



产前染色体数目检测试剂盒（荧光原位杂交法）说明书

【产品名称】

通用名称：产前染色体数目检测试剂盒（荧光原位杂交法）

【包装规格】

5 人份/盒、20 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒适用于羊水样本中 13/18/21/X/Y 染色体数目的检测。

用于对产前筛查高风险孕妇、高龄孕妇、超声检查发现胎儿结构异常且怀疑存在 13、18、21、X、Y 等染色体数目异常孕妇及其他有相关医学指征的孕妇羊水样本中 21 三体、18 三体、13 三体和 XXY、XYY 及 XXX 等非整倍体综合征的辅助判断，不适用于有染色体异常家族史或有既往不良孕产史或超声筛查胎儿结构发现明显异常的孕妇，不得用于非医学指征相关的性别鉴定。在进行该检测前和检测后，必须结合孕妇的临床情况（如胎儿超声检查情况）对孕妇及家属进行相关的产前遗传咨询。相关检测的开展应符合原卫生部发布的《产前诊断技术管理办法》的相关规定。在进行该检测前，必须与孕妇有充分的知情谈话，需说明该技术检测的内容、风险和技术局限性，并签署相关的知情同意书。

该检测结果仅供参考，不单独作为确诊或排除病例的依据，可为染色体核型分析技术提供有效的补充。阴性结果不能排除其他染色体三体，其结果的确认应结合临床进行综合判断。

本试剂盒的检测项目应在有产前诊断资质的医疗机构中开展。项目申请的要求参照我国相关的卫生行业标准。申请检测的医师应是经过产前诊断专业培训的、有资质的医师。检测应在获得体外基因扩增检测资质的 PCR 实验室中进行，实验室应配备毛细管电泳仪、PCR 扩增仪等相应的实验设备，并建有实验操作技术文件；实验室操作人员应经过体外基因扩增检验实验室技术的专业培训并获得许可资质；出具诊断报告的人员应是具备产前诊断资质的医师，并经过相关技术的培训。

本试剂盒对嵌合体样本的检出率较低，当样本为嵌合体时，会影响本试剂盒检测结果的准确性；样本存在母源污染时会影响试剂盒结果的准确性，如发现存在母源污染建议废弃标本重新取样。

【检验原理】

荧光原位杂交是在染色体中检测和定位特定 DNA 序列的细胞遗传学技术，主要原理是以不同颜色荧光标记的探针与染色体上显示高度同源的特定序列区域结合，然后通过荧光显微镜检测荧光信号。本试剂盒提供 5 种探针，分别为 13/18/21/X/Y 染色体上部分区段（13q14.2, 18p11.1-q11.1, 21q22.13, Xp11.1-q11.1, Yp11.1-q11.1）高度同源探针，杂交完成后，通过荧光显微镜可以清晰地观察到单个细胞内相应染色体区段的荧光信号点，从而判断该染色体区段的数量，用于检测样本细胞中 13/18/21/X/Y 号染色体的非整倍性。检测步骤主要包括样本处理、制片、预处理、变性、杂交、洗涤、复染、镜检等步骤。

【主要组成成分】

组分名称	规格		数量	主要成分
	5 人份/盒	20 人份/盒		
13/21 杂交液	50μL/管	200μL/管	1 管	GSP13 探针, GSP21 探针, 甲酰胺, DMSO, SSC, 硫酸葡聚糖
18/XY 杂交液	50μL/管	200μL/管	1 管	CSP18 探针, CSPX 探针, CSPY 探针, 甲酰胺, DMSO, SSC, 硫酸葡聚糖
DAPI 复染剂 II	100μL/管	400μL/管	1 管	DAPI 和抗褪色剂 II

以下仪器及材料需自备：

仪器：荧光显微镜，15mL、1.5mL 离心机，移液器、恒温箱（37±1℃），恒温水浴锅（可调至 72℃），原位杂交仪（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），冰箱，计时器，镊子。

耗材：15mL、1.5mL 离心管，防脱载玻片，18×18mm 盖玻片，22×22mm 盖玻片，圆形玻璃染色缸，橡皮胶（rubber cement），1mL、200μL、10μL 枪头。

试剂：胰蛋白酶，氯化钾，甲醇，冰醋酸，无水乙醇，纯化水，胃蛋白酶（1:10000），盐酸，多聚甲醛，氢氧化钠，20×SSC，20×PBS，NP-40。

试剂配制：

0.05%胰蛋白酶： Hanks 平衡液（或者使用 1×PBS）溶解；

低渗液（0.075mol/L KCL）： 5.59 g 氯化钾+500mL 纯化水，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；

1×PBS： 38mL 纯化水+2mL 20×PBS；

胃蛋白酶溶液： 40mL 纯化水+400μL 1mol/L HCL，置于 37±1℃ 水浴中，使用前加入 100μL（根据样本类型或样本实际情况调整）10% 胃蛋白酶，混匀，使用一天后更换；

4%多聚甲醛： 900 mL 纯化水+500μL 1mol/L NaOH，加热到 65-70℃；边搅拌边加入 40 g 多聚甲醛，持续搅拌直到溶解；冷却至室温后加入 100 mL 的 10×PBS；用 HCl 调节 pH 到 7.3；过滤除菌，4℃ 避光保存；

1%多聚甲醛/PBS： 26mL 纯化水+2mL 20×PBS+10mL 4%的多聚甲醛+2mL 1M MgCl₂；

梯度乙醇： 70%、90%、100%梯度乙醇；

洗液 I（0.1% NP-40/1×SSC）： 37.96mL 纯化水+2mL 20×SSC+40μL NP-40，总体积 40mL；

洗液 II（0.1% NP-40/2×SSC）： 35.96mL 纯化水+4mL 20×SSC+40μL NP-40，总体积 40mL。

【储存条件及有效期】

2-8℃ 避光保存，有效期 9 个月。

以下环境或条件下，试剂性能无变化：

25℃ 光照度 25000Lux 环境下保存 1 小时，500Lux 和 11Lux 环境下保存 36 小时；37℃ 避光保存 7 天；25℃ 开瓶保存 10 小时；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。

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)、Orange (552/576) 及 Aqua (426/450) 观察的滤块。

【样本要求】

1. 新鲜羊水样本，2-8℃保存，建议 1 个星期内处理；
2. 一般介入性产前诊断手术（羊膜腔穿刺术），有医学指征的孕 16 周~22 周⁺⁶。

【检验方法】

1. 样本处理

- 1.1 取≥5mL 羊水转移到 15mL 的离心管（标记）中，2000rpm 室温离心 10 分钟，弃上清，管底留约 1mL；
- 1.2 沉淀加入 5mL 1×PBS 并振荡混匀，2000rpm 室温离心 10 分钟，弃上清，管底留约 1mL；
- 1.3 加入 5mL 的 0.05% 胰蛋白酶溶液，振荡混匀，37℃放置 10 分钟，2000rpm 室温离心 10 分钟，弃上清，管底留约 1mL；
- 1.4 加入 5mL 0.075mol/L KCL，轻轻上下颠倒混匀，37℃孵育 20 分钟；
- 1.5 缓慢贴壁加入 1mL 的固定液，室温静置 5 分钟，2000rpm 室温离心 10 分钟，弃上清至约 1mL；
- 1.6 沉淀加入 5mL 的固定液，振荡混匀，放入-20℃冰箱中至少 1 小时以上；
- 1.7 2000rpm 室温离心 10 分钟，尽可能吸尽上清。

2. 制片

视细胞沉淀量酌情加入固定液，吹打混匀，滴于（3μL 悬液）准备好的干燥玻片上，自然晾干后于相差显微镜下观察细胞密度，10 倍镜下样本单视野细胞数量在 10~50 个为宜，根据镜检结果用新鲜固定液调整细胞悬液浓度，重新滴片备用。

3. 预处理

- 3.1 将干燥的样本片放入 37±1℃的 1×PBS 中孵育 5 分钟；
- 3.2 取出玻片，放入 37±1℃预热的胃蛋白酶溶液中消化 5~20 分钟左右；

注意：胃蛋白酶的用量和反应时间需要根据样本类型和样本情况通过预试验进行确定。通过处理时间的不同调整消化强度，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、15 分钟和 20 分钟，完成“预处理”后，使用 10×或 20×物镜观察消化状态；或者直接进行 DAPI 复染，进行消化状态判断。

- 3.3 取出玻片，放入 1×PBS 室温洗涤 3 分钟；
- 3.4 取出玻片，放入 1%多聚甲醛/PBS 室温固定 10 分钟；
- 3.5 取出玻片，放入室温 1×PBS 中 3 分钟；
- 3.6 取出玻片，再将其依次放入室温 70%，90%，100%梯度乙醇脱水各 2 分钟；
- 3.7 取出玻片，室温晾干。

4. 样品和探针同时变性（避光操作）

- 4.1 从 2-8℃冰箱中取出杂交液，37±1℃环境下预热 10 分钟后，震荡混匀；
- 4.2 在 2 片干燥的 22×22mm 盖玻片上，分别加入 10μL 的 13/21 杂交液、18/XY 杂交液，将样本片翻转，使样本朝下，迅速盖上，反转后轻压盖玻片使杂交液均匀分布，避免产生气泡，作好标记；
- 4.3 用橡皮胶沿盖玻片边缘封片，完全覆盖盖玻片与载玻片接触的邊緣；
- 4.4 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 82±1℃ 5 分钟，杂交 45±1℃ 1 小时（若无杂交仪，可使用替代仪器，如恒温热台进行变性，电热恒温箱进行杂交，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 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，可以将其放入室温洗液 II 中微微摇晃，以利于其脱落，取下盖玻片后应立即将样本片放入洗液 I）；
- 5.2 玻片放入 72±1℃ 洗液 I 中 5 分钟；
- 5.3 取出玻片，放入室温洗液 II 中 2 分钟；
- 5.4 取出玻片，室温 70%、90%、100%梯度乙醇依次脱水各 2 分钟；
- 5.5 取出玻片，暗处自然干燥玻片；
- 5.6 室温，滴加 10 μLD API 复染剂 II 到 22×22mm 的盖玻片，反转样本片，使盖玻片分别与载玻片上的目标区域接触，反转后轻压，避免产生气泡，在暗处存放，待检。

注意：上述所列试剂配制在圆形染色缸中（试剂总体积 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。

6. 镜检

相关荧光和 DAPI 需用合适的滤块观察；其中，13/21 杂交液区染色体探针分别显示为绿色（G）/红色（R）信号；18/XY 杂交液区染色体探针分别显示为青色（A）/绿色（G）/红色（R）信号。

7. 结果分析

7.1 信号计数和结果分析

- 7.1.1 使用合适的滤镜，在 10×物镜下寻找，在 100×物镜下计数；
- 7.1.2 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；
- 7.1.3 按左上到右下的折线方式连续观察，扫视整个细胞区域，75%的细胞应显示出大于 1 个的杂交信号点；探针信号应明亮，与 DAPI 背景有明显区别，易于计数，信号形态为紧密卵圆形或线状弥散形；
- 7.1.4 只计数每种颜色荧光信号点≥1 的核；需要主观辨别的核不计数；跳过信号弱及没有特定信号或高背景的核计数；

7.1.5 在每个核内计数信号点；调焦找到每个核内的所有信号点，计数一个区域内的信号，记录观察的细胞总数（染色体正常及异常）；

7.2 结果判读

随机计数 50 个细胞核，当出现嵌合体（10-60%的非整倍体细胞）情况时，样本需计数分析 100 个细胞核，当样本中可被有效分析的细胞核少于 50 个时，应增加一张样本片继续计数分析，或判断为该样本信息不足。结果判读如下：

- (1 区) 13/21 杂交液：13 绿色 (G)、21 红色 (R)；
- (2 区) 18/X/Y 杂交液：18 青色 (A)、X 绿色 (G)、Y 红色 (R)。

信号类型		阈值	结果
正常信号	(1 区) 2R2G (2 区) 男性：1R1G2A；女性：2G2A。	>90%	二倍体*diploid
	异常信号	(1 区) 3R2G、2R3G、其他； (2 区) 男性：1R2A、1R2G2A、1R1G3A、其他； 女性：1G2A、3G2A、2G3A、其他。	>60%
		10~60%	嵌合体*mosaicism
(1 区) 3R3G 且 (2 区) 3G3A/1R2G3A、其他。		>90%	整倍体*(≥3)

*非整倍体：人类体细胞为二倍体，含 46 条染色体，任何不成倍增加或者减少的染色体异常个体均统称为非整倍体。

嵌合体：由两种或多种具有不同核型的细胞系所组成的个体称为嵌合体。

整倍体：整倍体是体细胞的染色体数为基本染色体组整数倍的个体，如一个基本染色体组的个体叫一倍体，含 2 个基本染色体组的叫二倍体，整个染色体组比正常二倍体数成倍增减。

8. 质量控制

8.1 每次检测都必须同时进行质控片操作，质控片必须和病例样本一同操作。质控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备。

8.2 质控片结果分析方法同上，计数连续 50 个细胞中各信号点的数目。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或与质控片要求结果不符，该批实验的结果不可以被分析，需要进行重检。

8.3 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。

【阳性判断值或参考区间】

依据 Abbott “AneuVysionMulticolor DNA Probe Kit” 说明书中的参考值标准，并通过临床标本的验证，最终确定本试剂盒的参考区间设定为：整倍体样本 FISH 检测结果应有>90%的间期核记数为整倍体；非整倍体样本 FISH 检测结果应有>60%的间期核记数为非整倍体；当记数结果接近 10%时不能排除嵌合体情况。此参考值仅供参考。

【检验结果的解释】

- 13/21 杂交液区每个样本应连续计数分析 50 个细胞核，记录的染色体信号点（1，2，3，4，>4）的数目，报告形式为分别记录 2 种颜色信号在 50 个细胞中的整倍体和非整倍体数目以及各自所占百分数（其中 13/21 杂交液中红色：21q22.13，绿色：13q14.2）；当出现嵌合体（10-60%的非整倍体细胞）情况时，样本需计数分析 100 个细胞核，再给出相应整倍体和非整倍体数目以及各自所占百分数。
- 18/XY 杂交液区每个样本应连续计数分析 50 个细胞核，记录的染色体信号点（1，2，3，4，>4）的数目，报告形式为分别记录 3 种颜色信号在 50 个细胞中的整倍体和非整倍体数目以及各自所占百分数（其中 18/XY 杂交液中青色：18p11.1-q11.1，红色：Yp11.1-q11.1，绿色：Xp11.1-q11.1）；当出现嵌合体（10-60%的非整倍体细胞）情况时，样本需计数分析 100 个细胞核，整倍体和非整倍体数目以及各自所占百分数。

示例：样本检测

临床质控使用已知的正常人外周血培养细胞制备的细胞片，按说明书所述方法进行未知样本的预处理，进行变性和杂交，最后经杂交后洗涤和复染进行结果分析。

样本 1 表示阴性质控片的检测结果，样本 2、3 表示羊水细胞样本检测结果，结果如下表：

样本名称	检测图		结果判断
	13/21 杂交液	18/XY 杂交液	
样本 1			阴性质控片杂交结果正常， <ul style="list-style-type: none"> ■ 13/21 杂交液区中期染色体绿色 (GSP 13)、红色 (GSP 21) 信号分别特异性杂交于染色体相应区域； ■ 18/XY 杂交液区中期染色体中绿色 (CSP X)、红色 (CSP Y)、青色 (CSP 18) 信号分别特异性杂交于染色体相应区域； 试验结果符合预期，可以进行未知样本判断。
样本 2			报告格式为： <ul style="list-style-type: none"> ■ 13/21 杂交液区计数 <u>50</u> 个细胞，信号类型 <u>3G2R</u>，百分数为 <u>100% (50/50)</u>，提示 13 号染色体<u>三体</u>，21 号染色体<u>未见异常</u>； ■ 18/XY 杂交液区计数 <u>50</u> 个细胞，信号类型 <u>2G2A</u>，百分数为 <u>100% (50/50)</u>，提示 18 号染色体<u>未见异常</u>、性染色体 (XY) <u>未见异常</u>。

样 本 3			报告格式为： <ul style="list-style-type: none"> ■ 13/21 杂交液区计数 <u>50</u> 个细胞，信号类型 <u>2G2R</u>，百分数为 <u>100% (50/50)</u>，提示 13 号染色体未见异常，21 号染色体未见异常； ■ 18/XY 杂交液区计数 <u>50</u> 个细胞，信号类型 <u>1G1R2A</u>，百分数为 <u>100% (50/50)</u>，提示 18 号染色体未见异常、性染色体 (XY) 未见异常。
-------------	--	--	---

除非有明确胎儿性别的医疗指征，不得报告胎儿性别。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒只用于检测 13/18/21/X/Y 染色体数目异常；无法检测染色体微小结构改变、单基因遗传病、多基因遗传病、环境及药物导致的胎儿宫内发育异常，不能检测导致出生缺陷的染色体结构异常。
2. 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会影响结果判定。
3. 检出结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或治疗的依据。
4. 应结合其它检测结果和病人实际情况进行综合评估，建议遗传咨询。

【产品性能指标】

1. 分析性能结果表明：
 - 1.1 杂交效率：阴性参考片检测结果显示均在染色体相应区域出现正确的荧光信号，杂交效率为 100%。
 - 1.2 特异性：杂交只出现在 5 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。
 - 1.3 准确度：5 张阴性参考片检测结果均为阴性；5 张阳性参考片检测结果均为阳性，符合率 100%。
 - 1.4 灵敏度：10 张嵌合体参考片检测结果均符合嵌合体判断标准（10~60%的非整倍体细胞）。
 - 1.5 重复性：同一标本来源的 5 张阳性重复性参考片检测结果均一致；同一标本来源的 5 张阴性重复性参考片检测结果均一致。
 - 1.6 精密性：进行了批内、批间、日间以及人员精密性进行评价。统计分析各参数未发现显著性差异。
 - 1.7 干扰试验：羊水细胞中的内源成分以及低渗液/固定液等外源物质均不影响检测结果。
 - 1.8 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。

2. 临床试验结果：

本试剂盒的临床试验共检测有效样本 1102 例，检测 13/18/21/X/Y 号染色体的阳性符合率、阴性符合率、总符合率均达 100%，Kappa 值 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，并由专业人员按说明书要求严格操作。
3. 实验室管理应严格按照细胞遗传性实验室的管理规范，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 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酰胺和二甲基亚砜 (DMSO)，其中甲酰胺是一种致畸物，操作过程中请注意防护，避免与皮肤及粘膜接触。DMSO 对人体皮肤有渗透性，对眼有刺激作用。操作过程中请注意防护，避免与皮肤接触。如果试剂接触到眼睛或皮肤，请立即用大量的水洗以及稀氨水洗涤，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。

【参考文献】

1. 胎儿常见染色体异常与开放性神经管缺陷的产前筛查诊断技术标准 第 2 部分：胎儿染色体异常的细胞遗传学产前诊断技术标准。
2. Ried T, Landes G, Dackowski W, et al. Multicolor fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells[J]. Human molecular genetics, 1992, 1(5): 307-313.
3. Ward B E, Gersen S L, Carelli M P, et al. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens[J]. American journal of human genetics, 1993, 52(5): 854.

【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
 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
 传真：020-32290284 电话：020-32299997 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

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20193400465

【说明书核准日期及修改日期】核准日期：2019 年 6 月 28 日 修改日期：变更产地试产