発現解析関連特集

今回は発現解析に関連する様々な商品を一挙にご紹介いたします。
今、お使いの製品はいかがですか。この機会にぜひ一度お試しください。

Products

高正確性PCR用酵素

KOD -Plus- Ver.2

PCRパフォーマンスを向上。安定・確実な増幅を実感ください。

KOD -Plus-は正確性の高いHot Start PCR用酵素としてご好評いただいておりましたが、この度、本製品に改良を加えることにより、フィデリティー（正確性）は落とさず、リライアビリティー（信頼性）を格段に向上させることに成功いたしました。この改良により、全般的にPCR増幅効率が向上し、また、RT-PCR時のRT反応溶液の持込による阻害も回避できるようになりました。

特長1 高いリライアビリティー

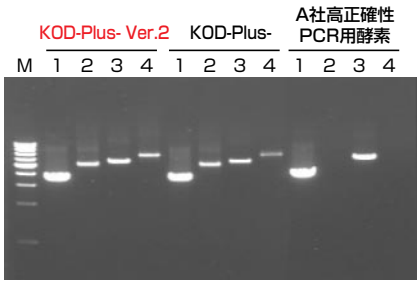
・増えにくい配列のテンプレートや長いテンプレートに対するPCR成功率が向上しました。より確実に増幅産物を取得いただけます。

特長2 RT溶液持込による阻害を低減

・KOD -Plus-に比べ、逆転写溶液の持込による阻害の低減に成功いたしました。RT-PCRでの増幅に力を発揮します。

特長3 高い正確性

・従来のKOD -Plus-と同等の正確性を保持しています。Taq DNAポリメラーゼの約80倍の正確性を有しており、PCR産物のクローニング等の用途に最適です。KOD/KOD -Plus-用TAクローニングキット『TArget Clone™ -Plus-』にも対応します。



Template
：HeLa total RNA reverse transcript.
反応液組成およびサイクル条件
：各製品推奨条件（50μl、30cycles）

1 ：human transferrin receptor cDNA 3.5kb
2 ：human tuberous scleosis cDNA 5.3kb
3 ：human adaptin cDNA 5.7kb
4 ：human polymerase εcDNA 6.8kb
M ：λ/*Hin*d Ⅲマーカー

各種cDNAをターゲットとした各社PCR用酵素増幅性能の比較

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
高正確性PCR用酵素 **KOD -Plus- Ver.2** KOD -Plus- Ver.2 200U 10×Buffer for KOD -Plus- Ver.2 1ml 25mM $MgSO_4$ 1ml 2mM dNTPs 1ml	200U×1本	-20℃	KOD-211	¥32,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004～2005 総合カタログ
高正確性PCR用酵素 **KOD -Plus-**	200U×1本	-20℃	KOD-201	¥30,000	1-10
KOD/KOD -Plus-用TAクローニングキット **TArget Clone™ -Plus-**	10回用	-20℃	TAK-201	¥16,000	-
1stストランドcDNA合成キット **ReverTra Ace® -α-**（逆転写酵素＋dNTPs他）	100回用	-20℃	FSK-101	¥53,000	1-30
逆転写酵素 **ReverTra Ace®**	2,000U×1本	-20℃	TRT-101T	¥6,000	5-77

Products

PCR用酵素

Blend Taq®／Blend Taq® -Plus-

増幅効率、伸長性に優れたTaqベースのブレンド型PCR用酵素です。

Blend Taq®はBarnesらの方法をベースに作られたPCR用酵素で、Taq DNA PolymeraseとProofreading活性を持つDNA Polymeraseを混合することにより、増幅効率、伸長性に優れたPCRを実現します。

特長1 優れたDNA増幅効率

・微量の鋳型からも効率良くPCRを行うことができます。

特長2 優れた伸長性

・本酵素はBarnesらの方法をベースに作られた酵素であり、PCRにおける伸長性が向上しています。
・human β-globin gene 17.5kbの増幅を確認しています。

特長3 簡単な条件設定

・TaqベースのPCR用酵素のため、Taqと同じサイクル条件でPCRを行うことができます。（実施例1）

特長4 TAクローニング可能

・Blend Taq®およびBlend Taq® -Plus-のPCR産物は、共にTAクローニングに使用可能です。

特長5 ホットスタートPCR対応 Blend Taq®-Plus-

・**Blend Taq® -Plus-**には、抗Taqモノクローナル抗体anti-Taq highを加えており、特別な操作無しにホットスタートPCRが可能です。エキストラバンドを抑え、特異性の高いPCRを実現します。

実施例1 他社ブレンド型PCR用酵素との検出感度の比較

human β-globin gene 3.6kbをターゲットにしてBlend Taq®、Blend Taq® -Plus-および他社ブレンド型酵素を使用してPCRを行いました。5ngから40ngのゲノムDNAと10pmolesのプライマーを用い、50μlの系で酵素を1.25U使用しました。

その結果、Blend Taq®、Blend Taq® -Plus-はゲノム5ngにおいても良好な増幅が認められ（図1、2）、他社ブレンド型酵素（図3）に比べ、優れた増幅効率を示しました。

PCRサイクル条件
94℃、 2min
↓
94℃、30sec ←
55℃、30sec　35 cycles
72℃、 3min ←

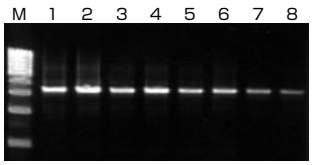


図1. Blend Taq®

Lane M：1kbラダーマーカー
Lane 1、2：ゲノム40ng
Lane 3、4：ゲノム20ng
Lane 5、6：ゲノム10ng
Lane 7、8：ゲノム 5ng
※以下、同様。

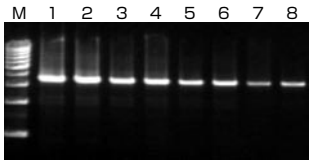


図2. Blend Taq® -Plus-

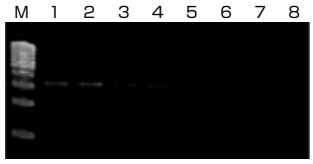


図3. 他社ブレンド型酵素

実施例2 他社ブレンド型PCR用酵素との伸長性の比較

human β-globin gene およびhuman Myosin heavy chain geneの異なる長さのものをそれぞれ用意し、ターゲットとしました。PCR用酵素として、Blend Taq®、Blend Taq® -Plus-および他社ブレンド型酵素を使用してPCRを行いました。種々の量のゲノムDNAと15pmolesのプライマーを用い、50μlの系で酵素を1.25U、他社ブレンド型酵素では各社推奨容量を使用しました。

その結果、Blend Taq®、Blend Taq® -Plus-はターゲット長が23.0kbでも良好な増幅が認められ、他社ブレンド型酵素に比べ、優れた伸長性を示しました。

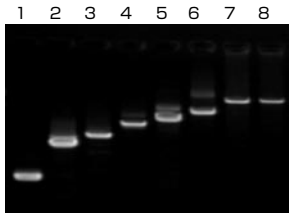


図4. Blend Taq®

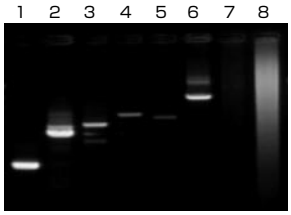


図5. A社ブレンド型酵素

Lane 1：β-globin 1.3kb（100ng）
Lane 2：β-globin 2.8kb（100ng）
Lane 3：β-globin 3.6kb（100ng）
Lane 4：Myosin h.c. 5.2kb（100ng）
Lane 5：Myosin h.c. 6.2kb（100ng）
Lane 6：β-globin 8.5kb（100ng）
Lane 7：β-globin 17.5kb（200ng）
Lane 8：β-globin 23.0kb（200ng）
※（ ）内は使用template量を示す。

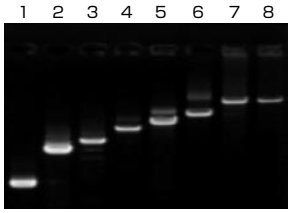


図6．Blend Taq® -Plus-

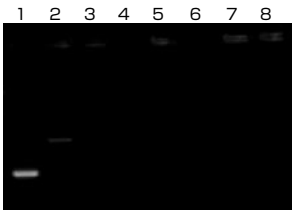


図7．B社ホットスタートPCR用酵素

Lane 1 : β-globin 1.3kb（100ng）
Lane 2 : β-globin 2.8kb（100ng）
Lane 3 : β-globin 3.6kb（100ng）
Lane 4 : Myosin h.c. 5.2kb（100ng）
Lane 5 : Myosin h.c. 6.2kb（100ng）
Lane 6 : β-globin 8.5kb（100ng）
Lane 7 : β-globin 17.5kb（200ng）
Lane 8 : β-globin 23.0kb（200ng）
※（ ）内は使用template量を示す。

実施例3 TAクローニング

human β-globin gene 582bpをターゲットにしてBlend Taq®、Blend Taq® -Plus-、rTaqを用いてPCRを行いました。得られたPCR産物をP社TAクローニングキットを用いてライゲーション反応を行い（16℃、1時間）、Competent high DH5αを形質転換して選択培地上にプレーティングし、青白判定を行いました。

その結果、Blend Taq®およびBlend Taq® -Plus-のPCR産物もrTaqと同様75%以上のwhiteコロニーが得られました（図8）。またコロニーダイレクトPCRにてインサートを確認したところ、いずれの酵素の場合もwhiteコロニーの90%以上が目的のインサートを有していました。

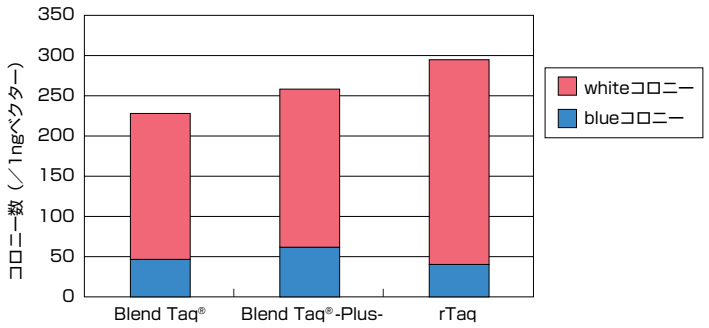


図8．各酵素から得たPCR産物の形質転換効率（青白判定結果）

一口メモ

Blend Taq®およびBlend Taq® -Plus-はTaq DNA Polymeraseに比べ、3～4倍の正確性を持っています（弊社データより）。

実施例3のように1～2kb程度の比較的短いターゲットならBlend Taq®、Blend Taq® -Plus-でクローニング可能です。これより長いインサートのクローニングには、正確性の高いKOD -Plus-、KOD -Plus- Ver.2をお勧めいたします。

参考文献

1) Barnes, W. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2216-2220（1994）

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
PCR用酵素 **Blend Taq®** Blend Taq® (2.5U/μl) 10×Buffer for Blend Taq® 2mM dNTPs	50U×1本 250U×1本 1,000U×1本 1,000U×3本	-20℃	BTQ-101T BTQ-101 BTQ-102 BTQ-103	¥5,000 ¥19,000 ¥62,000 ¥170,000
ホットスタートPCR用酵素 **Blend Taq®-Plus-** Blend Taq® -Plus-(2.5U/μl) 10×Buffer for Blend Taq® 2mM dNTPs	50U×1本 250U×1本	-20℃	BTQ-201T BTQ-201	¥6,000 ¥21,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004～2005 総合カタログ
1stストランドcDNA合成キット **ReverTra Ace -α-®**（逆転写酵素＋dNTPs他）	100回用	-20℃	FSK-101	¥53,000	1-30
逆転写酵素 **ReverTra Ace®**	2,000U×1本*	-20℃	TRT-101T	¥6,000	5-77
RNase Inhibitor	2,500U×1本*	-20℃	SIN-101	¥9,000	5-85
Oligo(dT)$_{20}$ Primer	1nmole	-20℃	FSK-201	¥8,000	(1-31)
Random Primer (9mer)	2.5nmoles	-20℃	FSK-301	¥8,000	(1-31)
Nucleotides dNTPs Mixture (2mM)	各2μmoles	-20℃	NTP-201	¥8,000	3-22、4-26
Nucleotides dNTPs Mixture (10mM)	各2μmoles	-20℃	NTP-301	¥8,000	3-22、4-26
コンピテントセル **Competent high DH5α**	0.1ml×10本	液体窒素	DNA-903	¥17,000	3-23

＊：この印のついた製品には、上記以外に他の容量でも販売しております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。

Products

Realtime PCR Master Mix

多くのリアルタイムPCR装置に対応可能な、汎用性の高い試薬です。

rTaq DNA Polymeraseをベースとした汎用性の高いリアルタイムPCR用マスターミックスです。ガラスキャピラリーを使用するリアルタイムPCRシステムや、パッシブリファレンスを使用するアッセイ系のどちらにも最適です。

特長1 簡便な操作

・2×マスターミックスの状態ですので、後はプライマー、プローブ、蒸留水、およびサンプルを混合していただくだけです。

特長2 高い汎用性

・ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler™など、ガラスキャピラリーを使用するシステムに対応するためBSAを含有しています。
・アプライドバイオシステムズ社のABI PRISM® 7700などに対応したパッシブリファレンスも添加されており、設定の変更なしで使用できます。

特長3 多くのアッセイ系に対応

・Realtime PCR Master Mixは、TaqMan®アッセイやその他のプローブアッセイにもご使用いただけます。
・SYBR® Green Realtime PCR Master Mixは、既にSYBR® Green I（Molecular Probes Inc.）を含有しています。未標識のプライマーをご用意していただくだけで、インターカレーターアッセイ法による定量PCRを行うことができます。

特長4 抗体によるホットスタートテクノロジーを採用

・非特異反応を抑えるため、弊社のanti-Taq抗体を使用したホットスタートPCRを採用しています。
・化学修飾によるホットスタートと異なり、ブロッキングが素早くはずれ（90℃以上で30秒）、PCRがスタートします。

特長5 cDNA合成キットとのマッチング

・弊社のcDNA合成キット「ReverTra Ace -α-®」（Code No.FSK-101）の反応液をそのまま希釈してご使用いただけます。
・「ReverTra Ace®」（Code No.TRT-101T,101,102）と「RNase Inhibitor」（Code No.SIN-101,102）を本試薬に添加することにより、“1ステップ RT-PCR”を実施することができます。

実施例1 SYBR® Green Realtime PCR Master Mixを用いたインターカレーターアッセイ

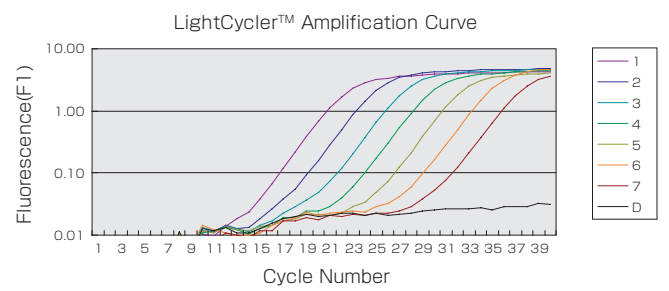


図1．LightCycler™におけるSYBR® Greenアッセイの増幅曲線

ReverTra Ace -α-®を使用し、HeLa total RNA（100ng）を鋳型としてrandom primerにて1st strand cDNA合成を行った後、10倍希釈をスタートとして5倍ずつ段階希釈（1～7）しました。これをサンプルとしてβ-actin遺伝子配列をターゲットとするPCRを実施しました。装置はLightCycler™を使用しました。

その結果（図1）、いずれの濃度でも良好な増幅曲線を得ることができました。増幅していない曲線Dはブランク（蒸留水）です。

品名及び内容	包装*	保存温度	Code No.	価格
Realtime PCR Master Mix（×2濃度）	200回用（1ml×5本）	-20℃	QPK-101	¥37,000
	40回用（1ml×1本）		QPK-101T	¥10,000
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix（×2濃度）	200回用（1ml×5本）	-20℃	QPK-201	¥37,000
	40回用（1ml×1本）		QPK-201T	¥10,000

＊本製品は2倍濃度に調製されています。上記回数は50μl反応系の場合の回数です。装置などによって推奨容量は異なります。

※本製品は、F. Hoffmann-La Roche Ltd.、Roche Molecular Systems Inc.並びにThe Perkin-Elmer Corporationとのライセンス契約に基づき販売されるものです。
※LightCycler™は、Idaho Technology Inc.並びにRoche Molecular Systems Inc.の商標です。
※SYBR®は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。
※TaqMan®は、The Perkin-Elmer Corporationの登録商標です。

これだっ!!!!

核酸増幅リアルタイムモニタリング装置

LineGene

本製品はすでに
販売を中止して
おります。

スリムに使える快適さ
— もっと身近に

新価格 ¥1,890,000

価格のスリム化

販売工程を徹底的に
スリム化の上、
生産ラインを合理化。

機器のスリム化

パソコンの附属なし。
任意選択可能。

反応系のスリム化

10μl反応系対応で、
ランニングコストもお得。

機能のスリム化

必要な機能だけを厳選、
だから使いやすい。

詳細はこちら

BioFlux

本製品はすでに販売を中止しております。

Products

Real Time Monitoring Fluorescent Quantitative Detection System

LineGene

新価格

核酸の増幅過程をリアルタイムモニタリング。コストパフォーマンスに自信あり。

本品は、核酸の増幅過程をリアルタイムにモニタリングする装置です。33フォーマットのパーソナルタイプで、再現性と精度の高いシステムをご提供します。機器本体価格もさることながら、ランニングコストも安価です。
また、広範囲で未知試料を正確に定量したり、全ウェルを一度に解析するなど非常に高性能です。

特長1 優れたコストパフォーマンス

・測定に専用チューブやキャピラリーは不要で、汎用0.2ml PCR用チューブを使用できます。
・非常に少ない反応ボリューム（10μl～）で安定した結果を実現します。
・試薬ランニングコストを低減※します。
※反応ボリューム10μlで…37円/チューブ（弊社キットSYBR® Green Realtime PCR Master Mixを用いた場合）

特長2 高感度オプティカルユニット

・励起用光源は、発熱性が低く安定かつ長寿命のBlue LEDを採用しています。
・検出器は、検出限界が高く高速応答低ノイズのPMTを採用しています。
・この光学系により、蛍光シグナル信号を高感度かつ高速に読み取り可能です。

特長3 多様な系に対応

・対応試薬は、SYBR® Green I、TaqMan® Probes（レポーター分子：FAM、クエンチャー分子：TAMRA）、Hybridization Probes、Molecular Beaconなど、多様な系に対応します。
　励起波長：470nm
　検出波長：530nm 、640nm 、710nm

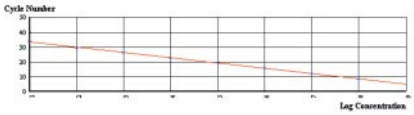
特長4 ソフトウェア

・GUI環境によりセットアップは簡単です。
・増幅曲線のリアルタイム表示により、反応の進行状況が一目瞭然です。また、ランニング中にグラフのスケールを拡大し反応初期の微小な蛍光をモニタリングすることも可能です。
・増幅の程度に合わせ、反応中にサイクルを追加、削除することも可能です。
・定量解析および融解曲線解析（SYBR® Green I アプリケーション）のどちらも可能です。

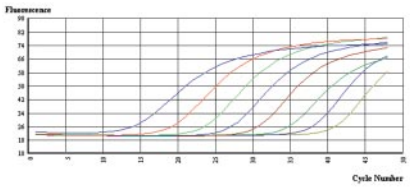
性　能

■テンプレート濃度2倍差の検出
初期の鋳型濃度が2倍差のサンプルを、はっきりと区別して検出できます。

■ウェル間均一性
全ウェルにわたり同等の解析が可能です。



■ダイナミックレンジ（図上･右）
広範囲かつ正確に未知試料を定量できます。
10コピー程度の低濃度での検出も可能です。



主な仕様

サンプル容量:	0.2ml×33本
励起波長:	470nm
検出波長:	530nm　640nm　710nm
励起用光源:	Blue LED
蛍光検出器:	フォトマルチプライヤーチューブ（PMT）
温度制御範囲:	30℃～99℃
温度変化率:	最大4℃/sec（2ステップ、45サイクルの反応=約90分）
温度精度（設定温度）:	≦±0.5℃（95℃）≦±0.3℃（72℃）≦±0.2℃（55℃）
温度均一性（設定温度）:	≦±1.0℃（95℃）≦±0.5℃（72℃）≦±0.3℃（55℃）
電源:	100V　50/60Hz
最大消費電力:	1000W
外形寸法：	W514×D456×H292（mm）
重量:	23kg

※製品の性能および仕様、外観は改良のため予告なく変更することがある。

品名及び内容	包装	Code No.	価格
Real Time Monitoring Fluorescent Quantitative Detection System **LineGene**（本体＋ソフトウェア）	1式	BFFQD-33A	¥1,890,000

※SYBR®は、Molecular Probes社の登録商標です。
※TaqMan®は、Roche Molecular Systems社の登録商標です。
※Hybridization ProbesはHoffman La Roche社の実施許諾が必要です。

品名及び内容	包装*	保存温度	Code No.	価格	2004～2005総合カタログ
Realtime PCR Master Mix（×2濃度）	200回用（1ml×5本） 40回用（1ml×1本）	-20℃	QPK-101 QPK-101T	¥37,000 ¥10,000	4-43
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix（×2濃度）	200回用（1ml×5本） 40回用（1ml×1本）	-20℃	QPK-201 QPK-201T	¥37,000 ¥10,000	4-43

*: 50μl反応系の場合の回数です。装置などによって推奨容量は異なります。

Products

Can Get Signal® immunostain

Immunoreaction Enhancer Solution

ご好評をいただいております*Can Get Signal*® シリーズの免疫組織染色バージョンの登場です。

ウェスタンブロッティングやELISA用としてご好評をいただいております*Can Get Signal*®に、新たに免疫組織染色専用の新バージョンが加わりました。組織や細胞の染色において、より鮮明な染色像を得られるよう最適化されています。

特長1 免疫染色のシグナルを増強

・*Can Get Signal*® immunostainは、抗原と抗体との反応を促進する効果があり、従来法に比べS/N比の高い良好なシグナルを得ることができます。また、二次抗体の使用量を抑え、高いS/N比の像を得るといった使い方も可能です。抗体の使用量を全体的に抑えることが可能です。

特長2 さまざまな抗原・抗体に対応

・*Can Get Signal*® immunostainには、反応促進効果の異なるSolution AとSolution Bとがあります。ご使用の実験系に合わせ、それぞれの実験系により適した試薬を選択することができます。
・2種類の試薬がセットになったStarter Setもございます。お持ちの抗体に対して、Solution AとSolution Bのどちらが適しているのかは、こちらでご確認ください。

特長3 高い汎用性

・*Can Get Signal*® immunostainは、化学発色、化学発光、蛍光などいずれの検出系にも使用することができます。
・ABC法やポリマーコンプレックス法などの増感システムとの併用も可能です。

特長4 使いやすいReady-to-Useタイプ

・*Can Get Signal*® immunostainは、希釈せずにそのままご使用いただけます。

実施例1 従来法との比較ー免疫組織染色（ABC法）

ヒト皮膚組織モデルTESTSKIN™（東洋紡）パラフィン包埋切片を用い、一次抗体として抗PCNA・マウスモノクローナル抗体、二次抗体にビオチン標識抗マウスIgG抗体をそれぞれ用いて、免疫組織化学染色を行いました（ABC法）。抗体の希釈には、*Can Get Signal*® immunostain（Solution Aを使用）と、1.5%ウマ正常血清を含むPBS（従来法）をそれぞれ用い、染色効率の比較を行いました。

Can Get Signal® immunostainを用いた場合は、従来法と比較して高いシグナルが得られ、バックグラウンドも低く抑えられた明瞭な染色像を得ることができました。

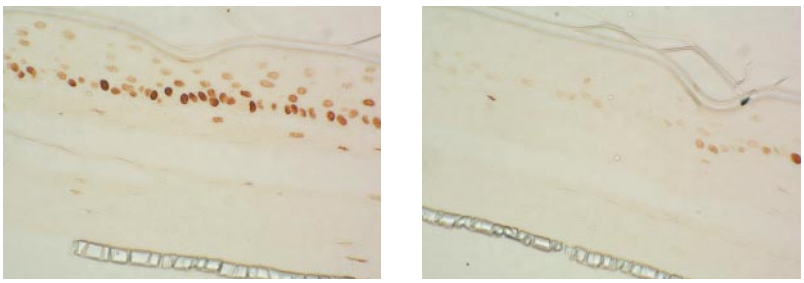


図1．抗PCNA抗体による免疫組織染色

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
***Can Get Signal*® immunostain Starter Set** Solution A Solution B	各5ml×1本	4℃	NKB-401	¥12,000
***Can Get Signal*® immunostain** Solution A	20ml×1本	4℃	NKB-501	¥30,000
	20ml×4本		NKB-502	¥70,000
***Can Get Signal*® immunostain** Solution B	20ml×1本	4℃	NKB-601	¥30,000
	20ml×4本		NKB-602	¥70,000

Products

MultiReporter Assay System -Tripluc®- *in vivo* アッセイ用試薬

D-luciferin（カリウム塩）

Tripluc®のルシフェラーゼのリアルタイム計測など、*in vivo*アッセイにご利用いただけます。

MultiReporter Assay System -Tripluc®-の3色のルシフェラーゼ（SLG、SLO、SLR）は、ホタルルシフェラーゼと同様にD-luciferinを基質としておりますので、培養液にD-luciferinを添加していただくことで、細胞を生きたまま非破壊的に測定することが可能です。

特長1 生細胞アッセイが可能

・本試薬は、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した哺乳類細胞の培養液に添加し、ルシフェラーゼによる発光を確認しております。

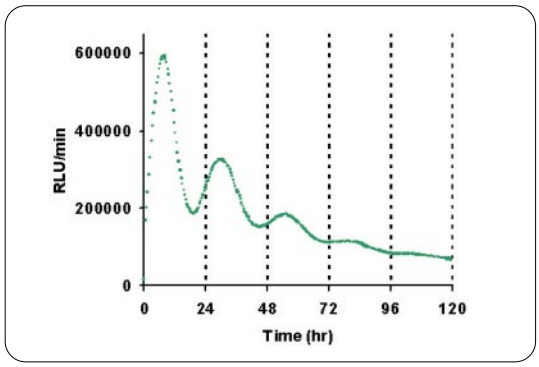
特長2 高純度

・HPLCにより98.0%以上であることを確認しております。

実施例

概日時計遺伝子のプロモーターの下流に、SLG遺伝子を連結したレポーターベクターを繊維芽細胞NIH3T3に導入しました。この細胞を100nMデキサメタゾンで処理後、200μMルシフェリンを含む培養液に置換し、連続発光測定装置で生物発光を非破壊的に5日間測定しました。

※本データは、産業技術総合研究所　中島芳浩先生よりご提供いただきました。



品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
MultiReporter Assay System -Tripluc®- *in vivo*アッセイ用試薬 **D-luciferin（カリウム塩）**	20 mg 100 mg	-20℃	MRL-101 MRL-102	¥24,000 ¥92,000

関連商品

	種類	SLG（緑色）	SLO（橙色）	SLR（赤色）
スタンダードタイプ	プロモーター挿入用ベクター [20μg]	**pSLG-test** 〈MRV-101　¥80,000〉	**pSLO-test** 〈MRV-102　¥80,000〉	**pSLR-test** 〈MRV-103　¥80,000〉
	プロモーター挿入用ベクターセット [各20μg]	**SLG/SLO/SLR プロモーター挿入用ベクターセット**〈MRV-111、¥200,000〉 pSLG-test　pSLO-test, pSLR-test		
	SV40コントロールベクター [20μg]	**pSLG-SV40 control** 〈MRV-201　¥80,000〉	**pSLO-SV40 control** 〈MRV-202　¥80,000〉	**pSLR-SV40 control** 〈MRV-203　¥80,000〉
	SV40コントロールベクターセット [各20μg]	**SLG/SLO/SLR　SV40コントロールプロモーターベクターセット**〈MRV-211　¥200,000〉 pSLG-SV40, pSLO-SV40, pSLR-SV40 control		
	HSVtkコントロールベクター [20μg]	**pSLG-HSVtk control** 〈MRV-301　¥80,000〉		
	ベクター フルセット [各20μg]	**SLG/SLO/SLR ベクター フルセット**〈MRV-311、¥350,000〉 プロモーター挿入用各種:pSLG-test, pSLO-test, pSLR-test コントロール各種:pSLG-SV40, pSLO-SV40, pSLR-SV40, pSLG-HSVtk control		
TAクローニングタイプ	プロモーター挿入用Tベクター（TA Cloning Kit）[20回用] 内容 ・ベクター ・T4 DNA Ligase ・2×Ligation Buffer （・10×A-attachment Mix）		**SLO TA Cloning Kit** 〈MRT-101　¥65,000〉 （MRV-102をTプラスミドベクター化） **SLO TA Cloning Kit for KOD** 〈MRT-201　¥69,000〉 （MRT-101にA-attachment添付）	**SLR TA Cloning Kit** 〈MRT-102　¥65,000〉 （MRV-103をTプラスミドベクター化） **SLR TA Cloning Kit for KOD** 〈MRT-202　¥69,000〉 （MRT-102にA-attachment添付）

※特許の関係上、ご購入の際は別途申込書を提出していただきます。企業の方のご購入に関しては、別途ライセンス契約が必要です。詳しくは下記ホームページの「お知らせ」でご確認いただくか、弊社までお問い合わせください。
http://www.toyobo.co.jp/bio/
※色分離機能を備えたルミノメーターについては、弊社よりカラフルックアナライザー™を販売しています。

本製品はすでに販売を中止しております。

Products

Protein Ladder Marker

サンプル調製用Dyeがセットになったの SDS-PAGE用のラダーマーカーです。

特長1 シャープなラダーバンド

・高度に精製したタンパク質を使用しており、シャープなバンドを示します。分子量も一目瞭然です。
・それぞれのバンドのタンパク質量が分かっているため、容易にサンプル濃度を推定することができます。

特長2 安定・便利

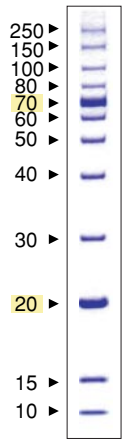
・室温でも2～3ヶ月安定です。加熱や希釈の必要もなく、いつでもそのまま使用できます。

特長3 サンプル調製用Special Dye set付き

・SDS-Dye（-DTT）と1M DTTからなるサンプル調製用のDyeが添付されています。

特長4 抗Hisタグ抗体で検出可能

・各バンドはHisタグ配列を保持しており、市販の抗Hisタグ抗体によって検出することができます。

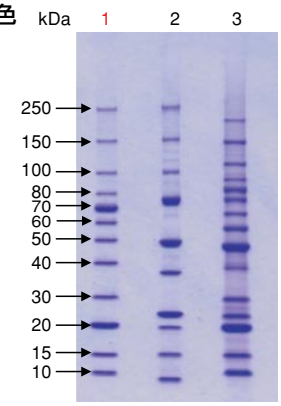


※70kDa、20kDaのバンドは増強しているので、目印になります。

［10-20%グラジアントゲルCBB染色、アプライ量5μl］

実施例1 他社タンパク質マーカーとの比較

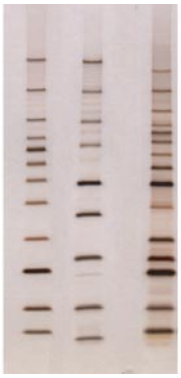
CBB染色



1：Protein Ladder Marker 5μl
2：A社Ladder Marker 10μl
3：B社Ladder Marker 5μl

各メーカーの使用説明書に基づいて推奨量をアプライ

銀染色



1：Protein Ladder Marker 0.2μl
2：A社Ladder Marker 1μl
3：B社Ladder Marker 0.2μl

各メーカーの使用説明書に基づいて推奨量をアプライ

各バンドのタンパク量

Protein (kDa)	μg/5μl
250	0.15
150	0.075
100	0.075
80	0.075
70	0.40
60	0.15
50	0.15
40	0.15
30	0.15
20	0.60
15	0.15
10	0.15

これらの結果よりProtein Ladder Makerは、他社マーカーに比べてエキストラバンドの少ないシャープなバンドであることが分かります。

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
Protein Ladder Marker Broad range（100～200回用）	Broad range ladder markers 500μl Special Dye set ・SDS-Dye (-DTT) 450μl ・1M DTT 50μl	-20℃	APSP-2130	¥21,000

※本製品は、アプロサイエンス社からTOYOBO専用向けに製造されているものです。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004～2005 総合カタログ
Sharpline SDS-PAGE用分子量マーカーセット Low range（100～200回用）	Low range markers 500μl Special Dye set 1set	-20℃	PMW-101	¥13,000	–
Sharpline SDS-PAGE用分子量マーカーセット Broad range（100～200回用）	Broad range markers 500μl Special Dye set 1set	-20℃	PMW-102	¥19,000	–
Sharpline SDS-PAGE用分子量マーカーセット Prestained Low range（50～100回用）	Prestained Low range markers 250μl Special Dye set 1set	-20℃	PMW-201	¥13,500	–
Sharpline SDS-PAGE用分子量マーカーセット Prestained Broad range（50～100回用）	Prestained Broad range markers 250μl Special Dye set 1set	-20℃	PMW-202	¥19,500	–
Sharpline Special Dye set	SDS-Dye (-DTT) 9ml 1M DTT 1ml	-20℃	PMW-301	¥12,000	–

QTL BIOSYSTEMS

本製品はすでに販売を中止しております。

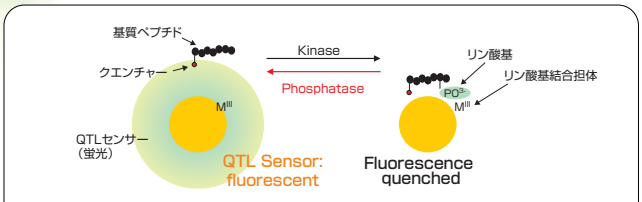
Technical Review

QTL LightSpeed® Assay Kitを用いたプロテインキナーゼ・プロテインホスファターゼ活性測定例のご紹介

はじめに

QTL LightSpeed® Assay Kitはスーパークエンチング法を用いたプロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ、およびプロテアーゼの迅速アッセイキットです。以下のような特長があります。

スーパークエンチング法は、各種酵素のハイスループットアッセイに最適な方法として現在注目されている技術です。



原理図

従来の低分子同士の組み合わせでは、大変弱いクエンチングしか観察されませんでしたが、蛍光ポリマーを用いることにより約100万倍の感度を実現しました。従来のクエンチング法に比べ、格段に広いダイナミックレンジかつ高い感度で検出することが可能となります。この原理を用いたホモジニアスアッセイキットが「QTL LightSpeed® Assay Kit」です。プロテインキナーゼアッセイにおいては、蛍光ポリマーを表面に結合させた微小ビーズ（QTLセンサー）にクエンチャーを有する（蛍光の減少）リン酸化されたペプチドが結合することによる、ポリマー単位でのクエンチングを測定します。一方、プロテインホスファターゼアッセイはその逆反応を測定します（原理図ご参照）。

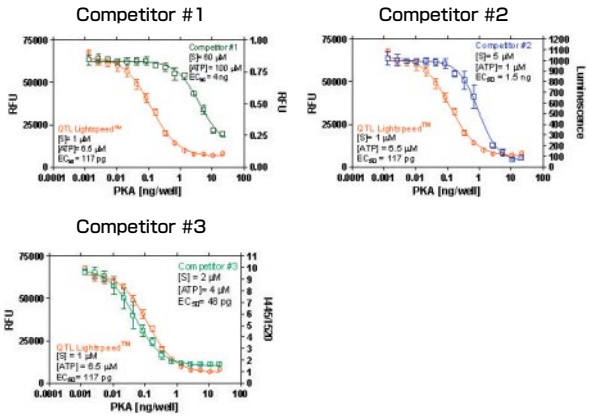
【特長】

1. **洗浄工程を一切必要としません。96,384 well plateを用いた迅速アッセイに最適です。**
2. **一般的な蛍光リーダーを使用して解析が可能です。**
3. **阻害剤スクリーニングアッセイ等に応用可能です。**
4. **抗体を使用しないため様々なアッセイに幅広く応用することができます。**
   - **Universal Assay Development kitを用いることで、自在にターゲット配列を選択可能です。（プロテインキナーゼアッセイ）**
   - **IP3KなどLipidを基質とするようなキナーゼの活性測定も可能です。（近日発売予定）**

方法および結果

1. 各種ホモジニアスアッセイ系との比較例

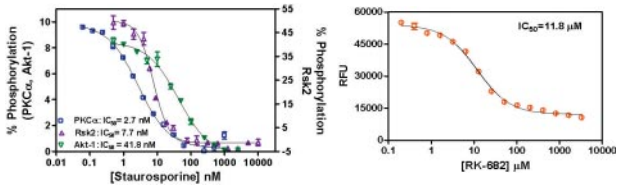
PKA（cAMP-dependent protein kinase）アッセイにおける種々のホモジニアスアッセイ系との比較を行いました。



FRET法（#1）、およびATP測定法（#2）に比べ、QTL LightSpeed®では（橙）、感度・ダイナミックレンジともに優れる結果でした。HTRF法(#3)とはほぼ同等の感度・ダイナミックレンジでしたが、測定誤差が少ない傾向にありました。

2. 阻害剤のアッセイ例

Protein kinaseおよびProtein phosphatase阻害剤の効果を測定しました。



Staurosporineの効果を種々のProtein kinase（PKCα、Rsk2、およびAkt-1）を用いて調べた結果、それぞれに濃度依存的阻害効果を確認することができました。また、RK-682のProtein phosphatase(PTP-1B)に対する阻害効果を認めることができました。Staurosporineはスペクトルの広い細胞浸透性プロテインキナーゼ阻害剤であり、RK-682は非膜透過性のPTPの特異的阻害剤です。

※以下のような商品を¥98,000 [100 well] ～¥320,000 [800 well] で取り揃えております。

Protein Kinase：**Abl、Akt1/PKB α、Aurora A、Erk1/Erk2、Fyn、IRAK4、Jnk3、Lyn、Msk1/Msk2、p38α、p70S6、PKA、PKCα、PKCβ Ⅰ/Ⅱ、PKCε、PKCζ、Rsk-2、Sgk、Src、Universal Assay Development Kit**

Protein Phosphatase：**PP2A、PTP-1B**

Protease：**CASPASE-3/7、β-SECRETASE、γ-SECRETASE**

詳細につきましては、弊社下記ホームページをご覧ください。
URL:http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/qtl/lightspeed/index.html

初代細胞スターティング培地

MF-start™

繊維芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞や組織からの分離培養効率を向上させます。

貴重な生体サンプルを入手しても思うように細胞培養が立上がらず、悔しい思いをしたことはございませんか。初代細胞の樹立には組織処理方法だけでなく初期培養にどの培地を使うかが重要です。
今までどの培地でもうまくいかなかった方、是非この培地をお試しください。

特徴1 アウトグロース効率の向上

・分離培養直後のアウトグロース効率、コロニー形成効率が向上します。

特徴2 間葉系由来細胞の樹立に

・繊維芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、間葉系幹細胞などの間葉系細胞に最適です。
※血球系、上皮系には不適です。

特徴3 簡単調製

・基礎培地に添付の1種類の添加剤を加えるだけで簡単に調製可能です。

使用方法

1. 細切方法、酵素処理方法などにより組織から目的とする細胞を調製します。
2. 分離した細胞、若しくは処理した組織をMF-start™で培養します。
3. 4～10日間 培地交換せず、本培地で培養します。
4. 細胞がコロニー様に増殖しはじめたら、所定の増殖培地で培地交換を行います。
   増殖が緩慢な場合は引続き MF-start™で培養します。
5. 以後、定法に従い細胞培養を行います。

※増殖培地としては弊社MF-medium®のご使用をお勧めいたします。

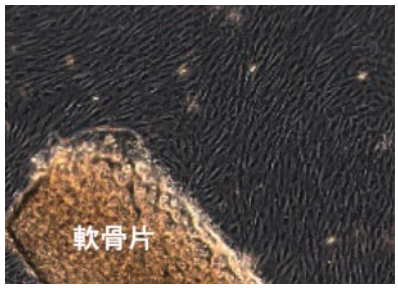


図1．ヒト関節軟骨からの細胞樹立

実施例1 ラット胎児組織からの細胞樹立

ラット胎児組織をコラゲナーゼ消化後、回収した細胞を各培地で10日培養後、増殖した細胞をカウントしました。
MF-start™では優れた立上りを観察できました。

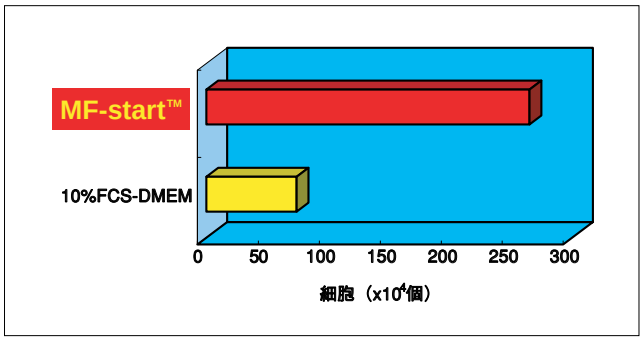


図2．ラット胎児組織からの分離増殖細胞数

実施例2 マウス組織からの細胞樹立

マウスから繊維芽細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を調製し各培地で培養しました。

10% FCS-DMEMではほとんど細胞が増えてきませんがMF-start™ではいずれも十分な細胞数を得ることができました。

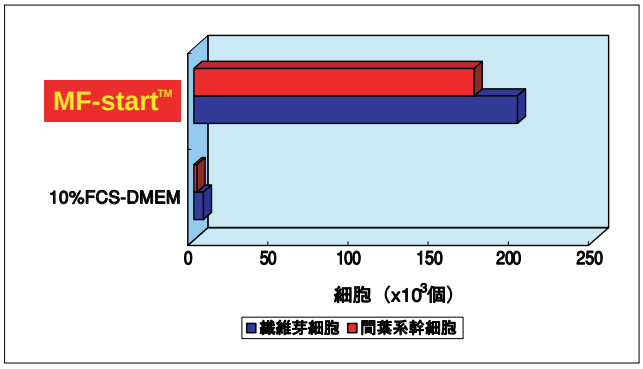
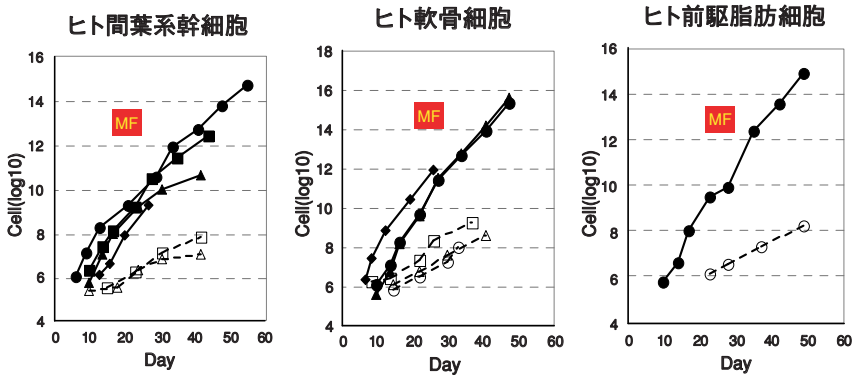


図3．マウス組織からの分離増殖細胞数

実施例3 組織培養への適用例

ヒト組織から各細胞を分離し、分離直後1週間MF-start™で培養し、以後MF-medium®に切換え継代培養を行いました。

3週間で100倍と従来培地に比べ優れた増殖性を示しました。MF-start™と弊社MF-medium®を組合わせることで短期間でより多くの初代細胞を得ることができました。



実線／ 培養１週間：MF-start™→以後：MF-medium®
破線／ 培養１週間：20%DMEM→以後：10%DMEMで培養

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
初代細胞スターティング培地 **MF-start™**	250ml	培地 4℃、添加剤 -20℃	TMMFS-001	¥28,000

※本培地はインビトロ研究用にのみ限定して販売しています。ヒト・動物への使用、臨床および体外診断には使用できません。

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004～2005 総合カタログ
間葉系幹細胞増殖培地 **MF-medium®**	500ml	培地 4℃、添加剤 -20℃	TMMFM-001	¥35,000	–

※本培地はインビトロ研究用にのみ限定して販売しています。ヒト・動物への使用、臨床および体外診断には使用できません。

MultiReporter Assay System -Tripluc®- ベクターシリーズ　多色ルシフェラーゼベクター

SLO/SLR TA Cloning Kitを用いたプロモーター解析方法のご紹介

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　浅井 友実

はじめに

TAクローニングは特別なプライマーを用いることなく、制限酵素等の処理も必要としませんので、PCR産物を効率的にクローニングする方法として広く普及しております。弊社では、このTAクローニング技術をプロモーター解析にもご利用いただくべく、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR TA Cloning Kitとしてご提供しております。さらに、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR TA Cloning Kit for KODは、高フィデリティ酵素としての特性上平滑末端産物を生じやすく、TAクローニングを苦手とするKODシリーズにおいても、高フィデリティ性を活かし、さらにTAクローニングを可能にするように工夫されたキットです。

一方、プロモーター領域の単離や解析には、従来、S1マッピング法、5'-RACE法によるmRNAの5'-UTR域（転写開始点近傍）の同定、さらにはこの配列をプローブとしたゲノムDNAライブラリーのスクリーニングといった手法が用いられてきました。これらの手法は煩雑な作業が必要で、多種類の遺伝子プロモーターを解析するには非常な労力を要します。

近年、ヒトゲノムプロジェクトにより決定されたヒトゲノム配列、およびNEDOの主導下で行われた「完全長cDNA構造解析計画」により蓄積された転写開始点に相当する5'末端情報をもとに、mRNA転写開始点データベースDBTSS（http://dbtss.hgc.jp/index.html）が公開されています。今後、転写制御やシグナル伝達などのプロセスを解析していく上で、このようなデータベースの公開配列をプロモーター領域候補として利用していくことは効果的な手法のひとつとなるものと考えられます。このような手法を進めていく上で、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR TA Cloning Kitは、解析の効率性をさらに向上させるものと期待しております。

本稿では、複数の遺伝子プロモーター候補をDBTSS公開配列をもとにMultiReporter Assay System -Tripluc®- SLR TA Cloning Kit for KODを用いてクローニングし、培養細胞で転写活性を確認した例をご紹介いたします。

方　法

1. プロモーター候補配列の検索およびクローニング

今回は、表1に示すハウスキーピング遺伝子として知られる10個の遺伝子について、DBTSSの情報より、RefSeqの5'末端を基点に－1400bp～＋100bpおよび－500bp～＋100bpの領域をプロモーター候補配列として抽出し、その5'末端、3'末端に相補的なプライマーを設計しました（図1）。

PCRは、Jurkat細胞より抽出したGenomic DNAを鋳型として、High fidelity hot start PCR酵素KOD -Plus-を用いて行いました。PCR増幅の成否結果は表1に記載します。

続いて、PCR増幅が認められたサンプルについて、MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLR TA Cloning Kit for KODのプロトコールに従い、精製処理を行わずにA-attachment Mixを用いて3'末端にdAを付加し、pSLR-Tとライゲーション反応を行いました。その反応液を用いてコンピテントセルDH5αへ導入し、翌日、コロニーダイレクトPCRを行い、目的産物が挿入されたポジティブクローンを単離しました。これらポジティブクローンを培養し、プラスミドを精製しました。

2. 培養細胞へのトランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性の測定

接着細胞であるHeLa S3細胞は前日、24ウェルプレートに0.75×10^{5}cells播種しました。浮遊細胞であるJurkat細胞はトランスフェクションの前に、24ウェルプレートに5×10^{5}cells（0.5ml/1ウェル）ずつ播種しました。被験配列を挿入したSLRベクター0.475μg、pSLG-SV40 control（Code No. MRV-201）0.025μgを混合し、市販の試薬を用いてトランスフェクションし、37℃、24時間インキュベートしました。

翌日、ルシフェラーゼ活性を検出試薬「MultiReporter Assay System -Tripluc®- Detection Reagents」と色分離機能付チューブ測定用ルミノメーター「カラフルックアナライザー™」を用いて測定しました。この際、接着細胞であるHeLa S3細胞は培地を除去後そのままLysis Solutionを添加することによって細胞を溶解しましたが、浮遊細胞であるJurkat細胞については培養液をマイクロチューブに移し、3,000rpmで5分間遠心した後、上清を除去し、Lysis Solutionを添加することによって細胞を溶解しました。

表1．プロモータークローニングを実施した遺伝子とプライマー

(1) ○、×はPCR増幅の有無を示します。

Gene Name	Symbol	cDNA RefSeq. No.	Target length	Forward Primer	Reverse Primer	PCR (1)
β-actin	ACTB	NM_001101	1.5 kb	ACACCTACTACGCGCTGCAAAGAGC	GAGCCGCCTGCCCCGGTCGGCTGGC	○
			0.6 kb	ACTCCATGCCCTCCAAGAGCTC		○
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	NM_002046	1.5 kb	GGTCAGGGACTGGAGTCCTGTGGGT	GCCTTCAGGCCGTCCCTAGCCTCCC	○
			0.6 kb	ACCGCAGAGCCTCGAGGAGAAG		○
α-tubulin	K-ALPHA-1	NM_006082	1.5 kb	TGTATGCAAATTTGGATTTTGAATC	AAAGCAGCCGGGAGCCGCACGGCTT	○
			0.6 kb	CACTGCCTTTAAAGGAACTGAG		○
ubiquitin C	UBC	NM_021009	1.5 kb	TTTTTCAGTTGGTAGCCTCTTTTTC	CGAAAGCCCCGGCCAGCCCAGCAGC	×
			0.6 kb	GTCAGGAGGGAGGGGAGGGAGAC		○
ribosomal protein S9	RPS9	NM_001013	1.5 kb	CGAGCTGTGGAGACAGACCATCGC	ATTTCTCGAAGGGTCTCCGCGGGGT	○
			0.6 kb	AAGGTTCTCCCTACTTCTCAGG		○
ribosomal protein L13	RPL13	NM_000977	1.5 kb	CATGCGCCACCACGCCCAGCTTTTT	CCGCGTTGGCTGAAGCGCCAGGCCG	×
			0.6 kb	CCACAAATGTTCTAAATGGATG		○
aminolevulinate, delta, synthase 1	ALAS1	NM_199166	1.5 kb	ACTCTGTCTCAAACAAACAAAC	GTCCAAACGAAACGCTCGTTGC	○
			0.6 kb	GCTGAGTGTCCCGCTTCTTCCG		○
Endonuclease G, precursor	endoG	NM_004435	1.5 kb	CTTATTTTCCTTAAAGGAAAAAAAAATGC	CCCTTCCACTCACAAACACTGC	×
			0.6 kb	GGCGCATGCCTGTAATCCCAGC		○
peroxisomal biogenesis factor 19	PEX19	NM_002857	1.5 kb	TTAGCTACCTTACAGCAGGGGG	CTATGGGCTCTTACTTTCCAG	○
			0.6 kb	TTGAACCCGGGAGGCCAAGGCTG		○
tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase	YWHAZ	NM_003406	1.5 kb	TTTCTTTCTGCTACTGAAGTTTCC	AGGTTTGAGGGACGTCGTAGTC	○
			0.6 kb	AAACCCACTAAAATATAACTGGTC		○
SV40	SV40	pSLR-SV40 control				
negative	negative	未挿入プラスミド（pSLR-T）				

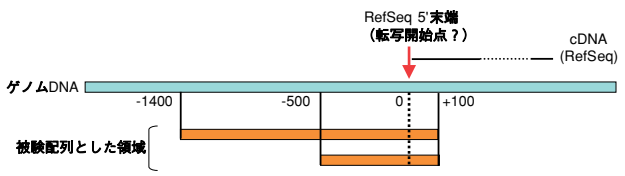


図1．被験配列の抽出

結果及び考察

今回、PCR増幅を試みた20個のターゲットのうち、17個において増幅が認められました。PCR増幅が認められなかったターゲットについては、プライマー配列の問題、ゲノムDNA中の繰り返し配列や相同性の高い配列の存在等の影響などが考えられますので、プライマー設計部位を変更して再度PCR増幅を試みる必要があります。

実際に2種類の細胞系を用いた各被験配列のプロモーター活性の評価結果について、ルシフェラーゼ活性を測定し色分離算出されたデータを図2、3に示します。ここでは、各サンプルにおいて内部標準として添加したSLG値に対するSLR値の割合を算出し、プロットしています。

個々のプロモーターの様子を見てみますと、例えば、Jurkat細胞ではACTBプロモーターの転写活性が強く認められることが分かります。この他、GAPDについては1.5kb、0.6kbに被験配列いずれも同等の活性が認められるのに対し、HeLa S3細胞では1.5kbにより強い活性が認められますので、HeLa S3細胞中に存在する転写因子に関係するエレメントが上流域に存在する可能性が考えられます。K-ALPHA-1については今回選択した領域にはプロモーター活性がありませんでしたので、評価領域を広げる必要があります。あるいは今回の検討ではRefSeqを基点としておりますので、オリゴキャップ法で得られたcDNAの5'末端を基点にすることでプロモーター活性を有する領域を取得できるかもしれません。KCIPについてはHeLa S3細胞においては転写活性が検出できませんでしたが、Jurkat細胞では比較的大きな活性が認められましたので、Jurkat細胞に存在する転写因子に関係するエレメントが存在する可能性が考えらます。

本稿では、MultiReporter Assay System -Tripluc®-SLO/SLR TA Cloning Kitをご利用いただくことによって、複数の遺伝子プロモーターの転写制御を効率的に比較できることが示されました。

ご関心あるファミリーに属する複数の遺伝子の転写制御を解析したい場合、あるいは一つの遺伝子について複数の被験配列長あるいは異なる配列部位の転写活性を比較評価したい場合など、本キットを用いることによって効率的に実験を進めていただくことができるのではないでしょうか。是非、一度MultiReporter Assay System -Tripluc®- SLO/SLR TA Cloning Kitシリーズをお試しください。

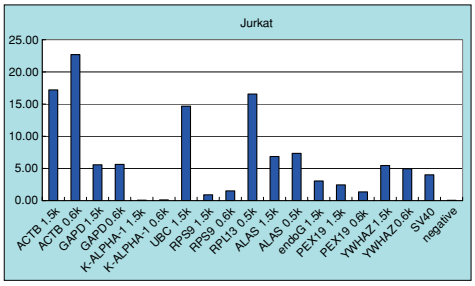


図2．Jurkat細胞における各被験配列の転写活性

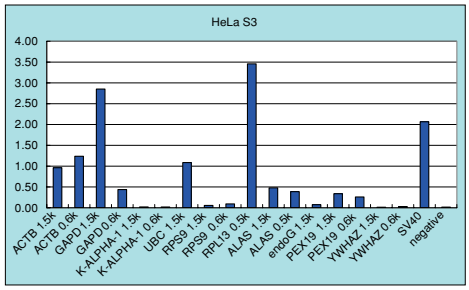


図3．HeLa S3細胞における各被験配列の転写活性

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
MultiReporter Assay System -Tripluc®- **SLO TA cloning kit for KOD** pSLO-T　2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase　10×A-attachment Mix	20回用	-20℃	MRT-201	¥69,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- **SLR TA cloning kit for KOD** pSLR-T　2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase　10×A-attachment Mix	20回用	-20℃	MRT-202	¥69,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- **SLO TA cloning kit** pSLO-T　2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase	20回用	-20℃	MRT-101	¥65,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- **SLR TA cloning kit** pSLR-T　2×Ligation Buffer T4 DNA Ligase	20回用	-20℃	MRT-102	¥65,000
MultiReporter Assay System -Tripluc®- *in vitro*アッセイ用試薬 **Detection Reagents** 細胞溶解剤（Lysis Solution） 発光基質（Assay Reagent）	100回用*	-80℃	MRA-101	¥30,000
色分離機能付チューブ測定用ルミノメーター **カラフルックアナライザー™**	1式	-	CLX-101	¥1,350,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格	2004～2005 総合カタログ
高正確性PCR用酵素 **KOD -Plus-**	200U×1本*	-20℃	KOD-201	¥30,000	1-10
MultiReporter Assay System -Tripluc®- *in vivo*アッセイ用試薬 **D-luciferin**（カリウム塩）	20mg*	-20℃	MRL-101	¥24,000	-

＊：この印のついた製品には、上記以外に他の容量でも販売しております。詳しくは、弊社までお問い合わせください。

Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solutionを用いたウェスタンブロッティングにおけるブロッキング条件の検討

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　川井 淳

はじめに

ウェスタンブロッティングにおいて良好な結果を得るためには、抗体濃度の至適化とともに、ブロッキング条件の検討が非常に重要な要素となっています。解析されるタンパク質や用いる抗体には、それぞれに多様な性質があり、最適なブロッキング条件も異なります。ブロッキング剤として主に用いられるものとしては、スキムミルク、カゼイン、ウシ血清アルブミン（BSA）、ゼラチン、正常血清等がありますが、万能といえるものはなく、またそれらの添加濃度やインキュベート温度・時間によっても効果が異なります。用いる抗体の種類によっては使用に適さないブロッキング剤もあります。従って、最も良好な結果を得るためには、それぞれの解析に最適なブロッキング条件をその都度決定することが好ましいと言えます。

Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solutionは、ウェスタンブロッティングやELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）などの解析でしばしば問題になる、感度不足や高いバックグラウンドを改善するために開発された免疫アッセイ用の反応促進試薬です。*Can Get Signal*®の使用法は非常に簡便で、従来ご使用されていた抗体希釈液の代替として用いるだけで、現行の実験系をほとんど変えずに高いS/N比の結果を得ることができます。ブロッキングにはいずれのブロッキング剤を用いることも可能ですが、ブロッキング条件の至適化を行うことによって、より改善された結果が得られると期待されます。

本号では、*Can Get Signal*®を用いたウェスタンブロッティングにおいて、ブロッキング剤を変えた場合に得られる結果の違いを、最も頻繁に用いられるブロッキング剤であるスキムミルクとBSAを用いて比較検討した例についてご紹介いたします。

方　法

サンプル*を4×SDSサンプルバッファーに懸濁し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行いました。電気泳動を行ったゲルからPVDF膜へ、セミドライ法によりタンパク質をトランスファーし、ブロッキングバッファー（5%スキムミルク/TBS-Tまたは5% BSA/TBS-T）で室温で1時間ブロッキング処理を行いました。一次抗体反応は、抗体*を*Can Get Signal*® Solution 1で希釈した液を用いて、室温で1時間行いました。また同時に比較対照として、通常抗体の希釈に用いられるTBS-T（TBS、0.1%Tween20）を用いて同様に実験を行いました（図1のみ）。二次抗体反応は、抗体*を*Can Get Signal*® Solution 2またはTBS-Tを用いて希釈した液（図1のみ）で、室温で1時間行いました。検出は、ECL Plus【Amersham Biosciences社】を用い、弊社微弱発光検出システムFAS-1000により撮影しました。

＊：次ページ掲載の表をご参照ください。

結果及び考察

1. *Can Get Signal*®によるシグナル増強効果の比較（図1）

段階希釈したHis-ERK2タンパク質合成反応液を電気泳動したものから、抗Hisタグ抗体を用いてタンパク質を検出する系において、ブロッキング剤としてスキムミルクとBSAをそれぞれ用いたものについて、*Can Get Signal*®によるシグナル増強効果を比較しました。

スキムミルクによりブロッキングを行った場合、従来法（TBS-T）で希釈してアッセイを行ったものでは、微弱なシグナルしか得られませんでしたが、*Can Get Signal*®の使用によりバックグラウンドを低く抑えたままポジティブなシグナルのみを増強することができました（図1上）。一方、BSAによりブロッキングを行ったものでは、従来法でもある程度強いシグナルは検出できた一方で非特異的なバンドが多数出現しましたが、*Can Get Signal*®の使用により非特異的なバンドを減らし、なおかつ特異的なシグナルを増強することができました（図1下）。

このように、*Can Get Signal*®は、ブロッキング剤としてスキムミルク、BSAのどちらを用いた場合でも、より改善された結果を得ることができることがわかりました。

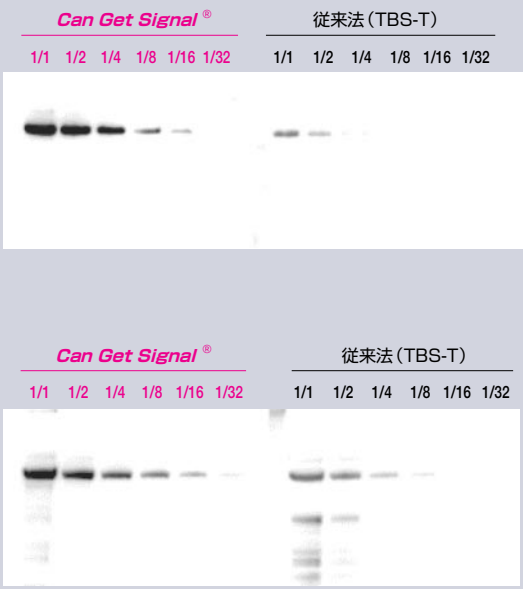


図1．*Can Get Signal*®によるシグナル増強効果の比較
上: 5%スキムミルク/TBS-T使用
下: 5%BSA/TBS-T使用

	サンプル	一次抗体	二次抗体
図1	His-ERK2無細胞タンパク質合成反応液	抗His-probe抗体（rabbit polyclonal）（Santa Cruz社）　1000倍希釈	抗rabbit IgG-HRP（Santa Cruz社）　10000倍希釈
図2	A431細胞	抗EGFR抗体（rabbit polyclonal）（Santa Cruz社）　1000倍希釈	抗rabbit IgG-HRP（Santa Cruz社）　10000倍希釈
図3	HeLa細胞	抗Actin抗体（goat polyclonal）（Santa Cruz社）　1000倍希釈	抗goat IgG-HRP（Santa Cruz社）　10000倍希釈

2. スキムミルクとBSAのブロッキング能の直接比較（*Can Get Signal*®使用）（図2、図3）

サンプルとしてA431細胞またはHeLa細胞抽出液を用い、それぞれからEGFR、Actinを検出する系において、ブロッキング剤としてスキムミルクまたはBSAを用いた場合に得られる結果の違いを、直接比較しました。

A431細胞からEGFRを検出する系では、BSAよりスキムミルクを用いた方がわずかに強いシグナルが得られ、またBSAを用いた場合には分子量マーカータンパク質に由来する非特異的シグナルが強力に検出されました（図2）。一方、HeLa細胞からActinを検出する系では、BSAを用いた方がスキムミルクより全体的に強いシグナルが得られました。多少非特異的なシグナルも強くなってますが、S/N比はほぼ同等であり、BSAの方が検出感度が高いという結果になりました（図3）。

一般的に、BSAよりスキムミルクのほうが強力なブロッキング効果がありますが、ここに示したように、ブロッキング剤の効果はタンパク質・抗体により違いがあり、それぞれ最適なブロッキング条件は異なるということがわかりました。

今回は、*Can Get Signal*®を用いたウェスタンブロッティングにおいて、スキムミルク、BSAいずれのブロッキング剤を用いた場合でもそれぞれより改善された結果が得られるということ、またそれぞれのタンパク質・抗体に最適なブロッキング条件が異なり、条件検討により更に良い結果が得られることを示しました。*Can Get Signal*®はウェスタンブロッティングのシグナルを強化し、高いS/N比の結果を得るための強力なツールですが、ブロッキング条件の最適化により更に明瞭な結果を得ることができます。抗体濃度の条件検討でもなかなか結果が改善しない場合などには、ブロッキング条件の至適化検討を強くお勧めします。

※ご注意

ブロッキングバッファー調製時に、ブロッキング剤の希釈液として*Can Get Signal*®を用いないでください。ブロッキング能が低下する場合があります。

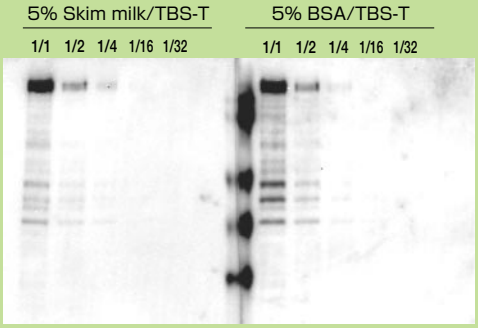


図2．A431細胞におけるEGFRの検出

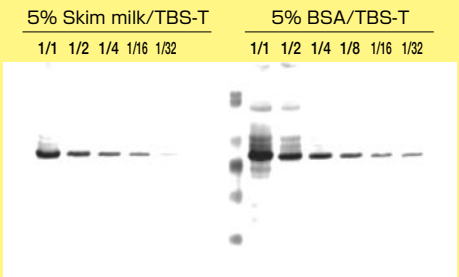


図3．HeLa細胞におけるActinの検出

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
***Can Get Signal*®** Immunoreaction Enhancer Solution Solution 1 for primary antibody Solution 2 for secondary antibody	各250ml 各50ml	4℃	NKB-101 NKB-101T	¥30,000 ¥10,000
***Can Get Signal*®** Solution 1 for primary antibody	250ml	4℃	NKB-201	¥17,000
***Can Get Signal*®** Solution 2 for secondary antibody	250ml	4℃	NKB-301	¥17,000

関連商品

品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
免疫反応促進試薬 ***Can Get Signal*® immunostain** Immunoreaction Enhancer Solution	各5ml *	4℃	NKB-401	¥12,000

＊：この印のついた製品には、上記以外に他の容量でも販売しております。詳しくは本誌P.7をご参照ください。

本製品はすでに販売を中止しております。

無細胞タンパク質合成システムを用いたSNAP-Tag™の評価

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　黒板 敏弘

はじめに

SNAP-Tag™ は Human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase（hATG）を遺伝子工学的手法を用いて改良された約20kDaの酵素タグです。ベンジルグアニン基やクロロベンジルピリミジン基を有する基質と反応して、図1、図2のような共有結合を形成する特徴を有しています。この特徴を利用して、タンパク質の蛍光ラベリング、*in vivo*イメージング[1)2)3)]、バインディングアッセイ[4)5)] など様々な用途に応用することが可能です。本タグは、目的タンパク質のN末端、C末端、さらにはタンパク質配列中に付加することが可能です。また、他のタグと併用することもできます。今回は、高効率コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システム：PROTEIOS™ Ver.2を用いてSNAPタグを付加したタンパク質を合成し、合成の有無、蛍光ラベル、および溶解性の検討を行った事例をご紹介いたします。

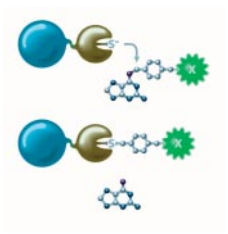


図1．蛍光基質との特異的結合
SNAP-tag™（金色）を融合したタンパク質（青色）と蛍光基質（緑色）との反応

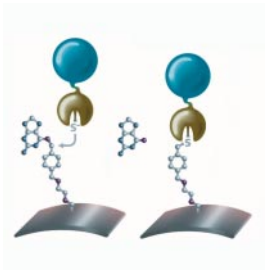


図2．固相への特異的結合
SNAP-tag™（金色）を融合したタンパク質（青色）のBG-Linkersを介した固相への固定化

方　法

1．鋳型DNAの調製

SNAP-Tag™配列はSNAP-sourse plasmid pSS26mから必要な配列をPCR法を用いて増幅し、最終的に種々の遺伝子との融合遺伝子として無細胞タンパク質合成用ベクターpEU3-NⅡのマルチクローニングサイトにクローニングしました。今回、SNAPタグのみ（SNAP）、SNAP-6×His（SNAP-6H）、Flag-SNAP-6×His（Flag-SNAP-6H）、および6×His SNAP-Fyn（6H-SNAP-fyn）の4種類のクローンを作製しました。6×Hisはヒスチジンタグ、FlagはFlagタグを示します。また、fynはhuman Src family kinaseの一種であり、無細胞合成した際に低い溶解性を示すことが知られています。

2．転写および翻訳

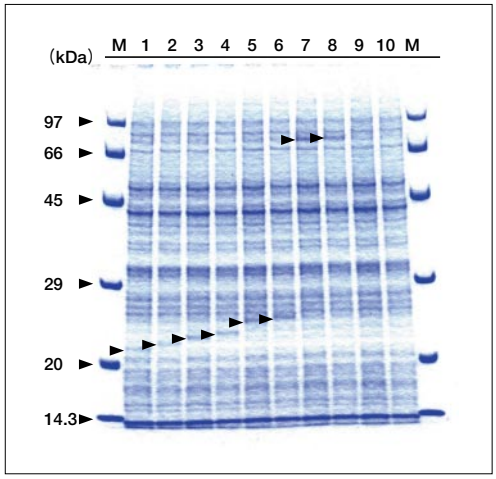
鋳型となるmRNAはScriptMAX™ Thermo T7 Transcription kit（Code No.:TSK-101）を用いて合成した後、簡易エタノール沈殿法によって精製し、翻訳に用いました。また、必要に応じて翻訳反応中に^{35}Sラベルされたメチオニンを添加し、翻訳産物の標識を行いました。^{35}Sラベルされたタンパク質は、SDS電気泳動後、BASシステム（FUJIFILM社製）を用いて検出を行いました。

3．タンパク質の蛍光ラベル・検出

SNAP-Vista™ Blue kit（Code No.:LK011）を用いて合成されたタンパク質の蛍光ラベルを行いました（本キットに用いられている蛍光色素はUV照射により検出することができます）。具体的には、無細胞タンパク質合成反応液（クルード）18μlにsubstrate stock solution（SNAP-Vista™ Blue kit）を2μl添加し、25℃で20分間反応させました。反応後、それぞれ10、5、2.5μlをSDS電気泳動した後、FASシステム（東洋紡製）を用いてUV照射下、蛍光ラベルしたタンパク質の検出を行いました。

結果及び考察

まず、無細胞タンパク質合成を行ったタンパク質溶液、およびそれを蛍光ラベルしたタンパク質溶液をSDS電気泳動法を用いて解析しました。図3には、クルードタンパク質溶液それぞれ3μlを泳動後、CBB染色した結果を示しています。矢印の部分に、合成されたタンパク質が確認されます。また、蛍光ラベルされたタンパク質は若干分子量が増大していることが確認できます。バンドのシフトからほぼすべてのタンパク質がラベルされたことが示唆されます。



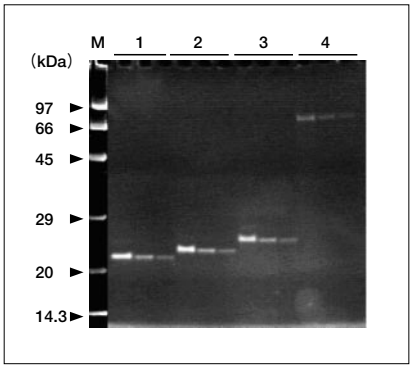
1 :SNAP
2 :SNAP（Vista Blue）
3 :SNAP-6H
4 :SNAP-6H（Vista Blue）
5 :Flag-SNAP-6H
6 :Flag-SNAP-6H（Vista Blue）
7 :6H-SNAP-fyn
8 :6H-SNAP-fyn（Vista Blue）
9 :Control
10 :Control（Vista Blue）

図3．無細胞タンパク質合成にて合成されたタンパク質のSDS-PAGE解析像

図4には、蛍光ラベルしたタンパク質をSDS電気泳動した後に、UV照射下で撮影した結果を示します。図からも明らかなように、すべてのレーンにおいて目的のバンドのみが特異的に検出されました。この結果は、キレーティングを用いる蛍光ラベルに比べて格段にラベリングの特異性が向上していることを示しています。これは、ラベリングが高い特異性をもった酵素反応を介して進行した結果であると考えられます。fynタンパク質のラベリング効率が若干低いように感じますが、これは以下に述べますように、溶解性に起因するものであると推察されます。

図5は、合成時にメチオニンラベルした各タンパク質を解析した結果を示しています。解析は、合成されたタンパク質の溶解性を調べるために、合成後のタンパク質溶液（T：Total）と、それを15,000r.p.m.にて15分間遠心した上清（S：Sup.）について行いました。この結果より、SNAPタグ自体は大変溶解性に優れるタンパク質であることが示唆されました。各タンパク質のsolubility（%）は（Sup./Total×100）として算出しています。また、fynの溶解性は本タグを融合することで、6%から12%に向上することが示されました。

今回は、基礎データのみの紹介ですが、種々の方法で合成したSNAPタグタンパク質は、蛍光タンパク質として、また、固定化タンパク質として、様々な用途に応用することが可能であると考えられます。また、本タグは培養細胞を用いた*in vivo*イメージングやパルスチェース実験等にも力を発揮します。Covalys社は様々な励起波長、性質の蛍光基質、およびリンカーを取り揃えています。是非一度、SNAPタグをお試しください。



1 :SNAP（10, 5, 2.5μl）
2 :SNAP-6H（10, 5, 2.5μl）
3 :Flag-SNAP-6H（10, 5, 2.5μl）
4 :6H-SNAP-fyn（10, 5, 2.5μl）

図4．蛍光ラベルしたタンパク質のUV照射下における検出

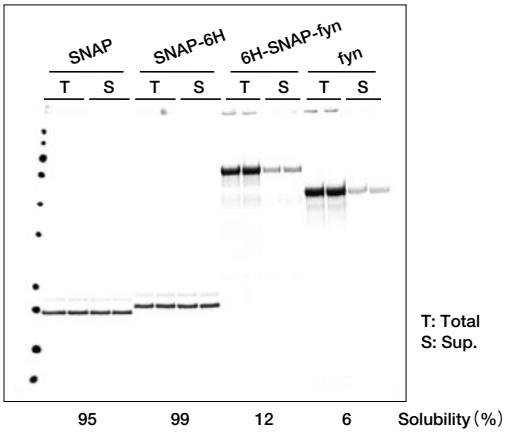


図5．RIラベルしたタンパク質のオートラジオグラム

参考文献

1）*Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **101**(27): 9955-9959(2004)
2）*Methods* **32**: 437-444 (2004)
3）*Nature Biotechnology* **21**: 86-89(2003)
4）*Anal. Biochem.* **333**(2): 280-288(2004)
5）*J. Am. Chem. Soc.* **125**(26): 7810-11(2003)

※ここで紹介させていただいた実施例に使用した製品をはじめ、その他の製品の詳細については下記弊社ホームページにて掲載しておりますので、是非ご覧ください。
http://www.toyobo.co.jp/seihin/xr/product/covalys/snaptag/index.html

製品紹介

☆SNAP-Cell™ Kits : *in vivo*イメージング用のキットです。緑（505）と赤（TMR）の2色を取り揃えています。
☆SNAP-Vitro™ Kits : *in vitro* labeling用のキットです。異なる7つの波長で励起される蛍光色素基質を取り揃えています。
☆SNAP-Vista™ Kits : *in vitro* labeling用のキットです。SDS-PAGEによる解析を行うことができ、SNAP-tag™ の反応性の確認等に用いることができます。
※*in vitro* labeling用のキットは浸透性の関係上*in vivo* labelingには適しません。
☆BG-Linkers : 固相への固定など様々な用途に応用できる、基質を含むリンカーです。
☆SNAP-express plasmids: 大腸菌および動物細胞にてSNAP-tag™融合タンパク質を発現させるための発現用プラスミドです。
☆Source plasmids : SNAP-tag™ 配列を含むソースプラスミドです。Codon usageの異なる2種類を揃えています。
発現用プラスミドではありません。
☆SNAP-Block™ ：何も結合させていないBG基質です。SNAP-tag™の酵素活性をブロックするのに使用します。

本製品はすでに販売を中止しております。

蛍光相関分光法（FCS）による ペプチド抗原と抗ペプチド抗体の反応性評価

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　西矢 芳昭

はじめに

蛍光相関分光法（FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy）は、共焦点光学系とレーザ、および高感度検出器を用い、観測される蛍光の揺らぎから蛍光物質あるいは蛍光標識された物質の運動状態とその数を測定できる実験手法です。この手法により、溶液中の分子間相互作用を1分子レベルで観測することが可能になります。一方の分子を固相化する必要がないため、生体内に近い状態で観測できるほか、少量のサンプルでも計測ができます。さらに、分子同士の結合・解離の状態が拡散時間により判別できるため、DNAチップやELISAのように結合していない分子を分離する必要がありません。 弊社では、FCS分析を手軽に行うことができる装置、FCS-101を商品化いたしました（図1）。今回、この装置を用いた分析例のひとつとして、ペプチド抗原と抗ペプチド抗体の反応性を評価した結果をご紹介いたします。

図1．FCS-101外観写真

方　法

抗原として、蛍光（tetramethylrhodamine-5-iodoacetamide（Ex;543nm、Em;567nm））標識ペプチド（分子量約1.7KDa）を、抗体はFab'化抗ペプチドモノクローナル抗体（分子量約55KDa）を使用しました。

一定量の抗原8×10^{-8}M/7.5μlに種々の濃度の抗体7.5μlを混合し、室温で30分間反応させ、PBSで150μlにメスアップして最終的な測定試料としました。この条件で、抗原の終濃度は4×10^{-9}Mとなります。抗体濃度は、抗原と抗体のモル比率が1:0～100となるよう、段階的に調製しました。

サンプル容器としてLab-Tek Chamber Slide（Nalge Nunc製）を用い、あらかじめ0.1%BSAでブロッキングしました。

各試料の測定は、FCS-101にサンプル容器をセットし試料溶液を30μl滴下して測定開始ボタンを押すだけです（図2）。各試料は、繰り返し測定回数10回（約3秒/回）で計測しました。

図2．FCS-101測定部

結果及び考察

測定の一例として、各試料の平均化された実測データより自己相関関数を演算した結果を図3に示します。（A）が抗原である蛍光標識ペプチド単独での結果、（B）が抗原:抗体モル比率1:100での結果、（C）が抗原:抗体モル比率1:5での結果になります。

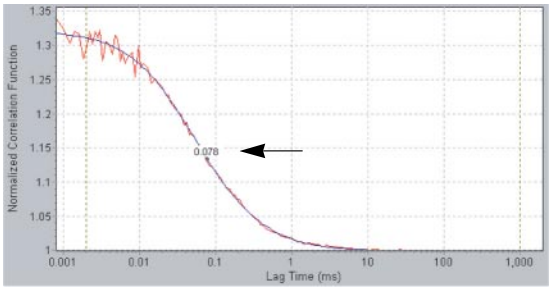
このデータに対しフィッティングカーブをとることにより、分子の運動速度（並進拡散時間）が求まり、分子の大きさを推測することができます。（A）では0.078、（B）では0.30という拡散時間が求まりました。動きの速い分子（小さな分子）ほど拡散時間は短くなります。（A）の0.078は抗原だけの運動速度、（B）の0.30は抗原－抗体複合体の運動速度を表しているといえます。また、（C）の結果は抗原単独と抗原-抗体複合体が混ざっている状態（2成分）を表しています（抗体単独分子は蛍光がないので観察されません）。

さらに、（A）～（C）の測定において測定領域での蛍光物質の分子数は約4分子と計測されました。

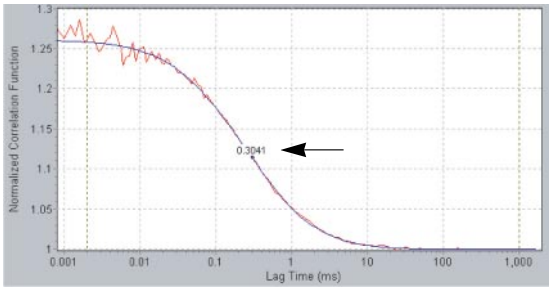
次に、抗原と抗体のモル比率を変えた試料を調製し、（C）と同様に抗原単独と抗原-抗体複合体の2成分状態と考えてデータの解析を行いました。各抗原:抗体モル比率でのデータをノーマライズ、フィッティングした結果は、図4に示しています。また、（A）および（B）より求めた拡散時間をそれぞれ抗原単独および抗原-抗体複合体の拡散時間とし、抗原:抗体モル比率と抗体に結合した抗原の率との関係を計算することができます。結果を表1に示します。

添加した抗体のモル比率に対して、結合した抗原の率をプロットすることにより、解離定数（Kd）も算出することができます。本測定結果より、Kd=1.1nMが算出されました。

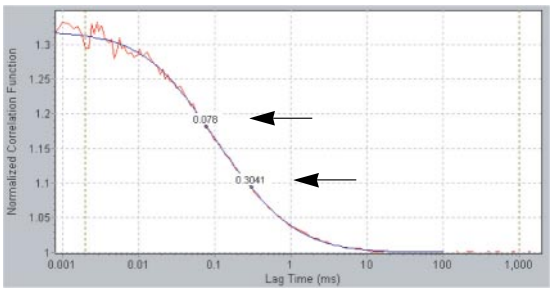
FCSは相互作用解析の手法として比較的新しく、さまざまな用途展開が期待されます。コンパクトで操作も簡便なFCS-101は、基礎的検討に最適と考えております。



（A）抗原単独での反応性



（B）抗原：抗体モル比率1：100での反応性



（C）抗原：抗体モル比率1：5での反応性

縦軸は分子数です。下へ行くほど増加していることを示します。
横軸は拡散時間です。右へ行くほど遅いことを示します。

：各試料の軸化された実測データ
：フィッティングカーブ

図3. 測定例

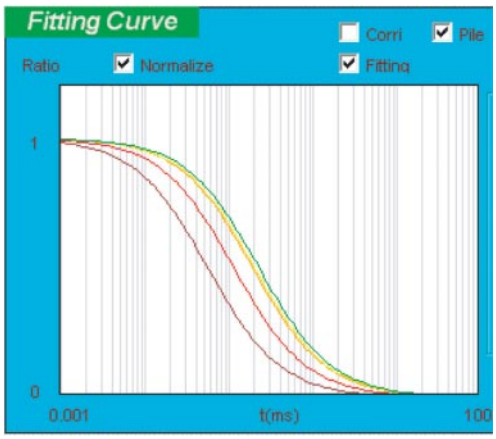


図4. 分子数をノーマライズしたフィッティングデータ

表1. 抗原:抗体モル比率と抗体に結合した抗原の率との関係

モル比率〔抗体/抗原〕	抗原結合率（%）
0	0
5	47.5
10	70.2
30	92.6
100	100

品名及び内容	包装	Code No.	価格
Fluorescence Correlation Spectroscopy **蛍光相関分光分析計測装置 FCS-101** 蛍光相関分光ユニット（本体 + 相関ボード）※	1式	FCS-101	¥7,000,000

※本製品にはパソコンは含まれておりません。別途、PCIバススロットに相関ボードを組み込むことのできるパソコンが必要です。

Q & A

Can Get Signal® Immunoreaction Enhancer Solution Q&A

TOYOBOテクニカルライン（TEL 06-6348-3888）へのお問い合わせの多い商品群ごとに、それらをまとめたQ&Aのコーナーです。今回は、ご好評いただいております、*Can Get Signal*®について、多くいただくお問い合わせ内容をまとめてお届けいたします。これらをご参考に、より一層効果的にご利用いただければ幸いです。

〈 商品の特長について 〉

Q1 どんな免疫アッセイに使用できますか?

A1 ELISA、ドットブロッティング、ウェスタンブロッティング等です。また、使用条件を詳細に検討することで、他の免疫アッセイ系に使用できる場合もあります。
※免疫組織染色には、本誌P.7掲載の*Can Get Signal*® immunostainのご使用をお勧めします。

Q2 どのくらいシグナルが上がるのですか?

A2 従来法に比べ数倍から数十倍の高いシグナルを得ることができます。反応性が低い抗体で顕著な効果を示す傾向があることを確認しております。

Q3 なぜシグナルが上がるのですか?

A3 抗原と抗体との反応を促進する効果があるためです。

〈 使用方法について 〉

Q4 どのように使用するのですか?

A4 通常、抗体の希釈に用いるTBS（TBS-T）、PBS（PBS-T）、希釈ブロッキング液などの代わりに、本試薬で抗体を使用濃度に希釈し、そのまま各種アッセイに用いてください。本試薬自体は希釈せずにご使用ください。

Q5 Solution 1とSolution 2があるが、どのように使い分けるのですか?

A5 Solution1が1次抗体希釈用、Solution2が2次抗体希釈用です。

Q6 抗体を一種類しか用いないアッセイ系（1次抗体に標識が付加されている場合など）ではSolution 1とSolution 2のどちらを使えばよいのですか?

A6 Solution 2をお勧めします。ただし、抗体の種類によっては、Solution 1を用いた方が、より優れた効果を示す場合があります。また、サンドイッチELISA法における固相化抗体と抗原との反応には、抗原の希釈液としてSolution 1を用いることができます。

Q7 どの標識酵素を使えば良いのですか?

A7 ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼなどの標識酵素の活性に影響を与えない成分から構成されていますので、これらの標識抗体を用いたアッセイ系にも使用することができます。

Q8 検出系はどのようなものが良いのですか?

A8 蛍光検出、発色検出、発光検出のいずれにも使用可能です。また、他の増感システムと併用することもできます。

Q9 検出にアマシャムバイオサイエンス社のECLシステムを使用していますが、ECL PlusやECL Advanceは使用可能ですか?

A9 問題なくご使用できます。また、ECL Advanceご使用の際は、付属の専用ブロッキング剤を本液に添加して使用することをお勧めします。

Q10 カゼイン、BSA等のブロッキング剤を加えて使用しても問題ありませんか?

A10 可能ですが、本試薬には、あらかじめブロッキング作用を持つ成分が混合されているため、追添加により濃度過多になる場合がありますので、ご注意ください。

Q11 アザイドを加えても問題ありませんか?

A11 特に問題はございません。

Q12 ブロッキング反応に使用可能ですか?

A12 ブロッキング能を低下させる可能性があるため、ご使用できません。

Q13 ELISA法における抗原または抗体の固相化反応に使用可能ですか?

A13 固相化能を低下させる可能性があるため、ご使用できません。

Q14 ブロッキング溶液のブロッキング剤としてはどのようなものが良いですか?

A14 スキムミルク、カゼイン、BSA、ゼラチン、正常血清等、いずれのブロッキング剤もご使用できます（リン酸化タンパク質の特異的検出やアビジン-ビオチン系を用いた検出系には、スキムミルクまたはカゼインの使用は避けてください）。
※ブロッキング剤の検討については、本誌P.15～16をご参照ください。

Q15 うまくいかないのですが、どうすれば良いですか?

A15 場合にもよりますが、抗体の濃度が高すぎて正常に反応できないことがあります。1次抗体の最適な希釈倍率は、抗体種、抗原の濃度、検出系の感度等に大きく依存しますので、抗体の供給元の推奨条件を参考にしてください。もし、最適な希釈倍率が分からない場合はドットブロッティングなどの予備検討を行うことにより、希釈倍率を決定することができます。

〈 保存方法について 〉

Q16 *Can Get Signal*®で希釈した抗体は、4℃で保存可能ですか?

A16 従来ご使用されていたTBS（TBS-T）、PBS（PBS-T）、希釈ブロッキング液などで保存可能な抗体であれば同様に保存できます。

Q17 希釈液は使い回すことはできますか?

A17 可能です。ただし、抗体の結合量が多くなるため、同じ希釈倍率でも今までより使い回せる回数が減る場合が予想されます。

Q18 ウェスタンブロッティング後にストリッピングしたメンブレンを再利用することは可能ですか?

A18 再利用することは可能です。

本製品はすでに販売を中止しております。

Terminal Deoxynucleotidyl Transferaseの代替品の販売開始のお知らせ

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase（Code No.TTF-101、TTF-102）は、原料入手の諸般の事情によりまして販売中止とさせていただきました。代替品として、原料を組換え体へ変更いたしました新製品を下記のごとく販売開始させていただくことになりました。新製品は従来品と同様にご使用いただくことが可能です。

新製品　（保存温度：-20℃）

品名及び内容	包　装	Code No.	価　格
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, recombinant	300U×1本	TTF-201	¥12,000
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, recombinant	1,500U×1本	TTF-202	¥48,000

販売中止品（従来品）　（保存温度：-20℃）

品名及び内容	包　装	Code No.	価　格
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	300U×1本	TTF-101	¥12,000
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	1,500U×1本	TTF-102	¥48,000

本製品はすでに販売を中止しております。

BisulFast™ Methylated DNA Detection Kit -メチル化DNA検出用試薬- の製品名変更のお知らせ

好評発売中のBisulFast™ Methylated DNA Detection Kit -メチル化DNA検出用試薬-（Code No.MDD-101、MDD-101T）の製品名を変更いたしました。新しい名称は以下の通りです。
その他、Code No.や包装などには変更ございません。

新名称：BisulFast™ DNA Modification Kit for Methylated DNA Detection

旧名称：Reagent Analysis of DNA Methylation BisulFast™ Methylated DNA Detection Kit -メチル化DNA検出用試薬-

●本ページ掲載の試薬類は全て一般研究用の目的にのみ販売しており、医薬品、診断用医薬品、化粧品、食品用等には使用できませんので、十分ご注意ください。誤用による事故については、当社は一切の責任を負いません。
●本ページ掲載商品にには消費税は含まれておりません。実際のご購入価格については弊社代理店へお問い合わせください。
●本ページ中の略号：毒印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外毒物です。
劇印は毒物および劇物取締法に基づく医薬用外劇物です。
危印は消防法に基づく危険物です。