

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒

简介

快速且准确的癌症基因组分析是癌症检测和治疗管理研究的迫切要求。然而，临床癌症研究样本通常为用于组织病理学分析和组织保存的福尔马林固定石蜡包埋样本 (FFPE)。该方法可保护组织，实现长期保存，但大量的核酸化学交联会使下游处理应用(如下一代测序(NGS))变得复杂。

Applied Biosystems™ MagMAX™ FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒可以从FFPE样本中快速、可靠地进行核酸分离。利用简单的工作流程，可从同一样本中顺序抽提DNA和RNA，实现各种样本分析。此外，还可以手动处理样本，或使用开放式机器人等自动化系统同时处理至多96个样本。基于磁珠的实验方案和磁珠核酸酶处理有助于减少样本损失，使该试剂盒适用于小量或有限的组织标本。该试剂盒还与CitriSolv™清洁剂结合使用，后者可代替二甲苯脱蜡，毒性较小，且无需在化学通风橱内使用。

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒已经过验证，适用于多种研究样本类型，包括实体瘤活检、穿刺活检和细针抽吸样本。利用该试剂盒，可从5 µm FFPE样本切片中分离核酸，产量和质量与其他使用磁珠或离心柱的商品化的试剂盒相当，与其他主要供应商的试剂盒相比，手动操作时间缩短约40%。使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒提取的DNA、RNA和microRNA可用于多种下游分子应用，



包括qPCR、Agilent Bioanalyzer™系统分析和NGS，即便是使用保存超过25年的FFPE组织亦可。

本应用指南介绍了使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒，从5–40 µm的人FFPE组织切片中抽提DNA和RNA并在Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo系统或KingFisher™ Flex磁粒处理仪上处理的过程。我们检测了多种FFPE样本类型，包括实体瘤切除、穿刺活检和细针抽吸样本。核酸产量、质量和功能已经过下游应用测试，包括Ion Torrent™ NGS测序。

方法

图1显示了从FFPE样本中分离核酸的工作流程步骤。FFPE样本先进行脱蜡，然后使用蛋白酶K溶液酶切。在微量离心管中手动处理利用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒获得的抽提物，或在KingFisher Duo系统或KingFisher Flex磁粒处理仪上自动处理。使用Invitrogen™ Quant-iT™ dsDNA和RNA分析试剂盒及96孔酶标仪定量核酸产量。

对于qPCR分析，使用Invitrogen™ SuperScript™ VILO™ cDNA合成试剂盒对样本进行逆转录，然后使用Applied Biosystems™ TaqMan™ 基因表达分析。对于miRNA分析，使用Applied Biosystems™ TaqMan™ MicroRNA逆转录试剂盒对RNA样本进行逆转录，然后使用Applied Biosystems™ TaqMan™ MicroRNA分析。在Applied Biosystems™ 7900HT快速实时荧光定量PCR系统上运行样本，自动测定C_q值。

为检测NGS兼容性，我们使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒或其他基于离心柱的商品化的抽提试剂盒抽提FFPE组织样本。使用两种试剂盒，从连续的FFPE组织切片中提取DNA和RNA，重复两次。参照其他供应商试剂盒的实验方案，对使用该试剂盒抽提的样本进行手动处理，而MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒样本在带有96孔板头的KingFisher Flex处理仪上处理。

文库制备和测序

使用Ion AmpliSeq™文库试剂盒2.0及Oncomine™ Focus Assay检测板或Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2和RNA Cancer Panel，从10 ng起始DNA或RNA构建NGS文库。在Ion Chef™系统上制备样本模板，然后使用Ion PGM™系统测序。利用Torrent Suite™软件或Ion Reporter™软件上的Torrent Variant Caller (覆盖度分析插件)，分析这些检测板上的基因数据并检测变异。

结果和讨论

回收率和可重复性

为检测核酸回收的可重复性，我们使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒及其他基于离心柱的商品化试剂盒(试剂盒Q)处理保存的FFPE样本。等体积(50 µL)洗脱所有样本，使用Quant-iT dsDNA和RNA分析试剂盒进行定量。使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒获得的DNA和RNA产量等于或高于使用其他供应商试剂盒获得的产量(图2)。此外，在KingFisher Flex系统上对使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒获得的样本进行自动化处理，操作时间较使用试剂盒Q进行手动提取的时间缩短约40%。

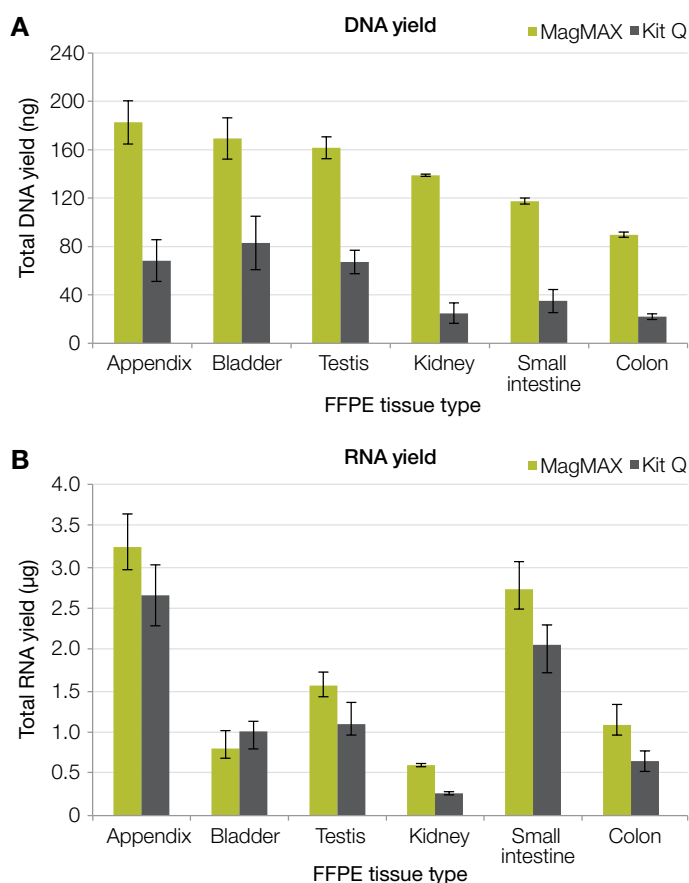


图2. 核酸回收的可重复性。使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒或其他基于离心柱的商品化试剂盒(试剂盒Q)，从FFPE组织(包埋时间1981–2004年)中抽提的(A) DNA和(B) RNA的产量。



图1. MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra样本抽提和测序工作流程。

为确定抽提的核酸是否适用于下游分子应用，我们进行了实时荧光定量PCR分析。使用SuperScript VILO cDNA合成试剂盒对RNA样本进行逆转录，在7900HT快速实时荧光定量PCR系统上，使用针对*GAPDH*基因(扩增片段长度93 bp)的TaqMan基因表达分析进行qPCR分析，所有样本的起始体积相同。使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒抽提的RNA样本的C_t值始终较使用试剂盒Q获得的样本的C_t值更低(图3)。

脱蜡剂

二甲苯是传统的FFPE样本脱蜡剂，样本脱蜡后再进行核酸抽提。二甲苯可以高效去除组织切片上的石蜡，但需要在化学通风橱内操作该溶剂。CitriSolv清洁剂是一种毒性较低的脱蜡剂，它已经过检测，可与MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒结合使用。使用二甲苯或CitriSolv溶液对三个不同FFPE样本中连续的10 μm切片进行脱蜡。脱蜡后，在带有96孔板头的KingFisher Flex磁粒处理仪上自动酶切并抽提样本。使用Quant-iT dsDNA和RNA分析试剂盒定量DNA和RNA产量(图4)。

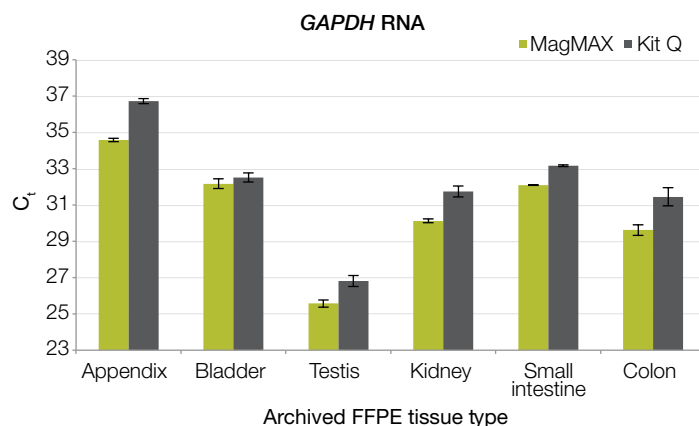


图3. RNA样本的实时荧光定量PCR分析。FFPE组织切片中，使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒提取的*GAPDH*分析RNA的C_t值始终低于其他使用基于离心柱的商品化试剂盒(试剂盒Q)获取的RNA。

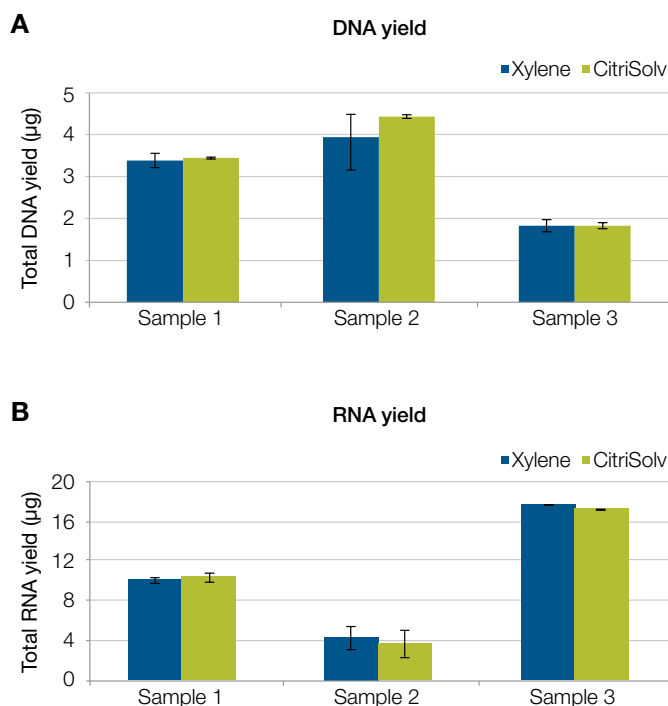


图4. CitriSolv脱蜡剂与MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒的兼容性。使用二甲苯或CitriSolv溶液进行脱蜡时，10 μm FFPE组织切片中的(A) DNA和(B) RNA的产量相当。

自动化和扩展性

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒具有内在灵活性和扩展性，利用KingFisher Duo系统可以同时处理多至12个样本，或使用KingFisher Flex磁粒处理仪可处理多至96个样本。为确定自动和手动抽提方法是否可以获得相同的核酸产量和质量，我们使用MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂

盒(手动抽提)以及在KingFisher Flex和KingFisher Duo磁粒处理仪上处理连续的FFPE样本。上述三种方法的总核酸产量相当，用于下游应用(如使用Agilent Bioanalyzer系统进行RNA分析)的核酸质量亦相当(图5和6)。

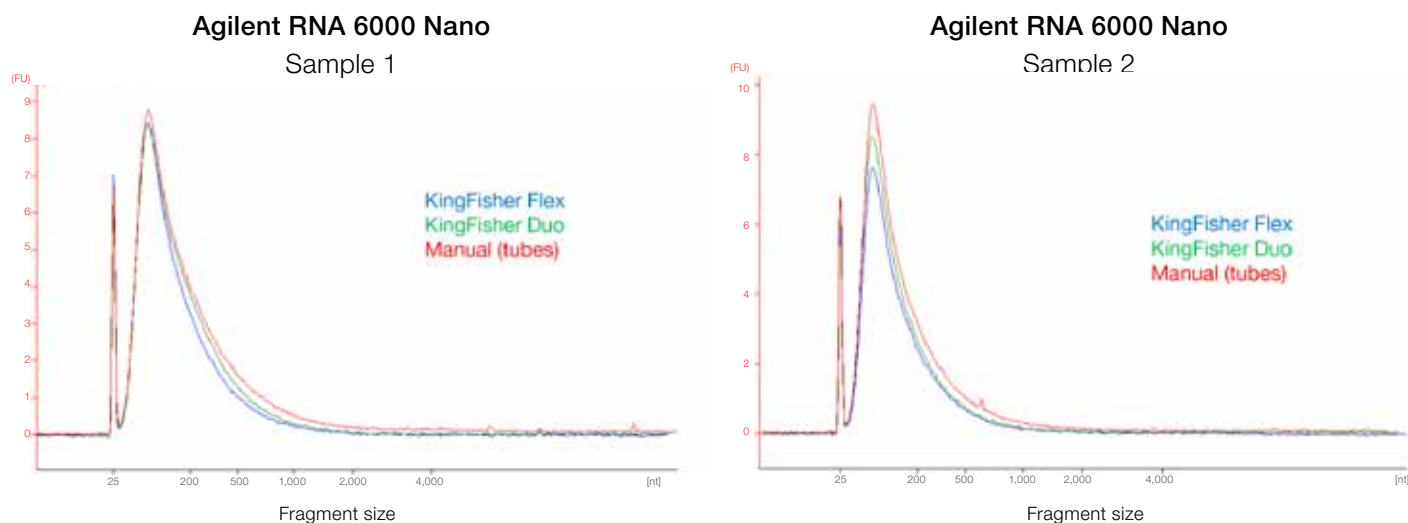


图5. 使用Agilent RNA 6000 Nano试剂盒对FFPE样本进行RNA分析。手动抽提的样本或在KingFisher Flex磁粒处理仪或KingFisher Duo系统上采用自动化实验方案抽提的样本，具有相当的RNA产量和片段大小。

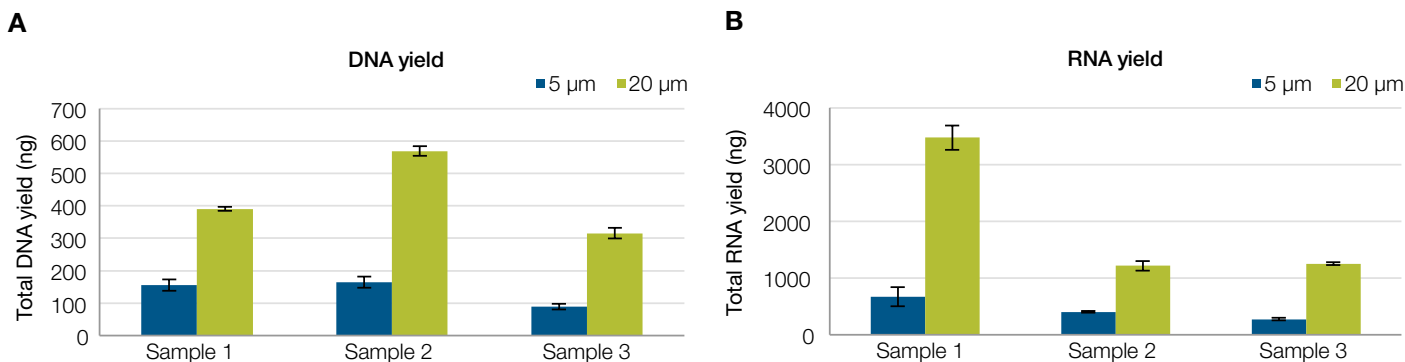


图6. 起始样本扩展性。在KingFisher Flex系统上处理配对的5 µm 和20 µm FFPE切片。所有样本的(A) DNA和(B)总产量相应增加，说明样本在一定的FFPE切片厚度范围内具有可扩展的功能。

穿刺活检和细针抽吸样本

为确定MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒在常用的癌症研究样本中的通用性，我们抽提了多种穿刺活检和细针抽吸样本。使用自动化的Kingfisher Duo实验方案抽提配对样本中的核酸。使用Oncomine Focus Assay检测板及10 ng起始样本制备文库。在Ion Chef系统上制备样本模板，然后使用Ion PGM系统测序。

所有的供体和组织类型均可获得一致的测序测量指标。DNA平均读取长度≥109 bp，均匀度为97%，无链偏差。所有5种内源性对照基因的RNA平均读取长度≥87 bp (图7)。

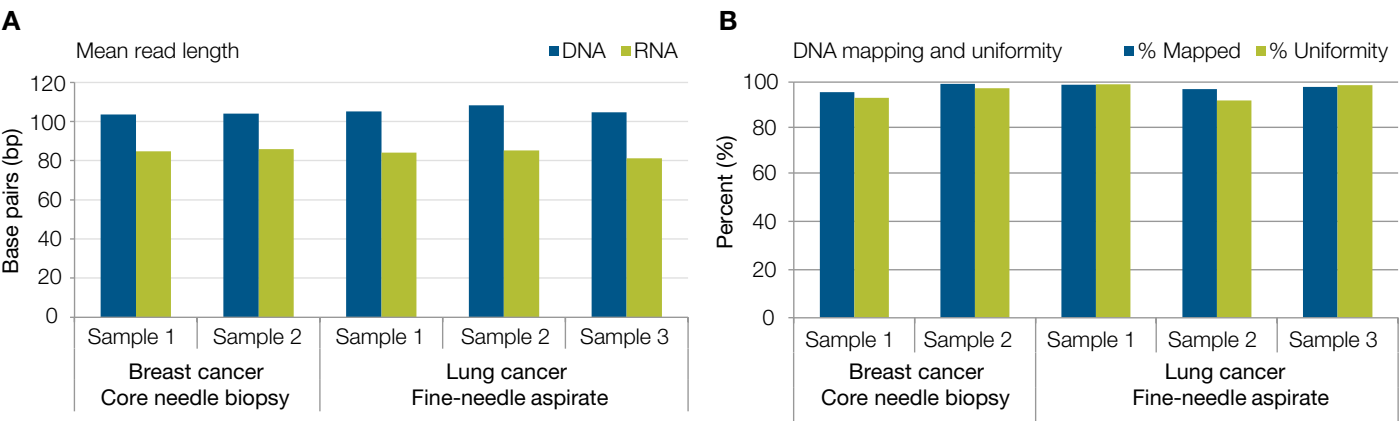


图7. 癌症研究样本的测序。从穿刺活检和细针抽吸样本中获取的测序测量指标(如(A)平均读取长度和(B) DNA映射和均匀度)均一致，证明了不同标本类型的核酸回收率。使用Oncomine Focus Assay检测板及10 ng起始样本制备60 pM文库。分别利用Ion Chef和Ion PGM系统制备样本模板并测序。

Ion Torrent测序的准确度和灵敏度

许多FFPE样本的供应都十分有限，这就要求提取方法不仅要具有可重复性，还必须从极少的起始样本中获得准确的结果。为检测分析灵敏度，我们对FFPE样本进行酶切，然后稀释至起始样本量的10%，用于剩下的提取实验方案。在全部起始样本滴度范围内，核酸产量具有高线性度，说明该分析的DNA和RNA回收率高(图8)。

为测定样本是否具有高功能质量，我们使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2制备了NGS文库。所有文库均使用10 ng起始样本制备，并在Ion PGM系统上测序。使用Torrent Variant Caller插件分析DNA变异。抽提的起始样本的滴度对平均读取长度或均匀度无影响。此外，在所有起始DNA样本百分比范围内均检测出了相同的单核苷酸多态性(SNP)变异(表1)。

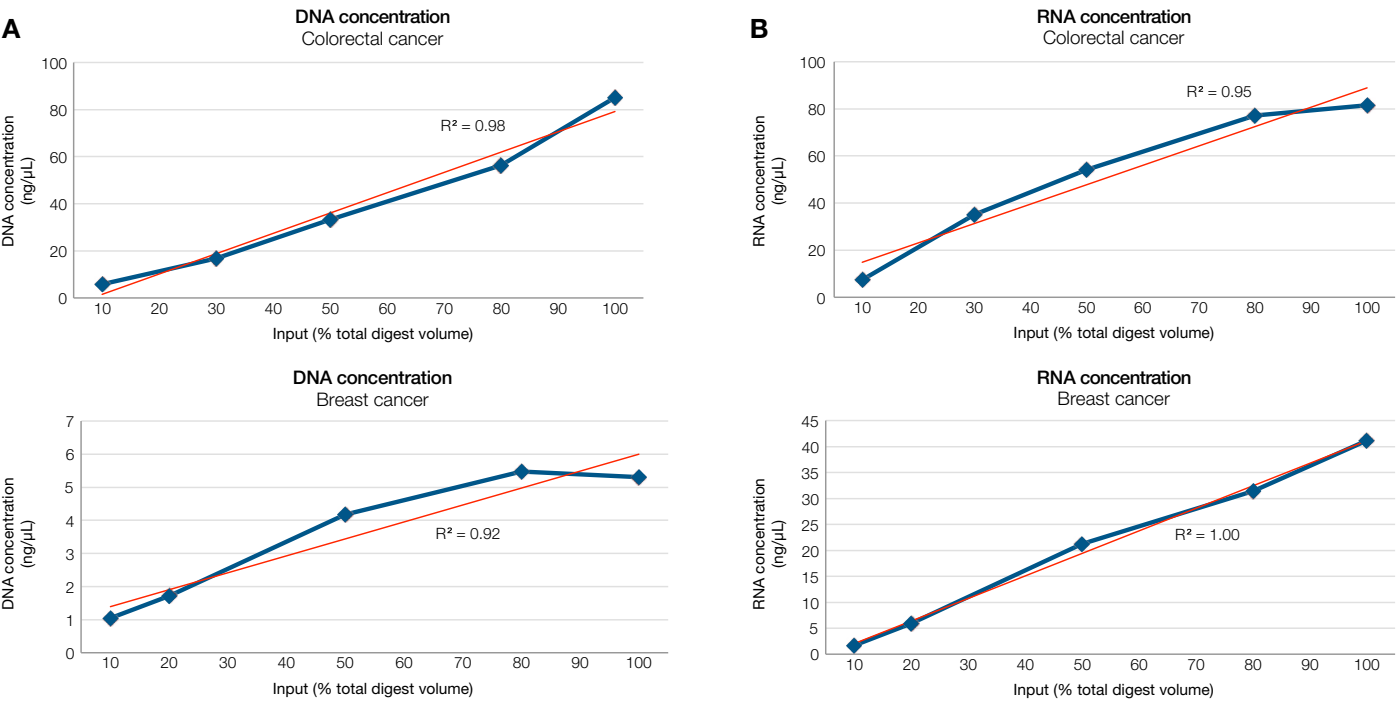


图8. 从FFPE癌症样本中回收DNA和RNA。10 μm FFPE结直肠癌和乳腺癌样本切片中的(A) DNA和(B) RNA产量。使用蛋白酶K溶液进行酶切，然后稀释样本至起始样本的10%，用于剩下的提取实验方案。产量和起始样本百分比之间的线性相关度说明了DNA和RNA的高核酸回收率。

表1. 癌症样本中的变异检测。蛋白酶K酶切后，用新鲜的酶切缓冲液稀释FFPE样本至不同的起始百分比。参照实验方案进行抽提，使用Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2制备文库，进行Ion PGM测序。对于结直肠癌和乳腺癌肿瘤类型，我们可以检测到完全相同的癌症热点变异，验证了起始滴度范围内分析的灵敏度和功能性。

FFPE组织类型	起始样本 (%总酶切产物)	平均读取长度(bp)	检测的热点变异数	热点基因ID
Colorectal cancer	100%	119	9	PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1
	80%	111	9	PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1
	50%	113	9	PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1
	30%	112	9	PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1
	10%	113	9	PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1
Breast cancer	100%	109	3	KIT, MET, HRAS
	80%	108	3	KIT, MET, HRAS
	50%	109	3	KIT, MET, HRAS
	20%	109	3	KIT, MET, HRAS
	10%	108	3	KIT, MET, HRAS

结论

MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra试剂盒提供了高度可靠、通用且可扩展的核酸提取方法，适用于各种分子分析和应用。该试剂盒适用于多种FFPE组织类型，即便是保存超过25年的组织块亦可。此外还可以从多种活检样本中轻松地回收核酸，包括实体瘤切片、细针抽吸和穿刺活检样本。

分析参数灵活，可用于多种处理方案。例如，从各种厚度的切片中抽提的样本具有相当的核酸产量和质量。您可以手动进行分析，也可自动化操作，同时处理多至96个样本。此外，该试剂盒还可与其他脱蜡试剂(如CitriSolv溶液)结合使用，提供一种毒性较低的流程，且无需使用化学通风橱。

使用MagMAX FFPE Ultra试剂盒提取的DNA和RNA适用于多种下游应用，包括qPCR，使用Agilent Bioanalyzer系统和Ion Torrent NGS进行分析。利用Ion AmpliSeq技术还可制备高质量的NGS文库，只需10 ng起始样本，使得从珍贵且不可替代的FFPE样本中采集的数据最大化。



如需了解更多信息，请登录 thermofisher.com/ffpeisolation

免费服务电话：800 820 8982 / 400 820 8982
销售服务信箱：sales.china@thermofisher.com
技术咨询信箱：lifescience-cn@thermofisher.com

上海办事处 电话：021-61452000	广州办事处 电话：020-38975100
北京办事处 电话：010-84461800	成都办事处 电话：028-65545388

thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2017 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.