



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107255584 B

(45) 授权公告日 2021.04.13

(21) 申请号 201710343058.X

(22) 申请日 2012.02.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107255584 A

(43) 申请公布日 2017.10.17

(30) 优先权数据
61/447,364 2011.02.28 US

(62) 分案原申请数据
201280010677.2 2012.02.28

(73) 专利权人 安捷伦科技有限公司
地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 S·H·马蒂森 S·尼尔森

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322

代理人 顾小曼

(51) Int.Cl.
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 1/36 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 1277156 A, 2000.12.20
CN 101693156 A, 2010.04.14
CN 1726386 A, 2006.01.25
CN 101929927 A, 2010.12.29
CN 201605875 U, 2010.10.13
EP 1793218 A1, 2007.06.06

审查员 李新科

权利要求书1页 说明书29页 附图14页

(54) 发明名称

用于预处理包埋的生物样本的不混溶两相系统

(57) 摘要

本申请提供用于包埋的生物样本的预处理的不混溶两相系统,包括向预处理容器中放入在其表面上具有包埋的生物样本的至少一个支撑物,向预处理容器加入至少一种形成层的试剂,向预处理容器加入载体成分,使形成层的试剂形成在载体成分的顶部且含量为使至少一种形成层的试剂接触至少一部分的包埋的生物样本。包埋的生物样本的处理可以包括,在染色组织化学分析或其他工序之前,从包埋的生物样本中去除包埋介质、目标物修复以及酶封闭。系统还包括使预处理方法自动化的装置和程序。

1. 一种用于包埋的生物样本的自动化预处理的装置,所述装置包含:

支撑支架,以及

预处理容器,所述预处理容器包含位于所述容器顶部的溢出通道和溢出排水管、经底部向容器提供液体的入口;和

双向口,

其中所述预处理容器适合于接收至少一个在其表面具有包埋的生物样品的支撑物,以及至少一种形成层的试剂和载体成分,使形成层的试剂形成在所述载体成分的顶部且其含量为使得至少一种形成层的试剂接触至少一部分的所述包埋的生物样本,以便提供两相系统,并且

其中所述预处理容器包括位于上方位置处的入口和设置成加入载体成分的位于下方位置处的双向口,使得当载体成分的体积增加时,上相在预处理容器中上行,当载体成分的体积减少时,上相在预处理容器中下行。

2. 根据权利要求1所述的装置,还包含用于推动空气进入容器的风扇。

3. 根据权利要求1或2所述的装置,还包含加热元件。

4. 根据权利要求1或2所述的装置,还包含设置有分散网格的开放内部框架。

5. 根据权利要求1或2所述的装置,其中,样本支架是设置有架臂的玻片架。

6. 根据权利要求5所述的装置,其中,所述玻片架放置在内部框架中,并且所述预处理容器设置有架导引,所述架导引引导所述玻片架进入所述容器和所述内部框架内的适当位置。

7. 根据权利要求1或2所述的装置,还包含水平移动条,所述水平移动条能够从所述预处理容器的顶部除去至少一部分的两相系统。

8. 根据权利要求1或2所述的装置,还包括用于供应不混溶两相系统的供给装置,所述不混溶两相系统的上相能够降低包埋介质的熔点或溶解包埋介质,下相用作载体溶剂。

9. 根据权利要求8所述的装置,其中所述入口包括通过其加入所述上相的入口,所述双向口包括通过其加入所述下相的双向口,并且所述入口在所述双向口的上方。

10. 根据权利要求9所述的装置,还包括在所述入口和所述双向口之间的分散网格。

用于预处理包埋的生物样本的不混溶两相系统

技术领域

[0001] 本公开涉及领域为生物样本的处理,具体为包埋的生物样本的预处理,例如在染色、组织化学分析或其他工序之前从包埋的生物样本中去除包埋介质。更具体地说,本发明涉及在工序中应用具有浸泡槽和表面薄层的两相系统,以从包埋的生物样本中除去包埋介质。本发明涉及一种高效和有成本效益的方法和组合物,以用于去除包埋的生物样本中的包埋介质。

背景技术

[0002] 样本处理,例如在免疫组织化学(“IHC”)应用中,以及在其他化学和生物学分析中,可能涉及至少一个处理顺序或处理操作指南,作为至少一个样本的分析的一部分。通常情况下,这样的处理操作指南由需要分析的组织或个人(如附属医院的路理学家或组织学家)来制定,还可以由待执行的特定分析的要求来限定。

[0003] 在样本分析的准备中,可以取得生物样本并以某种保存形式将其贴附在玻片或其他载体上。作为一个实例,样本诸如组织层或组织切片可以保存在甲醛中并包埋在石蜡或其他包埋介质中,用切片机进行切片。然后,组织切片可以贴附在玻片上。用石蜡保存的样本可以进行脱石蜡,通过脱石蜡过程除去包埋样本的石蜡。此外,目标物或样本可以进行目标物修复,该工序将目标物或样本修复到适合染色操作的状态。

[0004] 术语“染色”是指一种工序,即对样本的某些部分进行处理,以显示或突出样本的特征。作为染色的结果,在可见光范围内或在其他电磁波范围内,如紫外线范围内,试图显现的特性可以获得不同的颜色。在某些情况下,染色可以引起可检测到的特性变化,如样本的荧光、磁性、电性或放射性特性的变化。样本的染色包括一系列的处理步骤,称为处理的操作指南。典型的处理操作指南可以包括洗涤、试剂与样本特定部分的结合、试剂的任何活化,并且每个处理步骤可以包括多个单独的处理。

[0005] 诊断应用,例如免疫组织化学(IHC)、原位杂交(ISH)和特殊染色,可能涉及例如脱石蜡、目标物修复和染色等步骤的处理顺序或处理操作指南。在某些应用中,这些步骤可以手动进行,可能创建出时间密集型的操作指南,并需要人员积极参与到样本处理中。即使在自动执行时,在这类应用中也存在不足。已经做出尝试来使样本处理自动化,以满足对于便利的样本处理和更少的手动繁琐操作的需求。

[0006] 为保存生物样本以供其他分析,已使用不同类型的包埋介质。“包埋介质”可以是任何组合物,该组合物在室温下是固体,并于组织学中用于包埋或以其他方式支撑组织学或其他分析用的生物样本,组织学或其他分析例如免疫组织化学、原位杂交、特殊染色和传统的染料染色。包埋介质的实例包括,但不限于,蜡、石蜡、paramat、paraplasts、peel away石蜡、组织冷冻介质、人体冷冻凝胶(cryonic gel)、OCT™(“最佳切割温度”)包埋化合物、Polyfin™、聚酯蜡。

[0007] “蜡”可以是用于包埋组织化学或其他化学和生物学分析用的生物样本的组合物。蜡在室温下是固体;通常由高级烃类的复合混合物组成,高级烃类通常包括高级脂肪酸和

高级二醇的酯；可以是矿物质，天然或合成来源；比脂更硬和更易碎；溶于油和脂，并可以任选地包含增强其样本包埋性的添加剂。石蜡是组织化学领域中最常用的矿物蜡的实例。石蜡是疏水性物质，通常通过石油的蒸馏来制备，且主要是固体饱和烃的混合物。石蜡（蜡）通常由高级聚烯烃组成，且通常包含聚合物，或加入有二甲基亚砷（“DMSO”）。多年来石蜡被用作制备生物样本的包埋介质，这些生物样本用于在切片机中切片，以制备组织学检查的样本切片。

[0008] 本公开中所用的“组织化学”，一般是指如下技术和方法：免疫组织化学、细胞化学、组织病理学、特殊染色、显微技术以及分子探针在例如原位杂交中的使用。

[0009] 如在本公开中所用的术语“脱石蜡”包括石蜡或其他在本申请中所描述的包埋介质的去除。在染色前，通常需要脱石蜡，以便在随后的染色过程中接触到抗体或探针所针对的目标物。用于脱石蜡的溶剂为，例如二甲苯、二甲苯取代物和甲苯。通常在脱石蜡中使用的溶剂可能是有毒的、易燃的、并造成环境危害。

[0010] 传统的手工脱石蜡过程包括，例如将包埋的样本浸入二甲苯（Fisher Scientific, Cat.#X5-4）浴、甲苯浴或Histo-Clear®（National Diagnostics Inc., Cat.#HS-200）浴中直至包埋介质溶解的步骤。脱石蜡后的样本随后进行洗涤和再水化，以除去溶剂，并使用醇浓度逐渐降低的一系列醇溶液（通常作为浸泡样本的浴）使样本再水化。例如，样本可以再水化，通过将其浸泡在95%乙醇的第一浴中两次，浸渍在70%乙醇的第二浴中两次，以及浸入水性缓冲液的第三浴。

[0011] 燃料的闪点是其能够与空气形成可燃性混合物的最低温度。在此温度，当移除点火源时，蒸汽可停止燃烧。稍高的温度，燃点，被定义为当蒸汽被点燃后持续燃烧的温度。如上所述，二甲苯是易燃、易挥发和有毒的有机溶剂；二甲苯具有约137°C的低沸点，和约29°C的低闪点，1至6%的爆炸下限。相似地，醇，尤其是乙醇，是易燃的，并具有约78°C的低沸点，约17°C的低闪点，3.5至15%的爆炸下限，因此容易形成爆炸性空气混合物中的一部分。然而，稀释的醇溶液，如10%或20%的乙醇水溶液，能够比传统上使用的乙醇溶液（70至95%的乙醇水溶液）具有显著更高的闪点和沸点。

[0012] 由于二甲苯和醇的危险特性，开发更安全的脱石蜡方法将是有利的。已做出努力来用毒性更小和更少挥发的溶剂来代替脱石蜡过程中的二甲苯。例如，萘烯油和异烷烃，已被证明产生与二甲苯相当的脱石蜡作用。然而，即使在使用这些替代溶剂时，仍然需要一系列的醇洗涤，也被称为再水化过程，在水洗涤前除去溶剂，以实现与大部分类型的染色的相容性，例如免疫组织化学染色。

[0013] BioGenex Laboratories的美国专利6,632,598、美国专利申请公开2003/0175852A1和国际专利申请WO 02/23156A1记载了用于从蜡包埋生物样本中除去蜡的的组合物和方法，其中可以消除二甲苯的使用，且在随后的洗涤步骤中减少或消除醇的使用。其中记载的的组合物包含溶解石蜡的有机溶剂、极性有机溶剂和表面活性剂。溶解石蜡的有机溶剂的实例包括芳香烃、脂肪烃、萘烯、其他油类和石油馏出物。极性有机溶剂包括，例如酮和低级醇。醇可以是，例如，乙醇、乙二醇、异丙醇、丙二醇及其混合物。

[0014] BioGenex Laboratories公开的组合物和方法的缺点是，即使可以减少或消除脱石蜡后的醇浴的使用，所公开的脱石蜡组合物的极性有机溶剂包含醇。因此，所公开的脱石蜡组合物具有与使用醇浴或进行洗涤的脱石蜡方法相同的缺点。

[0015] Camiener的美国专利5,344,637记载了使用有机含环化合物来替代Histo-Clear®和二甲苯作为溶剂的方法。该溶剂用于取代在被固定的生物材料中的醇或其他脱水剂,并从蜡包埋的生物材料中除去蜡。该溶剂包含5wt%至100wt%的化合物,所述化合物选自饱和的有机含环化合物的未取代和取代衍生物(单独的或存在于氢化芳香族石油馏出物中)、及其组合。溶剂经CBG Biotech出售,商标为Formula 83™。Formula 83™的缺点是其119至145℃的相对低的沸点,及其普通可燃性。伴随着仅为7℃的低闪点,和仅为1.3vol%的爆炸下限(LEL)(即在7℃之上的温度),Formula 83™可以与空气形成可燃混合物,从而造成危险状况。此外,Formula 83™是有机溶剂的共混物,应采取个人安全防范措施,例如应使用手套和护目镜。

[0016] Ventana Medical Systems, Inc.的美国专利申请公开2004/0002163和国际专利申请公开W0 03/089240A1描述了自动化玻片染色系统,应用于对贴附在显微镜玻片上的生物组织切片的染色。组织样本通过使样本与脱石蜡液在高于对组织样本进行包埋的石蜡的熔点的温度下接触,从而进行脱石蜡。之后漂洗掉液化的石蜡。脱石蜡液是水性类液体,当包埋介质是熔点在50和57℃之间的石蜡时,通常加热到60至70℃之间的温度。

[0017] Ventana Medical Systems, Inc.的美国专利6,855,559和6,544,798、国际专利申请公布W0 99/44030和W0 00/14507公开了包埋介质的去除,无需使用有机溶剂,通过加热样本的一侧,使样本玻片干燥并使包埋介质溶解。之后,洗掉溶解的包埋介质。在免疫组织化学(“IHC”)、原位杂交(“ISH”)或其他组织化学或细胞化学操作之前,在自动化仪器上将包埋介质从生物样本中去除。

[0018] 根据W0 99/44030的公开,通过单个玻片的精确控制加热,使得包埋在组织中的石蜡熔化并浮在水溶液中,从而实现包埋组织的脱石蜡,其中石蜡在水溶液中冲洗掉。可以通过径向排列在玻片传送带四周的加热台来实现加热,玻片传送带上可以放置带组织样本的玻片。

[0019] 利用热来去除包埋介质也在Torstein Ljungmann等人的国际申请W0 2005/057180中公开。

[0020] 用热除去包埋介质的方法和系统的缺点是,其可能是缓慢的过程,因为石蜡包埋的生物样本要在5分钟至60分钟的期间经受升高的温度。另一个缺点是除去组织切片中的最后石蜡残留时的效率较低。还有一个缺点是,所使用的加热元件需要在放置生物样本的表面与加热元件之间保持充足的接触。

发明内容

[0021] 本申请的一个方面是提供与已知方法相比改进的脱石蜡方法。

[0022] 因此,本申请的一个目的是,在例如实验室处理生物样本时,减少火灾和爆炸的风险。火、废料、工人的安全等,可能是具有各种移动自动装置和电路的复杂自动化设备中的相关因素,并且是具有培训不足的人员的实验室中的相关因素。本公开的目的还在于,减少对实验室中通风设备和空气流通的需求。

[0023] 另外,本发明的一个实施方式意在,使用不混溶两相系统,为竖式(vertical)的操作模式提供简化的方法,其中玻片用最小体积的上层以及下层或载体层进行竖式处理。因此,本发明的另一个目的是提供组织化学分析用的包埋的样本的预处理方法的更简单自动

化,使得成本降低和环境条件改善,这是因为(除其他原因外)所使用的溶剂量减少。

[0024] 在本申请的一个实施方式中,已公开一种去除方法,在玻片上几乎不留或根本不留包埋介质残留物,并且该方法可以去除不同种类的包埋介质。例如,在石蜡的情况下,各种石蜡切片可以源自各种石蜡类型和混合物。因为这些包埋介质的残留物可能妨碍染色以及形态学样式和信息,具有去除不同残留物的方法是有利的。这是可取的,因为样本中的石蜡残留物可能对ISH法造成问题,并且由于IHC变得更加定量化和标准化,任何包埋介质残留物均可能会降低或改变染色强度,从而导致错误的解读。

[0025] 本公开的实施方式还旨在提供与已有方法相比,从包埋的生物样本中除去包埋介质的更简化方法。此外,实施方式的目的是使处理自动化,并使人工处理降至最低。

[0026] 在本申请的另一个实施方式中,已公开使用溶剂来脱石蜡的方法,其在目标物修复之前不需要再水化的后续步骤。在本申请的另一个实施方式中,已公开在一个室中进行脱石蜡、再水化和目标物修复的方法和装置。

[0027] 另外,本发明的实施方式旨在提供一种竖式操作的简化方法,使用不混溶两相系统,其中玻片使用最少体积的上层以及下层或载体层进行竖式处理。因此,本发明的另一个目的是提供组织化学分析所用的包埋的样本的预处理方法的更简单自动化,使得降低成本并且改善环境条件,因为(除其他原因外)使用减少量的溶剂。

[0028] 总结

[0029] 本申请的实施方式通过例如,使用高效、无毒的有机溶剂来除去包埋介质,以及使得使用者直接应用水性缓冲液而无需使用极性有机溶剂(例如醇)的多次漂洗来进一步处理生物样本(即,再水化),从而达成上述目的。

[0030] 本申请的另一个实施方式提供,使用比现有方法少很多的有机溶剂量,从包埋的生物样本中去除包埋介质的方法。因此,出于经济原因,没有必要考虑重复使用溶剂。

[0031] 本发明的发明人已经意识到,脱石蜡后有可能可以直接应用水性缓冲液,而无需使用极性有机溶剂,例如醇。已知的使用有机溶剂的方法,试图通过使用与两相均相容的溶剂(例如,醇),在脱石蜡后从纯的有机相逐渐变为水相。与此相反,本申请使用两相系统,且不使用与两相均混溶的醇。

[0032] 本发明的发明人还意识到,可能可以使用简化的、快速的和自动化的溶剂两相系统,以除去包埋介质和水性洗涤溶液,从而取得例如与使用溶剂的传统方法等同或者更好的脱石蜡结果。

[0033] 此外,本发明的发明人还发现,固体包埋介质,例如石蜡,能够通过将溶剂扩散到固体表面来降低它们自身的熔点从而迅速溶解。此过程可以在不同于或远离包埋介质的原始熔点的温度下进行,例如在室温下。

[0034] 本申请涉及根据独立权利要求所述的方法、装置、以及具有溶剂的两相系统的使用,以从包埋的生物样本中去除包埋介质。其他实施例限定在从属权利要求中。

[0035] 在本申请的另一个实施方式中,在去除包埋介质、生物样本的再水化及目标物修复后,应用试剂来封闭内源性过氧化物酶的活性。在本申请的另一个实施方式中,将包埋介质的去除、生物样本的再水化及目标物修复、以及应用试剂以封闭内源性过氧化物酶活性组合到单一操作中。该实施方式可以称为4合1方法。

附图说明

[0036] 结合到本申请并构成本申请一部分的附图,示例说明本申请的多个非限制性实施方式,并与说明书一起解释本申请的原理。

[0037] 图1示出用于生物样本的自动化预处理和加工的预处理模块的分解图。

[0038] 图2A示出用于生物样本的自动化预处理和加工的插入有玻片架的预处理模块的正交视图。

[0039] 图2B示出用于生物样本的自动化预处理和加工的插入有玻片架的预处理模块的截面图。

[0040] 图3A示出在液体进入装置之前的插入有玻片架的预处理模块的长边示意图。

[0041] 图3B示出稍后当第二相层和第一相液体加到装置中时的预处理模块的长边示意图。

[0042] 图3C示出稍后当增加的第一相液体加到装置并移动第二相层来扫过玻片的预处理模块的长边示意图。

[0043] 图3D示出稍后当增加的第一相液体加到装置从而使液体达到满位,但在第二相层通过溢出去除之前的预处理模块的长边示意图。

[0044] 图4示出当第二相层通过溢出移除到溢出通道且第一相液体保留在装置中时的插入有玻片架的预处理模块的截面示意图。

[0045] 图5示出基于溶剂类两相预处理法的方法流程图。

[0046] 图6示出液化石蜡两相预处理的方法流程图。

[0047] 图7示出使用烘烤和干燥的预处理法的流程图。

[0048] 图8示出用于生物样本的自动化预处理和加工的,玻片架在模块外部的预处理模块的侧视图。

[0049] 图9示出用于带烘烤和干燥的预处理方法的预处理模块的截面示意图,示出环绕所插入玻片的气流。

[0050] 图10示出,用两相系统(图10a (HistoClear II®) 和图10b (Isopar G)) 脱石蜡的组织样本显示出比用3合1缓冲液(图10c) 和传统二甲苯脱石蜡法(图10d) 进行脱石蜡的组织样本更好的结果。

具体实施方式

[0051] 本文公开的简单且有效的方法基于形成层的试剂在包埋的生物样本表面上的传输,从而除去包埋介质。形成层的试剂位于载体成分的顶部,其中载体成分不参与溶解石蜡。因为两种溶液不混溶,形成两相系统。在本申请的内容中,术语“不混溶”应被理解为,不能混合或达到均一性,即放在一起时,两种溶液基本上不能均一混合。

[0052] 形成层的试剂具有比载体成分更低的密度,因此形成两相系统中的上相。在本公开中,该层也可以称为“上层”或“第二相层”。在形成层的试剂是溶剂的实施方式中,也可以称为“溶剂层”。载体成分作为两相系统中的第一相,并且可以称为“下层”,“第一相层”,或“溶剂载体层”。

[0053] 在本申请中所用的“生物样本”一般是指细胞的任何集合,或松散或在组织中,其可以贴附在支撑物上。非穷举的例子包括器官切片、肿瘤切片、体液、涂片、冰冻切片、血液、

细胞学制品、微生物和细胞系。

[0054] “支撑物”一般是指可以放置至少一种生物样本以做进一步分析的任何媒介。这包括任何支撑物,例如试管、芯片、阵列、盘、或玻片如显微镜玻片。如本文所用的“样本支架”包括任何支撑物,例如载体、试管、芯片、阵列、盘、或玻片如显微镜玻片,其可以支撑至少一个生物样本。

[0055] “样本支架”或“支撑支架”也可以包括能够支撑一组支撑物的设备,例如可容纳一组玻片的架。

[0056] “样本支架”也可指更大规模的支撑物,例如容纳至少一个更小支撑物的玻片支持架,例如多个玻片架,其中各个架含有多个玻片。支架是可拆卸的、固定的、和/或保持在允许运动的状态(例如垂直、水平或绕一个或多个轴旋转)。在一个实施方式中,样本支架可以用作样本保持装置。样本架的可替换实例包括旋转传送带、托盘、架、载体、支架、隔室或用于处理和加工样本和样本载体的其他运输装置,其中任何一个均可以是至少部分可移动的。

[0057] 如本文所用的“除去包埋介质”或“包埋介质的除去”是指,从包埋的生物样本中去除充分量的包埋介质,从而使得样本可以进行进一步的处理和/或分析。通常,这样的分析是组织学分析,如免疫组织化学或原位杂交,且应去除的包埋介质的量是足以允许所选择分析技术接触到样本中至少一个反应位点的量。当包埋介质是蜡或石蜡时,这个过程也可以称为“脱蜡”或“脱石蜡”。

[0058] 两相系统是指相对小体积的溶剂可以用来从包埋的生物样本中去除包埋介质例如石蜡的预处理系统。例如,去除包埋介质的试剂,例如HistoClear II®,可以加在载体成分的顶部。载体成分可以是例如去离子水(“DI水”)或目标物修复缓冲溶液。溶剂(例如HistoClear II®或Clearify™),具有比水更低的密度,因此将浮在水的顶部,由此产生液体两相系统。

[0059] 可以通过将在表面上含有包埋的生物样本的支撑物或样本支架放置到容器中,并将两相系统的试剂引入预处理槽或容器中来执行该方法。在脱石蜡过程中,载体成分的体积会改变。例如,载体成分的体积可能会增加,从而引起上层溶剂朝向容器或预处理槽的顶部或上端部输送,因此,稳定地扫过包埋的生物样本。在一个实施方式中,溶剂层立即部分覆盖包埋的生物样本。在另一实施方式中,溶剂层立即完全覆盖包埋的生物样本。

[0060] 在本申请的一个实施方式中,两相系统提供用于包埋的样本的脱石蜡的改进方法和装置。两相在移动中与样本接触是有益的。当溶剂首次接触到石蜡时,开始溶解石蜡。溶剂的运动可以协助一些石蜡脱离样本。此后,载体成分与样本以及溶剂和/或石蜡的残留物接触,洗掉溶剂和/或石蜡。任何被洗掉的溶剂和/或石蜡将会漂浮并与上相混合。如有必要,此过程可重复多次,直到实现样本的最佳脱石蜡和洗涤。

[0061] 根据本申请的一个实施方式,此过程可以重复3次,即沿着玻片向上一次,然后沿着玻片向下,然后沿着玻片向上,然后进入溢出。根据样本和包埋介质的类型不同,如果需要,也可以重复该过程更多次数。也可以操作更少的次数,例如只有一次,即使溶剂层沿玻片向上移动并进入溢出。

[0062] 在本申请的一个实施方式中,生物样本的包埋介质去除、再水化和目标物修复,通过三个独立的工序实现,之后可以是应用试剂来封闭内源性过氧化物酶的活性。这可以通过

过应用本申请的两相脱石蜡系统来完成。封闭内源性过氧化物酶活性的试剂可以加入载体成分。因此,当用于溶解包埋介质的溶剂最后一次扫过样本时,包含封闭剂的载体成分与样本接触,并基本上封闭内源性过氧化物酶的活性。如前面所提及的,当应用两相系统时,再水化的步骤不是必要的,因此样本可以直接进行至目标物修复。

[0063] 在本申请的另一个实施方式中,生物样本的包埋介质去除、再水化及目标物修复,以及应用试剂以封闭内源性过氧化物酶活性,可以组合到单一的步骤中。这个实施方式可以称为4合1法。

[0064] 基于非溶剂的过程,通常被称为3合1,通常用在与福尔马林固定、石蜡包埋的组织样本中表位的目标物修复相关的免疫组织化学中。3合1过程包括,在染色前对福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片进行脱石蜡、再水化和热诱导表位修复(HIER)的步骤,应用单一的试剂(例如,DAKO;S2375)。3合1试剂与包埋的样本接触,且试剂和/或样本加热到包埋介质的熔点以上。包埋介质熔化,能够从样本中移除。

[0065] 当在容器或预处理槽中进行3合1工序时,本申请的装置和方法可以用于从容器或预处理槽中去除熔化的包埋介质,而包埋介质不会与样本再次接触。这是有利的,因为如果去除的包埋介质与样本再次接触,可能会在样本上留下包埋介质残留物。熔化的包埋介质的密度比3合1试剂的密度更低,因此,浮在3合1试剂的顶部,形成两相系统。之后,通过本文所述的溢出,并且根据本申请的方法和装置,上层(即包埋介质)从容器或预处理槽中去除。

[0066] 在本申请的另一实施方式中,脱石蜡、再水化、目标物修复和应用试剂来封闭内源性过氧化物酶活性,可以组合成单一试剂中的单一过程,也称为4合1。4合1试剂与3合1的类似,也就是说,其能够执行脱蜡、再水化和目标物修复的步骤,但其还包括内源性过氧化物酶封闭的步骤。过氧化物酶会影响在染色中使用另一过氧化物酶例如辣根过氧化物酶(HRP)的染色,因为它们催化相同的底物。传统的3合1工序和试剂不涉及酶封闭步骤,其会延长检测时间,从而增加检测成本,不管是对于自动化和手动操作。传统的3合1手动操作还涉及酶封闭步骤所需的增加的手工时间。4合1应用意味着,以前仅用于修复免疫目标物的加热步骤,现在包括脱蜡、再水化、目标物修复和过氧化物酶封闭。

[0067] 相比于传统的独立单元操作,用于免疫组织化学的4合1试剂减少所涉及的步骤数量。此外,4合1缓冲液使得四个步骤同时进行,从而降低检测时间。对于完全自动化、半自动化、和手动进行的检测,检测时间可以减少。在手动进行的检测中,也减少所需的手工时间。可以使用用于热诱导表位修复的任何加热装置来使用4合1方法。通常以传统顺序执行这些步骤,将花费40至60分钟。使用4合1的总检测时间可以减少到,例如,20至40分钟。该时间可以用来在4合1缓冲液中加热玻片。处理时间的减少将使得实验室人员在一个工作日内执行两轮或更多轮免疫组织化学检测。处理时间的减少也将改善检测的工作流程。4合1工序可结合,例如,DAKO的目标物修复缓冲液S2367和S1699进行使用。

[0068] 在至少一个实施方式中,4合1工序可以涉及首先烘烤玻片,然后在4合1缓冲液中加热玻片例如约20至40分钟,然后进行免疫组织化学检测。例如,在标准的免疫组织化学工序中,在二甲苯中的脱石蜡可能进行两次,每次花费约5分钟,然后在醇中的再水化可能进行四次,每次花费约5分钟,然后热诱导表位修复例如约20至40分钟,然后酶封闭可能花费约10分钟,然后进行免疫组织化学检测。

[0069] 在本申请的至少一个实施方式中,石蜡包埋的组织切片直接放置在含有4合1缓冲

液的容器中并加热。可以通过本领域中通常已知的设备和方法例如水浴,向工序供热。加热后,玻片在洗涤缓冲液中洗涤,并在随后相应地进展到实验室使用的免疫组织化学方法。通过使用4合1试剂,将有效地封闭内源性过氧化物酶,同时在加热后的洗涤步骤中,切片上的石蜡将熔化并洗去。在至少一个实施方式中,成功地使用浓度为0.075%至0.00005%,例如0.075%至0.0000025%的过氧化氢。虽然先前已尝试使用过氧化氢作为抑制剂,结果不尽如人意,直到发明本文公开的添加非常低浓度的概念。

[0070] 在本申请的另一个实施方式中,执行染色后清洁工序来进一步降低样本中石蜡或溶剂残留的可能性。根据此实施方式,染色的样本或生物样本还暴露于能够溶解任何残留物的成分中。例如,在封片之前,将染色的生物样本暴露于能够溶解任何石蜡介质的溶剂中。

[0071] 本申请的实施方式还涉及系统、装置、组合物和方法,用于处理生物样本,尤其是包埋的生物样本的预处理,例如通过溶剂的方式从包埋的生物样本中去除包埋介质。

[0072] 本申请还涉及用于自动化生物样本处理装置的控制、管理、追踪、监控、时序安排、和诊断的软件和硬件。根据本申请的系统、方法和装置使得玻片上或其他载体或基质(玻片)上的生物样本可以在自动处理装置(例如自动染色装置(染色机))中进行自动预处理,从而使生物样本的整个处理可以在单个仪器上自动地进行。

[0073] 溶剂一般具有快速软化、液化或溶解包埋介质的性质。溶剂在室温下,即在约19至25℃或更高,例如高达40℃或60℃时,在数分钟内或甚至例如在数秒钟内溶解例如石蜡。形成层的试剂可以基于物理性质进行选择,物理性质包括快速扩散到包埋介质中从而溶解包埋介质的能力。溶解的包埋介质在此后将很容易去除或在去除前被进一步稀释。

[0074] 在形成层的试剂是溶剂的实施方式中,除其他性质外,溶剂可以具有低粘度、低气味、以及在储存和使用过程中的高稳定性。低粘度促使溶剂向样本输送,确保溶剂快速铺展在样本上并渗透入组织,且在洗涤过程中易于除去。

[0075] 如在本申请中使用的,具有低粘度的溶剂是指,室温下动力粘度低于500cP的溶剂。在一些实施方式中,可以使用粘度低于85cP,例如粘度低于30cP的溶剂或溶剂混合物。低粘度溶剂的非穷举实例是植物油,例如粘度为约25至150cp的大豆油、玉米油、油菜籽油、橄榄油或其他天然油,而其相应的单醇酯,如甲酯,可以具有10至50cP或更低的粘度。

[0076] 在本申请的至少一个实施方式中,溶剂在化学上不活跃,以防止样本的改变。换言之,溶剂不发生化学反应,即稳定,以防止样本的改变。一般来说,在室温下,溶剂能够在溶液中容纳高浓度的包埋介质,例如石蜡。从而,可以使用最小体积的溶剂并防止包埋介质例如石蜡的析出。

[0077] 在本申请的一个实施方式中,溶剂具有高沸点、低可燃性、高闪点或无闪点。在本申请的另一个实施方式中,溶剂不易燃。这类溶剂的实例,例如,油,可用在食品应用中作为例如食用油;用在制药工业中,用于例如溶解和稳定药物;用在化妆品行业中作为例如润肤剂;以及用在涂料行业中作为例如稀释剂。

[0078] 在优选实施方式中,本申请的溶剂或作用剂对于人以及大体环境为低毒性或无毒性,使得可以方便消灭以及废品处理。

[0079] 在实施方式中,对合适溶剂或溶剂混合物的选择可以通过使用Hansen溶解度模型来完成,该模型总结了溶剂或包埋介质在三维空间的分散、极性和氢键特性。

[0080] 例如密度、蒸气压、蒸发速率、闪点、沸点等的性能可以更容易地进行调整以适应实际使用,并仍然保持可接受程度的溶解能力。对于各特定溶剂的各个参数值,可以从各种文献来源处得到。在文献中也有计算或估计不常用溶剂的参数方法。

[0081] 对于溶剂或溶剂混合物,在3维空间中的所得点可以表示溶质的溶解度,大致的球形包围这个点并定义对于溶质的“交互半径”(Ir)。在理论上而言,3维溶解度参数落入球体的溶剂可以溶解包埋介质。

[0082] 在一些实施方式中,溶剂将溶解包埋介质。得到的液体可从样本除去。液体的密度低于用作载体层的水性洗涤缓冲液,因此将从样本中分离并浮到水性缓冲液的表面。

[0083] 在本申请的优选实施方式中,溶剂的密度低于用来除去溶剂和所溶解包埋介质的载体成分(例如洗涤缓冲液)的密度。溶剂的密度可以低于1.00g/ml。例如,如果石蜡包埋的生物样本暴露于溶剂Histo-Clear®(密度相当于约0.84的石蜡油),当暴露于密度为约1.00g/ml或由于其盐含量而密度更高的水性洗涤缓冲液时,得到的Histo-Clear®和石蜡液体将从样本上分离并上升至样本的顶部,以方便除去。在一些实施方式中,大部分的包埋介质被溶剂取代并在用载体成分(包括例如水性缓冲液)洗涤玻片之前溶解。

[0084] 溶剂与载体成分的密度差将加强从样本中分离包埋介质的效率。可以通过操作例如水性洗涤缓冲液中的盐含量以及溶剂的确切混合来增加所述密度差。

[0085] 根据一个实施方式,两相系统创建在容器或预处理槽内,之后将支撑物上的包埋的生物样本放入两相系统中。由此,用于除去包埋介质的溶剂,将在与样本接触时除去生物样本的包埋介质。之后,处理过的生物样本可以很容易地在单独容器中洗涤,以除去任何残余的溶剂。

[0086] 根据本申请的另一个实施方式,将用于除去包埋介质的形成层的试剂,例如溶剂,放入容器或预处理槽中,之后将载体成分引入容器中。这引起用于除去包埋介质的溶剂从容器底部朝向容器或预处理槽的顶部或上端部输送。将用于除去包埋介质的溶剂在包埋的生物样本上传输的方法可以变化而不脱离本申请的范围。因而,已放置在容器中的支撑物上的包埋的生物样本将与两个液相接触。当形成层的试剂在包埋的生物样本上传输时,用于除去包埋介质的形成层的试剂将与包埋的生物样本接触并开始除去包埋介质。当形成层的试剂已经通过生物样本时,更低位的载体成分层基本上用作洗涤溶液,漂洗不含包埋介质和溶剂的生物样本。几分钟的孵育后,将载体溶液引入到容器的过程可以停止或重复例如二、三或四次。

[0087] 当包埋介质已经从包埋的生物样本中去除后,形成层的试剂或溶剂层可以在容器的底部,或在容器的顶部。根据一个实施方式,当溶剂在容器的底部时,可以重复使用或通过在容器底部的出口进行去除,且任何多余的溶剂可以从生物样本中漂洗掉。

[0088] 按照本申请的另一个实施方式,载体溶液的体积可以增加至超过可包含在容器或预处理槽中的体积,从而通过溢出而从容器中除去大部分形成层的试剂,例如排出到排水管中。之后,目标物修复可以在同一容器中通过施加热和所需的方法步骤来进行。

[0089] 通过采用溢出法,载体溶液可以用作洗涤溶液/漂洗溶液,减少添加溶液的需要或步骤。此外,这种方法还防止将用于除去包埋介质的溶剂携带到其他后续处理步骤中,有助于使交叉污染降至最低。

[0090] 在一些实施方式中,在脱石蜡后,样本可以用醇或稀释的醇溶液漂洗,其可以除去

任何残留的溶剂。例如,可以使用乙醇溶液。合适的乙醇浓度的例子是水中的10%乙醇、20%乙醇或30%乙醇。这些成分成功地从样本去除任何残余的溶剂,但具有足够高的闪点和沸点,因此消除了火灾或爆炸的危险并且毒性降低。这样的乙醇洗涤可以在脱石蜡后的任何时间进行,但要在向样本应用抗体或探针之前。

[0091] 可以在同一容器中将不混溶两相系统与目标物修复进行组合,与现有技术相比,既不需要使用二甲苯,也不需要使用醇。用于除去包埋介质的溶剂也称为上层、上相、或上层溶剂,这些术语可以互换使用。在本申请中所用的溶剂包括能够溶解包埋介质的有机溶剂。合适溶剂的例子包括,但不限于,氢化萘、环烷烃、d-柠檬烯、石蜡烃/异烷烃、石蜡基二醇醚(paraffinic-glycol ether)、烷烃或其组合物。

[0092] 环烷烃的销售品牌为Formula 83TM和Histochoice;d-柠檬烯的销售品牌为Americlear、Bioclear、Clearene、Hemo-DE、Histoclear、HistoSolve X、Master Clear和Safsolv。石蜡烃/异烷烃的销售品牌为Clearify、Clearing 100、Clear Rite 3、Isopar L、Isopar G、Isopar H、Micro-Clear、Micro-Clear-HC、Micro-Clear-R、Paraclear、Safe Clear、Safe Clear II、Shandon XY、Slide-Brite、Xy-Less、XS-3。石蜡基二醇醚混合物的销售品牌为Pro-Par。

[0093] 溶剂的其他例子是Histo-Clear®或Histo-Clear® II,其为高级油的复合混合物。Histo-Clear®是由National Diagnostics,Atlanta,GA销售的有机溶剂的商品名。HistoClear(C₁₀H₁₆)是在植物中发现的天然存在的烃类。Histo-Clear®也已知为1-甲基-4(1-甲基乙烯基)环己烷对薄荷-1,8-二烯、d--柠檬烯、Safsolv(商品名,由BrodiSpecialty Products,Ltd.销售)、histolene、双戊烯。Fisher Scientific的citrisolv,是d-柠檬烯类溶剂,也可以用作安全的二甲苯和乙酸乙酯替代品。

[0094] ClearifyTM和Histo-Clear®可能是特别有用的溶剂,因为许多包埋介质,例如石蜡,含有高聚物,难以用温热的水性洗涤溶液(例如水性缓冲液)除去。Isopar也非常有用,因为其气味较小且相对便宜。

[0095] 有用溶剂的其他例子是烷烃类,包括戊烷、庚烷、己烷、辛烷和更高的类似物和支链异构体,包括十二烷;甲苯、氯苯、1-甲基萘、二异丁基甲酮、联苯和各种卤化溶剂,及其混合物。

[0096] 合适溶剂的其他例子是基于动物、植物或矿物来源的油或混合物。植物油可以是精油和天然油。天然油与动物油脂相似。天然油是天然存在的长链脂肪酸的甘油三酯,其可生物降解并具有低毒性。粗制天然油可以通过例如除去游离脂肪酸,漂白和在真空下汽提以除去气味、香料和一些色素形成产物,在萃取后变成精制油。

[0097] 可能令人感兴趣的是低毒性或无毒性的溶剂或油,包括动物油和植物油。植物油可以是甘油与脂肪酸的多种共混物的酯。植物油具有低毒性和低可燃性,并且广泛可得。植物油来源的例子包括,但不限于,含油种子如腰果、蓖麻子、椰子籽、亚麻籽、葡萄籽、大麻、芥末、罂粟种子、油菜籽、加拿大油菜、红花、芝麻籽、和向日葵。植物油的其他来源包括,但不限于,杏仁、杏、鳄梨、玉蜀黍/玉米、棉花、可可籽、黄油、椰子、镰刀菌、榛实、苦楝、橄榄、棕榈叶和棕仁、花生、南瓜、大米、大豆和胡桃。

[0098] 例如,油包括,但不限于,得自玉米、大豆、棕榈、油菜籽、向日葵籽、花生、棉籽、棕

仁、和橄榄的油或油混合物。植物油可以包括,但不限于,基于辛酸和癸脂的氢化植物油、精制油及混合物。

[0099] 在本申请的一些实施方式中,溶剂可以包括植物油的酯。酯可以是植物油的醇解制备而来的混合脂肪酸酯。一般而言,相比于制备脂肪酸酯的植物油的粘度和稳定性,这样的混合脂肪酸酯具有较低的粘度和改善的抗氧化稳定性,其可以改善第一溶剂的粘度和稳定性。在上述酯化反应或酯交换反应后得到的产物包括,例如,支链或直链伯醇与直链二元羧酸的酯、支链单羧酸与直链二醇或聚乙二醇的酯、直链伯醇与支链二元羧酸的酯、以及新戊基多元醇与一元羧酸的酯。

[0100] 在本申请的其他实施方式中,第一溶剂可以包括脂肪酸甲酯(FAME)。脂肪酸甲酯可以通过脂或脂肪酸与甲醇之间的催化反应制备而来。具有8至18个碳原子的甲酯实际上是无毒的。例如,溶剂可以包括乳酸乙酯、大豆甲酯、或大豆乙酯。

[0101] 可以通过添加抗氧化剂来降低溶剂抗降解(主要是氧化)的稳定性。抗氧化剂的例子包括,但不限于,受阻苯酚,例如丁基化羟基甲苯(BHT)和二丁基对甲酚;特定的胺,例如苯基 α -萘胺;硫和磷或同时含有这些元素的化合物;金属酚盐,例如苯酚二硫化物的碱土金属化合物;硫代磷酸盐和氨基甲酸盐的锌化合物,例如二烷基二硫代磷酸锌。

[0102] 另外,由电离辐射引起的自由基反应,可以通过向溶剂中添加吸收300至400nm波长的化合物来减少。这类化合物的例子是羟基二苯酮和羟基苯基苯并三唑。

[0103] 在实施方式中,溶剂或试剂可以包括染料、荧光添加剂、气味剂和/或抗微生物防腐剂。通过向溶液添加染料或气味剂,可以对某些类型的试剂、溶剂、操作指南和仪器提供独特外观。

[0104] 合适染料的实例包括,但不限于,不溶于水、油溶性的偶氮染料,例如1-(2,4-二甲基苯基偶氮)-2-羟基-萘,其为红色;或2,3-二甲基-4-(2-羟基-1-偶氮萘基)-偶氮苯,其为红褐色。

[0105] 可以添加气味剂来遮盖溶剂或试剂的本来气味,以改善用户对它们的接受性和认可度。这些产品包括物质,例如薄荷、松树油和香茅油。尤其是一些天然油例如柑橘类油的独特气味,可以通过添加让人愉悦的气味剂来转变。

[0106] 抗微生物防腐剂可以添加到溶剂中,以抑制微生物的生长,并从而延长贮藏期限。合适的人造防腐剂的例子包括,但不限于,咪唑啉、氨基乙缩醛、六氢三嗪、恶唑烷衍生物、O-缩甲醛、苯氧基醇和异噻唑啉酮衍生物。

[0107] 载体成分、载体液,也可以称为下层、下层溶剂、下相或第一相、或第一相液。这些术语在本申请中互换使用。合适的载体成分是水和各种水性溶液,例如缓冲溶液或目标物修复溶液。本文所提及的同时用于两层的溶剂也可以用于4合1工序。

[0108] 根据本申请的一个实施方式,载体成分用作洗涤溶液,对来自生物样本的溶剂和/或包埋介质进行洗涤。清洁剂可以添加到第二溶液中,以改善其洗涤能力。

[0109] 当二甲苯用于除去包埋介质时,按常规进行包埋的生物样本的再水化,以从生物样本中去除二甲苯。然而,当使用本申请的方法时,再水化生物样本不是必需的。因此,可以从包埋介质的去除直接前进到例如目标物修复。

[0110] 在不进行目标物修复的方法中(例如,由于表位的灵敏性),利用本申请来去除所有的包埋介质,提高测试的性能。当使用传统的方法来除去包埋介质时,通常在生物样本中

残留有少量的包埋介质。

[0111] 生物样本的固定经常破坏结构或遮盖抗体的结合位点,从而降低小肽(peptide)或表位的抗原性。因此,可能难以检测对常规IHC法中福尔马林固定敏感的表位。热诱导表位修复(HIER)可以恢复抗原性,并已成功地用于检测固定生物样本中的多种抗原。

[0112] 根据本申请的一个实施方式,表位修复溶液(也称为目标物修复溶液)可以用作载体成分。因此,在除去包埋介质之后,可以在生物样本中进行目标物修复,其中的全部或至少大部分生物样本完全浸在目标物修复溶液中。用于HIER的合适溶液是例如钙螯合剂,诸如柠檬酸盐缓冲液、MES缓冲液或Tris-EDTA溶液。

[0113] 根据本申请的另一个目的,包含溶剂的上相用作处于目标物修复溶液的顶部的盖子,以使加热过程中的蒸发降至最低。因此,减少在装置中的冷凝以及生物样本的干燥和过热。

[0114] 根据本申请的一个实施方式,第一溶液(溶剂或形成层的试剂)和第二溶液(载体成分)相组合,以形成两相系统。在本申请的一个实施方式中,形成层的试剂的体积是固定的,而载体成分的体积是变化的。因此,当载体成分的体积增加时,包含第一溶液的相在容器或预处理槽中上行,当载体成分的体积减少时,包含形成层的试剂的相在容器中下行。当将具有生物样本的载体插入到容器中时,载体成分的体积是变化的,包含形成层的试剂的相在生物样本表面上上行和下行。在该过程中,形成层的试剂去除生物样本中的任何包埋介质。

[0115] 形成层的试剂的厚度取决于容器的尺寸、第二溶液的体积、和载有生物样本的载体或支撑物的体积。因此,不同厚度的形成层的试剂均包含在本申请中。根据本申请的一个实施方式,形成层的试剂的厚度可以非常小或薄。这造成所需的第一溶液的体积小、更环保、更简便、并降低成本。在一个实施方式中,形成层的试剂(也被称为第二相或溶剂层)可以具有的厚度为约1cm。

[0116] 包含形成层的试剂的相在包埋的生物样本表面上运行一次或通过一次,通常会引起足量的脱石蜡,从而使得生物样本可以进一步完备以进行目标物修复或其他处理步骤。本公开也将用于优化包埋介质的去除的额外运行或通过考虑在内。

[0117] 用于预处理包埋的生物样本的本方法的一个实施方式,包括提供两相不混溶系统,上相能够降低包埋介质的熔点或溶解包埋介质,下相用作载体溶剂;将包埋的生物样本暴露于不混溶两相系统,从而液化包埋介质;通过溢出过程除去上相;任选地用漂洗溶液(例如去离子水(“DI水”)或目标物修复溶液)漂洗样本。

[0118] 本申请的实施方式还包括:提供容器,其中提供至少一部分的不混溶两相系统。所述容器,在本公开中也可以称为处理槽、浸泡槽或预处理槽。在实施方式中,将样本暴露于不混溶两相系统的步骤包括将样本浸在处理槽中的步骤。在一些实施方式中,样本竖直放置在处理槽中。

[0119] 本申请的一些实施方式还提供供给装置,以向包埋的生物样本供应不混溶两相系统。供给装置可以包含溶剂源、供给喷嘴和将溶剂由源头供应到供给喷嘴的供给管,由此溶剂可以经喷嘴供给到样本。在本申请的另一个实施方式中,形成层的试剂、或溶剂,可以经入口或阀引入预处理槽。

[0120] 在一些实施方式中,使包埋的生物样本暴露于不混溶两相系统的步骤,包括用载

体成分(也称为下层或载体层)冲洗样本的任选步骤。任选漂洗步骤可通过与两相系统中使用的相同的载体成分或通过不同的载体成分来完成。在一些实施方式中,通过入口或供给装置将载体成分供给到预处理槽,从而完成漂洗。在一些实施方式中,样本在下层或载体层的连续流动下漂洗一段预定时间。按照其他实施方式,样本在数个漂洗期间用下层或载体层漂洗;各个漂洗期具有预定的时间长度,且两个漂洗期通过预定时间长度的非漂洗期隔开。在某些情况下,在样本已经被不混溶两相系统漂洗后,任选的漂洗步骤可能不是必要的,因为充分量的包埋材料已经被去除且玻片充分洁净。

[0121] 上述的漂洗步骤,也称为不混溶两相系统漂洗循环,可以重复需要的次数,例如两次或三次或更多次。

[0122] 在实施方式中,在将新的不混溶两相系统供给至样本之前,从样本中除去已经供给至样本的不混溶两相系统。

[0123] 本申请的实施方式还可以提供机械装置,以用于从容器或预处理槽中去除不混溶两相系统。例如,上部水平移动条,将上层从预处理容器中移至例如排水管。不混溶两相系统可以例如通过配置成将不混溶两相系统从样本上吹落的鼓风机而完全或部分地除去,或者溶剂可以通过配置成抽吸溶剂的抽吸装置而去除。作为替代方案,鼓风机可以配置有额外的抽吸能力,由此不混溶两相系统可以通过鼓风机吹走或抽吸。此外,可以通过溢出来首先除去上层并收集上层来去除不混溶两相系统。

[0124] 在一些实施方式中,供给装置,例如供给管、供给喷嘴、入口,还包含鼓风机或气体喷嘴,用于将气体吹到载玻片上以干燥玻片或吹走载玻片上可能存在的液体,例如上层、下层、不混溶两相系统、或任选的其他洗涤溶液。

[0125] 在一些实施方式中,也可以使用离心机来除去液体,例如,上层、下层、不混溶两相系统、或任选的其他洗涤溶液,从而通过离心机的离心力的方式除去液体。离心机可以配置成绕一个或多个旋转轴旋转。旋转轴线可以是在玻片平面中的轴或与玻片平面平行的轴,或垂直于玻片平面的轴。

[0126] 在一些实施方式中,玻片放置在一个或多个附着点上或放置在固定装置上,这样使得玻片缓慢地或快速地倾斜或旋转,以协助有效地从玻片上除去液体。

[0127] 在一些实施方式中,从样本去除液体,通过引力的方式进行。载有样本的玻片可以例如放置成竖直位置,由此由于引力或通过溢出,液体将流出玻片。

[0128] 在实施方式中,提供洗涤溶液来从样本中洗掉可能残留的液化包埋介质的任选步骤,包括提供用于供给洗涤溶液的洗涤溶液供给装置的步骤。洗涤溶液供给装置可以包含洗涤溶液源、洗涤溶液供给喷嘴和用于将洗涤溶液从源头经供给喷嘴或入口供给至样本的洗涤溶液供给管。在一些实施方式中,洗涤溶液的供给和样本的洗涤是自动控制的。在一些实施方式中,溶剂供给喷嘴以及可能地部分溶剂管配置成,行使洗涤溶液供给喷嘴以及可能地部分洗涤溶液管的功能。

[0129] 按照实施方式,载体成分、下层或载体层或任选的漂洗溶液是能够除去液化包埋介质的水性缓冲溶液,并与上层不混溶。在一个实施方式中,载体层可以是DI水。水性缓冲溶液的实例是,但不限于,Tris-缓冲盐水吐温20(“TBST”)、PBS、Hepes、MES缓冲液和传统的IHC和ISH目标物修复溶液。

[0130] 本申请的一些实施方式还包括,在去除包埋介质,即脱蜡或脱石蜡之前,任选地用

含有疏水性染料例如偶氮染料、苏丹黑或油红O的洗涤溶液来漂洗包埋的生物样本。染料可以选择为,可以通过所使用的相机给出高对比度的画面。例如,染料可以非共价键结合至包埋介质以及组织。在洗涤后,包埋的生物样本将着色,而周围的玻片几乎未着色。成像装置诸如相机摄取的着色的包埋的生物样本以及玻片的图像可以进行分析,由此着色的包埋的生物样本及其尺寸和在玻片或支撑物上的位置可以一同检测。这些信息可以被例如染色机使用,以限定试剂滴加区域、所需的试剂体积,并确保染色过程的质量。在包埋介质的去除过程中除去染料。染料可以进一步用来确认包埋介质的去除,例如脱蜡或脱石蜡,以及确认洗涤是有效的。

[0131] 传统上而言,进行按序的醇处理,以在组织中从有机相变到水相。本申请提供一种方法,其中当完整除去包埋介质时,生物样本处于水性环境中,且包埋介质已经被水性成分(载体成分)取代。因此,基本上消除对随后的传统再水化步骤的需求。通过基本上消除传统的醇步骤,使整个过程简化,从而避免醇的不便之处,即易燃性和毒性。

[0132] 本申请的方法,使得可以从脱蜡或脱石蜡过程中减少废料的含量。此外,由于通常不在本申请中使用纯的醇或高浓度的醇混合物,废料的性质发生变化,基本上避免具有大量醇的监管和健康问题。此外,按照本申请,通过使用无毒或低毒性的形成层的试剂,包埋的玻片的预处理过程被简化,并比传统的去除法更安全,并保留至少相当的效率。

[0133] 如上所述,实施方式也可以包括任选的漂洗步骤,其中,样本用漂洗溶液漂洗,例如去离子水或目标物修复溶液。

[0134] 如上所述,玻片上的液体,例如溶剂、洗涤溶液、漂洗溶液或目标物修复溶液,可以用不同方式从玻片或支撑物上除去,例如,通过应用气体流、离心力、引力、毛细管力引起的流动,通过抽吸的方式或通过移动水平条。

[0135] 在一些实施方式中,当玻片或支撑物处于竖直位置时,样本暴露于不混溶两相系统和/或目标物修复溶液。在这样的竖直玻片位置,样本也被认为处于竖直位置。在竖直玻片上提供脱石蜡(即,在竖直位置的玻片上使用不混溶两相系统)的实施方式的优点是,基本上避免或消除可能发生在不使用不混溶两相系统的处理槽中的交叉污染或带入。

[0136] “交叉污染”或“带入”指的是,材料被带入它们不属于的反应混合物中的过程。这些材料可以是部分的样本、或试剂。在这种情况下,带入指的是材料的转移,例如样本或试剂,从一个容器,或从一个反应混合物,到另一个。带入在一系列的样本或检测中可以是单向或是双向的。

[0137] 此外,通过单个地处理玻片,众多的处理操作指南可以在许多不同的玻片上平行运行。另外,玻片不需要同时加载到样本处理装置例如染色机中,但是能够在连续流动过程中添加和移除,即,可以在染色机处理其他玻片时,从染色机中添加和移除玻片。

[0138] 在包括利用不混溶两相系统的竖式处理玻片的本申请实施方式中,基本上消除细胞从一个玻片带入另一个玻片的可能性,因为样本玻片一般暴露于新鲜过滤的上层或目标物修复溶液中,并且在使不混溶两相系统单向地在样本架中的玻片上通过的系统中,防止脱石蜡或目标物修复过程中的由玻片之间细胞的携带而产生的可能的交叉污染。

[0139] 利用不混溶两相系统的竖式处理玻片或支撑物的另一个优点是,在不同的步骤之间,例如在预处理步骤与进一步样本处理步骤之间,不需要清洗处理槽。因此,处理速度可以增加,且处理时间,例如总检测时间(“TAT”)或测定的操作时间可以减少。

[0140] 利用不混溶两相系统的提供竖式玻片脱石蜡的实施方式的另一个优点是,可以减少所需要的溶剂体积。与使用不含不混溶两相系统的处理槽的竖式洗涤相比,由于不混溶两相系统,可以例如使每个玻片使用更小的体积的溶剂。溶剂的体积可以小于每玻片每溶剂漂洗循环10毫升。例如,溶剂的体积可以小于每玻片每溶剂漂洗循环2毫升。在另一个例子中,溶剂的体积可以小于每玻片每溶剂漂洗循环300微升。此外,使用带有不混溶两相系统的竖式处理时,只有玻片具有样本的一侧需要暴露于互不混溶两相系统(形成层的试剂和载体成分)。

[0141] 应当理解,根据申请的方法也可以在升高的温度下进行。通常而言,随着温度的增加,溶解力,即上层增溶或溶解包埋介质的能力会增加。通过将脱蜡步骤期间的温度提升至环境温度以上,脱蜡将更加有效。上层经过固体包埋介质的第一渗透步骤可以通过温度而提升。温度升高,可以以不同的方式来实现。例如,可以在供给两相系统之前,以及当包埋的样本暴露于两相系统时,加热包埋的样本;或者在供给液体接触样本前加热供给液。在本申请的一个实施方式中,非溶剂载体成分可以加到预处理容器中,并在与样本接触之前加热至包埋介质的熔点以上的温度。随后,在包埋介质熔化以后,凉的载体成分加到预处理槽中。一旦接触到熔化的包埋介质,载体成分冷却并有效地凝结包埋介质,并在溢出时带出预处理槽。

[0142] 在一些实施方式中,升高的温度可以在室温与刚好低于包埋介质的熔点之间。升高的温度可以在25至60摄氏度的范围内。合适的温度范围可以是30至50摄氏度,进一步在大约40摄氏度。

[0143] Autostainer™系统(LabVision Corporation)是自动化的玻片处理系统的实例。该染色机与目前可用于例如石蜡包埋切片和冰冻组织切片、细胞离心涂片、细胞涂片、细针吸的染色试剂兼容。染色机设计成使经常用在免疫组织化学和细胞化学中的手动染色方法自动化。灵活的编程允许无限数量的含多达35个步骤的操作指南(包括在不同的处理步骤之间的漂洗和吹气步骤)和64种不同的试剂。染色运行可以处理1至48个显微镜玻片。单独的玻片可以编程为,在染色操作指南的任何步骤中接收特定体积的不同试剂,且废料分隔至危险和非危险废料收集容器中,降低处理成本。染色机还设置成,追踪各个数据。其可以生成病人、试剂和实时运行的数据报告,以及追踪试剂的使用以及记录仪器的维护。在本文中,术语“试剂”可以包括化学或生物材料的任何液体或气体,可以施加于样本载体例如玻片,包括,但不限于,水性混合物、生物探针、聚合酶、抗体、消化酶、预固定剂、后固定剂、可读化学、染料和染液、标记物色原、荧光团、和溶剂。

[0144] 可以在所有玻片上仔细监测脱石蜡后的任何石蜡痕迹。通过利用石蜡的双折射,可以使在正常明视场显微镜下难以检测的石蜡残留物可视化。

[0145] 在一些实施方式中,用于处理玻片的方法包括,将一个或多个新的玻片引入样本处理装置例如染色机中,获得一个或多个新玻片中至少一个的玻片识别信息,使用玻片识别信息从与染色机相关联的数据库中获得针对一个或多个新玻片中至少一个的处理操作指南顺序,并根据与针对一个或多个新玻片中至少一个新玻片的处理操作指南顺序相对应的指令表中的指令来处理新玻片。在一些实施方式中,在染色机处理先前放入染色机的任何旧玻片时,将一个或多个新的玻片引入染色机。

[0146] 在一些实施方式中,通过使用在至少一个新玻片上的玻片识别信息来检索含有针

对至少一个新玻片的处理操作指南顺序的单独玻片记录,从而可以从与染色机相关联的数据库中获得针对至少一个新玻片的处理操作指南顺序。

[0147] 在一些实施方式中,根据与针对至少一个新玻片的处理操作指南顺序相对应的指令表中的指令来处理至少一个新玻片,还包括创建与针对至少一个新玻片的处理操作指南顺序中单个处理步骤相对应的染色机指令列表,并对至少一个新玻片按顺序执行染色机指令表中的指令处理。在一些实施方式中,根据与针对一个或多个新玻片中至少一个新玻片的处理操作指南顺序相对应的指令表中的指令来处理新玻片,可以通过染色机自发执行。

[0148] 在一些实施方式中,针对至少一个新玻片的玻片识别信息可以通过读取含有附着于至少一个新玻片的编码玻片识别信息的标签来获得。在一些实施方式中,玻片识别可以通过读取包含编码玻片识别信息的图标(glyph)或条形码来获得。在一些实施方式中,针对至少一个新玻片的玻片识别信息可以通过读取与至少一个新玻片相关的无线电频率识别标签来获得。

[0149] 在一些实施方式中,与染色机相关联的数据库,可以出于其他目的而进行访问,包括玻片预处理、数据录入、查询、以及与处理先前放入染色机的旧玻片同时发生的报告生成。玻片预处理包括创建或更新与染色机相关联的数据库中有关玻片的玻片记录,以及生成附加至玻片的含有玻片识别信息的标签。

[0150] 在一些实施方式中,对至少一个新玻片按顺序执行染色机指令表中的指令还包括,确定是否已满足执行指令列表中下一指令的先决条件,如果没有满足执行指令列表中下一顺序指令的先决条件则采取纠正措施,以及在已满足执行该指令的先决条件时执行下一指令。在一些实施方式中,在已满足执行该指令的先决条件时执行下一指令还包括,对至少一个新玻片施用试剂,以及更新与染色机相关联的数据库中的至少一个数据库记录来反映执行的完成。在一些实施方式中,确定是否已满足执行指令列表中下一指令的先决条件还包括,获得在执行下一指令中使用的试剂的信息,以及确定是否有足量的试剂可用。

[0151] 在一些实施方式中,如果没有满足按序执行指令列表中下一指令的先决条件则采取纠正措施还包括,警示操作者执行下一指令的先决条件未满足,以及监测未满足下一指令的先决条件的状态变化。

[0152] 在一些实施方式中,更新与染色机相关联的数据库中的至少一个数据库记录来反映执行完成还包括,更新选自以下的至少一个数据库记录:反映对至少一个新玻片采取的行动的玻片记录、反映对试剂采取的行动的试剂记录、以及反映染色机采取的行动的染色机记录。

[0153] 本申请的一些实施方式中还包括,用于在网络上对连接在染色机网络(例如,LAN)中的多个染色机中的至少一个染色机执行操作的方法,包括,与染色机网络中的至少一个染色机建立网络连接,通过网络连接将指令发送到至少一个染色机,并通过网络接收与发送到至少一个染色机的指令相对应的响应。在一些实施方式中,从染色机网络中的设备开始与至少一个染色机建立网络连接。

[0154] 在一些实施方式中,与染色机网络中至少一个染色机建立网络连接,还包括,与染色机网络内的代理建立网络连接,其中代理的功能包括传递指令至至少一个染色机和传递来自至少一个染色机的响应,以及传递查询至与多个染色机相关联的数据库并从与多个染色机相关联的数据库返回响应,其中数据库包括信息,该信息包括染色机、玻片、耗材以及

与多个染色机相关联的操作指南的状态信息。在一些实施方式中,代理是还提供用于外部应用的限定界面的软件工具,通过该界面,可以通过网络连接对至少一个染色机进行操作。在一些实施方式中,外部应用是实验室信息系统。

[0155] 在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括,运行诊断测试和返回诊断信息。在某些实施方式中,如果诊断信息显示这些服务将被执行,则该诊断信息用于对至少一个染色机的服务进行自动安排。在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括执行一种或多种软件以及固件的更新。

[0156] 在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括获取关于染色机耗材使用的信息。在一些实施方式中,关于染色机耗材使用的信息可以包括对于多个染色机的总染色机耗材使用。在一些实施方式中,关于染色机耗材使用的信息包括试剂的使用信息和生物流体(bulk fluid)的使用信息。在一些实施方式中,关于染色机耗材使用的信息被用于做出订购一种或多种耗材的增加(additional)供给的决定。在一些实施方式中,订购一种或多种耗材的增加供给可以自动进行。在一些实施方式中,订购一种或多种耗材的增加供给基于经济订货批量。在一些实施方式中,订购一种或多种耗材的增加供给基于针对由操作染色机网络的实体所预定的耗材订购的预定计划。

[0157] 在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括监测正在由至少一个染色机装置操作的玻片的状态。在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括获得由至少一个染色机操作的任何玻片的完成时间的实时估计。在一些实施方式中,完成时间的实时估计可以反映用户操作的效果或其他未安排的事件,例如染色机的试剂瓶的引入或去除,或改变染色机中玻片架的优先级,或向染色机引入新的玻片。

[0158] 在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括获得由至少一个染色机操作的玻片上的样本图像。在一些实施方式中,样本的图片可以采取适当的放大倍率和分辨率获得。在一些实施方式中,在网络上对至少一个染色机执行的操作包括获得有关没有装载到染色机中的玻片的状态信息。在一些实施方式中,通过网络连接与染色机进行交换的所有信息,包括通过网络连接发送到染色机的所有指令和通过网络连接接收的所有响应,都是加密的。

[0159] 本申请的实施方式还包括,用于使结合至染色机的自动装置以一定时间间隔适应性地安排自动装置的任务的方法。在一些实施方式中,根据处理的操作指南,自动装置使用连接至染色机的试剂瓶或液体容器中的试剂,来处理连接至染色机的玻片。在一些实施方式中,在以一定时间间隔适应性地安排自动装置任务的方法中的步骤包括,创建自动装置任务列表,包括在一定时间间隔内可以执行的所有的自动装置任务,计算自动装置任务列表中各个自动装置任务的优先级,按照自动装置任务优先级的降序排列对自动装置任务列表进行整理,以及从所整理的自动装置任务列表的顶部开始向自动装置任务执行队列中添加自动装置任务,直至自动装置在一定时间间隔内被完全利用,或自动装置任务列表已满。

[0160] 在一些实施方式中,创建自动装置任务列表还包括向自动装置任务列表中添加作为同期事件的结果而产生的自动装置任务。同期事件包括,向染色机中引入新的玻片、添加或去除试剂瓶和液体容器、以及改变分配给安放玻片的一个或多个玻片架的优先级中的一种或多种。在一些实施方式中,自动装置可以执行很多种类的任务,包括将自动装置移动至染色机内的位置、混合用于玻片的试剂、将试剂从试剂瓶或流体容器施用到玻片上、对玻片

吹气、将玻片倾斜至水平或垂直位置；以及拍摄玻片的图像中的一种或多种。在一些实施方式中，将试剂从试剂瓶或流体容器施用到玻片上还包括在玻片上施用缓冲液、以及在玻片上施用去离子水中的一种或多种。

[0161] 在一些实施方式中，在以一定时间间隔适应性安排自动装置任务的方法中的步骤，由染色机自发执行，其可以对自动装置及其操作施加控制。在一些实施方式中，步骤在从染色机首次接通电源开始的连续时间间隔中重复执行。在一些实施方式中，在运行其他染色机和自动装置任务的同时执行这些步骤。

[0162] 在一些实施方式中，计算自动装置任务列表中各个自动装置任务的优先级还包括，基于分配给单个任务参数的子分数的数学函数来计算各个自动装置任务的分数。在一些实施方式中，单个任务参数还包括，任务的最早开始时间、任务的最晚开始时间、执行任务的持续时间、自动装置的位置、放置有与任务相关的玻片的架子的优先级、针对自动装置任务类型的预定相对优先级。在一些实施方式中，自动装置任务的预定相对优先级可以是高或低的预定相对优先级。在一些实施方式中，某些自动装置任务可以指定为最高优先级，并直接加至自动装置的执行队列的顶部。

[0163] 可以如上所述采用脱石蜡/脱蜡的自动化样本处理装置的一个实例在图1~3中示例并且在如下详细描述。自动化样本处理装置的可能实施方式的其他方面和细节在如下申请和国际专利申请中提供，各个通过引用的方式全部并入本文：国际专利申请公开W0 2004/057307 A1、国际专利申请公开W0 2004/057308 A1、国际专利申请公开W02004/058950 A1、国际专利申请公开W0 2004/059287 A2、国际专利申请公开W0 2004/058404 A2、国际专利申请公开W0 2004/059284 A2、国际专利申请公开W0 2004/059288 A2、国际专利申请公开W02004/059441 A2、和国际专利申请公开W0 2004/059297 A1、临时专利申请60/616,444、和美国专利申请11/177,730、和美国专利申请US11/229,098和US 11/227,270。

[0164] 图1示出用于生物样本的自动化预处理和加工的预处理模块100的分解视图。如图1所示，预处理模块100包括含有玻片110的玻片架104，玻片110可以含有需要处理的生物样本112。在一些实施方式中，玻片110装载在玻片架104上，使得玻片110可以以竖直位置操作。玻片架104滑入内部框架117。在一个实施方式中，内部框架117可以是开放的而没有壁。内部框架117的底部任选地具有分散网格114，分散网格114可以在添加液体以进行预处理时减少涡流或气泡。架臂105滑入预处理槽102的架臂导引116，而玻片架104在内部框架117中。架臂导引116可以将玻片架引导至预处理槽102的合适位置。预处理槽102可以由随着加热板107的温度而变的加热器导线109来进行温度控制。加热板107可以在预处理槽或容器102的部分或全部壁上。凸缘103可用于安装预处理槽或容器102。在一个实施方式中，在液体以超出最大量加入预处理模块100后，液体可以流入溢出通道113中。溢出通道113朝向溢出排水管111向下倾斜以促使排出液体。

[0165] 图2A示出玻片架204插入预处理槽202中的预处理模块200的正交视图。图2B示出玻片架204插入预处理槽202中的预处理模块200的截面视图。如图2B所示，在一个实施方式中，溢出通道213可以使达到某一水平的液体从玻片架204的顶部除去。在溢出通道213中的液体将会收集在溢出排水管211中并可以进一步为目标物修复进行操作或循环使用用过的溶剂。溢出液体可以是溶剂形成层(或第二相层)并可以包含具有目标样本的石蜡。在另一

个实施方式中,溢出液体可以是已经去除第二相层后的第一相液体(载体成分),并且可以含有具有目标样本的水性溶剂。

[0166] 图3A~3D示出为预处理模块300的长边示意图,包含样本312的玻片310通过夹子318固定在玻片架304上,玻片架304插入预处理槽302中,架导引插槽316作为用于合适放置的导引。如图3A所示,两相溶剂体系尚未引入预处理模块300中。如图3B所示,薄的第二相层322和较厚的第一相液体320开始引入预处理槽302。第二相层322是薄层,浮在第一相液体320上。使用任选单向的入口306来加入第二相层322,入口306任选地在预处理槽302的分散网格314上方。第一相层(载体成分)320使用双向口308加入,双向口308任选地在预处理槽302的分散网格314下方。任选的分散网格314可以减少第一相液层(载体成分)320加入预处理槽302时的涡流或气泡。涡流或气泡的减少使得两相系统以均一的速率和水平沿样本向上移动。如之前所述,在本申请的一个实施方式中,第二相层可以包括石蜡相,且第一相液体可以包括水性相。如图3C所示,增加的第一相层(载体成分)320已通过双向口308加入。第一相层(载体成分)320的加入将薄的第二相层322向上扫向支撑物或玻片310,以与样本312接触。如图3D所示,增加的第一相液体已经通过双向口308加入。第一相层(载体成分)320的加入将第二相层322扫向玻片310的顶端,并完成第二相层322与样本312的接触。在一个实施方式中,第二相层322可以在之后经溢出通道(未显示)除去。然后,第一相液体320可以经双向口308除去,且玻片310从预处理模块300中移除。在另一个实施方式中,在第二相层322已经经溢出通道(未显示)除去后,新的第一相层320和第二相层322可以加入,使得新的第二相层322与样本312接触。在另一个实施方式中,第一相层320将通过双向口308除去,以将同一第二相层322向下扫过玻片310,从而与样本312再次接触。第一相层320可以任选地加入或除去,通过使第二相层322沿玻片310上下移动,使得同一第二相层322与样本312接触数次。是否将第二相层322扫过样本312一次或多次可以取决于除其他因素之外的样本类型。

[0167] 图4示出插入有玻片412的预处理模块400的截面示意图。如图4所示,第一相层420已经通过双向口408加入,且第二相层420已经经入口406加入,入口406任选地在任选的分散网格414上方。预处理模块400可以通过使用在预处理模块400两侧的随着加热板407的温度而变的加热器电源导线409进行温度控制。如图4所示,第二相层420在玻片412顶部的样本412上方,且足够高以流入溢出通道413。然后,溢出通道413中的液体可以流入溢出排水管411中,从而可以去除液体。在至少一个实施方式中,第二相层420可以通过溢出到溢出通道中来去除,且第一相液体420可以保留在预处理模块400中。

[0168] 图5示出用于溶剂类两相预处理方法的方法的流程图500。如图5所示,工序以将玻片架插入槽中的步骤504开始502。预处理方法可以在步骤506至512之间连续循环,循环次数根据ISH和IHC而变化。随着步骤506加入第一相液体后,分散网格可任选地使用,且第一相液体加至分散网格下方。如前所述,第一相层或载体成分可以是例如能够用于目标物修复的水性相或者是含有洗涤剂的DI水。在步骤506至510中将第二相层扫过玻片的顶部之后,可以在步骤510与512之间使用溢出通道任选地除去第二相层。在已经进行预处理方法并循环或重复充足次数以后,将预处理槽填充至玻片上方,以在步骤514中经溢出通道除去第二相层。在步骤515中,如果需要热诱导的目标物修复,可以是任选酶封闭的目标物修复液的第一相液体可以加热至例如约97℃,并以所需的操作指南和时间间隔进行孵育。在步

骤516中,玻片从预处理模块中移出,在步骤518中,预处理模块被清空。在步骤516从预处理槽移至下一个站点之前,热的玻片可以冷却至一定温度,以避免样本在转移过程中破坏,例如冷却至用于慢转移的约45℃,或冷却至例如用于快速转移的约65℃。

[0169] 图6示出用于液化石蜡两相预处理方法的方法流程图600。如图6所示,处理过程以步骤604加入第一相液体开始。之后,在步骤606中将玻片架插入,并加热预处理模块。预处理模块的加热使得可以加热第一相液体和/或熔化石蜡,石蜡在第一相层的顶部形成第二相层。在一个实施方式中,在也可以进行目标物修复的步骤608中将第一相液体加热至97℃。在另一个实施方式中,加热是用来去除包埋介质,例如脱蜡,在步骤608中,将第一相液体或载体成分加热至约60℃。步骤608和610在图中示为两个独立的步骤,然而在一个实施方式中,两个步骤可以组合。然后,在步骤612中,第一相液体可以添加至超过溢出水平,通过溢出到溢出通道中而除去第二相层。在一个实施方式中,步骤604至612可以按照需要进行重复,以确保除去石蜡或其他包埋介质。在一个实施方式中,步骤611可以通过使用含有任选酶封闭的目标物修复溶液重新填充预处理槽来实现,以进行额外的目标物修复。在一个实施方式中,步骤613包括加热第一相液体至约97℃,并按照所需的操作指南和时间间隔进行孵育,其中第一相液体可以是任选酶封闭的目标物修复溶液。这可以使得完成热诱导目标物修复和任选酶的封闭。在已经进行预处理方法并循环或重复所需的次数后,可以在步骤614中将玻片从预处理模块中转移出来,并在步骤616中将预处理模块清空。可以在步骤614中从预处理槽转移至下一个站点之前,将热的玻片冷却至一定温度,以避免转移过程中的样本破坏,例如冷却至用于慢转移的约45℃,或冷却至用于快速转移的约65℃。

[0170] 图7示出含有烘烤和干燥的预处理方法流程图700。如图7所示,工序以玻片架插入704开始702,并确保安放加热器来加热预处理槽中的气体和样本706。之后,在步骤708中使气体和样本加热指定时间来烘烤样本。样本可以烘烤来改善样本对玻片的粘附。改善样本的粘附可以防止在随后的预处理步骤中样本的不时脱落。之后,分别通过如之前图5和6所示的溶剂类两相预处理500或基于加热的两相石蜡溢出预处理600来处理样本。在样本处理完成后,在步骤710中,可以将空气和样本加热指定时间来干燥样本或玻片。随后,在步骤712中将玻片架转移至下一站点。

[0171] 图8示出用于自动化预处理和加工生物样本的预处理模块800的侧视图,其中玻片架810在模块800的外部。包含竖直玻片810和样本812的玻片架810可以插入预处理模块800中。预处理模块包含与排水管811连接的溢出通道813,以去除预处理模块中的液体,还包含与加热器807连接的加热器电源导线809,以用于温度控制。第一相液体(未显示)通过双向口808加入,第二相层(未显示)通过任选的单向入口806加入。

[0172] 图9示出用于带烘烤和干燥的预处理法的预处理模块的截面示意图,展示出气流924环绕所插入的玻片910。风扇923可以将气体推动至预处理模块中,且气体可以经气体加热器925加热。任选加热的气体具有围绕含有样本912的玻片910的气流924。气流924路径可以将气体带向溢出通道913,气流在溢出通道913处离开预处理模块。任选加热的气体可以干燥样本912或玻片910。这可以使玻片910从预处理模块中移出时是干燥的。玻片910和样本912也可以烘烤以加强样本912对玻片910的粘附。预处理模块中的烘烤可以通过加热器907实现。

[0173] 对记载实施方式的多种修改对于本领域技术人员是显而易见的,且本文公开的基

本原理可以应用于其他实施方式。所记载的例子仅仅是示例性的,且本文描述的实施方式并不意在限制本申请。因此,权利要求将包括与本文描述的原则和特征一致的最宽范围。所有的专利、专利申请、和其他公开物通过引用的方式全部并入本文。

[0174] 实施例

[0175] 实施例按照后述的常规FISH和/或CISH法或常规IHC法执行。对于参数的任何具体变化均在实施例中提及。

[0176] 常规FISH和/或CISH法:

[0177] 常规方法可以同时手动执行以及在自动装备中执行。自动装备的实例在本申请中说明。

[0178] 1. 脱石蜡-参见实施例中的测试条件

[0179] 手动脱石蜡-将载体成分加到容器中,之后,将溶剂添加到容器中。溶剂将“漂浮”在载体成分的顶部。将玻片或玻片架慢慢地插入容器的分层内容物中。以本实施例所述的次数,抬高或放低玻片或玻片架。如果需要的话,后续进行再水化。

[0180] 自动脱石蜡-在自动装备中,将载体成分填充至低于溶剂入口。通过溶剂入口施加溶剂(澄清剂/脱石蜡剂)。也可以以自动的方式向上和向下移动玻片或玻片架。

[0181] 2. 如适当的话,可以进行目标物修复-可以使用传统的方法,例如将MES缓冲液或柠檬酸盐缓冲液加热至略低于水的沸点(约95~100℃),且使用高压锅可以得到高于100℃的温度而不煮沸组织。也可以在80℃下使用硫氰酸钠进行目标物修复。在95℃以上使用预处理溶液(K5599,Dako) 10分钟。

[0182] 3. 胃蛋白酶消化-可以使用传统方法,例如去除多余的预处理缓冲液或目标物修复缓冲液,对样本施用胃蛋白酶(K5599,Dako),在37℃下孵育2~6分钟,如果需要的话用稀释的FISH洗涤缓冲液(K5599,Dako)进行洗涤。

[0183] 4. 脱水-传统的方法例如将玻片放置在一系列乙醇溶液(70%、85%、96%)中,每个溶液约2分钟。之后空气干燥。或者用水代替乙醇进行洗涤并在45℃左右室温下空气干燥。

[0184] 5. 变性和杂交-传统的方法,例如对样本施用探针混合物,用盖玻片覆盖样本并密封边缘,在适当的温度下(取决于探针混合物和杂交缓冲液的组成,例如室温、30℃、37℃、40℃、45℃、50℃、52℃、57℃、60℃、65℃、67℃、70℃、75℃、80℃、82℃、88℃、90℃、92℃、95℃)孵育以进行变性和杂交,其中对于甲酰胺类杂交缓冲液需杂交孵育过夜,或者对于IQFISH杂交缓冲液,则孵育杂交一小时。

[0185] 6. 严格的洗涤-传统的方法,例如用严格(Stringency)缓冲液(K5599,Dako)在室温下洗涤一次,并在65℃下洗涤一次,计10分钟,当进行FISH检测时用洗涤缓冲液(K5599,Dako)洗涤。当样本用于CISH时,在SK108(Dako)中操作,且不进行6以后的步骤。

[0186] 7. 脱水-传统的方法,例如将玻片放置在一系列乙醇溶液(70%、85%、96%),在各个溶液中约2分钟。之后,空气干燥。或者,用水或缓冲液替代乙醇进行洗涤,并在约45℃室温下空气干燥。

[0187] 8. 封片-在封片介质中进行样本的封片,贴片介质为例如荧光封片介质(K5599,Dako)。

[0188] 常规IHC法:

[0189] 常规方法可以手动进行以及在自动装备中进行。自动装备的实例在本申请中示出。

[0190] 1. 脱石蜡-参见实施例中的测试条件。

[0191] 手动脱石蜡-将载体成分加到容器中,其后将溶剂添加到容器中。溶剂将“漂浮”在载体成分的顶部。将玻片或玻片架慢慢地插入容器中分层的内容物中。以本实施例所述的次数,抬高或放低玻片或玻片架。后续进行再水化。

[0192] 自动脱石蜡-在自动装备中,将载体成分填充至低于溶剂入口。通过溶剂入口施加溶剂(澄清剂/脱蜡剂)。也可以以自动方式向上和向下移动玻片或玻片架。

[0193] 2. 如适当的话可以进行目标物修复-

[0194] a) 当使用溶剂时,可以应用传统的方法,例如在MES缓冲液或柠檬酸盐缓冲液中将样本加热至略低于水的沸点(约95~100℃),且使用高压锅允许高于100℃的温度而不煮沸组织。一些表位不能耐受目标物修复,通常用蛋白酶K处理来代替目标物修复步骤

[0195] b) 当使用3合1时,遵照S2375 (Dako) 的包装插入物中的程序。

[0196] 3. 染色可以按照用于FLEX (K8000, Dako) 或FLEX+ (K8002, Dako) 的操作指南来进行。

[0197] 所使用原理的实例:

[0198] -将目标物修复 (TR) 缓冲溶液加到槽的底部

[0199] -将溶剂(例如Clearify™、Histoclear II®、Isopar G™) 加在TR缓冲液的顶部,即液体位置1 (这将形成两相系统)

[0200] -用TR缓冲液填充槽

[0201] -将槽清空至液体位置1,在样本上留下薄层的溶剂

[0202] -孵育0~3分钟。某些样本可能需要加热(例如加热至40℃或50℃)

[0203] -用TR缓冲液或水装满槽并溢出(溶剂在溢出排水管中流出)

[0204] -在97±2℃下孵育例如10分钟

[0205] -用DI水冷冲洗至<40℃ (如果有任何剩余溶剂的话,剩余溶剂在溢出排水管流出)

[0206] -将玻片转移至染色模块以进行进一步的处理:ISH消化、IHC染色、特殊染色和苏木精染色。

[0207] *n=0~5个循环,取决于进一步的处理。

[0208] 实施例1

[0209] 进行本实验来再次确认,与传统二甲苯处理相比,手动执行(用手)的两相脱石蜡可以与Dako标准甲酰胺HER2FISH pharmDx™一同使用。使用MES缓冲液在微波炉中进行目标物修复步骤。

[0210] -向容器中加入DI水

[0211] -在DI水的顶部加入溶剂(Histoclear II®) (形成两相系统)

[0212] -将玻片浸入两相系统

[0213] -从两相系统中移出玻片

[0214] -孵育2分钟

[0215] -在洗涤缓冲溶液中洗涤2×3分钟

[0216] -在微波炉内进行目标物修复10分钟

[0217] -继续标准程序

[0218] 结论:采用传统甲酰胺缓冲液的手动执行的两相脱石蜡适用于Dako FISH和CISH。Histoclear的余留物(液滴)以非常高的浓度存在于玻片上(TR步骤前没有去除Histoclear)。

[0219] 实施例2

[0220] 本实验是为测试,与传统二甲苯处理相比,手动进行(用手)的2相脱石蜡是否可以与HER2IQFISH PharmDx™缓冲液一同使用。目标物修复步骤在微波炉中进行。请注意所使用的CISH操作指南对于组织非常苛刻。

[0221] -向容器中加入DI水

[0222] -在DI水的顶部加入溶剂(Histoclear)(两相系统)

[0223] -将玻片浸入两相系统

[0224] -从两相系统中移出玻片

[0225] -孵育2分钟

[0226] -在洗涤缓冲溶液中洗涤3×3分钟

[0227] -在微波炉内进行目标物修复10分钟

[0228] -继续FISH/CISH程序

[0229] 结论:使用HER2IQFISH PharmDx™缓冲液的手动执行2相脱蜡适用于Dako FISH和CISH.Histoclear II®的剩余物(液滴)以非常高的浓度存在于玻片上(TR步骤前没有去除Histoclear II®)。

[0230] 实施例3

[0231] 本实验是为测试,与传统的二甲苯处理相比,自动化(图8~9)2相脱石蜡是否可以与HER2IQFISH PharmDx™一同使用。通过模块执行目标物修复步骤。

[0232] A版本:

[0233] -将DI水加到槽的底部

[0234] -将溶剂(Histoclear II®)加在DI水的顶部(液体位置1),2相系统

[0235] -用DI水填充槽

[0236] -将槽清空至液体位置1

[0237] -孵育2分钟。

[0238] -用DI水装满槽并溢出(Histoclear II®在溢出排水管中流出)

[0239] -将槽清空

[0240] -用MES缓冲液填充槽

[0241] -在97℃下孵育10分钟

[0242] -用DI水冷冲洗至35℃(剩余的Histoclear II®在排水管中流出)

[0243] -将玻片转移至洗涤缓冲液

[0244] -继续进行FISH/CISH程序

[0245] B版本:

[0246] -将MES缓冲液加到槽的底部

[0247] -将溶剂(Histoclear II®)加在MES缓冲液的顶部(液体位置1),2相系统

- [0248] -用MES缓冲液填充槽
- [0249] -将槽清空至液体位置1
- [0250] -孵育2分钟。
- [0251] -用MES缓冲液装满槽并溢出 (HistoClear II®在溢出排水管中流出)
- [0252] -在 $97 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下孵育10分钟
- [0253] -用DI水冷冲洗至约 35°C (剩余的HistoClear II®在溢出排水管中流出)
- [0254] -将玻片转移至洗涤缓冲液
- [0255] -将玻片转移至染色模块以进行进一步的FISH处理
- [0256] 结论:对于FISH染色而言,使用HER2 IQFISH pharmDx™的自动执行的2相脱石蜡,与使用传统二甲苯脱石蜡的那些同样好,或比那些更好。CISH染色未经测试。没有HistoClear II®剩余物(液滴)存在于玻片上(通过模块在TR步骤前和后去除HistoClear II®)。
- [0257] 实施例4:各种溶剂(FISH和CISH)
- [0258] 遵照一般的FISH法。具体变化列于表1。
- [0259] 表1:溶剂类型、载体成分、探针组合物的类型、自动/手动方法的变化

[0260]

用于脱石蜡的溶剂	方法修改	结果
Isopar G	载体成分是MES缓冲液(K5599, dako)。对样本施用 $10\ \mu\text{L}$ HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako, K5731)。在 67°C 变性10分钟。自动化方法,溶剂层的厚度是约6 mm,循环之间的各个循环后孵育时间(即,溶剂在容器的底部)是1分钟。运行3个循环。	无背景,良好形态,清晰信号
Isopar G	载体成分是DI水。对样本施用 $10\ \mu\text{L}$ HER2 IQFISH pharmDx™ (DAKO, K5731)。在 67°C 变性10分钟。自动化方法,溶剂层的厚度是约6 mm,循环之间的各个循环后孵育时间(即,溶剂在容器的底部)是1分钟。运行3个循环。	无背景,良好形态,清晰信号

[0261]

Isopar G	载体成分是 DI 水。对样本施用 10 μ L HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako, K5731)。在 67℃ 变性 10 分钟。自动化方法, 溶剂层的厚度是约 6 mm, 循环之间的各个循环后孵育时间 (即, 溶剂在容器的底部) 是 2 分钟。运行 1 个循环。	无背景, 良好形态, 清晰信号
Isopar G	载体成分是 MES 缓冲液 (K5599, Dako)。对样本施用 10 μ L HER2 FISH pharmDx™ (Dako, K5331)。在 82℃ 变性 5 分钟。自动化方法, 溶剂层的厚度是约 6 mm, 循环之间的各个循环后孵育时间 (即, 溶剂在容器的底部) 是 1 分钟。运行 3 个循环。之后进行 CISH 步骤 (SK108, Dako)。	无背景, 良好形态, 清晰信号
Isopar L	载体成分是 MES 缓冲液 (K5599, Dako)。对样本施用 10 μ L HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako, K5731)。在 67℃ 变性 10 分钟。自动化方法, 溶剂层的厚度是约 6 mm, 循环之间的各个循环后孵育时间 (即, 溶剂在容器的底部) 是 1 分钟。运行 3 个循环。	无背景, 比使用 Isopar G 时更难从样本中去除溶剂, 形态被影响, 清晰信号
Clearify™	载体成分是 MES 缓冲液 (K5599, Dako)。对样本施用 10 μ L HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako, K5731)。在 67℃ 变性 10 分钟。自动化方法, 溶剂层的厚度大于样本且覆盖整个染色区域 (80 ml 或约 60 mm 厚)。在溶剂中的孵育时间为 10 分钟。溶剂在样本上运行一轮, 即从下至上直至溢出。	无背景, 良好形态, 清晰信号
Clearify™	载体成分是 MES 缓冲液 (K5599, Dako)。对样本施用 10 μ L HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako, K5731)。在 67℃ 变性 10 分钟。自动化方法, 溶剂层的厚度是约 4 mm, 循环之间的各个循环后孵育时间 (即, 溶剂在容器的底部) 是 1 分钟。运行 3 个循环。	无背景, 良好形态, 清晰信号
HistoClear II®	载体成分是 FISH 洗涤缓冲液 (K5599, Dako)。向样本施用 10 μ L HER2 FISH pharmDx™ 试剂盒 (Dako, K5331) 的 HER2 FISH 探针。在 82℃ 变性 5 分钟。手动方法 (没有溢出)。	无背景, 良好形态, 清晰信号, 在玻片上辨认出少量溶剂残留。
HistoClear II®	载体成分是 FISH 洗涤缓冲液 (K5599, Dako)。对样本施用 10 μ L HER2 IQFISH pharmDx™ (Dako, K5731)。在 67℃ 变性 10 分钟, 在 45℃ 杂交 1 小时。手动方法。	无背景, 良好形态, 清晰信号

[0262]

Histoclear II®	载体成分是 MES 缓冲液 (K5599, Dako)。向样本施用 10 µL HER2 FISH pharmDx™ 试剂盒 (Dako, K5331) 的 HER2 FISH 探针。在 82℃ 变性 5 分钟。自动化方法。	无背景, 良好形态, 清晰信号
Histoclear II®	载体成分是 DI 水。向样本施用 10 µL HER2 FISH pharmDx™ 试剂盒 (Dako, K5331) 的 HER2 FISH 探针。在 82℃ 变性 5 分钟。自动化方法。	无背景, 良好形态, 清晰信号
Histoclear II®	载体成分是 MES 缓冲液 (K5599, Dako)。对样本施用 10 µL HER2 FISH pharmDx™ (Dako, K5331)。在 82℃ 变性 5 分钟。自动化方法, 溶剂层的厚度是约 6 mm, 循环之间的各个循环后孵育时间 (即, 溶剂在容器的底部) 是 1 分钟。运行 3 个循环。之后进行 CISH 程序 (SK108, Dako)。	无背景, 良好形态, 清晰信号, 在玻片上辨认出少量溶剂残留。

[0263] 实施例5:IHC

[0264] 测试玻片 (A): 测试样本 A (见表2) 在图1~4所示的模块中进行自动化预处理, 使用 EnVision FLEX 目标物修复液--高 pH 的 K8000/K8004 或 EnVision FLEX--低 pH 值的 K8005, 使用在包装插入物 S2375 中指定的三合一流程。

[0265] 在预处理结束后, 玻片降低到室温, 用 EnVision FLEX 洗涤缓冲液 K8007 稀释。

[0266] 测试玻片 (B): 测试样本 (见表2) 在图1~4所示的模块中自动化地预处理, 应用 EnVision FLEX 目标物修复溶液--高 pH 的 K8004 或 EnVision FLEX--低 pH 值的 K8005。溶剂循环数为 1, 所用的溶剂是 Clearify™, TR 后的冷却后体积比容器容积大 1.5。

[0267] 测试玻片 A、B:

[0268] 将测试玻片 A 和测试玻片 B 以及参照玻片转移到自动染色机。使用 FLEX RTU 抗体特异的方法进行染色。染色后, 将玻片脱水, 并永久性地封片。

[0269] 结论: 应用 2 相脱石蜡的预处理显示出比应用 3 合 1 法显著更好的染色结果。

[0270] 表2: 各测试的多种抗体

[0271]

编号	Dako 产品编号	名称	测试用组织	HE*	LE*
----	--------------	----	-------	-----	-----

[0272]

1	IR700	肌动蛋白（肌肉）克隆 HHF35	较多种 （large multi）/舌	结肠	舌
2	IR614	BCL2 癌蛋白	较多种	扁桃体	扁桃体
3	IR625	BCL6 蛋白	较多种	扁桃体	扁桃体
4	IR650	BSAP（Pax5）	较多种	扁桃体	扁桃体
5	IR622	癌胚抗原	较多种	结肠	扁桃体
6	IR526	癌胚抗原，多抗	较多种	肝	胰（腺）
7	IR069	CD1a	较多种	扁桃体	扁桃体
8	IR651	CD2	较多种	扁桃体	扁桃体
9	IR503	CD3	较多种	扁桃体	扁桃体
10	IR637	上皮抗原	较多种	结肠	肾
11	IR643	CD7	较多种	扁桃体	扁桃体
12	IR623	CD8	较多种/脾	扁桃体	脾
13	IR648	CD10	较多种	肝	扁桃体
14	IR062	CD15	较多种	扁桃体	肾
15	IR604	CD20cy	较多种	扁桃体	扁桃体
16	IR608	CD21	较多种	扁桃体	扁桃体
17	IR602	CD30	较多种	扁桃体	扁桃体
18	IR610	CD31，内皮细胞	较多种	结肠	扁桃体
19	IR636	CD34 II 类	较多种	肝	肝
20	IR751	CD45，白细胞共同抗原	较多种	扁桃体	脑
21	IR628	CD56	较多种	结肠	扁桃体
22	IR647	CD57	较多种	扁桃体	结肠
23	IR609	CD68	较多种	扁桃体	脑
24	IR613	CD68	较多种	扁桃体	脑
25	IR621	CD79 α	较多种	扁桃体	扁桃体
26	IR080	CDX-2	较多种	结肠	胰（腺）
27	IR053	细胞角蛋白	较多种	肝	肝
28	IR620	细胞角蛋白 5/6	较多种	扁桃体	前列腺
29	IR618	细胞角蛋白 7	较多种	胰（腺）	胰（腺）
30	IR780	细胞角蛋白 19	较多种	胰（腺）	胰（腺）
31	IR619	细胞角蛋白 20	较多种	结肠	结肠
32	IR051	细胞角蛋白，高分子量	较多种	扁桃体	NA
33	IR072	D2-40	较多种	结肠	结肠

[0273]

34	IR059	结蛋白	较多种	结肠	结肠
35	IR629	上皮膜抗原	较多种/乳腺	乳腺	扁桃体
36	IR654	ERa 克隆 1D5	子宫颈	子宫粘膜	子宫粘膜
37	IR506	κ 轻链	较多种	扁桃体	扁桃体
38	IR626	Ki-67 抗原	较多种	扁桃体	扁桃体
39	IR507	λ 轻链	较多种	扁桃体	扁桃体
40	IR633	黑色素 (melan) -A	较多种/皮肤	恶性黑色素瘤	皮肤
41	IR079	黑素体	较多种	恶性黑色素瘤	恶性黑色素瘤
42	IR511	髓过氧化物酶	较多种	扁桃体	肝
43	IR060	P504S	前列腺腺癌/ 较多种	前列腺腺癌	正常前列腺 (将为阴性)
44	IR616	p53 蛋白	较多种	结肠腺癌	扁桃体
45	IR068	孕酮受体	子宫颈	子宫颈	子宫颈
46	IR514	前列腺特异性抗原	较多种	正常的前列腺 和良性前列腺 增生	正常的前列腺 和良性前列腺 增生
47	IR504	S100	较多种	结肠	胰(腺)
48	IR611	平滑肌肌动蛋白	较多种	结肠	肝
49	IR630	波形蛋白	较多种	扁桃体	肝
50	IR527	血管性血友病因子	较多种	结肠	肝
51	IR524	GFAP	较多种	脑	结肠
52	IR001	TdT	胸腺	胸腺	NA
53	IR059	E-钙粘蛋白	较多种	结肠	肝

[0274] *HE=高表达,LE=低表达

[0275] 实施例6:改进的脱石蜡

[0276] 遵照在上述常规IHC法中描述的程序。载体成分是DI水,组织类型是扁桃体,孵育时间为2分钟,孵育温度是40℃。两相处理过程包括3个循环,即3次沿玻片向上和3次沿玻片向下(共计6次+溢出)。

[0277] 所有的玻片均手动地用S3301苏木精染色5分钟,用DI水洗涤,洗涤缓冲液5分钟变蓝,并用水性封片介质Paramount封片介质(S3025,Dako)进行封片。

[0278] 四种类型的脱石蜡。使用Histoclear II或Isopar G的两相处理、3合1脱石蜡(过

程参见S2375包装插入物和PT101,Dako)和传统的二甲苯脱石蜡(过程参见K5599的包装插入物)。

[0279] 结果:使用偏振滤光器并用Faramount封片,在用正常明视场显微镜可视化时,石蜡残留物显示为白色/亮点。用两相系统脱石蜡的组织样本(图10a(Histoclear II®)和图10b(Isopar G))显示出比使用3合1缓冲液(图10c)和传统二甲苯脱石蜡法(图10d)进行脱石蜡的组织样本更好的结果。

[0280] 实施例7:溶剂量

[0281] 测试不同体积的溶剂(上层),以找出是否有得到最好脱石蜡效果的最优含量。

[0282] 测试例如常规FISH和/或CISH方法,使用DI水作为载体成分,Her2IQFISH pharmDx探针(K5731,Dako),自动化方法。

[0283] 循环数为4,孵化时间2分钟,孵化温度为室温。

[0284] Histoclear II®用作脱石蜡剂。所测试的体积为15ml;3.0ml;4.5ml;6.0ml;7.5ml;9.0ml和10.5ml。

[0285] 1.5ml等于约1mm厚度的溶剂层,3.0ml等于约2mm厚度的溶剂层,4.5ml等于约3.0mm厚度的溶剂层,6.0ml等于约4mm厚度的溶剂层,7.5ml等于约5.5mm厚度的溶剂层,9.0ml等于约6mm厚度的溶剂层。

[0286] 结果:当如实施例6使用双极偏振滤光器(dipolarised filter)进行评测时,所有测试均表现出良好的脱石蜡化,且优于3合1法。然而,体积6.0ml以上给出比低于6.0ml更好的结果,且9.0ml得到最好的脱石蜡效果。不同厚度的两相脱石蜡的FISH染色均表现出较好的形态、低背景水平和可接受的信号强度。

[0287] 实施例8:用20%乙醇洗涤

[0288] 如果样本上残留有任何溶剂痕迹,用20%乙醇溶液洗涤是有利的。在目标物修复和冷却后,用20%乙醇溶液洗涤,显示出改善的结果。用300μl的于DI水中的20%乙醇洗涤2次,在乙醇溶液中的孵育时间为5分钟。这个过程表现出改善的从样本中除去溶剂。

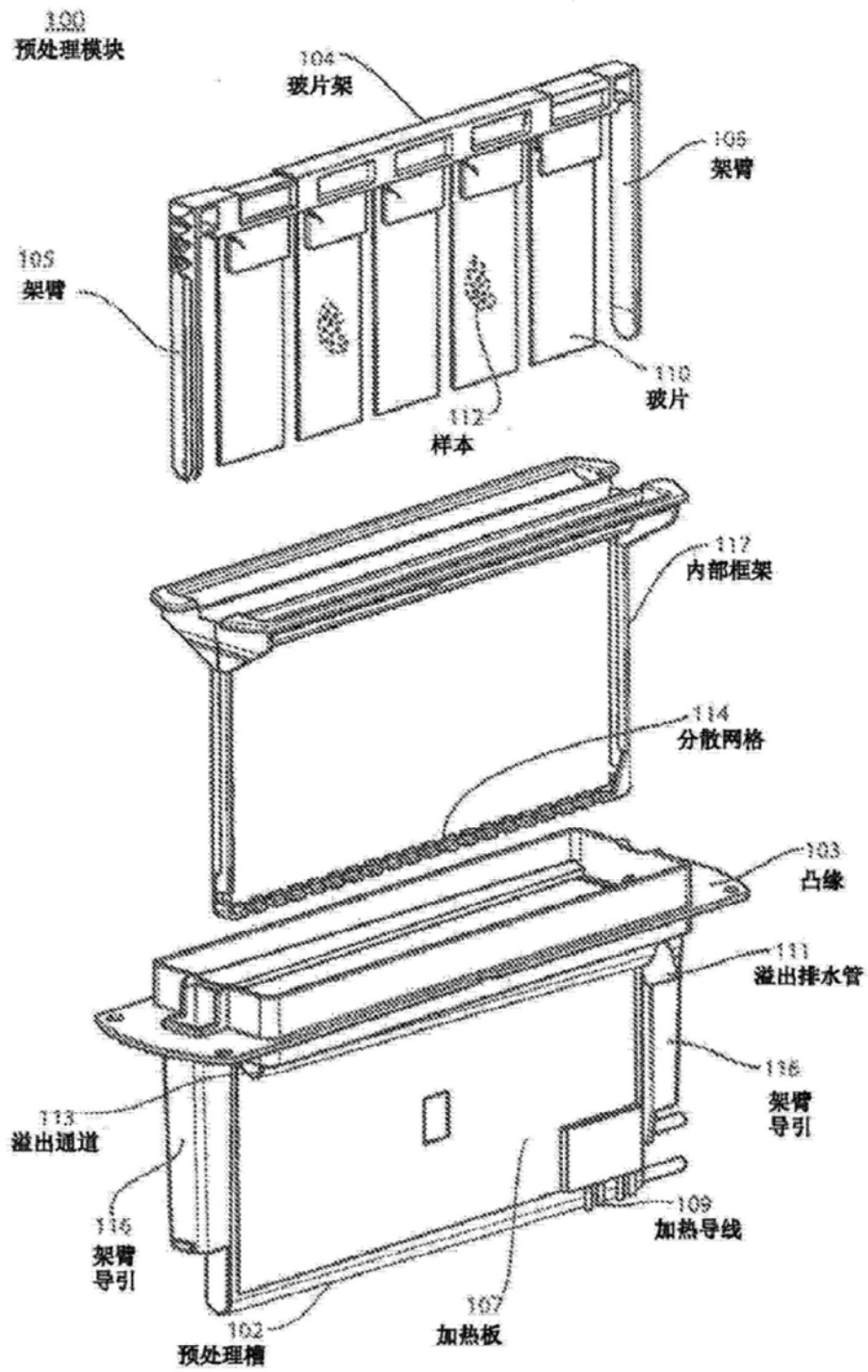


图1

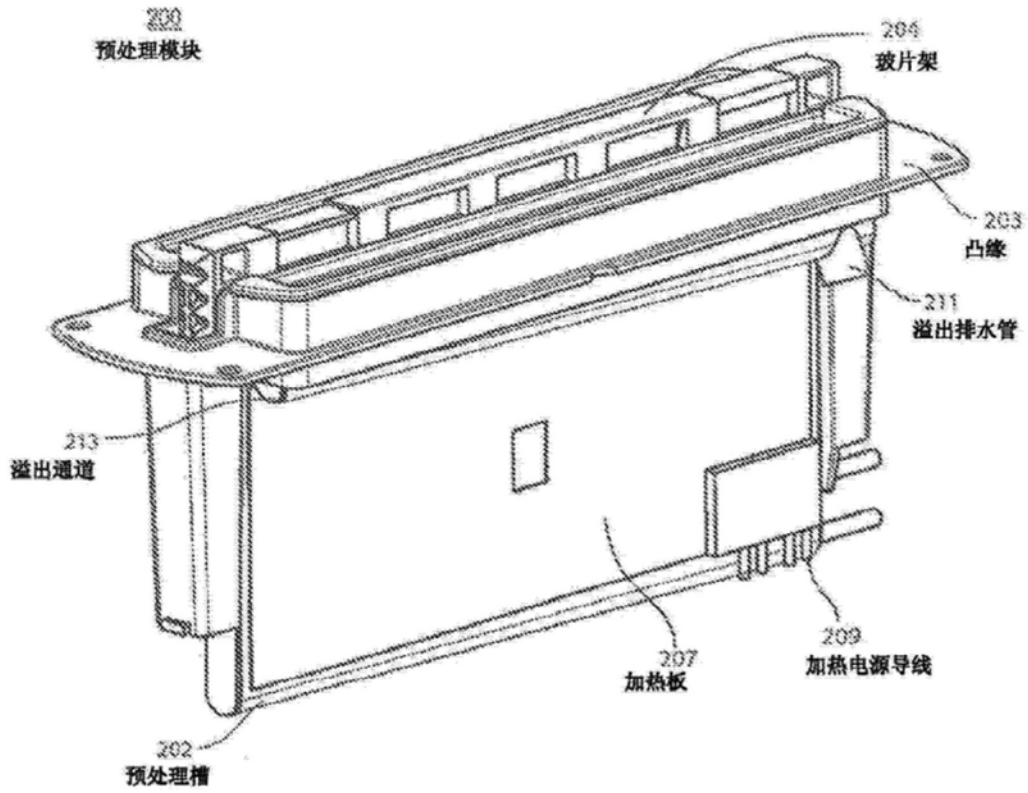


图2A

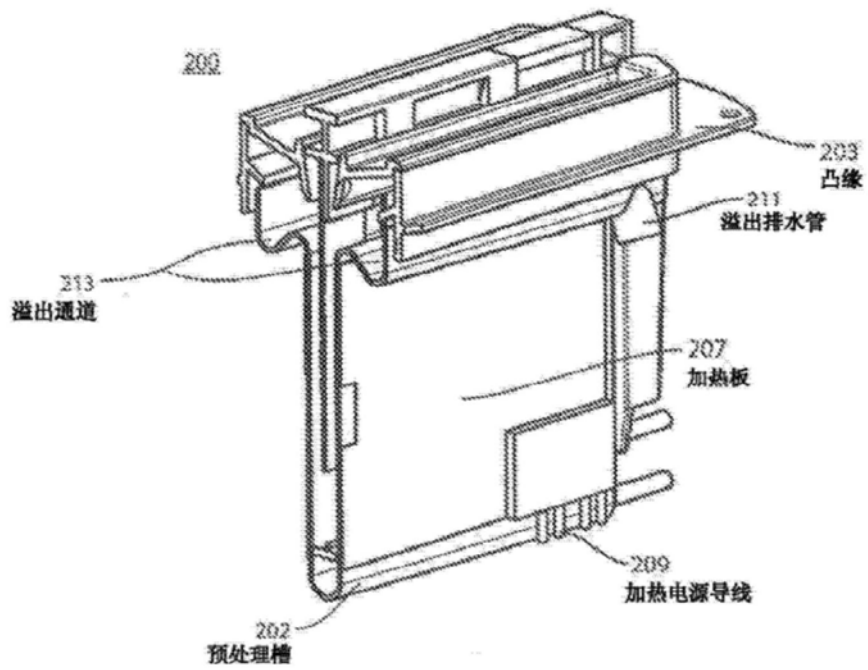


图2B

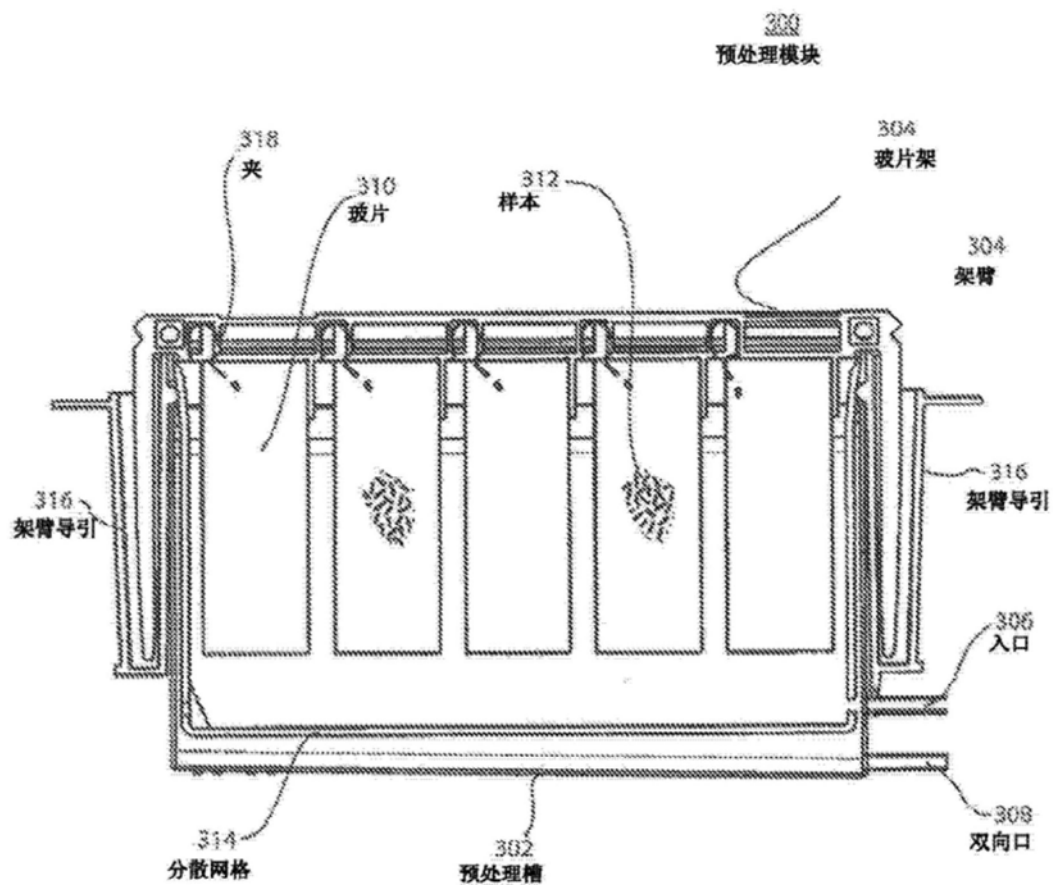


图3A

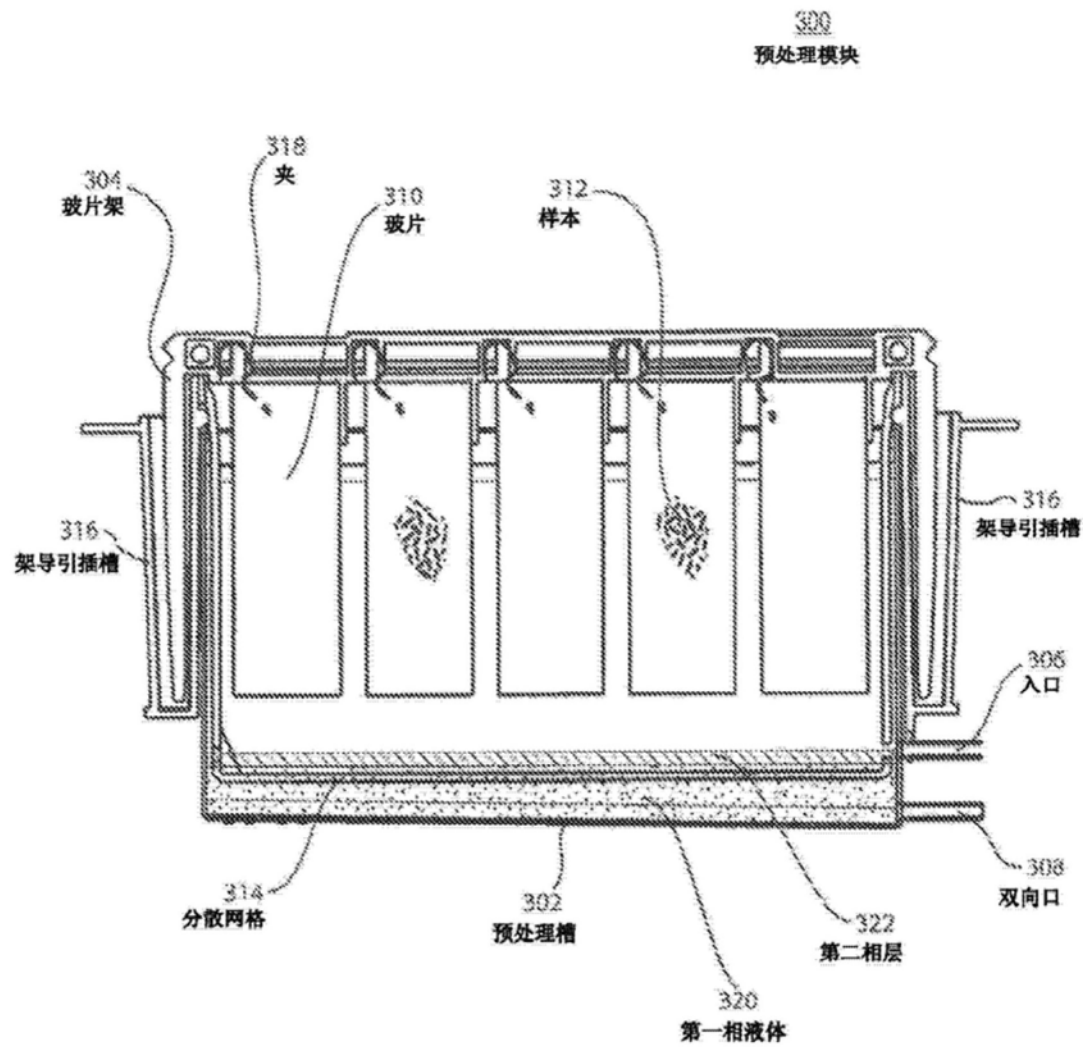


图3B

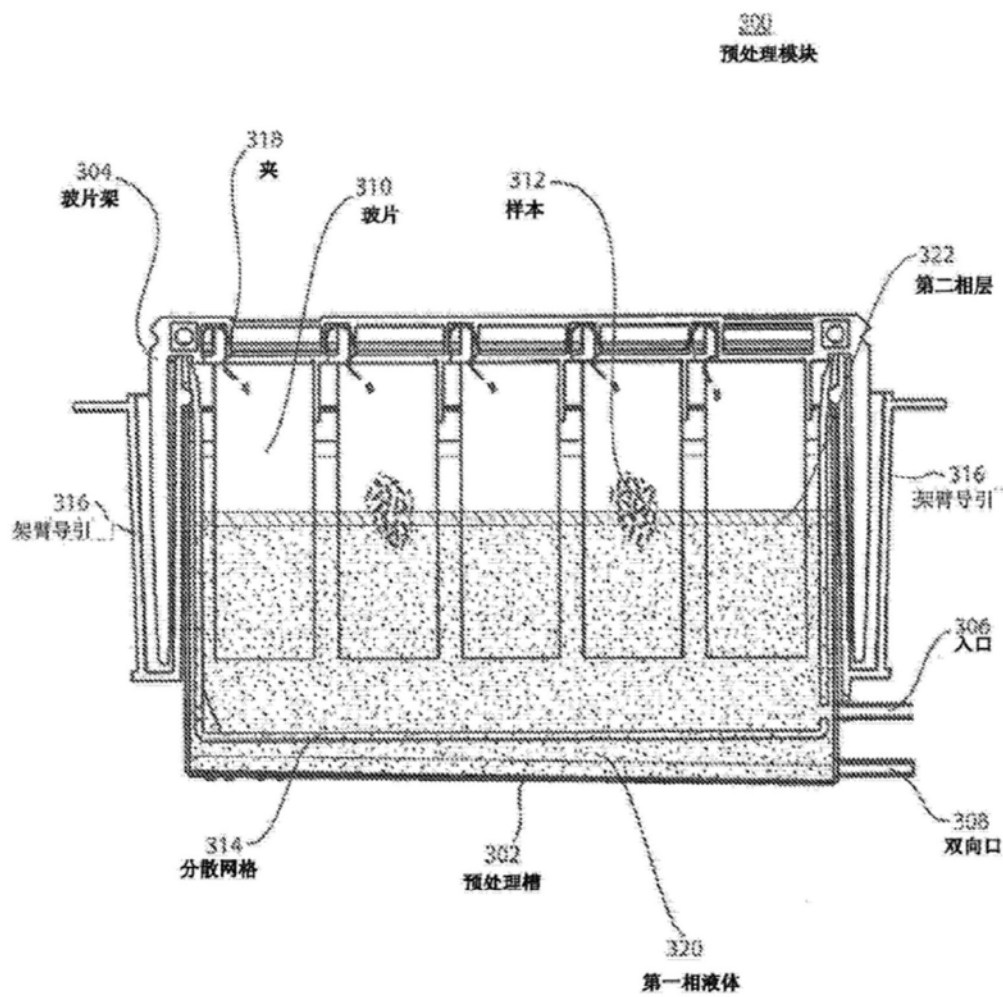


图3C

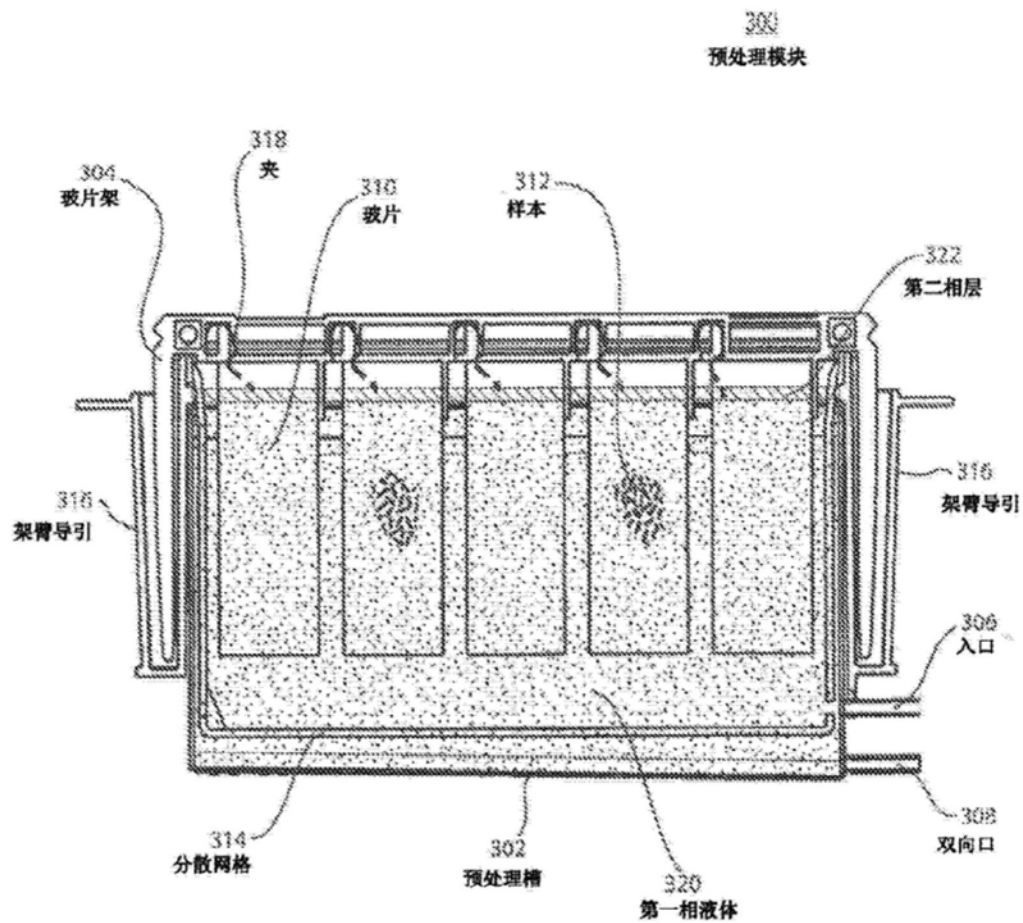


图3D

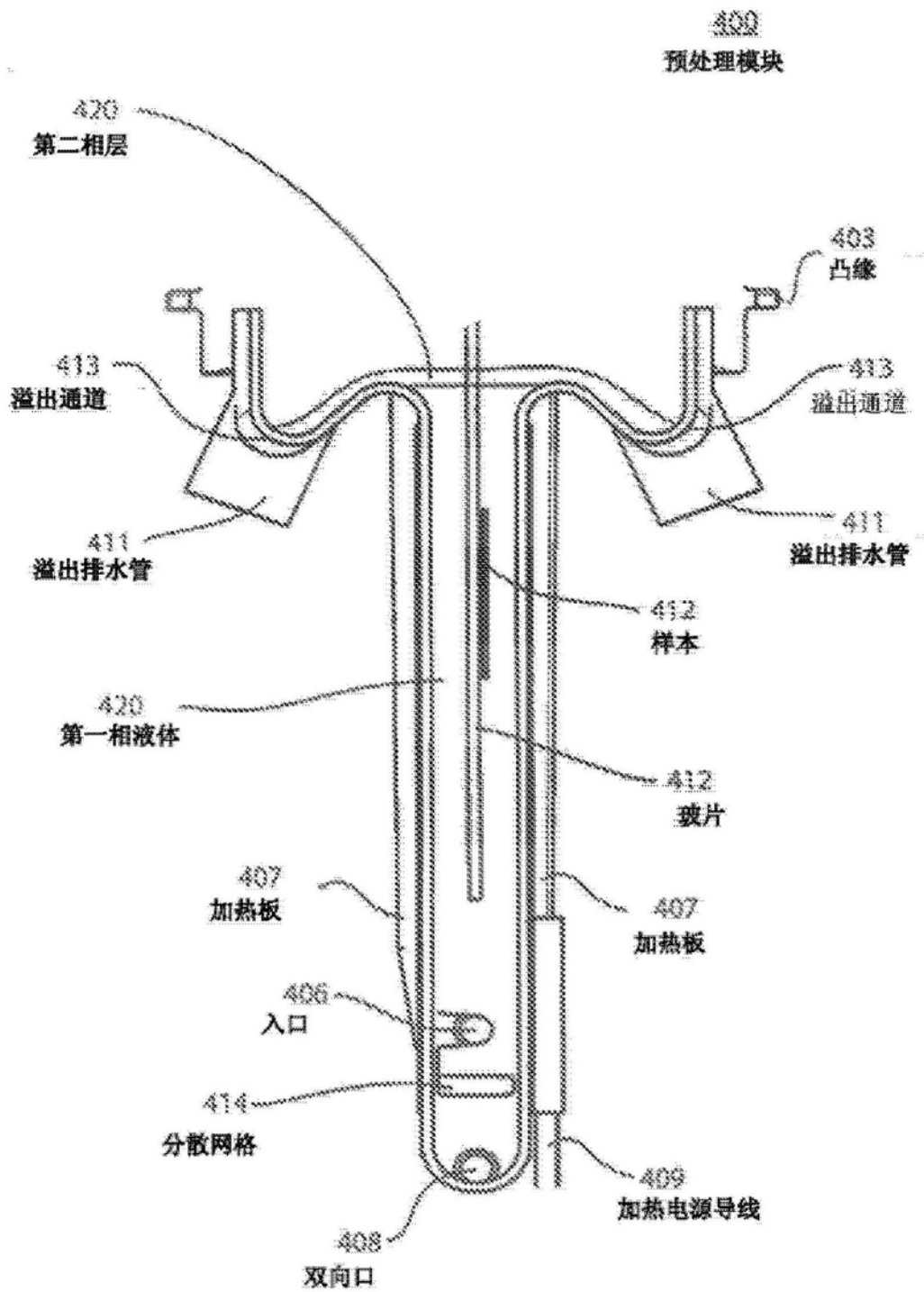


图4

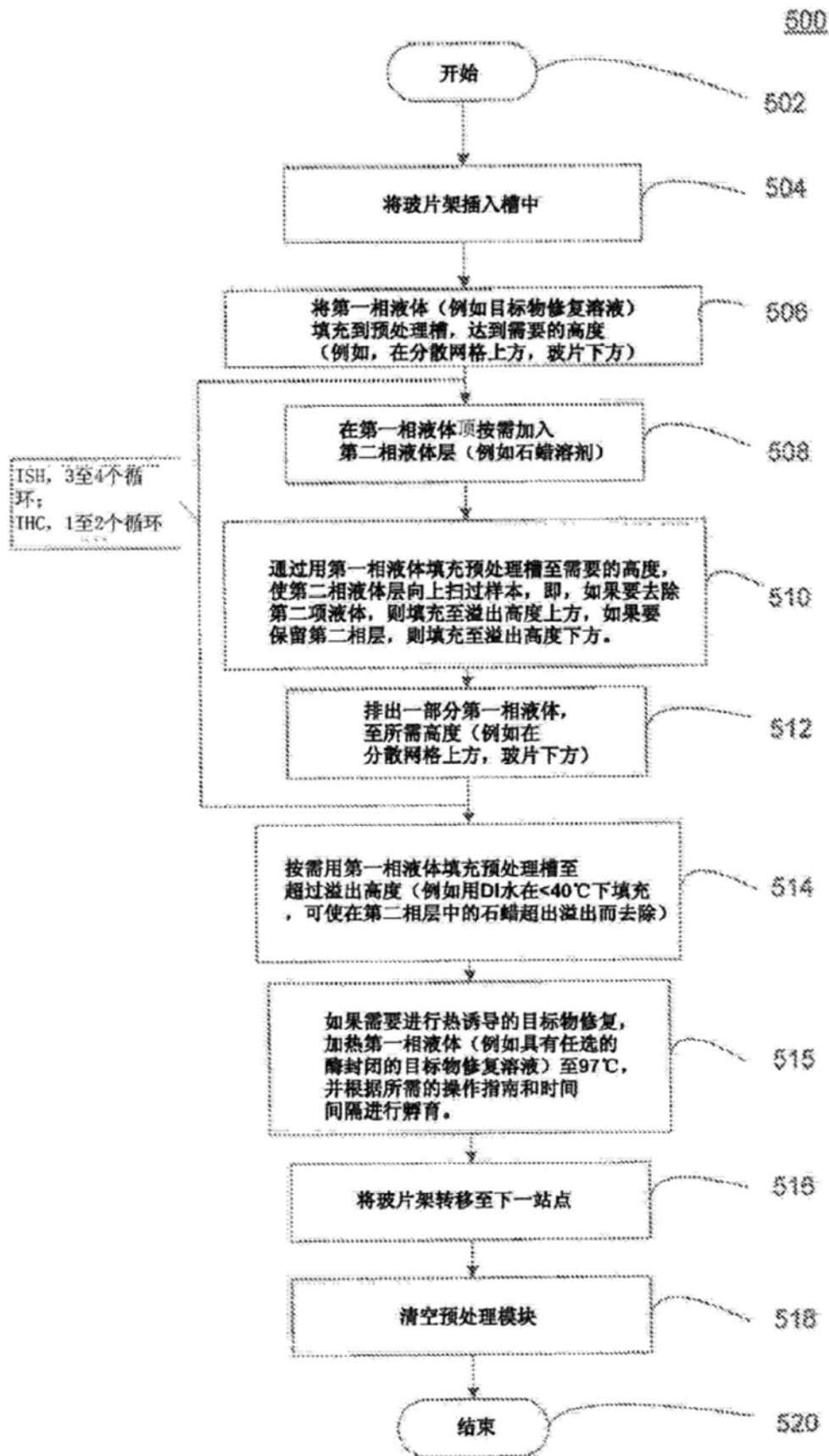


图5

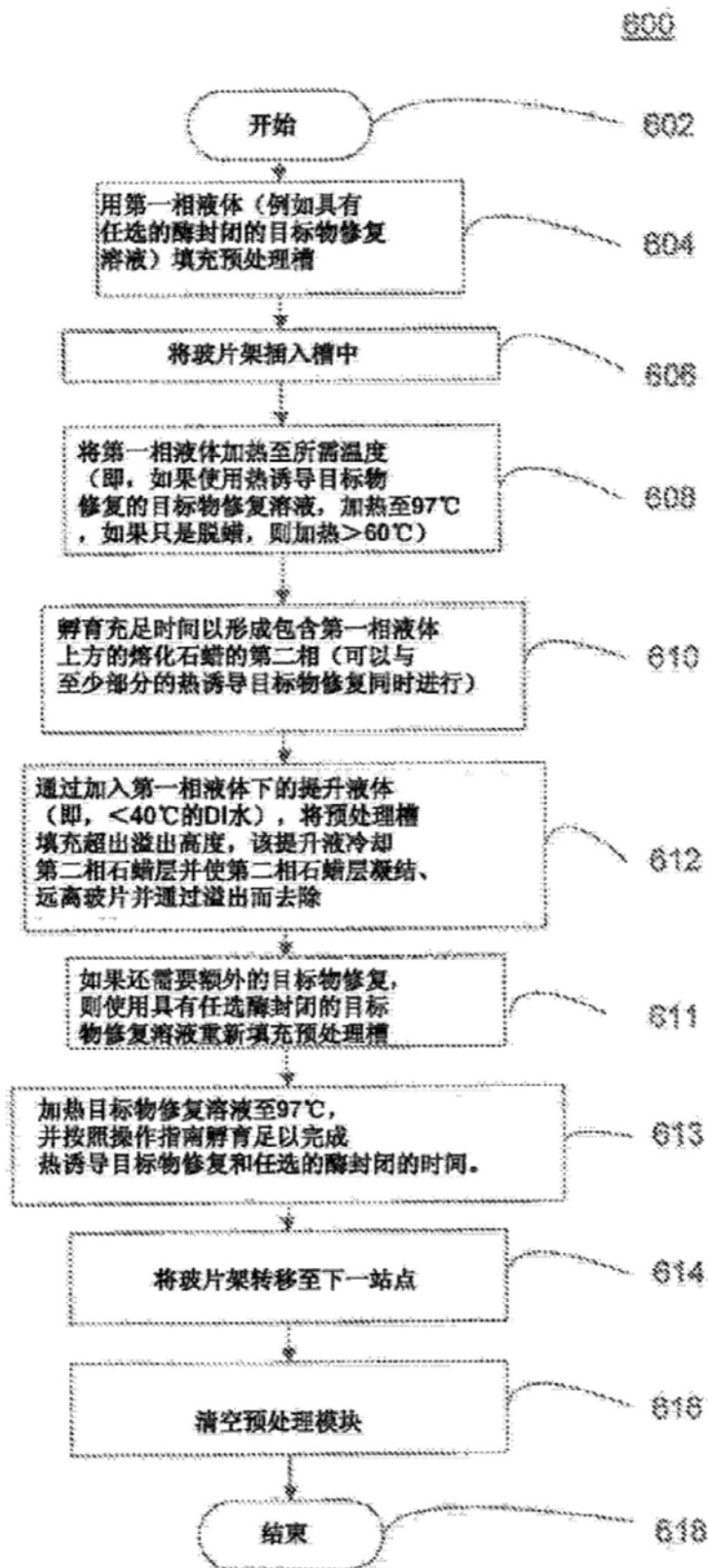


图6

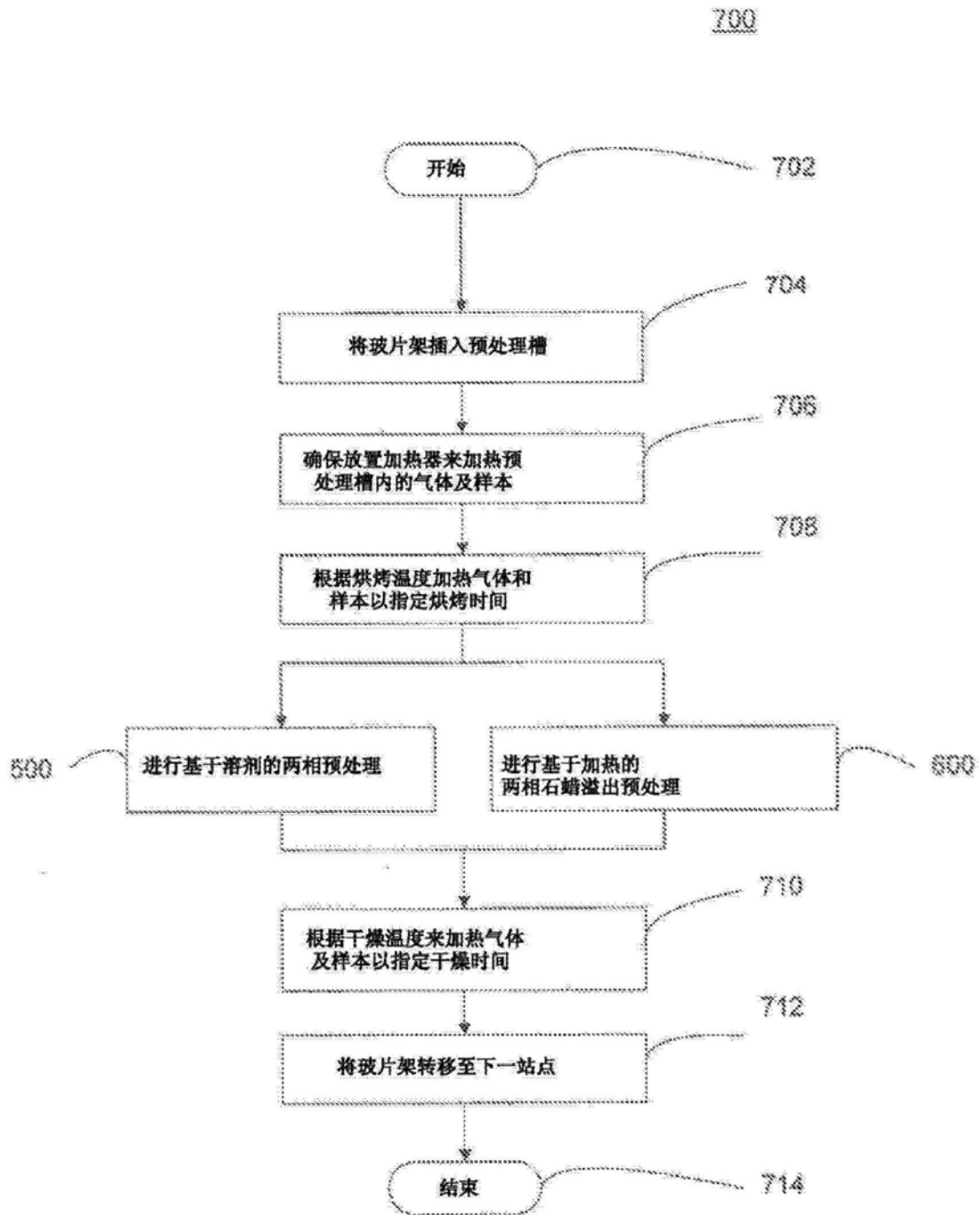


图7

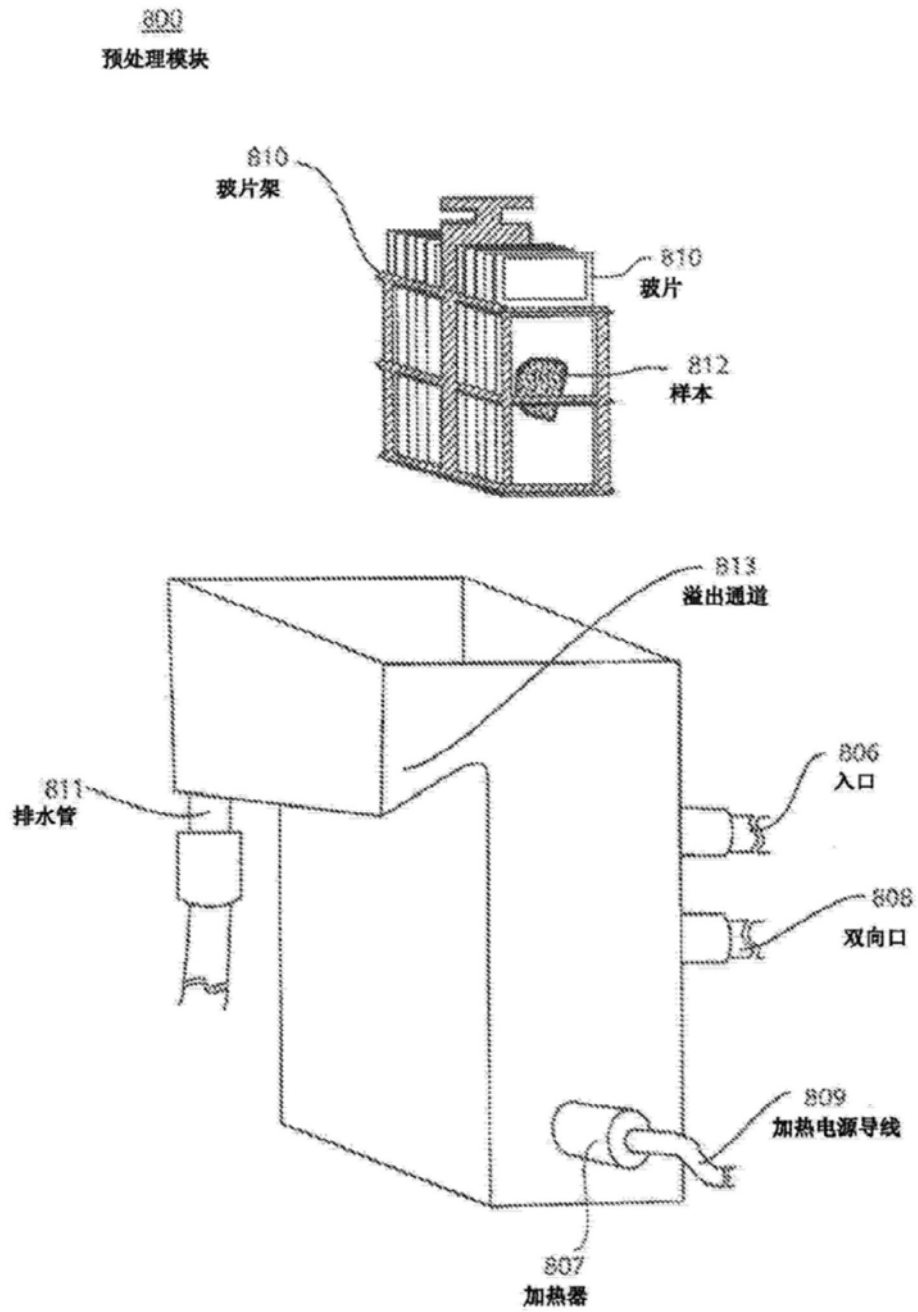


图8

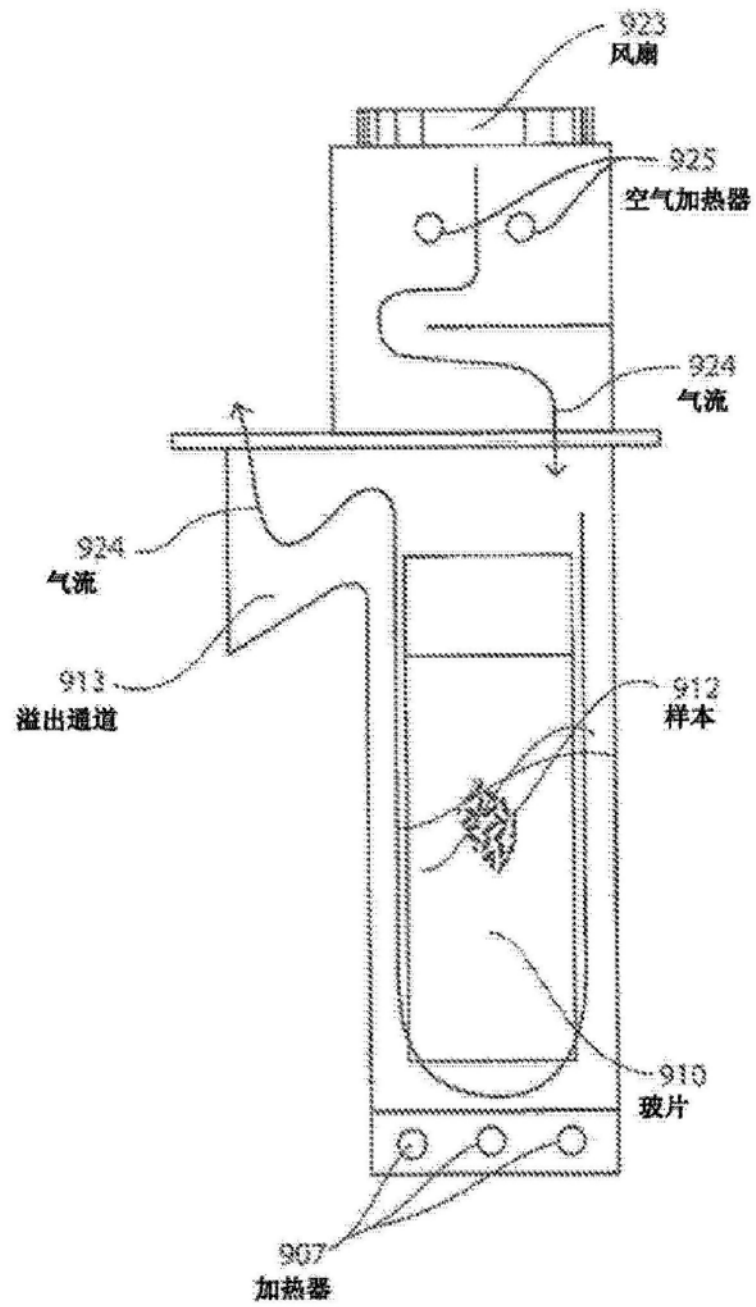


图9

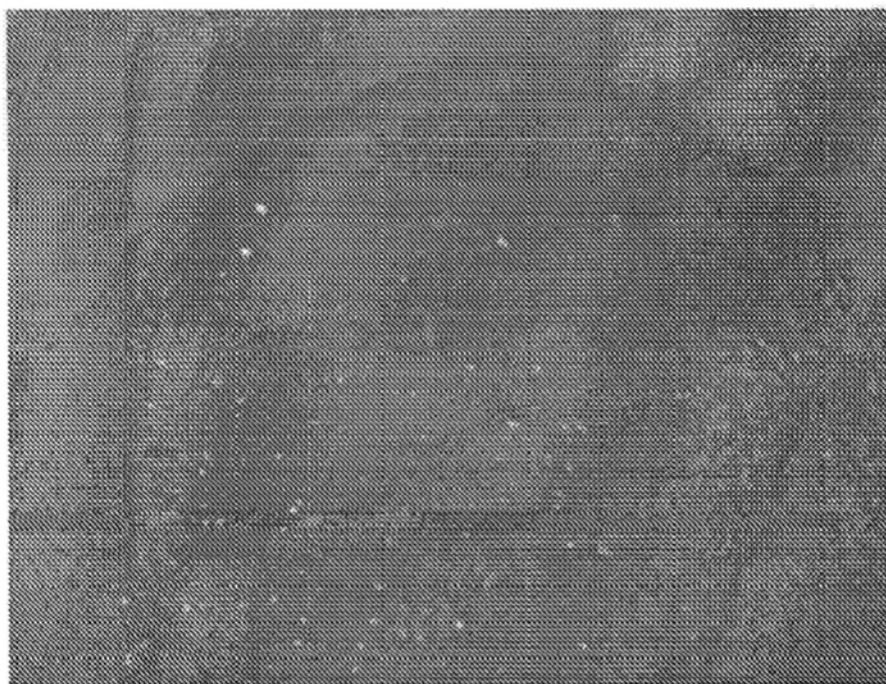


图10a

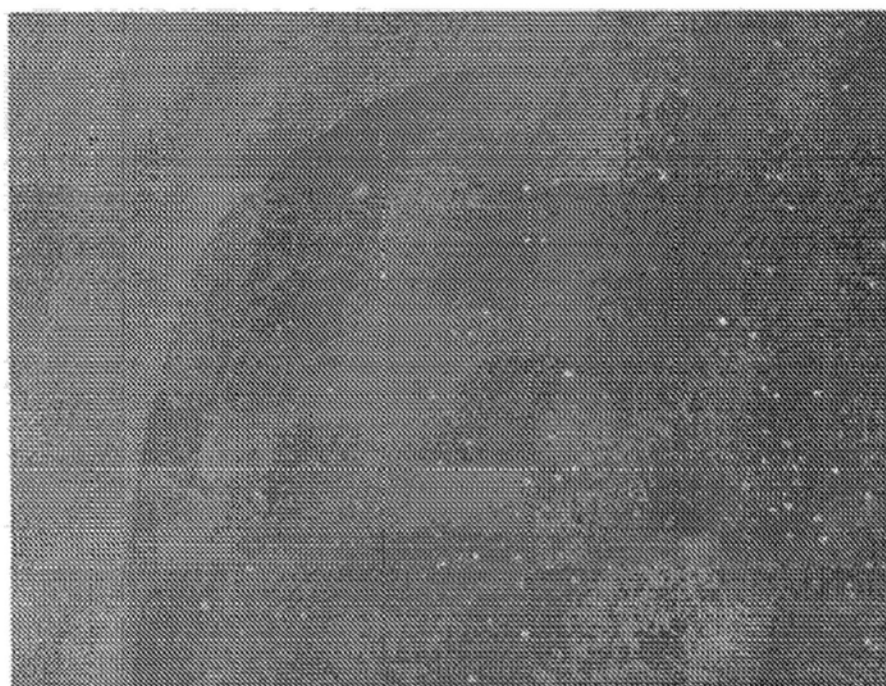


图10b

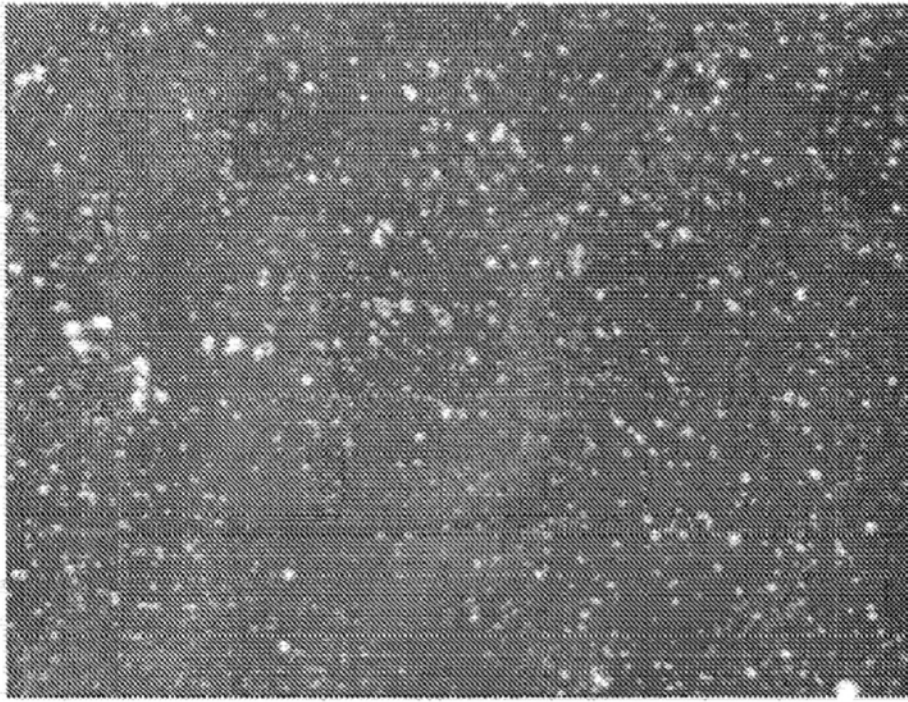


图10c

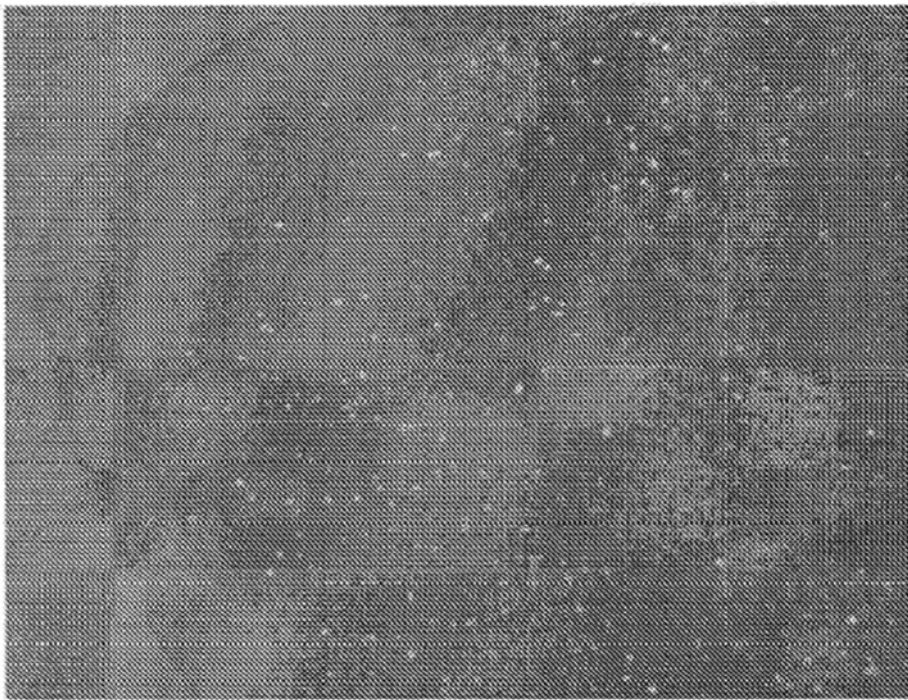


图10d