



## EliZyme™ HS FAST

### 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™ HS FAST využívá protilátkou zprostředkovanou hot-start technologii, která inaktivuje enzym při teplotě nižší než 65 °C a zabraňuje tak tvorbě dimerů-primer komplexů a nespecifických produktů. Kombinace robustního enzymu a pokročilé chemie pufru umožňuje vynikající výkon při amplifikaci náročných templátů, jako je savčí genomová DNA, templátů bohatých na GC a AT báze a je rovněž ideální pro každodenní PCR aplikace, včetně Sangerova sekvenování, genotypizace, screeningu, konstrukce knihoven a multiplex PCR. Enzym je obzvláště odolný vůči PCR inhibitorům a je vhodný pro přímou PCR z nezpracovaných vzorků, včetně bakteriálních kultur, bakteriálních kolonií, krve a moči. EliZyme™ HS FAST má chybovost přibližně 1 chyba na  $2,0 \times 10^5$  začleněných nukleotidů. Enzymový systém se vyznačuje zvýšenou rychlostí, výtěžností a specifitou PCR. PCR produkty generované pomocí EliZyme™ HS FAST polymerázy jsou opatřené A-koncem a lze je použít pro TA klonování. Polymeráza obsažená v EliZyme™ HS FAST má 5'-3' exonukleázovou aktivitu, ale nemá 3'-5' exonukleázovou (proofreading) aktivitu.

Pro větší pohodlí je EliZyme™ HS FAST k dispozici jako 2X koncentrovaný Ready mix a EliZyme™ HS FAST MIX Red obsahující červené barvivo, které umožňuje přímé nanášení na gel (není potřeba žádné další nanášecí barvivo) a sledování migrace během gelové elektroforézy.

### Obsah

|                      | Kat. číslo | Obsah balení                    | Velikost balení |
|----------------------|------------|---------------------------------|-----------------|
| EliZyme™ HS FAST     | EZ5505     | 1×0.1 ml 5 U/μl + 4×1 ml buffer | 500 U           |
|                      | EZ5510     | 2×0.1 ml 5 U/μl + 1×8 ml buffer | 1000 U          |
|                      | EZ5520     | 4×0.1 ml 5 U/μl + 2×8 ml buffer | 2000 U          |
| EliZyme™ HS FAST MIX | EZ5720     | 5×1 ml mix                      | 200 rxns        |
|                      | EZ5760     | 2×7.5 ml mix                    | 600 rxns        |
| EliZyme™ HS FAST MIX | EZ5620     | 5×1 ml mix                      | 200 rxns        |
| Red                  | EZ5660     | 2×7.5 ml mix                    | 600 rxns        |



|                          | Pufr/MIX   | Obsah                                |
|--------------------------|------------|--------------------------------------|
| EliZyme™ HS FAST         | 5× buffer  | 15 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM dNTPs |
| EliZyme™ HS FAST MIX     | 2× mix     | 6 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM dNTPs  |
| EliZyme™ HS FAST MIX Red | 2× mix Red | 6 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM dNTPs  |

Doplňkový MgCl<sub>2</sub> 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

Pro experimentální stanovení optimální teploty annealingu doporučujeme provést teplotní gradient. Případně doporučujeme teplotu annealingu 55 °C a pokud jsou přítomny nespecifické produkty, teplotu zvyšovat v krocích po 2 °C.

Optimální extenze je dosažena při teplotě 72 °C. Optimální doba extenze závisí na délce amplikonu a složitosti templátu. Pro amplifikaci z eukaryotické DNA se doporučuje 20 sekund na kilobázi (kb) pro amplikony mezi 1 kb a 6 kb. U kratších amplikonů je možné použít rychlejší cyklování.

Při prvním provedení multiplex PCR se doporučuje provést teplotní gradient annealingu v rozmezí od 55 °C do 65 °C. V následujících experimentech by se měla použít teplota annealingu, která vede k nejlepší specifitě. Pro multiplex PCR by se neměly používat podmínky rychlého cyklování. Dobu extenze doporučujeme zpočátku nastavit na 90 sekund. Pro zvýšení výtěžnosti lze dobu extenze prodloužit.

Z bakteriálních kolonií vyberte sterilní špičkou kolonii a resuspendujte ji v 50 μl reakce, jak je popsáno níže. Z tekuté kultury přidejte 5 μl do finálního mixu. Prodlužte počáteční dobu denaturace na 10 minut.

V případě přímé PCR z krve/moči, přidejte 2 μl savčí krve nebo moči do 50 μl reakce, jak je popsáno níže.

### Složení reakční směsi

#### EliZyme™ HS FAST

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

| Komponenty                  | 50 μl reakce | Finální konc. |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| 5× EliZyme™ Reaction Buffer | 10 μl        | 1×            |
| Forward primer (10 μM)      | 2 μl         | 400 nM        |



|                                         |                                       |            |
|-----------------------------------------|---------------------------------------|------------|
| Reverse primer (10 µM)                  | 2 µl                                  | 400 nM     |
| Templátová DNA                          | < 500 ng genomické DNA, < 100 ng cDNA | Variabilní |
| EliZyme™ HS Taq DNA Polymerase (5 U/µl) | 0.25–1 µl                             |            |
| PCR voda                                | Doplnit do 50 µl                      |            |

### EliZyme™ HS FAST MIX

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

| Komponenty             | 50 µl reakce                         | Finální konc. |
|------------------------|--------------------------------------|---------------|
| 2× EliZyme™ HS Taq MIX | 25 µl                                | 1×            |
| Forward primer (10 µM) | 2 µl                                 | 400 nM        |
| Reverse primer (10 µM) | 2 µl                                 | 400 nM        |
| Templátová DNA         | < 500 ng genomické DNA, <100 ng cDNA | variabilní    |
| PCR voda               | Doplnit do 50 µl                     |               |

### EliZyme™ HS FAST MIX Red

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

| Komponenty                 | 50 µl reakce                         | Finální konc. |
|----------------------------|--------------------------------------|---------------|
| 2× EliZyme™ HS Taq MIX Red | 25 µl                                | 1×            |
| Forward primer (10 µM)     | 2 µl                                 | 400 nM        |
| Reverse primer (10 µM)     | 2 µl                                 | 400 nM        |
| Templátová DNA             | < 500 ng genomické DNA, <100 ng cDNA | variabilní    |
| PCR voda                   | Doplnit do 50 µl                     |               |

### PCR protokol

| Krok                | Teplota  | Čas      | Cykly |
|---------------------|----------|----------|-------|
| Iniciace denaturace | 95 °C    | 1–2 min* | 1     |
| Denaturace          | 95 °C    | 15 s     | 40    |
| Annealing           | 55–65 °C | 15 s     |       |
| Extenze             | 72 °C    | 1–90 s** |       |
| Finální extenze     | 72 °C    | 90 s***  | 1     |

\*Pro PCR z bakteriálních kolonií prodlužte počáteční denaturaci na 10 minut.

\*\*15 s/kb, pro amplikony kratší než 1 kb lze použít extenzi 1 s.

\*\*\*Pouze pro multiplexní PCR.



### Výrobce:

**ELISABETH PHARMACON, spol. s r. o.**

Rokycanova 4437/5, Brno-Židenice 615 00

[info@elisabeth.cz](mailto:info@elisabeth.cz) | [www.elisabeth.cz](http://www.elisabeth.cz) | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Číslo šarže



Datum expirace



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Výrobce



Počet reakcí v balení