

# SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

Cat. No: 18080-051

Size: 50 reactions

Store at -20°C

## 概要

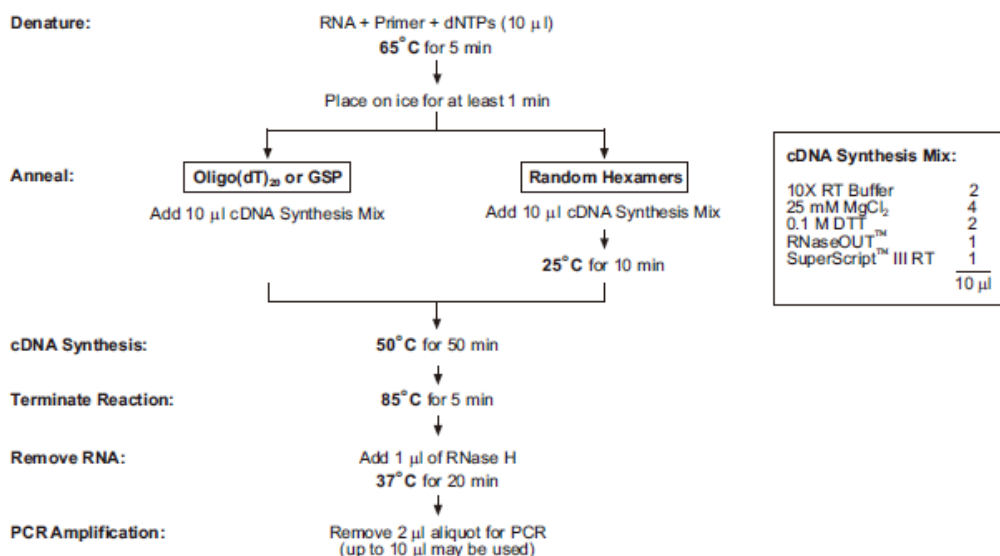
精製ポリ(A)+またはトータルRNAからファーストストランドcDNAを合成するために、SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR キットは最適化されています。100 baseから12 kbまでのRNAをこのシステムで検出できます。また、出発材料の量は、トータルRNAで1 pg ~5 µgの範囲で可能です。SuperScript III逆転写酵素(SuperScript III Reverse Transcriptase)は、RNase H活性を低下させ、かつ熱安定性を増大させた変異型M-MLV RTです。cDNA合成を、42 - 55°Cの温度範囲で行うことができ、他の逆転写酵素より特異性、収量が高く、かつ完全長性の高いcDNAの合成が可能です。SuperScript III RT がリボソームRNAおよびトランスファーRNAによる障害を受けないため、SuperScript III RTはトータルRNAからのファーストストランドcDNA合成にご使用いただけます。

cDNA合成は、トータルRNAもしくは精製ポリ(A)+ RNAを材料とし、oligo(dT)プライマー、ランダムヘキサマー、または遺伝子特異的プライマーのいずれかを用いて、一段階の反応で行われます。次に、目的の遺伝子に対する特異的プライマーを使用して、PCRを行います。PCRには、以下のDNAポリメラーゼを推奨します: Platinum Taq DNA Polymeraseは4kbまでのターゲットを増幅できるホットスタート対応酵素。Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelityは15kbまでのターゲットを増幅できるホットスタート対応酵素で、収量が最大で、正確性はPlatinum Taq DNA Polymeraseよりも優れています。Platinum Pfx DNA Polymeraseは、12kbまでのターゲットを増幅できるホットスタート対応酵素で正確性は最も優れています。

System Component	Amount	Related products	Amount	Catalog
Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 µM)	50µl	Platinum® Taq DNA Polymerase	100 units	10966-018
Random hexamers (50 ng/µl)	250µl		250 units	10966-026
10X RT buffer*	1 ml		500 units	10966-034
25 mM MgCl <sub>2</sub>	500µl	Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	100 units	11304-011
0.1 M DTT	250µl		500 units	11304-029
10 mM dNTP mix	250µl	Platinum® Pfx DNA Polymerase	100 units	11708-013
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	50µl		250 units	11708-021
RNaseOUT™ (40 U/µl)	100µl		500 units	11708-039
E. coli RNase H (2 U/µl)	50µl	PCRx Enhancer System	250 rxns	11495-017
DEPC-treated water	1.2 ml	Micro-to-Midi Total RNA Purification System	50 rxns	12183-018
Total HeLa RNA (10 ng/µl)	20µl	TRizol® Reagent	100 ml	15596-026
Sense Control Primer (10 µM)	25µl		200 ml	15596-018
Antisense Control Primer (10 µM)	25µl	DNase I, Amplification Grade	100 units	18068-015
*200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl		Custom primer		to order, visit <a href="http://www.invitrogen.com">www .invitrogen.com</a>

## 品質管理

100 pgのHeLaトータルRNAから、ヒトβ-アクチンプライマーを使用して、353-bpのRT-PCR産物が最低 25 ng得られました。また、500 ngのHeLaトータルRNAから、ヒトPolεプライマーを使用して、6.8-kbのRT-PCR産物が最低 25 ng得られました。



18080051.pps

Rev. date: 3 Oct 2003

This product is distributed for laboratory research use only. CAUTION: Not for diagnostic use. The safety and efficacy of this product in diagnostic or other clinical uses has not been established.

For technical questions about this product, call the Invitrogen TECH-LINE<sup>SM</sup> 800 955 6288

## ファーストストランドcDNA合成のためのガイドラインと推奨事項

### RNA

- 高品質で無傷のRNAは、完全長cDNA合成のために必須となります。このキットは、1 pg~5 µgのトータルRNAまたは1 pg~500 ngのpoly(A)+ RNAに適応可能です。トータルRNAで5 µgを超える場合は、SuperScript III RT の反応液量および量を増加させる必要があります。
- RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitorは、RNA調製の際、RNaseによる標的RNAの分解を防ぐために反応液に添加されています。
- トータルRNAの単離には、PureLink RNA Mini kit (カタログ番号 12183-020/-018A)、TRIzol<sup>®</sup> Reagent(カタログ番号15596-026/-018)、またはChomczynski and Sacchiの方法を推奨します。特異的cDNAの収量が向上する可能性があります。オリゴ(dT)を用いたpoly(A)+RNAの精製は一般的に必要ありません。
- RNA調製液に少量含まれるゲノムDNAが、標的のcDNAと共に増幅される可能性があります。RNA調製液からゲノムDNAを完全に除去する必要がある場合、DNase I, Amplification Grade(カタログ番号18068-015)の使用を推奨します。DNase I, Amplification Grade は、微量のRNase活性を除去するよう念入りに精製されており、使用の際RNaseインヒビターの添加を必要としません。

### RNase H消化

特に長いテンプレートの場合、ファーストストランドcDNA合成のあと、RNase HでcDNA:RNAハイブリッドのRNA鎖を消化することにより、PCRの感度は上昇する傾向があります。一方、ファーストストランドcDNA合成中にRNase Hが存在すると、鋳型mRNAが分解され、その結果、完全長cDNAの合成効率が低下し、ファーストストランドcDNAの産生量が低下します。SuperScript III First-Strand Synthesis Systemでは、必要な時にのみRNase Hを添加しており、この点が他の手法と比較して優れている点の一つです。

### プライマー

ファーストストランドcDNA合成反応には、ランダムヘキサマー、オリゴ(dT)、または遺伝子特異的プライマー(GSPs)が使用可能。

- ランダムヘキサマーは最も非特異的にアニーリングさせる方法で、主に、完全長のmRNAをコピーすることが困難な場合に使用されます。この方法では、全てのRNAがファーストストランドcDNA合成のための鋳型となり、特異性はPCRのステップでPCRプライマーによって付与されます。cDNAのサイズを最大化するためには、RNAに対するランダムヘキサマーの最適な割合を決定する必要があります。  
**注意:** RT-PCRを行う場合、トータルRNA 5 µgあたりランダムヘキサマー 50 ngが通常適当です。RNA 5 µgに対してランダムヘキサマーを250 ngに増加させると、500 bp未満の短いPCR産物の収率が増加する可能性があります。逆に長いPCR産物および完全長cDNAの収量が減少する可能性があります。
- オリゴ(dT)プライマーはより特異的にアニーリングさせる方法で、多くの真核生物のmRNAに見られるpoly(A)+とハイブリッド形成します。ポリ(A)+RNAの存在比はトータルRNAの約1%~2%であるので、cDNA合成量および種類は、ランダムヘキサマーよりかなり小さくなります。オリゴ(dT) 20(キットで提供した)の使用を推奨します。  
**注意:** 新規のmRNAをターゲットとして RT-PCR を行う場合、ランダムヘキサマー、GSPよりもオリゴ(dT)プライマーの使用を推奨します。オリゴ(dT)プライマーは、ランダムヘキサマーまたはGSPよりも、PCR産物量の再現性が高い傾向があります。
- 最も特異的な方法は、目的の配列に対応する遺伝子特異的なプライマーを用いる方法です。ファーストストランドcDNA合成は、mRNAの3'末端の最も近くにハイブリッド形成するPCRプライマーが用いられます。たとえ、DNAテンプレートを用いた場合PCRで機能するとしても、GSPがcDNA合成において機能しないことがあり、注意が必要です。RT-PCRにおいて遺伝子特異的なプライミングがうまくいかない場合は、オリゴ(dT)プライマーを用いてファーストストランドcDNA合成を再度行う必要があります。

## ファーストストランドcDNA合成

1 pg~5 µgのトータルRNAまたは1 pg~500 ng のpoly(A)+RNAを用いてファーストストランドcDNAを合成するための方法。

- 使用前に、それぞれのチューブを混合し、軽く遠心してください。
- 0.2ml または 0.5ml チューブ中で、以下を混合してください。

Component	Amount
up to 5 µg total RNA	n µl
Primer*	1 µl
*50 µM oligo(dT) <sub>20</sub> , or	
2 µM gene-specific primer (GSP), or	
50 ng/µl random hexamers	

- 10 mM dNTP mix 1 µl
- DEPC-treated water to 10 µl
- 65°Cで5分間インキュベートした後、1分間以上氷上で静置してください。
- 以下に示された試薬を上から順に混合し、cDNA合成ミックスを調製してください。

Component	1 Rxn	10 Rxns
10X RT buffer	2 µl	20 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl	40 µl
0.1 M DTT	2 µl	20 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl	10 µl
SuperScript™ III RT (200 U/µl)	1 µl	10 µl

- 10 µlのcDNA合成MixをRNA/primerミックスに加えた後、穏やかに混合し、軽く遠心分離してください。その後、それぞれ以下の条件でインキュベートしてください。  
オリゴ(dT)20またはGSP: 50°Cで50分間  
ランダムヘキサマー: 25°Cで10分間、続いて50°Cで50分間
- 85°Cで5分間インキュベートすることにより反応を停止させた後、氷上で冷却してください。
- 軽く遠心分離することにより反応液を集め、1 µlのRNase Hを添加後、37°Cで20分間インキュベートしてください。
- cDNA合成反応液は-20°Cで保存、あるいはすぐにPCRに使用してください。

## ターゲットcDNAの増幅

合成反応で得られたファーストストランドcDNAは、通常直接PCRにより増幅可能です。ファーストストランド合成反応液の10%(2 µl)をPCRに使用することを推奨します。しかし、加える反応液の量を10 µlまで増やすことにより、収量が増加する可能性があります。

以下のPCR酵素の使用を推奨します(オーダー情報は1ページを参照)。

- Platinum Taq DNA Polymerase:** ホットスタート酵素。4 kbまでのターゲットに推奨されます。
- Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity:** ホットスタート酵素。正確性、収量共にPlatinum Taq DNA Polymeraseよりも高い。15 kbまでのターゲットに推奨されます。
- Platinum Pfx DNA Polymerase:** ホットスタート酵素。校正活性(3'-5'エキソヌクレアーゼ活性)が高く、正確性が非常に高い。12 kbまでのターゲットに推奨されます。

各PCR酵素の推奨プロトコールは製品に添付されているマニュアルを参照してください。製品マニュアルはホームページからも入手可能です。  
[www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

## コントロール反応

本キットにはコントロールRNAとして、HeLa細胞由来トータルRNA (10 ng/μl) が含まれます。また、センスおよびアンチセンスコントロールプライマーは、ヒトβ-actin遺伝子に対して設計されており、353-bpのRT-PCR産物を生成します。

Sense primer: 5'-GCTCG TCGTC GACAA CGGCT C-3'  
Antisense primer: 5'-CAAAC ATGAT CTGGG TCATC TTCTC-3'

RT酵素プラス、マイナス両方のコントロール反応に、以下のプロトコルはご使用いただけます。

- DEPC-treated waterでTotal HeLa RNA を100pg/μlまで希釈してください。
- 以下に従い、0.2 mlまたは0.5 mlチューブでRNA/プライマーミックスを調製してください。

Component	+ RT Control	- RT Control
Diluted total HeLa RNA (100 pg/μl)	1 μl	1 μl
Oligo(dT) <sub>20</sub>	1 μl	1 μl
10 mM dNTP mix	1 μl	1 μl
DEPC-treated water	7 μl	7 μl

- 65°Cで5分間熱処理後、1分間以上氷上で静置してください。軽く遠心してから以下の試薬を追加してください。

Component	+ RT Control	- RT Control
10X RT buffer	2 μl	2 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 μl	4 μl
0.1 M DTT	2 μl	2 μl
RNaseOUT™ (40 U/μl)	1 μl	1 μl
SuperScript™ III RT (200 U/μl)	1 μl	—
DEPC-treated water	—	1 μl

- 穏やかに混合した後、軽く遠心して反応液を集めてください。
- 50°Cで50分間インキュベートしてください。
- 85°Cで5分間加熱することにより反応を停止させ、その後氷上で冷却してください。
- 軽く遠心して反応液を集めた後、各チューブにRNase Hを1 μl 添加し、37°Cで20分間インキュベートしてください。
- 氷上で冷やした0.2 mlチューブの中で以下の試薬をミックスして、それぞれのPCR反応液(+RT及び-RT)を調製してください。

Component	Volume
DEPC-treated water	38.1 μl
10X PCR buffer minus Mg <sup>++</sup>	5 μl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5 μl
10 mM dNTP mix	1 μl
Control sense primer (10 μM)	1 μl
Control antisense primer (10 μM)	1 μl
cDNA from control RNA	2 μl
Taq DNA polymerase (5 units/μl)	0.4 μl
final volume	50 μl

- 反応液を混合後、軽く遠心して反応液を集めてください。
- 反応液の入ったチューブを、あらかじめ94°Cに加熱したサーマルサイクラー上に置き、最初の変性反応を行います(94°Cで2分間)。
- PCRを40サイクル実施する。
  - Denature 94°C for 15 sec
  - Anneal 55°C for 30 sec
  - Extend 68–72°C for 1 min

**注記:**ランプ速度が遅いサーマルサイクラーを使用する場合は、メーカーの指示に従ってください。

- 反応終了時、4°Cに冷やしてください。
- アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色により、それぞれのサンプル 10 μlを分析してください。353-bpのバンド(25 ng以上)が、+ RT Controlで確認できるはずですが、- RT Controlではバンドは確認されないはずですが。

## GC含量の高い転写産物からのファーストストランド cDNA合成

GC含量の高いmRNAはしばしば安定な二次構造をとるため、逆転写酵素活性、プライマーのアニーリングを阻害する可能性があります。この二次構造形成によるRT-PCRの問題は、しばしばRT反応液量の増加および反応温度を高めることによって改善することがあります。

**注記:** 55°C以上のcDNA合成温度を必要とする鋳型については、ThermoScript RT-PCR System を推奨します。(カタログNo. 11146-024) ThermoScript RT は、70°CまでのcDNA合成温度に対応できます。

このプロトコルで遺伝子特異的プライマー及びoligo (dT)プライマーは使用できますが、ランダムヘキサマーは使用できません。

- それぞれの試薬を混合した後、軽く遠心して反応液を集めてください。
- 以下に従い、0.5 mlチューブでRNA/プライマーミックスを調製してください。

Component	Sample	Control RNA
1 to 5 μg total RNA	n μl	—
Control total HeLa RNA (10 ng/μl)	—	1 μl
Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 μM) or 2 μM GSP	1 μl	1 μl
10 mM dNTP mix	2.5 μl	2.5 μl
DEPC-treated water	to 25 μl	to 25 μl

- 各サンプルを65°Cで5分間インキュベートし、直ちに55°Cに温度を下げます。
- 順番通り試薬を加えて、cDNA合成ミックスを調製してください。

Component	1 Reaction	10 Reactions
DEPC-treated water	3 μl	30 μl
10X RT buffer	5 μl	50 μl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 μl	100 μl
0.1 M DTT	5 μl	50 μl
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 μl	10 μl
SuperScript™ III RT	1 μl	10 μl

**注記:** -RTコントロールに関しては、SuperScript III RT 1 μlの代わりにDEPC処理水を1 μl添加してください。

- あらかじめ55°CにcDNA合成ミックスを温めておいてください。
- 55°Cで処理した各サンプルに、あらかじめ温めたcDNA合成Mix 25 μlを添加してください。穏やかに混合し、55°Cで50分間インキュベートしてください。
- 85°Cで5分間加熱することにより反応を停止させ、その後氷上で冷却してください。
- 軽く遠心して反応液を集めてください。PCRに進む前に、各チューブに1 μlのRNase Hを添加し、37°Cで20分間インキュベートしてください。

**注記:** しばしば、GC-リッチcDNAのRT-PCRにおける問題は、ファーストストランド合成と同様にPCRでも起こります。GCリッチ配列の増幅が困難な場合は、PCRx Enhancer System(カタログNo. 11495-017)の使用を推奨します。

## トラブルシューティングガイド

問題	考えられる原因	解決策
目的の産物の増幅を電気泳動で確認できない	ファーストストランドcDNA合成中の操作上の間違い	コントロールとして提供されたトータルHeLa RNAを使用し、ファーストストランド合成反応の効率を確認してください(3ページを参照)。
	RNase(リボヌクレアーゼ)のコンタミネーション	サンプルにコントロールRNAを添加し、ファーストストランド合成の反応液にRNaseがコンタミネーションしているかどうか確認してください。 RNaseのコンタミネーションを防ぐために、無菌環境を保ってください。 ファーストストランド合成反応液に、RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor を添加してください。
	多糖類がRNAと共沈している	Sambrookらの論文を参考にして、RNAの沈殿操作の際、多糖類の共沈を防ぐために塩化リチウムを使用してください。
	ターゲットmRNAが、強い転写停止シグナルを含む	ファーストストランド合成反応で、オリゴ(dT)の代わりに、ランダムヘキサマーを使用してください。 アニーリング後、高温を保ってください(GC含量の高い転写産物からのファーストストランドcDNA合成の記載を参照) ファーストストランド合成反応の温度を上げてください(55°Cまで)。 ターゲットcDNAの3'末端により近い位置のPCRプライマーを使用してください。
	PCRに用いられたファーストストランドcDNAの量が少なかった	ファーストストランドcDNA合成液の量を10 µl まで増やしてください。
	ファーストストランドcDNA合成にGSPを使用した	別の配列のGSPを試すか、オリゴ(dT)プライマーを使用してください。GSPがアンチセンス配列であることを確かめてください。
	RT 反応の阻害剤が含まれる	ファーストストランド合成反応の前に、mRNAのエタノール沈殿を行い阻害剤を除去してください。70%(v/v)エタノールを用いてmRNAペレットの洗浄も行ってください。 <b>注記:</b> RT反応の阻害剤として以下の物質が考えられます。 ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、EDTA、グアニジウム塩、ホルムアミド、ピロリン酸ナトリウムおよびスベルミジン。
電気泳動解析で予期せぬサイズのバンドが確認される	ゲノムDNAのコンタミネーション	DNase I ( Amplification Grade, カタログNo. 18068-015、DNase I のマニュアルに記載)を用いて、RNAサンプルを前処理してください。 プライマーペアーをイントロンを挟むエキソン同士、あるいはmRNAのエクソン/エクソン境界にアニールするように設計し、増幅されたcDNAと混在しているゲノムDNAから得られるPCR産物を区別できるようにする。製品がDNAに由来しているかどうかをテストするために、マイナス RT コントロールを行ってください。
	プライマーの非特異的アニーリング	アニーリング条件を変えてください。自動ホットスタートPCRを行えるPlatinum Taq DNA Polymerase を使用してください。 各テンプレートおよびプライマーの組み合わせに合わせてマグネシウム濃度を最適化してください。
	プライマーダイマーの形成	3'末端で相補的な配列を持たないプライマーを設計してください。

## References

- Berger, S.L. and Kimmel, A.R. (1987) *Methods Enzymol* 152, 316.  
 Bracete, A.M., Mertz, L.M., Fox, D.K. (1999) *Focus* 21, 38.  
 Chomczynski, P. (1993) *Biotechniques* Vol. 15, 532. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156.  
 Compton, T. (1990) in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T., eds.), p. 39, Academic Press, Inc.  
 Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci USA* 85, 8998.  
 Gerard, G.F. (1994) *Focus* 16, 102.  
 Sambrook J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.  
 Simms, D., Cizdziel, P.E., and Chomczynski, P. (1993) *Focus* 15, 99.  
 Westfall, B., Sitaraman, K., Solus, J., Hughes, J., and Rashtchian, A. (1997) *Focus* 19, 46.  
 Westfall, B., Sitaraman, K., Lee, J., Borman, J. and Rashtchian, A. (1999) *Focus* 21, 49.  
 Takagi, M., Nishioka, M., Kakiyama, H., Kitabayashi, M., Igoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4504.  
 Sitaraman, K., Darfler, M., and Westfall, B. (1999) *Focus* 21, 10.  
 Nathan, M., Mertz, L., Fox, D. (1995) *Focus* 17, 78.  
 Schwabe, W., Lee, J.E., Nathan, M., Xu, R.H., Sitaraman, K., Smith, M., Potter, R.J., Rosenthal, K., Rashtchian, A., Gerard, G.F. (1998) *Focus* 20, 30.

### Limited Use Label License 4: Products for PCR that include no rights to perform PCR

This product is optimized for use in the Polymerase Chain Reaction (PCR) covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche, Ltd. ("Roche"). No license under these patents to use the PCR process is conveyed expressly or by implication to the purchaser by the purchase of this product. A license to use the PCR process for certain research and development activities accompanies the purchase of certain reagents from licensed suppliers such as Invitrogen, when used in conjunction with an Authorized Thermal Cycler, or is available from Applied Biosystems. Further information on purchasing licenses to practice the PCR process may be obtained by contacting the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404 or at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501.

### Limited Use Label License 138: SuperScript™ III Reverse Transcriptase

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) not to 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 patents owned by Invitrogen Corporation and claiming this product 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 Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500.

### Limited Use Label License 18: RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor

This product is the subject of U.S. Patent 5,965,399 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 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) not to 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 Licensing Department, Invitrogen Corporation, 1600 Faraday Avenue, Carlsbad, California 92008. Phone (760) 603-7200. Fax (760) 602-6500.