

OZYME

Des femmes et des hommes
au service de vos recherches

Taq'Ozyme HS

*ADN polymérase thermostable rapide à démarrage
à chaud (« Hot Start »)*

OZYA002-250 – 250 unités

OZYA002-1250 – 5 x 250 unités

Stockage et stabilité : **un an à -20°C**

MANUEL D'UTILISATION

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE
Service client – commande : commande@ozyme.fr
Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

SOMMAIRE

Descriptif	P.3
Précautions	P.3
Liste des composants	P.3
Compositions des solutions	P.3
Définition de l'unité	P.3
Protocole standard	P.4
Optimisations	P.5
Protocoles spécifiques	P.6
Résolution des problèmes	P.8
Produits associés	P.9

MU-OZYA002-072024

DESCRIPTIF

La **Taq'Ozyme HS** est une Taq ADN Polymérase recombinante thermostable à démarrage à chaud (« Hot Start »). L'enzyme est inactivée grâce à un anticorps anti-Taq permettant la préparation du mélange réactionnel à température ambiante (ex : PCR haut débit). Cette caractéristique évite l'amplification des dimères d'amorces et des hybridations non spécifiques à basse température. Cette enzyme est fournie avec un tampon de réaction 5X contenant des dNTP, du MgCl₂, des amplificateurs de PCR et des stabilisateurs aux concentrations optimales. Les optimisations particulières (voir la section « Optimisations »), si elles peuvent être nécessaires, sont ainsi facilitées.

PRÉCAUTIONS

- Éviter les congélations/décongélations répétées.
- La Taq'Ozyme HS n'est pas adaptée pour des amplicons de plus 5 kb (6 kb en plasmide). Si besoin, voir section « Produits associés ».

Liste des composants

	Taq'Ozyme HS	Tampon de réaction 5X
OZYA002-250 – 250 unités	1 x 50 µl	2 x 1 ml
OZYA002-1250 – 5 x 250 unités	5 x 50 µl	10 x 1 ml

Compositions des solutions

	Tampon de réaction 5X
dNTP	5 mM
MgCl ₂	15 mM
Autres	Stabilisateurs et amplificateurs de PCR (Composition confidentielle)

Définition de l'unité

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmoles de dNTP dans un fragment d'ADN en 30 min à 74°C.

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE
Service client – commande : commande@ozyme.fr
Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

PROTOCOLE STANDARD

Ce protocole est adapté pour une réaction de 50 µl à partir de matrices purifiées. Les amorces ont préférentiellement une température de fusion (Tm) proche de 60°C. C'est un point de départ pour les optimisations. Voir sections « Optimisations » et « Protocoles spécifiques » (PCR sur colonies, PCR multiplexe).

Après décongélation complète de chaque réactif, bien homogénéiser à l'aide d'un vortex ; puis centrifuger brièvement tous les réactifs avant leur utilisation.

1. Les réactifs sont mélangés dans un micro-tube stérile, dans l'ordre suivant : V

Réactif	Volume	Concentration finale
Eau stérile redistillée	q.s.p* 50 µl	-
Tampon de réaction 5X	10 µl	1X
Amorce sens (ex : 20 µM)	1 µl	0,4 µM
Amorce anti-sens (ex : 20 µM)	1 µl	0,4 µM
Taq'Ozyme HS (5 u/µl)	0,25 µl	1,25 unités/50 µl
Matrice d'ADN	Plasmide : 10 ng ADNg : 200 ng ADNc non dilué [§] : < 5µl	Entre 50 pg à 500 ng/50 µl
Volume final	50 µl	

*q.s.p. : quantité suffisante pour

§ : aliquot d'un mélange réactionnel de transcription inverse

2. Le mélange réactionnel est vortexé doucement, puis centrifugé brièvement pour rassembler l'échantillon au fond du tube.

3. Programmation du thermocycleur :

Étape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min [§]	1
Dénaturation	95°C	15 sec	25-35
Hybridation	55°C*	15 sec	
Élongation	72°C	30 sec [§]	
Extension finale	72°C	5 min	1

MU-OZYA002-072024

Stockage (option)	4°C	variable	1
-------------------	-----	----------	---

* : ou $T_m - 5^\circ\text{C}$ sur le T_m le plus bas des deux amorces si le T_m des amorces est différent de 60°C

§ : pour ADNg > 1 kb, une optimisation peut être nécessaire. Voir session "Optimisations".

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE

Service client – commande : commande@ozyme.fr

Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

OPTIMISATIONS

Préambule : tester un protocole validé pour un mélange similaire est possible et ne requiert généralement que peu d'optimisation. Nous recommandons de réaliser un gradient de température d'hybridation et de respecter le temps de dénaturation / activation et le temps d'élongation du protocole standard.

Les conditions optimales diffèrent d'une réaction à l'autre et dépendent des matrices et des amorces utilisées. En premier lieu, les variables clés à optimiser dans toutes PCR sont : 1. la quantité de polymérase, 2. la température d'hybridation des amorces et 3. la concentration en magnésium (déjà optimisée dans le tampon de réaction 5X de la Taq'Ozyme HS).

Mélange réactionnel :

Quantité d'enzyme : la quantité optimale d'enzyme dépend de la quantité, de la taille et de la complexité de la matrice d'ADN. Optimiser dans les fourchettes indiquées ci-dessous en commençant par la quantité standard recommandée.

Taq'Ozyme HS : 1,25 à 5 unités dans 50 µl (conditions standard : 1,25 unités).

Magnésium (MgCl₂) : la concentration en Mg²⁺ est optimisée dans le tampon 5X livré avec la Taq'Ozyme HS.

dNTP : la concentration en dNTP est optimisée dans le tampon 5X livré avec la Taq'Ozyme HS.

Matrice : la quantité optimale de matrice pour une PCR dépend essentiellement du type d'ADN. Nous recommandons, pour une réaction de 50 µl :

	Plasmide (ou complexité équivalente)	ADN génomique (ou complexité équivalente)
Taq'Ozyme	1-10 ng (commencer avec 10 ng)	50-500 ng (commencer avec 200 ng)
Taq'Ozyme HS	50 pg-10 ng (commencer avec 10 ng)	5-500 ng (commencer avec 200 ng)
Taq'Ozyme Purple Mix	1-10 ng (commencer avec 10 ng)	50-500 ng (commencer avec 200ng)

ADNc : prélever un aliquot du mélange réactionnel de transcription inverse. Le volume de celui-ci ne doit pas dépasser 10% du volume réactionnel de la PCR (5 µl pour une réaction de 50 µl).

IMPORTANT : ne pas utiliser de l'ADN solubilisé dans une solution contenant de l'EDTA (ex : tampon TE), agent chélateur des ions Mg²⁺ libres.

Amorces : la conception et la concentration des amorces sont essentielles au succès de toutes PCR. Des sites en ligne d'aide à la conception d'amorces sont très utiles. Citons Primer 3. Nous recommandons des amorces de 18 à 30 nucléotides, contenant 40-60% de GC. Dans la mesure du possible, les températures de fusion (T_m) des deux amorces doivent être plus proches possible entre elles et aux environs de 60°C. La méthode la plus simple pour estimer le T_m est : $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{G}+\text{C})$. Les amorces sens et anti-sens sont généralement utilisées à une concentration finale comprise entre 0,2-0,6 µM. Nous recommandons de commencer avec 0,4 µM de chaque

MU-OZYA002-072024

amorce (20 pmol de chaque dans 50 µl de mélange réactionnel). Une concentration trop élevée en amorces peut diminuer la spécificité d'hybridation et induire en conséquence des amplifications non spécifiques.

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE
Service client – commande : commande@ozyme.fr
Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

Amplificateurs de PCR : le tampon de réaction 5X Taq'Ozyme HS contient des stabilisateurs et des amplificateurs de PCR. La concentration de chaque composant a été rigoureusement optimisée, minimisant le besoin de nouvelles optimisations. Il est déconseillé d'ajouter des amplificateurs de PCR supplémentaires.

Programmation du thermocycleur :

Nombre de cycles : le nombre de cycles est généralement compris entre 25 et 35 en fonction du nombre de copies de la séquence à amplifier. Augmenter le nombre de cycles ne conduit pas nécessairement à améliorer le rendement du fragment d'intérêt. Au-delà d'un certain nombre de cycles, le bruit de fond provenant d'amplifications non spécifiques s'accroît.

Dénaturation initiale / activation de l'enzyme : la dénaturation initiale est nécessaire pour activer l'enzyme et dénaturer efficacement la matrice. Nous recommandons 1 minute à 95°C. Cependant, pour les matrices plus complexes comme l'ADN génomique eucaryote, un temps de dénaturation plus long, mais toujours inférieur à 3 minutes, peut être nécessaire.

Dénaturation : nous recommandons 15 secondes à 95°C pour l'étape de dénaturation. Cette condition convient aux matrices jusqu'à 55% de GC. Il est possible de raccourcir ce temps à 5 secondes pour les amplicons à faible pourcentage de GC (40-45 %) et de le rallonger au delà de 15 secondes pour les amplicons riches en GC (>55 %).

Température et temps d'hybridation : la température d'hybridation optimale dépend des amorces utilisées et de la composition du tampon de réaction. Elle est généralement 2-5°C en-dessous du Tm le plus bas des deux amorces. Dans le protocole standard, nous recommandons des amorces de Tm similaires et le plus proche possible de 60°C (voir « Amorces » dans ce chapitre). L'hybridation se fait en première instance à 55°C. Si nécessaire, réaliser un gradient de température afin de déterminer la température d'hybridation optimale (entre 45 et 68°C). Suivant les amplifications, le temps d'hybridation, en conditions standard de 15 secondes, peut être réduit jusqu'à 5 secondes.

Température et temps d'élongation : l'élongation se fait à 72°C. Le temps d'élongation dépend de la longueur de l'amplicon et de la complexité de la matrice. En conditions standard, nous recommandons 30 secondes. Ce temps d'élongation est suffisant pour des matrices de faibles complexité (plasmide, ADNc jusqu'à 5 kb). Pour l'amplification de fragments d'ADN génomique (ou autre matrice de complexité équivalente) de plus de 1 kb, une optimisation peut être nécessaire en incrémentant le temps d'élongation jusqu'à 30 sec/ kb.

PROTOCOLES SPÉCIFIQUES

PCR sur colonies :

La Taq'Ozyme HS peut être utilisée pour l'amplification d'ADN plasmidique à partir de bactéries en culture liquide ou en colonies sur milieu solide.

- À partir d'une culture liquide : collecter jusqu'à 8 µl de milieu d'une culture ayant poussé la nuit. Ajouter ces 8 µl directement dans un mélange réactionnel de 50 µl final.
- À partir de colonies : nous recommandons de piquer une colonie avec un cure-dent stérile et de resuspendre directement dans un mélange réactionnel de 50 µl final.

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE
Service client – commande : commande@ozyme.fr
Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

Programmation du thermocycleur pour PCR sur colonie (≤ 1 kb)* :

Étape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	25-35
Hybridation	55°C	15 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

* Les optimisations de ces conditions peuvent être nécessaires. Voir section « Optimisations ».

PCR multiplexe :

Mélange réactionnel pour PCR multiplexe :

Réactif	Volume	Concentration finale
Eau stérile redistillée	q.s.p* 25 μ l	-
Tampon de réaction 5X	5 μ l	1X
Amorce sens/anti-sens (25 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
Taq'Ozyme HS (5 u/ μ l)	0,5 μ l	2,5 u/25 μ l
Matrice d'ADN	x μ l**	500 ng/25 μ l
Volume final	25 μ l	

*q.s.p. : quantité suffisante pour

** : ajuster le volume de matrice d'ADN pour une concentration finale de 500 ng/25 μ l

Programmation du thermocycleur pour PCR multiplexe :

- **PCR en 2 étapes** : si les Tm de vos amorces sont compatibles avec l'hybridation à 65°C, nous vous recommandons ce protocole :

Étape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	25
Elongation	65°C	4 min	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

- **PCR en 3 étapes** : si les Tm de vos amorces ne sont pas compatibles avec notre protocole de PCR en 2

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE

Service client – commande : commande@ozyme.fr

Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

étapes décrit ci-dessus, veuillez-suivre les recommandations suivantes :

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE
Service client – commande : commande@ozyme.fr
Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr

Programmation du thermocycleur pour PCR multiplexe (en 3 étapes, ≤ 1 kb)

Étape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 min	1
Dénaturation	95°C	15 sec	25-35
Hybridation	55°C	15 sec*	
Élongation	72°C	90 sec**	
Extension finale	72°C	5 min	1
Stockage (option)	4°C	variable	1

Les optimisations de ces conditions peuvent être nécessaires. Notamment, la température d'hybridation et le temps d'élongation peuvent être ajustés :

*Température d'hybridation : nous conseillons d'hybrider à 55°C. En cas de besoin, nous recommandons de réaliser un gradient de température afin de déterminer la température d'hybridation optimale.

**Temps d'élongation : la PCR multiplexe requiert une élongation plus longue. Nous recommandons de commencer 90 secondes et d'augmenter ce temps si nécessaire.

RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

1/ Absence de produits de PCR ou rendement faible

Causes possibles	Remarques / Solutions
Omission des composants / Erreurs de pipetage	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier la préparation du mélange réactionnel et les volumes utilisés Vérifier les concentrations/dilutions de tous les composants
Composants défectueux	<ul style="list-style-type: none"> Vérifier les conditions de stockage de tous les composants. Si nécessaire, tester chaque composant individuellement Nous recommandons d'utiliser un mélange de dNTP ultra-pur (dNTP PreMix - 4 x 10 mM - OZYD001-500) Utiliser de l'ADN purifié (hors PCR sur colonie). Vérifier si l'ADN est dégradé ou endommagé Vérifier la pureté des amorces
Quantité d'enzyme insuffisante	<ul style="list-style-type: none"> Augmenter la quantité d'enzyme jusqu'à 5 u/50 µl de réaction
Quantité d'ADN non optimale	<ul style="list-style-type: none"> Titre la quantité de la matrice d'ADN. Augmenter la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)
Conditions des cycles PCR non optimales	<ul style="list-style-type: none"> Diminuer la température d'hybridation. Idéalement réaliser un gradient pour déterminer la température d'hybridation optimale Augmenter le temps d'élongation, ou utiliser une enzyme mieux adaptée (voir section « Produits associés ») si la séquence cible est longue/riche en GC

MU-OZYA002-072024

- Augmenter le nombre de cycles
- Augmenter le temps de dénaturation particulièrement pour les matrices complexes (ADN génomique)

2/ Bandes multiples ("smear") ou bandes non spécifiques

Causes possibles	Remarques /Solutions
Excès d'enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuer la quantité d'enzyme (en cas de « smear »)
Quantité de matrice non optimale	<ul style="list-style-type: none"> • Titrer la quantité d'ADN. Diminuer la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)
Conditions des cycles PCR non optimales	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuer le nombre de cycles
	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuer le temps d'élongation
	<ul style="list-style-type: none"> • Augmenter la température d'hybridation (accroît la stringence)
Concentrations d'amorces trop élevées	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuer les concentrations des amorces
Contamination	<ul style="list-style-type: none"> • Remplacer chaque composant afin de trouver la source de contamination • Réaliser les réactions de PCR dans un espace réservé et séparé de celui dédié à l'analyse des produits de PCR
Conception d'amorces non optimale	<ul style="list-style-type: none"> • Désigner des nouvelles amorces (voir section « Amorces »)

PRODUITS ASSOCIÉS

- Taq'Ozyme - OZYA001-1000
- Taq'Ozyme HS Mix – OZYA006-200XL
- Taq'Ozyme Purple Mix 2 - OZYA007-200 (avec supplément de MgCl₂) (Mélange 2X prêt à l'emploi)
- Fidelio® Hot Start PCR Kit – OZYA010-50
- Fidelio® Hot Start Master Mix – OZYA009-50
- ExactLadder® DNA PreMix 100 bp Plus - OZYC001-100
- ExactLadder® DNA PreMix 2 Log - OZYC002-100
- SeaKem LE Agarose - 500 g - LON50004
- AccuGENE Molecular Biology Water - 1 L - LON51200
- Les thermocycleurs UNO

AVERTISSEMENT

Ce produit est à usage de recherche uniquement.

MU-OZYA002-072024

OZYME SAS - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE
Service client – commande : commande@ozyme.fr
Service technique : Réactifs: tech@ozyme.fr - Instrumentation: instrum@ozyme.fr