

# 多重单核苷酸测序 (Multiplex SNaPshot) 技术 ——一种子宫内膜癌 *POLE* 核酸外切酶结构域突变的 快速廉价检测方法

*Kelly A. Devereaux, M.D., Ph.D., David F. Steiner, M.D., Ph.D., Chandler Ho, B.S.,  
Adam J. Gomez, M.D., Blake Gilks, M.D., Teri A. Longacre, M.D., James L. Zehnder, M.D.,  
Brooke E. Howitt, M.D., and Carlos J. Suarez, M.D.*

**摘要:** 大多数 DNA 聚合酶ε (DNA polymerase epsilon, *POLE*) 中核酸外切酶结构域存在致病突变 (*POLEmut*) 的“超突变”肿瘤预后良好, 即使是高级别组织类型, 因此确定子宫内膜癌 (endometrial carcinomas, ECs) 的 *POLE* 突变状态具有重要的临床意义。目前, 尚无特异的形态学或免疫表型特征可在不进行分子检测的情况下准确判断是否为 *POLEmut* 肿瘤。因此, 如果不使用昂贵和/或耗时的 DNA 测序方法, 识别 *POLEmut* 肿瘤具有挑战性。我们研发了一种新的 SNaPshot 检测方法, 以促进在 ECs 中常规且高效的进行 *POLE* 突变检测。SNaPshot 识别编码 *POLE* 核酸外切酶结构域的 9、11、13 和 14 外显子中的 15 个核苷酸变异位点。变异位点的选择依据突变位点的重现性、影响蛋白功能的

证据、与高肿瘤突变负荷 (TMB) 的相关性和/或 ECs 临床疗效研究的发现。根据文献报道的致病性体细胞变异, 预测该方法对 ECs 的临床灵敏度为 90%-95%。在多次的重复试验和倍比稀释试验中, 阳性患者 (n=11) 和阴性对照患者 (n=20) 均得到预期的基因型结果。验证性研究表明, 该方法覆盖变异的特异度和灵敏度均为 100%。分析的灵敏度保守估计约为 10% 的变异等位基因丰度 (variant allele fraction, VAF), 但也有灵敏度低至 5%VAF 的报道。正如预期的那样, SNaPshot 检测比 Sanger 测序对低于 20% 的 VAFs 更灵敏, 这是体细胞变异检测的一个重要特征。我们首次开发和验证了用 SNaPshot 检测 *POLE* 热点突变。虽然二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 和 Sanger 测序的方法也被用于检测 *POLE* 突变, 但在高负荷的病例量背景下, SNaPshot 方法为实现分析的灵敏度、成本效益和效率三者之间的平衡提供了可行性。

From the Department of Pathology, NYU Grossman School of Medicine, New York, New York (K.A.D.); Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, Stanford (D.F.S., C.H., T.A.L., J.L.Z., B.E.H., C.J.S.); Department of Pathology, Phoenix Veterans

Affairs Health Care System, Phoenix (A.J.G.), California; and Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada (B.G.).

K.A.D. and D.F.S. contributed equally to this work.

The authors declare no conflict of interest.

Address correspondence to Carlos J. Suarez, MD, Department of Pathology, Stanford University School of Medicine, 300 Pasteur Drive,

Stanford, CA 94305. E-mail: cjsuarez@stanford.edu.

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and

PDF versions of this article on the journal's website, www.int-jgynpathology.com.

**关键词:** *POLE*; 子宫内膜癌; 单基因测序; SNaPshot

(*IJGP.2022 Nov.;41(6):541-551*)

## 背景

2013 年, 癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 首次对子宫内膜癌的基因组和蛋白质组学特征进行了大规模的整合。此举导致了 ECs 分类的重大转变, 即从传统的基于形态学的方法转向了形态学和分子特征整合的方法。具体来说, 该研究确定了 4 个分子特征亚组, 包括: [1]以 DNA 聚合酶ε (*POLEmut*) 含有核酸外切酶结构域突变 (exonuclease domain mutations, EDMs) 为特征的“超突变型”肿瘤, [2]以微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI-H/MMRd) 为特征的“高突变型”肿瘤, [3]

缺乏 MSI 和 *POLE* 突变（“无特定分子特征”或 NSMP）的“低拷贝数变异型”的肿瘤，和[4]以大量的拷贝数变异为特征的“高拷贝数变异型”的肿瘤，这类肿瘤具有基因组不稳定性 和 TP53 重现性突变（也称为“浆液样”）<sup>[1]</sup>。这些生物学上独特的亚群已被证明具有显著的预后预测意义，且在风险分层和指导治疗和监测决策方面正变得越来越有价值。因此，尤其是当分子分型被纳入到 NCCN 和 ESGO/ESTRO/ESPEC 指南，分子分型与临床实践相结合可能在未来变得更加普遍<sup>[1-11]</sup>。

*POLE*mut 肿瘤患者有良好的预后和总体生存优势，因此识别该亚型肿瘤具有特殊的临床意义<sup>[1, 2, 6, 9]</sup>。具体来说，*POLE* 核酸外切酶结构域的致病性突变会导致复制校对受损以及较高频的碱基替换或错误，从而导致了高 TMB 或超突变（常  $\geq 100$  个突变/Mb）、特征性突变特征（COSMIC 特征 10）以及可能特别适合检查点抑制剂治疗的增强免疫反应<sup>[1, 3, 7, 12-19]</sup>。*POLE*mut 肿瘤占有所有子宫内膜癌的 5%~10%，主要在子宫内膜样 ECs 中检出，其中约 20% 的子宫内膜样 ECs 形态上为高级别（FIGO 3 级）<sup>[1-4, 6, 9]</sup>。此外，*POLE*mut 肿瘤可以表现出模糊的组织形态学模式，并且在形态上与浆液性和透明细胞癌重叠，而后者为具有侵袭性肿瘤生物学特征的高级别 ECs<sup>[20, 21]</sup>。因此，分子分型还有助于提高这类高级别 ECs 的诊断可重复性，而以往仅通过形态学评估，观察者之间的一致性较差<sup>[3, 22, 23]</sup>。在最近的 PORTEC-3 试验中，回顾性研究和前瞻性研究均证实 *POLE*mut 亚组的分子分类和鉴定具有良好的预后和无复发生存期的预测潜能<sup>[5, 7-9, 24, 25]</sup>。随着 ECs 分子分型在诊断病理学和妇科肿瘤学实践中变得越来越常规，迫切需要一种高效和经济的方法将 ECs 分为 4 个亚组。为此，免疫组化（immunohistochemistry, IHC）已被证明是一种有效的替代方法，用于识别 ECs 中错配修复蛋白（如，MLH1、PMS2、MSH6 和 MSH2）和 p53 蛋白对应的大部分基因变异<sup>[5-9, 26-33]</sup>。然而，目前仍需要基于核酸的检测方法来评估 *POLE* 突变状态。迄今为止，将包含 *POLE* EDM 的分子分型应用到实践仍是一个挑战，尤其是在不使用成本高昂且耗时的 NGS 方法的情况下。虽然 Sanger 测序作为一种相对廉价的检测 *POLE* 突变的方法也在开展，但其分析的灵敏度仅限于 VAF>20%，即当单个等位基因突变的肿瘤细胞数低于 40% 时会有假阴性结果的风险，这在活检标本中尤其具有挑战性。本研究中，我们通过用 SNaPshot 的方法学研发了一个快速、经济且灵敏的检

测 *POLE* EDMs 的方法，以实现 ECs 分子分型。

## 材料和方法

### 基因变异的选择和分类

2018 年 *POLE* SNaPshot 试验首次被构思和设计。检索 2018 年 12 月之前 PubMed 和公共癌症数据库中已发表的文献，包括 COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) 以及 cBioportal (<https://www.cbioportal.org/>)，筛选用于检测的临床相关 *POLE* 变异。变异选择的标准如下：[1]具有影响蛋白功能的证据；[2]与高 TMB 相关；[3]ECs 中的重现性突变，定义为出现在  $\geq 2$  个 ECs 样本中；和/或[4]ECs 临床预后研究中报告的非重现性突变，需要进一步研究其突变频率和致病性<sup>[1, 2, 12, 13, 17, 19, 34]</sup>。然后根据详细的标准（附表 1）将变异分为致病性、可能致病性或意义不确定。

### 引物/panel 设计

SNaPshot 技术包含两个部分，一是对相关基因靶序列进行首轮 PCR 扩增，二是如前期文献所述的多重单核苷酸引物延伸<sup>[36]</sup>。依据 NCBI 中的 *POLE* 基因参考序列 NM\_006231.4 设计所有的实验用引物。

采用 Primer3plus 在线引物设计网站针对 *POLE* EDM 结构域的第 9、11、13 和 14 号外显子设计 PCR 引物，并将退火温度控制在 58°C 至 60°C（附表 2）。使用凝胶电泳确认 PCR 扩增产物条带。

此外，设计 15 到 20 个核苷酸长度的延伸引物，并确保该引物结合位置紧邻正义链或反义链上的目标核苷酸。根据它们的核苷酸序列差异，将这些引物分组为 5 个多重引物 panel，以保证引物间的相互影响最小，且各个待测位点的信噪比最高。为了增加片段在毛细管电泳中的分辨率，每个引物的尾部都增加一个以 GACT 为单位的重复序列（附表 3）。通过毛细管电泳分析每个多重引物 panel 的延伸反应效率。凭经验根据凝胶电泳显示的扩增产物条带强度和毛细管电泳显示的延伸产物相对荧光值分别优化每组 panel 中的扩增引物和延伸引物的浓度。

由于用于检测第 11 号外显子的引物 panel II 缺少阳性对照样本，我们在这个 panel 中增加了一个靶向 c.1092G 的延伸引物，c.1092G 是一个已知的胚系多态性位点，该位点发生的任意核苷酸变异均不导致氨基酸编码的改变。

人工合成含有相关核苷酸变体的 40-mer 寡核苷酸 (IDT, San Diego, CA), 用于作为毛细血管电泳时单个扩增产物中各个目标核苷酸之间的距离的标准。在每个寡核苷酸的 3' 末端附加一个 poly-A 尾以防止非特异性延伸。这些寡核苷酸被加入到阴性对照样品的扩增后产物中 (附表 4)。

## 验证和样品选择

**POLE** SNaPshot 分析作为实验室开发的检测项目 (Laboratory developed test, LDT), 其验证是根据标准化实验医学实践准则 (standard laboratory medicine practice) 和美国病理学家 (CAP) 分子病理学核查列表 (Molecular Pathology Checklist) 进行方法学验证<sup>[37]</sup>。通过回顾斯坦福分子病理检测记录, 收集了福尔马林固定、石蜡包埋的子宫内膜样癌, 以及具有相似 **POLE** EDMs 的结直肠癌标本<sup>[38]</sup>。符合以下标准的样本被用于验证性研究: (1) 已通过 NGS 和/或 Sanger 测序检出 **POLE** 突变; (2) 肿瘤细胞占比大于 20%。共 31 例样本被用于验证研究, 包括 11 例阳性病例和 20 例阴性对照。

## 基因组DNA提取

使用 QIAmp 血液 DNA 小型提取试剂盒 (Qiagen, Germantown, MD), 按照说明书步骤从石蜡切片提取 DNA。用 NanodropOne 分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 检测 DNA 浓度。

## SNaPshot

使用 25 ng 的基因组 DNA 置于 10  $\mu$ l 体系中进行多重 PCR 反应。该扩增体系包含 1 $\times$  PCR 缓冲液 (Invitrogen)、2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、0.3 mmol/L ddNTP 以及最佳浓度的引物 (附表 3, 附数字内容 1, <http://links.lww.com/IJGP/A131>)。在热循环仪 (Eppendorf, Enfield, CT) 中按照以下条件进行扩增: 95 $^{\circ}$ C 8 分钟, 1 个循环; 95 $^{\circ}$ C 20 秒, 58 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟, 共 45 个循环; 72 $^{\circ}$ C、3 分钟, 1 个循环。在 2% 琼脂糖凝胶上确认多重 PCR 的扩增产物。为了灭活和降解多余的 dNTP 和引物, 将扩增产物与 3.44  $\mu$ l Exo-I/SAP 混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 分钟, 然后 80 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟灭活 Exo-I/SAP 酶。Exo-I/SAP 混合物含有 1 U/ $\mu$ l 的虾碱性磷酸酶 (SAP; Fermentas, Waltham, MA) 和 20 U/ $\mu$ l 的核酸外切酶 -I (Fermentas)。

单核苷酸延伸反应包含经灭活处理的 PCR 扩增产物 1  $\mu$ l、特定浓度的延伸引物 (附表 4, 附数字内容 1, <http://links.lww.com/IJGP/A131>)、5 $\times$  测序缓冲液 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 1  $\mu$ l 和 SNaPshot 试剂 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 2.5  $\mu$ l, SNaPshot 试剂中含有荧光标记的双脱氧核苷酸 (ddNTPs: A = dR6G, 绿色; C = dTAMRA, 黑色; G = dR110, 蓝色; T = dROX, 红色), 使用 ddH<sub>2</sub>O 将最终反应体积补足为 10  $\mu$ l。延伸反应条件如下: 96 $^{\circ}$ C 30 秒, 1 个循环; 96 $^{\circ}$ C 10 秒, 50 $^{\circ}$ C 5 秒, 60 $^{\circ}$ C 30 秒, 25 个循环。随后在延伸反应产物中加入 1 U/ $\mu$ l 虾碱性磷酸酶 1  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 分钟, 然后 80 $^{\circ}$ C 灭活 2 分钟。

然后, 使用 ABI 3500xL24 通道基因分析仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 及其匹配的 POP-7 凝胶和 50 厘米毛细管, 通过毛细管电泳测定 SNaPshot 延伸产物的大小和荧光信号值。在电泳上样之前, 需将处理过的 SNaPshot 多重延伸反应产物 0.5  $\mu$ l 与 Hi Di 甲酰胺 9.4  $\mu$ l、片段标准品 (GS120LIZ) 0.1  $\mu$ l 混合。将该混合物加热至 95 $^{\circ}$ C 3 分钟以诱导 dsDNA 变性, 4 $^{\circ}$ C 冷却 2 分钟。15 kV 电压下 5 秒内上样, 采用 Matrix 标准设置 D2-02, 在 15 kV 和 (原文此处缺数据)  $\mu$ A 60 $^{\circ}$ C 条件下电泳 24 分钟。在这个过程中, 激光要保持恒定的功率。使用 GeneMapper v5.0 和预定的检测参数分析所得数据。

SNaPshot 方法易受潜在的伪峰干扰, 这会使解读变得复杂, 因此需要确定严格的解读标准。为从背景噪声中区分出小的突变峰, 峰值颜色必须落在突变等位基因的预定大小范围内。此参数是通过分析引物 /panel 设计中描述的人工合成 40-mer 寡核苷酸信号来确定。此外, 在正常对照中, 可用于分析的低信号峰的高度荧光值应当超过已知背景峰高度的 3 倍以上。如果在检测范围内遇到低丰度阳性结果, 则通过重复检测进行确认。

如果未观察到任何野生型等位基因峰或丰度低于 1000 个荧光单位, 则该样本的检测是失败的。无论是否存在 **POLE** 突变, 野生型等位基因均应出现。内对照可用于评估 DNA 的整体质量和是否存在扩增抑制物污染。扩增抑制物可能对 DNA 扩增和引物在每个待测核苷酸位点的延伸效率具有潜在影响。此外, 每次实验都应包含阳性灵敏度对照和阴性对照, 以确保检测性能一致性。

## 检测量值有效范围

通过 NGS 方法确定了 VAF 的已知样本用于建立 SNaPshot 试验的检测限度 (分析灵敏度)。具体来说, 具有不同致病变异 (c.857C > G、c.1231G > T、c.1270C > T) 的三个阳性对照样品, NGS 检测所得的突变 VAFs 分别为 36%、25%、49%, 通过适当稀释, 得到最终 VAFs 分别为 20%、10%、5% 或 1% 的试验样本。使用阴性对照 DNA 进行上述样本的稀释, 同时保持扩增反应的 DNA 模板量恒定于 25 ng。

如果待测样本的某一信号峰高度超过阴性对照中相同荧

光颜色和片段长度的任何背景峰高度的 3 倍, 则判定为阳性, 即存在相应的 *POLE* 突变。

### DNA模板量最低限

为了能够可靠的识别接近检测下限的突变样本, 使用梯度稀释实验确定检测所需的最小 DNA 输入量, 分别使用 25、12.5、6.25 和 3.125 ng 的 DNA 进行该项检测。

**表1. *POLE* SNaPshot 靶向核酸外切酶结构域外显子 9, 11, 13 和 14 中的 15 个核苷酸位置**

套餐	外显子	位置	氨基酸改变	核苷酸改变	变异的判读		
I	9	p.Pro286	p.Pro286Arg*	c.857C>G	Pathogenic		
			p.Pro286His*	c.857C>A	Likely pathogenic		
		p.Ser297	p.Pro286Leu	c.857C>T	VUS		
			p.Ser297Phe*	c.890C>T	Likely pathogenic		
		p.Met299	p.Ser297Tyr	c.890C>A	VUS		
			p.Ser297Cys	c.890C>G	VUS		
			p.Met299Val*	c.895A>G	VUS †		
			p.Met299Leu	c.895A>C, c.895A>T	VUS		
			II (RUO)	11	p.Phe367	c.1100T>C	Likely pathogenic
					p.Phe367Cys	c.1100T>G	VUS
IIIA	13	p.Val411	p.Phe367Tyr	c.1100T>A	VUS		
			p.Val411Leu*	c.1231G>C, c.1231G>T	Pathogenic		
		p.Leu424	p.Val411Met	c.1231G>A	VUS		
			p.Leu424Ile*	c.1270C>A	Likely pathogenic		
		p.Pro436	p.Leu424Val	c.1270C>G	Likely pathogenic		
			p.Leu424Phe	c.1270C>T	VUS		
			p.Pro436His*	c.1307C>A	Likely pathogenic		
			p.Pro436Arg*	c.1307C>G	Likely pathogenic		
			p.Met444	p.Pro436Leu	c.1307C>T	VUS	
				p.Met444Lys*	c.1331T>A	VUS †	
IIIB	13	p.Leu424	p.Met444Thr	c.1331T>C	VUS		
			p.Met444Arg	c.1331T>G	VUS		
		p.Pro436	p.Leu424Pro*	c.1271T>C	VUS †		
			p.Leu424Arg	c.1271T>G	VUS		
		p.Pro436	p.Leu424His	c.1271T>A	VUS		
			p.Pro436Ser	c.1306C>T	VUS †		
			p.Pro436Ala	c.1306C>G	VUS		
			p.Pro436Thr	c.1306C>A	VUS		
			IV	14	p.Ala456	c.1366G>C	Pathogenic
					p.Ala456Thr	c.1366G>A	VUS
p.Tyr458	p.Ala456Ser	c.1366G>T	VUS				
	p.Tyr458His*	c.1372T>C	VUS †				
	p.Tyr458Asp	c.1372T>G	VUS				
	p.Tyr458Asn	c.1372T>A	VUS				
	p.Tyr458Cys*	c.1373A>G	VUS †				
	p.Tyr458Ser	c.1373A>C	VUS				
	p.Ser459	p.Tyr458Phe ‡	c.1373A>T	VUS			
		p.Ser459Phe*	c.1376C>T	Pathogenic			
	p.Ala465	p.Ser459Cys	c.1376C>G	VUS			
		p.Ser459Tyr	c.1376C>A	VUS			
p.Ala465Val*		c.1394C>T	VUS †				
p.Ala465Gly		c.1394C>G	VUS				
		p.Ala465Asp	c.1394C>A	VUS			

\*实验设计时认为与临床相关的变异。

† 特指在临床预后研究中发现的意义不确定的罕见变异。

‡ 体系和胚系中已被报道的变异。

RUO 表示仅用于研究; VUS 指意义不明的变异。

## 重现性评估

通过评估批次内和批次间的样本变异性来评估检测的精确度。5个阳性样本均进行了三次重复（批次内），且分别进行了三次独立的重复试验（批次间）（附表5）。

## Sanger测序

使用上述多重 PCR 扩增引物对验证样品进行扩增和测序分析。

## 统计分析

使用 4.0.2 版 R 语言包进行统计分析。

## 结果

### SNaPshot检测的设计

基于描述 ECs 分子特征和 *POLE* 突变所累积的文献，*POLE* SNaPshot检测在 2018 年被设计出来。该方法检测 *POLE* 变异的临床灵敏度达到 90%-95%。换言之，该检测覆盖了 ECs 中最常见的突变位点。这些突变位点占 ECs 中已报道的所有临床相关 *POLE* EDMs 变异的 90-95%（1, 2, 17, 35, 39, 40）。具体来说，该检测囊括了 *POLE* 基因 EDM 9、11、13 和 14 外显子的 15 个核苷酸位点，包括几个

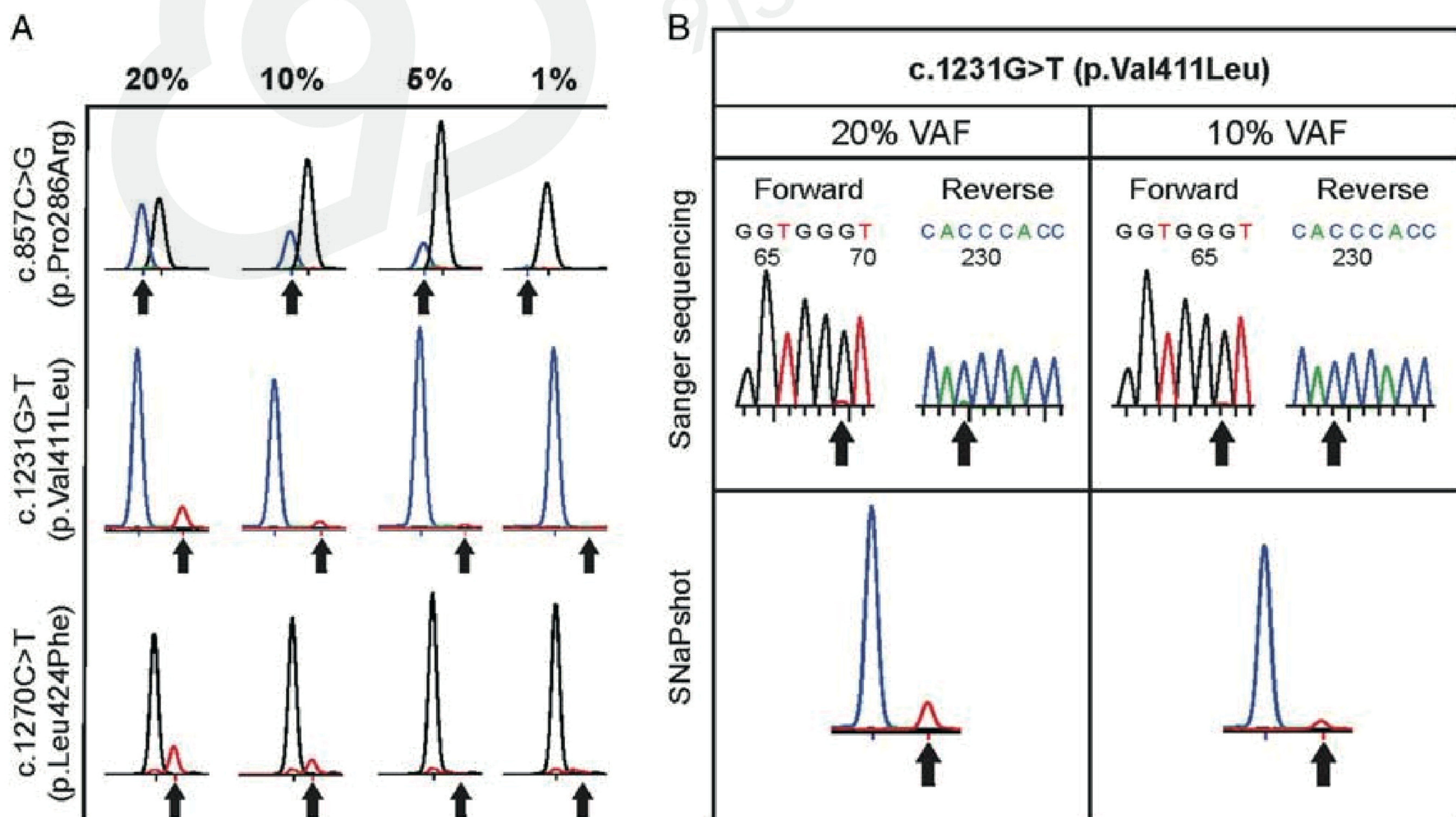
临床相关的氨基酸变异（表 1）。检测 panel 的设计特意包含几个反复出现的未知意义的变异。这些变异已在文献中报道过，并在临床预后研究中得到确定。把这些位点包括在内的目的是增加检测的覆盖度，且如果我们研究中检测到这些位点，可以进一步描述其致病性。15 个靶点使该检测能够检测到 45 个核苷酸变异，对应 43 个氨基酸的改变（表 1）。

为达到这样的覆盖率，设计和使用了 4 对 PCR 扩增引物（每个外显子 1 对，附表 2）和 15 个延伸引物（分别在 5 个不同 panel，附表 3，附数字内容 1）。

### 分析验证

验证样本包括 31 个子宫内膜样 ECs 和结直肠癌的石蜡组织。31 个样本中有 11 个检测出 *POLE* 突变，其余样本未检测出 *POLE* 突变。在 2018 年测试验证时，大多数临床 NGS 和 Sanger 测序仅针对 *POLE* 的 9 和 13 外显子；因此，本组阳性样本主要包含这两个外显子中的变异，以及少数具有 14 外显子变异的样本。鉴于此，临床验证期间的性能特征只能建立在评估 9、13 和 14 外显子的 panel。检测 11 外显子的 panel 仅作为研究用途，只是为了前瞻性地收集病例，以供未来临床验证。

SNaPshot 检测显示所有阳性（n=11）和阴性对照样本



**图1.** *POLE* SNaPshot 和 Sanger 测序的灵敏度对比。(A) 使用含有 c.857C>G (p.Pro286Arg), c.1231G>T (p.Val411Leu) 和 c.1270C>T (p.Leu424Phe) 核苷酸变异的样本评估检测的灵敏度, 这些样本的变异等位基因丰度 (variant allele fraction, VAF) 用二代测序 (next-generation sequencing, NGS) 来确定。对稀释至 20%、10%、5% 或 1% 的 VAF 的样品进行 SNaPshot, 并使用阴性对照 DNA, 同时保持总输入 DNA 不变 (25 ng)。所有 3 个变异均重复检测到 VAF 至 10%。(B) 将含有 c. 1231G > T (p.Val411Leu) 核苷酸变异的样本分别稀释至 VAF 为 20% 和 10%, 对同一样品进行 Sanger 测序和 SNaPshot 测定。Sanger 测序显示 VAF 检出限值为 20%, 人工复查时可识别出变异峰, 测序仪则无法识别。然而, SNaPshot 检测对于同一样品, 在 20% 和 10% VAF 条件下都有一个易于识别的峰值。核苷酸荧光标记如下: A-绿, T-红, C-黑, G-蓝。实线箭头表示突变变异峰。

(n=20) 预期的基因型结果, 反映了 100% 的准确度 (95% CI: 86.27–100) (31/31)。同样, 检测灵敏度 (11/11) 和特异度 (20/20) 均为 100% (95% CI: 灵敏度: 67.86–100; 特异度: 79.95–100)。其中一个样本, 由于提取的 DNA 产量低以及 NGS 检测时发现大量非特异性核苷酸变异, 被怀疑为 DNA 质量差, 最初 SNaPshot 显示出一个非常弱的突变信号峰 (c.1231G > A), 此峰值低于 10%VAF 灵敏度控制; 然而, 这一发现在重复测试后没有再出现。

在评估检测极限的研究中, 对于检测的所有 3 种变异体 (c.857C > G, c.1231G > T, c.1270C > T), 在 VAF 估计为 10% 时, 很容易观察到突变峰。在 VAF 估计为 5% 时, 3 个变异中只有 1 个具有清晰可辨的突变峰; 因此, SNaPshot 的总检测极限值为 10%VAF (图 1A)。正如预期的那样, SNaPshot 检测的灵敏度明显高于 Sanger 测序, 后者无法检测低于 20%VAF 的变异 (图 1B)。

在批内和批间的精密度评估中, 用于这些实验的所有 5 个阳性样本的突变等位基因, 在批内和批间均被检测到。为了更精确地评估重现性, 我们使用附表 5 (附数字内容 1) 中描述的公式计算了每次检测的等位基因比率。批内试验的等位基因比率变异系数在 6% 到 26% 之间, 批间试验的等位基因比率变异

系数在 1% 至 13% 之间 (附表 5, 附数字内容 1)。重要的是, VAF ≤ 20% 的样本的变异系数 < 10%, 表明接近检测极限的变异有足够的重现性。

最后, 使用给定的 DNA 上样量用于评估分析性能。在 VAF 为 10% 时, 对所有 3 个阳性对照进行一致检测所需的最小 DNA 上样量确定为 6.25 ng。在所有验证性研究中, 在空白对照 (待测样本无 DNA) 中未检测到峰。

## 讨论

随着 ECs 分子分型在指导临床管理方面的进一步确立, 在诊断时尽早报告关键分子生物标志物将变得越来越有用。虽然 MLH1、PMS2、MSH6、MSH2 和 TP53 的基因改变常通过免疫组化进行评估, 但亟待确立能够快速且廉价评估 *POLE* 突变状态的方法, 以避免延误临床治疗。本文中, 我们详述了 SNaPshot 检测技术的研发, 自行设计并优化了包含 *POLE* EDM 的 9、11、13 和 14 外显子中 15 个核苷酸位点的检测。这项技术能够可靠的检出 ECs 中目前已报道的所有致病性 *POLE* 体系突变, 对 ECs 检测的临床灵敏度达 90% 至 95% [1, 2, 17, 34, 35, 39, 40]。

以前临床工作中 *POLE* 突变的检测主要依赖 NGS 或

**表2.** SNaPshot测序、Sanger测序和二代测序的性能评估

	SNaPshot	Sanger 测序	NGS
敏感性	约 10%VAF	约 20%VAF	约 5%VAF
覆盖范围	靶向局部外显子	全外显子	全外显子
特殊设备	毛细管电泳	毛细管电泳	NGS测序
解读	容易	中度难度	中度难度
分子病理医生参与的时间	数分钟	数分钟至数小时*	数分钟至数小时*
出结果所耗的总时间	数小时	数小时至数天	数周
每例样本所耗试剂的费用	便宜	价格中等	昂贵

\*需要分子病理学家来确定新的致病性变异。

NGS 表示二代测序; VAF, 变异等位基因丰度。

Sanger 测序。SNaPshot 测序的发展有以下几个优点 (表 2)。此单基因检测在能够覆盖 *POLE* 几乎所有相关的变异位点的同时, 检测时间更短, 成本更低。具体而言, SNaPshot 检测可以在临床实验室一个班次内完成 (8 小时以内), 并且可以快速的进行结果解读, 从而最大限度地缩短实验室审核时间, 并能更高效地将结果反馈给医师和患者。SNaPshot 与 NGS 的总体成本差异主要取决于机构定价, 这通常与地域和医院相关。根据我们研究所 SNaPshot 检测的经验, 我们估算试剂、技术人员和病理学家的时间等成本约为每个样本 50 美元, 这一成本至少是 NGS 实验室成本的五分之一。与 Sanger 测序相比, SNaPshot 不但结果解释更便利, 更重要的是, 分析灵敏度大大提高。在使用石蜡标本检测体细胞突变时, Sanger 测序特别容易出现假阴性, 因为可能需要 >40% 的肿瘤细胞才能可靠地检测相关突变 (即单个等位基因突变的 VAF>20%)。正如所证明的, Sanger 测序的检测极限接近 20% 的 VAF, 通过人工复核可辨别出不能被测序仪识别的小突变峰。理论上, Sanger 测序可以检测整个外显子的新突变, 而不是只关注少数几个热点, 但在实践中, 评估 Sanger 测序结果面临着许多挑战, 突变信噪比低、乘客突变或胚系多态性均会使结果解读变的复杂且耗时, 而不能提供临床有用的信息。

SNaPshot 检测的概念于 2018 年被提出, 被设计用于检测 *POLE* EDMs, 在 ECs 中检测的临床敏感度 >90%。事实上, 基于 COSMIC、cBioportal 和公开发表的文献, 3 个最常见的致病性 *POLE* 突变位点, p.Pro286Arg、p.Val411Leu 和 p.Ala456Pro, 占 ECs 致病性 *POLE* 突变的 70% 以上<sup>[1, 3, 6, 17]</sup>。目前, 大多数致病性 *POLE* 突变在 9、11、13 和 14 外显子内, 这一区段编码有校对功能的核酸外切酶结构域。然而, 已报道的核酸外切酶结构域外的低频致病突变甚少, 特别是在 ECs 中尤其罕见<sup>[12, 17]</sup>。与任何分子检测一样, 需要不断回顾文献, 以确保最优化的热点检测并保持高的临床灵敏度。随着 ECs 中 NGS 和分子检测增多, 很可能会发现其它临床相关的致病性 *POLE* 突变。从我们 *POLE* 检测的最初设计和验证以来, Leon-Castillo 等人<sup>[41]</sup>提出了 11 种致病性 *POLE* 突变。值得注意的是, 我们的检测 panel 不包括 11 个 *POLE* 突变中的 2 个位点 (p.Met295Arg 和 p.Asp368Tyr)。然而, p.Met295Arg 和 p.Asp368Tyr 突变非常罕见, 各自只在文献中报道过一次。即使不包括这两个变异的检测, 我们检测方法的临床灵敏度仍为 90% 至 95%。重要的是, SNaPshot 方法可以灵活地添加核苷酸延伸引物, 增加外显子覆盖率, 这对于维护一种高

临床敏感度的检测是必要的, 而且修改后的再验证也快速且经济。如果该变异类型出现更多的报道病例, 且致病性表型得到验证, 我们会考虑在下一版检测 panel 中加入 p.Met295Arg 和 p.Asp368Tyr 突变。

尽管高度重现的 *POLE* EDMs (p.Pro286Arg, p.Val411Leu 和 p.Ala456Pro) 极具特征性, 但是大多数 *POLE* EDMs 发生的频率较低, 对其明确的分类更具挑战性。在临床分子病理学实践中, 我们使用保守且循证的方法对变异进行分类。*POLE* EDM 只有在以下情况下才被认为是致病性的: 1) 高度重现; 2) 始终与高 TMB 相关; 3) 体外研究证实其可导致功能损伤; 4) 非官方或官方的专家共识认为其具有致病性。目前, 有几种 *POLE* EDM, 其重现率低到中等, 在有限的病例中有相关的高 TMB, 有或无体外证据表明其影响功能。在这种情况下, 鉴于一致的证据仍在不断出现, 且尚未达成共识, 因此对于上述 *POLE* EDM 使用了“可能”致病的限定词。如前所述, *POLE* SNaPshot 被设计用于检测一些更为罕见的临床预后研究中发现的 *POLE* EDMs, 以便更好的了解这些变异的突变频率和致病性<sup>[2, 3, 42]</sup>。具有以下特点的 *POLE* EDM 被认为是意义不确定的变异, 1) 检出率低或非重现性, 2) 尚无或很少报道其与 TMB 相关, 3) 没有体外研究表明其影响功能, 4) 对其致病性未达成共识。值得注意的是, 在评估证据时的个别临床判断可能导致不同分子病理学实践中对变异的致病性分类略有差异。开展测序技术的实验室在解读致病性变异、良性变异和意义不确定的变异时应具有决策流程和书面方案。AMP/ASCO/CAP 共识指南已经被发布, 以帮助变异的解读和分类的标准化<sup>[43, 44]</sup>。在我们的分子病理学实践中, 我们继续至少每年一次地回顾已发表的文献和公开的癌症数据库, 并相应地更新变异的解读。

当使用 SNaPshot 技术时, 可能会发现以前未报告的单核苷酸变异。由于这些变异的功能和临床意义可能不如更常见的核苷酸变异和相同位点的氨基酸变异那么明确, 因此我们建议解读这些发现时要谨慎, 分类时应趋于保守。补充包括 NGS 在内的其它检测, 以评估 TMB 和遗传结构或突变特征, 可帮助对 *POLE* EDM 进一步描述和分类。

确定 *POLE* 突变的致病性, 并最终用于 ECs 的分子分型仍然是分子病理学中的一个持续性挑战。最近, Leon-Castillo 等利用 TCGA 全外显子组测序数据中的重现性 *POLE* EDM, 识别与致病性 *POLE* 突变有关的特征性基因关联。在高 TMB (100 个突变/Mb) 和基因组结构或特征 (例如, COSMIC

突变特征 10, 即 TpCpT 中 C>A 突变和 TpTpT 中 T>G 突变显示出了链偏倚, 这与致病性 *POLE* 突变相关) 的情况下评估致病性。具体而言, 其设计了一个“*POLE*-评分”系统, 以下每项观察值给予 1 分: 重现性突变 (观察 >2 目标), 高 TMB (>100 个突变/Mb), C>A 超过 20%, T>G 超过 4%, indels 低于 5%, C>G 低于 0.6%。得分  $\geq 4$  的被认为是致病性变异, =3 是意义未知的变异, <3 是非致病性 *POLE* 突变<sup>[41]</sup>。随着 ECs 测序病例的增加, 将发现更多具有这些罕见 *POLE* EDM 的肿瘤, 有助于通过更多的分析明确致病性突变, 并确定在不同变异之间外切酶活性的破坏和超突变表型是否相似。

已发现的致病性胚系 *POLE* 突变可增加 EC、结直肠癌以及其他肿瘤 (包括乳腺癌、胃癌和卵巢癌、脑肿瘤、十二指肠腺瘤和癌) 的发病风险<sup>[12]</sup>。由于胚系检测需要患者知情同意和非肿瘤组织样本, 该检测旨在检测体细胞 *POLE* 突变。重要的是, 一些体细胞 *POLE* 突变类型在胚系中也有发现, 包括 p.Pro436Ser、p.Leu424Val、p.Tyr458Phe 和 p.Val411Leu, 这些突变均可被 *POLE* SNaPshot panel 检测到<sup>[12, 45]</sup>。虽然 SNaPshot 检测的目的不是为了区分体系和胚系 *POLE* 变异, 但如果在检测期间发现了一个上述的体系/胚系均可出现的突变, 则可以在有临床提示并获得患者知情同意的情况下进行额外的胚系检测。

虽然 *POLE* 突变与其它分子分型的共存并不常见, 但这种现象可以发生在一小部分 ECs 中 (占 3%-5%)<sup>[1, 24]</sup>。在伴有微卫星不稳定/错配修复蛋白缺陷 (MSI/MMRd) 的 *POLE* 突变的分子分型应该特殊分析。*POLE* 突变可能导致错配修复基因的体细胞突变, 反之亦然。为了区分这两种情况, 可以通过免疫组化评估 MMRd。由于体系 MMR 基因突变可能继发于致病性 *POLE* 突变的后期事件, 因此, 免疫组化可以显示 MMR 蛋白亚克隆性丢失。另外, 特定的 *POLE* 突变也很关键; 非重现性和发生在核酸外切酶结构域之外的 *POLE* 突变在 MMRd 中更常见, 这种情况下, *POLE* 突变为继发于 MMRd 的乘客事件<sup>[24, 41, 46]</sup>。NGS 有助于提供 VAF、TMB 和突变特征 (例如, COSMIC 特征 10), 联合应用这些检测方法有助于最终的分子分型。

在诊断时整合 ECs 的组织形态学和分子分型将在临床实践中将变得越来越常规, 特别是当分子分型被纳入 NCCN 和 ESGO/ESTRO/ESP EC 指南时<sup>[10, 11]</sup>。因为这类肿瘤中的一部分表现出高级别和/或与浆液性和透明细胞癌重叠的模棱两可的

形态特点, 诊断时具备 *POLE*mut 检测技术不仅能够提高诊断的可重复性, 而且能够识别生物学上表现不同的肿瘤类别, 这类肿瘤往往具有更良好的临床结局。目前正在进行一项随机对照临床试验 (PORTEC4a), 研究将分子分型纳入风险评估和辅助治疗的价值, 以减少过度治疗和治疗不足<sup>[47, 48]</sup>。最近, 报道了 *POLE*mut 肿瘤中一部分病例出现复发和远处转移, 包括那些具有最常见的致病性 *POLE* 突变的肿瘤 (例如 p.286r>p.V411L)。然而, 这些患者中的大多数具有良好的预后, 死亡率仍然极低<sup>[46, 49, 50]</sup>。整合分子分型可以在肿瘤进展或复发时提供更有价值和针对性的策略。例如, *POLE*mut 肿瘤显示出较强的免疫反应, 并适用于检查点抑制剂<sup>[15, 51-53]</sup>。

我们注意到, 本文所述的 *POLE* SNaPshot 检测法的应用和设计也存在一定的局限性。虽然与 NGS 相比, SNaPshot 技术的验证和操作相对简单, 但这仍是一种 LDT, 仍然需要分子病理学家和技术专家的专业知识和专业设备, 并且最好在有分子实验室的机构进行。我们的分子实验室已建立了 ABI 毛细管电泳技术, 并先前推出数项针对单基因检测的 SNaPshot 试剂。我们实验室具备的专业水平是开发 *POLE* SNaPshot 检测试剂的基础。其他支持多功能性技术, 如质谱分析或基于实时 PCR 的方法, 也是建立 *POLE* 检测时的合理考虑因素, 并且根据分子实验室的检测实践可能更容易整合。我们在研发该检测方法时利用了现有文献和数据库设计出复杂的 panel, 并纳入了尚未确定的 *POLE* 突变, 以便在检测到这些突变时能够进一步明确其性质。但这需要分子病理学家去回顾和解释变异的致病性和临床意义, 然而并非所有研究机构都能有此条件。根据研究机构对单基因 *POLE* 检测的具体使用情况, 可能需要一个仅限于包含明确致病变异的小 panel 即可。

此外, 有必要进行持续的质量评估, 以确保正确地理解真实世界的测序结果。据我们所知, 目前没有现成的 *POLE* 突变参考样本。因此, *POLE* 突变检测的实验室需要自行筛选含有 *POLE* 突变的临床样本以用于验证, 而这可能会限制验证队列中突变的数量和多样性。通过使用 SNaPshot 检测方法可以发现含有 *POLE* 变异的其它样本, 我们从而可以使用更大的样本队列进行验证研究。

虽然本文中描述的验证没有任何失败样本, 但由于不同固定方法、核酸降解或抑制性污染物等问题, 有可能出现测试失败的情况。为了解决这些问题, 在进行 *POLE* SNaPshot 检测之前, 应该常规评估每个样本的 DNA 上样量。此外, 为防止不正确的判读, 应制定严格的判读标准和样本中肿瘤细胞百分比的要



求, 因为这些因素会增加检测失败或样本不合格的可能性(见材料与方法)。最后, 未来在不同癌种(如结肠癌和子宫内膜癌)和标本类型(如活检和切除术)中对该方法评估, 将进一步证明此检测方法的优越性。

小结一下, 我们报告了一种基于 SNaPshot 技术检测 *POLE* EDMs 的方法, 此方法快速、廉价且灵敏度高。由于确定是否存在 *POLE* 突变依赖于分子检测, 因此可能会有更多的单基因检测和方法学陆续出现, 以便在常规临床实践中更容易地实现 ECs 分子分型。

### 参考文献

1. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C, Schultz N, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature* 2013;497:67–73.
2. Church DN, Stelloo E, Nout RA, et al. Prognostic significance of *POLE* proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015;107:402.
3. McConechy MK, Talhouk A, Leung S, et al. Endometrial carcinomas with *POLE* exonuclease domain mutations have a favorable prognosis. *Clin Cancer Res* 2016;22:2865–73.
4. Hussein YR, Weigelt B, Levine DA, et al. Clinicopathological analysis of endometrial carcinomas harboring somatic *POLE* exonuclease domain mutations. *Mod Pathol* 2015;28:505–14.
5. Meng B, Hoang LN, McIntyre JB, et al. *POLE* exonuclease domain mutation predicts long progression-free survival in grade 3 endometrioid carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol* 2014;134:15–9.
6. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer* 2015;113:299–310.
7. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, et al. Improved risk assessment by integrating molecular and clinicopathological factors in early-stage endometrial cancer-combined analysis of the PORTEC cohorts. *Clin Cancer Res* 2016;22:4215–24.
8. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, et al. Confirmation of ProMisE: a simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer. *Cancer* 2017;123:802–13.
9. Kommoss S, McConechy MK, Kommoss F, et al. Final validation of the ProMisE molecular classifier for endometrial carcinoma in a large population-based case series. *Ann Oncol* 2018;29:1180–8.
10. Concin N, Creutzberg CL, Vergote I, et al. ESGO/ESTRO/ESP Guidelines for the management of patients with endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2021;31:12–39.
11. National Comprehensive Cancer Network. Uterine Neoplasms (Version 1.2021). Available at: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/uterine.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterine.pdf). Accessed March 1, 2021.
12. Rayner E, van Gool IC, Palles C, et al. A panoply of errors: polymerase proofreading domain mutations in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016;16:71–81.
13. Church DN, Briggs SE, Palles C, et al. DNA polymerase epsilon and delta exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum Mol Genet* 2013;22:2820–8.
14. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415–21.
15. van Gool IC, Eggink FA, Freeman-Mills L, et al. *POLE* proofreading mutations elicit an antitumor immune response in endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2015;21:3347–55.
16. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, et al. Association of polymerase e-mutated and microsatellite-instable endometrial cancers with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes, and expression of PD-1 and PD-L1. *JAMA Oncol* 2015;1:1319–23.
17. Campbell BB, Light N, Fabrizio D, et al. Comprehensive analysis of hypermutation in human cancer. *Cell* 2017;171: 1042–56. e10.
18. Nelson BH, McAlpine JN. The more tumors change, the more they stay tame: do T cells keep *POLE* ultramutated endometrial carcinomas in check? *Gynecol Oncol* 2015;138:1–2.

19. Shinbrot E, Henninger EE, Weinhold N, et al. Exonuclease mutations in DNA polymerase epsilon reveal replication strand specific mutation patterns and human origins of replication. *Genome Res* 2014;24:1740–50.
20. Bakhsh S, Kinloch M, Hoang LN, et al. Histopathological features of endometrial carcinomas associated with POLE mutations: implications for decisions about adjuvant therapy. *Histopathology* 2016;68:916–24.
21. Conlon N, Da Cruz Paula A, Ashley CW, et al. Endometrial carcinomas with a “serous” component in young women are enriched for DNA mismatch repair deficiency, Lynch syndrome, and POLE exonuclease domain mutations. *Am J Surg Pathol* 2020;44:641–8.
22. Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2013;37:874–81.
23. Lomo L, Nucci MR, Lee KR, et al. Histologic and immunohistochemical decision-making in endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:937–42.
24. Leon-Castillo A, Gilvazquez E, Nout R, et al. Clinicopathological and molecular characterisation of “multiple-classifier” endometrial carcinomas. *J Pathol* 2020;250:312–22.
25. Leon-Castillo A, de Boer SM, Powell ME, et al. Molecular classification of the PORTEC-3 trial for high-risk endometrial cancer: impact on prognosis and benefit from adjuvant therapy. *J Clin Oncol* 2020;38:3388–97.
26. de Leeuw WJ, Dierssen J, Vasen HF, et al. Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumours from HNPCC patients. *J Pathol* 2000;192:328–35.
27. Goodfellow PJ, Billingsley CC, Lankes HA, et al. Combined microsatellite instability, MLH1 methylation analysis, and immunohistochemistry for Lynch syndrome screening in endometrial cancers from GOG210: an NRG Oncology and Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2015;33:4301–8.
28. Mills AM, Liou S, Ford JM, et al. Lynch syndrome screening should be considered for all patients with newly diagnosed endometrial cancer. *Am J Surg Pathol* 2014;38:1501–9.
29. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol* 2011;24:1248–53.
30. Kobel M, Piskorz AM, Lee S, et al. Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res* 2016;2:247–58.
31. Cole AJ, Dwight T, Gill AJ, et al. Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci Rep* 2016;6:26191.
32. Singh N, Piskorz AM, Bosse T, et al. p53 immunohistochemistry is an accurate surrogate for TP53 mutational analysis in endometrial carcinoma biopsies. *J Pathol* 2020;250:336–45.
33. Kim G, Kurnit KC, Djordjevic B, et al. Nuclear beta-catenin localization and mutation of the CTNNB1 gene: a contextdependent association. *Mod Pathol* 2018;31:1553–9.
34. Chakravarty D, Gao J, Phillips SM, et al. OncoKB: a precision oncology knowledge base. *JCO Precis Oncol* 2017;2017: PO.17.00011. doi:10.1200/PO.17.00011.
35. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2:401–4.
36. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, et al. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: a clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2010;2:146–58.
37. College of American Pathologists. Checklist. AMP. August 21, 2017 ed: Northfield, IL: College of American Pathologists; 2017.
38. Forgo E, Gomez AJ, Steiner D, et al. Morphological, immunophenotypical and molecular features of hypermutation in colorectal carcinomas with mutations

- in DNA polymerase epsilon (POLE) . *Histopathology* 2020;76:366–74.
39. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, et al. COSMIC: the catalogue of somatic mutations in cancer. *Nucleic Acids Res* 2019;47:D941–D7.
  40. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;6:pl1.
  41. Leon-Castillo A, Britton H, McConechy MK, et al. Interpretation of somatic POLE mutations in endometrial carcinoma. *J Pathol* 2020;250:323–35.
  42. Billingsley CC, Cohn DE, Mutch DG, et al. Polymerase varepsilon (POLE) mutations in endometrial cancer: clinical outcomes and implications for Lynch syndrome testing. *Cancer* 2015;121:386–94.
  43. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–24.
  44. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2017;19:4–23.
  45. Wimmer K, Beilken A, Nustede R, et al. A novel germline POLE mutation causes an early onset cancer prone syndrome mimicking constitutional mismatch repair deficiency. *Fam Cancer* 2017;16: 67–71.
  46. Stasenko M, Tunnage I, Ashley CW, et al. Clinical outcomes of patients with POLE mutated endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2020;156:194–202.
  47. Stelloo E, Bosse T, Nout RA, et al. Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative. *Mod Pathol* 2015;28:836–44.
  48. PORTEC-4a. Molecular Profile-based Versus Standard Adjuvant Radiotherapy in Endometrial Cancer (PORTEC-4a). Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03469674>. Accessed December, 2018.
  49. Devereaux K, Chow S, Steiner D, et al. Abstracts from USCAP 2020: gynecologic and obstetric pathology (1047-1234). *Mod Pathol* 2020;33:1041–42.
  50. McAlpine JN, Chiu DS, Nout RA, et al. Evaluation of treatment effects in patients with endometrial cancer and POLE mutations: an individual patient data meta-analysis. *Cancer* 2021;127:2409–2422.
  51. Talhouk A, Derocher H, Schmidt P, et al. Molecular subtype not immune response drives outcomes in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2019;25:2537–48.
  52. Mehnert JM, Panda A, Zhong H, et al. Immune activation and response to pembrolizumab in POLE-mutant endometrial cancer. *J Clin Invest* 2016;126:2334–40.
  53. Veneris JT, Lee EK, Goebel EA, et al. Diagnosis and management of a recurrent polymerase-epsilon (POLE)-mutated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2019;153:471–8.

Suppl. Table 1. Variant interpretation criteria

Classification	Evidence
Pathogenic	Variants of high-frequency, established association with a high tumor mutation burden, with in vitro evidence of functional impact, and at least unofficial expert consensus
Likely pathogenic	Variants of low to intermediate frequency, limited number of cases showing an association with increased tumor mutation burden, with or without in vitro evidence of functional impact, and emerging consensus
Variant of unknown significance (VUS)	Variants of low-frequency, uncharacterized or few reports of tumor mutation burden, without in vitro evidence of functional impact, and no consensus

**Suppl. Table 2. Exon PCR amplification primers**

Exon	Primer name	Strand	Primer sequence (5' to 3' )	Primer Length (bps)	Amplicon size (bps)	Final Conc. in 10X Primer Mix (μM)
9	POLE-Ex9Fw	Sense	GTGTTTCAGGGAGGCCTAATG	20	248	1.2
	POLE-Ex9Rev	Antisense	GGGCAGATGCTGCTGTAGTA	20		
11	POLE-Ex11Fw	Sense	ACTTTGGGAGAGGAATTTGG	20	250	1.2
	POLE-Ex11Rev	Antisense	CCTAAGTCGACATGGGAAGC	20		
13	POLE-Ex13Fw	Sense	TTGCATCTGTCTGTGTGGTG	20	364	1.2
	POLE-Ex13Rev	Antisense	GAGCGGGCTGGCATAACAT	18		
14	POLE-Ex14Fw	Sense	GTGCTTCACACTTGACCCT	19	261	1.2
	POLE-Ex14Rev	Antisense	CACCTCCATTCAGCTCCAGT	20		

**Suppl. Table 3. Extension primers**

Panel	Primer name	Primer sequence (5' to 3' )	Primer Length (bps)	Final Conc. in 10X Primer Mix (μM)
I	857fwd	CCAAACTGCCCCTCAAGTTTC	21	0.3
	890fwd	GACTGACTGACAGACCAGATTATGATGATTT	31	0.6
	895fwd	GACTGACTGACTGACTGACTCCAGATTATGATGATTTTCCTAC	42	0.3
II	1100fwd	TCACCTACAACGGGGACTTTT	21	0.2
	1092fwd	GACTGACTGACTGACTGACTGACTATCATGGTCACCTACAAC- GG*	44	0.1
IIIA	1231fwd	GACTGACTGTCTCATTCTCCTTCCAGGTGG	30	0.3
	1270fwd	ACTGACTGACTGACTGACTCTTCCCTGTGGGCAGTCATAAT	40	0.6
	1307fwd	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTAGGCCAAGCTAG- GCTATGATC	49	0.6
	1331fwd	CTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTG- GAGCTAGACCCGGAGGACA	58	0.3
IIIB	1271fwd	CTTCCTGTGGGCAGTCATAATC	22	0.3
	1306fwd	GACTGACTGACTAAGGCCAAGCTAGGCTATGAT	33	0.2
IV	1366fwd	GCGTTCTCTCCTCAGACTCTG	21	0.15
	1372fwd	GACTGACTGACTCTCCTCAGACTCTGGCCACG	32	0.05
	1373rev	GACTGACTGACTGACTGACTGCGACAGCATCTGACACAGAA	41	0.2
	1376rev	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTTGGCGACAG- CATCTGACACA	52	0.4
	1394rev	GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGAC- TACTTCATGTACAGGTAGTAAGTG	59	0.2

The underlined nucleotide sequences are repetitive GACT sequences used to adjust the product size

\* Extension primer targeting a germline polymorphic position

**Suppl. Table 4.** Synthetic oligonucleotides harboring different nucleotide variants

Synthetic Oligonucleotide	Oligonucleotide sequence (5' to 3' )
A-POLE857C>A	CTGGTCTGTCTCAGCATCATGAAACTTGAGGGGCAGTTTG
A-POLE857C>T	CTGGTCTGTCTCAGCATCAAGAACTTGAGGGGCAGTTTG
A-POLE890C>A	CTGGCCATCGATCATGTAGTAAATCATCATAATCTGGTCT
A-POLE890C>G	CTGGCCATCGATCATGTAGCAAATCATCATAATCTGGTCT
A-POLE890C>T	CTGGCCATCGATCATGTAGAAAATCATCATAATCTGGTCT
A-POLE895A>G	CTCACCTGGCCATCGATCACGTAGGAAATCATCATAAAAAA
A-POLE895A>C	CTCACCTGGCCATCGATCAGGTAGGAAATCATCATAAAAAA
A-POLE895A>T	CTCACCTGGCCATCGATCAAGTAGGAAATCATCATAAAAAA
A-POLE1100T>A	GACACAGACTCACCAGTCATAAAAGTCCCCGTTGTAGGTG
A-POLE1100T>C	GACACAGACTCACCAGTCAGAAAAGTCCCCGTTGTAGGTG
A-POLE1100T>G	GACACAGACTCACCAGTCACAAAAGTCCCCGTTGTAGGTG
A-POLE1231G>A	AGGTAAGTGTCCCTCTTCATCCACCTGGAAGGAGAATGAG
A-POLE1231G>C	AGGTAAGTGTCCCTCTTCAGCCACCTGGAAGGAGAATGAG
A-POLE1270C>A	GCCTTGGCGGCCGCCTTGATATTATGACTGCCCACAGGAA
A-POLE1270C>G	GCCTTGGCGGCCGCCTTGACATTATGACTGCCCACAGGAA
A-POLE1271T>C	TGGCCTTGGCGGCCGCCTTGGGATTATGACTGCCCAAAAA
A-POLE1271T>G	TGGCCTTGGCGGCCGCCTTGGCATTATGACTGCCCAAAAA
A-POLE1271T>A	TGGCCTTGGCGGCCGCCTTGTGATTATGACTGCCCAAAAA
A-POLE1306C>T	CTCCGGGTCTAGCTCCACGGAATCATAGCCTAGCTTGAAAA
A-POLE1306C>G	CTCCGGGTCTAGCTCCACGGCATCATAGCCTAGCTTGAAAA
A-POLE1306C>A	CTCCGGGTCTAGCTCCACGGTATCATAGCCTAGCTTGAAAA
A-POLE1307C>A	CTCCGGGTCTAGCTCCACGTGATCATAGCCTAGCTTGGCC
A-POLE1307C>G	CTCCGGGTCTAGCTCCACGCGATCATAGCCTAGCTTGGCC
A-POLE1307C>T	CTCCGGGTCTAGCTCCACGAGATCATAGCCTAGCTTGGCC
A-POLE1331T>A	CTCCGTGGCCATCCGGCACTTGTCTCCGGGTCTAGCTCC
A-POLE1331T>C	CTCCGTGGCCATCCGGCACGTGTCTCCGGGTCTAGCTCC
A-POLE1331T>G	CTCCGTGGCCATCCGGCACCTGTCTCCGGGTCTAGCTCC
A-POLE1366G>A	TCTGACACAGAATACGTGGTCAGAGTCTGAGGAGAGAACG
A-POLE1366G>C	TCTGACACAGAATACGTGGGCAGAGTCTGAGGAGAGAACG
A-POLE1366G>T	TCTGACACAGAATACGTGGACAGAGTCTGAGGAGAGAACG
S-POLE1370C>A	TCTCCTCAGACTCTGGCCAAGTATTCTGTGTCAGATGCTG
S-POLE1370C>T	TCTCCTCAGACTCTGGCCATGTATTCTGTGTCAGATGCTG
S-POLE1370C>G	TCTCCTCAGACTCTGGCCAGGTATTCTGTGTCAGATGCTG
A-POLE1372T>C	GACAGCATCTGACACAGAATGCGTGGCCAGAGTCTGAAAAA
A-POLE1372T>G	GACAGCATCTGACACAGAATCCGTGGCCAGAGTCTGAAAAA
A-POLE1372T>A	GACAGCATCTGACACAGAATTTCGTGGCCAGAGTCTGAAAAA
S-POLE1376C>A	CAGACTCTGGCCACGTATTATGTGTCAGATGCTGTGCCA
S-POLE1376C>T	CAGACTCTGGCCACGTATTTTGTGTCAGATGCTGTGCCA
S-POLE1376C>G	CAGACTCTGGCCACGTATTGTGTCAGATGCTGTGCCA
S-POLE1394C>T	TCCTCAGACTCTGGCCACGTTTTCTGTGTCAGATGCTAAAA
S-POLE1394C>G	TCCTCAGACTCTGGCCACGTGTTCTGTGTCAGATGCTAAAA
S-POLE1394C>A	TCCTCAGACTCTGGCCACGTATTCTGTGTCAGATGCTAAAA
S-POLE1394C>A	TCTGTGTCAGATGCTGTGTCGACACTTACTACCTGTACATGA
S-POLE1394C>T	TCTGTGTCAGATGCTGTGTCGACTTACTACCTGTACATGA
S-POLE1394C>G	TCTGTGTCAGATGCTGTGTCGGCACTTACTACCTGTACATGA

Suppl. Table 5. Precision studies

Within-run reproducibility e9							
Mutant	Sample	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Mean	SD	CV
c.857C>G	S1	18.85%	19.78%	16.36%	18.33%	1.77%	9.63%
c.857C>G	S2	54.31%	55.38%	45.59%	51.76%	5.37%	10.37%
c.857C>G	S3	50.74%	40.00%	29.80%	40.18%	10.47%	26.06%

Within-run reproducibility e13							
Mutant	Sample	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Mean	SD	CV
c.1231G>T	S4	11.98%	13.21%	12.05%	12.41%	0.69%	5.56%
c.1270C>T	S5	52.79%	53.47%	44.84%	50.37%	4.80%	9.52%

Inter-run reproducibility e9							
Mutant	Sample	Run 1	Run 2	Run 3	Mean	SD	CV
c.857C>G	S1	18.85%	19.13%	20.08%	19.35%	0.65%	3.34%
c.857C>G	S2	54.31%	54.74%	53.48%	54.18%	0.64%	1.19%
c.857C>G	S3	50.74%	65.00%	54.09%	56.61%	7.46%	13.18%

Within-run reproducibility e13							
Mutant	Sample	Run 1	Run 2	Run 3	Mean	SD	CV
c.1231G>T	S4	11.98%	10.44%	11.09%	11.17%	0.78%	6.95%
c.1270C>T	S5	52.79%	58.55%	56.92%	56.09%	2.97%	5.29%

(刘从容 翻译 陶祥 审校)