

SeqStudio基因分析仪

Sanger测序和片段分析的最新创新成果

在本应用指南中，我们将介绍Applied Biosystems™ SeqStudio™基因分析仪并演示如下内容：

- 使用全新的SeqStudio基因分析仪进行测序和片段分析
- 直观的运行设置和实时质控结果监控
- 通过连接功能无缝整合到Thermo Fisher Cloud现有测序应用组合中
- 集数款强大的Sanger测序和片段分析应用亮点于一体，包括：
 - 质粒测序
 - 肿瘤学研究
 - 种属鉴定
 - CRISPR-Cas9基因组编辑分析
 - 人细胞系鉴定
 - Applied Biosystems™ SNaPshot™基因分型
 - 用多重连接探针扩增(MLPATM)技术分析人拷贝数变异(CNV)



引言

Applied Biosystems™基因分析仪以可靠性和值得信赖的结果为立足点。作为Applied Biosystems™毛细管电泳(CE)基因分析仪产品系列的最新成员，SeqStudio基因分析仪同样基于这一理念，但同时又追求易用、易维护，易于存取和分享数据。在本应用指南中，我们将介绍其独一无二的先进特性——将Sanger测序和片段分析的可靠性，与远程监控和云应用便利性结合在一起。

多功能卡夹

这款仪器的易用性在于最大限度提高效率和便利的新型卡夹设计。SeqStudio基因分析仪采用一种含有毛细管阵列、POP胶以及阳极缓冲液的多功能卡夹。该卡夹可插拔，并可在仪器上存放达四个月之久。每个卡夹上均含有SeqStudio系统所独有的新型聚合物，无需重新配置即可进行Sanger测序和片段分析。配备4道毛细管可以处理来自标准96孔板或8联管的样品。卡夹和阴极缓冲液容器均带有射频识别(RFID)标签，可跟踪二者各自在仪器上加样(卡夹)和存放的时长(阴极缓冲液)。这一特性使科研人员可以利用同一台仪器，根据需要管理并使用自己的卡夹，进一步提高灵活性。最后，SeqStudio基因分析仪的维护工作也

得到简化。仪器校准工作通过成像和算法工具的先进功能自动化完成。

紧凑的仪器设计

SeqStudio仪器具有小巧的外形，同时配有机载计算机和一体触摸屏，让您可快速、直观、灵活地进行运行设置(图1)。运行软件经过专门配置，可在运行不中断的情况下，在同一块板上设置测序和片段分析反应并在仪器上运行。这一特性开辟了简化分析的全新机会——例如，在同一次CE运行中，您可将基于测序的位点突变筛选检测与基于片段分析的CNV检测结合在一起。

A



B



C



D

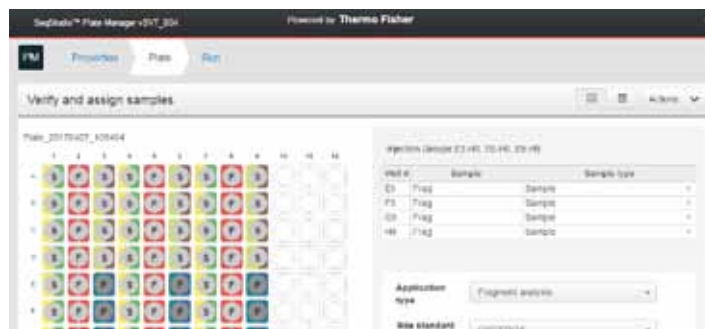


图1. SeqStudio基因分析仪运行实时监测。(A) SeqStudio仪器实时显示各个毛细管的结果。**(B)** 加样完成后，进行一系列质量检查并显示结果。如果一次加样产生了较差的数据或QC值，则可根据需要调整加样参数，然后重新加样这一类样品。**(C)** 现场执行监测的计算机截图，图中显示了运行的进度。**(D)** PlateManager之中的运行设置可直接上传到仪器。PlateManager允许研究人员在同一块板上设置测序和片段分析反应，充分利用卡夹内的通用引物。

连通体验

通过整合无线连接功能(图2)，仪器的便利性提升至全新水平，由此可通过联机触摸屏，远程计算机和移动设备APP 操作仪器。用户可使用联机计算机或独立的软件PlateManager (在Thermo Fisher Connect或单独的计算机上工作的独立软件)来设置运行(图2)。通过使用基于网页浏览器的软件，只要能上网，就能随时随地地访问运行设置、反应板图、运行条件和分析设置。加样条件、重新加样和重新调整加样次序可在运行期间调整，从而最大限度提高从每块板采集优质数据的能力。采集数据后，基于网页浏览器的应用程序组合包(Sanger Quality Check、Sanger Variant

Analysis和Next-Generation Confirmation (NGC))可轻松、方便地分析数据。完成运行后，DNA序列变异、序列比对，以及片段分析工作均可立即开展。最后，云连接允许合作机构在不同地点监控、存取和分享数据信息，快速分析统一数据集。

在本应用指南中，我们将演示如何将全新的SeqStudio基因分析仪无缝整合到部分最常见的Sanger测序和片段分析应用中。SeqStudio基因分析仪的易用性和数据分析便利性，可为研究人员带来最大限度的灵活性，使该系统成为基因分析工具包之中必不可少的新利器。

1 设置和运行

- ✓ 注册仪器
- ✓ 获取运行程序
- ✓ 设置和执行反应
- ✓ 将运行数据上传到Thermo Fisher Cloud

2 监测

- 在任意设备上监测运行
- 浏览结果

4 分析

- 存取和分享数据
- 使用云端应用分析数据
- 存储和备份

3 分享

- ✓ 分享程序
- ✓ 分享数据和结果
- ✓ 与同行交流



使用任意设备连接Thermo Fisher Cloud



易于使用



经济



可靠

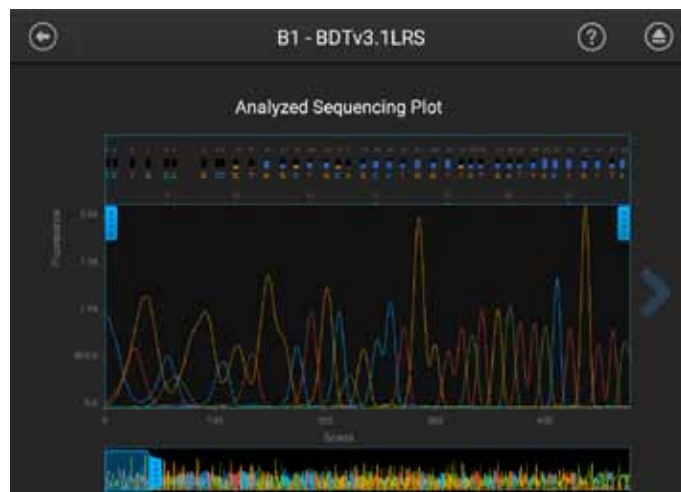
图2. SeqStudio基因分析仪无缝整合到Thermo Fisher Cloud之中。注册您的仪器并登陆云账户，即可使用各种远程功能，包括监测仪器、使用云端应用进行数据分析，以及与同事分享数据。

质粒测序

Sanger测序最常见应用之一是分析亚克隆到质粒之中的插入片段。Applied Biosystems™ BigDye™化学试剂被Sanger测序广泛使用，是质粒测序工作流程不可分割的一部分。SeqStudio平台的部分新特性包括，可让质粒测序研究人员获益。该仪器预先加载了针对短(<300 bp)、中(500 bp)和长(>600 bp)读长应用优化的测序模块，还可针对特殊要求进行定制。其配备的可插拔式卡夹可关联单独的项目和用户。基于云的Sanger Quality Check应用程序包含了一套评价测序原始数据质量的直观工具。最后，云连接功能支持远程监控、存取和分享测序信息，有助于合作机构快速分析统一数据集。

通过pGEM7zf+质粒、M13引物和Applied Biosystems™ BigDye™ Terminator v3.1化学试剂，测定SeqStudio仪器的质粒测序性能。通过Thermo Fisher Cloud (图3)上的Sanger Quality Check模块评价测序原始数据，获得分析结果。在本实例中，测序16个孔内的相同质粒，并在SeqStudio基因分析仪上通过4次加样分析。请注意，各样品的原始数据得分、峰间(PUP)值、连续读长(CRL)和QV20+(质量值大于>20的长度)相似。使用Applied Biosystems™ BigDye™ Terminator v1.1化学试剂进行的其他序列测序和实验获得了相似结果。这些数据表明，SeqStudio平台可以获得极高质量的质粒测序结果。

A



B

Sample Name	Reads	Mean QV	Mean PUP	Mean CRL	Mean QV20+	Mean QV10+	Mean QV5+	Pass/Fail
11	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
12	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
13	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
14	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
15	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
16	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
17	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
18	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
19	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
20	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
21	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
22	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
23	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
24	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
25	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass
26	100	35.0	1.0	100	100	100	100	Pass

图3. 使用Sanger Quality Check Cloud应用分析测序质量。(A) 运行完成后，仪器即会显示测序文件及各个碱基的质量得分。(B) 在SeqStudio仪器上进行16次独立的pGEM7zf+测序反应，并将.ab1文件上传到云端分析。请注意，十六个不同的反应的测序指标非常相近。CRL=连续读长；QV20+=质量值>20的核苷酸数量。

肿瘤学研究、二代测序验证

临床研究人员可采用SeqStudio基因分析仪保证金标准检测质量，验证肿瘤组织中是否存在突变等位基因。SeqStudio系统通过整合以下工具，简化了Sanger测序工作流程：

- 针对提取自福尔马林固定石蜡包埋组织的片段化DNA，SeqStudio基因分析仪预装载了经过优化的运行模块。
- 基于云的NGC模块，允许研究人员通过Sanger测序原始数据，快速验证二代测序 (NGS) .vcf文件发现的变异。
- 频率低至5%的等位基因变异，可采用Applied Biosystems™ Minor Variant Finder (MVF)软件以及SeqStudio仪器生成的Sanger原始数据检测出来。
- Applied Biosystems™ BigDye™ Direct和BigDye XTerminator™ 化学试剂提供了单管测序和回收解决方案，简化了Sanger测序工作流程。

SeqStudio基因分析仪检测肿瘤样品突变等位基因的性能，可通过分析源自10份不同FFPE肿瘤样品的基因组DNA、测定4种不同热点区域的变异频率来测定。采用Ion Torrent™ Oncomine™ Oncology Focus Panel进行NGS，通过BigDye Direct/BigDye XTerminator化学试剂和MVF软件进行Sanger测序，测定突变等位基因的频率。通过与NGS测得的等位基因频率相比较(约9%-70%)，SeqStudio基因分析仪测得的频率相关性非常出色(图4)。

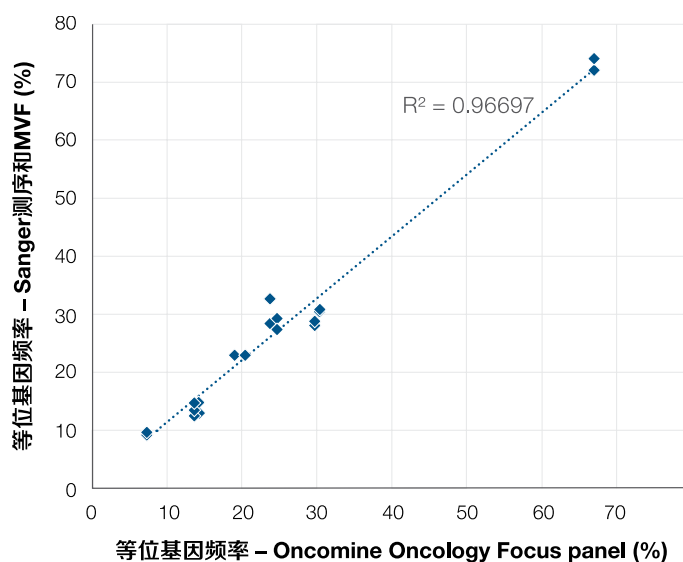


图4. 使用SeqStudio仪器分析等位基因频率9-70%的FFPE样品。通过Ion Torrent™测序及SeqStudio仪器上的Sanger测序，分析10个不同肿瘤样品在4个不同热点的突变情况。在广泛的等位基因频率范围内，两种方法测得等位基因频率相关性都非常好。

SeqStudio基因分析仪的变异频率分析能力，也可使用含有靶向KRAS和NRAS中最常见致癌突变的Sanger测序引物的96孔板进行测定。使用SeqStudio精确测定1 ng稀释的FFPE来源DNA中低频等位基因频率(图5A)。因此，需要检测罕见等位基因的研究人员可充分信任SeqStudio基因分析仪能够产生FFPE组织精确分析结果。更多详情，请见[1]。

最后，基于云的NGC应用可以根据扩增子和样品组织整理Sanger测序数据，并与.vcf文件之中的候选变异序列进行比对，简化了NGS变异数据的验证工作。为了展示NGC APP在肿瘤学工作流程之中的应用，我们采用Sanger测序，验证通过Oncomine Oncology Focus panel发现的NRAS突变是否存在(图5B)。SeqStudio结果证明 NRAS (p.Ala59Thr)中的突变存在。因此，NGC APP对测序原始数据最有意义部分的集中、快速检验，有助于促进NGS变异验证工作。

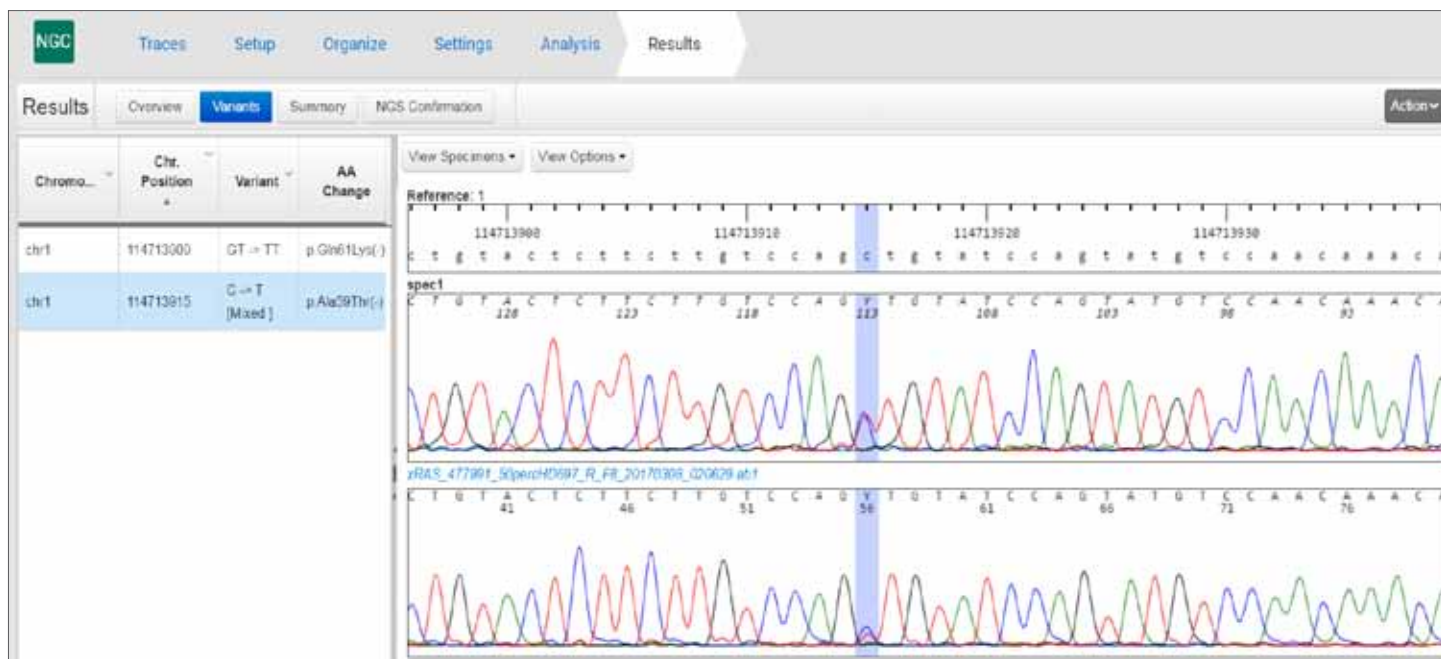
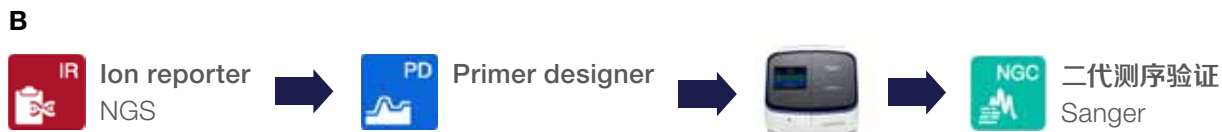
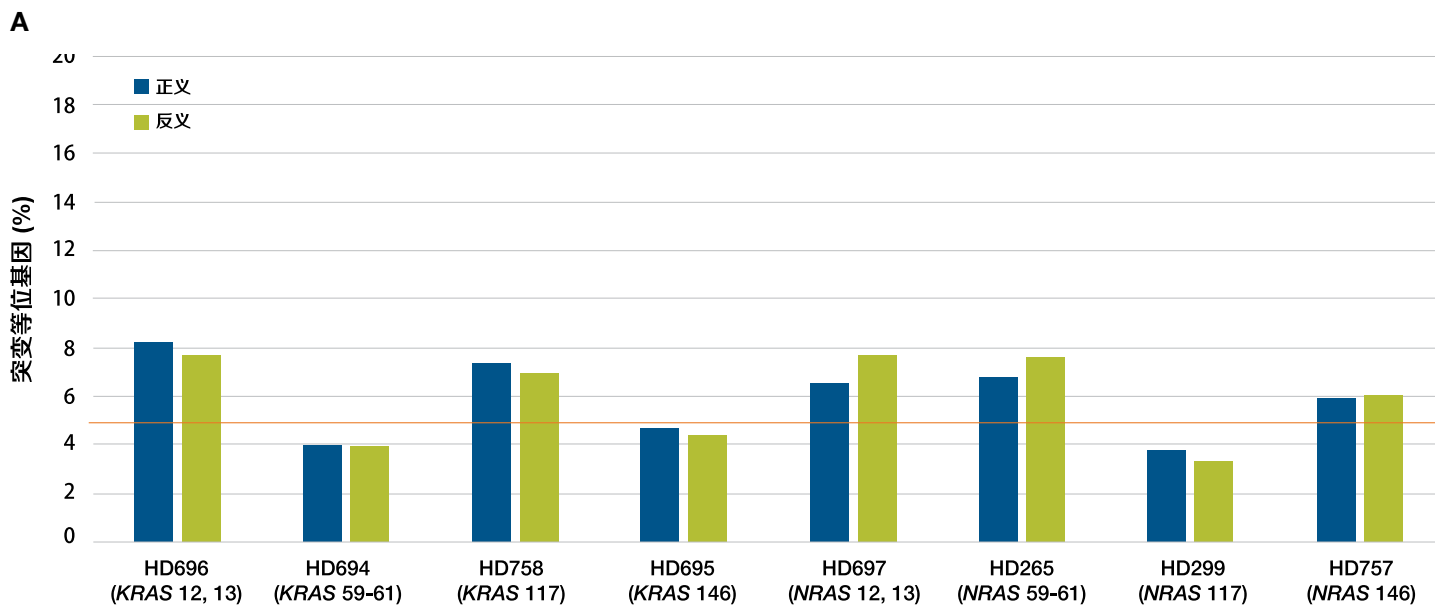


图5. 分别采用SeqStudio基因分析仪和NGC应用分析和验证变异。(A) 取八份已知在RAS热点突变的FFPE样品，稀释至5%的等位基因频率，然后采用含有Sanger测序引物(靶向最常见的KRAS和NRAS致癌突变)的96孔板，采用SeqStudio基因分析仪进行分析。每次等位基因检测都精确测定出等位基因频率；偏离5%表示样品起始浓度存在轻微不一致。黄线即代表5%的频率。10%和50%稀释物获得了相似的结果。**(B)** 验证NGS发现的变异。根据Ion Reporter™软件生成的.vcf文件，通过Primer Designer订购靶向目标位点的Sanger测序引物，在SeqStudio仪器上进行测序，使用NGC云端应用，找出.vcf文件和Sanger测序数据共有的变异。

物种鉴定

可直接使用的基因组数据为通过“指纹”位点DNA测序来判断不明样本中的物种提供了可能。Applied Biosystems™ 试剂盒系列，例如MicroSEQ™试剂盒简化了通过对核糖体DNA (rDNA)序列进行Sanger测序来鉴定原核生物和真菌的工作[2]。同样地，使用线粒体特异位点作为识别位点也可识别真核生物。“Barcode of Life”项目(barcodeoflife.org, 详见[3])就是利用了这种策略，从而提供一种快速确立不明真核生物身份的手段。

为了展现SeqStudio基因分析仪在微生物鉴定方面的性能，我们从各种微生物的ATCC中获得基因组DNA，然后使用Applied Biosystems™ MicroSEQ™ 500 PCR试剂盒和SeqStudio分析仪进行测序，再参照BLAST数据库来查询所获得的序列。对于每次测序反应，都能识别正确的物种，BLAST置信度高。同样地，使用鱼类线粒体序列的引物(CO1基因)和鱼类样本，也可以正确识别鱼类物种，具有很高的BLAST成功率。使用BLAST查询精确地鉴定物种表明SeqStudio平台在物种鉴定过程中表现优异。

表1. 使用SeqStudio基因分析仪来鉴定物种身份。使用16s rDNA的引物和MicroSEQ试剂盒(BigDye Terminator v1.1化学试剂)或使用鱼类线粒体CO1序列和BigDye Terminator v3.1化学法对从鱼类提取的微生物DNA或基因组DNA样本进行测序。

	物种数量	鉴定次数	正确率
微生物	24	48	100
鱼类	12	24	100

基因编辑

基因编辑技术，包括CRISPR-Cas9引发的基因编辑事件，正迅速在大部分生物科研人员中普及，有望颠覆生物和医疗保健的各个领域。Thermo Fisher Scientific提供基因编辑项目所需的一切必要工具。作为这类项目的重要组成部分，SeqStudio基因分析仪的诸多特性可以方便Sanger测序分析，完美匹配基因编辑工作流程，例如数据兼容Tracking of Indels by Decomposition (TIDE)软件[4]，后者是一种广泛用于分析基因组编辑效率的工具。

通过编辑HEK293细胞后在HPRT或relA位点内的靶向位点周围引入随机缺失，然后获得全细胞裂解物，从而验证SeqStudio基因分析仪在基因组编辑中的有效性。为确认该编辑的位置，将Sanger测序数据上传至云端，然后使用Sanger Variant Analysis模块来进行分析(图6)。注意，编辑位置清晰显示，并在断裂处下游出现高丰度混合碱基峰。在此混合原培养基中的编辑效率，可通过TIDE软件分析这些数据文件测定。在每种情况下，正向和反向测序产生的数据，每个位点的峰图和缺失频率几乎相同(图7)。这些频率验证了使用Invitrogen™ TOPO™克隆获得的结果，以及之后同一编辑细胞群的Sanger测序结果[5]。



图6. 使用SeqStudio仪器分析基因组编辑的样品。选取一组包含人HPRT位点进行过基因组编辑的混合细胞，使用基于云的Sanger Variant Analysis应用程序进行分析。请注意，此应用程序不仅能够发现正义和反义链共有的单核苷酸变异，还可检测出基因组切割，获得断裂点下游的混合序列信息。

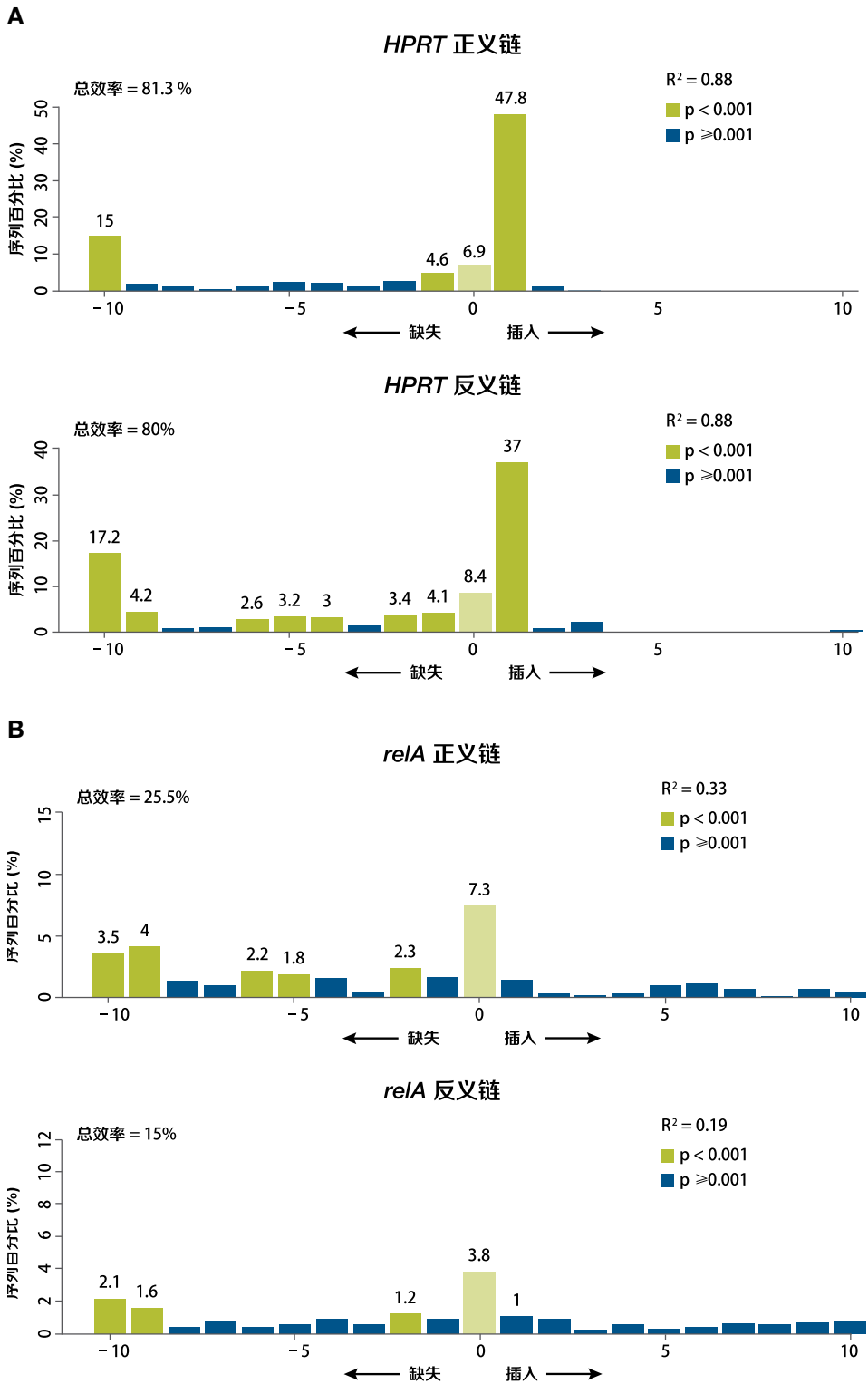


图7. 使用TIDE软件和SeqStudio仪器生成的混合细胞群测序数据，分析HPRT和relA位点上的两种不同的基因组编辑活动。竖条表示存在图示数量的核苷酸缺失或插入的细胞在整个细胞群中所占的比例。(A) HPRT位点编辑的整体效率大约为80%；(B) relA位点编辑的整体效率大约为20%。

人类细胞系鉴定

人类疾病形成的研究极大程度上依赖于游离人类细胞系在培养基中的生长分析。但是，这面临着一个日益清晰的问题，即体内细胞可能被误识别或被其他无关细胞系所污染。细胞系的身份可通过短串联重复序列(STR)的高特异性基因“指纹”来核实。SeqStudio平台完全集成了Thermo Fisher Scientific细胞系鉴定解决方案。Applied Biosystems™ Identifiler™ Plus and Identifiler™ Direct试剂盒可分别在纯化和原始DNA制备物中分析16个常用于细胞系鉴定的高变人类STR位点。Applied Biosystems™ GeneMapper™软件兼容SeqStudio仪器所产生的数据，可对Identifiler试剂盒识别的等位基因进行分析，然后提供分析结果来查询ATCC或其他STR数据库来核实细胞的真实性[6]。

为展示SeqStudio分析仪在细胞系鉴定 workflow 中的有效性，设计实验从五个不同的常用人类细胞系中获得STR的等位基因信息。即使gDNA起始量低至300 pg，仍可以有效确认细胞系的身份。为展示检测污染细胞系的能力，我们在M4A4GFP细胞群掺入不同量的HeLa细胞，然后使用Identifiler Direct试剂盒进行分析。即使在只有10%细胞群具有HeLa细胞的情况下，仍可见到HeLa细胞特有的等位基因(图8)。因此，当与Identifiler试剂盒联用时，SeqStudio分析仪可成为细胞系鉴定解决方案的核心组件。

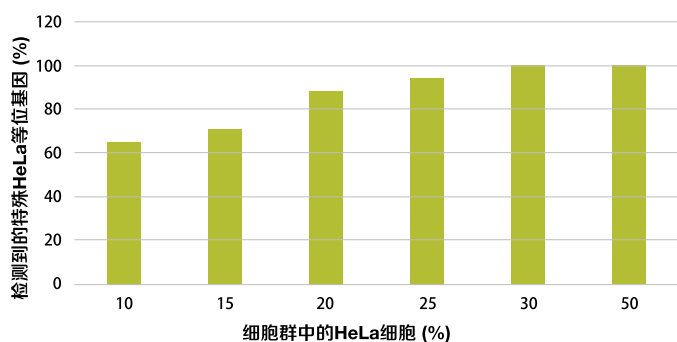


图8. 在SeqStudio仪器上分析细胞系污染情况。将HeLa细胞和M4A4GFP细胞悬液稀释到 5×10^5 细胞/mL，按照指定的比例混合，在NUCLEIC-CARD™样品采集设备上采集。污染HeLa细胞占细胞群的比例如果达到20%，则可可靠地检测出；但部分HeLa特有的等位基因，即便HeLa细胞比例低于10%，仍可检测出。

SNaPshot多重分析系统

单核苷酸多态性(SNP)检测在理解基因组如何影响生物表型中发挥着关键的作用。Applied Biosystems™ SNaPshot™ 多重分析就是为SNP分析而研发的[7]。其原理是通过片段分析来对对应于特定等位基因的不同大小的自定义、颜色编码片段进行分析。SeqStudio系统包括方便SNaPshot分析的若干新特性，例如生成片段大小和峰值区域分析结果的内置报告。此外，还能够在一块板上混合进行片段分析和测序反应，使科研人员能够在一次运行过程中同时执行SNP检测和Sanger测序。

为展示SeqStudio分析仪在SNaPshot workflow 中的功能有效性，从FFPE保存的肿瘤切片中收集基因DNA，然后使用SNaPshot多重分析试剂盒和探针靶标KRAS G12X和G13X进行分析。该仪器所生成的结果清晰地表明，在此位置精确地检出不同的等位基因(图9)。注意，尽管SeqStudio分析仪精确地检测到等位基因，由于不同聚合物的化学性质不同，相比同类平台，所有峰值的绝对迁移仍将会略微不同。因此，要清楚无误地将峰值和等位基因关联起来，在开展大规模分析之前建议使用已知等位基因进行校准。

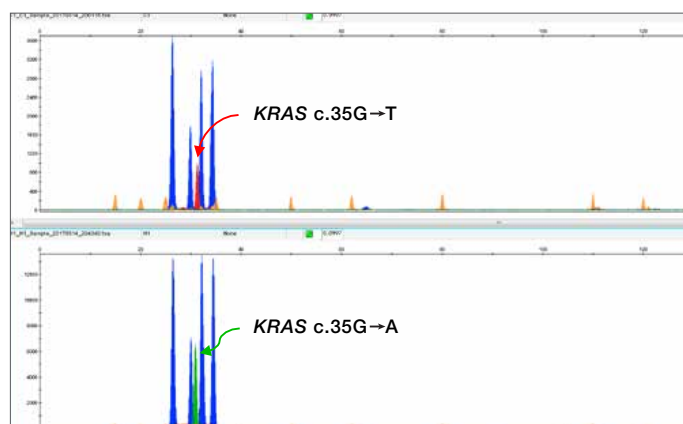


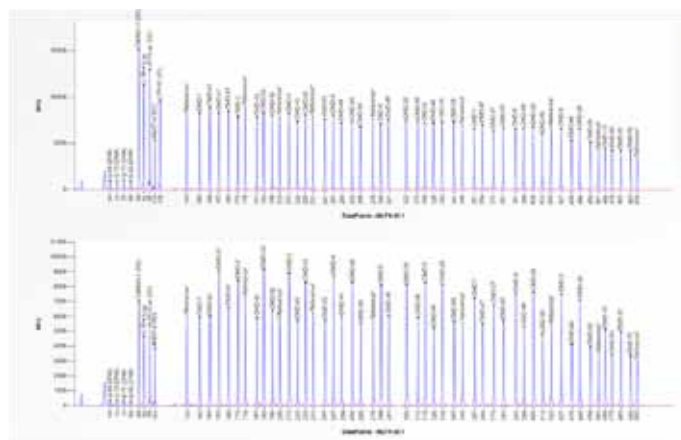
图9. 使用试剂盒在SeqStudio仪器上分析SNP。使用SNaPshot多重检测试剂盒和KRAS特异性引物处理来自于两份不同的肿瘤的1 ng FFPE来源DNA，然后在SeqStudio系统上进行片段分析。SNaPshot多重检测试剂盒可生成等位基因的颜色和长度各异的片段。四个蓝色的峰代表野生型等位基因(c.34、c.35、c.37和c.38)。红色的峰(上图)表示样品还存在KRAS c.35G T突变，而绿色的峰(下图)则是因为不同样品在同一位置存在不同的等位基因。

多重连接探针扩增 (MLPA)

多重连接探针扩增是一种广泛用于研究位点中拷贝数突变引起人类遗传病的方法[8]。这种方法最早由MRC Holland研发并投入商用，可分析多达50对多重邻接探针与目标位点的杂交情况。SeqStudio系统在MLPA探针扩增分析过程中具有高动态范围、定量准确、峰值高度保真度高等优点，非常适合执行MLPA分析。所获得的结果与MRC Holland用于分析MLPA数据的Coffalyzer.Net软件兼容。

在DNA样本分析过程中，在SeqStudio分析仪上分析一个含有2-30外显子重复的假肥大型肌营养不良症(DMD)基因的样本以及一个正常样本，使用MRC Holland P034 DMD检测试剂盒进行检测。这类样本的峰值高度和相对大小可轻易地转换成精确地检测到含重复的区域(图10)。使用用于大或小片段缺失的探针获得了类似的结果。因此，SeqStudio分析仪可成为含CNV区域的一种MLPA研究的集成工具。

A



B



图10. 利用MLPA在SeqStudio仪器上分析CNV。(A) 样品中的DMD基因CNV分析。请注意，底部样品部分片段的峰值高度要高于顶部片段，表明这个区域的DNA存在过度表达。(B) 对应的比例图，与DMD位点上的探针比对，清晰显示出外显在2-30外显子内的DMD探针比例增加。蓝色阈值区域的探针表明，拷贝数从2增加到3。

总结

毛细管电泳仍是强大的基因信息鉴定方法。Sanger测序和片段分析仍是测序和片段分析的金标准。在本应用指南中，我们介绍了新型SeqStudio基因分析仪如何产生与最常见CE应用完全兼容的数据。此外，我们还介绍了SeqStudio基因分析仪的新功能如何实现花更少的时间更轻松地运行CE实验，如何通过Thermo Fisher Cloud和应用促进合作研究，如何提供了同时进行样品测序和片段分析的机会。总之，SeqStudio基因分析仪提供的新设计和增强功能，为在综合系统中利用金标准的毛细管电泳方法，提供了全新的机遇。

参考文献

1. Low-level somatic variant detection in tumor FFPE samples by Sanger sequencing COL31176 0616
2. Technical note: MicroSEQ Rapid Microbial Identification System
3. Borisenko AV et al. (2009) The front-end logistics of DNA barcoding: challenges and prospects. *Mol Ecol Resour* 1:27-34.
4. Brinkman EK et al. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42:e168.
5. Application note: Using Sanger sequencing to facilitate CRISPR- and TALEN-mediated genome editing workflows
6. https://www.atcc.org/STR_Database.aspx
7. Product bulletin: SNaPshot Multiplex System for SNP genotyping
8. Schouten JP et al. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.

订购信息

产品	数量	货号
BigDye Terminator v1.1循环测序试剂盒	100次反应	4337450
BigDye Terminator v3.1循环测序试剂盒	100次反应	4337455
BigDye Direct循环测序试剂盒	100次反应	4458687
BigDye Xterminator纯化试剂盒	100次制备	4376486
ExoSAP-IT PCR产物回收试剂	100次反应	78200.200.UL
MicroSEQ 500 16S rDNA PCR试剂盒	1试剂盒	4348228
MicroSEQ 500 16S rDNA测序试剂盒	1试剂盒	4346480
Identifiler Plus PCR扩增试剂盒	200次反应	4427368
Identifiler Direct PCR扩增试剂盒	200次反应	4467831
SNaPshot多重检测试剂盒	200次反应	4323151
SeqStudio基因分析仪		A34274
SeqStudio分析软件		4443764
SeqStudio Cartridge Assay		A33671
SeqStudio起始试剂盒		A35000
SeqStudio SmartStart一天培训课程		A34684

更多有关SeqStudio的信息请见 thermofisher.com/seqstudio



赛默飞
官方微信



赛默飞
Applied Biosystems
官方微信

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC