

TOP-PCR (T oligo primed PCR) 使用說明書

Version: Oct. 31, 2023

產品規格 Product Spec.



產品編號 (Catalog #)	D02
反應數 (#rxn)	24
目的(Purpose)	定序/分析前擴增 (amplification)
複製品質 (required quality)	Purified or unpurified DNA fragments
最大長度(max length)	1.2 kb
最少輸入量 (min input)	≥ 1 molecule
保存溫度	-20°C

保存溫度與注意事項

本產品效期大約一年半，可在 4°C 下儲存以供短期使用，或可置於 -20°C 長期儲存。不建議在室溫或 4°C 做長期儲存。配製時請確保產品在使用前已完全解凍和混合。本產品運送時將採用乾冰或保冰劑低溫運輸方式。

研發背景

科學研究與診斷技術愈來愈趨向微觀，使得原本為足量 DNA 樣本所設計的方法與分析方式變成無法使用，或產生鉅大誤差，須要有更新穎、更有效的方法來彌補這些缺陷，(DNA) TOP-PCR (T Oligo Primed-Polymerase Chain Reaction，簡稱 TOP-PCR，中文翻譯為「T 寡核苷酸引發的聚合酶連鎖反應」) 以及其所衍生的一系列生物科技與對應的試劑產品就是在這種情況下研發出來的。

體液內核酸屬於非侵入性(或半侵入性) 遺傳物質，可用以分析多種遺傳疾病與傳染病原。最近十多年來，隨著定序科技與分析技術的發展，使得這方面的研究與診斷成為一股熱潮。但使用這類遺傳物質有一個嚴重的缺點，亦即，即使取得方便，但是其中核酸的含量經常過低，導致不敷使用或定序。因此，我們在中央研究院時期就開發了 TOP-PCR 與 RNA TOP-PCR，用以複製超微量的 cfDNA 與 cfRNA，得以克服量不足的問題，而且還能保存原貌。TOP-PCR 最早使用於複製體液內的細

胞外游離 DNA 片段 (cell-free DNA · cfDNA) · 擴展到 RNA TOP-PCR · 用以複製細胞外游離 RNA (cell-free RNA · cfRNA) 或胞器 (如 exosome 或 extracellular vesicle) 內所有的 RNA 分子 · 接著更擴展到其他科技與產品。

成立玉山生醫科技股份有限公司之後 · 我們繼續開發一系列相關科技與相關產品 · 包括基因網 PCR (gene net-PCR) · 一滴體液 PCR (1DF-PCR) 與單細胞 PCR (SC-PCR) 等。

總而言之 · TOP-PCR 突破質與量的限制 · 保存原貌做等比率放大 · 有效複製存在於體液樣本中所有的 · 微乎其微的 DNA · 有效提升檢測的便利性與靈敏度。這項研究成果發表於 2017 年 1 月 17 日的 Scientific Reports 國際期刊上 · 也獲得多國專利。

精心設計使 TOP-PCR 具有多種特點

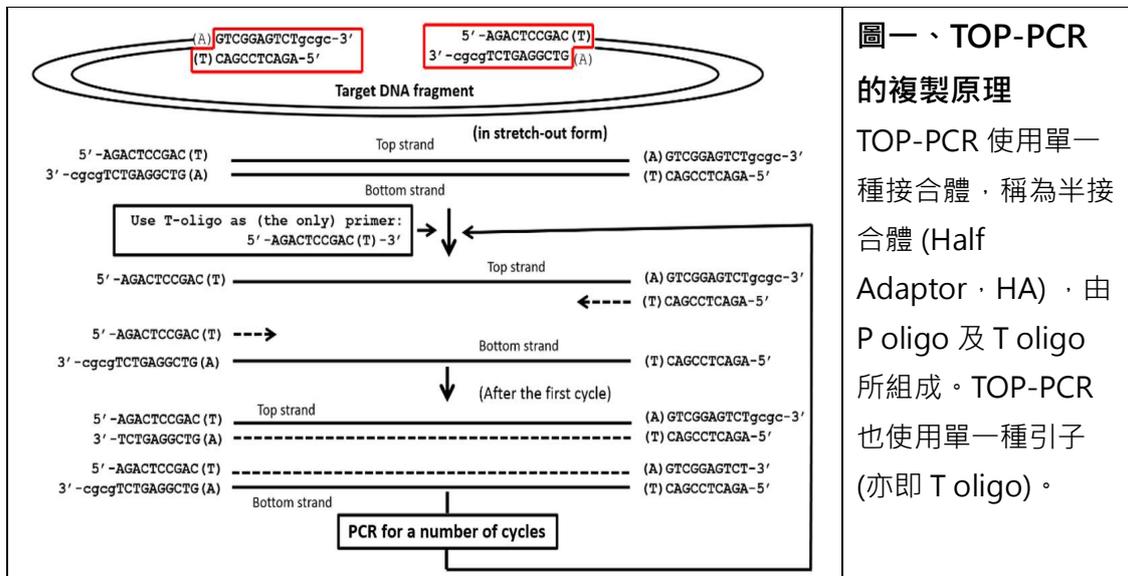
TOP-PCR 的設計可分為 DNA 分子載體的設計與實驗操作程序 (experimental procedure 或 protocol) 的設計。

I. DNA 載體設計上的特點: TOP-PCR 使用單一種接合體 · 不會有 50% 的損失

在複製未知序列的 DNA 片段之前 · 必須先使用兩個相同或不同的接合體 (adapter) 做為載體 · 架住未知序列的 DNA 片段的兩端 · 再用接合體上一個或兩個局部片段做為引子 (primer) · 以引發 PCR 的連鎖反應 · 複製成千上萬倍 (包含引子以及內部的) DNA 片段。在使用兩種不同接合體的情況下 · DNA 兩邊就有可能接上相同的接合體 · 導致 PCR 無法正常運作 · 因而造成 50% 的損失。

TOP-PCR 只使用單一種類的結合體 (homogeneous adapter) · 以框住 DNA 兩端 (圖一紅框內) · 再以一個引子 (T oligo) 進行 PCR 反應 · 這是 TOP-PCR 在 DNA 載體結構設計上的特徵。更詳細地說 · TOP-PCR 所使用接合體由 P oligo 及 T oligo 所組成 · 稱為半接合體 (Half Adaptor · 簡稱 HA) · 同一種 HA 可以接在游離

DNA 的任何一端，然後以 T oligo 作為 PCR 的唯一引子。相對地，目前世界上類似的科技以及最常用的定序科技，一般採用兩個在序列上不盡相同的接合體，配合兩種序列不同的引子，以進行 PCR 反應，導致其中半數(50%)待複製(或定序)的 DNA 無法正常複製，因而喪失訊息。TOP-PCR 就沒有這個問題。



II. 實驗操作程序 (protocol) 上的設計

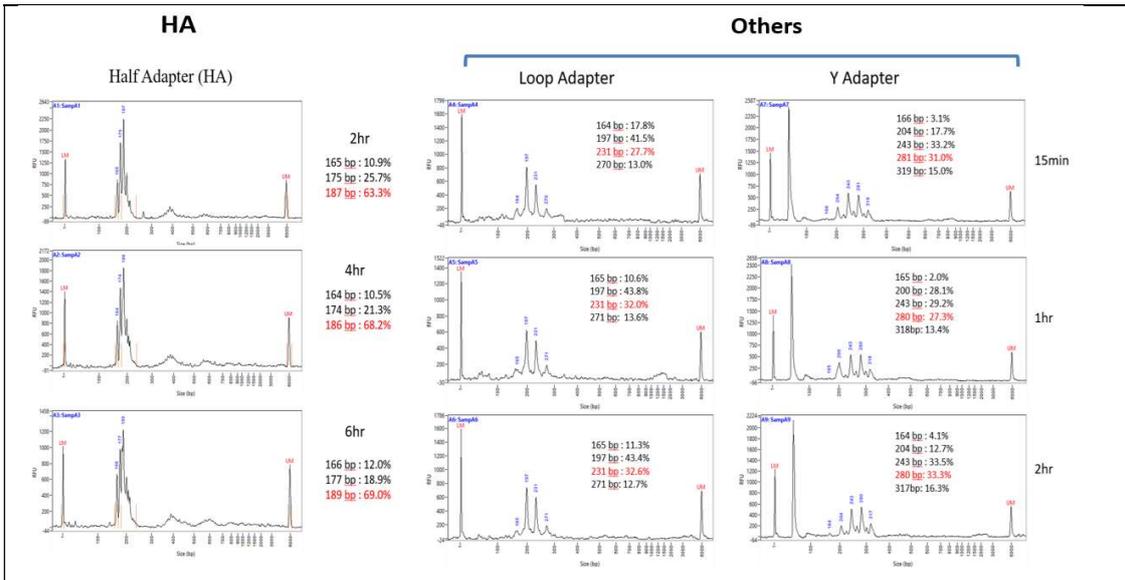
TOP-PCR 使用非常簡化、且已最佳化的 single-tube procedure。所有的實驗步驟在同一試管中完成，在過程中不必更換緩衝液或純化中間產物或 DNA。相反地，其它類似科技，很多在實驗過程中還須要更換緩衝液或純化中間產物或 DNA，造成珍貴物質的流失。(據統計，每次純化會造成約 20%的流失)

與目前世界上類似科技相比較顯示功能上的優越性

性能包含多個層面，以下分類敘述。

I) TOP-PCR 接合體與 DNA 的接合效率遠勝其它技術

接合體與 (target) DNA 如果接合不完全 (例如完全沒有接上，或只接一邊)，PCR 就無法有效地複製。寶貴的遺傳物質也會因此流失而失去相關資訊。經過分析，HA 與 DNA 的雙邊接合效率是其他接合體的兩倍以上 (~68% vs. ~33%) (圖二)。

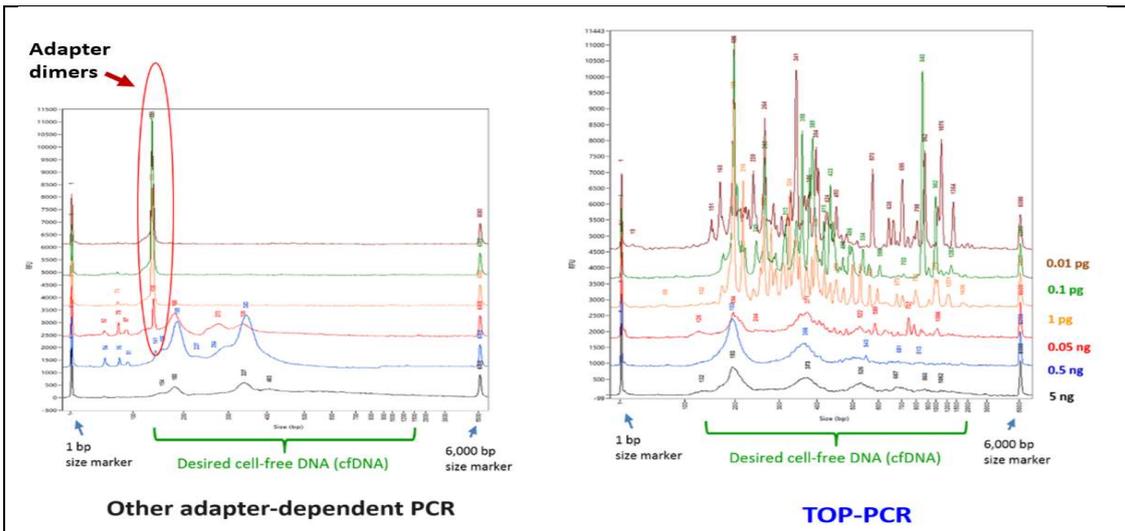


圖二、HA 與市面上其他類似的接合體在與 DNA 接合效率上的比較

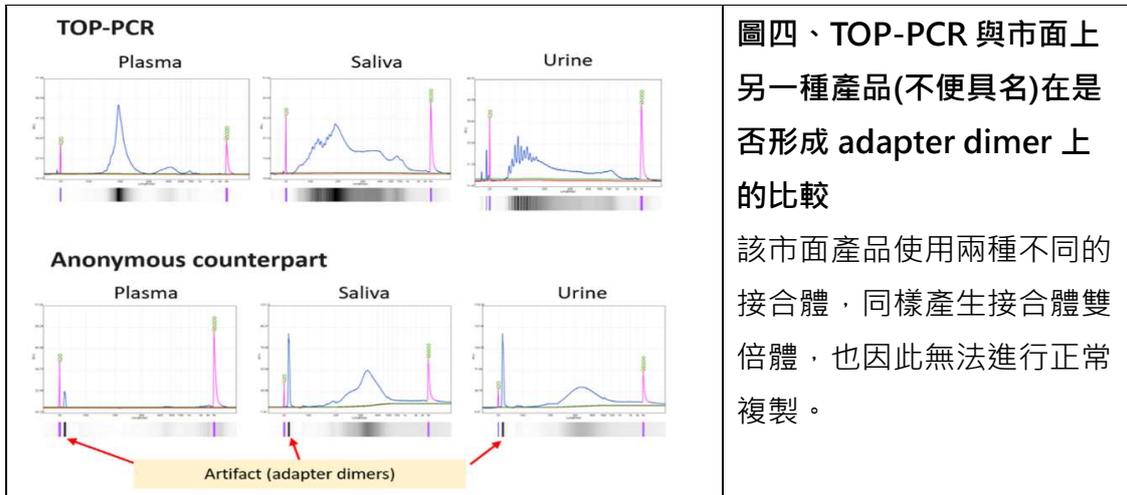
紅色標示為雙邊都接合的比率。

II) TOP-PCR 沒有接合體自粘的問題

目前定序界所使用的 PCR 無法處理極少量的 DNA，主要因為在 DNA 與該接合體的相對比例過低時，該接合體會產生自粘，導致 PCR 無法正常進行(圖三與圖四)。相反地，HA 不但沒有自粘現象，它已經推廣到法醫鑑定與數位 PCR (digital PCR) 的應用，原因在於它可以複製單一的 DNA 分子。



圖三、TOP-PCR 與定序界最常用的 PCR 在複製效率上的比較 正常 cfDNA 經過系列稀釋之後，分別使用定序界最常用的 PCR (左) 與 TOP-PCR (右) 作比較。左邊在輸入量低於 0.05 ng 之後就產生大量的接合體雙倍體，干擾正常的複製。



總結: TOP-PCR 具有多重優越性

總之，TOP-PCR 解決了量不足的問題，它沒有最低量的限制，亦即再少量亦可定序，靈敏度遠超越任何其他方法。它具有多重優越性 (表一)，因此在診療上具有莫大的潛力。

表一、TOP-PCR 的優越性

	TOP-PCR	市面上其他相對產品	TOP-PCR 的優越性
接合體(adapter) 種類	1	2	2 倍
雙邊接合的比率	70%	33%	2 倍
接合體自粘	不會	會	遠高過對方
所需 DNA 最低量	單一個分子	> 0.05 ng	遠高過對方
準確性	高	甚低	遠高過對方
使用單一試管操作程序	是	未知	高過對方

實驗操作程序

- Protocol available with kit order.



玉山生醫科技股份有限公司
新北市石碇區碇坪路一段 50-2 號 4 樓
Tel: +886 2 2663-3113, 0975578860
Email: kpchiu@topscibio.com

© 2023 All other product names and trademarks are the property of their respective owners