

Liquid Biopsy

研究工具

分離



MERCK

純化



濃縮

定序



騰達行

UNIMED unimed.com.tw

台北 TEL (02)2720-2215
新竹 TEL (03)6684-586
台中 TEL (04)2463-3591

嘉義 TEL (05)2844-162
台南 TEL (06)2890-665
高雄 TEL (07)3470-143

免付費客服專線
0800-211-819

癌症在台灣的十大死亡率中排名第一，並且已連續 34 年位居首位。

根據 104 年衛福部公布的 10 大癌症依序為

- (1) 氣管、支氣管和肺癌
- (2) 肝和肝內膽管癌
- (3) 結腸直腸和肛門癌
- (4) 女性乳房癌
- (5) 口腔癌
- (6) 前列腺癌
- (7) 胃癌
- (8) 胰臟癌
- (9) 食道癌
- (10) 子宮頸及子宮癌。

液體活檢 (Liquid Biopsy)

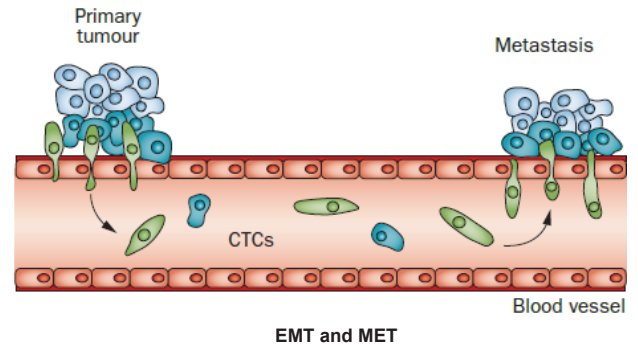
早在 1000 年以前，一位阿拉伯醫生 Abulcasis(1013-1017) 就提出了活檢技術。活檢的好處是醫生可以根據病灶組織學結構對病情做出判斷。但隨著對腫瘤研究的深入，科學家發現在癌症的診斷和治療過程中組織活檢技術因為腫瘤具有異質性而有一定的局限性。

液體活檢 (Liquid Biopsy) 技術的出現，解決了上述的問題，也提前了癌症的診斷時間。液體活檢技術更被《麻省理工大學科技評論》評選為「2015 年十大突破技術」。近年來更隨著腫瘤細胞生物學以及分子生物學的深入研究，加上分子生物學檢測技術的快速發展，讓醫生可對患者樣品定序進而給出更精確的診斷結果。

目前液體活檢的主要檢測物包括檢測血液中游離的循環腫瘤細胞 (Circulating tumor cell ; CTCs)、循環腫瘤 DNA (Circulating tumor DNA ; ctDNA)，和外吐小體 (Exosome)。

CTCs: 循環腫瘤細胞 (Circulating tumor cell ; CTCs)

1869 年，澳大利亞籍醫生 Ashworth 首次提出循環腫瘤細胞的概念。1976 年，Nowell 將 CTCs 的定義修正為來源於原發腫瘤或轉移腫瘤，侵襲基底膜後並通過組織基質進入血管的腫瘤細胞。目前，CTCs 是指存在於外周血中的各類腫瘤細胞的統稱。CTCs 以不同形態存在於外周血中，既有游離的單個 CTCs，也有聚集成團的細胞團 (CTM, Circulating Tumor Microemboli)

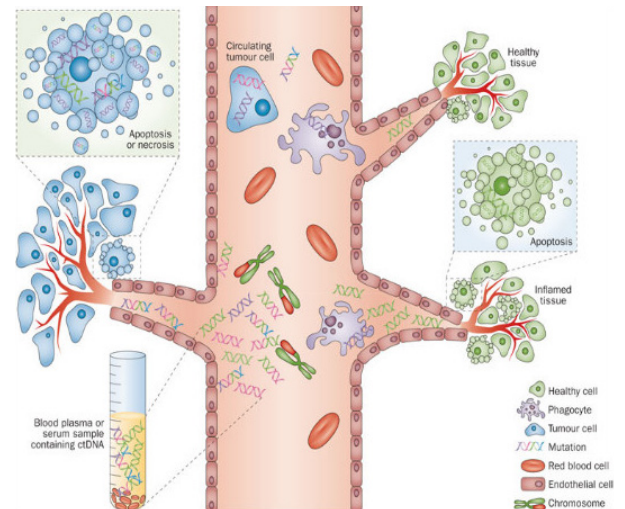


cfDNA: 血漿游離 DNA (Cell free DNA; cfDNA)

早於 1948 年科學家就發現循環血液中含有 DNA，它們有的來自於正常細胞，有的來自於異常細胞（如腫瘤細胞），還有部分來自於我們外部（如病毒 DNA）。當細胞破碎和死亡時，會釋放細胞內所有內容物，包含 DNA，游離於循環血液中，正常狀況下，這些游離物質會被巨噬細胞清除，然而當細胞繁殖快過於清除速率，如腫瘤細胞，將有機會持續游離在循環血液中。

ctDNA 循環腫瘤 DNA (Circulating tumor DNA ; ctDNA)

ctDNA 即循環腫瘤 DNA 是來自腫瘤基因的 DNA 片段，是一種流離於細胞外的 DNA，存在於血液、滑膜液和腦脊液等體液中，其主要是由單鏈或雙鏈 DNA 以及單鏈與雙鏈 DNA 的混合物組成，以 DNA 蛋白質複合物或游離 DNA 兩種形式存在。



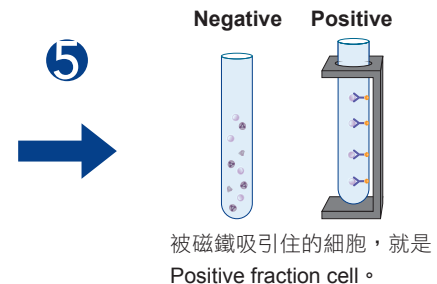
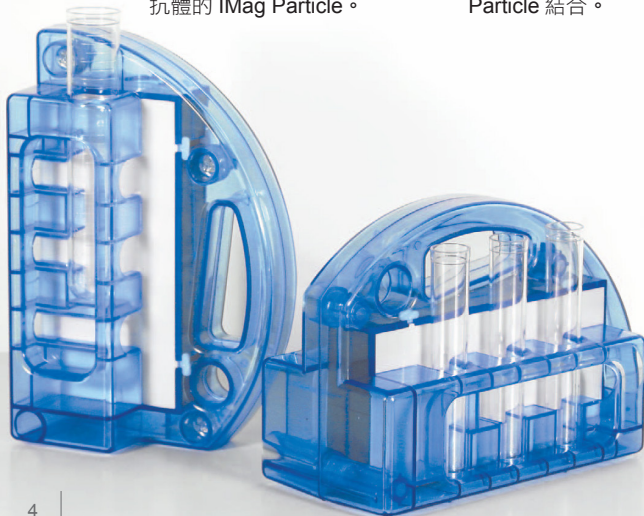
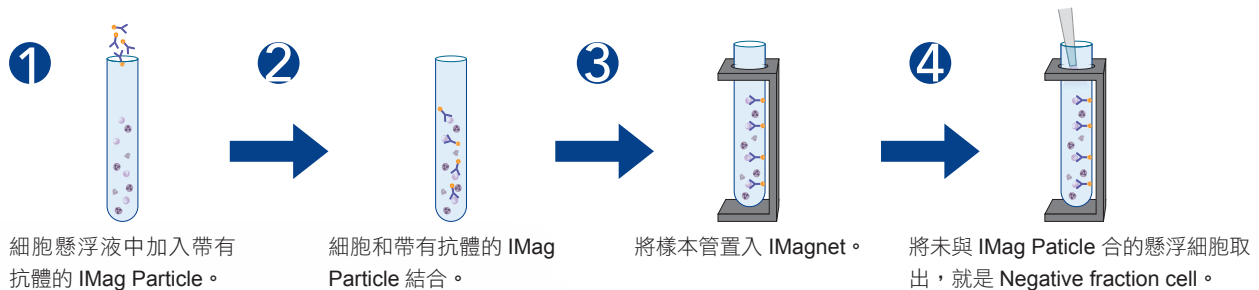
循環腫瘤細胞 (Circulating tumor cell ; CTCs)

CTCs 在腫瘤患者外周血中含量極低，在癌前病變或腫瘤早期數目更加稀少 (大部分 CTCs 在進入外周血後發生凋亡或被吞噬，少數能夠逃逸並鉆著發展成為轉移灶，增加惡性腫瘤患者死亡風險)。一般患者 10ml 血中只有 1-10 個 CTC。

IMag™ Magnetic Cell Separation System 磁珠分離細胞系統

BD IMag Cell Separation System 是利用磁珠抗體和磁座分選出目標細胞，不需要昂貴的 column，免去繁瑣步驟，只需利用圓底管 (round-bottom tube) 及磁座 (BD IMagnet)，即可在短時間內分離出特定細胞。

可以利用上皮黏附蛋白 (Ep-CAM) 抗體與磁珠抗體結合後利用磁座來分離出 CTCs。另外，可再將這些 CTCs 染上 Cytokeratin、CD45 螢光抗體及 DAPI，最後利用流式細胞分析 / 分選儀來定義分離出 Cytokeratin⁺ & CD45⁻ 的 CTCs。

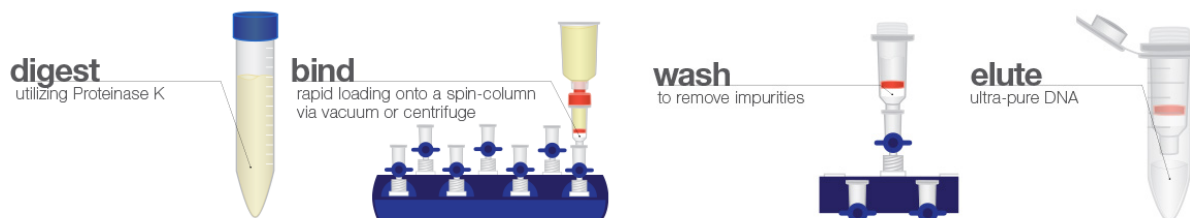


血漿游離 DNA (cfDNA) & 血漿游離 RNA (cfRNA)

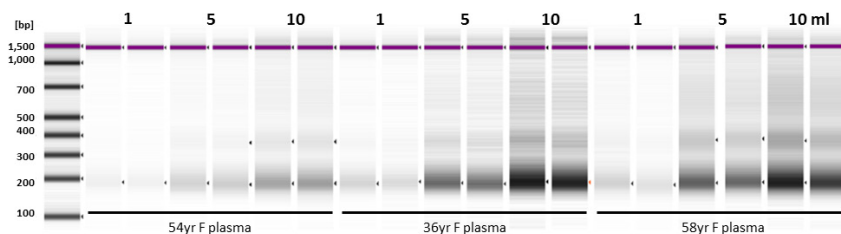
腫瘤患者外周血中的 cfDNA 總量，要高於健康人。1 ml 的血漿中含量約為 1-100ng/ml，cfDNA 其片段範圍約為 100 bp ~10 kb。cfDNA 作為液態活檢，不只局限於腫瘤學。例如，有研究報導接受器官移植手術的病人，可通過監測術後外周血中具有捐獻者基因特徵片段化的 cfDNA 含量變化，來評估移植器官的排斥情況。

Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit

- 操作流程有 Vacuum Protocol、Centrifugation Protocol 可選擇。
- 適用於各種體液：Serum, plasma, amniotic fluid, and cerebrospinal fluid (CSF)。
- 樣本最大體積可達 10 ml，可回收 DNA 片段 ≥ 100 bp。
- 高品質 DNA 可應用於更靈敏、更精準的實驗分析：qPCR, NGS...

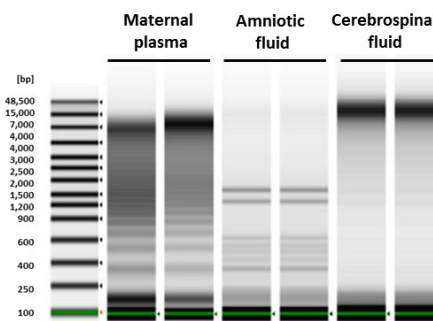


樣品總量增加，有效獲得更多 cfDNA



Total DNA is efficiently purified from cell-free biological fluids with the Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit. Total DNA, including both high and low molecular weight species, purified (duplicates) from human maternal plasma, amniotic fluid and cerebrospinal fluid was analyzed.

從不同體液輕鬆萃取 cfDNA

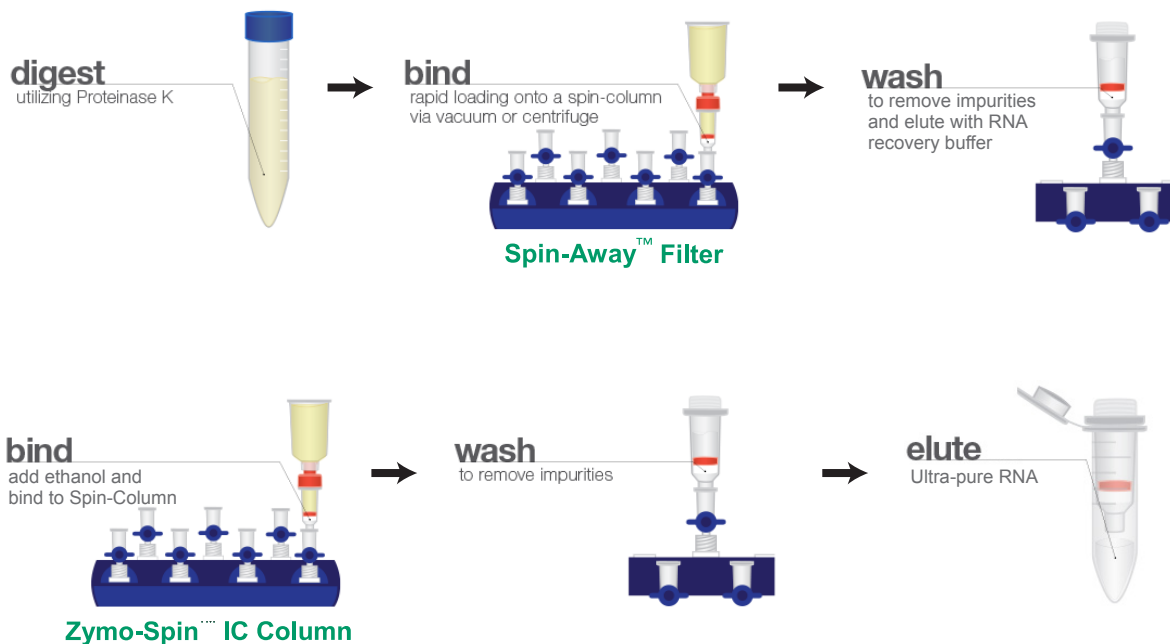


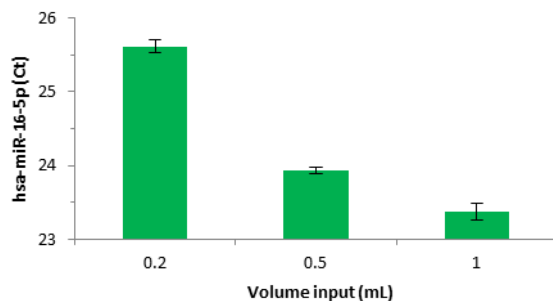
Cell-free DNA recovery scales proportionally with sample input using the Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit gel image show the linear recovery of cfDNA from human plasma and serum (healthy female donors), as measured.

血漿游離 DNA (cfDNA) & 血漿游離 RNA (cfRNA)

Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit

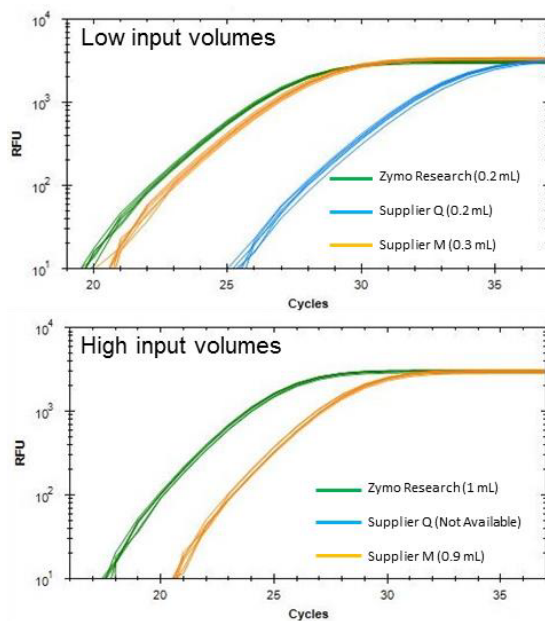
- 實驗操作可搭配 Vacuum manifold 超省時。
- 適用於各種體液：Serum, plasma, amniotic fluid, and cerebrospinal fluid (CSF)。
- 樣本最大體積可達 1ml，可回收 RNA 片段 $\geq 17\text{nt}$ 。
- 利用 Spin-Away™ Filters 技術有效移除 DNA 汙染。
- 高品質 RNA 可應用於更靈敏、更精準的實驗分析：RT-qPCR, NGS...





少量或大量樣品，cfRNA 產量優於他牌

Proportional scale up relative to input volume (from 0.2 ml to 1 ml; 55y male plasma). Triplicates of purified samples used to generate RT-qPCR (Bioline; EPIK miRNA Select Kit, hsa-miR-16-5p assay).



從少量的樣品萃取出

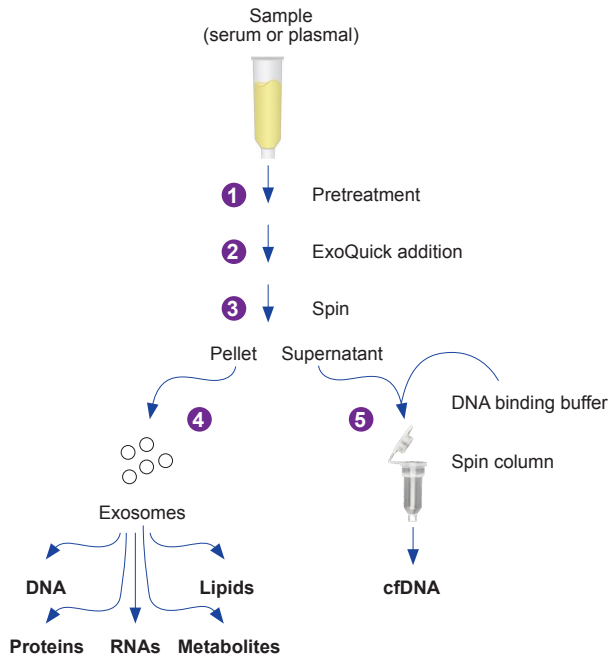
品質好、濃度佳的 cfRNA 進行 RT-PCR

2x and 8x more yields achieved from low and high input volumes, respectively, compared to the next best product from other supplier. Triplicates of purified samples from different kits used to generate RT-qPCR data .

血漿游離 DNA (cfDNA) & 外吐小體 (Exosomes)

XCF™ COMPLETE Exosome & cfDNA Isolation Kits

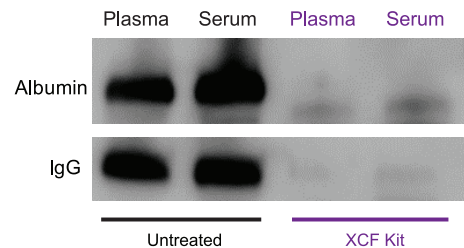
- 操作流程簡單省時。
- 只需單管血清或血漿，就可同時收集 cfDNAs 和 exosomes
- 充分利用 liquid biopsy，加速 biomarkers 研究。
- 分離出來的 exosomes，non-exosomal proteins 殘留率低，利於後續更靈敏的實驗分析
- 純化出來高品質的 cfDNAs 可運用於 qPCR, NGS



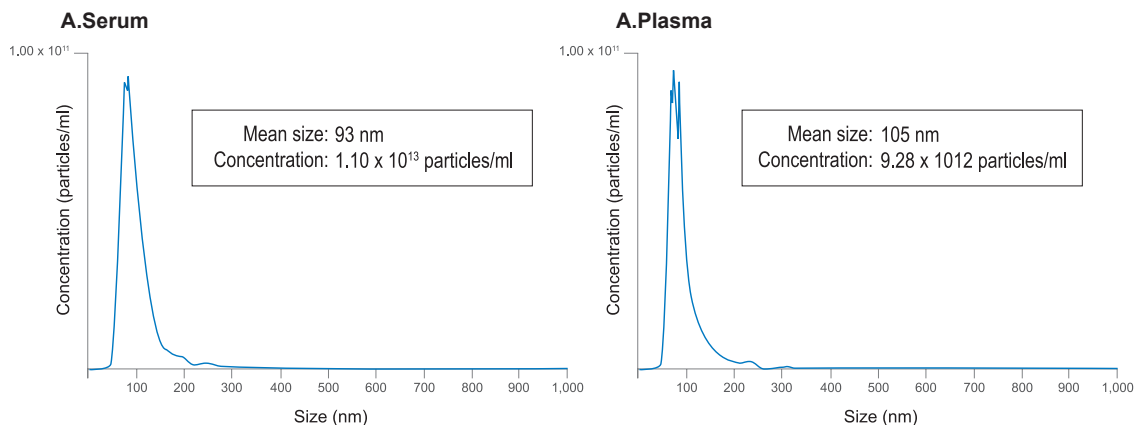
- 1 Pretreatment**：移除 non-exosomal proteins，例：Albumins, Immunoglobulins
- 2 添加 ExoQuick**：沉澱、分離 exosomes
- 3 離心**：分離 exosome pellet 和 cfDNA supernatant
- 4 進行 exosomes 後續分析實驗**
- 5 萃取、純化 cfDNA**

non-exosomal protein 殘留率低

The XCF COMPLETE Kit shows low protein carryover. Western blots of co-purifying human albumin (~67kD) and heavy-chain IgG (~50kD) comparing untreated serum and plasma versus the same samples processed using the XCF Kit .



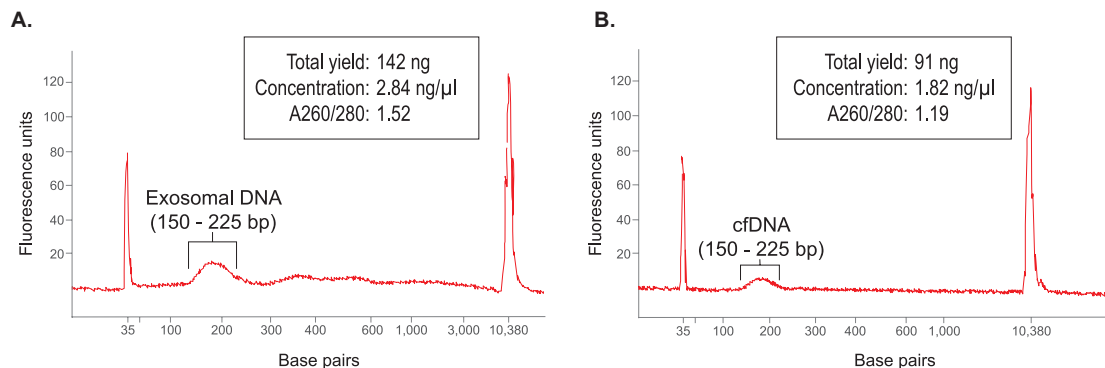
分離出來的 **exosome** 大小正常為 **40-150 nm**



Exosomes prepared using the XCF COMPLETE Kit deliver the expected particle size profile. NanoSight NTA data for extracellular vesicles isolated from 500 μ l of serum (Panel A) and plasma (Panel B).

萃取出高品質 **cfDNA**

搭配 **XCF™ Exosomal DNA Isolation Kit** 也可以萃取出 **exosomal DNA**



cfDNA and exosomal DNA isolated using the XCF COMPLETE Kit are of good quality and yield with the expected size. Agilent Bioanalyzer profiles of the exosomal DNA portion (Panel A) and cfDNA portion (Panel B) of 500 μ l of serum processed with the XCF COMPLETE Kit. A notable peak around ~166 bp is seen in both cfDNA and exosomal DNA.

循環腫瘤 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA)

一般而言，ctDNA 在癌症晚期或轉移性腫瘤中含量較高，而在早期或非轉移性腫瘤中含量較低。因此，原發癌檢出率較低，轉移癌、復發癌檢出率較高，癌症分期越高，檢出率也越高。在幾乎所有種類的癌症中，都檢測到了 ctDNA 所帶有的標誌性突變，並且腫瘤越晚期，病情越嚴重，腫瘤的惡性程度越高，ctDNA 特有突變的頻率就越高。

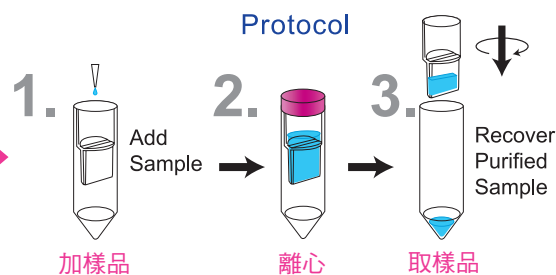
其主要片段範圍約在 166 bp 左右，半衰期短 <2hr，能更準確反映腫瘤當前情況。ctDNA 僅占 cfDNA 的 0.1%~5%，微量變異的偵測技術將會是一大難題。

Amicon Ultra Centrifugal Filter Unit 濃縮離心管，濃縮微量 ctDNA

- 使用 RC (Regenerated Cellulose) 材質，蛋白質殘留量少。
- Dead volume stop 設計：就算離心時間過久，也不用擔心樣品離到乾掉。並可計算最終的樣品稀釋倍數。
- Heat sealing：不用擔心黏膠的膠體溶劑溶出，對 sample 產生影響。
- 回收率高：採用 TFF 方式濃縮，樣品不易堆疊，回收率高。
- 快速：使用濃縮離心管形式，不只可以濃縮還可以進行置換 buffer 的動作。
- 安全：離心管為 PP 材質，不易破碎。



步驟 1.2.3
拿到 Sample 好簡單



Nucleotide cut-off guidelines for single stranded DNA

Single-Stranded Nucleotide Cut-off (bp)	NMWL	
	3K (40 min)	10K (20 min)
10	98	97
15	96	95
20	94	94
25	96	96

Nucleotide cut-off guidelines for double stranded DNA

Double-Stranded Nucleotide Cut-off (bp)	NMWL		
	30K	50K	100K
137	95	95	—
301	—	94	—
657	—	99	—
1129	—	100	97

Based on >90% retention. Spinning 50 and 100K devices at higher than recommended g-force may result in lower recovery of DNA.

Recommended g-force and spin time for Amicon Ultra devices

NMWL	Maximum G-Force Rating	Spin Time (min) at 25 °C
3K	7,500	40
10K	7,500	20
30K	5,000	10
50K	2,000	20
100K	2,000	10

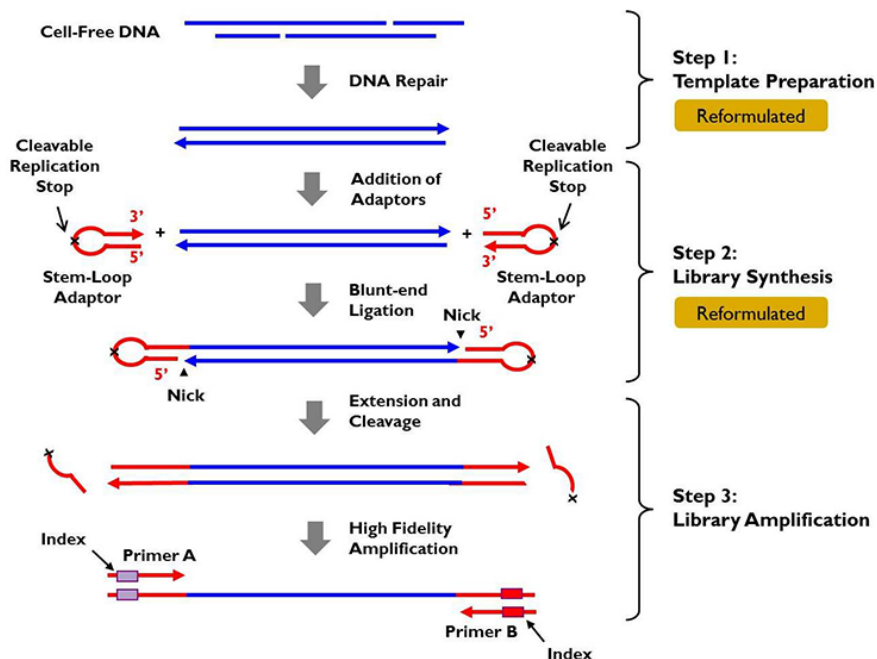
建構 cell-free DNA (cfDNA) 基因庫的最佳選擇

ThruPLEX® Plasma-seq Kit

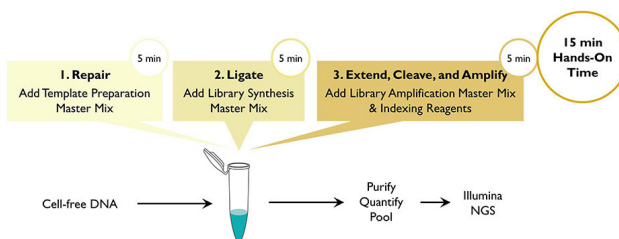
專為 cfDNA 而設計

- 低樣本量需求：只需要 <1 ng to 30 ng 從 plasma 分離出來的 cell-free DNA
- 建構高品質基因庫：High library diversity、broad & reproducible GC coverage
- 超簡易單管操作流程：三個步驟，2 小時完成可以用於 Illumina 定序儀的基因庫
- 後續應用範圍廣：WGS、WES、Targeted Sequencing、ctDNA Analysis

ThruPLEX® Plasma-seq Kit 原理



手動操作僅需 15 分鐘，確保快速高效地完成建庫過程



- Ultra-low input: 1–1,000 cells 或 10 pg–10 ng total RNA (RIN>8)
- 領先業界的技術： SMART-Seq2 方法與 locked nucleic acid (LNA) 技術的結合，提升反應靈敏度
- 適用於多個 NGS 平台：後續可應用於 Illumina® 或是 Ion Torrent 定序儀
- 操作簡單省力：單一管子的操作流程，保持樣品的完整性
- 擁有多篇文獻 citations 的支持



1 顆細胞就能做

Clontech 以 ultra low input 和 single cell 市場中的領先者之姿，不斷致力於更創新、更有效能的研發，SMART-Seq v4 因應而生！
利用 SMART-Seq2 方法與 locked nucleic acid (LNA) 技術將 RNA 反轉錄為 ds cDNA

1. Cann, G.M., et al. (2012) mRNA-seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. PLoS ONE 7(11):e49144
2. Ramsköld, D., et al. (2012) Full-length mRNA-seq from single cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. Nature Biotechnol. 30(8):777–782.

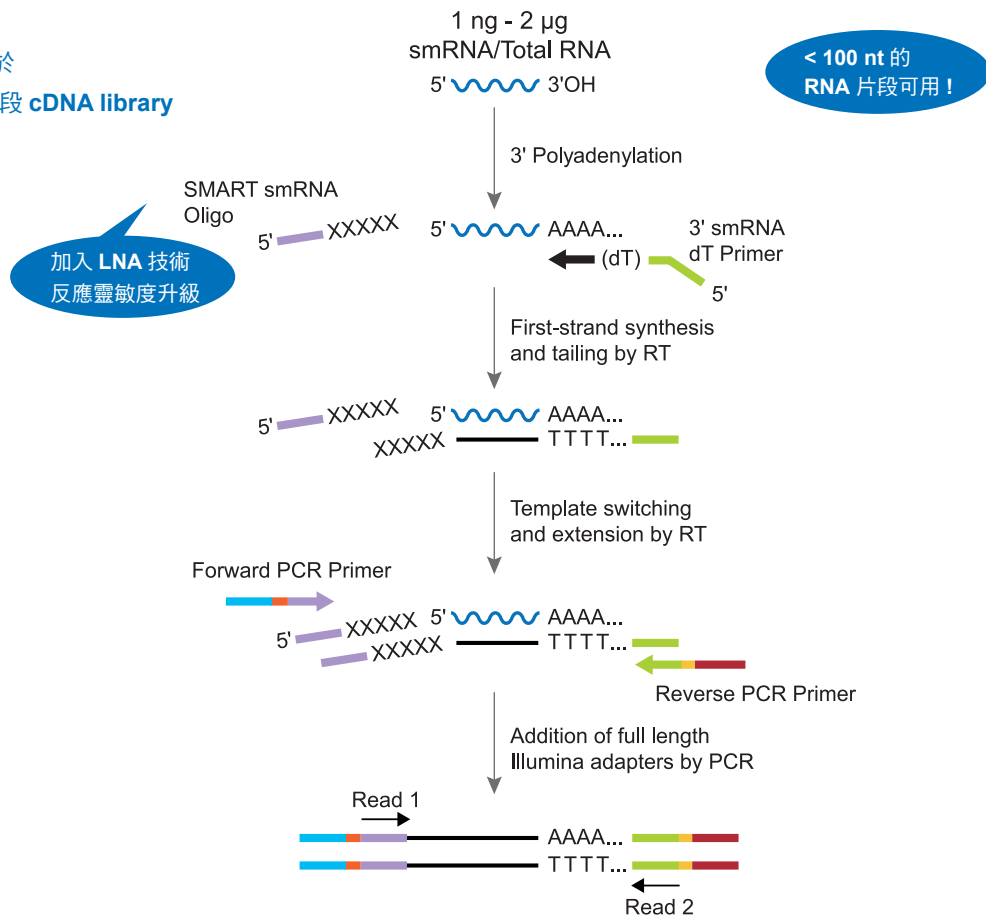
cell-free RNA (cfRNA) 定序利器

SMARTer[®] smRNA-Seq Kit for Illumina[®]

短片段 RNA 的幫手

- 適用於 15–150 nt small RNAs (miRNA, piRNA, snoRNA, snRNA)
- 低樣本量需求：1 ng–2 µg total RNA 或 enriched small RNA
- 以 ligation free 的方式接上 Illumina adapters 和 indexes，後續可應用於 Illumina[®] 平台
- 快速簡單的 single-tube 流程，只需要 ~3 小時完成 cDNA library 建構 (不包括 size selection 的時間)

能夠迅速地建構可以用於
Illumina 定序儀的小片段 cDNA library



cell-free RNA (cfRNA) 定序利器

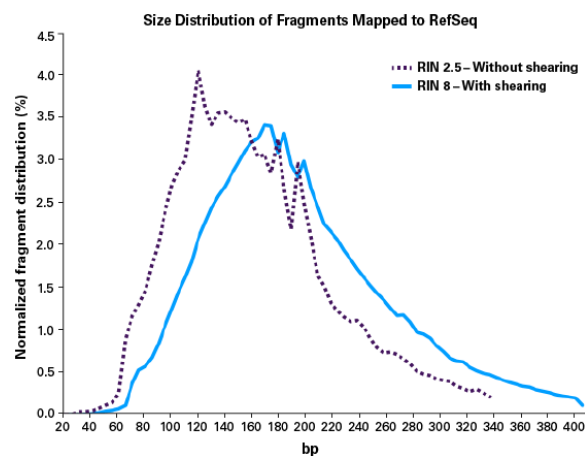
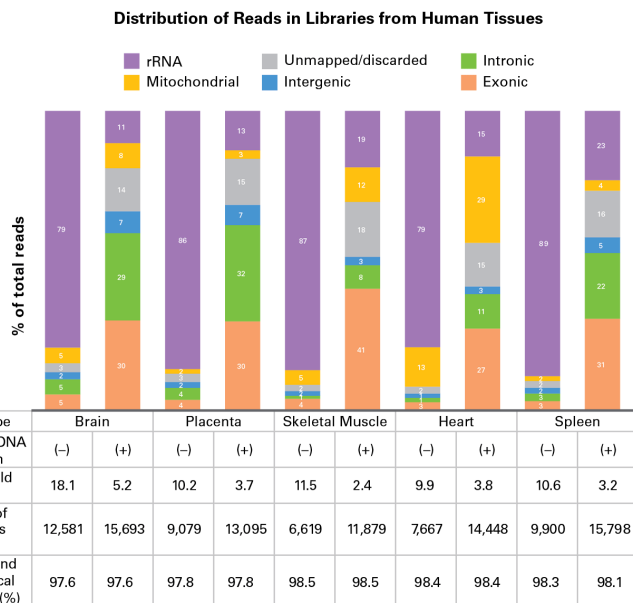
SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit - Pico Input Mammalian

微量 Total RNA 的救星

- 樣本不需多：只需要 250 pg - 10 ng 的 total RNA (human、mouse 或 rat)
- 各種品質的 RNA 都能使用，包含 degraded RNA (FFPE 和 LCM 的樣本)
- 不用事先移除 rRNA，以專利的方法移除 rRNA cDNA，降低樣本損失的可能
- 可以 99% 確定每個轉錄體的 strand 來源，可用於 non-coding RNA-Seq
- 流線型操作：只需要大約 5 個小時就能完成適用於 Illumina® NGS 平台的 library

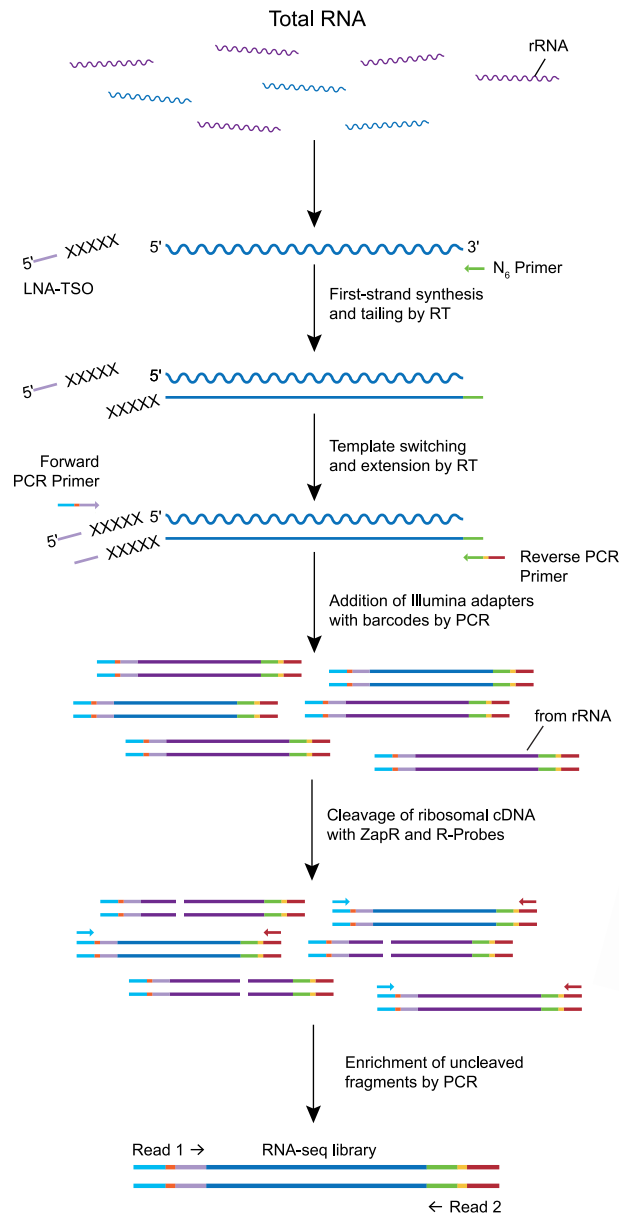
使用 SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit - Pico Input
Mammalian 建構的 library 不用擔心 rRNA 的干擾！

SMARTer® Stranded Pico cDNA library 內
cDNA 片段的大小分佈 (size distribution)



- High-quality RNA 或 highly degraded RNA 皆可建構 cDNA libraries
- 適用於 ~100 nt 和以上的 RNA 片段

- 有效移除 rRNA cDNA，mapping 到 transcript 的 reads 數明顯提升 5-10 倍



利用 **ligation-independent**
 的方式，
 快速地在 **5 個小時**內合成可
 以用於 **Illumina** 定序儀的
cDNA library

BD	分離	循環腫瘤細胞 (Circulating tumor cell ; CTCs)	
	Cat. No.	name	size
	565398	BD Horizon™ BB515 Mouse Anti-Human EpCAM	50 tests
	557983	BD IMag™ Anti-Mouse IgG1 Magnetic Particles - DM	5 mL
	563614	BD Pharmingen™ Alexa Fluor® 647 Mouse Anti-Human Cytokeratin	50 tests
	555483	BD Pharmingen™ PE Mouse Anti-Human CD45	100 tests
	564907	BD Pharmingen™ DAPI Solution	1 mg
	552362	BD IMag™ Buffer (10X) (磁珠系統專用 buffer)	100 mL
	552311	BD IMag™ Cell Separation Magnet (磁座)	1 each
	純化	血漿游離 DNA (Cell-free DNA; cfDNA) & 血漿游離 RNA (Cell-free RNA; cfRNA)	
 ZYMO RESEARCH <i>The Beauty of Science is to Make Things Simple</i>	D4076	Quick-cfDNA™ Serum & Plasma Kit	50 preps
	R1059	Quick-cfRNA™ Serum & Plasma	50 preps
 SBI System Biosciences	XCF100A-1	XCF COMPLETE Exosome and cfDNA Isolation Kit	20 rxns
	XCF200A-1	XCF Exosomal DNA Isolation Kit	20 rxns
	濃縮	循環腫瘤 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA)	
	UFC500324	Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit ; 3 kDa	24/pk
	UFC501024	Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit ; 10 kDa	24/pk
	UFC503024	Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit ; 30 kDa	24/pk
	UFC505024	Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit ; 50 kDa	24/pk
	UFC510024	Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Unit ; 100 kDa	24/pk
	定序	Next Generation Sequencing (NGS)	
 Clontech Takara cellartis	R400490	ThruPLEX® Plasma-seq Kit	12 rxns
	634888	SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit for Sequencing	12 rxns
	635005	SMARTer® Stranded Total RNA-Seq Kit - Pico Input Mammalian	12 rxns
	635029	SMARTer® smRNA-Seq Kit for Illumina®	12 rxns