·技术与方法· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.18.018

不同脱蜡剂对实时荧光定量 PCR 检测石蜡块 EGFR 基因突变结果的影响

徐 帆
(重庆三峡中心医院病理科 40400)

[摘要] **目的** 观察不同的脱蜡剂对实时荧光定量 PCR 检测表皮生长因子受体(EGFR)基因结果判读的影响。**方法** 从 2014 年 11 月起,连续 6 个月收集该院病理科石蜡标本切片 68 份,均分成 A 组(二甲苯脱蜡)和 B 组(松节油脱蜡)进行石蜡块 EGFR 基因突变检测。**结果** 同一份石蜡切片检测 EGFR 的 6 个靶点两组结果均相同。两组同一份标本的内质控(内参)扩增曲线 CT 值之差均小于 0.99;同一份标本,两组检测相同靶点时有效的扩增曲线 CT 值之差均小于 0.99,且结合内质控(内参)CT 值分析最终判定两组靶点检测的阳性、阴性结果完全相符。**结论** 采用松节油与二甲苯脱蜡后检测 EGFR 基因突变的实时荧光定量 PCR 结果一致,对检测的靶点无影响,松节油可用作分子实验室的脱蜡剂。

[关键词] 石蜡;表皮生长因子受体基因;实时荧光定量 PCR;检测靶点;脱蜡剂;实验室环境
[中图法分类号] R446.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2018)18-2467-03

The effects of different dewaxing agents on the detection of EGFR gene mutation in paraffin-embedded tissues specimens by real-time quantitative PCR method

XU Fan
(*Department of Pathology, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing* 40400, *China*)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of different dewaxing agents on the detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in paraffin-embedded tissues specimens by real-time quantitative PCR. **Methods** From November 2014, 68 paraffin-embedded specimens were were consecutively collected from the department of pathology in this hospital for 6 months. All specimens were each treated with different dewaxing agents: the group A was treated with xylene dewaxing, the group B was treated with turpentine dewaxing. Then DNA was extracted by DNA extraction kit and detected by real-time quantitative PCR. **Results** The results of 6 targets of EGFR in each paraffin-embedded section were consistent for the two groups. For each paraffin-embedded section, the difference of CT value of interval reference amplification curve between the group A and the group B was less than 0.99. For the same targets of each paraffin-embedded section, the difference of CT values of effective amplification curve between the group A and the group B were less than 0.99. Considering the CT value of internal control (internal reference), the positive and negative results of targets in group A were consistent with those in group B. **Conclusion** The results of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation in turpentine dewaxing paraffin-embedded tissues specimens are consistent with those in xylene dewaxing paraffin-embedded tissues specimens by real-time quantitative PCR, without influences on detection results of each target, which indicates turpentine could serve as an alternative dewaxing agent for molecular laboratory.

[**Key words**] paraffin; epidermal growth factor receptor genes; real-time quantitative PCR; detection target; dewaxing agent; laboratory environment

表皮生长因子受体基因(EGFR 基因)是非小细胞肺癌((NSCLS)高频驱动基因,先检测、后治疗的 NSCLS 靶向个体化治疗模式已成为临床诊疗规范。所有接受 EGFR 靶向酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TK1)治疗的患者都需要接受 EGFR 分子检测。病理科所开展的石蜡块 EGFR 基因突变检测法是利用活检组织脱水后制成的石蜡块进行的 DNA 提取,然后实时荧光定量 PCR 分析结果,极大地方便了患者,但需确保敏感性和特异性。质量保证和质量控制是关键环节,其中重要的环节包括石蜡块的 DNA 提取[1],检测中的设备、试剂及实验室的检测环境。目前所有试剂公司在 DNA 提取的操作规范说明书中均要求对石蜡块切片脱蜡处理时使用二甲苯,但二甲苯具有极强的挥发性,对人体健康有影响。美国劳工部的职业安全与卫生管理处规定二甲苯的安全空气浓度在 100 ppm 以下,而目前分子实验室的工作环境超出了此安全范围。弥散在空气中的二甲苯可以通过呼吸道吸入或皮肤黏膜接触进入人体,损伤神经系统和血液系统,导致慢性中毒症状。对于空气要求极其严格的分子实验室环境污染大,我国已将二甲苯中毒定为职业病。有研究报道,松节油在病理苏木素-伊红(HE)制片的各个环节均能替代二甲苯,起到很好的效果[2-4],

作者简介:徐帆(1978-),主管技师,本科,主要从事病理学技术与分子检测方面的研究。

而石蜡块 EGFR 基因突变检测中石蜡切片 DNA 提取过程中的脱蜡与 HE 制片中原理一致。本研究旨在寻找一种既能不影响实时荧光定量 PCR 结果分析，又能不污染实验室工作环境的方法[5-6]，以确保各个环节的质控，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 从 2014 年 11 月起，连续 6 个月收集本院病理科石蜡标本切片 68 份，均分成 A 组（二甲苯脱蜡）和 B 组（松节油脱蜡）进行石蜡块 EGFR 基因突变检测。DNA 提取试剂盒由 QIAGEN 生物工程有限公司提供，EGFR 突变检测试剂盒由上海源奇生物公司提供，CObasZ480 型 PCR 扩增仪器由罗氏公司提供。

1.2 方法

1.2.1 石蜡切片制作及脱蜡 标本均经 4%中性甲醛固定，常规取材，脱水，石蜡包埋，6 μm 厚切片 10～15 片。将石蜡切片放入 1.5 mL 离心管中，A 组加入 1.0 mL 二甲苯，B 组加入 1.0 mL 松节油，盖紧并剧烈震荡混匀 10 s，然后将标本置于 56 ℃水浴中 10 min 脱蜡，室温（15～25 ℃）下 13 200×g 离心 5 min，吸取上清液丢弃。A 组再加入 1.0 mL 二甲苯，B 组再加入 1.0 mL 松节油，重复上述步骤 2～3 次，最后 1 次脱蜡离心 10 min（大标本脱蜡 2～3 次，小标本脱蜡 2 次）。之后操作步骤严格按 QIAGEN 试剂盒及上海源奇试剂盒说明书进行。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测 扩增条件：42 ℃ 5 min；94 ℃ 3 min，94 ℃ 45 s；60 ℃ 80 s，共 40 个循环，反应体系共 25 μL。在 PCR 循环第 2 步 60 ℃时收集荧光信号。检测通道为：FAM，参比荧光设定为 none。（1）基线的确定：软件默认为 3～15 个循环的平均荧光信号为基线。在实验中，一般选择曲线波动较小，较稳定的片段作为基线，可根据实际情况自行酌情调整。终点避免覆盖信号已经开始有明显增长的地方，且以起点与终点间间隔 8 个循环以上为原则。（2）阈值的确定：在阴性对照无扩增的情况下，以阈值设定在无典型扩增曲线样本的最高点，且阴性对照未检出为原则，确定起始阈值。（3）不同的反应液应分别单独确定各自的基线和阈值后，再进行各自分析。

1.2.3 实验初期为了确保每次实验的客观性及准确性，每份标本都送上海源奇生物公司总部实验室进行印证实验，结果均相符合。本实验室也在 2016 年参加了病理质控评价中心（PQCC）分子病理室间质控石蜡块 EGFR 的检测，顺利通过质评并获得 PQCC 室间质评证书。

2 结 果

本研究实验中检测时均设立了外部质控和内质控（内参）。外部质控包含阳性及阴性对照，检测结果外部质控的阳性及阴性对照均符合要求；内质控（内参）均在有效范围内，显示检测过程规范、合理、有效。接收的同一标本检测相同的靶点时 A、B 对照组选取规则的扩增曲线为有效的（疑似阳性标本）读取其 CT 值，作为对照比较；不规则的扩增曲线为无效的作为阴性处理，不作为对照分析。68 份标本中，每份标本 A、B 两组内质控（内参）CT 值均有效，差值均小于 0.99，见表 1、图 1。

表 1 检测结果有效性判定（n=68）

项目	A、B 两组内质控（内参）CT 数值之差	阳性质控	阴性质控	标本数（n）
有效	＜0.99	阳性	阴性	68
无效	＞0.99	阴性	阳性	0

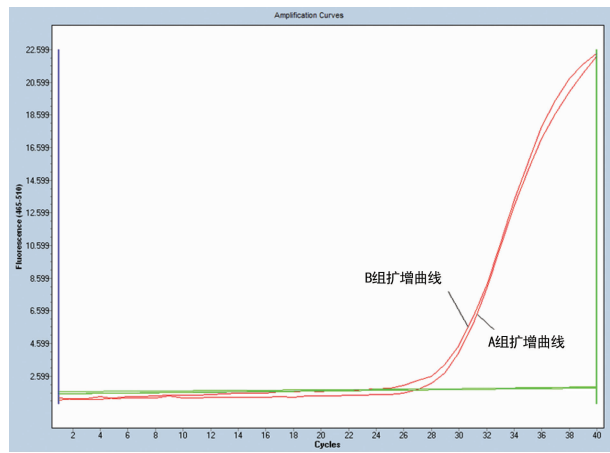
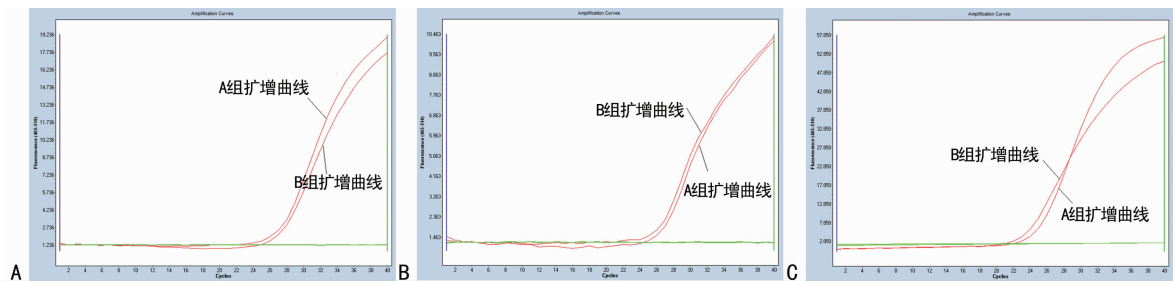


图 1 A、B 组内质控（内参）扩增曲线比较



A：18 号检测靶点；B：19 号检测靶点；C：21 号检测靶点

图 2 A、B 组各检测靶点扩增曲线比较

在相同切片标本的 18 号检测靶点中，A、B 两组均有 3 份疑似阳性标本，两组扩增曲线 CT 值之差均小于 0.99；结合内质控（内参）CT 值分析，最终结果判定 1 份切片标本 A、B 两组均为阳性，2 份切片标本 A、B 两组均为阴性。在相同切片标本的 19 号检测靶点中，A、B 两组均有 7 份疑似阳性标本，两组扩增曲线 CT 值之差均小于 0.99；结合内质控（内参）CT 值分析，最终结果判定 3 份切片标本 A、B 两组均为阳

性，4 份切片标本 A、B 两组均为阴性。在相同切片标本的 21 号检测靶点中，A、B 两组均有 11 份疑似阳性标本，两组扩增曲线 CT 值之差均小于 0.99；结合内质控（内参）CT 值分析，最终结果判定 6 份切片标本 A、B 两组均为阳性，5 份切片标本 A、B 两组均为阴性。本研究中只检测到 18、19、21 这 3 个靶点的阳性结果进行比对，其他的 3 个靶点未检测到阳性结果。最终结果分析表明同一份切片标本分为 A、B 两组经不同的脱蜡剂处理后同时实时荧光定量 PCR 分析，结果无差异，阳性及阴性结果判定相符。A、B 组各检测靶点扩增曲线比较，见图 2。

3　讨　论

EGFR 基因共 28 个外显子，其中编码酪氨酸激酶的是第 18～21 号外显子。关于 EGFR 基因突变的研究表明，尽管突变部位分散整个酪氨酸激酶编码区，但绝大多数突变集中在第 19 外显子的缺失和第 21 外显子的 L858R 点突变。本实验使用的 EGFR 突变检测试剂盒由上海源奇生物公司提供，检测 18、19、20、21、S768I、T790M，共 6 个靶点，方法简便、快速、准确。进行 EGFR 基因突变检测时，本研究将每份石蜡切片分入 A、B 两组，分别用二甲苯和松节油脱蜡处理后[7]，同时进行实时荧光定量 PCR 扩增，探讨两组扩增曲线的差异性，保证 EGFR 基因突变检测结果判读的客观性和准确性[8-9]，同时又为实验室塑造一个良好的工作环境，确保实验操作每一个过程有效合理[10]。分析 A、B 两组同一份石蜡切片检测相同靶点时有效扩增曲线 CT 值，以及内质控（内参）CT 值之差均小于 0.99，最终判定两组阳性、阴性结果均相符，确定采用二甲苯和松节油两种脱蜡剂后实时荧光定量 PCR 扩增实验结果判读一致，完全相符。本报道旨在研究石蜡块 EGFR 基因突变检测时使用不同的脱蜡剂后，实时荧光定量 PCR 扩增曲线形态的相似性，CT 值结果比对的差异性，以及最终对实时荧光定量 PCR 扩增结果相符度的比较。至于在基因突变检测诸多方法中，如荧光原位杂交技术（FISH）和 DNA 测序，不同的脱蜡剂对结果有无影响则需要进一步的研究。

综上所述，采用二甲苯和松节油对石蜡切片行脱蜡处理后，其实时荧光定量 PCR 分析结果判读无差异。对于靶点的检测无影响[11-12]。由于二甲苯具有极强的挥发性，对人体健康有一定的影响，而松节油对人体无害，采用松节油脱蜡既保证了分子实验室的空气环境，保护了工作人员的身体，同时又不影响实时荧光定量 PCR 结果分析的准确性及可靠性[13]，可使实验室的操作更加规范、科学、合理。

参考文献

[1] 王伯沄，李玉松，黄高昇，等. 病理学技术[M]. 北京：人民卫生出版社，2000：128-134.

[2] 傅春燕，胡康新，肖德胜，等. 松节油香味封片剂在 HE 制片中的应用[J]. 诊断病理学杂志，2006，13(5)：397.

[3] 谭俊，符弘枚. 松节油型生物制片透明剂在 HE 制片中的应用[J]. 国际检验医学杂志，2010，31(8)：908-909.

[4] 曹晖，胡平，方力. 松节油与二甲苯混合液替代单纯二甲苯进行组织透明的实验体会[J]. 黑龙江医药科学，2000，23(1)：70.

[5] 杨军. 组织标本处理的经济环保流程[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2008，12(46)：9015-9017.

[6] 韩庆伟，詹彦萍. 松节油透明在冰冻切片中的应用[J]. 实用医技杂志，2007，14(14)：1866-1867.

[7] 邓昂. 病理切片中松节油代替二甲苯脱蜡[J]. 华中医学杂志，2002，26(5)：262.

[8] 阙丹，肖何，陈川，等. REDE-DHPL（检测 NSCLC 血浆 EGFR 突变及其临床意义[J]. 重庆医学，2016，45(13)：1767-1769.

[9] 喻巍，梁剑平，杨德松，等. 连续 100 例肺癌术后 EGFR 基因突变检测结果分析[J]. 肿瘤药学，2016，6(2)：150-153.

[10] 罗勇军，刘昕. 实时荧光定量 PCR 标准品的制备及应用[J]. 重庆医学，2005，34(3)：414-415.

[11] 王鑫，支修益. 2009 年非小细胞肺癌靶向治疗新进展[J]. 中国处方药，2010，8(4)：42-44.

[12] 王梁燕，洪奇华，张耀洲. 实时定量 PCR 技术及其应用[J]. 细胞生物学杂志，2004，26(1)：62-67.

[13] 高云，陈嘉昌，朱振宇，等. EGFR 基因突变及其检测方法的研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志，2011，3(1)：51-57.

（收稿日期：2017-08-13　修回日期：2018-03-12）

（上接第 2463 页）

[9] 王实，赵秋，戴一杨，等. 中药清胰汤对 ERCP 术后胰腺炎预防作用的探讨[J]. 中华中医药学刊，2012，30(10)：2276-2278.

[10] 刘存根，冷大跃，刘欢，等. 清胰汤预防经内镜逆行性胰胆管造影术后所致胰腺炎和高淀粉酶血症的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志，2009，29(7)：607-610.

[11] 张俊. 清胰汤对 ERCP 术后胰腺炎的预防作用[J]. 河南中医，2016，36(8)：1419-1421.

[12] 张廷凯，郭东梅，李启菊，等. 清胰汤灌肠对 ERCP 术后胰腺炎及高淀粉酶血症发生的预防[J]. 中国中西医结合消化杂志，2012，20(6)：269-270.

[13] 杨德平，王荣. 中西医结合预防 ERCP 术后胰腺炎研究[J]. 江西中医药，2007，38(10)：47.

[14] SOFUNI A，MAGUCHI H，MUKAI T，et al. Endoscopic pancreatic duct stents reduce the incidence of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in high-risk patients[J]. Clin Gastroenterol Hepatol，2011，9(10)：851-858.

[15] 廖雯斐，王红玲，江平，等. 不同方法预防 ERCP 术后胰腺炎效果的 Meta 分析[J]. 中华消化外科杂志，2014，13(9)：702-708.

[16] 周庆，王鸣，吴丽丽. 鼻胆管引流术预防内镜逆行胰胆管造影术后胰腺炎的 Meta 分析[J]. 北京医学，2017，39(3)：232-235.

[17] 陈道华. 空肠营养管联合清胰汤治疗重症胰腺炎疗效评价[J]. 河南医学研究，2014，23(8)：63-65.

[18] 吴承堂，黎沾良，黄祥成，等. 中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究[J]. 世界华人消化杂志，1999，7(6)：525-528.

（收稿日期：2017-04-15　修回日期：2018-03-24）