを実施しました。また、増幅された溶液(未精製)10 μ lに様々な制限酵素を1 μ l (約10 U)添加し、37 $^{\circ}$ C、1時間の条件で切断を行いました。

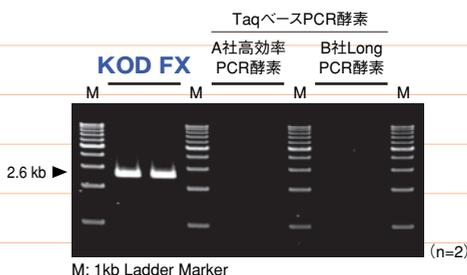


図13 マウステールライセートを用いたPCRの結果

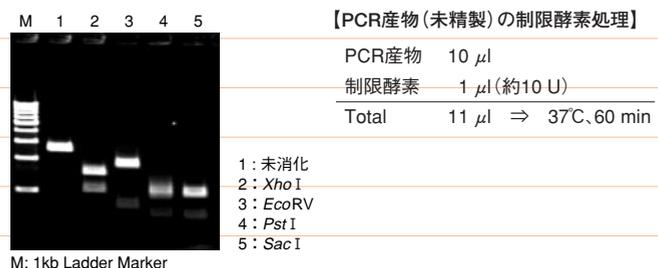


図14 PCR産物の制限酵素消化結果

2-4 次なるSリーダーからの課題

それにしても、今回の課題も2人にとってかなり勉強になったようです。今まであまり意識せずに行ってきた実験も、今回のことで原理を考えてから実行するようになるはずですよ。と、そこへSリーダーから次なる課題のメールが届いたようです。

●大腸菌のDHFR (ジヒドロ葉酸還元酵素) を発現するベクターがあります。そのDHFRのN末端にタグ配列を付加するにはどのようなプライマーを設計すれば良いですか？

- 〈条件〉
- インバースPCR法を用いること。
 - タグのアミノ酸配列は以下のとおり。
Leu-Ile-Arg-Arg-Ile (L-I-R-R-I)
タグは開始コドンの隣りに挿入すること。
 - 発現は大腸菌で行います。

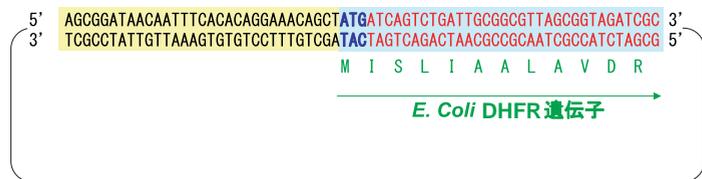


図15 DHFR発現ベクター

この課題を見て、A子さんは、インバースPCR法の原理を忠実に頭の中で再現しつつ、プライマーを思い浮かべているようです。一方、N代さんは、タグのアミノ酸配列を、真剣に見つめています。

悩んだ結果、A子さんは、図16のようなプライマーを設計しました。タグの部分は、コドン表を眺めつつ適当に対応する配列を入れたようです。一方、N代さんはコドン表と何やらインターネットの画面をにらみながら、タグのアミノ酸配列に相当する部分の配列を念りに決定しているようです。結局、N代さんは図17のようなプライマーを設計しました。N代さんのプライマーはA子さんのプライマーとは何やら少し異なるコンセプトで設計されているようです。

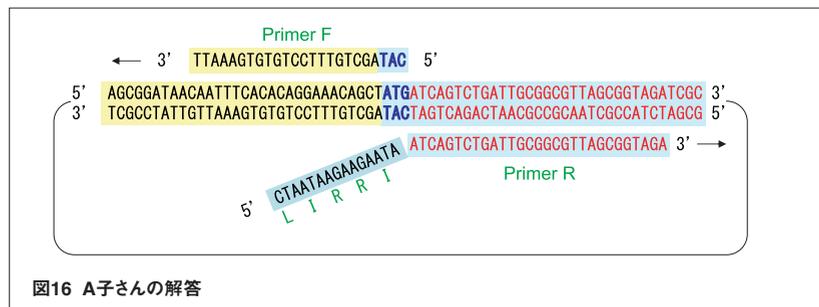


図16 A子さんの解答

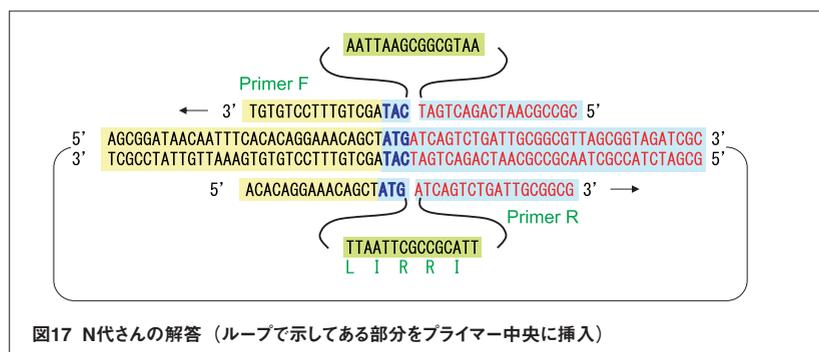


図17 N代さんの解答 (ループで示してある部分をプライマー中央に挿入)

2人の解答を見た瞬間、またしてもSリーダーのメガネが突然ざらりと輝きました。その横で、アシスタントのS本さんはなにやら胸騒ぎがしています。「もしかして…また思わぬ罠が仕掛けてあるのではないかと。さて、皆さんならば、どのようなプライマーを設計しますか？

研究所の周りは、既に晩秋から初冬の気配が漂い始めています。では、次回お会いしましょう。



みなさんも2人の解答が正しいかどうかを、吟味してみてください。【注意:2人の解答には間違いが含まれている可能性がありますので、上の図を実験の参考にはしないでください。】

2人の解答の解説は、次号「PCR実戦技術編(4)」でお届けする予定です。

次回、どうぞ期待!!

Q & A

A子さん

KOD FXでクルードサンプルを鑄型に用いる場合、何かコツや注意点はありますか？

KOD FXは、クルードサンプルに対し高い耐性を示しますが、増幅が見られない場合はサンプル量を少なくする方向で検討します。また、2ステップサイクルよりも3ステップサイクルの方が安定した結果が得られる場合があります。

また、サイクル数は通常30サイクルで十分増幅が得られますが、ターゲット長やサンプルによっては、増幅が低下する場合があります。このような場合には、35~40サイクル程度までサイクル数を増やすことで良好な結果が得られることがあります。

さらに、今回ご紹介したようにクルードサンプルを直接PCR反応に持ち込む場合、Proteinase KやSDSなどが含まれる処理液を用いないように注意してください。これらの成分の活性が残っていると、PCR酵素などが不活性化されてしまいます。

SJ-ダー

A子さん

インバースPCRを用いる変異導入に向くPCR酵素はどのようなものですか？

この方法に必要なPCR酵素の特性として、①高正確であること、②平滑末端産物を生成すること、及び③高効率であることを挙げるができます。この観点から最も適している酵素として、KOD -Plus- (Code No. KOD-201) やKOD -Plus- Ver.2 (Code No. KOD-211) を挙げるができます。

「KOD -Plus- Mutagenesis (Code No. SMK-101)」は、KOD -Plus-を用いる部位特異的変異導入キットで、変異導入に必要な試薬がすべて添付してあるため、とても簡単に変異導入実験を行うことができます。

また、KOD FX (Code No. KFX-101)もKOD -Plus-に比べて正確性は低い(KOD -Plus-及びKOD -Plus-Ver.2はTaq DNA polymeraseの約80倍、KOD FXは約10倍)ですが、上記すべての条件は満たしていますので、本用途に用いることが可能です。

SJ-ダー

A子さん

KOD FXをマルチプレックスPCRに応用したいのですが、コツはありますか？

プライマーを等モルで添加した場合、どちらかの増幅産物が増幅しすぎてしまうことがあります。その場合、添加するプライマー量の比を検討してください。一般的には、増幅の悪かった方のプライマー量を1.5倍程度に増やし、サイクル数を少なくする方向で検討することで良好な結果が得られることがあります。

SJ-ダー



関連製品紹介

品名	用途	包装	Code No.	価格
KOD -Plus-	高正確PCR	200U×1本	KOD-201	¥30,000
KOD -Plus- Ver.2	” (さらに高効率)	200U×1本	KOD-211	¥32,000
KOD FX	高成功率PCR	200U×1本	KFX-101	¥35,000
KOD Dash	インサートチェック	250U×1本	LDP-101	¥25,000
Blend Taq®	正確性の不要なPCR全般	250U×1本	BTQ-101	¥19,000
Blend Taq® -Plus-	” (Hot start可能)	250U×1本	BTQ-201	¥21,000
ReverTra Ace -α-®	高効率逆転写	100回用	FSK-101	¥53,000
Ligation high Ver.2	高効率Ligation	750µl×1本	LGK-201	¥22,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製	200回用	NPK-601	¥28,000
MagExtractor™ -mRNA-	Poly (A) ⁺ RNAの精製	5回用	NPK-801F	¥43,000
T4 Polynucleotide kinase	DNAのリン酸化	1,500U×1本	PNK-111	¥15,000
rATP	リン酸化の基質	50µmoles/0.5ml	ATP-111	¥15,000
<i>E. coli</i> Alkaline Phosphatase	脱リン酸化	100U×1本	BAP-111	¥15,000
MagExtractor™ -Plasmid-	プラスミドの精製	500回用	NPK-301	¥33,000
<i>Magical Trapper</i>	磁性分離 (磁性スタンド)	1個	MGs-101	¥38,000
TArget Clone™	TA Cloning vector	10回用	TAK-101	¥12,000
TArget Clone™ -Plus-	” (KOD専用)	10回用	TAK-201	¥16,000
Competent high JM109	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-900	¥17,000
Competent high DH5α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5α	サブクロニング用	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000