



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110741302 A

(43)申请公布日 2020.01.31

(21)申请号 201880039196.1

(22)申请日 2018.06.15

(30)优先权数据

62/520,169 2017.06.15 US

62/520,178 2017.06.15 US

62/520,187 2017.06.15 US

62/520,319 2017.06.15 US

62/539,281 2017.07.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2018/091686 2018.06.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/228575 EN 2018.12.20

(71)申请人 日光石科技有限公司

地址 中国香港九龙土瓜湾木厂街3号飞达
工商业中心3楼D单元

(72)发明人 弗雷德里克·克努特·哈舍
岑子祥

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限
公司 44202

代理人 熊永强

(51)Int.Cl.

G02B 21/34(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

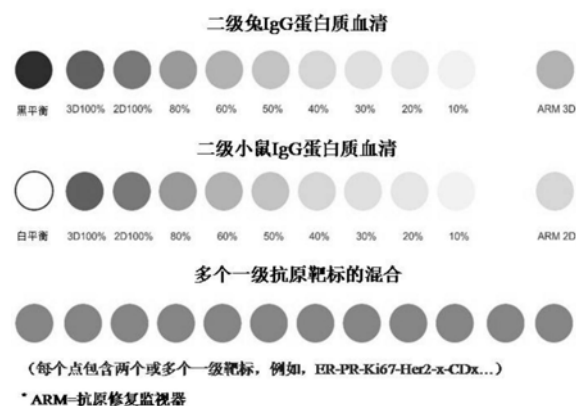
权利要求书4页 说明书22页 附图3页

(54)发明名称

用于免疫组化染色的过程记录玻片

(57)摘要

一种用于确定在试验过程中,特别是多步免疫组化(IHC)试验中石蜡去除、抗原修复以及使用的一级和二级染色试剂的效果的装置和方法。所述装置包括粘合剂涂覆的显微镜玻片,所述显微镜玻片包含以2D或3D结构作点涂并密封在石蜡涂层下的多种化合物。随后,将组织切片或疏松细胞加到同一玻片上,并且全部经历从组织捕获到盖玻片施加的IHC处理步骤。所述化合物与一级或二级IHC染色试剂反应,以记录共存组织切片或疏松细胞的处理经历。



1. 一种玻片,包括检测区和对照区,其中

所述检测区用于通过免疫组化(IHC)或免疫化学(ICC)检测和/或后续检查,而对组织切片或疏松细胞进行处理的空间;以及

所述对照区具有对照靶标,所述对照靶标反映在所述免疫组化或免疫化学检测过程的一种或多种(例如,2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种)中间步骤中存在的可能错误(如有),和/或为定性或定量地确定染色组织或细胞的颜色密度提供参考;

优选地,所述中间步骤是选自由石蜡去除、抗原修复、一级染色和二级染色组成的组的一种或多种步骤。

2. 如权利要求1所述的玻片,所述玻片具有粘合剂涂层,以使所述玻片能够连接分子,诸如肽、蛋白质、糖、脂类、无机小分子;更优选地,所述粘合剂涂层共价结合至玻璃并存在一种或多种端基,所述端基选自由 $-ROH$ 、 $-R(C=O)OH$ 、 $-RNH_3$ 、 $-R(C=O)NH_2$ 和 $-RNH_2$ 组成的组;仍更优选地,所述粘合剂涂层具有轻微亲水性。

3. 如权利要求1或2所述的玻片,其中所述对照区包含一组或多组(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10组)一级靶标阵列,所述一级靶标阵列包括一种或多种(例如,1-50种、5-45种、10-40种、15-35种或20-30种,具体地,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或10种)一级靶标加载点(所述点可以为任意规则或不规则形状,诸如圆形、椭圆形、正方形、菱形等),每个点包含一种或多种(例如,1-50种、5-45种、10-40种、15-35种或20-30种,具体地,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或10种)一级靶标,所述一级靶标为固定在所述玻片上的抗原肽片段并与抗原蛋白或不改变其抗原特异性的所述抗原蛋白的变体的至少一种(例如,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或10种)的全长或部分相一致;

优选地,通过用于所述免疫组化或免疫化学检测的一级抗体,可以识别一种所述一级靶标加载点中的至少一种所述一级靶标(或抗原肽片段)。

4. 如权利要求1-3任一项所述的玻片,其中所述一级靶标的肽链与载体蛋白通过半胱氨酸残基偶联,优选地通过磺基-SMCC交联的方式,结合的所述载体蛋白可选地与假蛋白混合以调节浓度;

优选地,所述载体蛋白选自钥孔血蓝蛋白(KLH)和与二级染色试剂无反应的其他蛋白,例如卵清蛋白(OVA),所述卵清蛋白来自鸡蛋白或任意马属科,诸如马、驴或斑马;

仍优选地,所述一级靶标用固定剂固定,诸如多聚甲醛或福尔马林。

5. 如权利要求4所述的玻片,其中所述一级靶标加载点形成梯度靶标密度对,每种靶标对结合单一反应性抗原;优选地,结合肽与中性KLH蛋白和4%福尔马林混合,以制备二至十倍(优选地,2、3、4、5、6、7、8、9或10倍)稀释的梯度密度系列;或

每个靶标点由二至十种不同抗原肽片段组成,例如,全部以最大密度。

6. 如权利要求1-5任一项所述的玻片,其中所述对照区还包括一组或多组(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10组)二级靶标阵列,二级靶标阵列包括一种或多种(例如,1-50种、5-45种、10-40种、15-35种或20-30种,具体地,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或10种)二级靶标加载点(所述点可以为任意规则或不规则形状,诸如圆形、椭圆形、正方形、菱形等),每种所述二级靶标加载点为宿主蛋白(例如IgG)和假蛋白(例如IgG)按一定比例固定在所述玻片上的混合物;其中

对于相同的不同二级靶标阵列中的不同点,所述宿主蛋白相同,所述假蛋白可以相同

或不同,优选为相同;以及

对于不同阵列组,所述宿主蛋白不同,所述假蛋白可以相同或不同;

优选地,所述二级靶标点阵列形成梯度稀释系列,优选地,梯度密度包含1至1000:1的逐步稀释增量;更优选地,所述梯度密度遵循-dBd曲线;例如,从0至-80dBd(100%至0.01%)所述宿主蛋白浓度,或0至-100dBd内包含一种或多种相同dBd增量稀释的任意系列;

仍优选地,所述二级靶标用固定剂固定,诸如多聚甲醛或福尔马林。

7.如权利要求6所述的玻片,其中所述宿主蛋白为动物蛋白,所述动物蛋白产生用于免疫组化或免疫化学检测的一级抗体;优选地,宿主选自小鼠、大鼠、兔和山羊组成的组。

8.如权利要求6或7所述的玻片,其中所述假蛋白为有时出现在二级染色试剂盒中,不支持非特异性染色的蛋白;优选地,所述假蛋白为驴或马蛋白。

9.如权利要求1-8任一项所述的玻片,其中所述对照区还包括一种或多种(例如,1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或10种)3D二级阵列靶标加载点,每种所述3D二级阵列靶标加载点由作为骨架的多糖和一定浓度的宿主蛋白(诸如100%、100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或中间的任意值)的混合物形成,并加载至所述玻片。

10.如权利要求1-9任一项所述的玻片,其中所述对照区还包括一种或多种(例如,1种、2种、3种、4种或5种)成像参考加载点,优选地,所述成像参考加载点至少包括黑色靶标或白色靶标,更优选地,包括黑色靶标和白色靶标,例如,位于二级靶标的两侧。

11.如权利要求10所述的玻片,其中,黑色参考靶标选自碳尘;优选地,碳化合物的尺寸范围为0.1-2微米;和/或

白色参考靶标选自在元素周期表中的“贫金属”的氧化物或硫酸盐状态,诸如氧化钛、氧化铝、硫酸铝或硫酸钡。

12.如权利要求10或11所述的玻片,其中所述黑色靶标和所述白色靶标均基于酸酐基环氧漆基,通过在指定365nm紫外线下,直接曝光来催化所述酸酐基环氧漆基,优选地,但不限于紫外线引发酸酐催化剂,所述酸酐催化剂由甲基四氢苯酐和二苯基碘鎓六氟砷酸盐组成。

13.如权利要求1-12任一项所述的玻片,其中所述对照区还包括一种或多种抗原修复监视器加载点,用于抗原修复过程的恢复条件下的检测,每种所述抗原修复监视器加载点为一种或多种宿主蛋白的混合物,优选地为小鼠和兔蛋白按一定比例的混合物,诸如(0-100):(100:0),例如约10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20或90:10,用最少固定剂(例如甲醛或福尔马林)固定处理;更优选地,所述点是小鼠和兔蛋白的50:50混合物。

14.如权利要求1-13任一项所述的玻片,其中所述对照区还包括另外一种或多种(例如,1种、2种、3种、4种或5种)抗原修复监视器加载点,用于抗原修复过程的过度恢复条件的检测,每种所述抗原修复监视器加载点为一种或多种宿主蛋白的混合物,优选地为小鼠和兔蛋白按一定比例的混合物,诸如(0-100):(100:0),例如约10:90、20:80、30:70、40:60、50:50、60:40、70:30、80:20或90:10,存放在用固定剂(例如甲醛或福尔马林)已经固定的3D支架(诸如多糖骨架)中;更优选地,所述点是小鼠和兔蛋白的50:50混合物。

15. 如权利要求1-14任一项所述的玻片,其中将石蜡涂层施加至一种或多种生物材料,所述生物材料选自自由所述玻片上的一级靶标、二级靶标、成像参考、和抗原修复监视器加载点组成的组;或将所述石蜡涂层施加至无机沉积物(例如染色剂),优选地,施加的涂层厚度为1-5微米(例如2-3),但不应厚于5微米。

16. 如权利要求15所述的玻片,所述石蜡涂层的施加包括如下步骤:

(a) 在60°C-70°C的温度范围下,熔化固体石蜡直至所述固体石蜡为液态,其中熔化温度不应超过75°C;

(b) 向步骤(a)得到的产物石蜡中加入脂肪族溶剂,直至获得饱和混合物;

(c) 使步骤(b)获得的混合物在30-33°C温度范围内冷却,然后通过缓慢加入有机溶剂直至获得基本澄清的液体;

(d) 步骤(c)得到的澄清液体的薄膜施加至所述玻片上的所述生物材料或所述无机沉淀物上,以在所述玻片上形成屏蔽涂层来用于屏蔽涂层;

(e) 将沉积的石蜡混合物暴露于红外线加热,以熔化和蒸发释放的溶剂,从而使所述石蜡恢复到其原始固体状态;

优选地,所述石蜡选自具有56°C的熔融温度的赛默飞世尔制TissuePrep和TissuePrep2、具有56°C的熔融温度的徠卡制Paraplast和Paraplast plus以及具有50-54°C的熔融温度的徠卡制Paraplast X-tra;和/或

所述有机溶剂选自二甲苯、脂肪族二甲苯替代物(诸如混合二甲苯)、甲苯、涂料稀释剂、松节油,或丙酮和煤油的50:50混合物。

17. 如权利要求15或16所述的玻片,通过喷涂法、喷墨沉积法、转移印刷法、丝网印刷法或气相沉积法施加步骤(c)中获得的石蜡澄清液体。

18. 如权利要求1-17任一项所述的玻片,还包括标识所述玻片类型的标记(优选地在玻片标签区域的顶部)和标识所述一级靶标支持的抗原的代码;和/或

批次号(优选地就在所述标签的下方)。

19. 如权利要求1-18中任一项所述玻片的免疫组化染色方法,包括如下步骤:

b. 去除固定剂(例如甲醛)固定,以暴露所述组织切片的抗原位点;

c1. 施加一种或多种(诸如1种、2种、3种、4种、5种)一级抗体以结合至在所述组织切片/疏松细胞或一级抗体靶标中发现的任意匹配抗原位点;施加一种或多种(诸如1种、2种、3种、4种、5种)与在染色试剂存在时能够产生颜色的部分而结合的二级抗体,以结合步骤c中组织切片/疏松细胞、二级抗原靶标或抗原修复监视器中使用的一级抗体;或

c2. 施加一种或多种(例如1种、2种、3种、4种、5种)与在所述染色试剂存在时能够产生颜色的部分而结合的一级抗体,以结合在所述组织切片/疏松细胞或一级抗原靶标中发现的任意匹配的抗原位点;

e. 施加所述染色试剂以产生靶标抗原存在的可见颜色指示;

f. 可选地,多步扩增步骤以获得足够的染色试剂密度;

g. 基于二级抗原密度梯度,和/或如果可能,在一级抗原密度梯度帮助下,定量地确定染色的组织或细胞的颜色密度;

h. 基于一级靶标、二级靶标和所述抗原修复监视器的染色密度,对检测过程的质量进行评估;

可选地,如果将石蜡涂层选择性地施加至所述玻片上的靶标,并且所述组织切片/疏松细胞也被嵌入石蜡中,则在步骤(b)之前执行如下步骤:

a. 从石蜡包埋的所述组织切片或疏松细胞和所述靶标上覆盖的所述石蜡屏蔽涂层中去除所述石蜡。

20. 如权利要求19所述的方法,其中步骤(a)中所述去除石蜡是通过在65-75°C之间的温度范围下,加热所述石蜡3-10分钟以获得半液态,然后用有机溶剂系列液化,直到在缓冲溶液中再水化。

21. 如权利要求19或20所述的方法,其中所述有机溶剂选自脂肪族溶剂起始的一系列溶剂,诸如二甲苯或混合二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇,以及盐基缓冲溶液,每种溶液的暴露时间指定为3分钟。

22. 如权利要求19-21任一项所述的方法,其中去除甲醛固定可以通过热诱导的表位修复(HIER)过程,或通过更长的多次交换温蒸馏水抗原修复过程来进行。

23. 如权利要求19-22任一项所述的方法,其中步骤(d)中使用的二级染色试剂可以选自酶标记的二级抗体、与酶标记的二级抗体反应的酶标记的三级抗体、与二级抗体反应的APAAP免疫复合物、与生物素化的二级抗体反应的酶标记的(链霉)亲和素、与生物素标记的二级抗体反应的亲和素-/链霉亲和素-生物素-酶复合物、在一级抗体中生物素化的二级抗体上的链霉亲和素-酶复合物,以及含有二级抗体和与一级抗体结合的酶位点的聚合物。

24. 如权利要求19-23任一项所述的方法,其中使用的抗原修复缓冲液可以选自pH6-9的范围。

25. 如权利要求19-24任一项所述的方法,其中在步骤(c)中的所述一级抗体选自宿主蛋白是小鼠或兔的抗体,包括常见的实例:ER、PR、Her2、Ki67。

26. 如权利要求19-25任一项所述的方法,其中色原可以选自3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、氨基-9-乙基咔唑(AEC)、DAB+镍增强剂、固红、TMB、留黄、BCIP/NBT、BCIP/TNBT、萘酚AS-MX磷酸盐+固蓝BB、萘酚AS-MX磷酸盐+固红TR、萘酚AS-MX磷酸盐+新品红、留绿和NBT。

27. 如权利要求19-26任一项所述的方法,其中所述方法是成本有效的、可重复的、稳定,有助于识别导致错误分析的IHC处理步骤。

28. 如权利要求19-27任一项所述的方法,其中所述方法用作用于对共存的所述组织切片或疏松细胞上抗原浓度的过程对照的定量标准。

29. 如权利要求19-28任一项所述的方法,抗原修复的评估标准如下:

如果用于检测在恢复状态靶标的抗原修复监视器加载点被染色,表明AR过程失败;

如果用于检测过度恢复状态的抗原修复监视器加载点被染色,表明AR过程过度,所述玻片不应用于诊断评估;

如果二级靶标阵列的10%到不超过30%不显示可见的染色,表明发生正常恢复状态,然后通过不染色的低浓度二级靶标的量评估AR损伤的程度。

30. 一种试剂盒,包括如权利要求1-18任一项所述的玻片,或执行权利要求19-29任一项所述的方法。

用于免疫组化染色的过程记录玻片

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年6月15日提交的标题为“用于免疫组化染色的过程记录玻片”的美国临时申请号62/520,319,2017年7月31日提交的标题为“用于免疫组化染色的过程记录玻片”的美国临时申请号US62/539,281,2017年6月15日提交的标题为“用于显微镜玻片蛋白质沉积物的屏蔽涂层”的美国临时申请号62/520,169,2017年6月15日提交的标题为“免疫组化成像基线参考”的美国临时申请号62/520,178,2017年6月15日提交的标题为“免疫组化抗原成像比例外推法”的美国临时申请号US 62/520,187的优先权,其每一个公开的全部内容通过引用并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及一种新型的过程记录玻片。本发明特别涉及一种用于免疫组化的过程记录玻片和染色方法。更特别地,本发明公开了一种过程记录玻片,其为共存患者样本提供了一起经历染色过程的对照靶标。染色后,若有的话,染色对照立即显示可能的错误,即与已知靶标基线的偏差。上述过程记录玻片以具有成本效益的价格和易于接受的门槛,提供了高准确性和精度的高效质量控制。

背景技术

[0004] 所有免疫组化的方法,以及其他免疫化学的方法,都是包括一系列的试剂交换、孵育和洗涤的多步程序。这些程序大多数需要训练有素的人员,并且实验室之间的结果可能有很大差异。采用成本节约、玻片制备一致并减少程序性人为错误的自动化系统已经开发出来。

[0005] 对于自动化的和人工的方法,都有一些关键点需要考虑。必须小心以避免玻片上样本损失。在试剂应用期间彻底洗涤样本是非常必要的,特别是去除未结合的抗体,因为残留物会被扩大。过量的液体必须去除,以避免先前试剂的遗留和/或随后试剂不必要的稀释,然而决不能让样本变干。必须使用足够的抗体试剂以完全覆盖样本可能存在的玻片区域,但必须把浪费控制在最低限度。

[0006] 此外,在免疫组化方法和免疫化学方法中使用的许多试剂,诸如酶溶液和过氧化物酶显色剂,在工作温度甚至室温下具有有限的稳定性。这就需要经常制备试剂。此外,导致错误结果的非特异性抗体结合仍然是一个问题。

[0007] 改善结果并最小化试剂制备的方法和试剂将促进人工和自动化的免疫组化方法。许多改进能够容易地应用于相关的免疫化学方法,诸如酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫荧光试验和原位杂交。

[0008] 可以参考“Use of cultured cells as a control for quantitative immunocytochemical analysis of estrogen receptor in breast cancer. The Quicgel method”,其公开了组织固定、处理和染色的变化是雌激素受体(ER)免疫组化试验重复性差的主要原因。将具有已知ER含量的MCF-7细胞的冷冻琼脂悬浮颗粒添加到55例浸润性乳腺

癌 (IBC) 样本的每一个中作为对照。图像分析确定MCF-7细胞和IBC阳性面积的百分比 (阳性核/分析的总核) 和阳性染色的百分比 (阳性细胞核区域的光密度之和除以研究的所有核的光密度之和)。通过葡聚糖包裹活性炭分析, MCF-7细胞中ER的平均值为150fmol/mg。55例MCF-7细胞的图像分析显示平均阳性面积为70.81。IBC情况的阳性染色范围为0到98.5。通过使用已知ER含量和阳性面积的MCF-7细胞, 转换因子用于将临床样本的阳性面积转换为飞摩尔当量, 55例IBC的阳性面积范围为0到1790 (平均值, 187)。包含已知飞摩尔量的ER对照为质量控制和ER定量提供了内标。

[0009] 可以参考CN102435728, 其公开了一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法。该方法包括以下步骤: 将能够与抗体发生特异性反应的、具有不同浓度的多肽或蛋白质预先吸附在玻片上, 或具有不同浓度的多肽或蛋白质预先置于玻片上, 该多肽或蛋白质和病理组织切片同时进行常规的免疫组化步骤, 并将多肽或蛋白质的显色结果作为免疫组化过程的阳性对照。该发明采用在玻片上设置阳性对照蛋白质或多肽的方法, 以实现阳性对照和质量控制标准, 该方法是现有的质量保证程序的重要补充, 并且是免疫组化试验的质量控制的新方法。

[0010] 上述发明报告了以下列出的问题:

[0011] a. 由于肽段与葡聚糖聚合物的结合取决于混合溶液的黏度, 从葡聚糖中洗去多余的肽, 和沉淀聚合物颗粒的温度和大小将根据溶液浓度、反应温度和NaOH注入重现性而变化, 而使得靶标密度将不一致。

[0012] b. 由于在聚合物颗粒上可利用的肽浓度是未知的, 已知反应性 (染色密度) 的构建靶标受到限制。结果仅为是/否一级抗体检测器。

[0013] c. 虽然葡聚糖能够支持二级IgG靶标的蛋白质捕获, 但仅限于是/否的结果。因此, 不能建立支持数字成像的基线检测标尺。

[0014] d. 在抗原修复过程中, 靶标会将蛋白质/肽泄漏到其余玻片和组织切片上。靶标置于组织切片上方, 因此在处理过程中会有来自靶标的背景和污染。

[0015] 可以参考Horizon Diagnostics, 其制作了与CN102435728相似的对照玻片, 但是靶标的构建很不同。从DNA经过修饰的组织培养细胞系中制备靶标, 以将所需的抗原肽与细胞天然地放置在一起。这些细胞系可以根据需要复制并称为“可再生资源”。细胞固定在福尔马林中, 并以疏松细胞浆形式石蜡化成组织块。在使用中, 靶标可以包括非反应细胞, 以在相同区域内产生阳性和阴性反应性靶标的混合物。要生成靶标阵列, 可以将每个细胞单元组形成与其他核心对齐的圆柱形核心, 并将整个阵列切割成单独部分以应用于玻片。

[0016] 上述发明报告了以下列出的问题:

[0017] a. 仅因为反应性靶标位点密度存在太多未知, 对照仅限于是/否的结果。简单地表示: 通过改变细胞的截面切片, 染色强度结果将改变。由于细胞块必须通过抗原修复过程, 不管什么抗原存在都将受到经验的影响, 从而导致未知的变量。

[0018] b. 在切割一部分时, 形成已知细胞的混合物 (抗原与空白) 在统计学上是无效的, 因为细胞上的静电荷会不同, 导致它们分离并聚集在一起。因此, 通过细胞块的截面与截面的比例是可变的, 这使得抗原密度比例的生成不太可能。

[0019] c. 由于细胞繁殖的复制寿命有限, 细胞系的性能不一致。无法保证新细胞系的抗原密度与先前的细胞系相同。

[0020] d. 由于人工构建组织块、切割块,并将切片用于玻片,因此成本效益不高。

[0021] 可以参考US2016/0274006A1,其公开了一种用作对安装在显微镜玻片上的细胞和组织进行试验的对照和校准器的方法和设备。该设备包括质量对照部分,诸如肽表位,连接至微粒对象,诸如透明球形珠且该珠优选地近似于细胞的大小。该质量对照部分设计成在分析中表现出与分析物类似的行为,从而产生阳性分析反应。在用新型液体基质染色的步骤中,该珠保存在显微镜玻片上,该基质在干燥后凝固并导致珠子粘附在显微镜玻片上。

[0022] 这个对照和校准解决方案尽管有趣,但在实际使用中是不切实际的,因为靶标对基片的稳定性较弱并且靶标数据难以提取,这是由于靶标材料在分布稀疏的涂覆珠上。当单个珠子成像时,染色颜色从珠子的顶部中心变化到珠子的边缘,因此很难知道在珠子表面上的哪一点的图像数据是正确的。

[0023] 可以参考US7271008B2,其公开了一种用于测定试验过程中试剂质量的装置和方法,特别是多步免疫组化试验。特别地,该装置包括基板,多种化合物附着于基片上,其中每种化合物都与测定中使用的试剂反应。

[0024] 在上述专利文件中公开的免疫染色旨在作为质量对照玻片,以评估二级染色试剂盒的性能,而不是支持进行免疫组化处理的组织切片。玻片基片是氨基硅烷,其不能支持能参与对任意靶标进行抗原修复过程的共价键。另外,碱性磷酸酶靶标会因暴露在抗原修复温度中而分解。

发明内容

[0025] 一般地,本发明一方面提供了一种用于免疫组化染色的过程记录玻片。

[0026] 在本发明的另一方面,提供了一种用于确定在试验过程中,特别是多步免疫组化(IHC)试验中石蜡去除、抗原修复以及使用的一级和二级染色试剂的效果的装置和方法。

[0027] 在另一方面,本发明提供一种装置,所述装置包括粘合剂涂覆的显微镜玻片,所述显微镜玻片包含以2D或3D结构点涂并密封在石蜡涂层下的多种化合物。

[0028] 在另一方面,本发明提供了一种过程记录玻片,其中组织切片或疏松细胞随后加到同一玻片上,并且全部经历从组织捕获到盖玻片施加的IHC处理步骤。

[0029] 在另一方面,本发明提供了一种过程记录玻片,其中化合物与一级或二级IHC染色试剂反应,以记录共存组织切片或疏松细胞的处理经历。

[0030] 在另一方面,本发明提供了一种过程记录玻片,其中一级靶标由载体蛋白上的结合抗原组成。

[0031] 在另一方面,本发明产生了一种过程记录玻片,其中一级靶标由载体蛋白上的结合抗原组成,其与结合有不同抗原的其他载体蛋白混合以形成具有多种捕获能力的靶标。一次只能使用一种,但是该方法扩增了一级靶标的数量,超过了玻片上一级靶标的实际数量。

[0032] 在另一方面,本发明产生了一种过程记录玻片,其中一级靶标由载体蛋白的结合抗原组成,其与其他非反应蛋白质混合以产生所有相同抗原的梯度密度阵列。

[0033] 在另一方面,本发明提供了一种过程记录玻片,其中使用两种二级靶标阵列,其中一种阵列是小鼠,另一种阵列是兔。

[0034] 在另一方面,本发明提供了一种过程记录玻片,其中二级阵列以2D梯度密度阵列

的形式从10%至100%的浓度连同2D/3D 100%浓度靶标施加于基片上。

[0035] 具体地,根据本发明提供了一种过程记录玻片,其中二级阵列的外推法,以及如果可能,通过一级阵列辅助而建立比例或标尺,来客观地测量共存组织切片上的每种抗原浓度。IHC染色经历与共存组织切片或疏松细胞永久锁定,以支持IHC过程的质量控制和抗原密度的客观测量。

[0036] 特别地,本发明包括以下实施方式:

[0037] 1.一种用于免疫组化染色的过程记录玻片,包括:

[0038] 可选地,在玻片标签区域顶部的标记以及代码,所述标记标识玻片的类型,所述代码标识一级靶标支持的抗原;

[0039] 可选地,在所述玻片上的标签下方打印的批次号;

[0040] 用于通过IHC进行处理以及随后检查组织切片的空间;

[0041] 位于所述组织切片下方的IHC靶标;

[0042] 位于蛋白阵列两边的成像参考点;以及

[0043] 可选地,玻璃显微镜涂层。

[0044] 2.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中所述靶标的组合可以为单独的二级、二级和抗原修复监视器,或二级和抗原修复监视器和一级抗原。

[0045] 3.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中所述组织切片可以应用于选自任意生物来源的所述组织切片的所述空间。

[0046] 4.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中二级IHC 2D靶标由4%的福尔马林和(a)小鼠和驴蛋白,以形成从100-10%小鼠浓度的梯度密度系列,和(b)兔和驴蛋白,以形成从100-10%兔浓度的梯度密度系列的混合物组成。

[0047] 5.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中二级IHC 3D 100%靶标由作为骨架的多糖和100%实施例4A(a)小鼠蛋白和(b)兔蛋白的混合物形成。

[0048] 6.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中扩大的抗原修复监视器靶标是100%小鼠和兔蛋白50:50混合物,其以两种结构沉积:(a)2D用2%福尔马林固定;(b)

[0049] 3D用多糖,再用6%福尔马林固定。

[0050] 7.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中一级IHC 2D靶标为共价连接至载体蛋白的抗原肽,诸如钥孔血蓝蛋白(KLH),其可以与中性KLH蛋白和4%福尔马林混合以制备3到5倍稀释度的梯度密度系列,或与不同抗原连接的KLH蛋白混合以形成多抗原靶标。

[0051] 8.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中成像参考点为黑白成像参考。

[0052] 9.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中玻璃显微镜玻片涂覆有生物粘合剂,所述生物粘合剂共价连接至玻璃,和与选自由胺基、酰胺基、羧基和羟基组成的组中的反应性端基共形,并具有轻微亲水性,诸如赛默飞世尔SuperFrost Plus#GL4951P。

[0053] 10.根据实施方式1的所述过程记录玻片,其中所述靶标共存靶向所述组织切片。

[0054] 11.一种根据实施方式1的过程记录玻片进行免疫组化染色的方法,包括如下步骤:

[0055] a.从石蜡包埋的组织切片中去除石蜡,以及在PRS靶标上覆盖石蜡屏蔽涂层;

[0056] b.通过抗原修复缓冲液去除甲醛固定,以暴露所述组织切片的抗原位点;

[0057] c.施加一种或两种一级结合抗体,以结合在所述组织切片或一级抗原靶标位点中

找到的任意匹配抗原位点；

[0058] d. 将染色试剂涂在步骤(b)获得的暴露的所述抗原位点上,以产生可见的颜色指示靶标抗原的存在；

[0059] e. 可选地,多步扩增步骤以获得足够密度的染色试剂；

[0060] f. 使用苏木素提供对比色(蓝色),以使物理形态可见。

[0061] g. 用盖玻片覆盖所述玻片,最终准备进行检测。

[0062] 12. 根据实施方式11所述的方法,其中步骤(a)中所述去除石蜡是通过在65-75°C之间的温度范围下,加热所述石蜡3-10分钟以获得半液态,然后用有机溶剂系列液化,直到在缓冲溶液中再水化。

[0063] 13. 根据实施方式11和12所述的方法,其中所述有机溶剂选自脂肪族溶剂起始的一系列溶剂,诸如二甲苯或混合二甲苯、无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇,以及盐基缓冲溶液,每种溶液的暴露时间指定为3分钟。

[0064] 14. 根据实施方式11所述的方法,其中甲醛固定可以通过抗原修复过程去除,诸如:热诱导的表位去除(HIER)过程或通过较长的温热蒸馏水进行多次水交换的抗原修复过程。

[0065] 15. 根据实施方式11所述的方法,其中步骤(d)中使用的二级染色试剂可以选自酶标记的二级、与酶标记的二级抗体反应的酶标记的三级抗体、与二级抗体反应的APAAP免疫复合物、与生物素化的二级抗体反应的酶标记的(链霉)亲和素、与生物素标记的二级抗体反应的亲和素-链霉亲和素-生物素-酶复合物、在一级抗体中生物素化的二级抗体上的链霉亲和素-酶复合物,以及含有二级抗体和与一级抗体结合的酶位点的聚合物。

[0066] 16. 根据实施方式11所述的方法,其中使用的抗原修复缓冲液可以选自pH6-9的范围。

[0067] 17. 根据实施方式11所述的方法,其中在步骤(c)中的一级抗体选自宿主蛋白是小鼠或兔的抗体,包括常见的实施例:ER、PR、Her2、Ki67。

[0068] 18. 根据实施方式11所述的方法,其中上述的色原可以选自3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、氨基-9-乙基咔唑(AEC)、3,3'-二氨基联苯胺+镍增强剂、固红、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、保持黄色(Stay Yellow)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸盐/硝基蓝四唑(BCIP/NBT)、5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸盐/四硝基四氮唑蓝(BCIP/TNBT)、萘酚AS-MX磷酸盐+固蓝BB、萘酚AS-MX磷酸盐+固红TR、萘酚AS-MX磷酸盐+新品红、保持绿色(Stay Green)和硝基蓝四唑(NBT)。

[0069] 19. 根据实施方式11所述的方法,其中所述方法是成本有效的、可重复的、稳定的,有助于识别导致错误分析的IHC处理步骤。

[0070] 20. 根据实施方式11所述的方法,其中所述方法用作定量标准,用于对共存组织切片或疏松细胞上抗原浓度的过程对照。

附图说明

[0071] 图1表示根据本发明一实施方式的可以利用的一级和二级靶标的种类。

[0072] 图2A显示了制作的基本玻片。该玻片通过批次号具有最小ID,并在着色的标签区域中具有空白区域。有两个厚的着色长轴条形,其延伸超过靶标点的区域。这些条形是最近

添加的,用于解决标签打印机如何从堆叠底部分配玻片。这些条形确保了上面堆叠的玻片不会损坏玻片涂层,更重要的是不会损坏石蜡屏蔽涂层以及石蜡下面的靶标点。

[0073] 图2B显示了如其已经在标签区域打印附加数据的基本玻片:日期,2D条形码以及已经捕获的组织切片。注意组织切片更像是石蜡。组织大体上是透明的,因此石蜡色占主导地位。“患者组织”和“对照靶标”文本未打印在玻片上,而是在此处指导读者石蜡覆盖的区域是什么。

[0074] 图2C显示了在IHC处理之后出现的基本玻片。靶标和组织切片都可见并准备好进行解释。

[0075] 图3是AR损伤效应的特写图。

[0076] 图4示出了照明水平过暗(最佳为-5%)、最佳状态(+0)和过亮(如+10或+15%)时对图像的影响。

[0077] 图5显示了石蜡屏蔽涂层如何确保其沉积物边缘的密封。

具体实施方式

[0078] 通过参考以下结合附图对本发明的详细描述,可以更容易地理解本发明,所述附图构成本发明的一部分。应当理解,本发明不限于本文描述和/或示出的特定装置、方法、条件或参数,并且本文使用的术语仅是示例性的,并不旨在限制所要求保护的发明。同样,如在包括所附权利要求书的说明书中所使用的,单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数形式,并且对特定数值的引用至少包括该特定值,除非另有明确指示。当在另一个实施例中表达这样的范围时,范围可以从“大约”或“近似”另一个特定值表达。另外,应该理解,除非另有说明,否则本文所述的尺寸和材料特性是作为示例而非限制,并且是为了更好地理解适当用途的示例实施方式,并且根据特定应用,所述值以外的变化也可以在本发明的范围内。

[0079] 本发明的应用不限于所述的结构细节和组件的布置。在以下说明书中或在以下说明书示出中或在附图中示出。本发明能够具有其他实施方式并且能够以各种方式被实践或执行。同样,本文中出于描述的目的而使用的措词和术语不应视为限制性的。“包括”、“包含”、“具有”、“由…组成”、“涉及”及其变体以及其他项的使用。

[0080] 现在将详细参考本发明的优选实施方式,其示例在附图中示出。在可能的情况下,在附图和说明书中使用相同的参考标号指代相同或相似的部件。

[0081] 定义

[0082] 如本文所使用的,术语“玻片”,也称为“显微镜玻片”,是指薄而平的薄片(通常由玻璃制成,因此有时称为“玻璃玻片”),通常为75×26mm(3×1英寸),约1mm厚,用于在显微镜下固定检查对象。

[0083] 本发明中的玻片也被称为“过程记录玻片(PRS)”,其可以互换地称为PRS-IHC玻片。

[0084] 如本文所使用的术语“检测区”是指玻片中的空间,在所述空间中放置诸如任何生物来源的组织 and 疏松细胞之类的样本,以用于随后的免疫组化或免疫化学检测。

[0085] 如本文所用的术语“对照区”是指容纳用于评估抗原修复状态、一级抗体试剂功效和二级试剂功效的已知反应性行为靶标的空间,包括从一级和二级靶标阵列、成像参考和抗原修复监视器中选择的一种或多种。

[0086] 应当注意,“检测区”和“对照区”是否在玻片上具有清晰的标记边界;最好仅根据其功能对其进行分类。

[0087] 如本文所用的,术语“一级靶标”是指用于IHC试验的一级抗体可以结合的靶标。同样,它可以指可以被抗体识别的任意未指定的抗原肽片段。抗原肽片的类型可以通过IHC过程中使用的一级抗体确定,然后与载体蛋白结合以获得所需的一级靶标阵列。或者,预先用共同的抗原肽片段制备一级靶标,以备后用。

[0088] 如本文所用的术语“抗原肽片段”是指抗原蛋白的全长或部分,其具有与抗原蛋白相同或几乎相同的抗原特异性,以及卤素。

[0089] 如本文所用的,术语“二级靶标”是指在IHC过程中使用的二级抗体结合的靶标。通常,二级抗体与IHC中的第一级抗体结合,因此,二级靶标通常包含不同来源的IgG,诸如小鼠和兔。

[0090] 术语“宿主蛋白”是指与一级抗体具有相同来源的蛋白(特别是IgG),例如小鼠、大鼠、兔和山羊蛋白(IgG)。

[0091] 术语“假蛋白质”是指与二级抗体无反应,并且用于与宿主蛋白质混合以获得梯度稀释液的蛋白质。优选地假蛋白是驴蛋白(IgG)或马蛋白(IgG)。

[0092] 如本文所用,术语“加载点”也可互换地称为“点”,其是指通过将所需肽或蛋白质固定在玻片上形成的实体。“点”可以具有任何形状,例如但不限于圆形、椭圆形、正方形、菱形等。

[0093] 玻片

[0094] 通常,免疫组织化学(IHC)染色用于评估患者组织切片中特定抗原位点的存在。针对组织切片上的染色密度进行主观解释,以确定异常或癌变情况的诊断水平。通常,假定IHC处理始终正确工作,并且组织切片将用可见的色原标记进行标记,以识别异常或癌变情况,如果存在。但是,抗原修复或染色试剂的失败不会留下任何识别伪影的特征。因此,实验室技术人员或病理学家有很大的机会无法做出有效的诊断决定。换句话说,物理形态可能不足以显示异常状况,但如果没有标记抗原位点,玻片仅提供苏木素和伊红(H&E)玻片上所看到的。

[0095] 在本发明一实施方式中公开了一种新型粘合剂涂覆的玻片,其可以互换地称为“过程记录玻片”(下文中粘合剂涂层玻片可以称为具有相同范围和含义的过程记录玻片)。上述“过程记录玻片-免疫组化”(PRS-IHC)玻片结合了已知反应行为的靶标,用于评估抗原修复状态,一级抗体试剂功效和二级抗体功效。在本发明的另一实施方式中,一级抗原靶位点是但不限于去石蜡化、抗原修复过程、一级抗体性能、对沉淀色原的二次扩增和覆盖玻片的累积结果。在本发明另一实施方式中,二级靶位点是但不限于一级抗原靶标减去一级抗体试剂性能的累积结果。

[0096] 在本发明另一实施方式中,上述染色的二级靶标组位点提供了基线,在基线上可以客观地确定一级位点的抗原密度。值得注意的是,每种二级蛋白质阵列的每一种也可以使用多糖作为3D支架被印刷为3D靶标。此外,在相同浓度的2D和3D靶标之间的色原沉淀比例确定了比例因子,该比例因子可应用于一级抗原阵列,从而能够客观测量3D材料上的抗原浓度。通过识别3D抗原密度作为色原沉淀的程度,可以将比例或标尺应用于共存组织切片,以客观地定量组织切片中抗原的存在。二级和一级反应性靶标的存在在识别染色试剂

生存力和通过抗原修复过程的暴露起着至关重要的作用。需要强调的是,上述任何步骤或试剂中的缺陷都可以在PRS靶标中轻松识别,因此很可能发出错误诊断信号。

[0097] 可以参考图1,其示出了在免疫组化试验过程中采用的可能的靶标。

[0098] 可以参考图2,其示出了粘合剂涂覆的玻璃片或过程记录玻璃片的结构,其中IHC靶标位于组织切片下方,以减少蛋白质从靶标材料中释放的可能性,该靶材料可以是扫到组织切片上并被捕获。靶标的第一行是小鼠梯度密度阵列,中间的是兔梯度密度阵列。最下面一行可以支持十二种靶标,其可以是一级抗原或一级抗原的混合物或组合。黑白成像参考点位于二级蛋白质阵列的左侧。着色靶标的右边是3D小鼠和兔靶标。二级靶标和所有一级靶标的其余部分均为2D配置。在本发明另一实施方式中,在赛默飞世尔SuperFrost玻璃片GL4951P上发现了可用的玻璃显微镜玻璃片粘合剂涂层。在另一实施方式中,最佳的涂覆有粘合剂的玻璃片具有与玻璃共价结合的特性,并向生物材料呈现但不限于两种或多种(-ROH、-R(C=O)OH、-RNH₃、-R(C=O)NH₂和-RNH₂)端基,并且在制造时可调节表面润湿性能。

[0099] 在本发明一实施方式中,上述的“过程记录玻璃片-免疫组化”(PRS-IHC)玻璃片可以加入已知反应行为的靶标,以评估抗原修复状态、一级抗体试剂功效和二级试剂功效。一级抗原靶标位点是去石蜡化、抗原修复过程、一级抗体性能、二级扩增至沉淀色原以及覆盖玻璃片的累积结果。二级靶标位点是一级抗原靶标减去一级抗体试剂性能的累积结果。

[0100] 在本发明另一实施方式中,为了与上述粘合剂涂覆的玻璃片或过程记录玻璃片的结构相符,上述PRS-IHC玻璃片在包括黑白成像参考靶标的梯度密度阵列中结合生物基靶标。由于靶标是生物来源的,可以施加石蜡薄膜以防止氧化和微生物侵袭。可以在与组织切片的包埋石蜡相同的IHC处理步骤中去除石蜡膜。主要强调的是,PRS-IHC经历了相同的组织捕获过程,以覆盖玻璃片来记录IHC过程,并永远保留在组织切片中。当处理经验已知、记录并可用时,第二意见和远程诊断变得可行。

[0101] 在本发明一实施方式中,粘合剂涂覆的玻璃片或过程记录玻璃片有助于使对照与患者材料共存,从而使其不会像实验室信息系统(LIS)那样取代和丢失。因此,该对照必须通过从生物材料捕获到覆盖玻璃片完成的所有经历。

[0102] 在本发明另一实施方式中,粘合剂涂覆的玻璃片或过程记录玻璃片是可重复的、随时间稳定的,支持一种或多种抗原,每种为梯度密度阵列,对IHC玻璃片的当前加工稳定,并且是具有成本效益。过程记录玻璃片为过程对照以及共存组织切片或疏松细胞上的抗原浓度的客观测量提供了定量标准,其中小鼠和兔蛋白用作梯度密度阵列。

[0103] 在本发明一实施方式中,可以描述IHC染色过程的步骤,以了解在粘合剂涂覆的玻璃片或过程记录玻璃片中进行的免疫组化染色。将固定的组织切片包埋在石蜡中,必须先将石蜡加热至半液态,然后通过二甲苯(或混合二甲苯)液化,然后逐渐用稀释的乙醇洗涤和最后用缓冲液将其除去,以暴露出切片的细胞结构。接下来,必须去除甲醛以暴露抗原位点。最常见的,通过热诱导表位修复(HIER)过程或更长的温水抗原修复过程去除固定。当组织暴露于缓冲剂(pH值6-10,根据组织类型而定)时,HIER过程通过施加热量(最适89°C并且不超过95°C)破坏甲醛与组织之间的席夫碱键。此时,抗原位点暴露,可以使用染色试剂,以产生可见的颜色指示靶标抗原的存在。基于水的抗原修复过程的运行温度比包埋石蜡熔化温度高约10°C,约60-65°C)。肥皂和许多连续的洗涤液慢慢溶解并除去石蜡。除蜡和固定修复中的操作者或加工缺陷会阻塞染色过程并产生假阴性结果。

[0104] 一旦抗原位点从甲醛固定中分离出来,则施加一种或两种一级结合抗体试剂。这些将结合在组织切片或PRS一级抗原靶标位点中发现的任意匹配的抗原位点。一级抗体偶联到小鼠或兔蛋白上,然后再被二级染色试剂作用。

[0105] 在本发明另一实施方式中,为了获得足够密度的用于人类视觉检测的染色试剂,可以进行多步扩增过程。从单步扩增到三步扩增,都有各种各样的二次检测试剂盒。全部到达色原沉淀的相同最终状态。通常,使用三种常用的二级染色试剂组以及几种复染剂中的一种:辣根过氧化物酶 (HRP),碱性磷酸酶 (AP),葡萄糖氧化酶和核复染剂中的一种或两种。可利用的可能沉淀的色原体颜色可以选自但不限于以下列表中的那些:

[0106] 辣根过氧化物酶 (HRP)

DAB (3,3'-二氨基联苯胺) >>棕色到红棕色

AEC (3-氨基-9-乙基咔唑) >>红色

[0107] DAB+镍增强剂

>>黑色

TNB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) >>蓝色

保持黄色 (Stay Yellow) >>黄色

[0108] 碱性磷酸酶 (AP)

BCIP/NBT >>蓝色

5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸盐/硝基蓝四唑

萘酚AS-MX磷酸盐+固蓝 >>蓝色

[0109] 萘酚AS-MX磷酸盐+固红

>>红色

萘酚AS-MX磷酸盐+新品红 >>红色

保持绿色 (Stay Green) >>绿色

葡萄糖氧化酶 >>蓝色

[0110] 核染色

[0111] 苏木素(最常用) >>蓝色

[0112] DAB众所周知的,并在美国广泛使用。世界上许多其他地区用AEC。使用DAB的人拒绝AEC的原因是,与DAB的棕红色相比,红色饱和太低。实验表明,原来的DAB在短时间内会出现明显的老化现象,从而使色彩饱和在4小时内明显下降。较新版本的DAB包含稳定剂,可将DAB的稳定性从数小时延长至数天。DAB还具有在随后的缓冲液洗涤周期中被洗去的倾向,另一方面,AEC可以在数周到数月内保持稳定。

[0113] 全世界的监管标准都寻求或坚持认为,一旦这种技术可行并可用,就可以使用经过验证的对照来检查处理组织切片和疏松细胞的试剂、方法和仪器。对于血液学和临床化学,此类监管控制早已存在,以验证结果并保证质量。对照测试的结果以Levey-Jennings图的形式绘制(Westgard等,1981)。Westgard J,Barry P,Hunt M,Groth T(1981) "A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry".Clin Chem27: 493-501。

[0114] 在本发明另一实施方式中,以上使用的对照必须不受到预处理步骤的显著影响:

去除石蜡和抗原修复。结果测量了IHC染色试剂的功效,并开发出一种比例或标尺,用于组织切片上抗原浓度的测定。了解某些步骤或试剂发生故障的鉴定很重要,这有助于防止误诊。

[0115] 在本发明另一实施方式中,所有上述的2D二级染色靶标均用甲醛固定。二级靶标如下:

[0116] >小鼠2D阵列在10-100%之间,3D@100%

[0117] >兔2D阵列在10-100%之间,3D@100%

[0118] 2D二级染色靶标结合了蛋白质梯度密度阵列,其中一种是小鼠和驴,另一种是兔和驴。梯度比例遵循在10%和100%密度之间的已知剖面曲线。由于驴不支持非特异性染色,有时在第二种染色试剂盒中发生驴比常用的牛更经常使用。ABC二级染色试剂盒使用山羊抗(小鼠或兔)作为第一步试剂和第二步染色试剂(含抗山羊)。山羊在物种上与牛太近,支持捕获第二步的二级染色试剂。驴或其他马类动物则避免了这种意外反应。

[0119] 在本发明另一实施方式中,不同的二级染色和沉淀的色原在类型和厂商之间的颜色密度上有很大不同。为了说明变化,2D梯度密度阵列形成了色原密度与小鼠和兔蛋白浓度之间的关系。虽然二级梯度阵列混合物可以产生绝对浓度比例,但它不能说明玻片涂层的物理结构。通过HIER处理显示出亲水行为和组织保留的所有IHC玻片均具有孔隙率因子。对于组织切片,这没什么影响,除了玻片涂层要与由切片表面的切片刀片以及试剂分散在玻片表面引起的物理不规则性相符。然而,对于蛋白质,孔隙率和润湿度变量会影响需要多少沉积物来填充空隙,以及表面上有多少有效面积。玻片之间的孔隙率是可变的,但是在任何一张玻片上的孔隙率大体上是均匀的。通过在280nm处的吸光度评估单个蛋白质的一级稀释液。然后将数据用于配制沉积的蛋白质阵列靶标混合物,以确保不同IgG批次之间的性能一致。所有二级靶标均用甲醛固定。

[0120] 在本发明另一实施方式中,2D一级抗原染色靶标通过半胱氨酸残基和磺基-SMCC交联方式,使用所需抗原的肽链与载体蛋白偶联。将目前结合的载体蛋白与假蛋白混合以调节浓度。所有一级抗原靶标均用甲醛固定。一级靶标可以以两种形式产生:

[0121] a. 梯度密度对,其中最大密度超过抗体结合的能力,第二种为50%浓度。每种靶标对包含单种反应性抗原。

[0122] b. 一系列抗原靶标,每种靶标最多包含十种不同的抗原,所有抗原具有最大密度。每种靶中抗原类型的混合使得在使用过程中只有一种抗原会发生反应。

[0123] 抗原由具有半胱氨酸残基的肽链组成,并共价结合至先前已被磺基-SMCC激活的载体蛋白。使用钥孔血蓝蛋白(KLH)是因为它与任何人类抗体都没有反应性,并且已知能够支持磺基-SMCC的位点范围。可以使用具有等效性能的其他类似蛋白质。

[0124] 由于肽链只是抗原的短片段,使用肽链存在潜在的问题。如果抗体未配置为匹配,则即使抗体正确结合到组织切片或疏松细胞上的抗原,也不会检测到。因此,对于某些抗体,一级靶标必须支持多达十种不同的抗原区段。大多数实验室使用75到100种不同的抗原。许多实验室选择使用与其使用的染色剂捆绑在一起的一级抗体和二级染色剂。对于那些是完整抗体片段的抗体,匹配的抗原是非常特异性的。由于染色厂商大量开发自己的抗体,因此PRS通过使用上述选项B而支持每种染色试剂套件,从而更好地服务于市场。

[0125] 然而,在开发新抗体时,需要测试多种抗原制剂,以达到最佳检测条件是非常重要的

的。上面的选项A可以更好地解决此问题,因为它不清楚最佳抗体浓度和灵敏度是多少。

[0126] 在本发明另一实施方式中,3D靶标将2D靶标结果转换为可应用于组织切片的测量的必要性。组织切片和细胞的高度都在4到10微米之间。抗原位点可以在细胞结构上或内的任何位置。垂直结构上的那些抗原位点可具有相当大的深度,其中色原可被位于切片顶部的酶沉淀。因此,与2D蛋白质沉积物相比,可以沉淀出更多的色原。这就是基于2D蛋白质和多肽的靶标永远无法像疏松细胞和组织切片那样暗的原因。

[0127] DAB试剂的老化作用在短时间内使染色结果发生了相当大的变化。但是,仅因为3D抗原浓度比例与DAB性能的变化无关,PRS-IHC溶液能够纠正色原沉淀的偏移减少。由于蛋白质和抗原靶标阵列是由已知浓度组成的,即使压缩,染色结果仍保持相同的相对关系。因此,当观察到的强度(暗度)减弱了,比例将继续在组织切片或疏松细胞上提供相同的抗原密度度量。

[0128] 成像参考靶标

[0129] 除了2D和3D二级蛋白质靶标阵列之外,还打印了黑白成像参考靶标。

[0130] 包含染色的生物材料的显微镜玻片的数字成像正在发展,以对染色材料进行预筛查和可能的全面诊断确定。通常,成像系统必须调整照明光水平,以使数字图像在白色或黑色边界处都不会处于压缩状态。常规解决方案是在标签的预期位置放置黑白靶标。基本假设是白色和黑色靶标代表玻片可以呈现的极限。然而,这样做时,数字比例存在压缩,因为黑色比组织切片的染色黑得多,白色白得多。

[0131] 在本发明一优选实施方式中,公开了一种显微镜玻片,其包含与患者组织切片或疏松细胞沉积物共存的对照和参考靶标标准。参考靶标和组织切片记录了组织捕获和覆盖玻片的染色玻片之间的处理经历。

[0132] 在本发明另一实施方式中,在显微镜玻片靶阵列之间是共存的黑色和白色参考靶标。黑白参考靶标与其他靶标和组织切片经历相同的试剂暴露和处理。

[0133] 在本发明另一实施方式中,两种参考靶,即黑色和白色靶标都是印刷的涂料沉积物,其与用于处理玻片的任何试剂均不反应。理想情况下的白色靶标将是完美的白色。然而,几乎没有染色的生物材料有效性能从黑色变成白色达到一半以上。因此,白色可以与完美的白色相差5-10%,仍然具有有用的价值。在一种优选的实施方式中,白色是金属氧化物或硫酸盐组合物,当不暴露在阳光下时,其随着时间的推移是稳定的。在一更优选的实施方式中,白色是铝和氧化钛。

[0134] 在另一实施方式中,黑色和白色靶标均基于酸酐基环氧漆基,其通过在指定的365nm紫外线下,直接曝光来催化。酸酐催化剂由甲基四氢苯酐和二苯基碘鎓六氟砷酸盐组成。除紫外线引发外,酸酐还需要加热以催化环氧树脂交联。列出了首选的紫外线引发酸酐及其伴侣,但是在搜索酸酐生产公司时,还可以找到其他解决方案。尽管可以根据需要构造此类涂料/油墨,但通常根据所使用的印刷方法,对已购买的组件进行优化。涂料/油墨的制造必须解决在颜料颗粒和环氧粘合剂之间实现良好润湿的难点。酸酐基涂料(当粘度低时也称为油墨)通常将酸酐与环氧树脂混合在一起,因为适用期可能长达数月。降低粘度是印刷行业相关人员的常识,并且配方会根据环氧混合物的表面和所用的印刷方法而变化。虽然通常使用热引发的酸酐-环氧涂料/油墨,但引发反应所需的热量可能会破坏可能与涂料/油墨共存的生物材料(蛋白质、肽和化学靶标)。

[0135] 在另一实施方式中, 酸酐催化剂消除了氨基硅烷基催化剂发现的未反应的胺, 否则该胺将支持非特异性染色。游离胺端基可以并将捕获生物材料和某些特异染色剂。具体地, 这解决了玻片处理试剂, 特别是染色试剂对白色靶标的不希望的染色问题。作为涂料/油墨表面上的游离胺端基, 它可以同时捕获一级抗体和二级染色试剂, 并被染色。因此, 破坏了在玻片上具有完整白色靶标的价值。

[0136] 在另一实施方式中, 黑色颜料使用小于2微米直径的碳尘, 而白色颜料使用铝、氧化钛或硫酸钡珠; 优选白色使用硫酸钡。

[0137] 在另一实施方式中, 优选的环氧油墨/涂料制剂完全避免了表面活性剂, 以防止使油墨/涂料对这些玻片可经历的染色和试剂产生反应。

[0138] 在另一实施方式中, 靶标的印刷可以通过印章或注射器来完成。在另一实施方式中, 优选注射器, 因为它支持更好地控制靶标沉积的特征尺寸。

[0139] 在另一实施方式中, 上述白色靶标由在酸酐催化的环氧树脂中的金属氧化物或硫酸盐颜料组成。在另一实施方式中, 上述黑色靶由紫外线引发的酸酐催化的环氧树脂中的碳颜料组成。在另一实施方式中, 酸酐催化剂是通过直接紫外线暴露的紫外线引发的。使用紫外线引发的酸酐催化剂的主要优点是引发酸酐-环氧反应所需的热量超过了生物材料(蛋白质、肽和化学靶标)所能承受而不会受到破坏的热量。更重要的是消除可能与染色试剂反应的任意游离胺。

[0140] 屏蔽涂层

[0141] 石蜡通常是一种白色或无色的软固体, 来源于石油、煤炭或油页岩, 是由含二十至四十个碳原子的烃分子混合组成。它在室温下为固体, 大约高于37°C (99°F) 时开始熔化; 其沸点>370°C (698°F)。石蜡的常见应用包括润滑、电绝缘和蜡烛; 染色的石蜡可以制成蜡笔。它不同于煤油和其他有时称为石蜡的石油产品。

[0142] 在病理实验室中, 在薄的组织样本切片之前, 使用石蜡来浸渍组织。通过提高酒精浓度(75%至绝对浓度)从组织中除去水, 并在有机溶剂, 诸如二甲苯, 或一种脂肪族替代物, 诸如混合二甲苯酚中清除组织。然后将组织放在石蜡中数小时, 然后将其放入带有蜡的模具中冷却并固化, 再在切片机上切割成片。

[0143] 将组织切片包埋在石蜡中, 是用于组织切片长时间保存的常规操作。然而, 尚未报道过将石蜡作为薄涂层涂覆在显微镜玻片的选定区域。在本发明中, 沉积在显微镜玻片、玻璃或塑料上的靶标蛋白为细菌或真菌拮抗剂提供了丰富的食物来源。另外, 蛋白质的抗原位点(例如表位)容易被氧化, 从而有效中和了检测抗体与蛋白质结合的能力。许多随后的反应结合位点都是羟基, 其可通过与空气中的酸和碱反应而被破坏。典型的, 含有蛋白质沉积物的玻片被储存在低于支持微生物生长的温度下。但是, 这样的约束限制了沉积物的有效利用。另外, 沉积有蛋白质的玻片被包装在真空密封的容器中, 以防止氧化破坏。未保护的沉积有蛋白质的玻片的露天保持期限为2至5天之间, 具体取决于环境温度和空气中的污染物水平。

[0144] 石蜡固有地被称为含有抗真菌剂和抗菌剂, 其防止抗原位点的氧化和暴露位点的空气传播的酸/碱降解。石蜡屏蔽涂层将生物材料的使用寿命从3-5天变为1-2年, 从而为最终用户提供了有用的产品寿命。

[0145] 为了使组织切片暴露于随后的免疫组化(IHC)染色, 去除包埋的石蜡也是常规操

作。使用相同或相似的石蜡配方来保护同一显微镜玻片上的其他沉积材料,确保在开始进行IHC染色之前,无需进行其他玻片处理。

[0146] 在本发明一实施方式中,将石蜡与溶剂混合以在室温下将材料状态从固体变为液体。该共混物使用帕拉普拉斯特X-tra (Paraplast X-tra) 或与二甲苯或脂肪族溶剂相当的产品,例如混合二甲苯,以降低粘度并减慢沉积后的固化速度。

[0147] 在另一实施方式中,溶剂的选择可以但不限于为甲苯、涂料稀释剂,松节油或丙酮和煤油的50:50混合物。Paraplast X-tra具体结合了一种酚类抗氧化剂丁基羟基甲苯,以减少蛋白质、肽和无机靶标的氧化降解。

[0148] 在另一实施方式中,将固体石蜡在高于石蜡熔融温度的、不超过75°C的温度下熔融直至液体,然后缓慢加入脂肪族溶剂直至观察到饱和点(形成固体)。使混合物冷却至45°C,并缓慢添加更多的脂肪族化合物,直至完全澄清。

[0149] 在另一实施方式中,上述石蜡涂层施加在生物材料上,并且特异染色反应性沉积物先施加到涂覆在显微镜玻片的粘合剂上,其中生物材料可以包括但不限于蛋白质、肽、结合蛋白质、蛋白质包裹的珠、肽包裹的珠、或结合包裹的珠,并且特异的染色反应性端基,其独特地捕获了特异染色材料,该染色材料与所施加的抗体和二级染色试剂反应。

[0150] 在另一实施方式中,将石蜡层选择性地施加到玻片上的靶标上。在另一实施方式中,可以将石蜡层沉积在显微镜玻片上,该显微镜载玻片包括但不限于:喷涂、喷墨沉积、转移印刷(诸如移印)、丝网印刷和气相沉积。在一优选的实施方式中,石蜡是薄层,优选不大于5微米。在另一优选的实施方式中,石蜡的熔融温度小于60°C,优选小于56°C,并且在暴露于二甲苯或混合二甲苯(脂肪族替代)溶剂中时溶解。在另一优选的实施方式中,石蜡具有与包埋石蜡相似的环境温度硬度。

[0151] 在另一实施方式中,包埋石蜡材料的组织块可以包括但不限于赛默飞世尔(Thermo Fisher)的提休普扑(TissuePrep)和提休普扑2(TissuePrep2),熔点为56°C,徕卡(Leica)的帕拉普拉斯特(Paraplast)和帕拉普拉斯特普拉斯(Paraplast plus),熔点为56°C,徕卡的帕拉普拉斯特X-tra(Paraplast X-tra),熔点为50-54°C。

[0152] 在另一实施方式中,每一种都是纯化的石蜡、合成聚合物和其他材料的混合物,以确定熔融温度、硬度和粘度。石蜡固有特性不支持微生物的生长。

[0153] 在另一实施方式中,特异染色试剂可以包括但不限于:阿尔新蓝(Alcian Blue)、苯胺蓝-耐光橙G溶液(Aniline Blue-Orange G Solution)、偶氮卡红染色(Azan Stain)、比耳朔夫斯基银染(Bielschowsky silver stain)、布朗本-革兰氏染色(Brow&Benn-Gramm Stain)、焦油紫(Cresyl Violet)、二氨基联苯胺(DAB)、丰塔纳马松(Fontana Masson)、戈登-斯威特浸银染(Gordon and Sweet's silver staining)、戈塞特六氨银染色法(Grocett's Methanamine silver method)、霍尔胆红素染色法(Hall's Bilirubin stain)、琼斯六胺银法(Jones Methanamine silver method)、劳克坚牢蓝(Luxol Fast Blue)、劳克坚牢蓝-焦油紫(Luxol Fast Blue-Cresyl Violet)、黏卡红(梅耶法)(Mucicarmine(Mayer's Method))、穆勒-莫里胶体铁(Muller-Mowry colloidal Iron)、耐光橙G(Orange G)、核固红(Nuclear Fast Red)、带淀粉酶消化的过碘酸雪夫氏(PAS with Diastase Digestion)、过碘酸雪夫氏(PAS)(Periodic Acid Schiff(PAS))、磷钨酸(Phosphotungstic Acid)、苏木素(Haematoxylin)、天狼星红(Picro Sirius Red)、酸化甲

苯胺蓝(Toluidine Blue Acidified)、一步三色戈莫理氏染色(Trichrome-Gomoris One-Step)、马森三色染色(Trichrome-Masson's)、维多利亚蓝(Victoria Blue)、钙盐染色(Von Kossa)、魏格特雷琐辛品红(Weigert's Resorcin Fuchsin)、魏格特铁苏木素(Weigert's Iron Haematoxylin)、萋-尼氏染色法(Zell-Neelsen Method)。

[0154] 在另一实施方式中,靶标的选择可以但不限于颜料着色的沉积物,诸如黑色和白色,但可以包括任何颜料颜色。

[0155] 在另一实施方式中,可以在其上施加上述石蜡涂层的显微镜玻片可以选自但不限于玻璃、塑料或任何聚合物材料。在另一个实施方式中,石蜡可以是纯化的并且无水。

[0156] 在另一实施方式中,可以将所得的显微镜玻片后加热,以将石蜡颗粒熔融和/或共混到整体表面涂层,从而密封沉积物和围绕沉积物的玻片表面。

[0157] 在另一实施方式中,在沉积石蜡之后加热所得的显微镜玻片,以迫使溶剂从石蜡中出来,从而确保其返回硬化状态。这必须从玻片的石蜡一侧开始,优选使用红外光。从上到下熔化石蜡可确保溶剂能够上升并从石蜡中蒸发而不会产生阻碍。结果如图5所示,该图示出了熔化的石蜡如何确保其沉积物边缘的良好密封。

[0158] 抗原修复监视器

[0159] 在本发明另一实施方式中,抗原修复监视器是通过抗原修复(以下称为AR)过程进行的,取决于所使用的过程及其实施方式,其玻片之间和染色剂之间变化非常大。AR是一个开环过程,因为对AR缓冲区和缓冲区温度的直接测量实际上是未知的,只是估计而已。AR过程假定由于告知加热器要在所需温度下使用,因此AR缓冲区的温度始终相同。AR过程还假定使用的AR缓冲液是使用正确试剂成分的正确混合物。这两个假设将导致在没有向实验室提供任何切实反馈下无法执行AR。

[0160] 在本发明另一实施方式中,PRS结合了两个AR靶标:ARM3D和ARM2D加上2D二级阵列。有三个AR状态:恢复不足、正常和过度恢复。

[0161] >恢复不足的状况是AR温度太低、曝光时间不足或完全不运行导致。ARM2D靶标是例如100%浓度的50:50混合小鼠和兔蛋白质(或其他物种的蛋白质,不限于小鼠和兔蛋白质),甲醛固定率最低。如果该靶标染色,则AR处理失败。优选地,蛋白质是IgG。

[0162] >过度恢复的状况是AR温度太高、暴露时间过多或AR缓冲液的pH值大于9.5或pH小于5.5而导致。ARM3D靶标是100%浓度的50:50混合小鼠和兔蛋白质(或其他物种的蛋白质,不限于小鼠和兔子蛋白质),沉积在已用甲醛过度固定的3D支架中。如果该靶标染色,则说明AR过程过度,玻片不应用于诊断评估。

[0163] >当小鼠和兔梯度密度阵列的10%到不超过30%的靶标不显示可见染色时,发生正常恢复状态。然后通过不染色的低浓度二级靶标的量评估AR损伤的程度。这种损伤也能在组织切片中看到。

[0164] 抗原成像比例外推法

[0165] 众所周知一级抗体由通过接种所需抗原片段的宿主动物(例如小鼠或兔)获得的经加工的宿主血清组成。然后宿主产生血清蛋白,其中抗原位点现在包含针对抗原拮抗剂的抗体反应物。当抗体随后与包含靶标抗原的蛋白质接触时,抗原和抗体结合在一起。结果是宿主物种(小鼠或兔)的抗体可以与二级染色试剂盒自由反应。

[0166] 一级靶标和二级靶标具有明确定义和规则的(诸如圆形)沉积区域,在其上施加已

知分配体积的靶标材料。由于蛋白质沉积物包含交联偶联剂,因此它们不会陷入玻片涂层中超过蛋白质深度的孔。当蛋白质甚至松散地交联在一起时,它们的有效尺寸会抑制陷入粘合剂涂层孔中的能力。孔隙率并不比交联在一起的一对蛋白质大很多。因此,蛋白质大部分留作许多蛋白质厚的涂层。直到蛋白质点沉积到玻片后的烘烤步骤,交联才完全发生。知道蛋白质沉积物不会被涂层吸收很重要,因为当吸收到涂层中时,它之后就不能和染色试剂反应,因为在可用空间中根本没有足够的空间容纳扩增化学物质。从成像的角度看,一些蛋白质会在抗原修复过程中丢失,但新的蛋白质会暴露出来。因此,靶标点显示为单层蛋白质,因为只有沉积物顶部的那些才能与染色反应。

[0167] 因此,知道蛋白质的原子质量,就可以计算出沉积物中每种蛋白质类型的蛋白质数量、靶标的面积和靶标的活性表面蛋白质密度。

[0168] 暴露于一级抗体试剂的玻片上的施加浓度、分配体积和表面积是已知的。可以合理地假设,在试剂的暴露时间内,大多数悬浮的抗体将会掉落并被受体抗原位点捕获。只有直接落在抗原位点上的那些才会被捕获,其余部分将通过缓冲液洗涤步骤洗掉。因此,可以在适当的条件下确定沉积的抗体浓度,例如,当浓度大于临界值25%以上且小于饱和值25%时,其中临界值定义为靶标位点密度不足以捕获所施加的蛋白质浓度;饱和值定义为所有施加的蛋白质都不能捕获的浓度。

[0169] 知道一级稀释比,就可以选择正确的一级靶标密度靶标,并可以验证一级浓度。

[0170] 在本发明一实施方式中,每种二级和一级靶标是混合[(小鼠或兔)+(驴+交联剂+真菌抑制剂)]或[(KLH与抗原A或KLH与抗原B)+(未结合的KLH+交联剂+真菌抑制剂)]的混合物。每个点的总蛋白质体积相同,但是由于构成特定靶标的蛋白质之间的原子质量可能不同,因此必须对混合比例进行微调。

[0171] 小鼠IgG=155kDa

[0172] 兔IgG=150kDa

[0173] 驴IgG=160kDa

[0174] 与抗原肽链结合的KLH亚基,其中亚基为KLH1和KLH2=350和390kDa。

[0175] 在本发明另一实施方式中,2D二级靶标梯度是1至1000:1的逐步稀释增量,优选地,遵循 $-20\log(\text{稀释度})$ 曲线,其中稀释增量为 -3dBd 步长。术语 $-20\log(\text{稀释度}) = \text{dBd}$ 均指以半对数形式描述稀释度,以使数据线性化,从而可以轻松施加修饰性术语。术语(稀释度)是指稀释X,其中X为[1..1000],等于1:1至1000:1。术语dBd定义为稀释度或稀释强度的分贝。修饰性术语包括:抗原修复损伤、酶增益、一级抗体试剂稀释度。单种2D/3D靶标用于测量2D基片和3D粒子之间的染色密度增量。可以将增量施加于2D阵列的其余部分,以产生与在组织切片中或上看到的3D表现非常匹配的颜色密度比例。

[0176] 二级100%2D/3D和2D靶标验证了这两种沉积物在2D染色密度方面是匹配的。这证明了3D粒子成分没有消耗足够的100%蛋白质材料导致2D成分的移动。

[0177] 二级染色剂具有介于1和20倍之间的酶增益功能,这是染色剂的结构功能。因此,随着增益的增加,较低浓度的二级靶标将变为饱和,当增益下降至1时,只有较高浓度的二级靶标会被明显染色。

[0178] 由于二级和一级靶标蛋白之间的大小差异很可观,因此通过一级蛋白建立蛋白质浓度密度。

[0179] 在平均一级抗体原子质量为150kDa的情况下,单种抗体的重量为150kDa (1.6605×10^{12}),相当于 249×10^{-12} ng的重量。如果我们选择将玻片的单种区域作为唯一暴露部分,那么我们可以获知施加的一级试剂的量。因此,在内部尺寸为 $20.3\text{mm}^2 \times 0.14\text{mm}$ 高的封闭毛细管间隙,体积为 $57.2\mu\text{L}$ 。直径为1mm的靶标区域的比率,其将产生 2.832nL 施加的一级抗体试剂。

[0180] 将一级抗体试剂从其浓缩物稀释至 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的中间稀释液。然后将中间稀释液从1:1稀释到1000:1,涂布到玻片上。这导致稀释比例从1:1至25.1:1的31.5至7.08抗体分别沉积在1平方微米区域上。

[0181] 为了确保100%的捕获能力,一级靶标应具有100至1000倍的安全系数。选择1000倍选项,则一级靶标需要包含 4×10^6 个抗原位点。尽管KHL亚基大于所施加的抗体,但这种增加不足以使捕获抗体的数量超过1:1。每种KLH亚基的平均原子质量为370kDa,相当于 614.4×10^{-12} ng的重量。

[0182] 可以从蛋白质的分子量和平均蛋白质部分比容非常简单且可靠地估计蛋白质分子的体积。(部分比容=体积/分子量。)实验确定的可溶性球状蛋白质部分比容的平均值为 $\sim 0.73\text{cm}^3/\text{g}$ 。该值因蛋白质而异,但是范围很窄。反应式减少到 $\sim (1.212 \times 10^3 \times \text{MW}) \text{nm}^3$ 的蛋白质体积。因此,对于KLH亚基个体体积是 448.44nm^3 。如果将蛋白质建模为球体,则球体的直径将变为 $0.132 \times \text{MW}^{1/3}$,单位为nm。对于KLH亚基,是 9.436nm 。

[0183] 对于1mm的靶标直径,KLH亚基的单层需要 11.237×10^{27} 蛋白。对于 4×10^6 蛋白质的有效靶标密度,最小稀释比变为 $1:2.8 \times 10^{21}$ 。实际上,任何接近1:1000的稀释度都是可行的,因为对一级抗体的评估主要取决于其活性蛋白的浓度。因此,靶标密度仅受其低浓度下限限制。

[0184] 在一实施方式中,二级靶标阵列为1至1000:1的逐步稀释增量。稀释度的线性斜率为 $\text{dBd} = -20 \log(\text{稀释度})$ 。对于列出的1至1,000:1的稀释范围,半对数范围为0dB至-60dBd。选择-3dB稀释步长,二级靶标稀释度变为:-0、-3、-6、-9、-12、-15、-18、-21dBd。

[0185] 二级和一级靶标阵列均不可逆地固定,并且在AR过程中比组织或AR靶标的降解程度小得多。降解来自可断裂而不是完整蛋白质的蛋白片段。随着AR过程继续作用于蛋白质靶标和组织切片,可以看到AR损伤是因为梯度比例模式向100%位置移动。另一方面,二级酶的增加导致梯度阵列向10%的位置移动。酶的增益为:1、2、4、5、8、10、15和20。这些转换通过以下方式将二级阵列移向10%靶标:

[0186] 1.20倍所有靶标移动-26dBd

[0187] 2.15倍所有靶标移动-23.52

[0188] 3.10倍所有靶标移动-20

[0189] 4.5倍所有靶标移动-13.98

[0190] 5.4倍所有靶标移动-12.04

[0191] 6.2倍所有靶标移动-6.02

[0192] 7.1倍仅2D 100%点接近黑色

[0193] 典型地,AR损坏会导致二级阵列向100%位置移动三个或更多点,这被认为是过多的,并且应使用酶含量更高的二级染色试剂盒或更高浓度的抗体重做玻片。

[0194] 一级抗原靶标颜色密度因此是抗体浓度乘以二级染色试剂盒的酶增益的总和。而

二级靶标密度仅为酶增益乘以二级靶标蛋白浓度。

[0195] 取决于数字成像系统,照明强度的变化会将图像的动态范围改变为压缩(变暗)或饱和(变亮)。这些变化将改变抗原的颜色标尺,而抗原密度的数字标尺不会改变。因此,数字标尺是独立的,而颜色标尺则取决于照明强度。

[0196] 在本发明一实施方式中,上述二级蛋白质靶标阵列形成两条线:一个小鼠IgG和另一种兔IgG与虚拟IgG血清蛋白混合,以形成五种或更多种成分梯度密度系列,其从-20log(稀释度)线性斜率中从最大密度至最小密度,其中初始1000:1稀释后,稀释可以从1:1至1000:1变化。

[0197] 在另一实施方式中,在最后处理步骤中,所识别的那些抗原位点通过色原沉淀而变色。因此,小鼠和兔靶标阵列反映了二级染色试剂盒色原沉淀的-20log(稀释度)线性斜率。

[0198] 在另一实施方式中,用于形成一级抗原密度比例的方法的优选解决方案是成功地组成靶标混合物为基础,将它们沉积至粘结剂涂覆的玻片上,并且在粘结剂和靶标材料之间具有共价键。

[0199] 在另一实施方式中,推断靶标阵列成功地应用并且一级和二级染色试剂合理执行,因此通过计算机算法能够容易得到数据集之间的拟合曲线。在另一实施方式中,一级染色可以选自任意IHC批准的使用的小鼠或兔宿主蛋白的抗体,其也不与荧光标记物结合或与酶位点(诸如HRP或AP)结合。在另一实施方式中,二级染色剂可以选自但不限于具有1倍至25倍的酶增益的二级染色剂,其分别在小鼠和兔之间是唯一独立的,各自使用不同的颜色色原。

[0200] 在本发明另一实施方式中,需要注意的是,绝对地基于一种玻片的性能结果可能与在另一个时间做的另一种玻片的性能结果不同。这是由于二级染色试剂盒的性能与一级结合的一级抗体的性能不同而引起的。但是,任何一个过程记录玻片的性能,抗原比例都是有效的,并且与使用不同染色试剂完成的另一张玻片具有相当的等效性。

[0201] 在另一实施方式中,将一级抗原浓度比例施加于共存组织切片,以接近检测到的细胞缺陷例如癌症的组织切片。

[0202] 本文描述的各种实施方式为示例。对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本文所呈现的本发明的更广泛范围的情况下,可以进行各种修改并且可以使用其他实施方式。本发明旨在涵盖示例性实施方式上的这些和其他变化。

[0203] 实施例

[0204] 以下实施例以阐释本发明的方式呈现,不应被解释为以任何方式限制本发明的范围:

[0205] 实施例1石蜡屏蔽涂层的喷涂方法

[0206] 用低气流喷涂在表面上。优选低液体与空气的混合。混合物通过掩膜被喷涂到玻片上,以涂覆PRS靶标。典型地需要经过1-2次形成厚度小于5微米的层,而无需重新加热以使石蜡密封流动。将石蜡混合物储存器和喷头都加热到略高于56°C,以确保石蜡为液体,并在从喷头飞向玻片的过程中维持为液体。来自喷头的喷洒覆盖范围大约0.375英寸。如果单次工序,则将需要重新加热以确保100%密封。

[0207] 实施例2石蜡屏蔽涂层的丝网印刷方法

[0208] 通过使电流经过两个平行侧边之间的丝网来加热不锈钢丝网。丝网的温度需要略低于石蜡熔化温度,以使石蜡不会渗透至丝网的底侧。基本上,石蜡更表现为糊剂而不是液体。PRS需要再加热以确保100%密封。

[0209] 实施例3石蜡屏蔽涂层的喷墨法

[0210] 喷墨头需要在打印头内具有集成的加热器,以保持石蜡处于液态。玻片上的后再热循环将确保100%密封。

[0211] 实施例4石蜡屏蔽涂层的辊转移印刷法

[0212] 加热的辊将石蜡膜从加热的储存器上拉到辊上。辊用拉毛辊涂刷墙壁的方式大致一样的方式将石蜡膜转印到玻片上。玻片上的后加热循环将确保100%密封。

[0213] 实施例5抗原修复暴露与PRS靶标的降解

[0214] 测试研究试图验证AR暴露的变化将在2D二级靶标和AR靶标中看到。

[0215] 预期结果是暴露时间和蛋白质降解的线性斜率。然而结果不是这样。这是因为AR缓冲液不是在预热的状态下加到玻片上,而是必须将其加热到92°C至95°C之间的工作温度。因此,忽略使AR缓冲液高于89°C所花费的时间,则斜率是线性的。使用带有PRS黑/白靶标的8位数字化来设置最佳白平衡和对比度,斜率是1.31sb/分钟,+/-0.21sb。超过89°C时间标记的20分钟后,50%的靶标受到了巨大的压力,二级靶标系列的有效性受到了损害。

[0216] 实施例6二级靶标的一致性

[0217] 测试研究具有两个要探索的因素:

[0218] I. 二级蛋白质的单个混合批次内的玻片之间的点对点。

[0219] II. 二级蛋白质阵列不同结构的玻片之间的点对点。

[0220] 单个混合批次测试使用了100%和40%的靶标制剂。印刷一百张玻片,并全部用购自Scytek的亲素-生物素复合(Avidin-Biotin Complex) (ABC)型小鼠和兔二级染色试剂盒处理。未执行抗原修复,因为它仅添加了一个附加变量。两者的分布均在1.5%以内。

[0221] 实施例7假蛋白质的选择

[0222] 由两种不同批次的小鼠、兔和牛IgG蛋白制成十个不同的二级稀释组。稀释度为100%,40%和20%小鼠和牛以及兔和牛。100%和40%稀释组的分布在1.5%以内。20%稀释组显示出意外的染色密度增加。从这些数据中,我们发现了牛与ABC染色试剂盒的生物素化山羊抗多价试剂之间的相互作用。通过用驴代替牛解决了该问题。重复测试,现在20%组保持在1.5%以内。

[0223] 实施例8 PRS-IHC的质量控制用途

[0224] 在QC模式下,如图3所示,共存靶标提供IHC过程反馈。显示了四行二级阵列,其区别在于标称、超过、非常超过和过度超过分别是5%、10%、30%和40%的范围内执行抗原恢复的程度。抗原恢复过程试图通过撤销甲醛和蛋白质之间的席夫碱键来显露抗原位点。抗原变为显露的速度在大程度上取决于反应的温度。随着温度升高,发生有泡核沸腾的机会。泡核沸腾对组织和蛋白质沉积物均造成物理损害。理想地,抗原恢复活性在玻片上是均匀的,但实际上不会发生,因此产生的区域具有或多或少的抗原恢复活性,取决于所使用的方法和环境。假设具有统一的抗原恢复活性,则以下可用于指示该玻片可用于诊断测定。

[0225] 如果AR最小或过多,二级阵列可能无法反映故障。但是,两个AR靶标将发出过多故障条件的信号。

[0226] a. 低AR被视为固定靶标下的2D/3D和固定靶标上的2D均为黑色。二级阵列看上去最佳,靶标也没有向左移动的AR。在下列情况下,IHC染色器中可以出现低AR活性:

[0227] i. AR加热器不工作或设置在80℃以下

[0228] ii. AR缓冲液具有中性pH值7,而不是6或9

[0229] iii. 曝光时间太短

[0230] b. 高AR被认为是固定靶标下的2D/3D变得非常白,并且固定靶标上的2D少于50%黑色。二级阵列也将大体上变白。在下列情况下,IHC染色器中可以出现低AR活性:

[0231] i. 加热器工作温度>95℃

[0232] ii. 曝光时间过长

[0233] c. 在两种情况下会产生色原沉淀错误:

[0234] i. 如果在高浓度下,二级靶标的染色强度下降,而不是在最大暗度下降。二级阵列应始终相对于站点密度增加。如果不是,色原沉淀将耗尽二次试剂盒的容量。解决方法是增加一级抗体稀释度(等同于降低抗体浓度)。

[0235] ii. 自激活以来,色原试剂已经变质(通常发生在DAB中)。解决方案是使用新的DAB混合物。

[0236] 根据一级抗体的浓度和二级染色试剂盒的酶增益,染色可经历饱和或临界。饱和是指酶位点的密度超过从色原中沉淀出着色剂的能力。换句话说,染色颜色尽可能深。当一级抗体的浓度和二级染色试剂盒的酶增益过低时,会发生临界,导致无法看到足够的着色剂沉淀。这两个因素导致二级线的暗度转移到饱和(100%)或临界(0%)。根据图3,这种移动被视为靶标数量可见。随着二级酶增益的增加,100%的点密度将移向0%的位置。常见的酶增益为:1、2、4、5、8、10、15和20。这些转换通过以下方式将二级阵列移向0%位置:

[0237] 1. 20倍所有靶标移动-26dBd

[0238] 2. 15倍所有靶标移动-23.52

[0239] 3. 10倍所有靶标移动-20

[0240] 4. 5倍所有靶标移动-13.98

[0241] 5. 4倍所有靶标移动-12.04

[0242] 6. 2倍所有靶标移动-6.02

[0243] 7. 1倍仅2D 100%点接近黑色

[0244] 如果存在一级靶标阵列,二级酶增益的增加将使染色密度向低一级浓度点移动。如果一级抗体浓度增加,情况也是如此。抗原修复过程将导致一级和二级靶标均降解到一定水平,从而逆转向临界移动。如果在IHC染色结束时有三个或三个以上的点消失了,则可以认为玻片的抗原修复时间、温度或两者过高,并且组织中丢失了过多的抗原,从而使诊断解释不重要。因为已经证明二级染色受到损伤,该决定与一级抗体的功效无关。抗体步骤上的没有什么能克服这个损害水平。

[0245] 实施例9 PRS以其抗原密度比例跟踪照明度

[0246] 就照明度而言,通过常规显微镜观察显微镜玻片是主观的。在整个玻片成像(WSI)中,扫描仪使用完美的白孔穴和黑孔穴来建立白平衡和对比度。手动显微镜不是这种情况。图4示出了照明度过暗(最佳为-5%),最佳(+0)和过亮(如+10或+15%)时对图像的影响。当光线水平低于最佳时,染色密度会降低。就癌症阶段而言,这可能会使诊断比原有的高一

级。当光水平高于最佳时,图像会褪色。就癌症阶段而言,这可能会使诊断比原有的低一级。抗原颜色密度和数字标尺由一级和二级靶标形成,并可以叠加在WSI图像上。数值比例是独立项,而颜色密度是相关项。当将抗原密度颜色和数字标尺应用于WSI时,随着用户上下移动照明度,数值刻度保持固定。另一方面,随着照明度的变化,颜色浓度刻度也会发生变化。优势在于,用户可以选择将表观照明向上/向下移动到组织图像上的最佳“可见”特征,而不会丢失颜色密度的数值关系。随着放大倍率的改变,这也将起作用。

[0247] 实施例10抗原密度标尺的构建

[0248] 可以通过两种形式建立抗原密度标尺。

[0249] 1. 类型A基于这种假设:相对于组织抗原位点,一级抗体总是相对于组织抗原位点施加少于10%的过量抗体。

[0250] 2. B型使用一级抗原梯度密度阵列。

[0251] 类型A:仅基于二级的抗原标尺

[0252] 这种形式仅使用二级靶标阵列。嵌入2D条形码中传递的信息包括(a)一级抗体数据:抗体的宿主物种和-dBd稀释度,以及(b)二级酶增益。

[0253] 二级梯度密度靶阵列由靶标之间的-3dBd递减后的已知浓度的蛋白质组成。通过用于一级抗体的最小稀释度选择最大浓度。大多数用户采用抗体试剂制造商提供的浓度规格,并稀释至1ug/ml的恒定中间浓度。由此,根据需要进行所有其他稀释以适应不同的组织类型。通常,第二组一级抗体稀释度在1:1至1000:1之间。

[0254] 为了适应二级酶的增益范围,二级阵列必须由更宽范围的稀释度组成。因此,以-3dBd的步长,二级阵列的最低稀释度开始于1,000:1或-60dBd,其以SdBd表示。然后,8点序列的最大值变为-0dBd或1:1。抗原修复的作用降解了以ARdBd为代表的二级蛋白质。在二级阵列中的八个点中每一个点代表-3dBd的增量。丢失两个靶标(不再可见)的抗原修复损失将为+6dBd。这意味着对于2D靶标,二级阵列为(-S+AR) dBd,或者为[+6至-54dBd]。现在必须考虑抗体浓度和二级酶增益。抗体浓度为AdBd,而酶增益为EdBd。因此,二级阵列为(-S+AR-E) dBd,而组织将为(+AR-E+A) dBd。下一个必须施加的因素是100%2D到3D差异。100%2D/3D靶标中的3D对象与100%2D之间的染色差别代表二次染色色原沉淀常数,该常数用于给颜色密度赋予数值刻度,并赋予为DdBd。颜色密度的差异将应用于阵列中的每种2D靶标。因此,2D阵列的染色颜色密度为(+AR-E+A+D) dBd。

[0255] 如果酶增益为10倍,则E=-20dBd。然后,2D二级阵列将变为:-14、-17、-20、-23、-26、-29、空白、空白dBd。朝向0%的两个点已被抗原修复过程完全损坏,以致于无法通过染色恢复,因此空白。例如,如果2D/3D颜色密度差为10倍,则D=+20dBd,使3D二级阵列达到-34、-37、-40、-43、-46、-49、空白、空白dBd。假定一级抗体试剂在一级靶标中找到合适的抗原位点,产生100%收率。还假设即使每种KLH蛋白有两种以上的抗原肽链,但每种KLH蛋白只有一种抗体能有效结合并被染色。在同一KLH蛋白质上的任何找到合适抗原的附加的抗体,由于重叠占位,会被防止实现被二级染色。因此,每种一级抗原携带的可被检测到的蛋白质中的抗原位点数目是一种。由于一级靶标每微米包含的蛋白质数量与二级相同,因此将500ug/ml抗体母液的一级稀释度应用于二级阵列数据,以将二级颜色密度调整为数值抗原密度。监视二级靶标,选择具有中间颜色密度的靶标。中间颜色密度定义为最大黑色和最大白色之间的50%点。则该点等于3dBd范围之外的1.5dBd。然后,该点将起到锚点的功能,

根据该锚点建立抗原密度尺。使用高于中点的最后一种靶标范围将变为-41.5dBd。

[0256] 二级蛋白质被稀释至10 μ g/ml主稀释液。每种阵列是小鼠或兔与驴IgG蛋白混合而成的混合物。尽管蛋白质的原子量均不同,但以下假设所有蛋白质均为150kDa,并且每种靶标点的蛋白质总数恒定,混合比不恒定。目前,仅考虑反应蛋白的浓度。在150kDa,单个蛋白质分子量MW=249.07 $\times 10^{-12}$ ng。标准靶标点的直径为1mm。如果印刷的沉淀物厚度为1 μ m,并且沉淀物浓度为10 μ g/mL,则将沉淀31.5 $\times 10^6$ 个蛋白质。直径为1 μ m的区域将包含31.5种蛋白质。如果我们允许一种蛋白质等于一种抗原位点,则可以确定抗原密度。二级阵列每次沉积使用相同数量的蛋白质,但是随着小鼠或兔浓度的降低,小鼠或兔与驴之间的比率也会发生变化。100%的靶标完全是小鼠或兔,并且与标尺上的0dBd点匹配。

[0257] 仅当一级抗体结合到组织上的抗原位点时,二抗才会在组织上染色。它并不特别取决于所施加抗体的浓度,除了必须提供足够的抗体浓度以结合可用的抗原位点外。因此,在组织上的抗原密度度量保持恒定,但是必须针对抗原修复损伤和二级酶增益校正数值。然后必须统一颜色密度与数值测量值。

[0258] 在先前的实施例中,酶增益是10倍,并且抗原修复已导致二级阵列损失了两个点。酶增益为-20dBd,而抗原修复损失为+6dBd。结果是-14dBd。稀释后将转化为:

| 数值密度 dBd | 颜色密度 dBd | %靶标 小鼠/兔: 驴 | 1 μ m ² 内的 小鼠/兔 抗原密度 |
|-------------|-------------|----------------|---|
| 0 | -14 | 100 | 31.5 |
| -3 | -17 | 70.8 | 23.32 |
| [0259] -6 | -20 | 50.1 | 15.78 |
| -9 | -23 | 35.5 | 11.18 |
| -12 | -26 | 25.1 | 7.90 |
| -15 | -29 | 17.78 | 5.60 |
| -17 | -32 | 12.59 | 3.96 |
| -20 | -35 | 9.9 | 3.12 |

[0260] 类型B: 基于一级抗原的标尺

[0261] 这种形式使用一级和二级靶标阵列。嵌入2D条形码中传递的信息包括(a)一级抗体数据: 抗体的宿主物种和-dBd稀释度,以及(b)二级酶增益。批次号数据包括有关使用哪个一级靶标组合的信息。

[0262] 如果存在一级靶标系列,则其将是3个点,其中最浓缩的点与二级阵列具有相同的100%浓度,但是这些点以-6dBd的步长间隔开。实际上,一级阵列和二级阵列具有相同的稀释斜率。一级靶标变为:-0、-6、-12dBd,并表示为PdBd。可以合理预期抗原修复损伤与二级阵列几乎相同。一级阵列受二级染色剂作用,因此具有相同的酶增益功能。因此,一级阵列为(-A+AR-E) dBd,其中一级靶标密度由一级抗体稀释度对照。唯一的要求是P始终大于A。

对于10倍的酶增益=-20dBd以及+6dbd抗原修复损失,一级阵列为-20、-26、-32dBd。基于对二级阵列的影响,抗原修复损失不能作用于主要靶标上,不足以将其消灭。尽管二级阵列足以产生抗原密度标尺,但重要的是要验证一级稀释度的正确使用。因此,一级靶标以这种能力发挥作用。

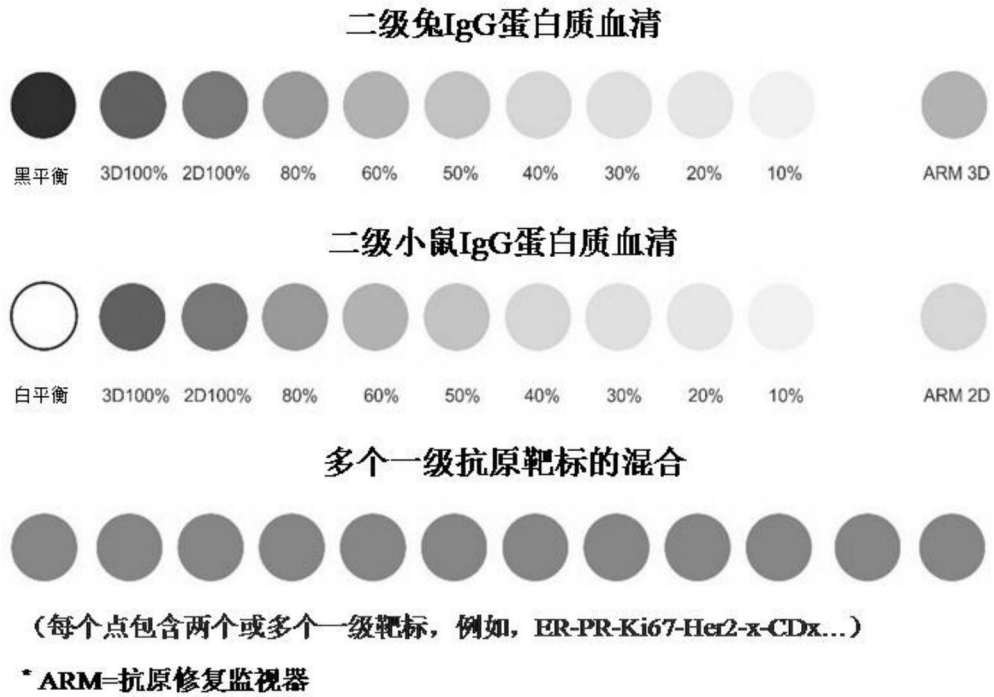


图1

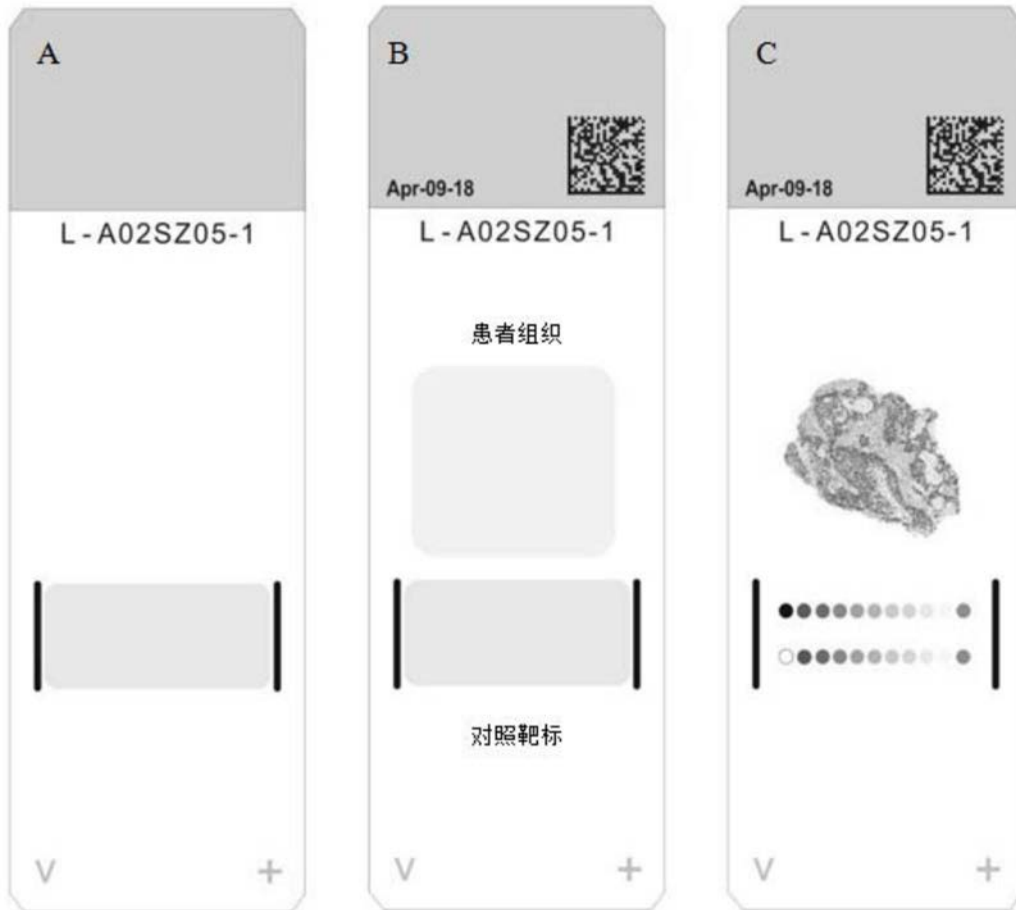


图2

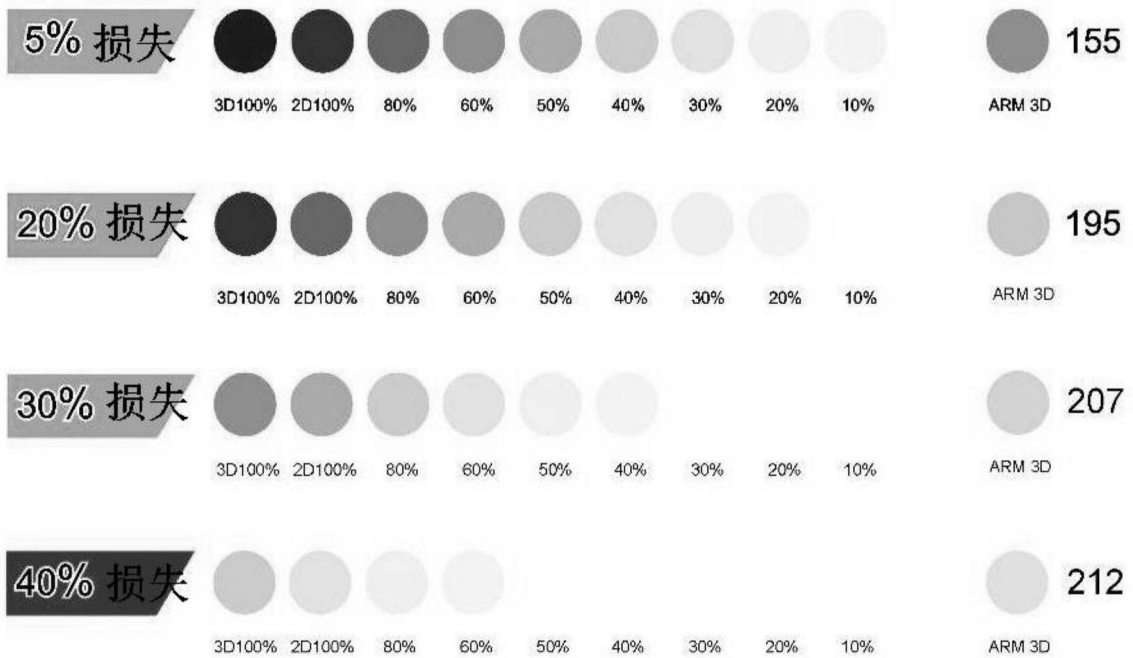


图3

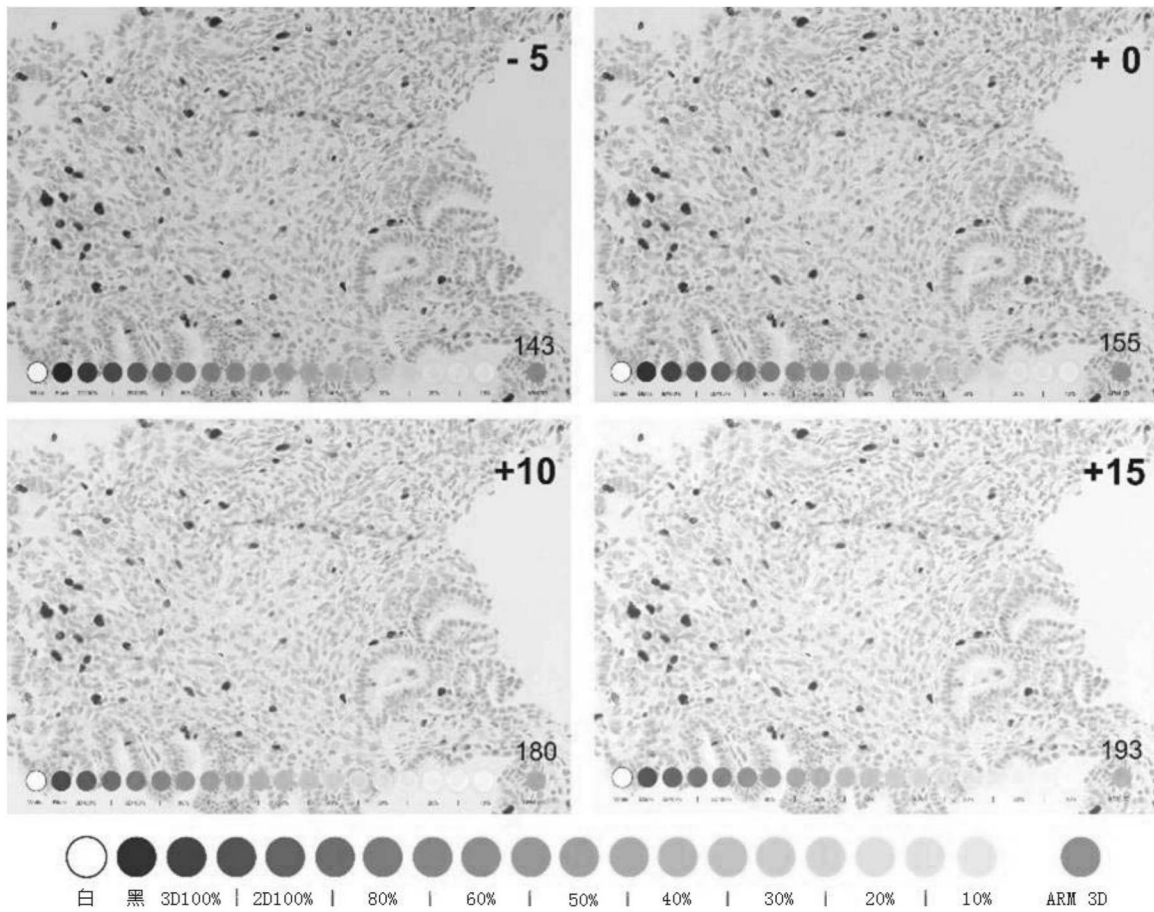


图4

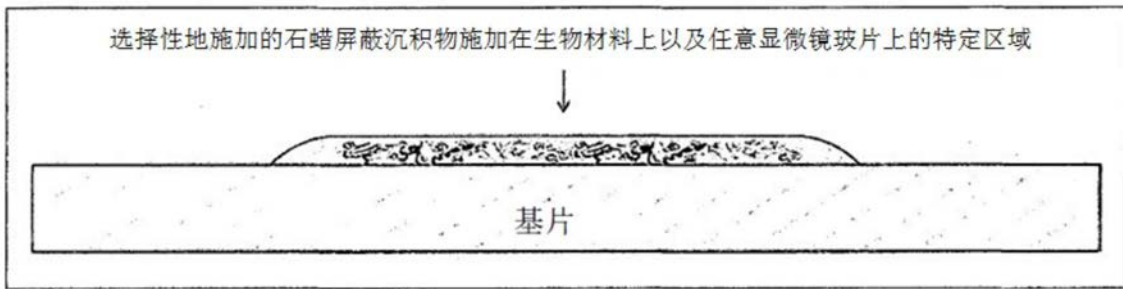


图5

| | | | |
|---------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于免疫组化染色的过程记录玻片 | | |
| 公开(公告)号 | CN110741302A | 公开(公告)日 | 2020-01-31 |
| 申请号 | CN201880039196.1 | 申请日 | 2018-06-15 |
| 发明人 | 弗雷德里克·克努特·哈舍 岑子祥 | | |
| IPC分类号 | G02B21/34 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | G01N1/30 G01N33/543 G01N33/54393 G01N33/574 G02B21/34 | | |
| 代理人(译) | 熊永强 | | |
| 优先权 | 62/520169 2017-06-15 US 62/520178 2017-06-15 US 62/520187 2017-06-15 US 62/520319 2017-06-15 US 62/539281 2017-07-31 US | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种用于确定在试验过程中，特别是多步免疫组化(IHC)试验中石蜡去除、抗原修复以及使用的一级和二级染色试剂的效果的装置和方法。所述装置包括粘合剂涂覆的显微镜玻片，所述显微镜玻片包含以2D或3D结构作点涂并密封在石蜡涂层下的多种化合物。随后，将组织切片或疏松细胞加到同一玻片上，并且全部经历从组织捕获到盖玻片施加的IHC处理步骤。所述化合物与一级或二级IHC染色试剂反应，以记录共存组织切片或疏松细胞的处理经历。

