

GeneRead™ DNA FFPE Kit

用于从 FFPE 组织中分离基因组 DNA，以便进行可靠的 NGS 分析

GeneRead DNA FFPE Kit 采用基于硅胶膜离心柱的优化方案，能够从福尔马林固定，石蜡包埋组织样本中纯化出高质量的基因组DNA。由于福尔马林固定以及标本老化会导致胞嘧啶的脱氨作用，进而会导致的 C>T 人为突变现象，从而会引起二代测序 (NGS) 结果产生偏差。GeneRead FFPE Kit 在纯化步骤中引入了酶处理，能够消除此类人为干扰，从而确保纯化到高丰度、高纯度的 DNA 样本，尤其适合于后续的 NGS 应用。

GeneRead DNA FFPE Kit 可以确保：

- 从 FFPE 样本中实现最佳的基因组 DNA 分离
- 易于执行且规范化的实验方案
- 酶学方法去除胞嘧啶脱氨作用导致的人为假突变
- 可在 QIAcube® 全自动核酸纯化仪上自动运行

DNA 组织中获取的 DNA 会导致假突变，干扰 NGS 数据

由于福尔马林固定操作，以及样品可能在非理想条件下长时间储存，从 FFPE 组织样本中提取的 DNA 在发生严重降解的同时，也经常会检测到人为假突变。值得一提的是，胞嘧啶向胸腺嘧啶的转换占低频随机突变的绝大部分比例。此现象的确切机制尚未可知，一个可能的解释是胞嘧啶的脱氨作用导致在该位置转化为尿嘧啶，后者会与腺嘌呤

嘌呤配对（图1）。在测序过程中，这一改变随后会按照 C>T 转化后的结果读取。如果在文库构建过程中链信息未能保留，则两条链都会被测序，这时此人为现象可能显示为 C>T 或 G>A 转化。很有必要对这些人为假突变进行去除，特别是对于癌症样本的测序分析而言，因为这些干扰在此类样本中会作为假阳性突变出现。

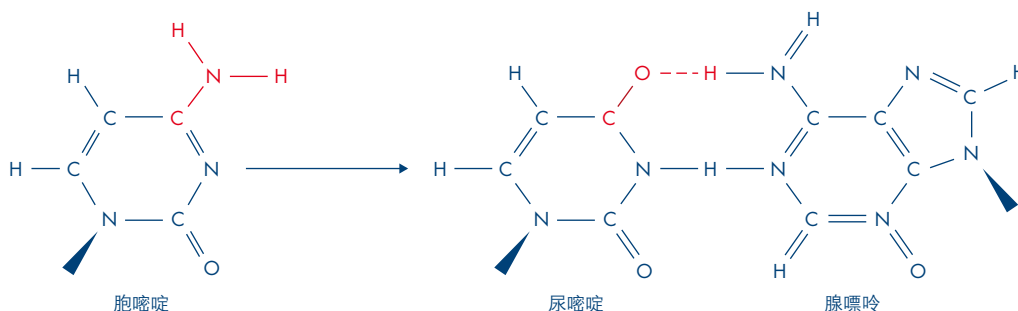


图1. 胞嘧啶的脱氨作用导致错误的胞嘧啶配对。在 FFPE 样本中，胞嘧啶可能会发生脱氨作用，进而导致胞嘧啶作为尿嘧啶与腺嘌呤发生配对。在测序反应中，此过程将导致 C>T | G>A 转化现象的产生（附图改编自 Klug 和 Cummings, 1997）。

从有限的起始材料中获得高产率

由于文库制备和测序技术的不断进步，对生物库内大量储藏的 FFPE 组织样本实施高通量测序逐渐变得可能，这无疑吸引了研究者的目光。这些测序技术同时也降低了可靠检测测序突变的频度阈值。不过，对 FFPE 样本进行测序还是会遭遇多种挑战。这些样本通常具有不可替代性，因此就需要以最小的起始材料获取最大的核酸产量。

除了 DNA 产率上的考虑之外，此时错误突变的相对频率也会相应增加，对 FFPE 样本测序的影响也会变得更为严重，相比标准的 QIAamp® FFPE DNA Kit，GeneRead DNA FFPE Kit 能够为小样本（1 x 10 μm 切片样本）提供同等水平乃至更高的双链 DNA 产率（图2）。

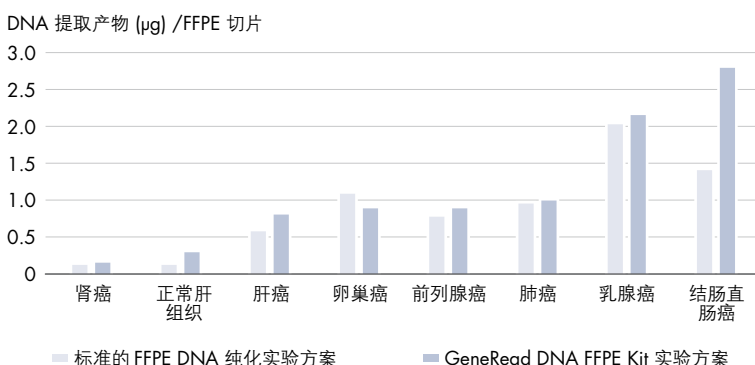


图2. 双链 DNA 的高产率。使用 FFPE 组织单个10 μm 切片样本，比较标准 DNA 纯化法与 GeneRead 方案的应用效果。起始材料不同会导致 DNA 产率在较大范围内变动。对于 FFPE 样本的 DNA 纯化工作，此为常见现象。

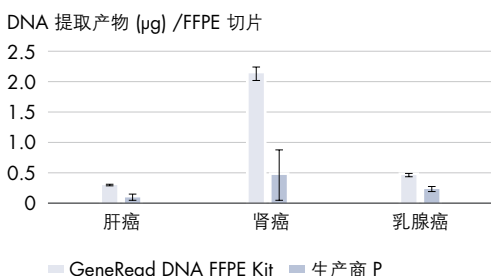


图3. GeneRead DNA FFPE Kit 的使用效果超过另一厂商的试剂盒。使用 GeneRead DNA FFPE Kit 及另一厂商的试剂盒产品，从单个 10 μm FFPE 组织切片中提取得到的双链 DNA。DNA 产率通过 Qubit® 荧光计进行定量。针对所测样本，GeneRead DNA FFPE Kit 获得了高达 4 倍的 DNA 产量。DNA 纯化产物的产率在很大范围内变动，这是由于起始材料的条件不同所导致，此现象在 FFPE 样本的 DNA 提取过程中很常见。

有效减少人为的 C>T | G>A 转换

由福尔马林固定和储藏过程所致的 DNA 损伤主要以随机形式发生，进而在序列上分布为不同的突变位点。由于只有少数基因组拷贝上发生了全局性的破坏，因此这些人为产生的假突变的发生频率通常较低。而低频度的新突变在癌症研究中可能携带有十分重要的信息，因此很有必要在这

些低频突变中区分真实突变与人为突变¹。通过考查样本的全新低频突变，对 GeneRead DNA FFPE 方案中人为突变的发生数目以及清除效率进行评定。GeneRead DNA FFPE Kit 极大降低了低频发生的 C>T | G>A 转换(人为突变)，同时有效保留了真实发生的突变（图4-5）。

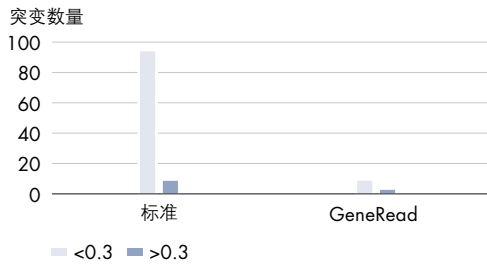


图4. 有效减少人为的 C>T | G>A 突变对肝癌样本进行分析。GeneRead DNA FFPE Kit 去除了超过90% 的全新低频突变，这些突变多为（保存过程中）自发的人为干扰。

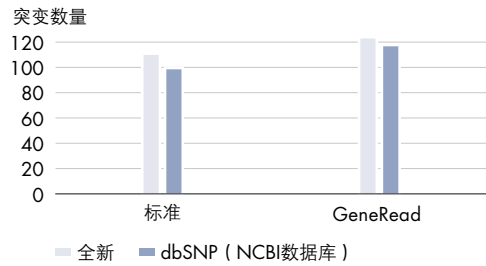


图5. 保留高频的 C>T | G>A 转换。对肝癌样本进行分析。在GeneRead DNA FFPE 方案的使用过程中，全新发生的及 dbSNP 中的高频 C>T | G>A 转换仍被保留下来。

将假阳性突变的风险减至最低

在分析癌症相关的 SNP 过程中，去除 C>T | G>A 转换的人为干扰显得尤为重要。脱氨作用多为随机发生，如未经有效清除这些人干扰，它们也可能被解释为具有癌症相关性，进而作为假阳性的 SNP 被显示出来。GeneRead DNA FFPE Kit 仅去除人为突变，从而使假阳性风险降至最低（表1）。

表1. 去除假阳性的 COSMIC 变异

Chrom	Pos	COSMIC ID	dbSNP ID	Gene name	Ref	Var	Standard FFPE	GeneRead FFPE
chr1	226595647	COSN392383	rs907187	PARP1	C	G	0.95	1.00
chr2	29416481	COSM1130802	rs1881420	ALK	T	C	1.00	1.00
chr2	48032105	COSM13342	-	MSH6	C	T	0.13	0.00
chr3	30713126	COSM149346	rs11466512	TGFBR2	T	A	0.51	0.45
chr3	47125385	COSM149376	rs4082155	SETD2	G	A	0.59	0.63
chr4	1807130	COSM327089	-	FGFR3	C	T	0.16	0.00
chr4	55152040	COSM22413	rs2228230	PDGFRA	C	T	0.63	0.67
chr4	55595519	COSM12708	rs121913516	KIT	C	T	0.31	0.56
chr5	35861068	COSM149813	rs1494558	IL7R	T	C	0.53	0.50
chr5	35871190	COSM149814	rs1494555	IL7R	G	A	0.49	0.47
chr5	35875593	COSN167436	rs987106	IL7R	A	T	0.66	0.49
chr5	180036871	COSN167671	rs2242219	FLT4	C	G	0.60	0.59
chr7	55214348	COSM42978	rs2072454	EGFR	C	T	1.00	1.00
chr9	21968199	COSM14251	rs11515	CDKN2A	C	G	0.99	0.99
chr9	139397707	COSM33747	rs10521	NOTCH1	G	A	1.00	1.00
chr11	64572018	COSM255213	rs2959656	MEN1	T	C	0.99	1.00
chr12	121426785	COSM46438	-	HNF1A	G	A	0.20	0.00
chr16	3828705	COSM970602	-	CREBBP	C	T	0.10	0.00
chr17	41244000	COSM148277	rs16942	BRCA1	T	C	0.40	0.52

从一例15岁病患的肝癌组织中鉴定到的COSMIC突变。对此样本同时使用标准 FFPE 试剂盒和带有人为突变清除步骤的全新 GeneRead DNA FFPE Kit 进行处理。处理后样本均通过 GeneRead DNAseq Comprehensive Cancer Gene Panel 进行扩增，并使用大规模平行测序技术完成测序。最后两列显示了鉴定得到的突变频率。使用 GeneRead DNA FFPE Kit 比标准试剂盒多鉴定出四个突变。这些突变均为 C>T | G>A 转换的低频突变，很容易与福尔马林固定和储藏过程中发生的人为突变相混淆。所有其他的突变均在两类处理中被成功检出，检出的突变发生频率也十分接近，这表明新试剂盒能够高效消除人为突变，而不会对真实突变造成影响。

References

1. Do, H., Wong, Q.S., Dobrovic, A. (2012) Reducing Sequence Artifacts in Amplicon-Based Massively Parallel Sequencing of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded DNA by Enzymatic Depletion of Uracil-Containing Templates. *Clinical Chemistry* **59**, 1376.

订购信息

产品	规格	货号
GeneRead DNA FFPE Kit (50)	Spin columns, buffers and reagents for 50 preparations, 8 ml Deparaffinization Solution	180134
GeneRead DNaseq Gene Panels	Wet-bench verified primer sets for targeted exon enrichment	180941
GeneRead DNaseq Gene Panels High-Content	Wet-bench verified primer sets for targeted exon enrichment	180942
GeneRead Custom DNaseq Gene Panels	Primer sets for customized targeted exon enrichment	180946
GeneRead Mix-n-Match DNaseq Gene Panels	Primer sets for customized targeted exon enrichment, selected from QIAGEN's laboratory-verified primer sets	180944
GeneRead DNaseq Library Quant Array	PCR arrays and components for library quantification	180601
GeneRead Size Selection Kit (50)	For reliable removal of DNA fragments <150 bp for library preparation in NGS applications: spin columns and buffers for 50 reactions	180514
GeneRead Library Prep Kits*	For the preparation of DNA libraries for use in NGS applications	Varies*
QIAcube	Robotic workstation for automated sample preparation using QIAGEN® spin-column kits	9001292† 9001293‡

* 不同的试剂盒形式针对不同的 NGS 平台应用，更多详情请参见 www.qiagen.com。

† 美国、加拿大和日本。

‡ 全球其他地区。

关于最新的许可信息和产品特定的免责声明，请阅读相关的 QIAGEN 试剂盒手册或操作指南。QIAGEN 试剂盒手册和操作指南可在 www.qiagen.com 上下载，或向 QIAGEN 技术服务或当地的经销商索取。

更多信息请见 www.qiagen.com/goto/DNA-FFPE-NGS

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, GeneRead™ (QIAGEN Group); Qubit® (Life Technologies Corporation).
8099086 06/2016 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

凯杰企业管理（上海）有限公司

电话：021-3865 3865 □ 技术支持热线：800-988-0325 400-880-0325

TechService-CN@qiagen.com □ www.qiagen.com



凯杰生命科学