



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101957282 A

(43) 申请公布日 2011.01.26

(21) 申请号 201010512725.0

(22) 申请日 2010.10.20

(71) 申请人 杭州市中医院

地址 310007 浙江省杭州市体育场路 453 号
杭州市中医院

(72) 发明人 任兴昌 刘卫艳

(74) 专利代理机构 杭州浙科专利事务所 33213

代理人 吴秉中

(51) Int. Cl.

G01N 1/28(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

A01N 1/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

一种单细胞或组织微粒悬液的制备方法及应用

(57) 摘要

一种单细胞或组织微粒悬液,属于生物医学技术领域。它由下列步骤制备而成:1)组织样品的收集;2)单细胞或组织微粒的缓冲液制作;3)单细胞或组织微粒的缓冲液洗涤;4)单细胞或组织微粒悬液的制备。本发明通过将多种具有阳性对照意义的单细胞或组织微粒或一种具有多种阳性对照意义的单细胞或组织微粒进行组合,只要一点一点该悬液即可作为对照物,不需要进行切片,简化了检测步骤;还可以用于原位杂交、FISH技术及一些病原体的染色,运用范围广;单细胞或组织微粒悬液保存方便、易于长期保存、可反复使用;确保了检测结果的准确性,便于推广、普及,有望全面轻松解决免疫组织化学等原位检测方法质量控制对照问题。

1. 一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于其制备方法如下步骤:

1) 切取并收集对照目标物丰富的组织,用 10% 中性福尔马林固定液固定,或直接收集留存已经确定有某些特定抗原、抗体标记阳性的用福尔马林固定液及时固定后的组织备用;

2) 将步骤 1) 得到的组织切成为 2mm-10mm 的小块,放入打碎器中,加入缓冲液进行打碎 1-2min,所述的组织与缓冲液的体积比为 1:1-100,弃去组织残渣,得到含单细胞或组织微粒的缓冲液;

3) 将步骤 2) 中得到的含单细胞或组织微粒的缓冲液过滤,100-400 目筛网过筛去除过大细胞,再放入离心机中以 2000-3000r/min 的速度离心 5-15min,弃去上层清液,向下层单细胞或组织微粒中加入与其体积比为 1:1-5 的缓冲液,充分震荡后浸泡 1-3h,离心弃去上层清液,重复操作 3-5 次,直至无福尔马林气味溢出为止,得到洗净的单细胞或组织微粒;

4) 将步骤 3) 得到的单细胞或组织微粒放入保存液中保存,得到单细胞或组织微粒悬液,并进行涂片按常规免疫组织化学方法确定阳性细胞所占比例,所述的单细胞或组织微粒与保存液的体积比为 1:1-3,所述的保存液的制备:取 0.05-0.1mol/L、PH 为 7.4 的三羟甲基氨基甲烷 100ml,加温到 60-70°C,加入优质明胶 50-100mg,搅拌溶解后,冷却至室温,加入 0.1-0.8g 牛血清白蛋白,加入 NaN_3 200mg 溶解后过滤制成。

2. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于所述的缓冲液为含 0.02% NaN_3 的磷酸缓冲液、生理盐水或 Tris 缓冲液。

3. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 2) 所述的打碎器可为组织细胞分离器,也可为豆浆机,用组织细胞分离器打碎时,组织切成 2mm-3mm 的小块,用豆浆机打碎时,组织切成 3mm-10mm 的小块。

4. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 2) 所述的缓冲液加入体积为组织体积的 3-50 倍,打碎时间 1min。

5. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 3) 所述的离心时间为 8-10min,优选为 10 min。

6. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 3) 所述的浸泡时间为 2h。

7. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 4) 所述的单细胞或组织微粒可以将处理后的不同微生物、不同肿瘤细胞、不同体细胞按使用方便和商品化的需要进行组合为通用型的单细胞和组织微粒悬液。

8. 根据权利要求 1 所述的一种单细胞或组织微粒悬液的用途,其特征在于在免疫组织化学等待检样本进行组织切片后,在烤片过程中使用点涂器将对照用的单细胞或组织微粒悬液点涂在组织附近,点涂面的最大径为 1~20mm,再在 60~80°C 烤片、抗原热修复,或酶消化、DNA 变性等处理,进行免疫组织化学染色或原位杂交、荧光原位杂交,当对照物中着色的阳性细胞定位清楚和阴性细胞背景干净,说明抗体和免疫组织化学方法可靠,待检切片中的阳性或阴性结果也可靠;应该阳性的抗体在对照物中为阴性,说明切片的阴性结果为假阴性;对应该细胞核阳性的抗体在对照物中为细胞浆或细胞膜着色,说明抗体滴加或免疫组织化学方法有问题;对照物中没有很好的阴性细胞,说明切片的阳性结果为假阳性。

9. 根据权利要求 8 所述的一种单细胞或组织微粒悬液的用途,其特征在于还可以根据

显色阳性细胞数占理论阳性细胞数的比例判断待测样本中的实际阳性细胞数。

10. 根据权利要求 8 所述的一种单细胞或组织微粒悬液的用途,其特征在於所述的对照方法为内组合式对照或外组合式对照。

一种单细胞或组织微粒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,具体涉及一种使用方便、检测方法准确性高的单细胞或组织微粒悬液的制备方法及应用。

背景技术

[0002] 免疫组织化学、原位杂交及荧光原位杂交在病理工作中应用越来越普遍,对部分病变的良恶性和组织细胞性质的确定、以及为放疗、化疗、抗激素治疗、新近发展起来的靶向治疗、新辅助化疗提供指标等都有重要作用。然而其质量影响因素较多以及原有阳性对照方法麻烦对很多缺乏有自身阳性对照的病变,结果的判断缺乏保障,导致诊断、治疗的不恰当,由此带来的医疗纠纷也不断上升。国外有人试用过蛋白质多肽作为阳性对照,但因其没有特定的细胞结构也就难以发挥作用。国内有人介绍因阑尾含有多种组织和细胞,可作为多种抗原的对照,但极为局限。还有根据需要收集各种各样的组织切成细丝包埋在一起,然后连续切片备用;或类似于多组织切片用芯片仪将各种各样的组织排列在一起进行连续切片备用。但这些介绍的方法操作繁琐;备用片相互摩擦影响难以运输、保存,再用于切片没有保障;工作量增加较大,对照物体积大,试剂耗费要增加一倍。由于存在以上多种缺陷,病理技师难以接受这些做法,使得这些方法在实际工作中无法推广应用。建立对照的传统做法是一组检测片只能通过切片方法设立一张阳性对照片作为对照,但是无论是机器操作还是手工操作均不能保证每张玻片的检测条件一致,如每一步骤的时间、试剂的用量、效价程度或其它人为因素等均存在差异,都会造成部分结果的准确性很难判断。目前在我国不设立阳性对照是普遍存在的现象,也是不符合质量控制要求的。

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检测操作过程简单,检测结果准确性高的单细胞或组织微粒悬液的制备方法及应用。

[0004] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于其制备方法如下步骤:

1) 切取并收集对照目标物丰富的组织,用 10% 中性福尔马林固定液固定,或直接收集留存已经确定有某些特定抗原、抗体标记阳性的用福尔马林固定液及时固定后的组织备用;

2) 将步骤 1) 得到的组织切成为 2mm-10mm 的小块,放入打碎器中,加入缓冲液进行打碎 1-2min,所述的组织与缓冲液的体积比为 1:1-100,弃去组织残渣,得到含单细胞或组织微粒的缓冲液;

3) 将步骤 2) 中得到的含单细胞或组织微粒的缓冲液过滤,100-400 目筛网过筛去除过大细胞,再放入离心机中以 2000-3000r/min 的速度离心 5-15min,弃去上层清液,向下层单细胞或组织微粒中加入与其体积比为 1:1-5 的缓冲液,充分震荡后浸泡 1-3h,离心弃去上层清液,重复操作 3-5 次,直至无福尔马林气味溢出为止,得到洗净的单细胞或组织微粒;

4) 将步骤 3) 得到的单细胞或组织微粒放入保存液中保存,得到单细胞或组织微粒悬

液,并进行涂片按常规免疫组织化学方法确定阳性细胞所占比例,所述的单细胞或组织微粒与保存液的体积比为 1:1-3,所述的保存液的制备:取 0.05-0.1mol/L、PH 为 7.4 的三羟甲基氨基甲烷 100ml,加温到 60-70℃,加入优质明胶 50-100mg,搅拌溶解后,冷却至室温,加入 0.1-0.8g 牛血清白蛋白,加入 NaN_3 200mg 溶解后过滤制成。

[0005] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于所述的缓冲液为含 0.02% NaN_3 的磷酸缓冲液、生理盐水或 Tris 缓冲液。

[0006] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 2)所述的打碎器可为组织细胞分离器,也可为豆浆机,用组织细胞分离器打碎时,组织切成 2mm-3mm 的小块,用豆浆机打碎时,组织切成 3mm-10mm 的小块。

[0007] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 2)所述的缓冲液加入体积为组织体积的 3-50 倍,打碎时间 1min。

[0008] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 3)所述的离心时间为 8-10min,优选时间为 10 min。

[0009] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 3)所述的浸泡时间为 2h。

[0010] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液,其特征在于步骤 4)所述的单细胞或组织微粒可以将处理后的不同微生物、不同肿瘤细胞、不同体细胞按使用方便和商品化的需要进行组合为通用型的单细胞和组织微粒悬液。

[0011] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液的用途,其特征在于在免疫组织化学等待检样本进行组织切片后,在烤片过程中使用点涂器将对照用的单细胞或组织微粒悬液点涂在组织附近,点涂面的最大径为 1~20mm,再在 60~80℃烤片、抗原热修复,或酶消化、DNA 变性等处理,进行免疫组织化学染色或原位杂交、荧光原位杂交,当对照物中着色的阳性细胞定位清楚和阴性细胞背景干净,说明抗体和免疫组织化学方法可靠,待检切片中的阳性或阴性结果也可靠;应该阳性的抗体在对照物中为阴性,说明切片的阴性结果为假阴性;对应该细胞核阳性的抗体在对照物中为细胞浆或细胞膜着色,说明抗体滴加或免疫组织化学方法有问题;对照物中没有很好的阴性细胞,说明切片的阳性结果为假阳性。

[0012] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液的用途,其特征在于还可以根据显色阳性细胞数占理论阳性细胞数的比例判断待测样本中的实际阳性细胞数。

[0013] 所述的一种单细胞或组织微粒悬液的用途,其特征在于所述的对照方法为内组合式对照或外组合式对照。

[0014] 与现有技术相比,本发明存在如下有益效果:

1) 本发明通过将多种具有阳性对照意义或一种细胞具有多种阳性对照意义的单细胞或组织微粒悬液进行组合达到有效的浓度,只要点一点于玻片上便可以成为“斑点式”对照物,不需要对对照物进行切片,简化了检测步骤;

2) 本发明制备的单细胞或组织微粒悬液通过等同原理还可以用于原位杂交、FISH 技术及一些病原体的染色,运用范围广;

3) 本发明制备的单细胞或组织微粒悬液保存方便、易于长期保存、可反复使用;

4) 本发明制备的单细胞或组织微粒悬液使用时操作方便,步骤少,节省时间,而且可以避免假阳性、假阴性结果,确保了检测结果的准确性,便于推广、普及,有望全面轻松解决免疫组织化学等原位检测方法质量控制对照问题。

具体实施方式

[0015] 以下结合实施例对本发明作进一步的描述：

一种单细胞或组织微粒悬液，由以下步骤制备而成：1) 先切取并收集对照目标物丰富的组织，用 10% 中性福尔马林固定液固定，或直接收集留存已经确定有某些特定抗原、抗体标记阳性的用福尔马林固定液及时固定后的组织；2) 把组织切成为 2mm-10mm 的小块，放入打碎器中，加入体积为组织体积 1-100 倍的含 0.02%NaN₃ 的磷酸缓冲液、生理盐水或 Tris 缓冲液，进行打碎 1-2min，弃去组织残渣，得到含单细胞或组织微粒的缓冲液，组织与缓冲液优选体积比为 1:3-50，优选打碎时间 1min，所述的打碎器可为 Medimachine 组织细胞分离器、豆浆机或多功能搅拌机等，用 Medimachine 组织细胞分离器打碎时，组织切成为 2mm-3mm 的小块，优选为 2mm 小块，用豆浆机或多功能搅拌机打碎时，组织切成为 3mm-10mm 的小块，打碎方式最好选用点动法，即间歇式打碎；3) 将上述缓冲液过滤，100-400 目筛网过滤除去过大的组织块和细胞碎屑，如果没有大细胞也可以不经过滤这一步，再放入离心机中以 2000-3000r/min 的速度离心 5-15min，弃去上层清液，向下层单细胞或组织微粒中加入与其体积比为 1:1-5 的缓冲液，充分震荡后浸泡 1-3h，离心弃去上层清液，重复操作 3-5 次，直至无福尔马林气味溢出为止，得到洗净的单细胞或组织微粒，优选离心时间为 8-10min，最优为 10 min，优选浸泡时间为 2h，所述的磷酸缓冲液也可不含 NaN₃ 成分；4) 将上述的单细胞或组织微粒放入保存液中保存，得到单细胞或组织微粒悬液，并进行涂片按常规免疫组织化学方法确定阳性细胞所占比例，所述的单细胞或组织微粒与保存液的体积比为 1:1-3，所述的保存液的制备：取 0.05-0.1mol/L、PH 为 7.4 的三羟甲基氨基甲烷 100ml，加温到 60-70℃，加入优质明胶 50-100mg，搅拌溶解后，冷却至室温，加入 0.1-0.8g 牛血清白蛋白，加入 NaN₃200mg 溶解后过滤制成。所述的单细胞或组织微粒可以将处理后的不同微生物、不同肿瘤细胞、不同体细胞按使用方便和商品化的需要进行组合为通用型的单细胞和组织微粒悬液。

[0016] 本发明的一种单细胞或组织微粒悬液的用途，在免疫组织化学等待检样本进行组织切片后，在烤片过程中使用点涂器将对照用的单细胞或组织微粒悬液点涂在组织附近，点涂面的最大径为 1~20mm，再在 60~80℃ 烤片、抗原热修复，或酶消化、DNA 变性等处理，进行免疫组织化学染色或原位杂交、荧光原位杂交，将染色结果进行对照：当对照物中着色的阳性细胞定位清楚和阴性细胞背景干净，说明抗体滴加和免疫组织化学方法可靠，待检切片中的阳性或阴性结果也可靠；应该阳性的抗体在对照物中为阴性，说明切片的阴性结果为假阴性；应该细胞核阳性的抗体在对照物中为细胞浆或细胞膜着色，说明抗体滴加或免疫组织化学方法有问题；对照物中没有很好的阴性细胞，说明切片的阳性结果为假阳性。本发明还可以根据显色阳性细胞数占理论阳性细胞数的比例判断待测样本中的实际阳性细胞数，看是否存在偏差。

[0017] 上述的对照方法为内组合式对照或外组合式对照，所述的内组合式对照，是指按需要将不同的细胞或组织微粒组合后构成单细胞或组织微粒悬液再点涂式对照，即单细胞或组织微粒中含有多种不同类型的细胞，点一点就可以对照多种待测样品，所述的外组合式对照，将含有需要的不同的单细胞悬液分别点涂，对待测样品进行对照。本发明通过将不同的单细胞或组织微粒混合构成组合式、通用型的单细胞或组织微粒悬液，可以发挥多用

途的适用于多种对照对象,减少阳性对照试剂的种类,建立对照时不需要从纷繁的试剂中去选择,以免给使用者带来新的麻烦,或出错。

[0018] 本发明在选取组织时,采用已固定的组织制作单细胞或组织微粒,这样不仅细胞或组织微粒的形态在制作过程中变形小,而且也不需要进行酶的消化处理,本发明还可选择脱落细胞或培养细胞制作单细胞或组织微粒。选用肿瘤组织时,可以选择上皮性、间叶性,也可以是淋巴造血组织肿瘤,最好是恶性肿瘤,因为其实质细胞黏附性差,容易成为单细胞或组织微粒,也可以利用相关细胞系的培养物。有利用价值的病原体的样本可以为结核、人乳头瘤病毒(HPV)、EB病毒、幽门螺杆菌(HP)等感染的组织或培养物。如针对乳腺可选择ER+、PR+、AR+、GCDFFP-15+或c-erbB-2+的乳腺癌组织(它们也可作为CK、CK5/6、CK7、CK8、CK18、CK34 β E12、E-cadherin、Ki-67、P53、Topo II、PCAN、SMA、Calponin、P63、CD34、CD31、CyclinD1等抗体的阳性对照组织),还可选用Her2蛋白(c-erbB-2)表达+、++、+++组织或细胞样本。

[0019] 在组织打碎时选用的打碎器,当组织样本量较少时可选用Medimachine组织细胞分离器,组织块要切成约2mm的小块,一次切割时间不超过2分钟为宜;样本量多时最好选用有200 μ m孔径滤网的豆浆机或多功能搅拌机,最好采用点动,此时组织块可以大一些3mm-10mm,但明显的脂肪和纤维组织要尽量去除,豆浆机或多功能搅拌机的刀刃不要过于锋利,要有切刮的作用就行,打碎之后缓冲液浑浊时及时收集,大的残渣或碎片在滤网内,富含单细胞或组织微粒的缓冲液,在单细胞或组织微粒收集孔和筛网外,反复重新添加缓冲液和新组织如前操作,在将组织放入机器中,加入足够的缓冲液,以保证单细胞或组织微粒是在液体中从组织上分离下来,并随即进入液体中以减少挤压变形的影响。

[0020] 因为切取出来的组织经福尔马林浸泡过,在制成悬液之前要先用大量的缓冲液进行多次充分洗涤,除去夹杂在组织里面的福尔马林,此过程中单细胞或组织微粒需过夜或来不及及时进行下一次清洗可在足量的缓冲液中于4 $^{\circ}$ C冰箱中临时存放。制成单细胞或组织微粒悬液时,要对单细胞或组织微粒进行普通涂片观察其形态,注意有无过大细胞团、过多细胞碎屑,并进行相关免疫组织化学,与来源组织切片进行比较,确定效果是否满意,即判断单细胞或组织微粒的阳性部位或阳性强度与来源组织切片是否相互印证,阳性部位相同、阳性强度一致说明该单细胞或组织微粒悬液制作成功,所述的阳性部位是指细胞膜、细胞核、细胞浆或特定细胞器所在部位。

[0021] 本发明的单细胞或组织微粒悬液在4 $^{\circ}$ C冰箱内可长期存放,不变质,但如果用作ER、PR对照,必须用半年内制作的单细胞或组织微粒;其余均可一年以上,用作抗酸染色对照的可五年以上。所述的单细胞和组织微粒的浓度加离心后下沉细胞体积的1-3倍的缓冲液稀释混匀即可,也可用细胞计数板计数细胞的浓度等待组合,最好在组合后确定阳性细胞所占的比例范围,保证用于对照的阳性细胞要每中倍视野(20倍视野)有50个以上,可含有一定量的组织微粒。

[0022] 本发明在组合时可将不同组织具有不同抗原性的细胞进行搭配,可按基本大类来分,如CK系列、CD系列、激素受体及靶向治疗系列等;也可按组织、器官,或肿瘤大类来分。根据点涂对照物的面积中各细胞的有效数量,组合成可直接使用的通用式的组合式单细胞悬液对照物。还可按膜、浆、核阳性设立点外独立阳性、阴性组合式对照,也可将微生物与细胞进行组合。

[0023] 本发明所用的点涂器具,可以用专用盛放对照用细胞试剂组合器具,配以排式点涂器具,如吸水的棉签、竹签、吸管、液体张力环、瓶口可形成张力膜的瓶、转移液体膜式滴瓶、排枪、排笔等。

[0024] 对照物中总会有阴性的细胞存在。细胞的形态完全可以满足对照观察的要求。对照物中着色的阳性细胞定位清楚和阴性细胞背景干净,说明抗体和免疫组织化学方法可靠,待检切片中的阳性或阴性结果也可靠;如果应该阳性的抗体在对照物中为阴性,说明切片的阴性结果为假阴性;对应该细胞核阳性的抗体在对照物中为细胞浆着色,说明抗体或免疫组织化学方法有问题;对照物中没有很好的阴性细胞,说明切片的阳性结果为假阳性。还可以根据显色阳性细胞数占理论阳性细胞数的比例判断是否存在偏差,可大概估算待测样本中的实际阳性细胞数,如对照样中理论阳性细胞数 30 个,而试验检测出为 20 个,说明有存在偏差,试验的阳性细胞数占总阳性细胞数的 $\frac{2}{3}$,而根据试验中待测样本的阳细胞数乘以 1.5 倍即为实际待测样品的阳细胞数,有定量检测的作用。

[0025] 该方法针对最迫切需要解决的免疫组织化学、原位杂交等组织、细胞等原位检测对照问题,将多种具有阳性对照意义及一种细胞具有多种阳性对照意义的单细胞悬液进行组合达到有效的浓度,只要点一点于玻片上便可以成为“斑点式”对照物,与切片一起进行免疫组织化学染色,不需要对对照物进行切片,完全改变了传统的做法,易于长期保存、反复使用,便于推广、普及,有望全面轻松解决免疫组织化学等原位检测等质量控制对照问题。组合式单细胞悬液作为对照的方法还可以用于原位杂交、FISH 技术及一些病原体的染色。

专利名称(译)	一种单细胞或组织微粒悬液的制备方法及应用		
公开(公告)号	CN101957282A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN201010512725.0	申请日	2010-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	杭州市中医院		
申请(专利权)人(译)	杭州市中医院		
当前申请(专利权)人(译)	杭州市中医院		
[标]发明人	任兴昌 刘卫艳		
发明人	任兴昌 刘卫艳		
IPC分类号	G01N1/28 G01N1/30 G01N33/53 A01N1/00		
其他公开文献	CN101957282B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种单细胞或组织微粒悬液，属于生物医学技术领域。它由下列步骤制备而成：1)组织样品的收集；2)单细胞或组织微粒的缓冲液制作；3)单细胞或组织微粒的缓冲液洗涤；4)单细胞或组织微粒悬液的制备。本发明通过将多种具有阳性对照意义的单细胞或组织微粒或一种具有多种阳性对照意义的单细胞或组织微粒进行组合，只要点一点该悬液即可作为对照物，不需要进行切片，简化了检测步骤；还可以用于原位杂交、FISH技术及一些病原体的染色，运用范围广；单细胞或组织微粒悬液保存方便、易于长期保存、可反复使用；确保了检测结果的准确性，便于推广、普及，有望全面轻松解决免疫组织化学等原位检测方法质量控制对照问题。