

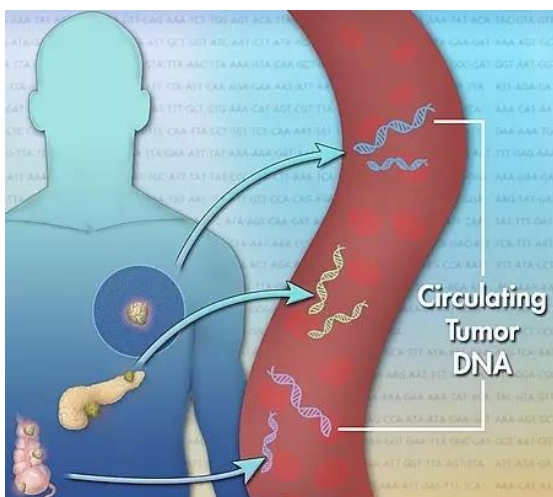
Acegen MethylDesign™ 定制化甲基化 Panel 捕获系统

—— 定制化 DNA 甲基化靶向检测方案！

—— Acegen Human Methylome Panel

cfDNA 甲基化测序是液体活检中最有前景的技术途径之一。研发团队基于高效的微量 DNA 建库技术和靶向甲基化液相捕获测序技术，在国内率先推出定制化 DNA 甲基化靶向检测方案——Acegen MethylDesign™ 定制化甲基化 Panel 液相捕获系统。该系统针对微量 DNA 及 cfDNA 样本进行先转化后正负链同时捕获的技术策略，最大限度地提高检测效率和准确性，实现低至 10ng 起始量的靶向甲基化检测。

基于 Acegen MethylDesign™ 甲基化捕获系统，我们推出了一个 Acegen Human MethylomeV1.0 大 Panel，覆盖 3.4M 个 CpG 位点，全面覆盖了 850K 甲基化芯片位点(94% 以上)及 UCSC, Ensembl, ENCODE 等数据库关注的重要甲基化位点和基因组元件，例如启动子, CG 岛, 增强子等。作为 cfDNA 甲基化研究方案，用于癌症早筛、MRD 检测及复发检测等应用场景。



技术优势

灵活定制化 DNA 甲基化靶向检测方案;

低至 10ng 的样本输入量要求;

覆盖超 3.4M 个 CpG 位点和 94% 的 850K 位点;

更高的测序深度，更高检测准确性;

高性价比 cfDNA 甲基化检测方案。

核心技术产品，用心服务每一个项目

专注表观组学 10 年，提供 DNA 甲基化完整解决方案;

国内首家提供 cfDNA 甲基化的完整解决方案;

已经完成 3000+例样本 cfDNA 甲基化项目经验;
 解决从血液采集保存、cfDNA 核酸提取(>90%得率),
 到 Human_MethylomeV1.0 大 Panel 检测 cfDNA 甲基化,
 再到 cfDNA 甲基化定制化 Panel 一整套甲基化核心技术方案;
 全方位助力 cfDNA 甲基化 biomarker 筛选及转化应用。

样本类型和要求

样本类型	样本要求
血浆/血清/cfDNA	建议 1-4ml 血浆/血清, 或者>15-40ng cfDNA (基于 Qubit)
基因组 DNA	总量≥ 1ug; 浓度≥ 20ng/ul; 基于 Qubit 定量
备注: 用封口膜密封样品; 干冰运输	

数据信息分析

Human_Methylome	分析内容	备注
标准分析	1、测序数据质量评估	过滤掉低质量数据, 保证数据质量
	2、与参考基因组比对	比对率和覆盖度分析
	3、甲基化位点 Calling	评估胞嘧啶甲基化状态
	4、甲基化分布图谱分析	甲基化在基因组、功能元件上的分布
	5、组间差异甲基化 DMR 分析	寻找 DMR 及注释
	6、差异甲基化基因 DMG 分析	DMG 富集分析 GO, KEGG
	7、多样本聚类分析	PCA 分析多样本甲基化变化规律
高级分析	8、多组学整合关联分析	例如与临床信息关联分析
	9、其它定制化分析	结合课题背景亮点挖掘

常见问题

Q1: Acegen MethylDesign™ 甲基化 Panel 定制化的注意事项?

1) Panel 设计: 只需要提供目标区域或者 CpG 位点信息, 即可进行定制化 Panel 设计。对于特定区域/CpG 位点, 会同时捕获正负链上的 DNA, 同时考虑甲基化和非甲基化两种状态, 分别设计探针覆盖。

2) 文库制备: MethylDesign™ 甲基化 Panel 测序主要包括 2 个环节: 全基因组亚硫酸盐测序文库制备和捕获建库制备。

3) 样本类型: 适合任何样本类型, 包括新鲜冷冻组织、血液基因组、石蜡切片 FFPE 及血浆/血清 cfDNA 等。

Q2: 为什么 Acegen Human Methylome 是高性价比 cfDNA 甲基化方案!

临床样本异质性较高, 课题设计需要较多的样本, 少则几十, 多则几百上千例; 全基因组亚硫酸盐测序 **WGBS** 成本最高、测序深度偏低, 检测准确性低等劣势, 用于 cfDNA 甲基化 biomarker 筛选及转化应用具有非常不现实的成本因素。Acegen Human Methylome 以相对较低的测序数据 (每个样本测 75M reads, PE100 测序), 覆盖 3.4M 个 CpG 位点, 全面覆盖了 850K 甲基化芯片位点 (94%以上) 及 UCSC, Ensembl, ENCODE 等数据库关注的重要甲基化位点和基因组元件, 例如启动子, CG 岛, 增强子等; 有效测序深度 (大于 100X) 高于 **WGBS** (~15X), 因此具有更为准确的甲基化检测准确性。

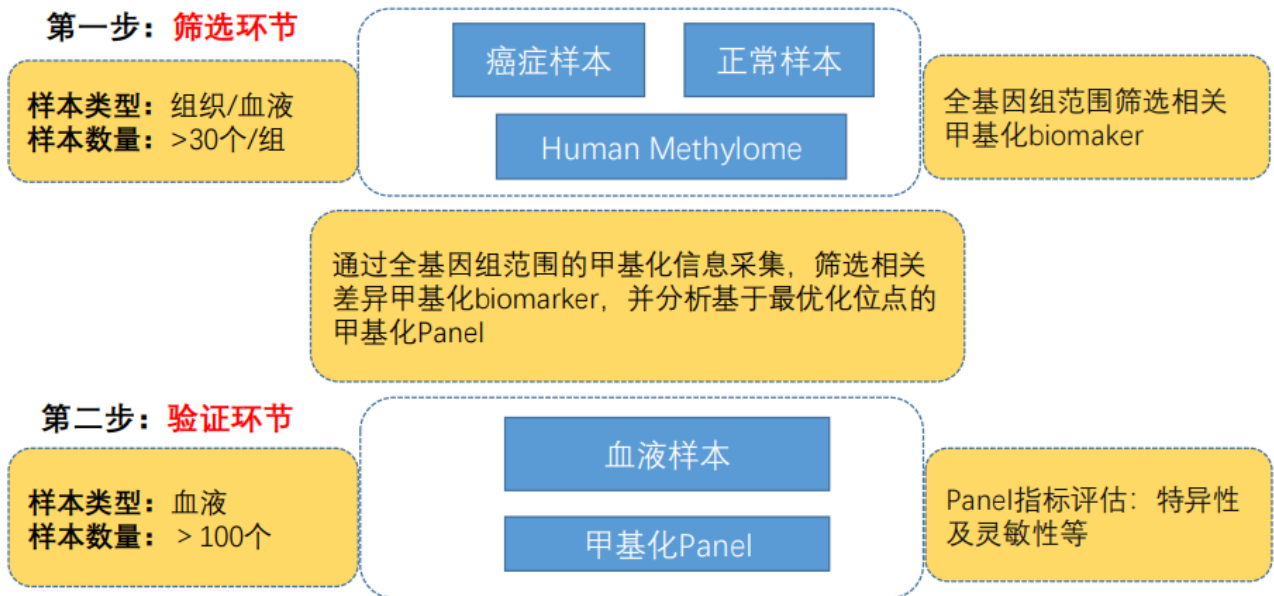
WGBS 和 Acegen Human Methylome 比较如下:

技术参数		WGBS	Human MethylomeV1.0
检测原理	检测原理	亚硫酸盐测序	液相捕获亚硫酸盐测序
	技术定位	全面的	高性价比的
样本要求	样本需求	1-4ml 血浆	1-4ml 血浆
检测覆盖	CG位点覆盖	28M	>3.4M
	区域元件覆盖	全基因组范围	CpG岛、启动子等; 850K位点
检测准确性	测序深度	~ 15X	> 100X
	检测准确性	较低	很高
周期费用	实验费用	~10K	~4K
	项目周期	45天	30天

Q3: 针对 cfDNA 甲基化 biomarker 开发，如何进行筛选和验证？

针对基于 cfDNA 甲基化 biomarker 开发的项目，一般技术方案是：中小样本筛选 + 大样本验证的技术路线：**1、筛选环节**：采用 Acegen Human Methylome（首选）或者 WGBS（次选）进行血浆游离 DNA 全基因组甲基化谱检测，筛选潜在的 cfDNA 甲基化 biomarker；**2、验证环节**：选择差异大的甲基化 biomarker，形成一个定制化的甲基化 Panel（通常几十到几百个 biomarker），在独立样本群里进行甲基化 biomarker 的验证及评估，以便开发出便于临床转化的检测产品。

cfDNA 甲基化 biomarker 开发技术方案



备注：1、筛选环节：建议 30 样本以上/分组，检测样本越多，筛选的潜在的 biomarker 越准确；2、验证环节：验证样本数大于筛选环节的样本数，建议 100 样本以上/分组，验证样本越多，甲基化 Panel 指标评估准确。

Q4: 血浆/血清 cfDNA 样本准备有哪些注意事项?

抽血离体之后 ctDNA 会继续降解、含量逐步减少；而来自白血细胞的 cfDNA 持续进入血浆，进而稀释 ctDNA 浓度，降低检测信号。因此，在采血、血浆分离及保存运输，每一步操作都会影响数据的质量。

第一步：抽血及暂存注意事项	
EDTA 抗凝管	在 2-8 度冰箱暂放；在 8 小时内低温离心分离血浆
Streck 等采血管	在 2-8 度冰箱或者常温暂放；在 48 小时内离心分离血浆
注意：全血样本在分离出血浆之前，千万不要冷冻保存	
第二步：血浆分离	
采取两轮离心分离血浆，4℃条件下以 1600g 离心 10min， 4℃条件下以 16000g 离心 10min； 要求 EDTA 抗凝管采血管需要低温条件离心； Streck 等采血管建议低温离心，也可以常温离心，不受到影响。	
第三步：保存及运输	
分离的血浆存放于-80℃冰箱保存(3年内都可以); 使用干冰运输。	
第四步：cfDNA 提取产量	
cfDNA 的含量存在较大的波动及异质性； 一般正常人及肿瘤早期, 5-15ng/ml 血浆； 肿瘤晚期或者化疗等病人, cfDNA 浓度显著提高。	



采血管

建议使用 **Streck** 等采血管
合作项目，免费提供采血管！

案例分析 1: GRAIL 基于 cfDNA 甲基化泛癌早检和组织溯源

Sensitive and specific multi-cancer detection and localization using methylation signatures in cell-free DNA. *Ann Oncol.* 2020 Jun;31(6):745-759.

研究方案: 早期癌症检测可以在预后更好、治疗不那么病态的时候发现肿瘤。本项目通过前瞻性病例-对照子研究评估了 cfDNA 靶向甲基化分析的性能，以评估在高特异性检测和定位各个阶段的多种癌症类型。6689 名参与者[2482 名癌症患者 (>50 种癌症类型)，4207 名非癌症患者]被分为训练组和验证组。血浆 cfDNA 经过亚硫酸氢盐测序，靶向超过 10 万个甲基化区域，用于开发并验证癌症检测和起源组织 (TOO) 定位的分类器。

研究结果: 检测技术性能在训练集和验证集中表现一致。在验证中，特异性为 99.3% [95% 置信区间(CI): 98.3%至 99.8%; 0.7%假阳性率(FPR)]。在预先设定的 12 种癌症类型 (肛门、膀胱、结肠/直肠、食管、头颈部、肝/胆管、肺、淋巴瘤、卵巢、胰腺、浆细胞肿瘤、胃) 中，I-III 期敏感性为 67.3% (CI:60.7%至 73.3%)，占美国每年癌症死亡的 63%，在所有癌症类型中为 43.9% (CI:39.4%至 48.5%)。检测灵敏性随分期的增加而增加：在预先指定的癌症类型中，I 期的敏感性为 39% (CI:27%至 52%)，II 期的敏感性为 69% (CI:56%至 80%)，III 期的敏感性为 83% (CI:75%至 90%)，IV 期的敏感性为 92% (CI:86%至 96%)。在所有癌症类型中，I 期的敏感性为 18% (CI:13%至 25%)，II 期的敏感性为 43% (CI:35%至 51%)，III 期的敏感性为 81% (CI:73%至 87%)，IV 期为 93% (CI:87%至 96%)。在 96% 的癌样中能检出组织溯源 TOO 信号，TOO 定位准确率为 93%。

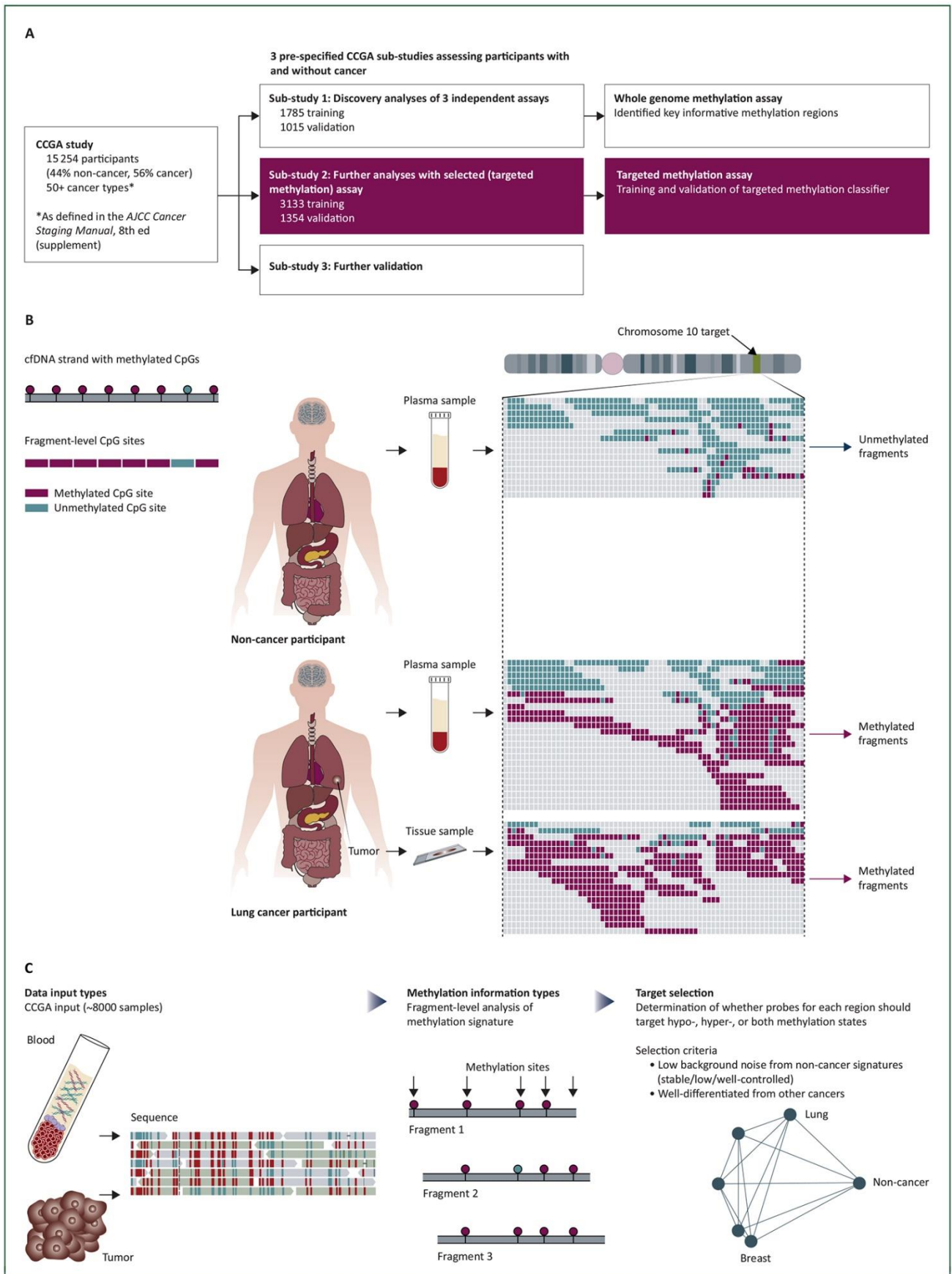


图 1. CCGA 研究课题：基于 cfDNA 的多种癌症检测方法的开发和验证

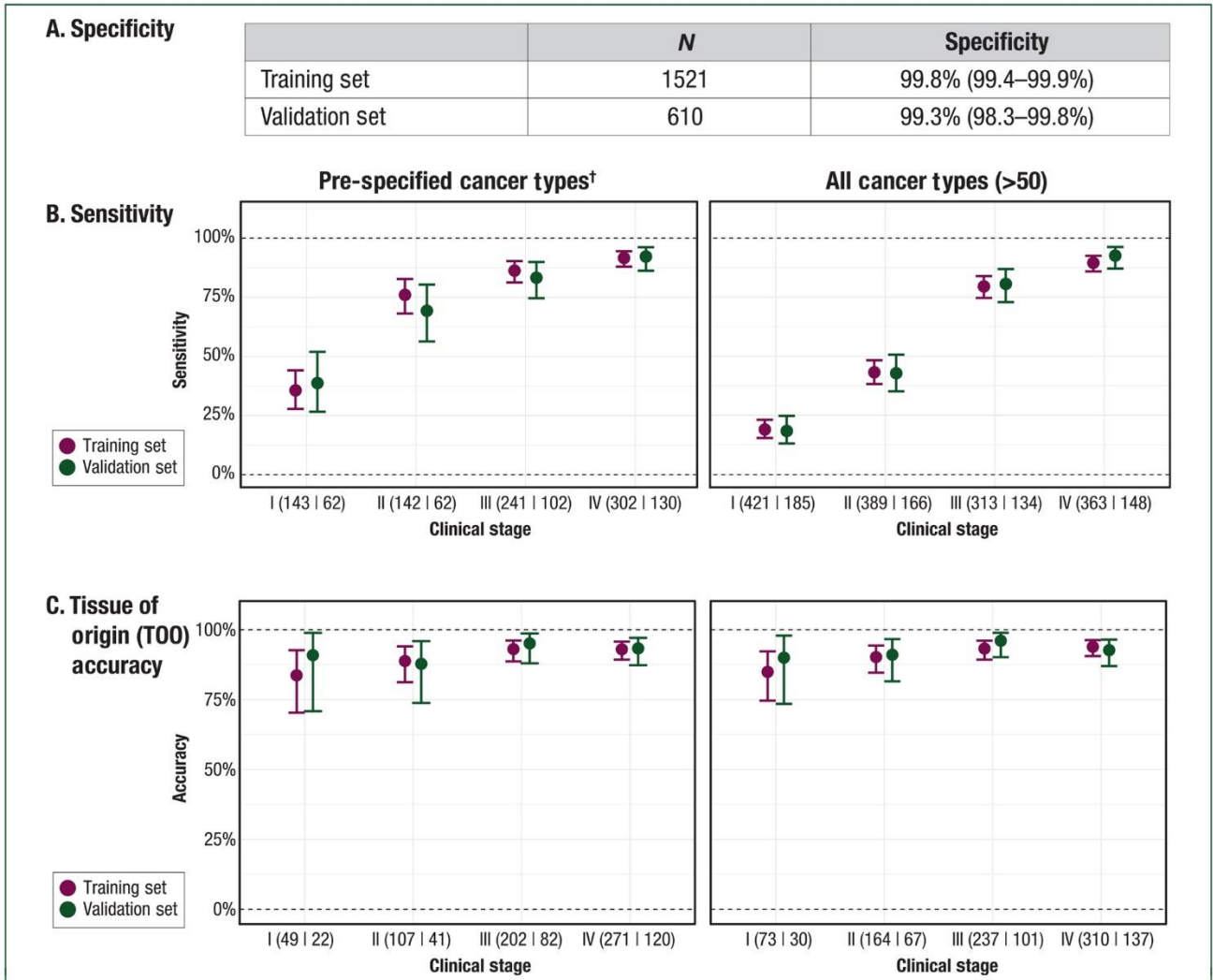


图 2. 靶向甲基化 cfDNA 检测性能

案例分析 2: 血浆 cfDNA 靶向甲基化测序用于癌症检测和分类

Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification. *Ann Oncol.* 2018 Jun 1;29(6):1445-1453.

研究方案: 血浆无细胞 DNA (cfDNA) 的靶向甲基化测序有可能将液体活组织检查扩展到未检测到致癌改变的肿瘤患者, 这可能有助于早期诊断。本课题根据 TCGA 癌症基因组图谱数据库, 开发了一种针对 9223 个持续高甲基化的 CpG 位点的全面甲基化测序分析。接下来使用 78 例晚期结直肠癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、乳腺癌或黑色素瘤患者的血浆 cfDNA 样本对该方法进行了临床验证, 并将结果与患者的结果进行了比较。

研究结果: 在接受治疗的患者血浆 cfDNA 样本的甲基化中位数得分低于未接受治疗的患者 (4.74 分 Vs. 85.29 分; $P=0.001$)。在 68 份停止治疗患者的血浆样本中, 甲基化评分检测到 57 份 (83.8%) 存在癌症, 其中 45 份 (78.9%) 基于甲基化的特征准确地对潜在癌症类型进行了分类。甲基化评分在检测结直肠癌 (96.3%) 方面最准确, 其次是乳腺癌 (91.7%)、黑色素瘤 (81.8%) 和非小细胞肺癌 (61.1%), 在分类结直肠癌潜在癌症类型方面最准确 (88.5%), 其次是非小细胞肺癌 (81.8%)、乳腺癌 (72.7%) 和黑色素瘤 (55.6%)。低甲基化评分与高甲基化评分与更长的生存期 (10.4 个月与 4.4 个月, $P<0.001$) 和更长的治疗失败时间 (2.8 个月与 1.6 个月, $P=0.016$) 相关。

结论: 对常见晚期癌症患者血浆 cfDNA 中 9223 个 CpG 位点进行全面的靶向甲基化测序, 可以高精度地检测癌症的存在和潜在的癌症类型, 血浆 cfDNA 甲基化评分与治疗结果一致。

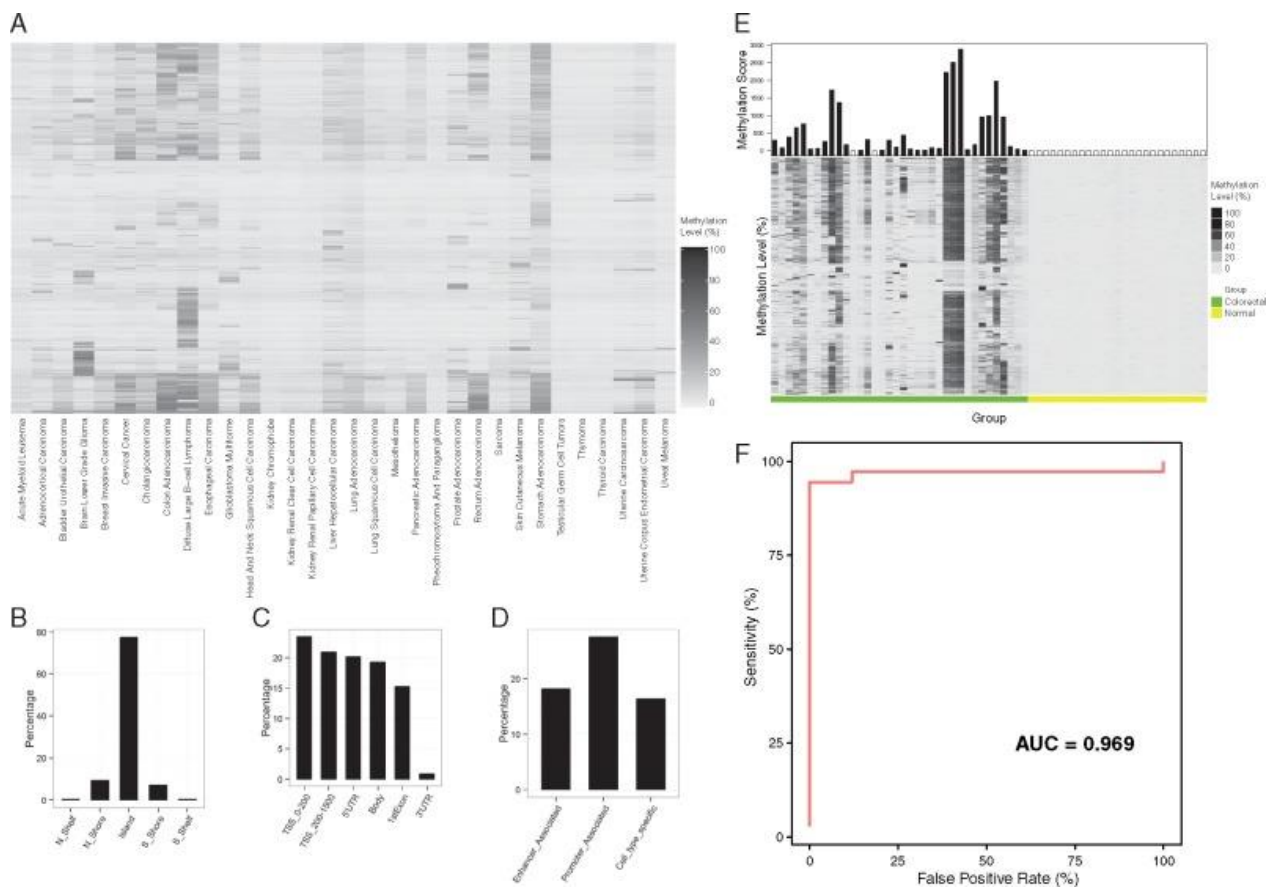


图 1. 泛癌甲基化 Panel 目标位点

Table 1. Classification accuracy using pan-methylation assay in clinical plasma cfDNA samples from patients with breast cancer, colorectal cancer, NSCLC and melanoma off or on systemic therapy at the time of collection

Plasma samples collected from patients off-therapy		Actual class			
		Breast (n = 12)	Colorectal cancer (n = 27)	NSCLC (n = 18)	Melanoma (n = 11)
Predicted Class ^a	AML	2	0	0	0
	Breast	8	0	0	0
	Colorectal	1	23	0	0
	Cholangiocarcinoma	0	0	0	1
	Esophageal	0	0	0	1
	Liver	0	1	1	1
	Lung	0	0	9	0
	Lymphoma	0	1	0	0
	Melanoma	0	0	0	5
	Pancreatic	0	1	0	0
	Sarcoma	0	0	1	1
	Stomach	0	0	0	0
	Not cancer	1	1	7	2
Total		12	27	18	11
Accurate classification of cancer irrespective of cancer type		91.7%	96.3%	61.1%	81.8%
Accurate classification of cancer type (out of set classified as cancer)		72.7%	88.5%	81.8%	55.6%
		78.9%			

表 1. 临床血浆 cfDNA 样本泛甲基化分析的分类准确性