

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780008717.9

[51] Int. Cl.

*G12Q 1/68 (2006.01)*

*G01N 33/53 (2006.01)*

*G01N 33/48 (2006.01)*

*G01N 33/533 (2006.01)*

*G01N 33/543 (2006.01)*

*G01N 21/76 (2006.01)*

[43] 公开日 2009年4月1日

[11] 公开号 CN 101400805A

[22] 申请日 2007.3.13

[21] 申请号 200780008717.9

[30] 优先权

[32] 2006. 3. 13 [33] US [31] 60/781,888

[32] 2006. 8. 4 [33] US [31] 60/821,550

[86] 国际申请 PCT/US2007/063927 2007. 3. 13

[87] 国际公布 WO2007/106837 英 2007. 9. 20

[85] 进入国家阶段日期 2008. 9. 11

[71] 申请人 伊康尼西斯公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 M·基尔帕特里克 A·赛博

T·塔法斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 刘玥

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

使用共价结合荧光团合并免疫染色法和荧光原位杂交法的方法

[57] 摘要

在实施方案中,公开了一种用于将样品免疫染色以使染色剂在 FISH 条件下稳定的方法。

1. 一种方法，其按顺序包括：

(a) 用一种或多种抗体处理含有染色体材料的生物样品，该抗体对该生物样品的至少一个非染色体部分有亲和力，其中所述抗体上有引入的不可检测的反应性缀合物；

(b) 用荧光标记的染色体探针处理所述生物样品，该探针与所述染色体材料的一个或多个部分有高度序列相似性；和

(c) 用可检测的标记处理所述生物样品，该标记与所述抗体上所述不可检测的反应性缀合物反应，而不与所述染色体材料或所述生物样品的非染色体部分反应。

2. 一种方法，其按顺序包括：

(a) 用一种或多种抗体处理含有染色体材料的生物样品，该抗体对该生物样品的至少一个非染色体部分有亲和力，其中所述抗体上有引入的可检测的反应性缀合物；

(b) 用荧光标记的染色体探针处理所述生物样品，该标记与所述染色体材料的一个或多个部分有高度序列相似性；和

(c) 用不可检测或可检测的标记处理所述生物样品，该标记与所述抗体上所述可检测的反应性缀合物反应，而不与所述染色体材料或所述生物样品的非染色体部分反应。

3. 一种用于将生物材料固定在表面的方法，所述方法包括以下步骤：

(a) 获得生物样品的含水上清液，将至少一部分所述样品置于部分样品将被固定的表面上；

(b) 取出等分体积的所述上清液，取出的等分体积用同样体积的烷基醇替代，其中所述取出和替代重复进行多次以使所述部分样品逐渐固定在所述表面。

4. 根据权利要求3所述的方法，其中所述烷基醇选自：所述烷基

醇可以是 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 醇、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 醇或者甲醇。

5. 一种用于装载密度离心梯度的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 制备离心梯度;

(b) 通过毛细管漏斗将样品加到所述离心梯度上。

6. 一种用于同步鉴定多种亚细胞组分的方法, 所述方法包括以下步骤:

用与待鉴定的每一个所述亚细胞组分有特异性的抗体将细胞样品免疫染色;

同时用一种或多种包含不同荧光团以区分待鉴定的每一个所述亚细胞组分的荧光原位杂交探针处理所述细胞样品;

使用显微镜系统显现并量化由所述探针产生的荧光信号。

7. 一种用于鉴定和计算荧光原位杂交(“FISH”)信号的方法, 该信号相对于与荧光标记原位杂交的细胞核组分而产生:

使用落射荧光显微镜, 在每一对应于杂交的 FISH 标记的荧光通道中, 在不同的焦平面上, 得到大量图像;

对于每一细胞核, 从所述大量图像中选出一个最佳聚焦图像;

对于每一细胞核, 使用所述落射荧光显微镜, 从所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下, 得到大量图像;

对于每一细胞核, 在图像最佳聚焦的所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下, 各选出一个焦平面;

将来自每个细胞核的所述最佳聚焦图像之上和之下的一个焦平面的所述图像与所述最佳聚焦图像合并, 以产生所述细胞核的合并图像;

分析每个细胞核的所述合并图像以把背景像素和信号像素分开, 而且确定符合预先调整尺寸和形状标准, 符合非人为目标的信号产生区域。

## 使用共价结合荧光团合并免疫染色法和荧光原位杂交法的方法

### 相关申请的交叉引用

本申请根据 35 U.S.C § 119(e), 要求享有美国临时申请序列号 60/821,550 (2006 年 8 月 4 日申请)和 60/781,888 (2006 年 3 月 13 日申请)的权益。

### 发明背景

本说明书中引用的所有参考文献及其参考文献,全都通过引用结合到本文中,适于教导额外的或替代的细节、特征和/或技术背景。

### 发明领域

本发明包括一种使用共价结合小分子标记而合并免疫染色法和荧光原位杂交法(FISH)的方法。

### 相关技术描述

已知有很多方法可以辅助样品的显微镜分析。例如但并不意味限制,众所周知某些染料对于某些细胞结构有亲和力。这类染料可帮助对这类结构作进一步阐明,因此它们可用于辅助分析。

细胞和组织的荧光显微镜法在本领域众所周知。已开发出多种方法来反映显微镜下的荧光细胞和空间分布的精确信息及发生在这些细胞中的瞬时改变。这些方法中的某些方法及其应用在 Taylor 等人的文章中已有描述(Taylor 等, American Scientist 80 (1992), p.322-335)。为了对细胞内荧光报道分子的分布、数量和生化环境进行高度空间和时间分辨率成像测定,对这些方法中少量样品的制备进行了合理设计和优化。

可以通过利用发射荧光成像的落射荧光显微镜,实现对荧光信号

的检测(而传统的反射显微镜利用分散照明光成像)。落射荧光显微镜的激发光可用于激发样品中的荧光标记,以引发荧光标记发射荧光。落射荧光显微镜的优势是可以制备样品以致荧光分子优先附着在目标生物结构上,因此可鉴定出这样的目标生物结构。

首字母缩略词“FISH”是指利用发色团标记(荧光团)经光照射后可发射二级信号来检测染色体结构的技术。FISH使用了荧光探针,该荧光探针只结合于染色体中与其有高度序列相似性的部分。这类标记可以针对特定染色体及染色体特定区域。探针需要足够长以便与其靶特异性杂交(而不与基因组中相似序列杂交),但不能过长以致妨碍杂交过程。典型地,探针直接用荧光团标记。这可以通过多种方法实现,如切口平移或使用标记核苷酸的聚合酶链式反应(PCR)。如果信号放大有必要超过显微镜的检测阈值(阈值取决于多种因素,如探针标记效率,探针和荧光染料种类),则将二抗或链霉抗生素与标记分子结合,这样即放大信号。

FISH技术可用于鉴定染色体异常和基因图谱绘制。例如,21号染色体的FISH探针允许对含有21三体(一条额外的21号染色体,引起唐氏综合征)的细胞进行FISH。包括多色DNA探针的FISH试剂盒是市售的。例如,Abbott实验室的Vysis公司销售的AneuVysion多色DNA探针试剂盒被设计为通过中期和间期细胞核的荧光原位杂交(FISH),体外诊断性检验羊水样品中13、18、21号染色体、X染色体和Y染色体的异常。AneuVysion Assay(CEP 18、X、Y- $\alpha$ 卫星序列,LSI 13和21)多色探针板使用CEP 18/X/Y探针来检测18号染色体、X染色体和Y染色体着丝粒区域内的 $\alpha$ 卫星序列,并且使用LSI 13/21探针来检测13q14区域和21q22.13到21q22.2区域。利用所显示颜色的组合来确定是存在正常染色体数目还是存在三体性。类似地,Abbott实验室的Vysis公司的UroVysion试剂盒被设计为通过荧光原位杂交(FISH)检测怀疑患有膀胱癌的有血尿病人尿样本中3、7、17号染色体的非整倍性及9p21位点缺失,来检测与膀胱癌的发生和发展有关的

染色体异常。

目标结构的另一种检测方法是免疫染色法。免疫染色法是指使用抗体检测生物材料的实验室方法。通常，这些抗体用一种可通过显微镜观察到的荧光化合物进行标记。例如，在生物样品中，检测目标蛋白质的抗体由外源宿主物种(多克隆抗体)或培养的免疫细胞克隆(单克隆抗体)产生。在暴露于外源蛋白之后，可收获抗体，而且用作十分特异和灵敏的检测试剂。这样产生的抗体被称为“一抗”，因为它们直接与目标蛋白结合。某些免疫染色剂可以单独阶段应用，其中一抗直接与显色剂连接。其它情况下，一抗是“二”抗的靶标，二抗以一抗结构中物种特异部分为靶标。后一技术的优势在于信号被放大，原因是多个二抗将结合于一个一抗。它也允许一抗的高度变化——研究者可制作自己的抗体而不需要将它们与显色剂自身缀合。最终，它意味着多种显色剂可以与任一给定种的二抗缀合，而且能够在现成供给中得到。这已打开了“双标记”实验的局面，在此实验中多种蛋白可被共定位。

传统上，免疫染色技术与 FISH 的结合已具挑战性。如果免疫染色先完成，后续的 FISH 处理可能破坏大部分抗体 - 抗原间的非共价相互作用。同样，如果 FISH 先完成，后续的抗体处理可能因其低盐浓度而释放 FISH 探针。因为生物样品中某些部分的免疫染色以及同一生物样品其它区域的 FISH 染色会有优势，所以如果能开发出一个允许免疫染色和 FISH 染色结合的系统将会是十分有利的。

### 发明概述

本文公开的实施方案包括：

一种方法，其按顺序包括：(a)用一种或多种抗体处理含有染色体材料的生物样品，该抗体对该生物样品的至少一个非染色体部分有亲和力，其中所述抗体上有引入的不可检测的反应性缀合物；(b)用荧光标记的染色体探针处理所述生物样品，该探针与所述染色体材料的一

个或多个部分有高度序列相似性；和(c)用可检测的标记处理所述生物样品，该标记与所述抗体上所述不可检测的反应性缀合物反应，而不与所述染色体材料或所述生物样品的非染色体部分反应。所述不可检测的反应性缀合物可以是生物素化酪胺酰胺，而与之反应的可检测标记可以用荧光团标记的链霉抗生素。

另一方面，还提供了一种方法，其按顺序包括：(a)用一种或多种抗体处理含有染色体材料的生物样品，该抗体对该生物样品的至少一个非染色体部分有亲和力，其中所述抗体上有引入的可检测的反应性缀合物；(b)用荧光标记的染色体探针处理所述生物样品，该探针与所述染色体材料的一个或多个部分有高度序列相似性；和c)用不可检测或可检测的标记处理所述生物样品，该标记与所述抗体上所述可检测的反应性缀合物反应，而不与所述染色体材料或所述生物样品的非染色体部分反应。

还提供一种用于将生物材料固定在表面的方法，所述方法包括以下步骤：(a)获得生物样品的含水上清液，将至少一部分所述样品置于部分样品将被固定的表面上；(b)取出等分体积的所述上清液，取出的等分体积用同样体积的烷基醇替代，其中所述取出和替代重复进行多次以使部分样品逐渐固定在表面。烷基醇可以是  $C_1$ - $C_{12}$  醇、 $C_1$ - $C_6$  醇或者甲醇。

又提供一种用于装载密度离心梯度的方法，所述方法包括以下步骤：(a)制备离心梯度；(b)通过毛细管漏斗将样品加到所述离心梯度上。

还公开一种用于同步鉴定多种亚细胞组分的方法，所述方法包括以下步骤：用与待鉴定的每一个所述亚细胞组分有特异性的抗体将细胞样品免疫染色；同时用一种或多种包含不同荧光团以区分待鉴定的每一个所述亚细胞组分的荧光原位杂交探针处理所述细胞样品；使用显微镜系统显现并量化由所述探针产生的荧光信号。

又公开一种用于鉴定和计算荧光原位杂交(“FISH”)信号的方法，该信号相对于与荧光标记原位杂交的细胞核组分而产生：使用落射荧

光显微镜，在每一对应于杂交 FISH 标记的荧光通道中，在不同的焦平面上，得到大量图像；对于每一细胞核，从所述大量图像中选出一个最佳聚焦图像；对于每一细胞核，用所述落射荧光显微镜，从所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下，得到大量图像；对于每一细胞核，在图像最佳聚焦的所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下，各选出一个焦平面；将来自每个细胞核的所述最佳聚焦图像之上和之下的一个焦平面的所述图像与所述最佳聚焦图像合并，以产生所述细胞核的合并图像；分析每个细胞核的合并图像以把背景像素和信号像素分开，而且确定符合预先调整尺寸和形状标准，符合非人为目标的信号产生区域。

### 发明详述

本文公开了一些用于标记细胞的亚细胞组分的技术，使得可以鉴定出细胞的亚细胞组分，并根据细胞的亚细胞组分的图像作出生物学决策。

在一个实施方案中，用免疫染色剂将亚细胞组分染色，该染色剂含有与待鉴定的每一个亚细胞组分有特异性的抗体，并用一种或多种 FISH 探针进行标记，该探针含有不同种可区分待鉴定的每一个亚细胞组分的荧光团。产生的信号经自动显微镜系统量化。

在一个实施方案中，公开一种鉴定和计算荧光原位杂交(“FISH”)信号的方法，该信号相对于与荧光标记原位杂交的细胞核组分而产生，该方法包括以下步骤：(a)使用落射荧光显微镜，在每一对应于杂交 FISH 标记的荧光通道中，在不同的焦平面上，得到大量图像；(b)对于每一细胞核，从所述大量图像中选出一个最佳聚焦图像；(c)对于每一细胞核，用所述落射荧光显微镜，从所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下，得到大量图像；(d)对于每一细胞核，在图像最佳聚焦的所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下，各选出一个焦平面；(e)将来自所述最佳聚焦图像之上和之下的一个焦平面的所述图像与所述最

佳聚焦图像合并，以产生所述细胞核的合并图像；(f)分析每个细胞核的合并图像以把背景像素和信号像素分开，而且确定符合预先调整尺寸和形状标准，符合非人为目标的信号产生区域。

在另一个实施方案中，提供一种用于同步鉴定多种亚细胞组分的方法，该方法包括以下步骤：(a)用与待鉴定的每一个亚细胞组分有特异性的抗体将细胞样品免疫染色；(b)同时用一种或多种包含不同荧光团以区分待鉴定的每一个所述亚细胞组分的荧光原位杂交探针处理所述细胞样品；和(c)使用显微镜系统显现并量化由所述探针产生的荧光信号。

亚细胞组分可以是任意细胞组分。例如，亚细胞组分可以是一种发育年龄的指示。例如，端粒长度可以根据信号来确定，而且可用于确定细胞年龄。

测试可在大量显微镜载玻片上实施，而且这些载玻片可用数字化可读信息任选编码，这些信息记载了载玻片上的样品或对样品实施的测试。

例如，可以使用其上有多聚-L-赖氨酸涂层的显微镜载玻片，沿着至少一个区域样品将沉积在载玻片上。多聚-L-赖氨酸涂层有助于细胞、细胞材料和其它生物材料粘附在载玻片上。可通过使用有壁的腔(有至少一个部分开放的顶部和底部，将沉积在载玻片上的材料可置于该腔内)，来辅助生物材料施加到载玻片上用多聚-L-赖氨酸包被的部分。该有壁的腔可连在一操作上构造为支撑显微镜载玻片(载玻片可作好标记后，再插入(例如插到舌形或凹槽结构中))的基座上。放置了样品的显微镜载玻片部分可以确立限定的覆盖区域的方式在壁结构中定位。该有壁的腔束缚于固定点以允许在通过推动或拉动载玻片将显微镜载玻片放入或从基座取出时，该有壁的腔可绕支点转动。

生物材料也可以固定在载玻片的表面，该方法包括以下步骤：(a)获得生物样品的含水上清液，将至少一部分所述样品置于部分样品将被固定的表面上；(b)取出等分体积的所述上清液，取出的等分体积用

同样体积的烷基醇替代，其中所述取出和替代重复进行多次以使部分样品逐渐固定在表面。烷基醇可以选自：烷基醇可以是 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 醇，C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 醇或者甲醇。

相对于与荧光标记原位杂交的细胞核组分而产生的荧光原位杂交(“FISH”)信号的鉴定和计算可通过许多不同的方法实现。一种可能有应用的方法包括以下步骤：用落射荧光显微镜，在每一对应于杂交 FISH 标记的荧光通道中，在不同的焦平面上，得到大量图像；对于每一细胞核，从所述大量图像中选出一个最佳聚焦图像；对于每一细胞核，用所述落射荧光显微镜，从所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下，得到大量图像；对于每一细胞核，在图像最佳聚焦的所述最佳聚焦图像的焦平面之上和之下，各选出一个焦平面；将来自每个细胞核的所述最佳聚焦图像之上和之下的一个焦平面的所述图像与所述最佳聚焦图像合并，以产生所述细胞核的合并图像；分析每个细胞核的合并图像以把背景像素和信号像素分开，而且确定符合预先调整尺寸和形状标准，符合非人为目标的信号产生区域。

在一个检测胎儿游离有核细胞的实施方案方法中，举例来说，将过量的血液转移至圆锥形管。随后，该量混合后加到制备好的梯度中。密度离心梯度可通过使用移液器或可选择的(已发现)——通过一次性塑料毛细管漏斗(其允许梯度依靠重力自我装载)而手动装载。随后，管可经离心分离，离心制动闸关闭以防止减速时破坏梯度。可取出有核细胞，而且作进一步稀释，然后再一次离心。在取出上清液之后，细胞可重新悬浮，例如重新悬浮在 PBS 中。

随后，可将细胞沉积在显微载玻片上，例如上面讨论的多聚-L-赖氨酸包被的载玻片或载玻片腔。甲醇溶液(随后用 2% 的甲醛 PBS (=磷酸缓冲盐溶液，例如 pH 值为 7.4)溶液处理，再将其从甲醇溶液中倒出)可用于将细胞固定在载玻片上。随着甲醇的逐步引入，部分量上清液被除去。该技术避免了溶剂性质的骤然变化，而且可逐步固定靶物质。在甲醇/甲醛/PBS 溶液全部被除去之后，经固定的细胞可保存

在 PBST (= PBS 和 0.05%吐温 20)溶液中直至准备好免疫染色。

在一项免疫染色技术中,载玻片可与抗体例如抗小鼠 IgG-HRP (=过氧化物酶缀合的兔抗小鼠 IgG)缀合物和/或抗 Hb<sub>E</sub>-CRTX (抗血红蛋白(ε 链)单克隆抗体)一起孵育,然后用 DNA 络合剂例如 DAPI (4'-6-二脒基-2-苯基吲哚)(可与天然双链 DNA 形成荧光络合物)进行染色。载玻片可在 PBS 中平衡,其中胃蛋白酶母液用于改进细胞核浓度。例如,细胞核可用甲醛、氯化镁的 PBS 溶液处理,用系列乙醇脱水、风干,这样细胞核就被固定在载玻片上。

随后,可采用探针杂交。探针可在载玻片上进行热循环,然后将载玻片置于上述架子中,最后将大批量置于潮湿的 FISH 室并允许杂交。随后,用本领域已知方法除去非特异结合的探针。经探针处理的样品可用 DNA 染色剂(如 DAPI)复染,用系列乙醇脱水,风干。可使载玻片上的样品成像以确定抗体和 DNA 染色剂的结合,根据结合特征确定样品特征。

在一种可能的选择中,抗体可含有一种自身不可检测的生物素化酪胺酰胺官能团。然而,FISH 处理后,抗体可通过使用荧光团标记的链霉抗生素予以阐明。

### 关于优选实施方案的声明

尽管本发明已就优选的实施方案进行了描述,但是本领域技术人员应当容易理解,在不偏离所附权利要求限定的发明精神或范围的情况下,可以对本发明进行各种变化和/或修改。

专利名称(译)	使用共价结合荧光团合并免疫染色法和荧光原位杂交法的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101400805A</a>	公开(公告)日	2009-04-01
申请号	CN200780008717.9	申请日	2007-03-13
[标]发明人	M基尔帕特里克 A赛博 T塔法斯		
发明人	M·基尔帕特里克 A·赛博 T·塔法斯		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/533 G01N33/543 G01N21/76		
代理人(译)	刘冬 刘玥		
优先权	60/821550 2006-08-04 US 60/781888 2006-03-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

在实施方案中，公开了一种用于将样品免疫染色以使染色剂在FISH条件下稳定的方法。