



Agilent 2200 TapeStation 系统提供的 DNA 完整值 (DIN) 是优化 FFPE 组织提取的理想工具

应用简报

核酸分析

作者

Christoph Kirsch
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,
德国迪伦

Eva Schmidt
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔特布隆

前言

长期保存临床样品的最常用方法之一是制备福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织。FFPE 块的薄片通常用于组织病理学研究，剩余样品可继续存放。这些存放的 FFPE 组织是进行基因表达和突变分析等回顾性研究的宝贵样品来源。然而，从 FFPE 样品中提取 DNA 具有一定的挑战性¹。在组织处理和储存过程中，DNA 交联和断裂是最常发生的问题。用于组织固定的福尔马林能导致核酸和蛋白质的交联，增加 DNA 对机械应力的敏感性，并降低酶对其的可作用性。另外，福尔马林可能被氧化为甲酸，而甲酸能造成 DNA 脱嘌呤与 DNA 链断裂。因此，固定条件能够对提取出的 DNA 质量产生显著影响²。此外，DNA 的提取方法对 DNA 的完整性和 PCR 等下游应用的性能有至关重要的影响³。标准的 DNA 分离流程通常只能获得极少量可用的 DNA。因此，我们开发出了专为提取 FFPE 组织块中的 DNA 而量身打造的流程。此流程包括从 FFPE 组织中释放 DNA 并逆转福尔马林交联的步骤，因此可提高 DNA 的产量及其在下游分析中的性能。

本应用简报重点介绍了应用 DNA 完整值 (DIN) 对 FFPE 组织中所提取的 gDNA 进行比较性质量测定。采用标准蛋白酶 K 裂解条件和延长过夜裂解 (表 1) 的三种不同市售 FFPE DNA 提取试剂盒用于进行 gDNA 提取。所得 DNA 样品的浓度和质量由 Agilent 2200 TapeStation 系统和基因组 DNA ScreenTape 分析法测定。作为 DNA 完整性的数值量度，所提取样品的 DIN 可由 TapeStation 分析软件 (A01.05 版) 自动测定，结果直接显示在胶图之下以及样品表中。数值评价范围为 1 - 10。高 DIN 代表高度完整的 gDNA，而低 DIN 代表已降解的 gDNA⁴。



Agilent Technologies

表 1. DNA 提取条件概述

FFPE DNA 提取试剂盒	标准方案	延长裂解
A	室温下 3 小时	室温下过夜
B	56 °C 1 小时	56 °C 过夜
C	56 °C 1 小时	56 °C 过夜

实验部分

材料

FFPE 样品、小鼠肝脏（约 10 μm 切片/0.4 × 0.9 cm）、小鼠脾脏（约 20 μm 切片/0.4 × 0.1 cm）和小鼠心脏（约 10 μm 切片/0.5 × 0.7 cm），均由 MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG（德国迪伦）友情提供。采用的三种市售 FFPE DNA 提取试剂盒来自不同的制造商（此处标记为 A、B 和 C）。配备 TapeStation 分析软件（A01.05 版）、基因组 DNA ScreenTape 消耗品（5067-5365）和基因组 DNA 试剂（5067-5366）的 2200 TapeStation 系统（G2965AA），购自安捷伦科技有限公司（德国瓦尔特布隆）。

从 FFPE 样品中提取 DNA

三种 DNA 提取试剂盒均依据标准方案，并遵照制造商的使用说明从 FFPE 样品中提取 DNA。每个试剂盒用于处理 FFPE 块的四片切片。除标准方案外，来自同一个 FFPE 块的切片还采用延长裂解方案进行了处理（表 1）。

采用 Agilent 2200 TapeStation 系统进行基因组 DNA 分析

依照使用说明进行 DNA 分析⁵。简言之，首先将 1 μL gDNA 与 10 μL 基因组 DNA 样品缓冲液混合。然后将基因组 DNA ScreenTape 消耗品、带滤芯的吸头和制备好的样品一起置于 2200 TapeStation 仪器中。2200 TapeStation 系统在 2 分钟之内即可完成一个样品的上样、电泳、成像与数字分析结果显示。

结果与讨论

为对比 DNA 提取方法和组织类型对所提取 DNA 数量和质量的影响，我们对三种市售 DNA 提取试剂盒提取出的小鼠三种不同组织（心脏，肝脏和脾脏）DNA 样品进行了研究。为排除福尔马林固定和石蜡包埋造成的任何影响，FFPE 块的制备条件完全相同。三种提取试剂盒的分析结果均表明了采用蛋白酶 K 方法以及更长的温育时间（可选）可提高 DNA 产量。采用延长裂解方案及蛋白酶 K 过夜温育并结合所描述的标准条件，对来自同一个 FFPE 块的其他切片进行处理（表 1）。

图 1 总结了采用三种不同 DNA 提取试剂盒从小鼠脾脏 FFPE 组织中提取的 DNA 获得的结果。对由 DNA 提取试剂盒 A 提取的 gDNA 分析获得的电泳图谱显示，标准和过夜裂解方案间的差异最大。而 DNA 提取试剂盒 B 所得的结果在标准和过夜裂解方案间几乎没有差异。

对比三个 DNA 提取试剂盒得到的电泳图谱突出了总体谱图的显著差异（图 1）。对试剂盒 A 提取的 DNA 样品的电泳图谱进行分析，发现其中存在明确突出的 gDNA 峰和一些 DNA 碎片峰，反映为 DIN 较高。相较之下，试剂盒 C 提取所得的 DNA 在胶图中表现为广泛分布的弥散条带，说明 gDNA 的完整性较低。广泛分布的弥散条带与提取过程中未充分去除交联 DNA 有关，这是在 FFPE 组织中提取 DNA 时的已知问题²。

图 2 对比了采用三种不同试剂盒提取心脏、肝脏和脾脏 FFPE 组织得到的 DNA 浓度。与新鲜组织或细胞相比，FFPE 组织的 DNA 产量预计相对较低。由心脏组织中提取的 DNA 含量尤其低，这是因为与其他组织相比，从心脏等纤维组织中提取 DNA 更具挑战性。而像脾脏这样富含核酸和核酸酶的组

织也很难进行核酸提取，但在本例中产生了良好结果。

如图 2 所示，DNA 产量取决于组织类型、DNA 提取方法和裂解条件。经检测，三种 DNA 提取试剂盒得到的小鼠心脏组织制备样品 DNA 浓度均低于用于基因组 DNA ScreenTape 分析法的定量范围。对于小鼠肝脏组织，DNA 提取试剂盒 A 和 B 得到的产量最高。而对于小鼠脾脏组织，DNA 提取试剂盒 A 和 B 结合延长过夜裂解可得到最高产量。这一结果清晰地表明，为提高 DNA 产量，需要针对每种组织类型分别优化其 DNA 提取流程，包括温育时间及所需的起始原料量。

而如果 DNA 发生了高度降解，仅依靠其数量评价提取方法是否高效则容易产生误导性。因此，还需要根据自动测得的 DIN 对样品的 DNA 完整性进行评估（图 3）。

在所有三种组织类型中，由 DNA 提取试剂盒 A 在延长过夜裂解条件下所得的 DNA 完整性最高。由 DNA 提取试剂盒 B 所得的 DNA 完整性也较高，并且分别对比肝脏与脾脏的标准和延长裂解方案，发现完整性结果并无差别。由心脏 FFPE 组织中提取的 DNA 浓度低于基因组 DNA ScreenTape 分析法的定量范围（10 ng/μL），且多数样品的浓度均低于 DIN 的功能定量范围（5 ng/μL）。对于 DNA 浓度低于 3 ng/μL 的样品，软件无法测定其 DIN⁴。

延长蛋白酶 K 裂解时间可略微提高 DNA 提取试剂盒 A 所得的 DNA 完整性，然而这对 DNA 提取试剂盒 B 似乎无明显作用，并且还会降低 DNA 提取试剂盒 C 所得肝脏和脾脏组织的 DNA 完整性。

总之，优化 DNA 提取流程不仅要考虑 DNA 产量，同时还需关注 DNA 完整性，以便对总体的 DNA 质量进行最佳评估。

结论

本文展示的数据显示，组织类型对 FFPE 组织的 DNA 提取效率有很大影响。另外，DNA 提取方案和裂解条件也会影响 DNA 产量和样品完整性，从而影响总体 DNA 质量。因此，根据下游应用的需求，可能需要对 DNA 提取流程进行优化以便获得最高的 DNA 产量或完整性。本应用简报证实结合了基因组 DNA ScreenTape 分析及 DIN 测定功能的 Agilent 2200 TapeStation 系统是用于 DNA 提取质量控制、定量测定和样品完整性自动评估的实用、可靠的工具。DIN 可自动显示，因此无需主观的完整性评估或基于用户经验的近似值。此外，DIN 测定有助于简化实验室间的 DNA 完整性对比。

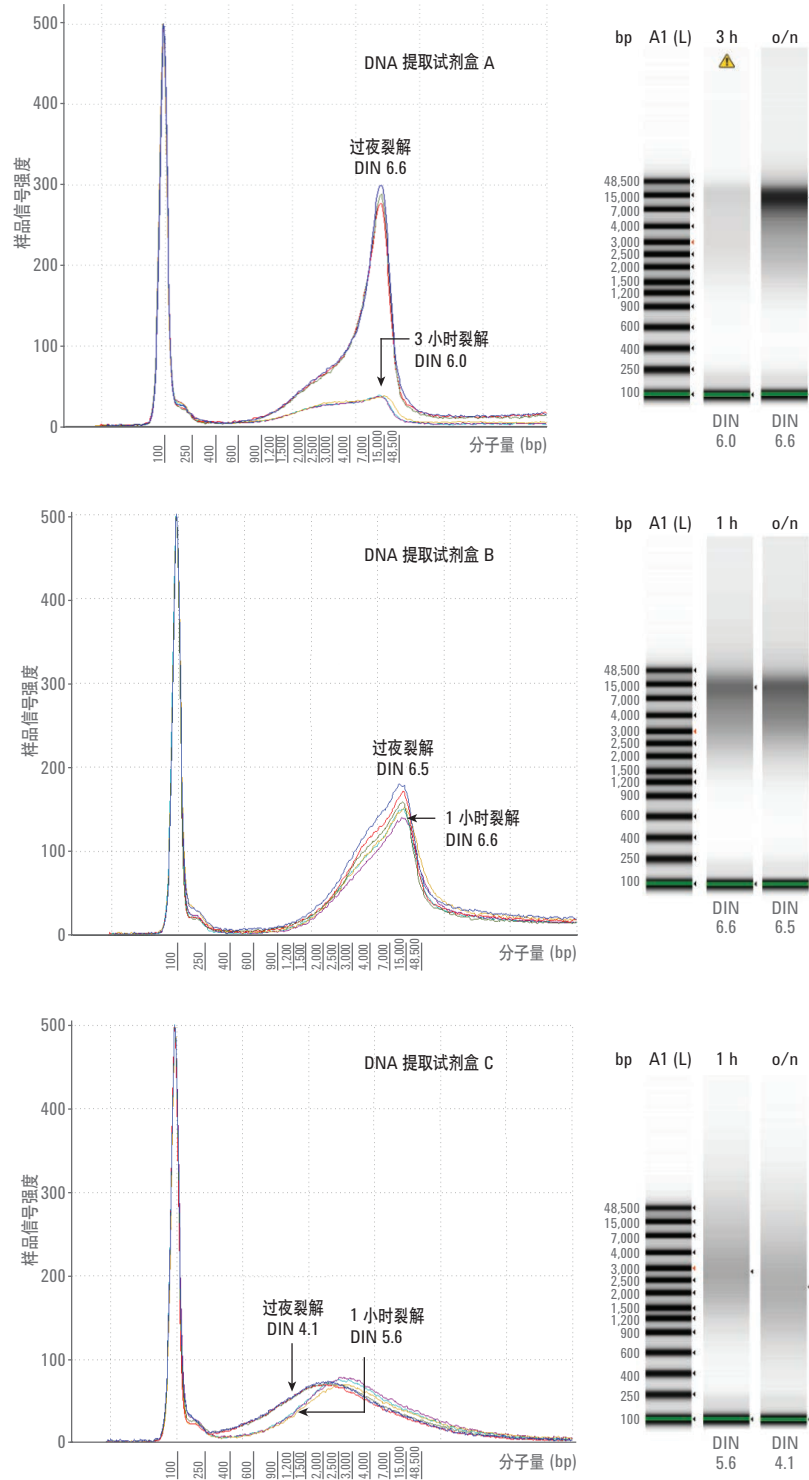


图 1. 采用三种不同 DNA 提取试剂盒从小鼠脾脏 FFPE 组织中提取的 DNA。图中显示了采用 Agilent 2200 TapeStation 系统和基因组 DNA ScreenTape 分析法进行分析后得到的六张电泳图的叠加以及平均 DIN (n = 3)。胶图中分别显示了标准裂解和延长裂解的代表性样品。超出基因组 DNA ScreenTape 分析法定量范围指标 (10–100 ng/ μ L) 的样品在胶图中以黄色警示标志表示。

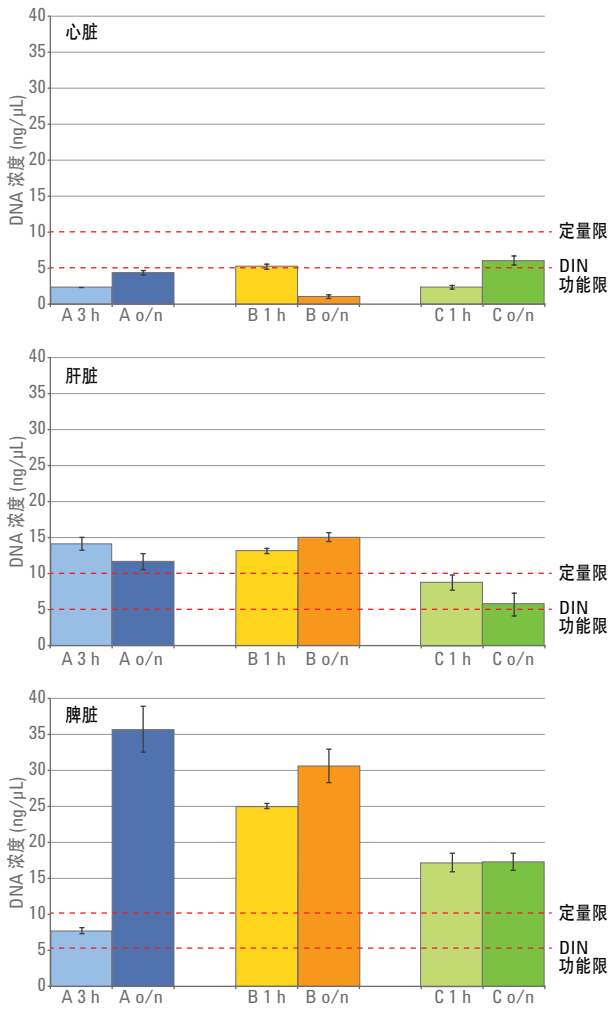


图 2. 利用 Agilent 2200 TapeStation 系统以及基因组 DNA ScreenTape 分析法测定 A、B 和 C 三种 DNA 提取试剂盒通过标准和延长裂解方案（每个数据点 n = 3）从小鼠心脏、肝脏和脾脏的 FFPE 组织中提取的 DNA 的浓度。基因组 DNA 分析法的定量下限 (10 ng/μL) 和 DIN 功能定量限 (5 ng/μL) 由红线表示。



图 3. 利用 Agilent 2200 TapeStation 系统测定 A、B 和 C 三种 DNA 提取试剂盒通过标准和延长裂解方案（每个数据点 n = 3，除非另有说明）从小鼠心脏、肝脏和脾脏的 FFPE 组织中提取的 DNA 样品的 DIN。红色星号表示样品的 DNA 浓度低于测定 DIN 所需的功能定量范围。

参考文献

1. Tang, W; *et al.* DNA Extraction from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. *Cold Spring Harbor Protocols*, doi:10.1101/pdb.prot5138, **2009**.
2. Srinivasan, M; Sedmak, D; Jewell, S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am. J. Pathol.* **2002**, 161(6), pp 1961-1971.
3. Okello, J. B. A; *et al.* Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed

paraffin-embedded autopsy tissues. *Analytical Biochemistry* **2010**, 400(1) pp 110-117.

4. DNA Integrity Number (DIN) with the Agilent 2200 TapeStation System & Genomic DNA ScreenTape (采用 Agilent 2200 TapeStation 系统和基因组 DNA ScreenTape 获得的 DNA 完整值 (DIN))，安捷伦科技公司，出版号 G5991-5258，**2014**.

5. Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide (安捷伦基因组 DNA ScreenTape 系统快速指南)，安捷伦科技公司，出版号 G2964-90040，修订版 C，**2014**。

www.agilent.com/genomics/tapestation

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司，2014
2014 年 11 月 1 日，中国印制
5991-5246CHCN



Agilent Technologies