



EliZyme™ ProofRead HS

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 HS obsahuje enzym odvozený od Pfu DNA polymerázy, který byl modifikován patentovanými mutacemi pro zvýšení procesivity, což vede ke zkrácení doby extenze a zvýšení výtěžnosti. Enzym je schopen amplifikovat delší a obtížnější cíle, včetně eukaryotických genomových templátů delších než 17,5 kb. Inovativní technologie EliZyme™ ProofRead HS využívá patentovanou molekulu podobnou aptameru, která inhibuje jak 3'-5' exonukleázovou aktivitu, tak 5'-3' polymerázovou aktivitu enzymu při okolních teplotách. To zabraňuje tvorbě primer-dimerů komplexů a nespecifické amplifikaci, čímž se zvyšuje citlivost a specifita PCR reakce. EliZyme™ ProofRead HS polymeráza má přibližně 100x vyšší přesnost než Taq DNA polymeráza (1 chyba na $2,5 \times 10^7$ začleněných nukleotidů) a proto je ideální pro aplikace, kde je vyžadována vysoká přesnost, jako je klonování, místě cílená mutagenese a sekvenování. EliZyme™ ProofRead HS polymeráza generuje PCR produkty s tupým koncem. Je dodávána s pokročilým pufrům včetně dNTP, Mg a enhancerů, což umožňuje vysoce přesnou PCR široké škály templátů s minimální nebo žádnou optimalizací. Je k dispozici ve formátu 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 HS		1×0.05 ml 2 U/μl + 1×1.7 ml	
	EZ0601	buffer + 1×1.7 ml 10× Enhancer	100 U
		1×0.25 ml 2 U/μl + 3×1.7 ml	
	EZ0605	buffer + 4×1.7 ml 10× Enhancer	500 U
EliZyme™ ProofRead HS MIX		4×0.25 ml 2 U/μl + 6×1.7 ml	
	EZ0610	buffer + 4×1.7 ml Enhancer	1000 U
	EZ0708	2×1 ml mix	80 rxns
	EZ0716	4×1 ml mix	160 rxns
EliZyme™ ProofRead HS MIX Red	EZ0706	4×7.5 ml mix	600 rxns
	EZ0808	2×1 ml mix	80 rxns
	EZ0816	4×1 ml mix	160 rxns



EZ0806

4x7.5 ml mix

600 rxns

	Pufr/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 ampikonu 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. Optimální doba extenze u multiplex reakcí závisí na složitosti templátu, délce ampikonů a počtu cílů. Doporučujeme začít s časem extenze nejdelšího fragmentu a pak v případě potřeby zvyšovat po 10–30 sekundách.

Složení reakční směsi

EliZyme™ ProofRead HS

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

Komponenty	50 μl reakce	Finální konc.
5X EliZyme™ PR HS 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™ ProofRead HS 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 HS MIX

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

Komponenty	50 µl reakce	Finální konc.
2X EliZyme™ PR HS 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 HS MIX Red

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

Komponenty	50 µl reakce	Finální konc.
2X EliZyme™ PR HS 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	25 - 35
Annealing	55 – 65 °C	15 s	
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

