



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104655475 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201510062783. 0

(22) 申请日 2015. 02. 06

(71) 申请人 丁伟

地址 310016 浙江省杭州市上城区钱塘人家
A幢 1004 室

申请人 任兴昌

(72) 发明人 丁伟 任兴昌

(74) 专利代理机构 杭州浙科专利事务所(普通
合伙) 33213

代理人 吴秉中

(51) Int. Cl.

G01N 1/36(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

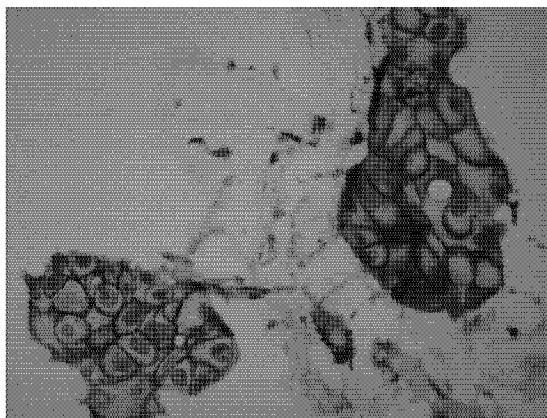
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用

(57) 摘要

石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用,属于生物医学技术领域。它主要包括以下步骤:石蜡包埋切片确定有对照价值的组织蜡块,按免疫组化、原位杂交组织切片厚度切片,收集进入容器中;脱蜡、清洗后处理得到切片碎屑或微切片;经不水化或水化处理后,保存备用,其对照物可来自不同的组织等,对照时可选用多种组合,可进行点涂物内部或外部组合,可减少对照物的种类,增加其利用价值,增加了对照物的特异性,将其用于石蜡切片的免疫组化、特殊染色、原位杂交等染色作为质控对照物时,不仅使用方便,而且与切片对照时其厚度基本相同,参照对比更为可靠,可大大地改变观察者的视觉感官,尤其是细胞膜、浆阳性的结构及组织的结构更为清晰。



1. 石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征包括如下步骤:

1) 石蜡包埋对照物切片脱蜡进行免疫组化、原位杂交等,观察切片中某种细胞丰富的成分,确定那些抗体阳性、核酸扩增或异常的对照物蜡块,对照切片修去不需要的组织备用;

2) 选定步骤 1) 得到的对照物蜡块,按常规免疫组化、原位杂交组织切片厚度进行切片,便于用于组织切片免疫组化、原位杂交染色观察时保持同样的组织厚度,连续切完组织,将切下来的对照物切片移入不会被有机溶剂溶解的容器中备用;

3) 向步骤 2) 的容器中加入能够溶解石蜡的溶剂,离心洗涤 3 次,除去不溶于水的溶剂,再加入梯度酒精离心处理,通过震荡、切割搅拌、超声波或移液器吸头破碎对照物切片,100-300 μm 过滤,得到对照物切片碎屑,有水化及不水化两种处理,梯度酒精按高浓度到低浓度的顺序;

4) 不水化处理:将步骤 3) 得到的对照物切片碎屑加入低浓度酒精保存,依据点涂器具的不同及实际效果调整组织碎屑大小及浓度;

5) 水化处理:将步骤 3) 得到的对照物切片碎屑彻底水化,加入蒸馏水或 PBS 或 TBS 缓冲液冲洗,离心沉积,将沉积物用能用于抗原保存的液体按体积比为 1:1-3 的比例稀释。

2. 根据权利要求 1 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征包括组织切片、细胞系、实体瘤或阳性组织冰冻切片。

3. 根据权利要求 1 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征包括步骤 2) 中的切片厚度为 3-4 微米。

4. 根据权利要求 1 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征包括步骤 2) 中容器为离心管。

5. 根据权利要求 1 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征包括步骤 2) 中在切片前将对对照物蜡块用利器划成 0.2-3mm 的组织片。

6. 根据权利要求 1 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征包括步骤 3) 中所述的溶剂为纯净二甲苯或石油醚。

7. 一种根据权利要求 1 所述的石蜡包埋对照物悬液在对免疫组化等原位组织检测染色过程中作为对照物的应用。

8. 根据权利要求 7 所述的石蜡包埋对照物悬液的应用,其特征包括在对免疫组化等使用时,能采用多种组合对照。

9. 根据权利要求 8 所述的石蜡包埋对照物悬液的应用,其特征包括组合对照包括:切片微粒/单细胞与非切片组织微粒/单细胞或培养细胞组合、点涂物内部或外部组合。

10. 根据权利要求 7 所述的石蜡包埋对照物悬液的应用,其特征包括方法如下:在对对照物进行免疫组化、原位杂交等对照物切片时将对对照物悬液点滴、涂敷与待测样品旁,待测样品为组织片或细胞片时,先观察对照物,阳性及阴性成分结果是否正确,阳性部位,膜阳性、浆阳性、核阳性是否正确、阳性强度如何:

1) 对照物结果正确,再观察待查样品片结果,确定结果的阳性或阴性;

2) 在确定阳性强度时,由于对照物进行过与待测组织样品同样厚度的切片处理,已知阳性强度的对照物阳性程度变化时,以此调整待查片阳性强度的结果;

3) 对已知对照物结果不正确时要寻找原因,是否少加某一步试剂、是否加错了主要试

剂、是否抗体已失效。

石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学技术领域,具体涉及一种制作、使用方便、对照物形态完美的石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 免疫组化、原位杂交等原位切片染色技术应用十分广泛,在实际工作中应该建立有效的阳性阴性对照,以保证结果的准确,对医师的准确诊断和患者能够获得恰当的治疗负责。我们原有的方法所获得的对照物主要为完整的单细胞或由完整细胞组成的组织微粒,在用于组织切片对照时,因组织切片一般为 3-4 微米厚,小于完整细胞的一半以上,因此存在一定不足之处,尤其是针对细胞膜阳性的免疫组化染色时,使用者认为膜阳性不够满意。

发明内容

[0003] 针对现有技术中存在的上述问题,本发明的目的在于提供一种制作、使用方便、对照物形态完美的石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用。

[0004] 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 石蜡包埋对照物切片脱蜡进行免疫组化、原位杂交等,观察切片中某种细胞丰富的成分,确定那些抗体阳性、核酸扩增或异常的对照物蜡块,对照切片修去不需要的组织备用;

2) 选定步骤 1) 得到的对照物蜡块,按常规免疫组化、原位杂交组织切片厚度进行切片,便于用于组织切片免疫组化、原位杂交染色观察时保持同样的组织厚度,连续切完组织,将切下来的对照物切片移入不会被有机溶剂溶解的容器中备用;

3) 向步骤 2) 的容器中加入能够溶解石蜡的溶剂,离心洗涤 3 次,除去不溶于水的溶剂,再加入梯度酒精离心处理,通过震荡、切割搅拌、超声波或移液器吸头破碎对照物切片,100-300 μm 过滤,得到对照物切片碎屑,有水化及不水化两种处理,梯度酒精按高浓度到低浓度的顺序,所述的梯度酒精离心处理时浓度从高到低;

4) 不水化处理:将步骤 3) 得到的对照物切片碎屑加入低浓度酒精保存,依据点涂器具的不同及实际效果调整组织碎屑大小及浓度,所述的低浓度酒精为 10%-30% 的酒精,如进行点涂物内部组合时可选择碎屑较小的对照物;

5) 水化处理:将步骤 3) 得到的对照物切片碎屑彻底水化,加入蒸馏水或 PBS 或 TBS 缓冲液冲洗,离心沉积,将沉积物用能用于抗原保存的液体按体积比为 1:1-3 的比例稀释,也可按实际使用情况调整浓度保存备用。

[0005] 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征在于所述的对照物包括组织切片、细胞系、实体瘤或阳性组织冰冻切片。

[0006] 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征在于步骤 2) 中的切片厚度为 3-4 微米。

[0007] 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征在于步骤 2) 中容器为离心管。

[0008] 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征在于步骤 2) 中在切片前将对照物蜡块用利器划成 0.2-3mm 的组织片。

[0009] 所述的石蜡包埋对照物悬液的制备方法,其特征在于步骤 3) 中所述的溶剂为纯净二甲苯或石油醚。

[0010] 所述的石蜡包埋对照物悬液在对免疫组化等原位组织检测染色过程中作为对照物的应用。

[0011] 所述的石蜡包埋对照物悬液的应用,其特征在于在对免疫组化等使用时,能采用多种组合对照。

[0012] 所述的石蜡包埋对照物悬液的应用,其特征在于组合对照包括:切片微粒 / 单细胞与非切片组织微粒 / 单细胞或培养细胞组合、点涂物内部或外部组合。

[0013] 所述的石蜡包埋对照物悬液的应用,其特征在于方法如下:在将对照物进行免疫组化、原位杂交等对照物切片时将对照物悬液点滴、涂敷与待测样品旁,待测样品为组织片或细胞片时,先观察对照物,阳性及阴性成分结果是否正确,阳性部位,膜阳性、浆阳性、核阳性是否正确、阳性强度如何:

1) 对照物结果正确,再观察待查样品片结果,确定结果的阳性或阴性。

[0014] 2) 在确定阳性强度时,由于对照物进行过与待测组织样品同样厚度的切片处理,已知阳性强度的对照物阳性程度变化时,以此调整待查片阳性强度的结果;

3) 对已知对照物结果不正确时要寻找原因,是否少加某一步试剂、是否加错了主要试剂、是否抗体已失效。

[0015] 通过采用上述技术,与现有技术相比,本发明的有益效果如下:

1) 经过本发明的方法,采用石蜡包埋,能使对照物细胞及微粒的厚度与待测样品切片厚度一致,改善了阅片观察者的感官感觉,用该方法为组织切片等免疫组化等原位玻片检测方法建立一一对照,特别是阳性强度对照时更有可比性,提高了准确性;

2) 利用该方法制作的对照物可以分明微切片的组织层次与结构,起到组织芯片的作用,利用正常组织、某些良性肿瘤可以看清阳性与阴性细胞的预期分布,作为对照物对观察判断者来说更为直观,可以利用细胞成分、结果复杂的组织作为提取对照物的组织来源,如用乳腺的纤维腺瘤制作的微切片悬浮对照物,可以看清 CK7、CK8、CK5/6、P63、S-100、CD10、SMA、ER、PR 等阳性细胞的分布是否正确。

附图说明

[0016] 图 1 为现有方法制作的对照物示意图;

图 2 为本发明制作的对照物示意图;

图 3 为待测阳性样本组织切片的免疫组化细胞膜阳性情况图。

具体实施方式

[0017] 以下结合说明书附图对本发明作进一步的描述,但本发明的保护范围并不限于此:

实施例 1:石蜡包埋组织切片对照悬液的制备方法如下,其对照物为组织切片:

1) 石蜡包埋组织切片脱蜡进行免疫组化、原位杂交等,观察切片中某种细胞丰富的成分,最好是肿瘤组织,或有特殊组织结构的组织,如乳腺纤维腺瘤组织,确定特定抗体阳性(蛋白表达)、核酸扩增或异常的组织蜡块;

2) 选定这些组织蜡块,按通常免疫组化、原位杂交组织切片厚度一样进行切片,厚度可以是 3-4 微米,这样便于用于组织切片免疫组化、原位杂交染色观察时保持同样的组织厚度,连续切片至足够量或切完组织,该切片不进入热水中展片,将切下来的蜡片移入离心管中;本发明中,切片前可以将蜡块用利器划成 0.2-3mm 大小的组织片;

3) 向步骤 2) 的离心管中加入纯净二甲苯,用于溶解石蜡,通过震荡、搅拌、超声波或移液器吸头破碎组织切片,并离心洗涤 3 次,除去不溶于水的纯净二甲苯,再分别加入 100%、95%、80% 的酒精进行离心处理,得到切片碎屑;该切片碎屑有两种处理,可以不水化,也可以水化;

4) 不水化处理:步骤 3) 得到的切片碎屑可以不用加入蒸馏水水化,直接加入低浓度酒精中保存,本发明所用的酒精浓度为 10%,使用时,可以依据点涂器具的不同及实际效果调整组织碎屑大小及浓度,该实施例中,步骤 2) 的组织切片可以不经脱蜡直接悬浮于低浓度酒精中备用;

5) 水化处理:步骤 3) 得到的切片碎屑彻底水化,入蒸馏水或 PBS 缓冲液冲洗,离心沉积,最后将沉积物用抗原保存液按 1:3 稀释,也可按实际使用情况调整浓度保存备用。

[0018] 如图 1-3 所示,图 1 为原有方法制作的对照物,组织微粒由于厚度大染色深,细胞膜结构不明显;图 2 本发明制作的对照物的局部展示,微切片因厚度与组织切片厚度一致,细胞膜阳性显示清晰;图 3 为待测阳性样本组织切片,免疫组化细胞膜阳性情况,将原有未切片组织微粒对照物、本发明组织切片微粒(微切片)与待测阳性样本切片免疫组化细胞膜阳性的比较,可以明显的得出,本发明石蜡包埋组织细胞切片微粒悬液对照物膜阳性及组织结构明显,大大地改善了观察者的感官效果。

[0019] 实施例 2:石蜡包埋细胞系切片对照悬液的制备方法如下:

其对照物为细胞系,培养 Her2³⁺、Her2²⁺、Her2¹⁺ 的细胞系公认的已知阳性的细胞提取单细胞与微粒,在 10% 中性福尔马林固定,离心洗去福尔马林,或石蜡包埋切片后按实施例 1 的方法制成对照物,由于细胞系相对固定,可商品化,来源稳定,便于标准化。

[0020] 实施例 3:石蜡包埋实体瘤切片对照悬液的制备方法如下:

其对照物为用肿瘤种植的实体瘤作为阳性对照物的组织来源。用某种特定抗原表达瘤细胞对裸鼠进行种植,获取实体瘤,进行瘤组织处理,按实施例 1 的制备方法制作为石蜡包埋切片微粒及福尔马林处理单细胞及组织微粒,来源稳定,便于标准化。

[0021] 实施例 4:石蜡包埋阳性组织冰冻切片对照悬液的制备方法如下:

其对照物为阳性组织冰冻切片。对选取组织或培养后离心沉积的细胞沉积物进行冰冻切片切后用福尔马林固定,离心洗去福尔马林等操作方法同前,按实施例 1 的制备方法制作为阳性组织冰冻切片。

[0022] 本发明的石蜡包埋不同对照物切片对照悬液作用对照物的应用

,对照物在对免疫组化等原位组织检测染色过程中作为对照物使用时,可进行多种组合,如可进行切片微粒/单细胞与非切片组织微粒/单细胞或培养细胞组合、可进行点涂物内部或外部组合,按需进行以减少对照物的种类,增加对照物的特异性。

[0023] 作为对照物的运用方法如下：在对组织进行免疫组化、原位杂交等组织切片时将对照物悬液点滴、涂敷与待测样品旁，待测样品亦可以是细胞片，以后的步骤按待测样品需要检测的操作步骤进行即可，如免疫组化或原位杂交。观察待测样品，组织片或细胞片时，先观察对照物，阳性及阴性成分结果是否正确，阳性部位，膜阳性、浆阳性、核阳性是否正确，阳性强度如何。如果对照物结果正确，即可观察待查样品片结果，确定结果的阳性或阴性。在确定阳性强度时，由于对照物进行过与待测组织样品同样厚度的切片处理，如果已知阳性强度的对照物阳性程度变化，可以此调整待查片阳性强度的结果。对已知对照物不正确时要寻找原因，是否少加某一步试剂，是否加错了主要试剂(如一抗)，是否抗体已失效。在新购主要试剂，如一抗时要已知阳性阴性的对照物进行检测是否可靠。

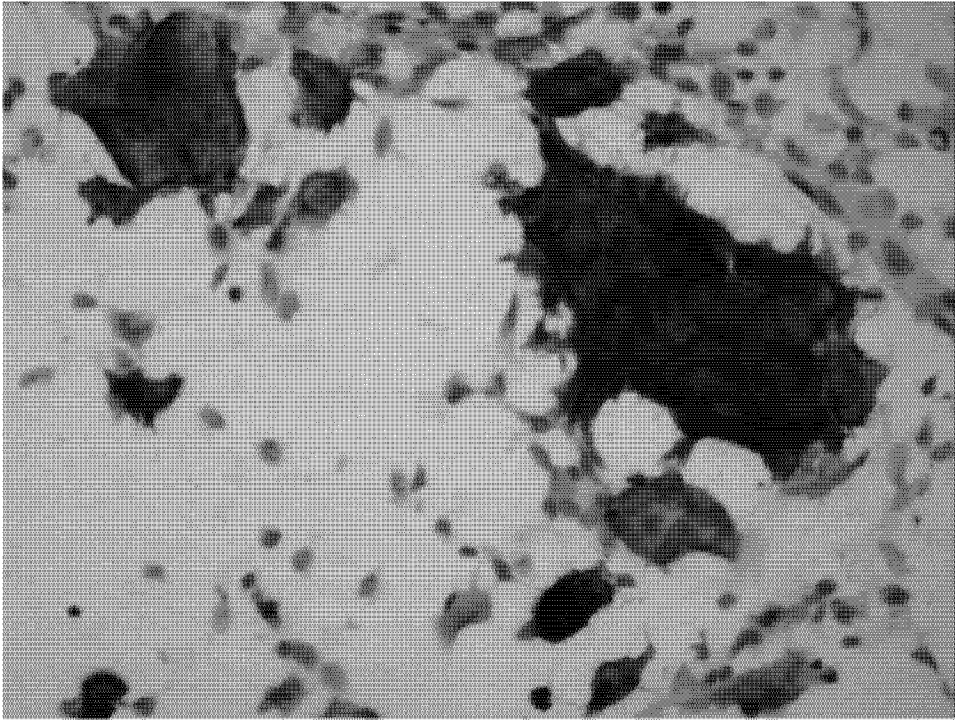


图 1

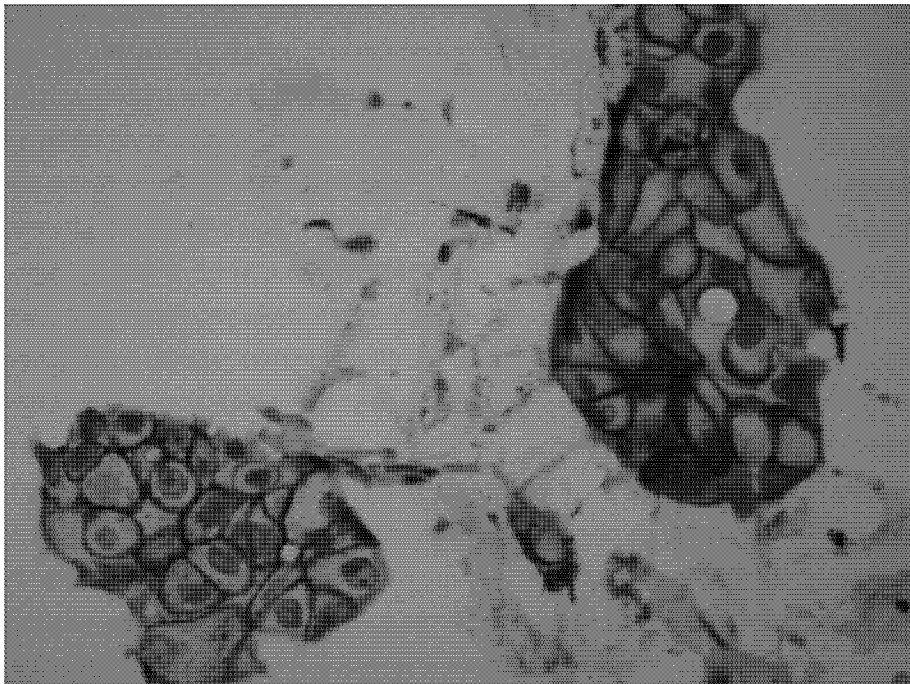


图 2

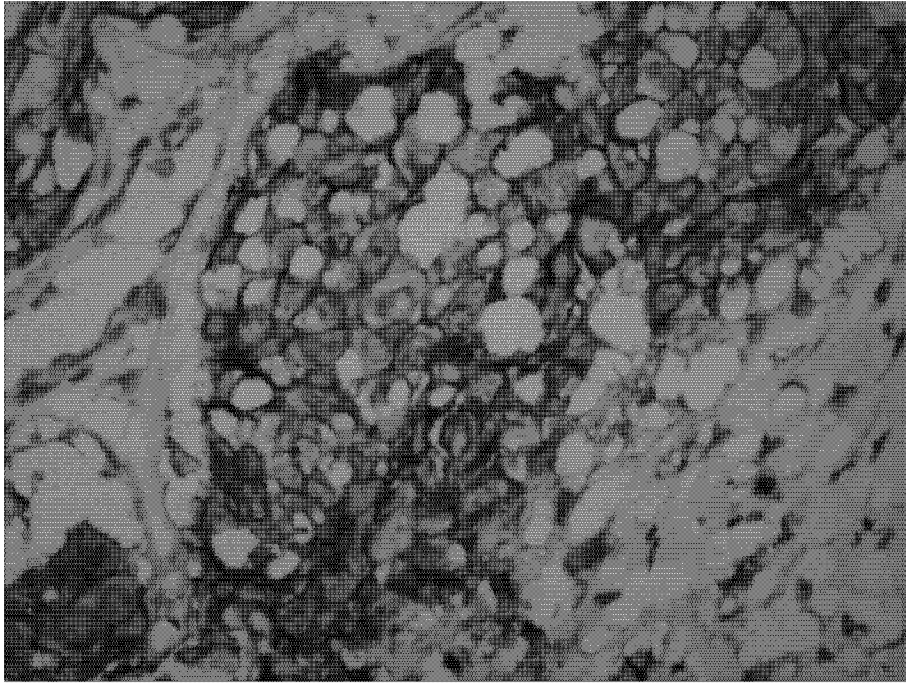


图 3

专利名称(译)	石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN104655475A	公开(公告)日	2015-05-27
申请号	CN201510062783.0	申请日	2015-02-06
[标]申请(专利权)人(译)	丁伟 任兴昌		
申请(专利权)人(译)	丁伟 任兴昌		
当前申请(专利权)人(译)	丁伟 任兴昌		
[标]发明人	丁伟 任兴昌		
发明人	丁伟 任兴昌		
IPC分类号	G01N1/36 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

石蜡包埋对照物悬液的制备方法及应用，属于生物医学技术领域。它主要包括以下步骤：石蜡包埋切片确定有对照价值的组织蜡块，按免疫组化、原位杂交组织切片厚度切片，收集进入容器中；脱蜡、清洗后处理得到切片碎屑或微切片；经不水化或水化处理后，保存备用，其对照物可来自不同的组织等，对照时可选用多种组合，可进行点涂物内部或外部组合，可减少对照物的种类，增加其利用价值，增加了对照物的特异性，将其用于石蜡切片的免疫组化、特殊染色、原位杂交等染色作为质控对照物时，不仅使用方便，而且与切片对照时其厚度基本相同，参照对比更为可靠，可大大地改变观察者的视觉感官，尤其是细胞膜、浆阳性的结构及组织的结构更为清晰。

