

Q-Taq DNA polymeráza

(katalogové číslo Q040, Q041, Q042)

rev. 01/2022

Popis

Jedná se o rekombinantní DNA polymerázu, izolovanou nově vyvinutou metodou snižující množství kontaminující DNA. V komerčně dostupných preparátech DNA polymeráz je přítomno 10 - 1000 genomových ekvivalentů bakteriální dsDNA na jednotku enzymu (Spangler et al., Plos One, 4: e7010, 2009). Bakteriální DNA, kontaminující preparáty DNA polymeráz, může způsobovat problémy při některých typech DNA amplifikací, zvláště bakteriálních genotypizací pomocí PCR. Q-Taq DNA polymeráza má významným způsobem sníženou kontaminující dsDNA (<0,5 ng/ml) a zvyšuje kvalitu PCR s některými typy primerů.

Technické údaje

Komponenty a balení

- Q-Taq DNA polymeráza je dodávána v koncentraci 5 U/μl. V základním balení jsou: 1 zkumavka obsahující 500 U/100 μl (kat. č. **Q040**), 5 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **Q041**) nebo 10 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **Q042**).
- Ke každé zkumavce s Q-Taq DNA polymerázou je přidána 1 zkumavka (1,5 ml) s 10x PCR Blue Bufferem, který vykazuje vyšší toleranci k suboptimálním koncentracím Mg²⁺ (kat. č. **T058**).

Pro optimalizaci koncentrace MgCl₂ lze objednat 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 Q-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 konc. PCR Blue Buffer: 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 Q-Taq DNA polymerázy 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.

Q-Taq DNA polymeráza

(katalogové číslo Q040, Q041, Q042)

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 PCR Blue Buffer s 25 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
Q-Taq DNA polymeráza (5U/µl)	0,5 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)	41,5 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 PCR Blue Buffer 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 PCR Blue bufferu bez MgCl₂, ke kterému je dodáván 25 mM MgCl₂ v samostatné zkumavce (T059).

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

10x PCR Blue Buffer 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
Q-Taq DNA polymeráza (5U/µl)	4 µl
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	8 µl
PCR H ₂ O	268 µl
Celkový objem	336 µl

- Master Mix jemně promíchat, stočit a rozdělit po 42 μl do 7 zkumavek.
- 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

- 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
Q040	Q-Taq DNA polymeráza	500 U
Q041	Q-Taq DNA polymeráza	5x 500 U
Q042	Q-Taq 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

