

BCL6/MYC/IGH/[BCL2/IGH]基因探针试剂（荧光原位杂交法）说明书

【产品名称】

通用名称：BCL6/MYC/IGH/[BCL2/IGH]基因探针试剂（荧光原位杂交法）

【包装规格】

10 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒在常规染色基础上进行原位杂交染色，为医师提供诊断的辅助信息。

【检测原理】

本试剂盒基于荧光原位杂交技术，根据碱基互补配对原则，经变性、杂交，特定的 DNA 序列与细胞内的目标序列互补结合，形成靶基因和核酸探针的杂交体。由于探针带有荧光，在荧光显微镜下，可实现对待测基因的定性分析。本试剂盒由 BCL6 双色探针、MYC 双色探针、IGH 双色探针和 BCL2/IGH 双色探针组成，BCL6 双色探针由红色荧光标记 3'端，绿色荧光标记 5'端；MYC 双色探针由红色荧光标记 5'端，绿色荧光标记 3'端；IGH 双色探针由红色荧光标记 3'端，绿色荧光标记 5'端；BCL2/IGH 双色探针由红色荧光标记 BCL2 基因位点，绿色荧光标记 IGH 基因位点，通过原位杂交技术，可将探针结合于目标检测部位，从而判断基因情况。

【主要组成成分】

本试剂盒由 BCL6 双色探针、MYC 双色探针、IGH 双色探针、BCL2/IGH 双色探针组成，详见表 1 所示。

表 1 试剂盒组成表

包装规格	组分名称	主要组成成分	规格	数量
10 人份/盒	BCL6 双色探针	BCL6 红色探针、BCL6 绿色探针、杂交缓冲液	100 μL/管	1 管
	MYC 双色探针	MYC 红色探针、MYC 绿色探针、杂交缓冲液	100 μL/管	1 管
	IGH 双色探针	IGH 红色探针、IGH 绿色探针、杂交缓冲液	100 μL/管	1 管
	BCL2/IGH 双色探针	BCL2 红色探针、IGH 绿色探针、杂交缓冲液	100 μL/管	1 管

自备试剂、耗材及设备信息：

①样本释放剂（推荐生产厂家：嘉兴允英医学检验有限公司，浙嘉械备 20210112 号）；②无水乙醇、甲醇、冰乙酸、氯化钾（规格：分析纯 AR）；③1×PBS 缓冲液；④FISH 封片胶；⑤原位杂交蓝染染色液（推荐生产厂家：嘉兴允英医学检验有限公司，浙嘉械备 20210113 号）；⑥镜油；⑦水浴锅（计量校准合格）；⑧杂交仪（计量校准合格）。

【储存条件及有效期】

储存条件：-20°C±5°C 避光保存，有效期为 12 个月。

生产日期和使用期限见试剂盒标签。

【适用仪器】

荧光显微镜，包括荧光显微镜及滤光片组，应选择与本试剂盒的荧光标记染料相适应的滤光片组。

红色染料：最大激发波长 552nm，最大发射波长为 570nm。

绿色染料：最大激发波长 496nm，最大发射波长为 519nm。

DAPI：最大激发波长 364nm，最大发射波长为 454nm。

【样本要求】

组织样本：

1. 适用样本类型：手术切除或活检组织石蜡包埋标本。
2. 组织离体后应在 1 小时内采用 10%中性福尔马林固定液固定，组织固定后经常规脱水和石蜡包埋。

细胞样本：

1. 样本采集：取 2-3 mL 肝素钠抗凝的骨髓细胞样本。
2. 样本保存：未经固定的新鲜骨髓细胞标本 2°C-8°C 保存不超过 24 小时。固定后细胞悬液 -20°C±5°C 保存不超过 12 个月。标本保存温度过高或过低时、细胞悬液保存过程中挥发过度或污染时，该样本将不能用于检测。

【检验方法】

1. 相关试剂配制

- 1.1 乙醇溶液：70%乙醇、85%乙醇

将 700 mL、850 mL 无水乙醇用纯化水分别稀释至 1 L，密封常温储存，保质期 6 个月，若试剂出现浑浊或污染则不能使用。

1.2 固定液（甲醇：冰乙酸=3:1）

用量筒量取 30 mL 甲醇和 10 mL 冰乙酸，充分混合。现配现用。

1.3 低渗液（0.075M KCl 溶液）

称取 2.8 g 氯化钾，用 400 mL 纯化水溶解，溶解充分后定容至 500 mL。密封常温储存，保质期 6 个月，若试剂出现浑浊或污染则不能使用。

2. 样本预处理

组织样本：（可参考样本释放剂说明书进行操作）

（1）预热：处理前，用水浴锅预热脱蜡剂（68℃），通透剂（90℃），纯化水（37℃），在酶消化处理前 20 分钟配制并预热蛋白酶工作液（37℃），使用前确保温度达到要求。

（2）烤片：将组织玻片置于烤片机上，80℃烤片 30 分钟或 65℃烤片 2 小时。

（3）脱蜡：将烤片结束的玻片，浸入 68℃的脱蜡剂中脱蜡 15 分钟。

（4）洗蜡：取出玻片，再将其浸入室温无水乙醇中 5 分钟。

（5）通透：取出玻片，再将其浸入 90℃的通透剂中通透 20 分钟。

（6）水洗：取出玻片，再将其浸入 37℃的纯化水中 3 分钟。

（7）消化：取出玻片，再将其浸入 37℃的蛋白酶工作液中消化 10~40 分钟（根据样本类型和切片厚度的不同，消化时间有所不同，需通过预实验进行确定，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）。

（8）洗涤：取出玻片，再将其浸入室温洗涤液中洗涤 5 分钟。

（9）脱水：取出玻片，再将其依次浸入室温 70%乙醇、85%乙醇和无水乙醇中各 2 分钟，取出后自然晾干即可进行后续实验操作。

细胞样本：

（1）样本采集：取 2-3 mL 肝素钠抗凝的骨髓细胞样本。

（2）细胞收获：将未经培养的骨髓细胞或经过培养的骨髓细胞样本吸至 15 mL 离心管，500g 离心 5 分钟，小心吸弃上清，留约 500 μL 残液重悬细胞。

（3）细胞洗涤：加入 5 mL 的 1×PBS 缓冲液吹打混匀重悬细胞沉淀，500g 离心 5 分钟，小心吸弃上清，留约 500 μL 残液重悬细胞；重复 1 次。

（4）细胞低渗：每管加入 10 mL 低渗液（提前 37℃温浴），37℃水浴低渗 20 分钟。

（5）细胞预固定：将低渗完成后的细胞悬液中逐滴加入 1 mL（10%体积）固定液预固定细胞，轻轻吹打混匀后马上 500g 离心 5 分钟，去除上清，留约 500 μL 残液重悬细胞。

（6）细胞固定：向细胞悬液中缓慢加入 10 mL 固定液，室温静置 10 分钟固定细胞，500g 离心 5 分钟，留约 500 μL 残液重悬细胞；重复 1 次（亦可多次固定细胞，直至细胞沉淀洗白洗干净为止）。

（7）细胞悬液的制备：最后一次细胞固定离心后，吸弃上清液，加入适量固定液，制成浓度合适的细胞悬液。

（8）制片：吸取 3-10 μL 细胞悬液滴至载玻片上，56℃老化 0.5 小时。

（9）预处理：室温下将细胞滴片置于洗涤液中漂洗玻片 2 次，每次 5 分钟。

（10）脱水：将细胞滴片依次置于 70%乙醇、85%乙醇和无水乙醇中各 2 分钟，取出后自然晾干即可进行后续实验操作。

3. 变性杂交（避光操作）

组织样本：

（1）取出探针，室温静置 5 分钟，用力上下颠倒混匀探针后短暂离心。取 10 μL 探针滴于组织切片杂交区域，盖上盖玻片，轻压盖玻片，使探针均匀分布，排除气泡，用封片胶沿盖玻片边缘封片。

（2）将玻片置于杂交仪上，润湿原位杂交仪湿条，插入湿条，盖上杂交仪上盖，设置“变性/杂交”程序，85℃变性 5 分钟，42℃杂交过夜。

细胞样本：

（1）取出探针室温静置 5 分钟，用力上下颠倒混匀探针后短暂离心。取 10 μL 探针滴于细胞杂交区域，盖上盖玻片，轻压盖玻片，使探针均匀分布，排除气泡，用封片胶沿盖玻片边缘封片。

（2）将玻片置于杂交仪上，润湿原位杂交仪湿条，插入湿条，盖上杂交仪上盖，设置“变性/杂交”程序，88℃变性 2 分钟，45℃杂交过夜。

4. 杂交后洗涤（避光操作）

4.1 洗涤前，用水浴锅预热杂交后洗液（68℃）和纯化水（37℃），使用前确保温度达到要求。

4.2 从杂交仪上取出杂交后的玻片，轻轻撕去封片胶，移去盖玻片，将玻片浸于室温下的洗涤液中洗涤 1 分钟。

4.3 取出玻片，浸入 68°C 的杂交后洗液中洗涤 2 分钟。

4.4 取出玻片，浸入 37°C 的纯化水中洗涤 1 分钟，用无尘纸吸取多余水分（注意不要碰到组织/细胞），暗处自然干燥玻片。

5. 复染（避光操作，可参考原位杂交蓝染染色液说明书进行操作）

5.1 取 10 μL 原位杂交蓝染染色液（DAPI 复染剂）滴于杂交区域，立即盖上盖玻片，去除气泡，置于暗盒中，放置 10-20 分钟后，可观察结果。

5.2 杂交、复染后的玻片置于 -20°C±5°C 保存，可保存 3 个月。

6. FISH 结果观察

使用合适的滤光片，先在低倍物镜（10×）下确认目标细胞区域，找到一个细胞分布均匀的位置；再在高倍镜（100×）下选择细胞核完整、DAPI 染色均匀、细胞核无重叠、荧光信号清晰的位置，随机选取至少 200 个肿瘤细胞，计数细胞核中的红色和绿色信号。

【常见信号类型判读】

● BCL6 基因 3' 端信号 ● BCL6 基因 5' 端信号	● MYC 基因 5' 端信号 ● MYC 基因 3' 端信号	● IGH 基因 3' 端信号 ● IGH 基因 5' 端信号	● BCL2 基因位点信号 ● IGH 基因位点信号
 阴性细胞	 阴性细胞	 阴性细胞	 阴性细胞：2R2G（两红两绿）
 阳性细胞	 阳性细胞	 阳性细胞	 阳性细胞：1R1G2F（一红一绿两融合）

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒为体外诊断试剂，为医师提供辅助诊断信息。检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊断的唯一依据，临床医生应结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。
2. 本试剂盒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、样本预处理等因素影响，同时由于结果判断的主观性，可能得到异常的检测结果。使用者应了解检测过程中的潜在错误导致结果不准确等局限性。
3. 检测结果如与组织病理学特征不符，应核实病理诊断或重新检测。
4. 本产品的性能指标是基于说明书所述检测程序获得，对该程序进行更改，可能会改变该检验的结果。

【产品性能指标】

1. 荧光信号强度：探针与特异性参考品杂交后，在荧光显微镜下，应发出可被肉眼识别的荧光信号。
2. 探针敏感性
 - 2.1 BCL6 双色探针敏感性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 3 号染色体，至少有 95 条 3 号染色体显示 1 个红色荧光信号和 1 个绿色荧光信号。
 - 2.2 MYC 双色探针敏感性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 8 号染色体，至少有 95 条 8 号染色体显示 1 个红色荧光信号和 1 个绿色荧光信号。
 - 2.3 IGH 双色探针敏感性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 14 号染色体，至少有 95 条 14 号染色体显示 1 个红色荧光信号和 1 个绿色荧光信号。
 - 2.4 BCL2/IGH 双色探针敏感性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 18 号染色体和 100 条 14 号染色体，至少有 95 条 18 号染色体显示 1 个红色荧光信号和 95 条 14 号染色体显示 1 个绿色荧光信号。
3. 探针特异性
 - 3.1 BCL6 双色探针特异性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 3 号染色体，至少有 95 条 3 号染色体在目标区域显示 1 个特定的红色荧光信号和 1 个特定的绿色荧光信号。
 - 3.2 MYC 双色探针特异性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 8 号染色体，至少有 95 条 8 号染色体在目标区域显示 1 个特定的红色荧光信号和 1 个特定的绿色荧光信号。
 - 3.3 IGH 双色探针特异性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 14 号染色体，至少有 95 条 14 号染色体在目标区域分别显示 1 个特定的红色荧光信号和 1 个特定的绿色荧光信号。
 - 3.4 BCL2/IGH 双色探针特异性：分析 50 个处于中期分裂相的细胞的 100 条 18 号染色体和 100 条 14 号染色体，至少有 95 条 18 号染色体在目标区域显示 1 个特定的红色荧光信号和 95 条 14 号染色体在目标区域显示 1 个特定的绿色荧光信号。

【注意事项】

1. 检测前请仔细阅读本说明书，检测人员应经过专业的技术培训，信号计数人员必须能够观察辨别红色、绿色信号。
2. 本实验中所用试剂中的甲酰胺及 DAPI 复染剂等具有潜在的毒性或致癌性，需穿戴口罩、手套、实验服等适宜的防护用品，避免直接接触。
3. 荧光染料在光照条件下容易淬灭。为降低该影响，对所有含荧光探针的溶液，包括杂交后样本载玻片均应尽量避免或者减少在光照条件下保存和处理。

- 使用校准过的水浴锅和杂交仪。
- 实验中常见影响检测结果的因素及处理方法如表 2 所示：

表 2 常见问题及处理办法

问题	可能的原因	推荐的解决方案
背景过强	滤光片组使用不当	更换适当的滤光片组观察以减弱背景光。
	杂交条件不当	确保杂交仪杂交温度为 42°C（组织样本）/45°C（细胞样本）。
	洗涤温度过低	确保洗涤玻片时溶液温度达到所要求的温度。
	洗液洗涤强度过低	确保杂交后洗液使用正确并在有效期内。
复染过弱	复染过弱	移去盖玻片，室温下将玻片置于洗涤液中 5 分钟，然后置于纯化水中 1 分钟，自然晾干后复染。
	复染剂陈旧或过度光照	确保 DAPI 复染剂置于 -20°C±5°C 避光保存；确保复染剂未失效。
无信号或信号微弱	标本变性不充分	确保杂交仪变性温度在 85°C（组织样本）/88°C（细胞样本）。
	探针使用前没有充分混匀	确保探针充分混匀。
	标本玻片上探针混合液干燥太快	探针混合液滴加后应立即将盖玻片覆盖目标区域；进行洗涤时，移除玻片上的盖玻片后，及时浸入洗涤液中。
	杂交时盖玻片下有气泡形成	放盖玻片后，轻轻挤压以便挤出气泡。
	杂交条件不合适	确保遵守杂交规定的时间和温度；封片胶封片时勿留缝隙；根据情况，调整杂交时间。
	洗涤液或洗涤条件不正确	确保洗涤液的温度达到洗涤步骤规定温度；确保水浴锅校准正确；玻片浸入洗涤液前移去盖玻片。
	探针或标本玻片储存不正确	确保探针置于 -20°C±5°C 避光保存；将杂交后玻片置于 -20°C±5°C 避光保存，保存期不要超过 3 个月。
	观察时所选用的滤光片组不合适	使用正确滤光片组观察探针荧光情况。

【标识的解释】

图形符号	符号标题	符号说明
	怕晒	表示医疗器械需要避开光源
	怕雨	表示医疗器械需要避免潮湿，保持干燥
	体外诊断医疗器械	表示医疗器械为体外诊断医疗器械
	查阅使用说明	表示用户需要查阅使用说明

【基本信息】

备案人/生产企业名称：嘉兴允英医学检验有限公司
 住所：浙江省嘉兴市南湖区大桥镇汇信路 153 号研发车间楼第三层
 联系电话：0573-83108883
 售后服务单位名称：嘉兴允英医学检验有限公司
 联系电话：0573-83108883
 生产地址：浙江省嘉兴市南湖区大桥镇凌公塘路 3556 号 5 号楼-2
 生产备案编号：浙嘉药监械生产备 20160011 号

【医疗器械备案编号/产品技术要求编号】 浙嘉械备 20240013

【说明书批准日期及修改日期】 批准日期：2024 年 03 月 12 日