

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

SYBR Green Iを用いたリアルタイム定量PCRおよび
2ステップRT-PCR用

| 目次 | ページ |
|--|-----|
| プロトコール | |
| Applied Biosystems Cyclorおよびその他のサイクラーでの リアルタイムPCR / 2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PCR / 2ステップRT-PCR | 6 |
| トラブルシューティング | 10 |



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 PCR / 2 ステップ RT-PCR

本プロトコールは、Applied Biosystems、Bio-Rad®/MJ Research、Cepheid®、Corbett、Eppendorf®、Roche®、Stratagene®社などほとん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、6 ページのプロトコールに従ってください。

反応容量

殆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の量も減らします：2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix の容量は常に最終反応容量の半分にします。さらに、プライマー、テンプレート、UNG の濃度は表 1 に記載されているものと同じにします。

実験を始める前の重要事項

- SYBR Green I を用いた効率的なリアルタイム PCR には、ターゲットの長さを **100 ~ 150 bp** にするのが理想です。
- HotStarTaq® DNA Polymerase を活性化するため、PCR の最初に必ず **95 °C で 15 分間のインキュベーション**を行なってください。
- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 中に既に含有されている **2.5 mM Mg²⁺ 溶液**で実験を始めることを推奨します。
- 毎回ランの解析ごとに threshold 値を調整します。
- 2x QuantiTect SYBR Green 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。
- **ABI PRISM® 7000**を使用する際には optical adhesive cover で PCR プレート を密封することをお勧めします。この機器を使用する際には、反応液量は 25 µl 以上にします。
- **QuantiTect Primer Assays**を使用する際は、QuantiTect Primer Assay Handbook のプロトコールに従ってください。日本語版のプロトコールとトラブルシューティングも入手可能です。www.qiagen.com/HB/PrimerAssay からダウンロードが可能です。
- **iCycler iQ®、iQ5**または**MyiQ**を使用する際は、ウェルファクターは各実験の初めに収集します。システムやピペッティングによるばらつきを補正する際にウェルファクターを使用します。詳細は英語版 Handbook 24 ページ、Appendix A あるいは機器に付属しているユーザーマニュアルをご覧ください。
- **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。詳細は英語版 Handbook 25 ページ、Appendix B をご覧ください。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix** (-20°C で保存の場合)、**テンプレートDNA**あるいは**cDNA**、**プライマー**、**RNaseフリー水**を解凍する。各溶液を混和する。

2. 表1に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタートPCRなので、反応のセットアップ中、あるいはリアルタイム用サーマルサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保冷する必要はありません。

注：2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix中に既に含有されている2.5 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5 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 SYBR Green PCR Master Mix* | 25 μl [†] | 1x |
| プライマーA | 適量 | 0.3 μM [‡] |
| プライマーB | 適量 | 0.3 μM [‡] |
| テンプレートDNAまたはcDNA (ステップ4で添加) | 適量 | ≤ 500 ng／反応 |
| RNaseフリー水 | 適量 | |
| オプション：Uracil-N-glycosylase (UNG) | 適量 | 0.5 unit／反応 |
| トータル反応容量 | 50 μl | |

* 最終濃度2.5 mMの MgCl_2 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の容量 (μl) = $0.5 \times$ [トータル反応容量 (μl)]

[‡] 通常は、最終プライマー濃度は0.3 μM が最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.2 μM から1 μM 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てPCRチューブあるいはプレートに適切な量を分注する。

4. **DNA**あるいは**cDNAテンプレート** (反応あたり**500 ng**以下)を反応ミックスの入ったそれぞれの**PCRチューブ**あるいは**ウェル**に添加する。

2ステップRT-PCRには、テンプレートとして加えるcDNA (未希釈の逆転写反応液から)の量が最終PCR容量の10%を超えないようにします。

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。

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 |
|-----------------------------------|------------|------------|---|
| オプション： UNG (キャリアオーバー防止) | 2分 | 50℃ | キャリアオーバーした dUMP を含む PCR 産物の来雑を UNG が除去 |
| 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 |
| 3 (4) ステップサイクリング | | | |
| 変性*： | 15秒 | 94℃ | |
| アニーリング： | 30秒 | 50～60℃ | プライマーの T_m より約 5～8℃ 低い温度 |
| エクステンション： | 30秒 | 72℃ | 追加データの収集を行なうオプションステップを行なわない場合には蛍光データの収集が行なわれる |
| オプション： データ収集 | 15秒 | x℃ | T_m ダイマー $< x < T_m$ 産物：詳細はステップ8と9を参照 |
| サイクル数： | 35～45 | | サイクル数はテンプレート DNA 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。

6. PCR チューブあるいはプレートを実タイム用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。

Applied Biosystems 7500 を使用される場合は、0.2 に設定されているデフォルトの “Manual Ct” threshold 値をさらに低く設定（例；0.02）することでデータ解析が適切に行なわれます。詳細は英語版 Handbook 25 ページ、Appendix B をご覧ください。

7. PCR産物の融解曲線解析を行なう。

PCR産物の同定と特異性の確認のためにこの融解曲線解析をルーチンに行なうことを推奨します。融解曲線解析はリアルタイム用サーマルサイクラーのソフトに組み込まれている解析ステップです。メーカーの説明書に従ってください。一般的には、融解曲線のデータは65～95℃の間で得られます。

注：PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green PCR Kitを用いて得られた T_m 値は、その他の試薬を用いて得られる値とは異なることがあります。

プライマーのデザインやターゲットのコピー数によって、プライマー・ダイマーが生じることがあります。これらの融解点は低いので、特異的な産物と区別することができます。

8. オプション：追加のデータ収集ステップのためのオプションステップを含んだ一連の操作を繰り返す。

プライマー・ダイマー形成によって起きる蛍光光度を抑えるために、3ステップのサイクリング・プロトコールにオプションのステップを入れて、追加のデータを収集することが可能です（4ページ、表2）。温度はプライマー・ダイマーの T_m より高く、特異的なPCR産物の T_m より約3℃低くします。プライマー・ダイマーが同時に増幅する場合には、この方法により、10の数乗の単位でダイナミックレンジおよび定量の信頼性が増加します。

9. オプション：アガロースゲル電気泳動によってPCR産物の特異性を調べる。

プロトコール：LightCycler 1.xおよび2.0を用いたリアルタイムPCR／2ステップRT-PCR

本プロトコールはLightCycler 1.xおよびLightCycler 2.0のみで使用可能です。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って行ないます。

実験を始める前の重要事項

- 既に確立されたプライマー・テンプレート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。表4（8ページ）およびステップ7（9ページ）に関しては特に注意してください。
- SYBR Green Iを用いた効率的なリアルタイムPCRには、ターゲットの長さを100～150 bpにするのが理想です。
- HotStarTaq DNA Polymeraseを活性化するため、PCRの最初に必ず95℃で15分間のインキュベーションを行なってください。
- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix中に既に含有されている2.5 mM Mg²⁺溶液で実験を始めることを推奨します。
- 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 SYBR Green 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。
- **QuantiTect Primer Assays**を使用する際は、QuantiTect Primer Assay Handbookのプロトコールに従ってください。日本語版のプロトコールとトラブルシューティングも入手可能です。www.qiagen.com/HB/PrimerAssayからダウンロードが可能です。

操作手順

1. **2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix** (-20℃で保存の場合)、**テンプレートDNA**あるいは**cDNA**、**プライマー**、**RNaseフリー水**を解凍する。各溶液を混和する。
2. 表3に従って反応ミックスを調製する。

ホットスタートPCRなので、反応のセットアップ中あるいはサイクラーのプログラミング中にサンプルを氷上に保冷する必要はありません。

注：2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix中に既に含有されている2.5 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5 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 SYBR Green PCR Master Mix* | 10 µl | 1x |
| プライマーA | 適量 | 0.5 µM† |
| プライマーB | 適量 | 0.5 µM† |
| テンプレートDNAまたはcDNA (ステップ4で添加) | 適量 | ≤1 µg／反応 |
| RNase フリー水 | 適量 | |
| オプション: Uracil-N-glycosylase (UNG) | 適量 | 0.5 unit／反応 |
| トータル反応容量 | 20 µl | |

* 最終濃度 2.5 mMのMgCl₂含有

† 通常は、最終プライマー濃度は0.5 µMが最適です。しかし、各々に最適なプライマー濃度は、0.5 µMから1 µM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。
4. DNAあるいはcDNAテンプレート(反応あたり1 ng以下)を反応ミックスの入ったそれぞれのPCRキャピラリーに添加する。
2ステップRT-PCRには、テンプレートとして加えるcDNA(未希釈の逆転写反応液から)の量が最終PCR容量の10%を超えないようにします。
5. 表4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5に記載されているようにfluorescence gainをセットする(LightCyclerソフトウェアのバージョンが3.5より古いものを使用の場合)

表4. 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 |
|-----------------------------------|------------|------------|--------------|--|
| オプション: UNG (キャリアオーバー防止) | 2分 | 50℃ | 20℃/秒 | キャリアオーバーした dUMPを含むPCR産物の 来雑をUNGが除去 |
| 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 (4) ステップサイクリング | | | | |
| 変性: | 15秒 | 94℃ | 20℃/秒 | |
| アニーリング: | 20~30秒 | 50~60℃ | 20℃/秒 | プライマーの T_m より 約5~8℃低い温度 |
| エクステンション: | 10~30秒 | 72℃ | 2℃/秒 | 追加データの収集オプ ションステップを行な わない場合には蛍光 データの収集が行なわ れる。エクステンショ ン時間は産物の長さに 依存する。100 bpあた り5秒、最低エクステ ンション時間は10秒に する。 |
| オプション: データ収集 | 5秒 | x℃ | 20℃/秒 | T_m ダイマー $< x < T_m$ 産物: 詳細はステップ8 と9を参照 |
| サイクル数: | 35~55 | | | サイクル数はテンプレ ートDNA量に依存 |

表5. 蛍光パラメーター

| Fluorimeter gain | Value |
|------------------|-------|
| Channel 1 (F1) | 15 |
| Channel 2 (F2) | 10 |
| Channel 3 (F3) | 10 |

Display mode : fluorescence channel 1/1 (F1/1)

LightCycler ソフトウェアバージョン3.5またはそれ以降のものは fluorescence channels用の fluorimeter gainが自動的に調節されます。ユーザーによるセッティングの必要はありません。

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。**

7. **PCR産物の融解曲線解析を行なう。**

PCR産物の同定と特異性の確認のためにこの融解曲線解析をルーチンに行なうことを推奨します。融解曲線解析の解析ステップは、LightCyclerのソフトに組み込まれています。メーカーの説明書に従ってください。一般的には、融解曲線のデータは65～95℃の間で得られます。

注：PCR産物の T_m 値は、バッファー組成と塩濃度に依存します。QuantiTect SYBR Green PCR Kitを用いて得られた T_m 値は、その他の試薬を用いて得られる値とは異なることがあります。

プライマーのデザインやターゲットのコピー数によって、プライマー・ダイマーが生じることがあります。これらの融解点は低いので、特異的な産物と区別することができます。

8. **オプション：追加のデータ収集ステップのためのオプションステップを含んだ一連の操作を繰り返す。**

プライマー・ダイマー形成によって起きる蛍光光度を抑えるために、3ステップのサイクリング・プロトコールにオプションのステップを入れて、追加のデータを収集することが可能です（8ページ、表4）。温度はプライマー・ダイマーの T_m より高く、特異的なPCR産物の T_m より約3℃低くします。プライマー・ダイマーが同時に増幅する場合には、この方法により、10の数乗の単位でダイナミックレンジおよび定量の信頼性が増加します。

9. **オプション：アガロースゲル電気泳動によってPCR産物の特異性を調べる。**

トラブルシューティングガイド

コメント

PCR産物がない、PCR産物の検出が遅れる、プライマーダイマーのみを検出

- | | | |
|----|--------------------------------------|---|
| a) | アニーリング時間が短すぎる | 推奨するアニーリング時間を用いる。 LightCycler 1.xおよび2.0 ：アニーリング時間は20～30秒。 その他のサイクラー ：アニーリング時間は30秒。 |
| b) | エクステンション時間が短すぎる | 常にプロトコールに記載されているエクステンション時間を用いる。 LightCycler 1.xおよび2.0 ：エクステンション時間はPCR産物100 bpあたり5秒、最低エクステンション時間は10秒にする。 その他のサイクラー ：エクステンション時間は500 bpまでのPCR産物で30秒。 |
| c) | Mg ²⁺ 濃度が最適ではない | いつも QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix に既に含まれている Mg ²⁺ 濃度でスタートする（最終濃度 2.5 mM）。いくつかのターゲットでは Mg ²⁺ 濃度を 5 mM まで増加して効果がある。0.5 mM 間隔の異なる濃度でテストする。 |
| d) | ピペット操作ミスあるいは試薬の入れ忘れ | プライマーや核酸テンプレートを含んだ試薬の濃度や保存条件をチェックする*。PCRをもう一度行なう。 |
| 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) | PCR産物が長すぎる | 最適な結果には、PCR産物は100～150 bpの長さにする。PCR産物の長さは500 bp以上にならないようにする。 |
| g) | アニーリング温度が高い | アニーリング温度を3℃ずつ下げる。 |

* 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

- h) プライマー・デザインが最適でない 融解曲線解析*あるいはゲル電気泳動でPCR産物をチェックする。特異的PCR産物が検出されない場合は、“アッセイデザインおよびプライマーの取り扱い”を再考する*。あるいは、リアルタイムRT-PCR用のデザイン済みプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 26ページ、ordering information 参照）。
- i) 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0.5 μM 。
その他のサイクラー：各プライマーの濃度は0.3 μM 。
- j) スタートテンプレートに問題 スタートのテンプレートの濃度、保存条件、品質についてチェックする*。
必要な場合には、テンプレート核酸のストック溶液の連続希釈系列を新しく調製する。これを用いてPCRを再度行なう。
- k) 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核酸がサンプル中に存在していることを確認する。
- l) サイクル数が足りない サイクル数を増やす。
- m) 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。
- n) 検出ステップが間違っている 蛍光検出がサイクリングプログラムのエクステンションステップで行なわれたか確認する。
- o) UNG処理を低温度のアニーリングと一緒に 行なった PCRを成功させるために55℃以下のアニーリング温度が必要な場合には、オプションのUNG処理は熱感受性UNGのみを用いて行なう。
- p) 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。
- q) **RT-PCRのみ**：添加した逆転写反応液量が多すぎる PCRに添加した逆転写反応液の量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性は低下する。通常添加する逆転写反応液量（未希釈）は、最終PCR量の10%を超えてはならない。

* 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

- r) **RT-PCRのみ** : RT-PCR産物が存在しないのは増幅や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*。
- s) **オプションのデータ収集ステップを行なっている場合** : 検出温度が高すぎる
データ収集ステップの温度を特異的な産物の T_m より 3°C 低くする。新しいプライマー/テンプレート系を使用する際に、最初からオプションのデータ収集（プロトコルのステップ8）は行なわず、プロトコル通りの通常の3ステップ・サイクリングで反応を行なう。

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

- t) 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、または SYBR Green I 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

- u) 選択した fluorescence gain が低すぎる
3.5 以前のソフトウェアバージョンを用いている場合には channel 1 の fluorescence gain が “15” にセットしてあることを確認する。

プライマー・ダイマーおよび/あるいは非特異的 PCR 産物

- a) Mg^{2+} 濃度が最適ではない
いつも QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix に既に含まれている Mg^{2+} 濃度でスタートする（最終濃度 2.5 mM ）。いくつかのターゲットでは Mg^{2+} 濃度を 5 mM まで増加して効果がある。 0.5 mM 間隔で濃度を増やしてみる。
- b) アニーリング温度が低すぎる
アニーリング温度を 2°C ずつ増やす。
- c) プライマー・デザインが最適でない
プライマーをデザインしなおす*。プライマーの再デザインが不可能な場合はプライマー・ダイマーの T_m より高い温度でのデータ収集ステップを加える（プロトコルのステップ5）。あるいは、リアルタイム RT-PCR 用のデザイン済みプライマーセット、QuantiTect Primer Assay を使用する（英語版 Handbook 26 ページの ordering information 参照）。
- d) PCR 産物が長すぎる
最適な結果には、PCR 産物は $100\sim 150\text{ bp}$ の長さにする。PCR 産物の長さは 500 bp 以上にならないようにする。

* 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

- e) プライマー・ダイマーと一緒に増幅
プロトコールに掲載されているように（5、9ページのステップ8）、サイクリングプログラムに追加の検出ステップを挿入し、プライマー・ダイマーの検出を避ける。
- f) 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。
- g) **RT-PCRのみ**：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をデザインする。あるいは、ゲノムDNAの増幅を回避するようにデザインされたプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 26ページのordering information参照）。
ゲノムDNAの除去とcDNA合成を一緒に行なえるQuantiTect Reverse Transcription Kitを用いて逆転写反応を行なう。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。

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量の最大量を超えないようにする。
LightCycler 1.xおよび2.0：1 μ g以上のゲノムDNAテンプレート量を使わない。
その他のサイクラー：500 ng以上のゲノムDNAテンプレート量を使わない。
- b) テンプレートの量が
低すぎる
可能な場合はテンプレート量を増やす。
- c) プライマー・ダイマーと一緒に増幅
プロトコールに掲載されているように（5、9ページのステップ8）、サイクリングプログラムに追加の検出ステップを挿入し、プライマー・ダイマーの検出を避ける。
- d) **RT-PCRのみ**：添加した逆転写反応液量が
多すぎる
PCRに添加した逆転写反応液の量が多すぎると、増幅効率と反応の直線性は低下する。通常添加する逆転写反応液量（未希釈）は、最終PCR量の10%を超えてはならない。

コメント

“No Template” コントロールで強い蛍光強度

- a) 試薬のコタミ 反応に使用した試薬を捨てて、新しい試薬でもう一度PCRを繰り返す。
- b) 反応セットアップ中にコタミネーション 適切な対応策を講じる（例；フィルターチップを使用）。
測定済み反応液からのキャリーオーバーを防ぐためにuracil-N-glycosylaseを使用する。

“No Reverse Transcription” コントロールで高い蛍光強度（RT-PCRのみ）

- RNAサンプル中にゲノムDNAが混在 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をデザインする。あるいは、ゲノムDNAの増幅を回避するようにデザインされたプライマーセット、QuantiTect Primer Assayを使用する（英語版 Handbook 26ページのordering information参照）。
ゲノムDNAの除去とcDNA合成を一緒に行なえるQuantiTect Reverse Transcription Kitを用いて逆転写反応を行なう。あるいはコ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の汚染 使用説明書に従って、リアルタイム用サーマルサイクラーの汚染を除去する。
- b) 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 使用説明書に従って、リアルタイム用サーマルサイクラーを較正しなおす。

Applied Biosystems、Bio-Rad、Stratageneのサイクラーのみ：

- c) 高濃度のテンプレートで曲線が波打つ ベースラインを計算するために使用したサイクル数を減らす。

LightCycler 1.xおよび2.0のみ：

- d) 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PCRミックスを入れるために、キャピラリーを遠心する。
- e) キャピラリーが完全に押し込まれてない 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。
- f) **LightCycler 1.xのみ：** Detection channelが間違っている Channel 1を選んだことを確認する。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq®, QuantiTect® (QIAGEN Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems® (Applied Biosystems Corporation or its subsidiaries); Bio-Rad®, iCycler iQ® (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Eppendorf® (Eppendorf AG); Roche®, LightCycler® (Roche Group); Cepheid®, SmartCycler® (Cepheid); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); Stratagene® (Stratagene).

The purchase price of this product (QuantiTect SYBR Green PCR Kit) includes a limited, non-transferable immunity from suit under U.S. Patents Nos. 5,994,056 and 6,171,785 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 the product for dsDNA-binding dye processes covered by said patents solely for the purchaser's own internal research. This product is also a Licensed dsDNA Dye Binding Kit for use with service sublicenses available from Applied Biosystems. 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 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 SYBR Green 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.

NOTICE TO PURCHASER: DISCLAIMER OF LICENSE

This product (QuantiTect Primer Assays) is compatible for use in real-time PCR methodologies, including 5' nuclease processes and dsDNA-binding dye processes claimed in patents owned by Roche Molecular Systems, Inc., F. Hoffmann-La Roche Ltd, and Applied Biosystems Corporation. No right to perform any of these patented processes is conveyed, expressly, by implication or by estoppel to the purchaser by the purchase of this product. A license to use these patented processes for the purchaser's own internal research accompanies the purchase of certain reagents of Applied Biosystems and other licensed suppliers, or is available from Applied Biosystems. 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。

© 2001–2009 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

