

准确定量 TruSight™ Oncology 500 ctDNA 检测中使用的 cfDNA

优化液体活检样本的 cfDNA 制备过程，实现最佳性能。

简介

液体活检是一种非侵入性检测方法，该方法通过收集血液样本，分析其中的细胞、蛋白质或 DNA 来检测疾病标记。血流中的 DNA 片段称为循环游离 DNA (cfDNA)，可在早期提供关于疾病存在和进展的重要信息。

大部分 cfDNA 不是以单独的 DNA 形式存在于循环系统中，而是缠绕在一个或多个核小体周围，形成不同大小的 cfDNA。电泳分离结果显示 cfDNA 片段在 166 bp (单核小体) 附近有一个主峰，在 300 bp (双核小体) 和 500 bp (三核小体) 附近出现了较小的峰。单个 cfDNA 分子能在血流中循环 16 分钟至 2.5 小时。这种短暂的生命周期导致特定时间内血流中存在的 cfDNA 量高度可变。

由于没有足够灵敏的方法来检测数量有限的 cfDNA，该领域的研究一直很困难。随着新一代测序 (NGS) 等技术的发展，提高了检测灵敏度并降低了起始量要求，这种情况正在发生变化。事实上，NGS 的灵敏度已经足够高，可以用来监测 cfDNA 的存在，为疾病诊断和突变监测提供有价值的信息。

为准确分析 cfDNA，Illumina 提供了 TruSight Oncology 500 ctDNA 解决方案。这项用于液体活检的 NGS 检测能分析 cfDNA，检测微卫星不稳定性 (MSI) 和肿瘤突变负荷 (TMB) 生物标记，分析 523 个基因的单核苷酸位点变异 (SNV)、插入缺失、拷贝数变异 (CNV) 和基因重排。本技术说明提供了关于血浆量和正确测量 cfDNA 的指导，以确保实现 TruSight Oncology 500 ctDNA 解决方案的高性能。

方法

cfDNA 收集

获得 cfDNA 的第一步是采集血液样本。今天，市面上有各种各样的采血管。临床环境中最常采用的是以 EDTA (乙二胺四乙酸) 作为抗凝剂来防止凝血的采血管。这些常规的 EDTA 管需要在采血后尽快处理，以此来确保 cfDNA 的完整性，避免血细胞破裂，从而导致高分子量的基因组 DNA (gDNA) 释放。另一种常用的试管是 Streck 游离 DNA BCT (采血管)。除了防止血液凝集，Streck BCT 还使用了保护剂来稳定有核血细胞，防止 gDNA 释放，能实现高质量的 cfDNA 分离。这也延长了血液在进一步处理前可在试管中储存的时间。

在采集血液后，将试管离心，把含有 cfDNA 的血浆和血细胞分离开，血细胞会沉积在试管底部。然后就可以轻松地从小管顶部取出血浆，并使用基于磁珠或基于硅胶膜的提取试剂盒提取 cfDNA。

cfDNA 定量

为了实现 TruSight Oncology 500 ctDNA 检测的最佳性能，建议至少使用 30 ng 的单核小体 cfDNA 作为起始材料。该起始量是基于 cfDNA 片段的量来计算的。

为了比较各个 cfDNA 定量方法，我们使用 QIAGEN QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit 按照制造商的说明提取了 15 份 cfDNA 样本 (未使用载体 RNA)。使用提取试剂盒提供的 50 μL 缓冲液洗脱 cfDNA。使用多种方法对样本进行了定量，一式三份 (表 1)。

此外，我们还评估了来自不同采血管的 cfDNA 与 TruSight Oncology 500 ctDNA 检测的兼容性。所有使用 EDTA 管收集的样本 (n = 660) 均在收集后 4 小时内进行血浆分离处理，血浆在 -80 °C 冷冻储存直至 cfDNA 提取。在 Streck 管中收集的样本 (n = 288) 在室温下连夜运输。在收到样本的当天分离血浆。

表 1：用于定量提取 cfDNA 的仪器和检测

制造商	仪器	检测
Agilent	4200 TapeStation System	TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay
Agilent	5300 Fragment Analyzer System	Fragment Analyzer High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit
Thermo Fisher	Qubit Fluorometer	Qubit dsDNA HS Assay Kit

结果与讨论

cfDNA 定量

cfDNA 的准确定量需要一种根据其不同大小进行定量的方法。Qubit dsDNA HS Assay Kit 能进行总体的双链 DNA 定量，但不能进行不同大小范围的定量。Fragment Analyzer High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit 能完全分离 cfDNA 部分和任何潜在的高分子量 DNA，能对 166 bp 附近的 cfDNA 和任何高分子量 DNA (10,544 bp) 进行定量 (图 1)。TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay 也能分离样本

中的 cfDNA 和高分子量 DNA。TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay 的大小范围仅能达到 800 bp，不能对大于 800 bp 的 DNA 进行定量，因此该检测不能报告总样本中的 cfDNA 百分比。

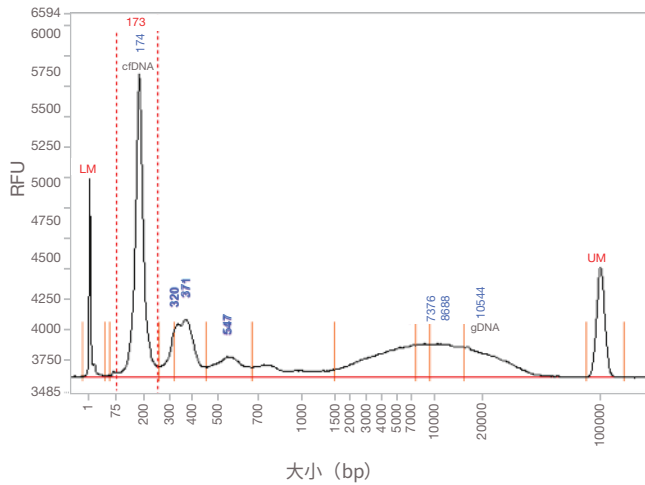


图 1：使用 High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit 分离单核小体 cfDNA - High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit 的曲线图表明样本可能含有单核小体 cfDNA 和某些高分子量 gDNA。虚线之间为 cfDNA 的定量范围。

Fragment Analyzer High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit 和 TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay 的大小范围略有不同。使用 Fragment Analyzer High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit 时，cfDNA 的单核小体峰通常位于 75 bp 到 250 bp 之间（图 1），而使用 TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay 时，这个峰会落在 75 bp 到 300 bp 之间（图 2）。TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay 测量报告的单核小体峰（125-300 bp）浓度低于 Fragment Analyzer High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit 测量（75-250 bp）的报告值，但这种差异是一致的，并且测量结果显示出很强的相关性（图 3）。由于 Qubit 检测不能进行不同大小范围的定量，因此高分子量 DNA 的存在也许会导致研究人员高估 cfDNA 的浓度（图 4）。

根据我们的经验，采血管类型对 cfDNA 产量没有显著的影响（图 5）。但我们使用了非常严格的处理方案。

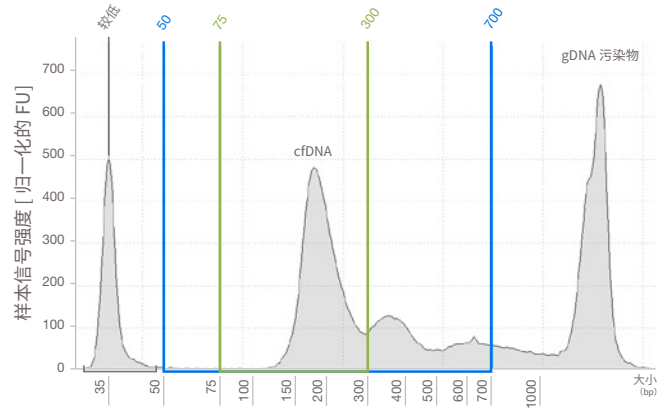


图 2：TapeStation Cell-free DNA ScreenTape Assay 检测的大小范围 - 电泳图着重展示了推荐用于 TruSight Oncology 500 ctDNA（绿色）的定量范围。

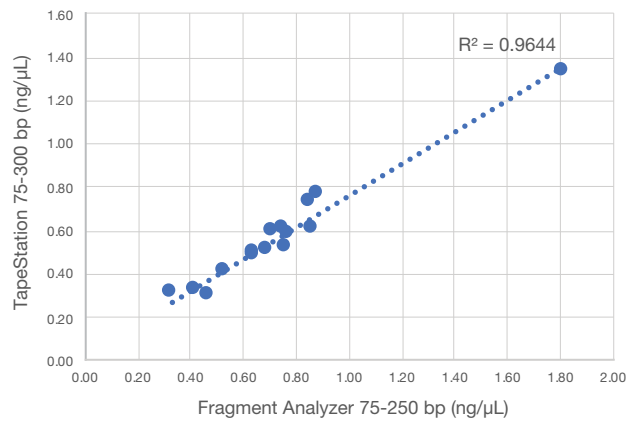


图 3：使用 Fragment Analyzer 和 TapeStation 系统测得的 cfDNA 浓度之间具有很强的相关性

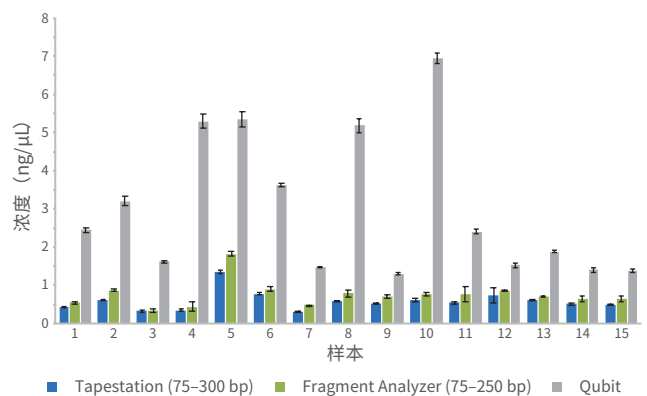


图 4：不同的仪器和检测方法测得的 cfDNA 浓度

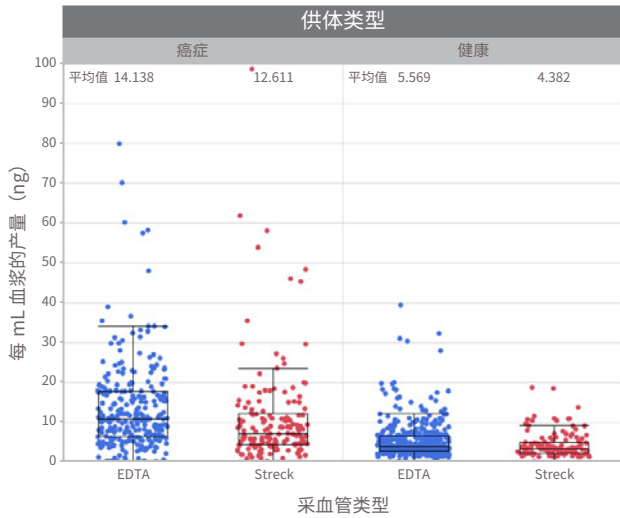


图 5：采血管类型对 cfDNA 的产量几乎没有影响

血浆体积和 cfDNA 产量

我们计算并比较了来自 794 个癌症供体和 516 个健康供体的血浆样本的 cfDNA 产量。癌症供体样本的 cfDNA 平均总产量是 205.07 ng，健康供体样本的 cfDNA 平均总产量是 67.79 ng。在癌症和健康供体中，各个样本的 cfDNA 产量差异很大，但癌症供体样本往往具有更高的 cfDNA 产量。使用更大体积的血浆进行提取时，可实现更高的总产量 (图 6)。为了至少获得 30 ng 的 cfDNA 产量，建议最少使用 6 mL 的癌症供体血浆样本和 10 mL 的健康供体血浆本来提取 cfDNA (图 7)。

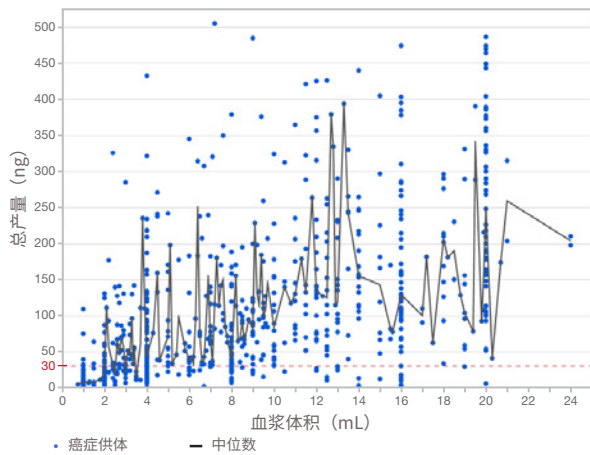


图 6：不同体积的癌症供体血浆样本的 cfDNA 产量

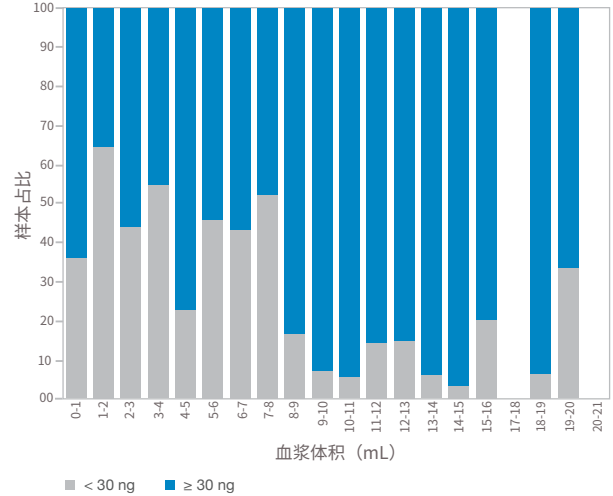


图 7：不同体积的癌症供体血浆样本中，获得了 30 ng cfDNA 的样本所占的比例

准确定量的影响

TruSight Oncology 500 ctDNA 起始量的准确定量，对满足变异检出性能和 TMB 计算的覆盖范围需求极为重要。较低的起始量将导致较低的覆盖范围 (图 8)，可能还会影响性能。在每个起始量水平上都存在一定的可变性，这在很大程度上可以归因于样本质量，而样本质量会受到分析前参数 (例如样本收集方法, 样本存储和供体年龄) 的影响。在使用 30 ng 起始量进行测试的样本 (n = 211) 中，超过 90% 的中位外显子覆盖范围为 2000X 或更高。

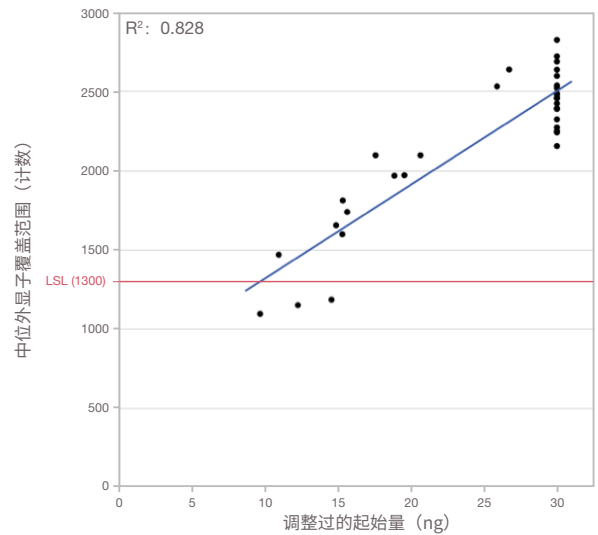


图 8：较低的起始量会导致较低的中位外显子覆盖范围 - LSL = 推荐的质量标准下限，平均覆盖范围为 1300X

总结

使用 TruSight Oncology 500 ctDNA 检测时，建议至少使用 8 mL 的癌症供体血浆样本和 10 mL 的健康供体血浆样本，以达到能实现该检测最佳性能所需的 30 ng cfDNA 的最小起始量。用于 Fragment Analyzer System 的 Agilent High Sensitivity Large Fragment Kit 和用于 TapeStation System 的 Agilent Cell-free DNA ScreenTape Assay 均可以分离 cfDNA 和高分子量 DNA，可用于定量 cfDNA 的单核小体峰。推荐的定量方法是确定 TruSight Oncology 500 ctDNA 检测的起始量所必需的。

参考文献

Sherwood K, Weimer ET. Characteristics, properties, and potential applications of circulating cell-free DNA in clinical diagnostics: a focus on transplantation. *J Immunol Methods* 2018;463:27-38. doi: 10.1016/j.jim.2018.09.011.

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017;17:223-238. doi: 10.1038/nrc.2017.

illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279

北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855

技术支持热线 400-066-5835 · techsupport@illumina.com · www.illumina.com.cn



Illumina Academy

@illumina

© 2020 Illumina, Inc. 保留所有权利。所有商标均为 Illumina 公司或其各自所有者的财产。关于具体的商标信息，请访问 www.illumina.com/company/legal.html。 Pub. No. 1170-2020-001-A QB9438

仅供研究使用。不得用于诊断。

illumina®

Pub. No. 1170-2020-001-A | 4