

HS qPCR Apta-Mix

HS qPCR Apta-Mix est un master mix prêt à l'emploi comprenant une polymérase hot start ainsi que tous les éléments nécessaires pour la PCR, y compris les dNTPs ultra purs. (la sonde, l'ADN matrice et les amorces ne sont pas inclus)

Ce master mix est parfaitement adapté aux PCR en temps réel (qPCR) par sonde fluorescente (Probe) et dispose des propriétés hot start par aptamères inhibant toute activité enzymatique avant activation de celle-ci.

Il est donc possible de réaliser la préparation des essais qPCR à température ambiante.

L'activation de la polymérase est réalisée en seulement 2 min par chauffage à 95 °C.

Compte tenu de la réduction du nombre d'étapes de pipetage que permet ce master mix, le risque de contaminations croisées s'en trouve également réduit.

L'alliance optimale entre la polymérase et le tampon de réaction, en combinaison avec une inhibition par aptamères, permet de diminuer considérablement l'amplification non spécifique afin d'obtenir une efficacité maximale de la qPCR.

I. Composants

	100 réact.	500 réact.
HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)	1 x 1.25 ml	5 x 1.25 ml
Réf. Catalogue	3010.100	3010.500

II. Conditions de stockage et durée de validité

Le **HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)** master mix est à stocker à -20 °C.

*Note : Le **HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)** master mix a une durée de validité minimum de 12 mois (sous réserve de respecter les conditions de stockage).*

III. Préparation du HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)

Le HS qPCR Apta-Mix (**Probe, 2x**) master mix est livré prêt à l'emploi et contient tous les éléments nécessaires pour la PCR, y compris les dNTPs ultra purs. (la sonde, l'ADN matrice et les amorces ne sont pas inclus)

*Remarque : Ne pas multiplier les cycles de congélation-décongélation du **HS qPCR Apta-Mix** prêt à l'emploi. Aliquoter si nécessaire. Le **HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)** master mix peut être stocké à +4 °C pendant une semaine.*

IV. Milieu réactionnel

Recommandations

a) ADN matrice

La quantité et la qualité de l'ADN matrice peu considérablement influencer sur les résultats d'une PCR. Une quantité excessive en ADN matrice augmente le risque d'amplicons non spécifique tandis qu'une trop faible quantité en ADN matrice nuit à la qualité et la précision de la PCR. Pour de l'ADN génomique nous recommandons l'utilisation de 1 à 300 ng d'ADN matrice par réaction et pour l'ADN plasmidique ou viral de 1 ng à 1 pg d'ADN matrice par réaction.

La qualité de l'ADN matrice peut être augmenté en procédant à une purification préalable (précipitation à l'éthanol, kit de purification ...).

b) Amorces et sonde (Probe)

Une concentration en amorces entre 0,05 μM et 1 μM est à préférer. Une concentration trop élevée en amorces peut engendrer des mésappariements. Idéalement maintenir le pourcentage en GC entre 40 et 60 %. Éviter les séquences complémentaires intra/inter-amorces afin de prévenir de la formation de structures secondaires du type épingles à cheveux ou la dimérisation des amorces. Pour obtenir des conditions de PCR optimales, les températures de fusion (T_m) des amorces sens et antisens devront être équivalents à +/- 5°C près.

Pour les sondes (Probe) nous conseillons d'utiliser des concentrations entre 0,05 μM et 0,3 μM . Éviter d'utiliser des sondes trop longues au risque de réduire la spécificité de l'hybridation. Afin d'augmenter l'efficacité nous recommandons de réduire la distance entre l'extrémité 3' de l'amorce et l'extrémité 5' de la sonde. Veiller à ce que la température de fusion (T_m) de la sonde soit de 6 °C à 10 °C au-dessus de celles des amorces.

Remarque: NCBI met à disposition gratuitement un logiciel de conception d'amorces (Primer-Blast).

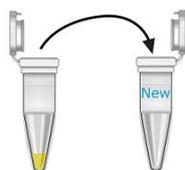
c) MgCl_2

La concentration en MgCl_2 du master mix **HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)** a été établie de sorte à convenir à la plupart des situations. Néanmoins, il est possible, si nécessaire, d'augmenter la concentration en MgCl_2 .

Composants	Volume	Concentration finale
HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)	12,5 µl	1x
Amorce sens (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM ⁽¹⁾
Amorce antisens (10 µM)	0,5 µl	0,2 µM ⁽¹⁾
Sonde (Probe)	x µl	0,2 µM ⁽²⁾
Matrice ADN	y µl	1 ng < ADN génomique ⁽³⁾ < 300 ng
Eau distillée stérile	Ajuster à 25 µl	

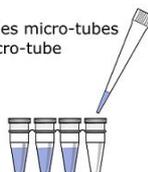
- (1) Plage de concentration idéale amorces (0,05 à 1 µM)
(2) Plage de concentration idéale sonde (0,05 à 0,3 µM)
(3) 1 ng à 1pg pour les matrices d'ADN viral ou plasmidique.

Transférer dans un nouveau tube 12.5 µl x (nombre de réactions) de master mix HS qPCR Apta-Mix (Probe, 2x)



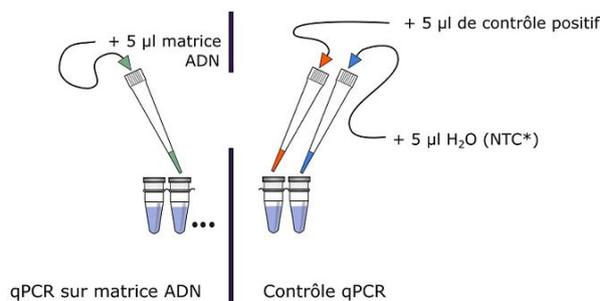
+ Amorces sens
(0.5µl x nb de réactions)
+ Amorces antisens
(0.5µl x nb de réactions)
+ Sonde (Probe)
(Xµl x nb de réactions)
+ H₂O
(ajuster à 20 µl x nb de réactions)

Charger les micro-tubes 20 µl/micro-tube



Exemple avec ADN matrice à 5 ng/µl

(*) NTC: no template control/sans ADN matrice



V. Paramétrage de la PCR

a) Dénaturation et activation

La polymérase fournie est inhibée par aptamères afin d'éviter toute activité enzymatique avant la dénaturation initiale. L'activation de la polymérase est effectuée par chauffage à 95 °C pendant 2 min.

La durée de dénaturation, par cycle d'amplification, conseillée est de 15 secondes, adaptable selon les caractéristiques de l'ADN matrice et les propriétés du thermocycleur.

b) Hybridation et élongation

La température optimale d'hybridation est généralement située 3 °C à 5 °C au-dessous de la température de fusion (T_m) calculée des amorces.

Le T_m peut être calculé approximativement en utilisant la formule suivante :

$$T_m (\text{°C}) = 4 \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \times (\text{A} + \text{T})$$

Le temps d'hybridation par cycle préconisé est de 60 secondes et est adapté selon les caractéristiques de l'ADN matrice et les propriétés du thermocycleur.

Exemple de protocole pour une PCR en 2 étapes :

	Température	Durée	Cycles
Activation (dénaturation initiale)	95 °C	2 min.	1x
Dénaturation	95 °C	15 sec. ⁽¹⁾	25 à 40 cycles
Hybridation/Elongation	60 °C ⁽²⁾	60 sec. ⁽¹⁾	

(1) A adapter selon les caractéristiques de l'ADN matrice et les propriétés du thermocycleur.

(2) A adapter selon le T_m des amorces

Exemple de protocole pour une PCR en 3 étapes :

	Température	Durée	Cycles
Activation (dénaturation initiale)	95 °C	2 min.	1x
Dénaturation	95 °C	15 sec. ⁽³⁾	25 à 40 cycles
Hybridation	55 °C – 68 °C ⁽⁴⁾	30 sec. ⁽³⁾	
Elongation	68 °C – 75 °C ⁽⁴⁾	40 sec. ⁽³⁾	

(3) A adapter selon les caractéristiques de l'ADN matrice et les propriétés du thermocycleur.

(4) A adapter selon le T_m des amorces.