



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107949790 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 26

(21) 申请号 201680051653.X  
 (22) 申请日 2016.08.08  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107949790 A  
 (43) 申请公布日 2018.04.20  
 (30) 优先权数据  
 62/201,978 2015.08.06 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2018.03.07  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/US2016/045981 2016.08.08  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 W02017/024298 EN 2017.02.09  
 (73) 专利权人 安捷伦科技有限公司  
 地址 美国加利福尼亚州  
 (72) 发明人 M·希利 X·陈 J·王 W·吴  
 S·彼得里琴科 S·张 S·弗莱

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理  
 有限责任公司 11258  
 专利代理师 赵艳

(51) Int.Cl.  
 G01N 33/533 (2006.01)  
 G01N 21/63 (2006.01)

(56) 对比文件  
 US 2014/0120532 A1, 2014.05.01  
 US 2011/0311966 A1, 2011.12.22  
 CN 101330931 A, 2008.12.24  
 US 2005/0017191 A1, 2005.06.27  
 CN 101203596 A, 2008.06.18  
 Roger Ramos, et al. Photocleavage of  
 Peptides and Oligodeoxynucleotides  
 Carrying 2-Nitrobenzyl Groups. 《Helvetica  
 Chimica Acta》. 2009,

审查员 许珊萍

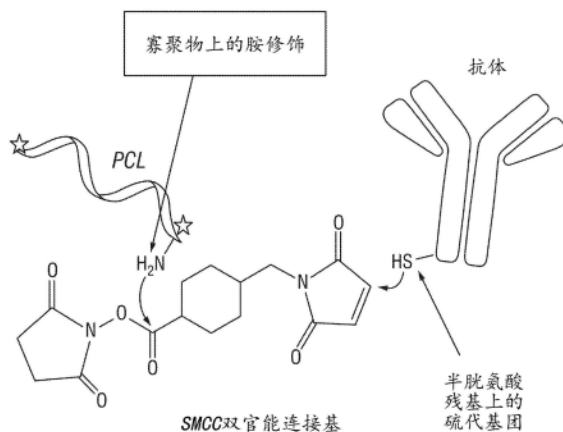
权利要求书7页 说明书27页  
 序列表4页 附图26页

## (54) 发明名称

使用光可裂解标记进行抗原检测

## (57) 摘要

本文提供了使用光可裂解标记进行多重和连续抗原检测的方法。所述方法包括检测光可裂解标记的存在,所述光可裂解标记通过官能连接基与抗原结合复合物缀合,所述抗原结合复合物继而与抗原非共价结合。所述光可裂解标记的存在指示由抗原结合复合物特异性或选择性结合的抗原的存在。本发明还提供了用于使用光可裂解标记进行多重和连续抗原检测的装置。



1. 一种用于检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,所述样品包括能够特异性结合所述第一抗原的第一抗原结合复合物,其中所述第一抗原结合复合物由式(II)定义:

一级抗体

|

缀合部分,

并且包括与缀合部分结合的一级抗体,并且其中所述第一抗原结合复合物与所述第一抗原非共价结合形成式(III)的抗原结合性抗原结合复合物:

抗原

|

一级抗体

|

缀合部分

|

官能连接基

|

光可裂解标记,

则所述方法包括检测所述样品中的光可裂解标记的存在,其中所述光可裂解标记的存在指示所述第一抗原的存在,其中所述光可裂解标记通过官能连接基与所述第一抗原结合复合物缀合,条件是所述官能连接基是部分双链寡核苷酸,所述光可裂解标记包括与光可裂解部分共价结合的报道分子部分,并且所述缀合部分是异双官能连接基;

其中所述方法还包括光裂解所述光可裂解标记;其中光裂解包括使所述样品暴露于紫外光。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述光可裂解部分选自由以下项组成的组:2-硝基苄基基团、苯偶姻基基团、香豆素基基团和对羟基苯甲酰基基团。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述光可裂解部分是2-硝基苄基基团。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述2-硝基苄基基团包括在所述2-硝基苄基基团的 $\alpha$ -碳和/或苯环上的取代。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述部分双链寡核苷酸是发夹寡核苷酸。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一级抗体被至少一种还原剂修饰。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一种还原剂是TCEP或2-MEA。

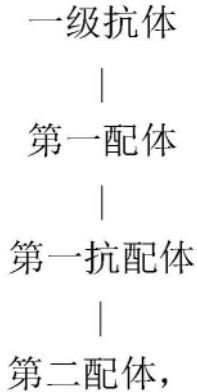
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述异双官能连接基是磺基-SMCC或SM(PEG)<sub>n</sub>。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缀合部分与所述一级抗体共价连接。

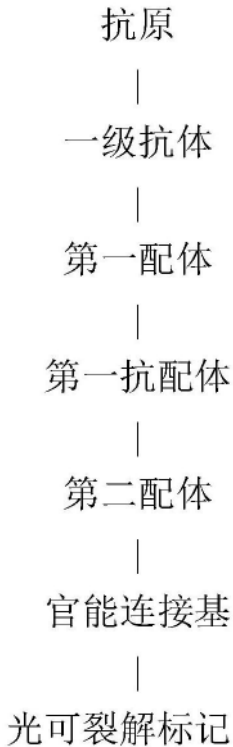
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述缀合部分与所述官能连接基共价连接。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述官能连接基是在5'末端具有C6氨基修饰且在3'末端具有光可裂解标记的部分双链寡核苷酸。

12. 一种用于检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,所述样品包括能够特异性结合所述第一抗原的第一抗原结合复合物,其中所述第一抗原结合复合物由式(VI)定义:



其中所述第一抗原结合复合物包括与第一配体共价结合的一级抗体,其中所述第一配体与第一抗配体非共价结合,其中所述第二配体与所述第一抗配体非共价结合,其中抗原结合性抗原结合复合物由式(VII)进一步定义:



所述方法包括检测所述样品中的光可裂解标记的存在,其中所述光可裂解标记的存在指示所述第一抗原的存在,其中所述光可裂解标记通过官能连接基与所述第二配体缀合,并且所述官能连接基是部分双链寡核苷酸,条件是所述光可裂解标记包括与光可裂解部分共价结合的报道分子部分。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述方法还包括使所述样品与所述一级抗体、所述第一抗配体和/或所述第二配体顺序地接触。

14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述方法还包括使所述样品与所述一级抗体、所述第一抗配体和/或所述第二配体同时接触。

15. 根据权利要求12所述的方法,其中两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与所述第二配体共价结合。

16. 根据权利要求12所述的方法,其中所述部分双链寡核苷酸是发夹寡核苷酸。

17. 根据权利要求12所述的方法,其中所述第一配体是生物素或抗生物素蛋白或链霉亲和素。

18. 根据权利要求12所述的方法,其中所述第一抗配体是抗生物素蛋白或链霉亲和素或生物素。

19. 根据权利要求12所述的方法,其中所述第二配体是生物素或抗生物素蛋白或链霉亲和素。

20. 一种用于检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,所述样品包括能够特异性结合所述第一抗原的第一抗原结合复合物,其中所述第一抗原结合复合物由式(X)定义:

一级抗体

|

二级抗体

|

第一配体

|

第一抗配体

|

第二配体,

其中所述第一抗原结合复合物包括由二级抗体结合的一级抗体,其中所述二级抗体与第一配体共价结合,其中所述第一配体与第一抗配体非共价结合,其中所述第二配体与所述第一抗配体非共价结合,其中抗原结合性抗原结合复合物由式(XI)进一步定义:

抗原  
 |  
 一级抗体  
 |  
 二级抗体  
 |  
 第一配体  
 |  
 第一抗配体  
 |  
 第二配体  
 |  
 官能连接基  
 |  
 光可裂解标记,

所述方法包括检测所述样品中的光可裂解标记的存在,其中所述光可裂解标记的存在指示所述第一抗原的存在,其中所述光可裂解标记通过官能连接基与所述第二配体缀合,并且所述官能连接基是部分双链寡核苷酸,条件是所述光可裂解标记包括与光可裂解部分共价结合的报道分子部分。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述方法还包括使所述样品与所述一级抗体、所述二级抗体、所述第一抗配体和/或所述第二配体顺序地接触。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中所述方法还包括使所述样品与所述一级抗体、所述二级抗体、所述第一抗配体和/或所述第二配体同时接触。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与所述第二配体共价结合。

24. 根据权利要求20所述的方法,其中所述部分双链寡核苷酸是发夹寡核苷酸。

25. 根据权利要求20所述的方法,其中所述第一配体是生物素或抗生物素蛋白或链霉亲和素。

26. 根据权利要求20所述的方法,其中所述第一抗配体是抗生物素蛋白或链霉亲和素或生物素。

27. 根据权利要求20所述的方法,其中所述第二配体是生物素或抗生物素蛋白或链霉亲和素。

28. 根据权利要求1、12和20中任一项所述的方法,其中所述方法被定义为检测所述样品中至少两种抗原的存在的方法,所述方法还包括检测所述样品中至少第二光可裂解标记的存在,其中所述第二光可裂解标记通过官能连接基与第二抗原结合复合物缀合,其中所

述第二抗原结合复合物与所述第二抗原结合,其中所述第二光可裂解标记的存在指示所述第二抗原的存在。

29.根据权利要求28所述的方法,其中检测所述第一光可裂解标记和检测所述第二光可裂解标记同时进行。

30.根据权利要求28所述的方法,其中所述第一抗原结合复合物和所述第二抗原结合复合物各自包括独特的光可裂解标记。

31.根据权利要求28所述的方法,其中所述第一抗原结合复合物和所述第二抗原结合复合物各自包括相同的光可裂解标记。

32.根据权利要求28所述的方法,其中检测所述第一光可裂解标记和检测所述第二光可裂解标记顺序地进行。

33.根据权利要求32所述的方法,还包括在检测所述第二光可裂解标记之前,光裂解所述第一光可裂解标记。

34.根据权利要求33所述的方法,其中光裂解包括使所述样品暴露于紫外光。

35.根据权利要求32所述的方法,还包括在所述第二光可裂解标记的检测之后,光裂解所述第二光可裂解标记。

36.根据权利要求35所述的方法,其中光裂解包括使所述样品暴露于紫外光。

37.根据权利要求28所述的方法,其中所述方法还被定义为自动化方法。

38.根据权利要求1、12和20中任一项所述的方法,其中所述光可裂解标记是比色染料、荧光染料、放射性标记、化学发光基团或生物发光基团。

39.根据权利要求1、12和20中任一项所述的方法,其中所述样品是组织切片、活检样品、细胞培养物样品、细胞涂片或蛋白质溶解产物。

40.一种被配置为执行权利要求1-39中任一项所述方法的装置,所述装置包括:

成像系统,所述成像系统被配置为对所述样品成像;

样品室,所述样品室包括流体入口和流体出口;以及

流体控制系统,所述流体控制系统包括多个储存器,其中:

所述流体控制系统与所述样品室的所述流体入口和所述流体出口流体连通。

41.根据权利要求40所述的装置,其中所述流体控制系统被配置为提供所述样品的自动化连续染色。

42.根据权利要求40所述的装置,其中所述流体控制系统还包括与所述样品室和所述多个储存器流体连通的阀。

43.根据权利要求42所述的装置,其中所述阀为回转阀。

44.根据权利要求40所述的装置,还包括:

光源,所述光源被配置为从所述第一抗原上光裂解所述第一抗原结合复合物。

45.根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:

容纳成像溶液的第一储存器。

46.根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:

容纳洗涤溶液的第二储存器。

47.根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:

容纳裂解溶液的第三储存器。

48. 根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:  
容纳缓冲溶液的第四储存器。
49. 根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:  
容纳杂交洗涤溶液的第五储存器。
50. 根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:  
容纳杂交溶液的第六储存器。
51. 根据权利要求40所述的装置,其中所述多个储存器包括:  
容纳成像溶液的第一储存器;  
容纳洗涤溶液的第二储存器;  
容纳裂解溶液的第三储存器;  
容纳缓冲溶液的第四储存器;  
容纳杂交洗涤溶液的第五储存器;以及  
容纳杂交溶液的第六储存器。
52. 根据权利要求51所述的装置,其中所述流体控制系统还包括与所述样品室以及与  
所述第一储存器、第二储存器、第三储存器、第四储存器、第五储存器和第六储存器流体连  
通的阀。
53. 根据权利要求40所述的装置,其中所述样品室包括:  
显微镜载片;  
盖片;以及  
垫圈,所述垫圈设置在所述显微镜载片和盖片之间。
54. 根据权利要求53所述的装置,其中所述样品室的所述流体入口和所述流体出口联  
接到所述盖片。
55. 根据权利要求40所述的装置,其中所述样品室联接到被配置为在X-Y平面中移动的  
平台。
56. 根据权利要求40所述的装置,其中所述样品室的所述流体出口联接到流体输送设  
备。
57. 根据权利要求56所述的装置,其中所述流体输送设备为注射泵。
58. 根据权利要求40所述的装置,其中所述成像系统包括:  
显微镜;  
光源;  
光导适配器;以及  
相机。
59. 根据权利要求40所述的装置,其中所述装置包括:  
样品室,所述样品室包括流体入口和流体出口;  
成像系统,所述成像系统被配置为对所述样品室中的样品成像;  
光源,所述光源被配置为从所述样品上或所述样品中的第一抗原上光裂解第一抗原结  
合复合物;以及  
流体控制系统,所述流体控制系统与所述样品室的所述流体入口和所述流体出口流体  
连通,其中所述流体控制系统包括与所述样品室流体连通的多个储存器。

60. 根据权利要求59所述的装置,其中所述流体控制系统被配置为提供所述样品的自动化连续染色。

61. 根据权利要求60所述的装置,其中所述成像系统被配置为提供所述样品的自动化成像。

62. 根据权利要求59所述的装置,其中所述多个储存器包括:

容纳成像溶液的第一储存器;  
容纳洗涤溶液的第二储存器;  
容纳裂解溶液的第三储存器;  
容纳缓冲溶液的第四储存器;  
容纳杂交洗涤溶液的第五储存器;以及  
容纳杂交溶液的第六储存器。

63. 根据权利要求62所述的装置,其中所述流体控制系统还包括与所述样品室以及所述第一储存器、第二储存器、第三储存器、第四储存器、第五储存器和第六储存器流体连通的阀。

64. 根据权利要求63所述的装置,其中所述阀为回转阀。

65. 根据权利要求59所述的装置,其中所述样品室包括:

显微镜载片;  
盖片;以及  
垫圈,所述垫圈设置在所述显微镜载片和盖片之间。

66. 根据权利要求59所述的装置,其中所述样品室联接到被配置为在X-Y平面中移动的平台。

67. 根据权利要求65所述的装置,其中所述样品室的所述流体入口和所述流体出口联接到所述盖片。

68. 根据权利要求59所述的装置,其中所述成像系统包括:

显微镜;  
光源;  
光导适配器;以及  
相机。

69. 根据权利要求59所述的装置,其中所述装置被配置为同时或通过随机存取对多个样品室进行染色和成像。

## 使用光可裂解标记进行抗原检测

[0001] 本申请要求2015年8月6日提交的美国临时申请号62/201,978的优先权,其全部内容以引用方式并入本文。

### 背景技术

[0002] 1. 技术领域

[0003] 本发明整体涉及组织学、病理学和分子生物学的领域。更具体地讲,涉及使用光可裂解标记(PCL)进行抗原检测,包括例如进行多重和连续抗原检测。

[0004] 2. 相关领域的描述

[0005] 在通常使用的免疫染色方案中,将抗原特异性抗体加入到含有抗原的标本(包括但不限于组织切片、细胞或蛋白质印迹)中并使其与抗原结合。然后使用多种技术中的任一种来检测这种抗原结合性抗体,该技术包括(a)将对第一抗体具有特异性亲和力的第二抗体与荧光团(例如,Cy5)或用于比色检测的酶(例如,HRP)缀合;(b)将对第一抗体具有特异性亲和力的第二抗体与生物素缀合,该生物素随后使用与荧光团(例如,Cy5)或用于比色检测的酶(例如,HRP)缀合的抗生物素蛋白或链霉亲和素进行检测;以及将(c)荧光团(例如,Cy5)或用于比色检测的酶(例如,HRP)或生物素与第一抗体直接缀合。在情况(a)和(b)中,此类技术允许在同一样品上使用约三种抗体,每种抗体被独特地标记。在情况(c)中,此类技术限于与可分别成像的不同标记缀合的约四种抗体。然而,二级抗体之间的非特异性相互作用和检测单独标记的有限能力阻止了更高阶的复合。正在涌现新的多重技术,但许多都有缺点,例如,耗时、昂贵和/或需要广泛优化的一级抗体。需要改进的用于自动化抗原检测的方法和仪器。

### 发明内容

[0006] 本文提供了使用光可裂解标记进行多重和连续抗原检测的方法。该方法包括检测光可裂解标记的存在,该光可裂解标记通过官能连接基与抗原结合复合物缀合,该抗原结合复合物继而与抗原非共价结合。因此,光可裂解标记的存在指示由抗原结合复合物特异性或选择性结合的抗原的存在。

[0007] 在一个方面,提供了用于检测样品上或样品中的至少第一抗原的存在的方法,该样品包括能够特异性结合该第一抗原的第一抗原结合复合物,该方法包括检测样品中的光可裂解标记的存在,其中该光可裂解标记通过官能连接基与该第一抗原结合复合物缀合,其中该第一抗原结合复合物与该第一抗原非共价结合形成式(I)的抗原结合性抗原结合复合物:

[0008] 抗原

[0009] |

[0010] 抗原结合复合物

[0011] |

[0012] 官能连接基

- [0013] |
- [0014] 光可裂解标记,
- [0015] 其中该光可裂解标记的存在指示该第一抗原的存在。
- [0016] 在一些实施方案中,该方法还包括光裂解该光可裂解标记。光裂解可包括使样品暴露于紫外光。
- [0017] 在一些实施方案中,光可裂解标记包括与光可裂解部分共价缀合的报道分子部分。光可裂解部分可以是2-硝基苄基基团、苯偶姻基基团、香豆素基基团或对羟基苯甲酰基基团。在各种实施方案中,光可裂解部分是2-硝基苄基基团。在某些实施方案中,2-硝基苄基基团包括在 $\alpha$ -碳和/或苯环上的取代。
- [0018] 在一些实施方案中,官能连接基是单链寡核苷酸、至少部分双链寡核苷酸、肽或链烷二基(alkanediyl) ( $C_{\leq 16}$ )。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是发夹寡核苷酸。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是完全双链寡核苷酸。
- [0019] 在一些实施方案中,第一抗原结合复合物由式(II)定义:
- [0020] 一级抗体
- [0021] |
- [0022] 缀合部分,
- [0023] 其中该第一抗原结合复合物包括与缀合部分结合的一级抗体,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(III)进一步定义:
- [0024] 抗原
- [0025] |
- [0026] 一级抗体
- [0027] |
- [0028] 缀合部分
- [0029] |
- [0030] 官能连接基
- [0031] |
- [0032] 光可裂解标记。
- [0033] 在一些实施方案中,该一级抗体被至少一种还原剂(诸如例如,TCEP或2-MEA)修饰。在一些实施方案中,该缀合部分是异双官能连接基,诸如例如磺基-SMCC或SM(PEG)<sub>n</sub>。在一些实施方案中,该缀合部分与一级抗体共价连接。在一些实施方案中,该缀合部分与官能连接基共价连接。在一些实施方案中,该官能连接基是在5'末端具有C6氨基修饰且在3'末端具有光可裂解标记的部分双链寡核苷酸。
- [0034] 在一些实施方案中,该第一抗原结合复合物由式(IV)定义:
- [0035] 一级抗体
- [0036] |
- [0037] 第一配体
- [0038] |
- [0039] 第一抗配体,
- [0040] 其中该第一抗原结合复合物包括与第一配体共价缀合的一级抗体,其中该第一配

体与第一抗配体非共价结合,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(V)进一步定义:

[0041] 抗原

[0042] |

[0043] 一级抗体

[0044] |

[0045] 第一配体

[0046] |

[0047] 第一抗配体

[0048] |

[0049] 官能连接基

[0050] |

[0051] 光可裂解标记。

[0052] 在一些实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体和第一抗配体顺序地接触。

在其他实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体和第一抗配体同时接触。第一配体可以是生物素、抗生物素蛋白或链霉亲和素或第一单链寡核苷酸。第一抗配体可以是抗生物素蛋白或链霉亲和素、生物素或与第一单链寡核苷酸至少部分互补的第二单链寡核苷酸。

[0053] 在一些实施方案中,该光可裂解标记通过官能连接基与第一抗配体共价结合。在一些实施方案中,两次出现的相同光可裂解标记通过官能连接基与第一抗配体共价结合。

在其他实施方案中,两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与第一抗配体共价结合。官能连接基可以是单链寡核苷酸、至少部分双链寡核苷酸(诸如但不限于发夹寡核苷酸)、肽或链烷二基<sub>(C<sub>≤16</sub>)</sub>。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是完全双链寡核苷酸。

[0054] 在一些实施方案中,该第一抗原结合复合物由式(VI)定义:

[0055] 一级抗体

[0056] |

[0057] 第一配体

[0058] |

[0059] 第一抗配体

[0060] |

[0061] 第二配体,

[0062] 其中该第一抗原结合复合物包括与第一配体共价结合的一级抗体,其中该第一配体与第一抗配体非共价结合,其中该第二配体与该第一抗配体非共价结合,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(VII)进一步定义:

[0063] 抗原

[0064] |

[0065] 一级抗体

[0066] |

[0067] 第一配体

[0068] |

[0069] 第一抗配体

[0070] |

[0071] 第二配体

[0072] |

[0073] 官能连接基

[0074] |

[0075] 光可裂解标记。

[0076] 在一些实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体、第一抗配体和/或第二配体顺序地接触。在其他实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体、第一抗配体和/或第二配体同时接触。第一配体可以是生物素、抗生物素蛋白或抗-抗生物素蛋白抗体。第一抗配体可以是抗生物素蛋白或链霉亲和素或生物素。第二配体可以是生物素、抗生物素蛋白或抗-抗生物素蛋白抗体。在一些方面,第一抗配体包括单链寡核苷酸,并且第二配体包括与该第一单链寡核苷酸至少部分互补的第二单链寡核苷酸。

[0077] 在一些实施方案中,该光可裂解标记通过官能连接基与第二配体共价结合。在一些实施方案中,两次出现的相同光可裂解标记通过官能连接基与第二配体共价结合。在其他实施方案中,两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与第二配体共价结合。官能连接基可以是单链寡核苷酸、至少部分双链寡核苷酸(诸如但不限于发夹寡核苷酸)、肽或链烷二基<sub>(C<sub>≤16</sub>)</sub>。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是完全双链寡核苷酸。

[0078] 在一些实施方案中,该第一抗原结合复合物由式(VIII)定义:

[0079] 一级抗体

[0080] |

[0081] 二级抗体

[0082] |

[0083] 第一配体

[0084] |

[0085] 第一抗配体,

[0086] 其中该第一抗原结合复合物包括由二级抗体结合的一级抗体,其中该二级抗体与第一配体共价结合,其中该第一配体与第一抗配体非共价结合,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(IX)进一步定义:

[0087] 抗原

[0088] |

[0089] 一级抗体

[0090] |

[0091] 二级抗体

[0092] |

[0093] 第一配体

[0094] |

[0095] 第一抗配体

[0096] |

[0097] 官能连接基

[0098] |

[0099] 光可裂解标记。

[0100] 在一些实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体、二级抗体和/或第一抗配体顺序地接触。在其他实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体、二级抗体和/或第一抗配体同时接触。第一配体可以是生物素、抗生物素蛋白或链霉亲和素或第一单链寡核苷酸。第一抗配体可以是抗生物素蛋白、链霉亲和素、生物素、抗-抗生物素蛋白或与第一单链寡核苷酸至少部分互补的第二单链寡核苷酸。

[0101] 在一些实施方案中,该光可裂解标记通过官能连接基与第一抗配体共价结合。在一些实施方案中,两次出现的相同光可裂解标记通过官能连接基与第一抗配体共价结合。在其他实施方案中,两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与第一抗配体共价结合。官能连接基可以是单链寡核苷酸、至少部分双链寡核苷酸(诸如但不限于发夹寡核苷酸)、肽或链烷二基( $C_{\leq 16}$ )。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是完全双链寡核苷酸。

[0102] 在一些实施方案中,第一抗原结合复合物由式(X)定义:

[0103] 一级抗体

[0104] |

[0105] 二级抗体

[0106] |

[0107] 第一配体

[0108] |

[0109] 第一抗配体

[0110] |

[0111] 第二配体,

[0112] 其中该第一抗原结合复合物包括由二级抗体结合的一级抗体,其中该二级抗体与第一配体共价结合,其中该第一配体与该第一抗配体非共价结合,其中该第二配体与该第一抗配体非共价结合,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(XI)进一步定义:

[0113] 抗原

[0114] |

[0115] 一级抗体

[0116] |

[0117] 二级抗体

[0118] |

[0119] 第一配体

[0120] |

[0121] 第一抗配体

[0122] |

[0123] 第二配体

[0124] |

[0125] 官能连接基

[0126] |

[0127] 光可裂解标记。

[0128] 在一些实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体、二级抗体、第一抗配体和/或第二配体顺序地接触。在其他实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体、二级抗体、第一抗配体和/或第二配体同时接触。第一配体可以是生物素或抗生物素蛋白或链霉亲和素。第一抗配体可以是抗生物素蛋白或链霉亲和素或生物素。第二配体可以是生物素或抗生物素蛋白或链霉亲和素。在一些方面,第一抗配体包括单链寡核苷酸,并且第二配体包括与该第一单链寡核苷酸至少部分互补的第二单链寡核苷酸。

[0129] 在一些实施方案中,该光可裂解标记通过官能连接基与第二配体共价结合。在一些实施方案中,两次出现的相同光可裂解标记通过官能连接基与第二配体共价结合。在其他实施方案中,两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与第二配体共价结合。官能连接基可以是单链寡核苷酸、至少部分双链寡核苷酸(诸如但不限于发夹寡核苷酸)、肽或链烷二基<sub>(C≤16)</sub>。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是完全双链寡核苷酸。

[0130] 在一些实施方案中,该第一抗原结合复合物由式(XII)定义:

[0131] 一级抗体

[0132] |

[0133] 二级抗体,

[0134] 其中该第一抗原结合复合物包括由二级抗体结合的一级抗体,其中该二级抗体通过官能连接基与光可裂解标记共价结合,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(XIII)进一步定义:

[0135] 抗原

[0136] |

[0137] 一级抗体

[0138] |

[0139] 二级抗体

[0140] |

[0141] 官能连接基

[0142] |

[0143] 光可裂解标记。

[0144] 在一些实施方案中,该方法还包括使所述样品与一级抗体和二级抗体顺序地接触。在其他实施方案中,该方法还包括使样品与一级抗体和二级抗体同时接触。

[0145] 在一些实施方案中,光可裂解标记通过官能连接基与二级抗体共价结合。在一些实施方案中,两次出现的相同光可裂解标记通过官能连接基与二级抗体共价结合。在其他实施方案中,两种不同的光可裂解标记通过官能连接基与二级抗体共价结合。官能连接基可以是单链寡核苷酸、至少部分双链寡核苷酸(诸如但不限于发夹寡核苷酸)、肽或链烷二基<sub>(C≤16)</sub>。在某些实施方案中,该至少部分双链寡核苷酸是完全双链寡核苷酸。

[0146] 在一些实施方案中,该第一抗原结合复合物包括适体,其中该适体通过官能连接基与该光可裂解标记共价结合,其中该抗原结合性抗原结合复合物由式(XIV)进一步定义:

[0147] 抗原

[0148] |

[0149] 适体

[0150] |

[0151] 官能连接基

[0152] |

[0153] 光可裂解标记。

[0154] 在一些实施方案中,该方法还包括使样品与适体接触。

[0155] 在一些实施方案中,该方法被定义为检测样品中至少两种抗原的存在的方法,该方法还包括检测样品中至少第二光可裂解标记的存在,其中该第二光可裂解标记通过官能连接基与第二抗原结合复合物缀合,其中该第二抗原结合复合物与该第二抗原结合,其中该第二光可裂解标记的存在指示该第二抗原的存在。同样地,该方法可被定义为检测样品中至少三种抗原的存在的方法,该方法还包括检测样品中至少第三光可裂解标记的存在,其中该第三光可裂解标记通过官能连接基与第三抗原结合复合物缀合,其中该第三抗原结合复合物与该第三抗原结合,其中该第三光可裂解标记的存在指示该第三抗原的存在。

[0156] 在一些实施方案中,检测第一光可裂解标记和检测第二光可裂解标记以及任选地检测第三光可裂解标记同时进行。在一些实施方案中,第一抗原结合复合物和第二抗原结合复合物各自包括独特的光可裂解标记。在其他实施方案中,第一抗原结合复合物和第二抗原结合复合物各自包括相同的光可裂解标记。在一些实施方案中,检测第一光可裂解标记和检测第二光可裂解标记顺序地进行。

[0157] 在一些实施方案中,该方法还包括在检测第二光可裂解标记之前光裂解第一光可裂解标记。在一些实施方案中,该方法还包括在第二光可裂解标记的检测之后光裂解第二光可裂解标记。在一些实施方案中,该方法还包括同时光裂解第一光可裂解标记和第二光可裂解标记。光裂解可包括使样品暴露于紫外光。

[0158] 在一些实施方案中,该方法还包括检测样品中的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100种抗原。可同时检测一些抗原,然后顺序地检测同一样品内的其他抗原。对于同时检测,每种抗原结合复合物包括独特的光可裂解标记。可同时检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20种不同的抗原。在抗原检测同时进行的方法中,可将各种抗原结合复合物顺序地加入到样品中,随后进行单个检测步骤。另选地,可同时加入抗原结合复合物中的一些。在各种实施方案中,该方法的步骤的至少一部分可以是自动化的。在一些实施方案中,该方法的所有步骤可以是自动化的。

[0159] 在一些实施方案中,光可裂解标记是比色染料、荧光染料、放射性标记、化学发光基团或生物发光基团。在一些实施方案中,样品是组织切片、活检样品、细胞培养物样品、细胞涂片或蛋白质溶解产物。

[0160] 某些实施方案包括被配置成进行本文所公开的任何方法的装置。特定实施方案包括:成像系统,其被配置成对样品成像;样品室,其包括流体入口和流体出口;以及流体控制系统,其包括多个储存器,其中该流体控制系统与样品室的流体入口和流体出口流体连通。

[0161] 在一些实施方案中,该流体控制系统被配置成提供样品的自动化连续染色。在特定实施方案中,该流体控制系统还包括与样品室和多个储存器流体连通的阀。在某些实施方案中,该阀是回转阀。特定实施方案还包括光源,其被配置为从第一抗原中光裂解第一抗

原结合复合物。在一些实施方案中,所述多个储存器包括容纳成像溶液的第一储存器、容纳洗涤溶液的第二储存器、容纳裂解溶液的第三储存器、容纳缓冲溶液的第四储存器、容纳杂交洗涤溶液的第五储存器和/或容纳杂交溶液的第六储存器。

[0162] 在特定实施方案中,该流体控制系统还包括与样品室以及与第一储存器、第二储存器、第三储存器、第四储存器、第五储存器和第六储存器流体连通的阀。在某些实施方案中,该样品室包括显微镜载片、盖片和设置在显微镜载片和盖片之间的垫圈。

[0163] 在特定实施方案中,该样品室的流体入口和流体出口联接到盖片。在一些实施方案中,样品室联接到被配置成在X-Y平面中移动的平台。在特定实施方案中,样品室的流体出口联接到流体输送设备。在某些实施方案中,该流体输送设备是注射泵。在特定实施方案中,该成像系统包括:显微镜;光源;光导适配器;和相机。

[0164] 特定实施方案包括用于检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的装置,该装置包括:样品室,其包括流体入口和流体出口;成像系统,其被配置成对样品室中的样品成像;光源,其被配置成从样品上或样品中的第一抗原中光裂解第一抗原结合复合物;以及流体控制系统,其与样品室的流体入口和流体出口流体连通,其中该流体控制系统包括与样品室流体连通的多个储存器。

[0165] 在特定实施方案中,该流体控制系统被配置为提供样品的自动化连续染色。在特定实施方案中,该成像系统被配置成提供样品的自动化成像。在一些实施方案中,所述多个储存器包括容纳成像溶液的第一储存器、容纳洗涤溶液的第二储存器、容纳裂解溶液的第三储存器、容纳缓冲溶液的第四储存器、容纳杂交洗涤溶液的第五储存器和容纳杂交溶液的第六储存器。在某些实施方案中,流体控制系统还包括与样品室以及与第一储存器、第二储存器、第三储存器、第四储存器、第五储存器和第六储存器流体连通的阀。在特定实施方案中,该阀是回转阀。在一些实施方案中,该样品室包括显微镜载片、盖片和设置在显微镜载片和盖片之间的垫圈。

[0166] 在特定实施方案中,该样品室联接到被配置成在X-Y平面中移动的平台。在某些实施方案中,该样品室的流体入口和流体出口联接到盖片。在特定实施方案中,该样品室的流体出口联接到流体输送设备。在一些实施方案中,该流体输送设备是注射泵。在特定实施方案中,该成像系统包括显微镜、光源、光导适配器和相机。在某些实施方案中,该装置被配置成同时或通过随机存取对多个样品室进行染色和成像。

[0167] 根据下述具体实施方式,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,在指出本发明的优选实施方案时仅以示例方式给出了详细描述和具体示例,因此根据本详细说明,在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对本领域的技术人员将变得显而易见。

## 附图说明

[0168] 本专利或申请文件包含至少一张彩色图纸。本专利或专利申请公布的一张或多张彩色图纸的副本将由办公室根据要求提供并需要支付费用。

[0169] 以下附图构成了本说明书的部分,并包括在内以进一步展示本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文呈现的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0170] 图1.使用单链生物素-寡核苷酸-光可裂解Cy5荧光染料检测组织切片中的抗原。作为对照包括生物素化的和荧光素标记的探针。

[0171] 图2.示例性的部分双链生物素-寡核苷酸-光可裂解荧光染料。上链的序列提供为SEQ ID NO:1;下链的序列提供为SEQ ID NO:2。

[0172] 图3.使用单链和部分双链的生物素-寡核苷酸-光可裂解Cy5荧光染料检测组织切片中的抗原。

[0173] 图4.与单个光可裂解荧光染料复合的示例性单链生物素-寡核苷酸-光可裂解标记。每个示例的序列提供为SEQ ID NO:3。

[0174] 图5.与两种相同颜色的可光裂解荧光染料复合的示例性双链生物素-寡核苷酸-光可裂解标记。第一示例(Cy5)的上链的序列提供为SEQ ID NO:3;第一示例(Cy5)的下链的序列提供为SEQ ID NO:4。第二示例(AF594)的上链的序列提供为SEQ ID NO:5;第二示例(AF594)的下链的序列提供为SEQ ID NO:6。第三示例(AF532)的上链的序列提供为SEQ ID NO:7;第三示例(AF532)的下链的序列提供为SEQ ID NO:8。第四示例(AF488)的上链的序列提供为SEQ ID NO:9;第四示例(AF488)的下链的序列提供为SEQ ID NO:10。

[0175] 图6.具有单个光可裂解荧光染料的示例性发夹生物素-寡核苷酸-光可裂解标记。第一示例(Cy5)的序列提供为SEQ ID NO:11;第二示例(AF594)的序列提供为SEQ ID NO:12;第三示例(AF532)的序列提供为SEQ ID NO:13;第四示例(AF488)的序列提供为SEQ ID NO:14。

[0176] 图7.通过官能连接基共价连接至生物素分子的示例性光可裂解标记。官能连接基可以是核酸、肽或脂肪酸链。

[0177] 图8.示例性核苷酸-光可裂解部分-荧光染料结构,诸如图2和图4至图6中所示的那些。

[0178] 图9A至图9E.光裂解效率。图9A示出了裂解之前染色组织切片的图像。图9B示出了经UV 365nm曝光裂解2分钟后的染色切片的图像。图9C示出了缓冲液重新洗涤之后的染色切片的图像。图9D是示出了裂解边界(左上角被裂解)的不同FOV的图像。图9E是沿跨图9A至图9C的线的图像像素强度分布,示出了裂解后和洗涤后的图像亮度变化。

[0179] 图10A-H.使用各种PCL进行光裂解的时间进程。图10A示出了最大信号强度的迹线。图10B示出了信号(相对于背景的信号)中的绝对差值的迹线。图10C示出了信号(相对于背景的信号)的相对差值的迹线作为最大信号的百分比。图10D示出了场中心的标准双链PCL在光裂解之前和之后的图像。图10E示出了长双链PCL在光裂解之前和之后的图像。图10F示出了短链PCL在光裂解之前和之后的图像。图10G示出了单生物素双链PCL在光裂解之前和之后的图像。图10H示出了具有光可裂解生物素的寡核苷酸(IDT Duplex PCL)在裂解之前和之后的图像。

[0180] 图11.连续组织染色。用两种不同颜色的光可裂解标记对两种靶蛋白进行FFPE组织染色。使用ImageJ软件用第一颜色对相同的视野成像并叠加在先前的颜色上。

[0181] 图12.实施例5中使用的光可裂解标记的图示。标准双链PCL由在其5'末端具有生物素且在其3'末端具有光可裂解荧光标记的两个34-核苷酸寡聚物组成,对这些寡聚物进行退火以形成在每个末端具有四个核苷酸单链悬端的28-核苷酸双链部分。该标准双链PCL的上链的序列提供为SEQ ID NO:3;该标准双链PCL的下链的序列提供为SEQ ID NO:4。长双

链PCL由在其5'末端具有生物素且在其3'末端具有光可裂解荧光标记的两个69-核苷酸寡聚物组成,对这些寡聚物进行退火以形成在每个末端具有两个核苷酸单链悬端的67-核苷酸双链部分。该长双链PCL的上链的序列提供为SEQ ID NO:15;该长双链PCL的下链的序列提供为SEQ ID NO:16。短链PCL由在其5'末端具有生物素且在其3'末端具有光可裂解荧光标记的单个12-核苷酸寡聚物 (SEQ ID NO:17) 组成。单生物素双链PCL与标准双链PCL相同,不同之处在于每次杂交时仅两个寡聚物中的一个在其5'末端具有生物素。该单生物素双链PCL的上链的序列提供为SEQ ID NO:3;该单生物素双链PCL的下链的序列提供为SEQ ID NO:4。IDT双链PCL由在其5'末端具有可光裂解生物素且在其3'末端具有荧光标记的两个34-核苷酸寡聚物组成,对这些寡聚物进行退火以形成在每一末端具有四个核苷酸单链悬端的28-核苷酸双链部分。该IDT双链PCL的上链的序列提供为SEQ ID NO:3;该IDT双链PCL的下链的序列提供为SEQ ID NO:4。

[0182] 图13. 根据本文公开的示例性实施方案的装置的示意图。

[0183] 图14. 根据本文公开的示例性实施方案的样品室的分解图。

[0184] 图15. 图14的样品室的组合图。

[0185] 图16. 图13的装置的一部分的示意图,包括流体控制系统和样品室。

[0186] 图17. 图13的装置的一部分的示意图,包括动力和控制系统。

[0187] 图18. 用SMCC (琥珀酰亚胺基-4-[N-马来酰亚胺甲基]环己烷-1-羧酸酯) 双功能交联剂修饰的示例性寡聚物。

[0188] 图19A至图19E. 图19A. 三个连续染色和成像循环的示意图。图19B. 用20×物镜(5×5)拍摄的25张照片的拼接图像,示出了胶原蛋白、ALCAM和Hoechst。虚线方框勾画出被放大并分裂到图19C至图19E中的通道的区域。图19C. ALCAM、CD44、Hoechst。图19D. SMA、细胞角蛋白、Hoechst。图19E. 纤粘蛋白、组蛋白H3、Hoechst。

[0189] 图20. 同时使用三种颜色的光可裂解标记多重染色FFPE组织切片的图像。对于Cy3、Cy5和Cy7,图像在三个适当波长处捕获信号,然后使用ImageJ软件进行图像合并,以共同显现三个不同的区域。

[0190] 图21A至图21C. 图21A: 图20中多重染色组织裂解后的图像。所有信号在一次光裂解事件后被释放。图21B: 示出了总信号相对于总裂解时间的相对百分比的迹线。图21C: 示出了最大信号强度的迹线。

## 具体实施方式

[0191] 在临床实践和研究实验室中,常规使用免疫荧光法检测固定组织标本中的抗原。目前的方法限于每组织切片一到四种抗原的检测。因此,额外的抗原的检测需要在分开的切片上进行多个单独的染色,并限制了抗原单个切片上的共定位。此外,目前的方法非常耗时,因为染色和成像是非连续的过程。

[0192] 为了克服这些限制,开发了福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 组织切片的自动化下一代组织学 (NGH) 平台。该平台被设计为使用探针,其中传统的荧光标签被受UV照射而释放的新型光可裂解荧光团取代。该光可裂解标记能够在同一组织切片中进行快速的重复染色循环,而不需要移除抗原检测抗体。该NGH平台还包括用于减少手动操作时间的自动流控技术和在单一平台上实现多重PCL检测的四色落射荧光显微成像系统。

[0193] I. 抗原检测方法

[0194] 在各种实施方案中,本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原存在的方法,该方法包括构建光可裂解标记通过官能连接基与其缀合的“抗原结合复合物”所需的各种孵育步骤。

[0195] 在一些实施方案中,本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,该方法包括以下步骤:

[0196] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品(例如,脱蜡、再水合等),其方法是本领域技术人员所熟知的

[0197] 2. 进行抗原修复(例如,热+盐+pH)

[0198] 3. 进行非特异性抗原封闭(例如,BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如 Tween<sup>®</sup>-20)

[0199] 4. 进行第一配体/第一抗配体封闭(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素/生物素封闭)

[0200] 5. 与一级抗体一起孵育

[0201] 6. 洗涤

[0202] 7. 与第一配体结合的(例如,生物素化的)二级抗体一起孵育

[0203] 8. 洗涤

[0204] 9. 与第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素)一起孵育

[0205] 10. 洗涤

[0206] 11. 与第二配体(例如,生物素)结合的光可裂解标记一起孵育

[0207] 12. 洗涤

[0208] 13. 检测来自光可裂解标记的信号

[0209] 14. 光裂解

[0210] 15. 任选地,通过检测来自光可裂解标记的信号或缺失来确认光裂解成功

[0211] 在一些变型中,步骤7和9可同时进行;在这些变型中,同时加入第一配体缀合的(例如,生物素化的)二级抗体和第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素),并且不进行步骤8。在一些实施方案中,它们在同一溶液中。在一些变型中,可针对第二(或更多)抗原重复步骤5至15。在一些实施方案中,该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次,以检测样品中的多种抗原。例如,该方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。

[0212] 在一些实施方案中,本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,该方法包括以下步骤:

[0213] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品(例如,脱蜡、再水合等),其方法是本领域技术人员所熟知的

[0214] 2. 进行抗原修复(例如,热+盐+pH)

[0215] 3. 进行非特异性抗原封闭(例如,BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如

**Tween<sup>®</sup>-20)**

[0216] 4. 进行第一配体/第一抗配体封闭(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素/生物素封闭)

[0217] 5. 与一级抗体一起孵育

[0218] 6. 洗涤

[0219] 7. 与第一配体结合的(例如,生物素化的)二级抗体一起孵育

[0220] 8. 洗涤

[0221] 9. 与第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素)结合的光可裂解标记一起孵育

[0222] 10. 洗涤

[0223] 11. 检测来自光可裂解标记的信号

[0224] 12. 光裂解

[0225] 13. 任选地,通过检测来自光可裂解标记的信号缺失来确认光裂解成功

[0226] 在一些变型中,步骤7和9可同时进行;在这些变型中,同时加入第一配体缀合的(例如,生物素化的)二级抗体和第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素),并且不进行步骤8。在一些实施方案中,它们在同一溶液中。在一些变型中,可针对第二(或更多)抗原重复步骤5至13。在一些实施方案中,该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次,以检测样品中的多种抗原。例如,该方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。

[0227] 另一方面,本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,该方法包括以下步骤:

[0228] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品(例如,脱脂、再水合),其方法是本领域技术人员所熟知的

[0229] 2. 进行抗原修复(例如,热+盐+pH)

[0230] 3. 进行非特异性抗原封闭(例如,BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如

**Tween<sup>®</sup>-20)**

[0231] 4. 与一级抗体一起孵育

[0232] 5. 洗涤

[0233] 6. 与缀合至光可裂解标记的二级抗体一起孵育

[0234] 7. 洗涤

[0235] 8. 检测来自光可裂解标记的信号

[0236] 9. 光裂解

[0237] 10. 任选地,通过检测来自光可裂解标记的信号缺失来确认光裂解成功

[0238] 在一些变型中,可针对第二(或更多)抗原重复步骤4至10。在一些实施方案中,该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次,以检测样品中的多种抗原。例如,该

方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。

[0239] 在一些实施方案中,本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,该方法包括以下步骤:

[0240] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品(例如,脱蜡、再水合等),其方法是本领域技术人员所熟知的

[0241] 2. 进行抗原修复(例如,热+盐+pH)

[0242] 3. 进行非特异性抗原封闭(例如,BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如 Tween<sup>®</sup>-20)

[0243] 4. 进行第一配体/第一抗配体封闭(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素/生物素封闭)

[0244] 5. 与第一配体缀合的(例如,生物素化的)一级抗体一起孵育

[0245] 6. 洗涤

[0246] 7. 与第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素)结合的光可裂解标记一起孵育

[0247] 8. 洗涤

[0248] 9. 检测来自光可裂解标记的信号

[0249] 10. 光裂解

[0250] 11. 任选地,通过检测来自光可裂解标记的信号缺失来确认光裂解成功

[0251] 在一些变型中,步骤5和7可同时进行;在这些变体中,同时加入第一配体缀合的(例如,生物素化的)一级抗体和第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素),并且不进行步骤6。在一些实施方案中,它们在同一溶液中。在一些变型中,可针对第二(或更多)抗原重复步骤5至11。在一些实施方案中,该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次,以检测样品中的多种抗原。例如,该方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。

[0252] 在一些实施方案中,本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法,该方法包括以下步骤:

[0253] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品(例如,脱蜡、再水合等),其方法是本领域技术人员所熟知的

[0254] 2. 进行抗原修复(例如,热+盐+pH)

[0255] 3. 进行非特异性抗原封闭(例如,BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如 Tween<sup>®</sup>-20)

[0256] 4. 进行第一配体/第一抗配体封闭(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素/生物素封闭)

[0257] 5. 与第一配体缀合的(例如,生物素化的)一级抗体一起孵育

[0258] 6. 洗涤

- [0259] 7. 与第一抗配体 (例如, 抗生物素蛋白或链霉亲和素) 一起孵育
- [0260] 8. 洗涤
- [0261] 9. 与第二配体 (例如, 生物素) 结合的光可裂解标记一起孵育
- [0262] 10. 洗涤
- [0263] 11. 检测来自光可裂解标记的信号
- [0264] 12. 光裂解
- [0265] 13. 任选地, 通过检测来自光可裂解标记的信号的缺失来确认光裂解成功
- [0266] 在一些变型中, 步骤5和7可同时进行; 在这些变型中, 同时加入第一配体缀合的 (例如, 生物素化的) 一级抗体和第一抗配体 (例如, 抗生物素蛋白或链霉亲和素), 并且不进行步骤6。在一些实施方案中, 它们在同一溶液中。在一些变型中, 可针对第二 (或更多) 抗原重复步骤5至13。在一些实施方案中, 该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次, 以检测样品中的多种抗原。例如, 该方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。
- [0267] 在一些实施方案中, 本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法, 该方法包括以下步骤:
- [0268] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品 (例如, 脱蜡、再水合等), 其方法是本领域技术人员所熟知的
- [0269] 2. 进行抗原修复 (例如, 热+盐+pH)
- [0270] 3. 进行非特异性抗原封闭 (例如, BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如 Tween<sup>®</sup>-20)
- [0271] 4. 与非蛋白第一配体结合的光可裂解标记一起孵育
- [0272] 5. 洗涤
- [0273] 6. 检测来自光可裂解标记的信号
- [0274] 7. 光裂解
- [0275] 8. 任选地, 通过检测来自光可裂解标记的信号的缺失来确认光裂解成功
- [0276] 在一些变型中, 可针对第二 (或更多) 抗原重复步骤4至8。在一些实施方案中, 该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次, 以检测样品中的多种抗原。例如, 该方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。
- [0277] 在一些变型中, 非蛋白质第一配体可以是适体、碳水化合物、核酸 (例如, DNA)、激素或小分子。
- [0278] 在一些实施方案中, 本发明提供了检测样品上或样品中至少第一抗原的存在的方法, 该方法包括以下步骤:
- [0279] 1. 根据需要准备用于抗原检测的样品 (例如, 脱蜡、再水合等), 其方法是本领域技术人员所熟知的
- [0280] 2. 进行抗原修复 (例如, 热+盐+pH)

- [0281] 3. 进行非特异性抗原封闭(例如,BSA、血清或基于非蛋白质的封闭剂诸如 Tween<sup>®</sup>-20)
- [0282] 4. 进行第一配体/第一抗配体封闭(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素/生物素封闭)
- [0283] 5. 与第一配体缀合的(例如,生物素化的)适体一起孵育
- [0284] 6. 洗涤
- [0285] 7. 与第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素)一起孵育
- [0286] 8. 洗涤
- [0287] 9. 与第二配体(例如,生物素)结合的光可裂解标记一起孵育
- [0288] 10. 洗涤
- [0289] 11. 检测来自光可裂解标记的信号
- [0290] 12. 光裂解
- [0291] 13. 任选地,通过检测来自光可裂解标记的信号或缺失来确认光裂解成功
- [0292] 在一些变型中,步骤5和7可同时进行;在这些变型中,同时加入第一配体缀合的(例如,生物素化的)适体和第一抗配体(例如,抗生物素蛋白或链霉亲和素),并且不进行步骤6。在一些实施方案中,它们在同一溶液中。在一些变型中,可针对第二(或更多)抗原重复步骤5至13。在一些实施方案中,该方法的步骤可重复至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100次,以检测样品中的多种抗原。例如,该方法可用于检测至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95种或100种抗原。
- [0293] 在一些实施方案中,本文提供的方法可与用于抗原检测的已知技术(包括但不限于Western印迹、微阵列、酶联免疫吸附测定(ELISA)、反相蛋白阵列(RPPA)和免疫组织化学(基于比色或荧光读数)结合和/或联合使用。
- [0294] 在一些实施方案中,在与抗原结合复合物的各种组分一起孵育之前需要将用于抗原检测的样品准备好。在一些变型中,靶细胞将需要被固定,例如,通过加入化学固定剂(诸如醛或多聚甲醛)以交联,加入醇以析出,以及加入氧化剂、汞和苦味酸盐。在一些变型中,将需要增加细胞透性,例如,加入甲醇、丙酮等有机溶剂或Triton<sup>™</sup>-X 100、皂素、Tween<sup>®</sup>-20等洗涤剂。在一些变型中,将需要进行封闭步骤以减少非特异性反应,通过例如加入牛血清白蛋白、山羊血清、鱼皮明胶、马血清、猪血清、驴血清或兔血清。
- [0295] 在一些实施方案中,进行各种孵育步骤以在样品中构建抗原结合性抗原结合复合物。在一些情况下,可将抗原结合复合物的多于一种组分同时添加到样品中,而其他组分顺序地添加。在一些情况下,将抗原结合复合物的每种组分顺序地添加到样品中。在一些情况下,可将抗原结合复合物的每种组分同时添加到样品中。各种孵育步骤可在有利于一级抗体、适体等与可能存在于样品中的靶抗原之间或(另选地/另外地)一级抗体与二级抗体之间、第一配体与第一抗配体之间或者第一抗配体与第二配体之间的相互作用的条件下进行。可进行调节以影响期望的相互作用的示例性条件包括温度和pH。孵育步骤的示例性温度包括介于15°C和30°C之间、介于18°C和27°C之间或介于20°C和25°C之间或可从中推论出的任何范围内的任何温度。孵育步骤的示例性温度包括例如15°C、16°C、17°C、18°C、19°C、

20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃和30℃。孵育步骤的示例性pH值包括介于6和8之间、介于6.2和7.8之间或介于6.5和7.5之间或可从中推论出的任何范围内的任何pH。孵育步骤的示例性pH值包括6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9和8.0。

[0296] 在一些实施方案中,洗涤步骤在各种孵育步骤之后进行以移除样品中不与抗原结合性抗原结合复合物特异性结合的任何组分。洗涤可使用包括例如水、缓冲溶液(例如,PBS)、生理盐水或其组合的洗涤液进行。

[0297] 在一些实施方案中,抗原结合复合物的各种组分可以是生物素化的。在生物化学中,生物素化是将生物素与蛋白质、核酸或其他分子共价连接的过程。生物素化是快速而特异的,并且由于生物素的尺寸小( $MW=244.31g/mol$ ),而不太可能干扰分子的天然功能。本领域已知用于生物素化生物大分子诸如例如蛋白质和核酸的各种方法。参见例如Moritz和Wahle(2014)、Hermanson(2013)。而且,可将多种生物素分子与感兴趣的分子缀合。蛋白质可通过化学方法或酶促方法生物素化。化学生物素化利用各种缀合化学反应产生胺、羧酸盐、巯基和碳水化合物的非特异性生物素化(例如,NHS-偶合使蛋白质中的任一伯胺生物素化)。酶促生物素化通过细菌生物素连接酶导致特定序列内的特异性赖氨酸的生物素化。大多数化学生物素化试剂由通过连接基连接到生物素的戊酸侧链的反应基团组成。由于抗生物素蛋白/链霉亲和素中的生物素结合口袋被掩埋在蛋白质表面之下,因此期望具有较长连接基的生物素化试剂,因为它们能够使生物素分子更易于结合抗生物素蛋白/链霉亲和素/中性抗生物素蛋白。该连接基还可调节生物素化试剂的溶解度;包含聚(乙二醇)二醇(PEG)的连接基可使不溶于水的试剂可溶或增加在一定程度上已溶解的生物素化试剂的溶解度。在寡核苷酸合成过程中,已通过亚磷酰胺法使用市售的生物素亚磷酰胺使寡核苷酸生物素化。在标准脱保护后,可使用反相或阴离子交换HPLC来纯化所获得的缀合物。

[0298] 在一些实施方案中,检测来自光可裂解标记的信号包括测量由样品中存在的抗原结合性抗原结合复合物产生的信号。检测可包括例如使用荧光显微镜测量由抗原结合性抗原结合复合物的荧光染料产生的信号。由例如荧光染料产生的信号的存在可指示样品中存在抗原。因此,检测可包括确定样品中抗原的存在。在一些变型中,检测信号可被定义为测量来自光可裂解标记的信号,其中所述测量提供同一样品中抗原量的相对定量、绝对定量或定性测量。

[0299] 在本文所述的一些实施方案中,光可裂解标记包括可例如用365nm的紫外光有效地光化学裂解的2-硝基苄基基团或取代的2-硝基苄基基团。参见美国专利申请公布2010/0041041,其以引用方式并入本文。应当理解,通常波长 $>300nm$ 用于对DNA和蛋白质产生最小化的损伤(Corrie,2005),其中几个特定的示例性波长除365nm之外为340nm和355nm(Seo,2005)。因此,如本文所用,术语“光裂解(photocleaving)”或“光裂解(photocleave)”通常是指将样品暴露于波长 $>300nm$ 的光以实现光可裂解键的裂解的行为。

[0300] 在一些实施方案中,在光裂解步骤之后,该方法还可包括重复孵育步骤以在样品上或样品中构建抗原结合复合物,并检测来自与抗原结合性抗原结合复合物缀合的光可裂解标记的信号,以检测样品中第二抗原的存在。对于任何给定的构建抗原结合复合物的方法,在从先前构建的抗原结合复合物中裂解了标记之后,构建新的抗原结合复合物的孵育步骤和检测来自光可裂解标记的信号步骤可被顺序地重复至少一次。在一些变型中,该

步骤可被顺序地重复至少两次、三次、四次、五次、10次、20次、30次、40次、50次、60次、70次、80次、90次或100次。在一些变型中,光可裂解标记可经受在步骤的每次重复之间实现光裂解的条件。在一些变型中,在进行光裂解步骤之前,可重复这些步骤一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在一些变型中,在任何给定的重复中与抗原结合复合物缀合的光可裂解标记可与在任何先前重复中使用的标记相同或不同。

[0301] 在一些变型中,在进行检测步骤之前,可连续地重复构建抗原结合复合物的孵育步骤一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。在这些变型中,与每种抗原结合复合物缀合的光可裂解标记是不同的,从而可在一个检测步骤中区分它们,即对标记进行选择以使各种标记的发射光谱的重叠最小化。

[0302] 在一些变型中,每次重复中使用的抗原结合复合物的组分可与来自先前循环的抗原结合复合物中使用的组分相同或不同。在一些变型中,只有与抗原直接结合的组分是不同的,而其他组分是相同的。

### [0303] II. 光可裂解标记

[0304] 本发明的一些方面涉及提供具有改进的UV-裂解速率的光可裂解标记,用于顺序地和/或同时检测单个样品中的多种蛋白质。用例如365nm紫外光进行2-硝基苄基或取代的2-硝基苄基基团的裂解,允许在不受一个或多个先前循环中使用的一种或多种标记干扰的情况下进行下一个抗原检测循环。不受理论的束缚,已发现至少两个因素影响取代的2-硝基苄基基团的UV-裂解速率:a) 2-硝基苄基基团的 $\alpha$ -碳取代的立体化学结构,以及b) 苄基环上的取代。

[0305] 光可裂解标记任选地与核糖核苷三磷酸(NTP)和脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)缀合。例如,核苷酸或核苷化合物可包括用报道分子基团(诸如荧光染料)标记的化学或酶促可裂解基团。核苷酸和核苷化合物可包括被设计成终止DNA合成的化学或酶促可移除的保护基团。核苷酸和核苷化合物上用荧光染料标记的此类可裂解基团的存在可提高间接检测单个样品中多种蛋白质的速度和准确性。此类核苷酸和核苷化合物的示例包括以下PCT国际公布中所公开的那些:W02003/006625、W02005/084367、W02008/070749、W02009/152353、W02013/040257,这些国际公布的全文以引用方式并入本文中。在一些情况下,可产生包括可商购获得的光可裂解连接基(Gene Link Cat.No.26-6888)或光可裂解间隔基团(Gene Link Cat.No.26-6889)的寡核苷酸。另外,可从Ambergen Technology购得光可裂解核苷酸-荧光团缀合物。而且,可使用氨基修饰分子C6-dT(Integrated DNA Technologies)来制备具有与核苷碱基连接的光可裂解荧光基团的寡核苷酸。

[0306] 如本文所用,术语“报道分子”或“标记”是指能够直接或间接产生可检测信号的化学部分。报道分子的示例包括荧光染料基团、比色染料基团、放射性标记或通过化学发光或生物发光方式影响信号的基团。荧光染料基团的示例包括氧杂蒽衍生物染料(例如,荧光素及其衍生物、异硫氰酸荧光素[FITC]、羧基荧光素琥珀酰亚胺酯[CFSE]、羧基荧光素二乙酸酯琥珀酰亚胺酯[CFDA-SE]、伊红Y、伊红B、罗丹明B、罗丹明6G、罗丹明123、罗丹明红-X[RRX]、羧基四甲基罗丹明[TAMRA]、四甲基罗丹明[TMR]、罗丹明的异硫氰酸盐衍生物[TRITC]、磺酰罗丹明101、磺酰罗丹明101的磺酰氯衍生物[Texas Red]、Oregon Green)、BODIPY衍生物染料(例如,BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR、BODIPY 581/591、BODIPY TR、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665)、香豆素衍生物染料(例如,氨基香豆素[AMCA])、

别藻蓝蛋白[APC]、苾衍生物染料(例如,级联蓝)、4',6-二氨基嘧啶-2-苯基吡啶[DAPI]、DyLight染料(例如,DyLight™350、DyLight™405、DyLight™488、DyLight™550、DyLight™594、DyLight™633、DyLight™650、DyLight™680、DyLight™755、DyLight™800)、藻红蛋白[PE]、PI、多甲藻叶绿素蛋白[PerCP]、花青衍生物染料(例如,Cy®5.5、吡啶二羧菁(Cy®5)、花青(Cy®2)、吡啶羧菁(Cy®3)、Cy®3B, Cy®3.5、Cy®7、Cy®7Q、氧羧菁、硫羧菁、部花青、酞菁)、葱衍生物染料(例如,Draq-5、Draq-7、CyTRAK Orange、IRIS 2、IRIS 3、IRIS 3.5、IRIS 5、IRIS 5.5、IRIS 7G)、eFluor染料(例如,eFluor® 450、PE-eFluor® 615、eFluor® 660、eFluor® 710、PE-eFluor® 610、PerCP-eFluor® 710、APC-eFluor® 780)、FluoProbes染料(例如,FluoProbes 390、FluoProbes 488、FluoProbes 532、FluoProbes 547H、FluoProbes 594、FluoProbes 647H、FluoProbes 682、FluoProbes 752、FluoProbes 782)、GFP、IRDye 800、Pacific Blue、Pacific Green、Pacific Orange、苾、藻胆蛋白、Quasar®染料(例如,Quasar® 570、Quasar® 670、Quasar® 705)、SNAFL、硫菁衍生物染料(例如,磺基-Cy3、磺基-Cy5、磺基-Cy7)、Tokyo Green、Alexa fluor®染料(例如,ALEXA FLUOR® 350、ALEXA FLUOR® 405、ALEXA FLUOR® 430、ALEXA FLUOR® 488、ALEXA FLUOR® 500、ALEXA FLUOR® 514、ALEXA FLUOR® 532、ALEXA FLUOR® 546、ALEXA FLUOR® 555、ALEXA FLUOR® 568、ALEXA FLUOR® 568、ALEXA FLUOR® 594、ALEXA FLUOR® 610、ALEXA FLUOR® 633、ALEXA FLUOR® 635、ALEXA FLUOR® 647、ALEXA FLUOR® 660、ALEXA FLUOR® 680、ALEXA FLUOR® 700、ALEXA FLUOR® 750、ALEXA FLUOR® 790)、方酸菁染料(例如,Seta™染料、SeTau染料、方形染料)或其组合。可用于本发明的一些实施方案的荧光染料基团的另外的示例在本说明书和Haugland, 2005以及美国专利4,439,356和5,188,934中公开,这些文献以引用方式并入本文。荧光染料可通过特定的官能团诸如氨基基团(例如,通过琥珀酰亚胺、异硫氰酸酯或肼)、羧基基团(例如,通过碳化二亚胺)、硫醇(例如,通过顺丁烯二酰亚胺或乙酰溴)、叠氮化物(例如,通过点击化学(click chemistry))或非特异性(戊二醛)或非共价性地(例如,通过疏水性等)连接到生物大分子(即蛋白质、核酸和脂肪酸链)。参见例如Proudnikov和Mirzabekov(1996)以及Riedel等人(2012)。在本发明的一些实施方案中可用作报道分子的本领域中公知的放射性标记的示例包括<sup>35</sup>S、<sup>3</sup>H、<sup>32</sup>P或<sup>33</sup>P。通过化学发光或生物发光手段起作用并且可在本发明的一些实施方案中用作报道分子的报道分子的示例在以下文献中有所描述:Nieman, 1989; Givens&Schowen, 1989; Orosz等人, 1996; 以及Hastings, 1983, 这些文献以引用方式并入本文。

[0307] 在本公开的方法的每个顺序重复中使用的抗原结合复合物的光可裂解标记可与先前重复中同一样品上的抗原结合复合物中使用的任何光可裂解标记相同或不同。在一些情况下,光可裂解标记可由多个报道分子组成,它们组合提供与单独使用的报道分子中的任一者不同的独特信号。

[0308] 在本公开的方法的多重重复中同时使用的抗原结合复合物中的每一者中的光可裂解标记优选是不同的,以允许每种报道分子彼此可区分。换句话讲,在荧光报道分子的情况下,可以使每种荧光报道分子的发射光谱之间的重叠最小化的方式来选择多个抗原结合复合物的每种荧光报道分子。在一些情况下,可同时使用两种不同的染料,但独立成像以提供位置。在本公开的方法的多重重复中可同时使用的不同光可裂解标记的数量为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15种。

### [0309] III. 装置

[0310] 如前所述,可通过自动化的下一代组织学(NGH)装置进行本文所公开的示例性方法。首先参考图13,提供了此类装置100的一个示例性实施方案的示意图。装置100能够在样品的同一组织切片中进行多次快速的染色循环,而不需要移除抗原检测抗体。如下文进一步讨论的,装置100还包括用于减少手动操作时间的自动流控技术和用于多重PCL检测的显微镜成像系统。在所示的实施方案中,装置100包括成像系统110、样品室120和流体控制系统130。

[0311] 在所示的实施方案中,流体控制系统130包括与样品室120和多个储存器132-137流体连通的阀131。储存器132-137可容纳分析时样品自动染色过程中使用的各种流体。在特定的实施方案中,储存器132可包括蛋白质封闭缓冲液,储存器133可包括洗涤溶液,储存器134可包括成像溶液,储存器135可包括裂解溶液,储存器136可包括生物素,并且储存器137可包括抗生物素蛋白封闭缓冲液。

[0312] 成像系统110包括显微镜101以及被配置为对样品室120中的样品进行成像的成像光源140。在所示的实施方案中,光源140联接到光导适配器148、液体光导147和TTL快门控件105。在特定实施方案中,成像光源140是固态光引擎。在所示的实施方案中,显微镜101包括底座115、机动载物台111、载物台控制器112、相机113、物镜107、机动物镜旋座109。在特定实施方案中,成像系统110还可包括机动滤光器转台、滤光块和滤光立方体(为清楚起见未在附图中标记)。

[0313] 在所示的实施方案中,可通过远程控制单元114控制装置100。在该实施方案中,装置100还包括多功能数据采集(DAQ)设备116、抓帧器118、计算机117和串行USB集线器119。在所示的实施方案中,装置100还包括用于样品室120的冷却元件145。在特定实施方案中,冷却元件145可包括温度控制块(例如,Peltier单元)和液体冷却器。

[0314] 现在参考图14和图15,分别提供了样品室120的一个实施方案的分解视图和组装视图。在该实施方案中,样品室包括显微镜载片121、盖片122和设置在显微镜载片121和盖片122之间的垫圈123。所示实施方案还包括联接到盖片122的流体入口124和流体出口126。垫圈123包括定位在垫圈123内部的开口部分125,使得垫圈123围绕着开口部分125。在该实施方案中,开口部分125包括中央体积和与流体入口124和流体出口126流体连通的延伸部分。在图15的组装视图中,样品127位于开口部分125中并位于显微镜载片121与盖片122之间。因此,样品127容纳在样品室120内,并且流体入口124和流体出口126可提供流入样品室120的流体。

[0315] 返回参考图13,流体入口124和流体出口126各自分别联接到光学气泡传感器142和146。流体入口124还联接到阀141和143以及储存器138和139(其可分别容纳抗体溶液和PCL溶液)并与其流体连通。在某些实施方案中,阀141和142可被配置为电磁阀。流体出口

126还联接到阀151和流体输送设备150,该流体输送设备在某些实施方案中可被配置为注射泵。阀151也联接到废物储存器152。在操作期间,(例如,通过阀131、141和143的操作)可控制流体从储存器132-137到流体入口124的流动,以根据本文所公开的方法提供样品127的自动化标记和染色。

[0316] 图16提供了流体控制系统130和样品室120的局部示意图。如该实施方案所示,垫圈123位于显微镜载片121和盖片122之间。流体入口124和流体出口126与流体控制系统130的部件流体连通,这允许样品127的自动化连续染色。例如,流体控制系统130可提供从储存器132-139到样品室120的流体转移,以便进行本文所述方法中所公开的步骤。

[0317] 图17提供了用于光源106的电源和控制系统160的一个示例性实施方案的示意图,该光源被配置为从样品室120中的样品上或样品中的抗原中光裂解抗原-抗原结合复合物。在特定实施方案中,光源106可被配置为LED头部单元。应当理解,图16中所指示的部件型号仅仅是一个示例性实施方案,并且示例性系统的其他实施方案可包括不同的部件和型号。

[0318] 在图17所示的实施方案中,系统160是紫外光(UV)反向终端子系统,其中LED头部单元106是被配置为提供用于裂解PCL的365nm激发光的Hamamatsu LC-L5 UV LED阵列。在该实施方案中,系统160由计算机117经由LabView软件通过多功能数据采集(DAQ)设备116控制,从而提供数字输出线以打开和关闭LED头部单元106以及模拟输出线以通过0-10V信号设置UV强度。与机电继电器162联接的固态继电器164切换来自120VAC-12VDC变压器163的12VDC信号,以打开和关闭LED头部单元106中的UV LED阵列。5VDC开关模式电源165向固态继电器164提供电力。LED头部单元106从其自身的36VDC电源161获得电力。

#### [0319] IV. 定义

[0320] 如本文所用,术语“抗原”是指存在于样品上或样品中的任何靶物。例如,抗原可以是蛋白质、糖、脂类、核酸、配体、碳水化合物、药物靶标或其组合。抗原可存在于细胞中或细胞上。抗原可仅存在于癌细胞中或其上,而不存在于正常细胞中或其上。抗原可存在于不含细胞的样品诸如血清或细胞裂解物中。

[0321] 如本文所用,术语“样品”是指其中可存在抗原的任何生物样品。例如,样品可以是活检样品、组织样品、细胞悬液、细胞培养物或其组合。此外,样品可从动物诸如灵长类(例如,人)、小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猫、狗、猪、牛或马中分离。在一些情况下,样品可以是植物样品、细菌样品或真菌样品。样品可以是动物体液,诸如例如血液、骨髓液、淋巴液、唾液、泪液、尿液、粘膜液、羊水或其组合。样品可以是包括混合在其中的不同类型的细胞的细胞混合物。该混合物可包括具有抗原的细胞和不具有抗原的细胞。样品可包括循环肿瘤细胞(CTC)、癌症干细胞、免疫细胞、胎儿干细胞、胎儿细胞、癌细胞、肿瘤细胞和/或正常细胞。

[0322] 如本文所用,术语“抗原结合复合物”是指包括能够选择性或特异性结合抗原的组分的任何复合物。抗原结合复合物还将包括与光可裂解标记共价结合的组分,该组分可与结合抗原的组分相同或不同。能够选择性或特异性结合抗原的组分可以是但不限于:一级抗体;适体;受体的配体,其中该受体是抗原;配体的受体,其中该配体是抗原;酶的底物、抑制剂或辅助因子,其中该酶是抗原;药物分子,其中该药物靶标是抗原;凝集素,其中碳水化合物是抗原;RNA分子,其中至少部分互补的核酸(例如,DNA或RNA)是抗原;DNA分子,其中至少部分互补的核酸(例如,DNA或RNA)是抗原;等。另外的示例包括使用膜联蛋白A5特异性结合细胞表面上的磷脂酰丝氨酸、使用凝集素特异性结合碳水化合物部分、使用特异性结合

激素配体的核受体,并且抗原是激素配体或在激素配体存在下由核受体结合的DNA调控元件。

[0323] 如本文所用,术语“一级抗体”通常是指选择性或特异性结合抗原的抗原结合复合物中的组分。一级抗体可以是例如抗体、抗体模拟物、适体、受体、配体、酶底物、酶抑制剂、酶辅助因子或酶。

[0324] 如本文所用,术语“抗体模拟物”是指像抗体一样可特异性结合抗原但在结构上与抗体不相关的有机化合物(包括摩尔质量为约3至20kDa的人造肽或蛋白质、核酸和小分子)。抗体模拟物的示例包括但不限于亲和体分子、亲和素、affimer、affitin、 $\alpha$ 体、anticalin、avimer、DARPin、fynomer、Kunitz结构域肽和单体。

[0325] 如本文所用,术语“适体”是指与特定靶分子(例如,抗原)结合的寡核苷酸或肽分子。一些适体是折叠成轮廓分明的三维结构的单链核酸。适体对其靶分子表现出高亲和力和特异性,并且在一些情况下抑制其生物学功能。适体可通过从大的随机序列库中选择它们来创建。天然适体也以核糖开关的形式存在,其可用于选择性或特异性检测配体抗原。在基于寡核苷酸的适体的情况中,光可裂解标记可直接与适体本身共价结合,从而产生单一组分的抗原结合复合物。

[0326] 如本文所用,术语“二级抗体”是指与一级抗体的Fc部分特异性结合的任何免疫球蛋白类的抗体。免疫球蛋白(Ig)单体的Fc部分对应于Y形Ig分子的茎并且由通过一个或多个二硫键连接的两条重链的C端部分组成。

[0327] 如本文所用,术语“第一配体”是指可与抗原结合复合物的组分(例如,一级抗体、二级抗体等)共价结合的任何分子。第一配体的一个示例是生物素。生物素是存在于所有活细胞中的与抗生物素蛋白或链霉亲和素的高亲和力结合的维生素。生物素和抗生物素蛋白/链霉亲和素之间的结合是已知的蛋白质和配体之间最强( $K_a = 10^{15} M^{-1}$ )的非共价相互作用。由于生物素是一个相对较小的分子,它可在不改变蛋白质(例如,抗体)生物学活性的情况下与其缀合。此外,单个蛋白质(例如,抗体)可与若干个存在的生物素缀合,每个生物素可结合一个抗生物素蛋白分子。生物素天然存在;因此,当使用生物素-抗生物素蛋白/链霉亲和素系统时,需要对生物素或抗生物素蛋白/链霉亲和素的非特异性结合进行表面封闭。通常使用的两步封闭策略包括:与过量的抗生物素蛋白/链霉亲和素一起孵育以封闭内源性生物素富集酶,然后与过量的生物素一起孵育以封闭引入的抗生物素蛋白/链霉亲和素。第一配体的另一个示例是寡核苷酸。此类寡核苷酸可与抗原结合复合物的组分(例如,一级抗体、二级抗体等)共价结合。此类寡核苷酸可以是单链的。此类寡核苷酸可由核糖核酸、脱氧核糖核酸或其衍生物组成。此类寡核苷酸可以是至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个核苷酸长。

[0328] 如本文所用,术语“第一抗配体”是指可特异性和/或选择性结合第一配体的任何分子。例如,如果第一配体是生物素,则第一抗配体可以是抗生物素蛋白。如本文所用,术语“抗生物素蛋白”通常是指任何生物素结合蛋白,包括天然蛋白以及重组和遗传工程蛋白。该术语包括两种常见的生物素结合蛋白,称为“蛋清或鸟类抗生物素蛋白”和“链霉亲和素”。蛋清或鸟类抗生物素蛋白(通常简称为抗生物素蛋白)是一种蛋白质,其是蛋清的组成成分并且与生物素形成非共价复合物。链霉亲和素是从放线菌(链霉菌属阿维丁链霉菌(*Streptomyces avidinii*))分离的蛋白质,并且也与生物素形成非共价复合物。生物素结

合蛋白的其他细菌来源也是已知的。蛋清抗生物素蛋白和链霉亲和素都是四聚体蛋白质，其中生物素结合位点成对排列在抗生物素蛋白分子的相对面上。因此，上述两种抗生物素蛋白都能够以游离形式或衍生形式与至多达四个生物素分子结合，形成“复合物”。生物素的衍生形式由生物素与另一种分子缀合产生。作为另一个示例，如果第一配体是寡核苷酸，则第一抗配体可以是与第一配体至少部分互补的第二寡核苷酸。

[0329] 如本文所用，术语“第二配体”是指可特异性和/或选择性结合第一抗配体的任何分子。例如，如果第一配体是生物素并且第一抗配体是抗生物素蛋白，则第二配体可以是生物素。

[0330] 如本文所用，术语“官能连接基”是指可由光可裂解标记和抗原结合复合物的组分（例如，第一配体、第一抗配体、第二配体、一级抗体、二级抗体或适体）共价结合的任何分子。官能连接基可以是核酸。此类核酸可以是至少二、三、四、五、六、七、八、九、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100个核苷酸长。此类核酸可以是单链的、双链的或部分双链的。官能连接基可以是肽。官能连接基可以是脂肪酸链。功能连接基可以是光稳定的。

[0331] 如本文所用，在指定组分的上下文中，“基本上不含”是指该指定组分没有被有目的地配制到组合物中和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此，由组合物的任何意外污染引起的该指定组分的总量远低于0.05%，优选地低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到该指定组分的量的组合物。

[0332] 所用词语“一个”或“一种”当在权利要求书和/或说明书中与术语“包括”联合使用时，可意指“一个”，但是它还与“一个或多个”、“至少一个”以及“一个或多个”的意思一致。

[0333] 在权利要求中使用术语“或”用于意指“和/或”，除非明确指出仅指替代方案或者替代方案是相互排斥的，尽管本公开支持仅指替代方案的定义以及“和/或”的定义。如本文所使用，“另一个”可表示至少第二个或更多个。

[0334] 在整个申请中，术语“约”用于指示包括装置的误差、用于确定值的方法的误差的固有差异或者研究对象之间存在的变化的值。

[0335] 术语“包括”“具有”和“包含”是开放式连接动词。这些动词中的一者或多者的任何形式或时态诸如“包括 (comprises)”“包括 (comprising)”“具有 (has)”“具有 (having)”“包含 (includes)”和“包含 (including)”也是开放式的。例如，“包括”“具有”或“包含”一个或多个步骤的任何方法不限于仅具有那些一个或多个步骤，而是还涵盖其他未列出的步骤。

[0336] 以上定义取代以引用方式并入本文的任何参考文献中的任何冲突的定义。但是，某些术语被定义的事实不应该被认为是指示任何未定义的术语都是不明确的。相反，所有使用的术语被认为就本领域普通技术人员能够理解本发明的范围和实践来描述本发明。

#### [0337] V. 实施例

[0338] 纳入以下实施例以展示本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解，在遵循发明人发现的代表技术的实施例中所公开的技术在本发明的实践中运行良好，因此可被认为构成本发明实践的优选模式。然而，根据本公开内容，本领域技术人员应当理解，可在不脱离本发明的精神和范围的情况下对所公开的具体实施方案做出许多改变，并且仍获得类似或相似的结果。

[0339] 实施例1:使用单链生物素-核苷酸-荧光团标签检测组织切片中的抗原

[0340] 本实施例示出了式 (IX) 的抗原结合性抗原结合复合物。首先制备福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 前列腺癌组织切片,并在PBS中用BSA封闭。然后,将这些切片与小鼠抗细胞角蛋白抗体一起孵育,之后进行洗涤。接下来,将这些切片与生物素化的山羊抗小鼠IgG二级抗体一起孵育,之后进行洗涤。然后,将这些切片与抗生物素蛋白或链霉亲和素或单独的缓冲液一起孵育,之后进行洗涤。然后,将这些切片与生物素缀合的光可裂解Cy5或抗生物素蛋白-荧光素一起孵育,之后进行洗涤。生物素的缀合光可裂解Cy5在其5'末端具有生物素修饰并且在其3'末端具有dC-Cy5 (图8)。最后,使用20倍水浸透镜对这些切片进行成像。图1示出了生物素缀合的光可裂解Cy5以依赖于二级抗体的生物素化的方式产生信号。

[0341] 在另一个实验中,将福尔马林固定的石蜡包埋的人前列腺切片与生物素化的抗平滑肌肌动蛋白一起孵育。然后,将这些切片顺序地与抗生物素蛋白或链霉亲和素和含有光可裂解Cy5的生物素缀合的探针一起孵育。在这种情况下,自动流体交换程序与探针配合使用,该探针由连接两个相对生物素的双链核苷酸组成。Cy5被结合到核苷酸主链中。洗掉未结合的探针,并且在光裂解之前和之后对组织进行成像。在用Cy5的荧光显微镜对载片进行成像之后,使用2分钟的UV曝光对组织中的单个位置进行光裂解,并以预编程方式重新成像。图9A示出了裂解前染色切片的图像,而图9B示出了光裂解后的相同区域。在用缓冲液洗涤后再次对该切片成像 (图9C)。图9E示出了沿图9A至图9C中的线的图像像素强度分布,其示出了裂解和洗涤之后的图像亮度变化。图9D示出了裂解之后的不同视场,并且示出了裂解边界 (左上角暴露于UV光)。

[0342] 实施例2:用两种不同颜色的光可裂解标记对两种靶蛋白进行自动连续FFPE组织染色

[0343] 本实施例示出了式 (VII) 的抗原结合性抗原结合复合物。对于连续FFPE,在对绿色通道成像前,组织首先与生物素化的抗平滑肌肌动蛋白一起孵育2小时,与抗生物素蛋白一起孵育30分钟,并且与包含光可裂解AF532的生物素缀合的探针一起孵育20分钟。在150mW/cm<sup>2</sup>光强度下UV曝光2分钟后,用组蛋白H3抗体和红光可裂解Cy5对组织进行相同的染色操作。使用ImageJ软件在红色通道中对相同的视野成像并叠加在先前的绿色通道上 (图11)。

[0344] 化学灭活的PCL与光漂白的Cy染料直接比较表明染料从PCL中的释放速度要快10-100倍。与其他光可裂解键类似的比较表明,比其他光可裂解反应相比,PCL导致更快和更完全的染料释放。

[0345] 开发并设计了针对FFPE组织切片的自动化NGH平台来使用光可裂解荧光团,使用UV照射,该光可裂解荧光团在几秒内被释放。这种独特的光可裂解标记能够在同一组织切片中进行快速的重复染色循环,而不需要移除抗原检测抗体。NGH平台还包括用于减少手动操作时间的自动流控技术和用于多重报道分子检测的四色落射荧光显微镜成像系统。

[0346] 将FFPE组织切片固定在标准载片上,加热固定、脱蜡、水合并置于专门的流通池中。使用自动流控技术进行组织封闭、洗涤,并使用标准试剂使组织暴露于生物素化的一级抗体。使用抗生物素蛋白或链霉亲和素-光可裂解标记复合物对抗体结合进行检测,在标记被光裂解之前对该复合物进行成像,以准备用于下一个染色循环。

[0347] NGH方法能够对前列腺组织切片进行连续染色。这种染色策略能够对抗原快速成像。

[0348] 实施例3:用两种颜色的光可裂解标记对单个FFPE组织切片上的8个靶区域进行多重染色

[0349] 在另一个实验中,制备6 $\mu$ m的人前列腺(正常)切片,并在三个连续循环中染色。在每个循环中探测组织切片的多个靶蛋白,每个循环中不同波长下的单个成像事件捕获来自各种靶蛋白的信号。在通过UV暴露进行裂解事件之后,再次探测组织的下一组靶蛋白质。三个此类多重循环导致在单个组织切片中捕获以下8个靶标:循环I:胶原(CNA35)、Hoechst(核DNA)、抗ALCAM和抗CD44;循环II:抗细胞角蛋白和抗SMA;循环III:抗纤粘蛋白和抗组蛋白H3。每个循环从四个通道捕获图像: Cy7(750nm)、Cy5(650nm)、Cy2(488nm)和Hoechst(365nm)。在实验完成时,使用Cy2通道共同记录三个图像数据组。使用ImageJ软件将图像合并成单个12通道图像。图19示出了循环多重染色和成像。

[0350] 在三次染色循环中,除了两种非抗体染色(胶原和核染色)之外,循环多重染色成功实现了六种不同抗体的免疫荧光滞留。在操作过程中没有可见的组织恶化或变形,并且当对基线图像(循环I之前捕获)和光裂解之后的图像(在循环I、II和III之后捕获)进行比较时,整个循环中没有显著的非特异性信号累积。

[0351] 实施例4:用三种颜色的光可裂解标记对FFPE组织切片进行多重染色

[0352] 使用实施例2中描述的操作制备FFPE组织切片。使用具有三种独特的生物素-光可裂解标记的三种抗体对同一组织切片上的三个组织区域进行多重染色,每种标记具有独特的荧光染料。封闭组织切片,并顺序地与生物素标记的一级抗体、链霉亲和素、生物素标记的光可裂解标记一起孵育,并且对随后的两种抗体和光可裂解标记重复该循环。通过光可裂解Cy3检测抗CD44,通过光可裂解Cy5检测抗-29-7,并且通过光可裂解Cy7检测抗组蛋白H3。单个图像在三个适当波长下捕获信号,并使用ImageJ软件进行图像合并来以三种不同颜色共同显现三个不同的区域(图20)。单个光裂解事件释放来自所有光可裂解标记的信号,之后成像(图21)。

[0353] 实施例5:使用部分双链生物素-核苷酸-荧光团标签检测组织切片中的抗原

[0354] 为了制备部分双链生物素-寡核苷酸-光可裂解Cy5荧光染料,使用DNA聚合酶将dC-Cy5(图8)延伸到上链寡聚物的3'末端,如图2所示。该复合产物通过RP-HPLC进行纯化。收集到的复合产物溶液的体积减少。然后,将该产物在1 $\times$ PBS中稀释至50 $\mu$ M的终浓度。

[0355] 如实施例1中所述,使用部分双链寡核苷酸-光可裂解Cy5荧光染料进行实验,并与使用单链寡核苷酸获得的结果进行比较。这两种设计的光可裂解标记都表现良好。

[0356] 实施例6:用各种PCL评估染色和光裂解

[0357] 在单个批次中制备单独的组织切片(前列腺癌,人)。对这些切片进行封闭(抗生物素蛋白或链霉亲和素、生物素、总蛋白)并用生物素化抗SMA抗体染色,之后加入抗生物素蛋白,然后以相同的浓度加入一系列PCL(标准双链PCL、长双链PCL、短双链体PCL和单生物素PCL;参见图12)中的一者。标准双链PCL由两个在其5'末端具有生物素且在其3'末端具有光可裂解荧光标记的34-核苷酸寡聚物组成,对这些寡聚物进行退火以形成在每个末端具有四个核苷酸单链悬端的28-核苷酸双链部分。长双链PCL由两个在其5'末端具有生物素且在其3'末端具有光可裂解荧光标记的69-核苷酸寡聚物组成,对这些寡聚物进行杂交以形成在每个末端具有两个核苷酸单链悬端的67-核苷酸双链部分。短双链PCL由在其5'末端具有生物素且在其3'末端具有光可裂解荧光标记的单个12-核苷酸寡聚物组成。该单个生物素

PCL与标准PCL相同,不同之处在于每次杂交时仅两个寡聚物中的一个在其5'端具有生物素。另外,在分开的批次中,用与PCL相同浓度的具有光可裂解生物素的寡核苷酸(IDT-PCL; 购自Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)进行染色。IDT-PCL由两个在其5'末端具有光可裂解生物素且在3'末端具有荧光标记的34-核苷酸寡聚物组成,对这些寡核苷酸进行杂交以形成在每个末端具有四个核苷酸单链悬端的28-核苷酸双链部分(图12)。在时移成像过程中,每个切片的视场中心被光裂解(3×2秒,每次之间有2分钟冲洗)。在两个相同大小的区域(ROI)中测量信号强度:一个特定染色区域和一个背景区域。随时间追踪染色的最大强度(图10A)。将信号和背景之间的差异绘制成绝对信号(图10B)和最大信号的百分比(图10C)。除了时移捕获之外,在光裂解之前和之后均获得每个染色切片的成像。图11D至图11H示出了通过将约25幅图像拼接在一起而产生的每个切片的图像。这些数据显示,所有探针的变型都可用作PCL。

[0358] 实施例7:使用具有SMCC交联剂的PCL检测组织切片中的抗原

[0359] 本实施例示出了式(III)的抗原结合性抗原结合复合物。从IDT(Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa)获得两个单链寡核苷酸,其中一个寡核苷酸在5'末端具有C6氨基修饰。对该寡核苷酸进行退火以形成部分双链寡核苷酸,并且将-dC-Cy5或dU-Cy7PCL延伸到3'末端。PCL合成之后进行RP-HPLC纯化。将磺基-SMCC(双功能交联剂)连接至双链体的5'氨基修饰链,并且该反应通过RP-HPLC进行纯化。磺基-SMCC通过酰胺键连接至位于寡核苷酸的5'末端上的伯胺。SMCC连接基允许探针与抗体的直接连接,从而消除了前述探针与抗体(诸如生物素-抗生物素蛋白或链霉亲和素连接)之间单独的配体-受体连接的需要。消除额外的配体降低了非特异性相互作用和空间位阻的风险。

[0360] 探针与抗体的直接缀合将减少完成染色的人工时间并允许用最少的步骤和试剂进行多重抗体染色。与独特标记的PCL(至少达三种颜色)缀合的多个抗体将被预混并用于组织染色,使得在单个染色/成像循环中检测三种抗原。因此,在每个成像事件结束时,三个此类染色循环与裂解循环将因此得到九种抗原的检测,相比于先前的基于配体的方法,其具有70%的时间减少。

[0361] 具有SMCC连接基的PCL的其他结构变型将包括将氨基修饰添加到寡聚物的碱基上而不是磷酸盐、用C12连接基代替C6连接基进行氨基修饰、远离寡聚物的末端连接SMCC以及将SMCC连接基加入并结合到相同的链上而不是相反的链上。

[0362] PCL与SMCC连接基的直接缀合也将通过SM(PEG)n异双功能交联剂来实现,其中聚乙二醇(PEG)间隔基团取代磺基-SMCC交联剂中的烃基间隔基团。PEG间隔基团将提供两个官能团之间更大的灵活性、改善反应和最终缀合物的溶解度,并且降低缀合物聚集的可能性,从而保留功能性。基于抗体的大小,将选择不同长度的PEG连接基以使交联剂与PCL部分的空间位阻最小化并使间隔臂的灵活性最大化。

[0363] PCL分子的直接缀合将通过以下方式合成:在合适的pH下(在PBS或pH 7-7.2的PBS-EDTA中)将异双官能连接基与氨基修饰的寡核苷酸一起孵育,之后使用RP-HPLC进行纯化和/或脱盐。随后,将活化的PCL与具有暴露的巯基基团的抗体(使用5mM TCEP进行还原)一起孵育。缀合反应将通过脱盐柱进一步纯化以移除未结合的寡聚物。另选地,将使用市售缀合试剂盒(诸如由Innova Biosciences提供的Thunder-Link PLUS oligo conjugation system, Cat#425-000, 425-0300)来实现PCL与抗体的缀合,该试剂盒提供实

现缀合所需的优化试剂和缓冲液。

[0364] \*\*\*

[0365] 按照本公开,可制备和实施本文所公开和要求保护的方法而无需过度实验。尽管已根据优选的实施方案对本发明的组合物和方法进行了描述,但对于本领域的技术人员而言显而易见的是,可在不脱离本发明的概念、实质和范围的情况下对本文所描述的方法或步骤或方法的步骤的顺序进行修改。更具体地,显而易见的是化学和生理相关的某些试剂可以替代本文所述的试剂,同时实现相同或类似的结果。所有此类对本领域技术人员而言显而易见的相似的替代和改进均被认为落在附加权利要求所定义的本发明的实质、范围和概念之内。

[0366] 参考文献

[0367] 以下参考文献提供了示例性操作或其他可补充本文内容的细节,本文在此程度上以引用方式将这些文献并入本文。

[0368] 美国专利4,439,356

[0369] 美国专利5,188,934

[0370] 美国专利申请公布2010/0041041

[0371] PCT国际公布WO 2003/006625

[0372] PCT国际公布WO 2005/084367

[0373] PCT国际公布WO 2008/070749

[0374] PCT国际公布WO 2009/152353

[0375] PCT国际公布WO2013/040257

[0376] Corrie,“Dynamics studies in biology”,Goeldner和Givens(编辑),Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.KGaA,Weinheim,第1-28页,2005。

[0377] Givens&Schowen,“Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography”,J.W.Birks编辑;VCH:New York,第125-47页,1989。

[0378] Hastings,J.Mol.Evol.19:309-21,1983。

[0379] Haugland,The Handbook;A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies,Invitrogen,2005。

[0380] Hermanson,“Bioconjugate Techniques”,第3版,San Diego:Academic Press,2013。

[0381] Moritz and Wahle,Simple methods for the 3'biotinylation of RNA,RNA,20:421-427,2014。

[0382] Nieman,“Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography”,J.W.Birks,Ed.;VCH:New York,pp 99-123,1989。

[0383] Orosz等人,Crit.Rev.Anal.Chem.,26:1-27,1996。

[0384] Proudnikov和Mirzabekov,Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling,Nuc.Acids Res.,24:4535-4532,1996。

[0385] Riedel等人,Labelling of nucleosides and oligonucleotides by solvatochromic 4-aminophthalimide fluorophore for studying DNA-protein interactions,Chem.Sci,3:2797-2806,2012。

[0386] Seo等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A,102:5926-5931,2005。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 激光基因公司
- [0003] <120> 使用光可裂解标记进行抗原检测
- [0004] <130> LSGN.P0011W0
- [0005] <140> 与其同时提交
- [0006] <141> 2016-08-08
- [0007] <150> US 62/201,978
- [0008] <151> 2015-08-06
- [0009] <160> 17
- [0010] <170> PatentIn版本3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 70
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> 合成多核苷酸
- [0017] <400> 1
- [0018] cgtacccccgc ttggtctttc tcccgtacct cgcttgggtct ttctccctgc cccgggttcc 60
- [0019] tcattctctc 70
- [0020] <210> 2
- [0021] <211> 34
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列
- [0024] <220>
- [0025] <223> 合成多核苷酸
- [0026] <400> 2
- [0027] tacggagcat gagagaatga ggaaccggg gcag 34
- [0028] <210> 3
- [0029] <211> 34
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列
- [0032] <220>
- [0033] <223> 合成多核苷酸
- [0034] <400> 3
- [0035] tacgctgccg gtgtctctat tctctcactc gctc 34
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 34
- [0038] <212> DNA

- [0039] <213> 人工序列  
[0040] <220>  
[0041] <223> 合成多核苷酸  
[0042] <400> 4  
[0043] tacggagcga gtgagagaat gaggacaccg gcag 34  
[0044] <210> 5  
[0045] <211> 35  
[0046] <212> DNA  
[0047] <213> 人工序列  
[0048] <220>  
[0049] <223> 合成多核苷酸  
[0050] <400> 5  
[0051] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctcc 35  
[0052] <210> 6  
[0053] <211> 35  
[0054] <212> DNA  
[0055] <213> 人工序列  
[0056] <220>  
[0057] <223> 合成多核苷酸  
[0058] <400> 6  
[0059] tacggagcga gtgagagaat gaggacaccg gcagc 35  
[0060] <210> 7  
[0061] <211> 36  
[0062] <212> DNA  
[0063] <213> 人工序列  
[0064] <220>  
[0065] <223> 合成多核苷酸  
[0066] <400> 7  
[0067] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctccg 36  
[0068] <210> 8  
[0069] <211> 36  
[0070] <212> DNA  
[0071] <213> 人工序列  
[0072] <220>  
[0073] <223> 合成多核苷酸  
[0074] <400> 8  
[0075] tacggagcga gtgagagaat gaggacaccg gcagcg 36  
[0076] <210> 9  
[0077] <211> 37

- [0078] <212> DNA  
[0079] <213> 人工序列  
[0080] <220>  
[0081] <223> 合成多核苷酸  
[0082] <400> 9  
[0083] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctccgt 37  
[0084] <210> 10  
[0085] <211> 37  
[0086] <212> DNA  
[0087] <213> 人工序列  
[0088] <220>  
[0089] <223> 合成多核苷酸  
[0090] <400> 10  
[0091] tacggagcga gtgagagaat gaggacaccg gcagcgt 37  
[0092] <210> 11  
[0093] <211> 70  
[0094] <212> DNA  
[0095] <213> 人工序列  
[0096] <220>  
[0097] <223> 合成多核苷酸  
[0098] <400> 11  
[0099] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctctttttt gagcgagtga gagaatgagg 60  
[0100] acaccggcag 70  
[0101] <210> 12  
[0102] <211> 71  
[0103] <212> DNA  
[0104] <213> 人工序列  
[0105] <220>  
[0106] <223> 合成多核苷酸  
[0107] <400> 12  
[0108] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctctttttt gagcgagtga gagaatgagg 60  
[0109] acaccggcag c 71  
[0110] <210> 13  
[0111] <211> 72  
[0112] <212> DNA  
[0113] <213> 人工序列  
[0114] <220>  
[0115] <223> 合成多核苷酸  
[0116] <400> 13

[0117] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctctttttt gagcgagtga gagaatgagg 60  
[0118] acaccggcag cg 72  
[0119] <210> 14  
[0120] <211> 73  
[0121] <212> DNA  
[0122] <213> 人工序列  
[0123] <220>  
[0124] <223> 合成多核苷酸  
[0125] <400> 14  
[0126] tacgctgccg gtgtcctcat tctctcactc gctctttttt gagcgagtga gagaatgagg 60  
[0127] acaccggcag cgt 73  
[0128] <210> 15  
[0129] <211> 69  
[0130] <212> DNA  
[0131] <213> 人工序列  
[0132] <220>  
[0133] <223> 合成多核苷酸  
[0134] <400> 15  
[0135] agtaccgccg ttggtcttcc tcccgtaccg cgcttggtct ttctccctgc cccgggttcc 60  
[0136] tcattctct 69  
[0137] <210> 16  
[0138] <211> 69  
[0139] <212> DNA  
[0140] <213> 人工序列  
[0141] <220>  
[0142] <223> 合成多核苷酸  
[0143] <400> 16  
[0144] agagagaatg aggaaccggg ggcagggaga aagaccaagc ggggtacggg agaaagacca 60  
[0145] agcggggta 69  
[0146] <210> 17  
[0147] <211> 12  
[0148] <212> DNA  
[0149] <213> 人工序列  
[0150] <220>  
[0151] <223> 合成多核苷酸  
[0152] <400> 17  
[0153] ggacaccggc ag 12

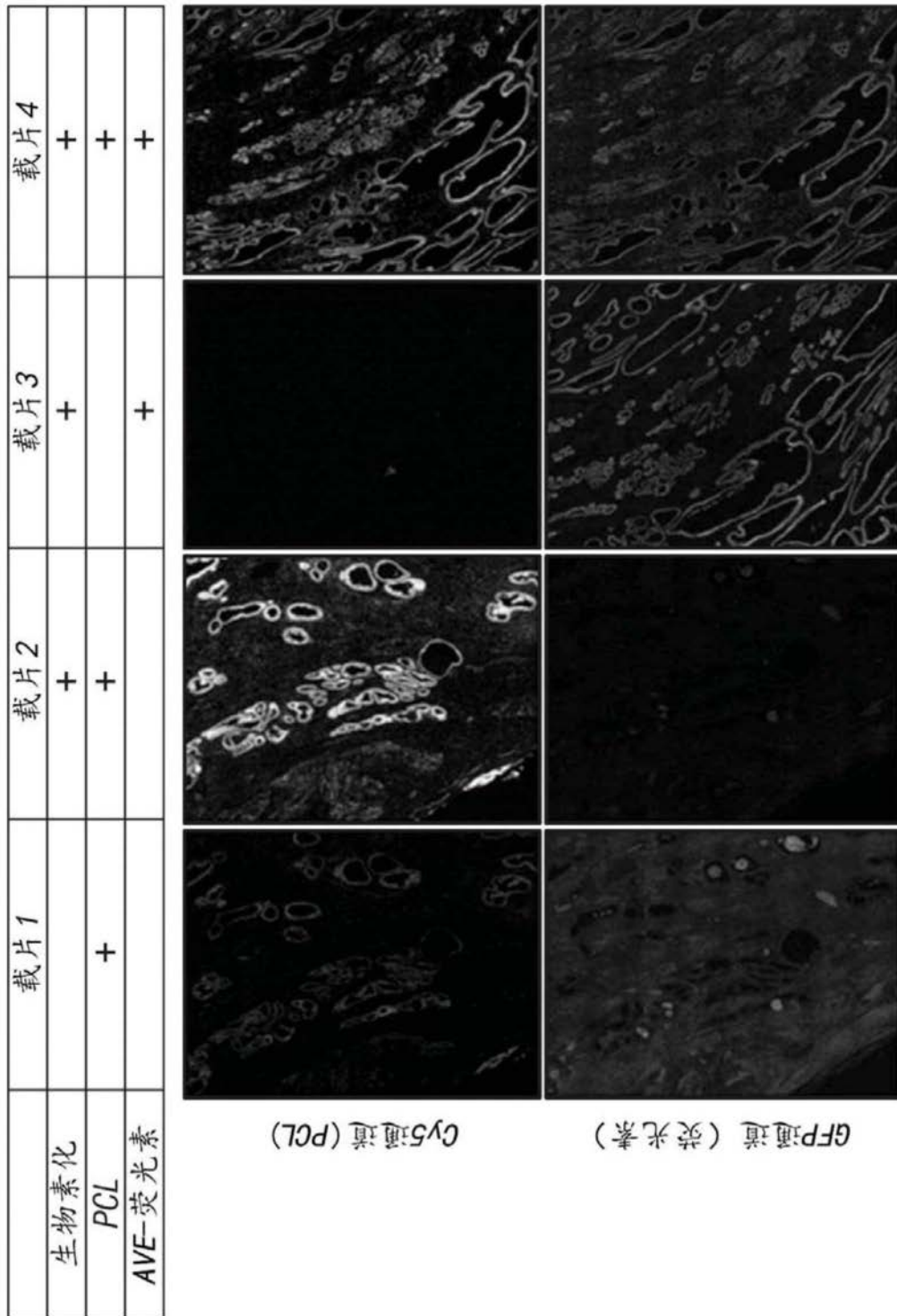


图1

5-生物素 / CGTACCCCGCTTGGTCTTCTCCCGTACCCCGCTTGGTCTTCTCCCTGCCCGGGTTCCCTCATTTCTCT  
3'-GACGGGGCCCAAGGAGTAGAGACTACGAGGCAT / 5-生物素 /  
dC-2-NB-Cy5

图2

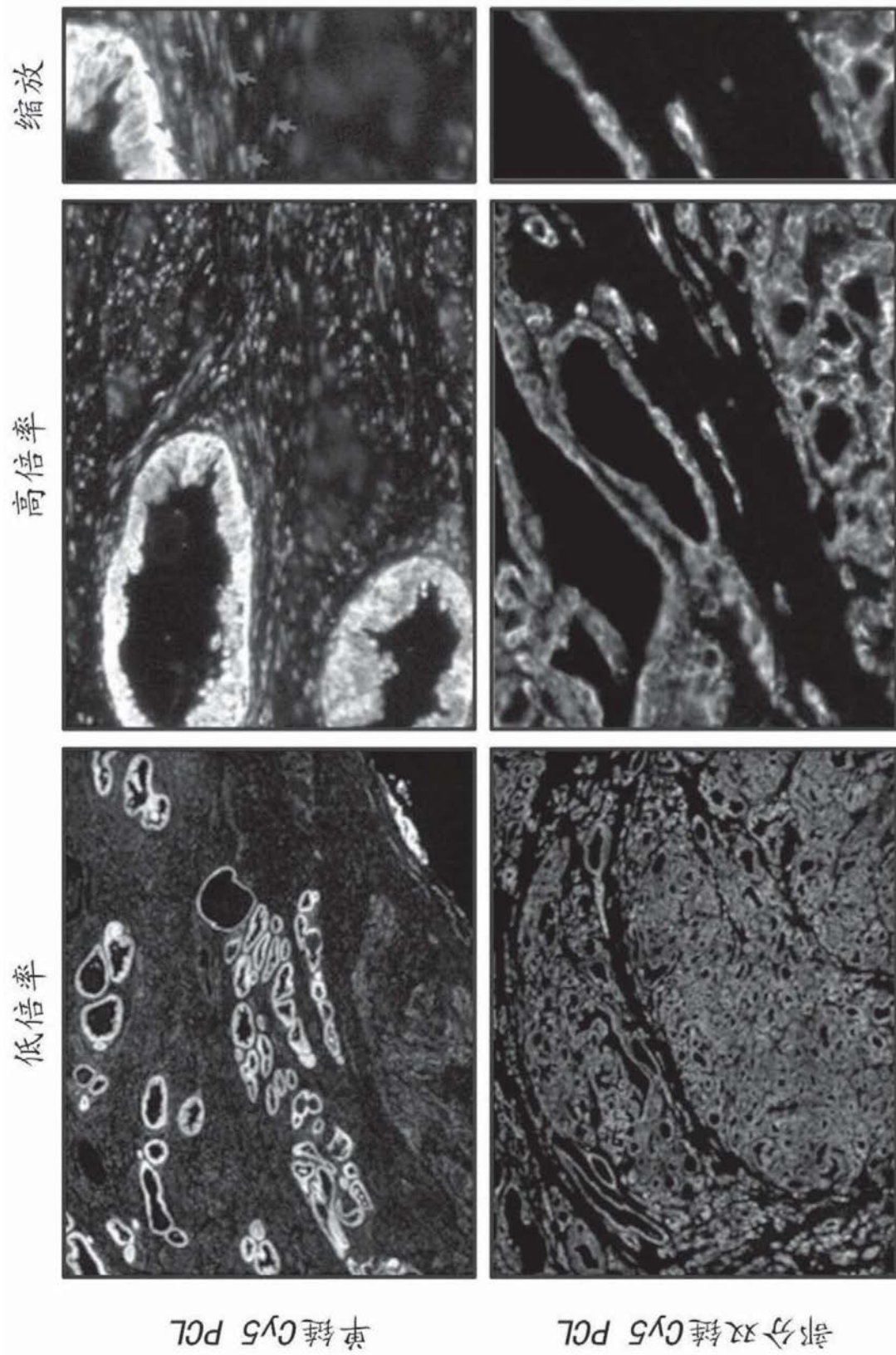


图3

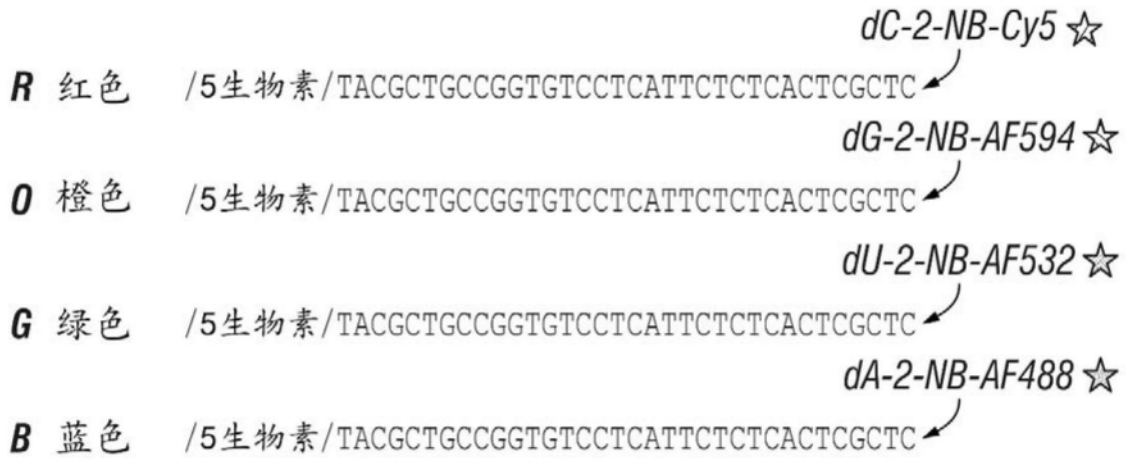


图4

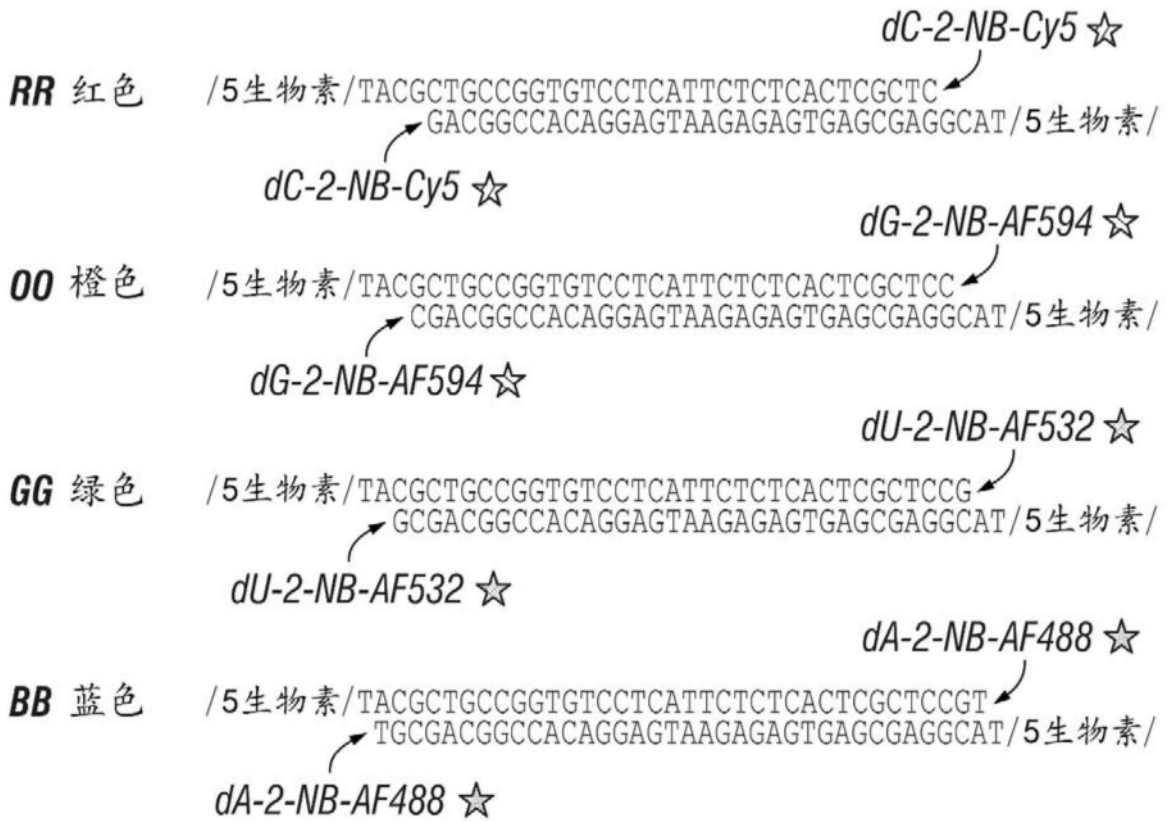


图5



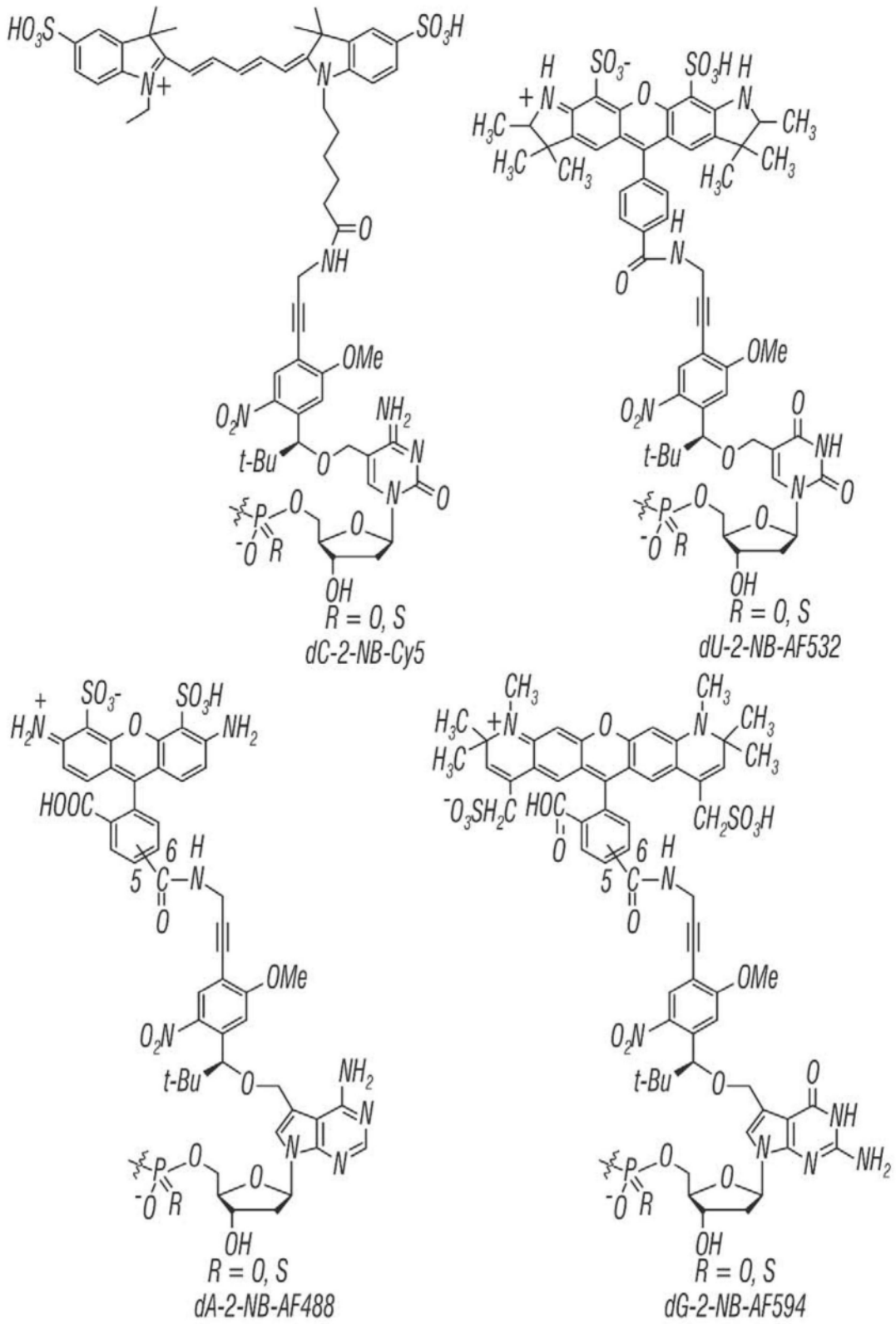


图8

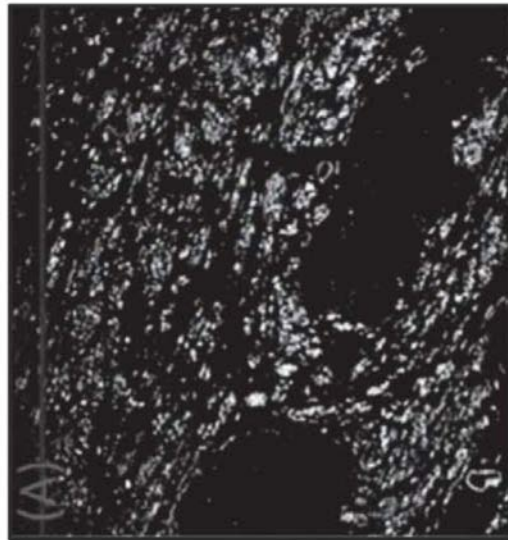


图9A



图9B



图9C

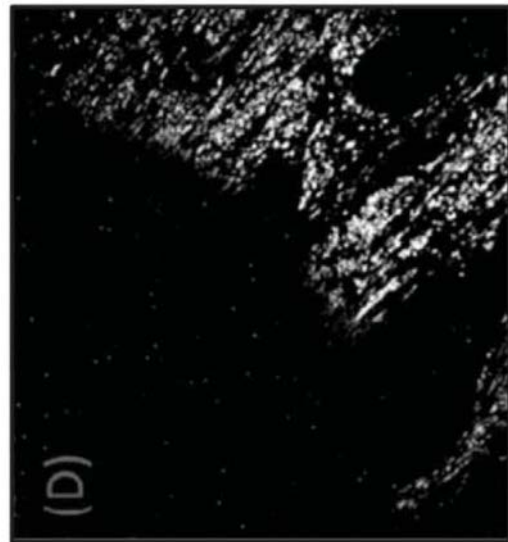


图9D

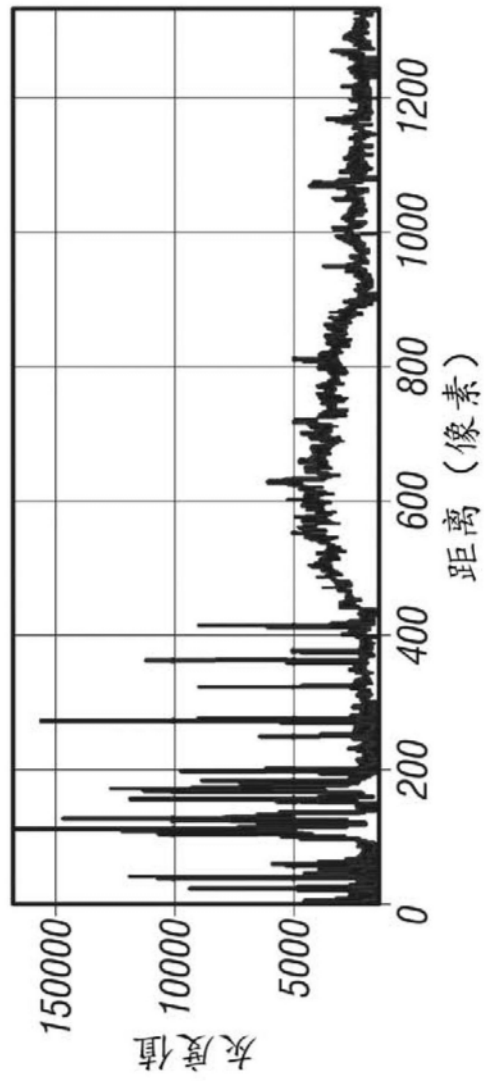


图9E

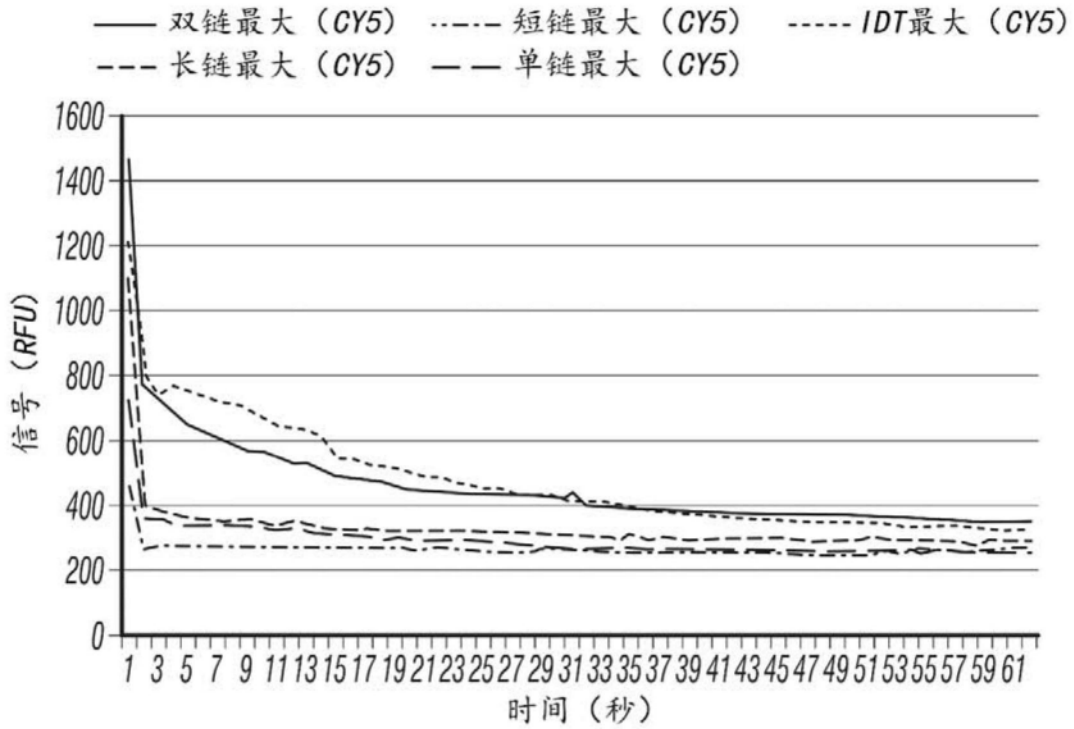


图10A

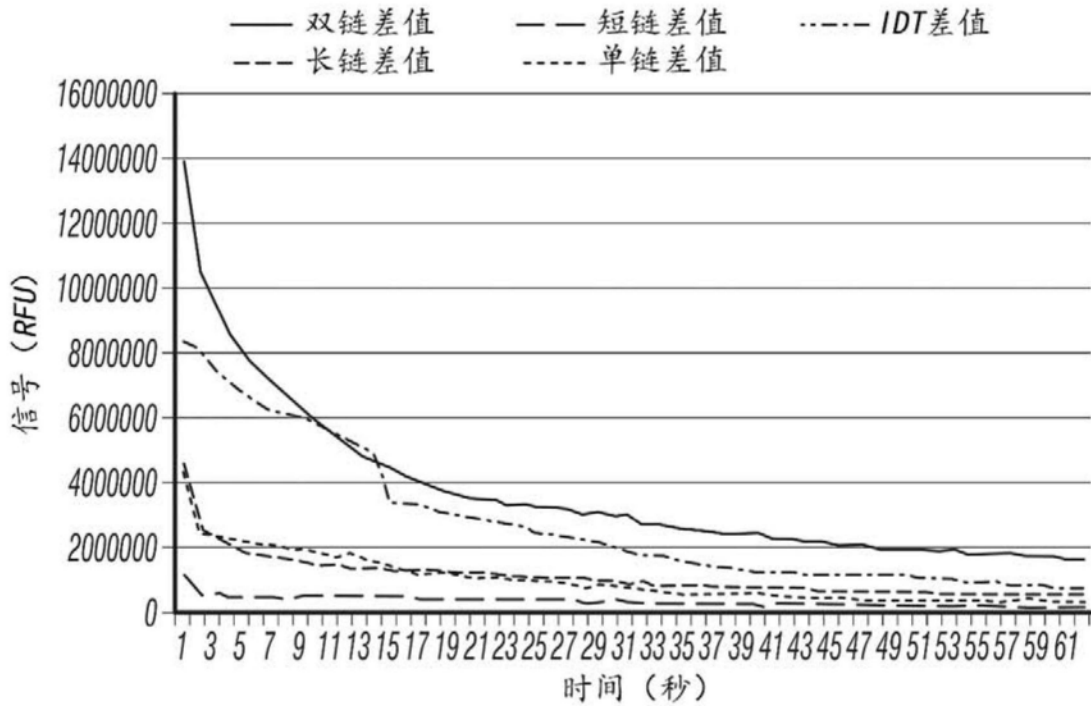


图10B

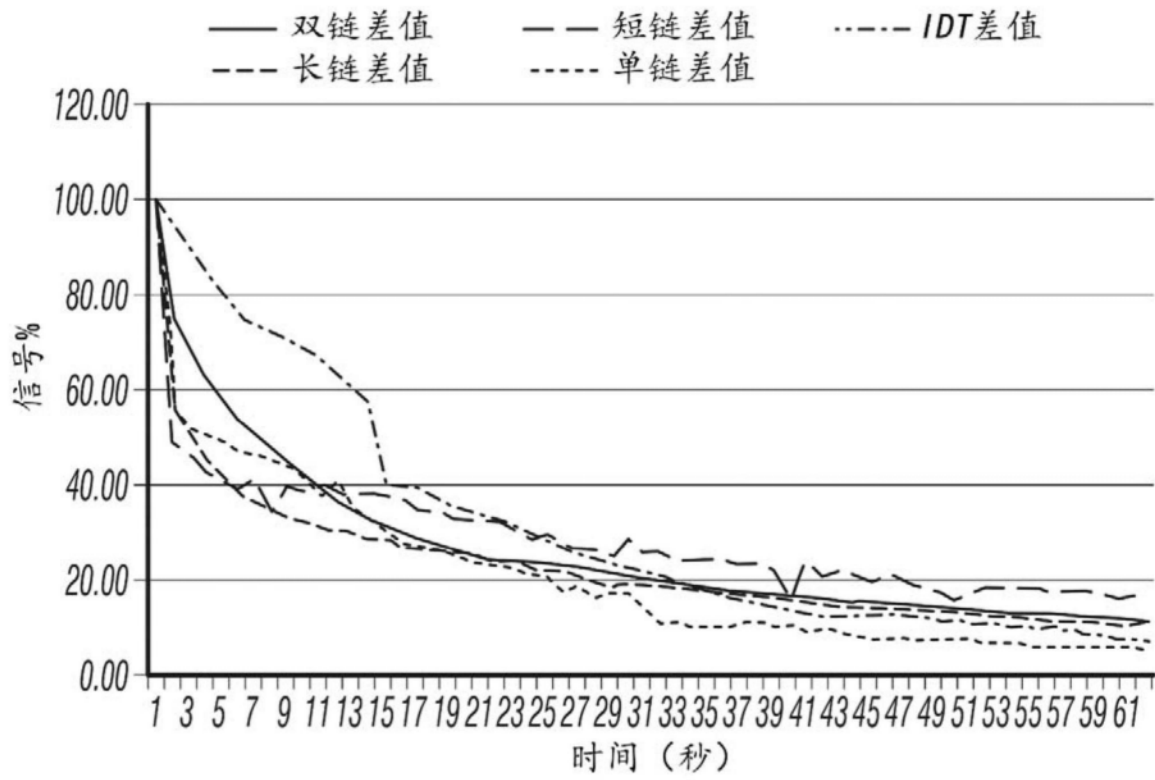


图10C

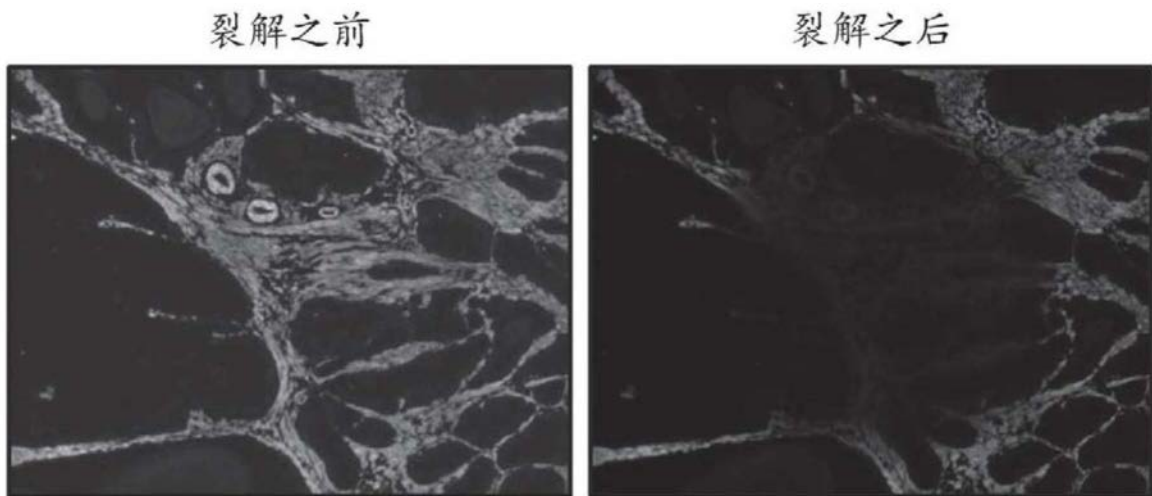
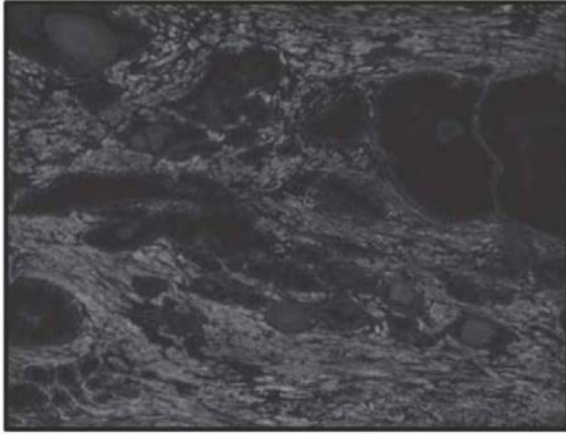


图10D

裂解之前

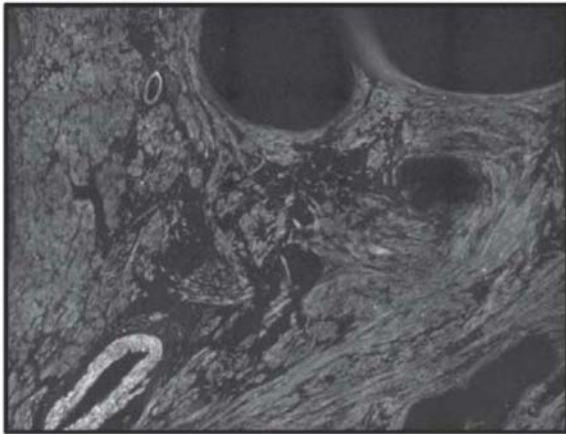


裂解之后



图10E

裂解之前



裂解之后

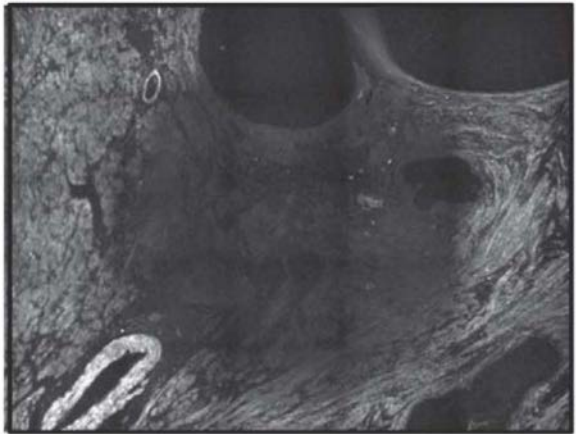
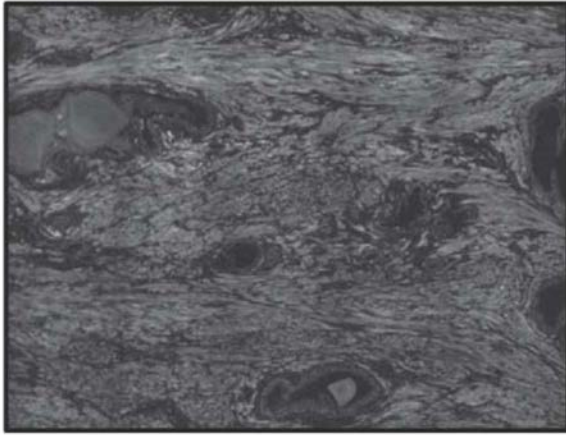


图10F

裂解之前



裂解之后

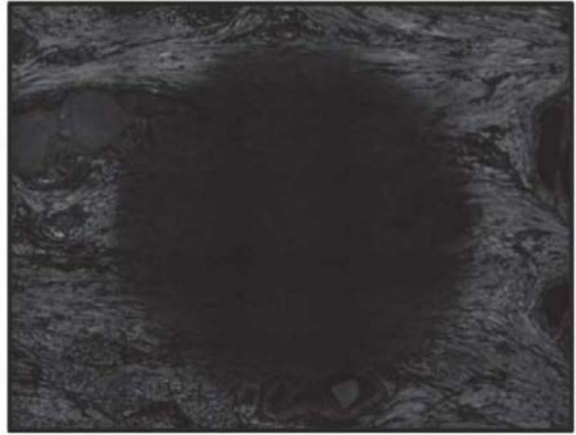
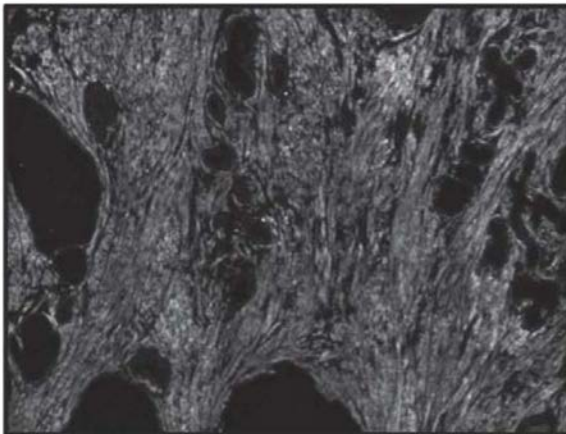


图10G

裂解之前



裂解之后

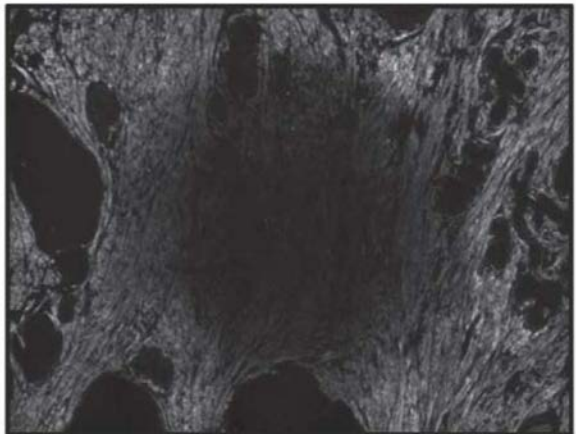


图10H

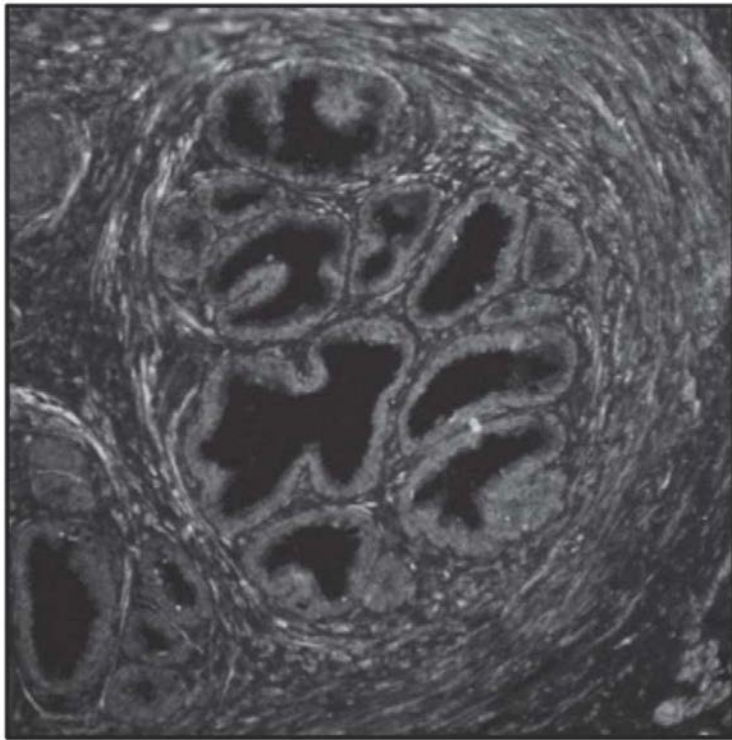


图11

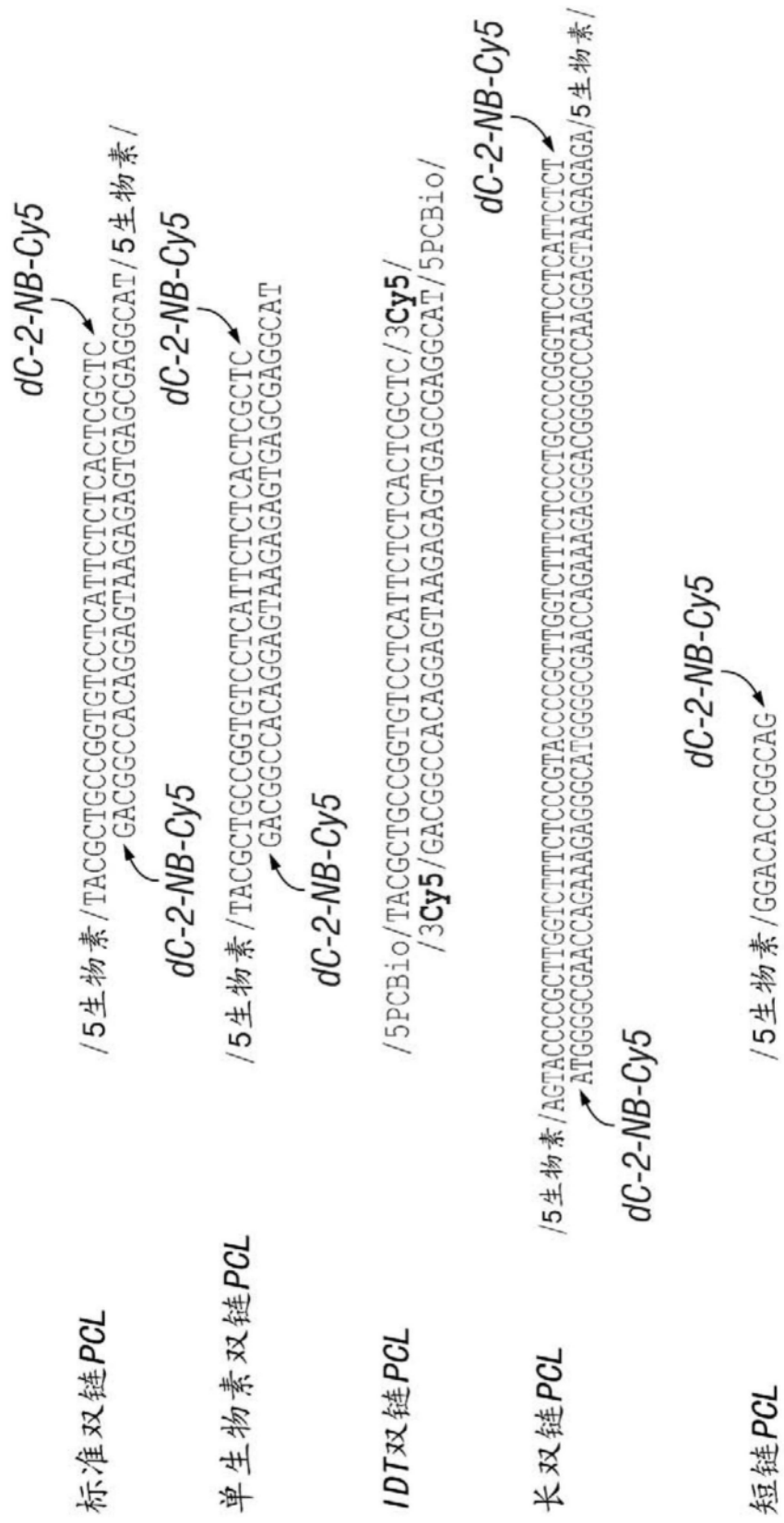


图12

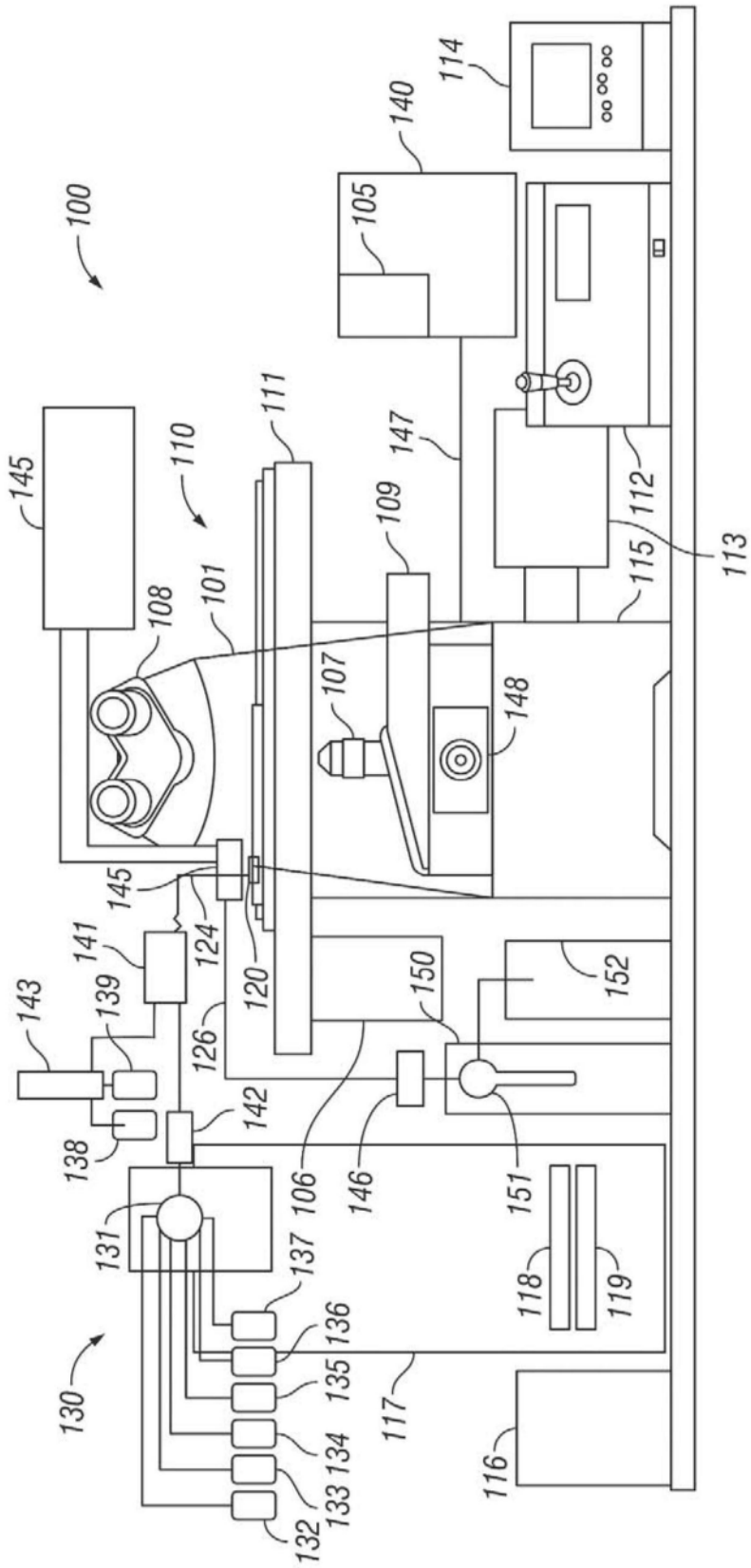


图13

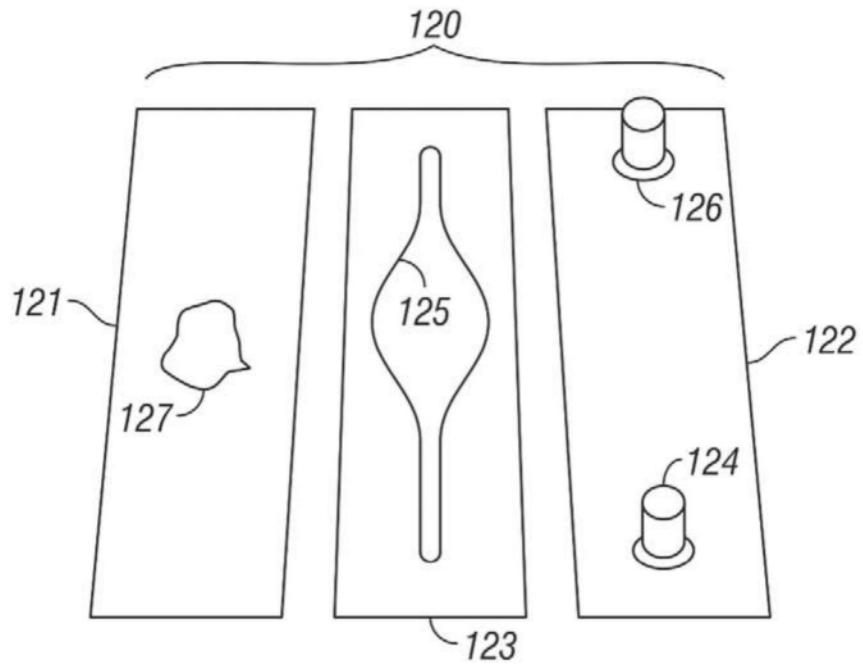


图14

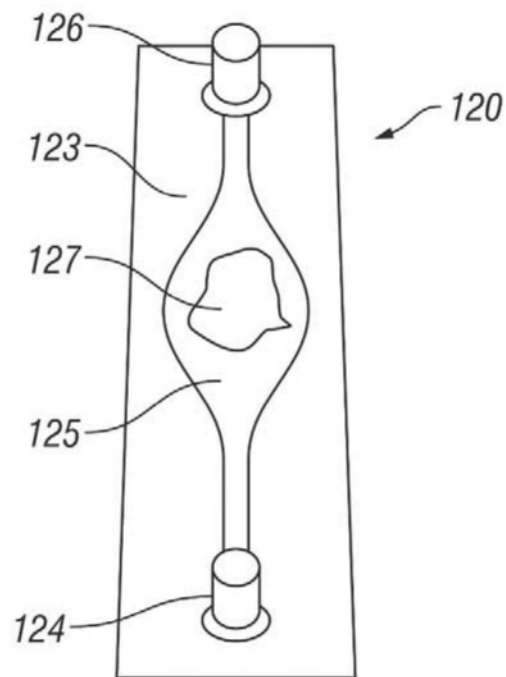


图15

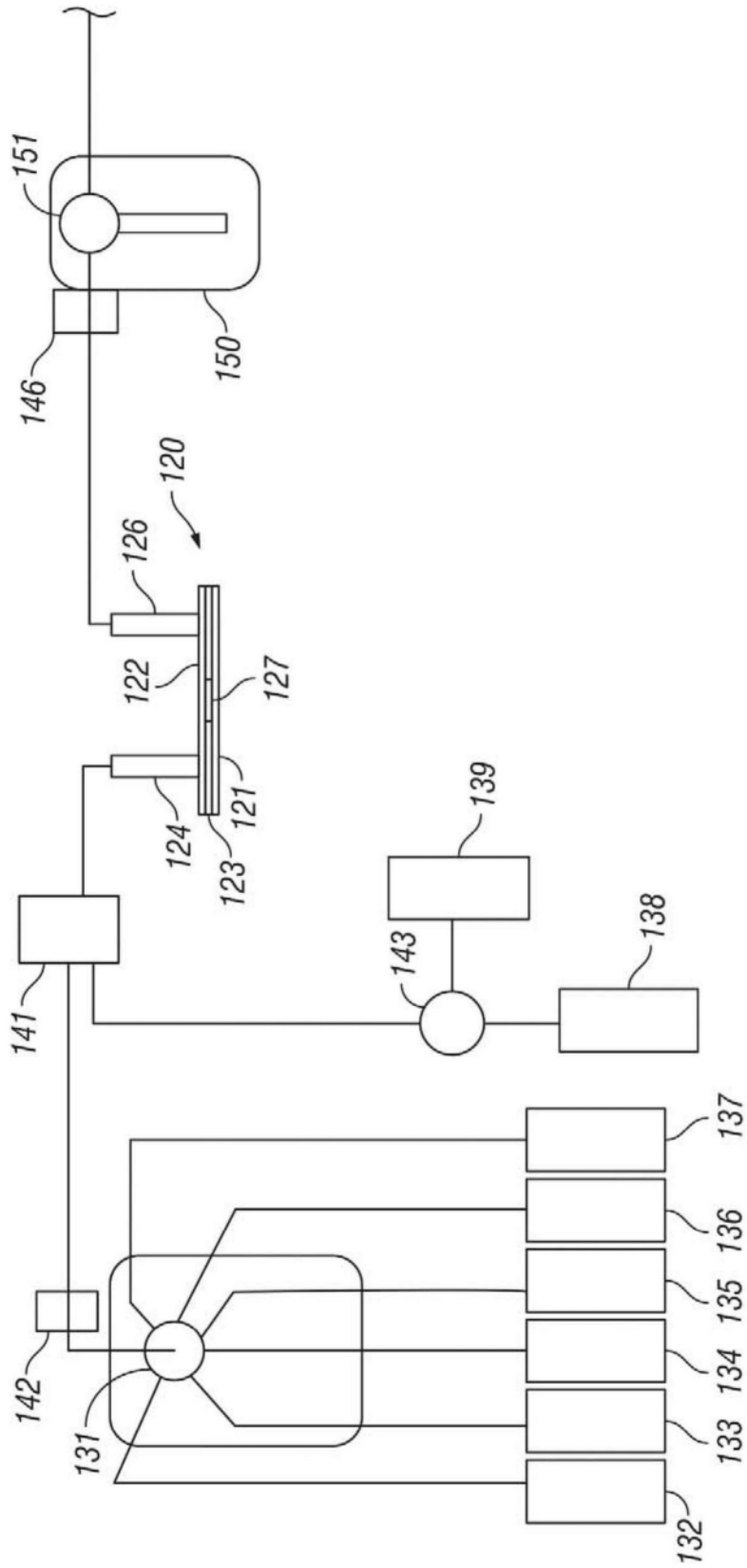


图16

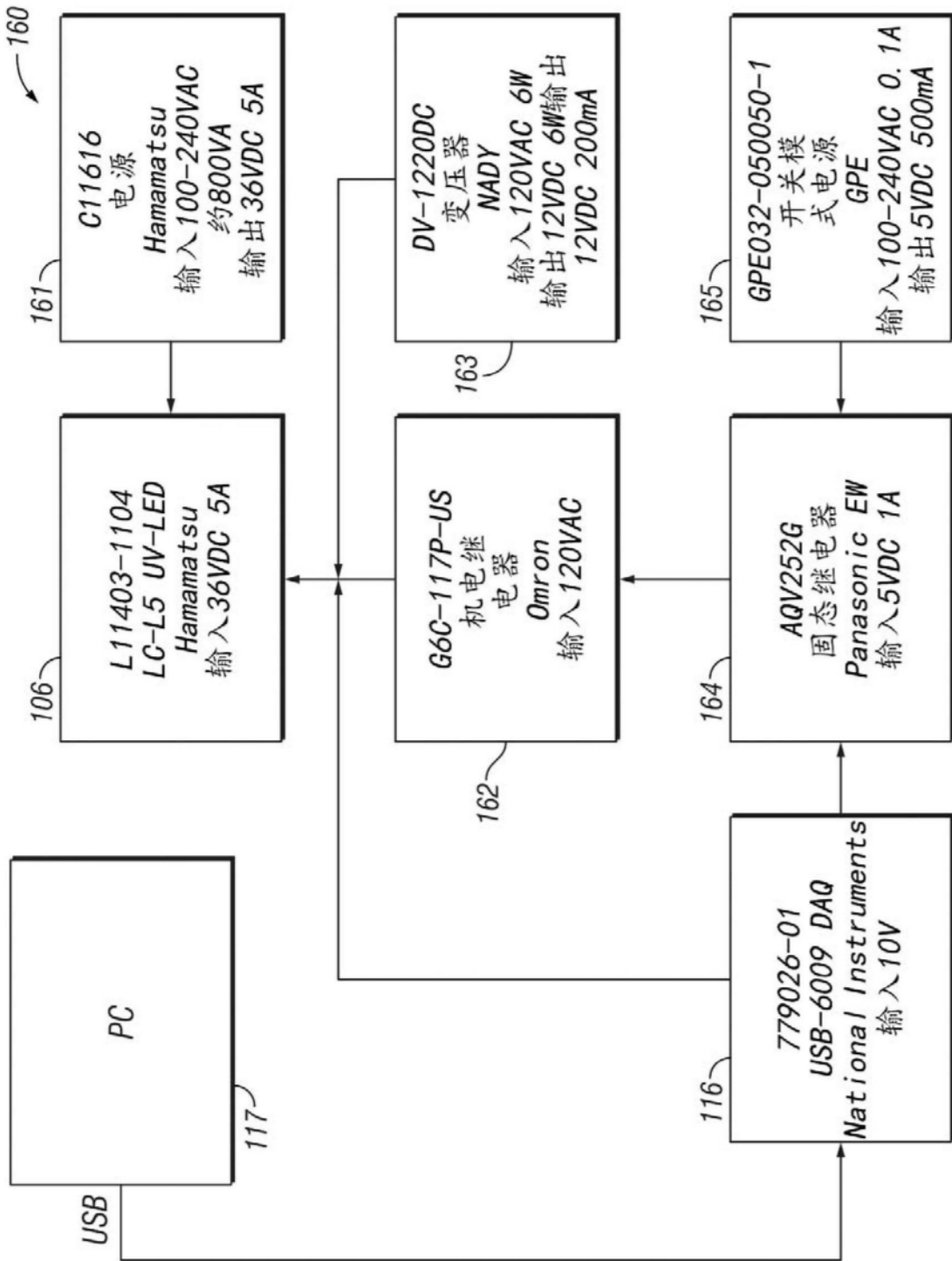


图17

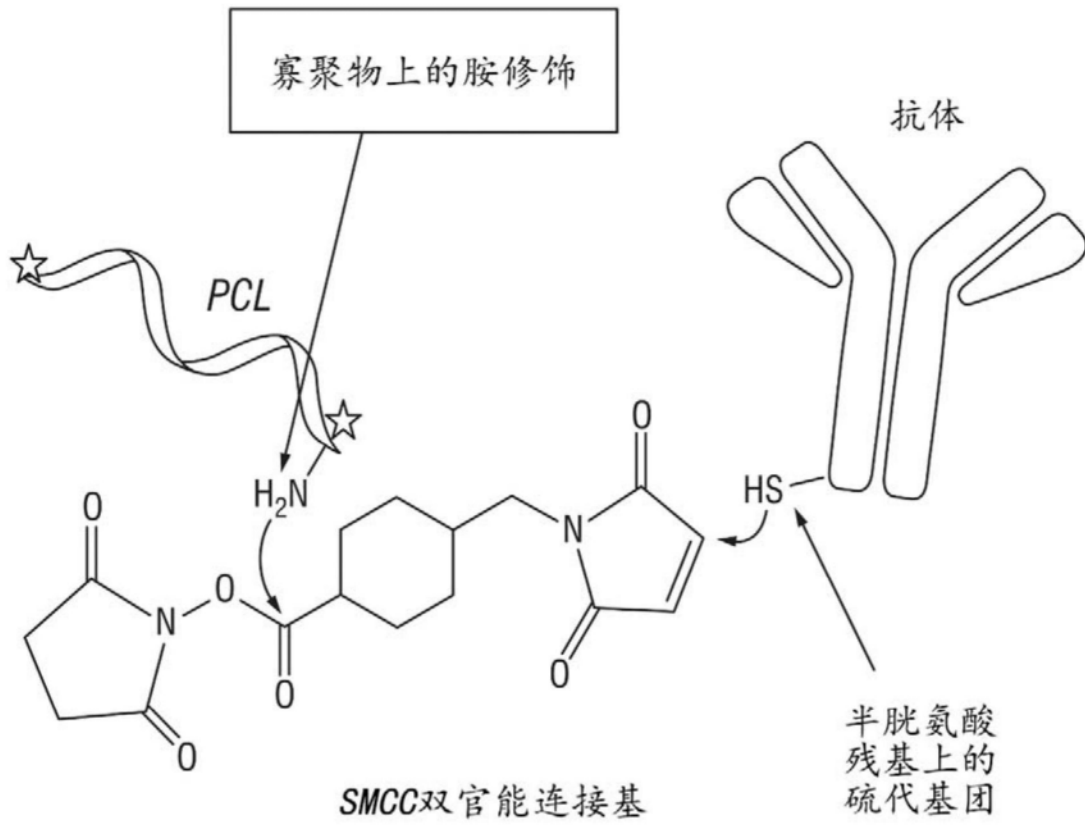


图18

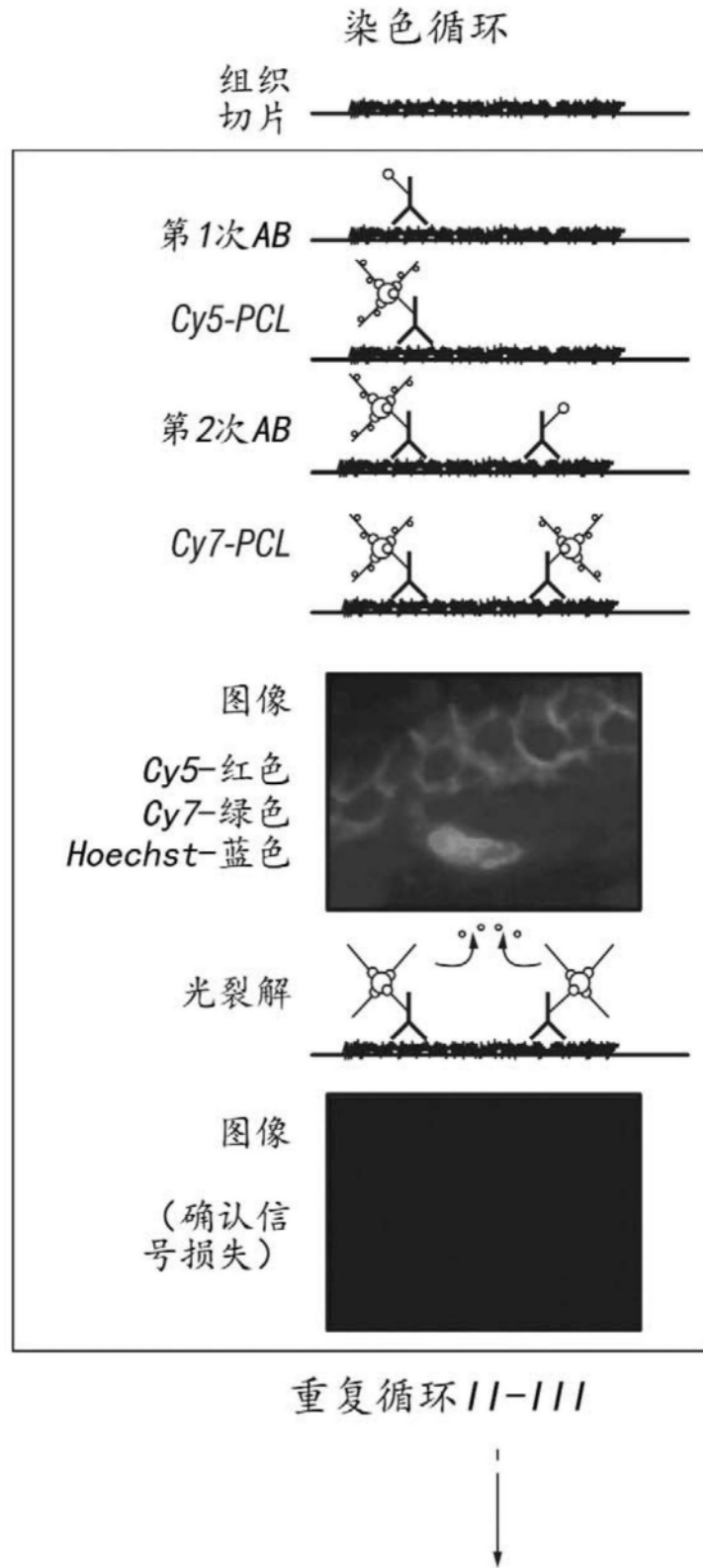


图19A

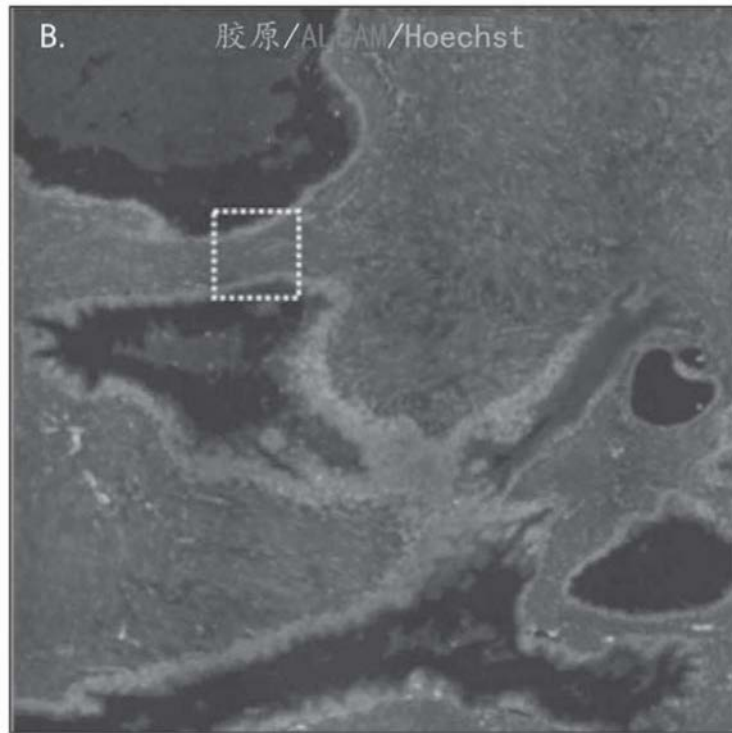


图19B

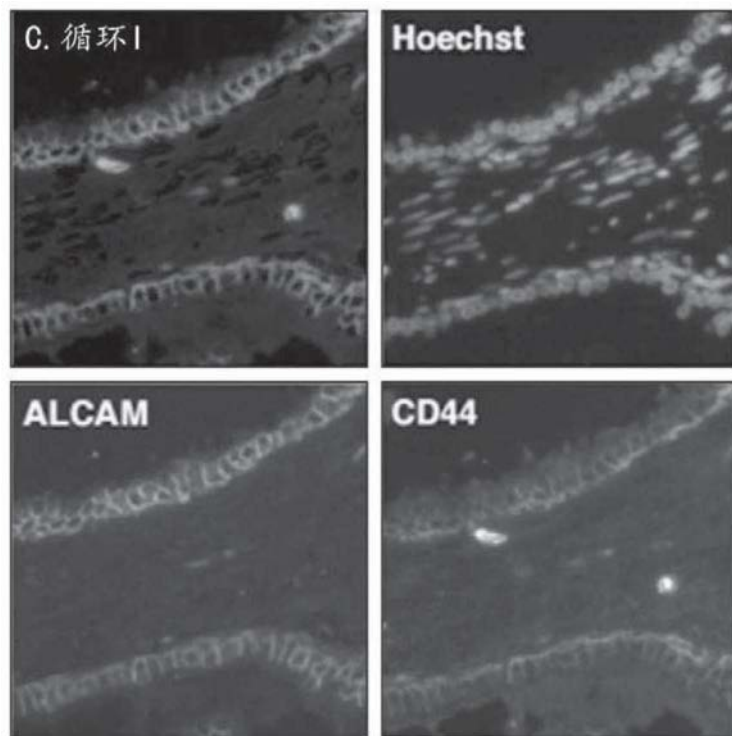


图19C

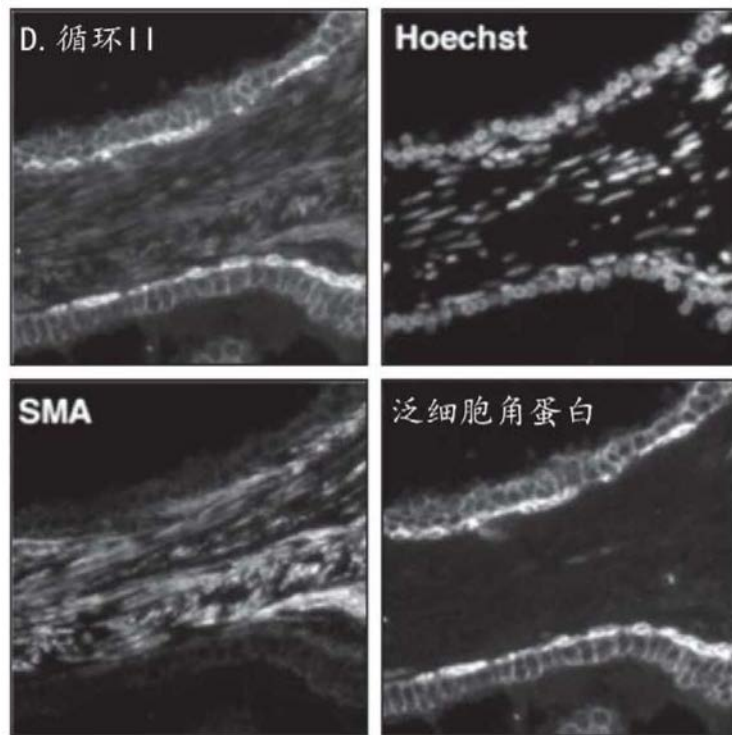


图19D

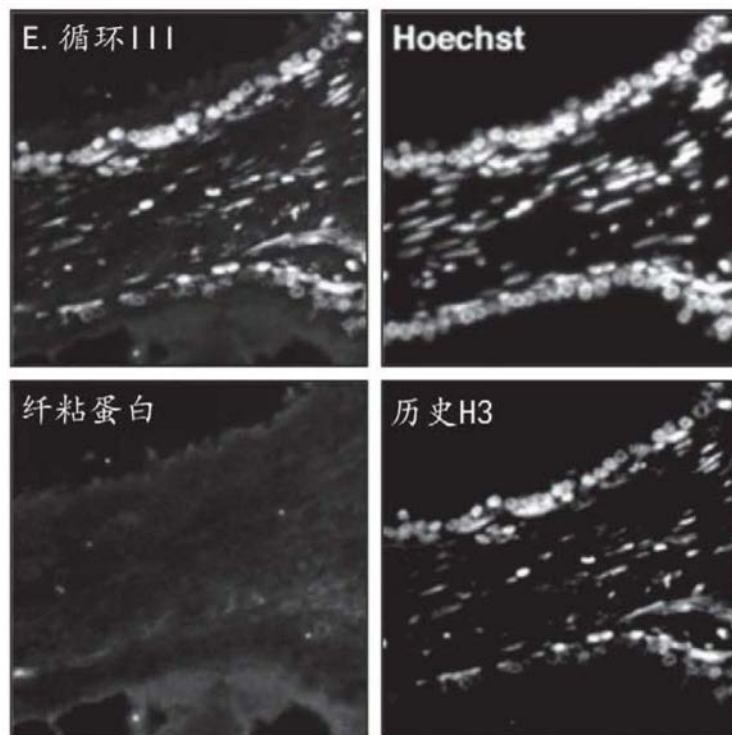


图19E

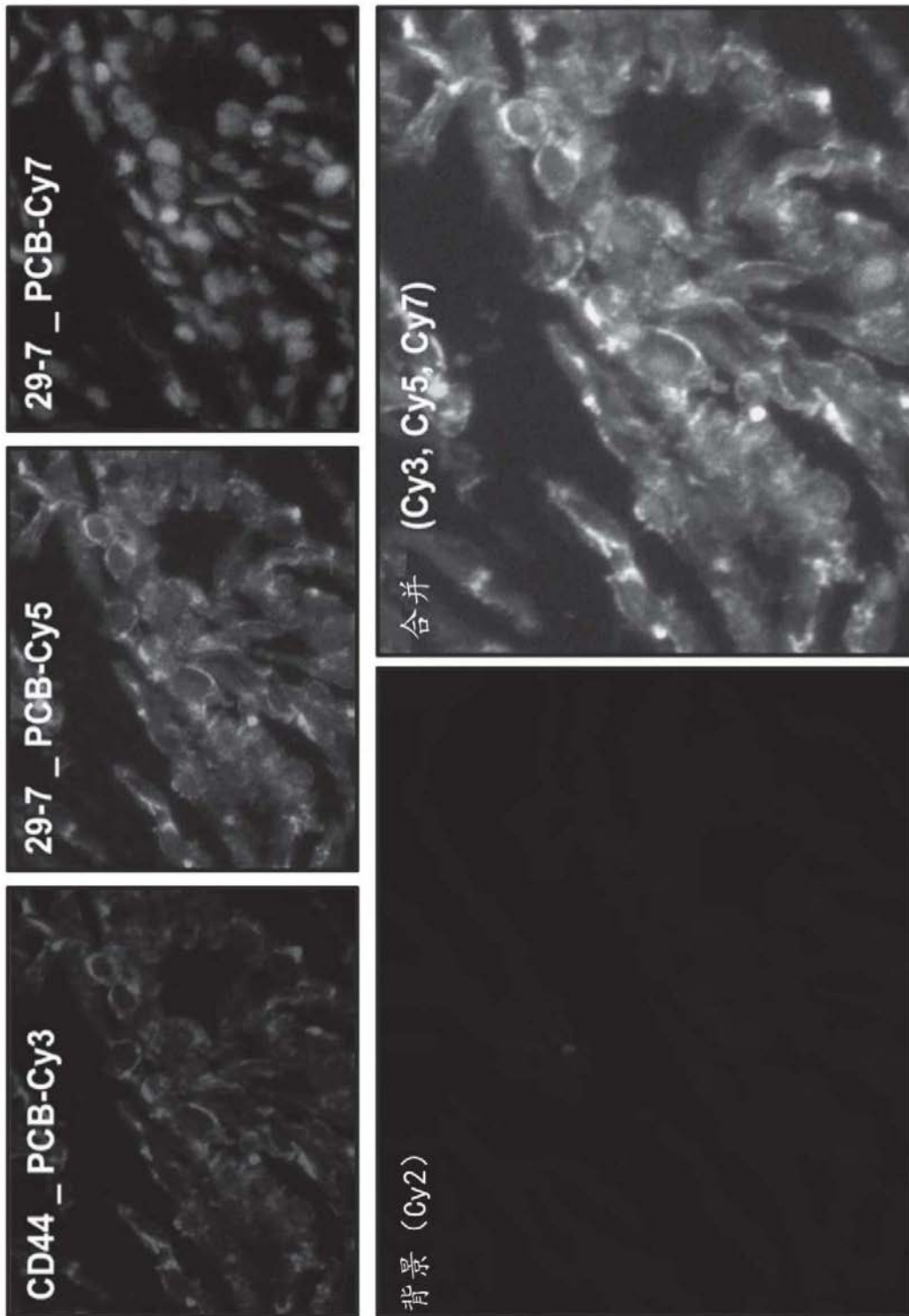


图20

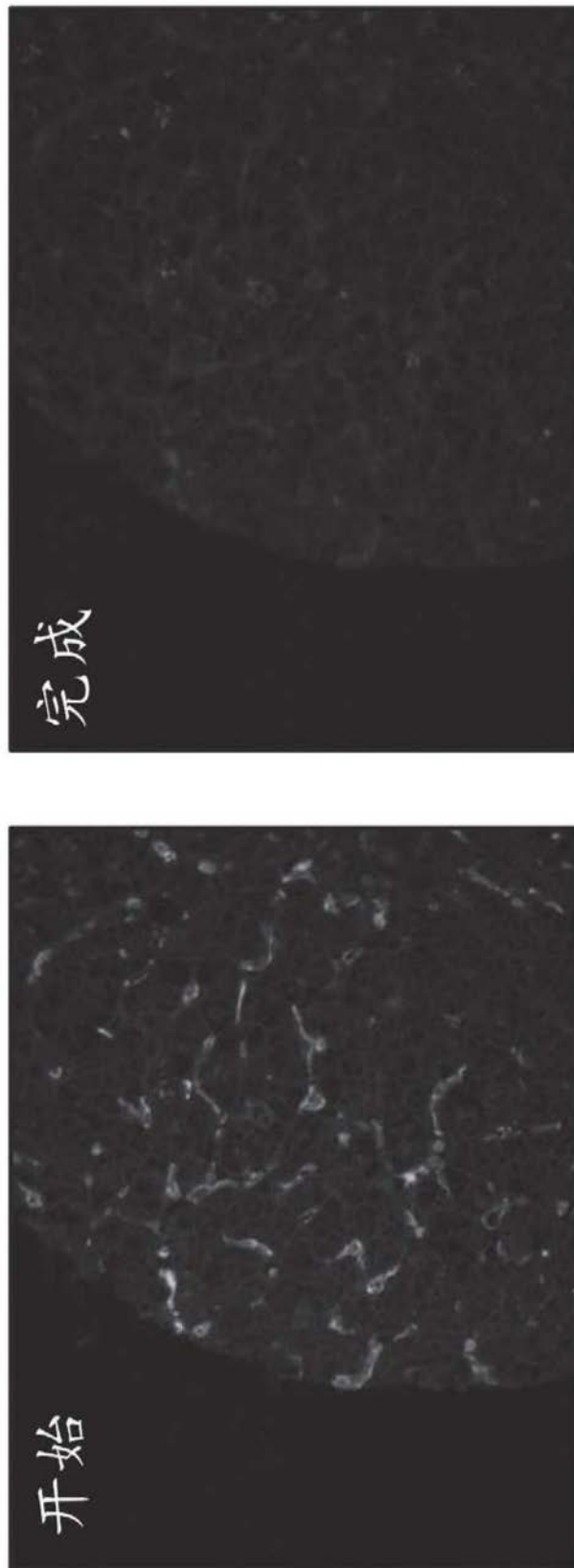


图21A

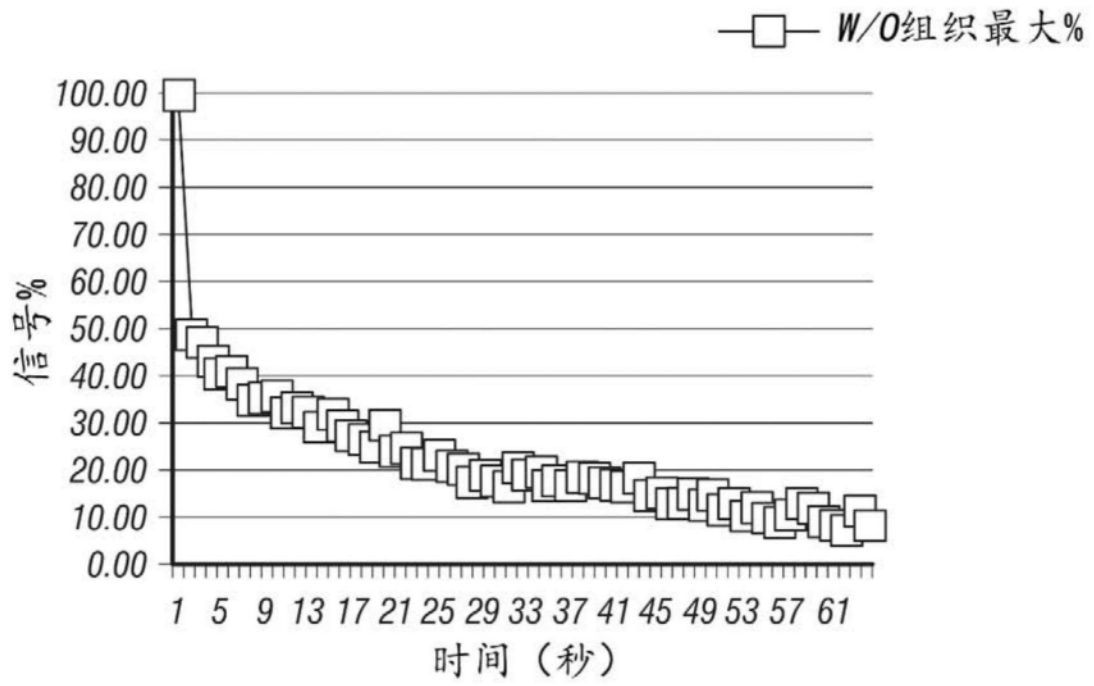


图21B

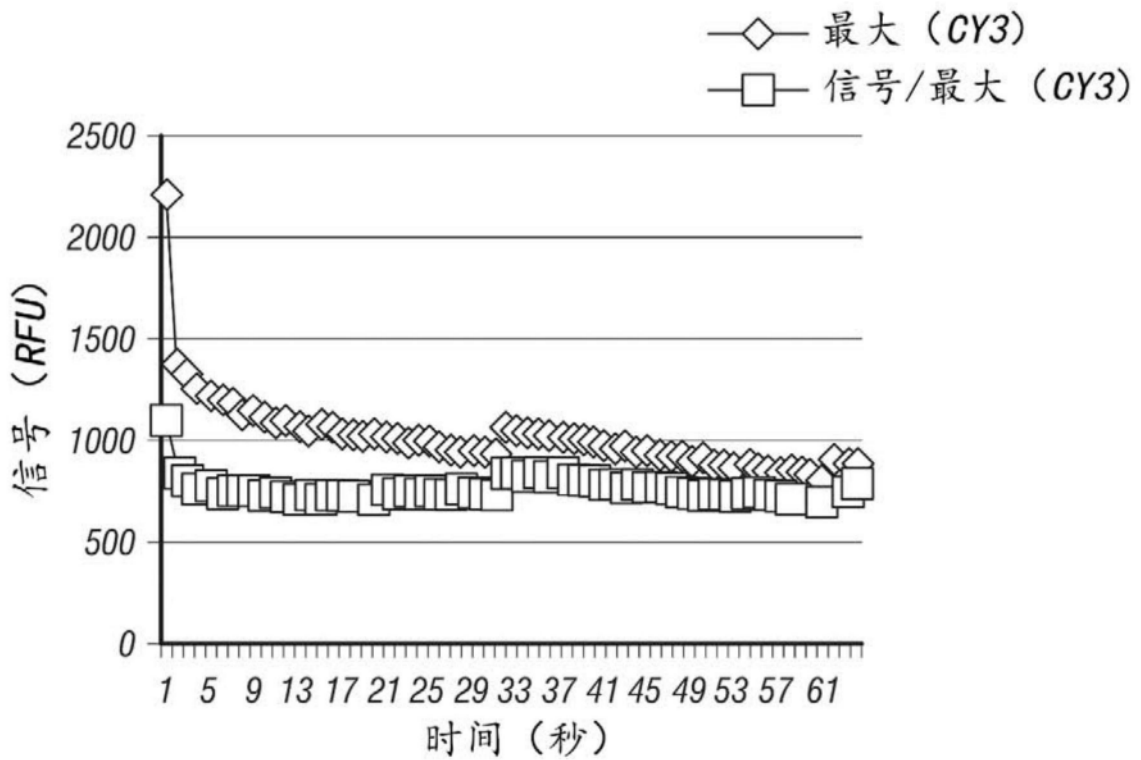


图21C