

一种手动制作不同种病理标本芯片的简易方法

张懿薇¹ 朱琪¹ 崔丹丹² 王一兵² 王俊苹^{1*} 于秀文¹

1. 齐齐哈尔医学院病理学院 齐齐哈尔 161006

2. 齐齐哈尔医学院临床病理诊断中心 齐齐哈尔 161000

摘要：目的：改进现有手工制作方法使操作更简便、成本更低廉、染色更稳定。方法：用注射器 16 号针头及手术刀等工具对不同种组织及包埋细胞沉渣进行处理，制作不同种病理标本芯片，设计适配模具，制作芯片蜡块并对成片进行 HE、免疫组化染色。结果：应用此方法制作的病理标本芯片组织位点排列整齐，无丢失移位，蜡块 HE 染色及免疫组化结果，组织形态及细胞结构均清晰可辨，诊断结果与单片诊断一致，抗体表达特异性强，抗体表达与单片表达一致。结论：在等量使用病理标本的前提下，标本芯片能更有效的节省标本的用量，节约试剂的成本，达到抗体表达环境一致的效果，使有限标本发挥最大作用。

关键词：组织芯片；手工制作；简易方法；病理标本芯片

组织芯片技术又称组织微阵列(tissue microarray,TMA)，是继基因芯片、蛋白质芯片之后以形态学为基础的分子生物学新技术^[1]。组织芯片以组织体积小、大样本信息含量大，定位准确^[2]，可根据不同的需要进行组合和设计等优势进行多种检测，大大节约了检测试剂，且高通量、实验条件一致，该技术被广泛应用到肿瘤学研究^[3]和实验教学^[4]中。现有组织芯片制备方法存在着一些不足之处，如全自动组织芯片机、半自动组织芯片机等制备仪器多为进口设备，且价格昂贵，操作繁琐，不易于广泛开展。手工制作组织芯片，根据是否需要受体蜡块一般分为两种，一种需要制作受体蜡块，因芯片经过二次包埋^[5]，包埋温度很难掌控，切片时会出现散片、掉片等现象；另一种不需要受体蜡块，先将穿刺完成的组织柱放入后用灌注的方法制作^[6]。本文对现有的手工制作方法进行改进，使操作更简便，成本更低廉，切片染色更稳定，不易掉片。

1 材料与方法

1.1 材料

选取黑龙江省齐齐哈尔医学院临床病理诊断中心 2022 年 5 月福尔马林固定石蜡包埋病理组织标本 50 例，及 2024 年 6 例胸水标本制成的细胞块，分别制作两组芯片，两组标本均为石蜡芯片。

1.2 耗材与仪器

石蜡（熔点 56–58℃）、HE 染液、世泰载玻片及防脱玻片、组织切片机（莱卡 RM2245）、烘片机、高压锅、眼科镊子、曲别针、注射器 16 号针头、手术刀、显微镜擦镜纸、1ml 注射器。

1.3 组织芯片制作

1.3.1 制备供体蜡块

石蜡组：取材组织按照常规方法前期处理并进行包埋。细胞块组：先对 6 例胸水标本进行 2500 转 / 分离心处理 5 分钟，去上清，混匀，加入 95% 酒精 10ml 混匀，固定 30 分钟，固定后离心 5 分钟，弃上清，将沉降物用镜头纸包好，放入组织脱水机处理。两组包埋好的蜡块均先切片进行 HE 染色，显微镜下观察染色结果，用记号笔在蜡块上标记出所需部位。

1.3.2 工具和芯片的设计

注射器 16 号针头针尖斜切面磨至平整，用钳子将曲别针调直，做成针管与针芯套管结构的穿刺针（图 1）。按照预先设计用记号笔在显微镜擦镜纸上画出方格，用剪刀剪裁出图形，使剪裁出来的图刚好铺在包埋模具的底部（图 2 为石蜡组所用图纸及模具）。



图 1 芯片制作所需工具

A. 1ml 注射器 B. 16 号针头 C. 曲别针 D. 眼科镊 E. 手术刀 F. 擦镜纸

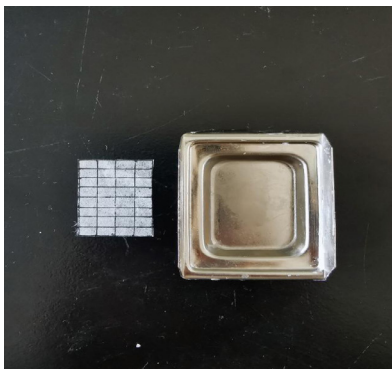


图 2 擦镜纸制作的芯片图及包埋模具 (石蜡组)

1.3.3 包埋准备

根据所需芯片点阵列的多少选取不同的模具, 石蜡组用大号模具, 细胞块组用中号模具, 将模具滴入少量石蜡, 加热模具后用镊子把剪好的图纸放置在包埋模具底部让两者紧密贴合, 室温冷却后待用。

1.3.4 制作芯片蜡块

制作表格编入供体蜡块的编号及所在位置。将两组供体蜡块在 65℃ 包埋台预热 1–2 min, 石蜡组: 用针孔对准欲穿点位垂直于组织块下压使针管穿透供体蜡块, 将针管拔出, 穿刺组织已于针管内, 再用曲别针从针管一侧插入轻轻推出组织柱置于干净的取材板上, 用手术刀修整组织柱的两端使其平整, 眼科镊夹取修好的组织柱按表格预定位置竖立摆好, 此时完成了一个标记点。下面的点同上, 待穿刺全部完成, 每个组织柱之间的间距以 0.1–0.2mm 为最佳。摆放好全部点位后, 将模具小心移动到 65℃ 包埋台上, 使模具底部原有石蜡稍融化, 滴入少量石蜡再移至冷台使组织柱与底部结合更稳固, 用注射器吸取石蜡液缓慢的沿着包埋模具注入, 注入完毕在模具顶部加盖包埋盒。为防止蜡液将组织柱

冲倒及组织柱间产生空洞, 在灌注过程要缓慢, 灌注动作要轻, 如有组织柱倒塌可重复以上步骤, 待蜡块冷却脱模, 此时组织芯片蜡块制作完毕。蜡块上可留出两个空白点位或者用不同的组织柱作为标记顺序点 (图 3)。细胞块组因细胞块易松散穿刺易破碎, 所以仅用刀片修整出所需部位不进行针管穿刺处理, 再用眼科镊夹取修好的细胞块按预先设计好的顺序设定位置摆在贴有芯片图的包埋模具内, 注入石蜡步骤同石蜡组, 完成包埋 (图 4)。

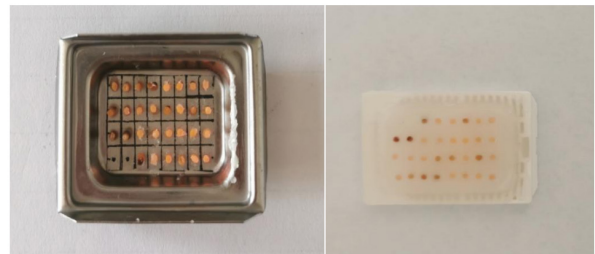


图 3 石蜡组摆放组织柱的包埋模具及制作完成的芯片蜡块

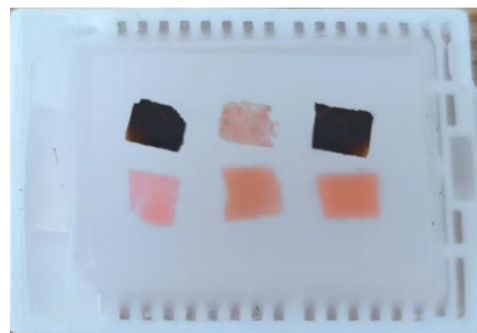


图 4 细胞块组制作完成的芯片蜡块

(1) 芯片蜡块切片、裱片及烤片 对两组芯片蜡块进行切片。为提高蜡块的切片数量, 尽量使用新刀片避免过度修片, 轻柔操作尽量避免组织阵列偏移。

(2) HE 和免疫组化染色 芯片常规脱蜡至水后进行 HE 染色及免疫组化染色。免疫组化染色, 按试剂盒说明书进行即可。石蜡组滴加一抗为 β -catenin 及 P53 抗体, 细胞块组滴加的一抗为 CK 及 TTF-1 抗体。

2 结果

(1) 应用此方法制作的石蜡组芯片合计 30 个点位, 细胞块组芯片合计 6 个点位, 位点排列整齐, 无位移缺失情况, 无空洞, 易修片及切片。通过多次验证, 实验过程中需控制好灌注石蜡液的温度, 应用注射器引流石蜡更为精准。

(2) HE 和免疫组化染色 两组 HE 染色结果: 无刀痕和脱片现象, 组织形态及细胞结构均清晰可辨。两组免疫组化染色结果显示: 组织排列整齐, 特异性强。整个染色流程

中无脱片及缺失位点情况。以上证明，通过此种手动制作不同种病理标本芯片的简易方法完成的组织芯片，符合技术标准，且方法简单，价格低廉（图5）（图6）。

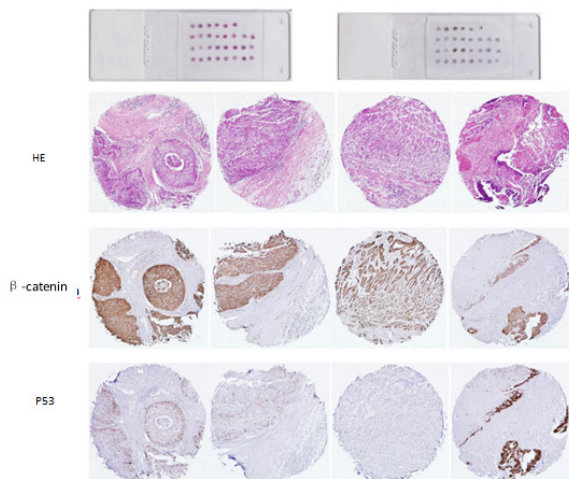


图5 石蜡组组织芯片 HE 染色与 β -catenin 及 P53 蛋白免疫组化染色（100倍）

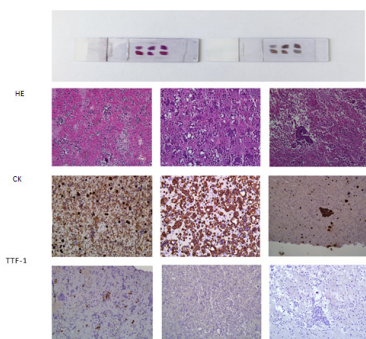


图6 细胞块组组织芯片 HE 染色与 CK 及 TTF-1 免疫组化染色（200倍）

3 讨论

组织芯片技术是将不同样本组织块按预先设计的排列顺序集成在同一玻片上形成的微阵列，具有高通量及均一性等优势，广泛用于临床及科学研究中。目前文献报道^[5-8]手动组织芯片制作方法较多，一种是需要制作受体蜡块。这种芯片的制作方法繁多，常出现供体组织柱与受体蜡块贴合不紧密的情况，植入受体蜡块后需要二次包埋，此步骤的温度和时间难以把控，温度和时间把控不好会造成蜡块植入组织的倒塌或供体组织及受体蜡块之间不能充分融合造成切片困难，组织移位。另一种是无需受体蜡块，对模具固定好的组织柱灌注石蜡，灌注过程中因为组织柱之间的距离小容易产生气泡，且用A4纸打印芯片图，A4纸过厚与模具相贴合不紧密，制作后的蜡块取下A4纸后蜡块容易出现不平的

现象，切片时需要修整蜡块，或调整刀头，修块多，出片率少。本文借鉴其以上经验，制作的组织芯片有以下优势：(1)不需要受体蜡块。避免了散片、掉片、组织移位及组织芯脱落等现象。(2)利用显微镜擦镜纸更薄更容易贴合模具的特性对组织柱进行标记排位，是对芯片蜡块难以标记的技术改进。且图纸便于使组织柱排列整齐，易于从包埋模具底部撕下，不易造成蜡块底部不平整。(3)灌注过程使用一次性注射器，注蜡更精准且不易产生空洞。(4)制作蜡块时石蜡逐渐溶解及逐渐冷冻使组织柱、芯片图、包埋模具紧密结合，组织柱不易倒塌且不产生空洞。(5)出片率符合标准且制作过程不易掉片。(6)此法简单容易操作且成本低，工具易获得，易于推广^[6]。

参考文献：

- [1] 张登才，刘 斌，张丽华，等. 一种简便实用的组织芯片制作方法 [J]. 诊断病理学杂志, 2013, 20(11): 722-724.
- [2] 孙璐瑛，巨宏亚，陈 妮，等. 组织芯片的简易制作方法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(06): 688-689.
- [3] 罗成贵. 组织芯片技术在消化道肿瘤研究中的应用 [J]. 中外医学研究, 2019, 17(13): 186-188.
- [4] 曹 璋，崔 敏，张 燕，等. 组织芯片在形态学实验教学中的应用及体会 [J]. 卫生职业教育, 2016, 34(14): 67-68.
- [5] 朱伟峰，彭凤英，翁秀琴，等. 手工制作组织芯片的方法 [J]. 中国卫生标准管理, 2019, 10(01): 127-128.
- [6] 武振汝，陈梦琳，李 丽，等. 介绍一种简单易行的组织芯片制作方法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(12): 1489-1491.
- [7] 孙璐瑛，巨宏亚，陈 妮，等. 组织芯片的简易制作方法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(06): 688-689.
- [8] 张 盛，岳君秋，王明伟. 一种制作组织芯片的简易方法 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(08): 1009-1010.

作者简介：

张懿薇（1989—），女，汉，黑龙江省齐齐哈尔市人，本科，齐齐哈尔医学院，助理实验师，病理学技术方向。

通讯作者：王俊苹（1984—），女，汉，黑龙江省齐齐哈尔市人，硕士，齐齐哈尔医学院，实验师，妇科肿瘤方向。

基金项目：

齐齐哈尔医科院基金资助项目（QMSI2022M-04）