

采用 RNA ScreenTape 分析法进行 DV₂₀₀ 评估

作者

Eva Graf
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

RNA 测序文库制备工作流程的成功与否在很大程度上取决于 RNA 起始材料的质量。采用 Agilent RNA ScreenTape 分析法获得的 RNA 完整值当量 (RIN[®]) 是一种评估标准 RNA 测序的样品完整性的可靠且可重现的指标。由于 RNA 降解以及样品体积有限, 从福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织中提取 RNA 样品进行文库制备具有挑战性, 因此建议针对 FFPE RNA 文库制备采用定制方案。FFPE RNA 样品的片段大小分布对文库产率具有重要影响, 可以将其描述为大于 200 个核苷酸的 RNA 片段所占的百分比, 用 DV₂₀₀ 质量指标来表示¹。Agilent RNA ScreenTape 和安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法有助于对从 FFPE 组织中提取的降解 RNA 样品进行高可重现的 DV₂₀₀ 评估。Agilent TapeStation 分析软件能够通过区域分析对 DV₂₀₀ 数据进行简单评估和处理, 自动进行重复 DV₂₀₀ 分析。

技术详情

使用配有 Agilent TapeStation 分析软件 (A.02.02 版) 的 Agilent 4200 TapeStation 系统。RNA ScreenTape (部件号 5067-5576) 和试剂 (部件号 5067-5577 和 5067-5578), 以及安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape (部件号 5067-5579) 和试剂 (部件号 5067-5580 和 5067-5581) 均购自安捷伦科技公司。除非另有说明, 否则所有分析均按照生产商的方案和指南进行。采用 ScreenTape 分析法对所有样品进行分析, 每个胶条包含梯度分子量内标上样。从 FFPE 组织中提取的 RNA 样品由国家肿瘤疾病中心 (简称 NCT, 位于德国海德堡) 组织库友情提供, 此过程符合组织库的规定, 并得到了海德堡大学伦理委员会的批准。

数据分析

DV₂₀₀ 表示大于 200 个核苷酸的 RNA 片段占有所有 RNA 片段的百分比。通过定义大于 200 个核苷酸的区域, 可以利用 TapeStation 分析软件计算得出 DV₂₀₀。该软件提供了区域设置的多种方式, 适用于从低到高的各种样品通量。如需了解更多信息以及关于区域分析的演示视频, 请咨询安捷伦信息中心 (AIC)。

单个样品的区域设置

为单个样品定义 DV₂₀₀ 区域, 请单击 **Region**, 然后右键单击电泳图以添加区域。可以通过向左或者向右滑动来单独调节区域边界。

数据文件的区域设置

如果要将 DV₂₀₀ 区域定义为默认适用于单个数据文件中所有样品, 请单击 **Region**, 然后单击 **Region Settings**, 在对话框中输入区域下限和上限 (图 1)。如需在电泳图中识别该区域, 请输入 DV₂₀₀ 作为区域注释。要将该区域应用于现用文件中的所有样品, 请选择 **This File**。

1. 单击 **Region**

2. 单击 **Region Settings**

3. 单击, 然后输入区域边界

4. 应用于现用文件或所有文件

From [nt]	To [nt]	Conc. [ng/μl]	% of Total	Region Comment	Color
200	100000	21.5	54.21	DV200	Orange

图 1. 使用 Agilent TapeStation 分析软件设置默认区域来计算 DV₂₀₀

自动区域设置

要将 DV₂₀₀ 区域定义为默认适用于所有重复的 FFPE RNA 样品分析，请单击 **Region**，然后单击 **Region Settings**，在对话框中输入区域下限和上限（图 1）。如需在电泳图中识别该区域，请输入 DV₂₀₀ 作为区域注释。要将该 DV₂₀₀ 区域应用于与现用文件分析方法相同的所有文件，请选择 **Assay Files**。

DV₂₀₀ 区域定义完成后，每个样品的值将显示在区域表中的 **% of Total** 列（图 2）。可以通过选中区域表，导出所有区域数据并生成报告。请注意，TapeStation 分析软件的区域表、导出文件和报告中显示的浓度，是指所定义区域的浓度；总样品浓度显示在样品表中。

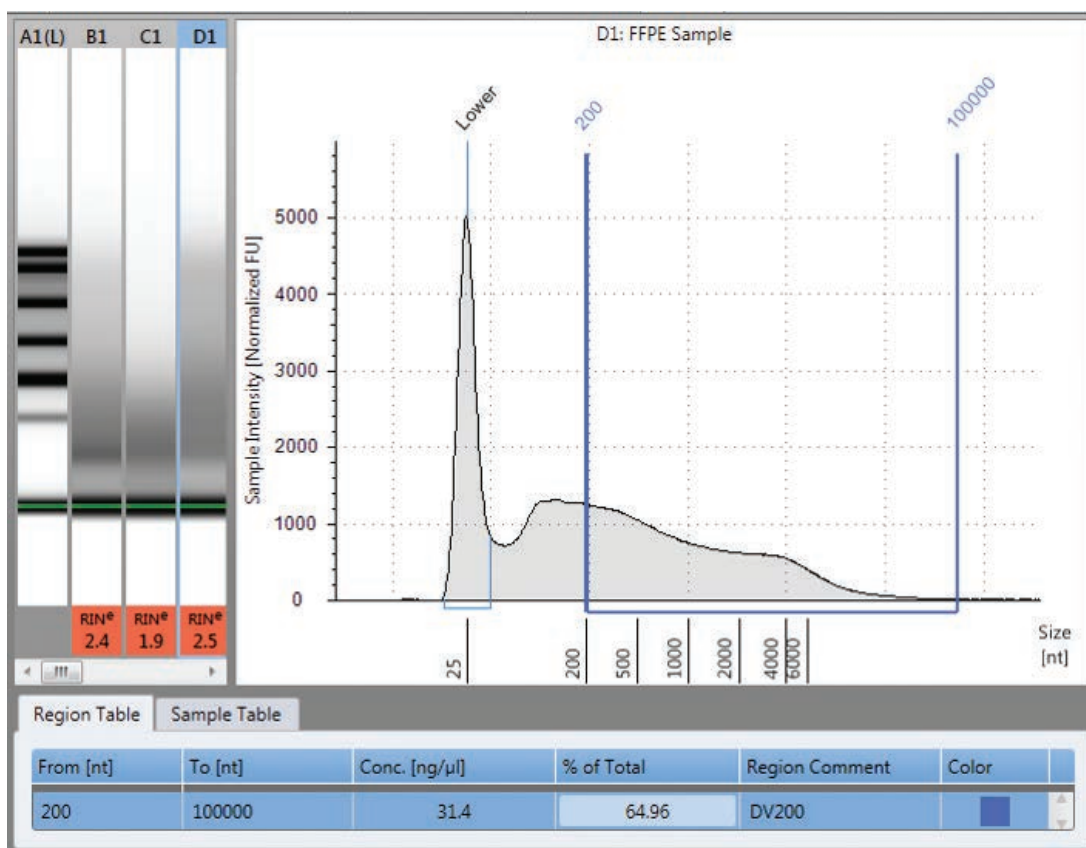


图 2. FFPE RNA 样品分析在区域表中 DV₂₀₀ 以总百分比显示

结果与讨论

重现性

对三个 FFPE RNA 样品进行五次独立重复测定，以对采用 RNA 和高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法获得的 DV₂₀₀ 重现性进行验证。两种方法均表现出较高的重现性，CV 小于 5% (图 3)。

浓度依赖性

采用 RNA 和高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法对三个单独 FFPE RNA 样品的系列稀释溶液进行分析，以确定 DV₂₀₀ 分析的一致性 (表 1)。RNA ScreenTape 分析法和高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法获得的 DV₂₀₀ 均表现出较高的精确度，其 CV 值小于 5%。

如图 4 所示，系列稀释溶液分析表明，当测量浓度高于特定分析浓度范围下限时，DV₂₀₀ 评估是最精确的。

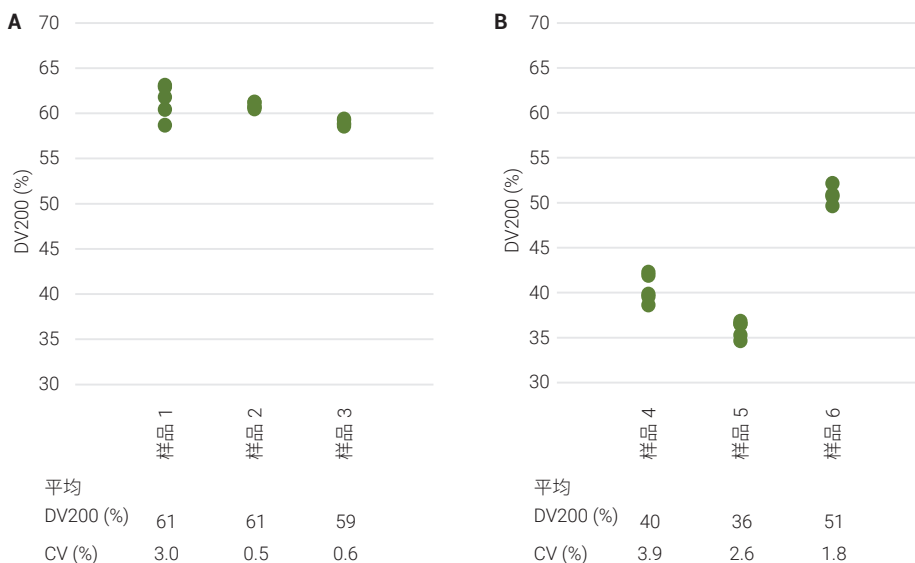
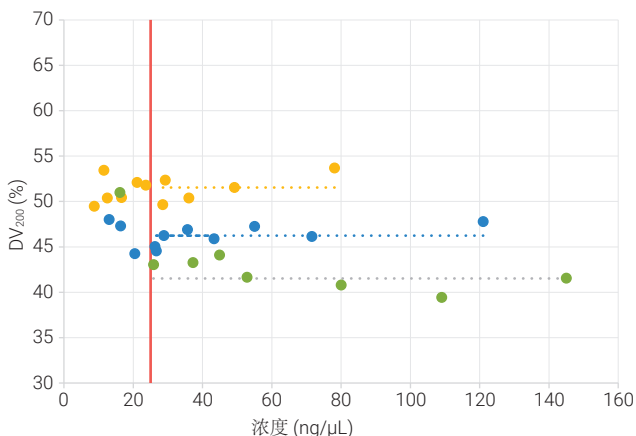


图 3. 采用 (A) Agilent RNA ScreenTape 分析法和 (B) 安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法得到的三个单独样品的 DV₂₀₀ 分析的重现性

表 1. 采用 Agilent RNA 和安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法对三个样品的系列稀释溶液进行分析得到的 DV₂₀₀ 分析的一致性

	Agilent RNA ScreenTape 分析法			安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法		
	样品 7	样品 8	样品 9	样品 10	样品 11	样品 12
平均 DV ₂₀₀ (%)	46	52	42	57	66	64
标准偏差	1.1	1.6	1.7	1.6	0.6	0.9
%CV	2.4	3.1	4.1	2.8	1.0	1.4

A Agilent RNA ScreenTape 分析法



B 安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法

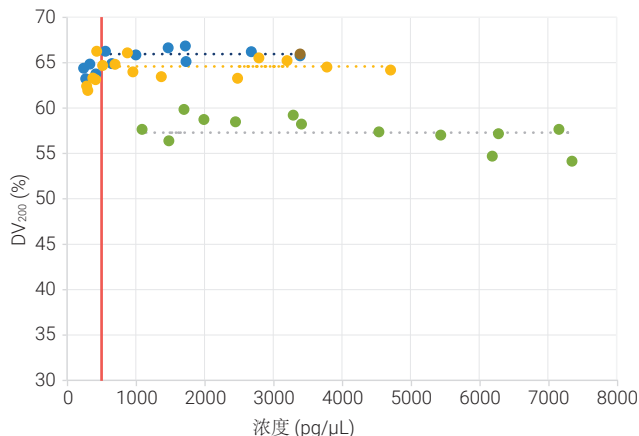


图 4. 3 个单独 FFPE 样品的系列稀释溶液的 DV₂₀₀ 评估。红线表示分析浓度范围的下限。水平线表示每个单独样品的平均 DV₂₀₀。仅使用各自分析浓度范围内的数据进行评估

严重降解的 FFPE 样品可能会下移到靠近下位分子量内标处，而不能完全与下位内标分离，特别是在样品浓度接近特定定量范围上限时。在这种情况下，稀释样品产生的 DV₂₀₀ 结果更为准确（见图 5）。

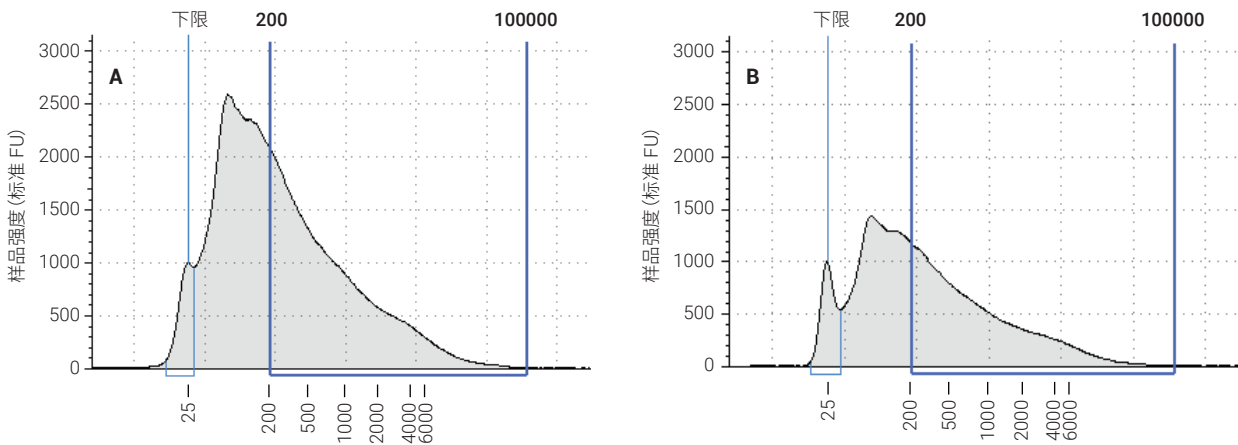


图 5. 高度降解的 FFPE RNA 与下位内标发生合并 (A)，在经过 1:2 稀释后分离情况改善 (B)

分析方法比较

采用 RNA ScreenTape 分析法对来自不同人体组织的 20 个 FFPE RNA 样品进行分析，然后将样品按 1:20 的比例稀释，再用高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法进行分析。RNA 分析法获得的 DV₂₀₀ 范围为 40%–74%，而用高灵敏度 RNA 分析法分析相应样品的结果为这些值的 101 ±5%。为了验证 RNA 和高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法测得的 DV₂₀₀ 的可比性，将两种方法得到的值绘制在一起，如图 6 所示。

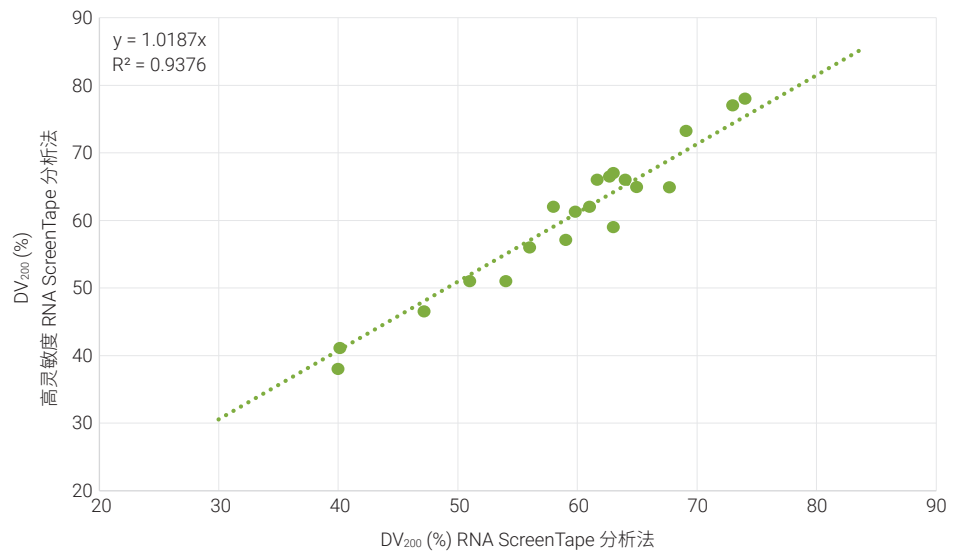


图 6. 由 Agilent RNA ScreenTape 和安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法获得的 FFPE RNA 样品的 DV₂₀₀ 数据的比较，以通过原点的线性回归线表示

结论

Agilent RNA 和安捷伦高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法，结合 Agilent 4200 TapeStation 系统，可以轻松快速地对 FFPE RNA 样品进行质量分析。Agilent TapeStation 分析软件在进行区域设置后 DV₂₀₀ 以总百分比显示。RIN^e 算法不会影响 DV₂₀₀ 的计算。由 RNA 和高灵敏度 RNA ScreenTape 分析法计算得到 DV₂₀₀ 具有较高的重现性，两种方法得到的结果高度一致。为了获得最佳性能，建议与样品一起进行梯度分子量内标分析。在特定分析范围内，系列稀释溶液的 DV₂₀₀ 具有一致性。对于未能与内标有效分离的高度降解样品，应对其进行稀释以获得最准确的结果。

参考文献

1. Evaluating RNA Quality from FFPE Samples. *Illumina Technical Note*, publication number 470-2014-001. <https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote-truseq-rna-access.pdf>

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。