

• 论 著 •

微滴式数字 PCR 检测结直肠癌 Septin9 基因甲基化的方法建立及性能评价^{*}

张 静, 吉旭瑶, 杨文旭, 刘 禹[△]

哈尔滨医科大学附属第四医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150001

摘要:目的 建立微滴式数字 PCR(ddPCR)检测结直肠癌(CRC)的 Septin9 基因甲基化的方法, 并对其进行性能评价。方法 针对 Septin9 基因甲基化设计特异的引物与探针, 并优化 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化反应条件, 包括反应的引物与探针浓度、退火温度与循环数, 建立 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化检测方法。通过检测甲基化标准物质及临床标本, 评价所建方法的线性、灵敏度、特异度、精密度、准确度及临床诊断准确性。结果 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化反应的最优引物与探针浓度分别为 500 nmol/L 与 200 nmol/L, 最佳退火温度为 56 °C, 最佳循环数为 45 次。线性试验表明, 在 $5 \sim 10^4$ 拷贝/反应内, 线性表现良好。ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化浓度预设检出限为 0.422%, 且能特异识别 Septin9 基因甲基化阳性质控品。精密度评价中, 高浓度和低浓度参考品的实验室变异系数分别为 1.340 0% 与 3.330 0%, 满足相关要求。准确度试验结果显示, 3 个批次的甲基化质控样品 10 次重复检测的阳性符合率和阴性符合率均为 100%。临床标本检测结果显示, ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化对 CRC 组的灵敏度为 82.61% (95% CI 66.10% ~ 99.10%), 特异度为 78.38% (95% CI 65.20% ~ 91.60%), 曲线下面积为 0.881 3 (95% CI 0.784 0 ~ 0.978 6)。结论 该研究建立的 ddPCR 检测 CRC 的 Septin9 基因甲基化的方法具有较高的灵敏度、特异度、精密度、准确度及临床诊断准确性, 可为 CRC 的早期诊断和监测治疗提供可靠的技术手段。

关键词:微滴式数字 PCR; 结直肠癌; Septin9 基因甲基化; 性能评价

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.06.002 **中图法分类号:**R446.9

文章编号:1673-4130(2025)06-0646-05

文献标志码:A

Establishment and performance evaluation of a droplet digital PCR method for detecting of Septin9 gene methylation in colorectal cancer^{*}

ZHANG Jing, JI Xuyao, YANG Wenxu, LIU Yu[△]

Department of Clinical Laboratory, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China

Abstract: Objective To establish a droplet digital PCR (ddPCR) method for detecting the Septin9 gene methylation in colorectal cancer (CRC) and evaluate its performance. **Methods** Specific primers and probes were designed for the methylation of Septin9 gene. The reaction conditions of ddPCR for Septin9 gene methylation detection were optimized, including primer and probe concentrations, annealing temperature and cycle number. A ddPCR method to detect the methylation of Septin9 gene was established. The linearity, sensitivity, specificity, precision, accuracy and clinical diagnostic accuracy of the established method were evaluated by detecting methylation reference materials and clinical samples. **Results** The optimal concentrations of primers and probes were 500 nmol/L and 200 nmol/L, respectively. The optimal annealing temperature was 56 °C and the optimal number of cycles was 45. The linearity test showed good linearity in the range of $5 \sim 10^4$ copy/reaction, and the preset detection limit of Septin9 gene methylation concentration detected by ddPCR was 0.422%, which could specifically identify Septin9 gene methylation positive control. In precision evaluation, the coefficients of variation of high concentration and low concentration reference materials were 1.340 0% and 3.330 0%, which met the relevant requirements. The results of accuracy test showed that the positive coincidence rate and negative coincidence rate of 10 repeated tests of methylation quality control samples of 3

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82272389)。

作者简介:张静,女,硕士研究生在读,主要从事新型临床检验技术建立的相关研究。 △ 通信作者, E-mail: rainfall1982@163.com。

batches were both 100%. The results of clinical samples showed that the sensitivity and specificity of ddPCR detection of Septin9 gene methylation in CRC group were 82.61% (95%CI 66.10%—99.10%) and 78.38% (95%CI 65.20%—91.60%), respectively. The area under the curve was 0.8813 (95%CI 0.784—0.9786).

Conclusion The ddPCR method for detection of Septin9 gene methylation in CRC has high sensitivity, specificity, precision, accuracy and clinical diagnostic accuracy. It can provide a reliable technical means for early diagnosis, monitoring and treatment of CRC.

Key words: droplet digital PCR; colorectal cancer; Septin9 gene methylation; performance evaluation

结直肠癌(CRC)是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤,在全球的发病率位居恶性肿瘤的第3位,死亡率居第2位^[1]。CRC早期诊断率仅10%~15%^[2],早发现、早诊断、早治疗对于延长CRC患者的生存期具有重大意义。研究表明CRC患者血液或粪便中各种DNA甲基化标志物已显示出高灵敏度和特异度^[1-2]。众多DNA甲基化的生物标志物中,Septin9基因甲基化检测是美国食品药品监督管理局(FDA)唯一批准作为CRC筛查的方法^[3]。目前临幊上主要通过实时荧光定量PCR(qPCR)检测Septin9基因甲基化^[4],但其灵敏度及特异度仍然不够理想。

新型的微滴式数字PCR(ddPCR)是近年来兴起的一种定量PCR技术,已被应用于肺癌等甲基化相关的癌症研究中^[5]。ddPCR通过将标本微滴化处理,分散成数万个反应单元,每个反应单元中独立进行扩增,最后对荧光信号进行收集,并利用泊松分布公式统计分析,实现依靠标准曲线就可准确对低至单拷贝的靶分子绝对定量检测^[6-7]。ddPCR能从基质复杂或微量的标本中识别稀有靶核酸,具有高灵敏度、准确性和耐受性等特点,相较于qPCR具有更高的检测精密度和更简单的定量方法^[8],在基因甲基化检测中具有广阔的应用前景。因此本研究建立并优化ddPCR检测CRC的Septin9基因甲基化的方法,并对此方法的检测性能进行全面评价,旨在为CRC早期筛查与诊断提供一种更加灵敏、可靠的检测手段。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2024年8月1—20日于本院做过结肠镜检查、病理活检诊断的60例患者的血浆标本,其中CRC组23例,非CRC组37例(结直肠腺瘤18例、结直肠息肉9例、非结直肠疾病10例)。本研究通过本院医学伦理委员会批准(审批号:2024-ZWLLSC-70),所有受试者均签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 TD-2型ddPCR平台(Drop Maker M1、Chip Reader R2)购自北京新羿生物科技有限公司,基因扩增仪购自杭州博日科技股份有限公司。Septin9基因甲基化参考品(10 ng/μL)购自苏州唯善生物公司,Septin9基因甲基化阳性及阴性质控品、黏结蛋白聚糖2(SDC2)基因甲基化阳性及阴性质控品

购自上海奥迪缇生物科技有限公司,EpiTect Control DNAs试剂盒(完全甲基化基因组DNA、非甲基化基因组DNA、未甲基化转化的基因组DNA)购自凯杰生物试剂公司。循环游离DNA(cfDNA)提取试剂盒、甲基化检测预混液、微液滴标本制备试剂盒、微液滴标本检测试剂盒均购自北京新羿生物科技有限公司,EZ DNA甲基化金试剂盒购自美国Zymo Research公司。

1.3 方法

1.3.1 设计引物与探针 根据GeneBank和UCSC生物软件,选取Septin9基因V2转录本启动子第3个CpG岛为目的序列^[9],以β-actin基因作为参照基因。在线软件MethPrimer通过亚硫酸氢盐处理模拟DNA序列的转化,将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,根据设计原则设计引物和探针,并整合了blocker引物技术与锁核酸的化学修饰。本研究引物探针由苏州唯善生物公司合成,Septin9正向引物序列为5'-AAATAATCCCATCCAAC-TA-3',Septin9反向引物序列为5'-GATT-dSp-GTT-GTTTATTAGTTATTATGT-3';Septin9blocker引物序列为5'-GTTATTATGTTGGATTTGTGGTT-AATGTGTAG-SpC3-3';Septin9探针引物序列为5'-FAM-TTAACCGCGAAATCCGAC-BHQ_1-3';β-actin正向引物序列为5'-GTGATGGAGGAGGTT-TAGTAAGTT-3',β-actin反向引物序列为5'-CCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3';β-actin探针引物序列为5'-VIC-ACCACCACCAACACA-CAATAACAAACACA-BHQ_1-3'。

1.3.2 临床标本处理 使用cfDNA提取试剂盒,按照说明书分离提取临床标本cfDNA,随后使用EZ DNA甲基化金试剂盒,按照说明书对上述提取获得的cfDNA进行重亚硫酸盐处理。经重亚硫酸盐处理后的样品中所有非甲基化的胞嘧啶均转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶则保持原样。

1.3.3 ddPCR检测 根据试剂说明书配制反应体系(30 μL)。将反应体系与微液滴生成油加入微液滴生成芯片,放入仪器相应位置固定,运行生成微液滴。再将含有微液滴的8联排管放置PCR仪上扩增。PCR完成后,将装有已反应完成微液滴的8联排管和

微液滴检测芯片放在检测芯片机械卡相应位置,固定芯片,芯片相应位置加入微液滴检测油,盖密封垫,放入生物芯片分析仪,启动系统进行检测。

1.3.4 反应条件优化 为获取最佳 ddPCR 检测结果,以等量 Septin9 基因甲基化参考品为标本,进行反应条件的优化。首先基于棋盘法,根据预混液所要求引物探针浓度范围,分别设置引物终浓度为 400、500、600、700、800 nmol/L 5 个梯度。探针终浓度分别采用 200、300、400 nmol/L。在相同反应条件下,根据引物探针要求的退火温度范围,设置 PCR 梯度退火温度 55、56、57、58、59、60 °C。循环次数分别设置为 35、40、45、50 次。根据结果中阴阳液滴荧光的分离程度来选取最适宜的反应条件。

1.3.5 线性试验 参考《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》^[10],以 10 ng/μL(ddPCR 检测 4 000 copy/μL)的 Septin9 基因甲基化参考品作为基础标本,对其进行控制加样或稀释,分别维持 10⁴、10³、10²、10、5 拷贝/反应,每个反应浓度重复检测 3 次。计算结果的对数平均值,并采用回归统计分析比较实测值和期望值。计算回归系数和相关系数,得到线性回归方程 $Y=bX+a$,要求 $R^2 \geq 0.995$ 。

1.3.6 敏感度试验 参考相关文献^[11],以甲基化浓度为 1%(30 ng/μL)的 Septin9 基因甲基化质控品作为预设检出限(LoD),用等浓度的阴性质控品对其倍比稀释,分别检测甲基化浓度 1.000 0%、0.500 0%、0.250 0%、0.125 0%、0.062 5% 的标本,每个反应浓度重复 20 次,分析各浓度标本的检出率(即阳性率),将这些阳性率和浓度值利用回归模型进行拟合分析,计算 95% 阳性率下的标本浓度,即为 LoD。

1.3.7 特异度试验 分别对 Septin9 基因甲基化阳性质控品、非甲基化基因组 DNA、未甲基化转化的基因组 DNA、SDC2 基因甲基化阳性质控品进行检测,以 ddH₂O 作为空白对照。观察是否生成阳性微滴,评价该方法的特异度。

1.3.8 精密度试验 使用高(10⁴ 拷贝/反应)和低(10 拷贝/反应)浓度的 Septin9 基因甲基化参考品进行检测评价。每个浓度每天使用一批样品,每批重复检测 3 次,持续 5 d,各浓度检测结果均取对数,并根据相关文献^[12]中概述的方案,评价精密度。

1.3.9 准确度试验 参考相关文献^[12],对 Septin9 基因甲基化的阴阳质控品进行检测。3 个批次的质控样品均经过了严格的 10 次重复检测。随后对这些检测结果进行了汇总分析,计算出阳性和阴性质控品的符合率,以此评价该检测方法的准确度。

1.3.10 临床标本初步检测 按照已建立的方法对收集的 60 例临床标本进行检测,获取每个标本中

Septin9 基因甲基化的检测数据。将检测结果与临床诊断结果进行比较,评价该检测方法对 CRC 临床诊断的准确性。

1.4 统计学处理 采用 Excel2021 软件、SPSS26.0 统计软件和 Graphpad prism8.0 进行数据处理分析。

2 结 果

2.1 ddPCR 反应的条件 经试验发现,当引物浓度为 500 nmol/L,探针浓度为 200 nmol/L 时,阴阳液滴分离程度最明显;在相同反应条件下,当退火温度为 56 °C 时阴阳液滴分离程度最明显;对循环次数分别为 35、40、45、50 次的 ddPCR 进行研究,结果显示当循环次数为 45 次时阴阳液滴分离程度最明显。基于以上结果,选择此条件进行后续试验。

2.2 线性试验结果 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化在 5~10⁴ 拷贝/反应内,实际浓度对数值与理论浓度对数值的线性回归方程为 $Y=0.9709X+0.1484$, $R^2=0.9990$,线性度良好,见图 1。

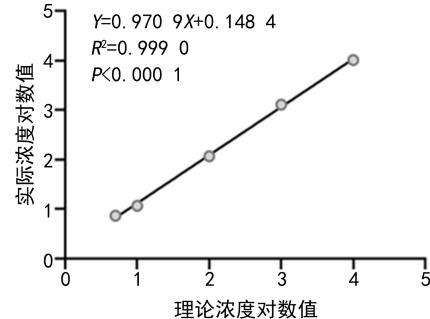
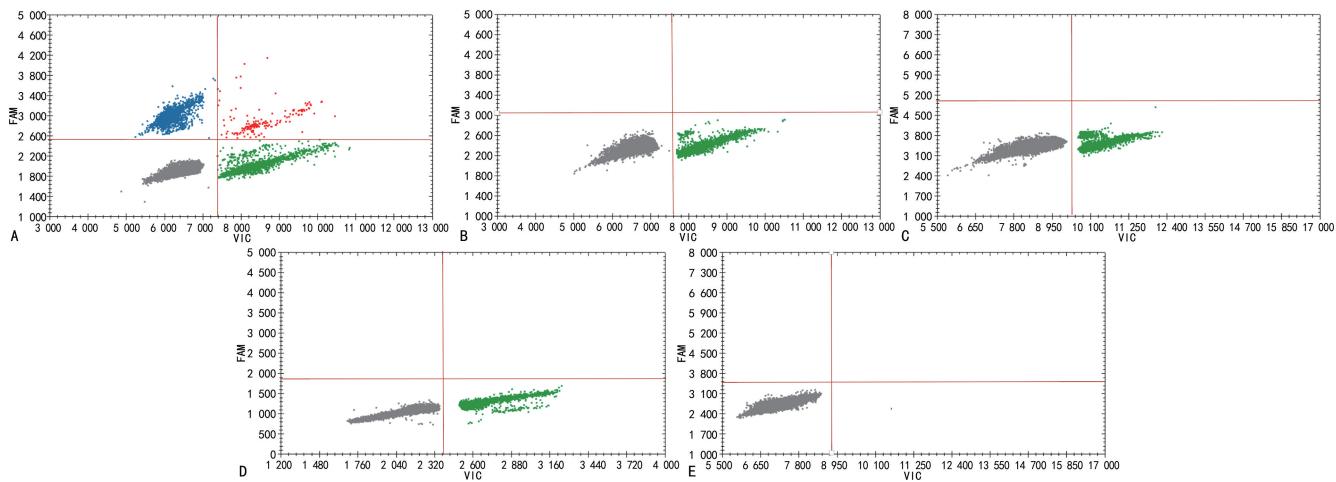


图 1 ddPCR 检测的实际浓度对数值与理论浓度对数值线性关系

2.3 敏感度试验结果 30 ng/μL 人基因组的背景下,甲基化浓度 1.000 0%、0.500 0%、0.250 0%、0.125 0%、0.062 5% 标本的检出率分别为 100%、100%、55%、40% 与 10%,概率回归分析结果显示,ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化浓度 LoD 为 0.422%(95%CI 0.344%~0.570%)。

2.4 特异度试验结果 Septin9 基因甲基化阳性质控品在 FAM 通道与 VIC 通道(内参通道)中检测到明显阳性信号,而非甲基化基因组 DNA、未甲基化转化的基因组 DNA、SDC2 基因甲基化阳性质控品只在 VIC 通道(内参通道)中检测到明显阳性信号,FAM 通道(Septin9 基因甲基化通道)未检测到信号,空白组在两通道均未显示阳性信号,表明 ddPCR 特异度良好。见图 2。

2.5 精密度试验结果 基于 ddPCR 定量检测 Septin9 基因甲基化精密度评价结果见表 1。高浓度 Septin9 基因甲基化参考品和低浓度 Septin9 基因甲基化参考品的实验室变异系数(CV)分别为 1.340 0% 和 3.330 0%,满足 $CV \leq 5\%$ 的要求。



注: A 为 Septin9 基因甲基化阳性质控品的 ddPCR 检测结果; B 为非甲基化基因组 DNA 的 ddPCR 检测结果; C 为未甲基化转化的基因组 DNA 的 ddPCR 检测结果; D 为 SDC2 基因甲基化阳性质控品的 ddPCR 检测结果; E 为白色对照品的 ddPCR 检测结果; 灰色散点表示双阴性液滴; 蓝色散点表示 Septin9 基因甲基化阳性液滴; 绿色散点表示内参基因阳性液滴; 红色散点表示 Septin9 基因甲基化与内参双阳性液滴。

图 2 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化特异度分析

表 1 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化精密度评价

项目	高浓度 Septin9	低浓度 Septin9
	基因甲基化参考品 (\log_{10} 拷贝/反应)	基因甲基化参考品 (\log_{10} 拷贝/反应)
总均值	3.993 3	1.116 0
批内方差	0.001 7	0.001 1
批内标准差	0.041 2	0.032 5
批间标准差	0.040 4	0.082 3
批间方差	0.001 7	0.006 8
批内方差/批间方差	1.000 0	0.155 6
总方差	0.002 9	0.001 4
实验室标准差	0.053 5	0.037 1

2.6 准确度试验结果 3 个批次的 Septin9 基因甲基化的质控样品 10 次重复检测中, 检测结果显示阳性符合率、阴性符合率均为 100%, 表明该检测方法准确度良好。

2.7 临床标本检测结果 CRC 组患者 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化阳性 19 例, 非 CRC 组患者 ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化阳性 8 例。ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化对 CRC 组的灵敏度为 82.61% (95% CI 66.10% ~ 99.10%), 特异度为 78.38% (95% CI 65.20% ~ 91.60%), 曲线下面积 (AUC) 为 0.881 3 (95% CI 0.784 0 ~ 0.978 6)。

3 讨 论

CRC 作为一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 其高发病率和低早期诊断率的现状亟待改善^[13]。CRC 的早期诊断对于延长患者生存期十分重要, 而目前常用的检测方法存在局限性^[14], 这为新的检测技术的研究提供了动力。血液或粪便中的 DNA 甲基化标志物

展现出的高灵敏度和特异度, 为 CRC 的诊断提供了新的思路。其中, Septin9 基因甲基化检测已获 FDA 批准用于临床筛查^[15], 但现有检测方法的不足促使临床探索更优的技术。新型的 ddPCR 技术与传统 qPCR 方法相比展现出诸多优势, 在基因甲基化检测中具有广阔前景。

本研究建立了检测 CRC 的 Septin9 基因甲基化的 ddPCR 方法, 首先针对 Septin9 基因甲基化设计了特异的引物与探针, 并且为了提升引物探针对甲基化碱基的甄别能力, 提高引物与探针在扩增反应中的灵敏度与特异度, 优化整体的分析效能, 确保了在复杂生物标本中对甲基化 CG 位点的准确鉴定, 创新地整合了 blocker 引物技术, 并对引物与探针进行了锁核酸的化学修饰。另外, 为获取最佳的检测结果, 本研究对建立的 ddPCR 方法的反应条件进行优化, 首先基于棋盘法对引物探针浓度进行筛选, 当引物浓度为 500 nmol/L, 探针浓度为 200 nmol/L 时, 阴阳液滴分离程度最大。ddPCR 的退火温度是最重要的影响 PCR 参数, 对于反应的特异性有重要影响, 退火温度太低可能引起非特异性扩增, 退火温度过高会降低反应的灵敏度, 本研究结果显示 56 °C 为最佳退火温度。合适的循环数能够确保对目标核酸分子进行充分扩增, 从而更准确地检测到微量的核酸, 提高检测的精密度和准确度, 本研究优化循环数的结果表明 45 次最佳。

自建 ddPCR 检测 CRC 的 Septin9 基因甲基化方法后, 本研究对此方法的性能进行了全面而深入的评价。在线性试验结果中, 检测范围在 5 ~ 10⁴ 拷贝/反应内, 实际浓度对数值与理论浓度对数值呈现出良好的线性关系, 线性回归方程为 $Y = 0.970 \times 9X +$

0.148 4, $R^2=0.999$ 0。这一高线性度表明该检测方法在一定浓度范围内能够准确且稳定地反映 Septin9 基因甲基化浓度, 为定量分析提供了可靠的基础。在灵敏度试验方面, 在 30 ng/ μ L 人基因组的背景下, 不同甲基化浓度的标本具有不同的检出率。其中, 甲基化浓度 1.000 0% 和 0.500 0% 的标本检出率达到 100%, 而随着甲基化浓度的降低, 检出率有所下降, 概率回归分析估算的 LoD 为 0.422% (95% CI 0.344%~0.570%), 显示出了较高的灵敏度, 能够检测到较低浓度的甲基化。特异度试验结果显示, Septin9 基因甲基化阳性质控品在相应通道有明显阳性信号, 而非甲基化基因组 DNA 等在特定通道未检测到信号, 空白组在两通道均无阳性信号, 充分证明了 ddPCR 检测方法的良好特异度, 能够准确区分甲基化和非甲基化状态。精密度评价结果中, 高浓度和低浓度的 Septin9 基因甲基化参考品的实验室 CV 分别为 1.340 0% 和 3.330 0%, 均满足 $CV \leq 5\%$ 的要求, 表明该检测方法具有较好的重复性和稳定性。此外, 3 个批次的 Septin9 基因甲基化质控样品的 10 次重复检测中, 阳性符合率和阴性符合率均为 100%, 进一步证实了检测方法的准确度良好。临床标本检测结果显示, ddPCR 检测 Septin9 基因甲基化对 CRC 组的灵敏度为 82.61% (95% CI 66.10%~99.10%), 特异度为 78.38% (95% CI 65.20%~91.60%), AUC 为 0.881 3 (95% CI 0.784 0~0.978 6), 表明该方法对 CRC 具有较高的诊断价值。

综合来看, ddPCR 定量检测 Septin9 基因甲基化在线性、灵敏度、特异度、精密度、准确度及临床诊断准确性等方面表现出色, 为 CRC 的早期诊断提供了一种有潜力的检测手段。然而, 在实际应用中, 还需要考虑标本的复杂性, 仍需更多的研究和实践来进一步完善和推广这一技术, 为 CRC 的诊治贡献更大的力量。

参考文献

- [1] 姚一菲, 孙可欣, 郑荣寿.《2022 全球癌症统计报告》解读: 中国与全球对比[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31 (7): 769-780.
- [2] 黄理宾, 黄秋实, 杨烈. 全球及中国的结直肠癌流行病学特征及防治: 2022《全球癌症统计报告》解读[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2024, 31(5): 530-537.
- [3] LU P, ZHU X, SONG Y, et al. Methylated septin 9 as a promising biomarker in the diagnosis and recurrence monitoring of colorectal cancer[J]. Dis Markers, 2022, 2022: 7087885.
- [4] YUAN R Q, ZHAO H, WANG Y, et al. SEPTIN9-SDC2-VIM methylation signature as a biomarker for the early diagnosis of colorectal cancer[J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(7): 3128-3140.
- [5] ZHAO Y, O'KEEFE C M, HSIEH K, et al. Multiplex digital methylation-specific PCR for noninvasive screening of lung cancer[J]. Adv Sci (Weinh), 2023, 10(16): e2206518.
- [6] MORENO-MANUEL A, CALABUIG-FARINAS S, OB-RADOR-HEVIA A, et al. dPCR application in liquid biopsies: divide and conquer[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2021, 21(1): 3-15.
- [7] ZHANG L X, PARVIN R, FAN Q, et al. Emerging digital PCR technology in precision medicine[J]. Biosens Bioelectron, 2022, 211: 114344.
- [8] OLMEDILLAS-LÓPEZ S, OLIVERA-SALAZAR R, GARCÍA-ARRANZ M, et al. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology: an updated review[J]. Mol Diagn Ther, 2021, 26(1): 61-87.
- [9] MOLNAR B, TOTH K, BARTAK B K, et al. Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15(2): 171-184.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证: WS/T 420-2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南: CNAS-GL039[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 临床检验定量测定项目精密度与正确度性能验证: WS/T492-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [13] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer[J]. Lancet, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [14] LADABAUM U, DOMINITZ J A, KAHI C, et al. Strategies for colorectal cancer screening[J]. Gastroenterology, 2020, 158(2): 418-432.
- [15] LIN K W. mSEPT9 (epi procolon) blood test for colorectal cancer screening[J]. Am Fam Physician, 2019, 100 (1): 10-11.

(收稿日期: 2024-10-30 修回日期: 2024-12-31)