

医学病理技术与诊断基础

(上)

张文丽等◎主编



张文丽

1974年出生，高级实验师，从事医学病理及超微病理形态学教学、实验及科研等工作10余年，理论扎实，技术经验丰富，尤其擅长神经系统疾病超微病理研究。任中国电子显微镜学会委员，《中国医学创新杂志》编委，曾在北京大学医学部病理学系研修电镜技术及超微病理诊断。主持市厅级科研项目3项，作为导师指导完成国家级大学生创新创业训练计划项目1项。发表中文核心及国家级论文20余篇，参编著作1部，参与研究国家自然科学基金课题1项，省科技厅课题多项，荣获河北省科研成果8项，先后获省及市科技进步二、三等奖多项。



王晓燕

1982年出生，主治医师，医学硕士，毕业于重庆医科大学。从事病理诊断及教学工作多年，具有较丰富的临床病理诊断经验，尤其擅长于甲状腺、乳腺、女性生殖系统肿瘤病理及软组织肿瘤病理，具有利用先进的病理技术解决疑难病理诊断的能力，在中文核心期刊发表科研学术论著5余篇。



楚广民

1966年出生，郑州大学附属肿瘤医院（河南省肿瘤医院）病理科，主任技师。毕业于郑州大学，学士学位。现担任医院病理科病理实验组组长，河南省医学会病理专业委员会病理技术学组副组长，河南省健康科技学会副理事长。擅长常规病理技术、快速病理诊断技术、免疫组化技术及分子生物学技术。获得河南省科学技术进步奖二等奖3项，国家发明专利2项。在各种专业杂志共发表国家级及核心期刊论文20多篇（第一作者），SCI论文1篇，以副主编参编专业书籍1部。

编 委 会

主 编 张文丽 王晓燕 楚广民
 赵 伟 李永格

副主编 潘陶强 赵玉峰 张静芳 袁 倩
 毛晓燕 刘琼琼 蒋春樊

编 委 (按姓氏笔画排序)

王晓燕	成都医学院第一附属医院
毛晓燕	平度市人民医院
付文荣	襄阳市中心医院 (湖北文理学院附属医院)
刘艳彩	衡水市第四人民医院
刘琼琼	河南科技大学第一附属医院
孙万仆	濮阳市人民医院
李东海	兰州市第一人民医院
李永格	南阳医学高等专科学校
李桂艳	辽宁中医药大学附属医院
张文丽	华北理工大学
张彩丽	河南中医药大学 (河南中医学院)
张静芳	河南省安阳市肿瘤医院
赵 伟	中国人民解放军第一五三中心医院
赵玉峰	河北医科大学第三医院
袁 倩	青岛市第八人民医院
蒋春樊	襄阳市中心医院 (湖北文理学院附属医院)
楚广民	郑州大学附属肿瘤医院 (河南省肿瘤医院)
潘陶强	安徽省安庆市第一人民医院

前言

随着医学科学技术的不断发展，临床病理学已经发展成为一门独立的学科，临床病理学由病理技术和病理诊断学组成，两者相辅相成，进一步完善了临床病理学。病理学是临床诊断疾病的金标准。主要研究疾病病因、发病机制、形态结构以及由此而引起的功能变化的一门基础医学。病理科医生可根据手术标本、各种活检、穿刺及脱落细胞为临床不同疾病提供诊断，尸检更可核实或纠正临床诊断。

本书依据最新的病理学诊断技术，重点介绍了分子病理学技术、病理活体组织常规制片技术、病理检查技术、肿瘤病理学诊断及各系统常见疾病的病理学诊断等内容。内容详实，选材新颖，图表清晰，详细而不冗杂，实用性较强，对于临床一线病理医师处理相关问题具有一定的参考价值，也可作为各基层医生和医务工作者学习之用。

本书编委均是高学历、高年资、精干的专业医务工作者，对各位同道的辛勤笔耕和认真校对深表感谢！鉴于本书涉及诸多专业，编写人员多，在各章内容的深度与广度上可能不太一致，且限于时间有限，书中可能存在不妥之处，望读者不吝指正。以便再版时修正。

编者
2016年6月

第一章 分子病理学技术	1
第一节 原位杂交技术概论.....	1
第二节 常用原位杂交技术.....	4
第三节 原位杂交技术在病理诊断中的应用	10
第二章 病理活体组织常规制片技术	12
第一节 组织固定	12
第二节 骨质脱钙	16
第三节 组织脱水	17
第四节 组织透明	19
第五节 组织浸蜡和石蜡包埋	21
第六节 组织脱水的常用程序	24
第七节 切片机与切片刀	26
第八节 石蜡包埋组织切片	29
第九节 摊片、贴片和烤片	31
第十节 冷冻切片	34
第十一节 染料与染色	36
第十二节 苏木精-伊红染色	39
第三章 病理检查技术	51
第一节 细胞学检查技术基本概念	51
第二节 细胞学标本采集原则和方法	52
第三节 细胞学涂片固定	53
第四节 细胞学常规染色技术	55
第五节 其他细胞学染色技术	59
第六节 浆膜腔积液细胞涂片制作	60
第七节 尿液细胞涂片制作	61
第八节 乳腺分泌物细胞涂片制作	62

第九节 阴道和宫颈细胞涂片制作	63
第十节 液基薄层细胞制作技术	64
第十一节 细针吸取细胞学技术应用和操作	68
第十二节 涂片制作技术	71
第十三节 针吸细胞涂片制作质量控制	73
第四章 肿瘤诊断	75
第一节 肿瘤病理学概论	75
第二节 肿瘤的一般形态和结构	78
第三节 肿瘤的病理诊断	79
第四节 免疫组织化学在肿瘤病理诊断中的应用	85
第五节 肿瘤的组织、细胞病理学诊断	86
第六节 肿瘤病理学诊断的特殊技术	92
第五章 肿瘤标志物诊断	110
第一节 肿瘤标志物概论	110
第二节 癌抗原检验	116
第三节 肿瘤相关蛋白检验	125
第四节 肿瘤相关酶检验	130
第六章 儿童肿瘤组织病理学诊断	133
第一节 儿童肿瘤概述	133
第二节 小儿恶性淋巴瘤	136
第三节 朗格汉斯细胞组织细胞增生症	140
第四节 儿童常见实体瘤	141
第七章 颅脑疾病	152
第一节 颅内神经鞘瘤	152
第二节 颅内转移瘤	164
第三节 脑干肿瘤	168
第四节 原发性脑血管病	172
第八章 口、口咽部、涎腺和颌骨疾病	180
第一节 口和口咽部疾病	180
第二节 涎腺疾病	192
第三节 颌骨疾病	205
第九章 消化系统疾病	222
第一节 食管	222
第二节 胃肿瘤及瘤样病变	230
第三节 小肠	238
第四节 大肠	251
第五节 阑尾	265
第六节 肝硬化	268
第七节 肝肿瘤和瘤样病变	270

第八节 胆石症·····	286
第九节 胆囊炎·····	287
第十节 胆囊和肝外胆道肿瘤·····	289
第十一节 胰腺炎·····	299
第十二节 胰腺癌·····	304
第十章 心血管系统疾病 ·····	311
第一节 基本病变·····	311
第二节 心肌炎·····	317
第三节 心肌病·····	322
第四节 心内膜病和心内膜心肌活检·····	331
第五节 心脏移植、人工瓣膜和支架置入病理·····	334
第六节 冠状动脉粥样硬化和冠心病·····	340
第七节 心脏瓣膜病·····	353
第十一章 呼吸系统疾病 ·····	368
第一节 肺炎·····	368
第二节 慢性阻塞性肺疾病和肺源性心脏病·····	377
第三节 结核病·····	382
第四节 肺部恶性肿瘤·····	393
第十二章 乳腺疾病 ·····	407
第一节 乳腺发育异常·····	407
第二节 乳腺病变的病理学诊断方法·····	408
第三节 乳腺化生性病变·····	417
第四节 乳腺反应性和瘤样病变·····	421
第五节 良性肌上皮增生性病变·····	425
第六节 乳腺炎症性病变·····	428
第七节 乳腺癌的分类、病理及分级·····	434
第八节 病理学检查对乳腺癌治疗和预后的意义·····	449
第九节 乳腺微小浸润性癌·····	452
第十节 浸润性乳腺癌·····	453
第十一节 乳腺淋巴造血组织肿瘤及瘤样病变·····	468
第十二节 乳腺转移性肿瘤·····	470
第十三节 乳腺腺瘤·····	471
第十四节 乳头肿瘤·····	473
第十五节 男性乳腺肿瘤和瘤样病变·····	477
第十三章 内分泌系统疾病 ·····	479
第一节 垂体疾病·····	479
第二节 甲状腺疾病·····	489
第三节 甲状旁腺疾病·····	506
第四节 肾上腺疾病·····	514

第五节 胰腺疾病·····	531
第六节 多发性内分泌腺肿瘤·····	537
第七节 弥散神经内分泌系统·····	540
第十四章 皮肤病·····	551
第一节 遗传性疾病·····	551
第二节 感染性疾病·····	553
第三节 非感染性疱性疾病·····	561
第十五章 软组织病理诊断·····	566
第一节 软组织肿瘤的概述·····	566
第二节 淋巴管肿瘤·····	572
第十六章 淋巴瘤的病理诊断·····	574
第一节 淋巴结·····	574
第二节 恶性淋巴瘤·····	577

分子病理学技术

分子病理学技术 (molecular pathology technique) 是新兴的病理学诊断辅助技术之一, 在肿瘤的早期诊断、鉴别诊断以及指导和评估临床治疗有着重要作用。许多常规技术和免疫组织化学技术难以诊断的疾病, 可通过分子病理学技术进一步确诊。随着技术的稳定, 必将越来越广泛应用于临床病理诊断, 成为临床病理诊断中不可缺少的辅助技术, 有助于提高临床病理诊断水平。

分子病理学技术通常是指在病理组织学的基础上, 将分子生物学和细胞遗传学的一些技术, 在分子水平上检测组织细胞中的生物性标志物来辅助病理学诊断。这些分子生物学技术主要有原位杂交技术、荧光原位杂交技术、聚合酶链反应和流式细胞分析技术等。

在临床病理诊断中, 最常用的是原位杂交技术。

第一节 原位杂交技术概论

原位杂交技术 (in situ hybridization technique, ISH) 简称原位杂交, 是把组织学、细胞学和生物化学结合起来的一门技术, 利用探针在组织切片或细胞涂片上原位检测细胞中核酸, 以了解组织细胞中基因 (核酸) 的变化 (基因扩增、丢失、易位以及点突变) 及其意义, 从而研究组织细胞的生理和病理改变及其机制。目前日益广泛应用在临床病理学诊断中。

一、原位杂交的基本概念

原位杂交技术是临床病理诊断中最常用的分子病理学技术, 随着技术日趋成熟和广泛应用, 在临床病理诊断中起着越来越重要的作用。原位杂交是核酸杂交的一部分。

(一) 核酸

核酸 (nucleic acid) 位于细胞核内, 是基本的遗传物质。核酸的基本组成单位是核苷酸, 核苷酸是由碱基、核糖和磷酸构成。其中碱基主要有: 腺嘌呤 (adenine, A)、鸟嘌呤 (guanine, G)、胞嘧啶 (cytosine, C)、胸腺嘧啶 (thymine, T) 和尿嘧啶 (uracil, U)。

核酸分为脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。

1. 脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 是储存、复制和传递遗传信息的主要物质基础, 呈双螺旋结构, 绝大部分的遗传信息都储存在 DNA 中。受温度和某些试剂的作用可使 DNA 变性, 双螺旋结构解离成单链。DNA 分子含有腺嘌呤 (A)、鸟嘌呤 (G)、胞嘧啶 (C) 和胸腺嘧啶 (T), A-T、G-C 严格配对。

基因是 DNA 链上的一个结构单位, 是带有遗传信息的 DNA 片段。不同的基因各有其独

特的 DNA 结构。

染色体的主要化学成分为 DNA，是细胞核内 DNA 分子与核蛋白结合形成的复合物，是基因（遗传信息）的载体。

2. 核糖核酸（ribonucleic acid, RNA）是遗传信息的中间载体，参与蛋白质合成，并与蛋白质一起共同参与基因的表达和调控，通常呈单链结构。RNA 分子中的碱基主要是腺嘌呤 A、鸟嘌呤 G、胞嘧啶 C 和尿嘧啶 U，A - U、G - C 配对。

参与蛋白质合成的 RNA 主要有 3 类：mRNA、tRNA 和 rRNA，它们的分子量、结构和功能都不相同。

（1）核糖体 RNA（ribosomal RNA, rRNA）：是核糖体的主要组成部分，与核糖体蛋白质结合形成核糖体。核糖体是细胞合成蛋白质的主要场所。

（2）信使 RNA（messenger RNA, mRNA）：在细胞质进行的蛋白质合成过程中，负责将 DNA 上调控蛋白质合成的遗传信息传递到细胞质，使这些遗传信息在合成的蛋白质中表达。

（3）转运 RNA（transfer RNA, tRNA）：在蛋白质合成过程中识别并按照 mRNA 传递的遗传密码，负责把特定的氨基酸转运到核糖体上。

（二）探针

原位杂交技术中的探针（probe）为核酸探针，是带有标记物的已知序列的 DNA 或 RNA 片段，用于与细胞中的靶 DNA 或 RNA 杂交结合。

1. 核酸探针的种类 用于原位杂交的探针有 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针、cRNA 探针和人工合成的寡核苷酸探针。根据所用探针的不同以及所检查核酸的不同，原位杂交的方式分为 DNA - DNA 杂交、cDNA - RNA 杂交、RNA - RNA 杂交和寡核苷酸探针与 DNA 或 RNA 杂交等。

（1）DNA 探针：是经过克隆的特定 DNA 片段，分单链和双链探针，用于检测 DNA，是较为常用的一种探针。

（2）cDNA 探针：互补 DNA（complementary DNA, cDNA）探针是以 mRNA 为模板复制的单链 DNA，具有与某一 RNA 链的碱基序列呈互补，用于检测 RNA。但 cDNA 探针不容易获得，所以用途不广。

（3）RNA 探针：为单链的核酸探针，杂交效率较高，可用于检查 DNA 和 mRNA。

（4）cRNA 探针：互补 RNA（complementary RNA, cRNA）探针是以 cDNA 为模板转录获得的单链探针，用于检测 RNA，与 RNA 的杂交比较稳定，所以应用广泛。

（5）寡核苷酸探针：以核苷酸为原料，使用 DNA 合成仪，人工合成预设相应序列的探针，用于检测核酸，具有特异性强的优点。

2. 探针的标记物 用于标记探针的标记物有放射性核素如 ^3H 、 ^{35}S 、 ^{32}P 和非放射性物质如荧光素、生物素、地高辛等。非放射性物质不及放射性物质敏感，但具有稳定、无放射污染、标记和检查操作简便等优点，随着技术的完善其特异性和敏感性不断提高，应用越来越广泛。

二、原位杂交技术的机制和特点

（一）机制

原位杂交技术是用标记的特异探针与组织细胞中相应的核酸杂交（特异结合）成杂交

体,再通过杂交体上标记物的免疫学反应和化学反应,形成有颜色的稳定的沉淀而显色,或荧光素标记物被激发光激发而发光,从而通过显微镜观察,将靶核酸进行定性、定位和定量。所使用的探针是已知碱基序列的核酸探针,探针与组织细胞中的靶核酸杂交结合是按照碱基互补原则,依靠 DNA 变性(双链的 DNA 解聚为单链)和复性(单链又聚合成双链)的性质。

(二) 特点

原位杂交技术是在分子水平上检测组织细胞中的核酸,而免疫组化是在蛋白质表达水平上检测组织细胞中的抗原,前者更有优势。在相同的石蜡切片上,用免疫组化技术检测不到 HPV 抗原,用原位杂交技术可以检测出 HPV-DNA,有助于对尖锐湿疣的病理诊断。

三、原位杂交技术操作

原位杂交技术操作与免疫组化技术操作有许多相同之处,但也有其特殊性,影响检测结果的因素更多。每种因素都可能会影响染色结果的准确性,从而影响病理诊断的准确性。因此,需要在原位杂交技术中进行规范操作和质量控制。

(一) 检测标本的处理

1. 原位杂交技术 适用于检测组织细胞的冷冻切片和石蜡切片以及细胞涂片,但部分项目只能用于冷冻切片和细胞涂片,大部分的项目可用于石蜡切片。冷冻切片能很好地保存某些核酸,但形态结构差,定位不很清晰;石蜡切片组织形态结构好,定位清晰,但在组织的固定、脱水、包埋等过程中容易破坏组织细胞中的核酸,因此,尽可能保存组织细胞中的核酸十分重要。组织细胞在甲醛固定液固定时间过长会影响探针的穿透力,降低杂交效率。固定液宜用 10% 的中性缓冲甲醛液,适宜的固定时间为 6~48 小时。

病理诊断中是否需要做原位杂交检测,往往是根据 HE 切片观察基础上所决定的,因此,组织来源主要为甲醛固定的组织石蜡切片。液基细胞学技术的应用,能够有充足的细胞量作原位杂交检测。

2. 组织的固定

(1) 组织取材:无论用于冷冻切片还是石蜡切片的组织,取材越新鲜越好。组织离体以后应及时取材并立即进行冷冻切片,切片可保存于 -20°C 或 -80°C ;如做石蜡切片应立即进行固定,尽可能保存组织细胞内的核酸不被降解,保存原有的形态结构。

(2) 组织细胞固定:最常用的固定方法是用固定液浸泡组织。固定液有多种,不同的固定液具有不同的作用,目前没有一种固定液都能适用于各种核酸的固定。由于临床送检标本难以使用特殊固定液,故目前主要使用的是甲醛固定液。因此,应要求临床送检标本时使用 10% 的缓冲中性甲醛液。

(3) 组织石蜡切片准备:是否进行原位杂交检测以石蜡切片 HE 诊断为依据。如需行原位杂交检测,应选用与该 HE 片相同的蜡块行连续石蜡切片。因此,在常规石蜡切片的过程中,要尽可能避免对组织细胞中核酸的破坏。切片厚度通常为 $4\mu\text{m}$,组织切片贴在硅化玻片上, 65°C 烤片 2~4 小时。

(4) 载玻片的要求:载玻片的使用和免疫组化染色一样,由于原位杂交实验过程中,

操作步骤及洗片次数较多,容易出现脱片现象,因此,将载玻片硅化或涂胶是必要的。常用的是硅化玻片。如果是做 RNA 检测,还应该将载玻片高温处理,如 160℃ 烤 4~6 小时,或通过高压以灭活玻片上的 RNA 酶。

(二) 实验操作

在原位杂交实验中,主要的操作步骤包括以下方面:

1. 蛋白酶消化 石蜡切片在杂交前需要用蛋白酶进行消化,目的是将交联的组织细胞与蛋白质分开,将核酸表面的蛋白质消化掉,使组织细胞的通透性增加,探针的穿透力加强,易于探针与核酸杂交,提高杂交率。常用的蛋白酶是胃蛋白酶和蛋白酶 K,浓度为 1μg/ml,37℃ 消化 30 分钟。酶的浓度和消化时间需要根据组织所用不同的固定液、不同的固定时间、不同类型的组织和不同的切片厚度等因素做相应调整。

2. 变性 通过加热将双链的探针和靶核酸解链成单链。

3. 预杂交 在杂交前加入不含探针和硫酸葡聚糖的杂交液处理,以封闭非特异性杂交位点,减少非特异性杂交结合,使背景更加清晰,利于阳性结果的观察。

4. 杂交 加入特异探针,与组织细胞中的靶核酸结合形成稳定的杂交体。

5. 杂交体的显示 利用杂交体上标记物的免疫学反应和化学反应,形成有颜色的稳定的沉淀物而显色,或用激发光激发荧光素标记物使杂交体部位发出可见的荧光。

(张彩丽)

第二节 常用原位杂交技术

原位杂交技术是最为常用的分子病理学技术,是目前重要的临床病理诊断辅助技术之一;其技术操作简单,结果稳定可靠、具有较高的特异性和敏感性。随着探针的商品化和试剂盒的推广,该技术越来越多的应用于日常临床病理诊断。

在临床病理诊断中,常用是原位杂交技术和荧光原位杂交技术。前者主要利用某些底物在杂交体部位显色,通过光学显微镜来观察杂交结果;后者利用荧光素标记探针,通过荧光显微镜观察杂交体上发出的荧光来确定杂交结果。

一、原位杂交技术

原位杂交技术 (ISH) 是用特定的标记物如地高辛或生物素标记特异核酸探针,按照核酸序列的互补原则,探针与被检测样本中的靶核酸杂交形成特异性的杂交体,杂交体上的地高辛与鼠抗地高辛抗体结合,再用辣根过氧化物酶标记的抗鼠抗体与鼠抗地高辛抗体结合,最后通过辣根过氧化物酶和 DAB 的反应而显色。在显微镜观察杂交体上的棕色的信号,从而确定组织中存在靶核酸。

原位杂交技术主要利用底物,通过化学反应在杂交体部位显色,通过光学显微镜来观察杂交结果,因此,也称显色原位杂交 (chromogenic in situ hybridization, CISH)。通过使用银离子等作为底物,通过化学反应在杂交体部位产生银沉淀而显色,称为银染原位杂交技术 (silver in situ hybridization, SISH)。

原位杂交技术操作简单,用 DAB 或银显色其阳性结果可长时间保存;在观察结果的同时,也可以看到组织细胞结构。实验一般不需要特殊的仪器设备。

(一) EBV 原位杂交检测操作

1. 主要实验仪器设备

- (1) 杂交仪或电热烤箱和恒温水浴培养箱, 用于组织切片变性和杂交等。
- (2) 光学显微镜, 用于染色结果观察。

2. 主要试剂 EBER - DNA 检测试剂盒一般提供以下试剂, 如果不是即用型试剂, 需要按说明书要求进行稀释和配制。

- (1) 胃蛋白酶消化液。
- (2) 生物素标记的 EBV - DNA 探针。
- (3) 辣根过氧化物酶标记的链菌抗生物素蛋白。
- (4) DAB 显色剂。

3. ISH 操作步骤

- (1) 组织石蜡切片厚 $4\mu\text{m}$ 贴在硅化载玻片上, 65°C 烤片 60 分钟。
 - (2) 常规脱蜡至蒸馏水。在脱蜡过程中将胃蛋白酶消化液从冰箱取出预热至 37°C 。
 - (3) 滴加胃蛋白酶消化液, 37°C 孵育 10 ~ 15 分钟, 蒸馏水洗。
 - (4) 80% 的乙醇、95% 的乙醇和 100% 的乙醇各脱水 2 分钟。
 - (5) 室温或 37°C 干燥约 5 ~ 10 分钟。
 - (6) 滴加生物素标记的 EBV - DNA 探针液 10 ~ $20\mu\text{l}$, 盖上盖玻片, 用专用的橡皮胶在盖玻片四周封边, 放在电热烤箱 95°C 变性 10 分钟, 再放在 37°C 的恒温箱杂交过夜 (约 16 小时)。也可以放在杂交仪进行变性和杂交。
 - (7) 用 PBS 浸泡切片, 并上下移动, 使盖玻片自然脱下。
 - (8) 缓冲液洗 2 分钟。
 - (9) 用 3% 的 H_2O_2 水溶液处理 5 分钟, 蒸馏水洗, PBS 洗。
 - (10) 滴加封闭液孵育 10 分钟。
 - (11) 将封闭液甩走, 直接滴加辣根过氧化物酶标记的链菌抗生物素蛋白孵育 30 分钟。
 - (12) PBS 洗 5 分钟, 3 次。
 - (13) DAB 显色剂显色 15 分钟, 37°C 。
 - (14) 流水冲洗 10 分钟。
 - (15) Mayer 苏木精染色液复染细胞核 3 ~ 5 分钟, 流水冲洗 10 分钟。
 - (16) 常规脱水透明, 中性树胶封片。
4. 结果 阳性结果呈棕色, 定位在细胞核, 其他细胞核呈蓝色 (图 1-1)。

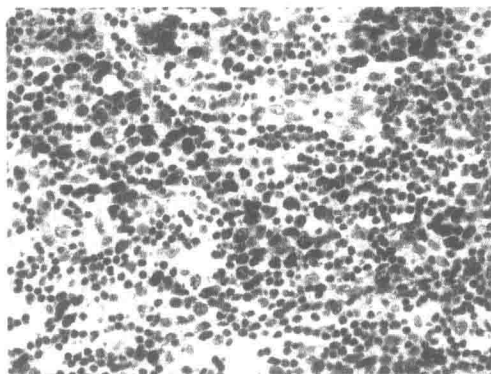


图 1-1 ISH 检测鼻咽癌, EBV 阳性结果呈棕色, 定位在细胞核

(二) HER2 基因显色原位杂交 (CISH) 检测

1. 主要实验仪器设备

- (1) 电磁炉, 用于组织片热修复。
- (2) 杂交仪或电热烤箱或恒温水浴培养箱, 用于组织切片变性和杂交等。

(3) 显微镜, 用于染色结果观察。

2. 主要试剂 商品化的检测试剂盒一般提供以下试剂, 如果不是即用型试剂, 需要按说明书要求进行稀释和配制。

(1) 热修复液 (pH 7.0)。

(2) 胃蛋白酶消化液。

(3) 地高辛标记的 HER2 探针。

(4) SSC 洗液。

(5) 封闭血清。

(6) 鼠抗地高辛抗体。

(7) 过氧化物酶标记的抗鼠抗体。

3. CISH 操作步骤

(1) 石蜡切片厚 $4\mu\text{m}$ 贴在硅化载玻片上, 65°C 烤片 60 ~ 120 分钟。

(2) 切片常规脱蜡至蒸馏水。在脱蜡过程中加热修复液并将胃蛋白酶消化液从冰箱取出恢复至室温。

(3) 切片放入煮沸的热修复液中保持 $98 \sim 100^{\circ}\text{C}$, 15 分钟, 冷却后蒸馏水洗 5 分钟。

(4) 滴加胃蛋白酶消化液室温孵育 5 ~ 10 分钟, 蒸馏水洗。

(5) 切片依次分别用 80% 的乙醇、95% 的乙醇和 100% 的乙醇脱水各 3 分钟后, 室温自然干燥 20 分钟。

(6) 滴加 HER2 探针液 15 ~ $20\mu\text{l}$ 并盖上盖玻片, 用专用的橡皮胶在盖玻片四周封边, 放于杂交仪 95°C 变性 5 分钟后于 37°C 杂交过夜 (10 ~ 15 小时)。也可以放在电热烤箱进行变性和杂交。

(7) 将切片浸泡在室温 SSC 洗液, 并上下移动, 使盖玻片自然脱下。

(8) 放入预热的 SSC 洗液中, 70°C 浸泡 5 分钟, 蒸馏水洗。

(9) 用 3% 的 H_2O_2 水溶液处理 5 分钟, 蒸馏水洗, PBS 洗。

(10) 滴加封闭血清 10 分钟。

(11) 用去血清滴加鼠抗地高辛抗体室温孵育 30 分钟, PBS 洗 5 分钟, 3 次。

(12) 滴加辣根过氧化物酶标记的抗鼠抗体室温孵育 30 分钟, PBS 洗 5 分钟, 3 次。

(13) DAB - H_2O_2 显色 1 ~ 5 分钟, 蒸馏水洗终止显色。

(14) Mayer 苏木精染色液复染细胞核 3 ~ 5 分钟, 蒸馏水洗 10 分钟。

(15) 常规脱水透明, 中性树胶封片。

4. 结果阳性结果呈细颗粒状或簇状粗颗粒状或团块状的棕色, 定位在细胞核, 细胞核呈蓝色。浸润癌细胞核内 HER2 平均拷贝数 >6 为扩增 (图 1-2)。

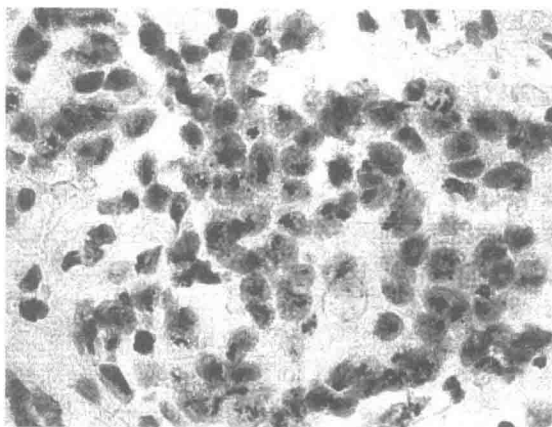


图 1-2 CISH 检测乳腺癌, 核内 HER2 杂交结果呈棕色

(三) HER2 基因银染原位杂交 (SISH) 检测

1. 主要实验仪器设备

- (1) 全自动组织切染色机 BenchMark XT (罗氏)。
- (2) 光学显微镜, 用于染色结果观察。

2. 主要试剂

- (1) 蛋白酶 3。
- (2) 二硝基苯 (DNP) 标记的 HER2 - DNA 探针。
- (3) 二硝基苯 (DNP) 标记 17 号染色体 DNA 探针。
- (4) 兔抗 DNP 抗体。
- (5) 羊抗兔抗体。
- (6) DNP 多聚体。
- (7) 银染染色液。
- (8) 快红色显色液。
- (9) 清洗缓冲液。

3. SISH 主要操作步骤

- (1) 烤片: 石蜡切片厚 $4\mu\text{m}$ 贴在硅化载玻片上, 56°C 烤片过夜 (约 16 小时)。
- (2) 脱蜡: 使用不含酒精、不含二甲苯的环保脱蜡液脱蜡约 8 分钟。
- (3) 预处理: 用冲洗缓冲液高温修复约 20 分钟, 蛋白酶消化 4 分钟。
- (4) 变性: 94°C 5 分钟。
- (5) 杂交: HER2 DNA 探针杂交 6 小时, 17 号染色体探针杂交 3 小时。
- (6) 探针标记物检测: 用抗 DNP 抗体检测探针标记物 DNP。
- (7) 显色: 银染染色液显色和快红溶液显色。
- (8) 复染: 苏木精和靛蓝染色液染细胞核。
- (9) 封片: 不含二甲苯的中性树胶封片。

4. 结果 阳性结果呈细颗粒状或成簇的状粗颗粒状或团块状的黑色, 定位在细胞核, 细胞核呈蓝色; 对照 17 号染色体探针杂交为红色信号点。30% 的肿瘤细胞中, HER2 阳性信号点 ≥ 6 个, 或信号点成簇分布为扩增 (图 1-3)。

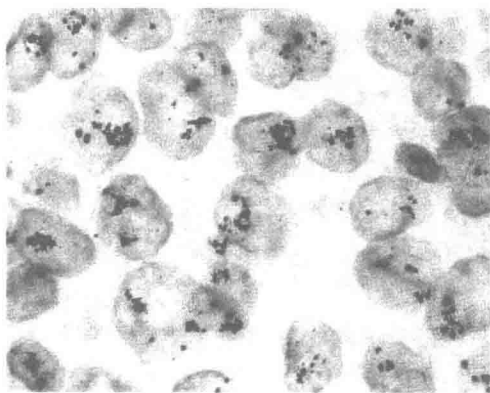


图 1-3 SISH 检测

乳腺癌, HER2 杂交结果呈黑色颗粒, 对照 17 号染色体针杂交结果呈红色颗粒

二、荧光原位杂交技术

荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 是采用荧光素标记的特异 DNA 探针, 按照 DNA 序列的互补原则, 探针与被检测样本中的靶 DNA 杂交形成特异性的杂交体, 通过荧光显微镜观察杂交体上的荧光信号, 从而确定组织中存在靶 DNA。

FISH 技术主要是检测细胞的 DNA, 尤其是常用于检测基因在染色体的定位, 了解基因的扩增、缺失或突变。使用的探针包括由一个或多个克隆已知序列组成的位点特异性探针、简单重复序列探针和由一条染色体或染色体上某一段核苷酸片段所组成的全染色体或染色体区域特异性探针。通常探针用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 和四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamine) 等荧光素标记。

FISH 技术操作简单快速, 敏感性和特异性高, 结果容易观察; 可检测冷冻切片和石蜡切片, 且可同时检测多种基因 (结果呈多种颜色)。但结果不能长时间保存, 一般需要尽快将结果拍摄保存。

HER2 基因 FISH 检测:

1. 主要实验仪器设备

- (1) 杂交仪或烤片机, 用于组织切片或细胞涂片预热、变性和杂交等。
- (2) 恒温水浴箱, 用于试剂加热, 探针变性, 组织细胞片的处理如消化、杂交等。
- (3) 荧光显微镜, 用于观察荧光结果, 需要在暗房条件下进行。
- (4) 电脑及其图像采集和分析软件系统, 用于实验结果的分析 and 报告。

2. 主要试剂 商品化的检测试剂盒一般提供以下试剂, 如果不是即用型试剂, 需要按说明书要求进行稀释和配制。

- (1) 荧光素标记的 HER2 - DNA 探针。
- (2) 杂交缓冲液。
- (3) SSC 溶液。
- (4) 蛋白酶 K 液。
- (5) 变性液。
- (6) NP40/SSC 溶液。
- (7) 甲酰胺/SSC 溶液。
- (8) DAPI 复染剂。

3. FISH 操作步骤

- (1) 组织石蜡切片厚 4um 贴在硅化载玻片上, 65℃ 烤片 60 分钟。
- (2) 常规脱蜡至蒸馏水, 用纸吸去切片上多余的水分。
- (3) 2 × SSC 溶液中浸洗 5 分钟, 2 次。
- (4) 滴加蛋白酶 K 液 (200μg/ml) 孵育消化 20 ~ 30 分钟, 37℃。
- (5) 2 × SSC 溶液中浸洗 5 分钟, 2 次。
- (6) 组织切片依次置于 -20℃ 预冷的 70% 的乙醇、85% 的乙醇和 100% 的乙醇中各 3 分钟脱水。
- (7) 浸入丙酮溶液中 2 分钟, 自然干燥玻片。
- (8) 加热组织切片至 56℃。

(9) 将组织切片浸泡在变性液中变性 5 分钟, 73 ~ 75℃。

(10) 组织切片在预冷 4℃ 的 70% 的乙醇、85% 的乙醇和 100% 的乙醇中各 3 分钟进行梯度脱水后自然干燥。

(11) 将组织切片放在 45 ~ 50℃ 烤片机上预热 2 ~ 5 分钟。

(12) 将装有探针混合物的试管置于 73 ~ 75℃ 水浴箱中变性 5 分钟, 后置于 45 ~ 50℃ 水浴箱中备用。

(13) 滴加 HER2 探针液 15 ~ 20 μ l 并盖上盖玻片, 再用专用的橡皮胶在盖玻片四周封边, 放于杂交仪或湿盒中于 42℃ 杂交过夜 (10 ~ 15 小时)。

(14) 用 50% 的甲酰胺 12 $\times$ SSC 溶液浸洗组织片, 并轻轻上下移动组织切片将盖玻片洗脱, 再浸洗 5 ~ 10 分钟后取出组织切片。

(15) 50% 的甲酰胺/2 $\times$ SSC 溶液洗 5 ~ 10 分钟, 2 次。

(16) 2 $\times$ SSC 溶液浸洗 10 分钟。

(17) 2 $\times$ SSC/0.1% 的 NP-40 溶液浸洗 5 分钟。

(18) 70% 的乙醇洗 3 分钟, 自然干燥。

(19) 滴加 DAPI 复染剂, 盖上盖玻片在暗处染色 10 ~ 20 分钟, 在荧光显微镜下选用合适的滤光片观察结果。

4. 结果 在黑暗的背景下阳性部位呈红色、绿色等不同颜色的荧光, 呈细颗粒状或簇状粗颗粒状或团块状, 定位在细胞核, 细胞核呈蓝色。红色信号总数与绿色信号总数比值 > 2.2 时为 HER2 基因有扩增。

三、质量控制

(1) 组织固定要及时, 并应使用 10% 的中性甲醛液固定, 固定时间为 6 ~ 24 小时。

(2) 建议使用商品化的试剂盒, 实验操作参照试剂盒说明书指南进行, 可根据各自实验室条件和经验作适当调整。

(3) 是否需要组织切片热修复要根据不同的试剂盒或所用的探针的不同而定, 一般试剂杂交结果呈绿色荧光信号。

(4) 蛋白酶消化液通常配成储备液冰箱保存, 用前用稀释液稀释成工作液。蛋白酶消化十分重要, 组织采用不同的固定液、固定时间不一、组织类型的不同和切片厚度的不同等因素都会影响消化效果, 过度消化或消化不足又会影响实验结果。如需观察组织细胞消化情况, 可在镜下观察, FISH 实验则自然干燥组织切片, 滴加 DAPI 复染剂后盖上盖玻片, 于暗处放置 10 ~ 20 分钟, 在荧光显微镜下观察。如果消化过度, 则终止实验, 重新切片进行实验, 消化时要适当减低蛋白酶浓度或缩短消化时间, 如果消化不足, 可继续滴加蛋白酶继续消化。

(5) 没有杂交仪可将组织片放电热烤箱变性, 然后放入恒温水浴培养箱杂交。要确保电热烤箱和恒温水浴培养箱温度准确恒定, 否则会影响变性和杂交效果。

(6) 探针液用前一般需要用杂交缓冲液和蒸馏水稀释, 可参考说明书按比例稀释。

(7) 滴加的杂交液后盖上盖玻片时应避免产生气泡, 气泡部位会出现假阴性。

(8) 用橡皮胶在盖玻片四周封边, 是为了防止长时间杂交过程中杂交液蒸发掉。

(9) 不同的检测试剂盒提供的浸洗液有所不同, 有 SSC 溶液、PBS 液和 TBS 液等, 浸