

# Type-it™ HRM PCR プロトコールとトラブルシューティング

HRM (High Resolution Melt) 解析による遺伝子変異および  
SNP の検出

目次	ページ
プロトコール	
遺伝子変異および微生物の遺伝的差異を HRM により解析	2
HRM による SNP 解析	9
トラブルシューティング	17



# プロトコール：遺伝子変異および微生物の遺伝的差異をHRMにより解析

本プロトコールはRotor-Gene™ Q、Rotor-Gene 6000、LightCycler® 480を用いた実験に最適化されています。特殊な装置あるいは新規のHRM装置を用いたHRM解析用プロトコールはすべて [www.qiagen.com/Products/Type-itHRMPCRKit.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Type-itHRMPCRKit.aspx) で入手いただけます。

## 実験を始める前の重要事項

- 良好な結果を得るために、ハンドブックに記載の最適化プロトコールに**必ず**従ってください。
- **0.7 μMのプライマー濃度を常に使用してください。**
- Mg<sup>2+</sup>濃度あるいはアニーリング温度の最適化は必要ありません。
- **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。**
- 正確なジェノタイピング結果を得るためには最適な装置とHRM解析設定が必須です。詳細に関してはHRM解析機能付きリアルタイムPCR装置に添付のマニュアルをご覧ください。

## 操作手順

1. **2x HRM PCR Master Mix、プライマー溶液、RNaseフリー水、DNAテンプレートおよびコントロールDNA（オプション）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。
2. **表1（3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。  
反応セットアップは室温（15～25℃）で行ないます。ただし、各試薬、サンプル、コントロールは氷上で保冷する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. **等量のDNAテンプレート（1～50 ngのゲノムDNAあるいは1～50 pgの微生物DNA、各サンプルの容量を同量にする）を個々のPCRチューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。**  
すべてのサンプルのC<sub>T</sub>値が30以下になるような十分量のDNAを添加します。C<sub>T</sub>値が3サイクル以上異なるサンプルは使用しないでください。

表 1. 2x HRM PCR Master Mix を用いる場合の反応成分

成分	容量 / 25 $\mu$ l 反応 *	容量 / 10 $\mu$ l 反応 (384 ウェル プレート)	最終濃度
<b>反応ミックス</b>			
2x HRM PCR Master Mix	12.5 $\mu$ l	5.0 $\mu$ l	1x
10 $\mu$ M プライマー ミックス†	1.75 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	0.7 $\mu$ M forward primer 0.7 $\mu$ M reverse primer
RNase フリー水	適量	適量	-
<b>DNA テンプレート</b> (ステップ 4 で添加)	適量 (全ての反応で 等容量)	適量 (全ての反応で 等容量)	真核細胞 : 1 ~ 50 ng DNA / 反応 微生物 : 1 ~ 50 pg DNA / 反応 (各反応で同量を 用いる)
<b>トータル容量 / 反応</b>	<b>25 <math>\mu</math>l*</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	<b>-</b>

\* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが 25  $\mu$ l 以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節する。

† 10  $\mu$ M プライマーミックスは 10  $\mu$ M forward primer と 10  $\mu$ M reverse primer で構成されている。

5. 表 2 (4 ページ) あるいは表 3 (6 ページ) 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。

注：リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルをチェックして装置のセットアップを正しく行なってください。

6. リアルタイム用サーマルサイクラーに PCR チューブあるいはプレートをセットして、PCR サイクリング・プログラムをスタートし、次に HRM 解析を行なう。

7. データ解析を行なう。

リアルタイム PCR および HRM のデータ解析を実施する前に、解析用に設定を行ないます。詳細はリアルタイム PCR 装置のマニュアルをご覧ください。

注：本誌に記載されていないリアルタイム用サーマルサイクラーは HRM 解析ができない可能性があります。

表2. Rotor-Gene QおよびRotor-Gene 6000でのHRM解析用に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
PCR 初期活性化	5分	95℃	HotStarTaq® Plus DNA Polymeraseはこの加熱ステップで活性化される。
<b>3ステップサイクリング：</b>			<b>重要：</b> これら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	10秒	95℃	
アニーリング	30秒	55℃	
エクステンション	10秒	72℃	
			Green channelで蛍光取り込みを行なう。 350 bpまでのPCR産物に最適。 350 bpを越えるPCR産物ではPCR産物25 bp当たり1秒のエクステンション時間を追加する。
サイクル数	40		10～50 ngのDNAテンプレート または10～50 pgの微生物DNA
	45		
HRM	2秒	65～95℃* 0.1℃間隔	蛍光取り込みに関する詳細は英語版Handbook 10ページを参照。

\* HRM解析する新規のPCR産物ごとに融点をまず決める必要がある。予想される融点を完全にカバーする65～95℃の温度領域にわたってHRM解析を行なう。 $T_m$ が決定後のHRM解析実験からは予想される全PCR産物の最小 $T_m$ 値から5℃低い温度と最大 $T_m$ 値よりも5℃高い温度領域でHRMを行なうことが可能。これによりHRM解析に必要な時間を短縮可能。

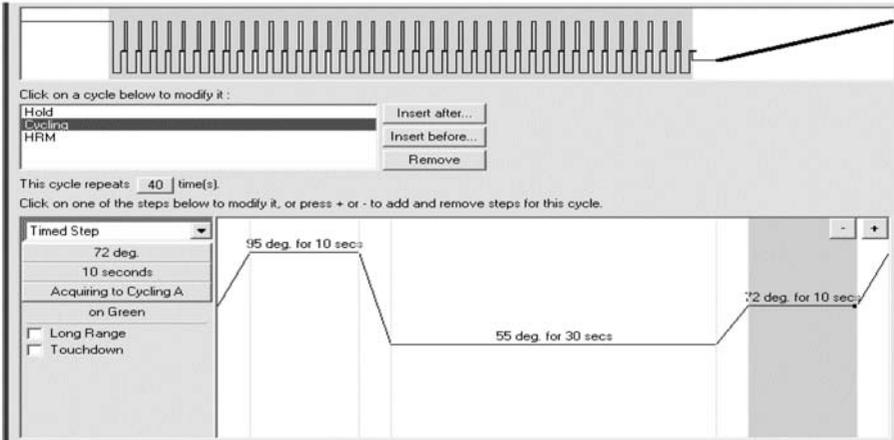


図1. Rotor-Gene システムでの遺伝子変異解析用サイクリングプロトコルのプログラミング

重要：HotStarTaq Plus DNA Polymeraseを活性化するために“hold” ステップを95℃、5分にセットする(未提示)。サイクリングステップには95℃で10秒、55℃で30秒、72℃で10秒間を使用し、72℃のステップにおいて green channelでCycling Aに蛍光取り込みを行なう。サイクル数を調節する；スタートポイントとして40を使用。詳細は表2を参照。HRMプロトコルのプログラミングを図2に示す。

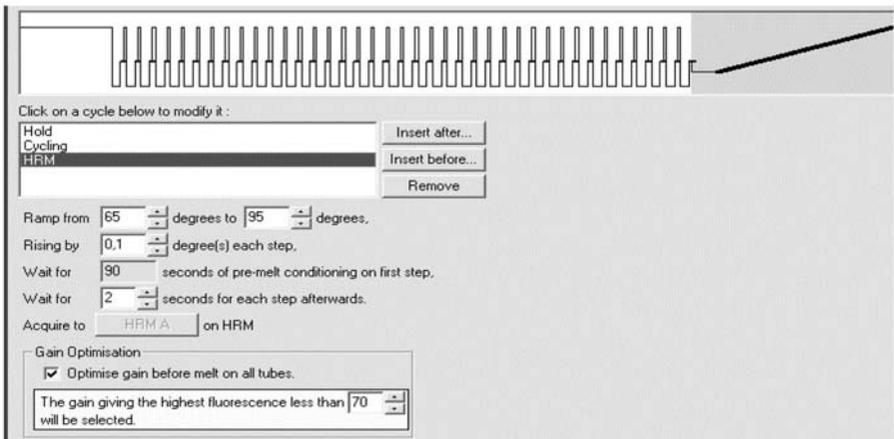


図2. Rotor-Gene システムでのHRM解析用プログラミング

図1、表2に記載されているように遺伝子変異解析のためにサイクリングプロトコルをプログラミングする。HRM解析に関しては、ランプを65～95℃に、温度上昇は各ステップあたり0.1℃間隔にセットする。

表3. LightCycler 480でのHRM解析用に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
PCR 初期活性化	5分	95℃	重要：検出フォーマットを選択：SYBR® Green I/HRM Dye HotStarTaq Plus DNA Polymeraseはこの加熱ステップで活性化される。
3ステップサイクリング：			重要：これら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	10秒	95℃	
アニーリング	30秒	55℃	
エクステンション	10秒	72℃	“single”で蛍光取り込みを行なう。 350 bpまでのPCR産物に最適。 350 bpを越えるPCR産物ではPCR産物25 bp当たり1秒のエクステンション時間を追加する。
サイクル数	45		10～50 ngのDNAテンプレート または10～50 pgの微生物DNA
	50		1～9 ngのDNAテンプレート または1～9 pgの微生物DNA
HRM	1秒	65℃* 95℃*	解析モード：Melting curve 蛍光取り込みを続ける。 ランプ速度：0.02℃/秒 毎秒25取り込み
冷却	1秒	40℃	HRM終了後サンプルを冷却

注：加熱および冷却に関しては最大のランプ速度を設定する。

\* HRM解析する新規のPCR産物ごとに融点をまず決める必要がある。予想される融点を完全にカバーする65～95℃の温度領域にわたってHRM解析を行なう。 $T_m$ が決定後のHRM解析実験からは予想される全PCR産物の最小 $T_m$ 値から5℃低い温度と最大 $T_m$ 値よりも5℃高い温度領域でHRMを行なうことが可能。これによりHRM解析に必要な時間を短縮可能。

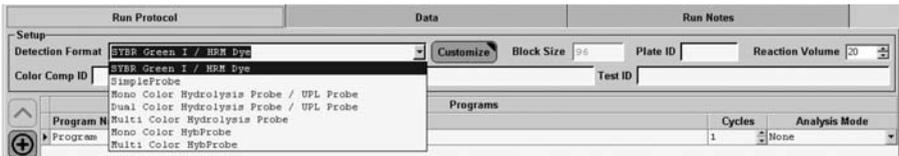


図3. LightCycler 480でのHRM解析用プログラミング

“Detection Format”の選択：SYBR Green I/HRM Dye

注：EvaGreen色素検出用のチャンネルを選択していない場合、蛍光強度の低下が観察されることがある。

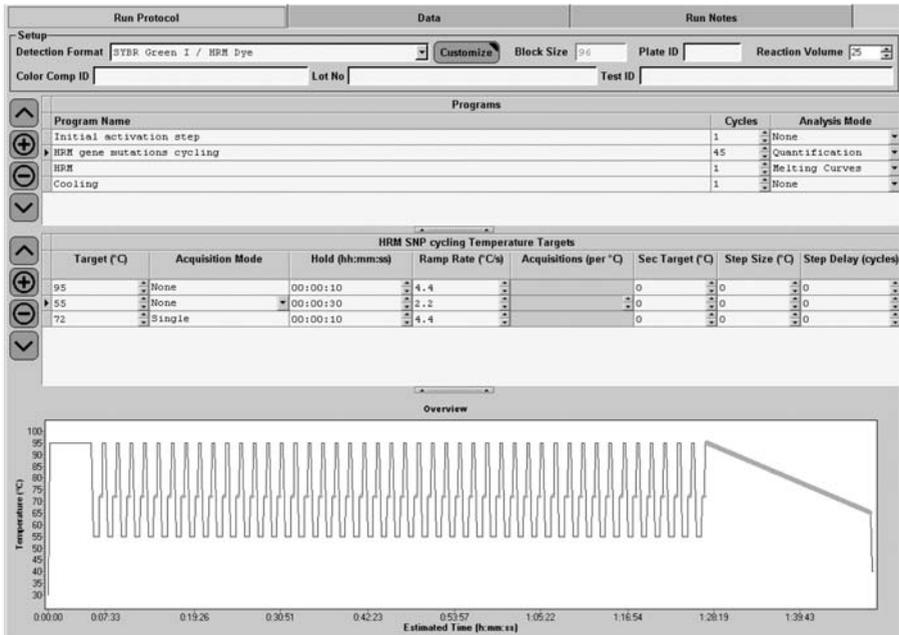


図4. LightCycler 480システムでの遺伝子変異解析用サイクリングプロトコルのプログラミング

注：時間はhh:mm:ssのフォーマットでインプットする。重要：HotStarTaq Plus DNA Polymeraseを活性化するために最初の活性化ステップを95℃、00:05:00（5分）にセットする（未提示）。サイクリングステップは、95℃で00:00:10（10秒）、55℃で00:00:30（30秒）、72℃で00:00:10（10秒）を用いる。72℃のステップのみ“Acquisition Mode”は“Single”を選ぶ。サイクル数を調節する；スタートポイントとして45を使用。詳細は表3を参照。全ステップで加熱/冷却速度を最大に設定する。HRMプロトコルのプログラミングを図5に示す。HRMの後サンプルを冷却したい場合は、最後のサイクルの後に40℃で00:00:01（1秒）を入れる（未提示）。

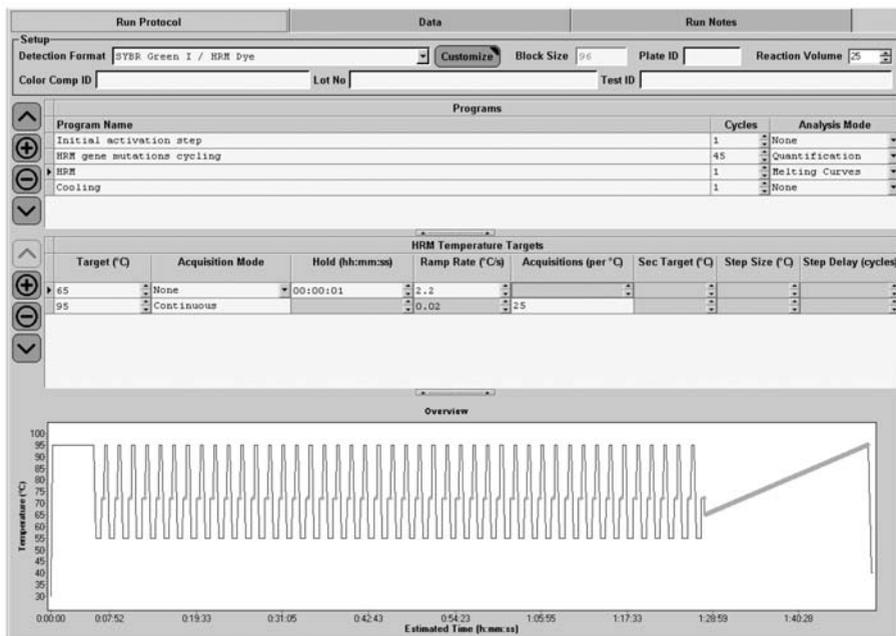


図5. LightCycler 480でのHRM解析用プログラミング

注：時間はhh:mm:ssのフォーマットで入力する。図4に記載されているサイクリングプロトコルをプログラミングする。HRM解析に関しては65°Cおよび95°Cで00:00:01（1秒）を使用する。“Acquisition Mode”の“Continuous”で1秒当たり25 acquisitionsにして、ランプ速度を0.02°C/sにする。HRMの後サンプルを冷却したい場合は、最後のサイクルの後に40°Cで00:00:01（1秒）を入れる（未提示）。

# プロトコール：HRMによるSNP解析

本プロトコールはRotor-Gene Q、Rotor-Gene 6000、LightCycler 480を用いた実験に最適化されています。特殊な装置および新規のHRM装置を用いたHRM解析用プロトコールはすべて [www.qiagen.com/Products/Type-itHRMPCRKit.aspx](http://www.qiagen.com/Products/Type-itHRMPCRKit.aspx) で入手いただけます。

## 実験を始める前の重要事項

- 良好な結果を得るために、ハンドブックに記載の至適化プロトコールに必ず従ってください。
- **0.7  $\mu$ M**のプライマー濃度を常に使用してください。
- $Mg^{2+}$ 濃度あるいはアニーリング温度の至適化は必要ありません。
- 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。
- 正確なジェノタイピング結果を得るためには最適な装置とHRM解析設定が必須です。詳細に関してはHRM解析機能付きリアルタイムPCR装置に添付のマニュアルをご覧ください。

## 操作手順

1. **2x HRM PCR Master Mix、プライマー溶液、RNase フリー水、DNA テンプレート** および**コントロールDNA (オプション)** 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。
2. **表4 (10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。  
反応セットアップは室温 (15~25℃) で行ないます。ただし、各試薬、サンプル、コントロールは氷上で保冷する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 プレーートのウェルに適切な量を分注する。**
4. **等量のDNA テンプレート (1~50 ngのゲノムDNAあるいは1~50 pgの微生物DNA、各サンプルの容量を同量にする) を個々のPCR チューブあるいはウェルに添加し、完全に混和する。**  
すべてのサンプルの $C_T$ 値が30以下になるような十分量のDNAを添加します。  
 $C_T$ 値が3サイクル以上異なるサンプルは使用しないでください。

表4. 2x HRM PCR Master Mixを用いる場合の反応成分

成分	容量/25 $\mu$ l 反応*	容量/10 $\mu$ l 反応 (384ウェル プレート)	最終濃度
<b>反応ミックス</b>			
2x HRM PCR Master Mix	12.5 $\mu$ l	5.0 $\mu$ l	1x
10 $\mu$ M プライマー ミックス†	1.75 $\mu$ l	0.7 $\mu$ l	0.7 $\mu$ M forward primer 0.7 $\mu$ M reverse primer
RNase フリー水	適量	適量	-
<b>DNAテンプレート</b> (ステップ4で添加)	適量 (すべての 反応で等量)	適量 (すべての 反応で等量)	真核細胞: 1 ~ 50 ng DNA/反応 微生物: 1 ~ 50 pg DNA/反応 (各反応で同量を 用いる)
<b>トータル容量/反応</b>	<b>25 <math>\mu</math>l*</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>	<b>-</b>

\* 使用するリアルタイム用サーマルサイクラーが25  $\mu$ l以外の最終反応量を必要とする場合には、その量に応じてマスターミックスとその他の反応液成分の量を調節する。

† 10  $\mu$ M プライマーミックスは10  $\mu$ M forward primerと10  $\mu$ M reverse primerで構成されている。

5. 表5 (11ページ) あるいは表6 (14ページ) 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。

注: リアルタイム用サーマルサイクラーのユーザーマニュアルをチェックして装置のセットアップを正しく行なってください。

6. リアルタイム用サーマルサイクラーにPCRチューブあるいはプレートをセットして、PCRサイクリング・プログラムをスタートし、次にHRM解析を行なう。

7. データ解析を行なう。

リアルタイムPCRおよびHRMのデータ解析を実施する前に、解析用に設定を行ないます。詳細はリアルタイムPCR装置のマニュアルをご覧ください。

注: 本誌に記載されていないリアルタイム用サーマルサイクラーはHRM解析ができない可能性があります。

表 5. Rotor-Gene Q および Rotor-Gene 6000 での SNP の HRM 解析用に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
PCR 初期活性化	5 分	95 °C	HotStarTaq Plus DNA Polymerase はこの加熱ステップで活性化される。
<b>2ステップサイクリング：</b>			<b>重要：これら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。</b>
変性	10 秒	95 °C	
アニーリング/ エクステンション	30 秒	55 °C	Green channel で蛍光取り込みを行なう。200 bp までの PCR 産物に最適。200 bp を越える PCR 産物では PCR 産物 25 bp 当たり 1 秒のエクステンション時間を追加する。
サイクル数	40		10 ~ 50 ng の DNA テンプレート または 10 ~ 50 pg の微生物 DNA
	45		
HRM	2 秒	65 ~ 95 °C* 0.1 °C 間隔	蛍光取り込みを行なう。

\* HRM 解析する新規の PCR 産物ごとに融点をまず決める必要がある。予想される融点を完全にカバーする 65 ~ 95 °C の温度領域にわたって HRM 解析を行なう。 $T_m$  が決定後の HRM 解析実験からは予想される全 PCR 産物の最小  $T_m$  値から 5 °C 低い温度と最大  $T_m$  値よりも 5 °C 高い温度領域で HRM を行なうことが可能。これにより HRM 解析に必要な時間を短縮可能。

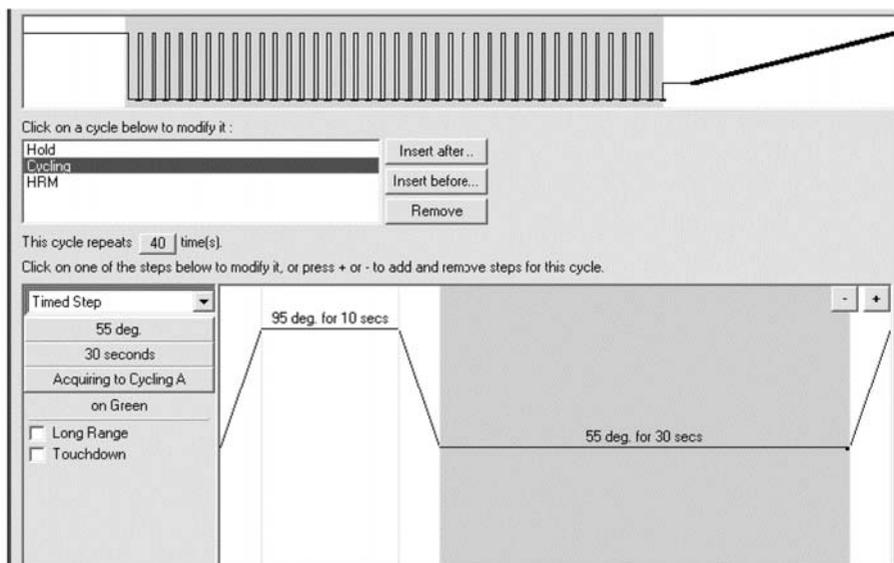


図 6. Rotor-Gene システムでの SNP 解析用サイクリングプロトコルのプログラミング

重要： HotStarTaq Plus DNA Polymerase を活性化するために “hold” ステップを 95 °C、5 分にセットする（未提示）。サイクリングステップには 95 °C で 10 秒、55 °C で 30 秒を使用し、55 °C のステップにおいて green channel で Cycling A に蛍光取り込みを行なう。サイクル数を調節する；スタートポイントとして 40 を使用。詳細は表 5 を参照。HRM プロトコルのプログラミングを図 7 に示す。

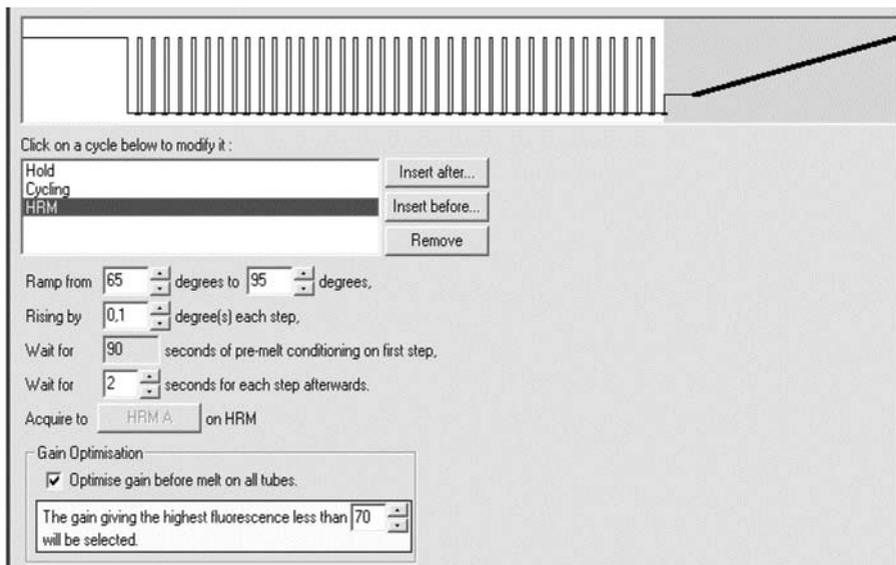


図7. Rotor-Gene システムでのHRM解析用プログラミング

図6と表5に記載されているサイクリングプロトコルをプログラミングする。HRM解析に関しては、ランブを65～95℃に、温度上昇は各ステップあたり0.1℃間隔にセットする。

表 6. LightCycler480での SNP の HRM 解析用に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
PCR 初期活性化	5 分	95 °C	重要：検出フォーマットを選択：SYBR Green I/HRM Dye 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：これら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	10 秒	95 °C	
アニーリング/ エクステンション	30 秒	55 °C	“single” 蛍光取り込みを行なう。200 bp までの PCR 産物に最適。  200 bp を越える PCR 産物では PCR 産物 25 bp 当たり 1 秒のエクステンション時間を使用。
サイクル数	45 50		10～50 ng の DNA テンプレート または 10～50 pg の微生物 DNA 1～9 ng の DNA テンプレート または 1～9 pg の微生物 DNA
HRM	1 秒	65 °C * 95 °C *	解析モード：Melting curve  蛍光取り込みを続ける。 ランプ速度：0.02 °C/秒 毎秒 25 取り込み
冷却	1 秒	40 °C	HRM 終了後サンプルを冷却

注：加熱および冷却に関しては最大のランプ速度を設定する。

\* HRM 解析する新規の PCR 産物ごとに融点をまず決める必要がある。予想される融点を完全にカバーする 65～95 °C の温度領域にわたって HRM 解析を行なう。 $T_m$  が決定後の HRM 解析実験からは予想される全 PCR 産物の最小  $T_m$  値から 5 °C 低い温度と最大  $T_m$  値よりも 5 °C 高い温度領域で HRM を行なうことが可能。これにより HRM 解析に必要な時間を短縮可能。

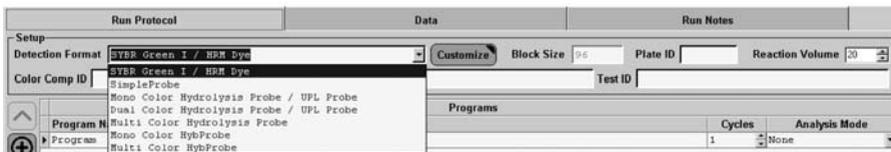


図8. LightCycler 480でのHRM解析用プログラミング

“Detection Format”の選択：SYBR Green I/HRM Dye

注：EvaGreen色素検出用のチャンネルを選択していない場合、蛍光強度の低下が観察されることがある。

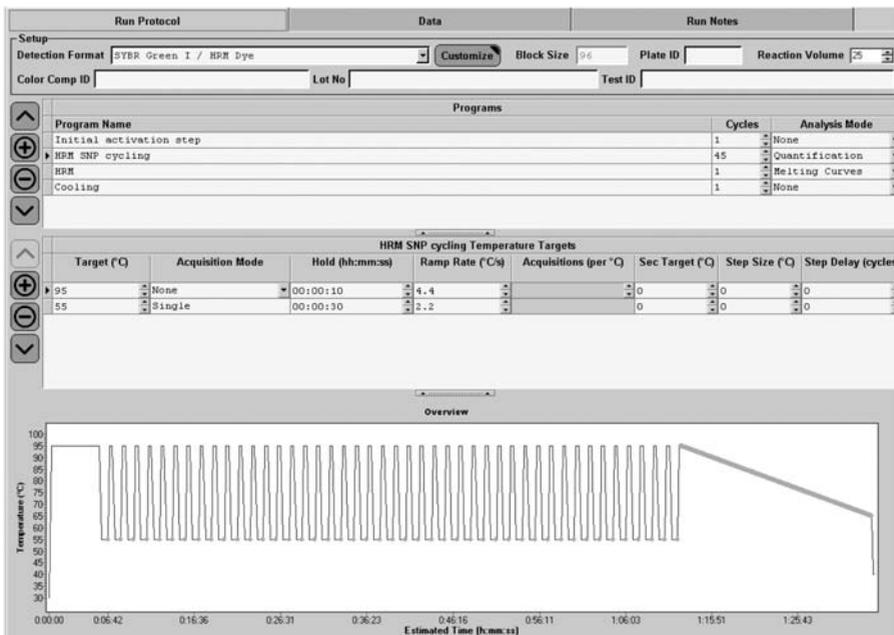


図9. LightCycler 480システムでのSNP解析用サイクリングプロトコルのプログラミング

注：時間はhh:mm:ssのフォーマットでインプットする。重要：HotStarTaq Plus DNA Polymeraseを活性化するために最初の活性化ステップを95℃、00:05:00（5分）にセットする（未提示）。サイクリングステップには95℃で00:00:10（10秒）および55℃で00:00:30（30秒）を用いる。55℃のステップのみ“Acquisition Mode”は“Single”を選ぶ。サイクル数を調節する；スタートポイントとして45を使用。詳細は表6を参照。全ステップで加熱/冷却速度を最大に設定する。HRMプロトコルのプログラミングを図10に示す。HRMの後サンプルを冷却したい場合は、最後のサイクルの後に40℃で00:00:01（1秒）を入れる（未提示）。

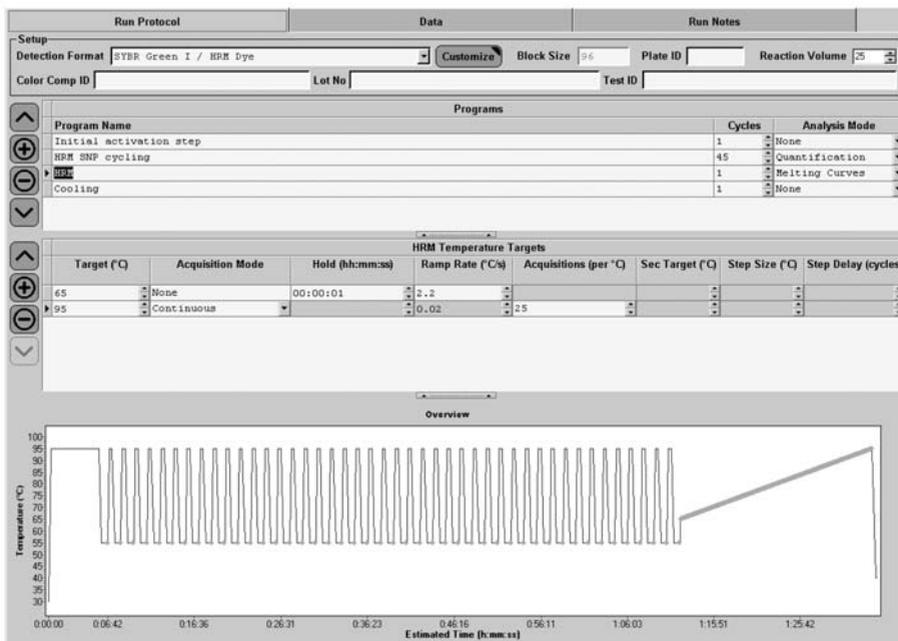


図 10. LightCycler 480でのHRM解析用プログラミング

注：時間はhh:mm:ssのフォーマットでインプットする。図9に記載されているサイクリングプロトコルをプログラミングする。HRM解析に関しては65°Cおよび95°Cで00:00:01（1秒）を使用する。“Acquisition Mode”の“Continuous”で1秒当たり25 acquisitionsにして、ランプ速度を0.02°C/sにする。HRMの後サンプルを冷却したい場合は、最後のサイクルの後に40°Cで00:00:01（1秒）を入れる（未提示）。

# トラブルシューティング

## コメント

PCRあるいはHRMでシグナルがない、 $R_n$ 値が低い、あるいはPCRで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。プライマー濃度を評価する際の詳細は英語版 Handbook 30ページ、Appendix C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  
リアルタイム解析に関して、遺伝子変異プロトコールでは72℃のエクステンション・ステップで、SNPプロトコールではアニーリング/エクステンションを組み合わせたステップで蛍光取り込みが行なわれていることを確認する。
- e) PCR効率が低い  
このプロトコールに記載されているプライマー濃度を使用する。プライマー濃度を決める際の詳細は英語版 Handbook 30ページ、Appendix Cを参照する。  
サンプルを繰り返して凍結・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。
- f) スタートのDNAテンプレートに問題  
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、ストック溶液を用いてDNAテンプレートの段階希釈液を再調製する。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。  
核酸テンプレート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。

## コメント

- g) DNAテンプレートが不十分あるいは分解      テンプレート量とPCRサイクル数が本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（表1～6）。可能ならDNAテンプレート量を増やす。

**“No Template” コントロール (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) 試薬がコンタミ      解析に使用した試薬（例；マスターミックス、プライマー）を全て廃棄する。コンタミしていないピペットとキット、試薬で実験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。

**Replicates あるいはサンプル間でシグナルが変動**

- a) DNAテンプレートに問題      サンプルのDNA濃度を再チェックする。  
すべてのサンプルで等量のDNAを使用し、全サンプルにおいて $C_T$ 値に3サイクル以上の差がないことを確認する。  
サンプル中のゲノムDNAの完全性をチェックするために異なるHRMジェノタイピング・アッセイを使用する。  
非常に微量あるいは新規の遺伝子変異により予想される領域以外にシグナルが存在することがあることに注意する。
- b) ウェルに気泡      PCRを開始する前に、プレート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。
- c) 反応成分が適切に混和されていない      プロトコールの混和操作に従う。
- d) 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。
- e) 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。

Trademarks: QIAGEN®, HotStarTaq® Type-it™ (QIAGEN Group); Rotor-Gene™ (Corbett Research Pty Ltd); LightCycler® (Roche Group); SYBR® (Molecular Probes, Inc.).

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license under U.S. patent No. 5,871,908 and all continuations and divisional, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics application with authorized reagents with regard to Melting Curve Analysis. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party.

The purchase price of this product 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.

This product is provided under an agreement between BIOTIUM, INC. and QIAGEN and the manufacture, use, sale or import of this product is subject to one or more of U.S. Patent Nos., application Nos. and corresponding international equivalents, owned by BIOTIUM and ALLELOGIC. 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, where such research does not include testing, analysis or screening services for any third party in return for compensation on a per test basis. The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for 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. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact BIOTIUM, INC., Business Development, 3423 Investment Blvd, Suite 8, Hayward, CA 94545 Tel: 510-265-1027, Fax: 510-265-1352.

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。

© 2009 QIAGEN, all rights reserved.

---

[www.qiagen.co.jp](http://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

