

MGIEasy FFPE DNA提取预装试剂盒和MGISP-NE32全自动核酸提取纯化仪在全外显子测序中的应用

亮点

- **超高的提取效率**

为文库制备提供足量的DNA样本

- **提取高质量的DNA**

优异的试剂配方, 为下游文库制备和测序提供相对高质量的DNA样本, 助力于发现肿瘤治疗靶点

- **适用于多种组织类型**

兼容多种组织样本, 如甲状腺、宫颈、结肠和乳腺等

简介

FFPE样本是最常见的临床样本类型之一, 肿瘤 FFPE 样本为临床与转化医学研究提供了宝贵的研究素材。福尔马林石蜡包埋固定技术可以让组织样本保存很长时间, 但其特殊的制作方法和保存过程会对核酸分子造成破坏, 例如福尔马林固定使核酸与蛋白发生交联, 影响核酸提取效率; 石蜡高温渗入过程加速磷酸二脂键的水解, 导致核酸降解, 造成核酸分子高度片段化。因此, FFPE样本中的DNA质量通常都比较差, 容易导致文库产量低, SNP检出率低, 重复片段率高等问题, 而这些问题对测序应用提出了很大挑战。为了确保FFPE样本的测序成功率和数据可靠性, 需要在提取阶段提供充足的、相对高质量的DNA样本。在这篇应用案例中, 通过使用MGIEasy FFPE DNA提取预装试剂盒搭配MGISP-NE32全自动核酸提取纯化仪来提取FFPE样本中的DNA, 并通过DNA杂交, 文库制备和高通量测序, 最终获得了高质量的测序数据。

方法

材料

样本为FFPE切片(0.5厘米×0.5厘米, 厚度约10μm), 包括宫颈癌S1(4张切片), 结肠癌S2(4张切片), 甲状腺癌S3(4张切片), 乳腺癌S4(4张切片), FFPE标准品S5(1张切片)(菁良基因, PN: GWC0301)

DNA提取

使用MGIEasy FFPE DNA提取预装试剂盒(PN:940-000113-00)搭配MGISP-NE32RS全自动核酸提取纯化仪(PN:950-000019-00)来提取FFPE样本中的DNA。提取流程包括脱蜡, 洗涤, 裂解, 变形和纯化。其中, 脱蜡步骤最为关键, 脱蜡时间太长容易导致DNA降解, 时间太短容易导致DNA产量低。



图 1. FFPE DNA提取流程图

文库制备

取400纳克提取好的DNA在Covaris ME220系统上进行超声打断, 然后用MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装 (PN:1000006985) 进行预文库制备, S1-S4预文库按照比例混合后, 取1000ng总量进行杂交捕获; 标准品S5取1,000 ng单独进行杂交捕获; 经过洗脱和 Post-PCR扩增后制备成终文库。杂交捕获采用了安捷伦的SureSelect Human All Exon V8人全外显子探针组合和SureSelect XT HS2试剂盒, 并使用MGIEasy外显子组捕获辅助试剂盒 (PN:1000007743) 进行接头封闭。其中, 杂交前的预文库制备是在MGISP-100RS自动化样本制备系统(PN: 900-000206-00)上完成的。

测序

对制备好的文库进行DNB制备, 然后通过MGISEQ-2000RS基因测序仪(PN:900-000035-00)和MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100) (PN: 1000013155)进行测序



图 2. 该应用案例中所使用到的试剂和仪器信息

结果

FFPE DNA 提取质量

提取所得的FFPE DNA采用Qubit进行定量的, DNA完整度采用安捷伦TapeStation进行检测的。由于样本储存时间过长, 部分样本降解比较严重, 但是各个样本的DNA产量可以满足下游文库制备的需求。

表 1. 提取所得的DNA的检测结果

样本编号	组织类型	DIN	产量 (ng)	主峰片段 (bp)	OD260\230	OD260\280
S1	宫颈	2.9	1001	1,919	1.71	1.82
S2	结肠	4.5	2968	2241	1.94	1.58
S3	甲状腺	2.6	2332	731	1.86	1.78
S4	乳腺	2.2	612	574	1.69	1.74
S5	标准品	7.9	1944	24,312	1.82	1.9

*DIN 值低于 6 代表核酸降解, DIN值越低, 降解越严重

测序数据质量

各样本数据均一化为7.5 Gb后进行分析, 过滤前后Q30均大于85% (合格标准), 5个样本的比对率, 覆盖度 (1×) 和SNP检出率均高于99%, 说明测序结果非常好。

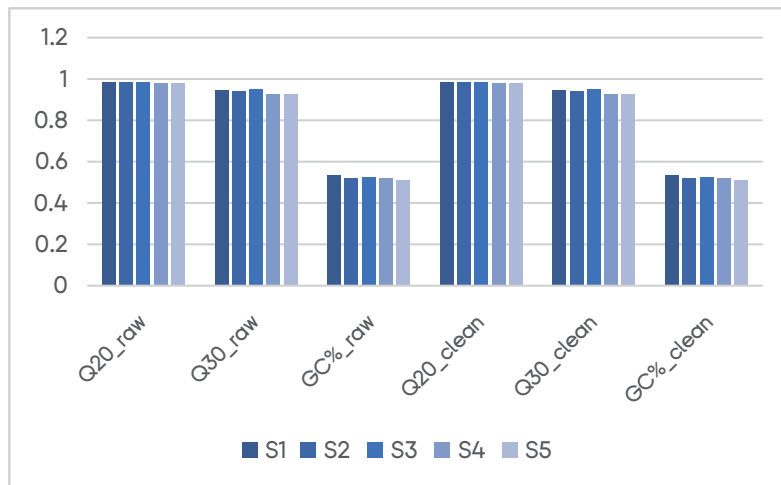


图 3. 5个FFPE样本的数据质量示意图

表 2. 测序数据质量

样本编号	比对率	覆盖度 (1×)	覆盖度(5X)	覆盖度(10X)	覆盖度(30X)	SNP检出数	dbSNP检出率
S1	99.71%	99.07%	98.79%	97.05%	93.15%	22897	99.30%
S2	99.72%	99.24%	99.07%	98.69%	98.26%	23633	99.27%
S3	99.67%	99.06%	98.47%	98.14%	97.24%	23515	99.02%
S4	99.72%	99.04%	98.85%	98.25%	97.45%	23524	99.02%
S5	99.74%	99.09%	98.92%	98.68%	98.49%	23633	99.42%

生信分析

将突变频率在1%以上的SNV和5%以上InDel分别进行统计分析,并制作circos图,如下图所示,上图是SNV的密度图,下图是InDel的密度图,从图中不同样本的曲线可以看出,5例样本检出的变异位点的密度分布比较一致。

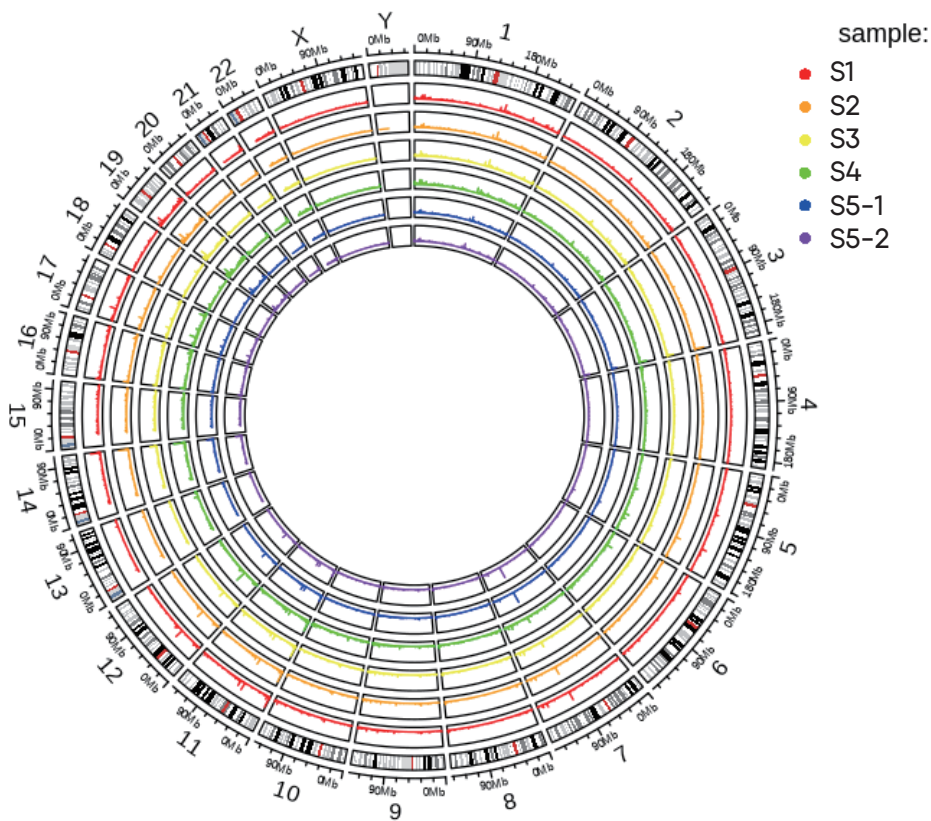


图 4. SNV密度分布图

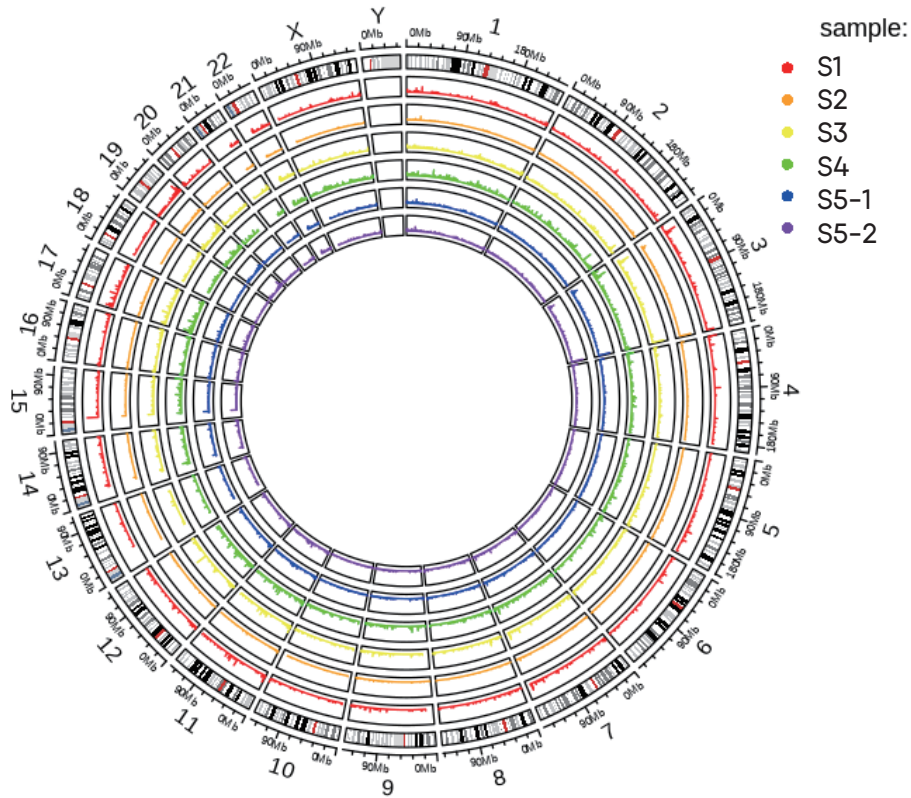


图 5. InDel密度分布图

表 3. COSMIC数据库比对结果

COSMIC数据库是Sanger研究所整理发布的一个综合性数据库,详细记录了与人类癌症相关的驱动基因,是肿瘤研究领域较权威的数据库,我们整理了这批数据能在COSMIC数据库中找到的突变。从下表可以看出, S1-S4四例肿瘤FFPE样本均能检出与人类癌症相关的驱动基因。

样本编号	在COSMIC数据库中有记录的突变数量
S1	59
S2	7211
S3	5013
S4	2912
S5	20381

总结

通过MGIEasy FFPE DNA提取预装试剂盒搭配MGISP-NE32全自动核酸提取纯化仪提取所得的DNA能完全满足下游杂交捕获,文库制备和测序的要求,测序数据质量非常好,例如比对率,基因组覆盖度,SNP检出率这些指标均完全满足下游生信分析的需求。研究结果表明MGIEasy FFPE DNA提取预装试剂盒是一款强有力的FFPE样本处理工具,能够助力于癌症研究。

订购信息

产品名	规格	货号
MGIEasy FFPE DNA提取预装试剂盒	32 人份	940-000113-00
MGIEasy 通用 DNA 文库制备试剂套装	16 人份	1000006985
MGIEasy外显子组捕获辅助试剂盒	16 人份	1000007743
MGISP-NE32RS全自动核酸提取纯化仪	-	950-000019-00
MGISEQ-2000RS 基因测序仪	-	900-000035-00
MGISEQ-2000RS 高通量快速测序试剂套装 (FCS PE100)	-	1000013155
MGISP-100RS自动化样本制备系统	-	900-000070-00

参考文献

1. Tang, W., David, F. B., Wilson, M. M., Barwick, B. G., Leyland-Jones, B. R., and Bouzyk, M. M., "DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue", Cold Spring Harbor Protocols, doi:10.1101/pdb.prot.5138, 2009.

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

 www.mgi-tech.com

 MGI-service@mgi-tech.com

 4000-688-114



仅供研究使用

版权声明: 本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有, 未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本: 2022年11月版