



HER2 基因检测试剂盒（荧光原位杂交法）说明书

【产品名称】

通用名称：HER2基因检测试剂盒（荧光原位杂交法）

【包装规格】5 人份/盒、10 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测经 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋乳腺癌组织切片中 HER2 基因的扩增情况。

HER-2 (v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, 也称 HER-2/neu), 基因定位于染色体 17q12, 是一种原癌基因, 属于 Her/erbB 家族, 编码分子量为 185kDa 的酪氨酸激酶活性跨膜糖蛋白。HER2 蛋白的过表达主要是由于 HER2 基因的扩增, 可导致肿瘤细胞内信号通路的异常活化, 与肿瘤的发生发展和侵袭转移有关。HER2 基因的扩增和蛋白的过表达均称为 HER2 阳性。对 HER2 阳性的乳腺癌进行联合抗 HER2 靶向治疗使得部分患者的生存状况得到改善^[1-3]。准确地检测 HER2 蛋白表达和基因扩增状态是抗 HER2 单克隆抗体分子靶向治疗患者筛选和疗效预测的前提, 对乳腺癌的临床治疗和预后判断至关重要^[4]。IHC 是一种常规检测方法, IHC 3+ 为 HER2 阳性; IHC 0 和 1+ 为 HER2 阴性; 而 IHC 2+ 为不确定, 需进一步应用 FISH 进行 HER2 扩增状态的检测^[4]。IHC 方法只能用于病人的初筛, 而 FISH 检测是目前公认的 HER2 基因状态检测的金标准, 是个体化治疗的重要参考指标。

本试剂盒未与具体药物联合进行临床试验, 仅针对 HER2 基因的检测性能进行了验证。本试剂盒仅用于 HER2 基因扩增情况的检测, 其检测结果仅供临床参考, 不作为患者个体化治疗的唯一依据, 临床医生应结合患者病情, 药物适应症、治疗反应及其他实验室检测结果进行综合判断。

【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 2 种探针, 分别与 17 号染色体上的着丝粒区、HER2 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-苯基咪唑啉酮) 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
	5 人份/盒	10 人份/盒		
HER2 杂交液	50 μ L/管	100 μ L/管	1 管	GSP HER2 探针、CSP 17 探针、甲酰胺、SSC、硫酸葡聚糖
DAPI 复染剂 II	50 μ L/管	100 μ L/管	1 管	DAPI 和抗褪色剂 II

以下仪器及材料需自备:

<制片> 防脱载玻片; 恒温箱。

<预处理> 二甲苯 (或环保脱蜡剂); 无水乙醇; 纯化水;

胃蛋白酶 (1:10000) 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; 圆形玻璃染色缸; 恒温水浴锅 (100 \pm 5 $^{\circ}$ C)。

<样品和探针同时变性> 22 \times 22mm 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; 20 \times SSC; 圆形玻璃染色缸; 恒温水浴锅 (37 \pm 1 $^{\circ}$ C); 22 \times 22mm 盖玻片;

2 \times SSC: 36mL 纯水+ 4mL 20 \times SSC, 总体积 40mL;

0.1% NP-40/2 \times SSC: 35.96mL 纯水+4mL 20 \times SSC +40 μ L NP-40, 总体积 40mL。

【储存条件及有效期】

-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 避光保存, 有效期 12 个月。

以下环境或条件下, 试剂性能无变化:

25 $^{\circ}$ C 光照度 25000Lux 环境下保存 1 小时, 482Lux 环境下保存 48 小时; 19Lux 环境下保存 48 小时; 37 $^{\circ}$ C 避光保存 7 天; 干冰密封运输 5 天; 25 $^{\circ}$ C 开瓶保存 10 小时; 5 人份盒: 反复冻融 5 次; 10 人份盒: 反复冻融 10 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, 信号判读开始出现偶然性。

生产日期及失效日期详见产品外包装。

【适用仪器】

各种荧光显微镜, 适合 DAPI (367/452)、Green (496/520) 及 Orange (552/576) 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 μ 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, 至少保存 12 个月。

【检验方法】

1. 玻片预处理

- 1.1 玻片放入 $65 \pm 5^\circ\text{C}$ 恒温箱中烤片 12~16 小时;
- 1.2 取出玻片, 将其放入室温二甲苯 (或环保脱蜡剂) 中 10 分钟;
- 1.3 取出玻片, 再将其放入另一缸室温二甲苯 (或环保脱蜡剂) 中 10 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, 再将其放入室温无水乙醇、90%乙醇、70%乙醇各 3 分钟;
- 1.6 取出玻片, 再将其放入室温纯化水中 3 分钟, 用无绒纸巾吸取多余水分;
- 1.7 取出玻片, 再将其放入 $100 \pm 5^\circ\text{C}$ 的纯化水中煮片 25 分钟 (确保样本区域与容器不接触);
- 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 3~15 分钟;
- 1.10 将多余液体甩去, 玻片放入室温 $2 \times \text{SSC}$ 中 3 分钟;
- 1.11 取出玻片, 再将其依次放入室温 70%乙醇, 90%乙醇, 无水乙醇各 2 分钟;
- 1.12 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 2 分钟为间隔时间。例如, 分别测试消化时间为 3 分钟、5 分钟和 7 分钟, 完成“玻片预处理”后, 可以在明场下, 使用 $10 \times$ 或 $20 \times$ 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杂交 (避光操作)

- 2.1 从 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 冰箱中取出杂交液, 震荡混匀, 瞬时离心;
- 2.2 加 $10 \mu\text{L}$ 的杂交液到杂交区域, 迅速盖上 $22 \times 22 \text{mm}$ 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°C 5 分钟, 杂交 37°C 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 $2 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{NP-40} \times 2 \times \text{SSC}$, 放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅中, 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 $2 \times \text{SSC}$ 中微微摇晃, 以利于其脱落);
- 3.3 玻片放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ $2 \times \text{SSC}$ 中 10 分钟;
- 3.4 取出玻片, 再将其放入 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ $0.1\% \text{NP-40} \times 2 \times \text{SSC}$ 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 $10 \mu\text{L}$ DAPI 复染剂到 $22 \times 22 \text{mm}$ 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: 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 分钟轻轻晃动玻片, 提高洗涤效果。

4. 结果分析

相关荧光和 DAPI 需用合适的滤块观察。其中, GSP HER2 探针显示红色信号; CSP17 探针显示绿色信号。

- 4.1 使用合适的滤镜, 在 $10 \times$ 物镜下寻找, 在 $100 \times$ 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; 信号点应位于细胞内; 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 扫视整个样本区域, 要求细胞核边界完整, DAPI 染色均匀、核无重叠, 信号清晰; 初步判断检测质量以及是否存在 HER2 扩增的异质性。
- 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, 要求至少找到 2 个浸润癌区域, 计数至少 20 个浸润癌细胞。
- 4.5 在每个核内计数信号点; 调焦找到每个核内的所有信号点, 计数一个区域内的两种信号, 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);
- 4.6 计数方法

在清晰的肿瘤区域, 找到至少 2 个浸润癌区域, 随机计数至少 20 个浸润癌细胞中的 GSP HER2 (红色) 和 CSP 17 (绿色) 信号, 分别记录 GSP HER2 和 CSP 17 的信号总数, 再分别计算 GSPHER2 与 CSP 17 比值。

5. 质量控制

- 5.1 内对照: 杂交的组织或细胞中 75% 的细胞核显示出双色信号时, 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本说明书所述方法自行制片。质控片结果分析方法同上。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4.6计数方法进行计数，当计数HER2基因状态出现如下情况时：

- a) HER2/CSP17 比值 <2.0 且平均HER2拷贝数/细胞 <4.0 时，为HER2基因无扩增；
- b) HER2/CSP17 比值 <2.0 且平均HER2拷贝数/细胞 <6.0 ，但 ≥ 4.0 时为HER2 FISH结果不确定；
- c) HER2/CSP17 比值 <2.0 ，但平均HER2拷贝数/细胞 ≥ 6.0 时，为HER2基因扩增；
- d) HER2/CSP17 比值 ≥ 2.0 时，为HER2基因扩增；
- e) 若众多HER2信号连接成簇时可不计数，即为HER2基因扩增。

若满足情况a)，判定为HER2基因无扩增；若满足情况c)、d)或e)判定为HER2基因扩增；

若满足情况b)，需再计数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。

【阳性判断值或者参考区间】

根据《乳腺癌HER2检测指南（2014版）》HER2基因检测判读标准，进行阈值设定，通过临床标本的验证，最终确定本试剂盒的阈值：（1）HER2/CSP17 比值 <2.0 ，但平均HER2拷贝数/细胞 ≥ 6.0 时，为HER2基因扩增；（2）HER2/CSP17 比值 ≥ 2.0 时，为HER2基因扩增；（3）HER2/CSP17 比值 <2.0 且平均HER2拷贝数/细胞 <6.0 ，但 ≥ 4.0 时为HER2 FISH结果不确定。

【检验结果的解释】

研究表明，HER2基因异常表现为成簇扩增或HER2/CSP17比值增加，本试剂盒提供双色探针，与HER2基因（17q12）区域同源，用以检测HER2基因异常。CSP17探针作为内对照，用以检测17号染色体数目情况。

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和图2示临床质控片的检测结果，图3和图4示未知样本检测结果。

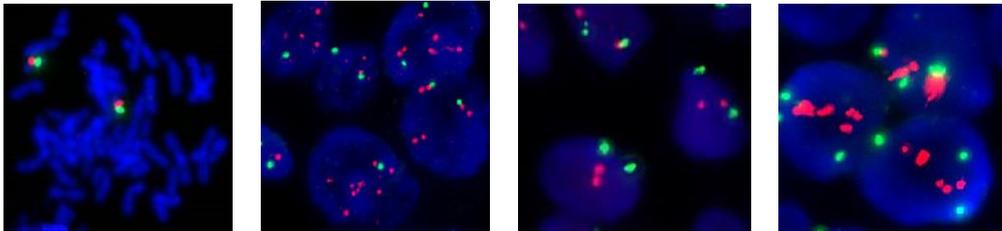


图 1

图 2

图 3

图 4

结果：

图1 阳性质控片杂交结果。中期染色体绿色（CSP17）和红色（GSP HER2）信号分别特异性杂交于染色体相应区域，未见交叉杂交情况，试验结果符合预期，可以进行未知样本判断。

图2 阳性质控片杂交结果。细胞核内可见GSP HER2信号（红色）和CSP17信号（绿色），3个浸润区域，共计数20个细胞核内的（红色拷贝数：绿色拷贝数）比值，GSP HER2总信号数142，平均拷贝数 $7.1 > 6.0$ ，CSP17信号总数35，平均拷贝数1.75；GSP HER2总信号数/CSP17信号总数=4.06，符合“阳性”判断标准，试验结果符合预期，可以进行未知样本判断。

图3 未知样本1杂交结果。细胞核内可见GSP HER2信号（红色）和CSP17信号（绿色），3个浸润区域，共计数20个细胞核内的信号比值（红色拷贝数：绿色拷贝数）。结果，GSP HER2总信号数40，平均拷贝数 $2.0 < 6.0$ ，CSP17信号总数40，平均拷贝数2；GSP HER2总信号数/CSP17信号总数=1，符合“阴性”判断标准。报告格式为：样本检测结果为HER2基因无扩增。

图4 未知样本2杂交结果。细胞核内可见GSP HER2信号（红色）和CSP17信号（绿色），2个浸润区域，GSP HER2（红色）众多信号连接成簇，可不计数，结果符合HER2基因“扩增”判断标准。报告格式为：样本检测结果为HER2基因扩增。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒为体外诊断试剂，检测结果的临床判定均应结合患者医疗病史和其他临床诊断结果进行综合评估，不得作为临床诊断的唯一依据。
2. 肿瘤组织HER2基因表达的异质性可能影响检测结果。
3. 检测结果受样本来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件及样本预处理都会因素影响。
4. 检测结果如与组织病理特征不符，应核实病理诊断或重新检测。
5. 本产品的性能指标是基于说明书所述检测流程获得，对该流程进行更改，可能会改变该检验结果。
6. 本试剂盒仅适用于经10%中性福尔马林固定石蜡包埋乳腺组织切片中HER2基因的扩增情况，不应使用其它样本类型和固定剂。

【产品性能指标】

1. 分析性能评估结果表明：
 - 1.1 杂交效率：5份阴性参考品和阴性参考品的检测结果显示无杂交信号的细胞百分比为0%，杂交效率为100%。
 - 1.2 分析灵敏度：阴性参考品检测结果显示均在染色体相应区域出现正确的荧光信号，分析灵敏度达100%。
 - 1.3 分析特异性：杂交只出现在2种探针预期的靶区域中，无染色体位点之间的交叉杂交现象。
 - 1.4 测定准确度：10份阴性样本检测结果均为阴性；10份阳性样本检测结果均为阳性，符合率100%。
 - 1.5 干扰试验：福尔马林固定石蜡包埋乳腺组织样本中的内源成分以及中性福尔马林固定剂和用于包埋的石蜡等外源物质均不干扰实验结果。
 - 1.6 同类产品性能对比：经临床样本验证，本试剂盒与市售商品化同类产品性能相似。

1.7 重复性: 同一标本来源的 5 张阳性参考品检测结果均一致, 且均为阳性; 同一标本来源的 5 张阴性参考品检测结果均一致, 且均为阴性。

1.8 精密度: 进行了批内、批间、日间以及人员精密度进行评价。统计分析各参数未发现显著性差异。

2. 临床试验结果:

本试剂盒的临床研究共检测有效样本 1604 例, 检测 HER2 基因的阳性符合率为 99.85%、阴性符合率为 93.51%、总符合率为 96.07%; Kappa 值 0.976 (P<0.001), 表明试剂盒与预期结果具有很好的一致性。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 本试剂盒只用于体外检测。
3. 实验室管理应严格按照实验室的管理规范, 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, 使用一次性枪头。
5. 对每次实验进行质量控制。
6. 配制试剂除特别说明外, 均使用纯化水配制。
7. DAPI 复染剂 II 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源和可能的呼吸道致敏源, 避免吸入、食入或与皮肤接触; 探针及变性液中含有甲醛胺是一种致癌物, 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, 从而减缓荧光衰减; 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. 本产品提供的试剂不含有源或动物源性物质。
12. 本试验操作步骤适用于 10% 中性福尔马林固定石蜡包埋乳腺癌组织切片样本处理。

【参考文献】

1. LANG I, BELL R, FENG F Y, et al. Trastuzumab retreatment after relapse on adjuvant trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: final results of the retreatment after herceptin adjuvant trial [J]. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2014, 26(2): 81-89.
2. SWAIN SM, BASELGA J, KIM S B, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. N Engl J Med, 2015, 372(8): 724-734.
3. Hanis L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer J J Clin Oncol 2007;25(33):5287-5312.
4. 《乳腺癌 HER2 检测指南 (2014 版)》编写组. 乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版)[J]. 中华病理学杂志, 2014, 4(43): 262-267.

【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: 邮政编码: 510663 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

联系方式: 邮政编码: 510663 电话: 020-32299997 传真: 020-32290284 客服电话: 4001-628-638

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

网址: <http://www.gzlbp.com>

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20213400138

【说明书核准及修改日期】核准日期: 2021 年 2 月 24 日 修改日期: 变更产地试产