

Taq'Ozyme HS – Applications spécifiques

Ils ont utilisé avec succès la Taq'Ozyme HS dans des applications spécifiques :

- ✓ **PCR multiplex**
- ✓ **Amplification de régions GC-riches**
- ✓ **PCR à partir d'ADNg traité au bisulfite**
- ✓ **Génotypage sur lysats de queues de souris**

La spécificité, la robustesse et la sensibilité de la Taq'Ozyme HS ont été confirmées par ces utilisateurs qui partagent leur expérience.

1. PCR Multiplex

Description de l'expérience :

La Taq'Ozyme HS a été utilisée pour détecter des infections fongiques chez le blé par une approche de PCR multiplex, en ciblant un gène de blé et deux gènes fongiques.

Matrice : 10ng ADNg (1 µl), 1µl d'ADNc non dilué ou 1µl d'eau (témoin)

Amorces : 1µl d'amorces à 10µM (mélange de sens et anti-sens). 3 couples d'amorces : 2 fongiques, 1 végétal. Tm= 68°C

Mélange réactionnel : 15,5µl d'eau UltraPure stérile, 5 µl de tampon 5x, 1 µl de chaque couple d'amorces à 10 µM, 0,5 µl de Taq'Ozyme HS à 5 u/µl et 1µl de matrice.

Programme d'amplification : 95°C 2min ; (95°C 30s, 65°C 4min) 25x ; 72°C 5min ; 4°C ∞

Electrophorèse sur gel agarose 2%, 100V.

Résultats :

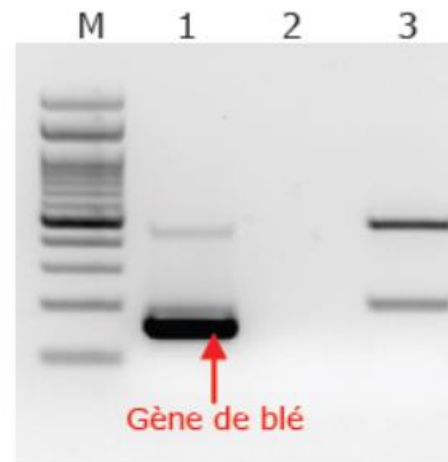
Obtention de fragments de taille attendue avec 3 bandes correspondantes aux 3 couples d'amorces pour l'ADNc (blé infecté) et 2 bandes correspondantes aux deux couples d'amorces fongiques pour l'ADNg fongique (absence d'ADN de blé).

La Taq'Ozyme HS amplifie avec succès le gène de blé contaminé et les 2 gènes fongiques (puits 1)

Conclusions :

La Taq'Ozyme HS a fonctionné dès la première PCR, avec le protocole recommandé et sans aucune optimisation.

Détection simultanée d'un gène de blé et de 2 gènes fongiques



M : 100 bp Ladder
1 : ADNc de blé infecté
2 : Témoin (eau)
3 : ADNg de champignon

2. PCR sur une région GC-riche

Description de l'expérience :

Pour des expériences de ChIP, nous avons besoin d'amplifier des régions de promoteur qui sont particulièrement GC-riche : 75% dans le cas du promoteur du gène *Bin* dont il est question ici. Pour l'instant, nous n'avions pu amplifier ce fragment qu'en utilisant le système « GC-rich PCR system » et en augmentant fortement la quantité de primers. Suite à de nouveaux tests, nous avons trouvé que la Taq'Ozyme HS fonctionnait aussi très efficacement dans ce contexte difficile. De nouveau, la quantité de primers utilisée est cruciale.

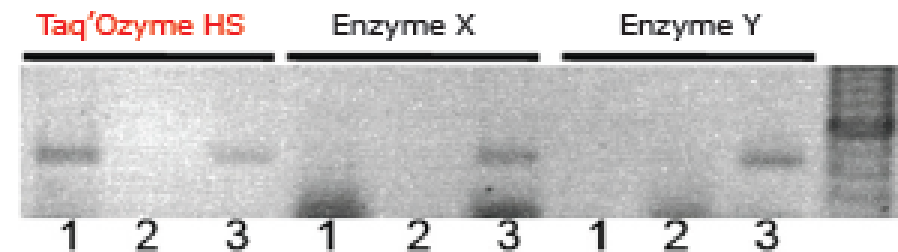
Résultats :

La Taq'Ozyme amplifie correctement la région GC-riche du promoteur du gène *Bin* avec 2 μ M d'amorces (puits 1)

Conclusions :

Suite à de nouveaux tests, nous avons trouvé que la Taq'Ozyme HS marchait aussi très efficacement dans ce contexte difficile. De nouveau, la quantité de primers utilisée est cruciale.

Amplification d'une région du promoteur du gène *Bin* avec 75% de GC



1 : Concentration d'amorce à 2 μ M

2 : Concentration d'amorce recommandée pour chaque enzyme

3 : Contrôle positif de PCR

3. PCR sur ADN génomique traité au métabisulfite (dT -> U)

Description de l'expérience :

Les amplifications ont été réalisées sur de l'ADN traité au bisulfite avec la Taq'Ozyme HS et une Taq Z. Deux régions indépendantes sont amplifiées (produit A et produit B) avec 3 Tm différents (52°C, 57°C et 61°C).

Toutes les amplifications sont réalisées sur la même machine PCR avec 35 cycles.

Pour la Taq'Ozyme les conditions utilisées (mix et cycles) sont celles préconisées sur la [fiche technique](#) fournie par Ozyme. Pour la Taq Z, le MgCl₂ est amené à un volume final de 2,5 mM.

Pour les cycles :

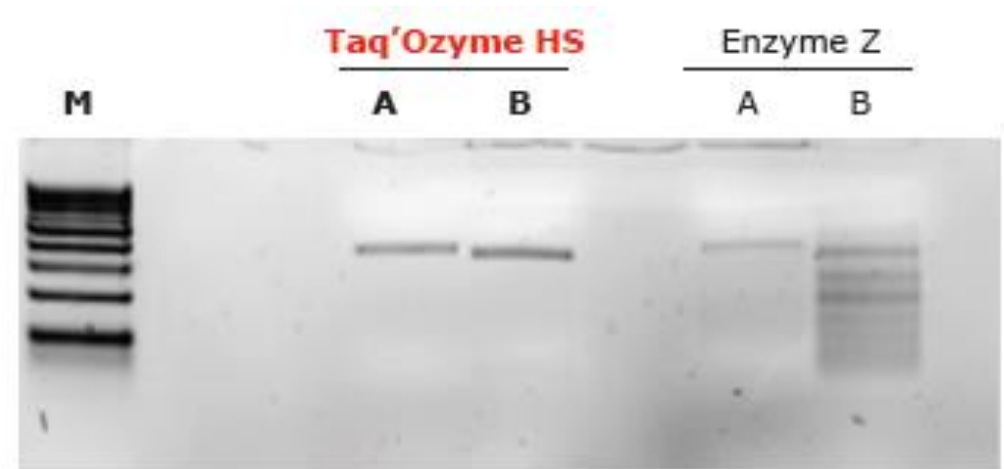
- ✓ Une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 16 minutes
- ✓ Puis 20 secondes à 94°C
- ✓ Pour l'annealing : 20 secondes pour les 3 Tm différents (52°C, 57°C et 61°C)
- ✓ 30 secondes à 72°C sur 35 cycles

Résultats :

Les PCR ont été réalisées selon les protocoles fournis pour chaque enzyme. La Taq'Ozyme HS amplifie efficacement les 2 régions A & B d'ADNg traité au bisulfite

Conclusions :

Taq'Ozyme HS donne des résultats corrects sur l'ADN traité au métabisulfite, moins intense que la Taq Z mais la Taq'ozyme est plus simple d'utilisation par rapport aux choix des Tm qui peuvent être plus bas qu'avec la Taq Z, ce dernier point est un plus.



4. Génotypage sur lysats de queues de souris

Description de l'expérience :

Les échantillons sont des lysats de queues de souris, avec les primers dirigés contre Slug; La taille de la cible est de 400 pb. Le protocole utilisé est celui de la Taq'Ozyme HS dans un volume total de 25 μ l :

- ✓ Tampon 5X: 5 μ l
- ✓ Primers 2 μ M: 5 μ l
- ✓ Taq'Ozyme HS (5 u/ μ l) : 0,125 μ l
- ✓ ADN (lysats): 1 μ l
- ✓ H₂O: 13,875 μ l

Pour le thermocycleur, j'ai suivi le programme proposé dans la fiche technique de la Taq'Ozyme HS. J'ai déposé sur gel 15 μ l de la réaction de PCR

Résultats :

Le marqueur Slug (400 pb), indétectable avec une Taq classique, est amplifié par la taq'Ozyme HS

Conclusions :

Les résultats de génotypage avec la Taq'Ozyme HS sont nettement mieux ! Pour certains échantillons dont on ne voyait pas la bande correspondante à l'allèle Slug avec la Taq classique, cette bande apparaît avec l'utilisation de la Taq'Ozyme HS. Sans doute, parce que j'ai une quantité trop faible d'ADN et parce que la Taq'Ozyme HS est plus sensible et ainsi plus efficace.

