



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101778672 B

(45) 授权公告日 2013.02.27

(21) 申请号 200880101307.3

A61B 10/02(2006.01)

(22) 申请日 2008.08.01

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

07113714.5 2007.08.02 EP

W0 2005037182 A1, 2005.04.28,

US 2005147538 A1, 2005.07.07,

US 7147826 B2, 2006.12.12,

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.01

US 20070140920 A1, 2007.06.21,

US 2004253662 A1, 2004.12.16,

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/060128 2008.08.01

US 20070140920 A1, 2007.06.21,

US 5089288 A, 1992.02.18,

(87) PCT申请的公布数据

W02009/016254 DE 2009.02.05

Wataya takafumi et al. High molecular weight neurofilament proteins are physiological substrates of adduction by the lipid peroxidation hydroxynonenal. 《the Journal of Chemistry》. 2002, 第 277 卷 (第 7 期),

(73) 专利权人 恰根有限公司

地址 德国希尔登

审查员 周春艳

(72) 发明人 D·格罗兹 C·伦茨 V·霍兰德

T·罗斯曼

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 郭辉 张静

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 1/36(2006.01)

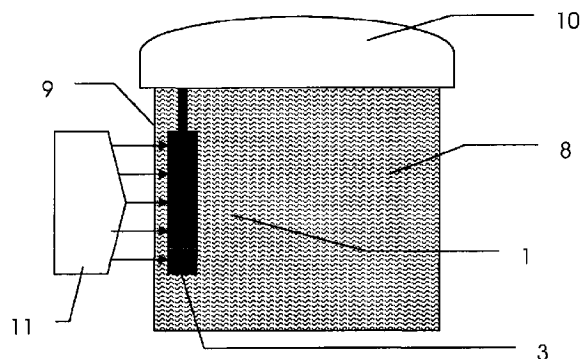
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 4 页

(54) 发明名称

用于固定 / 稳定化样品的方法和装置

(57) 摘要

本发明涉及用于固定和 / 或稳定化样品的方法和装置。生物分子和组织被稳定化或固定, 即保存。需要稳定化的生物分子具体是 DNA、RNA 和蛋白质。本发明的目的是改进生物分子和组织的固定和 / 或稳定化, 并且能够以简化方式分析某种形式的生物分子和组织。为此, 将样品置于最大高度 10 毫米、优选 5 毫米的可渗透容器中。为了实现该目的, 首先例如用解剖刀适当限定样品尺寸。将装填有样品的可渗透容器浸没到固定和 / 或稳定介质中。结果, 样品被固定和 / 或稳定化。提供具有上述高度的可渗透容器用于本发明。



1. 用于执行固定和 / 或稳定化样品方法的可渗透容器, 其总高度不超过 10 毫米, 其特征在于, 其具有锐缘, 位于所述容器的窄面上。
2. 如权利要求 1 所述的可渗透容器, 其特征在于, 所述容器具有可拆卸地连接的盖子 (4)。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的可渗透容器, 其特征在于, 所述容器具有将样品推出所述可渗透容器的柱塞 (7)。
4. 如权利要求 1 所述的可渗透容器, 其特征在于, 其总高度不超过 5 毫米。
5. 一种成套工具, 其包括权利要求 1-4 任一项所述的可渗透容器以及具有给定尺寸和 / 或体积的器皿。
6. 如权利要求 5 所述的成套工具, 其特征在于, 所述可渗透容器阳性闭锁和 / 或摩擦方式连接于所述器皿。
7. 如权利要求 5 或 6 所述的成套工具, 其特征在于, 所述成套工具包括用于固定或稳定化样品的给定方式。

用于固定 / 稳定化样品的方法和装置

[0001] 本发明涉及用于固定和 / 或稳定样品的方法和装置。稳定化生物分子和 / 或固定组织,从而使其耐久。需要稳定化的生物分子具体包括 DNA、RNA 和蛋白质。

[0002] 文献 WO 03/040697 和 DE 4019182A1 揭示了固定组织样品,使固定样品脱水并用石蜡包埋。将包埋在石蜡中的样品切成薄片,在显微镜下进行研究。根据文献 DE 4019182A1,超声有助于样品的浸渍。文献 DE 19820466A1 揭示了用超声破坏生物样品。

[0003] 为了能够稳定生物样品,尤其重要的是使稳定液或稳定流体能够足够快地渗透含生物分子的样品。具体说,如果生物样品是组织,为使组织成功固定,优选使用能够足够快地渗透所述组织的固定液或固体流体。

[0004] 在现有技术中,稳定液生产商规定了稳定期间必须遵守的边界条件。因此,稳定液生产商声称,为在样品的每个点均匀稳定,样品不能超过一定尺寸,尤其是生物分子,例如 RNA。这种声明可能规定了为实现所需的稳定化作用,样品不能超过某一厚度。在一些情况下,还会添加其他几何学规定。例如,实验室助手必须用解剖刀将样品调整到所需大小,然后将样品置于稳定液中。此外,在许多情况下,生产商规定为实现所需稳定化作用,稳定液和样品必须维持一定比率。

[0005] 如果需要固定组织,生产商常常不会规定固定时必须遵守的任何边界条件,尤其是在需要固定的组织用于组织学研究时。对于组织学研究,原则上使用福尔马林作为固定液。将所需组织置于福尔马林中,因而固定。

[0006] 虽然原则上对于使用含甲醛的固定液(例如福尔马林)进行固定没有要求,但在稳定组织的情况下证明不宜采用超过尺寸的样品。因此,即使使用含甲醛的固定液,为成功固定组织,建议不要超过某一大小或尺寸。

[0007] 文献 US 7,147,826B2 揭示了提供可闭合的可渗透篮,将其置于另一含稳定液的器皿中。液体从所有方向渗透进入可渗透篮。如果所述篮含有需要稳定的生物样品,需要确保稳定液能够从所有方向达到样品。

[0008] 文献 US 2003/0087423A1 也揭示了提供用于生物样品的可渗透篮。然而,在这种情况下,将篮紧固于容器盖以便于掌控。同样,溶液能够从所有方向可靠且完全地达到篮中包含的样品。

[0009] 文献 EP 1262758A1 揭示了另一种用于制备组织的可渗透容器。

[0010] 现有技术已知塑料制成的具有铰接盖的盒,商品名“Histosette”,用于控制组织样品进行处理或组织脱水。Histosette 的底部或盖区至少是 3 厘米*2.5 厘米。所述盒至少 0.5 厘米高或厚。底物或盖区为筛孔形式,或具有大量狭缝,使得例如在组织脱水期间液体能够进入盒。

[0011] 如果使用 Histosette 进行组织脱水,然后进行组织学研究,首先将组织置于福尔马林中进行固定,然后将经过固定的组织切成所需大小以匹配 Histosette。再将组织置于 Histosette 中,关闭 Histosette。然后将 Histosette 与其包含的组织一起置于自动化装置中,自动进行脱水。

[0012] 所述自动化装置中规定的脱水步骤包括用固定液重复处理已经固定的组织。然

而,在该发明涵义内并未固定组织,因为组织先前已经固定。然后,将 Histosette 与其包含的组织一起成功浸入醇浓度越来越高的各种醇浴中。醇从组织提取水。为确保组织温和脱水,从一个醇浴到下一个醇浴非常缓慢地提高醇浓度。

[0013] 然后将 Histosette 与其包含的组织一起浸入中间介质,例如二甲苯中。中间介质置换组织中的醇。与醇不同,中间介质与石蜡混溶,便于后续的石蜡处理。

[0014] 然后,将 Histosette 与其包含的组织一起浸入热的液体石蜡中。然后,石蜡渗透进入组织。如果石蜡以所需方式渗透进入组织,从自动装置中取出 Histosette。然后将已发生一定程度固化的包含组织片的石蜡转移到小容器或“模”中,模顶端开口,用热的液体石蜡覆盖,从而在石蜡冷却之后,得到包含组织的石蜡块。当石蜡冷却时,得到包埋在石蜡中的脱水样品。为进行组织学研究,制备微米厚度的组织切片。将这些组织切片安装到载玻片上,脱蜡,染色,显微镜下进行评价。用含甲醛的固定液进行固定的一个缺点在于,有时生物分子发生不可逆交联而被破坏。因此,难以或不可能分离适合分析研究的生物分子。

[0015] 文献 US 2007/0140920A1 揭示了具有适合容纳组织样品的可提升盖的可渗透盒。将样品置于盒中,关闭盒。样品在盒中脱水,清洁并用蜡浸润。从 US 2007/0140920A1 不能推断,在盒中进行固定或稳定化样品然后脱水。

[0016] 文献 US 2005/0147538A1 和 WO 2005/037182A2 也揭示了用于容纳生物样品的可渗透盒。这两篇文献均指出首先应固定样品。只有在固定之后,才将样品材料置于盒中,以所需方式具有进一步处理。

[0017] 文献 US 2006/0178598A1 揭示了一种工具,该工具具有带有钩的突出的针状部件。所述突出的针状部件应插入样品中,然后将被突出的针状部件俘获的样品材料从其余样品上撕下。该工具不包括任何筛孔、狭缝或栅格形式的壁。

[0018] 本发明的目的在于,在一个实施方式中提供生物分子或组织更好的稳定或固定以简化研究。

[0019] 采用具有权利要求 1 所述特征的方法来实现本发明的目的。执行该方法的目的之一包括从属权利要求的特征。由这些从属权项可见优选的实施方式。

[0020] 将样品置于最大总高度 10 毫米,优选 5 毫米的可渗透容器中。这可通过利用原先具有适当尺寸的样品,或者例如在解剖刀的辅助下实现。将装填有样品的容器浸入试剂中进行固定和 / 或稳定化。结果,样品被固定和 / 或稳定化。

[0021] 组织样品固定过程中最急迫的问题之一在于标准的缺乏。没有普遍接受和实施的方法,例如每单位体积的组织所需的固定剂(例如福尔马林)的体积,虽然已知由于自溶作用,太少的固定剂可导致样品内部组织结构的破坏。而且,由于基因诱导或 mRNA 降解,未固定区域细胞的表达模式可能发生变化。

[0022] 当两侧壁或相应的容器底部和盖分开不超过 10 毫米或 5 毫米时,主权项所述容器的最大总高度为 10 毫米或 5 毫米。当样品包含在容器中时,确保液体固定剂和 / 或稳定剂能够快速渗透容器中的样品,当总高不超过 5 毫米时尤其好。由于能够流过容器,一种或多种溶液形式的液体固定剂和 / 或稳定剂能够达到容器内部并渗透进入样品。只有在浸入时或浸入后,可渗透容器内包含的样品才被固定或稳定化。这表示先前样品并未进行固定或稳定。

[0023] 优选地,可渗透容器的两壁或底部和盖是筛孔形式或者具有狭缝等结构,所述两

壁或底部和盖相隔不超过 10 毫米,优选不超过 5 毫米。这种设置在确保可渗透容器内的样品被适当固定和 / 或稳定化方面表现更好。

[0024] 在本发明优选的实施方式中,在填充有精确限定体积的固定液和 / 或稳定液的具有精确限定尺寸的器皿中实现可渗透容器内包含的样品的固定和 / 或稳定化。可渗透容器的尺寸限定了组织样品的最大尺寸,器皿则限定了固定剂和 / 或稳定剂的体积。这具有突出的优势,选定的设置能够实现固定剂和 / 或稳定剂与组织样品之间精确限定的比率。精确限定尺寸的可渗透容器结合精确限定尺寸的器皿导致组织固定的标准化。固定剂和 / 或稳定剂与组织样品之间的最佳选定比率可防止固定不足并确保固定的标准化,因而不同样品间的可比性也更好。为了实施本发明的实施方式,提供或揭示一种成套工具,除可渗透容器外,还包括至少一个具有特定尺寸的器皿。该成套工具优选还包括特定的固定液,从而能够以标准化方式固定或稳定样品。

[0025] 除固定之外,器皿和可渗透容器还可用作储存器皿或由于样品的运输。在另一实施方式中,可渗透容器的器皿的组成部分。例如,可渗透容器可通过连接元件连接于容纳器皿的盖,所述容纳器皿容纳固定剂和 / 或稳定剂。这样,可渗透容器形成器皿的整合组成部分。对于连接于盖的可渗透容器,可容易地从器皿中取出容器进行装料和卸料。无需镊子等辅助工具即可抓紧可渗透容器。这样,污染风险或潜在地接触毒性固定剂的风险最小。如果组织样品必须通过几种溶液,这可以简化方式进行。将所有需要的容器填充到相同设计和相同尺寸的器皿中。与这些器皿匹配的盖通过连接元件连接件可渗透容器。装载组织样品之后,将盖相继放置到不同器皿中而不需要从可渗透容器中取出样品进行转移。

[0026] 在另一实施方式中,可渗透容器不是例如器皿盖子的整体构件,而是通过紧固件固定于盖子。这种紧固件可直接固定于盖子下方或者固定于连接盖子的连接元件。这种设置的优点在于,可渗透容器能够干法装载,因为在装载组织样品之前未与器皿中潜在的毒性固定剂相接触。

[0027] 在另一构型中,可通过简单的机械操作,从盖子去除通过连接元件连接于器皿盖子的可渗透容器。例如,连接元件可以在可渗透容器附近包含预定的断裂点。在又一构型中,可通过容纳器皿盖子上的弹出装置去除可渗透容器。例如,在一个实施方式中,通过连接元件内存在的柱塞产生的机械压力弹出可渗透容器。柱塞位于一端位于可渗透容器上,另一端由器皿盖子伸出。柱塞上的外部压力迫使可渗透容器弹出。该装置的优点在于,无需操作或操纵可渗透容器将其转移到自动脱水器或另一溶液中。

[0028] 在本发明的一个实施方式中,选择可渗透容器的尺寸,使得可渗透容器能够在自动脱水器中使用,可渗透容器中的样品能够在固定或稳定之后进行脱水。如果样品需要在固定或稳定之后进行脱水,无需将样品从可渗透容器转移到另一容器中。因而省去了一项处理步骤。然而,也可以在自动脱水器中进行固定和 / 或稳定化。在固定或稳定化之前,首先由自动脱水器将样品浸入固定液和 / 或稳定液或相当的试剂中。这主要在样品足够薄,因而可以相对快速地进行固定和稳定化的情况下经济值得。

[0029] 如果只需进行组织学研究,可使用福尔马林作为固定剂。然而,如果生物分子需要稳定化用于后续研究,因而耐久,则必须选择合适的稳定液或稳定剂,因为福尔马林不能达到这种效果。为稳定化 RNA 样品,可使用美国安碧公司 (Ambion) 的 **RNAlater®** 作为稳定液。另一个同时稳定 DNA、RNA 和蛋白质的例子是德国恰根有限公司 (Qiagen GmbH) 的稳定

液 Allprotect™ 组织试剂。用于稳定形态进行组织学研究以及稳定组织样品中的 DNA、RNA 和蛋白质生物分子的一个例子是市售 PAXgene® 组织稳定和固定剂。因此,所有这些例子是本发明范围内的稳定剂和固定剂。

[0030] 优选地,使用含多元醇的组合物作为固定和稳定样品的试剂。采用这种组合物,固定和稳定作用尤其好而且简便,参见文献 EP 1804045A1。由这些文献内容可知这种试剂的其他优选实施方式,作为本发明方法的优选实施方式包括在此。

[0031] 为了同时稳定和固定生物样品,将样品以权利要求的方式与包含以下成分的组合物相接触:1-100 重量%至少一种多元醇,0-99 重量%至少一种添加剂,两种所述组分的总量为 100 重量%。

[0032] 多元醇具体是二醇、三醇、四醇、五醇、六醇、七醇、八醇和九醇,尤其优选二醇或三醇。优选地,多元醇具有 2-20 个碳原子。

[0033] 在有关优选的实施方式中,多元醇选自下组:1,2-乙二醇、1,2-丙三醇、1,3-丙三醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇、1,2-戊二醇、1,3-戊二醇、1,4-戊二醇、1,5-戊二醇、2,3-戊二醇、2,4-戊二醇、1,2-己二醇、1,3-己二醇、1,4-己二醇、1,5-己二醇、1,6-己二醇、2,3-己二醇、2,4-己二醇、2,5-己二醇、3,4-己二醇、1,2,3-丙三醇、1,2,3-丁三醇、1,2,4-丁三醇、1,2,3-戊三醇、1,2,4-戊三醇、1,2,5-戊三醇、2,3,4-戊三醇、1,2,3-己三醇、1,2,4-己三醇、1,2,5-己三醇、1,2,6-己三醇、2,3,4-己三醇、2,3,5-己三醇、3-甲基-1,3,5-戊三醇、三甲基醇丙醇、季戊四醇、二乙二醇、二丙二醇、三乙二醇、三丙二醇、聚乙二醇和聚丙二醇。

[0034] 尤其优选地,组合物包含至少两种多元醇的混合物。

[0035] 添加剂优选选自下组:去污剂、抑制核酸或蛋白质降解的抑制剂、粘度调节剂、染料、缓冲化合物、防腐剂、络合剂、还原剂、改善细胞渗透性的物质、离液物质 (chaotropic substances)、固定剂、除多元醇之外的溶剂、至少两种所述添加剂的混合物。

[0036] 在一个优选的实施方式中,方法包括与组合物接触的生物样品的组织学分析和/或与组合物接触的生物样品中的生物分子或来自生物样品的生物分子的分析。

[0037] 根据现有技术,如果样品需要进行组织学研究,用福尔马林完全或部分地固定样品。如果需要对生物分子进行补充稳定,用稳定剂处理未固定的样品部分。相反,本发明方法提供了后续操作的简化,主要是在容器内的样品用固定剂或稳定剂处理时,例如 PCT/EP/2008052371 中所述,同时固定样品中的组织和稳定所述样品中的生物分子。因此,在一个优选的实施方式中,选择溶液或液体,使得所述生物分子和组织同时耐久。

[0038] 根据文献 PCT/EP/2008052371,固定和稳定化形态和生物材料的生物分子,该方法包括以下步骤:

[0039] i) 提供生物材料,和

[0040] ii) 使所述生物材料与第一非水性组合物接触,所述组合物包含:

[0041] (a1) 10-90 体积%甲醇,和

[0042] (a2) 至少一种额外的添加剂,和

[0043] (a3) 任选地,酸,

[0044] iii) 将所述生物材料转移到第二组合物 (B) 中,该组合物包含最高至 99 体积%的乙醇。

[0045] 作为步骤 ii) 中的第一组合物,用于保存生物材料的非水性组合物 (A) 尤其有用,该非水性组合物 (A) 包含以下组分:

[0046] (α 1) 10 到小于 80 体积%的甲醇,

[0047] (α 2) 至少一种额外的添加剂,和

[0048] (α 3) 酸。

[0049] 组合物 (A) 的组分 (α 1) 是甲醇。甲醇在组合物 (A) 中的含量为 10 到小于 80 体积%;优选甲醇含量约为 70 体积%,约为 60 体积%或约 50 体积%。

[0050] 上述方法步骤 (ii) 中组合物 (A) 的至少一种添加剂 (α 2) 或第一组合物的 (α 2) 可以是除甲醇外的其他溶剂,或是选自下组的添加剂:去污剂和抑制核酸或蛋白质降解的抑制剂、DEPC、烷化剂、乙酰化试剂、卤化试剂、核苷酸、核苷酸类似物、氨基酸、氨基酸类似物、粘度调节剂、染料、缓冲物质、防腐剂、络合剂、还原剂、氧化剂、改善细胞渗透性的物质、离液物质(例如异硫氰酸胍或盐酸胍)、含阴离子的离液盐、以及至少两种到六种所述添加剂的混合物。

[0051] 优选的额外添加剂是 C2-C12 的多元醇、聚乙二醇 (PEG) 和二乙二醇单乙基醚乙酸酯 (DEGMEA) 和氯仿。根据本发明,优选组合物 A 的额外组分不是氯仿。优选 PEG 的熔点低于环境稳定。

[0052] 除甲醇之外的溶剂可以是优选选自下组的有机溶剂:一羟基醇(一元醇),C2-C12 多元醇,酮,二甲亚砜,芳族烃,卤代烃,醚,羧酸,羧酰胺,腈,硝基烷和酯,例如选自下组的合适的溶剂:乙醇、1-丙醇、2-丙醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、乙腈、丙酮、茴香醚、苄腈、1-甲氧基-2-丙醇、喹啉、环己酮、二醋精、二氯甲烷、氯仿、二甲苯、二乙醚、二甲醚、甲苯、二甲酮、二乙酮、己二酸二甲酯、碳酸二甲酯、硫酸二甲酯、二噁烷、二甲亚砜、乙酸甲酯、乙酸乙酯、苯甲酸、苯甲酸甲酯、苯甲酸乙酯、乙基苯、甲酰胺、甘油三醋酸酯、乙酰乙酸乙酯、乙酰乙酸甲酯、N,N-二乙基乙酰胺、N-甲基-N-乙基乙酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺、N-甲基-N-乙基甲酰胺、N,N-二乙基甲酰胺、N,N-二甲基硫代甲酰胺、N,N-二乙基硫代甲酰胺、N-甲基-N-乙基硫代甲酰胺、N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基-N-乙基乙酰胺、N,N-二乙基乙酰胺、硝基乙烷、硝基甲基甲苯和磷酸三乙酯。优选地,步骤 (ii) 中的组合物 A 和/或非水性组合物不含卤代烃,尤其是没有氯代烃,特别是氯仿和/或三氯乙烷。

[0053] 根据文献 PCT/EP/2008052371,组分 (α 2) 和 (α 2) 的浓度约为 50-1 体积%,优选约 20%。

[0054] 文献 PCT/EP/2008052371 中描述的组合物 (A) 的组分 (α 3) 或方法步骤 (ii) 中使用的第一组合物的任选组分 (α 3) 是无机酸或有机酸,优选弱酸,最优选乙酸或丙酸。

[0055] 组合物 (A) 可用作本发明方法步骤 ii) 中的第一组合物。然而,需要强调的是,组合物 (A) 也可用于无需“转移步骤”iii) 的生物材料的处理或保存方法中。此外,本发明方法步骤 ii) 中的第一组合物可以是除组合物 (A) 之外的组合物,只要上述步骤 ii) 中的第一组合物包含甲醇作为主要成分。

[0056] 根据文献 PCT/EP/2008052371,用于除了生物材料的方法包括“转移步骤”iii),其中将生物材料转移到第二组合物 (B) 中,所述第二组合物 (B) 包含最高达 99 体积%的乙醇。转移步骤尤其适用于储存生物材料。

[0057] 在采用文献 PCT/EP/2008052371 的方法时,本发明方法的特别优点变得尤其清

楚。在一个实施方式中,用器皿中的组合物 A 固定可渗透容器中的样品,然后将样品转移到含有组合物 B 的器皿中。对于这种组合物 A 到组合物 B 的转移,不需要将样品从一个可渗透容器转移到另一个可渗透容器。

[0058] 在另一种构型中,可渗透容器通过连接元件连接于包含组合物 A 的容纳器皿的盖子。当包含组合物 A 和 B 的器皿具有相同尺寸时,可利用盖子转移可渗透容器内的样品,在这种情况下盖子密封包含组合物 B 的器皿。该过程不需要接触或打开可渗透容器。在此实施方式中,含组合物 B 的器皿可同时用作储存器皿或其他,用于将样品运输到病理学实验室。

[0059] 参考国际专利申请 PCT/EP/2008052371,不同实施方式的优点的具体细节将显而易见。

[0060] 在另一实施方式中,该方法包括与组合物接触的生物样品的组织学分析和 / 或与组合物接触的生物样品中的生物分子或来自生物样品的生物分子的分析。优选地,同时包括组织学分析和生物分子的分析。

[0061] 优选地,同时包括蛋白质分析和核酸分析。

[0062] 在一个实施方式中,样品包含:生物体,分离的细胞,细胞器,细菌,真菌或真菌的部分,病毒,类病毒,朊病毒,组织,组织片段,组织切片,体液,天然且任选分离的蛋白质,合成或修饰的蛋白质,天然且任选分离的核酸,合成或修饰的核酸,其它生物分子,例如脂质,碳水化合物,代谢产物和代谢物,植物或植物的部分,粪便,污迹,自来水,食物样品,环境样品和 / 或法医学样品。

[0063] 各种其他实施方式的优点的进一步的细节参见 EP 1804045A1 或国际专利申请 PCT/EP/2008052371。

[0064] 对于样品,选择能够同时固定组织形态和稳定生物分子的试剂,特别是在先进行组织学研究,然后根据组织学结果任选地分离和分析生物分子的情况下。

[0065] 在一个实施方式中,去除水后可渗透容器完全或部分连接,以现有技术已知的方式形成包含样品的石蜡块,所述样品首先固定和 / 或稳定然后脱水。连接可通过以下方式实现:将可渗透容器完全或部分安装到“模”上,可渗透壁浸入石蜡中,其中所述样品已具有石蜡。从上方通过可渗透壁进一步加入石蜡。石蜡从容器或容器一部分额外地通过可渗透壁,进入“模”并包裹可渗透壁。石蜡冷却之后,容器或容器的一部分连接于该石蜡块。

[0066] 现在容器或其连接于石蜡块的部分形成手柄或握持件,可利用该手柄或握持件将包含样品的石蜡块从“模”中取出。在自动装置或半自动装置中,手柄可用于钳夹包含样品的石蜡块,利用该方式从样品切割所需的组织切片。这种自动或半自动装置称为切片机。

[0067] 因此,优选地,在一个实施方式中,切片机和可渗透容器设计成相互匹配,使得容器可以完全或部分地以所述方式钳夹在所述切片机中。

[0068] 如果已经进行了组织学研究,现在要处理生物分子,常规方式是先从需要进一步处理的石蜡样品部分去除石蜡。例如,为了研究生物分子,用切片机制备进一步的样品。这些切片收集在微量离心机容器中,先去除石蜡,基本上是与脱水相反的过程。首先,加入中间溶液以溶解石蜡。然而,离心组织样品,去除溶解在中间溶液中的石蜡上清液。然后,将组织团粒重悬在纯醇中,以置换中间溶液。第二次离心和去除上清液之后,将组织团粒加入合适的裂解缓冲液中,根据现有技术进行加工。然后,使用纯化的生物分子进行所需的研究。

[0069] 在组织学研究范围内一优选的实施方式中,使用配备有激光的显微镜。如果利用显微镜进行组织学研究,发现感兴趣区域,可用激光非常准确地切割出该区域。利用本发明,尤其便于根据生物分子立即研究该切割区域。如果切割区域非常小,可将该组织部分转移到裂解缓冲液中以分离生物分子如 DNA、RNA 和 / 或蛋白质,进行进一步的研究。

[0070] 在本发明的一个实施方式中,适当限制待固定的组织的大小,尤其是厚度的可渗透容器在其一侧,优选较窄的一侧上具有锐缘开口。提供所述锐缘开口用于推送到需要固定和 / 或稳定的样品中。旋转运动的同时,可渗透容器内的样品部分被分离和去除。可渗透容器侧面优选具有孔等结构,例如筛孔。可渗透容器内的组织具有尤其适用于固定和 / 或稳定化的尺寸。

[0071] 尤其是在具有锐缘开口的实施方式中,可渗透容器固定于盖子,用盖子闭合其中包含需要固定和 / 或稳定化的物质的器皿。盖子满足双重功能。一方面,在固定或稳定化期间用作闭合包含需要固定和 / 或稳定化的试剂的器皿,原则上需要几个小时。另一方面,盖子用作手柄,以使可渗透容器能够简单地推送到样品内。这样,操作尤其简便。

[0072] 在本发明的一个实施方式中,可渗透容器优选包括锐缘开口,并具有柱塞,柱塞穿过盖子用作手柄并穿透进入可渗透容器内。这样,尤其便于将可渗透容器内的组织推送出去。

[0073] 这对于在稳定化后需要立即进行研究的生物分子尤其有利。将稳定化的样品用柱塞推出可渗透容器,优选推送到适当溶液中,生物分子在该溶液中进行研究。通常,首先将需要研究的包含生物分子的样品推送到缓冲液中。

[0074] 提供柱塞也是有益的,因为以这种方式,只有一部分的固定或稳定化样品能够退出可渗透容器。然后,切断从可渗透容器伸出的这部分样品,用于研究生物分子。其余部分用于组织学研究。

[0075] 如果需要研究生物分子,基本上需要破坏并匀浆化样品。在现有技术中,这利用超声实现。然而,现有技术存在可能导致感兴趣分子被破坏的风险。因此,在本发明的一个实施方式中,将包含稳定化样品的可渗透容器置于含液体的另一器皿中。设置超声源,使得超声冲击在可渗透容器上,尤其是聚焦在可渗透容器上。如果可渗透容器内的样品被超声捣碎,捣碎的组织碎片通过可渗透容器适当的渗透壁进入所述液体中,所述液体例如可以是稳定剂。这样,捣碎的碎片发生逃逸,它们不再暴露于超声,因此此时的超声是有害的。这可降低样品捣碎过程中由于过度接触而导致感兴趣分子以不希望的方式被破坏的风险。

[0076] 在上述实施方式中,特别调节和限制超声源,使得基本上仅涉及可渗透容器及容器内部的样品,因而聚焦在可渗透容器上。

[0077] 基本上,可选择一些用于捣碎可渗透容器内的样品的其他方式来代替超声,结果是充分捣碎的样品部分逃逸到外部,较佳地被进一步机械处理排除在外。

[0078] 下面将参考附图更详细地解释本发明。

[0079] 图 1 显示了用于固定样品的可渗透容器的典型基本形式。容器包括相对较大区域的前侧 1 和背侧,例如它们可以是栅格形式,因而允许液体流过。前侧可以是铰接盖,背侧则成为可渗透容器的底部。前侧和背侧之间的举例相对较小,仅仅是几个毫米,具体说不超过 5 毫米。这可确保可渗透容器内的样品能够足够快地被固定液浸透。可渗透容器的壁 2 和 3 也是可渗透的。然而,出于稳定性的原因,优选地实心闭合的壁 2 和 3。

[0080] 图 2 显示了包括前壁 1 的可渗透容器的侧视图,其通过网 5 固定于盖子 4,优选是可拆卸的,例如通过正向闭锁,例如通过搭扣配合连接件。一方面,盖子可用作手柄,用于握持可渗透容器而不发生污染,或者相对地盖子也不被容器或其内容物污染。另一方面,在将可渗透容器浸入适当流体中时,盖子可用于闭合包含需要固定和 / 或稳定化的物质的器皿。如果固定或稳定化需要将样品从一种溶液转移到另一种溶液,利用盖子能够转移可渗透容器内的样品,而不需要打开可渗透容器。由于可拆卸附连,可进一步使用可渗透容器,例如将包含经过固定或稳定化的样品的可渗透容器转移至相应适配的自动脱水器中。

[0081] 在图 2 所示实施方式中,容器底侧 6 优选开放或者打开。制备锐缘,使得所述底侧能够推送到典型样品中,用样品材料填充容器,同时赋予样品材料合适的尺寸。

[0082] 图 3 显示了柱塞 7 的一个实施方式,生物材料可以利用柱塞推出可渗透容器。

[0083] 从成本考虑,可渗透容器优选由塑料制成。对于一次性制品尤其如此。每种新样品采用一全新的可渗透容器,简化操作。

[0084] 然而,可渗透容器也可由金属制成,主要是在需要锐缘来压入组织时。

[0085] 图 4 显示了浸入包含液体 8 的器皿中的包含稳定化样品的可渗透容器的结构。可渗透容器位于器皿壁 9 的附近,优选固定于器皿盖子,具体是可拆卸的和 / 或正向闭锁。超声源 11 位于器皿壁 9 的附近,其尺寸被配置成超声能够到达可渗透容器但不能在器皿中穿透更远,如箭头所示。因此,超声可打碎可渗透容器中包含的样品,然后逃逸通过栅格型的壁浸入液体 8,到达可渗透容器的外部。这样,超声能够进入可渗透容器,超声对准冲击在可渗透壁上。

[0086] 图 5 显示了实施例 1 所述的采用安捷伦生物分析仪 (AgilentBioanalyzer) 对来自大鼠肝脏的 RNA 制剂进行的分析。A:安捷伦凝胶,B:电泳和 RIN 值。

[0087] 图 6 显示了实施例 1 所述的采用安捷伦生物分析仪 (AgilentBioanalyzer) 对来自大鼠肾脏的 RNA 制剂进行的分析。A:安捷伦凝胶,B:电泳和 RIN 值。

[0088] 图 7 显示了实施例 1 所述的采用安捷伦生物分析仪 (AgilentBioanalyzer) 对来自大鼠脾脏的 RNA 制剂进行的分析。A:安捷伦凝胶,B:电泳和 RIN 值。

[0089] 图 8 显示了根据实施例 2 所述对来自 (a) 大鼠肝脏,(b) 大鼠肾脏,(c) 大鼠脾脏和 (d) 大鼠小肠的 DNA 进行琼脂糖凝胶分析。

[0090] 图 9 显示了 (a) 整体,(b) 放大 100 倍和 (c) 放大 630 倍后大鼠肝脏的苏木精 / 伊红染色结果。所述组织根据实施例 3 所述进行固定和处理。

[0091] 图 10 显示了 (a) 整体,(b) 放大 100 倍和 (c) 放大 630 倍后大鼠肾脏的苏木精 / 伊红染色结果。所述组织根据实施例 3 所述进行固定和处理。

[0092] 图 11 显示了 (a) 整体,(b) 放大 100 倍和 (c) 放大 630 倍后大鼠脾脏的苏木精 / 伊红染色结果。所述组织根据实施例 3 所述进行固定和处理。

[0093] 现在将参照以下实施例更详细地描述本发明。这些实施例仅仅是为了说明的目的,不应解释为将本发明限制在所述的实施方式。

[0094] 实施例 1

[0095] 在可渗透容器中固定后组织中 RNA 的稳定性:

[0096] 切除大鼠肝脏、肾脏和脾脏后直接切片,厚度约 3 毫米。将组织样品置于长 4 厘米,宽 2.7 厘米,深 5 毫米的可渗透容器中进行固定。将包含组织样品的可渗透容器完全浸没

到装有 250 毫升 PCT/EP/2008052371 的组合物 A 的固定液的 500 毫升烧瓶中。固定液包含甲醇、乙酸、1,3- 丁二醇和 PEG300。2 小时后,将可渗透容器中的组织样品转移到另一 500 毫升烧瓶中终止固定,该烧瓶装有 250 毫升 PCT/EP/2008052371 的组合物 B 的溶液,包含乙醇 (p. a.) 和 1,3- 丁二醇。孵育 20 小时之后,将可渗透容器中的样品转移到 70% 乙醇中作为第一处理步骤。

[0097] 采用 Leica TP1020 处理器以自动方式进行包括脱水、澄清和石蜡浸润的组织处理过程。在浓度逐渐升高的乙醇中进行可渗透容器的上述处理。用二甲苯进行澄清,作为脱水和用包埋介质浸润之间的中间步骤。在 56°C,用液状石蜡 (Paraplast XTRA, 低熔点, 罗氏有限公司 (Roth Inc.)) 浸渗组织中的空穴和细胞 (详见表 1)。为了获得组织切片所需的载体,将样品包埋到浸润所用的相同石蜡中。

[0098] RNA 提取所用原料是来自石蜡块的新鲜切片。用轮转切片机 (LeicaRM2245) 切割石蜡块,每个样品切割 5 片,厚度 10 μ m,将它们收集在微量离心管中。加入 1 毫升二甲苯,涡旋并在 14000rpm 离心 2 分钟,去除石蜡。弃去上清液,将沉淀溶解在 1 毫升 100% 乙醇中。

[0099] 在 14000rpm 离心 2 分钟后,去除乙醇,沉淀溶解在 150 微升的 RLT 缓冲液中 (市售得自德国恰根有限公司 (QIAGEN)) (包含 GTC, pH = 7, 含 0.143M β - 巯基乙醇)。加入 295 微升水和 5 微升蛋白酶 K (> 600mAU/ 毫升) 之后,在 55°C、1400rpm 的振荡器 / 培养箱中进行消化,持续时间 10 分钟。将裂解液加入 QIA 粉碎机自旋柱 (市售得自德国恰根有限公司),在 14000rpm 离心 2 分钟,进行匀浆化。将渗透的材料与 1225 微升乙醇 (100%) 混合,加入 RNeasyMinElute 自旋柱中 (市售得自德国恰根有限公司)。裂解液离心通过膜, RNA 被膜截留。用包含 GTC, pH = 7.5 和乙醇的 RW1 洗涤缓冲液 (市售得自德国恰根有限公司) 洗涤两次膜,去除污染物。两次洗涤操作之间,将与 pH7.5 的 70 微升 RDD 缓冲液 (市售得自德国恰根有限公司) 混合的 10 微升 DNase (约 30Kunitz 单位) 滴加到膜上并在环境温度下孵育 15 分钟,去除膜上剩余的 DNA。用 500 微升 RPE 缓冲液 (市售得自德国恰根有限公司) (pH = 7.5, 含 80% 乙醇) 再进行两次洗涤操作之后,以最大速率 14000rpm 离心干燥膜 1 分钟。最后,将 30 微升 BR5 缓冲液 (市售得自德国恰根有限公司) (pH = 7) 滴加到膜上,然后在环境温度下孵育 1 分钟,在 14000rpm 离心 1 分钟,洗脱 RNA。所有提取一式三份进行。

[0100] 根据生产商的说明,在安捷伦 2100 生物分析仪上,采用 RNA 6000 纳米分析 (RNA 6000 Nanoassay) 分析总 RNA 的完整性和大小分布。

[0101] 图 5-7 显示了肝脏、肾脏和脾脏一式三份进行的安捷伦凝胶结果,相应的电泳结果和 RIN 值 (“RNA 完整数”)。

[0102] 安捷伦生物分析仪上的 RNA 分析显示了高分子量 RNA 的所有主要特征而没有降解。在凝胶上 (图 5-7, A),可见 18S- 和 28S-rRNA 的两个核糖体带,清晰条带而没有实质变形。在电泳图上 (图 5-7, B),两个条带对应于两个核糖体最大值。以 1-10 为量程, RNA 的 RIN 值在 7 到 9 之间。

[0103] 结论:结合 PCT/EP/2008052371 所述的固定化学在可渗透容器中进行固定可保存组织样品中的 RNA,即使在加工处理和石蜡包埋之后。

[0104] 步骤 介质 时间 温度

[0105]	1	70%乙醇	15 分钟	
[0106]	2	80%乙醇	30 分钟	
[0107]	3	90%乙醇	60 分钟	
[0108]	4	99%乙醇	60 分钟	
[0109]	5	99%乙醇	60 分钟	
[0110]	6	异丙乙醇	60 分钟	
[0111]	7	异丙乙醇	60 分钟	
[0112]	8	二甲苯	60 分钟	
[0113]	9	二甲苯	60 分钟	
[0114]		Paraplast-XTRA 和二甲		
[0115]	10			
[0116]			60 分钟	50℃
[0117]		苯 (1 : 1 混合物)		
[0118]	11	Paraplast-XTRA	60 分钟	56℃
[0119]	12	Paraplast-XTRA	90 分钟	56℃
[0120]	表 1 :在 Leica TP1020 组织处理器上进行可渗透容器内组织样品的加工处理			
[0121]	<u>实施例 2</u>			

[0122] 在可渗透容器中固定后组织的 DNA 的稳定性 :

[0123] 根据实施例 1 所述,将大鼠肝脏、肾脏、脾脏和小肠的组织样品在可渗透容器中根据 PCT/EP/2008052371 所述的组合物 A 和 B 的试剂中进行稳定化,加工处理和石蜡包埋(只有稍许改变:在 300 毫升组合物的试剂中固定,固定 6 小时后终止)。

[0124] DNA 提取所用原料是来自石蜡块的新鲜切片。用轮转切片机(LeicaRM2245)切割石蜡块,每个样品切割 5 片,厚度 10 μ m,将它们收集在微量离心管中。加入 1 毫升二甲苯,涡旋并在 14000rpm 离心 2 分钟,去除石蜡。弃去上清液,将沉淀溶解在 1 毫升 100%乙醇中。在 14000rpm 离心 2 分钟后,去除乙醇,沉淀在 37℃ 孵育 10 分钟以蒸发残留乙醇。

[0125] 所得沉淀溶解在 180 微升 ATL 缓冲液中(市售得自德国恰根有限公司)(pH8.3-8.5),加入 20 微升蛋白酶 K(活性 600mAU/ml)进行消化。连续轻柔混合样品(1400rpm)的同时,蛋白酶消化在 56℃ 进行 1 小时。加入 4 微升 RNase A(100 毫克/毫升)并在环境温度下孵育 2 分钟,去除样品的 RNA。加入 200 微升 AL 裂解缓冲液(市售得自恰根有限公司)(包含 GuHCl, pH6.0),在 70℃ 孵育 10 分钟后加入 200 微升乙醇(100%),将裂解液滴加到 DNeasy®微量自旋柱的二氧化硅膜上(市售得自德国恰根有限公司)。裂解液离心通过膜(1 分钟,8000rpm),使得 DNA 被膜截留。用 500 微升 AW1 缓冲液(市售得自德国恰根有限公司)(GuHCl, 含 57% EtOH)洗涤膜并用 AW2 缓冲液(市售得自德国恰根有限公司)(pH7.5, 含 70% EtOH)进行第二次洗涤操作,去除杂质。在每种情况下,洗涤试剂各自在 8000rpm 离心 1 分钟以通过膜。最后的洗涤操作之后,以最大速率 14000rpm 离心 3 分钟,干燥膜。最后,将 50 微升 AE 洗脱缓冲液(市售得自德国恰根有限公司)(10mM Tris-Cl, pH9.0, 0.5mMEDTA)直接滴加到膜上,然后在环境温度下孵育 1 分钟,在 14000rpm 离心 1 分钟,洗脱 DNA。所有提取一式三份进行。

[0126] 通过琼脂糖凝胶电泳分析总 DNA 的完整性和大小。这涉及将 10 微升合适的洗出

液与 5 微升洗脱缓冲液（含 50% 甘油和溴酚蓝）混合。将该样品施加于 1x TBE 缓冲液中的 0.8% 琼脂糖凝胶中。在 120 分钟内，在每厘米电泳室长度约 3.3 伏下进行电泳。用溴化乙锭染色观察 DNA。

[0127] 琼脂糖凝胶电泳表明 DNA 具有高分子量。在琼脂糖凝胶上（图 8），可见 (a) 肝脏、(b) 肾脏、(c) 脾脏和 (d) 小肠 DNA 各自清晰的条带，分子量约 21kD。基本上没有显示 DNA 发生降解的明显变形。

[0128] 结论：结合 PCT/EP/2008052371 所述的固定化学在可渗透容器中进行固定可保存组织样品中高分子量的 DNA，即使在加工处理和石蜡包埋之后。

[0129] 实施例 3：

[0130] 在可渗透容器中固定组织后组织学形态的保存

[0131] 根据实施例 1 所述，将大鼠肝脏、肾脏、脾脏和小肠的组织样品在可渗透容器中根据 PCT/EP/2008052371 所述的组合物 A 和 B 的试剂中进行固定和稳定化。然后，对样品进行处理并用石蜡包埋。与实施例 1 不同，固定持续 6 小时，转移到根据 PCT/EP/2008052371 的组合物 B 的试剂中之后开始处理 30 小时。根据表 1 所述方案，在步骤 8-10 中采用 Neoclear 代替二甲苯，在 60°C 的温度，用石蜡浸润（表 1 中的步骤 11 和 12），在 Leica TP1020 设备上进行处理。

[0132] 对于组织学分析，采用轮转切片机（Leica RM2245）制备厚度 4 微米的组织切片并固定在玻璃板上。根据标准方案（表 2），用西格玛有限公司（Sigma Inc.）的苏木精和伊红手动进行染色。

[0133] 图 9-11 显示了肝脏（图 9）、肾脏（图 10）和脾脏（图 11）的形态。从左到右，首先在整个切片的概况、再是放大 100 倍和 630 倍。

[0134] 概况表明总体形态和各个组织的细胞结构是完整的。较高的放大倍数（100- 倍）表明典型的形态结构如肝脏小叶（图 9），肾小球（图 10）以及脾脏中的滤和生发中心（图 11）。更高的放大倍数（630- 倍），单个细胞清晰可见。可见细胞核和细胞质，可鉴定各种细胞类型。

[0135] 结论：结合 PCT/EP/2008052371 所述的固定化学在可渗透容器中进行固定对于组织样品的组织学保存尤其有益。

[0136]

孵育 / 介质	持续时间 [分钟]
在 70°C 孵育	10
罗替西托 (Rotihistol) (二甲苯替代品, 罗氏有限公司 (Roth Inc.))	10
罗替西托	10
96% 乙醇	5
80% 乙醇	5

70%乙醇	5
60%乙醇	5
水	3
Mayer 苏木精	5
水	0.5
含 1% HCl 的 70%乙醇	0.5
水	5
伊红	5
水	1
96%乙醇	3
96%乙醇	5
100%异丙醇	10
罗替西托	10
罗替西托	10
用 Entellan 封片	

[0137] 表 2 用苏木精和伊红的染色方案。

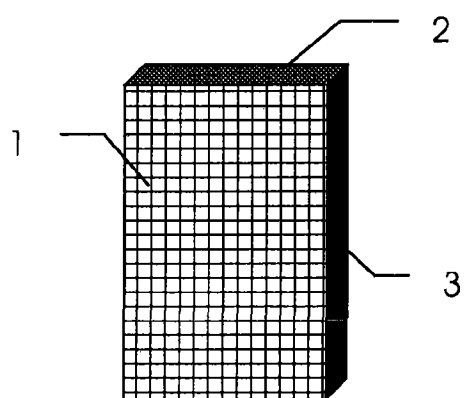


图 1

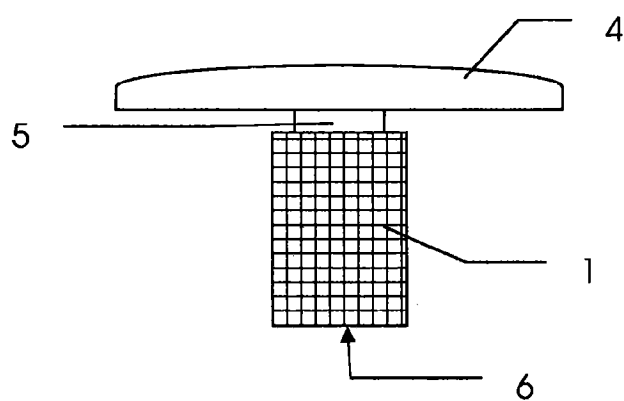


图 2

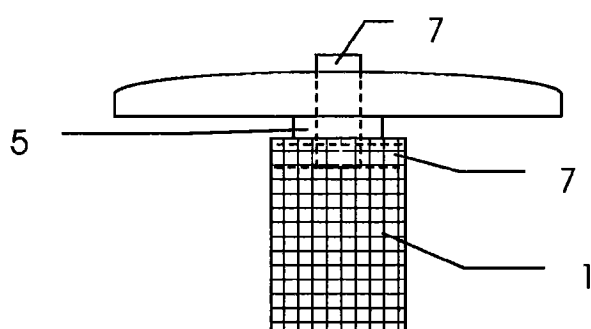


图 3

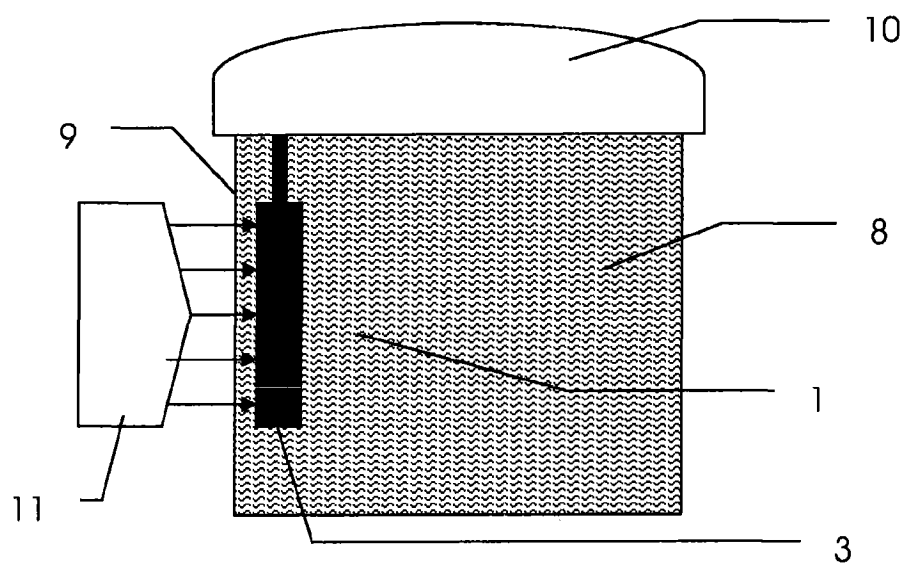


图 4

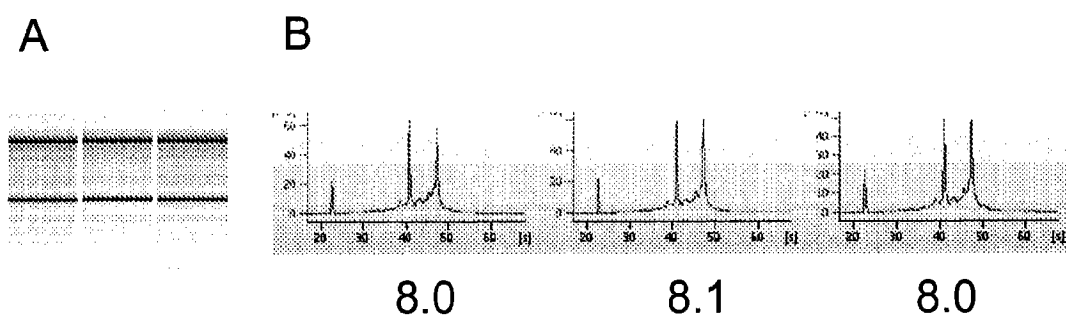


图 5

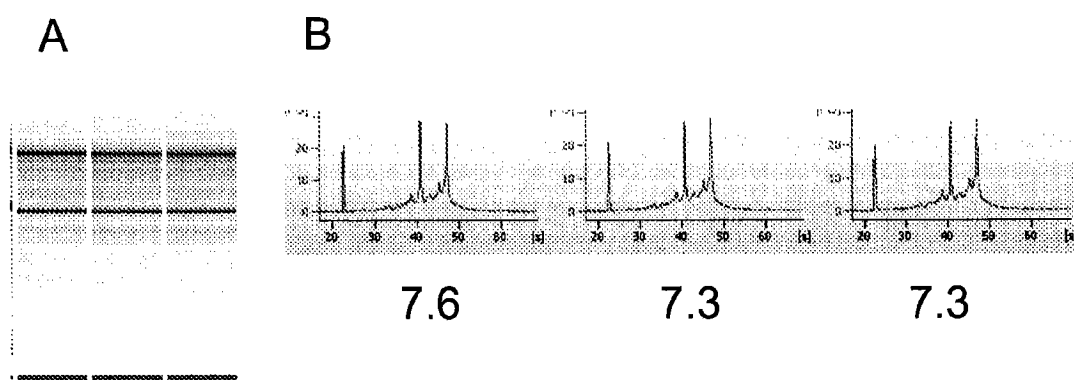


图 6

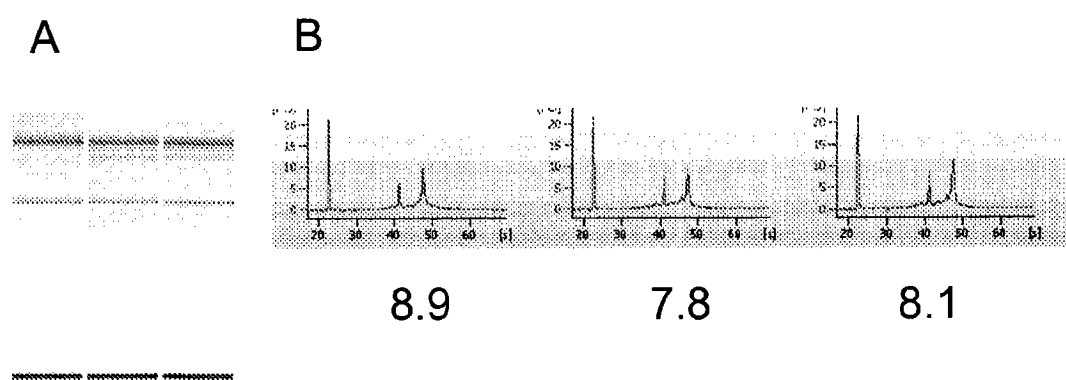


图 7

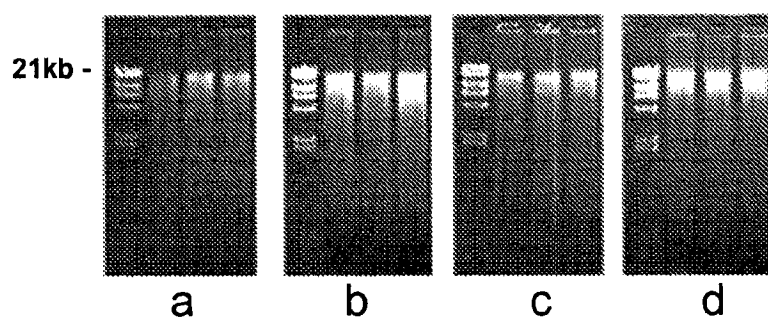


图 8

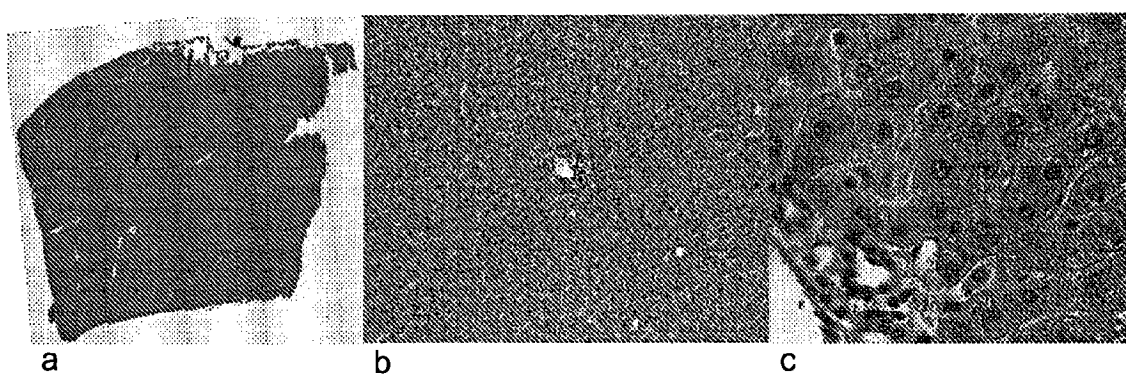


图 9

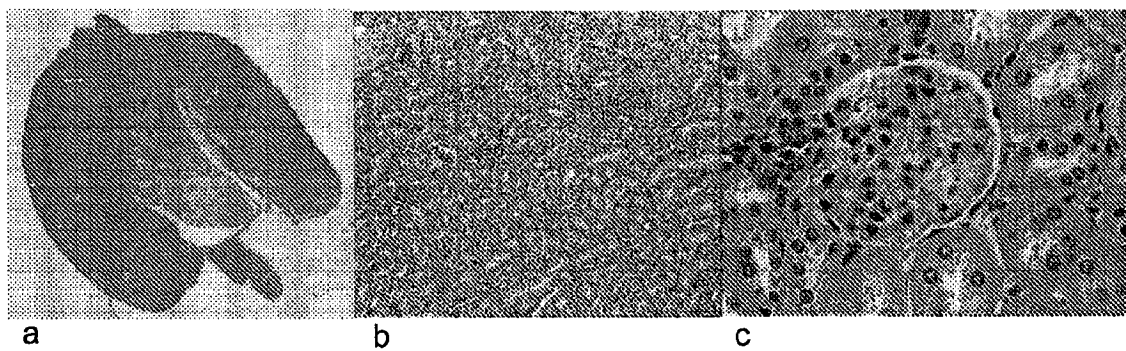


图 10

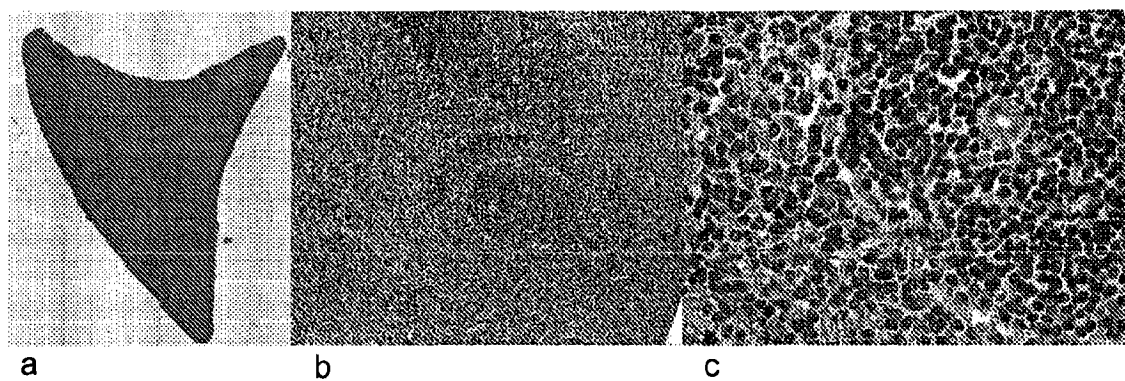


图 11

专利名称(译)	用于固定/稳定化样品的方法和装置		
公开(公告)号	CN101778672B	公开(公告)日	2013-02-27
申请号	CN200880101307.3	申请日	2008-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	恰根有限公司		
申请(专利权)人(译)	恰根有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	恰根有限公司		
[标]发明人	D·格罗兹 C·伦茨 V·霍兰德 T·罗斯曼		
发明人	D·格罗兹 C·伦茨 V·霍兰德 T·罗斯曼		
IPC分类号	B01L3/00 G01N1/36 A61B10/02		
CPC分类号	G01N1/30 B01L3/508 G01N1/36		
代理人(译)	郭辉 张静		
审查员(译)	周春艳		
优先权	2007113714 2007-08-02 EP		
其他公开文献	CN101778672A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于固定和/或稳定化样品的方法和装置。生物分子和组织被稳定化或固定，即保存。需要稳定化的生物分子具体是DNA、RNA和蛋白质。本发明的目的是改进生物分子和组织的固定和/或稳定化，并且能够以简化方式分析某种形式的生物分子和组织。为此，将样品置于最大高度10毫米、优选5毫米的可渗透容器中。为了实现该目的，首先例如用解剖刀适当限定样品尺寸。将装填有样品的可渗透容器浸没到固定和/或稳定介质中。结果，样品被固定和/或稳定化。提供具有上述高度的可渗透容器用于本发明。

