

具备高稳定性的全自动杂交靶向测序样本制备方案 在 OT-2 自动化移液平台执行上 Point-n-Seq® 工作流程



摘要

随着生物科研实验对样本通量增加、检测结果的可靠性的提升和减少操作时间等需求与日俱增，自动化对于生物科研实验的需求变得越来越重要。本次实验研究将呈现在 Opentrons® OT-2 自动化移液平台上执行 Avida Point-n-Seq® (PnS) 杂交靶向测序化学技术的自动化的实验结果，验证了 OT-2 为 NGS 样品预处理库的构建和靶标富集提升了处理效率，同时也保证了 NGS 的数据表现。

主要特点

- 在 OT-2 移液平台上进行的 6 小时自动化 Avida Point-n-Seq 靶向测序样本前处理，只需 10-15 分钟的手动操作时间。
- 自动化执行 Point-n-Seq 测序工作流程与手动操作流程的测序效果相当。
- Avida Point-n-Seq 500 (PnS 500) 检测试剂盒能准确检测 FFPE 和 cfDNA 样本中的肿瘤变异。它所需要耗费的检测时间更短同时检测一致性较高。

介绍

Avida Point-n-Seq 是一种全新的靶标富集化学技术。该技术是基于互锁的三维结构，专为协同间接捕获目标 DNA 靶标而设计。相较于传统的杂交捕获化学技术，这种高效的 DNA 捕获化学技术具有更高的特异性和更快的结合速度，1 小时内即可完成杂交靶向富集。这省去了许多像 PCR、纯化、定量这样的流程步骤，可以节省时间并减少每个步骤的 DNA 损失。在这里，我们展示了 Point-n-Seq 靶向测序 (TS) 样品制备工

作流程可在 OT-2 移液平台上实现完全自动化。OT-2 自动化移液平台是一种经济实惠的开源移液平台，其模块化设置支持多种分子生物实验工作流程。在 OT-2 自动化移液平台上实现 Point-n-Seq 工作流程自动化，可以在保持检测结果稳定性和准确性的同时，大幅减少手动操作时间。只需 10 到 15 分钟的手动操作时间，6 小时内就能制备出可用于测序的靶标富集库。我们运用各种输入和小型捕获基因包 (Panel) 对自动化工作流程进行了测试，包括基因组 DNA、FFPE 基因组 DNA，细胞游离 DNA (cfDNA) 以及大小为 20 Kb - 2 Mb 的小型捕获基因包。

材料和方法

Opentrons OT-2 自动化移液平台上 Point-n-Seq (PnS) TS 工作流程概述：

Point-n-Seq TS 协议包括试剂设置、在线协议库预处理和靶标捕获以及索引 PCR 扩增和纯化 (图1)。如表 1 列出了每个步骤的处理时间和手动操作时间。

Point-n-Seq TS 协议对应 OT-2 自动化移液平台甲板布局示意图，包括模块、实验器皿和协议库预处理试剂 (图 1)。运行设置并启动后无需人工干预。

A OT-2平台上 PNS的工作 流程	试剂设置	靶标捕获 库准备	PCR索引 和纯化
处理时间	15 min	270 min	60 min
操作时长	10 min	0 min(walk-away)	15 min

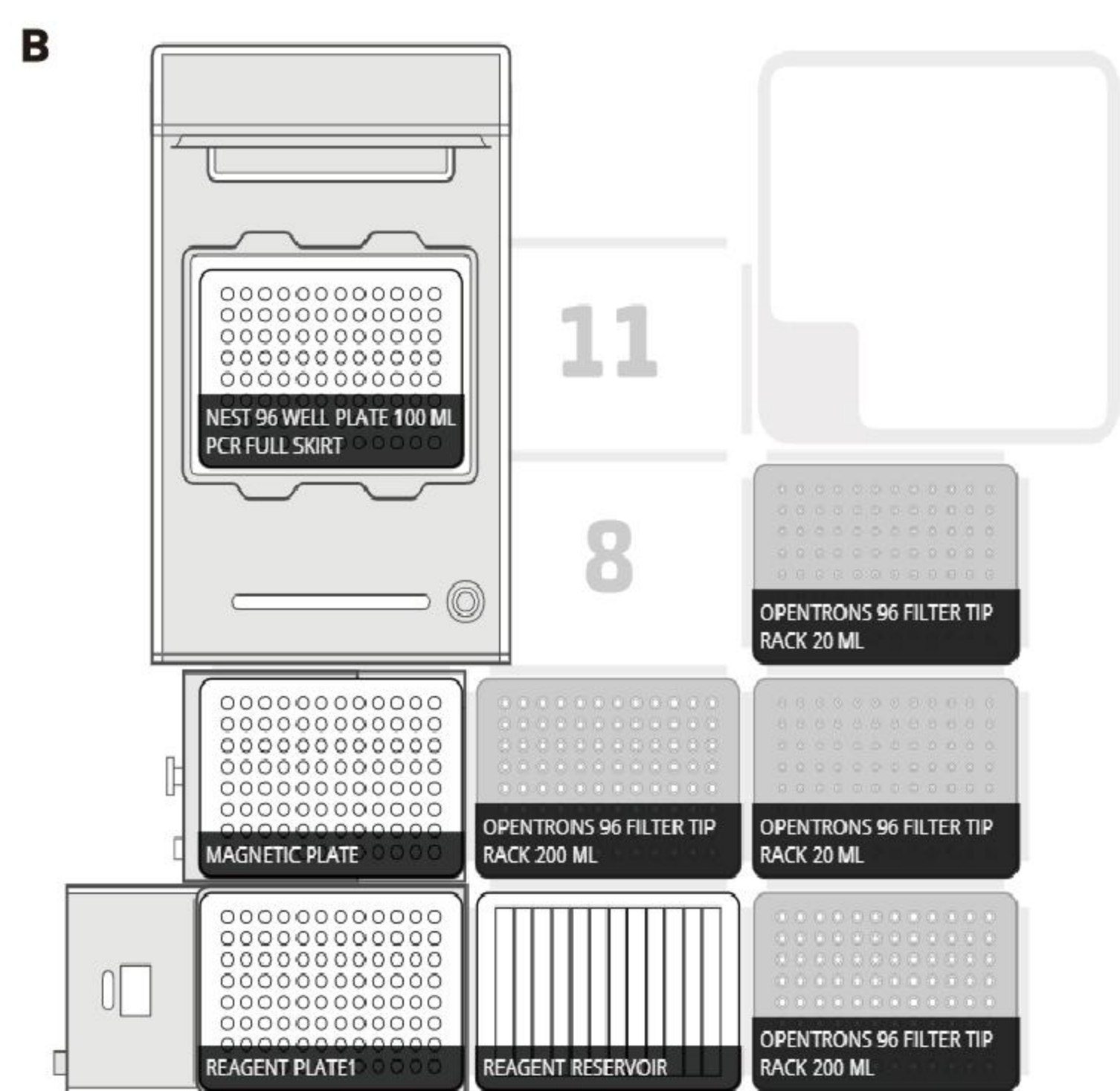


图 1. OT-2 移液平台上的 Point-n-Seq TS 工作流程 (A)，以及用于 NGS 样品制备和靶标富集的甲板配置 (B)。

结论

Point-n-Seq TS 自动化实验流程减少了动手操作时间，缩短了实验运转时间，并提高了检出限。相较于传统的杂交靶标富集，自动化 Point-n-Seq TS 工作流程的处理时间从 2 天缩

短到 6 小时 (表 1)。相较于市场上领先的肿瘤检测方法，Avida Point-n-Seq 500 的小型捕获基因包的检出限从 5% 提高到 1% (表 2)。

自动化可提供准确的 SNV 检出限

混合从参考基因组 - NA12878 和 NA24385 分离的 DNA，用于模拟 SNV 检测的 1% 替代等位基因频率。所有库都用人类样本 ID 小型捕获基因包 (Panel) 对 14kb 区域的高聚合 SNP 进行富集。评估 12 个位点变异调用的准确性 (表 3)。

用具有高重复性的数据对一系列中的 8 个孔 (孔 A 至孔 H) 的 12/12 位点进行了检测。

对肿瘤 FFPE 和 cfDNA 样本 DNA 进行可靠的变异检测

使用 30 ng FFPE 样本 (严重受损的福尔马林损伤 DNA, Horizon, HD833) (表 4) 和 40ng cfDNA (Horizon, HD833) (表 5) 进行自动靶标富集。检测突变等位基因频率 (AF)，并通过与已知频率进行比较，从而利用自动化 Point-n-Seq 工作流程确认变异等位基因的可靠性。

		试剂设置	靶标捕获库准备	索引PCR纯化
OT-2自动化移液平台 Point-n-Seq	处理时间	15 min	270 min	60 min
	手动操作时间	10 min	0 min	15 min
传统杂交靶标富集	处理时间		2 days	
	手动操作时间		6 hr	

表 1. Opentrons OT-2 平台上执行自动化 Point-n-Seq TS 缩短了处理时间和手动操作时间。

靶标捕获产品	自动化仪器成本价格	总时间	手动操作时间	DNA 输入	LOD
Avida PNS 500 (on OT-2)	\$25,000	6 hr	25 min	40 ng	1%*
其它肿瘤检测基因捕获包	\$200,000	2 days	2.5 hr	40 ng	5%

表 2. Avida PNS 500 与领先肿瘤试剂盒的比较数据

*正在开发 LOD 值为 0.1% 的液体活检产品

	CHROM:POS	预期 VAF %	检出 VAF% A1	检出 VAF% B1	检出 VAF % C1	检出 VAF % D1	检出 VAF % E1	检出 VAF % F1	检出 VAF % G1	检出 VAF % H1
HID02	chr1:89388944	2.00	2.61	2.86	2.66	2.62	2.41	2.25	2.07	2.28
HID07	chr2:60000720	1.00	0.70	1.04	0.72	0.35	0.60	0.34	0.57	0.54
HID15	chr4:46329655	1.00	1.54	1.53	1.41	1.01	0.55	0.58	1.12	1.14
HID16	chr4:58706855	1.00	1.24	1.30	1.75	1.71	2.06	1.37	1.64	2.24
HID27	chr6:164782889	2.00	3.88	4.38	2.70	3.70	3.32	2.17	2.38	2.43
HID30	chr7:105679551	1.00	1.13	1.19	1.10	1.65	1.77	1.39	1.78	1.98
HID33	chr8:11718528	1.00	1.23	1.26	1.18	1.51	1.56	2.02	2.07	0.99
HID39	chr9:137417308	1.00	1.59	1.12	1.66	0.92	1.58	2.26	1.28	1.83
HID48	chr12:130761696	1.00	1.34	1.66	1.36	1.37	1.16	1.16	1.38	1.86
HID52	chr15:25057315	1.00	1.59	1.79	1.81	1.66	1.63	1.82	1.95	1.46
HID61	chr18:23417133	1.00	1.58	1.46	1.20	1.35	0.96	1.36	1.48	1.92
HID71	chr22:33559508	1.00	1.41	1.66	1.16	1.55	1.51	2.06	1.97	1.45

表 3. 靶标捕获 SNV 的准确性以 20% 的混合率混合 20ng DNA-NA12878 和 NA24385 (Genome In A Bottle-GIAB) , 从而模拟 1% 的替代等位基因频率进行 SNV 检测。

基因	变体	水平 AF%	AVIDA PNS 500 AF%
BRAF	V600E	13.6	14.6
cKIT	D816V	9.5	11.6
EGFR	ΔE746 - A750	2.27	3.1
EGFR	L858R	3.67	5.1
EGFR	T790M	1.28	0.7
EGFR	G719S	24	20.2
KRAS	G13D	13.5	22.5
KRAS	G12D	5.41	4.7
NRAS	Q61K	13.1	15.4
PIK3CA	H1047R	19.5	20.2
PIK3CA	E545K	6.79	11.6

表 4. 肿瘤 FFPE 参考 DNA 的可靠变异检测。加入 40ng Horizon Multiplex 福尔马林重度破坏 DNA (DIN: 1.9) 进行等位基因频率 (AF) 检测。检测到 11/11 个变体的等位基因频率接近预期值。

基因	变体	水平 AF%	PNS 500
ALK	c.*61_ *64dup - CAAT	8.3	4.0
APC	p.T1493T	35.2	33.5
BRAF	p.V600E	9.8	9.1
BRCA2	p.K1691fs*15	32.4	29.7
CTNNB1	p.S33Y	36.8	35.7
CTNNB1	p.S45del	10.5	7.8
EGFR	p.E746_A750_ delELREA	2.54	1.9
EGFR	p.G719S	23.8	24.4
EGFR	p.L858R	2.7	2.4
EGFR	p.Q787Q	14.8	14.6
EGFR	p.T790M	1.06	0.3
FBXW7	p.S668fs*39	32.8	34.2
FLT3	p.P986fs*8	10.2	9.1
KIT	p.D816V	10.8	8.1
KIT	p.L862L	6.5	5.5
KRAS	p.G12D	5.7	7.4
KRAS	p.G13D	15.7	12.3
MET	p.A1357A	6.2	6.6
MET	p.L238fs*25	6.5	5.3
NOTCh1	p.P668S	30.1	26.6
NRAS	p.Q61K	12.4	11.7
PIK3CA	p.E545K	16.1	9.6
PIK3CA	p.H1047R	8.3	17.3
RET	p.L769L	64.0	66.9
TP53	p.P72R	92.85	92.5

表 5. 肿瘤 cfDNA 参考 DNA 的可靠变异检测加入 30 ng Horizon OncoSpan cfDNA 标准品检测 DNA 等位基因频率 (AF) , 输入量为 30 毫微克。检测到 25/25 个变体的等位基因频率接近预期值。

检测到符合预期 AF (低至 1%) 的 SNVs、小段缺失和插入的片段是由制造商使用 ddPCR 检测的 Avida Point-n-Seq 500 检测法与市场上领先的肿瘤检测法相比检测结果具有更高的一致性。通过评估一系列多种 GC 含量的覆盖范围, 在相同的测序读数条件下, Avida Point-n-Seq 500 的覆盖率比市场上领先的综合肿瘤检测方法的覆盖率更高 (图 2)。自动化检测性能与人工性检测性能相当。对于 cfDNA, 使用一个集中基因捕获包 (20kb) 进行靶标富集; 对于 gDNA, 使用一个相对较大的综合性基因捕获包 (约 2Mb) 进行靶标富集。对基因库产量、靶上率、去重读数、重复读数、可映射性、插入长度和均匀性进行了比较, 进一步展示人工 Point-n-Seq 工作流程和 OT-2 自动化移液平台工作流程测序结果相当 (表6)。

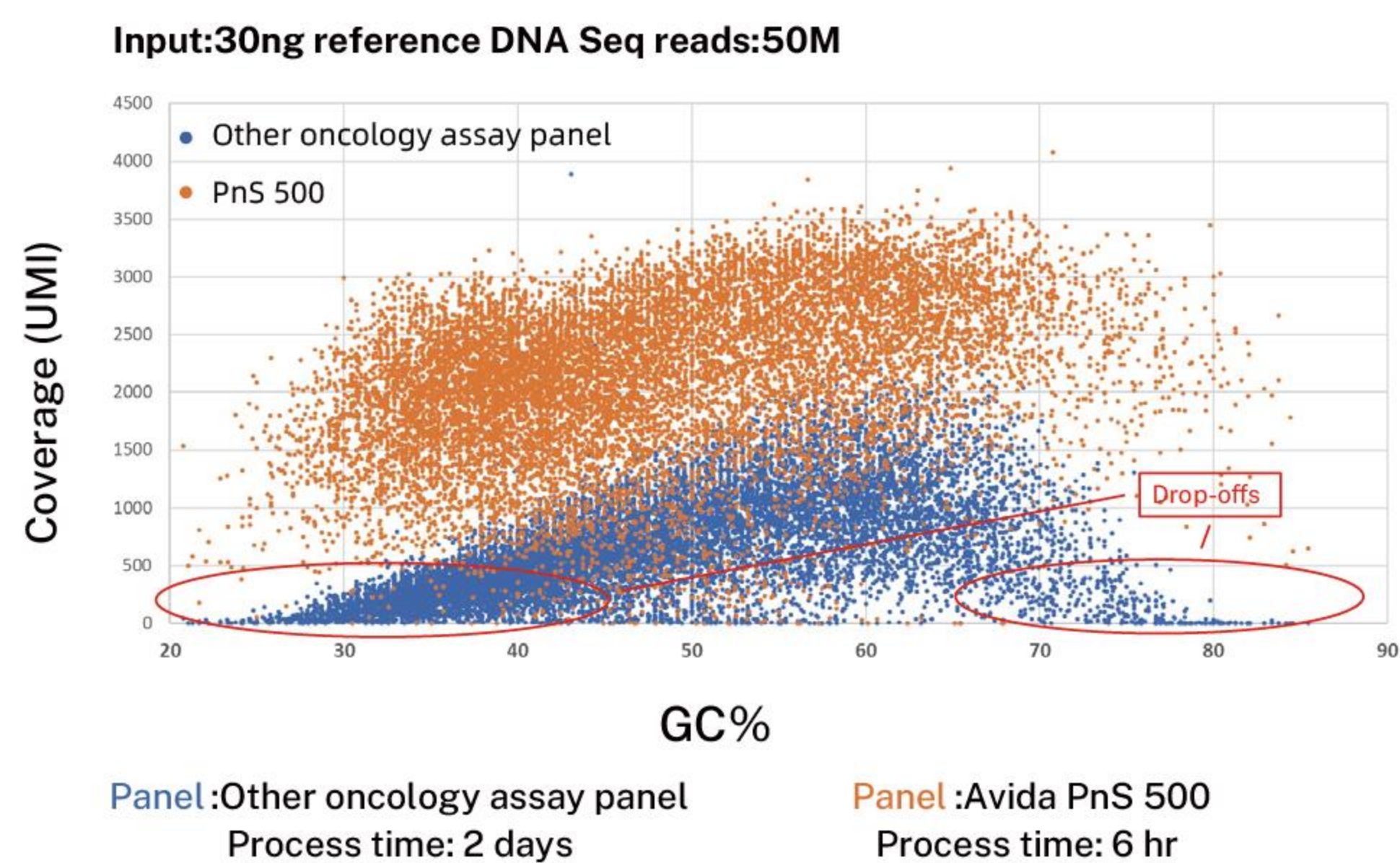


图 2. Avida PnS 500 panel 比市场领先的肿瘤检测 Panel 表现出更卓越的性能, 实验结果对 GC 含量的覆盖率进行了评估, 结果显示, 与另一种市面上在售的综合肿瘤检测试剂盒相比, Avida PnS 500 的检测结果表明出更高的一致性。加入 30 ng 参考 DNA; 测序读数: 50 M。

结论

Avida 的 Point-n-Seq 技术可在 Opentrons OT-2 自动移液平台上自动化运行, 为快速准确的变异检测提供了一种无人值守高效运行的解决方案。这一自动化方案大大加快了当前和未来临床应用中快速、简单、准确的基因组分析测定的开发速度。

cfDNA 10 NG

20KB 捕获基因包	基因库产量均差	基因库产量标准差	去重平均值	去重标准差	映射平均值	映射标准差	目标平均值	目标标准差	0.2X 平均值	0.2X 标准差	0.5X 平均值	0.5X 标准差
人工 n=4	22.9	1.5	3288	162	99.7	0.1	69.4	1.9	100	0	100	0
自动 n=8	20.4	1.4	3382	101	99.7	0.2	74.2	1.7	100	0	100	0

gDNA 100 NG

2MB 捕获基因包	去重平均值 25M读数	去重标准差	重复平均值	重复标准差	映射平均值	映射标准差	插入平均值	插入标准差	0.2X 平均值	0.2X 标准差	0.5X 平均值	0.5X 标准差	80%目标区域被覆盖平均深度(150X)	80%目标区域被覆盖深度标准差(150X)
Manual n=8	1214	14	23.8	0.9	99.9	0	216.3	1.0	97.9	0.0	92.4	0.1	1.46	0.01
Auto n=8	1142	22	26.6	0.9	99.9	0	211.3	1.9	98.2	0.1	94.5	0.1	1.38	0.05

表 6. 与人工 Point-n-Seq 工作流程性能相当。对 100 ng NA12878 gDNA (剪切至 200 bp 峰长) 上的 PNS 500 (2 Mb) 和 10 ng cfDNA (n=4) 上的 Pan-Cancer (20 kb) 进行了库产量、靶上率、去重读数、重复读数、可映射性、插入长度、均匀性的评估。