



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104497595 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 08

(21) 申请号 201510014255. 8

(22) 申请日 2015. 01. 13

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100000 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 郝俊峰 仓怀兴 王建华 周洁  
田勇

(51) Int. Cl.

*G08L 91/06*(2006. 01)

*G08K 5/09*(2006. 01)

*G08J 3/00*(2006. 01)

*G01N 1/36*(2006. 01)

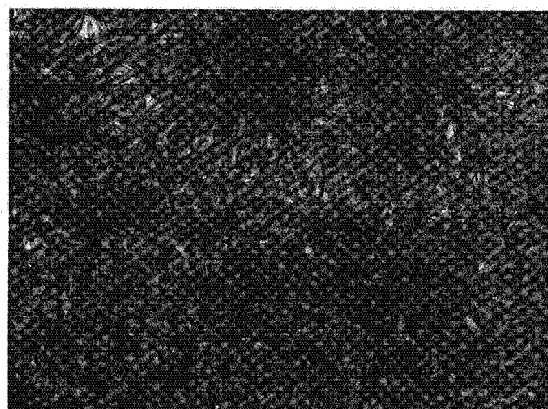
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54) 发明名称

组织芯片受体石蜡复合物及其制备工艺

(57) 摘要

本发明提供一种组织芯片受体石蜡复合物,包括 LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸。本发明还提供该复合物制备工艺,包括步骤:向 LEICA 蜡中添加硬脂酸和巴西棕榈蜡,巴西棕榈蜡的质量百分比为 2%~5%,硬脂酸的质量百分比为 0.5%~1%,获得复合受体石蜡;对所述复合受体石蜡采用两个阶段不同速度降温工艺控制受体蜡块晶体组织结构,第一阶段冷却速度为 0.02-0.1℃/min,持续 4-8 小时,至结晶开始时结束;第二阶段冷却速度为 0.5-5℃/min,至加样温度为止,有效避免后续操作过程中的阵点移位、变形和脱落等问题,很好地满足组织芯片技术要求。



1. 一种组织芯片受体石蜡复合物,该复合物熔点在 56-65℃,针入度值 5-15mm<sup>-1</sup>,其特征在于,包括 LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸,按质量百分比计,LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸的质量比例分别是 97.5%~94%、2%~5%、0.5%~1%。

2. 根据权利要求 1 所述的组织芯片受体石蜡复合物,其特征在于,所述巴西棕榈蜡和硬脂酸的质量百分比分别为 3%和 0.5%。

3. 根据权利要求 1 所述的组织芯片受体石蜡复合物,其特征在于,该复合物经 0.02-0.1℃/min 冷却速度降温至 60℃和 0.5-5℃/min 冷却速度降温至熔点时,具有海胆状晶体显微组织形貌。

4. 根据权利要求 1 所述的组织芯片受体石蜡复合物,其特征在于,该复合物的熔点为 58~60℃。

5. 根据权利要求 1 所述的组织芯片受体石蜡复合物,其特征在于,该复合物针入度为 11.5~7.7mm<sup>-1</sup>。

6. 一种组织芯片受体石蜡复合物制备工艺,其特征在于,包括步骤:

向 LEICA 蜡中添加硬脂酸和巴西棕榈蜡,巴西棕榈蜡的质量百分比为 2%~5%,硬脂酸的质量百分比为 0.5%~1%,获得复合受体石蜡;

对所述复合受体石蜡采用两个阶段不同速度降温工艺控制受体蜡块晶体组织结构,第一阶段冷却速度为 0.02-0.1℃/min,持续 4-8 小时,至结晶开始时结束;第二阶段冷却速度为 0.5-5℃/min,至加样温度为止。

7. 根据权利要求 6 所述的组织芯片受体石蜡复合物制备工艺,其特征在于,在结晶区温度 58-62℃,加载包埋组织试样蜡柱。

## 组织芯片受体石蜡复合物及其制备工艺

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物学技术领域,更具体地说,特别涉及一种组织芯片受体石蜡复合物及其制备工艺。

### 背景技术

[0002] 医学与生物学领域各学科的发展和技术进步密不可分。当代医学病理学吸收了当今分子生物学的最新研究方法和最新成果,使病理学的观察从器官和细胞水平深入到亚细胞乃至分子水平,如蛋白质表达及基因的改变等,病理学技术也得到了极大的发展和提升。组织芯片技术伴随着芯片技术的发展成为了生命科学研究中最常用、最有效的技术方法。

[0003] 组织芯片(tissue chip),也称组织微阵列(tissue microarrays)是生物芯片技术的一个重要分支,是以形态学为基础的分子生物学新技术。组织芯片可将许多不同个体组织标本以规则阵列方式排布于同一载玻片上,进行同一指标的原位组织学比较研究。

[0004] 组织芯片与基因芯片和蛋白质芯片一起构成了生物芯片系列,使人类第一次能够有效利用成百上千份组织标本,为病理学提供了一种高通量、多样本、快速的分子水平的分析工具,使研究者第一次有可能同时利用多份自然或处于疾病状态下的组织标本来研究特定基因及其所表达的蛋白质与疾病之间的相互关系,对于疾病的分子诊断、预后指标的筛选、治疗靶点的定位及治疗效果的预测等方面均有重大实用价值。它克服了传统方法操作复杂、自动化程度低、检测效率低等缺点,既可以进行基础研究,也可以进行临床研究。

[0005] 在组织芯片制作过程中,受体蜡块的石蜡质量对于构建一个完整的组织芯片具有极其重要作用。构建熔点、硬度和柔韧性等物理特性均能达到最佳状态的受体石蜡是制备优质组织芯片的必要条件和基础,如熔点在 56-65℃ 范围内,硬度在针入度值 5-15mm<sup>-1</sup> 范围内。但是,目前国产石蜡打孔时退让性差,容易引起孔周边的石蜡出现裂纹。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是提供一种组织芯片受体石蜡复合物,用以解决上述技术问题。

[0007] 为此,本发明提供了如下技术方案。

[0008] 一种组织芯片受体石蜡复合物,该复合物熔点在 56-65℃,针入度值 5-15mm<sup>-1</sup>,其特征在于,包括 LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸,按质量百分比计,LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸的质量比例分别是 97.5%~94%、2%~5%、0.5%~1%。

[0009] 其中,所述巴西棕榈蜡和硬脂酸的质量百分比分别为 3%和 0.5%。

[0010] 其中,该复合物经 0.02-0.1℃/min 冷却速度降温至 60℃和 0.5-5℃/min 冷却速度降温至熔点时,具有海胆状晶体显微组织形貌。

[0011] 其中,该复合物的熔点为 58~60℃。

[0012] 其中,该复合物针入度为 11.5~7.7mm<sup>-1</sup>。

[0013] 本发明还提供一种组织芯片受体石蜡复合物制备工艺,包括步骤:

[0014] 向 LEICA 蜡中添加硬脂酸和巴西棕榈蜡,巴西棕榈蜡的质量百分比为 2%~5%,硬脂酸的质量百分比为 0.5%~1%,获得复合受体石蜡;

[0015] 对所述复合受体石蜡采用两个阶段不同速度降温工艺控制受体蜡块晶体组织结构,第一阶段冷却速度为 0.02-0.1℃/min,持续 4-8 小时,至结晶开始时结束;第二阶段冷却速度为 0.5-5℃/min,至加样温度为止。

[0016] 其中,在结晶区温度 58-62℃,加载包埋组织试样蜡柱。

[0017] 本发明提供了一种组织芯片受体石蜡复合物及其制备工艺,以进口 LEICA 蜡为基础蜡原料,通过适量添加硬度及熔点各不相同的巴西棕榈蜡和硬脂酸,并结合控制降温冷却工艺、升温预热工艺以及使用 温度等专用技术,确保受体石蜡具有海胆状晶体结构,且在点样时呈现外形结构完整的半熔融状态,这样包埋组织的蜡柱被插入受体石蜡的孔内时,受体石蜡不仅退让性好,而且因为有液态石蜡的存在使得二者结合紧密,从而有效避免后续操作过程中的阵点移位、变形和脱落等问题,很好地满足组织芯片技术要求。

### 附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0019] 图 1 为 LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸不同配比的复合受体石蜡特征熔点曲线图;

[0020] 图 2 为 LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸不同配比的复合受体石蜡针入度曲线图;

[0021] 图 3 为复合受体石蜡典型结晶冷却曲线图;

[0022] 图 4 为复合受体石蜡典型海胆状晶体形貌图片;

[0023] 图 5 为镶嵌了组织蜡柱的受体石蜡图片;

[0024] 图 6 为组织芯片图片。

### 具体实施方式

[0025] 为了使本技术领域的人员更好地理解本发明,下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步的详细说明。

[0026] 本发明实施例提供了一种组织芯片受体石蜡复合物。

[0027] 该复合物包括 LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸,按质量百分比计,LEICA 蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸的质量比例分别是 97.5%~94%、2%~5%、0.5%~1%。

[0028] 优选地,巴西棕榈蜡和硬脂酸的质量百分比分别为 3%和 0.5%。

[0029] 本发明实施例还提供一种组织芯片受体石蜡复合物制备工艺,包括步骤:

[0030] 获得一种三组份复合受体石蜡,基础蜡为进口 LEICA 蜡,组份巴西棕榈蜡的质量百分比为 2-5%,硬脂酸的质量百分比为 0.1-1%;采用两个阶段不同速度降温工艺控制受体蜡块晶体组织结构:第一阶段冷却速度为 0.02-0.1℃/min,持续 4-8 小时,至结晶开始时结束;第二阶段冷却速度为 0.5-5℃/min,至加样温度为止;使用温度在结晶区(58-62℃),也就是在结晶区加载包埋组织试样——蜡柱,确保受体石蜡的退让性及其与蜡

柱的紧密结合。

[0031] 该复合物的熔点为  $58 \sim 60^{\circ}\text{C}$ ，针入度为  $11.5 \sim 7.7\text{mm}^{-1}$ 。

[0032] 反映复合受体石蜡物理性能的主要参数是熔点和硬度，其中硬度用针入度表征。熔点和针入度的测定按国标进行。反映受体石蜡组织性能的主要参数是其晶体显微组织形貌。

[0033] (1) 熔点测定：采用冷却曲线法 (Melting point(cooling curve)of petroleum wax)。根据石油蜡熔点的测定 - 冷却曲线法 (GB/T 2529-2008)，所用仪器为：GL220-UM-851。

[0034] 原理：将装有融化的石油蜡试样和温度计的试管置于空气浴内，空气浴置于水温  $16^{\circ}\text{C} \sim 28^{\circ}\text{C}$  的水浴中；在试样冷却过程中，定期记录温度计读数；当试样发生凝固时，其温度变化率减少，在冷却曲线上形成停滞期。

[0035] 测定步骤：(1) 在 1L 大烧杯中加入  $20^{\circ}\text{C}$  左右的水，使水面与顶部距离小于 15mm，使用水浴锅维持温度。(2) 在小烧杯内加入受体石蜡试样，水浴加热熔化（控制加热温度比预计温度高  $10^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$ ）。(3) 待试样完全熔化后密封试样杯，在其中央处插入将温度电极（使电极处于试样的中央位置），将其直立放入到大烧杯水浴内。(4) 每隔 15s 读取并记录一次温度读数。(5) 观察这些连续读数，当第一次出现 5 个连续读数（即 1 分钟内）总差不超过  $0.1^{\circ}\text{C}$  时，即判定为停滞期，此时即可停止试验。(6) 计算第一次出现总差不超过  $0.1^{\circ}\text{C}$  的 5 个连续读数的平均值，并对此平均值进行温度计校正值的修正。(7) 对同一试验样本测温 3 次，求取停滞期各数值的均值作为该试样的熔点。

[0036] (2) 硬度测定：采用石油蜡针入度测定法 (determination of needle penetration of petroleum waxes)。根据 GB/T 4985-2010，所用仪器为：针入度计。

[0037] 原理：石油蜡针入度在规定的条件下，标准针垂直刺入蜡试样的深度，以  $1/10\text{mm}$  为单位，可以表征硬度。针入度越小，硬度越大。针入度计用于测定固体或半固体原料稠度或硬度的仪器，测定规定重量的针或锥在重力作用下刺入原料的深度。

[0038] 测定步骤：(1) 加热受体石蜡试样至比其预期熔点高至少  $20^{\circ}\text{C}$ ，充分搅拌确保使蜡样均匀并使气泡逸出，待完全熔化后倒入成型器中，置于空气中冷却、成型。(2) 将成型的试样置于水浴中的试验架上，并确保测试过程中成型器和试验架不晃动。调整水浴水面至高于试样上表面至少 25mm，保持在试验温度 ( $45^{\circ}\text{C}$ )。(3) 加 50g 砝码于针入度标准针上，使针及其附件的总质量为  $100\text{g} \pm 0.15\text{g}$ 。检查释放机构是否卡杆，指示器应在“零”位。按针入度计不同类型调节指示器组件或调节台，调到针尖几乎触及蜡的表面，并在此位置安全地锁定可移动的组件。(4) 用微调法使针尖恰好接触试样的蜡表面，观察针尖投影有助于准确调节。确定浴温在规定范围内后，释放滑杆并持续  $5\text{s} \pm 0.1\text{s}$ ，用自动计时器计时。(5) 轻轻压下指示器杆直至被滑杆顶住为止，并由指示器刻度盘读出针入度值。(6) 在距成型器边缘至少 3.2mm 的圆周上，取约相等间隔 (15mm) 的点进行四次测定，每次测定前用清洁的干布顺时针方向仔细擦拭，以除去所有的附着的石蜡，并按上述要求定位标准针，然后再进行测定。(9) 记录试样四次测定值并取其算术平均值为单次试验测定值，精确至  $1/10\text{mm}$ 。

[0039] (3) 晶体显微组织形貌测定

[0040] 采用 LEICA DM2500 体视显微镜，放大倍数 10X(10 倍物镜)，CCD/数码相机 DFC300。

[0041] 根据以上方法研究表明,LEICA 蜡中分别添加 0.5% -1% 硬脂酸和 2 ~ 5% 巴西棕榈蜡,可以小幅度提高受体石蜡的熔点和硬度(针入度降低):其中熔点从 56℃ 左右提高到 60℃ 左右,参见图 1 所示,针入度从 11 左右降低到 8 左右,参见图 2 所示。改性后的复合受体石蜡的熔点和硬度可以满足组织芯片受体蜡物理特性的基本要求。

[0042] 下面以 LEICA 基础蜡与巴西棕榈蜡和硬脂酸的配比为 96.5 : 3 : 0.5 的复合受体石蜡为具体实施例,说明该复合受体蜡良好的组织芯片制备性能。

[0043] 实施过程:

[0044] 按总量 10g 复合受体石蜡和前述比例,分别称取 LEICA 基础蜡、巴西棕榈蜡和硬脂酸 9.65g、3g 和 0.5g,加入 50ml 容量烧杯,按前述方法测定复合受体石蜡冷却结晶曲线如图 3 所示。图 3 表明,该复合受体石蜡结晶开始温度在 65℃ 左右,因为前面存在一较大过冷区,石蜡结晶释放结晶潜热使温度回升。冷却曲线在 63℃ 位置存在一转缓拐点,说明如果排除受体石蜡的过冷效应,结晶开始温度应当在 63℃ 左右。冷却曲线进入停滞区的温度为 58.9℃,根据前述熔点测定方法,可判定该复合受体石蜡的熔点为 58.9℃。

[0045] 切取以上结晶完毕的复合受体石蜡试样 4 克,置于组织芯片模具中用 70℃ 水浴熔化。第一阶段冷却以 0.1℃ /min 速度降温;冷却至 65℃ 后进入第二阶段冷却,降温速度升高至 0.5℃ /min,同时启动体视显微镜开始观察石蜡晶体显微组织形貌,至 61℃ 时晶体显微组织形貌如图 4 所示,为典型海胆状晶体;温度降至 60℃ 时进行保温,5min 后加入组织蜡柱,并继续降温至室温为止。图 5 为镶嵌了组织蜡柱后的复合受体石蜡的实物照片,可以看出蜡柱与受体石蜡结合良好,无缝隙、开裂、破碎等问题。

[0046] 根据病理学组织芯片技术规范,对镶嵌了组织蜡柱后的复合受体石蜡块进行切片、振片和烤片,得到图 6 所示完整的、无点位脱落的连续切片,呈现良好的振片性,无点位漂移、脱落现象。

[0047] 上述试验测定结果表明,上述配比复合受体石蜡可制备优质芯片,且无效点位数均可控制内 1% 以内。

[0048] 在现有技术中,国产石蜡的纯度、硬度和柔韧性均比较差,打孔时退让性差,容易引起孔周边的石蜡出现裂纹,包埋组织的蜡柱与受体石蜡结合性差,切片和振片时容易发生点阵脱落。进口石蜡纯度较高,但普遍偏软,制备组织芯片时容易出现滞针现象,难以实现连续切片,振片时易出现点阵移位、变形等现象。究其原因,国产石蜡纯度不够导致其内部多为小的块状晶体或较粗的刀片状晶体结构,组织连续性差,进一步导致受体蜡块在打孔时易开裂,装填的组织蜡柱与受体蜡块的孔壁结合不好;进口石蜡虽然纯度好,但是晶体结构为层状结晶大块或粗大刀片状,易发生打孔时因受力牵拉范围大而致滞针,切片粘刀,以及振片时阵点移位变形等问题。因此,在芯片的制作过程中,受体石蜡的组织结构及其相应的质量好坏以及柔韧性和硬度的平衡对于构建完整的组织芯片十分重要。

[0049] 对石蜡进行改性处理是获得合用组织芯片受体石蜡的最佳选择方案,也是当前业界普遍采用的方法。石蜡改性包括物理改性和化学改性。物理改性较化学改性工艺相对简单,没有复杂的新物质生成,改性后的石蜡物理性能如硬度、熔点、滴熔点、粘度等有所改变,通常可以达到制备合格组织芯片所需受体石蜡的性能要求;但是对晶体结构改进的关注度不够,进而蜡块退让性和包埋组织的蜡柱与受体石蜡结合性改善不够。化学改性则更为彻底,采用氧化、接枝等技术改变石蜡分子结构,以提高其硬度和熔点等性能,但是在改

善退让性以及包埋组织的蜡柱与受体石蜡结合性方面同样效果不明显。

[0050] 本发明实施例提供的组织芯片受体石蜡复合物及其制备工艺通过添加互溶物质的物理改性方法改变基础蜡原料的熔点、硬度等物理特性,很好地解决上述问题,达到制备合格组织芯片所需受体石蜡的性能要求,同时改进晶体结构,改善蜡块退让性和包埋组织的蜡柱与受体石蜡结合性。

[0051] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

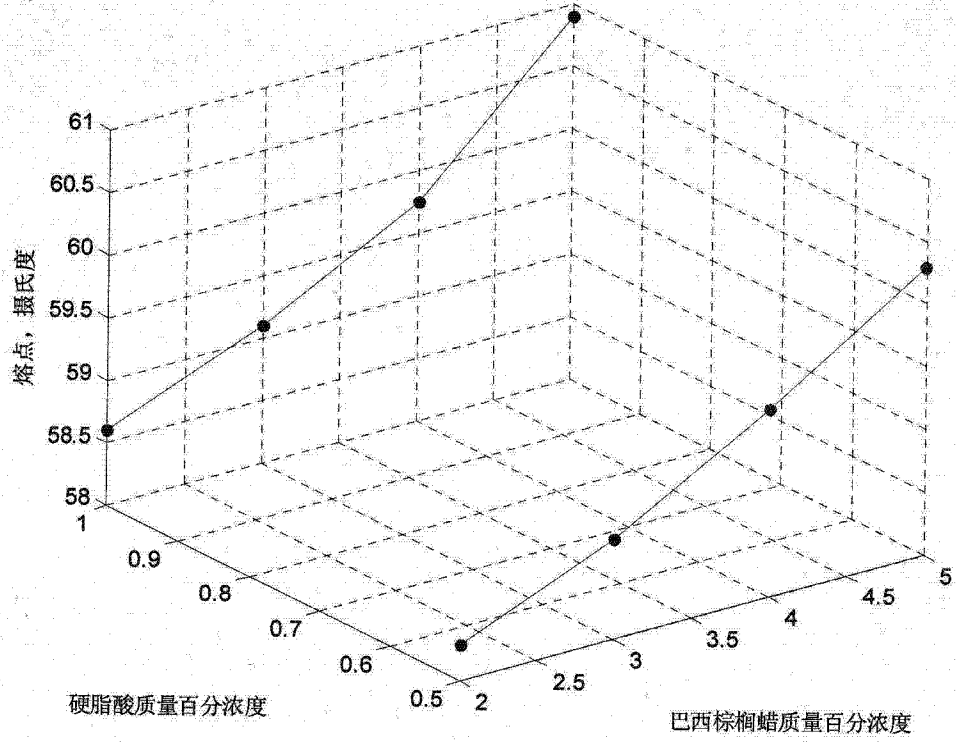


图 1



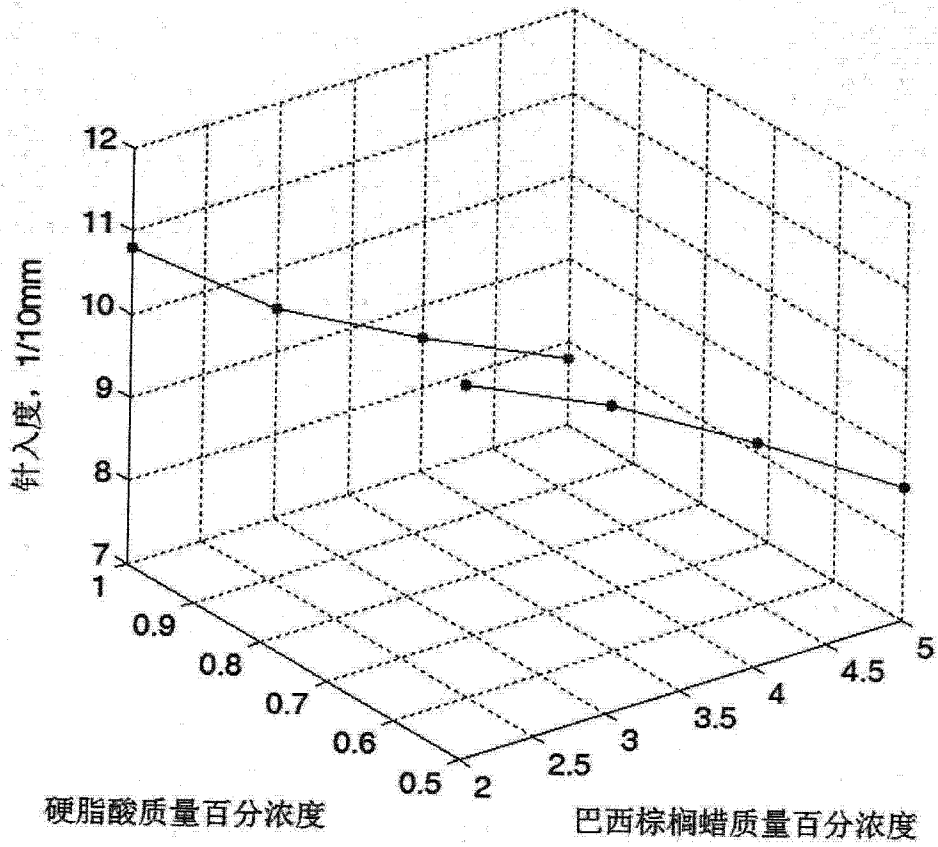


图 2

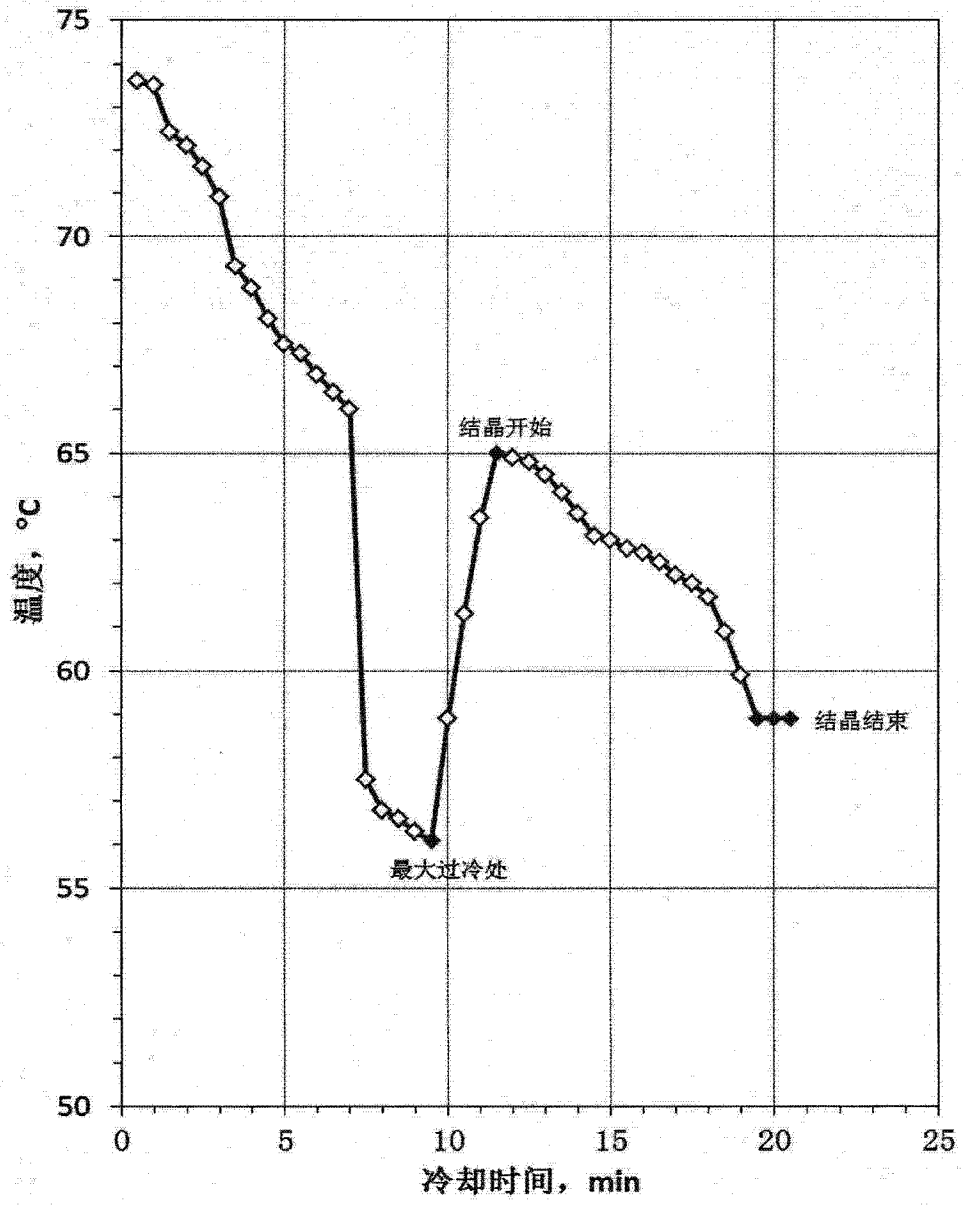


图 3

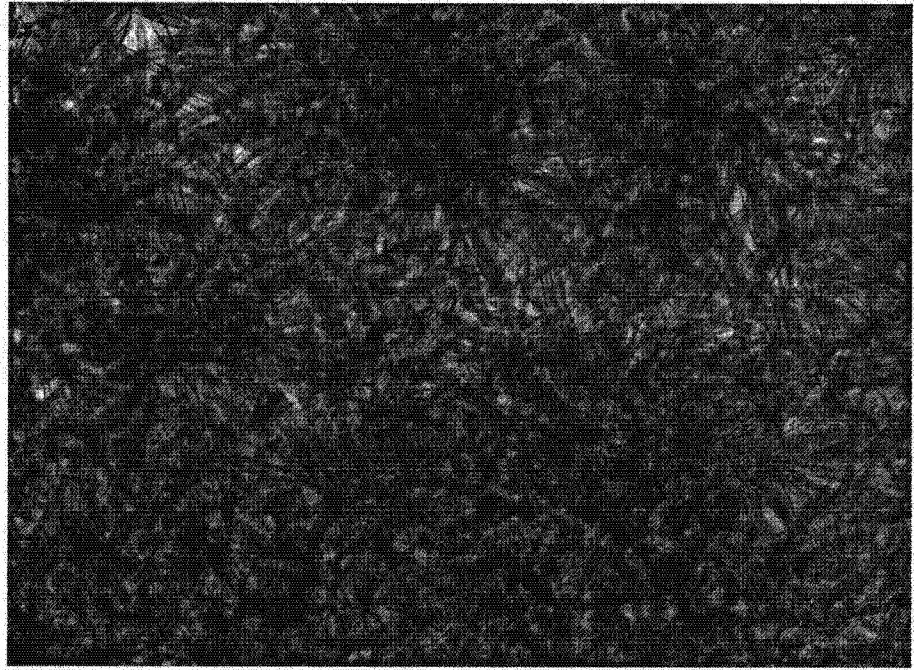


图 4

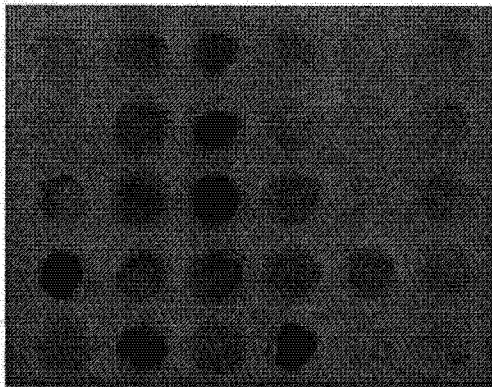


图 5

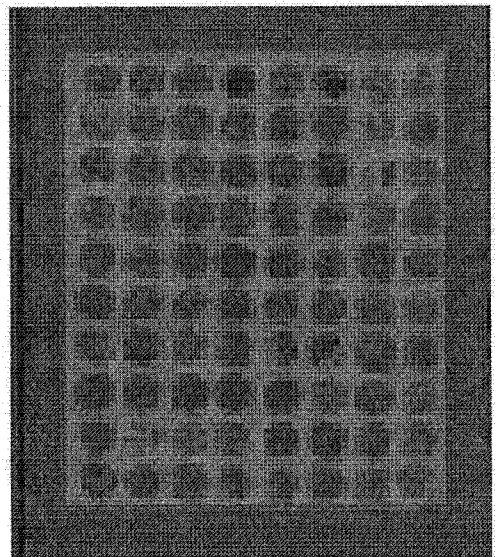


图 6