

## 用于游离循环DNA分离与分析的下一代完整测序工作流程

### 摘要

目前发现，游离循环DNA (cfDNA)有望成为用于肿瘤细胞检测和监测的非侵入性材料。由于循环肿瘤DNA在cfDNA中出现的几率往往较低，因此靶向测序将是一种最佳的突变检测工具。为了支持cfDNA研究的发展，我们验证了一套完整的工作流程，包括：(1) 使用Applied Biosystems™ MagMAX™游离DNA分离试剂盒从血浆中分离cfDNA，可使用磁力架手动操作，也可使用Thermo Scientific™ KingFisher™ Flex或KingFisher™ Duo Prime磁粒处理仪自动操作，(2) 然后使用Ion PGM™系统利用Ion AmpliSeq™技术的多重分析功能对分离出的cfDNA进行分子鉴定。

利用MagMAX游离DNA分离试剂盒分离并经Ion AmpliSeq™癌症热点组合试剂v2扩增的cfDNA对50个目的基因具有可重复的扩增子代表性和突变体检测能力，涵盖2,800种COSMIC突变。利用MagMAX游离DNA分离试剂盒或者按照分离柱方法分离cfDNA的效果相近。重要的是，使用MagMAX游离DNA分离试剂盒时血浆用量不到分离柱方法的一半，但分离效果同样相近。饱和研究和二次采样显示，Ion PGM系统上cfDNA热点的检测限在1%以下。这套性能稳定的cfDNA靶向测序分析工作流程兼具样品制备简单、Ion AmpliSeq技术操作简便和Ion PGM系统周转快速等特点。



### 简介

文献显示，cfDNA有望成为用于肿瘤细胞检测和监测的非侵入性材料[1, 2]。由于循环肿瘤DNA在cfDNA中出现的几率往往较低，因此靶向测序将是一种最佳的突变检测工具。血浆cfDNA在基础和临床研究(包括肿瘤研究)中应用广泛。但是，一些商品化cfDNA分离试剂盒操作流程冗长，使用试剂多，并且往往需要通过加热进行蛋白酶K处理和DNA洗脱，因此难以实施。

现在，下一代测序(NGS)技术的发展使我们可将cfDNA作为液相活检研究应用的生物标记物。要将cfDNA成功用作肿瘤研究生物标记物，需要有便于实施的模板处理程序，以及可从大量血浆(1–10 mL)中高效提取DNA的方法(因为血液中cfDNA浓度很低(10–1,000拷贝/mL))。诸如NGS等技术可对大量血浆中包含的少量cfDNA进行浓集和分析，与现有方法相比，研究人员能够更快获得更多信息。血液样品易于获得，提示我们未来可利用cfDNA提取和分析进行肿瘤细胞演化的检测和监测，这将有助于癌症的研究。

## 材料与amp;方法

### 循环cfDNA的分离与定量

从4份正常的无细胞血浆样品中分离cfDNA，以便研究cfDNA回收的可重复性和可扩展性以及cfDNA的富集程度。使用MagMAX游离DNA分离试剂盒和带24孔深孔头的KingFisher Flex磁粒处理仪对来自每份样品的4 mL和10 mL血浆进行提取。定量时利用Agilent™ 高灵敏度DNA试剂盒评估cfDNA组分，并利用Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS (高灵敏度)分析试剂盒进行总DNA定量。

为了验证上述方法与NGS分析的兼容性，我们使用MagMAX游离DNA分离试剂盒或商品化的分离柱试剂盒(试剂盒Q)对储存的4份非小细胞肺癌(NSCLC) cfDNA血浆样品进行提取。从每份血浆样品中各取1 mL，按照文献所述操作程序使用试剂盒Q分离cfDNA。使用MagMAX游离DNA分离试剂盒提取时，其中两份血浆样品取1 mL进行cfDNA分离，另两份血浆样品的起始样品量则大大减少(分别为0.580 mL和0.381 mL)。

### 分析cfDNA

使用Ion AmpliSeq™文库试剂盒2.0和Ion AmpliSeq癌症热点组合试剂v2构建文库，PCR循环数为20。使用Ion Chef™系统制备模板，然后使用Ion PGM系统测序。使用Torrent Suite™软件的Torrent Variant Caller插件或Ion Reporter™软件进行突变体检测。

## 结果

### 实验方案概述

在KingFisher Flex或KingFisher Duo Prime系统上使用MagMAX游离DNA分离试剂盒进行自动分离，可加快样品处理速度。也可使用磁力架手动处理样品。然后进行靶向测序，即通过富集的cfDNA制备文库和模板，并通过Ion PGM系统测序(图1)。

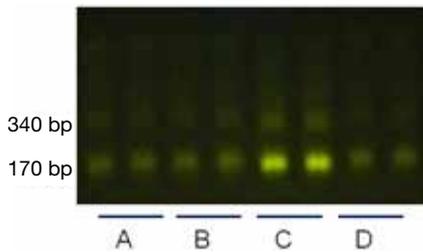


图1. 此工作流程采用NGS技术，可成功用于大量血浆中cfDNA的分析，规模可扩展，重复性好。

## 回收和可重复性

循环cfDNA呈高度碎片化，主要组分约为170 bp。为了确定分子大小依赖性的DNA回收率，将50  $\mu$ L的50 bp DNA分子量标准加入到4 mL已去除内源性cfDNA的商品化血浆中。然后使用MagMAX游离DNA分离试剂盒纯化DNA分子量标准。经过Agilent™ 2100 Bioanalyzer™系统分析，分子量100 bp至750 bp的cfDNA近100%得到回收，分子量 $\geq$ 800 bp的DNA洗脱效率较低(图2)。分子量 $<$ 800 bp的双链DNA (dsDNA)的高效回收使洗脱的DNA样品中cfDNA尤其得到富集。

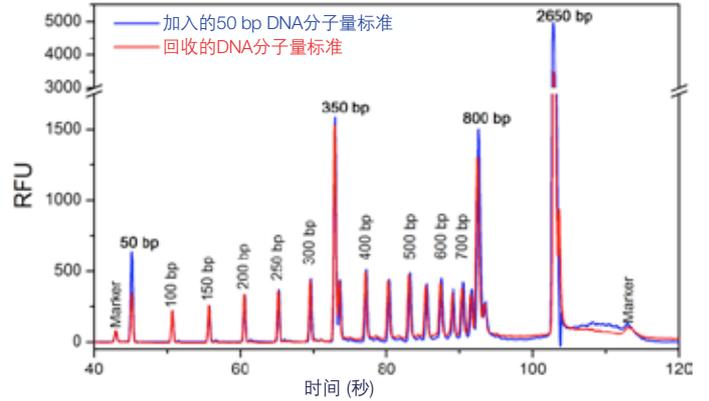
为了确定可重复性，我们使用MagMAX游离DNA分离试剂盒对4份血浆样品进行双份处理。使用2% Invitrogen™ E-Gel™ EX琼脂糖凝胶分析提取的DNA (图3)。每组双份样品的cfDNA产量均相近，主要组分在170 bp附近最为清晰。



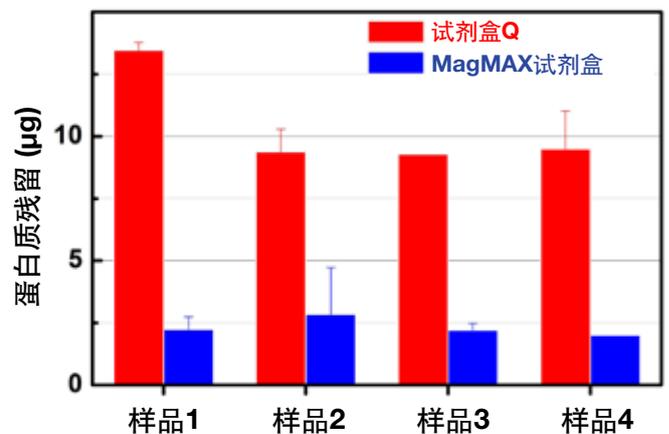
**图3. cfDNA回收的可重复性。**使用MagMAX游离DNA分离试剂盒对来自4名供者的血浆样品进行双份处理。从4 mL血浆中提取cfDNA，然后洗脱到50  $\mu$ L洗脱液中。通过2% E-Gel EX琼脂糖凝胶对20  $\mu$ L洗脱的DNA进行分析，以便分析。

## 蛋白质污染

使用Invitrogen™ Qubit™蛋白质分析试剂盒对分别采用MagMAX游离DNA分离试剂盒和商品化分离柱试剂盒(试剂盒Q)提取的DNA中的蛋白质污染情况进行定量分析。尽管未使用蛋白酶K，但与同类厂商的试剂盒相比，使用MagMAX游离DNA分离试剂盒处理样品时，蛋白质残留显著减少(图4)。试剂盒Q操作程序的第一步是在60°C下进行30分钟的蛋白酶K消化。



**图2. 短链DNA回收效率。**将50  $\mu$ L的50 bp DNA分子量标准(2 ng/ $\mu$ L)加入到4 mL已去除cfDNA的血浆中，然后向血浆中加入60  $\mu$ L MagMAX™游离DNA磁珠。冲洗结合的DNA，将其洗脱到50  $\mu$ L洗脱液中。为了评估MagMAX游离DNA分离试剂盒的回收效率，使用Agilent 2100 Bioanalyzer系统和高灵敏度DNA芯片分析1  $\mu$ L分子量标准和1  $\mu$ L提取的DNA样品。



**图3. cfDNA回收的可重复性。**使用MagMAX游离DNA分离试剂盒对来自4名供者的血浆样品进行双份处理。从4 mL血浆中提取cfDNA，然后洗脱到50  $\mu$ L洗脱液中。通过2% E-Gel EX琼脂糖凝胶对20  $\mu$ L洗脱的DNA进行分析，以便分析。

## cfDNA的富集

一些高分子量细胞DNA可能会在采血后以及血浆分离过程中从白细胞中释放出来。cfDNA呈高度碎片化，会与核糖体RNA一同迁移，主峰在170 bp附近。经过设计，MagMAX游离DNA分离试剂盒仅高效回收长度小于800 bp的DNA (图2)，因此可以富集cfDNA。通过比较MagMAX游离DNA分离试剂盒和试剂盒Q对多个血浆样品的cfDNA富集效果，可以确认这一点(图5)。MagMAX游离DNA分离试剂盒的cfDNA (<700 bp的组分)产量与试剂盒Q相同，但细胞DNA (>700 bp的组分)产量相对较低。因此，使用MagMAX游离DNA分离试剂盒时，cfDNA组分在提取的总DNA中所占百分比相对较高(即：cfDNA得到富集)。

## 扩展性和自动化

使用MagMAX游离DNA分离试剂盒时，可处理的样品体积和回收的DNA量具有高度的扩展性。将长度为120 bp和170 bp的dsDNA以10 ng至200 ng的不同加样量加入到血浆样品中。在整个加样范围内两种DNA均得到一致、高效的回收(图6A)。为了验证样品体积的扩展性，对来自同一样品的4 mL和10 mL血浆分别进行cfDNA分离。不出预料，10 mL血浆的DNA产量约为4 mL血浆DNA产量的2.5倍(图6B和C)，而残留蛋白质总量仅轻微增加(图6D)。

使用KingFisher Flex (每次处理24个样品)或KingFisher Duo Prime (每次处理6个样品)系统最多可自动处理5 mL的血浆。将试剂和血浆样品加入样品板后大约40分钟即可获得富集的cfDNA样品。为了验证上述两个系统的性能，从4份血浆样品中各取4 mL，并用MagMAX游离DNA分离试剂盒进行处理。将洗脱的DNA加到高灵敏度DNA芯片上，并使用Agilent Bioanalyzer 2100系统进行分析。4份样品的产量和分子量分布图均相近，表明二者回收性能接近(图7)。

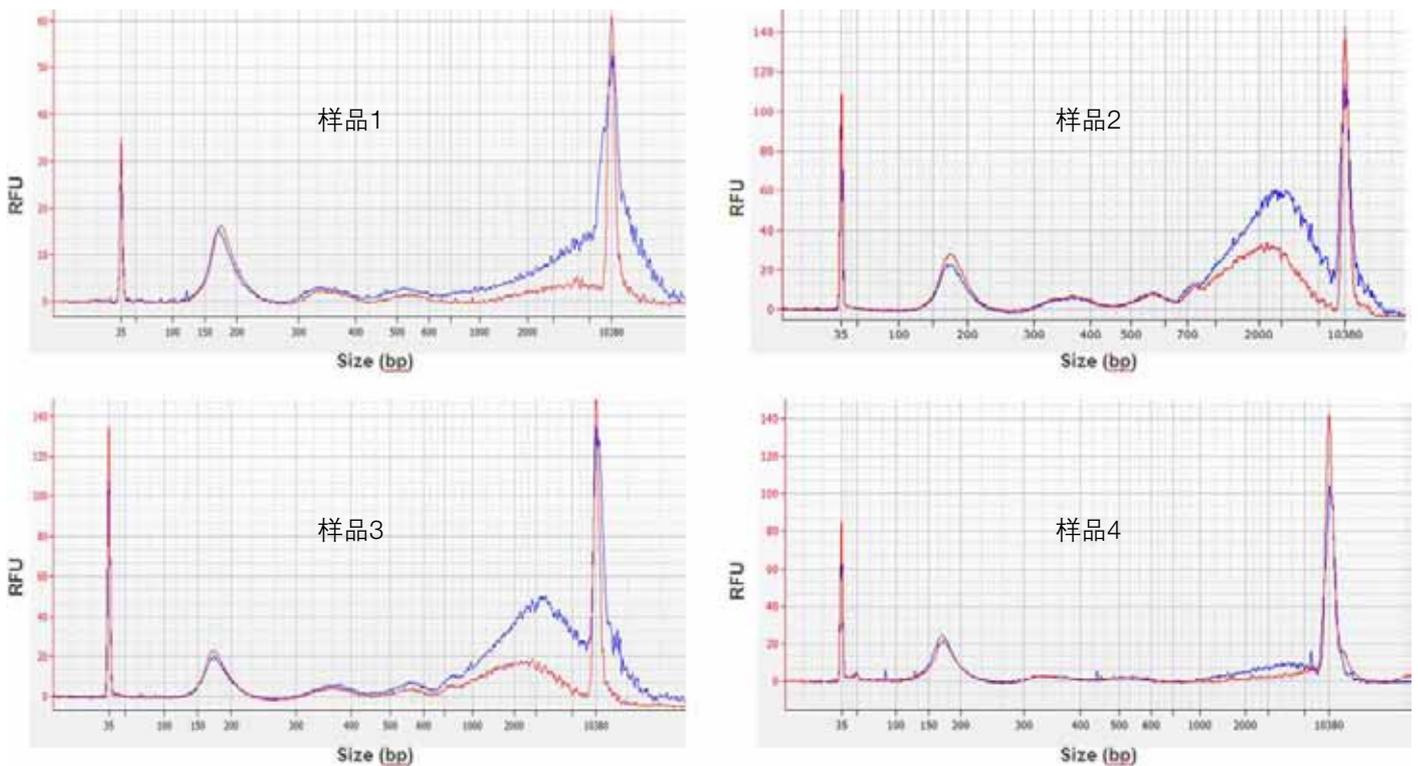


图5. 对从血浆样品中提取的cfDNA进行富集。将4份正常血液样品先以2,000 × g的离心力离心20分钟，然后以6,000 × g的离心力离心30分钟分离无细胞血浆。分别使用MagMAX游离DNA分离试剂盒(红线)或试剂盒Q(蓝线)从4 mL血浆中提取DNA。将洗脱的DNA加到高灵敏度DNA芯片上，并使用Agilent Bioanalyzer 2100系统进行分析。

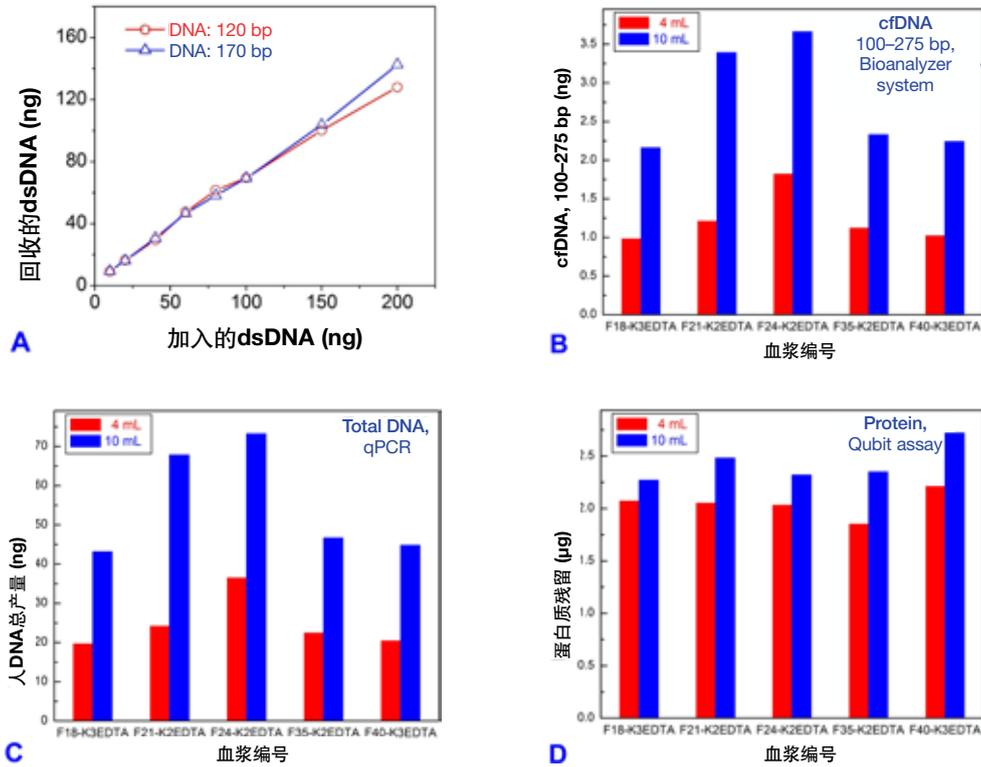


图6. cfDNA分离的扩展性。图6. 将120 bp和170 bp的dsDNA以不同的加样量加入到血浆样品中，并用MagMAX游离DNA分离试剂盒进行回收。(B) 使用Agilent Bioanalyzer 2100系统对来自4 mL和10 mL血浆的cfDNA进行定量。(C) 通过qPCR对来自4 mL和10 mL血浆的cfDNA进行定量。(D) 使用Qubit蛋白质分析试剂盒测定残留蛋白质总量。

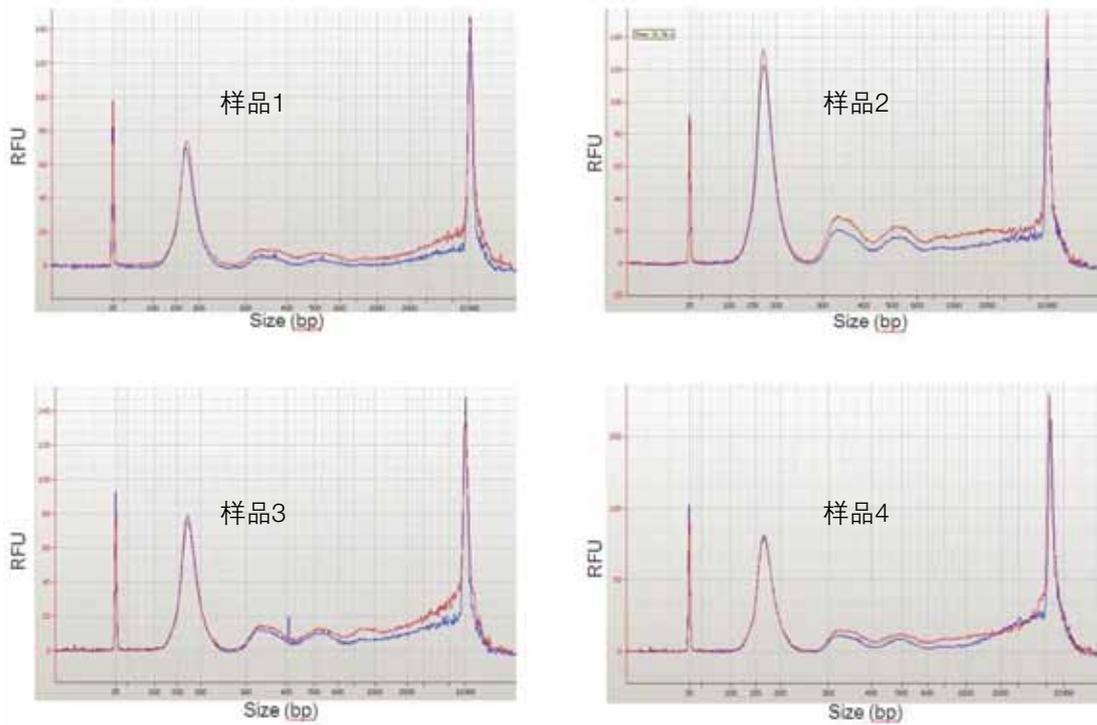
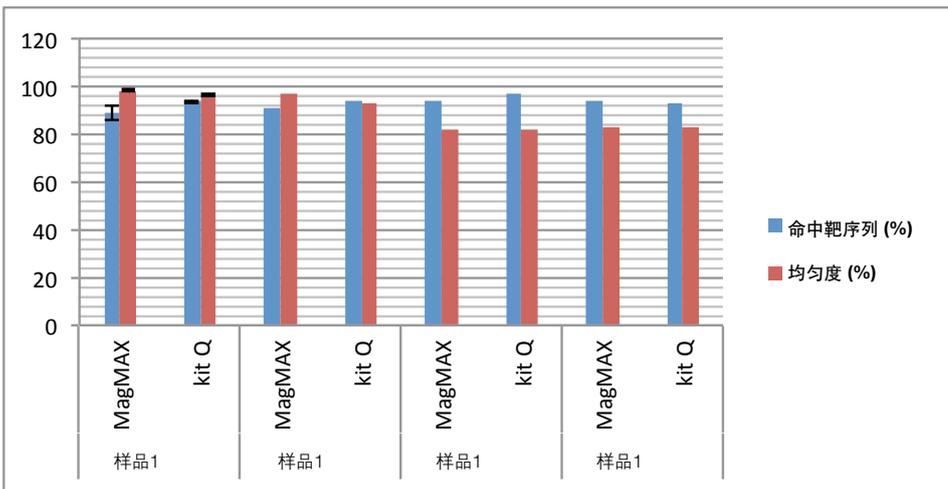


图 7. 使用KingFisher系统进行cfDNA自动分离。图中显示使用KingFisher Flex系统(红色)和KingFisher Duo Prime系统(蓝色)分离的cfDNA曲线重叠。

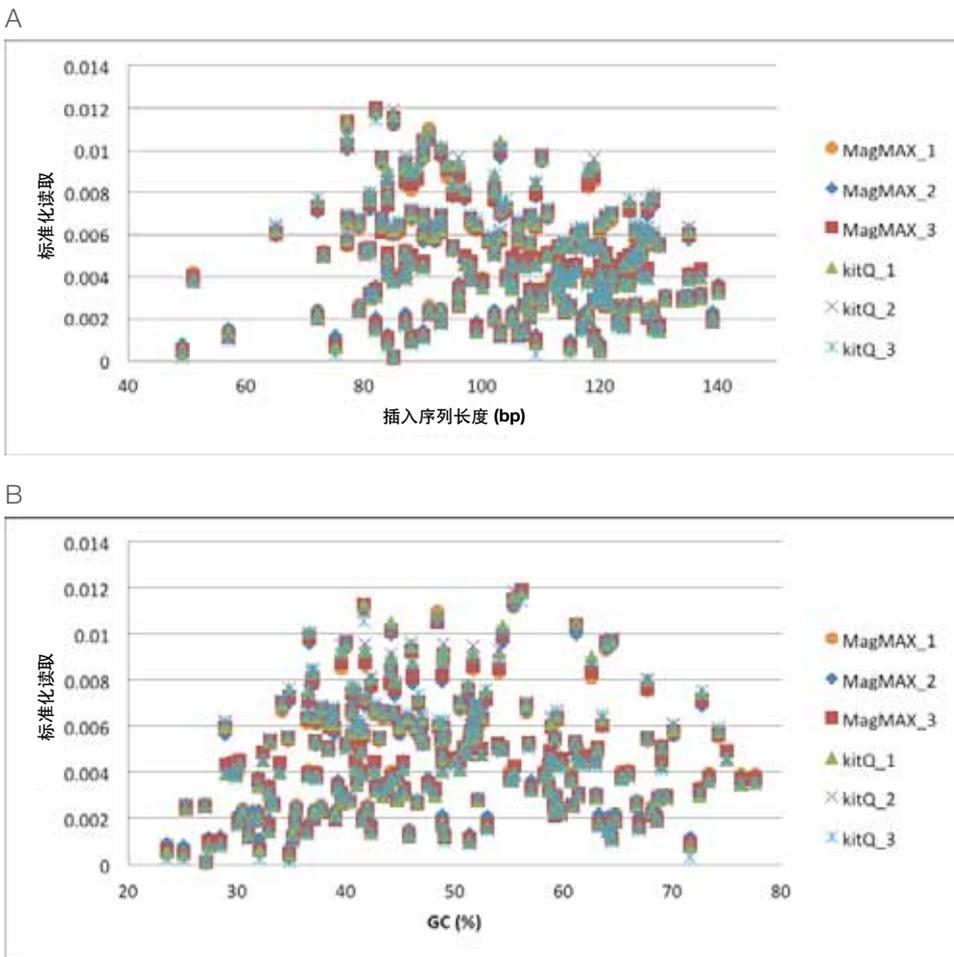
## cfDNA靶向测序

使用MagMAX游离DNA分离试剂盒或试剂盒Q分离4份NSCLC cfDNA样品。使用试剂盒Q时，分离每份样品使用1 mL血浆。使用MagMAX游离DNA分离试剂盒时，前两份使用1 mL进行分离，后两份分别使用0.580 mL和0.381 mL血浆进行分离。使用Ion AmpliSeq癌症热点组合试剂v2构建Ion AmpliSeq™ 文库，使用Ion Chef系统制备模板，使用Ion PGM系统进行测序。两种分离方法测序读取命中靶序列的百分比相近，MagMAX游离DNA分离试剂盒使用较少血浆体积时也是如此(图8)。4份样品的扩增子均匀度均相近。



**图8. NSCLC样品的扩增子性能。**1-4号样品采用MagMAX游离DNA分离试剂盒或试剂盒Q进行分离，并采用Ion PGM系统进行测序。图中显示了两种分离方法的命中靶序列测序读取百分比和均匀度。

使用Ion AmpliSeq癌症热点组合试剂v2和通过MagMAX游离DNA分离试剂盒或试剂盒Q分离的NSCLC cfDNA制备三份相同的文库。每份文库单独进行模板制备和测序。Torrent Suite软件的覆盖度分析插件可显示插入序列长度与标准化扩增子覆盖度之间的关系，结果显示两种cfDNA分离程序之间存在高度的可重复性(图9A)。结果同样显示，对这两种cfDNA分离程序而言，每个扩增子的GC含量百分比与标准化扩增子覆盖度之间的关系具有可重复性(图9B)。



**图9. NSCLC样品扩增子覆盖度的可重复性。**使用经MagMAX游离DNA分离试剂盒或试剂盒Q分离的cfDNA单独制备3份相同的文库并测序。(A)以插入序列长度与标准化扩增子覆盖度的关系作图。(B)以每个扩增子的GC含量百分比与标准化扩增子覆盖度之间的关系作图。

使用Torrent Suite软件的Torrent Variant Caller插件进行分析显示，等位基因频率具有良好的一致性。样品1有分别采用MagMAX游离DNA分离试剂盒和试剂盒Q制备的cfDNA文库各3份(表1)。6份文库的突变体检测结果均相近。来自样品3的0.381 mL血浆经MagMAX游离DNA分离试剂盒处理，1 mL血浆经试剂盒Q处理，二者的突变体检测结果相近。

表1. NSCLC样品的热点等位基因频率。

样品	基因	COSMIC ID	FFPE	MagMAX 游离DNA 分离 试剂盒	试剂盒 Q
样品1	MET	710	ND	49.8	47.9
				46.8	50.1
				49.2	50
样品3	MET	710	63	47.9	46
	SMARCB1	1090	62.9	46	45.2
	PTEN	5915	62.5	49.6	46.6
	PDGFRA	22413	73.6	47.7	46.5
样品4	MET	710	31.8	49.1	47.2
	PTEN	5915	86.7	52.7	47.9
	HRAS	249860	99	99.8	96

## 结论

我们开发了一套包含一系列试剂和工具的工作流程，可用于血浆或血清等无细胞样品中cfDNA的回收和分析。这套完整的工作流程包括自动分离cfDNA以及采用Ion AmpliSeq癌症热点组合试剂v2以靶向测序方式进行高灵敏度、可重复的下游分析。

Ion AmpliSeq癌症热点组合试剂v2的扩增子性能重复性好，并可检测cfDNA突变。使用MagMAX游离DNA分离试剂盒或分离柱法分离cfDNA时，Ion AmpliSeq技术的性能相近，即使MagMAX试剂盒法的血浆用量不到分离柱法的一半，结果也是如此。这套性能稳定的cfDNA分离和靶向测序工作流程兼具样品制备简单、Ion AmpliSeq技术操作简便和Ion PGM系统周转快速等特点。

## 参考文献

- Bettegowada C, Sausen M, Leary RJ et al. (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra24.
- Lebofsky R, Decraene C, Bernard V et al. (2015) Circulating tumor DNA as a non-invasive substitute to metastasis biopsy for tumor genotyping and personalized medicine in a prospective trial across all tumor types. *Mol Oncol* 9:783-790.

## 订购信息

产品	货号
MagMAX游离DNA分离试剂盒	A29319
KingFisher Duo Prime磁粒处理仪	5400110
KingFisher Flex磁粒处理仪及96孔深孔头 (适用于1 mL以下的血浆体积)	5400630
KingFisher Flex磁粒处理仪及24孔深孔头 (适用于5 mL以下的血浆体积)	5400640
Qubit dsDNA HS分析试剂盒	Q32854
Ion AmpliSeq文库试剂盒2.0	4480442
Ion AmpliSeq癌症热点组合试剂v2	4475346

如需了解更多信息，请登录 [thermofisher.com/cfdnaisolation](http://thermofisher.com/cfdnaisolation)

免费服务电话：800 820 8982 / 400 820 8982

销售服务信箱：sales-cn@thermofisher.com

技术咨询信箱：LifeScience-CNTS@thermofisher.com

上海办事处 电话：021-61452000

北京办事处 电话：010-84461800

广州办事处 电话：020-38975100

成都办事处 电话：028-65545388

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC

[thermofisher.com](http://thermofisher.com)