

Taq DNA polymeráza

(katalogové číslo T032, T033, T034)

rev. 07/2025

Popis produktu

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 je dodávána v koncentraci 5 U/μl. V základním balení jsou: 1 zkumavka s 500 U/100 μl (kat. č. **T032**), 5 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **T033**) nebo 10 zkumavek po 500 U/100 μl (kat. č. **T034**).
- Ke každé zkumavce s Taq DNA polym. je přidána 1 zkumavka (1,5 ml) obsahující 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. 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 HEPES (pH 7,9 při 25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, stabilizátor, 50% glycerol.
- 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 (salmon testes) a 0,2 - 0,5 U enzymu.

Kontrola kvality

- Čistota Taq DNA polymerázy je ověřována metodou SDS-PAGE. Enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti 94 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá výrobní šarže 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.

Taq DNA polymeráza

(katalogové číslo T032, T033, T034)

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 komponenty¹:

	PCR v 50 μ l	Výsledná koncentrace
10x PCR Blue Buffer s 25 mM $MgCl_2$ ²	5 μ l	1x reakční pufr s 2,5 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 (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 vyhřívaného 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 vkládacím pufrem (kat. č. P048, P064, P066) a analyzovat pomocí elektroforézy v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu nebo skladovat při -20°C.

Optimalizace koncentrace $MgCl_2$

Koncentrace 2,5 mM $MgCl_2$ je vhodná pro většinu PCR s Taq DNA polymerázou. 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 Buffer bez $MgCl_2$, ke kterému je dodáván 25 mM $MgCl_2$ v samostatné zkumavce (kat. č. 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 (5U/ μ l)	4 μ l
Templátová DNA (1 ng/ μ l - 1 μ g/ μ l)	8 μ l
PCR H ₂ O	252 μ l
Celkový objem	320 μl

2. Master Mix jemně promíchat, 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
T032	Taq DNA polymeráza	500 U
T033	Taq DNA polymeráza	5x 500 U
T034	Taq DNA polymeráza	10x 500 U
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

