



BenTaq HotStart PCR Master Mix, lyophilisé

Cat#BBE001

Taille: 50 x 50 µl réactions

Conservation

Température ambiante ou inférieure pour le Master Mix lyophilisé,
Jusqu'à la date de péremption - voir l'étiquette du produit
-20°C pour le Master Mix reconstitué, jusqu'à 12 mois

Caractéristiques

- Master Mix prêt à l'emploi. Il suffit d'y ajouter les amorces et votre échantillon
- La formulation lyophilisée permet une meilleure stabilité à température ambiante
- Idéal pour un large éventail d'applications, notamment la PCR de routine et les diagnostics moléculaires
- Évite l'amplification non spécifique d'acide nucléique
- Préparation de réaction à température ambiante

Description

BenTaq HotStart PCR Master Mix contient une polymérase HotStart Taq très pure, fiable pour les applications PCR de routine et exigeantes. L'ADN polymérase HotStart Taq est inactif pendant la préparation de la réaction en raison de l'anticorps lié, qui est rapidement libéré à des températures élevées, ce qui garantit que l'enzyme n'est active que pendant la PCR. La fonction HotStart réduit au minimum les erreurs d'amorçage et de dimères. Le format séché permet l'expédition et le stockage de longue durée à température ambiante.

Protocole

Première étape: Reconstituer le mélange lyophilisé BenTaq HotStart PCR Master Mix

- Transférer l'intégralité du contenu d'un tampon BenTaq HotStart dans un flacon de BenTaq HotStart PCR Master Mix 2x ;
- Mélanger bien, le lyophilisat se dissout en quelques secondes ;
- Conservez le BenTaq HotStart PCR Master Mix reconstitué à -20°C.

Prévention de la contamination par PCR

- Lors de la préparation des réactions d'amplification, il faut veiller à éliminer la possibilité de contamination par de l'ADN non désiré ;
- Utiliser des zones propres séparées pour la préparation des échantillons et des mélanges réactionnels et pour le cyclage ;
- Porter des gants propres. Utilisez des tubes et des embouts de pipette stériles avec des filtres à aérosol pour la préparation de la PCR ;
- N'utilisez que de l'eau et des réactifs exempts d'ADN et de nucléases ;
- Pour chaque préparation PCR, effectuez une réaction de contrôle de la contamination qui n'inclut pas d'ADN modèle.

Configuration standard de la PCR

Ce protocole standard donne d'excellents résultats pour la plupart des applications.

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

Les meilleures conditions peuvent être optimisées grâce à ce qui suit :

- Choisir les quantités optimales d'échantillon 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 l'échantillon présente de structures secondaires dynamiques ou s'il est d'une pureté insuffisante.

Protocole standard

Le Master Mix est conçu pour être utilisé sans aucune optimisation car il contient tous les composants réactionnels nécessaires en quantité optimale pour une PCR réussie.

- Décongelez le BenTaq HotStart PCR Master Mix reconstitué 2x sur de la glace et bien mélanger.
- Conservez tous les réactifs et les réactions sur de la glace.
- Pipeter le master mix dans des tubes PCR de 0,2 ml à paroi mince.
- Ajouter l'échantillon et les amorces séparément s'ils ne sont pas utilisés dans toutes les réactions.

Rapports des composants pour une réaction PCR de 50 µl

Pour les volumes totaux de réaction autres que 50 µl, mettre les réactifs à l'échelle proportionnellement.

Composantes	Volume	Concentration finale
BenTaq HotStart Reconstitué PCR 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

- Mélangez et centrifugez brièvement pour recueillir le culot au fond du tube.
- Placer dans le cycleur PCR.

Programme de cyclage

Phase	Température	Durée	Cycles
Activation initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 s	25–35
Hybridation*	(55-68°C)	15–30 s	
Extension	72°C	30–60 s/kb	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage dans le cycleur	4°C	Indéfiniment	1

* La température d'hybridation recommandée est de 2°C au-dessus de la T_m des amorces.

Ajouter le colorant de chargement aux réactions pour analyser les produits PCR sur un gel d'agarose ou stocker la réaction PCR terminée à -20°C.