



BenTaq HiFi PCR Master Mix, 2x

Cat#BBE003

Taille: 50 x 50 µl réactions

Conservation

Température ambiante jusqu'à 1 mois

4°C jusqu'à 6 mois

-20°C jusqu'à 1 an

Remarque : la PCR BenTaq HiFi est photosensible et doit être stockée et protégée de la lumière.

Caractéristiques

- Mélange maître PCR prêt à l'emploi. Il suffit d'ajouter les amorces et le modèle ;
- Contient de l'ADN polymérase avec une fidélité et une activité améliorées et optimisées ;
- Efficace pour les cibles riches en GC ;
- Visualisation directe des bandes d'ADN à l'aide de lumière bleue ou UV.

Description

La PCR BenTaq HiFi est une solution pré-mélangée contenant de l'ADN polymérase GDP-HiFi, un tampon, des dNTP, un activateur, des colorants de charge de gel et un colorant de fluorescence. L'ADN polymérase GDP-HiFi fournie dans le mélange est une nouvelle enzyme recombinante qui a une fidélité 70 fois supérieure et un taux d'élongation plus rapide (jusqu'à 15 secondes par kilo de base, kb) que l'ADN polymérase Taq. La GDP-HiFi présente une plus grande stabilité à haute température, ce qui fait de la GDP-HiFi ADN polymérase un bon choix pour les matrices riches en GC. L'ADN polymérase GDP-HiFi produit des produits PCR à extrémité émoussée. Les colorants inclus dans le mélange PCR BenTaq HiFi permettent une visualisation instantanée des bandes à l'aide d'un détecteur de lumière bleue ou UV et constituent une alternative sûre, non toxique et non mutagène au bromure d'éthidium.

Protocole

1. Pour chaque 50 réactions µl, assemblez les composants suivants dans un tube PCR de 0,2 ml sur de la glace juste avant l'utilisation :

Composantes	Volume	Concentration finale
BenTaq PCR HiFi Master Mix 2x	25 µl	1×
Amorce primaire	Variable	0.2–1 µM
Amorce inverse	Variable	0.2–1 µM
Echantillon d'ADN*	Variable	10 pg–1 µg
Eau sans nucléase	Variable	-
Volume total	50 µl	

*Utiliser 0,01-1 ng pour l'ADN de plasmide ou de phage et 0,05-1 µg pour l'ADN génomique

2. Mélanger doucement et centrifuger brièvement, fermer les tubes et les placer dans le thermocycleur.

Programme de cyclage

Phase	Temperature	Durée	Cycles
Activation initiale	94°C	2-5 min	1
Dénaturation	94°C	20-40 s	25-35
Hybridation*	(55-68°C)	15-30 s	
Extension	72°C	2 min	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage dans le cycleur	4°C	Indéfiniment	1

* La température d'hybridation recommandée est de 5°C inférieure à la T_m des amorces.

Une optimisation peut être nécessaire dans certaines conditions, telles que l'amplification de cibles longues, une teneur élevée en GC ou AT, des échantillons à structures secondaires dynamique ou d'une pureté insuffisante. Dans de tels cas, il est recommandé d'optimiser la purification d'échantillon, la conception de l'amorce et la température d'hybridation.

Les conditions optimales peuvent être optimisées grâce aux éléments suivants

- Choix des quantités optimales de gabarit et d'amorces
- Optimiser les conditions d'utilisation du thermocycleur
- L'ajout de bétaïne ou de DMSO (concentration finale suggérée de 2M et 10 % respectivement) peut être utile si le modèle présente de fortes structures secondaires ou s'il est d'une pureté insuffisante

3. Après la réaction PCR, utilisez l'électrophorèse de l'ADN pour détecter le produit de la PCR.

Note : lorsque la concentration d'ADN est inférieure à 4 pg, le colorant fluorescent peut provoquer un déplacement migratoire lors de l'électrophorèse. Pour éviter ce décalage, vous pouvez retirer le colorant fluorescent en suivant les étapes suivantes :

1. Immerger le produit PCR contenant le colorant fluorescent dans le NaCl 100 mM et ajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu ou à 95% ;
2. Incuber sur de la glace pendant 20 minutes ;
3. Centrifuger le mélange à 4°C pendant au moins 10 minutes ;
4. Enlever la suspension d'éthanol et laver le culot avec 1 ml d'éthanol à 70 % ;
5. Sécher l'éthanol résiduel et remettre en suspension l'ADN double brin dans l'eau double distillée exempte de TE ou de DNase RNase.

Précautions

- Pendant les opérations, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et un équipement de protection ;
- Utilisation à des fins de recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins thérapeutiques ou diagnostiques sur les animaux ou sur l'homme.