

FIREPol® DNA Polymerase

(5 U/μl)

| Numéro de catalogue | Taille de l'emballage (5 U/μl) |
|---------------------|--------------------------------|
| 01-01-0000S | 100 U |
| 01-01-00500 | 500 U |
| 01-01-01000 | 1000 U |
| 01-01-02000 | 2000 U |

Envoi: À température ambiante

Numéro de lot et date d'expiration: Voir flacon

Stockage et stabilité:

- Stockage de routine à -20°C jusqu'à la date de péremption
- Peut être conservé à +4°C jusqu'à 6 mois
- Stabilité à température ambiante (15–25°C) pendant 1 mois
- Stabilité gel-dégel: 30 cycles

Préparation de la réaction: À température ambiante

Fabriqué par Solis BioDyne, conformément au système de gestion de la qualité certifié ISO 9001 et ISO 13485.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

1/8

- **FIREPol® DNA Polymerase** (5 unités/μl) dans 20 mM de Tris-HCl pH 8.7 à 25°C, 100 mM de KCl, 0.1 mM d'EDTA, 50 % de glycérol (v/v) et des stabilisants.
- **FIREPol® 10x Buffer B** (sans Mg²⁺, avec détergent): 0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄, 0.2 % p/v Tween-20.
- **FIREPol® 10x Buffer B** contient un détergent non ionique supprimant les effets inhibiteurs des traces de tampon d'extraction d'ADN et améliorant le rendement et l'efficacité de la PCR.
- **FIREPol® 10x Buffer BD** (sans Mg²⁺ ni détergent): 0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄.
- **25 mM MgCl₂**
- **10x Solution S** est un additif qui facilite l'amplification de matrices difficiles (par ex. matrices d'ADN riches en GC).
- Cette solution doit être utilisée à une concentration finale définie (solution 1x, 2x ou 3x). La solution 10x S n'est PAS un tampon de réaction et doit être utilisée UNIQUEMENT SI une amplification non spécifique se produit.

Réactifs supplémentaires requis:

- ADN modèle
- Paire d'amorces spécifiques au gène
- Mélange dNTP (20 mM de chaque) (No. de Cat: 02-31-00020)
- Eau de qualité PCR sans nucléase (No. de Cat: water-025)

3/8

Description du produit:

- FIREPol® est une ADN polymérase hautement processive et thermostable. En raison de ses modifications génétiques, elle a une stabilité améliorée à température ambiante sans perte d'activité jusqu'à 1 mois.
- Recommandé pour les applications de routine (fragment jusqu'à 3 kb d'ADN génomique).
- Possède 5'→3' polymérase et 5'→3' activité endonucléase, ainsi que d'une activité de transférase terminale non dépendante de la matrice, mais il lui manque une 3'→5' activité exonucléase (relecture) rendant le produit généré adapté pour le TA- clonage.
- La fidélité de FIREPol® est similaire à celle d'une Taq DNA Polymerase (taux d'erreur par nucléotide d'environ 2.5 x 10⁻⁵).

Contenu:

| Composant | Numéro de catalogue | | | |
|---|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | 01-01-0000S | 01-01-00500 | 01-01-01000 | 01-01-02000 |
| FIREPol® DNA Polymerase (5 U/μl) | 100 U / 20 μl | 500 U / 100 μl | 1000 U / 200 μl | 2000 U / 400 μl |
| FIREPol® 10x Buffer B | 500 μl | 2.5 ml | 5.0 ml | 2 x 5.0 ml |
| FIREPol® 10x Buffer BD | 500 μl | 2.5 ml | 5.0 ml | 2 x 5.0 ml |
| 25 mM MgCl₂ | 500 μl | 2.5 ml | 5.0 ml | 2 x 5.0 ml |
| 10x Solution S | 100 μl | 100 μl | 500 μl | 500 μl |

2/8

Instructions étape par étape:

1. Décongeler les réactifs à température ambiante. Mélanger chaque réactif en agitant doucement au vortex ou en pipetant de haut en bas, puis centrifuger brièvement.
2. Préparer un mélange réactionnel à température ambiante. Ajoutez tous les composants requis à l'exception de l'ADN modèle.

| Composant | Volume ¹ | Conc. finale |
|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| FIREPol® DNA Polymerase (5 U/μl) | 0.08–0.2 μl | 0.02–0.05 U/μl |
| FIREPol® 10x Buffer B or BD | 2 μl | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 1.2–2 μl | 1.5–2.5 mM |
| dNTP Mix (20 mM of each) | 0.2 μl | 200 μM de chaque |
| Amorcé directe (10 μM) | 0.2–0.6 μl | 100–300 nM |
| Amorcé inverse (10 μM) | 0.2–0.6 μl | 100–300 nM |
| 10x Solution S (optional) | 2, 4 ou 6 μl | 1x, 2x ou 3x |
| Matrice d'ADN (ajouté à l'étape 4) | Variable | Variable ² |
| Eau sans nucléase | jusqu'à 20 μl | |
| Volume total de réaction | 20 μl | |

¹ Mettre à l'échelle tous les composants proportionnellement en fonction du nombre d'échantillons et des volumes de réaction. Assurez-vous d'utiliser suffisamment de chaque réactif pour vos réactions, plus 10 % de volume supplémentaire pour tenir compte des erreurs de pipetage.

² Pour les modèles de faible complexité (c'est-à-dire plasmide, lambda), utilisez 20 pg à 2 ng d'ADN pour 20 μl de réaction. Pour les modèles de complexité plus élevée (c.-à-d. ADNg), utilisez 2 ng – 200 ng d'ADN par réaction de 20 μl.

4/8

- Bien mélanger le mélange réactionnel, puis centrifuger brièvement. Distribuer des volumes appropriés de mélange dans les puits PCR.
- Ajouter l'ADN modèle aux puits PCR. Sceller les puits en utilisant la procédure recommandée pour l'instrument de cyclage utilisé et centrifuger brièvement les réactions.
- Incubez vos réactions PCR dans un thermocycleur comme suit.

| Étape du cycle | Température | Temps | Cycles |
|------------------------------------|-------------|--------------|--------|
| Dénaturation initiale ¹ | 95°C | 3–5 min | 1 |
| Dénaturation | 95°C | 15–30 sec | 26–35 |
| Hybridation ² | 50–68°C | 30–60 sec | |
| Extension ² | 72°C | 45 sec–4 min | |
| Extension Finale | 72°C | 5–10 min | 1 |

¹ Les modèles complexes, tels que l'ADNg, nécessitent plus de temps pour se dénaturer (5 min). Avec des modèles de faible complexité (c'est-à-dire lambda, ADN plasmidique), le temps de dénaturation initial peut être réduit à 3 min.

² La température de d'hybridation dépend de la température de fusion des amorces. Le temps d'extension dépend de la longueur du fragment à amplifier. Un temps de 1 min/kpb est recommandé.

Recommandations pour une expérience PCR réussie

Les conditions préalables à une PCR réussie comprennent la conception d'amorces optimales, l'utilisation d'une matrice d'ADN de haute qualité et des concentrations appropriées de composants de réaction.

Utilisez des logiciels dédiés, tels que Primer3 et NCBI Primer-BLAST pour concevoir des amorces spécifiques à la cible. La longueur d'amorce optimale est de 20 à 30 pb, avec un teneur en GC de 35 à 65 % et des températures de fusion calculées (T_m) de 60 à 70°C. La T_m des deux amorces ne doit pas différer de plus

de 3°C. Analysez vos amorces pour l'auto-complémentarité et les structures secondaires stables, la présence de structures secondaires augmente la probabilité de mauvais amorçage et de formation de dimères d'amorces.

L'intégrité, la pureté et la concentration de la matrice d'ADN doivent être adaptées à l'expérience PCR. Incluez toujours un contrôle sans modèle (NTC) en remplaçant la matrice d'ADN par le même volume d'eau sans nucléase.

Veillez consulter le Guide de dépannage ci-dessous pour obtenir des suggestions et de l'aide en cas de problèmes spécifiques.

Guide de dépannage

Rendement PCR nul ou faible

- Les conditions de cyclage ne sont pas optimales – diminuez la température de recuit de l'amorce (T_a); si nécessaire de déterminer la valeur optimale T_{un} en exécutant un gradient de température; augmenter le temps d'extension (en cas d'amplification d'une longue cible); augmenter le nombre de cycles de 3 à 5.
- Mauvaise qualité du modèle - vérifiez la pureté et l'intégrité du modèle, assurez-vous que votre modèle ne contient pas d'inhibiteurs de PCR.
- La concentration de la matrice est trop faible – augmentez la concentration de la matrice d'ADN.
- La concentration en amorces n'est pas optimale – titrer la concentration en amorces (concentration finale de 100 à 300 nM de chacune); s'assurer que les deux amorces ont la même concentration.
- Les composants de la réaction sont dégradés – vérifiez les conditions de stockage et la date de péremption des réactifs; effectuer un contrôle positif avec de l'ADN matrice et/ou des réactifs connus auparavant pour s'amplifier.

5/8

6/8

Produits non spécifiques

- Amplification non spécifique – utiliser une enzyme PCR de démarrage à chaud (Hot Start) (par exemple, HOT FIREPol® DNA Polymerase, Cat. No. 01-02-00500); assurez-vous que vos amorces sont spécifiques à la cible.
- La concentration en amorces n'est pas optimale – titrer la concentration en amorces (concentration finale de 100 à 300 nM de chacune); une concentration d'amorce trop élevée peut réduire la spécificité de liaison, entraînant des produits indésirables.
- La température d'hybridation de l'amorce (T_a) est trop basse – augmentez la T_a ; maintenez la température de recuit de votre amorce de 2 à 5°C en dessous de la T_m de l'amorce ayant la T_m la plus basse.
- Trop de cycles – réduisez le nombre de cycles de 3 à 5.
- Contamination – pour éviter la contamination, travaillez dans un espace dédié, séparez les zones de pré-amplification et de post-amplification, décontaminez vos surfaces et votre équipement, si possible, aliquotez vos réactifs en plus petits volumes pour éviter la contamination des solutions mères.

Frottis en électrophorèse

- Trop de modèle - chargez une quantité inférieure ou préparez des dilutions en série de modèle.
- Trop de cycles – réduisez le nombre de cycles de 3 à 5.
- Le temps d'extension est trop long – réduisez le temps d'extension.
- La conception des amorces n'est pas optimale - passez en revue vos amorces et redessinez les amorces si nécessaire.
- La concentration en enzyme est trop élevée – diminuez la quantité d'enzyme dans la solution finale par incréments de 0.005 U/μl (la concentration optimale de polymérase dans la solution PCR finale est de 0.02 à 0.05 U/μl).

La source:

Souche d'*E. coli* qui porte un plasmide surproducteur avec un gène modifié de l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus*.

Définition de l'unité :

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser l'incorporation de 10 nmoles de dNTP sous une forme insoluble dans l'acide en 30 minutes à 74°C.

Contrôle de qualité:

L'enzyme est exempte d'activités d'entaille et d'amorçage, d'exonucléases et d'endonucléases non spécifiques. Bande SDS/PAGE 95 kD, pureté >98 %. Activité et stabilité testées par thermocyclage. Le taux d'erreur par nucléotide par cycle est d'environ 2.5×10^{-5} ; la précision est d'environ 4×10^4 . La demi-vie estimée à 95°C est de 1.5 heure.

Précautions de sécurité:

Veillez-vous référer à la fiche de données de sécurité pour plus d'informations.

Soutien technique:

Contactez votre commercial pour toute question ou envoyez un email à support@solisbiodyne.com

DS-01-01 v1.1_FR

Révisé le 17.11.2021

Ceci est une traduction, la version originale, en anglais, est disponible sur le site www.solisbiodyne.com

Ce produit est fourni à des fins de recherche uniquement. Couvert par le brevet EP2501716, fabriqué selon les méthodes du brevet américain n° 9 321 999.

FIREPol® est une marque déposée de Solis BioDyne OÜ.

7/8

8/8