

HER2 基因扩增检测试剂盒（荧光原位杂交法） 说明书

【产品名称】

通用名称：HER2 基因扩增检测试剂盒（荧光原位杂交法）

英文名称：FISH detection Kit for the amplification of HER2 gene

【包装规格】

10 人份/盒、20 人份/盒

【预期用途】

本产品用于检测福尔马林固定、石蜡包埋人乳腺癌组织样本中的HER2基因扩增情况。指导乳腺癌的治疗和预后评估，不用于乳腺癌的筛查或诊断^[1]。

【检测原理】

荧光原位杂交法（Fluorescent In Situ Hybridization, FISH）能够使细胞中特定的核苷酸片段通过荧光而清楚的呈现，FISH 试验过程中包含了双链 DNA 的解链，荧光标记的 DNA 探针能够与目标序列结合^[2-3]。杂交完成之后，多余的探针被清洗掉，同时，细胞核被复染剂 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色会发出蓝色的荧光。本试剂盒包含一组探针：HER2(红色)位点和 CEP17（绿色）位点及 DAPI 复染液。

正常细胞信号方式：每个细胞显示两个绿色信号及两个红色信号。

异常细胞信号方式：细胞中若出现三个及以上红色信号且绿色信号不小于两个。

【主要组成成分】

试剂	规格		主要成分
	10 人份	20 人份	
HER2/CEP17 探针	100μl	200μl	荧光标记探针
DAPI	0.5ml	0.5ml	DAPI 抗褪色液、甘油

【储存条件及有效期】

HER2/CEP17 探针及 DAPI 于-20℃避光、密封储存；

开封后，探针及 DAPI 24 小时内可在 2-8℃避光、密封储存；

24 小时内不能使用完的，请放置于-20℃±3℃避光、密封储存；

自生产之日起有效期为一年。

【适用仪器】

本试剂盒探针杂交需在杂交仪上进行杂交，如 ThermoBrite。

本试剂盒探针需在荧光显微镜下观察并分析结果。所需荧光显微镜的配置包括：

物镜：在 FISH 分析上，使用 100×消色差浸油类型物镜可取得满意效果。

镜油：在浸油式物镜上使用的镜油应为低水平自发荧光配方，并专门在荧光显微镜上使用。

滤光片：建议客户处客使用探针前向滤片组供应商了解所使用的滤片组的详细情况，以便选择与标记荧光染料相适应的滤片组。

绿色荧光：激发波长为 496nm，发射波长为 520nm

橘红色荧光：激发波长为 551nm，发射波长为 572nm

【样本要求】

福尔马林固定、石蜡包埋的乳腺癌组织或细胞。样本应根据实验室标准程序进行采集，试剂盒检验样本的选择应由病理学专业人员执行。样本应避免与酸、强碱接触，并避免过热。

建议切片厚度不超过 4μm 左右。

【检验方法】

一、样本收集及玻片制备：

1、样本于常温下在 10% 中性福尔马林缓冲液中固定 6~48 小时，为了达到最佳的和均匀的固定与石蜡包埋效果，样本大小不宜超过 0.5cm³。

2、标准操作和石蜡包埋，使用高质量的石蜡。渗透和包埋应在低于 65℃ 下进行。

3、切成 4μm 厚度的切片。

4、切片捞于黏性玻片。

二、玻片预处理程序：

1. 56-65℃ 左右烤片三小时以上（过夜）。

2. 提前预热胃蛋白酶处理液，使其温度达到 37℃ 保温备用。

3. 二甲苯中室温放置切片 10 分钟，重复该步骤两次。

4. 100% 乙醇中室温放置切片 5 分钟，重复该步骤一次。

5. 依次 85%、70% 乙醇中室温处理切片 3 分钟。

6. 去离子水洗 2 分钟，重复 3 次。

7. 用微波炉将适量的预处理缓冲液煮沸后，然后使其处于保温状态，放入切片修复 20mins，或是在高压锅内加入适量的预处理缓冲液，高压修复 5min。。

8. 取出玻片，用去离子水洗涂三次。将切片直接放入蛋白酶消化液中，消化 15±10mins。

注：根据不同的组织（细胞）类型及切片厚度，消化时间有所不同，一般来讲，建议预实验找到样本的最佳消化时间。

9. 去离子水清洗 2mins，三次。

10. 脱水：70%，85%，100% 乙醇溶液中依次处理各 2 分钟，晾干。

三、FISH 操作步骤

警告和预防：荧光基团遇强光会产生光漂白现象。将含有荧光基团的试剂与玻片避免有助于减少此效应。所有需避光的步骤均在暗处进行。

FISH 实验操作过程中请注意防护，试剂勿与皮肤直接接触。

（一）标本变性与杂交

1. 将含有的 HER2/CEP17 探针的杂交液从冰箱取出，瞬时离心，用移液器取 10μl 至各个样本。滴加至目标区域；

2. 样本盖上盖玻片，避免气泡；封片胶封片；

3. 将玻片放入杂交仪，80℃（±2℃）变性 6 分钟，40℃ 过夜杂交。

注意：杂交期间片子不能干！

（二）杂交后的处理

1、提前 30min 将洗涤液 I 水浴加热到 73±1℃，小心除去封片胶；

2、将切片置于洗涤液 II 溶液中，放置 5-10min，除去盖玻片；

3、将切片置于洗涤液 I 洗液（水浴加热到 73±1℃）中，上下提拉切片 1-3s，放置 2mins；

4、室温条件下，将切片置于洗涤液 II 洗液中，上下提拉 1-3s，处理切片 3mins；

5、在 70%、85% 的乙醇溶液中依次放置 2mins。

6. 避光晾干样本。

注：考普林缸中每次最好同时放置 4 张切片，当最后一张玻片放入考普林缸时开始计时。

（三）观察

1. 滴加 10 μl DAPI 复染液到切片组织上，盖上盖玻片，避免气泡，暗处 20℃ 处理 15 分钟。

2. 于荧光显微镜下观察计数。

3. 长期保存应放于 -20℃。

五、FISH 检测结果分析

计数 30 个细胞，统计 Ratio 值（Ratio 值 = 30 个细胞核中红信号总数 / 30 个细胞核中绿信号总数）。

常见异常类型：HER2 位点扩增。

1、正常细胞：单个间期细胞核中红色及绿色信号各 2 个。

2、HER2 基因扩增异常细胞：单个间期细胞核中红色信号大于 2，且绿色信号不少于 2 个。

结果分析注意事项：

1、样本需随机计数细胞。

2、计数细胞必须是各通道信号均清晰可辨的细胞。

3、杂交不均匀的区域不要分析。

4、细胞核轮廓不清或有重叠的不要分析。

5、背景深影响信号判断的区域不要分析。

6、计数结果需有两个参与人员独立完成，结果一致方可认定。

7、在分析石蜡切片时，分析的区域应在肿瘤细胞集中的部位（需由病理科医师认定）。

8、如果超过 25% 的细胞核内信号太弱，则该区域不要进行分析。

9、如果超过 10% 的细胞质内有信号，则该区域不要进行分析。

【参考范围】

HER2/CEP17 探针包含 2 种 DNA 探针，在中期染色体与间期核上均能杂交产生明亮的显微镜下肉眼可识别信号。HER2 DNA 探针杂交到人类 17 号染色体长臂 (17q11.2-q12)，荧光信号为红色。对照探针为 CEP17，探针杂交信号位于人类 17 号染色体

17p11.1-q11.1, 覆盖整个着丝粒区域, 荧光信号为绿色。
 当 HER2/CEP17 比值 ≥ 2.0 为阳性结果, 提示该样本 HER2 基因扩增;
 当 HER2/CEP17 比值 < 2.0 , 但平均 HER2 拷贝数/细胞 ≥ 6.0 也为阳性结果; 扩增细胞应均质、连续, 且占浸润癌的 10%以上。
 当 HER2/CEP17 比值 < 2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 < 4.0 为阴性结果;
 当 HER2/CEP17 比值 < 2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 < 6.0 , 但 ≥ 4.0 为 HER2 FISH 结果不确定;

【检测结果的解释】

1. 需要特别注意的是对于 HER2/CEP17 比值 ≥ 2.0 , 但平均 HER2 拷贝数/细胞 < 4.0 的病例是否应该视为 FISH 阳性目前尚存一定争议。建议对这部分病例在报告中加以备注, 提示目前的认识争议, 建议临床医师参考免疫组化检测结果并与患者进行必要的沟通。

2. 当 HER2/CEP17 比值 < 2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 < 6.0 , 但 ≥ 4.0 为 HER2 FISH 结果不确定, 需要通过其他诊断方法, 或者重新进行 FISH 试验并结合免疫组化结果做出判断;

【检测方法的局限性】

本试剂盒采用荧光原位杂交技术用于乳腺癌患者HER2基因扩增检测, 不能用于其他基因突变方式的检测。

【注意事项】

- 1、供体外检测使用。
- 2、本试剂盒实验操作过程中, 需戴乳胶手套操作, 避免试剂接触肌肤。
- 3、实验过程中的废弃样本及实验废弃物, 需作为医疗废物统一回收处理
- 4、实验过程中的常见问题及处理方法:

问题	可能的原因	推荐的解决方案
无信号或信号微弱	标本及探针变性不充分	确保玻片进行变性时温度在 $80\pm 2^{\circ}\text{C}$; 将玻片变性时间延长2-4分钟。
	未添加探针	探针充分解冻, 短暂离心, 确保移液器吸取到探针试剂。
	探针添加数量不足	确保移液器吸取准确, 探针加入量到达10ul, 请不要稀释探针。 使用前确保探针解冻充分并达到室温。
	玻片干燥不充分	探针滴加至玻片前, 确保玻片上的乙醇溶液已经完全挥发。
	探针干燥太快	探针滴加后应立即将盖玻片覆盖目标区域; 进行洗脱时, 一次只能移除一张玻片上的盖玻片, 并且在移除下一张之前立即将玻片浸入洗脱液中。
	杂交时盖玻片下有气泡形成	放置盖玻片时要覆盖探针表面, 轻轻挤压以便挤出气泡。
	杂交条件不合适	确保遵守杂交所规定的时间和温度; 橡皮胶封片时勿留缝隙; 根据情况, 调整杂交时间和湿度。
	洗脱液或洗脱条件不正确	确保按照产品说明书要求配制洗脱液; 确保洗脱液的温度达到洗脱步骤所规定温度; 玻片浸入洗脱液前移去盖玻片。
	探针或标本玻片储存不正确	确保探针 -20°C 避光保存; 将未杂交玻片干燥后置于 -20°C 长期保存或者室温短期保存(一般不超过两星期); 将杂交后玻片置于 -20°C 避光保存。
	观察时所选择的滤片组不合适	使用正确滤片组观察探针荧光情况。 详情请咨询河南赛诺特生物技术有限公司技术服务部门。
玻片背景过强	显微镜构造及物镜不宜观察FISH标本, 或者滤片组损伤	请联系显微镜制造商。
	标本制作前玻片清洗不够干净	将玻片浸入无水乙醇中, 滴片前用无尘纸巾擦干。
	杂交后洗脱不充分	确保洗脱液按说明书配制; 确保按说明书操作; 确保洗脱液温度正确; 移去盖玻片, 重复洗脱步骤。
	洗脱液使用时间太长或不正确储存	确保洗脱液 $2-8^{\circ}\text{C}$ 储存, 配制7天后或者经常使用的洗脱液应丢弃。

问题	可能的原因	推荐的解决方案
染色体系形态扭曲	在标本制备阶段玻片干燥过快	降低烤片机温度, 延长室温下玻片干燥时间, 室温下老化至少24小时; 勿在高温下烘烤玻片。
	标本变性过度	确保变性温度调整为 $80\pm 2^{\circ}\text{C}$; 缩短变性时间1-3分钟。
	标本变性前老化不足	滴片后室温下放置老化至少24小时。
	标本变性前未充分干燥	玻片变性前乙醇梯度脱水。
复染过弱	复染过弱	移去盖玻片, 室温下将玻片置于 $1\times$ 洗脱液 $0.1\text{NP-}40/2\times\text{SSC}$ 中浸泡5分钟。将玻片依次置于70%、85%和100%的乙醇溶液中各1分钟进行梯度脱水后再复染。
	复染液陈旧或过度光照	确保复染液 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光保存; 确保复染液未失效。

【参考文献】

1. Dal Lago L, Durbecq V, Desmedt C, et al. Correction for chromosome 17 is critical for determination of true HER2 gene amplification status in breast cancer. Molecular Cancer Therapeutics, 2006,5(10):2572-9.
2. Wiegant J, Ried T, Nederlof PM., et al., In situ hybridization with fluoresceinated DNA. Nucleic Acids Research,1991,19:3237-3241.
3. Levisky, R.H., Singer.J. Fluorescence in situ Hybridization: past, present and future. Cell Science,2003,116:2833-2838
4. Rakha EA, Starczynski J, Lee AH, et al. The updated ASCO/CAP guideline recommendations for HER2 testing in the management of invasive breast cancer: a critical review of their implications for routine practice Histopathology. 2014,64(5):609-15.
5. Beser AR, Tuzlali S, Guzely D, et al. HER2, TOP2A and chromosome 17 alterations in breast cancer. Pathol Oncol Res. 2007,13:180-185

【生产企业】

企业名称: 河南赛诺特生物技术有限公司
 住 所: 郑州高新技术产业开发区翠竹街1号109号
 售后服务单位: 河南赛诺特生物技术有限公司
 电话: 0371-56596916
 传真: 0371-56596918

【医疗器械生产企业许可证编号】

豫食药监械生产许 20150054 号

【说明书批准及修改日期】

批准日期: 2016年9月16日