



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103328979 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201180058767. 4
 (22) 申请日 2011. 12. 06
 (30) 优先权数据
 61/419, 949 2010. 12. 06 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2013. 06. 06
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/DK2011/000148 2011. 12. 06
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02012/076010 EN 2012. 06. 14
 (73) 专利权人 丹麦达科有限公司
 地址 丹麦格洛斯楚普
 (72) 发明人 J. 洛泽
 (74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
 代理人 龙淳 顾小曼
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/52(2006. 01)
 G01N 33/53(2006. 01) (续)
 (56) 对比文件
 US 2002173053 A1, 2002. 11. 21,
 CN 101836117 A, 2010. 09. 15,
 WO 2010094284 A1, 2010. 08. 26,
 Ryuichi Okamoto 等. Damaged epithelia

regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract.. 《Nature Medicine》. 2002, 第 8 卷 (第 9 期),
 Hiroaki Nitta 等. Development of automated brightfield double In Situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence In Situ hybridization.. 《Diagnostic Pathology》. 2008, 第 3 卷
 Norihiro Teramoto 等. Simultaneous detection of two independent antigens by double staining with two mouse monoclonal antibodies.. 《Journal of Virological Methods》. 1998, 第 73 卷
 Hiroaki Nitta 等. Development of automated brightfield double In Situ hybridization (BDISH) application for HER2 gene and chromosome 17 centromere (CEN17) for breast carcinomas and an assay performance comparison to manual dual color HER2 fluorescence In Situ hybridization.. 《Diagnostic Pathology》. 2008, 第 3 卷 (续)

审查员 毕秀华

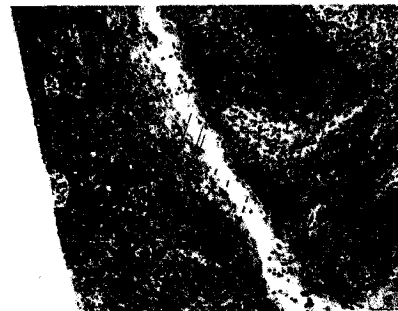
权利要求书3页 说明书41页 附图1页

(54) 发明名称
 组合的组织学染色

学诊断。

(57) 摘要

本发明涉及使组织样品例如活检样品中的靶标可视化的方法, 其中该方法包括用 (i) 一种或多种靶标特异免疫化学染色以及 (ii) 用于特定组织组分 (例如, 铁、粘蛋白、糖原、淀粉体、核酸等) 的组织学染色 (例如, 苏木精和 / 或伊红染色等) 对样品进行染色, 其中组织学染色用于加强组织样品的显微图像中的对比度、突出样品中的形态学结构以便观测、限定并检查组织、细胞群体或单独细胞内的细胞器。方法还可包括评估样品中一种或多种靶标的表达。所公开的方法可用于医



↓ 步骤 (a) 的Her2染色的点状形式
 ↓ 步骤 (b) 的Her2染色的常规形式
 ↓ 步骤 (c) 的苏木精核染色

CN 103328979 B

[接上页]

(51) Int. Cl.

G01N 33/86(2006.01)

(56) 对比文件

Chris M. van der Loos. Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging.. 《Journal of Histochemistry & Cytochemistry》.2008, 第 56 卷 (第 4 期),

Ernst J.M. Speel等. Sensitive multicolor fluorescence In Situ hybridization using catalyzed reporter deposition(CARD)

amplification.. 《Journal of Histochemistry & Cytochemistry》.1997, 第 47 卷

H Y Lan 等. A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens.. 《Journal of Histochemistry & Cytochemistry》.1995, 第 43 卷

B Hunyady 等. Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining.. 《Journal of Histochemistry & Cytochemistry》.1996, 第 44 卷 (第 12 期),

1. 一种使组织样品中的靶标可视化的方法,以任意顺序包括:
 - (a) 使用第一染色对所述样品进行染色,
 - (b) 使用第二染色对所述样品进行染色,
 - (c) 使用第三染色对所述样品进行染色,其中
 - (i) 经由可检测酶底物在所述样品的包括所述靶标单元的部位处的酶介导沉积,产生所述第一染色和所述第二染色;
 - (ii) 所述第一染色使靶标单元的第一部分分子群可视化,且所述第二染色使靶标单元的第二部分分子群可视化;
 - (iii) 所述第一染色和所述第二染色具有不同的染色形式,其中所述第一染色的染色形式由所述样品的包括靶标单元的部位处的染色的明显点构成;并且
 - (iv) 所述第三染色是使所述组织样品的形态学特征可视化而不使所述靶标可视化的组织学染色。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述靶标的第一部分分子群是所述样品中靶标总量的小部分,且所述靶标的第二部分分子群是所述样品中靶标总量的大部分。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述第一染色的光学特征不同于所述第二染色。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中染色 (a) 和 (b) 采用靶标特异结合剂来使所述靶标与酶活性相关联。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中染色 (a) 的至少一种靶标特异结合剂和染色 (b) 的至少一种靶标特异结合剂是与所述靶标的特异结合对的成员。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中染色 (a) 和染色 (b) 的所述至少一种特异结合剂是相同的结合分子。
7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中染色 (a) 和染色 (b) 的所述至少一种特异结合剂是不同的结合分子。
8. 根据权利要求 4 所述的方法,其中染色 (a) 和染色 (b) 的所述至少一种特异结合剂是抗体、核酸、或 PNA 或 LNA 分子,或者包括抗体、核酸、或 PNA 或 LNA 分子。
9. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中通过由相同的酶介导的可检测酶底物的沉积,产生所述第一染色和所述第二染色。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述酶是辣根过氧化物酶。
11. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中通过由不同的酶介导的可检测酶底物的沉积,产生所述第一染色和所述第二染色。
12. 根据权利要求 11 所述的方法,其中产生所述第一染色的酶是辣根过氧化物酶,且产生所述第二染色的酶是碱性磷酸酶。
13. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述第一染色的明显点具有约 0.4 微米至约 4 微米的视直径。
14. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述第三染色是组织学染色。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述第三染色是苏木精。

16. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述第三染色是组合的组织学染色。
17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述第三染色是苏木精和伊红染色。
18. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述第三染色是特殊的组织学染色。
19. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述靶标是生物标记物。
20. 根据权利要求 19 所述的方法,其中所述靶标是蛋白或核酸。
21. 一种使组织样品中两种或更多种靶标可视化的方法,以任意顺序包括:
 - (a) 使用第一染色对所述样品进行染色,
 - (b) 使用第二染色对所述样品进行染色,
 - (c) 使用第三染色对所述样品进行染色,其中
 - (i) 经由可检测酶底物在所述样品的包括所述靶标的部位处的酶介导沉积,产生所述第一染色和所述第二染色;
 - (ii) 所述第一染色使包括第一靶标的单元的靶标部位可视化;
 - (iii) 所述第二染色使包括第二靶标的单元的靶标部位可视化;
 - (iv) 所述第一染色和所述第二染色通过其染色形式区分,其中所述第一染色的染色形式的特征是由明显点构成,且所述第二染色的染色形式是均匀颜色的均一染色形式;
 - (v) 所述第三染色是使所述组织样品的形态学特征可视化而不使所述靶标可视化的组织学染色,并且
所述第一靶标和所述第二靶标是不同的蛋白靶标。
22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所述第一染色的光学特征不同于所述第二染色。
23. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述第一染色的灵敏度不同于所述第二染色。
24. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中染色 (a) 和 (b) 采用靶标特异结合剂来使所述第一靶标和所述第二靶标与酶活性相关联。
25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中染色 (a) 的至少一种第一靶标特异结合剂和染色 (b) 的至少一种第二靶标特异结合剂是与所述靶标的特异结合剂对的成员。
26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中染色 (a) 和染色 (b) 的至少一种靶标特异结合剂是抗体、核酸、或 PNA 或 LNA 分子,或者包括抗体、核酸、或 PNA 或 LNA 分子。
27. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中通过由相同的酶介导的可检测酶底物的沉积,产生所述第一染色和所述第二染色。
28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中所述酶是辣根过氧化物酶 (HRP)。
29. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中通过由不同的酶介导的可检测酶底物的沉积,产生所述第一染色和所述第二染色。
30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中产生所述第一染色的酶是 HRP,且产生所述第二染色的酶是碱性磷酸酶 (AP)。
31. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述第三染色是组织学染色。
32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述第三染色是苏木精。

33. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述第三染色是组合的组织学染色。
34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述第三染色是苏木精和伊红染色。
35. 根据权利要求 32 所述的方法,其中所述第三染色是特殊的组织学染色。
36. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述第一靶标是生物标记物。
37. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述第二靶标是参考标记物。
38. 根据权利要求 1 或 21 所述的方法,其中所述组织样品是包括细胞的样品。
39. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述样品是身体组织样品或肿瘤样品。
40. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述样品是固体组织样品或细胞固定在固体支撑物上或固定于其中的样品。
41. 根据权利要求 21 或 22 所述的方法,其中所述方法包括使用第四染色对所述样品进行染色,
 - (i) 其中经由可检测酶底物在所述样品的包括所述靶标的部位处的 HRP 介导的沉积,产生所述第四染色;
 - (ii) 其中所述第四染色使第三靶标可视化,其中所述第三靶标被可视化为第四染色的明显点,
 - (iii) 其中所述第四染色的明显点与第一染色的明显点相比具有不同的光学特征。
42. 根据权利要求 1 或 21 所述的方法,还包括确定所述样品中靶标的量。
43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中确定所述第一靶标的量。
44. 根据权利要求 42 所述的方法,其中确定所述第三靶标的量。
45. 根据权利要求 43 或 44 所述的方法,其中所述量是所述样品中靶标的总量。
46. 根据权利要求 43 或 44 所述的方法,其中所述量是所述第一靶标相对于所述第二靶标的相对量。

组合的组织学染色

技术领域

[0001] 本发明涉及使组织样品例如活检样品中的靶标可视化的方法,其中该方法包括使用一种或多种针对靶标的免疫化学染色,以及用于特定组织组分例如铁、粘蛋白、糖原、淀粉体、核酸等的组织学染色,例如苏木精和 / 或伊红染色等,来对样品进行染色,其中该组织学染色用于加强组织样品显微图像中的对比度、突出样品中形态学结构以便观测、限定并检查组织、细胞群或单独细胞内的细胞器。

背景技术

[0002] 组织病理学,即对病变组织的显微研究,是解剖病理学中的重要工具,因为癌症和其它疾病的准确诊断通常需要样品的组织病理学检查。

[0003] 通常通过在光学显微镜下检查负载在载玻片上的患者组织的薄切片(slice 或 section)来执行患者组织样品的显微解剖学分析。使显微结构可视化或对其进行区别地识别的能力通常通过使用组织学染色而加强。苏木精和伊红(H&E)染色是组织学和组织病理学中最常使用的光学显微染色,其中苏木精被用来将核染成蓝色而伊红将细胞质和胞外连接组织基质染成粉色。

[0004] 除 H&E 染色之外,还可以应用特殊染色来解答除可通过解读 H&E 染色的组织形态而解答的问题之外出现的问题。将要提及的特殊染色的一些有用应用是:DNA 和 RNA 含量的确定、代谢生物化学、疾病进程的生物化学、众多转移肿瘤的原发部位、无色转移黑素瘤的识别、早期侵入性肿瘤的检测等(参见,例如 Education Guide:Special stains and H&E, 2nd edition, Kumar GL and Kleman GA eds, Dako, 2010)。

[0005] 当前,免疫组织化学(IHC)已经替代了很多传统的“特殊染色”,因为 IHC 染色具有极大的特异性。最常用的 IHC 染色,例如基于辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)底物的 IHC 染色,提供与特殊染色相同的均一染色形式,其对显微镜人员呈现为均匀的颜色,具有细胞结构例如膜、细胞质和核的胞内分辨率。

[0006] IHC 染色是医学诊断中常用的工具,并且还通常用于评定治疗生物标记物。然而,尽管 IHC 染色在样品的特定靶标或表位的识别中异常精确,并允许对这些靶标和表位进行定量,但它们太昂贵而不能用于组织样品一般形态的常规评估中。因此,H&E 和特殊染色对于病理学家和技术人员仍然是重要工具,提供对 IHC 的重要补充以作为限定患者医学概况的诊断技术。然而,至今还没有描述任何组织学染色法,其允许对组织的形态特征、在得自患者的一个和相同组织样品中的精确靶标定位及其含量分布进行评估。

[0007] 如上所述,采用对组织样品中的靶标进行标记的发色和荧光报道物的常规 IHC 染色允许对这些靶标(和表位)进行一些定量。然而,这种定量不精确,因为其采用信号的密度分析并将报道物信号水平与靶标(例如,蛋白)表达水平或定位相关联。新近开发的超灵敏 IHC 可视化体系(参见 PCT/DK2010/000137 和 PCT/DK2011/000131)允许对组织样品中靶标(例如,蛋白)的单个分子进行可视化和定量,但是这些体系具有的缺点是它们并不揭示样品的组织形态,因此不允许对其进行分析。

[0008] 因此,有利的是有一种方法,允许对用组织学染色进行染色的组织样品中的分子靶标进行可视化和精确定量,因为其允许对癌症和其它疾病(其同时需要样品的组织病理学检查和这些疾病生物标记物的定量)进行准确诊断和有效治疗。

发明内容

[0009] 本发明提供使组织样品中的靶标可视化的方法,其中该方法包括使用至少两种不同染色对所述组织样品进行染色,其中至少一种所述染色是适用于免疫组织化学(还称为免疫组织化学染色或 IHC 染色)以使样品的包括靶标的部位(本文中称为“靶标部位”)可视化为明显的点的免疫化学染色,且至少一种所述染色为用于显微镜检查中以加强组织样品的显微图像的对比度、突出样品中结构以进行观察、限定并检查块状组织(例如,突出连接组织)或细胞群体(例如,对不同血液细胞分类)或单个细胞内细胞器的组织学染色,例如苏木精染色等,即能够在显微水平上使组织样品的形态可视化的组织学染色。

[0010] 在一个实施方式中,本发明涉及使组织样品中靶标可视化的方法,包括使用至少三种不同染色对所述组织样品进行染色,其中至少两种这些染色是使样品中靶标部位可视化的两种 IHC 染色,且至少一种染色是使样品形态可视化的组织学染色。根据本发明,至少两种针对靶标部位的 IHC 染色在样品中靶标部位检测的灵敏度以及染色样品中光学外观方面相互不同:所述至少两种 IHC 染色中的第一种使单个靶标部位中的小部分分子群可视化,其中所述靶标部位的至少一部分包括单个靶标单元,并对显微镜人员呈现为标记所述单个靶标部位的染色明显点;所述至少两种 IHC 染色中的第二种使样品中靶标部位块可视化,并对显微镜人员呈现为均匀的颜色(即,对标记单个靶标部位的明显点没有可见分辨率)。

[0011] 该方法提供均一的染色形式,其对显微镜人员呈现为具有细胞结构(例如,膜、细胞质和核)的胞内分辨率的均匀颜色,使得不可以对染色进行精确定量。

[0012] 具体地,在一个实施方式中,本发明涉及使组织样品中靶标可视化的方法,以任意顺序包括:

[0013] (a) 使用第一染色对样品进行染色,

[0014] (b) 使用第二染色对样品进行染色,

[0015] (c) 使用第三染色对样品进行染色,

[0016] 其中

[0017] (i) 经由可检测酶底物在样品的包括靶标单元的部位处的酶介导沉积,产生第一染色和第二染色;

[0018] (ii) 第一染色使靶标单元的第一部分分子群可视化,且第二染色使靶标单元的第二部分分子群可视化;

[0019] (iii) 第一染色和第二染色具有不同的染色形式,其中第一染色的染色形式由样品的包括靶标单元的部位处的染色明显点构成;

[0020] 并且

[0021] (iv) 第三染色是使组织样品的形态学特征可视化而不使靶标可视化的组织学染色。

[0022] 在另一个实施方式中,本发明涉及使组织样品中两种或更多种靶标可视化的方

法,以任意顺序包括:

[0023] a. 使用第一染色对样品进行染色,

[0024] b. 使用第二染色对样品进行染色,

[0025] c. 使用第三染色对样品进行染色,

[0026] 其中

[0027] (i) 经由可检测酶底物在样品的包括靶标的部位处的酶介导沉积,产生第一染色和第二染色;

[0028] (ii) 第一染色使包括第一靶标单元的靶标部位可视化;

[0029] (iii) 第二染色使包括第二靶标单元的靶标部位可视化;

[0030] (iv) 第一染色和第二染色可通过其染色形式而区分,其中第一染色的染色形式的特征在于由明显的点构成,且第二染色的染色形式是均匀颜色的均一染色形式;

[0031] 并且

[0032] (v) 第三染色是使组织样品的形态学特征可视化而不使靶标可视化的组织学染色。

[0033] 本发明方法的有利特征允许使在用组织学染色进行染色的一个和相同组织样品中的靶标块和例如靶标(例如蛋白或细胞质核酸)的单个靶标实体(相同或不同靶标)同时可视化。组织学染色的使用有利地显示出样品组织的特征形态学外观,用于显微评估样品中靶标的区域性表达。亲和结合剂在靶标检测中的使用以及允许检测单个靶标分子(或其它单个靶标实体)的强有力信号扩增体系的使用使得本发明方法成为用于精确定量组织样品中靶标的不可缺少的工具,特别是用于基于包括细胞的生物学样品的评估的医学诊断,例如用于癌症诊断。

附图说明

[0034] 图 1 示出使 Her2 蛋白(根据 Hercept 测试,表达水平为 2+)可视化的扁桃体组织样品的组合组织学染色的代表性显微图像。

具体实施方式

[0035] 本发明大体上涉及对组织样品中感兴趣的靶标具体是分子靶标进行可视化和定量的方法,其中通过使用组织学染色对样品进行染色来使样品的形态可视化,并且其中通过使用靶标特异结合剂来检测靶标,且通过使用可检测酶底物在样品部位处的酶介导沉积而使样品的包括靶标的部位可视化。

[0036] 定义和实施方式

[0037] 1. 组织样品

[0038] 本发明大体上涉及组织样品等。术语“样品”是指较大的整体或群组的代表性部分、可能包括或可能不含有待被检测的靶标的物质或对象的量或部分。术语“组织样品”是指含有包括细胞和/或细胞碎片的生物材料的样品,例如身体组织样品、细胞培养样品,例如克隆的细胞、样品身体组织匀浆等;包括动物体、身体组织、涂片或流体的完整或损坏细胞的样品,或肿瘤样品,例如活检样品;包括活有机体的样品,例如包括动物、织物、细菌、真菌等的介质的样品;包括病毒颗粒、其碎片或病毒产物的样品,例如包括病毒核酸、蛋白、肽

等的身体涂片 ;包括细胞器的样品 ;包括天然或重组的生物学分子的样品,例如血浆样品、条件细胞培养基等 ;包括植物细胞或其碎片的样品。

[0039] 组织样品可以是新鲜身体样品或肿瘤组织样品。在一个实施方式中,组织样品可以是假组织的样品。本文中的术语“假组织”是指包括包埋到介质中的细胞和 / 或细胞碎片以及任选地构成天然生物学组织的一种或多种其它组分的人造物质,其在显微观察下,形态呈现为身体组织样品或肿瘤样品。

[0040] 组织样品的上述例子不具有限制性。

[0041] 2. 靶标

[0042] 在一个实施方式中,本发明的方法可以涉及包括(将要被可视化的)靶标(例如,作为疾病生物标记物的蛋白)的组织样品,在另一个实施方式中,组织样品可以不包括靶标,例如对照组织样品,在另一个实施方式中,本发明可以涉及推测包括靶标的组织样品,例如可能或可能不含有靶标蛋白的样品。

[0043] 术语“靶标”在本文中是指推测存在于样品中的感兴趣对象,其特征可为特定物理和 / 或功能特征。应该理解,在本文中,术语“靶标”涉及该对象的基本上相同实体的整个池,而不是该对象在样品中的单个实体 ;在通过仅有的单个单元表示靶标的样品中,该仅有的单个靶标单元应理解为靶标整体。本文中的术语“基本上相同”是指样品中靶标整个池的所有或基本上所有单个实体具有一个或多个使它们被识别为靶标的特征。例如,靶标可以是特定蛋白(包括样品中该特定蛋白的所有单独分子)、分子聚集物、分子复合物或结构、病毒或细菌,其中样品中该特定蛋白的所有单独分子、所有分子聚集物、分子复合物、结构、病毒颗粒或细菌被称为靶标,且它们的单独实体被称为单个靶标单元。

[0044] 一些生物学分子、分子复合物、结构、颗粒或有有机体与被认为是特定细胞类型、组织、细胞结构、生理条件等的特征的特点相关,并经常被称为这些特定细胞类型、组织、细胞结构或生理条件的“生物标记物”。在一个实施方式中,本发明涉及作为生物标记物的靶标。

[0045] 在一个实施方式中,靶标可以是蛋白,例如细胞膜受体或细胞质蛋白,在另一个实施方式中,靶标可以是核酸,例如细胞质核酸。任何在后所述靶标的衍生物,例如靶标蛋白或核酸的片段、前体、突变体等,在本发明一些实施方式中也可以是靶标。

[0046] 因此,在本发明的不同实施方式中,靶标可以是生物学或化学靶标分子、或颗粒、或分子或细胞复合物、或分子或细胞结构、或病毒、或微生物、或所述靶标分子、颗粒、复合物、结构、病毒或微生物的片段。包含在组织样品中的可被本发明方法检测的靶标可以是不同的污染物、毒素、战争物质(warfare substance)、分子库成员等。

[0047] 在一个实施方式中,本发明涉及存在于样品中作为多个基本上相同的单个单元的靶标。

[0048] 术语“单元”是指通过物理特征和 / 或功能而可与其它量的靶标或与环境的其它组分分离且可以单独考虑并计数的量的靶标。本文中的术语“单独靶标单元”或“单个靶标单元”是指靶标单元是指,靶标单元在数量上为一,与很多相对或相反。例如,靶标蛋白的单个 / 单独单元是指该靶标蛋白的单个单独蛋白分子,即多个相同种类分子中的一个分子。术语“基本上相同的单元”是指,靶标的多个单个单元具有一个或多个使这些单元被认为是靶标的特征。术语“独立的”是指靶标的单个单元以明显的实体存在,并不依赖于样品中相同种类的其它明显实体的存在。

[0049] 本发明的一些实施方式涉及作为靶标分子、结构、聚集物或复合物的一部分的单个靶标,其具有允许将分子的该部分与相同分子、结构、聚集物或复合物的其它部分区分开的一些特性。这些实施方式的非限制性例子可以是蛋白分子的功能域、表位、靶标蛋白的水解片段、融合分子的一部分、核酸的特定结构等。

[0050] 因此,在一个实施方式中,本发明可以涉及靶标的单个单元,其中所述单个单元是单个靶标分子。在另一个实施方式中,本发明可以涉及作为分子的单个单独部分的靶标的单个单元,例如,表位。在另一个实施方式中,本发明可以涉及多个单个分子聚集物/复合物,例如包括相同靶标蛋白的两个相关单个蛋白分子的细胞受体,例如,Her 受体或 G 蛋白偶联受体二聚体。

[0051] 靶标的单个单元的非限制性例子可以是单个生物学分子(蛋白、核酸、糖类等)、单个颗粒(病毒)、单个单独的分子或细胞复合物(细胞受体或染色质单元)、单个单独的分子或细胞机构(蛋白的功能域、单核苷酸多态性(SNP)、表位、锌指、PDZ 结构域、水解复合物等)、或单个病毒颗粒或单个微生物、或所述分子、颗粒、复合物、结构病毒或微生物的单个片段。

[0052] 在一个优选的实施方式中,靶标是与癌症相关的生物标记物,例如激素和生长因子及其受体、细胞粘合分子、信号传导分子、细胞周期调控分子等的核酸和多肽,例如,包括生长因子 PDGF、VEGF、TGF、HGF 或 EGF、其受体和通路相关分子的基因、RNA 和蛋白,与信号传导通路例如 JAK/STAT 通路或 Akt1/PKB 细胞存活通路或 5-FU 通路相关的基因及其产物,雌激素受体 ER 及其基因(ERS1)等。在一个实施方式中,靶标是 Her 受体或 Her 受体复合物(例如,Her2-Her3 二聚体),或 Her 受体的片段、结构或功能域,或与其相关的核酸。

[0053] 本发明的方法允许对以较宽动态范围存在于组织样品中的靶标的单个单独单元进行可视化和定量。在一些实施方式中,靶标的单个单元可以基本上均匀地分布在样品中,在一些实施方式中,靶标的单个单元可以在样品的一部分中较丰富,并在其其它部分较不丰富。在所有在后实施方式中,靶标的单个单元的群体可以被可视化为明显的点,且靶标在样品中的量被定量,并且剩余的靶标单元可以被可视化为均一形式的均匀染色,使得显微镜人员将靶标分配到组织样品的某些区域。

[0054] 在不同的实施方式中,本发明的方法可以包括通过使用两种不同的针对靶标的染色法使样品中的一种靶标或一个样品中的两种或多种不同靶标可视化,其中第一染色法使靶标的小子群、或第一靶标的子群的单个靶标单元可视化颜色或荧光或发光的明显点,并且第二染色法使靶标单元块(即,通过第一方法未可视化的剩余靶标单元或其子群)或第二靶标(或所述第二靶标的子群)可视化为均匀颜色的均一染色形式。因此,在一些实施方式中,本发明涉及存在于样品中的单个靶标单元的部分子群的可视化。

[0055] 本文中的术语“靶标(单元)的部分子群”是指单个靶标单元总群的一部分,即少于样品中靶标单个单元的总量的 100%,例如,等于或小于 99.9%,例如等于或小于 98%、97%、95%、94%、93%、92%、91% 或 90%,例如在 90% 与 85% 之间,小于 85%,例如样品中靶标单元的总量的 85%~80%、80%~75%,例如小于 75%,例如样品中靶标单个单元总量的 1%~74%,例如样品中靶标单元总量的 1%~60%、1%~50%、1%~40%、1%~30% 或 25%,等等。根据本发明,由总群的 50%~99.9% 表示的部分子群单个靶标单元被认为是存在于样品中的单个靶标单元的大子群或靶标单元块。小于样品中单个靶标单元总群的 50% 的部分子群在本文中

被认为是存在于样品中的单个靶标单元的小子群或靶标单元的小部分。

[0056] 本发明优选涉及组织样品,其中靶标是固定的,即在本发明的检测和可视化步骤中免于自由移动。在一些实施方式中,本发明涉及靶标运动通过机械或化学方式基本上减少或消除的组织样品。新鲜的或固定的固体身体组织或固体肿瘤样品、或靶标附着到某些支承物或介质上或附着到其中的样品是后者的非限制性实例。

[0057] 本发明方法的靶标可视化步骤在可视化之前可能需要一系列样品处理步骤,其可以在贴附于适用于显微观察或生成显微照片的固体支承物上的组织切片上进行,例如盖玻片或其它平面支承物,以通过对疾病状态的某些形态学指示物的选择性染色或对生物标记物的检测来进行突出。因此,例如,首先从个体中取出样品,然后固定并随后暴露于与感兴趣的生物标记物特异结合的抗体。样品处理步骤在本发明的可视化步骤之前还可以包括其它步骤,例如,可以包括以下步骤:切割并修整组织、固定、脱水、石蜡渗透、切成薄片、贴附到载玻片上、烘烤、脱蜡、再水化、抗原修复、封闭步骤等。可以使用合适的缓冲液或溶剂进行洗涤步骤,例如磷酸盐缓冲盐水(PBS)、tris 缓冲盐水(TBS)、蒸馏水。洗涤缓冲液可以任选地含有洗涤剂,例如吐温 20。所有这些步骤都是实验室中熟知的常规步骤。

[0058] 可以使用本发明方法处理两类组织样品:(1)包括新鲜组织和/或细胞的制品,通常未用醛类固定剂固定;以及(2)固定和包埋的组织样品的制品,通常是存档的材料。

[0059] 很多固定和包埋组织样品的方法是已知的,例如,醇固定和福尔马林固定,以及随后的石蜡包埋(FFPE)。

[0060] 需要固定剂来以可再现且类生命的方式保存细胞和组织。为达到此,将组织块、切片或涂片浸没在固定液中,或在涂片的情况下使其干燥。固定剂使细胞和组织稳定,从而使它们免受处理和染色技术的严苛性。

[0061] 可以使用任何合适的固定剂,例如,乙醇、乙酸、苦味酸、2-丙醇、四盐酸盐二水合物、乙偶姻(单体和二聚体的混合物)、丙烯醛、巴豆醛(顺式+反式)、甲醛、戊二醛、乙二醛、重铬酸钾、高锰酸钾、四氧化钨、多聚甲醛、氯化汞、甲苯-2,4-二异氰酸酯、三氯代乙酸、钨酸。其它实例包括福尔马林(水性甲醛)和中性缓冲福尔马林(NBF)、戊二醛、丙烯醛、碳二亚胺、亚氨酸酯(imidate)、苯醌、钨酸、和四氧化钨。

[0062] 用于免疫组化分析的新鲜的活检样品、细胞学制品(包括印片(touch preparation)和血液涂片)、冰冻切片和组织通常可以固定在有机溶剂中,包括乙醇、乙酸、甲醇和/或丙酮。

[0063] 假组织的样品,例如意在作为对照样品的样品,可以以任何以上模式进行处理。

[0064] 3. 靶标的可视化

[0065] 根据本发明,使用可检测酶底物的酶介导沉积来使样品中的靶标免疫化学地可视化。因此,靶标的可视化包括使用一种或多种试剂来检测样品中靶标的步骤,其中该一种或多种试剂能够(i)在样品的包括靶标单元的部位处特异识别靶标单元,以及(ii)将酶活性与所述靶标单元相关联。

[0066] 3.1. 结合剂

[0067] 本文中的术语“结合剂”涉及能够识别靶标单元(将其与周边的其它组分区分开)并直接或间接与靶标单元结合的分子。在一个实施方式中,本发明的结合剂对样品中的靶标或另一结合配偶体具有特异亲和性,即结合剂和靶标是特异结合对的成员,例如抗

原-抗体结合对或抗体-抗体结合对。

[0068] 作为靶标的亲和配偶体并且能够与靶标单元特异结合的结合剂在本文中被称为第一结合剂。对第一结合剂或与第一结合剂化学连接的物质(因此能够与靶标单元间接结合,即,通过第一结合剂)具有亲和性的结合剂在本文中被称为第二结合剂。在一些实施方式中,第二结合剂可以对与靶标化学连接的物质具有亲和性。根据本发明的靶标检测体系还可以包括结合剂,例如第三、第四和更进一步的结合剂,其可以相互是亲和配偶体或是对于体系中其它组分是亲和配偶体。

[0069] 通常而言,第一结合剂,或在一些实施方式中,第二或第三结合剂被用来接触样品,以识别靶标、与其结合并与单个(或多个)靶标单元形成复合物。第二、第三和更进一步的结合剂可以用在本发明方法的其它步骤中,例如用于识别在样品靶标部位处的可检测酶底物的沉积。在一些实施方式中,第二、第三和更进一步的结合剂可以用来放大与靶标部位处的靶标相关的信号。多个结合剂的使用增加本发明检测体系的灵活度和敏感度。

[0070] 领域内已知很多不同特异结合对,这些是能够相互特异结合的两个不同分子的配对。适用于实施本发明的特异结合对的成员可以是免疫或非免疫型。

[0071] 非免疫特异结合对包括其中两个组分分享对相互的天然亲和性而不是抗体的体系。示例性的非免疫结合对是生物素-亲和素或生物素-链霉亲和素、叶酸-叶酸结合蛋白、互补核酸、受体-配体等。本发明还包括相互形成共价键的非免疫结合对。示例性的共价结合对包括巯基反应基团,例如马来酰亚胺和卤代乙酰基衍生物,以及胺反应基团例如异硫氰酸盐(酯)、琥珀酰亚胺酯、磺酰卤化物,以及耦合染料例如 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脎(MBTH)和 3-(二甲基-氨基)苯甲酸(DMAB)等。

[0072] 免疫特异结合对可以示例为抗体-抗体体系或半抗原-半抗原抗体体系。在一个实施方式中,本发明的免疫特异结合对可以是包括两种或多种相互有亲和性的抗体分子的抗体-抗体结合对,例如一抗和二抗对,其中一抗表示第一结合剂,且二抗表示第二结合剂;包括 3 或 4 或更多种抗体成员的抗体体系可以用在另一个实施方式中。在本发明的其它实施方式中,免疫结合对可以由半抗原-半抗原抗体体系表示。在这样的实施方式中,可以由包括对靶标具有亲和性的分子和半抗原的结合物表示第一结合剂,例如与半抗原连接的一抗或核酸序列,且可以由抗半抗原抗体表示第二结合剂。

[0073] 术语“半抗原”是指能够被认为是分离的表位的小分子,对该表位可以制备抗体,尽管半抗原独自在注射到动物中时不引发免疫应答,其必须与载体(通常为蛋白)结合。因为半抗原是小分子,多个拷贝的半抗原可以连接到大分子,例如聚合物分子,例如蛋白、核苷酸序列、葡聚糖等。半抗原可以用作为用于其中放大信号是必须或有利的检定形式的便利标记分子。因此,结合的多个拷贝的半抗原提供增强的灵敏度,例如,增加的信号强度。合适半抗原的非限制性实例包括荧光素(FITC)、2,4-二硝基酚(DNP)、myc 地高辛(DIG)、酪氨酸、硝基酪氨酸生物素和染料,例如四甲基罗丹明、德克萨斯红、丹酰、Alexa Fluor 488、BODIPY FL、荧光黄和 Alexa Fluor 405/Cascade 蓝色荧光团,US20080305497 中描述的半抗原也可以用于本发明的目的。

[0074] 本文中使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白或其一部分,并包括含有抗原结合位点的任何多肽,而不管来源、制造方法和其它特征。该术语包括,例如,多克隆的、单克隆的、单一特异性的、多特异性的、人化的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂交的、突变的和 CDR 接

枝的抗体。抗体的一部分可以包括仍然能够结合抗原的任何片段,例如, Fab、F(ab')₂、Fv、scFv。通过与制造方法无关的基因序列来限定抗体的来源。

[0075] 本发明上下文中的一抗是指抗体结合剂,例如,整个抗体分子、所述分子的片段或衍生物,例如包括抗体或聚合抗体的结合物,其与靶标特异结合,更具体地与样品中靶标的单个单元结合,例如,与单个靶标分子结合。在一些实施方式中,一抗可以是能够与不同靶标的两个(或更多)单个单独单元结合的二价抗体,例如能够结合到受体二聚体(例如 Her2/Her3 二聚体)的抗体。在该实施方式中,根据本发明的靶标的单个单元是单个的 Her2/Her3 二聚体,并且靶标是样品中 Her2/Her3 二聚体的群体,包括样品的所有所述二聚体。一抗可以源自任何热血种属例如哺乳类、鸟类。

[0076] 本发明上下文中的二抗是指抗体结合剂,例如,整个抗体分子、所述分子的片段或衍生物,例如包括抗体或聚合抗体的结合物,其具有与一抗、或沉积在靶标部位处的半抗原、或直接或间接连接至一抗或另一结合剂的半抗原特异结合的抗原结合域。

[0077] 本发明上下文中的三抗是指抗体结合剂,例如整个抗体分子、所述分子的片段或衍生物,例如包括抗体或聚合抗体的结合物,其包括与二抗或连接至二抗的半抗原或连接至结合二抗的聚合物的半抗原或沉积在靶标部位处的半抗原特异结合的抗原结合域。

[0078] 有时候抗体可以同时起到二抗和三抗的作用。

[0079] 本发明中使用的抗体,包括一抗、二抗和三抗,可以源自任何哺乳动物种属,例如大鼠、小鼠、山羊、豚鼠、驴、兔、马、美洲驼、骆驼、或任何鸟类种属,例如鸡、鸭。如本文中使用的源自任何哺乳动物或鸟类种属是指编码特定抗体的核酸序列的至少一部分源自特定哺乳动物例如大鼠、小鼠、山羊或兔,或特定的鸟例如鸡、鸭的基因组序列。抗体可以是任何同种型,例如 IgG、IgM、IgA、IgD、IgE 或任何亚类,例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。

[0080] 在某些实施方式中,一抗含有抗原结合区,其能够与生物标记物特异结合,具体是与由生物样品的细胞表达的所述生物标记物的单个单独单元结合。标记物可以表达在细胞表面上或细胞膜内即细胞的内部,例如细胞质内、内质网内等。在一些实施方式中,可以从细胞中提取生物标记物,因此其存在于无细胞的介质中,例如水溶液中,或者其是存在于细胞培养介质、血浆、脑脊液等中的可溶分子。上面描述相应样品的实例。

[0081] 在某些实施方式中,二抗含有与一抗例如与一抗的恒定区特异结合的抗原结合区。在某些实施方式中,二抗可以与聚合物结合。在一些实施方式中,2 ~ 20 个二抗例如 5 ~ 15 个二抗可以与聚合物结合。在其它实施方式中,聚合物可以与 1 ~ 10 个二抗例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个二抗结合。

[0082] 在某些实施方式中,三抗可以含有与二抗例如与二抗的恒定区、或与连接至二抗的半抗原、或与结合有二抗的聚合物特异结合的抗原结合区。在某些实施方式中,三抗与聚合物结合。在一些实施方式中,1 ~ 20 个三抗可以与聚合物结合。在其它实施方式中,1 ~ 5 个三抗例如 1、2、3、4 或 5 个三抗可以与聚合物结合。

[0083] 在一些实施方式中,可以优选包括单个结合单元的结合剂的聚合物,例如与一个分子的一抗、二抗或三抗结合的聚合物。

[0084] 可用于本发明目的的抗体包括单克隆和多克隆抗体,使用噬菌体展示或可选技术制造的含有嵌合的、CDR 接枝和人工选择抗体的工程抗体。

[0085] 可以通过本领域熟知的多种方法中的任何一种来制造本发明的抗体结合剂,例

如根据 Harlow 和 Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)。用于制备重组抗体分子的技术在上述文献和多个其它文献例如 EP0623679、EP0368684 和 EP0436597 中有过描述。可以从 cDNA 库中分离编码抗体的核酸。可以从噬菌体库中分离编码抗体的核酸(参见例如 McCafferty 等人 1990, *Nature* 348:552, Kang 等人 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363; EP0589877B1)。可以通过已知序列的基因改组而获得编码抗体的核酸(Mark 等人 1992, *Bio/Technol.* 10:779)。可以通过体内重组而分离编码抗体的核酸(Waterhouse 等人 1993, *Nucl. Acid Res.* 21:2265)。用于本发明方法中的抗体包括人化的免疫球蛋白(参见 US5585089, Jones 等人 1986, *Nature* 332:323)。可以以任何可能的方式改变本发明的抗体,假定它们保持它们的结合亲和性,例如它们可以与效应蛋白、毒素、标记物等融合。抗体与不同试剂结合的方法也在领域内熟知并在本发明以下的示例性实施方式中描述。

[0086] 在本发明的一个实施方式中,由 Fab 区域即 F(ab)₁或 F(ab)₂表示抗体结合剂。

[0087] 在一个实施方式中,抗体结合剂可以是包括两种或更多种不同抗体结合剂的组合物,例如包括第一抗体结合剂和第二抗体结合剂的组合物,其中该两种或更多种不同抗体结合剂具有不同的免疫结合对。在一个实施方式中,在组合物中,两种或更多种不同抗体结合剂中的至少一种是能够与靶标特异结合的抗体,且至少一种另外的结合剂是包括酶的抗体。

[0088] 在另一个实施方式中,本发明可涉及作为非免疫特异结合对的成员的结合剂,例如互补的核苷酸序列或核酸类似分子。

[0089] 包括核酸或核酸类似分子例如 DNA 分子、RNA 分子、PNA 分子的结合剂可以用于核酸靶标的单个单独单元的可视化和定量。

[0090] 用作本发明目的用结合剂的核酸序列可以化学合成或在重组细胞中产生。两种产生模式在领域内均公知(参见,例如 Sambrook 等人 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press)。在一些实施方式中,核酸结合剂可以包括肽核酸(PNA)。肽核酸是其中通常存在于 DNA 和 RNA 中的脱氧核酸或核酸糖骨架(backbone)被肽骨架替换的核酸分子。制作 PNA 的方法在领域内已知(参见,例如 Nielson, 2001, *Current Opinion in Biotechnology* 12:16)(并入本文以供参考)。在其它实施方式中,结合剂可以包括锁核酸(LNA)(Sorenson 等人 2003, *Chem. Commun.* 7(17):2130)。

[0091] 在一些实施方式中,核酸结合剂可以包括至少一个寡核苷酸序列或至少一个聚核苷酸序列,其在特定的严格条件下与生物样品中靶标序列的单个单元(例如,单个 mRNA 序列)特异杂交。本文中使用术语“在严格条件下的杂交”来描述杂交的条件,在该条件下,显著地相互互补例如至少 70%、至少 80%、至少 85 ~ 90% 互补的核苷酸序列保持相互结合。如 Altschul 等人 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (并入本文以供参考)中所述地确定互补百分比。

[0092] 规定的严格条件在领域内已知,并可以在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ausubel 等人 1995eds.), 第 2、4 和 6 节(并入本文以供参考)中找到。此外,在 Sambrook 等人 (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, 第 7、9 和 11 章(并入本文以供参考)中描述了规定的严格条件。在一些实施方式中,杂交条件为高度严格的条件。高度严格的杂交条件的实例是在 65 ~ 70°C 下在 4× 氯化钠 / 柠檬酸钠(SSC)中的杂交或是在 42 ~ 50°C 下在 4× SSC 加

50% 甲酰胺中的杂交,之后在 65 ~ 70°C 下在 1×SSC 中洗涤一次或多次。应理解的是,其它的试剂可以添加到杂交和 / 或洗涤缓冲液中,例如,封闭剂(BSA 或鲑鱼精子 DNA)、洗涤剂(SDS)、螯合剂(EDTA)、聚蔗糖、PVP 等。

[0093] 在一些实施方式中,结合剂可以在中等严格的条件下与样品中的靶标序列杂交。本文中使用的中等严格包括能够由本领域普通技术人员基于例如 DNA 的长度而容易确定的条件。例示的条件在 Sambrook 等人 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. Vol. 1, pp. 1. 101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989) (并入本文以供参考) 中提出,并包括使用 5×SSC、0.5%SDS、1.0mM EDTA (pH8.0) 的预洗液,42°C 下 50% 甲酰胺、6×SSC 的杂交条件(或其它类似的杂交液,例如 Stark 溶液,在 50% 甲酰胺中,42°C),以及 60°C、0.5×SSC、0.1%SDS 的洗涤条件。

[0094] 在一些实施方式中,结合剂在低严格条件下与样品中靶标序列杂交。本文中使用的低严格条件可以包括能够由本领域普通技术人员基于例如 DNA 的长度而容易确定的条件。例如,低严格可以包括在含有 35% 甲酰胺、5×SSC、50mM Tris-HCl (pH7.5)、5mM EDTA、0.1%PVP、0.1% 聚蔗糖、1%BSA 和 500 μg/ml 变性的鲑鱼精子 DNA 的溶液中于 40°C 对 DNA 预处理 6 小时。在具有以下改变的相同溶液中进行杂交:使用 0.02% PVP、0.02% 聚蔗糖、0.2% BSA、100 μg/ml 鲑鱼精子 DNA、10% (wt/vol) 硫酸葡聚糖和 5 ~ 20×10⁶CPM 结合剂。在杂交混合物中于 40°C 孵育样品 18 ~ 20 小时,之后在含有 2×SSC、25mM Tris-HCl (pH7.4)、5mM EDTA 和 0.1% SDS 的溶液中于 55°C 洗涤样品 1.5h。使用新鲜溶液替换洗涤液并再使其于 60°C 孵育 1.5h。

[0095] 在其它实施方式中,本发明可以涉及结合剂,其为源自非抗体蛋白的肽序列或包括该肽序列,例如源自不同蛋白的核酸结合域、不同细胞和核受体的配体及其衍生物的肽序列。这些结合剂的一些非限制性实例可以是能够与抗体恒定区结合的补体级联的经典通路的 C1q 蛋白,MHC 分子例如 I 类 MHC 和 II 类 MHC 和非常规 MHC,具有特异结合配偶体的分子例如涉及细胞信号通路的分子例如具有亮氨酸拉链结构域分子,例如 fos/jun、myc、GCN4,具有 SH1 或 SH2 结构域分子,例如 Src 或 Grb-2;免疫球蛋白受体,例如 Fc 受体;嵌合蛋白,即工程制备为将两种或更多种特异结合配偶体的特征结合的蛋白,例如亮氨酸拉链可以被工程制备成抗体的 Fc 区,SH2 结构域可以被工程制备成在抗体的 Fc 区中表达。在其它实施方式中,融合蛋白可以被工程制备成包括具有取代的可变结构域的抗体的 Fc 部。

[0096] 结合剂也可以是能够与生物大分子的某些结构单元特异结合的小分子。

[0097] 本发明的实施方式包括含有可检测标记物例如荧光物质、半抗原、酶等的结合剂。使用这些标记的结合剂是在样品的包括靶标单元的部位处使靶标单元可视化的一部分,具体地,使用酶标记的结合剂来将酶活性与靶标相关联。在一个实施方式中,本发明涉及包括酶的第一结合剂,在另一个优选的实施方式中,本发明涉及包括酶的第二结合剂,在另一个实施方式中,本发明涉及包括酶的第三结合剂。

[0098] 在一个实施方式中,本发明涉及本文所述的靶标可视化体系中包括的两种或更多种结合剂,例如第二和第三结合剂可以包括酶。与结合剂连接的酶可以是相同的酶,例如辣根过氧化物酶(HRP),或其可以是不同的酶,例如 HRP 和碱性磷酸酶(AP)。在一个优选实施方式中,第二结合剂、或第三结合剂或更进一步的结合剂是与酶结合的抗体。在另一个优选实施方式中,结合剂是用于检测核酸的探针,其与酶结合。

[0099] 合适的酶标记物的非限制性实例可以是辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β -葡糖糖醛酸酶、转化酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶、葡糖氧化酶(GO)、或这些酶的衍生物。在一个优选实施方式中,结合剂可以包括HRP或其衍生物。在另一个优选实施方式中,结合剂可以包括AP或其衍生物。酶标记物的实施方式也在下文中讨论。

[0100] 用于靶标可视化过程的不同步骤中的结合剂的量可以根据不同因素例如样品种类、靶标种类、结合剂种类、结合剂的结合亲和性等而变化。使用公知常识,本领域技术人员可以选择合适的结合剂并确定每个特定实施方式需要的量(详细指南可以在例如 Harlow and Lane, *Antibodies: a Laboratory Manual*, (1988) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 或 Harlow, Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, (1999) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 中找到)。

[0101] 在一个实施方式中,可以优选的是,用于检测样品中靶标单元然后与酶活性相关联的结合剂的量是,仅检测靶标单元的小分子群并与将其与酶活性连接。这样的条件优选用于使单独靶标单元可视化为明显的点,其中明显的点和通过与单个靶标单元相关联的酶活性产生的可检测酶底物的沉积相应。在其它实施方式中,可以优选的是,使用一种或多种结合剂检测大部分的靶标单元并使其与酶活性相关联。在这些实施方式中,可以优选使用一种或多种结合剂的饱和量。在这样的条件下,样品的包括靶标的部位被可视化为与沉积的酶底物的颜色相应的均匀颜色的均一形式。

[0102] 在一个实施方式中,结合剂可以是未标记和标记的相同种类的结合分子的混合物,其对相同的结合配偶体具有亲和性,例如,对特定靶标蛋白的标记和未标记的一抗的混合物,或针对特定种类的一抗的标记和未标记的二抗的混合物等等。根据本发明,使用在后结合分子混合物,其中一部分标记的结合分子是预定的,使用通过该部分标记的结合剂预定的单个靶标单元的某个部分分子群形成靶标部位(之后可视化为视觉上明显的点)。这允许确定样品中单个靶标单元的精确量,并由此确定靶标的量,包括样品中靶标的相对量和总量。对本发明方法而可视化的组织样品中靶标的定量方法在 PCT/DK2011/000131 (引入本文以供参考)中描述。

[0103] 3.3. 酶

[0104] 根据本发明,通过在样品部位产生染色而使组织样品中的靶标可视化,其中该部位包括靶标。经一种或多种可检测底物的酶介导沉积产生染色,其中至少一种沉积底物是染料。根据本发明,通过使用与靶标单元直接或间接结合并与所述单元形成复合物的至少一种包括酶的结合剂,使样品的包括靶标的部位与酶活性相关联。

[0105] 在一个实施方式中,根据本发明的与靶标部位相关的酶是具有氧化还原酶活性的酶。

[0106] 术语“具有氧化还原酶活性的酶”是指在酶的EC编号分类中被分类为EC1的酶,其催化电子从一个分子(还原剂,也称为氢或电子供体)转移到另一个分子(氧化剂,也称为氢或电子受体)。在一些优选实施方式中,本发明涉及被分类为E1.10.(酚氧化酶)和E1.11.(过氧化物酶)的氧化还原酶。

[0107] 在一个优选实施方式中,本发明涉及酚氧化酶,特别是含铜氧化酶家族,漆酶(E1.10.3.2)。漆酶作用在酚和相似分子上,进行单电子氧化。漆酶通过促进

木质醇(天然出现的酚的家族)的氧化耦合而在木质素形成中发挥作用。适用于本发明目的的漆酶可以是例如由Phillips LE和Leonard TJ(Benzidine as a Substrate for Measuring Phenoloxidase Activity in Crude Cell-Free Extracts of *Schizophyllum commune*. *Mycologia* 1976, 68:277-285)、或Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. (Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat Biotechnol.* 2008, 2(1):10-24)、或Rodriguez Couto S, Toca Herrera JL (Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv.* 2006, 24(5):500-13)描述的酶。

[0108] 在另一个优选实施方式中,本发明涉及催化以下形式反应的过氧化物酶活性: $ROOR' + \text{电子供体}(2e^-) + 2H^+ \rightarrow ROH + R'OH$ 。

[0109] 在本发明的一个优选实施方式中,具有过氧化物酶活性的酶是辣根过氧化物酶(HRP)。在本发明的另一个实施方式中,具有过氧化物酶活性的酶是大豆过氧化物酶(SP)。

[0110] 对于一些过氧化物酶,最佳的底物是过氧化氢,一些其它的过氧化物酶对有机氢过氧化物例如有机过氧化物更有活性。电子供体的性质非常依赖于酶的结构,例如辣根过氧化物酶(HRP)可以使用多种有机化合物同时作为电子供体和受体。HRP具有可接近的活性位点,并且很多化合物可以达到反应位点。

[0111] 与样品的靶标部位相关的氧化还原酶活性可以通过与结合剂分子直接或间接连接的酶的全长分子、或混有酶活性的酶片段例如酶分子整个大小的51%~99.9%,或少于51%,例如40%、30%或更少来表示。

[0112] 本发明的结合剂可以与一个或多个酶部分直接或间接结合,(本文中的术语“部分”是指具有氧化还原酶活性的酶分子的一部分,其包括整个或基本上整个酶分子以及具有氧化还原酶活性的所述分子的一部分)。第一和第二结合剂两者或其中之一分子可以与氧化还原酶的一个或数个官能活性部分结合。在一个实施方式中,第一结合剂的至少一个分子可以与具有氧化还原酶活性的一个或多个酶部分结合;在另一个实施方式中,第二结合剂的至少一个分子可以与一个或多个这样的部分结合。第三和更进一步的结合剂的分子也可以与氧化还原酶结合。术语“直接结合”是指酶部分经由化学键与结合剂的分子连接。术语“间接结合”是指酶的部分经由连接分子与结合剂的分子连接,该连接分子具有与结合剂的一个化学键和与酶的另一个化学键。将生物分子与连接分子结合的方法在领域内熟知并在以下进行例示。

[0113] 在一个实施方式中,氧化还原酶的部分是HRP的部分,例如,整个HRP分子或其具有HRP酶活性的片段,其也可以是包括具有酶活性的部分HRP的重组蛋白,等等。在另一个实施方式中,氧化还原酶的部分可以是大豆过氧化物酶(SP)的部分。在另一实施方式中,氧化还原酶的部分可以是漆酶的部分。

[0114] 包括具有氧化还原酶活性的酶的结合剂的非限制性实例可以是抗体分子或其衍生物,例如与HRP的一个或多个部分结合的Fab,例如F(ab)1或F(ab)2,和与HRP结合的核酸结合剂。这样的结合剂可以与单个靶标单元例如单个靶标分子直接或间接地结合,并从而形成复合物,其中单个这样的复合物包括靶标的单个单独单元和一种或多种结合剂,其中一种或多种结合剂包括具有氧化还原酶活性的酶。

[0115] 在一个实施方式中,结合剂可以是包括过氧化物酶的一个、或两个或更多个部分

的结合物,其中所述部分与结合剂化学连接,例如与 HRP 的一个或多个部分结合的抗体分子,其中一个或多个抗体分子以及一个或多个 HRP 部分与骨架聚合物独立地连接的结合物。

[0116] 每一分子结合剂的酶部分(例如,HRP)的数量可以相对于每一结合剂在 1 至 20 ~ 50 的范围内变化,或更高。在一些实施方式中,可以优选使用其中酶部分相对于每一结合剂的数量为至少两个、优选两个到二十五个酶部分的结合剂,例如在三个与二十个之间,例如 4、5、6、7、8、9、10 等。在一些实施方式中,可以优选使用相对于每一结合剂包括多于四个酶部分的结合剂,优选在 5 与 20 之间,例如 5 ~ 15。具有多于四个的酶部分的结合剂有利地用于能够被可视化为基本上大小相同的点的靶标部位的形成。在一些实施方式中,可以优选使用相对于每一结合剂分子包括 4 ~ 6 个酶的结合剂分子池,或 5 ~ 7、6 ~ 8、7 ~ 9、8 ~ 10 等,例如相对于每一抗体分子 5 ~ 6 或 6 ~ 7 个 HRP 部分。在一些实施方式中,结合剂分子还可以包括不同氧化还原酶的多个部分的组合。

[0117] 在一些实施方式中,可以优选结合剂的较小结合物分子,例如与酶例如 HRP 的一个、或两个、或多个部分结合的单个抗体分子或抗体中分离的 Fab 区。这样的结合剂是较紧凑的分子,且其可以有利于检测“隐藏”或掩盖在靶标或样品中的靶标的单独单元,例如单独单个靶标分子可以被周围的其它分子掩盖,单个靶标结构可以隐藏在靶标分子中,或单个病毒颗粒可能难以到达包括细胞的复杂生物样品。

[0118] 在一些其它实施方式中,可以优选包括结合剂和数十到数百的酶部分的较大结合物。例如,在关心非常快的靶标检测或需要在每一单独靶标部位获得较大沉积的情况下,这样的结合剂可以是有利的。

[0119] 在一个实施方式中,结合剂可以包括碱性磷酸酶(AP)的一个或多个部分。结合剂的上述实施方式,具有氧化还原酶活性的酶,适用于包括 AP 的结合剂。

[0120] 3.4. 染色的沉积

[0121] 可以根据本发明通过以下步骤使组织样品中的靶标可视化:

[0122] a) 使用第一染色对样品进行免疫化学染色,以及

[0123] b) 使用第二染色对样品进行免疫化学染色,

[0124] 其中第一和第二染色均经由可检测酶底物在样品的包括靶标的部位处的酶介导沉积而产生;并且

[0125] 其中,第一染色使靶标的一个或多个单个单元可视化为第一染色的明显点,且第二染色使靶标块可视化为均匀第二染色的均一染色形式。

[0126] 3.4.1. 使用第一染色进行染色

[0127] 使用第一染色对靶标部位进行染色使样品中单个靶标部位(即,包括单个靶标实体的部位(例如,单个靶标分子或单个表位))可视化为第一染色的明显点(参见 W02011047680 和 PCT/US2011/6242)。令人惊讶地发现,点的大小和光学特征使得它们在组织学染色的背景以及具有均一染色形式的常规 IHC 染色的背景上可清楚区分开。“均一染色形式”是指染色对显微镜人员呈现为均匀且均质的颜色,且在构成染色的染色部分之间没有明显的分辨率。通常而言,由常规 IHC 提供的均匀颜色形式使用细胞结构(例如,膜、细胞质和核)的胞内分辨率对样品的包括靶标的部位进行标记,而并不区分靶标的单独单个单元。通过使用第一染色进行染色而提供的点即使在常规 IHC 染色提供均一染色形式的实

施方式中也是可区分的。这个优点被用在本发明的方法中,并且在一个实施方式中,使用提供均一染色形式的第二染色进行染色来使相同的靶标(或第二靶标)可视化。

[0128] 使用熟知的结合剂,如上所述, IHC 染色(a)使样品中包括一个单个靶标单元、数个单个单元、以及高达所有靶标单元的约 50% 的部分子群靶标单元的单个靶标单元可视化。在一些实施方式中,可以通过染色(a)而使单个靶标单元的总群可视化(例如,低表达靶标)。根据本发明,在步骤(a)用酶活性标记且不经第一染色进行染色的剩余靶标单元,即不与结合剂结合的靶标单元,适合用于经由其它合适方法进行可视化/检测,例如通过常规 IHC 染色,例如基于相应可检测底物的 HRP 或 AP 介导沉积的染色。

[0129] 在一个实施方式中,可以根据 W02011047680 中描述的过程来进行将靶标部位的群体染色为明显点的处理。术语“明显”<点>是指靶标部位处的染色点具有特定的光学和物理特征,例如圆度、色调、锐度、大小等,使得其可以从样品中染色的和未染色的材料中区分开。

[0130] 因此,在本发明的一个实施方式中,使用第一染色对组织样品中靶标的可视化可以包括以下步骤:

[0131] a) 将包括靶标的单独单元群体的样品与一种或多种结合剂孵育,其中

[0132] (1) 至少一种结合剂包括具有氧化还原酶活性的酶;

[0133] (2) 至少一种结合剂能够与靶标的单独单元直接结合,并且与靶标的单独单元的部分子群形成一个或多个离散的单个靶标部位,其中各个单个离散的靶标部位包括所述部分子群的一个单独单元与一种或多种结合剂的复合物,至少一种结合剂包括酶;

[0134] b) 将(a)的样品孵育在水溶液(A)中,该水溶液(A)包括:

[0135] 少于 2mM 的量的过氧化物、

[0136] 与(a)的离散单个靶标部位相关的酶的第一底物,以及

[0137] 所述酶的第二底物,

[0138] 其中所述第一底物是水溶性富电子有机化合物,其

[0139] (1) 能够在与所述酶反应时产生自由基;并且

[0140] (2) 能够在所述酶和过氧化物的存在下使所述第二底物分子交联,从而产生所述第二底物的水不溶性聚合产物,

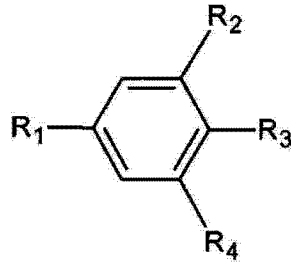
[0141] 并且其中所述第二底物是包括至少两个能够用作为所述酶底物的化合物和可检测标记物的结合物分子,其中可检测标记物选自荧光、发光、放射或发色物质以及特异结合对的成员,

[0142] 从而在(a)的离散单个靶标部位处形成第二底物的离散沉积,并使(a)的所述单个靶标部位可视化为离散的光学可区分染色点。

[0143] 在一个优选实施方式中,与单个靶标单元相关的酶是 HRP。

[0144] 酶的第一底物的实施方式包括但不限于 3,3'-二氨基联苯胺、阿魏酸和 α -氰基-4-羟基肉桂酸。其它适合作为第一底物的化合物可以由式(I)大致说明:

[0145]



[0146] 其中，

[0147] R1 是芳基或乙烯基，

[0148] R2、R3 和 R4 独立地为 H、N-(X)₂、O-(X)₂，其中 X 是烷基、乙烯基或芳基、或 H，且其中 R2、R3 和 R4 不同时为 H，

[0149] 其中，

[0150] N 是氮，

[0151] H 是氢，

[0152] O 是氧。

[0153] 与靶标部位相关的酶的第二底物可以选自具有以下特征的大量结合物分子：

[0154] 1. 结合物分子是水溶性分子，包括两个或更多个能够用作本发明酶底物的物质，优选为 HRP 的底物，以及一个或更多个标记物，其中底物和标记物经由水溶性连接化合物（在下文中称为“连接物”）而连接；

[0155] 2. 酶底物部分在结合物分子中“集中”于所述分子的一部分，而标记物“集中”于所述分子的另一部分，其中标记物距离底物约 30 个连续互连的原子或更多，即，隔开约 2.5nm 或更远，优选多于 3nm；

[0156] 3. 酶底物相互隔开少于 2.5nm 的距离，例如在结合物分子内隔开少于 30 个互连的碳或杂原子或更少，例如碳、氮、硫和 / 或氧原子，优选不多于 5 ~ 20 个原子；

[0157] 4. 连接物是包括至少 30 个连续连接的原子的化合物；

[0158] 5. 在环境中没有具有氧化还原酶活性的酶的情况下，结合物并不从含有过氧化物和本发明第一底物的水溶液 (ii) 中沉淀出；

[0159] 6. 在环境中存在具有氧化还原酶活性的酶而没有所述酶的第一底物的情况下，结合物并不从含有过氧化物的水溶液 (ii) 中沉淀出；

[0160] 7. 在环境中存在所述酶的情况下，结合物从含有过氧化物和本发明具有氧化还原酶活性的酶的第一底物的水溶液 (ii) 中沉淀出。

[0161] 第二底物的沉积可以直接光学地检测为明显的点，因为在一些实施方式中，第二底物可以包括发色、荧光或发光的标记物。在其它实施方式中，靶标部位的第二底物的沉积可以在沉积之后的步骤中被“染色”。使用免疫染色的常规方法来完成第二底物的光学“不可见”沉积的染色，包括 (i) 使用亲和结合剂检测沉积；(ii) 利用酶活性（例如，HRP 或 AP）“标记”沉积；以及 (iii) 在沉积部位沉积可检测酶底物。沉积还可以通过使用光学可检测的另一个第二底物重复在靶标部位处沉积第二酶底物的过程来进行染色。在任何情况下，样品中第二底物的沉积将“报道”包括靶标单个单元的靶标部位的存在。因此，本发明的第二底物分子也在本文中称为“报道物”分子。

[0162] 在一个实施方式中，本发明涉及作为水溶性结合物分子的第二底物，其包括

[0163] (i) 一个或多个可检测的物质(互换地称为“标记物”),

[0164] (ii) 能够用作为本发明的酶底物的至少两个物质,以及

[0165] (iii) 连接物

[0166] 其中,

[0167] 所述连接物是包括至少一个由至少 30 个连续连接的原子构成且含有至少两个分支点的直链的化合物,其中所述分支点被隔开至少 30 个连续连接的原子的分子距离;

[0168] 其中,

[0169] 标记物(i)和氧化还原酶底物部分(ii)在两个分支点与连接物连接,其中该两个分支点被隔开至少 30 个连续连接的原子的分子距离,

[0170] 其中,

[0171] 任何两个相邻的酶底物相互隔开少于 30 个连续连接的原子的分子距离。

[0172] 在一个实施方式中,本发明的结合物分子可以选自式(II)的化合物:

[0173] $(Y)_n-L-(Z)_m$,

[0174] 其中,

[0175] Y 是能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的部分;

[0176] Z 是可检测的标记物;

[0177] L 是连接化合物,

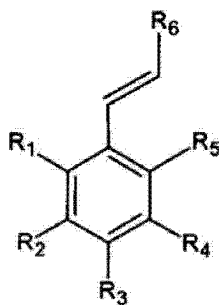
[0178] 其中

[0179] N 是 2 ~ 150 之间的整数,且

[0180] M 是 1 ~ 150 之间的整数。

[0181] 在一个优选实施方式中,Y 选自以下式(II)的化合物:

[0182]



[0183] 其中

[0184] R1 是 -H、-O-X、 $N(X)_2$ 或 -S-X;

[0185] R2 是 -H、-O-X、 $-N(X)_2$ 或 -S-X;

[0186] R3 是 -H、-OH、 $-NH_2$ 或 -SH;

[0187] R4 是 -H、-O-X、 $-N(X)_2$ 或 -S-X;

[0188] R5 是 -H、-O-X、 $N(X)_2$ 或 -S-X;

[0189] R6 是 $-CON(X)_2$ 或 CO-X,

[0190] 其中

[0191] H 是氢;

[0192] O 是氧

[0193] S 是硫

[0194] N 是氮,且

[0195] X 是 H、烷基或芳基。

[0196] 在一个实施方式中,至少一个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的化合物。

[0197] 在一个实施方式中,结合物分子中的至少两个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的化合物。

[0198] 在一个实施方式中,结合物分子中的至少两个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的相同化合物。

[0199] 在一个实施方式中,结合物分子中的至少两个能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物是式(ii)的不同化合物。

[0200] 在一个实施方式中,结合物分子中的所有能够用作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物由式(II)限定。在一个实施方式中,这些化合物是相同的化合物,在另一个实施方式中结合物分子包括由式(II)限定的不同化合物的任意组合。

[0201] 在一个优选实施方式中,Y 可以是肉桂酸的残基;在另一个优选实施方式中,Y 可以是阿魏酸的残基。在另一个优选实施方式中,Y 可以是咖啡酸的残基;在另一个优选实施方式中,Y 可以是氨基肉桂酸的残基。在另一个优选实施方式中,Y 可以是芥子酸的残基。在另一个优选实施方式中,Y 可以是阿魏酸、肉桂酸、咖啡酸、氨基肉桂酸或芥子酸的衍生物。

[0202] 优选地,由式(II)限定的残基 Y 经由基团 R6 与连接物 L 连接。

[0203] 在一个优选实施方式中,结合物包括两到四个相同的残基 Y。在另一个优选实施方式中,结合物包括两到四个不同残基 Y 的组合。在一个优选实施方式中,两到四个残基 Y 是式(II)限定的化合物。

[0204] 在一个优选实施方式中,结合物可以包括两到四个阿魏酸的残基或其衍生物的残基,在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个肉桂酸的残基或其衍生物的残基;在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个咖啡酸的残基或其衍生物的残基;在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个氨基肉桂酸的残基;在另一个实施方式中,结合物可以包括两到四个芥子酸的残基或其衍生物的残基。在后化合物的两到四个衍生物可以是相同的化合物或可以是不同的化合物。

[0205] 在一个优选的实施方式中,结合物分子可以包括式(II)的两个 Y 化合物,或其两个衍生物,例如两个阿魏酸残基,或两个肉桂酸残基,或两个氨基肉桂酸残基,或两个咖啡酸残基,或两个芥子酸残基等,以及一个或多个可检测的标记物;在另一个实施方式中,结合物可以包括式(II)的三个分子或其三个衍生物,例如三个阿魏酸、肉桂酸、咖啡酸、氨基肉桂酸、芥子酸等,以及一个或多个可检测的标记物;在另一个实施方式中,结合物可以包括式(II)的四个化合物或其四个衍生物,例如四个阿魏酸、肉桂酸、咖啡酸、氨基肉桂酸、芥子酸或四个衍生物,以及一个或多个可检测的标记物。

[0206] 在一些实施方式中,Y 化合物的数量可以高于 4,例如 5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 50、50 ~ 100 或 100 ~ 150 个化合物。在实施例部分中描述这样的结合物分子的非限制性实例。在一些优选的实施方式中,这样的结合物可以包括多于一条至少 30 个连续连接的原子的直链,例如 30 ~ 150 个原子,其中两到四个 Y 化合物在链的第一且相同的分支点

与各条直链连接,并且数条这样的直链经由所述直链的第二(另一)分支点与另一水溶性连接分子例如葡聚糖连接。

[0207] 在一个优选实施方式中,结合物分子可以包括两个或四个式(II)的不同化合物的组合,或者两个或四个其衍生物的组合,例如两个阿魏酸残基和一个肉桂酸残基、两个芥子酸残基和两个咖啡酸残基等。

[0208] 在一个优选实施方式中,Y可以是氨基酸酪氨酸的残基或其衍生物的残基。结合物可以包括2~4或更多个这样的残基。

[0209] 在一个实施方式中,结合物分子可以包括具有氧化还原酶活性的酶的底物的组合,其中至少一个所述底物是酪氨酸。在一个实施方式中,结合物分子包括至少一个酪氨酸残基和至少一个式(II)的化合物或其衍生物,并且至少一个另外的化合物是式(II)的化合物或其衍生物,例如,一个酪氨酸残基和两个芥子酸残基或其衍生物。

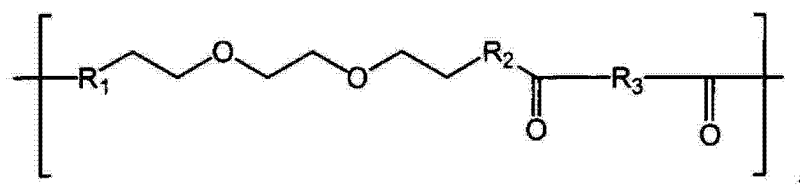
[0210] 在一些实施方式中,可以优选结合物包括4~6个残基Y,其中由上述任何化合物或任何化合物的组合表示Y。

[0211] Y化合物可以位于结合物分子中作为群组,优选分组为相对每一群组为两到四个Y化合物(即,包括多于四个Y化合物的结合物可以包括数组两到四个Y化合物,其中在结合物分子中通过一群原子例如以与30个或更多连接原子相应的分子距离隔开所述群组)。优选地,这些群组中的两到四个Y化合物经由在两个相邻Y残基之间提供距离的间隔化合物而连接在一起,该距离不长于5~15个互连的原子,例如5~10、6~12、7~13、8~14、9~15等。例如,2~4个Y化合物可以与氨基酸连接,该氨基酸构成含有2~4个氨基酸残基例如赖氨酸、丝氨酸、半胱氨酸等的残基的肽链,其中Y化合物与肽的氨基酸残基的反应基团连接,例如与赖氨酸残基的ε-氨基连接。两到四个化合物Y也可以经由包括多个分支点的其它短聚合物来相互连接,其中这些分支点之间的分子距离相应于不多于3~7个原子的链,优选3~5个原子,其中Y化合物可以与所述分支点直接或间接地连接。还可以把两到四个与非聚合分子结合的化合物Y分组到一起,该非聚合分子具有允许连接任何两到四个Y化合物的两到四个反应基团。Y化合物的这种分组位置(grouped location)在之后被称为结合物分子的“Y-头”。

[0212] 在一个优选实施方式中,Y-头包括经由短聚合物(例如,短PNA分子或短肽,其中肽优选包括赖氨酸、丝氨酸、谷氨酸盐和/或半胱氨酸残基)连接的两到四个Y残基。然而,包括15个或更少原子且可以与至少两个Y残基和连接物L结合的任何其它聚合或非聚合水溶性分子可以是合适的。

[0213] 在一个实施方式中,包括两到四个化合物Y的一个Y-头可以与包括下式(III)的两个或更多重复的聚合物连接:

[0214]



[0215] 其中R₁和R₂选自NH和O,且R₃选自甲基、乙基、丙基、CH₂OCH₂和(CH₂OCH₂)₂,且其中不多于三个连续重复的乙氧基。所得结合物还可以与一个(或多个)可检测标记物结合,

或其可以与另一个水溶性分子结合,该另一个水溶性分子包括一个或多个允许连接一个或数个这样的结合物的反应基团。这样的水溶性分子的一个非限制性实例可以是葡聚糖聚合物。

[0216] 结合物分子的可检测标记物可以是视觉上可检测的任何物质,例如荧光或发光的物质,或可通过使用一些检测手段检测出的任何物质,例如放射性标记物,特异结合对的成员,例如核酸序列、半抗原等。

[0217] 可以使用任何荧光的、发光的、生物发光的或放射性分子作为标记物。很多是市售的,例如荧光染料 Alexa Fluors (分子探针) 和 DyLight Fluors (Thermo Fisher Scientific)。荧光标记物的其它非限制性实例可以是以下分子:5-(和6-)-羧基荧光素、5-或6-羧基荧光素、6-(荧光素)-5-(和6-)-甲酰氨基己酸、异硫氰酸荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、Cy2、Cy3、Cy5、AMCA、PerCP、R-藻红蛋白(RPE)、别藻红蛋白(allophycocyanin, APC)、德克萨斯红、普林斯顿红(PrincetonRed)、绿色荧光蛋白(GFP)涂覆的 CdSe 纳米晶、钆衍生物、氨基苯二酰肼、异氨基苯二酰肼、吡啶酯、1,2-二氧杂环丁烷(1,2-dioxetane) 和吡啶并哒嗪,氢、碳、硫、碘、钴、硒、氚或磷的放射性同位素。

[0218] 在一些实施方式中,可检测的标记物可以是酶。合适的酶标记物的非限制性实例可以是碱性磷酸酶(AP)、 β -半乳糖苷酶(GAL)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、转氨酶、黄嘌呤氧化酶、萤火虫荧光素酶、葡萄糖氧化酶(GO)。

[0219] 在其它实施方式中,可检测标记物可以是特异结合对的成员,例如半抗原。作为合适半抗原的非限制性实例,可以是提到的2,4-二硝基酚(DNP)、地高辛(digoxigenin)、荧光素、德克萨斯红、四甲基罗丹明、硝基酪氨酸、乙酰氨基苄、三硝基苯酚汞(mercury trinitrophenol)、雌二醇、溴脱氧尿苷、二甲基氨基萘磺酸酯(丹酰)、氨基酸酪氨酸、丝氨酸等。作为合适的特异结合对的实例,还可以是提到的生物素、链霉亲和素、互补的天然和非天然寡聚核苷酸序列、锌指结合结构域对等。其它实例在以上讨论。

[0220] 在一个优选实施方式中,标记物是半抗原。在另一个优选实施方式中,标记物是荧光物质。在另一个优选实施方式中,标记物是特异结合对的成员。在其它实施方式中,可以优选其它标记物。

[0221] 每一结合物分子(上述中的任意一个)中的可检测标记物的数量可以变化。在一些实施方式中,相对于每一结合物分子标记物的数量可以是1~3,例如1、2或3个标记物。在一些其它实施方式中,结合物相对于每一结合物分子可以包括更多的4~150个标记物。

[0222] 在一个优选实施方式中,结合物(上述中任意一个)包括一个可检测标记物。在一个优选实施方式中,结合物分子可以包括一个Y-头(上述中的任意一个)和一个标记物。

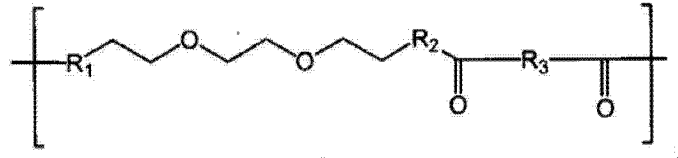
[0223] 在结合物分子中,可检测物质(单个标记物或多个)可以与作为具有氧化还原酶活性的酶的底物的化合物(例如与Y-头)隔开多于2.5nm的分子距离,例如隔开至少30个连续原子(例如30~150或更多连续原子)的链。在结合物在Y-头与1个(或多个)标记物之间包括一个连接原子链作为L连接物的实施方式中,Y-头和标记物在相互隔开至少30个原子的分支点处例如在30个连接原子链的相反两端与所述链连接。

[0224] 在一些实施方式中,当结合物包括多于1个标记物时,可以优选对标记物分组使得标记物之间的分子距离相应于至少30个连接原子的链(称为“间隔物”),优选60个连续原子或更多,例如90个连续互连的原子。优选标记物之间的间隔物是亲水化合物。在后组

的标记物之后以上述方式与在结合物分子中连接所述标记物和酶底物部分的连接化合物连接,即,位置最靠近 Y-头的组的标记物距离任何 Y-头的酶底物至少 30 个互连原子,即,至少 2.5nm 距离。多个标记物在结合物分子中的这种排布在之后被称为“Z-尾”。

[0225] 优选地,在 Z-尾的标记物之间的至少 30 个连续原子的间隔物是包括下式(III)的两个或更多重复的聚合化合物:

[0226]



[0227] 其中 R_1 和 R_2 选自 NH 和 O, 且 R_3 选自甲基、乙基、丙基、 CH_2OCH_2 和 $(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_2$, 且其中不多于三个连续重复的乙氧基。

[0228] 连接上述间隔物并经其隔开的多个标记物可以经由任何合适的连接物例如允许多处连接的水溶性聚合物例如葡聚糖而与一个 Y-头或数个 Y-头结合。在一些实施方式中,数个 Y-头可以经由这些聚合物与数个 Z-尾结合。

[0229] 在一个实施方式中,本发明结合物分子的多个标记物可以是相同的可检测物质,在另一个实施方式中,标记物可以是不同的可检测物质。

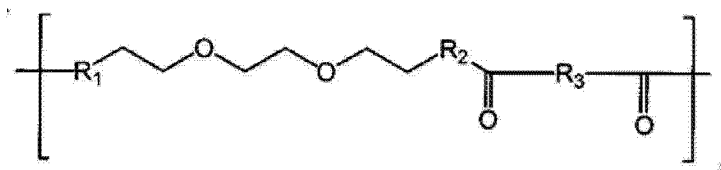
[0230] 氧化还原酶底物与标记物之间(例如 Y 头与 Z 尾之间)的连接物 L 根据本发明是包括至少 30 个连续原子的链的分子,例如 30 ~ 150 个原子或更多,例如 30、45、60、90、120 个原子或更多。在一个优选实施方式中,优选地, L 包括 150 个连续的原子。在一些实施方式中,连接分子包括原子直链,其中每两个连接碳原子之后是氧或氮原子。

[0231] 在一个优选实施方式中, L 可以是单个直链聚合物分子;在另一个优选实施方式中, L 可以是可包括结合在一起的数个不同聚合物的结合物分子。

[0232] 在一个优选实施方式中, L 是包括原子链的直链聚合物,其中两个连续碳原子之后是选自氧或氮的杂原子,例如,包括下述的连接物或聚乙二醇等。

[0233] 在另一个优选实施方式中,连接物是包括下式(III)的两个或更多个重复的化合物:

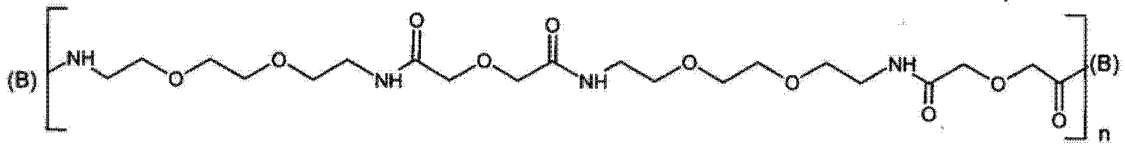
[0234]



[0235] 其中 R_1 和 R_2 选自 NH 和 O, 且 R_3 选自甲基、乙基、丙基、 CH_2OCH_2 和 $(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_2$, 且其中不多于三个连续重复的乙氧基。

[0236] 优选地, L 包括上式的至少两个重复,其中 R_1 和 R_2 均为 NH 且 R_3 为 CH_2OCH_2 。优选地, L 包括下式(IV)的一个或多个重复

[0237]



[0238] 其中 n 是 1 ~ 10 之间的整数, 且 (B) 是分支点。该式的 L 分子及其合成在 W02007/015168 中详细描述, 其并入本文以供参考。

[0239] 术语“分支点”是指聚合物分子中可以连接分支例如同一聚合物的侧链或其它分子的点。分支点可以是原子、一群原子或官能团, 化合物 Y 和 Z 可以经其与 L 直接或间接结合。

[0240] 存在很多种可以用作连接物 L 的聚合物分子。实例包括多糖, 例如葡聚糖、羧甲基葡聚糖、葡聚糖聚醛、羧甲基葡聚糖内酯、和环糊精; 支链淀粉、裂褶菌多糖、硬葡聚糖、黄原胶、胶凝糖、邻乙氨基半乳糖甘露聚糖、壳多糖、和壳聚糖例如 6-邻羧甲基壳聚糖和 N-羧甲基壳聚糖; 衍生的纤维素例如羧甲基纤维素、羧甲基羟乙基纤维素、羟乙基纤维素、6-氨基-6-脱氧纤维素和邻乙胺纤维素; 羟基化淀粉、羟丙基淀粉、羟乙基淀粉、角叉菜胶、海藻酸盐(酯)、和琼脂糖; 合成多糖例如聚蔗糖和羧甲基化聚蔗糖; 乙烯基聚合物包括聚(丙烯酸)、聚(丙烯酰胺)、聚(丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸-2-羟乙基酯)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(马来酸)、聚(马来酸酐)、聚(丙烯酰胺)、乙基-醋酸乙烯共聚物、聚(甲基丙烯酸)、聚(乙醇醇)、乙醇醇-氯乙酸乙烯酯共聚物、胺化的聚(乙醇醇)、和其嵌段共聚物; 聚乙二醇(PEG)、或聚丙二醇或氧化乙烯-氧化丙烯共聚物, 含有聚合物骨架, 包括线性、梳状、或超支化的聚合物和树枝状大分子, 包括分支的 PAMAM- 树枝状大分子; 聚氨基酸, 包括聚赖氨酸、聚谷氨酸、聚氨基酯、聚(乙烯亚胺)、pluriol; 蛋白, 包括白蛋白、免疫球蛋白、和病毒样蛋白(VLP) 和聚核苷酸、DNA、PNA、LNA、寡核苷酸和寡核苷酸树枝状聚合物构成物; 混合的聚合物, 即, 包括一个或多个前述聚合物、嵌段共聚物和无规共聚物的实例的聚合物。

[0241] 可以对所选聚合物的特性改性以使性能最佳化, 例如, 可以使长度或分支最佳化。此外, 可以对聚合物化学改性以携带多种取代基。还可以化学保护和 / 或活化取代基, 使聚合物进一步衍生化。

[0242] 在一个优选的实施方式中, 氧化还原酶底物与标记物之间的连接化合物是葡聚糖聚合物或包括葡聚糖聚合物的结合物分子。

[0243] 使聚合物与不同化学物质(例如标记物)结合的方法在领域内熟知, 且可以用来制备本发明的结合物。例如, 可以用乙烯砜活化聚合物并与使其与可检测标记物和式(II)的分子混合以形成聚合物结合物。在其它实施方式中, 可以使用醛来活化聚合物, 例如葡聚糖, 之后将其与可检测标记物和式(II)的分子混合。制备聚合结合物的又一种方法是使用所谓的化学选择结合方案以将组分结合到一起, 例如在与硫醇改性的聚合骨架共价结合之前可以使用硫醇反应马来酰亚胺基团来使分子衍生。在一些其它实施方式中, 式(I)的分子和可检测标记物可以经由连接化合物连接到聚合物。该方法的例子包括使用同双官能连接化合物例如戊二醛、二异氰酸己酯、二甲基己二亚酰胺化物、1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯、异双官能交联剂等例如 N- γ -马来酰亚胺丁酰氧基琥珀酰亚胺酯。或者, 化学物质可以与聚合物直接结合。

[0244] 包括式(III) (在下文中称为“L30”)的一个或多个重复的聚合物的衍生法在 W02007015168 中详细描述,其并入本文以供参考。

[0245] 在实施例部分描述包括连接物的示例性结合物,该连接物是包括多个式(III)的重复的聚合物,例如包括两个 L30 重复的聚合物(称为 L60),例如包括三个 L30 重复的聚合物(称为 L90),例如包括五个 L30 重复的聚合物(称为 L150)。

[0246] 第二底物在水性介质(ii)中的量可以在约 10^{-10} M 至约 10^{-4} M 范围内变化,例如,在结合物(上述中的任意一个)包括放射性标记物的情况下,适用的量可以是约 10^{-10} M 至约 10^{-6} M,并且在结合物包括荧光标记物或作为特异结合对成员的标记物的情况下,适用的量可以是约 10^{-9} M 至约 10^{-4} M。

[0247] 适用于本发明的第二底物分子在本文实施例部分中示例并在 W02011047680 中描述。

[0248] 出于本发明的目的,即为在本发明的条件下生成第二底物的沉积,其在光学上呈现为直径大于 0.4 微米、例如约 1 微米、1.5 微米、2 微米、3 微米或 4 微米的明显的染色点,根据表示第一底物的化合物的结构,第一底物在水性介质(A)中的量可以在约 0.05mM 至约 15mM 的范围内变化。

[0249] 例如,作为第一底物的阿魏酸或其衍生物在水性介质(A)中的量可以在 0.5mM 至 5mM 之间变化,例如约 0.5mM、约 1mM、约 1.5mM、约 2mM、约 2.5mM、约 3mM。术语“约”表示所述值的 1 ~ 25% 的偏差。

[0250] 优选以约 1.5mM 至约 15mM 的范围使用作为第一底物的羟基肉桂酸的衍生物例如 α -氰基-4-羟基肉桂酸,例如约 1.5mM、约 1.75mM、约 2mM、约 2.5mM、约 3mM、3mM 至 4mM、4mM 至 5mM、5mM 至 6mM、6mM 至 7mM、7mM 至 8mM、8mM 至 9mM、9mM 至 10mM、10mM 至 11mM、11mM 至 12mM、12mM 至 13mM、13mM 至 14mM、14mM 至 15mM(包括所有所述区间的两个端点以及所有区间内的值)。

[0251] 当使用 DAB 作为第一底物时,其在水溶液(A)中的量优选少于 1mM,优选在 0.05mM 至 1mM 的范围内,例如 0.05mM 至 0.08mM,例如约 0.07mM,即 0.066mM 至 0.074mM,或 0.08mM 至 0.1mM,例如约 0.09mM,或 0.1mM 至 0.3mM,例如约 0.15mM、约 0.2mM、约 0.25mM,或 0.3mM 至 0.6mM,例如约 0.35mM、约 0.4mM、约 0.45mM、约 0.5mM、约 0.55mM,或 0.6mM 至 1mM,例如约 0.7mM、约 0.75mM、约 0.8mM、0.8mM 至 1mM。

[0252] 在可视化过程中,样品孵育在不同介质中(例如,孵育(a)、孵育(b))。孵育介质的非限制性实施方式在下面讨论。

[0253] 将样品保持/孵育在孵育介质中的时间可以根据孵育之后想要达到的技术效果而变化。在不同的实施方式中,孵育可以持续约 3 秒至约 3 分钟,例如约 10 秒、20 秒、30 秒、1 分钟、2 分钟、5 分钟、10 分钟或更长,例如 1 ~ 2 小时、过夜。在一个实施方式中,方法所有步骤中的孵育时间可以具有相同的持续时间,即,各个孵育可以持续 5 ~ 10 分钟等。另一个样品可以在包括结合剂的水溶液(在下文中称为“结合剂溶液/介质”)中持续 1 ~ 3 分钟,水性介质(i)和/或水溶液(ii)介质中的孵育可以持续 10 分钟。

[0254] 根据靶标、结合剂类型等,可以在不同温度进行孵育。根据本发明的过程基本上不依赖温度且可以在约 +4°C 至约 +40°C 的温度下进行。然而,如果需要的话,温度可以用于延长或减短孵育的持续时间,例如可以使用较低的温度来延长孵育时间,相反亦然,可以使用

较高的温度来缩短孵育时间。

[0255] 基本上,适用于本发明目的的结合剂介质是 pH 为 4 ~ 9 的一种或多种结合剂的缓冲水溶液。在一些实施方式中,结合剂介质可以包括有机或无机盐。无机盐可以选自例如氯化钠、氯化镁、氯化钾、氯化钙、磷酸钠、或硫酸铵。有机盐可以选自例如醋酸钠、醋酸铵或咪唑盐,例如咪唑盐酸盐等。

[0256] 盐在结合剂介质中的量可以从约 10^{-3} M 变动到饱和,例如约 20mM 至约 200mM,或约 50mM 至约 500mM。在一个优选实施方式中,介质可以包括约 10mM 至 500mM 量的盐。在另一个优选实施方式中,介质可以没有盐。

[0257] 如上所述,通常,结合剂介质的 pH 值可以从约 4 变化到约 9,例如在 pH3.5 与 pH9.5 之间,例如在 pH5 与 pH7 之间,在 pH5.5 与 pH6.5 之间或在 pH6.5 与 pH7.5 之间,或在 pH7 与 pH8 之间,或在 pH7.5 与 pH8.5 之间,或在 pH8 与 pH9 之间。可以使用任何具有合适缓冲能力的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐(PBS)和咪唑缓冲液。其它合适的缓冲液可以在 Good, NE., 等人(1966)Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem. 5(2), 467-477 中找到。介质的 pH 值对于结合剂与靶标的结合可以是重要的;可以根据结合剂和靶标的性质来使其最佳化。

[0258] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括有机改性剂(术语“有机改性剂”是指任何非水溶剂),例如 N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砜(DMSO)、乙二醇和二甘醇、环丁砜、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、聚乙二醇(PEG)、丙二醇等。有机改性剂的量可以在约 1% 至约 20% (v/v 或 w/v) 的范围内变化,或者在一些实施方式中可高于 20%。

[0259] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括洗涤剂,例如聚乙二醇对异辛基苯基醚(NP-40)或表面活性剂(例如,选自基于聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温)的表面活性剂、或基于嵌段共聚物(pluronic 等)的表面活性剂等。洗涤剂的量可以在约 0.001% 至约 5% (v/v 或 w/v) 的范围内变化。

[0260] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括结合剂稳定剂,例如牛血清白蛋白或葡聚糖。稳定剂的量可以在 0.01 ~ 20% (w/v) 的范围内变化。

[0261] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括离子螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二胺羟基苯乙酸型螯合剂(EDHPA)等)。螯合剂的量可以在约 10^{-9} M 至约 10^{-6} M 的范围内变化。

[0262] 在一些实施方式中,结合剂介质可以包括一种或多种封闭剂以使非特异结合位点即不包括靶标的固体支承物的位点饱和。适用于不同实施方式的封闭剂的一些非限制性实例可以是 Denhard 溶液、牛血清白蛋白、脱脂奶等。

[0263] 如上所述,本发明涉及多种种类的靶标、结合剂和检定形式,因此,结合剂介质的组成可以变化并应该使用本领域知识来针对每个特定实施方式作出调整。

[0264] 结合剂在结合剂介质中的量可以根据结合剂、样品、靶标的种类,介质组成等而变化。例如,在一个实施方式中,当样品包括以较低浓度范围存在的靶标时,可以优选在结合剂介质中使用较高量的结合剂,该结合剂介质的组成(例如, pH、盐浓度等)和孵育条件(例如,与样品孵育的持续时间、温度)被最佳化以促进结合剂与靶标(或其它结合配偶体)之间的相互作用。特异结合对的配偶体之间的结合的优化是对于用于本发明目的的大部分结合剂的常规操作,使得本领域技术人员能够通过遵循本领域的指南来实施。有时候需要这样

的优化,以保证结合剂与样品中最大可能数量的靶标单个单元或与另一结合剂(例如,结合到靶标的结合剂)结合。

[0265] 在一个优选实施方式中,可以调整结合剂在结合介质中的量,以结合样品中存在的所有单个靶标单元或其部分子群。在另一个实施方式中,调整结合剂的量,以结合样品中单个靶标单元与另一结合剂的所有复合物或其部分子群。在一个实施方式中,部分子群相应于样品中单个靶标单元的大部分。在另一个实施方式中,部分子群相应于样品中小部分的单个靶标单元。在这样的实施方式中,可以调整结合剂介质的组成例如 pH、盐含量等,或孵育条件例如温度、持续时间等,使得结合剂与其在样品中的配偶体的亲和性被减弱或增强,因此结合剂会与样品中存在的靶标的单个单元的较大或较小部分子群形成结合复合物。在一个优选实施方式中,能够与其在样品中的配偶体特异结合的结合剂例如第一结合剂、第二结合剂的量,和 / 或在第一或第二结合剂混合物(参见以下)中的结合分子的量,即使在不利于配偶体结合的条件下对于使样品中所有可得结合位点饱和而言是相对高的。

[0266] 本文中的术语“部分子群”是指样品中结合剂配偶体单元的总群的一部分,即等于或小于 99.9%,例如等于或小于 99%、98%、97% 等,例如 75 ~ 80%,小于 75%,小于 60% 等,例如 1% 至 50%,例如 1% 至 25% 等。在一些实施方式中,部分子群可以小于样品中存在的结合剂配偶体单元总量的 1%。

[0267] 在一些优选实施方式中,样品中结合剂的结合配偶体的可检测的部分子群可以是预定的。这可以通过使用结合剂的结合分子的混合物来完成,其中混合物的结合分子全都是相同种类并对样品中的(对所有的所述结合分子是共同的)结合配偶体基本上具有相同的亲和性(本文中的“基本上”是指亲和性包括 +/-10% 的差异),并且其中一部分所述结合分子被可检测地标记且一部分所述结合分子未标记,且两个部分都是预定的。术语“标记的结合分子”是指所述结合分子与可检测标记物例如荧光标记物或酶相关 / 连接。在一个优选实施方式中,标记物是酶;在一个优选实施方式中,酶是氧化还原酶(例如,如上所述的那些,例如 HRP)。未标记的结合分子不包括任何可检测的标记物。

[0268] 在一个这样的实施方式中,结合剂可以是能够与靶标的单个单元结合并与所述单个单元形成复合物的第一结合剂。在另一个这样的实施方式中,结合剂可以是对与样品中单个靶标单元结合的第一结合剂具有亲和性的第二结合剂。在一些实施方式中,结合剂可以是能够与第二结合剂、或者与连接至第二结合剂的标记物、或靶标部位处的报道物沉积结合的第三结合剂。

[0269] 使用包括预定比例的标记和未标记结合分子的结合剂(上述的任意一种),可以通过对由标记的结合剂形成的靶标部位(可视化为点)进行定量而精确定量样品中靶标的量。在实施例部分详细说明使用标记和未标记结合分子的混合物来对组织样品中靶标进行定量的方法。

[0270] 在结合剂介质中孵育之后,在包括具有氧化还原酶活性的酶的第一底物、具有氧化还原酶活性的酶的第二底物和过氧化物的水溶液(A)(在本文中也称为“报道物沉积介质”)中孵育样品。

[0271] 任选地,在水溶液(A)中孵育之前,可以在水溶液(B)中孵育样品,该水溶液(B)的组成与没有第二底物的水溶液(A)相同。

[0272] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及的孵育介质是水溶液(A),且在另一个实施

方式中,本发明涉及的孵育介质是水溶液(B)。

[0273] 水溶液(A)和水溶液(B)均可以是具有合适缓冲能力的水性缓冲溶液,例如,磷酸盐缓冲盐(PBS)和咪唑缓冲液。其它合适的缓冲液可以在 Good, NE., 等人 (1966) Hydrogen ion buffers for biological research. Biochem. 5(2), 467-477 中找到。可以调整溶液的 pH 值以达到孵育的技术效果,即在本发明的离散的单个靶标部位处形成具有氧化还原酶活性的酶的第二底物的离散沉积,例如调整成约 4 至约 9 的 pH 范围。然而,水溶液(A)和(B)的 pH 对于孵育的技术效果具有较小的重要性。

[0274] 水溶液(A)和水溶液(B)两者还可以包括有机或无机盐。

[0275] 无机盐可以选自例如氯化钠、氯化镁、氯化钾、氯化钙、磷酸钠或硫酸铵等。

[0276] 有机盐可以选自例如醋酸钠、醋酸铵或咪唑盐,例如咪唑盐酸盐等。

[0277] 盐在水溶液(A)和水溶液(B)中的量可以从约 10^{-3} M 变化到饱和,例如约 20mM 至约 200mM,或约 50mM 至约 500mM。在一个优选实施方式中,介质可以包括约 10mM 至 500mM 量的盐。在另一个优选实施方式中,介质可以没有盐。

[0278] 水溶液(A)和水溶液(B)两者在不同实施方式中还可以包括:

[0279] (i) 有机改性剂和 / 或

[0280] (ii) 酶增强剂,和 / 或

[0281] (iii) 铁螯合剂,和 / 或

[0282] (iv) 洗涤剂,和 / 或

[0283] (v) 抗菌剂。

[0284] 有机改性剂可以以约 1% 至约 20% (v/v 或 w/v) 的量存在于介质中,然而,在一些实施方式中,可能需要更高浓度的有机改性剂。有机改性剂可以例如是聚乙二醇(PEG)。其它实例包括但不限于选自 C1 ~ C4 即低级醇、N-甲基吡咯烷酮(NMP)、二甲基亚砷(DMSO)、乙二醇和二甘醇、环丁砜、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的有机改性剂。在一些实施方式中,可有利的是使用聚乙二醇(PEG)例如 PEG2000,或丙二醇。在这些情况下,聚乙二醇在介质中的量可以在约 0.1% (v/v) 至约 20% (v/v) 的范围内变化,例如约 1% (v/v) 至约 15%,例如 5 ~ 10% (v/v)。

[0285] 术语“酶增强剂”是指增强过氧化物酶催化活性的任何化合物。这样的酶增强剂可以选自苯基硼酸衍生物和二价金属离子例如镍或钙。酶增强剂的量可以在约 10^{-7} 至约 10^{-3} M 的范围内变化。

[0286] 铁螯合剂可以是乙二胺四乙酸(EDTA)或乙二胺羟基苯乙酸型螯合剂(EDHPA)。铁螯合剂的浓度可以在约 10^{-9} 至约 10^{-6} M 的范围内变化。

[0287] 洗涤剂可以选自聚乙二醇对异辛基苯基醚(NP-40),选自基于聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(吐温)的表面活性剂、或基于嵌段共聚物(pluronic 等)的表面活性剂。洗涤剂的浓度可以在约 0.001% 至约 5% 的范围内变化。

[0288] 水溶液(A)的基本组分是具有氧化还原酶活性的酶的第一底物、所述酶的第二底物和过氧化物。

[0289] 在以上详细讨论了第一底物和第二底物的实施方式。

[0290] 在一个优选实施方式中,第一底物可以是 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)或其衍生物。在另一个优选实施方式中,第一底物可以是阿魏酸或其衍生物。在另一个实施方式中,第一

底物可以是 α -氰基-4-羟基肉桂酸。

[0291] 第一底物在水溶液(A)中的量可以根据选为第一底物的化合物而变化(参见以上的讨论)。例如,在实施方式中,当DAB被选为第一底物时,DAB在水溶液(A)和水溶液(B)中的量小于1.4mM,优选小于1.2mM,优选小于1mM,例如约0.005mM至约0.5mM,例如约0.3mM,或约0.2mM,例如约0.15mM等。在阿魏酸用作第一底物的实施方式中,所述化合物的量小于2.5mM,优选小于2mM,例如约1.5mM。该上下文中的术语“约”是指 $\pm 0.05 \sim 0.5$ mM。

[0292] 本发明中其它第一底物在水溶液(A)或(B)中的量在之前的章节中有过讨论。

[0293] 水溶液(i)可以包括多种量的酶的第二底物,例如约 10^{-10} M至约 10^{-4} M。例如,在第二底物(上述的任意一种)包括放射性标记物的实施方式中,适用的量可以在 10^{-10} M至约 10^{-6} M的范围内。在其它实施方式中,例如,当第二底物包括荧光标记物或作为特异结合对成员的标记物时,量可以在约 10^{-9} M至约 10^{-4} M的范围内。

[0294] 在一个实施方式中,水溶液(A)可以包括第二底物的相同结合物分子的群体。在另一个实施方式中,水溶液(i)可以包括第二底物的不同结合物分子的群体。

[0295] 本发明的优选过氧化物是过氧化氢,然而,其它过氧化物也可以用于不同的实施方式中,例如,在一些实施方式中,其可以优选为有机过氧化物,例如叔丁基过氧化物、二叔丁基-过氧化物、过醋酸等,或者在一些实施方式中,其可以是过氧化氢的加合物,例如过氧化氢尿素加合物。

[0296] 过氧化物在水溶液(i)和水溶液(ii)中的量可以不高高于5mM,优选小于5mM,优选在0.1mM至5mM的范围内,例如0.1mM至1mM、1mM至mM、2mM至3mM、或3mM至4mM,优选在约1mM至约2mM的范围内,例如约1.5mM。术语“约”在该上下文中是指 $\pm 0.05 \sim 0.5$ mM。

[0297] 包括具有氧化还原酶活性的酶的第一底物、所述酶的第二底物和过氧化物的水溶液(A)在本文中称为“沉积介质”。

[0298] 水溶液(B)可以以与水溶液(A)中相同的量包括相同的化合物,不同之处在于水溶液(ii)不包括具有氧化还原酶活性的酶的第二底物。

[0299] 在一些实施方式中,可以初始在水溶液(B)中继而在水性介质(A)中孵育包括单个靶标部位的样品。

[0300] 在另一个实施方式中,在水溶液(A)中孵育包括单个靶标部位的样品,而不在水溶液(B)中预孵育。

[0301] 根据本发明,沉积介质是稳定的溶液,即在较长的时间(例如至少5小时)内不出现溶解化合物的沉淀。为延长介质的保存期限,可有用的是在 $+20^{\circ}\text{C}$ 之下的温度例如在 $+4 \sim +10^{\circ}\text{C}$ 储存介质,并且/或者向介质中添加抗菌化合物。抗菌化合物可以是任何常用于该目的的抗菌化合物,例如,叠氮化钠、Proclin™或 Bronidox®。

[0302] 在一个实施方式中,本发明涉及对单个靶标部位处的第二底物的离散单个沉积的可视化,例如,可以在包括能够与第二底物的沉积分子的可检测标记物特异结合的结合剂的孵育介质中进一步孵育包括第二底物的离散沉积的样品。

[0303] 包括能够与第二底物的沉积分子的可检测标记物特异结合的结合剂的孵育介质通常具有与上述结合剂介质相似或相同的组成。

[0304] 在一个实施方式中,与沉积的第二底物的可检测标记物结合的结合剂可以包括酶,例如辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)。可以使用标准的可视化体系来检

测这些结合剂,该标准的可视化体系采用酶的发色底物,例如酶底物溶液或显色液。这种介质可以是领域内已知的任何合适介质,其根据可得的可可视化手段并遵循关于沉积的可检测标记物的性质的普通常识而进行选择。HRP 和 AP 生成的沉积的常规染色均可以使用本领域熟知的过程来产生(参见,例如 *Immunochemical staining methods. Handbook. 3rd ed, Dako, 2010*)。在一个实施方式中,通过使用 W02009036760、W02010094283 或 W02010094284 中描述的方法来产生染色(所有在后文件中公开的染色过程的实施方式并入本文以供参考)。

[0305] 或者,在沉积结合剂包括 HRP 的情况下,本发明的可视化方法可以包括在上述沉积介质中孵育含有与所述结合剂结合的第二底物的离散沉积的样品的更进一步的步骤。在一些实施方式中,当与沉积的第二底物相关的信号可能较弱,或初始沉积的尺寸较小时,该更进一步的步骤可以是有利的。额外的沉积步骤允许与沉积相关的信号进一步放大,并且还可以增加可检测沉积在单个靶标部位处的尺寸。此外,该步骤还允许对可检测信号的特性进行改变,例如改变信号的光谱特征,例如,通过使用包括用于该额外沉积的绿色标记物的结合物分子来替代包括用于初始沉积的红色标记物的结合物分子(在方法的步骤(b)中),可检测为红色信号的初始标记物可以被取代为可检测为绿色信号的标记物。然而,本发明方法的这种灵活性不对检测的额外步骤中使用的试剂增加额外的复杂度,因为可以成功地使用本方法步骤(a)和(b)(以上讨论的)的孵育介质的所有实施方式而无需在这些额外步骤中作出重大改变。

[0306] 在一个实施方式中,本发明涉及洗涤介质,即在孵育的技术效果发生之后用于从样品中去除(孵育介质中)剩余化合物的介质。本发明的方法通常可以在于上述介质中孵育样品的步骤之后例如在步骤(a)与(b)之间等包括一个或多个洗涤步骤。通常,洗涤介质可以是与洗涤步骤之前的步骤中孵育样品使用的相同介质,而没有孵育介质的基本化合物,即,没有结合剂、酶的底物等。

[0307] 在一个实施方式中,本发明涉及用于使内源性氧化还原酶活性终止的介质。这类介质可以是通常用于本领域目的的任何此类介质,例如过氧化氢溶液。可以在方法的步骤(a)之前使用该介质。也可以在步骤(b)之后且在沉积的第二底物的额外检测步骤之前使用该介质。该介质在过程的该阶段中的应用可以用于使样品中残余的氧化还原酶活性终止。

[0308] 上述产生酶促沉积染色的明显点的方法不限制本发明。利用亲和结合剂来检测单个靶标部位处的靶标单元以及该靶标部位处点染色的酶介导染色沉积的其它方法也包括在本发明的范围中。

[0309] 因此,在一个实施方式中,可以通过将与单个靶标部位相关的信号的滚环扩增(RCA)与该靶标部位处染色的酶沉积相结合的方法来产生本发明方法的靶标点染色。这样的方法在领域内熟知(参见,例如 **Söderberg, O. 等人. Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. Nat. Methods 3, 995–1000 (2006).** Tao, R. -H. & Maruyama, I. N. All EGF (ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J. Cell Sci.* 121, 3207–3217 2008; or Mats Gullberg & Ann-Catrin Andersson Highly specific detection of phosphorylated proteins by Duolink. *Nature Methods* 6, (2009)), 并且试剂从 Olink Bioscience (<http://www.olink.com/>) 可得。

[0310] 3.4.2. 使用第二染色进行染色

[0311] 在一个实施方式中,可以使用 IHC 染色用传统 / 常规方法来完成根据本发明的使用第二染色对样品中靶标进行染色,例如 HRP 可检测底物例如 DAB 的 HRP 介导的沉积、或 AP 可检测底物例如 Liquid Red (LR) 染色的 AP 介导的沉积。

[0312] 本文中的术语“IHC 染色用传统 / 常规方法”是指一种方法,大体包括:(i)使用作为与靶标的特异结合对的成员的结合剂,检测样品中靶标的步骤,(ii)使用酶活性,例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶活性来直接或间接标记靶标的步骤,以及(iii)使用作为靶标相关酶的底物的染料来对包括靶标和酶活性的部位进行标记,其中染料沉积在靶标部位处并对显微镜人员呈现为均匀的颜色形式,使用细胞结构(例如,膜、细胞质和核)的胞内分辨率对样品的包括靶标的部位进行标记,而不区分靶标的单独单个单元。这些方法在领域内熟知(参见,例如 Immunochemical staining methods. Handbook. 3rd ed, Dako, 2010)。

[0313] 本文中描述的结合剂可以用于使用第一和第二染色进行染色的目的(相应地,染色(a)和(b))。

[0314] 使用染色(a)和(b)的靶标部位的可视化均可以采用标记有 HRP 活性的结合剂,其中结合剂在样品中具有不同的结合亲和配偶体:在染色(a)中,结合剂识别第二底物的沉积并与其结合,且在染色(b)中,结合剂识别并结合靶标。由于染色(a)和(b)的外观差异,可以使用对一种(相同靶标)或多种(不同靶标)的靶标部位进行标记的相同可检测底物。在一个实施方式中,用于识别染色(a)的第二底物的沉积的结合剂以及用于识别染色(b)的靶标的结合剂可以用不同酶标记,例如具有 HRP 的结合剂(a)以及具有 AP 的结合剂(b),反之亦然。

[0315] 在一个实施方式中,可以使用 W02009036760、W02010094283 或 W02010094284 中描述的方法来产生染色(在后文件中公开的染色过程的所有实施方式并入本文以供参考)。

[0316] 在上述文件中描述的方法和本发明方法使用针对靶标部位的可检测底物的 HRP 介导(或另一氧化还原酶介导的)的沉积。结合剂和酶底物两者均与上述用于使单个靶标部位可视化为明显的点的相似或相同。然而,这些方法提供与常规 HRP-DAB 免疫染色的均一染色形式相似的染色形式,但是不与本文所述的点染色相似。通过在沉积介质中进行第二酶底物(即,报道物)的沉积来保证染色形式的差异,该沉积介质对于染色(a)和染色(b)具有不同的组成并使用识别样品中靶标单元的结合剂的量并使用酶活性来标记靶标部位,其中染色(b)中的酶活性高于染色(a)中的酶活性。

[0317] 具体而言,组织样品中靶标部位的可视化在一个实施方式中包括

[0318] a) 将包括靶标的单独单元的群体的样品与一种或多种结合剂孵育,其中

[0319] (1) 至少一种结合剂包括具有氧化还原酶活性的酶;

[0320] (2) 至少一种结合剂能够与靶标的单独单个单元直接结合,并且与靶标的单独单个单元的部分子群形成一个或多个离散的单个靶标部位,其中各个单个离散靶标部位包括所述部分子群的一个单独单个单元与一种或多种结合剂的复合物,至少一种结合剂包括酶;

[0321] c) 将(a)的样品孵育在水溶液(A)中,其中水溶液(A)包括

[0322] 多于 2mM 的量的过氧化物,优选约 5mM 或更多于 5mM;

[0323] 与(a)的离散单个靶标部位相关的酶的第一底物,以及

[0324] 所述酶的第二底物，

[0325] 其中，所述第一底物是水溶性富电子有机化合物，其

[0326] (3) 能够在与酶反应时生成自由基；并且

[0327] (4) 能够在所述酶和过氧化物的存在下使所述第二底物分子交联，从而产生所述第二底物的水不溶性聚合产物，

[0328] 且其中所述第二底物是结合物分子，包括至少两个能够用作为所述酶底物的化合物以及可检测标记物，其中可检测标记物选自荧光的、发光的、放射的或发色的物质以及特异结合对的成员，

[0329] 从而在(a)的离散单个靶标部位处形成第二底物的离散沉积，并使(a)的所述单个靶标部位可视化光学上可观察为均匀染色的均一染色形式。

[0330] 在一个优选实施方式中，单独靶标单元的部分子群是在染色(a)中未可视化的剩余单独靶标单元。在一个实施方式中，部分子群可以是样品中所有靶标单元的约5~10%，或更多，例如约10~20%或更多，约15~30%或更多，约25~35%或更多，等等。

[0331] 结合剂在孵育介质中的量可以根据本领域指南进行调整(上述)。

[0332] 为生成本发明第二底物的在光学上呈现为均一染色形式(可观察为均匀染色)而非直径大于0.4微米的染色明显点的沉积，沉积介质(即，水溶液A)应该含有一定量的过氧化物以及与所述靶标部位相关的酶的第一底物。

[0333] 过氧化物可以选自有机过氧化物，例如叔丁基过氧化物、二叔丁基过氧化物、过乙酸，或者其可以是过氧化氢的加合物，例如过氧化氢尿素加合物。在一些实施方式中，过氧化氢(H_2O_2)是优选的过氧化物。在不同的实施方式中， H_2O_2 在介质中的量可以在1.5mM至150mM的范围内变化，例如约6mM至约100mM，约5mM至约50mM，约10mM至约15mM等。

[0334] 在一个优选实施方式中， H_2O_2 在沉积介质中的量多于5mM，例如，5.1mM至65mM，例如5.2mM至55mM，例如5.3mM至45mM，例如5.4mM至35mM，例如5.5mM至25mM，例如5.6mM至15mM。

[0335] 第一底物，例如DAB，在沉积介质中的量可以根据 H_2O_2 在介质中的量而变化。在一些实施方式中，DAB可以以少于1mM的量存在，例如0.25mM至0.85mM，条件是 H_2O_2 在该沉积介质中的量高于5.5mM，例如5.6mM至56mM。在其它实施方式中，DAB可以以多于1.5mM的量存在于沉积介质中，例如1.5mM至6mM，其中 H_2O_2 的量为1.5mM至159mM。

[0336] 优选地，DAB在沉积介质中的量高于1.5mM，例如1.5mM至6mM。DAB的该量对报道物分子在包括浓度范围为1.5mM至159mM的 H_2O_2 的沉积介质中提供非常特异且大量的沉积。3mM至6mM的DAB量提供非常特异且大量的报道物分子的沉积，其例如在免疫组化检测中保证报道物沉积的最终染色的清脆度(crispness)和强度。1.5mM至3mM的DAB量提供稍模糊但仍很强的信号(与3mM至6mM的DAB量相比)，其可以在一些实施方式中有利地用于检测低量靶标。在使用沉积的报道物来加强靶标部位的饱和度的实施方式中，可以延长样品在沉积介质中的孵育持续时间，例如，与在高量DAB情况下的1分钟孵育相比，延长到3~5分钟。然而，如所述，靶标最终染色的清脆度会显著降低。

[0337] 另一个合适的第一底物(例如 α -氰基-4-羟基肉桂酸)在沉积介质中的量可以在3mM至10mM的范围内变化，例如约4mM、约5mM、约6mM等，且 H_2O_2 的量可以在1.5mM至6mM的范围内，例如约2mM至约4mM，例如约3mM。在这种条件下的染色是清脆且强烈的(反映出

报道物的精确且有效的沉积)。

[0338] 在一个实施方式中,用于步骤(a)和步骤(b)中使靶标部位可视化的可检测酶底物是不同的发色物质。采用酶(例如 HRP 或 AP)的许多不同发色底物来进行 IHC 染色,且其可适用于执行本发明方法步骤(a)和(b)的 IHC 染色。示例性的物质在实施例中描述。其它合适的物质在 WO2011047680、WO2009036760、WO2010094283、WO2010094284 或 PCT/DK2011/000131 中描述(这些实施方式并入本文以供参考)。

[0339] 4. 使用组织学染色进行染色

[0340] 在使用第一 IHC 染色(染色 a)或第二 IHC 染色(染色 b)进行染色之前或之后,可以用组织学染色对样品进行染色。

[0341] 术语“组织学染色”通常是指,能够使组织样品中显微结构可视化或区分地识别的染色。该术语是组织学和组织病理学领域的基本常识的一部分,且本领域技术人员熟悉该术语及其含义。适用于本发明目的的组织学染色的一些实例在 Michael H. Ross, Wojciech Pawlina, (2006). Histology: A Text and Atlas. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins, or in Education Guide: Special stains and H&E, 2nd edition, Kumar GL and Kleman GA eds, Dako, 2010 中描述。

[0342] 在一个实施方式中,组织学染色是苏木精染色。在另一实施方式中,组织学染色是组合的染色,例如苏木精和伊红(H&E)染色。苏木精或 H&E 染色方案可以是本领域常规使用的任何方案(参见,例如 <http://www.protocol-online.org/prot/Histology/Staining/>; 或 <http://protocolsonline.com/histology/haematoxylin-eosin-he-staining/>)。

[0343] 在一个实施方式中,步骤(c)的组织学染色可以是特殊的染色。对显示组织样品形态的特殊染色的选择取决于评估的组织样品。本领域技术人员能够容易地遵循本领域指导选择合适的染色和染色方案(例如, Education Guide: Special stains and H&E, 2nd edition, Kumar GL and Kleman GA eds, Dako, 2010)。

[0344] 5. 额外步骤

[0345] 本发明的方法可以包括一个或多个额外步骤,例如在步骤(a)、(b)和(c)染色之间的洗涤步骤,使用封片介质进行封片来结束染色等。

[0346] 在一个实施方式中,可以对根据步骤(a)和(c)染色以及任选地根据步骤(b)染色的组织样品进行进一步处理,分析样品含量,例如可以确定一个或多个染色靶标的表达水平、一个或多个染色靶标的区域分布、或一个或多个靶标的总量等。还可以评估样品中靶标的相对表达,其中可以相对于另一个靶标来评估靶标表达,例如相对于持家蛋白,相对于样品面积,相对于样品体积,相对于样品中存在的另一对象,例如细胞结构等。

[0347] 例如根据 PCT/DK2011/000131 (其中描述的方法引入本文以供参考)或 PCT/US2011/6242 (其中描述的方法引入本文以供参考)中描述的方法,或者根据本领域中开发的开发用于对组织样品中光学可检测靶标进行定量的任何其它方法,可以手动或自动完成靶标的定量。

[0348] 本发明方法的实施方式

[0349] 以下是根据本发明的可视化过程的非限制性实施方式。在上文中通篇讨论的所有术语和实施方式适用于任何以下描述的实施方式。

[0350] 1. 一种靶标的可视化

[0351] 在一个实施方式中,本发明涉及对组织样品中靶标进行可视化的方法(I),以任意顺序包括:

[0352] a) 使用第一染色对样品进行染色,

[0353] b) 使用第二染色对样品进行染色,

[0354] c) 使用第三染色对样品进行染色,

[0355] 其中

[0356] (i) 经由可检测酶底物在样品的包括靶标的部位处的酶介导沉积而产生第一染色和第二染色;

[0357] (ii) 第一染色使靶标单元的第一分子群可视化,且第二染色使靶标单元的第二分子群可视化;

[0358] (iii) 第一染色和第二染色通过其染色形式可光学区分,其中第一染色的染色形式的特征是其由明显的点构成;

[0359] 并且

[0360] (iv) 第三染色是使组织样品的形态学特征可视化的组织学染色。

[0361] 在方法(I)的一个优选实施方式中,染色(b)是提供均匀颜色的均一染色形式的常规 IHC 染色。

[0362] 在方法(I)的一个实施方式中,步骤 b 的常规染色可以在步骤 a 的点染色之前,且与步骤(a)中第一分子群的靶标单元以及步骤(b)中第二分子群的靶标单元相关的酶活性可以是不同的酶活性(例如,步骤(a)的 HRP 和步骤(b)的 AP)。可视化过程可以如下进行(方法(I)A):

[0363] i) 使用 HRP 活性对靶标部位的小子群进行标记;

[0364] ii) 使用 AP 活性对剩余(或大子群)的靶标部位进行标记;

[0365] iii) 在部位(ii)处沉积 AP 底物并从而使所述部位可视化;

[0366] iv) 在部位(i)处沉积 HRP 底物并从而使所述部位可视化。

[0367] 在另一个实施方式中,常规染色(步骤 b)可以在点染色(步骤 a)之前,且与靶标部位(a)以及靶标部位(b)相关的酶活性可以相同,即为氧化还原酶活性,例如 HRP。靶标可视化可以如下进行(方法(I)B):

[0368] i) 使用 HRP 活性对靶标的第一子群进行标记;

[0369] ii) 沉积第一 HRP 底物并使靶标单元的第一子群可视化为均一的染色形式;

[0370] iii) 使用 HRP 活性对靶标的第二子群进行标记;

[0371] iv) 沉积第二 HRP 底物,并使靶标单元的第二子群可视化为明显的点。

[0372] 在另一个实施方式中,常规染色(步骤 b)可以在点染色(步骤 a)之前,与步骤(a)中靶标单元以及步骤(b)中靶标单元相关的酶活性可以是不同的酶活性(例如,步骤(a)的 HRP 和步骤(b)的 AP)或相同的酶活性,即氧化还原酶活性,例如 HRP 活性。靶标可视化如下进行(方法(I)C):

[0373] i) 使用包括一种靶标特异结合剂的不同分子的混合物来使样品中的靶标部位饱和,其中结合剂分子的第一部分包括 HRP 或 AP,且结合剂分子的第二部分包括不是 HRP 的可检测标记物(例如,半抗原);

[0374] ii) 通过在所述靶标部位处沉积第一染料,使使用结合剂分子的第一部分饱和的

靶标部位可视化均一染色形式；

[0375] iii) 检测样品中使用靶标分子的第二部分饱和的靶标部位并用 HRP 活性标记所述靶标部位；

[0376] iv) 通过在所述靶标部位处沉积 HRP 底物，来使靶标部位(iii) 可视化明显的点。

[0377] 在一个实施方式中，常规染色(步骤(b))可以在点染色(步骤(a))之后(方法(I)D)。在这个实施方式中，可视化过程可以如下进行：

[0378] i) 使用 HRP 活性标记靶标部位的第一分子群；

[0379] ii) 通过在所述部位处沉积第一染料，来使靶标部位的第一分子群可视化明显的点，其中该染料是 HRP 的底物；

[0380] iii) 使用 HRP 或 AP 活性标记靶标部位的第二分子群；

[0381] iv) 通过在所述部位处沉积第二染料，来使靶标部位的第二分子群可视化均一染色形式，其中该染料是 HRP 或 AP 的底物。

[0382] 可以优选方法(I)的任何上述实施方式。在一个优选实施方式中，本发明涉及根据方法(I)D的靶标的可视化。

[0383] 在另一个实施方式中，本发明涉及对组织样品中靶标进行可视化的方法(II)，以任意顺序包括：

[0384] a) 使用第一染色对样品进行染色，

[0385] b) 使用第二染色对样品进行染色，

[0386] c) 使用第三染色对样品进行染色，

[0387] 其中

[0388] (i) 经由可检测酶底物在样品的包括靶标的部位处的酶介导沉积，产生第一染色和第二染色；

[0389] (ii) 第一染色使靶标单元的第一分子群可视化，且第二染色使靶标单元的第二分子群可视化；

[0390] (iii) 第一染色和第二染色具有相同的染色形式，其中染色形式的特征是由明显的点构成；

[0391] (iv) 第一染色和第二染色通过它们的光学特征优选通过颜色可相互区分，并且

[0392] (v) 第三染色是使组织样品的形态学特征可视化的组织学染色。

[0393] 因此，根据本发明，可以使用提供点状形式的染色过程来使相同靶标两个或更多不同分子群可视化。为区分染色样品中靶标单元的不同分子群，生成不同颜色的不同可检测酶底物可以用于与靶标单元的不同分子群相应的靶标部位处的沉积。

[0394] 在一个实施方式中，靶标的第一分子群是样品中靶标总量的小部分，且靶标的第二分子群是样品中靶标总量的大部分。在一个实施方式中，第一和第二分子群可以特别具有相同尺寸，即包括基本上相同数量的靶标单元(“基本上”是指约 25% 左右)。

[0395] 在一个实施方式中，第一染色的光学特征例如颜色不同于第二染色，例如第一染色可以是红色，而第二染色可以是棕色，等。

[0396] 优选实施方式中的染色(a)和(b)采用靶标特异结合剂来将靶标与酶活性相关联。在优选实施方式中，染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特

异结合剂是与靶标的特异结合对的成员。

[0397] 在一个实施方式中,染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂可以是相同的结合分子。在另一个实施方式中,染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂是不同的结合分子。

[0398] 在一个优选实施方式中,染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂是抗体、核酸或核酸类似物,或者包括抗体、核酸或核酸类似物。

[0399] 在一个实施方式中,通过由相同酶介导的可检测酶底物的沉积而产生第一和第二染色。在一个优选实施方式中,酶是辣根过氧化物酶(HRP)。

[0400] 在另一个实施方式中,通过由不同酶介导的可检测酶底物的沉积产生第一和第二染色。在一个优选实施方式中,产生第一染色的酶是辣根过氧化物酶(HRP),且产生第二染色的酶是碱性磷酸酶(AP)。

[0401] 在一个实施方式中,第一染色的明显点具有约0.4微米至约4微米的明显视觉直径。

[0402] 在一个实施方式中,第三染色是苏木精。在另一个实施方式中,第三染色是组合的组织学染色,例如苏木精和伊红染色。在另一个实施方式中,第三染色是特殊的组织学染色,例如选自以下的染色:

- [0403] ○抗酸染色(用于分支杆菌)
- [0404] ○抗酸染色
- [0405] ○阿新蓝染色
- [0406] ○阿新蓝-PAS染色(PAB)
- [0407] ○对阿新蓝的透明质酸酶消化
- [0408] ○茜素钙染色
- [0409] ○金胺-罗丹明染色(荧光)
- [0410] ○Bielschowsky(比耳朔夫斯基)染色(用于老年斑)
- [0411] ○胆汁染色
- [0412] ○Bodian's(博迪恩)染色
- [0413] ○胶原铁染色
- [0414] ○刚果红染色
- [0415] ○铜染色
- [0416] ○Elastic van Gieson 染色
- [0417] ○Elastic-Weigert's 间苯二酚品红法
- [0418] ○修改的Elastic van Gieson 染色
- [0419] ○黑色素 Fontana-Masson 染色
- [0420] ○黑色素漂白
- [0421] ○Fraser Lendrum 染色
- [0422] ○(造血组织)Giemsa 染色(修改的 May-Gruenwald 染色)
- [0423] ○(螺杆菌)Giemsa 染色
- [0424] ○Gram(改进的 Brown-Brenn)染色
- [0425] ○阿米巴 Gridley 染色

- [0426] ○ Grimelius 嗜银染色(Pascual 法)
- [0427] ○ Grocott 乌洛托品银(GMS)染色
- [0428] ○ Holzer 神经胶质纤维染色
- [0429] ○ Hortega 松果体染色
- [0430] ○ 铁染色(Prussian 蓝)
- [0431] ○ 铁染色(Turnbull 蓝)
- [0432] ○ Jones 银染色
- [0433] ○ Luxol 固蓝(LFB)染色
- [0434] ○ 甲基绿派洛宁(MGP)染色
- [0435] ○ 粘蛋白胭脂红染色
- [0436] ○ Nissl 染色
- [0437] ○ 油红 O 染色
- [0438] ○ 苔红素染色
- [0439] ○ 过碘酸-Schiff 染色(PAS)
- [0440] ○ 过碘酸-Schiff 消化染色(PAS-D)
- [0441] ○ PTAH 染色
- [0442] ○ 网硬蛋白染色
- [0443] ○ 螺旋菌染色(Steiner&Steiner 法)
- [0444] ○ (脂色素) 苏丹黑 B 染色
- [0445] ○ (脂肪) 苏丹黑 B 染色
- [0446] ○ 三色染色-Masson 法
- [0447] ○ 三色染色-微波法
- [0448] ○ (组织中淀粉体) 硫磺素 S 染色
- [0449] ○ (老年斑) 修改的硫磺素 S 染色
- [0450] ○ (肥大细胞) 甲苯胺蓝染色
- [0451] ○ 尿酸盐结晶染色
- [0452] ○ VonKossa 钙染色
- [0453] 在一个优选实施方式中,靶标是生物标记物。在一个优选实施方式中,靶标是蛋白或核酸。
- [0454] 上述实施方式的一些非限制性工作实施例在实施例部分中描述。
- [0455] 2. 两种或更多种靶标的可视化
- [0456] 在一个实施方式中,本发明涉及使组织样品中两种或更多种靶标可视化的方法,以任意顺序包括:
- [0457] a) 使用第一染色对样品进行染色,
- [0458] b) 使用第二染色对样品进行染色,
- [0459] c) 使用第三染色对样品进行染色,
- [0460] 其中
- [0461] (i) 经由可检测酶底物在样品的包括靶标的部位处的酶介导沉积,生成第一染色和第二染色;

- [0462] (ii) 第一染色使包括第一靶标单元的靶标部位可视化；
- [0463] (iii) 第二染色使包括第二靶标单元的靶标部位可视化；
- [0464] (iv) 第一染色和第二染色通过其染色形式区分，其中第一染色的染色形式的特征是由明显的点构成，且第二染色的染色形式是均匀颜色的均一染色形式；
- [0465] 并且
- [0466] (v) 第三染色是使组织样品的形态学特征可视化而不使靶标可视化的组织学染色。
- [0467] 在一个优选实施方式中，第一染色在光学特征例如颜色方面不同于第二染色，例如第一染色可以是红色而第二染色可以是棕色，等。
- [0468] 优选实施方式中的染色(a)和(b)采用靶标特异结合剂来使靶标与酶活性相关联。在优选实施方式中，染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂是与靶标的特异结合对的成员。
- [0469] 在一个实施方式中，染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂可以是相同的结合分子。在另一个实施方式中，染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂是不同的结合分子。
- [0470] 在一个优选实施方式中，染色(a)的至少一种靶标特异结合剂和染色(b)的至少一种靶标特异结合剂是抗体、核酸或核酸类似物，或者包括抗体、核酸或核酸类似物。
- [0471] 在一个实施方式中，通过由相同酶介导的可检测酶底物的沉积，产生第一染色和第二染色。在一个优选实施方式中，酶是辣根过氧化物酶(HRP)。
- [0472] 在另一个实施方式中，通过由不同酶介导的可检测酶底物的沉积，产生第一和第二染色。在一个优选实施方式中，产生第一染色的酶是辣根过氧化物酶(HRP)，且产生第二染色的酶是碱性磷酸酶(AP)。
- [0473] 在一个实施方式中，第一染色的明显点具有约 0.4 微米至约 4 微米的明显视觉直径。
- [0474] 在一个实施方式中，第三染色是苏木精。在另一个实施方式中，第三染色是组合的组织学染色，例如苏木精和伊红染色。在另一个实施方式中，第三染色是特殊的组织学染色(合适的特殊染色的一些实例如上所述)。
- [0475] 在一个优选实施方式中，靶标是生物标记物。在一个优选实施方式中，靶标是蛋白或核酸。
- [0476] 在一个实施方式中，可以在组织样品中使多于两种不同的靶标例如三种不同的靶标可视化。为使第三靶标可视化，以上根据本发明染色的样品可以用第四染色进行染色，
- [0477] (i) 其中经由可检测酶底物在样品的包括第三靶标的部位处的 HRP 介导的沉积产生第四染色；
- [0478] (ii) 其中第四染色使第三靶标可视化为第四染色的明显点，
- [0479] (iii) 其中与第一染色的明显点相比，第四染色的明显点具有不同的光学特征。
- [0480] 第一染色的点与第四染色的点的优选不同光学特征是颜色，例如第一染色的点可以是红色，且第四染色的点可以是绿色。点也可以在尺寸或其它光学特征上不同(点的光学特征以及其操作方法的实例在 W02011047680 和 PCT/US2011/6242 中公开，并引入本文以供参考)。

[0481] 在一个实施方式中,第三靶标是不同于第一生物标记物的生物标记物。

[0482] 在一个实施方式中,第二靶标是参考标记物。在一个实施方式中,第二靶标是蛋白或核酸。

[0483] 在一个优选实施方式中,组织样品是包括细胞的样品,例如,身体组织样品或肿瘤样品。在一个优选实施方式中,样品是固体组织样品或包括样品的细胞,其中细胞固定在固体支承物上或固定于其中。

[0484] 在一个实施方式中,本发明涉及如上述任意的的方法,还包括确定样品中靶标的量。在一个实施方式中,确定第一靶标的量。在另一个实施方式中,确定第三靶标的量。在一个实施方式中,量是样品中相应靶标的总量。在另一个实施方式中,量是靶标的相对量,例如第一靶标相对于第二靶标和/或第三靶标的相对量。本发明方法允许使多种靶标(两种或更多种)可视化并对其定量。

[0485] 如上所述,本发明的方法特别有利于基于在体外用不同组织学染色进行染色的组织样品的评估而进行的医学诊断,例如用于在人或动物受试者(本文中称为“受试者”或“个体”)中诊断疾病;在受试者中监测治疗处理、选择受试者的治疗处理等。因此,在一个实施方式中,本发明涉及用于医学诊断的方法,包括根据任意上述方法对得自个体(受试者)的组织样品进行处理的步骤。特别是,方法可用于疾病的诊断,其中确定疾病的一种或多种生物标记物的表达以及亚细胞分布对于正确的诊断和治疗是重要的。

[0486] 实施例

[0487] 以下是说明本发明的非限制性选择的工作实施例的描述。

[0488] 试剂

[0489] 如果没有指明,使用的试剂是从公认制造商处购得的或使用 W02011047680 或 W02010094283 中描述的过程(这些过程并入本文以供参考)或遵循本领域标准过程,例如用于固相合成、将聚合物(包括抗体)与不同标记物结合、制备抗体、抗体操作等的过程而制备的。以下描述对于两种所选化合物的示例性制备步骤。

[0490] 与结合有 HRP 的 Dex70 结合的山羊抗兔抗体(L348.111,10-11部分)

[0491] 在 40°C 下,在 316 微升的缓冲液 A(100mM NaCl、25mM NaHCO₃, pH9.5)中使 11nmol 70kDa MW 的葡聚糖与 484nmol HRP 反应 3h。之后,将 44nmol 的山羊抗兔在 196 毫升水中的溶液添加到葡聚糖-HRP 结合物中并使其在 40°C 另外反应 1h。通过添加 70 毫升 0.165M 孕尿翳(cystein)30 分钟来淬灭反应混合物,并在缓冲液 B(100mM NaCl,10mM HEPES pH7.2)中在 Sephacryl 300 (GE Medical)上纯化产物。洗脱的产物是包括山羊抗兔(GaR)和 HRP 的葡聚糖结合物。产物基于结合物大小分为 4 个部分:含有产物的前两个部分(8~9 部分)洗脱为第一个峰,推测含有一些交联的结合物,之后是较宽的肩部,其被分为 10~11 部分(均质的大结合物)和 12~21 部分(较小的可变结合物),且最后是在 22~42 部分的未结合的酶和抗体。对单独产物部分、以及含有未结合抗体和 HRP 的部分的测量,显示出 87% 的总结合物回收率。假设引入的 HRP 与葡聚糖之间直接成比例,显示出 10~11 部分相对于每一葡聚糖含有 10.9 个 HRP 和 0.96 个抗体。仅这两个部分被用于实验。

[0492] 在 W02011047680 中描述结合物分子山羊抗兔 F(ab)₁-(HRP)₁ (D20149)的制备(参见化合物 AMM279.168)。以相同的方式制备结合物 FITC 抗体-F(ab)₁-(HRP)₁ (D20154),将 AP 替换为 HRP。

[0493] D21067Sin-Lys(Sin)-Lys(Sin)-L150-Lys(Flu)

[0494] 在固相合成携有游离 N- 端氨基和游离赖氨酸侧链氨基的中间体之后,在液相中,用肉桂酸(Sin)衍生物标记结合物。使用 α -N-Boc-(ϵ -N-2-Cl-Z)-赖氨酸来引入赖氨酸残基,其在树脂开裂之后提供游离的 ϵ -N- 氨基。液相标记基本上是固相技术的延伸,利用的是,相对高分子量的中间体几乎能够与乙醚从 TFA 或 NMP 溶液中定量地沉淀出。

[0495] D210053 (Fer-Lys(Fer)-L150-Lys(Lissamin)),D20171 (Fer-Lys(Fer)-Lys(Fer)-Lys(Fer)-L150-Lys(羧基荧光素))的制备在 W02011047680 中有过描述。

[0496] 其它试剂

[0497] 孵育介质(1)

[0498] 0.1%4-氨基抗嘌呤剂、0.2% Procline、2%BSA、0.2% 酪蛋白、2%PEG、0.1%吐温 20、0.1M NaCl、10mM HEPES, pH7.2 (ABCPT- 缓冲液)。

[0499] 孵育介质(2)

[0500] 50mM 咪唑 HCl pH 7.5、0.1%Nonidet P40、0.1% 苯扎氯铵、0.005% (1.5mM)过氧化氢。

[0501] 实验

[0502] 实验 1通过在用苏木精和伊红(HE 染色)染色的组织样品中的染色(a)对一种靶标进行可视化

[0503] 使用具有福尔马林固定石蜡包埋的多种人类组织样品的切片的片子作为测试材料。

[0504] 将片子在二甲苯(2×5min)、99%乙醇(2×2min)、之后 70%乙醇 中脱蜡。将片子转移到水中 5min,之后用微波炉在靶标修复液中煮沸 10min (Dako, 低 pH, S1699)。

[0505] 在冷却后,片子转移到自动染色仪(Autostainer)中并执行以下染色方案:

[0506] - 用洗涤缓冲液(Dako S3006)预漂洗

[0507] - 过氧化物酶封闭液(Dako S2023),5min

[0508] - 洗涤(Dako S3006)

[0509] - 细胞角蛋白特异抗体(Dako M3515)与山羊抗小鼠 -Dex150-HRP (L348.121)预混合,均为 20nM,之后稀释到 20pM,5min

[0510] - 洗涤(Dako S3006)

[0511] - 孵育介质 2 中的 5 μ M D21067、0.28mM DAB,10min

[0512] - 洗涤(Dako S3006)

[0513] -FITC 抗体 -F(ab)₁-(AP)₁ (D20036),孵育介质 1 中 20nM,10min

[0514] - 洗涤(Dako S3006)

[0515] -BCIP/NBT (Dako K5098,即用),10min

[0516] - 洗涤(Dako S3006)

[0517] - 苏木精(Dako S3301)

[0518] - 去离子水洗涤

[0519] - 洗涤(Dako S3006)

[0520] - 去离子水洗涤

[0521] -99.9%乙醇,1min

- [0522] - 伊红 Y 染色 (Steosgal, American MasterTech Scientific), 1min
- [0523] - 99.9% 乙醇, 1min
- [0524] 使用永久封片介质 (Tissue-Tek, Sakura) 来进行封片。
- [0525] 结果:
- [0526] 片子显示出常规 H 和 E 染色, 以及表达细胞角蛋白的组织中的黑点。点数量与细胞角蛋白的表达水平相应。这允许常规视觉检测 H 和 E 染色形式以及点计数 (enumeration), 以评定细胞角蛋白表达水平。
- [0527] 实验 2 通过用苏木精染色的组织样品中的染色 (a) 和 (b) 对一种靶标进行可视化
- [0528] 如实验 1 对片子进行预处理, 并在自动染色仪中执行以下染色方案:
- [0529] - 用洗涤缓冲液 (Dako S3006) 预漂洗
- [0530] - 过氧化物酶封闭液 (Dako S2023), 5min
- [0531] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0532] - 抗 Her2 抗体, 克隆 Dak 3-25-11, 6nM, 20min
- [0533] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0534] - 孵育介质 1 中的山羊抗兔 - 葡聚糖 70-HRP (Lit348. 111, 10-11 部分), 不同的浓度, 12、6、3 和 1.5picoM, 20min
- [0535] - 孵育介质 2 中的 5 μ M D21067、0.28mM DAB, 10min
- [0536] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0537] - FITC 抗体 -F(ab)₁-(AP)₁ (D20036), 孵育介质 1 中 20nM, 10min
- [0538] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0539] - 液体永久红 (Dako K0640), 10min
- [0540] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0541] - 山羊抗兔 F(ab)₁-(HRP)₁ (D20149), 孵育介质 1 中 40nM, 20min
- [0542] 或
- [0543] - 山羊抗兔 F(ab)₁-(HRP)₁ (D20149), 40nM, 孵育介质 1 中与 40nM 未标记山羊抗小鼠混合, 20min
- [0544] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0545] - DAB (Dako K5007), 5min
- [0546] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0547] - 苏木精 (Dako S3301)
- [0548] - 去离子水洗涤
- [0549] - 洗涤 (Dako S3006)
- [0550] 使用 Dako Faramount (S3025) 进行封片。
- [0551] 结果:
- [0552] 在 HER2 阳性组织、扁桃体、乳腺癌和结肠中, 片子被共定位的红点和棕色 DAB 沉积双染。点的数量与山羊抗兔 - 葡聚糖 - HRP 的浓度成比例。棕色 DAB 染色的强度在单独使用山羊抗兔 F(ab)₁ 的片子中最高, 且在试剂与未标记山羊抗兔混合的片子中, 低 0.5 ~ 1 个等级。这表明常规 IHC (棕色)、苏木精 (蓝色) 和红点的三色组合。即, 病理学家可以检测常规棕色 / 蓝色染色形式, 并使用点来定量 HER2 表达水平。二抗的浓度和 / 或与未标记抗

体混合,可以用于调节 DAB 的染色强度和点的数量。

[0553] 实验 3:对染色(a)使用不同色原

[0554] 使用具有福尔马林固定石蜡包埋的 HercepTest 对照细胞系切片的片子作为测试材料。

[0555] 在二甲苯(2×5min)、99%乙醇(2×2min)、之后 70%乙醇中使片子脱蜡。片子转移到水中 5min,之后用微波炉在靶标修复液中煮沸 10min (Dako, pH9, S2367)。

[0556] 在冷却后,片子转移到自动染色仪并执行以下染色方案:

[0557] - 用洗涤缓冲液(Dako S3006)预漂洗

[0558] - 过氧化物酶封闭液(Dako S2023),5min

[0559] - 洗涤(Dako S3006)

[0560] -Her2 抗体,克隆 Dak3-25-11,3nM,10min

[0561] - 洗涤(Dako S3006)

[0562] - 孵育介质 1 中山羊抗兔 - 葡聚糖 70-HRP (Lit348.111,10-11 部分)

[0563] - 沉积介质 2 中 10 μ M D21067、1.5mM 过氧化氢、0.14mM DAB,10min

[0564] - 洗涤(Dako S3006)

[0565] -FITC 抗体 -F(ab)₁-(AP)₁ (D20036),孵育介质 1 中 20nM,10min (片子 1 ~ 4)

[0566] 或

[0567] -FITC 抗体 -F(ab)₁-(HRP)₁ (D20154),孵育介质 1 中 20nM,10min (片子 5 ~ 10)

[0568] - 洗涤(Dako S3006)

[0569] 然后以下列方式对各个片子进行手动染色:

[0570] 片子 1 :液体永久红(Dako K0640),10min

[0571] 片子 2 :品红 + (Dako K0625),10min

[0572] 片子 3 :BCIP/NBT (Dako K0598),10min

[0573] 片子 4 :BCIP/NBT (Dako K0598),2×10min

[0574] 片子 5 :DAB (Dako K5007),10min

[0575] 片子 6 :D21053 (Fer-Lys(Fer)-L150-Lys (Lissamin)), DAB 底物缓冲液 (Dako5007) 中 400 微克 /mL,10min

[0576] 片子 7 :D20171 (Fer-Lys(Fer)-Lys(Fer)-Lys(Fer)-L150-Lys (羧基荧光素)), DAB 底物缓冲液 (Dako5007) 中 1mg/mL,10min

[0577] 片子 8 :蓝色色原, DAB 底物缓冲液 (Dako5007) 中 1mg/mL,10min

[0578] 片子 9 :AEC+ (Dako K3461),10min

[0579] 片子 10 :NovaRed (SK-4800, Vector Laboratories),10min

[0580] 之后使用洗涤缓冲液(Dako S3006)然后使用去离子水洗涤片子,并且用 Dako Faramount (S3025)封片。

[0581] 结果:

[0582] 所有十种色原产生可见点。在 1+ 细胞系中,在片子 1、2、3、4、5、7、8 和 10 中产生约 2 ~ 3 个点。在片子 7 和 9 中,看到更少和更小的点,表明点在可见检测限之下。以下对点和各个色原做出评论。

[0583] 片子 1 :亮红点,直径高达 4 微米。几乎没有背景。即使在 10× 物镜下也很易看

到。

[0584] 片子 2 :亮橘红点,直径高达 4 微米。几乎没有背景。即使在 10× 物镜下也很易看到。进一步的实验显示出与蓝色苏木精的很好对比。

[0585] 片子 3 :黑紫色到黑色点,直径高达 4 微米。很少背景。即使在 10× 物镜下也很易看到。

[0586] 片子 4 :黑点,直径高达 5 微米。一些浅灰的背景。即使在 10× 物镜下也很易看到。

[0587] 片子 5 :棕色点,高达 3 微米的直径。几乎没有背景。即使在 10× 物镜下也很易看到。

[0588] 片子 6 :非常弱的黄色点,直径为 1 微米之下。需要 20 或 40× 物镜才能观察。进一步的对照实验显示,向贴片介质中添加 2% 哌啶将可视点的尺寸增加到 1 ~ 2 微米,并使点更加黄棕色。即使没有哌啶,点在荧光显微镜下观察也是极强的绿色。

[0589] 片子 7 :紫色点,直径高达 1 微米。在荧光显微镜下观察为极强的红色。

[0590] 片子 8 :深蓝色点,直径高达 4 微米。浅蓝色背景。即使在 10× 物镜下也很易看到。

[0591] 片子 9 :棕色点,直径在 1 微米之下。

[0592] 片子 10 :红棕色点,直径高达 2 微米。

[0593] 实验 4. 用苏木精染色的组织样品中两种靶标的可视化(生物标记物蛋白和参考蛋白)

[0594] 如实验 1 预处理具有 HER2 对照细胞系的片子,并在自动染色仪中执行以下染色方案:

[0595] - 用洗涤缓冲液(Dako S3006)预漂洗

[0596] - 过氧化物酶封闭液(Dako S2023),5min

[0597] - 洗涤(Dako S3006)

[0598] -Her2 抗体,克隆 Dak3-25-11,6nM,以及细胞角蛋白抗体 Dako M3515,6nM,10min

[0599] - 洗涤(Dako S3006)

[0600] - 山羊抗兔 - 葡聚糖 70-HRP (Lit348. 111, 10-11 部分),孵育介质 1 中 4pM,10min

[0601] -5 μ M 的 Fer-(Lys(Fer))3-L150-Lys(Flu) (Lit370. 073/D20171),孵育介质 2 中 5mM α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸以及 0.6mM 过氧化氢,10min

[0602] - 洗涤(Dako S3006)

[0603] -FITC 抗体 -F(ab)₁-(AP)₁,20nM,以及山羊抗小鼠 - 葡聚糖 70-HRP,孵育介质 1 中 25nM,10min

[0604] - 洗涤(Dako S3006)

[0605] - 液体永久红(Dako K0640),10min

[0606] - 洗涤(Dako S3006)

[0607] -DAB (Dako K5007),不同时间,10、8、5、3、2、1min

[0608] - 洗涤(Dako S3006)

[0609] - 苏木精(Dako S3301)

[0610] - 去离子水洗

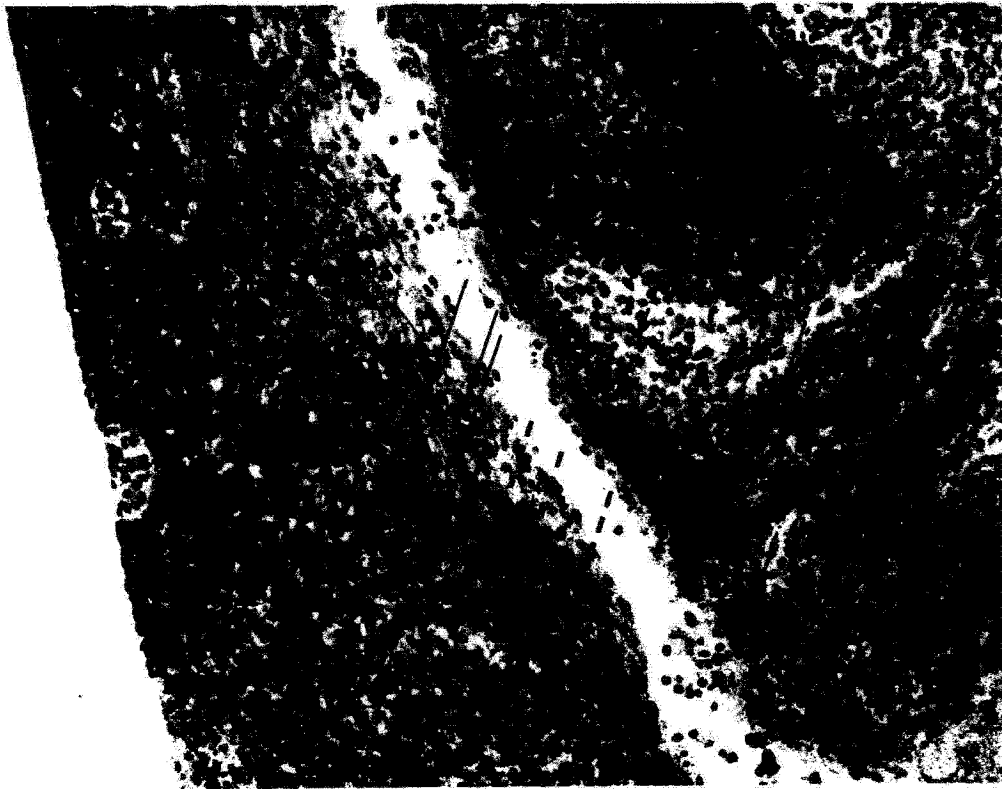
[0611] - 洗涤 (Dako S3006)

[0612] 使用 Dako Faramount (S3025) 进行封片。

[0613] 结果：

[0614] 片子被 Her2 (步骤(a) - 红点) 和细胞角蛋白(步骤(b) - 均一 棕色 DAB 染色) 双染。对点计数, 并对 1+ 和 0+ 细胞系中 Her2 的表达水平进行评估(在 3+ 细胞系中, 染色产生很多待被计数的点, 从而 Her2 的表达水平在该情况下没有被评估)。与 0+ 相比, 在 1+ 细胞系中观察到约 3 倍多的点, 与之前在这些细胞中 Her2 表达水平的观测相符。5 分钟的 DAB 染色沉积(步骤 b) 在所有三个细胞系的细胞质中引起细胞角蛋白的中等均匀棕色 DAB 染色。

[0615] 该实验证实常规 IHC (棕色)、非常规点状 IHC 染色(红点) 和组织学染色(苏木精 - 蓝色) 的三种颜色组合, 以及使用两种不同的 IHC 染色对两种不同靶标进行染色。



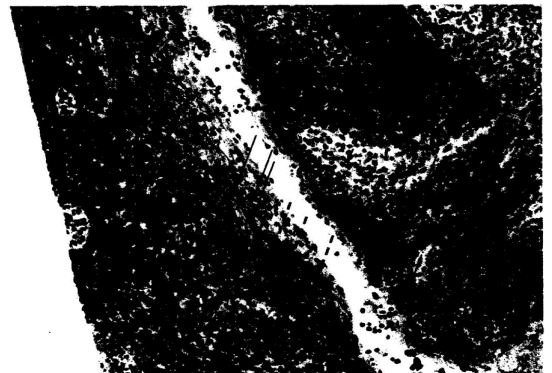
- ↓ 步骤 (a) 的Her2染色的点状形式
- ▶ 步骤 (b) 的Her2染色的常规形式
- ▶ 步骤 (c) 的苏木精核染色

图 1

专利名称(译)	组合的组织学染色		
公开(公告)号	CN103328979B	公开(公告)日	2015-10-07
申请号	CN201180058767.4	申请日	2011-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
[标]发明人	J 洛泽		
发明人	J.洛泽		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/53 G01N33/86		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/86		
优先权	61/419949 2010-12-06 US		
其他公开文献	CN103328979A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使组织样品例如活检样品中的靶标可视化的方法，其中该方法包括用 (i) 一种或多种靶标特异免疫化学染色以及 (ii) 用于特定组织组分 (例如，铁、粘蛋白、糖原、淀粉体、核酸等) 的组织学染色 (例如，苏木精和/或伊红染色等) 对样品进行染色，其中组织学染色用于加强组织样品的显微图像中的对比度、突出样品中的形态学结构以便观测、限定并检查组织、细胞群体或单独细胞内的细胞器。方法还可包括评估样品中一种或多种靶标的表达。所公开的方法可用于医学诊断。



- ↓ 步骤 (a) 的Her2染色的点状形式
- ↓ 步骤 (b) 的Her2染色的常规形式
- ↓ 步骤 (c) 的苏木精核染色