

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA TAQ ADN POLYMERASE

Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Hồng Loan, Ngô Thu Hường, Lê Hà Mi

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN

1. Mở đầu

Taq ADN polymerase (Taq) là enzym xúc tác cho phản ứng tổng hợp ADN được tách ra từ loài vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* và đã được nghiên cứu khá kỹ về tính chất [1, 2, 3]. Thậm chí gen của Taq đã được nhân dòng và biểu hiện thành công trong *E. coli* [3]. Nhờ tính chất bền với nhiệt, hoạt tính polymerase và khả năng bổ sung gốc adenosin (A) vào đầu 3' của chuỗi ADN dạng sợi kép nên sau khi được phát hiện, Taq đã trở thành công cụ hết sức hữu ích của các nghiên cứu sinh học phân tử, đặc biệt là của các nghiên cứu nhân bản gen.

Nghiên cứu của chúng tôi là nhằm góp phần tìm hiểu thêm một số tính chất của Taq, giúp cho việc sử dụng enzym hiệu quả hơn và bài báo này giới thiệu kết quả nghiên cứu gây kháng thể kháng Taq trên chuột, sự tương tác của kháng thể với một số ADN polymerase khác nhau cũng như ảnh hưởng của một số hợp chất khác nhau lên hoạt tính tổng hợp ADN của Taq.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất chính sử dụng cho nghiên cứu gồm các oligonucleotit, thang chuẩn λ Hind III, 1 kb và 250 bp được mua từ hãng Invitrogen (Mỹ). Thang chuẩn protein được mua từ hãng Amersham (Mỹ), Agarose, Tris-base, EDTA, SDS, isopropanol được mua từ hãng Sigma (Mỹ). Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh khiết dành cho nghiên cứu sinh học phân tử.

PCR được tiến hành với tổng thể tích phản ứng là 25 μ l, thành phần các hợp phần như sau: 3-5 ng ADN khuôn là đoạn gen 0,8 kb được gắn vào vectơ pBluescript, 2,5 μ l đệm phản ứng 10x, dNTP mỗi loại 0,4 mM, 25 ng mỗi T3 và 25 ng mỗi T7, 2,5 đơn vị Taq ADN polymerase. Chế độ nhiệt cho phản ứng 94°C-3 phút để khởi động nóng, tiếp theo là 32 chu kỳ của 3 bước: 94°C-1 phút để làm biến tính ADN, 55°C-1 phút để gắn mẫu và 72°C-1 phút để kéo dài chuỗi. Mẫu sau đó được ủ tiếp ở 72°C trong 7 phút và giữ ở 4°C cho đến khi phân tích. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose với chất nhuộm ADN là ethidium bromide (EB).

Hoạt độ tổng hợp ADN được đánh giá thông qua khả năng kéo dài oligo 32 nucleotit làm mẫu (P) liên kết bổ sung với đoạn ADN khuôn 60 nucleotit (T) trong hỗn hợp có bổ sung các dNTP. Sản phẩm được phân chia bằng điện di trên gel polyacrylamit và sau đó được nhuộm bạc. Ngoài ra hoạt độ tổng hợp ADN còn được đánh giá bằng kỹ thuật PCR.

Độ tinh sạch của protein được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit có SDS (SDS-PAGE) theo phương pháp của Laemmli [4].

Kháng thể kháng Taq được gây trên chuột, sử dụng enzym tinh sạch, chạy điện di SDS-PAGE, cắt phần băng protein, trộn với tá được để tiêm cho chuột. Tá được của lần tiêm đầu tiên là loại đầy đủ (complete) còn các lần tiêm nhắc lại là không đầy đủ (incomplete). Kết quả sinh kháng thể (IgG) kháng Taq được đánh giá bằng kỹ thuật thẩm tách miễn dịch.

3. Kết quả nghiên cứu

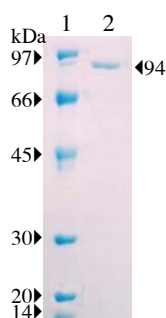
3.1. Tinh sạch Taq và gây kháng thể kháng Taq trên chuột

Để tinh sạch Taq, chúng tôi đã sử dụng 1,5 l dịch lên men tế bào *E. coli* mang gen *taq* thu ở pha ổn định, 3-5 giờ sau khi bổ sung IPTG (0,5 mM). Sinh khối tế bào được thu và rửa bằng ly tâm, sau đó được hoà trở lại trong 20 ml đệm Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 có chứa 50 mM KCl, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol và 10% glycerol (đệm A). Tế bào được phá vỡ bằng siêu âm, dịch chiết được thu bằng ly tâm, sau đó lại cho xử lý nhiệt ở 70°C trong 15 phút để kết tủa một số protein không hoạt tính. Dịch tế bào còn lại được cho qua cột DE-52 cellulose (2x15 cm) đã được cân bằng với cùng đệm A. Cột này được mắc nối tiếp với cột Heparin-Sepharose (1x2 cm). Heparin là một protein có tính axit nên trong môi trường trung tính và kiềm protein này hoạt động như một polyanion (giống ADN), có ái lực với nhiều enzym tham gia trao đổi ADN. Sau khi cho dịch chiết chảy qua hệ thống cột, cột DE-52 cellulose được tách ra. Cột Heparin-Sepharose được rửa bằng đệm A cho đến khi A_{280} của dịch rửa < 0,01, protein bám trên gel được rửa chiết ra bằng gradient KCl từ 50mM- 800mM pha trong cùng đệm A với tổng thể tích 2 bình của hệ thống là 32 ml. Các phân đoạn dịch rửa chiết (0,5 ml/phân đoạn) được xác định protein và hoạt độ tổng hợp ADN. Kết quả phân tích hoạt độ tổng hợp ADN cho thấy các phân đoạn ứng với nồng độ KCl 0,3 M đến 0,5 M là có hoạt tính. Kết quả điện di SDS-PAGE của dịch gộp các phân đoạn này (hình 1, cột 2) cho thấy chỉ có duy nhất một băng protein với kích thước 94 kDa, tương ứng với khối lượng phân tử (KLPT) của Taq và chứng tỏ chế phẩm thu được đã tinh sạch.

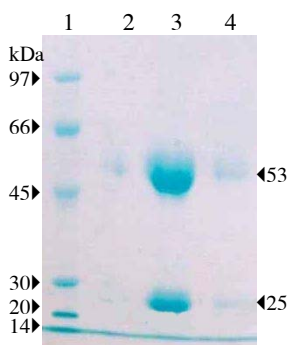
Tóm lại có thể tinh sạch Taq qua một qui trình khá đơn giản: xử lý nhiệt dịch chiết tế bào để loại bớt các protein không mong muốn, sắc ký dịch chiết đã được xử lý nhiệt qua hệ thống cột DE-52 cellulose gắn với cột Heparin-Sepharose.

Nhằm tìm hiểu một số đặc trưng miễn dịch của Taq, chúng tôi đã tiến hành gây kháng thể trên chuột nhắt trắng. Kháng huyết thanh chuột được thu bằng cách loại bỏ các tế bào máu bằng ly tâm. Dịch thu được sau đó cho qua cột protein G-Sepharose và đẩy bằng đệm glycine-HCl 50 mM, pH 3,0. Độ tinh sạch của kháng thể (IgG) qua cột được đánh giá bằng SDS-PAGE. Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy các phân đoạn rửa chiết qua cột protein G-sepharose (cột 2,3 và 4) đều chứa hai băng protein với kích thước là 25 kDa và 53 kDa. Dựa trên tính đặc hiệu của protein G với các IgG và KLPT

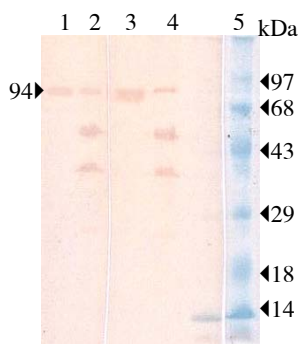
của hai băng protein trên có thể khẳng định rằng kháng thể đã được tinh sạch, băng 25 kDa và 53 kDa là tương ứng với chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của phân tử IgG. Kết quả phân tách thẩm tách miễn dịch (h.3) cho thấy kháng thể có mặt trong kháng huyết thanh (trước khi tinh sạch) ở độ pha loãng 50.000 lần (cột 1 và 2) và kháng thể tinh sạch (cột 3 và 4) đều có khả năng phản ứng đặc hiệu với Taq ở dạng tinh khiết, được thể hiện ở một băng hiện màu ở vị trí tương ứng KLPT khoảng 94 kDa (cột 1 và cột 3). Ngoài việc nhận ra Taq, kháng thể cũng còn có khả năng phản ứng với hai protein có KLPT nhỏ hơn trong dịch chiết tế bào *E. coli* mang gen *taq* (cột 2 và 4).



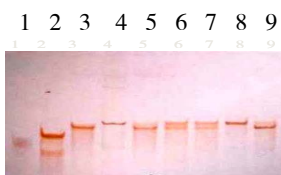
Hình 1: Kiểm tra độ tinh sạch Taq ADN polymerase bằng SDS-PAGE
1: Các protein chuẩn
2: Chế phẩm Taq sau khi qua các bước tinh sạch



Hình 2: Kiểm tra độ tinh sạch của kháng thể kháng Taq bằng SDS-PAGE
1: Các protein chuẩn
2,3 và 4: các phân đoạn chứa IgG bám cột protein G-sepharose được rửa chiết bằng đệm Glycin-HCl, pH 3.0



Hình 3: Kết quả thẩm tách miễn dịch với các chế phẩm kháng thể kháng Taq
1: Taq tinh sạch+ kháng huyết thanh được pha loãng 50.000 lần,
2: Dịch chiết tế bào *E. coli* mang Taq + kháng huyết thanh được pha loãng 50.000 lần
3: Taq tinh sạch + kháng thể tinh sạch
4: Dịch chiết tế bào *E. coli* mang Taq + kháng thể tinh sạch
5: Các protein chuẩn dạng tiền nhuộm



Hình 5: Ảnh hưởng của kháng thể kháng Taq (KT) lên hoạt động của một số ADN polymerase
1: Mồi (P), 2: Khuôn (T), 3: Phức hợp T-P, 4: T-P + Taq
5: T-P+ KT + Taq, 6: T-P+ Vent
7: T-P+ KT +Vent, 8: T-P + Pfu, 9: T-P+KT+ Pfu

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất ức chế enzym và kháng khuẩn lên hoạt độ tổng hợp ADN của Taq

Phần nghiên cứu này nhằm có thêm cơ sở để sử dụng Taq một cách hiệu quả hơn. Ngoài ra, Taq còn được sử dụng như một enzym mẫu để đánh giá tác dụng của một số hợp chất có tính kháng khuẩn đang được ứng dụng trong một số lĩnh vực khác nhau.

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số hợp chất khác nhau lên hoạt độ tổng hợp ADN của Taq được thể hiện ở hình 4. Cột gel 1 là của mẫu (P), có kích thước nhỏ nhất và chạy nhanh nhất, cột 2 là khuôn (T), có kích thước lớn hơn nên chạy chậm hơn. Cột 3 là phức hợp T-P, nên chạy chậm hơn cả P và T, còn cột 4 là phức hợp T-P, trong đó do có enzym hoạt động và sự có mặt của các dNTP nên P đã được kéo dài bằng T vì vậy có KLPT lớn nhất và chạy chậm nhất. Kết quả ở hình 4 cho thấy rằng EDTA và ethidium bromide (EB) ở nồng độ tương ứng là 2,5 mM và 0,25 mM trở lên (h. 4A, cột 8-10 và h. 4B, cột 7-8) ức chế hoạt độ của Taq, được thể hiện qua băng ADN chạy tương ứng với phức hợp T-P như khi không có Taq (cột 3). Tương tự, ZnSO_4 ở nồng độ từ 0,05 mM trở lên (h. 4C, cột 7-10) ức chế hoạt độ của Taq. Trong khi đó NaF (h. 4D), benzoat (h. 4E), sobat (h. 4F), monocaprin (h. 4G), butylparaben (h. 4H), heptylparaben (h. 4I) ở các nồng độ từ 1,25 mM đến 50 mM đều không ức chế hoạt độ của Taq. Dịch chiết nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*) ở các nồng độ 0,05% đến 2,5% (so với dịch gốc 100% được chiết với H_2O theo tỷ lệ 1 g nguyên liệu: 5 ml H_2O) cũng không ảnh hưởng đến hoạt độ của enzym. Ngược lại dịch chiết của lá cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*) thể hiện hoạt tính ức chế Taq ở nồng độ rất thấp, 0,4%. Ngoài ra kết quả cũng còn cho thấy benzoat và sobat ở nồng độ rất cao 100 mM (h. 4E và 4F, cột 10) có khả năng ức chế hoạt động của enzym.

Để khẳng định lại các kết quả của các tác động trên của các hợp chất khác nhau lên Taq, chúng tôi đã sử dụng thêm kỹ thuật PCR, kết quả được trình bày ở hình 4L. Có thể dễ dàng nhận thấy rằng khi có Taq nhưng không có chất ức chế, sản phẩm PCR có một băng nhân bản 0,8 kb (Đ/C). EDTA 2,5 mM (cột A), ethidium bromide 0,25 mM (cột B), ZnSO_4 0,05 mM (cột C) và dịch chiết cỏ ngọt 0,4% (cột K) đều ức chế hoạt động của Taq do đó băng nhân bản 0,8 kb không xuất hiện. Khi có mặt các hợp chất còn lại là NaF (cột D), benzoat (cột E), sobat (cột F), monocaprin (cột G) và butylparaben (cột H) ở nồng độ 25 mM, sản phẩm PCR vẫn có băng 0,8 kb, chứng tỏ các hợp chất này đều không ảnh hưởng đến hoạt độ của Taq. Kết quả này là hoàn toàn phù hợp với phát hiện nêu ở phần trên về sự ảnh hưởng của các chất này lên hoạt độ của enzym.

Kết quả thí nghiệm tiến hành ủ kháng thể kháng Taq thu được ở trên với Taq và sau đó tìm hiểu khả năng tổng hợp ADN của Taq (hình 5) cho thấy rằng khi có mặt của kháng thể (cột 5) thì Taq bị ức chế hoàn toàn vì vậy kết quả điện di chỉ thu được băng ADN có kích thước tương tự như phức hợp T-P khi không có Taq (cột 3). Điều này chứng tỏ có sự liên quan chặt chẽ giữa epitope kháng nguyên và trung tâm hoạt động của Taq. Tương tự, chúng tôi cũng phát hiện thấy kháng thể kháng Taq ức chế hoạt độ tổng hợp ADN của Pfu ADN polymerase (cột 8 và 9), nhưng không ảnh hưởng đến hoạt độ

của Vent ADN polymerase (cột 6 và 7) hay của T4 ADN polymerase (kết quả không minh họa ở đây).

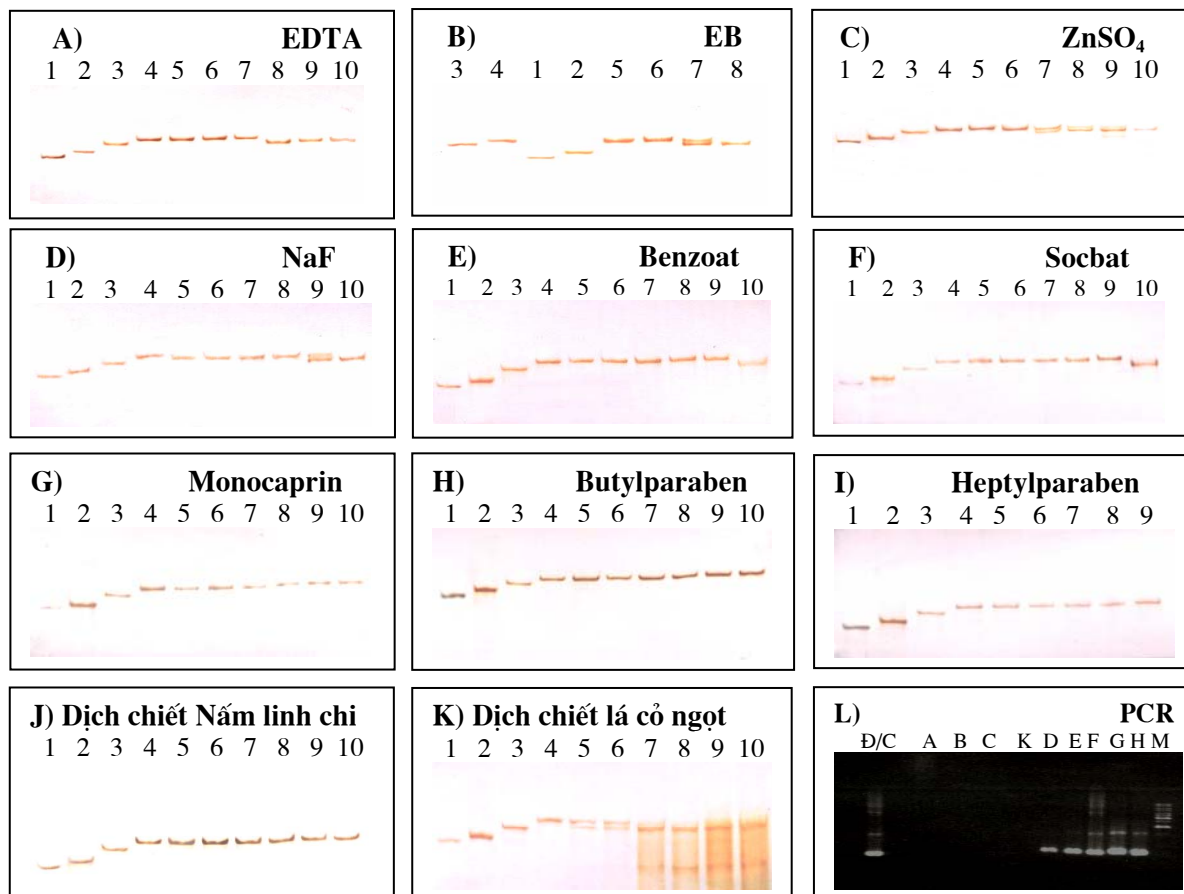
4. Thảo luận

Taq ADN polymerase là enzym được sử dụng rất phổ biến trong các thí nghiệm PCR. Enzym hoạt động cần sự có mặt của Mg^{2+} ở nồng độ 1,5-5 mM [5]. Điều này giải thích vì sao EDTA, chất tạo phức của các ion kim loại đã ức chế hoạt động của Taq. Ethidium bromide (EB) là chất tạo liên kết chéo với các ADN sợi đôi và được phát hiện là chất ức chế hoạt động của ADN helicase [6, 7, 8, 9]. Đây là công trình đầu tiên cho thấy EB ức chế hoạt động của ADN polymerase. Tuy vậy, EB ức chế Taq ở nồng độ cao khoảng 500 lần so với nồng độ ức chế ADN helicase II của người [9] hay các ADN helicase của đậu Hà lan [6, 7, 8]. Phải chăng cơ chế tác dụng của EB lên Taq hay các ADN polymerase là hoàn toàn khác với cách tác dụng của nó lên ADN helicase?

Gần đây kẽm được phát hiện là chất ức chế của nhiều enzym khác nhau, trong đó có urease, ATPase, hệ thống enzym phosphoryl hoá đường [10]. Phát hiện kẽm là chất ức chế Taq trong nghiên cứu này là một bổ sung mới về tác dụng của kẽm. Đặc biệt đối với Taq, nồng độ kẽm gây ức chế là 0,05mM, thấp hơn đáng kể so với nồng độ kẽm ức chế các enzym vừa nêu.

Khác với EDTA, EB hay kẽm, fluo được biết là chất ức chế hoạt động của urease, enolase, catalase và một số enzym khác [11] nhưng không hề ảnh hưởng đến hoạt độ của Taq. Tương tự, các axit yếu thường dùng trong bảo vệ răng miệng hay bảo quản thực phẩm là benzoat, sobat hay một số chất kháng khuẩn có tiềm năng sử dụng trong bảo vệ răng như các paraben, monocaprin đều không ức chế Taq thậm chí ở nồng độ tới 50 mM. Nấm linh chi được xem là có khả năng chống ung thư cùng nhiều tác dụng dược lý khác [12]. Kết quả khảo sát bước đầu của chúng tôi cho thấy dịch chiết bằng H_2O của nấm Linh chi không ức chế hoạt động của Taq. Các nghiên cứu gần đây của Tomita và tập thể [13] cho thấy dịch chiết nước đã khử trùng của cỏ ngọt (*Stevia rebaudiana*) có tác dụng giết chết một số vi khuẩn Gram (-) và Gram (+), vì vậy đang hứa hẹn về khả năng sử dụng hợp chất có hoạt tính trong bảo quản thực phẩm. Khả năng ức chế mạnh hoạt độ của Taq phải chăng có liên quan đến tính chất này? Đây là một điểm thú vị cần được tiếp tục điều tra, đặc biệt là việc làm rõ hợp chất nào trong dịch chiết có tác dụng ức chế enzym.

Mặc dầu Taq, Vent và Pfu đều là những ADN bền nhiệt, trong đó Taq thuộc họ A, còn Vent và Pfu thuộc họ B trong 5 họ ADN polymerase [5] nhưng kháng thể kháng Taq lại ức chế hoạt động của Taq và Pfu mà không ức chế hoạt động của Vent. Kết quả phân tích miễn dịch ban đầu về Taq của Lawyer và tập thể [2] cho thấy Taq có nhiều epitope kháng nguyên khác nhau và Taq ở dạng đầy đủ có nhiều epitope hơn là loại đã bị cắt bỏ một phần ba đầu vẫn còn hoạt tính tổng hợp ADN. Phát hiện này của chúng tôi có thể là cơ sở để nghiên cứu sự liên quan giữa các epitope kháng nguyên khác nhau với hoạt tính xúc tác của ADN polymerase.



Hình 4: Ảnh hưởng của các hợp chất ức chế enzyme và kháng khuẩn lên hoạt độ sinh tổng hợp ADN của Taq. Với tất cả các hình trừ L, ký hiệu các cột gel từ 1-4 là như nhau, trong đó: 1: Mẫu (P) 32 nt, 2: Khuôn (T) 60 nt, 3: Phức hợp T-P, 4: Phức hợp T-P với T đã được kéo dài bằng T nhờ Taq.

A (EDTA): cột 5-10 tương ứng với 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5mM, 5 mM và 12,5 mM. B (ethidium bromide): các cột từ 5-8 tương ứng với 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM và 0,5 mM. C (ZnSO₄): các cột từ 5-10 tương ứng với 0,01 mM, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25mM và 0,5 mM. D (NaF): các cột từ 5-10 tương ứng với 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 12,5 mM, 25 mM và 50 mM. E (benzoat) và F (socbat): các cột từ 5-10 tương ứng với 5 mM, 12,5 mM, 25 mM, 50 mM và 100 mM. G (monocaprin), H (butylparaben) và I (hetylparaben): các cột từ 5-10 tương ứng với 2 mM, 5 mM, 10 mM, 25 mM, và 50 mM. J (dịch chiết nấm linh chi) và K (dịch chiết cỏ ngọt): các cột từ 5-10 tương ứng với 0,05%, 0,1%, 0,4%, 0,8%, 1,6% và 2,5%.

L: Ảnh hưởng của các hợp chất khác nhau lên hoạt độ sinh tổng hợp ADN của Taq trong PCR. Đ/c: mẫu đối chứng, M: thang chuẩn 1 kb, ký hiệu các chữ cái trên các cột gel còn lại được lấy từ tên hợp chất ghi ở các hình 4A đến 4H.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Eckert, K.A. and Kunkel, T.A., High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerases, *Nucleic Acids Res*, V.18 (1990), pp 3739-3744.
2. Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummon, R. and Gelfand, D., Isolation, characterization, and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*, *J. Biol. Chem.*, V.264 (1989), pp 6427-6437.
3. Lawyer, F.C., Saiki, R.K., Chang, S.Y., Landre, P.A. Abramson, R.D. and Gelfand, D.H. High level expresion, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' activity, *PCR methods App.*, V.2 (1993), pp 275-287.
4. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, V.227 (1970), pp 680-685.
5. Abramson, R.D., Thermostable DNA polymerases, In *PCR strategies*, Ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H. and Sninsky, J. J. Academic Press, Inc. San Diego, California 1995, pp 373.
6. Phan, T.N., Ehtesham, N., Tuteja, R. and Tuteja, N., A novel nuclear DNA helicase with high specific activity from *Pisum sativum* catalytically translocates in the 3' to 5'direction, *Eur. J. Biochem.*, V.270 (2003), pp 1735-1745.
7. Tuteja, N. and Phan, T.N., Inhibition of pea chloroplast DNA helicase and ATPase activities by DNA interacting ligands, *Biochem, Biophys. Res. Commun*, V.244 (1998), pp 861-867.
8. Tuteja, N., and Phan, T.N., A chloroplast DNA helicase II from pea that prefers replication forks, *Plant Physiol*, V.118 (1999), pp 1029-1039.
9. Tuteja, N., Phan, T. N., Tuteja, R., Ochom, A., Falaschi, A., Modulation of DNA helicase and ATPase activities of human helicase II by chemotherapeutic agents, *Biochem, Biophys. Res. Commun*, V.636 (1997), pp 636-640.
10. Phan, T.N., Buckner, T., Sheng, J., Baldeck, J.D. and Marquis, R.E., Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms and enhanced peroxide killing, *Oral. Microbiol. Immunol.* V.19 (2004), pp 31-38.
11. Marquis, R.E., Clock, S.A., Mota-Meira, M., Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology, *FEMS Microbiol Rev.*, V.26 (2003), pp 493-510.
12. Cao, Q.Z. and Lin, Z.B., Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide peptide, *Acta Pharmacol. Sin.*, V.25 (2004), pp 833-838.
13. Tomita, T., Sato, N., Arai, T., Shiraishi, H., Sato, M., Tacheuchi, M. and Kamio, Y. Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria, *Microbiol. Immunol.*, V.41 (1997), pp 1005-1009.

ADDITIONAL CHARACTERIZATION OF TAQ DNA POLYMERASE

Phan Tuan Nghia, Nguyen Thi Hong Loan, Ngo Thu Huong and Le Ha Mi

Faculty of Biology, College of Science

Recombinant Taq DNA polymerase has been purified to apparent homogeneity by a three step procedure: heat treatment of the cell extract at 70°C for 15 min, followed by chromatography on DE-52 cellulose and Heparin-Sepharose columns. The obtained enzyme preparation showed to have a single protein band of 94 kDa on SDS-PAGE and DNA polymerase activity. The protein was used to raise the polyclonal antibodies in mice. The obtained antibodies reacted specifically with the purified Taq DNA polymerase and with the enzyme in crude cell extract as well.

Using PCR technique and an assay mixture with a 60 mer oligonucleotide as a template and a 32 mer oligonucleotide as primer which was complementary to the template to form a template and primer complex for assessment of DNA synthesizing activity, we found that ethidium bromide, EDTA, zinc sulphate at submillimolar concentrations and the water extract of *Stevia rebaudiana* leaves were inhibitory for the activity of Taq DNA polymerase, whereas monocaprin (monoglycerol ester of capric acid), butyl paraben, heptyl paraben, benzoate, sorbate and fluoride even at a concentration of 50 mM did not inhibit the enzyme. The polyclonal antibodies against Taq DNA polymerase inhibited the activities of the Taq DNA polymerase as well as Pfu DNA polymerase but had no effect on Vent DNA polymerase or T4 DNA polymerase.