



EliZyme™ Lyo OneS Super Probe Kit

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. Nevystavujte mix častým změnám teploty a omezte manipulaci s ním při pokojové teplotě na dobu nezbytně nutnou.

Popis produktu

EliZyme™ Lyo OneS Super Probe Kit je speciálně navržen pro přesnou a spolehlivou detekci RNA sekvencí pomocí RT-qPCR se sondami, což z něj činí ideální volbu pro vývoj lyofilizovaných diagnostických testů. 4X koncentrovaný mix bez glycerolu obsahuje HS Taq polymerázu, dNTP, MgCl₂ a kombinaci pomocných látek, které zajišťují spolehlivou lyofilizaci při zachování veškeré aktivity. Souprava je vhodná pro lyofilizaci do kuliček nebo koláčů. EliZyme™ qPCR Probe mixy jsou kompatibilní se všemi sondami, jako jsou TaqMan[®], Scorpions[®] a molekulární majáky.

Souprava obsahuje EliZyme™ Reverzní transkriptázu, která je dodávána samostatně ve vysoce koncentrovaném formátu (3200X). Tato modifikovaná MMLV reverzní transkriptáza je termostabilní, robustní a navržena pro zvýšení rychlosti a výtěžnosti syntézy cDNA s přesným zastoupením transkriptu, což umožňuje rychlou a účinnou reverzní transkripci až do 55 °C.

Kit je optimalizován pro lyofilizaci, čímž poskytuje výhody, jako je skladování při pokojové teplotě, prodloužená doba použitelnosti a větší flexibilita v objemu vzorku. Souprava po lyofilizaci poskytuje stejně přesné a spolehlivé výsledky jako standardní EliZyme™ OneS Super Probe Kit.

Obsah

	Kat. číslo	Obsah balení	Velikost balení
EliZyme™ Lyo OneS Super Probe Kit	EZ2010	5×1 ml mix + 1×6.25 µl 3200× RTase	1000 rxns
	EZ2050	5×5 ml mix + 1×31.25 µl 3200× RTase	5000 rxns
	EZ2014	10×7 ml mix + 1×87.5 µl 3200× RTase	14000 rxns



Postup lyofilizace

1. Před zahájením lyofilizace rozmrazte a krátce promíchejte zkumavku nebo lahvičku s mixem 4X EliZyme™ Lyo SP.
2. Přidejte 1,25 µl 3200X RTázy na každý ml mixu EliZyme™ Lyo SP. Roztok RTázy je viskózní, dbejte proto na přesnost.
3. Krátce promíchejte, aby se komponenty propojily. Nyní je 4X EliZyme™ Lyo OneS SP Mix připraven k použití. Mix lze skladovat až 3 dny při 4 °C. V případě potřeby lze připravit i menší množství mixu 4X EliZyme™ Lyo OneS SP a zbývající komponenty (4X EliZyme™ Lyo SP Mix a 3200X RTáza) znovu uskladnit při teplotě -20 °C.
4. Přidejte primery a sondy do mixu 4X EliZyme™ Lyo OneS SP a poté spusťte cyklus lyofilizace. Doporučujeme naředit směs s výše uvedenými složkami a vodou na 1x nebo 2x, aby se usnadnil proces lyofilizace. Směs má následující kritické teploty: teplota počátku kolapsu (Tc), kdy směs začíná ztrácet své původní fyzikální vlastnosti: -35,1 °C, teplota počátku skelného přechodu (Tg:) 68,9°C, střední bod Tg: 75,1°C a koncový bod Tg: 81.3°C.

Následující podmínky byly testovány ve skleněných 2ml zkumavkách obsahujících 500 µl EliZyme™ Lyo OneS SP mixu. Při použití standardních PCR zkumavek a destiček bude zapotřebí kratší doba sušení. V závislosti na lyofilizačním přístroji může být nutná další optimalizace.

Fáze	Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Tlak (µBar)	Popis
Zmrazení	-	+2 to +6	N/A	Atmosférický	Nanesení
	1	+5	10	Atmosférický	Inkubace
	2	-50	110	Atmosférický	Ramp (0.5 °C/min)
	3	-50	180	Atmosférický	Inkubace
Fáze primárního sušení	4	-45	10	30	Ramp (0.5 °C/min)
	5	-45	5400	30	Inkubace
Fáze sekundárního sušení	6	+20	130	30	Ramp (0.5 °C/min)
	7	+20	600	30	Inkubace
Konec cyklu	-	+20	N/A	Poloviční atmosférický	Odvětrání pomocí N ₂
	-	+20	N/A	Poloviční atmosférický	Uzavření
	-	+20	N/A	Atmosférický	Zavzdušnění

Primery

Primery by měly mít teplotu tání okolo 60 °C. Čím kratší je délka amplikonu, tím rychlejší jsou jednotlivé cykly. Doporučená délka amplikonu je mezi 80 bp až 200 bp. Délka amplikonu by neměla



překročit 400 bp. U TaqMan® sondy zvolte sondu blízko 5' primeru, vyhněte se koncovým guanosinovým zbytkům.

Nastavení reakce

Pro otestování mixu (získaného po 3. kroku lyofilizace) si připravte mastermix dle následující tabulky. Doporučujeme připravit také kontrolní zkumavku bez RTázy.

Komponenty	20 µl reakce	Finální konc.
4× ELiZyme™ Lyo OneS SP Mix	5 µl	1×
Forward primer (10 µM)	0.8 µl	400 nM
Reverse primer (10 µM)	0.8 µl	400 nM
Probe (10 µM)	0.4 µl	200 nM
Templátová RNA	1 pg – 1 µg celkové RNA, > 0.01 pg mRNA, 10 to 1×10 ⁸ kopií virové RNA	Variabilní*
PCR voda	Doplnit do 20 µl	

* Přidáním 2 až 5 µl vzorku se zvýší přesnost reakce.

PCR protokol

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Reverzní transkripce	55 °C	5–20 min*	1
Aktivace polymerázy	95 °C	3 min	1
Denaturace	95 °C	15 s	40-50
Annealing/Extenze	55–65 °C	30 s	
Melt curve analysis**			

* 5-10 minut pro singleplex, 10-20 minut pro multiplex.

** Volitelné, pouze pro hybridizační sondy.

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