

## Taq'Ozyme

*ADN polymérase thermostable*

**OZYA001-1000** - 1000 unités

**OZYA001-5000** - 5000 unités

**OZYA001-1000D** - 1000 unités + dNTP Premix - 4x10 mM

### Stockage et stabilité :

- Taq'Ozyme : **2 ans à -20°C**
- dNTP Premix : **1 an à -20°C**

## MANUEL D'UTILISATION

**MU-OZYA001- 072024**

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

Service client - commande : [commande@ozyme.fr](mailto:commande@ozyme.fr)

Service technique : Réactifs : [tech@ozyme.fr](mailto:tech@ozyme.fr) - Instrumentation : [instrum@ozyme.fr](mailto:instrum@ozyme.fr)

## SOMMAIRE

Descriptif .....	P.3
Précautions .....	P.3
Liste des composants .....	P.3
Composition des solutions .....	P.3
Définition de l'unité .....	P.3
Protocole standard .....	P.4
Optimisations .....	P.5
Résolution des problèmes .....	P.7
Résolution des problèmes (suite) .....	P.8
Produits associés .....	P.8
Avertissement .....	P.8

**MU-OZYA001- 072024**

## DESCRIPTIF

La Taq'Ozyme est une Taq ADN Polymérase thermostable utilisable pour des applications de PCR standard. Un tampon de réaction et une solution de MgCl<sub>2</sub> séparée sont inclus pour faciliter les optimisations. La nouvelle Taq'Ozyme fonctionne dans les mêmes conditions de PCR que celles de la Taq'Ozyme précédente.

## PRÉCAUTIONS

- Conserver le mélange réactionnel sur la glace jusqu'au démarrage des cycles de PCR.
- Éviter les congélations/décongelations répétées.
- La Taq'Ozyme n'est pas adaptée pour des amplicons de plus de 4 kb (6 kb en plasmide) ou contenant plus de 60% de GC.

## LISTE DES COMPOSANTS

	Taq'Ozyme (5 u/μl)	Tampon de réaction 10X (sans magnésium)	Solution de magnésium	dNTP Premix - 4 x 10 mM
<b>OZYA001-1000</b> – 1000 unités	1 x 200 μl	2 x 1,0 ml	2 x 1,0 ml	-
<b>OZYA001- 5000</b> – 5000 unités	5 x 200 μl	10 x 1,0 ml	10 x 1,0 ml	-
<b>OZYA001-1000D</b> – 1000 unités	1 x 200 μl	2 x 1,0 ml	2 x 1,0 ml	1x 500 μl

## COMPOSITIONS DES SOLUTIONS

	Tampon de stockage (Taq'Ozyme)	Tampon de réaction 10X (sans magnésium)	Solution de magnésium
Tris-HCl	50 mM, pH 8,0	100 mM, pH 9,0	-
KCl	-	100 mM	-
NaCl	100 mM	-	-
EDTA	0,1 mM	-	-
DTT	1 mM	-	-
Glycérol	50%	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	80 mM	-
Nonidet P-40	0,5%	-	-
TritonX-100	0,5%	1%	-
MgCl <sub>2</sub>	-	-	25 mM

## 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-OZYA001- 072024**

**OZYME SAS** - 6 bd Georges Marie Guynemer – ZAC Charles Renard – Bât.G – 78210 SAINT CYR L'ECOLE  
Service client - commande : [commande@ozyme.fr](mailto:commande@ozyme.fr)  
Service technique : Réactifs : [tech@ozyme.fr](mailto:tech@ozyme.fr) - Instrumentation : [instrum@ozyme.fr](mailto: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 section « Optimisations »). 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 :

Réactif	Volume	Concentration finale
Eau stérile redistillée	q.s.p* 50 µl	-
Tampon de réaction 10X	5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 µl	1,5 mM
dNTP (mélange 10 mM de chaque)	1 µl	200 µM chacun
Amorce sens (ex : 20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Amorce anti-sens (ex : 20 µM)	0,5 µl	0,2 µM
Taq'Ozyme (5 u/µl)	0,5 µl	2,5 unités/50 µl
Matrice d'ADN	Plasmide : 10 ng ADNg : 200 ng ADNc non dilué <sup>§</sup> : < 5 µl	< 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	2 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec	25-35
Hybridation	55°C*	30 sec	
Élongation	72°C	1 min <sup>§</sup>	
Extension finale	72°C	5	1
Stockage (optionnel)	4°C	variable	1

\* : ou Tm-5°C sur le Tm le plus bas des deux amorces si le Tm des amorces est différent de 60°C

§ : 1 min/Kb pour les amplicons > 1 Kb

**MU-OZYA001- 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 une enzyme 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 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.

### 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 :** 0,5 à 2,5 unités dans 50 µl (conditions standard : 2,5 unités).

**Magnésium (MgCl<sub>2</sub>) :** la concentration recommandée en condition standard est 1,5 mM  
Une étape d'optimisation supplémentaire (par 0,5 mM) peut-être nécessaire dans les limites de 1 à 5 mM, particulièrement dans les cas suivants :

- Présence importante d'EDTA (un chélateur des ions Mg<sup>2+</sup>). Augmenter la concentration.
- Bandes multiples (« smear ») non résolues par la diminution de la quantité de l'ADN. Diminuer la concentration.

Concentration finale en MgCl <sub>2</sub>	Volume de MgCl <sub>2</sub> 25 mM (fourni) dans 50 µl
1,0 mM	2,0 µl
<b>1,5 mM</b>	<b>3,0 µl</b>
2,0 mM	4,0 µl
2,5 mM	5,0 µl
3,0 mM	6,0 µl
3,5 mM	7,0 µl
4,0 mM	8,0 µl
4,5 mM	9,0 µl
5,0 mM	10,0 µl

D'une manière générale, il est recommandé d'utiliser la concentration la moins élevée possible. En effet, une surconcentration de magnésium conduit à des hybridations non spécifiques pouvant générer des produits de PCR non souhaités.

**dNTP :** nous recommandons d'utiliser des dNTP « PCR Grade », purs à plus de 99% et exempts d'activité nucléase et phosphatase détectable. La concentration de la solution doit être déterminée par mesure de densité optique et l'activité fonctionnelle testée (séquençage, remplissage d'extrémités sortantes 5', extension d'amorces...). Un format de mélange prêt à l'emploi facilite les manipulations et diminue les erreurs de pipetage. Voir section « Produits associés ». La concentration standard est 200 µM (0,2 mM) de chacun des dNTPs.

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

**MU-OZYA001- 072024**

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 200 ng)

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 (soit 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 Mg<sup>2+</sup> 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<sub>m</sub>) 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<sub>m</sub> est :  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (A+T) + 4^\circ\text{C} \times (G+C)$ . 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 0,2 µM de chaque amorce (10 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.

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** : la dénaturation initiale est nécessaire pour dénaturer efficacement la matrice. Nous recommandons 2 minutes à 95°C. Cependant, pour les matrices plus complexes comme l'ADN génomique eucaryote, un temps de dénaturation plus long, pouvant aller jusqu'à 5 minutes, peut être nécessaire.

**Dénaturation** : nous recommandons 30 secondes à 95°C. Cette condition convient aux matrices jusqu'à 60% de GC.

**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 T<sub>m</sub> le plus bas des deux amorces. Dans le protocole standard, nous recommandons des amorces de T<sub>m</sub> 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 30 secondes, peut être réduit jusqu'à 15 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 1 minute ou 1 min/kb pour les amplicons de plus de 1 kb. Ce temps d'élongation est généralement suffisant pour toutes les matrices.

## RÉSOLUTION DES PROBLÈMES

**MU-OZYA001- 072024**

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

## 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"> <li>Vérifier la préparation du mélange réactionnel et les volumes utilisés</li> <li>Vérifier les concentrations/dilutions de tous les composants</li> </ul>
Composants défectueux	<ul style="list-style-type: none"> <li>Vérifier les conditions de stockage de tous les composants. Si nécessaire, tester chaque composant individuellement</li> <li>Nous recommandons d'utiliser un mélange de dNTP ultra-pur (dNTP PreMix - 4 x 10 mM - OZYD001-500)</li> <li>Utiliser de l'ADN purifié. Vérifier si l'ADN est dégradé ou endommagé</li> <li>Vérifier la pureté des amorces</li> </ul>
Quantité d'enzyme insuffisante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter la quantité d'enzyme jusqu'à 5 u/50 µl de réaction</li> </ul>
Quantité d'ADN non optimale	<ul style="list-style-type: none"> <li>Titrer la quantité de la matrice d'ADN. Augmenter la concentration finale (voir section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)</li> </ul>
Concentration insuffisante de MgCl <sub>2</sub> (ex : présence d'EDTA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter la concentration de MgCl<sub>2</sub> par paliers de 0,5 mM</li> </ul>
Conditions des cycles PCR non optimales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuer la température d'hybridation. Idéalement réaliser un gradient pour déterminer la température d'hybridation optimale</li> <li>Augmenter le temps d'élongation, ou utiliser une enzyme mieux adaptée (voir section « Produits associés ») si la séquence cible est longue/riche en GC</li> <li>Augmenter le nombre de cycles</li> <li>Augmenter le temps de dénaturation particulièrement pour les matrices complexes (ADN génomique)</li> </ul>

## 2. Bandes multiples (« smear ») ou bandes non spécifiques

**MU-OZYA001- 072024**

Causes possibles	Remarques / Solutions
Préparation ou distribution du mélange à température ambiante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Préparer et distribuer le mélange réactionnel sur de la glace. Alternativement, utiliser une enzyme à démarrage à chaud (« Hot Start ») permettant la préparation du mélange réactionnel à température ambiante. Nous recommandons la Taq'Ozyme HS</li> </ul>
Excès d'enzyme	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuer la quantité d'enzyme (en cas de « smear »)</li> </ul>
Concentration de MgCl <sub>2</sub> trop élevée	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuer la concentration de MgCl<sub>2</sub> par paliers de 0,5 mM</li> </ul>
Quantité de matrice non optimale	<ul style="list-style-type: none"> <li>Titrer la quantité d'ADN. Diminuer la concentration finale (voir la section « Matrice » du chapitre « Optimisations »)</li> </ul>
Conditions des cycles PCR non optimales	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuer le nombre de cycles</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuer le temps d'élongation</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter la température d'hybridation (accroît la stringence)</li> </ul>
Concentrations d'amorces trop élevées	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diminuer les concentrations des amorces</li> </ul>
Contamination	<ul style="list-style-type: none"> <li>Remplacer chaque composant afin de trouver la source de contamination</li> <li>Réaliser les réactions de PCR dans un espace réservé et séparé de celui dédié à l'analyse des produits de PCR</li> </ul>
Conception d'amorces non optimal	<ul style="list-style-type: none"> <li>Désigner des nouvelles amorces (voir section « Amorces »)</li> </ul>

## PRODUITS ASSOCIÉS

- Taq'Ozyme HS- OZYA002-200 ("Hot Start")
- Taq'Ozyme HS Mix - OZYA006-200XL ("Hot Start")
- Taq'Ozyme Purple Mix 2 - OZYA007-200
- 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
- dNTP PreMix - 4 x 10 mM - OZYD001-500
- SeaKem LE Agarose - 500 g- LON50004
- AccuGENE Molecular Biology Water - 1 L - LON51200
- Les thermocycleurs UNO

## AVERTISSEMENT

Produit à usage de recherche uniquement.

**MU-OZYA001- 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