

Taq DNA polymeráza Unis

(katalogové číslo T037, T038, T039)

rev. 01/2022

Popis

Taq DNA polymeráza Unis představuje alternativu k Taq DNA polymeráze (kat. č. T032-T034). Rozdíl mezi těmito produkty spočívá v použití jiného skladovacího pufru, který zajišťuje vyšší stabilitu enzymu a zvyšuje enzymatickou účinnost. Případné amplifikaci nespecifických fragmentů lze obvykle zamezit větším ředěním enzymu.

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 DNA polymeráza Unis je dodávána v koncentraci 5 U/μl. V základním balení jsou: 1 zkumavka obsahující 500 U/100 μl (kat. č. **T037**), 5 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **T038**) nebo 10 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **T039**).
- Ke každé zkumavce s Taq DNA polymerázou Unis je přidána 1 zkumavka (1,5 ml) s 10x reakčním pufrem (zelené víčko kat. č. **T029**) a jedna zkumavka (1,5 ml) s 10x PCR Blue Bufferem, 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 DNA polymerázu: 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 reakční pufr (zelené víčko): 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25°C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂.
- 10x konc. PCR Blue Buffer (modré víčko): 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 1% Tween 20, 25 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 DNA polymerázy Unis je ověřována metodou SDS PAGE. Enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá výrobní šarže Taq DNA polymerázy Unis je testována na schopnost amplifikovat fragment genu savčí genomové DNA pomocí PCR. Výsledný produkt je analyzován elektroforézou na agarozovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu; pouze očekávaný fragment DNA je produkován.

Taq DNA polymeráza Unis

(katalogové číslo T037, T038, T039)

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 $MgCl_2$.

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

	PCR v 50 μ l	Výsledná koncentrace
10x PCR Blue Buffer s 25 mM $MgCl_2$ ²	5 μ l	1x reakční pufr s 1,5 mM $MgCl_2$
PCR dNTP mix (10 mM každý) (kat. č. P041)	1 μ l	0,2 mM každý dNTP
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
Taq DNA polymeráza Unis (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)	1 μ l	0,02 ng/ μ l – 0,02 μ g/ μ l
PCR H ₂ O (kat. č. P042)	41,5 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 PCR Blue Buffer bez $MgCl_2$ a optimalizovat koncentraci $MgCl_2$ (viz. níže).

2. Vzorky jemně promíchat 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 pufrům (kat. č. P048) a analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu nebo skladovat při -20°C.

Optimalizace koncentrace $MgCl_2$

Koncentrace 1,5 mM $MgCl_2$ je vhodná pro většinu PCR. Nicméně pro některé amplifikace je nutné najít optimální koncentraci $MgCl_2$. V tom případě je vhodné specifikovat při objednávce požadavek na dodání 10x PCR Blue bufferu bez $MgCl_2$, ke kterému je dodáván 25 mM $MgCl_2$ v samostatné zkumavce (T059).

1. Připravit na ledu Master Mix bez $MgCl_2$ smícháním následujících komponent:

10x PCR Blue Buffer bez $MgCl_2$	40 μ l
PCR dNTP mix (10 mM každý)	8 μ l
5' primer (50 μ M)	4 μ l
3' primer (50 μ M)	4 μ l
Taq DNA polymeráza Unis (5U/ μ l)	4 μ l
Templátová DNA (1 ng/ μ l - 1 μ g/ μ l)	8 μ l
PCR H ₂ O	268 μ l
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 (kat. č. P046) a určit nejvhodnější koncentraci MgCl_2 .

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
T037	Taq DNA polymeráza Unis	500 U
T038	Taq DNA polymeráza Unis	5x 500 U
T039	Taq DNA polymeráza Unis	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

