

Aptamer-Taq DNA polymeráza, 5 U/μl

(katalogové číslo A025, A026, A027)

rev. 10/2023

Popis

Aptamer-Taq DNA polymeráza, 5 U/μl obsahuje DNA aptamer anti-Taq. Tento aptamer, stejně jako protilátka inhibuje enzymatickou aktivitu Taq DNA polymerázy. Ve srovnání s protilátkou má aptamer anti-Taq několik výhod při použití pro „hot-start“ PCR: (1) nedochází u něj k irreverzibilní denaturaci při teplotách až do 100°C, (2) jedná se o nízkomolekulární látku, která je připravována synteticky a má známé a definované složení, (3) není kontaminován komponentami savčích buněk, (4) je odolný k působení proteáz a umožňují přípravu PCR směsí při pokojové teplotě, (5) je cenově dostupnější.

Hot Start

- DNA aptamer anti-Taq, který se specificky váže na Taq DNA polymerázu a tím blokuje její enzymatickou aktivitu. Při teplotě nad 50°C dochází k uvolnění aptameru a tím k odblokování enzymatické aktivity DNA polymerázy. Tímto způsobem výrazně klesá tvorba nespecifických DNA fragmentů v důsledku aktivity polymerázy před prvním cyklem PCR.

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 DNA 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

- Aptamer-Taq DNA polymeráza, 5 U/μl je dodávána v koncentraci 5 U/μl. V základním balení jsou 1 zkumavka obsahující 500 U/100 μl (kat. č. **A028**), 5 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **A029**) nebo 10 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **A030**).
- Ke každé zkumavce s Aptamer-Taq DNA polymerázou, 5 U/μl je přidána 1 zkumavka s 10x PCR Blue Buffer (1,5 ml kat. č. **T058**). Rovněž je možné objednat 10x Blue Buffer bez MgCl₂, ke kterému je dodáván 25 mM MgCl₂ v samostatné zkumavce (kat. č. **T059**).

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 Aptamer-Taq DNA polymerázu, 5 U/μl: 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 PCR Blue Buffer: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% 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 Aptamer-Taq DNA polymerázy, 5 U/μl je ověřována metodou SDS PAGE. Enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá šarže Aptamer-Taq DNA polymerázy, 5 U/μl je testována na schopnost amplifikovat fragment genu savčí genomové DNA, izolované pomocí DEP-25 DNA extraction kitu (Kat. č. D225 – D227), v PCR. Výsledný produkt je analyzován elektroforézou na agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu; pouze očekávaný fragment DNA je produkován.

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 jednotlivé komponenty ¹:

	PCR v 50 μl	Výsledná koncentrace
10x reakční pufr s 25 mM MgCl ₂ ²	5 μl	1x reakční pufr s 2,5 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
Aptamer-Taq DNA polymeráza, 5 U/μl	0,5 ul	2,5 U
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 studované DNA.

² V případě potřeby je možné použít 10x konc. 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 skládacím puforem (kat. č. P048, P062, P066 nebo P064) a analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu nebo skladovat při -20°C.

Optimalizace koncentrace MgCl₂

Koncentrace 2,5 mM MgCl₂ je vhodná pro většinu PCR. Pro některé amplifikace je však nutné najít optimální koncentraci MgCl₂. V tom případě je vhodné specifikovat při objednávce požadavek na dodání 10x PCR Blue pufru 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 konc. 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
Aptamer-Taq DNA polymeráza, 5 U/µl	4 µl
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	8 µl
PCR H ₂ O	252 µl
Celkový objem	320 µl

2. Master Mix důkladně krátce promíchat, krátce stočit a rozdělit po 40 µl do 7 zkumavek.
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.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
A025	Aptamer-Taq DNA polymeráza	500 U
A026	Aptamer-Taq DNA polymeráza	5x 500 U
A027	Aptamer-Taq DNA polymeráza	10x 500 U
T029	10x konc. reakční pufr	1,5 ml
T035	10x konc. reakční pufr bez MgCl ₂ +MgCl ₂	1,5 ml + 0,5 ml
T058	10x konc. PCR Blue Buffer	1,5 ml
T059	10x konc. PCR Blue Buffer bez MgCl ₂ +MgCl ₂	1,5 ml + 0,5 ml

