Owi AptaFi Hot Start Master Mix

Manuel d'utilisation

Références : 258513

POUR USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT

CONDITIONNEMENT : 20 / 100 / 500 Rxns de 50 µl de PCR – 1 x 0.5 mL / 2 x 1.25 mL / 10 x 1.25 mL

TEMPÉRATURE DE STOCKAGE : Conserver à -20°C. Le produit peut être conservé à 4 °C pendant 1 mois.

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

DESCRIPTION DU PRODUIT :

Owi AptaFi Hot Start Master Mix est une ADN polymérase à haute-fidélité, spécialement conçue pour les applications PCR exigeant à la fois une précision maximale et une grande robustesse. Dérivée d'une polymérase de type Pfu possédant une activité exonucléase 3'→5' (proofreading), elle intègre des mutations spécifiques augmentant la processivité et l'affinité pour l'ADN, assurant des rendements élevés même sur des matrices complexes ou de grande taille.
Grâce à son système de correction d'erreurs, **Owi AptaFi Hot Start Master Mix** est jusqu'à 100 fois plus fidèle que la Taq polymérase standard, ce qui en fait la solution idéale pour les applications où la moindre mutation compte : mutagenèse dirigée, clonage, édition génomique, préparation de banques NGS ou encore PCR multiplexée de haute spécificité.
Son système Hot Start, basé sur une inhibition réversible par aptamère, permet une mise en place des réactions à température ambiante tout en évitant la formation d'amorces-dimères et les amplifications non spécifiques. **Owi AptaFi Hot Start Master Mix** permet des vitesses d'extension rapides (10–30 s/kb) et l'amplification efficace de fragments dépassant 17 kb, même à partir de matrices complexes.

LISTE DES COMPOSANTS:

Composant	OZYA014-20	OZYA014-100	OZYA014-500
2X Owi AptaFi Hot Start Master Mix	0.5 mL	2 x 1.25 mL	10 x 1.25 mL

La Master Mix 2X contient 6 mM de $MgCl_2$, 2 mM de dNTPs, des stabilisants et des activateurs.

L'ajout d'activateurs PCR ou de $MgCl_2$ supplémentaires dans la réaction n'est pas recommandé.

Protocole Standard :

1. Préparez le mélange réactionnel :

Réactif	25 µL réaction	50 µL réaction	Concentration finale
2x Owi AptaFi Hot Start Master Mix	12.5 µL	25 µL	1x
Amorce sens (10 µM)	1 µL	2 µL	0,4 µM
Amorce antisens (10 µM)	1 µL	2 µL	0,4 µM
Template DNA	Variable	variable	variable
PCR grade dH2O	Ajuster à 25 µL	Ajuster à 50 µL	-

2. Effectuez le cycle en utilisant les conditions basées sur le tableau suivant :

Etape 1	Pre-dénaturation	1 cycle	95 °C	1 min
Etape 2	Dénaturation	25 – 35 cycles	98 °C	15 sec
	Annealing		60 – 75 °C	15 sec
	Elongation		72 °C	10 - 30 sec/kb

CONSIDÉRATIONS ET OPTIMISATIONS PCR :

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

DNA template type	Quantité pour 25 µL*	Quantité pour 50 µL*
Genomic DNA (human, animals, or plants)	2,5 ng – 250 ng	5 ng – 500 ng
Plasmid or viral DNA	2.5 pg – 250 pg	5 pg – 500 pg

**Remarque : en cas d'amplification de fragments longs, la quantité de matrice doit être augmentée en conséquence.*

Amorces
Nous recommandons des amorces de 20 à 40 nucléotides, avec une teneur en GC comprise entre 40 et 60 %.

Les amorces peuvent être conçues à l'aide de logiciels comme Primer3.
La concentration finale de chaque amorce doit être comprise entre 0,2 et 0,6 µM dans la réaction PCR.

Cycle PCR

Dénaturation

Une dénaturation initiale de 1 minute à 95 °C est recommandée.
Pour les matrices complexes ou riches en GC, une température plus élevée (98–100 °C) peut améliorer le rendement.

Annealing (Hybridation):

La température d'hybridation optimale pour le **Owi AptaFi Hot Start Master Mix** est généralement plus élevée que pour d'autres polymérases de PCR. Nous recommandons donc de réaliser une PCR en gradient afin de déterminer la température la plus appropriée. La règle générale 4 × (G + C) + 2 × (A + T) °C peut être utilisée comme point de départ.

Pour le protocole d'amplification en deux étapes (2-step PCR), la température d'hybridation doit être réglée entre 65 et 72 °C et éventuellement ajustée en fonction des résultats obtenus.

Elongation

La température d'élongation recommandée est de 72 °C.
Le temps d'élongation dépend de la longueur et de la complexité de la matrice. Pour la plupart des applications, 30 s/kb est adapté, mais un temps plus court (jusqu'à 10 s/kb) est possible.
La PCR en 2 étapes (fusion annealing/élongation) entre 68 °C et 75 °C est également compatible.

PCR multiplex

Dans les réactions multiplex, le temps d'élongation optimal dépend de la complexité de la matrice, de la taille des amplicons et du nombre de cibles. Nous recommandons de commencer avec un temps basé sur le fragment le plus long attendu, puis d'ajuster par paliers de 10 à 30 secondes si nécessaire.

Nombre de cycles

Entre 25 et 35 cycles sont généralement recommandés.

Visualisation sur gel

Étant donné que la technologie Hot Start du Owi AptaFi repose sur un aptamère, celui-ci peut apparaître sur gel d'agarose sous la forme d'une bande d'environ 40 pb. La présence de cette bande ne doit pas être interprétée comme une amplification non spécifique.

PRODUITS ASSOCIÉS

AGAROSE	
OZYI001	Owi Agarose Molecular Grade - Low EEO
OZYI002	Owi Agarose Standard

LADDER ADN	
OZYC006-500	Owi ExactLadder DNA 100bp Ready to Load

POLYMÉRASE *(Routine, Hot Start, Haute-fidélité)*	
OZYA011	Owi Taq Master Mix Ready to Load
OZYA013	Owi Taq Hot Start Master Mix Ready to Load

COLORANT ADN	
OZY755110	Owi EmeralDye Safe DNA Stain

MIX dNTP	
OZYJ001-1000	Owi dNTP Mix 40mM (10mM dATP, dCTP, dGTP & dTTP) 1 ml