

膀胱癌液基薄层细胞染色 操作培训



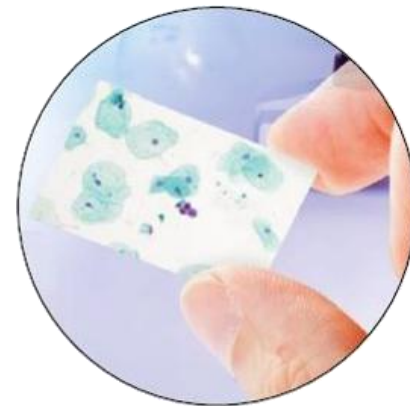
目录

CONTENTS

1. 实验原理
2. 试剂盒的包装与组成
3. 实验所需材料
4. 标本的采集与保存
5. 标本的预处理
6. 载玻片的制备
7. 染色液试剂的准备
8. 手工染色步骤
9. 全自动染色程序
10. 制片的筛查、读片与分析报告的原则
11. 常见问题解答



基于正常细胞和肿瘤细胞不同的代谢过程和代谢产物, 其中恶性肿瘤细胞中的**新陈代谢能力增强**（瓦博格效应），用专用的从植物中提取的特殊染料（红色复红染色液和琼斯亮绿染色液）对各种类型的细胞和组分进行染色区分，该技术在保留细胞形态的同时提供基于颜色的差异对可疑细胞进行区分。



	货号：BLC0050 规格：50T	货号：BLC0100 规格：100T
组织固定液	125ml	250ml
苏木素染色液	125ml	250ml
红色复红染色液1	125ml	250ml
红色复红染色液2a	62.5ml	125ml
红色复红染色液2b	62.5ml	125ml
琼斯亮绿染色液	125ml	250ml
缓冲液	125ml	250ml

*** 试剂盒里的所有液体要避光在15°C至30°C保存，未开封的试剂可保存至有效期。



产品名称	货号	厂家	备注
液基薄层涂片细胞染色液	BLC0050/BLC0100	上海景源	与染色液配套提供
细胞清洗液	CWC0050		
细胞保存液PreservCyt [®] Solution	70406-004	Hologic, Inc.	
50ml离心管	KD5-026	江苏康典	
江帆牌粘附载玻片	CL004A	海门昌隆	
SUPERFROST [®] PLUS 载玻片	#4951PLUS-001E	Thermo Scientific	
制片管	TCT-YT-ZPG	长沙英泰	与细胞离心机配套使用
制片管卡座	TCT-YT-ZPGKZ		与细胞离心机配套使用
医用离心机	Centrifuge-C1		细胞离心机
一次性使用标本杯（60mL尿杯）	CYB-060	江苏康健医疗	
组织染色机	KD-RS3	金华科迪	
医用离心机	Centrifuge-AXTD4	安信实验仪器	适合50ml离心管的离心机
乙醇（无水乙醇）	10009218	国药集团化学试剂有限公司	
乙酸（冰醋酸）	10000218		
二甲苯	10023418		
中性树脂	/	上海华灵康复器械厂	
其他：显微镜、去离子水			

1. 样本采集

自然排尿，留取中段尿液（非首次晨尿），至少采集35ml的尿液样本。建议留取连续三天的样本。

2. 样本保存

A: 新鲜的尿液样本必须在采集后6小时内处理，以防止细胞退变。

B: 也可以用等体积的50%乙醇溶液保存样本，在2-8℃下存储可达24小时，但必须在2-8℃的环境下冷藏运输。



1. 将尿液样本倒入标有病人身份信息的50ml离心管中。

2. 室温下3000r/min离心5分钟。

3. 弃去上清液到生物废物筒中，**将沉淀物轻轻混匀呈悬浮状态。**

4. 加入30ml预装的细胞清洗液并轻轻旋转混匀。

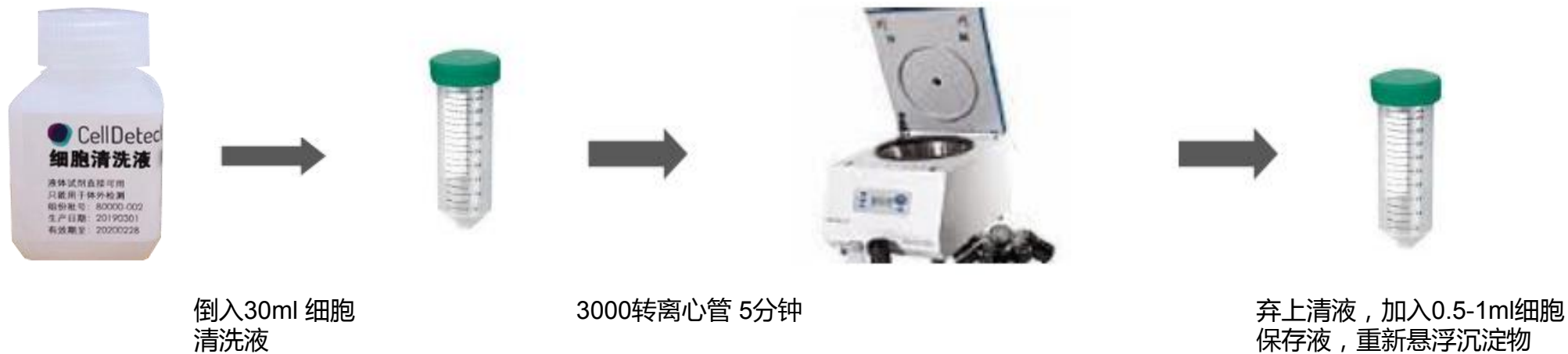
5. 室温下3000r/min离心5分钟，如果颗粒出现混浊或含有血液，重复步骤4。

6. 将上清液弃至生物废物筒中，再加入0.5ml-1ml的PreservCyt[®]细胞保存液**重新悬浮沉淀物**

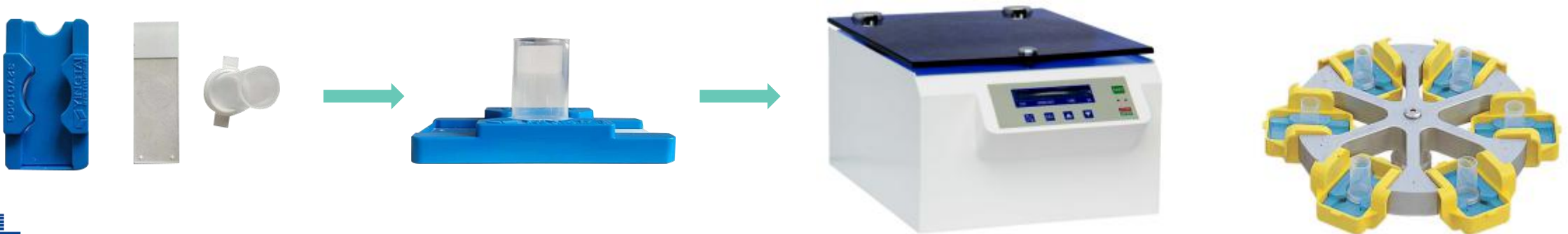
7. 在继续进行下一步之前，孵育15分钟。

8. 悬浮液在室温下可保存3天





1. 在涂层载玻片上标上患者的详细信息。（注意：不要使用无涂层的玻片）
2. 组装制片管卡座和制片管。
3. 将制备好的悬浮液倒入制片管中，将制片管卡座置于医用离心机(液基薄层细胞制片离心机)中，1000r/min离心10分钟。（注意：如果悬浮液较浑浊，提示细胞密度较大，建议倒入少量悬浮液或稀释悬浮液后再进行制片。稀释方法：吸取0.1ml的悬浮液，加入0.4ml的PreservCyt[®]细胞保存液并混匀）。
4. 立即将载玻片放入96%乙醇中固定至少10分钟。
5. 将剩余样品在室温下保存至完成染色分析，未染色的载玻片在96%的乙醇中室温下储存可达2周。



1. 红色复红染色液2

总共制备250ml：

- 1.1 将红色复红染色液2b转移到红色复红染色液2a瓶中。
- 1.2 混匀。
- 1.3 请在4周内使用。

2. 乙酸溶液，0.25% (v/v)

总共制备250ml：

- 2.1 量取625ul 乙酸加入到量筒中。
- 2.2 加入蒸馏水使总体积达到250ml。
- 2.3 将溶液转移到玻璃瓶中，颠倒混匀。
- 2.4 每日需重新配制新鲜溶液，隔日不再使用。

3. 乙醇溶液，20% (v/v)

总共制备250ml：

- 3.1 量取50ml的100%乙醇加入到量筒中。
- 3.2 加入蒸馏水使总体积达到250ml。
- 3.3 将溶液转移到玻璃瓶中，颠倒混匀。
- 3.4 每日需重新配制新鲜溶液，隔日不再使用。

4. 清洗缓冲液

- 4.1 将一瓶缓冲液加蒸馏水20倍稀释，混匀备用。
- 4.2 在室温下储存。
- 4.3 溶液请于4周内使用。



安全声明：注意！乙酸、甲醇具有易燃和腐蚀性。请戴手套、衣服、护目镜等防护装备

- 按右表中列出的溶液倒入染色缸中，并相应的做上标记。
- 从96%乙醇中取出载玻片。
- 在通风柜中将载玻片风干30分钟。
- 如右表所示，在溶液中依次浸入载玻片。
- 立即从载玻片架上取出载玻片，并用纸巾将每个载玻片轻轻地吸干。
- 在通风柜中将载玻片风干1小时。
- 涂片保存：将载玻片浸入二甲苯中透明，**不要在乙醇中对载玻片进行脱水处理**，因为它可能会去除红色染料。在涂片上滴入中性树胶并盖上盖玻片。
- 置于玻片盒中保存。

溶液序号	溶液名称	时间	备注
1	组织固定液	10分钟	
2	蒸馏水1	浸入10-15下	
3	苏木素染色液	4分钟	
4	蒸馏水2	浸入10-15下	
5	蒸馏水3	浸入10-15下	
6	蒸馏水4	1分钟	轻轻搅拌1-2次
7	清洗缓冲液 1	1分钟	
8	红色复红染色液1	2分钟	
9	清洗缓冲液 2	1分钟	
10	红色复红染色液2	1分钟	
11	清洗缓冲液 3	浸入10-15下	
12	清洗缓冲液 4	浸入10-15下	
13	清洗缓冲液 5	1分钟	
14	0.25% 乙酸	25秒	在进入下一个程序之前，请勿摇晃载玻片，也不要清洗
15	20% 乙醇	30秒	
16	琼斯亮绿染色液	25秒	
17	蒸馏水 5	浸入10-15下	在这些步骤中不要使用清洗缓冲液，因为它可能会去除绿色染料
18	蒸馏水 6	浸入10-15下	

1. 从96%乙醇中取出载玻片。
2. 在通风柜中将载玻片风干30分钟。
3. 按右表中列出的溶液倒入染色缸中，并相应的做上标记。
4. 将载玻片转移到自动染色机的启动位并根据右表中详细说
明的方案运行程序。
5. 立即从载玻片架上取出载玻片，并用纸巾将每个载玻片轻
轻地吸干。
6. 在通风柜中将载玻片风干1小时。
7. 涂片保存：将载玻片浸入二甲苯中透明，**不要在乙醇中对
载玻片进行脱水处理**，因为它可能会去除红色染料。在涂
片上滴入中性树胶并盖上盖玻片。
8. 置于玻片盒中保存。

溶液 序号	溶液名称	时间	搅拌	精度 要求	对应染色机 的染缸位置
1	组织固定液	10分钟	否	是	3
2	蒸馏水1	20秒	是	-	2
3	苏木素溶液	4分钟	否	是	4
4	蒸馏水2	10秒	是	-	2
5	蒸馏水3	20秒	是	-	2
6	蒸馏水4	1分钟	是	-	2
7	清洗缓冲液 1	1分钟	是	-	5
8	红色复红染色液1	2分钟	否	是	6
9	清洗缓冲液 2	1分钟	是	-	7
10	红色复红染色液2	1分钟	否	是	8
11	清洗缓冲液 3	10秒	是	-	9
12	清洗缓冲液 4	20秒	是	-	10
13	清洗缓冲液 5	1分钟	是	-	11
14	0.25% 乙酸	25秒	否	是	12
15	20% 乙醇	30秒	否	是	13
16	琼斯亮绿染色液	25秒	否	是	14
17	蒸馏水 5	15秒	是	-	2
18	蒸馏水 6	15秒	是	-	2

1. 制片质量评估（基于Bethesda系统）

- 1.1 使用显微镜在10-20倍下浏览整个载玻片。
- 1.2 如果载玻片上有足够数量的保存完好的细胞则该制片是合格的。
- 1.3 如果超过75%的细胞是模糊的，则该载玻片是不合格的，除非当前存在异常细胞。

2. 染色质量评估

- 2.1 评估正常上皮细胞的色泽。忽略位于边缘和染色不清楚或模糊的成片细胞。
- 2.2 如果大多数正常的非反应性上皮细胞的细胞核呈现绿色或者暗紫色，细胞质是绿色的则该染色结果是可接受的。如果含有 $> 5\%$ 的细胞核被染成红色和/或细胞质被染成粉红色则是不合格的，除非存在异常细胞。

❖ 如果制片或染色质量不合格，请参阅下面的常见问题指南。



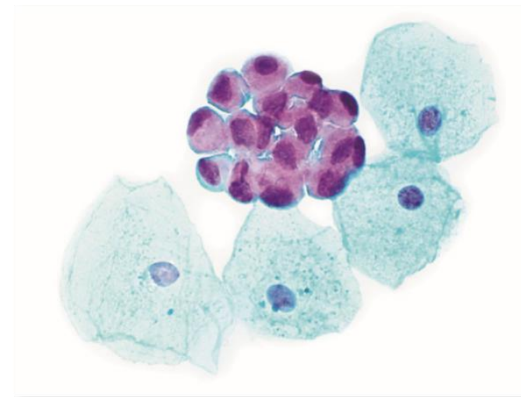
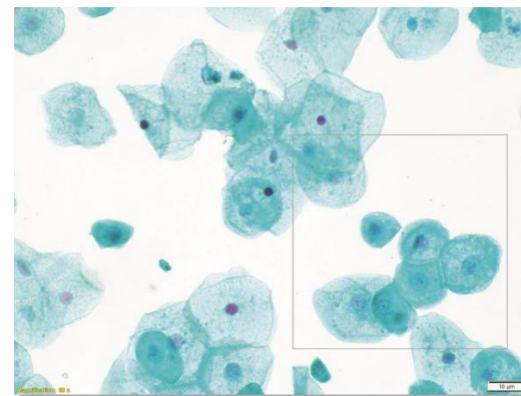
3. 分析报告原则

下面的分析涉及到除载玻片边缘之外的所有区域

3.1 评估载玻片上的细胞色泽和形态。

3.2 如果所有的上皮细胞都是绿色的，形态看起来正常的话，
那么可诊断该病例为“阴性”。

3.3 如果有非炎性细胞的细胞核被染成红色以及形态学怀疑
是结构异常，那么可诊断该病例为“阳性”。



问题	原因	解决方案
涂片细胞很少	尿液样本保存在乙醇中，但没有在4°C储存或储存时间超过24小时	严格按照说明书保存样品
	尿液样本采集后没有及时处理	
	尿液样本量少于35ml	最少使用35ml尿样
	尿液样本没有按照“样品采集和处理”部分的规定进行离心	按规定离心尿液样本
	没有足够的细胞被离心分离	另外制备一张载玻片，如有必要浓缩尿液样品
	尿样中细胞的含量不足	重新采集样本
细胞被白/红细胞掩盖	患者患有严重的炎症和/或血尿	有>75%的细胞是模糊的涂片应该被丢弃，除非有异常细胞存在。但是也可以用PreservCyt [®] 细胞保存液中按1：10稀释细胞沉淀物并重新制片
正常细胞的细胞核被染成红色	尿液样本离心时按了“停止”键，没有离心	离心时请按“启动”键
	制片时细胞离心机的转速过高	降低细胞离心机的转速
	细胞离心机离心后未及时用乙醇固定载玻片	细胞离心机离心后立即固定载玻片

问题	原因	解决方案
正常细胞的细胞核被染成红色	染色前，玻片在乙醇中放置时间过长	载玻片应在制片后两周内进行染色
	在用组织固定液固定前载玻片过于干燥	按要求操作
正常的单个细胞被染成粉红色/透明状	涂片太密	使用PreservCyt [®] 细胞保存液重新稀释保存的样本，并制备新的载玻片
	在亮绿染色液中染色时间太短	严格按照染色方案，包括准确的染色时间和适当的清洗。使用带有载玻片架子的染色缸
	在红色复红染色液2中染色时间太短	
	洗涤不正确（例如：在亮绿染色液中染色后使用缓冲液或自来水，而不是蒸馏水，省略了乙醇或乙酸）	严格按照洗涤说明：1.在将载玻片浸入红色复红染色液、乙醇和乙酸之前使用清洗缓冲液2.亮绿染色液染色后要用蒸馏水洗涤3.不要在乙醇、乙酸和亮绿染色液染色之间清洗载玻片
癌细胞被染成灰色或绿色	在亮绿染色液中染色时间太长	严格按照染色方案，包括准确的染色时间和适当的清洗。使用带有载玻片架子的染色缸
	在乙醇或乙酸溶液中染色时间太长，或在这些液体里染色时摇动载玻片	
	红色复红染色液1的活性降低	将红色复红染色液1的染色时间增加1分钟。为了避免非特异性背景，选择癌细胞染成紫红色的最小染色时间
	在部分脱水时使用了乙醇	不要在该步骤使用乙醇
涂片上有紫色沉淀	苏木素染色液使用太久	载玻片染色前更换新的苏木素染色液

谢谢观看！
Thank You!

