


Возможности по выделению ДНК и РНК из FFPE образцов: автоматизация для ПАО

Никитин Алексей Георгиевич

к.б.н.

ЦКБ с поликлиникой УДП РФ

ФГБУ ФНКЦ ФМБА России



Молекулярно-генетическая диагностика в онкологии

Таргетная терапия

Потребность определять генетические маркеры опухоли привела к необходимости использовать для анализов гистологический материал, который изначально не предназначался для этих целей

Молекулярно-генетическая диагностика в онкологии

Фиксация формалином

Химическая фиксация обеспечивает стабилизацию тканевых и клеточных структур, но крайне негативно влияет на нуклеиновые кислоты

Молекулярно-генетическая диагностика в онкологии

Негативные эффекты химической фиксации

Кросс-сшивки белков и ДНК/РНК	Приводят к частичной денатурации ДНК
Фрагментация ДНК/РНК	Снижает эффективность ПЦР
Депуринизация	Приводит к возникновению ошибок амплификации
Дезаминирование	Приводит к ошибочной замене С>Т, особенно в NGS на основе амплификационных технологий

Проблемы при выделении нуклеиновых кислот из гистологических блоков

Нестабильное качество

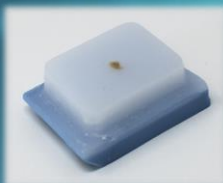
Хромает стандартизация методик



Проблемы при выделении нуклеиновых кислот из гистологических блоков

Разница в количестве материала

Биопсии может не хватать на все виды анализа



Проблемы при выделении нуклеиновых кислот из гистологических блоков

Деграция нуклеиновых кислот

Низкая концентрация, ошибочные замены

Образцы FFPE содержат значительно большее количество мутаций, чем парные замороженные образцы тканей

Около 1% мутаций в образцах FFPE являются ошибочными

Как минимизировать проблемы?

- Использовать наборы реагентов, предназначенные для выделения из тканей
- Следовать рекомендациям по пробоподготовке
- Использовать средства автоматизации

Рекомендации по пробоподготовке

- Обязательное использование нейтрального забуференного формалина для фиксации
- Не допускать фиксации более 24 часов
- Не использовать первые 1-2 среза, особенно для архивных блоков
- Количество и толщину срезов регулировать в зависимости от объема залитой ткани – от 1-2 срезов толщиной 5-10 мкм для крупных кусочков до 4-6 срезов для мелких
- Толстые срезы хуже депарафинизируются и расщепляются протеиназой К
- Выдерживать рекомендации инструкций по длительности обработок

Реагенты для выделения нуклеиновых кислот из блоков

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Qiagen

Cobas DNA Sample Preparation Kit

Roche

Экстракт ДНК FFPE

НОМОТЕК

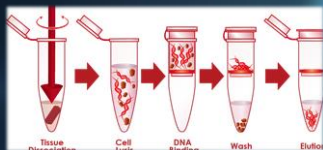
ДНК-Ткань-Ф

Тестген

Методы выделения нуклеиновых кислот из блоков

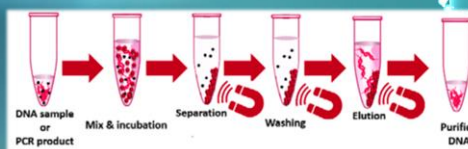
На колонках

Qiagen



На магнитных частицах

Roche



Методы выделения нуклеиновых кислот из блоков

Параметр	На колонках QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	На магнитных частицах Cobas DNA Sample Preparation Kit
Чистота A260/A280	1.78	1.84
Концентрация Qubit	0.31–20.0	0.43–21.2

Sarnecka AK, Nawrat D, Piwowar M, Ligeza J, Swadzba J, Wójcik P. DNA extraction from FFPE tissue samples - a comparison of three procedures. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2019;23(1):52-58. doi:10.5114/wo.2019.83875

Почему специальные реагенты?

- Состав оптимизирован для выделения даже малых количеств ДНК
- Протокол предусматривает восстановление артефактов химической фиксации
- Требуются особые условия по расщеплению большого количества белков
- В некоторых наборах есть ферменты для коррекции ошибок (актуально для NGS)

Преимущества и особенности решения по автоматизации

- Отсутствие риска перепутывания образцов из-за большого количества манипуляций
- Высокая воспроизводимость
- Снижение рисков контаминации
- Возможность постановки единичных образцов
- Возможность перехода на ручную методику в случае неисправности оборудования



Использование блоков FFPE в секвенировании нового поколения (NGS)

- Рекомендуется применение наборов для выделения с коррекцией ошибок фиксации формалином (например, Qiagen GeneRead™ DNA FFPE Kit)
- Рекомендуется применение реагентов для подготовки библиотек, не допускающих включения ошибочных оснований во время амплификации (например, KAPA) и использующих UMI
- При выборе способа обогащения преимущество следует отдавать гибридным методам – амплификационные требуют тщательной валидации из-за особенностей дизайна и постобработки

Спасибо за
внимание