

Blood Taq DNA polymeráza

(katalogové číslo B222, B223, B224)

rev. 01/2022

Popis

Blood Taq DNA polymeráza je nová geneticky modifikovaná forma teplotně rezistentní DNA polymerázy pro hot start PCR v přítomnosti krevních inhibitorů. Cílené mutace způsobily, že enzym vykazuje zvýšenou odolnost k inhibičnímu působení krevních inhibitorů, interkalačním DNA barvivům a některým dalším inhibitorům PCR. Enzym je funkční v přítomnosti až 20% krve. Při této koncentraci krve jsou jiné komerčně dostupné enzymy nefunkční. Rezistence ke krevním inhibitorům a zvýšené teplotě umožňuje provádět amplifikace krevních vzorků bez nutnosti izolace DNA. Tato vlastnost zásadním způsobem zjednodušuje provedení PCR. Hot start PCR je zajištěna přítomností DNA aptameru, který se váže na Blood Taq DNA polymerázu a redukuje produkci nespecifických fragmentů DNA.

Blood Taq DNA polymeráza

Tato mutantní forma Taq DNA polymerázy katalyzuje syntézu komplementárního řetězce DNA ve směru 5'→3', ale na rozdíl od Taq DNA polymerázy nevykazuje 5'→3' exonukleázovou aktivitu. Cílené mutace vedly k zvýšené aktivitě a vysoké toleranci enzymu k různým inhibitorům. Hlavní využití enzymu je v rutinní diagnostické analýze DNA fragmentů o velikosti do 5000 párů bází z různých zdrojů, zvláště při použití celé krve (bez izolace DNA) a jiných obtížně amplifikovatelných vzorků.

Hot Start

Tento produkt obsahuje DNA aptamer, který se specificky a reverzibilně váže na Blood Taq DNA polymerázu a tím blokuje její enzymatickou aktivitu. Při teplotě nad 50°C dochází k uvolnění aptameru a tím k odblokování enzymatické aktivity polymerázy. Tímto způsobem výrazně klesá tvorba nespecifických DNA fragmentů při PCR. Ve srovnání s anti-Taq monoklonální protilátkou, která se často používá pro hot start PCR, použitý aptamer má několik výhod: (1) není denaturován při teplotách až do 100°C, (2) má relativně nízkou molekulovou hmotnost, (3), má známé a definované složení, (4) je připravován synteticky, (5) není kontaminován komponentami savčích buněk, (6) je odolný k působení proteáz a tím umožňuje přepravu enzymu a přípravu PCR bez chlazení a (7) je cenově dostupnější.

Technické údaje

Komponenty a balení

- Blood Taq DNA polymeráza je dodávána v koncentraci 1 U/μl. V základním balení je 1 zkuševka obsahující 500 U/500 μl (kat. č. **B222**), 5 zkuševek po 500 U/500 μl (kat. č. **B223**) nebo 10 zkuševek po 500 U/500 μl (kat. č. **B224**).
- Ke každé zkuševce s Blood Taq DNA polymerázou je přidána 1 zkuševka 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 zkuševce (kat. č. **T059**).

Pro optimalizaci koncentrace MgCl₂ lze objednat 10x konc. PCR Blue Buffer bez MgCl₂ s 25 mM MgCl₂ v samostatné zkuševce (kat. č. **T059**).

Skladování

- Skladovat při teplotě -20°C ± 5°C. Krátkodobě (dny) lze skladovat/přepravovat při teplotě až do 30°C.

Složení

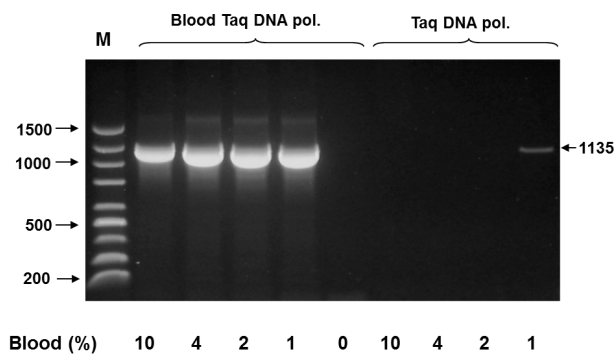
- Skladovací pufr: 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (25°C), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Nonidet P-40, 0,5% Tween 20, 50% glycerol.
- 10x PCR blue pufr: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tween 20, 25 mM MgCl₂.

Aktivita

- Jedna jednotka aktivity (U) je definována jako množství enzymu, které katalyzuje zabudování 10 nmol dNTP za 30 min při 72°C do denaturované DNA precipitovatelné trichloroctovou kyselinou. Reakce probíhá v objemu 50 μl v pufru obsahujícím 10 mM Tris-HCl (pH 8,8, 25°C), 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP a 200 μM [α-³²P]dTTP, 50 μg/ml denaturované DNA, 0,5 μM primeru a 0,2 - 0,5 U enzymu.

Kontrola kvality

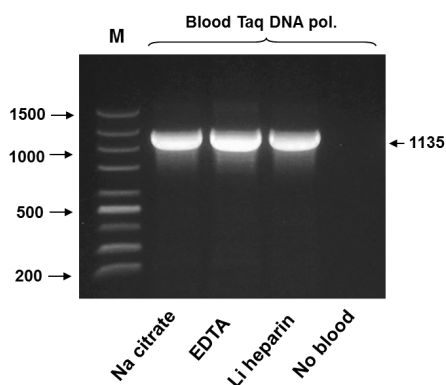
- Čistota Blood Taq DNA polymerázy je ověřována metodou SDS-PAGE. Enzym migruje jako jediný proužek o molekulové hmotnosti přibližně 62 kD. Preparát neobsahuje nukleázy.
- Každá šarže Blood Taq DNA polymerázy je testována na schopnost amplifikovat fragment genu lidské genomové DNA v celé krvi odebrané do Na-citrátu (finální koncentrace krve v PCR reakční směsi je 10%). Výsledný produkt je analyzován elektroforézou na agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu; dominantní je očekávaný fragment DNA (Obr. 1 a 2).



Obr. 1. Amplifikace fragmentu lidského genu CCR5 pomocí PCR s neseparovanou krví odebranou do Na citrátu. Finální koncentrace krve byla 10%, 4%, 2%, 1% nebo 0%. K amplifikaci byla použita Blood Taq DNA polymeráza (Top-bio, kat. č. B222; 2,5 U/50 µl) nebo běžná Taq DNA polymeráza (Top-Bio kat. č. T111; 2,5 U/50 µl). Směs pro PCR obsahovala 1x Blue buffer s 2,5 mM MgCl₂ (kat. č. T058), PCR dNTP mix (200 µM každý z nukleotidů; kat. č. P041), 500 nM primery a odpovídající množství krve. Amplifikace probíhala za následujících podmínek: úvodní denaturace (5 min při 95°C), 30 cyklů zahrnujících denaturaci (15 s při 94°C), nasedání primerů (15 s při 55°C) a syntézu DNA (45 s při 72°C). Na závěr byla finální extenze

amplikonů (7 min při 72°C). PCR produkty byly smíchány s vkladacím pufr (Red load, kat. č. P066), analyzovány elektroforézou v 1% agarózovém gelu (kat. č. P045) a vizualizovány barvením pomocí ethidium bromidu (kat.č. P046).

Závěr: Výsledky ukazují, že Blood Taq DNA polymeráza je schopna amplifikovat fragment genomové DNA o velikosti 1135 bp z neseparované krve ve finální koncentraci až 10%. Nemutovaná forma Taq DNA polymerázy je schopna amplifikovat stejný fragment z neseparované krve v koncentraci maximálně 1%; vyšší koncentraci jsou inhibiční.



Obr. 2. Amplifikace fragmentu lidského genu CCR5 pomocí PCR z neseparované krve s různými antikoagulačními látkami. Lidská krev byla odebrána do 3,2% citrátu sodného (BD Vacutainer – Na citrate; 9NC), EDTA (BD Vacutainer – EDTA; K2E) nebo 17 IU lithium heparinu (BD Vacutainer – Li Heparin; LH-BD PSTTM; polymer, gel). Finální koncentrace krve byla 10%. K amplifikaci byla použita Blood Taq DNA polymeráza (Top-Bio; Kat. č. B222). Složení reakčních směsí, cyklovací podmínky a způsob vyhodnocení tvorby PCR amplikonů je popsán v legendě k Obr. 1.

Závěr: Výsledky ukazují, že Blood Taq DNA polymeráza je schopna amplifikovat fragment genomové DNA o velikosti 1135 bp z 10% krve bez ohledu na použití antikoagulačního agens.

Protokol

Tento protokol může být použit pro rutinní provedení PCR s využitím Blood Taq DNA polymerázy. V některých případech je však nutné optimalizovat reakční podmínky. Především se jedná o nastavení teplot nasedání primerů a eventuálně nalezení optimální koncentrace MgCl₂. Při amplifikaci DNA z celé krve je nutná úvodní 5 min denaturace při 95°C.

- V tenkostěnné zkumavce pro PCR smíchat jednotlivé komponenty ¹:

	PCR v 50 µl	Výsledná koncentrace
10x reakční Blue buffer 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
Blood Taq DNA polymeráza (1U/µl)	2,5 ul ³	2,5 U (0,05 U/µl)
Templátová DNA (neseparovaná krev)	x µl	Různá
PCR H ₂ O (kat. č. P042)	Do objemu 50 µl	

¹ Při testování více vzorků DNA se stejnými primery je výhodné připravit tzv. Master Mix, ve kterém jsou objemy jednotlivých komponent (bez templátové DNA) násobkem počtu vzorků. Master Mix je rozdělen do zkumavek (např. po 45 µl) a do každé z nich je přidáno např. 5 µl neseptované krve jako zdroj templátové DNA.

² V případě potřeby je možné použít 10x koncentrovaný PCR Blue pufr bez MgCl₂ a optimalizovat koncentraci MgCl₂ (viz. níže).

³ Pro určení optimální koncentrace enzymu lze doporučit titrační analýzu enzymu.

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 (příklad):

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95°C	5 min	1
Denaturace	94°C	15 s	30
Nasednutí primerů	55-68°C ¹	15 s	
Extenze	72°C	~1 min na 1 kb	
Finální extenze	72°C	7 min	1
Chlazení	22°C		

¹ Je vhodné zjistit experimentálně; obvykle bývá o 5°C nižší než teplota tání (T_m) primerů.

5. Získané PCR produkty smíchat s vkladacím pufrem (kat. č. P048, P062, P066 nebo P064) a analyzovat elektroforézou v agarózovém gelu v přítomnosti ethidium bromidu (kat. č. P046). Do doby analýzy lze produkty skladovat při -20°C.

Optimalizace koncentrace MgCl₂

Finální koncentrace 2,5 mM MgCl₂ je vhodná pro většinu PCR s Blue buffer. Pro některé amplifikace je však nutné optimalizovat koncentraci MgCl₂. V tom případě je vhodné specifikovat při objednávce požadavek na dodání 10x PCR Blue buffer bez MgCl₂; 25 mM MgCl₂ je dodáván zvlášť 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 (každý dNTP 10 mM)	8 µl
5' primer (50 µM)	4 µl
3' primer (50 µM)	4 µl
Blood Taq DNA polymeráza (1U/µl)	20 µl
Templátová DNA (1 ng/µl - 1 µg/µl)	8 µl
PCR H ₂ O	236 µl
Celkový objem	320 µl

2. Master Mix 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 optimální koncentraci MgCl₂.

Kat. č.	Název výrobku a specifikace	Množství
B222	Blood Taq DNA polymeráza	500 U
B223	Blood Taq DNA polymeráza	5x 500 U
B224	Blood Taq DNA polymeráza	10x 500 U
T058	10x konc. PCR Blue Buffer	1,5 ml
T059	10x konc. PCR Blue pufr bez MgCl ₂ +MgCl ₂	1,5 ml + 0,5 ml

