

### Easy Taq DNA Polimerase (Recombinante)

**Código Nº:**

**13-10500: 500 unidades**

**Concentração: 5,0 U/μL**

**Armazenamento: - 20°C**

**Não armazenar em geladeira com sistema frost-free.**

#### DESCRIÇÃO:

A enzima termoestável *Taq* DNA polimerase de *Thermus Aquaticus* é a forma recombinante da enzima expressa em *Escherichia coli*. Apresenta elevada processividade 5'→3', e uma atividade de exonuclease 5'-3', porém sem atividade exonuclease 3'→5'.

A *Taq* DNA polimerase mostra excelente atividade em pH 8,5 á 72°C, sendo estável na incubação em elevadas temperaturas (95°C).

A enzima é constituída por uma cadeia polipeptídica simples com peso molecular de aproximadamente 94 kDa.

#### UNIDADE ENZIMÁTICA:

Uma unidade da *Taq* DNA Polimerase é definida como a quantidade necessária para incorporar 10 nmoles de dNTPs em 30 minutos a 72°C, em condições de ensaio padrão.

#### COMPONENTES:

- Enzima *Taq* DNA Polimerase,
- Tampão de amplificação 10X (livre de íons  $Mg^{2+}$ ),
- 50 mM de  $MgCl_2$

#### TAMPÃO DE ARMAZENAMENTO:

- 20 mM HEPES pH 7,9
- 100 mM KCl
- 0,1 mM EDTA
- 0,5 mM PMSF
- 1,0 mM DTT
- 50% glicerol

#### TAMPÃO DE REAÇÃO (10X):

- 100 mM TrisHCl pH 8,5
- 500 mM KCl

#### ENSAIOS DE CONTROLE DE QUALIDADE:

##### Atividade:

SDS-PAGE (pureza),

Espectrometria de massa (Figura 1),

**OVER-DIGESTÃO:** A incubação de 5U da *Taq* DNA Polimerase com 1 mg de DNA, em tampão de reação próprio durante 16 horas a 72°C, fornece um padrão de fragmentos de clivagem nítido, livre de DNA de *E.coli* [3].

#### PROTOCOLO BÁSICO DE AMPLIFICAÇÃO:

Componentes	Volume	Concentração final
Tampão 10X PCR (free $Mg^{2+}$ )	5 μL	1X
dNTP mix (10 mM)	1 μL	0,2 mM cada
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 μL	1,5 mM
Mix de primers (10 mM cada)	2,5 μL	0,5 μM cada
DNA	0,5 – 10 μL	-----
<i>Taq</i> DNA polimerase (5U/μL)	0,5 μL	2,5U
Água livre de RNase q.s.p.	50 μL	-----

LGC Biotecnologia Ltda.

Rua Pasadena, 235 – Pq. Industrial San José – Cotia – SP

CEP: 06715-864 [www.lgcbio.com.br](http://www.lgcbio.com.br)

Tel.: (55 11) 4614.8070, Fax.: (55 11) 4614.8070

a) Utilizar microtubos estéreis de 0,2 – 0,5 mL.

Os tubos devem permanecer dentro de gelo.

Detalhes sobre parâmetros críticos e informações adicionais podem ser encontrados na referência [1].

Para obter um excelente rendimento na amplificação de fragmentos de DNA é aconselhável a utilização de um kit de pipetas exclusivas, ponteiros com barreira e ambiente livre de contaminação.

O protocolo sugerido serve como um guia geral e ponto inicial de protocolos de amplificação de DNA.

b) Homogeneizar a mistura, através de rápida centrifugação (*fast-spin*),

c) Incubar em termo bloco a 94°C por 3-5 min, para desnaturar o DNA,

d) Proceder com 20 - 35 ciclos de amplificação: desnaturação a 94°C por 45 s; anelamento a 55°C [\*\*] por 30 s e extensão a 72°C por 1 min. Adicionalmente uma etapa de extensão a 72°C por 10 min é recomendada.

Manter a 4°C até a análise.

e) Analisar os produtos obtidos através de eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida, corando com brometo de etídeo e visualizando em luz ultravioleta.

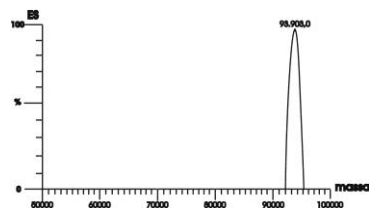


Figura 1. A deconvolução da espectrometria de massa da *Taq* DNA Polimerase revela com precisão o valor da massa molecular da enzima (93.903 kDa) quando comparado com o valor teórico, baseado em dados da seqüência primária da enzima. Adicionalmente, o pico foi muito homogêneo (\*) revelando o grau de pureza da preparação da enzima *Taq* Polimerase.

[\*] A homogeneidade da preparação protéica foi feita através de espectrometria de massa utilizando algumas adaptações do sistema descrito por Chasaigne & Lobinski, 1998.

[\*\*] usualmente entre 5 a 10°C abaixo da Tm.

#### Bibliografia:

[1] Innis, M. A. *et al.* (1990) PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press, San Diego, Ca.

[2] Chasaigne, H. and Lipinski, R. (1998) Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS. and reversed-phased HPLC-electrospray MS. *Analyst* 123: 2125.

[3] Bornema, J. and Triplet, F. W. (1997) Molecular microbial diversity in soil from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2647.