

外显子测序助力非小细胞肺癌研究

华大智造肿瘤全外显子组测序产品组合



亮点



全外显子测序助力肿瘤临床检测

华大智造提供肿瘤全外显子组测序产品组合。全外显子测序（Whole Exome Sequencing, WES）可选择性地对人类基因组编码区进行测序，在肿瘤临床应用，对肿瘤突变负荷（TMB）进行精确评估。



外显子测序验证肿瘤突变负荷（TMB）与DNA甲基化的关系

测序结果表明，与低肿瘤突变负荷组相比，非小细胞肺癌高肿瘤突变负荷组表现出更多基因组结构性变异特征。



外显子测序为肿瘤ICI（免疫检查点抑制剂）疗法提供科学诊断依据

测序结果发现肿瘤突变负荷与DNA甲基化相关。该数据为中国非小细胞肺癌ICI疗法中将TMB作为新的生物标记物的开发，提供了科学依据。

背景

肺癌是全世界患病率最高的癌症之一，约85%的肺癌病例为非小细胞肺癌。传统靶向治疗对目标人群很有效，但治疗后疾病可能迅速复发。有研究表明，DNA甲基化与染色体不稳定性有一定联系，但在非小细胞肺癌人群中，差异甲基化与TMB值是否有直接联系却鲜有研究。本篇文章研究显示，非小细胞肺癌中DNA甲基化与TMB显著相关。这也是在众多非小细胞肺癌研究中，首次将DNA甲基化与TMB直接联系起来。

全外显子测序（Whole Exome Sequencing, WES）可选择性地对人类基因组的编码区进行测序。WES仅占WGS的1%，但涵盖了约85%的致病相关基因变异。随着测序成本降低，WES也逐渐被用于肿瘤临床检测，如胚系和体细胞的基因变异情况可用于评估全癌种的遗传性肿瘤风险、指导靶向用药及评估临床疗效等；也可通过WES进行肿瘤突变负荷（TMB）、肿瘤新抗原负荷（TNB）、免疫识别与杀伤信号等的检测，据此进行肿瘤免疫治疗方法选择与疗效评估。

通过检测得出非小细胞肺癌患者的DNA甲基化谱图，并使用MGIEasy外显子组捕获V4探针试剂套装和DNBSEQ测序平台对患者肿瘤组织DNA进行全外显子组测序（WES），结合全外显子组测序数据探讨DNA甲基化与TMB的直接相关性，从而探究肿瘤突变负荷与非小细胞肺癌的关系。

检测方法

文库制备

使用MGIEasy外显子组捕获V4探针试剂套装（16RXN，货号1000007745，如图1），搭配MGIEasy外显子组相关文库制备试剂套装，对从89个病人样本中提取的非小细胞肺癌肿瘤DNA进行杂交捕获并洗脱，富集外显子区域，从而进行MGI平台外显子文库的构建。



图1 MGI外显子组捕获探针试剂盒套装

样本测序

基于DNBSEQ高通量测序平台，对DNA进行PE100测序（2×100bp）。使用biobambam、FastQC、DKFZ-pipeline软件进行QC对比变异检测，得出具体各样本TMB。使用HumanMethylation 850 K EPIC BeadChip对样本DNA进行甲基化测序。

MGI也提供多种规格测序仪，如MGISEQ-200（货号：900-000350-00）和DNBSEQ-T7（货号：900-000128-00）等测序平台，为客户提供快速灵活的测序方法。

结果

肿瘤编码体细胞突变数量计算

经外显子测序，通过计算得出体细胞突变分布（如图2），该分布显示每个肿瘤平均104个编码体细胞突变，个数在37至465个之间，其中红色横线以上计为高负荷，绿色横线以下计为低负荷。

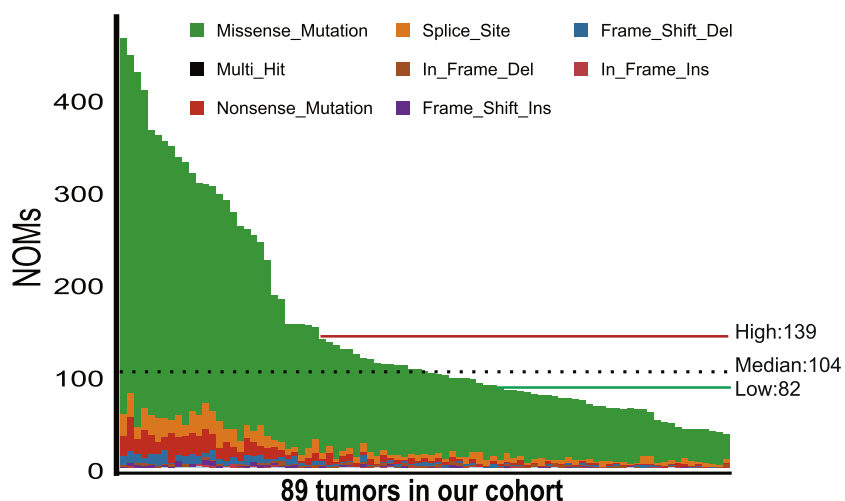


图2 患者编码体细胞突变数量

由盒形图分析表明（如图3），与低TMB组相比，高TMB组（中位TMB=343）甲基化水平有明显差异。

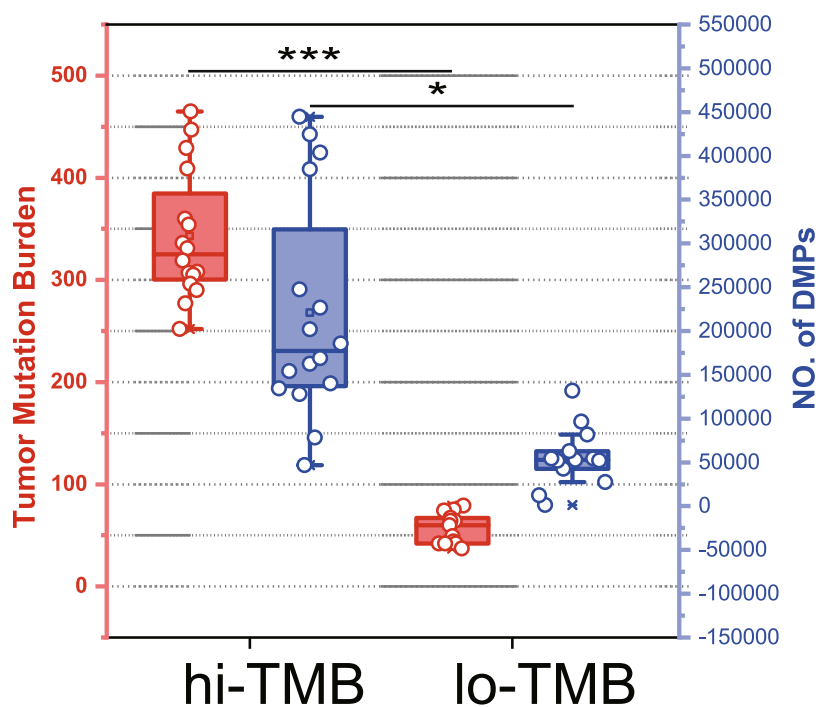


图3 高TMB与低TMB组中DNA甲基化差异

外显子测序验证肿瘤突变负荷的高低与结构突变（CNV）数量的关系

根据EPIC芯片分析结果，用非整倍体得分（AS）展示高TMB和低TMB组的拷贝数变异（CNV）。结果表明，高TMB肺癌具有更多的结构性CNV，而低TMB变异则保留了更稳定的基因结构（如图4）。

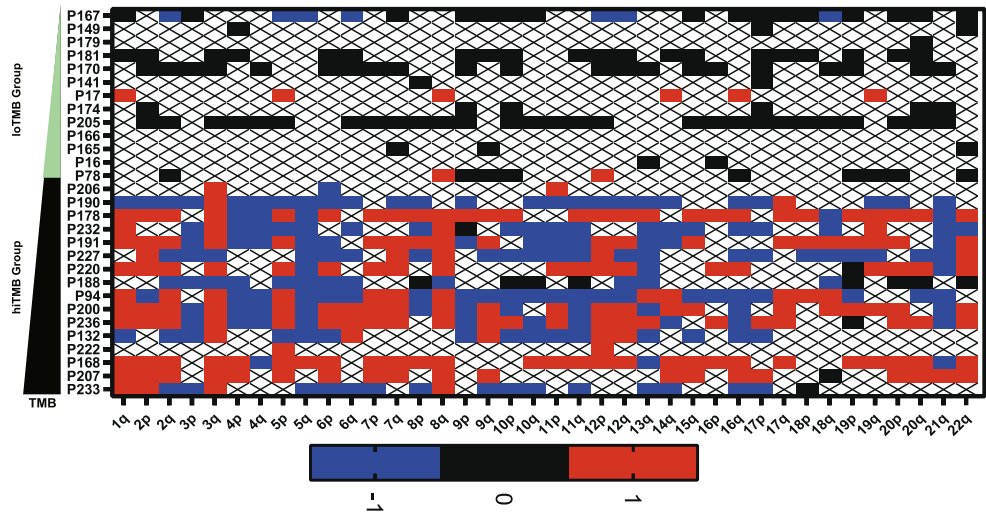


图4 高TMB组和低TMB组的CNV热图:通过EPIC芯片数据计算非整倍体得分。“丢失”计为-1，“获得”计为+1，“无变化”计为0，其他为NA;

测序结果表明，与低肿瘤突变负荷组相比，高肿瘤突变负荷组表现出更显著的基因组缺失与扩增（如图5）。

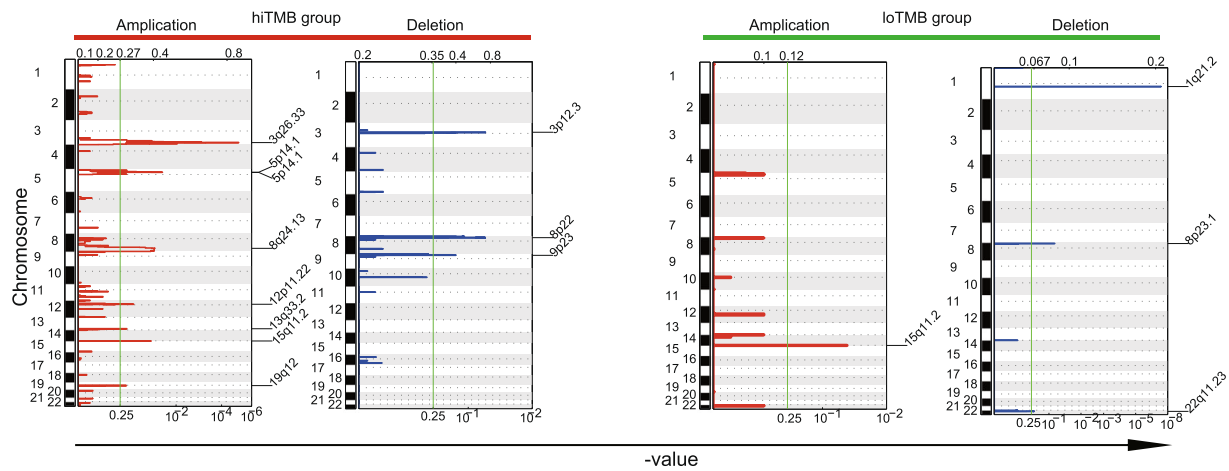


图5 肿瘤突变负荷与结构突变（CNV）数量的关系

结果表明，在中国非小细胞肺癌患者中，肿瘤突变负荷（TMB）表现出与甲基化区域CNV数量有高度相关性。

本次研究利用华大智造提供的MGIEasy外显子组捕获V4探针试剂套装和DNBSEQ高通量测序平台，对非小细胞肺癌患者进行外显子捕获测序，将由此计算出的肿瘤突变负荷与甲基化分析结果进行比较，发现“肿瘤突变负荷”与“肿瘤甲基化”显著相关。我们希望该种检测方法能为今后非小细胞肺癌的诊断及免疫治疗研究提供科学手段。

华大智造 肿瘤全外显子组测序产品组合

Tumor Exome Sequencing Total Solution

■ 订购信息

试剂

产品	货号
MGIEasy外显子组捕获V4探针试剂套装 (16 RXN)	1000007745
MGIEasy外显子组捕获V5探针试剂套装 (16 RXN)	1000007746
MGIEasy外显子组通用文库制备试剂套装 (16 RXN)	1000009657
MGIEasy外显子组酶切文库制备试剂套装 (16 RXN)	1000009658
MGIEasy全基因组甲基化文库制备试剂盒 (16 RXN)	1000005251

仪器

产品	货号
自动化文库制备系统MGISP-100	900-000027-00
自动化文库制备系统MGISP-960	900-000143-00
桌面型测序仪MGISEQ-200	900-000350-00

软件

产品	货号
生信分析加速器MegaBolt (全外显子组测序分析系统)	510-000306-00

参考文献

1. Cai L, Bai H, Duan J, et al. Epigenetic alterations are associated with tumor mutation burden in non-small cell lung cancer[J]. Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019, 7.

2. Eden, Amir, Gaudet, et al. Chromosomal Instability and Tumors Promoted by DNA Hypomethylation.[J]. Science, 2003.

