



## BenTaq PCR Master Mix, 2x

Cat#BBE002

Taille : 50 x 50 µl réactions

### Stockage

Température ambiante jusqu'à 3 mois

4°C jusqu'à 6 mois

-20°C jusqu'à 1 an

**Remarque:** la PCR BenTaq est photosensible et doit être manipulée dans l'obscurité.

### Caractéristiques

- PCR master mix prêt à l'emploi. Il suffit d'ajouter les amorces et l'échantillon ;
- Contient de l'ADN polymérase *Taq* ;
- Visualisation directe des bandes d'ADN à l'aide de la lumière bleue ou UV.

### Description

La BenTaq PCR Master Mix 2x est une solution pré-mélangée contenant de l'ADN polymérase *Taq*, un tampon, des dNTP, des colorants de charge et un colorant de fluorescence. L'ADN polymérase *Taq* fournie dans le mélange est purifié de *E. Coli.* et possède la 5' → 3' ADN polymérase et l'activité exonucléase 5' → 3' mais manque l'activité exonucléase 3' → 5'. Les colorants inclus dans le mélange de la PCR BenTaq 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 réaction de 50 µl, assemblez les composants suivants dans un tube PCR de 0.2 ml sur de la glace juste avant l'utilisation :

Composante	Volume	Concentration finale
BenTaq PCR Master Mix 2x	25 µl	1×
Amorce avant	Variable	0.2–1 µM
Amorce inverse	Variable	0.2–1 µM
Echantillon d'ADN*	Variable	10 pg–1 µg
Eau sans nucléase	Variable	-
<b>Volume total</b>	<b>50 µl</b>	

\*Utiliser 0.01–1 ng pour l'AND 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 un thermocycleur.

### Programme de Cyclage

Étape	Température	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	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 5°C inférieure à Tm des amorces.

Une optimisation peut être nécessaire dans certaines conditions, comme l'amplification de cibles longues, une teneur élevée en GC ou AT, des échantillons d'ADN à structures secondaire dynamiques ou à 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 :

- Un choix optimal des échantillons et des amorces ;
  - Une optimisation des conditions de cyclage ;
  - Un ajout de bétaïne ou de DMSO (concentration finale suggérée de 2M and 10% respectivement) peut être utile si les échantillons ont une structure secondaire dynamique ou une faible pureté.
3. Après réaction de la PCR, utilisez l'électrophorèse de l'ADN pour détecter le produit de la PCR.

**Remarque** : lorsque la concentration en 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 de la PCR contenant le colorant fluorescent dans les 100 mM de NaCl 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 1ml 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.

### Attention

- Pendant l'opération, portez toujours une blouse de laboratoire, des gants jetables et un équipement de protection.
- Utilisation à des fins de recherche uniquement. Non destiné à des utilisations thérapeutiques ou diagnostiques sur les animaux ou sur l'homme.