



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105247348 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 13

(21) 申请号 201380074349. 3

(22) 申请日 2013. 09. 13

(30) 优先权数据

61/778093 2013. 03. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 09. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/059829 2013. 09. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/143155 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 文塔纳医疗系统公司

地址 美国亚利桑那州

(72) 发明人 L. 莫里森 L. 迪茨

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 唐华东 石克虎

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

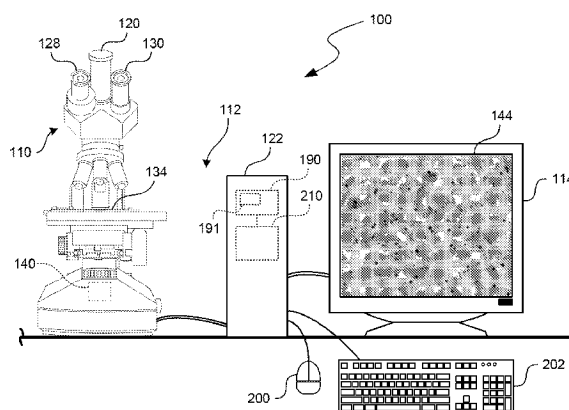
权利要求书3页 说明书47页 附图22页

(54) 发明名称

用于多路化组织学的数字增强的显微镜检查

(57) 摘要

本文公开的是使生物样本成像的实施方案。成像系统可以包括用于直接观察生物样本的显微镜和多光谱成像仪器,其用于输出样本的数字增强的图像、接近视频速率的成像和/或视频。成像系统可以包括数字扫描仪,其数字处理图像,以产生具有目的特点的增强颜色对比的合成图像。



1. 一种用于使位于显微镜载玻片上的样本成像的多光谱成像系统,所述多光谱成像系统包含:

成像仪器,其包括

照明器,其包括多个不同颜色的光源,所述光源序贯产生光用于序贯照明所述样本的至少一部分,

定位于捕获多个样本图像的图像捕捉装置,所述多个样本图像各自对应于暴露于来自不同的光源之一的光的样本,和

处理装置,其配置为基于通过所述图像捕捉装置捕获的样本图像,产生对比增强的彩色图像数据和/或光谱解卷积图像数据;

沿光程定位的至少一个透镜,所述光程从所述样本延伸到所述图像捕捉装置;和

显示器,其与所述成像仪器通讯,并且配置为基于来自所述处理装置的对比增强的彩色图像数据和/或光谱解卷积图像数据,展示所述样本的对比增强的输出和/或光谱解卷积的输出。

2. 权利要求1的多光谱成像系统,其进一步包含显微镜,所述显微镜包括固定所述显微镜载玻片的固定装置,至少一个透镜,以及在所述显示器展示所述样本的对比增强的输出和/或光谱解卷积的输出时,用户能够通过其观察所述样本的至少一个目镜。

3. 权利要求2的多光谱成像系统,其中所述处理装置配置为输出所述增强的彩色图像数据,使得所述对比增强的输出是以等于或大于2帧/秒的帧率展示的视频。

4. 权利要求1的多光谱成像系统,其进一步包含数字显微镜载玻片扫描仪,其包含成像仪器和载玻片操作机构,其中所述载玻片操作机构可移动以将一个或多个显微镜载玻片递送至所述成像仪器,并且可移动以从所述成像仪器处取出一个或多个显微镜载玻片。

5. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述光源各自包括至少一个发光二极管。

6. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述图像捕捉装置与所述光源的脉冲同步。

7. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述多个不同颜色的光源包含:

第一光源,其产生被所述样本的一个或多个第一目的特征吸收的光;和

第二光源,其产生被所述样本的一个或多个第二目的特征吸收的光,其中所述第一光源具有的第一平均波长不同于所述第二光源的第二平均波长。

8. 权利要求7的多光谱成像系统,其中所述处理装置包括存储装置,其储存在所述样本由所述第一光源照明时,由所述图像捕捉装置捕获的第一样本图像,以及在所述样本由所述第二光源照明时,由所述图像捕捉装置捕获的第二样本图像,并且其中所述处理装置配置为数字合并所述第一和第二样本图像的图像数据,以产生所述样本的假彩色合成图像。

9. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述多个不同颜色的光源包括至少四个光源,其具有彼此不同的平均波长。

10. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述照明器产生具有彼此不同的平均波长的多个能量发射,并且其中所述能量发射的总数目在4至8的范围内。

11. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述处理装置产生所述样本的4至10个光谱解卷积图像,并且基于所述光谱解卷积图像,产生所述样本的假彩色图像。

12. 权利要求1的多光谱成像系统,其中所述处理装置配置为增强(a)所述样本的第一

目的特征和(b)所述样本的第二目的特征之间的对比,

其中所述第一目的特征包含第一生色团或第一荧光团,和

其中所述第二目的特征包含第二生色团或第二荧光团。

13. 权利要求 1 的多光谱成像系统,其中所述光源各自包括一个或多个发光二极管,其中所述图像捕获装置配置为提供所述样本的单色图像,并且其中所述处理装置基于所述单色图像生成假彩色图像。

14. 权利要求 1 的多光谱成像系统,其中所述处理装置配置为产生由所述样本图像生成的所述样本的假彩色合成图像。

15. 权利要求 1 的多光谱成像系统,其中所述处理装置配置为以等于或大于 10 帧 / 秒的帧率生成多色图像,用于在所述显示器上观察。

16. 权利要求 1 的多光谱成像系统,其中所述图像捕获装置包括单色照相机。

17. 一种用于使位于显微镜载玻片上的样本成像的基于计算机的成像系统,其包含:

用于存储一系列程序指令的存储器;和

可编程处理器,其具有配置为执行所述程序指令的电路,以促使所述可编程处理器:

接收暴露于以第一波长或第一波段的光的所述样本的第一图像,所述第一波长或第一波段的光用于与至少一种第一目的特征相互作用,

接收暴露于以第二波长或第二波段的光的所述样本的第二图像,所述第二波长或第二波段的光用于与至少一种第二目的特征相互作用,其中所述第二波长或所述第二波段可以分别不同于所述第一波长或所述第一波段,和

基于所述第一图像和所述第二图像生成所述样本的彩色图像,以增强所述至少一种第一目的特征和所述至少一种第二目的特征之间的颜色对比。

18. 权利要求 17 的基于计算机的成像系统,其中所述存储器存储可由所述电路执行的转换指令,以:

将所述第一图像转换为第一假彩色图像;和

将所述第二图像转换为第二假彩色图像,

其中所述生成的彩色图像中的所述第一目的特征(如果存在的话)和所述第二目的特征(如果存在的话)之间的颜色对比大于所述第一目的特征和所述第二目的特征之间的天然颜色对比。

19. 权利要求 18 的基于计算机的成像系统,其中生成所述彩色图像包括合并来自所述第二假彩色图像的第一假彩色数据和来自所述第二假彩色图像的第二假彩色数据。

20. 权利要求 19 的基于计算机的成像系统,其中所述生成的彩色图像是所述样本的假彩色图像。

21. 权利要求 19 的基于计算机的成像系统,其中所述第一和第二目的特征包括一种或多种荧光团或生色团。

22. 权利要求 18 的基于计算机的成像系统,其中所述电路执行所述程序指令,以促使所述可编程处理器接收所述样本的至少两个另外的图像,其对应于暴露于另外的波长和/或波段的所述样本,和

其中生成所述样本的彩色图像包括合并所述样本的第一图像、所述样本的第二图像、以及所述样本的至少两个另外的图像。

23. 一种用于使显微镜载玻片携带的样本成像的方法,所述方法包括:

在所述样本暴露于以第一峰波长或第一波段的光时,捕获所述样本的第一图像,其中所述第一峰波长或所述第一波段对应于所述样本的第一目的特征的第一吸收波长或第一吸收波段;

在捕获所述第一图像后,在所述样本暴露于以第二峰波长或第二波段的光时,捕获所述样本的第二图像,其中所述第二峰波长或所述第二波段对应于所述样本的第二目的特征的第二吸收波长或第二吸收波段;和

基于所述第一图像和所述第二图像生成假彩色图像。

24. 权利要求 23 的方法,其中生成所述假彩色图像包括:

将所述第一图像转换成第一假彩色图像;

将所述第二图像转换成第二假彩色图像;和

合并所述第一假彩色图像和所述第二假彩色图像。

25. 权利要求 23 的方法,其中生成所述假彩色图像包括合并所述第一图像和所述第二图像,并且其中所述第一图像和所述第二图像是光谱离散图像。

26. 权利要求 23 的方法,其中生成所述假彩色图像包括合并所述第一图像、所述第二图像以及在所述样本暴露于光时捕获的另外图像。

27. 一种用于使由显微镜载玻片携带的样本对比增强成像的方法,所述方法包括:

使样本的至少一部分序贯暴露于来自多个光源的光,所述光源各自输出能够由所述样本的分别目的特征吸收的平均波长;

捕获所述样本的多个图像,所述捕获的图像个别对应于暴露于来自分别的光源之一的光的所述样本;和

基于所述多个捕获图像生成假彩色图像数据,使得所述假彩色数据代表在不同目的特征之间具有增强的颜色对比的所述样本的假彩色图像。

28. 权利要求 27 的方法,其中使所述样本序贯暴露于光包括:

使所述样本暴露于来自第一彩色光源的光;

捕获由所述第一彩色光源照明的所述样本的第一样本图像;

在捕获所述第一样本图像后,使所述样本暴露于来自第二彩色光源的光;和

捕获由所述第二彩色光源照明的所述样本的第二样本图像。

29. 权利要求 28 的方法,其中所述第一彩色光源具有第一峰波长,并且第二彩色光源具有不同于所述第一峰波长的第二峰波长。

30. 权利要求 27 的方法,其进一步包括通过重新定义所述捕获图像的光谱特征来处理所述捕获图像,以增加用户对所述假彩色图像中的一种或多种靶向特征的视觉感知。

31. 权利要求 30 的方法,其中所述捕获图像是单色图像。

32. 权利要求 30 的方法,其进一步包括执行所述捕获图像的光谱分离。

用于多路化组织学的数字增强的显微镜检查

[0001] 与相关申请的交叉参考

本申请要求于 2013 年 9 月 13 日提交的美国非临时申请号 14,027,093, 和于 2013 年 3 月 12 日提交的美国临时专利申请号 61/778,093 的利益, 所述专利整体引入本文作为参考。

技术领域

[0002] 本公开内容涉及用于组织学的对比增强的显微镜检查。特别地, 呈现的技术涉及显微镜检查和样本图像 / 视频的数字增强、颜色重新分类和 / 或数字处理。

[0003] 背景

免疫组织化学 (IHC) 一般指检测、定位且定量生物样品中的抗原例如蛋白质, 并且使用特异性结合部分例如对于特定抗原特异性的抗体的过程。原位杂交 (ISH) 一般指检测、定位和定量核酸的过程。IHC 和 ISH 两者均可对各种生物样品执行, 例如组织 (例如新鲜冷冻的、福尔马林固定石蜡包埋的) 和细胞学样品。在靶识别后, 无论靶是核酸还是抗原, 识别事件可以通过使用各种标记 (例如生色、荧光、发光、放射性等) 进行检测。例如, 在组织上的 ISH 可以包括通过应用报道分子与之偶联的核酸互补链来检测核酸。报道分子的显现允许观察者定位异质细胞群体, 例如组织学、细胞学或环境样品中的特异性 DNA 或 RNA 序列。ISH 技术可以包括例如银原位杂交 (SISH)、生色原位杂交 (CISH) 和荧光原位杂交 (FISH)。可能难以鉴定极小的染色样品。在一些临床读出时, 标记可以接近显微镜的光学分辨率极限, 从而限制用户分辨多重杂交信号的颜色中和 / 或重叠中的轻微差异的能力。在使用显微镜的临床读出中, 病理学家通常通过目视检查染为不同颜色的细胞或细胞组分 (例如蛋白质、脂质等), 报道关于生物样品的得分。不幸的是, 可能难以察觉一些染剂和 / 或区分染色的特征。另外, 色觉在病理学家之间可以不同。具有较不敏锐的视力的病理学家可能难以区分颜色, 这可能导致病理学家之间的不一致评分。

[0004] 多路化组织学技术可以用于评估 IHC 和 ISH 中的许多生物标记物。然而, 观察者的色觉通常限制可以同时使用的色原或荧光团数目, 从而限制测定多路化。在使用明视野显微镜的生色多路化中, 可能难以在视觉上检测不同颜色的色原, 因为色原可以具有相对广泛的光谱。即使使用更窄频带的吸收剂, 不同色原之间的光谱重叠可以导致提供有限的色觉的暗点。样本间的染色中的变动可以进一步增加准确区分不同颜色的色原中的困难。另外, 一些颜色比其他颜色更难以区分。黄色和蓝色一般提供更少的对比, 因为它们吸收在可见光谱的蓝色或红色边缘处的光, 使得吸收的总可检测光的百分比相对于例如绿光吸收剂相对很小, 导致黄色和蓝色色原显示出相对于品红原更低的视觉对比。在可见光谱外的色原吸收剂可以用于增加多路化, 但不能使用常规明视野显微镜进行观察。在荧光检测中, 由于在可见光谱边缘上或外部的荧光标记发射, 荧光标记无法通过不同观察者同样检测。因此, 测定多路化的水平通常是有限的, 并且测定多路化具有显著缺点。

[0005] 概述

至少一些实施方案是用于直接观察染色的生物样本且输出数字增强的样本图像和 / 或视频的成像系统。成像系统可以包括用于直接观察样本和多光谱成像仪器的显微镜。用

户可以通过显微镜的目镜观察,以快速定位用于检查的区域和 / 或定位特定目的特征,例如色原染色的特征,荧光团染色的特征,或关于 IHC、ISH 或其他检查技术的其他特征。样本的图像和 / 或视频可以在定位接近于显微镜的成像仪器的显示屏上实时输出。图像和 / 或视频可以得到数字增强,以促进染色特征的鉴定。通过在明视野观察(例如经由显微镜观察)之间交替且察看数字增强的图像 / 视频,用户可以快速且准确地评分样本。成像系统可以提供数字增强、颜色重新分类、光谱解卷积图像 / 视频、和 / 或图像 / 视频的数字处理。

[0006] 在一些实施方案中,显微镜载物台可以在 X、Y 和 Z(聚焦)方向上移动,并且成像仪器可以输出视频(或以接近视频的速率成像),以最小化、限制或基本上消除与展示图像和 / 或视频相关的延迟。在一个实施方案中,成像系统的图像捕获装置可以与复合显微镜偶联。在其他实施方案中,成像仪器可以并入数字显微镜内或是数字显微镜的部分。数字显微镜可以具有或不具有用于直接观察生物样本的目镜,以及用于输出数字增强的图像 / 视频的显示屏。

[0007] 成像系统可以包括一个或多个图像捕获装置和能量发射器,例如光源、红外线源、紫外线源等。光源可以是发光二极管(LED),其对应于成像帧脉冲打开和关闭,使得相继帧用不同 LED 照明记录。LED 可以产生光,其对应于用于染色样本的每种色原的吸光度,并且在一些实施方案中,可以限制来自光谱附近色原的贡献。数字处理可以用于重新定义捕获图像的光谱特征,使得目的特征由观察者最佳察觉。例如,可以执行每种 LED 照明的颜色重新定义和 / 或对比增强,以最佳地在视觉上区分每种色原且适合观察者的敏锐度。在一些实施方案中,数字处理使对应于目的特征的区域变暗且可以使其他区域变亮。另外,颜色可以重新定义以进一步增强目的特征的视觉和 / 或自动化鉴定。在一些实施方案中,成像仪器是具有图像捕获装置的无滤波器成像仪器,其输出基于来自照明器的特异性波长和 / 或波段的图像。

[0008] 在一些实施方案中,图像捕获装置提供了多光谱图像。可以对图像执行光谱分离。分离的图像的颜色可以重新定义以提供最佳的色彩分离。在一个实施方案中,重新定义的图像可以组合以产生彩色合成图像(例如假彩色合成图像)。为了增加多路化能力,图像捕获装置可以提供在可见光谱范围外的灵敏度,以成像在可见光谱外的色原和 / 或荧光信号。图像捕获装置可以配置为提供由于例如与 UV 和近 IR 能源相关的色差的再聚焦能力。在一个实施方案中,自动化聚焦装置或自动化聚焦载物台可以用于调整与照明器同步的焦点。例如,自动化的聚焦装置可以并入图像捕获装置内。可替代地或另外地,自动化的聚焦载物台可以调整用于可见光发射器、UV 能量发射器和 IR 能量发射器的焦点。足够明亮用于视频或接近视频速率成像的荧光染料可以用不同脉冲的 LED 选择性且序贯地激发,所述不同脉冲的 LED 与图像记录同步。放大方法例如荧光团的酪酰胺沉积可以用于致使样本荧光对于视频速率或接近视频速率成像足够强烈。

[0009] 在一些实施方案中,成像系统可以包括与复合显微镜的接目镜偶联或接近的图像捕获装置。在其他实施方案中,显微镜可以是具有整合的图像捕获装置的数字显微镜。在另外其他实施方案中,成像系统可以与立体显微镜或其他类型的显微镜一起使用,所述显微镜用于以例如几百倍放大率观察极小物体。成像系统的照明器和图像捕获装置的位置可以基于显微镜的配置加以选择。成像系统可以进一步包括以台式计算机、膝上计算机、平板电脑等形式的处理装置,并且可以包括数字电子电路、固件、硬件、存储器、计算机存储介

质、计算机程序、处理器(包括编程处理器)等。

[0010] 在一些进一步的实施方案中,成像系统配置为使位于显微镜载玻片上的样本成像,并且包括成像仪器、一个或多个透镜和与成像仪器通讯的显示器。成像仪器包括以照明器形式的能量发射器,所述照明器具有多个不同颜色的光源,其序贯产生光用于序贯照明样本的至少一部分。成像仪器还包括定位于捕获多个样本图像的图像捕捉装置,所述多个样本图像各自对应于暴露于来自分别的光源之一的光的样本。处理装置配置为基于样本图像产生对比增强的彩色图像数据。显示器可以配置为展示基于对比增强的彩色图像数据的样本。显示器可以展示样本的假彩色图像或假彩色视频。还可以展示其他类型的输出(例如患者信息、染剂信息、报告等)。在一些实施方案中,显示器展示对比增强的彩色输出(例如假彩色合成图像/视频)和/或光谱分离的输出,其提供了在靶向细胞结构之间比由明视野观察提供的天然存在的颜色对比更大的颜色对比。处理装置可以输出对比增强的彩色数据,使得对比增强的彩色输出是以等于或大于所需帧率(例如 2 帧/秒)的帧率展示的样本视频。

[0011] 在一些实施方案中,能量发射器配置为产生具有彼此不同的平均波长的能量发射。在一个实施方案中,不同能量发射(即,具有不同平均波长的能量发射)的总数目在例如约 4 至 8 的范围内。能量发射器可以包括但不限于不同平均波长的四个光源、不同平均波长的五个光源、或不同平均波长的十个或更多个光源。能量发射数目、发射特征(例如平均波长)和/或光源数目可以基于目的特征数目、标记类型等加以选择。

[0012] 在一些实施方案中,成像系统进一步包括显微镜,其包括携带显微镜载玻片的固定装置,以及在显示器展示样本的对比增强的彩色输出时,用户能够通过其观察样本的一个或多个目镜。照明器可以照明显微镜视野内的样本一部分。当使用目镜时,照明器可以生成关于样本的正常外观的白光。虽然照明器输出白光,但对比增强的彩色输出可以不实时更新。

[0013] 在一些进一步的实施方案中,系统包括成像仪器、一个或多个透镜、和与成像仪器通讯的显示工具。成像仪器包括用于序贯发射能量的工具和用于捕获图像/视频的工具。在一些实施方案中,用于捕获的工具定位于捕获样本图像,各自对应于暴露于能量的样本。在一些实施方案中,用于捕获的工具可以包括定位于携带生物样本的显微镜载玻片的前侧和/或背侧上的一个或多个照相机。在一些实施方案中,显示工具可以包括监视器或屏幕。在一些实施方案中,用于序贯发射能量的工具包括多重能量发射器。每个能量发射器可以包括一个或多个 IR 能量发射器、UV 能量发射器、LED 光发射器、其组合、或其他类型的能量发射装置。成像系统可以进一步包括用于产生对比增强的彩色图像数据的工具,所述彩色图像数据基于由用于捕获的工具捕获的样本图像。显示工具展示基于对比增强的彩色图像数据的样本。

[0014] 在另外其他实施方案中,用于使位于显微镜载玻片上的样本成像的基于计算机的成像系统包括存储器和可编程处理器。存储器可以存储一系列程序指令。在一些实施方案中,处理器具有配置为执行指令的电路,以促使可编程处理器接收暴露于以第一波长/波段的光的样本的第一图像,所述第一波长/波段的光用于与至少一种第一目的特征相互作用,并且接收暴露于以第二波长/波段的光的样本的第二图像,所述第二波长/波段的光用于与至少一种第二目的特征相互作用。第二波长/波段可以分别不同于第一波长/波段。

指令还可以促使处理器基于第一和第二图像生成样本的彩色图像。

[0015] 在一些实施方案中,存储器存储可由电路执行的转换指令。例如,可以执行转换指令,以将第一图像转换为第一假彩色图像,并且将第二图像转换为第二假彩色图像。第一和第二假彩色图像可以合并,以产生彩色合成图像。线性混合方法、非线性混合方法和/或其他混合技术可以用于合并成像。合成图像中的目的特定可以是靶(例如核酸、抗原等)、标记(例如生色标记、荧光标记、发光标记、放射性标记等)、或各种细胞组分或结构。可以生成另外的假彩色图像。在一些方案中,可以生成总共 4-8 个假彩色图像,以产生每个彩色合成图像。

[0016] 在一些实施方案中,用于使由显微镜载玻片携带的样本成像的方法包括:在样本暴露于以第一峰波长或第一波段的光时,捕获样本的第一图像。第一峰波长或第一波段对应于样本的第一目的特征的第一吸收波长或第一吸收波段。第二图像可以在样本暴露于以第二峰波长或第二波段的光时被捕获。第二峰波长或第二波段对应于样本的第二目的特征的第二吸收波长或第二吸收波段。图像可以基于第一和第二图像来生成。在一些实施方案中,所生成的图像是假彩色图像(例如合成图像)或其他类型的增强图像。在一些实施方案中,该方法包括将第一图像转换成第一假彩色图像,将第二图像转换成第二假彩色图像,并且合并第一和第二假彩色图像。第一和第二图像可以是光谱离散图像,例如单色图像。

[0017] 在另外一个实施方案中,用于对比增强成像的方法包括使样本的至少一部分(例如在显微镜的视野内的样本一部分、整个样本等)序贯暴露于来自光源的光。每个光源可以输出能够由样本的分别目的特征吸收的平均波长。样本的图像可以在每个照明步骤时捕获。假彩色图像数据可以基于捕获的图像生成,使得假彩色数据代表在样本的不同目的特征之间具有增强的颜色对比的假彩色图像。

[0018] 在一些实施方案中,成像系统可以捕获由显微镜载玻片携带的样本的图像。在图像捕获过程期间,样本可以暴露于能量,使得样本的目的特征的特征在图像之间变化。图像可以进行数字处理且合并,以产生用于观察的图像。在一个实施方案中,捕获的图像可以转换成假彩色图像且合并,以提供合成假彩色图像。在一个实施方案中,分类器可以用于测定应用于样本的染剂数目和类型。图像可以基于来自分类器的信息进行处理。

[0019] 本发明的实施方案的前述及其他目的、特征和优点根据下述详述将变得更显而易见,所述详述参考附图进行。

[0020] 附图简述

专利或申请文件含有至少一个彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请的拷贝在请求和支付必要的费用后由专利局提供。

[0021] 图 1 是依照公开技术的一个实施方案,用于使位于显微镜载玻片上的样本成像的成像系统的前视图。

[0022] 图 2 (A) 显示了依照公开技术的一个实施方案,数字增强的生物样本图像。

[0023] 图 2 (B) 显示了图 2 (A) 的生物样本的明视野显微照片。

[0024] 图 3 是依照公开技术的一个实施方案,显微镜以及与该显微镜偶联的多光谱成像仪器的部件的前视图。

[0025] 图 4 是依照公开技术的一个实施方案,用于产生样本的数字图像的方法的流程图。

[0026] 图 5 (A-E) 显示了染色用于鉴定非何杰金 Ki 阳性大细胞淋巴瘤的人组织。图 5 (A-D) 是通过彩色 LED 照明的人组织的黑白显微照片。图 5 (E) 是组织的假彩色合成图像。

[0027] 图 6 显示了依照公开技术的一个实施方案, 染色用于鉴定非何杰金 Ki 阳性大细胞淋巴瘤的人组织的增强假荧光图像。

[0028] 图 7 是各种染剂的波长相对于吸收的曲线。

[0029] 图 8 举例说明了依照公开技术的一个实施方案, 用于分析组织样本的基于计算机的系统。

[0030] 图 9 是依照公开技术的一个实施方案, 用于检测靶的流程图。

[0031] 图 10 (A-B) 是两种信号传导缀合物的示意图。图 10 (A) 举例说明了包含潜在反应部分和生色团部分的信号传导缀合物。图 10 (B) 举例说明了进一步包含接头的替代信号传导缀合物。

[0032] 图 11 (A-F) 是举例说明了其中检测样品上的靶的方式的示意图。图 11 (A) 显示了与靶结合的检测探针。图 11 (B) 显示了与检测探针结合的标记缀合物。图 11 (C) 显示了酶促沉积到样品上的信号传导缀合物。图 11 (D) 显示了替代实施方案, 其中基于抗体的检测探针用于检测不同靶。图 11 (E) 显示了使用放大缀合物用于检测靶的方法。图 11 (F) 显示了与样品结合且由次级标记缀合物标记的放大缀合物。

[0033] 图 12 (A-B) 是示意图, 其举例说明 (A) 与靶 (T) 接近的标记缀合物的分布的横截面描述, 和 (B) 描述跨越 (A) 中所示的样品的入射辐射功率 (P_0) 和穿过样品的透射辐射功率 (P) 之间的关系的曲线, y 轴代表辐射功率, 并且 x 轴代表跨越样品的线性距离。

[0034] 图 13 (A-B) 是显示用色原获得的信号和用荧光团获得的信号之间的差异的图示。图 13 (A) 举例说明了其中检测到透射光的色原的检测。图 13 (B) 举例说明了其中检测到发射光的荧光团的检测。

[0035] 图 14 (A-B) 是举例说明本文讨论的彩色特征的图像。图 14 (A) 是描述所观察到的颜色之间的关系的色轮, 并且图 14 (B) 是关于信号传导缀合物的吸收辐射的图像。

[0036] 图 15 (A) 是举例说明 5-TAMRA- 酞酰胺缀合物的吸收光谱的曲线图, 并且图 15 (B) 是举例说明具有由 5-TAMRA- 酞酰胺缀合物检测的靶的生物样品的显微照片。

[0037] 图 16 (A) 是在肺组织切片上的两种基因探针的双重染色的显微照片, 所述肺组织切片测试与非小细胞肺癌相关的 ALK 重排, 并且图 16 (B) 是乙酸乙酯溶液中的坚固红和坚固蓝的 UV- 可见光谱以及得自组织样品的痕迹。

[0038] 图 17 (A) 和 17 (B) 是波长相对于吸光度的曲线图, 并且举例说明了两组痕迹。图 17 (A) 举例说明了得自组织样品的痕迹, 而图 17 (B) 举例说明了得自坚固红和坚固蓝的乙酸乙酯溶液的痕迹。

[0039] 图 18 (A-B) 是举例说明双重 ISH 生色检测之间的差异的图像和图示, 其中图 18 (A) 显示了 SISH/ 红色合并的检测方案, 并且图 18 (B) 显示了如本文描述的紫色和黄色信号传导缀合物。通过组合这两种色原产生的信号检测为第三种独特颜色。

[0040] 图 19 (A-B) 是显示接近沉积两种颜色以制备视觉上不同的第三种颜色的两个例子的显微照片。

[0041] 图 20 (A-C) 是显示使用 LED 照明以分离来自色原双重染剂的信号的显微照片。图 20 (A) 显示了白光照明, 图 20 (B) 显示了绿光照明, 并且图 20 (C) 显示了红光照明。

[0042] 图 21 (A-B) 是显示图 21 (A) 向其中不加入 BSA-BF 的对照载玻片, 和图 21 (B) BSA-BF 已与样品附着的载玻片的显微照片。

[0043] 图 22 (A-B) 是显示用信号传导缀合物染色的样品的显微照片, 图 22 (A) 不含酪氨酸增强, 和图 22 (B) 含酪氨酸增强。

[0044] 图 23 (A-B) 是显示用两种不同的信号传导缀合物染色的 Calu-3 异种移植物中的 HER2 (4B5) IHC 的显微照片。

[0045] 图 24 举例说明了在溶液中且如用于染色图 23 (A-B) 中所示的样品的两种信号传导缀合物的吸光度光谱。

[0046] 详述

I. 定义和缩写

除非另有说明, 否则技术术语根据常规用法使用。在分子生物学中的常见术语的定义可以在下述中发现: Benjamin Lewin, *Genes VII*, 由 Oxford University Press, 2000 (ISBN 019879276X) 出版; Kendrew 等人 (编辑), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由 Blackwell Publishers, 1994 (ISBN 0632021829) 出版; 和 Robert A. Meyers (编辑), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由 Wiley, John & Sons, Inc., 1995 (ISBN 0471186341) 出版; 及其他相似参考文献。

[0047] 如本文使用的, 除非上下文另有明确说明, 否则单数术语“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数参考。类似地, 除非上下文另有明确说明, 否则单词“或”意欲包括“和”。术语“包括”定义为包含在内, 使得“包括 A 或 B”意指包括 A、B 或 A 和 B。应进一步理解对于核酸或多肽或其他化合物给出的所有核苷酸大小或氨基酸大小, 以及所有分子量或分子量值是近似值, 并且提供用于描述。尽管下文描述了合适的方法和材料, 但与本文描述的那些相似或等价的方法和材料可以用于本公开内容的实践或测试中。

[0048] 在与本文提及的出版物、专利申请、专利及其他参考文献的公开内容冲突的情况下, 以本说明书包括术语解释为准。另外, 材料、方法和例子仅是举例说明性的, 并且不预期是限制性的。

[0049] 本文公开的是一个或多个通用化学式。对于本文提供的通式, 如果未指示取代基, 则本领域普通技术人员应当理解取代基是氢。与原子不连接但显示例如延伸至环系统内部的键指示此类取代基的位置是可变的。通过键描绘的曲线指示一些另外的结构与该位置键合, 通常为用于将两个部分 (例如生色团和酪酰胺或酪酰胺衍生物) 偶联在一起的接头或官能团或部分。此外, 如果对于具有一个或多个手性中心的化合物未指示立体化学, 则包括所有对映体和非对映体。类似地, 对于脂肪族基团或烷基的叙述, 还包括其所有结构异构体。除非另有说明, 否则下文提供的通式中的 R 基 (例如 R1-R24) 独立地选自: 氢; 酰基; 醛; 烷氧基; 脂肪族, 特别是低级脂肪族 (例如 C1-10 烷基、C1-10 烯基、C1-10 炔基); 取代的脂肪族; 杂脂肪族 (例如具有杂原子例如氧、氮、硫、烷基的有机链, 特别是具有 20 个或更少的碳原子的烷基, 并且甚至更通常为具有 10 个或更少原子的低级烷基, 例如甲基、乙基、丙基、异丙基和丁基); 取代烷基, 如烷基卤化物 (例如 -CX₃, 其中 X 是卤化物及其组合, 无论是在链中还是与之键合); 肟; 肟醚 (例如甲氧基亚胺, CH₃-O-N=); 醇 (即脂肪族或烷基羟基, 特别是低级烷基羟基); 酰氨基; 氨基; 氨基酸; 芳基; 烷基芳基例如苄基; 碳水化合物; 单糖例如葡萄糖和果糖; 二糖例如蔗糖和乳糖; 寡糖; 多糖; 羰基; 羧基; 羧化物 (包括其盐, 例如 I

族金属或铵离子羧化物);环状;氰基(-CN);酯例如烷基酯;醚;外亚甲基;卤素;杂芳基;杂环;羟基;羟胺;酮例如脂肪族酮;硝基;巯基;磺酰基;亚砷;外亚甲基;及其组合。

[0050] “吸光度”或“吸收”指在材料上入射的辐射(P_0)与穿过材料透射的辐射(P)的对数比。根据等式 1,材料的吸光度 A 随通过其的光程长(l)而改变。

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -(\log T) = \epsilon lc$$

[0051] P_0 和 P 是入射和透射光强度, T 是光透射,并且 ϵ 是摩尔消光系数($M^{-1} cm^{-1}$), l 是照明区域的长度或深度(cm),并且 c 是吸收分子的浓度。

[0052] “放大”指使得信号更强的动作或结果。

[0053] “放大缀合物”指包含与半抗原缀合的潜在反应种类的分子,例如半抗原-酪酰胺缀合物。放大缀合物可以充当特异性结合对的成员,例如与半抗原特异性结合的抗半抗原抗体。放大方面涉及酶促转换为反应种类的潜在反应种类,使得单一酶可以生成多个反应种类。参考美国专利号 7,695,929。

[0054] “抗体”有时缩写为“Ab”,指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子(包括例如但不限于 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,其组合和在任何脊椎动物中(例如在哺乳动物例如人、山羊、兔和小鼠中)的免疫应答期间产生的相似分子、以及与目的分子(或一组高度相似的目的分子)特异性结合以基本上排除与其他分子的结合的抗体片段(例如,抗体和抗体片段对于目的分子具有的结合常数比对于生物样品中的其他分子的结合常数大至少 $10^3 M^{-1}$ 、至少 $10^4 M^{-1}$ 或至少 $10^5 M^{-1}$ 。抗体进一步指包含至少轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽配体,其特异性识别且结合抗原的表位。抗体可以由重和轻链组成,其各自具有可变区,称为可变重(VH)区和可变轻(VL)区。VH 区和 VL 区一起负责结合由抗体识别的抗原。术语抗体还包括完整免疫球蛋白以及本领域众所周知的其变体和部分。抗体片段包括蛋白酶解的抗体片段[例如,如本领域已知的 $F(ab')_2$ 片段、 Fab' 片段、 $Fab'-SH$ 片段和 Fab 片段]、重组抗体片段(例如 sFv 片段、dsFv 片段、双特异性 sFv 片段、双特异性 dsFv 片段、 $F(ab)'$ 2 片段、单链 Fv 蛋白质(“scFv”)、二硫键稳定的 Fv 蛋白质(“dsFv”)、双抗体和三抗体(如本领域已知的)和骆驼科抗体(参见例如美国专利号 6,015,695;6,005,079,5,874,541;5,840,526;5,800,988;和 5,759,808)。抗体可以包括单克隆抗体,其特征在于通过 B 淋巴细胞的单个克隆或者单一抗体的轻和重链基因已转染到其内的细胞产生。单克隆抗体通过本领域技术人员已知的方法产生。单克隆抗体包括人源化单克隆抗体。

[0055] “抗原”指化合物、组合物或物质,其可以由特异性体液或细胞免疫的产物,例如抗体分子或 T 细胞受体特异性结合。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单中间代谢产物、糖(例如寡糖)、脂类、和激素以及大分子例如复杂碳水化合物(例如多糖)、磷脂、核酸和蛋白质。

[0056] “生色团”指分子或负责其颜色的分子部分。当分子吸收一定波长的可见光且透射或反射其他时,出现颜色。具有在落入可见光谱范围内的两个不同分子轨道之间的能量差异的分子可以吸收可见光,并且因此可以适当地表征为生色团。在生色团上入射的可见光可以被吸收,因此将来自基态分子轨道的分子激发成激发态分子轨道。

[0057] “缀合”、“连接”、“键合”、“偶联”或“联系”同义使用,以意指将第一原子或分子与另一个原子或分子直接或间接连接,以制备更大的分子。

[0058] “缀合物”指共价连接成更大构建体的两种或更多种分子。在一些实施方案中,缀合物包括与一种或多种其他分子(例如一种或多种其他生物分子)共价连接的一种或多种生物分子(例如肽、核酸、蛋白质、酶、糖、多糖、脂质、糖蛋白和脂蛋白)。在其他实施方案中,缀合物包括与一种或多种可检测标记(半抗原、酶及其组合)共价连接的一种或多种特异性结合分子(例如抗体和核酸序列)。在其他实施方案中,缀合物包括与可检测标记(半抗原、生色团部分、荧光部分)共价连接的一种或多种潜在反应部分。

[0059] “DABSYL”指 4-(二甲基氨基)偶氮苯-4'-磺酰胺,黄-橙色生色团。

[0060] “衍生物”指通过将一个原子或一组原子替换为另一个原子或另一组原子,衍生自相似化合物的化合物。

[0061] “表位”指抗原决定簇。这些是在分子上的特定化学基团或者邻接或不邻接的肽序列,其为抗原性的,即引发特异性免疫应答。抗体结合特定抗原表位。

[0062] “增强/增强剂”增强剂或增强试剂是与不含此类化合物的酶活性相比较,足以增加酶的催化活性的任何化合物或任何化合物组合。增强剂或增强试剂还可以定义为增加或加速活化缀合物与受体位点的结合速率的化合物或化合物组合。增强是与不包括此类增强剂的过程相比较,酶的催化活性通过其经由增强剂增加的过程。增强还可以定义为增加或加速活化缀合物与受体位点的结合速率。增强可以在视觉上进行测量,例如通过经由病理学家评分。在特定实施方案中,得分范围为大于 0 到大于 4,其中更高的数目指示更佳的视觉检测。更通常地,得分范围为大于 0 到约 4++,例如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、3.75、4、4+ 和 4++。另外,增强可以通过测定酶的表现 $V_{\max}$ 进行测量。在特定实施方案中,该术语涵盖范围为大于 0 mOD/分钟至约 400 mOD/分钟的表现 $V_{\max}$ 值(测量为光密度/分钟),例如约 15 mOD/分钟、18 mOD/分钟、约 20 mOD/分钟、约 40 mOD/分钟、约 60 mOD/分钟、约 80 mOD/分钟、约 100 mOD/分钟、约 120 mOD/分钟、约 140 mOD/分钟、约 160 mOD/分钟、约 200 mOD/分钟、约 250 mOD/分钟、约 300 mOD/分钟、约 350 mOD/分钟和约 400 mOD/分钟。更通常地, $V_{\max}$ 范围为大于 0 mOD/分钟至约 160 mOD/分钟,例如约 20 mOD/分钟、约 40 mOD/分钟、约 60 mOD/分钟、约 80 mOD/分钟、约 100 mOD/分钟、约 120 mOD/分钟、约 140 mOD/分钟和约 160 mOD/分钟。另外,增强可以使用大于 0 mM 的任何增强剂浓度而发生。参考美国专利公开号 2012/0171668,其公开了在本公开内容内有用的增强剂。

[0063] “官能团”指在分子内的特异性原子组,其负责分子的特征性化学反应。示例性官能团包括但不限于烷烃、烯烃、炔烃、芳烃、卤代(氟、氯、溴、碘)、环氧化物、羟基、羰基(酮)、醛、碳酸酯、羧化物、醚、酯、过氧、过氧氢、羧酰胺、胺(伯、仲、叔)、铵、酰亚胺、叠氮化物、氰酸酯、异氰酸酯、硫氰酸盐、硝酸盐、亚硝酸盐、腈、硝基烷、亚硝基、吡啶基、磷酸盐、磺酰基、硫化物、硫醇(巯基)和二硫化物。

[0064] “FWHM”指在半最大吸光度处的吸收峰的完全宽度。

[0065] “半抗原”指分子,通常为小分子,其可以与抗体特异性组合,但通常基本上单独不能是免疫原性的。

[0066] “接头”指定位于两个部分之间的分子或原子组。例如,信号传导缀合物可以包括在生色团部分和潜在反应部分之间的化学接头。通常,接头是双功能的,即接头包括在每个末端处的官能团,其中官能团用于将接头与两个部分偶联。两个官能团可以是相同的,即同双功能接头,或不同的,即异双功能接头。

[0067] “MG”指孔雀绿。

[0068] “部分”指分子的片段或缀合物的一部分。

[0069] “目的分子”或“靶”各自指待测定关于其的存在、位置和 / 或浓度的分子。目的分子的例子包括蛋白质和核酸序列。

[0070] “多路化”指同时、基本上同时或序贯检测样品中的多重靶。多路化可以包括鉴定和 / 或定量个别地且以任何和所有组合的多重不同的核酸(例如 DNA、RNA、mRNA、miRNA) 和多肽(例如蛋白质)。

[0071] “接近”指位于在参考点处或附近。如本文使用的,接近意指在参考点约 5000 nm、约 2500 nm、约 1000 nm、约 500 nm、约 250 nm、约 100 nm、约 50 nm、约 10 nm 或约 5 nm 内。

[0072] “反应基团”指如本文描述的,适合于将第一单元与第二单元偶联的各种基团。例如,反应基团可以是氨反应基团,例如异硫氰酸酯、异氰酸酯、酰基叠氮、NHS 酯、酰基氯例如磺酰氯、醛和乙二醛、环氧化物和环氧乙烷、碳酸盐、芳化剂、酰亚胺酯、碳二亚胺、酸酐及其组合。合适的硫醇反应官能团包括卤代乙酰和烷基卤化物、马来酰亚胺、氮丙啶、丙烯酰基衍生物、芳化剂、硫醇-二硫化物交换试剂例如吡啶基二硫化物、TNB 硫醇和二硫化物还原剂及其组合。合适的羧化物反应官能团包括重氮烷、重氮乙酰基化合物、羰基二咪唑化合物和碳二亚胺。合适的羟基反应官能团包括环氧化物和环氧乙烷、羰基二咪唑、N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯或 N-羟基琥珀酰亚胺基氯甲酸酯、高碘酸盐氧化化合物、酶促氧化、烷基卤素和异氰酸酯。醛和酮反应官能团包括肼、希夫碱、还原性胺化产物、曼尼希缩合产物及其组合。活性氢反应化合物包括重氮衍生物、曼尼希缩合产物、碘化反应产物及其组合。光反应性化学官能团包括芳基叠氮化物、卤代芳基叠氮化物、二苯甲酮、重氮化合物、重氮甲烷衍生物及其组合。

[0073] “Rhod”指罗丹明,通过其各种取代基而不同的生色团的结构类别。另外,化合物四甲基罗丹明通常被称为“罗丹明”。

[0074] “样品”指得自受试者,含有基因组 DNA、RNA (包括 mRNA)、蛋白质或其组合的生物样本。例子包括但不限于外周血、尿液、唾液、组织活组织检查、手术样本、羊膜穿刺术样品和尸检材料。

[0075] “特异性结合部分”指特异性结合对的成员。特异性结合对是分子对,其特征在于它们彼此结合以基本上排除与其他分子的结合(例如特异性结合对可以具有的结合常数比结合对的两个成员中任一与生物样品中的其他分子的结合常数大至少 10^3 M^{-1} 、 10^4 M^{-1} 或 10^5 M^{-1})。特异性结合部分的特定例子包括特异性结合蛋白质(例如抗体、凝集素、抗生物素蛋白例如链霉抗生物素蛋白、和蛋白 A)、核酸序列和蛋白质-核酸。特异性结合部分还可以包括由此类特异性结合蛋白质特异性结合的分子(或其一部分)。示例性特异性结合部分包括但不限于抗体、核苷酸、寡核苷酸、蛋白质、肽或氨基酸。

[0076] “TAMRA”指羧基四甲基罗丹明,淡红色(即在红色至品红上变动)罗丹明生色团。

[0077] “TMR”指四甲基罗丹明,淡红色罗丹明生色团。“TSA”指酪酰胺信号放大。

[0078] “TYR”指酪胺、酪酰胺、酪胺和 / 或酪酰胺衍生物。

[0079] II. 成像系统和成像技术

图 1 是依照一个实施方案,用于使位于具有样本的显微镜载玻片 134 上的样本成像的成像系统 100 的前视图。成像系统 100 可以包括显微镜 110、多光谱成像仪器 112 (“成像

仪器 112”)和显示器 114。成像仪器 112 可以包括图像捕获装置 120 和处理装置 122。图像捕获装置 120 固定到显微镜 110 上,并且与处理装置 122 通讯。在显示器 114 展示输出 144 时,目镜 128、130 可以用于直接观察生物样本,所述输出 144 提供关于 IHC、ISH 等的目的特征之间增加的对比。目的特征可以是靶(例如核酸、抗原等)、标记(例如生色标记、荧光标记、发光标记、放射性标记等)、或细胞组分或结构。

[0080] 显微镜 110 可以用于方便地定位样本的目的区域。在定位目的区域后,样本可以使用输出 144 进行分析,所述输出 144 可以包括图像和 / 或视频,以及组织制备信息、染剂信息、患者信息、报告等。视频(或以接近视频的速率展示的图像)可以最小化、限制或基本上消除在使用显微镜 110 直接观察和使用显示器 114 非直接观察之间的延迟。

[0081] 成像仪器 112 可以包括照明器 140 (以虚线显示),其序贯照明样本以分离来自染剂的信号。例如,样本可以用电磁能的不同波长、峰发射和 / 或波段进行照明,以分离来自双重染剂的信号。图像捕获装置 120 可以捕获样本图像集合。图像集合送往处理装置 122,以产生输出 144。

[0082] 图 2(A)显示了以人样本的假彩色合成图像 144 形式的数字增强的图像。图 2(B)显示了相同组织通过显微镜(例如图 1 的显微镜 110)可观察的明视野图像。图 2 (A)的图像 144 中的不同色斑之间的颜色对比大于图 2 (B)中的相同斑点的天然存在的颜色对比。像这样,病理学家可以快速且准确地鉴定图 2 (A)中的斑点,并且可能难以区分图 2 (B)中的斑点。

[0083] 参考图 2 (A),红色斑点通过圆圈(R)突出显示,并且绿色斑点通过圆圈(G)突出显示。环(A)内的邻近斑点可以作为分开的红色和绿色斑点明确地彼此区分。重叠的红色和绿色斑点可以看起来为蓝色,如通过圆圈(B)突出显示的。基于例如参数选择、所需信号分离等,用户可以选择合成图像的假彩色。例如,绿色斑点可以重新定义为蓝色,并且红色斑点可以重新定义为黄色。

[0084] 图 2 (A)中的红色斑点对应于图 2 (B)中的紫色斑点,并且图 2 (A)中的绿色斑点对应于图 2 (B)中的红色斑点。现在参考图 2 (A),双重染剂已应用于组织,并且可以包括第一生色团部分和第二生色团部分。对应于第一生色团部分的红色斑点通过圆圈(R)突出显示,并且紫色特征通过圆圈(P)突出显示。难以区分在圆圈(A)内的邻近特征,并且难以鉴定且表征如通过圆圈(O)突出显示的重叠的红色和紫色特征。相应地,可能难以快速且准确地检测、鉴定、表征、计数或执行其他任务,以评分组织,而图 2 (A)的圆圈(A)内的邻近斑点可以明确地彼此区分,并且图 2 (A)的圆圈(R)和(G)内的红色和绿色斑点可以准确地进行鉴定。

[0085] 图 3 是成像仪器和显微镜 110 的部件的前视图。显微镜 110 可以包括物镜 150a-d 和固定装置 152。物镜 150a-d 可沿光程或轴 154 定位,所述光程或轴 154 从照明器 140(在剖视图中显示)延伸到图像捕获装置 120。固定装置 152 可以包括但不限于载物台 170,用于容纳定位于载物台 170 上的显微镜载玻片 134 的固定元件(例如夹),和用于移动载物台 170 的定位机构 172。载物台 170 可以具有一般沿光程 154 定位的小孔(未显示)。定位机构 172 可以包括但不限于一个或多个旋钮(例如细调旋钮、粗调旋钮、X 方向旋钮、Y 方向旋钮等)、传动机构等。显微镜 110 的配置、部件和操作可以基于待执行的组织分析加以选择。

[0086] 照明器 140 可以容纳在基部 178 中,并且定位于具有样本的显微镜载玻片 13 的背

侧上,以产生透射穿过样本 156 的光。举例说明的样本 156 在盖玻片 139 和载玻片 134 之间。在一些实施方案中,照明器 140 可以包括以彩色光源 180a、180b、180c、180d (统称“光源 180”)形式的能量反射器和反射器 181。每个光源 180 可以产生光(由箭头表示)用于照明定位于显微镜视野内的样本 156 的一部分。不同颜色的光可以通过图像捕获装置 120 序贯捕获,而无需使用滤波器。在一些实施方案中,照明器 140 可以构建到显微镜 110 内。在其他实施方案中,照明器 140 可以是对于显微镜 110 外部的,其中光经由光纤或其他类型的光导偶联到显微镜 110 内。例如,照明器 140 可以是经由多根光学纤维与显微镜 110 连接的外部 LED 面板。照明器还可以包括驱动器、开关、电位器、电源及其他电子装置。

[0087] 对于生色显微镜检查,由光源 180 各自发出的辐射波长或波段可以对应于与色原相关的吸收波长或波段,或者至少和与色原相关的吸收波长或波段重叠。光源 180 可以具有在不同光谱区域(包括红外线、可见光、紫外线等)中的平均或峰波长,用于增加的多路化能力。源的平均波长、峰波长、发射光谱、光强度、色坐标和 / 或波长 / 波段可以基于例如染剂的特征加以选择。在一些实施方案中,每个源 180 可以是光谱离散的光源,其平均或峰波长在色原之一的吸光度波段内。

[0088] 每个源 180 可以包括但不限于一个或多个 LED(例如边缘发射 LED、表面发射 LED、超发光 LED 等)、激光二极管、电致发光光源、白炽光源、冷阴极荧光光源、有机聚合物光源、灯、无机光源或其他合适的发光源。源 180 可以是对于显微镜 110 外部或内部的。光源 180 可以是光谱窄的光源,具有在约 30 nm 至约 250 nm、约 30 nm 至约 150 nm、约 30 nm 至约 100 nm、或约 20 nm 至约 60 nm 之间的第二半峰全宽(FWHM)的光谱发射。可以生成其他光谱发射。

[0089] 在 LED 实施方案中,光源 180a 可以是在光谱的蓝色区域中的波长处具有最大强度的蓝光 LED。例如,蓝光 LED 180a 可以具有在约 430 纳米至约 490 纳米(nm)范围内的峰波长和 / 或平均波长。光源 180b 可以是在光谱的绿色区域中的波长处具有最大强度的绿光 LED。例如,绿光 LED 180b 可以具有在约 490–560 nm 范围内的峰波长和 / 或平均波长。光源 180c 可以是在光谱的琥珀色区域中的波长处具有最大强度的琥珀色光 LED。例如,琥珀色光 LED 180c 可以具有在约 570–610 nm 范围内的峰波长和 / 或平均波长。光源 180d 可以是在光谱的红色区域中的波长处具有最大强度的红光 LED。例如,红光 LED 180d 可以具有在约 620–800 nm 范围内的峰波长和 / 或平均波长。LED 光源的数目、颜色和位置可以基于样本的生物标记物加以选择。

[0090] 使用多重单标记滤波器和灯来检测多路化测定中的所有标记通常是耗时和困难的。另外,滤波器例如长通滤波器可以引起渗透,并且产生相对亮的图像本底。多波段滤波器可以用于多路化,但通常需要昂贵的彩色照相机、昂贵的色轮和 / 或复杂的软件。滤波器还可以导致不希望的信噪比。此外,可能难以选择适当染料、照明源和滤波器,尤其是在荧光显微镜检查中,其中杂散光必须降到最低,同时使激发发射的透射达到最大。有利的 LED 光源 180 可以是廉价的,并且可以通过脉冲 LED 180 消除与滤波器相关的一个或多个缺点,以可靠地产生高质量样本图像集合,如与图 5A–D 结合讨论的。

[0091] 对于混合光,来自 LED 光源 180 中的两个或更多个的发射可以合并,从而产生处理灵活性。例如,蓝色、绿色和红色 LED 180a–c 可以产生混合光,其可以看起来是白色的,以产生明视野图像。可以选择光源 180 的不同排列,以实现所需照明场。LED 光源 180 可以是

发光面板的部分或构成发光面板。可以选择 LED 的数目、颜色和位置,以实现所需照明。

[0092] 在非 LED 实施方案中,照明器 140 可以包括但不限于一个或多个激光器、卤素光源、白炽光源或其他能够发光的装置。在一些实施方案中,每个源 180 可以包括输出白光的光发射器(例如卤素灯白炽光源等),和透射白光的一定波长或波段的滤波器。源的激发波长、峰发射或波段可以与染剂的特征匹配。来自光源的光强度、脉冲序列(如果存在的话)和照明场的形状可以凭经验或数学建模进行测定,以获得所需照明。

[0093] 图像捕获装置 120 沿光程 154 定位,并且可以捕获样本 156 的图像(例如低分辨率数字图像、高分辨率数字图像、多光谱图像、光谱离散图像等)。图像捕获装置 120 可以包括但不限于一个或多个照相机(例如模拟照相机、数码照相机等)、光学元件(例如一个或多个透镜、聚焦透镜组等)、成像传感器(例如电荷偶联装置(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器等)等。协作以提供动态聚焦(on-the-fly focusing)的多个透镜和 CCD 传感器可以捕获多光谱数字图像、单色数字图像或其他类型的数字图像。为了提供单色数字图像,图像捕获装置 120 可以包括但不限于一个或多个单色照相机(例如黑白照相机、黑白摄像机等)。为了提供彩色图像,图像捕获装置 120 可以是多光谱照相机。获得的通道可以是使用光谱解卷积算法分离的。可以使用其他类型的图像捕获装置。

[0094] 再次参考图 1,处理装置 122 可以命令照明器 140 和图像捕获装置 120,使得图像捕获装置 120 与光源 180 的脉冲同步(图 3)。处理装置 122 一般可以包括但不限于编程处理器 190 (“处理器 190”)和存储装置 210。(内部部件以虚线显示)。除硬件之外,处理装置 122 可以包括其产生用于所讨论的计算机程序的执行环境的代码,例如构成程序、处理器固件、协议栈、数据库管理系统、操作系统、跨平台运行环境、虚拟机、或者其中一个或多个的组合的代码。

[0095] 处理器 190 可以是用于处理数据的所有种类的仪器、装置和机器,包括例如可编程微处理器、芯片上的系统、电路或前述的组合。例如,处理器 190 可以包括用于处理数据(例如图像、视频等)的专用逻辑电路 191,例如 FPGA(现场可编程门阵列)或 ASIC(特定应用集成电路),并且可以输出数据,例如对比增强的彩色数据用于生成以等于或大于约 2 帧/秒、5 帧/秒、10 帧/秒、30 帧/秒或其他所需帧率的帧率展示的样本视频。处理器 190 可以选择为实现所需帧率,以在显微镜移动以定位新的样本区域用于检查时,产生流畅的视频。

[0096] 存储装置 210 可以包括可执行指令,其可以通过处理器 190 执行,以例如将单色视频/图像转换为假彩色视频/图像,重新定义颜色的视频/图像(例如单色视频/图像、多色视频/图像等),和/或用于改变图像、分类特征(例如分类斑点或其他特征)等的其他可执行指令。例如,存储装置 210 的存储器可以存储可通过处理器 190 的电路执行的转换指令,以将样本图像转换成假彩色样本图像,并且检测特征且使用特征性和/或形态度量,以测定检测的特征是否对应于基因、蛋白质、染色体或其他目的解剖结构。图像特征性度量可以包括例如颜色、色平衡、强度等。处理器 190 可以执行来自存储装置 210 的指令,以重新定义颜色,调整色平衡,和/或调整强度,以促进基于特征性度量的分析。形态度量可以包括例如特征大小、特征颜色、特征取向、特征形状、特征例如邻近特征)之间的关系或距离、特征相对于另一个解剖结构的关系或距离等。

[0097] 存储装置 210 可以包括非临时性、有形的计算机可读存储介质,例如可以用计算

机可执行指令编码的计算机可读介质(例如含有指令的计算机可读介质)。适合于存储计算机程序指令和数据的装置包括所有形式的非易失性存储器、介质和存储装置,包括例如半导体存储装置,例如 EPROM、EEPROM 和闪存装置;磁盘,例如内部硬盘或可移动盘;磁性光盘;以及 CD-ROM 和 DVD-ROM 盘。非易失性存储介质可以包括有形的装置,意指装置具有具体的物质形态,尽管装置可以改变其物理状态。因此,非易失性指装置保持有形,尽管状态中有变化。在一些实施方案中,存储装置 210 可以是机器可接近的存储介质,其包括例如能够存储数据、数字图像、计算机程序等的可记录/不可记录的介质(例如 ROM;RAM;磁盘存储介质;光存储介质;闪存装置;等)等,或其任何组合。

[0098] 存储的数字图像可以是以二进制形式的对比增强的彩色图像数据。图像还可以分成像素矩阵。像素可以包括通过比特深度限定的一个或多个比特的数字值。数字值可以代表例如能量、亮度、颜色、强度、声音、标高或通过图像处理衍生的分类值。非限制性示例性数字图像形式包括但不限于位图、联合图片专家组(JPEG)、标签图像文件格式(TIFF)、和图形交换格式(GIF)、以及其他数字数据格式。视频还可以通过存储装置 210 存储。存储的计算机程序可以但无需对应于文件系统中的文件。程序可以存储于容纳其他程序或数据(例如存储于置标语言文件中的一种或多种脚本)的文件的一部分,专用于所讨论的程序的单一文件,或多个协调文件(例如存储一个或多个模块、子程序或代码一部分的文件)中。计算机程序可以用于在一个计算机或多个计算机上执行,所述多个计算机位于一个场所或分布在多个场所中,并且通过通信网络互联。在一些实验室设置中,存储装置 210 可以存储由多个计算机使用的计算机程序。

[0099] 现在参考图 1,用户可以经由选择工具 200、键盘 202 或与处理装置 122 偶联的其他输入装置提供输入。选择工具 200 可以用于选择样本的一部分用于放大和/或自动化分析。用户还可以使用选择工具 200 来选择个别区域/细胞结构/目的特征。

[0100] 显示器 114 与处理装置 122 通讯偶联,并且可以是例如 LCD(液晶显示器)、LED(发光二极管)显示器、OLED(有机发光二极管)显示器、或用于对用户展示信息的其他类型的显示器。显示器 114 可以定位接近于显微镜 110 用于方便观察。如果显微镜 110 是数字显微镜,则数字显示器 114 可以是显微镜的部分。在其他实施方案中,显示器 114 可以位于远程位置(例如另一个实验室)。实验室技术人员可以操作显微镜 110,而在远程位置的病理学家研究图像 144。多重显示器可以用于同时显示不同图像,包括非增强和增强的图像。显示器类型、显示器位置和/或显示器数目可以基于待执行的检测加以选择。

[0101] 图 4 是用于产生数字增强的图像、视频或其他输出的一种方法的流程图。一般地,光源输出能够被目的特征吸收或引起来自目的特征的发射的光。捕获图像集合。每个图像可以对应于暴露于来自分别的光源之一的光的样本。图像集合可以用于产生数字增强的样本图像/视频。图 4 的方法与图 5(A-E)结合讨论,但它可以用于产生其他类型的增强图像。

[0102] 在方框 220 中,使在显微镜载玻片上携带的样本暴露于光源,所述光源具有与色原的吸收波长/波段匹配的激发波长/波段。来自光源的入射光可以被色原吸收。在一些实施方案中,至少约 20%、50%、60%、70%、80% 或 90% 的入射光被色原吸收。其他百分比的光也可以被吸收,取决于染剂和光源特征。对于荧光染色的样本,光可以引起来自染色的目的特征的激发发射。生色检测和荧光检测与图 13(A-B)结合讨论。

[0103] 在方框 230 处,图像捕获装置(例如图 1 和 3 的图像捕获装置 120)可以捕获照明样本的图像/视频。例如,可以获得照明样本的单一图像。在其他实施方案中,可以捕获在各种 Z 切片或焦平面上的图像集合,并且可以具有在整个图像各处和/或在特异性区域中不同的锐度。

[0104] 当照明光被色原吸收时,光强度在该位置处降低。图 5 (A) 显示了通过蓝色 LED 照明的样本的一个捕获的单色图像。以色原 210 形式的靶特征可以吸收蓝光,因此促使色原 210 看起来是相对暗的斑点。色原 211 形式中的另一个靶特征可以是与色原 210 相比较的相对光。这是因为色原 211 吸收比色原 210 更少的蓝光。

[0105] 在决策框 234 中,如果图像未捕获以获得关于所有目的特征的不同强度,则另一个光源可以用于照明在方框 220 处的另外目的特征,用于捕获在方框 230 处的另外图像。可以重复方框 220 和 230,以产生样本图像集合。在集合中的图像数目可以等于或大于应用于组织样品的不同生物标记物的数目。如果组织样品已用六种染剂进行处理,则样本图像的完全集合可以包括至少六个图像。这提供了用于执行广泛范围的不同类型的检测技术的灵活性。集合中的图像数目可以基于多路化测定中的生物标记物数目得到增加或减少。在荧光分析中,单色显微照片的完全集合可以显示荧光信号中的变动。例如,每个单色图像可以具有对应于分别荧光团的荧光信号的斑点。

[0106] 图 5 (A-D) 显示了单色显微照片的一个完全集合,其中色原的强度在图像之间变化。在一些实施方案中,图像集合可以包括暴露于来自蓝色 LED 的光的样本的单色图像(图 5 (A)),暴露于来自绿色 LED 的光的样本的单色图像(图 5 (B)),暴露于来自琥珀色 LED 的光的样本的单色图像(图 5(C)),和暴露于来自红色 LED 的光的样本的单色图像(图 5(D))。

[0107] 下文是来自图 3 的光源 180 的照明序列,其可以用于以约 0.1 秒产生图 5 (A-E) 的图像。

时间(秒)	蓝色 LED	绿色 LED	琥珀色 LED	红色 LED	图像
0-0.02	开	关	关	关	图 5A
0.02-0.04	关	开	关	关	图 5B
0.04-0.06	关	关	开	关	图 5C
0.06-0.08	关	关	关	开	图 5D
0.08-0.1	关	关	关	关	图 5E

[0108] 在 0-0.02 秒时,蓝色 LED 180a (图 3)照明样本,以产生图 5 (A)的样本图像。在 0.02-0.04 秒时,绿色 LED 180b(图 3)照明样本,以产生图 5(B)的样本图像。在 0.04-0.06 秒时,琥珀色 LED 180c (图 3)照明样本,以产生图 5 (C)的样本图像。在 0.06-0.08 秒时,红色 LED 180d (图 3)照明样本,以产生图 5 (D)的样本图像。在 0.08-0.1 秒时,处理装置 122 可以数字处理图像集合,以产生图 5E 的图像。还可以使用其他时间段和序列模式。

[0109] 在决策框 234 中,如果已生成图像的完全集合,则图像集合用于产生增强的图像/视频。在方框 236 中,处理图像集合以例如增强对比、分离光谱图像、分类特征、其组合等。为了增强颜色对比,图像可以重新分类。为了分离光谱图像,分类器可以鉴定目的特征,并且重新分类图像,以产生经处理的图像集合。经处理的图像集合可以合并,以产生一个或多个对比增强的彩色图像、光谱解卷积图像等。本领域已知的线性混合方法、非线性混合方法或其他混合技术,以及数字处理,可以用于产生所需输出图像/视频。

[0110] 图像/视频可以在方框 236 处展示。在假彩色模式中,图 5 (A-D) 的每个黑白单色图像可以转换成彩色单色图像(即假彩色单色图像)。彩色单色图像集合可以合并,以产

生图 5 (D) 的合成图像。本领域已知的线性混合方法、非线性混合方法或其他混合技术可以用于产生多光谱图像。在一些实施方案中,将图 5 (A) 的黑白图像转换成红色单色图像,将图 5 (C) 的黑白单色图像转换成绿色单色图像,并且将图 5 (D) 的黑白单色图像转换成蓝色单色图像。颜色转换可以基于待检测的靶特征数目加以选择。

[0111] 为了产生假荧光图像,捕获的单色图像可以转换成暗视野图像。暗视野图像可以重组,以产生假荧光图像。例如,图 5 (A-C) 的图像可以分别转换成红色单色图像、绿色单色图像和蓝色单色图像。假彩色图像(即红色、绿色和蓝色单色图像)可以倒转,以产生暗视野图像,其合并以产生图 6 的图像。假荧光图像可以快速生成且用作视频帧。

[0112] 在光谱解卷积成像中,分类器可以用于处理图 5 (A-D) 的图像。目的特征可以在图像集合中加以鉴定。分类器可以检测丰富的目的特征,并且随后重新分类和 / 或调整图像。在一些实施方案中,分类器可以使用训练载玻片进行训练。每个训练载玻片可以携带染色的样本。可以对于每块载玻片生成关于照明序列的图像集合,并且照明序列可以包括用不同颜色的光序贯照明样本。可以分析每个图像集合,以测定关于染剂的信息,例如可以用于检测染色特征的光谱(pectral)信息。在一些实施方案中,对于每种染剂可以生成检测算法、检测方案或其他检测手段。另外的训练载玻片可以用于产生另外的检测算法、检测方案或其他检测手段,用于检测由其他染剂染色的特征。基于检测算法、检测方案或其他检测手段,可以生成一个或多个另外的分类器。可替代地,通过计算机建模或其他合适技术可以生成一个或多个分类器。

[0113] 再次参考图 1,成像系统 100 可以执行图 4 的方法。在一些实施方案中,处理装置 122 可以自动检测目的斑点 / 点 / 特征。例如,通过使图 2A 和 5E 的增强图像运行通过许多滤波器,可以执行点检测。在一个实施方案中,滤波器是高斯差分(“DOG”)滤波器,其中每个滤波器大小基于待检测的点 / 点块的预期大小加以选择。还可以使用其他滤波器。增强的图像可以使用分析软件进行分析。例如,颜色可以测量为红色、蓝色和绿色值;可以测定色调、饱和度和强度值。样本还可以进行定性、半定量和 / 或定量评估。定性评价可以包括评价染色强度,鉴定阳性染色的细胞和涉及染色的细胞内区室,并且评估总体样品或载玻片质量。可以对测试样品执行分开的评估,并且该分析可以包括与已知平均值比较,以测定样品是否代表异常状态。分析计算机程序可以用于鉴定特征且定量测定载玻片和 / 或目的区域的得分。计算机程序可以以任何形式的编程语言书写,包括汇编或解释型语言、说明性或过程语言,并且它可以以任何形式采用,包括作为独立的程序或作为适用于计算环境中的模块、部件、子程序、对象或其他单元。

[0114] 图 7 是关于沉积染料的波长相对于吸收的曲线。染料各自具有最大吸光度。磺基罗丹明 B 具有在约 560 nm 至 570 nm 之间的最大吸光度。用磺基罗丹明 B 染色的样本可以暴露于具有在约 560 nm 至 570 nm 之间的波长或约 560 nm 至 570 nm 的波段的光。光源的特征可以基于染料的特征加以选择。例如,照明器可以具有十七个 LED,各自选择为匹配染料之一的吸光度。本文公开的存储装置可以包括关于染料特征的一个或多个地图或查找表。阅读器(例如条形码阅读器)可以获得来自载玻片的信息,以测定用于照明组织样本的适当波长和 / 或波段。可替代地,使用例如键盘或其他输入装置,用户可以输入关于样本和 / 或染料的信息。

[0115] III. 具有扫描仪的成像系统

图 8 举例说明了依照公开技术的一个实施方案,用于分析组织样本的基于计算机的系统 300 和环境。系统 300 包括以多光谱成像仪器 310 形式的数字扫描仪和客户端计算机系统 320。具有样本的显微镜载玻片可以装载到成像仪器 311 内,其可以提供具有样本的显微镜载玻片的窄波段或波长成像、明视野成像和 / 或荧光成像。在窄波段或波长成像中,成像仪器 311 可以包括照明器 312 和扫描仪头,以执行与图 1-4 结合讨论的方法。成像仪器 311 可以进一步是全载玻片扫描仪。全载玻片扫描仪的一个例子可以是受让人 Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ) 的 VENTANA iScan HT 产品,其用具有多重光源的照明器(例如图 3 的照明器 140)进行修饰。成像系统 310 可以包括载玻片处理机构 318,其可移动以将一个或多个显微镜载玻片递送至多光谱成像仪器,并且可移动以从多光谱成像仪器 311 处取出一个或多个显微镜载玻片。载玻片处理机构 318 可以包括能够在不同位置之间运输显微镜载玻片的一个或多个机械臂、XYZ 载玻片处理器、抓握机构、运输装置等。图像可以通过直接联系(未显示)或经由网络 330 送往客户端计算机系统 320。客户端计算机系统 320 将图像展示给用户,例如病理学家、组织技术人员等。

[0116] 成像仪器 311 可以包括但不限于一个或多个图像捕获装置 313、一个或多个透镜 315 和设备。(成像系统 310 的内部部件以虚线显示。)图像捕获装置 313 可以包括但不限于具有光学系统成像传感器(例如电荷偶联装置(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器等)的数字成像仪(例如数字照相机)等。透镜 315 可以协作以提供聚焦(例如自动聚焦)。在一些实施方案中,图像捕获装置 313 具有用于产生多光谱彩色图像红色、绿色和蓝色颜色通道。光学系统 315 可以包括多重和 / 或可调谐滤波器,并且多光谱或彩色图像通道通过使用不同滤波器和 / 或滤波器设置采集多重图像产生。一种产生彩色增强的图像的方法包括测定包含显微镜载玻片的区域或载玻片位置的一个或多个扫描区域,其包括样本的至少一部分。扫描区域可以分成多个快照。图像可以通过合并快照来产生。整个样本或载玻片的合并图像可以具有其图像在相同或不同焦平面上的 RGB 通道中的快照。

[0117] 成像仪器 311 还可以包括通道门 321 和控制器 323。载玻片可以经由通道门 321 装载到成像仪器 311 内,并且控制器 323 可以用于控制成像仪器 311 的操作。控制器 323 可以包括一个或多个可编程处理器、存储装置等。

[0118] 客户端计算机系统 320 可以包括台式计算机、膝上计算机、平板电脑等,并且可以包括数字电子电路、固件、硬件、存储器、计算机存储介质、计算机程序、处理器(包括编程处理器)等,并且可以存储以二进制形式的数字图像。图像还可以分成像素矩阵且经由显示器 327 展示。

[0119] 网络 330 或直接连接使成像系统 310 和客户端计算机系统 320 互联。网络 330 可以包括但不限于一个或多个网关、路由器、电桥、其组合等。网络 330 可以包括一个或多个服务器和一个或多个网站,其对用户可接近且可以用于发送和接收客户端计算机系统 320 可以利用的信息。服务器可以包括但不限于一个或多个相关数据库,用于存储信息(例如数字图像、算法、染色方案等)。网络 330 可以包括但不限于使用传输控制协议(TCP)、用户数据报协议(UDP)、因特网协议(IP)和其他数据协议的数据网络。客户端计算机系统 320 可以执行本文讨论的方法和技术。客户端计算机系统 320 的部件和特征可以与公开技术的其他部件和特征混合且匹配。

[0120] IV. 用于检测样品中的靶的技术

本文公开的成像系统可以提供用广泛范围的染剂染色的组织样品的增强数字图像,所述染剂用于 IHC、ISH 或其他分析。在各种实施方案中,应用于组织样品的物质可以包括但不限于染剂、润湿剂、探针、抗体(例如单克隆抗体、多克隆抗体等)、抗原回收液体(例如水基或非水基抗原寻回溶液、抗原回收缓冲液等)、溶剂(例如醇、柠檬烯等)等。染剂包括但不限于染料、苏木精染剂、伊红染剂、抗体或核酸与可检测标记的缀合物,所述可检测标记例如半抗原、酶或荧光部分、或用于赋予颜色和 / 或用于增强对比的其他类型物质、以及可以用于抗原寻回或其他类型方案(例如免疫组织化学方案、原位杂交方案等)的物质,用于制备用于目视检查、荧光显现、显微镜检查等的样本。非限制性示例性染剂、缀合物、信号传导缀合物、放大缀合物、生色团部分、色原、探针、复染剂和组合物在下文讨论。

[0121] 缀合物可以用于检测生物样品中的一种或多种靶,并且可以用于标准测定中,例如原位杂交、免疫细胞化学和免疫组织化学检测方案。这些测定中的任何一种均可与信号放大组合,和 / 或测定可以涉及多路化,其中多重不同靶可以使用成像系统(例如成像系统 100、300)进行检测。一种方法使用 IHC 检测方案,其与 ISH 检测方案组合。公开的染色和成像技术的非限制性示例性实施方案可以用于测定细胞克隆性(例如表达两种生物标记物中任何一种而不是两者的细胞),预测癌症患者对癌症治疗的应答(例如检测预测性生物标记物,以测定特定患者是否响应治疗),同时分析生物标记物表达和内部对照基因表达,以监控测定性能和样品完整性,及其组合。

[0122] 检测方法可以用于具有固相的生物样品,例如固定到基底(例如显微镜载玻片)上的细胞或细胞结构的蛋白质组分。在举例说明性实施方案中,样品是固定到玻璃显微镜载玻片上的组织或细胞学样品,例如福尔马林固定的石蜡包埋的样品。在一个实施方案中,该方法特别用于自动化的载玻片染色器械。

[0123] 本领域普通技术人员应当理解众多类型的靶可以使用增强成像进行检测且观察。靶可以是特定核酸序列、蛋白质或其组合。例如,靶可以是特定 RNA 序列(例如 mRNA、微小 RNA 和 siRNA)、DNA 及其组合。样品可以怀疑包括一种或多种目的靶分子。靶分子可以在细胞的表面上,并且细胞可以在悬浮液中或在组织切片中。靶分子还可以是细胞内的,并且在细胞裂解或细胞由探针穿透后检测到。本领域普通技术人员应当理解,检测样品中的靶分子的方法取决于使用的样品和探针类型而改变。收集和制备样品的方法是本领域已知的。

[0124] 与本文公开的组合物一起使用的样品,例如组织或其他生物样品,可以使用本领域已知的任何方法由本领域普通技术人员进行制备。样品可以得自用于常规筛选的受试者或怀疑患有病症例如遗传异常、感染或赘生物的受试者。公开方法的所述实施方案还可以应用于不具有遗传异常、疾病、病症等的样品,被称为“正常”样品。此类正常样品尤其可用作与其他样品相比较的对照。样品可以就许多不同目的进行分析。例如,样品可以用于科学研究中或用于诊断可疑病,或用作治疗成功、存活等的预后指示剂。样品可以包括可以通过一种或多种检测探针特异性结合的多重靶。本公开内容自始至终提及靶蛋白时,应当理解与该蛋白质相关的核酸序列也可以用作靶。在一些例子中,靶是来自病原体例如来自病毒基因组的蛋白质或核酸分子,所述病原体例如病毒、细菌或细胞内寄生物。例如,靶蛋白可以由与疾病相关(例如关联、原因牵涉等)的靶核酸序列产生。

[0125] 微小 RNA (miRNA 或 miR)是小型非编码 RNA,其例如通过翻译阻遏而负面调节基因表达。例如,miR-205 调节上皮至间充质转化(EMT),EMT 促进胚胎发育期间的组织重构的

过程。然而, EMT 也是肿瘤转移中的早期步骤。微小 RNA 例如 miR-205 的下调可以是肿瘤进展中的重要步骤。例如, miR-205 的表达在一些乳腺癌中是下调或丧失的。miR-205 也可以用于分层鳞状细胞癌和非小细胞肺癌(*J. Clin Oncol.*, 2009, 27 (12):2030-7)。已发现其他微小 RNA 调节血管生成信号传导级联。miR-126 的下调例如可以通过血管生成和炎症增加而加剧癌症进展。因此, 微小 RNA 表达水平可以指示疾病状态。对于在本公开内容范围内的微小 RNA, 参考 PCT 申请号 PCT/EP2012/073984。

[0126] 公开的成像系统和技术可以用于分析临床乳腺癌 FFPE 组织块, 其已分别使用 NFORM HER2 双重 ISH DNA 探针混合物和 IHC 测定(Ventana Medical Systems, Inc., “VMSI”), 就 *HER2* 基因拷贝数和 Her2 蛋白质表达进行表征。根据已知方法使用 qPCR, 可以测定相对于 *ACTB* (β -肌动蛋白) 的 *HER2* mRNA 表达水平。基因拷贝、蛋白质表达和 qPCR 分析的结果可以与通过 *HER2* 和 *ACTB* mRNA 的 mRNA-ISH 检测获得的结果相比较, 使用本文公开的方法来分析 FFPE 样品。

[0127] 公开的成像系统和技术可以用于鉴定一定类型的细胞的单克隆增殖。癌症起因于不受控制的细胞群体生长; 这个群体可以起于单个突变型亲本细胞, 并且因此包含克隆群体。衍生自克隆群体的癌症的例子是 B 细胞非何杰金淋巴瘤(B-NHL), 其起源自 B 细胞的单克隆增殖。通过作为其 B 细胞受体抗体部分的 κ 或 λ 轻链 mRNA 和蛋白质的单独表达, 可以检测特异性 B 细胞群体的克隆扩增。相应地, 本文公开的方法的一个实施方案涉及使用 κ 和 λ mRNA 的色原双重染色, 鉴定 B 细胞的单克隆增殖。

[0128] 通过恶性 B 细胞的任一轻链的均匀表达允许区分单克隆 B 细胞淋巴瘤与表达多克隆 κ 和 λ 轻链的 B 细胞群体, 其在正常免疫应答期间产生。测定轻链 mRNA 表达模式通过由 B 细胞赘生物表达的轻链 mRNA 和抗体蛋白质的拷贝数范围复杂化, 所述 B 细胞赘生物衍生自各个 B 细胞阶段(首次用于实验的和记忆细胞: 10-100 个拷贝/细胞; 浆细胞: ~100 至一千个拷贝/细胞)。

[0129] 方法

检测生物样品中的靶的方法可以包括使生物样品与检测探针接触, 使生物样品与标记缀合物接触, 并且使生物样品与信号传导缀合物接触。图 9 是用于检测靶的流程图。特别地, 该方法包括使样品与检测探针接触的步骤 401。该步骤可以包括单一检测探针或对于多个不同靶特异性的多个检测探针。后续步骤 402 包括使生物样品与标记缀合物接触。进一步的后续步骤 407 包括使生物样品与信号传导缀合物接触。至步骤 403 (使样品与放大缀合物接触) 和步骤 405 (使生物样品与次级标记缀合物接触) 的虚线代表这些步骤是任选的。至步骤 410 (使样品与酶抑制剂接触) 的虚线指示任选的回路可以用于根据多路化方法检测多重靶。在特别公开的实施方案中, 可以使用其中将酶抑制剂加入生物样品的一个或多个步骤。例如, 在其中两种或更多种信号传导缀合物加入样品的实施方案中, 可以加入酶抑制剂(例如过氧化物酶抑制剂), 以便在一种信号传导缀合物已共价沉积之后, 且在加入第二种不同的信号传导缀合物之前, 抑制或破坏任何残留的酶促活性。

[0130] 检测样品内的靶可以包括使生物样品与第一放大缀合物接触, 所述第一放大缀合物与第一标记缀合物相关。例如, 放大缀合物可以接近地或直接地共价沉积到第一标记缀合物上。第一放大缀合物可以通过使生物样品与次级标记缀合物接触进行跟踪。举例说明性地, 使用放大缀合物放大信号增强信号传导缀合物的沉积。信号传导缀合物的增强沉积

允许更容易的视觉鉴定色原信号,即放大使得颜色更暗且更容易看见。对于低表达的靶,这种放大可以导致信号变得足够暗以便是可见的,而如果没有放大,则靶将不明显。在其中使用放大步骤的实施方案中,生物样品可以首先与检测探针和标记缀合物接触,并且随后与一种或多种放大缀合物接触。在特别公开的实施方案中,放大缀合物包含与可检测标记偶联的潜在反应部分。例如,酪胺部分(或其衍生物)可以与半抗原直接地或间接地例如使用接头偶联。放大缀合物可以通过酶缀合物的酶共价沉积,通常使用本文描述的或是本领域普通技术人员已知的条件,其适合于允许酶执行其所需功能。放大缀合物随后共价沉积到靶上或接近于靶。

[0131] 使用适合于引入信号传导缀合物与生物样品的条件,并且通常包括提供反应缓冲液或溶液,其包含过氧化物(例如过氧化氢),并且具有适合于允许或促进酶执行其所需功能的盐浓度和 pH。在特别公开的实施方案中,该方法的这个步骤在范围为约 35°C 至约 40°C 的温度下执行。这些条件允许酶和过氧化物反应,且促进在信号传导缀合物的潜在反应部分上的原子团形成。潜在反应部分和因此作为整体的信号传导缀合物共价沉积到生物样品上,特别是在接近于固定的酶缀合物的一个或多个酪氨酸残基、酶缀合物的酶部分的酪氨酸残基、和 / 或酶缀合物的抗体部分的酪氨酸残基处。生物样品随后用光照明,并且靶可以通过经由信号传导缀合物的生色部分产生的光的吸光度进行检测。

[0132] 取决于多路化水平,任选的回路可以重复一、二、三、四、五、六、七、八次或更多次,取决于样品中待检测的靶数目。在后续检测期间,标记缀合物可以是相同或不同的,取决于使用的阻断试剂。不同标记缀合物的例子将是第一酶抗半抗原抗体缀合物和第二酶抗半抗原抗体缀合物,其中第一抗半抗原抗体和第二抗半抗原抗体对于不同半抗原是特异性。根据另一个例子,差异可以涉及不同的抗物种抗体,其中靶使用衍生自不同物种的一抗进行检测。在后续检测期间,用于每种靶的信号传导缀合物通常将是不同的。例如,不同靶可以作为不同颜色进行检测。

[0133] 虽然使样品与检测探针接触的步骤 401 在图 9 中显示为在一步期间的多重靶的同时检测,但多路化还可以序贯执行。序贯方法包括添加第一检测探针,随后为进行各个后续方法步骤(即 402、407,任选 403 和 405)。第二检测探针随后可以在第一信号传导缀合物已共价沉积到第一靶上或接近于第一靶后添加,从而提供检测第二靶的能力。这个过程随后可以使用不同的信号传导缀合物进行迭代重复,所述不同的信号传导缀合物包含不同于沉积的其他生色团的生色团部分。

[0134] 该方法还包括用光照明样品的步骤 409 和检测靶步骤 411。检测通过信号传导缀合物产生的信号,从而提供检测特定靶的能力。在特别公开的实施方案中,通过信号传导缀合物产生的信号可以是荧光的、生色的或其组合。示例性实施方案涉及检测生色信号。信号可以使用本领域普通技术人员已知的合适方法进行检测,例如生色检测方法、荧光检测方法及其组合。例如,信号可以使用明视野检测技术或暗视野检测技术进行检测,含或不含数字增强。

[0135] 图 10 (A-B) 是信号传导缀合物的两个实施方案的示意图。图 10 (A) 举例说明了包含潜在反应部分 404 和生色团部分 406 的信号传导缀合物 412。图 10 (B) 举例说明了替代信号传导缀合物 414,其包含生色团部分 406、潜在反应部分 404 且进一步包含接头 408。

[0136] 图 11 (A-F) 是举例说明了用于检测样品 416 上的靶 417 的方法实施方案的示意

图。图 11 (A) 显示了与靶 417 结合的检测探针 418, 其举例说明性显示为具有半抗原 419 的核酸分子, 所述靶 417 在这种情况下将是核酸靶。图 11 (B) 显示了与检测探针 418 结合的标记缀合物 420。标记缀合物描述为对于与两种酶缀合的半抗原 419 特异性的抗半抗原抗体, 描述为含有“E”的圆圈。虽然显示为一种抗体和两种酶分子的缀合物, 但酶数目 / 抗体可以通过本领域普通技术人员对于特定应用加以改变且优化。特别地, 酶数目可以从约 1 修饰为约 10, 取决于各种因素包括抗体大小和酶大小。图 11 (C) 显示了酶促沉积到样品 416 上的信号传导缀合物 412。特别地, 酶“E”, 标记缀合物 420 的部分, 催化信号传导缀合物 412 的第一潜在反应部分转换成第一反应种类 413。该催化通过将信号传导缀合物 412 导向酶“E”的第一大箭头 421, 以及从酶“E”散发到反应种类 413 的第二大箭头 422 表示, 所述反应种类 413 由生色团部分 406 (图 10B) 和反应部分制成, 其由如信号传导缀合物 406 (图 10B) 上所示的替换箭头的点表示。反应种类 413 与接近于或直接在第一靶上的生物样品共价结合, 以形成共价结合的生色团 415。图 11 (D) 显示了替代实施方案, 其中基于抗体的检测探针 428 用于检测蛋白质靶 427。包括图 11 (D) 以显示核酸靶 417 和 / 或蛋白质靶 427 的检测是类似的, 除了检测探针 428 表示为与核酸相反的抗体之外 (例如检测探针 418)。检测探针 428 显示为非半抗原化的, 暗示标记缀合物 430 是与酶“E”缀合的抗物种抗体。然而, 在替代实施方案中, 检测探针 428 可以是半抗原化的, 并且标记缀合物 430 可以包括抗半抗原抗体。

[0137] 图 11(E) 显示了使用放大缀合物 442 用于检测靶的方法。特别地, 放大缀合物 442 酶促沉积到样品 436 上。特别地, 酶“E”, 标记缀合物 440 的部分, 催化信号传导缀合物 442 的第一潜在反应部分转换成第一反应种类 443。该催化通过将放大缀合物 442 导向酶“E”的第一大箭头 431, 以及从酶“E”散发到反应种类 443 的第二大箭头 432 表示, 所述反应种类 443 由半抗原 (显示为十字形) 和反应部分制成, 其由如放大缀合物 442 上所示的替换箭头的点表示。反应种类 443 与接近于或直接在第一靶上的生物样品共价结合, 以形成共价结合的半抗原 445。在此处显示图 11 (E) 中所示的方案, 以使得图 11 (E) 的方案和图 11 (C) 的方案之间的相似性明显。特别地, 方案是几乎相同的, 除了信号传导缀合物 412 的生色团部分替代为放大缀合物 442 的半抗原之外。图 11 (F) 显示了与样品结合的放大缀合物 (如图 11 (E) 中可见的共价结合的半抗原 445) 可以用次级标记缀合物 441 标记。虽然未显示, 但图 11 (C) 中所示的方案随后可以用于形成共价结合的生色团。放大缀合物 442 沉积到样品上提供了更大数目的酶分子 (即来自标记缀合物 440 和次级标记缀合物 441 的酶显示接近于图 11 (F) 中的靶)。

[0138] 信号传导缀合物可以使用数字明视野检测方法、自动化检测方法等进行检测。自动化检测方法可以包括但不限于产生数字增强的图像 / 视频, 并且使用自动化分析技术来检测靶。明视野检测的概述在图 12 (A-B) 中举例说明。图 12 (A) 是样品 416 的横截面视图的图示, 所述样品 416 包括上表面 448 和下表面 449, 其中多个信号传导缀合物 412 定位接近于靶 (T); 样品显示为具有代表朝向上表面 448 的入射辐射的第一箭头 446, 和代表从下表面 449 散开的透射辐射的第二箭头 447。图 12 (B) 是描述图 12 (A) 中所示的跨越样品 416 的入射辐射功率 (P_0) 和穿过样品的透射辐射功率 (P) 之间的关系的曲线, y 轴是辐射功率, 并且 x 轴是跨越样品的线性距离。图 12 (A-B) 叙述靶如何可以使用信号传导缀合物 412 进行显现。等式 1 提供了入射和透射辐射功率之间的数学关系。

[0139] 公开的方法步骤可以以任何合适次序进行,并且并不限于本文描述的那些。在特别公开的实施方案中,该方法可以包括其中将标记缀合物加入生物样品,随后为信号传导缀合物的步骤。在其他公开的实施方案中,该方法可以包括其中标记缀合物加入生物样品,随后为放大缀合物、另外的酶缀合物和信号传导缀合物的步骤。本文公开的缀合物可以同时或序贯加入。缀合物可以在分开溶液中或者作为包含两种或更多种缀合物的组合物加入。另外,在公开的方法中使用的每类缀合物可以包含相同或不同缀合物组分。例如,当多重信号传导缀合物加入样品时,缀合物可以包含相同或不同的生色部分和/或潜在反应部分。仅作为例子,一种信号传导缀合物可以包含与酪胺部分偶联的香豆素生色团,并且另一种信号传导缀合物可以包含与酪胺衍生物部分偶联的罗丹明生色团。适用于公开的多路化测定中的信号传导缀合物数目范围可以为一到至少六,或更通常为二到五。在特别公开的实施方案中,使用三至五种不同的信号传导缀合物,该方法用于检测三至五种不同的靶。本文公开的照明器可以具有光源,其输出光用于促使缀合物透射辐射。多重靶可以使用本文公开的系统和方法在单一测定中进行检测。在另一个实施方案中,本文对于方法公开的任何一个或多个步骤通过自动化载玻片染色器械(例如图 8 的成像系统 300)执行。

[0140] 生色相对于荧光

本文公开的实施方案可以用于生色和荧光检测。生色检测和荧光检测之间的差异在图 13 (A) 和 13 (B) 中以图形举例说明。图 13 (A) 举例说明了红色色原例子 451、蓝色色原例子 453、以及红色和蓝色多路化色原例子 452。当色原暴露于光(即暴露于具有入射功率 P_0 的光)时,色原通过吸收各种波长与光相互作用。例如,光可以通过光源 180a-d 或其他光源/照明器发出。透射光具有特定功率(图 13 (A) P_1 、 P_2 和 P_3),取决于色原的吸光度和存在的色原量。更佳检测事件导致更多色原被沉积,其吸收更多的光并且使得观察到的信号更小。即使对于有色色原,透射光的降低最终促使色原看起来很暗或很黑,因为不透射光。多路化通常加剧这种效应,如红色和蓝色多路化色原例子 452 中所示。当常规红色色原和蓝色色原在空间中重叠时,吸光度是广泛的,并且检测事件看起来带黑色且很暗,如通过小于 P_1 和 P_2 的 P_3 信号举例说明的。基本上,具有重叠信号的生色检测可以导致消减效应。这与图 13 (B) 中所示的荧光形成对比。参考图 13 (B),显示了紫色荧光染料例子 461、绿色荧光染料例子 463、以及紫色和绿色多路化荧光染料例子 462。激发光(在图中显示为 λ_{ex})可以与荧光染料 461、462、463 相互作用,可以引起发射。激发光可以跨越三种样品是相同的,并且 461 显示出 λ_{f1} (紫色荧光),463 显示出 λ_{f2} (绿色荧光),并且 462 显示出 λ_{f1} (紫色荧光)和 λ_{f2} (绿色荧光)。当更多荧光染料沉积到样品上时,生成更强的荧光信号。类似地,在多路化的情况下,对于荧光团存在累加效应,而消减效应对于生色团发生。这种消减相对于累加特征显著复合使用色原多路化的困难。本文公开的成像系统可以用于生色检测和荧光检测,并且可以增强通过使用假彩色合成图像的信号的色觉。例如,图 1 的照明器 140 可以位于载玻片的前侧上用于荧光检测。

[0141] 检测和照明

信号传导缀合物配置为提供各种特征,其促进提供可检测信号。信号传导缀合物可以包含适当的生色团部分,以提供明视野信号。如果生色团部分提供明视野信号,则明视野显微镜可以用于视觉检测信号。数字处理也可以用于促进信号的检测。例如,可以选择本文公开的生色团,以产生适合于视觉检测本文公开的靶的光学信号。在特别公开的实施方案

中,生色团具有光学特性,例如下文讨论的那些,其允许信号传导缀合物配置为提供所需信号。

[0142] 当光(即可见电磁辐射)经过有色物质或由有色物质反射时,光谱波长分布的特征性部分被吸收。该特征性部分的吸收对物体赋予对应于剩余光的互补色。图 14 (A) 和 14 (B) 显示了举例说明所观察到的颜色和吸收的辐射之间的关系的色轮(图 14 (A))。色轮包括代表颜色(R) 红色、(O) 橙色、(Y) 黄色、(G) 绿色、(B) 蓝色、(I) 靛蓝和(V) 紫罗兰色的许多饼形片(pie pieces)。每种颜色显示为由一系列线与下一种颜色分开的饼形片,所述线在轮外的数目处终止。这些数目指定以纳米表示的光波长,这些波长传统上视为颜色之间的转变点。图 14 (B) 显示了在 x 轴上具有光波长的线性曲线上的相同颜色分布。即,从 620 到 800 nm 的区域显示着色为红色,因为这些波长是“红色”光波长。红色 LED 可以发出在约 620–800 nm 范围内的波长。通常,颜色被优先察觉,并且一些颜色仅对于极窄的波长跨度察觉。例如,具有从 490 nm 到 560 nm 的任何地方的发射的光源可以察觉为绿色(70 nm 跨度)。为了察觉为橙色,光可以发出在 580 nm 和 620 nm 范围内(40 nm)的光。曲线仅提供用于表现,并且本领域普通技术人员应当理解电磁波谱在性质中是连续的,并且不是如图所示的离散的。然而,本文描述的颜色分类法促进如本文请求保护的技术的理解。

[0143] 当物质吸收特定波长时,物质看起来是互补色,该颜色对应于剩余的光。图 FIG. 14 (A) 的色轮显示了彼此直接相反的互补色。根据色轮,短波长更蓝的光(例如 420–430 nm 光)的吸收对物质赋予黄色(425 nm 与其为黄色的轮一部分相反)。类似地,在 500–520 nm 范围内的光吸收对物质赋予淡红色至品红色,因为红色饼图区域相对 500–520 nm 的数目范围。绿色是独特的,因为短波长更蓝的光(例如接近 400 nm)的吸收加上长波长更红的光(例如接近 650nm)的吸收可以对物质赋予绿色。

[0144] 在 420–430 nm 之间的波长处的光吸收导致物质看起来黄色的概念是本文描述的许多吸收现象的过度简化。特别地,吸收光谱概况对观察到的颜色具有强烈影响。例如,其为黑色的物质在 420–430 nm 的范围自始至终强烈吸收,然而,黑色物质看起来不是黄色的。在这种情况下,黑色吸收剂吸收跨越整个可见光谱包括 420–430 nm 的光。因此,虽然在特定波长处的光吸收是重要的,但跨越可见光谱的吸收特征(即光谱吸收)也是重要的。

[0145] 光谱吸收可以根据几个可测量的参数进行表征。在其处最大部分的光被物质吸收的波长被称为 $\lambda_{\max}$ 。因为该波长吸收至最大程度,所以它通常被称为吸光度波长。照明器可以用接近于或等于待成像的目的特征的 $\lambda_{\max}$ 的波长来生成。图 15 (A) 是特定信号传导缀合物的吸收光谱,并且图 15 (B) 举例说明了使用信号传导缀合物染色的蛋白质的显微照片,所述信号传导缀合物产生图 15 (A) 的吸收光谱。图 15 (A) 包括举例说明最大吸光度的幅度的第一箭头(470)。第二箭头(471) 显示了最大值一半的幅度。第三箭头(472) 显示在最大吸光度一半处的峰宽度。对于这种示例性信号传导缀合物, $\lambda_{\max}$ 是 552 nm,并且在一半最大吸光度处的峰全宽(例如 FWHM)为大约 40 nm。虽然 $\lambda_{\max}$ 指定最大吸收的波长,但 FWHM 指定光谱吸光度的宽度。两个因素在描述生色团的颜色中均为重要的,因为广泛的吸收光谱看起来没有颜色,如由其 $\lambda_{\max}$ 预期的。相反,它们看起来是褐色、黑色或灰色。参考图 15 (B),信号传导缀合物的沉积在预期阳性染色的那些位置(Calu-3 异种移植植物中的 HER2 (4B5) IHC) 中是明确显而易见的。回头参考色轮(图 14 (A)), 552 nm 的 $\lambda_{\max}$ 应对应于红色或红色–紫罗兰色的互补色。这匹配在图 15 (B) 中所示的组织样品中观察到的颜

色(应注意到样品进一步包括其为蓝色的苏木精核复染色)。因为复染剂局限于核,所以它看起来不干扰或基本上不影响基于 HER2 染色的细胞膜。

[0146] 一些示例性生色团可以具有强吸光度特征。在一些实施方案中,生色团是非荧光或弱荧光的。由于其吸光度特征,生色团是能够吸收可见光的种类。一种优选生色团可以能够吸收具有足够波长特异性的足够数量的可见光,使得生色团可以使用明视野照明、数字成像技术等进行显现。在另一个实施方案中,生色团具有大于约 $5,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 至约 $250,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 的平均摩尔吸光系数。例如,平均摩尔吸光系数可以大于约 $5,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、大于约 $10,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、大于约 $20,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、大于约 $40,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 、或大于约 $80,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。强吸光度特征可以用于增加由生色团提供的信号或颜色。

[0147] 在靶附近的信号传导缀合物的沉积产生入射光的吸收。因为吸收跨越样品非均匀地发生,所以如与图 5 (A-E) 结合讨论的,可以鉴定在样品内的靶位置。

[0148] 公开实施方案的一些方面或全部可以自动化,并且通过计算机分析和 / 或图像分析系统得到促进。在一些应用中,精确的颜色比通过本文公开的成像系统进行测量。在一些实施方案中,光学显微镜检查用于图像分析,如与图 1 结合讨论的。由染色样品获得的数字图像可以使用图像分析软件进行分析。例如,软件可以由处理装置 122 存储。颜色可以以几种不同方法进行测量。例如,颜色可以测量为红色、蓝色和绿色值;色调、饱和度和强度值;和 / 或通过使用光谱成像照相机测量特异性波长或波长范围。

[0149] 举例说明性实施方案涉及使用使用信号传导缀合物的明视野成像,窄波段成像和 / 或波长成像。在明视野照明中,可见光谱中的白光透射穿过生色团部分。生色团吸收一定波长的光,并且透射其他波长。这使光从白色变为有色的,取决于透射的光的特异性波长。

[0150] 窄光谱吸光度允许在超出传统色原能力的水平上的生色多路化。例如,传统色原略微照常规双重化(例如坚固红和坚固蓝、坚固红和黑(银)、坚固红和 DAB)。然而,三重或三种颜色应用是非典型的。在举例说明性实施方案中,该方法包括来自二至约六种不同靶,例如三至六种、或三至五种的检测,使用不同的信号传导缀合物或其组合。在一个实施方案中,用光照明生物样品包括用光谱窄的光源照明生物样品,该光谱窄的光源具有约 30 nm (其中滤波器可以是使用明亮源的 10 nm) 至约 250 nm 、约 30 nm 至约 150 nm 、约 30 nm 至约 100 nm 、或约 20 nm 至约 60 nm 的第二半峰全宽(FWHM)的光谱发射。在另一个实施方案中,用光照明生物样品包括用一个或多个 LED 光源(例如 LED 光源 18)照明生物样品。在另一个实施方案中,用光照明生物样品包括用过滤光源照明生物样品。例如,图 3 的光源 180 可以包括灯和一个或多个滤波器。

[0151] 样品还可以进行定性和半定量评估。定性评价可以包括评价染色强度,鉴定阳性染色的细胞和涉及染色的细胞内区室,并且评估总体样品或载玻片质量。对测试样品执行分开的评估,并且该分析可以包括与已知平均值比较,以测定样品是否代表异常状态。

[0152] 在一个实施方案中,信号传导缀合物接近于靶共价沉积,其浓度适合于产生可检测信号,例如大于约 1×10^{11} 分子 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 到至少约 1×10^{16} 分子 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 生物样品的浓度。通过使用等式 1 和跨越样品的吸光度测量,小心扣除对应于样品的吸光度,本领域普通技术人员可以计算分子数目 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 生物样品。在公开方法例如多路化方法的一个实施方案中,检测一种信号包括检测与本底相比较的 5% 或更多的入射光吸光度,并且检测不同的分开信号包括检测与本底相比较的 5% 或更多的入射光吸光度。在另一个实施方案中,检

测一种信号包括检测与本底相比较的 20% 或更多的入射光吸光度,并且检测不同的分开信号包括检测与本底相比较的 20% 或更多的入射光吸光度。在另外一个实施方案中,检测一种信号包括检测与本底相比较的 30% 或更多的入射光吸光度,并且检测不同的分开信号包括检测与本底相比较的 30% 或更多的入射光吸光度。。观察者可以观察合成图像(参见图 5 (E)),以视觉上鉴定此类吸光度。例如,明视野图像、数字增强的图像等中的色斑可以对应于高吸光度区域。

[0153] 在一个实施方案中,第一靶和第二靶可以是遗传核酸。经由第一信号传导缀合物通过光的吸光度检测第一靶包括检测选自红色、橙色、黄色、绿色、蓝色、靛蓝或紫罗兰色的第一有色信号。第一有色信号与光谱吸光度相关,所述光谱吸光度与第一信号传导缀合物的第一生色部分相关。经由第二信号传导缀合物通过光的吸光度检测第二靶包括检测选自红色、橙色、黄色、绿色、蓝色、靛蓝或紫罗兰色的第二有色信号。第二有色信号与光谱吸光度相关,所述光谱吸光度与第二信号传导缀合物的第二生色部分相关。有色信号可以重新定义以增强颜色对比。经由第一信号传导缀合物通过光的吸光度附近中的重叠在第二信号传导缀合物附近重叠,使得可以检测到第三有色信号,其与第一光谱吸光度和第二光谱吸光度的重叠光谱吸光度相关。根据一个例子,该第三颜色发出正常遗传排列的信号,并且第一和第二颜色发出遗传重排或易位的信号。

[0154] *ISH三色分离探针*

信号传导缀合物可以特别用于多路化测定,以及使用易位探针的测定。图 16 (A)是在肺组织切片上的两种基因探针的双重染色的明视野显微照片,所述肺组织切片测试与非小细胞肺癌相关的 ALK 重排,并且图 16 (B)是乙酸乙酯溶液中的坚固红和坚固蓝的 UV- 可见光谱。3' 探针使用坚固红进行检测,并且 5' 探针使用坚固蓝进行检测。图 17 (A)和 17 (B)分别举例说明了图 16 (B)的痕迹。图 16 (B)显示了坚固红和坚固蓝具有广泛和充分确定的光谱吸收特征。坚固红显示了在约 475 nm 至约 560 nm 之间的强吸收。比较该范围与色轮,对应于光谱吸收特征的预期颜色将是红色或橙色。吸收范围如此大,使得它基本上覆盖预期导致红色或橙色的所有那些波长。坚固蓝显示出在约 525 nm 至约 625 nm 之间的强吸收,甚至比坚固红更广泛的范围。再次,参考图 14 (A)中的色轮,来自 525 - 625 nm 的吸收覆盖与蓝色、靛蓝和紫罗兰色互补的接近一半的色轮。为了增强坚固红和坚固蓝之间的对比,光源可以发出 475 nm-560 nm 的波长,用于成像坚固红,并且另一个光源可以发出 525-625 nm 内的波长,用于成像坚固蓝。增强的图像(未显示)可以基于吸收而产生。

[0155] 现在参考图 16 (A),坚固红斑点通过圆圈(R)突出显示,坚固蓝斑点通过圆圈(B)突出显示,一个坚固红斑点和一个坚固蓝斑点的斑点集合标记为由圆圈(A)邻近,并且彼此重叠的坚固红斑点和坚固蓝斑点通过圆圈(O)标记。如预期的,坚固红斑点(A)是红色的,并且坚固蓝斑点(B)看起来是由蓝色、靛蓝和紫罗兰色的混合物预期的暗蓝色。在圆圈(A)内的邻近斑点可以彼此明确区分为分开的红色和蓝色斑点。然而,包括重叠的红色和蓝色斑点的斑点导致模糊颜色。它看起来是略微带蓝色的,并且在一个侧面上具有红色条纹。斑点的颜色难以区分且难以表征。对于重叠斑点,坚固红和坚固蓝的吸收将是累加的,并且光谱吸收概况从约 475 nm 跨越到约 625,并且具有约 550 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。再次参考色轮(图 14 (A)),这个波长范围覆盖几乎整个轮。覆盖整个广谱的广基吸收通常给出黑色或褐色外观,具有最少吸收的那些颜色的色调,在这种情况下靛蓝和紫罗兰色。考虑图 16 (A)中的显微

照片的病理学家可能难以区分蓝色至靛蓝斑点(B)和重叠斑点(O)。

[0156] 不同的信号传导缀合物可以有目的地加以选择,并且使得包含在 UV- 可见光谱的相对端处产生光的生色部分。图 18 (A)和 18 (B)举例说明了公开的信号传导缀合物和方法如何可以用于分辨与包含两种不同的生色部分的探针相关的问题。参考图 18(A),能够产生黑色(“B”)的生色部分与产生红色(“R”)的生色部分组合使用。当两种信号传导缀合物重叠时,不明确观察到的黑色(“B”)是由黑色生色部分产生,还是由红色和黑色生色部分之间的重叠产生。然而,参考图 18 (B),这个问题可以通过使用两种生色部分得到解决,当组合时,所述两种生色部分产生第三种独特颜色。例如,紫色生色部分(“P”)可以与黄色生色部分(“Y”)组合使用。两种之间的重叠可容易观察,因为产生橙色信号(“O”)。图 19 (A-B)进一步显示两种颜色如何可以接近地沉积,以产生视觉上不同的第三种颜色。特别地,图 19 (A)显示了由字母“y”显示的黄色信号,与由字母“m”显示的品红信号组合,以产生由字母“r”显示的车厘子红(vibrant cherry red)色。图 19 (B)显示了由字母“m”指示的品红信号和由字母“t”指示的绿松色信号组合,以产生由字母“b”显示的深蓝色信号。

[0157] 照明

可以使用传统白色源和滤波器系统,例如由本领域普通技术人员通常使用的那些。例如,图 1 的照明器 140 可以包括白色光源和滤波器,以产生彩色单色图像集合。单色图像的颜色可以重新定义且合并,以产生增强的数字图像。在其他公开的实施方案中,LED 光源可以用于检测步骤中,以便生成更窄的照明光,如与图 3 结合讨论的。此类光源可以用于其中使用一种或多种不同的信号传导缀合物的实施方案中,特别是当使用三种或更多种不同缀合物时。LED 光源可以提供在可以由公开的信号传导缀合物吸收的波长范围内的灵活性。在特别公开的实施方案中,信号传导缀合物可以通过用其中色原吸收的波长的光照明样本独立地显现,因此促使色原针对光本底看起来很暗(光被色原吸收,降低在该斑点处的光强度)。例如,照明图 5 (A)的样本的光被色原 210 吸收,导致色原 210 看起来相对很暗。在特别公开的实施方案中,用不被色原吸收的光照明样本促使色原‘消失’,因为光强度在它经过色原斑点时不改变(吸收)。例如,照明图 5 (A)的样本的光不被色原 211 吸收。色原 211 因此与色原 210 比较看起来相对很亮。组织特征可以促使一些透射丧失,导致不吸收光的组织特征的显现。仅作为例子,用绿光照明生物样品促使罗丹明色原看起来很暗,而 Cy5 色原消失。相反,用红光照明载玻片促使 Cy5 色原看起来很暗,并且罗丹明色原消失。

[0158] 使用一些公开的信号传导缀合物染色的载玻片用多 LED 照明器进行照明,所述多 LED 照明器适合 Olympus BX-51 光学显微镜。样本在每个消除步骤时进行成像。使用两种 LED 照明器:1)自制 3-LED 照明器,其包含 Lamina RGB 光引擎(EZ-43F0-0431)与具有电势计和开关的 3 个 LED 动态 BuckPlus 电流调节驱动器,以允许红色、绿色和蓝色 LED 强度独立的开关控制和变动;和 2)用于经修饰用于手动 LED 开关的 Upright Microscopes 的 TOFRA, Inc. RGBA Computer-Controlled LED Illuminator。为了仅显现酪酰胺色原,用其中色原吸收的波长的光照明样本促使色原针对光本底看起来很暗(光被色原吸收,降低在该斑点处的光强度)。用不被色原吸收的光照明样本促使色原‘消失’,因为光强度在它经过色原斑点时不改变(吸收)。

[0159] 图 20 (A-B)是在(A)白光照明、(B)绿光照明和(C)红光照明下,已用绿松色和品红信号传导缀合物双重染色的样品的显微照片。用红光照明载玻片促使绿松色信号传导缀

合物看起来很暗,而品红信号传导缀合物消失。相反,用绿光照明载玻片促使品红信号传导缀合物看起来很暗,并且绿松色信号传导缀合物消失。在品红和绿松色信号传导缀合物之间的重叠在白光照明、绿光照明和红光照明中很暗。图 20 (A、B) 的图像可以重新定义(例如转换成不同颜色)且合并,以促进不同缀合物之间的对比。察觉到的荧光显微镜检查的利益之一是使用滤波器在个别探针信号之间转换的能力。使用本文描述的信号传导缀合物,能够允许使用生色化合物的转换。LED 动力源可以通过替换聚光器容易地加入光学显微镜中。LED 的发射波长可以通过用户按下图 3 中的按钮 467,或通过处理装置 122 自动地在颜色之间转换。LED 动力源还可以替换明视野显微镜的常规照明源,使用光学元件以将光适当地导向显微镜的照明端口内。

[0160] 酪氨酸增强

本文描述的酪酰胺信号放大和信号传导缀合物可以与可得自样品和或用于检测且标记靶的分子 / 缀合物的酪氨酸残基反应。待检测的生物标记物周围的蛋白质量基于组织样品之间的天然变异可变。当检测以高水平存在的生物标记物时,或当检测多重生物标记物的共定位时,酪酰胺分子与之附着的蛋白质量可以是沉积过程中的限制性反应物。组织中不足的蛋白质量可以导致基于检测的酪酰胺扩散,生物标记物的表达水平调用不足的可能性,且不能检测共定位的生物标记物。这些问题的一种解决方案是通过用蛋白质性质的溶液包被组织,并且使用福尔马林或其他固定剂使蛋白质与组织永久交联,来提供更多的蛋白质结合位点(即酪氨酸)。

[0161] 使用 TSA 的大部分工作已在荧光检测的背景下完成。荧光 TSA 检测通过荧光团的单一酪酰胺沉积来完成,并且沉积时间通常相当短,因为荧光检测的灵敏度很高,而与传统 TSA 相关的本底随着更长的沉积时间而变得有问题。相比之下,生色 TSA 检测可以包括酪酰胺缀合物的多重沉积,伴随延长的沉积时间。像这样,荧光 TSA 技术未提出生色 TSA 问题的解决方案,因为问题的性质如此不同。特别地,样品的酪氨酸结合位点被酪酰胺反应种类饱和被认为是本文描述的检测化学特有的独特问题。源于 TSA 荧光研究的 TSA 增强通常解决反应性酪酰胺部分的扩散和 TSA 信号的缺乏。这些问题的解决方案已在本领域中得到描述。例如,通过添加可溶性聚合物增加反应溶液的粘度描述用于减少扩散,并且 HRP 活性通过添加香草醛和 / 或碘苯酚得到增强。这些解决方案不足以解决对于本文描述的检测化学观察到的一些问题。

[0162] 通过各种研究,发现鉴定的问题的严重性取决于使用的样品而改变。例如,发现乳腺癌组织和前列腺癌组织包括不同水平的可用酪酰胺结合位点。还已知在细胞区室(核、细胞膜、细胞质等)中的蛋白质含量中存在差异,所述蛋白质在各种 IHC 和 / 或 ISH 测试中被靶向。因此,除 TSA 共定位必需的之外,本发明将标准化蛋白质含量(例如酪酰胺结合位点),且降低样品之间或跨越样品的变异。在举例说明性实施方案中,酪氨酸增强试剂的添加可以增加本文描述的测定的样品间和样品内重现性。

[0163] 当使用如本文描述的放大缀合物,尤其是与本文描述的信号传导缀合物结合时,在一种或多种靶周围的蛋白质量可能是不足的。当检测以高水平存在的生物标记物时,或当检测多重生物标记物的共定位时,基于酪酰胺的检测试剂可以与之附着的样品中的蛋白质量可以是限制试剂。酪酰胺结合位点中的不足可以引起降低的反应速率,允许酪酰胺反应分子扩散远离靶,并且由于在靶附近中反应的信号传导缀合物的更低数量,一般导致更

弱的应答。发现对样品提供更多的结合位点增强如本文描述的检测。增强可用结合位点的一种方法是将蛋白质溶液引入样品中。为了使蛋白质通过各种洗涤仍保留,并且蛋白质在后续检测步骤期间或之后不扩散,蛋白质使用固定剂(例如福尔马林)与样品交联。

[0164] 在举例说明性实施方案中,另外量的含酪氨酸试剂例如蛋白质可以与生物样品一起温育,并且固定到生物样品,以便提供用于多重信号传导或放大缀合物例如多路化或放大中的另外结合位点。例如,当使用易位探针时,通过将另外量的蛋白质加入生物样品,可以获得更清楚的三色染色。另外,非特异性探针结合可以使用这个添加步骤得到减少。示例性实施方案涉及将 BSA 加入生物样品,随后使用交联剂例如固定剂(例如 10% NBF)来固定蛋白质。

[0165] 为了证实溶液的功效,首先确定外源蛋白质可以固定至样品(例如组织学制备的石蜡包埋的组织样品)。为了证实另外的蛋白质可以共价附着至石蜡组织切片,牛血清白蛋白(BSA)用半抗原(2,1,3-苯并噁二唑碳酰胺,“BF”)进行官能化。在其中不加入探针的杂交步骤后,将 BSA-BF 加入组织中,并且所有实验均在 Benchmark XT 自动化载玻片染色机(Ventana Medical Systems, Inc., Tucson AZ)上完成。将 10 μ g BSA-BF 缀合物加入载玻片,并且温育 16 分钟。随后通过添加 100 μ l 4% 多聚甲醛且温育 16 分钟,使 BF 标记的 BSA 蛋白质与组织共价固定。通过添加抗 BF 单克隆抗体检测共价附着的 BSA-BF 的存在,所述抗 BF 单克隆抗体由辣根过氧化物酶(HRP)官能化。图 21 (A-B) 显示了向其中不加入 BSA-BF 的对照载玻片的显微照片(图 21 (A)),并且图 21 (B) 是 BSA-BF 已对于其使用的载玻片的显微照片。HRP 酶催化酪酰胺-TAMRA 的沉积,其染色具有粉红色色原的载玻片,其中 BSA-BF 附着至组织。如果不存在 BSA-BF,则在相同实验条件下,粉红色色原不沉积(图 21 (A)),提示外源添加的 BSA 蛋白质可以永久固定到石蜡包埋的组织切片内。

[0166] 发现如本文描述的应用信号传导缀合物,对于某些实施方案,在非染色酪酰胺沉积循环后使用酪氨酸增强试剂更有效。为了证实该假设,对组织样品实施使用酪氨酸-半抗原缀合物的多轮 TSA。图 22 (A-B) 是如本文描述的信号传导缀合物沉积至其的第一样品的显微照片(图 22 (A)),并且图 22 (B) 是其中酪氨酸增强溶液在用信号传导缀合物检测前使用的第二样品。图 22 (A) 和图 22 (B) 之间的差异支持下述假设:样品内的蛋白质的可用性通过 TSA 沉积缩小,并且含酪氨酸增强剂的添加可以提供更强的染色。在不存在蛋白质固定的情况下(图 22 (A)),信号传导缀合物的后续沉积产生低水平的生色信号。当外源蛋白质使用多聚甲醛固定到组织切片内时(图 22 (B)),信号传导缀合物产生明显更强烈和众多的信号。数据提示通过提供酪酰胺试剂与之共价附着的另外蛋白质结合位点,外源蛋白质固定至组织切片增强酪酰胺信号放大。

[0167] 用于检测样品中的靶的方法的一个公开实施方案包括:使样品与对于靶特异性的检测探针接触;使样品与酪氨酸增强剂接触;使样品与交联剂接触;使样品与基于酪酰胺的检测试剂接触;并且检测样品中的靶;其中交联试剂使酪氨酸增强剂与样品共价附着。在一个实施方案中,该方法进一步包括使样品与标记缀合物接触。在另一个实施方案中,该方法进一步包括使样品与放大缀合物接触。在一个实施方案中,该方法进一步包括检测第二靶,其中使样品与酪氨酸增强剂接触在使样品与用于第一靶的基于酪酰胺的检测试剂接触之后,并且在使样品与用于第二靶的基于酪酰胺的检测试剂接触之前发生。在一个实施方案中,酪氨酸增强剂包括蛋白质。在另一个实施方案中,酪氨酸增强剂是含有酪氨酸残基

的聚合物。在一个实施方案中,交联剂是福尔马林或甲醛。在另一个实施方案中,交联剂是中性缓冲福尔马林(NBF)。在另一个实施方案中,交联剂是亚氨酸酯、辛二亚氨酸二甲酯或N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS 酯)。在另一个实施方案中,交联剂是光辐射。在一个实施方案中,交联剂是UV光或X射线辐射。在一个实施方案中,检测样品中的靶包括使基于酪酰胺的检测试剂中的至少一种成像。在另一个实施方案中,检测靶包括使基于酪酰胺的检测试剂中的至少一种荧光成像。在另一个实施方案中,检测靶包括使基于酪酰胺的检测试剂中的至少一种成像,基于酪酰胺的检测试剂获得使用明视野光学显微镜检查可检测的生色信号。在另一个实施方案中,检测靶包括使信号传导缀合物成像。在另一个实施方案中,检测靶包括使色原成像,所述色原沉积在基于酪酰胺的检测试剂中的至少一种附近。

[0168] 复染色

复染色是在样品已用检测一种或多种靶的试剂染色后,后处理样品的方法,使得它们的结构可以更容易显现。例如,复染剂任选在盖上盖玻片前使用,以致使免疫组织化学染色更独特。复染剂在颜色中不同于初级染剂。众多复染剂是众所周知的,例如苏木精、伊红、甲基绿、亚甲基蓝、吉母萨、阿尔新蓝和核坚固红。在一些例子中,超过一种染剂可以混合在一起,以产生复染剂。这提供了选择染剂的灵活性和能力。例如,可以对于混合物选择第一染剂,其具有特定属性,但还没有不同的所需属性。第二染剂可以加入混合物中,其展示缺失的所需属性。例如,甲苯胺蓝、DAPI 和溴胺天蓝可以混合在一起,以形成复染剂。本公开内容的一个方面是本领域已知的复染色方法可与公开的方法和组合物组合,使得染色的样品可容易地由阅读者解释。

[0169] V. 缀合物

本文公开的是适用于公开的系统和方法中的各种不同的缀合物。由本公开内容考虑的各个种类的缀合物在下文描述。广泛不同的缀合物可以用于多路化。

[0170] 检测探针

检测探针可以用于检测样品例如生物样品中的靶。检测探针可以包括能够与靶特异性结合的特异性结合部分。检测探针包括允许通过标记缀合物检测的一个或多个特征。代表性检测探针包括核酸探针和一抗探针。

[0171] 在举例说明性实施方案中,检测探针是寡核苷酸探针或抗体探针。如本文描述的,检测探针可以是间接检测探针。间接检测探针不配置为直接检测。特别地,探针未配置用于直接显现的目的。相反,检测探针一般是两个类型之一,尽管这些不是相互排斥类型。第一类检测探针是半抗原化的,并且第二类检测探针基于特定物种的抗体。其他类型的检测探针是本领域已知的,并且在本公开内容的范围内,但这些更不常实现,例如适体标记的探针或抗体、加上核酸标签的探针或抗体、与其他抗体共价结合以便提供双重结合能力的抗体,(例如通过偶联技术或通过融合蛋白)。虽然未像这样配置,但检测探针中的一些可以具有允许其直接检测的特性。例如,使用半抗原荧光团在本公开内容的范围内。根据一个实施方案,检测探针包括半抗原标记。本领域普通技术人员应当理解,检测探针可以使用各种方法用一种或多种半抗原进行标记。检测探针可以包括选自下述的半抗原:噻唑半抗原、吡唑半抗原、噻唑半抗原、硝基芳基半抗原、苯并呋喃半抗原、三萜半抗原、脲半抗原、硫脲半抗原、鱼藤酮类半抗原、香豆素半抗原、环木脂体半抗原、二硝基苯基半抗原、生物素半抗原、地高辛半抗原、荧光素半抗原和罗丹明半抗原。在其他例子中,检测探针是衍生自第二物种例如

山羊、兔、小鼠等的单克隆抗体。为了标记半抗原标记的检测探针,标记缀合物将包括抗半抗原抗体。为了标记基于物种的检测探针,标记缀合物可以用抗物种抗体进行配置。

[0172] 在举例说明性实施方案中,本公开内容描述了可以与一种或多种靶核酸序列杂交的核酸探针。在适合于杂交的条件,例如适合于原位杂交、DNA 印迹或 RNA 印迹的条件下,核酸探针优选与靶核酸序列杂交。优选地,检测探针一部分包含任何合适的核酸,例如 RNA、DNA、LNA、PNA 或其组合,并且可以包含标准核苷酸例如核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸,以及核苷酸类似物两者。LNA 和 PNA 是核酸类似物的两个例子,其形成的杂交复合物比在 DNA 和 DNA 或 DNA 和 RNA 之间形成的那些更稳定(即,具有增加的 T_m)。LNA 和 PNA 类似物可以在化学合成期间与传统 DNA 和 RNA 核苷组合,以提供可以用作探针的杂交核酸分子。LNA 和 PNA 类似物的使用允许修饰杂交参数,例如杂交复合物的 T_m 。这允许设计检测探针,在与靶探针部分和靶核酸序列杂交所需的条件相同或相似的条件下,所述检测探针与靶核酸探针的检测靶序列杂交。

[0173] 合适的核酸探针可以手动选择,或借助于计算机实现的算法选择,所述计算机实现的算法基于所需参数例如温度、长度、GC 含量等优化探针选择。经由因特网或在个人计算机上使用的众多计算机实现的算法或程序是可获得的。例如,为了生成来自靶核酸序列(例如基因组靶核酸序列)的多重结合区,例如手动地或通过使用计算机算法例如 RepeatMasker,鉴定缺乏重复(或其他不希望的,例如产生本底的)核酸序列的序列区域。制备重复缺失和独特的特异性探针的方法在例如美国专利公开号 2012/0070862 中发现。在跨度几个至几百个千碱基的靶核酸序列(例如基因组靶核酸序列)内,通常鉴定众多结合区,其基本上或优选完全不含重复(或其他不希望的,例如产生本底的)核酸序列。

[0174] 在一些实施方案中,例如通过使用半抗原化的核苷,将半抗原掺入核酸探针内。用于将半抗原及其他标记与 dNTP 缀合(例如以促进掺入标记的探针内)的方法是本领域众所周知的。事实上,众多标记的 dNTP 例如由 Invitrogen Detection Technologies(Molecular Probes, Eugene, Oreg.) 商购可得。标记可以在 dNTP 上的任何位置处直接或间接附着至 dNTP,所述位置例如磷酸盐(例如 α 、 β 或 γ 磷酸盐)、环或环外位置或糖。探针可以通过任何合适的已知核酸合成方法进行合成。在一些实施方案中,检测探针使用亚磷酰胺核苷和/或亚磷酰胺核苷类似物进行化学合成。例如,在一些实施方案中,探针通过使用标准 RNA 或 DNA 亚磷酰胺核苷进行合成。在一些实施方案中,探针使用单独或与标准亚磷酰胺核苷组合的 LNA 亚磷酰胺或 PNA 亚磷酰胺进行合成。在一些实施方案中,半抗原在含有所需可检测部分的无碱基亚磷酰胺上引入。其他方法还可以用于检测探针合成。例如,由 LNA 类似物或 LNA 类似物和标准核苷酸的组合制成的引物可以用于转录探针的剩余部分。作为另一个例子,包含可检测部分的引物用于转录剩余探针。在另外其他实施方案中,例如通过转录或化学合成产生的探针区段可以通过酶促或化学连接进行连接。

[0175] 各种半抗原可以用于检测探针的可检测部分一部分中。此类半抗原包括但不限于吡唑,特别是硝基吡唑;硝基苯基化合物;苯并咪唑;三萜;脲和硫脲,特别是苯基脲,并且甚至更特别是苯基硫脲;鱼藤酮和鱼藤酮衍生物,在本文中也称为鱼藤酮类;噁唑和噻唑,特别是噁唑和噻唑磺胺;香豆素和香豆素衍生物;环木脂体,由鬼臼毒素和鬼臼毒素衍生物例示;及其组合。荧光素衍生物(FITC、TAMRA、得克萨斯红等)、地高辛(DIG)、5-硝基-3-吡唑碳酰胺(硝基吡唑, NP)、4,5,-二甲氧基-2-硝基肉桂酰胺(硝基肉桂酰胺、NCA)、

2-(3,4-二甲氧基苯基)-喹啉-4-脲(苯基喹啉酮,DPQ)、2,1,3-苯并噁二唑-5-碳酰胺(苯并呋喃,BF)、3-羟基-2-喹啉啉碳酸胺(羟基喹啉,HQ)、4-(二甲基氨基)偶氮苯-4'-磺酰胺(DABSYL)、鱼藤酮异噁唑啉(Rot)、(E)-2-(2-(2-氧代-2,3-二氢-1H-苯并[b][1,4]二氮杂卓-4-基)苯氧基)乙酰胺(苯并二氮杂卓,BD)、7-(二乙基氨基)-2-氧代-2H-色烯-3-羧酸(香豆素 343,CD0)、2-乙酰氨基-4-甲基-5-噻唑磺酰胺(噻唑磺酰胺,TS)、和对甲氧基苯基吡唑鬼臼酸胺(p-Mehtoxyphenylpyrazopodophyllamide)(POD0)。这些半抗原及其在探针中的使用在美国专利号 7,695,929 中更详细地描述。

[0176] 标记缀合物和次级标记缀合物

在举例说明性实施方案中,标记缀合物与检测探针特异性结合,并且配置为用酶标记靶。如上所述,由第二物种配置或包括半抗原的检测探针可以通过抗物种抗体或抗半抗原抗体进行检测。配置标记缀合物的一种方法是将酶与抗物种或抗半抗原抗体直接偶联。可以包括或不包括各种接头的这种缀合物也在美国专利号 7,695,929 中描述。标记缀合物包括一种或多种酶。示例性酶包括氧化还原酶或过氧化物酶。信号传导缀合物包括潜在反应部分和生色部分。酶催化潜在反应部分转换成反应部分,其共价结合接近于靶或直接在靶上的生物样品。

[0177] 如本文描述的,次级标记缀合物与放大缀合物结合使用。次级标记缀合物以与标记缀合物相同的方式进行配置,除了它们配置为标记通过放大过程沉积的半抗原,而不是与检测缀合物缀合的半抗原之外。在举例说明性实施方案中,次级标记缀合物包含与酶缀合的抗半抗原抗体。在一个实施方案中,酶是氧化还原酶或过氧化物酶。

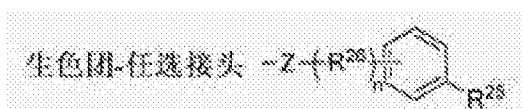
[0178] 信号传导缀合物

本文公开的另一类缀合物是信号传导缀合物。信号传导缀合物提供了根据本文公开的方法,用于检测靶的可检测信号。在特别公开的实施方案中,信号传导缀合物包含潜在反应部分和生色团部分。

[0179] 信号传导缀合物可以配置为比传统可用的色原更选择性吸收光。检测通过经由信号传导缀合物的光吸光度实现;例如,至少约 5% 的入射光吸光度促进靶的检测。在其他更暗的染剂中,至少约 20% 的入射光将被吸收。在可见光谱内非均匀的光吸光度导致生色团部分看起来有色。本文公开的色原缀合物可以由于其吸光度而看起来有色;色原缀合物可以看起来红色、橙色、黄色、绿色、靛蓝或紫罗兰色,取决于与生色团部分相关的光谱吸光度。根据另一个方面,生色团部分可以具有比传统使用的色原(例如 DAB、坚固红、坚固蓝)的那些吸光度更窄的光谱吸光度。在举例说明性实施方案中,与第一信号传导缀合物的第一生色团部分相关的光谱吸光度具有约 30 nm 至约 250 nm、约 30 nm 至约 150 nm、约 30 nm 至约 100 nm、或约 20 nm 至约 60 nm 的半峰全宽(FWHM)。

[0180] 窄光谱吸光度允许信号传导缀合物生色团部分与传统色原不同地进行分析。虽然与传统色原相比较具有增强的特征,但检测信号传导缀合物仍是简单的。检测可以包括使用明视野显微镜、本文公开的成像系统或等价的数字扫描仪。

[0181] 公开的信号传导缀合物的一个实施方案在图 10 (A)和 10 (B)中举例说明。参考图 10(A-B),信号传导缀合物 412 包含潜在反应部分 404 和生色团部分 6;在另一个实施方案中,替代信号传导缀合物 414 可以包括接头 408,用于将生色团部分 406 与潜在反应部分 404 缀合。在特别公开的实施方案中,信号传导缀合物具有下述通式 1:



式 1。

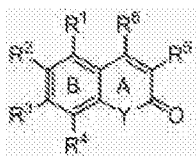
[0182] 公开的信号传导缀合物通常包含如本文描述的潜在反应部分。例如,潜在反应部分可以与公开的放大缀合物的那种相同或不同;然而,每个潜在反应部分能够形成反应性原子团种类,并且具有本文提供的通式。如式 1 中所示,信号传导缀合物可以包含任选接头。如果使用接头,则它可以选自本文公开的接头中的任一种。在特别公开的实施方案中,接头选择为改善信号传导缀合物的亲水溶液溶解度,和/或改善对生物样品的缀合物功能性。在特别公开的实施方案中,接头是烯烃氧化物接头,例如聚乙二醇接头;然而,本文公开的接头中的任一种均可用于信号传导缀合物。

[0183] 生色团部分

生色团部分一般描述为负责其颜色的分子部分。当分子吸收一定波长的可见光且透射或反射其他时,出现颜色。生色团是分子中的区域,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,其中与该区域相互作用的可见光可以被吸收。吸光度通常与从其基态到激发态的电子跃迁相关。具有在可见光谱内的基态至激发态能量差异的分子通常是共轭碳结构。在这些化合物中,其为扩展的 π 轨道的能级之间的电子跃迁,通过通常在芳香族系统中的一系列交替单键和双键产生。常见例子包括各种食物着色剂、织品染料(偶氮化合物)、pH 指示剂、番茄红素、 β -胡萝卜素和花青素。分子的结构赋予导致能级的 π 轨道特征。通常,在分子中用更多不饱和(多重)键延长或延伸共轭系统趋于使吸收转变为更长波长。伍德沃德-菲泽规则可以用于约计在具有共轭 π 键系统的有机化合物中的紫外线-可见光最大吸收波长。

[0184] 在举例说明性实施方案中,金属络合物可以是生色团。例如,具有配体的配位络合物中的金属通常吸收可见光。例如,叶绿素和血红蛋白(脊椎动物血液中的氧转运蛋白)是包括金属络合物的生色团。在这两个例子中,金属在卟啉环的中心处络合:金属是血红蛋白的血红素基团中的铁,或叶绿素的情况下的镁。卟啉环的高度共轭的 π 键合系统吸收可见光。中心金属的性质还可以影响金属卟啉络合物的吸收光谱或特性例如激发态寿命。

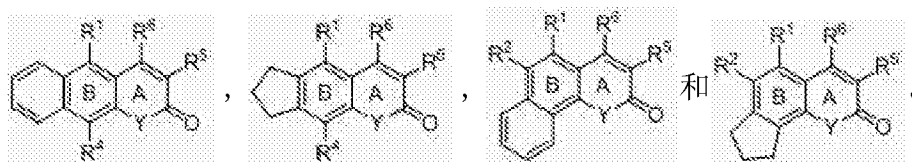
[0185] 在举例说明性实施方案中,生色团部分是香豆素或香豆素衍生物。香豆素和香豆素衍生物的通式在下文提供。



式 2。

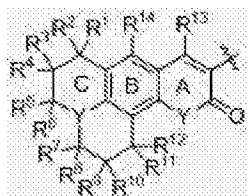
[0186] 参考式 2, R^1 - R^6 在本文中定义。 R^1 - R^6 取代基中的至少一个通常也与接头或潜在反应部分(例如酰胺或酰胺衍生物)键合。一些工作实施方案已使用指示为具有 R^5 取代基的位置,用于与接头或潜在反应部分(例如酰胺或酰胺衍生物)偶联。在 4 位置处除氢外的取代基被认为猝灭荧光,但可用于本公开内容的范围内。 Y 选自氧、氮或硫。在与具有举例说明性通式的化合物键合或耦合的环系统中,可用于形成此类化合物的 R^1 - R^6 取代基中的两个或更多个也可以是原子,通常为碳原子。这些类型的化合物的示例性实施方案

包括：



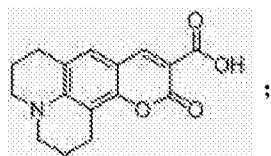
[0187] 本领域普通技术人员应当理解,环还可以是杂环和 / 或杂芳基。

[0188] 工作实施方案通常包含耦合的 A-D 环系统,其具有至少一个接头、酪酰胺或酪酰胺衍生物偶联位置,其中一个可能的偶联位置在下文指示：

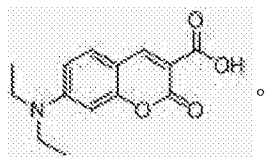


式 3。

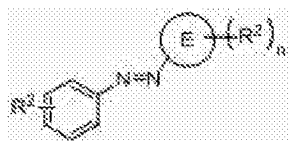
[0189] 参考式 3, R 和 Y 可变基团如本文所述。最通常地, R^1 - R^{14} 独立地是氢或低级烷基。基于香豆素的生色团的特定实施方案包括 2, 3, 6, 7- 四氢 -11- 氧代 -1H, 5H, 11H-[1] 苯并吡喃并 [6, 7, 8-ij] 喹啉 -10- 羧酸



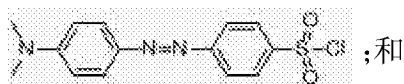
和 7- (二乙氨基) 香豆素 -3- 羧酸



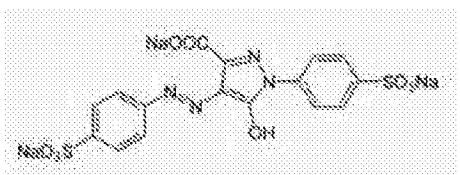
[0190] 适用于本文的另一类生色部分包括含重氮基色原。这些特定生色团可以具有如下所示的式。



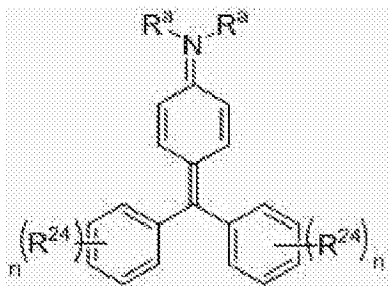
[0191] 就该式而言,环 E 可以选自苯基、咪唑、吡唑、噁唑等。每个 R^2 可以独立地选自本文所述的那些基团。在特别公开的实施方案中,每个 R^2 独立地选自胺、取代的胺、苯基、羟基、磺酰氯、磺酸酯、羧化物及其组合 ; 并且 n 范围可以为零至 5。特别公开的实施方案可以选自下述重氮基生色团 :DABSYL, 其具有约 436 nm 的 $\lambda_{\max}$ 并且具有下述化学结构



柠檬黄, 其具有约 427 nm 的 $\lambda_{\max}$ 并且具有下述化学结构

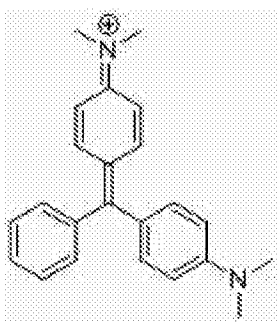


[0192] 在另外其他实施方案中,生色团可以是三芳基甲烷化合物。在本公开内容范围内的三芳基甲烷化合物可以具有下式。

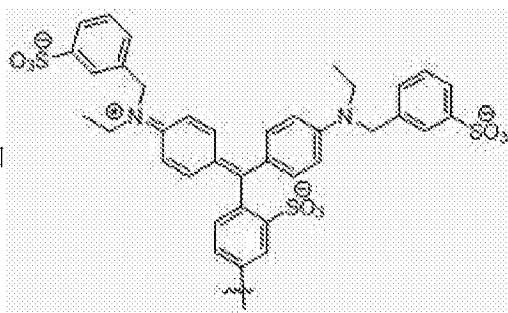


式 4。

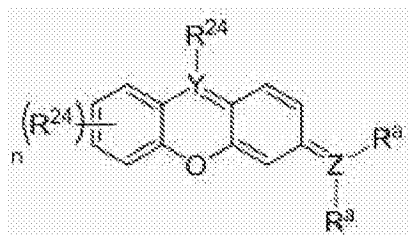
[0193] 就式 4 而言,每个 R^a 可以独立地选自氢、脂肪族、芳基和烷基芳基;并且每个 R^{24} 可以选自胺、取代的胺、羟基、烷氧基及其组合;每个 n 独立地范围可以为零至 5。示例性生色团在下文提供:



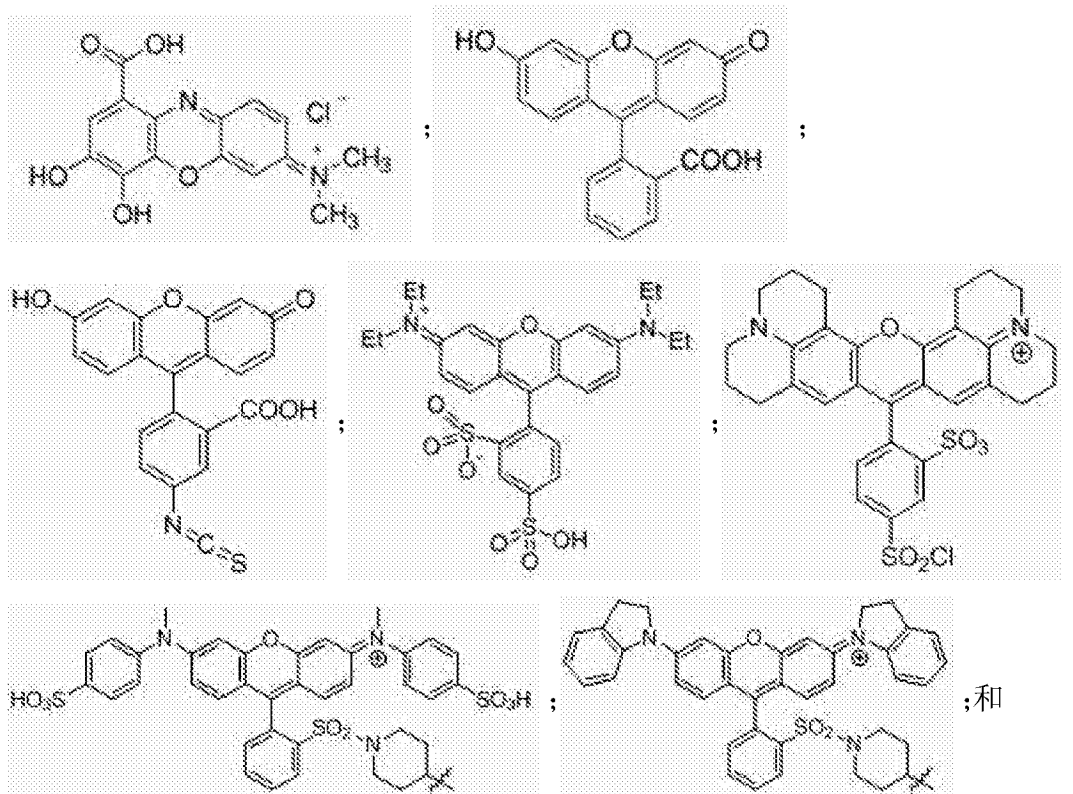
;和



[0194] 在其他公开的实施方案中,生色团部分可以具有下式



其中每个 R^a 可以独立地选自氢、脂肪族、芳基和烷基芳基;每个 R^{24} 可以独立地选自本文提供的基团,包括取代的芳基,其包含由选自在本文中公开的 R^1 - R^{23} 中的任何一个的一种或多种基团取代的芳基; Y 可以是氮或碳; Z 可以是氮或氧,并且 n 范围可以为零至 4。在特别公开的实施方案中, Z 是氮,并且每个 R^a 可以是脂肪族并且与环的碳原子稠合,包含 R^a 的胺与所述环附着,或每个 R^a 可以连接在一起,以形成 4 或 6 元脂肪族或芳香族环,其可以是进一步取代的。示例性实施方案如下提供:



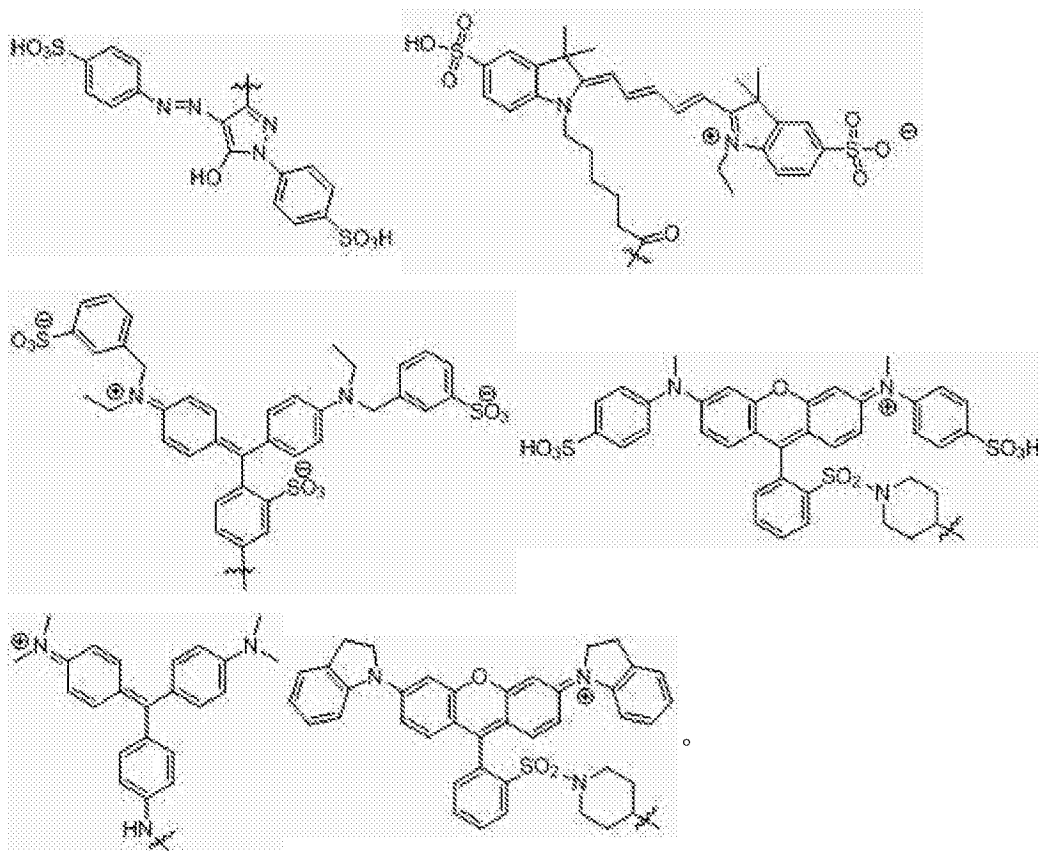
其他罗丹明衍生物,例如四甲基罗丹明(包括TMR、TAMRA和反应性异硫氰酸酯衍生物),和二芳基罗丹明衍生物,例如QSY 7、QSY 9和QSY 21染料。

[0195] 示例性生色团选自DAB;AEC;CN;BCIP/NBT;坚固红;坚固蓝;碱性品红;NBT;ALK GOLD;级联(Cascade)蓝乙酰叠氮化物;Dapoxyl磺酸/羧酸琥珀酰亚胺酯;DY-405;Alexa Fluor 405琥珀酰亚胺酯;级联黄琥珀酰亚胺酯;吡啶基噁唑琥珀酰亚胺酯(PyMPO);太平洋蓝琥珀酰亚胺酯;DY-415;7-羟基香豆素-3-羧酸琥珀酰亚胺酯;DYQ-425;6-FAM亚磷酰胺;荧光黄;碘乙酰胺;Alexa Fluor 430琥珀酰亚胺酯;Dabcyl琥珀酰亚胺酯;NBD氯化物/氟化物;QSY 35琥珀酰亚胺酯;DY-485XL;Cy2琥珀酰亚胺酯;DY-490;俄勒冈州绿488羧酸琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 488琥珀酰亚胺酯;BODIPY 493/503 C3琥珀酰亚胺酯;DY-480XL;BODIPY FL C3琥珀酰亚胺酯;BODIPY FL C5琥珀酰亚胺酯;BODIPY FL-X琥珀酰亚胺酯;DYQ-505;俄勒冈州绿514羧酸琥珀酰亚胺酯;DY-510XL;DY-481XL;6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素琥珀酰亚胺酯(JOE);DY-520XL;DY-521XL;BODIPY R6G C3琥珀酰亚胺酯;赤藓红异硫氰酸酯;5-羧基-2',4',5',7'-四溴磺酰基荧光素琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 532琥珀酰亚胺酯;6-羧基-2',4,4',5',7,7'-六氯荧光素琥珀酰亚胺酯(HEX);BODIPY 530/550 C3琥珀酰亚胺酯;DY-530;BODIPY TMR-X琥珀酰亚胺酯;DY-555;DYQ-1;DY-556;Cy3琥珀酰亚胺酯;DY-547;DY-549;DY-550;Alexa Fluor 555琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 546琥珀酰亚胺酯;DY-548;BODIPY 558/568 C3琥珀酰亚胺酯;罗丹明红-X琥珀酰亚胺酯;QSY 7琥珀酰亚胺酯;BODIPY 564/570 C3琥珀酰亚胺酯;BODIPY 576/589 C3琥珀酰亚胺酯;羧基-X-罗丹明(ROX);琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 568琥珀酰亚胺酯;DY-590;BODIPY 581/591 C3琥珀酰亚胺酯;DY-591;BODIPY TR-X琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 594琥珀酰亚胺酯;DY-594;羧基萘基荧光素琥珀酰亚胺酯;DY-605;DY-610;Alexa Fluor 610琥珀酰亚胺酯;DY-615;BODIPY 630/650-X

琥珀酰亚胺酯;羊毛罂红;Alexa Fluor 633 琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 635 琥珀酰亚胺酯;DY-634;DY-630;DY-631;DY-632;DY-633;DYQ-2;DY-636;BODIPY 650/665-X 琥珀酰亚胺酯;DY-635;Cy5 琥珀酰亚胺酯;Alexa Fluor 647 琥珀酰亚胺酯;DY-647;DY-648;DY-650;DY-654;DY-652;DY-649;DY-651;DYQ-660;DYQ-661;Alexa Fluor 660 琥珀酰亚胺酯;CY5.5 琥珀酰亚胺酯;DY-677;DY-675;DY-676;DY-678;Alexa Fluor 680 琥珀酰亚胺酯;DY-679;DY-680;DY-682;DY-681;DYQ-3;DYQ-700;Alexa Fluor 700 琥珀酰亚胺酯;DY-703;DY-701;DY-704;DY-700;DY-730;DY-731;DY-732;DY-734;DY-750;Cy7 琥珀酰亚胺酯;DY-749;DYQ-4;和 Cy7.5 琥珀酰亚胺酯。

[0196] 在特别公开的实施方案中,生色团部分可以选自柠檬黄、7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸、琥珀酰亚胺酯、Dabsyl 磺酰氯、异硫氰酸荧光素(FITC)羧基琥珀酰亚胺酯(DY-495)、罗丹明绿羧基琥珀酰亚胺酯(DY-505)、伊红异硫氰酸酯(EITC)、6-羧基-2',4,7,7'-四氯荧光素琥珀酰亚胺酯(TET)、羧基罗丹明 6G 琥珀酰亚胺酯、羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯(TMR、TAMRA)(DY-554)、QSY 9 琥珀酰亚胺酯、磺酰罗丹明 B 磺酰氯(DY-560)、德克萨斯红(磺酰罗丹明 101)、桅花青、坚牢绿 FCF、孔雀绿、异硫氰酸酯和 QSY21 琥珀酰亚胺酯。在某些公开的实施方案中,信号传导缀合物的生色团部分是 Dabsyl 磺酰氯、FITC、7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸、琥珀酰亚胺酯、罗丹明绿羧基琥珀酰亚胺酯(DY-505)、伊红异硫氰酸酯(EITC)、6-羧基-2',4,7,7'-四氯荧光素琥珀酰亚胺酯(TET)、羧基四甲基罗丹明琥珀酰亚胺酯(TMR、TAMRA)(DY-554)、磺酰罗丹明 B 磺酰氯(DY-560)、德克萨斯红(磺酰罗丹明 101)和桅花青。

[0197] 用于信号传导缀合物的进一步示例性生色部分在下文提供:



[0198] 信号传导缀合物可以具有特别适合生物样品中的靶的明视野成像的最大吸收和

吸收宽度。在一个实施方案中,信号传导缀合物配置为提供具有约 350 nm 至约 800 nm、约 400 nm 至约 750 nm、或约 400 nm 至约 700 nm 的 $\lambda_{\max}$ 的吸收峰。这些波长范围是特别有利的,因为它们转化为人可见的颜色。然而,本文描述的方法还可以应用于可用于近红外线(NIR)、红外线(IR)或紫外线(UV)诊断方法的生色团部分。信号传导缀合物非可见光峰可以进行成像且转换成颜色。在一些实施方案中,图 1 和 3 的照明器 140 可以包括一个或多个 IR 和 / 或 UV 源。参考图 3,例如,光源 180 可以是朝向样本发出 IR/UV 能量的 IR 和 / 或 UV 源。图像捕获装置 120 可以配置为基于来自样本的 IR/UV 能量捕获样本的图像。捕获的图像可以转换成可观察的彩色图像(例如假彩色单色图像)。如果对于多路化捕获多重可观察的彩色图像,则图像集合可以合并,以产生合成图像(例如数字增强的图像)。

[0199] 在一个实施方案中,信号传导缀合物配置为产生选自红色、橙色、黄色、绿色、靛蓝、紫罗兰色或其混合物的有色信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 400 nm 至 430 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生黄色信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 430 nm 至 490 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生橙色信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 490 nm 至 560 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生红色信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 560 nm 至 570 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生紫罗兰色信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 570 nm 至 580 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生靛蓝信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 580 nm 至 620 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生蓝色信号。在一个实施方案中,信号传导缀合物具有约 620 nm 至约 800 nm 的 $\lambda_{\max}$ 。在另一个实施方案中,信号传导缀合物产生绿色至蓝绿色信号。

[0200] 在一个实施方案中,信号传导缀合物配置为具有约 20 nm 至约 60 nm、约 30 至约 100 nm、约 30 至约 150 nm、或约 30 至约 250 nm 的半峰全宽(FWHM)。在特别公开的实施方案中,FWHM 小于约 300 nm、小于约 250 nm、小于约 200 nm、小于约 150 nm、小于约 100 nm、小于约 50 nm。在举例说明性实施方案中,描述了具有小于约 150 nm 的 FWHM 的信号传导缀合物。在一个实施方案中,FWHM 小于约 150 nm、小于约 120 nm、小于约 100 nm、小于约 80 nm、小于约 60 nm、小于约 50 nm、小于约 40 nm、小于约 30 nm、约 10 nm 至 150 nm、约 10 nm 至 120 nm、约 10 nm 至 100 nm、约 10 nm 至 80 nm、约 10 nm 至 60 nm、约 10 nm 至 50 nm、或约 10 nm 至 40 nm。

[0201] 在另一个实施方案中,信号传导缀合物具有大于约 5,000 M⁻¹ cm⁻¹ 至约 250,000 M⁻¹ cm⁻¹ 的平均摩尔吸光系数。Cy 染料可以具有 >200,000 M⁻¹ cm⁻¹ 的消光系数。例如,大于约 5,000 M⁻¹ cm⁻¹、大于约 10,000 M⁻¹ cm⁻¹、大于约 20,000 M⁻¹ cm⁻¹、大于约 40,000 M⁻¹ cm⁻¹、或大于约 80,000 M⁻¹ cm⁻¹ 的平均摩尔吸光系数。在另外一个实施方案中,信号传导缀合物具有在水中至少约 0.1 mM 至约 1 M 的溶解度。例如,信号传导缀合物具有在水中至少约 0.1 mM、至少约 1 mM、至少约 10 mM、至少约 100 mM、或至少约 1 M 的溶解度。在一个实施方案中,信号传导缀合物针对水性缓冲溶液中的沉淀稳定大于约 1 个月到约 30 个月。例如,信号传导缀合物针对水性缓冲溶液中的沉淀稳定大于约 1 个月、大于约 3 个月、大于约 6 个月、大于约 12 个月、大于约 18 个月、或大于约 24 个月。

[0202] 图 23 (A) 是使用具有图 24 中所示的吸收光谱的信号传导缀合物染色的蛋白质

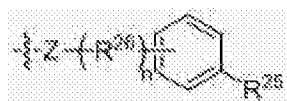
(Calu-3 异种移植植物中的 HER2 (4B5) IHC) 的第一显微照片, 并且图 23 (B) 是第二显微照片。痕迹 A 对应于用于图 23 (A) 的信号传导缀合物, 并且痕迹 B 对应于用于图 23 (B) 的信号传导缀合物; 应当指出在染色前且在载玻片已检测 HER2 后, 每种信号传导缀合物在溶液中用光谱测定法进行分析(虚线痕迹代表对组织获得的光谱)。图 23 (A) 中所示用于染色组织的信号传导缀合物具有约 456 nm 的 $\lambda_{\max}$ 和约 111 nm 的 FWHM。图 23 (B) 中所示用于染色组织的信号传导缀合物具有约 628 nm 的 $\lambda_{\max}$ 和约 70 nm 的 FWHM。

[0203] 潜在反应部分

潜在反应部分配置为经历催化活化, 以形成反应种类, 其可以与样品或其他检测组分共价键合。催化活化通过一种或多种酶(例如氧化还原酶和过氧化物酶, 如辣根过氧化物酶)驱动。在过氧化物的存在下, 这些酶可以催化反应种类的形成。这些反应种类例如自由基能够与接近于其生成即接近酶的苯酚化合物反应。样品中可获得的苯酚化合物通常为蛋白质内的酪氨酸残基。像这样, 在过氧化物酶和过氧化物(例如过氧化氢)的存在下, 潜在反应部分可以加入含蛋白质样品中, 所述在过氧化物酶和过氧化物可以催化原子团形成, 且随后促使反应部分与生物样品形成共价键。

[0204] 在特别公开的实施方案中, 潜在反应部分包含至少一个芳香族部分。在示例性实施方案中, 潜在反应部分包含苯酚部分, 并且与酪氨酸的苯酚基团结合。然而, 希望经由潜在反应部分特异性结合标记缀合物, 所述潜在反应部分在样品内的所需靶处或与所需靶紧密接近。这个目的可以通过将酶固定到靶区域上来实现, 如本文描述的。仅与固定酶紧密接近的潜在反应部分将与酪氨酸残基反应且形成键, 所述酪氨酸残基在固定酶附近或接近于固定酶, 包括酶自身中的酪氨酸残基、酶与之缀合的抗体中的酪氨酸残基、和 / 或接近于固定酶的样品中的酪氨酸残基。在特别公开的实施方案中, 标记缀合物可以接近地例如在固定酶约 800 nm、约 100 nm、约 10 nm 或约 5 nm 内结合。例如, 酪氨酸残基可以在与固定酶约 10 埃至约 800 nm、约 100 埃至约 50 nm、约 10 埃至约 10 nm、或约 10 埃至约 5 nm 的距离内。此类接近结合允许以与本文公开的检测方法使用的常规染色方法至少相同程度的特异性检测靶。例如, 公开方法的实施方案允许区分亚细胞结构, 例如核膜相对于核区、细胞膜相对于胞质区等。

[0205] 潜在反应部分可以是下文举例说明的通式。



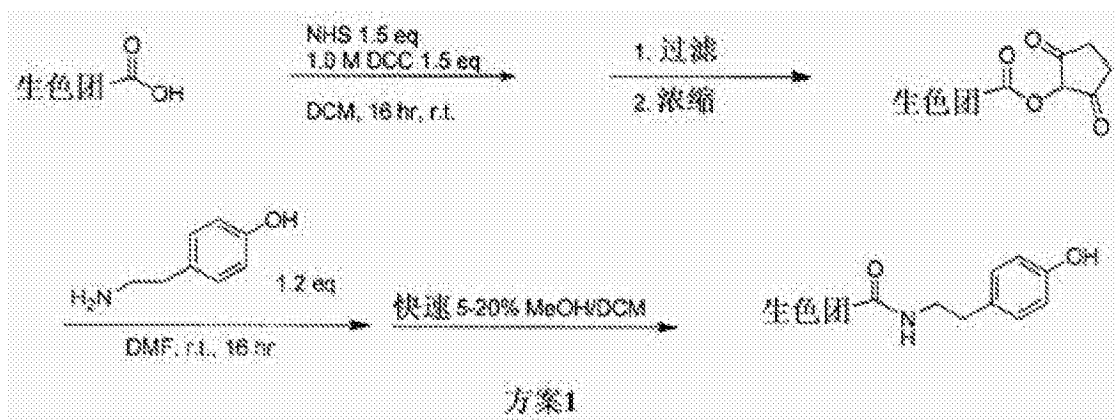
式 5。

[0206] 就式 5 而言, R^{25} 选自羟基、醚、胺和取代的胺; R^{26} 选自烷基、烯基、炔基、芳基、杂芳基、 $-OR_m$ 、 $-NR_m$ 和 $-SR_m$ 、其中 m 是 1-20; n 是 1-20; Z 选自氧、硫和 NR^a 、其中 R^a 选自氢、脂肪族、芳基和烷基芳基。潜在反应部分的一个示例性实施方案是酪胺(或酪酰胺, 其为给予与可检测标记和 / 或任选接头缀合的酪胺分子的名称) 或其衍生物。

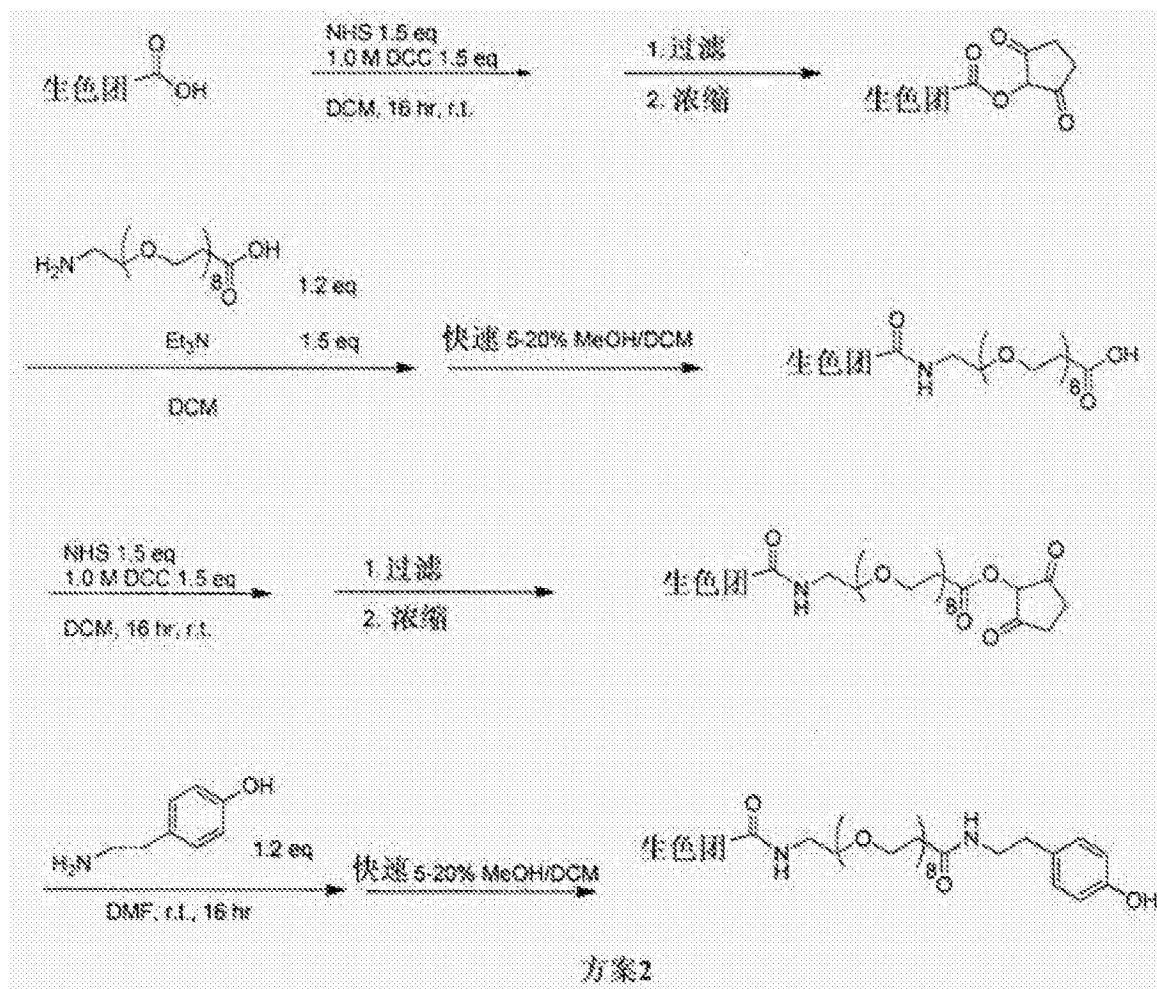
[0207] 在特别公开的实施方案中, 当共价沉积到样品上时, 信号传导缀合物具有在生物样品内大于约 1×10^{11} 分子 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 或大于约至约 1×10^{13} 分子 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 的最小浓度。在特别公开的实施方案中, 沉积的信号传导缀合物浓度范围为约至约 1×10^{11} 分子 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 至约至约 1×10^{16} 分子 / $\text{cm}^2 \cdot \mu\text{m}$ 。

[0208] 公开的信号传导缀合物的实施方案可以使用方案 1 中举例说明的一般操作进行

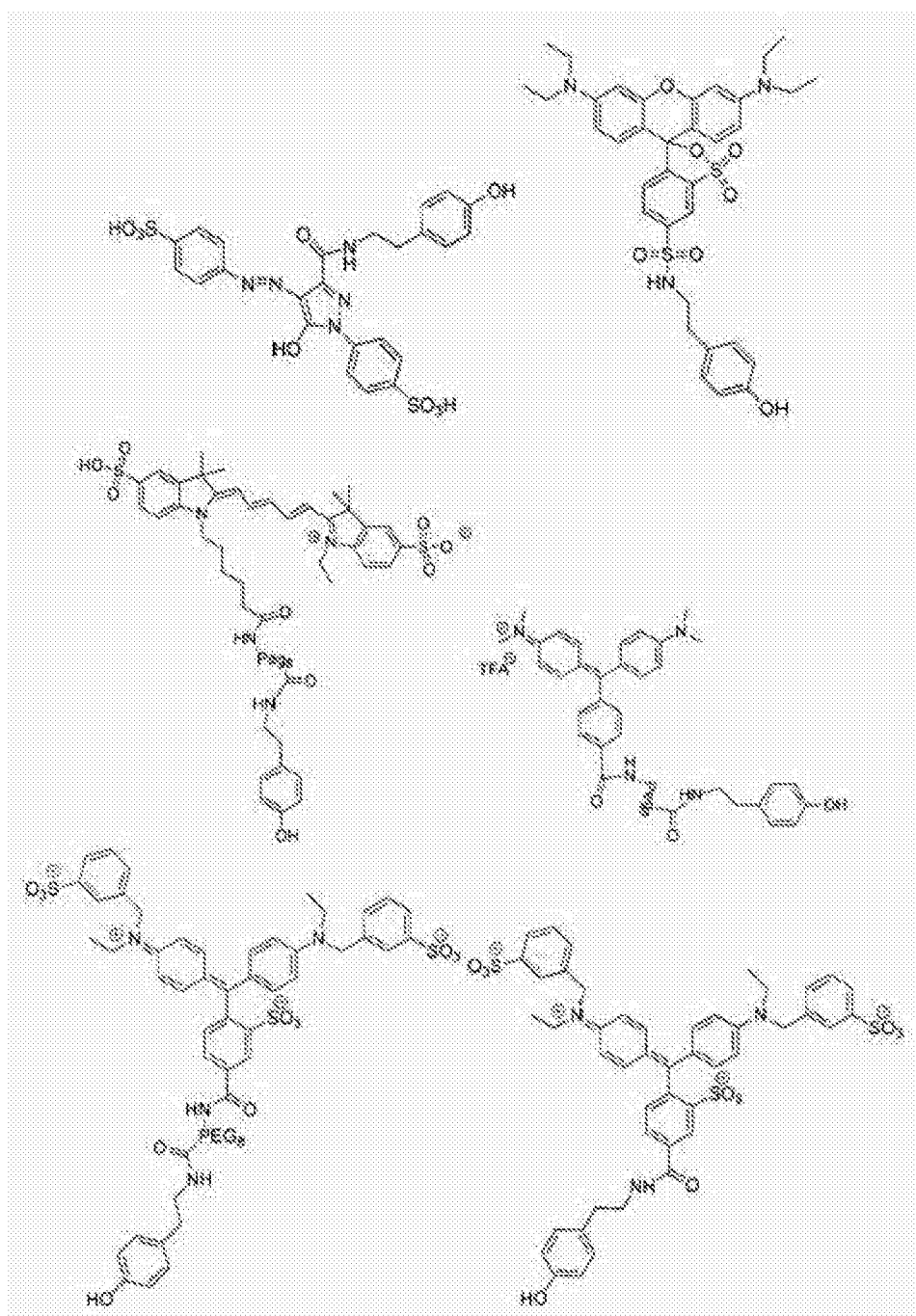
制备。在特别公开的实施方案中,缀合物不含任选接头形成。例如,通过首先将羧酸转换为活化酯,并且随后在生色团和酞胺分子或酞胺衍生物之间形成酰胺键,生色团的羧酸部分可以与酞胺分子或酞胺衍生物偶联。不使用接头用于制备信号传导缀合物的示例性方法在下文方案中举例说明。

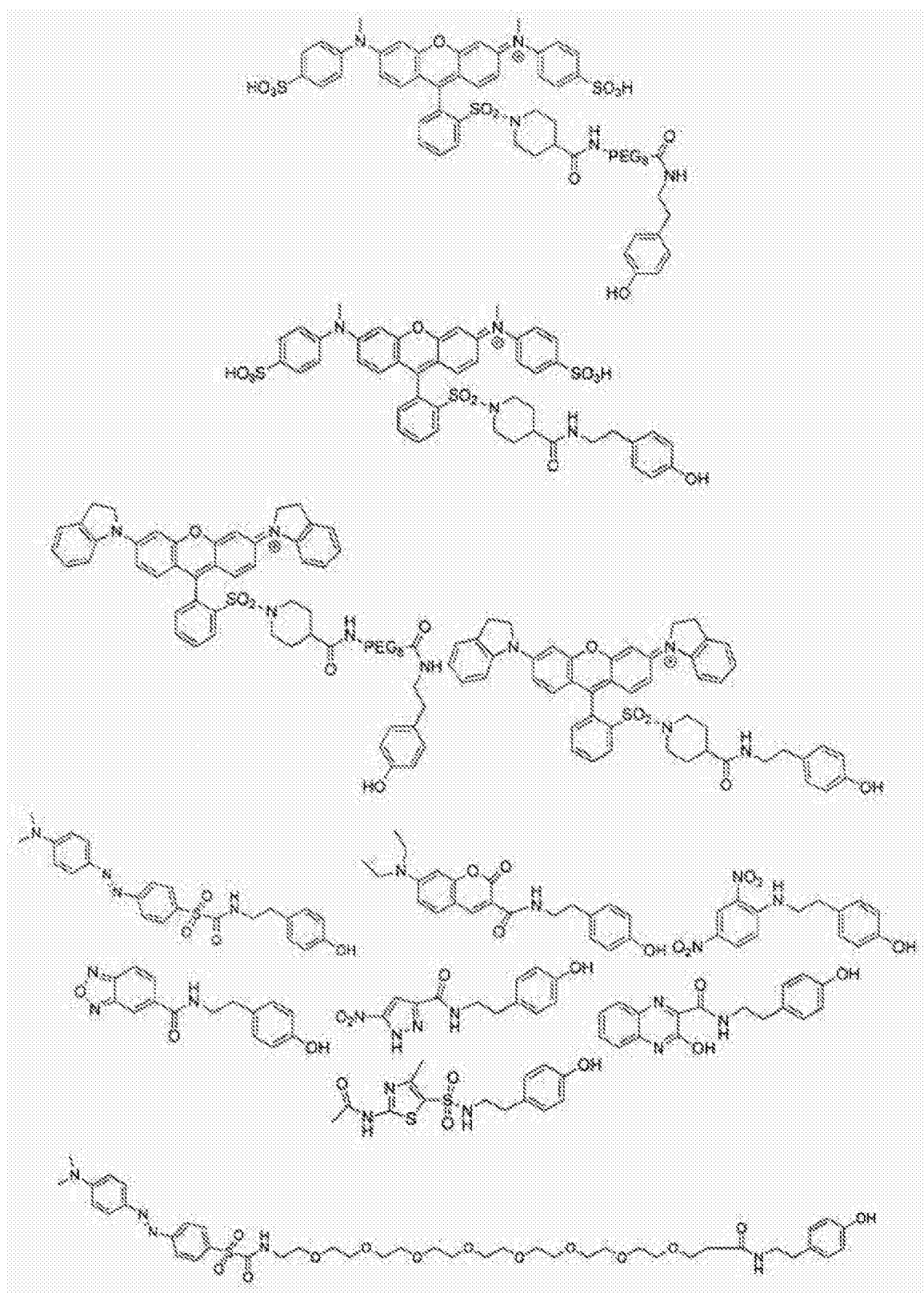


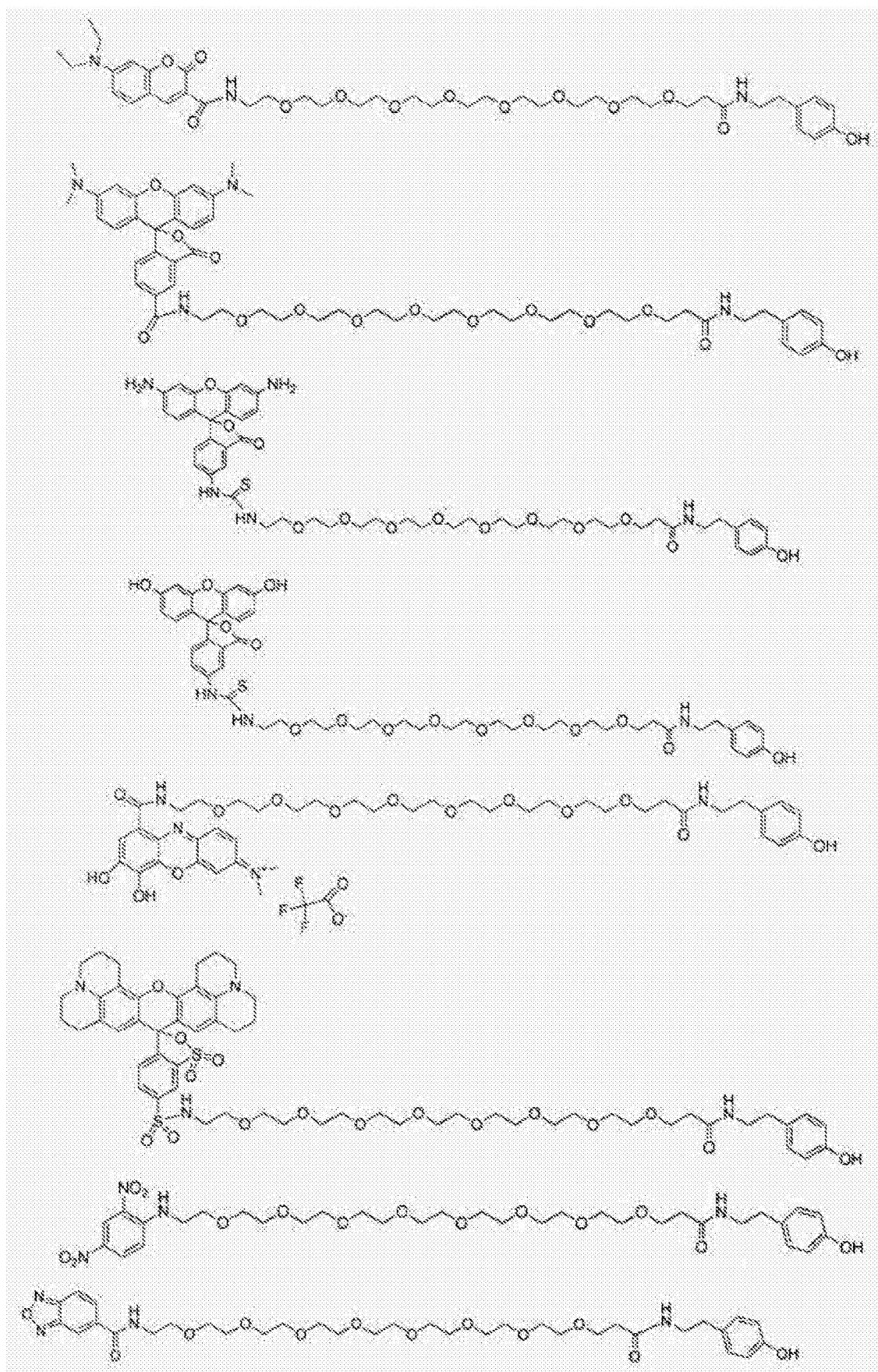
[0209] 在其中存在接头的实施方案中,通过首先将羧酸转换为活化酯,并且随后在生色团和胺封端的接头之间形成酰胺键,生色团的羧酸部分可以与胺封端的接头(例如烯烃氧化物)偶联。接头的剩余末端随后可以活化,并且随后与酞胺分子或酞胺衍生物偶联。用于制备信号传导缀合物的示例性方法在下文方案2中提供。

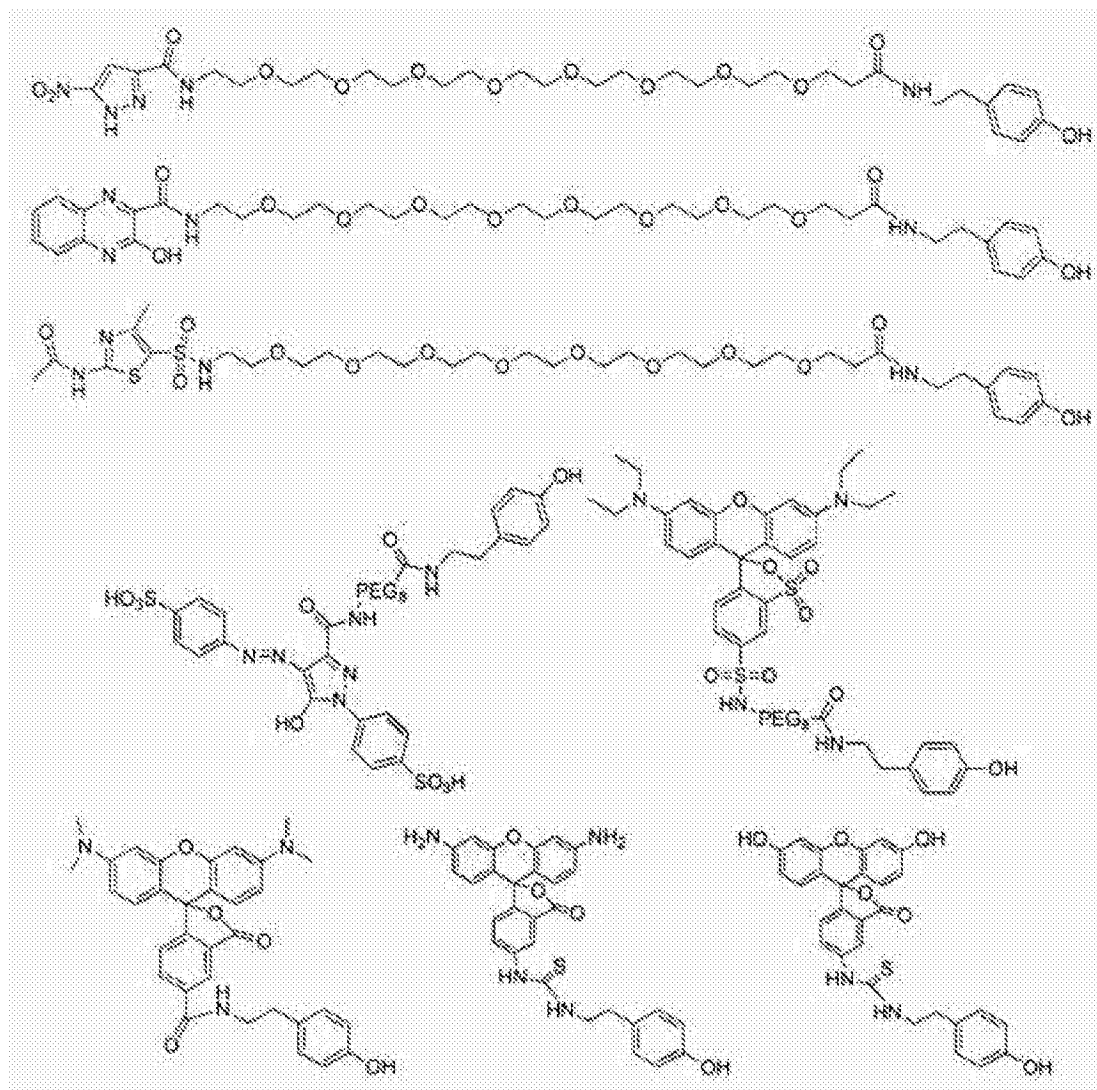


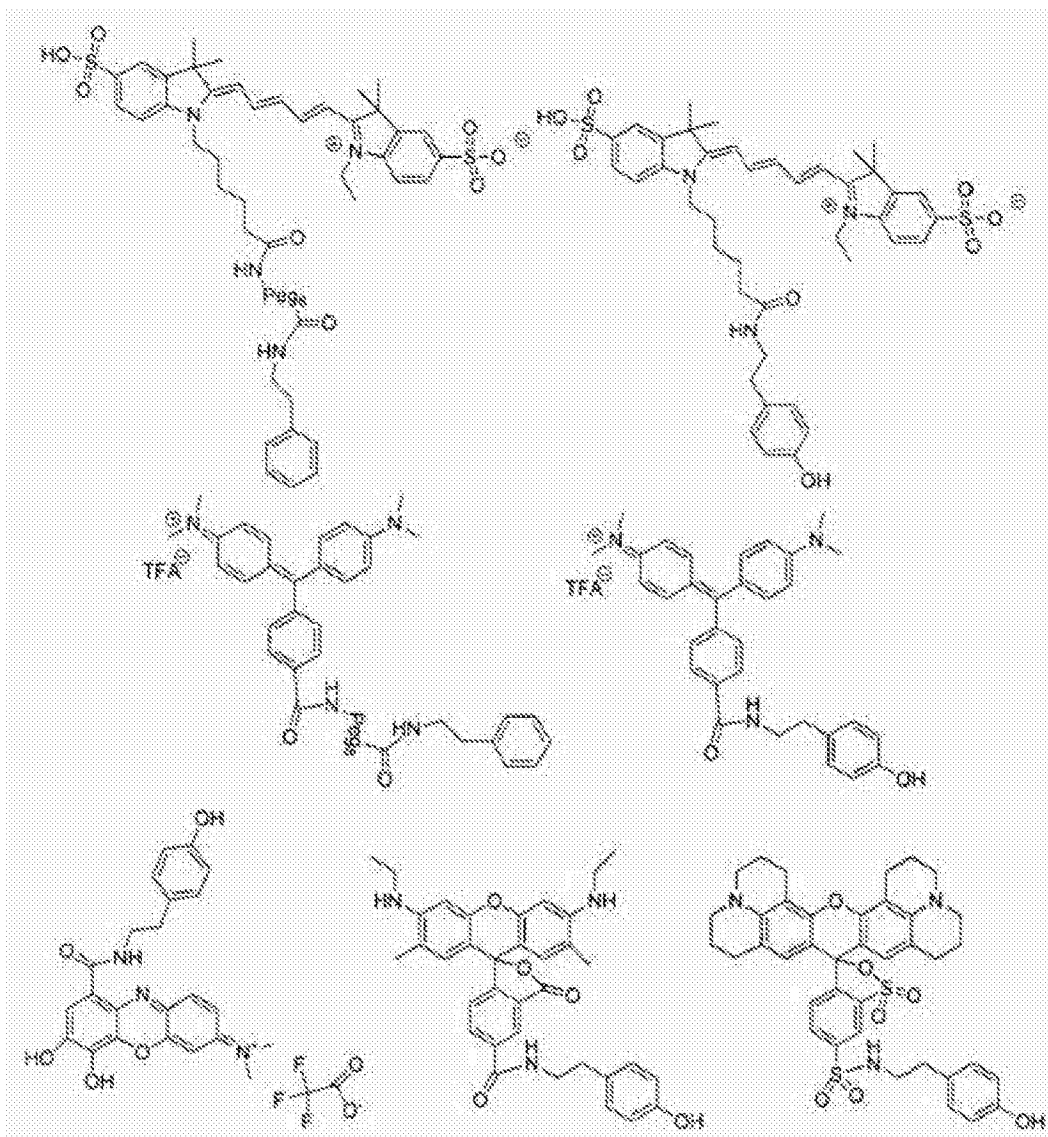
[0210] 示例性信号传导缀合物在下文提供。











[0211] 放大缀合物

本文还公开的是适合于放大得自进行本文公开的方法的信号缀合物。放大缀合物通常包含潜在反应部分、可检测标记和任选接头。

[0212] 放大缀合物的可检测标记可以是本文提供的任何可检测标记。在特别公开的实施方案中，可检测标记是半抗原，例如本文公开的半抗原中的任一种。参考美国专利号 7,695,929，其公开了制备放大缀合物及其相应特异性抗体的结构和合成方法。在特别公开的实施方案中，具有亲电子官能团(或具有能够转换为亲电子官能团的官能团)的半抗原结合至潜在反应部分或接头(例如脂肪族或聚(烷撑氧化物)接头)。在某些实施方案中，半抗原包括羧酸官能团，其转换为活化的亲电子的含羰基官能团，例如但不限于酰基卤、酯(例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯)或酸酐。潜在反应部分包括能够与半抗原的活化亲电子官能团反应的亲核官能团(例如氨基、羟基、硫醇或由其形成的阴离子)。使用有机化学合成领域普通技术人员已知的有机偶联技术，半抗原的亲电子基团可以与潜在反应部分的亲核基团偶联。在其中缀合物包括接头的实施方案中，接头通常具有在一个末端处的亲核官能团和在另一个末端处的亲电子官能团。使用有机化学合成领域普通技术人员已知的有机偶联技术，接头的亲核基团可以与半抗原的亲电子基团偶联，并且接头的亲电子基团可以活化且

与潜在反应部分的亲核基团偶联。

[0213] 在进一步的举例说明性实施方案中,信号传导缀合物用作放大缀合物。信号传导缀合物可以用作放大缀合物,其中生色团部分是有效的标记部分。在举例说明性实施方案中,对于生色团部分特异性的抗体允许生色团部分充当信号传导和标记缀合物。从另一个角度来看,如本文公开的,对于有效生色团部分具有物理属性的半抗原可以用作生色团部分和半抗原两者。存在使用信号传导缀合物作为放大缀合物的特定利益。特别地,放大步骤将导致显著例如潜在可检测量的生色团部分的沉积。像这样,后续生色检测可以更强。类似地,如本文就混合来自不同分类的色原描述的,使用来自两种或更多种生色团部分的吸光度重叠可以生成独特的颜色。

[0214] VI. 组合物

举例说明性组合物可以是包括生物样品和多个信号传导缀合物的样本。在特别公开的实施方案中,组合物包含生物样品,其包含用于显现的一种或多种酶标记的靶。用于标记靶的酶可以源于标记缀合物,例如酶缀合物。组合物还可以进一步包含一种或多种检测探针。多个信号传导缀合物如本文公开的且配置为提供明视野信号。多个信号传导缀合物接近于一种或多种靶或者直接在一一种或多种靶上共价结合。在特别公开的实施方案中,配置为提供明视野信号包含选择用于信号传导缀合物的特定生色部分,其能够吸收约 5% 或更多的入射光。在特别公开的实施方案中,可以吸收约 20% 的入射光。

[0215] 组合物包含信号传导缀合物,其已配置为提供用于信号传导缀合物的生色部分的本文公开的特定最大波长。仅作为例子,信号传导缀合物配置为提供明视野信号,使得吸收峰具有如本文公开的 $\lambda_{\max}$ 。如本文公开的,通过配置不同的信号传导缀合物,以包含具有不同 $\lambda_{\max}$ 值的吸收峰的不同生色部分,还可以获得两个不同的吸收峰。通过选择为具有特定 FWHM 值,组合物还可以包含配置为提供明视野信号的多个信号传导缀合物。合适的 FWHM 值在本文中公开。在其他公开的实施方案中,多个信号传导缀合物的至少一部分具有选自本文提供的特定值的平均摩尔吸光系数。

[0216] 组合物的特别公开的实施方案还涉及多个信号传导缀合物,其在水中具有特定溶解度,例如本文提供的那些值。另外,多个信号传导缀合物还可以在水性缓冲溶液中稳定本文提供的时间段。

[0217] 在特别公开的实施方案中,组合物包含多个信号传导缀合物,其配置为在明视野照明下提供光学上明显的颜色,例如红色、橙色、黄色、绿色、靛蓝或紫罗兰色。光学上明显的颜色还可以是混合物,使得可以获得且显现第一光学上独特的颜色、第二光学上独特的颜色、第三光学上独特的颜色、第四光学上独特的颜色且甚至第五光学上独特的颜色。

[0218] 公开的组合物中存在的生物样品可以是如本文公开的组织或细胞学样品。在特别公开的实施方案中,生物样品可以包含两种靶,第一靶和第二靶,并且组合物可以进一步包含对于第一靶特异性的第一检测探针,和对于第二靶特异性的第二检测探针。

[0219] VII. 试剂盒

本文还公开的是试剂盒的实施方案,所述试剂盒包含与本文公开的成像系统一起使用的信号传导缀合物。在另一个实施方案中,试剂盒包括检测探针。在另一个实施方案中,试剂盒包括标记缀合物。在另一个实施方案中,试剂盒包括放大缀合物和次级标记缀合物。在另一个实施方案中,试剂盒可以进一步包含过氧化物溶液。在举例说明性实施方案中,试剂

盒包括检测探针。在举例说明性实施方案中,试剂盒的试剂包装在容器中,所述容器配置用于自动化载玻片染色平台上。例如,容器可以是配置用于 BENCHMARK Series 自动化 IHC/ISH 载玻片染色机的分配器。

[0220] 在举例说明性实施方案中,试剂盒包括在不同容器中包含的一系列试剂,所述不同容器配置为一起工作,以执行特定测定。在一个实施方案中,试剂盒包括在第一容器中的缓冲溶液中的标记缀合物。缓冲溶液配置为当试剂贮存于冷藏环境中且置于器械上时,维持标记缀合物的稳定性且维持特异性结合能力。在另一个实施方案中,试剂盒包括在第二容器中的水溶液中的信号传导缀合物。在另一个实施方案中,试剂盒包括在第三容器中的过氧化氢溶液,用于与信号传导缀合物同时用于样品。在第二或第三容器中,可以发现各种增强剂(例如嘧啶),用于增加酶通过其将潜在反应种类活化成反应种类的效率。在进一步的实施方案中,试剂盒包括放大缀合物。

[0221] 试剂盒可以包括广泛范围的混合测定(cocktail assays),包括 ULTRAVIEW SISH 检测试剂盒(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-001)、INFORM HER2 DNA 探针(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4332)、兔抗 DNP 抗体(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4335)、兔抗 HER2 (4B5)抗体(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-2996)、ULTRAVIEW 通用碱性磷酸酶 Red 检测试剂盒(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 760-501)、银洗涤(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-002)、和 / 或 INFORM 染色体 17 探针(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4331)。另一种混合测定是由(Ventana Medical Systems, Inc.)销售的 INFORM HER2 双重 ISH DNA 探针,其包括 INFORM HER2 双重 ISH DNA 探针混合物(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-4422)、HybReady (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-4409)、ultraView SISH DNP 检测试剂盒(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-098)、ultraView Red ISH DIG 检测试剂盒(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-505)、ultraView Siler Wash II (Ventana Medical Systems, Inc., p/n 780-003)、和 / 或 HER2 双重 ISH 3-in-1 异种移植载玻片(Ventana Medical Systems, Inc., p/n 783-4332)。可以使用其他混合测定。在福尔马林固定、石蜡包埋的人乳腺癌和胃癌的组织样本中,包括胃-食道交界处,经由两种颜色的生色 ISH,混合测定可以用于定量检测 HER2 基因的扩增,并且可以帮助评价关于其赫赛汀(曲妥珠单抗)可以是治疗选项的患者。在另外其他方案中,混合测定是由 Ventana Medical Systems, Inc., p/n 800-4422 销售的 VENTANA HER2 DNA 探针测定。名称为 MULTICOLOR CHROMOGENIC DETECTION OF BIOMAKERS 的美国专利申请号 11/809,024 (对应于美国专利公开号 2008/299555),以及名称为 METHOD FOR CHROMOGENIC DETECTION OF TWO OR MORE TARGET MOLECULES IN A SINGLE SAMPLE 的美国专利申请号 11/809,024 (对应于美国专利公开号 2011/0136130) 公开了物质、方案和样本处理技术,其可以与本文公开的系统、仪器和方法一起使用。还可以使用其他测定或混合测定。

[0222] 在一些实施方案中,组织样品根据 ISH 方案进行处理。通过使核苷酸(例如探针)的互补链与目的序列杂交,ISH 方案可以提供冷冻组织切片、固定 / 石蜡包埋的组织切片、或其他细胞制剂中的特异性核酸序列(例如 DNA、mRNA 等)的显现。ISH 方案可以包括但不限于双重 SISH 和 Red ISH 方案、单一 Red ISH 方案、单一 SISH 方案等。为了测定乳腺组织中的 HER2/ 染色体 17 比,图 1 的成像仪器 112 可以捕获图像,其包括银原位杂交信号、红色

原位杂交信号等。数字增强的图像 / 视频可以基于图像产生且在显示器上观察。组织基于对应于 HER2 基因和染色体 17s 的信号进行评分,以测定 HER2/CR17 比。基于该比率,样本的 HER2 基因测定为扩增或未扩增的。为了自动化评分乳腺组织样品,可以选择候选核用于定量分析。图 1 的处理装置 122 可以自动化计数不同特征(例如 HER2 基因、染色体 17s 等),并且测定特征数目的比率。可以评分另外的核。诊断可以至少部分基于该比率而作出。结果可以展示在图 1 的显示器 114 上。为了评估组织样品(例如乳腺组织)是否是癌,通过评估 HER2 基因信号数目与染色体 17 信号数目的比率,通过例如检测基因的扩增,图 1 的处理装置 122 可以帮助用户获得关于所选区域的信息。

[0223] VIII. 结论

本文公开的技术可以用于不同类型的生物样品。生物样品可以是组织样品或从受试者中取出的样品(例如任何细胞集合)。组织样品可以是在生物内执行相似功能的互联细胞的集合。生物样品还可以是得自任何活生物,由任何活生物排泄或由任何活生物分泌的任何固体或流体样品,所述活生物包括但不限于单细胞生物,例如细菌、酵母、原生动物和阿米巴,多细胞生物(例如植物或动物,包括来自健康或外表健康的人受试者,受待诊断或调查的状况或疾病例如癌症影响的人患者的样品)。在一些实施方案中,生物样品可固定到显微镜载玻片上,并且包括但不限于组织切片、器官、肿瘤切片、涂片、冰冻切片、细胞学制剂或细胞系。切取活组织检查、穿刺活组织检查、切除活组织检查、针吸活组织检查、芯针穿刺活组织检查、立体定位活组织检查、切开活组织检查或手术活组织检查可以用于获得样品。

[0224] 生物样品可以由标准显微镜载玻片携带,所述标准显微镜载玻片由玻璃例如硅硼玻璃(例如 BK7 玻璃)制成。载玻片可以具有约 3 英寸(75 mm)的长度、约 1 英寸(25 mm)的宽度和约 1 mm 的厚度。可以使用由不同材料制成且具有不同尺寸的载玻片。盖玻片也可以由玻璃(例如硅硼玻璃)或者其他光学上透明或半透明的材料(例如塑料或聚合物)制成。载玻片(例如图 3 的载玻片 134)和盖玻片(例如图 3 的盖玻片 139)可以是基本上平坦的基底。术语“基本上平坦的基底”指的是但不限于具有至少一个基本上平坦的表面的任何物体,但更通常为在物体的相对侧面上具有两个基本上平坦的表面的任何物体,并且甚至更通常为具有相对的基本上平坦的表面的任何物体,所述相对表面一般在大小中相等,但大于物体上的任何其他表面。成像系统和技术可以进行修饰,用于与其他类型的样本运载工具一起使用。

[0225] 通过重新定义图像的光谱特征,使得靶向特征最佳地被观察者察觉,本文公开的成像系统可以利用不同类型的多光谱图像。例如,可以执行颜色重新定义和 / 或对比增强,以更佳地视觉上区分每种靶特征且适合观察者的颜色敏锐度。在实施方案中,图 1 的图像捕获装置 120 是多光谱照相机,并且图 1 的处理装置 122 可以执行颜色的光谱分离或相似技术,作为重新定义的部分,以提供最佳的颜色分离。颜色的光谱分离可以使用已知的分离算法执行,包括但不限于美国专利号 8,285,024 和 PCT 申请 PCT/EP2012/058253 (PCT 公开号 W02012/152693) 中公开的仪器、算法和方法。另外,可以对分离的图像执行基于组织的分析、基于细胞的分析或其他类型的分析。分离的图像中的一个或多个可以重新定义,并且分离的图像中的两个或更多个可以合并,以产生一个或多个增强图像(例如假彩色合成图像)。

[0226] 需要时,实施方案的方面可以进行修饰,以采用本文描述的各个专利、申请和出

版物的概念,以提供再进一步的实施方案。例如,本文公开的系统、方法和仪器可以与下述中公开的实施方案和概念一起使用:于2012年3月27日提交的美国临时专利申请号61/616,330,于2012年10月5日提交的美国临时专利申请号61/710,607,以及于2012年3月12日提交的美国临时专利申请号61/778,093。

[0227] 考虑到本发明的原则可以应用于其的许多可能实施方案,应认识到举例说明的实施方案仅是本发明的优选例子,并且不应视为限制本发明的范围。相反,本发明的范围由下述权利要求限定。我们因此请求在这些权利要求的范围和精神内的全部作为本发明。

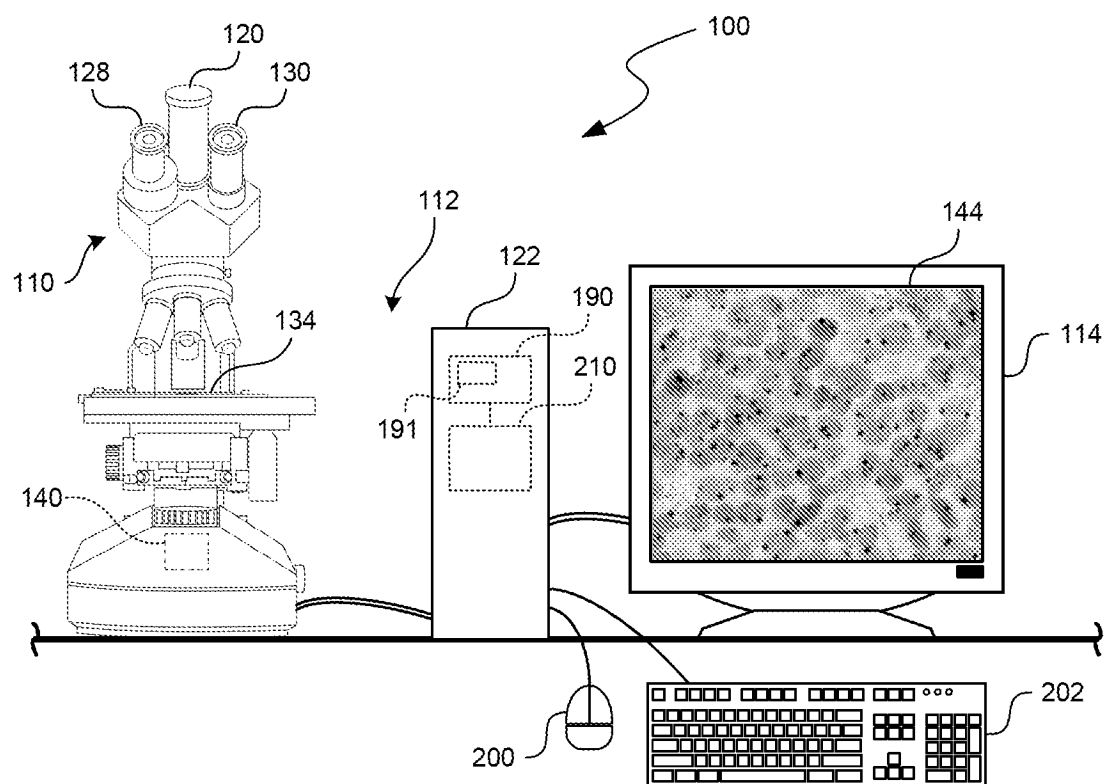


图 1

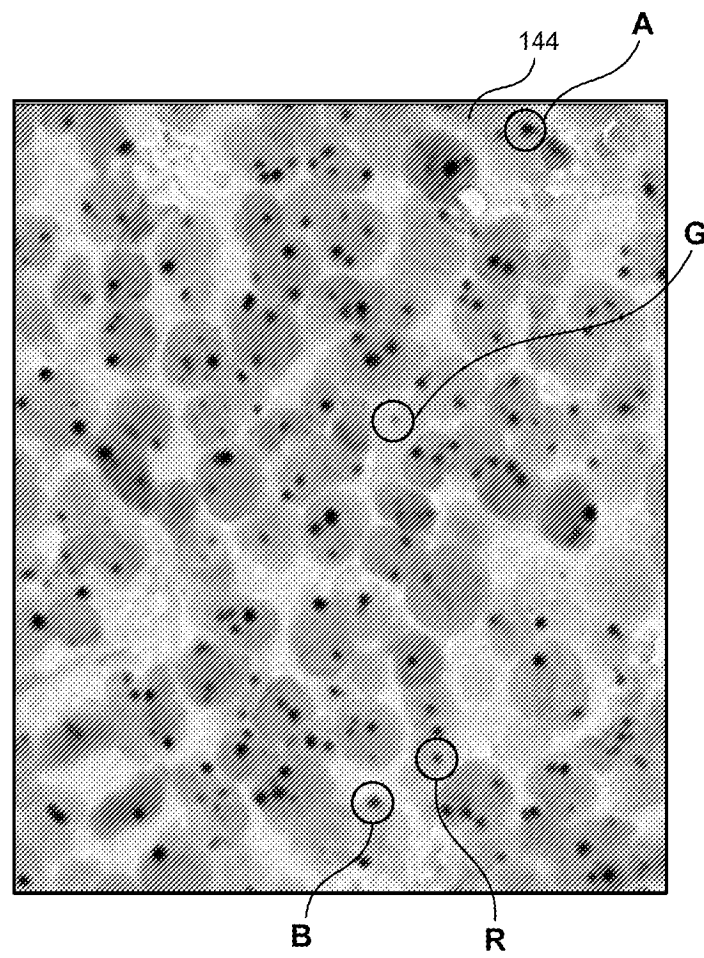


图 2 (A)

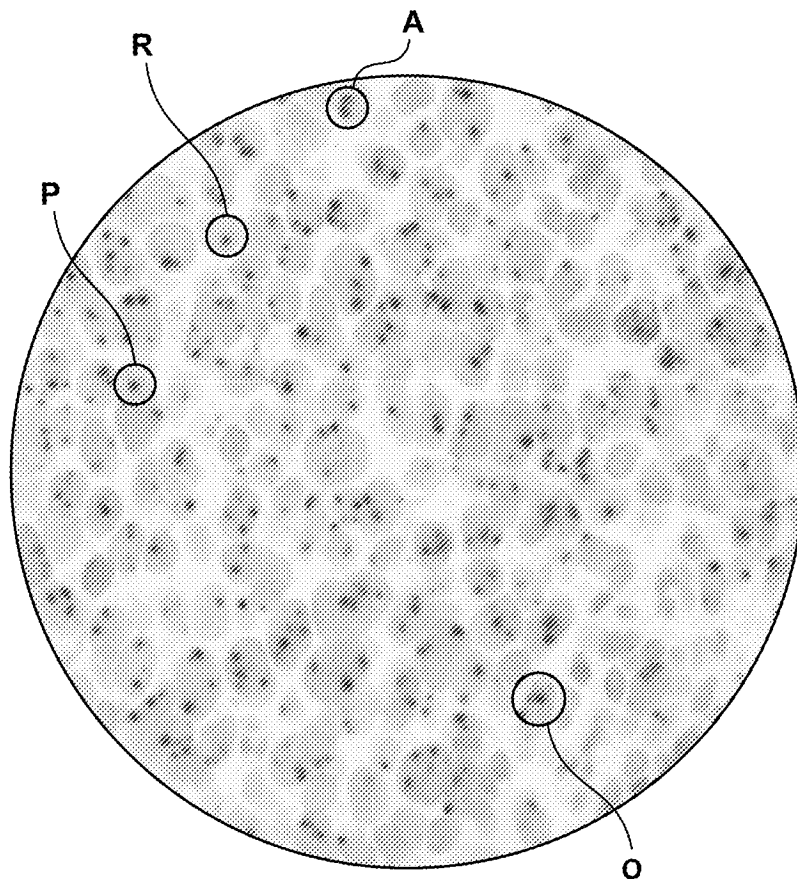


图 2 (B)

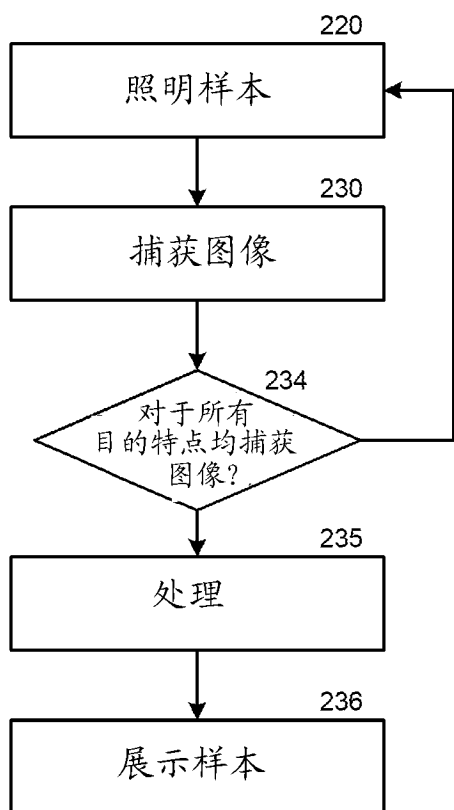


图 4

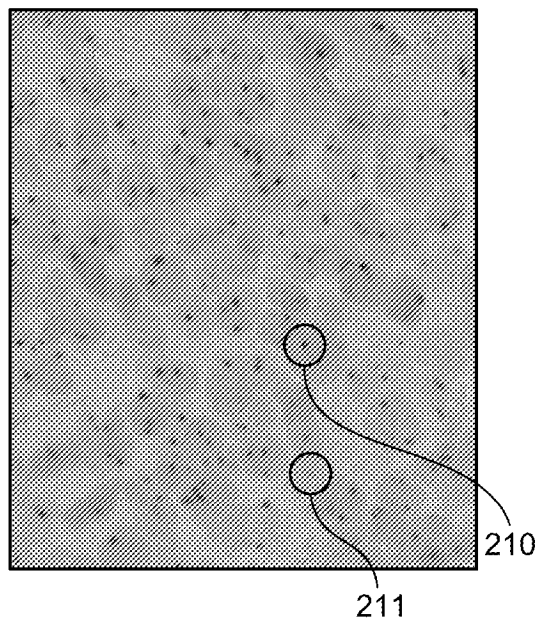


图 5(A)

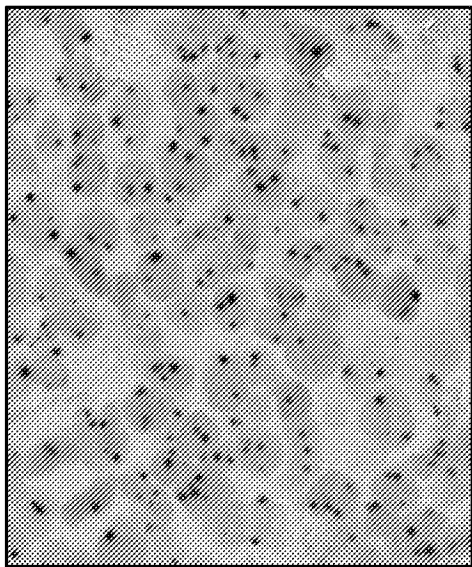


图 5(B)

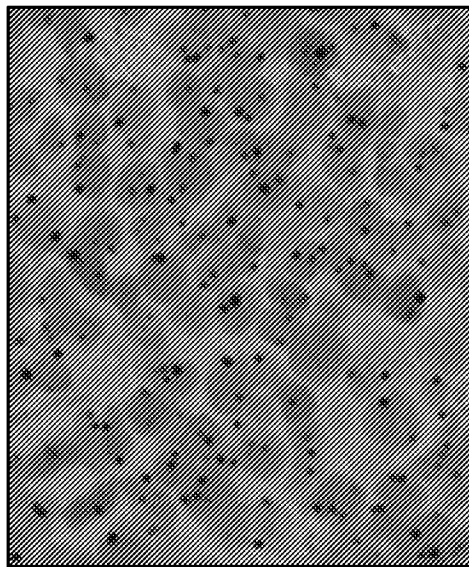


图 5(C)

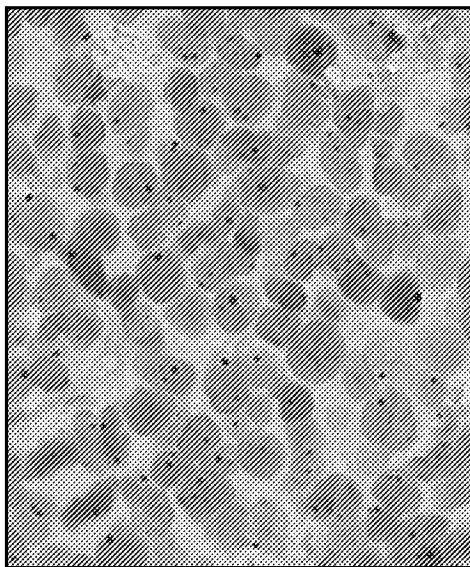


图 5(D)

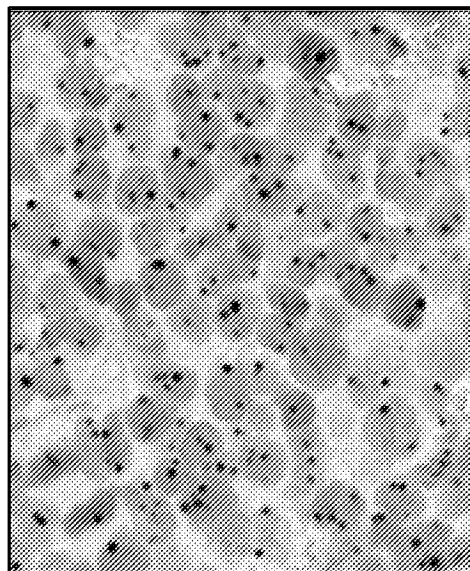


图 5(E)

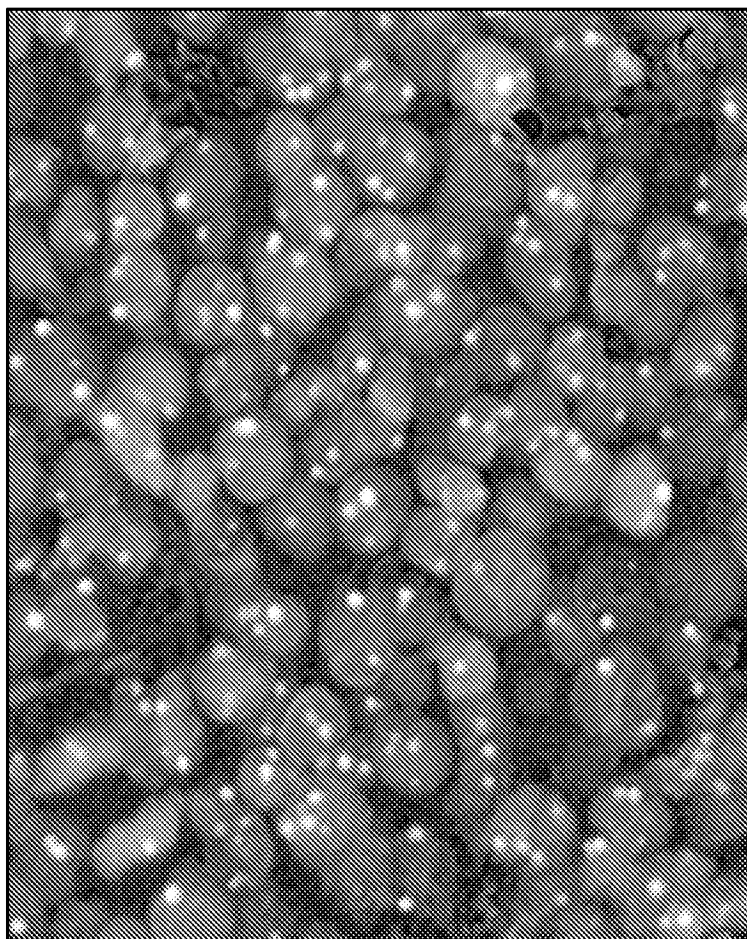


图 6

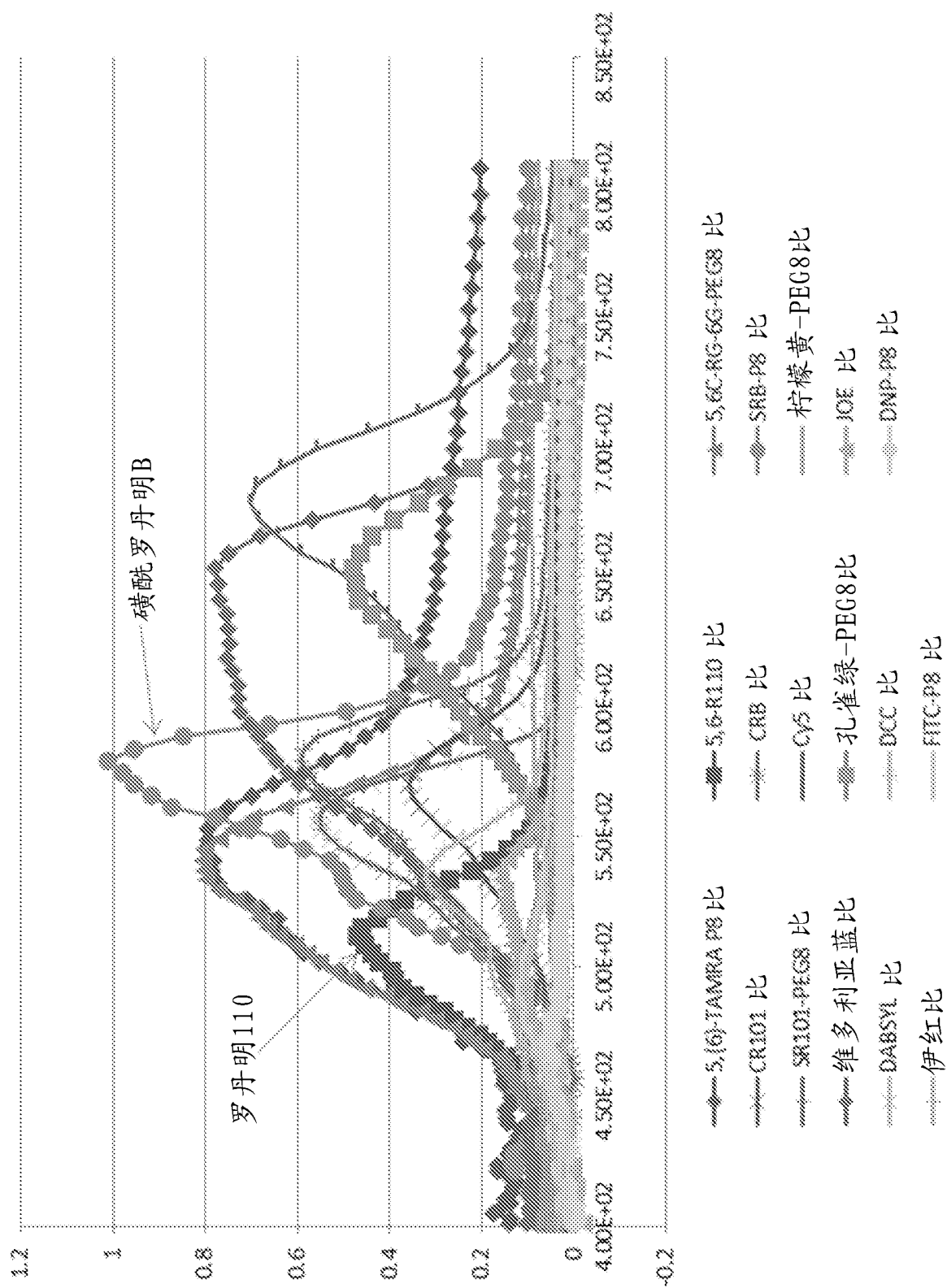


图 7

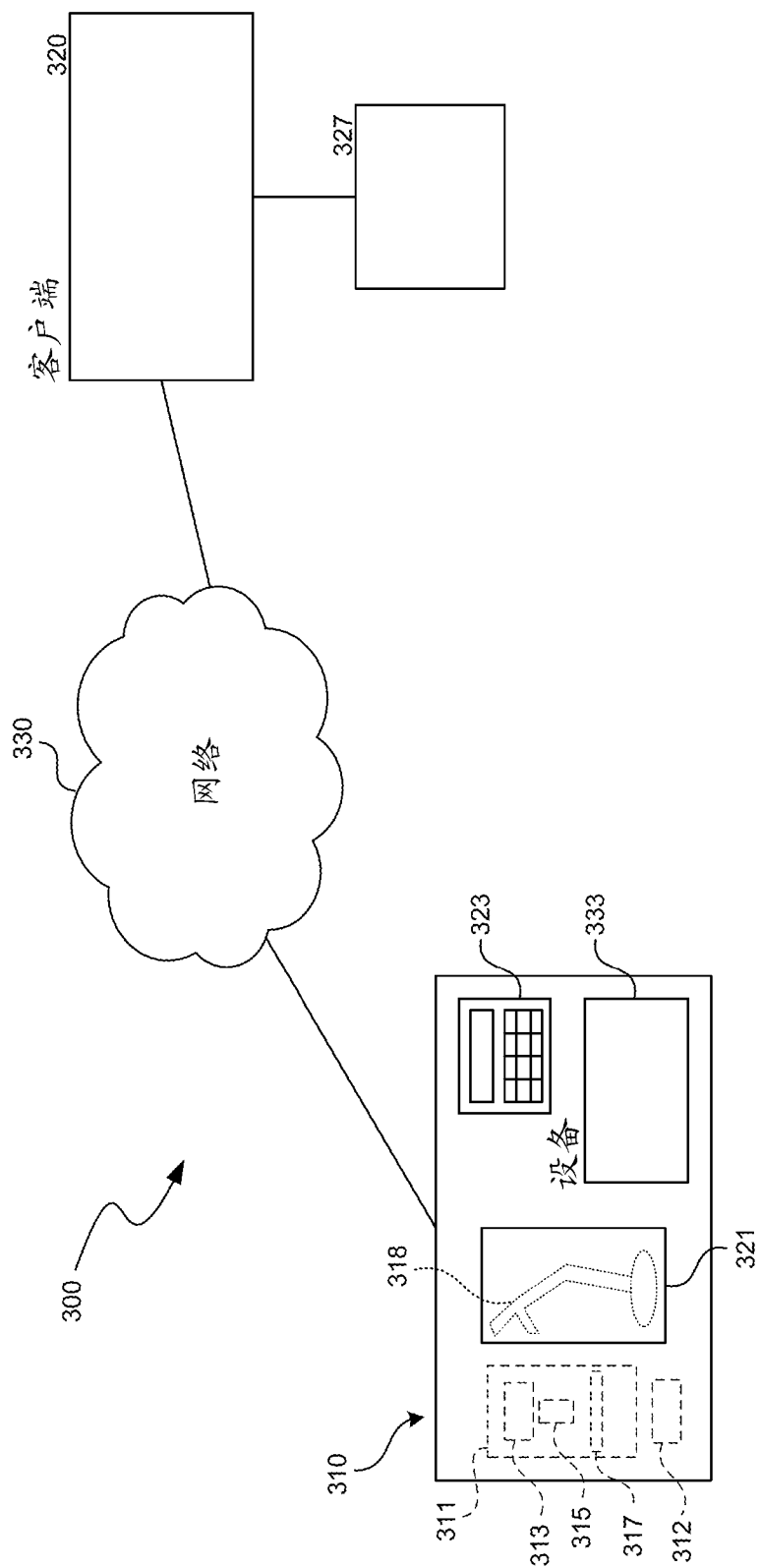


图 8

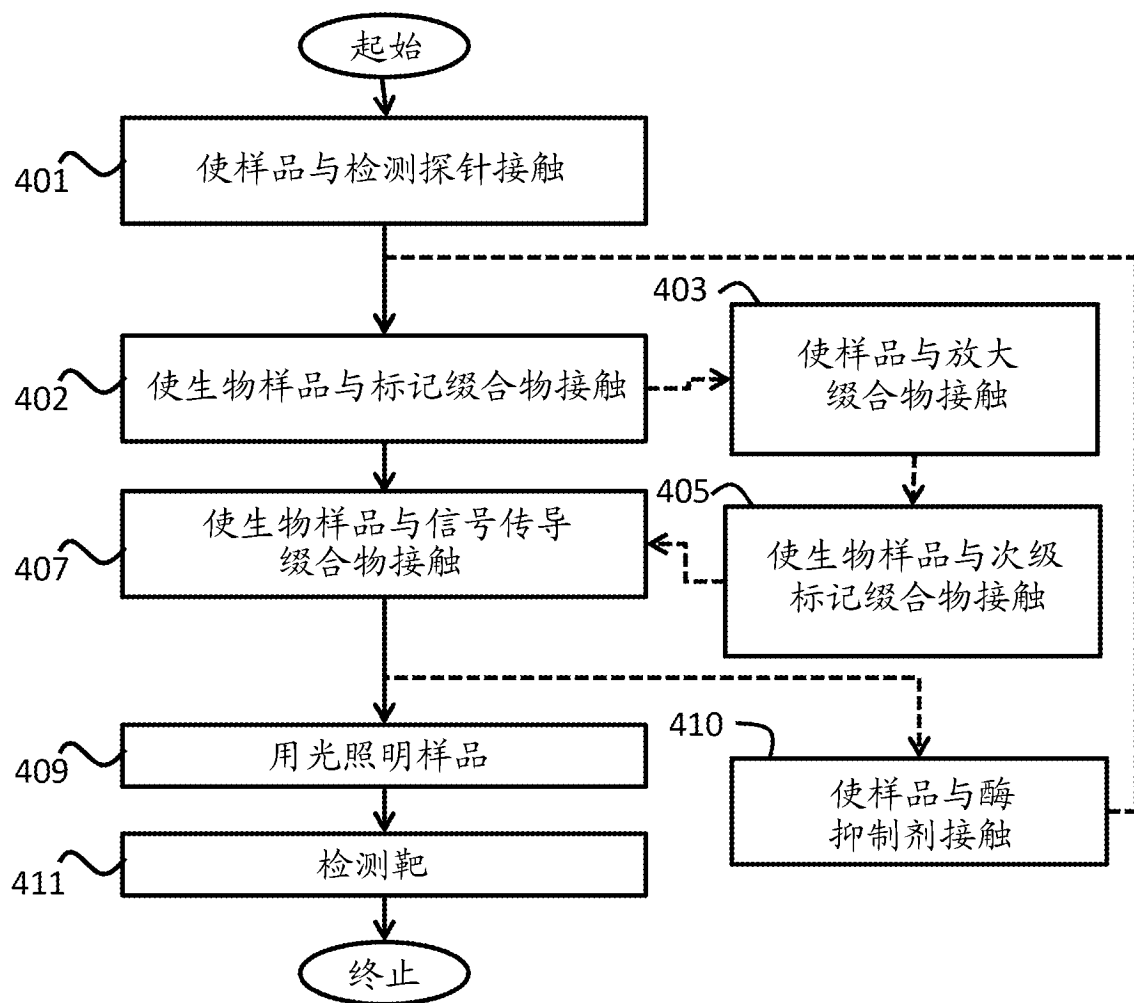


图 9

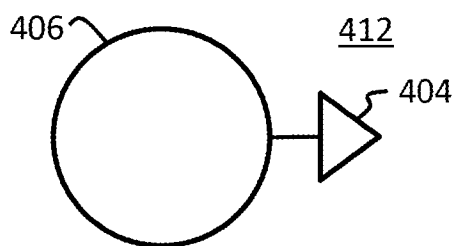


图 10(A)

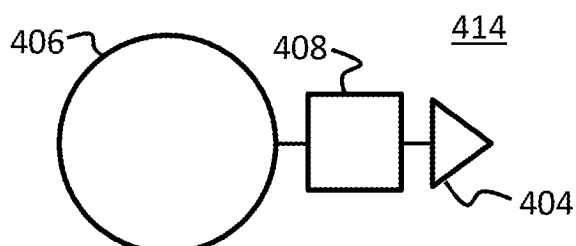


图 10(B)

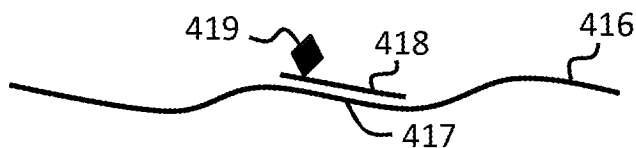


图 11(A)

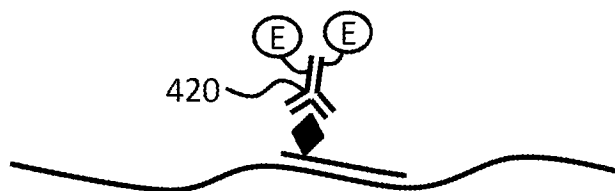


图 11(B)

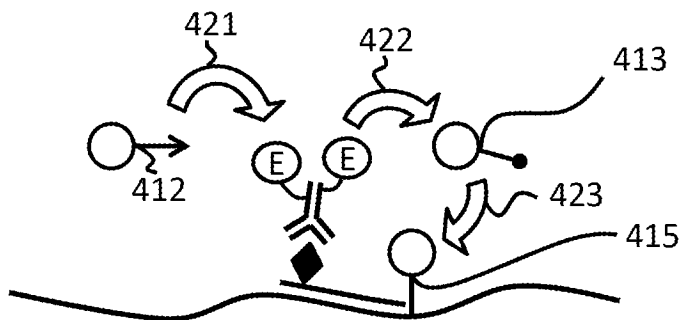


图 11(C)

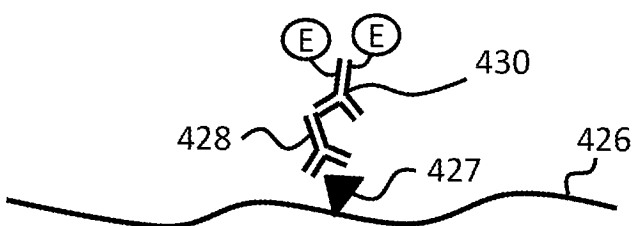


图 11(D)

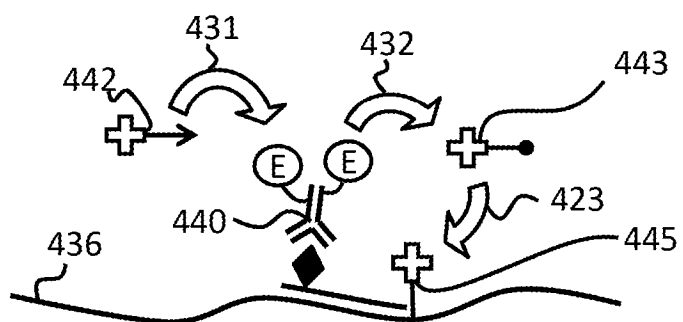


图 11(E)

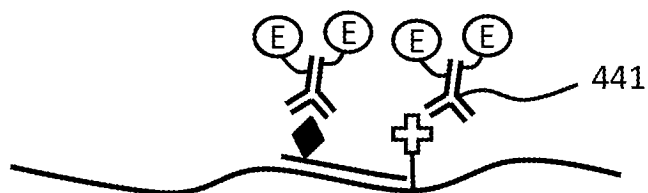


图 11(F)

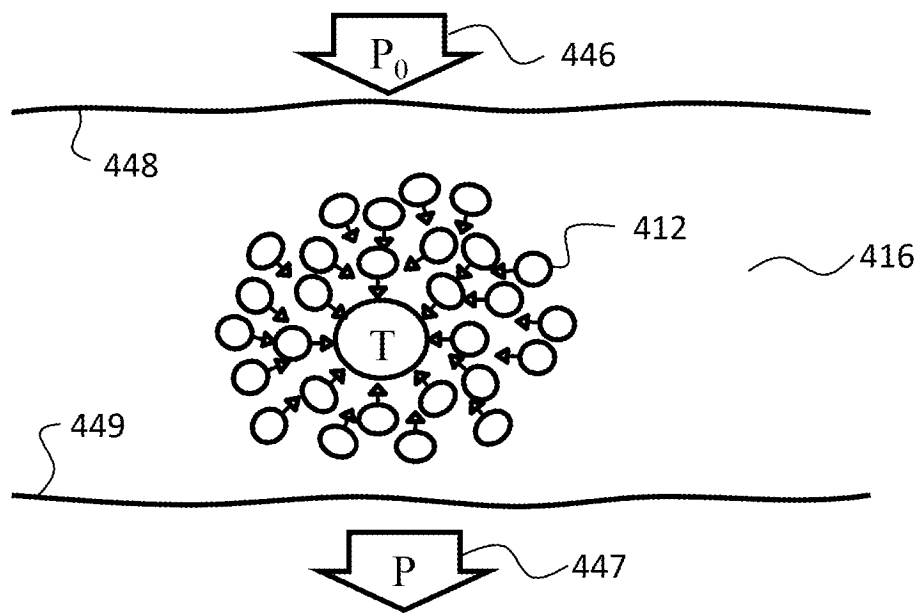


图 12(A)

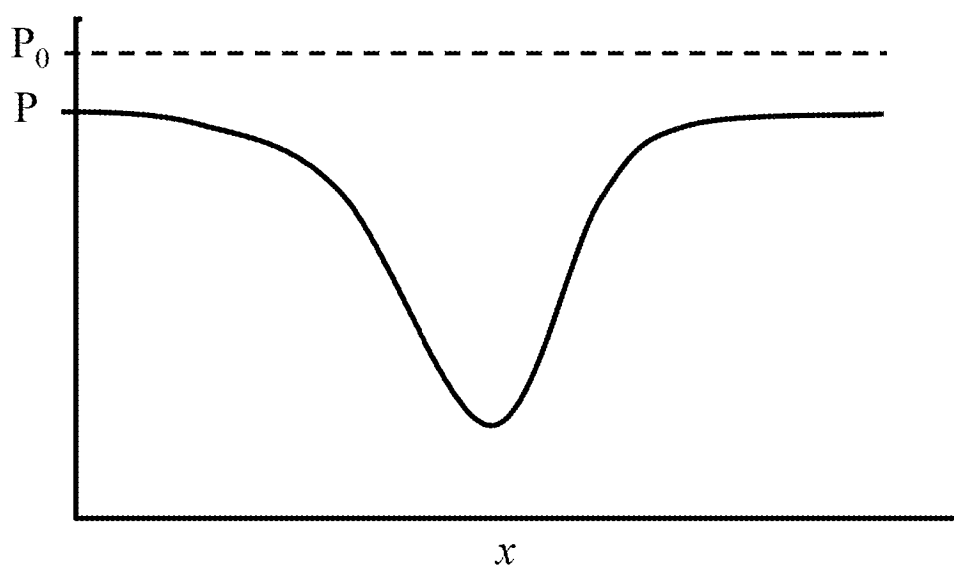


图 12(B)

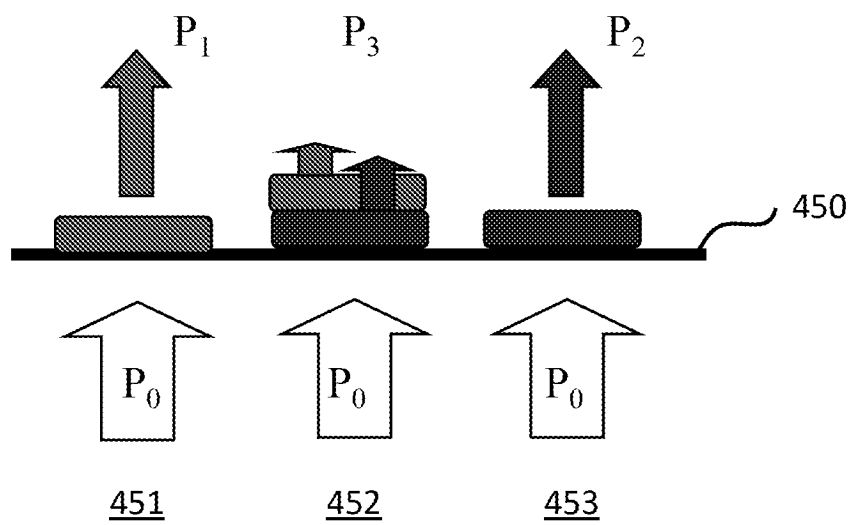


图 13(A)

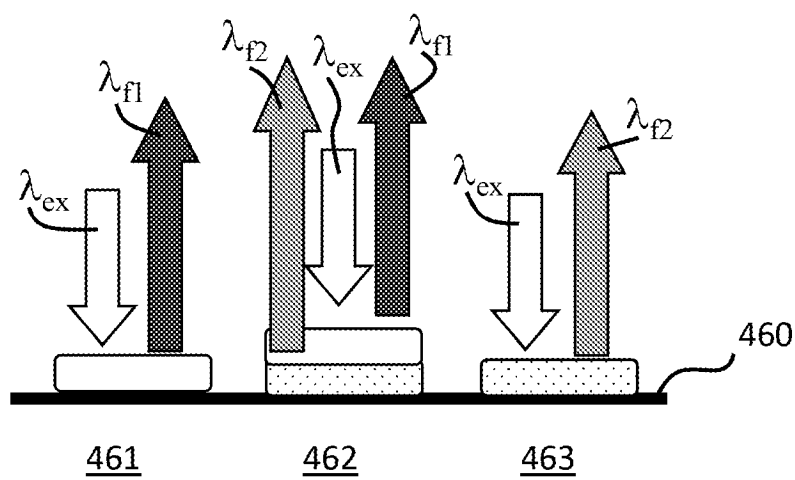


图 13(B)

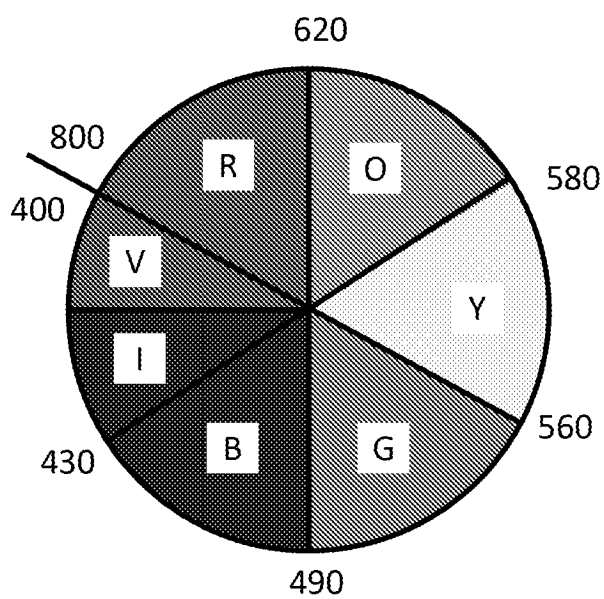


图 14(A)

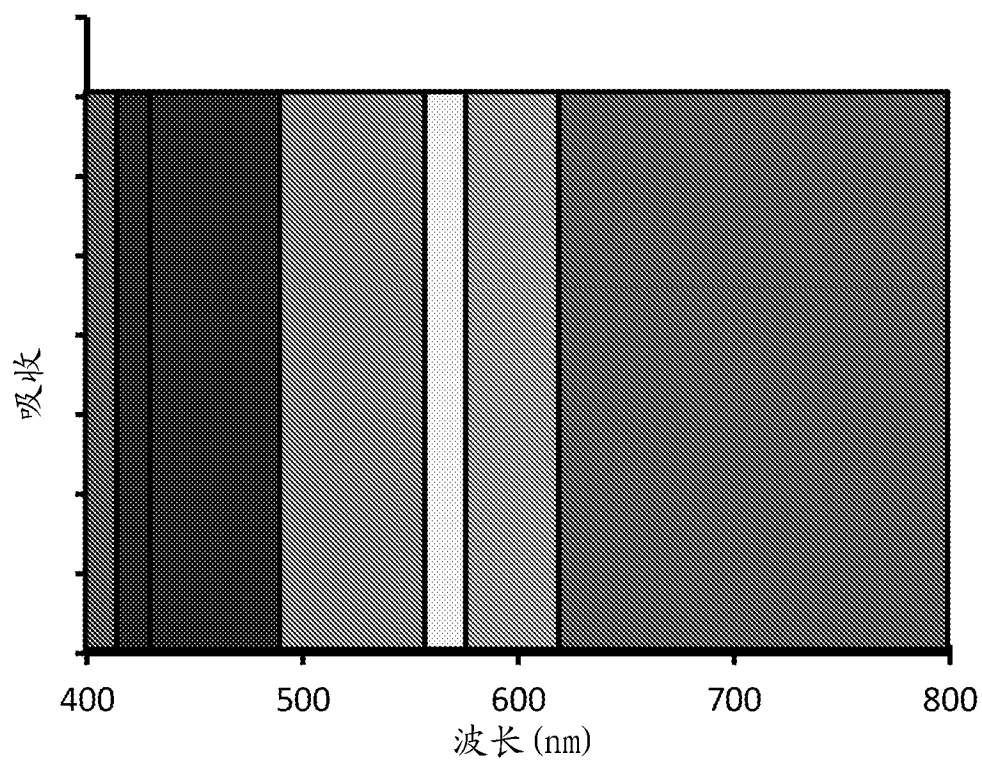


图 14(B)

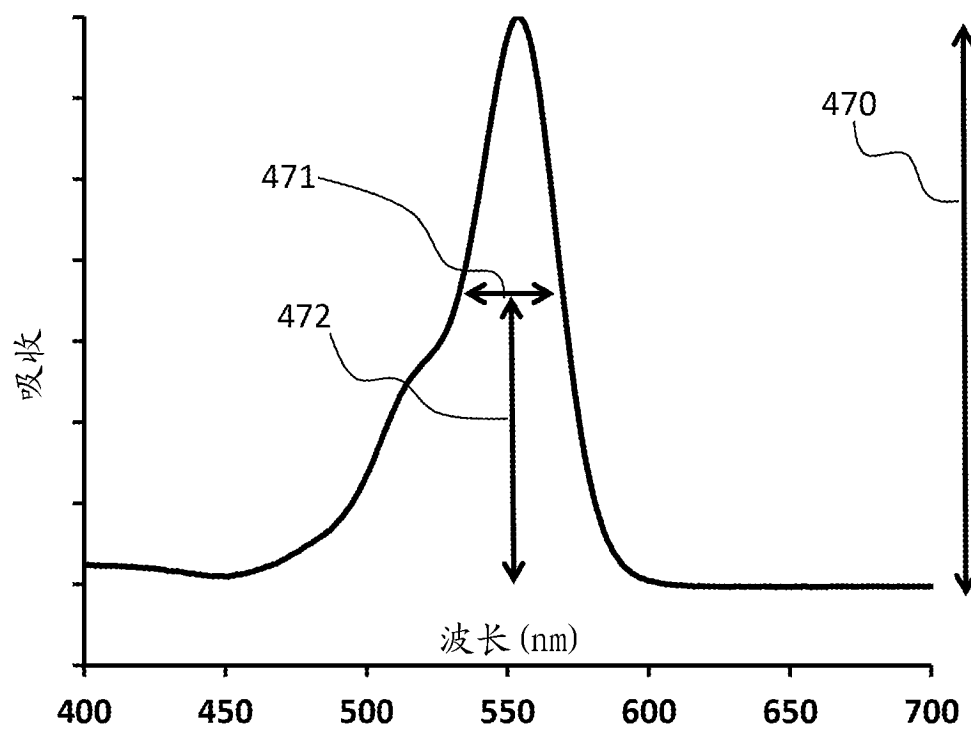


图 15(A)

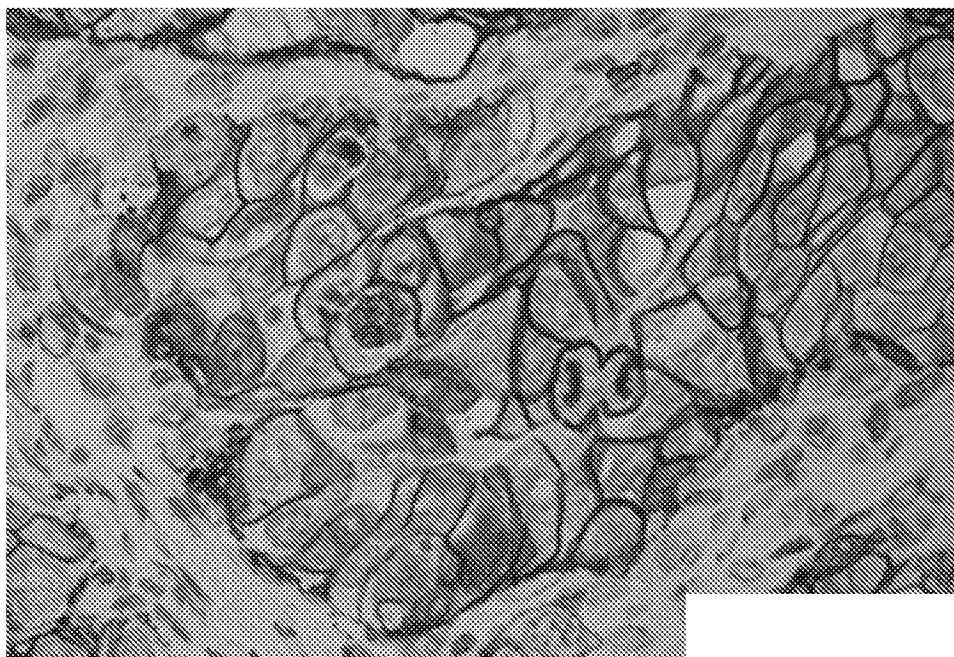


图 15(B)

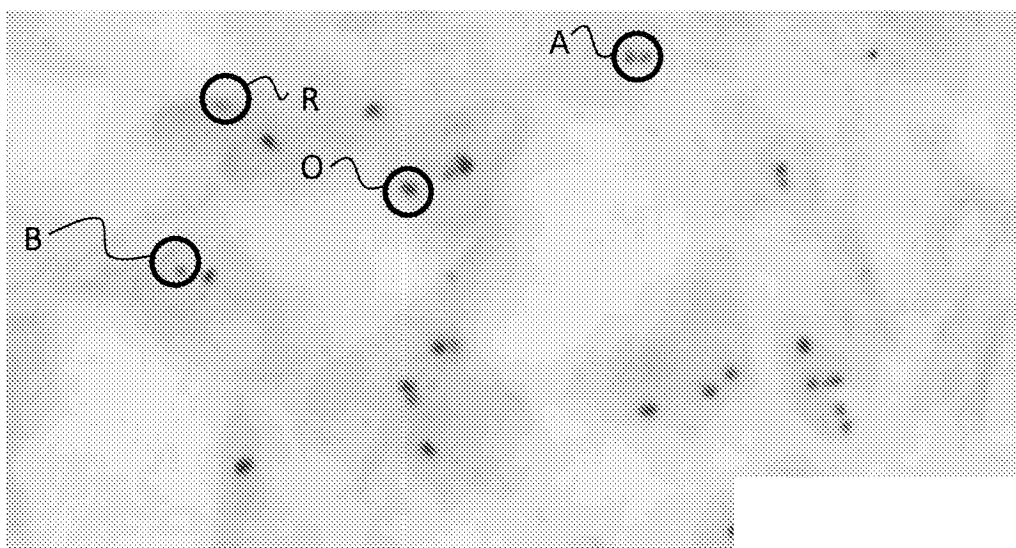


图 16(A)

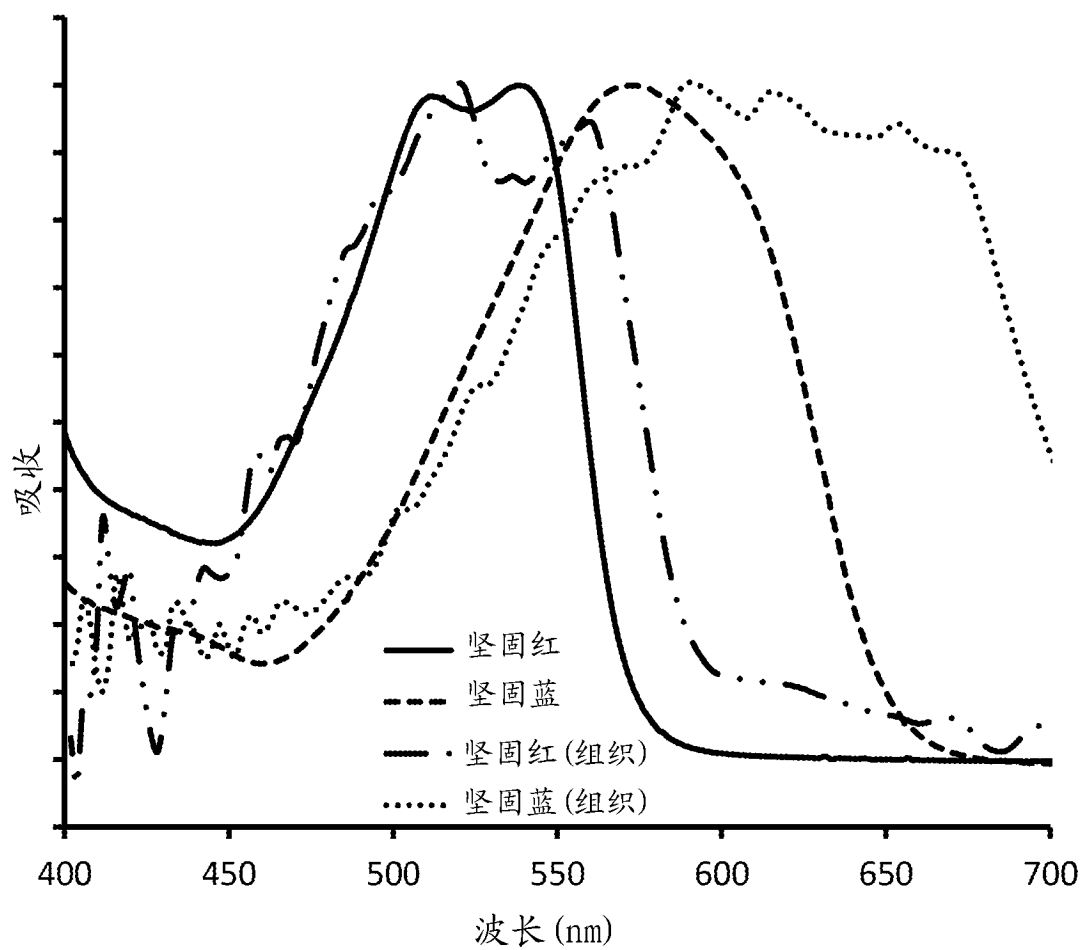


图 16(B)

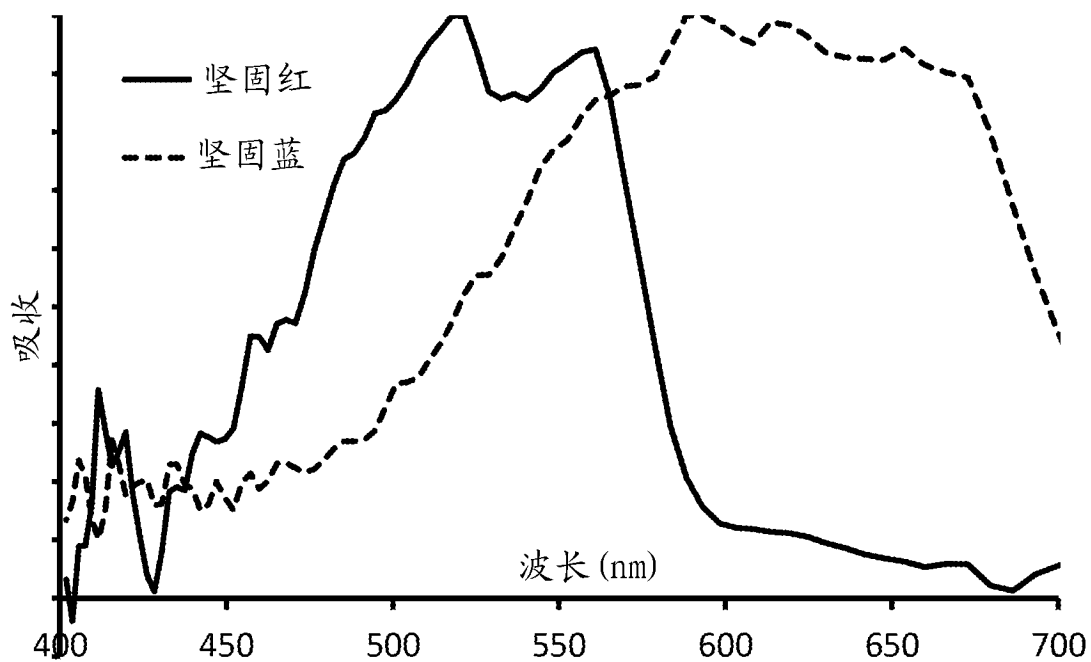


图 17(A)

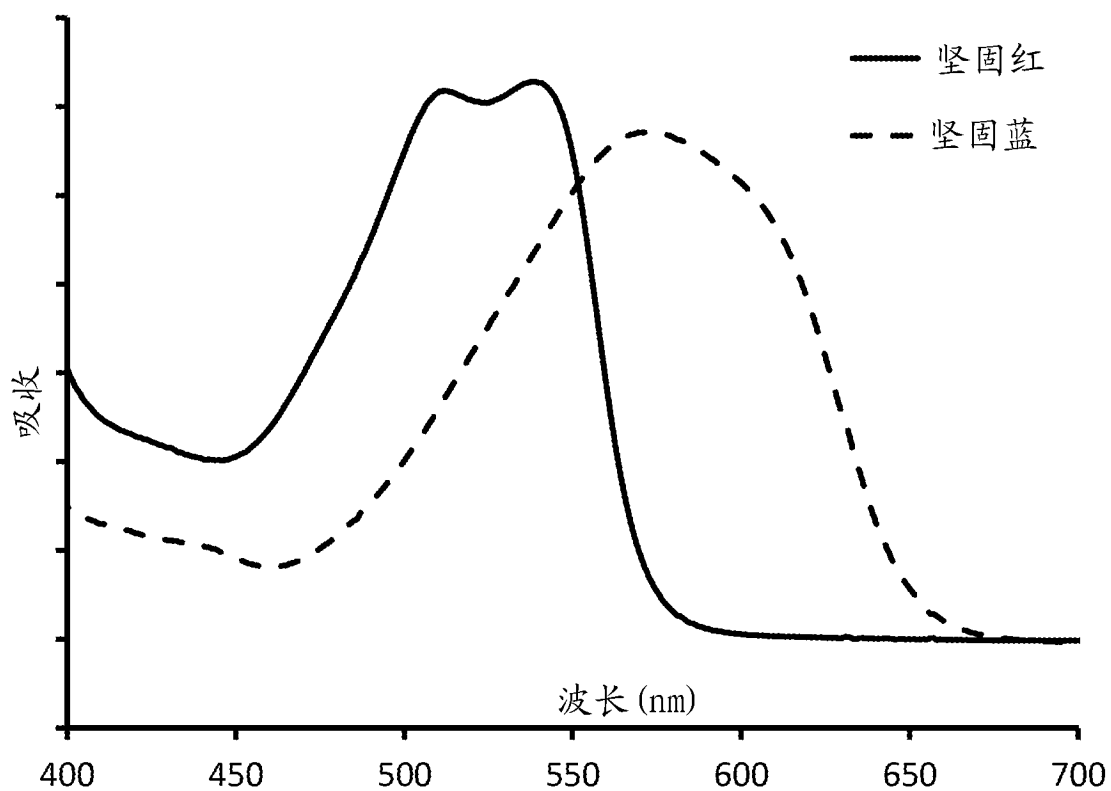


图 17(B)

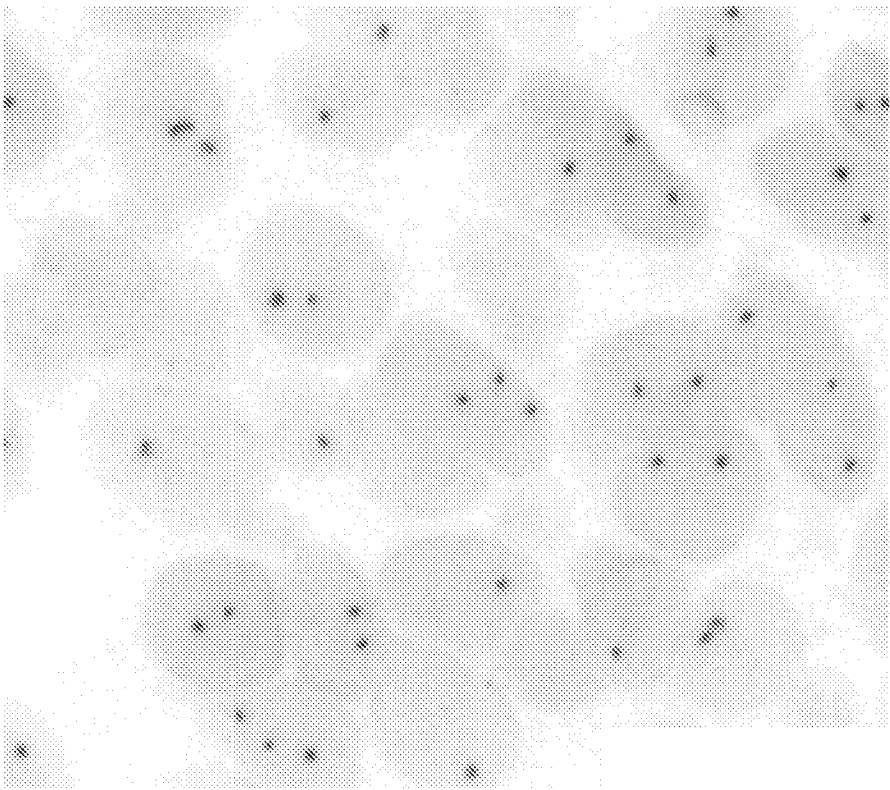
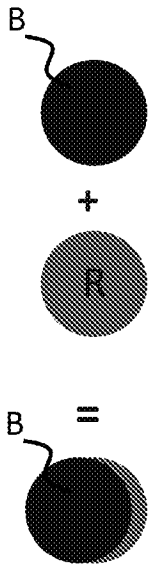


图 18(A)

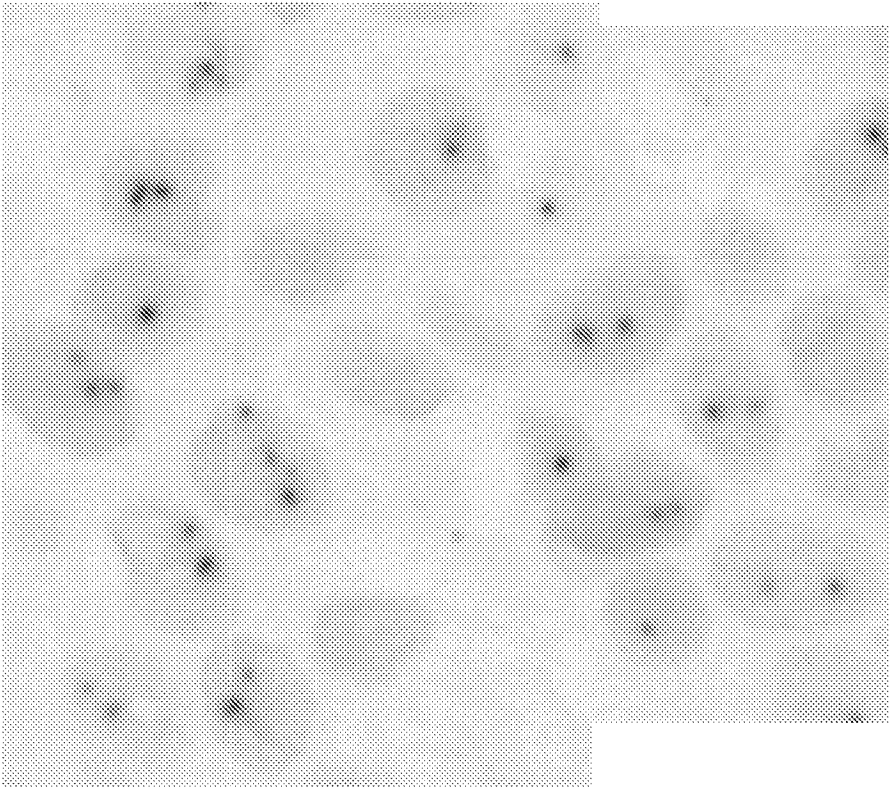
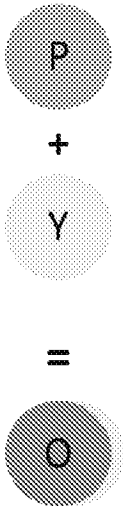


图 18(B)

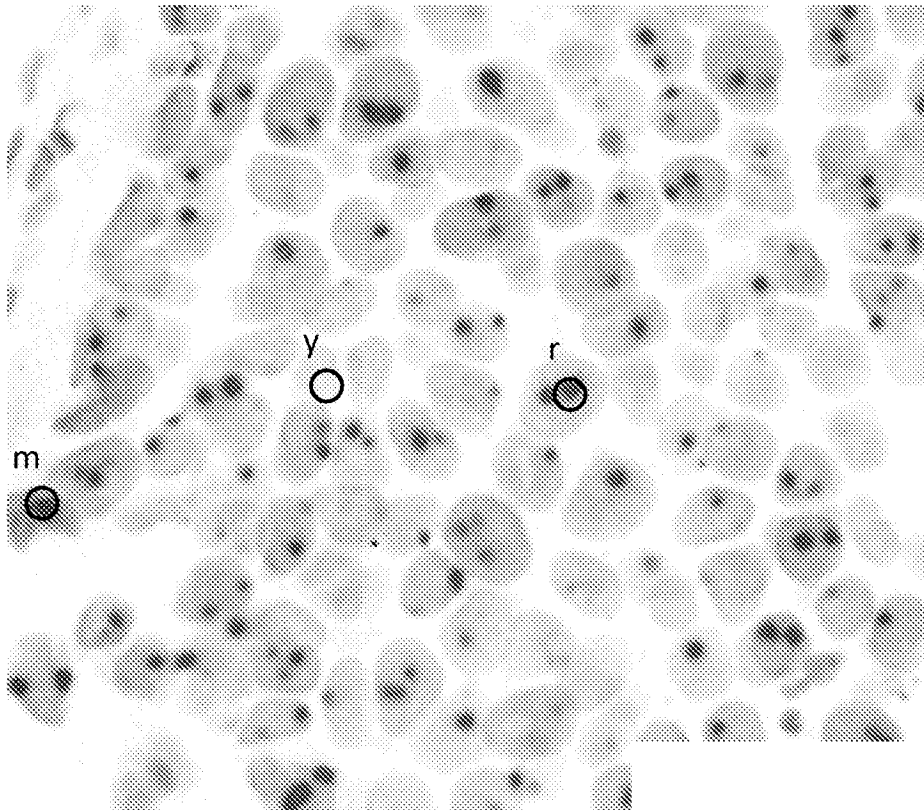


图 19(A)

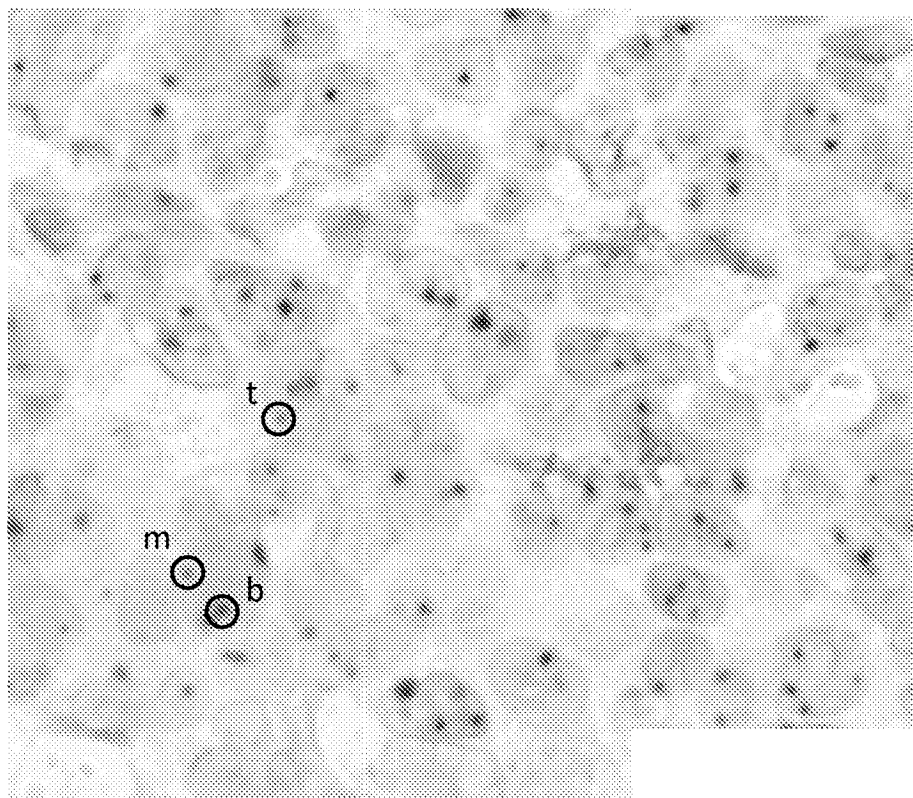


图 19 (B)

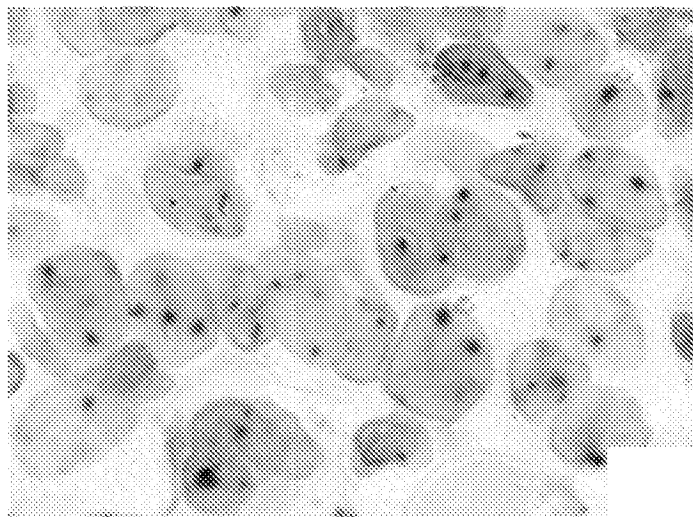


图 20 (A)

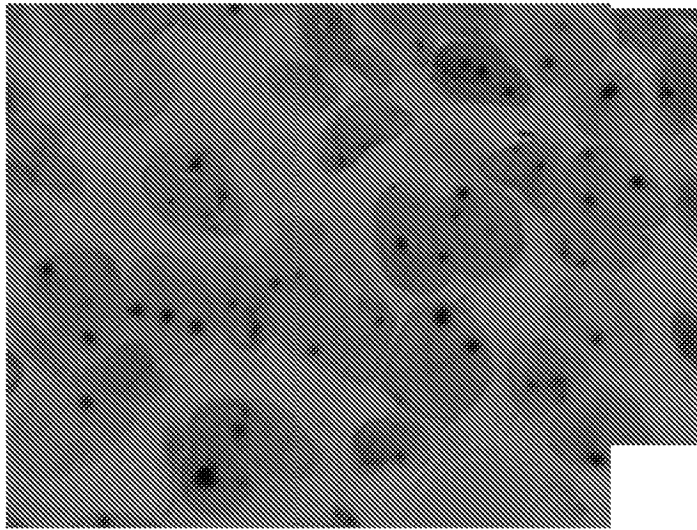


图 20 (B)

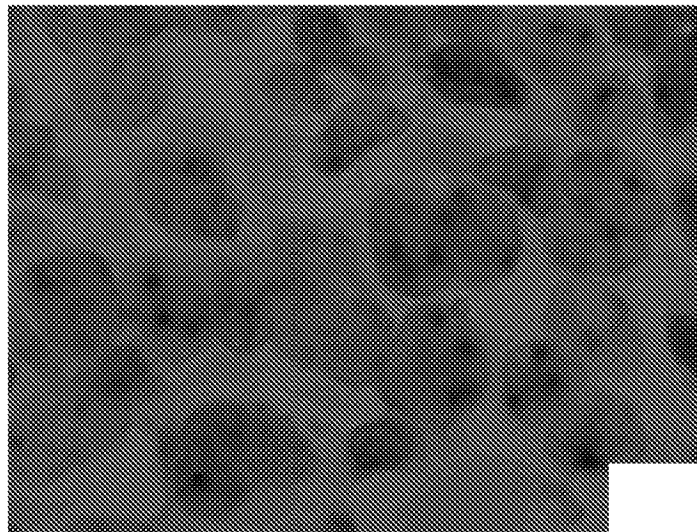


图 20 (C)

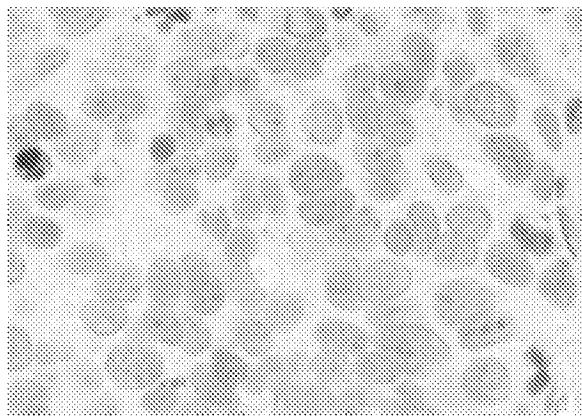


图 21(A)

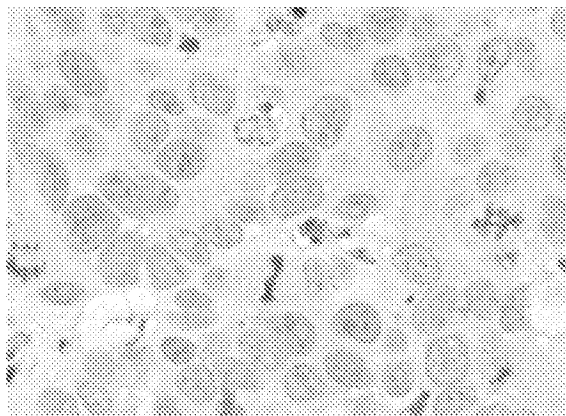


图 21(B)

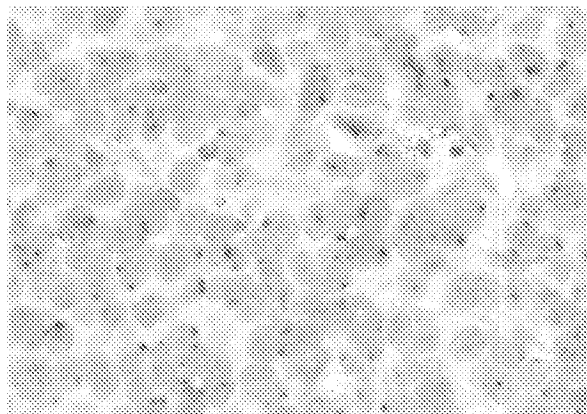


图 22(A)

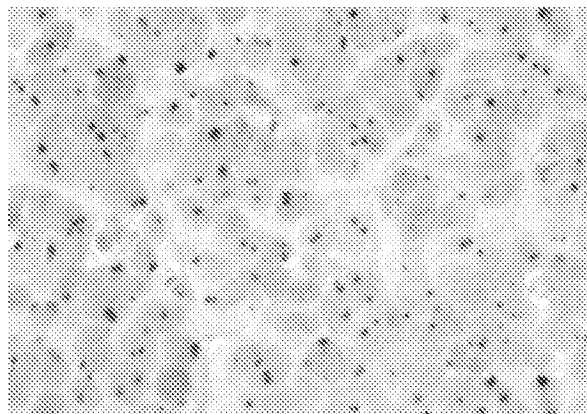


图 22(B)

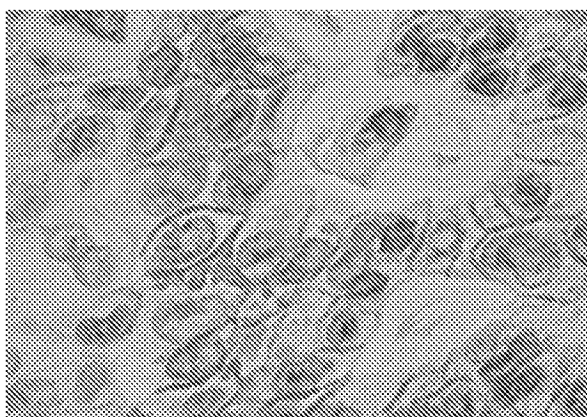


图 23(A)

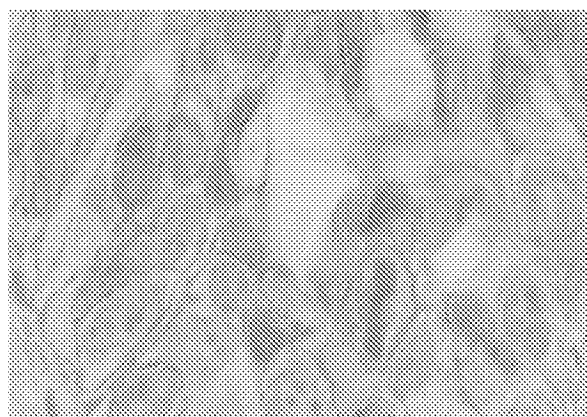


图 23(B)

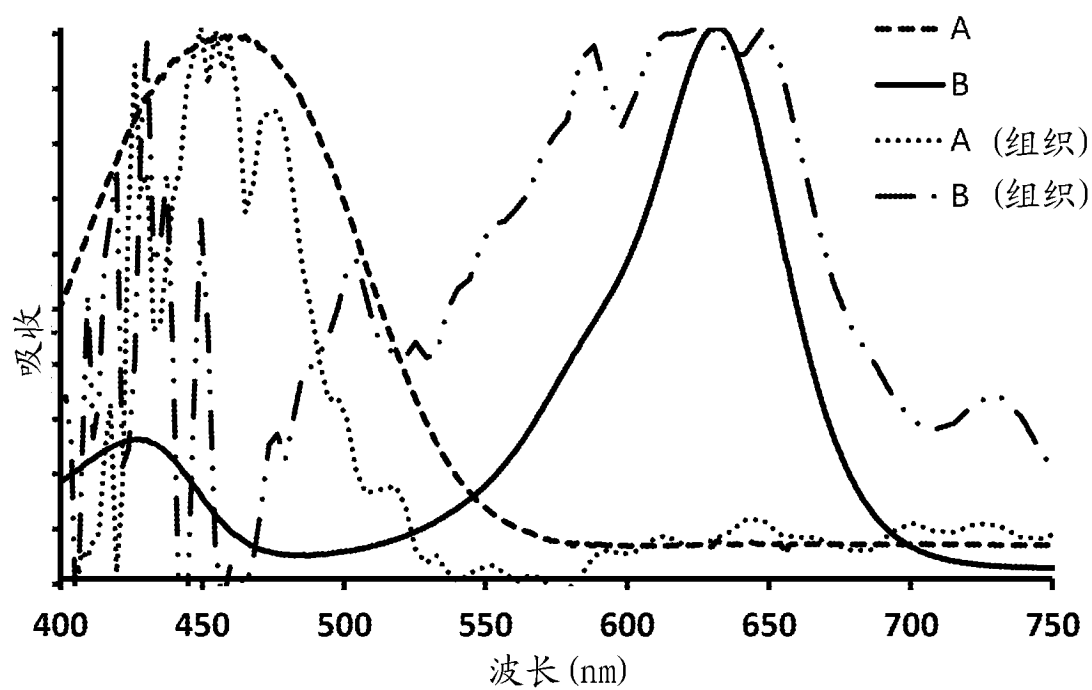


图 24