

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 1/30 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99805028.8

[45] 授权公告日 2008年7月16日

[11] 授权公告号 CN 100403008C

[22] 申请日 1999.2.26 [21] 申请号 99805028.8

[30] 优先权

[32] 1998.2.27 [33] US [31] 60/076,198

[86] 国际申请 PCT/US1999/004181 1999.2.26

[87] 国际公布 WO1999/044030 英 1999.9.2

[85] 进入国家阶段日期 2000.10.13

[73] 专利权人 文塔纳医疗系统公司

地址 美国亚利桑那州

[72] 发明人 威廉·理查兹 查尔斯·D·莱米

金伯利·克里斯坦森

埃塞尔·R·麦克雷

[56] 参考文献

US5273905A 1993.12.28

US5645114A 1997.7.8

US5645144A 1997.7.8

US5075079A 1991.12.24

US4384193A 1983.5.17

审查员 贺文晶

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 范明娥

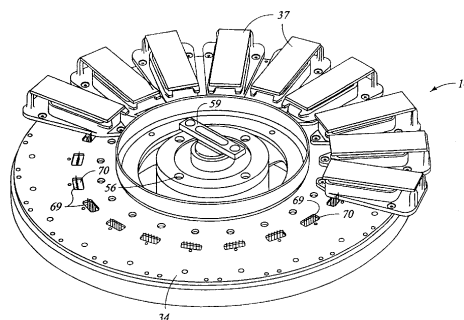
权利要求书3页 说明书23页 附图16页

[54] 发明名称

对组织样品进行处理的方法及装置

[57] 摘要

本发明提供一种自动操作对多个固定在显微镜载片(37)上的组织样品进行染色或处理的装置和方法,根据本发明通过加热系统实现对单独载片的温度控制,该装置包括辐射状安置在用于加热各载片(37)和传感各载片温度的圆片传送带(34)上的加热平台(64),如果需要,该加热系统也允许自动脱蜡。



1. 一种对旋转的圆盘传送带上的安装在许多载片上的组织样品进行处理的方法, 包括:

提供多个安装在旋转的圆盘传送带上的加热器, 每个所述的加热器适合接受载片, 其中, 每个载片的温度可独立控制;

用安装在所述旋转的圆盘传送带上的控制电子件控制所述多个加热器中的每一个的加热; 和

处理所述组织样品, 其中, 所述处理包括通过所述加热器之一加热至少一载片。

2. 根据权利要求1的方法, 其中所述处理步骤还包括使用选自核酸探针、核酸引物、抗体和染料的可检测的染色。

3. 根据权利要求1的方法, 其中所述的处理步骤还包括选自洗涤、漂洗、干燥、覆盖、混合、培育、和冷却的自动过程。

4. 根据权利要求1的方法, 其中至少所述加热器中之一能够将载片加热到至高达94℃的温度。

5. 根据权利要求1的方法, 其中所述组织样品是选自肿瘤切片、器官切片、冷冻切片、体液、涂片、细胞学制剂和细胞系的样品。

6. 根据权利要求1的方法, 其中所述处理步骤还包括施加流体以去除石蜡的步骤。

7. 一种向多个生物材料自动施加试剂的装置, 该装置包括:

包括多个将载片安装在圆盘传送带上的位置的旋转的圆盘传送带;

用于多个载片中的每一个的单独加热单元, 其中, 每个所述的单独加热单元具有监测和控制所述生物材料温度的装置, 其中每个单独加热单元位于所述旋转的圆盘传送带上; 以及

也位于旋转的圆盘传送带上的用于监测和控制所述生物材料温度的装置。

8. 根据权利要求7的装置, 其中每个所述加热单元与来自相邻加热单元的热传递热隔离。

9. 一种采用权利要求1的方法同时处理二个或多个安装在载片上的组织样品的方法, 还包括步骤:

(i)将多个加热器中的二个或多个加热器用于对需要处理的安装在每个载片上的组织样品进行加热，其中每个加热器温度由计算机单独控制；以及

(ii)同时进行所述处理。

10. 根据权利要求9的方法，其中所述的处理选自DNA变性、DNA复原、探针杂化、和杂化后洗涤。

11. 一种从固定在载片上的组织切片中去除包埋介质的方法，包括步骤：

(a)使用权利要求9的处理方法加热载片；和

(b)向载片自动施加流体流。

12. 一种改进对固定到载片上的细胞中的目标分子的染色的可达性的方法，包括步骤：

(a)使用权利要求9的处理方法加热载片，和

(b)自动向载片施加水溶液。

13. 一种进行原位PCR的方法，以对固定在显微镜载片上的细胞中的目标核酸进行扩增，包括步骤：

(a)提供权利要求7的装置；

(b)向所述细胞施加一组PCR试剂；

(c)使用所述加热单元以使所述细胞进行足以扩增所述目标核酸的热循环；和

(d)检测所述扩增的目标核酸。

14. 一种用于对多个显微镜载片保持不同靶温度的显微镜载片加热系统，包括：

对多个载片的每一片产生热输出的加热单元；

用于支持加热单元的旋转的圆盘传送带；

用于多个载片的每一片的温度传感器；和

与温度传感器连通的处理器；和

用于对多个载片的每一片改变加热单元热输出的装置，用于改变与处理器连通的装置。

15. 权利要求14中的用于对多个显微镜载片保持不同靶温度的显微镜载片加热系统，其中所述的用于对多个载片的每一片用于改变加热单元热

输出的装置包括用于改变加热单元的工作循环的装置。

## 对组织样品进行处理的方法及装置

本申请是1998年2月27日递交的美国申请No.60/076198的继续申请，该申请的主要内容包括在本申请中作为参考。

### 发明领域

本发明是关于一种用于诊断性分子病理学的装置，具体是关于用来对置于显微镜载片上的组织样品自动进行染色和/或处理的装置。

### 发明背景

分子病理学是指在分子水平检测引发疾病或是与疾病相关的DNA、mRNA和蛋白质。通过这种检测可获得有关患者的诊断，预后和治疗选择的重要信息。分子病理学的实践一般分成二个主要方面：(i)对完整细胞中DNA、mRNA和蛋白质的分析(原位)；(2)将这些生物物质从组织中提取出来以后的分析。第一类分析，即本发明主要涉及到的，其优点是，可使病理学家或科学工作者在显微镜下研究组织样品的组织病理结构或形态，同时对核酸或蛋白质进行检测。这些技术包括：观测蛋白质的免疫组织化学(IHC)；观测核酸的原位杂交(ISH)，观测碳水化合物的组织化学(HC)；和观测酶的化学的酶组织化学(EHC)。例如，ISH可用于探寻是否存在基因异常或疾病，例如致癌基因的扩增，尤其是可用在当在显微镜下观察时在组织形态上呈现出恶性的细胞中。ISH也应用于感染性疾病的诊断中，它不仅能检测出微生物的序列，而且也能确切地检测出被感染的细胞，这具有很重要的临床病理意义，而且也是一种排除来自无临床关系的相邻组织或来自血液或外部感染的阳性杂交信号的可能性的有效手段。

IHC使用与仅存在于一定类型的患病细胞组织中的独特表位特异性结合的抗体。IHC需要对置于载玻片上的组织切片或细胞(如，血液或骨髓)进行一系列的处理步骤，通过对患病状态的特定形态学指示物进行选择性的染色而使之突出。常见步骤包括：组织切片的预处理，以去除石蜡，并减少非特异性的结合；从化学固定剂回收被蛋白质的交联而隐蔽的抗原；抗体的处理和保温；酶标记的第二抗体的处理和保温；酶与底物反应以产生荧光团或生色团，以突出具有与抗体结合的表位的组织切片区域；复染等。

这些步骤大多数都由多次润洗步骤间隔，以从前一步骤中除去未反应的残余试剂。保温是在升高的温度下进行，通常约 37°C，而且必须不断地防止组织脱水。ISH 分析，取决于探针与来自组织样品或体液的细胞的独特的或重复的核苷酸序列的特异性结合亲和力，它要求用许多不同试剂的一系列相类似的工艺步骤，并还可包括不同温度要求。

鉴于对 IHC 和 ISH 需要大量的重复处理步骤，已经引入自动化系统以减少人力、费用，以及与此有关的错误率，并且引入一致性。已成功使用的自动化系统实例包括：NEXES<sup>®</sup>和 GenII<sup>®</sup>染色系统，可由 Ventana 医疗系统(Tucson, Arizona) 获得以及 Copeland 等人的美国专利 5654199 中公开的系统，这些系统使用了微处理机控制的系统，该系统包括支撑辐射状定位载片的旋转圆盘传送带。步进电机使该圆盘传送带旋转，将每个载片放置在位于载片上的一系列试剂分配器的下方。载片和试剂分配器上的条形码可使计算机控制分配器和载片的定位，以致通过适当的计算机程序完成对每种不同组织样品的不同试剂处理。

上面提到的染色系统包括一个热空气吹风机，或者一个加热灯，以加热各样品到高于实验室的环境温度，以进行要求较高温度的步骤。对载片的加热可通过加速化学反应而改进染色质量，并能使反应温度与体温(约 37°C)更匹配，在此温度下设计抗体以进行反应。虽然这种对流或辐射加热系统基本适用于以抗体为基础的 IHC 分析，其不太适用于以核酸为基础，并且要求更高更精确的温度控制的 ISH。为了使目标样品和探针两者的 DNA 双螺旋变性，以使它们变成单链，温度必须提高到双链的熔点以上，通常约 94°C。同时必须强调的是样品不能加热超过 100°C，如果加热过高，会破坏细胞的形态，使它难以在显微镜下观察。在 ISH 分析中也要求精确的温度控制，以在所要求的严格性下实现探针的杂交。所选择的温度必须足够低以便在探针和模板剂之间进行杂交，但是还要保持足够高以防止错配杂合子的形成。因此需要一种自动化的组织染色装置，该装置对大多数 ISH 应用能够控制足够精确的反应温度。

通常用于自动化组织染色器的加热单元的另一个缺点是它们不能够对各个片进行单独的温度控制。现有技术的系统中，所有的载片在处理过程中，在任何给定的时间都加热到相同的温度。例如，在 Bogen 等人的美国专利 5645114 中公开了可用于承载多个显微镜载片的分配组件。提供了一

种含有电阻加热单元的分离的载片夹具。然而，因为 Bogen 等人提出的组件，对所有的载片都加热到同一温度，这是因为例如没有公开能单独控制加热或能使载片屏蔽从而不受相邻载片产生的热的影响的装置。这就排除了在同一时间内对不同样品进行具有不同温度参数的方案。例如，具有不同严格要求的 DNA 探针测定不能在同一时间有效地进行。因此，要求一种自动的组织染色装置，其中即使不同试验有独特的加热要求时，也可对相邻载片进行不同的试验。

在 IHC 和 ISH 试验中经常遇到的困难是产生于保存组织的常用方式。几十年来，诊断病理学实验室工作主要用到的是福尔马林固定，组织的石蜡包埋封存、切片和置于载玻片上，在这种防腐剂中固定能引起大分子(包括氨基酸和核酸)的交联。这些交联的成分必须去除，以使探针能接近目标核酸，并使抗体识别相应的抗原。使抗原和/或核酸“去掩蔽(unmasking)”通常是用人工多次预处理、蛋白水解消化和洗涤等步骤而完成。需要使细胞进行调节过程，以使它们的抗原和核酸可用于检测的过程自动化。

在染色前，要求必须完全去除石蜡，以使其不干扰抗体或探针的结合。石蜡是一种疏水物质，在染色或使用探针杂交前必须被去除。连续使用 2 或 3 种净化剂通常可实现脱蜡，其中所述净化剂是石蜡的溶剂，如二甲苯、二甲苯取代物或甲苯，它们可能是有毒的，易燃的，并造成环境危害。使载片脱蜡的更安全且更快速的方法是有利的。

#### 发明简要

本发明涉及这样的装置和方法，它们对多个固定在显微镜载片上的组织样品进行自动染色或处理，从而使每个样品都能接受到单独的染色或处理方案(protocol)，甚至当这种方案需要不同的温度参数时也如此。这样，基于不同 DNA 探针和/或抗体的染色步骤可同时进行，尽管在给定时间点每个可有不同的加热要求。此外，要求脱蜡的样品(例如，肿瘤切片)可以和不要求这种预备步骤的其它样品(例如，涂片)在同一时间自动地被处理。

本发明还涉及一种向多个生物材料自动施加试剂的装置，该装置包括：包括多个将载片安装在圆盘传送带上的位置的旋转的圆盘传送带；用于多个载片中的每一个的单独加热单元，其中，每个所述的单独加热单元具有监测和控制所述生物材料温度的装置，其中每个单独加热单元位于旋转的圆盘传送带上；以及也位于旋转的圆盘传送带上的用于监测和控制所述生

物材料温度的装置。优选的是，所述装置包括固定到平台上的多个加热器，其中每个所述加热器与来自相邻加热器的热传递热隔离。

更具体地，该装置是一种计算机控制、条形码驱动的染色装置，能自动地将化学试剂和生物试剂施加到置于(mount)或固定(affix)在标准显微镜载玻片上的组织或细胞。多达 20 个载片以环形排列置于在圆盘传送带上，所述圆盘传送带根据计算机指令旋转，使得每个载片放置在位于载片上方的一系列试剂分配器中的一个之下。每一载片都能以最佳的顺序和所要求的时间周期接受到所选择的试剂(例如，DNA 探针)，并且进行洗涤、混合和/或加热。然后，将这样染色或处理的组织切片由使用者从装置内取出，由医务专业人员在显微镜下观测，他们研究载片以用于病人的诊断、预后或治疗方法选择，计算机控制的自动化能使该装置以一种“轻而易举(walk-away)”(即使用很少的人力)的方式进行应用。

本发明还涉及一种改进对固定到载片上的细胞中的目标分子的染色的可达性的方法，包括步骤：(a)使用上述的处理方法加热载片，和(b)自动向载片施加水溶液。

根据本发明的加热系统完成各个载片的温度控制，该加热系统具有以辐射状安装到圆盘传送带上的加热平台(thermal platform)，用于对每个载片进行加热和温度传感。在载片的圆盘传送带上也装有印刷线路板，分别对每一个加热平台进行监测和控制。信息和能源借助于滑环组件而在旋转的圆盘传送带和固定装置之间通过。这些信息包括对 20 个载片中的每一片加热适宜的时间所需的较高和较低的温度参数。

本发明的主要优点是每个样品都能受到单独的染色或单独的处理方案，即使是这些方案要求不同的温度参数时也如此。

本发明的另一个优点是该系统能对其上置有组织的载片整个表面的温度进行精确地控制(即，在规定温度的 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内)。对于 ISH 中的 DNA 变性和探针杂交及相关的过程，如原位 PCR，尤其需要这样的精确性。此外，由于根据本发明能进行均匀加热，所以整个载片表面保持在狭窄的温度范围内，使得不管所述组织在载片上的位置如何，它都得到均匀的加热。

本发明的另一个优点是该系统能以自动化方式进行组织样品的脱蜡，而不必依赖于如二甲苯一类的有害溶剂。

本发明的另一个优点是利用在水溶液中加热组织，该组织通过使细胞



中的靶分子更易于染色而使其染色条件更好。

本发明的另一个优点是该系统能迅速加热其上置有组织的载片的表面(即,不到2分钟内,从37°C到95°C,并且在不到4分钟内,即可同一范围内冷却在),从而能使DNA变性,而不会变性过度和因加热过度而使细胞形态受到损失。

本发明的另一个优点是该系统能在染色后,利用热量使组织样品脱水。

本发明的另一个优点是不存在人为的误差,并因自动操作而增加产率。

参照本发明的以下的详细描述、所附的权利要求书和附图中的说明,本发明上述的和其他的目的、优点和特征将更加明显,本发明的实质也可更加清楚理解。

#### 附图简述

图1是表明载片盖已打开和圆盘传送带门已去除的本发明的透视图。

图2是表明本发明与用以操作的计算机及其他装置连接时的透视图。

图3是本发明的立体分解图。

图4是表明带有试剂分配器的本发明的透视图。

图5是本发明加热系统的方框图。

图6是本发明加热器/传感器单元的透视图,显示板部分断开以暴露属于控制电子件部分的销子。

图7是加热器的平面视图。

图8是表明其上有载玻片的加热平台的透视图。

图9是沿图8中9-9线剖开的加热平台的断面图。

图10是表明其上装有多个加热平台的滑环组件和载片的圆盘传送带的透视图。

图11是表明其上装有控制电子件印刷线路板的图10中圆盘传送带下侧的透视图。

图12是加热器的顶面视图。

图13是图5中所示的控制电子件、加热器和传感器的方框图。

图14是控制加热各个载片的流程图。

图15是控制冷却各个载片的流程图。

图16是环组合件的断面视图。

#### 发明详述

现在详细参照附图，其中用同一标号表示同一部件，图 1 表明了根据本发明的分子病理学装置的透视图，一般用标号 10 表示。所设计的装置 10 是以要求的顺序、时间和温度，用核酸探针、抗体、和/或与其有关的试剂对置于显微镜载片上的组织自动进行染色或其他形式的处理。然后，由专业医务人员在显微镜下观察这样染色或处理的组织切片，他们观察该载片以对病人诊断、预后、或治疗方案选择。

在优选实施方案中，装置 10 是系统 12(图 2)中的一部分或者是一个组件，该系统还包括主机 14，其优选个人计算机，监测器 16、键盘 18、鼠标 20、整体流体容器 22、废物容器 23 和有关的设备，另外的染色组件或其他装置可加入到系统 12 中，以形成用计算机 14 作为服务器的网络。另外，这些单独部件中的一些或全部都能组装到装置 10 内，使它成为一个独立应用的装置。

装置 10 及系统 12 的优选结构形式描述于如 1997 年 12 月递交的美国专利申请 08/995052 及由 Ventana Medical Systems, Inc(Tuscon, AZ)获得的 Ventana Nex ES User's Guide 中，两者均包含在本文中作为参考，但对于加热系统，载片支架、整体流体组件、容积调节体系和载片的擦拭体系如下公开内容所述。为了清楚起见，在本发明和引入的参考文件中已有的这些组件的详细描述都省略掉。

简单地说，装置 10 是一个由微处理机控制的染色装置，它能自动地向置于标准显微镜载玻片上的组织施加化学试剂和生物试剂。支撑辐射式定位载玻片的圆盘传送带由步进电机驱动旋转，以将每一个载片放在一系列试剂分配器中之一的下面。装置 10 控制分配、洗涤、混合和加热，以优化反应动力学，计算机控制的自动操作保证装置 10 能以“轻而易举”(即，只用很少的人力)的方式使用。

更具体，装置 10 包括一个由较低部分 30 和较高部分 32 形成的壳体(housing)，其中较低部分 30 可拆卸地安装或较接到较高部分 32 上，载片的圆盘传送带 34 安装在较低部分 30 内，并围绕着轴 A-A 旋转。下面将更详细地描述，在圆盘传送带 34 的周边处辐射状地安装多个加热平台 50，在其上可以放置有组织样品的标准载玻片。圆盘传送带 34 最好用不锈钢制作。正如本文中所描述的，本发明的主要特征是通过各种传感器和微处理机分别控制每个载片的温度，在装置 10(图 3)中还安装有清洗分配喷嘴 36，

Coverslip™分配喷嘴 37、流体刀 38、洗涤容积调节喷嘴 39、条形码阅读器反射镜 40、和空气涡流混合器 42，这些将在后文中详细描述。

在部分 32 上部顶上可旋转安装的是试剂圆盘传送带 28。分配器 26 可拆卸地安装到试剂盘 29 上(图 4)，而它可用于与圆盘传送带 28 相啮合。试剂包括通常施用于各种载片的化学物质或生物物质，这些载片含有核酸探针或引物、聚合酶、初级抗体和二级抗体、消化酶、预-固定剂、后-固定剂、显示(readout)化学剂、和复染剂。为了用计算机识别，试剂分配器 26 优选是条形码标记的 29。对每个载片施加单一试剂，然后，在温控环境下保温精确的一段时间。用瞄准载片边缘的压缩空气喷射口 42 以完成试剂的混合，因此引起试剂旋转。在适当保温后，使用喷嘴 36 将试剂由载片上洗掉。然后使用容积调节喷嘴 39 以调节剩余洗涤缓冲液的体积。然后通过喷嘴 37 向载片施加 Coverslip™溶液，以防止蒸发。气刀 38 分隔开 Coverslip™池，随后使用下一个试剂，当圆盘传送带旋转时，重复这些步骤，直到方案完成为止。

除了主机 14 外，装置 10 优选包括它自己的微处理机 44，来自主机 14 的信息可以下载于其中。具体是计算机将运转程序中的步骤顺序、和称作“运行规则”的传感器的监测和控制逻辑、以及该方案的温度参数下载到微处理机 44。来自 Dallas 半导体(Dallas Semiconductor)的 Dallas TX 的型号(Model)No.DS2251T128K 就是能完成这一功能的微处理机的实例。

参照图 5，它表明载片加热系统 48 的方框图。该系统一般包括约 20 个加热平台 50，辐射状地安装到圆盘传送带 34 上，以加热载片并监测其温度，并控制将电子件印刷线路板 52 也安装到载片圆盘传送带，以监测传感器和控制加热器。控制电子件 52 安装在旋转的载片圆盘传送带 34 之下。信息和电源通过滑环组件 56 从固定装置平台转移到旋转的圆盘传送带。如下面描述的，该信息包括加热载片所需的温度参数(较高和较低)，其中所述信息从微处理机 44(从计算机 14 下载后)传输到控制电子件 52，在运行期间，如果确定载片温度低于程序设定的下限，则加热平台加热载片。同样，如果发现载片温度高于上限，加热停止(参看图 14 的方框 88)。提供有足够电容的电源以达到每个加热器约 8 瓦，从而满足所要求的升温速率(a/k/a “直线上升(ramp up)”)。

同样，在另一个方案中，可以控制 leisi 载片的冷却，如后面描述的。

在另一个方案中，在载片的下面装有冷却平台，冷却平台可以包括珀尔帖(Peltier)型热转换器。在kexuan方案中，如果具体用途要求将载片迅速冷却，则可任选地提供如风扇(未图示)一类的冷却装置。冷却装置将改变所有平台的周围环境空气，迫使对应于不应冷却的各载片的加热器补偿环境空气温度的降低。

本文所描述的载片加热系统采用传导加热并分别加热各载片。该系统提供更精确的载片上温度，并能通过载片基底而设定载片上的温度。现在更详细地描述加热系统48的每一个构成部件。

#### 加热平台

参照图6-10，加热平台50包括两部件：加热器/传感器单元58和壳体70，以便可拆卸地将加热器/传感器单元58安装在圆盘传送带34上并支撑各载片37。

加热器/传感器58有一个平板60，约50.8毫米(2英寸)长和25.4毫米(1英寸)宽，最好由0.04英寸厚的黄铜板制成。也可以用其他材料取代黄铜，只要它是一种刚性材料并具有足够的传导性，以将热量均匀地分散在其整个表面，以致使载片可被均匀地加热即可。平板任选地用抗腐蚀材料如Teflon<sup>®</sup>覆盖。

本发明的一个具体特征是在具体的时间能将相邻的载片任意地加热到不同的温度，这是通过在加热器之间具有高热阻而使各载片相互热隔离而完成的。正如本技术领域的人员所理解的那样，热阻是材料传导性、材料厚度、和热传播距离的函数。因此，可以使用各种类型的材料对相邻载片进行热隔离，包括橡胶、塑料、陶瓷，或金属，只要它们能提供根据文中提到的标准的热阻就可以。本文使用的术语“热隔离”，意思是来自一个加热器的热量对相邻载片的温度没有明显的影响。此外，对于热隔离相邻载片可以使用各种结构方式，包括：将载片安装在热阻材料上，将热阻材料装在载片之间，和将载片放置在热阻平台上。

在优选的实施方案中，围绕着平板60的周围并垂直于其底侧悬挂安装的防护罩62，该防护罩62优选用橡胶或类似材料制成，它既是防水层，又是隔热层。防护罩62的绝热特性有利于相邻载片之间的这些温度差异。应当指出的是可以使用各种材料以代替橡胶对相邻载片的隔热，包括能经受至少100℃温度的陶瓷和塑料。安装在加热器/传感器单元58(已描述)空腔中

的部件必须被屏蔽，以防被该装置进行染色操作时所使用的各种加热过的溶液(基于油和水)破坏。因此，优选通过硫化或类似工艺方法将平板 60 连结到防护罩 62 上，以致形成即使在高温下流体也不渗透的密封层。防护罩 62 的壁同样必须能抵抗住这些加热溶液。在优选的实施方案中，防护罩 62 的厚度是 0.06 英寸的橡胶材料，因此减小了热可以传播的横截面。另一方面，防护罩 62 也可以用金属材料如黄铜制成，其要足够薄(例如，约 2.01 毫米(0.01 英寸))，以提供热阻。当安装到圆盘传送带 34 上时，防护罩 62 的高度约 10.3 毫米(0.5 英寸)，因此使平板 60 并且在其上支撑的载片也升高同样高度，在操作时升高放置有载片的平台，使载片远离收集在圆盘传送带 34 上的各种流体，并使载片与相邻加热器产生热相隔离或绝缘。

光蚀刻的电阻加热器 64 安装在由防护罩 62 限定的空腔中的平板 60 的下侧。该加热器可用选自包括高阻抗镍基材料，如铬镍铁合金，到导热性更高的材料，如铜-镍的各种材料制成，铜-镍是优选的。光蚀刻电阻器 64 连接并夹在二个 0.2 毫米(0.008 英寸)厚的由杜邦公司购买的 Kapton™ 聚酰亚胺薄膜制成的塑料薄片之间，导线 65 焊在电阻跟踪器(resistive trace)的端部，这些导线从两个 Kapton™ 层之间引出，并连接到光蚀刻的电阻器上。该夹层的一个外侧指定与加热器连接，而另一外侧有光蚀刻线路连接，第二线路是传感温度的，并具有四个低电阻跟踪器，其终止是在加热器中心处的焊片上，该焊片与用 Dallas 半导体(Dallas Semiconductor)制造传感器连接，它们的部件号码是 DS1721S。所述四个跟踪器焊接到四根导线上，所述导线从与所述导线和加热跟踪器相连的相同区域中引出。第三层 Kapton™ 是连接在控制跟踪器上并且该第三层在中心处的焊片上有中断器，以便连接传感器。如图 7 所示，从加热器引出六根导线，二根向加热器供电源，四根用于传感温度，六根导线接到六孔线路母插孔板 67，它由多家公司制造的，如 AMP(Harrisburg,PA)或 Molex(Lisle, IL)。该母插孔板可插在焊在另外描述的控制电子件环路 PC 线路板 52 上的六个匹配插头 69。PC 板 52 安装在载片圆盘传送带 34 的与安装载片加热器的一面相反的面，所以所述六个匹配插头向上延伸通过圆盘传送带内的矩形开口 75。

根据本文公开的说明，加热器 64 的制造来源是 Minco Products(Minneapolis, MN)。正如下面更详细的公开，加热器各自通过集成电路驱动器或能够启动和关闭加热器的分离晶体管(安装到印刷线路板 52

上)进行控制。

正如所描述的，加热器/传感器单元能够迅速加热载片的有效面积，在2分钟内从37℃加热到95℃，并在4分钟内在同样范围冷却，以使DNA变性而不会过度变性，也不会因加热过度，而使细胞形态受到损失。

由于组织试样常常安放在载片的不同位置上，所以均匀加热载片表面是本发明的另一个关键目的。这就对传导加热提出一个课题，甚至当人工完成时也如此，这是由于传统的加热板常常产生不规则的“热点”，使得难以知道在板上何处放置载片。如果整个组织的细胞得不到均匀地加热，则显微镜载片将得不到准确的解释。例如，如果温度达不到使探针和组织DNA变性的温度，就有可能导致假阴性而在洗涤时的严格不一致时，又能导致假阳性。

为了确保利用加热平台60均匀加热，所以将电阻加热器64安装在板60的底侧。如上所说，黄铜板具有足够的传导性，以消除因加热跟踪器不能在表面连续，而是由不产生热量的空间所分隔相邻线条而引起的任何局部不均匀性，分隔的量级为0.4毫米(0.015英寸)，所以在黄铜板的另一侧看不到热源中的这种非均匀性，通过改变加热跟踪器，使它们以非均匀方式产生热，同样可以获得载片温度的均匀性，热量损失到所有表面的四周空气，所述边缘包括载片37的边缘和黄铜板60的边缘，但是，热量只由黄铜板底表面上的加热器64产生。如果在加热器的整个区域中产生的热是均匀的，所以热量以恒定通量进行黄铜板底部，则载玻片的顶部中心将明显高于能快速散热的边缘。如果减小中心处的加热器通量从而能提高载玻片顶部温度的均匀性，这一现象是可以调节的，可以使用由Parametric Technologies(Waltham, MA)生产的有限元热量传递程序Mechanica，以模拟系统中的热流动。加热器通量优选如图12所示设置，中心区63覆盖总面积的40%，产生的热能为总能量的8.3%，而外区域61产生的热能与之平衡。因此，由于中心区接收较少的热量，所以中心区正上方的载片上温度稍低于长方形环正上方的载片温度，当加热器制成如所述的外形时，则载玻片的有效区域(其上放置组织的区域一般不包括载片的最外边缘)的温度变化约为0.2℃，从玻璃片中心到玻璃片有效区域边缘的温度梯度为：逐渐升高0.2℃，然后逐渐下降0.2℃。25.4毫米(1英寸宽)，76.2毫米(3英寸)长的湿润载玻片的顶表面，在它的有效区域内保持特定的均匀的温度，

该有用区的限定为集中在载片宽度为 0.75 英寸，长度为 1.6 英寸的区域，并从标记的相反端开始 6.4 毫米(0.25 英寸)。对于从 37°C ~ 95°C 的任意设定温度，均匀性的目的是将有用区域内的温度保持在  $\pm 2^\circ\text{C}$  的范围内。

可以使用 Peltier 型热转换器代替上述的加热元件，它通过转换器而变换极性而既能加热和又能冷却。这种冷却能力可用于一些潜在应用以及本发明的应用如原位进行 PCR 中(下文将讨论)。

温度传感器 68 也安装在空腔 73 中的加热器 64 的底侧。可使用几种不同类型的传感器，如热敏电阻，RTD's、或热偶。在本发明的优选方案中，使用集成线路传感器 68，它可以直接将温度转换成数字信号，如从 Dallas 半导体(Dallas Semiconductor)(Dallas, TX)获得的型号 No.DS1721 型的传感器。这种传感器利用 I<sup>2</sup>C 方案以数字报导所感到的温度。类似的传感器也可从 National Semiconductor(Santa Clara CA)获得，所选择的传感器必须精确、可重复，并具有很低的热质。

壳体 70(优选由喷射模铸塑料构成)能提供将加热器/传感器 58 可拆卸地定位到圆盘传送带 34 上，并能支撑载玻片 37。正如图 9 中所见到的，壳体 70 限定为一个基本矩形空腔 71，可将加热器/传感器单元 58 装嵌到其里面，并由夹持器固定。在壳体 70 的底部，限定了一个凹槽区 72，它收容沿防护罩 62 的端边限定的相应凸缘 74，以使加热器/传感器单元 58 固定在应有的位置上。为了进一步密封空腔 71 以隔离装置操作时所用各种试剂，可提供一个向下延伸的凸出部分 76，可更严密地使凸缘 74 啮合。为进一步密封，也可沿防护罩 62 的外壁提供一个凸起部分 78。该凸起部分的外侧尺寸稍稍大于壳体的内侧尺寸，可产生一种干扰，防止流体从防护罩和壳体间的凸起部分的下面进入空腔 71 中。

在壳体的基座上限定了一组安装机器用的螺栓孔 80(图 8)，以使限定在圆盘传送带上的孔成一直线。

载玻片 37 通过四个向上的支柱 82 固定而放置在平板 60 上，支柱 82 整体地安装在壳体 70 上。支柱延伸到载玻片厚度的一半，如图 9 所示。由于载玻片厚度为 0.04 英寸，支柱是低于载玻片顶面 0.02 英寸，重要的是支柱伸向到载片的顶面，以防止水溶液表面张力使溶液排出。现有技术的已知的相对载片顶部垂直固定的装置的问题是它们存在一种趋势，以毛细作用会虹吸掉载片的流体。应当指出的是可以使用其他方式固定或支撑载片。

### 控制电子件(印刷电路板)

参照图 13 所示的方框图, 控制电子件 52 包括环形印刷电路板和需通过一系列数字方案 57 由染色装置微处理机 44 接受温度设定点信息的必要部件, 并使用该信息将每个加热器 64 保持在其设定点上。那些没有示出的部件(例如, 电阻器、电容器等), 对本技术领域技术人员容易理解的。加热器的控制可以以各种方法完成, 在优选实施方案中, 各加热器可以通过集成线路驱动器或能开启/关闭加热器的单独的转换器 53 而单独地进行各自的控制。因此, 处理器可控制加热器的运行循环, 正如随后描述的, 在另一个实施方案中, 可通过处理器 55 调整加热器的电量, 以至使加热器可以总电量的百分比下进行(例如, 最大加热电源的 50%)。在优选实施方案中, 使用由 Allegro Microsystems(Worcester, MA)获得的集成线路(UDQ 2559)。具有微处理机 44 的系列信息设备 57(通过滑环组件 56)。优选使用由荷兰 Eindhoven, Philips Labs 开发的 I<sup>2</sup>C(内集成线路(Inter Integrated Circuit))系列总线驱动方案。也可以使用, 如 RS232D、RS422 等或其它的另外方案。控制电子件 52 起到监测传感器 68 和控制加热器 64 两种功能的作用。控制电子件 52 中重要的是微处理机 55(它与存储器 51 相连)或者是其它数字的电路系统, 其有足够能力以通过 I<sup>2</sup>C 系统总线驱动与染色装置微处理机 44 连通, 能监测加热器温度传感器 68 和在特定时间需要提高载片温度时向加热器 64 提供电能。这种微处理机的实例是由 AZ, Chandler, Microchip Technology Inc. 获得的 PIC16C64A。当与染色系统微控制器(参看图 14)提供的定点温度(或靶温度)相比较时, 该程序必须控制对应于加热器温度传感器的每一个加热器。(见图 14)。根据存储器 51 中定点温度 47 的查找表, 微处理机 55 确定如何控制各加热器。从具有微处理机 44 的系列信息设备 57 接收到查找表 47 中的定点温度。微处理机 55 从传感器 68 获得实际的温度, 而后, 根据实际温度和定点温度之间的差异改变加热器 64 的控制。这种加热器的控制可以为严格的开-关(即, 如果其传感器温度低于定点, 则开启加热器, 如果其传感器温度高于定点, 则关闭加热器), 或者可利用百分比、积分和/或微分控制系统计算以提供更可控制的和精确的应答。

电源分配和控制反馈系统必须足够以使热平台能够精确地调整以模拟热循环工艺中的特征(例如, 原位 PCR), 并能够迅速升温 and 降温(例如, 在 3 分钟内从 37°C ~ 95°C, 在 5 分钟内在同一范围冷却), 这些特征对于成功地



ISH 染色尤为重要。

为了使各载片的温度调到靶温度，处理器通过改变对各载片的加热以控制载片的温度，在优选实施方案中，通过改变加热器的输出功率以改变对各载片的加热改变。参照图 14，该图给出了各个载片加热控制的流程图。如方框 84 所示，获得各个载片的靶加热温度(或设定点温度)。在优选实施方案中，靶温度是从微处理机 42 传送到控制电子件 52。靶温度也可选可以由操作人员输入或通过载片上的条型码读出。如方框 86 所示，通过温度传感器 68 指示，确定载片温度是否高于靶温度。如果为“是”，关闭加热器，如方框 88 所示。另一方面，根据实际温度和靶温度之间的不一致，可以改变由加热器产生的加热量。例如，可以减少加热器的工作循环。通过脉冲宽度调节，可以改变加热器的工作循环(例如，可以减少加热器的工作循环，从 50%(此时加热器在 50%的时间运行)到 25%工作循环(此时加热器在 25%的时间运行))。在另一可选方案中，如果实际温度明显高于靶温度或如果想要更精确的温度控制，则在关闭加热器之后，打开冷却器。

在另一实施方案中，处理器通过改变加热器和载片之间的热的传递量而控制传递到各载片的热量。作为一个实例，微处理机可改变加热器和载片之间缓冲物的热传递特性，来改变传递到载片的热量，并由此改变载片的温度。

如果载片温度低于靶温度，加热器打开，如方框 90 所示，加热器的控制可利用百分比的、积分的，和/或微分的控制系统算法以提供更可控制和更精确的应答。在优选实施方案中，由加热器产生的热量是基于实际温度和靶温度之间的差异。例如，根据目前和靶温度之间的温差，加热器可以启动 100%，50%，等的工作循环。因此，如果实际温度高于靶温度 2℃ 以上，则加热器启动为满负荷循环。当实际温度接近靶温度，则减少加热器的工作循环，以使对载片产生较低的总热量。此外，一旦加热器达到靶温度，则处理器 55 通过确定实际温度和靶温度之间的差异而维持控制，如方框 86 所示。这种循环继续直到载片的加热完成为止，如方框 92 所示。因此，如果载片计划要加热预定的时间，则载片的温控制要进行到完成预定时间为止。

此外，根据载片的特定靶温度，以经验确定维持载片在靶温度时所需要的热量，例如，当根据改变加热器的工作循环而改变热量时，则根据靶

温度确定加热器的特定工作循环。将这些值存储在查找表 47 中。因此，当载片的实际温度接近靶温度时，工作循环减少到查找表 47 中的经验值。以这种方式，载片温度可以从当前温度转变成靶温度。

可选，温度的控制可以是严格地开-关(即，加热器的传感器温度低于靶温度，启动加热器，而当加热器的传感器温度等于或高于靶温度时，则关闭加热器)或温度的控制可以是按比例(即，改变加热器产生的热量，而不是工作循环，以至于使加热器输出其总热能的一部分，例如其总加热器输出功率的 50%)。

参照图 15，表明作为本发明的另一种实施方案的单个载片的冷却控制流程图。如方框 94 所示，得到对单个载片的靶冷却温度。靶温度从微处理机 42 传送到控制电子件 52，靶温度可以由操作人员输入或通过载片上的条形码读出。如方框 95 所示，根据系统的操作，载片可以由环境空气冷却，或者由冷却平台冷却，等等。

如方框 96 所示，类似于图 14，如由温度传感器 68 指示确定载片温度是否低于靶温度。如果为“是”，则关闭冷冷却器，如方框 94 所示，另一方面，根据实际温度和靶温度之间的差异，可以改变冷却器产生的冷却量，例如，可以减少冷却器的工作循环，通过调节脉冲宽度，可以改变冷却器的工作循环。

如果载片温度高于靶温度，则冷却器启动，如方框 98 所示。冷却器的控制，类似于加热器的控制，可以使用比例、积分、和/或微分控制系统算法，以提供更可控制和更精确的应答。在一个实施方案中，产生的冷却能力是基于实际温度和靶温度之间的差异。例如，根据目前和靶温度之间的温度差异，冷却器可以启动 100%、50% 等工作循环。因此，如果实际温度高于靶温度 2°C 以上，则启动的冷却器为满负荷循环。当实际温度接近靶温度，则减小冷却器的工作循环，从而对载片产生较低的总冷却能量。此外，一旦冷却器达到靶温度，则处理器 55 通过确定实际温度和靶温度之间的差异而维持控制，如方框 96 所示，这个循环继续直到超过载片冷却已完成时为止，如方框 100 所示。

### 滑环组件

滑环组件 56 是使用旋转的银环和银石墨刷的技术。滑环必须有足够的尺寸(约 3"直径)和电容(每个环约 20 安培)，以承载 I<sup>2</sup>C 数字控制信号(2 环)、

对逻辑提供电能(2环)和对加热器提供电能(2环)。适于这种用途的滑环可从 Fabricast, Inc South ElMonte CA, Airflyte Electronics, Bayonne, New Jersey, Litton Poly-Scientific, Blacksburg, VA 和其它地方获得。电缆 57 可操作地将滑环转动体连接到控制电子件 52(图 11)。提供定子支架 59 以使用机器螺栓或类似部件(未示出安装)将定子固定到装置 10 上。参照图 16, 其表示滑环组件 56 的纵切面视图, 具有传输数据的导件 49, 逻辑电能和加热器电能, 如图 5 和 16 所示。

参照图 3, 在装置 10 中一般安装有, 如美国专利申请 08/995052 中描述的如下部件: 液体 Coverslip™ 分配喷嘴 37、步进电机 61、淋洗分配喷嘴 36, 流体刀 38、条形码阅读器 40、空气涡流混合器 42、和洗涤容量调节器 39。以上参考申请中公开的缓冲加热器已被去除。整体流体组件 22(图 2) 优选制成能容纳 ISH 所需要的许多流体的接收器, 包括 SSC、DI 水, 和细胞调节缓冲剂。容积调节喷嘴 39 制成可使用多种流体。

本发明的方式与美国专利申请序号 No.08/995052 中公开的方式不同, 其中, 在使用了洗涤缓冲剂后从片上被擦掉, 以致使其不稀释下一次使用的试剂。本发明喷嘴 36 的目的是将流体喷射到载片的端部, 由此形成流体被抽空从而引起通过毛细作用而抽吸流体。

#### 定义

本文中所用的如下术语具有如下意义:

“组织”是指能够置于标准显微镜载玻片上的细胞集合体, 包括, 并不仅限于, 器官切片、肿瘤切片、体液、涂片、冻片、细胞学制剂、和细胞系。

“被靶向的分子”是指在细胞中发现的可检测的分子, 包括, 但并不限于核酸, 蛋白质、碳水化合物、脂类、和小分子。

“染色”是指任何生物的或化学的实体, 当应用到组织中的被靶向分子时, 使得分子在显微镜下可以检测。染色包括, 但并不限于可检测的核酸探针, 抗体, 和染料。

“进行处理”或“处理”都是指对组织使用染色, 以及与这些应用有关的其他工艺方法, 包括, 并不限于, 加热、冷却、洗涤、清洗、干燥、蒸发抑制、脱蜡、细胞调节、混合、保温, 和蒸发、DNA 变性、DNA 复原、探针杂化、和杂化后洗涤。

“自动化的”或“自动化”是指主要由计算机或机器驱动的活动，并且基本没有人工介入。

### 应用和操作

在操作中，装置 10 可用于进行原位杂交(ISH)，原位 PCR，免疫组织化学分析(IHC)，以及各种化学(非生物的)的组织染色技术。而且，本发明的加热系统，尽管不同技术可要求不同的温度，仍可以在单次运行中使用上述技术中的 2 种或多种。

原位杂交显然是一项本发明可有利应用的技术，它可以单独也可以与其他技术组合地使用，这是由于 ISH 分析中的许多步骤在精确的时间周期内必须仔细控制温度。在具体的时间周期内的精确加热量对于充分地使 DNA 变性而言必不可少，以使随后的杂交出现，而不致过热到使细胞形态降解的温度点。不同的样品对于变性要求不同的温度，这取决于怎样制备和固定组织。变性，杂交，和杂交后洗涤等步骤，都要求独特的温度，并取决于要检验的具体探针和组织。这些温度要求可通过如上述讨论的加热器的单独控制来控制。DNA 探针要求并通常是在 30~55℃ 间进行杂交，而 RNA 探针通常是在高温下杂交；杂交时间从 30 分钟到 24 小时，这取决于目标拷贝数，探针大小和样品类型。对于细胞遗传学制剂的标准变性是在约 72℃ 下进行 2 分钟，而对于组织切片，条件是从 55℃~95℃，2~30 分钟。杂交后洗涤温度，从 37℃~72℃，2~15 分钟。盐浓度为  $0.1 \times \sim 2 \times 55C$ 。探针检测温度，可从环境温度到 42℃，2~30 分钟。

低重量的平板 60 和加热器能使载片从而使载片上的组织被迅速地加热和冷却(即，在 180 秒内从 37℃~95℃)。加热和冷却的速度增加，可增加原位杂交的效率。通过迅速改变温度促使探针迅速退火到目标可使探针特性增加。伴随而来的是本底降低和所得试验的质量大大改进。ISH 可以用于检测 DNA，cDNA，和高拷贝的 mRNA 也可以应用于涂片、组织、细胞系，和冷冻切片。通常，将样品置于在 1"×3"的载玻片上。

DNA 的杂交或变性对于组织染色过程是绝对需要的，并要求温度迅速达到 92-100℃，并进行精确地控制和维持。热平台使显微镜载片上的待处理组织在低于 180 秒内达到所要求的温度范围，其精确度为  $\pm 2^\circ C$ 。在杂交组织中迅速降低温度对成功的染色和诊断也是重要的。为使要求的温度在 420 秒以内达到 37℃，可以加入风扇或其他快速冷却部件。

本发明的装置可以在同一次试验中放置多种类型的样品并进行 ISH 试验，而不损害每个 ISH 试验的独特要求(即，杂交温度 37-45℃，严格度和洗涤浓度)。该系统在同一试验中可对不同载片进行一个以上的化学检测。本文所用的“ISH”包括荧光检测(FISH)和非荧光检测(例如，明视野检测)。

也可以使用装置 10，以对某组织切片同时使用 ISH 和 IHC 染色，而可在同时观察遗传变异和蛋白变异。这在例如检测乳腺肿瘤切片中的 HER-2/neu 的基因增殖和蛋白质表达(两者都已评价为具有临床的意义)时是有利的。参看 *Oncologist* 1998; 3:237-253, Ross 等人的“The Her-2/neu Oncogene in Breast Cancer”。

通过加热平台的迅速加热和冷却使得本发明也能够用于原位 PCR(聚合酶链反应)，该反应要求高和低温度的重复循环。PCR 的限制是要求在增殖之前提取目标 DNA 或 RNA，以排除相关分子结果与样品的细胞学或组织学的特征的相关性。原位 PCR 通过 ISH 的细胞定位能力与 PCR 的极端敏感性相结合而排除了所述限制。该技术已描述于 Nuovo 等人的美国专利 5538871 中，引入本文作参考。

对于包埋在石蜡中的切片，第一步要求对包埋的组织进行脱蜡。使用加热平台消除使用刺激性的化学药品如二甲苯，通过使用精确控制的各个载片的加热，使包埋于组织中的石蜡溶出并漂浮在水溶液中，再将它漂洗出去。石蜡的密度低于水，其一旦液化通过含水缓冲剂上升到组织样品上方，并漂浮在该流体顶部。然后，可通过使流体流(液体或气体形式)经过所述液体石蜡而将该液体石蜡从显微镜载片中除掉并离开组织样品。该方法的详细情况已公开于美国专利申请 60/099018 中(1998 年 9 月 3 日递交)，引入本文作为参考。也可以使用类似技术以去除除石蜡以外的包埋材料，如塑料，但可能需要加入蚀刻试剂。

已发现在适当的水溶液中用加热平台 50 以加热组织能够改进染料对细胞中的目标分子(蛋白质、核酸、碳水化合物、脂类、或小分子)的可达性。通过因保藏组织中所用的乙醛分子的交联或固定剂引起的其他构行变化，而可能引起的缺乏可达性。由于抗原蛋白的化学修饰，抗原的交联会使抗原性丧失。染料对分子靶的可达性的这种改进(生物的或化学的)在本文中称为“细胞调节(cell conditioning)”。对于 DNA 靶，优选的调节溶液是柠檬酸盐缓冲剂，优选的温度可高达约 95℃，优选的加热时间约为 1 小时。对于蛋

白靶, 优选的调节溶液是柠檬酸盐缓冲剂, 优选的温度达约 100℃, 进行约 42 分钟。使用加热平台加热组织样品可降低乙醛处理组织中的交联度, 使得改进的抗原还原为可由相应抗体识别的形式, 因此提高了染色。对于 RNA 靶, 优选的调节溶液是柠檬酸盐缓冲剂, 优选的温度达约 75℃, 调节约 1 小时。可以使用许多替代物取代柠檬酸盐缓冲剂作为细胞的调节溶液。这种溶液的目录列于 Analytical Morphology, Gu, ed, Eaton Publishing Co.(1997).PP.1-40。溶液一般具有已知的摩尔浓度、PH 和组成。优选向调节溶液中添加十二烷基硫酸钠盐(SDS)、乙二醇。

用本发明的装置完成的原位杂交(ISH)、原位 PCR、免疫组织化学(IHC)、组织化学(HC), 或酶组织化学(EHC)方法, 主要包括如下步骤。

1)将条形码用于载片以表明将用于组织的原位杂交、原位 PCR 免疫组织化学、组织化学、或酶组织化学方法来制备载片。

2)将一批载片插入装置中, 将每个载片置于载片支架上。

3)关闭装置, 开始处理过程。

4)如果载片要在装置被脱蜡作为预处理, 则每个载片将在干燥条件下加热到 60℃以上。干燥加热后, 用约 7ml 的 DI 水洗涤载片, 残留约 300μl 的水溶液。然后约 600μl 的蒸发抑制液覆盖各片。再使各载片在 60℃以上保持 6 分钟, 然后再用约 7ml DI 水清洗, 再用 600μl 蒸发抑制液覆盖。将温度降低到 37℃。载片已经脱蜡, 并准备好用于所指出过程的下一阶段。

5)待细胞调节的各载片用约 7ml DI 水清洗。所述装置中的减容器(volume reducing fixture)使残存容积从约 300μl 降到约 100μl。使用装置中的容积调整器(volume adjusting fixture)将 200μl 细胞调节溶液加到载片上。然后, 所述载片将接受约 600μl 的蒸发抑制液。如在方案中设定的那样, 将该载片温度升高到 37~100℃范围的指定温度, 而流体循环将开始, 并每在 6-8 分钟重复循环, 时间达 2 小时。将各载片冷却到 37℃, 并用约 7ml APK 洗涤液清洗。在这时, 各载片准备好用于指出过程的下一阶段。

6)当各载片暂停在试剂应用区时, 适宜的试剂容器由试剂圆盘传送带移动到试剂应用站。向载片上提供计量容积的试剂。所述液体试剂通过蒸发抑制液层而到达位于下面的液层。

7)然后载片的圆盘传送带开始运行, 将各载片直接移动到涡流混合站的前面。涡流混合器喷射嘴搅动在蒸发抑制液层下方位于载片表面的试剂。

### 8a)原位杂交

如果方法需要蛋白质消化,则将各载片用约 7ml APK 洗涤漂洗,残留 ~ 300 $\mu$ l 的缓冲剂。然后,载片再接受 ~ 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液,重复步骤 6 和 7 中描述的步骤以应用消化酶。在 37 $^{\circ}$ C 可选择的保温时间为 2 ~ 32 分钟。各载片用约 7ml 的 2  $\times$  SSC 缓冲液清洗,残留 ~ 300 $\mu$ l 缓冲剂,使用容积减少器使容积从约 300 $\mu$ l 降到约 100 $\mu$ l。重复 6-7 中描述的步骤以使用探针。然后,载片接受约 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液。升高载片温度到 37 $^{\circ}$ C ~ 95 $^{\circ}$ C 范围内的具体温度,以使靶和/或探针分别变性或去折叠。

可选择的保温时间为 2 分钟到 18 小时。

在使用者可选择的严格度下进行杂交后进行清洗,所述严格度包括可选择的盐浓度即为 2  $\times$ , 1  $\times$ , 0.5  $\times$ , 0.1  $\times$  SSC, 以及 37 ~ 75 $^{\circ}$ C 的温度范围。

利用探针的步骤以后,用 1  $\times$  APK 洗涤缓冲剂洗涤各载片,然后接收约 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液。对于一些标记的探针如在 FISH 中可直接检测探针,并对 ISH 而言可根据下面的适当检测技术用抗半抗原抗体进行间接检测。

如果要求净化,则在对探针的检测步骤之后,用 DI 水清洗各载片,并用去污剂净化各载片的蒸发抑制液。再次用 DI 水清洗各载片,并使用降容器去除残留的体积。在 37 $^{\circ}$ C 或高于 37 $^{\circ}$ C, 在干燥条件下加热各载片,直到所有水份从组织、细胞或涂片中蒸发掉。

### 8b)原位 PCR

如果方法要求蛋白质消化,则将各载片用约 7ml 的 APK 洗液清洗,残留约 300 $\mu$ l 的缓冲剂。然后,载片接受约 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液,重复步骤 6 和 7 中所述步骤以应用消化酶。在 37 $^{\circ}$ C 可选择的保温时间范围为 2 分钟到 32 分钟。

各载片用约 7ml 的 DI 水清洗,残留约 300 $\mu$ l 的缓冲剂,使用容积减少器,使容积从约 300 $\mu$ l 降到约 100 $\mu$ l。重复步骤 7 中所述步骤以应用扩增试剂。为在 37 $^{\circ}$ C 以上输送到 100 $\mu$ l 的残留载片容积,配置扩增试剂。然后,载片将接受约 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液。在 2 分钟以上,将载片温度升高到 37 ~ 95 $^{\circ}$ C 范围内的具体温度以开始 PCR 反应。加热循环达到 30 个循环,由 55 $^{\circ}$ C 的 1.5 分钟开始到 89 $^{\circ}$ C 的 45 秒。

在原位 PCR 之后,如在有关部分中所描述各载片进行原位杂交。

8c)对于 IHC、HC、EHC 的方案,将各片用约 7ml 的 1  $\times$  APK 洗液或适

当缓冲剂进行清洗,残留约 300 $\mu$ l 的缓冲剂。可以使用或不使用容积减少器,使容积从约 300 $\mu$ l 降低到约 100 $\mu$ l。然后,载片将接受约 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液。重复步骤 7 中所述步骤以使用抗体或其他试剂。

可选择的保温时间范围为 2 约 32 分钟。

可选择的保温温度范围为 37 约 95 $^{\circ}$ C,这取决于是否要求细胞调节或脱蜡。

整个工艺中,各载片都用 1 $\times$ APK 洗液或适当的缓冲剂进行洗涤,然后接受约 600 $\mu$ l 的蒸发抑制液。蛋白质、碳水化合物、和酶可用荧光直接标记,或者使用适当的检测技术间接地标记。在规定的染色工序结束时,制备载片以使用自动净化程序加盖玻片、已加上盖玻片后、在显微镜下观察适当的染色,其中所述样品可以是 DNA/RNA、蛋白质、碳水化合物或酶。

以上列出的工序,包括各步骤的顺序,各试剂的应用,和上述温度参数优选是由生产者预先编入到主机程序内。一些参数,如反应时间,可由使用者任意变动的。试验的初始程序是灵活的,足以允许方案的复杂操作以及在将探针添加到靶组织或样品之前或之后添加多种试剂(5-6 种试剂)。

在试验运行中或各次运行之间,温度控制为靶温度的  $\pm 1\%$ ,并可以如上已描述的进行控制。操作者在同一试验中可进行多个复杂的 ISH 方案,这包括能够对 ISH 方法设计程序方案,所述方案在相同的变性温度下运行。同样,该系统也便于操作者校正载片温度,而不必使麻烦地拆卸装置。通过可靠的途径而保护使用者限定的 ISH 方案的方案变化。该系统对于载片和试剂系统通过条形码驱动。还可选择操作者对所有主要的硬件功能可进行人工控制,包括试剂分配、洗液分配、盖片(高和低温度)分配、载片标识和温度控制,这就有助于使用者查找故障。使用者限定的方案可使操作者控制除了检测温度以外所有反应阶段的温度。软件包括存储在软件中的预先编制的优化方案,以使连续引入优化的一切齐全即可使用的(turnkey)探针。

### 实施例

以下非限定性的实施例进一步详细说明本发明的用途和应用

#### 实施例 1

使用自动的原位杂交对人乳头瘤病毒的高危菌株的检测

一种宫颈涂片,通过标准收集装置如细胞刷或 Thin Prep<sup>TM</sup>载片法(Cytec



Inc)收集,其通常用巴帕尼科拉乌染剂(papanicolau)染色法染色(Pap Smear),用该涂片进行探针原位杂交,其中所用探针对高危型 HPV 特异。将样品载片按照本发明装入所述装置(以下称“染色装置”)的载片夹持器上。设置该系统运行 HPV 原位程序。该程序完成原位反应的所有步骤,而一旦程序开始,不需要来自使用者的反应。

染色装置首先进行载片的预处理:在室温用 1×APK(10×APK Ventana P/N250-042)清洗并使用 Coverslip™,然后,在 37℃,用蛋白酶 I(Protease I)进行 4 分钟的蛋白酶消化,随后是在 2×SSC 中的清洗步骤。2×SSC 清洗后,使残留的载片容积从 300μl 减少到约 100μl,并使用 Coverslip™。从 Ventana 可确定分配器(Ventana definable dispenser)向载片中加入与杂交溶液予混合(cocktail premixed)的 FITC-标记 DNA 探针合剂(FITC-label DNA probe cocktail),使样品和载片加热到 72℃持续 4 分钟,以便对探针和样品 DNA 进行变性。然后染色装置迅速将载片温度降至 37℃,并在 37℃杂交 2 小时。该染色装置从载片上去除探针混合物和 Coverslip™,并进行后杂交洗涤。向载片添加杂交后洗液(2×SSC)和并将 coverslip,加于载片上,且所述装置将该载片加热到 45℃持续 10 分钟。该染色装置去除杂交后洗液,并开始检测步骤。首先,染该色装置用 1×APK 清洗各载片,并加上盖片。然后,由分配器向载片施加抗-FITC(Serotec P/N MCA1320)抗体,并将载片保温 20 分钟,同时加热载片到 37℃,接着通过 APK 清洗和加上盖片。随后加入生物素标记的第二抗体,并在 37℃保温 8 分钟,接着也进行 APK 清洗并加上盖片。将 Streptavidin-Alkaline 磷酸盐偶联物放置在载片上,所述染色装置将载片在 37℃保温 30 分钟。用 APK 清洗后,向载片加入 Ventana Blue 检测剂,并在室温下保温 20 分钟,Ventana Blue Kit(P/N760-060)包括生物素标记的第二抗体、链霉抗生物素-碱性磷酸酶和 NBT/BCIP 底物。用 DI 水清洗该载片,利用装置加热干燥载片,此时,在该载片上施加核速红(Nuclear Fast Red)复染剂,室温下保温 5 分钟,再用水洗涤该载片。

## 实施例 2

利用自动原位杂交对石蜡包埋的组织中的 Epstein Bar 病毒(EBER)的 mRNA 进行检测

将脾(Spleen)#EBV 37A 切成 5μm 的切片,并放置在毛玻璃(supper frost)染色载片上。将样品载片按照本发明装入所述装置(以后本文称为“染色装

置” )的载片夹具。对所述染色装置进行程序编制以在原位程序中进行 EBER。该程序将完成原位反应的所有步骤，且一旦程序开始，不要求使用者的反应。

染色装置首先进行脱蜡：将各载片干燥加热到 65°C 持续 6 分钟，在室温用 DI 水洗涤载片，残留 300 $\mu$ l 残余体积和 600 $\mu$ l 液体盖片，防止蒸发并保护载片样品不干燥，温度保持在 65°C 以熔掉石蜡。用 DI 水洗涤载片完成细胞调节，然后，降低残留容积，并加入 200 $\mu$ l 细胞调节缓冲剂(柠檬酸盐缓冲剂)和 600 $\mu$ l 液体 Coverslip<sup>TM</sup>。将载片加热到 75°C，并在 40 分钟内每 8 分钟重新施加一次调节缓冲剂和 Coverslip<sup>TM</sup>。将载片温度冷却到 37°C，并用室温的 1 $\times$  APK 洗液(Ventana 10 $\times$  APK P/N250-042)洗涤载片，留下 $\approx$  300 $\mu$ l 残留载片体积，并施加约 600 $\mu$ l 液体盖片。在 37°C 用蛋白酶 I (Ventana P/N 250-2018)进行 8 分钟的蛋白酶消化。消化之后，用室温的 2 $\times$  SSC(20 $\times$  SSC Ventana P/N650-012)洗涤载片。使用所述染色装置中的容积减少器将残留载片容积从约 300 $\mu$ l 降到约 100 $\mu$ l，并向载片施加约 600 $\mu$ l 的液体盖片，设计为用于目标靶向 EBER 的 mRNA 的 Dig-标记的(Boehringer Mannheim cat#1417231)寡核苷酸探针，与杂交溶液进行预混合，并将试剂放置进 Ventana 使用者限定的分配器(Ventana P/N 551-761)中。向样品中施加探针，并将载片加热到 75°C 持续 4 分钟，使所述寡核苷酸和样品 mRNA 解链。所述染色装置将载片温度迅速调到 37°C，并杂交 2 小时。染色装置从载片去除了探针溶液和 Coverslip<sup>TM</sup>，并进行 3 次杂交后洗涤。杂交后洗液包括在 42°C 用 2 $\times$  SSC 洗涤载片 4 分钟，然后用 1 $\times$  SSC 在 42°C 洗涤 4 分钟，最后在 42°C 用 0.5 $\times$  SSC 洗涤 4 分钟。然后，该染色装置进行检测步骤。用 1 $\times$  APK 洗涤载片，并施加盖片。向载片施加抗 - Dig 抗体(Sigma P/ND-8156)，并在 37°C 保温 16 分钟，接着用 1 $\times$  APK 洗涤并使用 Coverslip<sup>TM</sup>。然后向所述载片加入生物素标记的第二抗体，在 37°C 保温 8 分钟，接着用 1 $\times$  APK 洗涤并加上盖片。使用第二抗体后，施加链霉抗生物素-碱性磷酸盐偶联物，并在 37°C 保温 30 分钟。在 APK 洗涤并加上盖片后，向样品施加 Ventana Blue 检测试剂，并在 37°C 保温 20 分钟。然后将载片用水洗涤，并用该装置加热干燥，生物素标记的第二抗体、链霉抗生物素-碱性磷酸酶，和检测试剂是 Ventana Blue Kit(Ventana P/N 760-060)的组分。样品脱水后，用玻璃盖片盖住载片，并进行显微镜观察。

---

虽然本文描述了本发明的一些优选实施方案，但是，很明显，本发明所属技术领域的技术人员对所述实施方案的变动和改进不偏离本发明的精神和范围。因此，认为本发明仅受到所附权利要求所要求的范围和法律适用条款的限制。

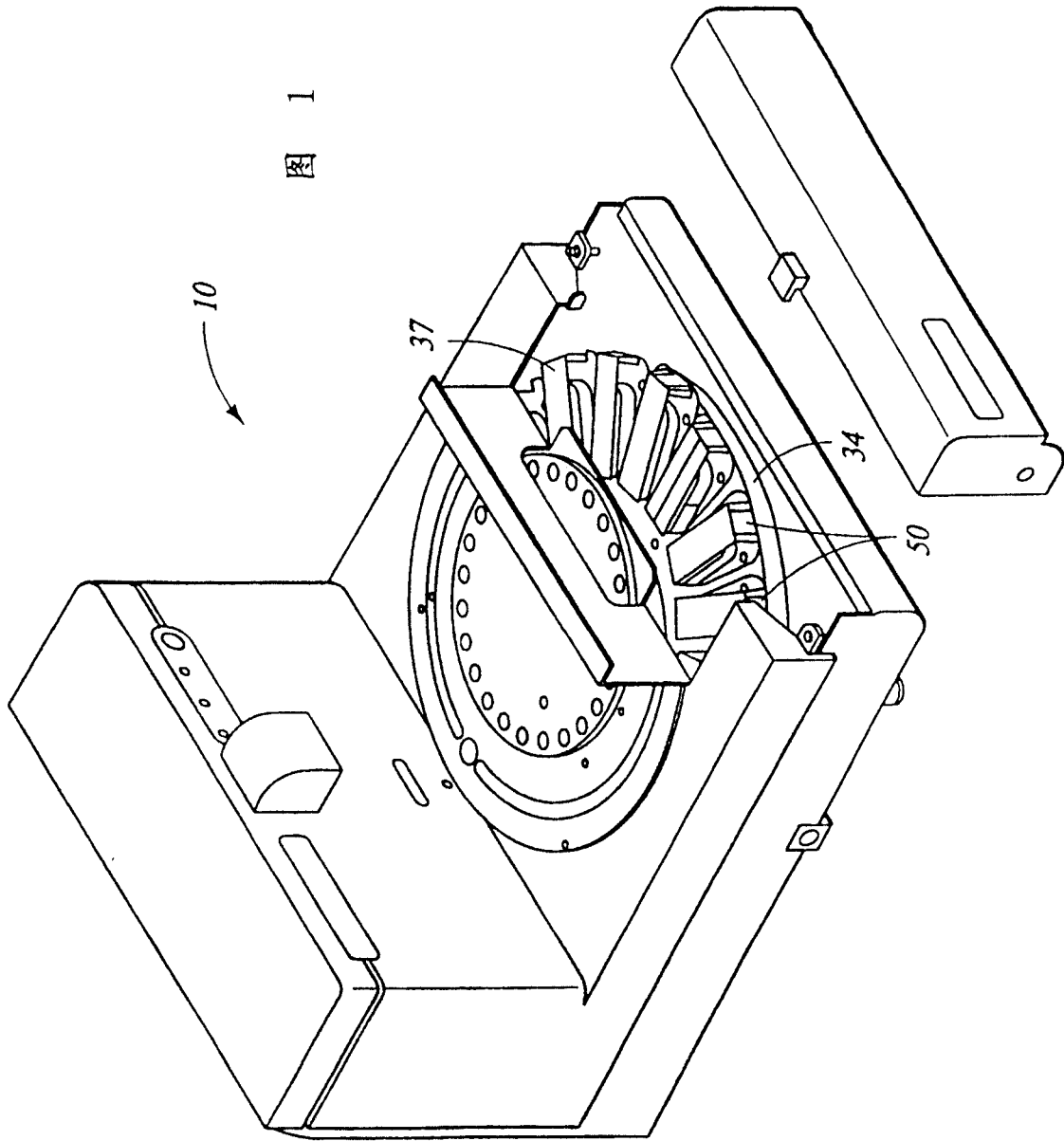


图 1

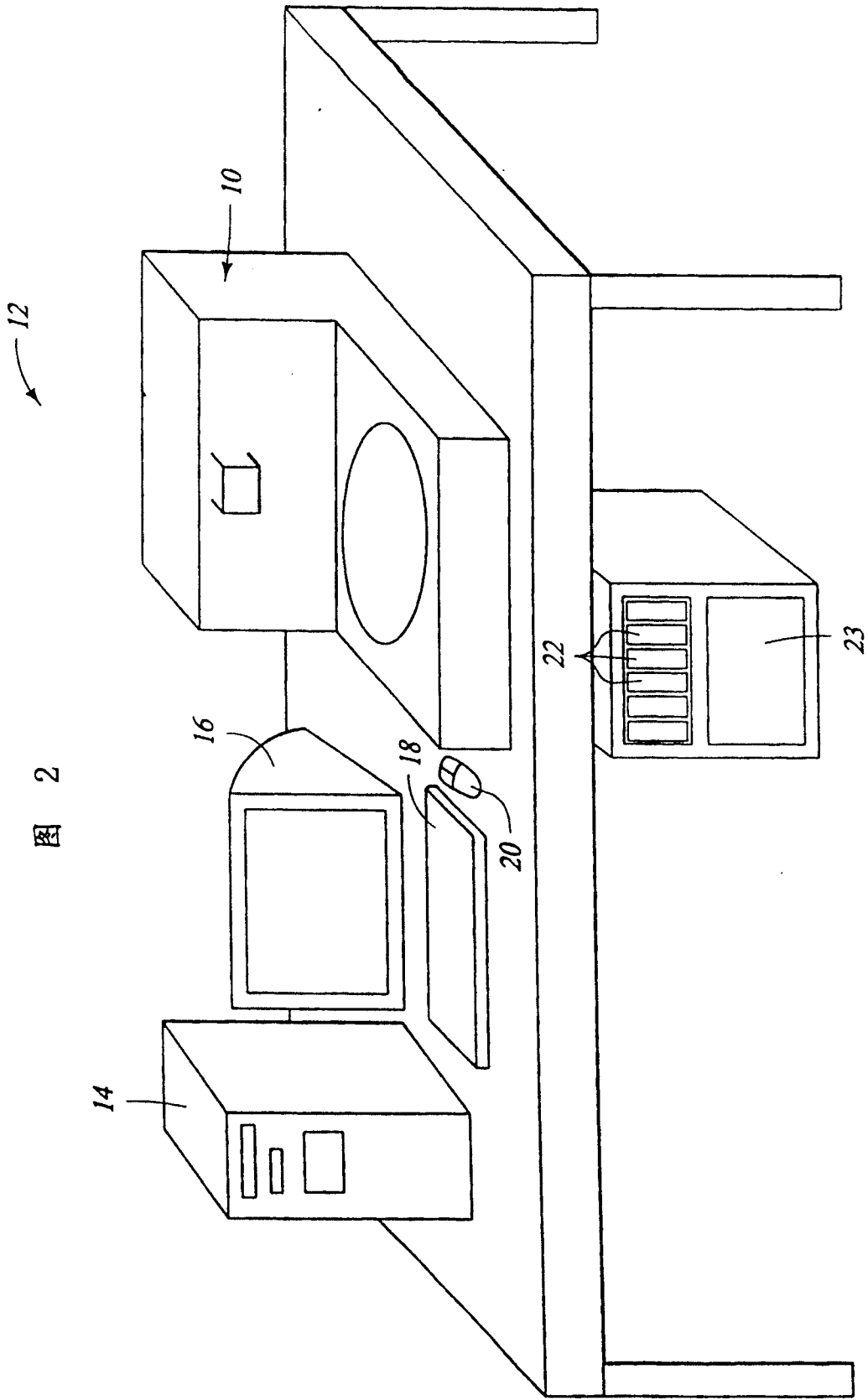


图 2

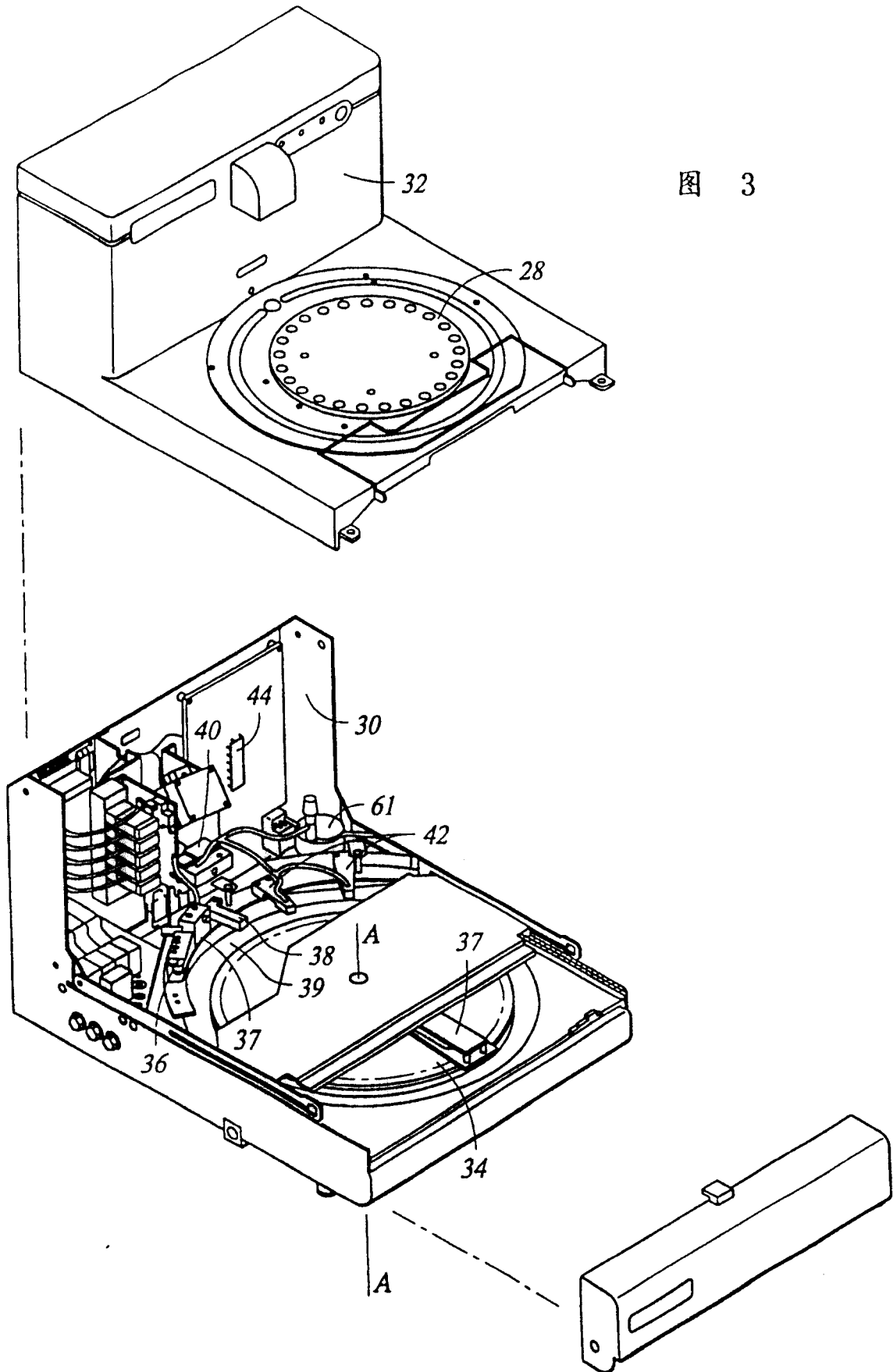


图 3

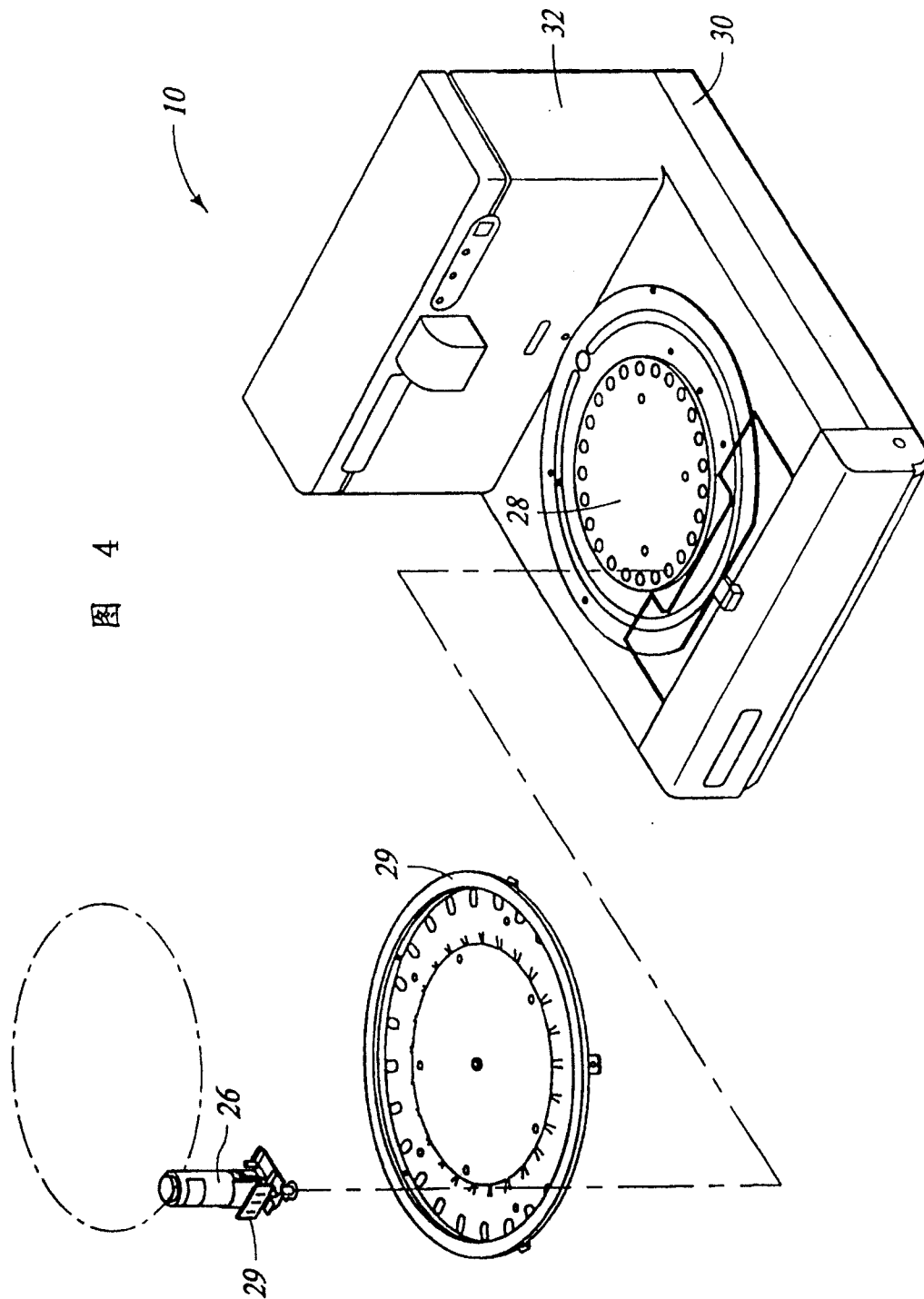


图 4

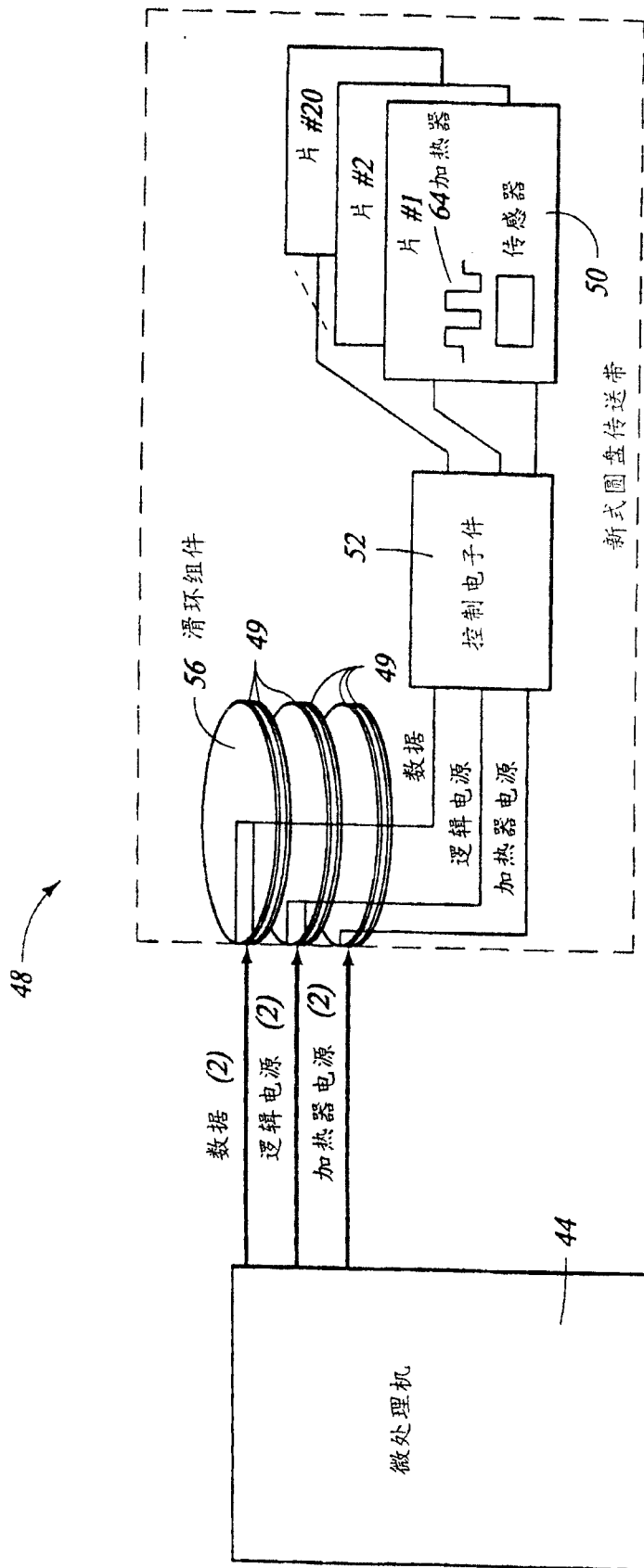


图 5



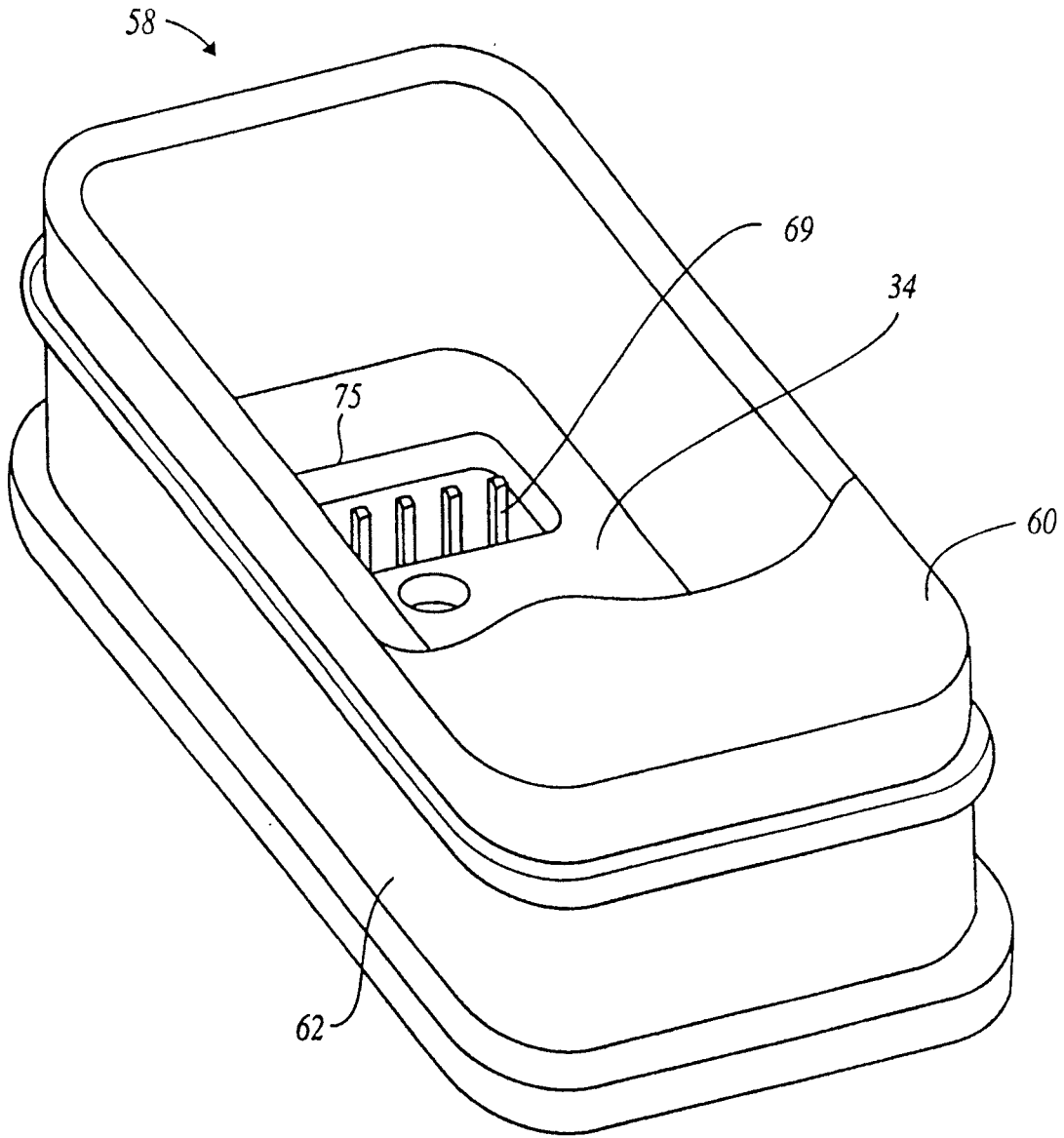


图 6

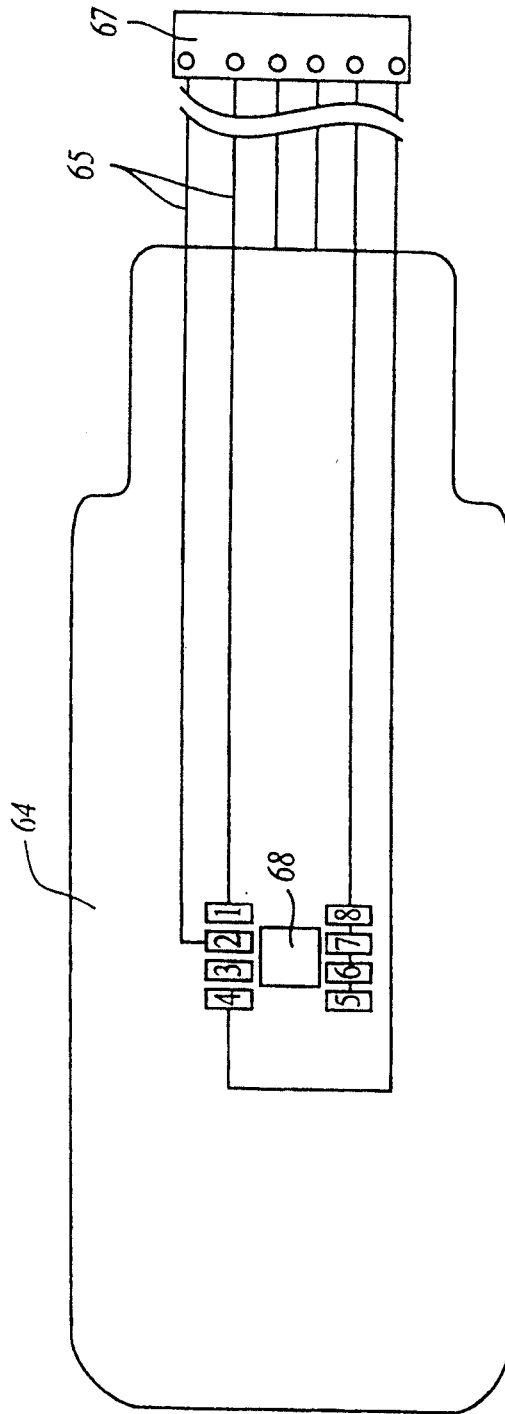
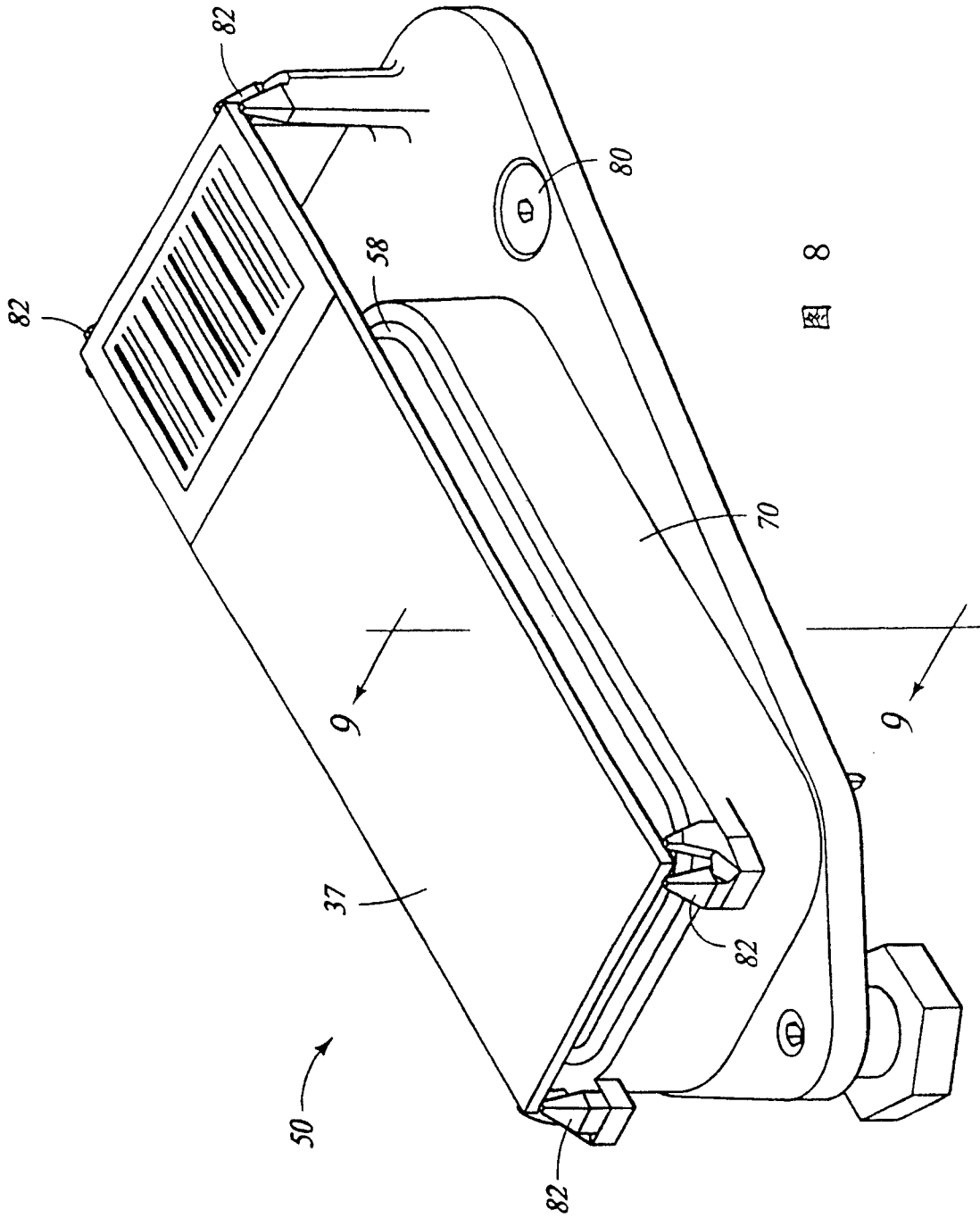


图 7



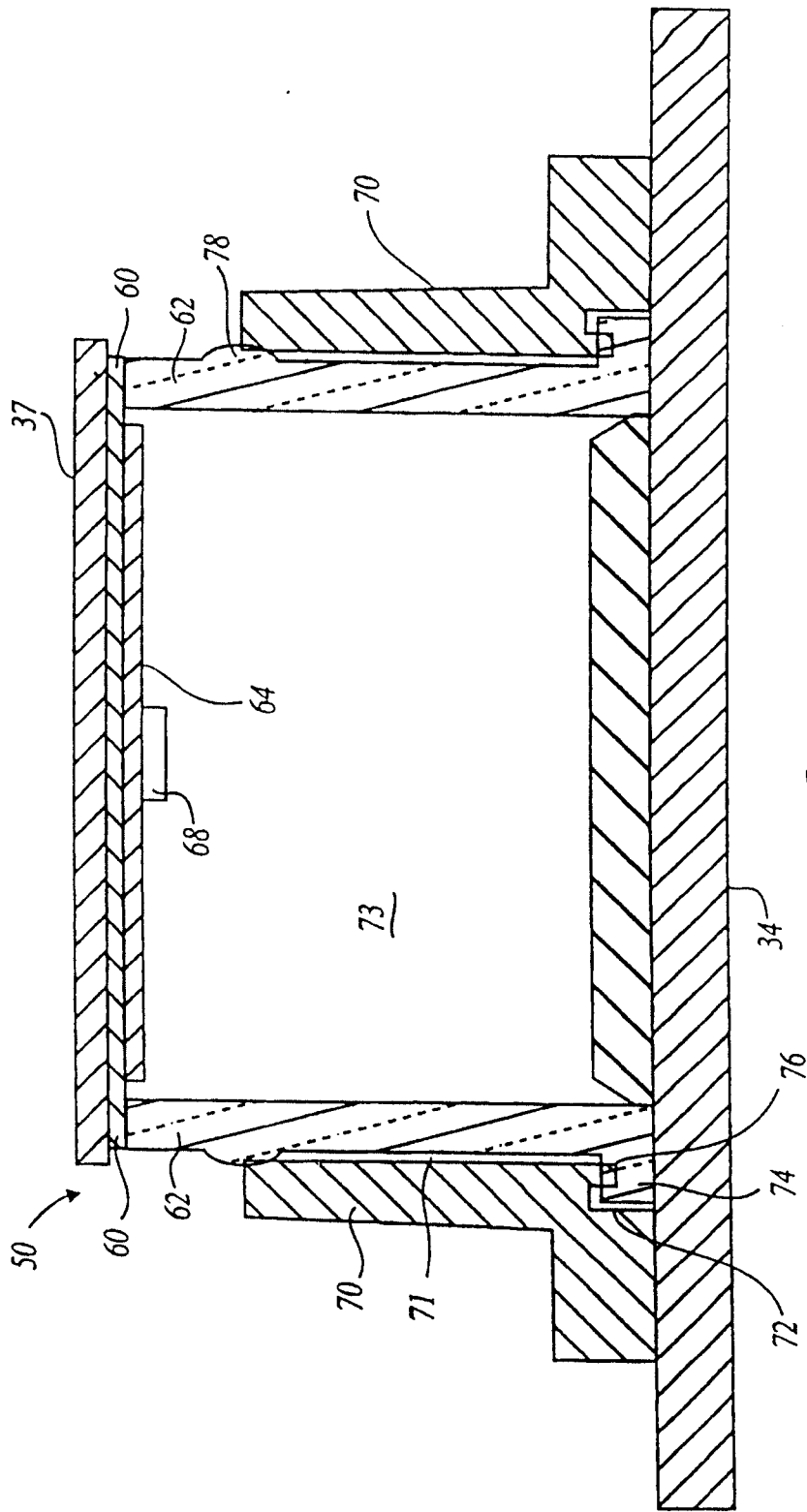
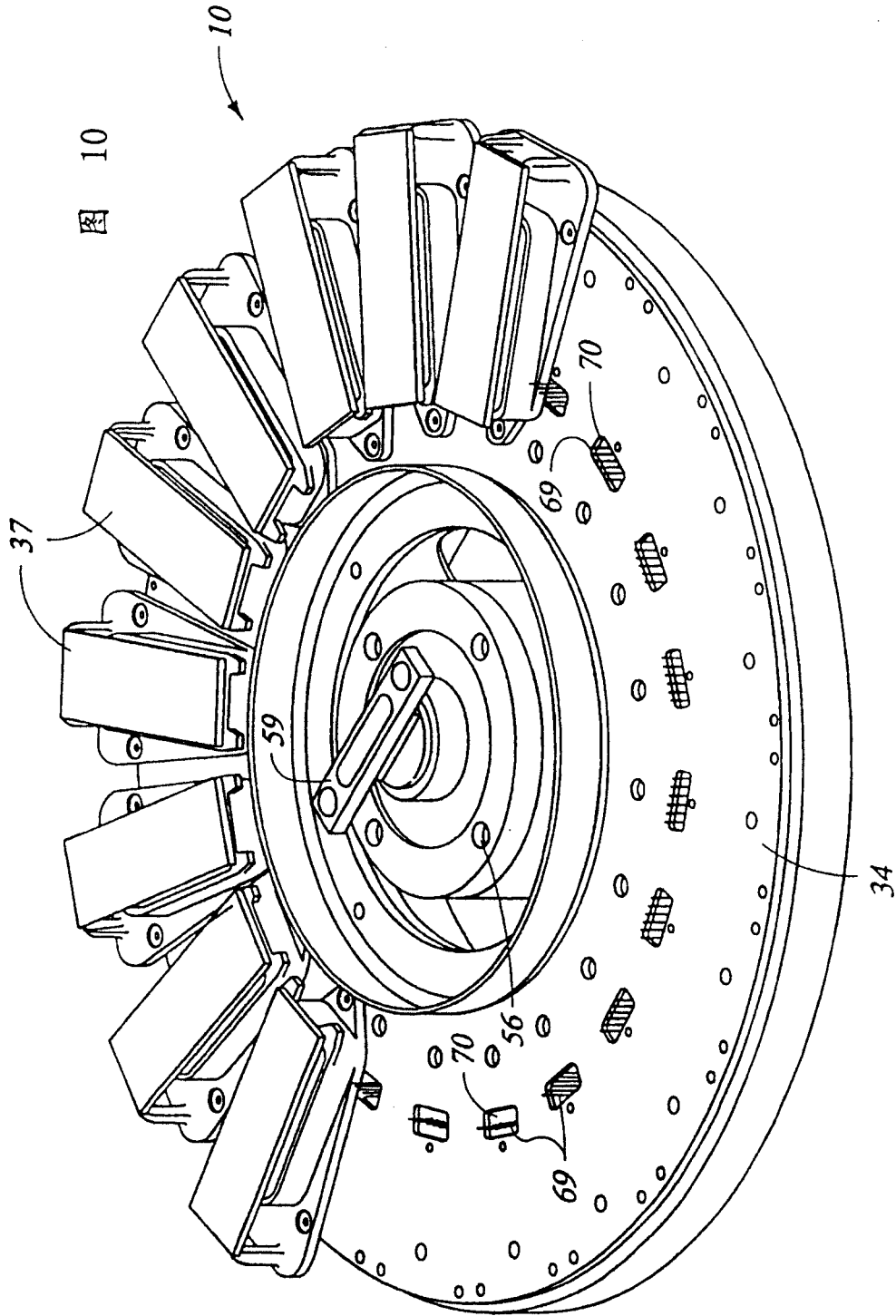


图 9



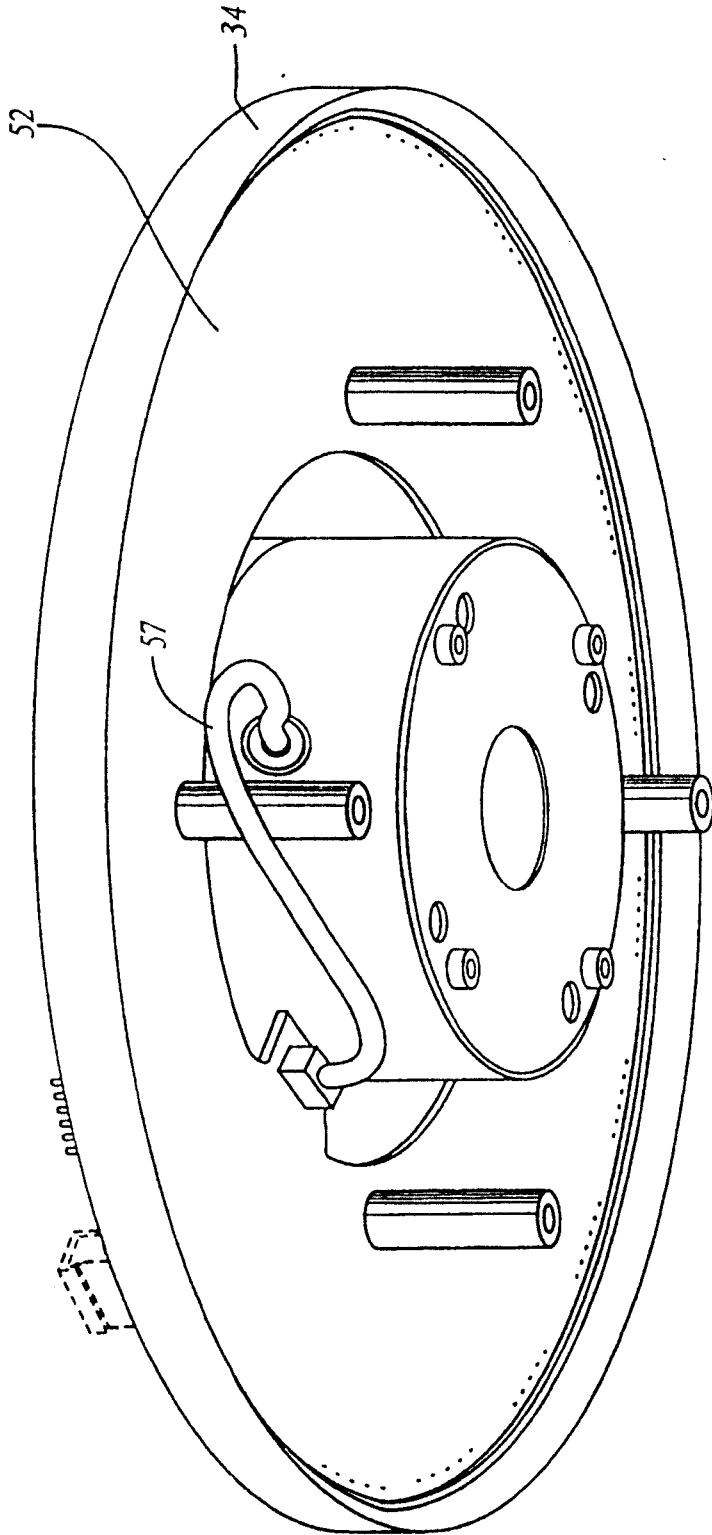


图 11

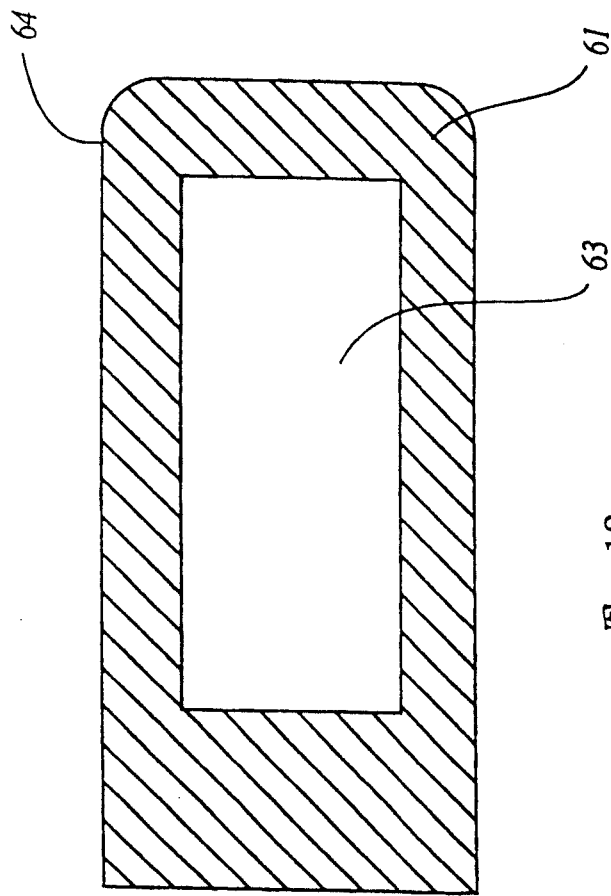


图 12

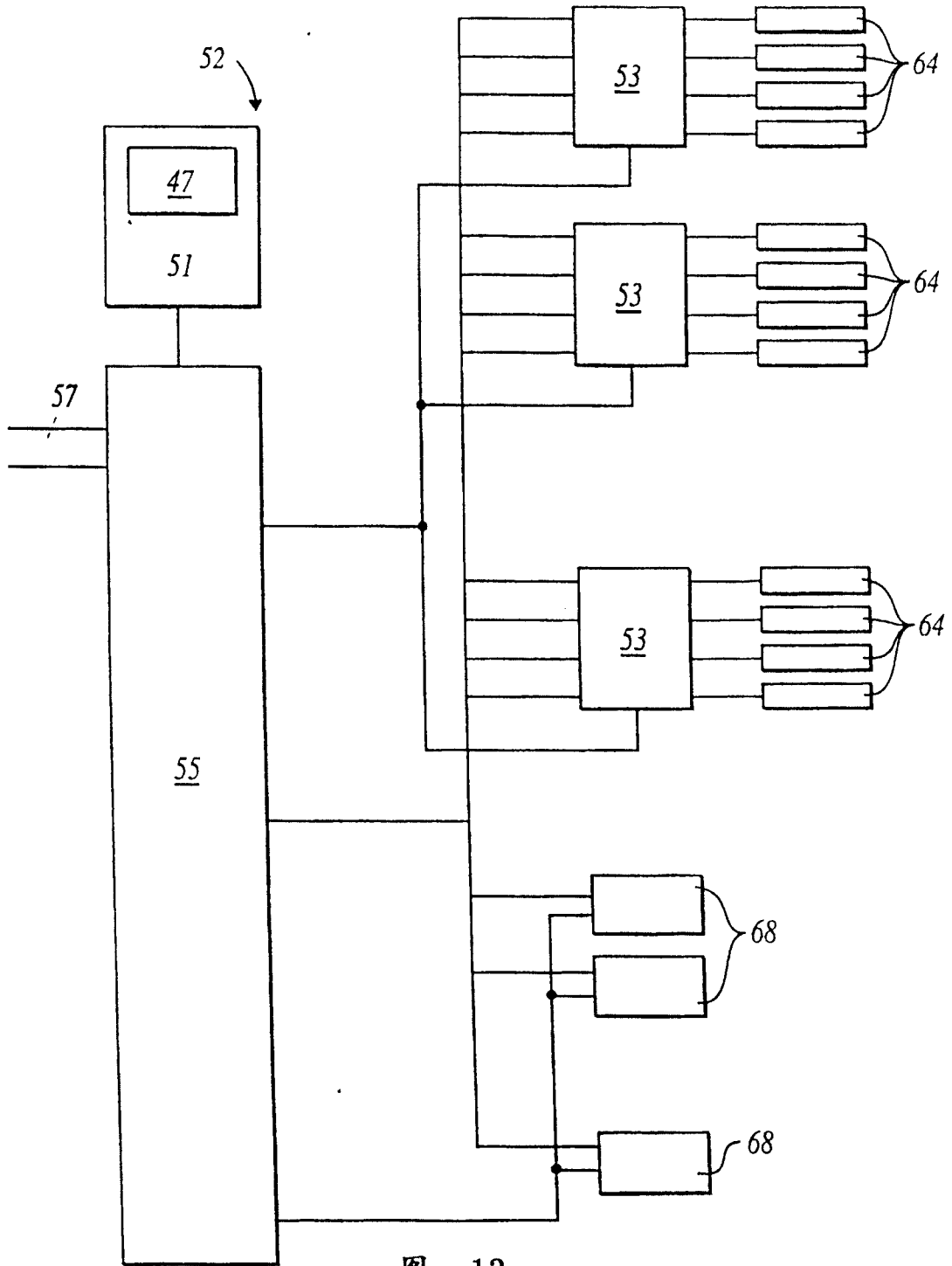


图 13



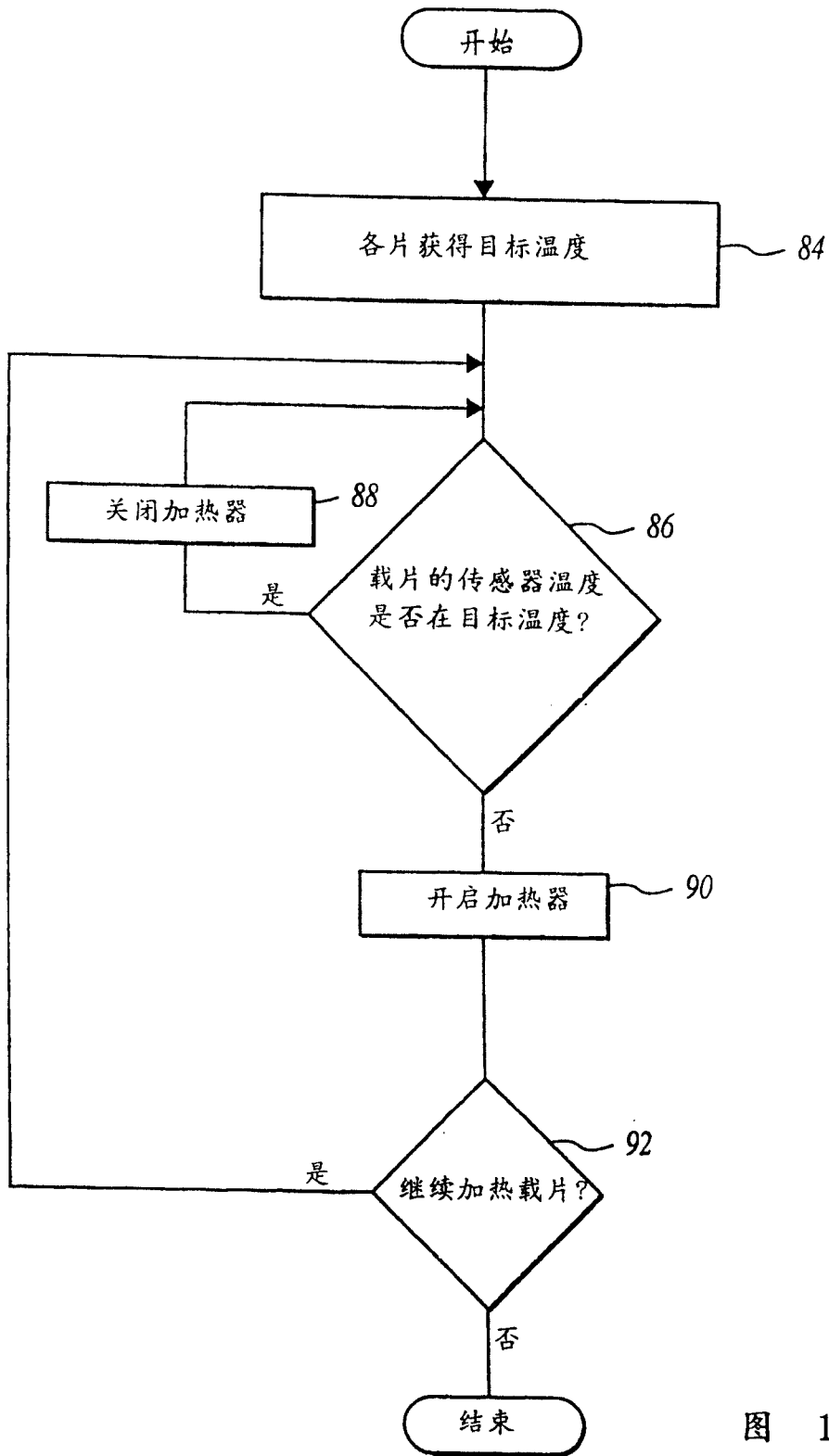


图 14

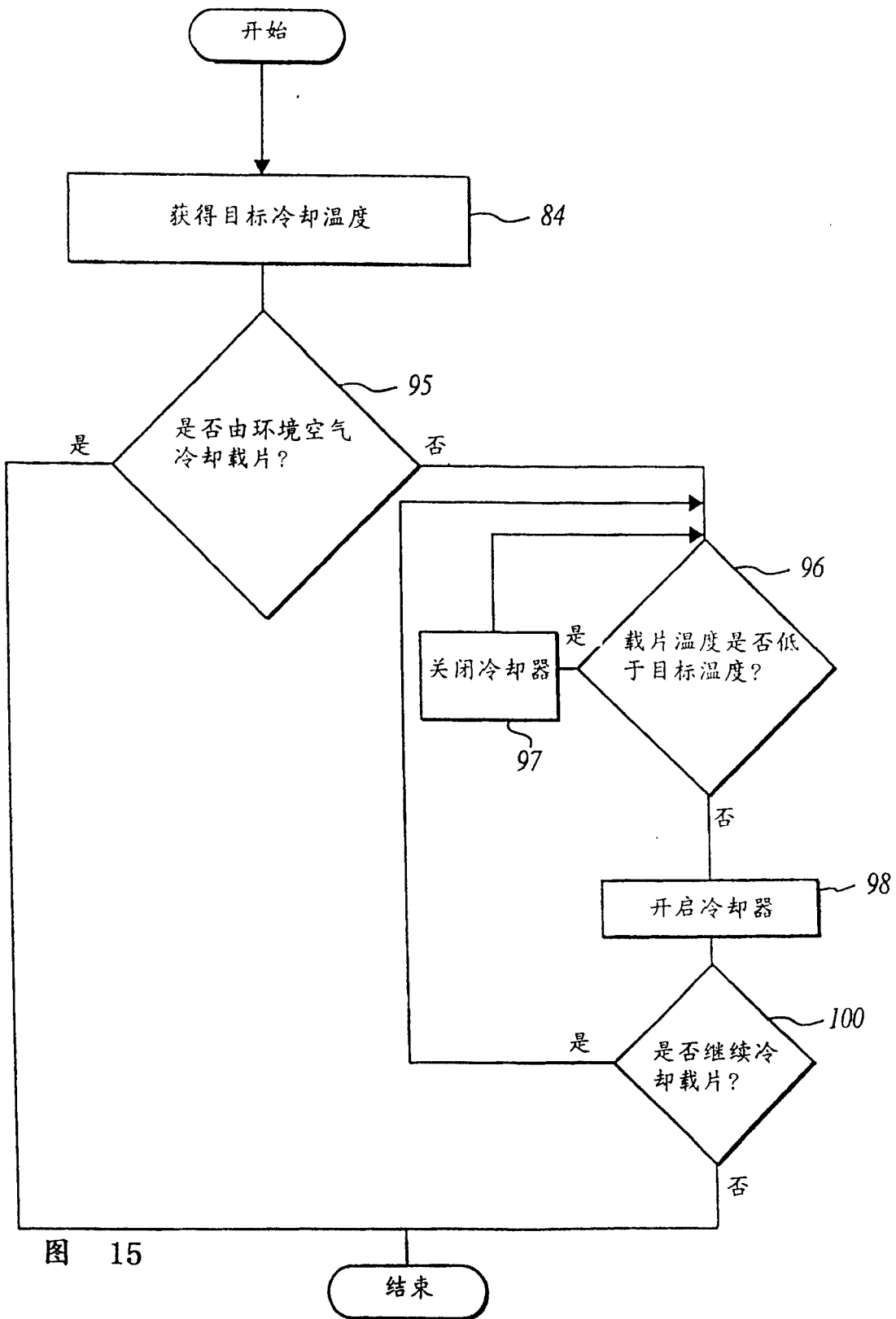


图 15

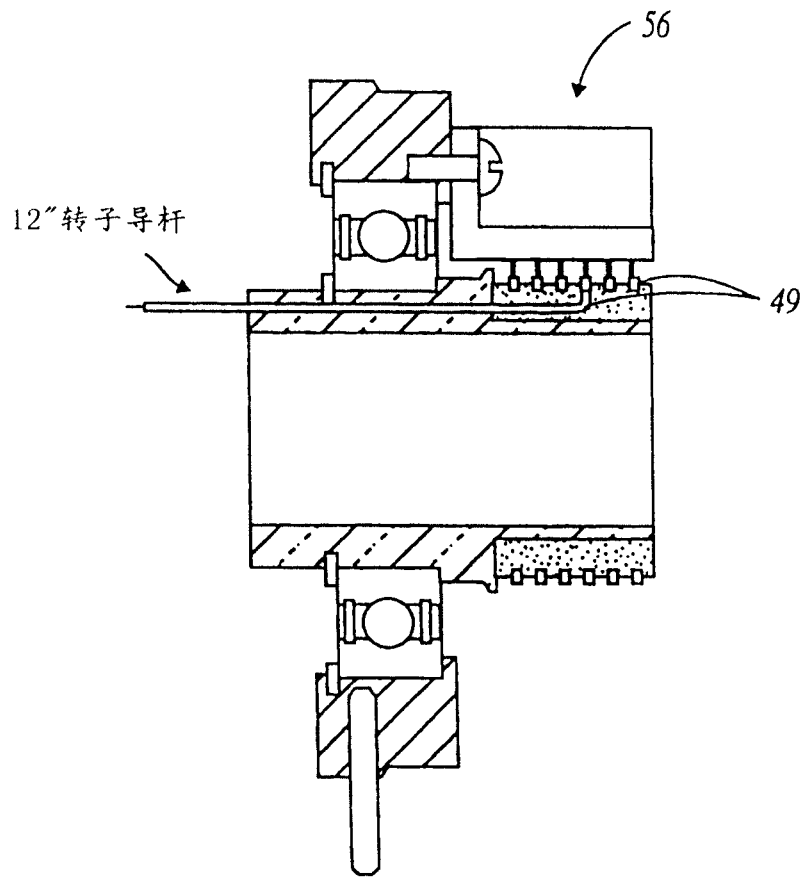


图 16