

ADN POLYMÉRISE HI-FI POP

Avec 5x tampon Hi-Fi (7,5 mM MgCl₂)

Concentration : 2 unités/μl

Chat. Réf. : 257650

1000 unités

MADE IN DENMARK

	L'ADN de la Hi-Fi Pop Polymérase	5x tampon Hi-Fi, 7,5 mM MgCl ₂	MgCl ₂ 25 mM
N° d'identification	Référence : Réf. CL0.250-0045	Référence : CL1.500-0049	Référence : Réf. CL1.500-0047

Caractéristiques clés

- Haute fidélité : > 60x Taq1)
- Amplification à longue portée : 18 kb d'ADN génomique humain
- Taux d'allongement élevé : 10 sec/kb
- Excellentes performances sur une vaste gamme d'amplifions (AT élevé et GC élevé)
- Recommandé pour le clonage, la mutagenèse et d'autres applications moléculaires nécessitant une fidélité extrêmement élevée

L'ADN polymérase Hi-Fi Pop est une ADN polymérase chimérique thermostable créée spécifiquement pour l'amplification à faible polarisation et haute fidélité d'une vaste gamme d'amplifions. L'ADN polymérase Hi-Fi Pop offre un allongement et une processivité à grande vitesse, grâce à sa fusion avec un domaine de liaison à l'ADN.

¹⁾ Déterminé par une nouvelle analyse basée sur le NGS de la mauvaise incorporation des nucléotides pendant la PCR

Protocole

Les conditions de réaction optimales telles que les temps d'incubation, les températures et la quantité d'ADN matrice peuvent varier et doivent être déterminées individuellement. L'amplification de modèles à forte teneur en GC, de structures secondaires étendues ainsi que d'une amplification à longue portée peut nécessiter plus d'optimisation - pour des conseils, voir la section *Stratégies d'optimisation*.

Préparez les mélanges réactionnels dans une zone distincte de celle utilisée pour la préparation de l'ADN ou l'analyse du produit. **Travaillez sur la glace en tout temps.**

1. Décongélation 5x tampon Hi-Fi, solutions de mélange et d'amorçage dNTP. **Un précipité est souvent observé dans le tampon Hi-Fi 5x après décongélation. Il est recommandé de décongeler complètement et de bien mélanger le tampon pour assurer une remise en suspension appropriée des précipités.**
2. Préparez un mélange maître selon le tableau 1. Le mixage maître contient généralement tous les composants nécessaires à l'amplification, à l'exception de l'ADN modèle. Il est important d'ajouter la dernière forme d'ADN polymérase Hi-Fi Pop pour éviter la dégradation de l'amorce causée par l'activité de l'εξονυχλ[ασε 3ε→5ε.
3. Mélangez soigneusement le mélange principal et distribuez les volumes appropriés dans des tubes de réaction. Mélangez doucement, par exemple en pipétant le mélange principal de haut

Tableau 1. Composants de réaction recommandés

Composant	Vol./réaction*	Concentration finale*
5x tampon Hi-Fi	5 μl	1x
Mixage dNTP (10 mM chacun)	0,5 μl	0,2 mM de chaque dNTP
Amorce A (10 μM)	0,5 μl	0,2 μM
Amorce B (10 μM)	0,5 μl	0,2 μM
25 mM MgCl ₂	0 μl (0 – 3 μl)	1,5 mM (1,5 à 4,5 mM)
Hi-Fi DNA Pol. 2U/μl	0,25 μl (0,125 à 0,5 μl)	0,5 unité (0,25 à 1 unité)
Bétaïne (5M)**	5 à 10 μl	1 à 2 millions
H2O de qualité PCR	X μl	-
ADN matrice	X μl	ADN génomique : 20 (10 – 500 of) ADN plasmidique : 0,5 ng (0,1 – 1 ng) ADN bactérien : 5 ng (1 – 10 ng)
Volume TOTAL	25 μl	-

* Conditions de départ suggérées ; conditions théoriquement utilisées entre parenthèses.

** Suggéré pour l'amplification riche en GC et l'amplification à longue portée. Voir la section *Stratégies d'optimisation*.

Tableau 2. Programme PCR en trois étapes

Pas	Durée du cycle	Température
Dénaturation initiale	2 min)	98 °C
25 à 35 cycles	10 à 20 secondes)	98 °C
4. Ajoutez de l'ADN matrice aux tubes individuels contenant le mixage maître.	15 à 30 secondes)	55 à 70 °C
5. Allongement final	10 à 60 secondes)	72 °C
5. Allongement final	Durée 5 min)	72 °C

Programmez le thermocycleur conformément au tableau 2. Pour un rendement et une spécificité maximum, les températures et les temps de cycle doivent être optimisés pour chaque nouvelle cible de modèle ou paire d'amorces.

6. Placez les tubes dans le thermocycleur et démarrez la réaction.

^{un}. Dénaturation : une dénaturation initiale de 2 minutes est suffisante pour la plupart des modèles. Pendant le thermocyclage, 10 secondes fonctionnent généralement très bien. Des temps de dénaturation plus longs peuvent être nécessaires pour la PCR à longue portée ou l'amplification à partir de matrices à forte teneur en GC.

^b Recuit d'apprêt : En règle générale, la température de recuit est d'environ 3 à 5 °C inférieure à la T_m (température de fusion) des apprêts utilisés. **En raison de la teneur élevée en sel du tampon Hi-Fi 5x, la température de recuit sera probablement plus élevée qu'avec des tampons PCR plus traditionnels.**

^c Extension : La température d'extension recommandée est de 72°C. Les temps d'extension dépendent fortement de la longueur de l'amplicon. **En général, nous recommandons un temps d'extension de 10 à 30 secondes par kb pour les cibles génomiques complexes. 10 secondes par kb sont souvent suffisantes pour les cibles plus simples (comme les plasmides) ou les cibles complexes courtes (< 3 kb). 30 à 60 secondes par kb sont recommandées pour les amplis longs (> 3 kb).**

Stratégies d'optimisation

Amplification longue portée

- Des temps d'extension plus longs résolvent souvent l'amplification à faible rendement de longs amplicons.
- L'augmentation de la quantité d'ADN polymérase Hi-Fi Pop (jusqu'à 1U) a souvent résolu des réactions à faible rendement à partir de très longs objectifs (>8 kb)
- L'augmentation de la concentration de dNTP (jusqu'à 1,6 µM) augmente souvent le rendement et diminue la création de produits non spécifiques.
- L'ajout d'une solution de bétaïne 1-2 M améliore souvent les performances de réaction (voir Produits supplémentaires pour commander des informations).
- Une concentration accrue du modèle augmentera le rendement du produit.
- Une concentration accrue de l'amorce peut augmenter le rendement du produit pour certaines réactions.

Amplification riche en GC

- L'ajout d'une solution de bétaïne de 1 à 2 M améliore souvent les performances de réaction (voir Produits supplémentaires pour plus d'informations sur la commande).

Amorces

- Il est recommandé d'utiliser des amorces de 20 à 40 nucléotides avec une teneur en GC de 40 à 60 %.
Logiciel en ligne tel que le Primer3plus

<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> peut être utilisé pour concevoir des apprêts.

MgCl₂

- La concentration optimale de MgCl₂ doit être déterminée empiriquement, mais dans la plupart des cas, une concentration de 1,5 mM, telle que fournie dans le tampon Hi-Fi 1x commun, produira des résultats satisfaisants. Le tableau 3 indique le volume de 25 mM de MgCl₂ à ajouter au mélange maître si une concentration plus élevée de MgCl₂ est requise.

Tableau 3. Volume supplémentaire (µl) de MgCl₂ par réaction de 25 µl

MgCl ₂ conc. final en réaction	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
Volume de 25 mM MgCl ₂	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3

Composants du kit

- **2U/µl d'ADN polymérase Hi-Fi Pop dans un tampon de stockage**
50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1,0 mM DTT, 0,1 % Tween 20, 50 % Glycérol
- **5x tampon Hi-Fi (7,5 mM MgCl₂)**
- **25 mM MgCl₂**
Pour une optimisation éventuelle des conditions de PCR.

Solution d'amélioration de la bétaine 5 M

Vendu séparément. N° de catalogue : A351104

Plus d'infos

Stockage et stabilité recommandés

Conservation à long terme à -20 °C. La date de péremption du produit à -20 °C est indiquée sur l'étiquette.

Facultatif : Conserver à +4 °C jusqu'à 6 mois.

Contrôle qualité

L'ADN polymérase Hi-Fi Pop est testée pour détecter les activités contaminantes, sans aucune trace d'activité endonucléase ou d'activité d'entaillement. De plus, la capacité à longue portée est testée sur une cible d'ADNg humain de 18 kb.

Définition de l'unité

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmoles de dNTP dans une forme d'ADN précipitable à l'acide en 30 minutes à 72 °C dans des conditions de test standard.

À des fins de recherche seulement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

D'autres tailles de produits, combinaisons et solutions personnalisées sont disponibles. Veuillez consulter www.dutscher.com ou demander notre liste complète de produits pour PCR Enzymes. Pour des solutions personnalisées, veuillez nous contacter.

Fabriqué au Danemark

Émis : 01/2022