

# 一种FFPF样本Sanger测序简易DNA提取方法

## 本应用说明向您展示：

- Ion AmpliSeq™ Direct FFPE DNA试剂盒最大限度简化了从FFPE样品中提取微量DNA，并应用于Sanger测序
- 采用Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒提取的DNA进行Sanger测序，性能堪比从同一样本中提取的纯化的DNA。
- 直接提取的DNA进行Sanger测序结合Minor Variant Finder软件分析，有助于检测保存样本中的低频等位基因，获得的数据和新一代测序结果一致。

## 简介

将组织样本固定在多聚甲醛中或者包埋在石蜡块中保存，是存档生物样本的标准保存法。福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样本中的核酸较好地保存了当时细胞的基因组状态和转录组信息，能够为回溯性研究提供重要信息。由此从这类存档样本中提取DNA和RNA的方法顺势而生。然而，这类核酸提取方法通常既费时，又需要许多步骤的手动操作，而且每一步操作都可能会造成样本混杂或者损失。另外，清除石蜡和核酸提取所用到的试剂有毒有害，对这些试剂进行后续处理又增加了成本。因此，从FFPF样本中提取DNA和RNA的简易方法可能大幅改善回溯性研究。



我们研发了一种简单、快速地从载玻片保存的组织切片中提取核酸的试剂盒。简单来说，实验步骤包括了将一种试剂加入组织切片，然后将组织从载玻片上刮下，保存在试管中。在混合物加入第二种试剂，孵育15分钟，随后高温变性10分钟。这之后提取的物质就可用于后续分析。

Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒最初是为了简化构建 Ion AmpliSeq™文库和 Ion Torrent™新一代测序 (NGS) 系统测序所需要的样品制备而设计的。在本应用说明中,我们将进一步说明,使用 Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒提取的DNA同样可用于 Applied Biosystems™毛细管电泳 (CE) 平台的 Sanger 测序 (图1)。为了具体说明如何进行这一流程,我们将展示 Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒提取的DNA如何用于检测肿瘤组织中单核苷酸变异 (SNV)。我们开发出了一种界面友好的台式机软件包 Minor Variant Finder, 专门用于 Sanger 测序数据的 SNV 检测和结果报告。Minor Variant Finder 可以从低至 1ng 的 FFPF 样本 DNA 提取物中检测到频率低至 5% 的变异。这些工具共同为临床研究者提供了从存档样本快速有效获得序列信息的方法。

### 实验方案

DNA 直接提取和 Sanger 测序方法总结如下。如需更多细节,请查阅 Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA 试剂盒使用指南 (Pub. No. MAN0014881), Applied Biosystems™ BigDye™ Direct Cycle 测序试剂盒产品手册 (Pub. No. CO13911) 和 Applied Biosystems™ BigDye™ XTerminator 纯化试剂盒实验方案概要 (Pub. No. 107PR04-01)。

### Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA 试剂盒 DNA 直接提取 DNA

1. 每个样本使用一个单独的 20 μL 移液器吸头:
  - a. 吸取 10 μL 转移液, 滴在载玻片固定的 FFPF 组织切片目标区域。
  - b. 紧接着使用该吸头, 铺开转移液, 确保目标组织区域被转移液完全覆盖。然后用吸头刮擦破坏组织, 使组织在转移液中呈小颗粒悬浮液。
2. 从载玻片上吸取悬浮液, 转入 0.2 mL 试管中。
3. 上下吹打悬浮液至少 5 次。
4. 如果需要, 使用同一个吸头重复 1-3 步, 尽可能将最多的目标区域组织转移到试管中。



图1. 从 FFPF 样本直接提取 DNA 和 Sanger 测序工作流程。使用这一简化的实验方案, 研究者可以在 7 小时内从 FFPF 样本中获得 Sanger 测序信息, 手动操作时间不到 1 小时。简化的流程还能帮助减少样本混杂或损失的几率。



图2. 从载玻片上转移 FFPF 样本实例。(A) 人肝脏起始样本, 在 FFPF 切片载玻片上保存。(B) 加上转移液后, 从载玻片上刮下组织。在某些情况下, 需要使用 20 μL 吸头作为涂刮板。(C) 将被刮下的组织转移到新管后, 剩下包含石蜡的载玻片。

注：最后悬浮液体积可能不同，但在步骤5-8中不需要进行体积量调节。

5. 将21  $\mu\text{L}$  Direct试剂加入试管中。
6. 将移液器调整到30  $\mu\text{L}$ ，上下吹打混匀悬浮液和Direct试剂10次。
7. 65°C孵育样本15分钟，然后95°C孵育10分钟。请注意Ion AmpliSeq文库制备方案不需要额外95°C孵育10分钟这一步。
8. 短暂离心，收集管底内容物。底层包含了提取到的DNA，可用于测序。

### 采用BigDye Direct和BigDye XTerminator试剂盒进行Sanger测序

1. 将1.5  $\mu\text{L}$  M13测序引物（每种引物0.8  $\mu\text{M}$ ），5  $\mu\text{L}$  BigDye™ Direct PCR预混液和1–3.5  $\mu\text{L}$ 提取的DNA混合。加水至总体积10  $\mu\text{L}$ 。在PCR仪上按照BigDye Direct循环测序试剂盒使用指南 (Pub. No. 4458016) 上的扩增条件进行扩增。如果使用Minor Variant Finder软件，同时进行正向和反向引物的测序反应。从正常组织中获得的切片所提取到的DNA可以用作对照样本。
2. 加入2  $\mu\text{L}$  BigDye™ Direct测序预混液和1  $\mu\text{L}$ 正向引物或1  $\mu\text{L}$ 反向引物。在PCR仪上按照BigDye Direct Cycle测序试剂盒使用指南上的测序条件进行反应。
3. 按照BigDye XTerminator纯化试剂盒使用指南 (Pub. No. 4374408) 上的说明，对于每一个反应体系，将45  $\mu\text{L}$  SAM™ 溶液和10  $\mu\text{L}$  XTerminator™溶液混合。混合均匀后，在每一个测序反应体系中加入55  $\mu\text{L}$ 试剂悬浮液，确保悬浮液在各添加步骤间都充分混匀。
4. 将反应板放在涡旋仪上振荡30分钟
5. 1,000 x g离心1分钟。在Applied Biosystems™ CE仪器上使用合适的模式运行样本。
6. 用Minor Variant Finder软件分析.ab1文件。

### 结果

为了说明直接提取DNA和Sanger测序流程，我们从不同的组织类型中获得了肿瘤组织样本，这些样本有不同的致癌等位基因和频率。每个样本是固定在显微镜玻璃载玻片上的一块7  $\mu\text{m}$ 大小FFPF切片块。DNA直接提取效率可以通过使用Invitrogen™ Qubit™ 3荧光计测量这些样本中获得的DNA产率来确定。一般来说，提取物中DNA产率和浓度足够用于下游Sanger测序分析（表1）。BigDye Direct Cycle测序试剂盒推荐测序DNA量至少为1ng，每个样本能为许多个Sanger测序反应提供足量的DNA。

表1. 使用Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒从每块7  $\mu\text{m}$ 固定切片中提取到的DNA浓度和产率。

| 样本名称     | 组织类型 | 浓度                     | 产率     |
|----------|------|------------------------|--------|
| 对照       | 正常肝脏 | 3.2 ng/ $\mu\text{L}$  | 48 ng  |
| 1188466b | 子宫   | 26.4 ng/ $\mu\text{L}$ | 396 ng |
| 1188945b | 大脑   | 6.0 ng/ $\mu\text{L}$  | 89 ng  |
| 1189051b | 肺    | 21.6 ng/ $\mu\text{L}$ | 324 ng |
| 35466214 | 胰腺   | 10.8 ng/ $\mu\text{L}$ | 162 ng |
| 370      | 黑色素瘤 | 19.5 ng/ $\mu\text{L}$ | 293 ng |

从同一FFPF石蜡样本分别用DNA直接提取法和柱式DNA纯化法提取DNA，然后比较两者的Sanger测序反应效果，以此来确定DNA直接提取法是否适合Sanger测序。对于每一个组织块，我们对10 ng柱纯化DNA和10–20 ng (1–2  $\mu\text{L}$ ) 直接提取获得的DNA分别测序。使用Primer Designer™ Tool ([thermofisher.com/primerdesigner](http://thermofisher.com/primerdesigner)) 选择测序引物。为了能获得最佳的灵活性，Primer Designer Tool的数据库包含了相同位置不同大小的扩增子的测序引物组合。对于这些实验，我们选择的测序引物可筛选出最短的扩增子，这类扩增子适合于FFPF样本降解DNA测序。

在每个案例中，同一种FFPF样本DNA直接提取法和柱式DNA纯化法所获得的测序质量指标相似，说明提取物中的组分不会干扰Sanger测序反应（图3）。另外，测序数据也没有任何差异（图4所示实例）。背景噪音水平低，相同的体细胞突变SNP均被检测到，不同反应间新SNP也无任何差异。因此，FFPF样本DNA直接提取能以较简化的实验流程，提供高质量的Sanger测序数据。

为了确定DNA直接测序检验等位基因频率的有效性，我们使用Minor Variant Finder软件分析Sanger测序数据，并且将结果和由NGS确定的SNP突变频率相比较。同时，用同一块组织切片，使用柱式方法纯化DNA，然后用Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2进行NGS测序。用同一块肿瘤样本不同切片，使用相同的柱式方法纯化DNA，然后进行正向反向双向Sanger测序。最后，用同一块肿瘤样本的第三片切片，使用Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒提取DNA，并进行正向反向双向Sanger测序。所有Sanger测序完成后，使用Minor Variant Finder软件确定样本的等位基因频率。

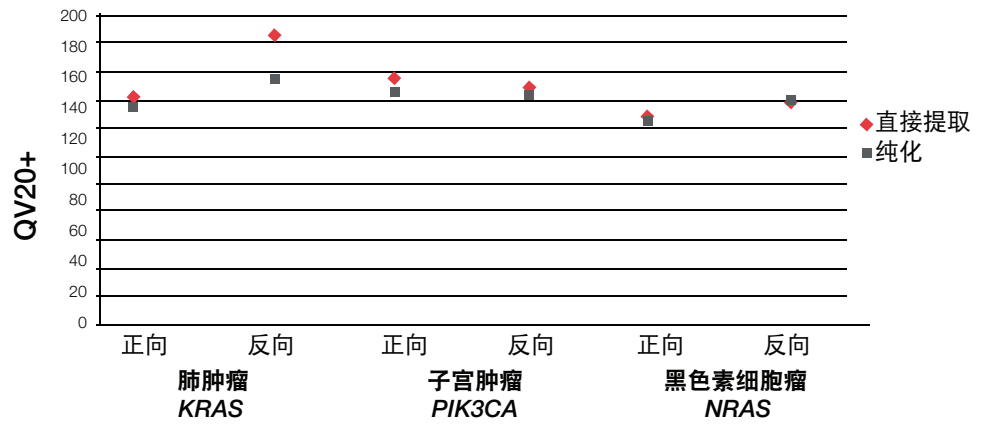


图3. 比较Sanger测序数据QC质量分数。测序获得的QC指标说明从同一个组织块获得的不同切片，使用DNA直接提取法和柱纯化DNA得到的DNA样本相似。QV20+表示质量值大于20的数据中碱基总量。

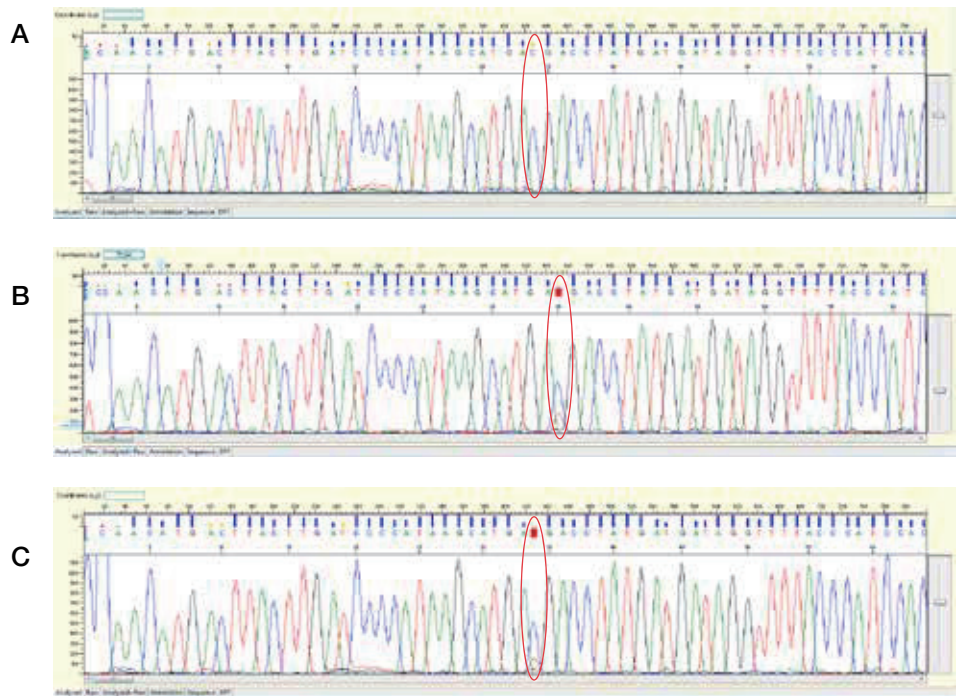


图4. 比较测序数据。(A) 正常组织样本纯化对照基因组DNA IDH1位点序列。(B) FFPF大脑肿瘤样本柱纯化DNA IDH1位点序列。注意在这个样本中观察到SNP突变（红圈）。(C) 相同大脑肿瘤组织DNA直接提取IDH1位点序列。数据质量和DNA纯化获得的数据质量没有差别。两种方法都检测到了相同的SNP突变（红圈）。



总的来说，不同方法获得的突变频率相关性强（表2）。比如，在黑色素瘤样本中，NGS检测到很高比例的NRAS p.Q61L等位基因，该等位基因在纯化法和直接提取的DNA样本中频率也很高。另外，在子宫样本中，PIK23CA p.E545K等位基因检出频率低（6.8%），其他两种样本制备方法Sanger测序的检出率也很低（纯化法3.9%，直接DNA提取法3.8%）。一类样本（肺 KRAS p.G12A）三种方法获得的等位基因频率结果差别较大：NGS 70.6%，柱式纯化DNA 54.1%，直接提取DNA 20%。但这是因为这三种方法所用样本来自同一肿瘤的不同切片，不同的等位基因频率可能反映了肿瘤的体细胞异质性，该特性在晚期肿瘤样本中非常常见[1]。尽管如此，这些结果都表明了使用Ion AmpliSeq Direct FFPE DNA试剂盒直接提取DNA然后进行Sanger测序所产生的等位基因频率数据，和同一样本DNA纯化法得到的结果一致。

## 结论

我们研发了一种能够简化FFPF样本基因组DNA提取的试剂盒，该方法还免于使用有毒试剂。获得的DNA浓度不少于或超过使用其他试剂盒能够获得的DNA浓度，同时获得的DNA量足够进行许多次测序反应。当用作Sanger测序模板时，FFPF样本DNA直接提取法能够提供高质量的结果，与使用传统柱式DNA纯化法结果相当。最后，提取的DNA的Sanger测序数据可以运用Minor Variant Finder软件来进行分析，确定肿瘤样本体细胞突变的等位基因频率，获得的结果与NGS流程相近。本应用说明中描述的流程要简便许多，为临床研究者存档样本快速序列信息获取提供了一种重要方法。

## 参考文献

1. Ryu D, Joung JG, Kim NK et al. (2016) Deciphering intratumor heterogeneity using cancer genome analysis. *Hum Genet* 135:635–642.

表2. 不同方法等位基因频率结果比较

| 样本名      | 组织类型 | 等位基因           | NGS等位基因频率 | Sanger等位基因频率 |             |            |            |
|----------|------|----------------|-----------|--------------|-------------|------------|------------|
|          |      |                |           | 纯化DNA, 正向反应  | 纯化DNA, 反向反应 | 直接提取, 正向反应 | 直接提取, 反向反应 |
| 1188466b | 子宫   | PIK3CA p.E545K | 6.8%      | 3.9%         | 4.0%        | 4.7%       | 3.1%       |
| 1188945b | 大脑   | IDH1 p.R132H   | 25.0%     | 27.3%        | 22.5%       | 24.1%      | 21.4%      |
| 1189051b | 肺    | KRAS p.G12A    | 70.6%     | 56.6%        | 51.7%       | 15.0%      | 25.0%      |
| 35466214 | 胰腺   | KRAS p.G12A    | 11.9%     | Not done     | Not done    | 23.4%      | 14.5%      |
| 370      | 黑色素瘤 | NRAS p.Q61L    | 91.2%     | >80%         | >80%        | >80%       | >80%       |

更多信息请见 [thermofisher.com/MVF](http://thermofisher.com/MVF) 及 [thermofisher.com/ampliseq](http://thermofisher.com/ampliseq)

**Thermo Fisher**  
SCIENTIFIC