



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104620107 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 13

(21) 申请号 201380048061. 9

代理人 黄登高 林森

(22) 申请日 2013. 07. 12

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/53(2006. 01)

13/551190 2012. 07. 17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 03. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/050218 2013. 07. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/014754 EN 2014. 01. 23

(71) 申请人 通用电气公司

地址 美国纽约州

(72) 发明人 A. 苏德 W. 高 M. J. 格尔德斯

F. M. 金蒂 A. E. 塞波 E. M. 科林斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

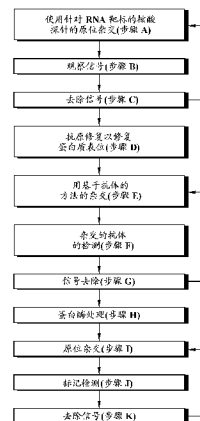
权利要求书2页 说明书24页 附图5页

(54) 发明名称

检测生物样品中 DNA、RNA 和蛋白质的方法

(57) 摘要

提供了探测生物样品中的多种靶标的新方法,其中所述靶标是DNA、RNA和蛋白质。所述方法包括使用与RNA靶标结合的标记的核酸探针使所述样品经历原位杂交反应,观察信号,和任选地去除所述信号。所述方法进一步包括抗原修复方案,观察信号,去除所述信号,和任选地应用蛋白酶处理以接近所述样品的DNA靶标,使用标记的核酸探针使所述样品经历原位杂交反应,观察来自所述标记的DNA靶标的信号,和任选地去除所述信号。



1. 探测生物样品中的多种靶标的方法,包括以下步骤:
 - (a) 使用与 RNA 靶标直接或间接结合的标记的核酸探针,使所述样品经历原位杂交反应;
 - (b) 观察来自与 RNA 靶标结合的所述标记的探针的信号;
 - (c) 任选地去除来自所述标记的探针的信号;
 - (d) 使所述样品经历抗原修复方案,以修复所述样品的蛋白质表位;
 - (e) 使用基于抗体的方法使所述样品经历原位杂交反应并将一种或多种抗体探针与所述样品上的抗原连接;
 - (f) 观察来自所述一种或多种抗体探针的信号;
 - (g) 去除来自所述抗体探针的信号;
 - (h) 任选地应用蛋白酶处理以接近所述样品的 DNA 靶标;
 - (i) 使用直接或间接标记所述样品的一种或多种 DNA 靶标的标记的核酸探针使所述样品经历原位杂交反应;
 - (j) 观察来自所述标记的 DNA 靶标的信号;
 - (k) 任选地去除来自一种或多种标记的 DNA 靶标的信号。
2. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 (a) 中使用标记的核酸探针的原位杂交反应包括与靶向相同 RNA 靶标的多种探针杂交。
3. 权利要求 1 的方法,其中步骤 a 进一步包括封闭 DNA 的预杂交步骤,在所述杂交反应中使用封闭剂,或其组合。
4. 权利要求 1 的方法,其中在观察来自与 RNA 靶标结合的标记的探针的信号后,所述样品经历步骤 c,并且用针对不同 RNA 靶标的其它标记的核酸探针将步骤 a、b 和 c 重复一次或多次。
5. 权利要求 1 的方法,其中使用基于抗体的方法的原位杂交反应包括免疫组织化学(IHC)或免疫荧光(IF)技术。
6. 权利要求 5 的方法,其中抗体探针包含超过一种探针的混合物。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述混合物包含 2-10 种探针。
8. 权利要求 5 的方法,其中至少一种抗体探针与酶标记、荧光信号发生器或其组合缀合。
9. 权利要求 5 的方法,其中在观察和去除来自所述一种或多种抗体探针的信号后,用针对不同抗原的另一抗体探针将步骤 e、f 和 g 重复一次或多次。
10. 权利要求 1 的方法,进一步包括在蛋白酶处理后保持组织形态学、预杂交或其组合的步骤。
11. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (i) 中的原位杂交包括用基于核酸的结合剂处理以形成沃森-克里克键、Hoogsteen 键或其组合。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述核酸结合剂的长度范围为约 4 个核苷酸至约 1000 个核苷酸。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述核酸结合剂的长度范围为约 12 个核苷酸至约 400 个核苷酸。
14. 权利要求 1 的方法,其中在观察来自与 DNA 靶标结合的标记的探针的信号后,用针

对不同 DNA 靶标的另一标记的核酸探针将步骤 I、j 和 k 重复一次或多次。

15. 权利要求 1 的方法,其中在步骤 c、g 和 i 中信号的去除了包括信号灭活剂、光反应、光活化化学漂白、探针剥离、氧化、电子转移或其组合。

16. 权利要求 1 的方法,进一步包括用一种或多种对照探针对所述样品染色以允许记录样品的多个图像。

17. 权利要求 16 的方法,其中所述对照探针是形态学染色剂。

18. 权利要求 16 的方法,进一步包括记录样品的多个图像,其中记录包括:

从步骤 b、f、j 或其组合获得样品的多个图像;

按照自对照探针检测的信号,比对和覆盖多个图像。

19. 权利要求 18 的方法,进一步包括根据覆盖的图像来分析蛋白质、RNA 和 DNA 的表达的步骤。

20. 权利要求 1 的方法,进一步包括测定在观察步骤 b、f、j 或其组合中观察到的一种或多种信号强度值。

21. 权利要求 20 的方法,其中测定一种或多种信号强度值包括信号放大技术。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述信号包括荧光信号、显色探针或其组合。

23. 权利要求 22 的方法,进一步包括测定所述强度值与所述样品中存在的靶标量的相关性。

24. 权利要求 1 的方法,其中所述样品包含细胞样品或组织样品。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述样品包括福尔马林固定的、石蜡包埋的 (FFPE) 组织样品。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述石蜡包埋的组织样品在步骤 a 前脱蜡。

27. 权利要求 1 的方法,其中所述样品包括细胞悬液,例如造血细胞或循环肿瘤细胞。

28. 权利要求 27 的方法,其中步骤 a 包括在溶液中使悬浮中的样品经历原位杂交反应。

29. 权利要求 1 的方法,包括在单一组织切片中检测 3 种或更多种靶标,其中所述靶标包含至少一种 DNA、一种 RNA 和一种蛋白质靶标。

30. 权利要求 29 的方法,进一步包括检测形态学靶标。

检测生物样品中 DNA、RNA 和蛋白质的方法

[0001] 背景

多种不同方法可用于生物学和医学中,以观察生物样品中的不同靶标。例如,组织切片和其它细胞制备物中的蛋白质分析可使用组织化学、免疫组织化学(IHC)、或免疫荧光的技术来进行。

[0002] 重复分析单个样品的方法描述于美国专利号 7,629,125 和美国专利号 7,741,046。具体地讲,美国专利号 7,741,046 提供了检测生物样品中的多个靶标的方法,其包括利用氧化以灭活信号发生器(例如,漂白荧光染料)。

[0003] 蛋白质和 DNA 靶标的原位检测常规用作癌症控制的诊断工具。近年来已经开发了在相同组织切片中同时检查这些靶标的方法,以测定这些标记彼此的相关性以及这些标记与临床参数的相关性。另一重要的细胞靶标是 RNA。已经鉴定了多种不同的 RNA 种类,除了作为蛋白质合成的模板外,它们中的许多例如 miRNA 还控制基因表达并因此控制细胞功能和/或疾病进程。RNA 稳定性提出了独特的挑战性并且通常需要极其谨慎以防 RNA 酶污染。因此适当的是在过程早期进行 RNA 检测。然而,在福尔马林固定的石蜡包埋的组织中进行 RNA 检测的现有方法通常是在广泛蛋白酶处理后进行,这与蛋白质靶标的下游检测不相容。

[0004] 本文公开的是检测 RNA 种类的方法,无需蛋白酶处理并且在相同样品中同时检测 3 种靶标:蛋白质、DNA 和 RNA。每种靶标在正常细胞功能和疾病进程中起到重要作用并且需要特定的样品制备物,其不必与所有靶标相容。在相同样品中的原位检测将允许更好地测定这些不同靶标的表达之间的相关性和更好地分析它们与疾病的关系。

[0005] 简述

本文公开的是探测生物样品中的多种靶标的新方法,其中所述靶标是 DNA、RNA 和蛋白质。

[0006] 在某些实施方案中,公开了包括多个步骤的探测生物样品中的多种靶标的方法。所述步骤包括使用与 RNA 靶标直接或间接结合的标记的核酸探针,使所述样品经历原位杂交反应,观察来自与 RNA 靶标结合的标记的探针的信号,和任选地去除来自所述标记的探针的信号。所述方法进一步包括使所述样品经历抗原修复方案的步骤,以修复所述样品的蛋白质表位,使用基于抗体的方法使所述样品经历原位杂交反应并将一种或多种抗体探针与所述样品上的抗原结合,观察来自所述一种或多种抗体探针的信号,去除来自所述抗体探针的信号,任选地应用蛋白酶处理以接近所述样品的 DNA 靶标,使用直接或间接标记所述样品的一种或多种 DNA 靶标的标记的核酸探针使所述样品经历原位杂交反应,观察来自所述标记的 DNA 靶标的信号,和任选地去除来自一种或多种标记的 DNA 靶标的信号。

[0007] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括用一种或多种对照探针对所述样品染色以允许记录样品的多个图像和任选地记录样品的多个图像。再其它实施方案包括根据多个图像来分析蛋白质、RNA 和 DNA 的表达的方法。

[0008] 附图描述

图 1 是探测生物样品中的多种靶标的方法的示意图,其中所述靶标包括 RNA、DNA 和蛋

白质。

[0009] 图 2a 显示 II 级肺鳞状细胞癌的多重 RNA、蛋白质和 DNA 染色, A: 细胞核用 DAPI 染色, B: U6 RNA, C: EGFR, D: 细胞角蛋白 7, E: IGF1R, F: NaKATP 酶, G: cMET 和 H: EGFR。

[0010] 图 2b, 图组 I & J 是图 2a 的图组 G & H 的相同视野切片的放大: 未观察到明显的 cMET 染色。

[0011] 图 3a 显示肺转移性腺癌的多重 RNA、蛋白质和 DNA 染色。A: 细胞核用 DAPI 染色, B: U6 RNA, C: EGFR, D: 细胞角蛋白 7, E: IGF1R, F: NaKATP 酶, G: cMET 和 H: EGFR。

[0012] 图 3b, 图组 I & J 是图 3a 的图组 G & H 的相同视野切片的放大。

[0013] 发明详述

为更清楚和简明地阐述并指出所要求保护发明的主题, 对下文描述和所附权利要求书中使用的特定术语提供了以下定义。

[0014] 单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数对象, 除非上下文中另有明确说明。本文贯穿说明书和权利要求书所用的近似措辞, 可应用于修饰任何数量表示, 这些数量表示在不导致对其涉及的基本功能改变的情况下可允许变化。因此, 由术语例如“约”修饰的值并不限于所指定的精确值。除非另有说明, 在说明书和权利要求书中所用的表示成分、特性例如分子量、反应条件等等的量的所有数字应理解为在所有的情况下由术语“约”修饰。因此, 除非有相反的说明, 否则在以下说明书和所附权利要求书中提及的数字参数都是近似值, 其可根据本发明试图获得的所需特性而变化。至少各个数字参数应至少根据所报告的有效数字的位数并通过应用普通的四舍五入技术来解释。

[0015] 本文使用的术语“抗体”是指与另一分子的特定空间和极性组构特异性地结合并由此定义为与其互补的免疫球蛋白。抗体可以是单克隆或多克隆的并可通过本领域熟知的技术制备, 所述技术例如使宿主免疫并收集血清(多克隆), 或通过制备连续杂交细胞系并收集分泌的蛋白质(单克隆), 或通过克隆和表达编码至少天然抗体的特异性结合所需的氨基酸序列的核苷酸序列或其突变形式。抗体可包括完全的免疫球蛋白或其片段, 所述免疫球蛋白包括各种类型和同种型, 例如 IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3、IgM。功能性抗体片段可包括能够保持以类似于全长抗体的亲和力结合的抗体部分(例如, Fab、Fv 和 F(ab')₂ 或 Fab')。此外, 在合适时, 可以使用免疫球蛋白或其片段的聚集体、聚合物和缀合物, 只要能基本上维持对特定分子的结合亲和力。

[0016] 本文使用的术语“结合剂”是指可结合生物样品中的一种或多种靶标的分子。结合剂可与靶标特异性地结合。合适的结合剂可包括一种或多种天然的或修饰的肽、蛋白质(例如, 抗体、亲和体(affibodies) 或适体)、核酸(例如, 多核苷酸、DNA、RNA 或适体); 多糖(例如, 凝集素、糖)、脂质、酶、酶底物或抑制剂、配体、受体、抗原或半抗原。合适的结合剂可根据待分析的样品和可供检测之用的靶标进行选择。例如, 样品中的靶标可包括配体且结合剂可包括受体, 或者靶标可包括受体且结合剂可包括配体。类似地, 靶标可包括抗原并且结合剂可包括抗体或抗体片段, 或者反之亦然。在一些实施方案中, 靶标可包括核酸并且结合剂可包括互补的核酸。在一些实施方案中, 靶标和结合剂两者可包括能够彼此结合的蛋白质。

[0017] 本文使用的术语“生物样品”是指得自生物受试者的样品, 包括在体内或体外获得

的生物组织或液体来源的样品。这样的样品可以是但不限于从哺乳动物（包括人）分离的体液（例如，血、血浆、血清或尿）、器官、组织、级分和细胞。生物样品还可包括生物样品的切片，包括组织的切片（例如，器官或组织的切片部分）。生物样品还可包括来自生物样品的提取物，例如来自生物液体（例如，血或尿）的抗原。

[0018] 生物样品可以是原核来源或真核来源（例如，昆虫、原生动物、鸟、鱼、爬行动物）。在一些实施方案中，生物样品是哺乳动物（例如，大鼠、小鼠、牛、狗、驴、豚鼠或兔）。在某些实施方案中，生物样品具有灵长类动物来源（例如，黑猩猩或人）。

[0019] 本文使用的术语“探针”是指具有结合剂和标记（例如信号发生器或酶）的试剂。在一些实施方案中，结合剂和标记（信号发生器或酶）包含在单一实体中。结合剂和标记可直接连接（例如，经由结合到结合剂中的荧光分子）或间接连接（例如，通过接头，其可包括切割位点）并以单一步骤应用于生物样品。在备选的实施方案中，结合剂和标记包含在分开的实体（例如，能够结合靶标和酶的第一抗体或者能够结合第一抗体的信号发生器-标记的第二抗体）中。当结合剂和标记（信号发生器或酶）是分开的实体时，它们可以单一步骤或多个步骤应用于生物样品。本文使用的术语“荧光探针”是指具有偶联于荧光信号发生器的结合剂的试剂。

[0020] 本文使用的术语“信号发生器”是指能够使用一种或多种检测技术（例如，光谱测定法、热量测定法、光谱法或肉眼检查）提供可检测的信号分子。可检测的信号合适实例可包括光信号和电信号、或放射性信号。信号发生器的实例包括发色团、荧光团或拉曼-活性标签或放射性标记中的一个或多个。如上所述，关于探针，在某些实施方案中信号发生器和结合剂可存在于单一实体（例如，含有荧光标记的靶标结合蛋白）中。或者，结合剂和信号发生器可以是在引入样品之前或之后彼此缔合的分开的实体（例如，受体蛋白和针对该特定受体蛋白的标记的抗体）。

[0021] 本文使用的术语“对照探针”是指具有与信号发生器偶联的结合剂或能够直接染色的信号发生器的试剂，以致信号发生器在与用于灭活荧光探针的信号灭活剂溶液接触后保留至少 80% 的信号。对照探针中的合适的信号发生器当与信号灭活剂接触时，基本上不被灭活。信号发生器的合适实例可包括放射性标记或非氧化的荧光团（例如，DAPI）。

[0022] 本文使用的术语“酶”是指能催化底物的化学反应的蛋白质分子。在一些实施方案中，合适的酶催化底物的化学反应，形成能结合于存在于样品或样品所结合的固体支持物中的受体（例如，酚基）的反应产物。受体可以是外源性的（即，受体非固有地粘附于样品或固体-支持物）或内源性的（受体固有地存在于样品或固体支持物中）。合适的酶的实例包括过氧化物酶、氧化酶、磷酸酯酶、酯酶和糖苷酶。合适的酶的具体实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、脂肪酶和葡糖氧化酶。

[0023] 本文使用的术语“酶底物”是指被酶化学催化以形成反应产物的化合物。在一些实施方案中，反应产物能够结合存在于样品或样品所结合的固体支持物中的受体。在一些实施方案中，本文方法中使用的酶底物可包括非-发色的或非-化学发光的底物。信号发生器可与酶底物连接作为标记。

[0024] 本文使用的术语“发色团”是指分子的一部分，其中两个不同分子轨道之间的能量差异落入可见光谱的范围内。发色团可为造成分子颜色的原因，所述分子颜色受到某波长的可见光的吸光度或者其它波长的透光率或反射率的影响。

[0025] 本文使用的术语“荧光团”或“荧光信号发生器”是指当通过暴露于特定波长的光激发时,发射不同的波长的光的化合物。荧光团可根据其发射特征或“颜色”进行描述。绿色荧光团(例如Cy3、FITC和俄勒冈绿(Oregon Green))的特征可在于其以通常在515-540纳米范围内的波长发射。红色荧光团(例如得克萨斯红(Texas Red)、Cy5和四甲基罗丹明)的特征可在于其以通常在590-690纳米范围内的波长发射。荧光团的实例包括但不限于,4-乙酰氨基-4'-异硫氰酸根合芪(isothiocyanatostilbene)-2,2'-二磺酸、吡啶、吡啶和吡啶异硫氰酸酯的衍生物、5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)、4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苯基]萘二甲酰亚胺-3,5二磺酸酯(Lucifer Yellow VS)、N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺、邻氨基苯甲酰胺、亮黄(Brilliant Yellow)、香豆素、香豆素衍生物、7-氨基-4-甲基香豆素(AMC、Coumarin 120)、7-氨基-三氟甲基香豆素(Coumaran 151)、焰红染料(cyanosine);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、5',5''-二溴邻苯三酚-磺酞(溴邻苯三酚红)、7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸基苯基)-4-甲基香豆素、-4,4'-二异硫氰酸根合二氢-芪-2,2'-二磺酸、4,4'-二异硫氰酸芪-2,2'-二磺酸、5-[二甲基氨基]萘-1-磺酰氯(DNS、丹磺酰氯)、曙红、曙红衍生物例如异硫氰酸曙红、赤藓红、赤藓红衍生物例如赤藓红B和异硫氰酸赤藓红;溴乙啶(ethidium);荧光素和衍生物例如5-羧基荧光素(FAM)、5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素(DTAF)、2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、QFITC(XRITC);荧光胺衍生物(与胺反应时发荧光);IR144;IR1446;异硫氰酸孔雀绿;4-甲基伞形酮;邻甲酚酞;硝基酪氨酸;副品红;酚红、B-藻红蛋白质;邻苯二甲醛衍生物(与胺反应时发荧光);苌和衍生物例如苌、丁酸苌和1-苌丁酸琥珀酰亚胺基酯;活性红4(Cibacron. RTM. 亮红3B-A)、罗丹明和衍生物例如6-羧基-X-罗丹明(ROX)、6-羧基罗丹明(R6G)、丽丝胺罗丹明B磺酰氯、罗丹明(Rhod)、罗丹明B、罗丹明123、异硫氰酸罗丹明X、磺基罗丹明B、磺基罗丹明101和磺基罗丹明101的磺酰氯衍生物(得克萨斯红);N,N,N',N'-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA);四甲基罗丹明、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC);核黄素;玫红酸和镧系元素螯合物衍生物、量子点、花菁、pyrelium染料和方酸菁(squaraines)。

[0026] 本文使用的术语“原位”通常指在原始位置例如在完整的器官或组织或者在器官或组织的代表性片段中发生的事件。在一些实施方案中,靶标的原位分析可在从多种来源获得的细胞上进行,所述来源包括生物体、器官、组织样品或细胞培养物。原位分析提供情境信息(contextual information),而这样的信息在将靶标从其起源部位移出时可能会丧失。因此,靶标的原位分析描述了位于全细胞或组织样品中的靶标-结合的探针的分析,而不管靶标-结合的探针保留在细胞内时细胞膜是否完全完整或是部分地完整。此外,本文公开的方法可用于原位分析固定的或未固定的细胞或组织样品中的靶标。

[0027] 本文使用的术语信号灭活剂是指可直接灭活信号或在灭活剂存在时照射样品之后灭活信号的化学物。

[0028] 本文使用的术语“照射”或“辐射”是指样品或溶液暴露于非-电离辐射的作用或过程。在一些实施方案中,非-电离照射具有350 nm和1.3 μm之间的波长。在优选的实施方案中,非-电离辐射是400-700 nm波长的可见光。照射可通过使样品或溶液暴露于辐射源例如能够发射某一波长或一定范围波长的辐射的灯而实现。在一些实施方案中,能够经历光激发的分子因照射而被光激发。在一些实施方案中,能够经历光激发的分子是信号

发生器,例如,荧光信号发生器。在一些实施方案中,荧光信号发生器的照射启动荧光信号发生器和信号灭活剂之间的光反应。在一些实施方案中,照射启动通过光活化化学漂白而基本上灭活信号发生器的光反应。在其它实施方案中,信号灭活剂经历光激发以产生反应性部分,其与信号发生器反应以灭活信号。光学滤波器可用于将样品或溶液的照射限制于某一特定波长或一定范围的波长。在一些实施方案中,光学滤波器可用于将照射限制在窄范围的波长,以选择性光激发能够经历光激发的一个或多个分子。术语“选择性光激发”指一种作用或过程,藉此使能够经历光激发的一个或多个分子在能够经历光激发的一个或多个其它分子(其在照射后保持在基础电子状态)的存在下被光激发。

[0029] 在某些实施方案中,能够经历光激发的分子是荧光染料,例如,花菁染料。在一个进一步的实施方案中,采用限制在 620-680 nm 之间的波长范围的照射以选择性光激发 Cy5 染料。在备选的实施方案中,以特定波长照射样品也可通过使用激光来实现。

[0030] 本文使用的术语“过氧化物酶”是指催化酶底物与电子供体一起的氧化反应的一类酶。过氧化物酶的实例包括辣根过氧化物酶、细胞色素 C 过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、微过氧化物酶、髓过氧化物酶、乳过氧化物酶或大豆过氧化物酶。

[0031] 本文使用的术语“过氧化物酶底物”是指被过氧化物酶化学催化而形成反应产物的化合物。在一些实施方案中,用于本文方法中的过氧化物酶底物可包括非-发色的或非-化学发光的底物。荧光信号发生器可与过氧化物酶底物连接作为标记。

[0032] 本文使用的术语“漂白”、“化学漂白”、“光活化化学漂白”或“光致化学漂白”是指一种作用或过程,藉此由信号发生器生成的信号在光反应的过程中被改变。在某些实施方案中,信号发生器被不可逆地改变。

[0033] 在某些实施方案中,信号由于光活化化学漂白作用而被减弱或消除。在一些实施方案中,信号发生器被完全漂白,即信号强度减少约 100%。在一些实施方案中,信号是光信号,而信号发生器是光信号发生器。本文使用的术语“光激发”指一种作用或过程,藉此分子在吸收辐射能例如在照射后从基础电子状态向激发电子状态跃迁。光激发的分子可参与化学反应,例如,参与电子转移反应。在一些实施方案中,能够经历光激发的分子是信号发生器,例如,荧光信号发生器。

[0034] 本文使用的术语“光反应”或“光致反应”是指由于至少一种反应物的光激发而启动和/或进行的化学反应。光反应中的反应物可以是电子转移试剂和能够经历光激发的分子。在一些实施方案中,光反应可包括自电子转移试剂至已经历光激发的分子(即,光激发的分子)的电子转移。在备选的实施方案中,光反应也可包括将电子从已经历光激发的分子转移至电子转移试剂。在一些实施方案中,能够经历光激发的分子是荧光信号发生器,例如荧光团。在一些实施方案中,光反应导致光反应的一种或多种成分的不可逆的改变。在一些实施方案中,光反应通过光活化化学漂白而基本上灭活信号发生器。

[0035] 在某些实施方案中,光反应可包括电子转移试剂和光激发的分子之间的分子间电子转移,例如,当电子转移试剂和光激发的分子之间的连接是短暂的,恰好在电子转移之前形成和电子转移后断开时,发生电子转移。

[0036] 在某些实施方案中,光反应可包括电子转移试剂和光激发的分子之间的分子内电子转移,例如当在启动电子转移过程之前电子转移试剂和光激发的分子例如通过共价或静电相互作用已经连接在一起时,发生电子转移。例如,当能够经历光激发的分子和电子转移

试剂携带相反电荷并形成通过静电相互作用保持的复合物时,可发生涉及分子内电子转移的光反应。例如,阳离子染料(例如阳离子花菁染料)和三苯基丁基硼酸盐阴离子可形成复合物,其中在照射时在花菁和硼酸盐部分之间可发生分子内电子转移。在其它实施方案中,电子转移过程可以是分子间的过程。

[0037] 本文使用的术语“固体支持物”是指存在于生物样品中的靶标可固定于其上且随后可经本文公开的方法检测的制品。靶标可通过物理吸附、通过共价键形成或通过其组合固定在固体支持物上。固体支持物可包括聚合物、玻璃或金属材料。固体支持物的实例包括膜、微量滴定板、珠、滤器、测试条、载玻片、盖玻片和试管。

[0038] 本文使用的术语“特异性结合”是指两种不同分子中的一种对另一种的特异性识别,相比之下,对其它分子的识别显著更少。所述分子可在其表面上或其腔内具有区域,引起这两种分子之间的由静电相互作用、氢键或疏水相互作用中的一种或多种而产生的特异性识别。特异性结合的实例包括但不限于抗体-抗原相互作用、酶-底物相互作用、多核苷酸相互作用等。在某些实施方案中,在例如 pH 约 6 至约 8 和温度范围约 0° C 至约 37° C 的周围条件下,结合剂分子对靶标的固有平衡缔合常数 (K_A) 可以是不小于约 $10^5 M^{-1}$ 。

[0039] 本文使用的术语“靶标”是指生物样品的成分,当其存在于生物样品中时可被检测到。靶标可以是对其存在天然存在的特异性结合剂(如,抗体)的任何物质,或对其可制备特异性结合剂(例如,小分子结合剂或适体)的任何物质。一般来说,结合剂可通过靶标的一个或多个分开的化学部分或靶标的三维结构成分(例如,由肽折叠造成的 3D 结构)结合于靶标。靶标可包括天然的或修饰的肽、蛋白质(例如,抗体、亲和体或适体)、核酸(例如,多核苷酸、DNA、RNA 或适体);多糖(例如,凝集素或糖)、脂质、酶、酶底物、配体、受体、抗原或半抗原中的一种或多种。在一些实施方案中,靶标可包括蛋白质或核酸。

[0040] 本发明包括通常涉及可应用于分析、诊断或预后应用的方法的实施方案,所述方法例如分析物检测、组织化学、免疫组织化学、免疫荧光、显色原位杂交或荧光原位杂交(FISH)。在一些实施方案中,本文公开的方法可以特别地应用于组织化学、免疫染色、免疫组织化学、免疫测定或免疫荧光。在一些实施方案中,本文公开的方法可特别地应用于免疫印迹技术,例如,蛋白质印迹或免疫测定例如酶-联免疫吸附测定(ELISA)。

[0041] 所公开的方法通常涉及检测单一生物样品中的多种靶标。在一些实施方案中,公开了在单一生物样品中使用相同的检测通道检测多种靶标的方法。靶标可存在于悬浮中的细胞的表面,存在于细胞学涂片表面,存在于组织学切片表面,存在于细胞阵列或细胞裂解物阵列表面,存在于固体支持物(例如凝胶、印迹、玻璃载玻片、珠或 ELISA 板)的表面。本文公开的方法可允许检测相同生物样品中的多种靶标,对生物样品的完整性具有很少或没有影响。检测在相同生物样品中的靶标可进一步提供关于在生物样品中的靶标的空间信息。本文公开的方法还可应用于这样的分析应用,在所述分析应用中有限量的生物样品可用于分析,并且所述样品可能必须经过处理以用于多重分析。本文公开的方法还可有利于固态样品(例如,组织切片)或附着于固体支持物的样品(例如,印迹)的多重分析,而基本不剥离(stripping)靶标。此外,相同的检测通道可用于检测样品中的不同靶标,使得能够对多重靶标的分析有更少的化学需要。所述方法可进一步促进基于检测方法的分析,其由于可解析信号的限制造成的同时可检测靶标的数目可受到限制。例如,使用基于荧光的检测,可同时检测的靶标的数目可被限制为约 4 个,因为仅有约 4 个荧光信号可基于其激发

和发射波长特性而被解析。在一些实施方案中,本文公开的方法可允许使用基于荧光的检测系统,检测大于 4 个靶标。

[0042] 在某些实施方案中,检测生物样品中的 DNA、RNA 和蛋白质靶标的方法包括序贯检测生物样品中的靶标。所述方法通常包括以下步骤:检测生物样品中的第一靶标,使用化学剂改变来自第一靶标的信号,和检测生物样品中的第二靶标。所述方法可以进一步包括重复改变来自第二靶标的信号的步骤,接着检测生物样品中的第三靶标,等等。

[0043] 在某些实施方案中,所述生物样品可以是附着于固体支持物或在悬浮中,例如但不限于在生物流体(包括血液样品)中的造血细胞或循环肿瘤细胞。因此在某些实施方案中,检测生物样品中的 DNA、RNA 和蛋白质靶标包括序贯检测生物样品中的靶标,其中所述生物样品处于悬浮;例如在溶液中的原位杂交反应。

[0044] 图 1 是所述方法的一个实施方案的示意图,其中自生物样品的石蜡或冷冻切片制备生物样品并使用针对 RNA 靶标的一种或多种特异性标记的核酸探针,使所述生物样品经历原位杂交(步骤 A)。接着是步骤 B,观察来自直接或间接连接到探针上的标记的信号,和如果在重复步骤 A-C 的多重循环中检测到多种 RNA 时任选地步骤 C 去除来自 RNA 探针的信号。

[0045] 进一步如图 1 所示,随后可使样品经历抗原修复和检测。这示于步骤 D 中,藉此样品可经历抗原修复方案,以修复蛋白质表位。抗原修复可包括但不限于热诱导方法或蛋白质水解消化。

[0046] 在某些实施方案中,接着是步骤 E,使用基于抗体的方法杂交到靶标上并将抗体探针连接到抗原上。这也可导致去除来自 RNA 探针的信号。在某些实施方案中,可以使用标准免疫组织化学(IHC)或免疫荧光(IF)技术。一旦杂交完成,通过直接或间接方法进行杂交抗体的检测(步骤 F),接着去除来自抗体探针的信号(步骤 G)。步骤 E-G 可以重复多次以检测多种蛋白质。

[0047] 然后应用蛋白酶处理以(步骤 H)显露或接近, DNA 靶标接着原位杂交方法(ISH)以连接和靶向 DNA(步骤 I),和检测直接或间接连接到探针上的标记(步骤 J)。在某些实施方案中,通过信号灭活或探针剥离可以进行额外的(步骤 K)信号去除,如果额外的 DNA 靶标待检出的话。在某些实施方案中,可使用显色检测。

[0048] 在某些实施方案中,在蛋白酶处理后可应用保持组织形态学、预杂交的步骤或类似处理步骤。

[0049] 在某些实施方案中,可以添加用一种或多种对照探针例如形态学染色剂例如 DAPI 使样品染色的步骤。对照探针可以一次或多次应用于样品。在某些实施方案中,这可允许根据形态学标记记录多个图像,使得可以获得具有检测的生物标记的样品的一个或多个复合图像。

[0050] 在某些实施方案中,步骤 A、B 和 C、步骤 E、F 和 G、和步骤 I、J 和 K 可以重复多次。

[0051] 在某些实施方案中,生物样品可含有附着于固体支持物的多种靶标。在某些实施方案中,生物样品可包括组织样品、全细胞、细胞组分、细胞离心涂片或细胞涂片。在某些实施方案中,生物样品基本上包括组织样品或组织成分。组织样品可包括获自生物受试者组织且可具有相似功能的相似细胞的集合。在某些实施方案中,组织样品可包括得自人体组织的相似细胞的集合。人体组织的合适实例包括但不限于(1)上皮组织;(2)结缔组织,包

括血管、骨和软骨；(3) 肌肉组织；和(4) 神经组织。组织样品来源可以是得自新鲜、冷冻和/或防腐的器官或组织样品或活检或吸出物的实体组织；血液或任何血液组分；体液例如脑脊液、羊膜液、腹膜液或间隙液；或来自受试者的妊娠或发育的任何时间的细胞。在某些实施方案中，组织样品可包括原代细胞或经培养的细胞、循环的患病或正常细胞例如循环肿瘤细胞、响应感染因子的活化的白细胞、或细胞系。

[0052] 在某些实施方案中，生物样品包括来自健康或患病组织样品的组织切片（例如来自结肠、乳腺组织、前列腺的组织切片）。组织切片可包括一份或一件组织样品，例如，从组织样品切下的薄片组织或细胞。在某些实施方案中，可以采集组织样品的多个切片，例如组织微阵列，并对其进行分析，只要本文公开的方法可以用于分析组织样品的相同切片的至少 3 种不同种类的靶标（在分子水平上，例如 RNA、蛋白质和 DNA）。在某些实施方案中，可以分析组织样品的相同切片的至少 4 种不同靶标（在形态学或分子水平上）。在某些实施方案中，可以分析组织样品的相同切片的多于 4 种不同靶标（在形态学或分子水平上）。在某些实施方案中，可以同时于形态学或分子水平上分析组织样品的相同切片。

[0053] 组织切片，如果用作生物样品的话，厚度范围可为小于约 100 微米、小于约 50 微米、小于约 25 微米、或小于约 10 微米。

[0054] 在某些实施方案中，生物样品或生物样品中的靶标可附着于固体支持物上。固体支持物可包括微阵列（例如 DNA 微阵列或 RNA 微阵列）、凝胶、印迹、载玻片、珠或 ELISA 板。在某些实施方案中，生物样品或生物样品中的靶标可以附着于选自尼龙、硝基纤维素和聚偏二氟乙烯的膜。在某些实施方案中，固体支持物可包括选自聚苯乙烯、聚碳酸酯和聚丙烯的塑料表面。

[0055] 本发明一个实施方案的生物样品可以是固体或液体。生物样品的合适实例可以包括但不限于细胞培养物、血液、血浆、血清、唾液、脑脊液、胸膜液、乳、淋巴、痰、精液、尿、粪、泪、唾液、针吸出物、皮肤的外部切片、呼吸道、肠道或泌尿生殖道、肿瘤、器官、细胞培养物或细胞培养物组分、或实体组织切片。在某些实施方案中，无需收获和/或分离目标靶标就可以按原样分析生物样品。

[0056] 生物样品可包括任何前述样品，无论其物理状况如何，例如但不限于经冷冻或染色或经其它处理。在某些实施方案中，生物样品可包括在自然界不与样品天然混合的化合物，例如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。

[0057] 所述样品可以是冷冻组织切片或石蜡包埋的样品。石蜡样品是指这样的样品：其中生物样品先前已经固定例如在多聚甲醛中，然后在蜡中包埋。在某些实施方案中，组织样品可以先经固定，然后再经递增系列的醇而脱水，用石蜡或其它切片介质浸润并包埋，以便可对组织样品切片。在一个替代实施方案中，可对组织样品进行切片并随后固定。在一些实施方案中，可将组织样品包埋在石蜡中并在其中处理。可使用的石蜡的实例包括，但不限于，Paraplast、Broid 和 Tissuemay。一旦组织样品被包埋，样品可经切片切成厚度范围为约 3 微米至约 5 微米的切片。一旦被切片，则可使用粘合剂将切片附着在载玻片上。载玻片粘合剂的实例可包括但不限于，甲硅烷、明胶、聚-L-赖氨酸。在实施方案中，如果石蜡用作包埋料，则可将组织切片去石蜡化并在水中再水合。组织切片可例如，通过使用有机试剂（如，二甲苯和逐渐递减系列的醇或去垢剂）而去石蜡化。

[0058] 在某些实施方案中，除了以上讨论的样品制备程序外，在原位杂交和/或免疫组

织化学之前、期间或之后,组织切片可经受进一步的处理。例如,在一些实施方案中,组织切片可经过表位修复方法,例如,将组织样品在柠檬酸盐缓冲液中加热。在一些实施方案中,组织切片可任选地经过封闭步骤,以使任何非特异性结合最少化。

[0059] 在某些实施方案中,生物样品或生物样品的一部分,或存在于生物样品中的靶标(例如细胞裂解物)可附着在固体支持物(例如凝胶、印迹、载玻片、珠或 ELISA 板)的表面上。在一些实施方案中,存在于生物样品的靶标可附着在固体支持物的表面上。在生物样品中的靶标可通过物理键形成、通过共价键形成或二者附着在固体支持物上。

[0060] 待分析的靶标的适用性可通过生物样品所需的分析类型和性质确定。在一些实施方案中,靶标可提供有关生物样品中分析物的存在或不存在的信息。在另一个实施方案中,靶标可提供有关生物样品的状态的信息。例如,如果生物样品包括组织样品,则本文公开的方法可用于检测以下靶标:其可有助于比较不同类型的细胞或组织,比较不同的发育阶段,检测疾病或异常的存在,或确定疾病或异常的类型。

[0061] 在某些实施方案中,生物样品中的靶标可包括以下的一种或多种:肽、蛋白质(例如,抗体、亲和体或适体)、核酸(例如,多核苷酸、DNA、RNA 或适体);多糖(例如,凝集素或糖)、脂质、酶、酶底物、配体、受体、抗原或半抗原。在一些实施方案中,靶标可基本包括蛋白质或核酸。上述靶标中的一种或多种可以是特定细胞所特有的,而其它靶标可与特定疾病或病症相关。在一些实施方案中,可使用本文公开的方法检测和分析的靶标可包括但不限于,预后靶标、激素或激素受体靶标、淋巴靶标、肿瘤靶标、细胞周期相关的靶标、神经组织和肿瘤靶标、或簇分化的靶标。

[0062] 预后靶标的合适的实例可包括酶促靶标例如半乳糖基转移酶 II、神经元特异性烯醇酶、质子 ATP 酶 -2 或酸性磷酸酶。

[0063] 激素或激素受体靶标的合适实例可包括人绒毛膜促性激素(HCG)、促肾上腺皮质激素、癌胚抗原(CEA)、前列腺-特异性抗原(PSA)、雌激素受体、黄体酮受体、雄激素受体、gC1q-R/p33 补体受体、IL-2 受体、p75 神经营养蛋白受体、PTH 受体、甲状腺激素受体或胰岛素受体。

[0064] 淋巴靶标的合适实例可包括 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -1-抗胰蛋白酶、B 细胞靶标、bcl-2、bcl-6、B 淋巴细胞抗原 36 kD、BM1(髓性靶标)、BM2(髓性靶标)、半乳糖素-3、颗粒酶 B、HLA I 型抗原、HLA II 型(DP)抗原、HLA II 型(DQ)抗原、HLA II 型(DR)抗原、人嗜中性粒细胞防卫素、免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 D、免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M、 κ 轻链、 κ 轻链、 λ 轻链、淋巴细胞/组织细胞抗原、巨噬细胞靶标、胞壁质酶(溶菌酶)、p80 间变性(anaplastic)淋巴瘤激酶、浆细胞靶标、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂、T 细胞抗原受体(JOVI 1)、T 细胞抗原受体(JOVI 3)、末端脱氧核苷酸转移酶或非簇集(unclustered) B 细胞靶标。

[0065] 肿瘤靶标的合适实例可包括 α 甲胎蛋白、载脂蛋白 D、BAG-1(RAP46 蛋白)、CA19-9(唾液酸基路易斯寡糖(sialyl lewisa))、CA50(癌相关粘蛋白抗原)、CA125(卵巢癌抗原)、CA242(肿瘤相关粘蛋白抗原)、嗜铬粒蛋白 A、簇蛋白(载脂蛋白 J)、上皮膜抗原、上皮-相关抗原、上皮特异性抗原、巨囊性病液体蛋白-15、肝细胞特异性抗原、调蛋白(heregulin)、人胃粘蛋白、人乳脂肪球、MAGE-1、基质金属蛋白酶、黑素 A、黑素瘤靶标(HMB45)、间皮素、金属硫蛋白、小眼球转录因子(MITF)、Muc-1 核心糖蛋白、Muc-1 糖蛋白、

Muc-2 糖蛋白、Muc-5AC 糖蛋白、Muc-6 糖蛋白、髓过氧化物酶、Myf-3（横纹肌肉瘤靶标）、Myf-4（横纹肌肉瘤靶标）、MyoD1（横纹肌肉瘤靶标）、肌红蛋白、nm23 蛋白、胎盘碱性磷酸酶、前白蛋白、前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶、前列腺抑制素肽、PTEN、肾细胞癌靶标、小肠粘蛋白抗原、四连接素、甲状腺转录因子-1、基质金属蛋白酶 1 的组织抑制剂、基质金属蛋白酶 2 的组织抑制剂、酪氨酸酶、酪氨酸酶-相关蛋白-1、绒毛蛋白或血管假性血友病因子 (von Willebrand factor)。

[0066] 细胞周期相关的靶标的合适实例可包括细胞凋亡蛋白酶激活因子-1、bcl-w、bcl-x、溴脱氧尿苷、CAK (cdk-活化激酶)、细胞凋亡易感性蛋白质 (CAS)、胱冬蛋白酶 2、胱冬蛋白酶 8、CPP32 (胱冬蛋白酶-3)、CPP32 (胱冬蛋白酶-3)、细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞周期蛋白 A、细胞周期蛋白 B1、细胞周期蛋白 D1、细胞周期蛋白 D2、细胞周期蛋白 D3、细胞周期蛋白 E、细胞周期蛋白 G、DNA 断裂因子 (N-末端)、Fas (CD95)、Fas-相关死亡域蛋白、Fas 配体、Fen-1、IPO-38、Mcl-1、微小染色体维持蛋白、错配修复蛋白 (MSH2)、聚 (ADP-核糖) 聚合酶、增生细胞核抗原、p16 蛋白、p27 蛋白、p34cdc2、p57 蛋白 (Kip2)、p105 蛋白、Stat 1 α 、拓扑异构酶 I、拓扑异构酶 II α 、拓扑异构酶 III α 或拓扑异构酶 II β 。

[0067] 神经组织和肿瘤靶标的合适实例可包括 α B 晶体蛋白、 α -丝联蛋白、 α 突触核蛋白、淀粉样蛋白前体蛋白、 β 淀粉样蛋白、钙结合蛋白、胆碱乙酰转移酶、兴奋性氨基酸转运蛋白 1、GAP43、神经胶质纤维酸性蛋白、谷氨酸受体 2、髓鞘碱性蛋白、神经生长因子受体 (gp75)、成神经细胞瘤靶标、神经丝蛋白 68 kD、神经丝蛋白 160 kD、神经丝蛋白 200 kD、神经元特异性烯醇酶、烟碱型乙酰胆碱受体 α 4、烟碱型乙酰胆碱受体 β 2、外周蛋白、蛋白基因产物 9、S-100 蛋白、血清素、SNAP-25、突触蛋白 I、突触素、 τ 蛋白 (tau)、色氨酸羟化酶、酪氨酸羟化酶或遍在蛋白。

[0068] 簇分化靶标的合适实例可包括 CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16a、CD16b、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD44R、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、CDw60、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CDw92、CDw93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CDw108、CD109、CD114、CD115、CD116、CD117、CDw119、CD120a、CD120b、CD121a、CDw121b、CD122、CD123、CD124、CDw125、CD126、CD127、CDw128a、CDw128b、CD130、CDw131、CD132、CD134、CD135、CDw136、CDw137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CDw149、CDw150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158a、CD158b、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166 和 TCR- ζ 。

[0069] 其它的合适预后靶标可包括着丝粒蛋白-F (CENP-F)、巨蛋白、内披蛋白 (involucrin)、核纤层蛋白 A&C (XB 10)、LAP-70、粘蛋白、核孔复合物蛋白、p180 板层体蛋白、ran、r、组织蛋白酶 D、Ps2 蛋白、Her2-neu、P53、S100、上皮靶标抗原 (EMA)、TdT、MB2、

MB3、PCNA 或 Ki67。

[0070] 在步骤 A、B 和 C 中的 RNA 检测通常包括任选的预杂交步骤,通常用鲑鱼精子 DNA 或 tRNA 进行封闭,接着是杂交步骤,在升高温度时使用针对目标靶标的序列-特异性探针。在预杂交步骤不存在时,在杂交步骤期间使用封闭剂和探针本身。对于最佳信噪比,最佳探针浓度和温度通常凭经验来确定,但随探针 T_m 、缓冲剂组成和探针类型(例如 LNA 与 DNA 主链)而变。杂交时间也可明显不同,从约半小时或更短到过夜杂交并可由探针浓度来控制。杂交后样品经历一次或多次严格性洗涤以去除过量的和非特异性结合的探针。最终,如果信号发生器直接连接到探针时就直接检测探针,或用或不用信号放大而间接检测探针。可使用各种技术进行检测,包括但不限于手工观察、影片或其它记录设备、相机、视频记录或其组合。在某些实施方案中,可通过化学失活通过上述方法而去除信号并可探测样品的额外 RNA 种类。或者在下一步骤是蛋白质检测的其它实施方案中,可在抗原修复步骤期间通过因抗原修复过程所致的已结合探针的变性或信号的失活而去除信号,所述抗原修复过程包括在酸和 / 或碱中高温加热。

[0071] 在某些实施方案中,前述生物样品然后可以经历抗原修复和检测。抗原靶标可以存在于生物样品表面(例如,组织切片表面的抗原)。在一些实施方案中,抗原靶标可不固有地存在于生物样品表面,并且生物样品可能必须经处理,以使靶标在表面上为可利用的(例如,抗原修复、酶促消化或表位修复)。

[0072] 一般而言,如步骤 D 至 G 所示,在某些实施方案中,抗原修复后,抗原如先前所述经历与结合剂杂交。在某些实施方案中,结合剂包括与抗原结合的抗体。合适的抗体可包括单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体例如双特异性抗体、或抗体片段,只要它们与靶标抗原特异性结合。在某些实施方案中,本文公开的方法可以用于免疫组织化学(IHC)。免疫化学可以包括靶标抗原与基于抗体的结合剂结合,以提供有关组织或细胞的信息(例如,患病的细胞和正常的细胞)。适合作为本文公开方法的结合剂的抗体实例(和相应的疾病/患病细胞)包括但不限于抗雌激素受体抗体(乳腺癌)、抗黄体酮受体抗体(乳腺癌)、抗 p53 抗体(多种癌症)、抗 Her-2/neu 抗体(多种癌症)、抗 EGFR 抗体(表皮生长因子,多种癌症)、抗组织蛋白酶 D 抗体(乳腺癌和其它癌症)、抗 Bcl-2 抗体(凋亡细胞)、抗 E-钙黏蛋白抗体、抗 CA125 抗体(卵巢癌和其它癌症)、抗 CA15-3 抗体(乳腺癌)、抗 CA19-9 抗体(结肠癌)、抗 c-erbB-2 抗体、抗 P-糖蛋白质抗体(MDR, 多重耐药性)、抗 CEA 抗体(癌胚抗原)、抗成视网膜细胞瘤蛋白质(Rb)抗体、抗 ras 肿瘤蛋白(oneoprotein)(p21)抗体、抗 Lewis X(也称为 CD15)抗体、抗 Ki-67 抗体(细胞增殖)、抗 PCNA(多种癌症)抗体、抗 CD3 抗体(T-细胞)、抗 CD4 抗体(辅助 T 细胞)、抗 CD5 抗体(T 细胞)、抗 CD7 抗体(胸腺细胞,未成熟 T 细胞,NK 杀伤细胞)、抗 CD8 抗体(抑制 T 细胞)、抗 CD9/p24 抗体(ALL)、抗 CD10(也称为 CALLA)抗体(普通的急性成淋巴细胞性白血病)、抗 -CD11c 抗体(单核细胞、粒细胞、AML)、抗 -CD13 抗体(髓样单核细胞、AML)、抗 -CD14 抗体(成熟的单核细胞、粒细胞)、抗 -CD15 抗体(霍奇金氏病)、抗 -CD19 抗体(B 细胞)、抗 -CD20 抗体(B 细胞)、抗 -CD22 抗体(B 细胞)、抗 -CD23 抗体(激活的 B 细胞、CLL)、抗 -CD30 抗体(激活的 T 细胞和 B 细胞、霍奇金氏病)、抗 -CD31 抗体(血管发生标志物)、抗 -CD33 抗体(骨髓细胞、AML)、抗 -CD34 抗体(内皮干细胞、间质瘤)、抗 -CD35 抗体(树突细胞)、抗 -CD38 抗体(浆细胞、激活的 T、B 和骨髓细胞)、抗 -CD 41 抗体(血小板、巨核细胞)、抗 -LCA/CD45 抗体(白细胞普通

抗原)、抗-CD45RO 抗体(辅助、诱导 T 细胞)、抗-CD45RA 抗体(B 细胞)、抗-CD39、CD100 抗体、抗-CD95/Fas 抗体(细胞凋亡)、抗-CD99 抗体(尤因氏(Ewings)肉瘤标志物、MIC2 基因产物)、抗-CD106 抗体(VCAM-1;激活的内皮细胞)、抗-泛素蛋白抗体(阿尔茨海默氏病)、抗-CD71(运铁蛋白受体)抗体、抗-c-myc(肿瘤蛋白(oncoprotein)和半抗原)抗体、抗-细胞角蛋白(运铁蛋白受体)抗体、抗-波形蛋白(内皮细胞)抗体(B 细胞和 T 细胞)、抗-HPV 蛋白(人乳头状瘤病毒)抗体、抗- κ 轻链抗体(B 细胞)、抗- λ 轻链抗体(B 细胞)、抗-黑素体(HMB45)抗体(黑素瘤)、抗-前列腺特异性抗原(PSA)抗体(前列腺癌)、抗-S-100 抗体(黑素瘤、涎细胞、神经胶质细胞)、抗- τ 抗原抗体(阿尔茨海默氏病)、抗-纤维蛋白抗体(上皮细胞)、抗-角蛋白抗体、抗-细胞角蛋白抗体(肿瘤)、抗- α -连环蛋白抗体(细胞膜)或抗-Tn-抗原抗体(结肠癌、腺癌和胰腺癌)。

[0073] 合适抗体的其它特异性实例可包括,但不限于,抗增殖细胞核抗原、克隆 pc10 (Sigma Aldrich, P8825);抗平滑肌 α 肌动蛋白(SmA)、克隆 1A4 (Sigma, A2547);兔抗 β 连环蛋白(Sigma, C 2206);小鼠抗泛细胞角蛋白(anti pan cytokeratin)、克隆 PCK-26 (Sigma, C1801);小鼠抗雌激素受体 α 、克隆 1D5 (DAKO, M 7047); β 连环蛋白抗体、克隆 15B8 (Sigma, C 7738);山羊抗波形蛋白(Sigma, V4630);雄激素受体克隆 AR441 (DAKO, M3562);血管假性血友病因子 7、角蛋白 5、角蛋白 8/18、e-钙粘蛋白、Her2/neu、雌激素受体、p53、黄体酮受体、 β 连环蛋白;驴抗-小鼠(Jackson ImmunoResearch, 715-166-150);或驴抗兔(Jackson ImmunoResearch, 711-166-152)。

[0074] 在某些实施方案中,所述抗原检测过程可包括在适合结合剂与靶标(例如抗原)结合的条件下,使探针溶液(例如标记的抗体溶液)与生物样品接触足够时间。在某些实施方案中,可以使用两种检测方法:直接或间接。在直接检测中,可将信号发生器-标记的第一抗体(例如,荧光团-标记的第一抗体或酶-标记的第一抗体)与在组织样品或膜中的抗原一起孵育,其可以直接观察,无需进一步抗体相互作用。在间接检测中,可将未缀合的第一抗体与抗原一起孵育,然后可将标记的第二抗体与第一抗体结合。当若干第二抗体可与第一抗体上的不同表位反应时,可出现信号放大。在某些实施方案中,可使两种或更多种(最多 5 种)第一抗体(来自不同的种类,标记的或未标记的)与组织样品接触。然后可使未标记的抗体与相应的标记的第二抗体接触。在替代实施方案中,可以使用第一抗体和特异性结合配体-受体对(例如生物素-链霉抗生物素)。第一抗体可以与所述对的一个成员(例如生物素)连接而另一成员(例如链霉抗生物素)可以用信号发生器或酶来标记。第二抗体、抗生物素蛋白、链霉抗生物素或生物素可以用信号发生器或酶各自独立地标记。

[0075] 在第一抗体或第二抗体可以与酶标记缀合的实施方案中,可加入荧光信号发生器-偶联的底物以提供抗原的可视化。在某些实施方案中,所述底物和荧光信号发生器可以包括在单一分子中并且可以在单一步骤中应用。在其它实施方案中,所述底物和荧光信号发生器可以是不同的实体并且可在单一步骤或多个步骤中应用。

[0076] 可使与结合剂偶联的酶与底物反应以催化底物的化学反应,以使荧光信号发生器-偶联的底物与生物样品共价结合。在某些实施方案中,酶可包括辣根过氧化物酶,底物可包括酪胺。辣根过氧化物酶(HRP)与酪胺底物的反应可使酪胺底物与样品中存在的酚基共价结合。在使用酶-底物缀合物的实施方案中,当一个酶可催化多个底物分子时,可达

到信号放大。在某些实施方案中,使用间接检测方法(例如,使用第一-第二抗体)、使用HRP-酪胺信号放大方法、或这两者的组合(例如,间接HRP-酪胺信号放大方法),本文公开的方法可以用于检测低丰度的靶标。

[0077] 在某些实施方案中,信号放大技术与所述方法和相应的对应信号放大技术的结合可以取决于特定靶标所需的灵敏度和方案中包括的步骤数量。

[0078] 可使用各种观察或检测系统来检测信号发生器的信号。所用检测系统的性质可取决于所用信号发生器的性质。检测系统可包括电荷耦合器件(CCD)检测系统、荧光检测系统、电子检测系统、摄影胶片检测系统、化学发光检测系统、酶检测系统、光学检测系统、近场检测系统或全内反射(TIR)检测系统。

[0079] 前述技术的一种或多种可用于观察来自信号发生器(与结合剂偶联或与酶底物偶联)的信号的一个或多个特征。在某些实施方案中,使用前述技术的一种或多种可以测定信号强度、信号波长、信号位置、信号频率或信号移位。在某些实施方案中,可以观察、测量和记录信号的一个或多个前述特征。

[0080] 在某些实施方案中,所观察的信号是荧光信号,与生物样品中的靶标结合的探针可包括作为荧光团的信号发生器。在某些实施方案中,使用荧光检测系统,通过测定荧光波长或荧光强度来测定荧光信号。在某些实施方案中,可在原位观察信号,也就是说,可从通过结合剂与生物样品中的靶标缔合的信号发生器直接观察信号。在某些实施方案中,可在生物样品内分析来自信号发生器的信号,无需单独的基于阵列的检测系统。

[0081] 在某些实施方案中,观察信号可包括捕获生物样品的图像。在某些实施方案中,按照本文公开的方法,与成像设备连接的显微镜可用作检测系统。在某些实施方案中,信号发生器(例如,荧光团)可被激发并且所得信号(例如,荧光信号)可被观察并以数字信号的形式记录(例如,数字化图像)。对于样品中结合的不同的信号发生器(如果有的话),可以使用合适的荧光滤波器重复相同的程序。

[0082] 在某些实施方案中,在相同样品中可观察多个不同种类的信号。例如,可用荧光探针检测一种靶标,并可用显色探针检测相同样品中的第二靶标。

[0083] 在某些实施方案中,从抗体探针去除信号(步骤G)包括使生物样品与能够选择性地改变一种或多种信号发生器的化学剂接触。在某些实施方案中,所述化学剂是基本上同时灭活荧光信号发生器和酶的氧化剂。在某些实施方案中,化学剂可以基本上包括氧化剂的碱性溶液。

[0084] 在某些实施方案中不同的信号发生器对化学剂的敏感性可以部分地取决于信号发生器的浓度、温度或pH。例如,两种不同的荧光团对氧化剂可具有不同敏感性,这取决于氧化剂的浓度。

[0085] 合适的氧化剂可以选自过氧化物、高碘酸钠或臭氧。在某些实施方案中,合适的氧化剂可包括过氧化物或过氧化物来源,碱性溶液可包括过氧化氢。可以选择碱性溶液中的过氧化氢浓度,使得在预定时间周期内基本上氧化荧光信号发生器。在某些实施方案中,可以选择碱性溶液中的过氧化氢浓度,使得在指定时间周期内基本上同时灭活荧光信号发生器和酶。

[0086] 在某些实施方案中,碱性溶液中包含的过氧化氢的量的范围可为约0.5体积百分率至约5体积百分率、约1体积百分率至约4体积百分率、或约1.5体积百分率至约3.5体

积百分率。在某些具体的实施方案中,碱性溶液中包含的过氧化氢的量的范围为约 3 体积百分率。

[0087] 在某些实施方案中,步骤 E、F 和 G 可以重复多次;使生物样品与后续(例如,第二、第三等)探针接触,观察信号,和漂白信号发生器。结合、观察和漂白步骤可以使用能够与额外靶标结合的第 n 种探针反复重复多次,以使用各种探针和 / 或信号发生器给用户提有关各种靶标的信息。在与酶偶联的结合剂可用作探针的实施方案中,结合步骤可以进一步包括反应步骤,涉及使酶与和荧光信号发生器偶联的酶底物反应。

[0088] 在某些实施方案中,步骤 E、F 和 G 可以重复 1-150 次,优选 5-100 次,或更优选 5-60 次。在某些实施方案中,一系列步骤可以重复 25-30 次或更优选 2-10 次。在某些实施方案中,一系列探针可以序贯方式与生物样品接触,以获得对生物样品的多重分析。在某些实施方案中,一系列探针组,其中探针组可包括靶向单一类型的靶标(例如不同的 RNA 靶标或不同的蛋白质或不同的 DNA 靶标)的超过一种探针的混合物,可以以序贯方式与生物样品接触,以获得对生物样品的多重分析。在某些优选的实施方案中,所述混合物包括 2-10 种探针,和优选 2-5 种探针。多重分析通常涉及使用相同检测机制对生物样品中的多种靶标的分析。

[0089] 在某些实施方案中,在信号去除、结合、反应(如果适用)和信号观察步骤的重复循环后,生物样品的组分未经显著改变。在某些实施方案中,在漂白步骤期间生物样品的组分未经显著改变。在某些实施方案中,在信号去除步骤期间未经显著改变的生物样品的组分是靶标。在某些实施方案中,在信号去除步骤期间超过 80% 的靶标未经显著改变。在某些实施方案中,超过 95% 的靶标未经显著改变。

[0090] 抗原 - 检测过程后,在某些实施方案中,步骤 H、I、J 允许检测 DNA。一般而言,所述方法包括用蛋白酶处理样品。处理时间可因样品、样品如何制备而不同,例如固定剂的种类、固定时间长度等、蛋白酶消化的温度和蛋白酶本身的浓度。蛋白酶处理后,可通过加热使杂交缓冲液中的探针和样品内的靶标两者变性并将探针加入样品中。或者,在探针加入样品中之后使探针和靶标一起变性。通常允许杂交过夜进行,尽管已经开发出需要更短杂交时间的探针并且可缩短杂交时间至约 1h 或更短。杂交后,严格性洗涤可用于去除过量探针以及非特异性结合的探针。在探针和形态学染色信号检测之前,样品可以用形态学染色剂处理以对核进行染色。在某些实施方案中可以进行预杂交步骤。在其它实施方案中,蛋白酶处理后样品可以经历固定步骤以保持组织形态学。原位 DNA 检测方法是本领域众所周知的并且其各种变更描述于 Volpi & Bridger 载于 *Biotechniques*, 45:385-409, 2008 并通过引用结合到本文中。

[0091] 在某些实施方案中基于核酸的结合剂可用于与 DNA 靶标结合。基于核酸的结合剂可与核酸靶标形成沃森 - 克里克键。在另一个实施方案中,所述核酸结合剂可与核酸靶标形成 Hoogsteen 键,从而形成三链体。通过 Hoogsteen 键结合的核酸结合剂可以进入核酸靶标的大沟并与位于其中的碱基杂交。上述结合剂的合适实例可包括识别核酸的大小沟并与其结合的分子(例如,某些形式的抗生素)。在某些实施方案中,所述核酸结合剂可以与核酸靶标同时形成沃森 - 克里克键和 Hoogsteen 键(例如,双 PNA 探针能够与核酸进行沃森 - 克里克和 Hoogsteen 结合两者)。

[0092] 核酸结合剂的长度也可决定结合特异性。结合剂和核酸靶标间的单个错配的能量

成本 (energetic cost), 对于较短序列比对于较长序列相对更高。在某些实施方案中, 较小的核酸结合剂的杂交比较长核酸探针的杂交可以是更具特异性, 因为较长探针可更易于错配并且可以根据条件继续与核酸结合。在某些实施方案中, 较短的结合剂在指定温度和盐浓度时可以表现出较低的结合稳定性。

[0093] 可以使用与短序列结合具有较大稳定性的结合剂。例如在某些实施方案中, 可使用双 PNA。在某些实施方案中, 所述核酸结合剂的长度范围可为约 4 个核苷酸至几千碱基, 优选 12-1000 个核苷酸, 和更优选 12-400 个核苷酸。在某些实施方案中, 所述核酸结合剂的长度范围可为大于约 1000 个核苷酸。不管核酸结合剂的长度, 并非结合剂的所有核苷酸残基都可与核酸靶标中的互补核苷酸杂交。例如, 结合剂长度可包含 50 个核苷酸残基, 这些核苷酸残基中仅 25 个可与核酸靶标杂交。在某些实施方案中, 可杂交的核苷酸残基可彼此相邻。核酸结合剂可以是单链或者可包括二级结构。在一些实施方案中, 生物样品可包括细胞或组织样品, 并且生物样品可使用核酸结合剂经受原位杂交 (ISH)。在一些实施方案中, 除了免疫组织化学 (IHC) 外, 组织样品还可经受原位杂交以获得来自样品的所需信息。

[0094] 在再一些实施方案中, 所述方法可以进一步包括至少一种对照探针与样品中的一种或多种靶标的结合。所述方法进一步包括观察来自结合的荧光探针的信号和来自对照探针的对照信号。结合的荧光探针暴露给基本上灭活荧光探针而不是对照探针的失活剂。所述方法进一步包括至少一种后续荧光探针与样品中存在的一种或多种靶标结合, 接着观察来自后续结合的荧光探针的信号。

[0095] 对照探针可包括对灭活剂稳定的或当与灭活剂接触时信号发生器的信号发生性质基本上不受影响的信号发生器。信号发生器可包括对灭活剂稳定的放射性同位素或荧光团。合适的放射性同位素可包括 P^{32} 、 H^3 、 ^{14}C 、 ^{125}I 或 ^{131}I 。合适的荧光团可包括 DAPI。

[0096] 在一些实施方案中, 在最后的探针杂交和检测步骤中信号发生器可包括一种或多种稳定的信号发生器, 其可通过多种质量检测器检测, 例如稳定的金属同位素或不可漂白的色原体。

[0097] 在某些实施方案中, 合适的信号发生器可以与结合剂偶联以形成对照探针。例如, 放射性标记可与抗体偶联以形成对照探针而抗体可与生物样品中存在的一种或多种靶标抗原结合。在其它实施方案中, 合适的信号发生器可能能够与样品中的另一靶标结合并且也提供可检测信号, 其在灭活剂存在时是稳定的。例如, 合适的对照探针可以是 DAPI, 其能够与样品中的核酸结合并且也能够提供对灭活剂稳定的荧光信号。

[0098] 在某些实施方案中, 对照探针可以用于本文公开的方法以提供靶标对重复染色步骤的稳定性的指示。例如, 对照探针可以与样品中的已知靶标键合并且观察和定量测定来自对照的信号。然后在反复染色步骤期间可监测对照信号以提供靶标或结合剂对灭活剂的稳定性的指示。在某些实施方案中, 在反复探测步骤后可以监测对照样品的定量量度, 例如信号强度, 以定量测定样品中存在的靶标量。

[0099] 在某些实施方案中, 可以使用对照探针以获得目标样品的定量信息, 例如样品中的靶标浓度或样品中靶标的分子量。在某些实施方案中, 在印迹技术中可将具有已知浓度或分子量的对照靶标与目标样品一起上样。可将对照探针与对照靶标键合并观察对照信号。然后可测定对照信号与所观察的来自目标样品的信号的相关性。

[0100] 在某些实施方案中, 对照探针可以用于提供通过反复的探测步骤而获得的多

种分子信息和例如使用形态学染色剂（例如 DAPI）而获得的形态学信息的共同记录（co-registration）。

[0101] 在某些实施方案中，方法可包括多个荧光图像以及明场形态学的图像（例如使用 H&E 获得的图像）的共同记录。在某些实施方案中，用于反复探测步骤的探针可不具有可用于与 H&E 图像一起记录的共同的区室信息（compartmental information）。对照探针，例如 DAPI 核染色剂，可用于共同记录在明场图像中用苏木精染色的核以及荧光图像。可以使用图像记录算法，共同记录荧光图像和明场图像，所述算法可以分为两类：基于强度的和基于特征的技术。

[0102] 在某些实施方案中，在与第一探针或后续探针接触步骤之前、期间或之后可使生物样品与形态学染色剂接触。形态学染色剂可包括可使不同细胞组分着色的染料，以便鉴定细胞类型或疾病状态。在某些实施方案中，形态学染色剂可与探针中的信号发生器容易区分，也就是说，染色剂可不发射可与来自探针的信号重叠的信号。例如，对于荧光形态学染色剂，来自形态学染色剂的信号不会自动发射与探针中所用的荧光团相同波长的荧光。

[0103] 在任一前述步骤之前、期间或之后可使形态学染色剂与生物样品接触。在某些实施方案中，在第一探针接触步骤同时可使形态学染色剂与生物样品接触。在某些实施方案中，在样品与化学剂接触之前和第一探针与靶标结合之后，可使形态学染色剂与生物样品接触。在某些实施方案中，在样品与化学剂接触并改变信号之后可使形态学染色剂与生物样品接触。

[0104] 在又一些实施方案中，在第二探针接触步骤同时可使形态学染色剂与生物样品接触。在某些实施方案中，在第二探针与靶标结合之后可使生物样品与形态学染色剂接触。在某些实施方案中，当形态学染色剂可导致对于来自信号发生器的荧光信号的背景噪声时，在探测、灭活和再次探测步骤之后可使形态学染色剂与生物样品接触。例如，在本文公开的方法之后，可连续对形态学染色剂例如 H&E 成像并记录。

[0105] 在某些实施方案中，发色团、荧光团、酶或酶底物可以用作形态学染色剂。可用作形态学染色剂的发色团的合适实例（和它们的靶细胞、亚细胞区室或细胞组分）可以包括但不限于伊红（碱性细胞组分，细胞质）、苏木精（核酸）、橙黄 G（血细胞、胰腺和垂体细胞）、亮绿 SF（胶原蛋白）、Romanowsky-Giemsa（全细胞形态学）、May-Grunwald（血细胞）、Blue Counterstain（Trevigen）、乙基绿（CAS）（淀粉样蛋白）、Feulgen-Naphthol Yellow S（DNA）、吉姆萨（区分地染色各种细胞区室）、甲基绿（淀粉样蛋白）、派洛宁（pyronin）（核酸）、萘酚黄（红细胞）、中性红（细胞核）、巴氏染色剂（苏木精、伊红 Y、橙黄 G 和苯胺棕的混合物（全细胞形态学））、Red Counterstain B（Trevigen）、Red Counterstain C（Trevigen）、天狼星红（Sirius Red）（淀粉样蛋白）、Feulgen 试剂（副品红）（DNA）、Gallocyanin chrom-alum（DNA）、Gallocyanin chrom-alum 和萘酚黄 S（DNA）、甲基绿-派洛宁 Y（DNA）、Thionin-Feulgen 试剂（DNA）、吡啶橙（DNA）、亚甲基蓝（RNA 和 DNA）、甲苯胺蓝（RNA 和 DNA）、阿辛蓝（碳水化合物）、钨红（碳水化合物）、苏丹黑（脂质）、苏丹 IV（脂质）、油红-O（脂质）、Van Gieson's 三色染色剂（酸性品红和苦味酸混合物）（肌肉细胞）、马森三色染色剂（苏木精、酸性品红和亮绿混合物）（分别染色胶原蛋白、细胞质、细胞核（nucleoli））、醛品红（弹性蛋白纤维）或 Weigert 染色剂（区分网状纤维和胶原纤维）。

[0106] 合适的荧光形态学染色剂（及其靶细胞、亚细胞区室或细胞成分，如果适用的话）的实例可包括但不限于：4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI)（核酸）、伊红（碱性细胞组分，细胞质）、Hoechst 33258 和 Hoechst 33342（两种双苯酰亚胺）（核酸）、碘化丙啶（核酸）、光谱橙（核酸）、光谱绿（核酸）、奎纳克林（核酸）、荧光素-鬼笔环肽（肌动蛋白纤维）、色霉素 A 3（核酸）、吖啶黄-Feulgen 反应（核酸）、奥拉明 O-Feulgen 反应（核酸）、溴化乙啶（核酸）、Nissl 染色剂（神经元）、高亲和力 DNA 荧光团例如 POPO、BOBO、YOYO 和 TOTO 等、和与 DNA 结合蛋白例如组蛋白融合的绿色荧光蛋白、ACMA、奎纳克林和吖啶橙。

[0107] 合适的酶（及其主要的细胞位置或活性）的实例可包括但不限于，ATP 酶（肌纤维）、琥珀酸脱氢酶（线粒体）、细胞色素 c 氧化酶（线粒体）、磷酸化酶（线粒体）、磷酸果糖激酶（线粒体）、乙酰胆碱酯酶（神经细胞）、乳糖酶（小肠）、酸性磷酸酶（溶酶体）、亮氨酸氨基肽酶（肝细胞）、脱氢酶（线粒体）、肌腺苷酸脱氢酶（肌细胞）、NADH 心肌黄酶（红细胞）和蔗糖酶（小肠）。

[0108] 在某些实施方案中，形态学染色剂对灭活剂可以是稳定的，也就是说，形态学染色剂的信号生成特性可基本上不受灭活剂的影响。在其中生物样品可用探针和形态学染色剂同时染色的一些实施方案中，改变来自探针的信号的应用可不改变来自形态学染色剂的信号。在一些实施方案中，形态学染色剂可用作对照以共同记录通过重复探测步骤而获得的分子信息和通过形态学染色剂获得的形态学信息。

[0109] 本文公开的涉及蛋白质、RNA 和 DNA 检测的方法通常包括结合剂的使用，所述结合剂以特异性方式与靶标物理地结合。因此，在某些实施方案中，结合剂可以与靶标以足够的特异性结合，也就是说，结合剂与靶标结合的亲和力可大于与任何其他分子结合的亲和力。在某些实施方案中，结合剂可以与其他分子结合，但所述结合可以使得非特异性结合可以在背景水平上或附近。在某些实施方案中，结合剂对目标靶的亲和力的范围可为它对其它分子的亲和力的至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍或更高。在某些实施方案中，可以使用具有最大的差异亲和力的结合剂，尽管它们可能并非是对靶标具有最大亲和力的那些。

[0110] 在某些实施方案中，靶标与结合剂之间的结合可通过物理结合而实现。物理结合可包括使用非-共价相互作用而实现的结合。非-共价相互作用可包括但不限于，疏水相互作用、离子相互作用、氢-键相互作用或亲和力相互作用（如，生物素-抗生物素蛋白或生物素-链霉抗生物素络合）。在一些实施方案中，靶标和结合剂可在其表面或其腔内具有区域，其在导致物理结合的二者之间产生特异性识别。在一些实施方案中，基于结合剂和生物靶标的分子形状的一部分的相互配合，结合剂可与生物靶标结合。

[0111] 结合剂及其相应的靶标可被看作是结合对，其非限制性实例包括免疫-型结合对，例如，抗原/抗体、抗原/抗体片段、或半抗原/抗-半抗原；非免疫-型结合对，例如生物素/抗生物素蛋白、生物素/链霉抗生物素、叶酸/叶酸结合蛋白、激素/激素受体、凝集素/特异性的糖类、酶/酶、酶/底物、酶/底物类似物、酶/假-底物（不能被酶促活性催化的底物类似物）、酶/辅因子、酶/调节剂、酶/抑制剂、或维生素 B12/ 内在因子。结合对的其它合适的实例可包括互补的核酸片段（包括 DNA 序列、RNA 序列、LNA 序列和 PNA 序列）；蛋白 A/ 抗体；蛋白 G/ 抗体；核酸/核酸结合蛋白；或多核苷酸/多核苷酸结合蛋白。

[0112] 在一些实施方案中，结合剂可以是序列特异性的或结构特异性的结合剂，其中被结合剂识别和结合的靶标的序列或结构对该靶标可以是足够独特的。

[0113] 在一些实施方案中,结合剂可以是结构特异性的并可识别靶标的一级、二级或三级结构。靶标的一级结构可包括其原子组成和连接所述原子的化学键(包括立体化学)的指定,例如,在蛋白质中的氨基酸的线性排列的类型和性质。靶标的二级结构可指生物分子片段的一般三维形式,例如,对于蛋白质,二级结构可指将肽“骨架”链折叠成可导致使距离远的氨基酸彼此接近的各种构象。二级结构的合适实例可包括但不限于, α 螺旋、 β 折叠片或无规卷曲(random coils)。靶标的三级结构可以是其整体三维结构。靶标的四级结构可以通过其与一个或多个其它靶标或大分子的非共价相互作用(例如蛋白质相互作用)形成的结构。四级结构的实例可以是由构成血红蛋白的四个-球蛋白亚单位形成的结构。根据本发明的实施方案的结合剂对于任何上述结构可以是特异性的。

[0114] 结构-特异性结合剂的实例可包括可结合蛋白质靶标的蛋白质-特异性分子。合适的蛋白质-特异性分子的实例可包括抗体和抗体片段、核酸(例如,识别蛋白质靶标的适体)或蛋白质底物(非-可催化的)。

[0115] 在某些实施方案中,结合剂可以是序列特异性的。序列-特异性结合剂可包括核酸,且结合剂可能能够识别靶标中的核苷酸或其衍生物的特定线性排列。在某些实施方案中,线性排列可包括邻接的核苷酸或其衍生物,其可各自结合结合剂中的相应的互补核苷酸。在一个备选的实施方案中,序列可以不是邻接的,因为可在探针上存在一个、两个或更多个可以不具有相应互补残基的核苷酸。基于核酸的结合剂的合适实例可包括但不限于,DNA或RNA寡核苷酸或多核苷酸。在一些实施方案中,合适的核酸可包括核酸类似物,例如地高辛(dioxygenin) dCTP、生物素 dcTP 7-氮杂鸟苷(azaguanosine)、叠氮胸苷、肌苷或尿苷。

[0116] 无论结合剂和靶标的类型如何,在蛋白质、DNA和RNA检测中,结合剂和靶标之间的结合特异性还可受结合条件(例如在互补核酸的情况下的杂交条件)的影响。可通过调节pH、温度或盐浓度的一个或多个实现合适的结合条件。

[0117] 结合剂可以是内在标记的(在合成结合剂期间连接的信号发生器或酶)或非内在标记的(在随后的步骤中连接的信号发生器或酶)。例如对于基于蛋白质的结合剂,内在标记的结合剂可通过使用标记的氨基酸制备。类似地,内在标记的核酸可使用这样的方法合成,即将信号发生器-标记的核苷酸直接掺入到成长的核酸中。在一些实施方案中,结合剂可以使得信号发生器或酶可在随后阶段掺入的方式来合成。例如,这后者的标记可通过化学方法通过将活性氨基或硫醇基引入核酸或肽链中完成。在一些实施方案中,可使用适宜的化学物直接化学标记结合剂例如蛋白质(例如,抗体)或核酸(例如,DNA)。

[0118] 在某些实施方案中,可使用结合剂的组合,所述组合可提供更大的特异性,或在某些实施方案中提供信号的放大。因此,在一些实施方案中,可使用夹心结合剂,其中第一结合剂可结合靶标并起提供二次结合的作用,其中第二结合剂可包括或不包括标记物,其可进一步提供第三结合(如果需要的话),其中第三结合成员可包括标记物。

[0119] 结合剂组合的合适实例可包括第一抗体-第二抗体、互补核酸或其它配体-受体对(例如生物素-链霉抗生物素)。合适的结合剂对的某些具体实例可包括小鼠抗-myc与具有c-myc表位的重组表达的蛋白质;小鼠抗-HisG与具有His-标签表位的重组蛋白,小鼠抗-xpress与具有表位-标签的重组蛋白;兔抗-山羊与山羊IgG主要分子;互补核酸序列与核酸;小鼠抗-硫氧还蛋白(thio)与硫氧还蛋白融合蛋白;兔抗-GFP与融合蛋白;菠

萝蜜凝集素 (jacalin) 与 α -D-半乳糖 ; 和蜜二糖 (melibiose) 与碳水化合物 - 结合蛋白、糖、镍偶联基质或肝素。

[0120] 在某些实施方案中, 第一抗体和第二抗体的组合可用作结合剂。第一抗体可具有结合靶标的特定区域的能力, 而第二抗体可具有结合第一抗体的能力。第二抗体可在与第一抗体结合之前与信号发生器或酶连接, 或者可在随后的步骤能够与信号发生器或酶结合。在一个备选实施方案中, 可使用第一抗体和特异性结合配体 - 受体对 (例如生物素 - 链霉抗生物素)。第一抗体与配对 (pair) 的一个成员 (例如生物素) 连接, 而另一成员 (例如链霉抗生物素) 可用信号发生器或酶标记。第二抗体、抗生物素蛋白、链霉抗生物素或生物素可各自独立地用信号发生器或酶标记。

[0121] 在一些实施方案中, 本文公开的方法可用于免疫染色程序, 且第一抗体可用于特异性地结合靶标蛋白。第二抗体如果存在的化, 可用于特异性地结合第一抗体, 由此形成第一抗体和随后的试剂 (例如信号发生器或酶) 之间的桥接。例如, 第一抗体可以是小鼠 IgG (一种在小鼠中产生的抗体), 并且相应的第二抗体可以是具有能够结合小鼠 IgG 中区域的区域的山羊抗 - 小鼠 (在山羊中产生的抗体)。

[0122] 在一些实施方案中, 当数个第二抗体可结合第一抗体上的表位时, 可获得信号放大。在免疫染色程序中, 第一抗体可以是用于该程序的第一种抗体而第二抗体可以是用于该程序的第二种抗体。在一些实施方案中, 第一抗体可以是用于免疫染色程序的唯一抗体。

[0123] 适合于本文公开的方法的信号发生器类型可取决于多种因素, 包括所进行的分析的性质、所用能源和检测器的类型、所用灭活剂的类型、结合剂的类型、靶标类型、或结合剂和信号发生器之间的连接方式 (例如, 可裂解的或不可裂解的)。

[0124] 合适的信号发生器可包括能够提供可探测信号的分子或化合物。信号发生器可在与能源或电流相互作用后提供特征信号。能源可包括电磁辐射源和荧光激发源。电磁辐射源可以能够提供任何波长包括可见光、红外和紫外线的电磁能。电磁辐射可以是直接光源的形式或可通过光发射化合物例如供体荧光团发射。荧光激发源可以能够产生源荧光或可导致光子发射 (即, 电磁辐射、定向电场、温度、物理接触或机械破碎)。合适的信号发生器可提供能够被多种方法检测的信号, 所述方法包括光学测量 (例如, 荧光)、电导性或放射性。合适的信号发生器可以是例如, 光发射、能量接受、发荧光、放射性或猝灭。

[0125] 合适的信号发生器可以是空间和化学上与其结合的成分例如结合剂相容的。此外, 合适的信号发生器可不干扰结合剂与靶标的结合, 也可不影响结合剂的结合特异性。合适的信号发生器在性质上可以是有机或无机的。在一些实施方案中, 信号发生器可具有化学的、肽或核酸特性。

[0126] 合适的信号发生器可以被直接检测。可直接检测的部分可以是可通过其发射信号 (例如被另一个较低的、特征波长的光激发后发射特定波长的光的荧光标记物) 和 / 或吸收特定波长的光的能力而可被直接检测的部分。

[0127] 根据本文公开的方法的适合的信号发生器可适于应用化学剂时的操作。在一些实施方案中, 信号发生器可以是在暴露给灭活剂时能够被化学破坏的。化学破坏可包括信号发生器的完全分解或信号发生器的信号 - 生成成分的改变。信号 - 生成成分的改变可包括可导致信号生成特征改变的任何化学修饰 (例如添加、取代或去除)。例如, 使缀合的信号发生器解缀合 (unconjugating) 可导致信号发生器的发色特征破坏。类似地, 取代荧光信

号发生器上的荧光-抑制官能团可导致其荧光特性的改变。在一些实施方案中,基本上抵抗由特定化学剂引起的灭活的一种或多种信号发生器可用作在所提供的方法中的对照探针。

[0128] 在一些实施方案中,信号发生器可选自光发射分子、放射性同位素(例如, P^{32} 或 H^3 、 ^{14}C 、 ^{125}I 和 ^{131}I)、光学或电子密度标记、拉曼-活性标签、电子自旋共振分子(例如硝酰基)、电荷转移分子(即,电荷转换分子)、半导体纳米晶体、半导体纳米颗粒、胶体金纳米晶体、微珠、磁珠、顺磁性颗粒或量子点。

[0129] 在某些实施方案中,信号发生器可包括光发射分子。光发射分子可响应用特定波长的光照射而发射光。光发射分子可以能够通过发光(在激发时由物质的电磁辐射的非-热发射)、磷光(由于吸收辐射而延迟发光)、化学发光(由于化学反应的发光)、荧光或偏振荧光而吸收和发射光。

[0130] 在某些实施方案中,信号发生器可基本包括荧光团。在一些实施方案中,信号发生器可基本包括与抗体连接的荧光团,例如,在免疫组织化学分析中。可与第一抗体缀合的合适荧光团包括但不限于,荧光素、罗丹明、得克萨斯红、载体红(VECTOR Red)、ELF(酶-标记的荧光)、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy7、Fluor X、钙黄绿素、钙黄绿素-AM、CRYPTOFLUOR、Orange(42 kDa)、Tangerine(35 kDa)、Gold(31 kDa)、Red(42 kDa)、Crimson(40 kDa)、BHMP、BHDMP、Br-俄勒冈(Oregon)、萤光黄、Alexa 染料家族、N-[6-(7-硝基苯-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基]己酰基(NBD)、BODIPY、硼二吡咯亚甲基二氟化物(boron dipyrromethene difluoride)、俄勒冈绿、MITOTRACKER Red、藻红蛋白、藻胆蛋白 BPE(240 kDa) RPE(240 kDa) CPC(264 kDa) APC(104 kDa)、光谱蓝(Spectrum Blue)、Spectrum Aqua、光谱绿、光谱金、光谱橙、光谱红、红外(IR)染料、环状GDP-核糖(cGDPR)、Calcofluor White、丽丝胺、伞形酮、酪氨酸或色氨酸。在某些实施方案中,信号发生器可基本包括花菁染料。在某些实施方案中,信号发生器可基本包括 Cy3 染料、Cy5 染料或 Cy7 染料中一个或多个。

[0131] 在某些实施方案中,信号发生器可以是 FRET 对的部分。FRET 对包括两种荧光团,当定位彼此接近时,其能够经历 FRET 以产生或消除可检测的信号。供体的某些实例可包括 Alexa 488、Alexa 546、BODIPY 493、Oyster 556、Fluor (FAM)、Cy3 或 TTR (Tamra)。受体的某些实例可包括 Cy5、Alexa 594、Alexa 647 或 Oyster 656。

[0132] 如上所述,一种或多种上述分子可用作信号发生器。在一些实施方案中,一种或多种信号发生器可不易于信号破坏,并且可裂解的接头可以用于将信号发生器和结合剂缔合。在某些实施方案中,一种或多种信号发生器可易于信号破坏,并且信号发生器可基本包括可被化学破坏的分子。在某些实施方案中,信号发生器可包括可被氧化剂化学破坏的荧光团。在某些实施方案中,信号发生器可基本包括可被氧化剂化学破坏的花菁、香豆素、BODIPY、ATTO 658、量子点或 ATTO 634。在某些实施方案中,信号发生器可包括能够被破坏或淬灭的 Cy3 染料、Cy5 染料或 Cy7 染料的一种或多种。

[0133] 在某些实施方案中,探针可包括与酶偶联的结合剂。在某些实施方案中,合适的酶催化酶底物的化学反应,以形成能结合存在于样品或样品所结合的固体支持物中的受体(例如,酚基)的反应产物。受体可以是外源性的(即,非内在地与样品或固体-支持物附着的受体)或内源性的(内在地存在于样品或固体-支持物中的受体)。因为单一酶可催

化底物的化学反应以共价结合靶标附近的多个信号发生器,因此可进行信号放大。

[0134] 在一些实施方案中,合适的酶也可以被氧化剂灭活。合适的酶的实例包括过氧化物酶、氧化酶、磷酸酯酶、酯酶和糖苷酶。合适的酶的具体实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -D-半乳糖苷酶、脂肪酶和葡萄糖氧化酶。在一些实施方案中,酶是选自辣根过氧化物酶、细胞色素 C 过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶、微过氧化物酶、髓过氧化物酶、乳过氧化物酶和大豆过氧化物酶的过氧化物酶。

[0135] 在一些实施方案中,结合剂和酶可包括在单一实体中,例如能够结合靶标并且还催化底物的化学反应的蛋白质分子。在其它实施方案中,结合剂和酶可包括在分开的实体中,并可通过共价键形成或通过使用配体-受体缀合物对(例如,生物素链霉抗生物素)偶联。

[0136] 可根据所用的酶和样品中或固体支持物上可用于结合的靶标选择酶底物。例如,在包括作为酶的 HRP 的实施方案中,底物可包括取代的苯酚(例如,酪胺)。HRP 对酪胺的反应可产生激活的酚底物,其可结合内源性的受体例如存在于生物样品的表面蛋白质上的富电子部分(例如酪氨酸或色氨酸)或酚基。在其中 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮盐酸盐(MBTH)可用作底物与 HRP 酶一起的备选实施方案中,外源性受体例如对-二甲基氨基苯甲醛(DMAB)可在与底物反应之前附着于固体支持物或生物样品。

[0137] 在某些实施方案中,酶底物可在与酶反应之后被去磷酸化。去磷酸化反应产物可以是能够结合样品或固体-支持物中的内源性或外源性受体(例如,抗体)。例如,酶可包括碱性磷酸酶(AP),而底物可包括 NADP、取代的磷酸酯(例如,硝基苯基磷酸酯)或磷酸化生物素。因此受体可包括 NAD 结合蛋白、针对去磷酸化反应产物的抗体(例如,抗硝基-苯酚)、抗生物素蛋白,或链霉抗生物素。

[0138] 在某些实施方案中,酶可包括 β -半乳糖苷酶,而底物可包括荧光素或香豆素的 β -半乳糖基-糖苷。受体可包括针对去糖基化部分的抗体(例如,抗-荧光素或抗-香豆素)。在一些实施方案中,多个酶组合例如 HRP/AP 可用作酶。底物可包括磷酸化的取代的苯酚例如,磷酸酪氨酸,其可在与 HRP 反应之前经 AP 去磷酸化,形成能够结合基于酚基或富电子部分的受体的反应产物。

[0139] 酶底物的反应产物可进一步地能够提供可检测的信号。在一些实施方案中,用于本文公开的方法的酶底物可包括非-发色的或非-化学发光的底物,即酶和酶底物的反应本身可不产生可检测的信号。用于本文公开的方法的酶底物可包括非内在的信号发生器(例如,荧光团)作为标记物。信号发生器和酶底物可直接(如,含有荧光标记物的酶底物)或间接(例如,通过配体-受体缀合物对)连接。在一些实施方案中,底物可包括被保护的功能团(例如,巯基)。激活的底物结合受体之后,官能团可以脱去保护并与信号发生器缀合,所述缀合使用具有硫醇反应性基团的信号发生器(例如,马来酰亚胺或碘代乙酰基)进行。

[0140] 在某些实施方案中,标记可包括辣根过氧化物酶,而底物选自取代的苯酚(例如,酪胺)。在一些实施方案中,辣根过氧化物酶引起激活的酚底物与存在于样品或样品所结合的固体支持物中的酚基共价结合。在一些实施方案中,探针可包括与 HRP 偶联的结合剂,而底物可包括与荧光团偶联的酪胺。

[0141] 化学剂可包括可改变信号发生器、酶或信号发生器和结合剂或酶底物之间的可裂

解接头（如果存在的话）的化学物。化学剂可以固体、溶液、凝胶或悬液的形式与样品接触。

[0142] 在某些实施方案中，化学剂可包括氧化剂，例如，活性氧种类、羟基自由基、单态氧、过氧化氢或臭氧。在某些实施方案中，化学剂可包括过氧化氢、高锰酸钾、重铬酸钾、溴水、碘-碘化钾或叔丁基氢过氧化物。

[0143] 上述化学剂的一种或多种可用于本文公开的方法，这取决于信号发生器、酶、结合剂、靶标或生物样品对所述化学剂的敏感性。在某些实施方案中，可以使用基本不影响结合剂、靶标和生物样品的完整性的化学剂。在某些实施方案中，可以使用不影响结合剂和靶标间的结合特异性的化学剂。对于步骤 B、F 和 J，其中检测或观察特定 RNA、蛋白质或 DNA 靶标，在某些实施方案中，所述步骤可包括样品中的至少一种靶标的定量测定。在某些实施方案中，可以测量信号的强度值（例如，荧光强度）并测定其与生物样品中的靶标量的相关性。可使用校准标准，测定靶标和信号强度间的相关性。在一些实施方案中，可以测量第一和第二信号的强度值并测定其与相应靶标量的相关性。在某些实施方案中，通过比较两个信号强度，可以确定第一靶标和第二靶标的相对量（相对于彼此或相对于对照）。同样，在使用多个探针分析多个靶标时，可通过检测不同的信号强度测定生物样品中不同靶标的相对量。在某些实施方案中，一种或多种对照样品可以如上所述地使用。通过观察样品（目标生物样品与对照）中信号的存在或不存在，可以获取生物样品的相关信息。例如通过比较患病组织样品与正常组织样品，可以获取患病组织样品中存在的靶标的相关信息。同样，通过比较样品（即目标样品和一种或多种对照）间的信号强度，可以获取样品中的靶标表达的相关信息。

[0144] 在某些实施方案中，检测步骤包括共同定位样品中的至少两种靶标。共同定位样品中的靶标的方法描述于美国专利申请顺序号 11/686,649，名称“System and Methods for Analyzing Images of Tissue Samples”，2007 年 3 月 15 日提交；美国专利申请顺序号 11/500028，名称“System and Method for Co-Registering Multi-Channel Images of a Tissue Micro Array”，2006 年 8 月 7 日提交；美国专利申请顺序号 11/606582，名称“System and Methods for Scoring Images of a Tissue Micro Array”，2006 年 11 月 30 日提交，和美国专利申请顺序号 11/680063，名称 Automated Segmentation of Image Structures，2007 年 2 月 28 日提交，其各自通过引用结合到本文中。

[0145] 在某些实施方案中，可以观察生物样品中的信号位置。在某些实施方案中，可使用形态学染色剂观察信号在生物样品中的位置。在某些实施方案中可以观察两种或更多种信号的相对位置。可测定信号位置与生物样品中靶标位置的相关性，提供生物样品中不同靶标位置相关的信息。在某些实施方案中，可测定信号强度值与信号位置的相关性以获得生物样品中不同靶标位置相关的信息。例如，某些靶标在胞质中可比在核中表达更多，或反之亦然。在某些实施方案中，关于靶标的相对位置的信息可通过比较两种或更多种信号的位置和强度值来得到。

[0146] 在某些实施方案中，可使用计算机辅助方式进行一个或多个观察或测定相关性的步骤。在来自信号发生器的信号可以数码图像的形式存储的实施方案中，可进行图像的计算机辅助分析。在一些实施方案中，图像（例如，来自探针和形态学染色剂的信号）可使用计算机辅助叠影覆盖，以获得生物样品的完整信息，例如拓扑及相关性信息。

[0147] 在一些实施方案中，一种或多种上述方法步骤可以是自动化的和可使用自动系统

进行。在一些实施方案中,所有步骤可使用自动化系统进行。

[0148] 本文公开的方法可应用于生物学和医学的分析、诊断和治疗应用。在一些实施方案中,本文公开的方法可应用于组织化学,特别是免疫组织化学。依据本文描述的方法,分析得自患者的细胞或组织样品可用于诊断(例如,鉴定患有特定疾病、已暴露于特定毒素或对特定治疗剂或器官移植反应良好的患者)和预后(例如,鉴定可能发生特定疾病、对特定治疗剂或接受特定器官移植反应良好的患者)。本文公开的方法,可有助于精确和可靠分析相同生物样品中的多数(例如,可能无限数目)靶标(例如,疾病标记)。

[0149] 实验

组织样品的制备

获取人肺组织样品,为包埋在石蜡中的组织切片(tissue slide)。样品包括正常的、恶化前的、和发展级的癌症组织(Panomics, LUC961)的一个微阵列和4个全组织肺癌样品(Wood Hudson Cancer Research Center)。

[0150] 石蜡包埋的切片在60°C烘烤一小时,组织面朝上并平行于烤箱架。烘烤后,通过在二甲苯中洗涤并温和搅拌4分钟使切片脱石蜡。然后通过4种乙醇溶液(浓度按照100%、95%、70%和50%的顺序降低)中洗涤,接着用1x磷酸缓冲盐水(PBS, pH 7.4)洗涤,使样品再水合。再水合后,切片用1x PBS洗涤。为了组织的膜透化作用,在0.3% Triton X-100的PBS中进行10分钟洗涤,接着用1x PBS洗涤。

[0151] U6 snRNA 染色

透化作用后,将切片与预杂交缓冲液(1x Exiqon 缓冲液, Exiqon, miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization Kit)在室温下孵育1小时,然后在Thermobrite中与100ul 50mM TYE665 标记的U6探针(定制U6探针,来自Exiqon, Inc.)的Exiqon缓冲液在50°C杂交过夜。切片用0.5xSSC和0.2x SSC在50°C洗涤10分钟,然后用0.1x SSC快速漂清。切片用DAPI在室温下染色15分钟并用封固介质封固。在20x物镜的Olympus显微镜上采集图像。图像见图2和3组图A:核用DAPI染色,组图B:U6 snRNA用TYE665染色。

[0152] 抗原修复

RNA检测过程后,切片用双重缓冲液处理,热诱导表位修复。使用压力锅,将切片暴露于柠檬酸缓冲液pH 6.0(Vector Unmasking Solution),在压力下20分钟,然后移至热Tris-EDTA缓冲液pH 9.0并让其在锅中在大气压力下静置20分钟。这之后在室温下冷却10分钟并在1xPBS中进行一系列洗涤。

[0153] 封闭

抗原修复后,针对非特异性结合而封闭切片,即通过在10%驴血清、3%牛血清白蛋白(BSA)溶液在4°C孵育过夜。

[0154] 蛋白质染色

切片用DAPI染色并盖上盖玻片。在蛋白质染色前,在20x采集图像,将来自Cy3和Cy5通道的自发荧光作为基线,使用用于RNA检测的同样的视野。将切片在1xPBS中去掉盖玻片并用3% BSA的1x PBS中稀释的Cy3-直接缀合的细胞角蛋白-7(Dako M7018, 20μg/mL)和Cy5-直接缀合的EGFR(Cell Signaling 4267, 20μg/mL)的混合物中染色。室温下孵育1小时。孵育后,在1xPBS中一系列洗涤去除过量抗体并将切片盖上盖玻片。对样品成像(图2和3,组图C:EGFR用Cy5染色和组图D:细胞角蛋白7用Cy3染色),然后

用碱性 H₂O₂ 溶液处理 15 分钟以漂白直接缀合的染料。15 分钟后,切片用 PBS 洗涤并盖上盖玻片。再次采集图像,将漂白后的自发荧光作为基线。切片用 Cy3- 直接缀合的 NaKATP 酶 (Epitomics 2047, 5μg/mL) 和 Cy5- 缀合的 IGF1R (Lifespan Biosciences LS-C82136, 20μg/mL) 的第二混合物染色,盖上盖玻片,并再次成像 (图 2 和 3, 组图 E: IGF1R 用 Cy5 染色和组图 F: NaKATP 酶用 Cy3 染色)。在 FISH 处理前将样品第二次漂白。

[0155] DNA FISH

为了允许后续 FISH 染色,通过在 2×SSC 缓冲液中孵育而去除盖玻片,并使切片经历 0.05% 胃蛋白酶 10 min 处理,其部分地去除蛋白质结构,以允许接近核 DNA。然后使用 4% 甲醛水溶液将切片固定 10min,洗涤并经过杂交,使用针对 EGFR 的 FISH 探针 (PlatinumBright415, aqua 荧光团), cMet (PlatinumBright550, 红色荧光团) 和染色体 7 着丝粒 (PlatinumBright495, 绿色荧光团) 并用 DAPI 复染色。如下进行杂交:让切片通过系列增加浓度的乙醇水溶液而使切片脱水,接着 100% 乙醇,然后允许快速干燥。将探针混合物施用于含有组织切片的载玻片区域,然后盖上盖玻片并放入能够加热和冷却载玻片的载玻片保温箱中。将含有探针混合物的载玻片加热至 80° C 10 min 以变性 DNA 杂合体并让其冷却至 37° C。然后将载玻片在该温度保持 16 小时。然后将载玻片在含有 0.3% 去垢剂 NP-40 的 2×SSC 缓冲液中洗涤并在 72° C 在含有 0.3% NP-40 的 0.4×SSC 中洗涤 2 分钟,接着用 DAPI 复染色。然后使用在免疫荧光步骤中记录的坐标对具有侵袭性肿瘤的组织切片的区域成像。在 40x 使用对蓝色、绿色和红色荧光团和 DAPI 具有特异性的滤镜组记录图像组 (图 2 和 3, 组图 G: cMET 用 PlatinumBright550 染色和组图 H: EGFR 基因用 PlatinumBright415 染色)。

[0156] 本发明可以以其它特定形式具体化,而不偏离其精神或基本特征。前述实施方案因此被认为在所有方面是说明性的,而不是限制本文所述的本发明。本发明的范围因此由所附权利要求书指定,而不是由前述描述指定,并且因此在权利要求书的等同含义和范围内的所有变化意欲被包括在其中。本发明可以以其它特定形式具体化,而不偏离其精神或基本特征。前述实施方案因此被认为在所有方面是说明性的,而不是限制本文所述的本发明。本发明的范围因此由所附权利要求书指定,而不是由前述描述指定,并且因此在权利要求书的等同含义和范围内的所有变化意欲被包括在其中。

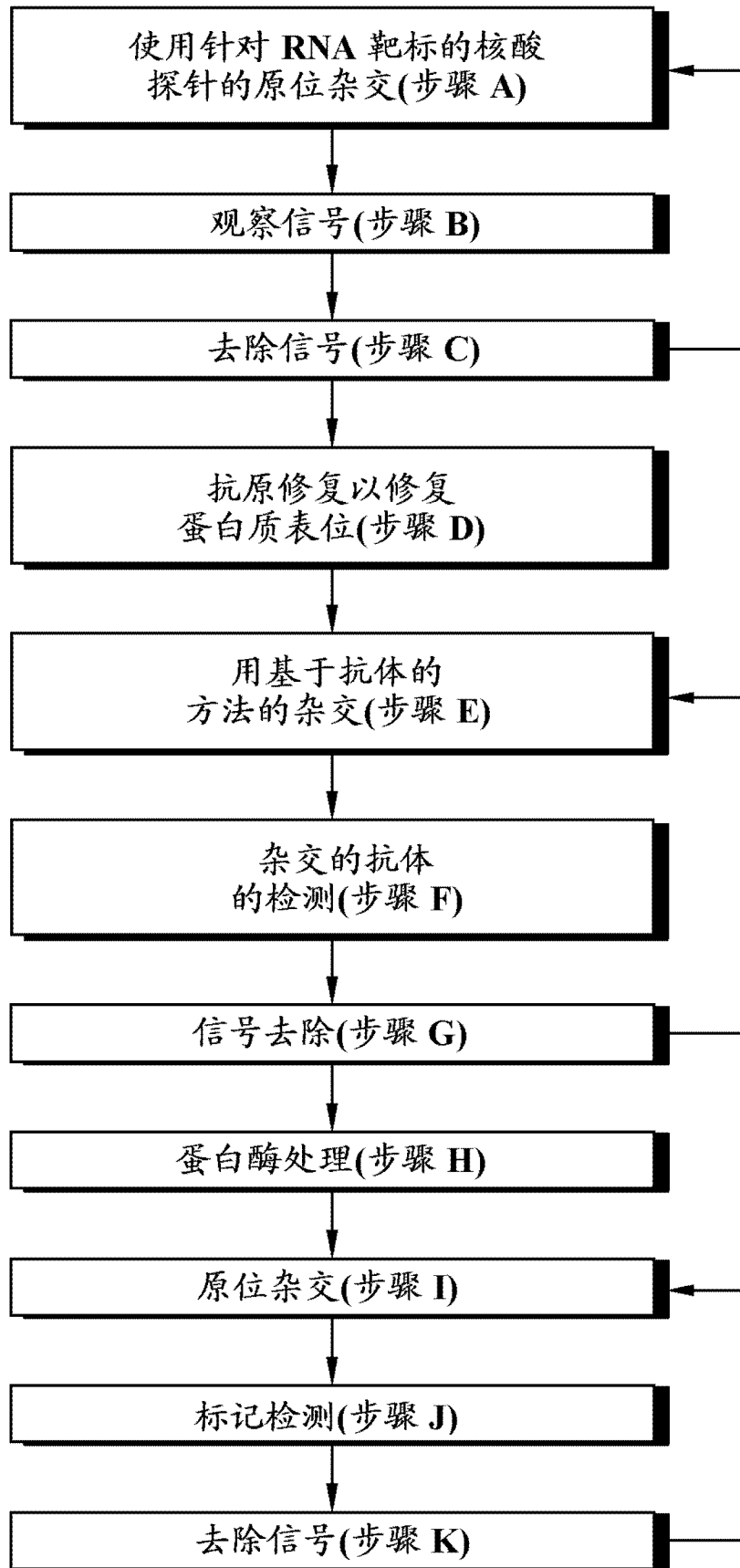


图 1

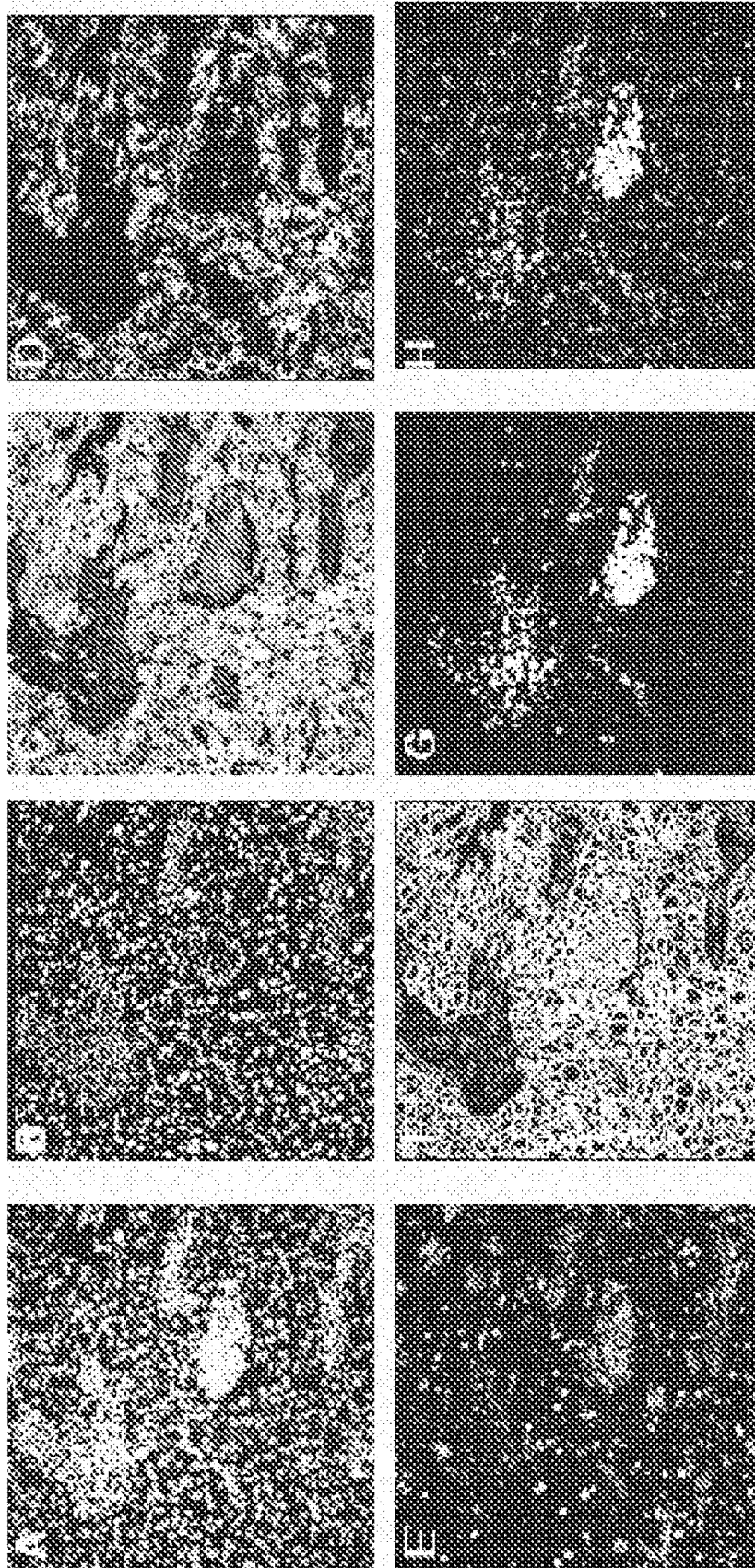


图 2A

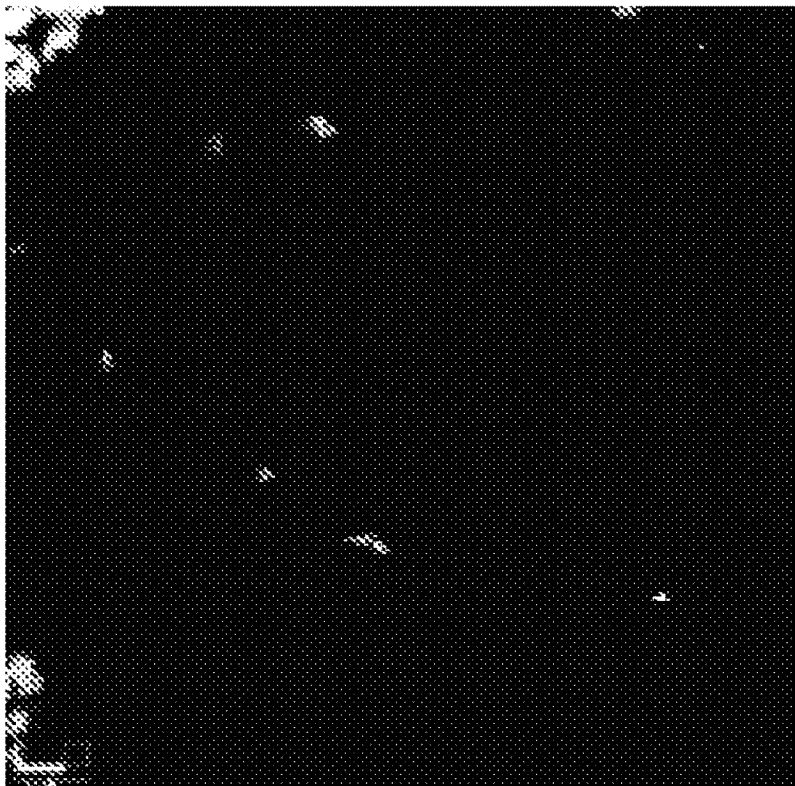
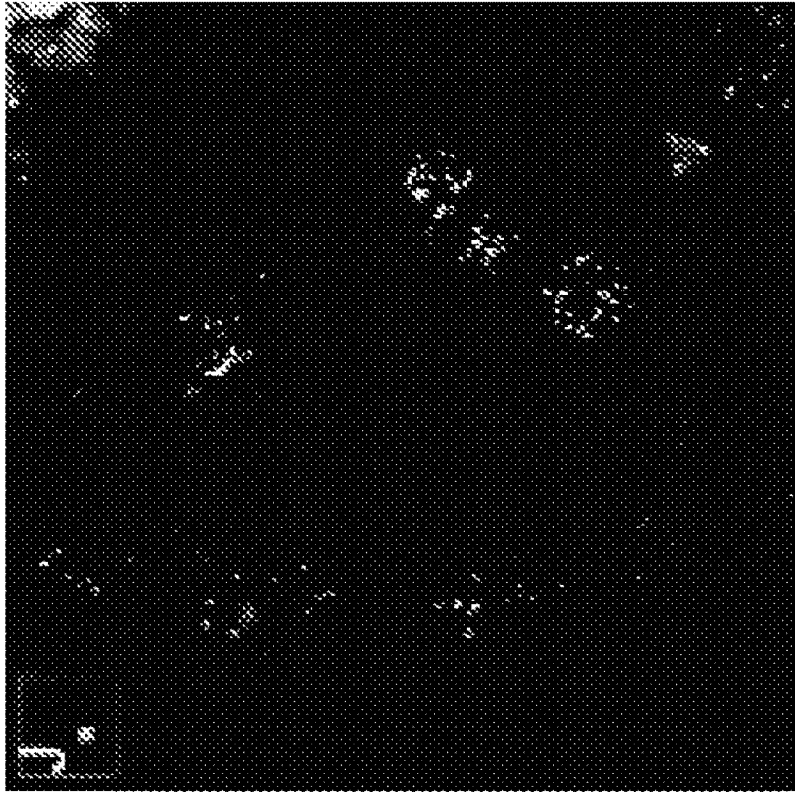


图 2B

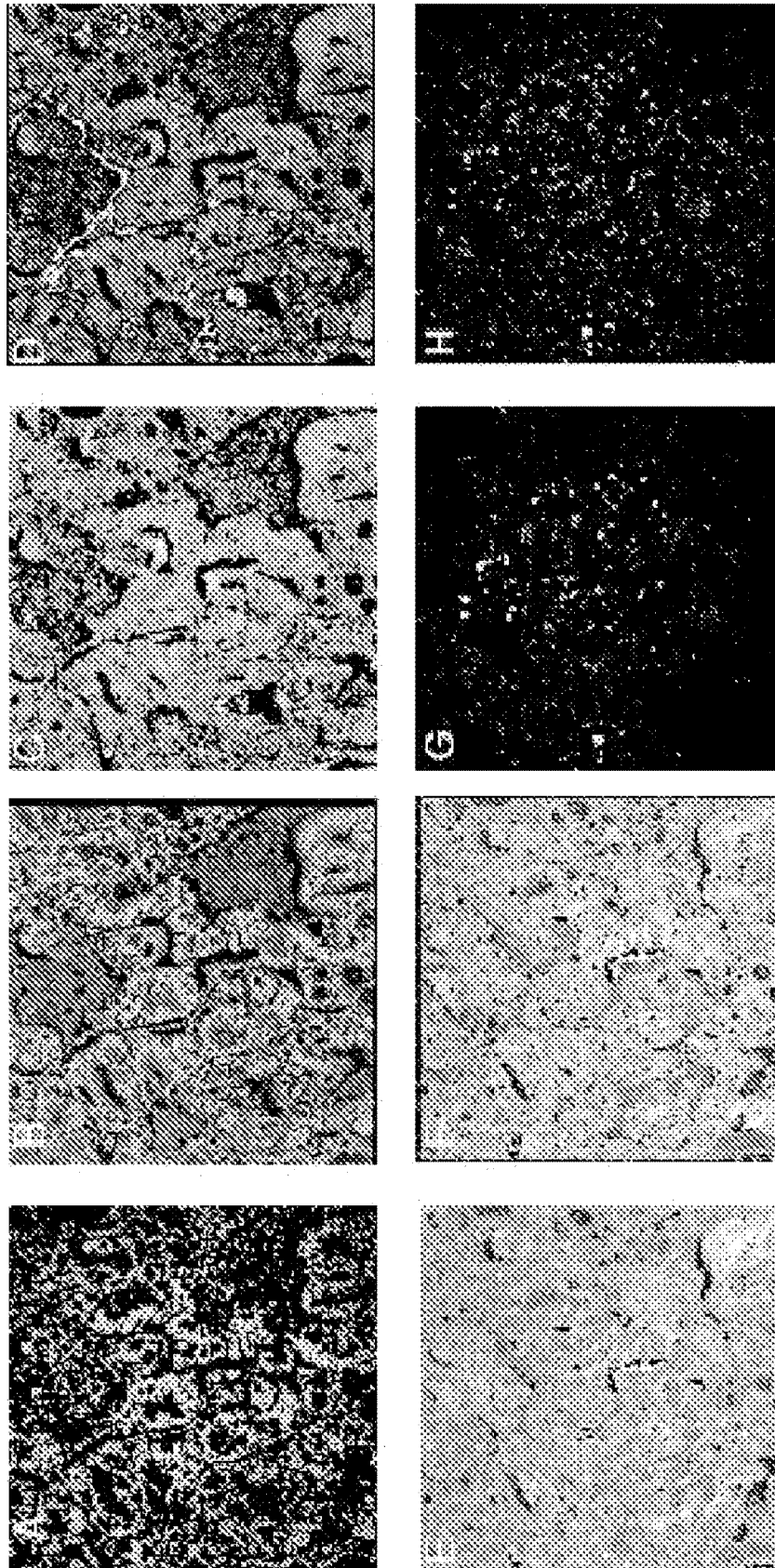


图 3A

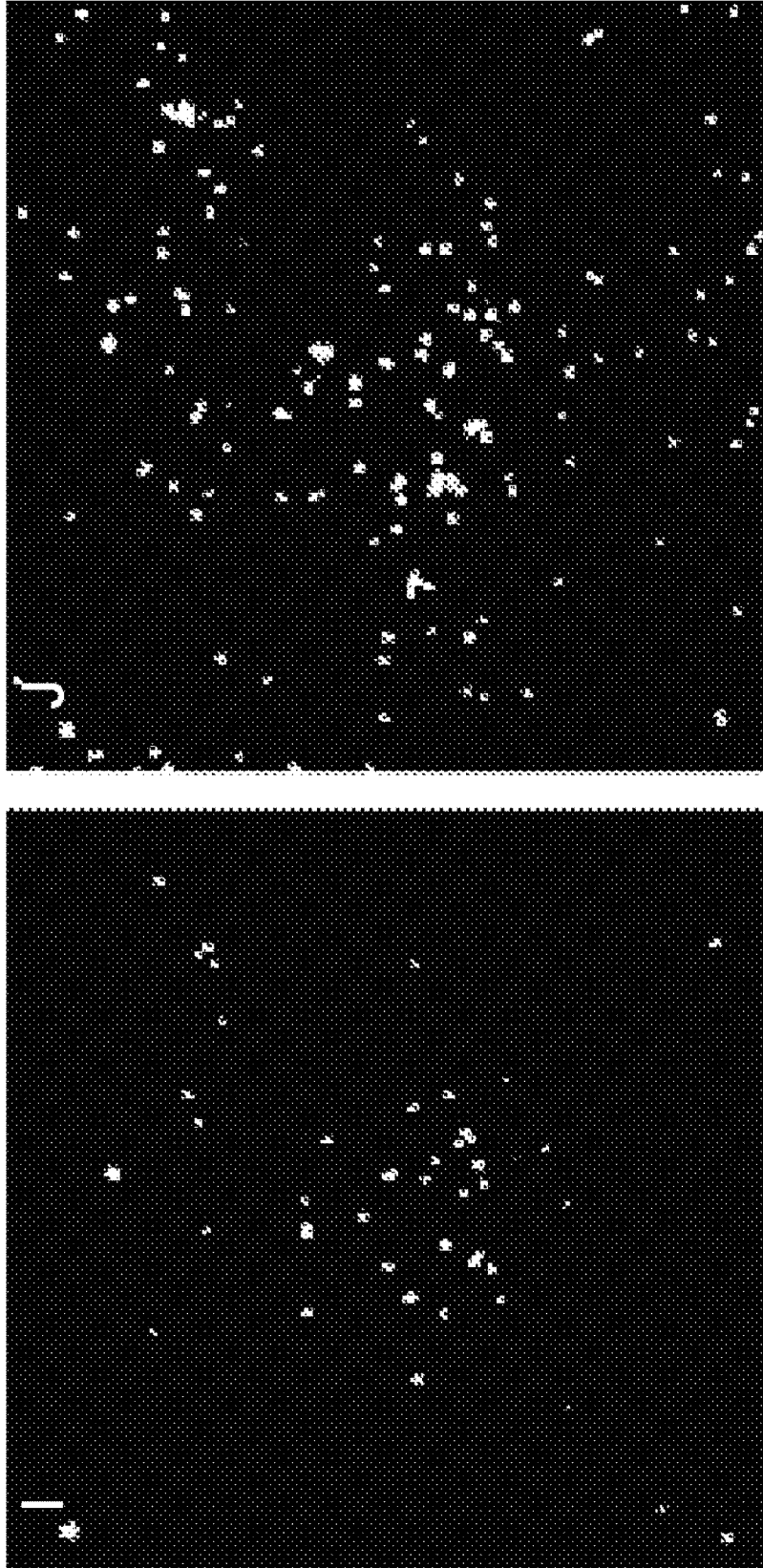


图 3B

专利名称(译)	检测生物样品中DNA、RNA和蛋白质的方法		
公开(公告)号	CN104620107A	公开(公告)日	2015-05-13
申请号	CN201380048061.9	申请日	2013-07-12
[标]申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用电气公司		
[标]发明人	A 苏德 W 高 M J 格尔德斯 F M 金蒂 A E 塞波 E M 科林斯		
发明人	A.苏德 W.高 M.J.格尔德斯 F.M.金蒂 A.E.塞波 E.M.科林斯		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6841 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/6803 C12Q2521/537 C12Q1/6804 G01N33/53 C12Q2523/319 C12Q2543/10 C12Q2563/107 C12Q2565/601		
代理人(译)	黄登高 林森		
优先权	13/551190 2012-07-17 US		
其他公开文献	CN104620107B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了探测生物样品中的多种靶标的新方法，其中所述靶标是DNA、RNA和蛋白质。所述方法包括使用与RNA靶标结合的标记的核酸探针使所述样品经历原位杂交反应，观察信号，和任选地去除所述信号。所述方法进一步包括抗原修复方案，观察信号，去除所述信号，和任选地应用蛋白酶处理以接近所述样品的DNA靶标，使用标记的核酸探针使所述样品经历原位杂交反应，观察来自所述标记的DNA靶标的信号，和任选地去除所述信号。

