



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 Red	EZ5620	5×1 ml mix	200 rxns
	EZ5660	2×7.5 ml mix	600 rxns



	Pufr/MIX	Obsah
EliZyme™ HS FAST	5× buffer	15 mM MgCl ₂ , 5 mM dNTPs
EliZyme™ HS FAST MIX	2× mix	6 mM MgCl ₂ , 2 mM dNTPs
EliZyme™ HS FAST 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

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	
Annealing	55–65 °C	15 s	40
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 | www.elisabeth.cz | tel.: +420 542 213 851



Katalogové číslo



Skladovací podmínky (teplotní limity)



Číslo šarže



Výrobce



Datum expirace



Počet reakcí v balení