

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_t 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%。

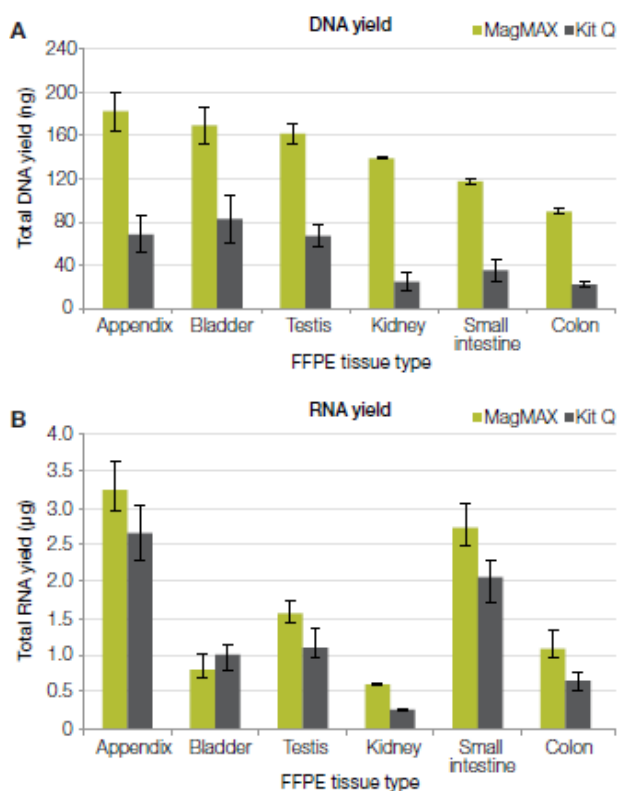


图 2. 核酸回收的可重复性。使用 MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra 试剂盒或其他基于离心柱的商品化试剂盒 (试剂盒 Q)，从 FFPE 组织 (包埋时间 1981–2004 年) 中抽提的 (A) DNA 和 (B) RNA 的产量。



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）。

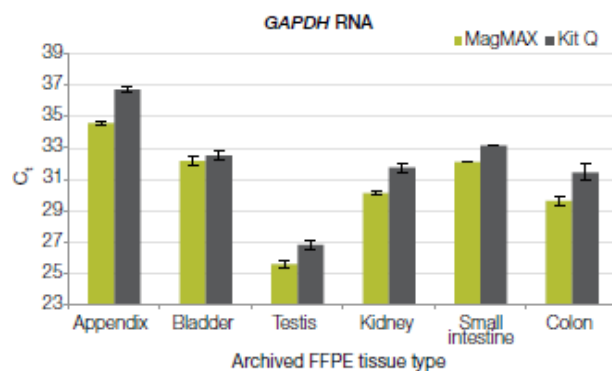


图 3. RNA 样本的实时荧光定量 PCR 分析。FFPE 组织切片中，使用 MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra 试剂盒提取的 *GAPDH* 分析 RNA 的 C_t 值始终低于其他使用基于离心柱的商品化试剂盒（试剂盒 Q）获取的 RNA。

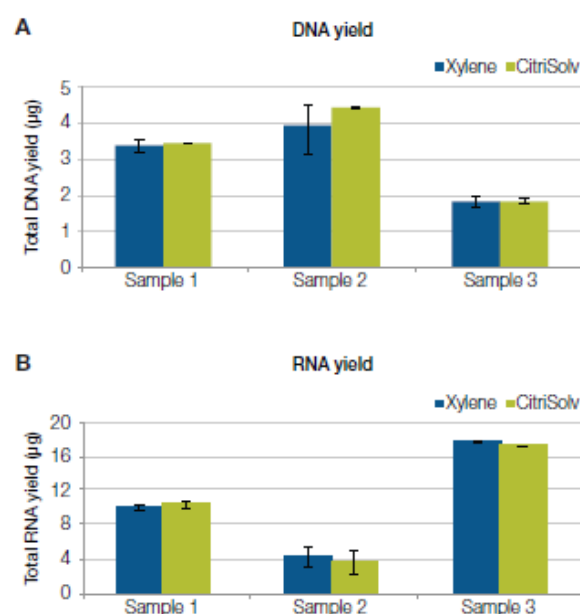


图 4. CitriSolv 脱蜡剂与 MagMAX FFPE DNA/RNA Ultra 试剂盒的兼容性。使用二甲苯或 CitriSolv 溶液进行脱蜡时，10 μm FFPE 组织切片中的 (A) DNA 和 (B) RNA 的产量相当。

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）。

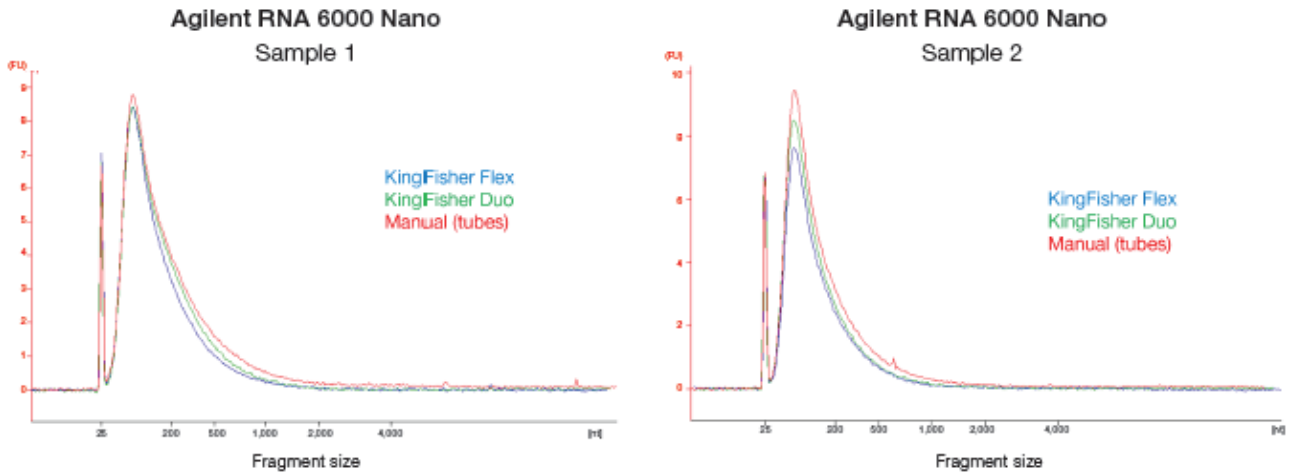


图 5. 使用 Agilent RNA 6000 Nano 试剂盒对 FFPE 样本进行 RNA 分析。手动抽提的样本或在 KingFisher Flex 磁粒处理仪或 KingFisher Duo 系统上采用自动化实验方案抽提的样本，具有相当的 RNA 产量和片段大小。

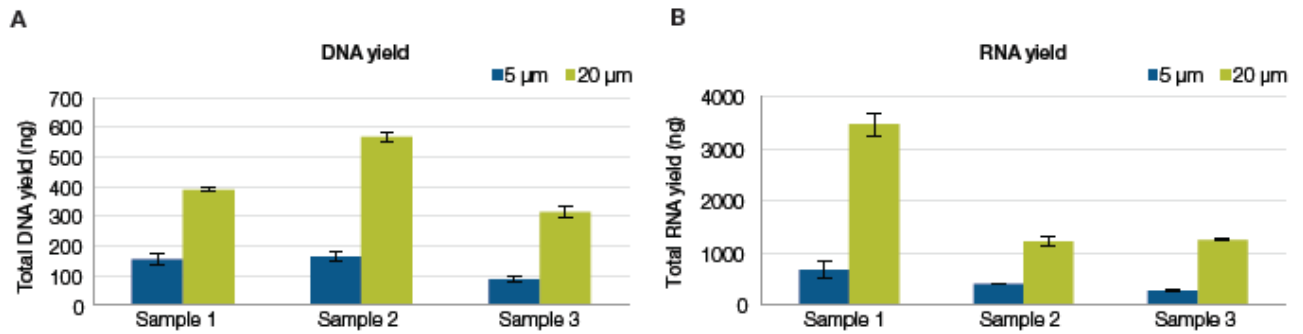


图 6. 起始样本扩展性。在 KingFisher Flex 系统上处理配对的 5 μm 和 20 μm FFPE 切片。所有样本的 (A) DNA 和 (B) 总产量相应增加，说明样本在一定的 FFPE 切片厚度范围内具有可扩展的功能。

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)。

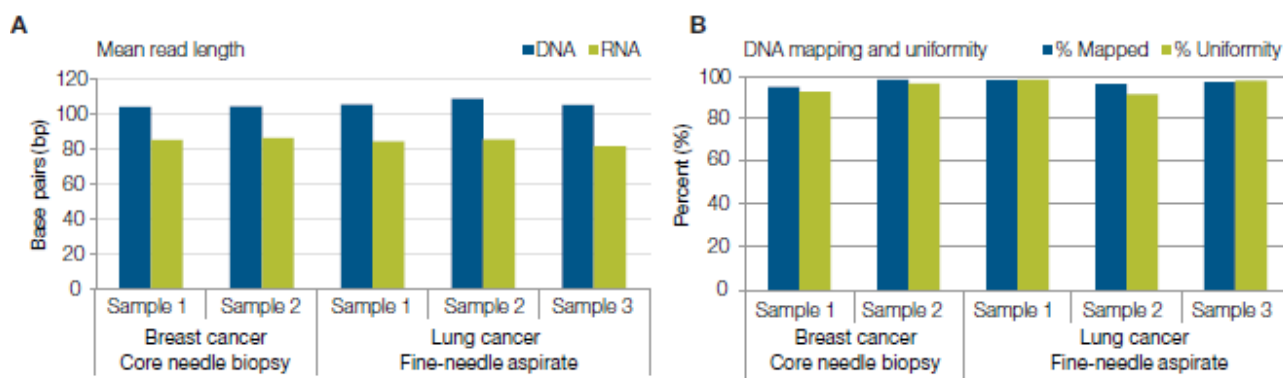


图 7. 癌症研究样本的测序。从穿刺活检和细针抽吸样本中获取的测序测量指标 (如 (A) 平均读取长度和 (B) DNA 映射和均匀度) 均一致，证明了不同标本类型的核酸回收率。使用 Oncomine Focus Assay 检测板及 10 ng 起始样本制备 60 pM 文库。分别利用 Ion Chef 和 Ion PGM 系统制备样本模板并测序。

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)。

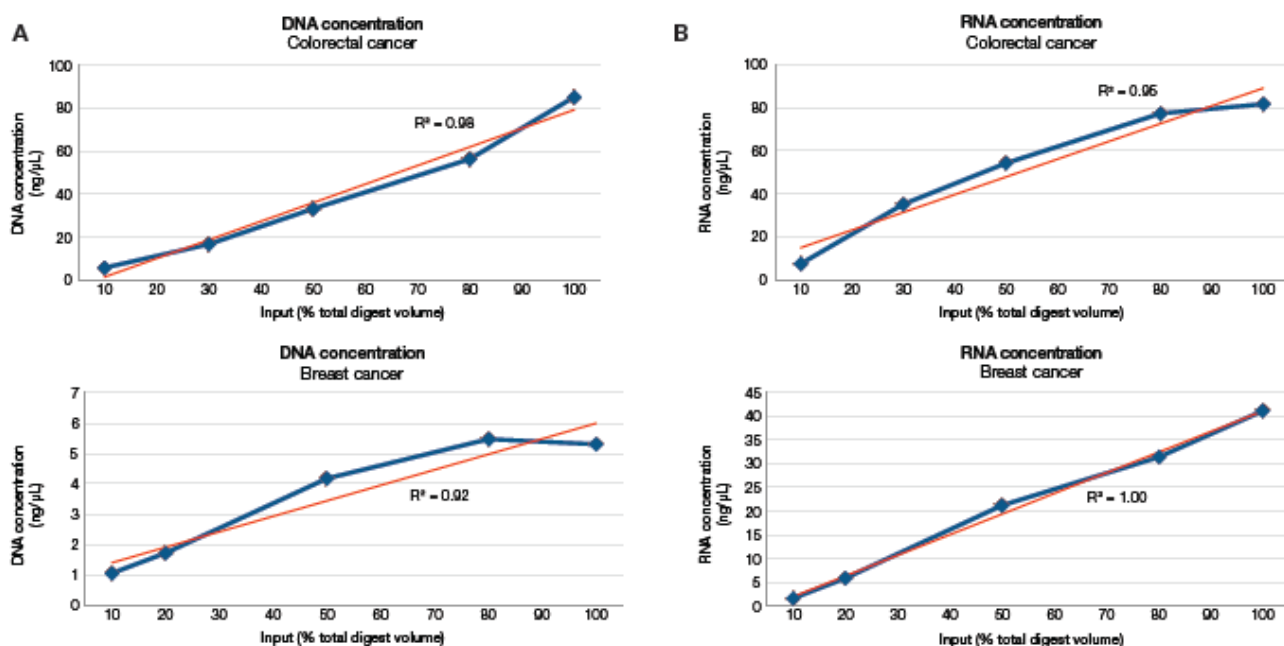


图 8. 从 FFPE 癌症样本中回收 DNA 和 RNA。10 μm FFPE 结直肠癌和乳腺癌样本切片中的 (A) DNA 和 (B) RNA 产量。使用蛋白酶 K 溶液进行酶切,然后稀释样本至起始样本的 10%,用于剩下的提取实验方案。产量和起始样本百分比之间的线性相关度说明了 DNA 和 RNA 的高核酸回收率。

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 |
|-----------|---------------|-------------|----------|---|
| 结直肠癌 | 100% | 119 | 9 | <i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i> |
| | 80% | 111 | 9 | <i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i> |
| | 50% | 113 | 9 | <i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i> |
| | 30% | 112 | 9 | <i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i> |
| | 10% | 113 | 9 | <i>PDGFRA, APC, PTEN, HRAS, KRAS, TP53, SMARCB1</i> |
| 乳腺癌 | 100% | 109 | 3 | <i>KIT, MET, HRAS</i> |
| | 80% | 108 | 3 | <i>KIT, MET, HRAS</i> |
| | 50% | 109 | 3 | <i>KIT, MET, HRAS</i> |
| | 20% | 109 | 3 | <i>KIT, MET, HRAS</i> |
| | 10% | 108 | 3 | <i>KIT, MET, HRAS</i> |

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。

applied
biosystems

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC

仅供研究使用。不得用于诊断。© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. 版权所有。除特别说明外，所有商标均为 Thermo Fisher Scientific 及其附属公司的财产。Agilent Bioanalyzer 是 Agilent Technologies 的商标。CitriSolv 是 Decon Laboratories 的商标。 **COL31317 1016**