

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
(第二版)

2010年5月

上海生物样本库 质量管理体系文件					
文件名称	组织样本石蜡包埋及石蜡切片制作操作规程			编号	SOP-SC-006-01
批准人		批准日期		实施日期	

组织样本石蜡包埋及石蜡切片制作操作规程

1. 目的

规范组织样本的采集后进行固定并使用石蜡包埋，以及制作石蜡组织切片的操作。

2. 适用范围

适用于组织样本采集后进行固定、石蜡包埋和制作石蜡组织切片的操作。

3. 定义和术语

3.1 组织样本

组织样本是指由捐赠者提供的，专业人员采集的组织，包括肿瘤、病变组织和其它对照组织（包含近癌组织、癌旁组织、正常组织等）。

3.2 石蜡包埋

石蜡包埋法是将组织块经固定、脱水、透明、浸蜡后包埋在石蜡里面，石蜡浸透组织内部，整个组织一样硬化，以利于切成薄片。

4. 职责

4.1 样本管理员

对切割的组织块进行固定、石蜡包埋和制作石蜡组织切片。

5. 设备和器材

5.1 个人防护装备

手套、口罩、实验防护服、护目镜及其它相关防护装备。

5.2 器材

熔蜡箱（或水浴锅）、镊子。

5.3 设备

通风橱（或脱水机、包埋机）、切片机、展片箱。

5.4 试剂

10%中性福尔马林、80%乙醇、95%乙醇、无水乙醇、二甲苯、石蜡。

6. 主要流程

6.1 样本要求

6.1.1 组织样本采集的过程参见《组织样本采集操作规程》中的具体流程。

6.1.2 进行石蜡包埋的组织块体积应不大于 $1.5 \times 1 \times 0.5\text{cm}$ ，取材后应迅速置于中性福尔马林中固定。

6.2 组织样本的福尔马林固定

6.2.1 10%中性福尔马林固定液的制备

甲醛（40%）	100ml
无水磷酸氢二钠	6.5g
磷酸二氢钠	4.0g
蒸馏水	900ml

6.2.2 组织样本浸没在 10%中性福尔马林液中固定。

6.2.3 组织样本固定的时间 6-24 小时最佳，能达到很好的细胞学和免疫组学的保存要求。

6.2.4 组织固定完成后需要经过脱水、透明和浸蜡的过程，然后再进行包埋，常规操作流程如下。如果整个过程使用自动化的脱水机和包埋机来完成，请使用厂商提供的流程。

6.3 组织块水洗和脱水

6.3.1 用流水冲洗固定组织 30 分钟。

6.3.2 在 80%乙醇中 60 分钟。

6.3.3 在 95%乙醇 I 中 60 分钟。

6.3.4 在 95%乙醇 II 中 60 分钟。

6.3.5 在无水乙醇 I 中 30 分钟。

6.3.6 在无水乙醇 II 中 30 分钟。

6.3.7 在无水乙醇 III 中 30 分钟。

6.3.8 注意事项:

- A. 未经充分固定的组织不得进行脱水。
- B. 脱水试剂体积至少是组织块体积的 5-10 倍
- C. 脱水的时间可以根据组织块的大小和类型作适当的调整。
- D. 脱水试剂应及时更换。

6.4 组织块透明

6.4.1 在二甲苯 I 中 20 分钟。

6.4.2 在二甲苯 II 中 20 分钟。

6.4.3 在二甲苯 III 中 20 分钟。

6.4.4 注意事项:

- A. 透明试剂体积至少是组织块体积的 5-10 倍
- B. 透明时间不宜过长，不同大小和类型的组织可以作适当的调整。
- C. 二甲苯试剂应及时更换。

6.5 组织块浸蜡

6.5.1 在石蜡（软蜡：熔点 45~50℃）中 60 分钟。

6.5.2 在石蜡（硬蜡：熔点 56~58℃）中 60 分钟。

6.5.3 在石蜡（硬蜡：熔点 56~58℃）中 60 分钟。

6.5.4 注意事项:

- A. 浸蜡过程应减少透明过程中带来的二甲苯
- B. 不得使用明火加热石蜡，可以使用水浴或熔蜡箱。
- C. 熔蜡体积至少是组织样本体积的 5-10 倍。
- D. 熔蜡应及时更换。

6.6 组织块包埋

6.6.1 将融化的石蜡（硬蜡）倒入包埋模具中。

6.6.2 将浸蜡后的组织块按切面或指定面朝下，用加热的镊子轻轻夹取埋入含有熔蜡的包埋模具中。

6.6.3 将组织块平整地置放于包埋模具的底面中央，避免气泡的产生。

6.6.4 当蜡块冷至蜡面有一层透明蜡膜时，浸入冷水中迅速使其冷却，否则蜡内常形成结晶。

6.6.5 从包埋模具中取出包埋蜡块，用刀片去除组织块周围多余石蜡，将包埋蜡块修正成为规则的正方形或长方形。

6.6.6 将复份样本条形码标签牢固地烙贴在蜡块一侧（标签内容应完整清晰），在室温条件下储存，储存的过程和要求参见《组织样本储存操作规程》。

6.6.7 注意事项：

- A. 皮肤、腔壁和粘膜等组织应垂直包埋。
- B. 勿将无关的组织 and 异物等埋入蜡块中，熔蜡使用前应静置沉淀和过滤。
- C. 包埋操作规程应迅速，避免未埋前熔蜡凝固。
- D. 不得使用明火加热石蜡，应使用水浴或熔蜡箱。

6.7 石蜡组织切片制作

6.7.1 切片机的使用参照厂商提供的使用方法，常规切片的操作方法如下。

6.7.2 将刀片安装在持刀座上，切片刀必须锋利，需经常磨砺，如是一一次性刀片，需及时更换。

6.7.3 将蜡块固定在支持器上，调整蜡块与刀刃至适当位置。移动刀座或蜡块支持器，使蜡块与刀刃接触，旋紧刀座和蜡块支持器。

6.7.4 修块，修切蜡块表面至包埋其中的组织块能完整全部切到。修块粗切片的厚度为 15-20 μm 。应尽量少修块，特别是再次深切片时，保证组织切片有关病变的连续性。

6.7.5 调节切片厚度至 4 μm 左右，然后进行切片。切片应该连续成带、完整、厚度适宜、均匀、无刀痕颤痕、无褶皱开裂和缺损。

6.7.6 切片出来后用毛笔将切片轻轻托起，用专用小镊子将切片移至展片箱的温水中（45℃左右）。

6.7.7 将切片在水中摊平后附于载玻片上，应置放于一端 2/3 处的中央，留出一端 1/3 位置贴标签。附着的过程应避免切片与载玻片之间产生气泡。

6.7.8 将载玻片 45° 斜置，待多于水分流下后，将其置于烤箱中烘干，一般在 60℃ 烘烤半小时。

6.7.9 在载玻片一端贴上复份样本条形码标签，放入切片盒中，转运送往特定的贮藏室，在室温条件下储存，储存的过程和要求参见《样本储存控制程序》和《组织样本储存操作规程》。

6.7.10 应预留至少一份切片进行 HE 染色并封片，有条件的样本库对 HE 染色切片进行拍照扫描，结果作为组织样本的重要信息保存。参见《组织样本石蜡切片 HE 染色操作规程》。

6.7.11 蜡块每次切片后要将切面用蜡封盖，避免组织与空气直接接触。

7. 相关文件

《组织样本采集操作规程》 SOP-SC-002-01

《组织样本石蜡切片 HE 染色操作规程》 SOP-SC-007-01

《样本储存控制程序》 SOP-SC-014-01

《组织样本储存操作规程》 SOP-SC-015-01

8. 参考标准与文献

Biorepository Protocols, Australian Biospecimen Network, 2007

Common Minimal Technical Standards and Protocols, WHO

2008 Best Practices for Repositories • Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research, ISBER, 2008

Best Practices for Biospecimen Resources, National Cancer Institute, 2007

临床技术操作规范·病理学分册, 中华医学会, 2008