Owi Green FAST qPCR Premix

Manuel d'utilisation

Références : 258493 - 258494 - 258495

POUR USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

CONDITIONNEMENT : 1 ml - 100 réactions (20 µL) / 5 ml - 500 réactions (20 µL) / 5 x 5 ml - 2500 réactions (20 µL)

TEMPÉRATURE DE STOCKAGE : -20°C à l'abri de la lumière

DURÉE DE CONSERVATION : un an à compter de la date de réception

DESCRIPTION DU PRODUIT :

Owi Green FAST qPCR Premix est conçu pour la PCR en temps réel basée sur un intercalant, le Owi Green Dye. Ce produit fournit des données en temps réel lors de l'amplification de l'ADN pendant la PCR en effectuant une détection quantitative du signal de fluorescence sur les canaux SYBR/™ FAM. Ce premix comprend un colorant de référence ROX dans deux tubes séparés et convient donc à tous les instruments qPCR (y compris les instruments à ROX élevé, à faible ROX ou n'utilisant pas le ROX). Il comprend également une Taq DNA polymérase Hot Start à base d'anticorps pour l'amplification, ce qui améliore considérablement la spécificité du produit tout en assurant l'efficacité de l'amplification.

Ce produit est fourni à une concentration de 2X et contient tous les composants nécessaires à la qPCR, à l'exception des amorces et des matrices, ce qui offre une grande commodité pour la manipulation.

LISTE DES COMPOSANTS :

Composant	1 mL	5 mL
2X Owi Green FAST qPCR Premix*	1 mL	5 mL
Colorant de référence 50X ROX I	50 µL	220 µL
Colorant de référence 50X ROX II	50 µL	220 µL

*contient de la taq ADN polymérase HotStart, du Mg2+, des dNTP, Owi Green, un tampon de réaction

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

INSTRUMENTS COMPATIBLES :

Types de ROX	Instruments qPCR
Pas de ROX	Série Bio-Rad iCycler™, série Roche LightCycler® Séries Qiagen/Corbett et autres
ROX Colorant de référence I	Biosystèmes™ appliqués 7000/7300/7700/7900HT, Biosystèmes™ appliqués StepOne™/StepOnePlus™ Eppendorf et autres
ROX Colorant de référence II	Applied Biosystems™ 7500/7500Fast, ABI ViiA™ 7, Applied Biosystems™ QuantStudio™, série Stratagene, Corbett Rotor-Gene® 3000P™ et autres

Remarque : Différents colorants de référence ROX peuvent être sélectionnés en fonction du type d'instrument qPCR. Veuillez vous référer au tableau ci-dessus pour le choix du colorant ROX

PRÉPARER:

1. Tubes Eppendorf, tubes PCR, pipettes et pointes, glacière ou bac à glace.
2. Amorces qPCR et matrices correspondantes.
3. Tubes dédiés pour la PCR en temps réel par fluorescence ou plaques dédiées et films optiques prêt à sceller.

PRÉCAUTIONS:

1. Lorsque vous utilisez le **2X Owi Green FAST qPCR Premix**, veuillez le décongeler complètement et le conserver à l'abri de la lumière avant de l'utiliser. L'exposition prolongée à la lumière entraîne une réduction des signaux fluorescents.
2. Le 2X **Owi Green FAST qPCR Premix** contient du glycérol. Mélangez doucement pour éviter les bulles d'air. Après mélange, récupérez tout le liquide au fond du tube par centrifugation. Après utilisation, remettez immédiatement le prémix au congélateur à -20 °C.
3. Ce prémix contient une polymérase. Veuillez préparer le mélange réactionnel sur de la glace. Pour une réutilisation de courte durée, stockez-le temporairement à 4 °C. Veuillez éviter les congélations et décongélations répétées.
4. Ce produit comprend deux colorants de référence ROX différents dans des tubes séparés. Sélectionnez le bon colorant de référence ROX en fonction du type d'instrument qPCR (veuillez-vous référer au tableau « Instruments compatibles »).

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

5. Veuillez utiliser des pointes de pipette appropriées et non contaminantes. Les embouts à filtre, sont recommandés pour minimiser la contamination croisée lors de la préparation de mélanges réactionnels qPCR.
6. Pour garantir une réaction réussie, il est recommandé d'utiliser des matrices d'ADN de haute qualité.

PROTOCOLE :

Avant l'expérience :

1. Veuillez vous assurer de la spécificité des amorces. Une concentration d'amorce de départ recommandée de 0,2 µM fournira de bonnes performances pour la plupart des cibles. Des titrations d'amorces supplémentaires de 0,1 µM à 1,0 µM aideront à optimiser l'efficacité de la réaction sans compromettre la spécificité.
2. Il est recommandé que la longueur de l'amplicon soit comprise entre 70 pb et 200 pb.
3. Il est recommandé d'établir une courbe standard en utilisant des dilutions en série de l'ADN matrice.
4. Il est recommandé d'ajouter 1 pg à 50 ng d'ADN matrice (génomique ou plasmidique) à 20 µL de mélange réactionnel et de définir toujours aucun contrôle de matrice (NTC). Pour les réactions RT-qPCR en deux étapes, le volume de la matrice d'ADNc ne doit pas dépasser 10 % du volume final de la réaction qPCR. Ou utilisez la dilution en série pour identifier le volume optimal du modèle.
5. Pour garantir la reproductibilité expérimentale, il est recommandé de définir des triplicats pour chaque échantillon et contrôle.

Réactif	Volume	Concentration finale
2X Owi Green FAST qPCR Premix	10 µL	1 fois
Amorce avant (10 µM)	0,4 µL	0,2 µM
Amorce inversée (10 µM)	0,4 µL	0,2 µM
Matrice d'ADN (< 50 ng)	≤ 2 µL	< 50 ng / rxn
50X ROX I ou 50X ROX II (en option)	0,4 µL	1 fois
Sans nucléase ddH2O	jusqu'à 20 µL	jusqu'à 20 µL

Pour l'expérience qPCR :

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com

1. Préparez le mélange réactionnel suivant sur de la glace :

   1) Décongelez le 2X **Owi Green FAST qPCR** Premix à température ambiante. Lorsqu'il est complètement décongelé, mélangez soigneusement le prémix pour éviter les bulles, centrifugez pour recueillir tout le liquide au fond du tube. Gardez-le sur de la glace.
   2) Calculez le volume total de mélange réactionnel de qPCR nécessaire pour l'expérience. Il est recommandé d'ajouter environ 10 % supplémentaires au volume théorique afin de compenser les pertes dues au pipetage. Distribuez avec précision le mélange de qPCR dans des tubes propres individuels ; évitez toute contamination du liquide.
   3) Ajoutez ensuite les amorces et le brin matrice correspondants dans chaque tube ou puits de réaction. Une fois tous les réactifs (mélange de qPCR, amorces, matrice, ROX si nécessaire, eau) ajoutés, mélangez soigneusement puis centrifugez immédiatement.
   4) Transférez ensuite le mélange réactionnel dans une plaque de qPCR dédiée, puis scellez-la soigneusement à l'aide d'un film optique d'étanchéité. Veillez à éviter au maximum la formation de bulles et tout contact entre le liquide et le film.
   5) Centrifugez la plaque de qPCR à 2500 rpm afin de rassembler toute la solution au fond des puits. La plaque est alors prête pour le thermocycleur.

2. Programmez la qPCR :

Étape 1	Pré-dénaturation	1 cycle	95 °C	3 min.
Étape 2	Cycles	40-45 cycles	95 °C	5 secondes
			60 °C	30 à 34 secondes*
Étape 3	Courbe de fusion	1 cycle	faire défaut	

* Assurez-vous que l'acquisition du signal est effectuée dans l'étape d'extension. Le temps d'extension doit être ajusté en fonction du temps minimum d'acquisition du signal par l'instrument qPCR en temps réel que vous utilisez. Réglez sur 30 s pour StepOnePlus™, 31 s pour ABI 7300 et 34 s pour ABI 7500.

ANALYSE DES DONNÉES :

1. Une courbe standard est générée à partir de la valeur de Ct et de la quantité d'échantillon introduite. Le coefficient de corrélation (R^2) de la courbe standard doit être supérieur à 0,98. La pente de la courbe standard doit se situer entre –3 et –3,5. L'efficacité d'amplification PCR (E) est généralement comprise entre 90 % et 120 %.
2. L'écart-type des valeurs de Ct entre les triplicats est généralement inférieur à 0,2.
3. Idéalement, la courbe de dissociation ne présente ni pics multiples, ni dimère d'amorces. Si nécessaire, les produits de qPCR peuvent être vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. La valeur de Tm observée sur la courbe de dissociation se situe généralement entre 80 °C et 95 °C.
4. Validation des Ct : pour être considérée comme valide, la valeur de Ct de l'amplification doit être au moins 5 cycles inférieure à celle du contrôle sans matrice (NTC), et la courbe de dissociation ne doit pas présenter de pics multiples.

DOMINIQUE DUTSCHER SAS

Dominique DUTSCHER SAS - 67170 BERNOLSHEIM - FRANCE
Tél. : +33 3 88 59 33 90 – www.dutscher.com
Service client – commande : info@dutscher.com
Support technique : demandes_techniques@dutscher.com