

组织列阵检测技术(TMA)制作组织切片 过程中的问题分析和改进

金月玲¹ Ui-Soon Khoo² 戴振声^{3Δ}

¹ 上海健康职业技术学院生物医药系 上海 200237; ² 香港李嘉诚医学院玛丽医院病理科 香港;

³ 复旦大学附属上海市浦东医院血液科 上海 201399)

【摘要】 目的 本文介绍组织列阵检测技术(tissue microarray technology, TMA)制作组织切片的程序, 阐述 TMA 检测技术的操作经验和改进方法。**方法** 收集 147 例乳腺癌标本(香港玛丽医院提供), 采用 TMA 技术制备石蜡切片。详述制作 TMA 石蜡切片的过程并分析和解决制作过程中出现的各种问题。**结果** TMA 技术可以将数百个组织整齐排列在同一个受体蜡块上, 使多种肿瘤基因在一张 TMA 切片上同时进行检测。乳腺癌组织阵列整齐, 微组织块无明显脱失, 有小部分折叠, 组织形态基本保存完好。**结论** 通过防止和改进在制作过程中出现的问题, 可成功制备 TMA 蜡块, 为后期基因表达及功能的检测提供了技术保障。

【关键词】 组织列阵检测技术(TMA); 分子生物学技术; 乳腺癌

【中图分类号】 Q-336 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2014.01.020

Problem analysis and improvement on making tissue sections using tissue microarray technology (TMA)

JIN Yue-ling¹, Ui-Soon Khoo², DAI Zhen-sheng^{3Δ}

¹ Department of Biomedicine, Shanghai Academy of Health Sciences, Shanghai 200237, China;

² Department of Pathology, The University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Hong Kong;

³ Department of Hematology, Shanghai Pudong Hospital, Fudan University, Shanghai 201399, China)

【Abstract】 Objective To introduce an array-based high-throughput and simple-operated technique named tissue microarray technology (TMA), also to analysis the problems and the improvement in the process. **Methods** We collected 147 case specimens of breast cancer from Queen Mary Hospital of Hongkong for TMA detection. We described the process of the TMA operation in detail, and analyzed the troubleshooting that may happen in TMA process. **Results** Hundreds of tissues were arrayed at a high density on one block and the specimens were neatly arrayed, the tissue appeared small part folded with the morphological characteristics being well preserved. **Conclusions** By preventing the problems and making improvement in the process, TMA block of wax can be successfully organized, which provides the possibility to widely investigate gene expression and function in clinical practice.

【Key words】 tissue microarray technology (TMA); molecular biology techniques; breast cancer

* This work was supported by the Project of Shanghai Municipal Health Bureau (2010052).

组织阵列检测技术(tissue microarray technology, TMA)是通过一个简单的手动操作的实验室仪器完成的组织检测技术,它可以将数十、数百乃至数千个小的组织整齐地排列在一个蜡块上,由多个高密度排列的0.6~3.0 mm的蜡芯组成。制成切片后,多个单独的组织样本可同时在一张玻璃片上进行基因的分析 and 表达,一次实验即可获得大量信息。这大大节约了组织原材料和检测试剂,减少了实验误差,增强了可比性,简化了操作,TMA技术为从基因功能研究走向临床实践提供了捷径。本文重点介绍在香港李嘉诚医学院病理学系学习组织芯片构建的过程和体会,探讨在切片制作过程中如何提高TMA的切片成功率,包括制作石蜡切片的改进方法、分析和解决切片过程中应注意的问题等。

材料和方 法

标本来源 收集1996年1月至2005年12月间香港玛丽医院外科送检的病理标本,经临床及病理HE染色确诊为乳腺癌,共计147例。

标本准备 所有标本经4%甲醛固定,石蜡包埋,常规切片,HE染色,经临床及病理检查确诊为乳腺癌。在切片上面画圈标记病变的切片部位,收集对应的组织蜡块作为供体蜡块,整理临床资料。

仪器 TMA仪器,直径2.0和0.6 mm组织打孔针(Beecher Instruments),切片机(德国MICROM公司)。

制作组织芯片

准备供体蜡块和HE染色切片 供体蜡块至少有1 mm厚,厚度最好为3~4 mm。判断每个供体蜡块对应的新鲜的HE染色切片,用圈或点标记取样部位。

制备受体蜡块 受体蜡块通过融化常规的石蜡(熔点温度55~58℃)浇注到模具中,制成空白蜡块,过程中避免形成气泡。模具的大小可根据列阵点的多少而定,模具厚度为5~10 mm。

受体蜡块与供体组织蜡芯的制备与融合 TMA仪器有2个打孔针,直径分别为2.0和0.6 mm。0.6 mm打孔针用来制备受体蜡孔,即用打孔针在受体蜡块上冲击一个孔,将空白组织芯推出,在受体蜡块上留下空白孔;再用2.0 mm打孔针在供体蜡块的标记部位打孔,采集组织芯,将需要的供体

组织芯推入受体蜡块的空洞中,于是供体蜡块的组织芯成功植入到受体蜡块的空白孔中。由于受体蜡块的组织芯直径比供体蜡块的孔径小,因此两者结合紧密,不留空隙。根据样本的多少,制备下一个组织芯,整齐排列在同一个受体蜡块上。两个打孔针的移动和定位可以通过调节仪器的螺丝来完成,因此在制作受体蜡块的空白孔及融合供体的组织芯时,一定要转换打孔针。完成两者融合后,再将打孔针调节控制旋钮到下一个组织阵点。每个标本制作3个组织芯,并列排列。

制作石蜡切片 常规石蜡切片之前,确保列阵蜡块的平面光滑平坦。将蜡块放置在37℃保温箱中10~15 min,使蜡块中的组织芯与孔壁紧密结合,然后用一张清洁的显微镜载玻片压在列阵蜡块的表面,均匀施压使所有组织芯在同一个水平面上。修正蜡块,用冰块冻结组织面,连续切片,厚度为4~5 μm,用于免疫组化染色检测,使用多聚赖氨酸处理过的载玻片以防脱片,常规制作石蜡切片。

结 果

本实验每个组织芯蜡块切5张切片,载玻片上组织阵列排列整齐,一张用于HE染色,再次确诊病理变化,其余用于免疫组化染色或其他分子生物学检测(图1)。HE染色切片结果与供体切片诊断一致。

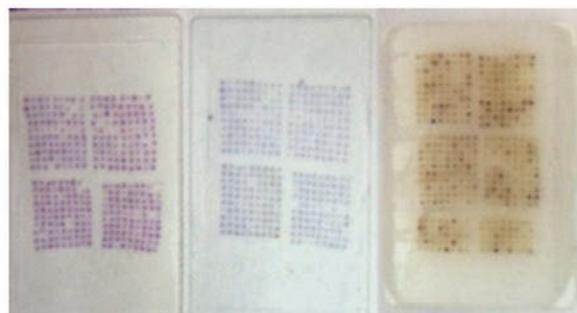


图1 制作成功的TMA蜡块(右)和切片(中、左)

Fig 1 TMA paraffin block (right) and slides (middle, left)

讨 论

TMA技术在文献中有很多介绍,本文介绍的这种技术操作相对简单,其在香港李嘉诚医学院病

理学系的实验室被广泛用于多项分子病理学检测。

1986年,Battifora^[1]首先提出了多肿瘤组织蜡块(multitumor tissue block, MTTB)的制作技术,即将多个组织标本经手工组合,重新排列包埋蜡块,即在一个正常大小的蜡块上嵌入100个或更多不同的组织样本。MTTB允许在一张切片上用一滴抗体检测大量的组织样本。1998年,Kononen等^[2]提出了组织芯片或称组织微阵列(tissue microarrays)的概念,开发了基于阵列方式的高通量技术,将直径0.6 mm的乳腺癌小组织样本,以阵列方式排列包埋于同一块20 mm×45 mm的石蜡块中,然后进行切片,即将数十个甚至数千个不同个体的圆柱型组织集中在一张载体上,形成组织微阵列生物芯片。随后,这项技术得到了改进和应用,主要用于生物标志物的鉴定、识别和验证,尤其是从实验室研究到临床验证会很大程度上依赖于组织芯片技术与自动化定量分析技术的结合^[3-4]。在一些样本量大、可重复性要求高的领域,如分子流行病学^[5]、细胞遗传学^[6]等,类似的TMA技术必不可少。国内亦有实验室构建了各种混合性肿瘤的芯片,并采用HE染色和免疫组化对多种抗体进行检测^[7]。

针对制作切片过程中的常见问题,我们提出了相应的解决方法,并进行操作技术上的改良:(1)供体组织芯没有准确进入受体空洞中,这时要检查是否移动了载物台,或打孔针是否弯曲。(2)供体组织芯不易取出,这时应更换新的针头,因为针头可能被堵住了。(3)供体组织芯推入受体空洞时太深,导致阵列平面凹进,这时要用小的打孔针钻掉该组织芯,然后在相同位置重新放入标本。(4)融合完成的蜡块表面不平,尤其是中央会凸起,这是由于蜡块表面排列大量样本时组织芯密度太高、样本间距太小造成的。可以通过减少供体组织芯的数量或加深受体空洞来解决。还有一种补救的办法是:将融合好的凸凹不平的蜡块放入37℃的保温箱中静置15 min,当蜡块变软时,用一张干净的玻璃片盖在表面,轻轻按压,直到表面平坦为止。

在制作TMA组织列阵蜡块过程中,最常见的问题就是供体组织芯没有准确地进入受体空洞中。我们建议:(1)可以将受体蜡块事先制作成排列整齐的空洞,这样就可以防止在多次转换打孔的过程中移动载物台,导致受体蜡芯未能准确植入到供体空

洞中;同时由于提前制作受体蜡块,还可大大缩短制作时间。(2)一定要保证受体蜡块的质量,要求蜡块韧性好、质地软,否则在打孔和植入的过程中容易碎裂或使打孔针弯曲。

制作成功的组织列阵蜡块可以用于免疫组化检测、HE染色、HC、ISH、荧光原位杂交(FISH)、原位杂交、TUNEL检测细胞凋亡等分子病理学检测。组织芯片将众多样本放在同一切片上,减少了分批、分次实验造成的实验误差,同化了实验条件,节约了实验试剂和操作时间。TMA所用样本的组织量少,剩余组织破坏性小,标本可继续用作其他检测。根据不同需要可设计同一肿瘤或多种肿瘤的组织芯片,以进行一种或多种肿瘤的分子生物学标记。

癌症的发生和发展是一个多基因、多步骤的复杂过程,至今未被完全了解,部分原因是由于缺少高通量的分析技术。尽管大量新的基因和基因改变不断被提出,但是这些分子标志物在临床肿瘤诊断、预后和治疗中的意义还需要TMA这样的高通量检测方法加以验证。

参 考 文 献

- [1] Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing[J]. *Lab Invest*, 1986, 55(2): 244 - 248.
- [2] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. *Natl Med*, 1998, 4(7): 844 - 847.
- [3] Giltane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2004, 1(2): 104 - 111.
- [4] Brennan DJ, Kelly C, Rexhepaj E, et al. Contribution of DNA and tissue microarray technology to the identification and validation of biomarkers and personalised medicine in breast cancer[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2007, 4(3): 121 - 134.
- [5] Vernon SD, Whistler T. Microarray technology for use in molecular epidemiology[J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 382: 97 - 113.
- [6] Bejjani BA, Shaffer LG, Ballif BC. The use of microarray technology for cytogenetics[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 632: 125 - 139.
- [7] 陈水平, 丁毅, 高美钦. 一种简易的免疫组织化学阳性对照新方法[J]. *中华病理学杂志*, 2006, 35(11): 693 - 694.

(收稿日期: 2013-02-01; 编辑: 王蔚)