

QuantiTect® Probe RT-PCR プロトコールとトラブルシューティング

配列特異的プローブを用いたリアルタイム定量
1ステップRT-PCR

目次	ページ
プロトコール	
Applied Biosystems Cyclarおよびその他のサイクラーでの リアルタイム1ステップRT-PCR	2
LightCycler 1.xおよび2.0を用いたリアルタイム1ステップRT-PCR	5
トラブルシューティング	9



プロトコール： Applied Biosystems® Cyclyerおよびその他のサイクラーでのリアルタイム1ステップRT-PCR

本プロトコールは、ダブル標識プローブ (TaqMan® など) を用いて Applied Biosystems、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett、Eppendorf®、Roche®、Stratagene® 社など殆どのリアルタイム用サーマルサイクラーで使用可能です。LightCycler® 1.x または LightCycler 2.0 を使用される場合は、5 ページのプロトコールに従ってください。

反応容量

ほとんどのリアルタイム用サーマルサイクラーで 50 µl の反応容量を使用します。しかし、Applied Biosystems 7500 Fast System あるいは SmartCycler® system を使用した場合は 25 µl に、LightCycler 480 を使用する場合は 10 µl に減らします。

反応容量を減らす場合は、反応で使用するマスターミックスおよび RT mix の量も減らします： 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix の容量は常に最終反応容量の半分にし、QuantiTect RT Mix の量は最終反応容量の 1/100 にします。さらに、プライマー、プローブ、テンプレート、UNG の濃度は表 1 に記載しているものと同じにします。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いたリアルタイム RT-PCR で最高の効率を得るには、ターゲットの長さを 100 ~ 150 bp にするのが理想です。
- 逆転写反応の後、RT-PCR の PCR ステップはまず、95°C で 15 分のインキュベーションを行ない HotStarTaq® DNA Polymerase を活性化させます。
- 不完全な cDNA 合成を防ぐために、全ての反応液セットアップは氷上で行ないます。
- 本キットは 50 µl の最終容量で最適化されています。他の反応液量を用いる場合には、2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix および QuantiTect RT Mix の量を調整して、これらの溶液の割合が一定になるようにしてください。
- 毎回ランの解析ごとに threshold 値を調整します。
- 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix は dUTP を含んでいるので、uracil-N-glycosylase (UNG) を使用する前処理が可能です。しかしその際は熱感受性 UNG のみを使用してください。
- Applied Biosystems 7500 を使用する際は、初期設定値の threshold 値を低く調節します。スタートポイントとして 0.01 を使用します。

操作手順

1. **2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、**テンプレートRNA**、**プライマー**および**プローブ溶液**、**RNaseフリー水**を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect RT Mix**は使用直前に-20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに-20℃に戻す。

2. 表1に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックス調製中はサンプルを氷上に置いておきます。

50 µl以外の最終反応容量を使用する場合には、2x QuantiTect Probe RT-PCR Mix および QuantiTect RT Mixの割合が一定になるように、これらの量を調整します。

注：2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix中に既に含有されている4 mM Mg²⁺溶液で実験を始めることを推奨します。いくつかのターゲットではMg²⁺濃度を6 mMまで増やすことで、反応が改良されることがあります。

表1. 反応セットアップ

成分	容量/反応	最終濃度
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix*	25 µl [†]	1x
プライマーA	適量	0.4 µM [‡]
プライマーB	適量	0.4 µM [‡]
プローブ	適量	0.1 ~ 0.2 µM
QuantiTect RT Mix	0.5 µl [§]	
RNA テンプレート (ステップ4で添加)	適量	反応あたり 1 pg ~ 500 ng
RNaseフリー水	適量	
オプション： Uracil-N-glycosylase (UNG)、熱感受性	適量	2 unit/反応
トータル反応容量	50 µl	

* 最終濃度4 mMのMgCl₂含有

[†] 50 µl以外の反応量を使用する場合には、この式を使って2x master mixの量を計算してください：2x master mix (µl)の容量 = 0.5 x [トータルの反応容量 (µl)]

[‡] 最終プライマー濃度0.4 µMは殆どのアプリケーションに最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.4 µMから1 µMのプライマー濃度で決定してください。

[§] 50 µl以外のトータル反応量を使用する場合には、この式を使ってRT mixの量を計算してください：RT mixの容量 (µl) = 0.01 x [トータルの反応容量 (µl)]

3. 反応ミックスを完全にミックスしてPCRチューブあるいはプレートに適切な量を分注する。
チューブあるいはプレートは氷上で保冷します。
4. テンプレートRNA (1 pg ~ 500 ng / 反応) を反応ミックスの入った個々のPCRチューブあるいはウェルに添加する。
5. 表2に記載したプログラムのアウトラインに従って、リアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミングを行なう。
オプションのUNG処理には、サンプルを5分間以上氷上に放置してください。
6. PCRチューブあるいはプレートをサーマルサイクラーにセットしてサイクリングプログラムをスタートする。

表2. リアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	コメント
逆転写反応*	30分	50℃	テンプレートRNAの二次構造を排除するために、温度は最高55℃まで使用できる
PCR初期活性化	15分	95℃	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
2ステップサイクリング			
変性*	15秒	94℃	
アニーリング/ エクステンション:	60秒	60℃	蛍光データの収集を行なう
サイクル数:	40 ~ 45		サイクル数はテンプレートRNAと転写物の量に依存

* SmartCyclerを用いる場合はこのサイクラーの特性を利用して、変性時間を1秒間に短縮することが可能です。

プロトコール：LightCycler 1.xおよび2.0を用いたリアルタイム1ステップRT-PCR

本プロトコールは、LightCycler 1.xおよびLightCycler 2.0のみを用いた実験に使用し、FRETプローブやダブル標識プローブ（TaqManなど）に最適です。その他のサイクラーに関しては、2ページのプロトコールに従います。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・プローブシステムを用いる場合でも、このプロトコールで決められているサイクリング条件で実験を始めてください。
- 配列特異的なプローブを用いたリアルタイムRT-PCRで最高の効率を得るには、ターゲットの長さを **100～150 bp** にするのが理想です。
- 逆転写反応の後、RT-PCRのPCRステップはまず、**95℃で15分のインキュベーションを行ない** HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化させます。
- 不完全なcDNA合成を防ぐために、すべての反応セットアップは冷却したキャピラリー中で行ないます。
- 本キットは20 μ lの最終容量で最適化されています。他の反応液量を用いる場合には、2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix および QuantiTect RT Mixの量を調整して、これらの溶液の割合が一定になるようにしてください。
- データ解析には“second derivative maximum”法を推奨します。
- データ解析に“fit-point”法を使用する際には、毎回ランの解析ごとに noise bandを調節します。
- 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master MixはdUTPを含んでいるので、uracil-N-glycosylase (UNG)を使用する前処理が可能です。しかしその際は熱感受性UNGのみを使用してください。

操作手順

1. **2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix** (–20℃で保存の場合)、**テンプレートRNA**、**プライマー**および**プローブ溶液**、**RNaseフリー水**を解凍する。個々の溶液を混和し、氷上に置く。**QuantiTect RT Mix**は使用直前に–20℃から取り出し、氷上に置き、使用後はすぐに–20℃に戻す。
2. 表3に従って反応ミックスを調製する。

反応ミックス調製中はキャピラリーを保冷してください。

20 μ l以外の最終反応容量を使用する場合には、2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mixと QuantiTect RT Mixの割合が一定になるように、これらの量を調整します。

注：2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix中に既に含有されている4 mM Mg^{2+} 溶液で実験を始めることを推奨します。いくつかのターゲットでは Mg^{2+} 濃度を6 mMまで増やすことで、反応が改良されることがあります。

表3. 反応セットアップ

成分	容量／反応	最終濃度
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix*	10 μ l	1x
プライマーA	適量	1 μ M†
プライマーB	適量	1 μ M†
プローブ	適量	0.2 μ M
QuantiTect RT Mix	0.2 μ l	
RNAテンプレート（ステップ4で添加）	適量	反応あたり 1 pg ~ 1 μ g
RNase フリー水	適量	
オプション： Uracil-N-glycosylase (UNG)、熱感受性	適量	2 unit／反応
トータル反応容量	20 μl	

* 最終濃度 4 mMのMgCl₂含有

† 最終プライマー濃度 1 μ Mは殆どのアプリケーションに最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.5 μ Mから2 μ Mのプライマー濃度で決定してください。

3. 反応ミックスを完全に混和し、PCRキャピラリーに適切な量を分注する。
キャピラリーは保冷してください。
4. テンプレートRNA (1 pg ~ 1 μ g／反応) を反応ミックスの入った個々のPCRキャピラリーに添加する。
オプションのUNG処理には、冷却したキャピラリーにサンプルを少なくとも5分間放置します。
5. 表4 (FRETプローブ) か表5 (TaqManその他のダブル標識プローブ) に記載したプログラムのアウトラインに従って、LightCyclerのプログラミングを行なう。表6に従ってチャンネルをセットする。
6. PCRキャピラリーをLightCyclerにセットして、サイクリングプログラムをスタートする。

表4. FRETプローブを用いたリアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	20℃/秒	テンプレートRNAの二次構造を排除するために、温度は最高55℃まで使用できる
PCR初期活性化	15分	95℃	20℃/秒	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
3ステップサイクリング				
変性：	0秒	95℃	20℃/秒	
アニーリング：	30秒	50～60℃	20℃/秒	プライマーの T_m より約5～8℃低い温度。蛍光データの収集を行なう
エクステンション：	30秒	72℃	2℃/秒	
サイクル数：	35～55			サイクル数はテンプレートRNAと転写物の量に依存

表 5. TaqMan およびその他のダブル標識プローブ用リアルタイム用サーマルサイクラー条件

ステップ	時間	温度	ランプ速度	コメント
逆転写反応	20分	50℃	20℃/秒	テンプレートRNAの二次構造を排除するために、温度は最高55℃まで使用できる
PCR 初期活性化	15分	95℃	20℃/秒	HotStarTaq DNA Polymeraseはこの加熱ステップにより活性化
2ステップサイクリング				
変性：	0秒	95℃	20℃/秒	
アニーリング/ エクステンション：	60秒	60℃	20℃/秒	蛍光データの収集を行なう
サイクル数：	35～55			サイクル数はテンプレートRNAと転写物の量に依存

表 6. ラン（ディスプレイモード）中およびデータ解析用のチャンネルセッティング

	検出 チャンネル	ディスプレイ モード	データ解析用 チャンネル
ダブル標識プローブ（FAM®）	F1	F1/1	F1/F2
ハイブリダイゼーションプローブ （LC-Red 640）	F2	F2/1	F2/F1
ハイブリダイゼーションプローブ （LC-Red 705）	F3	F3/1	F3/F1

トラブルシューティングガイド

コメント

PCRで産物がない、あるいは遅れて検出される

- a) アニールステップ (FRETプローブおよび Molecular Beacons) あるいはアニール/エクステンションステップ (ダブル標識プローブ) が短すぎる プロトコールで明記されているアニール時間あるいはアニール/エクステンション時間をいつも用いる。いくつかのケース、特にLightCycler 1.xおよび2.0では、アニール時間を10秒間隔で増加させると、増幅が改善されることがある。
- b) エクステンション時間が短すぎる (FRETプローブおよび Molecular Beacon) 常にプロトコールに明記されたエクステンション時間を用いる。いくつかのケース、特にLightCycler 1.xおよび2.0では、時間を10秒間隔で増加させると、増幅が改善されることがある。
- c) 検出ステップが間違っている FRETプローブおよびMolecular Beaconを用いた場合にはアニールステップで、ダブル標識プローブを用いている場合にはアニール/エクステンションを組み合わせたステップで、蛍光検出が行なわれていることを確認する。
- d) ピペット操作ミス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RNAを含んだ試薬の濃度や保存条件をチェックする*。RT-PCRをやり直す。
- e) HotStarTaq 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 DNA Polymerase活性化ステップ (95℃、15分) が含まれていることを確認する。
- f) HotStarTaq DNA Polymeraseの活性化が早すぎる サイクリングプログラムをチェック。HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化する前に逆転写反応が完了していることを確認する。
- LightCycler 1.xおよび2.0** : 50℃で20分間
その他のサイクラー : 50℃で30分間
- g) 逆転写反応の温度が正確でない 逆転写反応は50℃を推奨する。しかし50℃で満足できる結果が得られない場合には反応温度を48～55℃で変更してみる。

* 詳細はwww.qiagen.com/resources/infoの“リアルタイムPCRのガイドライン”を参照してください。

コメント

- h) QuantiTect RT Mixの濃度が適正でない
正確な量のQuantiTect RT Mixを使用。
LightCycler 480 : 反応あたり 0.1 μ l の RT mix
LightCycler 1.x および 2.0 : 反応あたり 0.2 μ l の RT mix
SmartCycler および Applied Biosystems 7500 Fast System : 反応あたり 0.25 μ l の RT mix
その他のサイクラー : 反応あたり 0.5 μ l の RT mix
- i) QuantiTect RT Mixの
QuantiTect Probe
RT-PCR Master Mix への
割合が正しくない
反応容量を増減した場合は、QuantiTect RT Mixと
QuantiTect Probe RT-PCR Master Mixの比率が一定にな
るように、適宜 QuantiTect RT Mixの量を変更する。
- j) RT-PCR 産物が長すぎる
最適な結果を得るには、RT-PCR 産物を 60 ~ 150 bp
の長さにする。RT-PCR 産物の長さは 300 bp 以上にな
らないようにする。
- k) プライマー・デザイン
が最適でない
RT-PCR 産物をゲル電気泳動によりチェックする。特異
的 RT-PCR 産物が検出されない場合は、primer design
guidelineを再考する*。
- l) プライマー濃度が
最適でない
適切なプライマー濃度を用いる。
LightCycler 1.x および 2.0 : 各プライマーの濃度は
1 μ M。
その他のサイクラー : 各プライマーの濃度は 0.4 μ M。
いくつかのケースでは、プライマー濃度を最高 2 μ M
まで増やすと、結果が改良されることがある。
分光光度計でプライマー濃度をチェックする*。
- m) Mg^{2+} 濃度が最適でない
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix に添加されて
いる Mg^{2+} 濃度 (最終濃度 4 mM) で常に始める。あ
るターゲットでは、 Mg^{2+} 濃度を最高 6 mM まで増や
すと、改善される場合がある。0.5 mM 間隔の異なる
濃度でテストする。
- n) スタートテンプレート
に問題
スタートのテンプレート RNA 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 RNA 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 RT-PCR
を繰り返す。

* 詳細は www.qiagen.com/resources/info の “リアルタイムPCRのガイドライン” を参照にしてください。

コメント

- o) スタートテンプレート量が不十分 可能な場合はテンプレート量を増やす。十分なコピー数のターゲット RNA がサンプル中に存在していることを確認する。
- p) サイクル数が足りない サイクル数を増やす。
- q) プローブデザインが適正でない 増幅反応しているのなら、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*。
Molecular Beaconsを使用する場合は、probe design guidelineに関する詳細はwww.molecular-beacons.orgを参照にする。
- r) アニール温度が高い アニール温度を2℃ずつ下げる。
- s) アニール温度が低すぎる アニール温度を2℃ずつ上げる。
- t) 検出が活性化されていない サイクリングプログラムで蛍光検出が有効かをチェックする。
- u) プローブ合成が適正でない DNase Iでインキュベートし、ダブル標識プローブあるいはMolecular Beaconの品質をチェックする。蛍光色素およびクエンチャーを含んだプローブが正しく合成されている場合には、DNase Iインキュベーション後に顕著な蛍光強度の増加が見られる。
- v) プライマーが分解 変性ポリアクリルアミドゲルでプライマー分解の可能性をチェックする。
- w) 転写物が発現していない RT-PCR産物が存在しないのは逆転写反応や増幅、検出に問題があるためではないことを確認するために、RT-PCRを繰り返して行ない、ポジティブコントロールも含める*。
- x) 熱感受性UNGを使用していない RT-PCRを開始する前にオプションのUNG処理を行なう際は、**熱感受性UNG**のみを使用する。大腸菌のUNGは温度が上がっても安定で、50℃の逆転写反応中に合成されたcDNAを壊すことがある。

* 詳細はwww.qiagen.com/resources/infoの“リアルタイムPCRのガイドライン”を参照にしてください。

コメント

LightCycler 1.x および 2.0 以外のリアルタイム用サーマルサイクラー：

- y) 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活性化されているか、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。

LightCycler 1.x および 2.0 のみ：

- z) 間違った検出チャンネルを選択した 正しい検出チャンネルが選択されていることを確認する（例；F1 は FAM 標識 TaqMan プローブ、あるいは Molecular Beacons 用、F2 は LC-Red 640 標識 FRET プローブ用、F3 は LC-Red 705 標識 FRET プローブ用）。

テンプレート量のログ値と C_T 値 / Crossing point 間の相関関係に直線性がない

- a) テンプレート量が多すぎる 推奨されたテンプレートの最大量を超えない。
LightCycler 1.x および 2.0：1 μg 以上のテンプレート量を使わない。
その他のサイクラー：500 ng 以上のテンプレートを使用しない。
- b) テンプレートの量が少なすぎる 可能な場合にはテンプレートの量を増やす。
- c) QuantiTect RT Mix の濃度が適正でない 正確な量の QuantiTect RT Mix を使用。
LightCycler 480：反応あたり 0.1 μl の RT mix
LightCycler 1.x および 2.0：反応あたり 0.2 μl の RT mix
SmartCycler および Applied Biosystems 7500 Fast System：反応あたり 0.25 μl の RT mix
その他のサイクラー：反応あたり 0.5 μl の RT mix

“No Template” コントロールで強い蛍光強度

- a) 試薬のコンタミ 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）をすべて廃棄する。新しい試薬でアッセイをもう一度繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコンタミネーション フィルター付チップを使用するなど、反応セットアップ中に適切な安全対策を講じる。
前の反応液からのキャリーオーバーを防ぐために、熱感受性 uracil-N-glycosylase を用いる。

コメント

“No Reverse Transcription” コントロールで蛍光強度が増加した

ゲノムDNAがRNA
サンプルにコンタミ

cDNAターゲットのみを増幅・検出するために、エキソン/エキソン境界にかかるプライマーおよび/あるいはプローブをデザインする。

あるいはコンタミしているゲノムDNAを分解するためにRNAサンプルをDNase処理する。

蛍光強度がバラつく

- a) 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。
- b) リアルタイム用サーマルサイクラーが較正されていない
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。

すべてのサイクラーシステム：

- c) 高濃度のテンプレートで波状のカーブ
Analysis Setting でバックグラウンドを計算するために使用したサイクル数を（ご使用のリアルタイム用サーマルサイクラーが変更可能な場合）減らすか、テンプレート量を減らす。

ABI PRISM® 7000のみ：

- d) 曲線が滑らかでない、あるいは標準偏差値が高い
反応液量は25 µl以上にする。プレートの蓋にoptical adhesive coverを必ず使用する。反応液量を50 µlに増加すると、結果が改良されることがある。
ハロゲンランプが古い。3ヶ月ごと（あるいは2,000時間使用後）に変換する。

LightCycler 1.xおよび2.0のみ：

- e) RT-PCR ミックスがキャピラリーチップに入っていない
キャピラリーチップにRT-PCR ミックスを入れるために、キャピラリーを遠心する。
- f) キャピラリーが完全に押し込まれていない
キャピラリーが完全にLightCycler カローセルに押し込まれていることを確認する。
- g) 検出チャンネルを間違えている
正しいチャンネルを選択したことを確認する。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiTect® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, FAM® (Applied Biosystems or its subsidiaries); Bio-Rad® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); TaqMan®, Roche®, LightCycler® (Roche Group); Cepheid®, SmartCycler® (Cepheid); Stratagene® (Stratagene).

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 plus Licensed Probe, or license rights that may be purchased from Applied Biosystems. This product (QuantiTect Probe RT-PCR Kit) 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 services sublicensees 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.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The purchase price of this product (QuantiTect Probe RT-PCR Kit) 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.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

This product (QuantiTect Probe RT-PCR Kit) or its use is covered by at least one claim of U.S. Pat. Nos. 5,035,996; 5,945,313; 6,287,823; or 6,518,026, owned by Invitrogen Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product, (b) its components, or (c) materials made by the employment of this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made by the employment of this product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity for which a party receives or is due to receive consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. The buyer cannot use this product or its components or materials made using this product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@invitrogen.com.

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。

© 2002–2008 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

