

Code No. NN0001

研究用

Takara

Takara FFPE DNA QC
All-in-One Kit

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	2
● 试剂盒以外需要准备的其他器具、仪器等（主要用品）	2
● 操作上的注意事项	2
● 实验操作	2
● 实验结果分析	5
● 补充：关于区域划分	5
● 关联产品	5

● 制品说明

福尔马林固定石蜡包埋 (Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 样品在临床和研究中应用广泛, 近年来 FFPE 样品的分析频率有所增加。虽然 FFPE 样品适合长期保存, 但其固定过程中使用的福尔马林会导致核酸和蛋白质发生化学及物理修饰, 影响下游实验 (如 PCR 扩增)。琼脂糖凝胶电泳法是评估 DNA 片段化的一种方法, 但需约 50 ng DNA 用于检测, 不适合评估珍贵样品。此外, 吸光度法可测定 DNA 浓度, 但无法评估 DNA 片段化程度。

本制品使用管家基因上长短 2 个扩增子的扩增引物, 通过 Real Time PCR 可以对有效分子数进行定量和片段化评估的试剂盒。使用梯度稀释的标准品进行 PCR, 以得到的 Ct 值为 y 轴、标准品拷贝数的对数值为 x 轴来绘制标准曲线。以该标准曲线为基础, 通过短链扩增子的扩增对有效分子数进行定量。对于片段化严重的 FFPE 来源 DNA, 由于长链扩增子的扩增降低, 可用以下公式, 根据长短扩增子的定量值求出比值 (Long/Short 比), 对 FFPE 来源 DNA 的片段化进行评估。未片段化样品的 Long/Short 比值为 1.0, 片段化程度越高, 比值越小。

Long/Short 比 = Long Assay 定量值 / Short Assay 定量值

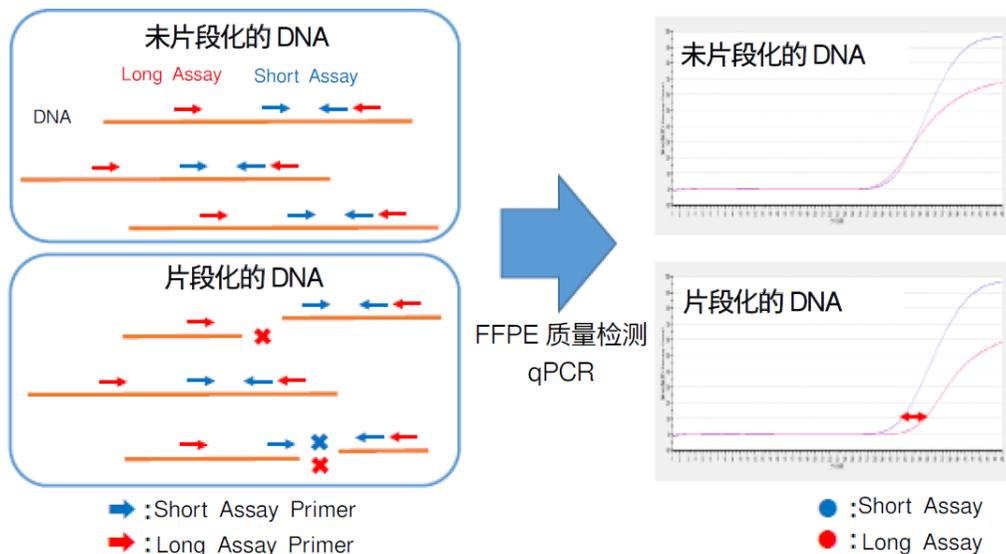


图 1. 评估 DNA 片段化的原理

将短扩增子的 Short Assay (92 bp) 与长扩增子的 Long Assay (268 bp) 的扩增情况进行比较, 评估 DNA 片段化情况。

片段化严重的 DNA 样品, Long Assay 的扩增会有所降低。

● 制品内容 (20 μ l 反应 \times 100 次)

○	2X Premix FFPE QC ^{*1}	2X conc.	1 ml \times 2
●	Short Assay Primer/Probe Mix ^{*2}	10X conc.	200 μ l
●	Long Assay Primer/Probe Mix ^{*2}	10X conc.	200 μ l
⑫	RNase Free H ₂ O		1 ml \times 2
●	DNA Standard FFPE QC	3.3×10^5 copies/ μ l	100 μ l
	EASY Dilution (for Real Time PCR)		1 ml \times 2
●	ROX Reference Dye II ^{*3}	50X conc.	100 μ l

*1: 含酶、底物等。

*2: 含荧光标记探针, 需避光保存。

*3: 含荧光物质, 需避光保存。

- 保存： -20℃

● 试剂盒以外需要准备的其他器具、仪器等（主要用品）

【实验器具】

- 微量移液器
- 微量移液器枪头（带疏水性过滤器）
- 实验专用反应管等

【仪器】

- Real Time PCR扩增仪（需支持FAM检测）：
 - Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000/TP1010/TP1030)
 - Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
 - CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
 - CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
 - Light Cycler 96 System/ Light Cycler 480 System II (Roche Diagnostics)
 - Quant Studio 5 Real-Time PCR System (96-well, 0.1或者0.2 mL block) (Thermo Fisher Scientific)

● 操作上的注意事项

1. 本制品用于检测人基因组 DNA，操作时需避免混入操作者的 DNA。
2. 如果样品和引物因混入核酸酶而被降解，则不能准确进行检测。实验者的汗液和唾液也会带入核酸酶，操作时应注意佩戴一次性手套和口罩。
3. 对于 2X Premix FFPE QC，使用前，请上下颠倒轻轻混合，避免起泡，混匀后再使用。如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。
4. 不能使用振荡器混匀。另外，将 2X Premix FFPE QC 在-20℃下冷冻保存时可能会形成沉淀。此时，轻轻用手握一会儿或室温短时间放置后，颠倒混匀可以完全溶解。请确保试剂混合均匀后再使用。
5. 配制反应液时需冰上放置。反应液的配制、分装请一定使用新的一次性枪头，尽量避免样品间的污染。
6. 建议从反应液的配制到样品的添加，设定以下 3 个实验区域，并进行物理性隔离。（请参考“补充：关于区域划分”）。无论在哪个区域，都要避免开闭装有扩增产物的反应管。
 - 区域 1：反应液的制备、分装等操作区域。
 - 区域 2：样品的制备区域。
 - 区域 3：向反应液中添加待检测样品的区域。
7. 本制品实时进行扩增反应和检测，无需通过电泳等分析反应结束后的扩增产物。为了避免污染，严禁从反应管中取出扩增产物。

● 实验操作

1. FFPE来源gDNA样品的制备（在区域3实施）

使用EASY Dilution (for Real Time PCR) 将每个gDNA样品稀释到1 ng/ μl。

2. 制作标准曲线用标准品（在区域3实施）

使用DNA Standard FFPE QC，准备 3.3×10^3 copies/ μl~ 13 copies/ μl的5个梯度稀释液。

[注意]请务必在使用时配制DNA稀释液。

1) 分别取45 μl EASY Dilution (for Real Time PCR) 分装到6个1.5 ml反应管中。

2) 在1) 的1个反应管中添加5 μl的● DNA Standard FFPE QC (3.3×10^5 copies/ μl)，充分混合后，轻轻离心，制备 3.3×10^4 copies/ μl的稀释液。

3) 在45 μl的新EASY Dilution (for Real Time PCR) 中添加5 μl在2) 中制备的 3.3×10^4 copies/ μl，充分混合后，轻轻离心制备 3.3×10^3 copies/ μl。

4) 在45 μl 的新EASY Dilution (for Real Time PCR) 中加入15 μl 在3) 中制备的 3.3×10^3 copies/ μl , 充分混合后, 轻轻离心制备 8.25×10^2 copies/ μl 。重复稀释操作, 最终制备出13 copies/ μl 的梯度稀释液。

No.	稀释液浓度	稀释液制备方法
1	3.3×10^4 copies/ μl	DNA Standard FFPE QC原液5 μl +EASY Dilution 45 μl
2	3.3×10^3 copies/ μl	1.的 3.3×10^4 copies/ μl 溶液5 μl +EASY Dilution 45 μl
3	8.25×10^2 copies/ μl	2.的 3.3×10^3 copies/ μl 溶液15 μl +EASY Dilution 45 μl
4	2.06×10^2 copies/ μl	3.的 8.25×10^2 copies/ μl 溶液15 μl +EASY Dilution 45 μl
5	52 copies/ μl	4.的 2.06×10^2 copies/ μl 溶液15 μl +EASY Dilution 45 μl
6	13 copies/ μl	5.的52 copies/ μl 溶液15 μl +EASY Dilution 45 μl

※上述6个梯度的稀释溶液中No.2~6 (3.3×10^3 copies/ μl ~13 copies/ μl) 作为制作标准曲线的标准样品进行反应。

(每个反应分别使用2 μl 。推荐n=2的反应)

3. Real Time PCR反应

1) 反应液的配制 (在区域1进行)

除样品以外的下列组分配制成所需量 (用于制作标准曲线的标准样品数量+检测样品数量+NTC) $\times 1.1$ 倍。为Short Assay和Long Assay制备两种Master Mix。在反应管或反应板各分装18 μl , 轻轻地盖上盖子或密封。

[注意]为了避免产生荧光噪声, 请勿用手触摸反应管、反应板、盖子或密封件。

【不使用ROX Reference Dye时*1】

< Short Assay >

[每个反应]

试剂	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μl
● Short Assay Primer/Probe Mix	2.0 μl
⊕ _{H₂O} RNase Free H ₂ O	6.0 μl
样品 (或制作标准曲线的标准样品 或⊕ _{H₂O} RNase Free H ₂ O)	2.0 μl
Total	20.0 μl

< Long Assay >

[每个反应]

试剂	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μl
● Long Assay Primer/Probe Mix	2.0 μl
⊕ _{H₂O} RNase Free H ₂ O	6.0 μl
样品 (或制作标准曲线的标准样品 或⊕ _{H₂O} RNase Free H ₂ O)	2.0 μl
Total	20.0 μl

*1: 仪器型号

- Thermal Cycler Dice Real Time System系列 (Code No. TP1000/TP950等)
- CronoSTAR 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
- CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

- LightCycler 96 System/LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics)

【使用ROX Reference Dye时*2】

< Short Assay >

[每个反应]

试剂	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μ l
● Short Assay Primer/Probe Mix	2.0 μ l
● ROX Reference Dye II	0.4 μ l
⊕ RNase Free H ₂ O	5.6 μ l
样品 (或制作标准曲线的标准样品 或 ⊕ RNase Free H ₂ O)	2.0 μ l
Total	20.0 μ l

< Long Assay >

[每个反应]

试剂	使用量
○ 2X Premix FFPE QC	10.0 μ l
● Long Assay Primer/Probe Mix	2.0 μ l
● ROX Reference Dye II	0.4 μ l
⊕ RNase Free H ₂ O	5.6 μ l
样品 (或制作标准曲线的标准样品 或 ⊕ RNase Free H ₂ O)	2.0 μ l
Total	20.0 μ l

*2: 仪器型号

- QuantStudio 5 Real-Time PCR System (96孔, 0.1或者0.2 mL规格)
(Thermo Fisher Scientific)

2) 样品 (模板) 的添加 (在区域3进行)

在反应管或反应板上添加 ⊕ RNase Free H₂O (Negative Control)、制作标准曲线的标准样品 (3.3 × 10³ copies/ μ l、8.25 × 10² copies/ μ l、2.06 × 10² copies/ μ l、52 copies/ μ l、13 copies/ μ l)、样品DNA 2 μ l, 盖紧或密封。

3) 进行Real Time PCR

在以下条件下进行Real Time PCR反应。

[注意事项]

· 反应前瞬时离心反应管或反应板, 确认内壁没有附着反应液或气泡。如果存在气泡, 可能会影响荧光检测。

· 请提前接通Real Time PCR仪器的电源, 进行上盖的预热。

<反应条件>

Hold

95°C 30秒

PCR: 45 cycles

95°C 5秒

60°C 60秒 (荧光检测: FAM)

※在Thermal Cycler Dice Real Time System IV/III中, Speed选择Fast, 分析时请关闭归一化校正。归一化校正的设定变更方法, 请参照本公司的网站 (<https://www.takarabiomed.com.cn/>)。

● 实验结果分析

1. 反应结束后，确认扩增曲线及分析参数是否适当*，计算 Ct 值。
*：有关分析方法，请参阅使用的 Real Time PCR 仪器说明书。

<检测对象和荧光检测滤光片>

检测对象	荧光检测滤光片
Short Assay	FAM
Long Assay	FAM

2. 将标准品（DNA Standard FFPE QC 梯度稀释液）的拷贝数的对数值绘制在 x 轴上，将其浓度对应的 Ct 值绘制在 y 轴上，分别制作 Short Assay 和 Long Assay 的标准曲线。

<标准曲线评估点>

评估标准曲线的2个要点是斜率和线性。可以根据斜率计算PCR扩增效率，80~120%为适当范围。可以通过以下的公式来计算扩增效率。

$$\text{扩增效率}(E) = 10^{[-1/\text{slope}] - 1}$$

(x轴为初始模型的浓度(Log10)、y轴为获得的Ct值)

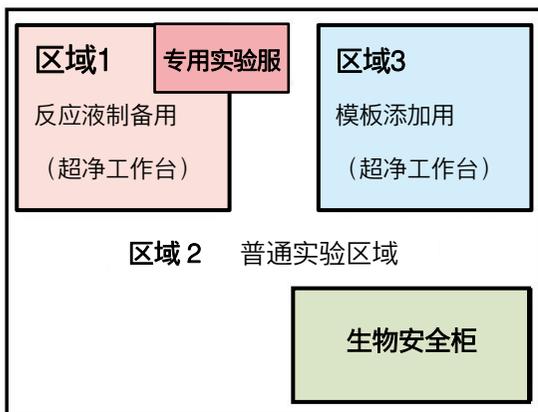
线性用相关系数 (r^2) 进行评估，其值最好在0.98以上。

3. 从2.的标准曲线中，根据各目标样品的 Ct 值计算 Short Assay 及 Long Assay 的定量值 (copies/反应)，求出 $n=2$ 的定量平均值。
4. 根据 Short Assay 的定量平均值，计算各 FFPE DNA 中的有效分子数 (copies/ μ l)。
 - 将由标准曲线确定的定量平均值除以 2 μ l (加入各 qPCR 反应的量)。
 - 乘以实验操作 1.中的稀释倍数，求出有效分子数 (copies/ μ l)。
5. 根据以下公式进行片段化评估 (Long/Short 比)。

Long/Short 比 = (Long Assay 定量平均值) / (Short Assay 定量平均值)

※Long/Short 比值以 0-1 进行评估，比值越接近 1 表示 DNA 的质量越高 (DNA 没有片段化)

● 补充：关于区域划分



- 区域 1：反应试剂配制区域
进行 Real Time PCR 反应液的配制及分装。
(无模板操作区)
- 区域 2：普通实验区域
进行样品的处理及 DNA 的制备。
根据需要设置生物安全柜。
- 区域 3：处理高浓度 DNA 的区域
在分装完成的反应液中添加模板 DNA。
待测样品和标准样品的稀释也在此进行。

● 关联产品

Thermal Cycler Dice™ Real Time System IV (Code No. TP1000/TP1010/TP1030)
 Thermal Cycler Dice™ Real Time System III (Code No. TP950/TP970/TP980/TP990)
 CronoSTAR™ 96 Real-Time PCR System (Code No. 640231/640232)
 NucleoSpin DNA FFPE XS (Code No. 740980.10/.50/.250)

Thermal Cycler Dice and CronoSTAR are trademarks of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品，或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站 www.takarabio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202507Da