

Type-it Fast SNP Probe PCR プロトコールとトラブルシューティング

確実で高いコールレートの5'-nuclease プローブに基づく
SNP タイピング用

目次	ページ
プロトコール	
Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを使用したSNPジェノタイピング (テンプレートを直接PCR反応に添加)	2
Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを使用したSNPジェノタイピング (テンプレートを乾燥)	6
Allelic Discrimination プレートリードおよび解析	10
トラブルシューティング	12



プロトコール：Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを使用したSNPジェノタイピング（テンプレートを直接PCR反応に添加）

テンプレートDNAをPCR反応に直接添加する場合は、本プロトコールをご利用ください。テンプレートDNAをウェルに添加し、乾燥後にPCRセットアップを行なう場合は、6ページのプロトコール“Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを使用したSNPジェノタイピング（テンプレートDNAを乾燥）”をご利用ください。

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールはTaqMan®プローブ（TaqMan MGBあるいは従来のTaqManプローブ）と、Applied Biosystems®社のリアルタイム用サーマルサイクラーやプローブベースのSNPジェノタイピング（英語版Handbook 12ページのTable 1参照）が可能な装置を用いた実験に至適化されています。
- 本プロトコールに記載のサイクリング条件で常に実験を始めます。
- 即使用可能な市販のTaqMan-based SNP Genotyping Assays (primer-probe mixes) は1xの濃度で、本プロトコールに記載のサイクリング条件と組み合わせて使用してください。
- オプションでQ-Solution™を使用することで、増幅困難な配列（GC含有量が高いなど）を持つターゲットの増幅が改善されることがあります。SNPジェノタイピングでのQ-Solutionの使用に関しては英語版Handbook 37ページのAppendix Dをご覧ください。
- オプション：C_t値によりアッセイの性能を評価するためにリアルタイムPCR装置でPCRを行なう場合は、正確なリアルタイム・データを得るために最適な解析設定が必須になります。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインとthreshold値など）を常に再調整する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版Handbook 32ページ、Appendix Aを参照してください。

操作手順

1. **Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mix、プライマー/プローブ溶液、RNaseフリー水、コントロールのゲノムDNA、テンプレートDNAを解凍する。**
塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を完全に混和します。
注：Q-Solutionを使用する場合は、これも同様に解凍します。

2. 表3 (4ページ) に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックスの容量は、実験に必要なトータル容量の10%増しになるように調製します。

通常、反応セットアップは室温 (15 ~ 25℃) で行ないます。しかし、各試薬、サンプル、コントロールは氷上に置くことをお奨めします。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCRチューブあるいはPCRプレートのウェルに適切な量を分注する。

4. テンプレートDNAを各PCRチューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。

テンプレートDNA量は最終反応容量の45%を超えないようにします。テンプレートDNAが低濃度なために大容量のテンプレートが必要な場合は、6ページのプロトコールをご利用ください。

注：反応ミックスおよびテンプレートは完全に混和してください。

5. 表4 (5ページ) に従ってサイクラーのプログラミングを行なう。

表3. Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを用いた反応組成

成分	容量/反応			最終濃度
	96ウェル プレート (標準)	96ウェル プレート (高速)	384ウェル ブロック	
反応ミックス				
Type-it Fast SNP PCR Master Mix, 2x	12.5 µl	5 µl	2.5 µl	1x
20x プライマー/ プローブ・ミックス*	1.25 µl	0.5 µl	0.25 µl	1x 0.9 µM both primers 0.2 µM both probes
オプション: Q-Solution、5x	2.5 µl	1.0 µl	0.5 µl	0.5x Q-Solution
RNase フリー水	変更可	変更可	変更可	-
テンプレートDNA	変更可	変更可	変更可	1 ~ 100 ng
トータル容量/反応	25 µl	10 µl	5 µl	-

* ターゲット毎に、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20x プライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 32 ページ、Appendix A を参照してください。

表4. 至適化済みのサイクリング・プロトコール

ステップ	時間	温度	コメント
初期活性化ステップ	5分	95℃	HotStarTaq® Plus DNA Polymeraseはこの加熱ステップで活性化される。
2ステップサイクリング：*			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる。
変性：	15秒	95℃	
アニーリング/ エクステンション：	30秒	60℃	PCR産物の長さは300 bp以下にする。
サイクル数：	40		1～100 ng
	45		1 ng以下

* 本プロトコールは、市販のサイクラーに搭載されているサイクリングブロックの加熱/冷却速度を最大に設定して使用できます。

6. PCRチューブ/プレートを簡単に遠心操作し、溶液をスピンドウンし、気泡を取り除く。

7. PCRチューブあるいはプレートをサイクラーにセットし、PCRサイクリング・プログラムを開始する。

注：後日PCRを行なう場合には、遮光して2～8℃で3日間まで保存可能です。

8. PCR増幅後にリアルタイムPCR装置でend-pointプレートリードを行なう際は、10ページを参照。

注：プレートリードを後日行なう場合（3日以内）は、プレートは遮光して室温（15～25℃）あるいは2～8℃で保存します。長期保存は-20℃で行ないます。

オプション：プレートをスピンドウンし、カバーについた溶液や気泡をスピンドウンして取り除いてからpost-PCRプレートリード解析を行ないます。

プロトコール：Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを使用したSNPジェノタイピング（テンプレートを乾燥）

PCRのセットアップを行なう前に、テンプレートDNAをウェルに添加し、PCRマスターミックスを添加する前に各ウェルを乾燥させる場合は、このプロトコールをご利用ください。PCRセットアップ中にテンプレートDNAを溶液として直接添加する場合は、2ページのプロトコール“Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mixを使用したSNPジェノタイピング（テンプレートを直接PCR反応に添加）”をご利用ください。

実験を始める前の重要事項

- 本プロトコールは、Applied Biosystems社のリアルタイムサイクラーやプローブベースのSNPジェノタイピング（英語版Handbook 12ページのTable 1参照）が可能な装置で、TaqManプローブ（TaqMan MGBあるいは従来のTaqManプローブ）を用いた実験用に最適化されています。
- 本プロトコールに記載のサイクリング条件で常に実験を始めます。
- 即使用可能な市販のTaqMan-based SNP Genotyping Assays (primer-probe mixes) は1xの濃度で、本プロトコールに記載のサイクリング条件と組み合わせて使用してください。
- 本プロトコールにはQ-Solutionを使用するオプションも記載されています。Q-Solutionにより、増幅困難な配列（GC含有量が高いなど）を持つターゲットの増幅が改善されることがあります。SNPジェノタイピングでのQ-Solutionの使用に関しては英語版Handbook 37ページ、Appendix Dをご覧ください。
- オプション：C_t値によりアッセイの性能を評価するためにリアルタイムPCR装置でPCRを行なう場合は、正確なリアルタイム・データを得るために最適な解析設定が必須になります。データ解析には、各ランですべてのレポーター色素チャンネルの解析ごとの設定（ベースラインとthreshold値など）を常に再調整する必要があります。

実験開始前の準備事項

- ターゲットごとに、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ20xプライマー/プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版Handbook 32ページ、Appendix Aを参照してください。

操作手順

1. テンプレートDNAとコントロールゲノムDNAを解凍する。個々のサンプルをボルテックスにより混和する。
塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を完全に混和します。

2. 個々のPCRチューブあるいはPCRプレートのウェルの底に相当する量のDNAサンプルを入れる。

反応あたり0.1～100 ngのゲノムDNAを使用する。

最適用量：1～20 ng

注：少容量のサンプルのみが乾燥しすぎるのを避けるために、DNAサンプル容量は等量で使用することをお奨めします。乾燥時間を最小限に抑えるために、2～5 μ lのテンプレート量を使用することをお奨めします。

3. DNAサンプルを乾燥する。室温（15～25℃）で溶液をエバポレートさせるか、PCRサーマルサイクラーの蓋を開けたまま37℃になるようにセットしてPCRチューブ/プレートを入れ、DNAサンプルを乾燥する。

注：SNPアッセイに影響するPCR増幅産物の混入を避ける。サーマルサイクラーの加熱蓋を閉める際、手を火傷しないように気をつけてください。

表5. テンプレートDNAの乾燥条件*

容量	37℃でのおおよその乾燥時間	
	96ウェル	384ウェル
2 μ l	1時間	1時間20分
5 μ l	2時間15分	2時間30分

* 乾燥時間は実験室の温度や湿度により著しく変動します。

4. QIAGEN Fast SNP Probe PCR Master Mix、プライマー/プローブ溶液、RNaseフリー水、Q-Solution（オプションで使用の場合）を解凍する。各溶液を混和する。

塩濃度が偏らないように、使用前に溶液を完全に混和します。

5. 表6（8ページ）に従って反応ミックスを調製する。

実験に必要なトータル容量の10%増しになるように、反応ミックスを調製します。

通常、反応セットアップは室温（15～25℃）で行ないます。しかし、プライマーやプローブは氷上で保管することをお奨めします。

6. 反応ミックスを完全に混和し、PCRチューブあるいはPCRプレートのウェルに適切な量を分注する。

7. 表7（9ページ）に従ってサイクラーのプログラミングを行なう。

表 6. Type-it Fast SNP Probe PCR Master Mix を用いた反応組成

成分	容量／反応			最終濃度
	96 ウェル プレート (標準)	96 ウェル プレート (高速)	384 ウェル ブロック	
反応ミックス				
Type-it Fast SNP PCR Master Mix, 2x	12.5 µl	5 µl	2.5 µl	1x
20x プライマー／ プローブ・ミックス *	1.25 µl	0.5 µl	0.25 µl	1x 0.9 µM both primers 0.2 µM both probes
オプション： Q-Solution、5x	2.5 µl	1.0 µl	0.5 µl	0.5x Q-Solution
RNase フリー水	変更可	変更可	変更可	-
テンプレート DNA	変更可	変更可	変更可	1 ~ 100 ng
トータル容量／反応	25 µl	10 µl	5 µl	-

* ターゲット毎に、ターゲットに特異的なプライマーとプローブを含んだ 20x プライマー／プローブ・ミックスを調製すると操作が容易になります。英語版 Handbook 32 ページ、Appendix A を参照してください。

表7. 至適化済みのサイクリング・プロトコール

ステップ	時間	温度	コメント
初期活性化ステップ	5分	95℃	HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこの加熱ステップで活性化される。
2ステップサイクリング：*			重要：以下のサイクリング条件を用いた場合のみ最適な結果が得られる。
変性：	15秒	95℃	
アニーリング/ エクステンション：	30秒	60℃	PCR産物の長さは300 bp以下にする。
サイクル数：	40		10～100 ng
	45		1 ng以下

* 本プロトコールは、市販の高速サイクラーに搭載されているサイクリングブロックの加熱/冷却速度を最大に設定して使用できます。

8. PCRチューブ/プレートを簡単に遠心操作し、溶液をスピンドウンし、気泡を取り除く。

9. PCRチューブあるいはプレートをサイクラーにセットし、PCRサイクリング・プログラムを開始する。

注：後日PCRを行なう場合には、遮光して2～8℃で最高3日間まで保存可能です。

10. PCR増幅後にリアルタイムPCR装置でend-pointプレートリードを行なう際は、10ページを参照。

注：プレートリードを後日行なう場合は、プレートは遮光して室温（15～25℃）あるいは2～8℃で保存します。長期保存は-20℃で行ないます。

オプション：カバーについた溶液や気泡を取り除くためにスピンドウンしてからpost-PCRプレートリード解析を行ないます。

プロトコール： Allelic Discrimination プレートリード および解析

PCR 増幅後にリアルタイム PCR 装置でエンドポイントプレートリードを行ないます。プレートリードで得られた蛍光測定値を用いて、リアルタイム PCR のソフトにより各ウェルからの蛍光強度に基づいて R_n 値をプロットした後、各サンプル中のアレルを決定します。

ジェノタイピングのデータ解析のための通常のプロセスには次のようなものが含まれます：

- Allelic discrimination プレートドキュメントの作製とセットアップ
- リアルタイム PCR 装置で allelic discrimination プレートリードを実施

注： Applied Biosystems 7500 および 7500 Fast PCR System を使用する場合は、Type-it Fast SNP Probe PCR Kit の ROX™ passive reference dye の組成は至適化済みなので、 R_n 値はスケール上にスキッタープロットとして現れます。0.1 から 1 の間になることが予想され、他のマスターミックスで得られた結果とは異なることがあります。これはアレルコール実験の精度には影響しません。

- プレートドキュメントの解析
- 自動あるいはマニュアルのアレルコール（遺伝子型同定）作成
- アレルタイプの検証

注： プレートリードおよび解析を行なう際のシステムソフトウェアの使用方法は、装置に付属のユーザーガイドの allelic discrimination の章を参照にしてください。

リアルタイム PCR 装置のソフトは、アレル 2 に対するアレル 1 をスキッタープロットした allelic discrimination ラン結果をプロットします。96 ウェルあるいは 384 ウェルの各ウェルはプロット上で個々の点として示されます。

図 1 に、ターゲットの遺伝子座のジェノタイピングに基づくクラスターの分布を示します。VIC® 蛍光は x 軸に、FAM 蛍光を y 軸に示しています。左下にある四角は No Template Controls (NTC)、丸は VIC で検出されたアレルのホモ接合体サンプル、ひし形は FAM で検出されたアレルのホモ接合体サンプル、三角形はヘテロ接合体のサンプル (FAM と VIC にポジティブ) を示します。

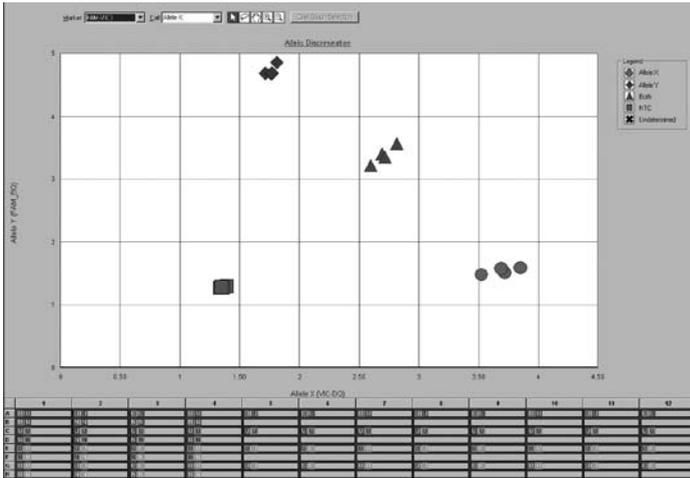


図 1. ターゲット遺伝子のジェノタイピングに基づくクラスターの分布。

データ解析に関する追加情報：データ解析は装置により異なります。ジェノタイピングデータの解析に関する詳細は、装置に付属のハンドブックをお読みください。

トラブルシューティングガイド

コメント

PCRでシグナルがない、 R_n 値が低い、あるいはシグナルが遅れて検出される

- a) サイクル条件が間違っている
常にプロトコールに記載されている至適化済みのサイクリング条件で始める。
- b) HotStarTaq *Plus* DNA Polymeraseが活性化されていない
プロトコールに記載されているようにサイクリングプログラムにHotStarTaq *Plus* DNA Polymerase活性化ステップ（95℃、5分）が含まれていることを確認する。
- c) ピペッティングエラー、あるいは試薬の入れ忘れ
プライマー、プローブ、テンプレート核酸を含んだ試薬の濃度と保存条件をチェックする。プライマーおよびプローブ濃度を評価する際の詳細は英語版 Handbook 32ページ、Appendix Aを参照する。再度アッセイを行なう。
- d) リアルタイム解析で検出ステップが間違っている、あるいはない
リアルタイム解析では、TaqMan プローブを用いたとき、アニーリング/エクステンションを組み合わせたステップ中に蛍光検出が行なわれていることを確認する。
- e) PCR効率が低い
本プロトコールに記載のプライマーおよびプローブ濃度を使用する。
ユーザーがデザインしたプライマーに関しては濃度をチェックする。プライマーおよびプローブ濃度を評価する際の詳細は英語版 Handbook 32ページ、Appendix Aを参照する。
プライマーやプローブを繰り返して凍結・融解することを避ける。凍結・融解の繰り返しを避けるために少量ずつ分注する。
300 bpより大きいPCR増幅産物に関しては、アニーリング/エクステンション時間を60秒に延長し、オプションでサイクル数を50に増やす。

コメント

- f) スタートテンプレートDNAに問題がある
- テンプレートおよびコントロールDNAの濃度、保存条件、品質についてチェックする。
- 必要な場合には、テンプレートDNAのストック溶液を段階的に希釈する。新しい希釈液を用いてアッセイを再度行なう。
- 最適な結果を得るにはPCR阻害物質の効果的な除去が必須である。適切な精製法を用いてサンプルから核酸を精製する。
- テンプレート核酸の分離および希釈に使用した試薬、バッファー、溶液のすべてがヌクレアーゼ（RNase/DNase）フリーでなければならない。
- g) テンプレートDNAが不十分あるいは分解
- テンプレート量がプロトコールに記載されている範囲にあることをチェックする（4ページの表3および7ページの表5）。可能ならテンプレート量を増やす。10～100 ngのテンプレート・ゲノムDNAには40サイクルを用いる。0.1～9 ngのテンプレート・ゲノムDNAには45サイクルを用いる。50サイクルまで増やすと微量および／あるいは分解したスタートテンプレートで良い結果が得られることがたまにある。
- 他のPCRアッセイを用いて、増幅可能なDNAかどうかをそれぞれのDNAサンプルで再テストする。
- h) ゲノム遺伝子座の増幅が困難
- 増幅困難なゲノム遺伝子座（二次構造やGCリッチ）にはQ-Solutionを用いると改良されることがある。Q-Solutionの添加／未添加で反応させる。
- i) プローブデザインが適正でない
- 増幅反応が成功しているのなら、プローブに問題のある可能性がある。プローブデザイン・ガイドラインを参照。英語版Handbook 32ページ、Appendix Aを参照。
- j) 間違った検出チャンネル／フィルターを選択した
- 正しい検出チャンネルが有効かどうか、あるいはレポーター色素に正しいフィルターを選択しているかを確認する。選択したレポーター色素の組み合わせが検出チャンネルあるいはフィルターセットに適合しているかチェックする。

コメント

- k) 蛍光のクロストーク アッセイに使用したレポーター色素がサイクラー上の SNP genotyping 解析に適切であることをチェックする。クロストーク効果の可能性を評価するために適切なコントロールを用いてテストする。

No Template Control (NTC ; テンプレート無添加のコントロール) で蛍光強度あるいは C_T 値が高い

- a) 試薬の汚染 SNP アッセイに使用した試薬 (例 ; マスターミックス、プライマー、プローブ) を全て廃棄する。コンタミしていないピペットとキット、試薬で SNP アッセイをもう一度繰り返す。
- b) リアルタイム用サーマルサイクラーにコンタミ メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのコンタミを除去する。
- c) リアルタイム用サーマルサイクラーの較正がずれている メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーの較正をもう一度行なう。

明確なクラスターが観察されない、あるいはサンプルがひとつの特異的なアレルのタイプでクラスターを形成しない、あるいは蛍光が変動する。

- a) 選んだレポーター色素が不適切あるいはクエンチャー色素が間違っている 色素のセッティングを確認し、データを再び解析する。
- b) テンプレートのゲノム DNA に問題 サンプルの DNA 濃度を再チェックする。全てのサンプルで、相当する量のテンプレートゲノム DNA を使用したことを確認する。
クラスターが明確になることを確認するためにサンプルの再テストを行なう。
サンプル中のゲノム DNA の品質をテストするために異なるジェノタイピング・アッセイを使用する。微量のアレル変異、配列重複、サンプル混和 (複数のアレルを含有) などでは予想されるジェノタイピング・クラスターの外側にシグナルを生成することがある。

コメント

- c) 試薬の導入が不正確あるいは蒸発した
- 容量に変動がないか各ウェルをチェックし、適切な容量が入っていないアッセイをもう一度行なう。optical adhesive film を以下の組み合わせで使用している場合は、compression pad を使用する：
- ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System でスタンダードの96ウェルプレート
 - 7900HT Fast Real-Time PCR System でスタンダードの96ウェルプレート
 - GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler でスタンダードの96ウェルプレートあるいは384ウェルプレート
 - 9800 Fast Thermal Cycler で Fast 96-well plate
- d) ウェルに気泡
- プレートをスピンドウンして気泡を取り除き、プレートカバーから溶液を除去する。post-PCR プレートリードをもう一度行なう。
- ご使用の装置で post- PCR プレートリードが行なえない場合は、新しい反応プレートを準備して、プレートの遠心操作後に PCR を行なう。
- e) ROX シグナルが不正確
- ABI™ 社の装置でプレートドキュメントをセットアップする際は passive reference として ROX 色素を選択する。
- 反応容量が少なすぎると不正確な ROX シグナルを生成することがある。推奨する反応容量を使用する。
- 装置のハードウェアで問題をチェックし、装置が校正されていることを確認する。

コメント

- f) プレートの端にあるサンプルがコールされていない
- PCRプレートとヒートブロックの間で熱が均一に伝わっているかチェックする。
- ABI装置に関しては、optical adhesive filmを以下の組み合わせで使用している場合は、compression padを使用する：
- ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systemでスタンダードの96ウェルプレート
 - 7900HT Fast Real-Time PCR Systemでスタンダードの96ウェルプレート
 - GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cyclerでスタンダードの96ウェルプレートあるいは384ウェルプレート
 - 9800 Fast Thermal CyclerでFast 96-well plate
- g) 反応成分が適切に混和されていない
- プロトコルの混和操作に従う。
- h) リアルタイム用サーマルサイクラーがコンタミ
- メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーのコンタミを除去する。
- i) リアルタイム用サーマルサイクラーの較正ができていない
- メーカーの説明書に従ってリアルタイム用サーマルサイクラーの較正をもう一度行なう。

Applied Biosystems 社の装置：allelic discrimination plotで目盛り（x軸、y軸）がない

- a) プレートドキュメントがセットアップされたときにROX色素がpassive referenceとして選択されていない
- プレートドキュメントをセットアップするときにROX色素をpassive referenceとして選択する。
- b) Applied Biosystems 7500 および7500 Fast PCR System：スキヤッタープロットでxとy軸の目盛が異なる
- これらの装置の R_0 値は0.1～1の間になることが予想され、スキヤッタープロットでxとy軸の目盛が異なる。これはROX passive reference dyeの組成が異なるためである。
- c) ABI PRISM 7000 SDS：曲線が乱れる、あるいは実験結果のばらつきが大きい
- 反応液量を25 μ l以上にする。必ずoptical adhesive coverでプレートをシールする。反応液量を50 μ lに増加すると、結果が改良されることがある。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, Q-Solution™ (QIAGEN Group); ABI™, ABI PRISM®, ROX™, VIC® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); GeneAmp®, TaqMan® (Roche Group).

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

A license to perform the 5' nuclease process for research requires the use of a Licensed 5' Nuclease Kit (containing Licensed Probe), or the combination of an Authorized 5' Nuclease Core Kit Fast Licensed Probe, or license rights that may be purchased from Applied Biosystems. This product is an Authorized 5' Nuclease Core Kit without Licensed Probe. Its purchase price includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 5,210,015, 5,487,972, 5,476,774, and 5,219,727, and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), for using only this amount of the product in the practice of the 5' nuclease process solely for the purchaser's own internal research when used in conjunction with Licensed Probe. This product is also an Authorized 5' Nuclease Core Kit for use with service sub-licenses available from Applied Biosystems. This product conveys no rights under U.S. Patents Nos. 5,804,375, 6,214,979, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, or 6,258,569, or corresponding patents outside the United States, expressly, by implication or by estoppel. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims in U.S. Patent No. 6,814,934) and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

The purchase price of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. Patents Nos. 5,407,800, 5,322,770, 5,310,652 and corresponding patent claims outside the United States, owned by Roche Molecular Systems, Inc. or F. Hoffmann-La Roche Ltd (Roche), to use only this amount of product solely for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claims (such as apparatus or system claims) and no right to use this product for any other purpose or for commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted expressly, by implication or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

記載のQIAGEN製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。

© 2008 QIAGEN, all rights reserved.

www.qiagen.co.jp

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき3-13-1 ■ Forefront Tower II

Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

