



Bfo ADN polimerasa

Para amplificación isotérmica de ADN



PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

Innovación y Desarrollo en Biotecnología

www.pb-l.com.ar

Bfo ADN polimerasa

Cat. N.º EA23

Contenido	EA2301 (1600 U)	EA2302 (4000 U)	EA2303 (8000 U)
Bfo ADN polimerasa (8 U/μl)	200 μl	500 μl	500 μl x2
Buffer Isotérmico 10×	500 μl	1,5 ml	1,5 ml x2
MgSO ₄ 100 mM	300 μl	750 μl	750 μl
Agua ultrapura – Libre de nucleasas	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml x2
Betaína 5M	1 ml	1 ml x2	1 ml x4
Manual	1	1	1

Almacenamiento

El producto Bfo ADN polimerasa puede ser almacenado a -20 °C durante 24 meses.

Introducción

La Bfo ADN polimerasa es una enzima termoestable de la familia de las ADN polimerasas del género *Geobacillus*. Presenta actividad polimerasa 5'-3' y una marcada actividad de desplazamiento de cadena, lo que le permite sintetizar ADN a temperatura constante sin la necesidad de desnaturalizar la doble hebra de ADN por aplicación de calor.

La enzima no posee actividad exonucleasa 5'-3'. Asimismo, carece de actividad exonucleasa 3'-5' (*proofreading*). Puede iniciar la síntesis de ADN a partir de un extremo 3' OH libre, incluyendo *nicks* en ADN doble cadena, utilizando dicho extremo como inicio de la

extensión de la nueva cadena

La Bfo ADN polimerasa esta purificada a partir de una cepa de *E. coli* recombinante mediante diferentes etapas cromatográficas que aseguran su pureza, calidad y la ausencia de trazas de ácidos nucleicos.

El producto Bfo ADN polimerasa incluye el buffer de reacción isotérmico 10X, MgSO_4 (100 mM) para el ajuste de la concentración final de Mg^{2+} en la reacción (2–8 mM), agua ultrapura libre de nucleasas para el armado de la mezcla de reacción y Betaína (5 M). Este último, actúa como agente desestabilizante de estructuras secundarias del ADN, favoreciendo la eficiencia y especificidad de la amplificación isotérmica. Se recomienda su utilización en concentraciones finales de 0,2–0,8 M.

Aplicaciones

Debido a sus propiedades bioquímicas, la enzima puede ser utilizada en metodologías como amplificación isotérmica en general, LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*) o WGA (*Whole Genome Amplification*), SDA (*Strand DNA Amplification*) y otras aplicaciones que requieren de actividad de desplazamiento de cadena. Por otro lado, la Bfo ADN polimerasa no es compatible con reacciones de PCR. La temperatura óptima de reacción esta entre 55-65 °C, aunque la misma debe ser ajustada por el operador según el diseño del ensayo. La misma puede ser inactivada durante 20 min. a 80 °C. La Bfo ADN polimerasa admite la incorporación de dUTP (<50%) en la reacción, lo que permite la implementación de sistemas de prevención de contaminación basados en dUTP/UDG.

La Bfo ADN polimerasa presenta mayor resistencia a la presencia de moléculas intercalantes como SyBR Green, respecto a otras enzimas comerciales de características similares. Además, posee alta especificidad, lo que reduce la obtención de falsos positivos por amplificación inespecífica:

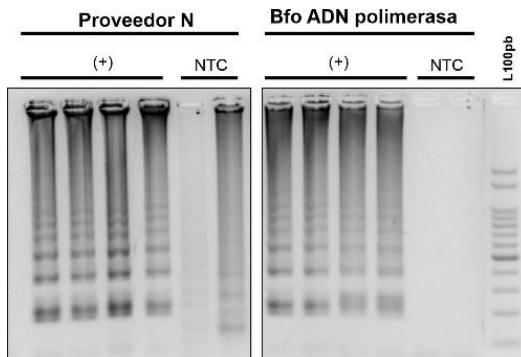
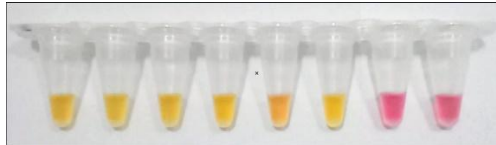


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2% de una reacción de amplificación isotérmica a 63°C utilizando la enzima Bfo ADN polimerasa y una enzima comercial del proveedor N.

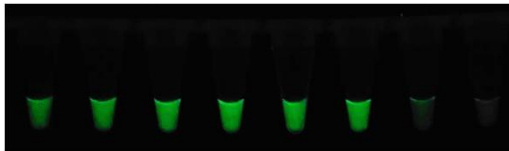
El revelado de este tipo de reacciones isotérmicas puede ser acoplado a diferentes métodos, como electroforesis en geles de agarosa, fluorescencia, colorimetría, turbidez, entre otros. También es compatible con métodos de revelado por dispositivos de flujo lateral, según la derivatización de los *primers* utilizados.

La Bfo ADN polimerasa también se encuentra disponible en formulaciones listas para usar, dependiendo del tipo de revelado:

- *Mastermix LAMP Color (#EA3201)*



- *Mastermix LAMP Fluorescente (#EA3301)*



Estas formulaciones incluyen buffer optimizado y los componentes necesarios para la amplificación de ADN por LAMP, reduciendo los tiempos y la variabilidad asociada a la preparación manual de mezclas, así mejorando la reproducibilidad del ensayo.

Controles de calidad

La Bfo ADN Polimerasa está certificada de ser libre de DNasas (endo- y exonucleasas), RNasas y trazas de ADN. Posee una pureza mayor al 95% comprobada por SDS-PAGE con tinción de *Coomassie Blue*.

Notas importantes

Las técnicas de amplificación isotérmica, particularmente LAMP y WGA, generan grandes cantidades de ADN amplificado (10^9 – 10^{12} copias), lo que incrementa significativamente el riesgo de contaminación cruzada y falsos positivos. En consecuencia, se recomienda:

1. La separación física de áreas de preparación de reactivos y análisis post-amplificación.
2. El uso de material exclusivo para pre- y post-amplificación.
3. Utilizar *tips* con filtro.
4. Realizar la descontaminación frecuente de superficies.
5. Realizar la apertura de los tubos post-reacción únicamente en áreas designadas diferentes a las utilizadas para la preparación de la reacción.

Por otro lado, para el armado de la reacción, el volumen estándar es de 25 µl, sin embargo, el mismo puede ser ajustado manteniendo las proporciones. Se recomienda utilizar como molde de la reacción un volumen no mayor al 20% del volumen final.

Este producto fue desarrollado únicamente para su uso exclusivo en laboratorios de investigación.

Protocolo

1. Descongelar los componentes de reacción, el molde, los *primers*, y el Agua ultrapura. Equilibrar los reactivos a temperatura ambiente, homogenizar por inversión y centrifugar brevemente antes del uso.
2. Preparar la reacción de acuerdo a la siguiente tabla. Se sugiere realizar los pasos de armado manteniendo los tubos en hielo.

Componentes	Volumen	Concentración final
Buffer isotérmico 10×	2,5 µl	1x (contiene 2mM de MgSO ₄)
MgSO ₄ 100 mM	0-1,5 µl	2-8mM _f
dNTPs 25 mM	1,4 µl	1,4 mM
Mix de primers 10X* ¹	2,5 µl	1X
Bfo ADN polimerasa (8 U/µl)	1 µl	8U _f
Agua ultrapura – Libre de nucleasas	c.s.p. 25 µl	-
Molde* ²	≤ 5 µl	
Betaina 5M	1-4 µl	0,2-0,8 M

*¹ La mezcla de *primers* para reacciones estándar de LAMP suele incluir las siguientes concentraciones:

Primer	Concentración stock 10x	Concentración final (1x)
FIP	16 µM	1.6 µM
BIP	16 µM	1.6 µM
F3	2 µM	0.2 µM
B3	2 µM	0.2 µM
LF	4 µM	0.4 µM
LB	4 µM	0.4 µM

Se sugiere el armado de mezclas de *primers* 10X, para facilitar la preparación de la reacción.

*² Para el armado de múltiples reacciones, preparar una mezcla en función del número de reacciones a realizar sin el agregado del molde

3. Homogeneizar la mezcla de reacción mediante vórtex y centrifugar brevemente para recoger el contenido.
4. Dispensar 20-24 µl de mezcla por reacción en los microtubos correspondientes y preparar los controles NTC (agregar el solvente utilizado para resuspender el molde, ej. Agua ultrapura).
5. En un lugar físico separado del anterior, añadir 1-5 µl del molde.
6. Cerrar los tubos, mezclar y centrifugar si es necesario para colectar el líquido que pueda haber quedado en la tapa.
7. Incubar a 55-65 °C durante 60 minutos. En este paso se recomienda utilizar baños térmicos (o termocicladores) con tapa termostatzada para evitar la condensación en la tapa de microtubo, lo que puede afectar el resultado de la reacción.
8. Una vez concluida la incubación, retirar los tubos y examinar según el método de revelado seleccionado.

Troubleshooting

Problema observado	Causas probables	Posibles soluciones
No se observa amplificación	Baja concentración de ADN objetivo	Verificar cantidad y calidad del ADN (usar control positivo conocido)
	Inhibidores en la muestra (ej. proteínas, detergentes, etanol)	Repetir extracción, asegurando eliminación de inhibidores o realizar una dilución del molde
	Desnaturalización incompleta del ADN	Realizar una desnaturalización inicial del molde antes de ser incorporado a la reacción
	Temperatura de incubación incorrecta	Realizar la puesta a punto de la temperatura óptima de reacción (55-65°C)
	Diseño o concentración inadecuada de <i>primers</i> .	Revisar diseño y optimizar concentración de <i>primers</i>
Amplificación tardía o baja eficiencia	Temperatura de incubación subóptima.	Optimizar temperatura dentro del rango recomendado.
	Concentración inadecuada de Mg ²⁺ .	Ajustar Mg ²⁺ en incrementos de 0,5–1 mM.
	Baja cantidad o calidad de ADN molde.	Aumentar cantidad de molde o mejorar su calidad.
Amplificación inespecífica o señal en controles negativos	Contaminación de los reactivos (<i>carry-over</i>)	Implementar flujo unidireccional y separación física de áreas. Utilizar <i>tips</i> con filtro y material exclusivo para pre- y post-amplificación.
	Formación de productos inespecíficos	Aumentar la temperatura de reacción
		Evaluar el diseño de los <i>primers</i> , y comprobar la formación de dímeros de <i>primers</i> Es posible comprobar la formación de dímeros mediante la realización de una curva de <i>melting</i>

	Tiempo excesivo de incubación.	Reducir tiempo de incubación
Variabilidad entre réplicas	Error de pipeteo	Verificar la precisión de micropipetas
	Mezcla no homogeneizada antes del fraccionamiento	Homogeneizar la mezcla antes de repartir la misma en los tubos de reacción
	Diferencias en la temperatura de incubación	Usar incubador con buena uniformidad térmica
	En reacciones isotérmicas monitoreadas mediante intercalantes, no se espera obtener valores de Ct estrictamente equivalentes entre réplicas, especialmente cuando se trabaja con muestras que contienen bajo número de moléculas de ADN molde. Esta variabilidad es inherente a la naturaleza de la amplificación isotérmica, caracterizada por una cinética exponencial no lineal y altamente estocástica en etapas tempranas	

