冷凍切片委託試驗說明書

OPEN INSTRUCTIONS FOR FROZEN SECTION



立众生技有限公司

電話:07-2411512

Email: info@litzungbio.com.tw

地址:801高雄市七賢二

路203號3樓

冷凍切片概述

冷凍切片(frozen section)為廣泛被應用於組織病理學研究的組織切片技術,相較於常規的石蠟組織切片,冷凍切片可更好的保留組織的抗原性,且避免組織細胞內的酵素、脂質等物質於組織脫水或包埋過程被酒精或二甲苯(xylene)等石蠟包埋過程必須使用的化學物質所破壞,於免疫組織化學(immunohistochemistry, IHC)染色或組織化學(histochemistry)染色試驗中,能更真實的反應組織細胞的生化表現。

冷凍切片組織試驗

冷凍切片製作係參照本公司實驗室冷凍切片標準操作流程進行,所有冷凍組織皆以同樣標準進行OCT包埋、冷凍切片製作及染色。如委託人有另外需求之切片流程或染色方法,須先與本公司進行試驗內容規劃討論,並填妥相關文件後進行。

冷凍切片適用之組織試驗包含有H&E染色、Oil red O染色、NADH及其它組織化學染色、IHC染色及免疫螢光(immunofluorescence, IF)等。

須知冷凍切片組織其形態上必定較常規石蠟組織切片不完整,其H&E下的組織細胞形態細節無法有效保留,不建議用於判讀組織形態學變化,但可進行組織化學染色結果評估。



1. 冰晶(ice crystal)

冷凍組織切片之前處理係以低溫冷凍方式進行,因生物檢體中必然有水分存在,故於冷凍處理過程中勢必有冰晶結構形成。冰晶可能造成組織形態學(morphology)上的損傷,為冷凍切片不可避免的人為組織病變之一。雖可使用快速冷凍及梯度蔗糖脫水等方式減少組織的冰晶產生,但視組織個體不同,仍可能有不等程度的冰晶造成組織破損(圖.1,2)。

福馬林短時間固定組織(固定時間小於24小時),為一有效減少冰晶造成組織損傷的方法,可大幅增加組織形態的完整性(相關文獻請參考附件連結)。且對組織中的生化特性影響有限,對化學染色影響不明顯。惟其不可避免的會造成抗原性的減退,可能造成部份生物標記(biomarker)在IHC染色的結果出現表現量衰退的情形。

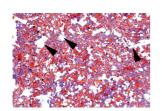


圖.1 冷凍切片可能因冰 晶產生一定程度的組織 破損(箭號)

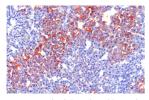


圖.2 冷凍切片可能因冰 晶產生一定程度的組織 破損,且細胞可能變 形。



2. 死後變化(postmortem change)

組織因未經過固定液充份固定,其蛋白質及酵素仍保有活性,於離開冷凍環境後,組織細胞仍可能持續有自溶(autolysis)的情形發生,影響形態觀察。於製作完成後越久的冷凍組織切片,其形態可能有越嚴重的變化。

3. 組織切片破損、皺摺

冷凍組織切片受限於組織包埋方法,其切片厚度及完整性難以同石蠟組織切片般完整,且極易於製作過程中產生皺摺。須知越為大型,且軟組織比例越高的組織,越容易出現局部組織破損及皺摺的情形。

因冷凍組織與玻片貼附力較差,於染色步驟較多、費時較長或有顯著溫度變化之試驗(如IHC),組織破損、剝落或摺疊情形可能加劇。

4. 氣泡

冷凍切片僅能以水膠或蛋白膠進行封片,該封片膠極易有氣泡產生,且可能於運送過程中發生封片膠流失情形,進而造成大小不等的空泡產生。多數情形下,氣泡不直接影響組織形態,重新封片後或可改善。

委託試驗收件標準及相關重要文件

1. 收件檢體類型

因新鮮冷凍檢體(fresh frozen sample)極易有形態損傷,其切片製成後的 形態差異甚大,易造成委託人及本公司兩造雙方認知上誤差,故本公司僅接受 「短時間福馬林固定」之冷凍組織。如因實驗上需求,檢體不得經福馬林固定處 理者,經由本公司負責業務明確告知試驗風險後,須填妥「試驗風險同意書」 後,本公司方可接受試驗委託。

綜合考量冷凍切片組織之操作時間成本、檢體來源及運送過程之不確定性、試驗操作過程及結果之風險,本公司不接受單純OCT包埋冷凍組織之空白切片製作。

立众生技有限公司

電話:07-2411512

Email: info@litzungbio.com.tw

地址:801高雄市七賢二

路203號3樓

2. 須檢附資料

2.1.組織病理服務申請單

委託人須詳細填寫送檢相關資料,包含試驗物種、組織類別、檢體類別 及數量、檢體編號、欲觀察的組織切面及其它委託試驗內容。申請單可由本公司 官網下載,資料填寫問題可撥打本公司客服電話或詢問負責業務。



2.2.委託病理實驗前實驗揭露書及規劃書

長期、多批次連續性委託試驗,或單次試驗估價超逾5萬元以上者,須詳細填寫「委託病理實驗前實驗揭露書及規劃書」,並經由委託人及本公司兩造雙方確認後簽名用印,本公司始得收受檢體並依規畫書進行後續委託試驗。如試驗過程中有實驗方法、內容或時程上需要調整,皆須立即暫停試驗操作。經由本公司及委託人雙方書信(email)或會議確認修改的試驗內容後,始得進行試驗內容修改,並進行後續試驗操作。

2.3.試驗風險承擔書

在委託人未特定要求的情形下,試驗內容皆依本公司標準試驗流程進行;委託人有填寫**委託病理實驗前實驗揭露書及規劃書**情形下,將依規劃書內容 進行試驗。

如委託人要求之試驗方法與本公司標準試驗流程有所不同,或委託人於 試驗中途欲改變原試驗規劃情形下,經與本公司討論試驗內容,並知悉試驗風險 後,委託人須確實填寫「**試驗風險承擔書**」,始得由本公司收受檢體,並執行後 續試驗操作。

2.4.委託試驗合約書

單次委託試驗估價超逾10萬元者,或預計進行長期多批次委託試驗者,本公司將以專案處理。為保證委託人及本公司雙方權益,須經雙方1次以上會議及書信(email)詳細溝通委託試驗流程、操作細節及預期結果後,簽署包含前述委託病理實驗前實驗揭露書及規劃書、試驗風險承擔書及本委託試驗合約書,始得由本公司收受檢體,並執行後續試驗操作。

3. 試驗交期

試驗交期以本公司實驗室評估委託人需求後,給予一預計交件期限,該期限為本公司實驗室根據當時實驗室收案排程、過往實驗操作經驗、試驗操作複雜度及委託人需求後,經審慎評估給予之試驗必須時程。因試驗必然存在不可預期之風險,因試驗需求必須延後交件情形下,本公司將於期限7個工作日以前,以書信(email)或其它通訊軟體告知委託人,延長時程以雙方討論並同意之新交件期限為準,以不超過原預估交期15個工作日為原則。

如試驗過程中,委託人欲更動試驗操作方法或內容,本公司將立即暫停 試驗,待雙方確認修改的試驗操作內容後始得繼續進行試驗,並決議新試驗交期。

如委託人因自身需求,必須提早獲得試驗數據,經與本公司討論並確實 了解壓縮試驗所需時間之風險,填妥**試驗風險承擔書**後,始得由本公司收受檢

立众生技有限公司

電話:07-2411512

Email: <u>info@litzungbio.com.tw</u> 地址: 801高雄市七賢二

路203號3樓



體,並以**急件程序**執行後續試驗操作。單次**委託試驗估價超逾2萬元以上者,或** 試驗條件不符合本公司標準試驗流程者,不適用急件程序。

責任範圍

- 1. 本公司僅對收受的檢體負責,不對其它非與本公司相關之試驗內容負責。
- 2. 委託人須知生物相關性試驗存在一定不可預測性。本公司所有試驗操作內容皆以本公司實驗室標準試驗流程進行,或為兩造雙方同意後之方法執行,且委託人應知悉試驗相關之風險。所有試驗過程皆有文字或影像記錄可供回溯,試驗結果本公司保留討論及後續修改試驗條件,並重新執行的空間,但在本公司無明顯試驗操作缺失,或無明顯違反雙方合約情事下,委託人不得以試驗結果與預期不相符、或成品結果未達預期為由,拒絕接受試驗結果。
- 3. 本公司僅針對委託試驗檢體及該檢體之試驗結果負責,不對試驗結果之後 續應用負責。

附件

參考文獻

- $1. \ http://mousepheno.ucsd.edu/pdfs/1_Oil_Red_O_HC.pdf$
- 2. https://www.urmc.rochester.edu/urmc-labs/pathology/stainsmanual/index.html?OILREDOMETHODFORFATS
- 3. http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/oil_red_o_ellis.htm
- 4. https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08066_special_stains_eduguide.pdf
- Naura, A. S., Hans, C. P., Zerfaoui, M., Errami, Y., Ju, J., Kim, H., ... & Boulares, A. H. (2009). High-fat diet induces lung remodeling in ApoEdeficient mice: an association with an increase in circulatory and lung inflammatory factors. Laboratory investigation, 89(11), 1243-1251.
- 6. Peters, S. R. (Ed.). (2010). A practical guide to frozen section technique. Springer Science & Business Media.