

Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit

カタログ番号 F10471、F10472、F10473

表 1. 製品内容および保存方法

試薬	量			保存方法*	安定性
	F10471	F10472	F10473		
Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイ試薬 (Component A)	10 × 10 mL	1 × 100 mL	1 × 1 L	• -20℃ 以下 • 乾燥条件 • 遮光	説明書の指示に従って保存した場合、最低 6 か月間は安定です。
水溶性プロベネシド (Component B)	2 × 77 mg	2 × 77 mg	1 × 1.54 g		
Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー (Component C)	200 mL	200 mL	含まれません		
* 届いたキット全体の保存に適した保存条件です。各構成品の最適な保存条件に関しては、各バイアルのラベルを参照してください。					
アッセイ数: 下記のプロトコルに基づいて、96 または 384 ウェルのプレート 20 枚分 (Starter Pack、カタログ番号 F10471)、1 × 100 mL により 96 または 384 ウェルのプレートを 20 枚分 (Surveyor Pack、カタログ番号 F10472)、1 × 1 L により 96 または 384 ウェルのプレートを 200 枚分 (High-Throughput Pack、カタログ番号 F10473) のアッセイを行うのに十分な量が含まれます。					
およその励起/蛍光最大波長: Fluo-4 Direct™カルシウム試薬: 495/516 nm					

はじめに

Fluo-4 Direct™は、インビトロジェン製品のラインナップを補完する進化した蛍光性 Ca^{2+} インジケータで、アッセイにおける大きな課題であるバックグラウンド蛍光を解消します。蛍光性 Ca^{2+} インジケータは、リガンド開口型および電位開口型のチャネル活性の測定に加え、創薬ターゲットとして広く活発に研究されている G タンパク質共役受容体 (GPCRs) を介するアゴニスト刺激性またはアンタゴニスト阻害性のカルシウムシグナル伝達の細胞内測定など、広く使用されています。蛍光性 Ca^{2+} インジケータは、可視光励起波長、高感受性、および Ca^{2+} 結合による蛍光強度の大きな増加といった特長を有することから、カルシウム検出に最も適した方法となってきました。また、ホモジニアスな細胞ベースのカルシウムアッセイは、少ないステップ数、低い変動性、および簡便なプロトコルを実現出来ることから広く普及してきました。このような特長により、多くのステップの自動化が可能となることから、ハイスループットの実現に重要なマルチウェルマイクロプレートを用いたアッセイに使用されてきています。しかし、従来の蛍光性 Ca^{2+} インジケータの多くは、培地の除去および洗浄ステップを行わないと良好な結果が得られませんでした。

Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit は、当社独自のアッセイ組成で、培地中で培養している細胞が含まれるウェルに直接添加することが可能で、培地の除去および洗浄ステップが不要です。ワークフローから培地の除去ステップを排除することで、より簡便で迅速なアッセイが可能となり、標準的な fluo-4 アッセイに比べて変動性が減少し、Z'値が向上しています。培地によるベースライン蛍光への影響は、バックグラウンド蛍光を低減させるサプレッサー色素を添加していることで低減されます。

細胞外蛍光を生じるもう 1 つの原因として、有機陰イオン輸送体によるインジケータの細胞外流出が挙げられます。Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit には、有機陰イオン輸送体を阻害しベースラインシグナルを減少させるために広く用いられている当社独自の水溶性プロベネシドが含まれています。水溶性のプロベネシドはバッファーへの溶解が容易で、溶解に腐食性の 1 M NaOH を必要とする遊離酸型プロベネシドと比較して安全に使用できます。Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit は、マイクロプレートおよびハイスループットスクリーニング (HTS) 用に開発された製品で、接着性細胞および非接着性細胞のいずれのアッセイにもご使用いただけます。Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit Starter Pack (カタログ番号 F10471) および Surveyor Pack (カタログ番号 F10472) は、マイクロプレート 20 枚分の試薬および Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー (Component C) が含まれます。Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit High-Throughput Pack (カタログ番号 F10473) は、マイクロプレート 200 枚分の試薬が含まれますが、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー (Component C) は含まれません。

実験準備

お客様にご用意 いただくもの

- 細胞および培養液
- poly-D-Lysine でコートした 96 または 384 ウェルのマイクロプレート
ハイスループットキット用のみ：
- 1.5 L の 1X ハンクス平衡塩 (HBSS) (インビトロジェン社カタログ番号 14025-092)
- 30 mL の 1 M HEPES バッファー液 (インビトロジェン社カタログ番号 15630-106)

注意

プロベネシド (Component B) は、飲み込むと有害です。本試薬を取り扱う際には、防護服、手袋、安全眼鏡を着用してください。

一般的推奨事項

- 試薬は実験当日に調製してください。試薬溶液を調製する際には、Component A および Component B が完全に溶解していることを確認してください。
- 含まれる試薬の量は、1 回当たり 2 枚 (Starter パック)、20 枚 (Surveyor パック)、および 200 枚 (ハイスループットパック) のマイクロプレートアッセイ用となっています。お客様の実験に合わせてスケールアップを行ってください。

- 下記に示す方法では、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイ試薬は2倍濃縮溶液となっています。培養液を除去し、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイ試薬を直接細胞に添加する場合には、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイ試薬を培養液またはアッセイバッファーで希釈し、1倍溶液として使用してください。例えば、Starter Pack（カタログ番号 F10471）をご使用の場合、試薬をウェルに添加する前に、1ボトルあたり 10 mL のバッファーを追加して試薬濃度を 1 倍に希釈することが必要となります。また、1倍の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液をご使用になる場合、プロベネシドの最終濃度は 2.5 mM となりますので、細胞毒性を示す可能性のあるプロベネシドを追加する必要はありません。
- Component A から調製した Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイ試薬の溶液は、-20°C で 7 日間まで冷凍保存が可能で、保存した試薬を用いた実験でも良好な結果が得られます。

接着性細胞用の実験プロトコール

細胞の準備

接着性細胞を 96 または 384 ウェルのマイクロプレート（poly-D-Lysine でコートしたプレートの使用を推奨しています）内で、コンフルエント近くまで培養します。以下に示すアッセイは、M1WT3（CHO M1）細胞株（ATCC カタログ番号 CRL-1985™）、GeneBLAzer® M1-NFAT-*bla* Jurkat（インビトロジェン社カタログ番号 K1710）、GeneBLAzer® H1-NFAT-*bla* HEK293T（インビトロジェン社カタログ番号 K1703）、および BacMam によりムスカリン性 1 およびムスカリン性 3 の GPCRs を発現している U-2 OS 細胞（ATCC カタログ番号 HTB-96™）を用いて開発したものです。

384 ウェルのプレートでは、CHO、U-2 OS、および HEK293 細胞を 1 ウェルあたり 5,000~10,000 細胞の割合で播き、一晚培養します。96 ウェルのプレートを使用する場合には、1 ウェルあたりの細胞数を 4~8 倍とします。別の方法として、細胞をより高密度に播き、4~6 時間のインキュベーション後に使用するという方法も可能ですが、この方法で良好な結果が得られるかどうかは細胞タイプに依存します。

試薬の調製

Starter Pack（カタログ番号 F10471）または Surveyor Pack（カタログ番号 F10472）をご使用の場合には、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー（Component C）がキットに含まれていますので、ステップ 1.2 にお進みください。

High-Throughput Pack（カタログ番号 F10473）は、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー（Component C）を含みませんので、ステップ 1.1 に従ってバッファーを調製してください。

- 1.1** ハイスループットパック用には、お客様が実験に使用されるマイクロプレートの枚数に応じて、必要な量の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを調製してください。マイクロプレートが 200 枚ある場合、合計 1.5 L のアッセイバッファーがあれば、すべての試薬を調製することができます。30 mL の 1 M HEPES を 1.47 L の 1 倍濃度の HBSS に加えて、1.5 L の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを調製してください。NaOH を用いてバッファーの pH を 7.3 に調整してください。
- 1.2** プロベネシドの 250 mM ストック溶液の調製は、水溶性プロベネシド 77 mg 入りの各バイアル（カタログ番号 F10471 および F10472 の Component B）に 1 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを加えるか、または 1.54 g の水溶性プロベネシド入りボトル（カタログ番号 F10473 の Component B）に 20 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを加え、溶解するまでボルテックスを行ってください。未使用のプロベネシドストック溶液は、-20°C 以下で 6 ヶ月間まで保存可能です。

注意：水溶性プロベネシドが付属しますが、アッセイに使用するかどうかはオプションです。Fluo-4 Direct™を用いる場合、最良の結果を得るためにプロベネシドが必要になる細胞タイプや、必要でない細胞タイプがあります。

- 1.3** プロベネシドを 5 mM の最終濃度で含む、2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液を、ご使用になるキットに応じて、以下に示す各方法で調製してください。

Starter Pack（カタログ番号 F10471）：Fluo-4 Direct™カルシウム試薬（Component A）1 ボトルに 10 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーおよび 250 mM のプロベネシドストック溶液 200 μ L を加えてください。この 2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液は、マイクロプレート 2 枚分のアッセイに十分な量となります。

Surveyor Pack（カタログ番号 F10472）：Fluo-4 Direct™カルシウム試薬（Component A）1 ボトルに 100 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーおよび 250 mM のプロベネシドストック溶液 2 mL を加えてください。この 2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液は、マイクロプレート 20 枚分のアッセイに十分な量となります。

High-Throughput Pack（カタログ番号 F10473）：Fluo-4 Direct™カルシウム試薬（Component A）1 ボトルに 1 L の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーおよび 250 mM のプロベネシドストック溶液 20 mL を加えてください。この 2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液は、マイクロプレート 200 枚分のアッセイに十分な量となります。

注意：混合物はボルテックスした後、5 分間静置して試薬を完全に溶解させ、再びボルテックスしてください。細胞ローディングを始める前に、必ず試薬が完全に溶解していることを確認してください。

- 1.4 必要に応じて、お客様が実験に使用する受容体リガンドを Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー（プロベネシド無添加）で調製してください。

Fluo-4 Direct™
カルシウム
アッセイ

- 2.1 細胞の入ったマイクロプレートを開クベーターから取り出し、培養液中で培養されている細胞を含むウェルに、等量の 2 倍濃度 Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液（ステップ 1.3 で調製）を、直接添加してください。

例えば、各ウェルに 50 µL の培地を含む 96 ウェルのプレートには、1 ウェルあたり 50 µL の 2 倍濃度 Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液を添加し、各ウェルに 12.5 µL の培地を含む 384 ウェルのプレートには、1 ウェルあたり 12.5 µL の 2 倍濃度 Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液を添加してください。

- 2.2 プレートを 37°C で、30～60 分間インキュベートしてください。インキュベーションは、37°C および室温でそれぞれ一定時間行うことができます。ただし、各温度でのローディング時間（インキュベーション時間）の合計は 60 分間以上となるようにしてください。

注意：当社の実験では、CHO M1 細胞および U-2 OS 細胞に関しては、37°C で 30 分間、室温で 30 分間のインキュベーションで最良の結果が得られました。

上記の操作により準備したプレートは、Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液をウェルから除去することなく使用することができます。ローディング後、アッセイに使用可能な時間は、細胞のタイプによって異なります。当社の実験では、Fluo-4 Direct™試薬のローディング後に室温で保存した場合、5 時間まで CHO M1 細胞から良好なアッセイ結果が得られました。

- 2.3 蛍光光度計を、励起波長 494 nm、発光波長 516 nm に設定して、蛍光強度を測定してください。

非接着性細胞用の実験プロトコール

細胞の準備

細胞をペレット化する（ステップ 3.3）ときは、事前に実験に十分な量の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを準備してください。

Starter Pack（カタログ番号 F10471）または Surveyor パック（カタログ番号 F10472）をご使用の場合には、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー（Component C）がキットに含まれていますので、ステップ 3.2 にお進みください。

High-Throughput Pack（カタログ番号 F10473）の場合は、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー（Component C）を含みませんので、ステップ 3.1 に従ってバッファーを調製してください。

- 3.1** ハイスループットパック用には、お客様が実験に使用されるマイクロプレートの枚数に応じて、必要な量の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを調製してください。マイクロプレートが 200 枚ある場合、合計 1.5 L のアッセイバッファーがあれば、すべての試薬を調製することができます。30 mL の 1 M HEPES を 1.47 L の 1 倍濃度の HBSS に添加して、1.5 L の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを調製してください。NaOH を用いてバッファーの pH を 7.3 に調整してください。

- 3.2** 細胞培養フラスコから直接、細胞の密度を測定してください。定着した細胞がウェルの底面を覆うのに必要な播種細胞数を計算してください。

Jurkat 細胞株（GeneBLAzer® ムスカリン受容体（M1））および NFAT-*bla* Jurkat 細胞株（インビトロジェン社カタログ番号 K1051）に関しては、96 ウェルのプレートでは、1 ウェルあたり 125,000 細胞、384 ウェルのプレートでは、1 ウェルあたり 31,250 細胞で良好なアッセイ結果が得られました。

例えば、細胞密度が 1.5×10^6 細胞/mL の場合、各マイクロプレートに必要な細胞数は（96 ウェルのプレートのウェル数を約 100、384 ウェルのマイクロプレートのウェル数を約 400 として概算した場合）、下記のようになります。

$$125,000 \text{ 細胞} \times 100 \text{ (または } 31,250 \text{ 細胞} \times 400) = 1.25 \times 10^7 \text{ 細胞}$$

$$1.25 \times 10^7 \text{ 細胞} = 1.5 \times 10^6 \text{ 細胞/mL が } 8.3 \text{ mL 必要であることとなります。}$$

- 3.3** 約 200 × g (1,000 rpm) で 3 分間遠心して、必要な量の培養液から細胞をペレット化してください。

- 3.4 培養液を除去し、ペレットを約 2.5×10^6 細胞/mL (96 ウェルのプレートの場合は 125,000 細胞/50 μ L、384 ウェルのプレートの場合は 31,250 細胞/12.5 μ L) の密度となるように、Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーに再懸濁してください。細胞を再懸濁するのに必要な Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーの容量は、必要なウェル数に 50 μ L または 12.5 μ L を乗じて算出することができます。

例えば、

96 ウェルの場合は、50 μ L/well $\times$ 100 wells = 5 mL

384 ウェルの場合は、12.5 μ L/well $\times$ 400 wells = 5 mL

となります。

- 3.5 再懸濁した細胞を、1 ウェルあたり 50 μ L または 12.5 μ L の割合で、ピペットを用いてマイクロプレートに移します。必要に応じて、無細胞コントロールとして、同容量のアッセイバッファーのみをピペットでコントロール用ウェルに移します。
- 3.6 プレートを 5%CO₂ 条件下 37°C で、60 分間インキュベートし、細胞を定着させてください。

試薬の調製

- 4.1 水溶性プロベネシドの 250 mM ストック溶液の調製は、水溶性プロベネシド 77 mg 入りの各バイアル (カタログ番号 F10471 および F10472 の Component B) に 1 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを加えるか、または 1.54 g のプロベネシド入りボトル (カタログ番号 F10473 の Component B) に 20 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーを加え、溶解するまでボルテックスを行ってください。未使用のプロベネシドストック溶液は、-20°C 以下で 6 ヶ月間まで保存可能です。
- 4.2 プロベネシドを 5 mM の最終濃度で含む、2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液を、ご使用になるキットに応じて、以下に示す各方法で調製してください。

Starter Pack (カタログ番号 F10471) : Fluo-4 Direct™カルシウム試薬 (Component A) 1 ボトルに 10 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーおよび 250 mM のプロベネシドストック溶液 200 μ L を加えてください。この 2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液は、マイクロプレート 2 枚分のアッセイに十分な量となります。

Surveyor Pack (カタログ番号 F10472) : Fluo-4 Direct™カルシウム試薬 (Component A) 1 ボトルに 100 mL の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーおよび 250 mM のプロベネシドストック溶液 2 mL を加えてください。この 2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液は、マイクロプレート 20 枚分のアッセイに十分な量となります。

High-Throughput Pack (カタログ番号 F10473) : Fluo-4 Direct™カルシウム試薬 (Component A) 1 ボトルに 1 L の Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファーおよび 250 mM のプロベネシドストック溶液 20 mL を加えてください。この 2 倍濃度の Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液は、マイクロプレート 200 枚分のアッセイに十分な量となります。

注意：混合物はボルテックスした後、5 分間静置して試薬を完全に溶解させ、再びボルテックスしてください。細胞ローディングを始める前に、必ず試薬が完全に溶解していることを確認してください。

- 4.3 必要に応じて、お客様が実験に使用する受容体リガンドを Fluo-4 Direct™カルシウムアッセイバッファー（プロベネシド無添加）で調製してください。

Fluo-4 Direct™ カルシウム アッセイ

- 5.1 細胞の入ったマイクロプレートをインキュベーターから取り出し、培養液中の細胞を含むウェルに、等容量の 2 倍濃度 Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液（ステップ 4.2 で調製）を直接添加してください。

例えば、各ウェルに 50 μ L の培地を含む 96 ウェルのプレートには、1 ウェルあたり 50 μ L の 2 倍濃度 Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液を添加し、各ウェルに 12.5 μ L の培地を含む 384 ウェルのプレートには、1 ウェルあたり 12.5 μ L の 2 倍濃度 Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液を添加してください。

- 5.2 プレートを 37°C で、30～60 分間インキュベートしてください。インキュベーションは、37°C および室温でそれぞれ一定時間行うことができます。ただし、各温度でのローディング時間（インキュベーション時間）の合計は 60 分以上となるようにしてください。

注意：当社の実験では、CHO M1 細胞および U-2 OS 細胞に関しては、37°C で 30 分間、室温で 30 分間のインキュベーションで最良の結果が得られました。

上記の操作により準備したプレートは、Fluo-4 Direct™カルシウム試薬ローディング溶液をウェルから除去することなく使用することができます。ローディング後、アッセイに使用可能な時間は、細胞のタイプによって異なります。当社の実験では、Fluo-4 Direct™試薬のローディング後に室温で保存した場合、5 時間まで CHO M1 細胞から良好なアッセイ結果が得られました。

- 5.3 蛍光光度計を、励起波長 494 nm、発光波長 516 nm に設定して、蛍光強度を測定してください。

結果の一例

CHO M1 細胞をアゴニストおよびアンタゴニストで処理し、そのカルシウム反応のアッセイを Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit を用いて行いました。図 1 に示すとおり、文献記載の結果と一致する反応結果が得られました。

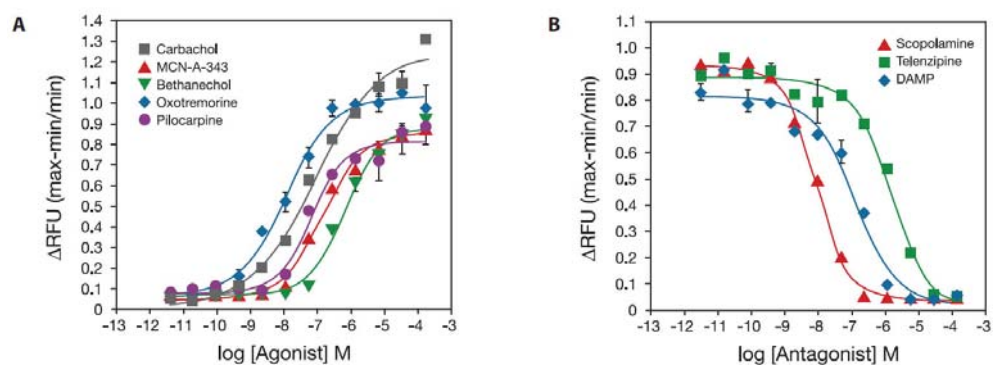


図 1. ムスカリン性 1 (M1) 受容体アゴニストおよびアンタゴニストに対する用量依存的カルシウム反応。CHO M1 細胞は、poly-D-Lysine でコーティングした 384 ウェルのプレートに播き、1 晩インキュベートしました。翌日、Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit を用いてアッセイを行い、細胞のカルバコールに対するカルシウムを確認しました。パネル A では、アゴニストであるカルバコール、MCN-A-343、ベタネコール、オキソトレモリン、およびピロカルピンで細胞を刺激しました。パネル B では、114 nM のカルバコール（本受容体における EC_{80} に相当する濃度）で誘発されたカルシウム反応を阻害するため、アンタゴニストであるスコポラミン、テレンジピン、および DAMP で処理しました。測定値は、最大反応値から最小反応値を差し引いた値を最小反応値で除した相対蛍光単位 (RFU) で表してあります。アゴニストおよびアンタゴニストの反応性の順位は、文献記載の結果と一致しています。

製品リスト 現在の価格は、当社のウェブサイトまたはカスタマーサービス部から入手いただけます。

カタログ番号	製品名	サイズ
F10471	Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit, Starter pack	1 kit
F10472	Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit, Surveyor pack	1 kit
F10473	Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit, High-throughput pack	1 kit
関連商品		
P10020	PowerLoad™ concentrate, 100X	5 mL
P36400	Probenecid, water soluble	10 × 77 mg
14025-092	Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (1X), liquid	500 mL
15630-106	HEPES Buffer Solution (1 M)	20 mL

Contact Information

Molecular Probes, Inc.
29851 Willow Creek Road
Eugene, OR 97402
Phone: (541) 465-8300
Fax: (541) 335-0504

Customer Service:
6:00 am to 4:30 pm (Pacific Time)
Phone: (541) 335-0338
Fax: (541) 335-0305
probesorder@invitrogen.com

Toll-Free Ordering for USA:
Order Phone: (800) 438-2209
Order Fax: (800) 438-0228

Technical Service:
8:00 am to 4:00 pm (Pacific Time)
Phone: (541) 335-0353
Toll-Free (800) 438-2209
Fax: (541) 335-0238
probetech@invitrogen.com

Invitrogen European Headquarters
Invitrogen, Ltd.
3 Fountain Drive
Inchinnan Business Park
Paisley PA4 9RF, UK
Phone: +44 (0) 141 814 6100
Fax: +44 (0) 141 814 6260
Email: euroinfo@invitrogen.com
Technical Services: eurotech@invitrogen.com

For country-specific contact information,
visit www.invitrogen.com.

Further information on Molecular Probes products, including product bibliographies, is available from your local distributor or directly from Molecular Probes. Customers in Europe, Africa and the Middle East should contact our office in Paisley, United Kingdom. All others should contact our Technical Service Department in Eugene, Oregon.

Molecular Probes products are high-quality reagents and materials intended for research purposes only. These products must be used by, or directly under the supervision of, a technically qualified individual experienced in handling potentially hazardous chemicals. Please read the Material Safety Data Sheet provided for each product; other regulatory considerations may apply.

Limited Use Label License No. 223: Labeling and Detection Technology

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 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. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) to not transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not 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. Invitrogen Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of the above patents based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Invitrogen is willing to accept return of the product with a full refund. For information on purchasing a license to this product for purposes other than research, contact Molecular Probes, Inc., Business Development, 29851 Willow Creek Road, Eugene, OR 97402, Tel: (541) 465-8300. Fax: (541) 335-0354.

Several Molecular Probes products and product applications are covered by U.S. and foreign patents and patents pending. All names containing the designation ® are registered with the U.S. Patent and Trademark Office.

Copyright 2009, Molecular Probes, Inc. All rights reserved. This information is subject to change without notice.