



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106995859 A

(43)申请公布日 2017.08.01

(21)申请号 201710419496.X

(22)申请日 2017.06.06

(71)申请人 重庆市肿瘤研究所

地址 400030 重庆市沙坪坝区汉渝路181号
(石门大桥旁)

(72)发明人 王利锋 陈锐 肖觉 郑晓东
袁芳 宋容

(74)专利代理机构 重庆华科专利事务所 50123
代理人 康海燕

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

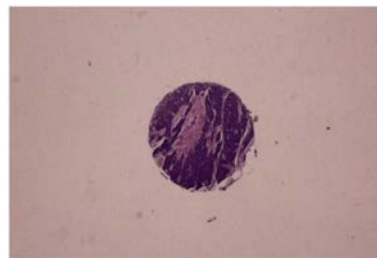
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物及其制备方法

(57)摘要

本发明属于生物病理检测领域,具体涉及一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物及其制备方法,所述阳性参照物中组织碎片形态完整,且大小适合观察,节省抗体试剂,避免了由于阳性组织蜡块切片太大,搅碎引起组织形态不完整、不便于实验观察的缺陷;且通过HE染色选取代表性病变组织块,组织阳性表达区域集中,染色阳性定位准确,质控作用好,能够保证实验结果的准确性及科学性,检测结果有充分的可比性;同时,制作方法非常简单、方便,一次操作就能够制备出大量的、能够供多次检测使用的阳性参照物,大大节省了人力和成本,适用于临床批量工作,提高了检测效率。



1. 一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物,由以下方法制备得到:

步骤1:将已知原位杂交或免疫组化染色阳性的肿瘤组织用福尔马林缓冲液固定,切成1.0-2.0cm×1.0-2.0cm、厚度为0.3-0.4cm的组织块,脱水、浸蜡,石蜡包埋制得阳性组织蜡块,HE染色定位,选择阳性组织蜡块上代表性病变组织区域;

步骤2:将石蜡和蜂蜡按质量比50:1的比例混合熔化成蜡液,将所得蜡液注入包埋模具中,冷却,制得空白蜡块,用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔;

步骤3:用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在步骤1所得的代表性病变组织蜡块穿刺取样后置入步骤2所得的空白蜡块穿刺孔中,加热使加入的病变组织与蜡块融合,冷却,烫熔表面,加上塑料组织包埋框和石蜡液,冷冻,脱模制得组织芯片蜡块;

步骤4:将步骤3所得的组织芯片蜡块切成厚度为4-10um的薄片,二甲苯溶解石蜡,离心,弃上清液,100%乙醇洗涤,离心,弃上清液,95%乙醇洗涤,离心,弃上清液,加入95-100%乙醇稀释至每毫升溶液中含500-1000个组织片段,制得阳性参照物。

2. 如权利要求1所述的阳性参照物,其特征在于:步骤1中所述的福尔马林缓冲液的浓度为10%。

3. 如权利要求1所述的阳性参照物,其特征在于:步骤1中所述的组织块为1.5cm×1.5cm、厚度为0.3cm。

4. 如权利要求1所述的阳性参照物,其特征在于:步骤1中所述的脱水为全自动密闭式脱水机脱水。

5. 如权利要求1所述的阳性参照物,其特征在于:步骤1中所述HE染色定位的方法是将阳性组织蜡块切片,HE染色,显微镜观察有代表性病变组织,定位。

6. 如权利要求1-5任一项所述的阳性参照物,其特征在于:步骤2和3中所述的组织芯片穿刺针的直径为1.0mm。

7. 如权利要求1-5任一项所述的阳性参照物,其特征在于:步骤4中所述的薄片厚度为4-8um;优选地,步骤4中所述的薄片厚度为6um。

8. 如权利要求1-7任一项所述的阳性参照物,其特征在于:步骤4中所述的阳性参照液的浓度为每毫升溶液中含700-800个组织片段。

9. 权利要求1所述的阳性参照物的制备方法,包括以下步骤:

步骤1:将已知原位杂交或免疫组化染色阳性的肿瘤组织用福尔马林缓冲液固定,切成1.0-2.0cm×1.0-2.0cm、厚度为0.3-0.4cm的组织块,脱水、浸蜡,石蜡包埋制得阳性组织蜡块,HE染色定位,选择阳性组织蜡块上代表性病变组织区域;

步骤2:将石蜡和蜂蜡按质量比50:1的比例混合熔化成蜡液,将所得蜡液注入包埋模具中,冷却,制得空白蜡块,用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔;

步骤3:用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在步骤1所得的代表性病变组织蜡块穿刺取样后置入步骤2所得的空白蜡块穿刺孔中,加热使加入的病变组织与蜡块融合,冷却,烫熔表面,加上塑料组织包埋框和石蜡液,冷冻,脱模制得组织芯片蜡块;

步骤4:将步骤3所得的组织芯片蜡块切成厚度为4-10um的薄片,二甲苯溶解石蜡,离心,弃上清液,100%乙醇洗涤,离心,弃上清液,95%乙醇洗涤,离心,弃上清液,加入95-100%乙醇稀释至每毫升溶液中含500-1000个组织片段的阳性参照物,4℃保存备用。

10. 如权利要求9所述的制备方法,包括以下步骤:

步骤1:将已知原位杂交或免疫组化染色阳性的肿瘤组织用10%福尔马林缓冲液固定,切成1.0-2.0cm×1.0-2.0cm、厚度为0.3-0.4cm的组织块,全自动密闭式脱水机脱水、浸蜡,石蜡包埋制得阳性组织蜡块,将所得的阳性组织蜡块切片,HE染色,显微镜观察有代表性病变组织,选择阳性组织蜡块上代表性病变组织区域;

步骤2:选用高纯度的石蜡和蜂蜡按质量比50:1的比例混合熔化成蜡液,将所得蜡液注入包埋模具中,室温下使蜡块自然冷却,制得空白蜡块,待其凝固且稍软时,用内径为1.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔,各孔间距紧凑排列,相距1mm,每排打4个孔,共计5排;

步骤3:用内径为1.0mm的组织芯片穿刺针在步骤1所得的代表性病变组织蜡块穿刺取样后置入步骤2所得的空白蜡块穿刺孔中,加热使加入的病变组织与蜡块融合,冷却,烫熔表面,加上塑料组织包埋框和石蜡液,冷冻,脱模制得组织芯片蜡块;

步骤4:将步骤3所得的组织芯片蜡块切成厚度为6um的薄片,二甲苯溶解石蜡,离心,弃上清液,100%乙醇洗涤,离心,弃上清液,95%乙醇洗涤,离心,弃上清液,加入95-100%乙醇稀释至每毫升溶液中含700-800个组织片段的阳性参照物,4℃保存备用。

一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物病理检测领域,具体涉及一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物及其制备方法。

背景技术

[0002] 在目前临床组织病理诊断和形态学的研究中,原位杂交和免疫组织化学染色已经成为不可或缺的病理诊断辅助技术,在全球临床病理检测中已经得到广泛应用,成为了临床病理检测常规工作中不可缺少的部分。这两种常规检测方法不仅提高了病理诊断的准确性,同时也渗透到了临床和基础学科,在探讨疾病的病因学、发病机制及科研工作中起到了不可估量的作用。如EBER原位杂交检测在多种恶性肿瘤特别是鼻咽癌的病理诊断中起着十分重要的作用,能够确定病毒与组织和细胞的关系,在确定EBV与疾病关系时,EBER原位杂交已成为公认的标准检测方法;又如在乳腺癌组织中,ER、PR及C—erbB-2的免疫组化检测可为患者的预后判断、个体化治疗和靶向治疗方案的选择提供帮助。

[0003] 但由于原位杂交和免疫组化的染色过程比较复杂,影响染色结果的因素也很多,如一些实验条件的差别及其他技术因素的影响,使得最终的染色结果差别很大,从而影响到病理诊断的结果,目前提高原位杂交和免疫组化染色技术水平的需要越来越迫切,而且任重道远。在日常的病理检测中,为保证结果的稳定和可信,常用的方法是在病理检测中设置阳性对照对实验过程进行质控。临床常用的阳性质控方法主要有两种:一种是每次在对待检组织进行检测时,都使用和待检组织同样的方法将已知表达为阳性的组织(简称阳性组织)制成蜡块,然后将制备的阳性对照蜡块和待检组织蜡块裱在同一张载玻片上,进行检测,该方法阳性对照与待检组织实验条件一致,具有结果可比性好和误差小等优点,但该方法每进行一次检测,均需要制备阳性对照蜡块,不仅需要耗费大量的阳性对照组织、试剂等,而且操作繁琐,工作量大,大大降低了检测效率;另一种是组织微阵列(TMA)技术,通过一次性将多个阳性组织转移到一个新石蜡块上,构建高通量阳性组织阵列的方法在一定程度上提高了检测效率,但依然存在制作过程烦琐,所占的面积较大,需耗费大量抗体试剂等缺点,制约其在临床上的推广应用。

发明内容

[0004] 针对现有技术的不足,本发明的一个目的是提供一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物,所述阳性参照物镜下观察组织形态完整,使用方便,保存时间长,制备方法简单,节约试剂成本。

[0005] 本发明的另一个目的是提供一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物的制备方法,所述方法仅需一次操作即可制备出能够供多次检测使用、组织形态完整且保存时间长的阳性参照物,实验操作简单方便、成本节约且大大提高检测效率。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物,由以下方法制备得到:

[0008] 步骤1:将已知原位杂交或免疫组化染色阳性的肿瘤组织用福尔马林缓冲液固定,切成(1.0-2.0) cm×(1.0-2.0) cm、厚度为(0.3-0.4) cm的组织块,脱水、浸蜡,石蜡包埋制得阳性组织蜡块,HE染色定位,选择阳性组织蜡块上代表性病变组织区域;

[0009] 步骤2:将石蜡和蜂蜡按质量比50:1的比例混合熔化成蜡液,将所得蜡液注入包埋模具中,冷却,制得空白蜡块,用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔;

[0010] 步骤3:用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在步骤1所得的代表性病变组织蜡块穿刺取样后置入步骤2所得的空白蜡块穿刺孔中,加热使加入的病变组织与蜡块融合,冷却,烫熔表面,加上塑料组织包埋框和石蜡液,冷冻,脱模制得组织芯片蜡块;

[0011] 步骤4:将步骤3所得的组织芯片蜡块切成厚度为4-10um的薄片,二甲苯溶解石蜡,离心,弃上清液,100%乙醇洗涤,离心,弃上清液,95%乙醇洗涤,离心,弃上清液,加入95-100%乙醇稀释至每毫升溶液中含500-1000个组织片段的阳性参照物,4℃保存备用,所述的95%乙醇、95-100%乙醇是指乙醇体积分数为95%、95-100%的乙醇水溶液。

[0012] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤1中所述的福尔马林缓冲液的浓度为10%。

[0013] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤1中所述的组织块为1.5cm×1.5cm、厚0.3cm。

[0014] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤1中所述的脱水为全自动密闭式脱水机脱水。

[0015] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤1中所述HE染色定位的方法是将阳性组织蜡块切片,HE染色,显微镜观察有代表性病变组织,定位。

[0016] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤3中所述的组织芯片穿刺针的直径为1.0mm。

[0017] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤4中所述的薄片厚度为4-8um;优选地,步骤4中所述的薄片厚度为6um。

[0018] 根据本发明所述的阳性参照物,步骤4中所述的阳性参照物的浓度为每毫升溶液中含700-800个组织片段。

[0019] 本发明提供的通过组织芯片穿刺针对阳性组织蜡块上代表性病变区域穿刺取样,制备成组织芯片蜡块后,再切薄片制备成液态阳性参照物的方法制备得到的阳性参照物,具有以下优点:首先,得到的阳性参照物组织碎片形态完整,且大小适合观察,节省抗体试剂,避免了由于阳性组织蜡块切片太大,搅碎引起组织形态不完整、不便于实验观察等缺陷;其次,通过HE染色选取代表性病变组织块,组织阳性表达区域集中,染色阳性定位准确,质控作用好,能够保证实验结果的准确性及科学性,检测结果有充分的可比性;再次,制作方法非常简单、方便,一次操作就能够制备出大量的、能够供多次检测使用的阳性参照物,大大节省了人力和成本,适用于临床批量工作,提高了检测效率,整个阳性参照物的制备大约需要40min,以用200张4-10um石蜡切片制备阳性参照物为例,按每次用时滴加5ul计算,可用2000次左右,该溶液制备完成后,可等份分装,方便存储,4度保存半年或-20℃保存两年染色阳性强度没有任何改变。

[0020] 本发明人发现,组织芯片穿刺针的直径、步骤4中所述薄片的厚度和阳性参照物的浓度对阳性参照物的实验效果影响很大,当组织芯片穿刺针的直径小于0.8mm或步骤4中所述薄片的厚度小于4um时,制得的阳性参照物中组织以碎片的形式存在,缺乏完整性;当组织芯片穿刺针的直径大于2.0mm或步骤4中所述薄片的厚度大于10um时,制得的阳性参照物

中组织容易压落、折叠、堆积,不便于实验观察;此外,阳性参照物中组织片段的浓度小于每毫升溶液中含500个组织片段,则组织太分散,不集中,容易扩散到待测组织上,造成污染;阳性参照物中组织片段的浓度大于每毫升溶液中含1000个组织片段时,阳性参照物不易扩散,易压落,组织折叠、堆积严重,不便于观察。本发明人通过大量实验发现,当组织芯片穿刺针的直径为0.8-2.0mm时,组织切片的厚度为4-10 μ m时,用95%的乙醇溶液稀释至每毫升溶液中含500-1000个组织片段时,能够得到阳性参照物中组织相对集中,不易折叠和重叠,组织形态完整便于观察,尤其是组织芯片穿刺针的直径为1.0mm,薄片的厚度为6 μ m时,浓度为每毫升溶液中含700-800个组织片段时得到的阳性参照物在使用时,阳性参照物中组织分布相对集中,而又不重叠,组织形态完整,染色结果准确可靠。

[0021] 本发明人经过大量实验发现,阳性参照物中稀释液的种类对实验效果影响较大,如果稀释液中乙醇浓度低于95%,组织片段无法分散均匀,组织重叠、掉片;当稀释液中乙醇浓度为95-100%时,组织片段分布相对集中,又不重叠,组织形态完整,染色结果准确可靠,且制得的阳性参照物4℃下保存半年或-20℃保存两年染色阳性强度没有任何改变。

[0022] 第二方面,本发明提供上述用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物的制备方法,包括以下步骤:

[0023] 步骤1:将已知免疫组化或原位杂交染色阳性的肿瘤组织用福尔马林缓冲液固定,切成(1.0-2.0)cm $\times$ (1.0-2.0)cm、厚度为(0.3-0.4)cm的组织块,脱水、浸蜡,石蜡包埋制得阳性组织蜡块,HE染色定位,选择阳性组织蜡块上代表性病变组织区域;

[0024] 步骤2:将石蜡和蜂蜡按质量比50:1的比例混合熔化成蜡液,将所得蜡液注入包埋模具中,冷却,制得空白蜡块,用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔;

[0025] 步骤3:用内径为0.8-2.0mm的组织芯片穿刺针在步骤1所得的代表性病变组织蜡块穿刺取样后置入步骤2所得的空白蜡块穿刺孔中,加热使加入的病变组织与蜡块融合,冷却,烫熔表面,加上塑料组织包埋框和石蜡液,冷冻,脱模制得组织芯片蜡块;

[0026] 步骤4:将步骤3所得的组织芯片蜡块切成厚度为4-10 μ m的薄片,二甲苯溶解石蜡,离心,弃上清液,100%乙醇洗涤,离心,弃上清液,95%乙醇洗涤,离心,弃上清液,加入95-100%乙醇稀释至每毫升溶液中含500-1000个组织片段的阳性参照物,4℃保存备用。

[0027] 在一个具体的实施方案中,本发明提供的用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物的制备方法,包括以下步骤:

[0028] 步骤1:将已知免疫组化或原位杂交染色阳性的肿瘤组织用10%福尔马林缓冲液固定,切成(1.0-2.0)cm $\times$ (1.0-2.0)cm、厚度为(0.3-0.4)cm的组织块,全自动密闭式脱水机脱水、浸蜡,石蜡包埋制得阳性组织蜡块,将所得的阳性组织蜡块切片,HE染色,显微镜观察有代表性病变组织,选择阳性组织蜡块上代表性病变组织区域;

[0029] 步骤2:选用高纯度的石蜡和蜂蜡按质量比50:1的比例混合熔化成蜡液,将所得蜡液注入包埋模具中,室温下使蜡块自然冷却,待其凝固且稍软时,用内径为1.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔,各孔间距紧凑排列,相距1mm,每排打4个孔,共计5排,制得空白蜡块;

[0030] 步骤3:用内径为1.0mm的组织芯片穿刺针在步骤1所得的代表性病变组织蜡块穿刺取样后置入步骤2所得的空白蜡块穿刺孔中,加热使加入的病变组织与蜡块融合,冷却,

烫熔表面,加上塑料组织包埋框和石蜡液,冷冻,脱模制得组织芯片蜡块;

[0031] 步骤4:将步骤3所得的组织芯片蜡块切成厚度为6 μ m的薄片,二甲苯溶解石蜡,离心,弃上清液,100%乙醇洗涤,离心,弃上清液,95%乙醇洗涤,离心,弃上清液,加入95-100%乙醇稀释至每毫升溶液中含700-800个组织片段的阳性参照物,4℃保存备用。

附图说明

[0032] 图1是本发明实施例1阳性参照物HE染色图(放大40倍);

[0033] 图2是本发明实施例2阳性参照物与待测组织的位置图;

[0034] 图3是本发明实施例2阳性参照物原位杂交染色结果染色图(放大40倍);

[0035] 图4是本发明实施例2阳性参照物原位杂交染色结果图(放大100倍);

[0036] 图5是本发明实施例2阳性参照物原位杂交染色结果图(放大200倍);

[0037] 图6是本发明实施例3阳性参照物HE染色图(放大40倍);

[0038] 图7是本发明实施例4阳性参照物免疫组化染色结果图(放大100倍);

[0039] 图8是本发明实施例4阳性参照物免疫组化染色结果图(放大200倍);

[0040] 图9是本发明实施例4阳性参照物免疫组化染色结果图(放大400倍)。

具体实施例

[0041] 实施例1 EBER原位杂交检测阳性参照物的制备

[0042] 选用重庆市肿瘤医院病理科外检标本中EBER原位杂交检测阳性的鼻咽癌组织,经10%福尔马林缓冲液固定24h,取材,将组织切成1.5cm $\times$ 1.5cm,厚0.3cm,全自动密闭式脱水机脱水、浸蜡,石蜡包埋,4 μ m切片,HE染色,显微镜观察定位,选取蜡块上有代表性的病变组织的区域。

[0043] 选用高纯度的石蜡,每500g加入10g蜂蜡充分熔化后,将蜡液注入不锈钢包埋模具中,室温下使蜡块自然冷却,待其凝固且稍软时,用直径1.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔,各孔间距紧凑排列,相距1mm,每排打4个孔,共计5排。

[0044] 用直径1.0mm组织芯片穿刺针在代表性病变组织蜡块上穿刺取样,用力均匀且有落空感,用针芯将所取组织芯推出,放入上述空白蜡块穿刺孔中,将蜡块模具置于热台上使病变组织样本与蜡块融合,此时观察其穿刺孔中会有小气泡溢出或芯片孔中蜡熔化,置于冷台冷却,再用烧热的电烙铁或镊子将蜡块表面烫熔,加上塑料组织包埋框,再加入熔好的石蜡,待冷冻后制作的组织芯片蜡块即可从不锈钢模具中脱离。

[0045] 使用Thermo HM325型手动轮转式切片机,切200片6 μ m的切片放到100ml的烧杯中,加10ml的二甲苯溶解石蜡,转移到15ml离心管,离心1500g,2min,弃上清;用100%和95%乙醇溶液各洗一次,离心1500g,2min;弃上清,按稀释液:沉淀体积比1:30的比例加入稀释液95%乙醇进行稀释制得阳性参照物,阳性参照物HE染色,显微镜下40倍观察,结果见图1,显微镜下检查组织片段的浓度,每毫升含约800个组织片段,4℃保存备用。

[0046] 实施例2待测组织检测

[0047] 将待测组织切片厚3~4 μ m,石蜡切片裱贴于经防脱处理的洁净载玻片上,常规脱蜡水化,室温晾干。

[0048] 将实施例1制备的阳性参照物摇匀,取阳性参照物5 μ l,滴于待测组织的载玻片上,

尽量靠近待测组织,但又不使阳性参照物扩散至待测组织切片上,位置见图2,室温晾干。

[0049] EBER原位杂交染色

[0050] 滴加100 μ l胃蛋白酶反应液,保证溶液完全覆盖阳性参照物和待测组织上,37℃下孵育30min,蒸馏水洗后无水酒精脱水,空气干燥,滴加10 μ l探针杂交液,盖上盖玻片,37℃下孵育3h或过夜,取出玻片,移去盖玻片,PBS冲洗甩干,滴加适量HRP标记的抗地高辛抗体,37℃下孵育30min,室温PBS浸泡3x2min,最后对切片进行二氨基联苯胺(DAB)显色液显色和常规苏木素复染、封片,显微镜下放大40、100倍观察,结果见图3、4,显微镜下放大200倍观察,结果见图5。由图3-5可以看出,阳性参照物中组织片段呈圆形,形态完整,没有脱落。组织细胞结构例如细胞膜,细胞质和细胞核保存良好。染色阳性定位准确,在细胞核内呈棕黄色,表明免疫组化的染色结果准确理想。

[0051] 实施例3免疫组化检测阳性参照物的制备

[0052] 选用重庆市肿瘤医院病理科外检标本中免疫组化孕激素受体(PR)检测阳性的乳腺癌组织,经10%福尔马林缓冲液固定24h,取材,将组织切成1.5cm $\times$ 1.5cm,厚0.3cm,全自动密闭式脱水机脱水、浸蜡,石蜡包埋,4 μ m切片,HE染色,显微镜观察定位,选取蜡块上有代表性的病变组织的区域。

[0053] 选用高纯度的石蜡,每500g加入10g蜂蜡充分熔化后,将蜡液注入不锈钢包埋模具中,室温下使蜡块自然冷却,待其凝固且稍软时,用直径1.0mm的组织芯片穿刺针在空白蜡块中穿刺打孔,各孔间距紧凑排列,相距1mm,每排打4个孔,共计5排。

[0054] 用直径1.0mm组织芯片穿刺针在代表性病变组织蜡块上穿刺取样,用力均匀且有落空感,用针芯将所取组织芯推出,放入上述空白蜡块穿刺孔中,将蜡块模具置于热台上使病变组织样本与蜡块融合,此时观察其穿刺孔中会有小气泡溢出或芯片孔中蜡熔化,置于冷台冷却,再用烧热的电烙铁或镊子将蜡块表面烫熔,加上塑料组织包埋框,再加入熔好的石蜡,待冷冻后制作的组织芯片蜡块即可从不锈钢模具中脱离。

[0055] 使用Thermo HM325型手动轮转式切片机,切200片6 μ m的切片放到100ml的烧杯中,加10ml的二甲苯溶解石蜡,转移到15ml离心管,离心1500g,2min,弃上清;用100%和95%乙醇溶液各洗一次,离心1500g,2min;弃上清,按稀释液:沉淀体积比1:30的比例加入稀释液95%乙醇进行稀释制得阳性参照物,阳性参照物HE染色,显微镜下40倍观察,结果见图6,显微镜下检查组织片段的浓度,每毫升含约800个组织片段,4℃保存备用。

[0056] 实施例4待测组织检测

[0057] 将待测组织切片厚3~4 μ m,石蜡切片裱贴于经防脱处理的洁净载玻片上,常规脱蜡水化,室温晾干。

[0058] 将实施例3制备的阳性参照物摇匀,取阳性参照物5 μ l,滴于待测组织的载玻片上,尽量靠近待测组织,但又不使阳性参照物扩散至待测组织切片上,位置见图2,室温晾干。

[0059] 免疫组化染色

[0060] 阻断灭活内源性过氧化物酶:3%H₂O₂ 37℃孵育10min,PBS冲洗3 $\times$ 5min;取出后进行抗原修复:置EDTA抗原修复液(pH8.0)中,放入高压锅中加热至沸腾。盖上压力阀至喷汽后持续2-3min,自然冷却20min以上,再用冷水冲洗缸子,加快冷却至室温,PBS冲洗3 $\times$ 5min。正常羊血清工作液封闭,37℃,10min,倾去勿洗。滴加抗PR的一抗4℃冰箱孵育过夜,PBS冲洗3 $\times$ 5min;滴加生物素标记二抗,37℃孵育30min,PBS冲洗3 $\times$ 5min;滴加辣根过氧化

物酶标记的链霉素卵白素工作液,37℃孵育30min,PBS冲洗 $3\times 5\text{min}$;DAB/H2O2反应染色,自来水充分冲洗后,苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。显微镜下放大100、200倍观察,结果见图7、8,显微镜下放大400倍观察,结果见图9。由图7-9可以看出,阳性参照物中组织片段呈圆形,形态完整,没有脱落。组织细胞结构例如细胞膜,细胞质和细胞核保存良好。染色阳性定位准确,在细胞核内呈棕黄色,表明免疫组化的染色结果准确理想。

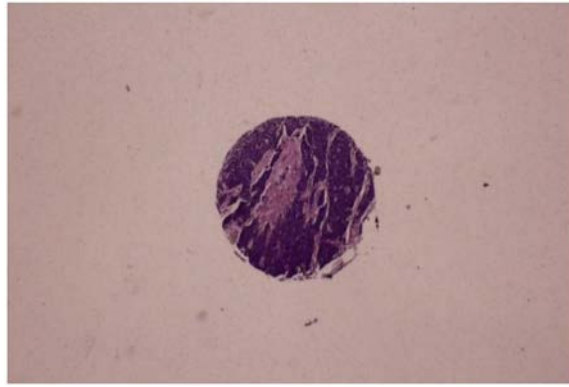


图1

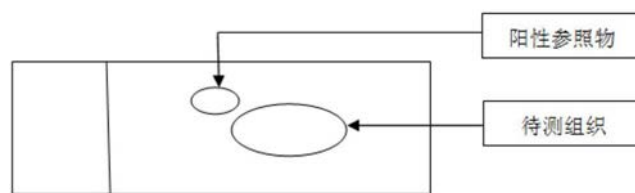


图2

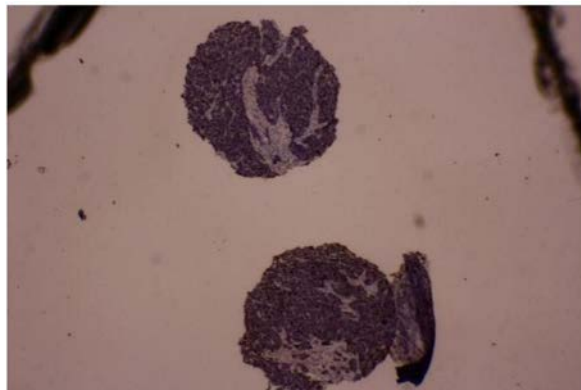


图3

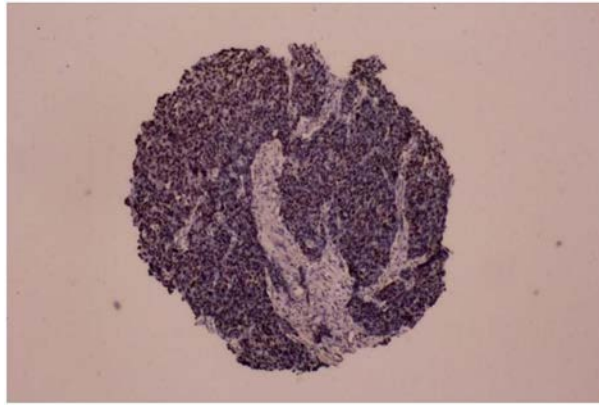


图4

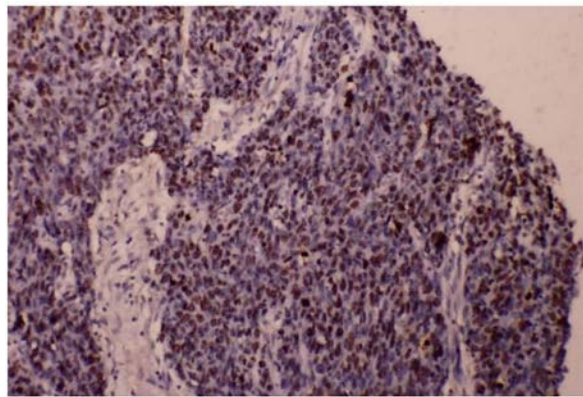


图5

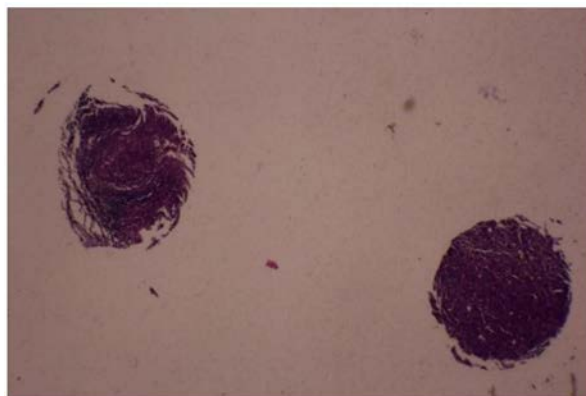


图6

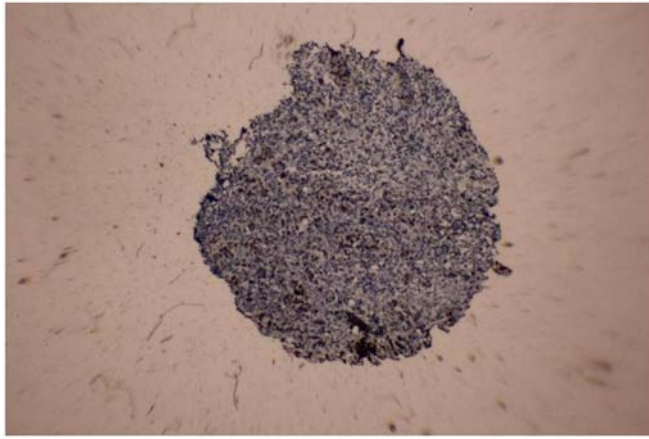


图7

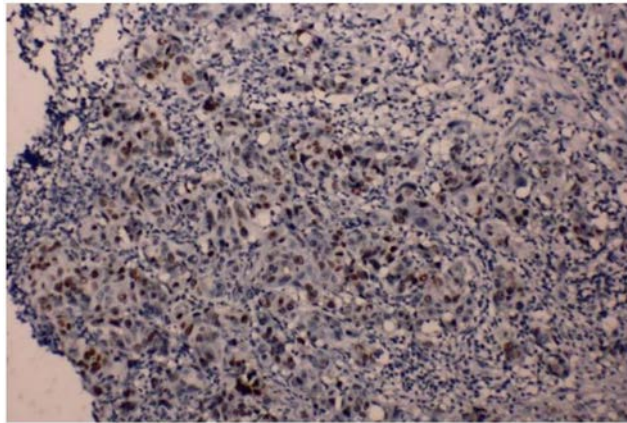


图8

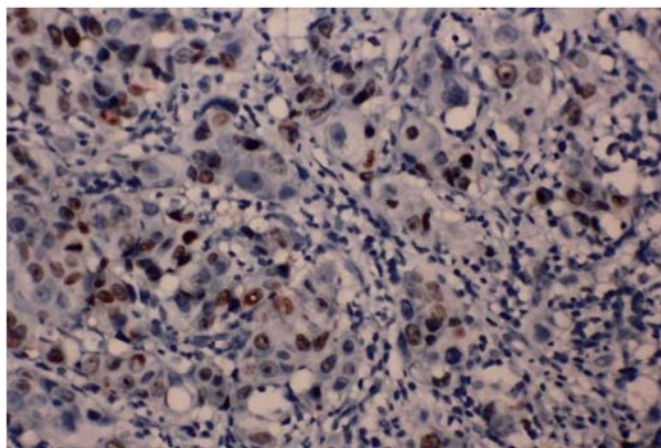


图9

专利名称(译)	一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物及其制备方法		
公开(公告)号	CN106995859A	公开(公告)日	2017-08-01
申请号	CN201710419496.X	申请日	2017-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	重庆市肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	重庆市肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	重庆市肿瘤研究所		
[标]发明人	王利锋 陈锐 肖觉 郑晓东 袁芳 宋容		
发明人	王利锋 陈锐 肖觉 郑晓东 袁芳 宋容		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/531		
代理人(译)	康海燕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物病理检测领域，具体涉及一种用于原位杂交或免疫组化检测的阳性参照物及其制备方法，所述阳性参照物中组织碎片形态完整，且大小适合观察，节省抗体试剂，避免了由于阳性组织蜡块切片太大，搅碎引起组织形态不完整、不便于实验观察的缺陷；且通过HE染色选取代表性病变组织块，组织阳性表达区域集中，染色阳性定位准确，质控作用好，能够保证实验结果的准确性及科学性，检测结果有充分的可比性；同时，制作方法非常简单、方便，一次操作就能够制备出大量的、能够供多次检测使用的阳性参照物，大大节省了人力和成本，适用于临床批量工作，提高了检测效率。

