

## 荧光原位杂交实验处理流程的构建与优化

朱晓莹, 陆海善, 潘英姿, 杨洁, 黄小英, 黄炳臣, 龙喜带

(右江民族医学院附属医院病理诊断与研究中心, 广西 百色 533000)

**摘要:**目的 探讨荧光原位杂交(FISH)实验流程构建与优化。方法 采用FISH法检测人类表皮生长因子受体2(HER-2)基因扩增情况,优化胃蛋白酶消化时间。采用25例乳腺癌标本进行试剂性能验证。采用10例正常人乳腺标本构建本实验室阈值。结果 胃蛋白酶消化时间8~10 min为宜,25例乳腺癌标本11例有HER-2基因扩增,本实验室HER-2基因部分缺失阈值为2.34%,扩增阈值为4.77%。结论 HER-2基因扩增检测(FISH法)构建成功。

**关键词:**原位杂交;荧光;胃蛋白酶;人类表皮生长因子受体2;实验流程

中图分类号:R-331 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2018)06-0526-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.06.004

### Construction and optimization of fluorescence in situ hybridization experimental process

Zhu Xiaoying, Lu Haishan, Pan Yingzi, Yang Jie, Huang Xiaoying, Huang Bingchen, Long Xidai

(Pathological Diagnosis and Research Center, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the process construction and optimization of fluorescence in situ hybridization(FISH). **Methods** The amplification of human epidermal growth factor receptor 2(HER-2) was detected by FISH method and digestion time of pepsin was optimized. Reagent performance was verified in 25 breast cancer samples. Ten normal human breast specimens were used to construct our laboratory threshold.

**Results** The optimal digestion time of pepsin was 8~10 minutes. Eleven of the 25 breast cancer samples had HER-2 gene amplification, and HER-2 gene partial deletion threshold value was 2.34% and amplification threshold value was 4.77% in our laboratory. **Conclusion** HER-2 gene amplification test (FISH method) has been successfully constructed.

**Key words:** in situ hybridization, fluorescence; pepsin; human epidermal growth factor receptor 2; experimental process

随着我国精准医学的蓬勃发展,分子病理诊断广泛地应用于临床诊疗,越来越多的医院开始构建自己的分子诊断实验室。在这个背景下,我院病理诊断与研究也逐步构建、完善分子诊断实验室。众所周知,分子病理诊断主要是指基于疾病组织和细胞等标本的分子遗传学检测<sup>[1]</sup>。检测的结果直接关系到临床疾病的诊断、临床分期、个体化治疗及预后的评估,其重要性不言而喻。那么对新构建的分子诊断实验室,如何在技术上优化,以便准确判读出检验结果,是本文需要探讨的问题,结合本实验近期在构建免疫荧光杂

交实验——人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)基因构建过程中遇到的问题及处理方法,为今后同行构建荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)实验方法提供解决思路。

#### 1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2018年1月~9月我院病理科已知乳腺癌存档组织蜡块25例;患者均为女性,年龄范围在28~70岁,平均年龄为50.3岁。所有组织标本均用10%中性福尔马林固定,并进行石蜡包埋,所

基金项目:国家自然科学基金(81860489,81760502);广西自然科学基金(2017GXNSFAA198002,2017GXNSFGA198002)

第一作者简介:朱晓莹(1981-),女,硕士,高级实验师,研究方向:肝癌的基础研究,E-mail:417343600@qq.com

通信作者简介:龙喜带(1973-),男,医学博士,教授,博士生导师,研究方向:肝癌的基础与临床综合研究;肝癌的早期预警模型研究,E-mail:sjtulongxd@263.net

有标本均经过 HE 染色检查确诊为乳腺癌;其中依据免疫组织化学法 (Immunohistochemistry, IHC) 检测结果分别为: IHC 0 级 5 例, IHC 1+ 级 5 例, IHC 2+ 级 10 例, IHC 3+ 级 5 例。各切取  $3\ \mu\text{m}$  切片一张, 裱于防脱玻片上,  $61^\circ\text{C}$  烘烤过夜, 常温保存备用。另选取 10 例已知正常乳腺标本, 年龄范围在 28~54 岁, 平均年龄为 50.3 岁, 切取  $3\ \mu\text{m}$  切片一张, 用于构建 HER-2 阴性阈值。

1.2 试剂、探针、试剂盒 HER-2/neu (17q12)/CSP17 探针、组织预处理试剂盒、原位杂交用蛋白酶 (胃蛋白酶工作液) 均购于广州安必平医药科技股份有限公司。

1.3 仪器 切片机, Leica RM2245; 摊烤片机, Histoline Tec2602 Slide Driver; 电热恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司 DND-9052 型; 数显型恒温水浴锅, 上海跃进医疗器械有限公司 DK-8D; 原位杂交仪, 美国雅培 ThermoBrite 原位杂交仪; 荧光显微镜, 奥林巴斯 BX53 型。

1.4 胃蛋白酶对样本消化时间的优化 选择同一蜡块, 取四张玻片, 分别于  $37^\circ\text{C}$  条件下消化 6 min、8 min、10 min、12 min, 终止消化后, 以 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色在荧光显微镜下观察消化效果。

1.5 试剂性能验证及结果判读标准 选择上述不同 IHC 级别的标本, 共 25 例, 按照优化后条件行 FISH 检测。结果判读参照乳腺癌 HER2 检测指南 (2014 版)<sup>[2]</sup> 选择至少 2 个视野, 随机计数至少 20 个浸润细胞。①当 HER-2/CEP17 比值  $\geq 2.0$  时, HER-2 为阳性; HER-2/CEP17 比值  $< 2.0$ , 但平均 HER-2 拷贝数  $\geq 6.0$  时, HER-2 阳性; HER-2 信号连接成簇时, 可不计数, 直接视为基因扩增。②当 HER-2/CEP17 比值  $< 2.0$ , 且平均拷贝数/细胞  $< 4.0$  时, HER-2 阴性。③当 HER-2/CEP17 比值  $< 2.0$ , 平均 HER-2 拷贝数在 4.0~6.0 之间, 结果判为不确定。

1.6 HER-2 阴性阈值建立 取上述正常乳腺标本, 行 FISH 检测, 每张随机计数 100 个细胞, 计算出现 FISH 阳性细胞的总数及百分比, 统计百分比的平均值及标准差, 阴性阈值 = 平均值 (M) +  $3 \times$  标准差 (SD)<sup>[3]</sup>。

## 2 结果

2.1 胃蛋白酶对样本消化时间的结果 不同消化时间, 经 DAPI 染色后镜下呈现出不同的细胞形态 (见表 1 及图 1 所示)。结果所示, 标本消化时间在 8~10 min 之间较为适宜, 考虑到标本大小, 可在此范围内适当调整消化时间。

表 1 胃蛋白酶消化后细胞的形态学变化

消化时间	细胞核形态
6 min	核完整, 边缘完整, 折光性强
8 min	核完整, 边缘完整, 呈网格状
10 min	核完整, 边缘略呈锯齿状, 呈网格状
12 min	核皱缩, 边缘呈锯齿状

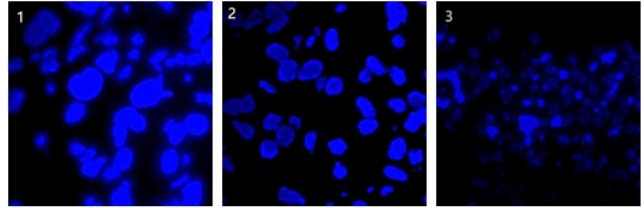


图 1 不同消化时间细胞核 DAPI 染色的形态  
注: 1 为消化 6 min; 2 为消化 10 min; 3 为消化 12 min

2.2 HER-2 基因检测结果 从表 2 可见, HER-2 蛋白表达 (IHC) 检测结果与 HER-2 基因结果相符率较高, 与文献报道相似<sup>[4]</sup>, 但其中 IHC 2+ 病例中 HER-2 基因扩增阳性率较高, 与文献报道的检出率有差异, 可能与标本抽样例数少有关, 不能排除抽样误差。图 2 为 HER-2 基因检测结果的图片。

表 2 乳腺癌 HER-2 基因 (FISH 法)、蛋白表达 (IHC 法) 检测结果

HER-2 蛋白	n	HER-2 基因	
		未见扩增	扩增
0	5	5	0
+	5	4	1
++	10	5	5
+++	5	0	5
合计	25	14	11

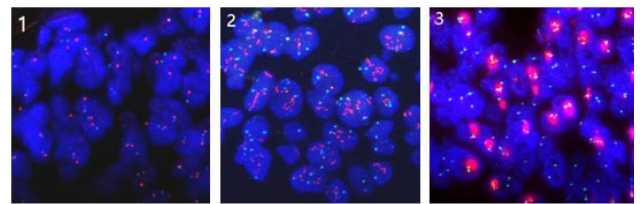


图 2 HER-2 基因检测结果

注: 1 为未见 HER-2 基因扩增; 2 为 HER-2 基因点状扩增; 3 为 HER-2 基因簇状扩增

2.3 HER-2 基因阴性阈值建立 依据阴性阈值构建方法计算得 HER-2 基因部分缺失阈值为 2.34%, 扩增阈值为 4.77%。

## 3 讨论

随着靶向药物的不断研发, 目前临床上能进行靶

向治疗的肿瘤种类越来越多。而分子病理检测协助临床医生筛选哪些患者适用靶向治疗,其诊断质量的优劣直接决定患者的治疗方式和效果<sup>[5-6]</sup>。FISH法检测患者基因突变,是分子病理的一种重要的检测手段,具有检测周期短、检测结果准确等优点。在检测过程中,标本处理、实验条件的优化、阈值的构建等因素对检测结果的准确判读有较大影响,因此,在实验流程的构建与优化过程中,应格外重视。

3.1 标本处理 标本规范化处理是分子诊断的基础和重要保障。为保障临床标本的规范处理,我科室安排专人全程跟踪,保障标本在离体30 min内固定。固定液统一采用10%中性甲醛固定液,并保障固定液充足(固定液:标本 $\geq$ 10:1),固定时间依据标本大小固定约6~48 h(大标本每隔1 cm切开固定)。此外病理科一般都采取双休制度。针对周五取材的标本,应安排人员周六进行包埋,以保证标本固定时间适宜。

3.2 胃蛋白酶消化时间的优化 FISH实验中的一个关键步骤是蛋白酶对标本中蛋白的消化程度。蛋白酶消化得当,标本的细胞核膜打开,杂交探针能顺利进入细胞核内与目的基因杂交,从而判读目的基因的状态。若消化不足,可导致探针无法进入细胞核内进行杂交反应;若核膜消化过度,细胞核皱缩,核酸外溢,无法以单个细胞核为基础判读目的基因的状态。胃蛋白酶的消化时间,需要通过预实验进行探索和优化。笔者选取了4个时间点进行优化,终止消化以后,以DAPI染色,在荧光下观察细胞形态。酶消化时间6 min时,细胞核呈圆形且折光性强,说明细胞核完整,不利于探针进入。当酶消化在8 min时,大部分细胞的核边缘完整,核呈网格状,说明核膜已经打开,有利于探针进入。当酶消化在10 min时,细胞核均呈网格状,部分细胞核边缘呈锯齿状。当酶消化在12 min时,大部分细胞核呈锯齿状,核皱缩明显。因此,我们认为胃蛋白酶在8~10 min内较为适宜,此外依据标本大小可适当调整消化时间。

3.3 试剂性能验证及结果判读 目前检测HER-2状态的方法有:IHC、FISH、ISH等,其中FISH法是检测HER-2基因的金标准。相对于IHC法,FISH检测的费用较高,在一定程度上给患者造成负担。根据2018年美国《NCCN乳腺癌筛查和诊断临床实践指南》<sup>[7]</sup>HER-2检测方法推荐,HER-2蛋白IHC 0和1+,判为HER-2基因扩增阴性;HER-2蛋白IHC 2+,HER-2基因扩增不确定,需要进一步做FISH检测HER-2基因扩增状态;HER-2蛋白IHC 3+,判为HER-2基因扩增阳性。本次试验选取我院已经确诊为乳腺癌并且HER-2蛋白IHC检测结果为0、1+、3

+级别的标本各5例,2+级别标本10例,进行试剂性能验证。在荧光显微镜下细胞核内红绿两色探针清晰可见,易于判读。检测结果显示IHC 0级无HER-2基因扩增,IHC 1+级有1例扩增,IHC 2+级有5例扩增,IHC 3+级5例均扩增。根据基因表达的原理,当存在基因扩增的情况下,其蛋白表达量一般会相应增加。在某些情况下细胞基因扩增,但基因转录和翻译受抑,导致其蛋白表达下调,反之亦然。此次检查结果,HER-2蛋白与基因检测结果基本一致,说明试剂检测性能良好。

3.4 实验室阈值的构建 阈值是体外诊断试剂的重要指标之一,也是临床判断被检测样本是否异常的重要依据。在采用FISH检测方法检测时,不同类型的标本,不同的信号导致结果解释和判读的差异,其最有利依据是本实验阴性阈值的建立。一般临床实验构建阈值的基础是以阴性标本5例以上,每例至少计算100个细胞,计数异常信号类型细胞数量,取其平均值再加上三倍标准差而得。此次依据阴性阈值构建方法计算得HER-2基因部分缺失阈值为2.34%,扩增阈值为4.77%,在为今后判读HER-2结果提供依据。

最后,随着科学技术的发展,运用于临床病理检测手段日益丰富,但不论何种检测技术,都必须有高度负责的责任心,严谨的工作态度,严格按照实验操作进行。同时应在工作中不断总结工作经验,优化实验方法,方可获得优良、可靠的检测结果。

#### 参考文献:

- [1] 中华医学会病理学分会,中国医师协会病理科医师分会,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会,等.分子病理诊断实验室建设指南(试行)[J].中华病理学杂志,2015,44(6):369-371.
- [2] 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,2014,43(4):262-267.
- [3] 林毅,陈文轩,郭洪波,等.荧光原位杂交技术在上尿路肿瘤诊断中的应用[J].山东医药,2010,50(10):15-16.
- [4] 邹玉凤.浅谈fish技术用于检测乳腺癌HER2基因扩增的临床研究[J].中国医药指南,2013,11(27):90-91.
- [5] 郑建明.应特别重视分子病理诊断的质量[J].诊断病理学杂志,2014,21(6):339-340,346.
- [6] 李金明.临床分子诊断质量保证的重要性[J].中华检验医学杂志,2003,26(11):652.
- [7] National Comprehensive Cancer Network(NCCN). NCCN Clinical practice guidelines in oncology:breast cancer. Version 1, 2018[EB/OL]. [2018-04-03]. [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/breast.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf).

收稿日期:2018-10-30;修回日期:2018-11-21