Owi Taq Hot Start Master Mix Ready To Load

Manuel d'utilisation

Références : 258507 - 258508 - 258509 - 258510

POUR USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT

CONDITIONNEMENT : 20 / 100 / 500 / 1000 Rxns de 50 µl PCR

1 x 0.5 mL / 2 x 1.25 mL / 10 x 1.25 mL / 20 x 1,25 mL

TEMPÉRATURE DE STOCKAGE : Stockage à long terme à -20 °C. Conserver à +4 °C jusqu'à 6 mois.

DURÉE DE CONSERVATION : La date de péremption du produit à -20 °C est indiquée sur l'étiquette.

DESCRIPTION DU PRODUIT :

Owi Taq Hot Start Master Mix Ready to Load est une solution prête à l'emploi au format 2x, combinant tous les composants nécessaires à une PCR efficace : la Taq ADN polymérase Hot Start Owi, un tampon à base d'ammonium, des dNTPs, du chlorure de magnésium ($MgCl_2$), un stabilisant et un colorant de migration bleu inerte. Les produits PCR peuvent être directement déposés sur un gel d'agarose pour électrophorèse et visualisation.

Le colorant migre à environ 400–500 pb sur un gel d'agarose à 0,5–1,5 %, en fonction des conditions du gel.

Owi Taq ADN polymérase Hot Start est une version chimiquement modifiée de la Taq polymérase classique. Un groupe inhibiteur thermosensible est fixé sur le site actif, rendant l'enzyme inactive à température ambiante. Ce blocage est levé lors de l'étape initiale de dénaturation par la chaleur, activant ainsi l'enzyme.

Ce mécanisme Hot Start évite les amplifications non spécifiques et la formation de dimères de primers pendant la préparation de la réaction, permettant une plus grande spécificité et de meilleurs rendements par rapport à une Taq polymérase standard.

COMPOSANTS:

- Tris-HCl pH 8,5, $(NH4)_{2S04}$, 3,0 mM MgCl2, 0,2 % Tween® 20
- 0,4 mM de chaque dNTP
- Owi Taq Hot Start Polymérase
- Colorant bleu inerte et stabilisant

Composants	OZYA013-20	OZYA013-100	OZYA013-500	OZYA013-1000
Owi Taq Hot Start Master Mix Ready to Load 2X	0,5 mL	2 x 1.25 mL	10 x 1.25 mL	20 x 1.25 mL

CONTRÔLE QUALITÉ :

Owi Taq Hot Start Polymerase est testée pour l'absence d'activités contaminantes : aucune activité endonucléase, activité de clivage simple brin (nicking) ni activité exonucléase n'a été détectée.

PROTOCOLE :

Ce protocole sert de guide pour garantir des résultats optimaux en PCR avec le Owi Taq Hot Start Master Mix Ready to Load.
Les conditions optimales de réaction (temps d'incubation, températures, quantité d'ADN matrice) peuvent varier selon les applications et doivent être déterminées individuellement.

1. Décongeler le Master Mix et les solutions d'amorces. Il est essentiel que les solutions soient entièrement décongelées et bien homogénéisées avant utilisation afin d'éviter toute concentration localisée en sels.
   Important : centrifuger brièvement les tubes avant usage.

2. Préparer le mélange réactionnel.

Le tableau 1 présente la composition recommandée pour un volume final de 50 µl.

Tableau 1. Mélange réactionnel et ADN matrice
* Conditions de départ suggérées ; conditions théoriquement utilisées entre parenthèses.

Réactif	20 µL	50 µL	Concentration finale
2X Owi Taq Hot Start Master Mix Ready to Load	10 µL	25 µL	1X
Amorce sens (10 µM)	0,4 µL	1 µL	0,2 µM
Amorce antisens (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	-

3. Mélanger soigneusement le mélange réactionnel, puis distribuer les volumes appropriés dans les tubes de réaction.
4. Ajouter l'ADN matrice dans chaque tube contenant le mélange réactionnel.
5. Programmer le thermocycleur selon les recommandations du fabricant. Chaque programme doit commencer par une étape d'activation thermique initiale à 95 °C pendant 15 minutes.
   Voir le **tableau 2** pour un exemple de programme.

Pour une spécificité et un rendement optimal, les températures et temps de cycle doivent être ajustés pour chaque nouvelle cible ou paire d'amorces.

6. Placer les tubes dans le thermocycleur et démarrer la réaction.

Tableau 2. Programme PCR en trois étapes

Stage 1	Pré-denaturation	1 cycle	95 °C	15 min[a]
Stage 2	Cycles	25-35 cycles	95 °C	20 - 30 sec[b]
			50 – 65 °C	20 - 40 sec[c]
			72 °C	60 sec/kb[d]
Stage 3	Elongation finale	1 cycle	72 °C	5 min[e]
	Maintenir	1 cycle	4 – 12 °C	∞

a. Activation de la Owi Taq Hot Start Polymérase.
b. Étape de dénaturation : cette étape est la première phase de chaque cycle. La réaction est chauffée à 95 °C pendant 20 à 30 secondes. Cette température provoque la dénaturation de l'ADN matrice en rompant les liaisons hydrogène entre les bases complémentaires, produisant ainsi des brins simples.
c. Étape d'annealing : la température est abaissée entre 50 et 65 °C pendant 20 à 40 secondes, permettant aux amorces de s'hybrider aux brins simples d'ADN matrice. En général, la température d'annealing est fixée environ 3 à 5 °C en dessous de la température de fusion (Tm) des amorces utilisées.
d. Étape d'élongation : la Owi Taq polymérase Hot Start présente une activité optimale à 72 °C. À cette étape, l'enzyme synthétise un nouveau brin d'ADN complémentaire au brin matrice. Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier. En règle générale, à sa température optimale, l'enzyme polymérise environ 1 000 bases par minute.
e. Elongation finale : cette étape unique est parfois ajoutée à 72 °C pendant 5 minutes après le dernier cycle de PCR afin de s'assurer que tous les brins d'ADN partiellement synthétisés les soient entièrement.

NOTES :

Matrice d'ADN

Type de matrice d'ADN	Quantité d'entrée pour un mélange réactionnel de 50 µL*
ADN génomique (humain, animal ou végétal)	1 ng – 200 ng
ADN génomique (*E. coli*, génôme lambda)	1 ng – 10 ng
ADN plasmidique	0.1 ng – 1 ng

- Pour l'amplification de fragments d'ADN plus longs, il est possible d'ajouter davantage de Owi Taq polymérase Hot Start au mélange PCR.
- La concentration finale en $MgCl_2$ dans le Owi Taq Hot Start Master Mix Ready to Load est de 1,5 mM.
  Dans certaines applications, une concentration supérieure peut être nécessaire pour obtenir des résultats optimaux.
  Utiliser une solution de $MgCl_2$ à 25 mM pour ajuster la concentration en Mg^{2+} selon le **tableau 3.**

Tableau 3. Volume supplémentaire (µl) de MgCl2 par réaction de 50 µl :

Final MgCl2 conc. en réaction (mM)	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
Volume de 25 mM MgCl2 (µL)	0	1	2	3	4	5	6