



Biodynamics

Boletín Técnico #123

Fidelio - Buffer de Mayor Fidelidad para PCR B123-1

Introducción:

La exactitud de la secuencia en la amplificación de DNA es importante en el clonado, la expresión de genes y otras aplicaciones. El buffer **Fidelio 5X** incrementa la fidelidad de las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) disminuyendo en más de 50% la incorporación de nucleótidos erróneos cuando se utiliza *Taq* Polimerasa. También puede emplearse para detectar SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) mediante ARMS™ (*Amplification Refractory Mutation System*), es decir, el uso de primers con diferentes bases alternativas en la posición 3'.

Coeficiente de error de la *Taq* Polimerasa (Método *LacI*):

Buffer tradicional: $\sim 5.5 \times 10^{-5}$ (frecuencia de mutación/bp/duplicación)

Buffer Fidelio 5X: $\sim 1.4 \times 10^{-5}$ (frecuencia de mutación/bp/duplicación)

Método *LacI*

El método de *LacI* (Ref. 1) consiste en la amplificación del gen represor *LacI* del operón lactosa y su posterior clonado *upstream* del gen *LacZ*. Los errores en la amplificación de *LacI* se evidencian como colonias azules (no reprimidas) sobre las colonias normales blancas (reprimidas) en placas con X-Gal (Fig.1).



Fig.1 Las colonias azules representan mutantes.

El buffer actúa sobre la selección del nucleótido correcto por parte de la enzima polimerasa antes de su incorporación y es por lo tanto independiente de la presencia o no de actividad *proof-reading*.

Presentación:

1mL Buffer 5X (tapa roja ●)

Utilización:

Reemplazar el buffer usual de la PCR por Fidelio 5X (Ej.: 10 µL para 50 µL final). El buffer incluye 7.5 mM MgCl₂ (1.5 mM final). Su alta densidad y el colorante rojo permiten sembrar el producto de PCR directamente en el gel. No es necesario modificar la T° de *annealing* habitual.

Ejemplo:

Detección de SNPs

Standard Fidelio 5X

A G T C A G T C

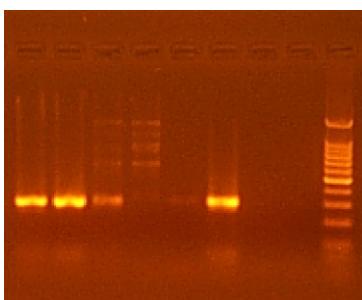


Fig.1 Amplificación de una región de mtDNA humano con los 4 primers alternativos complementarios a la posición 16311 con buffer standard (izquierda) y buffer Fidelio 5X (derecha). Sólo el primer homólogo G amplifica, detectando la transición TxC a la secuencia standard de Anderson.

Templado:

...CACATAAAGCCAATTTACCCCTGT...

Primers alternativos:

A: ACGGTAATGGCTTATGTA
G: ACGGTAATGGCTTATGTC
T: ACGGTAATGGCTTATGTT
C: ACGGTAATGGCTTATGTC

Recomendaciones:

Al excluirse numerosas copias erróneas el rendimiento de producto final puede ser algo menor si las condiciones de reacción no son óptimas.

Referencias:

Cline,J.,Braman,J.C. and Hogrefe, H.H. (1996) Nucl.Acids Res. **24**, 3546.

Patentes:

Este producto se encuentra protegido bajo US Pat. # 7,312,054