

FFPE DNA样本 NGS检测全流程解决方案

COMPLETE SOLUTION OF FFPE DNA SAMPLES FOR NGS



中国
武汉市东湖新技术开发区高新二路388号光谷生物加速器7栋4层
WEB: www.abclonal.com.cn
TEL: 400-999-6126
E-mail: cn.market@abclonal.com

USA
ABclonal Technology Co.,Ltd.
500W Cummings Park, Ste. 6500 Woburn,
MA 01801
WEB: www.abclonal.com
TEL: 888-754-5670
E-mail: info@abclonal.com



20211014/1.0



Web

abclonal.com.cn



E-mail

cn.market@abclonal.com



Phone

400-999-6126

COMPANY PROFILE

Antibody / Protein / ELISA Kits / Enzyme / NGS / Service

ABOUT US

武汉爱博泰克生物科技有限公司 (ABclonal Technology Co.,Ltd.) 是全球生物试剂定制化服务领域的创新型领跑者。经过多年的深耕与发展, ABclonal旨在为生物医药前沿领域的基础研究、转化研究、精准医疗等多个领域提供专业可靠并符合市场需求的优质的产品与服务。公司主营业务包括科研抗体、分子酶产品、NGS建库试剂盒、活性重组蛋白、诊断抗原抗体原料、ELISA试剂盒以及CRO服务, CRO服务主要包括抗体与蛋白技术服务、基因与多肽合成技术服务、免疫学检测技术服务等。

ABclonal成立于2011年, 现已跻身全球化的跨国公司之列。公司总部位于中国武汉, 目前在美国波士顿设有抗体与蛋白研发中心、中国光谷生物城设有抗体生产基地、上海设有分子酶研发中心, 并在美国波士顿、日本、台湾、上海、北京、武汉、南京、成都、厦门、杭州、青岛、苏州、重庆和西安建立直销团队, 签约代理商近100家覆盖全球50多个国家与地区。在过去的10年中, 全球有超过100个国家, 超过100,000客户选择ABclonal。

目录

前言	1
FFPE DNA研究现状	2
FFPE DNA NGS检测全流程解决方案	3
核酸提取篇	4
核酸质控篇	5
文库制备篇	6
靶向捕获篇	10
数据分析篇	12
单品模块篇	13
产品订购信息	15

FFPE DNA研究现状



//建库成功率低

福尔马林的固定使组织中的核酸发生不同程度的降解和交联, 石蜡的高温渗透, 以及样本的长时间保存和周围环境也会对样品中的核酸产生极大的影响。使得从FFPE样本提取的DNA含量低、质量差, 且样本间质量差异较大, 导致下游NGS建库成功率低。

影响FFPE DNA质量的主要因素

因素	结果
福尔马林固定使蛋白质和核酸发生交联	影响核酸提取的质量
石蜡高温渗入加速磷酸二脂键的水解	导致DNA片段化
固定和包埋增加核酸分子脆性	造成核酸高度片段化

//检出率低

FFPE DNA质量差及建库过程会对后续测序数据质量产生影响, 例如reads 比率低、高PCR Duplication rate、文库丰度低、高假阳性率等, 造成信噪比低, 很难区分真实突变和假阳性突变。

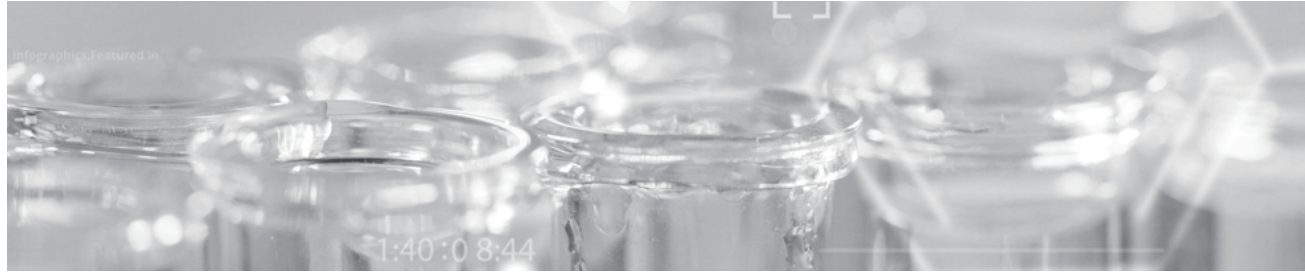
NGS测序分析常见问题

高假阳性率	福尔马林的固定会人为引入“C>T”和“G>A”突变, 给低频率突变检测造成很大的干扰
高Duplication rate	交联、突变、物理损伤等问题使得DNA的扩增更困难, 在起始量和连接效率相同的情况下, FFPE样本需要更多的PCR循环
低文库丰度	初始样本量、质量和文库有效转化率决定了文库丰度, 低丰度文库的额外测序, 只是徒增了重复率 (Duplication Rates)。

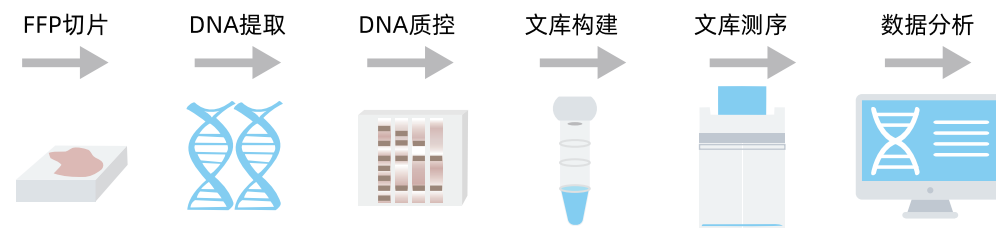
前言

福尔马林固定石蜡包埋处理的样本 (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded, FFPE) 因其可以室温长时间保存, 易于运输等特点, 已成为病理组织样本最常用的储存方式之一。目前, 全球约有2~4亿的FFPE组织样本, 是疾病诊断和科学研究最为宝贵的生物学资源之一。随着下一代测序技术 (NGS) 的快速发展, FFPE样本除了用于组织形态观察外, 更多的开始在分子层面进行研究。目前, 大部分保存的肿瘤组织为FFPE样本, 通过NGS技术对这些FFPE样本进行分子水平的研究, 为建立新的肿瘤分类、诊断和预后标准, 开发肿瘤早筛以及个体化医疗技术提供了有利依据。

FFPE DNA NGS检测全流程解决方案



如何从石蜡切片中提取出高质量DNA，并构建信息完整，无偏好，可用于后续充分挖掘FFPE中的有效核酸序列信息，已成为当前肿瘤研究领域亟待解决的问题。ABclonal科学家经过匠心打磨，开发了适用于FFPE样本的DNA提取、质量评估、文库构建、靶向捕获、数据分析等一系列产品和服务，可为客户提供一体化研究解决方案。



//ABclonal全流程解决方案优势

全流程覆盖

从提取到数据分析的整套解决方案，周到的技术服务

全流程覆盖

成本可控

合理的成本控制，最大程度降低成本

测序准确性好

真实临床样本数据验证，保证检测可靠性

测序准确性好

建库成功率高

建库成功率高
引进样本QC分级机制，搭配多种建库策略，提高建库成功率



核酸提取篇

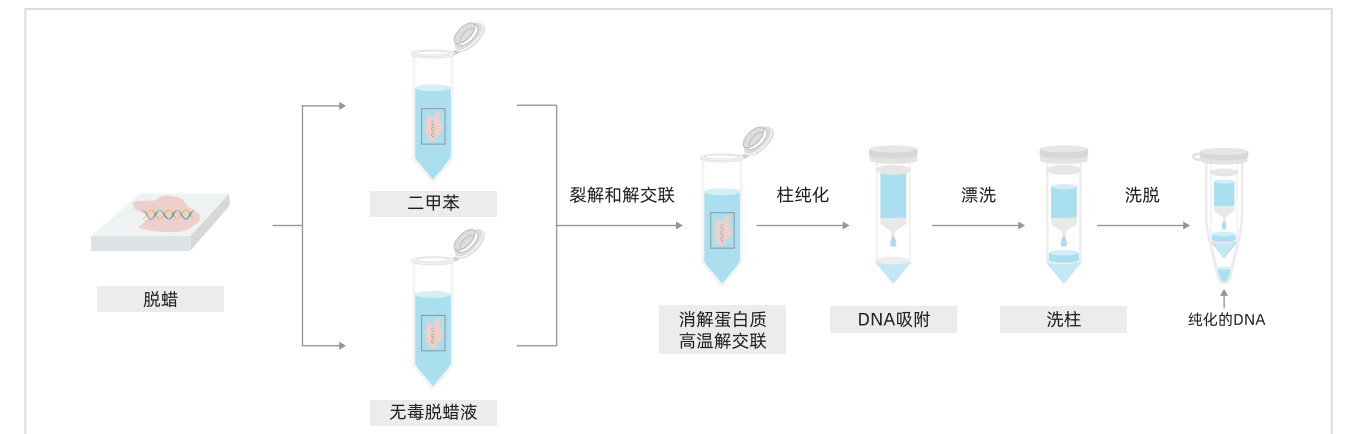
//DNA提取

FFPE样本需要进行脱蜡处理，常用的脱蜡试剂是二甲苯，但二甲苯容易造成核酸片段化，且对人体有毒害作用。同时，FFPE样本中DNA分子与其它生物大分子（蛋白质、RNA）交联在一起，需要解除交联才能有效释放出DNA。ABclonal FFPE提取试剂盒同时兼容二甲苯和无毒脱蜡液两种方法，可为实验人员提供更加安全的操作流程。同时，该试剂盒提供了优化的解交联步骤，能够高效释放出DNA，释放出的DNA通过硅胶膜进行进一步分离纯化，从而获得高质量的DNA。

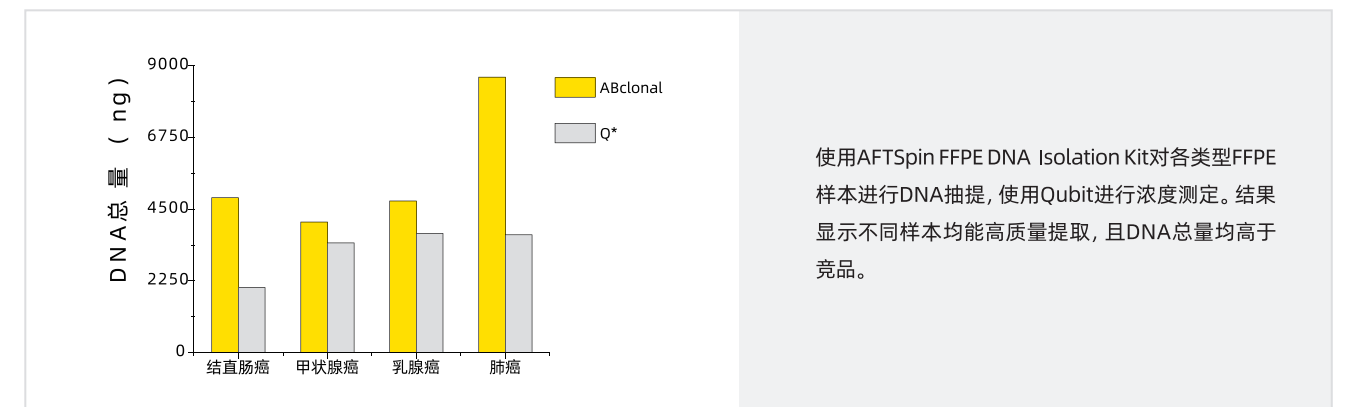
//AFTSpin FFPE DNA Isolation Kit-RK30112

- 简单快速：20 min 完成提取（除消化和解交联时间）
- 兼容性广：满足下游不同实验需求Southern Blot、PCR、NGS
- 得率高：超过行业标杆的核酸回收效率
- 安全：兼容二甲苯和无毒脱蜡

实验流程图



优异的DNA提取量



核酸质控篇

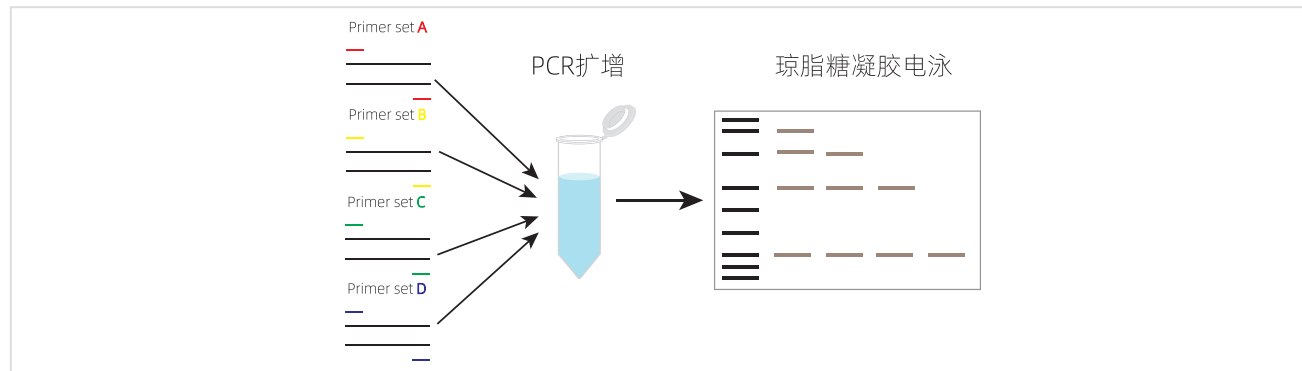
//DNA QC

NGS的建库和测序成本较高，因此，提取DNA不仅要总量高，质量比如完整性也尤其需要关注。因此，在建库之前需要对FFPE DNA进行更加全面和准确的质控。ABclonal FFPE DNA QC Kit包含针对4个不同大小目的产物的特异性引物，多重PCR扩增后直接进行电泳检测，根据PCR条带数量对DNA质量划分等级，根据精确分级灵活选择不同建库策略，提高文库制备成功率。同时，还可以根据分级为后续建库时PCR循环数提供指导，减少过度PCR扩增造成的假阳性。

//FFPE DNA QC Kit-RK20229

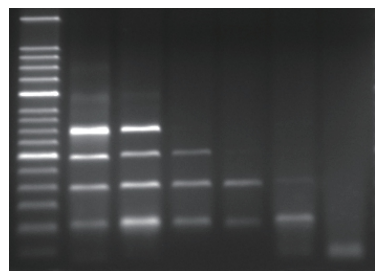
- 操作简单：一次多重PCR实验即可完成检测
- 灵敏度高：最低起始量pg级别
- 结果直观：通过条带数量判断FFPE DNA完整性
- 分型正确：根据分级标准选择不同建库试剂盒及PCR循环数，提高建库成功率和准确性

实验流程图



准确评估DNA完整性

Mark gDNA 1级 2级 3级 4级 5级



PCR产物条带数目	FFPE级别	建议PCR循环数 (30-200 ng)	建议PCR循环数 (30-5 ng)
4	1	6-9*	9-12***
3	2	7-10*	10-13***
2	3	9-12*	11-14***
1	4	11-14**	12-15***
0	5	13-16***	13-16***

*, 注: 建库试剂盒为RK20255和RK20261
 **, 注: 建库试剂盒为RK20255
 ***, 注: 建库试剂盒为RK20228

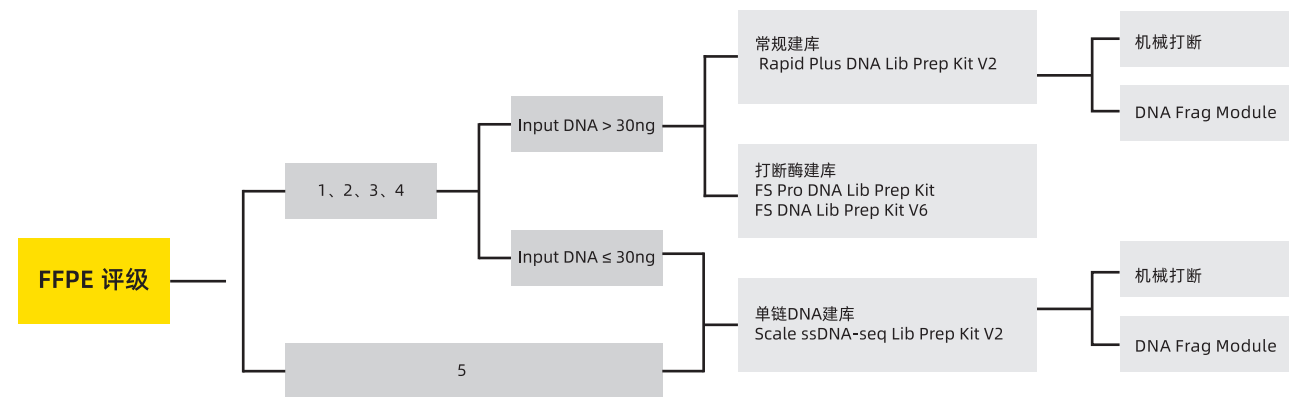
使用FFPE DNA QC Kit对各类FFPE样本进行QC质控，Human Blood gDNA作为阳性对照。根据PCR扩增的条带数量将样本划分为1-5等级。不同QC等级样本在使用建库试剂盒选择合适的PCR循环数。

文库制备篇



在高通量测序过程中，文库质量是决定实验是否成功的关键因素。若文库质量不佳，则有可能影响结果的可靠性。同时，高质量的文库也是保障FFPE DNA NGS检测成功的必要前提。为了适应FFPE样本建库成功率低，以及文库中reads 比对率低、高PCR Duplication rate、文库丰度低、高假阳性率等特点，ABclonal致力于测序建库试剂的升级和拓展，提供针对各种类型FFPE DNA 样本高质量的文库制备方案。

//ABclonal 解决方案



根据QC 评级，选择最合适的建库方式，能够显著提高FFPE样本建库成功率

//ABclonal 文库制备优势

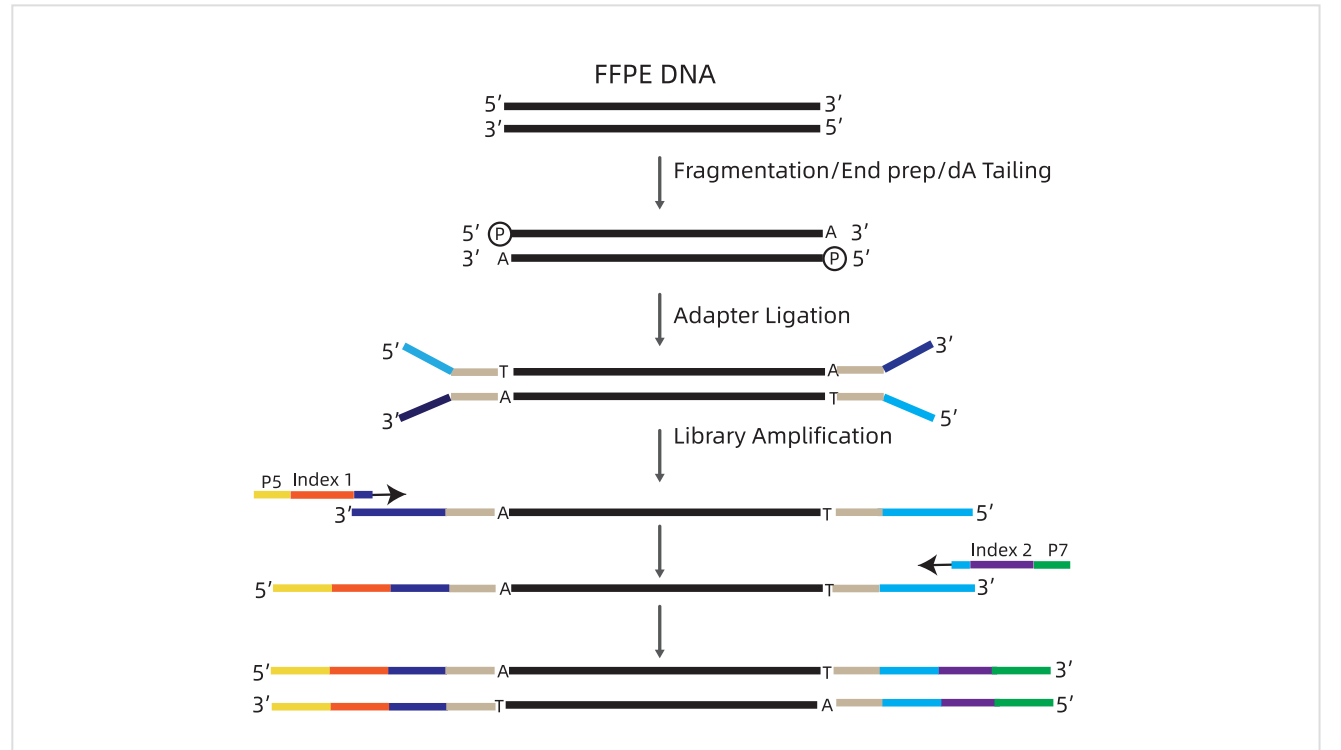
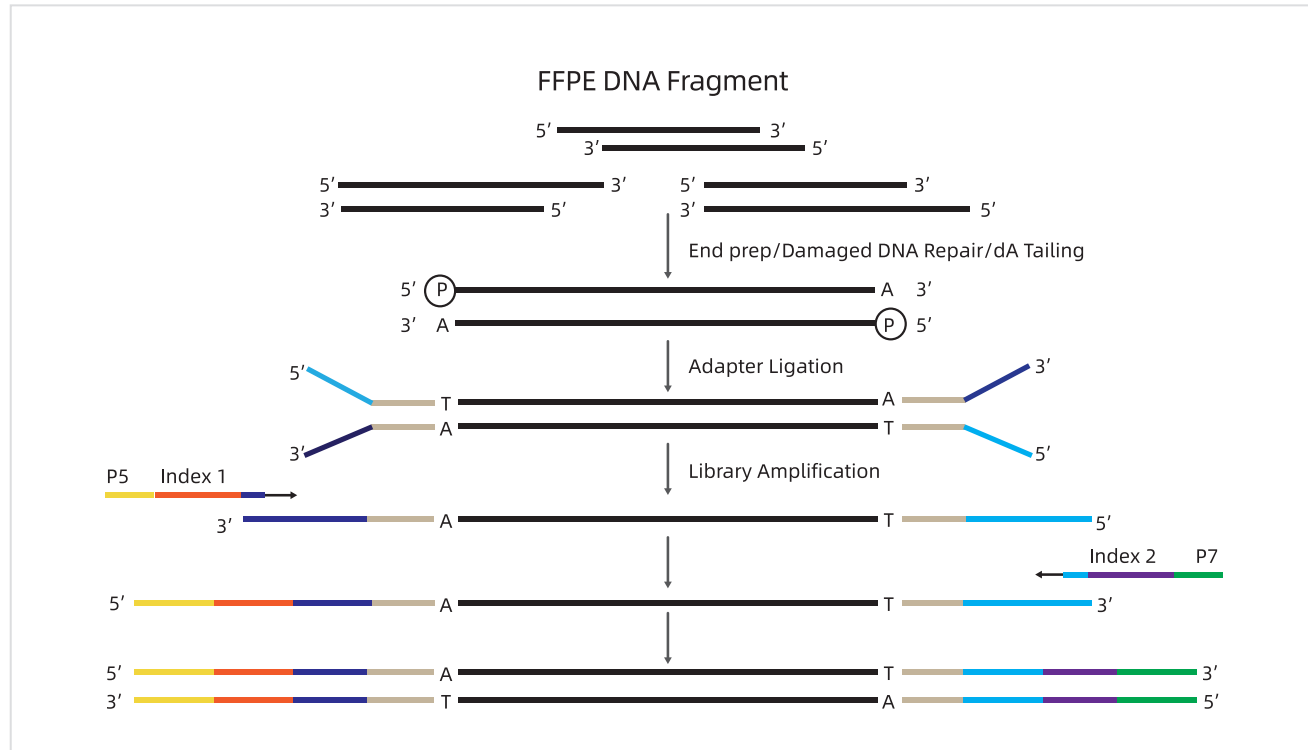
- 多样性 提供多种建库试剂盒和多平台（Illumina, MGI）。还提供单模块以共自由组合。
- 灵活性 兼容10 pg ~ 1,000 ng DNA，可搭配自动化工作站，提升效率。
- 质量控制 所有试剂都经过严格的质量QC，保证文库制备的稳定性和重复性。

建库策略1：常规建库方案

Rapid Plus DNA Lib Prep Kit V2 (RK20255)

建库策略2：打断酶建库方案

FS Pro DNA Lib Prep Kit (RK20261) FS DNA Lib Prep Kit V6 (RK20259)



产品特点

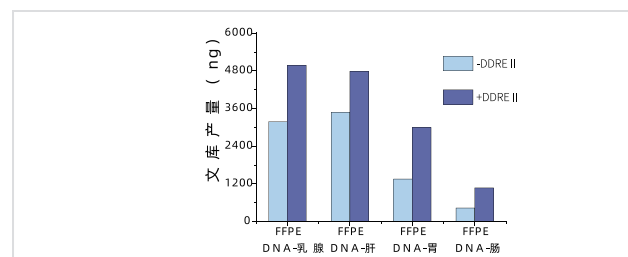
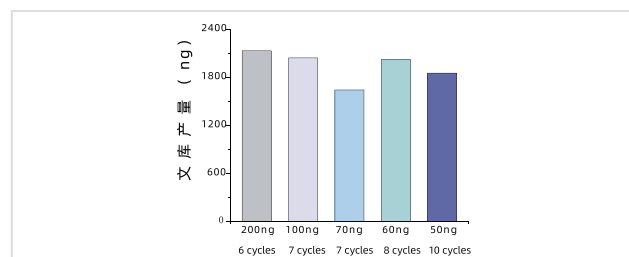
产品特点

- 末端修复、损伤DNA修复、加A合为一步反应极大缩短建库时间
- 强大的损伤DNA修复能力，提高文库产出
- 独特的试剂配比和连接酶提高接头连接效率
- 减半体系建库，仍能保持良好的连接效率，满足产量需求。

- 酶切、末端修复、加A合为一步反应，缩短建库时间至2 h以内
- 提供多种片段打断方案
- 文库产出量更高
- 兼容不同投入量的DNA模板

宽广起始量

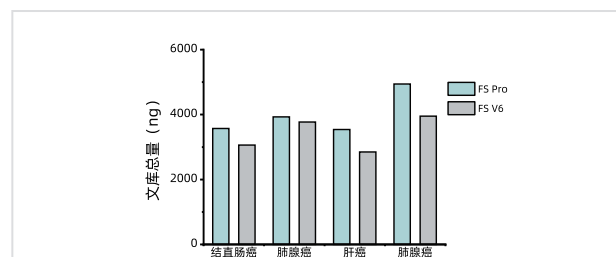
兼容DDRE II模块



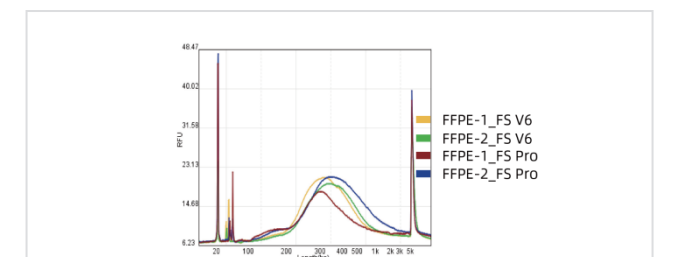
数据展示

不同起始投入量下，Rapid Plus V2均能高效建库。

DDRE II修复显著提高文库产量，尤其对于低质量的FFPE DNA样本，产量提升了2.5倍。



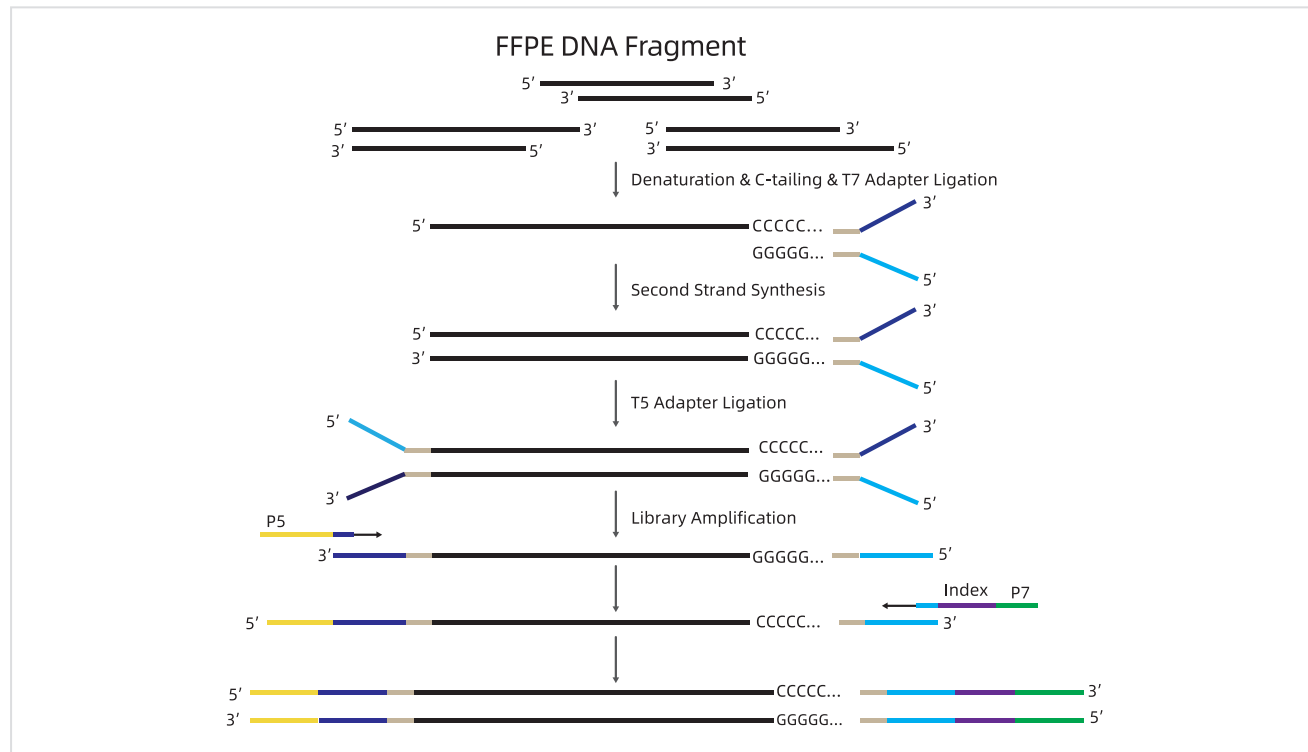
200 ng投入量，不同类型样本均能高效建库。



相同样本分别使用FS Pro和FS V6构建文库，峰型一致性较好。

建库策略3：困难样本建库方法

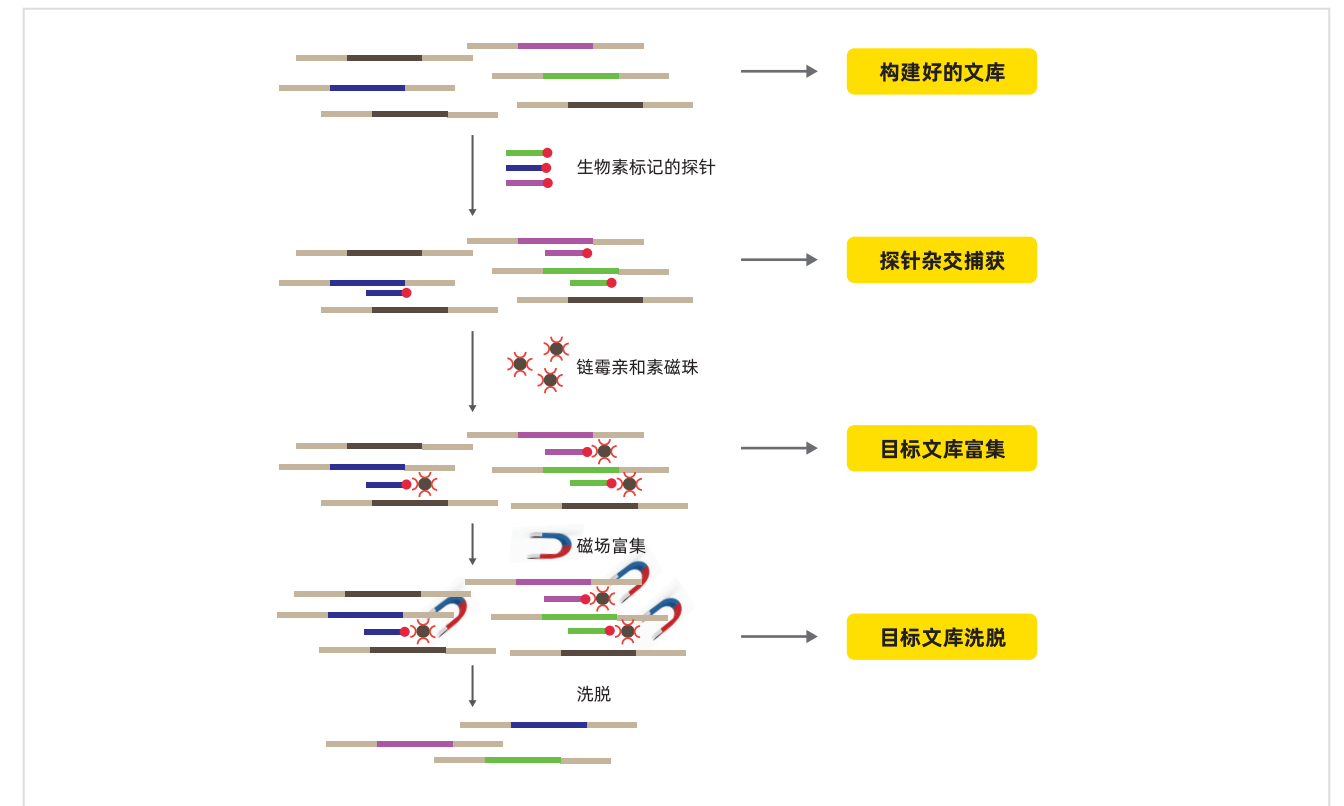
Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2 (RK20228)



靶向捕获篇

靶向捕获测序是仅关注基因组中的特定区域并进行定向富集和分析，可以一次性检测单核苷酸变异、易位、结构变异、插入和缺失及拷贝数变异等。为个体靶向治疗，免疫治疗及术后复发监控等临床应用提供指导。

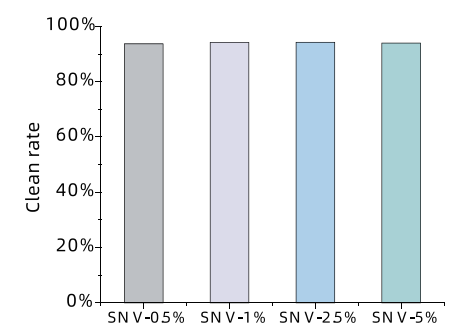
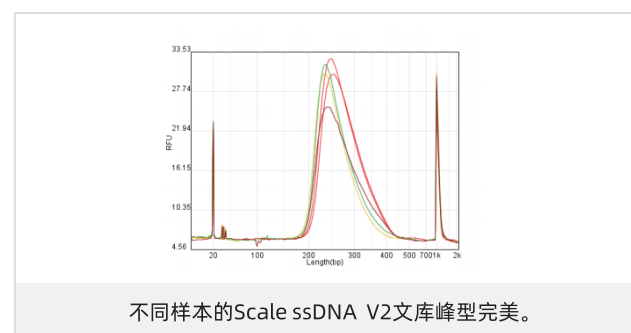
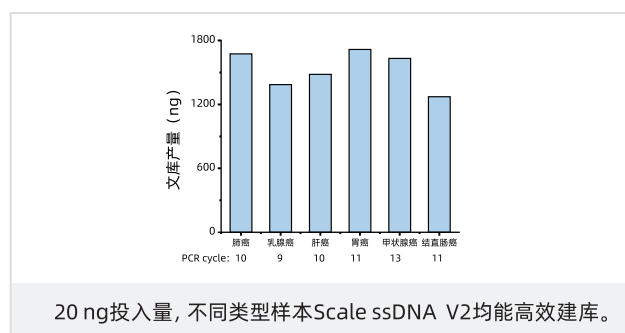
ABclonal靶向捕获试剂可用于Illumina测序平台，包含杂交/洗脱液 (Hybridization and Wash Kit)，通用Blocker封闭试剂 (ILM Universal Blockers-X1)，磁珠 (Streptavidin Beads)，人基因组重复序列封闭试剂(Human Cot DNA)，高保真低偏好性PCR试剂 (Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS) 等。这些靶向捕获试剂经过精心优化，具有高灵敏性和特异性，可用于各种致病基因的研究以及健康筛查等。



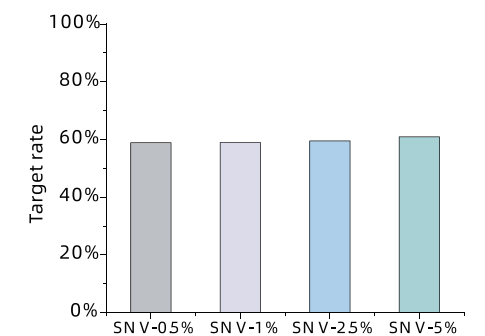
产品特点

- 兼容10 pg~ 200 ng投入量
- 可适用于质控QC评级为5，或投入量< 30 ng的样本建库
- 独特的建库方法保证低质量样本建库成功率
- 兼容机械打断和酶法打断

数据展示



肿瘤SNV (0.5-5%) 野生型FFPE标准品使用Rapid Plus V2 DNA文库构建试剂盒，搭配定制panel (目标区域约154Kb)，Clean比例大于90%。



肿瘤SNV (0.5-5%)野生型FFPE标准品使用Rapid Plus V2 DNA文库构建试剂盒，搭配定制panel (目标区域约154 Kb)，捕获效率在60%。

//SNP检出率-肿瘤SNV野生型FFPE标准品

基因名称	染色体	突变碱基	氨基酸改变信息	Cosmic ID	标准品突变率 (%)	检出突变率 (%)			标准品突变率 (%)	检出突变率 (%)			标准品突变率 (%)	检出突变率 (%)		
						ABclonal	I*	I*		ABclonal	I*	I*		ABclonal	I*	
EGFR	chr7	c.2573T>G	p.L858R	COSM6224	0.5	1.16	0.46	1	2.90	0.82	2.5	4.60	2.33	5	6.52	5.99
EGFR	chr7	c.2369C>T	p.T790M	COSM6240	0.5	0.99	0.30	1	1.33	0.30	2.5	2.69	1.33	5	3.55	3.39
KRAS	chr12	c.35G>A	p.G12D	COSM521	0.5	0.32	0.28	1	1.74	0.45	2.5	3.32	1.99	5	6.70	5.55
KRAS	chr12	c.38G>A	p.G13D	COSM532	0.5	0.35	0.28	1	1.16	0.53	2.5	2.10	1.51	5	6.07	3.25
EGFR	chr7	c.2235_2249del15	ΔE746_A750	COSM6223	0.5	0.53	/	1	1.40	0.72	2.5	3.33	1.18	5	4.23	3.62

▲ ABclonal的BK0003捕获试剂盒突变检出率与标准品预期基本一致

//SNP检出率-肿瘤样本

样本类型	基因名称	染色体	突变碱基	氨基酸改变信息	突变检出率 (%)		
					FS Pro	Rapid V2	第三方检测
肝内胆管癌	TP53	chr17	c.496delT	p.S166fs	65.87	60.36	53.88
	TSC2	chr16	c.331G>T	p.G111W	35.2	35.55	37.58
右肺上叶腺癌	SRC	chr20	c.1439_1440delGGinsTT	p.R480L	29.29	25.22	25.72
	STK11	chr19	c.642_649dupGGGCTCCC	p.P217fs	73.16	75.14	71.17
	TP53	chr17	c.569C>T	p.P190L	77.85	81	85.3
肺癌右锁骨上转移	FGFR2	chr10	c.17G>C	p.R6P	18.88	17.2	16.22
	PDGFRA	chr4	c.1508C>A	p.A503D	2.48	2.27	2
	TP53	chr17	c.798_806dupACGGAACAG	p.N268_S269insRRN	52.9	48.27	39.63
肝癌	ARID1A	chr1	c.4336C>T	c.4336C>T	44.12	41.55	40.5

▲ ABclonal的Rapid Plus V2和FS Pro试剂盒构建的肿瘤样本测序文库突变检出率与第三方检测机构的结果一致性较好, 结果可靠。

//SNP检出率-肿瘤样本

样本类型	基因名称	染色体	突变碱基	氨基酸改变信息	突变检出率 (%)	
					Scale ssDNA	第三方检测机构
胰腺癌肝转移	KRAS	chr12	c.35G>A	p.G12D	23.88	23.05
	TP53	chr17	c.916_917dupCG	p.A307fs	19.58	22.17
肺癌右锁骨上转移	BRCA2	chr13	c.3109C>T	p.Q1037*	50.47	50
	EGFR	chr7	c.2239_2261delTTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAinsGC	p.L747_K754delinsA	8.28	8.41

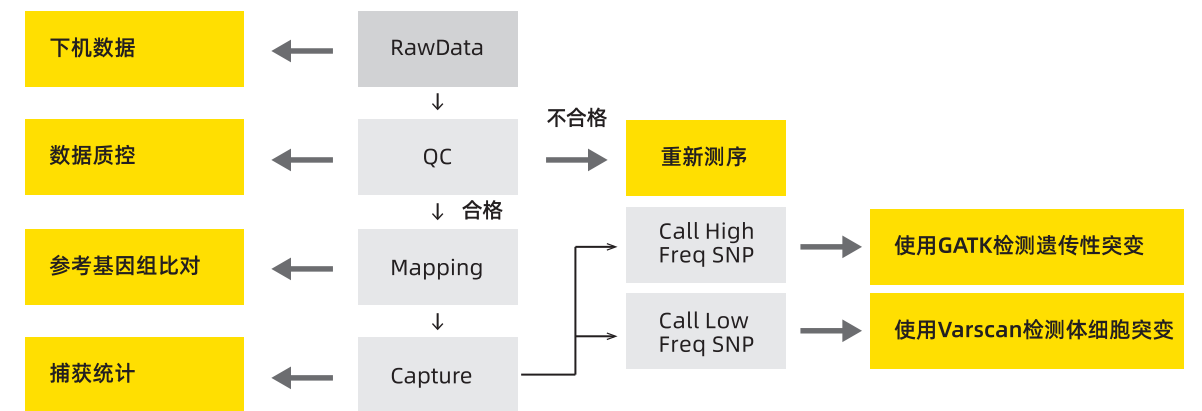
▲ ABclonal的Scale ssDNA试剂盒构建的肿瘤样本测序文库突变检出率与第三方检测机构的结果一致性较好, 结果可靠。

数据分析篇



FFPE DNA数据分析是先对测序数据进行质控, 得到高质量的测序数据, 比对到人的参考基因组上获得基因信息。进一步分析SNP和INV等。

//数据分析流程



//数据分析步骤

- 使用fastp软件对于下机的原始数据进行QC, 过滤掉影响后续分析的低质量数据。
- 使用bwa软件对于质控后的数据进行Mapping比对。
- 使用bamdst软件对于比对后的数据进行捕获统计。
- 使用GATK检测遗传性突变 (即高频突变)。
- 使用Varscan检测体细胞突变 (即低频突变)。

单品模块篇

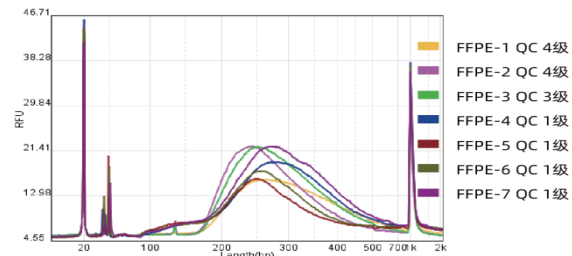


//DNA Frag Module-RK20260

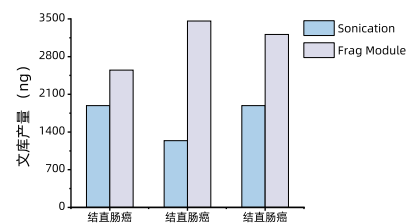
DNA Frag Module是一款酶法打断DNA的试剂盒模块,可将完整的DNA样本根据不同片段化时间打断成预期的不同大小片段的DNA,打断的DNA可直接适用于后续的文库构建。该模块包含了反应Buffer、反应酶与1X TE Buffer反应补充液。整个DNA片段化实验过程可以在30min内完成。

产品特点

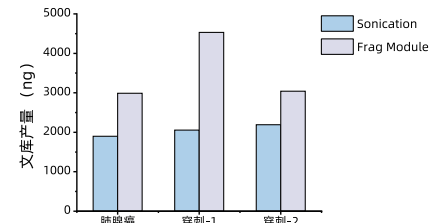
- 应用范围广, 适用于FFPE、gDNA样本
- 模板量兼容范围广, 可适用于5 ng~ 1ug DNA
- 片段化效果佳, 酶切时间可控
- 可灵活搭配不同文库试剂盒



不同质量等级的FFPE样本, 200 ng投入量, 使用FS Pro进行文库构建, 片段化条件为32°C 5min。不同质量等级FFPE样本, 使用相同片段化时间构建的文库大小基本一致。



200 ng投入量, 分别用超声打断和酶法片段化, 使用Rapid Plus V2构建文库, 酶法片段化相比超声打断文库产量更高。



12 ng投入量, 分别用超声打断和酶法片段化, 使用Scale ssDNA V2构建文库, 酶法片段化相比超声打断文库产量更高。

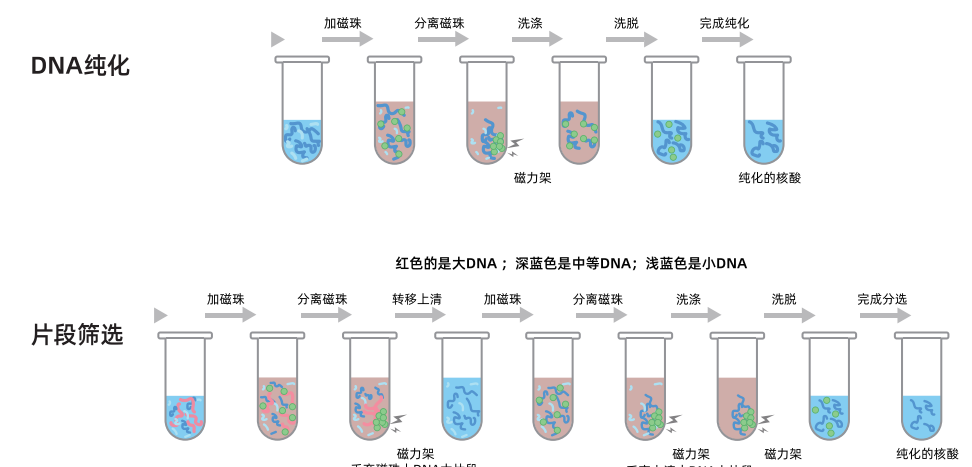
//ABclonal AFTMag NGS DNA Clean Beads-RK20257

高性能的DNA纯化磁珠, 基于SPRI(Solid Phase Reverse Immobilization)原理, 适用于NGS文库构建中的DNA片段纯化与大小分选。AFTMag NGS DNA Clean Beads可兼容市场上主流的NGS文库构建试剂盒 (DNA、RNA), 使用方式、文库产量与片段大小与AMPure XP Beads高度一致, 因此可以无缝替代AMPure XP Beads, 有效降低您的建库成本。

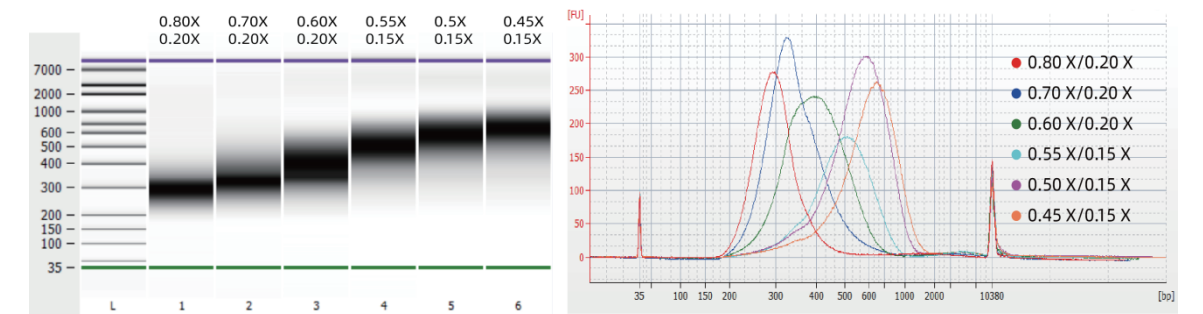
产品特点

- 操作方便, 效率高, DNA损失少
- 可以无缝替代AMPure XP Beads
- 能够用于DNA纯化和分选
- 适配NGS文库构建

操作流程



数据展示



用Tn5 Transposase(1 mg/ml) (Cat:RM21303)搭配Dual DNA Adapter 96 Kit for One-step DNA Lib Prep (Cat:RK20290)构建DNA文库。经过1 × Clean Beads纯化后, 得到大小为200-1500 bp的文库。再用 Clean Beads按下表的条件进行分选, 得到不同大小的文库, 用Agilent 2100 Bioanalyzer进行分析。

COMPLETE SOLUTION OF FFPE DNA SAMPLES FOR NGS

产品订购信息

分类	产品应用	产品名称	产品货号	规格
DNA 提取和质控	DNA 提取试剂盒	AFTSpin FFPE DNA Isolation Kit	RK30112	10 RXN/50 RXN
	DNA 质控试剂盒	FFPE DNA QC Kit	RK20229	8 RXN/64 RXN
DNA 建库 (Illumina 平台)	机械打断 DNA 建库试剂盒	Rapid Plus DNA Lib Prep Kit for Illumina V2	RK20255	8 RXN/24 RXN/96 RXN
	机械打断 DNA 建库试剂盒	Scale ssDNA-seq Lib Prep Kit for Illumina V2	RK20228	8 RXN/24 RXN/96 RXN
	酶切片段化法 DNA 建库试剂盒	FS DNA Lib Prep Kit V6	RK20259	8 RXN/24 RXN/96 RXN
	酶切片段化法 DNA 建库试剂盒	FS Pro DNA Lib Prep Kit for Illumina	RK20261	8 RXN/24 RXN/96 RXN
	双端 index 接头	Unique Dual Index for Illumina	RK21622~RK21625	8 RXN/24 RXN/48RXN
	Scale ssDNA 专用接头	PCR Index Set_B/C	RK21632~RK21633	48RXN
建库模块	酶切片段化试剂盒	DNA Frag Module	RK20260	8 RXN/24 RXN/48RXN
	文库扩增	Gloria Nova HS 2X PCR Mix for NGS	RK20716	24 RXN/96 RXN
捕获测序	杂交、洗脱	Hybridization and Wash Kit	BK0003	4RXN
	Blocker 封闭试剂	ILM Universal Blockers-X1	BM0010	4RXN
	磁珠	Streptavidin Beads	BM0011	4RXN
	人重复序列封闭试剂	Human Cot DNA	BM0009	4RXN
	引物	10X PCR Primers	RM20205	500 ul
磁珠和磁力架	DNA 纯化与分选磁珠	AFTMag NGS DNA Clean Beads	RK20257	1 mL/5 mL/60 mL/450 mL
		96 孔板磁力架	AI20027	96 孔
耗材	DNA 提取和建库	1.5mL 尖底连盖离心管, 袋装	AI03002	250 Tubes/Bag, 20 Bags/ Carton
		2mL 圆底连盖离心管, 袋装	AI03003	250 Tubes/Bag, 20 Bags/ Carton
		1000µL 盒装吸头, 透明, 灭菌	AI1000R1	96 Tips/rack, 50 racks/ Carton
		100µL 盒装吸头, 带滤芯, 透明, 灭菌	AI100R1	96 Tips/rack, 50 racks/ Carton
		10µL 盒装吸头, 透明, 灭菌	AI10R1	96 Tips/Rack, 100 racks/ Carton
		0.1mL PCR 八联排管 + 光学平盖, 透明铰链式	AI02081	125 Strips/Box, 10 Boxes/ Carton
		0.2mL PCR 八联排管 + 光学平盖, 透明铰链式	AI02084	125 Strips/Box, 10 Boxes/ Carton
		0.2mL 96 孔普通 PCR 板, 无裙边, H1 切角	AI02009C	10 Pcs/Box, 5 Boxes/ Carton