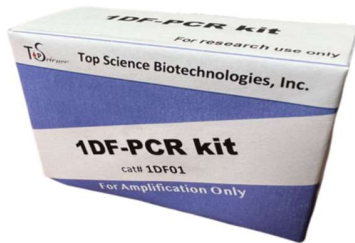


一滴體液-聚合酶連鎖反應(1DF-PCR)試劑組

產品使用說明書

產品規格

1DF-PCR kit



產品編號	1DF01	1DF02
反應數	24	48
用途	DNA 複製(可接 NGS 或單分子定序)	
最少起始量	1 molecule - ng level	
適用樣本	各種體液(尤其是不易取得的微量樣本)	
適用樣本體積	0.1-20 uL	
最大長度	1.2 kb	
保存溫度	-20°C	

Note:

- 1) 1DF-PCR kit 由於所需樣本體積與 DNA 量極少，可用於 single cell (如 CTC) DNA 的放大與分析，也已經在肺癌細胞株 A549 單一細胞實際印證 (見以下“應用”部分)。
- 2) 雖然不受體積與 DNA input 量的拘束，但使用者也請思考所使用樣本量是否具有代表性。若不夠具有代表性，可以使用純化過的 DNA 樣本。

產品概述

體液檢體中的細胞外的游離核酸 (cell-free nucleic acid, cfNA) 是逐漸被廣泛使用於生物醫學研究和診斷的重要非侵入性遺傳材料。然而，通常需要至少幾毫升(C.C.)的血液或其他體液來獲得足夠量的 cfNA 用於分析。目前大多數都需要先從體液檢體中預先純化 cfNA，純化過程中會流失 20%以上的 cfNA，且各廠牌的純化試劑功效不一，容易造成偏差(bias)。這些問題嚴重阻礙了使用 cfNA 做為檢體上的進展。為了克服這些問題，我們最近開發了一種新型生物科技擴增套組，稱為“一滴體液-聚

合酶連鎖反應”(1 drop of body fluid-PCR, 以下簡稱 1DF-PCR)試劑組。1DF-PCR 試劑組能夠“直接”從一滴(~10 μL)的體液中擴增細胞外的游離 DNA (cfDNA)，而且無需預先純化核酸分子，所以沒有流失的問題，所有內含的核酸分子皆可進入分析流程，同時也減少了人為與純化技術性上造成的差異，大幅提高了分析的全面性和可靠性。此外，我們採用單一試管實驗程序，即在擴增完成之前無需更換緩衝液或試管。

擴增原理

技術上是以聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR) 為基礎，其原理是像一般的擴增技術一樣，未知序列的核酸分子，都必須在兩端接上特別設計的接合體(adapter，或稱銜接子)，該接合體是由兩個特定設計的寡核苷酸(oligonucleotide)引子所組成。銜接子上有引子(primer)黏著點，將引子一起放入 PCR 機器，經過聚合酶在重覆的連鎖反應後，可製造出成千上萬的複製品。研究團隊在研發技術上有重大突破，只需微量體液檢體，並可省略前述的純化步驟，且研發出來的銜接子，在聚合酶的連鎖反應中不會像一般的銜接子產生自黏成雙倍體或多倍體，造成 PCR 與分析上的困擾。

運輸、儲存和處理

1DF-PCR 試劑組將採用乾冰或冰袋運輸方式，具體取決於目的地國家/地區。試劑活性將保留到試劑組標籤上標明的失效日期。1DF-PCR 試劑組即使在-15°C 至-25°C 下儲存，也不會影響產品的保質期。請確保產品在使用前已完全解凍和混合。試劑可在 4°C 下儲存以供短期使用（最長 6 個月）。若要長期保存請放回至-20°C 儲存（最長 18 個月）。如果所有試劑都經過仔細處理且未受到污染，則將試劑組（無意地）在室溫下放置一小段時間，預計也不會受到損害。不建議在室溫和 4°C 下做長期儲存。

請注意，儲存在-20°C 溫度以上的試劑在使用過程中受到污染時更容易降解，因此在此溫度下儲存的風險由用戶自行承擔。

品質管理

1DF-PCR 試劑組經過嚴格的質量控制測試，無污染的核酸外切酶活性，符合 DNA 無污染的嚴格要求。

製造工廠皆有國家級 GMP 認證，確保產品品質管理上皆有嚴格把管。

經常影響 PCR 結果的主要因素	解決方案
模板 DNA 數量和品質	<ul style="list-style-type: none"> • 檢查模板 DNA 品質以及是否具有完整代表性， • 請在緩衝溶液中儲存和稀釋，而不是在水中。 • 檢查實驗步驟 Step 1-7 是否正常進行。
黏合 (Annealing) 時間與溫度	<ul style="list-style-type: none"> • 引子與模板 DNA 的黏合時間會影響專一性，且與 DNA:primer 的相對濃度有關。可作適度調整。 • PCR annealing temperature (黏合溫度) 會影響產物的專一性 (specificity)，太低會降低專一性，高會提高專一性，但太高會降低產量，應作適當調整。 • 亦可使用有溫度梯度的 PCR 機型來優化黏合溫度。
聚合時間 (Elongation time)	<ul style="list-style-type: none"> • 增長 elongation time 會增加長度。對於 > 1 kb 的擴增，可將 elongation time 增加到每個循環 30 秒或更久。但是過長也沒有必要。
引子 (primer) 濃度	<ul style="list-style-type: none"> • 引子濃度會影響 PCR 複製的專一性。濃度太高會降低專一性，宜適當調整。
循環 (cycle) 次數	<ul style="list-style-type: none"> • 增加循環次數可增加產量，但是儘量不要超 50 個循環，免得耗盡 dNTPs 與 primers 而產生錯誤序列。

應用

- 1DF-PCR 可直接應用在癌單細胞(single cancer cell)基因突變的檢測
單一個癌細胞的 gDNA 先經過複製放大，再強化(enrich)對象基因序列，經過定序分析之後即可得知是否具有突變。下圖顯示肺癌 KRAS 基因的 G12S 胺基酸突變是由於 G -> A 的基因突變所造成。

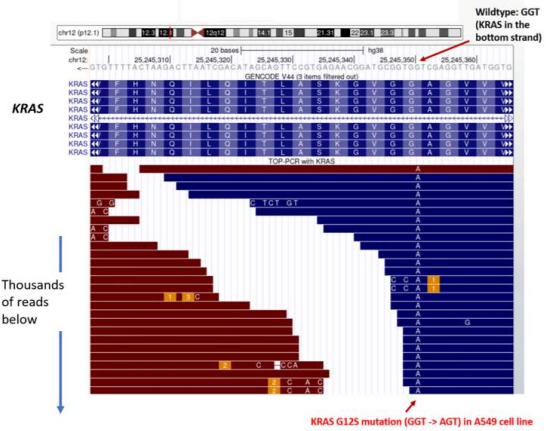
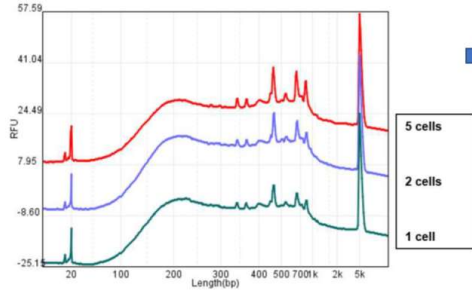
Detection of point mutation in single cells by Single Cell PCR (SC-PCR)

--- G12S mutation in A549 lung cancer cells as an example ---



玉山生醫科技/ Top Science Biotech

<https://topsciencebiotech.com>



- 提高定序樣本足夠分析量
- 協助法醫研究
- 協助考古研究
- 協助種類鑑定

產品內容	
一滴體液-聚合酶連鎖反應試劑組 (1DF01)	Dilution buffer (Tube #1) End polishing buffer (Tube #2) End polishing enzyme (Tube #3) Adapter (Tube #4) Ligation mix (Tube #5) T3 oligo (Tube #6) 2X PCR mix (Tube #7) Exonuclease (Tube #8) Buffer I (Tube #9) Enzyme I (Tube #10)

特點及優點	
<ul style="list-style-type: none"> • 1DF-PCR 試劑組是專為各種微量體液開發的。 • 無需專門的儀器或特殊的 PCR 耗材。 • 優化的結合系統提供了更高的產量、特異性和靈敏度。 • 只需 0.1-20 μL 原始體液的量。 • 不需要事先純化核酸 (NA) 分子。 	

- 可用於血漿、唾液、尿液、淚液、耳屎等體液等。
- 可節省時間和成本。
- 全程採用單管實驗程序。
- 提高效率、具高性能。
- 提高定序樣本足夠分析量 (增加 PCR 產物)。

配製注意事項

始終確保產品在使用前已完全解凍和混合。試劑可在 4°C 下儲存以供短期使用。

試劑在 -20°C 進行長期儲存。不建議在室溫和 4°C 下長期儲存。

請注意，儲存在 -20°C 以上溫度的試劑在使用過程中受到污染更容易降解，因此在此溫度下儲存的風險由用戶自行擔。

實驗步驟 (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