



## 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：ZytoLight SPEC HER2/CEN17 Dual Color Probe Kit

### 【包装规格】

货号 Z-2020-5: 5 测试/盒

货号 Z-2020-20: 20 测试/盒

### 【预期用途】

本试剂盒用于检测经 10%中性缓冲福尔马林固定、石蜡包埋的乳腺癌组织切片中 HER2 基因的扩增状态。

本试剂盒尤其适用于免疫组织化学 HER2 (ERBB2) 蛋白检测结果为不确定的标本的检测。

HER2 基因扩增是确定靶向治疗适应症的重要指标，基于本试剂盒未与具体药物联合进行临床评价，临床医生应在本检测结果基础上结合患者病情、药物适应症、治疗反应及其他检测结果对患者的个体化治疗进行综合判断。

### 【检验原理】

荧光原位杂交技术 (Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) 是一种以荧光标记的核酸探针与组织中的特异核酸分子进行杂交的技术，其基本原理是利用荧光标记的核酸探针在变性后根据碱基互补配对原则准确识别待检样本中的靶核酸序列，经退火复性后形成靶 DNA 与核酸探针杂交体，通过荧光检测系统（荧光显微镜）直接观察和分析染色体或基因的数量或结构的状态。

本试剂盒内 HER2/CEN17 双色探针液（以下简称为探针）设计序列来源图见图 1 和图 2。将样本经福尔马林固定、石蜡包埋后制成  $4 \pm 1 \mu\text{m}$  厚度的切片，固定于粘性玻片上。切片经预处理后，将 HER2/CEN 17 双色探针液与待测样本 DNA 变性、杂交。杂交完成后，通过一系列洗涤缓冲液洗去未结合探针，并用 DAPI (4, 6-二咪基-2-联苯基吡啶) 对样本中的细胞核复染成蓝色。DAPI 是一种蓝色荧光素，为

DNA 特异性染色剂。探针杂交信号可通过配置相应滤光片的荧光显微镜进行观察。在显微镜下观察细胞核内的荧光信号，对 HER2 基因（绿色荧光染料 ZyGreen: 激发波 503nm, 发射波 528nm, 同 FITC）和 CEN17 着丝粒（橙红色荧光染料 ZyOrange: 激发波 546nm, 发射波 572nm, 同罗丹明）信号进行计数，计算比值 (HER2/CEN17)，从而判断 HER2 基因状态。

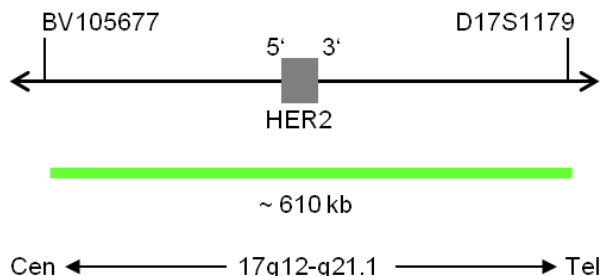


图 1 17 号染色体 HER2/CEN17 双色探针液杂交位点

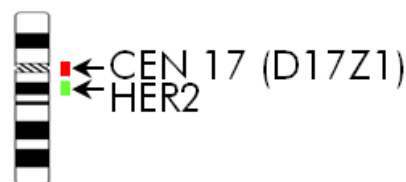


图 2 HER2/CEN17 双探针基因图谱（非按比例）

### 【主要组成成分】

#### 试剂盒中包含的试剂组成

试剂盒的组成成分见表 1。

表 1 试剂盒的组成成分

编号	组分名称	主要成分	数量 (测试)		容器
			20	5	
PT1	预处理液	NaSCN	500ml	150ml	螺纹瓶 (大号)
ES1	蛋白酶液	胃蛋白酶/NaCl, pH 2.	4ml	1ml	白色盖滴管瓶
WB1	洗涤缓冲液	2XSSC, pH 7.	500ml	150ml	螺纹瓶 (大号)
PL8	HER2/CEN17 双色探针液	用于检测 HER2 基因位点的 DNA 探针和检测 17 号染色体 $\alpha$ 卫星 DNA 探针, 杂交缓冲液	0.2ml	0.05ml	反应管 (红盖)
WB2	25 $\times$ 洗涤缓冲液 A	25XSSC/0.3%NP-40, pH 7.	2x50ml	50ml	螺纹瓶 (中号)
MT7	DAPI/抗荧光衰减封片剂	DAPI (4, 6-二咪基-2-联苯基吡啶), 邻苯二胺盐酸盐和丙三醇缓冲液	0.8ml	0.2ml	反应管 (蓝盖)

Z-2020-20 (20 测试): 组分 (ES1), (PL8) 和 (MT7) 足够 20 个反应。组分 (WB2) 足够用 11 $\times$ 3 个染色缸 (每缸 70ml)。组分 (PT1) 和 (WB1) 足够用 7 个染色缸 (每缸 70ml)。

Z-2020-5 (5 测试): 组分 (ES1), (PL8) 和 (MT7) 足够 5 个反应。组分 (WB2) 足够用 5 $\times$ 3 个染色缸 (每缸 70ml)。组分 (PT1) 和 (WB1) 足够用 2 个染色缸 (每缸 70ml)。

说明: 不同批号试剂盒中各组分在有效期内不互换使用。

## 实验必需但是没有提供的试剂

本试剂盒中不包括以下试剂：

- 二甲苯
- 100%无水乙醇
- 去离子水或蒸馏水
- 橡胶胶水

### 【储存条件及有效期】

有效期：18个月（正常储存条件下）。

生产日期：见标签。

有效期至：见标签。

试剂盒中各组分应储存于2~8°C，密封干燥储存，其中HER2/CEN17 双色探针液（PL8）和 DAPI/抗荧光衰减封片剂（MT7，以下简称 DAPI 液）需避光储存。以上储存条件在开封和未开封组分上均适用。每次使用后应立即放回2-8°C进行保存。

开瓶-放回 2-8°C，20天。

### 【适用仪器】

配备有相应滤光片的荧光显微镜。

#### 关于荧光显微镜及滤光片

荧光显微镜：使用前，需经过显微镜生产商技术人员确认显微镜无质量问题，并配备10×，40×物镜和100×油镜。  
激发光源：建议使用100W汞灯，每次使用完，记录下灯泡已使用小时数，并在超过额定时间前更换灯泡，确保汞灯的正常使用寿命。

滤光片：ZytoVision 滤光片组件与试剂盒配套使用会达到最佳效果，ZytoVision 可提供大部分型号的荧光显微镜滤光片。建议与本试剂盒配备的滤光片为：绿色滤光片（为 HER2，激发波长 503，发射波长 528nm，类似于 FITC），橙红色滤光片（为 CEN17，激发波长 547nm，发射波长 572nm，类似于罗丹明）以及 DAPI 滤光片。

### 【样本要求】

本试剂盒用于检测经10%中性福尔马林固定、石蜡包埋组织样本的HER2状态。样本应根据实验室标准程序进行采集。应避免样本与强酸、强碱接触，避免过热，从而对样本DNA造成损害，导致FISH实验失败。

适用标本类型：经10%中性缓冲福尔马林固定石蜡包埋乳腺癌组织切片。

标本固定：从取材到固定间隔时间不超过1小时，固定的时间以24小时为宜（6-72小时范围内）。

以下为推荐的组织标本制备方法：

1. 室温下在10%中性福尔马林缓冲液中固定24小时为了达到最佳和均匀的固定和石蜡包埋，样本大小不宜超过0.5cm<sup>2</sup>；
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°C下进行。

经10%中性福尔马林固定、石蜡包埋组织样本的切片制备方法如下：

1. 用超薄切片机将组织切割成4±1 μm厚的石蜡切片；
2. 使这些切片在无蛋白质的水浴槽内（40°C）展片；
3. 将切片捞于有氢化硅（silane）涂层玻片或黏性玻片；
4. 50~60°C环境中固定2~16小时。

蜡块保存：在室温条件下可保存5年。

切片保存：室温下可保存4周。

### 【检验方法】

#### 1.检测所需仪器、设备

水浴锅（37°C，98°C），热平板，杂交仪，染色缸（50~80ml），恒温恒湿箱，移液器（10μl，30μl），盖玻片（22 mm x 22 mm，24 mm x 60 mm），荧光显微镜/镜油。

#### 2.工作试剂的配制

第一天：

- 两组三种浓度（70%，90%，100%）的乙醇溶液：用去离子水或蒸馏水，通过稀释（v/v）无水乙醇制备（分别用7，9和10份100%乙醇体积与3，1和0份去离子水或蒸馏水体积混合）。
- 预处理液（PT1）：加热至98°C。
- 洗涤缓冲液（WB1）：使用前先恢复到室温。

第二天：

- 1×洗涤缓冲液A的配制：用1份的25×洗涤缓冲液A（WB2）混合24份去离子水或蒸馏水。将混合好的1×洗涤缓冲液A倒入3个染色缸中，预热至37°C。
- DAPI/抗荧光衰减封片剂（MT7）：使用前避光放至室温。

#### 3.检验程序

简易操作步骤见附件一。

第一天

##### 3.1 切片预处理

###### (1) 脱蜡

- a) 将切片置于70°C，孵化10分钟（比如置于热平板上）；
- b) 室温下将切片浸入二甲苯中孵化10分钟，在另一缸中重复该步骤1次；
- c) 将切片依次分别浸入100%，100%，90%和70%乙醇溶液中，各5分钟；
- d) 将切片浸入蒸馏水或去离子水中2分钟，在另一缸中重复该步骤1次。

###### (2) 预处理

- a) 将切片置于已经预热到了98°C的预处理液（PT1）中孵育15分钟；（建议一个染色缸中不超过6张切片）
- b) 立即将切片转入蒸馏水或去离子水中洗2分钟，在另一缸中重复该步骤1次，并甩掉或用吸水纸吸掉表面水分。

### (3) 消化

- a) 将蛋白酶液 (ES1) 滴至组织区域, 并在37°C恒温恒湿箱孵化5-15分钟;

*注: 根据不同的多种因素, 如片子固定的条件与过程, 片子厚度, 组织的特性, 孵化时间可以不同。一般来说, 我们对组织标本推荐的孵化是间为5-15分钟。不过我们也建议按通常的做法经预实验找到样本的最佳消化时间。*

- b) 将切片浸没在洗涤缓冲液 (WB1) 中5分钟, 再转入蒸馏水或去离子水中1分钟。

### (4) 脱水

将切片依次浸没在 70%, 90%, 100%乙醇溶液中各 1 分钟, 空气干燥切片。

## 3.2 变性与杂交 (避光操作)

- a) 用移液器吸取 10  $\mu$ l HER2/CEN17 双色探针液 (PL8) 加至每个样本的待杂交区域;

*如果把探针在室温下放一会, 同时将移液器吸管的尖头在使用前剪掉一点点以增大开口可使加样过程更容易。探针不宜在光线下放着过久。*

- b) 盖上盖玻片 (22mm  $\times$  22mm), 探针在盖玻片下均匀扩展, 过程中应避免产生气泡从而影响杂交效果, 然后用橡胶胶水密封盖玻片和玻片之间的缝隙;  
c) 将切片 75°C变性 10 分钟, 比如置于热平板上;  
d) 将切片转移至恒温恒湿箱中 37°C杂交过夜。

*至关重要的是杂交过程中组织标本不能干。*

## 第二天

### 3.3 杂交后洗涤 (避光操作)

- a) 仔细除去橡胶胶水;  
b) 将切片浸入 37°C的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 A 中洗涤 1~3 分钟, 使盖玻片脱落;  
c) 将切片依次浸入另外 2 个 37°C的 1 $\times$ 洗涤缓冲液 A 的染色缸中, 各 5 分钟。  
*1 $\times$ 洗涤缓冲液 A 应预热。必要时用温度计检查。*  
d) 将切片依次浸入 70%、90%、100%的乙醇中各 1 分钟, 避光风干。

### 3.4 DAPI 染色 (避光操作)

- a) 用移液器吸取 30  $\mu$ l DAPI/抗荧光衰减封片剂 (MT7), 加入至切片杂交区域。盖上盖玻片 (24mm  $\times$  60mm), 应避免产生气泡。避光孵育 15 分钟。  
*把将移液器吸管的尖头在使用前剪掉一点点以增大开口可使加样过程更容易。避免切片长时间暴露于光线下。*  
b) 用吸水纸小心地吸掉在片子上溢出的 DAPI/抗荧光衰减封片剂 (MT7)。

### 3.5 切片保存

上述切片应避光保存。

2-8°C避光储存条件下, 连续放置 40 天对杂交信号无影响。

## 4 质量控制

### 内对照:

选择癌旁正常组织, 目的在于确认计数信号的特异性, 组织中 $\geq$ 75%的肿瘤细胞核显示出双色信号 (绿色和橙红色) 时视为杂交成功。

出现下列情况时应视为内对照 FISH 检测失败并需要重

做, 包括:

- ① 对照样本未出现预期结果, 可参照表 2 (问题及解决办法);
- ② 浸润癌病灶太小, 难以观察到两个浸润癌区域并计数;
- ③ 可计数信号的细胞 $<$ 75%;
- ④  $>$ 10%的荧光信号位于细胞核外;
- ⑤ 细胞核结构难以分辨;
- ⑥ 有强的自发荧光。

### 外对照:

选择已知 HER2 基因扩增状态的组织切片, 至少包括临界值及无扩增样本, 且杂交结果与预期相符。明确每一批次患者样本检测盒更换使用新的试剂盒批次时, 均应同时进行质控片检测, 以监控检测性能并评估信号计数的准确性。可选用商用质控片, 或临床检测实验室自制质控片。

出现下列情况时应视为外对照 FISH 检测失败并需要重做, 包括:

- ① 对照样本未出现预期结果, 可参照表 2 解决问题;
- ② 浸润癌病灶太小, 难以观察到两个浸润癌区域并计数;
- ③ 可计数信号的细胞 $<$ 75%;
- ④  $>$ 10%的荧光信号位于细胞核外;
- ⑤ 细胞核结构难以分辨;
- ⑥ 有强的自发荧光。

实验室检测相关的仪器设备需定期维护、校验, 应建立完善的标准操作规范文件, 从事检测的技术人员和病理医师应通过必要的培训和资格考核, 做好记录和存档, 内部定期对不同批次检测结果进行重复性分析; 并积极参加相关的外部质控活动。

### 【阳性判断值】

推荐的 HER2 结果解读参照乳腺癌 HER2 检测指南(2014 版):

HER2 阳性: HER2/CEN17 比值 $\geq$ 2.0 或 HER2/CEN17 比值  $<$  2.0, 但平均 HER2 拷贝数/细胞  $\geq$  6.0;

HER2 阴性: HER2/CEN17 比值 $<$ 2.0, 且平均 HER2 拷贝数/细胞  $<$  4.0.;

HER2 结果不确定: HER2/CEN17 比值  $<$  2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 $<$  6.0 但 $\geq$  4.0。需再计算 20 个细胞核中的信号或由另一位阅片人重新计数。如仍为临界值, 则应行 IHC 检测 (若 FISH 前未行), 也可以选取不同的组织块重新检测。

### 【检验结果的解释】

#### 结果有效性评估

片子是否合适用以下指标评估:

探针信号强度: 可计数信号 $\geq$ 75%, 且信号均匀、清晰、明亮, 易于观察。

杂交背景: 背景应为黑色或暗色, 无点状或片状的非特异性荧光染色。

如出现不符合上述标准的情况, 可参照问题及解决办法 (见表 2) 重新进行 FISH 实验。

表 2 问题及解决办法

问题	可能的原因	解决办法
蛋白酶处理后片子上有条纹	沉淀作用	立即用蒸馏水或去离子水洗脱
信号微弱或者无信号	被检测材料不含目标序列	同时杂交对照片确认
	组织固定不当	优化固定时间
	蛋白消化不足或过度	优化蛋白酶液消化时间
	变性温度不正确	检查温度，必要时调整温度
	杂交温度不正确	检查温度
	荧光显微镜调节错误	检查显微镜及滤光片是否符合要求
染色不匀，局部很淡	脱蜡不彻底	使用新准备的试剂，检查脱蜡时间长短
	交叉（非特异）杂交：背景染色过强	降低单个切片/区域探针体积，逐滴加探针，避免局部浓度过高
交叉（非特异）杂交：背景染色过强	蛋白酶液消化过度	优化消化时间
	在某个孵化间隔期间，片子干燥了	防止干燥
	杂交后洗涤温度过低	检查洗涤温度
切片从玻片脱落	蛋白消化过度	缩短蛋白酶液消化时间
	玻片的涂层不合适	使用合适的玻片

**观察及计数指南**

低倍镜下观察整张 FISH 切片，初步判断检测质量以及是否存在 HER2 扩增的异质性。至少找到 2 个浸润癌区域，随机计数至少 20 个浸润癌细胞核中的双色信号。也可以参照 IHC 切片先确定可能存在扩增的浸润癌区域，然后于 100 倍物镜下通过特异通道滤光片观察 HER2 和 CEN17 信号，并进行信号计数和比值计算。








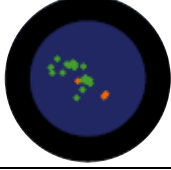

如果切片存在异质性，但只要扩增细胞连续、均质，且占浸润癌 10% 以上，就应明确报告为 HER2 阳性。可补充报告不同细胞群的计数值，并报告扩增细胞群占有浸润癌细胞的比例。

注意事项：应选择细胞核大小一致、核的边界完整、DAPI 染色均一、细胞核无重叠、信号清晰的细胞。

双色信号计数指南见表 3。

表 3 双色信号计数指南

G: 代表绿色信号 (●)，为 HER2 信号；  
O: 代表橙红色信号 (●)，为 CEN17 信号。

图示	计数
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 2G 和 2O</li> <li>● HER2/CEN17 比值=1.0</li> </ul> HER2 阴性
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 2G 和 2O</li> </ul> 两个信号之间距离 ≤ 1 个信号大小距离的，记为 1 个信号 <ul style="list-style-type: none"> <li>● HER2/CEN17 比值=1.0</li> </ul> HER2 阴性
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 7G 和 2O</li> <li>● HER2/CEN17 比值=3.5</li> </ul> HER2 阳性
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 12G 和 3O</li> </ul> 绿色信号成大簇，需要估算 <ul style="list-style-type: none"> <li>● HER2/CEN17 比值=4.0</li> </ul> HER2 阳性
	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 4G 和 2O</li> <li>● HER2/CEN17 比值=2.0</li> </ul> 不确定 需再计算 20 个细胞核中的信号或由另外以为分析者重新技术。如仍为临界值，则应行 IHC 检测（若 FISH 前未行），也可以选取不同的组织块重新检测
	细胞核内有黑暗区域，为消化过度 <b>消化过度的细胞核：不予计数！</b>
	不同细胞核有重叠，单个细胞核部分分界不清，妨碍准确计数单个核内的信号 <b>有重叠的细胞核：不予计数！</b>
	两种颜色的信号重叠 <b>信号重叠：用单通道滤片观察信号数或者不予计数！</b>
	存在很明显的自发荧光，妨碍辨别信号 <b>有自发荧光的细胞核：不予计数！</b>

在观察信号时，应根据情况随时调节显微镜的焦距，准确观察位于细胞核不同平面上的信号以免遗漏。对于簇状信号，小簇按 5-10 个信号计数；大簇按 10-16 个信号计数，亦可直接视为 HER2 基因扩增。（见表 3 细胞核 4）。

### FISH 结果信号计数

参考表 4，至少记录样本中 20 个肿瘤细胞的 HER2 及 CEN17 信号数，病理医生必须确认计数的细胞是浸润性肿瘤细胞。

表4 信号计数表格

细胞核	计数 HER2 (绿色)	计数 CEN17 (橙红色)	HER2/CEN17 比值
1			
2			
3			
4			
5			
.....			
20			
.....			
平均值			

#### 【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，不得作为临床诊治的唯一依据。
2. 肿瘤组织 HER2 基因表达的异质性可能影响检测结果。例如可导致 IHC 与 ISH 检测、原发灶与转移灶、活检标本与手术切除标本的检测结果不一致。
3. 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，可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果，使用者应了解检测过程中可能存在的潜在错误导致结果不准确等局限性。
4. 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。
5. 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。
6. 本试剂仅对经 10%中性缓冲福尔马林固定石蜡包埋的组织进行了验证，不得用于其他样本类型或流式细胞检测等其他用途。

#### 【产品性能指标】

##### 灵敏度

采用三个批次试剂盒，选择 20 个乳腺浸润癌的组织样本，以及 20 个癌旁正常组织样本，对同样数量的细胞随机进行分析计数。每例组织样本应至少检测 20 个细胞，分析统计同时显示 HER2 基因位点标记（绿色）和 CEN17 位点标记（橙红色）的荧光信号的细胞占全部细胞的比例。分析灵敏度实验结果表明，探针的杂交灵敏度达到 100%（800/800）。

##### 特异性

采用三个批次试剂盒，对 240 例正常男性的外周血，经过植物血凝素（PHA）刺激下培养的十一种不同核型的中期分裂相淋巴细胞涂片样本（共 12 张）进行特异性实验。每例样本检测 20 个染色体分散良好的中期分裂相细

胞，结合反向 DAPI 条带技术，统计细胞核染色体上正确位点的杂交信号占全部杂交信号的比例。标识出预期的中期分裂相信号数量。分析特异性实验结果表明探针的杂交特异性为 100%（240/240）（95% CI 97.0 - 100.0）。

#### 阴、阳性符合率

使用临床应用环境中所有可能的样本类型：乳腺浸润性癌非特殊类型、乳腺浸润性小叶癌、小管癌、粘液癌，良性疾病（如腺病及纤维腺瘤）以及正常乳腺组织等，每种组织类型设置 2-3 例进行评价，着重评价 HER2 IHC 2+ 的样本基因状态。结果表明，本试剂盒对各种组织类型的检测结果均与预期结果一致。

#### 精密度

选取 10 例经福尔马林固定、石蜡包埋的乳腺癌肿瘤组织样本分析了以变异系数（CV）为主要指标的精密度，其中包括未扩增的 4 例，扩增的 4 例和临界值的 2 例，按说明书要求连续切片并进行检测和计数。

以  $CV(\%) < 15\%$   $\{CV(\%) = 100\% \times (10 \text{ 次重复的标准偏差}) / (10 \text{ 次重复的平均值})\}$  作为精密度符合的标准，本检测结果表明了各项精密度指标（包括批内精密度、批间精密度、日间精密度、人员间精密度和室间精密度）均符合相应的要求。

#### 临床实验数据总结

1353 例临床研究结果显示，本试剂盒与同类已上市进口试剂盒对比检测结果的阳性符合率为 99.48%（95%置信区间：99.10%，99.86%），阴性符合率为 99.68%（95%置信区间：99.38%，99.98%），不确定符合率为 70.83%（95%置信区间：68.41%，73.26%），总符合率为 99.11%（95%置信区间：98.61%，99.61%），Kappa 值为 0.98；其中 401 例 HER2 IHC 2+ 浸润性乳腺癌样本的对比检测结果的阳性符合率为 96.88%（95%置信区间：95.17%，98.58%），阴性符合率为 99.04%（95%置信区间：98.09%，100.00%），不确定符合率为 70.83%（95%置信区间：66.38%，75.28%），总符合率为 97.01%（95%置信区间：95.34%，98.68%），Kappa 值为 0.92。以上临床实验结果分析说明本试剂盒与已上市进口同类试剂盒的检测结果非常一致，适用于临床上检测乳腺癌 HER2 基因的扩增状态。

#### 【注意事项】

- 本试剂盒仅供体外诊断使用！
- 使用前认真阅读说明书！
- 试剂盒应置于 2-8℃保存，并在有效期内使用！
- 避免交叉污染和微生物污染本试剂！
- 试验中请穿着实验服并带乳胶手套，做好防护工作！
- 如果皮肤接触试剂，立即用大量清水冲洗！
- 废弃试剂的处理应按当地规定执行！
- 在杂交和洗涤过程中杂交区域不能干！
- HER2/CEN17 双色探针液（PL8）和 DAPI 液（MT7）应当避光，尤其是避免强光长时间照射！
- 使用校准过的温度计测定溶液、水浴槽和恒温箱温度。

**【参考文献】**

- Alexandrov IA, et al. (1988) *Chromosoma* 96: 443-53.
- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Hynes NE, Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Waye JS, Willard HF (1986) *Nucleic Acids Res* 14: 6915-27.
- Wilkinson DG: *In Situ Hybridization, A Practical Approach*, Oxford University Press (1992)  
ISBN 0 19 963327 4.
- Wolff AC, et al. (2007). *J Clin Oncol* 25(1):118-145.
- Wolff AC, et al. (2013). *J Clin Oncol* 31(31):3997-4013.
- Selvarajan S, Bay B H, Choo A, et al. Effect of fixation period on HER2/neu gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in invasive breast carcinoma.[J]. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2002, 50(12):1693-1696.

**【基本信息】**

注册人/生产企业名称：蔡图微生物技术（德国）有限公司  
（ZytoVision GmbH）  
住所：Fischkai 1 27572 Bremerhaven Germany  
生产地址：Fischkai 1 27572 Bremerhaven Germany  
联系方式：+49 (0) 471 / 4832-300 /  
info@zytovision.com  
售后服务单位名称：极地基因技术（杭州）有限公司  
联系方式：400-8118-036 / info@genediagnostic.com  
代理人：极地基因技术（杭州）有限公司  
住所：杭州市滨江区丹枫路 1075 号雪峰银座 2201 室  
电话：400-8118-036  
传真：0571-86758550  
邮编：310051

**【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】**

国械注进 20203400450

**【说明书核准日期及修改日期】**

2020 年 10 月 23 日

附件一 FISH 简易操作步骤<sup>注</sup>

简易操作步骤		
脱蜡	烤片	10min, 70°C
	二甲苯	10min*2 次, RT
	100%, 100%, 90%和 70%乙醇溶液	各 5min, RT
	蒸馏水或去离子水	2min*2 次, RT
预处理	预处理液 (PT1)	15min, 98°C
	蒸馏水或去离子水	2min*2 次, RT
消化	蛋白酶液 (ES1)	5-15min, 37°C
	洗涤缓冲液 (WB1)	5min, RT
	蒸馏水或去离子水	1min, RT
脱水	70%, 90%, 100%乙醇溶液	各 1min, RT
	干燥切片	RT
杂交	吸取适量 HER2/CEN17 双色探针液 (PL8)	避光, RT
	用橡胶胶水封片	RT
	变性	10min, 75°C
	杂交	杂交过夜, 37°C
洗涤	去除胶水	RT
	1×洗涤缓冲液 A	1~3min, 37°C
	1×洗涤缓冲液 A	5min*2 次, 37°C
	70%、90%、100%的乙醇溶液	各 1min, RT
	避光风干	RT
染色	吸取适量 DAPI/抗荧光衰减封片剂 (MT7)	避光, RT
	封片	RT

注：简易操作步骤为[检验程序]内容的概括。