(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110195106 A
(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910391638.5

(22)申请日 2019.05.10

(71)申请人 广州安必平医药科技股份有限公司
地址 510663 广东省广州市广州高新技术产业开发区南翔三路11号自编7栋

(72)发明人 何瑰 陈绍宇

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
代理人 颜希文 罗尧

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)
C12N 15/11(2006.01)

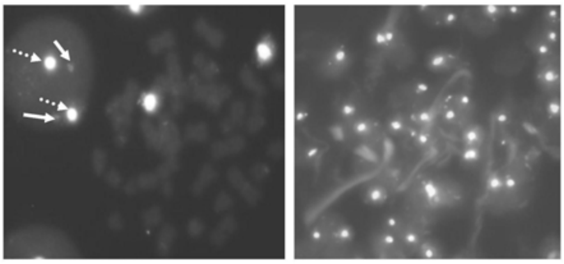
权利要求书1页 说明书19页 附图3页

(54)发明名称

用于检测PD-L1基因异常的探针组、试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测PD-L1基因异常的探针组和试剂盒，其中探针组包括PD-L1基因断裂探针和PD-L1基因异常扩增探针，PD-L1基因断裂探针为一对探针，靶点序列分布于断裂点的两侧，异常扩增探针靶向PD-L1基因编码区，PD-L1基因断裂探针和PD-L1基因异常扩增探针均采用phi29 DNA聚合酶进行探针标记。采用本发明的PD-L1基因异常快速检测试剂盒，能准确地检测肿瘤细胞中PD-L1基因的表达水平；同时，可以准确判读PD-L1基因异常(断裂、扩增)；采用该试剂盒的快速杂交体系，可以快速(2小时内)完成组织样本与检测探针的杂交；采用本发明的试剂盒能够有效辅助现有方法进行肿瘤的准确分层、精准诊断和预测抗肿瘤药物治疗效果。



CN 110195106 A

1.用于检测PD-L1基因异常的探针组,其特征在于,包括PD-L1基因断裂探针和PD-L1基因异常扩增探针,所述PD-L1基因断裂探针为一对探针,靶点序列分布于断裂点的两侧,所述异常扩增探针靶向PD-L1基因编码区,所述PD-L1基因断裂探针和PD-L1基因异常扩增探针均采用phi29 DNA聚合酶进行探针标记。

2.根据权利要求1所述的探针组,其特征在于,所述探针组还包括用于监测PD-L1基因异常扩增水平的内参探针。

3.根据权利要求2所述的探针组,其特征在于,所述内参探针靶向9号染色体着丝粒核苷酸序列。

4.根据权利要求1所述的探针组,其特征在于,所述探针组进行探针标记时,采用随机六聚体引物进行扩增,扩增温度为30℃,扩增时间为12小时。

5.用于检测PD-L1基因异常的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括权利要求1～4任一项所述的探针组。

6.根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括杂交缓冲液,所述杂交缓冲液中包括作为促进剂的二甲基亚砜。

7.根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述杂交缓冲液中含有质量百分含量为15％～50％的甲酰胺、硫酸葡聚糖0.2～0.25g/700uL以及二甲基亚砜20～30uL/700uL。

8.根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括用于阻断非特异性杂交的胎盘DNA。

9.权利要求1～4任一项所述的探针组或权利要求5～8任一项所述的试剂盒在制备肿瘤分层诊断剂或/和预测抗肿瘤药物疗效的试剂中的应用。

用于检测PD-L1基因异常的探针组、试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因检测技术领域,尤其是一种用于检测PD-L1基因异常的探针组、试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] PD-L1(CD274)广泛表达于细胞表面,是PD-1的配体,PD-1是CD28家族的一个负性共刺激分子,表达于淋巴细胞,特别是肿瘤浸润性淋巴细胞。研究表明,PD-L1可选择性的在肺癌细胞表面高表达,并通过与激活的T细胞表面的PD-1特异性结合,活化PD-1/PD-L1下游通路,传递负性调节信号,进而导致激活T细胞的凋亡和免疫活性的丧失。PD-1/PD-L1通路被认为是存在于肿瘤微环境中的介导免疫逃逸的关键分子,阻断该通路可以解除肿瘤细胞对T淋巴细胞的抑制,加强免疫系统对肿瘤的识别杀伤作用。因此,肿瘤细胞表面PD-L1的表达可能是抗PD-1/PD-L1免疫治疗的重要疗效预测标志物。

[0003] 目前,有两类阻断PD-1/PD-L1通路抑制剂,针对PD-1的单克隆抗体和针对PD-L1的单克隆抗体。已经开展的临床试验在晚期NSCLC治疗中获得成功,多项III期临床试验研究显示,可以提高晚期NSCLCORR和OS。FDA于2014年底批准2个药物nivolumab(BMS-936558)和pembrolizumab(MK-3475)(针对PD-1的单克隆抗体)用于晚期黑色素瘤的免疫靶向治疗。2015批准了这两个药物用于含铂方案化疗疾病进展后的转移性NSCLC[1]。目前临床试验或研究中涉及的肿瘤已经包括肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、血液肿瘤和脑肿瘤等。

[0004] 研究发现,抗PD-1/PD-L1药物虽然在部分肺癌患者中效果相当显著,但在腺癌中的有效率仍不足50%,鳞癌中约20%,且治疗费用相当昂贵,故需要选择可靠的标志物筛选出适应人群。另外,PD-L1阴性的患者仍有部分对抗PD-1/PD-L1药物有效,可能也存在其他的用于指导抗PD-1/PD-L药物治疗的生物标志物。

[0005] PD-L1蛋白的基因CD274位于9p24.1,可以通过FISH方法对肿瘤细胞染色体9p24.1中相关基因拷贝数进行检测,从而评估PD-L1在肿瘤组织中的表达水平。免疫组化是目前检测肿瘤组织中PD-L1蛋白表达水平的主要方法,相关文献报道的阳性率为32%～60%,由于各种抗体本身差异和判定PD-L1阳性的cutoff值不同导致检测结果不一致。

[0006] 参考文献:

[0007] 1、赵沙等.抗PD-1/PD-L1免疫治疗疗效预测标志物在非小细胞肺癌中的研究进展.肿瘤。

发明内容

[0008] 基于上述问题,本发明的目的在于克服上述现有技术的不足之处而提供一种能准确检测肿瘤细胞中PD-L1基因表达水平和基因异常表达水平的试剂盒。

[0009] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案包括以下几个方面:

[0010] 在第一个方面,本发明提供了一种用于检测PD-L1基因异常的探针组,包括PD-L1

基因断裂探针和PD-L1基因异常扩增探针，所述PD-L1基因断裂探针为一对探针，靶点序列分布于断裂点的两侧，所述异常扩增探针靶向PD-L1基因编码区，所述PD-L1基因断裂探针和PD-L1基因异常扩增探针均采用phi29DNA聚合酶进行探针标记。需要说明的是，本发明中首次将phi29DNA聚合酶用于探针标记，建立phi29DNA随机引物标记方法。

[0011] 优选地，所述探针组还包括用于监测PD-L1基因异常扩增水平的内参探针。

[0012] 优选地，所述内参探针靶向9号染色体着丝粒核苷酸序列。由此，本发明中的9号染色体着丝粒探针(即CSP 9)，其标记颜色与PD-L1基因异常扩增探针(即GSP PD-L1)不同，通过计算GSP PD-L1(可标为红色)与CSP 9(可标为绿色)的比值，判断PD-L1是否发生扩增以即扩增的水平。

[0013] 优选地，所述探针组进行探针标记时，采用随机六聚体引物进行扩增，扩增温度为30℃，扩增时间为12小时。本申请的发明人经多次试验发现，当扩增时采用随机六聚体引物进行扩增，扩增温度为30℃，扩增时间为12小时，相比随机八聚体引物、随机十聚体引物扩增，扩增效果最佳，扩增的产率最高。

[0014] 在第二个方面，本发明提供了用于检测PD-L1基因异常的试剂盒，包括上述的探针组。

[0015] 优选地，所述试剂盒还包括杂交缓冲液，所述杂交缓冲液中包括作为促进剂的二甲基亚砜。本申请的发明人经多次试验发现，杂交缓冲液中采用二甲基亚砜作为促进剂时，杂交的效果更佳，背景更弱而杂交信号更亮。

[0016] 优选地，所述杂交缓冲液中含有质量百分含量为15％～50％的甲酰胺、硫酸葡聚糖0.2～0.25g/700uL以及二甲基亚砜20～30uL/700uL。本申请的发明人经多次试验发现，杂交缓冲液中含有质量百分含量为15％～50％的甲酰胺、硫酸葡聚糖0.2～0.25g/700uL以及二甲基亚砜20～30uL/700uL时，缓冲液的杂交效果(从信号、背景、杂交时间综合考虑)相比其它含量的甲酰胺、硫酸葡聚糖和二甲基亚砜更好。

[0017] 优选地，所述试剂盒还包括用于阻断非特异性杂交的胎盘DNA。

[0018] 在第三个方面，本发明提供了上述的探针组或上述的试剂盒在制备肿瘤分层诊断剂或/和预测抗肿瘤药物疗效的试剂中的应用。优选地，所述肿瘤为肺癌、肾癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、血液肿瘤或脑肿瘤。

[0019] 综上所述，本发明的有益效果为：

[0020] (1)采用本发明的PD-L1基因异常快速检测试剂盒，能准确地检测肿瘤细胞中PD-L1基因的表达水平；同时，可以准确判读PD-L1基因异常(断裂、扩增)；采用该试剂盒的快速杂交体系，可以快速(2小时内)完成组织样本与检测探针的杂交；

[0021] (2)采用本发明的试剂盒能够有效辅助现有方法进行肿瘤的准确分层、精准诊断和预测抗肿瘤药物治疗效果。

附图说明

[0022] 图1为本发明中探针与9号染色体上相对应的位置关系示意图；

[0023] 图2为本发明中探针与9号染色体上相对应的位置关系示意图；

[0024] 图3为本发明中探针与9号染色体上相对应的位置关系示意图；

[0025] 图4为本发明中探针与9号染色体上相对应的位置关系示意图；

[0026] 图5是断裂双色探针组的检测结果在显微镜下的照片，其中左图为人外周血培养细胞，右图为组织样本；

[0027] 图6是扩增双色探针组的检测结果在显微镜下的照片，其中左图为人外周血培养细胞，右图为组织样本；

[0028] 图7是四色探针组的检测结果在显微镜下的照片，其中，实线箭头示2RAG融合信号，虚线箭头示2Gold信号。

具体实施方式

[0029] 本发明提供了PD-L1基因异常检测方法和试剂盒，其中异常包括断裂和扩增，采用该试剂盒能准确判读样本中PD-L1基因是否异常，能够更好的辅助现有方法进行肿瘤的准确分层、精准诊断和治疗。本发明的检测试剂盒通过优化配方，实现1～2小时快速检测组织样本，有利于优化诊疗结构，减少患者等待时间。

[0030] 在一些实施例中，本发明提供了一种快速杂交体系，其中涉及DMSO的新应用；在一些实施例中，本发明提供了一种PD-L1基因异常检测探针的制备方法以及一种酶的新应用；在一些实施例中，本发明提供了四种检测试剂盒，解决临床用药前诊断需求，实现精准诊疗。

[0031] 在一些实施例中，本发明提供了用于检测PD-L1基因异常的探针，该探针同时用于扩增和重排检测，包含两种方案：

[0032] 方案一、四色探针组，即针对断裂点的红、绿探针和针对PD-L1异常扩增的扩增探针；

[0033] 方案二、两色探针组，即一组探针用于检测PD-L1基因断裂重排，另一组探针用于检测PD-L1基因扩增。两组探针的优缺点如下表1所示：

[0034] 表1两组探针的特点

[0035]

	方案一：四色探针组	方案二：两色探针组
优	一例样本同时检测两种异常，适合快速初筛。	扩增检测更准确、直观。只需双色滤块即可满足判读。
劣	对硬件有较高要求，需同时配备四色滤块。	需两张白片分别杂交、检测。

[0036] 在一些实施例中，本发明提供了探针的制备方法，包括步骤：

[0037] (1)探针设计：BAC克隆选择→购买(商品化)→标记、测试→确认探针克隆组(可用于后续生产)；

[0038] (2)探针制备：

[0039] 探针标记(使用phi29DNA聚合酶标记)→定量(#探针的点样量、长度都会影响杂交效果)→包装/待用；

[0040] (3)探针杂交体系优化：

[0041] 主要涉及杂交促进剂的使用、减少杂交时间，实现快速杂交。

[0042] 在一些实施例中，本发明提供了杂交体系的优化过程，包括如下：

[0043] (1)促进剂选择

[0044] 杂交过程中，通过增加变性剂能够影响碱基堆积力和氢键的形成，增加水的疏水

性和降低双链和单链DNA间的能量差异，降低Tm值。目前常规的杂交缓冲液中包含甲酰胺，杂交温度在37℃。此外，包含的硫酸葡聚糖因其微粒表面可以吸附DNA探针分子，使接触面积增大，有利杂交进行。有记录的核酸杂交促进剂种类较多，但在荧光原位杂交技术中主要使用的为硫酸葡聚糖和甲酰胺，也能完成FISH的基本要求，但受杂交时间较长的影响，限制了其临床应用。

[0045] 本发明通过筛选其他惰性多聚体或化学试剂，测试其对杂交结果的影响，筛选出有益于缩短杂交时间的杂交促进剂。

[0046] (2)促进剂用量调整

[0047] 鉴于某个实施方案中进行6小时和16小时杂交时，杂交背景有区域性升高。调整杂交缓冲液配方，通过优化其中配比，包括甲酰胺含量、硫酸葡聚糖用量、钠盐含量、DMSO用量等，降低背景，改善信噪比。结果显示，当硫酸葡聚糖含量增加时，能够提高信号亮度，但随着杂交时间延长，可能会增加杂交背景；当甲酰胺用量降低时，伴随增加DMSO的量，能够弥补杂交信号，满足预期要求，但低于15％时，会影响短时杂交效果。确定甲酰胺添加量在15％～50％、硫酸葡聚糖0.2～0.25g/700uL、二甲基亚砜20～30uL。

[0048] (3)样本杂交条件优化

[0049] 表2样本杂交条件的选择

[0050]

优化条件	参数
杂交温度	37、42、45℃
变性温度	78℃、82℃、85℃、90℃
杂交时间	1小时、2小时、16小时

[0051] 采用表2中各杂交条件相应的参数进行单因素和组合对比试验，发现变性85℃，杂交45℃，杂交2小时，可以实现2小时探针和样本的快速杂交。

[0052] 在一些实施例中，本发明提供了探针质控及阈值建立的过程，涉及人外周血培养细胞用于灵敏度和特异性评估(常规方法)，从而建立阈值；以及骨髓样本用于使用效果评估(基质样本来源于临床)两个方面。

[0053] 在一些实施例中，本发明提供了用于检测PD-L1基因异常的试剂盒及其制备方法。

[0054] 在一些实施例中，本发明对用于检测PD-L1基因异常的探针和试剂盒进行了临床应用评价，选择了20例左右样本进行探针和试剂盒的应用评估，并使用建立的阈值进行结果判读。

[0055] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点，下面将结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。如无特别说明，本发明中的方法均为常规方法。

[0056] 实施例1探针的制备

[0057] (1)探针设计

[0058] 包含4条探针，涉及PD-L1基因、基因两端延展序列、9号染色体着丝粒四个区段，设计过程包括：BAC克隆选择→购买(商品化)→标记、测试→确认探针克隆组(可用于后续生产)。BAC克隆筛选(参见表3)方法参照《医学遗传学数据库资源利用实例教程》赵佳等p26-28。

[0059] 表3优选的BAC克隆的组合

[0060]

	探针组
PD-L1	chr9:5,450,525-5,470,547 9p24.1
断裂探针	断裂探针位于断裂点两边，分别标记红色和绿色。当PD-L1基因未发生断裂重排时，基因完整，红绿信号相邻（间距118Kb），表现出两个融合信号；当PD-L1基因发生断裂重排时，其中断裂点处染色体会与伙伴基因（如，IGH）发生重排，此时，断裂点两边的探针会分离，在细胞中表现一红一绿的信号类型，未发生断裂的染色体则仍在细胞中表现融合的信号类型。 探针克隆选择要注意克隆的特异性，通过验证选择荧光强度满足要求的克隆制备探针。 优选的克隆组合如下： **GSP PD-L1-ba-t 374Kbp** CTD-2270E17 chr9:5,266,136-5,398,711 CTD-2652J12 chr9:5,024,451-5,262,489 **GSP PD-L1-ba-c 353Kbp** CTD-2531H15 chr9:5,517,361-5,690,206 CTD-3029D21 chr9:5,670,604-5,870,685
扩增探针	扩增探针位于待检基因（PD-L1）区，标记红色或绿色。当PD-L1基因未发生扩增时，染色体上基因区段拷贝数为1，表现为单个红色或绿色信号点，在细胞核中表现2个信号点；当PD-L1基因发生扩增时，基因区段拷贝数增多，表现为红色或绿色信号点增多，即>2个信号。因为基因扩增的机制比较复杂，表现为多种情况：（1）仅一条染色体上的基因拷贝数增多；（2）整条染色体增多；（3）两条染色体上基因拷贝数均增多。扩增模式的差异可能表现出临床表现的差异性。为了监控拷贝数增多的多种模式，设置了内参探针——CSP 9，即9号染色体着丝粒探针，标记颜色与PD-L1不同。通过计算GSP PD-L1（标为红色）与CSP 9（标为绿色）的比值，判断PD-L1是否发生扩增。 探针克隆选择要注意克隆的特异性，通过验证选择荧光强度满足要求的克隆制备探针。 优选的克隆组合如下： **GSP PD-L1-amp 156Kbp** CTD-2566P7 chr9:5,357,978-5,513,546 **CSP 9**

[0061]

	F：CATTCTCAGAATCTTCTTTGTGAT R：CTTCTGTCTAGGTTCTATGTGAAGAT

[0062] (2)探针制备

[0063] 制备流程:探针标记(使用phi29DNA聚合酶标记)→定量优化(#探针的点样量、长度都会影响杂交效果)→包装/待用。

[0064] 1)探针标记:以BAC克隆为基础模板,使用phi29DNA聚合酶,利用随机六聚体引物,常温下扩增。基因探针的标记利用phi29DNA聚合酶进行常温标记。phi29DNA聚合酶是从噬

菌体phi29中克隆出的嗜温DNA聚合酶。具有3’→5’外切酶校读能力，并且具有特殊的多重置换和连续合成特性。标记中使用短的随机六聚体引物进行扩增，扩增温度30℃，标记时间(即PCR扩展时间)12小时。

[0065] 随机六聚体引物含有6个碱基的随机序列。5`末端带有磷酸基，3`末端为羟基。序列为5`-P-d(NNNNNN)-3`，N＝G\A\C\T。随机引物的组合形式多，因此，特异性较低，但对于长的或带有二级结构区域模板扩增效果较好。探针标记中，因选择的克隆模板除载体序列(载体序列为非人基因组)外，余序列为靶区域特异互补区段。标记过程需在扩增中合成带荧光标记序列。为提高扩增效率，分别使用了随机六聚体引物、随机八聚体引物、随机十聚体引物进行测试(结果参见表4)，以PD-L1扩增探针(红色GSP PD-L1)和PD-L1断裂探针(红绿两色)克隆质粒作为扩增模板，扩增后通过对产物探针定量确定扩增得率，结果显示随机六聚体引物的扩增效果最佳，探针产率最高，相比随机八聚体引物、随机十聚体引物，随机六聚体引物扩增产率分别提高了至少110.5％、125％和227％。

[0066] 表4不同引物扩增产率比较

[0067]

	引物类型	探针 PD-L1-amp-R 得率（ng/μL）	探针 PD-L1-ba-t-R 得率（ng/μL）	探针 PD-L1-ba-c-G 得率（ng/μL）
1	随机六聚体引物	510 ng/μL	410 ng/μL	450 ng/μL
2	随机八聚体引物	156 ng/μL	190 ng/μL	200 ng/μL
3	随机十聚体引物	108 ng/μL	120 ng/μL	140 ng/μL

[0068]

[0069] R代表标记为红色；G代表标记为绿色；Amp为amplification扩增的缩写，代表扩增探针；Ba为break apart断裂分离的缩写，代表断裂探针；其后的t为telomere端粒的缩写，代表探针靠近基因的端粒端，c代表centrosome着丝粒的缩写，代表探针靠近基因的着丝粒端。

[0070] 2)试剂用量的选择：使用优化过的标记体系进行探针标记，质粒混合物的使用量分别为1ug，荧光素dUTP/dCTP的用量如下表4所示，其中内参探针与待检探针分别标记为绿色和红色，断裂探针两端分别标记为绿色和红色。

[0071] 表5标记体系

[0072]

组分名称	用量/uL
dATP(1mM)	1
dGTP(1mM)	1
dTTP(1mM)	0.4
dCTP(1mM)	0.7

Spectrum-O或G-dUTP	0.6
Spectrum-O或G-dCTP	0.3
NNNNNN(10pmol/μL)	2
质粒DNA(200ng/μL)	1
水	补足10(uL)

[0073] *青色和金色探针分别使用DEAC-dUTP和Spectrum-gold-dUTP进行标记，与dTTP的摩尔比例分别为0.5:(0.4～0.6)和0.4:(0.6～0.8)。

[0074] 配制如上表5所示体系，然后在上述溶液中依次加入10×Reaction buffer 2μL、phi29DNA聚合酶(10U/μL)4.0～6.0μL、Tween20 1μL、H_2O补足20μL。配完后混匀，30℃标记12小时，65℃10分钟灭活酶。取20μL标记产物加入1.5mL离心管，然后依次加入3mol/L醋酸钠2μl和无水乙醇50μl，混匀后置于-70℃冰箱中至少2小时，4℃13000rpm离心30分钟，去上清；加入500μl的70％乙醇，4℃13000转/分钟离心15分钟，去上清，避光干燥。

[0075] 使用100μL纯化水溶解沉淀。将溶解后的产物置于Covaris M220超声波DNA破碎仪，20℃处理40秒。完成DNA片段化后，取出产物，按照1:1.8比例使用Ampure XP纯化磁珠纯化产物，最后溶于20μL纯化水中，即得标记好的探针。取1μl使用2％琼脂糖凝胶电泳，要求在200bp左右存在弥散带。

[0076] 标记好的探针按下表5进行杂交体系配制，下表6中是几种探针组合形式，如果需要可以分别套用上述步骤完成探针的标记。

[0077] 表6杂交体系

[0078]

成份	每测试
绿色探针(50ng/μl)	0.3～0.6μl
红色探针(50ng/μl)	0.3～0.5μl
青色探针(50ng/μl)(如有)	0.5～0.8μl
金色探针(50ng/μl)(如有)	0.5～0.8μl
杂交缓冲液	7μl
COT Human DNA(1mg/ml)*	1μl
H_2O	补至10μl

[0079] *COT Human DNA是胎盘DNA，长度主要为50至300bp，并且富含重复的DNA序列，比如Alu和Kpn家族成员，通常用于阻断非特异性杂交，抑制重复DNA序列。

[0080] 实施例2杂交体系优化

[0081] 主要涉及杂交促进剂的使用减少杂交时间，实现快速杂交。

[0082] 不同条件的具体优化过程如下：

[0083] (1)促进剂选择

[0084] 杂交过程中，通过增加变性剂能够影响碱基堆积力和氢键的形成，增加水的疏水性和降低双链和单链DNA间的能量差异，降低Tm值。目前常规的杂交缓冲液中包含甲酰胺，杂交温度在37℃。此外，包含的硫酸葡聚糖因其微粒表面可以吸附DNA探针分子，使接触面积增大，有利杂交进行。有记录的核酸杂交促进剂种类较多，但在荧光原位杂交技术中主要使用的为硫酸葡聚糖和甲酰胺，也确实的完成了FISH的基本要求，但受杂交时间较长的影

响,限制了其临床应用。

[0085] 本实施例通过筛选其他惰性多聚体或化学试剂,测试其对杂交的影响,筛选出有益于缩短杂交时间的杂交促进剂(参见表7)。测试探针统一选择为100bp～500bp核酸混合物。

[0086] 表7杂交缓冲液中促进剂的优化

[0087]

杂交缓冲液	配方量				
组分	A1	B1	C1	D1	E1
甲酰胺	350 uL	350 uL	350 uL	350 uL	350 uL
柠檬酸钠缓冲液	70 uL	70 uL	70 uL	70 uL	70 uL
硫酸葡聚糖	0.15g	0.15g	0.15g	0.15g	
促进剂	碳酸亚乙酯	二甲基亚砜	聚乙二醇	聚丙烯酸	硫氰酸胍
	20 uL	20 uL	20 uL	20uL	20 uL
纯化水	补足 700 uL				

[0088] 为了测试不同杂交促进剂的影响,探针为同一探针,按照表8配制杂交液:

[0089] 表8杂交液体系

[0090]

	配方量				
组分	A2	B2	C2	D2	E2
	碳酸亚乙酯	二甲基亚砜	聚乙二醇	聚丙烯酸	硫氰酸胍
杂交缓冲液	7 uL	7 uL	7 uL	7 uL	7 uL
标记探针-B500（100~500bp）	1.6 uL	1.6 uL	1.6 uL	1.6 uL	1.6 uL
纯化水	补足 10 uL				

[0091] 以A2～E2为杂交体系,人外周血培养细胞为样本,进行杂交。杂交时间设定3个时间点,分别为1小时、2小时、6小时和16小时。杂交完成后DAPI复染,镜下评估杂交信号、背景情况。

[0092] 结果如表9所示,A-Z和B-Z即碳酸亚乙酯和二甲基亚砜具有更好的杂交效果。考虑到碳酸亚乙酯已经有过临床应用,选择二甲基亚砜(DMSO)作为后续研发测试的重点。

[0093] 表9杂交效果统计

[0094]

组分	配方量				
杂交时间	A-Z	B-Z	C-Z	D-Z	E-Z
	碳酸亚乙酯	二甲基亚砜	聚乙二醇	聚丙烯酸	硫氰酸胍
1 小时	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	无信号 背景 1+	无信号 背景 1+	无信号 背景 1+
2 小时	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 1+ 背景 1+	无信号 背景 1+	无信号 背景 1+

[0095]

6 小时	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+/2+	信号 1+ 背景 1+	信号 0/1+ 背景 1+	信号 0/1+ 背景 1+
16 小时	信号 2+ 背景 1+/2+	信号 2+ 背景 1+/2+	信号 1+ 背景 2+	信号 2+ 背景 2+	信号 1+ 背景 2+

[0096] (2)促进剂用量调整

[0097] 鉴于B1(参见表10)配方进行6小时和16小时杂交时,杂交背景有区域性升高。调整杂交缓冲液配方,通过优化其中配比,包括甲酰胺含量、硫酸葡聚糖用量、钠盐含量、DMSO用量等,降低背景,改善信噪比。

[0098] 表10杂交缓冲液配方

[0099]

组分	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**
甲酰胺	350 uL	350 uL	200 uL	200 uL	100 uL	100 uL
柠檬酸钠缓冲液	70 uL	70 uL	70 uL	70 uL	70 uL	70 uL
硫酸葡聚糖	0.2g	0.2g	0.25g	0.25g	0.25g	0.25g
二甲基亚砜	20 uL	10 uL	20 uL	30 uL	30 uL	40 uL
纯化水	补足 700 uL					

[0100] 如上表10示例分别配制杂交液。以人外周血培养细胞为样本,进行杂交。杂交时间设定4个时间点,分别为1小时、2小时、6小时和16小时。杂交完成后DAPI复染,镜下评估杂交信号、背景情况,结果如表11所示。

[0101] 表11杂交结果统计

[0102]

	1 小时	2 小时	6 小时	12 小时
B1/对照	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+/2+	信号 2+ 背景 1+/2+
B2	信号 1+/2+ 背景 1+	信号 1+/2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+
B3	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+/2+
B4	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+/2+
B5	信号 1+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+
B6	信号 1+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+	信号 2+ 背景 1+/2+

[0103] 结果如上表11显示,当硫酸葡聚糖含量增加时,能够提高信号亮度,但随着杂交时间延长,可能会增加杂交背景;当甲酰胺用量降低时,伴随增加DMSO的量,能够弥补杂交信号,满足预期要求,但低于15%时,会影响短时杂交效果。由此确定:甲酰胺添加量在15%～50%、硫酸葡聚糖0.2～0.25g/700uL、二甲基亚砜20～30uL/700uL。

[0104] (3)样本杂交条件优化,其中选择的参数如下表12所示:

[0105] 表12杂交参数的选择

[0106]

优化条件	参数
杂交温度	37、42、45℃
变性温度	78℃、82℃、85℃、90℃
杂交时间	1小时、2小时、16小时

[0107] 通过采用表12中的参数进行单因素和组合实验，发现变性温度85℃，杂交温度45℃，杂交2小时的实验效果能满足准确检测PD-L1基因异常的需求。

[0108] (4)探针用量优化

[0109] 探针组中包含4条标记颜色有差异的探针，为了优化得到最佳反应体系，先在单个体系中初步估算单条探针的用量范围(参见表13)，确定单个参数的最佳用量(即信号达到2+，背景0或1+)，然后再按两种方案分别进行反应体系优化(参见表14和15)。

[0110] 表13探针的用量范围

[0111]

	单体系中的最佳用量（uL）	说明
GSP PD-L1-ba-t	0.5~0.8	--
GSP PD-L1-ba-c	0.5~0.8	--
GSP PD-L1-amp	红色 R 标记：0.5~0.8 青色 A 标记：0.6~1.0	青色标记探针的用量要高于绿色探针。受青色染料的淬灭性影响，相对提高用量能够改善淬灭性。
CSP 9	绿色 G 标记：0.2~0.4 金色 Gold 标记：0.4~0.7	金色标记探针的用量高于绿色探针，但用量过高时，会升高背景噪声，影响阅片。

[0112] 表14四色探针(方案一)

[0113]

(uL)	A	B	C	**D**	E
杂交缓冲液	**7**	**7**	**7**	**7**	**7**
GSP PD-L1-ba-t-R	**0.5**	**0.8**	**0.5**	**0.6**	**0.5**
GSP PD-L1-ba-c-G	**0.8**	**0.5**	**0.5**	**0.6**	**0.5**
GSP PD-L1-amp-A	**0.6**	**0.6**	**0.6**	**0.8**	**1**

[0114]

CSP 9-Gold	**0.4**	**0.5**	**0.7**	**0.5**	**0.5**
COT-1 DNA	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
纯化水	0.2	0.1	0.2	0	0
总体积	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL
2 小时杂交 结果	信号 R 1+/2+ G 2+ A 2+ Gold 1+/2+ 背景 0	信号 R 2+ G 1+/2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0	信号 R 1+/2+ G 1+/2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0	信号 R 1+/2+ G 1+/2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0
过夜（10 小时）杂交 结果	信号 R 2+ G 2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0/1+	信号 R 2+ G 2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0/1+	信号 R 2+ G 2+ A 2+ Gold 2+ 背景 R/G/A 0 Gold 1+	信号 R 2+ G 2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0/1+	信号 R 2+ G 2+ A 2+ Gold 2+ 背景 0/1+

[0115] 参见表14，Red和Green探针在0.5～0.8间都取得了较好结果，但2小时和过夜杂交略有差异，即，高浓度的探针量杂交信号更稳定；Aqua探针用量0.6时能够满足检测要求，增加用量对信号无改善，背景相似；Gold探针用量0.5时能够满足要求，0.7时部分区域有背景增高情况，0.4时信号有区间差。过夜或快速杂交对背景影响不明显；过夜杂交会提高探针低浓度用量时的信号，即当信号表现一般时，通过延长杂交时间有助于改善信号亮度。COT Human DNA是胎盘DNA，长度主要为50至300bp，并且富含重复的DNA序列，比如Alu和Kpn家族成员，通常用于阻断非特异性杂交，抑制重复DNA序列。COT-1DNA用量具一定的改善背景效果，但持续增加对背景并无明显优化。本实施例中选择1.0uL添加量，能够较好抑制背景。综上所述，选择D配方作为最优配方，制备PD-L1杂交液(四色)。

[0116] 表15双色探针组(方案二)

[0117]

(uL)	A	B	C	D
杂交缓冲液	**7**	**7**	**7**	**7**
GSP PD-L1-ba-t-R	**0.5**	**0.6**	**0.7**	**0.8**
GSP PD-L1-ba-c-G	**0.5**	**0.6**	**0.7**	**0.8**
COT-1 DNA	0.5	0.5	0.5	0.5
纯化水	1.5	1.3	1.1	0.9
总体积	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL
2 小时杂交结果	信号 R 2+	信号 R 2+	信号 R 2+	信号 R 2+

[0118]

	G 1+/2+ 背景 0	G 2+ 背景 0	G 2+ 背景 0	G 2+ 背景 0
过夜（10 小时）杂交结果	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 0/1+

[0119] 参见表15，检测断裂的双色探针组中，R/G探针的用量在0.6～0.8间有较好的信噪比，且2小时或过夜杂交信号均表现稳定；G探针用量降低至0.5时，会表现杂交的不稳定性，特别是在快速短时杂交中表现明显。综上，GSPPD-L1-ba-t-R和GSP PD-L1-ba-c-G用量选择0.6～0.8。选择B配方作为最优配方，制备PD-L1(ba)杂交液(双色)。

[0120] 表16检测扩增的双色探针组

[0121]

(uL)	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
杂交缓冲液	**7**	**7**	**7**	**7**	**7**
GSP PD-L1-amp-R	**0.5**	**0.6**	**0.6**	**0.7**	**0.8**
CSP 9-G	**0.2**	**0.2**	**0.3**	**0.4**	**0.4**
COT-1 DNA	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
纯化水	1.8	1.7	1.6	1.4	1.3
总体积	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL	10 uL
2 小时杂交结果	信号 R 1+/2+ G 1+/2+ 背景 0	信号 R 2+ G 1+/2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 R 0 G 1+	信号 R 2+ G 2+ 背景 R 0/1+ G 1+
过夜（10 小时）杂交结果	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 0	信号 R 2+ G 2+ 背景 R 0 G 1+	信号 R 2+ G 2+ 背景 R 0/1+ G 1+

[0122] 参见表16，检测扩增的双色探针组中，红色R探针的用量在0.6～0.8间有较好的信噪比，且2小时或过夜杂交信号均表现稳定，过夜杂交时，背景有略微上升，不影响观察；绿色G探针的用量在0.3～0.4间有较好的信噪比，且2小时或过夜杂交信号均表现稳定；G探针用量降低至0.2时，会显示杂交的不稳定性，特别是在快速短时杂交中表现明显。综上所述，GSP PD-L1-amp-R和CSP 9-G用量分别选择0.6～0.8和0.3～0.4。因此，选择C配方作为最优配方，制备PD-L1(amp)杂交液(双色)。

[0123] 实施例3用于检测PD-L1基因异常的试剂盒

[0124] 根据使用目的差异，形成四个不同试剂盒，包括：

[0125] (1)PD-L1断裂检测试剂盒(FISH)，用于PD-L1基因断裂重排检测，包括GSP PD-L1break断裂双色探针，记录为PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c。

[0126] (2)PD-L1扩增检测试剂盒(FISH)，用于PD-L1基因扩增检测，包括GSP PD-L1(记录

为PD-L1-amp)和CSP 9双色探针。

[0127] (3)PD-L1基因异常检测试剂盒(DC)(FISH),用于PD-L1基因扩增和重排检测试剂盒,包括两组探针,其一为GSP PD-L1(记录为PD-L1-amp)、CSP 9;其二为GSP PD-L1break断裂双色探针(记录为PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c)。DC表示双色探针。

[0128] (4)PD-L1基因异常检测试剂盒(TC)(FISH),用于PD-L1基因扩增和重排检测试剂盒,包括GSP PD-L1(记录为PD-L1-amp)(青)、CSP 9(金)和GSP PD-L1break断裂双色探针(红/绿)(记录为PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c)。TC表示四色探针。

[0129] 上述标记颜色只作范例,根据需要可进行调整或互换。

[0130] 需要说明的是amp为amplification扩增的缩写,代表扩增探针;ba为break apart断裂分离的缩写,代表断裂探针;其后的t为telomere端粒的缩写,代表探针靠近基因的端粒端,c代表centrosome着丝粒的缩写,代表探针靠近基因的着丝粒端。

[0131] 除上述探针外,本实施例的检测试剂盒还包括杂交缓冲液,杂交缓冲液中含有甲酰胺15%～50%(W/W)、硫酸葡聚糖0.2～0.25g/700uL、二甲基亚砜20～30uL/700uL,以及2×SSC(柠檬酸钠缓冲液)。

[0132] 实施例4探针质控及阈值建立

[0133] 为了找到探针(实施例2)合适的检测阈值,采用人外周血培养细胞用于探针灵敏度和特异性评估(常规方法);骨髓样本用于探针的使用效果评估(基质样本来源于临床)。具体的处理步骤如下:

[0134] 4.1制片

[0135] •取骨髓2～3ml(肝素钠抗凝)2000rpm离心5分钟,去大部分上清;

[0136] •取1ml细胞加入10ml的0.075M KCl,吹打混匀,静置2分钟;

[0137] •37±1℃恒温水浴锅低渗20分钟;

[0138] •加卡诺氏固定液1ml,吹打混匀,室温预固定10分钟;

[0139] •吹打混匀,2000rpm离心5分钟;

[0140] •去上清,沉淀加固定液10ml,吹打混匀,-20℃静置30分钟;

[0141] •2000rpm离心5分钟,去上清;

[0142] •加入适量固定液重悬细胞,取3μl悬液滴加到干净的载玻片上;

[0143] 4.2预处理/变性杂交

[0144] •将滴好的玻片置于室温2×SSC溶液中浸泡2分钟;

[0145] •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;

[0146] •处理好的样本片待用。

[0147] •取出包含探针的杂交液,平衡至室温;

[0148] •杂交液滴至盖玻片,然后将样本片反转,对齐后轻合。轻压使探针均匀分布,避免产生气泡;

[0149] •湿润原位杂交仪湿度条,将玻片置于原位杂交仪上,关闭原位杂交仪盖,设置“Denat&Hyb”程序,变性78±1℃2分钟,杂交37±1℃1～16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)。

[0150]　4.3洗涤复染

[0151]　•关闭杂交仪电源，取出玻片，去除盖玻片；

[0152]　•样本片放入72±1℃0.3%NP-40/SSC中2分钟；

[0153]　•取出，将其放入室温0.1%NP-40/2×SSC中30秒；

[0154]　•取出，再将其放入室温70%、90%、100%乙醇中各2分钟脱水；

[0155]　•取出，暗处自然干燥玻片；

[0156]　•室温，滴加10μl DAPI复染剂，暗处存放，待观察。

[0157]　检测结果参见图5～7和表17，图5左图显示人外周血培养细胞中期染色体上可见双色探针杂交于预期靶区域，显示重叠融合信号(实线箭头示)；右图的骨髓组织样本检测可见双黄色/融合信号，表示PD-L1基因未断裂，表现重叠融合信号。

[0158]　图6左图显示人外周血培养细胞中期染色体上可见双色探针杂交于预期靶区域，显示为着丝粒绿色信号(虚线箭头示)和基因红色信号(实线箭头示)；右图的骨髓组织样本检测可见2红2绿信号，表明PD-L1基因未扩增。

[0159]　图7显示四色探针在骨髓样本中检测结果，其中实线箭头指示示2RAG融合信号，虚线箭头指示2Gold信号，表示PD-L1基因无异常。

[0160]　综上所述，实施例2的探针在骨髓样本中的检测信号明亮，方案一和方案二的检测结果符合预期。

[0161]　表17标记不同颜色的三组探针的检测结果

[0162]

		中期染色体	骨髓样本
方案一（D 配方）	四色探针组	2Gold 2RAG	2Gold 2RAG
方案二（B 配方）	断裂双色探针组	2F	2F
	扩增双色探针组	2R2G	2R2G

[0163]　表17中，F表示红绿融合信号，即R红和G绿色信号接近或重合时表现为融合信号；RAG示红青绿融合信号，即R红、G绿和A青三种颜色信号接近或重合时表现为融合信号。

[0164]　本实施例中包括四条探针，分别为PD-L1-amp、CSP 9、PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c。其中，PD-L1-amp和内参探针CSP 9用于PD-L1扩增检测；PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c用于PD-L1断裂重排的检测。图1示出了上述探针间的关系及对应9号染色体上位置。

[0165]　计数100个人外周血培养细胞，分别计算典型异常和正常细胞比例，计算异常细胞平均值，计算标准差，以平均值±3SD作为探针组的阈值范围，结果如下表18所示，异常细胞比例超过阈值，即可判断检测结果为阳性。

[0166]　表18阈值

[0167]

[0168]

	平均值	标准差STDEV	均值+3*STDEV（阈值）
四色探针组	0.350	0.587	2 %
断裂双色探针组	0.400	0.754	3 %
扩增双色探针组	0.400	0.598	2 %

[0169]　实施例5检测试剂盒的组成

[0170]　用于检测PD-L1基因异常的试剂盒可以组装成四类产品，均包含杂交缓冲液和探针两个组分，及用于包装的试剂盒、说明书。四类试剂盒的组分分别说明如下：第一类试剂

盒:对应四色探针组,其组成如表19和20所示。

[0171] 表19

[0172]

(uL)	配方
杂交缓冲液	7
GSP PD-L1-ba-t-R	0.6
GSP PD-L1-ba-c-G	0.6
GSP PD-L1-amp-A	0.8
CSP 9-Gold	0.5
COT-1DNA	0.5
纯化水	0
总体积	10uL

[0173] 表20试剂盒组成(5人份/盒)

[0174]

组成	数量	装量
PD-L1 扩增/断裂杂交液(四色,表 18)	1 管	50 uL/管
说明书	1 份	--

[0175] 第二类试剂盒:对应双色探针组,包括断裂双色探针组和扩增双色探针组,其组成如表21、22和23所示。

[0176] 表21

[0177]

断裂双色探针	组成(uL)
杂交缓冲液	7
GSP PD-L1-ba-t-R	0.6
GSP PD-L1-ba-c-G	0.6
COT-1DNA	0.5
纯化水	1.3
总体积	10uL

[0178] 表22

[0179]

[0180]

扩增双色探针组	组成(uL)
杂交缓冲液	7
GSP PD-L1-amp-R	**0.6**
CSP 9-G	**0.3**
COT-1 DNA	0.5
纯化水	1.6
总体积	10 uL

[0181] 表23试剂盒组成(5人份/盒)

[0182]

组成	数量	装量

PD-L1断裂杂交液(表20)	1管	50uL/管
PD-L1扩增杂交液(表21)	1管	50uL/管
说明书	1份	--

[0183] 第三类试剂盒:对应断裂双色探针组,其组成如表24和25所示。

[0184] 表24

[0185]

断裂双色探针	组成(uL)
杂交缓冲液	7
GSP PD-L1-ba-t-R	0.6
GSP PD-L1-ba-c-G	0.6
COT-1DNA	0.5
纯化水	1.3
总体积	10uL

[0186] 表25试剂盒组成(5人份/盒)

[0187]

组成	数量	装量
PD-L1断裂杂交液(表23)	1管	50uL/管
说明书	1份	--

[0188] 第四类试剂盒:对应扩增双色探针组,其组成如表26和27所示。

[0189] 表26

[0190]

扩增双色探针组	组成(uL)
杂交缓冲液	7
GSP PD-L1-amp-R	0.6
CSP 9-G	0.3
COT-1DNA	0.5
纯化水	1.6
总体积	10uL

[0191] 表27试剂盒组成(5人份/盒)

[0192]

组成	数量	装量
PD-L1 扩增杂交液（表 25）	1 管	50 uL/管

[0193]

说明书	1 份	--

[0194] 实施例6临床应用评价

[0195] 应用例一:在肺癌样本中的应用

[0196] 收集20例福尔马林固定石蜡包埋的肺癌肿瘤组织样本,切片厚度4um。使用实施例5中第二类“双色探针组”试剂盒,包括断裂双色探针组和扩增双色探针组。分别在两张样本片中对PD-L1基因扩增和/或重排进行检测。以红/绿信号比值≥2.0作为扩增阳性的判断标准,以出现断裂信号作为重排阳性的判断标准。样本结果判断时,以高于阈值(2%)作为阳

性判断的标准。当异常细胞比值低于阈值时判断为阴性；当异常细胞比值高于阈值时判断为阳性；在阈值附近时，则增加计数细胞至100个，若仍为阈值附近，则在结果中进行说明。计数50个肿瘤细胞，记录阳性细胞数。

[0197] 上述肿瘤组织样本处理方法，包括如下步骤：

[0198] 1、玻片预处理

[0199] 1.1玻片放入65±5℃恒温箱中或者恒温加热台上烤片过夜；

[0200] 1.2取出玻片，将其放入室温二甲苯(或二甲苯替代剂)中，10分钟；

[0201] 1.3取出玻片，将其放入室温另一缸二甲苯(或二甲苯替代剂)中，10分钟；

[0202] 1.4取出玻片，再将其放入室温无水乙醇中10分钟；

[0203] 1.5取出玻片，再将其放入室温100％乙醇、90％乙醇、70％乙醇各3分钟；

[0204] 1.6取出玻片，再将其放入室温纯化水中3分钟，甩去多余水分；

[0205] 1.7将其放入100±5℃的纯化水中煮片25分钟(确保样本区域与容器不接触)；

[0206] 1.8取出玻片，室温晾干；

[0207] 1.9将玻片正面朝上平置，在样本区域滴加200μl的胃蛋白酶工作液(胃蛋白酶工作液使用前，在37±1℃预热10～15分钟；以覆盖全部组织部分为准)，消化5～20分钟(可通过预试验确定酶效力)；

[0208] 1.10将多余液体甩去，玻片放入室温2×SSC中3分钟；

[0209] 1.11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；

[0210] 1.12取出玻片，室温晾干。

[0211] 2、样品和探针同时变性/杂交(避光操作)

[0212] 2.1从-20±5℃冰箱中取出探针，震荡混匀，瞬时离心；

[0213] 2.2加10μl的探针到杂交区域，迅速盖上22×22mm盖玻片，轻压使探针均匀分布，避免产生气泡；

[0214] 2.3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；

[0215] 2.4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85℃5分钟，杂交37℃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)。

[0216] 3、杂交后洗涤及复染(避光操作)

[0217] 3.1洗涤前30分钟，将2×SSC，0.1％NP-40/2×SSC，放入37±1℃的恒温水浴锅中，测量以确保温度合适；

[0218] 3.2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2×SSC中微微摇晃，以利于其脱落)；

[0219] 3.3玻片放入37±1℃2×SSC中10分钟；

[0220] 3.4取出玻片，再将其放入37±1℃0.1％NP-40/2×SSC中5分钟；

[0221] 3.5取出玻片，室温70％乙醇中3分钟；

[0222] 3.6取出玻片，在暗处晾干；

[0223] 3.7室温，滴加10μl原位杂交蓝染染色液至干燥的22×22mm盖玻片上，反转样本片，使盖玻片分别与载玻片的目标区域接触，反转后轻压，避免产生气泡，在暗处存放，待观察。

[0224]　第二类试剂盒包括两组双色探针，模式图如图2和3所示。如图2所示，包括两条探针，分别为PD-L1-amp(红色)和CSP 9(绿色)；PD-L1-amp和内参探针CSP 9用于PD-L1扩增检测；如图3所示，包括两条探针，分别为PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c，分别为红色或绿色，PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c用于PD-L1断裂重排的检测。检测结果如表28所示。

[0225]　表28 PD-L1基因异常检测结果

[0226]

	扩增检测		重排检测	
样本编号	信号类型	检测结果	信号类型	检测结果
1	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
2	≥2R2G	R 228/G 102=2.24，扩增阳性	2F	阴性
3	2R2G	R 101/G 100=1.01，扩增阴性	2F	阴性
4	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
5	2R2G	R 115/G 102=1.03，扩增阴性	2F	阴性
6	2R2G	R 143/G 127=1.13，扩增阴性	2F	阴性
7	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
8	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
9	≥2R2G	R 228/G 102=2.2，扩增阳性	2F	阴性
10	≥2R2G	70% GSP PD-L1 拷贝数≥5，扩增阳性	2F	阴性
11	2R2G	R 107/G 161=0.66，扩增阴性	2F	阴性
12	2R2G	R 113/G 116=0.97，扩增阴性	2F	阴性
13	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
14	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
15	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
16	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
17	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
18	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
19	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性
20	2R2G	R 100/G 100=1.00，扩增阴性	2F	阴性

[0227]　其中，F指融合信号，即红色(R)和绿色(G)信号相邻或重合。

[0228]　应用例二：在弥漫大B细胞淋巴瘤中的应用

[0229]　收集20例福尔马林固定石蜡包埋的弥漫大B细胞淋巴瘤(DLBCL)肿瘤组织样本(具体的组织样本处理方法参见应用例一)，切片厚度4um。使用实施例5中第一类“四色探针组”进行检测，试剂盒基于FISH方法进行检测。样本结果判断时，以高于阈值(2%)作为阳性判断的标准。当异常细胞比值低于阈值时判断为阴性；当异常细胞比值高于阈值时判断为阳性；在阈值附近时，建议增加计数细胞至100个，若仍为阈值附近，则在结果中进行说明。要求计数50个肿瘤细胞，记录阳性细胞数。

[0230]　第一类试剂盒包括四色探针，模式图如图4所示，图4示出了探针间的关系及对应9号染色体上位置。本应用例中包括四条探针，分别为PD-L1-amp、CSP 9、PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c；其中，PD-L1-amp和内参探针CSP 9用于PD-L1扩增检测；PD-L1-ba-t和PD-L1-ba-c用于PD-L1断裂重排的检测。检测结果如表29所示。

[0231] 表29 PD-L1基因异常检测结果

[0232]

样本编号	信号类型	检测结果
1	2F2A2Gold	阴性
2	2F2A2Gold	阴性
3	2F2A2Gold	阴性
4	2F2A2Gold	阴性
5	2F2A2Gold	阴性
6	2F2A2Gold	阴性
7	2F2A2Gold	阴性
8	2F2A2Gold	阴性
9	2F2A2Gold	阴性
10	4F4A4Gold	PD-L1 基因获得（gain），阳性细胞比例
11	4F4A4Gold	PD-L1 基因获得（gain），阳性细胞比例
12	2F2A2Gold	阴性
13	2F2A2Gold	阴性
14	2F2A2Gold	阴性
15	2F2A2Gold	阴性
16	2R2G2A2Gold	PD-L1 易位阳性，阳性细胞比例
17	2F2A2Gold	阴性
18	2F2A2Gold	阴性
19	2F2A2Gold	阴性
20	2F2A2Gold	阴性

[0233] 其中,F指融合信号,即红色(R)和绿色(G)信号相邻或重合。

[0234] 综上所述,通过检测结果的判读,针对不同使用场景,本发明的试剂盒能够准确判断样本PD-L1基因的异常。

[0235] 最后应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

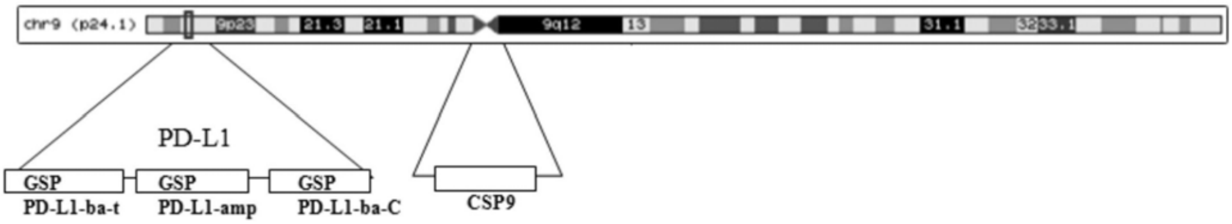

chr9 (p24.1)
9p23
21.3
21.1
9q12
13
31.1
32
33.1
PD-L1
GSP
PD-L1-ba-t
GSP
PD-L1-amp
GSP
PD-L1-ba-C
CSP9

图1

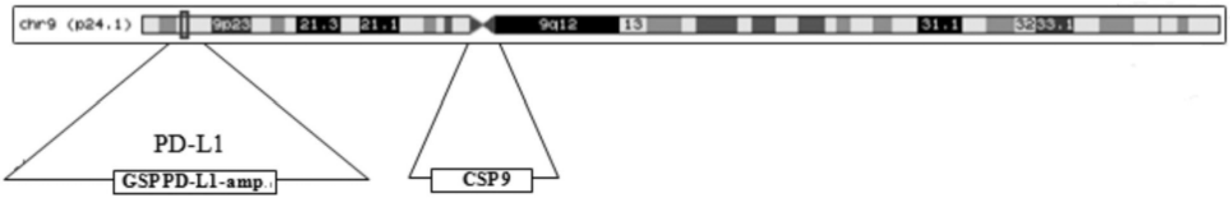

chr9 (p24.1)
9p23
21.3
21.1
9q12
13
31.1
32
33.1
PD-L1
GSPPD-L1-amp
CSP9

图2

chr9 (p24.1)
9p23
21.3
21.1
9q12
13
31.1
32
33.1
PD-L1
GSPPD-L1-ba-t
GSPPD-L1-ba-C

图3

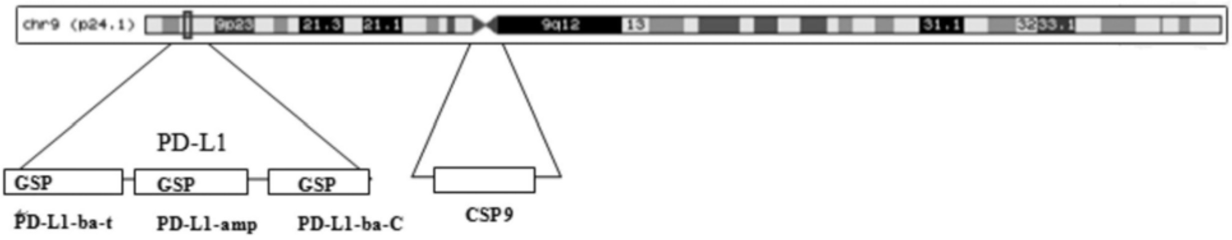

chr9 (p24.1)
9p23
21.3
21.1
9q12
13
31.1
32
33.1
PD-L1
GSP
PD-L1-ba-t
GSP
PD-L1-amp
GSP
PD-L1-ba-C
CSP9

图4

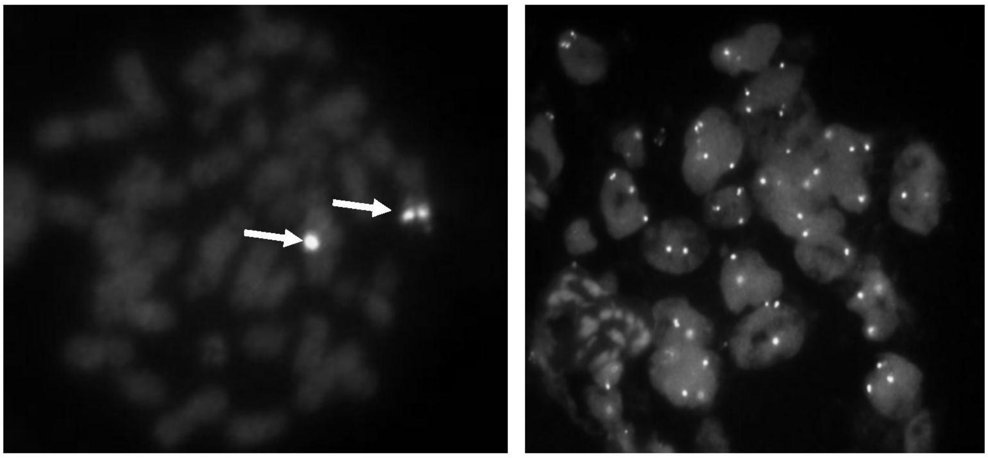


图5

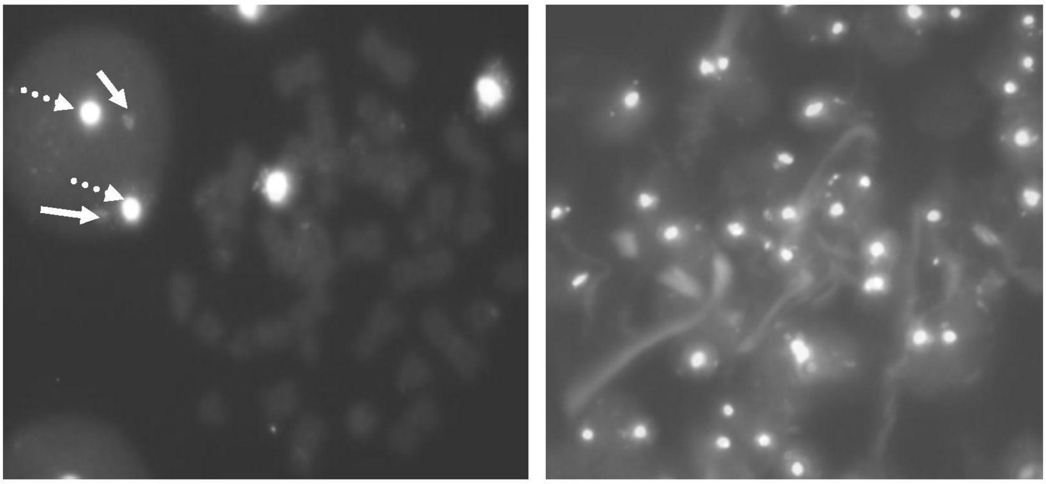


图6

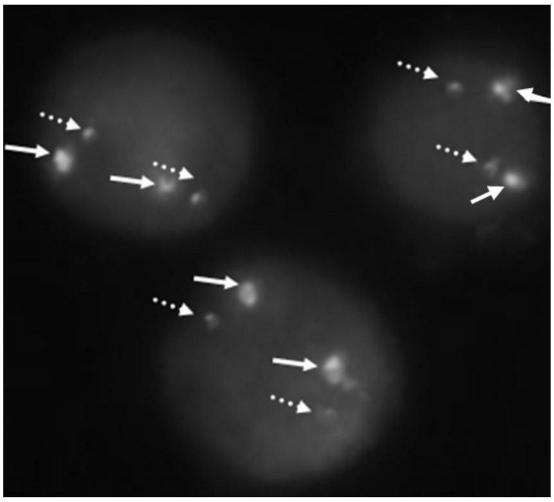


图7