四川大学学报（医学版） 2020，51（4）：521－525
J Sichuan Univ（Med Sci Edi）

微滴数字PCR定量检测葡萄膜黑色素瘤患者*GNAQ*/11突变基因

赵 清[1]，陈莹莹[1]，侯 宸[1]，曾少雪[1]，张宇辉[2]，张军军[1△]
1. 四川大学华西临床医学院 四川大学华西医院 眼科（成都 610041）；2. 四川大学华西临床医学院 循证医学教研室（成都 610041）

【摘要】 **目的** 探讨基于微滴数字PCR定量检测葡萄膜黑色素瘤（uveal melanoma, UM）患者肿瘤组织*GNAQ*/11突变的可行性。**方法** 肿瘤标本取自2009−2015年间在四川大学华西医院确诊并行眼球摘除术的78例UM患者的甲醛固定石蜡包埋（FFPE）肿瘤组织，取标本前所有患者均未进行放疗或化疗。采用回顾性研究，以微滴数字PCR技术检测葡萄膜黑色素瘤*GNAQ*/11的突变情况，同时Sanger测序对目标基因进行DNA测序，比较两种检测方式结果的一致性。**结果** 74例UM患者肿瘤组织*GNAQ*/11突变频率为91.9%。对Sanger测序与微滴数字PCR技术两种方式检测74例葡萄膜黑色素瘤患者*GNAQ*/11突变的结果进行一致性检验，*Kappa*系数=0.436，*P*=0.001。检测*GNAQ*/11突变基因的两种方法差异最常见的是Sanger测序没有检测出*GNAQ*/11突变。Sanger测序结果的出错率在异质突变组高于同质突变组（12/37 vs. 3/16，*P*=0.53），但差异无统计学意义。**结论** 微滴数字PCR与Sanger测序结果具有较好的一致性，葡萄膜黑色素瘤中*GNAQ*/11的突变率差异较大。数字PCR检测葡萄膜黑色素瘤患者*GNAQ*/11突变频率接近报道水平。肿瘤组织DNA来源于FFPE的样本更推荐使用灵敏度高的微滴数字PCR检测基因突变，Sanger测序易出现假阴性结果。

【关键词】 葡萄膜黑色素瘤 *GNAQ*/11 微滴数字PCR Sanger测序

Detection of *GNAQ*/11 Mutations in Uveal Melanoma Patients' FFPE DNA with Droplet Digital PCR

ZHAO Qing[1], *CHEN Ying-ying*[1], *HOU Chen*[1], *ZENG Shao-xue*[1], *ZHANG Yu-hui*[2], *ZHANG Jun-jun*[1△]. 1. *Department of Ophthalmology*, *West China Hospital*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China; 2. *Department of Evidence-Based Medicine*, *West China School of Medicine*, *Sichuan University*, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: zhangjunjun@medmail.com

【**Abstract**】 **Objective** To quantitatively detect *GNAQ*/11 mutations in uveal melanoma (UM) by droplet digital PCR (ddPCR). **Methods** Formaldehyde-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples were taken from 78 UM patients with enucleation in West China Hospital between 2009 and 2015. None of the patients received radiotherapy or chemotherapy before enucleation. A retrospective study was conducted to detect *GNAQ*/11 mutation in UM by ddPCR. To compare the consistency of the results of the two detection methods, DNA sequencing was performed on the target gene by Sanger sequencing. 78 patients with UM were studied retrospectively. *GNAQ*/11 mutations in uveal melanoma was detected by ddPCR. The consistency of the results of the two detection methods was analyzed. **Results** *GNAQ*/11 mutations frequency was 91.9%. The consistency test between Sanger sequencing and ddPCR of *GNAQ*/11 mutations in 74 patients with UM was conducted. *Kappa* coefficient=0.436, *P*=0.001. The error rate of Sanger sequencing results was significantly higher in the heterogeneous group than in the homogeneous group (12/37 vs. 3/16, *P*=0.53), but the difference was not statistically significant. **Conclusion** The results of ddPCR and Sanger sequencing showed good consistency, and the mutation ratio of *GNAQ*/11 in UM was significantly different. *GNAQ*/11 mutation frequency in UM patients detected by ddPCR was close to the reported frequency. It is more recommended to use ddPCR with high sensitivity to detect gene mutations in samples of tumor tissue DNA derived from FFPE. Sanger sequencing is prone to false negative results.

【**Key words**】 Uveal melanoma *GNAQ*/11 ddPCR Sanger sequencing

葡萄膜黑色素瘤（uveal melanoma, UM）是成人最常见的原发性眼内恶性肿瘤，起源于眼球壁的中层葡萄膜，其中超过90%为脉络膜黑色素瘤[1-2]。大约一半的UM患者最终发生血行转移，肝脏转移最为常见[2-3]。发生转移的患者若不治疗大多在短期内死亡。眼黑色素瘤协作研究（COMS）的大样本数据显示：确诊转移的UM患者中位生存期仅为3.6个月，5年累计生存率仅为1%[3]。

分子遗传学研究表明，UM是以*GNAQ*和*GNA*11突变为特征的一种眼内肿瘤[1-2]。*GNAQ*和*GNA*11分别编码异三聚体鸟嘌呤核苷酸结合G蛋白亚基αq和11[4]。*GNAQ*和*GNA*11的突变只发生在183（4号外显子）或209（5号外显子）密码子中，导致有丝分裂原活化蛋白激酶（MAKP）通

△ 通信作者，E-mail: zhangjunjun@medmail.com

路的本构激活[5]。*GNAQ*的热点突变是209位密码子由谷氨酰胺变为脯氨酸或是亮氨酸(c.626A>C Q209P或c.626A>T Q209L),*GNA*11的热点突变是第209位密码子谷氨酰胺被亮氨酸替换(c.626A>T Q209L)。*GNAQ*/11突变发生在UM发展的早期,只有在细胞发生*GNAQ*/11突变后才能发生克隆性扩增[2]。目前许多针对UM的治疗研究都集中在抑制*GNAQ*/11或其下游的靶点上[6-7]。因此*GNAQ*/11突变的基因能够被正确检测与量化分析对于UM的预防、诊断、治疗和预后具有非常重要的临床意义。

目前对于UM的基因突变检测方法有多种,如直接测序[8]、焦磷酸测序[9]等,但各种方法均有不足之处。微滴数字PCR(droplet digital PCR, ddPCR)是一种快速、可定量的检测方法,灵敏性高,准确度高,其对突变检测的理论检测下限可有效达到0.001%[10]。目前国内对ddPCR的检测应用比较少,本研究旨在探索采用ddPCR对UM组织标本进行*GNAQ*/11基因突变检测,并与常规Sanger测序方法测序结果比较,从而为ddPCR检测基因突变应用于临床提供更多的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本收集 肿瘤材料取自2009年–2015年间在四川大学华西医院确诊并行眼球摘除术的78例UM患者的甲醛固定石蜡包埋(FFPE)肿瘤组织。此项研究获得四川大学华西医院医学伦理委员会的批准〔2018(487)号〕,所有患者均知情同意。患者年龄26~75岁,中位年龄48岁,取标本前所有患者均未进行放疗或化疗。

1.1.2 试剂和仪器 主要试剂:QIAamp FFPE Tissue kit购于德国Qiagen Hilden;*GNAQ*/11引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列详见表1。Taq PCR Master Mix (2×, with Blue Dye)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;2×Droplet PCR Supermix、*GNAQ*/11野生型和热点突变的探针和引物(5号外显子:Q209P, Q209L)购于Bio-Rad公司。

表 1 PCR引物序列

Table 1 The primer sequence

Gene	Exon	Sequence of primer (5′ to 3′)	Amino acid
GNAQ	5	F: TCCCTAAGTTTGTAAGTAGTGCTA	Q209
		R: ACTAGAAACATGATAGAGGTGACA	
*GNA*11	5	F: CCAGGTGGCTGAGTCCTG	Q209
		R: CGACGAGAAACATGATGGAT	

GNAQ: G protein subunit alpha Q; *GNA*11: G protein subunit alpha 11

主要仪器:PCR扩增仪为美国Bio-Rad产品,QX200 Droplet Digital PCR(ddPCR™)为美国Bio-Rad产品。

1.2 实验方法

1.2.1 组织DNA提取 每例患者选取5张石蜡切片标本,厚度均为10 μm,包含肿瘤的3个不同部位。按照QIAamp FFPE Tissue kit试剂盒说明书进行基因组DNA提取。提取完成后,采用分光光度计检测DNA的吸光度A_{260}/A_{280}比值,比值为1.8~2.0,则表明提取的DNA符合标准,可进行后续的实验,DNA标本于–20 ℃保存备用。全程冰上操作,采用低温离心机进行离心。

1.2.2 ddPCR 每个样本的总DNA量为10 ng,反应体积为20 μL。反应混合物为2×Droplet PCR Supermix、20×目标探针(FAM)和20×野生型探针(HEX)。将每个配制好的PCR反应体系加至微滴发生卡中间一排“Sample”孔内,在微滴发生卡下面一排“Oil”孔内加入70 μL微滴生成油。使用QX200液滴发生器,20 μL的反应体系被转换成20 000个油包水状的微滴位于微滴发生卡最上排孔内。最后将微滴化的样品转移到96孔PCR板上进行扩增,PCR的流程为:95 ℃, 10 min;(94 ℃, 30 s; 55 ℃, 1 min) 40个循环;98 ℃, 10 min; 4 ℃,直到结束。在PCR过程中,为保证微滴间热传导更加充分,升降温度设定在2 ℃/s。运行PCR后,将96孔板加放到QX200液滴读取器中,运行恰当的检测模式后,仪器将自动读取每个孔内的荧光信号。然后软件Quantasoft根据Possion分布的原理完成对数据的转化,实时获得目标基因在PCR反应体系中的突变浓度。

1.2.3 Sanger法DNA测序 本实验同时对标本的PCR产物采用Sanger双脱氧链终止法直接进行DNA测序,将其结果与ddPCR测定基因突变数据进行对比。扩增反应体系为20 μL,反应混合物为样本DNA 50 ng、2× *Taq* DNA酶、PCR mix、上游引物、下游引物。 PCR的流程为:95 ℃, 4 min;(95 ℃, 30 s; 53 ℃, 30 s; 72 ℃, 40 s)35个循环;72 ℃, 5 min; 4 ℃,直到结束。将基因扩增产物送测序公司(生工生物)进行DNA测序。

1.3 统计学方法

组间两两比较采用χ^2检验,并用Kappa检验对Sanger测序与ddPCR两种检测方式的检测结果进行一致性检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sanger测序检测结果

78例UM患者肿瘤样本DNA成功进行*GNAQ*/11 5

号外显子测序，其中38例(48.7%)患者携带*GNAQ*突变，其中热点突变Q209P 29例，热点突变Q209L 7例，罕见突变Q209R 2例；32例(41.0%)患者携带*GNA*11突变，其中热点突变Q209L 30例，罕见突变Q209H 2例。14例(17.9%)患者肿瘤样本两种基因测序结果均为野生型。

2.2　ddPCR突变检测结果

使用ddPCR和*GNAQ*/11热点突变特异性探针，我们成功定量分析了74例UM患者肿瘤组织中*GNAQ*/11热点突变的比率。通过ddPCR检测，35例(47.3%)UM患者携带*GNAQ*突变，其中热点突变Q209P 28例，热点突变Q209L 7例。33例(44.6%)UM患者携带*GNA*11热点突变Q209L。只有6例(8.1%)UM肿瘤样本两种基因突变检测均为野生型。本次UM患者肿瘤组织*GNAQ*/11突变频率为91.9%(68/74)。由于缺乏相应特异性探针，4例携带*GNAQ*/11罕见突变(Q209R、Q209H)的UM患者样本未进行ddPCR。

2.3　Sanger测序与ddPCR结果比较

在Sanger测序与ddPCR在检测相同UM患者肿瘤组织样本*GNAQ*/11基因突变结果对比中发现，最常见的是Sanger测序没有检测出*GNAQ*/11突变。9例UM患者肿瘤组织样本*GNAQ*/11基因Sanger测序均为野生型，其中在5例(肿瘤样本编号：16、27、45、76、78)UM患者肿瘤组织样本中，ddPCR检测出各样本*GNAQ*突变比率分别为69%、82%、99%、67%、66%；另外4例(肿瘤样本编号：3、8、24、25)ddPCR检测出各样本*GNA*11突变比率分别为83%、16%、9%、4%。与此相反的是，1例(肿瘤样本编号：9)UM患者肿瘤组织Sanger测序检测出携带*GNAQ*/11突变但ddPCR检测突变等位基因为阴性，结果见图1。另外有6例UM患者肿瘤组织样本Sanger测序结果检测出存在*GNAQ*/11基因的共同突变，然而ddPCR结果显示每个样本只是单独地发生了某一种突变：*GNA*11 Q209L突变(肿瘤样本编号：1、31、35、75、77)；*GNAQ* Q209P突变(肿瘤样本编号：69)。

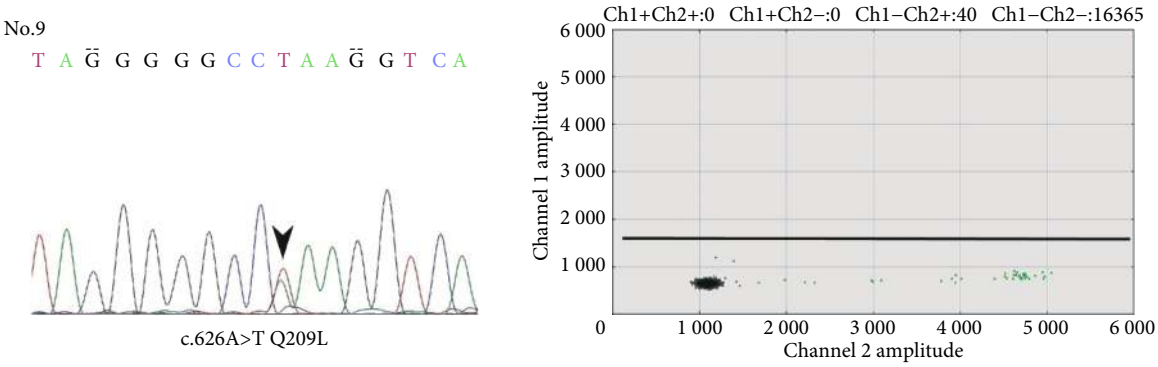

图 1　9号肿瘤样本Sanger测序（左）与ddPCR检测（右）结果

Fig 1　Representative traces of concordant mutations detected by two platforms tested:Sanger sequencing (left) showing the *GNAQ* mutations, indicated by arrow, ddPCR (right) showing negative droplets

2.4　一致性分析

对Sanger测序与ddPCR两种方法检测74例UM患者*GNAQ*/11突变的结果进行一致性检验，*Kappa*系数= 0.436，P= 0.001。统计学上认为两种检测方式一致性较好。每个UM患者肿瘤样本*GNAQ*/11突变比率之间都有差异(图2A)。根据每个样本的突变类型以及相对应的两种方法的检测结果，绘制在不同突变类型下，两种检测方法检测结果频数的差异，结果见图2B。*GNAQ*/11异质突变组中两种方法检测结果不一致样本数量12例；*GNAQ*/11同质突变组中两种方法检测结果不一致样本数量3例。无*GNAQ*/11突变组中两种方法检测结果不一致样本数量1例。Sanger测序的出错率在异质突变组高于同质突变组(12/37 vs. 3/16，P= 0.53)，但差异无统计学意义。

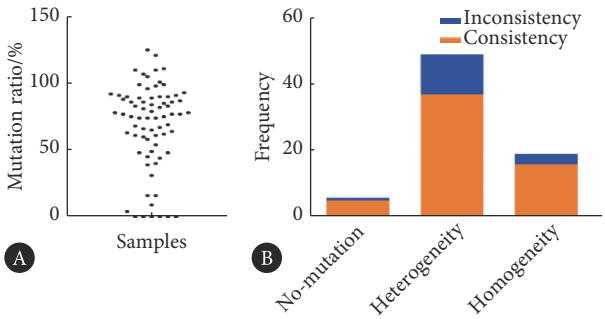

图 2　*GNAQ*/11突变比率（A）及两种检测方法在不同突变类型下检测结果频率差异（B）

Fig 2　Mutation ratio of *GNAQ*/11 in 74 samples (A), absolute frequency of consistent and inconsistent results detected by the two methods in different mutation types (B)

3 讨论

目前研究中用于检测*GNAQ*/11基因突变的方法有Sanger测序、焦磷酸测序、全外显子或全基因组测序等。DNA测序是检测突变的“金标准”,优点是可以直接读取序列,但缺点是灵敏度较低且无法实现定量分析[9]。焦磷酸测序是新一代DNA序列分析技术,该技术优点是检测快速,可提供序列信息以及确定相对变异负载,但缺点是只能检测短序列,而且试剂与设备价格昂贵[9]。全外显子或全基因组测序是对整个基因组的所有碱基或基因组的所有外显子进行测序,优点是能够获得样本的整个基因组的数据,但是价格昂贵以及复杂的数据分析限制了其应用。

ddPCR是利用油包水原理将PCR反应体系分散为数万个微滴来实现理论上的单分子分离,每个微滴都是一个单模板PCR反应室,其对突变检测的理论检测下限可有效达到0.001%[10]。模板DNA在微滴中扩增后释放荧光信号,通过对每个微滴荧光值的逐一收集来统计PCR扩增阴性和阳性微滴数量,并通过Possion分布计算核酸的初始拷贝浓度,进而对模板初始浓度进行精准到单拷贝的定量。近年来,ddPCR被成功地应用于检测黑色素瘤和其他癌症FFPE组织的异常基因组突变[11-12],表明它是一个强大、高度敏感和特异的方法,以及用于检测纳克基因组DNA(gDNA)级别中DNA突变的稀有拷贝的特定平台。ddPCR对于肝素等多种PCR抑制剂都有着较好的耐受特性,可以避免复杂体液中可能存在的PCR酶抑制剂对实验的影响,从而提高检测的稳定性与重复性[13]。在每一次ddPCR定量检测核酸时,对不含任何分析物样本(空白样本)检测对照对于控制假阳性微滴至关重要,检测阈值通常设置在所有空白样本荧光值之上。而ddPCR技术减少了模板间的反应竞争,降低了PCR抑制因子的影响,可以很大程度避免假阴性的发生,提高检测精准性。

目前我国大部分UM的分子遗传学研究DNA模板来源都是肿瘤组织的石蜡包埋切片,但肿瘤组织在包埋过程、蜡块保存的时间以及肿瘤细胞个体异质性都会影响检测的准确性。研究人员对非小细胞肺癌FFPE样本在长期保存后,与初检时的表皮生长因子受体*EGFR*突变频度对比,结果发现未检出*EGFR*突变或检出突变频度明显降低的样本的突变频度均较低,这就可能随着保存时间的延长,突变基因降解,造成“假阴性”的结果[14]。

本研究利用ddPCR检测74例UM患者肿瘤组织*GNAQ*/11突变基因,其中*GNAQ*/11突变样本68例,未发生突变样本6例,*GNAQ*/11突变频率为91.9%,与欧洲白种人相似[3]。呈现相同数量野生型和突变的等位基因为同质突变(突变率≥0.9),过多野生型等位基因为异质性突变(突变率>0~<0.9)。根据已报道的文献发现[15],东亚的UM患者*GNAQ*/11突变频率较低:韩国66.6%,中国38%,日本57.9%。可能的原因是石蜡包埋肿瘤组织存放时间较长,突变基因发生降解,检测结果出现假阴性;或是检测方法灵敏度较低未能检测出较低含量的*GNAQ*/11异质突变的肿瘤。总体上来讲,ddPCR与Sanger测序,两者检测结果的一致性较好,说明该方法具有较好的准确性。但在异质突变的样本中,ddPCR有着更好的检测能力。9例样本Sanger测序结果是野生型,但通过ddPCR检测8例存在*GNAQ*/11异质突变,1例存在同质突变;而且他们的石蜡包埋肿瘤组织切片保存时间最长为10年,最短则是6年。

综上,本研究成功应用ddPCR技术对UM FFPE来源的gDNA进行*GNAQ*/11突变基因定量检测,该方法具有高灵敏度,高特异度,可实现绝对定量等优点,可用于各种肿瘤疾病相关分子生物学研究,是值得临床推广的一项新兴基因检测技术。

参 考 文 献

[1] ONKEN M D, WORLEY L A, LONG M D, *et al*. Oncogenic mutations in *GNAQ* occur early in uveal melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(12): 5230–5234.

[2] VAN RAAMSDONK C D, GRIEWANK K G, CROSBY M B, *et al*. Mutations in *Gna*11 in uveal melanoma. N Engl J Med, 2010, 363(23): 2191–2199.

[3] DIENER-WEST M. Development of metastatic disease after enrollment in the coms trials for treatment of choroidal melanoma. Arch Ophthalmol, 2005, 123(12): 1639–1643.

[4] RADHIKA V, DHANASEKARAN N. Transforming G proteins. Oncogene, 2001, 20(13): 1607–1614.

[5] GOLDSMITH Z G, DHANASEKARAN D N. G protein regulation of MAPK networks. Oncogene, 2007, 26(22): 3122–3142.

[6] CARVAJAL R D, SOSMAN J A, QUEVEDO J F, *et al*. Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. JAMA, 2014, 311(23): 2397–2405.

[7] FENG X, DEGESE M S, IGLESIAS-BARTOLOME R, *et al*. Hippo-independent activation of YAP by the *GNAQ* uveal melanoma oncogene through a Trio-regulated Rho GTPase signaling circuitry. Cancer Cell, 2014, 25(6): 831–845.

[8] GRIEWANK K G, MURALI R, SCHILLING B, *et al*. Tert promoter mutations in ocular melanoma distinguish between conjunctival and uveal tumours. Br J Cancer, 2013, 109(2): 497–501.

[9] MCEVOY A C, WOOD B A, ARDAKANI N M, *et al*. Droplet digital

PCR for mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma tissues: a comparison with Sanger sequencing and pyrosequencing. J Mol Diagn, 2018, 20(2): 240–252.

[10] HINDSON B J, NESS K D, MASQUELIER D A, *et al*. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal Chem, 2011, 83(22): 8604–8610.

[11] LAMY P J, CASTAN F, LOZANO N, *et al*. Next-generation genotyping by digital PCR to detect and quantify the *BRAF* V600E mutation in melanoma biopsies. J Mol Diagn, 2015, 17(4): 366–373.

[12] PHALLEN J, SAUSEN M, ADLEFF V, *et al*. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. Sci Transl Med, 2017, 9(403): eaan2415[2019-12-14]. http://www.sciencemag.org/about/science-licenses-journal-article-reuse.

[13] TEO C R, RAJAN-BABU I S, LAW H Y, *et al*. Methylation-specific triplet-primed PCR and melting curve analysis as a rapid screening tool for identifying actionable FMR1 genotypes. Clin Chem, 2013, 59(11): 1668–1670.

[14] 钱坤, 张毅. 组织样本保存状态及时间对EGFR基因突变检测结果的影响. 临床肿瘤学杂志, 2014, 19(4): 132–135.

[15] LEE S H, KIM J E, JANG H S, *et al*. Genetic alterations among Korean melanoma patients showing tumor heterogeneity: a comparison between primary tumors and corresponding metastatic lesions. Cancer Res Treat, 2018, 50(4): 1378–1387.

（2020 – 01 – 04收稿, 2020 – 04 – 15修回）

编辑　汤　洁

本　刊　征　稿　启　事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊, 曾荣获全国优秀科技期刊一等奖, 首届国家期刊奖提名奖, 第二、三届国家期刊奖百种重点期刊, 四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖, 2016年度中国高校百佳科技期刊, 2016中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被中国科学引文数据库(CSCD)、北京大学图书馆中文核心期刊要目总览(北大核心/中文核心)、中国科技论文与引文数据库(CSTPCD)(科技核心)、美国PubMed《医学索引》(IM/MEDLINE)、Scopus等收录。

为了更好地开展国内外学术交流, 促进医药卫生事业的发展, 凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约), 均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿, 编辑部将适当地给予优先。

本刊在线投稿网址: http://ykxb.scu.edu.cn/

地址: 四川省成都市人民南路三段17号《四川大学学报(医学版)》编辑部

邮政编码: 610041

电话/传真: (028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部