

Taq-Purple DNA polymeráza

(katalogové číslo T107, T108, T109)

rev. 01/2022

Popis

Tento produkt je modifikací produktu Taq DNA polymerázy Unis (kat. č. T037-T039). Rozdílem je nižší koncentrace polymerázy (1 U/μl), což umožňuje přesnější dávkování enzymu a přidavek inertního barviva, které umožňuje vizuální kontrolu přítomnosti enzymu v reakční směsi.

Inertní barvivo

- Barvivo neovlivňuje reakční podmínky PCR a při elektroforéze v agarózovém gelu má vyšší pohyblivost než oligonukleotidové primery a neinterferuje proto s kvantifikací DNA fragmentů při analýze PCR produktů.

Taq DNA polymeráza

Taq DNA polymeráza je termostabilní enzym pocházející z bakterie *Thermus aquaticus*. Tento enzym katalyzuje syntézu komplementárního řetězce DNA ve směru 5'→3' a také vykazuje exonukleázovou aktivitu ve směru 5'→3'. Při amplifikaci DNA fragmentů Taq polymeráza často přidává na 3' konec přesahující adenosin, který lze využít pro tzv. TA klonaci PCR produktů. Tato polymeráza však nemá exonukleázovou aktivitu ve směru 3'→5' a v důsledku toho není schopna opravovat chyby vzniklé při amplifikaci. Výhodou tohoto enzymu je jeho vysoká aktivita (amplifikace 1000 párů bází (bp) trvá < 1 minutu); nevýhodou je výskyt chyb při replikaci (přibližně 1 chyba na 10⁵ až 10⁶ syntetizovaných párů bází). Hlavní využití Taq DNA polymerázy je v diagnostické analýze přítomnosti specifických fragmentů DNA pomocí PCR až do velikosti kolem 5000 bp.

Technické údaje

Komponenty a balení

- Taq-Purple DNA polymeráza je dodávána v koncentraci 1 U/μl. V základním balení jsou: 1 zkumavka obsahující 500 U/500 μl (kat. č. **T107**), 5 zkumavek po 500 U/500 μl (kat. č. **T108**) nebo 10 zkumavek po 500 U/500 μl (kat. č. **T109**).
- Ke každé zkumavce s Taq-Purple DNA polym. je přidána 1 zkumavka (1,5 ml) s 10x reakčním pufrům (zelené víčko kat. č. **T029**) a jedna zkumavka (1,5 ml) s 10x PCR Blue buffer, který vykazuje vyšší toleranci k suboptimálním koncentracím Mg²⁺ (modré víčko kat. č. **T058**).

Pro optimalizaci koncentrace MgCl₂ lze objednat 10x konc. reakční pufr bez MgCl₂, ke kterému je dodáván 25 mM MgCl₂ v samostatné zkumavce (kat. č. **T035**), nebo 10x konc. PCR Blue Buffer bez MgCl₂ s 25 mM MgCl₂ v samostatné zkumavce (kat. č. **T059**).

Skladování

- Skladovat při teplotě -20°C ± 5°C. Materiál snáší opakované rozmrazování.

Složení

- Skladovací pufr pro Taq-Purple DNA polymerázu: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 při 25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Tween 20, inertní barvivo, 50% glycerol.
- 10x reakční pufr: 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25°C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂.

Aktivita

- Jedna jednotka aktivity (U) je definována jako množství enzymu, které katalyzuje zabudování 10 nmol dNTP během 30 min při 72°C do materiálu precipitovatelného trichloroctovou kyselinou. Reakce probíhá v objemu 50 μl v pufru obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25°C), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dATP, dCTP, dGTP a [α-³²P]dTTP, 50 μg/ml denaturované DNA, 0,5 μM primer a 0,2 - 0,5 U enzymu.

Kontrola kvality

- Čistota Taq-Purple DNA polymerázy je ověřována metodou SDS-PAGE. Enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá výrobní šarže Taq-Purple DNA polymerázy je testována na schopnost amplifikovat fragment genu savčí genomové DNA pomocí PCR. Výsledný produkt je analyzován elektroforézou na agarosovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu; pouze očekávaný fragment DNA je produkován.

Taq-Purple DNA polymeráza

(katalogové číslo T107, T108, T109)

Protokol

Základní protokol

Tento protokol slouží jako výchozí návod pro přípravu a průběh PCR. V některých případech je však nutné optimalizovat reakční podmínky. Především se jedná o nastavení teplot dosedání primerů a eventuálně nalezení optimální koncentrace MgCl₂.

1. V tenkostěnné zkumavce pro PCR smíchat na ledu jednotlivé komponenty ¹:

	PCR v 50 µl	Výsledná koncentrace
10x reakční pufr s 15 mM MgCl ₂ ²	5 µl	1x reakční pufr s 1,5 mM MgCl ₂
PCR dNTP mix (10 mM každý) (kat. č. P041)	1 µl	0,2 mM každý dNTP
5' primer (50 µM)	0,5 µl	0,5 µM
3' primer (50 µM)	0,5 µl	0,5 µM
Taq-Purple DNA polymeráza (1U/µl)	2,5 ul	2,5 U (0,05 U/µl)
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	1 ul	0,02 ng/µl – 0,02 µg/µl
PCR H ₂ O (kat. č. P042)	39,5 ul	

¹ Při testování více vzorků DNA je výhodné připravit tzv. Master Mix, ve kterém jsou objemy jednotlivých komponent násobkem počtu vzorků plus jeden. Master Mix je poté rozdělen po 49 µl do zkumavek a do každé z nich je přidán 1 µl studovaného vzorku DNA.

² V případě potřeby je možné použít 10x reakční pufr bez MgCl₂ a optimalizovat koncentraci MgCl₂ (viz. níže).

2. Vzorky jemně promíchat a stočit.
3. Pokud je používán PCR cykler bez vyhřívání víčka, převrstvit reakční směs 25 µl PCR oleje (kat. č. P043).
4. Na teplotním cykleru provést PCR s následujícími cykly:

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94°C	3 min	1
Denaturace	94°C	30 s	25-35
Nasednutí primerů	55-68°C ¹	30 s	
Extenze	72°C	1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	10 min	1
Chlazení	4°C		

¹ Je vhodné zjistit experimentálně; obvykle o 5°C nižší než teplota tání (T_m) primerů.

5. Získané PCR produkty lze smíchat s vkladacím pufrům (kat. č. P048) a analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu nebo skladovat při -20°C.

Optimalizace koncentrace MgCl₂

Koncentrace 1,5 mM MgCl₂ je vhodná pro většinu PCR. Nicméně pro některé amplifikace je nutné najít optimální koncentraci MgCl₂. V tom případě je vhodné specifikovat při objednávce požadavek na dodání 10x reakčního pufru bez MgCl₂, ke kterému je dodáván 25 mM MgCl₂ v samostatné zkumavce (kat. č. T035).

1. Připravit na ledu Master Mix bez MgCl₂ smícháním následujících komponent:

10x reakční pufr bez MgCl ₂	40 µl
PCR dNTP mix (10 mM každý)	8 µl
5' primer (50 µM)	4 µl
3' primer (50 µM)	4 µl
Taq-Purple DNA polymeráza (1U/µl)	20 µl
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	8 µl
PCR H ₂ O	252 µl
Celkový objem	336 µl

2. Master Mix jemně promíchat, stočit a rozdělit po 42 μl do 7 zkumavek.
3. Do jednotlivých zkumavek doplnit 25 mM MgCl_2 a PCR H_2O podle schématu (na celkový objem 50 μl):

Číslo zkumavky	25 mM MgCl_2	PCR H_2O	Finální konc. MgCl_2
1	1 μl	7 μl	0,5 mM
2	2 μl	6 μl	1,0 mM
3	3 μl	5 μl	1,5 mM
4	4 μl	4 μl	2,0 mM
5	5 μl	3 μl	2,5 mM
6	6 μl	2 μl	3,0 mM
7	8 μl	0 μl	4,0 mM

4. Provést PCR (viz. výše), výsledné vzorky analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu a určit nejvhodnější koncentraci MgCl_2 .

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
T107	Taq-Purple DNA polymeráza	500 U
T108	Taq-Purple DNA polymeráza	5x 500 U
T109	Taq-Purple DNA polymeráza	10x 500 U
T029	10x konc. reakční pufr	1,5 ml
T035	10x konc. reakční pufr bez $\text{MgCl}_2+\text{MgCl}_2$	1,5 ml + 0,5 ml
T058	10x konc. PCR Blue Buffer	1,5 ml
T059	10x konc. PCR Blue Buffer bez $\text{MgCl}_2+\text{MgCl}_2$	1,5 ml + 0,5 ml

