

表皮生长因子受体 (EGFR) 基因突变检测质控品制备及应用

蒋玲丽, 黄中强, 王雪亮, 鲍芸, 王青, 肖艳群 (上海市临床检验中心, 上海 200126)

摘要: 目的 制备模拟临床样本的表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor EGFR) 基因突变检测质控品, 评估其临床适用性。方法 选择含 EGFR 不同突变位点和无 EGFR 突变位点细胞, 培养收集后制作成蜡卷。用三种临床常用试剂盒检测, 并评估其均一性和稳定性。将含不同突变型 5 份样本的样本盘, 随机编码后发送至参评实验室, 评价回报结果。结果 三种不同试剂检测样本盘结果一致。结果显示质控品均匀, 室温放置可稳定 12 个月。28 家实验室 5 个样本符合率分别为 92.88%, 96.43%, 78.57%, 96.43% 和 100%, 突变型样本和野生型样本的符合率分别为 91.07% (102/112) 和 100% (28/28)。结论 研制的 EGFR 基因突变质控品具有较好的临床适用性, 可用于室内质量控制和室间质量评价。

关键词: 非小细胞肺癌; 表皮生长因子受体 (EGFR); 质控品

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 02-145-04

doi:10.3969 / j.issn.1671-7414.2020.02.040

Development and Application of Quality Control Materials for Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Mutation Determination

JIANG Ling-li, HUANG Zhong-qiang, WANG Xue-liang, BAO Yun, WANG Qing, XIAO Yan-qun

(Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai 200126, China)

Abstract: Objective To develop quality control materials which can simulate clinical specimens for epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation determination and evaluate the application in clinical laboratories. **Methods** Cells containing different EGFR mutations and cells without EGFR mutation were cultured and sectioned into wax rolls. The quality control materials were detected by three different commercial kits. The homogeneity and stability were evaluated. The panel consisted of 5 blindly coded samples distributed to external quality assessment participants. The results from the participants were summarized and analyzed. **Results** The results of three different reagents were consistent. The quality control materials were homogeneity and could be stable at room temperature for 12 months. 28 valid lab results were received. The coincidence rate of 5 sample were 92.88%, 96.43%, 78.57%, 96.43% and 100% respectively. The overall coincidence rate of positive samples and negative ones were 91.07%(102/112) and 100%(28/28). **Conclusion** The quality control materials had good clinical applicability, and they can be used for internal quality control and external quality assessment materials.

Keywords: non-small cell lung cancer; epidermal growth factor receptor (EGFR); quality control material

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占所有肺癌的 75%~80%, 并且是世界上死亡率最高的癌症^[1]。表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 基因是 NSCLC 的高频驱动基因^[2], 相关指南推荐所有含腺癌成分的 NSCLC 常规检测 EGFR^[3], 通过检测 EGFR 基因突变位点指导 NSCLC 的治疗和判断预后^[4]。开展 EGFR 基因突变检测的分子病理实验室必须按要求进行质量控制, 而开展室内质量控制和室间质量评价都需有适宜的质控品, 但实际工作过程中收集或制备出合适的质控品是实验室面临的一大难题。为了满足临床实验室质量控制的需要, 研制了模拟临床样本的 EGFR 基因突变检测质控品,

并评价其临床适用性。

1 材料和方法

1.1 细胞株 H1650 和 H1975EGFR 突变型细胞系和人肺癌细胞系 A549EGFR 野生型细胞系购自中国科学院细胞库, SW48EGFR 突变型细胞系购自美国标准生物制品收藏中心 (American type culture collection, ATCC)。H1650 和 H1975 细胞分别在含有 10g/dl FBS 的 RPMI-1640 培养液中, 37℃ 及 5ml/dl CO₂ 培养箱内培养, 每周传代 2~3 次; A549 细胞在含有 10g/dl FBS 的 F-12K 培养液中, 37℃ 及 5ml/dl CO₂ 培养箱内培养, 每周传代 2~3 次; SW48 细胞在含有 10g/dl FBS 的 L-15 培养液中, 37℃ 培养箱内培养, 每周传代 1~2 次。

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会资助项目 (201640187)。

作者简介: 蒋玲丽 (1980-), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事免疫学和分子生物学的质量控制工作。

通讯作者: 肖艳群, 本科, 主任技师, Tel: 021-68316300-2303。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司），NanoDrop One 分光光度计（美国 Thermo 公司），INC 153 二氧化碳培养箱（德国 Memmert 公司）。人类 EGFR 基因突变检测试剂盒（厦门艾德生物医药科技股份有限公司，武汉海吉力生物科技有限公司，武汉友芝友医疗科技有限公司），石蜡组织 DNA 提取试剂（德国 Qiagen 公司）。

1.3 方法

1.3.1 质控品制备：所有细胞传至第 10 代时去培养基，PBS 洗涤 2 次，离心 5min 收集细胞。收集的细胞按突变型细胞系和野生型细胞系不同比例混匀后采用 4g/dl 中性甲醛液固定，加入伊红点染肿瘤细胞，经乙醇梯度脱水和二甲苯透明后充分浸蜡。制备成含有不同突变的甲醛固定石蜡包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 切片。为评价切片中肿瘤细胞的形态、数目及分布状态，在每个蜡块最前和最后各切一张 4μm 的白片进行 HE 染色，评估肿瘤细胞数量。评估合格的蜡块，切片后放入 1.5ml 离心管，每管内放置 2 张 10μm 的卷片，切片后按顺序排放，每个蜡块制备 80 份质控品，室温保存待用。

1.3.2 质控品性能评价：采用 Sanger 测序进行 EGFR 基因突变的验证，二代测序进行突变等位基因含量的测定。用 QIAamp 石蜡组织 DNA 提取试

剂盒进行提取，采用分光光度法测定浓度和纯度后，用三种不同商品化试剂检测。采用扩增阻滞突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS) 评估质控品均匀性和稳定性。从 80 份样本中分别抽取第 1, 40 和 80 份样本检测评估均匀性。每月抽取 1 份 (按等距随机抽样) 质控品评估稳定性。

1.3.3 组织室间质评计划：将含不同突变类型及不同突变率共 5 份样本的样本盘，随机编码后发送至参评实验室，要求各质评实验室采用日常方法进行 DNA 提取和 EGFR 基因突变检测，并在 2 周内将结果上传至中心数据库，超过规定时间系统不再接收上传数据。

1.3.4 质评结果分析：依据回报结果计算各参评实验室的得分情况。依据回报结果，与预期结果相符计 20 分，与预期结果不符计 0 分，≥ 80 分判定为室间质评成绩合格。同时计算每个样本的符合率以及阳性样本和阴性样本的总体符合率，并对不符合样本原因进行汇总分析。

2 结果

2.1 质控品评估结果

2.1.1 测序法验证结果：见图 1。4 个突变样本经 Sanger 测序验证，结果与细胞系预期基因型一致，采用二代测序 (next generation sequencing, NGS) 测定突变等位基因的含量结果见表 1。

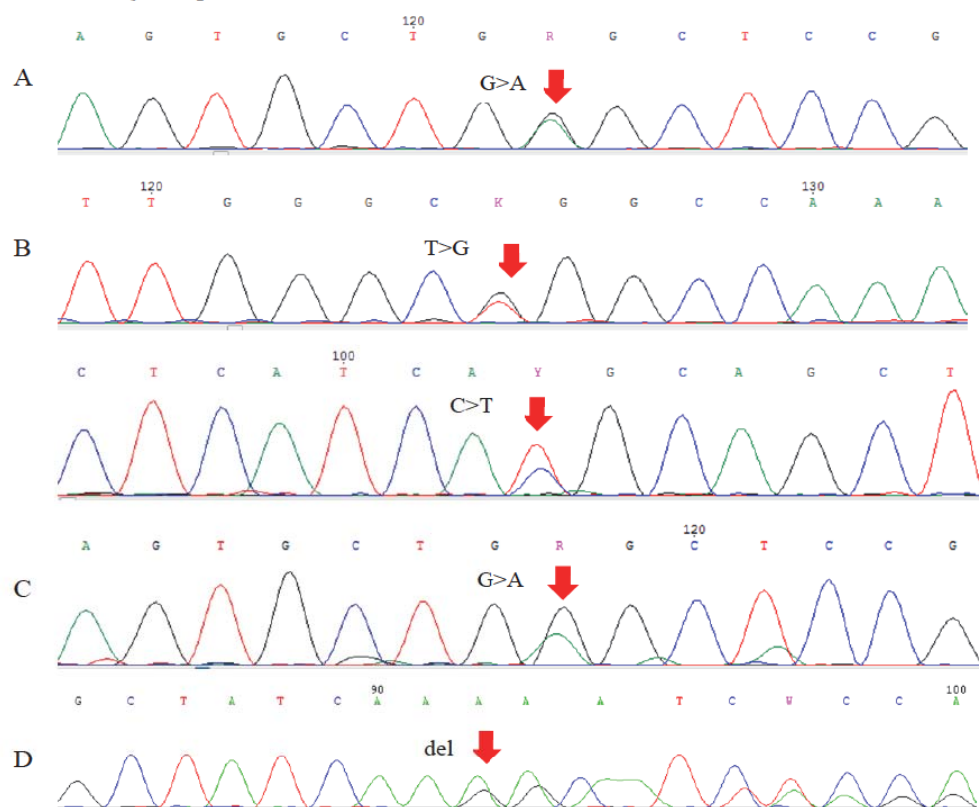


图 1 突变型样本 Sanger 测序结果

表1 NGS检测结果

样本号	EGFR 基因突变	突变比例 (%)	其他基因
1	c.2155G>A:p.G719S	27.71	未检测到突变
2	c.2573T>G:p.L858R;	75.93	未检测到突变
	c.2369C>T:p.T790M	79.05	
3	c.2155G>A:p.G719S	23.01	未检测到突变
4	c.2235_2249del15:E746_A750del	29.89	未检测到突变
5	未检测到突变	未检测到突变	未检测到突变

注: 其他基因包括 BRAF, HER2, KRAS, MET, ALK, ROS1, RET, PIK3CA 和 NRAS。

2.1.2 适用性评价: 采用国内临床常用的三种 EGFR 基因突变检测试剂进行检测。国内商品化试剂不能区分 G719A, G719S 还是 G719C, 仅报告为 G719X。三种试剂 5 个样本检测结果分别为 G719X, T790M/L858R, G719X, 19del 和野生型, 与预期基因型一致。

2.1.3 均匀性和稳定性评价: 采用 ARMS 法评估质控品的均匀性和稳定性。用 QIAamp 石蜡组织 DNA 提取试剂盒进行提取, 采用分光光度法测定浓度和纯度, 每次提取浓度均大于 30ng/μl, 纯度 A_{260nm}/A_{280nm} 均在 1.8~2.0 之间。分别检测第 1, 40 和 80 份质控品, 检测结果一致并符合细胞系预期基因型, 表明制备的质控品均匀。质控品室温放置, 每月抽取 1 份, 连续检测 12 个月, 检测结果一致并符合细胞系预期基因型, 表明制备的质控品稳定。

2.2 室间质量评价反馈结果

2.2.1 实验室总体回报情况: 制备的质控品在 2019 年 9 月发放至 32 家实验室, 在规定时间内收回有效报告 28 份 (上海市 24 份, 外省市 4 份)。其中 20 家采用 ARMS, 4 家采用 NGS, 2 家采用实时荧光聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 1 家采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS), 1 家采用流式荧光杂交法。28 家实验室中 21 家使用商品化试剂, 涉及 11 个试剂品牌; 7 家使用自配试剂。

2.2.2 结果评价与分析: 28 家实验室中 20 家 (71.43%) 检测结果完全正确, 7 家 (25%) 检测结果为 80 分, 1 家 (3.57%) 检测结果小于 80 分。5 个样本符合率分别为 92.86% (26/28), 96.43% (27/28), 78.57% (22/28), 96.43% (27/28) 和 100% (28/28), 突变型样本和野生型样本的符合率分别为 91.07% (102/112) 和 100% (28/28)。10 个检测不符合结果全部为突变型样本检测错误, 具体结果见表 2。

表2 EGFR 室间质评样本不符合原因分析 (n=10)

样本号	错误比例 [% (n)]	错误原因
1	20 (2)	G719S 检测为野生型
2	10 (1)	T790M, L858R 检测为 G719X
3	60 (6)	5 个 G719S 检测为野生型; 1 个 G719S 检测为 20ins
4	10 (1)	19del 检测为 L858R
5	0	无错误检测结果

3 讨论

临床上 EGFR 基因突变项目检测步骤多、样本处理过程复杂、人为影响因素多, 相比普通血液样本的处理, 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 提取增加了脱蜡的过程, 为保证检测结果的准确可靠, 需在检测过程中使用质控品进行监控。由于质控品来源短缺, 目前实验室大多采用试剂盒提供的阳性标准品作为室内质控, 此类标准品通常为人工合成质粒, 不参与样本处理过程, 不能监测样本检测的全过程, 不能称为严格意义上的室内质控, 故不能满足质量管理和质量控制的要求。当前常用的分子病理检测质控品主要有以下两种: ①天然样本, 即患者组织样本; ②人工制备的质控品, 包括质粒 DNA 或基因组片段、细胞系、异种移植肿瘤组织、基因编辑修饰细胞等^[5]。已有多个研究报道^[6-7]使用不同类型细胞系作为质控品样本用于 EQA 评价中。本研究利用筛选含 EGFR 不同突变位点和不含 EGFR 突变位点细胞系, 经培养收集、固定、石蜡包埋后切片制备成质控品。制备的质控品在不同的商品化试剂中具有良好的适用性, 并且通过均匀性和稳定性评价, 表明质控品性能良好。本研究表明制备的质控品可长期保存, 故可解决质控品来源问题。后期本研究将通过不同比例的突变型细胞系和野生型细胞系混合制备成不同突变比例的质控品以满足不同灵敏度检测试剂盒使用需求。

另外利用制备质控品组织室间质量评价, 结果表明 28 家实验室中只有 1 家实验室结果不满意, 通过调查该实验室为未经 PCR 实验室验收的医学检验实验室, 且使用自建方法 (laboratory developed test, LDT) 检测。另外 140 个检测结果中 10 个不符合结果全部为突变型样本检测错误, 包括突变型检测为野生型及检出突变但突变结果错误。其中 5 个为 3 号样本 G719S 检测为野生型结果, 该样本突变比例为 23.01%, 是 4 个突变型样本中突变比例最低的样本, 分析原因可能为一些提取效率及扩增效率较低的实验室在低突变样本中出现了漏检, 此种情况需引起实验室的关注。通过此次调查实验室应关注以下问题 ①实验室应在进行性 (下转 152 页)