

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.01.01

· 临床研究技术 ·

联合运用 Triton X-100 和多聚甲醛改善血液肿瘤骨髓标本荧光原位杂交检测质量*

傅菁^{1a}, 谢珊珍^{1b}, 叶常姜², 黄慧芳^{1b} (1. 福建医科大学附属协和医院 a. 福建省血液病研究所, 福建省血液病学重点实验室, b. 中心实验室, 福州 350001; 2. 北京金菩嘉医疗科技有限公司, 北京 100000)

摘要: **目的** 通过联合运用 Triton X-100 和多聚甲醛 (PFA) 处理玻片, 改善血液肿瘤骨髓标本荧光原位杂交 (FISH) 检测质量。**方法** 42 例血液肿瘤患者骨髓标本玻片, 在常规 FISH 流程中, 实验组增加 Triton X-100/4% PFA 预处理步骤, 对照组按照常规步骤进行。配对比较实验组与对照组中未见杂交信号细胞数和阳性细胞比例。当实验组与对照组结果不一致时, 骨髓增生异常综合征 (MDS) 标本通过扩大计数范围验证准确性, 多发性骨髓瘤 (MM) 标本采用荧光免疫表型结合间期原位杂交 (FISH) 检测验证准确性。**结果** 与对照组相比, 实验组杂交区域非特异性荧光信号减少, 背景干净, 细胞核内探针信号更清晰, FISH 检测成功率达 100%。实验组中未见杂交信号的细胞比例为 $(4.30 \pm 3.30)\%$, 对照组为 $(8.04 \pm 5.45)\%$, 二者配对差值 (实验组-对照组) 为 $(-3.74 \pm 4.27)\%$, 实验组未见杂交信号的细胞比例低于对照组 ($P < 0.001$)。实验组与对照组判读结果一致的 132 个信号位点中, 实验组的阳性细胞比例为 $(82.16 \pm 23.89)\%$, 对照组为 $(77.10 \pm 23.56)\%$, 二者配对差值 (实验组-对照组) 为 $(5.06 \pm 10.08)\%$, 实验组阳性细胞比例高于对照组 ($P < 0.001$)。此外, 实验组与对照组的判读结果不一致的 5 个检测位点, 验证结果与实验组结果一致。**结论** 联合运用 Triton X-100/4% PFA 能够提高骨髓标本间期 FISH 检测成功率和阳性位点检出率。

关键词: 荧光原位杂交; Triton X-100; 多聚甲醛; 骨髓

中图分类号: R446

文献标志码: A

Combining Triton X-100 and Paraformaldehyde to Optimize Bone Marrow FISH Detection of Hematological Tumors

FU Qiang^{1a}, Xie Shanzhen^{1b}, Ye Changjiang², Huang hui芳^{1b} (1. Fujian Medical University Union Hospital a. Fujian Institute of Hematology, Fujian Provincial Key Laboratory on Hematology, b. Central Laboratory, Fuzhou 350001; 2. Beijing GP Medical Technologies, Ltd. Beijing 100000)

Abstract: **Objective** Improve the fluorescence in situ hybridization (FISH) detection quality of hematological tumor bone marrow samples by using Triton X-100 and paraformaldehyde (PFA) in combination to pretreat sample slides. **Methods** For 42 patients with hematological tumors on bone marrow specimen slides, in routine FISH procedure, the experimental group added Triton X-100/ 4% PFA pretreatment step, and the control group followed the routine steps. The number of cells with no hybridization signal and the proportion of positive cells in the experimental group and the control group were paired and compared. In addition, when the results of the experimental group and the control group are inconsistent, the accuracy of the myelodysplastic syndrome (MDS) samples is verified by expanding the count range, and multiple myeloma (MM) samples are combined with fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms (FISH) detection and verification. **Result** Compared with the control group, the experimental group had fewer non-specific fluorescence signals in the hybridization area, a clean background, clearer probe signals in the nucleus, and a FISH detection success rate of 100%. The average of the proportion of cells without hybridization signal in the experimental group was $(4.30 \pm 3.30)\%$, the control group was $(8.04 \pm 5.45)\%$, and the paired difference between the two (experimental group - control group) was $(-3.74 \pm 4.27)\%$. The proportion of cells with no hybridization signal in the experimental group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.001$). Among the 132 signal sites where the interpretation results of the experimental group and the control group were consistent, the average ratio of positive cells in the experimental group was $(82.16 \pm 23.89)\%$, and the control group was $(77.10 \pm 23.56)\%$. The paired difference between the two (experimental group - control group) was $(5.06 \pm 10.08)\%$, and the proportion of positive cells in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.001$). In addition, the 5 detection sites where the interpretation results of the experimental group and the control group are inconsistent, the

* 基金项目: 国家临床重点专科建设项目; 福建省临床重点专科建设项目; 福建省血液医学中心建设项目 [闽政办 (2017) 4 号]; 福建省高水平实验研究平台建设项目 (闽 201704); 福建医科大学启航基金 (2016QH031)。

作者简介: 傅菁, 1986 年生, 女, 主管技师, 硕士, 研究方向为血液病遗传学检验。

通信作者: 黄慧芳, 博士, 主任技师, E-mail: huanghui@126.com。

verification results as the same as the experimental group. Conclusion The combined use of Triton X-100/4% PFA can improve the success rate of interphase FISH detection and the detection rate of positive sites in bone marrow samples.

Key Words: fluorescence in situ hybridization; Triton X-100; paraformaldehyde; bone marrow

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术能够在荧光显微镜下直接观察探针信号,分析 DNA 序列变化,安全、快速、特异性好、灵敏度较高,被广泛应用于血液病的诊断分型、鉴别诊断、预后判断及移植后监测等方面^[1]。

有效、清晰的荧光信号是保障 FISH 检测质量的关键。但在抽取骨髓液标本的过程中,尤其是白血病患者与多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 患者的骨髓液,容易发生不同程度的凝固,导致背景荧光信号杂乱,非特异性荧光信号较强,探针信号微弱或缺失。此外,骨髓标本中过多的纤维丝和细胞间的强粘附性等因素,也可能导致 FISH 探针信号进入细胞困难,造成 FISH 检测失败。

Triton X-100 是一种表面活性剂,可以增强膜表面通透性。多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 是一种广泛用于免疫组化的固定剂,能保持组织的抗原性和细微结构^[2]。本研究尝试在常规 FISH 实验流程中增加联用 Triton X-100 和 PFA 处理标本玻片步骤,以期获得更加清晰、有效的探针信号,改善间期 FISH 检测探针信号质量,提高 FISH 检测成功率及阳性信号检出率。

1 材料与方法

1.1 临床资料 收集 2018 年在福建医科大学附属协和医院血液科就诊的 42 例血液肿瘤患者的骨髓标本,其中 MM 25 例,慢性髓细胞白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) 8 例,骨髓增生异常综合征 (myelodysplastic syndromes, MDS) 6 例,急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 2 例,急性原始粒细胞白血病部分分化型 (acute myeloid leukemia-M2, AML-M2) 1 例,诊断标准参照《血液学诊断及疗效标准》第 4 版^[3]。其中男 29 名,女 13 名,年龄 9~88 岁,中位年龄 55.5 岁。建立各探针检测阈值共采用 10 例健康供者的骨髓标本,男 7 例,女 3 例,年龄 22~45 岁,中位年龄 34.5 岁。以上所有取样均获得患者知情同意,并通过福建医科大学附属协和医院伦理委员会批准 (批准文号: 2016KY050)。

1.2 FISH 检测 检测所用探针均购自北京金菩嘉公司。取 -20 ℃ 保存的固定后的骨髓单个核细胞

悬液,用新鲜固定液 (甲醇:冰醋酸 = 3:1) 调至合适浓度滴片,按照试剂盒提供的 FISH 操作说明书操作, Olympus BX51 荧光显微镜在 4,6-二脒基-苯基吡啶 (DAPI)/异硫氰酸荧光素 (FITC)/罗丹明 (RHOD) 三色滤光镜下观察杂交信号。

结果判读:每份标本分析 200 个细胞,不计重叠细胞,按照探针说明书,以 75% 以上细胞核中均有杂交信号为满意标本。用 FISH 分析软件进行图像分析。FISH 结果判读采用双盲实验,由 2 名有经验的检验者进行判读。采用 10 例健康供者的骨髓标本作为正常对照建立各探针检测阈值,以大于正常对照组 $\bar{x}+3s$ 作为判断阳性的阈值。

1.3 Triton X-100/4% PFA 预处理对 FISH 检测的改良作用 取 -20 ℃ 保存的固定后的骨髓单个核细胞悬液,用新鲜固定液 (甲醇:冰醋酸 = 3:1) 调至合适浓度滴片,用 Triton 100-X/4% PFA (4% PFA: 0.5% Triton X-100 = 1:1) 预处理 1 min,吸干液体后置 37 ℃ 预温的 2×柠檬酸钠盐 (SSC) 溶液中温浴 10 min。后续实验步骤同 1.2。

1.4 MM 骨髓标本荧光免疫表型结合间期原位杂交技术 (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms, FICTION) 检测 肝素钠抗凝骨髓液充分裂解红细胞后,用 -20 ℃ 预冷甲醇预固定,调至合适浓度滴片, Triton X-100/4% PFA 固定标本玻片 10 min,后续实验步骤同 1.2。翌日杂交结束后,先后用小鼠抗人 CD138 抗体 (一抗) 和 AMCA 标记的山羊抗小鼠 IgH 抗体 (二抗) (以上抗体均购自美国 Pepro Tech 公司) 室温避光温育 1 h。充分洗涤后加 DAPI 复染, Olympus BX51 荧光显微镜在 AQUA/FITC/RHOD 三色滤光镜下观察信号。每份标本分析 100 个胞浆染为蓝色的浆细胞,不计重叠细胞。结果判读和阈值建立同 1.2。

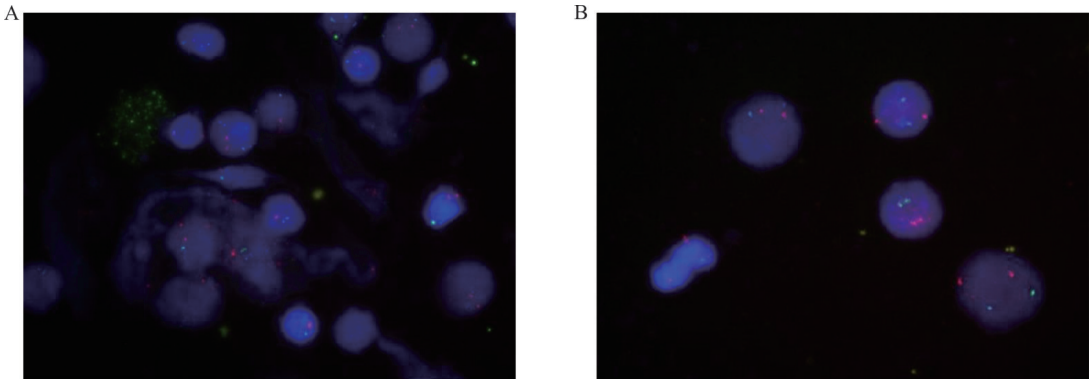
1.5 统计学分析 用 SPSS25.0 软件进行。计量资料的组间比较采用配对 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Triton X-100/4% PFA 预处理后的 FISH 探针信号更清晰 对照组 FISH 检测杂交区域非特异性

信号杂乱,背景荧光强,探针内信号较小,易受背景及非特异性荧光信号干扰,结果判读困难。经 Triton X-100/4% PFA 处理后,杂交区域非特异性

荧光信号减少,背景干净,细胞核内探针信号更清晰,以 FITC 标记的绿色荧光信号改善效果显著,见图 1。



注:A,对照组,背景荧光杂乱,探针信号小;B,实验组,背景干净,探针信号清晰。

图 1 Triton X-100/4% PFA 预处理后对 FISH 检测探针信号的影响(×1 000)

2.2 Triton X-100/4% PFA 预处理标本玻片能够提高 FISH 检测成功率 42 例标本中共检测 148 个探针位点,对照组有 11 个位点因杂交信号细弱、非特异性荧光信号杂乱干扰无法分析,有的甚至细胞核内无杂交信号,导致 FISH 检测失败,检测失败率为 7.43%(11/148);Triton X-100/4% PFA 预处理的实验组,FISH 检测成功率达 100%(148/148)。

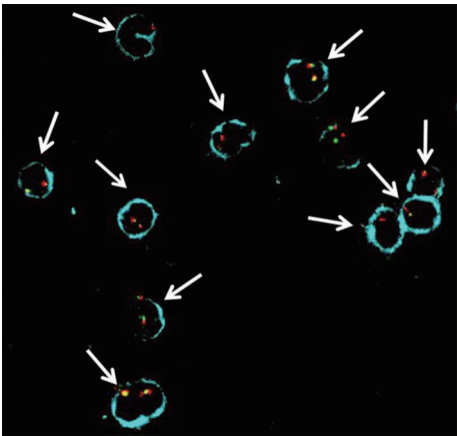
剔除杂交失败的 11 个位点后,对有杂交信号的 137 个检测位点,分别分析 200 个细胞核中的信号,实验组中未见杂交信号的细胞比例为 $(4.30 \pm 3.30)\%$,对照组为 $(8.04 \pm 5.45)\%$,二者配对差值(实验组-对照组)为 $(-3.74 \pm 4.27)\%$,实验组未见杂交信号的细胞比例低于对照组($P < 0.001$)。

2.3 Triton X-100/4% PFA 预处理标本玻片使 FISH 检测结果更准确 在 137 个检测位点中,实验组与对照组的判读结果一致的有 132 个位点,其中实验组的阳性细胞比例为 $(82.16 \pm 23.89)\%$,对照组为 $(77.10 \pm 23.56)\%$,二者配对差值(实验组-对照组)为 $(5.06 \pm 10.08)\%$,实验组阳性细胞比例高于对照组($P < 0.001$)。

此外,有 5 个检测位点,实验组与对照组的判读结果不一致,见表 1。除 3 号标本来自 MDS 患者外,其余均来自 MM 患者。为明确哪组结果更接近真实情况,4 份 MM 标本均采用 FICTION 进行验证,FICTION 检测的判读结果均与实验组一致,图 2 展示了 25 号标本的 FICTION 检测信号。3 号标本经扩大计数范围至 500 个细胞后,对照组阳性细胞比例为 3.0%,最终判定为阴性,与实验组一致。

表 1 实验组与对照组判读结果不一致的 5 个检测位点

标本 编号	病种	探针	FISH		增加计 数至 500 个细胞	FICTION
			实验组	对照组		
3	MDS	-5(1G1R)	-	+	-	/
27	MM	1q21 扩增(3R)	-	+	/	-
34	MM	P53 缺失(1G)	-	+	/	-
37	MM	1q21 扩增(3R)	+	-	/	+
41	MM	1q21 扩增(3R)	+	-	/	+



注:箭头所指均为浆细胞,探针为 GLP IgH(断裂重组探针)

图 2 25 号标本 FICTION 检测信号(×1 000)

3 讨论

作为常规染色体核型检查的重要补充,间期 FISH 检测在血液肿瘤诊疗中应用广泛。FISH 检测时,由于在激发光照射下,标本背景成分中的核蛋白、胞质蛋白、胶原纤维等均可产生荧光,容易形成非特异性背景荧光^[4]。背景荧光强度强,判读信号荧光易受干扰;背景荧光弱,则信号荧光清晰显著,易于准确判读。因此,FISH 检测时,除了要保证杂

交成功,还应注意减弱背景荧光,增强信号荧光,即提高信噪比。

血液肿瘤细胞中往往含有较多的胞核蛋白和/或胞浆蛋白,干扰了探针与基因组 DNA 结合,致使探针信号不稳定^[5],最终可能造成间期 FISH 检测失败。另外,我们在临床工作中也发现,某些标本出现细胞核轮廓不清或空洞,背景荧光信号杂乱,非特异性荧光信号强,探针信号拉丝现象严重、信号细弱甚至缺如等现象,导致人工阅片过程费时费力,判读结果误差大,遇到复杂信号模式时,极易受到非特异荧光信号的干扰而造成误判。这种情况与石蜡组织标本 FISH 检测中蛋白酶消化不完全时表现相似。

骨髓标本间期 FISH 常规操作流程中,没有消化步骤^[6],且骨髓标本与石蜡组织标本不同,蛋白酶消化时间难以掌握,因此,我们尝试联合非离子化学表面活性剂 Triton X-100 和交联固定剂 PFA 进行杂交前预处理。Triton X-100 对疏水分子具有很高的结合亲和力,能够溶解磷脂膜,从而允许探针进入细胞核^[7-8]。PFA 是核酸最有效的固定剂,且没有自发荧光^[9]。PFA 在固定细胞膜和细胞内蛋白的同时,能够在一定程度上提高细胞膜的通透性,并可能与 Triton X-100 呈现协同作用^[10]。有报道称^[11],运用 Triton X-100 和 4% PFA 作为固定/渗透化合物能够增强肽核酸-荧光原位杂交的荧光信号强度。

本研究发现,与常规流程 FISH 检测相比,经 Triton X-100/4% PFA 处理后,荧光显微镜下标本的非特异性荧光干扰显著减少,探针信号拉丝现象减少,信号点更清晰,尤以 FITC 标记的绿色信号效果显著。同时,经 Triton X-100/4% PFA 处理的标本,预处理时间从原来的 30 min 缩短至 10 min,且未见杂交信号的细胞的比例明显降低,阳性细胞的比例也显著提高。这不仅有效地缩短了实验操作时间,提高工作效率,而且使 FISH 检测成功率提高至 100%,有效地降低了判读复杂异常时的个人主观差异,使实验结果更加客观可靠。对实验组与对照组判定结果不一致的 4 例 MM 标本,我们进一

步采用 FICTION 检测方法进行验证,发现 4 例标本的判读结果均与实验组一致。1 例实验组与对照组结果不一致的 MDS 标本,经扩大技术范围至 500 个细胞后,最终判为阴性,该结果与实验组一致。

综上所述,通过在杂交前对标本玻片进行 Triton X-100/4% PFA 预处理,能够提高骨髓标本间期 FISH 检测成功率和阳性位点检出率。因此,在骨髓标本的 FISH 检测时,检验人员可以根据病种、标本状态和具体实验条件,酌情增加 Triton X-100/4% PFA 处理步骤,以期获得更加清晰的探针荧光信号。

4 参考文献

- [1] Gonzales PR, Mikhail FM. Diagnostic and prognostic utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in acute myeloid leukemia[J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2017, 12(6): 568-573.
- [2] 朱小兰, 张威, 骆新兰, 等. 不同固定剂对肾穿刺冷冻切片免疫荧光染色的影响[J]. *诊断病理学杂志*, 2013, 20(7): 441.
- [3] 沈悌, 赵永强. 血液病诊断及疗效标准[M]. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2018.
- [4] 徐明堂, 赵焕芬, 何春年, 等. 实时控制 FISH 预处理中酶消化的操作[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(9): 1053-1055.
- [5] Keyvanfar K, Weed J, Swamy P, *et al.* Interphase chromosome flow-FISH[J]. *Blood*, 2012, 120(15): e54-e59.
- [6] Barbara Beatty 等编. 荧光原位杂交技术[M]. 王瑛, 张诗武, 译. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2003: 42-43.
- [7] Morrisette JJD, Bagg A. Acute myeloid leukemia: conventional cytogenetics, FISH, and molecuolocentric methodologies[J]. *Clin Lab Med*, 2011, 31(4): 659-686.
- [8] Rocha R, Almeida C, Azevedo NF. Influence of the fixation/permeabilization step on peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA-FISH) for the detection of bacteria[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0196522.
- [9] Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, *et al.* Fixation and permeabilization of cells and tissues[J]. *CSH Protoc*, 2008, 2008: pdb.top36.
- [10] Cheng R, Zhang F, Li M, *et al.* Influence of fixation and permeabilization on the mass density of single cells; a surface plasmon resonance imaging study[J]. *Front Chem*, 2019, 7: 588.

(收稿日期:2020-10-15)

(本文编辑:王海燕)