
 National HiBank Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-009
	標題: 胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液檢體 採集處理流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/5 頁
		發布日期: 114-12-01

本文件歷次變更紀錄：

版本	制定單位	核可日期	核可者	發布日期
1.0	中央辦公室	110-07-14	衛生福利部	110-07-20
1.1	中央辦公室	114-09-16	衛生福利部	114-12-01

目錄

一、目的.....	2
二、範圍.....	2
三、權責.....	2
四、說明.....	2
五、檢體採集處理作業流程	
5.1.1 腫瘤病患之胸水或腹水的採集處理流程.....	2
5.1.2 取胸水或腹水離心沉澱細胞製作蠟塊之流程.....	3
5.1.3 取胸水或腹水離心沉澱下層細胞萃取DNA之流程.....	4
5.2 骨髓液的採集處理流程.....	4
5.3 腦脊髓液的採集處理流程.....	4
六、出庫品質標準.....	5

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-009
	標題: 胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液檢體 採集處理流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/5 頁
		發布日期: 114-12-01

一、目的

「國家級人體生物資料庫整合平台」(下稱整合平台)主要透過雲端整合國內人體生物資料庫, 資料、生物檢體及其資訊(下稱整合平台檢體資料), 並供全國醫學、臨床、產業及相關醫療生技研究者申請使用。為能夠達成跨機構的合作, 需要建立一致性的檢體出庫品質標準和臨床資料內容。為維持檢體的良好品質, 使各種體液檢體, 如胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液檢體之採集處理流程具有一致性, 以利未來進行相關研究, 因此訂定此標準作業流程。

二、適用範圍

此作業流程適用於胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液等檢體的採集處理流程。

三、權責

所有加入整合平台之人體生物資料庫, 欲將胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液等檢體出庫時, 建議都依此標準作業流程辦理。

四、說明


此作業流程包含胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液等檢體的採集處理, 這些檢體的採集以腫瘤病患為主。檢體的處理流程各略有不同之處。

五、作業流程

5.1.1 腫瘤病患胸水或腹水的採集處理流程

步驟:

1. 在取得個案同意之後, 先準備好 2 支 50ml 尖底離心管。
2. 收集至少 50cc 胸水或腹水, 分裝在 2 支 50ml 尖底離心管。
3. 以 1,250 rpm 轉速離心 10 分鐘; 若細胞含量多, 則 1,500 rpm 轉速離心 20 分鐘。
4. 將上清液用塑膠吸管(dropper), 移置於另一支 50ml 尖底離心管。留下離心沉澱之下層細胞。
5. 上清液較無研究價值, 可以銷毀丟棄。
6. 有離心沉澱之下層細胞之兩管, 將其中一管之下層細胞, 以微量吸管取出, 分裝於 1 ml 微量離心管, 冷凍保存於-20°C (或-80°C) 冰箱, 未來可以用來抽 DNA。
7. 另一管之下層細胞留作細胞離心塗片(cytospin), 需先放置碎冰桶上。
8. 做完細胞離心塗片(cytospin) 之後, 此管剩下之下層細胞也可先冷凍於-20°C。等細胞離心塗片經確認有足量腫瘤細胞(>50%)的話, 也可以微量吸管取出, 分裝於 1

 National Human Biobank Consortium of Taiwan (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-009
	標題: 胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液檢體 採集處理流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/5 頁
		發布日期: 114-12-01

ml 微量離心管，冷凍保存於-20°C (或-80°C) 冰箱，未來可以用來抽 DNA。
9. 若要做成蠟塊，需要另外收集 50ml 檢體才足夠。

細胞離心塗片 (Cytospin) (需有細胞離心塗片器之設備)：

1. 將一管離心後沉澱之下層細胞，加入 1ml 的 PBS (管子需先放置碎冰桶上。)
2. 依下層細胞的多寡來調整用 PBS 稀釋的比例，如 1:10，或是 1:100。
3. 用細胞離心塗片器(Cytospin)，用 1,500 rpm 轉速離心 2 分鐘，將細胞打在 coating slide 上。
4. 每張 slide 打 50 ul，各做 4 片，一片染 Liu's stain，其他玻片未來可以染免疫染色。
5. 染 Liu's stain 的玻片，以顯微鏡觀察腫瘤細胞數量。
6. 視需要，可重複 2.3. 步驟，將細胞重複打在同一個位點，以增加抹片上細胞之數量。

Liu's stain：

1. Liu's A buffer 0.8ml 滴在玻片上，靜置約 3-5 秒。
2. Liu's B buffer 1.5ml 滴在玻片上，混合 A,B 液，靜置約 30-60 秒。
3. 以流動的自來水沖洗 5 分鐘。
4. 晾乾後即可閱片。


5.1.2 取胸水或腹水離心沉澱細胞製作蠟塊之流程

設備： 脫水機，包埋機

耗材： 10%中性福馬林，無水酒精，蠟粒

步驟：

1. 收集至少 50cc 胸水或腹水在 1 支 50ml 尖底離心管。
2. 將胸水或腹水檢體，以 1,500 rpm 轉速離心 20 分鐘。
3. 抽掉上層組織液後，加入 15ml PBS buffer，左右輕拍和細胞混合均勻。
4. 再一次以 1,500 rpm 轉速離心 20 分鐘，抽掉上層組織液後，加入 15ml PBS buffer，左右輕拍和細胞混合均勻。
5. 用 2,500 rpm 轉速離心 20 分鐘，抽掉上層 PBS，加入 15ml 10%中性福馬林充分混和；室溫靜置 40 分鐘，讓沉降之細胞固定及結塊。

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-009
	標題: 胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液檢體 採集處理流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/5 頁
		發布日期: 114-12-01

- 再一次以 2,500 rpm 轉速離心 20 分鐘，抽掉上清液(10%中性福馬林)，再加入 15ml 95%酒精，不要搖晃混合，放入 4°C 冰箱至少兩小時，以將細胞層固定及脫水。
- 將尖底離心管自冰箱取出，此時細胞層已結塊，可以將細胞塊倒入包埋專用卡匣，送去脫水包埋以製作蠟塊。

注意事項:1.脫水及包埋製作蠟塊，需要專門設備和專業技術人員，建議直接請醫院病理科實驗室幫忙製作即可。

5.1.3 取胸水或腹水離心沉澱下層細胞萃取 DNA 之流程: 此流程可以採用將白血球層 (buffy coat)抽取 DNA 的做法，請參考整合平台 SOP -007 v1.1 整合平台血液檢體 DNA 萃取流程。

5.2 骨髓液的採集處理流程


步驟:

- 在取得個案同意之後，先準備好欲留存骨髓液檢體之含 EDTA 抗凝固劑真空採血管 10ml(EDTA K2 10ml)(簡稱 CBC 管)，貼上已編號之抗凍貼紙，由醫療人員抽取個案 2 ml 骨髓液檢體，放入 CBC 管，混合均勻後，分裝於 1 ml 微量離心管。
- 冷凍保存於至或-80°C 冰箱。未來可以提供給申請者萃取 DNA。
- 依據骨髓切片報告，紀錄骨髓腫瘤細胞百分比。

5.3 腦脊髓液的採集處理流程

步驟:

- 在取得個案同意之後，先準備好欲留存腦脊髓液檢體之含 EDTA 抗凝固劑真空採血管 10ml(EDTA K2 10ml)(簡稱 CBC 管)，貼上已編號之抗凍貼紙，由醫療人員抽取個案 2-5 ml 腦脊髓液檢體，放入 CBC 管，混合均勻後，分裝於 1 ml 微量離心管。
- 冷凍保存於-80°C 冰箱。未來可以提供給申請者萃取 DNA。
- 依據腦脊髓液的細胞檢查報告，紀錄腦脊髓液腫瘤細胞百分比。

 (網頁連結)	國家級人體生物資料庫整合平台 標準作業程序	編號: NBCT SOP-009
	標題: 胸水、腹水、骨髓液、腦脊髓液檢體 採集處理流程	版本/總頁數: 第 1.1 版/5 頁
		發布日期: 114-12-01

六、出庫品質標準

1. 取腫瘤病人之胸水或腹水離心沉澱細胞所製作之蠟塊，要先請病理科醫師確定該切片有足夠之腫瘤細胞，腫瘤細胞比例最好大於 50%。
2. 取腫瘤病人之胸水或腹水離心沉澱細胞所萃取的 DNA，腫瘤細胞比例最好大於 50%。
3. 骨髓液檢體，應提供其骨髓切片報告之骨髓腫瘤細胞百分比數據。
4. 腦脊髓液檢體，應提供其腦脊髓液細胞學報告之腫瘤細胞百分比數據。
5. 胸水或腹水離心沉澱細胞所萃取的 DNA，其 optical density (O.D)值:
 - 260/280 比值應介於 1.6-2.2 之間
 - 260/230 比值應介於 1.6-2.5 之間

說明:(1)因為有些檢體難以取得，或很稀少，能萃取之 DNA 量很少，可以與申請者討論，若申請者能接受，即使 O.D 值不理想，也可以出庫，但是要有註記，並已充分告知申請者。

(2)260/280 比值與 260/230 比值，建議最好能>1.8，以確認 DNA 內不含大量蛋白質汙染。