

【产品名称】

通用名：PML/RARA 融合基因检测试剂盒（荧光原位杂交法）

英文名：PML/RARA Fusion Detection Kit（Fluorescent in situ Hybridization Method）

【包装规格】 20 人份/盒。

【预期用途】

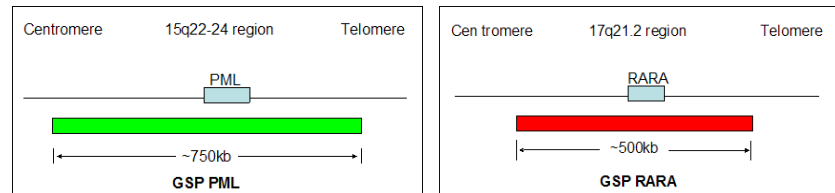
本试剂盒适用于定性检测白血病患者骨髓样本中的 PML/RARA 融合基因，仅用于初治病人的分子分型的辅助诊断。

急性早幼粒细胞白血病（APL）是急性髓细胞白血病（AML）的一种特殊类型（M3），占有 AML 病例的 10%~15%。APL 具有独特的临床表型及细胞形态学、细胞遗传学和分子生物学特征¹。目前发现 70%~90% 的 APL 患者伴有异常染色体核型 t(15;17)(q22;q21)，该易位使 15 号染色体上的 PML 基因与 17 号染色体上的 RARA 基因发生相互易位形成 PML/RARA 融合基因，是 APL 的一个特异分子标志。PML/RARA 融合蛋白通过显性负抑制作用抑制早幼粒细胞分化成熟，从而阻断细胞分化导致持续增殖。全反式维甲酸（ATRA）和三氧化二砷能靶向降解 PML/RARA 融合蛋白，恢复野生型 PML 和 RARA 基因功能，解除其对基因转录的抑制，诱导细胞发生分化和凋亡，使 APL 得到有效治疗^{2,3}。

本试剂盒检测结果仅代表对 PML 基因和 RARA 基因的检测结果，PML 基因和或 RARA 基因重排发生时会出现绿色（G）和或红色（R）信号断裂，融合发生时会出现红绿融合信号（F）。本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段，不得作为临床诊断或排除的唯一标准。

【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。杂交包括以下几个步骤：首先按说明书要求对样本进行预处理；其次将 DNA 与探针一起变性并杂交；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 DAPI 及探针发出的荧光信号。**在正常的细胞中，其杂交信号显示为两红两绿(2R2G)；在典型的异常细胞中，其杂交信号显示为一红一绿两黄(红绿融合)信号(1R1G2F)。**



【主要组成成分】

| 组分名称 | 规格 | 数量 | 主要成分 |
|--------------|---------|-----|--------------------------------------|
| | 20 人份/盒 | | |
| PML/RARA 杂交液 | 200μl/管 | 1 管 | GSP PML 探针、GSP RARA 探针、甲酰胺、SSC、硫酸葡聚糖 |
| DAPI 复染剂 | 200μl/管 | 1 管 | DAPI 和抗褪色剂 |

以下仪器及材料需自备：

< 样本处理 > 15ml 尖底离心管、离心机、移液器或一次性带刻度吸管、冰箱、计时器。**低渗液 (0.075mol/L KCl)**：准确称取 5.59 g 氯化钾，加入 500ml 纯水，充分溶解后，定容至 1 升；**固定液**：体积比 3:1 的甲醇:冰醋酸，化学通风橱中配制，充分混匀。< 制片 > 载玻片、移液器、显微镜。< 玻片预处理 > 20×SSC；70%、90%、100%梯度乙醇；圆形玻璃染色缸；< 样品和探针同时变性 > 22×22mm 盖玻片、镊子、橡皮胶（rubber cement）、原位杂交仪；< 杂交后洗涤及复染 > 20×SSC；镊子；圆形玻璃染色缸；恒温水浴锅（72±1°C）；70%、90%、100%梯度乙醇；22×22mm 盖玻片；

洗液 I (1×SSC/0.3% NP-40)：37.88ml 纯水 + 2ml 20×SSC + 120μl NP-40，总体积 40ml；

洗液 II (2×SSC/0.1% NP-40)：35.96ml 纯水 + 4ml 20×SSC + 40μl NP-40，总体积 40ml。

【储存条件及有效期】 -20±5°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：①25°C 光照度 2500Lux 环境下保存 2 小时，500Lux 环境下保存 24 小时；②37°C 避光保存 7 天；③25°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 20 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)及 Red(555/565)观察的滤块、双通滤块。

【样本要求】

- 1 适用样本类型：骨髓。
- 2 载玻片：防脱载玻片。
- 3 样本采集：2~3ml（肝素钠抗凝），标本量依病人具体情况而定，如再障的病人白细胞较少，应加大采集。
- 4 样本保存及运输：收集后 2 小时内处理，样本运送建议用 4~8°C。

【检验方法】

- 1 样品处理
 - 1.1 取骨髓 2~3ml（肝素钠抗凝）2000rpm 离心 5 分钟，小心去上清；
 - 1.2 加入 10ml 的低渗液（0.075mol/L KCl），吹打混匀，静置 3 分钟；

- 1.3 37±1°C水浴箱低渗30分钟;
- 1.4 加新鲜固定液1ml,吹打混匀,室温预固定10分钟;
- 1.5 吹打混匀,2000rpm离心5分钟;
- 1.6 去上清,沉淀加新鲜固定液5~10ml,吹打混匀,室温静置10分钟;
- 1.7 2000rpm离心5分钟,去上清;
- 1.8 可重复以上洗涤步骤,直至细胞沉淀洗白洗干净(此步骤不需室温静置10分钟)。

2 制片

- 2.1 取一张干净的载玻片;
- 2.2 重悬细胞后取3μl悬液滴加到载玻片上;
- 2.3 室温下晾干;
- 2.4 用10×物镜在相差显微镜下观察细胞密度,要求细胞无重叠,且单视野细胞数量在100~200个为宜;①如果细胞密度及数目合适,继续步骤3“玻片预处理”;②如果细胞有重叠,则加入适量新鲜固定液稀释细胞悬液,混匀后另取3μl悬液制片;③如果细胞密度低,则2000rpm离心5分钟,小心吸去适量上清液,混匀后另取3μl悬液制片,晾干,观察;
- 2.5 在相差显微镜下观察,如果细胞碎片太多,则需要做预处理并且选择合适的杂交区域;

注意: 每个病例至少需要多制一张片,细胞滴片可置于放有无水乙醇的密闭容器中,在-20±5°C可以保存12个月。剩余的细胞悬液可以在2~8°C保存1个月,以便必要时重新制片。

3 玻片预处理

3.1 方法一:快速处理法

- 3.1.1 将滴好的玻片置于室温2×SSC (PH7.0)溶液中浸泡2分钟;
- 3.1.2 依次在室温70%、90%、100%的乙醇中浸泡2分钟脱水;然后取出玻片,室温晾干。

3.2 方法二:胃蛋白酶消化处理法

- 3.2.1 胃蛋白酶工作液配制: 400μl 1M HCl加入40ml纯化水中,置于37±1°C恒温水浴锅中,使用前加入75ul 10%胃蛋白酶,混匀,使用一天后更换;
- 3.2.2 玻片放入37±1°C的1×PBS中孵育5分钟;
- 3.2.3 取出玻片,再将其放入37±1°C胃蛋白酶工作液中消化3~10分钟(可通过预试验确定酶效力);
- 3.2.4 取出玻片,再将其放入1×PBS室温洗涤3分钟;
- 3.2.5 取出玻片,再将其放入1%多聚甲醛PBS室温固定10分钟;
- 3.2.6 取出玻片,再将其放入1×PBS室温洗涤3分钟;
- 3.2.7 取出玻片,再将其放入70%、90%、100%梯度乙醇脱水各2分钟;
- 3.2.8 取出玻片,室温晾干。

备注: 当样本难处理时,如细胞厚、杂质过多、信号较弱等,可选择方法二进行玻片预处理。

4 样品和探针同时变性(避光操作)

- 4.1 从-20°C冰箱中取出杂交液,震荡混匀,瞬时离心;
- 4.2 加10μl的杂交液到杂交区域,迅速盖上22×22mm盖玻片,轻压使杂交液均匀分布,避免产生气泡;
- 4.3 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;
- 4.4 湿润原位杂交仪湿度条,将玻片置于杂交仪上,关闭原位杂交仪盖,设置“Denat&Hyb”程序,变性78°C 2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)。

5 杂交后洗涤及复染(避光操作)

- 5.1 洗涤前30分钟,将配制好的洗液I放入72±1°C水浴中,测量以确保温度合适;
- 5.2 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,可以将其放入室温2×SSC中微微摇晃,以利于其脱落);
- 5.3 玻片放入72±1°C洗液I中2分钟;
- 5.4 取出玻片,再将其放入室温洗液II中30秒;
- 5.5 取出玻片,再将其放入室温70%,90%,100%乙醇中各2分钟脱水;
- 5.6 取出玻片,暗处自然干燥玻片;
- 5.7 室温,滴加10μl DAPI复染剂至22×22mm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。

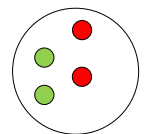
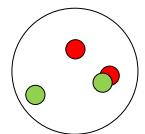
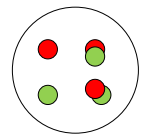
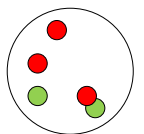
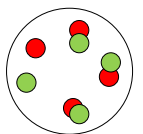
注意事项: 上述所列试剂均在圆形染色缸中配制(每种试剂体积均为40ml),每个染色缸最多可放入5片切片。非室温溶液,在操作开始前需提前预热反应试剂至指定温度。在洗涤过程中,可间隔2分钟轻轻晃动染色缸,提高洗涤效果。为保证试剂质量和检测稳定性,杂交液或DAPI复染剂使用完成后,剩余试剂需及时放回-20±5°C避光保存;取出的检测试剂一次性使用,不能重复使用。

6 结果分析

相关荧光和DAPI需用合适的滤块观察。其中,GSP PML探针显示绿色信号;GSP RARA探针为红色信号。

- 6.1 使用合适的滤镜,在10×物镜相差显微镜下寻找,在100×物镜下计数;
- 6.2 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;
- 6.3 扫视几个细胞区域,要求细胞核边界完整,DAPI染色均匀、核无重叠,绿色和红色信号点清晰;跳过信号弱及没有特定信号或高背景的信号;需要主观辨别的核不计数;

6.4 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; 转到 100×物镜, 调整焦距, 在核的不同层次找到所有信号点; 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, 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);

| | | | | | |
|------|---|---|---|--|---|
| 信号类型 |  |  |  |  |  |
| 信号记录 | 2R2G | 1R1G1F* | 1R1G2F | 2R1G1F | 1R1G3F |
| 细胞判读 | 阴性细胞 | 阳性细胞 | 典型-阳性细胞 | 阳性细胞 | 阳性细胞 |

* 细胞核的立体结构中会出现 R、G 信号的随机重叠, 样本检测结果需结合阈值谨慎判断。

6.5 设定阴性阈值

阈值设定方法: 平均值+3 倍标准差方法。随机选取 5 例以上的正常外周血细胞或骨髓细胞, 按照样本处理要求进行处理, 制备阴性阈值参考片。每张阴性参考片随机计数 200 个细胞。观察每个核内的绿色 (PML) 和红色 (RARA) 信号点。当红色与绿色信号点重叠在一起或两者临近距离小于一个信号直径时记为 1 个融合信号 (黄色 F); 否则记为 1 个红色 (R) 和 1 个绿色 (G) 信号。

- 计算出现 1R1G1F (随机融合出现机率较高) 信号类型的细胞总数及百分比, 统计百分比的平均值及标准差, 阴性阈值设定为平均值+3 倍标准差, 记为阴性阈值 A。
- 计算出现除 1R1G1F 外的其他融合信号类型 (包括典型阳性 1R1G2F、>1R1G2F、1R>1G2F 和多 F 信号类型) 的细胞总数及百分比, 统计百分比的平均值及标准差, 阴性阈值设定为平均值+3 倍标准差, 记为阴性阈值 B。

阈值设定举例: 随机选取 8 例外周血细胞和 12 例骨髓细胞 (经临床确认为 PML/RARA 阴性), 按照说明书所述样本处理要求进行处理, 制备阴性阈值参考片。参照上述方法进行观察、计数和结果统计。由于信号的随机重叠, 阴性质控片出现 1R1G1F 的比例明显高于其他融合信号类型, 所以对 1R1G1F 单独设定一种阴性阈值。本试剂盒特定实验环境特定样本经评估的阴性阈值 A 和阴性阈值 B 分别为 12% 和 2%。*除 1R1G1F 外的其他 F: 指包含典型阳性 1R1G2F、>1R1G2F、1R>1G2F 和多 F 信号类型细胞。

| 阈值结果 | 1R1G1F (%) | 除 1R1G1F 外的其他 F* (%) |
|-----------|------------|----------------------|
| 均值 | 3.616 | 0.420 |
| 标准差 | 2.509 | 0.494 |
| 均值+3 倍标准差 | 11.14 | 1.90 |

阈值设定重要性: 实验室初次使用本试剂盒时, 应该该方法进行实验室阴性阈值设定, 此设定值也可作为此后实验中的阴性阈值。但当实验条件 (如样本处理方法或实验人员) 发生变化时, 需要重新设定该阈值。

6.6 计数方法与结果判断

计数至少 200 个细胞, 出现 1 个及以上融合信号类型的细胞记为异常细胞; 出现 2R2G 信号类型的细胞记为正常细胞。

- 若出现 1R1G1F 信号类型的异常细胞的比例大于阴性阈值 A 时, 视为发生 PML/RARA 融合。
- 若出现 1R1G1F 信号类型的异常细胞的比例小于阴性阈值 A 时, 视为未发生 PML/RARA 融合。
- 若出现除 1R1G1F 信号类型外其他融合信号类型的异常细胞的比例大于阴性阈值 B 时, 视为发生 PML/RARA 融合。
- 若出现除 1R1G1F 信号类型外其他融合信号类型的异常细胞的比例小于阴性阈值 B 时, 视为未发生 PML/RARA 融合。
- 若出现异常细胞的比例等于阴性阈值时, 应加大计数数目或分析整张片子。如果仍小于或等于阴性阈值, 视为未发生 PML/RARA 融合; 否则视为发生 PML/RARA 融合。

7 质量控制

7.1 每次检测都必须使用至少一张阴性质控片, 用以监测整个试验过程, 阴性质控片必须与病例样本一同操作。

7.2 使用实验室建立的阈值进行样本结果的判断。

7.3 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。

【参考范围】

根据阴性阈值设定方法, 考虑立体结构中信号的随机重叠可能 (例如, 阴性质控片中出现 1R1G1F 的比例明显高于其他融合信号类型), 本试剂盒针对不同融合信号类型设定了两种阴性阈值 (A 和 B)。说明书中的阈值设定示例为公司实验环境熟练技术人员条件下建立, 仅供方法参考。当实验条件发生变化时, 该值会存在波动, 各实验室应根据自己的实验条件参照阈值建立方法建立实验室的阈值范围。

【检验结果的解释】

约 95% 的 APL 患者伴有 t (15; 17) 易位, 17 号染色体断裂点恒定在 RARA 内含子 2 中, 而 15 号染色体 PML 基因断裂点有 3 个集中区域 (bcr), 其中 bcr1 和 bcr3 的发生率达 92%-95%。PML/RARA 相互易位的信号类型显示为 1R1G2F。但是, 仅有 70%-80% 的患者同时出现 PML/RARA 和 RARA/PML 两种融合基因, 仍有 20%-30% 仅含有 PML/RARA 一种融合基因而检测不到相应的 RARA/PML (只显示 1 个融合信号)。其中原因较为复杂, 涉及隐匿型插入、17q 缺失、其他染色体参与易位等类型。

在 APL 中, RARA 基因除了与 PML 基因相互易位外, 目前已发现还有其他易位类型, 包括与分别位于 11q23、5q35、11q13 和 17q11 上的 PLZF、NPM、NuMA 和 STAT5B 基因形成融合基因。本试剂盒只能检测 t (15; 17) 易位, 如果 RARA 与其他基因相互易位, 其信号类型应为 3R2G, 但用本试剂盒无法检测其与哪种基因相互易位。

APL 患者的 15 号、17 号染色体还可能伴有其他的异常核型, 如文献有报道 t (6; 15; 17) (q25; q22; q21), i (17q), 四倍体 t (15; 17), Y 缺失, t (5; 17; 15) (q11; q21; q22), 5RARA 缺失, t (17; 20) (q21; q12), t (15; 17) (q35; q21), t (3; 17) (q26.3; q12), t (3; 17) (p25; q21), t (15; 17) (q13; q12), t (4; 17) (q12; q21), t (5; 17) (q13; q21) 等。这些异常核型会导致出现其他异常信号。另外, 如果出现 1R1G1F 的比例稍高于阴性阈值 A, 判定结果时需慎重, 可增加计数或结合其他方法进行判断。

样本分析示例: 未知临床样本使用本试剂盒进行检测。阴性质控片使用正常外周血细胞制备的细胞片进行。按说明书所述进行样本处理、制片, 玻片预处理后, 进行变性和杂交, 经杂交后洗涤及复染进行结果分析。图 1a 和 1b 分别示阴性质控片的中期染色体和间期细胞检测结果, 图 2a 和 2b 分别示临床样本中正常细胞和异常细胞的检测结果。

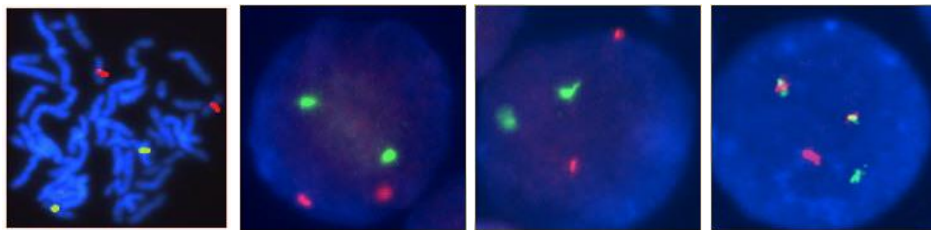


图 1a

图 1b

图 2a

图 2b

结果：阴性质控片杂交结果正常，中期染色体红色和绿色信号分别特异性杂交于 17q21 和 15q22-24 上（图 1a），间期细胞出现 2R2G 信号（图 1b）。临床样本正常细胞出现 2R2G 信号（图 2a），异常细胞出现 1R1G2F 信号（图 2b），且比例高于阴性阈值，符合 FISH 阳性判断标准。

报告格式为：样本检测结果为发生 PML/RARA 融合，异常信号类型为 1R1G2F，比例为 58% (116/200)。

【检验方法的局限性】

本试剂盒选取 1 个及以上融合信号的类型作为阳性信号类型，可能会存在检测无 PML/RARA 融合但实际为染色体异常的情况，如 RARA 与其他基因相互易位的信号类型表现为 3R2G，需结合其他 FISH 探针或方法如细胞形态学分析、核型分析、M-FISH 进行判断。此外，临床操作人员对荧光信号的判定和不符合本说明书要求的操作也可能影响结果判定。检出结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或治疗的依据。

【产品性能指标】

- 1 杂交效率：对临床样本制备的 5 例阴性参考片和 5 例阳性参考品进行检测，无杂交信号的细胞百分比为 0%，杂交效率为 100%。
- 2 灵敏度和特异性：对 50 个中期染色体杂交性能进行评估，染色体上均发生在镜下被肉眼识别的信号。杂交液的 PML 基因（15q22-24）位置、RARA 基因（17q21）位置分别显示绿色和红色荧光，分析灵敏度可以达到 100%。无染色体位点之间的交叉杂交现象，杂交只出现在 2 种探针预期的靶区域中，分析特异性达到 100%。
- 3 准确度：对临床确认的 FISH 检测 10 例阳性和 10 例阴性样本进行测试，检测结果符合率 100%。
- 4 干扰试验：骨髓样本中的内源成分和作为抗凝剂的肝素钠不会干扰试验结果。
- 5 对比试验：本试剂盒与国外同类产品检测临床样本是否发生 PML/RARA 融合基因具有相似性能。
- 6 临床试验：共检测 1205 例临床样本，与对照试剂检测结果相比，本试剂盒检测结果的阳性符合率、阴性符合率、总符合率均为 100%，Kappa 值为 1.000 (p<0.001)。

【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，均使用纯化水配制。
- 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源和可能的呼吸道致敏源，避免吸入，食入或与皮肤接触；杂交液中含有甲醛胺是一种致癌物，操作过程中需注意防护，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操作；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 操作过程中涉及到的溶液，水浴，烤箱的温度非常关键，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。
- 13 本试剂盒的检测步骤适用于骨髓样本。

【参考文献】

- 1 Jaffe ES, Harris NL, Stein HEA. 造血与淋巴瘤组织肿瘤病理学和遗传学[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 139—142, 2006.
- 2 Degos L, Dombret H, Chomienne C, et al. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. BLOOD-NEW YORK-, 1995, 85: 2643-2643.
- 3 Warell Jr R P, Frankel S R, Miller Jr W H, et al. Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid)[J]. New England Journal of Medicine, 1991, 324(20): 1385-1393.

【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
 售后服务单位名称：广州安必平医药科技股份有限公司
 传真：020—32290284 电话：020—32299997

住所：广州市黄埔区科信街 2 号
 生产地址：广州市黄埔区科信街 2 号
 邮政编码：510663 网址：<http://www.gzlbp.com>

【医疗器械生产企业许可证编号】 粤食药监械生产许 20111993 号

【说明书核准及修改日期】 核准日期：2015 年 7 月 2 日

【医疗器械注册编号/产品技术要求编号】 国械主准 20153401137

修改日期：变更产地试产