



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107980095 A

(43)申请公布日 2018.05.01

(21)申请号 201680027053.X

(22)申请日 2016.05.09

(30)优先权数据

62/159297 2015.05.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/060263 2016.05.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/180747 EN 2016.11.17

(71)申请人 文塔纳医疗系统公司

地址 美国亚利桑那州

(72)发明人 J. 格里尔 B.D. 凯利 J. 科斯梅德

E. 梅 N. 塞巴斯蒂奥 P. 沃思

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 黄希贵

(51)Int.Cl.

G01N 33/52(2006.01)

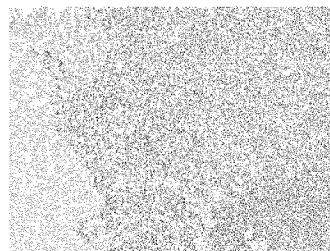
权利要求书2页 说明书29页 附图71页

(54)发明名称

用于在自动化多重组织组织染色测定期间使碱性磷酸酶和过氧化物酶同时失活的组合物和方法

(57)摘要

本发明公开了使生物样品中的一种或多种酶失活的组合物和方法。



1. 酶失活组合物,其包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂,其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。

2. 权利要求1的酶失活组合物,其中所述过氧化物是过氧化氢,且所述防腐剂是叠氮化钠。

3. 权利要求2的酶失活组合物,其中所述多元羧酸是柠檬酸盐。

4. 权利要求1至3中任一项的酶失活组合物,其还包含洗脱缓解剂。

5. 权利要求4的酶失活组合物,其中所述洗脱缓解剂是氯化钠。

6. 权利要求3的酶失活组合物,其中所述组合物具有约1.5的pH,所述过氧化物以所述组合物的总重量的约1%的量存在,且其中所述防腐剂以所述组合物的总重量的约0.08%的量存在。

7. 权利要求3的酶失活组合物,其中所述组合物具有约1.5的pH,所述过氧化物以所述组合物的总重量的约0.5%的量存在,且其中所述防腐剂以所述组合物的总重量的约0.08%的量存在。

8. 权利要求3的酶失活组合物,其中所述组合物具有约2.0的pH,所述过氧化物以所述组合物的总重量的约1%的量存在,且其中所述防腐剂以所述组合物的总重量的约0.08%的量存在。

9. 权利要求6的酶失活组合物,其还包含0.5M氯化钠。

10. 权利要求6的酶失活组合物,其还包含0.75M氯化钠。

11. 权利要求6的酶失活组合物,其还包含1M氯化钠。

12. 酶失活组合物,其基本上由具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂组成;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。

13. 酶失活组合物,其由具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂组成;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。

14. 使生物样品中的一种或多种酶失活的方法,其包括向生物样品应用约50 μ L至约200 μ L酶失活组合物,所述酶失活组合物包含多元羧酸、过氧化物和防腐剂,所述生物样品包含一种或多种试剂或内源性酶,且其中将所述组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约25 $^{\circ}$ C至约50 $^{\circ}$ C的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。

15. 权利要求14的方法,其还包括向所述生物样品中添加洗脱缓解剂的步骤。

16. 权利要求14或15的方法,其中所述一种或多种试剂或内源性酶选自试剂过氧化物酶、内源性过氧化物酶和碱性磷酸酶。

17. 使生物样品中的一种或多种酶失活的方法,其包括向生物样品应用约50 μ L至约200 μ L权利要求6、7和8中任一项的酶失活组合物,所述生物样品包含一种或多种试剂或内源性酶,且其中将所述酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在约37 $^{\circ}$ C至约41 $^{\circ}$ C的温度下维持至少约4分钟。

18. 使生物样品中的一种或多种酶失活的方法,其包括向生物样品应用约50 μ L至约200 μ L权利要求9、10和11中任一项的酶失活组合物,所述生物样品包含一种或多种试剂或

内源性酶,且其中将所述酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在约37℃至约41℃的温度下维持至少约4分钟。

19. 试剂盒,所述试剂盒包含第一组分和第二组分,所述第一组份包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在;所述第二组分包含洗脱缓解剂。

20. 检测生物样品中的靶标的方法,其包括:

- a) 使所述生物样品与具有第一酶的第一显色检测试剂接触;
- b) 检测来自所述第一显色检测试剂的第一信号;和
- c) 通过应用第一酶失活组合物来使所述第一酶失活,所述第一酶失活组合物包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;和过氧化物和防腐剂中的至少一种,其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在,其中将所述第一酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约25℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。

21. 权利要求20的方法,其进一步包括以下步骤:

- a) 使所述生物样品与具有第二酶的第二显色检测试剂接触;
- b) 检测来自所述第二显色检测试剂的第二信号;和
- c) 通过应用第二酶失活组合物来使所述第二酶失活,所述第二酶失活组合物包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;和过氧化物和防腐剂中的至少一种,其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在,其中将所述第二酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约25℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。

22. 权利要求20或21的方法,其中所述第一或第二酶失活组合物中的至少一种包含柠檬酸盐、过氧化氢和叠氮化钠,其中所述组合物具有约1.5的pH,所述过氧化氢以所述组合物的总重量的约1%的量存在,且其中所述叠氮化钠以所述组合物的总重量的约0.08%的量存在。

23. 权利要求22的方法,其中所述组合物进一步包含氯化钠。

24. 生物样品,其包含一种或多种基本上失活或完全失活的酶,所述生物样品通过应用包含柠檬酸盐、过氧化氢和叠氮化钠的酶失活组合物来制备,其中所述组合物具有约1.5的pH,所述过氧化氢以所述组合物的总重量的约1%的量存在,且其中所述叠氮化钠以所述组合物的总重量的约0.08%的量存在,且其中使所述组合物与所述生物样品在约25℃至约41℃的温度下保持接触至少约4分钟。

25. 权利要求24的生物样品,其中所述组合物还包含氯化钠。

用于在自动化多重组织组织染色测定期间使碱性磷酸酶和过氧化物酶同时失活的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2015年5月10日提交的美国临时专利申请号62/159,297的申请日的权益,所述申请的公开内容在此通过引用并入本文。

[0002] 工业适用性的声明

本公开在诊断领域中具有工业适用性。

[0003] 发明背景

免疫组织化学(IHC)是通过使用标记的抗体作为特异性试剂,通过抗原-抗体相互作用(其通过标记物诸如荧光染料、酶或胶体金显现)来检测组织切片中的局部抗原或蛋白。这种检测技术具有能够精确地显示给定蛋白位于组织样品内何处的优点。它也是检查组织本身的有效方法。原位杂交或ISH是指检测、定位和定量核酸的过程。IHC和ISH两者都可以在各种生物样品(诸如组织(例如,新鲜冷冻、福尔马林固定石蜡包埋的)和细胞学样品)上进行。无论靶标是核酸还是抗原,在识别靶标后,都可以通过使用各种标记(例如显色、荧光、发光、辐射)来检测识别事件。组织上的原位杂交(ISH)包括通过应用与报道分子偶联的核酸互补链来检测核酸。报道分子的显现允许观察者在异质细胞群体(诸如组织学、细胞学或环境样品)中定位特异性DNA或RNA序列。目前可用的ISH技术包括银原位杂交(SISH)、显色原位杂交(CISH)和荧光原位杂交(FISH)。

[0004] 显色底物用于IHC和ISH中,其中显色检测提供了一种简单且经济有效的检测方法。传统上,当通过合适的酶活化时,显色底物沉淀。也就是说,传统的显色物质在与酶接触后从可溶性试剂转化为不溶的着色沉淀物。两种此类酶包括辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP)。

[0005] 正在开发多重IHC和ISH测定法,以在单个组织载片上使用几种碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶检测步骤来检测例如多种组织抗原。酶失活对于减轻随后的酶检测步骤中的不适当的信号产生是重要的。尽管存在至少部分失活酶的方法,但这些方法不能完全抑制内源性和试剂酶活性,并且易于酶再活化(例如,过氧化氢是可逆的HRP酶抑制剂,但去除过氧化氢恢复酶活性)。

[0006] 酶的失活通常需要大量时间,当应用于多重测定时,该时间会倍增。例如,过氧化物酶失活步骤可能每个检测周期需要约1小时。在更高阶的多重测定(例如使用四种或更多种色原检测步骤的那些)中,此酶杀灭步骤将使测定持续时间增加大量的时间。尽管较短的酶失活步骤是可用的,但它们经常需要苛刻的条件(例如高于50℃的热),这可以影响组织抗原检测信号强度、组织形态、色原稳定性和复染外观。

[0007] 发明简述

本发明的一个方面是酶失活组合物,其包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂或添加剂中的至少一种。在一些实施方案中,所述多元羧酸是柠檬酸盐。在一些实施方案中,选择也充当可逆酶抑制剂的防腐剂(例如NaN₃)。在一些实施方案中,所述过氧化物是过氧化氢(H₂O₂),且所述防腐剂是叠氮化钠(NaN₃)。在一些实施方案中,所述

过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约5%的量存在;且所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。在一些实施方案中,所述酶失活组合物还包含洗脱缓解剂。在一些实施方案中,所述洗脱缓解剂是氯化钠。在一些实施方案中,所述洗脱缓解剂是氯化钠。在一些实施方案中,将所述组合物应用于已经含有与生物样品接触的一定体积的流体的生物样品,其中在添加所述酶失活组合物之后与样品接触的总积的流体(例如“液态物(puddle)”)的pH范围为约1至约3。

[0008] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%)。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约0.5%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%)。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约2.0的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%)。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠(约0.5M)。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠(约0.75M)。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠(约1M)。

[0009] 本发明的另一个方面是使生物样品中的一种或多种酶失活的方法,其包括以下步骤:将酶失活组合物应用于生物样品,所述生物样品包含一种或多种试剂或内源性酶,且其中将所述酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约25℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含酸、过氧化物和防腐剂。在一些实施方案中,改变组合物的pH和/或其中组合物保持与样品接触的温度和/或时间以实现酶失活。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。在一些实施方案中,将所述酶失活组合物的组分同时应用于样品。在其它实施方案中,将所述组分依次且以任何顺序应用于样品。在一些实施方案中,所述酶失活组合物还包含洗脱缓解剂(例如NaCl)。在一些实施方案中,与生物样品接触的总流体体积(“液态物”)的最终pH范围为约1.5至约3.0。在其它实施方案中,与生物样品接触的总流体体积的最终pH范围为约1.5至约2。在一些实施方案中,所述生物样品用显色底物染色,且其中通过病理学或合格阅读者检查,确定所述显色底物(例如来自上游过程期间应用的一种或多种检测试剂盒)的可检测强度和色调在应用酶失活组合物后不显著降低。在一些实施方案中,一种或多种酶被基本上失活或完全失活,如那些术语在本文所定义的。

[0010] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%),其被应用于所述生物样品,所述生物样品包含内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种,且其

中所述酶失活组合物被保持与所述生物样品连通至少约4分钟,且其中将所述组合物、所述生物样品或其它引入的组分中的至少一种加热至范围为约37℃至约41℃的温度。

[0011] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约0.5%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%),其被应用于所述生物样品,所述生物样品包含内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种,且其中所述酶失活组合物被保持与所述生物样品连通至少约4分钟,且其中将所述组合物、所述生物样品或其它引入的组分中的至少一种加热至约37℃至约41℃的温度。

[0012] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约2的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%),其被应用于所述生物样品,所述生物样品包含内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种,且其中所述酶失活组合物被保持与所述生物样品连通至少约4分钟,且其中将所述组合物、所述生物样品或其它引入的组分中的至少一种加热至约37℃至约41℃的温度。

[0013] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和0.5M氯化钠,其被应用于所述生物样品,所述生物样品包含内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种,且其中所述酶失活组合物被保持与所述生物样品连通至少约4分钟,且其中将所述组合物、所述生物样品或其它引入的组分中的至少一种加热至至少约37℃的温度。

[0014] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和0.75M氯化钠,其被应用于所述生物样品,所述生物样品包含内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种,且其中所述酶失活组合物被保持与所述生物样品连通至少约4分钟,且其中将所述组合物、所述生物样品或其它引入的组分中的至少一种加热至至少约37℃的温度。

[0015] 在一些实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和1M氯化钠,其被应用于所述生物样品,所述生物样品包含内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种,且其中所述酶失活组合物被保持与所述生物样品连通至少约4分钟,且其中将所述组合物、所述生物样品或其它引入的组分中的至少一种加热至至少约37℃的温度。

[0016] 本发明的另一个方面是检测生物样品中的多种靶标的方法,其包括:(a) 使所述生物样品与具有第一酶的第一显色检测试剂接触;(b) 检测来自所述第一显色检测试剂的第一信号;和(c) 通过应用第一酶失活组合物来使所述第一酶失活,所述组合物包含具有范围为约1至约5的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在,其中将所述第一酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约25℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。在一些实施方案中,所述方法还包括以下步骤:(d) 使所述生物样品与具有第二酶的第二显色检测试剂接触;(e) 检测来自所述第二显色检测试剂的第二信号;和(f) 通过应用第二酶失活组合物来使所述第二酶失活,所述组合物包含具有范围为约1至约5的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在;其中将所

述第二酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约25℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。在一些实施方案中,重复步骤用于检测额外的显色检测试剂,诸如第三、第四和第五(和第n)显色检测试剂。在一些实施方案中,将一种或多种酶基本上失活或完全失活。在一些实施方案中,所述生物样品用一个或多个显色底物染色,使得通过病理学或合格阅读者检查,确定所述显色底物的可检测强度或色调在应用酶失活组合物后不显著降低。在一些实施方案中,所述生物样品用酶失活组合物预处理以使内源性过氧化物酶活性基本上或完全失活。

[0017] 本发明的另一个方面是制备用于检测至少第二靶标的生物样品的方法,其包括将具有内源性过氧化物酶、试剂过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种的生物样品与第一酶失活组合物接触,所述第一酶失活组合物包含具有范围为约1至约5的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在;且依次引入组分以检测至少第二靶标。在一些实施方案中,将所述样品和/或所述酶失活组合物中的至少一种在范围为约25℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。在其它实施方案中,将所述样品和/或所述酶失活组合物中的至少一种在范围为约37℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。

[0018] 本发明的另一个方面是包含基本上失活或完全失活的一种或多种酶的生物样品,所述生物样品通过将酶失活组合物在范围为约25℃至约41℃的温度下应用约4分钟至约8分钟来制备,其中所述酶失活组合物选自包含以下的组合物:(i)具有约1.5的pH的柠檬酸盐、H₂O₂(组合物的总重量的约1%) 和NaN₃(组合物的总重量的约0.08%);(ii)具有约1.5的pH的柠檬酸盐、H₂O₂(组合物的总重量的约0.5%) 和NaN₃(组合物的总重量的约0.08%);(iii)具有约2.0的pH的柠檬酸盐、H₂O₂(组合物的总重量的约1%) 和NaN₃(组合物的总重量的约0.08%);(iv)具有约1.5的pH的柠檬酸盐、H₂O₂(组合物的总重量的约1%)、NaN₃(组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠(约0.5M);(v)具有约1.5的pH的柠檬酸盐、H₂O₂(组合物的总重量的约1%)、NaN₃(组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠(约0.75M);(vi)具有约1.5的pH的柠檬酸盐、H₂O₂(组合物的总重量的约1%)、NaN₃(组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠(约1M)。在一些实施方案中,所述生物样品在上游过程中用显色检测试剂处理,其中所述显色检测试剂包含酶(例如过氧化物酶和/或碱性磷酸酶)。

[0019] 本发明的另一个方面是试剂盒,所述试剂盒包含第一组分和第二组分,所述第一组分包含具有范围为约1至约5的pH的多元羧酸;过氧化物;和防腐剂;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在;所述第二组分包含洗脱缓解剂。在一些实施方案中,所述洗脱缓解剂是盐(例如NaCl)。

[0020] 仍然需要酶失活组合物和将那些组合物应用于生物样品的方法,其允许样品内的试剂和/或内源性酶至少基本上失活,并且在适当的时间量内如此进行,而基本上不影响组织抗原检测信号强度、组织形态、色原稳定性和复染外观。

[0021] 申请人已经开发了所公开的酶失活组合物和将那些组合物应用于生物样品的方法,其中所述组合物和方法允许其中存在的任何试剂和/或内源性酶被基本上失活或完全失活,如那些术语如本文所定义的。事实上,申请人已经显示,所述组合物和方法允许在与

现有技术方法相比不苛刻的条件下发生酶失活,即应用本文组合物的方法不需要持续长时间段应用超过50℃的温度。再次,与现有技术的酶失活方法相反,本文公开的组合物和方法比较优异并且允许在短时间量(例如4-8分钟)内不可逆酶失活,而没有完全洗脱检测试剂盒,并且这在多重测定的背景下尤其重要。此外,申请人已经显示,所述组合物和方法允许酶失活,而基本上不负面影响组织抗原检测信号强度、组织形态、色原稳定性和复染外观,如本文提供的实施例中所示。实际上,已经显示,本文提供的组合物和方法不负面影响任何下游处理步骤。

[0022] 附图简述

本专利或申请文件含有至少一幅以颜色绘制的图。根据请求并支付必要费用后,本专利或专利申请公开的具有彩图的副本将向官方提供。

[0023] 图1A至1HH记载了一系列的图像,其显示了不同的酶失活组合物和方法在应用于生物样品后对过氧化物酶失活的影响。

[0024] 图2A至2S记载了一系列的图像,其显示了不同的酶失活组合物和方法在应用于生物样品后对碱性磷酸酶失活的影响。

[0025] 图3A至3V记载了一系列的图像,其显示了在不同的酶失活组合物和方法应用于生物样品之后,酶失活与检测试剂盒洗脱之间的比较。

[0026] 图4A至4HH记载了一系列的图像,其显示了不同的酶失活组合物和方法在应用于生物样品后对DAB色原强度或色调的影响。

[0027] 图5至5HH记载了一系列的图像,其显示了不同的酶失活组合物和方法在应用于生物样品后对组织抗原检测信号强度(BLC2)的影响。

[0028] 图6至6HH记载了一系列的图像,其显示了不同的酶失活组合物和方法在应用于生物样品后对组织抗原检测信号强度(CD8)的影响。

[0029] 图7至7HH记载了一系列的图像,其显示了不同的酶失活组合物和方法在应用于生物样品后对组织抗原检测信号强度(HER2)的影响。

[0030] 详述

如本文所用,单数术语“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数对象,除非上下文另有清楚指出。类似地,词语“或(or)”意在包括“和(and)”,除非上下文另有清楚指出。术语“包括”以包含的方式定义,使得“包括A或B”意味着包括A、B,或者A和B。

[0031] 术语“包含”、“包括”、“具有”等可互换使用且具有相同含义。类似地,“包含”、“包括”、“具有”等可互换使用且具有相同含义。具体地,每个术语都与“包含”的通常美国专利法定义一致地定义,并且因此被解释为开放术语,意指“至少以下”,并且还被解释为不排除额外的特征、限制、方面等。因此,例如,“具有组件a、b和c的装置”意味着该装置至少包括组件a、b和c。类似地,短语:“涉及步骤a、b和c的方法”意味着该方法至少包括步骤a、b和c。此外,尽管本文可以以特定顺序概述所述步骤和方法,但技术人员将认识到,排序步骤和方法可以变化。

[0032] “抗体”,偶尔缩写为“Ab”,是指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,包括例如但不限于,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM、其组合以及在任何脊椎动物中(例如在哺乳动物诸如人、山羊、兔和小鼠中)的免疫应答过程中产生的类似分子和抗体片段,其特异性结合目标分子(或一组高度相似的目标分子),以至基本上排除结合其它分子。抗体进一步是指至少包含特异性

识别并结合抗原的表位的轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽配体。抗体可以由重链和轻链构成,其各自具有可变区,称为可变重(VH)区和可变轻(VL)区。VH区和VL区共同负责结合被抗体识别的抗原。术语抗体还包括完整的免疫球蛋白及其本领域众所周知的变体和部分。

[0033] “抗原”是指可以由特异性体液或细胞免疫的产物诸如抗体分子或T细胞受体特异性结合的化合物、组合物或物质。抗原可以是任何类型的分子,包括例如半抗原、简单中间代谢物、糖(例如寡糖)、脂质和激素以及大分子诸如复杂碳水化合物(例如多糖)、磷脂、核酸和蛋白。

[0034] “生物样品”可以是获自任何活的生物体、由任何活的生物体排出或分泌的任何固体或流体样品,所述生物体包括但不限于单细胞生物体,尤其是诸如细菌、酵母、原生动物和变形虫以及多细胞生物体(诸如植物或动物,包括来自健康或表观健康的人类对象或受待诊断或调查的病况或疾病诸如癌症影响的人类患者的样品)。例如,生物样品可以是获得自例如血液、血浆、血清、尿液、胆汁、腹水、唾液、脑脊液、房水或玻璃体液或任何身体分泌物、渗出物、流出物(例如,获得自脓肿或任何其它感染或炎症部位的流体)的生物流体,或获得自关节(例如,正常关节或受疾病影响的关节)的流体。生物样品也可以是获得自任何器官或组织的样品(包括活检样品或尸检样本,诸如肿瘤活检样品),或者可以包括细胞(无论是原代细胞还是培养细胞)或由任何细胞、组织或器官调节的培养基。在一些实例中,生物样品是核提取物。在某些实例中,样品是质量控制样品,诸如公开的细胞团块切片样品之一。在其它实例中,样品是测试样品。例如,测试样品是从获得自对象的生物样品制备的细胞、组织或细胞团块切片。在一个实例中,所述对象是有风险或已获得的对象。可以使用本领域普通技术人员已知的任何方法来制备样品。可以从用于常规筛选的对象或从被怀疑具有病症,诸如遗传异常、感染或瘤形成的对象获得样品。公开的方法的所描述的实施方案也可以应用于被称为“正常”样品的不具有遗传异常、疾病、病症等的样品。样品可以包括可以被一种或多种检测探针特异性结合的多个靶标。

[0035] 小牛肠碱性磷酸酶(AP)是这样的酶,其通过破坏磷酸酯-氧键并暂时形成中间酶-底物键而(通过水解)去除并转移磷酸酯基有机酯。例如,AP将萘酚磷酸酯(底物)水解成酚类化合物和磷酸酯。酚类与无色重氮鎝盐(色原)偶联,以产生不溶性的有色偶氮染料。

[0036] “发色团”是指分子或负责其颜色的分子部分。当分子吸收某些波长的可见光并透射或反射其它波长时,产生颜色。具有落在可见光谱范围内的两个不同分子轨道之间的能量差的分子可以吸收可见光,且因此被适当地表征为发色团。可以吸收入射在发色团上的可见光,因此将电子从基态分子轨道激发成激发态分子轨道。

[0037] 辣根过氧化物酶(HRP)是可以与标记的分子缀合的酶。当与适当的底物一起孵育时,其产生标记的分子的可有、荧光或发光衍生物,允许其能够被检测和定量。HRP在电子供体存在的情况下起作用,以首先形成酶底物复合物,且然后随后起作用以氧化电子供体。例如,HRP可以作用于3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)以产生可检测的颜色。HRP还可以作用于标记的酪酰胺缀合物,或酪酰胺样反应性缀合物(即阿魏酸盐、香豆酸、咖啡酸、肉桂酸盐、多巴胺等),以沉积有色或荧光或无色的可检测部分用于酪酰胺信号扩增(TSA)。

[0038] “多重”、“多重的”或“多重化”是指同时、基本上同时或依次检测样品中的多种靶标。多重化可以包括单独地和以任何和所有组合来鉴定和/或定量多种不同的核酸(例如,

DNA、RNA、mRNA、miRNA) 和多肽(例如,蛋白)。

[0039] 本文公开了用于在下游加工之前使生物样品中的至少一种酶失活的酶活化组合物和方法。在其中依次检测多种显色试剂的多重测定的背景下,期望在连续的显色检测步骤之间使任何试剂或内源性酶失活。作为结果,据信任一种显色检测步骤中存在的酶将不干扰后来的显色检测步骤中的那些。据信这进而在此后改进多重测定中使用的不同色原的显现和检测。

[0040] 通过实例的方式,多重测定可以包含一系列显色试剂检测步骤。每个显色试剂检测步骤涉及提供显色检测试剂,其包含例如酶和酶的显色底物。不希望受任何特定理论所束缚,据信该酶作用于显色底物以产生有色的可检测信号(即,酶底物反应将无色色原或显色底物转化成适合于检测的有色终产物)。在一些实施方案中,所述显色检测试剂是检测试剂盒的一部分,其可以包括例如检测探针(例如抗体)、标记缀合物(其中所述标记缀合物包含酶)、潜在的反应性部分和/或显色部分中的一种或多种。

[0041] 再次,作为实例,多重测定可以需要检测第一显色检测试剂(例如二氨基联苯胺),随后使第一显色检测试剂中存在的第一酶(例如HRP)失活。首先将第一显色检测试剂应用于样品,并允许时间反应,然后检测其中含有的第一显色底物。然后可以应用第一酶失活组合物,以便在检测色原后作用于第一显色检测试剂盒中的第一酶并使其失活。随后,可以向样品提供第二显色检测试剂(例如4-氯-2-甲基苯重氮鎓盐),随后检测第二显色检测试剂中的第二显色底物。然后通过应用可以与第一酶失活组合物相同或不同的第二酶失活组合物来使第二显色检测试剂中的第二酶(例如AP)失活。可以根据所涉及的测定和所检测的靶标,根据需要重复应用显色检测试剂、检测显色底物信号和酶失活的步骤。

[0042] 在一些实施方案中,将本发明的酶失活组合物应用于包含一种或多种试剂或内源性酶的生物样品。酶的实例包括,但不限于,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酸酶或 β -内酰胺酶。

[0043] 可用于显色检测测定中的酶底物和酶底物系统的具体实例包括但不限于二氨基联苯胺(DAB)、4-硝基苯基磷酸酯(pNPP)、萘酚磷酸酯、萘酚磷酸酯/Fast Red (例如4-氯-2-甲基苯重氮鎓盐及其变体诸如Fast Red KL/萘酚AS-TR、萘酚磷酸酯/品红(fuscin)、Fast Blue BB (4-(苯甲酰基氨基)-2,5-二乙氧基苯重氮基四氯合锌酸盐)/萘酚磷酸酯(例如萘酚AS-TR磷酸酯(N-4-氯-2-甲基苯基)-3-(磷酸基氧基)萘-2-甲酰胺)、磷酸溴氯吡啶酯(BCIP)、BCIP/INT(硝基蓝四唑鎓)、BCIP/INT(对碘硝基四唑鎓)、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)、邻联茴香胺、4-氯萘酚(4-CN)、硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷(ONPG)、邻苯二胺(OPD)、5-溴-4-氯-3-吡啶基- 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-吡啶基- β -D-葡萄糖苷酸(X-Gluc)和3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)。在酶是碱性磷酸酶的一些优选实施方案中,所述显色底物系统选自萘酚磷酸酯/Fast Red(及其变体诸如Fast Red KL/萘酚AS-TR)、萘酚磷酸酯/品红、萘酚磷酸酯/Fast Blue BB (4-(苯甲酰基氨基)-2,5-二乙氧基苯重氮基四氯合锌酸盐)、5-溴,4-氯,3-吡啶基磷酸酯(BCIP)/萘酚磷酸酯、BCIP/硝基蓝四唑鎓(NBT)和BCIP/对碘硝基四唑鎓(INT);靛甲基化物及其中间体;HRP可以作用于3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB)以产生可检测的颜色;HRP还可以作用于标记的酪酰胺缀合物,或酪酰胺样反应性缀合物(即阿魏酸盐、香豆酸、咖啡酸、肉

桂酸盐、多巴胺等),以沉积有色或荧光或无色的可检测部分用于酪酰胺信号扩增(TSA)。

[0044] 在一些实施方案中,将酶失活组合物应用于具有试剂过氧化物酶、一种或多种内源性过氧化物酶或碱性磷酸酶中的至少一种的生物样品。在其它实施方案中,将酶失活组合物应用于具有辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)或一种或多种内源性过氧化物酶中的至少一种的生物样品。在一些实施方案中,所述样品包含HRP和AP两者。

[0045] 通常,将酶失活组合物置于与生物样品接触一段时间,并且温度足以使其中含有的试剂或内源性酶基本上失活或完全失活(统称为“失活”或“失活的”)。“基本上失活”或“基本上失活的”表示所述一种或多种试剂或内源性酶的活性降低至其正常活性的约小于约90%。在其它实施方案中,所述一种或多种试剂或内源性酶的活性基本上失活至其正常活性的约小于95%。如本文所用,术语“完全失活”或“完全失活的”表示所述一种或多种试剂或内源性酶的活性小于其正常活性的1%或降低至通过仪器不可检测的水平。在一些实施方案中,使过氧化物酶(HRP或一种或多种内源性过氧化物酶)或碱性磷酸酶中的至少一种基本上失活。在其它实施方案中,使过氧化物酶(HRP或一种或多种内源性过氧化物酶)或碱性磷酸酶中的至少一种完全失活。

[0046] 技术人员将理解,当设计适当的酶失活组合物和/或用于将组合物应用于生物样品以使得其中的试剂或内源性酶失活的方法时,可以考虑几个变量。这些变量包括,例如,(i)组合物与生物样品接触的时间量(例如约4分钟至约8分钟);(ii)组合物或生物样品在其与生物样品接触的同时保持的温度(例如约37℃至约50℃);(iii)组合物的pH(例如约1.5至约2.5);(iv)组合物内单独组分的量和/或浓度;和(v)对额外组分(例如洗脱缓解剂或螯合剂)的需求。当然,这些变量可取决于所失活的酶和/或其它检测试剂盒组分。

[0047] 例如,如技术人员将理解,增加酶失活组合物或含有酶失活组合物的生物样品的温度可以缩短酶失活所需的时间(例如从约8分钟至约4分钟)。相反,增加失活的时间可减少使用较高温度(例如从约37℃至约41℃)的需求。同样,技术人员将理解,酶失活组合物的任何组分的量可影响时间和/或温度变量,以及对辅助组分(例如洗脱缓解剂、螯合剂等)的需求。通过实例的方式,降低与生物样品接触的酶失活组合物的pH(例如从约2.0至约1.5)可以减少失活一种或多种酶所需的时间或温度变量中的至少一种(例如从约8分钟至约4分钟)。

[0048] 可以将任何酶失活组合物应用于生物样品,条件是组合物或组合物保持与生物样品接触的时间和/或温度的量没有不利地影响组织抗原检测信号强度或组织形态和/或影响色原和/或复染的强度和/或色调。例如,尽管在应用酶失活组合物之后可出现视觉上可检测的DAB强度或色调偏移,但应当选择所包含的组合物和方法以减轻任何强度或色调变化,使得可以通过病理学或合格阅读者检查,确定显色底物的可检测强度或色调在应用酶失活组合物后不显著降低。

[0049] 大体上,本发明提供了包含具有约1至约3的pH的酸、防腐剂和过氧化物的酶失活组合物。在一些实施方案中,所述酶失活组合物还包含螯合剂、缓冲剂和/或洗脱缓解剂中的至少一种。

[0050] 在一些实施方案中,所述组合物的pH范围为约0.5至约3.5。在其它实施方案中,所述组合物的pH范围为约1至约3。在还有其它实施方案中,所述组合物的pH为1.5。在又进一步实施方案中,所述组合物的pH为2.0。在还有额外实施方案中,所述组合物的pH为2.5。不希望受任何特定理论所束缚,据信较低的pH可有助于改善酶失活,即组合物pH和酶活性之

间存在直接的相关性。

[0051] 转向组合物的组分,任何酸都可以与本发明结合使用,条件是pH满足本文建立的pH标准。所述酸可以是无机酸或有机酸,并且可以选自一元酸或多元酸。在一些实施方案中,所述酸选自乙酸、苯甲酸、柠檬酸、盐酸、乳酸、硝酸、琥珀酸、硫酸、亚硫酸、酒石酸、三氯乙酸、低pH氨基酸,例如丙氨酸或其盐。

[0052] 在一些实施方案中,所述酸是多元羧酸或其盐。在其它实施方案中,所述多元羧酸具有小于约500g/mol的分子量。合适的多元羧酸可以具有式 $\text{CO}(\text{OH})-\text{R}_1-\text{R}_2-\text{C}(\text{O})(\text{OH})-\text{R}_3-\text{C}(\text{O})\text{OH}$,其中 R_1 、 R_2 和 R_3 可以相同或不同,并且可以具有取代或未取代的脂族或芳族基团,且其中 R_1 、 R_2 或 R_3 中的任一个可以含有任意数目的额外羧酸基团。在一些实施方案中,所述多元羧酸是柠檬酸盐或异柠檬酸盐或其盐。在其它实施方案中,所述多元羧酸是柠檬酸钠,例如1M柠檬酸盐。

[0053] 在一些实施方案中,所述酸能够螯合金属离子,包括钙、铁、镁和锌离子。例如,据信柠檬酸盐能够螯合 Ca^{2+} 辅因子。在其它实施方案中,当螯合多元羧酸不存在时,将螯合剂添加至组合物。在一些实施方案中,任选的螯合剂以所述组合物的总重量的约0.05%至约2.5%的量存在。在所述酸不能直接螯合酶辅因子的一些实施方案中,添加螯合剂以螯合所需的酶辅因子。这些螯合剂可以包括但不限于乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇四乙酸(EGTA)、乙二胺二琥珀酸(EDDS)、甲基甘氨酸二乙酸(MGDA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或适合于螯合所需的酶辅因子的其它螯合剂。不希望受任何特定理论束缚,据信传统上在细胞内发现或与酶结合的金属离子的螯合可有助于不可逆地失活或变性酶,因此促成酶的失活。

[0054] 任何过氧化物,包括无机过氧化物和有机过氧化物,都可用于本发明的酶失活组合物中。在一些实施方案中,所述过氧化物具有式 $\text{R}_a-\text{O}-\text{O}-\text{R}_b$,其中 R_a 和 R_b 可以相同或不同,并且可以独立地选自氢、烷基、芳基、酸基($\text{R}(\text{C}(\text{O}))$),其中 R 可以与 R_a 或 R_b 相同,或者是酰基。在一些实施方案中,所述过氧化物是过氧化氢(H_2O_2)。通常,所述过氧化物以范围为所述酶失活组合物的总重量的约0.025%至约5%的量存在。

[0055] 所述防腐剂可以选自通常与生物样品结合使用的任何防腐剂。在一些实施方案中,所述防腐剂是叠氮化钠(NaN_3)。通常,所述防腐剂以范围为所述酶失活组合物的总重量的约0.025%至约1.5%的量存在。在一些实施方案中, NaN_3 用作防腐剂,因为据信 NaN_3 也是过氧化物酶的可逆抑制剂,并且可进一步促成酶失活(参见本文实施例3、6、7和8)。

[0056] 在一些实施方案中,洗脱缓解剂包括在酶失活组合物内。在一些实施方案中,所述洗脱缓解剂是碱金属的氯化物盐。所述洗脱缓解剂可以选自氯化钠和氯化钾。在一些实施方案中,所述洗脱缓解剂是盐。通常,所述洗脱缓解剂以范围为所述酶失活组合物的总重量的约1%至约5%的量存在。在一些实施方案中,0.5M NaCl用作洗脱缓解剂。在其它实施方案中,0.75M NaCl用作洗脱缓解剂。在还有其它实施方案中,1M NaCl用作洗脱缓解剂。

[0057] 本发明的组合物还可以包含其它组分诸如缓冲剂、可逆酶抑制剂、不可逆酶抑制剂等。

[0058] 本发明的一个实施方案是酶失活组合物,其包含具有范围为约1至约3.0的pH的多元羧酸;和过氧化物和防腐剂中的至少一种。本发明的另一个实施方案是酶失活组合物,其包含具有范围为约1至约3.0的pH的柠檬酸盐、过氧化氢和叠氮化钠。在一些实施方案中,所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且所述防腐剂以

范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在。

[0059] 本发明的又一个实施方案是酶失活组合物,其包含具有范围为约1至约3.0的pH的柠檬酸盐;过氧化氢和叠氮化钠以及氯化钠。在一些实施方案中,所用的氯化钠的体积摩尔浓度范围为约0.25M至约1M。

[0060] 在一个实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%)。在另一个实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约0.5%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%)。在另一个实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约2.0的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%) 和 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%)。在另一个实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠 (约0.5M)。在另一个实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠 (约0.75M)。在另一个实施方案中,所述酶失活组合物包含具有约1.5的pH的柠檬酸盐、 H_2O_2 (组合物的总重量的约1%)、 NaN_3 (组合物的总重量的约0.08%) 和氯化钠 (约1M)。

[0061] 所述酶失活组合物以及同样地,检测试剂盒和显色检测试剂可以使用本领域已知的任何方式应用于生物样品。例如,检测试剂盒和酶失活组合物可以用样品处理设备 (包括自动化样本处理设备) 应用于生物样品。通常,样本处理设备被配置为向样本应用宽范围的物质。所述物质包括但不限于染色剂、探针、试剂、漂洗剂和/或调理剂。所述物质可以是流体 (例如,气体、液体或气体/液体混合物) 等。所述流体可以是溶剂 (例如极性溶剂、非极性溶剂等)、溶液 (例如水溶液或其它类型的溶液) 等。试剂可以包括,但不限于,染色剂、润湿剂、抗体 (例如单克隆抗体、多克隆抗体等)、抗原回收流体 (例如基于水性或非水性的抗原修复溶液、抗原回收缓冲液等) 等。在一些实施方案中,检测试剂盒和酶失活组合物各自通过样品处理设备依次应用。

[0062] 所述样品处理设备可以是自动化设备,诸如由Ventana Medical Systems, Inc. 销售的BENCHMARK XT仪器和SYMPHONY仪器。Ventana Medical Systems, Inc. 是公开用于进行自动化分析的系统和方法的许多美国专利的受让人,包括美国专利号5,650,327、5,654,200、6,296,809、6,352,861、6,827,901和6,943,029以及美国公开专利申请号20030211630和20040052685,其各自以其整体通过引用并入本文。或者,可以手动处理样本。

[0063] 可以将任何量的酶失活组合物应用于生物样品以适当地失活其中含有的酶。在一些实施方案中,将约0.25滴至约2滴之间的酶失活组合物添加至生物样品以实现酶失活。在其它实施方案中,将约1滴 (约50 μ L至约150 μ L) 的本发明的组合物添加至与生物样品接触的“液态物”中,其中所述液态物含有显色检测试剂或试剂盒组分 (例如,预先存在体积的与样品接触的流体)。在一些实施方案中,将约100 μ L的如本文所述的酶失活试剂添加至具有约300 μ L的体积的液态物,以得到具有约2.5的pH的液态物。在一些实施方案中,将约100 μ L的如本文所述的酶失活试剂添加至具有约300 μ L的体积的液态物,以得到具有约2至约3的pH的液态物。当然,可以根据需要使用使得生物样品中的酶失活所需的任何量。所述组合物也可以作为薄膜应用在生物样品的表面上。然后可以在约2.5的pH,在四分之一缓冲液浓度调节薄膜溶液,以在组织上洁净地使用,而无需修改。所有试剂条件有效地提供AP和HRP酶失活。

[0064] 如技术人员将理解, 尽管组合物可以具有特定pH, 但当将组合物添加至生物样品时, 所得的与生物样品接触的“液态物”或薄膜可具有与组合物的pH相比大约相同或不同的pH。例如, 如果将一滴公开的组合物添加至与生物样品接触的现有“液态物”, 其中现有液态物具有比所添加的组合物 (例如, 1.5的pH) 更高的pH (例如, 2.5的pH), 所得的新“液态物”可具有2.0的pH。因此, 在一些实施方案中, 如果期望与生物样品接触的累积液态物的特定pH, 则技术人员可以添加具有低于现有液态物的pH的组合物用于失活。

[0065] 所述酶失活组合物以一定温度和时间应用于生物样品, 使得其中含有的任何试剂或内源性酶基本上或完全失活。在一些实施方案中, 所述酶失活组合物保持与所述生物样品连通至少约3分钟。在其它实施方案中, 所述组合物保持与所述生物样品连通至少约4分钟。在其它实施方案中, 所述组合物保持与所述生物样品连通至少约8分钟。在还有其它实施方案中, 所述组合物保持与所述生物样品连通范围为约3分钟至约16分钟的时间段。在又进一步实施方案中, 所述组合物保持与所述生物样品连通范围为约4分钟至约12分钟的时间段。在还有额外实施方案中, 所述组合物保持与所述生物样品连通范围为约4分钟至约8分钟的时间段。在还有额外实施方案中, 所述组合物保持与所述生物样品连通约4分钟。

[0066] 在一些实施方案中, 将酶失活组合物、生物样品和/或用于将组合物应用于生物样品的仪器维持在特定温度 (统称为“组合物的温度”) 以实现酶失活。在一些实施方案中, 所述组合物的温度为高于30℃的温度。在其它实施方案中, 所述组合物的温度范围为约30℃至约90℃。在还有其它实施方案中, 所述组合物的温度范围为约35℃至约50℃。在还有其它实施方案中, 所述组合物的温度范围为约35℃至约41℃。在又进一步实施方案中, 所述组合物的温度范围为约37℃。在还有额外实施方案中, 所述组合物的温度范围为约41℃。在还有额外实施方案中, 所述组合物的温度范围为约50℃。

[0067] 在一些实施方案中, 将本发明的组合物添加至包含第一显色检测试剂或第一检测试剂盒的生物样品, 其中所述生物样品和/或检测试剂/试剂盒包含至少一种酶, 诸如一种或多种过氧化物酶或磷酸酶。在一些实施方案中, 允许所述组合物以预定的时间量和预定的温度与含有检测试剂/试剂盒的生物样品保持接触, 使得一种或多种酶基本上失活或完全失活。

[0068] 酶失活后, 将第二显色检测试剂或第二检测试剂盒添加至样品, 其中第二显色检测试剂或第二检测试剂盒包含第二酶。添加第二试剂/试剂盒后, 将第二酶失活组合物添加至样品以基本上或完全失活第二酶。技术人员将理解, 对于多重测定, 上述添加检测试剂/试剂盒, 随后酶失活的顺序可以重复任何次数。根据多重的水平, 根据样品中待检测的靶标数目, 所述方法可以重复一次、二次、三次、四次、五次、六次、七次、八次或更多次。

[0069] 本发明的另一个方面是检测生物样品中的多种靶标的方法, 其包括: (a) 使所述生物样品与具有第一酶的第一显色检测试剂接触; (b) 检测来自所述第一显色检测试剂的第一信号; 和 (c) 通过应用如本文公开的第一酶失活组合物来使所述第一酶失活, 其中将所述第一酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约37℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。在一些实施方案中, 所述方法进一步包括以下步骤: (d) 使所述生物样品与具有第二酶的第二显色检测试剂接触; (e) 检测来自所述第二显色检测试剂的第二信号; 和 (f) 通过应用如本文公开的第二酶失活组合物来使所述第二酶失活, 其中将所述第二酶失活组合物或所述生物样品中的至少一种在范围为约37℃至约50℃的温度下维持范围为约4分钟至约16分钟的时间段。在一些实施方案中, 重复步骤用于

检测额外的显色检测试剂,诸如第三、第四和第五显色检测试剂。

[0070] 在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:(i) 使生物样品与第一检测探针(例如抗体)接触;(ii) 使所述生物样品与第一标记缀合物接触,其中所述第一标记缀合物包含第一酶(其中所述标记缀合物特异性结合所述检测探针且被配置为用酶标记所述靶标);(iii) 使所述生物样品与包含第一潜在反应性部分和第一显色部分的第一信号传导缀合物接触;(iv) 经由通过第一信号传导缀合物的第一显色部分的光的吸光度来检测第一靶标;和(v) 使所述生物样品与本文公开的第一酶失活组合物接触以基本上失活或完全失活生物样品中含有的第一酶。信号传导缀合物提供用于检测靶标的可检测信号。发色团部分通常被描述为分子的负责其颜色的部分。潜在的反应性部分被配置为经历催化活化以形成可与样品或其它检测组分共价键合的反应性物质。催化活化由一种或多种酶(例如辣根过氧化物酶)驱动。这些类型的特异性检测试剂盒及其对生物样品的应用在美国专利公开号2013/0260379中进一步描述,其公开内容以其整体通过引用并入本文。

[0071] 在一些实施方案中,在第一酶失活后,所述方法进一步包括以下步骤:(vi) 使生物样品与第二检测探针接触;(vii) 使所述生物样品与第二标记缀合物接触,其中所述第二标记缀合物包含第二酶;(viii) 使所述生物样品与包含第二潜在反应性部分和第二显色部分的第二信号传导缀合物接触;(ix) 经由通过第二信号传导缀合物的第二显色部分的光的吸光度来检测第二靶标;和(x) 使所述生物样品与本文公开的第二酶失活组合物接触以基本上失活或完全失活生物样品中含有的第二试剂酶。在一些实施方案中,所述第一和第二酶失活组合物是相同的,且其中所述第一和第二酶是相同或不同的。

[0072] 公开的方法步骤(i)至(x)可以以任何合适的顺序进行,并且不限于本文所述的那些。在一些实施方案中,所述方法可以包括其中将标记缀合物添加至生物样品中,随后添加信号传导缀合物的步骤。在其它公开的实施方案中,所述方法可以包括其中将标记缀合物添加至生物样品中,随后添加扩增缀合物、额外的酶缀合物和信号转导缀合物的步骤。本文公开的缀合物可以同时或依次添加。所述缀合物可以在分开的溶液中或作为包含两种或更多种缀合物的组合物添加。此外,公开的方法中使用的每种类型的缀合物可以包含相同或不同的缀合物组分。例如,当将多种信号转导缀合物添加至样品时,所述缀合物可以包含相同或不同的显色部分和/或潜在的反应性部分。仅作为实例,一种信号传导缀合物可以包含偶联至酪胺部分的香豆素发色团,且另一种信号传导缀合物可以包含偶联至酪胺衍生物部分的罗丹明发色团。适用于公开的多重测定中的信号传导缀合物的数目可以为1至至少6的范围,或更通常为2至5。在一些实施方案中,所述方法用于使用三至五种不同的信号传导缀合物检测三至五种不同的靶标。可以使用本文公开的方法在单个测定中检测多种靶标。在另一个实施方案中,本文公开的用于该方法的任何一个或多个步骤通过自动化载片染色仪进行。

[0073] 本发明的失活酶的方法还可以与额外的步骤(诸如设计用于洗脱检测试剂盒的组分和/或洗涤或纯化生物样品的步骤)组合。

[0074] 在一些实施方案中,所述生物样品用酶失活组合物预处理以使内源性过氧化物酶活性基本上或完全失活。例如,一些细胞或组织含有内源性过氧化物酶。使用HRP缀合的抗体可以导致高的、非特异性背景染色。可以通过用如本文公开的酶失活组合物预处理样品来减少该非特异性背景。在一些实施方案中,所述样品仅用过氧化氢(适当的预处理溶液的约1重量%至约3重量%)预处理以降低内源性过氧化物酶活性。一旦内源性过氧化物酶活

性已经减少或失活,可以添加检测试剂盒,随后失活如上文所提供的检测试剂盒中存在的酶。公开的酶失活组合和方法也可以用作失活内源性酶过氧化物酶活性的方法。

[0075] 在一些实施方案中,如果样本是嵌入石蜡中的样品,则可以使用适当的脱蜡流体将样品脱蜡。在废物去除剂去除脱蜡流体后,可以连续地向样本应用任何数目的物质。所述物质可以用于预处理(例如,蛋白-交联,暴露核酸等),变性,杂交,洗涤(例如,严格洗涤),检测(如将视觉或标记分子连接至探针),扩增(例如扩增蛋白,基因等),复染,盖玻片等。

[0076] 在处理样本之后,用户可以将携带样本的载片输送至成像设备用于分析或其它下游处理。例如,所述成像设备可以是明场成像仪载片扫描仪。一种明场成像仪是由Ventana Medical Systems, Inc.销售的iScan Coreo™明场扫描仪。在自动化实施方案中,成像设备是如题为IMAGING SYSTEM AND TECHNIQUES的国际专利申请号:PCT/US2010/002772(专利公开号:W0/2011/049608)中公开或2011年9月9日提交的题为IMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAME的美国专利申请号61/533,114中公开的数字病理学装置。国际专利申请号PCT/US2010/002772和美国专利申请公开号2014/0178169以其整体通过引用并入。在其它实施方案中,所述成像设备包括偶联至显微镜的数字相机。

[0077] 在本发明的另一个方面是试剂盒,所述试剂盒包含第一组分和第二组分,所述第一组分包含具有范围为约1至约3的pH的多元羧酸;和过氧化物或防腐剂中的至少一种;其中所述过氧化物以范围为所述组合物的总重量的约0.25%至约1.5%的量存在,且其中所述防腐剂以范围为所述组合物的总重量的约0.05%至约1.0%的量存在;所述第二组分包含洗脱缓解剂。在一些实施方案中,所述洗脱缓解剂是盐。在其它实施方案中,所述第二组分选自缓冲剂、螯合剂或其混合物。在一些实施方案中,所述第一和第二组分与第三组分一起提供,所述第三组分可包括显色检测试剂组分或检测试剂盒的组分。

实施例

[0078] 通用免疫组织化学(IHC)方案。

[0079] 除非另有指定,否则所有IHC染色实验都在VENTANA BenchMark® XT自动化组织染色平台上,使用来自Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ, USA;“Ventana”)的试剂进行。使用Ventana ultraView通用DAB检测试剂盒(VMSI, #760-500)或Ventana OptiView DAB IHC检测试剂盒(VMSI, #760-700)进行辣根过氧化物酶IHC检测。使用Ventana ultraView通用碱性磷酸酶红色检测试剂盒(VMSI, #760-501)进行碱性磷酸酶IHC检测。AffiniPure兔抗辣根过氧化物酶购自Jackson ImmunoResearch (#323-005-021)。

[0080] 通用ultraView通用DAB IHC检测方法

进行以下常用步骤:(1)用EZ Prep去垢剂溶液(Ventana Medical Systems, Inc. (VMSI), #950-101)脱蜡(75℃;20分钟);(2)用反应缓冲液(VMSI, #950-300)洗涤;(3)在细胞调节剂1(VMSI #950-124)中的抗原修复(95℃;时间依赖于目标抗原);(4)洗涤(与步骤2相同);(5)使用ultraVIEW通用DAB抑制剂(VMSI, #253-4291)失活内源性过氧化物酶(37℃;4分钟);(6)洗涤(与步骤2相同);(7)一抗(Ab)孵育(37℃;时间依赖于一抗,范围为8-32分钟);(8)洗涤(与步骤2相同);(9)用ultraVIEW通用HRP多聚体(VMSI, #253-4290)的一抗检测(37℃;8分钟);(10)洗涤(与步骤2相同);(11)在添加ultraVIEW通用过氧化氢(VMSI, 253-4293)和ultraVIEW通用DAB(VMSI, 253-4292)后,经由HRP产生的棕色沉淀而

可视化(37℃;8分钟);(12)洗涤(与步骤2相同);且(13)通过添加ultraVIEW通用铜(VMSI, 253-4294)来将DAB调色(37℃;4分钟)。在一些情况下,染色的组织切片用修饰的迈尔氏(Mayer's)苏木精(VMSI苏木精II,790-2280)复染(37℃;4分钟),且然后与发蓝剂(VMSI, 790-2037)孵育(37℃;4分钟)。然后将载片用去垢剂水混合物冲洗,通过梯度乙醇系列脱水,用二甲苯透化,并手动盖片(cover-slip)。通过明场显微镜观察载片。

[0081] 通用OptiView DAB IHC检测方法

进行以下常用步骤:(1)用EZ Prep去垢剂溶液(Ventana Medical Systems, Inc. (VMSI), #950-101)脱蜡(75℃;20分钟);(2)用反应缓冲液(VMSI, #950-300)洗涤;(3)在细胞调节剂1(VMSI #950-124)中的抗原修复(95℃;时间依赖于目标抗原);(4)洗涤(与步骤2相同);(5)使用OptiVIEW过氧化物酶抑制剂(VMSI, #253-4578)失活内源性过氧化物酶(37℃;4分钟);(6)洗涤(与步骤2相同);(7)一抗(Ab)孵育(37℃;时间依赖于一抗,范围为8-32分钟);(8)洗涤(与步骤2相同);(9)用OptiVIEW HQ通用接头(VMSI, #253-4580)的一抗检测(37℃;8分钟);(8)洗涤(与步骤2相同);(9)用OptiVIEW HRP多聚体(VMSI, #253-4581)的接头检测(37℃;8分钟);(10)洗涤(与步骤2相同);(11)在添加OptiVIEW H₂O₂(VMSI, 253-4583)和OptiVIEW DAB(VMSI, 253-4582)后,经由HRP产生的棕色沉淀而可视化(37℃;8分钟);(12)洗涤(与步骤2相同);且(13)通过添加OptiVIEW铜(VMSI, 253-4584)来将DAB调色(37℃;4分钟)。在一些情况下,染色的组织切片用修饰的迈尔氏苏木精(VMSI苏木精II,790-2280)复染(37℃;4分钟),且然后与发蓝剂(VMSI, 790-2037)孵育(37℃;4分钟)。然后将载片用去垢剂水混合物冲洗,通过梯度乙醇系列脱水,用二甲苯透化,并手动盖片。通过明场显微镜观察载片。

[0082] 通用ultraView通用碱性磷酸酶红色IHC检测方法

进行以下常用步骤:(1)用EZ Prep去垢剂溶液(Ventana Medical Systems, Inc. (VMSI), #950-101)脱蜡(75℃;20分钟);(2)用反应缓冲液(VMSI, #950-300)洗涤;(3)在细胞调节剂1(VMSI #950-124)中的抗原修复(95℃;时间依赖于目标抗原);(4)洗涤(与步骤2相同);(5)一抗(Ab)孵育(37℃;时间依赖于一抗,范围为8-32分钟);(6)洗涤(与步骤2相同);(7)用ultraView通用碱性磷酸酶多聚体(VMSI, # 253-4327)的一抗检测(37℃;8分钟);(8)洗涤(与步骤2相同);(9)在添加ultraView通用碱性磷酸酶红色增强剂(VMSI, 253-4326)后,经由AP产生的红色沉淀而可视化(37℃;4分钟);(10)ultraView通用碱性磷酸酶红色A(VMSI, 253-4329)和ultraView通用碱性磷酸酶红色萘酚(VMSI, 253-4328)(37℃;8分钟);(11)ultraView通用碱性磷酸酶红色B(VMSI, 253-4330)(37℃;8分钟);且(12)洗涤(与步骤2相同)。在一些情况下,染色的组织切片用修饰的迈尔氏苏木精(VMSI苏木精II,790-2280)复染(37℃;4分钟),且然后与发蓝剂(VMSI, 790-2037)孵育(37℃;4分钟)。然后将载片用去垢剂水混合物冲洗,在60℃的烘箱中干燥30至60分钟,并手动盖片。通过明场显微镜观察载片。

[0083] 通用辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶失活方法

在IHC测定期间在各种步骤中检查使用所公开的组合物中的HRP和AP酶失活,以检查试剂组成和仪器方法对各种IHC检测步骤的影响:(1)抗原稳定性(在抗原修复之后和用一抗检测抗原之前放置酶失活步骤);(2)酶失活(在用酶多聚体检测抗体之后和色原检测之前放置酶失活步骤);和(3)检测洗脱(在色原沉积之后和复染之前(如果应用复染)放置酶失活

步骤。在VENTANA BenchMark® XT自动化组织染色平台上进行以下常用步骤：(1) 用反应缓冲液(VMSI, #950-300)洗涤；(2) 在各种温度(37至50℃)和孵育时间(4至20分钟)下用酶失活试剂处理；和(3) 洗涤(与步骤1相同)。如果串联进行多个杀灭步骤，则将适当地重复这三个步骤的过程。

[0084] 检查通常利用的其它酶失活/抑制方法以在自动化设置中比较试剂性能。用酶失活方法，使用Ventana PO抑制剂(VMSI #253-4578)和Discovery抑制剂(VMSI #760-4840)进行与上述类似的通用程序。进行包括多次处理的方法，其中在处理之间具有单次用反应缓冲液(VMSI, #950-300)的洗涤步骤。各种Ventana仪器批量试剂[Ventana反应缓冲液(VMSI #950-300)、Ventana细胞调节剂1(CC1, VMSI #950-124)；和Ventana细胞调节剂1(CC1, VMSI #950-123)]已被用于在升高温度下使用类似方案来失活检测系统。在某些方案中，期望较小的残留液态物体体积以允许增加的试剂浓度。在添加试剂之前，在VENTANA BenchMark® XT自动化组织染色平台上进行“喷射排放(jet-drain)”程序，其将液态物体体积减小至约20至25%标称反应缓冲液(VMSI, #950-300)。

[0085] 在本文的实施例中使用AP和HRP模型系统(OptiView DAB或ultraView AP红色检测系统，扁桃体组织上的CD20, 8分钟CC1, 16分钟CD20)。

[0086] 具体而言，在HRP多聚体孵育之后和DAB检测(OptiView DAB检测，CD20，扁桃体组织，8分钟CC1, 16分钟CD20)之前，研究过氧化物酶失活组合物/方法。OptiView DAB IHC检测试剂盒(OptiView)是一种用于检测小鼠IgG、小鼠IgM和兔一抗的间接的、不含生物素的系统。该试剂盒意欲通过免疫组织化学(IHC)鉴定福尔马林固定、石蜡包埋和冷冻的组织切片中的靶标，所述切片在VENTANA自动化载片染色仪上染色并通过光学显微镜观察。

[0087] 同样，在AP多聚体孵育之后和AP红色检测(ultraView AP红色检测，CD20，扁桃体组织，8分钟CC1, 16分钟CD20)之前，研究小牛肠AP失活组合物/方法。Ventana Medical Systems, Inc. (Ventana) ultraView通用碱性磷酸酶红色检测试剂盒是一种用于检测小鼠IgG、小鼠IgM和兔一抗的间接的、不含生物素的系统。该试剂盒意欲通过免疫组织化学(IHC)鉴定福尔马林固定、石蜡包埋和冷冻的组织切片中的靶标，所述切片在Ventana BenchMark系列仪器(包括Benchmark, Benchmark XT和Benchmark ULTRA自动化载片染色仪)上染色。

[0088] 在本文提及的图中，在DAB的背景下，可见DAB的量减少表明HRP酶失活增加。例如，在样品仅显示复染且没有可见的DAB信号的情况下，酶失活可以是完全或接近完全的。同样，在Fast Red的背景下，可见Fast Red的量减少表明AP酶失活增加。例如，在样品仅显示复染且没有可见的Fast Red信号的情况下，酶失活可以是完全或接近完全的。

[0089] 实施例1 - 试剂pH对过氧化物酶抑制/失活的影响

本研究期间使用Ventana ultraView通用DAB IHC检测试剂盒。在ultraVIEW通用HRP多聚体(VMSI, #253-4290)检测步骤之后和ultraVIEW通用DAB色原沉积之前，将所需的酶失活步骤插入上述通用方案中。酶失活步骤在约37℃下进行约16分钟。抗原修复使用Ventana CC1进行约8分钟。Ventana Confirm MsAntiCD20 (克隆L26, VMSI #760-2531)一抗在约37℃下使用约16分钟。通过使用1M柠檬酸盐缓冲液(pH = 约1.5至约3.0, 约0.5单位的增量)的处理来验证HRP失活/变性pH依赖性。当将约一滴的组合物添加至Ventana反应缓冲液液态物中时，试剂pH的增加引起暴露于组织的所述液态物pH的增加(试剂pH/近似最终液态物

pH:约1.5/约2.0;约2.0/约2.5至2.75;约2.5/约3.0至3.25;约3.0/约3.5至4.0)。HRP酶失活效率随着所得液态物pH增加而降低。仅1M柠檬酸盐基本品(pH=约1.5)展示HRP酶活性的完全失活。DAB IHC染色强度和染色细胞百分比随试剂pH增加而增加。通过过氧化物酶失活处理后的DAB IHC检测观察到残留的内源性过氧化物酶。

[0090] 实施例2 -试剂应用温度对过氧化物酶抑制/失活的影响

本研究期间使用Ventana ultraView通用DAB IHC检测试剂盒。在ultraVIEW通用HRP多聚体(VMSI, #253-4290)检测步骤之后和ultraVIEW通用DAB色原沉积之前,将所需的酶失活步骤插入上述通用方案中。酶失活步骤以可变的温度和孵育时间进行。抗原修复使用Ventana CC1进行约8分钟。Ventana Confirm MsAntiCD20 (克隆L26, VMSI #760-2531)一抗在约37℃下使用约16分钟。据信组合物对组织抗原检测信号强度的影响受组合试剂pH、应用时间和温度影响。在升高温度下研究1M柠檬酸盐基本品(pH=约1.5)以确定温度可以如何有助于缩短酶失活。据显示,1M柠檬酸盐基本品(pH=约1.5)的孵育时间可以从在约37℃的约16分钟降低至在约41℃的约8分钟或在约 $T \geq$ 约45℃的约4分钟,同时完全抑制HRP酶活性。据信,具有高坏死的组织区域具有更高的多聚体非特异性结合,产生更强的DAB IHC染色,并且是研究酶失活的更有价值的位点。当提高酶失活试剂pH时,DAB IHC染色强度和百分比染色细胞在约41℃和约8分钟下略高于在约37℃和约16分钟。在约41℃和约8分钟的所有酶失活处理后,通过DAB IHC检测观察到残留的内源性过氧化物酶活性。

[0091] 实施例3 -额外添加剂对过氧化物酶失活的影响

基于柠檬酸盐的酶失活试剂需要抗菌试剂以达到目标保质期。预期的试剂pH=约1.5至约2.0处于或低于Proclin®试剂的耐受pH范围。据信,Proclin 950具有pH=约2至约12的pH耐受范围,且其他Proclin试剂pH具有 $pH \geq$ 约2.5的耐受性。叠氮化钠(约0.08 wt%)被确定为可行的抑菌保护剂选择,因为据信其不仅充当抑菌的氧化酶抑制剂,而且还可以可逆地抑制过氧化物酶。

[0092] 本研究期间使用Ventana ultraView通用DAB IHC检测试剂盒。在ultraVIEW通用HRP多聚体(VMSI, #253-4290)检测步骤之后和ultraVIEW通用DAB色原沉积之前,将所需的酶失活步骤插入上述通用方案中。酶失活步骤在约37℃下进行约4分钟。抗原修复使用Ventana CC1进行8分钟。Ventana Confirm MsAntiCD20 (克隆L26, VMSI #760-2531)一抗在约37℃下使用约16分钟。在1M柠檬酸盐基本品试剂(pH=约1.5)中研究过氧化氢滴度(约0.1、约0.5和约1.0 wt%),以评价添加的内源和基于检测的过氧化物酶抑制能力。通过在约37℃下在约4分钟内添加约0.5或约1.0 wt%过氧化氢,观察到增加的过氧化物酶失活效率。据信在约0.1 wt%,过氧化氢不是如此有效,其中观察到残留的HRP活性。向上述柠檬酸盐-过氧化氢组合物添加叠氮化钠(约0.08 wt%)得到类似的结果。用约0.5或约1.0 wt%过氧化氢,基本上没有观察到内源性或检测试剂盒过氧化物酶活性。该试剂组合物在VENTANA BenchMark® XT自动化组织染色平台($T =$ 约37℃)上,在不存在额外热的情况下,在约4分钟孵育中实现了酶失活/抑制。

[0093] 先前观察到氯化钠在先前研究中使检测试剂盒洗脱最小化,并且预期在酶失活期间需要氯化钠来使检测试剂盒最小化。将氯化钠滴加(tittered)到基础柠檬酸盐试剂[约1M柠檬酸盐(pH=约1.5)+约1.0 wt% H_2O_2 +约0.08 wt% NaN_3]中,从约0.25M至约4M NaCl。在过氧化物酶失活效率中基本上没有观察到变化,因为据信添加NaCl将使试剂成为更强的

蛋白变性试剂。然而,据信氯化钠使OptiView检测试剂盒洗脱最小化。

[0094] 在本研究期间使用Ventana OptiView DAB IHC检测试剂盒(VMSI #760-700)。在OptiVIEW通用HRP多聚体(VMSI, #253-4581)检测步骤之后,将所需的酶失活步骤插入上述通用方案中。酶失活步骤在约37℃下进行约4分钟。对组织进行以下处理:用RbAntiHRP检测(Jackson #323-005-021)(在约37℃,持续约16分钟)、洗涤步骤、UltraView通用HRP多聚体(在约37℃,持续约8分钟)(VMSI, #253-4290)和然后OptiVIEW DAB色原检测。抗原修复使用Ventana CC1进行约64分钟。Ventana Confirm MsAntibcl2(克隆124, VMSI #790-4464)一抗在约37℃下使用约16分钟。对无洗脱处理的cl2对照标准的RbAntiHRP检测扩增了具有增加的背景的DAB IHC检测。用基本柠檬酸盐试剂的酶失活引起显著的检测试剂盒洗脱,其中IHC检测弱于无扩增的对照载片。氯化钠添加降低检测试剂盒洗脱,其中通过病理学家评价, $[NaCl] \geq 1.0$ M和RbAntiHRP IHC的检测确定为与对照标准载片大致相等。

[0095] 实施例4 -对于碱性磷酸酶抑制/失活,温度与试剂pH变化的对比

本研究期间使用Ventana ultraView通用碱性磷酸酶红色IHC检测试剂盒。在ultraVIEW通用AP多聚体(VMSI, #253-4327)检测步骤之后和ultraVIEW通用AP红色色原沉积之前,将所需的酶失活步骤插入上述通用方案中。酶失活步骤在可变的温度和孵育时间下进行。抗原修复使用Ventana CC1进行8分钟。Ventana Confirm MsAntiCD20(克隆L26, VMSI #760-2531)一抗在约37℃下使用约16分钟。如用HRP所进行的,通过用约1M柠檬酸盐缓冲液($pH =$ 约1.5至约3.0,约0.5 pH单位的增量)的处理来验证小牛肠碱性磷酸酶失活/变性pH依赖性。试剂pH的增加引起暴露于组织的液态物pH的增加(试剂pH/近似液态物pH: 约1.5/约2.0;约2.0/约2.5至2.75;约2.5/约3.0至2.25;约3.0/约3.5至4.0),如上文所解释的(参见实施例1)。AP酶失活效率随着液态物pH增加而降低。仅1 M柠檬酸盐基本品($pH =$ 约1.5和约2.0)在约37℃下在约12分钟内展示完全AP酶活性损失。AP红色IHC染色强度和染色细胞百分比随试剂pH增加而增加。对于在约37℃的较短的酶失活步骤,在 $pH =$ 约2.0下,使用1M柠檬酸盐基本品观察到比 $pH =$ 约1.5更高强度的AP红色染色。温度升高至约41℃允许使用约1M柠檬酸盐基本品($pH =$ 约1.5)在约41℃下在约4分钟内的酶失活。约1M柠檬酸盐基本品($pH =$ 约2.0)在约41℃下需要约8分钟。

[0096] 实施例5 -添加剂对碱性磷酸酶失活的影响

这如实施例4中所讨论来进行。对用于过氧化物酶失活的酶失活组合物(参见上述实施例3)进行碱性磷酸酶失活测试,以评价它们是否会增加失活效率。没有观察到添加过氧化氢或叠氮化钠的显著优点。在约4分钟,添加氯化钠将碱性磷酸酶失活所需的温度从约41℃降低至约37℃。

[0097] 实施例6 -酶失活/方法比较研究

将酶失活组合物最好候选物和与VMSI Benchmark XT和Ultra平台相容并且目前在VMSI Benchmark XT和Ultra平台上使用的现有技术的酶失活(和检测洗脱)方法进行比较(参见表1)。进行研究以比较它们对酶失活、洗脱效率、DAB色原色调/稳定性、组织抗原检测信号强度和复染外观的影响。然后用肿瘤(tour of tumor)(TOT)和机体(tour of body)(TMB)组织载片测试前五种最好组合物/方法对组织形态学的影响。

[0098] 表1. 与公开的最好酶失活组合物候选物相比的酶失活/检测洗脱组合物和方法
(X dp = X试剂分配/液滴,JD =喷射排放方案)

酶失活方法(检测洗脱方法)
A: 1 M 柠檬酸盐基本品(pH = 1.5) (4 min, 37 °C)
B: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)
C: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 0.5% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)
D: 1 M 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)
E: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.5 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)
F: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.75 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)
G: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 1.0 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)
H: Ventana PO 抑制剂(3 x 4 min, 45 °C)
I: Ventana PO 抑制剂(1 x 12 min, 45 °C)
J: Ventana DISCO 抑制剂(3 x 12 min, 37 °C)
K: Ventana CC1 抗原修复(8 min, 95 °C)
L: Ventana CC2 抗原修复(8 min, 95 °C)
M: 热变性(反应缓冲液, 4 min, 90 °C)
N: 25 mM 甘氨酸(pH = 2.0), 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)
O: 25 mM 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)
P: 25 mM 甘氨酸(pH = 2.0), 1.0% SDS (3 dp, JD, 2x8 min, 50 °C)
Q: 25 mM 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% SDS (3 dp, JD, 2x8 min, 50 °C)

[0099] 实施例7 -过氧化物酶抑制/失活组合物/方法比较

在正常扁桃体组织上,使用OptiView DAB IHC检测(VMSI #760-700)与CD20 (克隆L26, VMSI #760-2531) 筛选表1中的酶失活组合物失活内源性和检测试剂盒过氧化物酶活性的能力(约8分钟CC1,约16分钟CD20)。在OptiView DAB IHC测定中,在酶级合物孵育步骤之后和DAB色原检测之前进行每种酶失活组合物(1°Ab孵育 - HRP多聚体孵育 - 酶失活/检测洗脱 - 标准DAB检测)。结果概述于表2中并在图1中示出。

[0100] 图1A和1B IHC DAB描绘没有处理的标准组织样品 - CD20,扁桃体(8分钟CC1,16分钟CD20),其中图像以20倍放大率捕获;图1C描绘没有处理的IHC DAB标准品 - CD20,扁桃体(8分钟CC1,16分钟CD20);图1D和1E描绘用组合物A处理的组织样品;图1F和1G描绘用组合物B处理的组织样品;图1H和1I描绘用组合物C处理的组织样品;图1K和1J描绘用组合物D处理的组织样品;图1L描绘用组合物E处理的组织样品;图1M描绘用组合物F处理的组织样品;图1N描绘用组合物G处理的组织样品;图1O和1P描绘用组合物H处理的组织样品;图1Q和1R描绘用组合物I处理的组织样品;图1S和1T描绘用组合物J处理的组织样品;图1U和1V描绘用组合物K处理的组织样品;图1W和1X描绘用组合物L处理的组织样品;图1Y和1Z描绘用组合物M处理的组织样品;图1AA和1BB描绘用组合物N处理的组织样品;图1CC和1DD描绘用组合物O处理的组织样品;图1EE和1FF描绘用组合物P处理的组织样品;且图1GG和1HH描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0101] 仅对于组合物I > J >> H ≈ A(排序顺序)观察到残留的HRP酶活性(检测试剂盒)。所有其它组合物完全抑制HRP酶活性。对于所有组合物观察到残留的内源性过氧化物酶活性,除了方法B至G。来自该比较研究的最好候选物是组合物B至G。

[0102] 表2. 与公开的最好酶失活组合物候选物相比的酶失活/检测洗脱组合物和方法

(X dp = X试剂分配/液滴, JD =喷射排放方案)

酶失活方法(检测洗脱方法)	检测试剂盒过氧化物酶失活	内源性过氧化物酶失活
A: 1 M 柠檬酸盐基本品(pH = 1.5) (4 min, 37 °C)	观察到残留的 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
B: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 HRP 活性	没有观察到内源性过氧化物酶活性
C: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 0.5% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 HRP 活性	没有观察到内源性过氧化物酶活性
D: 1 M 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 HRP 活性	没有观察到内源性过氧化物酶活性
E: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.5 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 HRP 活性	没有观察到内源性过氧化物酶活性
F: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.75 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 HRP 活性	没有观察到内源性过氧化物酶活性
G: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 1.0 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 HRP 活性	没有观察到内源性过氧化物酶活性
H: Ventana PO 抑制剂(3x4 min, 45 °C)	观察到残留的 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
I: Ventana PO 抑制剂(1x12 min, 45 °C)	观察到残留的 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
J: Ventana DISCO 抑制剂(3 x 12 min, 37 °C)	观察到残留的 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
K: Ventana CC1 抗原修复(8 min, 95 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性

酶失活方法(检测洗脱方法)	检测试剂盒过氧化物酶失活	内源性过氧化物酶失活
L: Ventana CC2 抗原修复(8 min, 95 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
M: 热变性(反应缓冲液 - 4 min, 90 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
N: 25 mM 甘氨酸(pH = 2.0), 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
O: 25 mM 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
P: 25 mM 甘氨酸(pH = 2.0), 1.0% SDS (3 dp, JD, 2x8 min, 50 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性
Q: 25 mM 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% SDS (3 dp, JD, 2x8 min, 50 °C)	没有观察到 HRP 活性	观察到内源性过氧化物酶活性

[0103] 实施例8 -碱性磷酸酶抑制/失活组合物/方法比较

在扁桃体上使用CD20 (克隆L26, VMSI #760-2531)的ultraView AP红色IHC检测试剂盒(VMSI #760-501)染色,筛选表1中的酶失活组合物失活内源性和检测试剂盒碱性磷酸酶

活性的能力(约8分钟CC1,约16分钟CD20)。在IHC测定中,在酶缀合物孵育步骤之后和AP 红色色原检测之前测试每种酶失活组合物(1°Ab孵育 - HRP多聚体孵育 - 酶失活/检测洗脱 - 标准AP 红色检测)。结果概述于表3和图2中。

[0104] 图2A描绘没有处理的IHC AP红色标准品-CD20,扁桃体(8分钟CC1,16分钟CD20)(10X的代表性图像);图2B描绘没有处理的IHC AP红色标准品-CD20,扁桃体(8分钟CC1,16分钟CD20)(10X的代表性图像);图2C描绘用组合物A处理的组织样品;图2D描绘用组合物B处理的组织样品;图2E描绘用组合物C处理的组织样品;图2E描绘用组合物C处理的组织样品;图2F描绘用组合物D处理的组织样品;图2G描绘用组合物E处理的组织样品;图2H描绘用组合物F处理的组织样品;图2I描绘用组合物处理的组织样品;图2J描绘用组合物H处理的组织样品;图2K描绘用组合物I处理的组织样品;图2L描绘用组合物J处理的组织样品;图2M描绘用组合物K处理的组织样品;图2N描绘用组合物L处理的组织样品;图2O描绘用组合物M处理的组织样品;图2P描绘用组合物N处理的组织样品;图2Q描绘用组合物O处理的组织样品;图2R描绘用组合物P处理的组织样品;且图2S描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0105] 仅对于组合物H-J观察到残留的AP酶活性(检测试剂盒)。组合物J显示围绕组织的增加的非特异性AP红色色原染色。所有其它组合物完全抑制AP酶活性。来自该比较研究的最好候选物是组合物A至G和K至Q。

[0106] 表3. 与公开的最好酶失活组合物候选物相比的酶失活/检测洗脱组合物和方法
(X dp = X试剂分配/液滴,JD =喷射排放方案)

酶失活方法(检测洗脱方法)	检测试剂盒 AP 失活
A: 1 M 柠檬酸盐基本品(pH = 1.5) (4 min, 37 °C)	没有观察到 AP 活性
B: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 41 °C)	没有观察到 AP 活性
C: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 0.5% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 41 °C)	没有观察到 AP 活性
D: 1 M 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 41 °C)	没有观察到 AP 活性
E: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.5 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 AP 活性
F: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.75 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 AP 活性
G: 1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 1.0 M NaCl, 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	没有观察到 AP 活性
H: Ventana PO 抑制剂(3 x 4 min, 45 °C)	观察到残留的 AP 活性
I: Ventana PO 抑制剂(1 x 12 min, 45 °C)	观察到残留的 AP 活性
J: Ventana DISCO 抑制剂(3 x 12 min, 37 °C)	观察到残留的 AP 活性
K: Ventana CC1 抗原修复(8 min, 95 °C)	没有观察到 AP 活性
L: Ventana CC2 抗原修复(8 min, 95 °C)	没有观察到 AP 活性
M: 热变性(反应缓冲液 - 4 min, 90 °C)	没有观察到 AP 活性
N: 25 mM 甘氨酸(pH = 2.0), 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)	没有观察到 AP 活性
O: 25 mM 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)	没有观察到 AP 活性
P: 25 mM 甘氨酸(pH = 2.0), 1.0% SDS (3 dp, JD, 2 x 8 min, 50 °C)	没有观察到 AP 活性
Q: 25 mM 柠檬酸盐(pH = 2.0), 1.0% SDS (3 dp, JD, 2 x 8 min, 50 °C)	没有观察到 AP 活性

[0107] 实施例9 -酶失活与检测试剂盒洗脱的比较

使用对扁桃体上的CD20 (克隆L26, VMSI #760-2531) (约8分钟CC1,约16分钟CD20)或扁桃体上的bcl2 (克隆124, VMSI #790-4464) (64分钟CC1,32分钟bcl2)的OptiView DAB IHC检测染色(VMSI #760-700)、RbAntiHRP检测(Jackson #323-005-021) (在约37℃,持续约16分钟)和ultraView HRP多聚体(VMSI, #253-4290) (在约37℃,持续约8分钟),筛选表1中的酶失活方法在酶过氧化物酶失活后洗脱检测试剂盒的能力。在IHC测定中,在OptiView HRP 多聚体孵育步骤之后和RbAntiHRP检测之前测试每种酶失活组合物(1°Ab孵育 - OptiView 2°孵育 - OptiView HRP多聚体孵育-酶失活/检测洗脱 - RbAntiHRP孵育 - ultraView HRP多聚体孵育-标准DAB检测)。使用任何处理方法没有观察到完整的检测试剂

盒洗脱(参见图3)。

[0108] 图3A和3B描绘没有处理的用IHC DAB标准品染色的组织(图3A CD20, 扁桃体(8分钟CC1, 16分钟CD20); 图3B bc12, 扁桃体(64分钟CC1, 32分钟bc12))。图3A和3B仅用于组合物A和E至G。代表性图像为10X。图3C和3D描绘用RbAntiHRP/ultraView检测的用IHC DAB标准品染色的组织(图3C是CD20, 扁桃体(8分钟CC1, 16分钟CD20), 而图3D是bc12, 扁桃体(64分钟CC1, 32分钟bc12))。图3E和3F描绘用组合物A处理的组织样品(图3E是CD20, 扁桃体(8分钟CC1, 16分钟CD20), 而图3F是bc12, 扁桃体(64分钟CC1, 32分钟bc12)); 图3G描绘用组合物B处理的组织样品; 图3H描绘用组合物C处理的组织样品; 图3I描绘用组合物D处理的组织样品; 图3J描绘用组合物E处理的组织样品; 图3K描绘用组合物F处理的组织样品; 图3L描绘用组合物G处理的组织样品; 图3M描绘用组合物H处理的组织样品; 图3N描绘用组合物I处理的组织样品; 图3O描绘用组合物J处理的组织样品; 图3P描绘用组合物K处理的组织样品; 图3Q描绘用组合物L处理的组织样品; 图3R描绘用组合物M处理的组织样品; 图3S描绘用组合物N处理的组织样品; 图3T描绘用组合物O处理的组织样品; 图3U描绘用组合物P处理的组织样品; 且图3V描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0109] 不希望受任何特定理论所束缚, 据信残留的HRP酶会被变性, 影响对组织的RbAntiHRP检测; 然而, 确实发生部分洗脱。含有氯化钠(和其它盐)的基本柠檬酸盐组合物展示较低的洗脱水平。具有约0.5M NaCl的组合物E仍然显示一些检测洗脱。然而, 组合物F和G(分别具有约0.75和约1.0 M NaCl)展示RbAntiHRP检测相对于标准和RbAntiHRP检测没有值得注意的变化。组合物M展示抗体结合的破坏; 然而, 检测系统非特异性分布在组织上(增加的非特异性背景染色)。病理学家评估表明, 通过组合物L > P ≈ Q > N ≈ O > A至D >> K >> M(排列顺序)实现了最佳的HRP多聚体洗脱。

[0110] 实施例10 - 酶失活组合物对DAB IHC色原染色的影响

用有和没有苏木精复染的OptiView DAB检测(VMSI #760-700), 对扁桃体组织的bc12进行染色(VMSI, #253-4290)。使用bc12 DAB IHC模型, 因为DAB染色没有过度饱和, 并允许检测微妙变化的能力。由于已经观察到共定位的DAB和苏木精染色增加表观DAB强度, 所以载片也在没有苏木精复染的情况下染色。在IHC测定期间, 在标准DAB色原检测(DAB/H₂O₂, 然后CuSO₄调色)之后立即在约37°C下添加基本柠檬酸盐酶失活组合物[1M柠檬酸盐(pH ≈ 1.5), 约1.0 wt% H₂O₂, 约0.08 wt% NaN₃], 持续约4分钟[HRP多聚体孵育-标准DAB检测-酶失活组合物-苏木精II复染(如果使用)]。酶失活组合物引起DAB色调从巧克力色或棕色/红色转变为棕色/橙色。通常在铜DAB染色调色不存在的情况下观察到该DAB色调。酶失活之后添加的额外铜-调色步骤恢复了一些DAB色调。然而, DAB染色强度不如没有处理的标准品那么强。用和不用苏木精复染观察到类似的DAB色调偏移。在低和中等表达IHC抗原间一致地观察到DAB色调改变。然而由于更高的DAB染色密度, 扁桃体上的更强抗原诸如CD20的OptiView DAB IHC染色中没有显著地观察到相同的DAB色调偏移。

[0111] 用含有氯化钠的柠檬酸盐酶失活组合物[1M柠檬酸盐(pH = 约1.5) + 约1.0 wt% H₂O₂ + 约0.5 M NaCl + 约0.08 wt% NaN₃]进行类似的实验。添加氯化钠将在1X和4X处理下用基本柠檬酸盐组合物观察到的DAB色原色调偏移最小化。最可能影响铜调色的过氧化氢仍然引起微妙的色调偏移。然而, 添加氯化钠降低了检测试剂盒洗脱, 其降低了表观DAB色调偏移。据信通过引入约0.5至约1.0M氯化钠使DAB色调影响的差异最小化。

[0112] 实施例11 - DAB IHC染色:酶失活组合物/方法影响比较

如先前在上面实施例9和10中所讨论,在DAB检测后色原暴露于含有过氧化氢的酶失活组合物影响DAB染色(强度和色调)。组合物引起DAB色调从巧克力色或棕色/红色转变为棕色/橙色,通常对于不存在铜调色的DAB染色观察到棕色/橙色。在用酶失活组合物处理之后的额外的铜调色步骤恢复了一些DAB色调;然而,它没有如没有处理的标准品那么强烈。在低和中等表达IHC抗原间一致地观察到DAB色调改变;然而,由于更高的DAB染色强度,没有在强抗原的OptiView DAB IHC染色中显著观察到相同的DAB色调偏移。

[0113] 针对其对扁桃体上的bcl2的OptiView DAB IHC染色的影响(约64分钟CC1,约32分钟bcl2),筛选表1中的酶失活组合物。在IHC测定中,在OptiView DAB色原沉积/铜调色之后,测试每种酶失活组合物。不进行苏木精复染,以允许更好地评价DAB色调和染色强度(1° Ab孵育 - HRP多聚体孵育 - 标准DAB检测 - 酶失活/检测洗脱)。1X和4X进行每种酶失活方法以检查可以在多重检测测定中进行的多个序列的累积效应(参见图4)。

[0114] 图4A和4B描绘没有处理的用IHC DAB标准品染色的组织 - bcl2,扁桃体(64分钟CC1,32分钟bcl2)。(第二轮试剂制剂标准-4B-仅对于组合物A2、E至G) 10X的代表性图像;图4C和4D描绘用组合物A处理的组织样品;图4E和4F描绘用组合物B处理的组织样品;图4G和4H描绘用组合物C处理的组织样品;图4I和4J描绘用组合物D处理的组织样品;图4K和4L描绘用组合物E处理的组织样品;图4M和4N描绘用组合物F处理的组织样品;图4O和4P描绘用组合物G处理的组织样品;图4Q和4R描绘用组合物H处理的组织样品;对于组合物I没有收集数据;图4S和4T描绘用组合物J处理的组织样品;图4U和4V描绘用组合物K处理的组织样品;图4W和4X描绘用组合物L处理的组织样品;图4Y和4Z描绘用组合物M处理的组织样品;图4AA和4BB描绘用组合物N处理的组织样品;图4CC和4DD描绘用组合物O处理的组织样品;图4EE和4FF描绘用组合物P处理的组织样品;且图4GG和4HH描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0115] 所有含有过氧化氢的组合物(组合物B-J)对从巧克力色或棕色/红色变化至棕色/橙色的DAB染色色调具有一些潜在的影响。在越高浓度过氧化氢下暴露,越高孵育温度或越长孵育时间引起更大的变化。在过氧化氢不存在的情况下,约1M柠檬酸盐组合物(pH = 约1.5) [组合物A]对DAB染色没有可辨别的影响。添加氯化钠大大降低柠檬酸盐-过氧化氢组合物的DAB色调影响(E-G)。含有约1.0 wt% SDS的25mM甘氨酸或柠檬酸盐组合物引起与组合物A-D相似的用过氧化氢观察到的色调偏移。相对于标准和1X处理,组合物K和L在4X处理具有降低的DAB染色强度。用组合物M没有观察到明显变化。申请人相信,如果最后在多重检测测定中进行DAB染色,则所有组合物都可用于使用。

[0116] 实施例12 -酶失活组合物对碱性磷酸酶红色IHC色原染色的影响

用具有苏木精II复染的ultraView AP红色检测(VMSI #760-501),针对bcl2 (VMSI, #253-4290)进行扁桃体组织染色。使用bcl2 AP红色IHC模型,因为AP红色染色没有过度饱和,并允许如上用DAB看到微妙变化的能力。在IHC测定期间,在标准AP红色色原检测之后和苏木精复染之前添加酶失活组合物[1M柠檬酸盐(pH = 约1.5), 约1.0 wt% H₂O₂,约0.08 wt% NaN₃] (AP多聚体孵育-标准AP红色检测-酶失活组合物-苏木精II复染)。AP酶失活序列在约41℃下1X和4X进行约4分钟。在最多达4次的酶失活处理之前或之后在初级AP红色色原染色中没有观察到可辨别的差异。认为任何观察到的变化都没有DAB色原那么显著,并且潜在地在仪器和ultraView红色检测系统的边界之内。

[0117] 实施例13 -酶失活组合物对组织抗原染色强度的影响(bc12组织抗原-正常扁桃体)

选择bc12抗原作为示例测试例,因为已知其受各种自动化组织处理的影响。在IHC测定期间,在细胞调节之后和1°Ab孵育之前添加酶失活组合物[1M柠檬酸盐(pH =约1.5),有或没有4N NaCl](细胞调节 - 洗脱组合物 - 1°Ab孵育 - HRP多聚体孵育-标准DAB检测)。酶失活序列在约37℃下1X和4X进行约16分钟,在过氧化氢不存在的情况下的HRP酶失活条件。单独的1M柠檬酸盐(pH =约1.5)基本品似乎对具有延长处理的bc12 DAB IHC染色具有潜在的负面影响。1X和4X处理提供了类似的bc12 IHC染色模式。然而,4X处理的样品的DAB染色强度小于1X处理的样品,这等于未处理的标准品。通过添加4N NaCl来大大降低bc12 DAB IHC强度。据信,孵育时间从约16分钟缩短至约4分钟可以潜在地降低氯化钠的蛋白变性影响。

[0118] 酶失活序列在约37℃下用1M柠檬酸盐(pH =约1.5)(有和没有额外约1.0 wt% H₂O₂ + 约0.08 wt% NaN₃)进行约4分钟,用于在过氧化氢存在的条件下抑制的条件。再次证实1M柠檬酸盐(pH =约1.5)基本品在细胞调节之后和在1°Ab孵育之前用4X失活处理降低bc12 DAB IHC强度。添加约1 wt% H₂O₂和约0.08 wt% NaN₃降低了柠檬酸盐基本品的负面组织染色影响。DAB IHC染色中观察到的任何变化都可在预期的仪器和检测系统的边界之内。bc12抗原检测信号强度影响与使用VMSI PO抑制剂(具有相似过氧化氢浓度的中性试剂)观察到的影响相似。以氯化钠作为组合物的添加剂的初始评估表明,所述添加没有超出上述基于柠檬酸盐的试剂的实质性负面影响。与没有盐的标称柠檬酸盐基本品相比,用公开的基于盐的酶失活组合物的IHC检测最多略微更淡。

[0119] 实施例14 -酶失活组合物对组织抗原检测信号强度的影响(CD8组织抗原 - 正常组织)

选择CD8抗原用于示例测试例,因为已知其受过氧化氢试剂的影响。酶失活序列在约37℃下用1M柠檬酸盐(pH =约1.5)(有和没有额外约1.0 wt% H₂O₂ + 约0.08 wt% NaN₃)进行约4分钟(细胞调节 - 酶失活组合物 - 1°Ab孵育 - HRP多聚体孵育-标准DAB检测)。酶失活序列在约37℃下1X和4X进行约4分钟,在过氧化氢存在的条件下的HRP抑制的条件。在有或没有过氧化氢的情况下评价酶失活组合物对CD8抗原检测信号强度没有可辨别的影响。DAB IHC染色模式和强度被认为等于未处理的标准品。以氯化钠作为组合物的添加剂的初始评估表明,所述添加没有超出上述基于柠檬酸盐的试剂的实质性负面影响。与没有盐的标称柠檬酸盐基本品相比,用公开的基于盐的酶失活组合物的CD8 IHC检测最多略微更淡。DAB IHC染色中观察到的任何变化据信在预期的仪器和检测系统的边界之内。

[0120] 实施例15 -酶失活组合物对组织抗原检测信号强度的影响(HER2抗原)

选择HER2抗原用于示例测试例,因为已知其如同bc12一样受各种自动化组织处理的影响。酶失活序列在约37℃下用1M柠檬酸盐(pH =约1.5)(有和没有额外约1.0 wt% H₂O₂ + 约0.08 wt% NaN₃)进行约4分钟(细胞调节 - 洗脱试剂 - 1°Ab孵育 - HRP多聚体孵育-标准DAB检测)。酶失活序列在约37℃下1X和4X进行约4分钟(在过氧化氢不存在的情况下的HRP抑制的条件)。因为载片含有单个细胞而不是连续组织切片,难以获得酶失活组合物对HER2抗原检测信号强度的影响。对于1M柠檬酸盐(pH =约1.5)基本品组合物(有和不具有约1.0 wt% H₂O₂ + 约0.08 wt% NaN₃),HER2 DAB IHC染色的染色模式被判断为等于未处理的标准

载片；然而，所有处理的载片的DAB IHC染色强度通常被判断为与标准载片相比等同或更暗。在每种情况下，酶失活处理没有改变标准载片上的HER2诊断。以氯化钠作为组合物的添加剂的初始评估表明，没有超出上述基于柠檬酸盐的试剂的实质性负面影响。与没有盐的标称柠檬酸盐基本品相比，用公开的基于盐的酶失活组合物的IHC检测最多略微更淡。DAB IHC染色中观察到的任何变化据信在预期的仪器和检测系统的边界之内。

[0121] 实施例16 -组织抗原检测信号强度：酶失活组合物/方法影响比较

如实施例13、14和15中先前所讨论，酶失活组合物（试剂pH、H₂O₂浓度、盐浓度等）和仪器应用条件（孵育温度、时间等）可以潜在地影响组织靶标的抗原检测信号强度。使用bc12/扁挑体（约64分钟CC1，约32分钟bc12）、CD8/扁挑体（约64分钟CC1，16分钟CD8）和HER2/VMSI Pathway™ HER2 4合1测试载片（约32分钟CC1，约32分钟HER2）的OptiView DAB IHC染色，就对抗原检测信号强度的影响筛选表1中的酶失活组合物/方法。在IHC测定期间在细胞调节之后和在1°Ab孵育之前测试每种酶失活组合物（细胞调节 - 洗脱试剂-1°Ab孵育-2°Ab孵育-HRP多聚体孵育-标准DAB检测）。1X和4X进行酶失活序列以评价其潜在的累积抗原检测信号强度影响。每种条件染色单个载片，对比重复，以仅初始研究在用于检查剧烈变化的可行性期间的条件。载片由3个病理学家和2个合格阅读者评估。相对于标准载片针对抗原检测信号强度将载片评分。如果检测到的抗原信号强度相对于标准品增加，则分配+1值，如果检测到的抗原信号强度等于标准品，则分配0值，如果检测到的抗原信号强度小于标准品，则分配-1值。将评估值求和，并针对其个体和总体检测到的抗原信号强度影响进行评估。结果显示于表4和图5、6和7中。

[0122] 表4. 与公开的最好酶失活组合物候选物相比的酶失活/检测洗脱组合物和方法

酶失活方法	组织抗原 IHC 检测信号影响			影响的 总和
	bcl2	CD8	HER2	
1 M 柠檬酸盐(pH = 1.5) (4 min, 37 °C)	-5	0	1	-4
1 M 柠檬酸盐(1.5), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	-2	0	3	1
1 M 柠檬酸盐(1.5), 0.5% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	2	-1	-2	-1
1 M 柠檬酸盐(2.0), 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	2	0	-1	1
1 M 柠檬酸盐基本品: pH = 1.5, 1.0% H ₂ O ₂ , 0.08% NaN ₃ (4 min, 37 °C)	1	-2	2	1
1 M 柠檬酸盐基本品 (1.5) + 0.5 M NaCl (4 min, 37 °C)	1	0	1	2
1 M 柠檬酸盐基本品 (1.5) + 0.75 M NaCl (4 min, 37 °C)	-2	0	-2	-4
1 M 柠檬酸盐基本品 (1.5) + 1.0 M NaCl (4 min, 37 °C)	1	-2	-3	-4
1 M 柠檬酸盐基本品 (1.5) + 2.0 M NaCl (4 min, 37 °C)	-3	-3	-3	-9
Ventana PO 抑制剂(3 x 4 min, 45 °C)	-3	0	0	-3
Ventana DISCO 抑制剂(3 x 12 min, 37 °C)	-2	5	1	4
25 mM 甘氨酸(2.0) + 1.0% SDS (5 dp, JD, 32 min, 50 °C)	-1	1	0	0
25 mM 柠檬酸盐(2.0) + 1.0% SDS (5 dp JD, 32 min, 50 °C)	-4	-2	0	-6
25 mM 甘氨酸(2.0) + 1.0% SDS (3 dp, JD, 2 x 8 min, 50 °C)	0	-1	-4	-5
25 mM 柠檬酸盐(2.0) + 1.0% SDS (3 dp, JD, 2 x 8 min, 50 °C)	1	0	1	2
热变性(反应缓冲液, 4 min, 90 °C)	-5	-1	0	-6
Ventana CC1 抗原修复(8 min, 95 °C)	-4	-4	-1	-9
Ventana CC2 抗原修复(8 min, 95 °C)	-1	2	2	3

[0123] 图5A和5B描绘没有处理的用IHC DAB标准品染色的组织-bcl2, 扁桃体(64分钟CC1, 32分钟bcl2); 5X的代表性图像。(在5B的第2轮试剂制剂标准); 图5C和5D描绘用组合物A处理的组织样品; 图5E和5F描绘用组合物B处理的组织样品; 图5G和5H描绘用组合物C处理的组织样品; 图5I和5J描绘用组合物D处理的组织样品; 图5K和5L描绘用组合物E处理的组织样品; 图5M和5N描绘用组合物F处理的组织样品; 图5O和5P描绘用组合物G处理的组织样品; 图5Q和5R描绘用组合物H处理的组织样品; 对于组合物I没有收集数据; 图5S和5T描绘用组合物J处理的组织样品; 图5U和5V描绘用组合物K处理的组织样品; 图5W和5X描绘用组合物L处理的组织样品; 图5Y和5Z描绘用组合物M处理的组织样品; 图5AA和5BB描绘用组合物N处理的组织样品; 图5CC和5DD描绘用组合物O处理的组织样品; 图5EE和5FF描绘用组合物P处理的组织样品; 且图5GG和5HH描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0124] 图6A和6B描绘没有处理的用IHC DAB标准品No.1染色的组织-CD8, 扁桃体(64分钟CC1, 16分钟CD8); 10X的代表性图像。(在5的第2轮试剂制剂标准); 图6C和6D描绘用组合物A处理的组织样品; 图6E和6F描绘用组合物B处理的组织样品; 图6G和6H描绘用组合物C处理

的组织样品;图6I和6J描绘用组合物D处理的组织样品;图6K和6L描绘用组合物E处理的组织样品;图6M和6N描绘用组合物F处理的组织样品;图6O和6P描绘用组合物G处理的组织样品;图6Q和6R描绘用组合物H处理的组织样品;对于组合物I没有收集数据;图6S和6T描绘用组合物J处理的组织样品;图6U和6V描绘用组合物K处理的组织样品;图6W和 6X描绘用组合物L处理的组织样品;图6Y和6Z描绘用组合物M处理的组织样品;图6AA和6BB描绘用组合物N处理的组织样品;图6CC和6DD描绘用组合物O处理的组织样品;图6EE和6FF描绘用组合物P处理的组织样品;且图6GG和6HH描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0125] 图7A和7B描绘没有处理的用IHC DAB标准品染色的组织-HER2, VMSI Pathway™ HER2 4合1测试载片(32分钟CC1,32分钟HER2);最高表达细胞的10X的代表性图像;(在7B的第2轮试剂制剂标准);图7C和7D描绘用组合物A处理的组织样品;图7E和7F描绘用组合物B处理的组织样品;图7G和7H描绘用组合物C处理的组织样品;图7I和7J描绘用组合物D处理的组织样品;图7K和7L描绘用组合物E处理的组织样品;图7M和7N描绘用组合物F处理的组织样品;图7O和7P描绘用组合物G处理的组织样品;图7Q和7R描绘用组合物H处理的组织样品;对于组合物I没有收集数据;图7S和7T描绘用组合物J处理的组织样品;图7U和7V描绘用组合物K处理的组织样品;图7W和7X描绘用组合物L处理的组织样品;图7Y和7Z描绘用组合物M处理的组织样品;图7AA和7BB描绘用组合物N处理的组织样品;图7CC和7DD描绘用组合物O处理的组织样品;图7EE和7FF描绘用组合物P处理的组织样品;且图7GG和7HH描绘用组合物Q处理的组织样品。

[0126] 不希望受任何特定理论束缚,据信优选的酶失活方法应当对单个标记物或标记物组的组织抗原检测信号强度具有最小的影响。上述抗原检测信号强度结果表明,所有酶失活方法可以对组织抗原检测信号强度具有影响,其中一些比其它更明显。每种酶失活方法将需要针对在多重检测测定中使用的抗原组和组织模型进行验证。据信,如果在任何内源性酶或检测化学酶失活之前合并一抗并同时孵育,则抗原检测信号强度将被最小地影响。在使用多个1°抗体种类或半抗原标记的1°抗体的非常专门的检测系统酶检测下,这是可能的。

[0127] 实施例17 -组织形态影响比较

用Ki67 (OptiView DAB,约64分钟CC1,约16分钟Ki67 1°Ab孵育)以及有或没有酶失活的苏木精II复染染色肿瘤(Tour of tumor) (TOT)和机体(tour of body) (TOB)微阵列载片。在抗原修复之后和一抗孵育之前,每种条件用一次处理测试(细胞调节 - 洗脱试剂 - 1°Ab孵育 - HRP 多聚体孵育 - 标准DAB检测)。据信,对于任何酶失活方法,没有观察到相对于未处理的标准品的明显的组织形态变化。

[0128] 实施例18 -液态物系统与薄膜的对比

也以“薄膜”形式研究公开的酶失活/检测洗脱组合物。在这些实施例中,通过混动混合,将约120μL的试剂置于覆盖瓦下与测试例直接接触。将试剂组合物从载片中取出,先后用和反应缓冲液洗涤,然后进行苏木精II复染。将最好组合物候选物1M柠檬酸盐(pH =约1.5)、约1.0% H₂O₂、约0.08% NaN₃以约1:约4的比率稀释于反应缓冲液中,并应用至测试例。在另一个实例中,将250 mM柠檬酸盐(pH =约2.5)、约1.0% H₂O₂、约0.08% NaN₃应用至测试例。当将约1M柠檬酸盐(pH =约1.5)、约1.0% H₂O₂、约0.08% NaN₃以约1:约4的比率稀释于反应缓冲液中时,获得pH =约2.5。初始靶向约1.0% H₂O₂,因为已经显示增加的试剂组合物浓

度在薄膜IHC DAB染色中提供更一致的结果。据信,在其它组合中, H_2O_2 浓度可以从约1.0 wt%降低至约0.25 wt% H_2O_2 。

[0129] 实施例19 -多重检测测定中的酶失活(双重HRP介导的组织染色)

进行HRP介导的多重检测测定,其比较公开的酶失活组合物/方法[1M柠檬酸盐(pH = 约1.5) + 约1.0 wt% H_2O_2 + 约0.5 M NaCl + 约0.08 wt% NaN_3 ,约37°C,约4 min]与优选的酶失活方法[Ventana DISCO抑制剂(3 x 约12分钟,约37°C)]。在不混合1°抗体的情况下依次进行酪酰胺色原检测。一抗检测序列在二抗检测序列之前完成(1°Ab孵育1 - HRP-Ab孵育1 - 酪酰胺色原检测1 - 酶失活 - 1°Ab孵育2 - HRP-Ab孵育2 - 酪酰胺色原检测2)。使用适当的VMSI Discovery UltraMap抗物种抗体-HRP缀合物(VMSI #760-4313和760-4315)检测每种一抗(预稀释的)。Ventana兔抗CD8抗体克隆SP57 (VMSI #790-4460)用TAMRA酪酰胺检测法检测,且Ventana小鼠抗CD163抗体克隆MRQ-26 (VMSI #760-4437)用Rhod110酪酰胺检测法检测。一抗孵育在约37°C下进行约32分钟,并且2°抗物种Ab-HRP缀合物孵育在约37°C下进行约32分钟。在37°C和100 μM 酪酰胺浓度下,所有酪酰胺检测进行约40分钟。一式两份进行每次实验。观察到的任何酪酰胺色原组织染色强度差异均在可以用可能的仪器和测定观察到的边界之内。公开的酶失活组合物/方法将HRP酶失活步骤从约60分钟缩短至约12分钟。这反映了在较高阶依次多重检测测定中减少组织染色测定时间的显著时间增益。使用相同的HRP酶抑制测定法,在HRP介导的DAB/酪酰胺色原检测测定中获得类似的结果。

[0130] 实施例20 -多重检测测定中的酶失活(双重AP介导的组织染色)

进行HRP介导的多重检测测定,其比较公开的酶失活组合物/方法[1M柠檬酸盐(pH = 约1.5) + 约1.0 wt% H_2O_2 + 约0.5 M NaCl + 约0.08 wt% NaN_3 ,约37°C,约4 min]以及AP多重检测测定法一起使用的优选的酶失活方法[反应缓冲液中的热变性,约90°C,约4分钟]。在扁桃体组织上,使用依次串联1°抗体和色原检测进行对CD8和CD163的双重AP介导的色原组织染色,其中在每个检测步骤之间进行适当的酶失活(1°Ab孵育1 - AP-Ab孵育1 - AP色原检测1 - 酶失活 - 1°Ab孵育2 - AP-Ab孵育2 - AP染色体检测2)。将1°抗体1:1稀释于VMSI抗体稀释剂(VMSI #251-018)中以控制直接的AP染色强度和背景。[VMSI兔抗CD8抗体(VMSI #790-4460, 克隆SP57)与Discovery UltraMap蓝色抗Rb检测试剂盒(VMSI #760-155); VMSI小鼠抗CD163抗体(VMSI #760-4437, 克隆MRQ-26)与Discovery UltraMap红色抗Ms检测试剂盒(VMSI #760-154);约32 min 1°Ab孵育(如上1:1稀释);约32 min 2°Ab-AP缀合物孵育(预稀释);约8分钟总AP色原沉积时间]。一式两份进行每次组织染色实验。

[0131] 已经显示,公开的低pH柠檬酸盐酶失活组合物和方法完全变性并抑制AP而不降低第一AP色原信号强度。反应缓冲液中在约90°C的热AP酶失活方法提供了类似的结果。观察到的任何AP色原组织染色强度差异均在可以用可能的仪器和测定观察到的边界之内。

[0132] CD8和CD163抗体染色表明每种酶失活组合物或方法可以对二抗检测具有的潜在影响。当在CD8之前检测CD163时,AP色原检测信号/背景比率密切反映了对相应标准品预期,并且对色原强度或背景几乎没有影响。然而,当在CD163之前检测CD8时,观察到相反的结果。在两种酶失活方法中,观察到CD163背景染色的增加,而在约90°C的反应缓冲液中的热酶失活方法提供了显著更高的背景,然后是较低温度的公开的组合物方法。更重要地,添

加的热元件将CD163抗原变性至阳性AP色原组织染色几乎完全损失的点。公开的低pH酶失活组合物和方法允许类似的酶失活时间而不使用热,同时仍然提供与标准水平相似的阳性CD163组织AP染色。

[0133] 在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物以其整体通过引用并入本文。如果必要,可以修改实施方案的方面,以采用各种专利、申请和出版物的概念以提供另外的实施方案。

[0134] 尽管已经参考具体实施方案描述了本文的发明,但应当理解,这些实施方案仅仅说明本发明的原理和应用。因此,应当理解,可以对说明性实施方案进行许多修改,并且可以在不脱离由所附权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下设计其它布置。

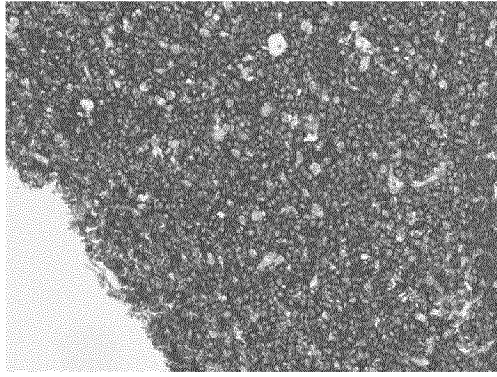


图 1A

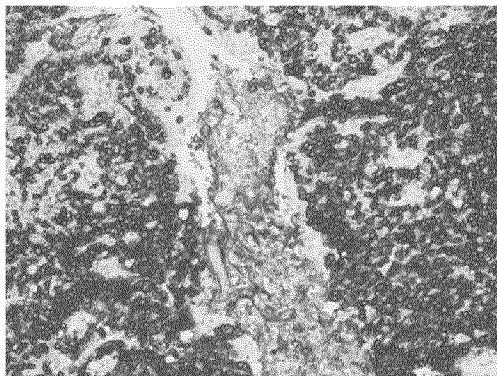


图 1B

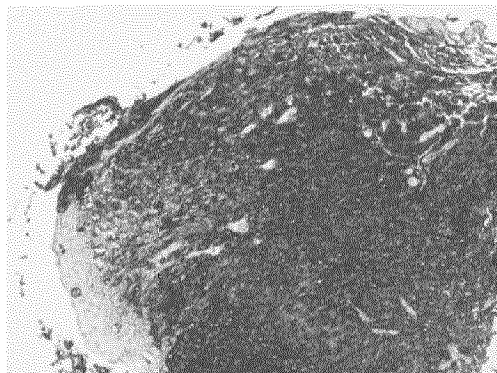


图 1C

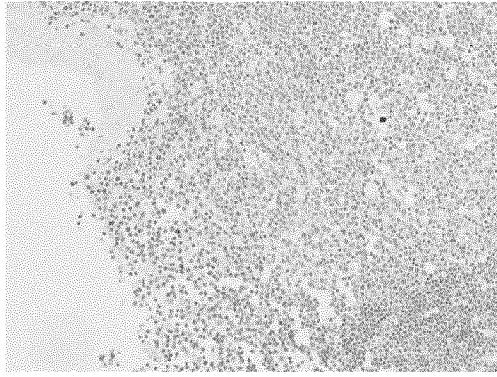


图 1D

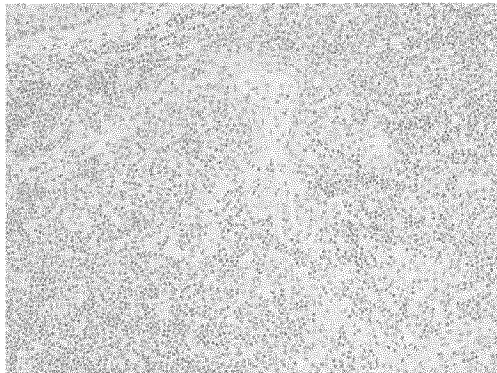


图 1E

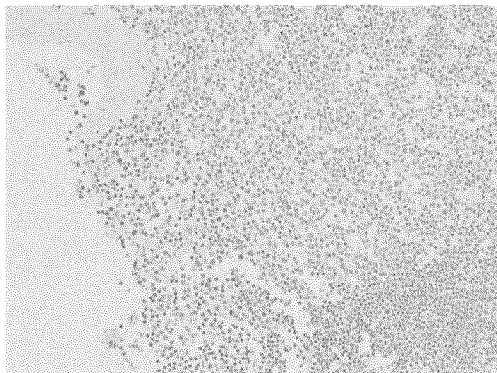


图 1F

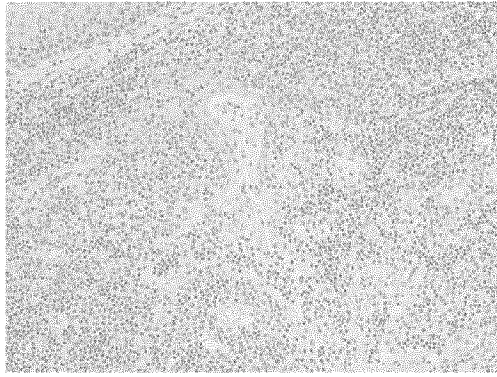


图 1G

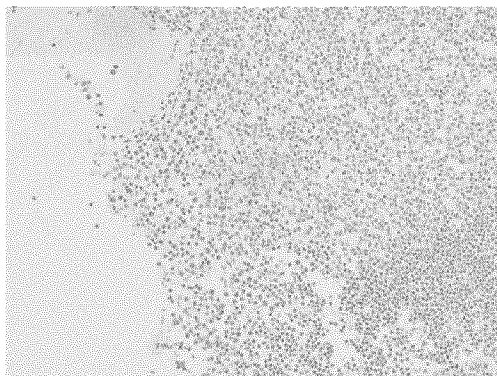


图 1H

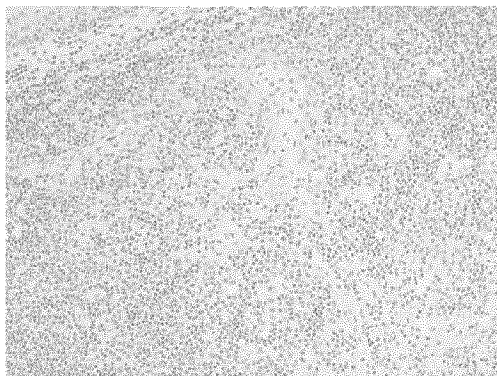


图 1I

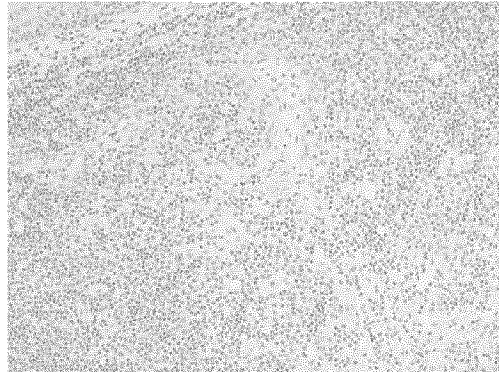


图 1J

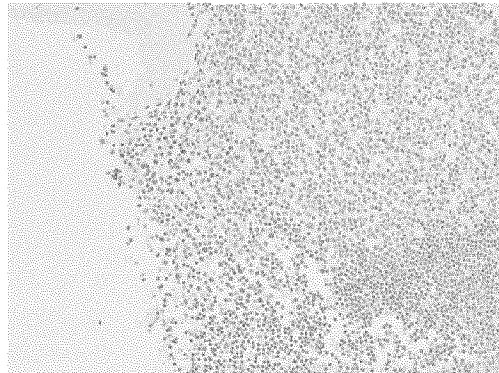


图 1K

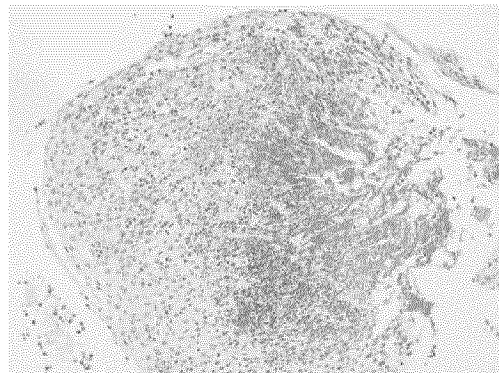


图 1L

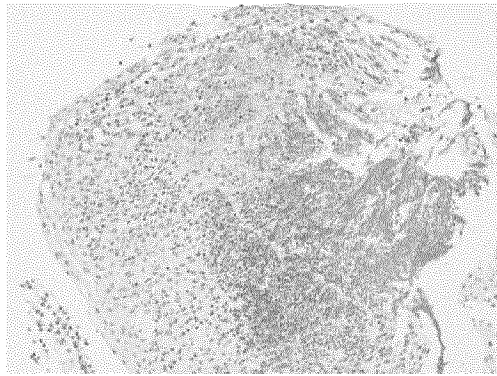


图 1M

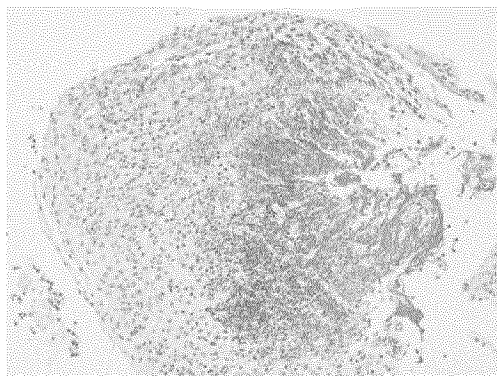


图 1N

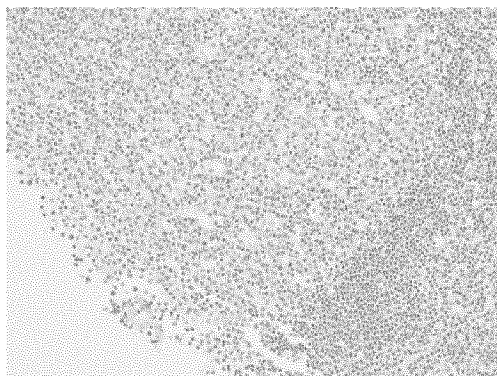


图 10

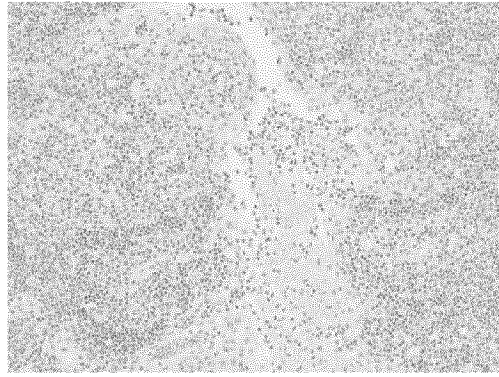


图 1P

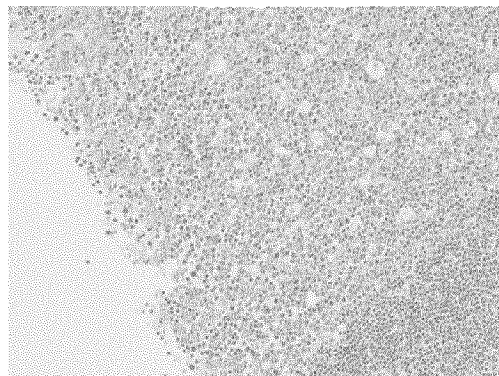


图 1Q

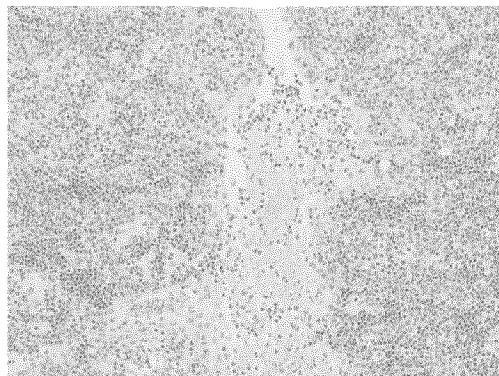


图 1R

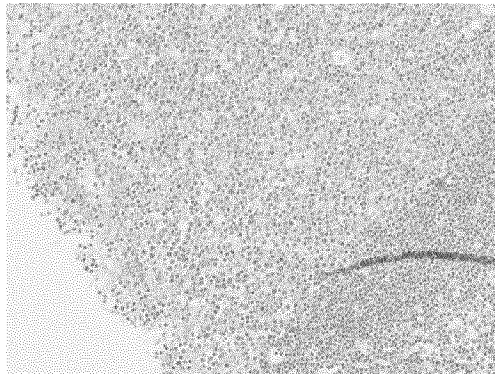


图 1S

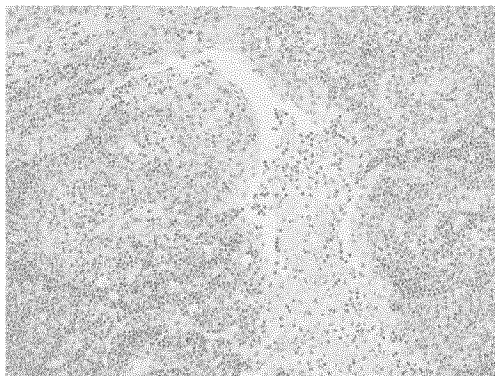


图 1T

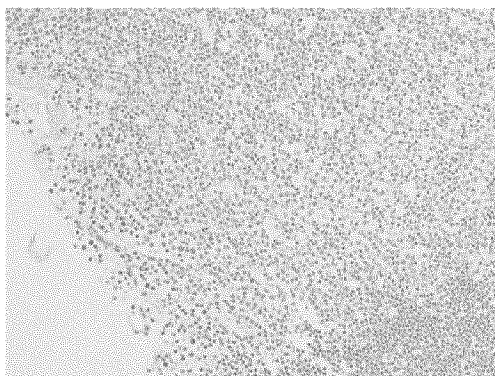


图 1U

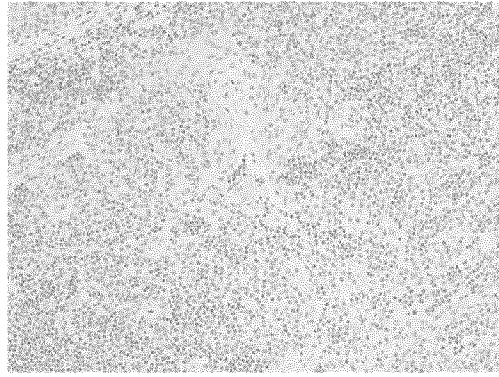


图 1V

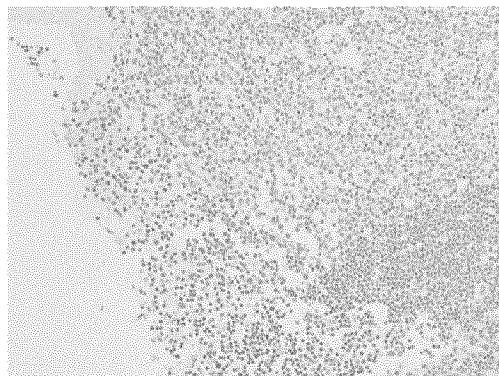


图 1W

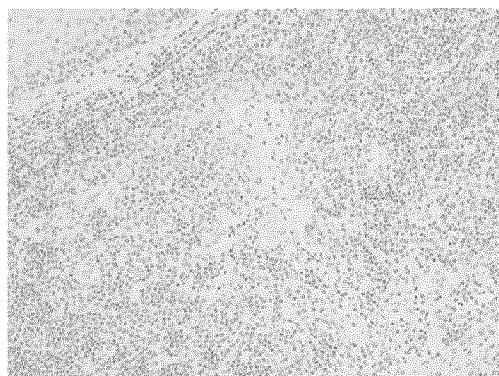


图 1X

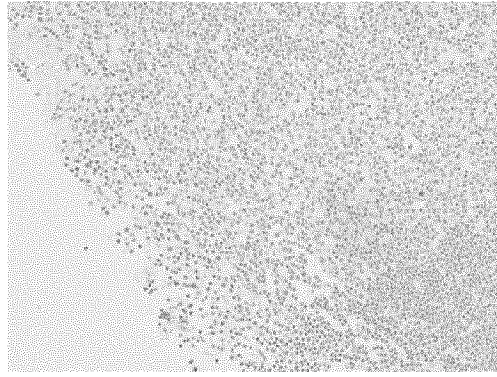


图 1Y

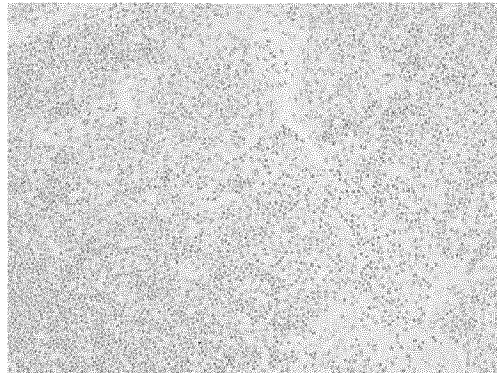


图 1Z



图 1AA

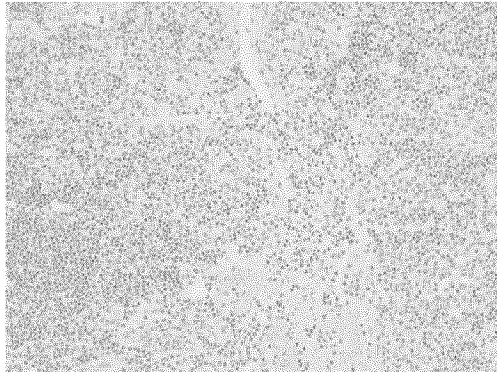


图 1BB

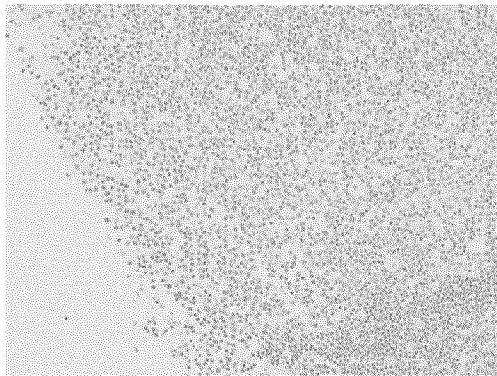


图 1CC

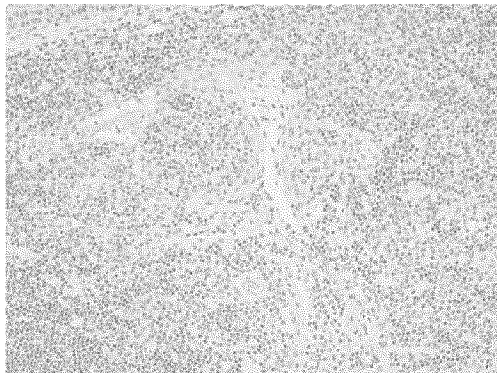


图 1DD

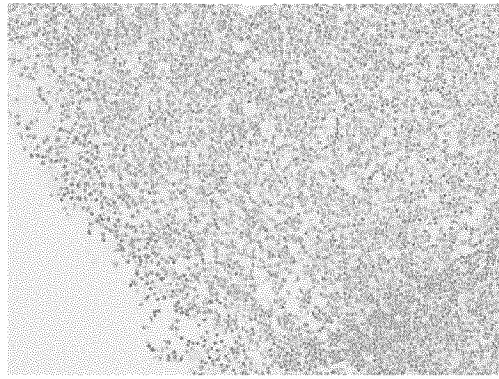


图 1EE

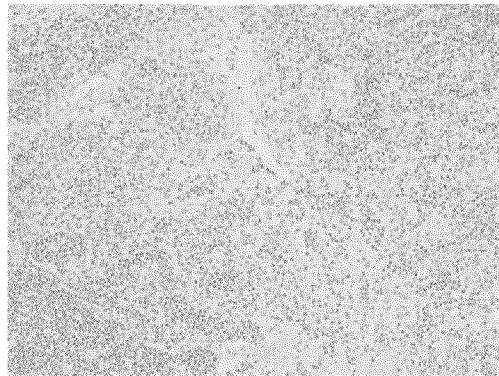


图 1FF

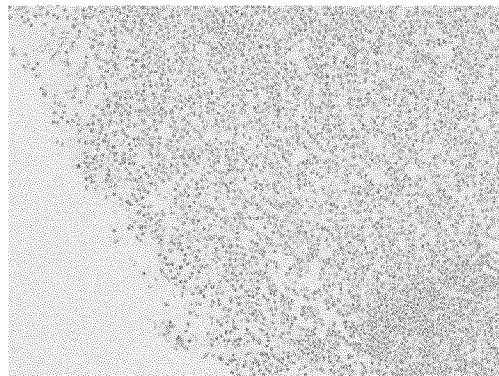


图 1GG

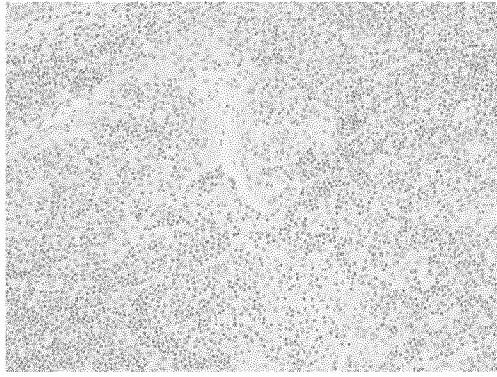


图 1HH

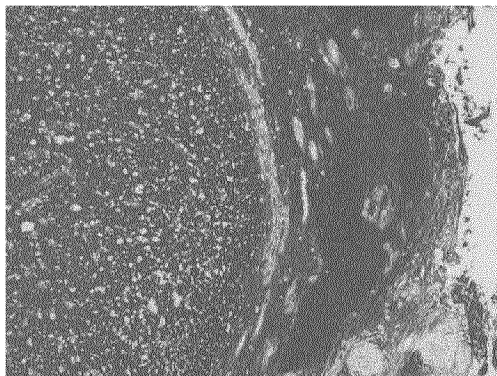


图 2A

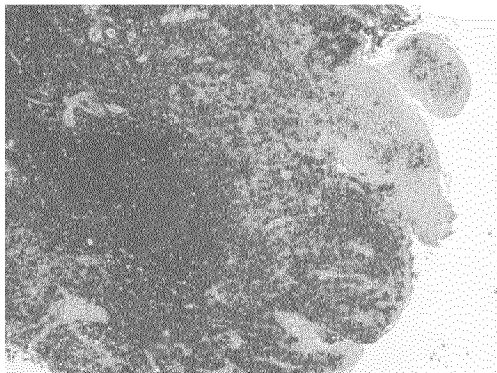


图 2B

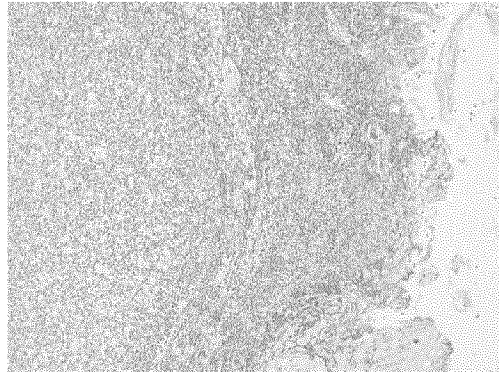


图 2C

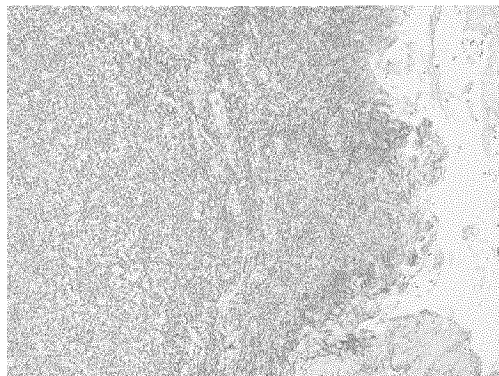


图 2D

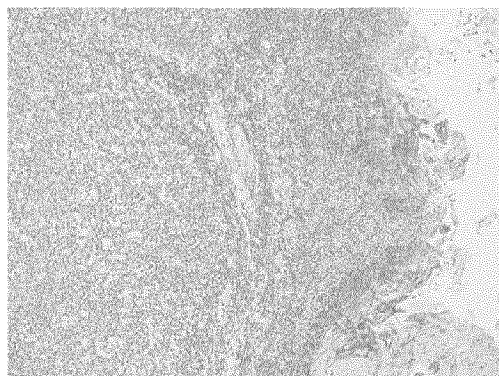


图 2E

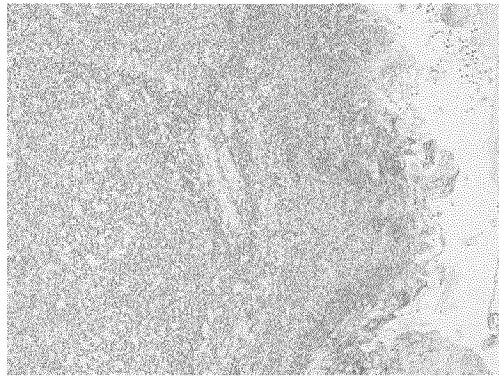


图 2F

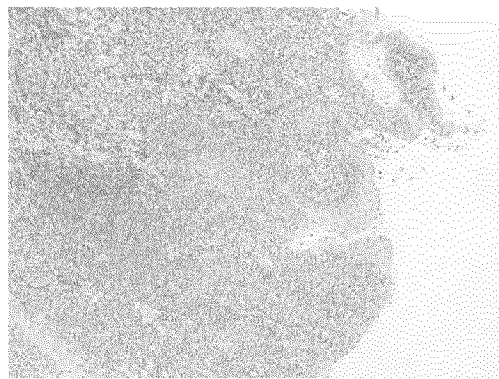


图 2G

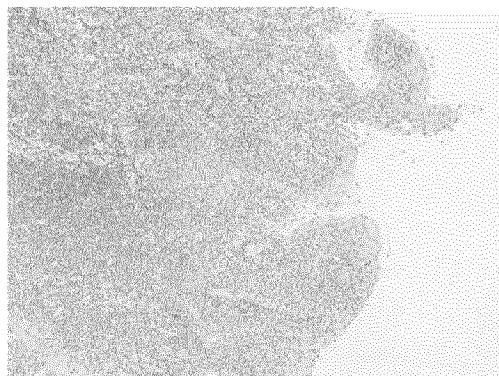


图 2H

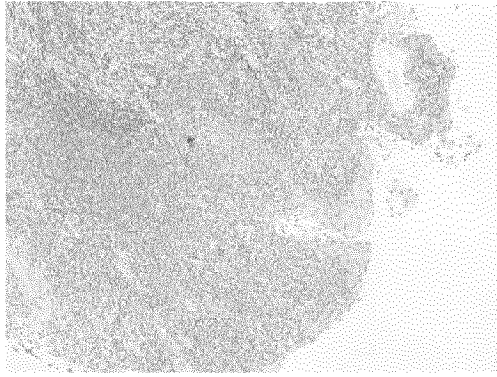


图 2I

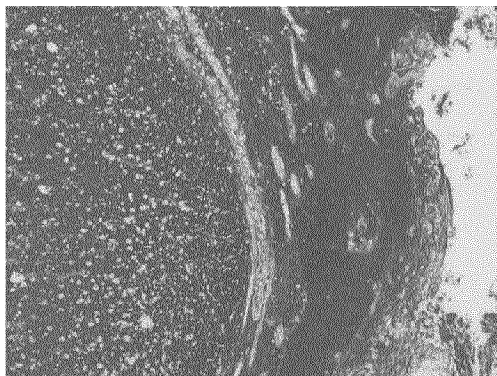


图 2J

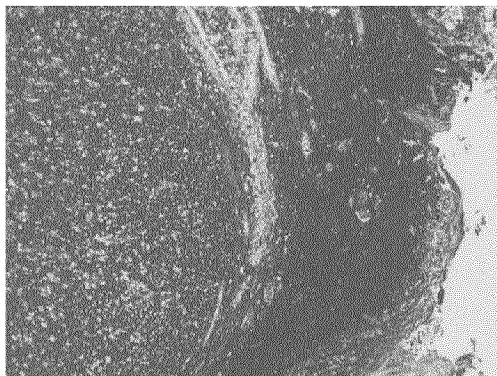


图 2K

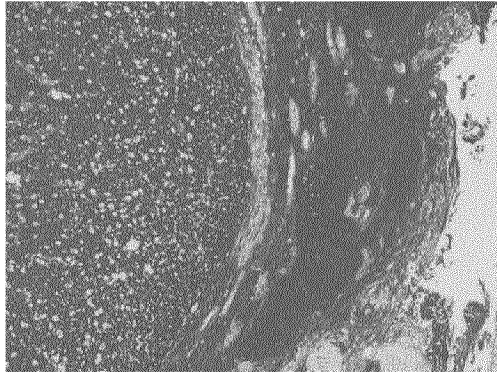


图 2L

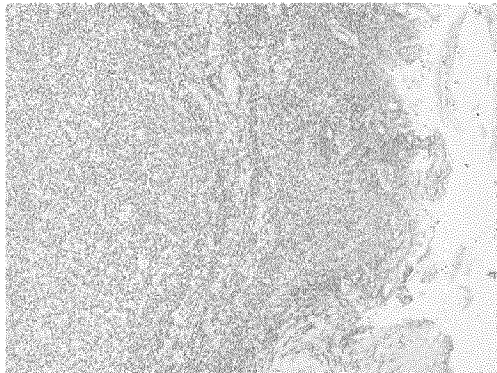


图 2M

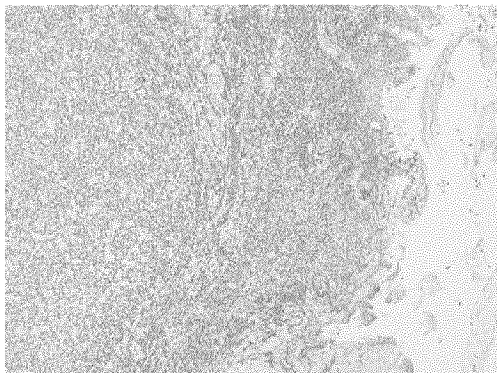


图 2N

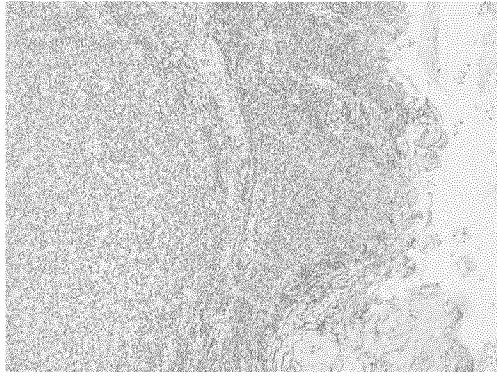


图 20

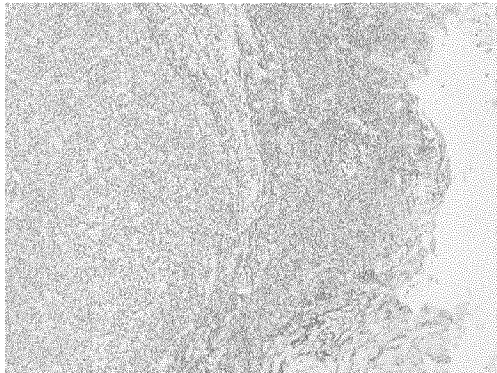


图 2P

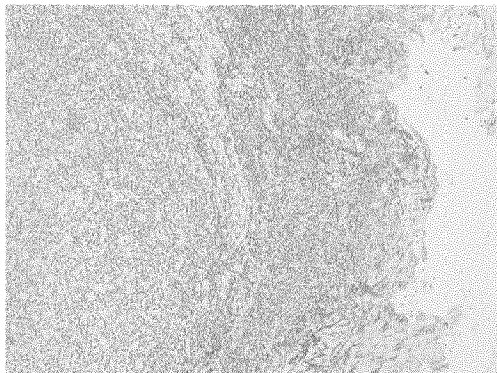


图 2Q

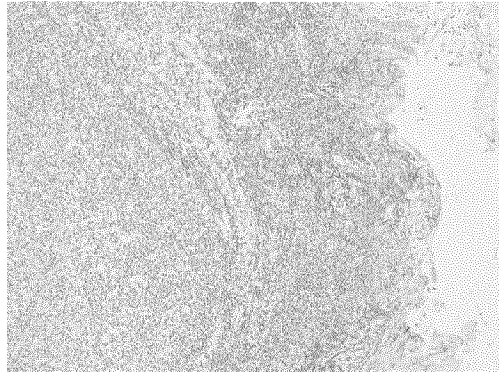


图 2R

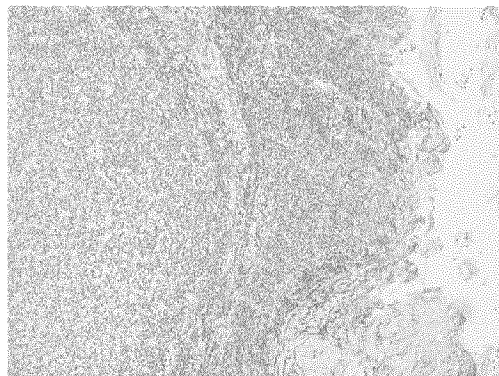


图 2S

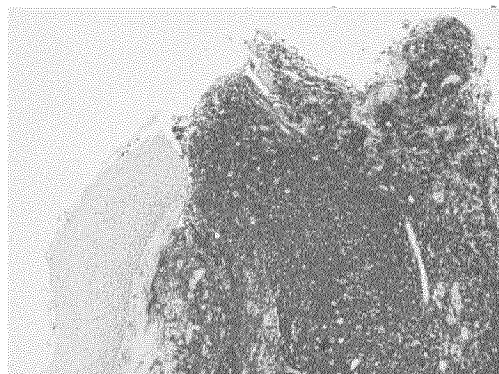


图 3A

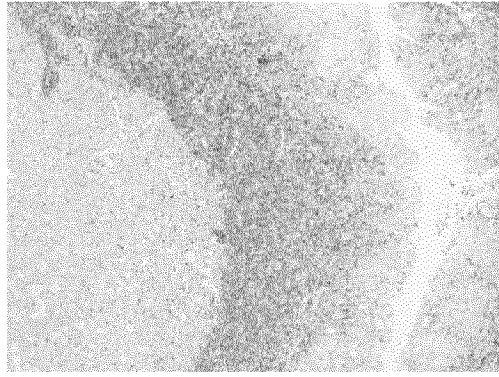


图 3B

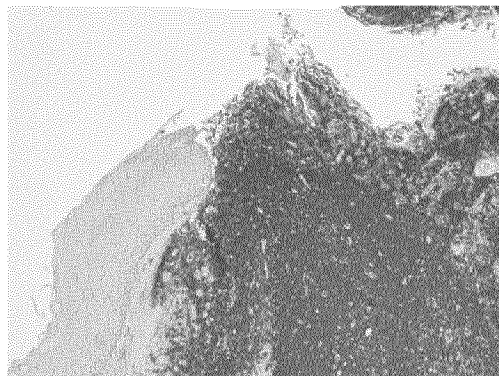


图 3C

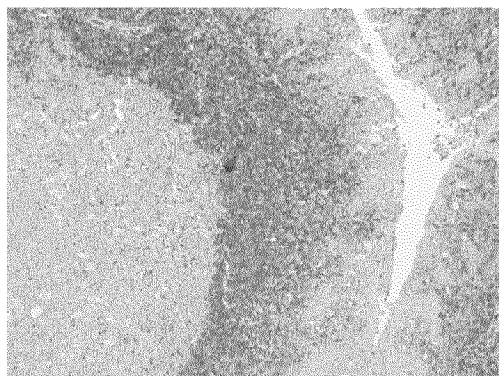


图 3D

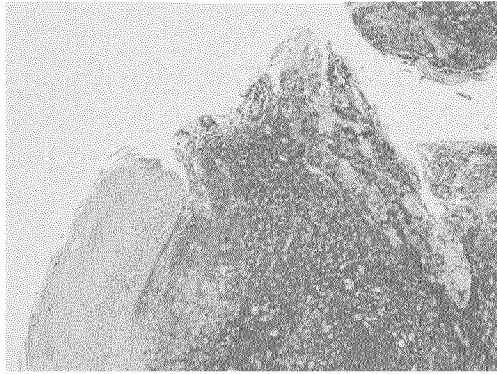


图 3E

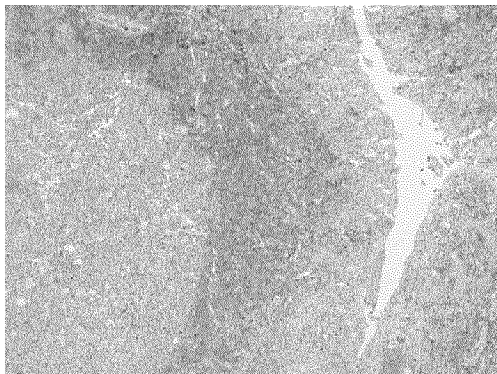


图 3F

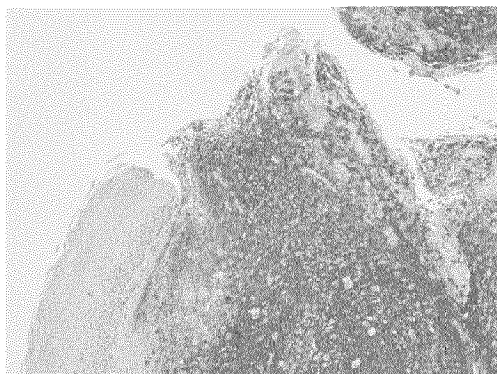


图 3G

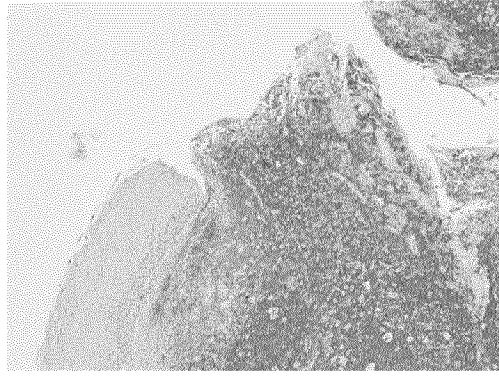


图 3H

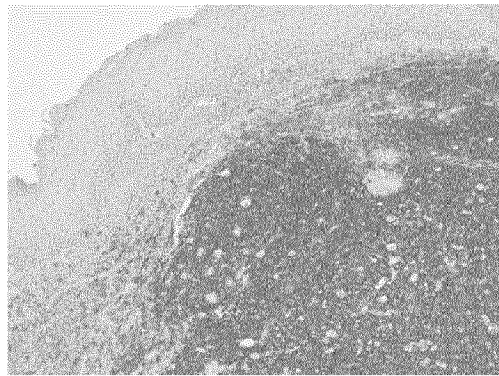


图 3I

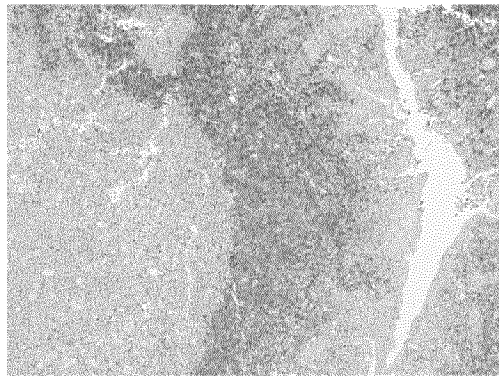


图 3J

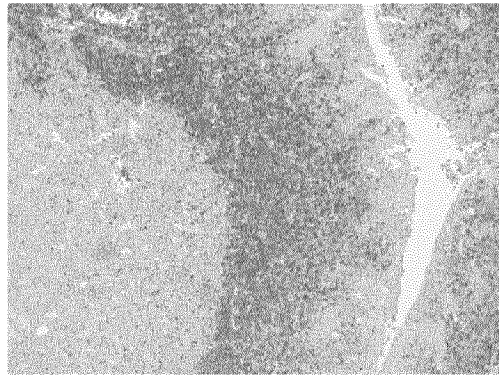


图 3K

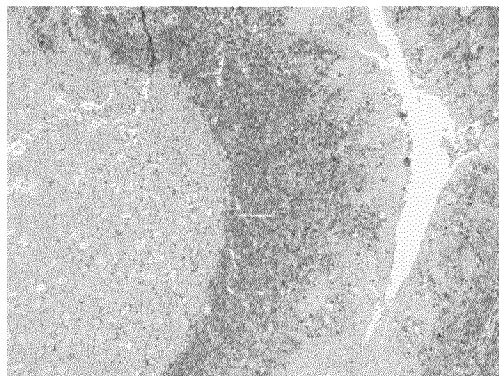


图 3L

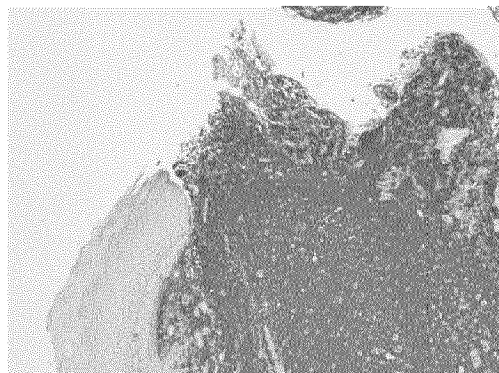


图 3M

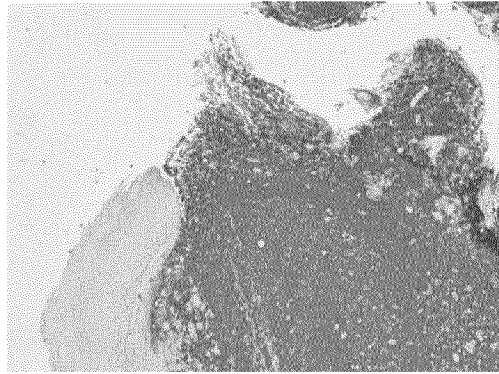


图 3N

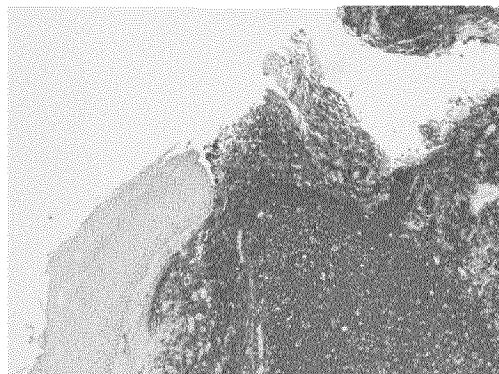


图 3O

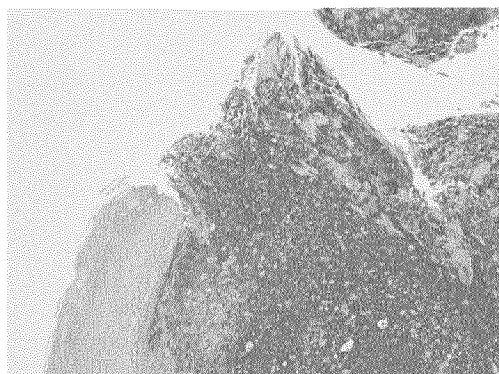


图 3P

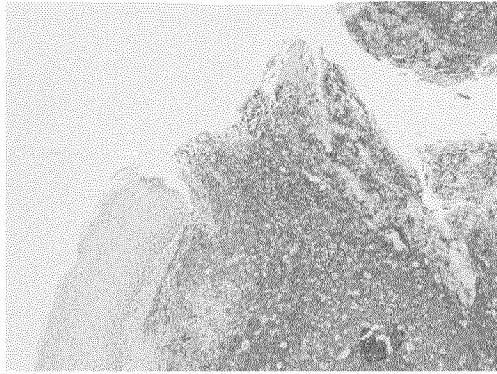


图 3Q

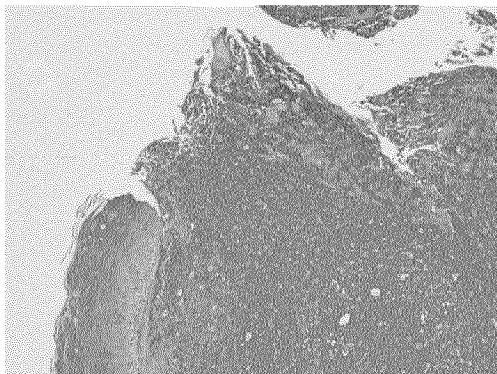


图 3R

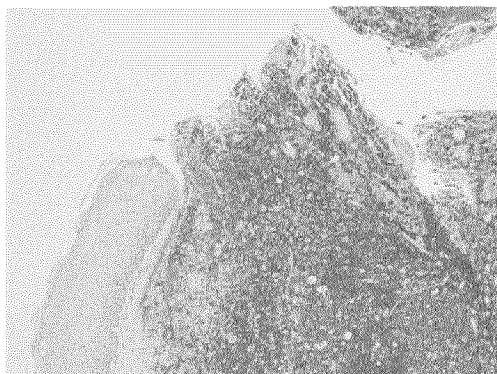


图 3S

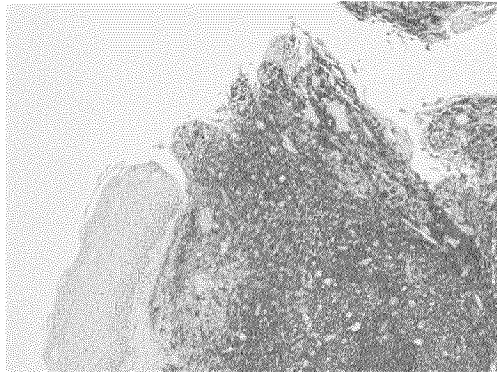


图 3T

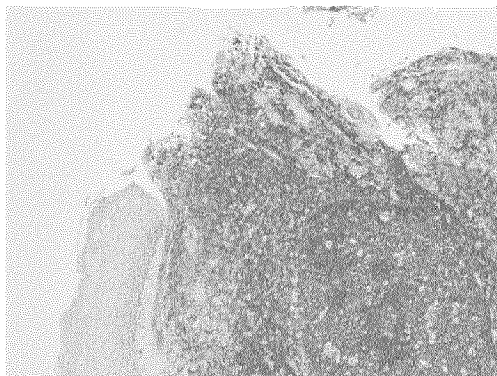


图 3U

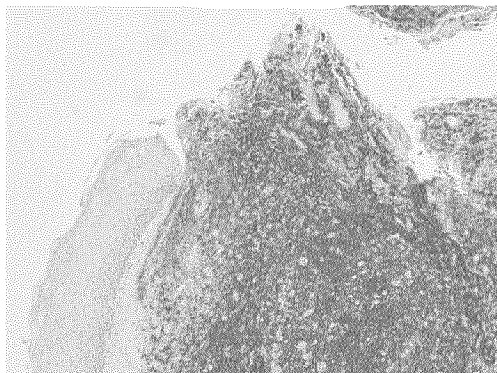


图 3V

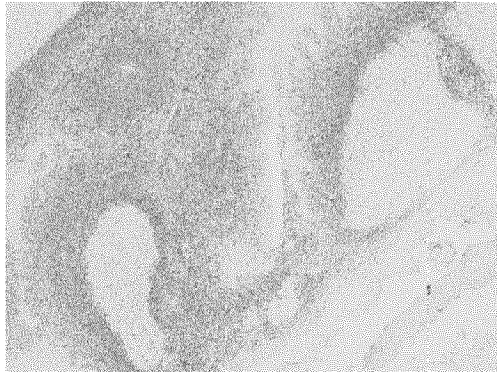


图 4A

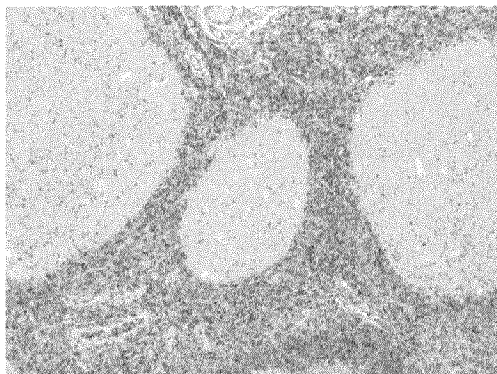


图 4B

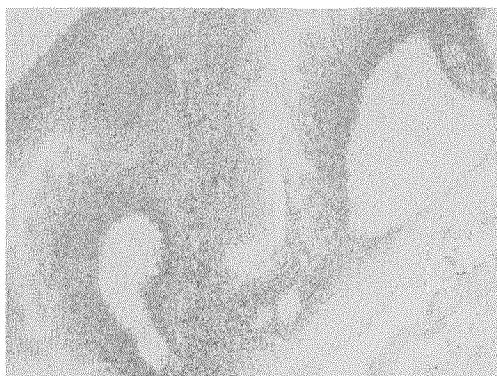


图 4C

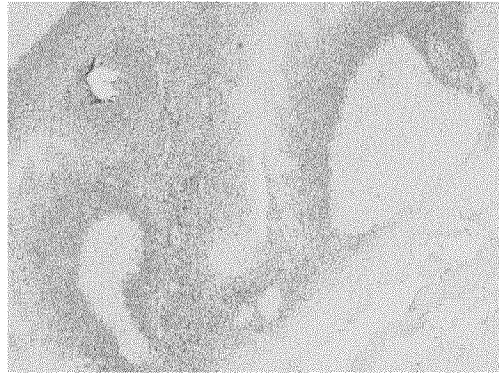


图 4D

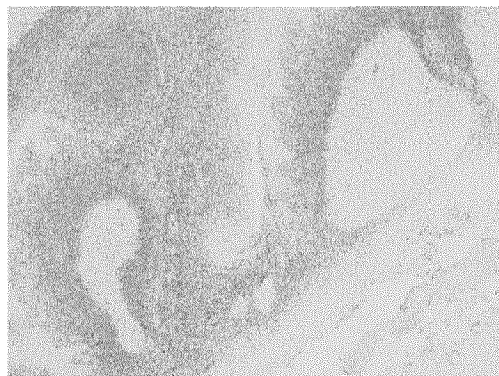


图 4E

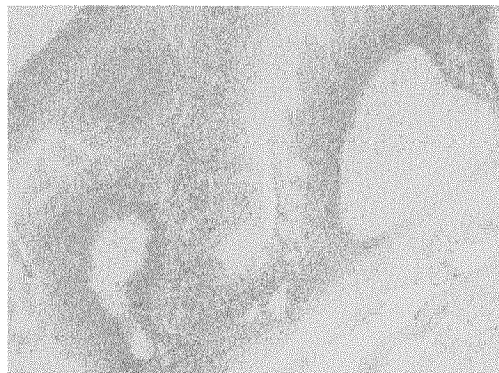


图 4F

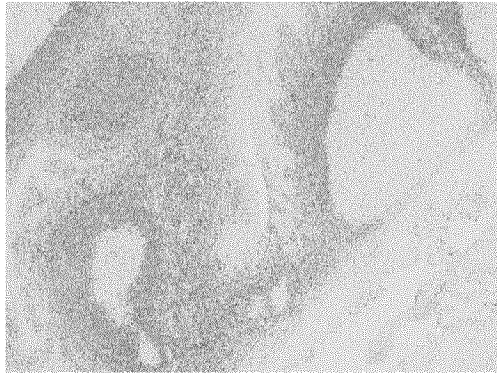


图 4G

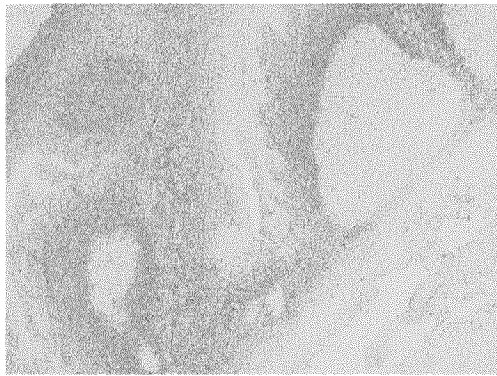


图 4H

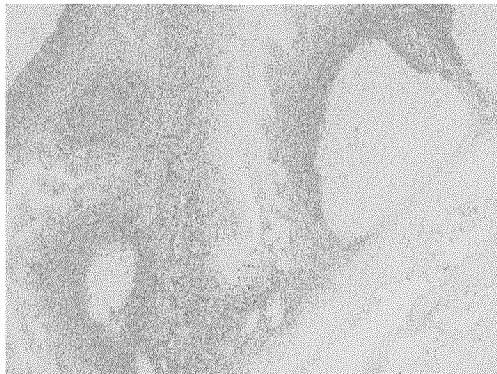


图 4I

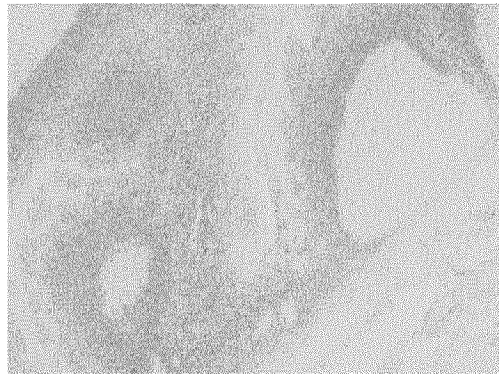


图 4J

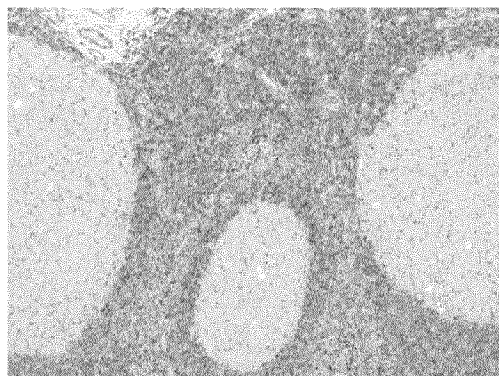


图 4K

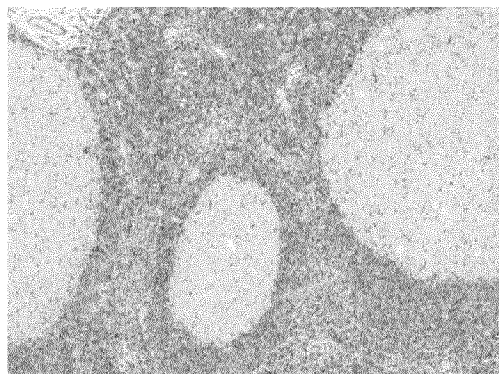


图 4L

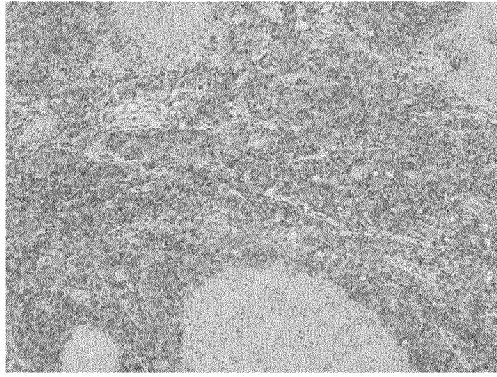


图 4M

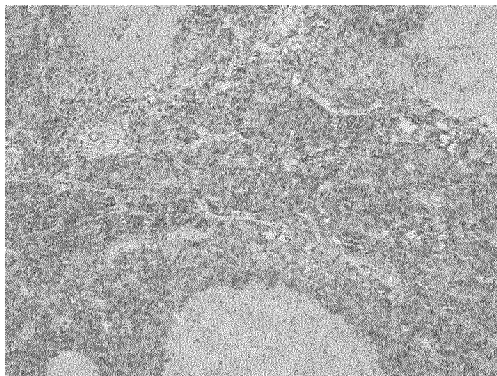


图 4N

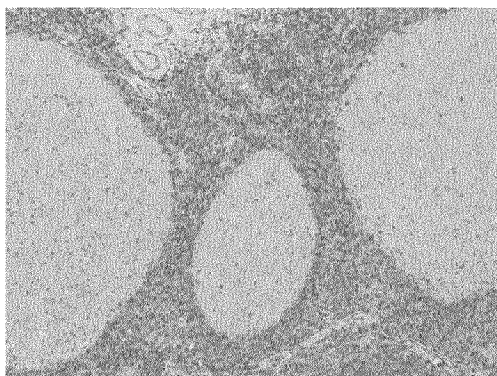


图 4O

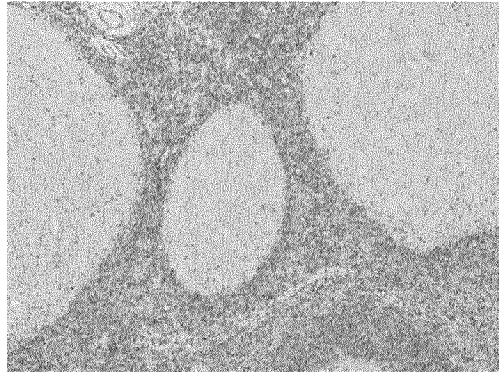


图 4P

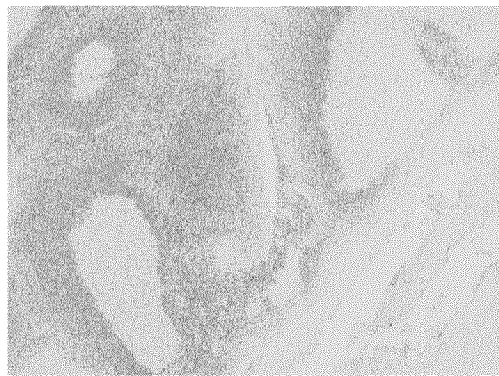


图 4Q

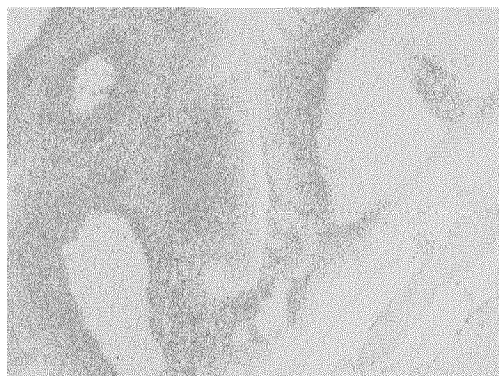


图 4R

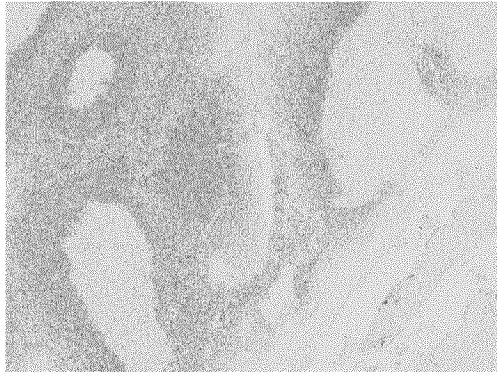


图 4S

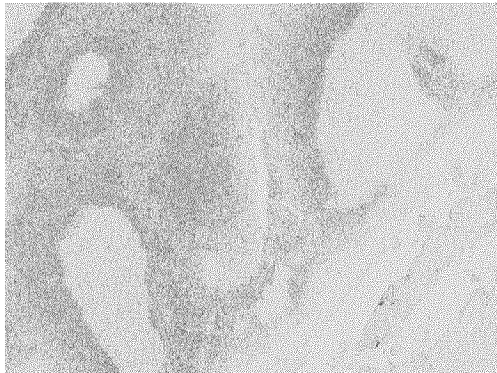


图 4T

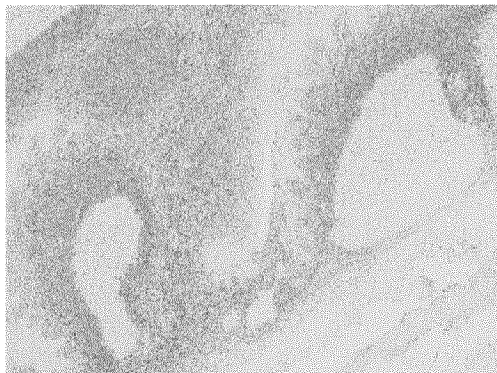


图 4U

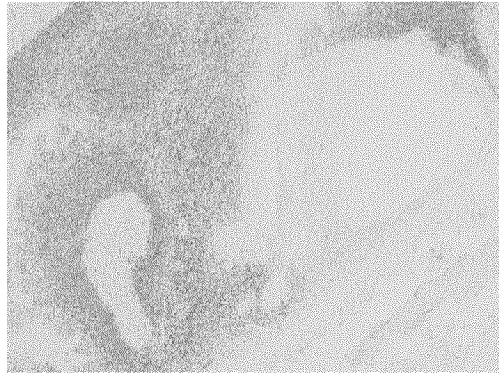


图 4V

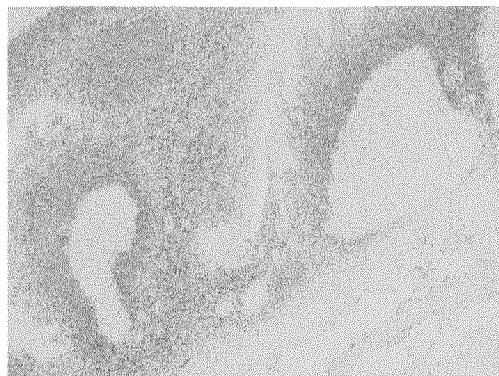


图 4W

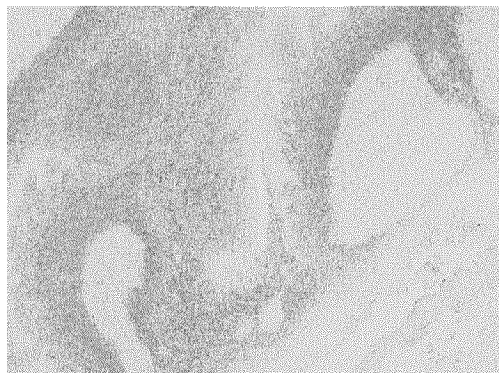


图 4X



图 4Y

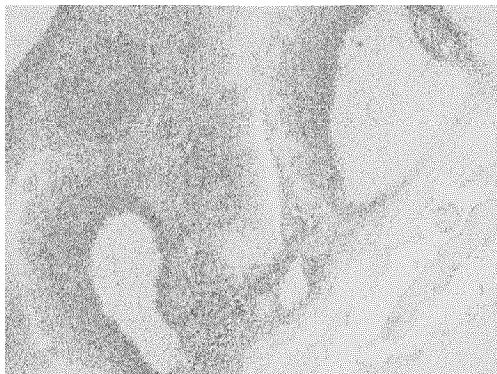


图 4Z

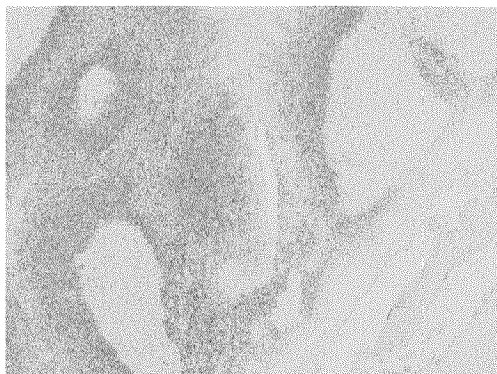


图 4AA

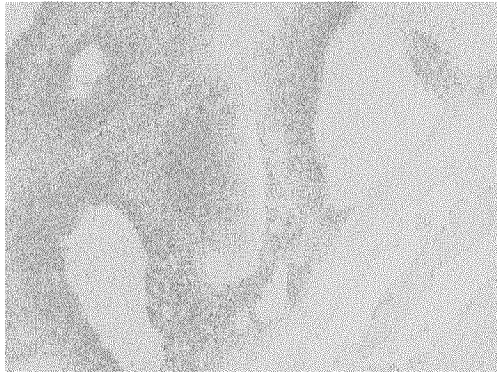


图 4BB

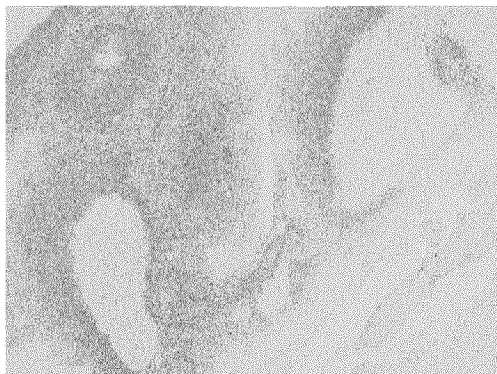


图 4CC

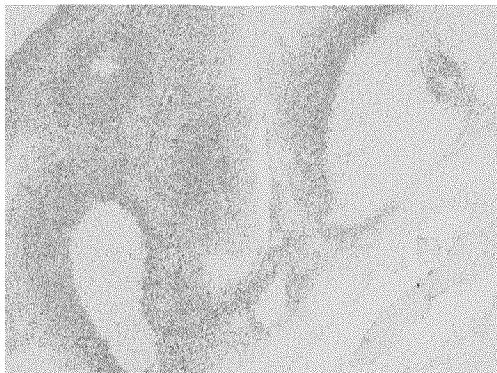


图 4DD

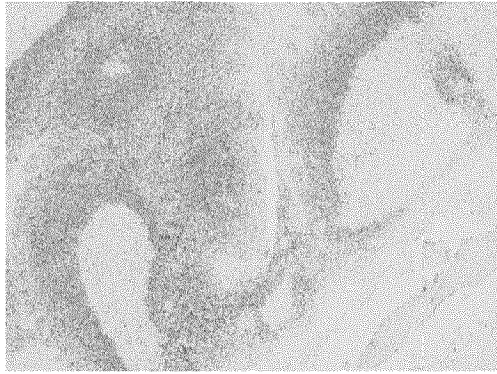


图 4EE

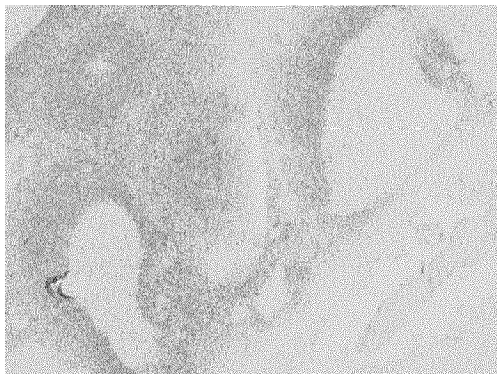


图 4FF

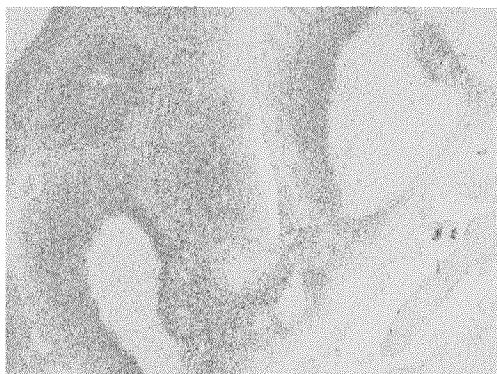


图 4GG

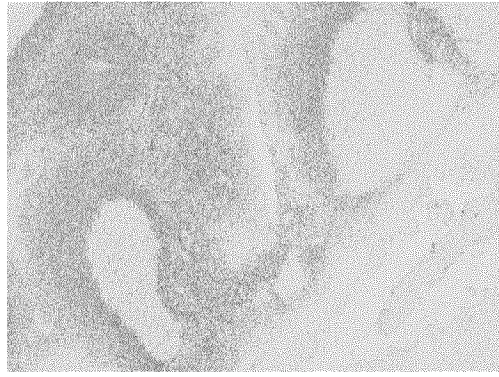


图 4HH

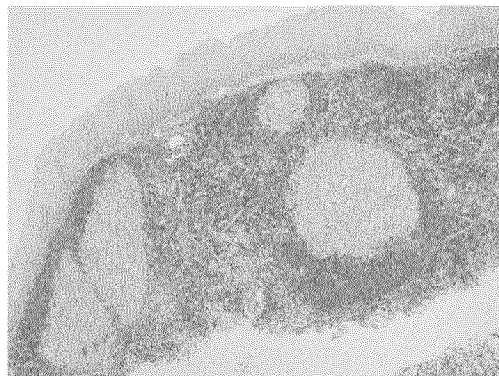


图 5A

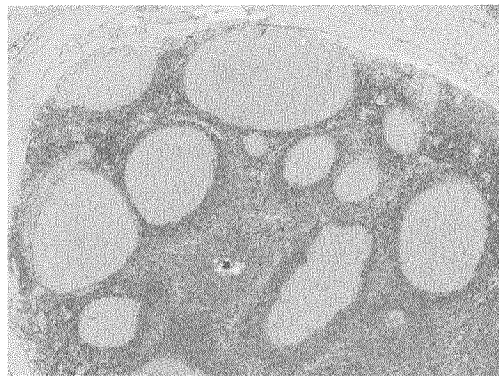


图 5B

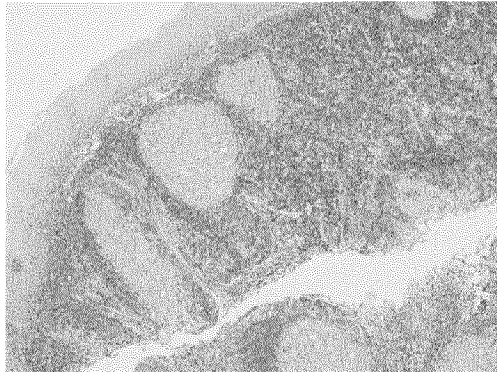


图 5C

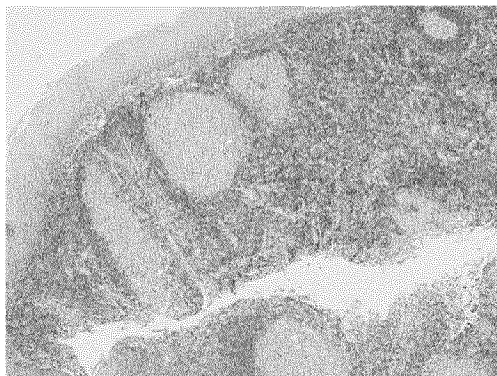


图 5D

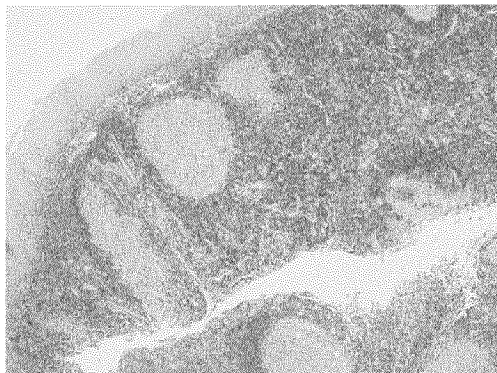


图 5E



图 5F

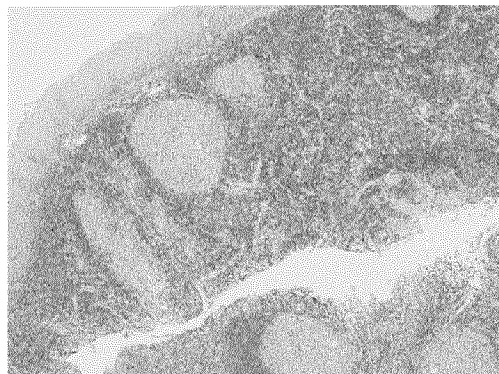


图 5G

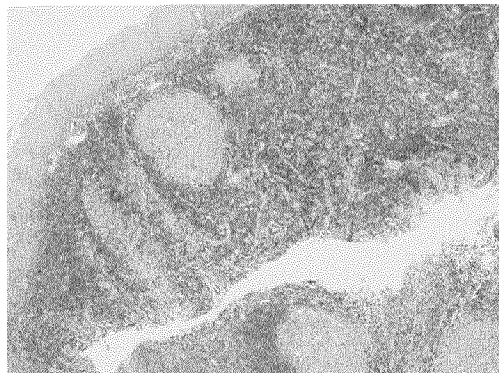


图 5H

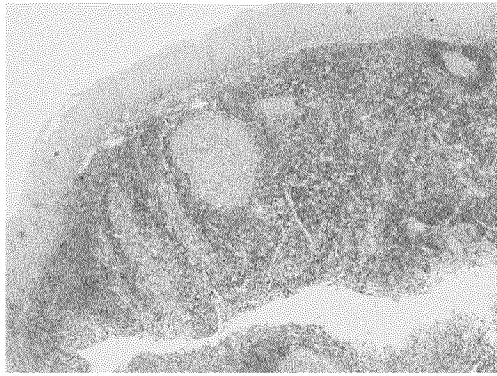


图 5I

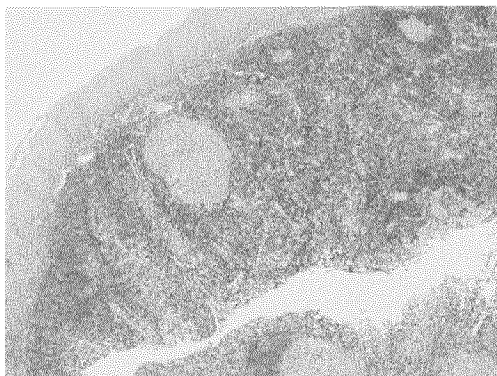


图 5J

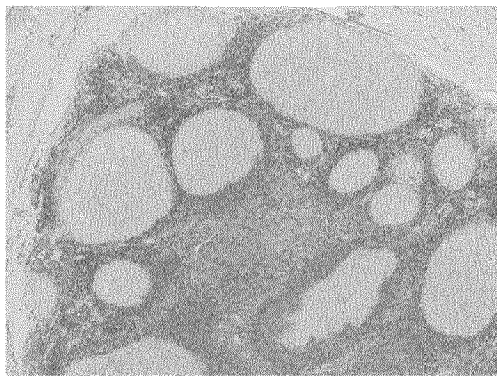


图 5K



图 5L

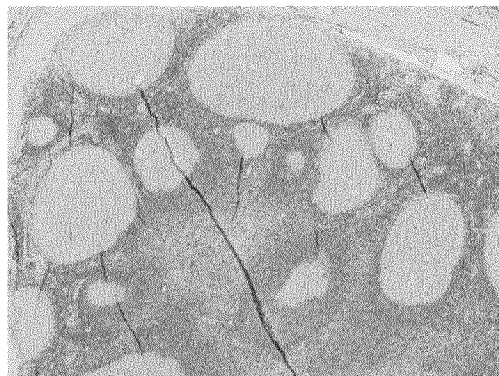


图 5M

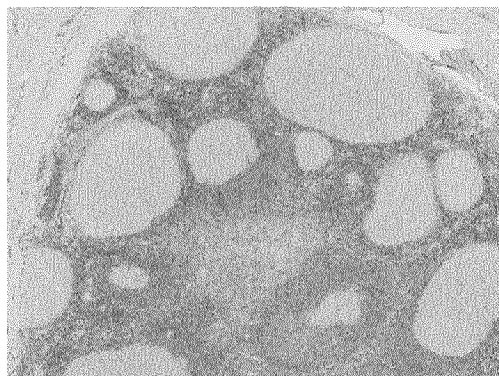


图 5N

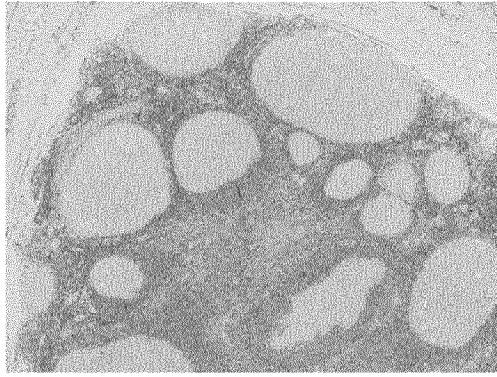


图 50

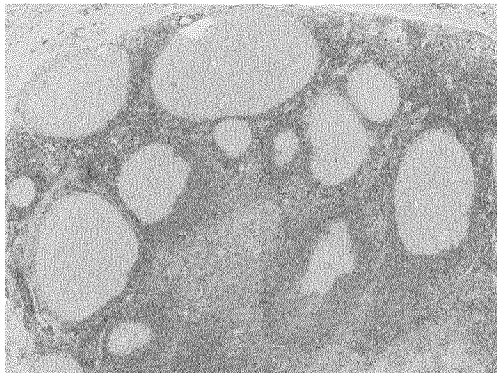


图 5P

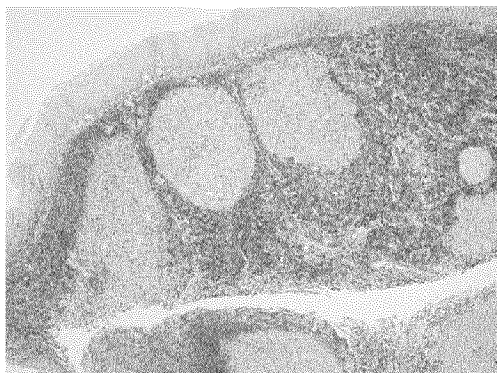


图 5Q

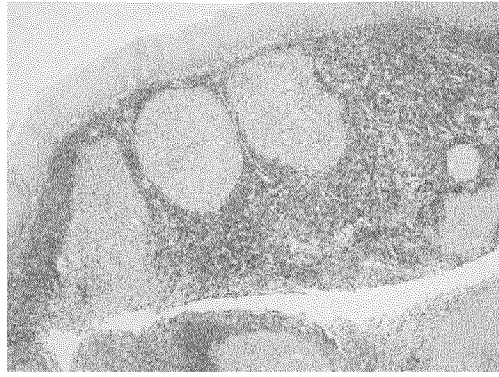


图 5R

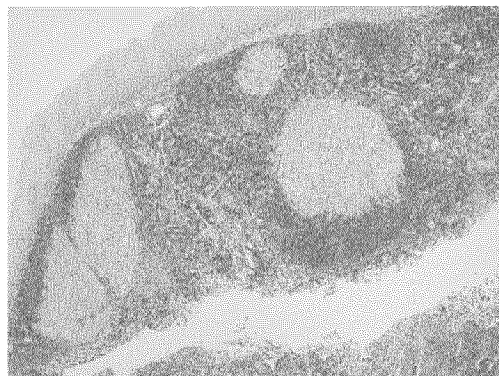


图 5S

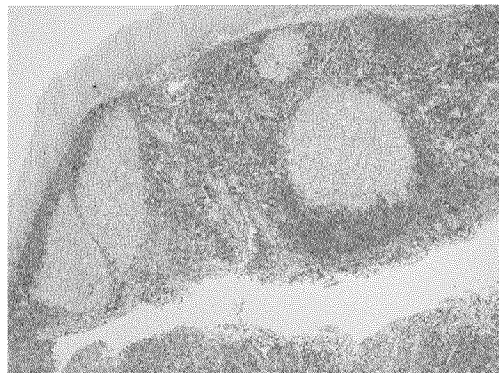


图 5T

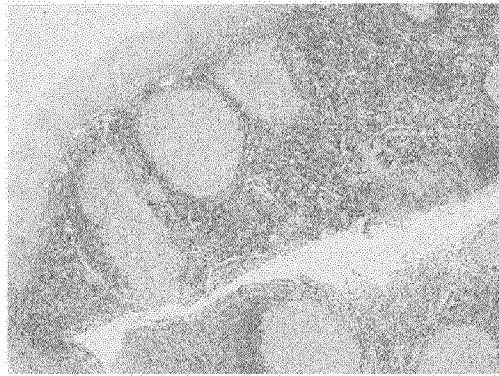


图 5U

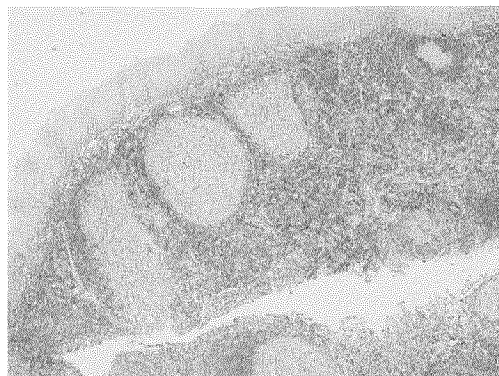


图 5V

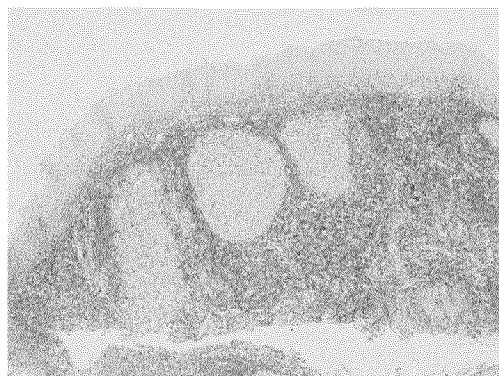


图 5W

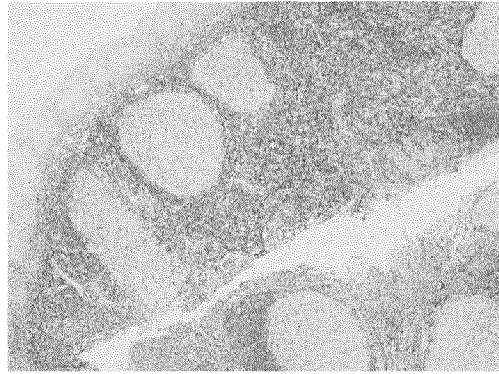


图 5X

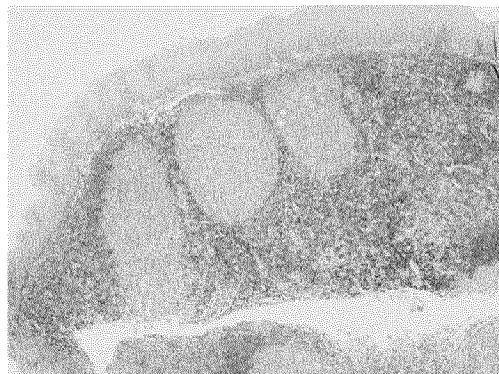


图 5Y

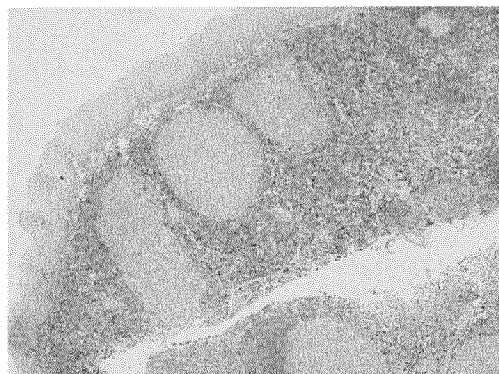


图 5Z

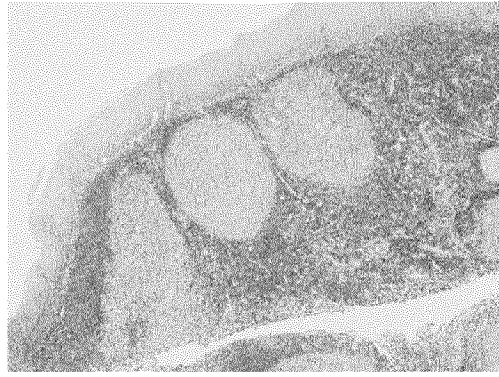


图 5AA

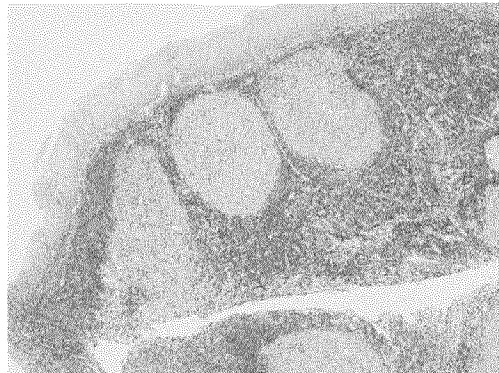


图 5BB

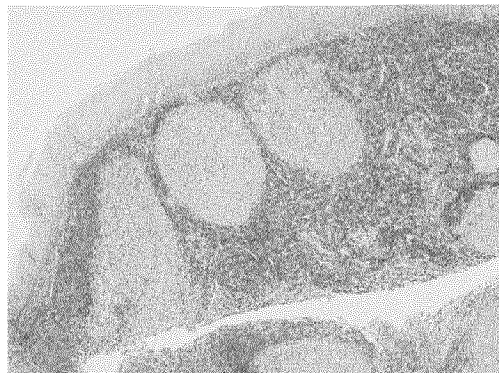


图 5CC

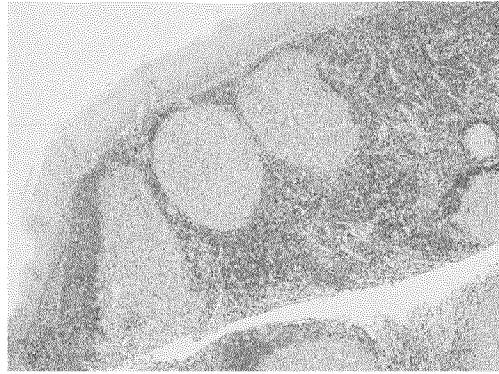


图 5DD

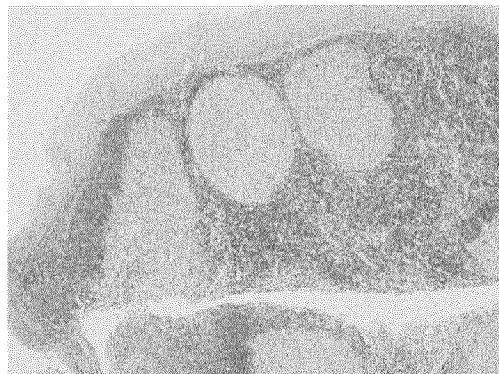


图 5EE

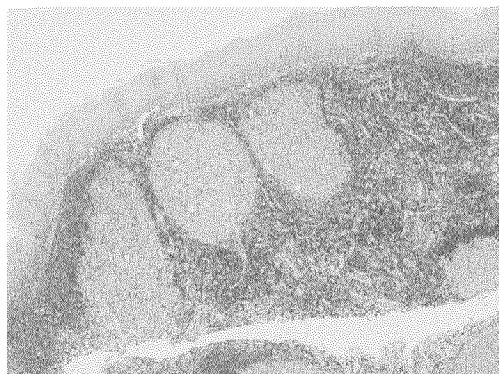


图 5FF

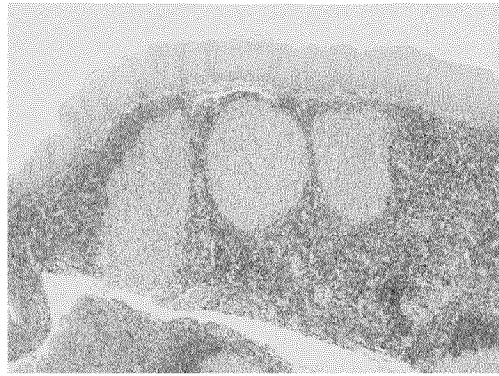


图 5GG

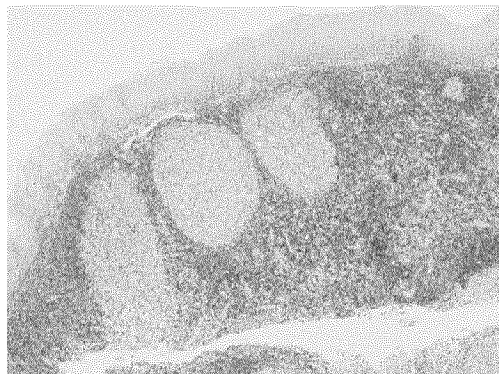


图 5HH

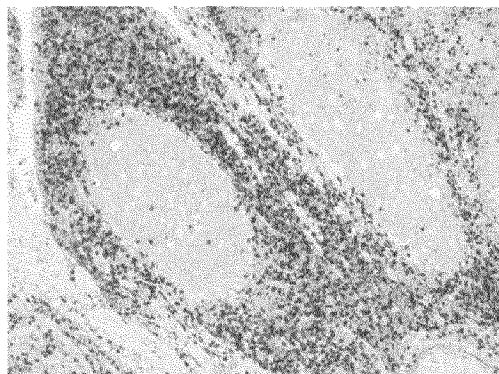


图 6A

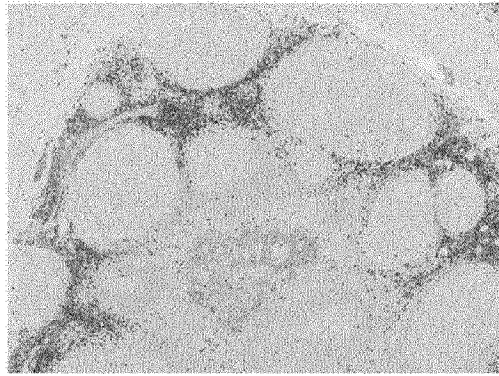


图 6B

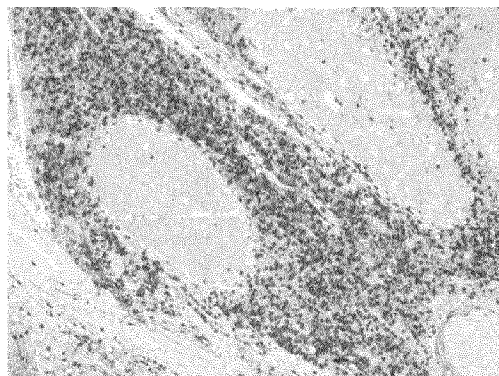


图 6C

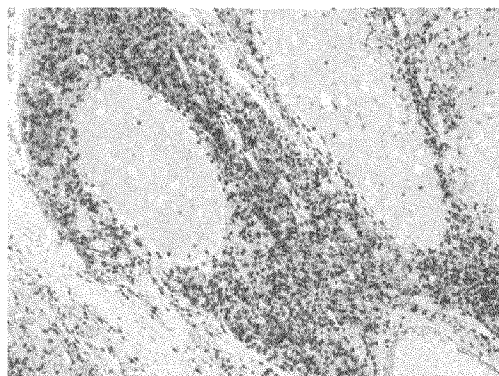


图 6D

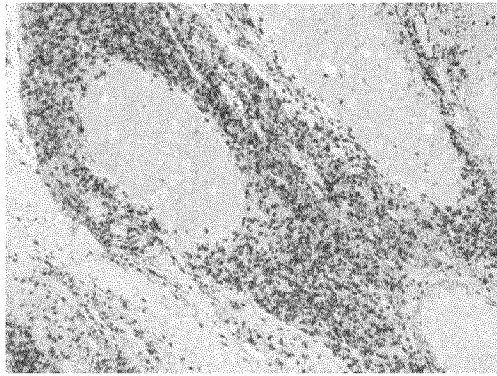


图 6E

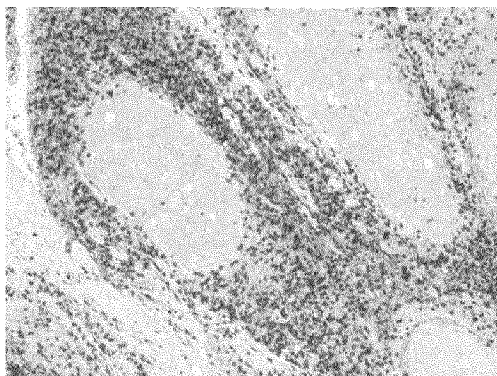


图 6F

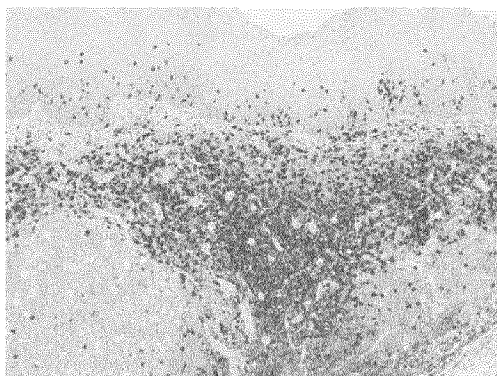


图 6G

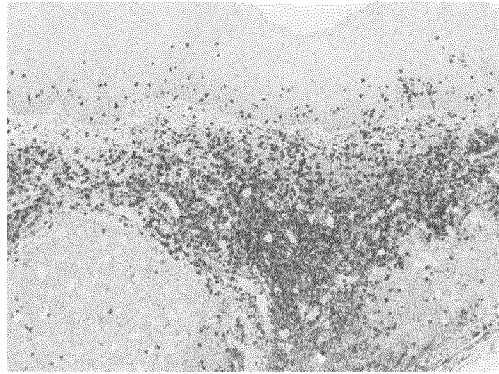


图 6H

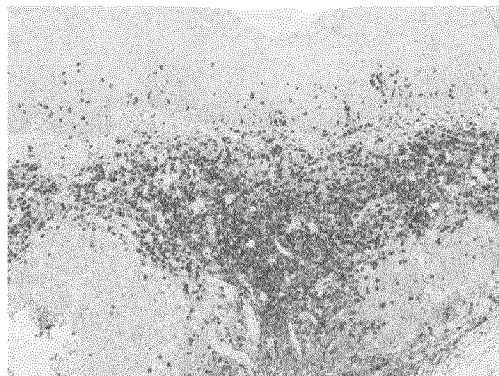


图 6I

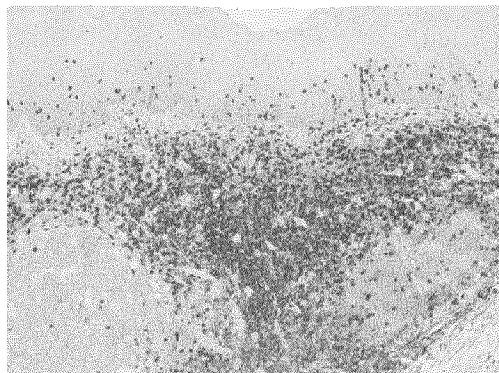


图 6J

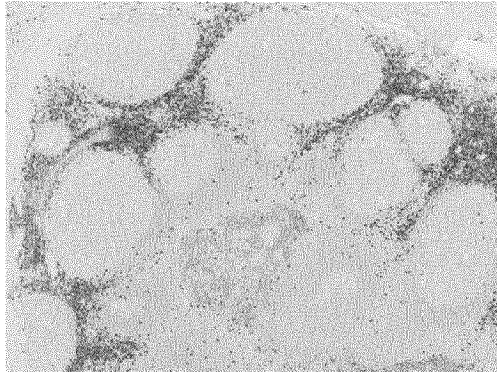


图 6K

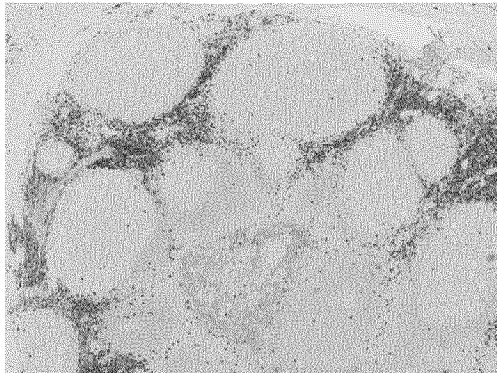


图 6L

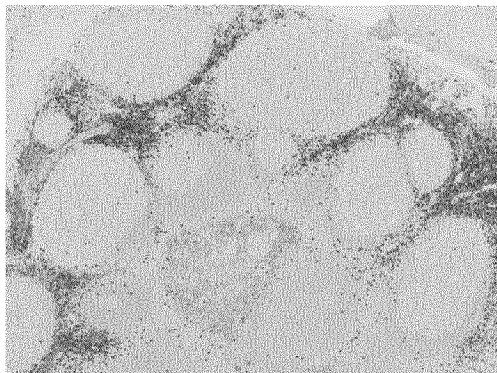


图 6M

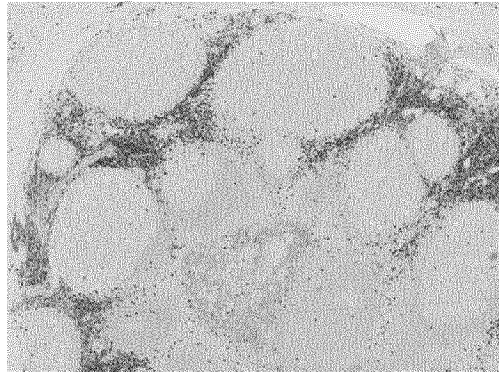


图 6N

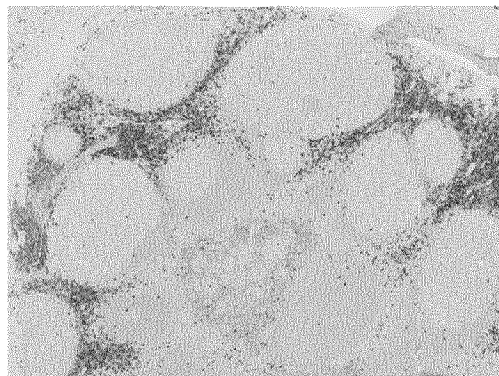


图 6O

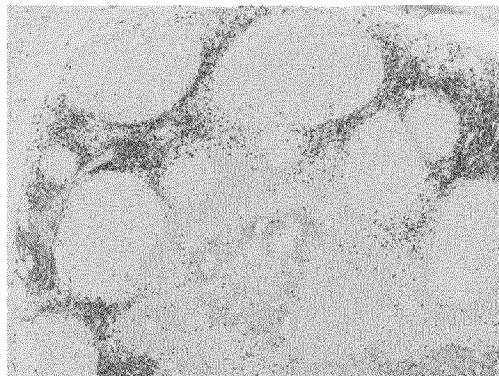


图 6P

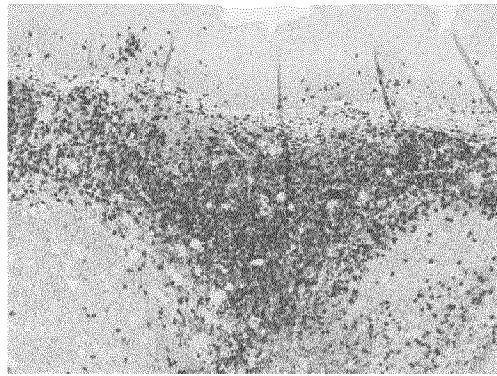


图 6Q

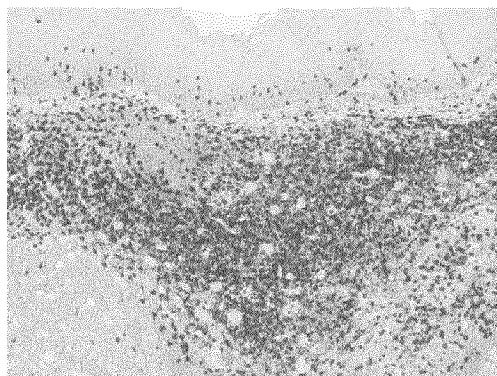


图 6R

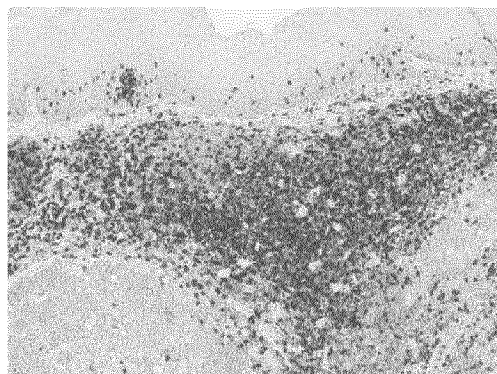


图 6S

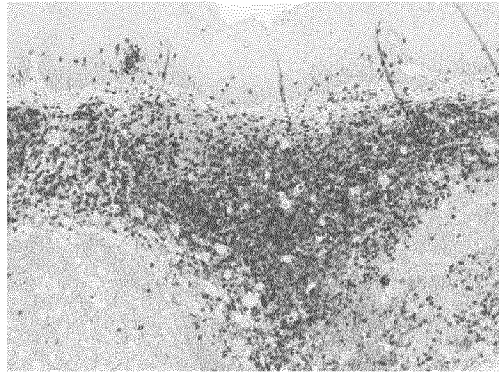


图 6T

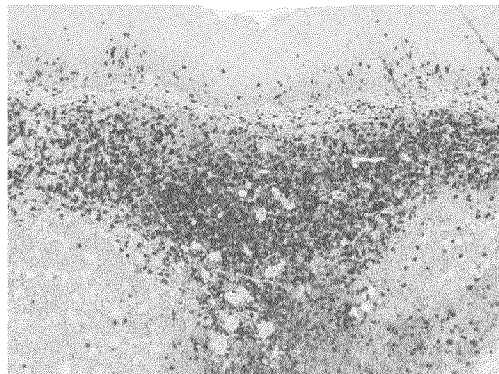


图 6U

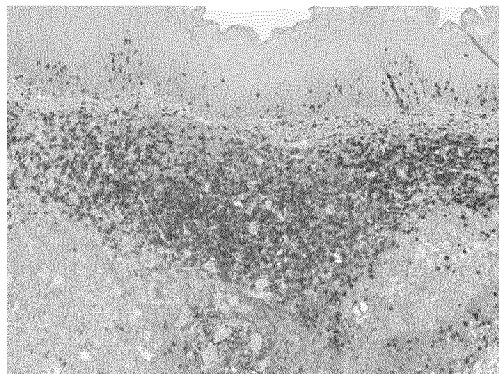


图 6V

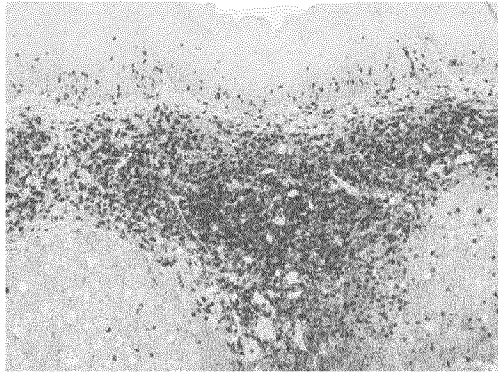


图 6W

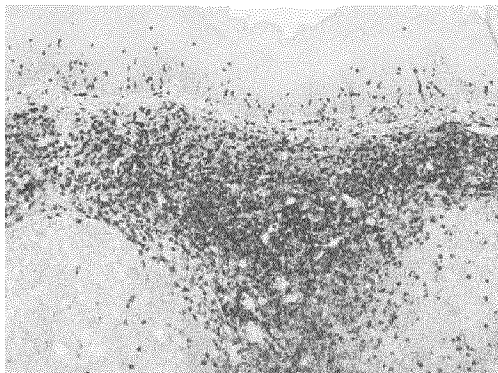


图 6X

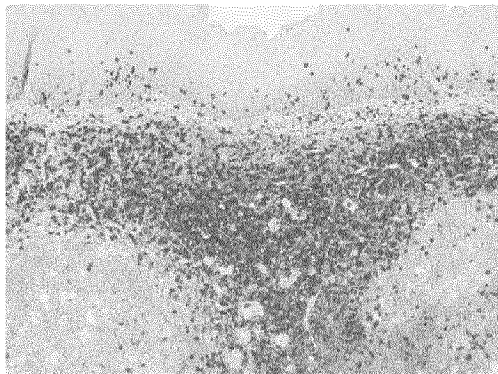


图 6Y

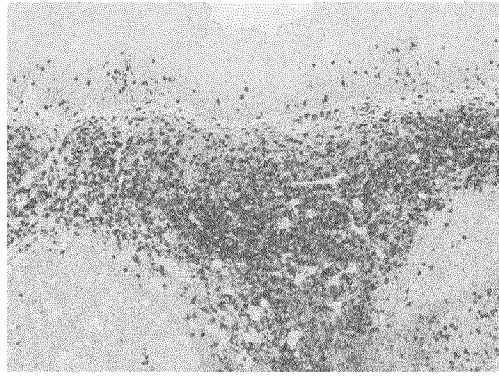


图 6Z

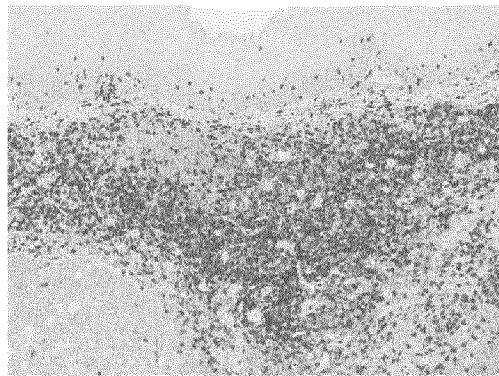


图 6AA

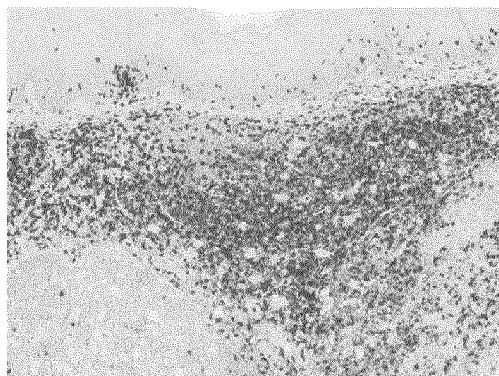


图 6BB

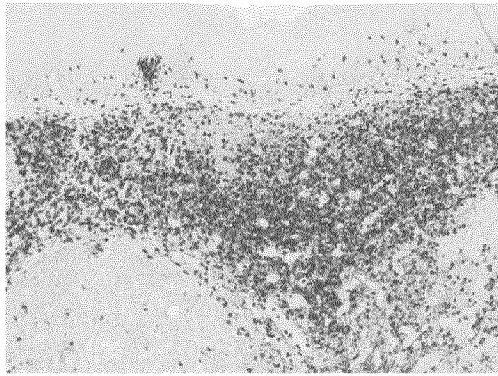


图 6CC

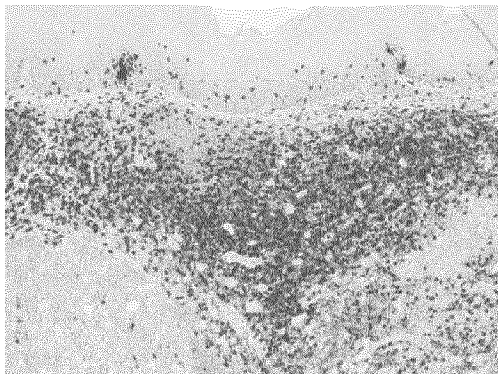


图 6DD

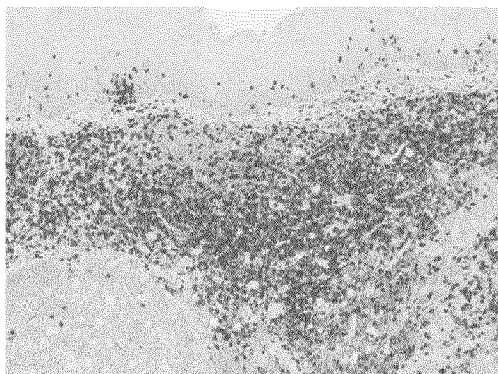


图 6EE

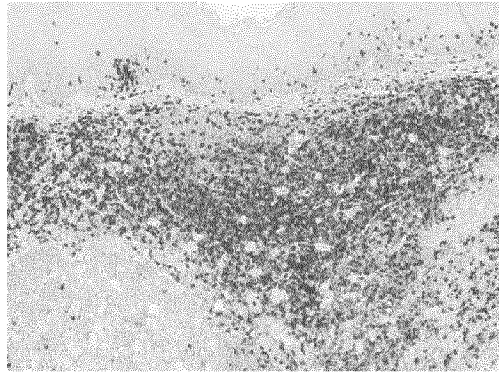


图 6FF

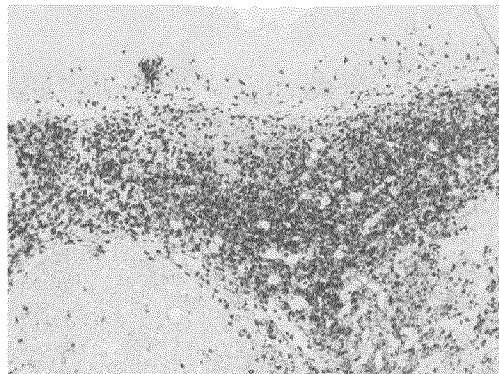


图 6GG

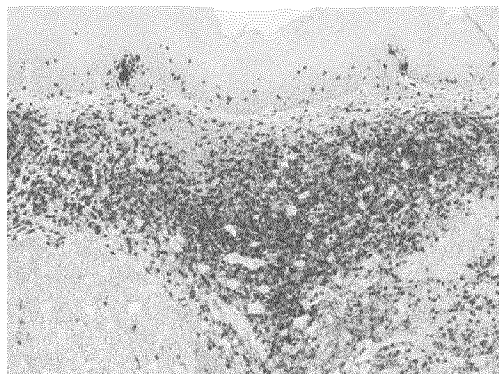


图 6HH

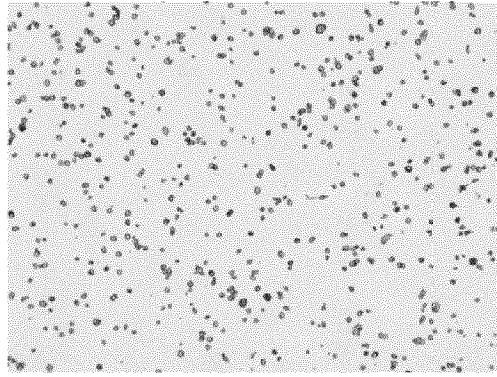


图 7A

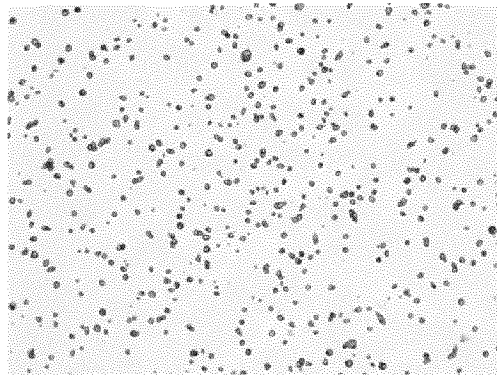


图 7B

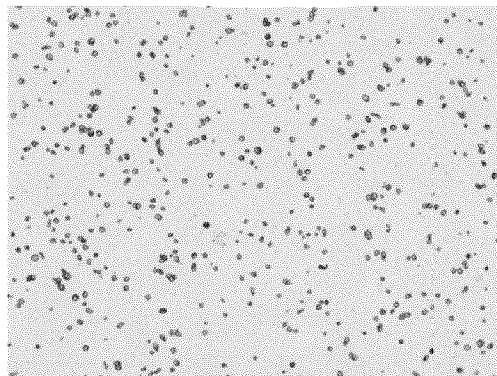


图 7C

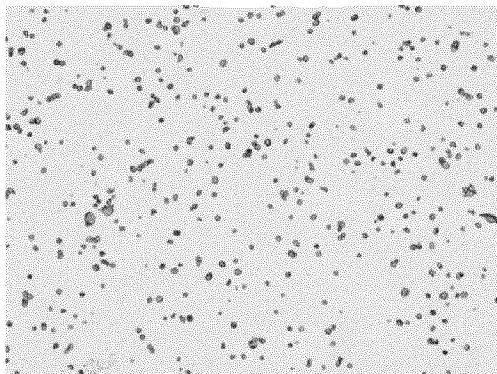


图 7D

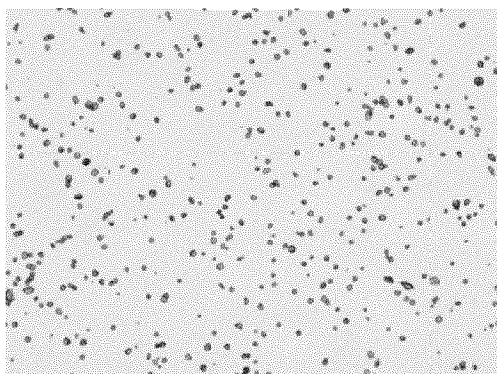


图 7E

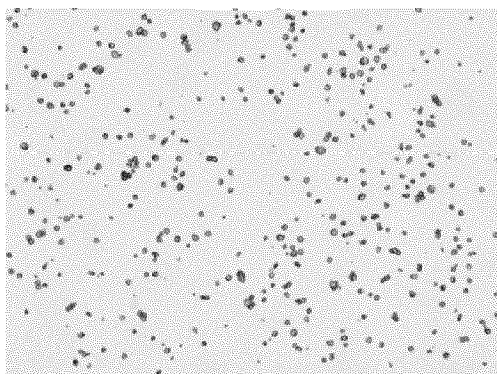


图 7F

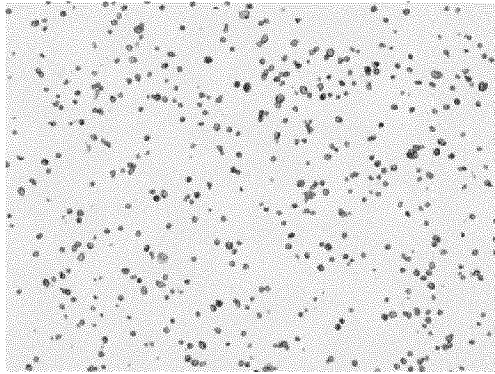


图 7G

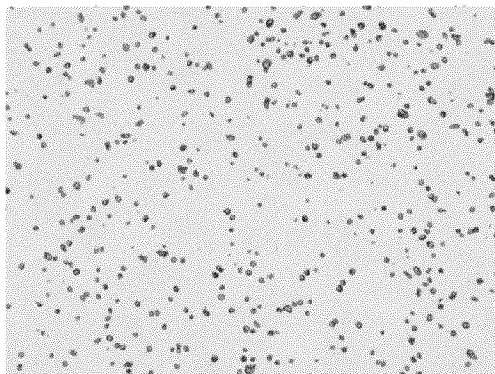


图 7H

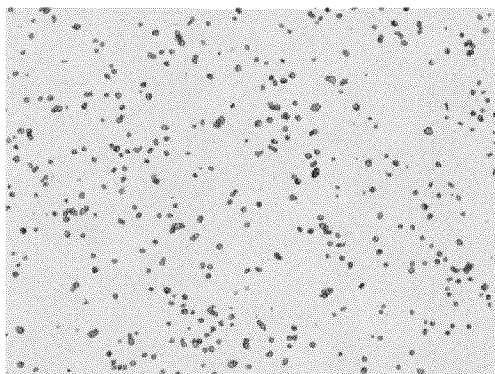


图 7I

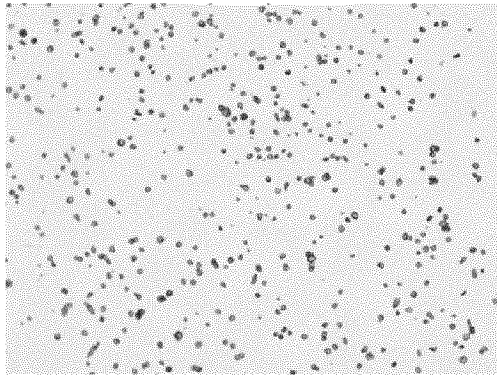


图 7J

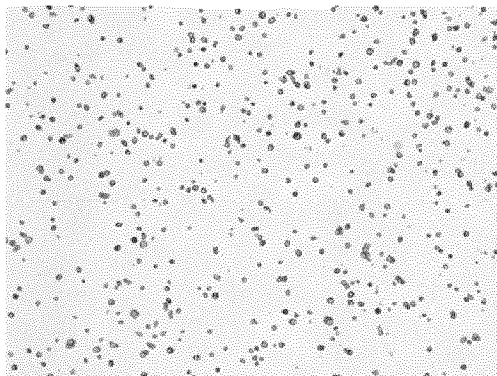


图 7K

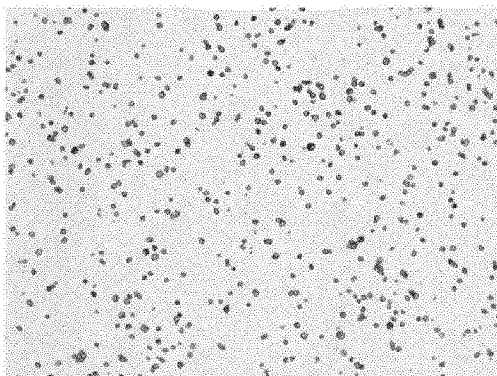


图 7L

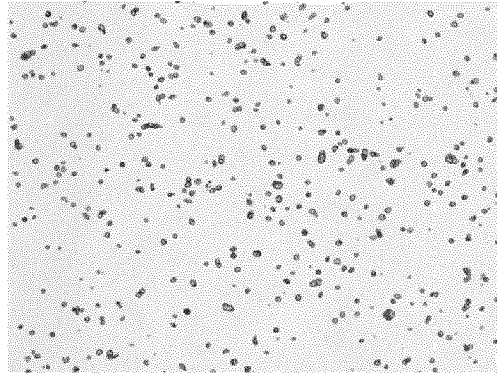


图 7M

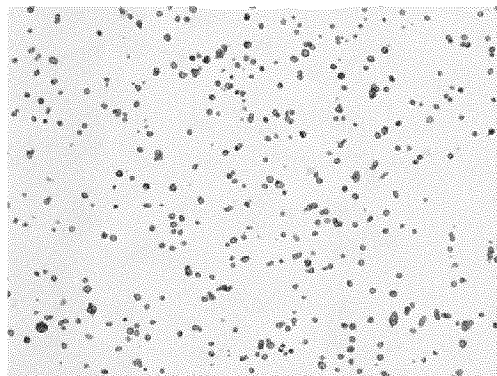


图 7N

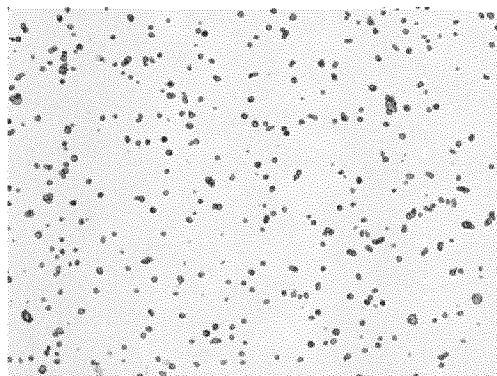


图 7O

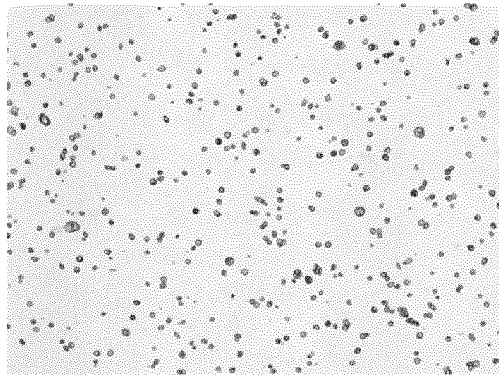


图 7P

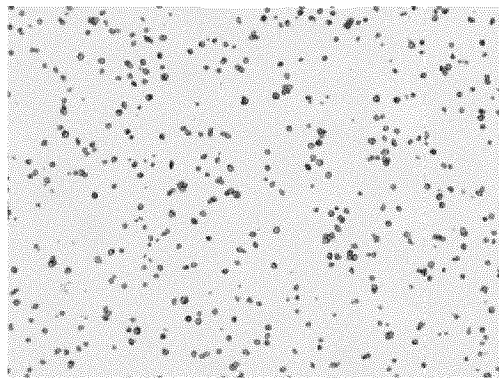


图 7Q

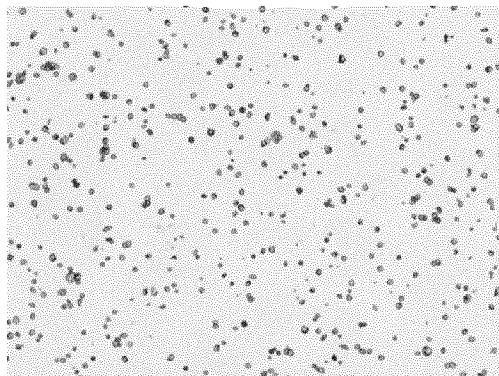


图 7R

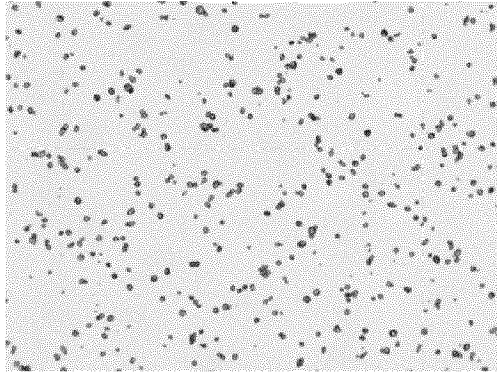


图 7S

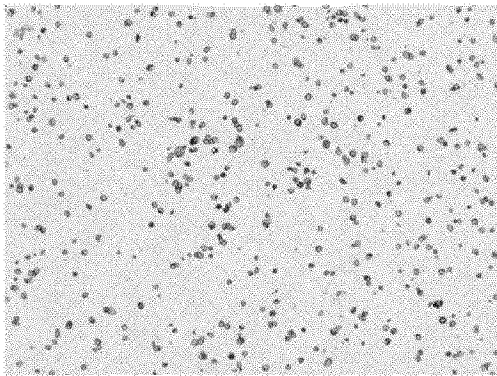


图 7T

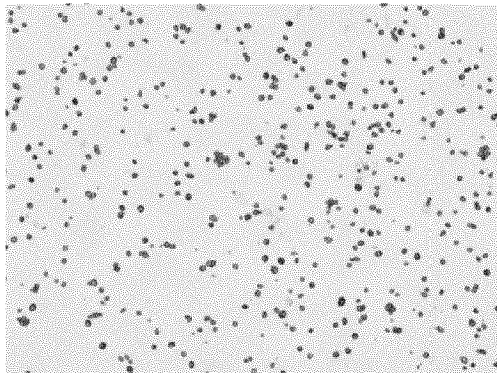


图 7U

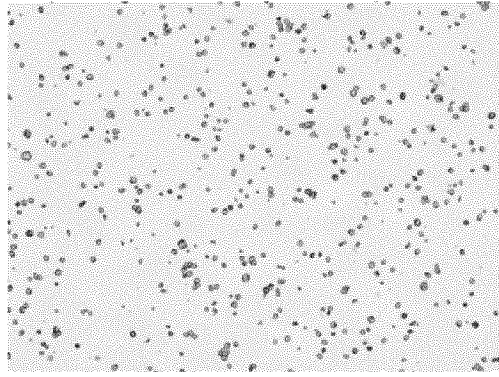


图 7V

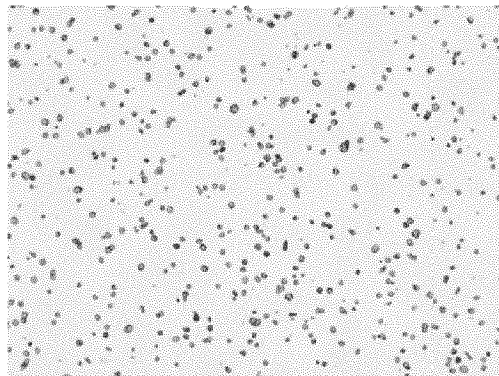


图 7W

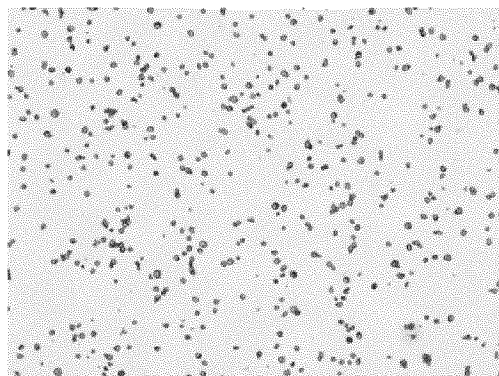


图 7X

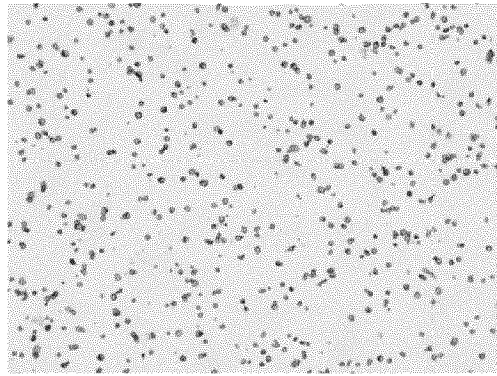


图 7Y

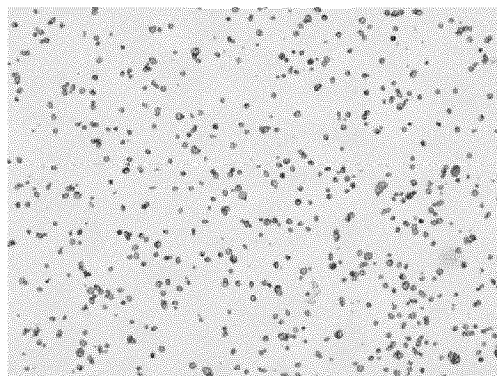


图 7Z

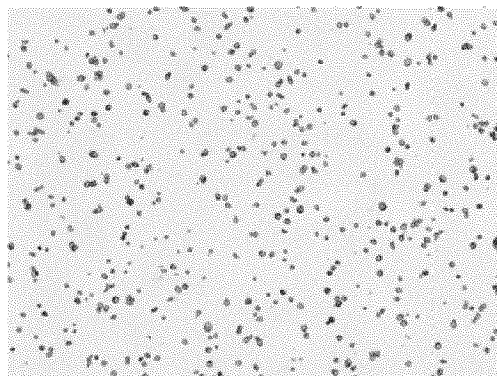


图 7AA

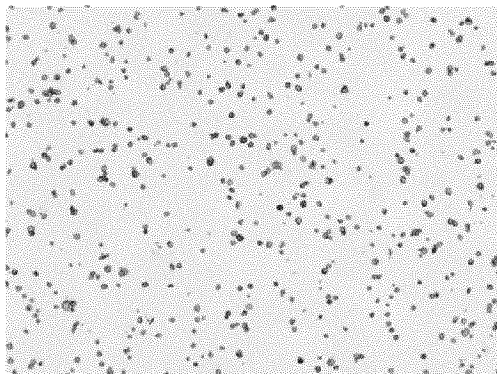


图 7BB

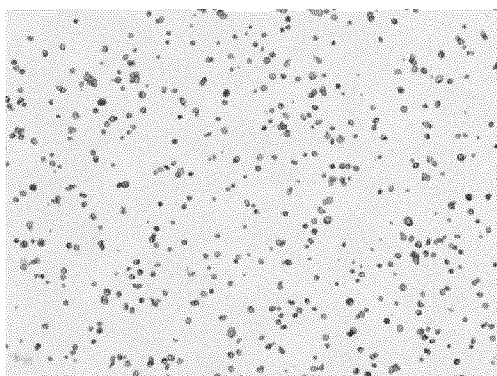


图 7CC

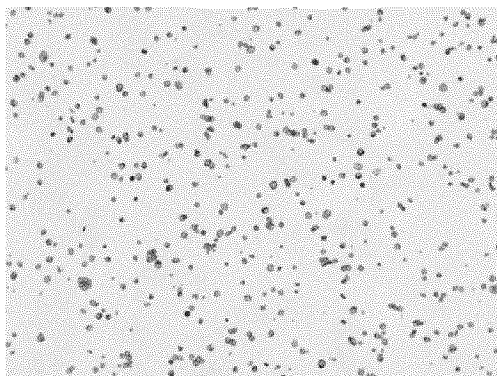


图 7DD

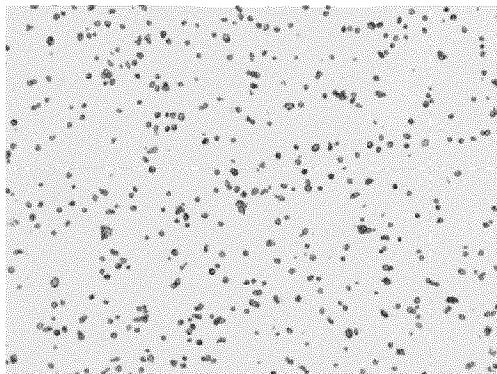


图 7EE

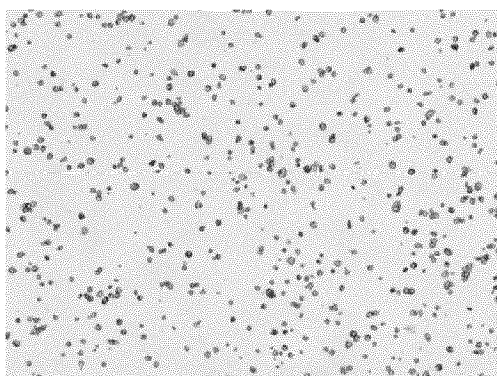


图 7FF

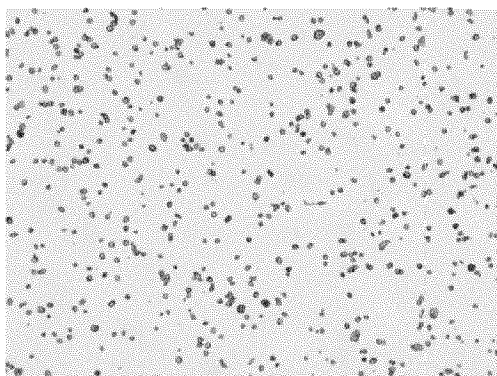


图 7GG

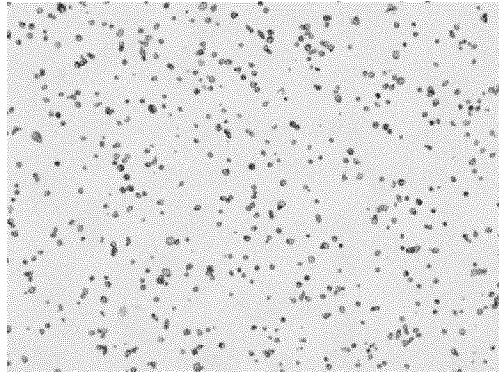


图 7HH