Owi Taq Master Mix Ready to Load

Manuel d'utilisation

Références : 258504 - 258505 - 258506

POUR USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT

CONDITIONNEMENT : 40 / 200 / 1000 Rxns de 50 µL de PCR - 1 mL / 1 x 5 mL / 5 x 5 mL

TEMPÉRATURE DE STOCKAGE : Stockage à -20°C.

DURÉE DE CONSERVATION : un an à compter de la date de réception lorsqu'il est correctement stocké.

DESCRIPTION DU PRODUIT :

Owi Taq est un Master Mix Ready to Load contenant tous les composants nécessaires à la PCR conventionnelle, à l'exception de l'ADN matrice et des amorces. Formulé en 2X, ce mélange intègre une ADN polymérase, dNTPs, $MgCl_2$, KCl, agents stabilisants ainsi qu'un colorant de charge permettant une migration directe sur gel d'agarose.
Compatible avec de nombreuses matrices : ADN purifié, ADNc, extraits bruts, colonies bactériennes ou cultures liquides,
Owi Taq Master Mix Ready to Load permet d'amplifier jusqu'à 10 kb à partir d'ADN génomique complexe et jusqu'à 20 kb à partir de matrices simples comme l'ADN lambda. Il est idéal pour des applications telles que la PCR standard, la PCR sur colonies ou encore la PCR directe à des fins de génotypage.

SOURCE D'ENZYME :

Le gène de l'ADN polymérase utilisé dans le **Owi Taq Master Mix Ready to Load** a été exprimé dans *E. coli* puis purifié par plusieurs étapes successives de séparation, et présente les propriétés enzymatiques suivantes :

- Inactivation thermique : non
- Activité exonucléase 5'-3' : Non
- Activité exonucléase de 3'-5' : oui
- Fidélité : 6x Taq
- Extrémités des produits d'amplification : extrémités franches (blunt ends)

LISTE DES COMPOSANTS :

Composant	OZYA011-40	OZYA011-200XL	OZYA011-1000
Owi Taq Master Mix Ready to Load (2X)	1 mL	1 x 5 mL	5 x 5 mL

PRÉCAUTIONS :

1. Préparez tous les composants de la réaction sur de la glace, puis transférez rapidement le mélange réactionnel dans un thermocycleur préchauffé à 98 °C.
2. Mélanger soigneusement tous les composants et les rassembler au fond du tube par une centrifugation brève avant utilisation.
3. Ajouter **Owi Taq Master Mix Ready to Load** en dernier dans le mélange réactionnel afin d'éviter une dégradation des amorces par l'activité exonucléase 3'→5'.

PROTOCOLE STANDARD :

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

Réactif	20 µL	50 µL	Concentration finale
Owi Taq Master Mix Ready to Load 2X	10 µL	25 µL	1X
Amorce forward (10 µM)	0,4 µL	1 µL	0,2 µM
Amorce reverse (10 µM)	0,4 µL	1 µL	0,2 µM
Matrice d'ADN	Variable	Variable	< 300 ng/rxn*
Eau exempt de DNase/RNase	Ajuster à 20 µL	Ajuster à à 50 µL	-

***Remarque** : La concentration optimale de la réaction varie selon les différentes matrices d'ADN. Voir la section « **Considérations et optimisations PCR** » ci-dessous.*

2. **Réglez le programme de cyclisme PCR*** :

Étape 1	Pré-dénaturation	1 cycle	98 °C	45 sec
Étape 2	Cycles	30 cycles	98 °C	10 sec
	Hybridation		55 à 65 °C	30 sec
	Elongation		72 °C	20 à 30 sec/kb
Étape 3	Elongation finale	1 cycle	72 °C	5 minutes
	Maintenir	1 cycle	4 à 12 °C	∞

***Remarque** : le programme optimal peut varier selon la matrice et la taille de l'amplicon. Voir la section "**Considérations et optimisations PCR**".*

CONSIDÉRATIONS ET OPTIMISATIONS PCR :

Matrice :
Les quantités recommandées d'ADN matrice varient selon le type de matrice, comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Type de matrice d'ADN	Quantité d'entrée pour un mélange réactionnel de 50 µL*
ADN génomique (humain, animal ou végétal)	10 ng à 100 ng
ADN génomique (*E. coli*, génome lambda)	500 pg – 200 ng
ADN plasmidique	1 à 10 ng
ADNc (mélange de réaction de transcription inverse)	< 5 µL (Moins de 10 % du volume de réaction final)

***Remarque** : si de longs fragments sont amplifiés, la quantité d'entrée de la matrice doit être augmentée de manière appropriée.*

Amorces :
Les amorces doivent être des oligonucléotides d'une longueur comprise entre 20 et 40 nucléotides, avec une teneur en GC située entre 40 % et 60 %. Elles peuvent être conçues et analysées à l'aide de logiciels spécialisés tels que Primer3. La concentration finale recommandée pour chaque amorce dans la réaction PCR se situe entre 0,1 et 1 µM.

Cycles PCR :
Dénaturation

Une prédénaturation de 45 secondes à 98 °C permet de dénaturer la majorité des matrices ADN.
Pour les matrices complexes (ex. ADN génomique humain), il est recommandé de prolonger cette étape jusqu'à 3 minutes pour garantir une dénaturation complète. Pour les matrices simples (ex. plasmides), une dénaturation standard de 5 à 10 secondes à 98 °C est généralement suffisante.

Annealing
IMPORTANT : la température de d'hybridation optimale pour Owi Taq Master Mix Ready to Load est généralement plus élevée que celle des autres polymérases PCR.
Les règles générales sont les suivantes :

a) amorces **> 20 nt** : la température d'hybridation recommandée est **Tm + 3 °C** (Tm de l'amorce la plus basse).

b) amorces **< 20 nt** : utiliser simplement **Tm de l'amorce la plus basse** comme température d'hybridation.

Pour de nouveaux jeux d'amorces, une PCR en gradient est recommandée afin de déterminer la température d'hybridation optimale. Dans un protocole d'amplification en deux étapes (PCR en 2 étapes), la température d'hybridation doit être identique à la température d'élongation.

Elongation

La température d'élongation recommandée pour **Owi Taq Master Mix Ready to Load** est de 72 °C. Le temps d'élongation dépend de la longueur et de la complexité de la matrice. Pour des matrices peu complexes telles que l'ADN plasmidique, le temps d'elongation est de 10 sec/kb. Pour des matrices complexes, telles que l'ADN génomique humain, il est nécessaire d'augmenter le temps d'extension à 20 à 30 sec/kb. Pour les modèles d'ADNc, le temps d'extension doit être fixé à < 1 min/kb dans certains cas.

Cycles

Pour obtenir un rendement suffisant en produits de PCR, **25 à 35 cycles** sont recommandés.