



EliZyme™ ProofRead

Účel použití:

Produkt je určen pouze pro vědecké účely, nikoliv pro diagnostické procedury.

Skladování:

Skladujte při -20 °C a vyhněte se dlouhotrvajícímu vystavování světelnému záření. Při dodržení těchto skladovacích podmínek si kity plně udrží svou aktivitu, dokud neuběhne expirační doba uvedená na kitu. Při 4 °C mohou být reagentie skladovány až jeden měsíc.

Popis produktu

EliZyme™ ProofRead obsahuje enzym odvozený od Pfu DNA polymerázy s 3'-5' exonukleázovou aktivitou pro korekturu během PCR. Enzym prošel patentovanými mutacemi, které výrazně zvyšují procesivitu, což má za následek kratší dobu annealingu (10-30 s/kb), vyšší výtěžnost a schopnost amplifikovat delší a náročnější cíle, včetně eukaryotických genomových templátů delších než 17,5 kb. Přesnost polymerázy EliZyme™ ProofRead je přibližně 100x vyšší než u Taq DNA polymerázy (1 chyba na $2,5 \times 10^7$ inkorporovaných nukleotidů), což z ní činí ideální volbu pro aplikace, jako je klonování, sekvenování a místně cílená mutagenese. Polymeráza generuje PCR produkty s tupým koncem. EliZyme™ ProofRead je dodáván s pokročilým pufrem včetně dNTP, Mg a enhancerů, což umožňuje vysoce přesnou PCR široké škály templátů s minimální nebo žádnou nutností optimalizace. Pro ještě větší pohodlí je EliZyme™ ProofRead k dispozici také jako 2X Ready MIX s možností červeného barviva pro přímé nanesení na gel a sledování průběhu elektroforézy.

Obsah

	Kat. číslo	Obsah balení	Velikost balení
EliZyme™ ProofRead		1×0.05 ml 2 U/μl + 1×1.7 ml	
	EZ0301	buffer + 1×1.7 ml 10× Enhancer	100 U
		1×0.25 ml 2 U/μl + 3×1.7 ml	
EliZyme™ ProofRead	EZ0305	buffer + 2×1.7 ml 10× Enhancer	500 U
		2×0.25 ml 2 U/μl + 6×1.7 ml	
EliZyme™ ProofRead	EZ0310	buffer + 4×1.7 ml 10× Enhancer	1000 U
EliZyme™ ProofRead MIX	EZ0408	2×1 ml mix	80 rxns
	EZ0416	4×1 ml mix	160 rxns
	EZ0406	2×7.5 ml mix	600 rxns
EliZyme™ ProofRead MIX	EZ0508	2×1 ml mix	80 rxns
	Red		
	EZ0516	4×1 ml mix	160 rxns
	EZ0506	2×7.5 ml mix	600 rxns



	Pufri/MIX	Obsah
EliZyme™ ProofRead	5× buffer	15 mM MgCl ₂ , 5 mM dNTPs
EliZyme™ ProofRead MIX	2× mix	6 mM MgCl ₂ , 2 mM dNTPs
EliZyme™ ProofRead MIX Red	2× mix Red	6 mM MgCl ₂ , 2 mM dNTPs

Doplňkový MgCl₂ není nutný. Složení pufru bylo optimalizováno pro maximalizaci úspěšnosti PCR.

Primery

Primery by měly mít teplotu tání okolo 60 °C. Zároveň by měly být navrhovány s ohledem na eliminaci tvorby primer-dimer komplexů a nespecifických produktů. Výsledná koncentrace primerů v reakci by se měla pohybovat mezi 0,2 μM a 0,6 μM.

PCR

Denaturace by měla probíhat při teplotě 95 °C. Pokud však přítomnost úseků s vysokým obsahem GC bází vede k nízkým výtěžkům, zvýšením teploty tání na 98–100 °C můžeme množství PCR produktu zlepšit. Pro experimentální stanovení optimální teploty annealingu doporučujeme provést teplotní gradient. Případně doporučujeme teplotu annealingu 60 °C a pokud jsou přítomny nespecifické produkty, teplotu zvyšovat po 2 °C.

Optimální extenze je dosažena při teplotě 72 °C. Optimální doba extenze závisí na délce ampliconu a složitosti templátu. Pro většinu aplikací se doporučuje 30 sekund na kilobázi (kb), je však možné použít i kratší čas extenze mezi 10 a 30 sekundami na kb. Lze také použít dvoukrokové cyklické protokoly s kombinací extenze a annealingu při 68–75 °C. Při použití kratší doby extenze je třeba dbát na to, aby vstupní množství templátové DNA nebylo příliš velké. Pokud jsou po amplifikaci viditelné nespecifické produkty, je třeba toto množství templátové DNA snížit.

Složení reakční směsi

EliZyme™ ProofRead

Před použitím musí být 5X EliZyme™ PR Reaction Buffer rozmražený, krátce promíchaný a stočený.

Komponenty	50 μl reakce	Finální konc.
5X EliZyme™ PR Reaction Buffer	10 μl	1×
10× Enhancer (Optional)*	5 μl	1×
Forward primer (10 μM)	2 μl	400 nM
Reverse primer (10 μM)	2 μl	400 nM
Templátová DNA	< 200 ng genomické DNA, < 10 ng cDNA	variabilní
EliZyme™ PR Polymerase (2 U/μl)	0.5 μl	
PCR voda	Doplnit do 50 μl	



* V případě, že nedojde k amplifikaci, doporučujeme přidat do reakční směsi 10x Enhancer. Ten může zlepšit výkonnost EliZyme™ ProofRead HS Polymerázy u některých obtížných nebo dlouhých templátů (např. templátů bohatých na GC báze nebo templátů se složitou sekundární strukturou).

EliZyme™ ProofRead MIX

Před použitím musí být mix rozmražený, krátce promíchaný a stočený.

Komponenty	50 µl reakce	Finální konc.
2X EliZyme™ PR MIX	25 µl	1×
Forward primer (10 µM)	2 µl	400 nM
Reverse primer (10 µM)	2 µl	400 nM
Templátová DNA	<200 ng genomické DNA, < 10 ng cDNA	variabilní
PCR voda	Doplnit do 50 µl	

EliZyme™ ProofRead MIX Red

Před použitím musí být mix rozmražený, krátce promíchaný a stočený.

Komponenty	50 µl reakce	Finální konc.
2X EliZyme™ PR MIX Red	25 µl	1×
Forward primer (10 µM)	2 µl	400 nM
Reverse primer (10 µM)	2 µl	400 nM
Templátová DNA	<200 ng genomické DNA, < 10 ng cDNA	variabilní
PCR voda	Doplnit do 50 µl	

PCR protokol

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Iniciace denaturace	95 °C	1 min	1
Denaturace	95 °C	15 s	
Annealing	55 – 65 °C	15 s	25 - 35
Extenze	72 °C	10-30 s/kb*	

* V návodu výše je uvedena optimální doba extenze a informace o rychlém cyklování.

Výrobce:

ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.

Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00

info@elisabeth.cz | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Číslo šarže



Datum expirace



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Výrobce



Počet reakcí v balení