



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106404886 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201610594348.7

(22)申请日 2016.07.26

(30)优先权数据

1513167.5 2015.07.27 GB

(71)申请人 塞莫费雪科学(不来梅)有限公司

地址 德国不来梅

(72)发明人 A·A·马卡罗夫 J·施韦特斯

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
31100

代理人 陶家蓉

(51)Int.Cl.

G01N 27/64(2006.01)

权利要求书4页 说明书16页 附图2页

(54)发明名称

有机样品的元素分析

(57)摘要

一种使有机样品中的一种或多种分析物元素成像的方法,包含:将样品作为层提供在基底上;使样品在基底上反应以产生离开样品的一种或多种挥发性产物,同时一种或多种元素保留在样品中,由此按重量计大部分样品层通过该反应从基底中去除并且剩余样品层富含一种或多种不受该反应空间干扰的元素;并且随后使用成像元素分析仪检测在浓缩样品层中的一种或多种元素。还提供了一种用于使有机样品中的一种或多种元素成像的装置和一种成像元素分析仪,所述成像元素分析仪包含用于使初级离子聚焦于样品上的离子枪、分别用于接收和分析来自样品的次级离子的RF离子导向器和TOF分析仪。

1. 一种使有机样品中的一种或多种分析物元素成像的方法,其包含:
将所述样品作为层提供在基底上;
使所述样品在所述基底上反应以产生离开所述样品并进入气相的一种或多种挥发性产物,同时所述一种或多种分析物元素保留在所述样品中,并且受到平均不大于所述成像分析的空间分辨率的所述反应的空间干扰,由此按重量计大部分所述样品层通过所述反应从所述基底中去除并且剩余样品层富含所述一种或多种分析物元素;并且随后
使用成像元素分析仪检测在所述富含样品层中的所述一种或多种分析物元素。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品为选自组织、细胞、细菌培养物和生物有机溶液的生物样品。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述一种或多种元素天然存在于所述样品中和/或作为元素标签已被引入到所述样品中。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述一种或多种元素标签包含一种或多种稀土元素、重金属元素和/或放射性同位素。
5. 根据权利要求3或4中任一项所述的方法,其中所述一种或多种元素标签连接至结合成员,所述结合成员选自多肽、多核苷酸、抗体、亲和抗体和适体,其中所述结合成员结合到所述样品中的靶标。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种元素为金属或半金属。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述层为薄层,具体来说厚度不超过(i)20 μm 、或(ii)10 μm 或(ii)5 μm 。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述反应去除至少60重量%、或至少70重量%、或至少80重量%、或至少90重量%、或至少95重量%、或至少99重量%、或至少99.9重量%或至少99.99重量%的所述样品层。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述反应包含使所述样品暴露于一种或多种氧化剂,可选地其中在所述氧化步骤期间加热所述样品。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述一种或多种氧化剂选自(i)电磁辐射和/或(ii)由气体放电产生的离子型且受激发的物质和/或(iii)一种或多种化学氧化剂。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述一种或多种氧化剂为:(i)电磁辐射并且所述氧化步骤包含用波长小于400nm的光辐照所述样品,其中所述基底作为光催化剂以氧化所述样品,或(ii)一种或多种化学氧化剂并且所述氧化步骤包含将所述样品暴露于一种或多种化学氧化剂,所述氧化剂选自:臭氧、过硫酸盐和过氧化氢。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述基底为平面载片,具体来说金属涂布或未涂布的玻璃或涂布或未涂布的陶瓷平板或具有二氧化钛表面的基底。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中使所述样品在所述基底上反应的步骤包含使一种或多种氧化剂从所述基底的相对侧经过至所述样品,通过在所述基底中的孔以到达所述样品。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中存在接近但与所述样品隔开并且面向所述样品的第二基底,由此所述一种或多种氧化剂通过所述样品扩散,产生来自所述样品的挥发性产物并且使得非挥发性分析物元素和/或其氧化物到达并保留于所述第二基底的所述表面

上,用于通过所述成像分析仪检测,其中所述基底之间的间隙使得传递至所述第二基底的所述分析物元素的所述空间分布受到平均不大于由所述成像分析仪执行的成像分析的所述空间分辨率的所述氧化的干扰。

15.根据前述权利要求中任一项所述的方法,另外包含生成在所述样品中所检测元素的图像。

16.根据权利要求15所述的方法,其中所述图像元素分析仪选自:二次电子光谱仪、X射线光子光谱仪、X射线荧光光谱仪、能量分散的X射线微分析仪、离子迁移率分析仪、放射性分析仪和质谱仪。

17.根据权利要求15或16所述的方法,其中检测所述一种或多种元素包含用聚焦于所述样品的所述表面上的局部点的初级粒子束辐照所述富含的样品以从所述点发射次级粒子,以及分析所述次级粒子以测定在所述点处所述一种或多种元素的存在以及任选地所述一种或多种元素的量,其中所述点随着时间推移移动至所述样品的所述表面上的多个位置,从而获得在所述样品中所述一种或多种元素的图像,其中在所述样品的所述表面上的所述点的每个位置对应于所述图像的像素。

18.根据权利要求15至17中任一项所述的方法,其中以至少100像素/秒或至少1000像素/秒或1000像素/秒至10000像素/秒范围内的速率采集所述图像。

19.根据权利要求17或18所述的方法,其中所述初级粒子选自X射线光子、电子和离子,并且其中所述次级粒子选自光子、电子和离子。

20.根据权利要求17至19中任一项所述的方法,其中所述初级粒子的所述能量超过1keV。

21.根据权利要求17至20中任一项所述的方法,其中所述初级粒子为在低于1毫巴的压力下形成的离子,并且所述次级粒子为用于由质量分析仪分析的离子。

22.根据权利要求17至21中任一项所述的方法,其中所述初级粒子束包含初级离子束并且具有每1 μm 直径点1nA至100nA的强度。

23.根据权利要求17至22中任一项所述的方法,其中所述初级粒子束包含来自具有每脉冲超过a)5J/cm²、或b)10J/cm²、或c)20J/cm²或d)50J/cm²的能量密度的脉冲激光的光子束,并且在所述样品中具有不大于a)100nm、或b)200nm或c)500nm的吸收长度。

24.根据权利要求17至23中任一项所述的方法,其中次级粒子为离子并且所述成像元素分析仪包含质量分析仪,其中所述质量分析仪选自:飞行时间(TOF)质量分析仪、飞行距离质量分析仪、四极离子阱质量分析仪、静电阱质量分析仪、离子回旋共振质量分析仪和扇形磁场质量分析仪或其阵列或组合。

25.根据权利要求24所述的方法,其中在由所述质量分析仪分析的所述次级粒子从所述表面发射之后,它们被传递至RF离子导向器中并且从所述离子导向器输送至所述质量分析仪。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述离子导向器含有用于产生与所述次级粒子的反应产物的反应性气体,其中所述次级粒子为包含所述元素中的一种或多种的离子,其中相对于在所述离子导向器的入口处的所述离子,在所述离子导向器的输出处的所述离子的组成和/或能量分布被改变。

27.根据权利要求24至26中任一项所述的方法,其中所述质量分析仪为TOF质量分析仪

并且所述TOF质量分析仪的重复率至少或高于(a)5kHz、或(b)20kHz、或(c)50kHz、或(d)100kHz,可选地其中使用所述TOF质量分析仪对每个点的分析采用不大于所述TOF分析仪的(a)2个脉冲、或(b)5个脉冲或(c)10个脉冲。

28.一种使有机样品中的一种或多种分析物元素成像的装置,包含:

接收所述样品的反应腔室,其中所述样品已经作为层在基底上提供;

其中所述反应腔室包含电磁辐射源和/或入口,用于将一种或多种化学或离子型氧化剂引入至所述腔室中,用于氧化所述样品以产生一种或多种离开所述样品并进入气相的挥发性产物,同时所述一种或多种分析物元素保留在所述样品中并且受到平均不大于所述成像分析的所述空间分辨率的所述氧化反应的空间干扰,由此按重量计大部分的所述样品层通过所述氧化反应从所述基底去除并且所述剩余样品层富集所述一种或多种元素;以及

在检测室中用于检测在所述浓缩样品层中所述一种或多种元素的所述空间分布的成像元素分析仪。

29.根据权利要求28所述的装置,其中所述成像元素分析仪包含数据采集系统,其接收来自对所述一种或多种元素的所述检测的输入并且产生在所述浓缩样品中的所述一种或多种元素的图像。

30.根据权利要求28或29所述的装置,其中所述样品为选自组织、细菌和细胞的生物样品,并且其中所述一种或多种元素为天然存在于所述样品中和/或已作为元素标签被引入到所述样品中。

31.根据权利要求28至30中任一项所述的装置,其中所述氧化去除至少60重量%、或至少70重量%、或至少80重量%、或至少90重量%、或至少95重量%、或至少99重量%、或至少99.9重量%、或至少99.99重量%、或90重量%至99重量%之间或90重量%至99.9重量%之间的所述样品层。

32.根据权利要求28至54中任一项所述的装置,其中所述辐射源包含紫外光或X射线光源。

33.根据权利要求28至32中任一项所述的装置,其中一种或多种化学氧化剂源连接至所述入口,其中所述一种或多种氧化剂选自:臭氧、过硫酸盐和过氧化氢。

34.根据权利要求28至33中任一项所述的装置,其中所述成像元素分析仪选自:二次电子光谱仪、X射线光电子光谱仪、X射线荧光光谱仪、放射性分析仪和质谱仪。

35.根据权利要求28至34中任一项所述的装置,其中所述成像元素分析仪包含初级粒子源,其用于产生初级粒子束并且将所述束聚焦于所述样品的所述表面上的局部点以从所述点发射次级粒子,并且包含次级粒子分析仪,其用于分析所述次级粒子以测定在所述点处的所述一种或多种元素的存在以及可选地所述一种或多种元素的量,其中所述初级粒子源经配置以随着时间推移将所述点移动至所述样品的所述表面上的多个位置,从而获得在所述样品中的所述一种或多种元素的图像,其中在所述样品的所述表面上的所述点的每个位置对应于所述图像的像素。

36.根据权利要求28至35中任一项所述的装置,其中所述成像元素分析仪可以以至少100像素/秒或至少1000像素/秒或在1000像素/秒至10000像素/秒范围内的速率采集所述图像。

37.根据权利要求35或36所述的装置,其中所述初级粒子选自光子、电子和离子,并且

其中所述次级粒子选自光子、电子和离子,并且其中所述初级粒子的所述能量超过1keV。

38. 根据权利要求35至37中任一项所述的装置,其中所述成像元素分析仪为经配置以被抽成真空的成像次级离子质谱仪(SIMS),其中所述初级粒子为在低于1毫巴的压力下形成于所述源中的离子,并且其中所述次级粒子为用于由所述SIMS的质量分析仪分析的离子。

39. 根据权利要求35至38中任一项所述的装置,其中所述初级粒子和次级粒子为离子,并且所述成像元素分析仪包含质量分析仪,其中所述质量分析仪选自:飞行时间(TOF)质量分析仪、飞行距离质量分析仪、四极离子阱质量分析仪、静电阱质量分析仪、离子回旋共振质量分析仪和扇形磁场质量分析仪或其阵列或组合。

40. 根据权利要求35至39中任一项所述的装置,其中所述成像元素分析仪包含RF离子导向器,其用于在所述次级离子在从所述表面发射之后接收它们并且将所述次级离子传递至所述质量分析仪中。

41. 根据权利要求40所述的装置,其中所述离子导向器经配置以接收填充所述离子导向器的反应气体,用于产生与所述次级离子的反应产物,其中所述次级离子为包含所述元素中一种或多种的离子。

42. 根据权利要求39至41中任一项所述的装置,其中所述质量分析仪为TOF质量分析仪,并且所述TOF质量分析仪的重复率为至少或高于(a)5kHz、或(b)20kHz、或(c)50kHz或(d)100kHz。

43. 一种用于使在有机样品中的一种或多种分析物元素成像的成像元素分析仪,所述分析仪包含:

腔室,其用于容纳含有待成像的一种或多种分析物元素的有机样品,其中在围绕所述样品的所述腔室内的压力在 10^{-5} 毫巴到 10^{-2} 毫巴的范围内;

至少一种辐照装置选自:(i)离子枪,其用高强度初级离子束辐照所述样品,其中所述初级离子在低于1毫巴的压力下形成于所述离子枪中,其中所述离子枪用于将所述初级离子束聚焦于所述样品的所述表面上的局部点并且用于随着时间推移将所述点移动至所述样品的所述表面上的多个位置;(ii)激光器,其用于辐照在所述样品的所述表面上的局部点并且用于随着时间推移将所述点移动至在所述样品的所述表面上的多个位置;;

充气RF离子导向器,其用于接收响应于由所述初级离子或所述激光器的辐照产生的包含由所述样品释放的所述分析物元素的离子,其中所述RF离子导向器阻止m/z低于所述分析物元素的所述质量或质量范围的所有离子的向前传输;以及

飞行时间(TOF)质量分析仪,其用于接收所述次级离子或来自所述RF离子导向器的所述次级离子的反应产物,其中所述TOF质量分析仪经配置具有至少5kHz的重复率。

有机样品的元素分析

技术领域

[0001] 本发明涉及成像质谱分析的领域,具体来说涉及成像元素质谱分析。在某些方面,本发明涉及分析特定元素在生物样品中的分布,所述特定元素可已经作为元素标签引入到样品中或可天然存在于样品中。

背景技术

[0002] 由于多种原因,测定所谓的无机元素在生物样品中的分布是重要的。无机元素一般是指除通常形成有机材料的那些元素(如C、H、N和O)之外的元素。通常,所关注的无机元素比氧重并且通常为金属或半金属元素。无机元素在生物样品中的天然分布揭示出如由新兴的金属组学领域反映的关于在基因、蛋白质和代谢物水平的生物过程的重要信息。此外,在称为元素标签的方法中,许多所谓的元素标签(其还可以称为标记)可以人工添加至在样品中的靶标,通常借助于特异性结合剂(例如抗体、适体、代谢标记物等)以聚焦于在生物系统中特异性的靶标或过程。可以采用许多不同的检测技术用于测量此类标签的元素的丰度,如放射性、光(例如荧光或吸收),其包括X射线荧光(XRF)、次级电子光谱测定(SES)、X射线光电子光谱(XPS)、电子微探针分析(EMPA)、次级离子质谱分析(SIMS)、激光等离子体电离质谱分析(LPI MS)和电感耦合等离子体质谱分析(ICP MS)等。

[0003] 在基于荧光分析的情况下,该技术可以是快速的但是遭受低的灵敏度,而且相比于质谱分析技术(如SIMS或ICP MS),其每次分析限于一个或几个靶标。

[0004] 质谱分析技术允许并行元素的高度多重测量,举例来说使用多收集器扇形磁场、飞行时间、轨道阱或傅里叶变换离子回旋共振分析仪。然而,当空间分辨率分析例如为组织成像所需要时,由于光谱变成被来自组织的强基质峰占据,所以低丰度元素给所有这些分析仪带来了挑战。这些基质峰可来源于构成组织主体的多原子物质,其中主要元素不仅为C、H、N、O,而且为S、P、碱金属(Na,K)等。尽管原则上多原子物质可以在仅RF充气的反应池中除去(例如US5,767,512、US7,230,232),但是此类反应是高度分析物相关的,可影响所关注的金属并且一般导致所关注这些离子的损失。这对于其中分析物的起始量受到来自起始限制的成像应用是特别明显的。

[0005] 已知具有激光消融(LA/ICPMS)的ICP MS对多原子物质的贡献可忽略,并因此变成用于组织的元素成像的优选方法中的一个,如例如示出在W02010/133196、DE10354787、W00151907、W002054057、US8274735、W02014/063246、W02015128490及其它中。已经证实具有微米(μm)空间分辨率的高达几十像素/秒的采集速率。甚至借助此类速率,单个图像的采集仍需要几个小时。然而,由于样品卷流在其从表面输送至ICP炬期间的扩展,另外增加采集速度受到信号时间扩展的限制,如大多数输送过程在大气压下和在低输送速度下进行。大气压对于ICP操作是至关重要的。伴随该扩展,传递管线可得到涂覆有由样品材料形成的气溶胶,因此导致样品引入单元的遗留和污染。由于任何临床应用需要更高的生产量,过度的污染将推动分析成本和服务时间。

[0006] 由于所产生的关注的离子的相对低电流,如本领域中已知的对于SIMS或激光等离

子体电离方法的传递至真空中的电离过程导致非常长的扫描过程,并因此需要长的曝光时间。

[0007] 所产生离子的此类低电流经常与其说是通过离子剂或低效率的次级离子生成引起的,不如说是通过在细胞/组织基质中天然元素的相对低浓度引起的。这还妨碍了利用多信道元素成像的其它方法,如SES、微X射线荧光(μ XRF)等。另一个问题是真空腔室和具有有机基质材料的分析仪部件的快速污染。举例来说,对仅一个典型的 100mm^2 面积 $5\mu\text{m}$ 厚的组织切片的分析可完全染污仪器,若为了满足灵敏度需求其全部用于分析。在SIMS的情况下,存在相对低速率样品去除的附加问题,这减缓了对通常至少为3微米至5微米厚的典型组织样品的分析。

[0008] 在同位素比质谱分析(IRMS)的领域中,特别是其中同位素比分析仪连接至气相色谱(GC)或液相色谱(LC)分离阶段,样品被氧化以产生气体如 CO_2 、 NO_x 、 H_2O ,分析这些气体以测定如C、N和/或O元素的同位素比。氧化可发生在燃烧烘箱(例如在GC-IRMS中)中,如在Z.Muccio和G.P.Jackson,同位素比质谱分析(Isotope ratio mass spectrometry),分析(Analyst)134(2009)213-222中所述,或其可涉及湿式化学法氧化过程(例如在LC-IRMS中),如在C.Osburn和G.ST-Jean,湖泊学与海洋学:方法(Limnology and Oceanography: Methods)5(2007)296-308中所述。例如通过UV-臭氧的“干燥”氧化还通常用于去除在半导体、玻璃等的表面上的污染物。

[0009] 相对于该背景技术,作出了本发明。

发明内容

[0010] 本发明涉及一种可以用于在组织样品通过以上提及的方法中任一者分析之前处理该组织样品的方法。由于组织的厚度通常几乎与所需要的分析空间分辨率相当,小心控制氧化的条件可使得逐步去除有机基质,同时限制离开其原始位置的较重元素或标签的扩散。其结果是,在采样期间更低量的材料将被解吸附或去除,同时传送关注的所需要分析物和成像信息。

[0011] 通过对以待分析元素(其本文中可以不同地称为所关注的元素或分析物元素)的预浓缩,本发明提供一种对有机样品的元素分析的改进的方法。这些通常为存在于样品中的天然或通过作为标签引入的无机元素。这使得能够使用在较早方法中效率差的多种元素成像的方法。

[0012] 根据本发明的一个方面,提供了一种使在有机样品中的一种或多种分析物元素成像的方法,其包含:

[0013] 将该样品作为层提供在基底上;

[0014] 使样品在基底上反应(优选氧化反应)以产生离开样品并进入气相的一种或多种挥发性产物,同时一种或多种分析物元素保留在样品中,由此按重量计大部分样品层通过该反应(优选氧化反应)从基底中去除,并且剩余样品层富含或富集一种或多种分析物元素;并且

[0015] 使用成像元素分析仪检测在富含或富集样品层中的一种或多种分析物元素。

[0016] 优选地,分析物元素不受大于成像分析的空间分辨率的该反应的空间干扰。尽管一些单独的分析物可以受到比这更大距离的干扰,优选平均地该分析物元素受到不大于成

像分析空间分辨率的的空间干扰。

[0017] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于使在有机样品中一种或多种分析物元素成像的装置,包含:

[0018] 接收样品的反应腔室(优选氧化反应腔室),其中样品已经作为层在基底上提供。

[0019] 其中反应(优选氧化反应)腔室包含电磁辐射源和/或入口,用于将一种或多种化学或离子型氧化剂引入至腔室中,用于氧化样品以产生一种或多种离开样品并进入气相的挥发性产物,同时一种或多种分析物元素保留在样品中,由此按重量计大部分样品层通过氧化反应从基底中去除并且剩余样品层富含一种或多种分析物元素;以及

[0020] 在检测室中用于检测在富含样品层中所述一种或多种分析物元素的空间分布的成像元素分析仪。

[0021] 根据本发明的另一方面,提供了一种用于使有机样品中的一种或多种分析物元素成像的专用成像元素分析仪,该分析仪包含:

[0022] 腔室,其用于容纳含有待成像的一种或多种分析物元素的有机样品,其中在围绕样品的腔室内的压力在 10^{-5} 毫巴到 10^{-2} 毫巴的范围内;

[0023] 至少一种初级辐照装置选自:(i)离子枪,其用于用高强度初级离子束辐照样品,其中该初级离子在低于1毫巴压力下形成于离子枪中,其中离子枪用于将该初级离子束聚焦于样品表面上的局部点并且用于随着时间推移将该点移动至样品表面上的多个位置;(ii)激光器,优选大功率激光器,其用于辐照在样品表面上的局部点以产生离子并且随着时间推移将该点移动至样品表面上的多个位置;

[0024] 充气的RF离子导向器,其用于接收包含响应于初级辐照所产生的由样品释放的分析物元素的离子,其中RF离子导向器阻止 m/z 低于分析物元素的质量或质量范围的所有离子的向前传输;优选地至少一些在所述离子导向器中经历离子-分子反应产生的离子;以及

[0025] 飞行时间(TOF)质量分析仪,其用于接收产生的离子或来自RF离子导向器的产生离子的反应产物,其中TOF质量分析仪经配置具有至少5kHz(优选50kHz-100kHz)的重复率。

[0026] 根据本发明的额外方面,提供了一种用于质量分析在样品中的一种或多种分析物元素,并且优选使在样品中的一种或多种分析物元素成像的元素分析仪,该分析仪包含:

[0027] 腔室,其用于容纳含有一种或多种分析物元素的样品,优选地其中在围绕样品的腔室内的压力在 10^{-5} 毫巴到 10^{-2} 毫巴的范围内;

[0028] 激光器,其用于辐照在样品表面上的局部点并且使得在样品中的至少一种或多种分析物元素的激光等离子体电离,优选其中激光器用于随着时间推移将该点移动至样品表面上的多个位置;

[0029] 反应池,其用于接收由激光等离子体电离产生的一种或多种分析物元素的离子,其中当离子穿过反应池时离子的组成和发射度被改变,优选降低;以及

[0030] 质量分析仪,优选飞行时间(TOF)质量分析仪,其用于接收一种或多种分析物元素的离子和/或来自反应池的一种或多种分析物元素的反应产物的离子,优选地其中TOF质量分析仪经配置以具有至少5kHz的重复率。

[0031] 优选实施例

[0032] 在基底上分析物元素(其可以是标签)的预浓缩通过使得氧化反应能够将有机基质或样品的材料转化成对于废料去除的挥发性气体而实施,同时所关注的无机元素保留在

基底上。因此,优选地挥发性产物基本上不会含有分析物元素。此外,无机元素物质可以在基底上以氧化形式结束(即以氧化的样品)。

[0033] 然后,在剩余样品中的富含的分析物元素可以使用成像元素分析仪检测。对于氧化反应,检测可在不同时间和位置(例如在不同腔室中)处发生。举例来说,检测通常发生在氧化反应之后。从检测中,然后可产生样品中所检测元素的图像。因此,成像元素分析仪可包含数据采集系统,其接收来自对一种或多种元素检测的输入并且产生在样品中一种或多种元素的图像。成像元素分析仪理想地为能够对多个元素并行快速成像的设备,如包含质量分析仪或多光谱仪的设备。

[0034] 初始样品为有机样品,即由大部分有机物质组成并含有包括待检测的分析物元素的少量或痕量的无机物质。其可以是包含有机基质的任何样品,在有机基质中包含了期望被检测的一种或多种分析物元素。有机基质构成样品的大部分质量或重量。有机基质可构成至少60重量%、或至少70重量%、或至少80重量%、或至少90重量%、或至少95重量%、或至少99重量%、或至少99.9重量%或至少99.99重量%的样品层。

[0035] 样品可以是生物样品,即生物来源的样品。生物样品可以来源于生物体。生物体可以是植物或动物或细菌。在本发明的优选的应用中,生物样品为组织和/或单个细胞。

[0036] 分析物元素一般为除通常形成有机基质的那些(C、H、N和O)之外的元素。通常,分析物元素比氧重。通常,元素为金属或半金属(类金属)元素。元素可以优选是比质量16更重的金属。元素可以是重金属元素。元素可以选自稀土元素(镧系元素)、或过渡金属、或后过渡金属、或碱金属、或碱土金属或类金属。元素可以是放射性同位素。在多种分析物的情况下,元素可以是上述类别的任何组合。一种或多种分析物元素可包含相同元素的两种或更多种不同的同位素。

[0037] 一种或多种分析物元素可以天然存在于样品中,例如如在样品(如生物样品)中的微量元素。此类元素还可以作为内标用于改进定量。一种或多种分析物元素可作为元素标签已经被引入到样品中,例如使用本领域中已知的元素标签的方法。一个优选的元素标签的类别为稀土元素(特别是镧系元素)标签可以是可通过放射性分析仪检测的放射性同位素。

[0038] 一种或多种元素标签可以作为纳米粒子、纳米棒、质量点或量子点而提供,例如如在US 2014/0221241 A1中所描述。

[0039] 一种或多种元素标签可以作为纯化的稀土或其它元素的同位素或以预定比例的它们的组合而提供。

[0040] 一种或多种元素标签可以连接至结合到样品中靶标的结合成员。结合成员可以是特异性的以使得其结合到样品中的特异性靶标。每种元素标签(每个质量)(其中存在多于一种)可以连接至对样品中的特定靶标特异性的不同结合成员。因此,可以存在多种不同的靶标。优选地,每种元素标签结合到不同的特异性结合成员。一种或多种元素标签可以直接或间接地(例如经由连接子)连接至结合成员。结合成员可以选自染色剂(例如荧光染色剂)、多肽、多核苷酸、抗体、亲和抗体和适体)或SOMAmer(TM)。靶标可以是样品中的任何有机分子。在生物样品的情况下,靶标可以是生物分子,例如,大分子如选自蛋白质、多糖、脂质和核酸以及小分子如代谢物与天然产物。靶标可以是抗原。作为一个实例,元素标签可以连接至抗体,以使得在抗体结合到抗原之后其连接至抗体-抗原复合物。所述或每种靶标优

选为生物标记物。

[0041] 在一些实施例中,一种或多种元素标签已经被可代谢地引入到例如在食物或支持培养基内的样品中。元素标签可因此形式代谢标记物的一部分。

[0042] 标签也可以利用以条码方式的多个元素,例如如在US 2014/106976中和在B Bodenmiller等人,自然·生物技术(Nature Biotechnology)30(2012)858-867中所描述。

[0043] 一种或多种元素标签可包含相同元素的两种或更多种不同的同位素标签。

[0044] 在基底上制备样品作为层。样品优选作为薄层提供,更优选厚度不超过(i)20 μm 、或(ii)10 μm 、或(iii)5 μm 或(iv)3 μm 的薄层。

[0045] 基底通常为载片,例如平面载片。基底或载片可以是金属、玻璃或陶瓷平板。在一些实施例中,基底可具有二氧化钛的表面。举例来说,前述载片或平板中的任一者可具有二氧化钛的表面。为此目的,基底可以涂覆有二氧化钛层,优选以二氧化钛膜或固定的二氧化钛粒子的形式。基底的优选实施例中的一个为具有如本领域中已知的铟-锡氧化物涂层的标准显微镜载玻片。

[0046] 在一些实施例中,样品可包含固定和嵌入的组织样品,例如福马林固定、石蜡嵌入(FPE)的组织,优选通过薄片切片机切割,优选切割至3 μm 至5 μm 厚度。

[0047] 在一些实施例中,样品可包含沉积在基底上的单独细胞,例如来自流式细胞仪或高含量筛选设备。细胞可以沉积例如在网格状图案中(例如,在X方向和Y方向上在每50 μm 或每30 μm 处)。在此情况下,典型的细胞尺寸可以高达5 μm 、或高达10 μm 或5 μm 至10 μm 。网格状样品制备的实例示出在W02014/063246中。

[0048] 在一些实施例中,样品可包含在生长培养基上的细胞培养物,例如在薄生长培养基(如琼脂糖)层上的微生物或细菌培养物。优选地,培养物至多10 μm 厚或至多20 μm 厚。通常,生长培养基将比该培养物厚度更厚。当培养物样品(例如使用等离子蚀刻)时它们可以被氧化,但是对于厚的生长培养基层氧化反应和随后的采样将不会如此有效。优选地,此类样品应该向下切割至薄培养层或接近于该薄培养层以提高氧化和采样。

[0049] 在一些实施例中,样品可以通过自动采样器(例如包括以下类型的自动采样器:流聚焦、声波液滴喷射、感应等)沉积。

[0050] 样品可以例如通过自动采样器沉积在基底上,作为在网格状图案中或在网格状图案上(例如在X方向和Y方向上每30 μm 至50 μm)、或在微阵列中或在微阵列上或在多孔板中的单独的液滴。

[0051] 在一些实施例中,多种样品(其可以是不同的样品)可以沉积在基底上的不同位置中的一个基底上,例如在如上所述的网格状图案中。

[0052] 对具有一种或多种分析物元素的样品加标签可在将样品提供在基底上之前或在这之后进行,优选在这之后。

[0053] 在本发明的某些实施例中,分析物元素不是元素标签而是样品中天然存在的元素(所谓的天然元素)。因此,在某些实施例中,从未被加标签的意义上来说样品是未经处理的。该方法可以用于应用中以得到天然无机元素(如金属元素)在样品中的分布,特别是天然较重的无机元素(例如金属,例如Fe、Zn、Sn等,例如用于金属组学实验)。

[0054] 一旦完成样品在基底上的制备,样品可以传递至用于氧化步骤的处理腔室(例如氧化腔室)。在该传递之前,可以可选地冻干样品以减小水在其中的量。样品可以被传递至

密封的反应腔室中,在该密封的反应腔室中样品经受一种或多种(优选强的)氧化剂。在一个实施例中,氧化反应可包含在氧气流或气氛中加热样品以实现燃烧。只要分析物元素或标签不受到大于期望的分析空间分辨率的过程的空间干扰,许多不同的燃烧或氧化过程就可起作用。分析的空间分辨率越精细(例如可以通常使用1微米或3微米至5微米空间分辨率),氧化反应过程应该越温和。由于起泡或沸腾将大幅度干扰元素的原始空间分布,所以没有任何情况允许其的形成。在一些实施例中,当所需要的空间分辨率约为几十微米时,可以使用更剧烈且快速的氧化反应。尽管优选气相氧化反应,只要元素标签的低干扰空间分布的需求仍然满足,则还可以实施通过RF放电等离子体的湿式化学法氧化反应和蚀刻。可以使用若干氧化过程的组合以促进剩余样品的富含。

[0055] 全密封腔室可以是其与检测或分析发生的检测室分离的反应腔室,或者其可以是与检测或分析腔室相同的腔室。因此,在一些实施例中,氧化腔室为与检测腔室相同的腔室,即在此类情况下存在单个氧化和检测腔室。优选地,氧化反应在不同于成像元素分析仪位于其中的检测腔室的腔室中进行。因此,氧化的样品通常必须从反应(即氧化反应)腔室中传递至检测/分析腔室(成像元素位于其中)。因此,在此类情况下,一旦完成所述氧化过程,基底(载片)就传递至真空腔室中,用于通过许多可适用方法中的任一者的元素成像(即该过程总体上为两步骤过程:转化/浓缩,接着进行基于真空的成像分析)。

[0056] 优选地,氧化步骤包含将样品暴露于一种或多种氧化剂,可选地其中在氧化步骤期间加热样品。装置(例如反应腔室)可因此另外包含用于在氧化步骤期间加热样品的加热器。反应腔室可以是真空腔室。可以在高(高于大气压)压力下、在大气压下或在低压(即低于大气压)下的腔室中执行该氧化反应。低压状态可以在100毫巴至1000毫巴之间或1毫巴至100毫巴之间。在后一种情况下,可以使用DC或RF气体放电以促进氧化反应。一种或多种氧化剂可以选自(i)电磁辐射和/或(ii)一种或多种气相化学氧化剂和/或(iii)离子或电子和/或(iv)一种或多种液相化学氧化剂。因此,一种或多种化学氧化剂源可以连接至入口,优选地其中一种或多种氧化剂选自:臭氧、过氧化氢和作为液相氧化剂的实例的过硫酸盐(例如过硫酸铵、过硫酸钠或过硫酸钾)。后者优选与催化剂(例如磷酸和硝酸银)一起使用。在低压(低于大气压)下,这些试剂可以一起或顺序地进入腔室。

[0057] 优选的气相氧化剂包括臭氧和过氧化氢。样品可以通过电磁辐射的作用而被氧化,具体来说是光,特别是具有波长<400nm的光(优选UV光但在一些实施例中为X射线)。对于臭氧氧化实例,UV-臭氧氧化腔室可以在如本领域中已知的大气压或高压下使用,其中额外供给湿空气或湿氧气并且用254nm和/或185nm UV光辅助活化。当使用光进行氧化反应时,样品可选地驻留在经受光的基底的光催化表面(优选二氧化钛表面)上氧化光优选以高于0.1毫瓦/cm²、或高于1.0毫瓦/cm²、或高于10毫瓦/cm²或在0.1毫瓦/cm²至10毫瓦/cm²范围内的强度辐照表面。

[0058] 因此,一种或多种氧化剂可以是:(i)电磁辐射并且氧化步骤包含用波长小于400nm的光辐照样品,其中基底作为光催化剂以氧化样品,或(ii)一种或多种化学氧化剂并且氧化步骤包含将样品暴露于一种或多种化学氧化剂,所述氧化剂选自:臭氧和过氧化氢。

[0059] 通过使用低压RF或DC气体放电接触样品实现类似的效果,以使得样品的表面被来自等离子体的带电粒子轰击并且通过溅射来补充氧化反应。相比于UV-臭氧处理,该过程通常更快并且更“耐磨”,并因此更适合于更大的元素结块或晶体。

[0060] 所描述的氧化过程适合于引起有机基质原子的快速氧化反应：例如以下氧化反应中的任一种或多种： $C \rightarrow CO$ 、 CO_2 ， $N \rightarrow NO$ 、 NO_2 ， $H \rightarrow H_2O$ 等。因此，一种或多种挥发性产物优选包含C、H和/或N的一种或多种氧化物。可选地将S转化成 SO_2 或硫的其它氧化物。氧化反应所产生的挥发性产物被优选抽走，因此带走部分、优选大部分的样品质量。同时，分析物元素（例如较重元素（比O重）以及特别是金属元素不会形成挥发性产物并因此主要以氧化形式保留在连续变薄的样品层上。因此，在通过成像元素分析仪分析之前，样品变得或富含一种或多种分析物元素。优选地，由于该反应，在基底上的样品中分析物元素的位置未改变（至少未显著改变或基本上未改变）。为此目的，可以控制该反应速率以使得没有起泡或沸腾发生并且分析物元素的位置未被改变。对于较重元素或此类元素的较大结块或晶体扩散较低，但是应该选择足够低的反应速率以保持低于a) $1 \times$ 样品厚度D，b) $0.5 \times D$ ，c) $2 \times D$ 的扩散长度。因此，如此测定的样品中分析物元素的图像表示分析物元素在原始样品（在反应之前）中的分布。

[0061] 优选地，反应步骤从基底中去除按重量计大部分的样品层。更优选地，按优选的顺序，反应去除至少60重量%、或至少70重量%、或至少80重量%、或至少90重量%、或至少95重量%、或至少99重量%、或至少99.9重量%或至少99.99重量%的样品层。在一些实施例中，反应步骤去除90重量%至99重量%之间或90重量%至99.9重量%之间的样品层。

[0062] 优选地，继续反应步骤直至氧化过程基本上达到饱和或接近其饱和，以使得去除大部分的有机基质（最优选 >90 重量%、或 >95 重量%或 >99 重量%），并且通常充分浓缩较重的分析物元素用于随后的分析。

[0063] 优选地，反应步骤包含通过调节氧化剂（包括其中使用的光或离子）的供应和/或样品的温度来控制氧化过程的速率。在一些实施例中，挥发性产物和/或其气相中的浓缩物中的至少一种的产生可以用于监测过程控制（例如使用一种或多种气体传感器），例如以测定停止氧化反应的时间（以监测氧化反应完全性使得最小化不期望产物的份额），或氧化反应的速度（使得其不太剧烈，这可扰乱元素或标签的位置）以及用于诊断，例如以测量在挥发性产物或其同位素中某些元素的相对含量以获得关于样品的其它类型的信息，如副产物、污染物等。反应腔室的另一实施例包括使用由氧化剂（臭氧、过氧化氢、过硫酸盐）从在下面的供应器被迫通过其的多孔无机材料制备的样品载片。该方法依赖于这些试剂通过薄的组织切片的快速扩散并因此更可能导致起泡和沸腾。然而，在此情况下，另一多孔载片可以位于远离组织仅几微米以“捕获”由所得气流带走的较重元素的非挥发性氧化物。该方法允许更快的氧化过程而无所关注分析物的任何损耗，甚至当形成气泡时也是如此。

[0064] 因此，在一些实施例中，使基底上的样品反应的步骤包含使一种或多种氧化剂从对于样品的基底相对侧通过基底中的孔以到达样品，存在接近于样品但与样品隔开并且面向样品的第二基底，由此一种或多种氧化剂扩散通过样品，产生来自样品的挥发性产物并且使得非挥发性分析物（较重）元素和/或其氧化物到达并且保留在第二基底的表面上，用于由成像分析仪检测。由于两基底之间的充分小的间隙（例如5微米至10微米），该间隙使得在元素被传递至第二基底之后，样品中分析物较重的元素的空间分布基本上被保存。至少优选平均地，传递至第二基底的分析物元素受到不大于待执行的成像分析的空间分辨率的氧化反应的空间干扰。

[0065] 成像元素分析仪可以选自：二次电子光谱仪（SES）、X射线光电子光谱仪（XPS）、X射

线荧光(XRF)光谱仪、能量分散的X射线微分析仪、放射性分析仪、离子迁移率分析仪和质谱仪(MS),优选质谱仪。

[0066] 优选地,检测一种或多种元素包含用聚焦于样品表面的局部点的初级粒子(如离子或光子)束辐照浓缩的样品,以从该点发射次级粒子并,以及分析次级粒子以测定在该点处一种或多种元素的存在以及可选该元素的量,其中该点随着时间推移移动至样品表面上的多个位置,从而获得在样品中一种或多种元素的图像,其中在样品表面上的点的每个位置对应于图像的像素。次级离子中的至少一些为包含分析物元素中的一种或多种的离子。当次级粒子从样品表面发射(例如若次级粒子已经为元素离子或其氧化离子,并且分析仪为质谱仪;或者若从特征为所述或更多分析物元素的一种或多种分析物元素发射的次级粒子为光子或电子)或它们可以转化成另一种用于分析的形式,例如从发射的中性或离子型多原子粒子转化成用于质量分析的单原子元素离子(例如在质量分析仪的ICP离子源中)或在反应或质量分析仪上游的碰撞池中转化成反应产物(经由离子-分子或离子-离子反应)时,可以直接分析它们。

[0067] 因此,成像元素分析仪可包含初级粒子源(例如离子枪)或光子源(例如激光器),其用于产生初级粒子束并且将该束聚焦于样品表面上的局部点以从该点发射次级粒子,并且包含次级粒子分析仪,其用于分析次级粒子以测定在该点处的一种或多种元素的存在以及可选地该元素的量,其中初级粒子源经配置以随着时间推移将该点移动至样品表面上的多个位置,从而获得在样品中一种或多种元素的图像,其中在样品表面上的点的每个位置对应于图像的像素。成像元素分析仪可以至少100像素/秒或至少1000像素/秒或在1000像素/秒至10000像素/秒范围内的速率采集图像。

[0068] 优选地,初级粒子选自IR或可见光或UV或X射线光子、电子和离子。还优选地,次级粒子为所选择的光子(特别是X射线)、电子和离子。

[0069] 优选地,初级粒子的能量超过1keV。

[0070] 优选地,初级粒子为离子,并因此更优选地,初级粒子源包含离子枪。优选地,初级离子束是连续的。然而,在一些实施例中,初级离子束是脉冲的。优选地,初级粒子为在低于1毫巴的压力下形成的离子并且次级粒子为用于由质量分析仪分析的离子。因此,成像元素分析仪可以是经配置被抽成真空的成像次级离子质谱仪(SIMS),其中初级粒子为在低于1毫巴的压力下形成于源中的离子,并且其中次级粒子为用于由SIMS的质量分析仪分析的离子。

[0071] 通过转向离子枪的板和/或通过移动样品或基底位于其上的工作台可以实施对样品的扫描。举例来说,通过使用更薄样品(例如3 μm 和更薄的组织切片厚度)和/或更强的初级束空间聚焦和/或减少的初级射束电流以减小空间电荷散焦,可以实现对于亚细胞和亚细胞器分辨率的更高空间分辨率。

[0072] 优选地,该初级离子束具有高达100nA/1 μm 尺寸的点(即1 μm 直径点)的强度。优选地,该初级离子束在1 μm 尺寸点中的强度至少为:a)1pA、或b)100pA、或c)1nA、或d)10nA。

[0073] 若光子用作初级粒子,则优选电离脉冲中的能量密度超过a)5J/cm²、b)10J/cm²、c)20J/cm²、d)50J/cm²,其允许形成密集等离子体并且如本领域中已知的实现高度的电离。激光器设备优选用作光子源。优选地此类激光器为脉冲激光器,其中脉冲在每次脉冲中优选具有上述能量密度。可以使用任何激光器波长,但是优选不长于所需要的空间分辨率并且

优选具有不大于a)100nm、b)200nm或c)500nm的吸收长度(即对于激光强度的长度通过因子 e (欧拉数)衰减)。举例来说,优选在辐照脉冲中的能量密度超过a)5J/cm²、或b)10J/cm²(或其它优选的能量密度)并且具有不大于500nm的吸收长度。最优选地,如Nd:YAG的固态激光器用于电离,具有或不具有倍频(可能需要后者以获得充分短的吸收长度)。

[0074] 激光辐射可从正面或从背面辐照样品。后一情况提供较易于对激光束聚焦,激光与样品的正交性并且因此应该使用圆点而非高辐射阈值玻璃以避免载片的辐射损害。在正面辐照情况下,激光将通常以一定角度进来(以简化对提取离子光学器件更苛刻的需求),同时从通过载玻片的背面可以实现焦点的光学观察。

[0075] 在其中成像元素分析仪包含用于测定发射离子或其反应产物的 m/z 的质量分析仪的实施例中,该质量分析仪可以选自:飞行时间(TOF)质量分析仪、飞行距离质量分析仪、四极离子阱质量分析仪、静电阱(EST)质量分析仪(如轨道EST,例如轨道阱)、离子回旋共振质量分析仪(FT-ICR),特别是采用成像电流检测的EST或ICR,扇形磁场质量分析仪和阵列或其任何组合,更优选地质量分析仪包含TOF质量分析仪。TOF分析仪可以是正交加速TOF分析仪(OA-TOF),特别是如本领域中已知的高重复率OA-TOF,优选具有无栅正交加速,可选地具有一种或多种离子反射镜,其提供在分析仪中离子的单反射或多反射(更优选单反射)。质量分析仪优选能够同时分析在离子的宽质量范围内的连续次级离子束,如TOF或轨道阱或轨道静电阱。优选地,存在多种待分析(成像)的分析物元素,例如来自多种元素标签。更优选地,存在由元素分析仪分析的至少5种或至少10种分析物元素或元素标签。质谱仪(特别是TOF质量分析仪)能够易于进行在短时间尺度上的此类多通道分析。分析仪的组合可以用于多模态分析,例如用于标称-质量元素分析的TOF质量分析仪以及具有图像电流检测的静电阱,如轨道阱-用于有机分析或高分辨率干扰。

[0076] 分析物元素(标签)的次级离子可以发射至 10^{-5} 毫巴至 10^{-2} 毫巴的中间真空压力,而不是更高真空,因此相比于高真空(例如SIMS)仪器减少了对样品干燥和传递时间的需求。因此,用于容纳用初级离子辐照的样品的腔室在围绕样品的腔室内部的压力在 10^{-5} 毫巴至 10^{-2} 毫巴的范围内。

[0077] 优选地,在用于由质量分析仪分析的次级粒子从表面发射之后,它们被传递至RF离子导向器中并且从离子导向器输送至质量分析仪。因此,成像元素分析仪优选包含RF离子导向器,其用于在次级离子从表面发射之后接收它们,并且将该次级离子传递至质量分析仪中。在使用中的离子导向器优选被充气例如至少 10^{-2} 毫巴的压力,由此除去所有低于分析物元素质量范围的 m/z 或其中元素离子的氧化物被检测的其氧化物。从而,离子导向器可宜充当反应或碰撞池。

[0078] 在一些实施例中,离子导向器可含有产生与次级粒子的反应产物(例如经由离子-分子反应)的反应气体,其中次级粒子为包含元素中一种或多种的离子。举例来说,反应气体可包含如NO或O₂的气体以将大部分的分析物元素(例如天然金属或稀土元素)完全氧化成如本领域中已知的氧化物(参见例如G.Koyanagi,D.Bohme,物理化学期刊A(J.Phys.Chem.A),105(2001)8964-8968),并因此减小干扰(按质量计移位那些元素峰16amu,而其它峰保持未移位)和增加并行分析的通道数。若使用反应气体,则可以除去所有氧化物和其它分子干扰。因此,优选地所产生(次级)离子中的至少一些在离子导向器中进行离子-分子反应。当离子传输通过离子导向器时,离子导向器可对它们具有冷却效果。以

此方式,相对于在离子导向器入口处的离子,在离子导向器输出处的离子的能量分布或发射率被改变(优选降低)。因此,在一些实施例中,相对于在离子导向器入口处的离子,可以改变在离子导向器输出处的离子的组成和/或能量分布。因此,离子导向器优选被配置成反应池。本领域中已知的是,气体如 N_2O 、 NO_2 、 O_2 、 CO_2 、 NO 促进许多金属离子的氧化,具体来说具有 $m/z > 100$,其反过来使得每种同位素许多分析通道减小至每种同位素一个分析通道。另外, NH_3 和 NO 可以用于在该氧化反应之前去除多原子物质,如氢化物。反应池可因此填充有作为在反应池中的一种或多种反应性气体的一种或多种此类气体。

[0079] 在某些实施例中,由于较重的元素浓缩在载片表面上,它们可形成新型基质,所述新型基质可开始影响分析,导致减小的电离产率或与表面形态相关的效应。举例来说,磷和磷脂可围绕细胞膜(包括核膜)并从细胞核内的DNA浓缩。碱金属(例如Na、K)可在膜的相对侧上以不同的浓度呈现,等等。因此,在此类实施例中,还应该优选监测这些元素(例如P、Na、K)中的一种或多种并且根据其丰度施加校正。举例来说,在一些实施例中,若此类常见元素(例如Na、K等)的浓度未遵循其在样品已知区域中的预期浓度,则观察到的与其预期浓度的偏差可以用作校正分析物(通常较重)元素的检测丰度的基础。

[0080] 此外,另外的处理可以应用于样品,例如应用额外的基质以增强电离并且补偿基质效应等。举例来说,包含辅助电离的一种或多种元素的均一涂层可以施用至样品(例如已知氧用于增加金属次级离子的产率)。另外,在激光辐照和/或电离的情况下,有机光-吸收层可以添加至样品。

[0081] 优选地,质量分析仪为TOF质量分析仪,特别是OA-TOF,并且TOF质量分析仪的重复率至少为或高于(a)5kHz、或(b)20kHz、或(c)50kHz或(d)100kHz。重复率可以是例如50kHz至100kHz。重复率在此是指脉冲离子进入用于通过其质荷比(m/z)对所述离子分离的TOF分析仪中的速率所检测的离子信号(强度与 m/z)从进入到TOF分析仪中离子的每个脉冲中获得。在样品表面上给定点处,来自进入到TOF分析仪中离子的每个脉冲的检测信号的求和可以用于生成元素分布图像的对应像素。优选地,以至少100像素/秒或至少1000像素/秒或在1000像素/秒至10000像素/秒范围内的速率采集元素分布的图像。优选地,质量分析仪经配置以检测元素或元素的氧化物。

[0082] 优选地,使用TOF质量分析仪对每个点的分析采用不大于TOF分析仪的(a)2个脉冲、或(b)5个脉冲或(c)10个脉冲。每个点的分析时间优选为采集用于图像像素的充分或期望信噪比或灵敏度的质谱的时间。

[0083] 本发明可用于以下各项中任一项:

[0084] i. 组织成像,例如应用于解剖病理学,特别是癌症,包括:固定的石蜡嵌入的组织与苏木素和曙红(H&E)染色的组合;

[0085] ii. 高含量细胞筛选;

[0086] iii. 用于临床上相关疾病生物标记的基于微阵列的靶向分析;

[0087] iv. 高通量医药、化学和临床分析;

[0088] v. 细菌鉴定和易感性测试(用在薄层培养基上的培养物)。

[0089] vi. 细胞测量术,包括离线流动式细胞测量术;

[0090] 在其中样品为生物样品(特别是临床上相关样品)的情况下,方法可另外包含使用样品中一种或多种元素的图像以测定生理状态或以判断从生物样品导出其的生物体的疾

病状态。

[0091] 本发明的样品预浓缩方法可提供许多优点,如增加像素采集速率并且因此增加元素成像的生产量;减少仪器污染;具有扩展元素成像技术范围的应用性;以及由于在氧化的表面上氧化元素离子物质的存在增加电离效率。

附图说明

[0092] 图1示意性地示出了根据本发明的用于使有机样品中一种或多种元素成像的装置的实施例。

[0093] 图2示意性地示出了根据本发明的用于使有机样品中一种或多种元素成像的装置的另一实施例。

[0094] 图3示意性地示出了所关注分析物传递到相对载片上的通过实施例。

具体实施方式

[0095] 为了能够更详细的理解本发明,现在将借助于实例且参考附图描述多个实施例。

[0096] 参照图1,示意性地示出了使有机样品中一种或多种元素成像的装置。待分析的样品的薄层沉积在载片(2)上。样品可以布置成在载片上的微阵列。载片为具有ITO涂层的平坦载玻片。可替代地,其可以是金属板。

[0097] 样品(例如)为生物(有机)样品,如组织样品或细胞系。然而,一般来讲,样品不限于给定的类型。样品可包含以下各者中任一者:

[0098] -生物或化学(有机但非生物)样品

[0099] -固定并嵌入的组织,例如福马林固定、石蜡嵌入(FFPE)的组织,优选通过薄片切片切割至优选 $3\mu\text{m}$ 至 $5\mu\text{m}$ 厚

[0100] -沉积在载片上的单个细胞,例如来自流式细胞仪或高含量筛选设备,例如在网格状图案中(例如在X方向和Y方向上每 $50\mu\text{m}$ 沉积,用于高达 $5\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$ 的典型细胞尺寸)。通常,不超过一个生物细胞占据每个网格单元或方形。网格中的细胞可以都是不同的(例如来自不同的样品或实验)或至少一些是不同的,可选地网格中的所有细胞可以来自一个样品或种群以便测定样品或种群中的变化。

[0101] -在生长培养基上的细胞培养物,例如在薄层生长培养基(如琼脂糖)上的微生物或细菌培养物(优选地,培养物高达 $10\mu\text{m}$ 厚或高达 $20\mu\text{m}$ 厚)

[0102] -沉积在载片上的样品(如非细胞样品),例如通过任何已知类型的自动采样器(包括通过流聚焦、声波液滴喷射、感应等)。样品可以沉积为在网格状图案(例如在X方向和Y方向上每 $50\mu\text{m}$)或微阵列上的单个液滴。

[0103] 由于以下另外描述的原因,在一些实施例中,载片涂覆有例如以膜或固定的粒子的形式的二氧化钛层。

[0104] 在一些实施例中,在载片上的样品可以按原样(即未处理,非加标签)分析以测定天然较重无机元素(例如Fe、Zn、Sn等,例如用于金属组学实验)的分布。在其它实施例中,样品可以被加标签,优选对样品非天然的一种或多种元素(本文中非天然元素)。稀土元素为本领域中已知的元素标签类别。一种或多种标签通常对样品中一种或多种不同的相应靶标具有选择性。在样品沉积在载片上之前或在这之后,但是优选在这之后,标签可以应用于

样品。可以借助于结合成员(如抗体、适体、Somamers、代谢标记)和其它已知的方法实现标签的特异性。标签可包括聚合物链、纳米粒子(如在US 8,679,858中示出)、量子点等。标签还可利用以条码方式的多种元素,如呈现在US 2014/106976和B Bodenmiller等人,自然·生物技术(Nature Biotechnology)30(2012)858-867中。

[0105] 在分析样品的方法中的下一步包含将含有(加标签的)样品的载片定位在反应或氧化反应腔室(10)中,其中执行氧化反应以通过去除大部分的有机基质减轻样品的质量,从而保留含有所关注的分析物元素的样品,通常为氧化物。可以使用氧化的两种方法中的一者或两者。第一种方法包含使用波长 $<400\text{nm}$ 的光(如UV光(12))辐照载片及其样品,优选以处于或高于 $0.1\text{毫瓦}/\text{cm}^2$ 至 $10\text{毫瓦}/\text{cm}^2$ 的强度和 $<400\text{nm}$ 的波长(例如来自如本领域中已知的气体放电源)。这些实施例是这样的实施例:其中优选的是,包括在经受UV光的载片上的二氧化钛涂层或其它光催化剂。二氧化钛展现出非常强的光催化性能,其导致基质原子的快速氧化。可替代地或此外,化学氧化剂(优选臭氧或过氧化氢蒸气)经由入口(14)进入到氧化腔室(10)中并且通过出口(16)从氧化腔室(10)中排出。样品可以在载片上加热以辅助如本领域中已知的氧化过程。

[0106] 在UV光和/或氧化剂的影响下,发生基质原子的快速氧化:例如 $\text{C}\rightarrow\text{CO}_2$, $\text{N}\rightarrow\text{NO}$ 、 NO_2 , $\text{H}\rightarrow\text{H}_2\text{O}$ 等。挥发性产物通过连接至腔室的真空泵(未示出)抽走,因此带走大部分的样品质量。同时,较重原子(包括标签的分析物元素或天然较重的元素)不会形成挥发性产物并因此主要以氧化形式保持留在变薄的样品层上。一旦该过程已达到饱和并且大部分有机基质被去除(优选去除 $>90\text{wt}\%$ 或 $>99\text{wt}\%$,例如 $90\text{wt}\%$ 至 $99\text{wt}\%$),充分浓缩了较重的原子用于随后的分析。氧化过程的速率可以通过控制氧化剂的供应或辐照光功率和/或样品的温度来调节。太快的氧化可不期望地导致气泡带走所关注的较重原子。因此,应该小心地使氧化速率与反应腔室中的样品产生保持平衡。挥发性产物可以用于过程控制(例如以测定停止氧化的时间)和/或用于诊断(例如测量元素或其同位素的相对含量以得到额外类型的信息)。举例来说,可以监测挥发性产物的元素。举例来说,若所监测的C与O的比例为1:1,则这指示不完全氧化,但是若C与O的比例为1:2,则这指示完全氧化成 CO_2 。在另一实例中,同位素比例如 $\text{C}^{12}/\text{C}^{13}$ 可以用作过程指示剂。举例来说,该比例可以用于辨别何时该过程已结束氧化细菌培养物并且开始氧化培养基(对于细菌其可具有不同的比例 $\text{C}^{12}/\text{C}^{13}$)。

[0107] 替代性方法示出在图3中并且允许更高的反应速率,甚至原则上允许样品的沸腾和起泡。在此情况下,一种或多种氧化剂(臭氧、过氧化氢、过硫酸盐)从在载片(102)下面的供应器(未示出)加压(101),所述载片(102)支撑样品(104),例如薄组织的样品。在该实施例中,存在两个隔开但是紧密分离的样品载片(102,106),其每个均由多孔无机材料(例如玻璃、陶瓷、ITO等)制备。一种或多种氧化剂被迫通过两个紧密分离的样品载片。这些试剂快速扩散通过薄的组织切片,在路径上产生光气体(即挥发性产物)。该混合物继续流经从样品载片(102)至相对载片(106)的5微米至10微米间隙,并且通过后者(相对载片(106))。若样品被充分冻干,则实际上可以引导至与相对载片(106)直接接触。在相对载片中的孔的尺寸以此方式选择(优选地,在 1nm 至 10nm 范围内):非挥发性较重元素及其氧化物不能进入孔中并且保留在相对载片的表面上用于随后的分析。因此,如本文中所描述的成像分析可以在相对载片上执行。由于载片之间充分小的间隙,基本上保存了样品中较重元素的空间分布。该通过方法允许更快的氧化过程而无所关注分析物的任何损耗,甚至当形成气泡

时也是如此。优选地,相对载片在UV范围内是透明的以使能够进行臭氧形成以及通过来自UV源(108)的UV辐射辅助的二氧化钛反应(例如其中样品基底包含二氧化钛表面)。这可促进氧化过程。

[0108] 还可以通过在整个表面上光栅化的聚焦的激光促进反应。在一种类型的实施例中,激光的功率可以足够高以产生局部的热量,其加快有机物的分解和氧化速率。

[0109] 应理解的是,在氧化腔室中可以同时处理多个样品载片。

[0110] 对于随后分析,将样品从反应腔室中取出并且传递至能够对多个元素并行快速成像的设备,优选地具有>100像素/秒、或>1000像素/秒(例如100像素/秒至1000像素/秒、或2000像素/秒)的采集速率。在某些情况下,该速率可以高达 10^5 像素/秒。对于此类采集速率的像素尺寸可为 $10\mu\text{m}$ 或更小,或 $5\mu\text{m}$ 或更小,或 $2\mu\text{m}$ 或更小,或 $1\mu\text{m}$ 或更小的理想地亚细胞分辨率(例如 $0.5\mu\text{m}$ 至 $1.0\mu\text{m}$)。应注意的是,反应腔室可以可替代地与成像设备整合,若例如后者内的一些构件(例如成像分析仪的离子或电子枪,或X射线枪)可以用于加速氧化反应,这将是优选的。

[0111] 以次级离子质谱仪(SIMS)或LPI(激光等离子体电离)质谱仪形式的优选成像设备示出在图1中。成像设备包含高亮度激光器或离子枪(20)作为产生来自样品的离子的辐照装置。参照图2,其共享许多与图1相同的特征,示出了作为辐照样品的初级离子源的离子枪(20)的更多细节。离子枪包括电离腔室(22)、透镜系统(24)、任选的准直器系统(26)、将离子束聚焦于样品表面上的小点的聚焦光学器件(28)和扫描在整个样品中的离子点的光栅电极板(30)。初级离子束电离元素标签或所关注的天然较重元素并且使得它们从表面发射。可以替代地使用激光消融(LA)或激光等离子体电离(LPI),优选在高能量密度 >1 焦耳/ cm^2 – 10 焦耳/ cm^2 下以促进分子键的解离和元素离子的释放。对连续初级束(离子或激光束)进行扫描比对样品支架进行机械移动能够使样品更快地成像。通常,通过在 $0.5\times 0.5\text{mm}$ 或 $1\times 1\text{mm}$ 面积上偏转板光栅化的组合可以与在更大距离上(例如 $50\times 100\text{mm}$ 或 $100\times 200\text{mm}$)的机械光栅化组合。

[0112] 一般来说,在 $1\mu\text{m}$ 点中产生高达 100nA 的连续高强度的初级离子束(36)。举例来说,合适的离子来源为使用RF气相离子来源产生的氧离子束,如在N.S.Smith,表面活性剂科学应用(Appl.Surf.Science),255(2008)1606–1609中所描述的。这在容纳样品的腔室中在 10^{-5} 毫巴至 10^{-2} 毫巴的中间真空压力下由包含元素标签的样品表面产生次级离子(38),因此相比于典型的SIMS仪器,减少了对样品干化和传递时间的任何需求。一般来说,在容纳样品的腔室中在 10^{-5} 毫巴至 10^{-2} 毫巴的中间真空压力下产生通过SIMS或LPI由样品产生的离子。

[0113] 产生的离子(38)(在使用初级离子辐照样品的情况下的次级离子)通过在高压(通常 $>10^{-2}$ 毫巴)下的短充气射频(RF)驱动离子导向器或碰撞池(40)加速,其中所有低于标签(或其氧化物)的质量范围的 m/z 的离子被除去。当离子穿过该导向器时,还减少了离子束的发射率。RF离子导向器通常包含多极,如定位于充气壳体(44)中的四极(42)。在RF离子导向器或碰撞池中的此类高压(不同于US 7,910,882)允许用于任选的反应气体(特别是氧化气体,如例如 NO 、 O_2)的离子导向器中,以便基本上将大部分金属离子氧化成如本领域中已知的氧化物(参见例如G.Koyanagi,D.Bohme.物理化学期刊A(J.Phys.Chem.A),105(2001)8964–8968,S.Tanner,V.Baranov,D.Bandura,光谱化学学报B(Spectrochimica Acta B),

57(2002)1361-1452),并因此通过监测元素或标签的氧化物减小干扰并增加待并行分析的通道数。因此,在某些实施例中,离子导向器被配置为反应池。优选地,RF离子导向器具有DC梯度以加速并控制离子的输送。

[0114] 在穿过RF离子导向器(40)之后,使用如本领域中已知的高速、正交加速(OA)TOF-质谱仪(50)对元素标签或天然元素产生的离子(38)进行质量分析,但是优选在50kHz至100kHz重复率下操作(即,使得电离的样品的每个点(像素)存在多个MS扫描)。优选地,如图1所示,该TOF-MS具有如在WO 01/11660中描述的无网格正交加速器(52),例如如描述于US 6,940,066、US 6,864,479、US2013/264474或其它中的任一的单级离子反射镜(54)和包含电子倍增管的高动态范围检测器(56)。从而产生的离子(38)通过其 m/z 而分离并且如所示出的检测。TOF分析仪能够同时分析宽质量范围的离子。优选地,存在待分析(成像)的多种分析物元素。

[0115] 通过转向离子枪的(光栅)板或在激光情况下使用移动反射镜和/或通过移动样品工作台(例如在x方向和/或y方向上)实施对样品表面的扫描。通过使用更薄样品(例如3 μm 和更薄的组织切片厚度)和/或更强的初级离子束空间聚焦和减少的初级射束电流以减小空间电荷散焦,可以实现对于亚细胞和亚细胞器分辨率的更高空间分辨率。

[0116] 由于上述高的初级离子电流或大功率激光器的使用,来自所产生离子的次级离子电流可达到高达数百微微安(PA)(例如高达100微微安、200微微安、500微微安或1000微微安或更大),其中分析物元素(或标签)的离子构成显著比例的电流。这表示整个像素可以在仅1TOF MS脉冲中得到分析,使得在中一些应用(例如在大脑切片中分析铁)中采集速率接近 10^5 像素/秒。因此,可以在一分钟内分析整个载片,因此减少了每次分析的成本。可以产生适合于组织学图像的 500×500 像素或更大的图像。该图像可以是样品的 $500 \times 500 \mu\text{m}$ 视场(例如具有 $1 \mu\text{m}$ 的像素尺寸)。相比于加标签样品的传统荧光检测,本发明的方法提供等于高达几十至一百种颜色或通道和在与单色测量相当的速度下的读数。

[0117] 从以上描述和图1中可以看出,可以使用多个优选的成像布置以使在反应或氧化样品中的元素成像。在一个布置中,可以使用激光等离子体电离以产生来自样品的离子,所述离子被导致进入下游反应池(其中所产生离子的组成和发射率被改变,优选地朝向更小改变)并且其后进入质量分析仪,优选TOF质量分析仪。激光等离子体电离可以在整个样品中扫描以使得能够获得样品的元素图像。在另一布置中,可以使用SIMS系统,其中使用初级离子束以产生来自样品的次级离子,所述次级离子被导致进入下游反应池(其中所产生离子的组成和发射率被改变,优选朝向更小改变)并且其后进入质量分析仪,优选TOF质量分析仪。初级离子束可以在整个样品中扫描以使得能够获得样品的元素图像。

[0118] 由于在如本领域中已知的氧化表面上氧化分析物元素原子的存在而增加的离子产率,该描述的方法也可提供分析物元素检测方法的更高的绝对灵敏度。由于在真空条件下0.1%至1%的电离效率和低损耗输送,SIMS或LPI方法相对于例如LA/ICP-MS提供一个数量级的优点,由于在后者方法中的输送期间的高损失(通常,导致 1×10^4 至 1×10^5 倍损失)。另一方面,所提出的样品处理的方法也全部与LA/ICP-MS兼容,其中其还可减少样品污染和残留。

[0119] 分析的结果可以以模拟或定量方式(例如以浓度形式测定存在多少元素或标签,优选考虑基质效应)或以数位或定性方式(例如测定是否存在元素或标签)呈现。结果可以

通过软件汇编成图像,例如元素分布的图像(并因此汇编成其中元素加标签成样品中的靶标的靶标分布)。

[0120] 作为应用本发明的工作流程的实例,给出以下步骤:

[0121] 1)制备样品,例如组织样品,

[0122] 2)用光通过光催化和/或用化学氧化剂氧化样品以去除几乎所有的有机基质;

[0123] 3)通过具有0.5 μm 至10 μm 的空间分辨率、具有使样品分解为以离子形式从表面释放的构成元素的此类强度的连续电流离子枪或聚焦激光脉冲辐照所氧化的样品表面;辐照点在期望分析的样品表面的区域中扫描;

[0124] 4)对于各个和每个辐照点,使用质谱仪并行检测来自元素离子的信号(多通道检测);

[0125] 5)基于质谱信息测定在样品中元素空间分布的存在或不存在。

[0126] 根据以上描述可以做出对此类工作流程的改变,例如当用作元素标签时,元素分布可以用于代替对应的抗原。

[0127] 作为对以上描述的图2的SIMS成像分析仪的电离初级离子方法的替代方案,可以使用可在真空中用于质量-光谱分析的其它电离方法:如激光等离子体电离或激光消融以及激光后-电离。应注意的是,激光辐射可以替代地从载片的背面传送,因此利用其透明度并且简化光学系统。

[0128] 作为对由样品表面产生的离子的质量分析的替代方案,元素成像的其它(例如非破坏性)方法还可以用于元素标签的成像,例如:

[0129] -微X射线荧光(μXRF),其允许在大气压条件下分析,优选其中多元件检测器用于允许并行化检测

[0130] -X射线光电子光谱(XPS)

[0131] -电子微探针分析仪(EMPA),特别是当与电子显微镜整合时

[0132] -次级电子光谱(SES)

[0133] -能量分散的X射线微量分析,优选使用硅漂移检测器

[0134] 元素成像技术中的任一个可以与样品成像的其它模式(例如光学成像)组合。此类光学成像可以用作内标用于改进样品的定量。

[0135] 从以上描述可以看出,可以发现本发明包含提供具有(生物-)有机样品薄层的基底或表面,所述(生物-)有机样品经受将有机基质(例如C、H、N、O、S)转化为挥发性物质的氧化过程,所述挥发性物质进入气相并主要留下具体来说以氧化形式的在样品中的较重无机元素。通过质谱或真空中的其它技术对所得样品进行剩余较重元素的高速成像分析,以便测量样品中元素的空间分布。

[0136] 在实施例中,本发明能够实现元素成像质谱仪(其能够传送与高度多重样品组合的亚细胞横向分辨率)在每次分析的更高的生产量和低成本下读取。本发明优选基于在真空中的次级离子或激光等离子体质谱分析以及飞行时间质量分析(图1)。

[0137] 本发明可广泛应用于现今高速增长的市场,如:

[0138] -组织成像,例如如应用于解剖病理学,癌症;

[0139] -基于微阵列的靶向分析,用于已知临床上相关的疾病生物标记或生物标记组并且用于生命科学研究和开发;

[0140] -高含量细胞筛选；

[0141] -高通量医药和临床分析；

[0142] -细菌鉴定和抗生素易感性测试。

[0143] 应了解,可以对本发明的上述实施例作出变化,但这些变化仍落入本发明的范围内。除非以其他方式规定,否则本说明书中所披露的各特征可被用于相同、等效或类似目的的替代性特征替换。因此,除非另外说明,否则所披露的每个特征仅是一系列通用等效或类似特征的一个实例。

[0144] 本文中提供的任何和所有实例或示范性语言(“举例来说”、“如”、“例如”以及类似语言)的使用预期仅更好地展示本发明,并且除非另外要求,否则并不指示本发明的范围上的限制。本说明书中的语言不应被解释为表示任何未提出权利要求的元素对于本发明的实施是必不可少的。

[0145] 如在本文中(包括在权利要求书中)所用,除非上下文另外指示,否则在本文中术语的单数形式应理解为包括复数形式,反之亦然。举例来说,除非上下文另外指示,否则本文中(包括在权利要求书中)的单数引用,如“一个(a)”或“一个(an)”意指“一个或多个”。

[0146] 贯穿本发明的说明书及权利要求书,词“包括”、“包含”、“具有”及“含有”以及这些词的变型(例如“包括(comprising)”及“包括(comprises)”等)意指“包含但不限于”,且并不旨在(且并不)排除其他组件。

[0147] 本说明书中所描述的任何步骤可按任何次序执行或同时执行,除非另外规定或上下文另外要求。

[0148] 本说明书中所披露的全部特征可以任何组合形式组合,但此些特征和/或步骤中的至少一些会互斥的组合除外。具体地说,本发明的优选的特征适用于本发明的所有方面且可以任何组合形式使用。同样,可单独地使用(不以组合形式)以非必需组合形式描述的特征。

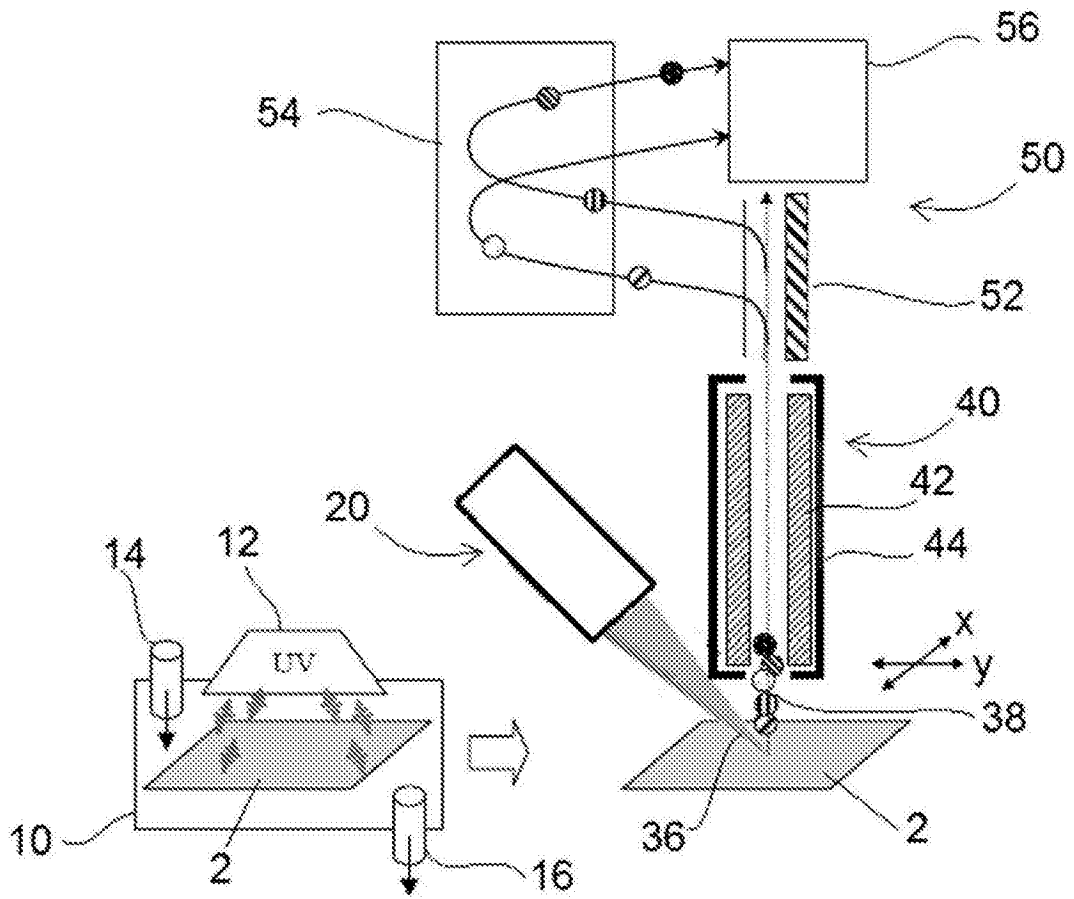


图1

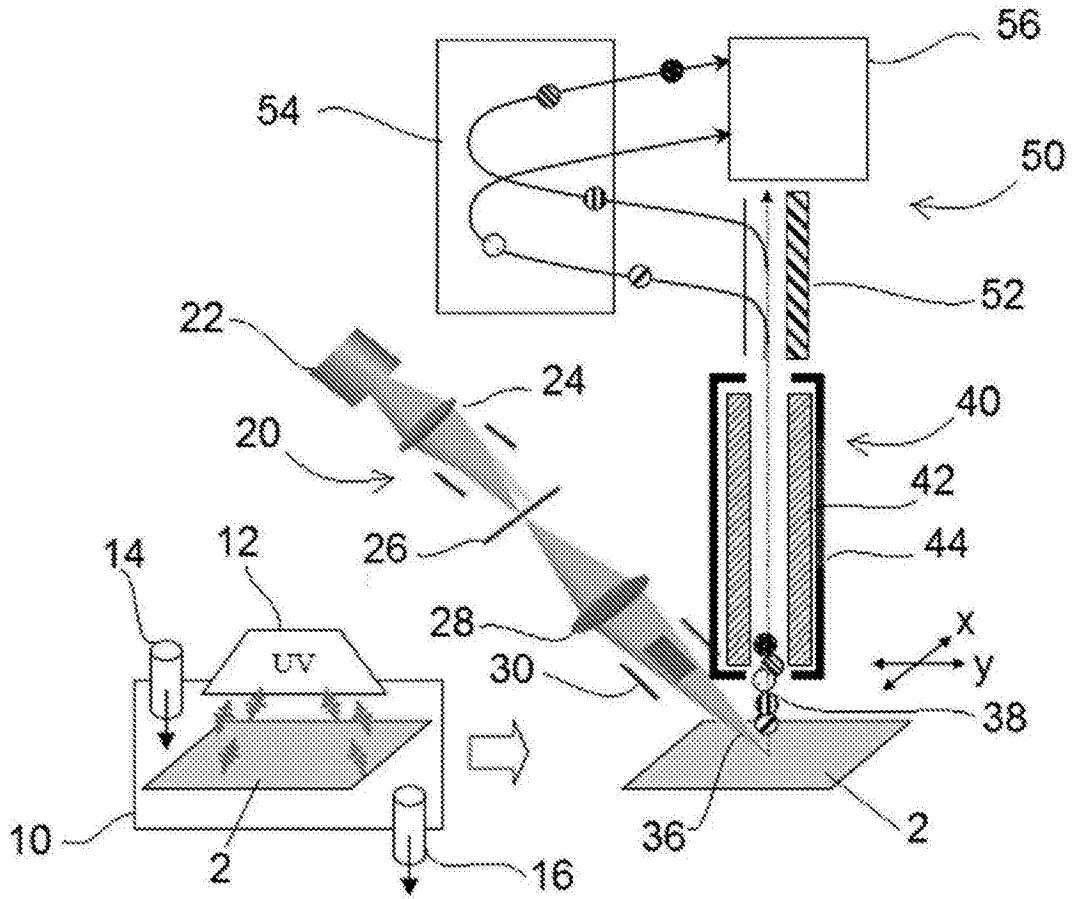


图2

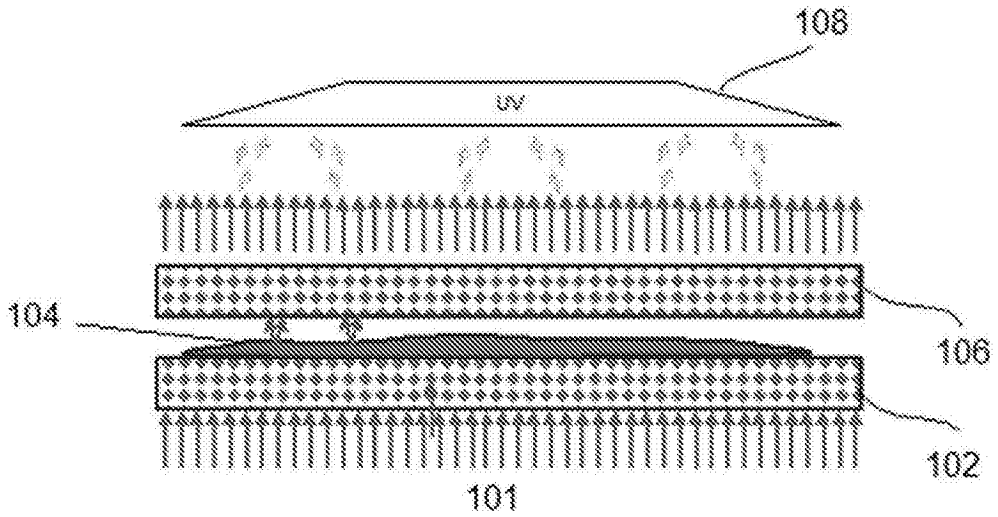


图3