

LA DNA Polymerases Mix

(katalogové číslo L072, L073, L074)

rev. 04/2025

Popis

LA DNA Polymerases Mix představuje unikátní směs dvou DNA polymeráz. Jednou z nich je Taq DNA polymeráza, která je vysoce procesivní, ale postrádá 3'→5' exonukleázovou aktivitu a tedy není schopna opravovat chyby v podobě nukleotidových záměn při syntéze komplementárního řetězce DNA. Druhá polymeráza je sice méně aktivní v syntéze nukleotidů, ale má schopnost 3'→5' exonukleázové aktivity a výrazně tak snižuje množství chyb vzniklých při replikaci DNA.

Kombinace těchto dvou polymeráz vede k výraznému snížení chyb při syntéze komplementárního vlákna DNA při zachování vysoké rychlosti syntézy. To umožňuje amplifikaci fragmentů DNA do velikosti 10-20 kb (v případě komplexní genomové DNA) nebo 40 kb (v případě virové DNA) s přibližně 5x nižším výskytem mutací ve srovnání se samotnou Taq DNA polymerázou. Jedná se tedy o „Long and Accurate“ (LA) PCR. LA DNA Polymerases Mix je především vhodný pro amplifikaci DNA nebo cDNA fragmentů určených pro klonace.

Technické údaje

Komponenty a balení

- LA DNA Polymerases Mix je dodáván v koncentraci 5 U/μl. V základním balení jsou: 1 zkuševka po 500 U/100 μl (kat. č. **L072**), 5 zkuševek po 500 U/100 μl (kat. č. **L073**) nebo 10 zkuševek po 500 U/100 μl (kat. č. **L074**).
- Ke každé zkuševce s LA DNA Polymerases Mix je přidána 1 zkuševka s 10x LA PCR reakčním pufr (1,5 ml). Rovněž je možné objednat 10x LA PCR reakční pufr bez MgCl₂, ke kterému je dodáván 25 mM MgCl₂ v samostatné zkuševce (kat. č. **L076**).
- Ke každé zkuševce s LA DNA Polymerases Mix je přidána 1 zkuševka s DMSO (1 ml, kat. č. **L077**).

Skladování

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

Složení

- Skladovací pufr pro LA DNA Polymerases Mix: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Tween 20, 50% glycerol.
- 10x LA PCR reakční pufr: 500 mM Tris-HCl, pH 9,3 (25°C), 150 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 22,5 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 polymeráz je ověřována metodou SDS-PAGE. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá výrobní šarže LA DNA Polymerases Mix 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.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
L072	LA DNA Polymerases Mix	500 U
L073	LA DNA Polymerases Mix	5x 500 U
L074	LA DNA Polymerases Mix	10x 500 U
L076	10x konc. LA PCR pufr bez MgCl ₂ +MgCl ₂	1,5 ml + 0,5 ml
L077	DMSO	1,0 ml



LA DNA Polymerases Mix

(katalogové číslo L072, L073, L074)

Protokol

Základní protokol

Tento protokol slouží jako výchozí návod pro přípravu a průběh LA PCR. V některých případech je však nutné optimalizovat reakční podmínky. Především se jedná o nastavení teplot dosedání primerů a eventuálně nalezení optimální koncentrace $MgCl_2$.

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

	PCR v 50 μ l	Výsledná koncentrace
10x LA PCR reakční pufr s 22,5 mM $MgCl_2$ ²	5 μ l	1x reakční pufr s 2,25 mM $MgCl_2$
PCR dNTP mix (10 mM každý) (kat. č. P041)	2,5 μ l	0,5 mM každý dNTP
DMSO ³	1 μ l	2%
5' primer (50 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
3' primer (50 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
LA DNA Polymerases Mix (5U/ μ l)	0,5 μ l	2,5 U (0,05 U/ μ l)
Templátová DNA (1 ng/ μ l - 1 μ g/ μ l) ⁴	1 μ l	0,02 ng/ μ l – 0,02 μ g/ μ l
PCR H ₂ O (kat. č. P042)	39 μ l	

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 μ l do zkumavek a do každé z nich je přidán 1 μ l studovaného vzorku DNA.

² V případě potřeby je možné použít 10x LA PCR reakční pufr bez $MgCl_2$ a optimalizovat koncentraci $MgCl_2$ (viz níže).

³ DMSO snižuje tvorbu sekundárních struktur DNA a zvyšuje tak výtěžek PCR.

⁴ Templátová DNA by měla být připravena se zvýšenou opatrností a neměla by být opakovaně rozmrazována, aby nedocházelo k její fragmentaci.

2. Vzorky jemně promíchat (bez vortexu) a stočit.
3. Pokud je používán PCR cykler bez vyhřívání víčka, převrstvit reakční směs 25 μ l 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 pufrem (kat. č. P048) a analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu (kat. č. P046) nebo skladovat při -20°C.

Optimalizace koncentrace MgCl₂

Zvýšená koncentrace MgCl₂ (2,25 mM) v LA PCR reakční směsi je použita z důvodů zvýšené koncentrace dNTP, které mají chelatační vlastnosti a je vhodná pro většinu LA PCR. Nicméně pro některé amplifikace je nutné koncentraci MgCl₂ optimalizovat. V tom případě je vhodné specifikovat při objednávce požadavek na dodání 10x konc. LA PCR reakčního pufru bez MgCl₂, ke kterému je dodáván 25 mM MgCl₂ v samostatné zkumavce (kat. č. L076).

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

10x LA PCR reakční pufr bez MgCl ₂	40 µl
PCR dNTP mix (10 mM každý)	20 µl
DMSO	8 µl
5' primer (50 µM)	4 µl
3' primer (50 µM)	4 µl
LA DNA Polymerases Mix (5U/µl)	4 µl
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	8 µl
PCR H ₂ O	232 µl
Celkový objem	320 µl

2. Vzorky jemně promíchat, stočit a rozdělit po 40 µl do 7 zkumavek pro PCR.
3. Do jednotlivých zkumavek doplnit 25 mM MgCl₂ a PCR H₂O podle schématu (na celkový objem 50 µl):

Číslo zkumavky	25 mM MgCl ₂	PCR H ₂ O	Finální konc. MgCl ₂
1	2 µl	8 µl	1,0 mM
2	3 µl	7 µl	1,5 mM
3	4 µl	6 µl	2,0 mM
4	5 µl	5 µl	2,5 mM
5	6 µl	4 µl	3,0 mM
6	8 µl	2 µl	4,0 mM
7	10 µl	0 µl	5,0 mM

4. Provést PCR (viz. výše), výsledné vzorky analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu a určit nejvhodnější koncentraci MgCl₂.