



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109406768 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201811311740.1

(22)申请日 2018.11.06

(71)申请人 扬州大学

地址 225000 江苏省扬州市开发区大学南路88号

(72)发明人 朱家桥 刘宗平 卞建春 刘学忠
袁燕 顾建红 张江虹

(74)专利代理机构 南京苏科专利代理有限责任公司 32102

代理人 董旭东

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

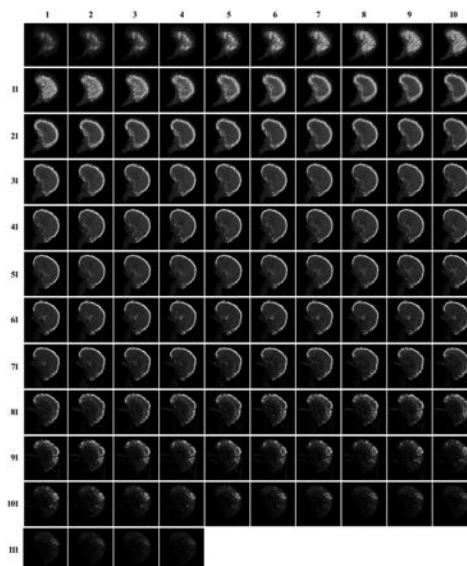
权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法

(57)摘要

本发明涉及生物组织的微观观察技术领域内一种观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法,将获取的待观察组织材料进行表面清洗后依次进行化学固定、脱水处理、免疫荧光染色和透明化处理;再将组织材料连同透明液移至共聚焦显微镜专用培养皿,用激光共聚焦显微镜进行逐层扫描拍照,获得整体组织各层的细胞分布图像,进行细胞立体分布的观察,再通过Imaris软件处理各层细胞分布图像数据,重建细胞组织的三维模型,观察三维立体模型中被免疫荧光标记细胞的立体分布,再利用Imaris Bitplane Spot检测分析,计算出免疫荧光标记细胞的准确数目。本发明的方法保持了待观察组织的完整性,而且观察细胞分布的清晰度和准确度都高,细胞的数目统计结果更准确。



1. 一种观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,包括以下步骤:获取待观察的组织材料并进行表面清洗;对所获取的组织材料进行化学固定和脱水处理;对脱水处理后的组织材料进行免疫荧光染色;对免疫荧光染色的组织材料进行透明化处理;将透明化处理的组织材料连同透明液移至共聚焦显微镜专用培养皿,用激光共聚焦显微镜进行逐层扫描拍照,获得整体组织各层的细胞分布图像,进行细胞立体分布的观察。

2. 根据权利要求1所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,所述组织材料的厚度小于500 μm ,所述逐层扫描拍照的层厚间距为1~5 μm 。

3. 根据权利要求1所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,组织材料的化学固定步骤包括:在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下将冲洗后的组织材料浸泡在质量浓度为3.5~4.5%多聚甲醛水溶液中固定2~2.5小时;之后,移除多聚甲醛水溶液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将组织材料分别用磷酸缓冲液进行振荡洗脱3~4小时,所述磷酸缓冲液每隔1小时更换一次。

4. 根据权利要求1所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,所述脱水处理步骤包括:移除脱水处理后的组织材料中磷酸缓冲液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将组织材料用质量浓度为9~11%和19~21%的蔗糖水溶液振荡洗脱3~4小时;之后,继续在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下将组织材料用质量浓度为29~31%的蔗糖水溶液振荡洗脱12~15小时。

5. 根据权利要求1所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,免疫荧光染色步骤包括:移除脱水处理后的蔗糖溶液,将组织材料依次进行透膜处理和封闭处理、然后分别用一抗和荧光标记的二抗依次孵育48~72小时,最后通过荧光染料进行荧光染色。

6. 根据权利要求5所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,所述透膜处理过程为:在20~25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将组织材料在透膜液中振荡孵育12~15小时,所述透膜液为质量浓度为0.4~0.6%的聚乙二醇辛基苯基醚水溶液。

7. 根据权利要求5所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,所述封闭处理过程为:移除透膜处理的组织材料中的透膜液,在4~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将透膜处理的组织材料在封闭液中振荡孵育12~15小时,所述封闭液成分包括以下质量组份水溶液:0.4~0.6%的聚乙二醇辛基苯基醚、0.10~0.20%的甘氨酸、9~11%的胎牛血清、3~4%的牛血清白蛋白。

8. 根据权利要求5所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,所述一抗和二抗孵育过程包括:

S1) 移除封闭处理的封闭液,在4~5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将封闭处理的组织材料移入一抗溶液中,以50~60rpm的转速摇床孵育48~72小时;

S2) 移除一抗溶液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用质量浓度为0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚水溶液进行清洗,以50~60rpm的转速摇床洗涤3~4小时,且每隔1小时更换一次水溶液;

S3) 移除上步的清洗水溶液,将组织材料移入二抗溶液中,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下,以50~60 rpm的转速摇床孵育48~72小时,如果S1)中的一抗耦合有荧光基团,本步省略;

S4) 移除二抗溶液,在4~5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将组织材料移入质量浓度0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚水溶液进行清洗,以50~60rpm的转速摇床洗涤3~4小时,且每隔1小时更换一次水溶液,如果S3)省略,则本步省略;

S5) 移除上步的清洗液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下,将组织材料移入DAPI稀释液中,以50~

60 rpm的转速摇床孵育10~12小时,以识别标记组织内所有细胞,所述DAPI稀释液为4',6-二脒基-2-苯基吲哚稀释水溶液。

9.根据权利要求1所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法,其特征在于,所述透明化处理步骤包括:将免疫荧光染色的组织材料移入透明液中,在20~25℃避光条件下,以50~60 rpm的转速摇床孵育48~72小时,所述透明液为以下质量组份的水溶液:22~26%的尿素、8~12%的甘油、0.9~0.12%的聚乙二醇辛基苯基醚、48~52%的蔗糖。

10.一种统计微小组织内细胞数目的方法,其特征在于,按权利要求1~9任一项所述的观察微小组织内细胞立体分布的方法获得微小组织各层的细胞分布图像,通过Imaris软件处理各层细胞分布图像数据,重建组织的三维模型,观察三维立体模型中被免疫荧光标记细胞的立体分布,再利用Imaris Bitplane Spot检测分析,计算出免疫荧光标记细胞的准确数目。

一种观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物组织的微观观察技术领域,特别涉及一种观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法。

背景技术

[0002] 在生命科学研究和临床病理学分析中,观察生物组织中细胞的微观分布和统计细胞数目,对研究细胞分化、组织发育、疾病发生等具有非常重要的意义。研究这一过程的常规方法是对组织进行连续切片后,利用免疫组织化学染色,然后通过不同切片间的图像数据拼接和叠加来模拟和推测出完整组织中细胞的分布,进而推算特定细胞的数目。但是,这一常规方法的局限性是,连续切片并不能完全显示真正的组织全貌、细胞分布和特定细胞数量。组织切片只能显示某一个层面的细胞分布和数量,况且在实际制作切片时,很难避免对组织的破坏和丢失,无法保证单个切片细胞分布和数量的准确性,同时,也很难保证不同切片厚度的均一性,这就导致叠加后的结果更加不准确,即便是用数学模型来重建和计算,其最终的结果也只是预测和估算而已,并非真实的图像和数据,这就造成同样的生物组织样品,最后结果的可变系数非常大,特别是细胞数量的结果可信度不高。

[0003] 如何在保持组织完整性的同时,观察特定细胞在组织内部的分布和数量,是生物学研究和医学研究的一个重点和热点。虽然,现在临床医学常用的计算机断层扫描(CT),正电子发射计算机断层扫描(PETCT),核磁共振成像(MRI)等技术得到了快速发展,但到目前为止,其分辨率仍达不到细胞水平或亚细胞水平。

发明内容

[0004] 本发明的目的是,提供一种保持组织完整性的同时观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法,为生命科学研究和临床病理学分析提供一种在细胞水平或亚细胞水平观察组织和统计细胞数量的方法。

[0005] 为实现本发明的上述目的,本发明首先提供一种观察微小组织内细胞立体分布的方法,包括以下步骤:获取待观察的组织材料并进行表面清洗;对所获取的组织材料进行化学固定和脱水处理;对脱水处理后的组织材料进行免疫荧光染色;对免疫荧光染色的组织材料进行透明化处理;将透明化处理的组织材料连同透明液移至共聚焦显微镜专用培养皿,用激光共聚焦显微镜进行逐层扫描拍照,获得整体组织各层的细胞分布图像,进行细胞立体分布的观察。

[0006] 本发明的方法,通过对整体生物组织进行化学固定、脱水处理、免疫荧光染色和透明化处理,保持获取的整体生物组织的完整性,对组织内的特异性细胞进行识别和荧光标记以便于观察,然后通过激光共聚焦显微镜进行逐层扫描拍照,获得整体组织各层的细胞分布图像,进行细胞立体分布的观察。本发明的方法中对生物组织的整体处理和观察过程,保持组织整体的完整性,不需要分层切片观察,实现细胞水平或亚细胞水平的高分辨率精确观察。

[0007] 作为本发明的优选,所述组织材料的厚度小于500 μm ,所述逐层扫描拍照的层厚间距为1~5 μm 。

[0008] 本发明的组织材料的化学固定步骤包括:组织材料的化学固定步骤包括:在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下将冲洗后的组织材料浸泡在质量浓度为3.5~4.5%多聚甲醛水溶液中固定2~2.5小时;之后,移除多聚甲醛水溶液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将组织材料分别用磷酸缓冲液进行振荡洗脱3~4小时,所述磷酸缓冲液每隔1小时更换一次。通过本步的处理,降低组织中蛋白质、肽类物质等多种物质的水溶性以便于将组织材料进行硬化固定,保证整体组织的完整性。

[0009] 为便于实现组织材料内细胞的彻底脱水,本发明的脱水处理步骤包括:移除脱水处理后的组织材料中磷酸缓冲液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将组织材料用质量浓度为9~11%和19~21%的蔗糖水溶液振荡洗脱3~4小时;之后,继续在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下将组织材料用质量浓度为29~31%的蔗糖水溶液振荡洗脱12-15小时。

[0010] 进一步地,本发明的免疫荧光染色步骤包括:移除脱水处理后的蔗糖溶液,将组织材料依次进行透膜处理和封闭处理、然后分别用一抗和荧光标记的二抗依次孵育48~72小时,最后通过荧光染料进行荧光染色。

[0011] 进一步地,本发明的透膜处理过程为:在20~25 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将组织材料在透膜液中振荡孵育12~15小时,所述透膜液为质量浓度为0.4~0.6%的聚乙二醇辛基苯基醚水溶液。本步的透膜处理过程,通过透膜时间的控制可以提高组织材料的细胞膜通透性,并使得完整组织内部细胞达到同样的细胞膜通透性;以便后续处理过程中抗体(包括一抗和二抗)能够顺利进入完整组织内部细胞。

[0012] 进一步地,本发明方法中的封闭处理过程为:移除透膜处理的组织材料中的透膜液,在4~5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,将透膜处理的组织材料在封闭液中振荡孵育12~15小时,所述封闭液成分包括以下质量组份水溶液:0.4~0.6%的聚乙二醇辛基苯基醚、0.10~0.20%的甘氨酸、9~11%的胎牛血清、3~4%的牛血清白蛋白。通过本步处理,可以降低后续处理过程中抗体的非特异性结合,消除假阳性信号的发生。

[0013] 为便于识别某一类特异性细胞,本发明的一抗和二抗孵育过程包括:

S1) 移除封闭处理的封闭液,在4~5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将封闭处理的组织材料移入一抗溶液中,以50~60rpm的转速摇床孵育48~72小时;通过一抗孵育使一抗与生物组织中某一类细胞特异表达的蛋白相结合,来达到识别组织内某一类细胞的目的;

S2) 移除一抗溶液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,用质量浓度为0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚水溶液进行清洗,以50~60rpm的转速摇床洗涤3~4小时,且每隔1小时更换一次水溶液;通过本步处理可以清洗掉未发生特异性结合的一抗;

S3) 移除上步的清洗水溶液,将组织材料移入二抗溶液中,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下,以50~60 rpm的转速摇床孵育48~72小时,如果S1)中的一抗耦合有荧光基团,本步省略;本步的目的是用荧光标记的二抗对S1)中的一抗进行免疫识别,以便于后续步骤中通过荧光显微镜能分辨出特异性细胞;

S4) 移除二抗溶液,在2~5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,将组织材料移入质量浓度0.1%的聚乙二醇辛基苯基醚水溶液进行清洗,以50~60rpm的转速摇床洗涤3~4小时,且每隔1小时更换一次水溶液,如果S3)省略,则本步省略;

S5) 移除上步的清洗液,在2~5℃避光条件下,将组织材料移入DAPI稀释液中,以50~60 rpm的转速摇床孵育10~12小时,以识别标记组织内所有细胞,所述DAPI稀释液为4',6-二脒基-2-苯基吲哚稀释水溶液;通过本步过程,可以使DAPI分子与组织内所有细胞的DNA结合,以便于观察组织内所有的细胞分布及前步抗体识别标记的特异性细胞在组织内的分布。

[0014] 进一步地,所述透明化处理步骤包括:将免疫荧光染色的组织材料移入透明液中,在20~25℃避光条件下,以50~60 rpm的转速摇床孵育48~72小时,所述透明液为以下质量组份的水溶液:22~26%的尿素、8~12% 的甘油、0.9~0.12% 的聚乙二醇辛基苯基醚、48~52%的蔗糖。通过本步的处理,可以使得激光穿透组织表层,进入组织内部,进而使得显微镜能够识别完整组织内部的荧光信号。

[0015] 本发明的方法,将待观察的生物组织通过上述处理,在保持待观察的生物组织的完整性的同时,通过特异性抗体对组织内的某一类细胞进行荧光标记,在透明化处理之后,利用激光共聚焦显微镜识别完整组织全部的荧光信号,真实而立体地显示特异性标记的细胞在完整组织中的空间分布。本发明解决了完整组织内部细胞的荧光标记和显微观察,将完整组织的观察提高的细胞水平和立体层面;理论上,借助于高分辨率共聚焦显微镜有可能达到亚细胞水平或分子水平。特别在透明化处理方面,本发明在透明化处理之前进行免疫荧光染色,避免了透明化处理对抗原的损伤和由此造成的荧光信号的丢失或减少;同时,优化的透明液使得激光更容易穿透完整组织,从而使得荧光信号清晰且背景信号弱。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种统计微小组织内细胞数目的方法,首先将按上述观察微小组织内细胞立体分布的方法获得微小组织各层的细胞分布图像,通过Imaris软件处理各层细胞分布图像数据,重建组织细胞的三维模型,观察三维立体模型中被免疫荧光标记细胞的立体分布,通过利用Imaris Bitplane Spot检测分析,计算出免疫荧光标记细胞的准确数目。通过本发明的细胞数目统计方法,根据微小组织各层的细胞分布图,通过Imaris三维软件再现微小组织细胞分布的高清渐度,高真实度的三维模型,以精确统计待观察的整体生物组织的细胞数目。

附图说明

[0017] 图1为采用本发明的观察微小组织内细胞立体分布的方法获得的1日龄小鼠的离体性腺组织的激光共聚焦全组织扫描层图。

[0018] 图2为图1中的部分扫描层图的局部截图,其中左侧竖排是用TRA98对完整的离体性腺组织内的生殖细胞特异性标识为绿色(图中已转化为白色)的扫描图,中间竖排为用DAPI对完整离体性腺组织中的所有细胞标识为蓝色(图中已转化为灰色)的扫描图,右侧竖排为左排和中间排合图后的整体组织的所有细胞分布的图。

[0019] 图3为通过Imaris软件再现合成的离体性腺组织的三维旋转图。

[0020] 图4为通过Imaris软件依据图1-3中荧光标记的特异性生殖细胞构建的三维模式图。

具体实施方式

[0021] 本实施例以出生一日龄小鼠的离体性腺为例,结合附图分步详细说明本发明的方

法。

[0022] 一、将一日龄小鼠的离体性腺组织,经PBS(磷酸缓冲液)或生理盐水洗涤以洗去组织材料表面的非必要组织,本例中获得的一日龄小鼠的离体性腺组织的厚度小于500 μm ,经显微镜下测量,厚度为228 μm 。

[0023] 二、对离体组织进行化学固定和脱水处理

1.将上步处理后的离体组织转移至1.5 ml离心管中,加入1 ml新鲜配制的质量浓度为4%多聚甲醛水溶液,在4℃的条件下固定孵育2小时;

2.小心移除固定处理后的多聚甲醛水溶液,将离体组织分别用磷酸缓冲液以500 rpm的转速摇床洗涤3小时,磷酸缓冲液每隔1小时更换一次,经前述洗涤后,洗除离体组织中残留的多聚甲醛溶液;

3.小心移除离体组织中磷酸缓冲液,向离体组织的离心管中加入1 ml质量浓度为10%蔗糖水溶液,在4℃条件下以50 rpm的转速摇床洗涤3小时;

4.小心移除上述质量浓度为10%蔗糖水溶液,向离体组织的离心管中加入1 ml质量浓度为20%蔗糖水溶液,在4℃条件下以50 rpm的转速摇床洗涤3小时;

5.小心移除上述质量浓度20%蔗糖水溶液,向离体组织的离心管内加入质量浓度为30%蔗糖水溶液,在4℃条件下以50 rpm的转速摇床洗涤12小时。

[0024] 经过上述三步蔗糖水溶液洗涤后,可以实现完整组织内部细胞的彻底脱水。

[0025] 三、对离体组织进行免疫荧光染色

1.透膜处理,将上述固定和脱水处理后的离体组织移至另一容量为1.5 ml的离心管中,加入质量浓度的0.5 Triton X-100的水溶液(聚乙二醇辛基苯基醚水溶液),在25℃条件下以50 rpm的转速摇床振荡孵育12小时;通过本步透膜处理,可以提高组织细胞的细胞膜通透性,并使得完整组织内部细胞达到同样的细胞膜通透性;以便后续处理过程中的抗体(包括一抗和二抗)能够顺利进入完整组织内部细胞。

[0026] 2.封闭处理,小心移除上述透膜液,加入1ml封闭液,在4℃条件下以50 rpm的转速摇床振荡孵育12小时,所用封闭液为以下质量组份的水溶液:0.5%的Triton X-100(也即是聚乙二醇辛基苯基醚)、0.15%的甘氨酸、10%的胎牛血清、3%的BSA(牛血清白蛋白);通过本步封闭处理,可以降低后续处理过程中抗体的非特异性结合,消除假阳性信号的发生。

[0027] 3.一抗孵育,小心移除封闭处理后的封闭液,向离体组织中加入0.5ml浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的TRA98一抗溶液,在4℃条件下,以50 rpm的转速摇床孵育48小时,用于与离体组织中生殖细胞特异性抗原结合,本实施例的一抗TRA98为购买自abcam公司的Anti-Germ cell-specific antigen抗体;

4.小心移除一抗溶液,用质量浓度为0.1%的Triton X-100水溶液(也即聚乙二醇辛基苯基醚水溶液)进行清洗,在4℃条件下,以50rpm的转速摇床洗涤3小时,且每隔1小时更换一次水溶液;

5.移除上步清洗溶液,将组织材料移入二抗溶液中,在4℃避光条件下,以50rpm的转速摇床孵育48小时,本步中的二抗为购买自abcam公司的山羊抗大鼠IgG H&L (Alexa Fluor® 488),用于与一抗TRA98结合,如果3中的一抗耦合有荧光基团,本步省略;本步的目的是对不带荧光基团的一抗进行识别和标记,以便于激光共聚焦显微镜识别特异性细胞;

6. 移除二抗溶液,在4℃条件下,将组织材料移入质量浓度0.1%的Triton X-100水溶液(也即聚乙二醇辛基苯基醚水溶液)进行清洗,以50rpm的转速摇床洗涤3小时,且每隔1小时更换一次水溶液,如果上述第5步省略,则本步省略;

7. 移除上步的清洗液,在4℃避光条件下,将组织材料移入浓度为1 μ g/ml 的DAPI(分子式为4',6-二脒基-2-苯基吡啶的荧光染色剂)溶液中,以50rpm的转速摇床孵育12小时;通过本步过程,可以使DAPI分子与离体组织内的所有细胞结合,以便于观察组织内所有的细胞分布及前步识别标记的特异性细胞在组织内的分布。

[0028] 四、对离体组织进行透明化处理:将免疫荧光染色的离体组织移入另一新的1.5 ml离心管中,加入1 ml的透明液,在25℃避光条件下以50rpm的转速摇床孵育48小时。其中透明液为以下质量配比的水溶液:含有24%的尿素、10%的甘油、0.1%的Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)、50%的蔗糖。通过本步透明化处理,可以使得激光穿透组织表层,进入组织内部,进而使得激光共聚焦显微镜能够识别完整组织内部的荧光信号。与现有透明化处理不同的是,本发明的透明化处理是在免疫荧光染色之后进行的,避免了透明化处理对抗原的损伤和由此造成的荧光信号的丢失或减少;同时,优化的透明液使得激光更容易穿透完整组织,从而使得荧光信号清晰且背景信号弱。

[0029] 将上述透明化处理的离体组织连同透明液移至共聚焦显微镜专用培养皿内,该培养皿的厚度为0.1mm,用激光共聚焦显微镜进行逐层扫描拍照,扫描时按沿Z轴以2 μ m的扫描间距进行逐层扫描拍照,获得整体组织各层的全细胞分布图像,如图1所示,本实施例的离体组织沿Z轴的厚度为228 μ m,共进行了114层扫描拍照,图中的阿拉伯数字编号表示扫描的层数,因图示已经转化为黑白图,图1中的白色部分显示细胞为荧光标识的生殖细胞。图2为分别截取图1中第5、10、30、64、90层的扫描图片,其中图中左侧竖排的各图中的白色细胞是用TRA98抗体对完整的离体组织内的生殖细胞进行荧光标识的相应层的激光扫描图,中间竖排为用DAPI对完整离体组织中的所有细胞进行荧光染色的相应层的激光扫描图,右侧竖排为左竖排和中间竖排叠加合图后相应层的整体组织的所有细胞分布的图。通过该系列图可以全方位的观察整体组织内特异性生殖细胞的分布情况,从左侧各排的图中可以看出,用TRA98标识为绿色的单个生殖细胞清晰可见、轮廓清楚、边界分明,在性腺组织的外围和内部均可见单个生殖细胞,并且生殖细胞大部分分布在性腺组织的外围,而性腺组织的内部(髓质)分布较少。通过本实施例的上述对小鼠离体性腺组织的处理方式,可以全方位观察了解离体组织内部真实的细胞分布。

[0030] 为便于准确统计离体组织内生殖细胞的数量,将上述过程获得的各层细胞图片数据通过Imaris软件处理,重建离体组织的三维模型,进行三维立体旋转观察,进一步了解被标识的生殖细胞在组织内的分布,如图3所示,三维模型沿Y轴分别顺时针旋转0°、45°、90°、135°和180°的三维图片。

[0031] 通过利用Imaris Bitplane Spot检测分析,计算出免疫荧光标记细胞的准确数目。通过本发明的细胞数目统计方法,根据微小组织各层的细胞分布图,通过Imaris三维软件再现微小组织细胞分布的高清晰度,高真实度的三维模型,以精确统计待观察的整体生物组织的细胞数目,如图4所示,为生殖细胞构建的三维模型其中一张截图,通过该三维模型,进行多方位旋转观察统计验证,生殖细胞的准确数目为2415。

[0032] 本发明并不局限于上述对小鼠离体性腺组织的实施方式,也可以用于观察处理其

它微小组织材料。

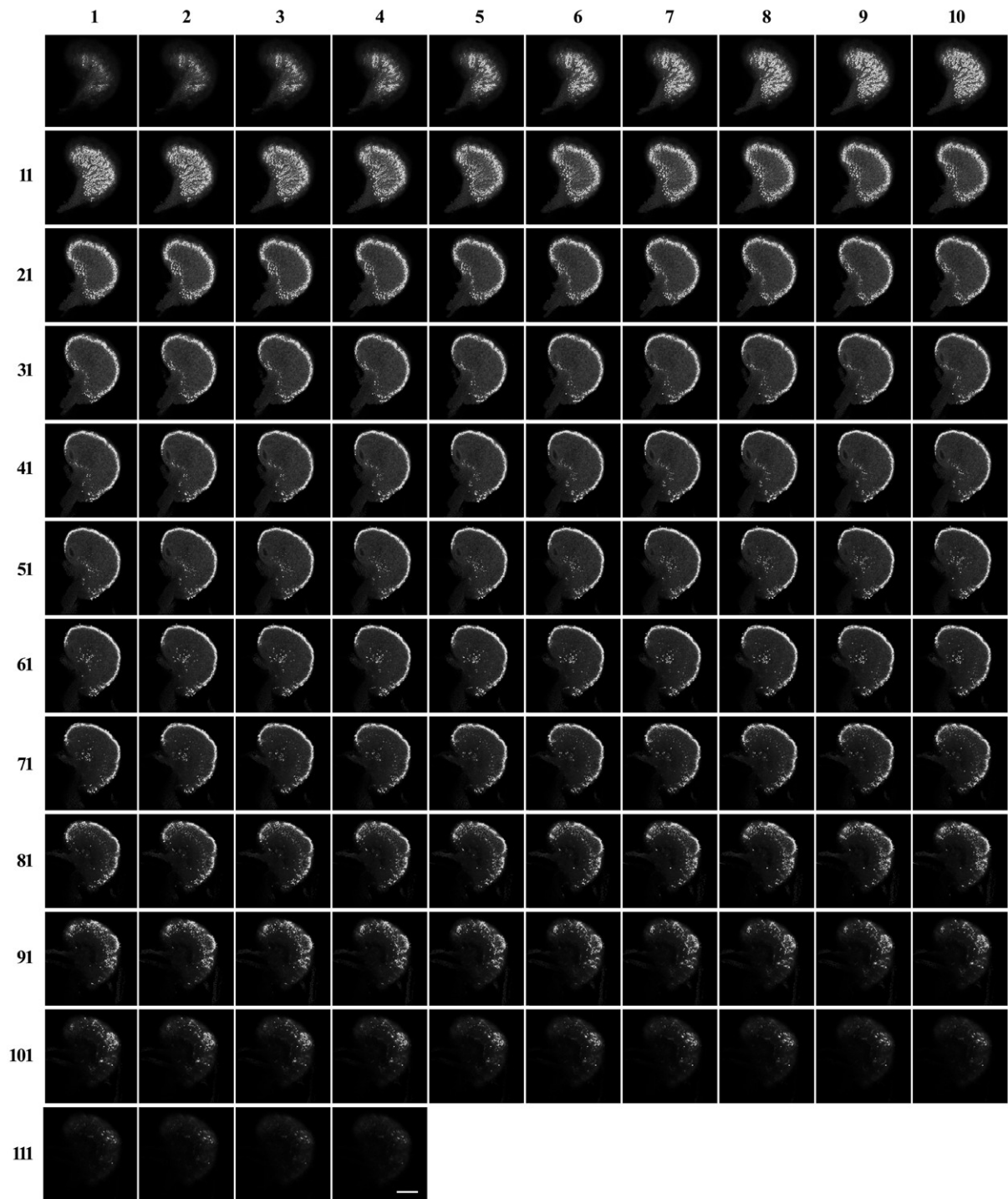


图1

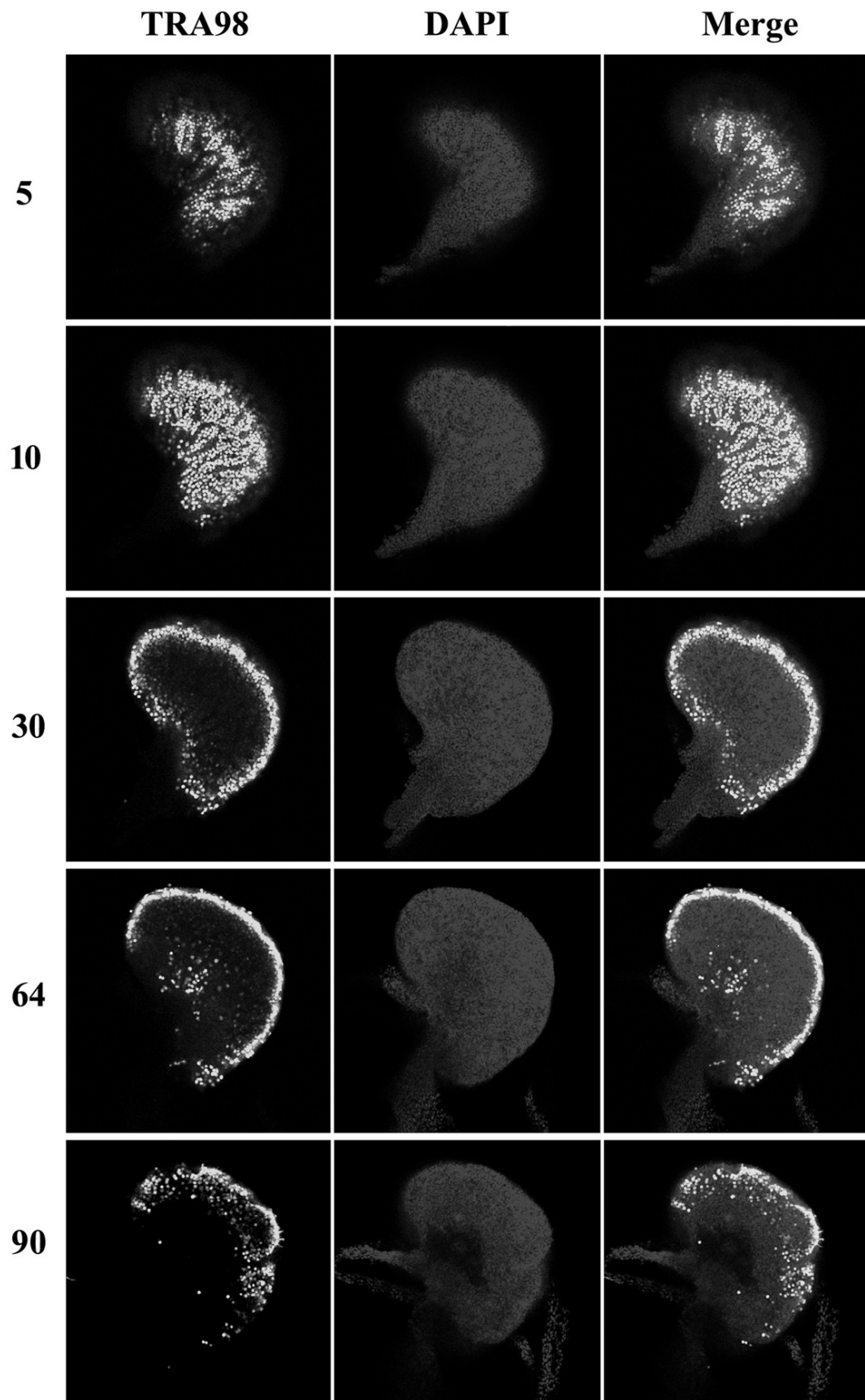


图2

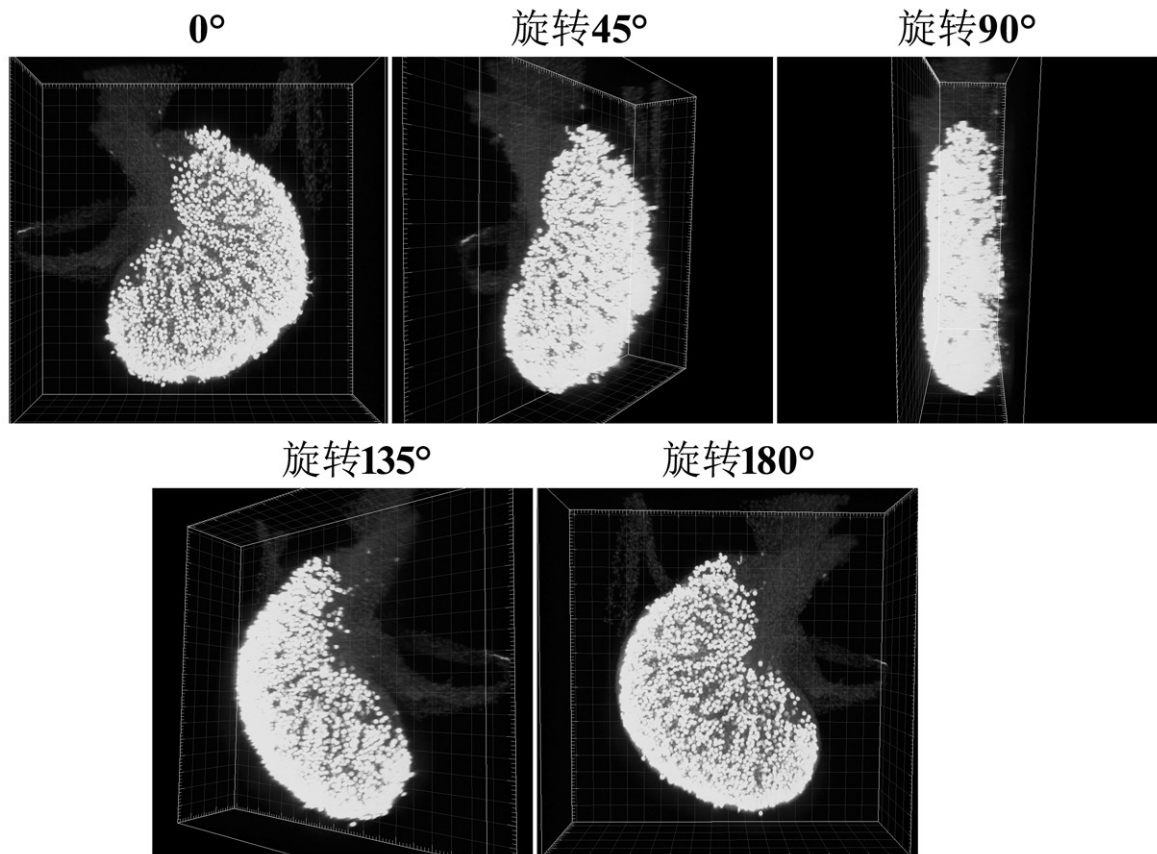


图3

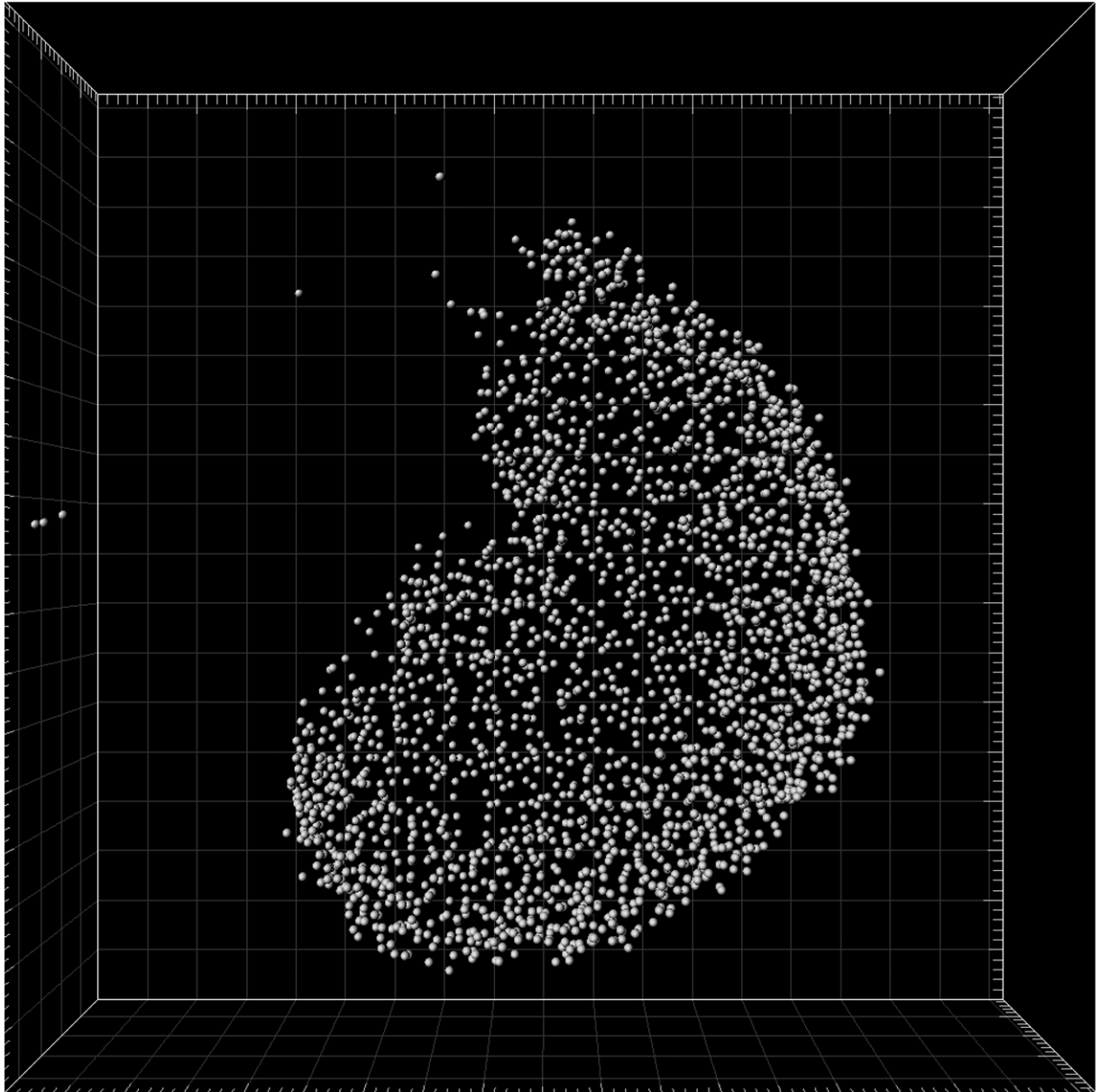


图4

专利名称(译)	一种观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法		
公开(公告)号	CN109406768A	公开(公告)日	2019-03-01
申请号	CN201811311740.1	申请日	2018-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	扬州大学		
申请(专利权)人(译)	扬州大学		
当前申请(专利权)人(译)	扬州大学		
[标]发明人	朱家桥 刘宗平 卞建春 刘学忠 袁燕 顾建红 张江虹		
发明人	朱家桥 刘宗平 卞建春 刘学忠 袁燕 顾建红 张江虹		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64 G01N1/30		
CPC分类号	G01N33/533 G01N1/30 G01N21/6458		
代理人(译)	董旭东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物组织的微观察技术领域内一种观察微小组织内细胞立体分布及统计细胞数目的方法，将获取的待观察组织材料进行表面清洗后依次进行化学固定、脱水处理、免疫荧光染色和透明化处理；再将组织材料连同透明液移至共聚焦显微镜专用培养皿，用激光共聚焦显微镜进行逐层扫描拍照，获得整体组织各层的细胞分布图像，进行细胞立体分布的观察，再通过Imaris软件处理各层细胞分布图像数据，重建细胞组织的三维模型，观察三维立体模型中被免疫荧光标记细胞的立体分布，再利用Imaris Bitplane Spot检测分析，计算出免疫荧光标记细胞的准确数目。本发明的方法保持了待观察组织的完整性，而且观察细胞分布的清晰度和准确度都高，细胞的数目统计结果更准确。

