(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103282516 B
(45)授权公告日 2015.06.10

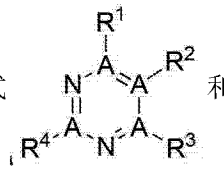
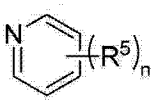
(21)申请号 201180062801.5
(22)申请日 2011.12.28
(30)优先权数据
61/460,349 2010.12.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/067481 2011.12.28
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/092322 EN 2012.07.05
(73)专利权人 文塔纳医疗系统公司
地址 美国亚利桑那州
(72)发明人 E.J. 梅 A.E. 穆里洛
J.W. 考斯梅德
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴
(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/52(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/58(2006.01)
(56)对比文件
WO 00/55358 A1,2000.09.21, 全文.
EP 0977033 A2,2000.02.02, 权利要求 12.
WO 03/002733 A2,2003.01.09, 全文.
F Naguib 等.Structure-activity relationships for the binding of ligands to xanthine or guanine phosphoribosyl-transferase from toxoplasma GOND II.《Biochemical Pharmacology》.1995, 第 50 卷(第 10 期), 第 1686 页右栏.
审查员 包毅宁

权利要求书2页 说明书43页 附图17页

(54)发明名称

利用嘧啶类似物的色原体的沉积增强

(57)摘要

本公开涉及增强可检测部分在组织样品上的沉积的组合物、采用这些组合物的方法以及包含这些组合物的试剂盒。所述组合物包含沉积增强剂、酶、特异性结合部分和可检测部分,所述沉积增强剂具有式  和/或者  ,其中 R^1、R^2、R^3和 R^4独立选自脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分和氢;R^1和/或者 R^3可结合至 R^2以形成稠合的芳族环系;R^5选自含有杂原子的部分;A 选自碳原子、除了硫之外的杂原子及其任何组合;n 为 1-5。

CN 103282516 B

1. 用于通过在邻近处沉积标记物来检测样品中的靶标的非诊断用途的方法，包括：

使得样品与识别溶液接触，所述识别溶液包含对于靶标具有特异性的特异性结合部分；

将所述特异性结合部分用酶标记；

使得样品与检测溶液接触，所述检测溶液包含酶底物，以使得所述标记物在沉积增强剂的存在下沉积在邻近靶标处，所述沉积增强剂选自嘧啶、2- 羟基嘧啶或嘧啶 -N- 氧化物；以及

检测所述标记物。

2. 权利要求 1 的方法，其中使得样品与检测溶液接触包括使用氧化剂酶促氧化酶底物以形成标记物，

其中使用氧化剂酶促氧化酶底物包括降低酶底物的可溶性或者稳定性，以使得酶底物变成作为标记物来沉积。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述酶底物选自色原体和酪酰胺 - 缀合物。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述酶为氧化还原酶或者过氧化物酶。

5. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述特异性结合部分包含抗体或者核酸。

6. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述酶底物选自 1,3- 二氨基联苯胺、3- 氨基 -9- 乙基咔唑、四甲基联苯胺、荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵、罗丹明或上述酶底物的衍生物。

7. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述酶底物为酪胺衍生物。

8. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述检测溶液进一步包含促进剂，其选自杂芳基化合物、硼酸、酚化合物或其组合。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述杂芳基化合物选自咪唑、L- 组氨酸、吡啶 N- 氧化物、嘧啶 N- 氧化物、N- 甲基吗啉氧化物和 2,2,6,6- 四甲基哌啶 -1- 氧基。

10. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述检测溶液进一步包含非离子型表面活性剂，其选自聚氧乙烯月桂基醚，其具有式 $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$；聚氧乙烯 (20) 山梨聚糖单烷基化物，所述单烷基化物包含 8-14 个碳；直链仲醇聚氧乙烯，其具有式 $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O]_x$，其中 x 等于 2-12 的整数；和聚氧乙烯辛基苯基醚。

11. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述检测溶液进一步包含抗氧化剂，其选自硫酸氢钠、锡酸钠、偏硫酸氢钠及其组合。

12. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述检测溶液进一步包含含有族 I 或者族 II 金属的盐，其具有式 MX_2 或者 MX，其中 M 为族 I 或者族 II 金属，其选自锂、钠、钾、铯、钙、镁、锶和钡；且 X 选自氟化物、氯化物、溴化物、碘化物、碳酸盐、氢氧化物和磷酸盐。

13. 权利要求 1-3 中任一项的方法，其中所述沉积增强剂具有范围为 5mM 至 15mM 的浓度且所述酶底物具有大于 0mM 且小于等于 8mM 的浓度。

14. 用于通过在邻近处沉积标记物来检测样品中的靶标的组合物，包含酶、沉积增强剂和酶底物，所述酶底物在与所述酶反应之后产生可检测部分，所述沉积增强剂选自嘧啶、2- 羟基嘧啶或嘧啶 -N- 氧化物。

15. 权利要求 14 的组合物，其中所述酶底物选自 1,3- 二氨基联苯胺、3- 氨基 -9- 乙基咔唑、四甲基联苯胺、荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵、罗丹明、酪酰胺或上

述酶底物的衍生物。

16. 权利要求 14 的组合物，进一步包含促进剂，其选自杂芳基化合物、硼酸、酚化合物或其组合；非离子型表面活性剂，其选自聚氧乙烯月桂基醚，其具有式 $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$；聚氧乙烯 (20) 山梨聚糖单烷基化物，所述单烷基化物包含 8-14 个碳；直链仲醇聚氧乙烯，其具有式 $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O]_x$，其中 x 等于 2-12 的整数；和聚氧乙烯辛基苯基醚以及抗氧化剂，其选自硫酸氢钠、锡酸钠、偏硫酸氢钠及其组合。

17. 权利要求 15 的组合物，进一步包含促进剂，其选自杂芳基化合物、硼酸、酚化合物或其组合；非离子型表面活性剂，其选自聚氧乙烯月桂基醚，其具有式 $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$；聚氧乙烯 (20) 山梨聚糖单烷基化物，所述单烷基化物包含 8-14 个碳；直链仲醇聚氧乙烯，其具有式 $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O]_x$，其中 x 等于 2-12 的整数；和聚氧乙烯辛基苯基醚以及抗氧化剂，其选自硫酸氢钠、锡酸钠、偏硫酸氢钠及其组合。

18. 权利要求 14-17 中任一项的组合物，其中所述沉积增强剂具有范围为 5mM 至 15mM 的浓度且所述酶底物具有大于 0mM 且小于等于 8mM 的浓度。

19. 试剂盒，包含酶和检测溶液，所述检测溶液包含沉积增强剂和酶底物，所述酶底物在与所述酶反应之后产生可检测部分，所述沉积增强剂选自嘧啶、2- 羟基嘧啶或嘧啶 -N- 氧化物。

利用嘧啶类似物的色原体的沉积增强

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求美国临时申请 61/460,349(其于 2010 年 12 月 30 日提交)的较早提交日的权益。认为该临时申请的全部公开内容构成后续申请的部分公开内容且由此通过引用的方式并入本申请。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于增加可检测部分在组织中靶标分子上的沉积的含有嘧啶类似物的新组合物。

背景技术

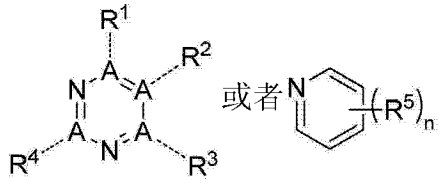
[0004] 细胞染色方法包括免疫组织化学 (IHC) 和原位杂交分析 (ISH) 为组织学诊断以及组织形态学研究中有用的工具。IHC 采用特异性结合试剂或者部分诸如抗体以检测可存在于组织样品中的感兴趣的抗原。IHC 广泛用于临床和诊断应用中,诸如用于诊断特定疾病状态或者状况。例如,特定癌症类型可基于特定标记物分子存在于获自受试者的样品中来诊断。IHC 也广泛用于基础研究以理解生物标记物在不同组织中的分布和定位。生物样品也可使用原位杂交技术诸如银原位杂交 (SISH)、显色体原位杂交 (CISH) 和荧光原位杂交 (FISH)(统称为 ISH) 来检查。ISH 不同于 IHC,这是因为 ISH 检测组织中的核酸而 IHC 检测蛋白质。

[0005] 对于组织和细胞学样品的原位测定诸如 IHC 测定和 ISH 测定,特别是所述样品的多重测定,高度期望的是鉴定和开发提供理想结果而无背景干扰的方法。一种所述方法涉及酪酰胺信号放大 (TSA) 的使用,其是基于拥有专利的催化报道分子沉积 (CARD)。美国专利 6,593,100,其标题为“Enhanced catalyzed reporter deposition”,公开了使用 CARD 或者 TSA 方法来增强酶的催化,其通过使标记的苯酚缀合物与酶反应,其中所述反应在增强剂的存在下来进行。

[0006] 尽管已经采用诸如如上所述的那些方法来增加由测定获得的信号,但是由这些方法获得的结果表明信号放大被相应的背景信号放大损伤。因此,存在对于可产生最佳结果而不产生相应的背景信号的增加的信号放大的持续需求。

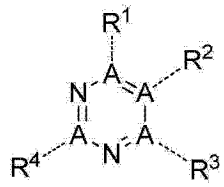
发明内容

[0007] 本发明涉及用于通过在邻近处沉积标记物来检测样品中的靶标的方法,包括:使得样品与识别溶液接触,所述识别溶液包含对于靶标具有特异性的特异性结合部分;将所述特异性结合部分用酶标记;使得样品与检测溶液接触,所述检测溶液包含酶底物,以使得所述标记物在沉积增强剂的存在下沉积在邻近靶标处,所述沉积增强剂具有式:

[0008] 

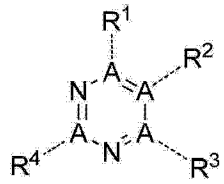
[0009] 其中 R^1、R^2、R^3和 R^4独立选自脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分和氢；R^1和/或者 R^3可结合至 R^2以形成稠合的芳族环系；R^5为含有杂原子的部分；A 选自碳原子、除了硫之外的杂原子及其任何组合；n 为 1-5；以及检测所述标记物。关于该方法，使得样品与检测溶液接触可包括使用氧化剂酶促氧化所述酶底物以形成所述标记物。在具体公开的实施方案中，使用氧化剂酶促氧化酶底物包括降低所述酶底物的可溶性或者稳定性，以使得所述酶底物变成作为标记物来沉积。

[0010] 在具体公开的实施方案中，所述酶底物选自色原体和酪酰胺－缀合物且所述沉积增强剂可具有式：

[0011] 

[0012] 其中 R^1、R^2、R^3和 R^4选自氢和羟基且每个 A 为碳原子。在某些公开的实施方案中，R^1、R^3和 R^4为氢且 R^2为羟基。

[0013] 沉积增强剂的其它实例包括具有下式的那些：

[0014] 

[0015] 其中 R^1、R^2和 R^3独立选自烷基、烯基、炔基、氢、碘、溴、氯、氟及其组合。

[0016] 具体公开的实施方案涉及使用酶，其可为氧化还原酶或者过氧化物酶。此外，所述酶可选自辣根过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶和微氧化酶（microoxidase）。公开的特异性结合部分典型地包含抗体或者核酸。

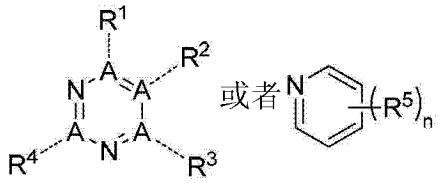
[0017] 关于所公开的方法，在沉积增强剂的存在下在邻近靶标处沉积所述标记物包括浓度范围为约 5mM 至约 15mM 的沉积增强剂。

[0018] 在具体公开的实施方案中，所述酶底物可选自 1,3-二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咔唑、四甲基联苯胺、荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵、罗丹明或其衍生物。更典型地，所述酶底物为酪胺衍生物。

[0019] 当所述样品与检测溶液接触时，典型地将其暴露至浓度范围为大于 0mM 至约 8mM 的酶底物。此外，所述检测溶液可进一步包含促进剂，其选自杂芳基化合物、硼酸、酚化合物或其组合。所述杂芳基化合物可选自咪唑、L-组氨酸、吡啶 N-氧化物、嘧啶 N-氧化物、N-甲基吗啉氧化物、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基。此外，所述检测溶液可进一步包

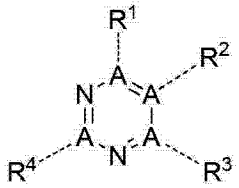
含非离子型表面活性剂，其选自聚氧乙烯月桂基醚，其具有式 $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$；聚氧乙烯(20)山梨聚糖单烷基化物，所述单烷基化物包含 8-14 个碳；直链仲醇聚氧乙烯，其具有式 $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O]_x$，其中 x 等于 2-12 的整数；和聚氧乙烯辛基苯基醚。在具体公开的实施方案中，所述检测溶液可进一步包含抗氧化剂，其选自硫酸氢钠、锡酸钠、偏硫酸氢钠及其组合，和/或者含有组 I 或者组 II 金属的盐，其具有式 MX_2 或者 MX，其中 M 为组 I 或者组 II 金属，其选自锂、钠、钾、铯、钙、镁、锶和钡；且 X 选自氟化物、氯化物、溴化物、碘化物、碳酸盐、氢氧化物和磷酸盐。

[0020] 本公开还涉及用于通过在邻近处沉积标记物来检测样品中的靶标的组合物，包含沉积增强剂和酶底物，所述沉积增强剂具有式：

[0021] 

[0022] 其中 R^1、R^2、R^3 和 R^4 独立选自脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分和氢；R^1 和/或者 R^3 可结合至 R^2 以形成稠合的芳族环系；R^5 为含有杂原子的部分；A 选自碳原子、除了硫之外的杂原子及其任何组合；n 为 1-5。

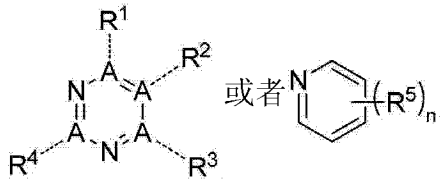
[0023] 在某些公开的实施方案中，所述沉积增强剂具有式：

[0024] 

[0025] 其中 R^1、R^2、R^3 和 R^4 选自脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分和氢；R^1 和/或者 R^3 可结合至 R^2 以形成稠合的芳族环系；A 选自除了硫之外的杂原子、碳原子及其组合。典型地，所述沉积增强剂可具有范围为约 5mM 至约 15mM 的浓度且所述酶底物具有范围为大于 0mM 至约 8mM 的浓度，其中所述酶底物选自 1,3-二氨基联苯胺、3-氨基-9-乙基咔唑、四甲基联苯胺、荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵、罗丹明、酪酰胺或其衍生物。

[0026] 在具体公开的实施方案中，所述组合物可进一步包含促进剂，其选自杂芳基化合物、硼酸、酚化合物或其组合；非离子型表面活性剂，其选自 Brij® 35、TWEEN®、Tergitol™ 和 Triton ™；和抗氧化剂，其选自硫酸氢钠、锡酸钠、偏硫酸氢钠及其组合。

[0027] 本申请还公开了试剂盒，包含检测溶液，所述检测溶液包含沉积增强剂和酶底物，所述沉积增强剂具有式：

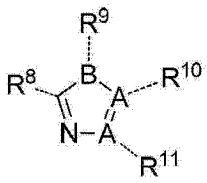
[0028] 

[0029] 其中 R^1、R^2、R^3 和 R^4 独立选自脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分和氢；R^1 和/或者 R^3 可结合至 R^2 以形成稠合的芳族环系；R^5 为含有杂原子的部分；A 选自碳原子、除了

硫之外的杂原子及其任何组合；n 为 1-5。

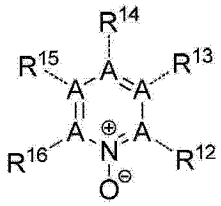
[0030] 在具体的实施方案中，所述杂芳基化合物具有下式：

[0031]



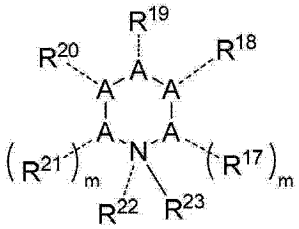
[0032] 和 / 或者下式：

[0033]



[0034] 和 / 或者下式：

[0035]

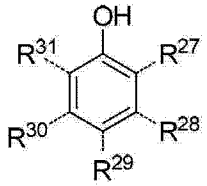


[0036] 其中 R^8-R^{22}独立为脂族基团、芳基卤素、含有杂原子的部分、氢或者其任何组合；R^{23}为 $[O]^{\cdot}$或者 $[O]^{-}$；A 为碳原子、除了硫之外的杂原子或者其任何组合；B 为氧、碳或者氮；且 m 为 0-2。卤素可选自碘、溴、氯或者氟，且含有杂原子的部分可选自羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺、NR^6R^7，其中 R^6和 R^7独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。在具体的实施方案中，R^{17}和 R^{21}各自包含甲基且 m 为 2。示例性杂芳基化合物包括但不限于咪唑、L- 组氨酸、吡啶 N- 氧化物、嘧啶 N- 氧化物、N- 甲基吗啉氧化物和 2,2,6,6- 四甲基哌啶 -1- 氧基。

[0037] 在具体的实施方案中，任选的增强剂为含有硼的化合物诸如有机硼酸。示例性有机硼酸包括但不限于硼酸。

[0038] 在具体的实施方案中，任选的增强剂为具有下式的酚化合物：

[0039]



[0040] 其中 R^{27}、R^{28}、R^{29}、R^{30}和 R^{31}可独立选自氢、脂族基团、芳基、含有杂原子的部分或者其任何组合。所述含有杂原子的部分为羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺和 NR^5R^6，其中 R^5和 R^6独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基及其任何组

合。在具体的实施方案中，选自 R^{27}、R^{28}、R^{29}、R^{30}和 R^{31}的任何两个相邻基团可结合以形成稠合的芳族或者非芳族环系。示例性酚化合物包括但不限于焦邻苯二酚。

[0041] 在具体的实施方案中，本发明方法可进一步包括：将特异性结合部分－酶缀合物固定化在样品中的靶标上；使得样品与包含酪酰胺－半抗原缀合物的溶液接触；使得样品与增强溶液接触；使得样品与氧化剂接触；和通过检测酪酰胺－半抗原缀合物来定位样品中的靶标。在具体的实施方案中，检测酪酰胺－半抗原缀合物进一步包括：使得样品与抗半抗原抗体和可检测部分接触，所述抗半抗原抗体能够识别和结合至酪酰胺－半抗原缀合物，且所述可检测部分能够利用沉积或者荧光技术来检测；以及检测所述可检测部分。在具体的实施方案中，所述酪酰胺－半抗原缀合物包含直接与酪酰胺缀合或者经接头与酪酰胺缀合的半抗原。典型地，所述接头为脂族基团或者杂脂族基团。

[0042] 本公开的上述内容和特征以及优势将根据下述详细内容而变得更加清楚明白，其由参照随附的附图来实现。

附图说明

[0043] 图1为数字图像，其显示使用标准ultraView™检测试剂盒对扁桃体组织上的bcl2的IHC染色。

[0044] 图2为数字图像，其显示对扁桃体组织上的bcl2的IHC染色，使用10mM咪唑作为在二氨基联苯胺(DAB)染色溶液中的基础缓冲液。

[0045] 图3为图示，其显示4-乙酰基氨基苯基硼酸对于HRP氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0046] 图4为图示，其显示咪唑对于辣根过氧化物酶(HRP)氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0047] 图5为图示，其显示L-组氨酸对于HRP氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0048] 图6为图示，其显示硼酸对于HRP氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0049] 图7为图示，其显示嘧啶对于HRP氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0050] 图8为图示，其显示2-羟基嘧啶对于HRP氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0051] 图9为图示，其显示潜在的增强剂对于HRP氧化的DAB的表观 V_{max}的影响（当先后加入至ultraView™检测试剂盒时）。氧化的DAB的光密度在455nm监测。

[0052] 图10为bcl2（扁桃体）组织的ultraView™DAB染色的数字图像，使用基于10mM咪唑的DAB色原体溶液。

[0053] 图11为bcl2组织的ultraView™DAB染色的数字图像，使用基于10mM L-组氨酸的DAB色原体溶液。

[0054] 图12为bcl2组织的ultraView™DAB染色的数字图像，使用基于10mM L-组氨酸中的10mM嘧啶-N-氧化物的DAB色原体溶液。

[0055] 图13为bcl2组织的ultraView™DAB染色的数字图像，使用基于10mM L-组氨酸

中的 10mM2- 羟基嘧啶的 DAB 色原体溶液。

[0056] 图 14-17 为使用标准 VMSI ultraView™检测试剂盒对扁桃体组织上的 bcl2 的 IHC 染色的数字图像，含有或者不含有 DAB" 增强溶液 "。DAB 增强溶液 :图 14 :无增强 ;图 15 :100mM 咪唑、50mM 硼酸 ;图 16 :50mM L- 组氨酸、10mM 嘧啶 ;图 17 :10mM L- 组氨酸、10mM2- 羟基吡啶、10mM 氯化钙、10mM 硼酸。对于信号 / 背景的病理学评分为 :图 14,3.75/0.5 ;图 15,4.0/0.75 ;图 16,4+/0.5 ;图 17,4/0.5。

[0057] 图 18 为图示，其显示咪唑和 L- 组氨酸 DAB 色原体溶液对于 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max}的影响（当与 10mM 嘧啶组合时）。氧化的 DAB 的光密度在 455nm 监测。

[0058] 图 19 为图示，其显示咪唑和 L- 组氨酸 DAB 色原体溶液对于 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max}的影响（当与 10mM2- 羟基嘧啶、10mM 硼酸和 10mM 氯化钙组合时）。氧化的 DAB 的光密度在 455nm 监测。

[0059] 图 20 为图示，其显示增强剂对于 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max}的影响（当与 50mM 咪唑、10mM 氯化钙和 10mM 硼酸组合时）。氧化的 DAB 的光密度在 455nm 监测。

[0060] 图 21 为对 HER-2 阳性 CaLu3 癌细胞系的 HER-23-in-1 小鼠异种移植物上的 HER-2 探针的 DAB ISH 染色的数字图像，使用 ultraView™检测系统。

[0061] 图 22 为对 HER-2 阳性 CaLu3 癌细胞系的 HER-23-in-1 小鼠异种移植物上的 HER-2 探针的 DAB ISH 染色的数字图像，使用 DAB 色原体溶液和 10mM L- 组氨酸增强。

[0062] 图 23-26 为对扁桃体组织上的 bcl2 的 IHC 染色的数字图像，使用具有或者不具有 HRP 氧化对于酪酰胺和 DAB 沉积的增强作用的酪酰胺放大系统。图 23 :对于酪酰胺或者 DAB 沉积无增强作用 ;图 24 :未增强的酪酰胺沉积，增强的 DAB 沉积 ;图 25 :增强的酪酰胺沉积，未增强的 DAB 沉积 ;图 26 :增强的酪酰胺和 DAB 沉积。

[0063] 图 27-28 为对扁桃体组织上的 bcl2 的 IHC 染色的数字图像，使用对于酪酰胺沉积的含有 10mM2- 羟基嘧啶的酪酰胺放大系统（图 27）和不具有 HRP 氧化的增强作用（图 28）。

[0064] 图 29 为使用 18s 核糖核酸探针对 CaLu-3 异种移植物组织上的 18s 核糖体的 ISH 染色的数字图像，以及增强的 DAB（含有 10mM2- 羟基吡啶和 10mM L- 组氨酸）。

[0065] 图 30 为使用 18s 核糖核酸探针对 CaLu-3 异种移植物组织上的 18s 核糖体对的 ISH 染色的数字图像，且无增强作用。

[0066] 图 31 为使用半抗原化的 HPV 探针对 CaSki 异种移植物组织上的 HPV 的 IHC 染色的数字图像，以及增强的 DAB（含有 10mM2- 羟基吡啶和 10mM L- 组氨酸二者）。

[0067] 图 32 为使用半抗原化的 HPV 探针对 CaSki 异种移植物组织上的 HPV 的 IHC 染色的数字图像，且无增强作用。

[0068] 图 33 为使用半抗原化的 HPV 探针对 HeLa 异种移植物组织上的 HPV 的 IHC 染色的数字图像，以及增强的 DAB（含有 10mM2- 羟基吡啶和 10mM L- 组氨酸二者）。

[0069] 图 34 为使用半抗原化的 HPV 探针对 HeLa 异种移植物组织上的 HPV 的 IHC 染色的数字图像，且无增强作用。

[0070] 图 35 为使用半抗原化的 HPV 探针对 C33 异种移植物组织上的 HPV 的 IHC 染色的数字图像，以及增强的 DAB（含有 10mM2- 羟基吡啶和 10mM L- 组氨酸二者）。

[0071] 图 36 为使用半抗原化的 HPV 探针对 C33 异种移植物组织上的 HPV 的 IHC 染色的

数字图像，且无增强作用。

[0072] 图 37 为使用抗 CD20 探针对扁桃体组织上的 CD20 的 IHC 染色的数字图像，以及增强的 DAB（含有 10mM2- 羟基吡啶和 10mM L- 组氨酸二者）。

[0073] 图 38 为使用抗 CD20 探针对扁桃体组织上的 CD20 的 IHC 染色的数字图像，且无增强作用。

[0074] 图 39 为使用抗 CD20 探针对扁桃体组织上的 CD20 的 IHC 染色的数字图像，以及增强的 AEC 沉积（使用 50mM L- 组氨酸和 10mM2- 羟基吡啶）。

[0075] 图 40 为使用抗 CD20 探针对扁桃体组织上的 CD20 的 IHC 染色的数字图像，且无增强作用。

[0076] 图 41 为使用抗 Ki67 探针对扁桃体组织上的 Ki67 的 IHC 染色的数字图像，以及增强的 AEC 沉积（使用 50mM L- 组氨酸和 10mM2- 羟基吡啶）。

[0077] 图 42 为使用抗 Ki67 探针对扁桃体组织上的 Ki67 的 IHC 染色的数字图像，且无增强作用。

[0078] 图 43-46 为对扁桃体组织上的 bcl2 的 IHC 染色的数字图像，使用具有或者不具有 HRP 氧化针对酪酰胺和 DAB 沉积的增强作用的酪酰胺放大系统。图 43 ：无酪酰胺或者 DAB 沉积的增强作用 ；图 44 ：未增强的酪酰胺沉积，增强的 DAB 沉积 ；图 45 ：增强的酪酰胺沉积，未增强的 DAB 沉积 ；图 46 ：增强的酪酰胺和 DAB 沉积。

[0079] 详述

[0080] I. 引言

[0081] 疾病诸如癌症可通过众多不同的方法来诊断。一种方法用于鉴定生物标记物诸如癌症生物标记物于组织或者细胞中的存在，所述生物标记物与特定癌症类型相关或者被认为与之相关。免疫组织化学通常用于靶向与特定类型的癌症相关的蛋白质生物标记物，而原位杂交技术通常用于靶向与特定类型的癌症相关的核酸序列。

[0082] 用于靶标鉴定的免疫组织化学和原位杂交方法在研究应用中以及对于临床医师例如针对诊断和 / 或者预后目的而言变得日益重要。然而，这些技术可能被由检测部分发射的可检测信号所限制，所述检测部分相互影响或者沉积在存在于组织样品中或者被认为存在于组织样品中的靶标分子上，所述靶标分子诸如蛋白质和 / 或者核酸靶标分子。理论上讲，增加获得的信号的一种方式为增加可检测部分在靶标分子上的沉积，例如通过增加沉积速率，以使得可在更短时间内获得更大的信号。

[0083] 如本申请所披露，DAB 色原体的新制剂发挥协同作用以在 IHC 或者 ISH 组织染色过程中提供最大化的 DAB 沉积。DAB 色原体的新制剂采用有机增强剂作为缓冲盐与多种有机 / 无机增强剂和表面活性剂组合，以协同性最大化 DAB 沉积以及由此的信号。本申请还披露了使用所披露的制剂来增强 IHC 和 / 或者 ISH 组织染色的方法。

[0084] 本申请所述的方法用于诊断学，其中由所披露的方法所提供的结果不仅用于诊断，还用于确定最佳处理以及跟踪所述处理的进程和成功状态（在临床环境下）。

[0085] II. 术语

[0086] 除非另作说明，否则技术术语根据常规用法来使用。分子生物学的常规术语的定义可出现于 Benjamin Lewin, Genes VII, published by Oxford University Press, 2000 ; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular

Biology,published by Blackwell Publishers,1994) ;Robert A.Meyers(ed.),Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference,published by Wiley,John&Sons,Inc.,1995 ; 和 George P.Rédei,Encyclopedic Dictionary of Genetics,Genomics,and Proteomics,2nd Edition,2003 中。

[0087] 单数形式“一个”、“一种”和“所述”是指一个或者多于一个 / 种,除非本说明另作明确说明。例如,术语“包括一个 / 种细胞”包括单个 / 种或者多个 / 种细胞且认为该术语相当于短语“包括至少一个 / 种细胞”。术语“或者”是指所述可选择要素中的单个要素或者两个或者更多个要素的组合,除非本说明另作明确说明。波浪线(“~~”)用于表示键的断开,且虚线 (“---”) 用于表示可在特定位置形成键。

[0088] 尽管类似于或者等于本申请所述的方法和材料可用于实施或者测试披露的技术,但是适当的方法和材料如下所述。所述材料、方法和实施例仅作为示例说明而不意在限制。

[0089] 提供术语和方法的以下解释以更好地描述本公开以及指导本领域技术人员来实施本公开。

[0090] 脂族基团 :包括烷基、烯基、炔基、卤化烷基和环烷基的部分。“低级脂族基团”为支化或者非支化脂族基团,其具有 1-10 个碳原子。该术语涵盖取代的脂族基团化合物、饱和的脂族基团化合物以及不饱和的脂族基团化合物。

[0091] 烷基 :1-24 个碳原子的支化或者非支化烃基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十四烷基、十六烷基、二十烷基、二十四烷基等。“低级烷基”为具有 1-10 个碳原子的饱和支化或者非支化烃。术语“卤化烷基”或者“卤代烷基”是指如上定义的烷基,其中存在于这些基团中的一个或者多个氢原子用卤素 (F、Cl、Br、I) 取代。术语“环烷基”是指由至少三个碳原子构成的非芳族碳环。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

[0092] 术语“杂环烷基”为这样的环烷基,其中所述环的至少一个碳原子用杂原子诸如但不限于氮、氧、硫或者磷取代。任选取代的基团诸如“取代的烷基”描述了如下基团,诸如这样的烷基,其具有 1-5 个取代基,典型地 1-3 个取代基,所述取代基选自烷氧基、任选取代的烷氧基、酰基、酰基氨基、酰基氧基、氨基、氨基酰基、氨基酰基氧基、芳基、羧基烷基、任选取代的环烷基、任选取代的环烯基、任选取代的杂芳基、任选取代的杂环基、硫醇、巯基和硫基烷氧基。

[0093] 放大 :放大是指使得信号更强的作用或者结果。放大可为信号强度的增加和 / 或者信号相对于背景的增加,例如增加的信噪比。

[0094] 抗体 :统指特异性结合感兴趣的分子 (或者一组高度相似的感兴趣的分子) 的免疫球蛋白或者免疫球蛋白样分子 (作为实例且不限于 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM 及其组合,以及在任何脊椎动物例如哺乳动物诸如人、山羊、兔和小鼠中的免疫应答过程中产生的相似分子) 以及抗体片段,这基本上排除了与其它分子的结合 (例如,抗体和抗体片段,其具有如下的针对感兴趣的分子的结合常数 :大于生物样品中的其它分子的结合常数至少 10^3M^{-1}、至少 10^4M^{-1}或者至少 10^5M^{-1})。

[0095] 更具体地,“抗体”是指包含特异性识别且结合抗原表位的至少一个轻链或者重链免疫球蛋白可变区的多肽配体。抗体可由重链和轻链构成,其各自具有可变区,称为可变重 (V_H) 区和可变轻 (V_L) 区。所述 V_H区和 V_L区一起对于结合由抗体识别的抗原起作用。

[0096] 抗体包括本领域熟知的完整的免疫球蛋白及其变体和部分。抗体片段包括蛋白水解抗体片段［诸如本领域已知的 $F(ab')_2$ 片段、Fab' 片段、Fab'-SH 片段和 Fab 片段］、重组抗体片段（诸如 sFv 片段、dsFv 片段、双特异性 sFv 片段、双特异性 dsFv 片段、$F(ab)'_2$ 片段、单链 Fv 蛋白（"scFv"）、二硫化物稳定的 Fv 蛋白（"dsFv"）、双抗体和三抗体（本领域已知），以及骆驼类 (camelid) 抗体（参见例如，美国专利 6,015,695 ;6,005,079 ;5,874,541 ;5,840,526 ;5,800,988 ;和 5,759,808）。scFv 蛋白为融合蛋白，其中免疫球蛋白的轻链可变区和免疫球蛋白的重链可变区通过接头结合，而在 dsFv 中，上述链已经突变为引入二硫键以稳定所述链的缔合。该术语也包括遗传工程的形式诸如嵌合体抗体（例如，人化鼠类抗体）、异源缀合抗体（诸如双特异性抗体）。也可参见 Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) ;Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman&Co., New York, 1997。

[0097] 典型地，天然存在的免疫球蛋白具有通过二硫键相互连接的重链和轻链。存在两型轻链，即 λ 和 κ。存在确定抗体分子的功能活性的五类主要重链（或者同种型）：IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。

[0098] 每个重链和轻链含有恒定区和可变区；所述区也称为"域"。组合来讲，重链和轻链可变区特异性结合抗原。轻链和重链可变区含有由三个高变区（也称为"互补决定区"或者"CDR"）间断的"框架"区域。已经确定了框架区和 CDR 的范围（参见 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991）。Kabat 数据库目前保持在线。不同轻链或者重链的框架区的序列在一个物种内是相对保守的。抗体的框架区（即组成性轻链和重链的组合的框架区）用于使得 CDR 定位且排列在三维空间中。

[0099] CDR 主要对于结合至抗原表位起作用。每个链的 CDR 通常称为 CDR1、CDR2 和 CDR3，其起始于 N- 末端来顺序编号，且通常也通过其中定位具体 CDR 的链来鉴定。因此，V_HCDR3 定位于发现它的抗体的重链的可变域，而 V_LCDR1 为来自发现它的抗体的轻链的可变域的 CDR1。

[0100] 抗原：刺激免疫应答的分子。抗原通常为蛋白质或者多糖。表位为抗原决定簇，其由导致特异性免疫应答的分子上的化学基团或者肽序列构成。抗体结合特定抗原或者表位。抗体与特定抗原或者抗原表位的结合可用于定位抗原在例如生物样品中或者生物样品上的位置，或者确定所述特定抗原是否存在于生物样品中。感兴趣的抗原为这样的抗原，其中设计 IHC 测定以在测试样品中检测所述抗原。例如，为了检测感兴趣的抗原，在 IHC 测定中使用的一抗特异性结合至感兴趣的抗原。

[0101] 表位为靶标分子（例如抗原，诸如蛋白质或者核酸分子）上的位点，其中抗原结合分子（例如抗体、抗体片段、含有抗体结合区的支架蛋白或者适体）结合至所述位点。表位可由靶标分子（例如蛋白质 - 蛋白质界面）的连续的或者并列而非连续的残基（例如氨基酸或者核苷酸）形成。由连续的残基（例如氨基酸或者核苷酸）形成的表位通常在暴露于变性溶剂时得以保持，而通过三级折叠形成的表位通常在使用变性溶剂处理时丧失。表位通常包含至少 3 个且更通常至少 5 或者 8-10 个残基（例如氨基酸或者核苷酸）。典型地，表位的长度也小于 20 个残基（例如氨基酸或者核苷酸），诸如小于 15 个残基或者小于 12 个残基。

[0102] 芳族：描述具有不饱和键、孤电子对或者空轨道的共轭环的术语，其展现出强于由共轭单独的稳定作用所预期的稳定性。其也可认为是环离域作用以及共振的表现。

[0103] 芳基：作为键合于其它基团特别是其它有机基团的取代基的基本上基于烃的芳族化合物或者其基团（例如 C_6H_5），其具有例如苯、萘、菲、蒽等的环结构。该术语也涵盖取代的芳基化合物。

[0104] 芳基烷基：作为键合于其它基团特别是其它有机基团的取代基的化合物或者其基团（对于甲苯为 C_7H_7），其含有脂族基团和芳族结构。

[0105] 结合或者稳定结合：两个物质或者分子之间的缔合，诸如特异性结合剂或者部分（例如抗体）与抗原的缔合。

[0106] 结合亲和力：一个分子与另一个分子结合（通常为非共价的）的趋势，诸如特异性结合对的一个成员与特异性结合对的另一个成员的趋势。结合亲和力可作为结合常数来测量，其中对于特异性结合对（诸如抗体/抗原对或者核酸探针/核酸序列对）的结合亲和力可为至少 $1x10^5M^{-1}$，诸如至少 $1x10^6M^{-1}$、至少 $1x10^7M^{-1}$或者至少 $1x10^8M^{-1}$。在一个实施方案中，结合亲和力通过Frankel et al.,Mol.Immunol.,16:101-106,1979所述的Scatchard方法的改良形式来计算。在另外的实施方案中，结合亲和力通过抗原/抗体解离速率来测量。在另外的实施方案中，高结合亲和力通过竞争性放射免疫测定来测量。在若干实例中，对于抗体/抗原对的高结合亲和力为至少约 $1x10^8M^{-1}$。在其它实施方案中，高结合亲和力为至少约 $1.5x10^8M^{-1}$、至少约 $2.0x10^8M^{-1}$、至少约 $2.5x10^8M^{-1}$、至少约 $3.0x10^8M^{-1}$、至少约 $3.5x10^8M^{-1}$、至少约 $4.0x10^8M^{-1}$、至少约 $4.5x10^8M^{-1}$或者至少约 $5.0x10^8M^{-1}$。

[0107] 色原体：能够转化为有色产物诸如色素或者染料的物质。某些色原体为电子供体，其在氧化时变为有色产物。有色产物的产生以及在化学转化诸如氧化后变为不可溶的性质使得色原体可用于IHC。生色化合物的具体实例包括但不限于二氨基联苯胺(DAB)、四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-连氮基-二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐](ABTS)、碘代硝基四唑(INT)、四唑蓝和四唑紫。

[0108] DAB为产生在醇和其它有机溶剂中为高度不可溶的棕色终末产物的色原体。在一些实例中，DAB为酶诸如HRP的底物。

[0109] 足以检测的条件：产生期望活性的任何环境，例如，使得探针结合靶标以及相互作用得以检测的任何环境。例如，所述条件包括适当的温度、缓冲溶液和检测手段诸如显微镜和数字成像装备。

[0110] 接触：允许例如均为固体形式和/或者液体形式的两个或者更多个部分之间的缔合特别是直接物理缔合的排布（例如，生物样品诸如附着于载玻片的生物样品与组合物诸如含有本申请所述的组合物的溶液接触的排布）。

[0111] 对照：评估测试有效性的样品或者所进行的操作。在一个实例中，对照为性质对照诸如阳性对照。例如，阳性对照为这样的操作或者样品诸如组织或者细胞，其与实际测试样品相似，但由先前经验获知获得阳性结果的。阳性对照证实该测试的基本条件产生阳性结果，即使实际测试样品均不产生所述结果。在具体实例中，阳性对照为由先前测试获知含有怀疑抗原的样品。

[0112] 在其它实例中，对照为阴性对照。阴性对照为由先前经验获知获得阴性结果的操作或者测试样品。阴性对照证实在测试不能产生可测量的阳性结果时所获得的基线结果；

通常将阴性对照的值作为要由测试样品结果中减去的"背景"值来处理。在具体实例中，阴性对照为不包括特定一抗的试剂。其它实例包括校准对照，其为含有已知量的对照抗原的样品。所述校准对照具有预期的信号强度，且因此可用于校准运行间或者运行内染色可变性。

[0113] 缀合物：包含已经经键（通常为共价键或者离子键）连接的两个独立分子的分子。在一些实例中，特异性结合剂或者部分缀合至作用于底物以产生可检测部分或者标记的酶。

[0114] 缀合 / 连接 / 键合 (Conjugating、joining、bonding 或者 linking)：将一个分子与另一个分子连接以产生更大的分子。例如，使得两个多肽成为一个邻接的多肽分子，或者使得半抗原或者其它分子共价连接至多肽诸如 scFv 抗体。该连接可为化学或者重组体方式。"化学方式"是指抗体部分和效应分子之间的反应，以使得在两个分子之间形成共价键以形成一个分子。

[0115] 偶联：术语"偶联"是指直接或者间接地连接在一起。第一个原子或者分子可直接偶联或者间接偶联至第二个原子或者分子。第二抗体提供了间接偶联的实例。间接偶联的一个具体实例为兔抗半抗原一抗，其受到小鼠抗兔 IgG 抗体结合，而后者又受到与可检测标记共价连接的山羊抗小鼠 IgG 抗体结合。

[0116] 衍生物：在化学领域中，衍生物为这样的化合物，其衍生自相似化合物或者可设想为自其它化合物产生的化合物（例如如果一个原子被另外的原子或者一组原子取代）。后一种定义为有机化学领域中常见的。在生物化学领域中，该词语用于至少理论上可由前体化合物形成的化合物。

[0117] 可检测的标记物：可产生表明靶标诸如靶标分子在样品诸如组织样品中的存在和 / 或者浓度的可检测（诸如视觉上、电学方式上等）信号的分子或者物质。当缀合至特异性结合分子时，所述可检测标记物可用于定位和 / 或者定量特异性结合分子所针对的靶标。由此，靶标在样品中的存在和 / 或者浓度可通过检测由可检测标记物产生的信号来检测。可检测标记物可直接或者间接来检测，且缀合至不同特异性结合分子的若干不同可检测标记物可组合使用来检测一种或者多种靶标。例如，第一可检测标记物诸如与对于靶标具有特异性的抗体缀合的半抗原可通过使用第二可检测标记物来间接检测，所述第二可检测标记物缀合至特异性结合所述第一可检测标记物的分子。可分开检测的多个可检测标记物可缀合至特异性结合不同靶标的不同特异性结合分子以提供多重测定，该测定可提供多种靶标在样品中的检测。

[0118] 可检测标记物包括有色的、荧光的、磷光的和发光的分子和物质；将一种物质转化为另一种物质以提供可检测差异的催化剂（诸如酶）（诸如通过将无色物质转化为有色物质或者反之亦然，或者通过产生沉淀物或者增加样品浊度）；可使用额外的可检测标记的抗体缀合物通过抗体 - 半抗原结合相互作用来检测的半抗原；以及顺磁和磁性分子或者物质。可检测标记物的具体实例包括：酶，诸如辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、β - 半乳糖苷酶或者 β - 葡糖醛酸糖苷酶；荧光基团（荧光分子的许多额外实例可出现在 TheHandbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR）；纳米颗粒，诸如量子点（例如美国专利 6,815,064、6,682596 和 6,649,138）；金属螯合物，诸如放射性或者顺磁性金属离子如 Gd^{3+} 的 DOTA 和 DPTA 螯合物；

色原体；和脂质体，例如，含有捕获的荧光分子的脂质体。

[0119] 当可检测标记物包括酶时，可检测底物诸如色原体、荧光化合物或者发光化合物与所述酶组合使用以产生可检测信号（多种所述化合物为可商购得到的，例如来自 Life Technologies, Carlsbad, CA）。

[0120] 可选择地，酶可用于金相检测方案。金相检测方法包括组合使用酶与水溶性金属离子和所述酶的无氧化还原活性底物。所述底物通过所述酶转化为氧化还原活性剂，且所述氧化还原活性剂还原所述金属离子，导致其形成可检测的沉淀物（参见例如，2004 年 12 月 20 日提交的同时待审的美国专利申请 11/015,646、PCT 公开 2005/003777 和美国专利申请公开 2004/0265922）。金相检测方法包括使用酶还原氧化酶（诸如辣根过氧化物酶 (HRP)）以及水溶性金属离子、氧化剂和还原剂，再次用于形成可检测的沉淀物（参见例如美国专利 6,670,113）。

[0121] 洗涤剂或者表面活性剂：降低水的表面张力的物质。具体地，洗涤剂或者表面活性剂为在水 - 油界面浓缩且展现出乳化作用的有表面活性的试剂，即表面活性剂。洗涤剂分为阴离子、阳离子或者非离子洗涤剂，这取决于它们的化学作用方式。非离子洗涤剂经氢键机制起作用。此外，表面活性剂或者洗涤剂降低两液体之间的界面张力。表面活性剂分子通常具有极性或者离子 " 头部 " 和非极性烃 " 尾部 "。在水中溶解后，所述表面活性剂分子凝聚且形成微团，其中非极性尾部朝向内且极性或者离子头部朝向外部含水环境。非极性尾部在所述微团内产生非极性 " 口袋 "。在该溶液中的非极性化合物扣留于由表面活性剂分子形成的口袋中，由此使得非极性化合物保持在水溶液中混合。

[0122] 检测：为了确定试剂（诸如信号或者具体抗原、蛋白质或者核酸）是否存在或不存在于例如样品中。在某些实例中，其可进一步包括定量和 / 或者定位，例如定位于细胞或者具体细胞隔室内。“检测”是指确定某物是否存在或不存在的任何方法，诸如确定靶标分子是否存在于生物样品中。例如，“检测”可包括使用视觉或者机械装置以确定样品是否显示特定特征。在某些实例中，检测是指在视觉上观察探针结合于靶标，或者观察探针并未结合至靶标。例如，光学显微镜检查和其它显微镜手段通常用于检测本申请所述方法的生色沉淀物。

[0123] 电磁辐射：通过电场和磁场强度的同时发生的周期变化而传播的一连串电磁波，其包括无线电波、红外线、可见光、紫外光、X- 射线和 γ 射线。在具体实例中，电磁辐射通过激光发射，其可具有单色性、方向性、相干性、极化和强度的性质。

[0124] 发射或者发射信号：由光源产生的具有具体波长的光。在具体实例中，在荧光基团吸收在其激发波长的光之后，发射信号由所述荧光基团发射。

[0125] 增强（增强 / 增强剂 / 增强作用）：增强剂或者增强试剂为足以增加酶的催化活性的任何化合物或者任何化合物组合（相比于不存在所述化合物的酶活性）。增强剂或者增强试剂也可定义为增加或者加速活性缀合物结合至受体位点的速率的化合物或者化合物组合。增强（增强 / 增强作用 / 增强）为使得酶的催化活性通过增强剂而增加（相比于不包括所述增强剂的方法）的方法。增强（增强 / 增强作用 / 增强）也可定义为增加或者加速活化缀合物结合至受体位点的速率。增强（增强 / 增强作用 / 增强）可在视觉上测量，诸如通过病理学家评分。在具体的实施方案中，评分范围为大于 0 至大于 4，其中较高数字表明更好的视觉检测。更典型地，评分范围为大于 0 至约 4++，诸如 1、1.5、2、2.5、3、3.5、

3.75、4、4+ 和 4++。此外，增强（增强 / 增强作用 / 增强）可通过确定酶的表观 V_{max} 来测量。在具体的实施方案中，术语涵盖表观 V_{max} 值（作为光密度 / 分钟来测量），其范围为大于 0mOD/min 至约 400mOD/min，诸如约 15mOD/min、18mOD/min、约 20mOD/min、约 40mOD/min、约 60mOD/min、约 80mOD/min、约 100mOD/min、约 120mOD/min、约 140mOD/min、约 160mOD/min、约 200mOD/min、约 250mOD/min、约 300mOD/min、约 350mOD/min 和约 400mOD/min。更典型地，所述 Vmax 的范围为大于 0mOD/min 至约 160mOD/min，诸如约 20mOD/min、约 40mOD/min、约 60mOD/min、约 80mOD/min、约 100mOD/min、约 120mOD/min、约 140mOD/min 和约 160mOD/min。此外，增强作用可使用大于 0mM 的任何浓度的增强剂来产生。典型地，增强作用在增强剂为以下浓度范围时产生：大于 0mM 至约 100mM；更典型地约 0.01mM 至约 100mM，诸如约 0.01mM、约 0.02mM、约 0.05mM、约 0.10mM、约 0.20mM、约 0.50mM、约 1.0mM、约 2.0mM、约 3.0mM、约 5.0mM、约 10.0mM、约 20.0mM、约 30.0mM、约 40.0mM、约 50.0mM、约 75.0mM 或者约 100.0mM，诸如约 0.01mM 至约 0.10mM、约 0.05mM 至约 0.50mM、约 0.4mM 至约 1.0mM、约 0.5mM 至约 2.0mM、约 1.0mM 至约 10.0mM、约 5.0mM 至约 50.0mM 和约 20.0mM 至约 100.0mM。

[0126] 激发或者激发信号：必需和 / 或者足以将电子跃迁激发至更高能量水平的具有具体波长的光。在具体实例中，激发为必需和 / 或者足以将荧光基团激发至如下状态的具有具体波长的光：使得荧光基团发射出不同（诸如较长）波长的光（相比于来自激发信号的光的波长）。

[0127] 固定：将细胞和组织成分保持在尽可能接近生命状态且允许它们经历制备性操作而无变化的方法。固定阻滞开始于细胞死亡后的自溶和细菌分解过程，且稳定细胞和组织成分以使得它们经受随后的组织加工阶段，诸如 IHC。

[0128] 组织可通过使用固定剂诸如醛（诸如甲醛、多聚甲醛、戊二醛等）灌注或者浸没在所述固定剂中来固定。其它固定剂包括氧化剂（例如金属离子和络合物，诸如四氧化锇和铬酸）、蛋白质变性剂（例如，乙酸、甲醇和乙醇）、未知机制的固定剂（例如，氯化汞、丙酮和苦味酸）、组合试剂（例如，卡诺依固定剂、乙酰胺甲氧基苯、布安液、B5 固定剂、罗斯曼固定剂和亨德雷液）、微波和混合物（例如，排除体积固定和蒸气固定）。添加剂也可包括在固定剂中，诸如缓冲剂、去污剂、鞣酸、苯酚、金属盐（例如，氯化锌、硫酸锌和锂盐）和镧。

[0129] 在制备针对 IHC 的样品中的最常用固定剂为甲醛，其通常为福尔马林溶液（4% 甲醛在缓冲溶液中，称为 10% 缓冲的福尔马林）的形式。

[0130] 荧光：某种类型的发光，其中原子或者分子吸收能量，然后在其由较高电子状态迁移至较低电子状态时发射可见光。术语 ″荧光″ 限于以下现象：其中能量吸收和发射之间的时间间隔是极其短的。

[0131] 荧光原位杂交 (FISH)：FISH 为用于检测和定位在染色体上存在或者不存在特定 DNA 和 / 或者 RNA 序列的技术。FISH 使用在确定的反应条件下仅结合于染色体的某些部分（其显示了高程度的序列相似性）的荧光标记的探针。FISH 也可用于检测在组织样品中的具体 mRNA 序列。

[0132] 荧光基团：化合物，其在通过暴露至特定刺激诸如确定波长的光而被激发时，发射例如不同波长（诸如较长波长的光）的光（荧光）。

[0133] 荧光基团是更大类别的发光化合物的一部分。发光化合物包括化学发光分子，其不需要特定波长的光发光，而是使用化学能量来源。因此，化学发光分子（诸如水母素）的

使用消除了对于外部电磁辐射来源诸如激光的需求。

[0134] 可在本申请公开的探针中使用的具体荧光基团的实例提供于 Nazarenko 等人的美国专利 5,866,366 中，诸如 4- 乙酰氨基 -4'- 异硫氰基均二苯乙烯 -2,2' 二磺酸、吖啶以及衍生物诸如吖啶和吖啶异硫氰酸盐、5-(2'- 氨基乙基）氨基萘 -1- 磺酸 (EDANS)、4- 氨基 -N-[3- 乙烯基磺酰基）苯基］萘酰亚胺 -3,5 二磺酸盐（萤光黄 VS)、N-(4- 苯胺基 -1- 萘基）马来酰亚胺、邻氨基苯甲酰胺、煌黄、香豆素和衍生物诸如香豆素、7- 氨基 -4- 甲基香豆素 (AMC, 香豆素 120)、7- 氨基 -4- 三氟甲基香豆素（香豆满 151）；四溴四氯荧光素钠；4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (DAPI)；5',5"- 二溴连苯三酚 - 磺酞（溴邻苯三酚红）；7- 二乙基氨基 -3-(4'- 异硫氰基苯基）-4- 甲基香豆素；二亚乙基三胺五乙酸盐；4,4'- 二异硫氰基二氢 - 均二苯乙烯 -2,2'- 二磺酸；4,4'- 二异硫氰基均二苯乙烯 -2,2'- 二磺酸；5-［二甲基氨基］萘 -1- 磺酰氯 (DNS, 丹酰氯）；4- 二甲基氨基苯基偶氮苯基 -4'- 异硫氰酸酯 (DABITC)；曙红和衍生物诸如曙红和曙红异硫氰酸盐；赤藓红和衍生物诸如赤藓红 B 和赤藓红异硫氰酸盐；乙啡啶；荧光素和衍生物诸如 5- 羧基荧光素 (FAM)、5-(4,6- 二氯三嗪 -2- 基）氨基荧光素 (DTAF)、2'7'- 二甲氧基 -4'5'- 二氯 -6- 羧基荧光素 (JOE)、荧光素、荧光素异硫氰酸盐 (FITC) 和 QFITC(XRITC)；荧光胺；IR144；IR1446；孔雀绿异硫氰酸盐；4- 甲基伞形酮；邻甲酚酞；硝基酪氨酸；副蔷薇苯胺；酚红；B- 藻红蛋白；邻苯二醛；嵌二萘和衍生物诸如嵌二萘、嵌二萘丁酸盐和 1- 嵌二萘丁酸琥珀酰亚氨酯；反应红 4(CIBACRON™ 亮红 3B-A)；罗丹明和衍生物诸如 6- 羧基 -X- 罗丹明 (ROX)、6- 羧基罗丹明 (R6G)、丽丝胺罗丹明 B 磺酰氯、罗丹明 (Rhod)、罗丹明 B、罗丹明 123、罗丹明 X 异硫氰酸盐、磺酰罗丹明 B、磺酰罗丹明 101 和磺酰罗丹明 101 的磺酰氯衍生物（德克萨斯红）；N,N,N',N'- 四甲基 -6- 羧基罗丹明 (TAMRA)；四甲基罗丹明；四甲基罗丹明异硫氰酸盐 (TRITC)；核黄素；玫红酸和铽螯合物衍生物；LightCycler Red640；Cy5.5；和 Cy5。

[0135] 半抗原：分子，典型为小分子，其可特异性与抗体结合，但典型地基本上不能产生免疫性的（除了与载体分子组合之外）。半抗原的实例包括但不限于荧光素、生物素，硝基芳基化合物包括但不限于二硝基酚 (DNP)、异羟基洋地黄毒苷元、噁唑、吡唑、噻唑、苯并呋喃、三萜、脲、硫脲、拟鱼藤酮、香豆素和环木脂体。

[0136] 异双功能：交联剂在各个末端含有至少两个不同的反应基团，其对于众多基团具有反应性，所述基团包括但不限于巯基和胺，且其在两个或者更多个分子之间，例如在特异性结合剂或者部分（诸如抗体）和酶（诸如 HRP) 之间产生化学共价键。

[0137] 杂交：在 DNA、RNA 或者 DNA 和 RNA 之间的两个链的互补区域之间形成碱基对，由此形成双链分子。导致特定严格程度的杂交条件将取决于杂交方法的性质以及杂交核酸序列的组成和长度而变化。一般而言，杂交的温度以及杂交缓冲剂的离子强度（诸如 Na^+ 浓度）将确定杂交的严格性。关于获得特定严格程度的杂交条件的计算在 Sambrook et al.,(1989)Molecular Cloning,second edition,Cold Spring Harbor Laboratory,Plainview,NY(chapters9and11) 中讨论。

[0138] 免疫组织化学 (IHC)：通过检测抗原与特异性结合剂或者部分诸如抗体的相互作用来确定抗原在样品中的存在或者分布的方法。包含抗原（诸如靶标抗原）的样品与抗体在允许抗体 - 抗原结合的条件下孵育。抗体 - 抗原结合可通过将可检测标记物缀合至抗体的手段（直接检测）或者通过将可检测标记物缀合至二抗（其针对一抗产生）的手段（例

如间接检测）来检测。可检测标记物包括但不限于放射性同位素、荧光染料（诸如荧光素、荧光素异硫氰酸盐和罗丹明）、酶和生色分子。

[0139] 原位杂交(ISH)：某种类型的杂交，其使用标记的互补性DNA或者RNA链（即探针）以定位在组织（原位）的部分或者切片中或者在全部组织（全组织标本包埋ISH）中(条件是所述组织足够小（例如植物种子、果蝇胚胎）的特定DNA或者RNA序列，。这与免疫组织化学是不同的，其定位组织切片中的蛋白质。DNA ISH可用于确定染色体的结构，诸如用于医学诊断以评估染色体完整性。RNA ISH(杂交组织化学）用于测量和定位在组织切片或者全组织标本包埋中的mRNA和其它转录物。

[0140] 对于杂交组织化学，通常处理样品细胞和组织以适当固定靶标转录物且增加探针向靶标分子的接入。如上所述，所述探针为标记的互补性DNA或者互补性RNA(核糖核酸探针）。所述探针在升高的温度与靶标序列杂交，然后将过量的探针洗掉（在存在未杂交的过量的RNA探针的情况下，在先前使用RNA酶的水解之后）。可操作溶液参数诸如温度、盐和/或者洗涤剂浓度以除去任何非全同的相互作用（即仅精确序列配对将保持结合）。然后，已经有效地使用诸如放射性-、荧光-或者抗原-标记的碱基（例如异羟基洋地黄毒苷元）进行标记的标记探针分别使用放射自显影术、荧光显微术或者免疫组织化学在组织中定位且可能地定量。

[0141] 接头：如在本申请中使用，接头为定位于两个部分之间的分子或者一组原子。典型地，接头为双官能的，即接头在各个末端包含官能团，其中所述官能团用于使得所述接头与两个部分偶联。两个官能团可为相同的，即同双官能接头，或者可为不同的，即异双官能接头。

[0142] 接头肽：在抗体结合片段（诸如Fv片段）内用于将可变重链间接键合至可变轻链的肽。“接头”也可指用于将靶向部分诸如scFv连接至效应分子诸如细胞毒素或者可检测标记物的肽。

[0143] 感兴趣的分子或者靶标分子：有待确定其存在、定位和/或者浓度的分子。感兴趣的分子的实例包括存在于组织样品中的蛋白质和核酸序列。

[0144] 多重、多重的、多重化：本公开的实施方案允许使用多种不同缀合物来基本上同时或者先后(如期望的)检测样品中多种靶标。多重化可包括以单独形式以及任何和所有组合的形式来鉴定和/或者定量一般而言的核酸、DNA、RNA、肽、蛋白质。多重化也可包括在细胞中在其解剖学环境下检测两种或者多种基因、信使和蛋白质。

[0145] 瘤形成和肿瘤：异常和不受控细胞生长的过程。瘤形成为增殖性病症的一个实例。

[0146] 瘤形成的产物为新生物（肿瘤），其为由过度细胞分裂导致的异常组织生长。不转移的肿瘤称为“良性”。侵袭周围组织和/或者可转移的肿瘤称为“恶性”。血液性肿瘤的实例包括白血病，包括急性白血病（诸如急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、急性骨髓性白血病和成髓细胞白血病、前髓细胞性白血病、骨髓单核细胞白血病、单核细胞白血病和红白血病）、慢性白血病（诸如慢性髓细胞性（粒细胞性）白血病、慢性骨髓性白血病和慢性淋巴细胞性白血病）、真性红细胞增多、淋巴瘤、何杰金病、非何杰金淋巴瘤（无痛和高级别形式）、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、重链病、骨髓增生异常综合征、毛细胞性白血病和脊髓发育不良。

[0147] 实体瘤诸如肉瘤和癌瘤的实例包括纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨

肉瘤和其它肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、淋巴样恶性肿瘤、胰腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髓样癌、乳头状甲状腺癌、嗜铬细胞瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝瘤、胆管癌、绒毛膜癌、维尔姆斯肿瘤、子宫颈癌、睾丸肿瘤、精原细胞瘤、膀胱癌和 CNS 肿瘤（诸如神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤和视网膜母细胞瘤）。

[0148] 寡核苷酸：经天然磷酸二酯键连接的多个连接的核苷酸，其长度为约 6 至约 300 个核苷酸。寡核苷酸类似物是指与寡核苷酸功能类似但具有非天然存在部分的部分。例如，寡核苷酸类似物可含有非天然存在部分诸如改变的糖部分，或者糖间连接诸如硫代磷酸酯寡聚脱氧核苷酸。天然存在的多核苷酸的功能类似物可结合于 RNA 或者 DNA，且包括肽核酸分子。

[0149] 具体的寡核苷酸和寡核苷酸类似物可包含长度为多至约 200 个核苷酸的线性序列，例如长至少 6 个碱基，例如至少 8、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100 或者甚至 200 个碱基，或者约 6 至约 50 个碱基，例如约 10-25 个碱基，诸如 12、15 或者 20 个碱基的序列（诸如 DNA 或者 RNA）。

[0150] 探针：连接至可检测标记物或者报道分子的分离的核酸、分离的合成的寡核苷酸。典型的标记物包括放射性同位素、酶底物、辅助因子、配体、化学发光剂或者荧光剂、半抗原和酶。用于标记的方法和对选择适于各种目的的标记物的指导在例如 Sambrook et al.(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,CSHL,New York,1989) 和 Ausubel et al.(Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publ.Assoc.and Wiley-Intersciences,1992) 中讨论。

[0151] 本领域技术人员应该认识到具体探针的特异性随着其长度而增大。因此，可选择探针以提供期望的特异性，且可包括至少 17、20、23、25、30、35、40、45、50 或者更多的连续核苷酸的期望的核苷酸序列。在具体实例中，探针可为至少 100、250、500、600 或者 1000 个连续核苷酸的期望的核苷酸序列。

[0152] 多肽：其中单体为经酰胺键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。当氨基酸为 α-氨基酸时，可使用 L-光学异构体或者 D-光学异构体。本申请使用的术语“多肽”或者“蛋白质”意在涵盖任何氨基酸序列且包括修饰的序列诸如糖蛋白。术语“多肽”特别地意在涵盖天然存在的蛋白质，以及以重组体方式或者合成方式产生的蛋白质。

[0153] 术语“残基”或者“氨基酸残基”包括这样的氨基酸，其掺入蛋白质、多肽或者肽中。

[0154] 样品：术语“样品”是指任何液体、半固体或者固体物质（或者材料），在其中或者其上可存在靶标。具体地，样品可为生物样品或者由生物材料获得的样品。生物样品的实例包括组织样品和细胞学样品。在一些实例中，所述生物样品由动物受试者诸如人类受试者获得。生物样品为由任何活体获得、排泄或者分泌的任何固体或者液体样品，所述活体包括但不限于单细胞生物体诸如细菌、酵母、原生动物和阿米巴等，多细胞生物体（诸如植物或者动物，包括来自健康或者表观上健康人类受试者或者人类患者的样品，所述患者患有待诊断或者研究的状况或者疾病，诸如癌症）。例如，生物样品可为由例如血液、血浆、血清、尿、胆汁、腹水、唾液、脑脊液、房水或者玻璃体液或者任何分泌、渗出液、渗出物（例如，

由脓肿或者任何其它感染或者炎症部位获得的流体）获得的生物学液体，或者由关节（例如，正常关节或者患病关节）获得的流体。生物样品也可为由任何器官或者组织（包括活组织检查或者尸体剖检标本，诸如肿瘤活组织检查）获得的样品或者可包括细胞（无论是原代细胞还是培养细胞）或者由任何细胞、组织或者器官条件化的培养基。在一些实例中，生物样品为核提取物。在一些实例中，生物样品为细菌细胞质。在其它实例中，样品为测试样品。例如，测试样品为细胞、组织或者由受试者获得的生物样品所制备的细胞团粒切片。在实例中，受试者具有具体状况或者疾病风险或者已经获得具体状况或者疾病。

[0155] 特异性结合：有关优选结合至确定靶标（诸如对于特定抗原的抗体或者对于特定核酸序列的核酸探针）的试剂的结合的术语。关于抗原，“特异性结合”是指全部或者部分抗体或者其它配体与特定多肽的优先缔合。关于核酸序列，“特异性结合”是指全部或者部分核酸探针于特定核酸序列的优先缔合。

[0156] 特异性结合剂或者部分基本上仅结合至确定的靶标。应该认识的是较小程度的非特异性相互作用可存在于分子，诸如特异性结合剂或者部分，与非靶标多肽或者非靶标核酸序列之间。尽管选择性反应的抗体结合抗原，但是其可在具有低亲和力的情况下结合抗原。抗体与抗原的特异性结合典型地导致与靶标多肽结合的抗体或者其它配体的量（每单位时间）增加大于2倍，诸如大于5倍、大于10倍或者大于100倍（相比于非靶标多肽）。各种免疫测定形式适于选择与特定蛋白质进行特异性免疫反应的抗体。例如，固相ELISA免疫测定通常用于选择与蛋白质进行特异性免疫反应的单克隆抗体。对于可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述，参见Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Publications,New York(1988)。

[0157] 核酸探针与核酸序列的特异性结合通常导致与靶标核酸序列结合的核酸探针的量增加大于2倍，诸如大于5倍、大于10倍或者大于100倍（相比于非靶标核酸）。各种ISH条件适于选择与特定核酸序列进行特异性结合的核酸探针。

[0158] 特异性结合部分或者特异性结合剂：特异性结合对的成员。特异性结合对为具有以下特征的分子对：它们彼此结合以基本上排除与其它分子结合（例如，特异性结合对可具有大于结合对的两个成员中任一个与生物样品中其它分子的结合常数至少10^3M^{-1}、10^4M^{-1}或者10^5M^{-1}的结合常数）。特异性结合部分的具体实例包括特异性结合蛋白（例如，抗体、凝集素、亲合素诸如链霉亲合素以及蛋白A）、核酸序列和蛋白质-核酸。特异性结合部分也可包括受所述特异性结合蛋白特异性结合的分子（或者其部分）。

[0159] 底物：经催化剂诸如酶起作用的分子。在一个实例中，底物为4-氯-1-萘酚(4-CN)或者二氨基联苯胺(DAB)。

[0160] 组织：在生物体内发挥相似功能的相互连接的细胞的集合。

[0161] 酪胺：具有式$C_8H_{11}NO$的化合物，也称为4-(2-氨基乙基）苯酚。

[0162] 酪酰胺：酪胺衍生物，其中酪胺分子的胺官能团已经与含有羰基的官能团形成酰胺键。

[0163] III. 若干实施方案的概述

[0164] A. 组合物

[0165] 本公开的多个方面涉及增强可检测部分在组织样品例如组织切片上的沉积的组合物，所述组织切片诸如针对标记物诸如疾病标记物的存在进行测试的那些。因此，本申请

公开了增强可检测部分在组织样品例如组织切片上的沉积的组合物。增强的沉积提供了容易地检测且鉴定组织样品中的靶标的改善的能力，例如通过改善可检测部分在组织样品上的性质、数量和/或者信噪比。在某些实施方案中，本申请提供的公开的组合物和方法通过提高表观酶氧化率来增加和/或者改善酶周转，且由此增强酶与组合物组分反应的能力且增加可检测部分在特定靶标位点诸如样品中的靶标分子位点的沉积。在所述实施方案中，酶产物为沉积在组织样品上的可检测部分。示例性组合物组分在以下部分中进一步详述。

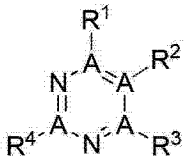
[0166] 1. 增强剂

[0167] 公开的实施方案采用增强剂或者增强溶液以改善酶对于可检测部分沉积的活性，例如在 HRP 的情况下通过提高表观酶反应动力学且由此提高酶底物（诸如 DAB 和 HRP 的生色反应产物）的沉积率。公开的增强剂可在包含其它组合物组分的溶液中使用，或者它们可包含分开的溶液，其中所述溶液分开加入至其它组合物组分中。所述溶液可为水溶液、水可混溶有机溶液或者其任何组合。示例性有机溶液包括但不限于二醇诸如丙二醇、二甲基亚砜、四氢呋喃、二甲基甲酰胺及其任何组合。

[0168] i. 嘧啶和吡啶类似物

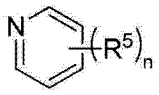
[0169] 公开的组合物的具体实施方案包括增强剂嘧啶类似物和/或者吡啶类似物，其具有以下通式（式 1 和式 2）：

[0170]



[0171] 式 1

[0172]



[0173] 式 2

[0174] 关于式 1，R^1、R^2、R^3和 R^4可独立为脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分和氢。在一些实例中，所述卤素为碘、溴、氯或者氟。在一些实例中，所述含有杂原子的部分为羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺或者 NR^6R^7，其中 R^6和 R^7独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。在一些实例中，R^1和/或者 R^3结合至 R^2以形成稠合环系。在一些实例中，关于式 2，R^5为含有杂原子的部分，诸如羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺或者 NR^6R^7，其中 R^6和 R^7独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。关于式 1，在一些实例中，“A”为杂原子（除了硫之外）、碳原子或者其任何组合。关于式 2，n 为 1 至 5，诸如 1、2、3、4 或者 5，例如 1-2、2-3、3-4、4-5、1-3、2-4、3-5、1-4、2-5 或者 1-5。在具体实例中，A 为碳原子且 n 为 1。包含在公开的组合物中的示例性嘧啶类似物为嘧啶和 2- 羟基嘧啶且示例性吡啶类似物为吡啶和 2- 羟基吡啶。

[0175] 在一些实例中，增强剂存在于溶液中以例如便于由自动化机器分配。在一些实例中，所述增强剂以以下浓度存在于溶液中：约 0.01mM 至约 100mM，诸如约 0.01mM、约

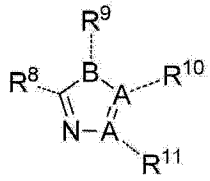
0.02mM、约 0.05mM、约 0.10mM、约 0.20mM、约 0.50mM、约 1.0mM、约 2.0mM、约 3.0mM、约 5.0mM、约 10.0mM、约 20.0mM、约 30.0mM、约 40.0mM、约 50.0mM、约 75.0mM 或者约 100.0mM，诸如约 0.01mM 至约 0.10mM、约 0.05mM 至约 0.50mM、约 0.4mM 至约 1.0mM、约 0.5mM 至约 2.0mM、约 1.0mM 至约 10.0mM、约 5.0mM 至约 50.0mM 和约 20.0mM 至约 100.0mM。

[0176] ii. 任选的增强剂

[0177] 在具体的实施方案中，嘧啶和吡啶类似物增强剂用于与额外任选的增强剂组合。在某些实施方案中，任选的增强剂包含在与嘧啶和吡啶类似物增强剂相同的溶液中，且由此可作为单一组合物诸如单一溶液与组织样品接触。在一些实例中，可能期望的是在分开的溶液中包含任选的增强剂以例如避免反应性和 / 或者溶解度降低。因此，在某些实施方案中，任选的增强剂包含在与嘧啶和吡啶类似物增强剂不同的溶液中，且由此可来自例如作为分步递送或者同时递送的分开的溶液与组织样品接触。

[0178] 公开的组合物的具体实施方案含有任选的增强剂，其可用于或者不用于与嘧啶类似物和 / 或者吡啶类似物组合，这取决于诸如特定应用或者可检测部分或者酶等的因素。在具体的实施方案中，公开的组合物含有作为任选增强剂的杂芳基增强剂，其具有以下通式（式 3）：

[0179]

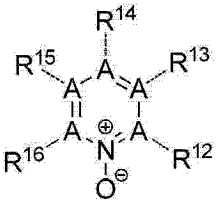


[0180] 式 3

[0181] 关于式 3，R^8、R^9、R^{10}和 R^{11}独立为脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分、氢或者其任何组合。在某些实例中，卤素为碘、溴、氯或者氟。在某些实例中，含有杂原子的部分为羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺或者 NR^6R^7，其中 R^6和 R^7独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。关于式 3，“A”为杂原子（除了硫之外）、碳原子或者其任何组合。关于式 3，“B”为氧、碳或者氮。在具体实例中，A 为碳原子且 B 为氮原子。在某些实施方案中，用于公开的组合物的杂芳基增强剂选自咪唑、L- 组氨酸、噻唑、噁唑或者其任何组合。在一些实例中，增强剂存在于溶液中以例如便于由自动化机器分配。

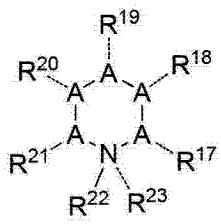
[0182] 在某些实施方案中，公开的组合物含有作为任选增强剂的杂芳基增强剂，其具有以下通式（式 4 和式 5）：

[0183]



[0184] 式 4

[0185]

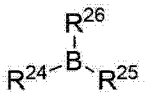


[0186] 式 5

[0187] 关于式 4 和 5，R^{12}-R^{23}独立为脂族基团、芳基、卤素、含有杂原子的部分氢或者其任何组合。在一些实例中，卤素部分为碘、溴、氯或者氟。在一些实例中，含有杂原子的部分为羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺或者 NR^6R^7，其中 R^6和 R^7独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。在某些实施方案中，R^{22}为根类物质诸如 $[O]^{\cdot}$，或者带负电荷类物质诸如 $[O]^{-}$。关于式 5，在具体的实施方案中，R^{21}和 R^{17}包括孪位二甲基。关于式 5 和 / 或者 6，“A”为杂原子（除了硫之外）、碳原子或者其任何组合。在具体实例中，A 为氮原子、氧原子、碳原子或者其任何组合。在具体实施方案中，杂芳基增强剂包括但不限于嘧啶 N- 氧化物、吡啶 N- 氧化物、N- 甲基吗啉 (NMO) 和 2,2,6,6- 四甲基哌啶 -1- 氧基 (TEMPO)。

[0188] 在一些实施方案中，公开的组合物含有作为任选增强剂的有机和无机硼酸。在某些实施方案中，有机硼酸具有以下通式（式 6）：

[0189]

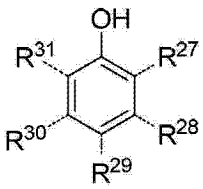


[0190] 式 6

[0191] 关于式 6，R^{24}、R^{25}和 R^{26}独立为脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。在具体实例中，两个或者更多个诸如 2 或者 3 个 R^{24}、R^{25}和 R^{26}为羟基，且其余 R^{24}、R^{25}或者 R^{26}为脂族基团、芳基、杂脂族基团或者杂芳基。在具体的实施方案中，R^{24}、R^{25}和 R^{26}独立为烷基、烯基、炔基和苯基。在公开的组合物的某些实施方案中，有机硼酸为硼酸、苯基硼酸、4-AcHN- 苯基硼酸或者其任何组合。

[0192] 在某些实施方案中，公开的组合物包含作为任选增强剂的酚类化合物。在某些实施方案中，酚类化合物具有以下通式（式 7）：

[0193]



[0194] 式 7

[0195] 关于式 7，R^{27}、R^{28}、R^{29}、R^{30}和 R^{31}独立为氢、脂族基团、芳基、含有杂原子的部分、卤素或者其任何组合。在一些实例中，卤素部分为碘、溴、氯或者氟。在一些实例中，含有杂原子的部分为羟基、醚、甲硅烷基醚、酯、羧酸、甲硅烷基、膦酸酯、膦、酰胺或者 NR^6R^7，其中 R^6和 R^7独立为氢、脂族基团、芳基、杂脂族基团、杂芳基或者其任何组合。在具体的实施方案中，选自 R^{27}、R^{28}、R^{29}、R^{30}和 R^{31}的任何两个相邻基团可结合以形成稠合的芳族或者非芳族环系。在

额外具体的实施方案中，R^{27}、R^{28}、R^{29}、R^{30}和 R^{31}中的至少一个选自羟基。具体操作实施方案涉及作为任选增强剂的酚类化合物诸如焦邻苯二酚。

[0196] 2. 可检测部分

[0197] 公开的组合物用于可检测部分的增加的检测。这些可检测部分可选自能够与组织样品一起使用的任何部分。具体实施方案采用选自色原体、荧光基团、在酪胺和半抗原之间形成的酪酰胺缀合物、纳米颗粒、荧光基团和蛋白质或者其任何组合的可检测部分。

[0198] 具体实施方案采用色原体作为可检测部分。色原体可选自能够在组织例如组织样品上沉积后产生可检测的颜色变化的任何化合物，所述组织样品诸如通常用于病理学检查的组织切片。在一些实例中，在可检测部分经酶起作用后，其沉积在样品组织中。作为实例，酶靶向于组织样品中的靶标分子，所述酶经可检测部分起作用，而后其在样品上在紧靠酶的位置沉积，由此能够进行组织样品中的靶标分子的检测、定量和/或者定位。所述可检测部分可在包含其它组合物组分的溶液中使用，或者它们可构成分开的溶液，其中所述溶液分开地加入至其它组合物组分中。

[0199] 特异性结合部分可被设计为直接缀合至标记物。在该方式使用时，特异性结合/标记复合物（即探针）与样品接触且检测靶标。

[0200] 特异性结合部分也可间接与标记物缔合。在一些实例中，第一特异性结合部分与样品接触。所述特异性结合部分可为核酸类或者蛋白质类。所述特异性结合部分可缀合至另外的部分，然后后者例如经二抗或者非肽类结合部分诸如生物素结合。然后所述二抗或者非肽结合对可连接至标记物诸如酶。在另外的实例中，特异性结合部分可通过将特异性结合部分直接或者间接地与具有酶活性的肽缀合来间接地与标记物缔合。选择所述酶活性以使得在加入底物后，所述底物转化为可检测部分或者变为更具活性的标记物。

[0201] 酶/底物对的示例性非限制性实例包括以下：具有生色底物或者荧光发生底物的HRP/DAB。众多其它酶-底物组合为本领域技术人员已知的。对于这些的一般概述，参见美国专利4,275,149和4,318,980。当探针通过一个或者多个额外分子的间接缔合来制备时，所述额外的分子可称为探针组分。

[0202] 在一些实例中，所述标记物间接地与抗体缀合。例如，抗体可缀合至生物素，其中生物素选择性结合至亲合素以用于随后检测。可选择地，抗体与小的半抗原缀合且标记物缀合至抗半抗原抗体。因此，可实现标记物与靶向部分的间接缀合。

[0203] 当探针包括与底物反应以产生检测标记物的酶时，所述底物可为生色化合物。存在众多所述底物的实例。例如，许多所述化合物可购自 Invitrogen,Eugene OR。生色化合物的具体非限制性实例包括硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷 (ONPG)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-吡喃半乳糖苷 (X-Gal)、甲基伞形酮基-β-D-吡喃半乳糖苷 (MU-Gal)、对硝基苯基-α-D-吡喃半乳糖苷 (PNP)、5-溴-4-氯-3-吲哚基-β-D-葡萄糖醛酸苷 (X-Gluc)、3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC)、10-乙酰基-3,7-二羟基吩噁嗪 (ADHP)、二氨基联苯胺 (DAB)、四甲基联苯胺 (TMB)、2,2'-连氮基-二-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐](ABTS)、邻联二茴香胺、4-氯萘酚 (4-CN)(与 DMPDA/DEPDA/MBTH/ADET 组合使用，根据 Kidwell,et al.Anal.Biochem.,(1991),192,207) 以及邻苯二胺 (OPD)。

[0204] 具体实施方案采用荧光基团作为可检测部分。荧光基团可选自显示荧光的化合物，包括但不限于荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵和罗丹明。可用于本申

请公开的探针的具体荧光基团的实例提供于 Nazarenko 等人的美国专利 5,866,366，诸如 4- 乙酰氨基 -4'- 异硫氰基均二苯乙烯 -2,2' 二磺酸、吖啶以及衍生物诸如吖啶和吖啶异硫氰酸盐、5-(2'- 氨基乙基) 氨基萘 -1- 磺酸 (EDANS)、4- 氨基 -N-[3- 乙烯基磺酰基) 苯基] 萘酰亚胺 -3,5 二磺酸盐 (萤光黄 VS)、N-(4- 苯胺基 -1- 萘基) 马来酰亚胺、邻氨基苯甲酰胺、煌黄、香豆素和衍生物诸如香豆素、7- 氨基 -4- 甲基香豆素 (AMC, 香豆素 120)、7- 氨基 -4- 三氟甲基香豆素 (香豆满 151) ；四溴四氯荧光素钠 ；4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚 (DAPI) ；5',5"- 二溴连苯三酚 - 磺酞 (溴邻苯三酚红) ；7- 二乙基氨基 -3-(4'- 异硫氰基苯基)-4- 甲基香豆素 ；二亚乙基三胺五乙酸盐 ；4,4'- 二异硫氰基二氢 - 均二苯乙烯 -2,2'- 二磺酸 ；4,4'- 二异硫氰基均二苯乙烯 -2,2'- 二磺酸 ；5-[二甲基氨基] 萘 -1- 磺酰氯 (DNS, 丹酰氯) ；4- 二甲基氨基苯基偶氮苯基 -4'- 异硫氰酸酯 (DABITC) ；曙红和衍生物诸如曙红和曙红异硫氰酸盐 ；赤藓红和衍生物诸如赤藓红 B 和赤藓红异硫氰酸盐 ；乙啡啶 ；荧光素和衍生物诸如 5- 羧基荧光素 (FAM)、5-(4,6- 二氯三嗪 -2- 基) 氨基荧光素 (DTAF)、2'7'- 二甲氧基 -4'5'- 二氯 -6- 羧基荧光素 (JOE)、荧光素、荧光素异硫氰酸盐 (FITC) 和 QFITC(XRITC) ；荧光胺 ；IR144 ；IR1446 ；孔雀绿异硫氰酸盐 ；4- 甲基伞形酮 ；邻甲酚酞 ；硝基酪氨酸 ；副蔷薇苯胺 ；酚红 ；B- 藻红蛋白 ；邻苯二醛 ；嵌二萘和衍生物诸如嵌二萘、嵌二萘丁酸盐和 1- 嵌二萘丁酸琥珀酰亚氨酯 ；反应红 4(CIBACRON™ 亮红 3B-A) ；罗丹明和衍生物诸如 6- 羧基 -X- 罗丹明 (ROX)、6- 羧基罗丹明 (R6G)、丽丝胺罗丹明 B 磺酰氯、罗丹明 (Rhod)、罗丹明 B、罗丹明 123、罗丹明 X 异硫氰酸盐、磺酰罗丹明 B、磺酰罗丹明 101 和磺酰罗丹明 101 的磺酰氯衍生物 (德克萨斯红) ；N,N,N',N'- 四甲基 -6- 羧基罗丹明 (TAMRA) ；四甲基罗丹明 ；四甲基罗丹明异硫氰酸盐 (TRITC) ；核黄素 ；玫红酸和铽螯合物衍生物 ；LightCycler Red640 ；Cy5.5 ；和 Cy5(荧光分子的许多额外实例可在 The Handbook-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes, Eugene, OR 中找到) 。

[0205] 在其它实施方案中，可检测部分可包含酪酰胺缀合物，其包含缀合至选自纳米颗粒、荧光基团和蛋白质的可检测部分的酪胺化合物。某些实施方案采用酪酰胺缀合物，其包含酪胺和半抗原，其中所述半抗原选自噁唑、吡唑、噻唑、苯并呋喃、三萜、脲、硫脲、硝基芳基、拟鱼藤酮、香豆素、环木脂体、杂联芳基、偶氮芳基、苯并二氮杂䓬或者它们的组合。

[0206] 本公开涵盖的其它实施方案包括酪酰胺缀合物，其包含结合至纳米颗粒诸如量子点的酪胺化合物。其它具体实施方案包括结合至荧光基团的酪胺化合物，所述荧光基团可选自荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵和罗丹明。其它具体实施方案涉及结合至蛋白质的酪胺化合物，所述蛋白质可选自酶诸如辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、β- 半乳糖苷酶、β- 葡糖醛酸糖苷酶或者 β- 内酰胺酶。

[0207] 在具体的实施方案中，所述可检测标记物或者半抗原经接头连接至所述酪胺化合物，所述接头诸如脂族基团接头、杂脂族基团接头或者具有相当反应性的任何其它柔性连接部分。例如，酪胺化合物可用可检测标记物经异双功能聚亚烷基二醇接头诸如异双功能聚乙二醇 (PEG) 接头共价修饰。

[0208] 适于形成公开的酪胺 - 可检测部分缀合物和酪酰胺 - 半抗原缀合物的一类接头为脂族基团化合物，诸如具有一个或者多个不饱和位点的脂族烃链或者烷基链。脂族烃链也典型地包括末端官能团，包括例如但不限于羰基反应基团、胺反应基团、巯基反应基团或者

光反应基团，其有助于与可检测部分和其它期望化合物偶联。该链的长度是可变的，但典型地具有约 30 个原子的实践中上限。已经证实大于约 30 个碳原子的链连接在效果上不如具有较小链连接的化合物。因此，脂族链接头典型地具有约 1 个碳原子至约 30 个碳原子的链长。然而，本领域技术人员应该认识到，如果具体接头具有大于 30 个原子，且仍然可有效地将可检测部分连接至酪胺化合物，且所述缀合物仍然起到期望作用，则所述链连接仍然在本发明的范围内。对于包含公开的接头的酪酰胺 - 半抗原缀合物的典型浓度的范围为约 500pM 至约 100μM。甚至更典型的浓度范围为约 5μM 至约 55μM。

[0209] 另一类有用的接头是烯基氧化物。所述烯基氧化物在本申请中以二醇，诸如乙二醇为代表。本领域技术人员应该认识到，随着氧原子数目的增加，化合物的亲水性也可增加。因此，本公开的接头典型地具有式 $(-OCH_2CH_2O-)_n$，其中 n 为约 2 至约 15，但更具体地为约 2 至约 8。在一些实例中，所述可检测部分以以下浓度存在于溶液中：约 0.01mM 至约 10.0mM，诸如约 0.01mM、约 0.02mM、约 0.05mM、约 0.10mM、约 0.20mM、约 0.50mM、约 1.0mM、约 2.0mM、约 3.0mM、约 5.0mM 或者约 10.0mM，诸如约 0.01mM 至约 0.10mM、约 0.05mM 至约 0.50mM、约 0.4mM 至约 1.0mM、约 0.5mM 至约 2.0mM 和约 1.0mM 至约 10.0mM。

[0210] 3. 特异性结合部分缀合物

[0211] 具体实施方案涉及使用包含特异性结合部分和酶的缀合物，其中所述特异性结合部分能够识别且结合至样品中的具体靶标。特异性结合部分可选自寡核苷酸、核酸、蛋白质和肽。具体实施方案涉及使用蛋白质诸如抗体作为特异性结合部分。

[0212] 在具体的实施方案中，所述特异性结合部分结合至酶。所述方法涵盖的酶的实例包括氧化还原酶诸如过氧化物酶。具体实施方案涉及使用辣根过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化物酶或者含有血红素部分的任何其它过氧化物酶。

[0213] 在某些实施方案中，包含特异性结合部分和半抗原的缀合物可与包含抗半抗原抗体和酶的第二缀合物组合使用。在这些具体实施方案中，所述特异性结合部分（典型地抗体）可识别样品中的靶标且与其结合。所述特异性结合部分结合至半抗原，其由包含抗半抗原抗体和酶的第二缀合物识别。该第二抗体缀合物将与第一缀合物结合，由此将酶结合至靶标。所述半抗原可选自噁唑、吡唑、噻唑、苯并呋喃、三萜、脲、硫脲、硝基芳基、拟鱼藤酮、香豆素、环木脂体、杂联芳、偶氮芳基、苯并二氮杂䓬或者其组合。示例性抗体包括但不限于兔 IgG、小鼠 IgG、小鼠 IgM 和羊 IgG。示例性酶如前公开。在一些实例中，所述特异性结合部分和酶缀合物以以下浓度存在于溶液中：约 0.01mM 至约 10.0mM，诸如约 0.01mM、约 0.02mM、约 0.05mM、约 0.10mM、约 0.20mM、约 0.50mM、约 1.0mM、约 2.0mM、约 3.0mM、约 5.0mM 或者约 10.0mM，诸如约 0.01 至约 0.10、约 0.05 至约 0.50、约 0.4 至约 1.0、约 0.5 至约 2.0 和约 1.0 至约 10.0。

[0214] 4. 其它组分

[0215] 具体实施方案涉及组合物，其进一步包含含有组 I 或者组 II 金属的盐，其具有式 MX_n 或者 MX，其中 M 为组 I 或者组 II 金属，且 X 选自卤化物诸如氟化物、溴化物、氯化物和碘化物；和含氧离子，诸如碳酸盐、氢氧化物和磷酸盐。具体实施方案涉及使用组 I 金属，其选自钠、锂、铯和钾。其它具体实施方案涉及使用组 II 金属，其选自镁、钙、锶和钡。具体实施方案采用钙和 / 或者镁盐增强剂，其选自氯化钙、氯化镁和碳酸钙。在一些实例中，任选的增强剂以以下浓度存在于溶液中：约 0.01mM 至约 100mM，诸如约 0.01mM、约 0.02mM、约

0.05mM、约 0.10mM、约 0.20mM、约 0.50mM、约 1.0mM、约 2.0mM、约 3.0mM、约 5.0mM、约 10.0mM、约 20.0mM、约 30.0mM、约 40.0mM、约 50.0mM、约 75.0mM 或者约 100.0mM，诸如约 0.01mM 至约 0.10mM、约 0.05mM 至约 0.50mM、约 0.4mM 至约 1.0mM、约 0.5mM 至约 2.0mM、约 1.0mM 至约 10.0mM、约 5.0mM 至约 50.0mM 和约 20.0mM 至约 100.0mM。

[0216] 具体实施方案涉及组合物，其进一步包含作为可用于与前面公开的任何组分组合的组分的氧化剂、抑制剂和表面活性剂。氧化剂可包括能够有效活化酶的任何化合物。具体实施方案涉及使用过氧化物诸如过氧化氢作为用于活化酶的氧化剂。典型地，所述氧化剂为 0.03% 过氧化氢。

[0217] 抑制剂可选自能够在酶已经充分地以导致可检测部分的沉积的方式反应之后有效抑制所述酶的任何化合物。具体实施方案涉及选自过氧化物酶的抑制剂。典型地，过氧化氢用作为抑制剂。某些实施方案涉及使用 3% 过氧化氢作为抑制剂。在具体的实施方案中，在加入其它组合物组分之后，将所述抑制剂加入至样品中。

[0218] 本公开的具体实施方案涉及用于检测样品诸如组织样品中的靶标分子的组合物。在某些实施方案中，可商购的组合物包含嘧啶类似物和 / 或者吡啶类似物、任选的增强剂、可检测部分、特异性结合部分缀合物、酶、氧化剂和表面活性剂。这些组合物组分可以导致可检测部分有效地沉积在样品中的靶标处的任何顺序以及任何组合加入。所述组合物可与结合至酶、氧化剂和染料的第二抗体组合使用。

[0219] 在具体的操作实施方案中，所述嘧啶类似物和 / 或者吡啶类似物选自 2- 羟基嘧啶和 / 或者 2- 羟基吡啶。在具体的操作实施方案中，所述特异性结合部分缀合物为半抗原化 IgG 抗体缀合物且所述第二抗体包含抗半抗原多聚体 HRP 缀合物。

[0220] 具体公开的实施方案涉及使用表面活性剂。表面活性剂分为阴离子、阳离子或者非离子表面活性剂，这取决于它们的化学作用方式。非离子表面活性剂经氢键机制起作用。此外，表面活性剂降低两液体之间的界面张力。表面活性剂分子通常具有极性或者离子 " 头部 " 和非极性烃 " 尾部 "。在水中溶解后，所述表面活性剂分子凝聚且形成微团，其中非极性尾部朝向内且极性或者离子头部朝向外部含水环境。非极性尾部在所述微团内产生非极性 " 口袋 "。在该溶液中的非极性化合物扣留于由表面活性剂分子形成的口袋中，由此使得非极性化合物保持在水溶液中混合。在具体公开的实施方案中，表面活性剂可用于产生试剂在组织切片上的均匀涂布以及减少背景染色。

[0221] 表面活性剂的实例包括但不限于聚氧乙烯烷基醚，其中所述烷基为 $(CH_2)_M$ 且氧化乙烯为 $(C_2H_4O)_N$，其中 M 为 5 至 16、8 至 14 或者 10 至 12 的整数且 N 为 10 至 40、15 至 30 或者 20 至 28 的整数。在一个实施方案中，所述表面活性剂为聚氧乙烯月桂基醚，其具有式 $(C_2H_4O)_{23}C_{12}H_{25}OH$。在另外的实施方案中，所述表面活性剂为聚氧乙烯 (20) 山梨聚糖单烷基化物，所述单烷基化物包含 8-14 个碳。在另外的实施方案中，所述表面活性剂为直链仲醇聚氧乙烯，其具有式 $C_{12-14}H_{25-29}O(CH_2CH_2O]_x$，其中 x 等于 2-12 的整数。在另外的实施方案中，所述表面活性剂为聚氧乙烯辛基苯基醚。示例性表面活性剂以如下名称销售：Brij® 35、TWEEN®、Tergitol™、Triton™、Ecosurf™、Dowfax™、聚山梨酯 80™、BigCHAP、Deoxy BigCHAP、IGEPAL®、Saponin、Thesit®、Nonidet®、Pluronic F-68、毛地黄皂苷、脱氧胆酸盐等。具体公开的操作实施方案涉及使用选自 Brij® 35、TWEEN®、

Tergitol™、Triton™的表面活性剂。

[0222] B. 检测靶标分子的方法

[0223] 公开的组合物特别用于检测样品中的靶标分子，这是因为它们在 IHC 或者 ISH 组织染色过程中发挥协同作用以提供最大化的沉积。因此，本公开提供了检测样品诸如组织样品中的靶标分子的方法。在某些实施方案中，所述方法包括使得样品与包含在前面章节（章节 A）所述的嘧啶类似物和 / 或者吡啶类似物的增强溶液接触，使得样品与酶接触和使得样品与能够使用沉积或者荧光技术检测的可检测部分接触。在一些实例中，所述酶作用于底物以催化可检测部分的产生，其在样品上在靶标分子的位置沉积，由此能够检测靶标分子。检测可检测部分，由此检测样品中的靶标分子。在一些实例中，测量由可检测部分产生的信号的强度和 / 或者定位，以例如确定靶标分子在组织样品中的量和 / 或者定位。所述靶标可为感兴趣的任何分子，针对其存在、定位和 / 或者浓度进行确定。感兴趣的分子的实例包括蛋白质和核酸序列。在某些实施方案中，所述嘧啶类似物为嘧啶和 / 或者 2- 羟基嘧啶。在某些实施方案中，所述吡啶类似物为 2- 羟基吡啶。

[0224] 在某些实施方案中，通过将样品与结合至靶标的酶缀合物孵育，将所述酶固定化于靶标上。所述酶可缀合至能够结合至靶标的任何部分，例如可缀合至特异性识别所述靶标分子的抗体或者核酸。适当的部分包括但不限于抗体、核苷酸、寡核苷酸、蛋白质、肽或者氨基酸。

[0225] 在其它实施方案中，固定化所述酶为多步操作。例如，可将样品与结合至靶标的第一部分（例如抗体、核苷酸、寡核苷酸、蛋白质、寡肽、肽或者氨基酸）孵育。然后可将样品与包含能够结合至所述第一部分的部分的酶缀合物孵育。在某些实施方案中，若所述第一部分为针对靶标的抗体，则所述两步操作可为更加多用途的，这是因为其允许使用者采用 " 通用 " 酶 - 抗体缀合物。例如，如果所述第一抗体为兔单克隆抗体，则所述酶 - 抗体缀合物可包含能够结合至任何兔单克隆抗体的抗体（例如二抗）。所述多步操作可消除对于产生适于每种靶标的酶 - 抗体缀合物的需求。

[0226] 在某些实施方案中，所述第一部分可为标记的探针，诸如标记的寡核苷酸。在所述探针已经与样品杂交之后，引入识别标记物的第一抗体且使其结合至标记的探针。所述第一抗体可为酶 - 抗体缀合物。然而，如果所述第一抗体并未缀合至酶，则引入酶 - 抗体缀合物，其中所述缀合物的抗体部分识别且结合至所述第一抗体。

[0227] 在某些实施方案中，所述酶为过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶或者谷胱甘肽过氧化物酶或者氧化还原酶。因此，针对酶反应选择适当的条件，诸如能够使得酶发挥其期望功能以例如将底物转化为可检测部分的盐浓度和 pH，所述可检测部分在组织样品上在靶标分子的位点沉积。所述反应在适于所述酶的温度进行。例如，如果酶为辣根过氧化物酶，则所述反应可在约 35-40° C 进行。

[0228] 在一些实例中，可检测部分为色原体、荧光基团、半抗原或者蛋白质。在具体实例中，所述可检测部分为 1,3- 二氨基联苯胺、3- 氨基 -9- 乙基咔唑或者四甲基联苯胺，或者其反应产物。用于公开的方法中的色原体的额外实例在前述章节（章节 A）中给出。

[0229] 在其它实例中，可检测部分为荧光基团，诸如荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵或者罗丹明。用于公开的方法的实施方案中的荧光基团的额外实例在前述章节（章节 A）中给出。

[0230] 在其它实例中，可检测部分为半抗原，诸如噁唑、吡唑、噻唑、苯并呋喃、三萜、脲、硫脲、硝基芳基、拟鱼藤酮、香豆素、环木脂体、杂联芳基、偶氮芳基或者苯并二氮杂䓬。

[0231] 在具体实施方案中，所述可检测部分例如经接头诸如在链中含有约 1 至约 30 个碳原子的脂族或者杂脂族接头而缀合至酪胺。在具体实施方案中，所述接头为烯基氧化物，诸如乙二醇或者其聚合物，例如含有 1 至约 15 个乙二醇单位的聚合物。当采用公开的方法来使用酪胺时，酪酰胺信号放大可用于进一步放大产生的信号。酪酰胺信号放大采用过氧化物酶的催化活性以将酪胺或者酪胺衍生物、残基共价结合至固相。所述固相可为例如，固定化于基片诸如显微镜载玻片的细胞或者细胞结构的蛋白质组分。在过氧化物的存在下，某些过氧化物酶（例如辣根过氧化物酶）可催化酚类化合物的二聚作用。因此，如果在辣根过氧化物酶和过氧化物（例如过氧化氢）的存在下将酪胺加入至含有蛋白质的样品中，则酪胺的苯酚基团可与酪氨酸氨基酸的苯酚基团形成二聚体。

[0232] 仅紧靠固定化的酶的酪胺分子将与在所述固定化的酶附近或者邻近所述固定化的酶的酪氨酸残基反应且形成二聚体，所述酪氨酸残基包括在酶本身中的酪氨酸残基、在与酶缀合的抗体中的酪氨酸残基和 / 或者样品中在邻近固定的酶的酪氨酸残基，诸如距离所述固定化的酶约 100nm 内、约 50nm 内、约 10nm 内或者约 5nm 内。例如，所述酪氨酸残基可在所述固定化的酶的以下距离范围内 :约 10 埃至约 100nm、约 10 埃至约 50nm、约 10 埃至约 10nm 或者约 10 埃至约 5nm。所述邻近结合允许靶标以与采用 IHC 和 / 或者 ISH 的常规染色方法至少相同程度的特异性来检测。例如，公开的方法的实施方案允许亚细胞结构在以下中能够区分 :例如核膜 / 核区、细胞膜 / 胞质区等。

[0233] 一旦所述酶固定化于样品上，在能够使得酶与酪酰胺反应的适当条件下引入酪酰胺缀合物。典型地，所述酶为过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶。在所述条件下，使得酪酰胺与过氧化物和酶反应，将所述酪酰胺转化为共价连接至样品的活性形式，这典型地通过结合至邻近所述固定化的酶的酪氨酸残基，包括在固定化的酶本身内的酪氨酸残基。在酪酰胺缀合物结合至样品后，通过适当手段例如借助连接至酪酰胺的可检测部分来检测其存在。

[0234] 在某些实施方案中，使得样品进一步与至少一种任选的增强剂诸如一种或者多种杂芳基化合物、含有组 I 或者组 II 金属的盐、含有硼的化合物、苯酚化合物接触。示例性任选的增强剂描述于前述章节（章节 A）。在某些实施方案中，使得样品进一步与氧化剂诸如过氧化物酶例如过氧化氢酶接触。在某些实施方案中，使得样品进一步与表面活性剂诸如 Brij® 35、TWEEN®、Tergitol™和 Triton ™接触。在某些实施方案中，使得样品进一步与抗氧化剂诸如锡酸钠、偏硫酸氢钠和硫酸氢钠接触。

[0235] 本申请公开的方法的实施方案可人工或者自动进行，例如在自动化组织加工仪器上进行。自动化系统典型地为至少部分（如果不是基本上全部的话）由计算机控制。由于自动化系统典型地为至少部分由计算机控制，所以本公开的某些实施方案也涉及一种或者多种实体的计算机可读的介质，其储存用于引起计算机进行公开的方法的实施方案的计算机可执行指令。

[0236] C. 样品和靶标

[0237] 样品包括生物学组分且通常怀疑包括一种或者多种感兴趣的靶标分子。靶标分子

可位于细胞表面上且细胞可在混悬液或者在组织切片中。靶标分子也可在细胞内且在细胞裂解或者细胞经探针渗透之后来检测。本领域技术人员将认识到检测样品中靶标分子的方法将取决于使用的探针和样品的类型而改变。收集和制备样品的方法为本领域已知的。

[0238] 用于本申请公开的组合物和方法的实施方案中的样品诸如组织或者其它生物样品可使用本领域技术人员已知的任何方法来制备。样品可由常规筛选的受试者或者怀疑具有诸如遗传异常、感染或者瘤形成的病症的受试者获得。公开的方法的所述实施方案也可应用于不具有遗传异常、疾病、病症等的样品，其称为“正常”样品。所述正常样品可用作为（除了别的之外）用于与其它样品比较的对照。样品可针对许多不同目的来分析。例如，样品可用于科学研究或者用于诊断可疑疾病，或者作为用于治疗成功、存活等的预后指标。

[0239] 样品可包括可经探针或者报道分子特异性结合的多种靶标。所述靶标可为核酸序列或者蛋白质。当涉及靶标蛋白质时，在本公开通篇应该理解的是与该蛋白质相关的核酸序列也可用作为靶标。在一些实例中，所述靶标为蛋白质或者核酸分子，其来自病原体诸如病毒、细菌或者细胞内寄生物，诸如来自病毒基因组。例如，靶标蛋白质可由与疾病相关（例如相关联、有原因地牵涉等）的靶标核酸序列产生。

[0240] 靶标核酸序列可在尺寸上实质性改变。无限制地，所述核酸序列可具有可变数目的核酸残基。例如靶标核酸序列可具有至少约 10 个核酸残基，或者至少约 20、30、50、100、150、500、1000 个残基。类似地，靶标多肽可在尺寸上实质性改变。无限制地，所述靶标多肽将包含至少一个表位，其与肽特异性抗体或者其片段结合。在一些实施方案中，多肽可包含至少两个表位，其与肽特异性抗体或者其片段结合。

[0241] 在具体的非限制性实例中，靶标蛋白质由与新生物（例如，癌症）相关的靶标核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生。众多染色体异常（包括易位和其它重排、扩增或者缺失）已经在赘生细胞中鉴定出，特别是在癌细胞诸如 B 细胞和 T 细胞，白血病、淋巴瘤、乳腺癌、结肠癌、神经学癌症等中。因此，在一些实例中，至少部分的靶标分子由在样品中至少一种细胞子集中扩增或者缺失的核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生。

[0242] 癌基因已知为对于若干人类恶性肿瘤起作用。例如，涉及位于染色体 18q11.2 的断裂点区的 SYT 基因的染色体重排在滑膜肉瘤软组织肿瘤中是常见的。可例如使用具有不同标记物的探针来鉴定 t(18q11.2) 易位 :第一探针包括由从 SYT 基因向远端伸展的靶标核酸序列产生的 FPC 核酸分子，以及第二探针包括由向 SYT 基因 3′ 或者近端伸展的靶标核酸序列产生的 FPC 核酸。当相应于这些靶标核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）的探针用于原位杂交操作中时，在 SYT 基因区缺失 t(18q11.2) 的正常细胞显示出两个融合（由彼此邻近的两个标记物产生）信号，这反映出 SYT 的两个完整拷贝。具有 t(18q11.2) 的异常细胞显示出单一的融合信号。

[0243] 在其它实例中，选择由核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生的靶标蛋白质，其为在恶性细胞中缺失（丢失）的肿瘤抑制基因。例如，位于染色体 9p21 的 p16 区（包括 D9S1749、D9S1747、p16(INK4A)、p14(ARF)、D9S1748、p15(INK4B) 和 D9S1752) 在某些膀胱癌中缺失。涉及染色体 1（包括例如，SHGC57243、TP73、EGFL3、ABL2、ANGPTL1 和 SHGC-1322) 的短臂的远端区以及染色体 19（包括例如，MAN2B1、ZNF443、ZNF44、CRX、GLTSCR2 和 GLTSCR1) 的着丝粒周围 (pericentromeric) 区（例如 19p13-19q13) 的染色体缺失是中枢神经系统的某些类型的实体瘤的特征性分子特征。

[0244] 提供前面提及的实例以仅用于示例说明的目的且不意在进行限制。与致瘤性转化和/或者生长相关联的众多其它细胞遗传异常是本领域技术人员已知的。由核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生的靶标蛋白质（已经与致瘤性转化相关联且用于公开的方法）也包括 EGFR 基因 (7p12 ;例如 GENBANK™登记号 NC_000007，核苷酸 55054219-55242525)、C-MYC 基因 (8q24.21 ;例如 GENBANK™登记号 NC_000008，核苷酸 128817498-128822856)、D5S271(5p15.2)、脂蛋白脂肪酶 (LPL) 基因 (8p22 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000008，核苷酸 19841058-19869049)、RB1(13q14 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000013，核苷酸 47775912-47954023)、p53(17p13.1 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000017，互补物，核苷酸 7512464-7531642)、N-MYC(2p24 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000002，互补物，核苷酸 151835231-151854620)、CHOP(12q13 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000012，互补物，核苷酸 56196638-56200567)、FUS(16p11.2 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000016，核苷酸 31098954-31110601)、FKHR(13p14 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000013，互补物，核苷酸 40027817-40138734)，以及例如 :ALK(2p23 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000002，互补物，核苷酸 29269144-29997936)、Ig 重链、CCND1(11q13 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000011，核苷酸 69165054..69178423)、BCL2(18q21.3 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000018，互补物，核苷酸 58941559-59137593)、BCL6(3q27 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000003，互补物，核苷酸 188921859-188946169)、MALF1、AP1(1p32-p31 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000001，互补物，核苷酸 59019051-59022373)、TOP2A(17q21-q22 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000017，互补物，核苷酸 35798321-35827695)、TMPRSS(21q22.3 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000021，互补物，核苷酸 41758351-41801948)、ERG(21q22.3 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000021，互补物，核苷酸 38675671-38955488) ;ETV1(7p21.3 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000007，互补物，核苷酸 13897379-13995289)、EWS(22q12.2 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000022，核苷酸 27994271-28026505) ;FLI1(11q24.1-q24.3 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000011，核苷酸 128069199-128187521)、PAX3(2q35-q37 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000002，互补物，核苷酸 222772851-222871944)、PAX7(1p36.2-p36.12 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000001，核苷酸 18830087-18935219)、PTEN(10q23.3 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000010，核苷酸 89613175-89716382)、AKT2(19q13.1-q13.2 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000019，互补物，核苷酸 45431556-45483036)、MYCL1(1p34.2 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000001，互补物，核苷酸 40133685-40140274)、REL(2p13-p12 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000002，核苷酸 60962256-61003682) 和 CSF1R(5q33-q35 ;例如，GENBANK™登记号 NC_000005，互补物，核苷酸 149413051-149473128)。

[0245] 在其它实例中，靶标蛋白质选自与疾病或者状况相关的病毒或者其它微生物。在细胞或者组织样品中的病毒或者微生物衍生的靶标核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）的检测能够指示生物体的存在。例如，靶标肽、多肽或者蛋白质可选自致癌或者致病性病毒、细菌或者细胞内寄生物（诸如镰状疟原虫和其它疟原虫属、利什曼原虫属、小球隐孢子虫、痢疾内变形虫和肠兰伯鞭毛虫以及弓浆虫属、艾美球虫属、泰勒虫属和巴贝西虫属）的基因组。

[0246] 在一些实例中，靶标蛋白质由来自病毒基因组的核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生。示例性病毒和相应的基因组序列（括号内为 GENBANK™RefSeq 登记

号）包括人腺病毒 A(NC_001460)、人腺病毒 B(NC_004001)、人腺病毒 C(NC_001405)、人腺病毒 D(NC_002067)、人腺病毒 E(NC_003266)、人腺病毒 F(NC_001454)、人星形病毒(NC_001943)、人 BK 多瘤病毒 (V01109 ;GI:60851)、人博卡病毒 (NC_007455)、人冠状病毒 229E(NC_002645)、人冠状病毒 HKU1(NC_006577)、人冠状病毒 NL63(NC_005831)、人冠状病毒 OC43(NC_005147)、人肠病毒 A(NC_001612)、人肠病毒 B(NC_001472)、人肠病毒 C(NC_001428)、人肠病毒 D(NC_001430)、人红细胞病毒 V9(NC_004295)、人泡沫病毒(NC_001736)、人疱疹病毒 1（单纯疱疹病毒类型 1)(NC_001806)、人疱疹病毒 2（单纯疱疹病毒类型 2)(NC_001798)、人疱疹病毒 3（水痘 - 带状疱疹病毒）(NC_001348)、人疱疹病毒 4 类型 1(EB 病毒类型 1)(NC_007605)、人疱疹病毒 4 类型 2(EB 病毒类型 2)(NC_009334)、人疱疹病毒 5 株 AD169(NC_001347)、人疱疹病毒 5 株 Merlin 株 (NC_006273)、人疱疹病毒 6A(NC_001664)、人疱疹病毒 6B(NC_000898)、人疱疹病毒 7(NC_001716)、人疱疹病毒 8 类型 M(NC_003409)、人疱疹病毒 8 类型 P(NC_009333)、人免疫缺陷病毒 1(NC_001802)、人免疫缺陷病毒 2(NC_001722)、人偏肺病毒 (NC_004148)、人乳头瘤病毒 -1(NC_001356)、人乳头瘤病毒 -18(NC_001357)、人乳头瘤病毒 -2(NC_001352)、人乳头瘤病毒 -54(NC_001676)、人乳头瘤病毒 -61(NC_001694)、人乳头瘤病毒 -cand90(NC_004104)、人乳头瘤病毒 RTRX7(NC_004761)、人乳头瘤病毒类型 10(NC_001576)、人乳头瘤病毒类型 101(NC_008189)、人乳头瘤病毒类型 103(NC_008188)、人乳头瘤病毒类型 107(NC_009239)、人乳头瘤病毒类型 16(NC_001526)、人乳头瘤病毒类型 24(NC_001683)、人乳头瘤病毒类型 26(NC_001583)、人乳头瘤病毒类型 32(NC_001586)、人乳头瘤病毒类型 34(NC_001587)、人乳头瘤病毒类型 4(NC_001457)、人乳头瘤病毒类型 41(NC_001354)、人乳头瘤病毒类型 48(NC_001690)、人乳头瘤病毒类型 49(NC_001591)、人乳头瘤病毒类型 5(NC_001531)、人乳头瘤病毒类型 50(NC_001691)、人乳头瘤病毒类型 53(NC_001593)、人乳头瘤病毒类型 60(NC_001693)、人乳头瘤病毒类型 63(NC_001458)、人乳头瘤病毒类型 6b(NC_001355)、人乳头瘤病毒类型 7(NC_001595)、人乳头瘤病毒类型 71(NC_002644)、人乳头瘤病毒类型 9(NC_001596)、人乳头瘤病毒类型 92(NC_004500)、人乳头瘤病毒类型 96(NC_005134)、人副流感病毒 1(NC_003461)、人副流感病毒 2(NC_003443)、人副流感病毒 3(NC_001796)、人双埃可病毒 (NC_001897)、人细小病毒 4(NC_007018)、人细小病毒 B19(NC_000883)、人呼吸道合胞病毒 (NC_001781)、人鼻病毒 A(NC_001617)、人鼻病毒 B(NC_001490)、人 spumaretrovirus(NC_001795)、人 T- 淋巴营养性病毒 1(NC_001436)、人 T- 淋巴营养性病毒 2(NC_001488)。

[0247] 在某些实例中，靶标蛋白质由来自致癌病毒诸如 EB 病毒 (EBV) 或者人乳头瘤病毒 (HPV，例如 HPV16、HPV18) 的核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生。在其它实例中，由核酸序列（例如基因组靶标核酸序列）产生的靶标蛋白质来自致病性病毒，诸如呼吸道合胞病毒、肝炎病毒（例如丙型肝炎病毒）、冠状病毒（例如 SARS 病毒）、腺病毒、多瘤病毒、巨细胞病毒 (CMV) 或者单纯疱疹病毒 (HSV)。

[0248] D. 样品制备

[0249] 本申请所述的组织样品可使用本领域目前已知的任何方法或者将来发展的任何方法来制备。一般而言，组织样品通过将组织固定并包埋至介质中来制备。

[0250] 在一些实例中，使用包埋介质。包埋介质为惰性材料，在其中包埋组织和 / 或者细

胞以有助于保存它们以用于将来分析。包埋也能够使得组织样品被切割为薄切片。包埋介质包括但不限于石蜡、火棉胶、OCT™化合物、琼脂、塑料或者丙烯酸树脂。

[0251] 许多包埋介质为疏水的；因此，惰性材料可能需要在组织学或者细胞学分析（其主要采用亲水试剂）之前被除去。术语去石蜡化或者去蜡在本申请中广泛使用，其是指任何类型的包埋剂由生物样品中部分或者完全除去。例如，使得石蜡包埋的组织切片经过有机溶剂诸如甲苯、二甲苯、柠檬油精或者其它适当溶剂而除蜡。

[0252] 固定样品的过程是可变的。组织样品的固定能够保存细胞和组织成分以保持尽可能接近生命样的状态且使得其经历制备性操作而无显著变化。固定阻止开始于细胞死亡的自溶和细菌分解过程，且稳定细胞和组织成分，由此它们能够经受随后的诸如针对 IHC 或者 ISH 的组织加工阶段。

[0253] 组织可通过任何适当方法固定，包括灌注或者浸没在固定剂中。固定剂可分为交联剂（诸如醛，例如甲醛、多聚甲醛和戊二醛，以及非醛类交联剂）、氧化剂（例如，金属离子和络合物诸如四氧化锇和铬酸）、蛋白质变性剂（例如乙酸、甲醇和乙醇）、机制未知的固定剂（例如氯化汞、丙酮和苦味酸）、组合试剂（例如卡诺固定剂、乙酰胺甲氧基苯、布安液、B5 固定剂、罗斯曼液和亨德雷液）、微波和混合固定剂（例如排除体积固定和蒸气固定）。添加剂也可包括在固定剂中，诸如缓冲剂、去污剂、鞣酸、苯酚、金属盐（例如，氯化锌、硫酸锌和锂盐）和镧。

[0254] 在制备 IHC 样品中最通常使用的固定剂为甲醛，其通常为福尔马林溶液（4% 甲醛在缓冲溶液中，称为 10% 缓冲的福尔马林）的形式。在一个实例中，所述固定剂为 10% 中性缓冲的福尔马林。

[0255] E. 复染

[0256] 复染为这样的方法，在样品已经使用试剂染色以检测一种或者多种靶标之后进行后处理，以使得它们的结构可更容易地在显微镜下被观察到。例如，在加盖盖玻片之前任选使用复染剂以使得免疫组织化学染色剂更加清晰。复染剂的颜色与初始染色剂不同。众多复染剂是熟知的，诸如苏木精、伊红、甲基绿、亚甲蓝、姬姆萨染料、阿辛蓝和核坚牢红。

[0257] 在一些实例中，多于一种的染色剂可混合在一起以产生复染剂。这提供了灵活性以及选择染色剂的能力。例如，可选择对于混合物具有特定属性，但不具有不同的期望属性的第一染色剂。可向混合物中加入第二染色剂，其显示出缺少的期望属性。例如，甲苯胺蓝、DAPI 和溏胺天蓝可混合在一起以形成复染剂。

[0258] F. 成像

[0259] 公开的实施方案中的某些方面或者全部方面可以自动化，且通过计算机分析和 / 或者图象分析系统而变得便利。在一些应用中，测量精确的颜色比例。在某些实施方案中，光显微术用于图象分析。某些公开的实施方案涉及获取数字图像。这可通过将数字照相机与显微镜联用来完成。使用图象分析软件来分析染色样品所获得的数字图像。颜色可以若干不同方式来测量。例如，颜色可测量为红色、蓝色和绿色；色调、饱和度和强度值；和 / 或者使用光谱成像照相机来测量特定波长或者波长范围。

[0260] 一个公开的实施方案涉及采用使用生色染料的亮视野成像。在可见光谱中的白光可透过所述染料传递。所述染料吸收某些波长的光且传递其它波长。这将光由白色改变为取决传递的特定波长的光的颜色。

[0261] 也可定性和半定量评价该样品。定性评估包括评估染色强度、鉴定阳性染色的细胞和在染色中涉及的细胞内隔室以及评价总部样品或者载玻片品质。分开的评价在测试样品上进行且该分析可包括与已知的平均值进行比较以确定所述样品是否显示异常状态。

[0262] G. 试剂盒

[0263] 公开的实施方案部分地提供了用于进行本发明方法的各种实施方案的试剂盒。所述试剂盒的实例包括用于胆固醇分析的那些、妊娠试剂盒、癌症诊断试剂盒等。在某些实施方案中，所述试剂盒包括具有在章节 A 中所述的式的嘧啶类似物和 / 或者吡啶类似物。

[0264] 在某些实施方案中，所述试剂盒包括酶，诸如氧化还原酶或者过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶或者谷胱甘肽过氧化物酶。在一些实例中，所述试剂盒包括特异性结合部分，诸如特异性结合于靶标分子的抗体或者核酸。在一些实例中，所述特异性结合部分和酶结合在一起。

[0265] 在某些实施方案中，所述试剂盒包括能够使用沉积或者荧光技术检测的可检测部分，或者在与酶反应之后产生所述可检测部分的酶底物。在一些实例中，所述可检测部分为荧光基团（诸如荧光素、发光基团、香豆素、BODIPY 染料、试卤灵或者罗丹明）、半抗原（诸如噁唑、吡唑、噻唑、苯并呋喃、三萜、脲、硫脲、硝基芳基、拟鱼藤酮、香豆素、环木脂体、杂联芳基、偶氮芳基、苯并二氮杂䓬）、蛋白质或者色原体（诸如 1,3- 二氨基联苯胺、3- 氨基 -9- 乙基咔唑或者四甲基联苯胺）。所述试剂盒可任选包含至少一种任选的增强剂诸如杂芳基化合物、含有组 I 或者组 II 金属的盐、含有硼的化合物以及苯酚化合物，例如在章节 A 中所述的那些。

[0266] 在某些实施方案中，所述试剂盒包含氧化剂，诸如过氧化物例如过氧化氢。

[0267] 在某些实施方案中，所述试剂盒包含表面活性剂，诸如 Brij® 35、TWEEN®、Tergitol™和 Triton ™。

[0268] 在某些实施方案中，所述试剂盒包含抗氧化剂，其选自锡酸钠、偏硫酸氢钠和硫酸氢钠。

[0269] 在某些实施方案中，所述试剂盒包含铜媒染剂。所述试剂盒可包含额外的组分，包括抗体、半抗原标记的探针以及进行经生色检测的 IHC 和 / 或者 ISH 所需的其它试剂。所述试剂盒可由例如临床医师或者医师来使用，其作为针对特定患者或者针对诊断目的而选择适当疗法的辅助。

[0270] 具体实施方案涉及使用包含以下的试剂盒 :抑制剂，诸如 3%H_2O_2;通用多聚体 HRP，诸如与 HRP 缀合的山羊抗小鼠 / 兔 ;过氧化物，诸如 0.03%H_2O_2;色原体，诸如 DAB ;以及铜媒染剂。该试剂盒称为 ultraView™，且其可用于与公开的增强剂组合。

[0271] H. 自动化实施方案

[0272] 本领域技术人员应该认识到用于生色检测两种或者更多种分子的本申请公开的方法的实施方案可以自动化。Ventana Medical Systems, Inc. 为众多公开了用于进行自动化分析的系统和方法的美国专利的受让人，所述专利包括美国专利 5,650,327、5,654,200、6,296,809、6,352,861、6,827,901 和 6,943,029，以及美国公开申请 20030211630 和 20040052685。该方法的具体实施方案使用各种自动化过程来进行。

[0273] IV. 操作实施例

[0274] 提供下述实施例以示例说明操作实施方案的某些具体特征。本发明的范围不限于如下述实施例所示例说明的那些特征。

[0275] 实施例 1

[0276] 使用咪唑的 IHC 组织染色

[0277] 对扁桃体上的 bcl2 的 IHC 染色使用咪唑增强的 ultraView™通用 DAB 色原体来进行。咪唑 (10mM-100mM) 显著增加了 DAB 染色强度 (参见图 1 和 2)。然而,随着期望的 DAB 信号增加,观察到的背景信号也增加。较高浓度的咪唑被证实为不相容的,其导致 DAB 由重新配制的 DAB 色原体溶液沉淀。

[0278] 实施例 2

[0279] 增强剂的动力学筛选

[0280] 开发板测定,能够独立地筛选可能的化合物且更好地理解观察到的增强的 DAB 沉积,如在实施例 1 中所证实。将添加剂直接加入至孔中,该孔含有来自 ultraView™检测试剂盒 (VMSI760-500:253-4290、253-4292 和 253-4293) 的必要试剂,其在 1X 反应缓冲剂 (VMSI950-300) 和 0.1% 鱼明胶中。鱼明胶用于帮助分散氧化的 DAB 且抑制其由溶液沉淀。将 ultraView™检测试剂盒稀释,经 UV-VIS 在 455nm 测量氧化的 DAB 的形成。将添加剂在设定浓度中测试,确定在 DAB 氧化反应中的增强作用。将该数据绘图,且在每个添加剂浓度水平处计算表观最大速度 (V_{max})。

[0281] 4- 乙酰基酰氨基苯基硼酸和咪唑的最初测试证实了在任一添加剂浓度增加时,对于 HRP 的反应速度也增加 (分别参见图 3 和 4)。HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max}为 18.5mOD/ 分钟,不具有增强作用。10mM 咪唑的加入使得表观 V_{max}增加了 56%,且 10mM4- 乙酰基酰氨基苯基硼酸的加入使得表观 V_{max}增加了 77%(增加百分数 V_{max}=[(增强的 V_{max}-uView V_{max})/uView V_{max}]x100%)。

[0282] 由上述结果得到启示,研究了可用作为潜在增强剂的其它缓冲剂。在咪唑类似物的概念用途之外,还研究了 L- 组氨酸促进的过氧化物介导的氧化反应。50mM L- 组氨酸使得 HRP 的表观 V_{max}增加了 138%(参见图 5)。随着咪唑的浓度更高,50mM L- 组氨酸还导致 DAB 由重新配制的 DAB 色原体溶液沉淀。10mM 浓度的 L- 组氨酸在 DAB 重新配制制剂中使用。HRP 的表观 V_{max}由于 10mM L- 组氨酸而增加了 18%。也测试了硼酸盐缓冲剂。硼酸的缓冲能力不在针对 DAB 制剂的期望 pH 范围之内 (可变 pH 范围为约 1 至约 7.9,最终 pH 范围为约 2 至约 3),这是因为硼酸具有约 8.5 至约 10.2 的有效 pH 缓冲范围。10mM 硼酸的加入使得 HRP 的表观 V_{max}增强了 265%,然而 50mM 的硼酸使得 HRP 的表观 V_{max}大幅增强了 592%(参见图 6)。

[0283] 研究了其它杂环化合物,从而发现可进一步增加 HRP 的表观速率的一类新的增强剂。发现了嘧啶类似物为一类新的增强剂。HRP 介导的 DAB 氧化的所有增强剂的测定结果的汇总可在表 1 中找到。

[0284] 表 1 :当加入至 ultraView™检测试剂盒时增强剂对于 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max}的影响

[0285]

增强剂	浓度 (mM)	Vmax (mOD/min)	回归系数
无增强剂	n/a	18.50	0.985

[0286]

硼酸	10	67.47	0.989
	50	128.00	0.935
	100	47.60 (sat)	0.999
氯化钙	5	43.50	0.984
	10	52.50	0.999
	20	57.00	0.998
4-AcHNPhB(OH)2	5	21.20	0.971
	10	32.80	0.975
	20	32.00	0.977
咪唑	10	28.80	0.982
	50	38.80	0.967
	100	70.00	0.954
噻唑	10	66.40	0.993
	50	27.00 (sat)	0.989
	100	27.05 (sat)	0.972
噁唑	10	24.00	0.995
	50	40.00	0.961
	100	18.00 (sat)	0.998
嘧啶	10	104.00	0.961
	50	124.00	0.968
	100	36.80 (sat)	0.983
L-组氨酸	10	21.84	0.973
	50	44.00	0.999
	100	72.00	0.961
2-羟基嘧啶	10	144.00	2 pt.
	50	156.00	2 pt.
	100	148.00	2 pt.
胸腺嘧啶	10	82.00	0.984
	50 (sol)	86.00	0.896
	100 (sol)	74.00	0.990

[0287]

胞嘧啶	10	36.00	0.931
	50 (sol)	66.00	0.857
	100 (sol)	n/a (1)	n/a (1)
尿嘧啶	10	52.00	0.942
	50 (sol)	72.00	0.933
	100 (sol)	n/a (1)	n/a (1)
2-硫代巴比妥酸	10	54.00	0.964
	50	56.00	0.911
	100	76.00	0.920
嘧啶-*N*-氧化物	10	104.00	2 pt.
	50	104.00	2 pt.
	100	36.00 (sat)	2 pt.
TEMPO	0.13% (8 mM)	18.00	0.993
	0.25% (16 mM)	24.80	0.914
	0.50% (32 mM)	21.20	0.959
NMO	0.13% (10.7 mM)	33.60	0.933
	0.25% (21.3 mM)	43.60	0.988
	0.50% (42.7 mM)	51.60	0.971
L-色氨酸	10	30.00	0.994
	50	52.00	0.825
	100	64.00	2 pt.
2-羟基吡啶	10	47.67	2 pt.
	50	18.19 (sat)	0.970
	100	15.98 (sat)	0.985

[0288] 氧化的 DAB 的光密度在 455nm 监测。(Sat)= 开始 UV-VIS 分析时反应速率达到饱和。(Sol)= 在室温发生溶解性问题。需要热量以将添加剂在反应缓冲液中溶解。(1) 添加剂在室温不可溶。

[0289] 10mM 嘧啶的加入使得 HRP 的表观 V_{max} 大幅增加了 462%。DAB 氧化的该表观速率增加高于其它杂环增强剂（咪唑、噻唑和噁唑核心结构）所观察到的增加。将嘧啶浓度增加至 50mM（相对于 10mM）提供了 HRP 的 V_{max} 的适度增加 (570%)（参见图 7）。DAB 色原体与嘧啶的重新配制制剂产生了由于高蒸气压 (bp ≈ 124° C) 导致的潜在的问题。因此，研究了

其它嘧啶类似物，从而发现了不具有挥发性问题的适当的可替代方案。

[0290] 嘧啶核苷酸碱基（胸腺嘧啶、尿嘧啶和胞嘧啶）增加了 HRP 的表观速率，然而它们存在在含水缓冲剂中的溶解性问题。已经发现 2- 羟基嘧啶（参见图 8）和嘧啶 -N- 氧化物均提供了相对于嘧啶的相似或者增加的表观速率且不具有溶解性或者挥发性问题。先前已经显示了五元和六元杂环 N- 氧化物增加了寡糖和多糖的基于 HRP 的氧化（即纤维素氧化）的表观速率。DAB 与嘧啶 -N- 氧化物的重新配制制剂随着时间的推移丧失了功能性且终止了染色。然而，如果加入至组织上的 HRP 介导的氧化反应中，则嘧啶 -N- 氧化物仍然在增强溶液中有用。在嘧啶之外，10mM2- 羟基吡啶也增加了 HRP 的表观 V_{max}(157%)。苯并咪唑、亚甲蓝、吩噻嗪和 4- 二甲基氨基吡啶未提供增强作用。

[0291] 实施例 3

[0292] 增强剂的协同和拮抗作用

[0293] 实施例 2 的板测定用于研究各个添加剂对于 HRP 介导的 DAB 氧化的表观速率的潜在的协同和拮抗作用。对于每个试验，相同浓度的来自 ultraView™检测试剂盒 (VMSI760-500 :253-4290、253-4292 和 253-4293) 的试剂在含有 0.1% 鱼明胶的 1X 反应缓冲剂 ™中使用。在每个试验中，一次性一起加入增强剂。结果汇总于图 9 和表 2 中。

[0294] 表 2 :当先后加入至 ultraView™检测试剂盒时，评价了增强剂对 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max}的影响。

[0295]

条目	增强剂	Vmax (mOD/min)	回归系数
1	无增强作用	18.50	0.985
2	10 mM咪唑	34.00	0.904
3	(2) + 10 mM氯化钙	96.00	0.982
4	(3) + 10 mM 硼酸	138.00	0.915
5	(4) + 10.7 mM NMO	84.00	2 pt
6	(5) + 50 mM L-组氨酸	92.00	2 pt
7	(5) + 10 mM 嘧啶	140.00	2 pt

[0296] 氧化的 DAB 的光密度在 455nm 监测。(NMO=4- 甲基 - 吗啉 N- 氧化物）。

[0297] 如前在表 1 中显示，10mM 硼酸使得 HRP 的表观速率增加了 265%。已经显示了将氯化钙加入至 HRP 测定增加了 HRP 的表观速率和稳定性。将 10mM 氯化钙和 10mM 硼酸同时加入至含有 10mM 咪唑的测定中协同性增加了 HRP 的表观速率。

[0298] 吗啉 -N- 氧化物增加了 HRP 反应的表观速率（参见表 1）;然而，当加入至测定混合物 4（参见表 2, 条目 5）中时，观察到拮抗作用。将 50mM L- 组氨酸或者 10mM 嘧啶加入至反应混合物 5（表 2, 条目 6 和 7）中增加了 HRP 的表观速率。这些数据支持了筛选 N- 氧化物在增强溶液中的使用。嘧啶 -N- 氧化物可用于与 L- 组氨酸组合以增加 DAB 在 IHC 组织染色中的沉积（参见图 11）。

[0299] 实施例 4

[0300] 使用增强剂的 IHC 组织染色

[0301] 使用增强的 DAB 色原体溶液进行了对扁桃体组织上的 bcl2 的 IHC 染色以进一步

研究增强剂对于 DAB 沉积的协同作用。对于 IHC 染色的病理学评分汇总显示于表 3 中。在相同时间段内读取器 1 进行了所有病理学评价。读取器 2 进行了分批评价（当最初产生载玻片时）且对于评分中的一些可变性进行了解释。

[0302] 表 3：使用 ultraView™DAB 染色和增强的 DAB 色原体溶液对扁桃体组织上的的 bcl2 的 IHC 染色的病理学评分汇总。

[0303]

测试的溶液	读取器 1	BG1	读取器 2	BG2
ultraView DAB	3.75	0.25	3	0.25
基础 1	3.75	0.5	4++	0.5
基础 1w/10mM 嘧啶	4	0.5	4++	0
基础 1w/10mM $CaCl_2$	4	0.5	3.5	0.5
基础 1w/5mM 亚磷酸盐	3.75	0.25	4	0.5
基础 2	4	0.5	4	0.75
基础 2w/10mM 嘧啶	4+	0.5	3.5	0.5
基础 2w/10mM $CaCl_2$	4	0.5	3.5	0.5
基础 2w/5mM 亚磷酸盐	4+	0.5	3.75	0.5
基础 3	4+	0.75	3.5	0.5
基础 3w/10mM $CaCl_2$	4+	0.5	3.5	0.5
基础 3w/5mM 亚磷酸盐	4+	0.75	3.75	0.5
基础 4	4	0.5	4	0.25
基础 4w/10mM 硼酸	4	0.5	3.5	0
基础 2w/10mM 硼酸	4	0.5	4	0.25
基础 4w/10mM 胸腺嘧啶	4	0.5	4	0.25
基础 4w/10mM2-OH 嘧啶	3.75	0.5	4	0.5
基础 4w/10mM L- 色氨酸	4	0.5	4	0.25
基础 4w/10mM 嘧啶 -N- 氧化物	4+	0.5	4	0.25

基础 4w/10mM $CaCl_2$	4	0.75	3.5	0.25
基础 4a	4+	0.75	3.5	0.5
基础 4a w/10mM 嘧啶	4+	0.75	3.5	0.25
基础 4a w/10mM2-OH 吡啶	4+	0.75	4++	0

[0304] 新的碱缓冲液的所有组合物含有 5.5mM3,3-二氨基联苯胺四氢氯化物(DAB·4HCl)和 0.05%wt. Brij® 35(不含过氧化物酶)。[基础 1:50mM L-组氨酸(pH=6.5);基础 2:10mM 咪唑(pH=6.5);基础 3:2.43mM 柠檬酸、5.13mM 磷酸钠(pH=5.3);基础 4:10mM L-组氨酸(pH=6.5);基础 4a:10mM L-组氨酸(pH=6.5)、10mM 氯化钙、10mM 硼酸]。

[0305] 注意到两项一般性观察。第一,对于 DAB 的 HRP 沉积的最大表观速率增强作用通过 2-3 种增强剂组分的组合来实现。其它增强剂并未增加组织上的最强 DAB 染色的信号强度;然而,具有最高信号强度的染色细胞的百分数在整个组织中增加。该观察结果很大程度上是由于经组织上的 HRP-DAB 氧化反应所观察到的有限周转数目。第二,增加板测定中的 HRP 介导的 DAB 氧化的增强剂提供了 DAB 在组织上的更加离散的沉积。DAB 染色通常较少扩散。

[0306] 使用 5.5mM DAB 溶液(由 10mM 咪唑或者 10mM L-组氨酸以及 0.05% Brij® 35 配制)对 bcl2(扁桃体)的 IHC 染色显示于图 10 和 11 中。使用 10mML-组氨酸的 DAB 染色的病理学观察显示了与由 10mM 咪唑所获得的强度相似的强度。

[0307] 使用 5.5mM DAB 溶液(由 10mM 嘧啶 -N-氧化物或者 10mM2-羟基嘧啶在 10mM L-组氨酸以及 0.05% Brij® 35 中配制)的组织染色显示于图 12 和 13 中。使用两种增强剂溶液的 DAB 染色的病理学观察显示了嘧啶 -N-氧化物提供了对于两种增强剂的最佳的 DAB 信号对背景比。

[0308] 通过将"增强溶液"加入至标准 ultraView™ 检测试剂盒中来评价对扁桃体组织上的 bcl2 的 IHC 染色。未对 ultraView™ 试剂的浓度进行校正以补偿增强溶液的稀释(参见图 14-17)。由病理学读取器 1 挑选 50mM L-组氨酸和 10mM 嘧啶(图 16)作为优选的 DAB 染料,如在表 3 中显示。100mM 咪唑和 50mM 硼酸增加 DAB 沉积,但减小 DAB 信号的动态范围且增加血清背景。较低浓度的增强剂将增加 DAB 信号的动态范围。10mM L-组氨酸、10mM2-羟基吡啶、10mM 氯化钙、10mM 硼酸的溶液显示较弱的 DAB 信号(当重新配制 DAB 溶液时)(表 3 的最后一排)。10mM 嘧啶 -N-氧化物为对于增强溶液的首要候选物。

[0309] 实施例 5

[0310] 米氏动力学 (Michaelis-Menton Kinetics)

[0311] 为了进一步研究 HRP 氧化的 DAB 的增加的表观 V_{max} 中的协同作用,计算表 3 中的最佳增强的 DAB 色原体混合物的米氏动力学。使得 1:32 稀释的 ultraView™ HRP 多聚体与可变浓度的过氧化氢(0.015μM-0.514μM)反应,使得 HRP 的表观速率达到饱和。最初,咪唑和 L-组氨酸均与 10mM 嘧啶(参见图 18)和 10mM2-羟基嘧啶(参见图 19)一起研究。用 1/2 V_{max} 计算相似的 K_m 值,但相比于 L-组氨酸,咪唑获得更大的表观 V_{max}(参见表 4)。当酶底

物浓度处于饱和水平时，定义 $V_{max}=k_{cat}\cdot[E]_{total}$。当酶浓度保持恒定时，表观 V_{max} 与 k_{cat}（HRP 的表观周转率或者一级速率常数）成比例。咪唑增加 HRP 的表观周转率高于 L- 组氨酸。

[0312] 表 4：当与 50mM 咪唑、10mM 氯化钙和 10mM 硼酸组合时，增强剂对 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max} 的影响

[0313]

增强剂	Vmax (mOD/min)	Km
无增强剂	228	0.073
含有 10 mM 嘧啶的缓冲剂		
10 mM 咪唑	330	0.085
10 mM L-组氨酸	300	0.088
含有 10 mM 2-羟基嘧啶的缓冲剂		
50 mM 咪唑	320	0.081
50 mM L-组氨酸	317	0.084
增强剂在 50 mM 咪唑、10 mM 氯化钙、10 mM 硼酸中的溶液		
50 mM 嘧啶	326	0.082
10 mM 2-羟基嘧啶	320	0.081
10 mM 2-羟基吡啶	383	1.001
嘧啶-N-氧化物	374	0.098

[0314] K_m 在 $1/2V_{max}$ 确定。

[0315] 针对对 HRP 的表观 V_{max} 的影响来筛选含有增强剂的咪唑 DAB 色原体溶液（参见图 20 和表 4）。50mM 咪唑用于 DAB 氧化的较大增强作用。对 HRP 表观周转率的增强作用为 10mM2- 羟基吡啶 >10mM 嘧啶 -N- 氧化物 >50mM 嘧啶 >10mM2- 羟基嘧啶。这些结果与在表 3 中所讨论的观察到的染色强度平行。

[0316] 使用表 4 中的 DAB 色原体溶液，板测定使用可变浓度的 ultraView™HRP 多聚体（0.27pg-68.8pg）来进行。监测表观 V_{max} 且数据报告为相比于未增强反应而言的表观 V_{max} 的增加百分数或者降低百分数（参见表 5）。随着 HRP 浓度的降低，观察到 HRP 的表观 V_{max} 的增加。在较低的 HRP 浓度时，变化幅度增加。这些数据证实了来自表 4 的结果，其中咪唑提供了相对于 L- 组氨酸的较大的表观 V_{max}。该作用在大多数浓度时观察到。

[0317] 表 5：当加入至 ultraView 检测试剂盒 ™中时，缓冲盐和增强剂对 HRP 氧化的 DAB 的表观 V_{max} 的影响

[0318]

基础盐	增强剂	HRP 浓度(pg)								
		68.8	34.4	17.2	8.59	4.3	2.15	1.07	0.54	0.27
10 mM 组氨酸	A	-12	-9	-7	3	-3	-7	-6	27	9
10 mM 咪唑	A	-22	-15	2	19	22	11	12	43	145
50 mM 组氨酸	B	-3	-10	0	13	10	0	4	35	9

[0319]

50 mM 咪唑	B	-3	14	16	30	28	18	34	71	32
50 mM 咪唑	C	-3	3	12	19	18	17	20	89	97
50 mM 咪唑	D	-2	11	10	20	31	30	62	58	45

[0320] 氧化的 DAB 的光密度在 455nm 监测。[增强剂 :(A)=10mM 嘧啶 ;(B)=10mM2- 羟基嘧啶、10mM 氯化钙、10mM 硼酸 ;(C)=10mM2- 羟基吡啶、10mM 氯化钙、10mM 硼酸 ;(D)=10mM 嘧啶 -N- 氧化物、10mM 氯化钙、10mM 硼酸]。

[0321] 实施例 6

[0322] 使用增强剂的 ISH 组织染色

[0323] ISH 组织染色使用增强的 DAB 溶液来检测。将 HER-2 阳性癌细胞系 CaLu3、ZR-75-1 和 MCF7 的 HER-23-in-1 小鼠异种移植物用 HER2DNA 探针 (VMSI480-4495) 处理并用 ultraView™DAB 色原体溶液或者含有 10mML- 组氨酸的增强的 DAB 色原体溶液染色 (参见图 21-22)。10mM L- 组氨酸增加了 DAB 在 CaLu3 癌细胞 (具有 HER2 的过度表达) 的 ISH 染色中的沉积。增加的 DAB 沉积对于最强的 ISH 信号而言是边际性的,但是对于较弱 DAB 信号的信号强度在整个组织中增大。对于在 IHC 中增强的 DAB 沉积中存在相同的观察结果。

[0324] 实施例 7

[0325] 使用增强剂的 TSA 组织染色

[0326] 增强的 DAB 沉积对扁桃体组织中的 bcl2 的 TSA-IHC 组织染色中进行评价。在 bcl2 一抗孵育 16 分钟后,将 bcl2 抗原用 TSA(使用 TA-HQ 沉积) 染色 4 分钟。酪酰胺沉积使用或不使用 10mM2- 羟基嘧啶来进行。DAB 沉积使用 ultraView™DAB 色原体溶液或者含有 10mM L- 组氨酸的 DAB 色原体溶液来进行 (参见图 23-26)。10mM L- 组氨酸增加了组织上的 DAB 沉积。

[0327] 在平行研究中,在 bcl2 一抗孵育 8 分钟后,将 bcl2 抗原用 TSA(使用 TA-HQ 沉积) 染色 4 分钟 (参见图 27 和 28)。10mM2- 羟基嘧啶增加了酪酰胺沉积且由此增加了 DAB 沉积。用 DAB 染色的细胞的百分数在具有低 bcl2 抗原表达的区域内增加。

[0328] 实施例 8

[0329] 18s 核糖核酸探针染色

[0330] 将福尔马林固定的石蜡包埋的 CaLu-3 异种移植物组织封固在 Superfrost® 载玻片上,去石蜡化并使用 RiboClear™变性剂 (RiboMap® 试剂盒的组分 ;Ventana® p/n760-102)(12 分钟孵育)、CC2 试剂 (Ventana® p/n950-123) 和蛋白酶 3 (Ventana® p/n760-2020)(8 分钟孵育) 来修复抗原。修复后,将两滴 (200μL)NP 半抗原化的反义链或者有义链 18s 探针分散在载玻片上,在 80° C 变性 8 分钟,且在 65° C 杂交 6 小时。杂交后,将载玻片使用 0.1x SSC 在 75° C 洗涤三次,8 分钟 ;使用 5μg 小鼠抗 NP HRP 缀合物、接着使用各 100μL 的 55μM 酪酰胺 -HQ 缀合物和 H_2O_2(ultraView™DAB 试剂盒的组分,Ventana® p/n760-500) 来检测每个 NP 半抗原化探针且孵育 12 分钟。使用 0.5μg 的小鼠抗 HQ HRP 缀合物、接着使用 1 滴 DAB(5.5mM DAB ;0.05% Brij® 35 ;10mM L- 组氨酸 ;10mM2- 羟基吡啶)

和 H_2O_2、在载玻片上孵育 8 分钟来检测沉积的酪酰胺 -HQ。ultraView™DAB 用作为参照。在将载玻片在反应缓冲剂中淋洗之后，将 100 μ L 铜 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 施用于载玻片上达 4 分钟。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。使用梯度醇使得载玻片脱水，盖上盖玻片并使用明视野显微镜来观察。增强剂处理的样品和 ultraView™样品的比较分别显示于图 29 和 30 中。

[0331] 实施例 9

[0332] HPV 染色

[0333] 将福尔马林固定的石蜡包埋的 C33、HeLa 和 CaSki 异种移植物组织封固在 Superfrost 载玻片上，去石蜡化并使用 CC2 试剂(Ventana® p/n950-123) 和蛋白酶 3 (Ventana® p/n760-2020)(8 分钟孵育) 来修复抗原。修复后，将三滴 (300 μ L)SISH Hyb 缓冲剂 (ultraView™SISH 检测试剂盒的组分，p/n780-001) 和三滴 DIG 半抗原化的 HPV 探针分散在载玻片上，在 75° C 变性 8 分钟，且在 44° C 杂交 6 小时。杂交后，将载玻片使用 0.1x SSC 在 64° C 洗涤三次，达 8 分钟。使用 3 μ g 的小鼠抗 DIG HRP 缀合物、接着使用 DAB(5.5mM DAB ;0.05% Brij® 35; 10mM L- 组氨酸 ;10mM2- 羟基吡啶) 和 H_2O_2(ultraView™DAB 试剂盒的组分，Ventana p/n760-500)、在载玻片上孵育 8 分钟来检测 DIG 半抗原化的探针。ultraView™DAB 用作为参照。在将载玻片在反应缓冲剂中淋洗之后，将 100 μ L 铜 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 施用于载玻片上达 4 分钟。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。使用梯度醇使得载玻片脱水，盖上盖玻片并使用明视野显微镜来观察。增强剂处理的样品和 ultraView™样品的比较分别显示于图 31/32、33/34 和 35/36 中。

[0334] 实施例 10

[0335] CD20DAB 染色

[0336] 将福尔马林固定的石蜡包埋的扁桃体组织封固在 Superfrost 载玻片上，去石蜡化并使用 CC1 填充剂(Ventana® p/n950-124) 来修复抗原。修复后，将一滴 (100 μ L)UV 抑制剂 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 分散在载玻片上并孵育 8 分钟。在孵育抑制剂之后，将一滴小鼠抗 CD20(克隆 L-26 ;Ventana® p/n760-2531) 分散在载玻片上并孵育 16 分钟。在用反应缓冲剂淋洗两次后，使用 1 滴 ultraView™通用 HRP 缀合物 (ultraView ™DAB 试剂盒的组分) 检测 CD20 抗体并在载玻片上孵育 8 分钟。将一滴 DAB(5.5mM DAB ; 0.05% Brij® 35 ;10mM L- 组氨酸 ;10mM2- 羟基吡啶) 和 H_2O_2分别加至载玻片上并孵育 8 分钟。ultraView™DAB 用作为参照。在将载玻片在反应缓冲剂中淋洗之后，将 100 μ L 铜 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 施用于载玻片上达 4 分钟。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。使用梯度醇使得载玻片脱水，盖上盖玻片并使用明视野显微镜来观察。增强剂处理的样品和 ultraView™样品的比较分别显示于图 37 和 38 中。

[0337] 实施例 11

[0338] CD20 和 Ki-67AEC 染色

[0339] 将福尔马林固定的石蜡包埋的扁桃体组织封固在 Superfrost 载玻片上，去石蜡化并使用 CC1 填充剂(Ventana® p/n950-124) 来修复抗原。修复后，将一滴 (100μL) 抑制剂 (AEC 试剂盒的组分，Ventana® p/n760-020) 分散在载玻片上并孵育 8 分钟。在孵育抑制剂之后，将一滴小鼠抗 CD20(克隆 L-26 ；

[0340] Ventana® p/n760-2531) 或者兔抗 Ki67(克隆 30-9 ；Ventana® p/n790-4286) 分散在载玻片上并孵育 16 分钟。在用反应缓冲剂淋洗两次后，使用 1 滴 ultraView™通用 HRP 缀合物 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 检测所述抗体并在载玻片上孵育 8 分钟。加入一滴含有 50mM L- 组氨酸 (pH6.5) 和 10mM2- 羟基吡啶的增强溶液并与 AEC 和 H_2O_2 各一滴共同孵育且孵育 8 分钟。用不具有任何增强作用的 AEC 色原体染色的载玻片用作为参照。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。将载玻片空气干燥 ；用含水封固剂加盖盖玻片且使用明视野显微镜来观察。增强剂处理的样品和 ultraView™样品的比较分别显示于图 39/40 和 41/42 中。

[0341] 实施例 12

[0342] Bcl-2DAB 染色

[0343] 将福尔马林固定的石蜡包埋的扁桃体组织封固在 Superfrost 载玻片上，去石蜡化并使用 CC1 填充剂(Ventana® p/n950-124) 来修复抗原。修复后，将一滴 (100μL)UV 抑制剂 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 分散在载玻片上并孵育 8 分钟。在孵育抑制剂之后，将一滴小鼠抗 bcl2(克隆 124 ；Ventana® p/n790-4464) 分散在载玻片上并孵育 16 分钟。在用反应缓冲剂淋洗两次后，使用 1 滴 ultraView™通用 HRP 缀合物 (ultraView ™DAB 试剂盒的组分) 检测 bcl2 抗体并在载玻片上孵育 8 分钟。将一滴 DAB(5.5mM DAB ；0.05% Brij® 35 ；以及在表 3 中研究的增强剂的任何组合) 和 H_2O_2 各自加至载玻片上并孵育 8 分钟。ultraView™DAB 用作为参照。在将载玻片在反应缓冲剂中淋洗之后，将 100μL 铜 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 施用于载玻片上达 4 分钟。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。使用梯度醇使得载玻片脱水，盖上盖玻片并使用明视野显微镜来观察。

[0344] 实施例 13

[0345] Bcl-2-TSA-HQ DAB 染色

[0346] 将福尔马林固定的石蜡包埋的扁桃体组织封固在 Superfrost 载玻片上，去石蜡化并使用 CC1 填充剂(Ventana® p/n950-124) 来修复抗原。修复后，将一滴 (100μL)UV 抑制剂 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 分散在载玻片上并孵育 8 分钟。在孵育抑制剂之后，将一滴小鼠抗 bcl2(克隆 124 ；Ventana® p/n790-4464) 分散在载玻片上并孵育 16 分钟。在用反应缓冲剂淋洗两次后，使用 1 滴 ultraView™通用 HRP 缀合物 (ultraView ™DAB 试剂盒的组分) 检测 bcl2 抗体并在载玻片上孵育 8 分钟。将各 100μL 的 55uM 酪酰胺 -HQ(含有 / 不含有 10mM2- 羟基吡啶) 和 H_2O_2(ultraView™DAB 试剂盒的组分，

[0347] Ventana® p/n760-500) 孵育 12 分钟。使用 0.5μg 的小鼠抗 HQ HRP 缀合物、接

着使用 1 滴 DAB(5.5mM DAB ;0.05% Brij® 35; 10mM L- 组氨酸) 和 H_2O_2、在载玻片上孵育 8 分钟来检测沉积的酪酰胺 -HQ。ultraView™DAB 用作为参照。在将载玻片在反应缓冲剂中淋洗之后,将 100μL 铜 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 施用于载玻片上达 4 分钟。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。使用梯度醇使得载玻片脱水,盖上盖玻片并使用明视野显微镜来观察 (图 23-26)。

[0348] 实施例 14

[0349] Bcl-2-TSA-NP DAB 染色

[0350] 将福尔马林固定的石蜡包埋的扁桃体组织封固在 Superfrost 载玻片上,去石蜡化并使用 CC1 填充剂(Ventana® p/n950-124) 来修复抗原。修复后,将一滴 (100μL)UV 抑制剂 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 分散在载玻片上并孵育 8 分钟。在孵育抑制剂之后,将一滴小鼠抗 bcl2(克隆 124 ;Ventana® p/n790-4464,1:300 稀释) 分散在载玻片上并孵育 16 分钟。在用反应缓冲液淋洗两次后,使用 1 滴 ultraView™通用 HRP 缀合物 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 检测 bcl2 抗体并在载玻片上孵育 8 分钟。将各 100μL 的 5uM 的酪酰胺 -NP(含有 / 不含有 10mM2- 羟基吡啶) 和 H_2O_2(ultraView™DAB 试剂盒的组分,Ventana® p/n760-500) 孵育 12 分钟。使用 0.5μg 的小鼠抗 NP HRP 缀合物、接着使用 1 滴 DAB(5.5mM DAB ;0.05% Brij® 35; 10mM L- 组氨酸 ;10mM2- 羟基吡啶) 和 H_2O_2、在载玻片上孵育 8 分钟来检测沉积的酪酰胺 -HQ。ultraView™DAB 用作为参照。在将载玻片在反应缓冲液中淋洗之后,将 100μL 铜 (ultraView™DAB 试剂盒的组分) 施用于载玻片上达 4 分钟。使用苏木精 II (Ventana® p/n790-2208) 和 Bluing 试剂(Ventana® p/n760-2037) 来复染载玻片。使用梯度醇使得载玻片脱水,盖上盖玻片并使用明视野显微镜来观察 (图 43-46)。

[0351] 在考虑到公开的本发明的原理可应用到的许多可能的实施方案时,应该认识到示例说明的实施方案仅为本发明的优选实施例且不应理解为限制本发明的范围。更准确来说,本发明的范围由所附权利要求所限定。因此要求全部落入到这些权利要求的范围和主旨中的实施方案为本发明。

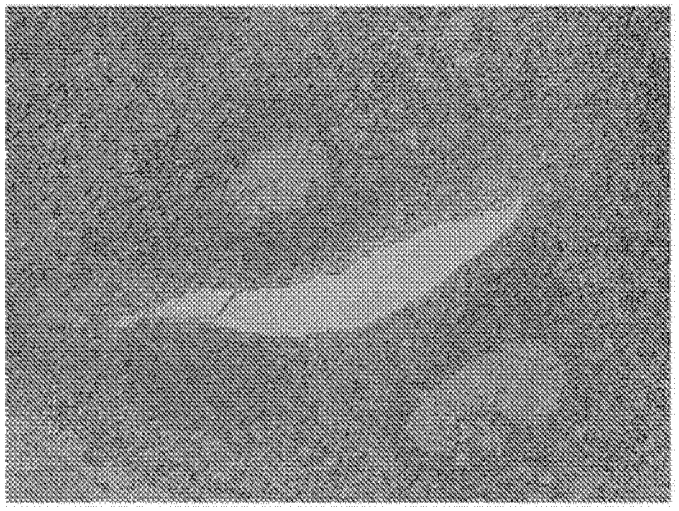


图 1

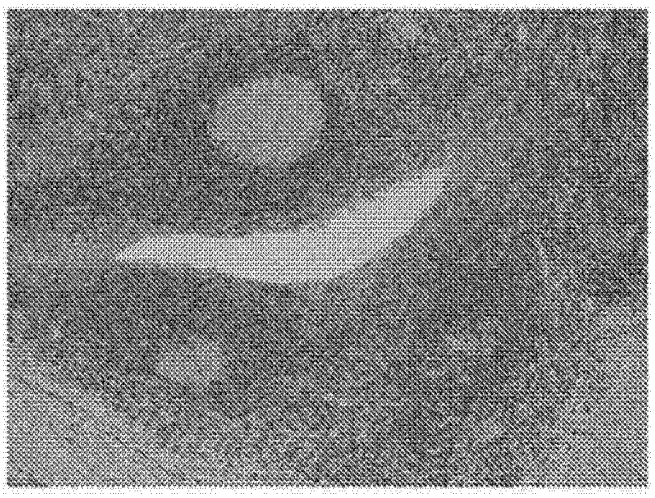


图 2

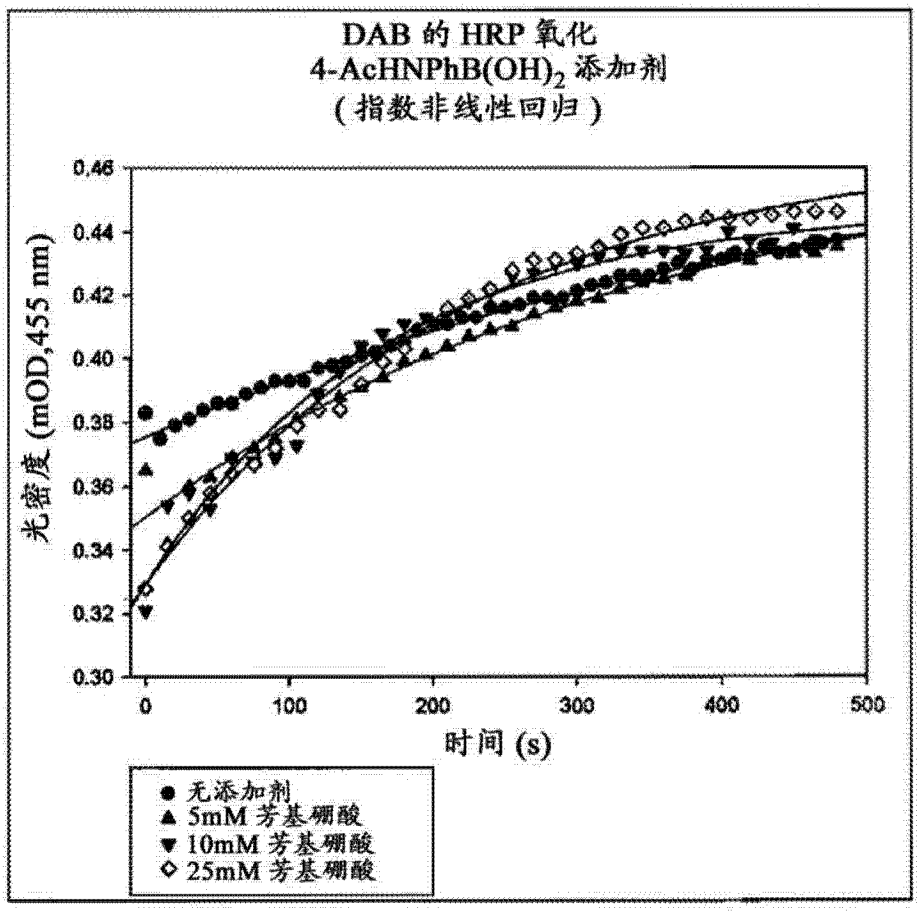

DAB 的 HRP 氧化
4-AcHNPhB(OH)2 添加剂
(指数非线性回归)
光密度 (mOD,455 nm)
0.46
0.44
0.42
0.40
0.38
0.36
0.34
0.32
0.30
0
100
200
300
400
500
时间 (s)
无添加剂
5mM 芳基硼酸
10mM 芳基硼酸
25mM 芳基硼酸

图 3

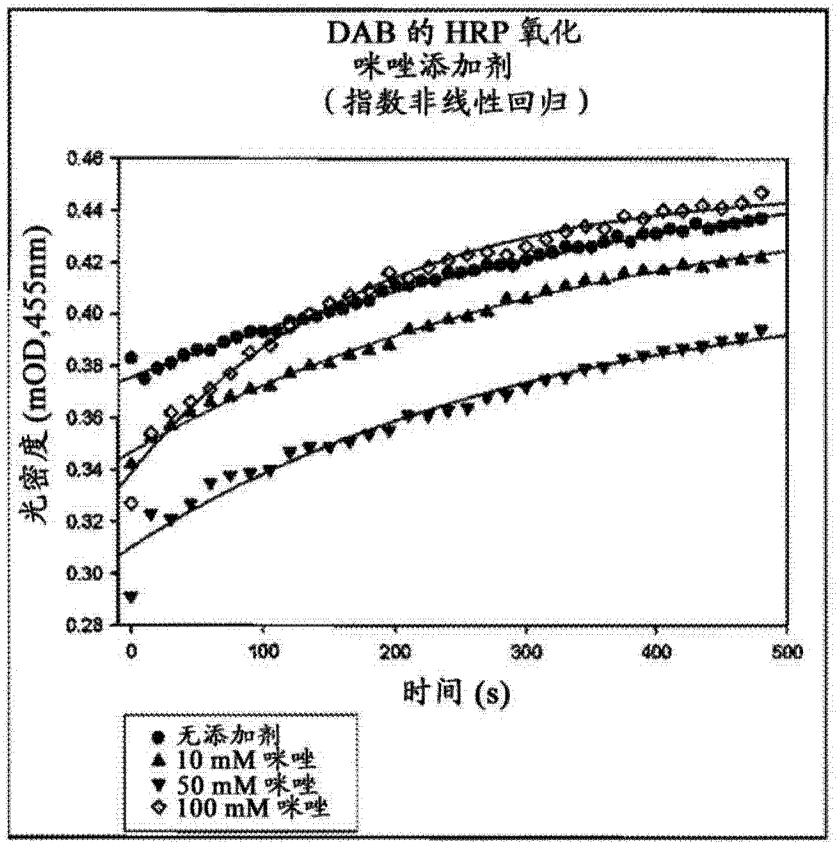

DAB 的 HRP 氧化
咪唑添加剂
（指数非线性回归）
光密度 (mOD,455nm)
时间 (s)
无添加剂
10 mM 咪唑
50 mM 咪唑
100 mM 咪唑

图 4

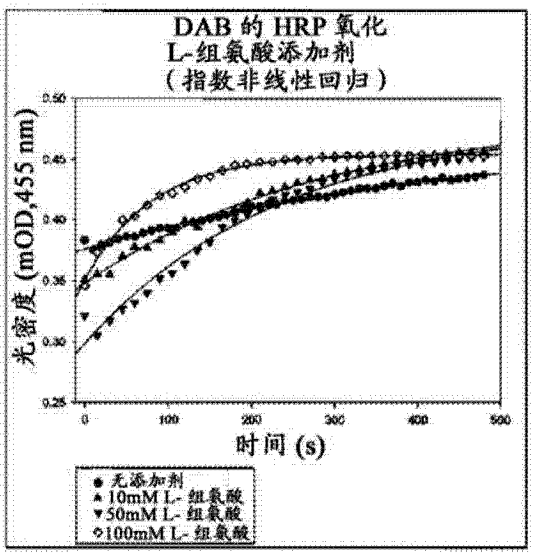

DAB 的 HRP 氧化
L-组氨酸添加剂
（指数非线性回归）
光密度 (mOD,455 nm)
时间 (s)
无添加剂
10mM L- 组氨酸
50mM L- 组氨酸
100mM L- 组氨酸

图 5

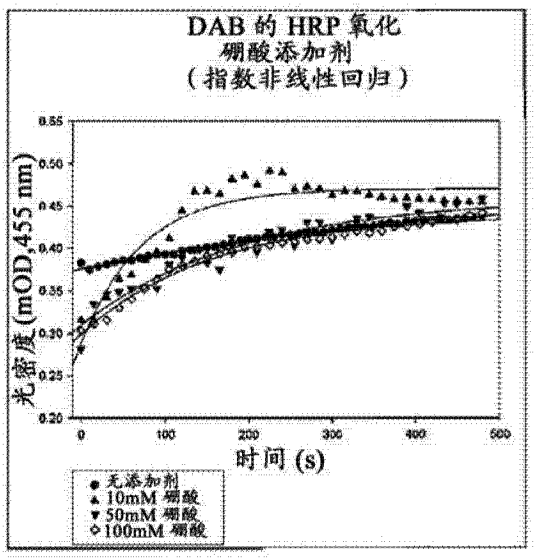

DAB 的 HRP 氧化
硼酸添加剂
（指数非线性回归）
光密度 (mOD,455 nm)
时间 (s)
无添加剂
10mM 硼酸
50mM 硼酸
100mM 硼酸

图 6

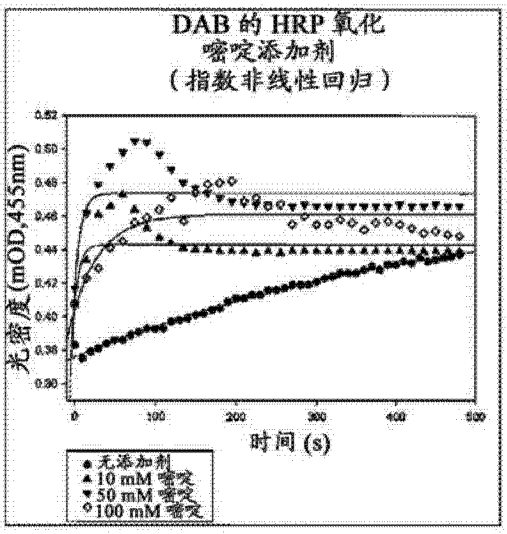

DAB 的 HRP 氧化
嘧啶添加剂
（指数非线性回归）
光密度 (mOD,455nm)
时间 (s)
无添加剂
10 mM 嘧啶
50 mM 嘧啶
100 mM 嘧啶

图 7

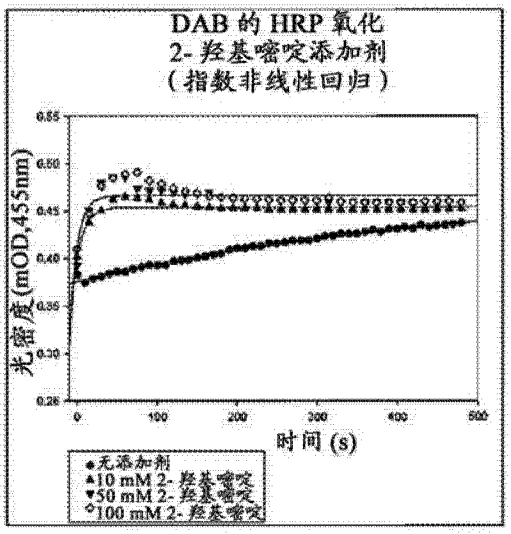

DAB 的 HRP 氧化
2- 羟基嘧啶添加剂
（指数非线性回归）
光密度 (mOD,455nm)
时间 (s)
无添加剂
10 mM 2- 羟基嘧啶
50 mM 2- 羟基嘧啶
100 mM 2- 羟基嘧啶

图 8

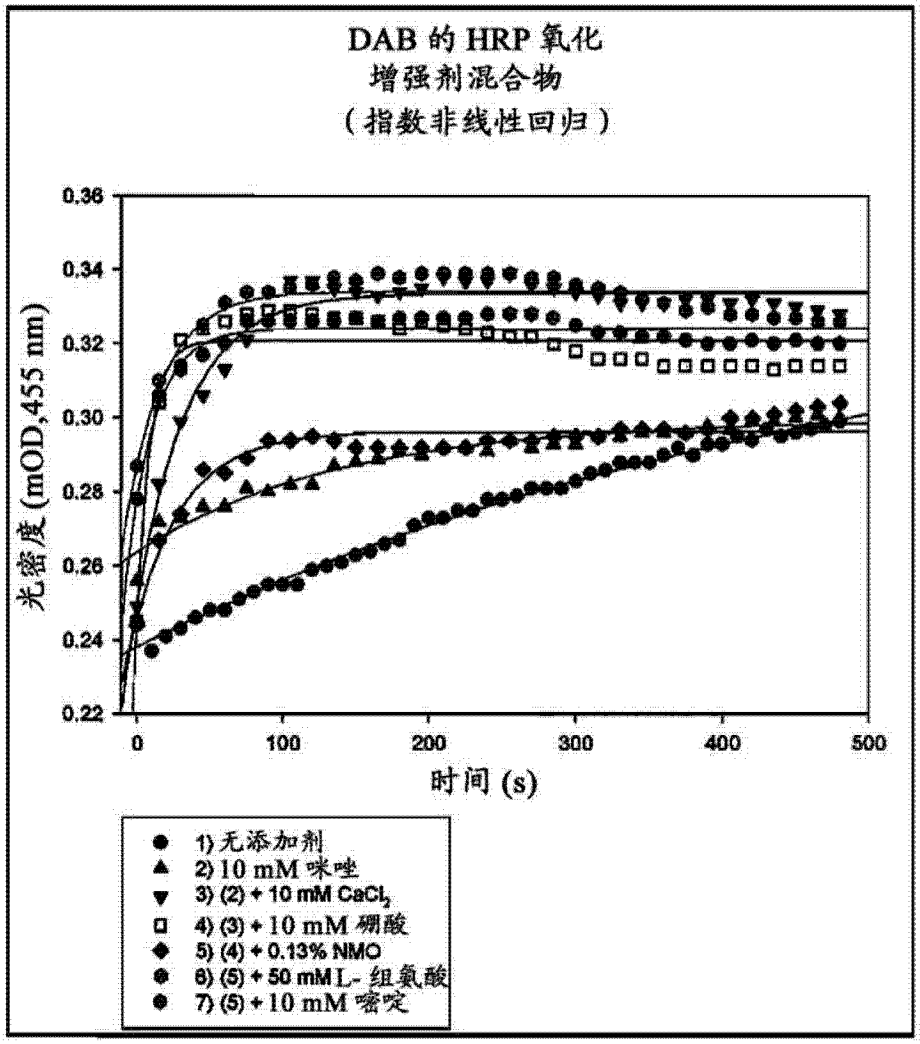

DAB 的 HRP 氧化
增强剂混合物
（指数非线性回归）
光密度 (mOD,455 nm)
时间 (s)
1) 无添加剂
2) 10 mM 咪唑
3) (2) + 10 mM CaCl2
4) (3) + 10 mM 硼酸
5) (4) + 0.13% NMO
6) (5) + 50 mM L- 组氨酸
7) (5) + 10 mM 嘧啶

图 9

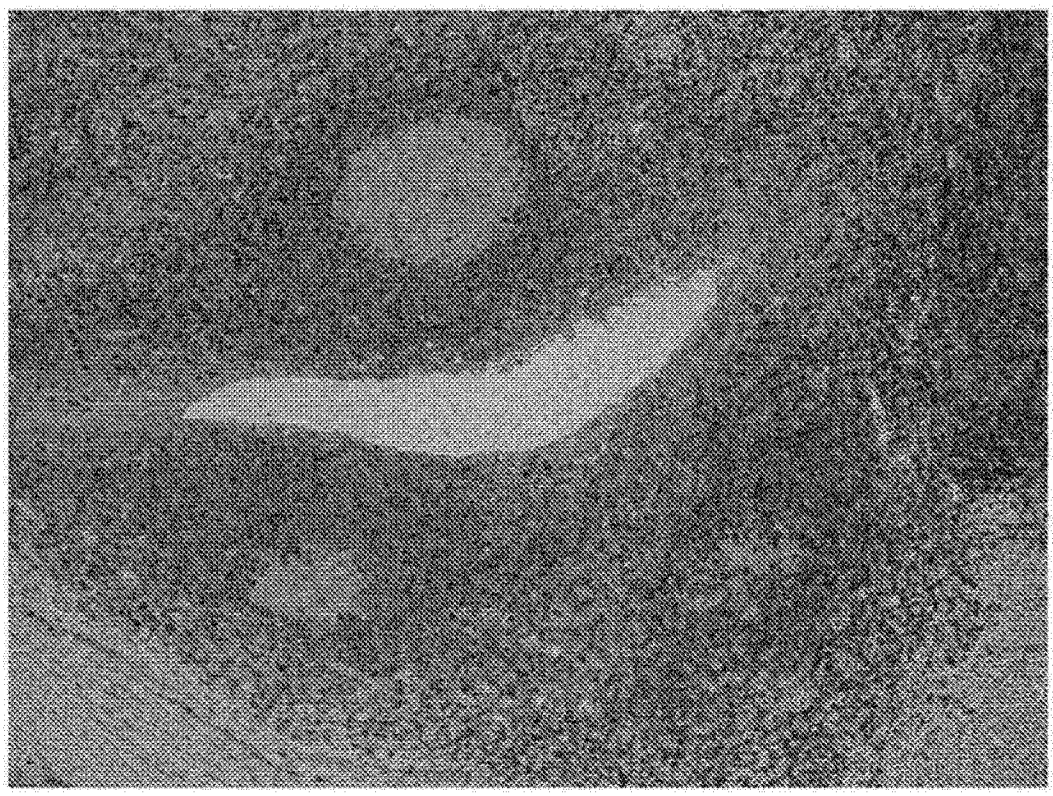


图 10

图 11

图 12

图 13

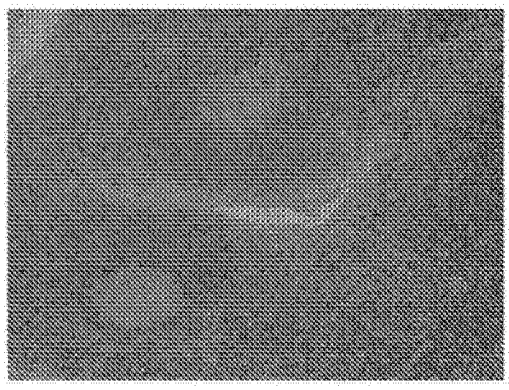


图 14

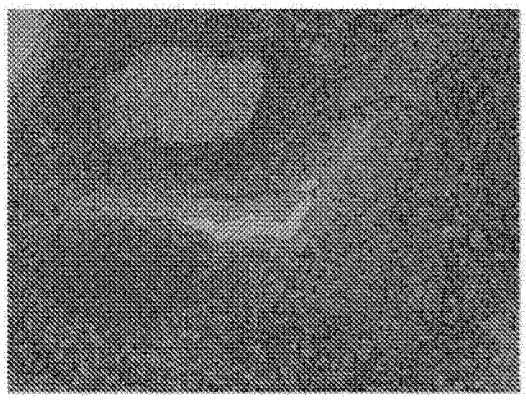


图 15

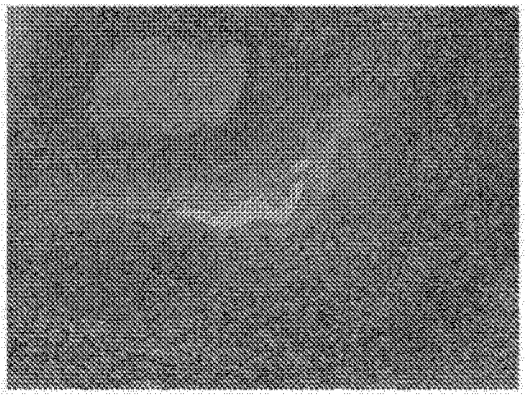


图 16

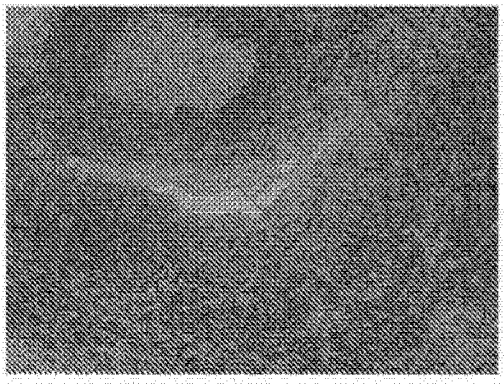


图 17

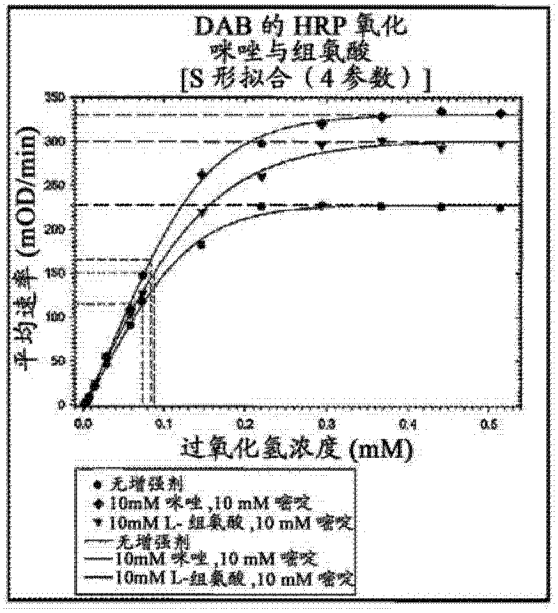


图 18

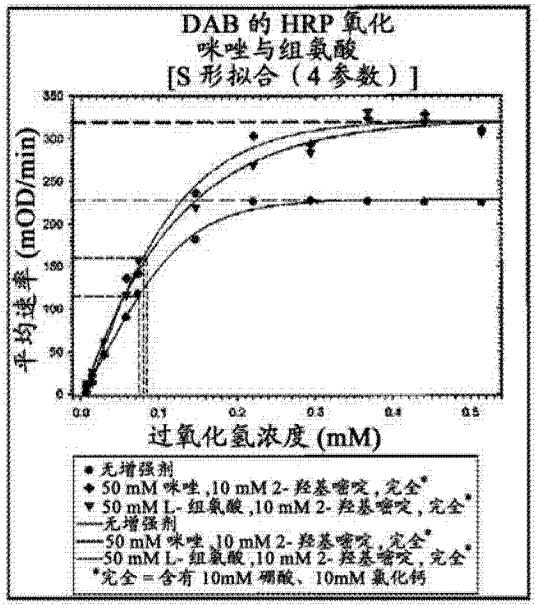


图 19

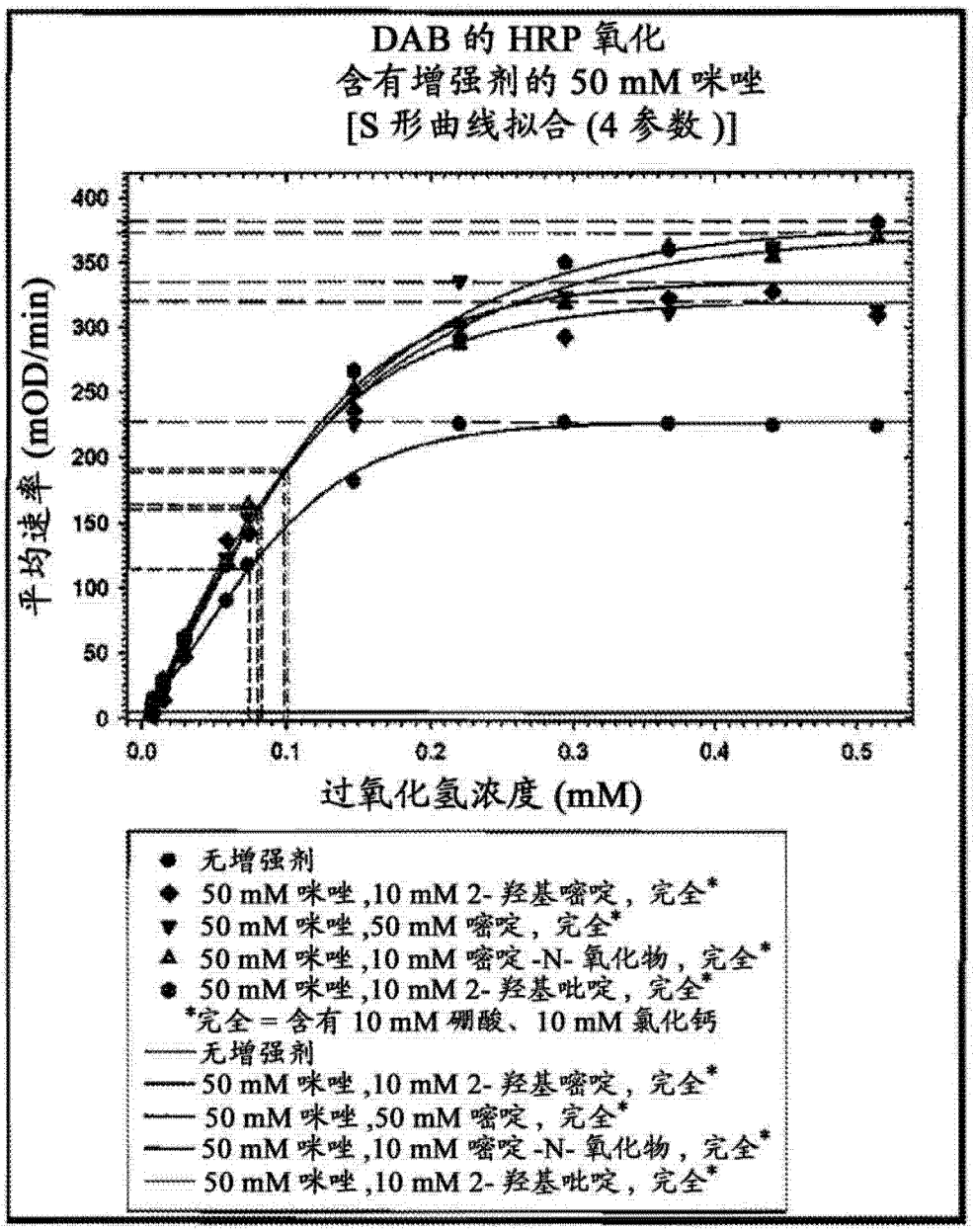

DAB 的 HRP 氧化
含有增强剂的 50 mM 咪唑
[S 形曲线拟合 (4 参数)]
平均速率 (mOD/min)
过氧化氢浓度 (mM)
无增强剂
50 mM 咪唑 ,10 mM 2- 羟基嘧啶，完全*
50 mM 咪唑 ,50 mM 嘧啶，完全*
50 mM 咪唑 ,10 mM 嘧啶 -N- 氧化物，完全*
50 mM 咪唑 ,10 mM 2- 羟基吡啶，完全*
*完全 = 含有 10 mM 硼酸、10 mM 氯化钙

图 20

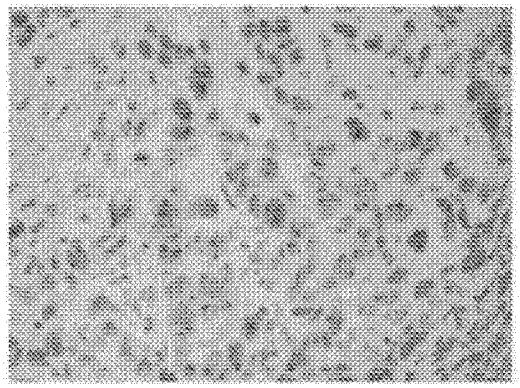


图 21

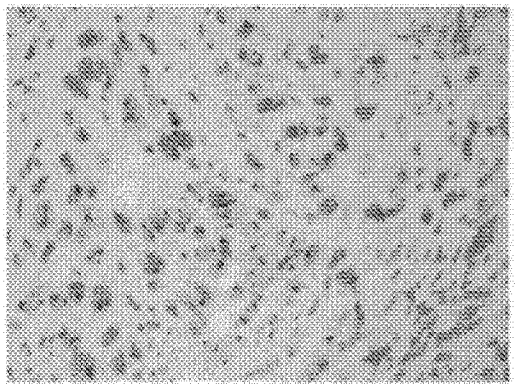


图 22

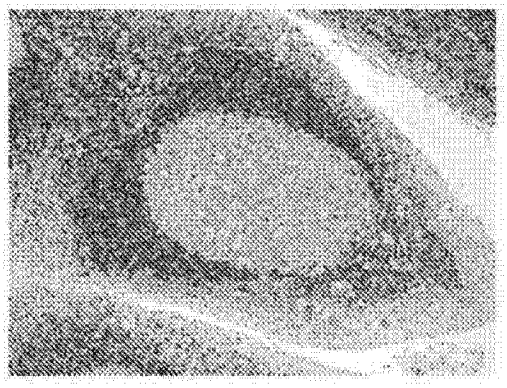


图 23

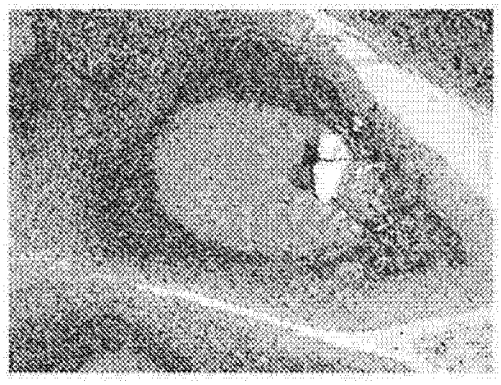


图 24

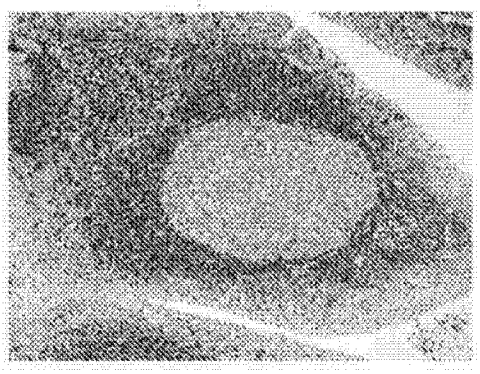


图 25

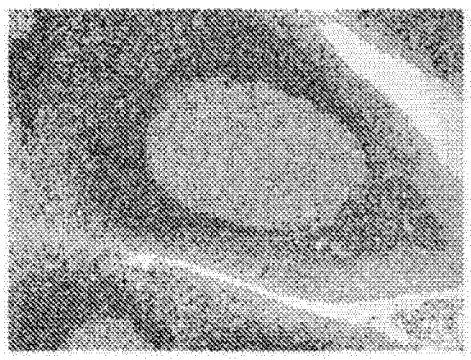


图 26

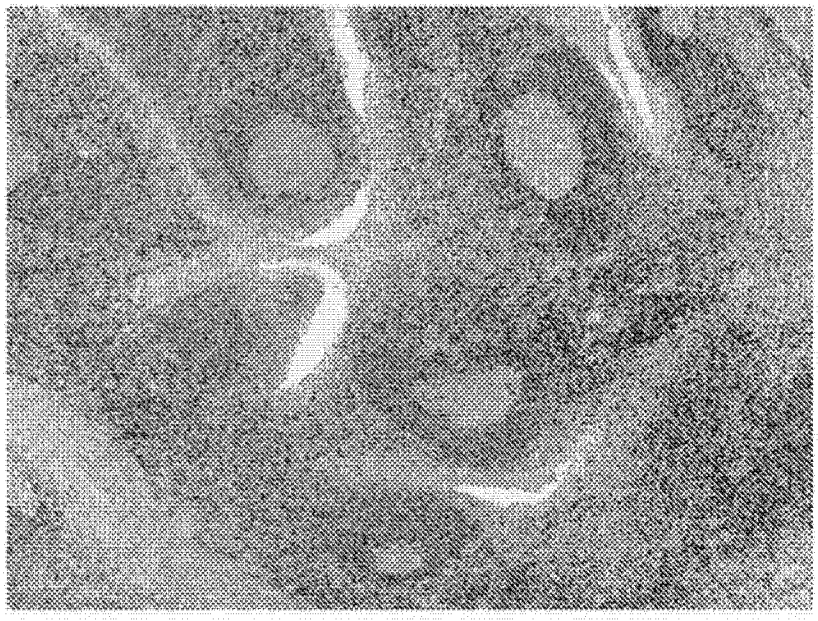


图 27

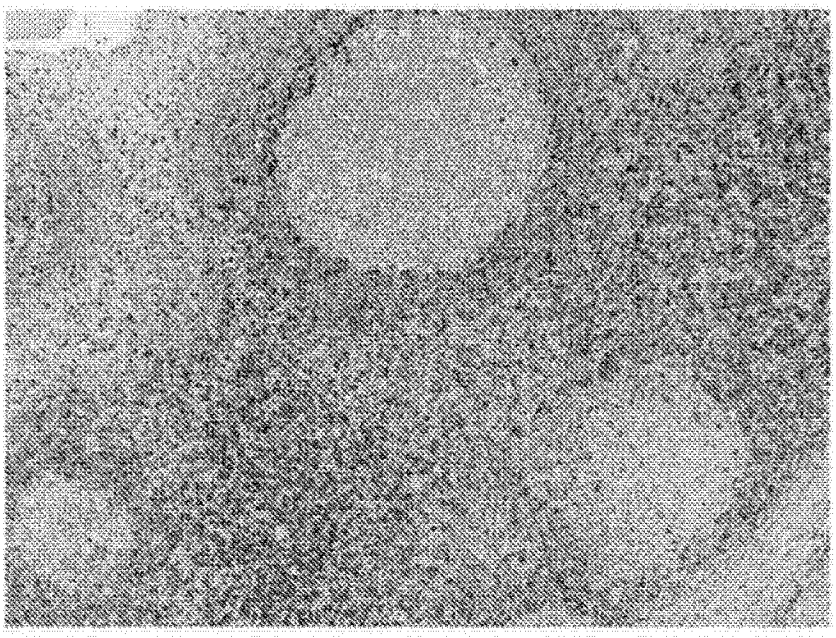


图 28

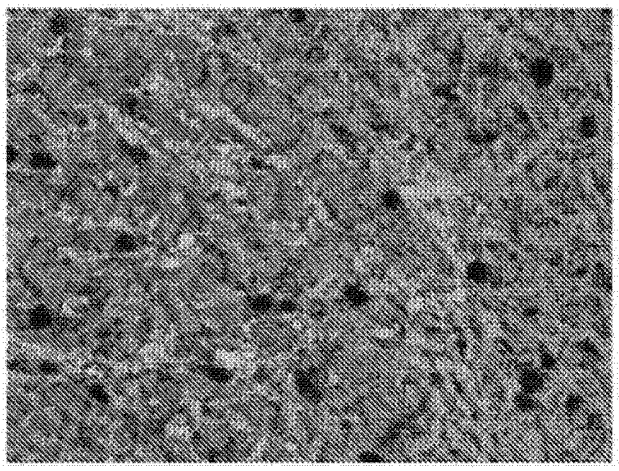


图 29

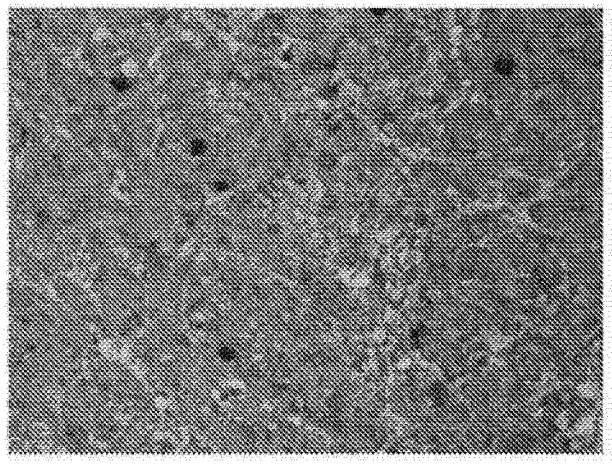


图 30

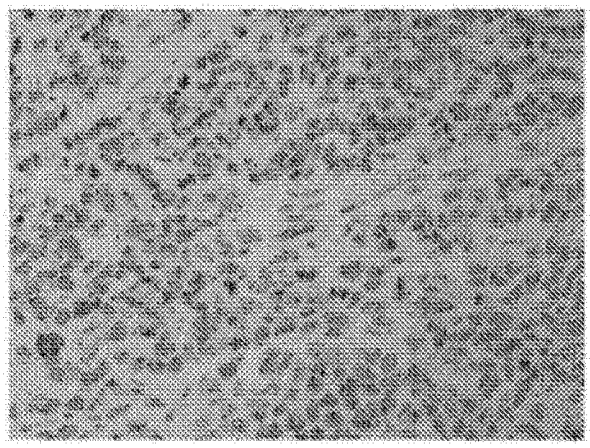


图 31

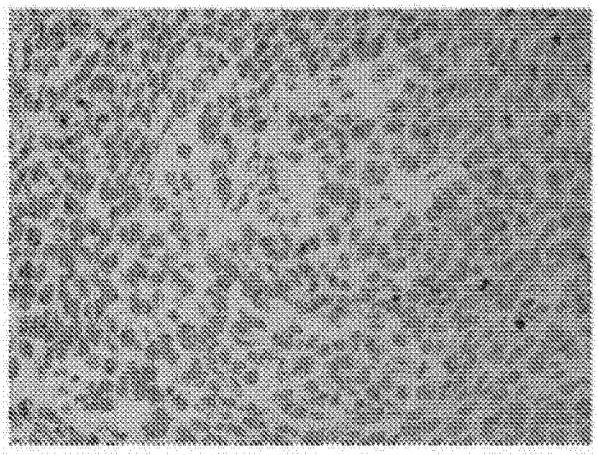


图 32

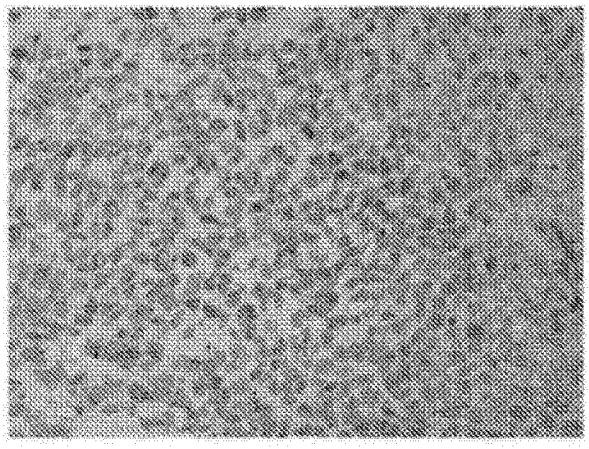


图 33

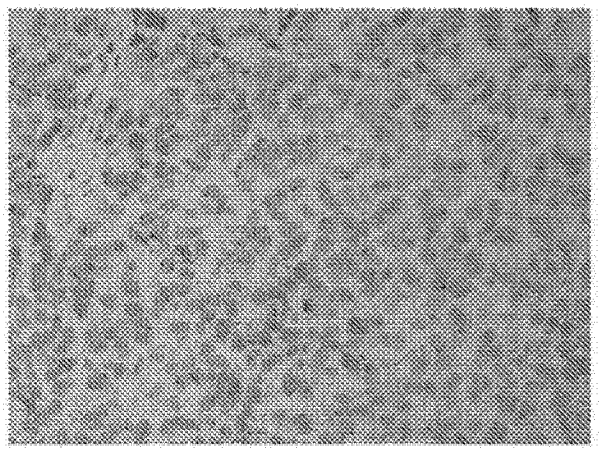


图 34

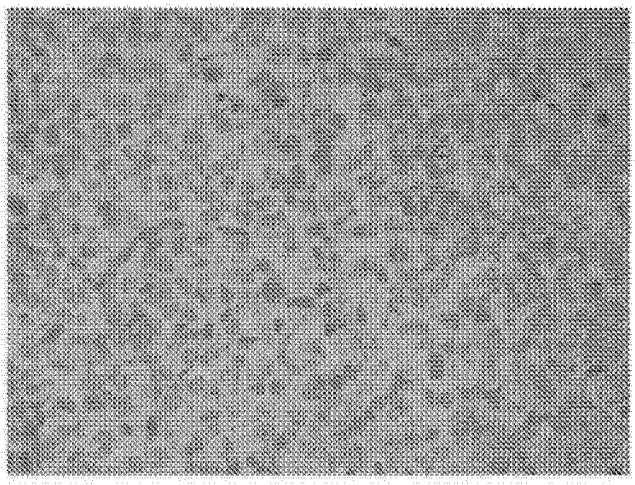


图 35

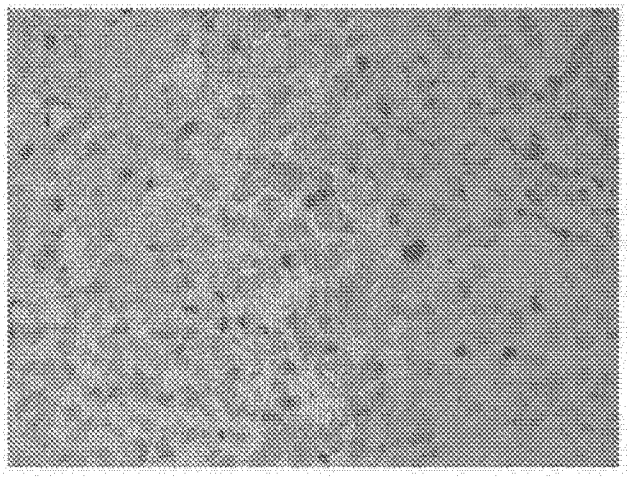


图 36

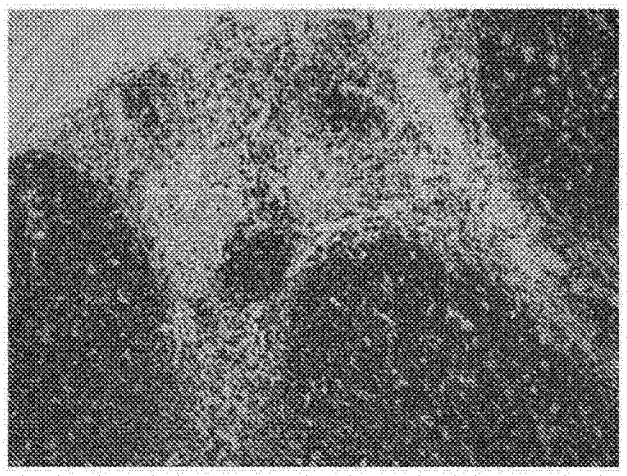


图 37

图 38

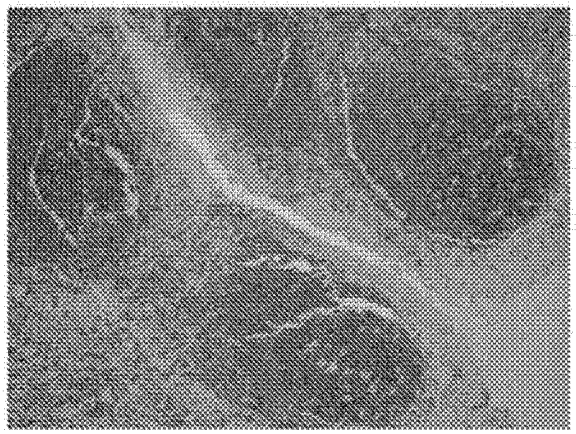


图 39

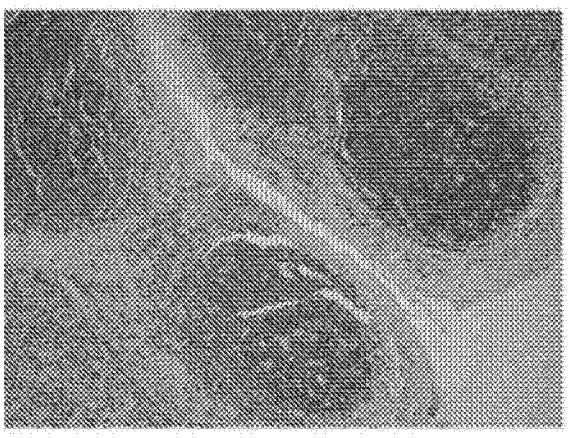


图 40

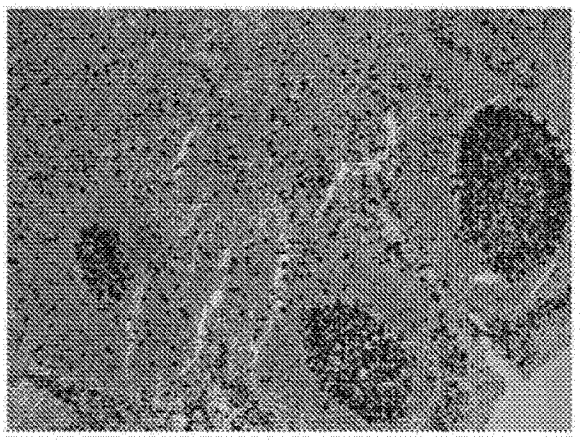


图 41

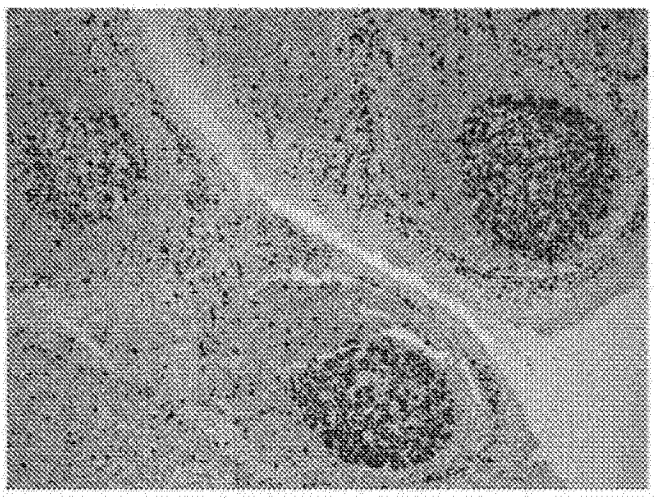


图 42

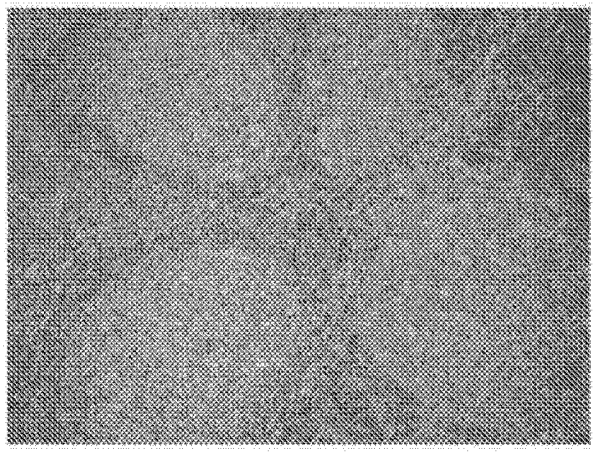


图 43

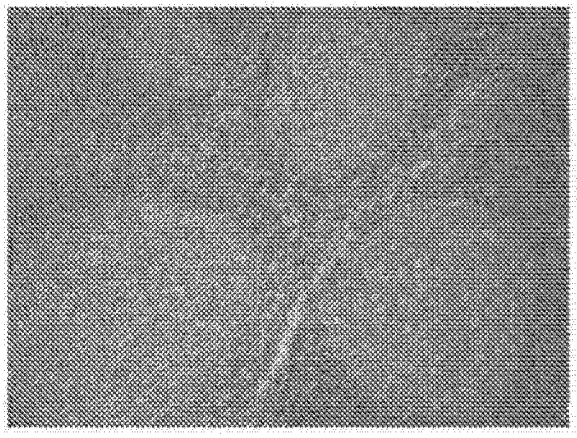


图 44

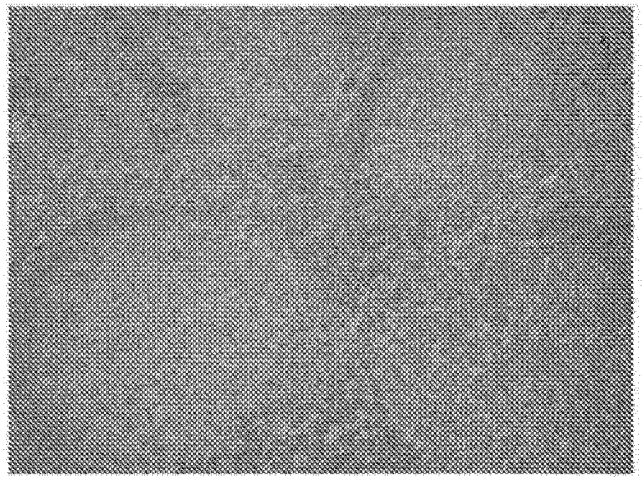


图 45

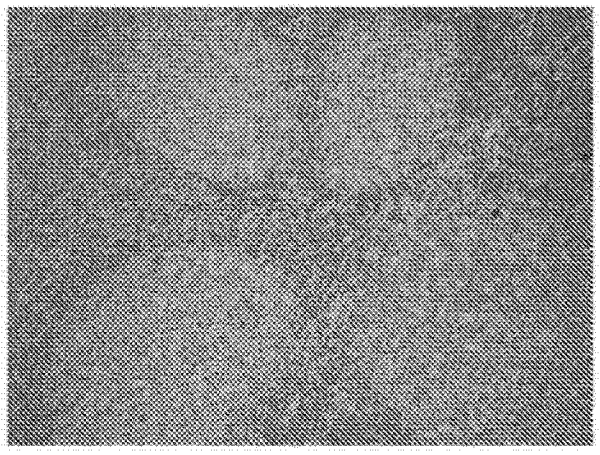


图 46