

## Porovnání účinnosti a specifity Taq purple polymerázy a Supreme NZY Taq DNA polymerázy při PCR amplifikaci fragmentu DNA.

### Materiál

#### Supreme NZYTaq DNA polymeráza

Katalogové číslo (SKU): MB0790

**Popis:** Supreme NZYTaq DNA polymeráza je rekombinantní modifikovaná forma Taq DNA polymerázy s "hot-start like PCR capacity". Enzym je neaktivní v laboratorní teplotě, což zabrání prodlužování nespecificky navázaných primerů nebo dvojic primerů čímž je zajištěna vyšší specifita amplifikace DNA. Enzym dosáhne plné aktivity již během 5-minutové inkubace v 95°C. Tato vysoce robustní DNA polymeráza je enzym s širokým použitím vhodný pro celé spektrum PCR aplikací amplifikujících cílovou DNA sekvenci až do délky 3kb. Při jejím použití pak řada komplexních PCR reakcí vykazuje vyšší specifitu i výtěžek v rozsahu koncentrací DNA od 5 do 10pg. Aktivovaný enzym vykazuje stejnou funkčnost jako Taq DNA polymeráza. Supreme NZYTaq DNA polymeráza nemá 3'-5' exonuklázovou aktivitu. Výsledný produkt PCR reakce tedy má A přesah a je použitelný pro klonování pomocí NZYTech's NZY-A PCR cloning kits (MB05301 or MB05302).

Supreme NZYTaq DNA polymeráza umožňuje snadnou manipulaci a přípravu za pokojové teploty.

**Skladování:** Supreme NZYTaq DNA polymeráza by měla být skladována při stabilní teplotě -20 °C. Supreme NZYTaq DNA polymeráza si zachová při správném skladování aktivitu po dobu 3 let.

**Pufr:** 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% (v/v) glycerol.

**Koncentrace enzymu:** 5 U/μl

**Reakční pufr (10×):** 670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 400 mM KCl, 0.1% Tween 20. Po roztavení, ještě před použitím, reakční pufr důkladně promíchejte. Opakované cykly zamražení/rozmražení ovlivňují stabilitu pufru (při teplotě +4 °C zůstává pufr stabilní přibližně jeden měsíc).

**Roztok Chloridu hořečnatého:** 50 mM MgCl<sub>2</sub>. Pro optimalizaci koncentrace MgCl<sub>2</sub> (1.5-4.0 mM). Po roztavení, ještě před použitím, roztok důkladně promíchejte.

## Protokol

Templátem pro PCR amplifikaci DNA fragmentu byla GC bohatá chromozomální DNA pocházející ze *Streptomyces lincolnensis* a *Streptomyces albus*.

Jako primery sloužily **15bp** dlouhé a na **třech místech** (uprostřed sekvence) **degenerované** oligonukleotidy.

### Složení premixu pro PCR:

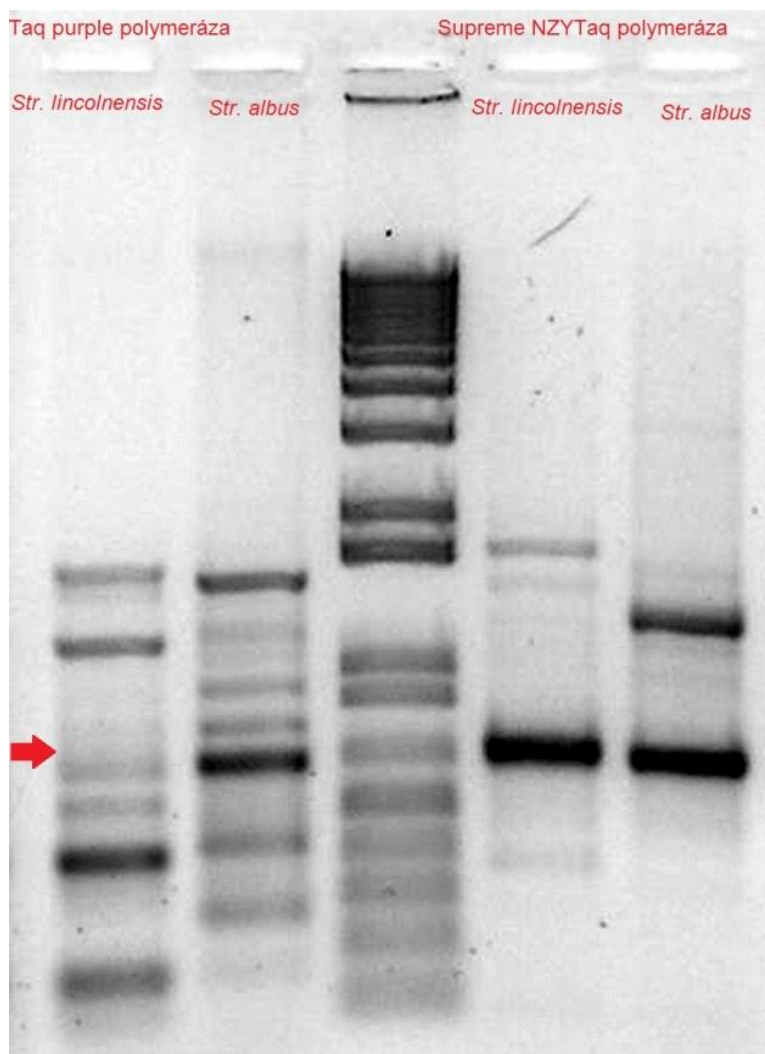
	<i>pro Taq purple polymerázu</i>	<i>pro Supreme NZYTaq polymerázu</i>
<b>10x reakční pufr</b>	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
<b>25mM MgCl<sub>2</sub></b>	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
<b>DMSO pro PCR</b>	2,5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
<b>100xBSA</b>	3 $\mu$ l	3 $\mu$ l
<b>10mM DNTPs</b>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
<b>10pM primer Fwd</b>	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
<b>10pM primer Rev</b>	2 $\mu$ l	2 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
<b>templátová DNA</b>	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

### Protokol PCR reakce:

94°C	5min.
72°C	přidání 0,5 $\mu$ l polymerázy
94°C	1min.
57°C	45s
72°C	20s
72°C	5min.

## Výsledky:

Na 1% agarózový gel s EtBr bylo naneseno po 10  $\mu$ l od každého vzorku a 5  $\mu$ l standardu (uprostřed).



Z obrázku je patrné, že při takto obtížných podmínkách PCR reakce (GC bohatá oblast, degenerované primery) vykazovala větší specifitu při PCR amplifikaci fragmentu Supreme NZY Taq DNA polymeráza a zároveň pak tato polymeráza dosahovala i většího výtěžku.