

应用扩展版RAS研究试剂盒检测FFPE样本中的低频体细胞突变

优化Sanger测序性能

本报告涵盖的内容如下：

使用针对8个最常研究的KRAS和NRAS热点区域的扩展版RAS研究试剂盒

- 在Applied Biosystems™SeqStudio™基因分析仪 — 我们产品系列中最新的毛细管电泳仪 — 上使用扩展版RAS试剂盒进行金标准Sanger测序
- 使用扩展版RAS试剂盒检测低频变异，并在SeqStudio和Applied Biosystems 3500xL两种毛细管电泳仪平台上进行性能对比。

Sanger测序常用于肿瘤研究中癌症的基因分析。Applied Biosystems™ Minor Variant Finder (MVF)软件现支持在Sanger测序中进行低频变异检测。这在检测体细胞突变方面尤为重要。

由于某些癌症(如结肠直肠癌)的RAS突变谱与其抗表皮生长因子受体(EGFR)反应之间的高度相关性，临床研究人员经常进行RAS突变检测。在携带RAS突变的肿瘤中激活的MAPK途径更可能赋予其对抗表皮生长因子抑制剂的耐受性[1]。

以下是使用基于即用型Sanger测序的扩展版RAS试剂盒检测的亮点，用于高灵敏鉴定福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样本中的低频突变(低至5%)。

扩展版RAS试剂盒检测亮点

- 检测限(LOD)为5
- 扩大了RAS覆盖范围(8个常研究KRAS和NRAS基因热点区域)
- 快速出结果(例如，3500xL基因分析仪<6小时/6个样本)，且手动操作时间短
- 提供准确和完整的双向序列信息
- 即用型平板
- DNA起始量要求低(低至1 ng /反应)

兼容仪器：

- SeqStudio基因分析仪
- Applied Biosystems™3500和3500xL基因分析仪

“新的SeqStudio基因分析仪快速、直观、使用简单。与qPCR平台相比，在SeqStudio系统上使用RAS试剂盒进行的全面分析可获得详细的序列信息，所需低质量FFPE DNA起始量更低。”

—Luca Quagliata 博士，高级主管
(瑞士)巴塞尔医科大学

使用MVF软件进行sanger测序的优势：

检测限为5%：与MVF软件结合使用时，Sanger测序可将检测下限降至5%，即临床研究人员常推荐的临界标准。

扩展版的RAS覆盖范围：我们已经开发出针对8个KRAS和NRAS基因的热点区域(外显子2的12-13区域，外显子3的59-61区域，外显子4的117和146的密码子)进行Sanger测序的扩展版RAS研究试剂盒。目前大多数基于qPCR或焦磷酸测序的方法不能涵盖上述所有热点密码子；使用这种基于Sanger测序的扩展版RAS研究试剂盒可以检测整个扩增子的任何变异。

快速出结果：Sanger测序可快速鉴定已知的体细胞突变。该方法适合需要高性价比、快速出结果的低通量实验室(使用SeqStudio基因分析仪<6小时/样本，使用3500基因分析仪<5小时/样本，使用3500xL基因分析仪<4小时/样本)。实际上，采用完整96孔板的3500xL平台的出结果时间<6小时/6个样品。此外，相对于焦磷酸测序结果更繁琐的峰分析和解读，此反应使用MVF软件解读结果并生成报告，数据分析更快速、简便和稳定。新一代测序(NGS)非常适合高通量检测，可通过快速的高性价比方式对更多靶标和样品进行多重检测和筛选。

准确和完整的双向序列信息：Sanger测序能够鉴定所有需要的热点变异，以及序列上下游整个扩增子长度上的许多其他变异。大多数基于qPCR的方法仅可检测热点突变“是”或“否”存在——不能准确识别特定变异或提供序列信息。特定的等位基因和附加的序列信息不仅在检测新突变方面重要，更可能对特定变异产生功能影响。例如，有证据表明，任何KRAS热点区域的氨基酸置换都具有不同的致癌潜力以及不同的功能[2]。

而且，Sanger测序允许用户目视检查实际序列，并使用正向和反向链接受或拒绝可能变异体进行双重确认，从而增加结果的可信度。

即用型平板：扩展版RAS研究试剂盒的引物预先加载在96孔板上，只需要添加PCR混合物和模板。进行正向和反向测序时，一个平板可以容纳五份样品和一份对照(表1)。为了简化、加速该过程，我们使用Applied Biosystems™ BigDye™ Direct cycle测序试剂盒和BigDye X Terminator™ 纯化试剂盒(图1)对该实验进行了优化。使用这两种试剂盒，可在整个工作流程沿用同一平板(包括电泳)，无需将样品或试剂从平板中移出，从而可以最大限度地减少样品混淆或污染的风险。

表1. 扩展版RAS研究试剂盒的平板布局：五份样品和一份对照。

| | 对照* | | 样品1 | | 样品2 | | 样品3 | | 样品4 | | 样品5 | |
|---|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|
| | 正向 | 反向 |
| 1 | T1 | T1 |
| A | T1 | T1 |
| B | T2 | T2 |
| C | T3 | T3 |
| D | T4 | T4 |
| E | T5 | T5 |
| F | T6 | T6 |
| G | T7 | T7 |
| H | T8 | T8 |

* BigDye Direct Cycle测序试剂盒随附的对照物DNA CEPH 1347-02可以用作参考序列对照。“T”代表热点靶标。



图1. 扩展版RAS试剂盒将预先加载冻干引物对的96孔板与BigDye Direct Cycle测序试剂盒和BigDye结合。

低DNA起始量：使用基于Sanger测序的方法，可以低至1 ng FFPE DNA/反应的样本检变异。其他基于qPCR和焦磷酸测序的方法(通常覆盖度较小)则需要较高起始量的DNA (>10 ng/反应)。

扩展版RAS研究试剂盒的简化工作流程

扩展版RAS研究试剂盒可以对从不同质量FFPE样品中提取的DNA扩增的KRAS和NRAS基因的8个热点区域的短扩增子(124-181 bp)进行测序(表2)。为简化工作流程，首先采用预上样8个引物对的Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 96孔反应板，然后只需要添加PCR预混液和模板(图2)。

8个扩增子均采用DNA参考标准品(Horizon Discovery, Cambridge, UK)作为阳性对照。为了评估扩展版RAS研究试剂盒在SeqStudio基因分析仪和3500xL基因分析仪上的性能和检测限，我们将CEPH 1347-02野生型对照DNA与50%等位基因频率的参考标准品混合，制备具有10%和5%低频等位基因频率的稀释混合物。在制备1 ng/μL参考标准品、CEPH DNA和稀释混合物之前，通过Applied Biosystems™ QuantStudio™ 3D数字PCR系统测量参考标准品和CEPH DNA的DNA浓度。

表2. 扩展版RAS研究试剂盒和参考标准的热点靶标(T)的详细信息。

| 行 | 靶标 | 基因 | 外显子 | 热点密码子 | 基因型 | 正向变异 | 参考标准品 |
|---|----|------|-----|-------|-------|-------|-------|
| A | T1 | KRAS | 2 | 12-13 | G12A | C → G | HD265 |
| B | T2 | KRAS | 3 | 59-61 | A59T | C → T | HD694 |
| C | T3 | KRAS | 4 | 117 | K117N | T → G | HD758 |
| D | T4 | KRAS | 4 | 146 | A146T | C → T | HD299 |
| E | T5 | NRAS | 2 | 12-13 | G12A | C → T | HD695 |
| F | T6 | NRAS | 3 | 59-61 | A59T | C → T | HD697 |
| G | T7 | NRAS | 4 | 117 | K117N | C → A | HD696 |
| H | T8 | NRAS | 4 | 146 | A146T | C → T | HD757 |

注：行：在扩展版RAS研究平板中的引物对位置。

基因型：水平参考标准品的基因型。

正向变异：正向电泳图中显示的变异。



图2. 扩展版RAS研究试剂盒的简便、快速工作流程。

在Applied Biosystems™ Veriti™热循环仪中进行PCR和测序反应。使用BigDye Direct Cycle测序试剂盒避免了PCR纯化步骤，提高了5'端测序质量，并通过使用M13测序引物简化了循环测序。

最后，BigDye XTerminator纯化试剂盒有利于测序反应物纯化。在正向和反向两个方向对待测样品和野生型CEPH 1347-02 DNA进行测序，并在整个工作流程中在相似条件下处理同一96孔板。将平板在SeqStudio和3500xL基因分析仪上进行电泳，并使用MVF软件分析.ab1文件。

便于使用SeqStudio基因分析仪进行Sanger测序

SeqStudio基因分析仪隶属Applied Biosystems™基因分析仪品牌，后者基于毛细管电泳技术，有着30年的历史。该仪器具有适合实验室空间的紧凑设计，非常适合8孔联管和标准96孔PCR板。该仪器使用方便，通过一个多合一卡夹将4道毛细管、通用聚合物、阳极缓冲液和胶泵体系整合在一个一体式设备中(图3)。集成卡夹生成数据时更加灵活可控。可以通过使用内置计算机的电子图形用户界面(eGUI)或使用Plate Manager (Thermo Fisher Cloud (thermofisher.com/cloud))内运行的独立软件或通过USB连接其他计算机，运行分析。SeqStudio基因分析仪与Thermo Fisher Cloud允许通过互联网连接随时随地实现数据共享，运行实时监控和数据分析。



图3. SeqStudio基因分析仪和卡夹。

使用MVF软件轻松进行数据分析

- 低频变异检测限低至5%
- 快速简单的数据解读和分析工作流程
- 可鉴定出候选变异供专家审查和报告

使用MVF软件进行等位基因频率分析 — MVF是易用的桌面软件，专门用于通过Sanger测序数据进行单核苷酸变异(SNV)的检测、可视化和报告，检测限低至5%。在一组

632,452个碱基位置的测试中，其具有5%的检测限，95.3%的灵敏度，99.83%的特异性。复杂的算法滤除双向痕量数据中的系统噪音，显示出真实体细胞候选变异，供审查和报告。

通过MVF软件分析证实NRAS特异性变异的类型和低频等位基因频率(图4)。MVF软件还可以将序列与来自NGS实验的人类对照基因组和vcf文件进行比对，为单核苷酸多态性(SNP)数据库(dbSNP)解读提供NGS验证工作流程。

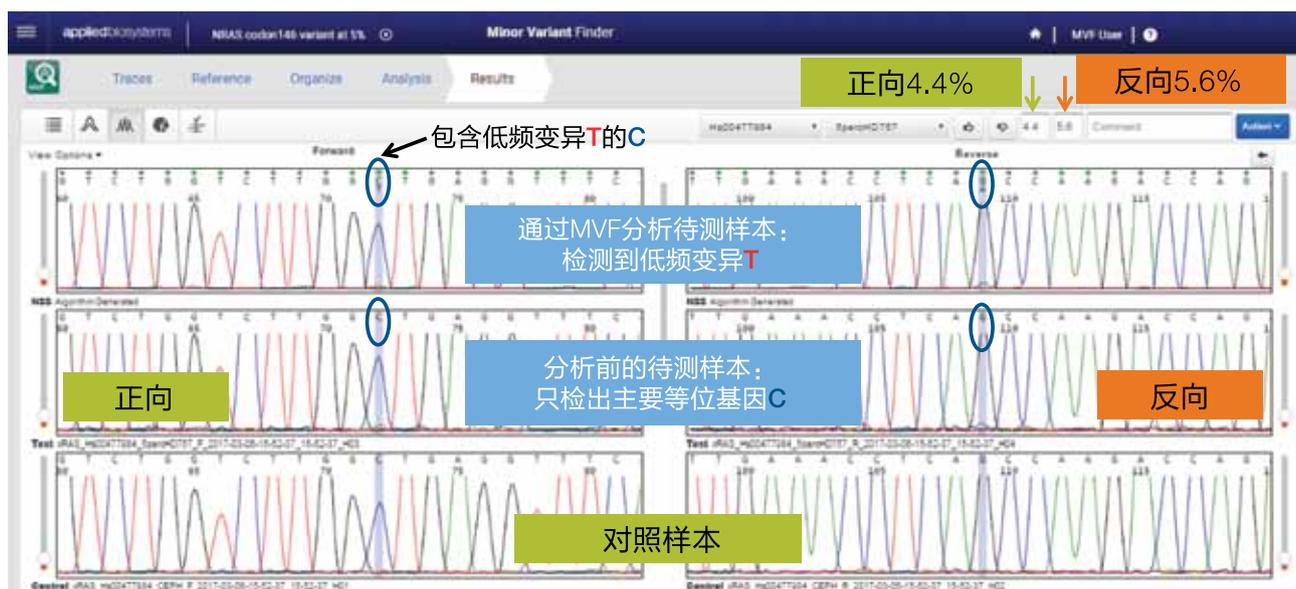


图4. MVF软件中的代表性电泳图。在分析之前在待测样品(中间的电泳图)中几乎不可见的NRAS密码子146的低频变异“T”(或相反序列中的相应的“A”),在约5%的水平下被MVF检测到(上方电泳图)。下方电泳图是使用CEPH野生型参考对照DNA在同一96孔板上处理100%“C”等位基因产生的序列。

实验结果

使用MVF软件成功鉴定了8种DNA参考标准品的所有预期变异，变异等位基因频率分别为50%，10%和5%。SeqStudio和3500xL基因分析仪的结果一致，所鉴定的变异等位基因频率高度相关(图5)。另外，从1 ng DNA模板/反应浓度开始的正向和反向测序均成功检测到变异。我们建议每次反应至少加入1 ng DNA以获得高质量结果，否则总测序质量可能会受到影响，并且等位基因比率在1 ng/反应浓度之下波动更大。

第三方客户实验室测试

在瑞士巴塞尔大学医学遗传与病理学研究所Luca Quagliata博士的实验室，也测试了展RAS研究试剂盒在新型SeqStudio仪器上的性能。

选择来自结肠癌活检样本的22份FFPE DNA样品进行研究。所有样品之前都使用Ion Torrent™ Oncomine™ 实体肿瘤DNA试剂盒在Ion S5™ XL系统上进行测序。FFPE样品制备，FFPE DNA提取(用蛋白酶K消化)和整个扩展版RAS工作流程 — 包括在SeqStudio基因分析仪原型机上进行的电泳 — 均在Quagliata博士的实验室中进行。使用Invitrogen™ Qubit™ 3.0荧光计测量FFPE DNA样品的浓度。在Veriti热循环仪中进行PCR和测序反应。

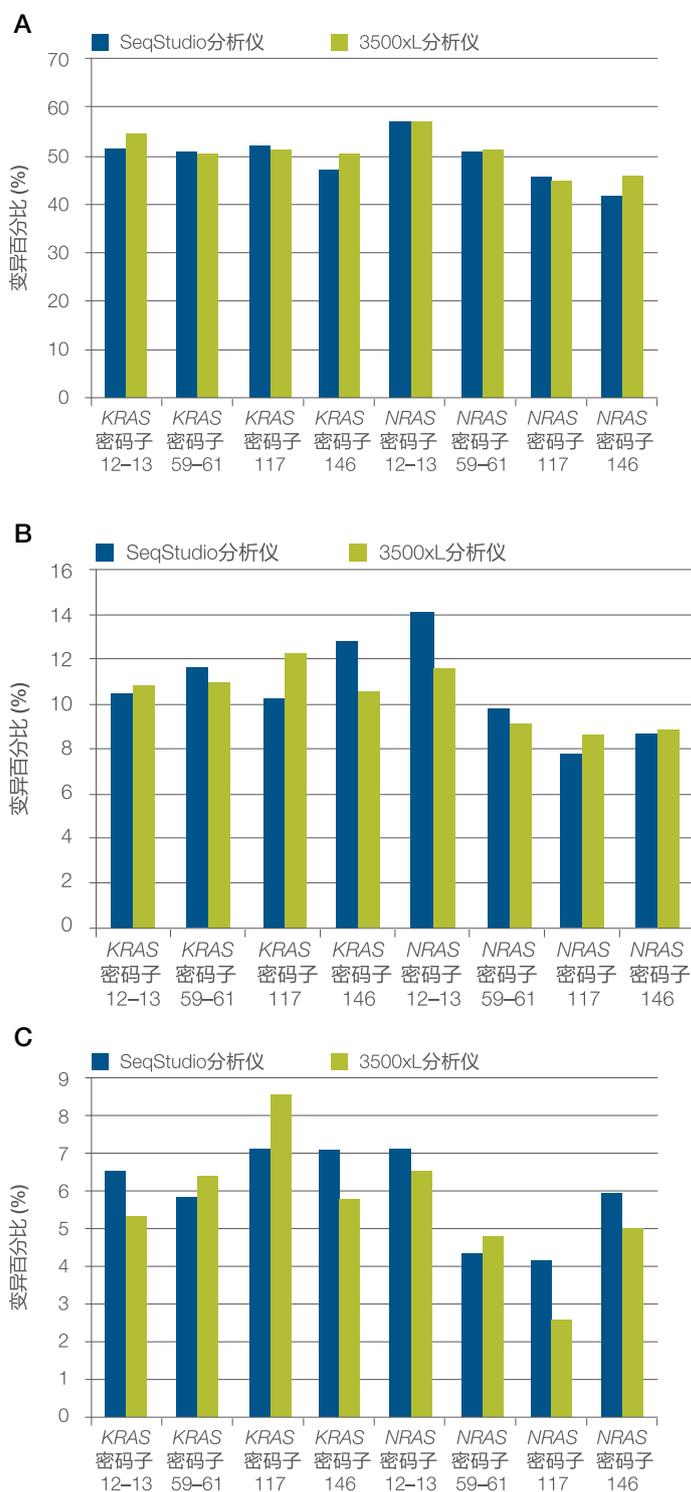


图5. (A) 50%、(B) 10%和(C) 5%等位基因频率的参考标准对品，按照1 ng DNA/反应的起始浓度，在SeqStudio和3500xL基因分析仪上评估扩展版RAS研究试剂盒的性能。变异百分比(%)显示在y轴上。变异百分比表示对于特定的热点突变，正向测序到的百分比的平均值和对应的反向测序中检测到的百分比。特定变异的峰高度百分比与相同位置处的参考峰相比较。使用以下公式计算变异百分比： $100 \times (\text{变异基峰高度}) / (\text{基本} + \text{变异基峰高度})$ 。

结肠癌活检研究样品的结果

即使每次反应DNA起始量低于1 ng，依然能够成功检测到每份突变样品。16份样品的起始DNA量/次反应超过1 ng；同时有6份研究样本由于来自有限的显微切割的FFPE切片：

DNA浓度低于1 ng。其中1份样品，反应的起始量低至0.094纳克。SeqStudio基因分析仪的结果与Ion Torrent™ NGS生成的数据一致(图6)。

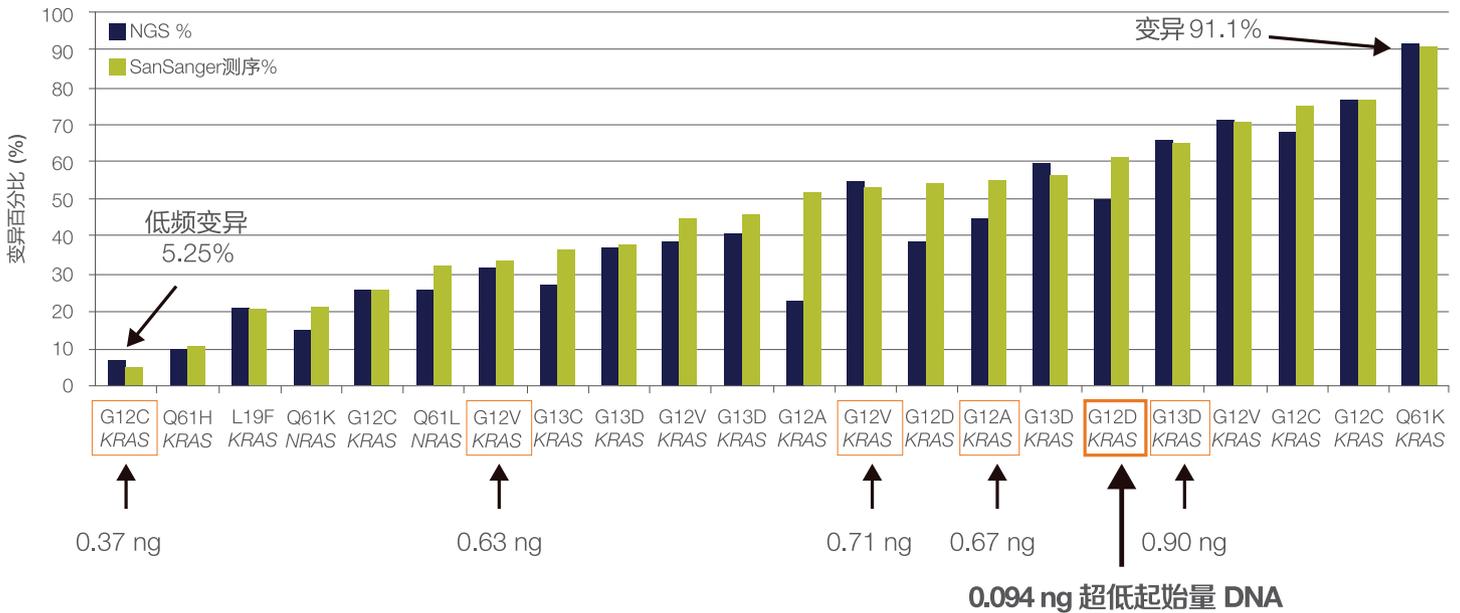


图6. 使用低起始量DNA时，扩展版RAS研究试剂盒在SeqStudio基因分析仪上的应用性能。扩展版RAS研究试剂盒的整个工作程包括在瑞士巴塞尔大学预处理的96孔板。通过使用来自SeqStudio仪器的.ab1文件的MVF软件计算的变异百分比值与由Ion Torrent NGS测量的变异百分比值进行比较，并且从最低(5.25%)到最高(91.1%)的Sanger测序变异百分比值进行分类。来自Sanger测序的变异百分数值表示在正向和反向测序中检测到的变异百分数值的平均值。

结论

我们推出用于Sanger测序的扩展版RAS研究试剂盒，针对8个最常研究的KRAS和NRAS热点区域。该试剂盒经过专门优化，可采用少量FFPE DNA样本(低至1 ng/反应)使用MVF软件检测低频变异(低至5%)。该实验工作流程稳定、简便，更通过96孔预加样板进一步简化，单个样品成本低且出结果时间短(例如，3500xL基因分析仪<6小时/6个样品)。

此外，使用使用扩展版RAS研究试剂盒在我们的新型毛细管电泳仪SeqStudio基因分析仪上进行分析，可展现出Sanger测序金标准性能。这一组合具有多种吸引人的优势，如通过多合一卡夹和易用的触摸屏界面最大限度缩短手动操作时间。我们已经证明，在SeqStudio和3500xL毛细管电泳仪上使用扩展版RAS研究试剂盒检测低频变异的性能相当。

订购信息

| 产品 | 数量 | 货号 |
|---|----------|---------|
| 扩展版RAS研究试剂盒, 早期试用版 | 25份样品 | A35176 |
| SeqStudio基因分析仪 | 1台仪器 | A34274 |
| SeqStudio分析软件 | 1套 | 4443764 |
| SeqStudio卡夹 | 500次反应 | A33671 |
| SeqStudio起始试剂盒 | 1试剂盒 | A35000 |
| SeqStudio SmartStart 1天培训 | 1次 | A34684 |
| 3500基因分型 | 1套 | 4440466 |
| 3500xL基因分析仪 | 1套 | 4440467 |
| BigDye Direct循环测序试剂盒 | 1000次反应 | 4458688 |
| BigDye XTerminator纯化试剂盒 | 1,000次反应 | 4376487 |
| Minor Variant Finder软件 | 1套 | A30835 |
| Qubit 3.0荧光计 | 1台 | Q33216 |
| QuantStudio 3D数字PCR仪 | 1台 | 4489084 |
| QuantStudio 3D Digital PCR 20K Chip Kit v2试剂盒及预混液 | 8 x 12芯片 | A26317 |
| Veriti热循环仪 | 1台 | 4375786 |

参考文献

1. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A et al. CS (2015) Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol* 26:13–21.
2. Ihle NT, Byers LA, Kim ES et al. (2012) Effect of *KRAS* oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 104: 228–239.

Minor Variant Finder 软件可自 thermofisher.com/mvf 免费下载

更多信息请见 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