

# MGISEQ-2000测序平台在结直肠癌中的应用

华大智造MGISEQ-2000应用案例

## 亮点

高通量测序技术的发展为癌症防治带来了深刻变革，其在肿瘤基因检测的应用，也逐步从病人的精准治疗，向健康人群的肿瘤早诊早筛前移。全外显子测序（WES）和各种肿瘤panel的快速发展，为肿瘤检测和靶向治疗带来了新的机遇，同时也对关键技术高通量测序平台的稳定性和准确性提出了很高的要求。华大智造MGISEQ-2000测序仪为肿瘤WES和panel检测提供了高标准，高质量，准确可靠的实验平台支持，助力肿瘤的精准检测和靶向治疗的探索。



### 测序数据质量高

华大智造独有的DNBSEQ™技术具有高准确性、低重复序列率、低标签跳跃的重要特性，可始终扩增原版DNA，避免错误积累，并兼具测序信号强度和准确性，以实现最高效准确的大规模并行测序



### 测序方法选择灵活

MGISEQ-2000测序仪采用双载片平台，在双载片独立运行的基础上，支持不同规格的载片，提供更全面更灵活的测序体验

应用类型	推荐读长	MGISEQ-2000平台单次运行推荐的最大样本数*				
		1张FCS	2张FCS	1张FCL	1张FCL+1张FCS	2张FCL
		550M reads	1100M reads	1800M reads	2350M reads	3600M reads
肿瘤小panel 1Gb/样本	PE100	85样本	170样本	275样本	360样本	550样本
肿瘤大panel 5Gb/样本		17样本	34样本	55样本	72样本	110样本
全外显子组测序 100×平均测序深度 15Gb/样本	PE150	8样本	16样本	28样本	36样本	56样本

\*综合考虑Pooling偏差及其应用场景后估算得出的样本个数,仅供参考,用户可根据实际需求调整。

## 应用案例 基于高通量测序建立的微卫星不稳定性（MSI）分类器<sup>1</sup>

### 背景

微卫星不稳定性（MSI）代表微卫星位点中的核苷酸插入或缺失，微卫星区域的突变通常发生在DNA复制过程中，与肿瘤的发生密切相关。在许多癌症类型中观察到MSI，特别是在结肠癌和子宫内膜癌发生率最高。MSI状态已成为免疫治疗的重要生物标志物，准确和有效地确定MSI有助于指导临床医生选择适合患者的免疫肿瘤治疗。如今高通量测序已成为肿瘤学的主流技术，基于高通量测序的MSI检测方法方兴未艾。微卫星位点的选择可能大大影响MSI检测工具的性能，本项研究基于华大智造MGISEQ-2000测序平台开发了一种包含9个微卫星位点的MSI分类器USCI-MSI。

## 实验方法

### 样本制备

肿瘤样本来源于64例原发性结直肠癌患者的样本，包括14例MSI-High (MSI-H) 病例和50例微卫星稳定 (MSS) 病例。使用新鲜或福尔马林固定和石蜡包埋的肿瘤样本，对照组样本使用肿瘤邻近组织或外周血。分别用QIAampDNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN) 和大量血液基因组DNA提取试剂盒 (TIANGEN) 分离组织和外周血样品的基因组DNA。

### MSI-PCR检测

使用MSI检测试剂盒 (阅微基因) 进行MSI-PCR测试。在ABI 3730xl基因分析仪 (Applied Biosystems) 上检测PCR片段的长度，并使用GeneMapper软件4.0版本 (Applied Biosystems) 进行分析。当在六个单核苷酸重复位点 (NR-21、BAT-26、NR-27、BAT-25、NR-24和MONO-27) 中观察到2个或以上不稳定时，样品被认为是MSI-H，当观察到少于两个位点不稳定时，样品被认为是MSS。

### 高通量测序

研究采用了定制化的2.2 Mb panel，覆盖癌症驱动基因、遗传性癌症相关基因和治疗相关基因的部分内含子和外显子。使用华大智造MGIEasy通用DNA文库制备试剂盒对50-100ng剪切的基因组DNA进行文库构建，然后使用xGen杂交洗脱试剂盒 (IDT) 进行杂交捕获。文库质量和浓度分别使用LabChip® GX Touch™基因组分析系统 (PerkinElmer, USA) 和Qubit® 3.0 荧光定量仪 (Life Technologies) 进行测定。质控合格的文库在华大智造MGISEQ-2000测序仪上进行测序。使用BWA-MEM (V0.7.17) 将测序结果与人类参考基因组GRCH37/hg19进行比对，并用VarScan (v2.4.3) 进行SNVs检测。

## 结果

### MSI分类器USCI-MSI中微卫星位点的选择

研究团队在全基因组上鉴定出2,952,815个微卫星位点，重复区域跨越10bp至100bp，重复长度跨越1到5nt。28个样本中，包括7个MSI-H和21个MSS病例，只有一个MSI-H样本被误判为MSS。分别对MSI-H和MSS样本中微卫星位点的平均不稳定性评分进行分析，发现9个位点是MSI-H样本中的前50个位点与MSS样本中的后50个位点之间的重叠，这可能具有最强的识别能力。用这9个位点对样本进行重新分析，达到100%的准确性。研究团队将这种9个位点MSI检测方法命名为USCI-MSI分类器。

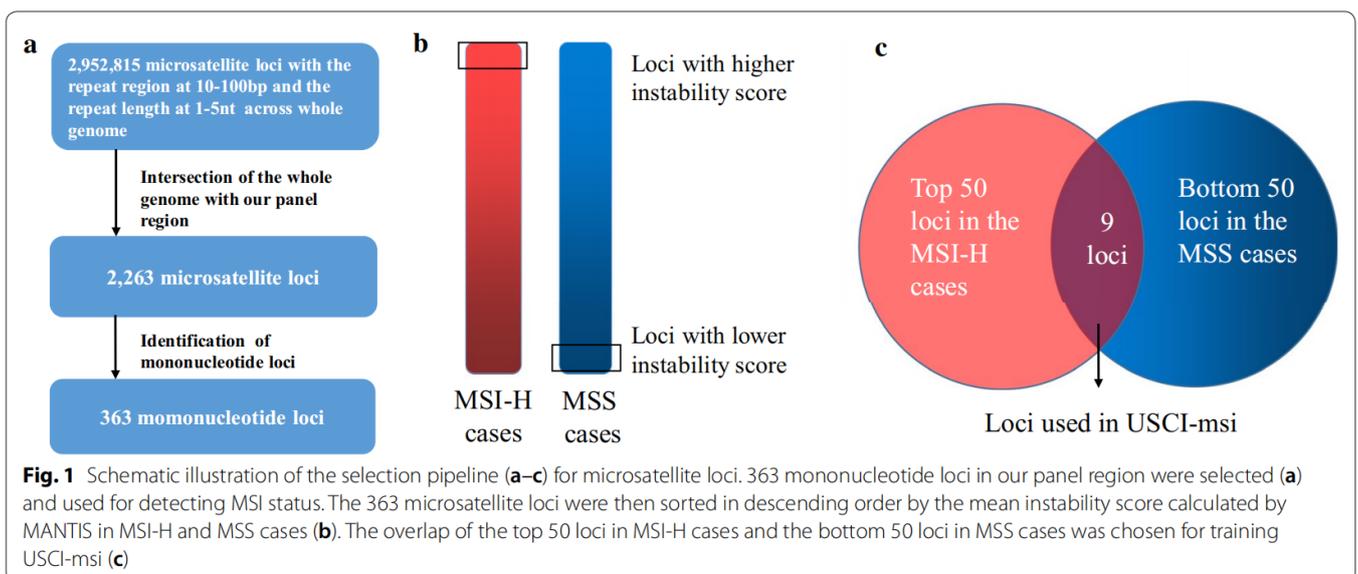


图1 位点选择流程示意图

## MSI-H肿瘤的基因组改变

在64例结直肠癌病例中，有468个基因共2249个位点发生改变。突变在MSI-H样品中明显富集，在14个MSI-H样品中发现78%（447个基因中1756个突变），在50个MSS样品中发现22%（186个基因中493个突变）。MSI-H病例的平均突变数为125（范围63-302），MSS为10（范围1-26）。其中60.2%（282/468）的基因仅在MSI-H病例中被检测到，而在MSS中只有4.5%（21/468）。

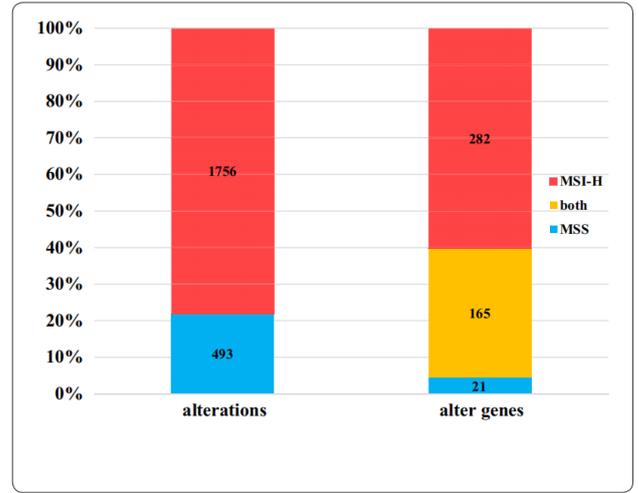


图2 64例结直肠癌病例中发生变化的位点与基因的示意图

在85个基因中检测到90个频发突变，其中最高频的为TCF7L2中的p.E384fs，RNF43中的p.G659fs和TGFB2中的p.E125fs。这三个突变都位于单核苷酸重复区，并分别在10、7和6例MSI-H病例中检测到，这表明微卫星位点在MSI-H病例中通常是不稳定的。热点突变p.G12V/S/D/A，p.G13D和p.A146T在MSI-H和MSS病例中均有检测到，而BRAF p.V600E仅在4例MSI-H病例中检测到，说明BRAF p.V600E可能与MSI有关。

Gene	Hotspot	Number of variant cases		
		Total	MSI-H	MSS
KRAS	p.G12V/S/D/A	16	3	13
	p.G13D	7	5	2
	p.Q61H	2	0	2
	p.A146T	4	3	1
NRAS	p.Q61R/H/L	3	0	3
BRAF	p.V600E	4	4	0
TCF7L2	p.E384fs	10	10	0
RNF43	p.G659fs	7	7	0
TGFB2	p.E125fs	6	6	0
QKI	p.K132fs	4	4	0
CARD11	p.R555fs	3	3	0
BCORL1	p.S1679fs	3	3	0
JAK3	p.Q39fs	2	2	0
BCOR	p.Q1156fs	2	2	0

p.G12V/S/D/A, p.G13D and p.A146T of KRAS were found in both MSI-H and MSS cases, while BRAF p.V600E was only found in 4 MSI-H cases. p.E384fs of TCF7L2 were highly mutated in MSI-H samples  
fs fragment shift

图3 结直肠癌中的热点突变

## 结论

基于华大智造MGISEQ-2000测序平台建立了一个新的基于高通量测序的MSI分类器USCI-MSI，包含9个微卫星位点用于检测结直肠癌病例中的MSI状态。该方法具有100%的灵敏度和特异性，在低纯度的肿瘤标本中表现良好。高MSI的肿瘤可能含有丰富的可以引起免疫反应的新抗原，因此，确定MSI状态为确定可能受益于免疫治疗的患者提供了机会。

## 参考文献

- Zheng, Kai, et al. "A novel NGS-based microsatellite instability (MSI) status classifier with 9 loci for colorectal cancer patients." *Journal of Translational Medicine* 18 (2020): 1-9.

## ■ 订购信息

### 测序仪

产品	规格	货号
基因测序仪MGISEQ-2000RS	台	900-000035-00

### 建库试剂

产品	规格	货号
MGIEasy 通用DNA文库制备试剂套装	16 RXN	1000006985
MGIEasy 通用DNA文库制备试剂套装*	96 RXN	1000006986
MGIEasy 通用DNA文库制备试剂套装**	96 RXN	1000017571

\* 该试剂套装中的MGIEasy环化模块V2.0规格为16RXN

\*\* 该试剂套装中的MGIEasy环化模块V2.0规格为96RXN

### 测序试剂

产品	最大支持循环数	货号
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE100)	220 Cycles	1000012554
MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装 (PE150)	320 Cycles	1000012555

深圳华大智造科技股份有限公司

MGI-service@mgi-tech.com | www.mgi-tech.com | 4000-688-114 | 深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼

仅供研究使用

版权声明: 本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司。未经本公司书面许可, 任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制, 拷贝, 编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。