

PCRやその周辺技術が発達し、本当に様々な実験ができるようになりました。しかし、原理をきちんと考えて実験しないと、思わぬ失敗をしてしまうことがあるようです。今回は、その中でも陥りがちな実験の『落とし穴』についてご紹介したいと思います。

1-1 サイトあれども切り出せず

制限酵素を発現している細菌は、同じサイトを認識しメチル化する制限メチラーゼを発現して自身のDNAを保護しています。このような菌に、メチル化を受けていないファージのDNAなどが侵入するとバラバラに切断を受けてしまうというわけです。これがいわゆる「制限現象」です。ただ、日常の実験ではこのような制限系を有する菌を用いることは無いので、特に困っている方は少ないと思います。

一方、通常の組換え実験に用いるJM109やDH5αなどのほとんどの大腸菌に発現しているDamメチラーゼやDcmメチラーゼに関しては注意が必要です。DamメチラーゼはGATCサイトのアデニンのN6を、DcmメチラーゼはCCWGG (W:A or T) サイトの2番目のシトシンのC5をメチル化します(図4)。よって、これらのメチル化によって切断を阻害される制限酵素が存在することに注意しなくてはなりません。

例えば、Damメチラーゼの認識サイトと同じGATC配列を認識するMbo Iは、一般的な組換え実験で用いられる大腸菌で調製されたプラスミドのGATCサイトを切断することができません。また、認識配列のコア部分にDamメチラーゼの認識サイトを含むBcl I (認識サイト:T**GATCA**)も100%切断を阻害されてしまいます。同様に、Dcmメチラーゼの認識サイト:CCWGGを認識するEcoR IIも一般的な大腸菌から調製されたプラスミドを切断することができません。しかし、このような制限酵素はマルチクローニングサイトなどに用いられることはありませんし、あまり問題になることは少ないといえます。

最も注意が必要なのはXba Iなどの制限酵素です。例えば、Xba Iの認識サイトはTCTAGAであり、一見、メチラーゼの認識サイトがないように思われます。そこが落とし穴です。このサイトの前にGA、もしくは後にTCの配列がくるとDamメチラーゼの認識サイトができてしまいます。実際に、このサイトは図5のように

メチル化され、Xba Iは阻害されてしまいます。この他にも、Aat I (認識サイト:AGGCCT)やBan III (認識サイト:ATCGAT)など、様々な酵素において、同様に前後の配列によってはメチル化サイトが生成され、切断の阻害が起こります。制限酵素のメチル化による阻害に関しては、弊社総合カタログ2008/2009の3-41ページに詳しい表が載っていますので、一度ご確認ください。また、メチル化の阻害を受けない制限酵素もありますので、あわせてチェックしてみてください。

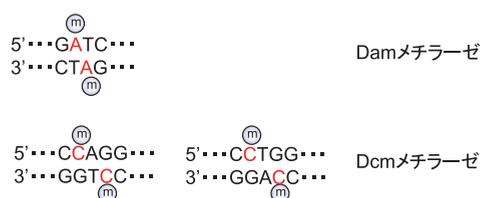
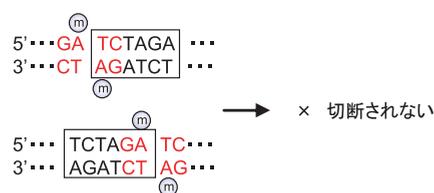


図4 Dam、Dcmメチラーゼのメチル化サイト



□: Xba I 認識サイト、赤字: Damメチラーゼ認識サイト

図5 切断阻害を受けるXba I サイト

1-2 できるかな? ライゲーション

DNAの各塩基間の結合はリン酸ジエステル結合であり、切断を受けた場合、リン酸基は5'末端か3'末端のどちらかにくることになります。制限酵素で切断を受けたDNAの末端は、Nci Iなどの特殊なものをのぞいて、ほとんどの場合5'末端にリン酸基、3'末端に水酸基がくることが分かっています(図6)。

一方、T4 DNAリガーゼなどのライゲーション反応は、ATPのエネルギーを用いる制限酵素反応の逆反応のようなものであり、反応が成立するにはDNA断片の5'末端にリン酸基が存在することが必須条件です(図6)。

前号(PCR実践技術辺(1))でご紹介しましたが、脱リン酸化

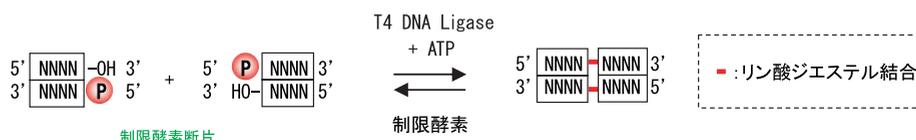


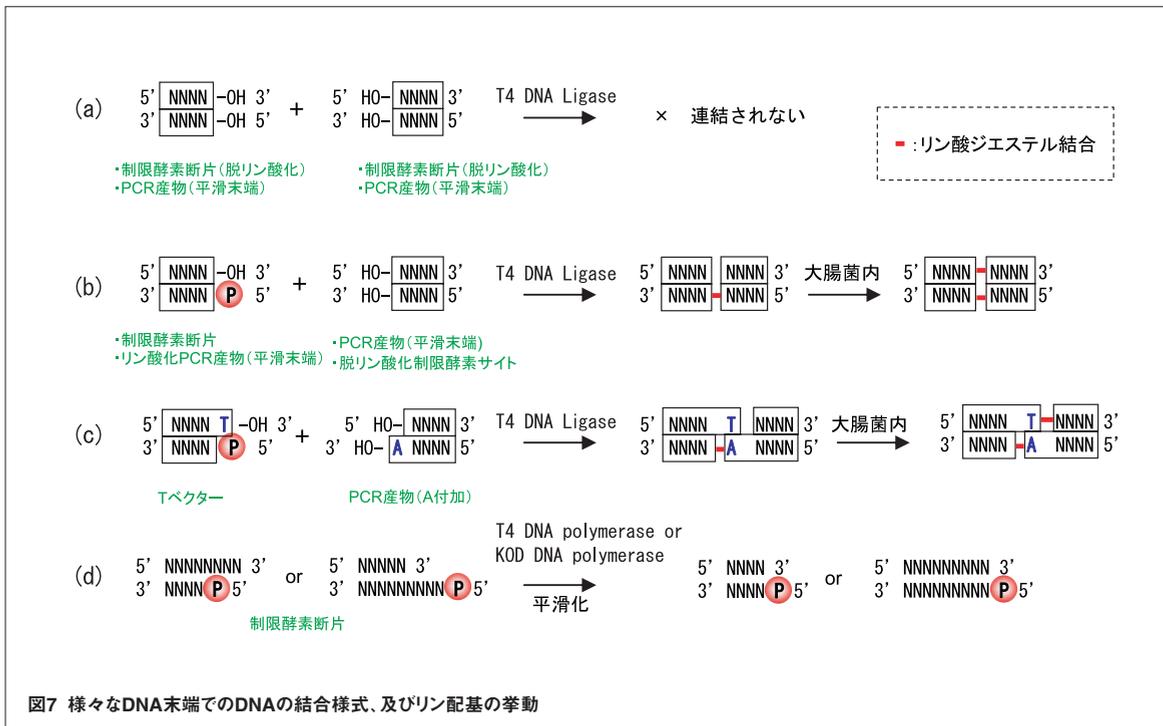
図6 制限酵素、ライゲーションにおけるリン酸基の行方

された制限酵素サイトや通常のプライマー（リン酸化されていない）で増幅されたPCR産物は、5'末端にリン酸基が存在しないためDNAリガーゼで結合することができません（図7a）。しかし、どちらか一方でもリン酸基が存在すると、2本鎖のうちの片方が連結され、さらに大腸菌に導入された後、大腸菌の修復機能が働いてもう片方の結合も形成されます（図7b、c）。脱リン酸化されたベクターへのインサートの挿入やTAクローニングなどがこの例になります。ちなみに、リン酸化されたPCR産物を用いてTA

クローニングを行うと効率が向上しますが、それは2本鎖DNAの両側が連結されるためであると考えられます。

また、制限酵素切断末端をポリメラーゼを用いて平滑化することがありますが、5'突出でも3'突出でも、その時にリン酸基が削られてしまうことはありません（図7d）。

リン酸基の位置や平滑化反応の方向性は、混乱しやすいので、この際に一度確認しておくことをお勧めします。



1-3 PCR産物の効率的な加工方法は？

PCR産物の末端がリン酸化されていないことから生じる平滑末端クローニングにおけるトラブルに関しては、前号（PCR実践技術編（1））でご紹介させていただきました。それに加えて、DNA末端の制限酵素サイトの切断性なども気になるところです。実際、制限酵素によっては、末端サイトの切断性が極端に低くなるものも存在するようので注意が必要です。通常は、1塩基程度の余分な配列をプライマーの5'末端に付加することで解決することが多いようですが、2塩基以上必要な制限酵素もあるようです。表1に、代表的な制限酵素の情報をまとめましたので、参考にしてください。

また、両端を効率的に同時に切断したいとか、コンパチブルサイト（切断面が同一配列で連結可能なサイト）などを知りたいなどの要望もあるかと思うので、表に加えていただきました。ちなみに、コンパチブルサイト同士で連結したサイトは、再切断できなくなるので注意してください。

また、この表にはDam・Dcmメチラーゼの影響についても載せていますが、PCR産

物は全くメチル化を受けていないため、メチル化の影響は考慮する必要はありません。クローニングする際のベクター切断の参考にしてください。

表1 制限酵素対応表

制限酵素	認識・切断サイト	各Buffer中での切断性*			推奨 Buffer	末端切断性**	Dam・Dcmメチラーゼの影響	Compatible site
		L	M	H				
BamHI	G GATCC	D	C	A	H	○	-	Bgl II
Bgl II	A GATCT	D	C	A	H	○	-	BamHI
EcoRI	G AATTC	B	A	A	H	○	-	
EcoRV	GAT ATC	D	B	A	H	○	-	Blunt Site
Hind III	A AGCTT	C	A	D	M	▲	-	
Kpn I	GGTAC C	A	C	D	L	○	-	
Nco I	C CATGG	C	B	A	H	○	-	
Not I	GC GGCCGC	D	C	A	H	○	-	
Pst I	CTGCA G	C	C	A	H	▲	-	
Sal I	G TCGAC	D	D	A	H	▲	-	Xho I
Spe I	A CTAGT	C	A	B	M	○	-	Xba I
Xba I	T CTAGA	D	A	C	M	○	配列によりDamの影響を受ける	Spe I
Xho I	C TCGAG	C	B	A	H	○	-	Sal I

*【酵素の切断性】 A: 100~80%, B: 80~50%, C: 50~20%, D: 20~0%

**【末端切断性】 ○: 1~2塩基程度の付加で良好な切断性を示す, ▲: 2~3塩基以上の付加が必要
<参考文献> Biotechniques, 19: 56-59 (1995)

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研究者です。今週2人は、わき目も振らずせっせと実験を行っています。そういえば、2人にはSリーダーから難問が課せられているのです(本シリーズ前号、もしくは本号表紙の前号の課題ダイジェスト参照;本シリーズは弊社ウェブサイト<http://www.toyobo.co.jp/bio>をご覧ください)。



2-1 A子さんの落とし穴

2人とも注文していたプライマーが到着するとすぐに実験を開始しました。

2人はまずそれぞれのcDNAが挿入されたプラスミドクローンを鋳型として、高正確性PCR酵素:KOD -Plus-を用いて目的配列を増幅しました。その結果、少し無理のあるプライマーでしたが、鋳型がプラスミドということもあり、きれいに増幅することができました。その後、2人はその増幅産物を、それぞれ平滑末端クローニングとTAクローニングのプロトコル(前号参照)に従って指定されたプラスミドにサブクローニングを行いました(図8)。

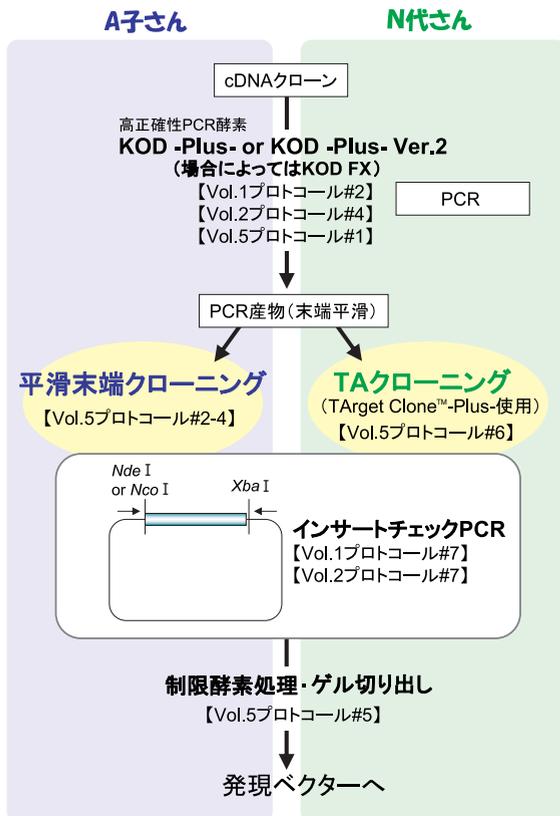


図8 A子さんとN代さんの戦略

翌日、2人はPCRを用いてインサートの有無を確認すると、その増幅産物を使ってそのままシーケンス確認まで済ませてしまいました。2人の手際はたいしたものですが。

今日は、先日から培養しておいた大腸菌から目的プラスミドを精製し、指定のあった制限酵素を用いてインサートを切り出し、発現ベクターにインサートを移し変える予定です。

午後、インサートの切り出しをしていたA子さんが浮かない顔をして暗室から出てきました。目的の位置にバンドが無いのです。ワンカットは入っているようですが、明らかにどちらかの制限酵素

での切断がうまくいっていないようです。その横でN代さんは知らぬ顔でゲルからインサートを切り出しています。

よく調べると、A子さんが作製したクローンのXba I サイトはDamメチラーゼの認識サイトが生じるような配列になっていました(図9)。しかも、ご丁寧に配列の両側にそのサイトが仕込まれていたようです。A子さんは、一般的な大腸菌株(DH5α)を用いてプラスミド調製を行っていたので、このサイトは明らかにメチル化を受けているはずですが。A子さんは、図9に示すBACT-R2のようなプライマーを設計する必要があったのです。A子さんは、自分の無知さ加減にしばし自己嫌悪に陥ってしまいました。

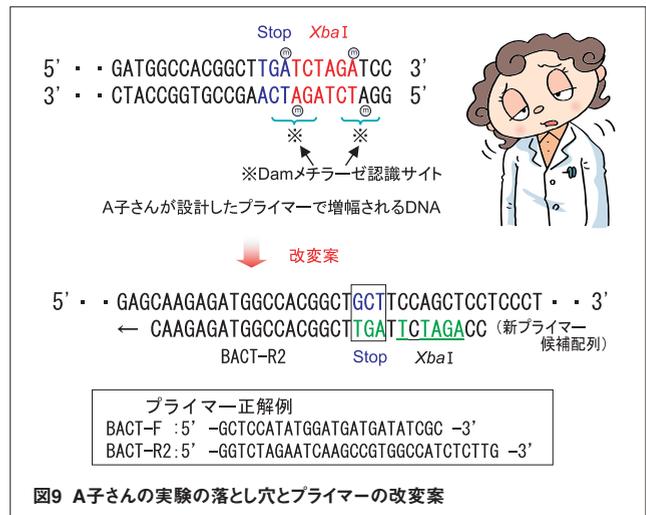


図9 A子さんの実験の落とし穴とプライマーの改変案

しかし、転んでただで起きるA子さんではありません。彼女はこの状態からすぐにリカバーできる方法を考え出しました(図10)。A子さんの考え出した方法は、今回得られたプラスミドを鋳型として、インサート確認用のプライマー(ベクター上に設計)を用いて増幅を行い、その増幅産物を制限酵素処理した後、発現ベクターにつなぎかえるというものです。PCR産物はメチル化などの修飾を受けていないので、メチル化サイトがあっても問題なく切り出すことができるのです。この場合、もう一度PCR工

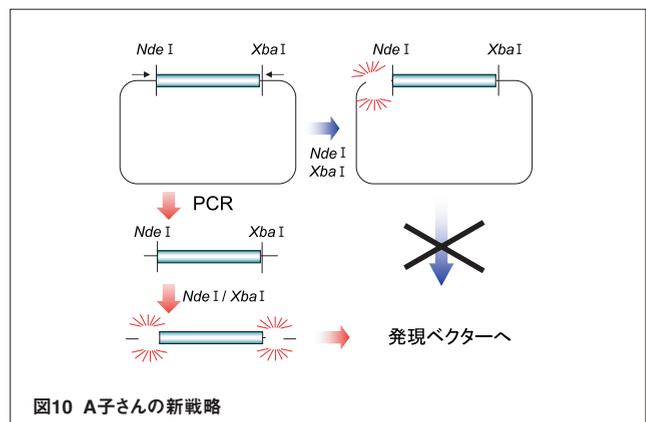


図10 A子さんの新戦略

ラーが無いかをシーケンスにより確認しなければならず、インサートは結局発現ベクターから切り出すことができなくなってしまうのですが、少なくともタンパク質発現実験はできるはずですが。

ワンポイントアドバイス ①

前後の配列によって認識配列にメチル化サイトが生じてしまい、切断が阻害されてしまう制限酵素には気をつけましょう。弊社総合カタログ2008/2009 p3-41にそのリストが掲載されていますので、是非一度ご確認ください。

一方、PCR産物は当然ながら何の修飾も受けていませんので、PCR-RFLP実験などを行う場合には心配無用です。

2-2 N代さんの落とし穴

実を言うと、N代さんは学生時代に今回のA子さんと同様の失敗を経験したのでした。

それを考慮して、今回N代さんは終止コドンから3塩基も離れた場所にXba I サイトを設計したのでした。N代さんに与えられた問題にも、Damメチラーゼのメチル化サイト(GATC)が数多く仕掛けられていました。しかも、終止コドンの直近はともかく、Xba I サイトを1つ離れた場合も、2つ離れた場合もXba I サイトの前後のどこかに必ずGATC配列ができるようになっていました。N代さんは、Sリーダーの仕込んだ落とし穴の巧妙さに少しビクビクしてしまいました。「天然の配列の中に、こんなサイトがあるなんて……」(図11)。

Stop Xba I

5'・ACCTGCCAAATGAGATCTCTAGAAAGAAGG 3'

3'・TGGACGGTTTACTCTAAGATCTTT TTCC 5'

N代さんが設計したプライマーで増幅されるDNA

もし、こうだったら?

- ACCTGCCAAATGATCTCTAGATCAAGAAGG
- TGGACGGTTTACTAGATCTTAGTCTTCC

※

- ACCTGCCAAATGAGTCTAGATCAAGAAGG
- TGGACGGTTTACTCAGATCTAGTCTTCC

※Damメチラーゼ認識サイト

- ACCTGCCAAATGAGATCTCTAGCAAGAAGG
- TGGACGGTTTACTCTAGATCTGTTCTTCC

※

図11 N代さんの回避した落とし穴

その後、N代さんは一気にタンパク質発現実験まで終えてしまいました。しかし、発現させたタンパク質の分子量が少し変わります。。。

ワンポイントアドバイス ②

組換え後のDNAの配列はきちんと調べておきましょう。特に、制限酵素サイトはきちんと調べておかないと大変なことになります。また、DNAの接合部に思わぬ配列が形成されていることもトラブルの元になるようですので、気をつけて。

796 Stop Xba I

5'・CTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATGAGATCTCTAGAAAGAAGG 3'

3'・GACGGCAGATCTTTTGGACGGTTTACTCTCAGATCTTTCTTCC 5'

N代さんが設計したプライマーで増幅されるDNA

ORF中にXba I サイトが!

変更案

Xba I 796

5'・CTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATGATGATGACATCAAGAA・3'

← CCGTCTAGCAAAACCTGCCAAATGAGATCTCTAGA (新プライマー候補配列)

G3PDH-R2 Stop Xba I

プライマー正解例

G3PDH-F : 5' -ACCCATGGGGAAGGTGAAGGT -3'

G3PDH-R2 : 5' -TCTAGAATCTATTGGCAGGTTTGTCTAGACGG -3'

図12 N代さんの落ちた落とし穴

あろうことか、N代さんの増幅した遺伝子のORF中にXba I サイトがあったのです(図12)。N代さんはDamメチラーゼサイトのことに気を奪われて最も基本的なチェックを怠ってしまったのでした。ゲルからDNAを切り出すときも、全く気づきませんでした。当然、N代さんのクローニングした断片には終止コドンがなく、その後に偶然終止コドンがでてくるまでベクターの配列が翻訳された変なタンパク質として発現されたのでした。分子サイズがおかしいはずですが。

実は、A子さんは同様なミスを過去におかしたことがあり、今回、自分の配列に加えてN代さんの配列についても組換え後にできる配列についてシミュレーションしていました。A子さんは、N代さんのミスに気づいていたのです。メチル化サイトには気づきませんでした。

結局、N代さんは、図12に示したようなプライマー(G3PDH-R2)を作り直しました。このプライマーは、上流側のXba I サイトに変異を入れて、Xba I サイトが潰れるようになっています。この勝負引き分けといったところでしょうか。

ワンポイントアドバイス ③

Nco IやNde Iなど、開始コドン(ATG)を認識サイトを含む制限酵素は、開始コドン付近でDNAを切り出す場合に重宝することが多いです。特に、Nde Iは2番目のアミノ酸に左右されることなくサイトを設計できるので、便利です。

ワンポイントアドバイス ④

プライマーへの変異は、なるべくプライマーの5'側に導入する必要があります。それは、3'側に近すぎるとミスマッチによってポリメラーゼが作用しにくくなるという理由と、3'→5' Exonuclease活性(校正活性)のあるポリメラーゼの場合はこのミスマッチが校正されてしまう可能性があるという理由からです。

ですから、図12のRプライマーのように3'末端付近に変異を導入する場合は、考えられる限り3'末端から離して設計する必要があります。少なくとも4~5塩基以上は離して設計した方が無難です。



最近、細胞などを直接サンプルとして用いるPCR法が注目を集めているようです。そこで今回は、様々なクールドサンプルを直接用いるPCRについて、高成功率PCR酵素『KOD FX』を用いて調べた結果をご紹介します。

KOD FXは、高いPCR成功率を念頭において開発されたPCR酵素です。特に、クールドサンプルやGC含量の偏ったテンプレートからの増幅に力を発揮します。正確性はTaqの約11倍程度です。

●培養細胞を用いた直接PCRの検討

動物細胞の培養が盛んに行われていますが、それらの細胞から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行うケースもしばしば生じるようです。ここでは、そのような場合を想定して、培養細胞をそのまま鋳型にしてPCR可能かどうかについて検討を実施しました。

PCRは、基本条件に準じ、図13に示したプライマーを用いて行いました。サンプルとしては、ヒト細胞株(Jurkat細胞)の培養液(2×10⁴cells 相当)を直接反応系に添加し、ボルテックスミキサーにて攪拌後、2ステップサイクルの条件で増幅を行いました。その結果、1.3~8.5 kbまでの断片を増幅することができました(図14)。

●血液を用いた直接PCRの検討

EDTA採血したヒトの血液を直接鋳型として、上記同様の条件を用い、PCRを行いました。その結果、KOD FXを用いることで、1~4 μlまで血液を添加したものですべてで1.3 kbの増幅を認めることができました。一方、A社のPCR酵素を用いた検討でも増幅は認められましたが、4 μl添加において明らかな増幅阻害がみられました。それとは対照的に、KOD FXを用いた場合には、血液量に従って増幅量が増加することが確認できました。このことは、KOD FXが、血液の阻害をほとんど受けていないことを示唆するものと考えられました(図15a)。

次に、2 μlの血液サンプルを用いて、長い断片の増幅を行いました。8.5 kbまでの明瞭な増幅を確認することができました(図15b)。

KOD FXは、これらの他にマウステールライゼートを用いるようなPCRにおいても威力を発揮することが調べられています(Q&A参照)。

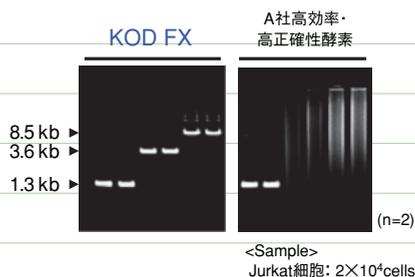
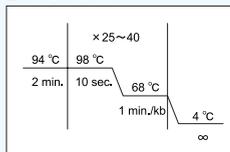


図14 培養細胞を直接用いたヒトゲノムDNAの増幅

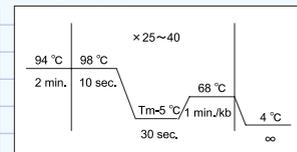
【プロトコール#1】KOD FXの基本反応条件

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

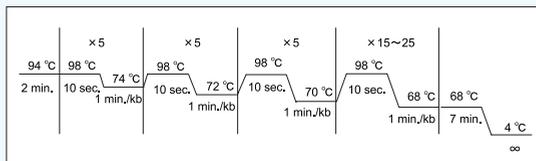
2ステップサイクル*



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°C未満の場合は、3ステップサイクルをお薦めします。

- 〈β-globin 1.3 kb〉
Primer F: 5' -TTAGGCCTTAGCGGGCTTAGAC-3'
Primer R: 5' -CCAGGATTTTTGATGGGACACG-3'
- 〈β-globin 3.6 kb〉
Primer F: 5' -GGTGTCCCTTGATGTAGCACA-3'
Primer R: 5' -ACATGTATTTGCATGGAAAACAAC-3'
- 〈β-globin 8.5 kb〉
Primer F: 5' -TGATAGGCACTGACTCTCTGTCCCTGGGCTGTTT-3'
Primer R: 5' -ACATGATTAGCAAAAGGGCTAGCTTGGACTCAGA-3'

図13 プライマーリスト

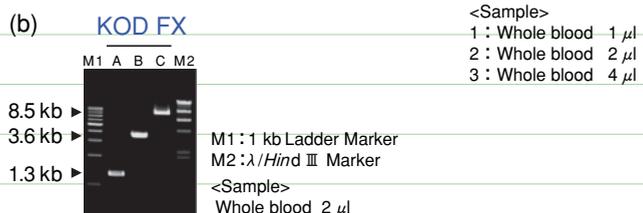
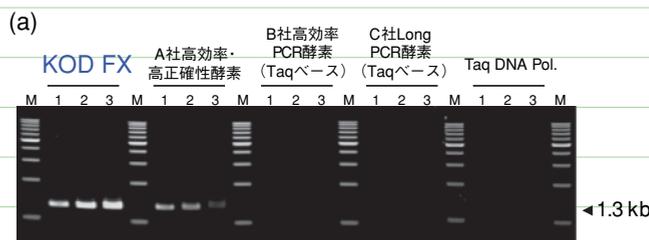


図15 血液を直接用いたヒトゲノムDNAの増幅

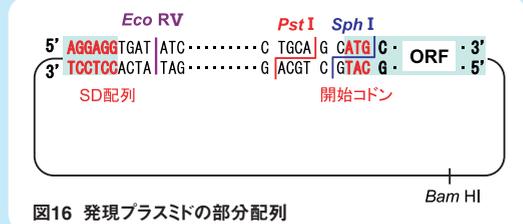
2-3 次なるSリーダーからの課題

その後、2人は何とか課題をやり終えることができました。それにしても、今回の課題は2人にとってかなりの教訓になりました。と、そこへSリーダーからのメールが届いたようです。添付ファイルを開いてみると次なる課題でした。

●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。

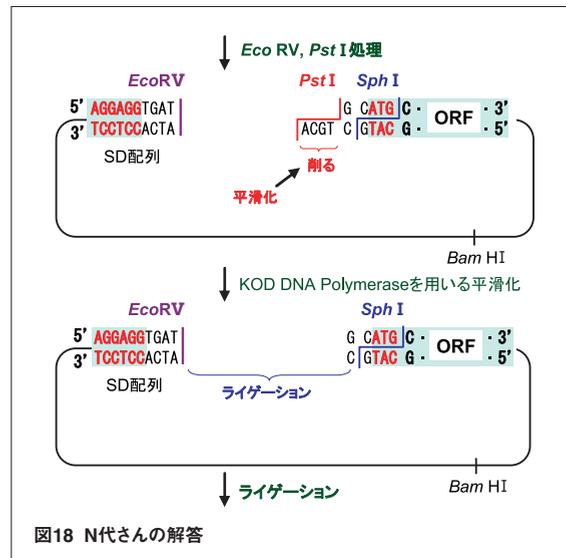
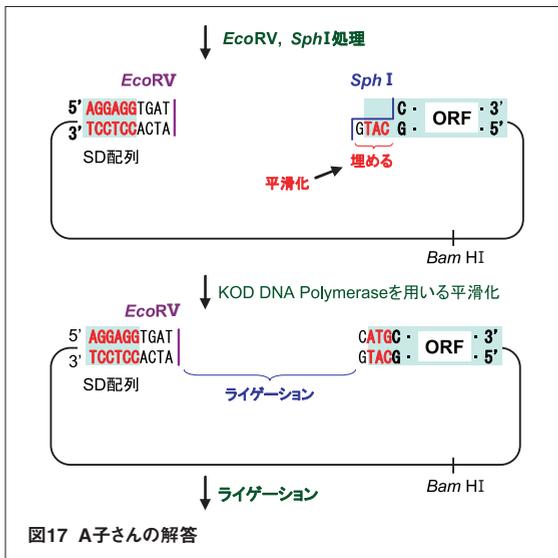
- 使用できる方法は以下のとおり。
 - ・各制限酵素での切断
 - ・KOD DNA polymerase*を用いる末端の平滑化
 - ・T4 DNAリガーゼによる結合
 - ・PCR (任意の場所にプライマーを設計可能)
 - ・T4 Polynucleotide Kinaseを用いるDNAのリン酸化
- *5'→3' DNA polymerase活性と3'→5' Exonuclease活性を有しています。



●上図に示したEcoRV、PstI、SphI、BamHIの認識配列は、ここに示したサイト以外には存在しません。

AさんとN代さんはこの課題を見て、制限酵素処理後に何らかの方法で連結することで最も簡単に課題を達成できるのではないかと考えたようです。確か、KOD DNA polymeraseは5'→3' DNA polymerase活性と3'→5' Exonuclease活性を有しているのでDNAの末端を平滑化でき、平滑化したサイト同士は直接連結できるはずでした。

Aさんは、3'とか5'とか、DNAの方向性を考えるといつも混乱してしまうようで、質問用紙を上下逆さに見たりしています。一方、N代さんは、この質問を見切ったのか、不敵な笑みを浮かべています。結局、2人は以下のような方法を考え出しました(図17、18)。2人の方法では、確かにSD配列と開始コドンの間は5~6塩基になるようです。



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きらりと輝きました。

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…、この解答には思いもかけない罠が仕掛けてあるのでは?」と。そしてS本さんは、なんとなく、2人が選択しなかったPCRとT4 Polynucleotide kinaseを用いるのではないかと思いました。

さて、皆さんなら、どのような方法を用いますか? 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(3)」でお届けする予定です。

次回、どうぞ期待!!

A子さん

KOD FXを用いてクールドサンプルから増幅する場合、どのような注意点がありますか？

KOD FXは、培養細胞、血液、マウステールライセートなど、様々なクールドサンプルを用いるPCRへ応用することが可能です。その際の注意点としては、サンプルを持ち込み過ぎないことが重要です。液量としては、反応液50 μ lに対して最大5 μ l、好ましくは2 μ l程度にすることで良好な結果を得ることができます。

マウステールの増幅では、適切な方法で前処理したものをを用いることが好ましいといえます。一般的には、Proteinase Kを用いる方法で処理することが多いのですが、クールドサンプルに強いKOD FXでは、アルカリ溶解法を用いて簡便に作製したライセート上清を用いることも可能です。

●マウステールライセートの調製方法 (アルカリ溶解法)

- マウステール約3 mm
- ↓ ←50 mM NaOH 180 μ lを加え、Vortexにて良く攪拌
- 95°C, 10 min. インキュベート
- ↓ ←1M Tris-HCl (pH8.0) 20 μ lを加え、Vortexにて良く攪拌
- 12,000 rpm, 10 min. 遠心
- ↓
- 上清回収
- ↓
- 0.5~2 μ lをPCR (50 μ l)へ

※本方法では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扱いに十分ご注意ください。

SJ-ダー

A子さん

KOD FXの正確性はどの程度ですか？

Taq DNA polymeraseの約11倍です。増幅産物の末端は平滑化されています。よって、PCR産物は直接TAクローニングすることはできません。専用のTARget Clone™-Plus- (Code No. TAK-201)を用いることによって、高効率にTAクローニングすることが可能です。

ちなみにKOD -Plus-とKOD -Plus- Ver.2の正確性はTaqの約80倍であり、こちらの方がクローニング用途には適しています。

SJ-ダー

A子さん

KOD FXに用いるプライマーの注意点を教えてください。

KOD FXに限らず、KOD -Plus-やKOD -Plus- Ver.2の場合も同様に、アニーリング温度はプライマーのTm値-5~10°C程度を目安にします。よって、2ステップサイクルやステップダウンサイクルの場合、プライマーのTm値は少なくとも73°C程度は必要です。

2ステップサイクルやステップダウンサイクルはクールドサンプルを用いるPCRや10kbを超える長いターゲットの増幅に有効であることが分かっています。

また、特に長いターゲット (>10kb) の場合に用いるプライマーは、脱塩グレードのものではスミアや非特異増幅が見られる場合があるため、少なくとも、カートリッジ精製やHPLC精製グレードのものを使用する必要があります。

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	750 μ l×1本	LGK-201	¥22,000
MagExtractor™ -PCR & Gel Clean up-	DNA断片の精製	200回用	NPK-601	¥28,000
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	50 μ moles/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
Magical Trapper	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 DH5 α	高効率形質転換	0.1ml×10本	DNA-903	¥17,000
Competent Quick DH5 α	サブクローニング用	0.1ml×20本	DNA-913	¥29,000