

生物样本库最佳实践：核酸样本的质量控制

作者

Chava Pocernich,
安捷伦科技有限公司

摘要

生物样本库为临床医学、生物医学和研究提供可靠、易于获取甚至稀有的生物样本，在医学研究中发挥着至关重要的作用。随着生物样本库收集样本的来源越来越多，以及可能提供短期和长期存储，有必要实行通用指南以实现一致、优化的操作。这些要求包括在样本收集期间、样本入库之前和样本使用时采取的质量控制 (QC) 措施，以确保生物材料和数据收集的最高质量。因此，包括国际标准化组织 (ISO) 和国际生物与环境样本库协会 (ISBER) 在内的各种国际机构和标准制定机构都提出了生物样本库最佳实践的建议。ISBER 对样本库的建议已将安捷伦质量指标确定为 DNA 和 RNA 完整性和片段化的评估方式之一。安捷伦自动化电泳仪器包括 TapeStation、Femto Pulse、生物分析仪和片段分析仪系统，提供各种质量指标是确定核酸质量的重要分析工具。各种质量指标包括评估 DNA 的 DNA 完整值 (DIN) 和基因组 DNA 质量值 (GQN)、评估游离 DNA 的百分比 %cfDNA，以及评估 RNA 的 RNA 完整值 (RIN)、RIN 当量 (RIN[®]) 和 RNA 质量值 (RQN)。本文将展示自动化电泳仪器在生物样本库中的应用，以及其帮助生物样本库确定核酸处理、提取、储存和运输的最佳实践。

前言

众多研究人员需要为研究收集大量样本，生物样本库应运而生，实现了在单一地点储存和收集样本，以供未来研究使用。多年来，随着新的科学见解不断涌现，为某一项研究收集的相同样本会随时间推移，对其他研究人员的实验或多中心队列研究产生重要价值。生物样本库已成为可靠的样本来源，供研究人员获取不太容易获得的样本。因此，存储具有完整记录的高质量样本，对于未来研究的使用十分重要。生物样本库最佳实践的建立，旨在协调学界使用统一的规程、标准和质量控制。

在过去几年中，国际标准化组织 (ISO) 和国际生物与环境样本库协会 (ISBER) 等组织制定了生物样本库的标准和建议。ISO 为国际标准制定机构，由来自各个国家标准组织的代表组成，旨在推行全球的专利、工业和商业标准。ISBER 为国际生物样本库机构，为传播最先进的政策、流程和研究成果提供了论坛，另外还创造教育和培训机会。越来越多的证据表明，生物样本的收集、处理、储存和运输等分析前程序会影响下游分析中分子分析物的检测。生物样本质量无疑已成为生物医学研究成功的重要因素，促使许多机构推荐采用质量标准。这些标准可促进生物样本的一致性和质量，并优化生物样本及其相关数据的获取。

ISO 和 ISBER 的生物样本适用指南

ISO^[1] 和 ISBER^[2] 为生物样本库和储备库制定了多种标准和建议，以便识别、记录和提供适合生物医学研究目的的样本。针对生物样本库，ISO 20387:2018 在第 7.8.1.1 节中指出，“对生物材料和相关数据质量有影响的关键活动应具备生物样本库、提供者、接收者或用户的识别信息。生物样本库应建立、记录并实施与此类活动相关的质量控制 (QC) 程序。”此外，第 7.8.1.2 节补充：“生物样本库应提供适用的生物材料和相关数据。生物样本库应定义对生物材料和相关数据或其子数据集进行的最低限度的 QC 程序。对于稀有或遗留宝贵生物材料，提供合理证明后可归为例外情况。”第 7.8.2.9 节还补充：“在具备可用的适当方法的情况下，生物样本库应设法提供客观证据证明生物材料质量（处理或测试结果）的可比性。”

同样，ISBER 最佳实践指南 E2 节中的质量控制部分指出，对于所有生物储备库和样本类型，QC 流程应包括收集质量的四个“支柱”：

1. 真实性 — 正确鉴别身份
2. 纯度 — 不受污染
3. 稳定性 — 在规定储存条件下，样本材料总量在规定的时间内能在规定的限度内维持初始测量值
4. 获得同意 — 适用于人体样本

纯度和稳定性的质量支柱专门针对核酸样本的完整性。ISBER 最佳实践在 E2.4 核酸样本质量控制注意事项中指出，“可对 DNA 和 RNA 的完整性和片段化（如分子量、DNA 完整值、RNA 完整值）、数量/浓度和纯度进行评估”。

核酸质量控制注意事项

高质量的核酸是各种应用中实现成功分析的必需要素，质量控制可以帮助确定哪些样本适合进行下游分析。DNA 和 RNA 可从许多不同类型的组织样本中提取获得。并非所有组织类型都具有相同稳定性，某些样本提取方法会促使降解，因此样本的完整性可能会存在差异。此外，生物样本的收集、处理、储存和运输等分析前程序会影响核酸的完整性。福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE)、古旧的样本和 RNA 等核酸样本很容易因化学固定、时间、温度、酶消化和处理不当而降解。高质量的完整基因组 DNA (gDNA) 会显示为很高分子量的弥散条带，而总 RNA 会具有非常明显的核糖体峰。如果样本产生明显降解，仅存在小片段，则会导致测序结果不佳、目标编码区域丢失以及全长 RNA 和 gDNA 序列出现缺口。了解起始核酸的质量有助于为确定适合特定研究或工作流程的样本提供指导。还有助于指导相应实验步骤更改以优化工作流程，例如：起始浓度、片段化条件、用于富集的文库量以及用于扩增步骤的 PCR 循环数。

安捷伦仪器

安捷伦自动化电泳系列产品提供多种仪器，包括 TapeStation、Femto Pulse、生物分析仪和片段分析仪系统，为核酸样本分析提供各种质量指标。此外，所有仪器都提供 DNA 和 RNA 的分子量测定、定量和质量分析，同时专门针对不同的通量性能、分辨率和应用要求，满足各个实验室的需求。

质量指标

ISBER 最佳实践中提到的质量指标，例如 DIN、GQN、RIN、RIN^o 和 RQN，能够为用户提供样本完整性的客观可靠评估（表 1）。质量指标使生物样本库能够轻松识别高质量样本，提供有助于研究样本选择的参考工具，并帮助建立或识别与处理、提取方法、运输和储存相关的质量程序问题。此外，研究人员可以在其工作流程中建立质量指标标准，例如在 RNA 降解研究中检查 RIN^[3] 或 FFPE 样本中的 DIN^[4]。质量指标标准可减少人为错误和用户评估之间的差异，节省了时间和成本，同时可轻松识别会导致不良结果的不合格起始材料。质量指标有助于建立处理、提取方法、运输和储存的质量程序。不同处理技术和提取方法的并列比较有助于确定最佳实践，而前后测量可验证运输和长期储存方案的可靠性。

表 1. 安捷伦自动化电泳系列产品的质量指标概览

DNA 质量指标			
	定义	样本类型	仪器
DIN	DNA 完整值 DIN 算法通过 1 至 10 的评分对 DNA 样本进行质量评估。高 DIN 代表高度完整的 gDNA，而低 DIN 则代表高度降解的 gDNA 样本。	gDNA FFPE DNA	TapeStation
GQN	基因组质量值 根据测得的高于指定分子量阈值样本的总浓度分数计算而得，范围为 0 至 10。10 表示测得 100% 的样本高于分子量阈值。	gDNA FFPE DNA	片段分析仪、 Femto Pulse
%cfDNA	游离 DNA 百分比 存在于 50–700 bp 预设区间中的 cfDNA 组分相对于总样本 DNA 的百分比。	cfDNA	TapeStation

RNA 质量指标			
	定义	样本类型	仪器
RIN	RNA 完整值 计算结果的范围是 1 至 10。高 RIN 代表高度完整的 RNA，而低 RIN 则代表高度降解的 RNA 样本。	总 RNA	生物分析仪
RIN ^o	RIN 当量 计算结果的范围是 1 至 10。高 RIN ^o 代表高度完整的 RNA，而低 RIN ^o 则代表高度降解的 RNA 样本 ^[9] 。与 RIN 值相当。	总 RNA	TapeStation
RQN	RNA 质量值 计算结果的范围是 1 至 10。高 RQN 代表高度完整的 RNA，而低 RQN 则代表高度降解的 RNA 样本 ^[10] 。与 RIN 值相当。	总 RNA	Femto Pulse、 片段分析仪
DV ₂₀₀	分布值 200 计算分子量大于 200 个核苷酸的 RNA 片段的百分比。然后使用 DV ₂₀₀ 指标来确定成功的文库制备和可重现的结果所需的最小 RNA 起始量。	FFPE RNA	TapeStation、 Femto Pulse、 片段分析仪、 生物分析仪

基因组 DNA 和 FFPE 样本 — DIN、GQN

基因组 DNA 在日常处理、混合和多次冻融过程中很容易发生断裂。TapeStation、片段分析仪和 Femto Pulse 系统可用于评估来自新鲜、冷冻或 FFPE 组织的 DNA。FFPE 和 gDNA 的完整性可以通过质量指标分数 DIN 和 GQN 进行评估。TapeStation 软件的动力学算法^[5] 通过 1 至 10 的评分对 DNA 样本进行质量评估。高 DIN 代表高度完整的 gDNA，而低 DIN 则

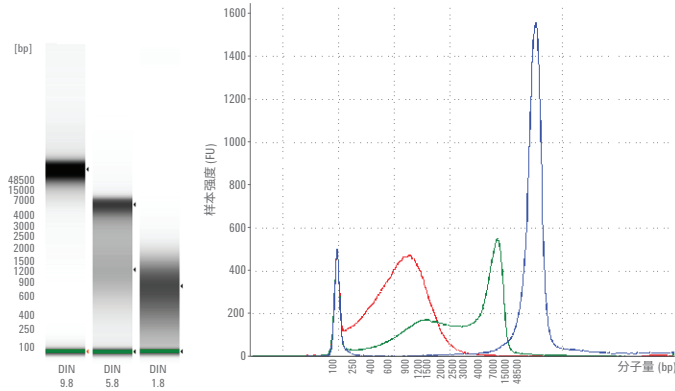
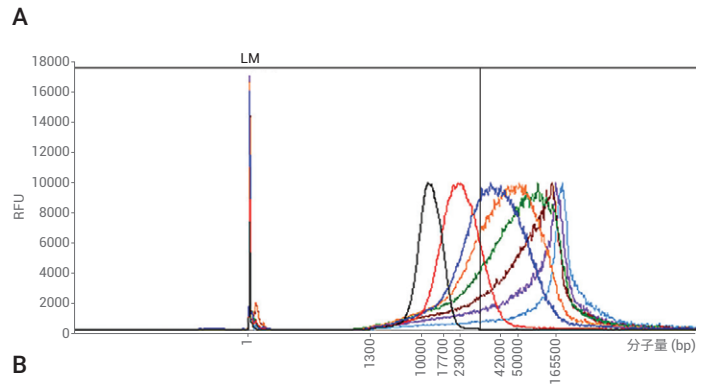


图 1. 使用 Agilent 4200 TapeStation 系统和安捷伦基因组 DNA ScreenTape 试剂对 DNA 完整性不同的小鼠 gDNA 样本进行分析。质量指标 DIN 随降解度增加而降低。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5991-6629EN^[5]

代表高度降解的 gDNA 样本 (图 1)。Femto Pulse 和片段分析系统生成的 GQN 质量指标设计用于简便分析 gDNA 和剪切 DNA。用户可针对其特定应用设定合适的分子量阈值。然后，根据测得的高于指定分子量阈值样本的总浓度分数计算 GQN 值。GQN 以 0 到 10 的等级对样本进行评分，0 表示样本均未超过阈值，10 表示 100% 的样本高于阈值^[6] (图 2)。



平均弥散条带分子量 (bp)	30 kb 处 GQN 数值
12147	0
23339	1.5
45304	6.4
57789	7.1
73267	7.8
94045	7.8
109968	8.2
164292	8.8

图 2. 来自 PacBio 的剪切 gDNA 在配备安捷伦基因组 DNA 165 kb 试剂盒的 Agilent Femto Pulse 系统上的分离。A) 电泳图的分离情况；B) 平均弥散条带分子量和质量指标 GQN₃₀₀₀₀，LM = 下位内标。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-0520ZHCN^[6]

RNA 样本 — RIN、RIN^e、RQN

新鲜或冷冻组织中的 RNA 可通过 RIN (生物分析仪)、RIN^e (TapeStation) 或 RQN (Femto Pulse 和片段分析仪) 评估。三种 RNA 质量指标均考虑了 RNA 样本的整个电泳分离过程, 包括核糖体片段以及是否存在 18S 峰之前的降解产物。指标的计

算结果范围是 1 至 10。高 RIN、RIN^e、或 RQN 代表高度完整的 RNA, 而低数值则代表高度降解的 RNA 样本^[7,8] (图 3)。已有数项研究证明了 RIN 与 RIN^e^[9] 和 RQN^[10] 的等效性。

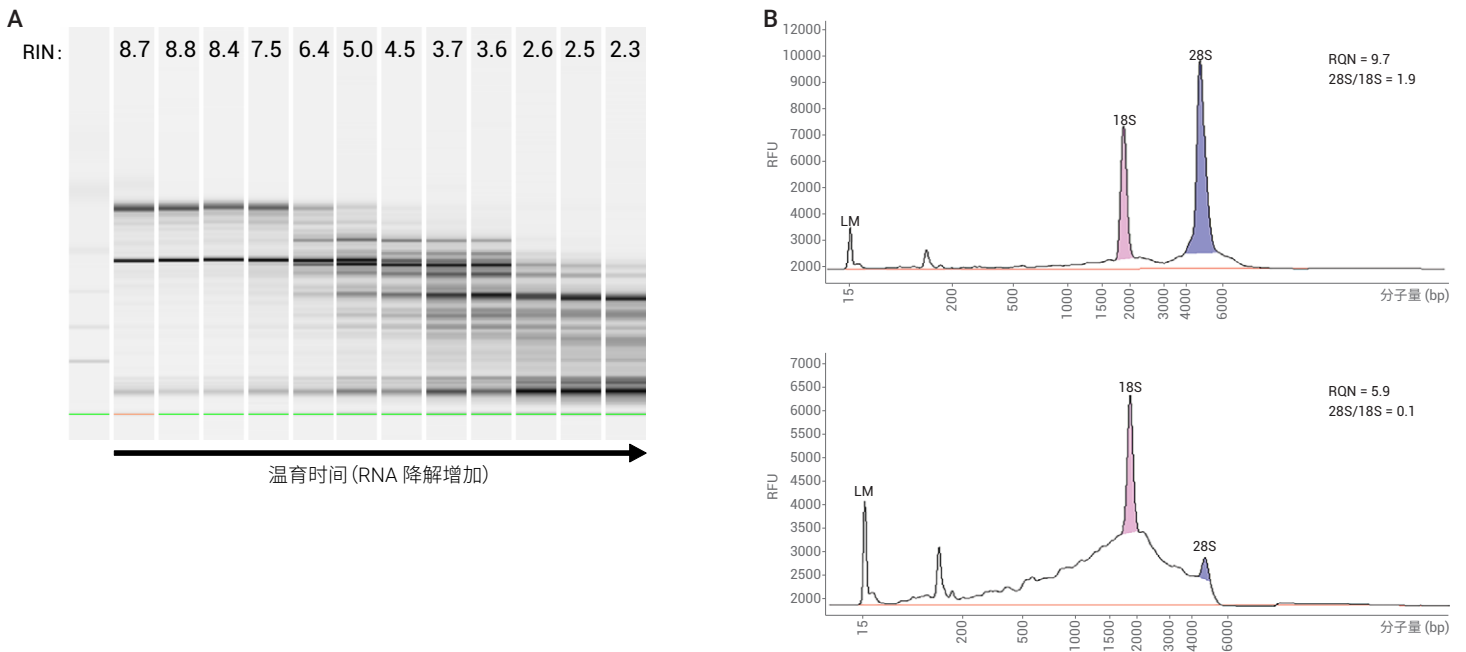


图 3. 使用 A) 安捷伦生物分析仪系统和真核生物总 RNA 检测试剂; B) 安捷伦片段分析仪系统和 HS RNA 试剂盒 (15 nt) 分析不同降解度的总 RNA。质量指标 RIN 和 RQN 随降解度增加而降低。此图转载自安捷伦出版物, 出版号 5989-1165CHCN^[7] 和 5994-0521EN^[8]

FFPE RNA — DV₂₀₀

FFPE RNA 样本因为固定和储存条件易造成高度降解，导致样本使用困难。在进行文库制备之前评估每个 FFPE RNA 样本的质量非常重要，以排除高度降解的样本，避免其含有小于最佳测序分子量范围的 RNA 片段。尽管 RIN、RIN[®] 和 RQN 值为可靠的指标，可评估新鲜和冷冻组织或细胞培养物中分离出的 RNA 质量，但其并非 FFPE 样本中分离出 RNA 的明确质量衡量标准。为了解决该问题，Illumina 开发的质量指标 DV₂₀₀ 计算了分子量超过 200 个核苷酸的 RNA 片段的百分比。然后使用 DV₂₀₀ 指标来确定成功的文库制备和可重现的结果所需的最小 RNA 起始量。鉴于 DV₂₀₀ 值与文库产量之间具有较强相关性，DV₂₀₀ 指标非常适合在构建文库之前使用生物分析仪^[11]、TapeStation^[12]、Femto Pulse 和片段分析仪系统^[13] 评估 FFPE RNA 质量。

游离 DNA — %cfDNA

随着微创样本采集方法（或称液体活检）在临床研究中的应用，细胞游离 DNA (cfDNA) 已成为 NGS 的重要起始材料，因此需要可靠的质量指标。cfDNA 样本中的高分子量 (HMW) DNA 会影响文库产量和测序质量。TapeStation 软件和细胞游离 DNA ScreenTape 试剂可出具新型质量指标 — %cfDNA（图 4）。该数值反映了存在于 50–700 bp 预设区间中的 cfDNA 组分相对于总样本 DNA 的百分比。%cfDNA 指标便于用户评估样本质量，并确定样本所含 cfDNA 百分比是否足以用于下游过程^[14]。

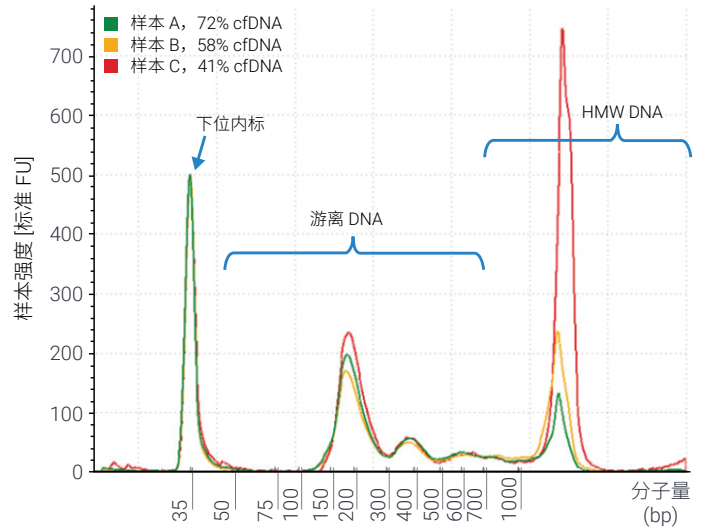


图 4. 不同质量的 cfDNA 样本叠加图。随着超过 700 bp 的高分子量基因组 DNA 的增加，质量指标 %cfDNA 降低。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-1390EN^[14]

要保持高核酸质量，有许多分析变量需要考虑。从采集方法和实验室器具,到周转时间、处理、提取方法和温度,再到样本的运输条件和最终储存的每个步骤，均会影响核酸质量（图 5）。在每个分析变量之后比较样本的质量指标，使用户能够确定每个步骤中哪种方法对核酸质量的影响最小。越来越多的生物样本库在使用质量指标来确定核酸生命周期中每个步骤的最佳实践。

生物样本库生命周期*

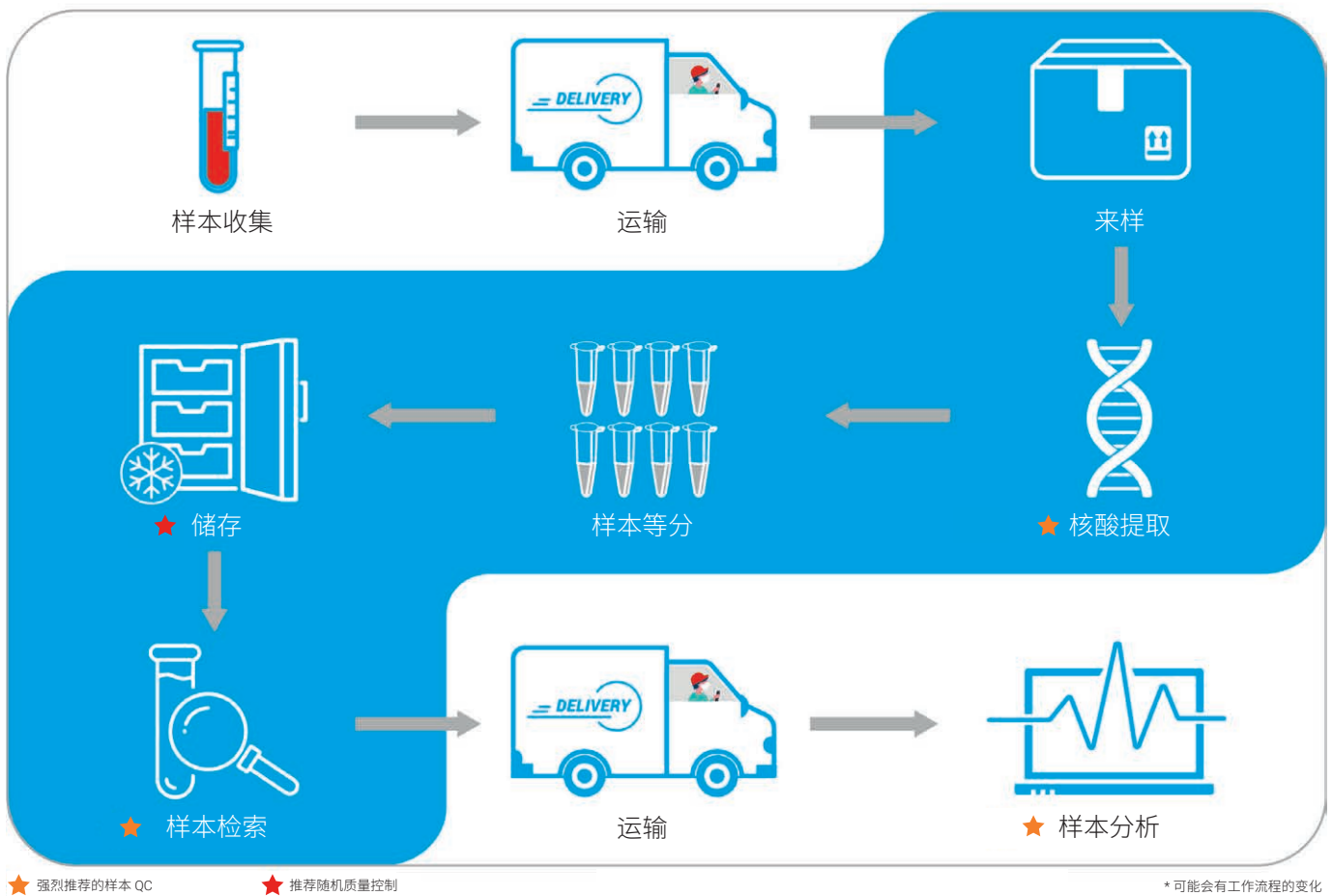


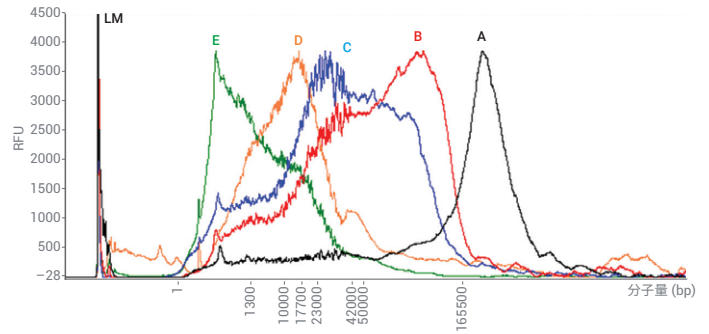
图 5. 可能影响核酸质量的分析前变量

基因组 DNA 提取方法

有针对特定的下游应用的多种方法从选取的真核和原核来源样本中提取 gDNA。分离 gDNA 的分子量和质量会受到不同提取方法的影响，因此需要对 gDNA 样本进行可靠的质量评估，以确定使用哪种提取方法。利用基因组 DNA 165 kb 分析试剂盒在 Femto Pulse 系统上对比五种不同的提取方法得到的 gDNA 分子量和质量^[15] (图 6)。酵母 gDNA 的弥散条带分子量分布和完整性随提取方法的不同而变化。苯酚-氯仿提取法 A 和另一种液相提取方法 B 所产生的完整 gDNA 弥散条带较长。离心柱提取方法 C 和膜提取方法 D 表现出相似的分子量，在五中不同提取方法中长度中等。另一种离心柱提取方法 E 得到的分子量最小。基因组质量值 GQN 随着 gDNA 样本分子量的减小而降低。Femto Pulse 和 GQN 显示了哪种提取方法可以保持 gDNA 的完整性和分子量。

基因组 DNA 的自动化提取

核酸提取自动化已变得越来越常见，能够提高提取效率。改变提取方法时，保证核酸质量和产量不降低十分重要。这对于 FFPE 样本尤其重要，因为化学固定已经影响了核酸质量。比较每种手动或自动方法十分关键，而不应将所有自动化过程混为一谈，因为每个方法都是独一无二的，且会产生不同的结果。Mathieson 等人使用 TapeStation 和 DIN 质量指标^[16] 比较了手动提取试剂盒和两种不同的自动化方法提取的 gDNA 质量。结果显示，两种自动化流程的 DIN 均值为 5.7，与此相比，手动方法的均值为 5.95，在统计学上更高 ($p < 0.003$) (图 7)。比较手动和自动提取过程的最终 DIN 质量指标，可为确定采用何种提取方法的决策过程提供清晰的数据。



提取方法	平均弥散条带分子量 (bp)	平均 GQN _{50 kb}
A	163670	8.2
B	103111	7.4
C	76778	6.1
D	62165	3.0
E	27388	1.1

图 6. 利用安捷伦基因组 DNA 165 kb 试剂盒在 Agilent Femto Pulse 系统上获得的电泳图。通过五种不同的方案提取酿酒酵母 gDNA: A) 苯酚氯仿; B) 液相提取; C) 和 E) 离心柱提取; 以及 D) 膜提取。LM = 下位内标。相应提取方法的平均弥散条带分子量和 GQN_{50 kb}。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-0754ZHCHN^[15]

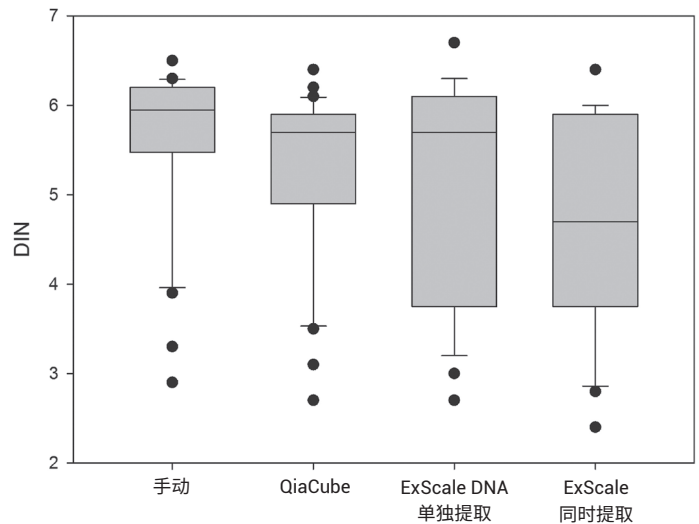


图 7. 比较 30 个 FFPE 组织块的 DIN，使用手动、QiaCube、ExScale DNA 单独提取和 ExScale DNA/RNA 同时提取方法获得 gDNA。DIN 值范围为 1-10，数字越大表示 DNA 降解程度越低。箱型图显示的是第 25 至第 75 百分位数，分隔线为中位数。箱线显示第 10 和第 90 百分位数，单个点代表剩余的异常值。任何两种提取方法之间的 DIN 差异都具有统计学意义 ($p < 0.05$)，但 QiaCube 法对比 ExScale DNA 单独提取法和 ExScale DNA 单独提取法对比 ExScale 同时提取法除外。DIN 即 DNA 完整值。此图转载自 Misra 等人^[16] 并经过修改。该版权资料为 Mary Ann Liebert, Inc 所有

德国海德堡生物样本库在对流程进行了许多更改后，对 gDNA 进行了回顾性质量分析^[17]。2014 年之前的样本根据针对特定研究的指南手动提取和处理。该生物样本库于 2015 年进行了重组，并采用了自动化提取方法和优化的工作流程，并增加了样本处理、运输和储存的标准操作规程。使用 TapeStation 系统和 DIN 质量指标对 2010–2014 年和 2015 年之后的 gDNA 质量进行了评估。DNA 质量分析显示，在 2015 年采用自动化流程和改进 SOPs 后，DIN > 9，数值更高且更一致。相比之下，在实施任何改进之前分析的样本显示 gDNA 质量的差异更大（图 8）。TapeStation 和 DIN 质量指标表明，为改进工作流程而实施的流程更改确实减少了差异并获得了更高质量的 gDNA。

基因组 DNA 提取随时间的变化

Coriell 医学研究所（以下简称 Coriell）公认拥有最多多样化的细胞系、DNA 和其他可用于生物医学研究的生物材料。2016 年，Coriell 将传统的凝胶电泳替换为 TapeStation 系统和基因组 DNA ScreenTape 试剂^[18]。该研究所采用 DIN 评估了在 -80 °C 下长期储存 30 年之后的 gDNA，以确认其稳定性和质量一致性。DIN 显示 1990–2000 年间的 gDNA 提取一致且可靠（图 9）。所有样本均得出 DIN > 7，具有高质量。TapeStation 和 DIN 确认 gDNA 在 -80 °C 长期储存后确实保持了完整性，并证实已采用了理想的长期储存方法。

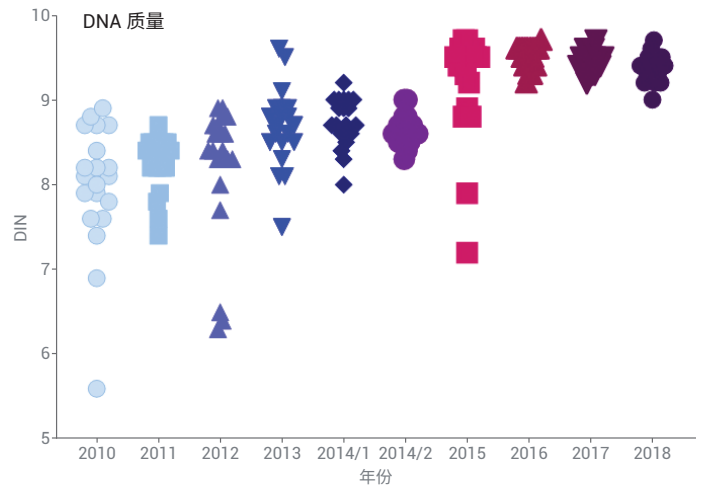


图 8. 9 年内样本质量的比较。每年使用 4150 TapeStation 系统和基因组 DNA ScreenTape 试剂对 20 个 gDNA 样本进行分析。2014 年，由于实验室器皿的变化，对两组样本进行了分析。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-0811ZHCN^[17]

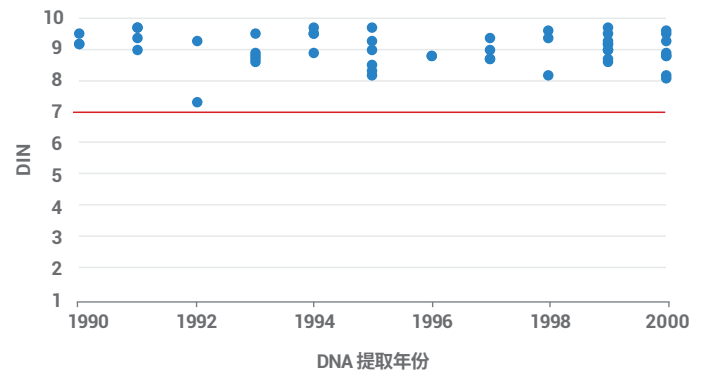


图 9. 使用 Agilent 4200 TapeStation 和基因组 DNA ScreenTape 试剂检测 1990–2000 年间提取的 50 个 gDNA 样本，并得到 DIN 数值。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-1362EN^[18]

基因组 DNA 混合

样本处理方法会极大地影响 gDNA 的分子量和质量。日常处理、混合和多次冻融很容易剪切 gDNA，因此正确处理 gDNA 对帮助保持样本的完整性非常重要。如果样本的处理方式过于剧烈，可能会导致样本降解。Femto Pulse 系统是对大分子量 gDNA 进行测定和质量分析的理想选择，其自动化脉冲场电泳方法取代了过夜脉冲场凝胶电泳 (PFGE)。Promega 通过数种不同的方法混合 gDNA：宽口径移液器吸头、窄口径移液器吸头、微孔板摇床和两种不同的涡旋仪，并在 Femto Pulse 系统上使用基因组 DNA 165 kb 试剂盒进行了分析^[9]。与使用移液器吸头进行更温和的手动混合相比，两个涡旋仪的剧烈摇动使 gDNA 样本大幅降解并降低了分子量 (图 10)。Femto Pulse 可帮助确定采用哪种提取方法可以保持 gDNA 的完整性和分子量。

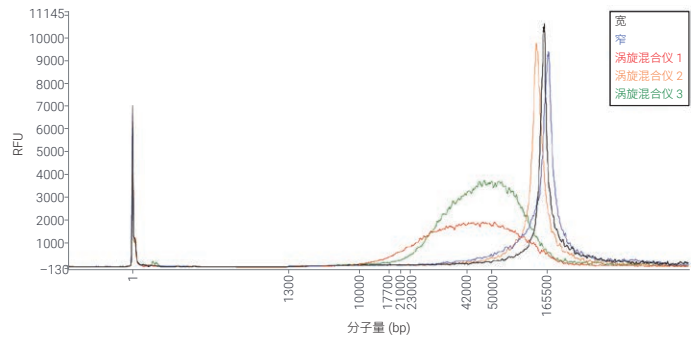


图 10. 在 Agilent Femto Pulse 系统上使用安捷伦基因组 DNA 165 kb 试剂盒分析混合对 gDNA 弥散条带分子量的影响。使用各种不同的混合技术将市售 Promega gDNA 样本与稀释液标准品，技术包括推荐使用的宽口径移液管 (黑色)、窄口径移液管 (蓝色)、接触式涡旋混合仪 1 (红色) 和两个微孔板摇床、涡旋混合仪 2 (橙色) 和涡旋混合仪 3 (绿色)。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-2723EN^[9]

运输和处理

生物样本在到达最终用户之前通常会经过多次运输。样本会从采集地点运往负责处理和提取的实验室，再到生物样本库进行储存，最后到达最终用户。Biobanque de Picardie 将 DIN 作为重要的 QC 工具，并用于监测实验室间运送时的 gDNA 完整性 (图 11)^[20]。

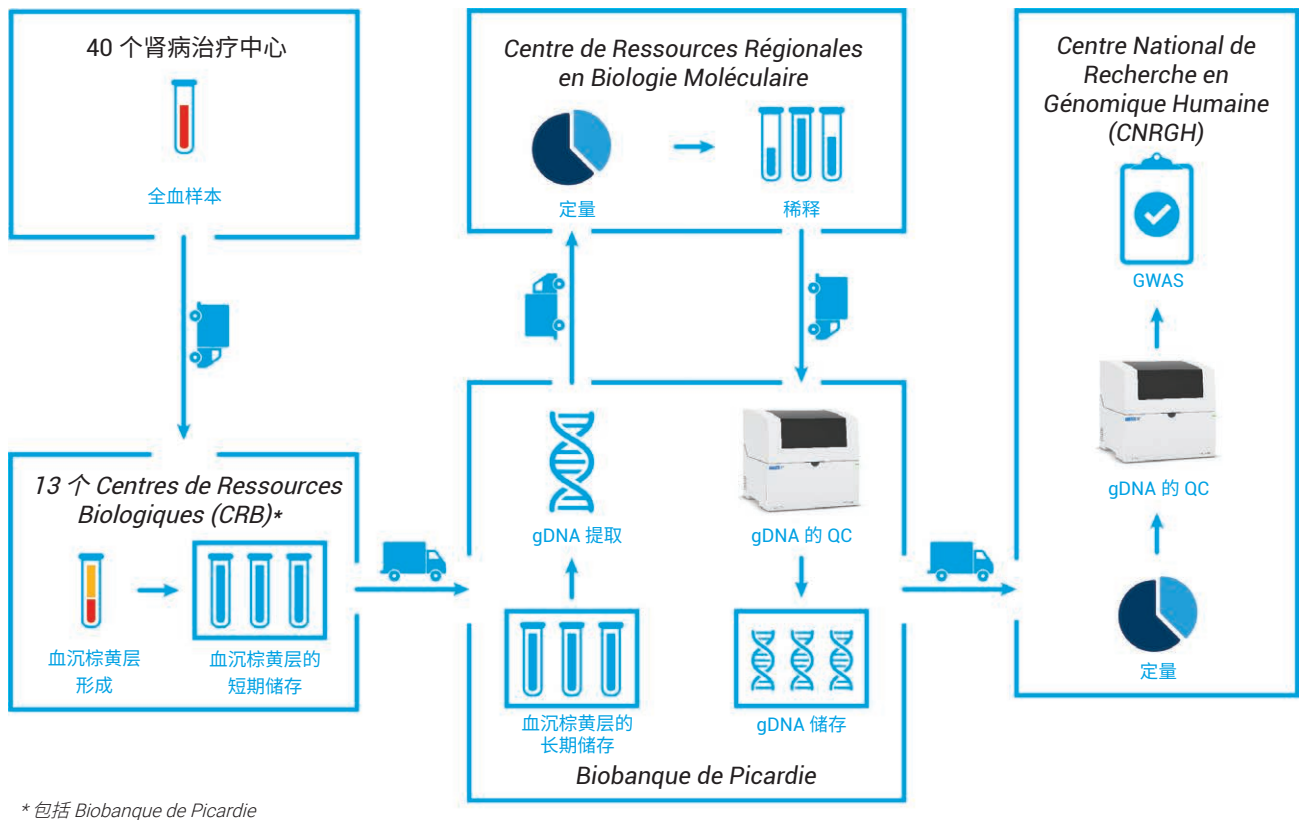


图 11. 慢性肾脏病-肾脏流行病学和信息网络 (CKD-REIN) 研究项目运输示意图。此图转载自安捷伦出版物，出版号 5994-3060EN^[20]

该附加 QC 步骤对于验证满足初始样本处理、储存安排和后续转移相关的各种质量要求是必要的。另一个实验室 Center National de Recherche en Génomique Humaine (CNRGH) 在 4200 TapeStation 系统上使用基因组 DNA ScreenTape 检测重新分析了 394 个样本的 gDNA 完整性 (图 12)。共有 32 个样本 (8.1%) 报告的 DIN 值相同, 94 个样本 (24%) 的差异范围为 0-0.2 (在 TapeStation 的标准偏差范围内^[21]), 197 个样本 (50%) 的 DIN 差异范围为 0.2-0.6。394 个样本中只有 10 个样本 (2.5%) 的 DIN 差异超过 1。DIN 差值的低平均值 (0.2) 表明在实验室之间成功进行了样本的运输和处理, 并没有影响 gDNA 的完整性。

停电后的质量确认

美国生物样本研究与开发中心 (CBRD) 负责运营纽约大学朗格尼医学中心的中央生物样本库, 是受 2012 年 10 月飓风桑迪停电影响的众多实验室之一^[22]。大多数样本冷冻保存在 -80°C 的冰箱中。由于断电该中心无法追踪冰箱中升高的温度, 也无法确定样本是否暴露室温下导致降解。为了确定停电和温度变化对这些冷冻组织样本质量的影响, 该中心使用了片段分析系统和 GQN 质量指标对飓风发生前后采集的核酸样本进行了分析。DNA 样本报告断电前后样本的 GQN 为 8.0 (图 13)。使用 RQN 评估了飓风前后样本的 RNA, 其范围为 8.1-8.3, rRNA 的 28Ss/18S 比率为 1.83-1.87。如果 GQN 或 RQN 大于 7 可视为 DNA 和 RNA 质量足以用于下游应用。片段分析仪系统证实, 在停电期间, 应急液氮和干冰能够保持核酸样本质量。

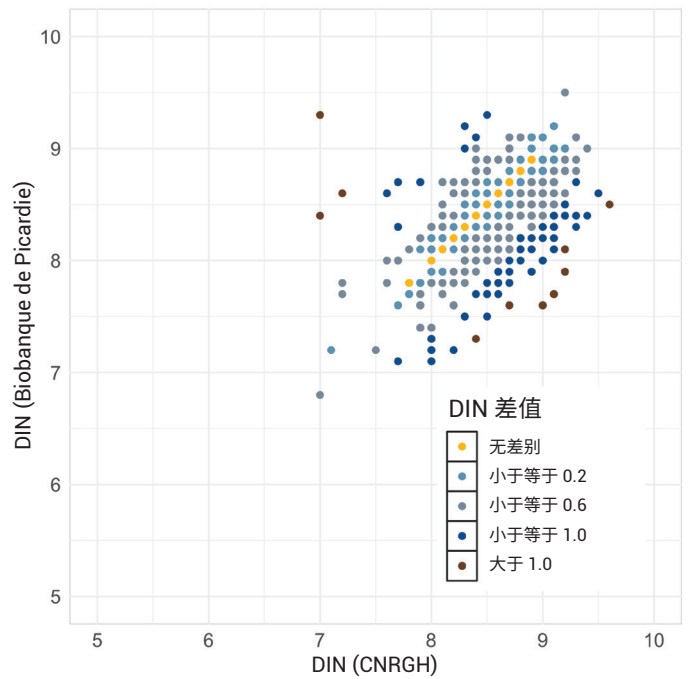


图 12. Biobanque de Picardie 与 CNRGH 之间运输前后 DIN 值的比较此图转载自安捷伦出版物, 出版号 5994-3060EN^[20]

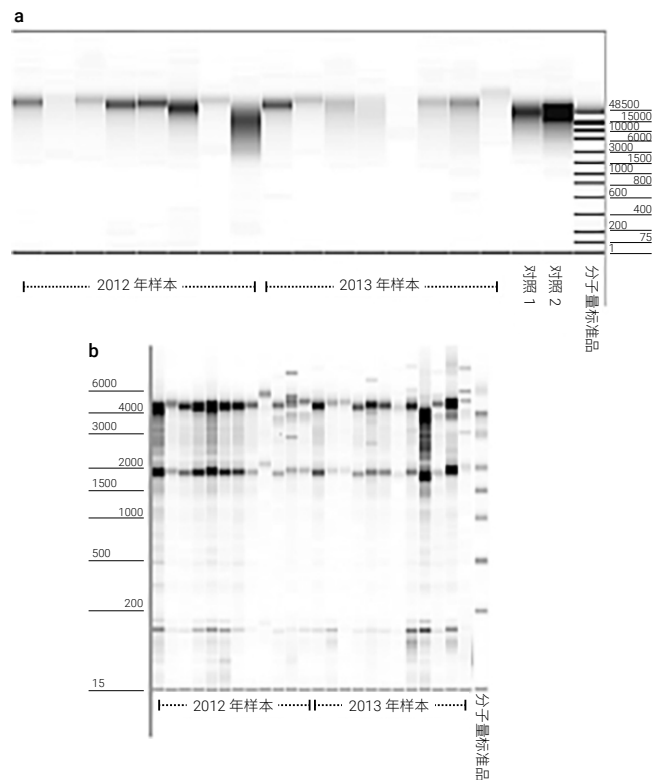


图 13. (a) 从 2012 年和 2013 年选取样本中提取的 DNA 的毛细管电泳结果, 与已知核苷酸长度的分子量标准品和两个已知高保真度的对照 DNA 样本进行比较。(b) 从 2012 年和 2013 年选取样本中提取的 RNA 的毛细管电泳结果, 与已知核苷酸长度的分子量标准品进行比较。约 4 kb 和 2 kb 处条带分别标记了核糖体 RNA 的 28S 和 18S 亚基。此图转载自 Mendoza 等人^[22] 并经过修改。该版权资料为 Mary Ann Liebert, Inc 所有

石蜡包埋组织和固定防腐剂的储存温度

存储在生物样本库中的许多样本为石蜡包埋组织 (PET)。这些样本对生物医学研究和生物标志物开发很重要。自 19 世纪后期以来，福尔马林固定此类组织已成为标准保存方法。虽然福尔马林固定可以很好地保存组织形态，但会导致核酸和蛋白质的交联和化学修饰。这些化学修饰会影响 RNA、RT-qPCR 和微阵列基因表达分析的 cDNA 合成结果。因此，人们正在不断研究与组织兼容性更好的固定防腐剂。长期储存此类组织也会影响从中提取的 RNA 和 DNA。一项比较研究评估了不同温度下福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 和 PAXgene 组织固定 (福尔马林替代品) 石蜡包埋 (PFPE) 组织的核酸稳定性和在 PCR 中的可用性^[23]。从 22 °C 室温、4 °C 和 -20 °C 下储存 9 年的大

鼠 FFPE 和 PFPE 组织中分离 DNA，并在 TapeStation 上使用基因组 DNA ScreenTape 检测评估了 DNA 完整性 (图 14)。对于 22 °C 下储存的组织中的 DNA，其在 0.3–1.5 kb 的较小分子量范围内的弥散条带显示出现了高度降解。DNA 质量在 4 °C 和 -20 °C 下得到改善，分子量增加，碎片减少。总体而言，用 PFPE 保存并储存在 -20 °C 的组织能产生分子量最高、片段化最少的 DNA。还观察到 FFPE 和 PFPE 组织分离 DNA 的 qPCR 性能受到储存温度影响。与室温相比，在较低温度下储存的 DNA 的总体扩增效率更高。由于福尔马林化学修饰的负面影响，PFPE DNA 的性能优于 FFPE DNA。

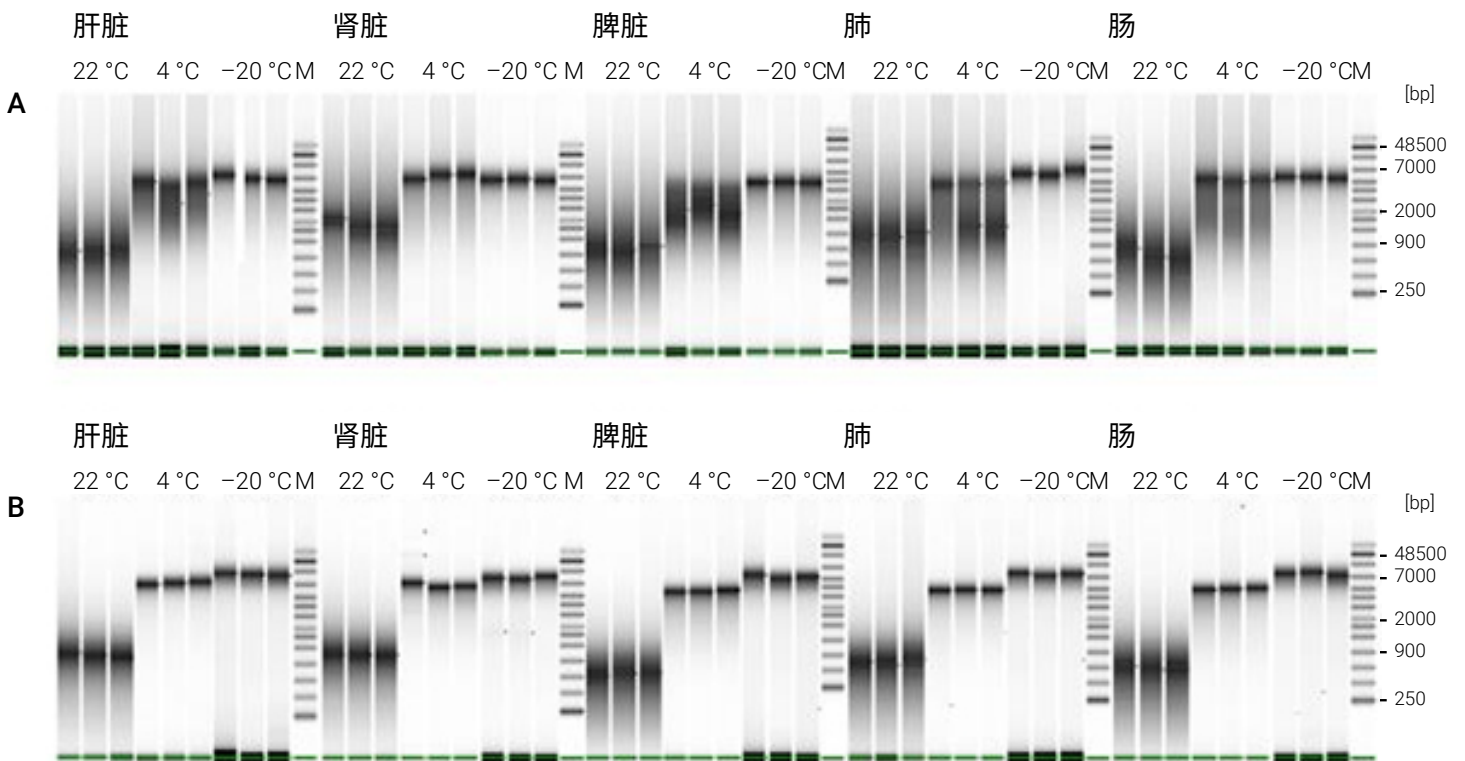


图 14. PET 组织块在较低温度下储存 9 年可防止 DNA 降解。在 Agilent 4200 TapeStation 系统上使用基因组 DNA 分析 ScreenTape 检测分析大鼠肝、肾、脾、肺和肠的 PFPE (A) 和福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) (B) 组织的 DNA 完整性。PET 组织块在 DNA 提取之前在 22 °C、4 °C 和 -20 °C 下储存 108 个月。并从 3 张 10 μm 切片中提取 DNA。此图转载自 Groelz 等人，并经过修改。本文章可免费获取，根据[知识共享署名许可条款](#)分发

另外从储存在 22 °C (室温)、4 °C、-20 °C 和 -80 °C 的 FFPE 和 PFPE 组织中提取 RNA，并使用生物分析仪系统和 RIN 质量指标进行了分析^[23] (图 15)。在室温下储存组织会在储存开始后会直接导致 RNA 降解，RIN 评分为 2-3。当组织块在 4 °C 下储存时，RIN 高于 6 达 24 个月，RNA 降解减慢。冷冻 FFPE 和 PFPE 组织块可防止 RNA 降解，使 RIN 保持在 7 以上 108 个月。RT-qPCR 的下游应用显示，在 4 °C 及以下储存的 PFPE 组织使结果得到改善。TapeStation 和生物分析仪系统可帮助生物样本库确定石蜡固定组织的最佳储存温度，以便为未来的研究提供高质量的样本。

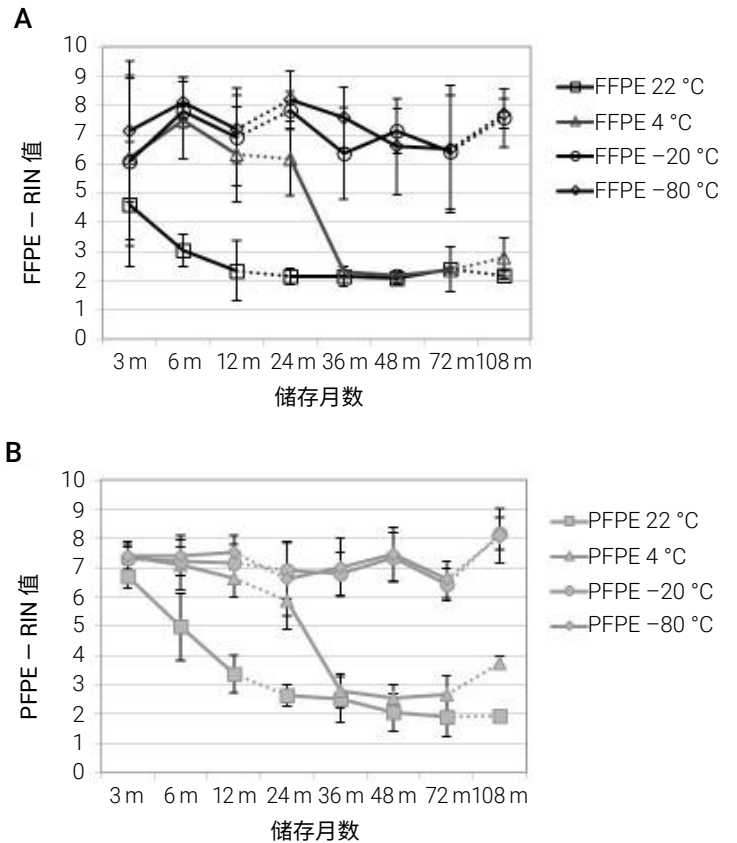


图 15. 大鼠 PET 组织块的 RNA 完整性降低程度受储存温度影响。根据五种不同组织类型 (肝、肾、脾、肺和肠) 和四种不同温度 (22 °C、4 °C、-20 °C 和 -80 °C) 的每种组合储存 3 块 FFPE 和 PFPE 大鼠组织。在储存 3、6、12 个月从组织块 1 中提取 RNA，在 24、36、48、72 个月从组织块 2 中提取，在 108 个月从组织块 3 中提取。对每种固定方法、储存时间点和温度，显示 5 种不同类型的 FFPE (A) 和 PFPE (B) 组织 3 次提取的平均 RNA 完整值 (RIN) (带标准偏差) (总 RIN 值 n = 942)。虚线表示组织块变化。此图转载自 Groelz 等人，并经过修改^[23]。本文章可免费获取，根据[知识共享署名许可条款](#)分发

低温长期储存

Ontario Tumour Bank (OTB) 自 2014 年以来一直在收集用于癌症研究的样本。在 OTB 一贯坚持的质量工作中，其加入了卢森堡生物样本能力测试计划 (Luxembourg Biospecimen Proficiency Testing Program) 的综合生物样本库。为确保在低温条件下长时间储存高质量样本，该机构每年对随机选择的冷冻样本的 RNA 和 DNA 完整性进行评估^[24]。从低温冷冻样本中提取 RNA，在生物分析仪上使用 RNA 6000 Nano 试剂盒进行分析，并指定 RIN (图 16)。作者指出，“安捷伦生物分析仪产生的 RIN 值普遍认可为总 RNA 质量和完整性的标准化指标。”大量的内源性和外源性 RNA 酶使 RNA 比 DNA 更容易降解。由于 RNA 稳定性低于 DNA，因此 RNA 质量是公认的衡量组织“质量”的标准。大多数样本的 RIN > 6.5，质量可接受。生物分析仪和质量指标 RIN 有助于确定组织的长期低温储存不影响 RNA 的质量，且仍然是组织样本长期储存的可行选择。

结论

生物样本库正在不断发展，储存来自多个来源的样本。ISO 和 ISBER 推出了生物样本库和储备库的标准化流程建议。本应用简报中通过示例展示了 TapeStation、Femto Pulse、生物分析仪和片段分析仪系统提供的质量指标如何帮助确定样本适用性以及是否遵循最佳实践。质量指标为确定核酸提取、处理和运输过程中样本的完整性提供了一种非常实用客观的测量方法。质量控制提供了测量任何给定样本完整性的一致可靠方法，为生物样本库及其客户保证了存储样本质量的可靠性。

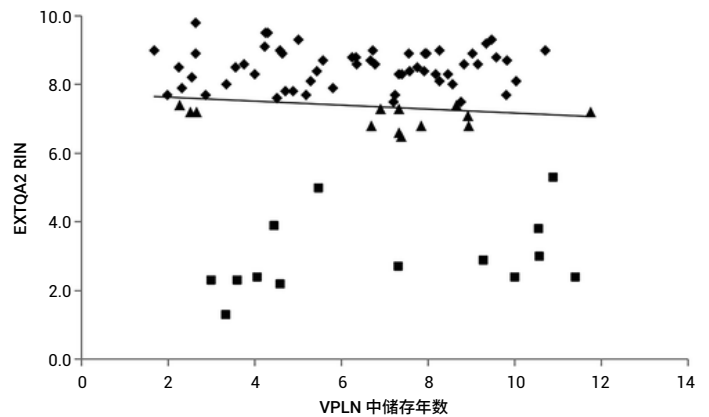


图 16. EXTQA2 RIN 与气相液氮 (VPLN) 中储存年数的函数。菱形代表质量好至优良的样本 (RIN > 7.5); 三角形代表质量可接受的样本 (6.5 < RIN < 7.5); 方形代表降解的质量不佳样本 (RIN < 6.5)。最佳拟合线的方程为 $y = -0.0577x + 7.7424$ 。相关性没有统计学意义 ($r = 0.0514$, $p = 0.6346$)。EXTQA2 = 外部质量保证 2; RIN = RNA 完整值; VPLN = 气相液氮。此图转载自 Kelly 等人，并经过修改^[24]。该版权资料为 Mary Ann Liebert, Inc 所有

附录

设备维护、维修和更换

根据 ISBER 最佳实践第 C12 节。对于设备维护、维修和更换，“应建立储存设备、配套系统和设施的预防性维护和维修制度。系统维护应按照制造商的建议定期、既定的时间间隔进行，并根据样本库的规范确定其使用性。”根据制造商的规格对设备进行例行评估和修改，可使样本库中使用的仪器保持最佳状态。在 C12.2 节设备功能验证中有如下补充，“所有设备和相关软件的正确性能应在使用之前或影响仪器操作性能的维修之后进行验证或确认。测试文件应保留并可用于审计。”ISO 第 6.5 节也规定了在安装、维护、记录、支持和更换时进行设备验证的指南。

安捷伦 IQ/OQ 服务和维护

安捷伦法规认证解决方案为核酸的质量控制提供了可靠的集成工具。法规认证解决方案包括 4150 和 4200 TapeStation、Femto Pulse、片段分析仪和 2100 生物分析仪仪器、软件、服务以及特定应用消耗品。认证的工程师可确保仪器和软件安装正确，记录运输、操作环境和系统部件的完整性。还可为仪器和软件提供了可用于审计的文档。执行 OQ 验证并记录系统满足指定性能标准的能力，从而确保系统在指定环境中安装后的基本准确性。OQ 应由认证的工程师进行，以验证硬件和软件的功能，从而确保系统的使用资格。

信息管理系统

ISBER 最佳实践第 1 节涵盖了样本库信息管理系统的必要性。“应建立有效的追踪系统，以确保可以在样本库准确跟踪样本从采集实验室起始的整个生命周期。追踪系统的关键组成部分包括使用唯一的样本标识符、适当的样本标签、用于样本跟踪的电子数据库存系统、同意书和/或许可证追踪。”ISO 第 7.10 节同样规定生物样本库应具备实施、修改和使用计算机系统软件、硬件和数据库的程序。

TapeStation^[26]、Femto Pulse 片段分析仪和生物分析仪系统的软件包可集成到实验室信息管理系统 (LIMS) 中。安捷伦提供名为 SLIMS 的信息管理系统^[25]，将实验室信息管理系统 (LIMS) 和电子实验室记录本 (ELN) 整合到一个系统，提供全面的工作流程管理。SLIMS 有实现数据采集和记录保存，提高合规性并简化流程。该系统设计符合 ISO17025、21 CFR Part 11、HIPAA 和 CLIA 法规/标准要求。SLIMS 可与冷冻系统、仪器和 EMR 系统集成，提升样本库管理。SLIMS 的功能不限于管理样本位置，还可帮助用户查看特定样本在储存前是否经过正确处理、处理人员以及冷冻温度随时间的变化，实现符合法规要求的材料可靠追溯功能。

参考文献

1. International Standard ISO 20387 Biotechnology – Biobanking – General requirements for biobanking. First Ed. **2018-08**
2. ISBER Best Practices: Recommendations for Repositories Fourth Ed. **2018**
3. Quality Control in Illumina Sequencing Workflow Using the TapeStation System (使用 TapeStation 系统的 Illumina 测序工作流程中的质量控制), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0327EN, **2018**
4. Use of the Agilent 4200 TapeStation for Quality Control in the Whole Exome Sequencing Workflow at the German Cancer Research Center (DKFZ) (在德国癌症研究中心 (DKFZ) 的全外显子组测序工作流程中, 使用 Agilent 4200 TapeStation 系统进行样本质量控制), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-7615EN, **2016**
5. High Throughput Genomic DNA Assessment by the Agilent 4200 TapeStation (采用 Agilent 4200 TapeStation 系统进行高通量基因组 DNA 评估), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-6629EN, **2016**
6. 使用 Agilent Femto Pulse 系统对用于生物样本库样本的基因组 DNA 进行质量评估, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0520CHCN, **2019**
7. RNA 完整值 (RIN) — RNA 质量控制标准化, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5989-1165ZHCN, **2016**
8. Quality Metrics for Nucleic Acids with the Agilent Fragment Analyzer and Femto Pulse Systems (使用安捷伦片段分析仪和 Femto Pulse 系统测定核酸的质量指标), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0521EN, **2019**
9. Performance Characteristics of the RNA and the High Sensitivity RNA ScreenTape Assays for the 4150 TapeStation system (Agilent 4150 TapeStation 系统的 RNA 和高灵敏度 RNA ScreenTape 检测的性能特征), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5994-1038EN, **2019**
10. Comparison of RIN and RQN for the 2100 Bioanalyzer and the 5200 Fragment Analyzer Systems (比较 2100 生物分析仪和 5200 片段分析仪系统的 RIN 和 RQN), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5994-1860EN, **2020**
11. Simplified DV₂₀₀ Evaluation with the 2100 Bioanalyzer System (利用 Agilent 2100 生物分析仪系统简化 DV₂₀₀ 评估), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5991-8287EN, **2017**
12. DV₂₀₀ Evaluation with RNA ScreenTape Assays (采用 RNA ScreenTape 检测进行 DV₂₀₀ 评估), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-8355EN, **2017**
13. Evaluating RNA Quality from FFPE Samples. Guidelines for Obtaining High-Quality RNA Sequencing Results from Degraded RNA with Illumina RNA Enrichment Assays. Illumina technical note, publication number 470-2014-001, **2016**.
14. Performance Characteristics of the Cell-free DNA ScreenTape Assay (游离 DNA ScreenTape 检测的性能特征), 安捷伦科技公司技术概述, 出版号 5994-1390EN, **2019**
15. 采用 Agilent Femto Pulse 系统对不同基因组 DNA 提取进行质量评估, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-0754ZHCN, **2019**

16. Mathieson, W.; Guljar, N.; Sanchez, I.; Sroya, M.; Thomas, G.A.; Extracting DNA from FFPE Tissue Biospecimens Using User-Friendly Automated Technology: Is there an Impact on Yield or Quality? *Biopreservation and Biobanking*. **2018**, 16, 3, 191–200.
17. 海德堡心脏生物样本库 DNA 样本的回顾性质量分析，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-0811ZHNCN，**2019**
18. Monitoring Long-Term DNA Storage in the Biorepositories at Coriell Institute (监测长期储存在 Coriell 研究所生物样本库中的 DNA)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-1362EN，**2019**
19. Genomic DNA Handling and the Femto Pulse System (基因组 DNA 处理与 Femto Pulse 系统)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-2723EN，**2020**
20. Quality Control of Genomic DNA for the French Kidney Disease Study by the Biobanque de Picardie (Biobanque de Picardie 对法国肾脏疾病研究中的基因组 DNA 进行质量控制)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-3060EN，**2021**
21. Performance Characteristics of the Genomic DNA ScreenTape Assay for the 4150 TapeStation System (4150 TapeStation 系统的基因组 DNA ScreenTape 检测的性能特征)，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5995-0497EN，**2019**
22. Mendoza, S.; Osman, I.; Ogilvie, J.; Patel, K.; Moreira, A. L.; Quality Assurance After a Natural Disaster: Lessons from Hurricane Sandy. *Biopreservation and Biobanking*. **2018**, 16(2), 92–96
23. Groelz, D.; Viertler, C.; Pabst, D.; Dettmann, N.; Zatloukal, K.; Impact of Storage Conditions on the Quality of Nucleic Acids in Paraffin Embedded Tissues. *PLOS ONE*. **2018**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203608>
24. Kelly, R.; Albert, M.A.; de Ladurantaye, M.; Moore, M.; Dokun, O.; Bartlett, J.M.S.; RNA and DNA Integrity Remain Stable in Frozen Tissue After Long-Term Storage at Cryogenic Temperatures: A Report from the Ontario Tumour Bank. *Biopreservation and Biobanking*. **2019**, 17, 4, 282-287
25. 安捷伦 SLIMS，安捷伦科技公司产品样本，出版号 5994-1578ZHNCN，**2020** <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/brochure-slims-5994-1578zh-cn-agilent.pdf>
26. Agilent 4200 TapeStation 系统的 LIMS 集成，安捷伦科技公司技术概述，出版号 5991-7984ZHNCN，**2017**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis

仅限科研使用。不用于临床诊断用途。
PR7000-7867

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021年6月1日，中国出版
5991-3143ZHCN

