

货号: #9101S, #9101M

HiDi® 2x PCR Master Mix

分子诊断技术手册

Medix Biochemica

介绍

HiDi® (High Discrimination) 表示对 PCR 引物 3' 端核苷酸错配的高鉴别能力。HiDi® 2X PCR Master Mix 是一种可应用于 SYBR 方法的即用型预混液，含有高鉴别能力的重组 DNA 聚合酶，可适用于等位基因特异性 PCR (AS-PCR)¹、甲基化特异性 PCR 等应用。

HiDi® 对于鉴定诸如 CRISPR/Cas 或 TALEN 等基因组编辑组技术的实验效果也同样有效^{2,3}。该酶采用适配体修

饰的热启动技术，50°C - 55°C 以上的温度会破坏适配体的二级结构，释放 DNA 聚合酶活性。优化的化学缓冲液提高了反应灵敏度，确保聚合酶稳定且高效地发挥其性能。

通过扩增信号的延迟，HiDi® 可有效地鉴别转换或颠换突变。基于探针法的检测，可选择 HiDi® Taq 2X PCR Master Mix (货号：#4200S 或 #4200M)。

**通过鉴别可导致扩增减少，
或完全不扩增的野生型错配引
物，HiDi® 可高效检测突变。**



方法

HiDi® 2x PCR Master Mix 和其他三家供应商, 同时以 100 bp 的肌动蛋白 (Actin) 基因片段 (Genbank NM_001101.5) 为靶基因进行扩增, 以 10 倍梯度稀释模板, 并设定 3 个平行实验组, 采用 SYBR Green

染料法每反应进行超过 40 次循环 (如表 1 所示)。根据图 1, 设计 3' 端匹配和错配的反向引物。反应程序及引物终浓度均根据不同供应商建议条件进行配置。

步骤	温度	时间	循环数
1	95°C	2 min	1
2	95°C	15 sec	40
3	60°C	30 sec	40
4	72°C	30 sec	40

表 1: 所应用热循环条件。
其中供应商 C 第一步的初始变性步骤延长至 10 min。

NM_001101.5:85-1212	3' -GTCTTTGCGGATGTCCACGTCACACTTCATGATGGAGT-5'
WT primer	5' -GGATGTCCACGTCACACTTC-3'
A-mismatch primer	5' -GGATGTCCACGTCACACTT A -3'
T-mismatch primer	5' -GGATGTCCACGTCACACTTT-3'
Forward primer	5' -CACTCTCCAGCCTTCCTTC-3'

图 1: 引物设计。

WT Primer: 与野生型目的基因匹配的反向引物。

A-mismatch primer: 野生型目的基因的 3' 端 A-碱基错配 (颠换突变) 的反向引物。

T-mismatch primer: 野生型目的基因的 3' 端 T-碱基错配 (转换突变) 的反向引物。

所有引物 T_m 值约为 63°C。

HiDi® 通过明显更早出现的扩增信号可有效检测出野生型基因。即使是转换突变的 T-等位基因突变引物，其扩增信号也有极为显著的延迟，从而表现出极佳的鉴别能力。

结果

首先, 从图 2 (A) (E) 中可以看出, 相较于野生型匹配引物的扩增结果, HiDi® 2x PCR Master Mix 表现出色, 在鉴别颠换突变 (A- 碱基错配引物) 方面最高效。

T- 碱基错配引物的扩增信号有极为显著的延迟, 这说明酶预混液具有良好的鉴别能力。此外, 使用其他供应商的

产品时荧光信号值更低, 这导致针对 A- 碱基错配引物或 T- 碱基错配引物的鉴别能力较差, 如图 2 (B) (C) (D) (E) 所示。

其次, HiDi® 2x PCR Master Mix 通过野生型匹配引物扩增后的效率高达 97%, 优于其他三家供应商的同类产品。

结论

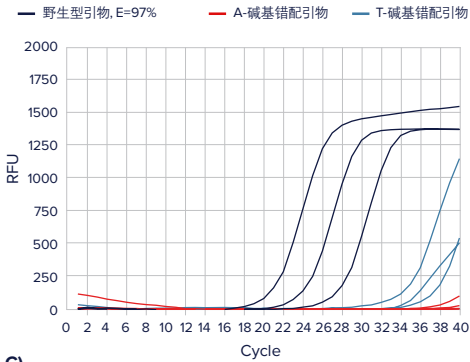
HiDi® 2x PCR Master Mix 在鉴别单个核苷酸突变方面表现出卓越的能力, 是使用等位基因特异性 PCR (AS-PCR) 进行突变检测、或基因组编辑效果验证的首选产品。

基于 SYBR Green 染料法的 HiDi® 2x PCR Master Mix, 相较于其他三家知名供应商的预混液, 具有更加优越的性能。

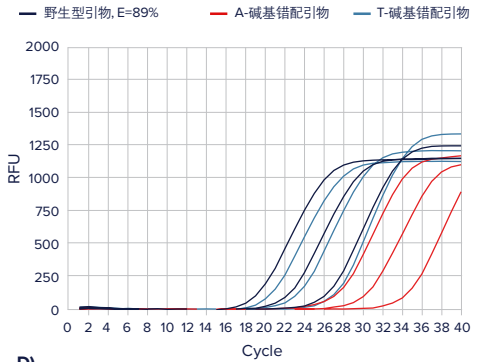
HiDi® 2x PCR Master Mix 在高灵敏 PCR 扩增中一样高效。

HiDi® 2x PCR Master Mix 是采用等位基因特异性 PCR (AS-PCR) 检测单核苷酸多态性的首选产品。

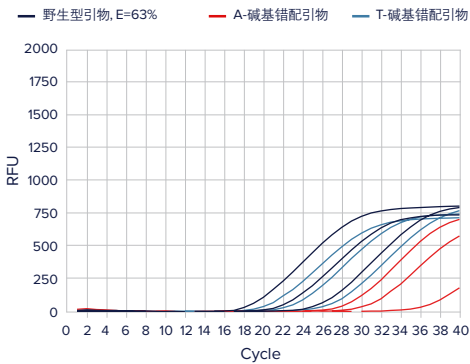
A) HiDi® 2x PCR Master Mix



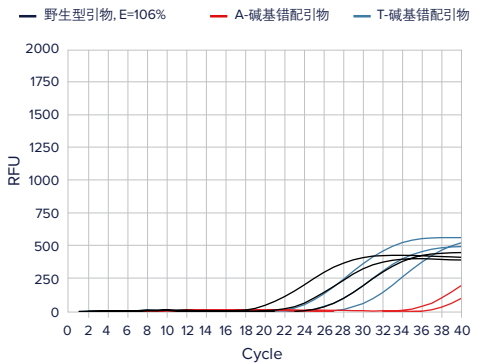
B) 供应商 A



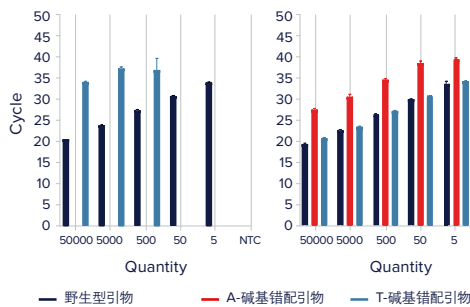
C) 供应商 B



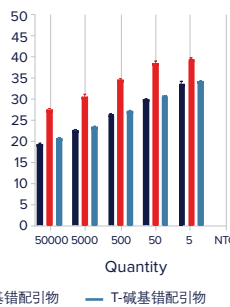
D) 供应商 C



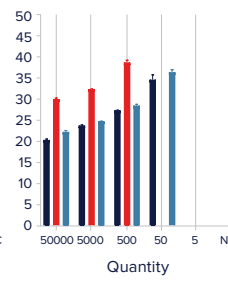
E) HiDi® 2x PCR Master Mix



供应商 A



供应商 B



供应商 C

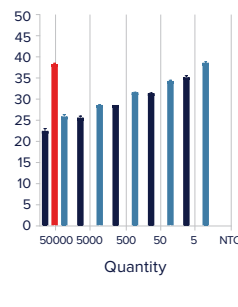


图 2: 扩增曲线和 Cq 值图。

A) HiDi® 2x PCR Master Mix 使用 3' 末端错配引物进行突变位点鉴别。

B) 供应商 A 采用任何一种错配引物均无法实现突变位点的鉴别。

C) 供应商 B 扩增效果不佳, 且无法达到鉴别突变的目的。

D) 供应商 C 扩增效果不佳, 且荧光信号值更低, 无法达到鉴别突变的目的。

E) HiDi® 2x PCR Master Mix 和其他供应商类似产品在不同浓度模板扩增时的 Cq 值表明无论是转换还是颠换突变, HiDi® 均具有很高的鉴别能力。

在 A、B、C 和 D 组中: 针对野生型匹配正、反向引物、A-碱基错配反向引物和 T-碱基错配反向引物的三条扩增曲线对应于样本中的 DNA 拷贝数分别为 50000、5000 和 500。



文献:

1. Miotto, O. et al. Emergence of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* with kelch13 C580Y mutations on the island of New Guinea. *PLoS Pathog.* 16, 1–21 (2020).
2. Morisaka, H. et al. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat. Commun.* 10, (2019).
3. Sakurai, T. et al. Bindel-PCR: a novel and convenient method for identifying CRISPR/Cas9-induced biallelic mutants through modified PCR using *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Sci. Rep.* 9, 1–14 (2019).

Medix Biochemica

更多产品信息:

cnmedixbiochemica.com

上海市闵行区浦江镇绿洲环路 10 号 6 幢 11 层

medixchina@medixbiochemica.com



myPOLS Biotec GmbH
Byk-Gulden-Str. 2 // 10, 78467 Konstanz,
Germany

Copyright © 6/2022 Medix Biochemica. All rights reserved.

Medix Biochemica 保留对本文件所述的任何产品进行更改和改进的权利, 无需另行通知。