

## 高效率的 Real-Time PCR System



Eco™ 48

Real Time PCR System

Eco 48 特色規格.....	2
Real-Time PCR 基本原理及應用介紹.....	6
RT 技術基本原理及應用.....	15
創世紀 qPCR master mix 產品.....	19
Primerdesign 品牌介紹.....	20
One step qRT-PCR 介紹.....	20
genesig®q16 規格.....	22
genesig®easy kit 介紹.....	23

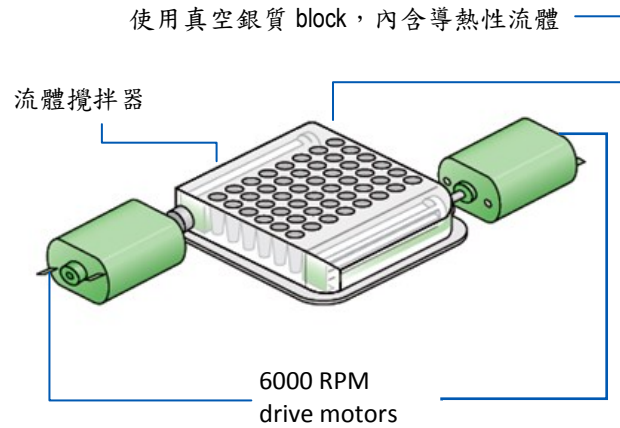


- ◆ 體積小：僅有 31x35x31cm，完全不佔實驗室空間
- ◆ 48 well 設計，搭配軟體可併盤分析，擴充 Throughput
- ◆ 升降溫速率高達 5.5°C/sec
- ◆ Block 均溫度業界最佳(± 0.1°C at 95°C)
- ◆ 偵測時間短：搭配 Fast qPCR reagent，40 cycles 僅需 40min
- ◆ 兩種激發光，搭配四組濾片可同時偵測 4 種不同螢光
- ◆ 能進行絕對定量、相對定量、SNP Genotyping，更內建 HRM 分析模式
- ◆ 軟體圖形化操作分析介面，直覺易上手
- ◆ 軟體提供不限安裝數
- ◆ 符合 MIQE 規範

支援高解析度解離曲線分析 (High Resolution Melt, HRM)	可, 且不需額外升級硬體或軟體。
加熱系統	單一制冷片系統 (液態介質循環控溫)
加熱模組型式	48 孔加熱模組
搭配耗材	48 孔反應盤及光學膜
反應體積	5-20µl
加熱模組	平均升降溫速率 5.5°C/秒
溫控區間	35-100°C
溫度均一性	± 0.1°C at 95°C
光學系統	電荷耦合元件照相機 (CCD camera)
激發光源	2 組發光二極體陣列 (LED array) 激發光波長 452-486 nm 及 542-582 nm
螢光通道 (channel)	四個濾鏡, 可偵測四個波段的訊號, 波長範圍分別為 505-545 nm、562-596 nm、604-644 nm、及 665-705 nm, 可支援 SYBR Green、FAM、VIC、HEX、ROX、Cy5 其他激發光及發射光波長在範圍內的螢光染劑。
數據收集	無需設定即可收集整個反應盤的數據 (四個濾鏡數據皆可收集)。可在反應結束後依數據分析需要更改反應盤設定。
反應時間 (40 cycles)	40 minutes
電力需求	電壓: 120-240VAC = 10% 頻率: 50/60Hz = 1% 最大電流: 8A 最大功率需求: 500W 一般功率需求: 180W
尺寸規格	關閉 (W x D x H): 34.5cm x 31cm x 32cm 開啟 (W x D x H): 34.5cm x 31cm x 36.8cm 重量: 13.6kg
軟體	Eco™ 系統軟體支援絕對定量、相對定量、等位基因辨別 (SNP Genotyping)、高解析度解離曲線分析 (HRM)。 檔案可輸出為 CSV、EXCEL、PDF 及 PowerPoint 格式。 圖檔可直接存為 BMP、JPG 及 PNG。
產品內容物	Eco Instrument、Eco Dock、Plate、Sealing film、筆電(選配)

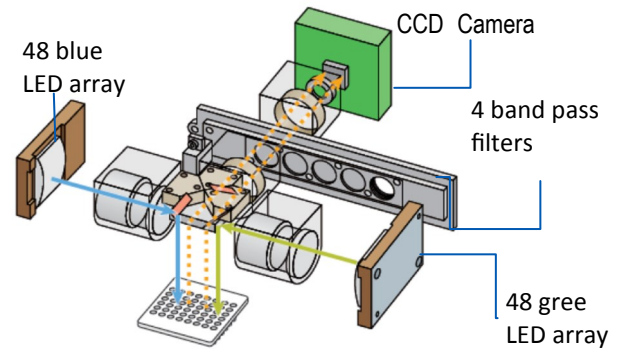
## 新一代溫控系統

Eco 48 Real-Time PCR System 使用真空銀質 block，內含導熱性流體，經流體攪拌器帶動均勻導熱，除了升降溫速度高達  $5.5^{\circ}\text{C}/\text{sec}$  外，更有效的將 well 均溫度降低至  $0.1^{\circ}\text{C}$ 。新一代的溫控系統能使實驗再現性高，在 HRM 分析時分辨 SNP Class IV (A/T,  $T_m < 0.2^{\circ}\text{C}$ ) 的效能更好。



## 高速且靈敏的光學系統

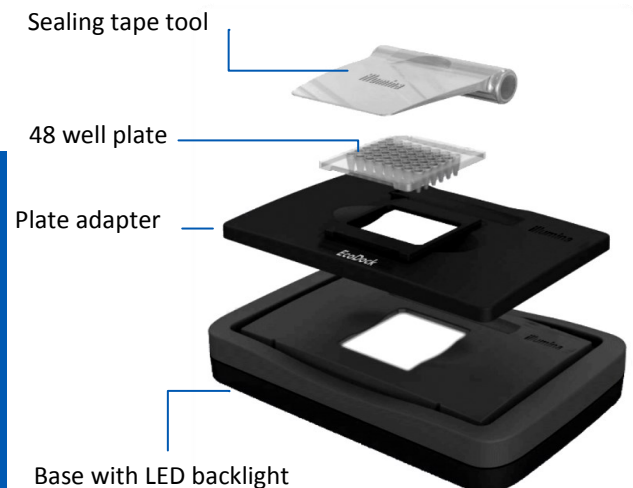
- ◆ Eco 48 Real-Time PCR System 使用 2 組 LED array 作為激發光源，螢光訊號經過 4 組不同的光學濾鏡，支援 SYBR Green、FAM、VIC、HEX、ROX、Cy5 及其他相同波長的螢光。
- ◆ Adaptive LED Control (ALC) 系統校正輸出光源，
- ◆ 以高速 CCD Camera 接收並轉換為螢光訊號，48 well 訊號同時擷取，well 間偵測沒有時間差，螢光偵測速率高達每分鐘 40 detections，因此 Melting Curve 只需要 3min 即可完成。



Channel	Excitation	Emission	Example Fluorescents Detected
1	LED 1 (452-486 nm)	505-545 nm	SYBR Green, FAM
2		604-644 nm	ROX, Texas Red, TAMRA
3	LED 2 (542-582 nm)	562-596 nm	HEX, JOE, TET, VIC
4		665-705nm	Cy5, Quasar 670

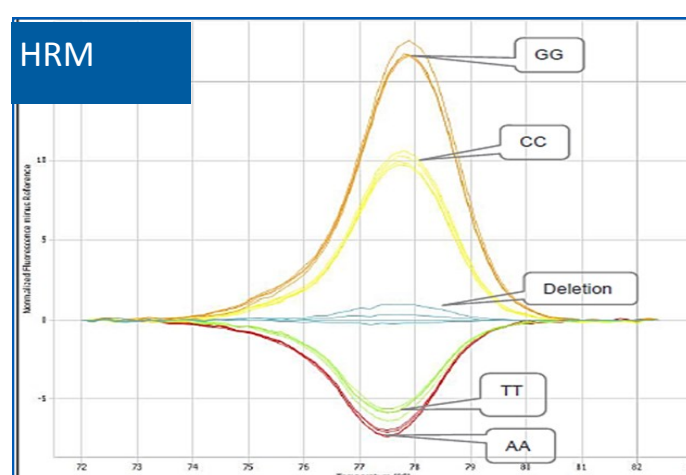
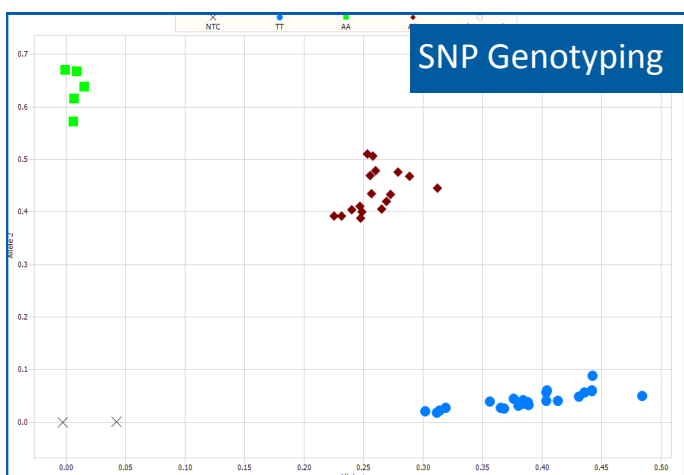
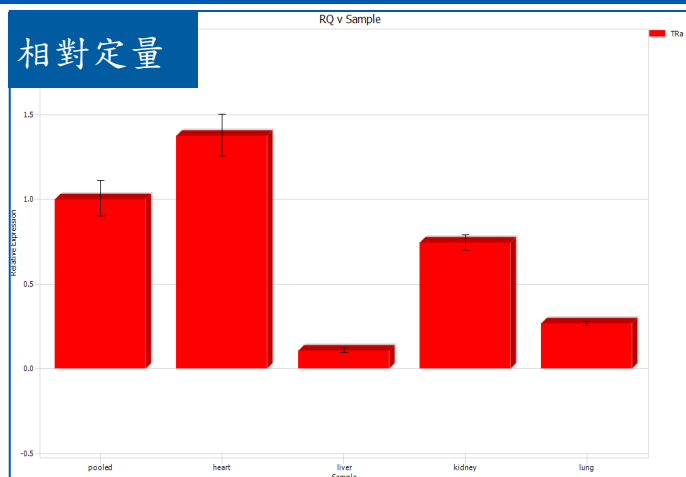
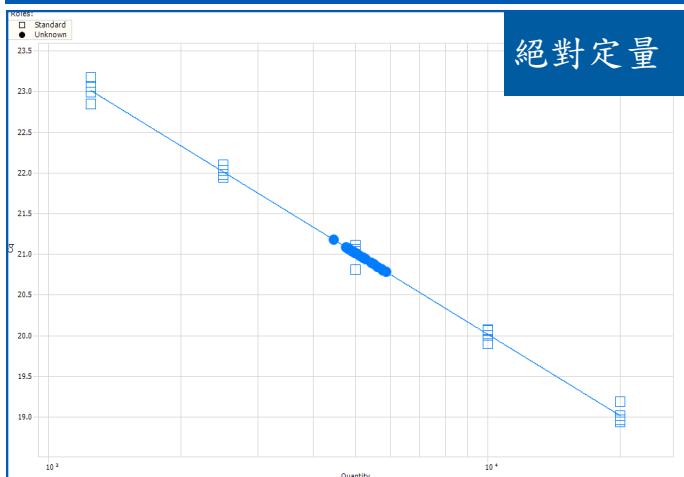
## 與 384 well plate 規格相容的 48 well plate 反應盤

- ◆ 內附 Eco Dock，具有 LED 背光，能讓 sample loading 更加便利。
- ◆ Plate adapter 與 96 well plate 尺寸相同，sample loading 後可直接移至 96well plate 離心機排除氣泡。
- ◆ 每個 well 容量為 20uL，建議反應體積為 10~20uL (最少反應體積為 5uL)
- ◆ 附 sealing tape tool，封膜更容易。



# 多樣的分析應用

PCR max Eco 48 Real-Time PCR System 能進行絕對定量、相對定量、SNP Genotyping 及 HRM，能滿足你四種分析應用的需求。



## Real-Time PCR 儀器性能大車拼

	Idaho LS32	Roche LC Nano	Bio-Rad MiniOpticon	ABI StepOne / StepOne Plus	<b>PCRmax Eco 48</b>	ABI 7500 Fast	Bio-Rad CFX96 Touch	Roche LC480
均溫性	—	± 0.1°C	± 0.4°C	± 0.5°C	<b>± 0.1°C</b>	± 1°C	± 0.4°C	± 0.4°C
反應時間	30min	<50min	~ 120min	<120min	<b>40min</b>	<120min	~ 90min	~ 90min
channels	4	2	2	3 / 4	<b>4</b>	5	6	6
樣本數	32	32	48	48 / 96	<b>48</b>	96	96	96/384
HRM	include	include	—	upgrade	<b>include</b>	upgrade	include	include
Size (Cu ft)	1.8	0.53	0.68	1.9 / 2.29	<b>1.2</b>	2.65	5.05	7.17

另有 Eco 48 Real-Time PCR System 體驗計畫，請聯絡各區業務代表

# Real-Time PCR 基本原理及應用介紹

## What is Real-time PCR

Real-time PCR，顧名思義，可以將之視為兩個部份，及“Real-time”和 PCR。藉由 PCR 擴增的原理，使極微量的 DNA 放大，並經由光學系統，達到即時偵測(Real-time)的目的；經由每一次 PCR 擴增循環，將其生成反應產物之螢光數值記錄下來，待反應全部完成之後，將每個檢體的 cycle number 與 PCR 產物的螢光數值相關位置做圖，可得到一反應曲線圖形，完整的呈現 PCR 反應中每一個 cycle 中 PCR 產物的生成情形。

## PCR vs. Real-time PCR

一般的 PCR 反應，利用熱循環(thermal cycle)步驟，以熱穩定性核酸聚合酶(ex: Taq)擴增 DNA 特定片段，理論上經過 30 cycles 的擴增 PCR 產物為原始量的  $2^{30}$  倍( $>10^9$  倍)，再利用洋菜膠電泳(agarose gel electrophoresis)進行結果分析。我們可以經由產物的片段大小、擴增後產物生成量等等條件來判斷實驗結果是否成功。又因為我們是分析反應終了後的產物，對於反應過程並沒有做任何分析、記錄，故一般 PCR 反應又可稱為 End-point PCR。

一般的 PCR 反應雖然可藉由洋菜膠電泳分析，並經由膠體影像擷取系統進行分析，但是電泳影像常因為 DNA 染劑的染色效果、電泳膠體的螢光背景值、影像系統曝光值設定等因素，造成每次拍照條件呈現的結果無法完全一致，並使得後續對核酸定量有相當的誤差。

Real-time PCR 和 End-point PCR 一樣是利用熱循環步驟使微量 DNA 樣本進行擴增達到放大的目的，但是最後並不是以洋菜膠電泳進行結果判讀，而是在反應中加入 DNA Binding Dye 或是螢光探針 (Fluorescent Probe)，並針對每個 cycle 所產生的螢光量進行偵測。理論上 PCR 產物隨著 cycle 增加，而螢光數值也伴隨著 PCR 產物一起增加；Real-time PCR 會紀錄每一個 PCR cycle 中螢光數值的情形，藉由分析 PCR cycle 與螢光數值這兩個因素之間的相對關係，來進行實驗結果的判讀。所以相較於 End-point PCR，Real-time PCR 較重視 DNA 樣本的增幅過程，而非擴增反應最終的產物量。

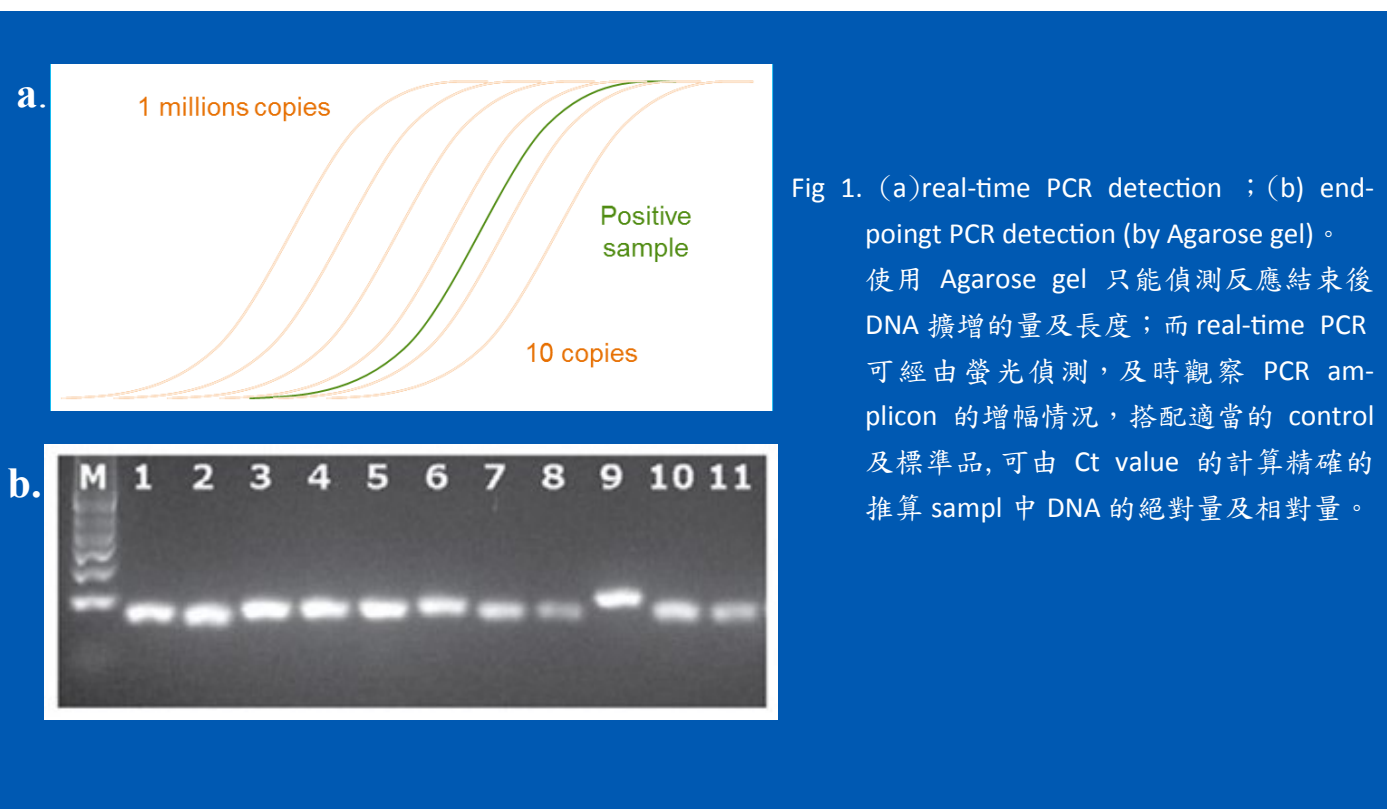


Fig 1. (a)real-time PCR detection ; (b) end-point PCR detection (by Agarose gel)。使用 Agarose gel 只能偵測反應結束後 DNA 擴增的量及長度；而 real-time PCR 可經由螢光偵測，及時觀察 PCR amplicon 的增幅情況，搭配適當的 control 及標準品，可由 Ct value 的計算精確的推算 sampl 中 DNA 的絕對量及相對量。

## Ct value

在進行 Real-time PCR 結果分析時，一定常聽到 Ct value (threshold cycle, 或稱為 Cq value、Cp value) 這個名詞，這是指 PCR 反應樣本擴增之生成量能夠通過閾值(threshold)之相對應 cycle number。由上述的定義，我們可以發現，要先定義閾值，才可以得到 Ct value。在一 Real-time PCR 擴增曲線中，我們在選取閾值之前，我們必須要先了解整個 PCR 反應過程中產物生成量的變化，才能選取適合的閾值(threshold value)來當做我們的定義值。

理論上 PCR 反應是以最佳效能  $2^n$  進行擴增，若是以擴增 30 cycles 為例，產物會以  $2^1$ 、 $2^2$ 、 $2^3$ 、 $2^4$ 、..... $2^{30}$  進行對數增加。但是實際上，初期的反應因為 DNA 樣本數過少，故無法

達到此理論值。而後期的反應，因為酵素活性降低、primer 耗盡等種種因素，導致整個 PCR 反應無法達到最佳效能，而無法以對數進行擴增。所以，整個 PCR 反應只有中段的部分是以理論值進行反應。當 PCR 以理論值進行對數擴增時，其具有高精度與高再現性等特徵，最能夠代表 PCR cycle 與生成產物的相對關係。實務上，由軟體紀錄而繪製的曲線圖形中，該如何判斷哪個部分為理想中的 PCR 擴增區段呢？我們可以在分析軟體中以 cycle number 對 fluorescence log value 進行做圖。整個圖形中呈現直線關係的區段，即表示反應產物以理論值進行對數增加，我們就可以將“閾值(threshold value)”定義在此區段即可。當產物的生成量達到此 threshold value 時，其相對應的 cycle number 即為 Ct value。

除了利用 PCR 的原理來判斷 Ct value，目前市面上所販售的 Real-time PCR 儀器，其分析軟體皆有 auto Ct 之功能。以 2nd derivative maximum method 為例，軟體將曲線圖形轉換為數學方程式後，再利用二次導數過後的結果產生一極大值，此極大值所對應的 cycle number 即為 Ct value。不論是利用 PCR 的原理做為基礎或是使用 auto Ct 來計算 Ct value，均各自有優點及缺點，各位可以參考 reference 或是實驗室傳承下來的經驗，來決定最符合實驗需求的分析方法。

## Ct value 與 data 分析

Real-time PCR 又稱做 quantitative PCR(qPCR)，故實驗結果主要用來分析同一基因在不同樣本中之含量。試想，在兩個不同的樣本中偵測同一個基因，一個所含的 copy 數較多，另一個較少，在相同擴增條件下，那一個樣本會先進入我們所設定之 threshold value 呢？換句話說，那一個樣本擴增較少的次數之後就可以達到設定之 threshold value 呢？沒錯，樣本中起始 copy 數較多時，會較快達到 threshold value，故 Ct 值較小；換句話說，Ct 值較小的樣本，其起始之 copy 數越多。所以，Ct value 越小，起始 copy 數越多，Ct value 越大，起始 copy 數越少。

要注意的是，即使 Ct value 與 copy 數是呈高度負相關，但是每次的 Real-time PCR Ct value 皆視為一獨立數據，並不適合將分屬兩次實驗的 Ct Value 進行比較，最主要原因是每次實驗的閾值(threshold)可依據當時實驗需求或軟體判斷進行調整，即使放入相同 copy 的待測基因，在兩次不同的 real-time 實驗中也會得到不同的 Ct value；因此每次 real-time PCR 實驗都應該視為獨立數據，放入相對應的 standard 或 control，才能夠避免被閾值左右實驗結果造成誤判。

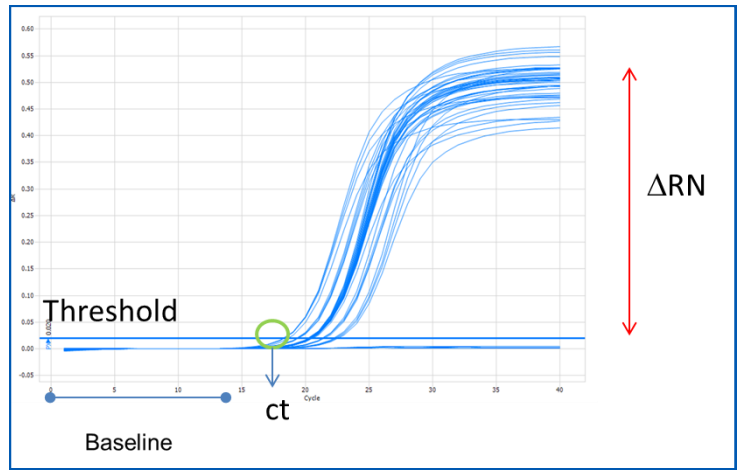
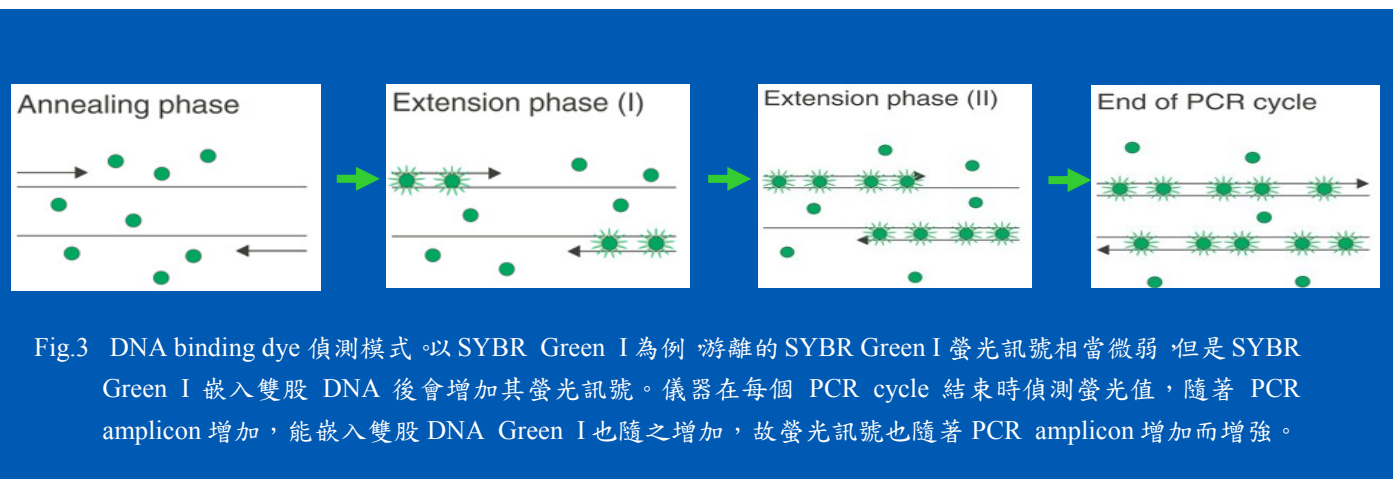


Fig.2 Ct value 的計算方式。一般 Real-time PCR 的 Ct value 需要經過數個步驟計算：(a)決定 Base-line region；(b)計算  $\Delta R_n$ ，也就是將各個 cycle 扣除 base-line 後的螢光值；(c)決定 Threshold。經軟體計算後，Threshold 與螢光值交叉位置所相對應的 PCR cycle 數值，即為 Ct value。

## Real-time PCR 偵測模式

要如何即時偵測產物變化量呢？當然是偵測每個 cycle 的螢光量並進行記錄，目前常用的方法可大致分為兩大類：DNA binding dye 及 fluorescent probe。分述如下：

**DNA binding dye**：DNA binding dye 是利用螢光物質嵌入雙股 DNA，並經由激發偵測其螢光量；理論上隨著 cycle 數增加 PCR 產物越多，嵌入 PCR 產物的 DNA binding dye 也越多，每個 cycle 能偵測的螢光量也會隨之增加。目前市面上最常用於 real-time PCR 的 DNA binding dye 包括 SYBR Green I 及 EvaGreen，其激發(excitation)波長為 488~500nm，散發(emission)波長為 517~530 nm，藉由與雙股 DNA 結合後，其螢光訊號能增加 800 倍以上。在 PCR 反應的過程中，隨著雙股 DNA 含量的增加，與 DNA 結合的 DNA binding dye 亦增加，螢光訊號即隨之增加。但是，需要特別注意一點，DNA binding dye 與 DNA 的結合為非專一性，因此只要是 primer dimer 或是非專一性產生的 PCR 產物都可能與 dye 結合，因此實驗前必須先確定 primer 對 PCR 產物的專一性，或是在 real-time PCR 中搭配 melting curve analysis 確認是否有 2 個以上的 PCR 產物，否則很容易造成 real-time data 的誤判。



常見的 DNA binding dye 包括 SYBR Green I 與 EvaGreen，兩者所使用的激發光與散發光波長相近（皆屬於綠光），在 real-time PCR 儀器設定上可使用同一個 channel。SYBR Green I 與 EvaGreen 都有低背景值的優點，皆適用於 real-time PCR 的偵測；但是 SYBR Green I 具有抑制 PCR 作用的缺點，因此一般的 master mix 中的 SYBR Green I 含量相當低，在 melting curve 分析中只能觀察是否有 primer dimer 或 non-specific PCR product 產生。

EvaGreen 屬於最新一代的 DNA binding dye，與 SYBR Green I 的比較如下：

- ▶ 沒有 PCR 抑制效果，與 SYBR Green I 相比更適用於 fast real-time PCR，大幅縮短反應時間
- ▶ 應用於 real-time PCR 的濃度比 SYBR Green I 高，在相同的條件下能獲得更亮的螢光訊號
- ▶ 可用於 HRM 分析，進行 SNP 分型或其他應用

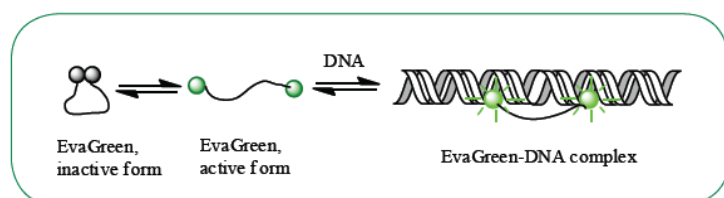


Fig.4 EvaGreen 未與 DNA 結合前是形成 dimer 不發光的狀態；只有與 DNA 結合才會形成 active form 被激發發光。



**Probe system**：依據不同的系統，probe 又可以分為數種不同的模式，但是基本的原理為利用 PCR 產物的序列來設計一段互補的核酸探針，並在探針上進行螢光修飾，利用 FRET (Fluorescence resonance energy transfer，螢光能量轉換)原理使探針在與 PCR 產物結合後，造成散發光(emission light)波長的改變，隨著產物的增加，改變後的散發光強度也隨之增強，進而達到及時針測的目的。使用探針系統的優勢是具有較好的專一性，不用擔心 non-specific binding 的問題，且可以藉由不同的螢光波長及探針的配合，對於同一樣本同時進行多目標偵測(multiplex detection)；其缺點為實驗成本較高，且需要花費較多的心力對於探針的效能進行確認。

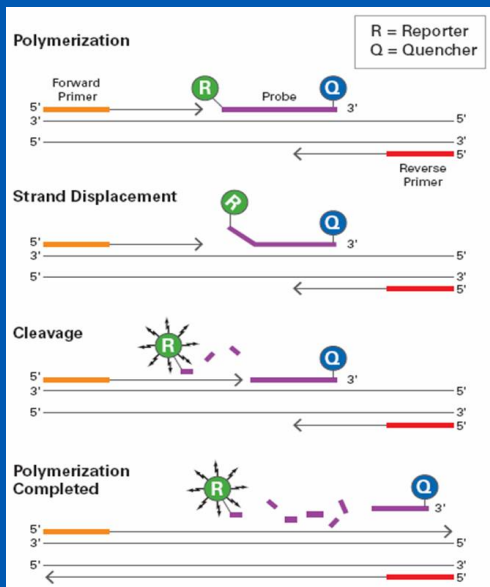


Fig.5 Hydrolysis Probe 偵測模式

Hydrolysis Probe (或稱為 Taqman-style Probe) 是目前最常使用的 probe detection system。使用 hydrolysis probe detection 需要設計 forward primer reverse primer 及 probe，其中 probe 分別在 5' end & 3' end 分別接上 reporter dye 及 quencher。依據 FRET 原理，當 reporter dye 與 quencher 距離相近時，reporter dye 散發的螢光會被 quencher 吸收而無法偵測。如果 hydrolysis probe 能夠正確附著在 target gene 上，Taq polymerase 上的 5' → 3' exonuclease activity 會將此段 probe 水解，使得 reporter dye 與 quencher 分離，並在每個 PCR cycle 結束後偵測其螢光值。

如果 target gene 的 PCR amplicon 增加，被水解的 probe 也隨之增加，相對的偵測的螢光值也隨著 cycle 數增加。

## Real-time PCR 分析模式

常見的 real-time PCR 分析模式包括：

- 絕對定量(Absolute quantification)
- Melting Curve
- 相對定量(Relative quantification)
- SNP Genotyping
- HRM (High Resolution Melting)

以下我們將針對這些分析方式進行介紹：

### 絕對定量(Absolute quantification)

絕對定量，即針對樣本作絕對的量化。先利用標準品作標準曲線，再比較樣本與標準品的相對關係，所呈現的實驗結果，依據使用標準品的不同，通常以濃度 ng/ml mg/ml 或是計量單位 ng pg copy number 等作為表示。一般進行絕對定量時要注意的是標準曲線的斜率與相關係數( $R^2$ )，一般能接受的斜率範圍為-3.0 ~ -3.6 (相對應的 PCR efficiency 為 90%~110%)，而相關係數( $R^2$ )則是越接近 1 越好。如果初期的標準曲線斜率與相關係數不如預期，是可以藉由刪減不適合的標準品、或是調整閾值使得方程式修正至可使用的範圍；若方程式無法修正，只能重新設計 primer 或是更改標準品來改進。

絕對定量常用於臨床診斷，如 HBV、HCV 的檢測。

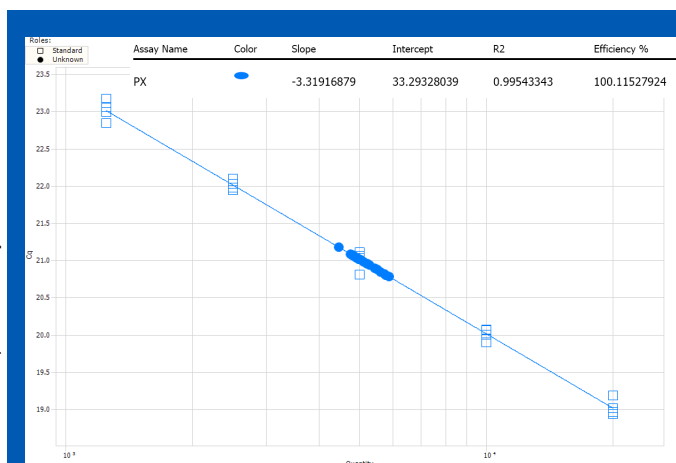


Fig.6 以 standard curve 進行絕對定量。上圖是偵測 PX gene，標準品分別為 20000 copies、10000 copies、5000 copies、2500 copies 及 1250 copies，每一個標準品做 4 重複，並計算其 standard curve 方程式。PCR efficiency 為 100.11%，相關係數為 0.995。待測品可根據其 Ct value 計算出 copies 數。

## Melting curve 分析

在進行 Real-time PCR 實驗時，我們該如何確認 PCR 產物的專一性？此時，我們可以利用 DNA 半解離溫度( $T_m$  value)的特性判斷，若是只有單一的產物，理論上半解離溫度均相同。但是當有第二組半解離溫度出現，不論是 PCR 產物的不專一或是 primer dimer 的形成，均會造成 Ct value 的誤判。Melting curve 只能使用在在使用 DNA binding dye 的系統時，只要是使用 DNA binding dye 進行 real-time PCR 偵測，或是設計新的 probe 實驗前，皆需要進行 melting curve 的分析。

Melting curve 分析都放在 real-time PCR 的 cycle 結束後，由 55~60°C 加熱至 95°C，偵測每一個溫度的螢光量，並將其數值轉換為每個溫度的螢光變化量( $dF/dT$ )，而螢光變化量最高的位置即為此 PCR 產物的  $T_m$  值。

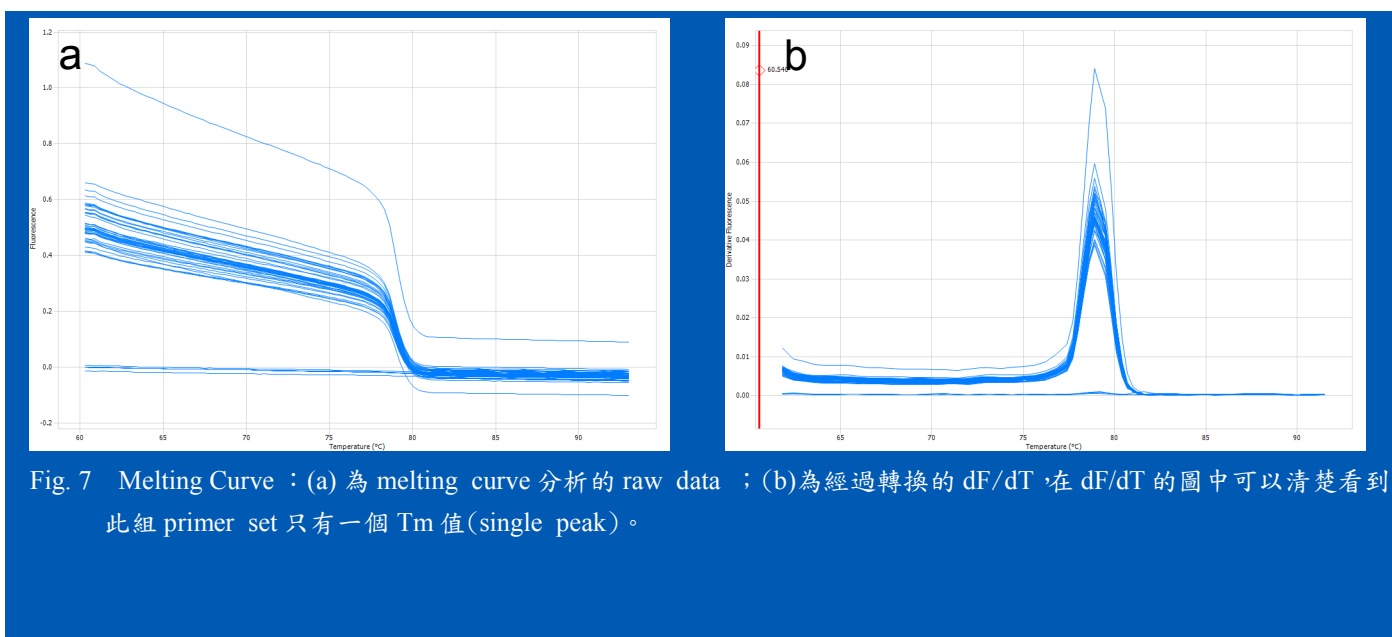


Fig. 7 Melting Curve : (a) 為 melting curve 分析的 raw data ; (b) 為經過轉換的  $dF/dT$  , 在  $dF/dT$  的圖中可以清楚看到此組 primer set 只有一個  $T_m$  值(single peak)。

## 相對定量(Relative quantification)

相對定量實驗不需要標準曲線的存在，所以實驗結果通常以”倍數”(n-fold)表示。實驗的設計上通常會包含三個數值，基準點(calibrator)、實驗點及內部校正點(internal control)。，一般的計算方式如下：

1.  $Ct$  of Target gene –  $Ct$  of reference gene =  $DCt$

先以 reference gene 做為內部校正點，分別將基準點  $Ct$  與實驗點  $Ct$  消去各樣品中的 reference gene 的  $Ct$  值。其目的為消除各 sample 之間非實驗所產生的差異，如樣本細胞數不同、pipetting error 等等，再將實驗點與基準點作比較。

2.  $DCt$  of Sample -  $DCt$  of Calibrator =  $DDCt$

以加藥試驗為例，可以將未加藥當作 Calibrator，加藥後 2、4、8、16 小時設為不同實驗點進行比較，此時將各時間點的  $DC$  消去  $DCt$  of Calibrator 即可得到與基準點相對應的  $DDCt$ 。

3. 帶入公式  $2^{(-DDCt)}$ ，計算相對倍率

將  $DDCt$  帶入公式後，得到的數據即為實驗點與基準點間基因的相對倍率。

在進行相對定量實驗前，必須先確定 reference gene 與 target gene 兩者之 PCR efficiency 相差不遠，才可進行後續的分析。

Table. 1 相對定量範例

下表針對不同組織內的 TRa gene 進行相對定量偵測。實驗中使用 B2M 作為 reference gene、pooled cDNA 做為 calibrator 進行相對定量。 $\Delta\Delta Ct$  經過轉換得到的 ratio 值即為各組織相對於 pooled cDNA 內 TRa 的相對比例。

	TRa Ct Mean (Target gene)	B2M Ct Mean (Reference gene)	$\Delta Ct$ (Target - Endo)	$\Delta\Delta Ct$ (Sample - Reference)	Ratio
Pooled cDNA (Calibrator)	28.11	23.23	4.88	—	1
Heart	28.59	24.16	4.43	-0.45	1.37
Kidney	27.82	22.51	5.31	0.43	0.75
Liver	31.44	23.35	8.09	3.21	0.11
Lung	29.24	22.46	6.78	1.9	0.27

### SNP Genotyping

SNP genotyping 是針對 SNP 位置設計 2 組 probe，這兩組 probe 除了 SNP 序列差異外，也分別在這 2 組 Probe 上標定不同螢光(Ex: FAM & VIC)。若待測物為 Homozygous Wild Type or Homozygous Mutant，則只有其中 1 組 probe 能偵測的到；如果是 Heterozygous，則 2 組 probe 可同時偵測得到 target gene。SNP genotyping 常應用於遺傳疾病偵測或是族群研究。

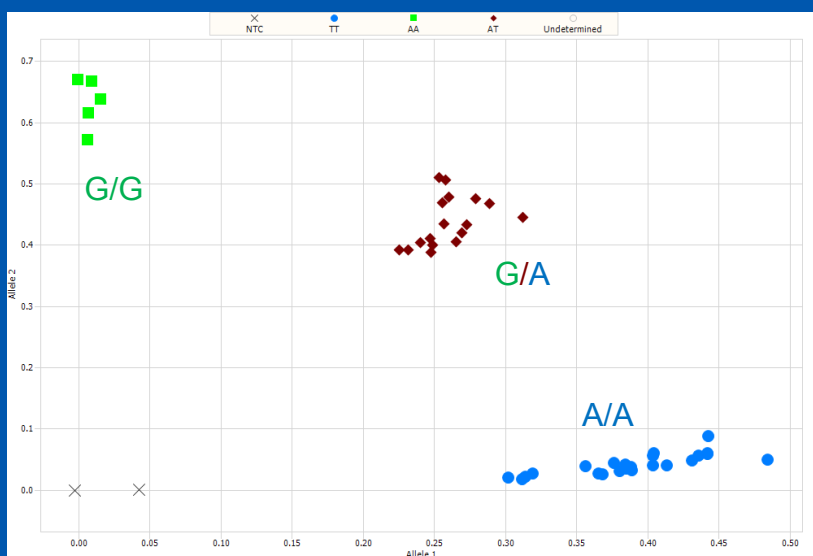


Fig.7 使用 probe 進行 SNP genotyping。其中偵測“A”的 probe label VIC；偵測“G”的 probe label FAM。經過 real-time PCR 偵測，軟體自動將待測物分群為 A/A、T/T 及 A/T (heterozygous)。

## HRM 分析

High Resolution Melting Analysis(高解析度融點分析,HRM)是新一代的 real-time PCR 偵測技術,其特點是可快速、大量的分析基因序列的突變或變異,讓研究人員能夠快速的針對基因變化的部分做篩選或分類(例如 SNPs)、發現基因變異(gene scanning)、或是確認族群內的基因變異。

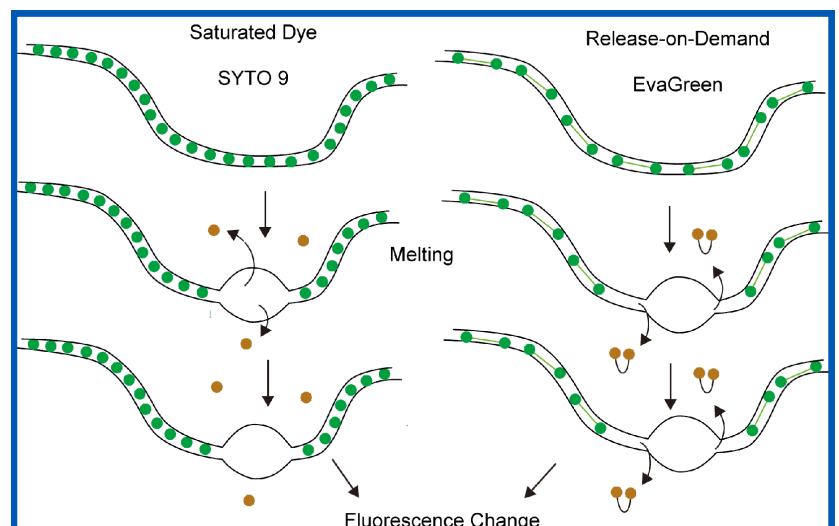
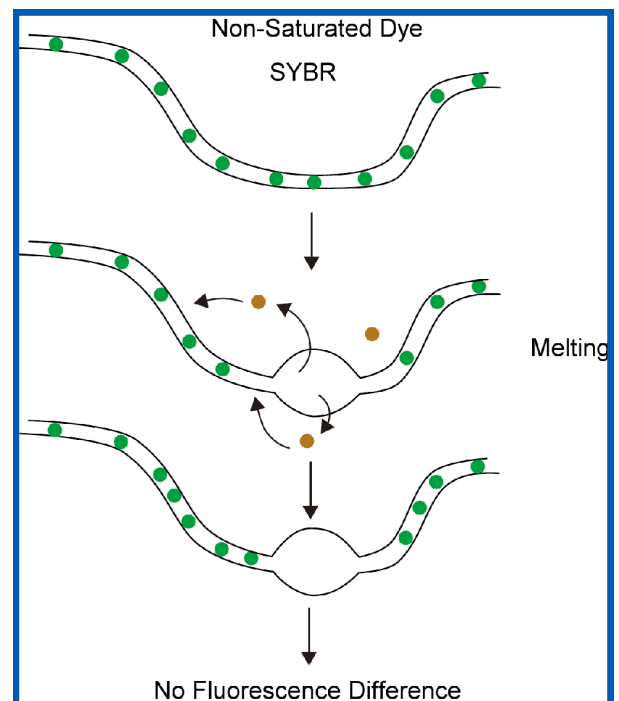
進行 HRM 的第一個步驟是使用 PCR 方式將待測基因區段放大,並使用特定的 dsDNA Binding Dye 染色,這時候可偵測到高度的螢光數值;待 PCR 放大至足夠的螢光量時,開始對這個 PCR 反應進行融點曲線分析(Melting Curve)。事實上,HRM 就是高解析度的 Melting Curve,可以分辨  $T_m=0.1^{\circ}\text{C}$  的差異,因此即使是 SNP Class IV A/T ( $T_m<0.2^{\circ}\text{C}$ )也可以區分;以實驗成本來說,dsDNA binding dye 比起 Probe 相對便宜,而且在前製作業上不需要完整的核酸序列即可進行,故非常適合作為大量檢體篩選之用。

### 選擇適合 HRM 的 DNA Binding Dye

一般最常使用的 DNA Binding Dye - SYBR Green I 並不適合用於 HRM 的實驗,原因是 SYBR Green I 在高濃度下會抑制 PCR 反應,而在低濃度時是屬於 non-saturated dye。Non-saturated dye 在 DNA melting 的過程中雖然會釋出,但是很快的又會嵌入沒有 dye binding 的位置,因此在進行 HRM 時使用 non-saturated dye 是無法觀察螢光值相對於溫度的細微變化。

適用於 HRM 的為 saturated dye (ex: SYTO9)或是"release-on-demand" dye (EvaGreen)。Saturated dye 不會抑制 PCR polymerase 活性,因此可放入 master mix 的濃度較 SYBR Green I 高,以確保 DNA binding dye 能嵌入 dsDNA 中所有的位置;由於所有 DNA binding dye 已飽和,隨溫度增加而釋出的 dye 不會再嵌回 dsDNA,在進行 HRM 分析時可觀察到細微的  $T_m$  變化。

"release-on-demand" dye (EvaGreen)是新一代的 DNA binding dye,其使用濃度與 non-saturated dye 相近,因此不會抑制 PCR polymerase 活性,且背景值也與 SYBR Green I 一樣低;而進行 melting 時,游離的 EvaGreen 也不會再回到 dsDNA binding,非常適合 HRM 分析使用。



## HRM 實驗設計注意要點

### DNA Sample

- ▶ 建議所有的 DNA sample 都應該使用同一套 extraction kit 進行純化，避免不同 kit 造成 HRM 分析結果差異。
- ▶ 進行 HRM 分析時，建議的 gDNA 起用量為 10ng~20ng，如果是 plasmid DNA 起用量可低於 1ng。DNA sample 經過 PCR 增幅後可達到足夠進行 HRM 分析的螢光量，螢光量越多，解離的區間越大，其解析度也越好。
- ▶ 進行 HRM 時一定要放入 positive control，包括 homozygous wild type、homozygous mutant 及 heterozygous，positive control 在 HRM 反應中可做為基準線，作為圖形分析判斷標準。

### Primer 設計與合成

- ▶ HRM primer 設計原則與一般 real-time PCR 原則相似，除了要針對基因片段進行設計，更要盡可能避免 primer dimer 的產生。
- ▶ 委託合成 primer 一定要進行 HPLC-purification，只有 HPLC 才能將 primer 合成時殘留的鹽類完全移除，避免干擾 HRM 分析。

### Amplicon 片段長度

- ▶ 進行 HRM 實驗設計時必須先考慮 amplicon 長度，一般來說如果是一個 nucleotide (SNP) 的變化，在 50~250bp 的區間內是可以 HRM 偵測其  $T_m$  的差異，雖然 amplicon 的片段越短越容易偵測其  $T_m$  變化，最後的螢光值也相對於長片段 amplicon 來的低，操作者必須依實驗需求決定 amplicon 的長短。
- ▶ 在進行族群研究時，常有多個核酸變異點座落於同一段基因中，此時可適當延長 amplicon 長度 (>400bp)，減少 primer set 設計的需求。

## HRM 分析流程

### PCR 增幅

此步驟與一般 PCR 步驟相同，其目的是將待測基因增幅至適合進行 HRM 分析的螢光量。在 PCR 增幅步驟中，可以用一般 end-point PCR 方式進行增幅再加入 DNA binding dye，或者是直接使用 real-time PCR 進行增幅。以 real-time PCR 增幅的好處是可即時監控每個 cycle 所產生的螢光量，做為未來調整實驗的依據。

### Raw Melting Curve Data

在 PCR 增幅待測基因後，緊接著就是進行 melting curve 偵測，在 HRM 的分析中建議先進行 95°C denature 及 55°C annealing 以產生 heterozygous miss-match，再由 55°C 升溫至 95°C 進行 HRM 偵測（每 0.1°C 偵測一次螢光訊號）。在進行 HRM 偵測時可以觀察到由 55°C 至接近  $T_m$  值前 (pre-melt) 會有一段等量的螢光衰減，而通過  $T_m$  後螢光值會呈現背景值至 95°C (post-melt)。由於 pre-melt 及 post-melt 的螢光值都會干擾 HRM 的分析，因此在軟體分析時在 pre-melt 及 post-melt 各設定一段 normalization region 作為 HRM 分析的起點 (pre-melt normalization region) 與終點 (post-melt normalization region)。

## Normalization data

在 HRM 分析軟體中設定 normalization region 後，軟體會自動將分析區間的螢光值由 100~0 做重新分配，此時 amplicon 螢光的強弱會決定 HRM 的解析度，當螢光值極高，normalization 後的解析度也會跟著提高，也更能夠辨識其螢光曲線的差異。

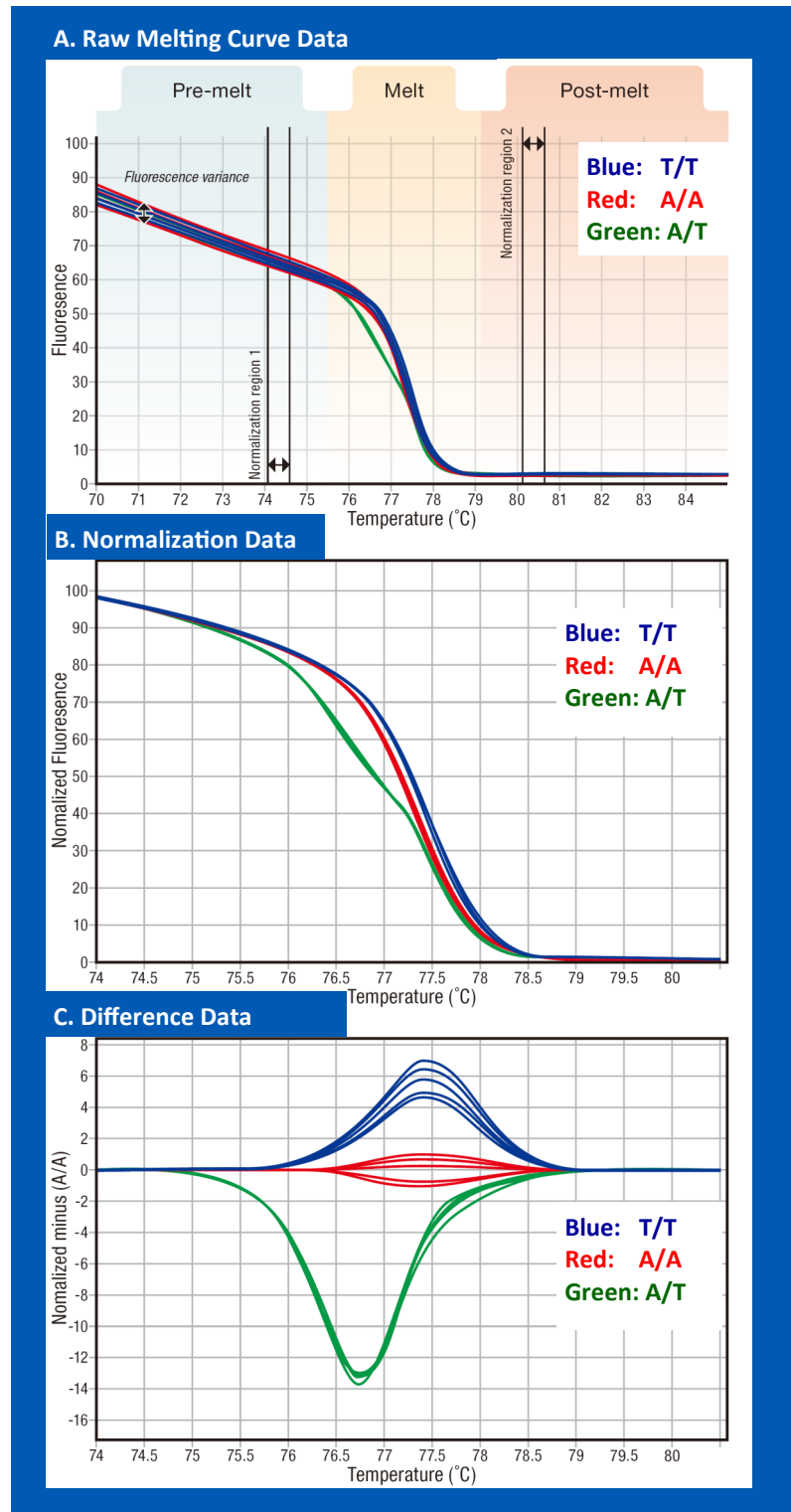
## Difference data

雖然 normalization data 可以分辨 homozygous 與 heterozygous 的螢光差異，但是 homozygous wild type 與 homozygous mutant 在 SNP Class IV (A/T) 仍無法準確辨識，此時可使用 difference data 增加其辨識度。Difference data 是先設定一個 sample 做為基準點(reference)，將所有 sample 的每個溫度點螢光數據扣除基準點後所產生的螢光曲線變化。以 SNP Class IV (A/T) 為例，若我們將 homozygous A 設為基準點，此時 homozygous A 在每一溫度點的螢光變化值為 0，故所有 homozygous A sample 所產生的螢光變化也會趨近於 0；但是 homozygous T 的 T<sub>m</sub> 值較 homozygous A 高，故進行 difference 時，每個溫度點 homozygous T 螢光扣除 homozygous A 後會形成正螢光值曲線，根據其曲線分佈即可分辨 homozygous A 與 homozygous T。

## 結語

上述的幾個主題，為 Real-time PCR 常見的項目，在此為各位讀者做基礎的介紹。更深入的實驗技術，如 probe 的設計、data 的分析、實驗條件最佳化、及儀器的基礎原理、試劑耗材的選擇等，若是各位讀者有興趣，歡迎您隨時來信或來電，我們將盡全力提供您所需要的資訊。

創世紀生技公司同時提供最專業的 real-time PCR instrument、master mix、pathogen detection kit 以及 HRM 相關試劑，我們將竭誠的為您服務。



## RT 技術 基本原理及應用介紹

反轉錄酶(Reverse transcriptase)是一種存在於一些 RNA 病毒中具有反轉錄活性、能以單股 RNA 為模板來進行雙股 DNA 合成的酶，並且由反轉錄酶催化所合成的雙股 DNA 稱為 cDNA (complementary cDNA)。

反轉錄酶是由美國威斯康星大學麥迪遜分校中霍華德·馬丁·特明 (Howard Martin Temin)在勞氏肉瘤病毒中

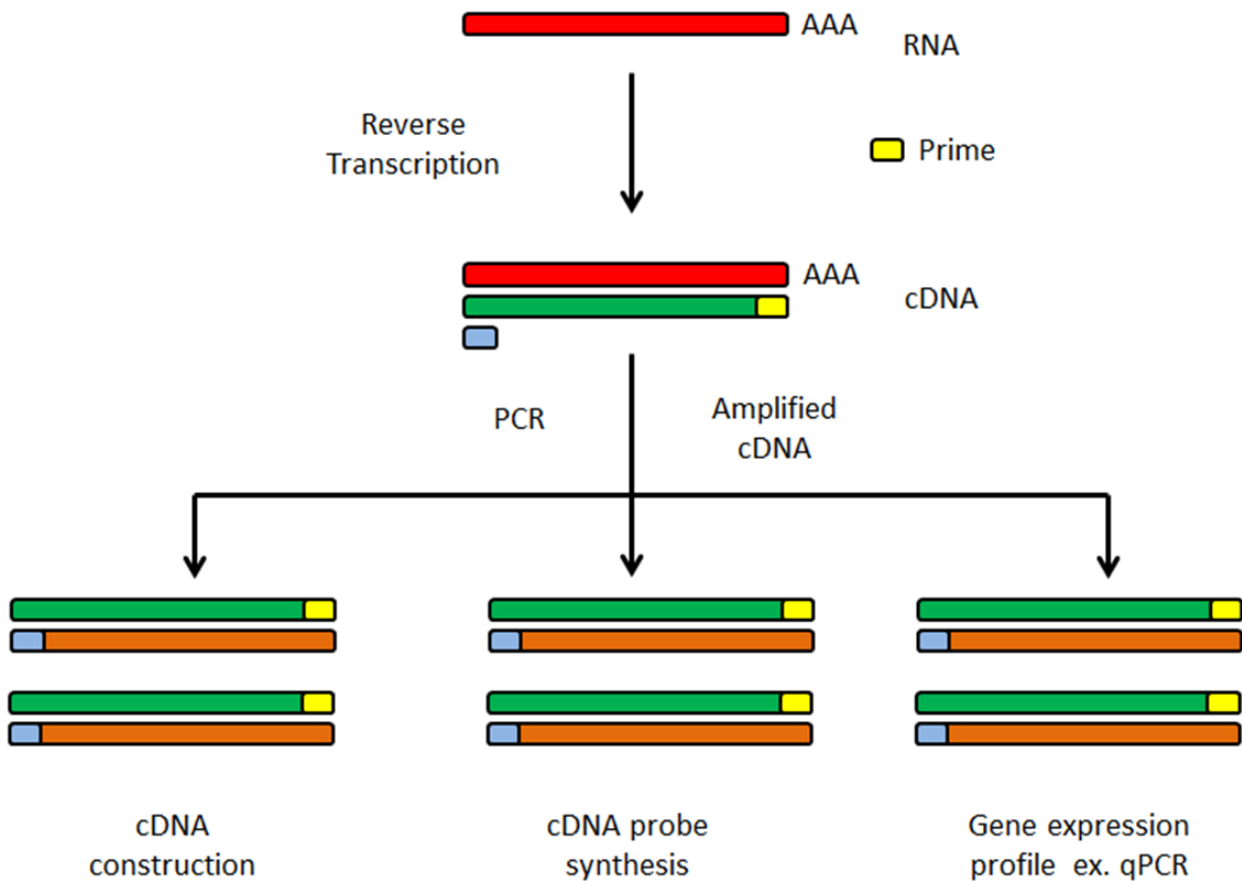


Fig. 1 反轉錄酶作用流程。由細胞或組織得到 RNA (total RNA, mRNA)之後，選擇適當的 primer (Oligo-dT, Random, Gene specific)，在適當的溫度下，使 primer 粘合到 RNA 序列上。接著加入反轉錄酶，由 primer 的位置進行 cDNA 的合成。接著即可利用 PCR 的實驗方法，進行 cDNA 的放大來進行所需要的實驗，例如：cDNA construction, cDNA prob 合成和基因表現:qPCR。

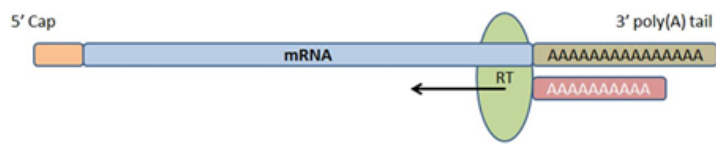
發現，並且 1970 在麻省理工學院由戴維·巴爾的摩(David Baltimore)從兩種 RNA 腫瘤病毒:R-MLV 和勞氏肉瘤病毒中分離出來。由於這些成就，兩人在 1975 年共同獲得了諾貝爾生理學或醫學獎 (和羅納托·杜爾貝科(Renato Dulbecco))。

## 分子生物學

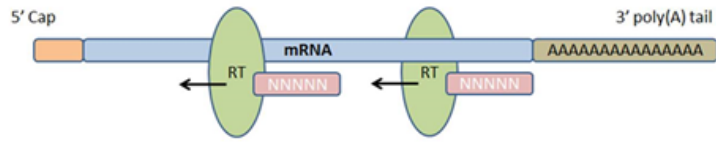
反轉錄酶在分子生物學上常用來應用於 PCR (polymerase chain reaction; 聚合酶連鎖反應)，而以 RNA 為主軸的技術稱作反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)。典型的 PCR 反應技術常用在雙股 DNA 上，但是有著反轉錄酶的幫助下，RNA 亦可以被反轉錄成 cDNA，因此使 PCR 這個技術可以應用於分析 RNA 分子，像 Real-time PCR，利用反轉錄酶將 RNA 反轉錄成 cDNA 之後，藉由 PCR 擴增的原理使極微量的 cDNA

## 引子(primer)及 RT 酵素(Reverse Transcriptase)選擇

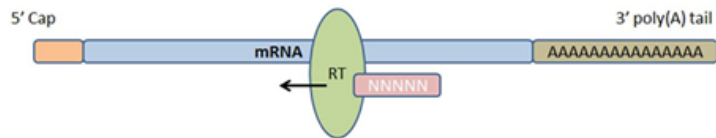
### 1. Oligo-dT



### 2. Random primer



### 3. Gene specific primer



**Oligo-dT primer**：利用 Oligo-dT primer (18-21 mer)來進行 cDNA 的合成方法是最常用也是最為普遍的一種選擇。其原理是利用 Oligo-dT primer 接在 mRNA 的 3' 端的 poly(A) 的序列，接著反轉錄酶的作用下進行 cDNA 的合成。由於在真核生物內的 RNA，包含 poly(A) 序列的 RNA 佔了 1-5% (mRNA)，所以只有 mRNA 可以當作 Oligo-dT primer 的模版。

**Random primer**：利用 Random primer (6-9 mer)來進行 cDNA 的合成相較於 Oligo-dT 來說其複雜性較高，因為在真核細胞的 RNA 中，rRNA 的比例 >95%，所以在使用的普遍上會比 Oligo-dT 來的低。但是在一些情況下，利用 Random primer 來進行 cDNA 的合成卻是最好的選擇。像一些尾端缺少 poly(A) 的 mRNA，因物理或化學因素 (FFPE) 導致 RNA 斷裂或降解的 RNA，包含許多 poly(A) 序列的 RNA 和需要排除 3' 端序列所產生的誤差。這些情況利用 Random primer 即為最好的選擇。

**Gene specific primer**：由實驗者自行設計 primer 來進行 cDNA 的合成，此種 primer 提供了對 mRNA 最好的專一性；然而在設計完 primer 之後，在 cDNA 合成時 annealing (primer 和 RNA 粘合) 以及 extension (延長) 的條件溫度則必需要由實驗者去進行測試及調整。

## RT 酵素(Reverse Transcriptase)選擇

	M-MLV RT	M-MLV RT (Rnase H Minus)	AMV-RT
來源	Moloney Murine Leukemia Virus	Moloney Murine Leukemia Virus	Avion Myeloblastosis Virus
DNA polymerase 活性	yes	yes	yes
RNase H 活性	+	-	++
熱穩定性	low	high	high
反應溫度	37-50 °C	50-60 °C	up to 65°C
cDNA 產物	產物較少，但可複製 cDNA 的長度較長	產物較少，但可複製 cDNA 的長度較長	產物較多，但可複製的 cDNA 長度較短



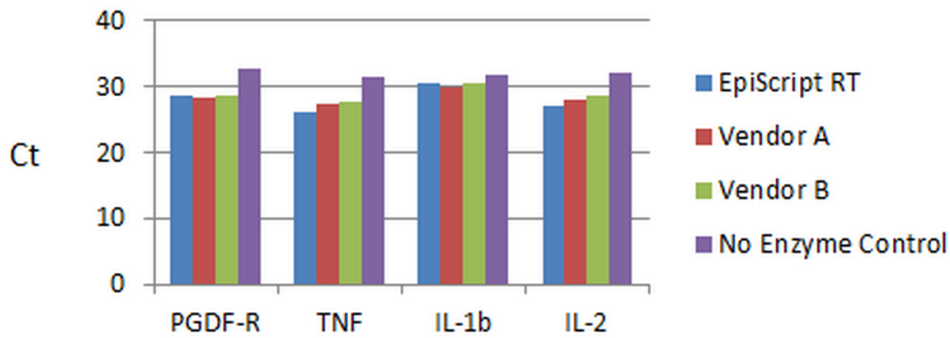
## RT 酵素(Reverse Transcriptase)選擇

RT-PCR 使得目前的基因工程在檢測及分析基因轉錄產物、合成 cDNA 探針技術上更為便利。而反轉錄酶的選擇上則具有以下特點：

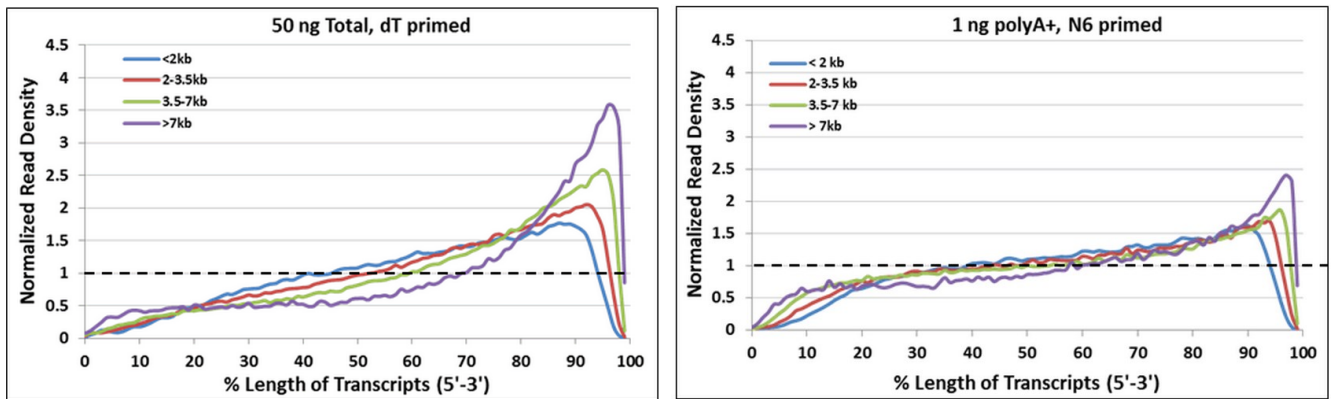
1. **莫洛尼(氏)鼠白血病毒反轉錄酶 (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase;M-MuLV-RT)**：此酵素具有很高的聚合酶活性以及較弱的 RNase H 活性。由於其具有較弱的 RNaseH 活性，使其具有更強的 RNA/DNA 聚合酶延伸能力，反轉錄效率更高，可達到 13kb 的 cDNA 片段。
2. **莫洛尼(氏)鼠白血病毒反轉錄酶 (Moloney Murine Leukemia Virus RNase H Minus reverse transcriptase;M-MuLV RNase H Minus-RT)**：此酵素具有高度聚合酶活性以及經由突變去除 RNase H 活性。由於其喪失了 RNaseH 活性，使其具有更強的 RNA/DNA 聚合酶延伸能力，反轉錄效率更高，可達到 15 kb 的 cDNA 片段
3. **禽類成髓細胞瘤病毒反轉錄酶(Avian Myeloblastosis Virus reverse transcriptase;AMV-RT)**：此酵素具有較高的溫度耐受性，所以可以適用於需要利用高溫的實驗，或是利用高溫來解開 RNA2 級結構的情況；此外，此酵素亦具有較高的聚合酶活性和 RNase H 活性，可以做為 cDNA 合成的酵素使用。

廠牌	Biogenesis	Epicentre
品名	Q - Amp™ MMuLV cDNA Synthesis Kit (random primer/oligo-dT)	MMLV High performance cDNA Synthesis Kit
Cat.no	GL - CDNA - 001/ GL - CDNA - 010	ERT12910K
RT enzyme	MMLV	EpiScrip
Time	45 min	70 min
RNA	up to 1ug	50 pg
RNaseH activity	+	+

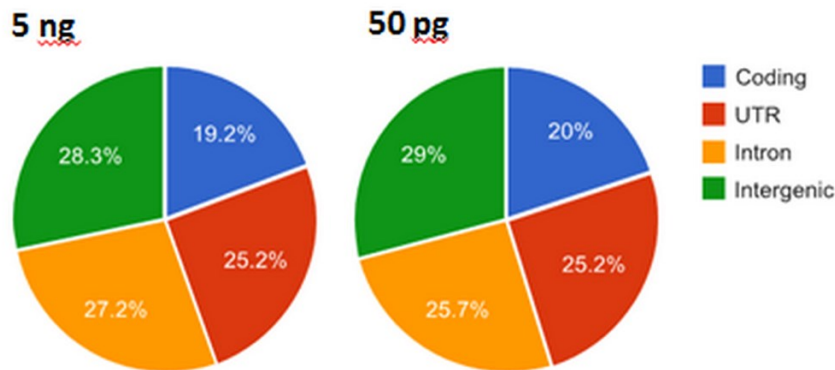
\* **RNase H**：Ribonuclease H (核糖核酸酶 H)，是一種核糖核酸內切酶，可以專一性的水解 DNA-RNA 粘和時此複合體中的 RNA，而且 RNase H 不能水解單股或雙股 DNA 或 RNA。所以在進行 cDNA 合成的時候，反轉錄酵素是否具有 RNase H 的酵素活性則成為了選擇的考量之一。



**Figure 1.** EpiScript™ Reverse Transcriptase 和其它廠牌在進行 cDNA 生合成時的效果比較. 利用 Jurkat 細胞來的總 RNA，取 1 ug 來進行 cDNA 的合成。接著在進行 qPCR 實驗時是利用 Bio-Rad iQ SYBR mastermix 以及 gene specific primers 來產生約 250-350 bp amplicons 來進行 qPCR 過程中的定量. PGDF-R (Platelet Derived Growth Factor Receptor), TNF (Tumor Necrosis Factor), IL-1b (Interleukin-1 beta), IL-2 (Interleukin 2).



**Figure 2.** EpiScript™ Reverse Transcriptase 在不同濃度及長度具有相似的 cDNA 合成覆蓋率. 利用 50 ng 總 RNA 以及 1ng polyA+ 篩選過的 RNA 以 EpiScript 酵素和 Oligo-dT 及 Random primer 進行 cDNA 的生合成，再進行不同長度之間的數據比較。由圖中可得知此酵素在不同量的 RNA 下具有相似的合成覆蓋率，並且可以看到 Oligo-dT 具有較好的合成結果。



**Figure 3.** 使用 EpiScript® Reverse Transcriptase 在加入不同量的 RNA 後可轉錄出相似比例的基因分佈. 利用 EpiScript RT 及 random primer 進行 5 ng 和 50 pg 人類 RNA cDNA 的合成，並且利用 illumina® 定序的技術分析 cDNA 合成的基因分佈. 由結果中可以觀察到在 5 ng 和 50 ng 合成出來的 cDNA，其不同位置的基因所佔的比例是相當接近的。

# IQ<sup>2</sup> SYBR Green Fast qPCR System

絕對、相對定量專用

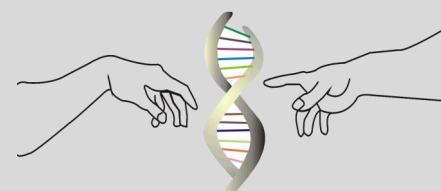


創世紀生技

產品名稱	適用機型	產品型號
IQ <sup>2</sup> SYBR Green Fast qPCR System Master Mix – <b>NO ROX</b>	Illumina: Eco™ PCRmax: Eco 48™ Bio-Rad: Opticon™, Opticon2™, MiniOpticon, Chromo4™, CFX96, CFX384 Thermo: PikoReal Cepheid: SmartCycler™ Qiagen (Corbett): Roto-Gene™ 3000 & 6000, Roto-Gene™ Q Eppendorf: Mastercycler® ep realplex Roche: LightCycler® 480, LightCycler® Nano Techne: Quantica® Takara: Thermal Cycler Dice® (TP800)	DBU-006-1mL DBU-006-5mL
IQ <sup>2</sup> SYBR Green Fast qPCR System Master Mix – <b>LOW ROX</b>	ABI: 7500, 7500Fast, ViiA 7 Agilent(Stratagene): MX4000P, MX3000P, MX3005P	DBU-007-1mL DBU-007-5mL
IQ <sup>2</sup> SYBR Green Fast qPCR System Master Mix – <b>HIGH ROX</b>	ABI: 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne, StepOne plus	DBU-008-1mL DBU-008-5mL

# IQ<sup>2</sup> Fast qPCR System

HRM 專用的 EvaGreen mastermix

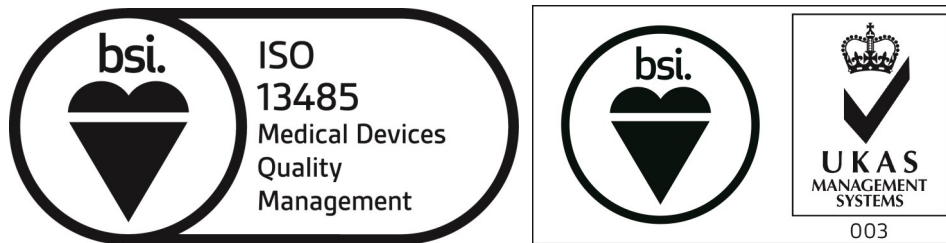


創世紀生技

產品名稱	適用機型	產品型號
IQ <sup>2</sup> Fast qPCR System	Illumina: Eco™ PCRmax: ECO 48™ Bio-Rad: Opticon™, Opticon2™, MiniOpticon, Chromo4™, CFX96, CFX384 Thermo: PikoReal Cepheid: SmartCycler™ Qiagen (Corbett): Roto-Gene™ 3000 & 6000, Roto-Gene™ Q Eppendorf: Mastercycler® ep realplex Roche: LightCycler® 480, LightCycler® Nano Techne: Quantica® Takara: Thermal Cycler Dice® (TP800)	DBU-001-1mL DBU-001-5mL
IQ <sup>2</sup> Fast qPCR System with <b>Low ROX</b>	ABI: 7500, 7500Fast, ViiA 7 Agilent(Stratagene): MX4000P, MX3000P, MX3005P	DBU-002-1mL DBU-002-5mL
IQ <sup>2</sup> Fast qPCR System <b>with ROX</b>	ABI: 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, StepOne, StepOne plus	DBU-003-1mL DBU-003-5mL

Primerdesign 於 2005 年創立於英國南安普頓，是一間專門設計、生產及供應 Real-Time PCR 相關試劑及偵測套組的公司。除了提供適用於各廠牌 Real-Time PCR 儀器的 Master Mix 之外，另有超過 400 項的 Real-Time PCR detection kit，可偵測病原、環境微生物、基因改造食物等等，應用於病理、流行病學、環境微生物、食品等相關研究領域。

Primerdesign 經 British Standards Institute 的監督確保生產過程，品質控制系統，客戶服務，執行管理系統皆符合高品質標準。並通過 **13485:2003**，**EN ISO 13485:2012 accreditation** 及 **ISO 9001:2008 認證**。其中 ISO 9001 則強調顧客滿意及持續的程序改善而 ISO13485 是在歐洲共同體醫療器械行業的品質管理標準，符合客戶對於風險管理及維持操作有效性的規範。



~ RT & qPCR 一次到位 ~

## Precision OneStep qRT-PCR MasterMix

- 更精準, 更方便, 更省時 -

### 更簡單快速的檢測方法 -- One step qRT-PCR 介紹

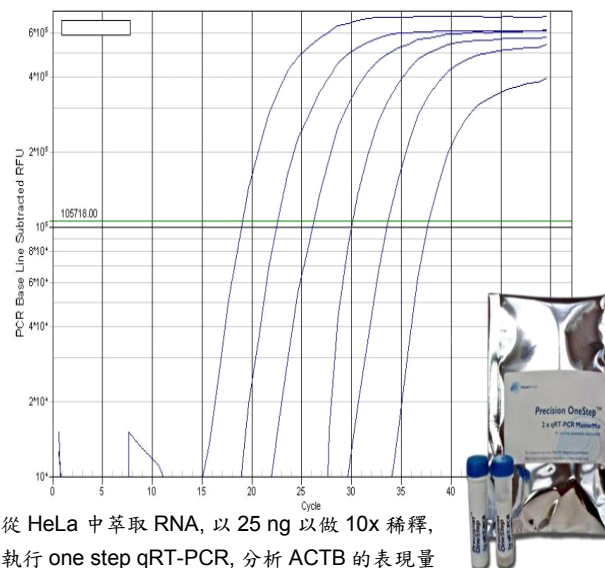
一般在使用 RNA 做為樣本進行 Real-Time PCR 偵測，都會先進行反轉錄反應（revers-transcription）合成第一股 cDNA (firststrand cDNA)，然後再取出部分 cDNA 進行 Real-Time PCR 偵測；對於大學實驗室來說，這樣執行一次反轉錄反應的結果可以用於多次的 Real-Time 反應檢測，也可以減少部分研究經費，但是對於樣本數眾多或是 RNA 極少的狀況時（最常見的是進行病毒篩檢），沒有辦法使用傳統方式先進行反轉錄反應時，One step qRT-PCR 就是最佳且唯一的解決方案。

就像 One step RT-PCR 一樣，One step qRT-PCR 內預先加入 revers-transcriptase，在反應的第一步中進行反轉錄反應，完成後繼續進行 qPCR 反應，同時兼備了 One step RT-PCR 的便利與 qPCR 的靈敏度，即使是 single-copy 的 RNA target 也可以偵測到。

PrimerDesign 的 Precision OneStep qRT-PCR Master Mix 是市售唯一 single-tube 的 master mix 產品，只要加入 RNA 與 primer set 就可以立刻上機分析，不像他牌必須在實驗前加入反轉錄酶，此外 Precision OneStep qRT-PCR Master Mix 內的反轉錄酶作用溫度是 55°C，能夠解決 RNA 常見的二級結構問題。

## One Step qRT-PCR, 好處多更多:

1. **RT step**—反應只需 10 分鐘, 可耐 55°C 高溫
2. **q-PCR step** - 不到 1 hr
3. **One Step**—減少你 set up 所需要的時間
  - A. 只需要加 **primers / probe / RNA**
  - B. 降低實驗的風險
  - C. 更節省經費
  - D. 包裝內附 RNase inhibitor
  - E. 更靈敏,  $> 10^9$  copies ;  $< 10$  copies.



產品名稱	適用機種	產品編號
Precision OneStep qRT-PCR Master Mix	Illumina Eco, PCRmax ECO48, MJ Chromo4, Roche 480, RotorGene (all models), Eppendorf Mastercycler, Fluidigm BioMark and Cepheid SmartCycler	OneStep OneStep-SY*
Precision OneStep qRT-PCR Master Mix with Low ROX	ABI 7500, 7500 Fast	OneStep-LR OneStep-LR-SY*
Precision OneStep qRT-PCR Master Mix with ROX	ABI 7000, 7300, 7700, 7900, and One Step platform	OneStep-R OneStep-R-SY*
Precision OneStep qRT-PCR Master Mix for BioRad iCycler	BioRad iCycler, IQ4 and IQ5	OneStep-iC OneStep-iC-SY*
Precision OneStep qRT-PCR Master Mix for Stratagene hardware	Stratagene MX	OneStep-MX OneStep-MX-SY*
Precision OneStep qRT-PCR Master Mix for capillary lightcyclers	Roche Lightcycler 1.0, 1.5, and 2.0	OneStep-CL OneStep-CL-SY*

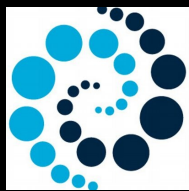
\*註: 編號-SY 表示內含 SYBR Green I



**Primerdesign** 出品超過 400 種的 **real-time PCR** 檢測套組產品系列 <http://www.genesig.com/home>

genesig® 系列產品為 PrimerDesign 旗下的 real-time PCR detection kit。所有的 genesig kit 都是依據 NCBI 提供的生物資訊進行比對, 並使用 hydrolysis probe (Taqman-Style probe) 偵測特定基因, 因此 100% 能使用 real-time PCR 偵測特定生物原或基因。目前 genesig 已有超過 400 組 real-time PCR detection kit, 並分為農業獸醫 (Veterinary & Agriculture)、人類疾病 (Human Pathogens)、食物與水質檢測 (Food & Water Testing)、與生物威脅檢測 (Biothreat Detection) 四大項。每種檢測項目細分為 standard kit 與 advanced kit 兩種, standard kit 內含 primer/probe mix 與 positive control template, 可以 real-time PCR 方式偵測並進行定量; advanced kit 除了 standard kit 內容物外, 還多了 internal control template、internal control primer/probe mix 與 endogenous primer/probe mix 作為實驗成功與否的參考。





# genesig® easy kit 介紹



genesig® 產品包括超過 400 種基因檢測套組，除了 advanced, standard 兩種包裝版本，最近新推出 easy 包裝版本。其中 easy 專為 q16 設計，操作最為簡便，反應所需的所有成分皆已乾燥成粉末，適合室溫運送，使用時僅需加水回溶，混和，與待測 DNA 一起加入所附的反應管，置入 q16 進行全自動分析。

## qPCR test kits Human pathogen



qPCR test kits  
Human pathogen

- Respiratory infections
- Sexually transmitted infections
- Herpes viral infections
- Hepatitis infections
- Human papillomavirus
- Gastrointestinal infections
- Vector-borne diseases
- Meningitis
- Periodontal infections
- Others

## qPCR test kits Veterinary and agricultural pathogen



qPCR test kits  
Veterinary and  
agricultural pathogen

- Avian
- Bovine
- Ovine/caprine
- Equine
- Feline
- Canine
- Piscean
- Others

## qPCR test kits Food and water



qPCR test kits  
Food and water

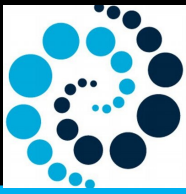
- Allergens
- Speciation
- Pathogen contamination
- Others

## Biothreat

- Bacillus anthracis
- Burkholderia mallei
- Burkholderia pseudomallei
- Chlamydomphila psittaci
- Clostridium perfringens species
- Coxiella burnetii
- Cryptosporidium
- Escherichia coli O157:H7
- Francisella tularensis
- H1N1 influenza
- Rift Valley Fever Virus
- Toxigenic subspecies of Vibrio cholerae
- Vaccinia virus



查詢檢測套組請  
至 <http://www.genesig.com/home>



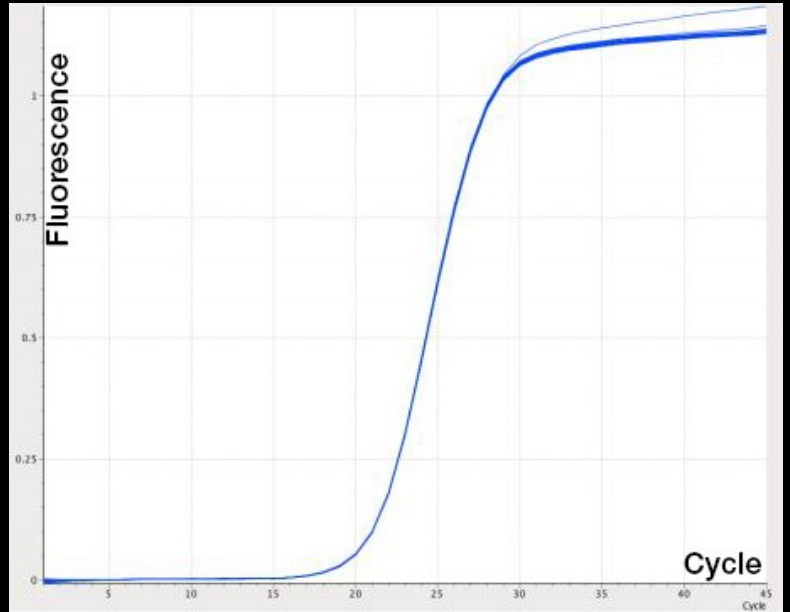
# genesig<sup>®</sup> q16 qPCR system 規格

- 極簡軟體介面
- 數據自動分析
- 沒有額外活動零件
- 運轉安靜
- 可經由網路以 PC, Mac, 控制, 或僅由 USB drive 操作

- **16 Wells**

\*20ul reaction volume

- 使用 Peltier 溫控反應器
  - \* 升溫 3°C/s
  - \* 降溫 2°C/s
  - \* 均溫度 $\pm$  0.1°C range
  - \* 溫度精準 $\pm$  0.25°C
- LED 激發光
- CMOS detection 訊號偵測
  - \*適用於 FAM and VIC labels
- 高 160mm  
直徑 120mm  
重量 2kg  
耗電量 90W



上圖 為同一次進行的 16 個反應的螢光擴增圖  
顯示**極佳的一致性!!**

- ◆ 搭配 genesig<sup>®</sup> easy real-time PCR 檢測套組可進行超過 400 種檢測
- ◆ 預設實驗條件，自動分析，不需特殊訓練人員進行繁複設定。
- ◆ 攜帶方便，適合現場操作，沒有實驗室也可進行核酸定量檢測!!

觀看 q16 操作影片請至  
<https://www.youtube.com/watch?v=KVXKoiHrgJE>



# The genesig<sup>®</sup> q16

令人驚艷的行動 qPCR system!!!



  
Primerdesign<sup>®</sup>

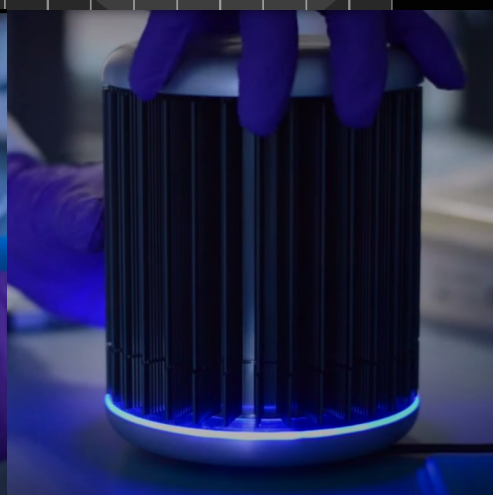
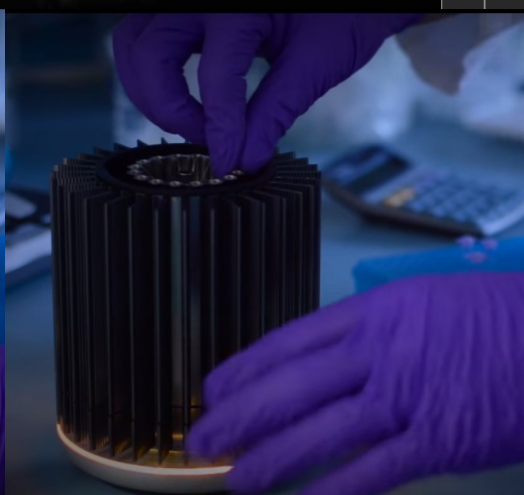
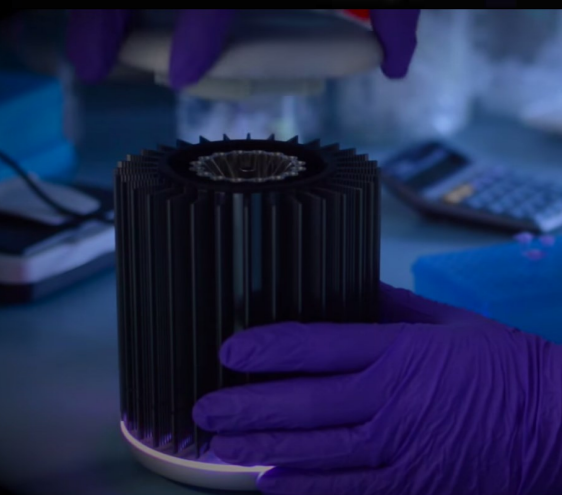
DNA testing

Everything...

Everyone...

Everywhere...

The genesig<sup>®</sup> q16



創世紀生物有限公司 網址：[www.biogenesis.com.tw](http://www.biogenesis.com.tw) 服務信箱：[service@biogenesis.com.tw](mailto:service@biogenesis.com.tw)

台北 02-26558877 台中 04-22602466 高雄 07-3422370 花蓮 03-8463953 竹南 037-687493