

利用 Agilent 2200 TapeStation 系统与安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法测定 DNA 完整值 (DIN)

技术概述

作者

Marcus Gassmann
安捷伦科技有限公司
德国瓦尔特布隆

Barry McHoull
安捷伦科技有限公司
英国爱丁堡

前言

许多分子筛选和测定方法通常取决于基因组 DNA (gDNA) 起始材料的整体质量。例如，微阵列比较基因组杂交 (aCGH) 和新一代测序 (NGS) 都需要完整的高质量 gDNA 以确保得到明确的高品质结果。我们强烈推荐实验者对于这些工作流程，特别是对 NGS 这类成本高昂的流程的起始材料进行质量控制 (QC)，以节省在低质量样品上浪费的时间和精力。

Agilent 2200 TapeStation 系统结合安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法，是评估 gDNA 起始材料数量和完整性的完美解决方案。为了更直接地测定 gDNA 完整性并将测定过程标准化，我们为基因组 DNA ScreenTape 分析法开发了一种软件算法。基于对大约 7000 个不同 gDNA 样品的分析，该算法能够提供对 gDNA 完整性的数值评估，这个数值被称为 DNA 完整值 (DIN)。这项功能与 TapeStation 分析软件 (A.01.05 或以上版本) 配合使用，可以自动测定与显示 DIN 这一 gDNA 完整性指标。旧版本软件产生的数据文件可在软件升级后进行重新分析，以便测定 DIN。

本技术概述从可靠性和重现性方面，对采用 2200 TapeStation 系统和基因组 DNA ScreenTape 分析法分析 gDNA 样品（包括福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 样品）时所得 DIN 的稳定性进行了评估。



Agilent Technologies

实验部分

材料

市售的完整人类 gDNA，购自 Promega 公司（美国威斯康辛州麦迪逊）。数字超声仪购自 Branson Ultrasonics 公司（美国州康涅狄格州丹伯里）。胰岛素注射器 Omnican® 50 (30G × 8 mm) 购自 B. Braun Melsungen AG（德国梅尔孙根）。配有 Agilent TapeStation 分析软件 (A.01.05 版) 的 2200 TapeStation 系统（部件号 G2965AA）、基因组 DNA ScreenTape 消耗品（部件号 5067-5365）和基因组 DNA 试剂（部件号 5067-5366）来自安捷伦科技公司（德国瓦尔特布隆）。

样品

约 7000 个来自真核生物的 gDNA 样品，包括血液、干血斑、唾液、无脊椎动物、多种人体组织和 FFPE 样品均由客户友情提供。为了进行稳定性验证，可采用超声仪（10% 振幅，处理 2 秒，暂停 5 秒，最多处理 120 秒）、或尖锐的针头反复吹吸，或结合两种方法使市售 gDNA 降解，得到一组 15 个具有各种不同 gDNA 降解程度的 gDNA 样品（gDNA 样品 1 的完整性最高，而 gDNA 样品 15 的降解程度最高）。

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

根据基因组 DNA ScreenTape 系统快速指南进行 DNA 分析¹。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

图 1 中的胶图和电泳叠加图展示了随着降解程度从右到左不断增加，DNA 的分子量偏移和分布情况。高度完整的 gDNA 样品在胶图中以单片段形式迁移，在电泳图中则显示为在最大分子量标准峰 (48500 bp) 之上的一个界限清晰的峰。随着降解程度的增加，一些 gDNA 小片段的肩峰开始形成，且主峰朝着小分子量的方向偏移。高度降解的 gDNA 在胶图中呈现弥散条带状，并在电泳图中迁移为分子量低于 2000 bp 的宽峰。

在胶图和电泳图中均可以目测 gDNA 完整性，但这种方法具有较大的主观性。为提供一个用于可靠测定完整性的客观和标准化工具，我们开发出了 DNA 完整值 (DIN) 算法。DIN 通过评估信号在分子量范围内的分布来测定基因组 DNA 的降解程度，并自动计算出 DNA 完整值。该算法基于来自多种基因组 DNA 的约 7000 个样品开发而成，通过将每个样品信号与其他所有信号进行对比，从而生成 DIN。

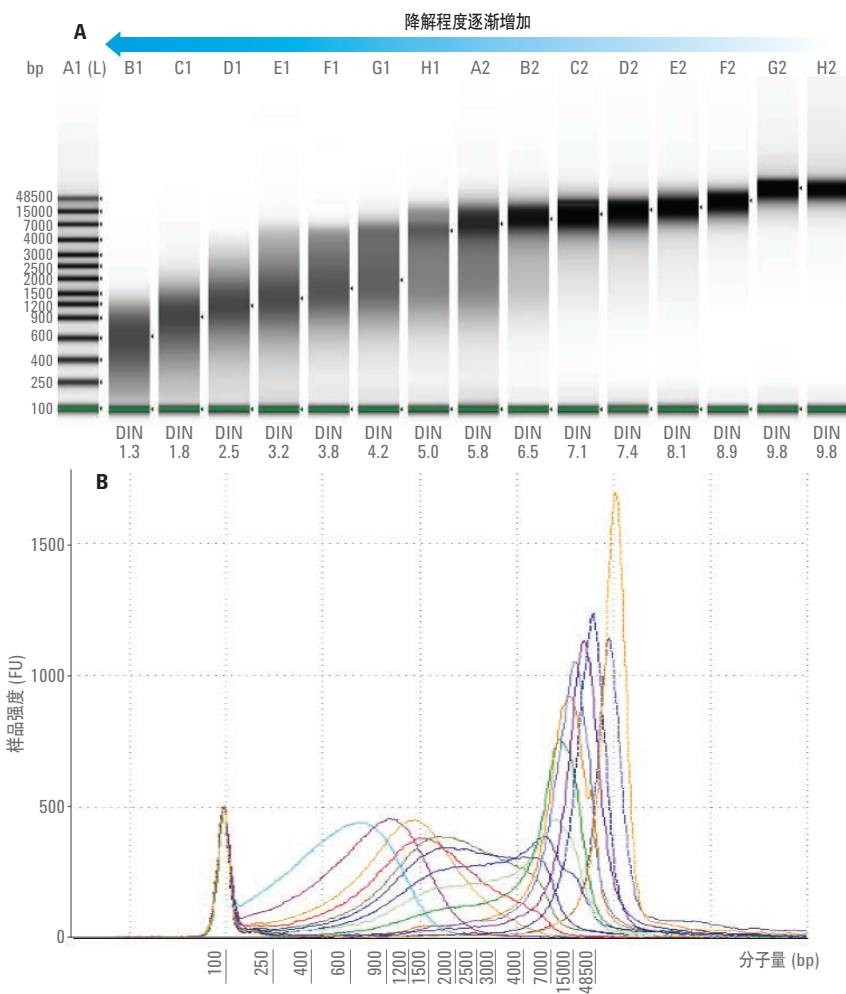


图 1. 采用 Agilent 2200 TapeStation 系统和安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法分析 15 个 gDNA 样品 (60 ng/μL) 的降解情况，以测定 DIN。A) 胶图从左至右依次显示 gDNA 样品 15 到 1，并在相应泳道下方显示各自的 DIN。B) 所有 15 个 gDNA 样品的叠加电泳图

为得到评估数值，样品根据其信号分布被分为 1 到 10 的 DIN 等级。高 DIN 代表高度完整的 gDNA，而低 DIN 则代表高度降解的 gDNA 样品。

稳定性与重现性

本例中制备的一组 15 个 gDNA 样品能够代表 7000 个样品的总降解程度范围。15 个 gDNA 样品测定出的 DIN 值从 9.8 到 1.3 不等。图 1 显示了 15 个样品的胶图及叠加电泳图，DIN 直接显示在胶图的各泳道下方。我们利用此标准化样品集，对算法的稳定性及重现性（表现为不依赖于样品浓度、基因组 DNA 试剂批次、基因组 DNA ScreenTape 胶条批次、TapeStation 系统类型，以及样品在 96 孔板中位置的特性）进行了分析。

将 3 个分别代表高、中、低完整性的基因组 DNA 样品在 6 个不同浓度下进行分析，浓度涵盖了从 5 到 300 ng/μL 的整个 DIN 特定功能范围，结果表明 DIN 与样品浓度无关。图 2 中清楚地显示了在 DIN 功能范围内，3 个 gDNA 样品测得的 DIN 并不依赖于 DNA 的上样浓度。

我们还进行了一组后续实验，以证明 ScreenTape 胶条批次 (n = 4) 或基因组 DNA 上样缓冲液批次 (n = 3) 均不影响 15 个 gDNA 样品测得的 DIN。

2200 TapeStation 系统有两种不同仪器可供选择，标准仪器适用于 RNA、DNA、和蛋白质分析；而核酸型仪器仅适用于核酸分析。以上 15 个 gDNA 样品均采用这两种仪器类型进行了分析，结果表明仪器类型不会对测得的 DIN 产生影响（数据未显示）。

2200 TapeStation 系统能够分析 96 孔板中的样品。为测试 DIN 的稳定性和重现性，我们从整个完整性范围中选择了 3 个 gDNA 样品，并从 96 孔板中取样 (n = 32) 进行了分析。图 3 中清晰地表明了全部 3 个被测样品 DIN 均值的标准偏差较小，更重要的是这个值在整个 96 孔板测定周期中均十分稳定。

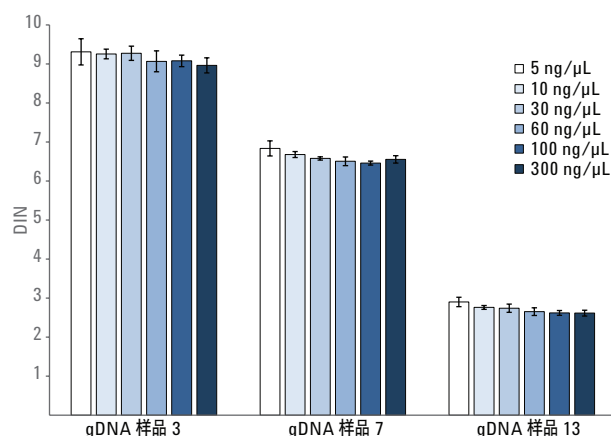


图 2. 3 个 gDNA 样品分别被稀释为 6 个不同浓度，并用 Agilent 2200 TapeStation 系统和安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法进行分析。此图中绘出了 DIN 的均值和标准偏差 (n = 10 到 15)

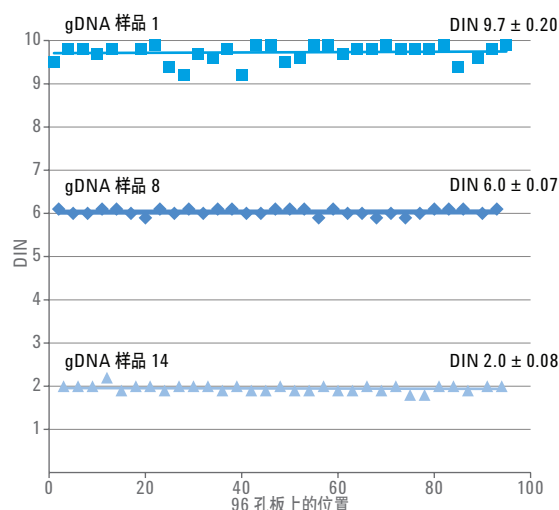


图 3. 利用 Agilent 2200 TapeStation 系统和安捷伦基因组 DNA ScreenTape 分析法分析 96 孔板中的 3 个 gDNA 样品 (25 ng/μL)。图中显示了相应的 DIN 均值和标准偏差 (n = 32)

图 4 总结了上述实验中得到的数据。我们计算了 DIN 均值和标准偏差并根据结果作图。

DIN 在不同样品浓度、不同仪器类型、不同 ScreenTape 胶条和上样缓冲液溶剂批次以及不同 96 孔板位置之间都具有高度重现性。所有被分析样品的总体标准偏差均小于 0.30 (图 4)。

旧版软件生成的基因组 DNA

TapeStation 文件可用于测定 DIN

利用 2200 TapeStation 系统生成的数字化数据, TapeStation 分析软件可自动测定 DIN (从修订版 A.01.05 开始) 并将其显示在胶图下方和样品数据表中。A.01.05 旧版本软件产生的数据文件可在软件升级后进行重新分析, 以便测定 DIN。

结论

本技术概述展示了 DIN:

- 可用于表征从高度完整的 gDNA (DIN 10) 到高度降解的 gDNA (DIN 约为 1) 的宽范围样品的完整性
- 可被用于评估由多来源样品 (包括 FFPE 组织) 中提取的基因组 DNA 的完整性
- 在较宽的浓度范围中具有稳定性
- 在不同样品浓度、ScreenTape 仪器消耗品和试剂批次, 以及 96 孔板位置之间都具有高度可重复性

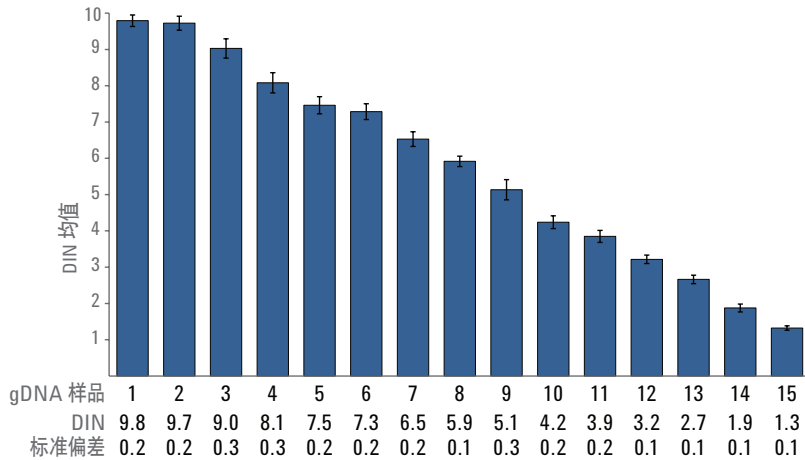


图 4. 利用 Agilent 2200 TapeStation 标准系统和 Agilent 2200 TapeStation 核酸系统分析 15 个 gDNA 样品, 并用不同批次的 ScreenTape 和安捷伦基因组 DNA 上样缓冲液以及不同的样品浓度进行分析。图形和表格将测得的所有数据结合在一起, 对 DIN 均值和标准差进行了总结

参考文献

1. 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 12 月 1 日, 中国印制
5991-5258CHCN



Agilent Technologies