

**【产品名称】**

通用名: 乳腺癌 HER-2/neu (17q12) /TOP2A (17q21) /CSP17 多色检测试剂盒 (荧光原位杂交法)

英文名: Breast Cancer HER-2/neu (17q12) /TOP2A (17q21) /CSP17 Multicolor Detection Kit (Fluorescent in Situ Hybridization Method)

**【包装规格】** 10 人份/盒, 20 人份/盒。

**【预期用途】**

本品用于体外定性检测确诊为乳腺癌患者的石蜡包埋乳腺癌组织切片中的 HER-2/neu 基因扩增或 TOP2A 基因异常。

HER2/neu 基因 (又名 HER-2, c-erbB-2) 酪氨酸激酶-人类表皮生长因子受体 2, 在 20%~30% 的乳腺癌患者中有基因的扩增和蛋白的过度表达。HER-2 阳性的乳腺癌浸润性强, 无病生存期短, 预后差。临床研究结果显示依据 HER-2 基因状态分层后治疗有利于判断靶向药物疗效及评判患者生存期及预后。因此正确检测和评定乳腺癌的 HER-2 状态至关重要。荧光原位杂交被认为是检测乳腺癌 HER-2 基因扩增的“金标准”。

TOP2A 基因 (Topoisomerase II alpha, TOPII $\alpha$ ) 编码 DNA 拓扑异构酶 II $\alpha$ , 是核基质成分之一, 在核内发挥作用。能调节核酸空间结构动态变化, 参与 DNA 的复制、转录、重组及修复过程。TOP2A 基因参与乳腺癌细胞的复制, 存在 TOP2A 基因异常的患者预后差, 无复发生存期缩短, 尤其是 TOP2A 基因缺失的患者预后更差。基因扩增提示肿瘤有复发的可能, 或者远期的疗效下降。临床试验结果显示 TOP2A 基因分层后治疗有利于延长乳腺癌患者的生存期。因此, 正确检测和评定乳腺癌的 TOP2A 状态至关重要。

本品以确诊为乳腺癌患者的石蜡包埋乳腺癌组织切片为检测对象, 用荧光原位杂交的方法检测乳腺癌细胞中是否存在 HER-2/neu 基因 (17q12) 扩增或 TOP2A 基因 (17q21) 异常。本产品检测结果仅代表对 HER-2 和 TOP2A 基因的检测结果, 可作为指导乳腺癌化疗及药物治疗的一项辅助检测手段, 为临床医生个体化用药提供参考。

**【检验原理】**

荧光原位杂交是一项在体外直接观察细胞中特定核酸的技术。根据碱基互补配对的原则, 特定的 DNA 序列与细胞内的目标序列互补结合。由于探针带有荧光, 在合适的激发光照射下, 杂交探针及目标 DNA 能够在荧光显微镜下被清楚地观察到。本试剂盒提供 3 种探针, 分别与 17 号染色体上的着丝粒区、HER-2/neu 基因区段和 TOP2A 基因区段同源。杂交完成后单个细胞内相应区段的数量可以被清晰地显示。杂交包括以下几个步骤: 首先需要将石蜡包埋的组织切片进行预处理; 其次将 DNA 变性为单链, 再与探针杂交; 杂交完成后, 通过一系列的洗涤, 将多余的未结合的探针洗去, 再用 DAPI (4, 6-二脒基-2-苯吡啶盐酸) 将细胞核复染成蓝色; 最后用荧光显微镜在合适的滤镜下观察探针及 DAPI 发出的荧光的信号。

**【主要组成成分】**

组分名称	规格		数量	主要成分
	10 人份/盒	20 人份/盒		
HER-2/TOP2A 杂交液	100 $\mu$ l/管	200 $\mu$ l/管	1 管	GSP HER-2, GSP TOP2A、CSP17 探针、甲酰胺、SSC、硫酸葡聚糖
DAPI 复染剂	100 $\mu$ l/管	200 $\mu$ l/管	1 管	DAPI 和抗褪色液

**以下仪器及材料需自备:**

<制片> 脱胶载玻片; 恒温箱。<预处理> 二甲苯; 无水乙醇; 去离子水; 胃蛋白酶 (1: 10000, Sigma) 一胃蛋白酶反应液 (4mg/ml 胃蛋白酶0.02mol/L HCL): 0.2g 胃蛋白酶 + 49ml 灭菌水 + 1ml 1mol/L HCL; 20 $\times$ SSC (上海生工); 圆形玻璃染色缸; 恒温水浴锅 (95 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)。<样品和探针同时变性> 18 $\times$ 18mm 盖玻片、镊子、橡皮胶 (rubber cement)、平板加热器、原位杂交仪 (ABBOTT) 或杂交盒与恒温水浴锅 (37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)。<杂交后洗涤及复染> 无水乙醇; NP-40 (上海生工); 20 $\times$ SSC (上海生工); 圆形玻璃染色缸; 恒温水浴锅 (37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C); 22 $\times$ 22mm 盖玻片;

**洗液 I (2 $\times$ SSC): 36ml 纯水+ 4ml 20 $\times$ SSC, 总体积 40ml;**

**洗液 II (0.1% NP-40/2 $\times$ SSC): 36ml 纯水+ 4ml 20 $\times$ SSC+ 40 $\mu$ l NP-40, 总体积 40ml;**

**【储存条件及有效期】** -20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 避光干燥保存; 有效期 12 个月。

以下环境或条件下, 试剂性能无变化: ①25 $^{\circ}$ C 光照度 25000Lux 环境下保存 2 小时, 500Lux 环境下保存 24 小时。②37 $^{\circ}$ C 避光保存 3 天; ③25 $^{\circ}$ C 开瓶保存 10 小时; ④模拟运输环境 (低温) 5 天内; ⑤反复冻融 5 次。一般, 随着保存时间延长和/或温度升高, 信号强度下降, 灵敏度降低, 检测背景的加深, 信号判读开始出现偶然性。

**【适用仪器】** 各种荧光显微镜, 适合 DAPI (367/452)、Green (496/520)、Orange (552/576) 及 Aqua (426/450) 观察的滤块

**【样本要求】**

- 1 适用标本类型: 石蜡包埋的组织样本切片
- 2 标本的固定: 从取材到固定间隔不超过 1 小时, 固定的时间以 6-48 小时为宜
- 3 固定液类型: 10% 中性福尔马林固定液
- 4 切片厚度: 3~5 $\mu$ m 之间
- 5 载玻片: 多聚赖氨酸处理
- 6 保存和运送: 石蜡包埋组织切片样本应室温防尘保存和运送, 保存期为 12 个月

**【检验方法】**

**1 玻片预处理**

- 1.1 玻片放入 65 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 恒温箱中烤片过夜;
- 1.2 取出玻片, 将其放入室温二甲苯中 15 分钟;
- 1.3 取出玻片, 再将其放入另一缸室温二甲苯中 15 分钟;
- 1.4 取出玻片, 再将其放入室温无水乙醇中 10 分钟;
- 1.5 取出玻片, 再将其放入室温 100% 乙醇、90% 乙醇、70% 乙醇各 3 分钟;
- 1.6 取出玻片, 再将其放入室温去离子水中 3 分钟, 用无尘纸巾吸取多余水分;
- 1.7 取出玻片, 再将其放入 100 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 的去离子水中煮片 25 分钟 (切片水平放置于容器中, 样本面朝上);
- 1.8 取出玻片, 室温晾干;
- 1.9 将玻片正面朝上平置, 在样本区域滴加适量的胃蛋白酶反应液, 消化 5~15 分钟;
- 1.10 将多余液体甩去, 玻片放入室温 2 $\times$ SSC 中 5 分钟;
- 1.11 取出玻片, 再将其放入另一缸室温 2 $\times$ SSC 中 5 分钟;
- 1.12 取出玻片, 再将其依次放入室温 70%, 90%, 100% 梯度乙醇脱水各 3 分钟;
- 1.13 取出玻片, 室温晾干。

**关键点:** 胃蛋白酶的反应时间需要通过预试验进行确定。可以使用同批制备的样本片按所述方法进行预试验, 通常以5分钟为间隔时间。例如, 分别测试消化时间为5分钟、10分钟和15分钟, 完成“玻片预处理”后, 可以在明场下, 使用10×或20×物镜观察组织消化状态; 或者直接进行DAPI复染, 进行消化状态判断。

## 2 样品和探针同时变性 (避光操作)

- 2.1 从-20±5℃冰箱中取出杂交液, 震荡混匀, 瞬时离心;
- 2.2 加10μl的杂交液到杂交区域, 迅速盖上18×18mm盖玻片, 轻压使杂交液均匀分布, 避免产生气泡;
- 2.3 用橡皮胶沿盖玻片边缘封片, 完全覆盖盖玻片和载玻片接触的部位;
- 2.4 将玻片放入杂交仪中, 湿润原位杂交仪湿度条, 插入湿条, 盖上杂交仪上盖, 设置“Denat&Hyb”程序, 变性85℃ 5分钟, 杂交37℃ 10~18小时。(若无杂交仪, 可使用替代仪器, 如恒温热台进行变性, 电热烘箱或水浴锅进行杂交, 需注意温度准确及保持杂交湿度)。

## 3 杂交后洗涤及复染 (避光操作)

- 3.1 洗涤前30分钟, 将配制好的洗液I, 洗液II, 放入37±1℃的水浴中, 测量以确保温度合适;
- 3.2 关闭杂交仪电源, 将玻片取出, 轻轻撕去橡皮胶, 移去盖玻片(若盖玻片难以去除, 可以将其放入洗液I中微微摇晃, 以利于其脱落);
- 3.3 玻片放入37±1℃洗液I(2×SSC)中10分钟;
- 3.4 取出玻片, 再将其放入37±1℃洗液II(0.1% NP-40/2×SSC)中5分钟;
- 3.5 取出玻片, 室温70%乙醇中3分钟;
- 3.6 取出玻片, 暗处自然干燥玻片;
- 3.7 室温, 滴加10μl DAPI复染剂到22×22mm的盖玻片, 载玻片目标区域朝下, 轻放于盖玻片上, 轻压, 避免产生气泡, 在暗处存放, 待观察。

**注意事项:** ①上述所列试剂均在圆形染色缸中配制(每种试剂体积均为40ml), 每个染色缸最多可放入5片切片。非室温溶液, 在操作开始前需提前预热反应试剂至指定温度。在洗涤过程中, 可间隔2~3分钟轻轻晃动染色缸, 提高洗涤效果。②杂交后样本在4℃避光至少可以保存7天。

## 4 结果分析

相关荧光和DAPI需用合适的滤块观察。其中, GSP HER-2 探针为红色信号; GSP TOP2A 探针为绿色信号; CSP17 探针显示青色信号。

- 4.1 使用合适的滤镜, 在40×物镜下寻找, 在100×物镜下计数;
- 4.2 调整合适的焦距, 对信号和背景有明确的概念; 信号点因位于细胞内; 当细胞外存在荧光信号点时, 要注意与细胞内信号点区分, 最好能避开该区域进行计数;
- 4.3 扫视几个肿瘤细胞区域, 选择一个有很好核分界的区域, 要求细胞核大小一致、边界完整, DAPI染色均匀、核无重叠, CSP17探针(青色信号点)信号清晰;
- 4.4 从选择区域的左上角开始分析, 从左到右扫视, 观察多个视野;
- 4.5 组织计数的要求:
  - a. 只计数发病的肿瘤组织
  - b. 避免在坏死区域及核边界不清的区域计数
  - c. 需要主观辨别的核不计数
  - d. 跳过信号弱及没有特定信号或高背景的核计数
- 4.6 转至100×物镜, 调整焦距, 在核的不同层次找到所有信号点;
- 4.7 在每个核内计数信号点; 调焦找到每个核内的所有信号点, 计数一个区域内的三种信号, 只计数每种颜色有1个或更多FISH信号的细胞, 没有信号或只有一种颜色信号的核不计数; 记录观察到的细胞总数(信号数目正常及异常);
- 4.8 计数方法  
在清晰的肿瘤区域, 在60个核内计数GSP HER-2(红色)、GSP TOP2A(绿色)和CSP17(青色)信号, 分别记录GSP HER-2、GSP TOP2A和CSP17的信号总数, 再分别计算GSP HER-2与CSP17比值及GSP TOP2A与CSP17比值。

## 5 质量控制

- 5.1 内对照: 杂交的组织中75%的细胞核显示出三色信号时, 方视为试验成功。可以将信号正常的细胞作为内对照, 对杂交特异性进行监控。
- 5.2 外对照: 每次检测都必须同时做质控片, 质控片必须和病例样本一同操作, 来对比操作的过程。对于一个新试剂盒, 必须先做一个质控片。质控片为FISH检测阳性和阴性的组织片, 可以购买商品化对照片或者选择已知的对照样本按照说明书所述方法自行制片。质控片结果分析方法同上, 计数60个细胞核中各信号点的数目。荧光信号计数结果必须和质控来源相同, 如果质控片无法达到分析的要求, 则该批实验结果不可以被分析。
- 5.3 对于临床样品, 如果杂交信号不明确, 该次试验被认为是无法判断结果; 同样地, 如果可用于分析的细胞数目不足, 该次试验也被认为是信息不足。

## 6 试验结果的判定

按计数要求进行计数, 当计数HER-2/neu基因状态出现如下情况时:

- a. GSP HER-2(红色) 众多信号连接成簇;
  - b. GSP HER-2/CSP17(红色/青色)  $\geq 2.2$ ;
  - c. GSP HER-2/CSP17(红色/青色)  $< 1.8$ ;
  - d.  $1.8 \leq \text{GSP HER-2/CSP17(红色/青色)} < 2.2$ ;
- 若满足情况a)、或b) 判定为HER-2/neu基因扩增; 若满足情况c), 判定为HER-2/neu基因无扩增;

若满足情况d), 需要再计数20个细胞核中的信号, 或由另一位实验人员重新计数, 如仍为临界值, 则应在检测报告中注明, 假如在计数区域存在主观辨别的核或信号弱或高背景情况, 有可能干扰到信号判断, 应再拿一张组织切片重新进行实验。

当计数TOP2A基因状态出现如下情况时:

- a. GSP TOP2A(绿色) 众多信号连接成簇;
  - b. GSP TOP2A/CSP17(绿色/青色)  $\geq 2.0$ ;
  - c. GSP TOP2A/CSP17(绿色/青色)  $< 0.8$ ;
  - d.  $0.8 \leq \text{GSP TOP2A/CSP17(绿色/青色)} < 2.0$ ;
- 若满足情况a)、或b), 判定为TOP2A基因扩增; 若满足情况c), 判定为TOP2A基因缺失; 若满足情况d), 判定为TOP2A基因无异常; 当GSP TOP2A/CSP17在0.7~0.9或1.8~2.2之间时, 需要谨慎解释结果, 先排除计数细胞中是否存在大量正常核信号类型, 可以增加计数细胞重新计算比值进行结果判断。假如在计数区域存在主观辨别的核或信号弱或高背景情况, 有可能干扰到信号判断, 应再拿一张组织切片重新进行实验。

【参考范围】

通过临床标本的验证, 最终确定本试剂盒的临界值范围为: 以GSP HER-2/CSP17比值1.8~2.2。以GSP TOP2A/CSP17比值1.8~2.2作为TOP2A扩增判断的临界值, 以0.7~0.9作为TOP2A缺失判断的临界值。

## 【检验结果的解释】

研究表明, HER-2/neu基因异常常表现为成簇扩增或HER-2/CSP17比值增加; TOP2A异常方式常表现为缺失或扩增, 本试剂盒提供三色探针, 分别与HER-2/neu

基因（17q12）和 TOP2A 基因（17q21）区域同源，用以检测 HER-2/neu 基因和 TOP2A 基因异常。CSP17 探针作为内对照，用以检测 17 号染色体单体或多体的现象。

#### 示例：样本检测

临床质控使用已知的对照样本制片，按说明书所述与未知样本同时进行样本预处理，进行变性和杂交，最后经杂交后洗涤和复染进行结果分析。图 1 示本试剂盒的特异性检测结果，图 2 示临床质控片的检测结果，图 3 和 4 示未知样本检测结果。

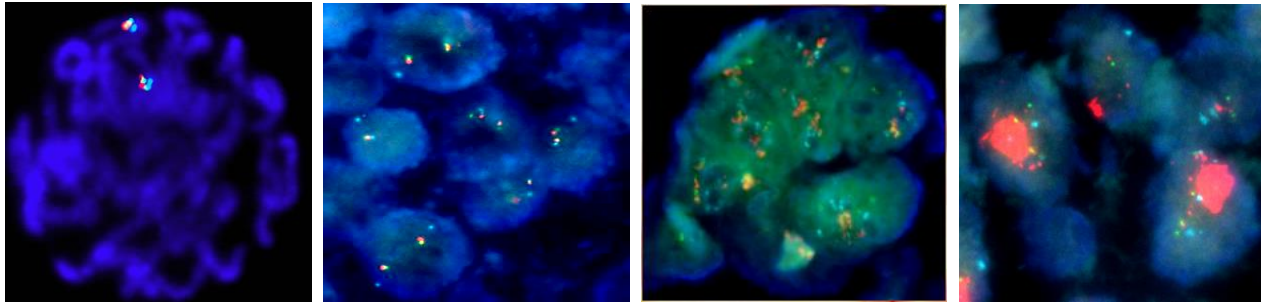


图 1

图 2

图 3

图 4

#### 结果

图 1 所示的人外周血培养细胞片杂交结果正常，荧光信号仅出现在预期的靶区域，未见交叉杂交，试剂质量合格，可以用于样本检测。

图 2 观察样本杂交信号，细胞核内可见 GSPHER-2 信号（红色）、GSP TOP2A 信号（绿色）和 CSP17 信号（青色），分别计数 60 个细胞核内的（红色；青色）、（绿色；青色）比值，结果比值均为 1，符合“阴性”判断标准，试验结果符合预期，可以进行未知样本判断。

图 3 GSPHER-2（红色）众多信号连接成簇，符合 HER-2/neu 基因“扩增”判断标准；GSP TOP2A（绿色）众多信号连接成簇，符合 TOP2A 基因“扩增”判断标准。报告格式为：样本检测结果为 HER-2/neu 基因扩增，TOP2A 基因扩增。

图 4 GSPHER-2（红色）众多信号连接成簇，符合 HER-2/neu 基因“扩增”判断标准；GSP TOP2A/CSP17（绿色/青色）=1，符合 TOP2A 基因“无异常”判断标准。报告格式为：样本检测结果为 HER-2/neu 基因扩增，TOP2A 基因无异常。

#### 【检验方法的局限性】

本试剂盒只用于体外诊断，适用于 10%中性福尔马林固定的石蜡包埋人类乳腺组织同期细胞核中的 HER-2/neu 基因、TOP2A 基因和 17 号染色体的检测，不应使用其它类型的标本和固定剂。样本及制片质量都会影响本试剂盒的检测结果。本试剂盒的检出结果仅供临床参考，假如实验结果与临床所见不符，应由病理医生和临床医生进行会诊，不能单独作为确诊或治疗的依据。

#### 【产品性能指标】

分析性能评估结果表明，作为固定剂的中性福尔马林和用于包埋的石蜡不会干扰试验结果。通过临床试验与同类检测试剂进行比较，本试剂盒对 HER2 基因检测的阳性符合率 100%、阴性符合率 100%，总符合率 100%，对于 TOP2A 基因检测的阳性符合率 100%、阴性符合率 99.9%、总符合率均达 99.9%。

#### 【注意事项】

- 1 本试剂盒只用于体外检测。
- 2 实验前请仔细阅读本说明书。
- 3 实验室管理应严格按照细胞遗传学实验室的管理规范，实验人员必须进行专业基础和技能培训，熟悉荧光显微镜的操作。
- 4 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜，样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，试剂准备需生物安全柜，实验过程中穿工作服，带一次性手套，使用自卸管移液器。
- 5 对每次实验进行质量控制。
- 6 配制试剂除特别说明外，均使用纯水配制。
- 7 DAPI 复染剂包含有 DAPI 和对苯二胺，DAPI 有潜在致突变作用，避免直接和皮肤或者粘膜接触；对苯二胺是已知的皮肤致敏原和可能的呼吸道致敏原，避免吸入，食入或与皮肤接触；探针及变性液中含有甲醛是一种致癌物，操作过程中请注意防护，避免与皮肤及粘膜接触。如果试剂接触到眼睛或皮肤，请立即用大量水冲洗，如有不适症状需及时就医。
- 8 荧光素在光照下易淬灭，所有含荧光的试剂都需要避光。所有步骤中包含荧光试剂的操作都需要避光；高倍镜长时间观察会发生荧光衰减，导致荧光图像反差减弱，可以减少激发光强度，从而缓解荧光衰减；观察计数时切勿长时间照射同一视野，以防止荧光淬灭。
- 9 溶液，水浴，烘箱的温度非常关键，需使用合格温度计进行校准，使用前须确定温度准确。
- 10 有毒有害试剂处理需按照相应程序处理。
- 11 在观察信号时应根据情况随时调节显微镜焦距，准确观察位于细胞核不同平面上的信号以免遗漏。
- 12 本产品提供的试剂不含有源或动物源性物质。

#### 【参考文献】

- 1 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. Journal of clinical oncology 2007, 25(1):118-145.
- 2 Wedad Hanna. Testing for HER-2 Status. Oncology 2007, 61(2): 22-30.
- 3 Werner M, Wilkens L, Aubele M, et al. Interphase Cytogenetics in Pathology: Principles, Methods, and Applications of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Histochem Cell Biol 1997, 108: 381-390.
- 4 Kirsten VN, Sven M, Susanne M, et al. Aberrations of ERBB2 and TOP2A genes in breast cancer. Molecular oncology 2010, 4: 161-168.
- 5 Bouchalova K, Trojanec R, Kolar Z, et al. Analysis of ERBB2 and TOP2A gene status using fluorescence *in situ* hybridization versus immunohistochemistry in localized breast cancer. Neoplasma 2006, 53(5): 393-401.
- 6 Järvinen TA, Tanner M, Rantanen V, et al. Amplification and deletion of topoisomerase IIa associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer. Am. J. Pathol 2000, 156(3): 839-847.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州安必平医药科技股份有限公司 住所：广州市黄埔区科信街 2 号  
联系方式：电话：020-32299997 传真：020-32290284  
售后服务单位名称：广州安必平医药科技股份有限公司 生产地址：广州市黄埔区科信街 2 号  
生产许可证编号：粤食药监械生产许 20111993 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20173400641

【说明书核准日期及修改日期】核准日期：2017 年 4 月 18 日；修改日期：2022 年 4 月 18 日