



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112840259 A

(43) 申请公布日 2021.05.25

(21) 申请号 201980067385.4

(22) 申请日 2019.10.11

(30) 优先权数据

62/745,074 2018.10.12 US

16/597,930 2019.10.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/058703 2019.10.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/075137 EN 2020.04.16

(71) 申请人 深圳市诺高实验器材有限公司

地址 518125 广东省深圳市宝安区新桥街
道新桥社区新玉路48号七层2-13楼
703

(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2页 说明书24页 附图13页

(54) 发明名称

用于染色的过程记录载玻片及其使用方法

(57) 摘要

本文描述了用于染色的过程记录载玻片。该过程记录载玻片包括用于安装样品的检测区域和包括一个或多个对照靶标的对照区域。本文还描述了在免疫组织化学(IHC)或免疫化学(ICC)染色过程中使用过程记录载玻片的方法。

1. 一种载玻片, 包括:

检测区域, 所述检测区域配置为容纳包括组织切片或疏松细胞的样品; 和

对照区域, 所述对照区域配置为:

指示免疫组织化学或免疫化学检测过程中的中间步骤的错误和性能指标, 并且

为定性或定量确定染色组织或细胞的颜色和抗原密度提供参考。

2. 根据权利要求1所述的载玻片, 还包括配置为与分子部分结合的粘合剂涂层, 其中所述粘合剂涂层包括选自以下的至少一个端基: $-ROH$, $-R(C=O)OH$, $-RNH_3$, $-R(C=O)NH_2$ 和 $-RNH_2$ 。

3. 根据权利要求1所述的载玻片, 其中所述对照区域包括第一靶标阵列, 所述第一靶标阵列包括一个或多个第一靶标装载点, 所述一个或多个第一靶标装载点中的每个第一靶标装载点包括蛋白质位点, 所述蛋白质位点包括对第一抗体上的宿主FcγRI肽具有反应性的蛋白质, 所述蛋白质对单个或多个第一抗体宿主具有反应性, 并且每个蛋白质位点都将单个第一抗体蛋白质固定在所述载玻片上。

4. 根据权利要求3所述的载玻片, 其中所述FcγRI肽与载体蛋白偶联, 并且所述载体蛋白包括非反应性蛋白, 所述非反应性蛋白与所述免疫组织化学或免疫化学检测过程中使用的第二染色剂不反应。

5. 根据权利要求4所述的载玻片, 其中所述第一靶标阵列包括多个第一靶标装载点, 所述多个第一靶标装载点中的每个第一靶标装载点包括相同的反应性FcγRI肽, 所述多个第一靶标装载点中的每个第一靶标装载点具有与所述多个第一靶标装载点中的其他每个第一靶标装载点不同的反应性FcγRI肽浓度。

6. 根据权利要求4所述的载玻片, 其中所述第一靶标阵列包括多个第一靶标装载点, 所述多个第一靶标装载点中的每个第一靶标装载点包括不同的反应性肽, 所述多个第一靶标装载点中的每个第一靶标装载点具有与所述多个第一靶标装载点中的其他每个第一靶标装载点不同的反应性肽浓度。

7. 根据权利要求1所述的载玻片, 其中所述对照区域包括第一靶标阵列, 所述第一靶标阵列包括第一靶标装载点, 所述第一靶标装载点包括多个第一靶标, 并且所述多个第一靶标中的每个包括针对在所述免疫组织化学或免疫化学检测过程中使用的第一抗体的宿主蛋白的抗体。

8. 根据权利要求1所述的载玻片, 其中所述对照区域包括第一靶标阵列, 所述第一靶标阵列包括第一装载点, 所述第一靶标装载点包括多个第一靶标, 并且所述多个第一靶标中的每个包括针对在所述免疫组织化学或免疫化学检测过程中使用的第一抗体的宿主蛋白的蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或蛋白L。

9. 根据权利要求1所述的载玻片, 其中所述对照区域包括第二靶标阵列, 所述第二靶标阵列包括第二靶标装载点, 所述第二靶标装载点包括多个第二靶标, 并且所述多个第二靶标中的每个包括:

在所述免疫组织化学或免疫化学检测过程中使用的第一抗体的宿主蛋白; 和
伪蛋白质。

10. 根据权利要求9所述的载玻片, 其中所述对照区域包括多个第二靶标阵列, 在相同的第二靶标阵列中的所述多个第二靶标阵列中的每个包括相同的宿主蛋白, 在不同的第二

靶标阵列中的所述多个第二靶标阵列中的每个包括不同的宿主蛋白。

11. 根据权利要求1所述的载玻片,其中所述对照区域还包括成像参考装载点。

12. 根据权利要求11所述的载玻片,其中所述成像参考装载点包括以下至少一个:

黑色参考靶标,所述黑色参考靶标包括碳尘;

白色参考靶标,其中所述白色参考靶标包括金属氧化物或金属硫酸盐;或者

透明参考靶标,其中所述透明参考靶标包括针对任何免疫组织化学或免疫化学试剂的非反应性蛋白质。

13. 根据权利要求11所述的载玻片,其中所述成像参考装载点包括:

用于白色参考靶标和黑色参考靶标的酸酐基环氧树脂;和

用于透明参考靶标的来自哺乳类马科动物的蛋白质。

14. 根据权利要求1所述的载玻片,其中所述对照区域还包括抗原修复监测装载点,其配置为监测所述免疫组织化学或免疫化学检测过程中抗原修复的程度。

15. 根据权利要求14所述的载玻片,其中所述抗原修复监测装载点包括载体蛋白或亚微珠粒,所述载体蛋白或亚微珠粒包括:

共价结合的宿主蛋白,用于定义3D颗粒;和

在所述宿主蛋白下方或上方的固定剂。

16. 根据权利要求1所述的载玻片,其中所述对照区域覆盖有石蜡涂层。

17. 根据权利要求1所述的载玻片,还包括以下至少之一:

用于标识载玻片类型的标记;

用于标识由所述对照区域所承载的抗原的编码;或者
批号。

18. 一种使用载玻片进行免疫组织化学染色的方法,所述方法包括:

去除固定剂的一部分,其中所述部分足以暴露组织切片中的抗原位点并足以暴露对照靶标;

对所述组织切片和所述对照靶标进行染色,其中所述染色包括:

将一种或多种第一抗体施加至载玻片,并将一种或多种与分子部分缀合的第二抗体施加至所述载玻片;或将一种或多种与所述分子部分缀合的第一抗体施加至所述载玻片;和
在存在所述分子部分的情况下施加产生颜色的染色剂以指示靶抗原的存在;

评估染色过程的质量,其中所述评估包括:评估所述对照靶标或位于与所述组织切片分开的对照区域中的抗原修复监测的染色结果。

19. 根据权利要求18所述的方法,还包括从所述对照靶标上去除石蜡保护层,其中所述去除石蜡保护层包括:

将所述载玻片加热至65°C至75°C之间的温度3至10分钟,以在所述对照区域和所述组织切片上获得半液化石蜡;

用有机溶剂液化所述半液化石蜡;

使用梯度无水乙醇至最高60%的乙醇浓度使所述对照区域和检测区域再水化;和
在缓冲溶液中使所述对照靶标再水化。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述有机溶剂包括以下至少一种:脂肪族溶剂、二甲苯和混合二甲苯,所述缓冲溶液是盐基缓冲溶液。

用于染色的过程记录载玻片及其使用方法

优先权和交叉引用

[0001] 本申请要求于2019年10月10日提交的美国专利申请16/597,930的优先权,其要求于2018年10月12日提交的美国临时申请62/745,074的优先权,其中每个申请的全部内容通过引用合并于本文。

背景

[0002] 免疫组织化学方法以及其他免疫化学方法是多步骤程序。这些方法包括一系列试剂交换、培养和洗涤。该程序需要熟练的技术人员,通常需要使用自动染色机。由于过程中缺乏质量控制标准或质量控制标准不统一,使得在实验室或研究所之间的差异可能很大。对处理过的载玻片的诊断解释取决于病理学家的主观分析,在大多数情况下,病理学家不参与染色过程。

附图的简要说明

[0003] 当结合附图阅读时,根据以下详细描述可以最好地理解本公开的各方面。应当注意,根据行业中的实践标准,各种特征未按比例绘制。实际上,为了清楚起见,可以任意地放大或缩小各特征的尺寸。

[0004] 图1是根据一些实施例的过程记录载玻片。

[0005] 图2是根据一些实施例的过程记录载玻片。

[0006] 图3A是根据一些实施例的在制造过程中的过程记录载玻片。图3B是根据一些实施例的在制造过程完成之后的过程记录载玻片。图3C是根据一些实施例的在染色过程之后的过程记录载玻片。

[0007] 图4是根据一些实施例的包括石蜡涂层的过程记录载玻片。

[0008] 图5A和图5B是根据一些实施例的载玻片的第一靶标密度梯度阵列和第二靶标密度阵列。

[0009] 图6是根据一些实施例的载玻片的抗原修复靶标。

[0010] 图7是根据一些实施例的载玻片的对照区域。

[0011] 图8A和图8B是根据一些实施例的在染色过程之后的载玻片。

[0012] 图9是根据一些实施例的使用载玻片的染色过程。

[0013] 图10是根据一些实施例的染色载玻片的成像结果。

[0014] 图11是根据一些实施例的酶扩增过程。

[0015] 图12是根据一些实施例的与任何基于小鼠或小兔的第一抗体共同使用的单个第一抗体对照载玻片。

[0016] 图13是根据一些实施例的双重第一抗体对照载玻片,其承载使用一种基于小鼠的第一抗体和一种基于小兔的第一抗体。

详细描述

[0017] 以下公开内容提供了用于实现本文所提供的技术主题的不同特征的多不同的实施例或示例。下面描述组件和布置的特定示例以简化本公开。当然,这些仅是示例,并不旨在进行限制。例如,在下面的描述中,在第二特征之上形成第一特征可以包括第一特征和

第二特征直接接触形成的实施例,还可以包括在第一特征和第二特征之间形成附加特征使得第一特征和第二特征可以不直接接触的实施例。另外,本公开可以在各个示例中重复参考数字和/或字母标记。该重复是出于简单和清楚的目的,并且其本身并不指示所讨论的各个实施例和/或配置之间的关系。

[0018] 对于免疫组织化学方法和其他免疫化学方法,自动程序和手动程序都包括应小心护理的步骤。例如,必须小心以避免载玻片上的样品丢失或损坏。由于在两次使用试剂之间要彻底清洗样品以去除任何未结合的抗体,因为残基会被扩增。而且要去掉多余的液体以避免前一试剂的残留和/或后一试剂的不必要的稀释,但是决不能让样品变干。另外,必须使用足够的抗体试剂来覆盖载玻片区域,但是由于试剂价格昂贵,因此必须把浪费保持在最低限度。

[0019] 另外,用于免疫组织化学方法以及免疫化学方法的试剂(例如酶溶液和过氧化物酶显色试剂)在工作温度或室温下具有有限的稳定性。稳定性有限导致需要频繁制备试剂。此外,非特异性抗体结合导致错误结果也是一个问题。

[0020] 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。在IHC分析中,会针对组织切片上的染色密度进行主观解释,以指定异常或癌性疾病的诊断水平。通常假设IHC处理正常,并且如果存在标记,则组织切片将用可见的色原标记进行标记,从而识别异常或癌性疾病。但是,抗原修复过程的失败或实验室技术人员或染色过程中的失误通常不会留下可识别的伪影。发生这种情况时,IHC分析仅提供苏木精和伊红(H&E)染色所提供的功能。此外,染色过程中的失败或失误有时会导致误诊,从而影响后续治疗。

[0021] 改善结果并最简化试剂制备的方法和试剂将促进手动和自动免疫组织化学方法。许多改进可以很容易地应用于相关的免疫化学方法,例如酶联免疫吸附试验(ELISA),免疫荧光试验和原位杂交。

[0022] 由于上述原因,很难完全消除免疫组织化学方法和免疫化学方法中的错误。因此,已经开发出揭示错误的存在和/或程度的各种方法。下面将描述一些方法以及这些方法的局限性。

[0023] 可以参考“Use of cultured cells as a control for quantitative immunocytochemical analysis of estrogen receptor in breast cancer the Quicgel method”(其全部内容通过引用并入本文)。该参考文献指出,组织固定、处理和染色的变化是造成雌激素受体(ER)免疫组织化学分析重现性差的主要原因。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)样品中的每一个中作为对照。图像分析确定了MCF-7细胞和IBC阳性面积的百分比(阳性核素/分析的总核仁)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)。通过葡聚糖包裹木炭分析,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。通过使用已知的ER含量和阳性面积的MCF-7细胞,转换因子用于将临床样品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。

[0024] 可以参考CN102435728(其全部内容通过引用合并于本文)。该参考文献描述了制备和利用阳性对照来检查和控制免疫组织化学过程质量的方法。根据CN102435728,通过在

载玻片上以不同浓度吸附与抗体发生特异性反应的多肽或蛋白质来构建对照靶标。然后将样品组织安装在载玻片上,并在载玻片上进行常规的免疫组织化学过程。因为样品组织和对照靶标经历相同的染色过程,所以多肽/蛋白质的染色结果可指示组织上免疫组织化学过程的结果。CN102435728还描述了将阳性对照蛋白或多肽设置在免疫组织化学载玻片上。

[0025] 普通技术人员评价CN102435728的方法将理解,对照靶标中蛋白质/肽的密度不一致。原因是肽段与右旋糖酐聚合物的结合取决于混合溶液的粘度、从右旋糖酐中去除过量肽的洗涤过程和温度。另外,沉淀的聚合物颗粒的尺寸随溶液浓度、反应温度和NaOH注入量而变化。

[0026] 普通技术人员评价CN102435728的方法将理解,构建已知反应性(染色密度)的靶标是困难的。原因是聚合物颗粒中可用肽的浓度不易得出。这样,得到的对照仅为是/否第一抗体检测。

[0027] 普通技术人员评估CN102435728的方法将理解,尽管右旋糖酐能够捕获蛋白质以靶向抗体,但是所捕获的蛋白质仅提供是/否的结果。因此,不能建立基线检测标尺来支持例如数字成像。

[0028] 普通技术人员评估CN102435728的方法将理解,吸收在载玻片上的蛋白质/肽在抗原修复过程中经常泄漏。由于载玻片的尺寸相对较小,因此对照靶标与样品区域之间的距离非常近,泄漏的蛋白质/肽可移至组织切片。这样,泄漏可结合到共存的组织切片和载玻片粘合剂上以发生非特异性染色。

[0029] 参考Horizon Diagnostics,其提供了与CN102435728中描述的载玻片不同的载玻片结构。在Horizon Diagnostics的载玻片中,对照靶标是培养的细胞系。对细胞系进行了基因改造,使其在DNA中包括特定抗原肽的编码序列。基因改造的细胞通过福尔马林固定在载玻片的组织块中,并以疏松细胞浆的形式进行石蜡化。另外,载玻片中还包括非反应性细胞的对照靶标作为阴性对照。为了产生对照靶标阵列,将每个细胞组形成为与其他核对齐的圆柱核,然后将整个阵列切割为单个部分,以施加到载玻片上。这些细胞系可以根据需要进行复制,因此可以视为可再生的。

[0030] 普通技术人员评估由Horizon Diagnostics制造的载玻片将理解,由于对照靶标中存在的反应性抗原的密度变化不可控制,因此对照靶标只能提供是/否结果。原因是难以控制细胞的量或由细胞产生的抗原的量。这样,每个对照靶标包括不同量的抗原。另外,对照靶标经过抗原修复过程,将另一个变量引入对照靶标中的抗原的量。

[0031] 普通技术人员评估由Horizon Diagnostics制造的载玻片将理解,不能简单地以一定比例混合产生抗原的细胞系和空白细胞系来控制每个细胞孔中的抗原的量。原因是不同细胞系上的静电荷通常不同。这样,不同的细胞系通常在细胞培养过程中解离,并长成不同细胞的切片,使得不太可能或甚至不可能产生抗原密度标度。

[0032] 普通技术人员评估Horizon Diagnostics制造的载玻片将理解,由于细胞复制的复制寿命有限,因此细胞系性能不一致。不能保证新的细胞系将具有与任何先前的细胞系相同的抗原密度。

[0033] 普通技术人员评估HorizonDiagnostics制成的载玻片将理解,由于构造组织块、切块并将切块切成片需要手工操作,因此HorizonDiagnostics的对照靶标成本效益不高。

[0034] 可以参考US2016/0274006A1(其全部内容通过引用并入本文),其描述了用作对安

装在显微镜载玻片上的细胞和组织进行的分析的对照和校准物的方法和装置。US2016/0274006A1的装置包括与颗粒物体(例如透明球形珠粒,并且该珠粒优选地大约为细胞的大小)相连的质量控制部分,例如肽表位。设计质量控制部分,使其在分析中的行为与分析物相似,从而发生阳性分析反应。在用新型液体基质染色的过程中,珠粒保留在显微镜载玻片上,该基质在干燥后会固化并导致珠粒粘附到显微镜载玻片上。

[0035] 然而,US2016/0274006A1的这种对照和校准物解决方案的实用性有限。由于将对照靶标材料涂覆在珠粒上并且位置稀疏,因此靶标的稳定性趋于弱,并且难以提取靶标数据。此外,在对单个珠粒进行成像时,染色的颜色会从顶部中心到边缘发生变化,从而引入其他变量。

[0036] 可以参考US7271008B2(其全部内容通过引用并入本文),该参考文献描述了用于确定在分析过程特别是多步免疫组织化学检测中使用的试剂的质量的装置和方法。特别地,该装置包括具有多种化合物附着于其上的基质,其中每种化合物都与分析检测中使用的试剂反应。

[0037] US7271008B2的装置提供了评估第二抗体染色的质量控制。然而,US7271008B2的装置没有与样品一起经历IHC染色的相同步骤。因此,该装置对IHC染色的代表性有限。此外,该装置在基质中使用氨基硅烷,无法形成能够在抗原修复过程中保留下来的共价键。而且,碱性磷酸酶靶标在暴露于抗原修复温度时会分解。这样,US7271008B2的装置在监测抗原修复过程中没有用(已知抗原修复过程在IHC染色过程中会引入未知变量)。

[0038] 鉴于上述情况,本说明书在一些实施例中描述了一种过程记录载玻片和一种用于解决这些问题的染色方法。具体而言,本说明书描述了一种过程记录载玻片,该载玻片允许患者样品和对照靶标共同驻留并共同经历染色过程。这样,在样品的处理中,对照靶标也被染色,这揭示了处理误差(与已知靶标基线的偏差)的存在和程度。本领域普通技术人员将认识到,施加到样品上的染色试剂浓度的变化将影响主观分析。过量的第一抗体通常会在组织切片上引起非特异性染色。忽略抗原修复过程,第一抗体、第二抗体和色原试剂的功效会影响染色颜色密度(组织切片上抗原密度的指示)。抗体蛋白质的老化会导致Fab和Fc之间的铰链域很快断裂,随后Fc域分裂。只有同时包括Fab和Fc域的抗体才能成功操作。许多色原试剂(包括用于沉淀的着色剂)的使用寿命很短,有些甚至只有几个小时。因此,不同寿命的色原试剂将具有不同的性能,从而导致染色颜色密度的变化。因此,试剂的性能可以而且确实会影响所观察样品中的染色颜色密度。由于相同的染色试剂同时用于样品和对照靶标,因此对照靶标考虑试剂使用寿命和用量的变化,以便为分析提供更多客观信息。根据这些实施例,过程记录载玻片能够在成本敏感的价格点内以期望的准确度和精确度来获得有效的过程QC,从而使其可以在每个IHC和ICC载玻片上使用。

过程记录载玻片

[0039] 在一些实施例中,本说明书涉及过程记录载玻片。在本说明书中,术语“过程记录载玻片”可替代地称为“载玻片”,“PRS”或“PRS-IHC”。术语“PRS-IHC”中的“IHC”部分并不意味着将载玻片的构建或功能仅限于免疫组织化学(IHC)染色。相反,本领域普通技术人员将理解,如本文所述的过程记录载玻片也可用于其他染色过程,例如免疫化学(ICC)。

[0040] 在一些实施例中,本说明书涉及过程记录载玻片,其能够容易地确定免疫组织化学(IHC)或免疫化学(ICC)检测中通常涉及的步骤的有效性。这些步骤包括石蜡去除、抗原

修复、第一染色、第二染色等。

[0041] 参照图1,在一些实施例中,过程记录载玻片100包括基板101、粘合剂层103和一个或多个对照靶标141。

[0042] 在一些实施例中,基板101包括玻璃基板、塑料基板或聚合物基板。

[0043] 在一些实施例中,粘合剂层103包括粘合剂。在一些实施例中,粘合剂共价结合到基板101上,例如玻璃基板。

[0044] 在一些实施例中,粘合剂在载玻片上提供略微亲水的表面。在一些实施例中,粘合剂的材料包括端基,该端基存在于生物材料中并且在制造时可调节表面润湿性。在一些实施例中,端基包括选自 $-ROH$, $-R(C=O)OH$, $-RNH_3$, $-R(C=O)NH_2$ 和 $-RNH_2$ 中的一个或多个基团。在一些实施例中,粘合剂层103包括与在Thermo-Fisher SuperFrost载玻片GL4951P的涂层中发现的粘合剂相同或相似的粘合剂。

[0045] 在一些实施例中,一个或多个对照靶标141经由粘合剂层沉积在基板层上。在一些实施例中,一个或多个对照靶标沉积在载玻片100的对照区域140中。

[0046] 在一些实施例中,对照靶标141包括与在IHC或ICC过程中使用的一种或多种试剂反应并产生读数(例如颜色形式的读数)的化合物。每个对照靶标141包括不同浓度的化合物。与在IHC或ICC过程中的一种或多种试剂相互作用后,化合物浓度的变化在对照靶标141之间提供了可识别的差异。

[0047] 在一些实施例中,过程记录载玻片100还包括覆盖载玻片100的全部或一部分的保护涂层105。在一些实施例中,保护涂层105将对照靶标141与外部环境密封。如下文所详述,对照靶标141有时包括蛋白质、肽或其他生物学来源的靶标。因此,保护涂层105保护对照靶标141免受氧化或微生物侵袭。

[0048] 在一些实施例中,保护涂层105是石蜡涂层。根据这些实施例,通过相同的去石蜡步骤,将石蜡涂层与在组织/细胞样品上的包埋石蜡一起去除,以进行IHC或ICC检测研究。

[0049] 参照图1-图3C,在一些实施例中,过程记录载玻片100包括配置为容纳样品的检测区域120和对照区域140。

[0050] 在一些实施例中,检测区域120配置为容纳患者样品,例如组织切片或松散的细胞。

[0051] 在一些实施例中,对照区域140容纳一个或多个对照靶标141,与容纳在检测区域中的样品共同经历染色过程。

[0052] 在一些实施例中,检测区域120和对照区域140具有标记边界。在一些实施例中,检测区域120和对照区域140不具有标记边界,而基于各自的功能进行分类。

[0053] 在一些实施例中,对照靶标141以一个或多个对照靶标装载点1411的形式布置。在一些实施例中,装载点为规则或不规则形状。在一些实施例中,规则形状包括圆形、椭圆形、正方形或菱形。在一些实施例中,对照靶标141以2D或3D配置布置。

[0054] 在一些实施例中,对照靶标141以一个或多个对照靶标阵列1415的形式布置,例如一个或多个对照靶标装载点1411的阵列。在一些实施例中,每个对照靶标阵列1415包括具有相同或相似的化学特性和生化特性的一种类型的对照靶标。在一些实施例中,每个对照靶标阵列1415包括导致对比光学特性的一种类型的对照靶标。

[0055] 根据这些实施例,因为检测区域120和对照区域140位于同一载玻片上,所以在IHC

或ICC过程中,保持在检测区域120中的样品和对照区域140中的对照靶标141进行相同的染色步骤(请参阅图9)。这样,对照靶标141的染色水平揭示了在IHC或ICC过程中发生的处理错误的存在与否和程度,并且对照靶标141允许将IHC或ICC过程的处理错误分析为相对于已知靶标基线的偏差。因此,根据这些实施例,过程记录载玻片能够提供有效的质量控制,且准确度和精确度符合期望,减少主观分析,成本相对较低,具有容易接受的阈值。此外,在随后的数字图像捕获和处理中,染色的对照靶标141可以用作抗原密度标尺,包括两个标度:抗原密度数值和颜色密度数值,可以应用于共存样品以帮助例如诊断确定。

[0056] 在一些实施例中,对照靶标141沉积在载玻片上,使得对照靶标141不受IHC或ICC染色中常用的预处理步骤的显著影响。在一些实施例中,预处理步骤包括去石蜡化或抗原修复。预处理步骤在下面详细描述。

[0057] 在一些实施例中,载玻片100还包括载玻片信息区域160。在一些实施例中,载玻片信息区域160包括关于载玻片类型的信息,例如批号、制造日期、对照靶标类型等。由于载玻片信息(例如关于对照靶标类型的信息)涉及广泛,所以在一些实施例中,载玻片信息区域160包括记录载玻片信息的条形码。在一些实施例中,条形码包括指向载玻片的详细描述的网站链接。

[0058] 参照图3,在一些实施例中,载玻片100还包括凸出结构107。根据这些实施例,凸出结构107确保当堆叠时,相邻的载玻片不会损坏石蜡涂层或对照靶标。在一些实施例中,凸出结构107包括延伸超过对照区域140的一对柱或多个点。这些缓冲件有助于直接打印喷墨标签打印机,该打印机通常从盒的底部馈送未标记的载玻片。因此,缓冲件确保了在从盒中分发时,一张载玻片在另一张载玻片上滑动时石蜡涂层和下面的靶标不会受到损坏。

保护涂层

[0059] 在一些实施例中,保护涂层105是石蜡涂层。

[0060] 参见图4,在一些实施例中,石蜡涂层是在对照靶标上的石蜡,其密封对照靶标。

[0061] 石蜡通常是一种白色或无色的软固体,衍生自石油、煤炭或油页岩,其由包括二十至四十个碳原子的烃分子的混合物组成。它在室温下为固体,在高于约37°C (99°F) 的温度下开始熔化;沸点为>370°C (698°F)。石蜡的常见应用包括润滑剂、电绝缘体和蜡烛。染色的石蜡可以制成蜡笔。它不同于煤油和有时被称为蜡的其他石油产品。

[0062] 在病理实验室中,在对薄的组织样品进行切片之前,使用无水石蜡来浸渍甲醛固定的组织。在该过程中,通过提高酒精的浓度(75%至无水酒精)将水从组织中去除,然后在有机溶剂(例如二甲苯)或脂肪族替代物(例如混合二甲苯)中清洁组织。然后将组织在真空烘箱中放置在液态石蜡中一段时间,以确保抽出所有空气,然后将其与液态蜡一起放在模架中冷却并固化。然后将切片在切片机上切割。

[0063] 将组织切片埋入石蜡是一种延长活检组织的保存时间的做法。然而,就本发明人所知,还没有报道将石蜡作为在显微镜载玻片的选定区域上的涂层。

[0064] 如下所述,对照靶标载玻片包括肽或蛋白质,因此为细菌或真菌提供了丰富的食物来源。肽和蛋白质及其抗原位点(例如表位)易于氧化,有时会损害结合抗体的能力。另外,随后的反应涉及羟基,其可通过与空气中的酸和碱反应而被破坏。因此,通常需要将含有蛋白质沉积物的载玻片保存在低于支持微生物生长的温度下,并需要用真空密封包装。未经保护的载玻片(例如暴露在环境中的载玻片)根据环境温度、湿度和空气污染水平的不

同,其保质期只有2至5天。这些限制了沉积物的有效利用。

[0065] 石蜡具有抗真菌和抗细菌能力,能防止在其下密封的材料的氧化。本发明人发现,石蜡涂层将生物材料的使用寿命从3-5天延长至1-2年,从而显著提高了过程记录载玻片的保存期限。

[0066] 通常在IHC或ICC染色期间从样品中去除包埋的石蜡(此过程称为“去石蜡化”)。因此,在一些实施例中,包括在保护层105中的石蜡制剂与在包埋过程中使用的石蜡制剂相同或相似。因此,可以在去石蜡的同时去除石蜡涂层,从而简化了染色过程。

[0067] 在一些实施例中,将石蜡液化,施加在载玻片上并固化,从而形成石蜡涂层。

[0068] 在一些实施例中,将石蜡与溶剂混合以在室温下将材料状态从固体改变为液体。在一些实施例中,溶剂包括二甲苯或脂肪族溶剂,例如混合二甲苯。与溶剂的混合降低了粘度并减慢了沉积后的固化。在一些实施例中,溶剂包括甲苯、涂料稀释剂、松节油或丙酮和煤油的50:50混合物。石蜡Paraplast X-tra还包括丁基化羟基甲苯(一种酚类抗氧化剂),可进一步减少蛋白质、肽或无机靶标的氧化降解。

[0069] 在一些实施例中,固体石蜡在比石蜡熔融温度高不超过75°C的温度下熔融。然后将熔融的石蜡与脂肪族溶剂缓慢加入,直到观察到饱和点(即形成固体)。使混合物冷却至约45°C。然后添加额外的脂肪族溶剂,直到混合物完全澄清。

[0070] 在一些实施例中,将石蜡涂层施加在生物材料和先前沉积到显微镜载玻片上的特殊的染色反应性沉积物上。如下所述,生物材料包括蛋白质、肽、结合蛋白、蛋白质包裹珠粒、肽包裹珠粒,缀合蛋白包裹珠粒,独特地捕获染色材料的特殊染色反应性端基,等等。

[0071] 在一些实施例中,通过喷涂、喷墨沉积、转移印刷例如移印、丝网印刷和气相沉积将石蜡施加到载玻片上。在一些实施例中,通过加热以将石蜡颗粒熔化和/或共混到密封对照靶标和围绕对照靶标的载玻片表面两者的整体表面涂层中,从而将石蜡涂层施加到载玻片上。

[0072] 在一些实施例中,在将石蜡涂层施加到载玻片上之后,加热载玻片以从石蜡中去除溶剂,从而确保石蜡返回硬化状态。通过从载玻片的石蜡侧施加的红外光进行除去溶剂的过程。该方法优先将溶剂对准石蜡或石蜡下方的生物材料,从而将所需的热能降至最低。蒸发的溶剂可以自由地离开石蜡而不受阻碍。

[0073] 在一些实施例中,石蜡是纯化石蜡、合成聚合物和其他材料的混合物。在一些实施例中,通过试验组分比例获得所需的石蜡熔融温度、硬度和粘度。然而,出于保护生物材料的目的,石蜡被纯化且无水。

[0074] 在一些实施例中,石蜡涂层的厚度为5微米以下。

[0075] 在一些实施例中,保护涂层105中的石蜡的熔融温度小于60°C,例如小于56°C。

[0076] 在一些实施例中,石蜡可被二甲苯、混合二甲苯或其脂肪族替代物溶解。

[0077] 在一些实施例中,石蜡制剂包括但不限于ThermoFisher的TissuePrep&TissuePrep 2,熔融温度为56°C;Leica的Paraplast&ParaplastPlus,熔融温度为56°C;和Leica的ParaplastX-tra,熔点为50-54°C。在一些实施例中,将石蜡涂层的环境温度硬度选择为可获得的最坚硬的制剂,如果该制剂中还没有丁基化羟基甲苯,则将其添加。

第一靶标和第一靶标阵列

[0078] 在一些实施例中,对照靶标141包括测试第一抗体试剂的一个或多个第一靶标。

[0079] 如本文所用,术语“第一靶标”是指仅通过其FcγRI位点特异性结合第一抗体的反应性和非反应性组分的组合物。如本文所用,术语“第一蛋白质”是指与第一抗体的FcγRI结合的蛋白质。如本文所用,术语“第一伪蛋白质”是指不会与任何第一抗体或第二抗体反应的蛋白质。如本文所用,术语“最大靶标密度”是指相邻蛋白质的最大单层密度。如本文所用,术语“替代抗原”是指未被IHC或ICC检测中使用的第一抗体靶向的蛋白,但是尽管如此,其仅通过在IHC或ICC检测中使用的第一抗体(基于小鼠或小兔的抗体)的两个FcγRI区之一与该第一抗体结合。如本文所用,术语“仅小鼠替代抗原”是指仅与基于小鼠的第一抗体的FcγRI唯一反应的蛋白质或抗原。如本文所用,术语“仅小兔替代抗原”是指仅与基于小兔的第一抗体的FcγRI唯一反应的肽或蛋白质。

[0080] 胎盘哺乳动物蛋白的重量在50-65kDa之间。第一抗体IgG蛋白由两个Fab和一个Fc域组成,通常以Y形建模。Fc通过铰链连接至两个Fab域。通过使用拮抗剂抗原肽接种宿主,所有非结合的抗体都在宿主哺乳动物(最常见的是小鼠或小兔)中生长。宿主通过在可以捕获交配抗原的抗体的Fab域N末端附近组装结合氨基酸序列,来生产抗体从而对抗有害的拮抗剂抗原肽。抗体的Fc域始终是宿主哺乳动物。宿主抗体的Fc域通常具有三个可用于第二抗体的结合位点,以最高亲和力至最低亲和力的顺序排列:FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) 和 FcγRIII (CD16)。

[0081] 选择第一伪蛋白质对小鼠、小兔、山羊、牛和绵羊无反应性,因为这些通常可以与第二抗体结合。在一些实施例中,伪第一蛋白质是马科的任何成员:马、驴、斑马、骡或犀牛。BSA(牛血清白蛋白)不是合适的蛋白质,因为BSA在没有加热和时间的情况下不会与组织或大多数载玻片粘合化学物质共价结合。牛、绵羊和山羊也不适合作为伪蛋白质,因为在某些情况下,根据第一抗体的特异性,这些蛋白质可能会与小鼠或小兔混淆。

[0082] 第一蛋白质是宿主抗小鼠或宿主抗小兔。宿主仅限于山羊或马科的任何成员。

[0083] 基于肽的第一蛋白质也可以由小鼠或小兔FcγRI反应性肽组成,其中在C末端半胱氨酸残基与载体蛋白例如KLH亚基(钥孔血蓝蛋白)共价连接。KLH亚基在其游离胺位点被Sulfo-SMCC激活,通过缀合而与肽的半胱氨酸残基结合。单独的未激活的KLH亚基就足以制造第一伪蛋白质。

[0084] 重要的是要注意,KLH作为全蛋白约为8000kDa。在全蛋白质状态下,其pH或温度不稳定,这将导致蛋白质分离成亚基:390kDa的KLH1和350kDa的KLH2。当Sulfo-SMCC激活时,这些亚基中的任何一个都可用作载体蛋白,用于带有半胱氨酸残基的肽(通常在该肽的C末端)。

[0085] 参照图5A,在一些实施例中,第一靶标被布置到第一靶标阵列1415中。在一些实施例中,第一靶标阵列1415是第一靶标密度梯度阵列。阵列中的每个靶标必须具有相同的最大靶标密度(蛋白质/表面积)。但是,第一和伪第一蛋白质之间的比例是按比例增加的,以确保可以鉴定出宽范围的第一抗体稀释剂。通常,两个第一替代抗原靶标检测足以将浓度映射到检测转移曲线。在一些实施例中,第一靶标密度梯度阵列包括多个第一靶标装载点,其中一个阵列是基于小鼠的而另一个阵列是基于小兔的。

[0086] 在一些实施例中,第一靶标的密度以线性方式增加或减少,例如100%,80%,60%,40%等。在一些实施例中,第一靶标的密度以对数方式增加或减少,例如100%,33%,10%,3%等。

[0087] 在一些实施例中,在第一靶标密度梯度阵列中,在具有最高第一靶标密度的装载点中,第一靶标密度足够高,使得第一靶标不能在染色过程中使装载点饱和。

[0088] 在一些实施例中,通用替代抗原是蛋白A或蛋白G。蛋白A结合FcγRI和胎盘哺乳动物Fab域内的某些区域。蛋白G仅与大多数胎盘哺乳动物的FcγRI位点结合。

[0089] 在一些实施例中,替代抗原必须仅对小鼠或小兔具有特异性。为了支持特异性,替代抗原可以分别由抗小鼠和抗小兔蛋白、载体蛋白上的抗小鼠和抗小兔肽、或抗小鼠和抗小兔VHH蛋白域组成。

[0090] 在一些实施例中,伪替代抗原包括来自马科的动物或有蹄类的胎盘哺乳动物(除山羊外)的抗体。马科包括马、驴、骡、犀牛和骡等动物。马科在进化和遗传上相距更远,从而减少了非特异性染色的发生。不能使用山羊,因为第二染色通常在测序中使用抗山羊蛋白,该蛋白会结合任何未反应的山羊第一位点。

[0091] 尽管在染色过程中使用的替代抗原和第一抗体之间的相互作用方式不同于实际抗原和第一抗体之间的相互作用方式,但是替代抗原靶标可以评估第一抗体的有效性。第一抗体用于以mg/ml为单位的浓度检测法。但是,该检测法并未表明代表完整IgG蛋白的检测法的百分比。由于靶标中替代抗原的密度浓度是已知的,因此可以确定捕获所施加的第一抗体浓度。通过外推可以确定共存组织切片的抗原密度。抗原密度在组织上的可分辨性受到第一抗体(单克隆或多克隆)、第二抗体和第二染色的酶增益的累积置换作用的限制。所施加的第一抗体的浓度取决于组织类型,并且总是有一些多余的余量。因此,假定第一抗体在其置换限制内结合所有可用的抗原位点。

[0092] 在一些实施例中,第一靶标密度梯度阵列是通用替代抗原的装载点阵列。在一些实施例中,阵列中的装载点包括增加的或降低的替代抗原的密度。在一些实施例中,将替代抗原与一种或多种伪蛋白质(例如伪替代抗体)混合,并且通过改变替代抗原与伪蛋白质之间的比例同时保持最大靶标浓度来增加或降低替代抗原浓度。

[0093] 在一些实施例中,对照区域140包括替代抗原靶标的至少两个阵列。在一些实施例中,对照区域140包括包括抗小鼠抗体的第一替代抗原靶标阵列和包括抗小兔抗体的第二替代抗原靶标阵列,两者均与伪替代抗原混合以形成所需的反应密度,同时保持最大靶标密度。

[0094] 因此,根据这些实施例,通过IHC或ICC步骤,替代抗原第一靶标可以使用第二靶标带来的酶增益和抗原修复因子来评估第一抗体浓度。

抗原修复靶标

[0095] 在一些实施例中,对照区域140包括抗原修复靶标。

[0096] IHC和ICC染色检测法通常包括抗原修复(也称为“AR”)过程。可以通过热诱导表位修复(HIER)方法或温水抗原修复方法执行AR过程。取决于所使用的方法以及特定方法的实施方式,会发生大量的变化,并且结果会因不同的从业者以及载玻片而有所不同。直接测量AR缓冲和缓冲温度通常不准确。但是,在没有适当对照的情况下,从业者常常不得不盲目地假设AR缓冲的温度和条件是理想的。因此,缺乏对照通常会导致AR过程无法进入最终评估,从而导致判断错误。

[0097] AR过程中最常见的问题是抗原修复不足或过度修复。当AR温度太低,暴露时间不足等时,会发生欠修复条件。当AR温度太高,在AR条件下的暴露时间过长或AR缓冲条件太苛

刻时(例如>pH 9.5或<pH 5.5),就会出现修复过度的情况。

[0098] 因此,在一些实施例中,抗原修复靶标配置为提供AR过程中修复不足、标称修复和过度修复的指示。

[0099] 在一些实施例中,对照区域140包括3D AR靶标(ARM3D)和2D靶标(ARM2D)。2D和3D靶标将在下面的部分中详细介绍。

[0100] 在一些实施例中,ARM2D靶标包括浓度为100%的小鼠和小兔蛋白(或来自其他物种的蛋白)的50:50混合物,其甲醛固定最少。在一些实施例中,蛋白质是IgG。由于2D靶标产生的信号少于相应的3D靶标,并且ARM2D靶标的固定最少,因此ARM2D靶标的染色表明抗原修复不足。

[0101] 在一些实施例中,ARM3D靶标包括浓度为100%的小鼠和小兔蛋白质(或来自其他物种的蛋白质)的50:50混合物,其沉积在已经用甲醛过度固定的3D支架中。因为3D靶标比相应的2D靶标生成更多的信号,并且ARM3D靶标被过度固定,所以ARM3D靶标没有染色表明AR过程过于激烈。

[0102] 在一些实施例中,除ARM2D或ARM3D靶标外,抗原修复靶标还包括第一靶标梯度阵列或第二靶标梯度阵列。在一些实施例中,第一靶标阵列或第二靶标阵列与如上所述的那些相同或相似。

[0103] 在一些实施例中,第二靶标梯度阵列是小鼠或小兔的密度梯度阵列。根据这些实施例,当小鼠和小兔梯度密度阵列的10%至不超过30%的靶点未显示可见的染色时,表明是标称修复状态。然后通过未染色的低浓度第二靶标的数量评估AR过程的程度。

2D/3D靶标

[0104] 在一些实施例中,对照靶标,例如第一靶标、第二靶标或抗原修复靶标包括2D靶标。

[0105] 如本文所用,术语“2D靶标”是指肽、蛋白质、抗原、抗体或任何其他对照靶标材料沉积在载玻片上的2D平面上。

[0106] 2D靶标更易于沉积,因此制造起来相对便宜。因此,在考虑成本时会使用2D靶标。

[0107] 在一些实施例中,对照靶标,例如第一靶标、第二靶标或抗原修复靶标包括3D靶标。

[0108] 如本文所用,术语“3D靶标”是指将肽、蛋白质、抗原、抗体或任何其他对照靶标材料中的至少一种施加至支撑结构,和沉积在载玻片上的3D空间中的复合物。

[0109] 在一个或多个实施例中,通过在载玻片上形成3D支架并将对照靶标材料沉积在支架上来构建3D靶标。在一些实施例中,3D支架是多糖簇。多糖与肽或蛋白质表面上的羟基或胺基形成共价键,将蛋白质连接在一起并将靶标固定在载玻片涂层粘合剂上。在一些实施例中,对照靶标通过甲醛固定而被固定在3D支架上。然后,靶标由2D和3D组分组成。

[0110] 在一个或多个实施例中,3D靶标是由与第一或第二靶标材料共价结合的亚微珠粒构成的。然后使用甲醛固定来稳定第一或第二靶标材料,以抵抗正常的抗原修复过程。然后,所沉积的靶标包括2D和3D组分。

[0111] 与2D靶标相比,3D靶标的行为与染色样品更为相似。IHC或ICC的染色样品(例如组织切片和细胞)具有高度。样品的高度通常为4微米至10微米。染色中靶向的抗原位点可以在组织切片的暴露表面拓扑结构上的任何位置。因此,样品中的抗原位点在该切片的底表

面的顶部或者沿着组织的侧壁的任何地方可以是平坦的。因此,与2D靶标相比,样品侧壁上的抗原能够从色原中沉淀出更多的着色剂。将3D组分包括在2D组分中会创建一个阶跃偏移,可以将其应用于其他2D靶标点以形成虚拟3D阵列。实验上发现,任何大于0.5微米的3D靶标都会像组织切片一样暗染。

[0112] 另外,在染色过程中通常使用的试剂DAB在相对短的时间内老化,从而导致颜色和强度的变化。本发明人已经发现,DAB染色的3D靶标的颜色和强度变化与样品相似。

特殊染色

[0113] 在一些实施例中,对照靶标包括特殊染色。

[0114] 在一些实施例中,特殊染色包括阿尔新蓝(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(VonKossa)、魏格特雷琐辛品红(Weigert's Resorcin Fuchsin)、魏格特铁苏木素(Weigert's Iron Haematoxylin)、萼-尼氏染色法(Zell-Neelsen Method)或其组合。

成像参考靶标

[0115] 在一些实施例中,对照区域140还包括成像参考靶标。在一些实施例中,成像靶标包括一个或多个黑色靶标、一个或多个白色靶标或透明靶标。

[0116] 包括染色的生物材料的显微镜载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。在一些实施例中,在染色过程之后,对载玻片进行成像过程,在该过程中调节光的照射水平或暴露情况,以使数字图像在白色或黑色边界处均不处于压缩状态。在另一种方法中,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染色信号水平可以达到的极限。然而,这样做时,数字标度上存在压缩,因为黑色比组织切片的染色黑得多,白色白得多。

[0117] 在一些实施例中,成像参考靶标被印刷在载玻片上。在一些实施例中,成像参考靶标包括一对黑色靶标和白色靶标。在一些实施例中,成像参考靶标是与染色过程中使用的试剂不反应的印刷涂料沉积物。

[0118] 在一些成像系统中,仅使用透射光(载玻片底部的照明)。在其他成像系统中,既透射光又反射光(载玻片顶部的照明)。第三透明参考靶标支持反射光照明。因此,对于透射光照明,黑/白靶标分别是黑色颜料靶标和透明靶标,而对于反射光照明,黑/白靶标分别是透

明靶标和白色靶标。关于单抗体载玻片的示例,请参见图12;关于双抗体载玻片,请参见图13。黑/白靶标实际上是一连串的点,也可以是柱,充当缓冲件以保护在喷墨打印机分配载玻片时靶标点不受损坏。喷墨打印机从盒的底部分配载玻片。缓冲件确保剩余的堆叠载玻片不会刮擦载玻片上的石蜡涂层或靶标。这些相同的凸出也确保载玻片应以包装形式运输,以使石蜡层不会粘附到相邻载玻片的底部。

[0119] 用透射光成像导致组织上抗原密度的错报。发生这种情况是因为染色组织不是所有抗原位点都在单个平面上的整体平板。而是,组织可以在其厚度内的任何地方具有抗原位点。第二染色产生着色剂颗粒,该着色剂颗粒继续沉淀,直到颗粒覆盖酶位点并阻止继续沉淀为止。如果抗原位点在组织切片的侧壁上,则该酶将永远不会被覆盖,并且沉淀将过度表达抗原的存在。对于透射光,由于沉淀的着色剂较浓,因此会出现“暗”。相反,反射光只能“看见”着色剂堆的顶面,从而可以更准确地指示抗原密度。

[0120] 在一些实施例中,白色靶标具有接近纯白色的颜色。因为难以获得纯白色,所以在一些实施例中,白色靶标的颜色与纯白色相差5-10%。与纯白色相距不到5%的白色很难产生,与纯白色相距超过10%的颜色有时准确度不足以作为染色信号强度的对照。

[0121] 在一些实施例中,白色靶标包括白色颜料。在一些实施例中,白色颜料是当不暴露于强光下时随时间推移稳定的金属氧化物或金属硫酸盐颜料。在一些实施例中,白色颜料包括氧化铝、氧化钛或硫酸钡。在一些实施例中,金属氧化物或金属硫酸盐为珠粒形式。

[0122] 在一些实施例中,黑色靶标包括黑色颜料。在一些实施例中,黑色颜料包括碳基颜料。在一些实施例中,黑色颜料包括碳尘。在一些实施例中,碳尘的直径小于2微米。

[0123] 在一些实施例中,成像参考靶标包括酸酐基环氧树脂。在一些实施例中,通过将颜料与酸酐基环氧树脂混合并固化酸酐基环氧树脂来产生成像参考靶标。环氧粘合剂和颜料的配合没有特别限制,只要能在颜料和环氧粘合剂之间获得良好的润湿性即可。

[0124] 在一些实施例中,酸酐基环氧树脂包括能够消除基于氨基硅烷的催化剂的未反应的胺的酸酐催化剂。游离胺基捕获生物材料和某些染色剂。因此,游离胺会在IHC和ICC过程中引起非特异性染色。因此,消除未反应的胺减少了非特异性染色。

[0125] 在一些实施例中,基于酸酐的环氧涂料包括酸酐催化剂,例如甲基四氢邻苯二甲酸酐或二苯基碘鎓六氟亚砷酸盐。

[0126] 在一些实施例中,固化酸酐基环氧树脂包括使酸酐基环氧树脂经受UV光照,例如包括365nm波长的UV光。在一些实施例中,固化基于酸酐的环氧涂料还包括使基于酸酐的环氧涂料受热,从而使环氧树脂交联。对UV引发的酸酐基环氧树脂及其伴随试剂没有特别限制。本领域普通技术人员能够通过对酸酐生产公司进行产品搜索来识别所需的酸酐基环氧树脂。

[0127] 在一些实施例中,在第一靶标、第二靶标或抗原修复靶标沉积之前,将包括酸酐基环氧树脂的成像参考靶标沉积在载玻片上。原因是在酸酐基环氧树脂的固化过程中的热处理会损坏包括在第一靶标、第二靶标或抗原修复靶标中的生物材料。在一些实施例中,酸酐基环氧树脂通过UV固化,并且成像参考靶标的沉积可以在第一靶标、第二靶标或抗原修复靶标的沉积之后发生,因为UV不太可能破坏肽和蛋白质。

[0128] 在一些实施例中,成像参考靶标制剂不含表面活性剂,从而防止油墨/涂料对这些载玻片可经历的染色和试剂具有反应性。

[0129] 在一些实施例中,成像参考靶标通过压印章被印刷在载玻片上。在其他实施例中,由于注射器能够控制靶标沉积的大小,因此成像参考靶由注射器打印。

[0130] 由于所有数字化范围都在载玻片定义的黑/白内(与使用纯黑/白参考相比),使用成像参考靶标,使数字分析得到了优化。数字分析有助于对对照靶标的颜色进行插值,以便更精确地确定染色样品中存在的抗原的量。使用图像参考靶标是为了协助数字分析的校准,以便提供用于测量对照靶标上的反应量的参考点。

沉积对照靶标的方法

[0131] 在一些实施例中,本说明书针对将对照靶标沉积在过程记录载玻片上的方法。在一些实施例中,载玻片和对照靶标与如上所述的那些相同或相似。

[0132] 在一些实施例中,沉积对照靶标的方法包括:将第一对照靶标或第二对照靶标沉积在载玻片上。

[0133] 在一些实施例中,沉积第一对照靶标或第二对照靶标包括:制备预定浓度的对照靶标溶液;固定对照靶标;并将溶液打印到载玻片上。

[0134] 在一些实施例中,制备对照靶标的溶液包括:制备包括对照靶标和多糖的溶液,以用作蛋白质和载玻片粘合剂之间的连接体。

[0135] 在一些实施例中,固定对照靶标包括:用甲醛固定对照靶标。甲醛使对照靶标交联,从而使对照靶标可以进行正常的抗原修复方案。

[0136] 在一些实施例中,对照靶标是交联的。在组织内,蛋白质与组织的其他部分结合,这些其他部分往往会阻止蛋白质扩散和变性。由于溶液中的对照靶标包括疏松的蛋白质,因此对照靶标对热和pH值更加敏感,因此易于在载玻片上发生扩散和变性,尤其是在IHC或OCC中进行AR处理时。

[0137] 在一些实施例中,第一靶标如下制备:

- 形成一组1ml的第一蛋白主稀释液,浓度为45ug/ml。根据需要用dH2O稀释驴抗小鼠,驴抗兔和驴IgG(H&L)蛋白,以达到45ug/ml的浓度。通常,购买时这些蛋白质的浓度在1至10mg/ml之间。加入10ul硫柳汞作为真菌生长抑制剂。

- 在40-60℃下,用10ul 0.2%甲醛将每个主稀释液固定1-4小时。
- 加入30ul浓度为0.45%的直链淀粉作为线性聚合物(已添加硫柳汞作为真菌生长抑制剂)并混合30分钟

- 加入20ul 0.1M碳酸氢铵以淬灭任何未反应的甲醛
- 使用主蛋白溶液形成“小鼠与驴”和“小兔与驴”的靶标混合物,其中每个靶标都包括700ul的主蛋白溶液。

[0138] 在一些实施例中,第二靶标如下制备:

- 形成一组1ml的第二蛋白主稀释液,浓度为45ug/ml。根据需要用dH2O稀释小鼠、小兔和驴IgG(H&L)蛋白,以达到45ug/ml的浓度。通常,购买时这些蛋白质的浓度在10至60mg/ml之间。加入10ul硫柳汞作为真菌生长抑制剂。

- 在40-50℃下,用10ul 0.2%甲醛将每个主稀释液固定1-4小时。
- 加入30ul浓度为0.45%的直链淀粉作为线性聚合物(已添加Thimersol作为真菌生长抑制剂)并混合30分钟

- 加入20ul 0.1M碳酸氢铵以淬灭任何未反应的甲醛

- 使用主蛋白溶液形成“小鼠与驴”和“小兔与驴”的靶标混合物,其中每个靶标都包括700ul的主蛋白溶液。

[0139] 在一些实施例中,根据以下步骤,以一个打印周期将准备好的第一靶标或第二靶标或成像参考靶标打印到载玻片上:

- 将靶标溶液打印到涂有粘合剂的显微镜上
- 在60℃空气中干燥,直到所有水蒸发掉,然后冷却
- 通过喷雾将石蜡-溶剂混合物喷涂在已打印的靶标阵列上
- 回流石蜡以完成靶标阵列的密封并排出溶剂。因此,使石蜡恢复其硬化状态和固态。

IHC或ICC染色方法

[0140] 在一些实施例中,本说明书涉及用于免疫组织化学(IHC)或免疫细胞化学(ICC)染色的方法。在一些实施例中,本说明书涉及使用如上所述的过程记录载玻片进行免疫组织化学(IHC)或免疫细胞化学(ICC)染色的方法。

[0141] 在一些实施例中,IHC或ICC染色过程包括:将固定的样品埋入石蜡中,并去除石蜡以暴露样品的细胞结构内的抗原位点。

[0142] 在一些实施例中,去除石蜡包括:在65至75摄氏度的温度下将石蜡加热至半液态3-10分钟,然后将半液态石蜡与脂肪族溶剂液化,例如二甲苯或混合二甲苯,然后是无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇和盐基缓冲液的再水化顺序。

[0143] 在一些实施例中,IHC或ICC染色过程还包括去除甲醛固定以暴露样品中的抗原位点。在一些实施例中,去除甲醛固定包括:进行热诱导表位修复(HIER),或进行多循环温水抗原修复。

[0144] 在一些实施例中,HIER过程包括:通过在水的存在下对样品进行加热来破坏甲醛和组织之间的席夫碱键。在一些实施例中,对样品进行加热包括:使样品经受从89℃至95℃的温度。在一些实施例中,在样品受热时,其暴露于缓冲试剂。在一些实施例中,缓冲试剂的pH范围为6至10,例如6至9。试剂pH的选择取决于样品的类型,例如组织类型。

[0145] 在一些实施例中,水基抗原修复过程包括:使样品经受比包埋石蜡的熔化温度高约10℃的温度,其范围为约60℃至约65℃。在一些实施例中,水基抗原修复过程包括:使样品经肥皂处理和连续洗涤以溶解并除去石蜡。

[0146] 应该注意的是,操作者的错误或石蜡去除和固定修复中的处理缺陷会阻碍随后的染色过程,并导致假阴性结果。尽管可以通过查看过程记录载玻片中对照靶标的染色结果来检测这种假阴性结果,但是操作员的错误或处理缺陷仍然会导致样品\时间和资源的浪费,因此应避免。

[0147] 此时,暴露抗原位点,并且可以施加染色试剂以产生指示目标抗原的存在和量的信号。

[0148] 在一些实施例中,IHC或ICC染色过程还包括:施加一种或多种第一抗体。如果施加了一种以上的第一抗体,则该抗体需要来自不同的动物物种,以避免第二抗体发生交叉反应。例如,如果使用了两种第一抗体,而第一种是小鼠抗体,那么第二种第一抗体就需要是非小鼠抗体,例如小兔抗体。根据这些实施例,一种或多种第一抗体将结合样品中的匹配抗原位点,以及第一对照靶标,例如蛋白质/肽抗原或替代抗原。在一些实施例中,第一抗体包

括靶向ER,PR,Her2或Ki67的抗体。

[0149] 参见图11,在一些实施例中,第一抗体与报告分子缀合,例如色原报告分子,例如酶色原报告分子。根据这些实施例,不需要第二抗体。

[0150] 在一些实施例中,第一抗体不与报告分子缀合。根据这些实施例,施用靶向第一抗体的第二抗体。在一些实施例中,第二抗体与报告分子缀合。

[0151] 参照图11,在一些实施例中,为了进一步扩增抗原的信号,执行了多步信号扩增过程。多步信号扩增过程的示例包括:酶标记的第三抗体与酶标记的第二抗体反应的2倍增益,3步间接反应;APAAP免疫复合物与第二抗体反应的2倍增益。在一些实施例中,第一抗体和免疫复合物的抗体是相同物种制备的。信号扩增过程包括:LAB或LSAB,酶标记的(链霉)亲和素与生物素化的第二抗体反应;CSA技术10倍以上的增益,在第一抗体上的生物素化的第二抗体上的链霉亲和素-酶复合物;>10倍增益,包括10个第二抗体和70个与单个第一抗体结合的酶位点的聚合物。

[0152] 在一些实施例中,报告分子是当存在底物时能够引起色原沉淀的酶。全部达到色原沉淀的相同最终状态。

[0153] 在一些实施例中,报告酶包括辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)或葡萄糖氧化酶。

[0154] 在一些实施例中,使用三个常用的第二染色组中的一个或两个以及几种复染中的一种:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)、葡萄糖氧化酶和核复染。

[0155] 在一些实施例中,色原包括3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)、DAB+镍增强剂、FastRed、TMB、StayYellow、BCIP/NBT、BCIP/TNBT、萘酚AS-MX磷酸盐+FastBlue BB、萘酚AS-MX磷酸盐+FastRedTR、萘酚AS-MX磷酸盐+新品红、StayGreen、NBT或其组合。

[0156] 在一些实施例中,底物和报告酶的组合以及结果颜色如下:

HRP(辣根过氧化物酶)

•DAB (3,3'-二氨基联苯胺)	>>	棕色至红棕色
•AEC (3-氨基-9-乙基咔唑)	>>	红色
•DAB +镍增强剂	>>	黑色
•TNB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)	>>	蓝色
•StayYellow	>>	黄色

AP(碱性磷酸酶)

•BCIP / NBT	>>	蓝色
-------------	----	----

(5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐) /

(硝基蓝四唑)

•萘酚AS-MX磷酸盐+FastBlue	>>	蓝色
•萘酚AS-MX磷酸盐+FastRed	>>	红色
•萘酚AS-MX磷酸盐+新品红	>>	红色
•StayGreen	>>	绿色

GO(葡萄糖氧化酶)

- 硝基蓝氯化四氮唑(NBT) >> 蓝色至紫色

[0157] 在一些实施例中,IHC或ICC染色方法还包括复染,例如核复染。在一些实施例中,核复染使用一种或多种核染色,例如产生蓝色的苏木精。

[0158] 可以基于颜色要求、稳定性要求和区域法规标准来选择染色底物或化合物。

[0159] 例如,DAB通常在美国和中国等国家使用,而AEC通常在其他国家使用。由于DAB生成的棕红色与AEC的红色相比具有更高的饱和度,因此DAB通常用于AEC之上。但是,AEC染色比DAB染色更稳定。实验表明,原始DAB在短时间内会显著老化,因此在4小时的时间内色彩饱和度会明显下降。新版本的DAB包括稳定剂,可将DAB的稳定性从数小时延长至数天。DAB还容易在随后的缓冲液洗涤周期中被洗去。另一方面,AEC可以在数周到数月内保持稳定。

[0160] 全世界的监管标准都坚持认为,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用于处理组织切片和松散细胞的试剂、方法和仪器。对于血液学和临床化学来说,早已存在此类用于验证结果并保证质量的监管控制。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.

抗原成像标度外推

[0161] 在一些实施例中,IHC或ICC染色方法还包括:通过外推第一靶标和第二靶标的染色结果来估计共居患者样品中的抗原浓度。

[0162] 在一些实施例中,IHC或ICC染色方法还包括:通过外推第一靶标和第二靶标的染色结果来确定IHC或ICC染色步骤的过程QC。

[0163] 可以预先确定沉积在载玻片上的对照靶标的量,因为知道沉积物中每种蛋白质类型的对照靶标分子的分子量、数量,可以计算靶标的面积以及载玻片涂层的孔隙率、靶标的活性表面蛋白。

[0164] 已知施加浓度、分配体积和在载玻片上暴露于第一抗体试剂的表面积。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掉落并被受体抗原位点捕获。仅那些直接落在抗原位点上的抗原将被捕获,其余部分将通过缓冲液洗涤步骤被洗去。因此,所沉积的抗体浓度可以在适当的条件下确定,例如,当浓度高于临界值25%以上且饱和浓度低于25%时。如本文所用,术语“临界值”定义为不足以捕获所施加的蛋白质浓度的靶标位点密度。饱和度定义为一个浓度,在该浓度下不能捕获所有施加的蛋白质。

[0165] 已知第一稀释比,可以选择正确的第一靶标密度目标,并且可以验证第一浓度。

[0166] 在本发明的一个实施例中,每个第二靶标和第一靶标是[(小鼠或小兔IgG)+(驴IgG+交联剂+真菌抑制剂)]或[(KLH与抗原A或KLH与抗原B)+(未缀合的KLH+交联剂+真菌抑制剂)]或替代抗原[(驴-抗小鼠IgG或驴-抗小兔IgG)+交联剂+驴IgG+真菌抑制剂]。每个点的总蛋白质体积相同,但混合比例略有调整,以使组成特定靶标的蛋白质之间的原子质量不同。

[0167] 一些示例性蛋白质的分子量如下:

[0168] 小鼠IgG=155kDa

[0169] 小兔IgG=150kDa

[0170] 驴IgG, 驴-抗小鼠和驴-抗小兔=160kDa

[0171] 蛋白A=42kDa

[0172] 蛋白G=58或65kDa

[0173] 蛋白A/G=50kDa

[0174] 蛋白L=76kDa

[0175] 鸡IgY=180kDa

[0176] KLH亚基:KLH1和KLH2分别为350和390kDa。

[0177] 在本发明的另一个实施例中,2D第二靶标梯度包括1至1000:1的逐步稀释增量。在一些实施例中,稀释遵循 $-20\log$ (稀释度)曲线,其中稀释以 -3dBd 的增量递增。术语 $-20\log$ (稀释度) $=\text{dBd}$,两者均以半对数形式描述了稀释度,以使数据线性化,从而可以轻松应用修改项。术语(稀释度)是指稀释度X,其中X为 $[1..1000]$,等于1:1至1,000:1。术语 dBd 定义为稀释或稀释强度的分贝。修改项包括抗原修复损害、酶增益或第一抗体试剂稀释度。

[0178] 第二染色结合了1到20倍之间的酶增益函数,这是染色剂的结构函数。因此,随着增益的增加,较低浓度的第二靶标将变为饱和,而当增益下降至1时,只有较高浓度的第二靶标会被明显染色。

[0179] 由于基于具有肽的KLH亚基的第二靶蛋白和缀合的第一靶蛋白之间的大小差异很大,因此假稀释剂必须是未活化的KLH单元,因为肽确实使KLH亚基的质量发生了明显变化。

[0180] 预计KLH亚基与蛋白A,G和A/G的预期结合能力在4至6个蛋白之间。对于合适的假KLH需要与鸡IgY结合,其对蛋白A,G,A/G或L蛋白质中的任何一种完全不反应。尽管鸡IgY比蛋白A/G高近4倍,但与KLH的结合却较少,因此最终结果大致相同。任一种选择都会使质量达到650至700kDa。如以下针对小鼠和小兔IgG的详细说明,可以插入KLH亚基质量数并进行计算。

[0181] 在本发明的另一个实施例中,第一靶标可由蛋白A,G或A/G制备。第一抗体主要基于小鼠IgG或小兔IgG宿主Fc域。但是,在小鼠IgG1和小兔IgG上发现了FcγRI位点。蛋白A与小兔IgG牢固结合,而与小鼠IgG1弱结合。蛋白G与小兔IgG牢固结合,而与小鼠IgG1中等结合。蛋白A/G与小兔IgG牢固结合,而与小鼠IgG1中等结合。与其他FcγRI相比,蛋白L在Fab轻链中与小鼠IgG1牢固结合而与小兔IgG弱结合。在一些实施例中,使用蛋白质G或A/G。两者都表现为偶极结构,其中它们仅支持与第一抗体的单连接。

[0182] 蛋白A,G,A/G和L与大多数胎盘哺乳动物IgG结合,这意味着如果使用BSA(牛血清白蛋白),则在施用第二染色试剂盒之前的阻断步骤将不起作用,因为BSA将不能结合这些蛋白质。特别是,山羊被阻止与蛋白A,G,A/G或L结合。这与其他方法不同,因为大多数第二染色试剂盒在某个步骤中都使用山羊作为宿主蛋白。因此,强烈建议阻断剂基于马科:马、驴、骡和犀牛IgG蛋白。马科从胎盘哺乳动物遗传上很早就分裂开了,足以使它对第二染色试剂基本上没有反应,但会与蛋白A,G和A/G结合,足以阻断未反应的第一靶标位点

[0183] 因为与第一抗体的结合连接总是使两个FcγRI位点之一开放以与第二抗体反应,所以捕获的第一抗体必须在功能上完整,且具有至少一个可用于支持第二染色的FcγRI位点。因此,捕获的被染色的第一抗体代表着实际应用的浓度与第一抗体的测定/稀释值之间的关系。

[0184] 在第一抗体的平均原子质量为150kDa的情况下,单个抗体分子的分子量为150kDa

(1.6605×10^{12}), 等于 249×10^{-12} ng 的重量。假设载玻片的单个区域是唯一暴露的部分, 则可以确定所施加的第一试剂的量。例如, 当使用内部尺寸为 $20.3 \text{ mm} \times 0.14 \text{ mm}$ 的封闭毛细管间隙时, 体积为 $57.2 \mu\text{L}$ 。靶标面积为 1 微米的比例, 产生 2.832 nL 的已施用第一抗体试剂;

[0185] 将第一抗体试剂从浓缩液稀释至 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的中间稀释液。然后将中间稀释液从 1:1 稀释到 1000:1, 以施用到载玻片上。这使得 31.5 至 7.08 抗体分别在 1:1 至 25.1:1 的稀释度下沉积在 1 平方微米区域上。

[0186] 为了确保 100% 的捕获能力, 第一靶标的安全系数应在 100 到 1000x 之间。选择 1000x 选项时, 第一靶标需要包括 4×10^6 个抗原位点。尽管 KHL 亚基大于所施用的抗体, 但这种增加不足以使捕获的抗体数量超过 1:1。每个 KLH 亚基的平均原子质量为 370 kDa, 相当于 614.4×10^{-12} ng 的重量。

[0187] 蛋白质分子的体积可以由蛋白质的分子量和平均蛋白质部分比容 (部分比容 = 体积/分子量) 来近似。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。该式将蛋白质体积减少至 $\sim (1.212 \times 10^3 \times \text{MW}) \text{ nm}^3$ 。因此, 对于 KLH 亚基, 单个体积为 448.44 nm^3 。假设蛋白质是一个球体, 则该球体的直径计算为 $0.132 \times \text{MW}^{1/3} (\text{nm})$ 。根据该计算方法, KLH 亚基的直径为约 9.436 nm。

[0188] 对于具有 1 mm 直径并且包括 KLH 亚基的单层的对照靶标点, 需要 11.237×10^{27} 蛋白。对于 4×10^6 蛋白质的有效靶标密度, 最小稀释比为 $1:2.8 \times 10^{21}$ 。实际上, 任何稀释度接近 1:1000 都是可行的, 因为第一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。

[0189] 在一个实施例中, 第二靶标阵列的逐步稀释增量是 1 至 1000:1。稀释度的线性斜率为 $\text{dBd} = -20 \log (\text{稀释度})$ 。对于 1 到 1,000:1 的稀释范围, 半对数范围是 0 dB 到 -60 dBd。在一些实施例中, 第二靶标的 -3 dB 逐步稀释产生 -0, -3, -6, -9, -12, -15, -18, -21 dBd 的一系列稀释。

[0190] 第二靶标阵列和第一靶标阵列都半可逆地固定, 因此与样品或 AR 靶标相比在 AR 过程中降解程度较小。降解来自自由断裂的蛋白质片段而不是完整蛋白质。在一些实施例中, 随着 AR 过程继续作用于蛋白质靶标和样品切片上, 被认为是梯度比例模式的 AR 损伤向 100% 位置移动。另一方面, 第二酶增益导致梯度阵列向 10% 的位置移动。在一些实施例中, 酶增益为 1、2、4、5、8、10、15 或 20。这转化为通过以下方式将第二阵列移向 10% 的靶标:

1. 20 倍 所有靶标移动 -26 dBd
2. 15 倍 所有靶标移动 -23.52
3. 10 倍 所有靶标移动 -20
4. 5 倍 所有靶标移动 -13.98
5. 4 倍 所有靶标移动 -12.04
6. 2 倍 所有靶标移动 -6.02
7. 1 倍 仅 2D 100% 点接近黑色

[0191] 通常, 将第二阵列向 100% 位置移动三个以上的点的 AR 损伤被认为是过度的, 并且应使用更高的酶增益第二染色试剂盒或更高浓度的抗体重新进行染色。

[0192] 因此第一抗原靶标颜色密度是抗体浓度乘以第二染色试剂盒的酶增益的总和。第二靶标密度仅为酶增益乘以第二靶标蛋白浓度的总和;

[0193] 取决于数字成像系统,改变照明强度会将图像的动态范围转变为饱和(变暗)或临界(变亮)。这些变化会改变抗原的颜色标度,而抗原密度的数字标度不会改变。因此,数字标度是独立的,而颜色标度则取决于照明强度。

[0194] 在本发明的一个实施例中,参见图13,在对照区域140内,上述第二蛋白质靶标阵列形成两条线:一条是小鼠IgG,另一条是与伪IgG血清蛋白混合的小兔IgG形成五个以上的梯度密度系列,从最大密度到最小密度以 $-20\log$ (稀释度)线性斜率递增,其中在最初的1000:1稀释后,稀释度的范围可以在1:1至1,000:1之间。

[0195] 在本发明的另一个实施例中,前述的第二靶标阵列形成33、16.5和4%的三种浓度的小鼠IgG或与驴IgG混合的小兔IgG。

[0196] 在另一个实施例中,在最后的工艺步骤中,所鉴定的那些抗原位点通过色原沉淀而变色。因此,小鼠和小兔的靶标阵列反映了第二染色试剂盒色原沉淀的 $-20\log$ (稀释度)线性斜率,或者靶标阵列反映了第二染色反应性和酶增益。

[0197] 在另一个实施例中,用于形成第一靶标密度梯度阵列的方法的方案是基于:成功地组成靶标混合物,将它们沉积到涂覆有粘合剂的载玻片上,以及在粘合剂和靶标材料之间具有共价键。

[0198] 在另一个实施例中,可推论:成功地沉积了靶标阵列并且第一和第二染色试剂均合理地执行,可以通过计算机算法来完成数据集之间的曲线拟合。在另一个实施例中,第一染色选自任何IHC或ICC允许的抗体,其包括也不与荧光标记物缀合或与酶位点(例如HRP或AP)结合的小鼠或小兔宿主蛋白。在另一个实施例中,第二染色包括具有从1x到25x的酶增益的第二染色,其分别在小鼠和小兔之间是唯一独立的,它们各自使用不同的颜色色原。

[0199] 在本发明的另一实施例中,需要注意的是,绝对地基于一种载玻片的性能结果可能与在另一个时间做的另一种载玻片的性能结果不同。这是由于第二染色试剂盒的性能与缀合的第二抗体的性能不同而引起的。但是,过程记录载玻片的结果可以通过对照靶标进行验证,并与使用不同染色剂得到的另一张载玻片具有同等的效果。

[0200] 在一些实施例中,然后将第一抗原浓度标度应用于共生组织切片,以进入组织切片以检测细胞缺陷,例如癌症。

[0201] 本文将各种实施例作为示例进行描述。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较宽范围的情况下,可以进行各种修改并且可以使用其他实施例。针对示例性实施例的这些变型和其他变型旨在被本发明覆盖。

实施例

[0202] 以举例说明本发明的方式给出以下实施例,并且不应以任何方式将其解释为限制本发明的范围。

实施例1:石蜡防护层的喷涂方法

[0203] 以低气流喷涂载玻片的表面。在一些实施例中,使用低液体与空气的混合物。通过掩膜将混合物喷涂到载玻片上,以覆盖对照靶标。典型地,进行1-2次以形成厚度小于5微米的层,而无需重新加热以使石蜡密封流动。将石蜡混合物储器和喷头都加热到略高于 56°C ,以确保将石蜡以液体形式喷雾,并在飞向载玻片时仍保持液体形式。喷头的喷洒宽度名义上为0.375英寸。通过将环境温度升高至 60°C 持续一分钟,使沉积的石蜡混合物回流,这去

除了溶剂,使石蜡在冷却后恢复到硬化状态。

实施例2:石蜡防护层的丝网印刷方法

[0204] 通过使电流从平行的两个侧面通过丝网的金属丝来加热不锈钢印刷丝网。丝网的温度略低于石蜡的熔化温度,因此石蜡糊不会渗入丝网的底部。在这样的温度下,石蜡比液体更接近糊状物。通过将环境温度升高至60℃持续一分钟,使沉积的石蜡回流。然后将所施加的石蜡混合物中的任何溶剂去除,使石蜡恢复到硬化状态。

实施例3:石蜡防护层的喷墨法

[0205] 结合有集成加热器的喷墨头用于将石蜡保持为液态。脂肪族溶剂,例如Zylo1,用于将石蜡从固体变为液体。通过将环境温度升高至60℃持续一分钟,使沉积的石蜡混合物回流。然后将所施加的石蜡混合物中的溶剂去除,使石蜡恢复到硬化状态。

实施例4:石蜡防护层的辊转移印刷法

[0206] 加热的辊从加热的储器中拉起石蜡膜。然后,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载玻片上。通过将环境温度升高至60℃持续一分钟,使沉积的石蜡回流。然后将所施加的石蜡混合物中的溶剂去除,使石蜡恢复到硬化状态。

实施例5:PRS第二靶标的简单对数——抗原修复暴露时间与降解

[0207] 该测试研究试图验证在2D第二靶标和AR靶标中观察到AR暴露时间的变化。

[0208] 预期结果是抗原修复暴露时间和信号强度降低的线性斜率。实际上,当不考虑AR缓冲达到89℃以上所用的时间时,绘制的斜率是线性的。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,可以得到1.3lsb/min,+/-0.2lsb的斜率。实验表明,在超过89℃时间标记的20分钟AR暴露后,AR靶标和第二靶标的信号呈线性降低。在20分钟标记后,由于50%或更多的对照靶标承受着巨大的压力,第二靶标的有效性受到了损害。

实施例6:第二靶标的一致性

[0209] 测试研究具有两个要探索的因素:

[0210] I. 使用单个批号第二蛋白质来源和稀释液组装的一批载玻片之间的点对点比较。

[0211] II. 使用不同批号第二蛋白质和稀释液组装的载玻片之间的点对点比较。

[0212] 使用100%和40%靶标制剂进行测试。印刷一百张载玻片,并全部用购自Scytek的亲素-生物素复合(Avidin-Biotin Complex)(ABC)型小鼠和小兔第二染色试剂盒处理。未执行抗原修复,因为它添加了一个附加变量。两者的分布均在1.5%以内。

实施例7:伪蛋白质的选择

[0213] 使用两种不同批次的小鼠,小兔和牛IgG蛋白构建了十种不同的第二阵列。用100%,40%和20%的IgG蛋白稀释液构建阵列。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强度增加。本发明人发现该问题是由于牛IgG与来自ABC染色试剂盒的生物素化的山羊抗多价试剂之间的意外相互作用。通过用驴蛋白替代牛IgG得以解决该问题。重复测试,现在20%组在1.5%以内。

实施例8:使用第二对数系列PRS的质量控制

[0214] 在QC模式下,共存靶标提供IHC过程反馈,如图6所示。

[0215] 参照图6,有四个第二靶标的阵列(小鼠和小兔按50:50比例混合)暴露于抗原修复,其范围从标称内,轻度超过,过度到过度超过(分别为5%,10%,30%和40%)。染色结果来自代表以上列出的每种情况的四个不同载玻片。抗原修复过程试图通过逆转甲醛和蛋白

质之间的席夫碱键来揭露抗原位点。抗原暴露的速度取决于反应温度。随着温度升高,可能发生泡核沸腾。泡核沸腾对组织和蛋白质沉积物造成物理损害。理想地,抗原修复(AR)的活性在载玻片上是均匀的,但是,实际上通常不是这种情况,并且存在具有或多或少的抗原修复活性的区域。如果忽略抗原修复活性的这种不均匀性,则下述内容可以表明载玻片可用于诊断确定。

[0216] 如果AR不足或过多,则第二阵列可能无法反映故障。但是,这两个AR靶标将发出不足或过多故障状态的信号。

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。第二阵列将看起来完美,靶标也不会向左移动AR。IHC染色器中的以下情况可能导致低AR活性:

- i. AR加热器无法正常工作或设置在80℃以下
- ii. AR缓冲液的pH值为7,而不是6或9
- iii. 曝露时间太短

b. 高AR被视为固定靶标下的2D/3D变白,固定靶标上的2D少于50%黑色。第二阵列也将大体上变白。IHC染色器中的以下情况可能导致高AR活性:

- i. 加热器工作温度>95℃
- ii. 曝露时间太长

C. 在两种情况下会发生色原沉淀错误:

i. 如果在高浓度下,第二靶标的染色强度下降,而不是在最大暗度下降。第二阵列应始终相对于位点密度增加。如果不是,色原沉淀将耗尽第二试剂盒的容量。解决方法是增加第一抗体稀释度(等同于降低抗体浓度)。

ii. 自被激活以来,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。。

[0217] 根据第一抗体的浓度和第二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。当第一抗体的浓度和第二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。这两个因素导致第二线的暗度转移到饱和(100%)或临界(0%)。基于图6,这种移动被视为靶标数量可见。随着第二酶增益的增加,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第二阵列移向0%位置:

- 20倍 所有靶标移动-26dBd
- 15倍 所有靶标移动-23.52
- 10倍 所有靶标移动-20
- 5倍 所有靶标移动-13.98
- 4倍 所有靶标移动-12.04
- 2倍 所有靶标移动-6.02
- 1倍 仅2D 100%点接近黑色

[0218] 如果存在第一靶标阵列,则第二酶增益的增加会将染色密度移向低第一浓度点。如果第一抗体浓度增加,则同样如此。抗原修复过程将导致第一和第二靶标均降解到一定水平,从而逆转向临界移动。如果在IHC染色结束时有三个以上的点消失,则可以认为载玻片的抗原修复持续时间、温度或两者过高,或者在组织中丢失了太多的抗原,使得诊断解释

不重要。因为已经证明第二染色受到损伤,该决定与第一抗体的功效无关。抗体步骤无法克服这个损害水平。

实施例9:PRS以抗原密度标度跟踪照明水平

[0219] 就透射光照明水平而言,通过常规显微镜观察显微镜载玻片是主观的。在整个载玻片成像(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10示出了照明水平太暗(偏离最近状态-5%),最佳状态(+0)和亮度太高(如+10或+15%)时对图像的影响。当光线水平低于最佳水平时,染色密度会降低。就癌症阶段而言,这可能会使诊断比原先的诊断高出一个阶段。当光水平高于最佳水平时,图像会褪色。就癌症阶段而言,这可能会使诊断比原先的诊断低一个阶段。抗原颜色密度和数字标度由第一和第二靶标形成,可以叠加在WSI图像上。数字标度是独立项,而颜色密度是相关项。当将抗原密度颜色和数字标度应用于WSI时,随着用户向上或向下移动照明水平,数字标度将保持固定。另一方面,随着照明水平的变化,颜色浓度标度也会发生变化。优势在于,用户可以选择将表现照明向上/向下移动到组织图像上的最佳“可见”特征,而不会丢失与颜色密度的数值关系。随着放大倍率的改变,这也将起作用。

实施例10:抗原密度标尺的构建

[0220] 根据一些实施例,开发了两种类型的抗原密度标尺。

[0221] 1.A型使用第二靶标阵列,其基于这样的假设:相对于组织抗原位点,第一抗体总是施加少于10%的过量抗体。

[0222] 2.B型使用第一靶标阵列(第一抗原梯度密度阵列)。

[0223] A型:仅基于第二抗原的标尺

[0224] 该类型仅使用第二靶标阵列。埋入2D条形码中传递的信息包括(a)第一抗体数据:抗体的宿主物种以及-dBd稀释度(dBd是dB稀释度)和(b)第二酶增益。

[0225] 第二梯度密度靶标阵列由靶标之间的-3dBd递减后的已知浓度的第二靶蛋白组成。通过用于第一抗体的最小稀释度选择最大浓度。用户经常采用抗体试剂制造商提供的浓度规格,并稀释至恒定的1 μ g/ml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,第二组第一抗体稀释度在1:1至1,000:1之间。

[0226] 为了适应第二酶的增益范围,第二阵列包括更宽范围的稀释液。因此,以-3dBd的增量,第二阵列的最低稀释度从1,000:1或-60dBd开始,以SdBd(第二dB稀释度)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(抗原修复dB稀释度)为代表的第二靶标。在第二阵列中的每个点(八个之一)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,第二阵列为(-S+AR) dBd,或者为[+6至-54dBd]。现在考虑抗体浓度和第二酶增益。抗体浓度为AdBd,而酶增益为EdBd。因此,第二阵列为(-S+AR-E) dBd,而组织为(+AR-E+A) dBd。下一个应用的因素是100%的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第二染色色原沉淀常数,该常数用于将颜色密度分配给数字标度,并赋为DdBd。颜色密度的差异将应用于阵列中的每个2D靶标。因此,2D阵列的染色颜色密度为(+AR-E+A+D) dBd。

[0227] 如果酶增益为10倍,则E=-20dBd。然后,2D第二阵列将变为:-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修复,因此空白。例如,如果2D/3D颜色密度差为10倍,则D=+20dBd,使3D第二阵列达到-

34、-37、-40、-43、-46、-49、空白、空白dBd。假定第一抗体试剂会在第一靶标中找到合适的抗原位点,从而产生100%的收率。还假设每个KLH蛋白有两个以上的抗原肽链,但每个KLH蛋白只有一种抗体可以有效结合并被染色。由于重叠占位,第二染色将阻止任何其他抗体在同一KLH蛋白上找到合适抗原。因此,每个第一抗原携带的蛋白质中可以被检测到的抗原位点数目是一个。由于第一靶标每微米包括的蛋白质数量与第二靶标相同,因此将500ug/ml抗体母液的第一稀释度应用于第二阵列数据,以将第二颜色密度调整为数字抗原密度。监视第二靶标,选择具有中级颜色密度的靶标。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,该点将作为锚点,在该锚点上建立抗原密度标尺。使用高于中点的最后一个靶标范围将变为-41.5dBd。

[0228] 将第二靶标稀释至10μg/mL主稀释液。每个阵列是小鼠或小兔与驴IgG蛋白混合而成的混合物。虽然蛋白质的原子量都不同,但以下假设所有蛋白质均为150kDa,并且每个靶标点的蛋白质总数恒定,混合比不恒定。目前,仅考虑反应性蛋白浓度。150kDa时,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1μm,并且沉淀物浓度为10μg/mL,则将沉淀 31.5×10^6 个蛋白质。直径为1μm的区域将包括31.5种蛋白质。如果我们允许一种蛋白质等于1个抗原位点,则可以确定抗原密度。第二阵列每次沉积使用相同数量的蛋白质,但是随着小鼠或小兔浓度的降低,小鼠或小兔与驴之间的比率也会发生变化。100%的靶标完全是小鼠或小兔,并且与标尺上的0dBd点匹配。

[0229] 仅当第一抗体结合到组织上的抗原位点时,第二染色试剂盒才会在组织上染色。所施加的抗体的浓度没有特别限制,只要能提供足够的抗体浓度以结合可用的抗原位点。因此,在组织上的抗原密度度量保持恒定,但是需要针对抗原修复损失和第二酶增益校正数值。然后将颜色密度与数值测量值进行协调。

[0230] 在先前的实施例中,酶增益为10倍,并且抗原修复已导致第二阵列损失了两个点。酶增益为-20dBd,而抗原修复损失为+6dBd。结果是-14dBd。稀释后的值将转换为:

数值密度 dBd	颜色密度 dBd	%靶标 小鼠/小兔: 驴	1μm ² 内的 小鼠/小兔 抗原密度
0	-14	100	31.5
-3	-17	70.8	23.32
-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

[0231] B型:基于第一抗原的标尺

[0232] 该类型使用第一和第二靶标阵列。埋入2D条形码中传递的信息包括(a)第一抗体数据:抗体的宿主物种和稀释度(dBd),以及(b)第二酶增益。批号数据包括有关使用哪个第一靶标组合的信息。

[0233] 如果存在第一靶标系列,则其将是3个点,其中最浓缩的点与第二阵列具有相同的100%浓度,但是这些点以-6dBd的间隔间隔开。实际上,第一阵列和第二阵列具有相同的稀释斜率。第一靶标变为:-0,-6,-12dBd,并表示为PdBd(第一dB稀释度)。可以合理预期抗原修复损失与第二阵列几乎相同。第一阵列受第二染色剂作用,因此具有相同的酶增益功能。因此,第一阵列将为 $(-A+AR-E)$ dBd,其中第一靶标密度由第一抗体稀释度控制。唯一的要求是P始终大于A。对于10倍的酶增益 $= -20$ dBd和 $+6$ dBd抗原修复损失,第一阵列为 $-20,-26,-32$ dBd。基于对第二阵列的影响,抗原修复损失不能作用在足以将其消灭的第一靶标上。尽管第二阵列足以产生抗原密度标尺,但重要的是要验证第一稀释液的正确使用。因此,第一靶标能这样发挥作用。

[0234] 上面概述了几个实施例的特征,使得本领域技术人员可以更好地理解本公开的各方面。本领域技术人员应该理解,他们可以容易地将本公开用作设计或修改其他工艺和结构的基础,以实现与本文介绍的实施例相同的目的和/或实现相同的优点。本领域技术人员还应该认识到,这样的等同构造不脱离本公开的精神和范围,并且在不背离本公开的精神和范围的情况下,它们可以进行各种改变、替换和变更。

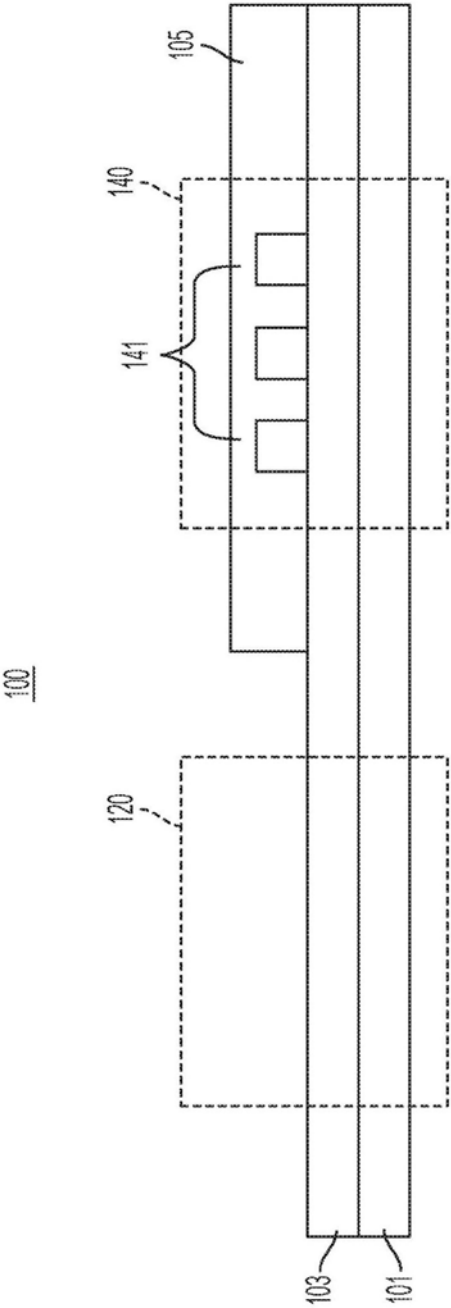


图1

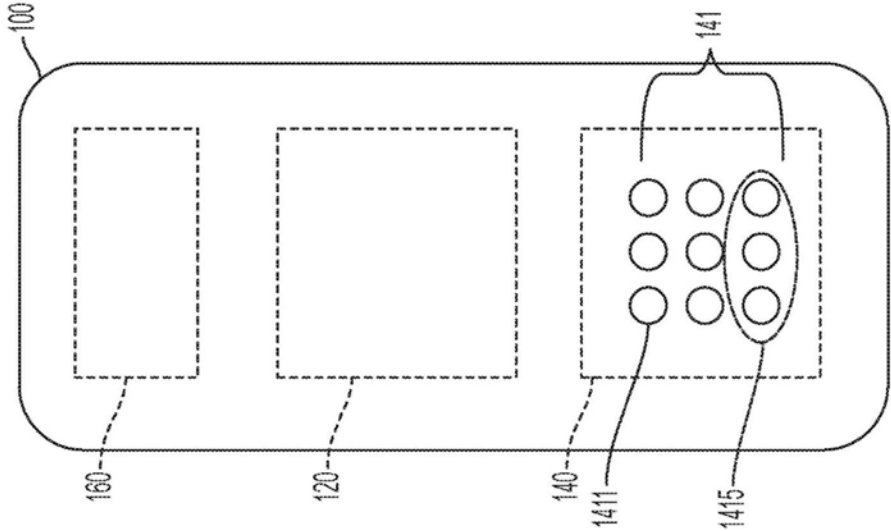
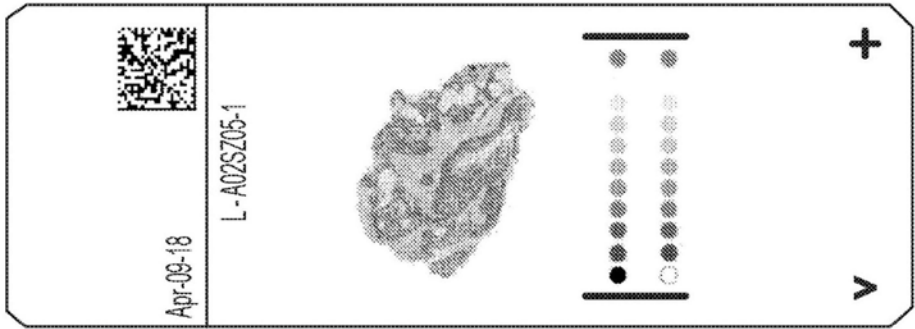
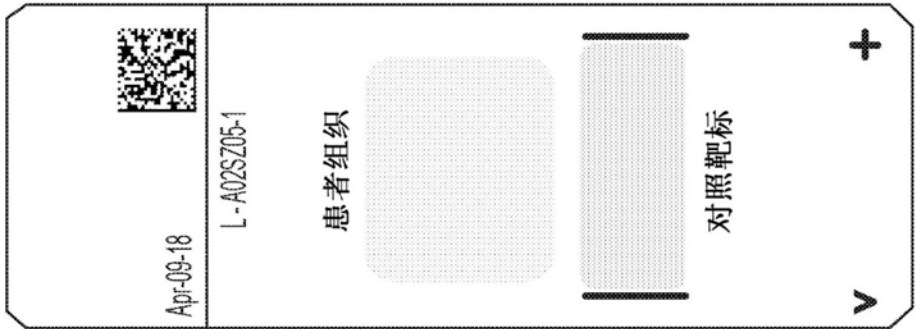


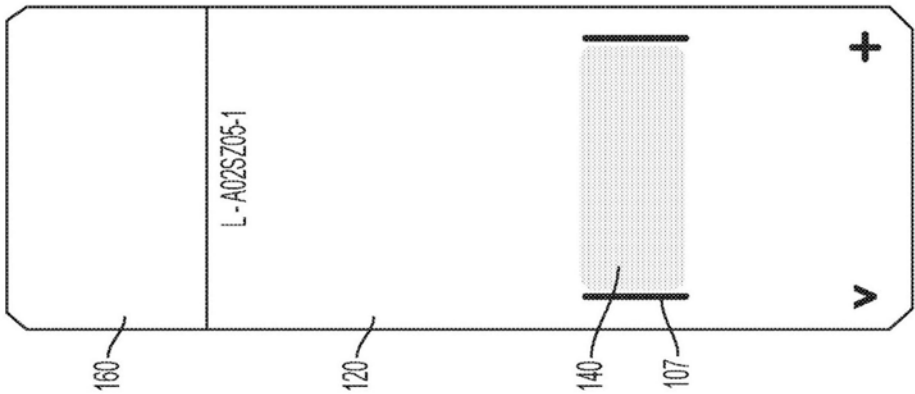
图2



图



图



图

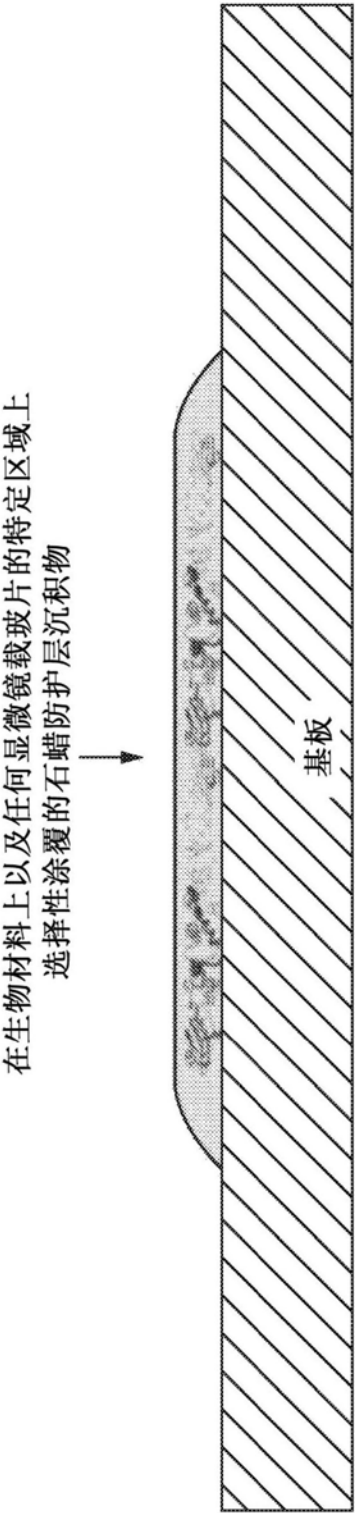


图4

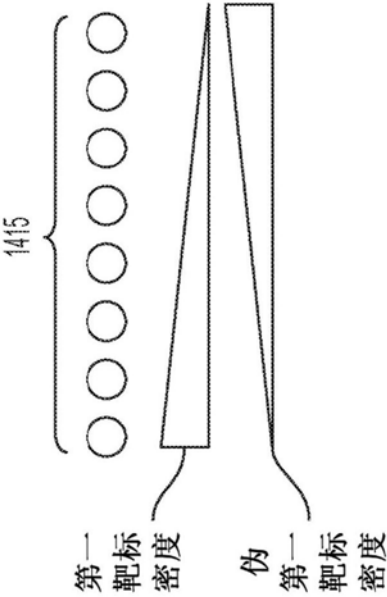


图5A

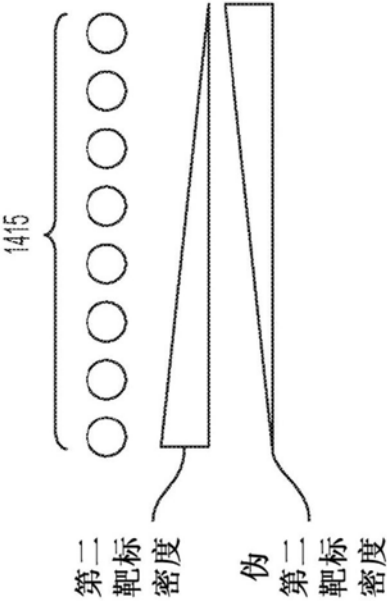


图5B

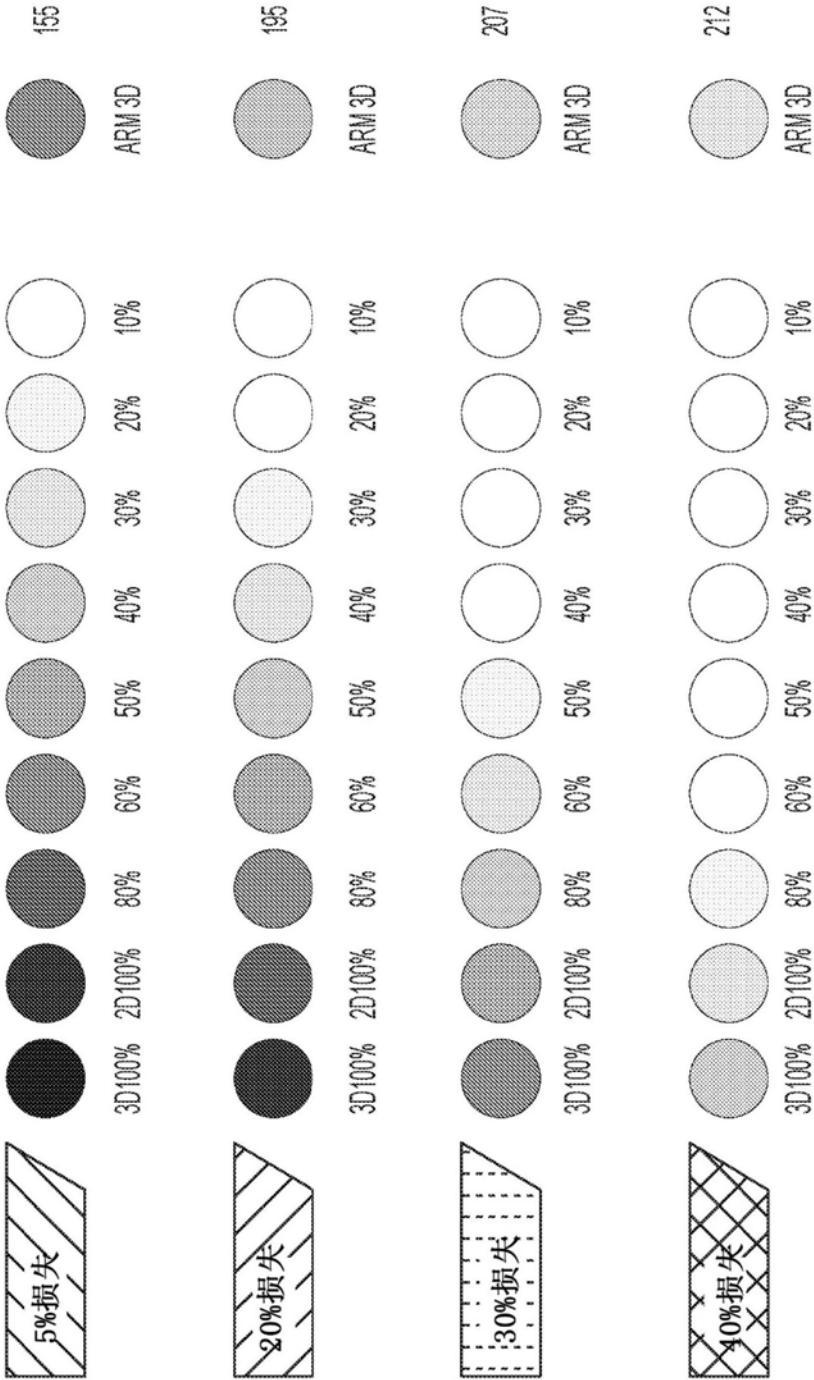


图6

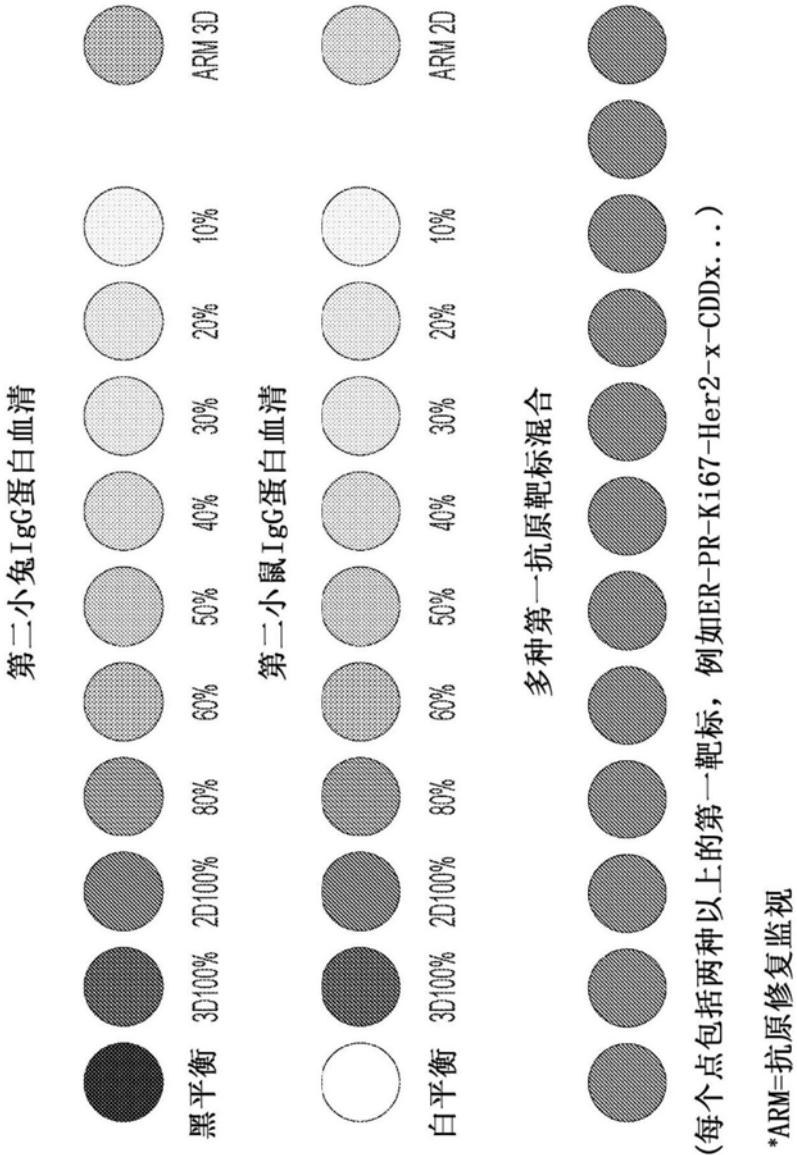
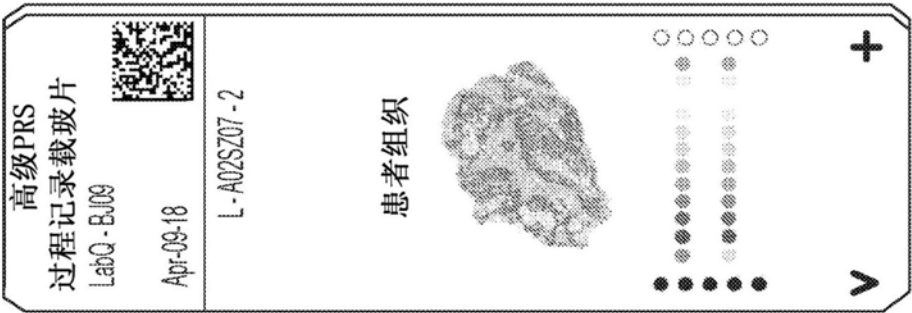
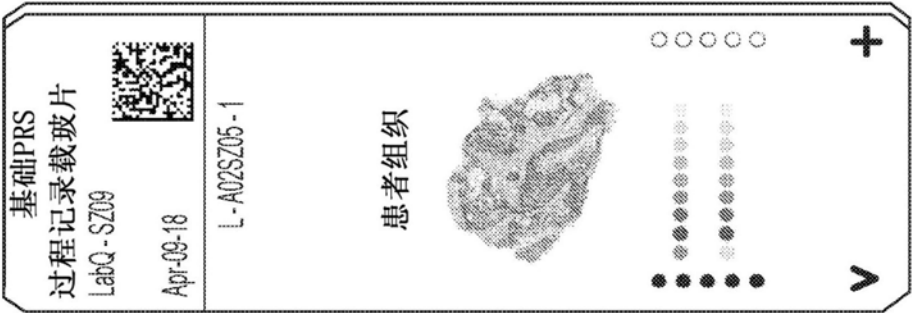


图7



图



图

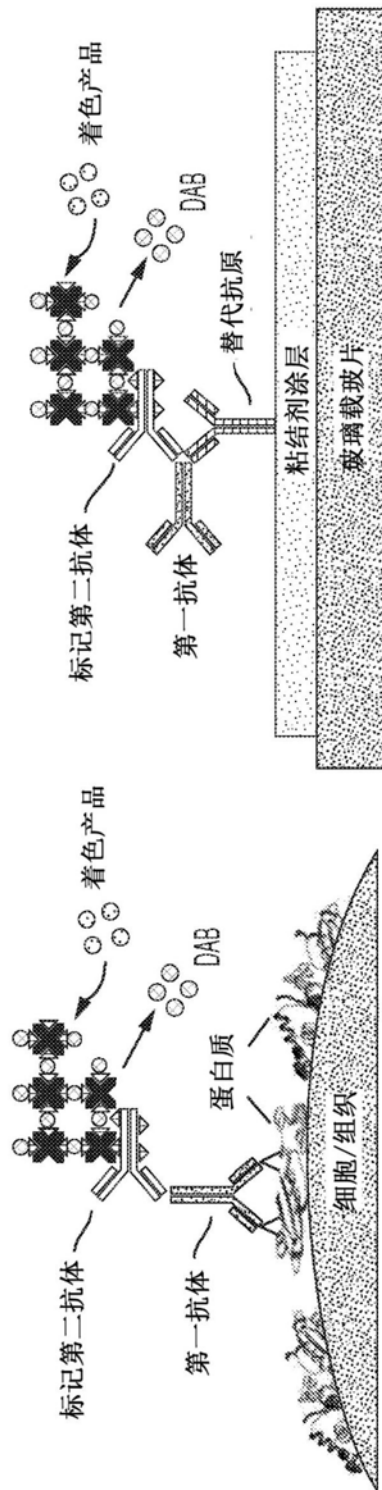
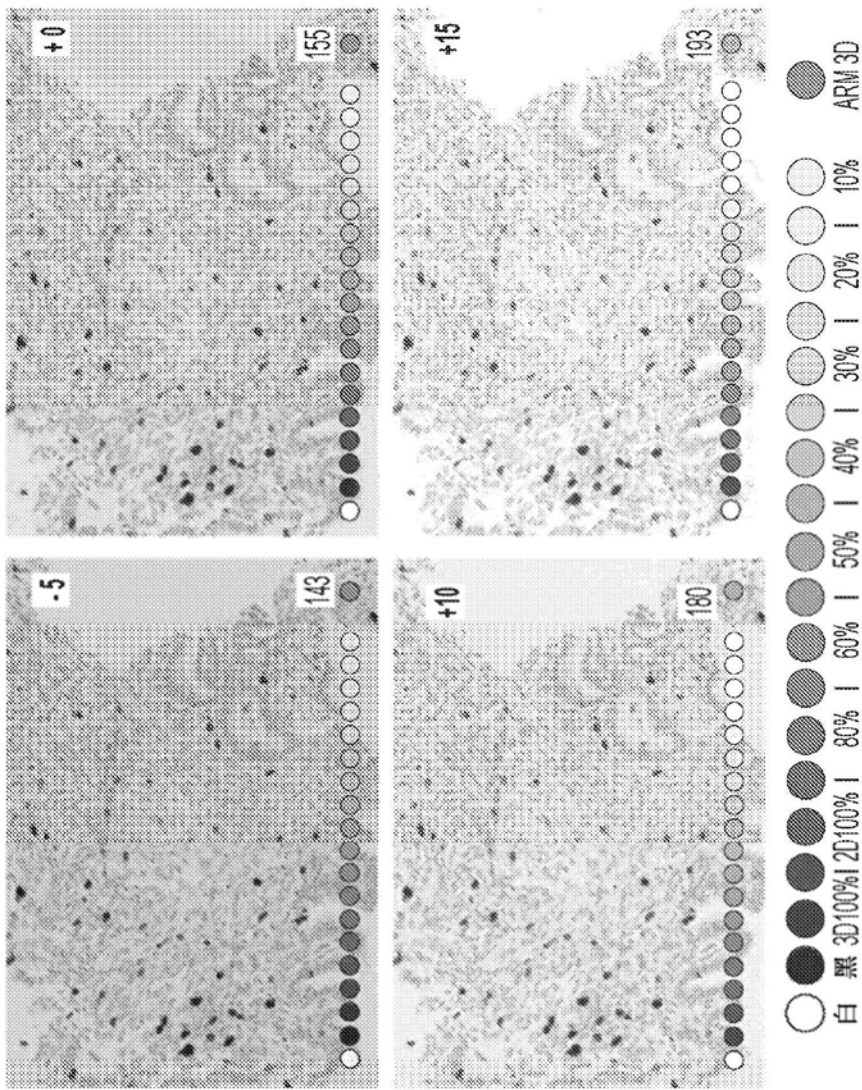


图9



图

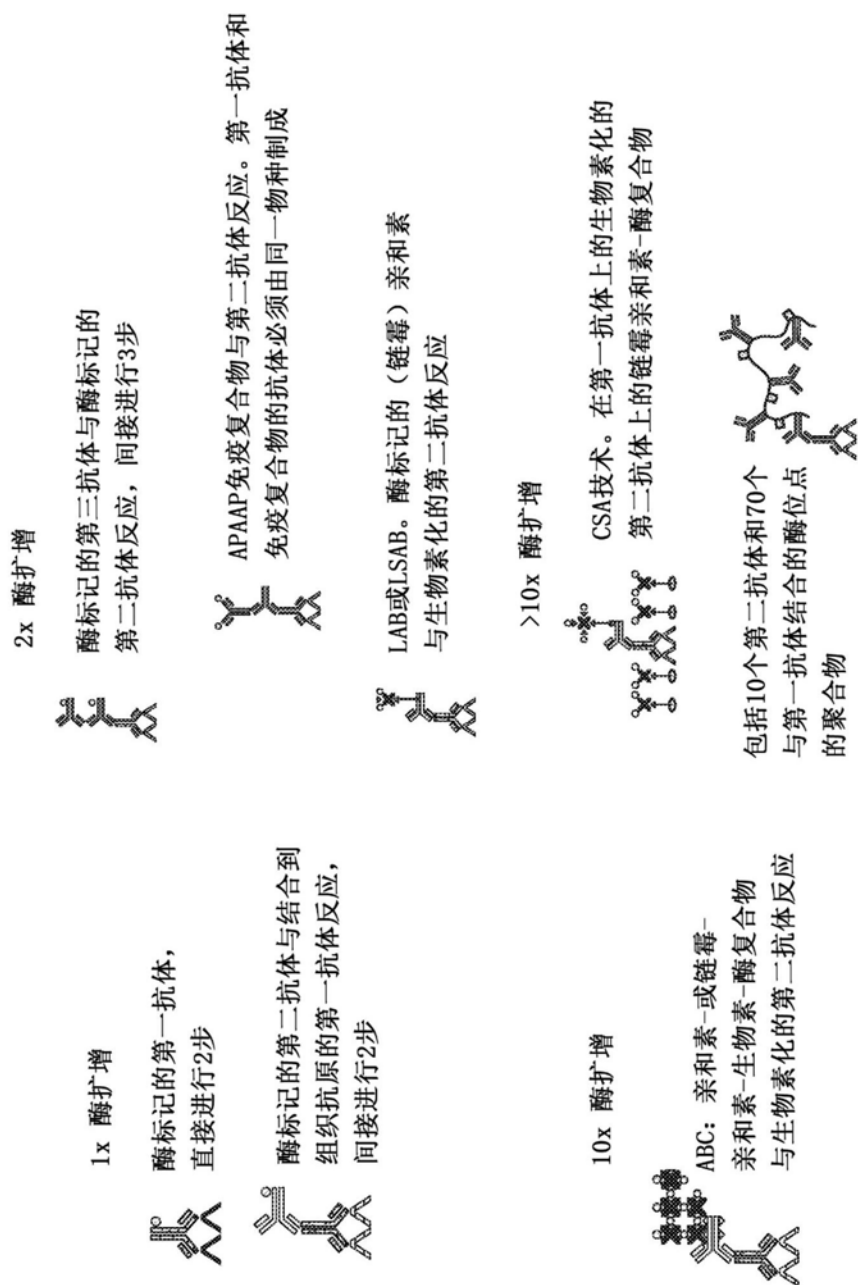


图1

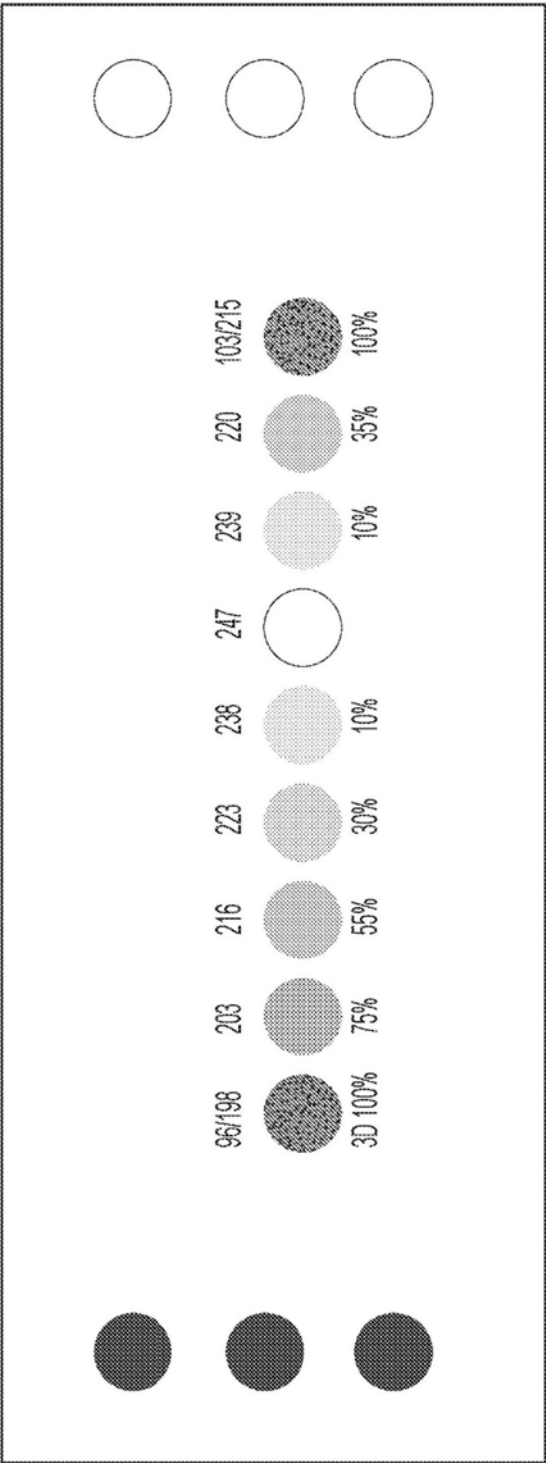


图12

高级PRS-IHC

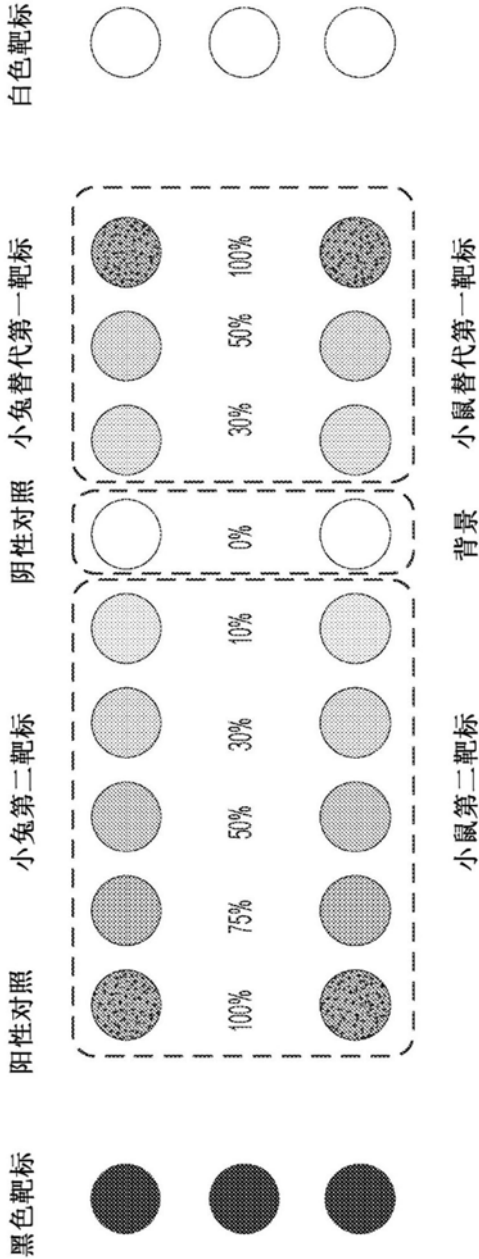


图13