

HI-FI POP ADN POLYMERASE

Avec tampon Hi-Fi 5x (7,5 mM MgCl₂)

Concentration : 2 unités/µl

Chat. N° : 257651
100 unités

MADE IN DENMARK

	ADN Hi-Fi Pop Polymérase	5x tampon Hi-Fi, 7,5 mM de MgCl ₂	MgCl ₂ 25 mM
Numéro d'identification	CL0.020-0045	CL1.500-0049	CL1.500-0047
Couleur du capuchon	Noir	Clair	Clair
Contenu	50 µl	2 x 1,5 ml	1,5 ml

Principales caractéristiques

- Haute fidélité : > 60x Taq₁)
- Amplification fragments longs: 18 kb d'ADN génomique humain
- Vitesse d'élongation élevée : 10 sec/kb
- Excellentes performances même sur les séquences complexes (riches en AT ou en GC)
- 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 haute fidélité. L'ADN polymérase Hi-Fi Pop offre une haute vitesse d'élongation et processivité, grâce à sa fusion avec un domaine de liaison à l'ADN.

¹Déterminé grâce à une nouvelle analyse basée sur NGS de la mauvaise incorporation de nucléotides lors de 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 matrice riche en GC, des structures secondaires complexes ainsi qu'une amplification de fragments très longs peuvent nécessiter davantage 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 tout le temps.

1. Décongelez les solutions de tampon Hi-Fi 5x, le mix de dNTP et les amorces. 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 adéquate des précipités.

2. Préparez un master mix selon le tableau 1. Le master mix contient généralement tous les composants nécessaires à l'amplification, à l'exception de l'ADN matrice. Il est important d'ajouter l'ADN polymérase Hi-Fi Pop en dernier pour éviter la dégradation des amorces causée par l'activité exonucléase 3'-5'.

3. Mélangez soigneusement le master mix et distribuez les volumes appropriés dans les tubes réactionnels. Mélanger délicatement, par exemple en pipetant et refoulant le master-mix plusieurs fois.

4. Ajoutez de l'ADN matrice aux tubes individuels contenant le master mix.

5. Programmez le thermocycleur selon le tableau 2. Pour un rendement et une spécificité maximaux, 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.

Tableau 1. Composants de réaction recommandés

Composant	Vol./réaction*	Concentration finale*
Tampon Hi-Fi 5x	5 µl	1 fois
mélange 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 de MgCl ₂	0 µl (0 - 3 µl)	1,5 mM (1,5 - 4,5 mM)
Hi-Fi Pop ADN Pol. 2U/µl	0,25 µl (0,125 - 0,5 µl)	0,5 unité (0,25 - 1 unité)
Bétaïne (5M)**	5 à 10 µl	1 - 2M
PCR-grade H ₂ O	X µl	-
ADN matrice	X µl	ADN génomique : 20 ng (10 - 500 ng) 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 une amplification riche en GC et une amplification longue. Voir section Stratégies d'optimisation.

Tableau 2. Programme PCR en trois étapes

Étape	Durée du cycle	Température
Dénaturation initiale	2 minutes ^{a)}	98 °C
25 à 35 cycles	10 - 20 secondes ^{a)}	98 °C
	15 - 30 secondes ^{b)}	55 - 70 °C
	10 à 60 secondes ^{c)}	72 °C
Allongement final	5 minutes	72 °C

^aDénaturation : une dénaturation initiale de 2 minutes est suffisante pour la plupart des matrices. 10 secondes fonctionnent généralement très bien. Des temps de dénaturation plus longs peuvent être nécessaires pour une amplification de fragments longs ou une amplification à partir de matrices à forte teneur en GC.

^bhybridation des amorces : généralement, la température d'hybridation est d'environ 3 à 5 °C en dessous de la T_m(température de fusion) des amorces utilisées. En raison de la teneur élevée en sel du tampon Hi-Fi 5x, la température d'hybridation sera probablement plus élevée qu'avec les tampons PCR plus traditionnels.

^cExtension : La température d'extension recommandée est de 72°C. Les temps d'extension dépendent fortement de la longueur de l'amplicon. Généralement, 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 des cibles plus simples (comme un plasmide) ou des cibles complexes courtes (< 3 Ko). 30 à 60 secondes par Kb sont recommandés pour les amplicons longs (> 3 Ko).

Stratégies d'optimisation

Amplification de fragments longs

- Des temps d'extension plus longs permettent d'améliorer le rendement de fragments longs
- Augmenter la quantité d'ADN polymérase Hi-Fi Pop (jusqu'à 1U) a souvent permis de résoudre des problèmes de rendement sur des cibles très longues (> 8 Kb)
- Une concentration accrue 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 à 2 M améliore souvent les performances de réaction (voir Produits supplémentaires pour les informations de commande).
- Augmenter la concentration de la matrice augmentera le rendement
- Augmenter la concentration des amorces peut augmenter le rendement de certaines réactions.

Amplification riche en GC

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

Amorces

-Des amorces de 20 à 40 nucléotides avec une teneur en GC de 40 à 60 % sont recommandées. Des logiciels en ligne tels que Primer3plus

<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> peuvent être utilisés pour concevoir des amorces.

MgCl₂

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

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

MgCl ₂ final:conc. en réaction (mM)	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

- ADN polymérase Hi-Fi Pop 2U/µl dans un tampon de stockage
Tris-HCl 50 mM pH 8,0, KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1,0 mM, Tween 0,1 % -20, 50% Glycérol

-Tampon Hi-Fi 5x (7,5 mM MgCl₂)

- 25 mM de MgCl₂
Pour une éventuelle optimisation des conditions de PCR.

Solution Ehancer bêtaïne 5 M

Vendu séparément, référence : 257543

Plus d'informations

Stockage et stabilité recommandés

Stockage longue durée à -20 °C. La péremption du produit à -20 °C est indiquée sur l'étiquette.

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

Contrôle de qualité

L'ADN polymérase Hi-Fi Pop est testée pour les activités contaminantes sans aucune trace d'activité endonucléase. De plus, la capacité sur fragments longs a été 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 par un acide en 30 minutes à 72 °C dans des conditions de test standard.

Pour usage de recherche uniquement. 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 les enzymes PCR. Pour des solutions personnalisées, veuillez nous contacter.

Fabriqué au Danemark

Publié le 01/2022