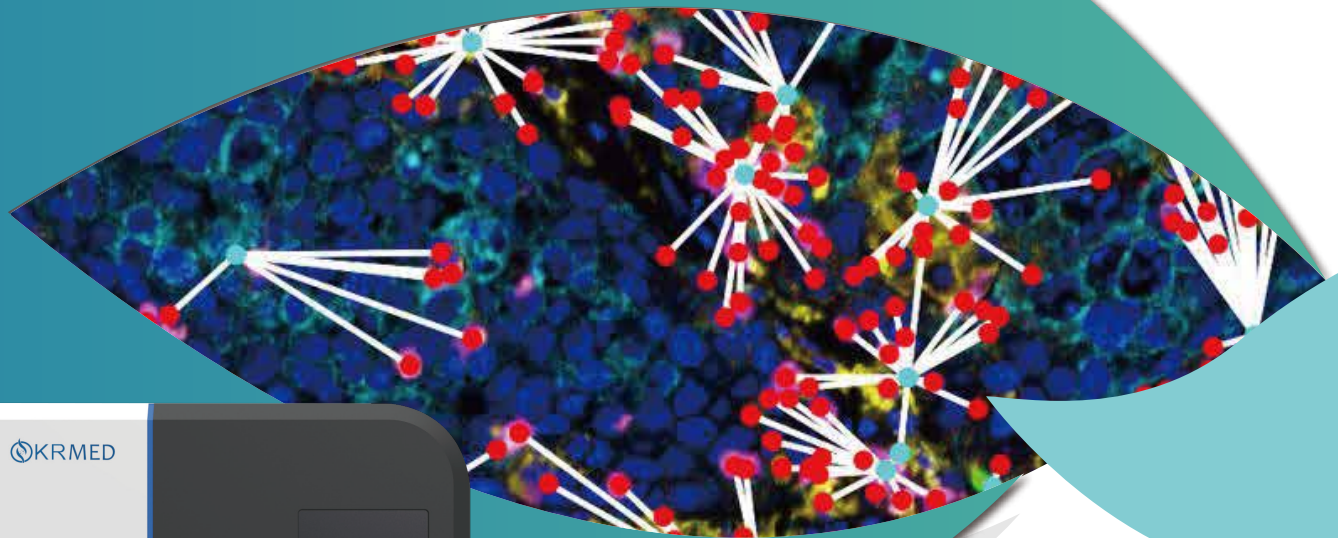




上海伯豪生物技术有限公司  
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

# 多重荧光免疫组化 ( mIHC )

赋能时空组学科学研究



伯豪生物官网

伯豪生物公众号

服务科技创新 护航人类健康

# 技术背景

## mIHC概念

多重荧光免疫组化技术(mIHC)，可以在一张FFPE组织切片中进行多种标志物染色，同时对多个生物组织样本的细胞进行平行检测，并统计各个组织区域中细胞类型，密度，空间位置关系等信息。

## mIHC一体化解决方案

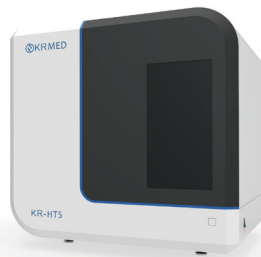
依托于 阔然自研 Krast 自动染色机、KR-HT5 扫描仪，可以根据不同生物组织样本进行检测方案定制，对客户已有的多组学数据得到的靶标基因进行验证，实现3-9色的高通量免疫荧光定量分析。伯豪生物整体解决方案，全流程产品已获医疗器械备案或注册证，满足科研探索+临床检测。



Kreep® 多标免疫荧光试剂盒  
Krast® 全自动mIHC染色平台

### 染色

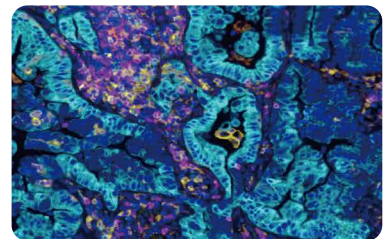
解决一抗抗体来源冲突的问题



KR-HT5®  
全自动定量病理成像系统

### 成像

解决重叠信号串色干扰的问题



病理图像分析系统

### 分析

解决定量分析标准化的问题

## mIHC赋能多组学研究

### mIHC 赋能多组学研究

微生物组学	单细胞测序	空间转录组测序	蛋白质组学
16S rDNA	单细胞RNA测序	10X visium	SomaLogic
18SrDNA	单细胞DNA测序	Nanostring	Olink
ITS	单细胞DNA甲基化测序	Xenium	Label free
宏基因组测序	单细胞ATAC测序		DIA
	单细胞TCR/BCR		DDA
			...

## TSA 技术原理

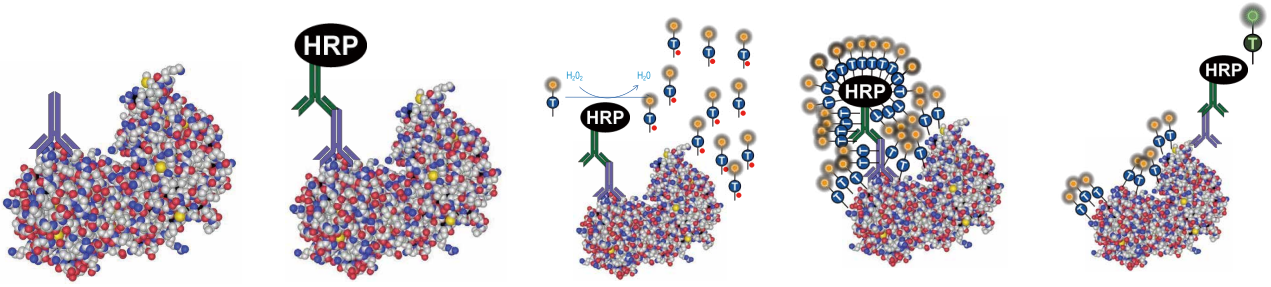
一抗孵育

引入HRP标记的二抗

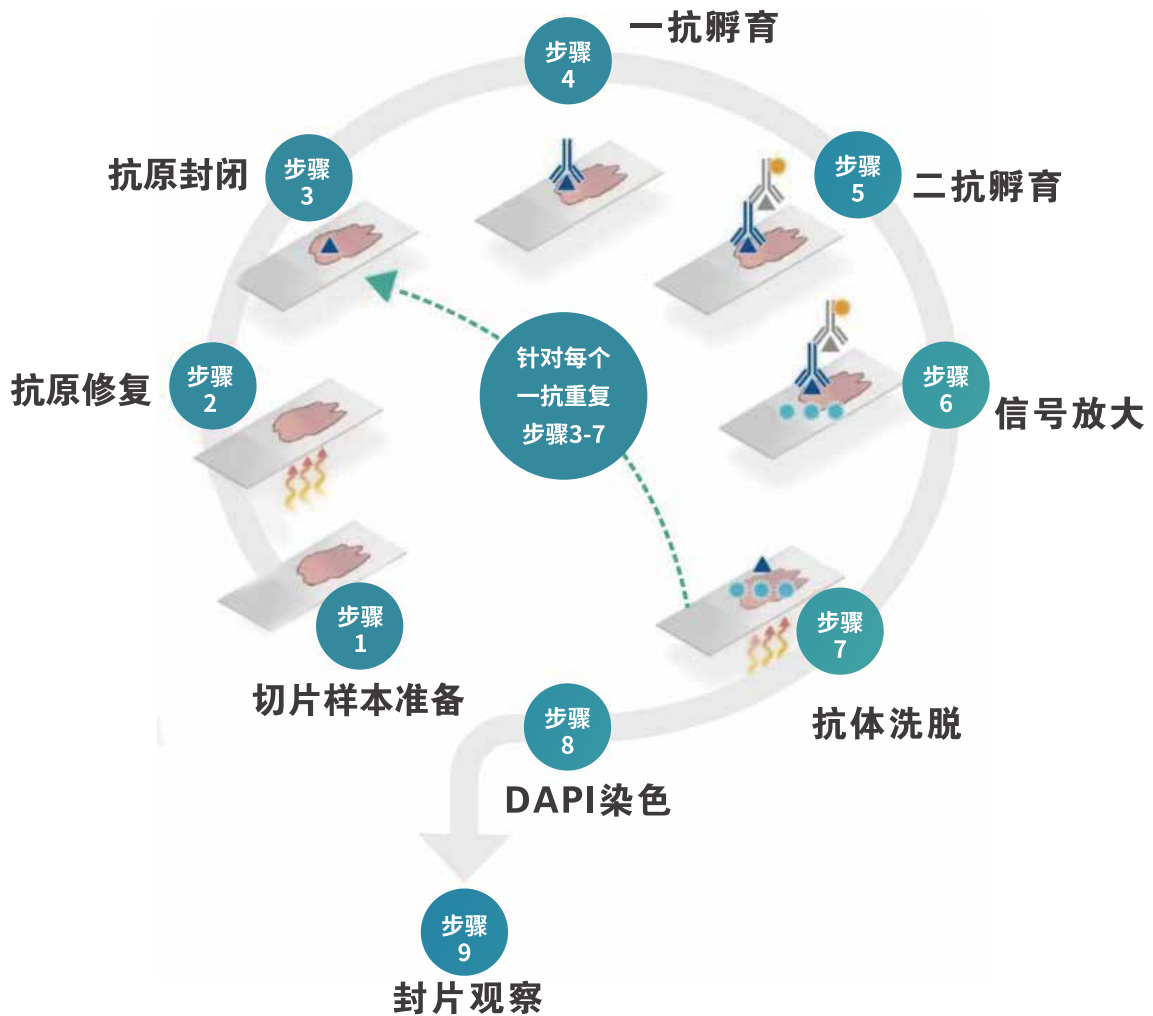
HRP活化TSA

信号放大

去除上一轮染色抗体

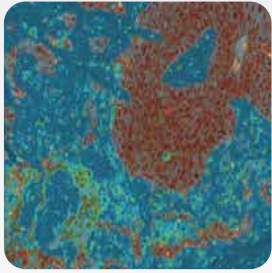


## 染色流程

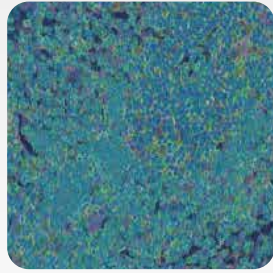


# 分析

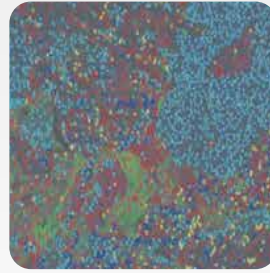
## 分析流程



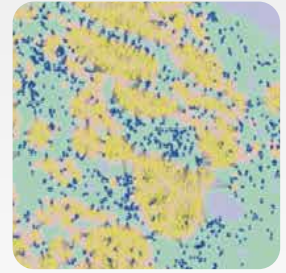
组织分割



细胞分割



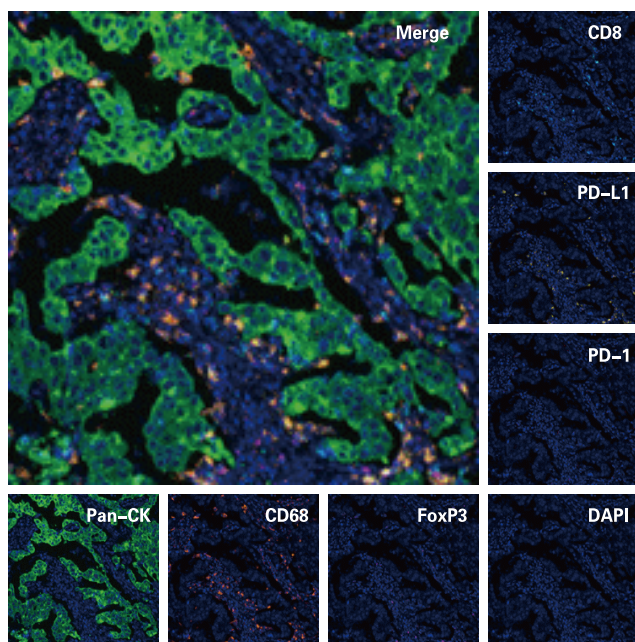
细胞分型



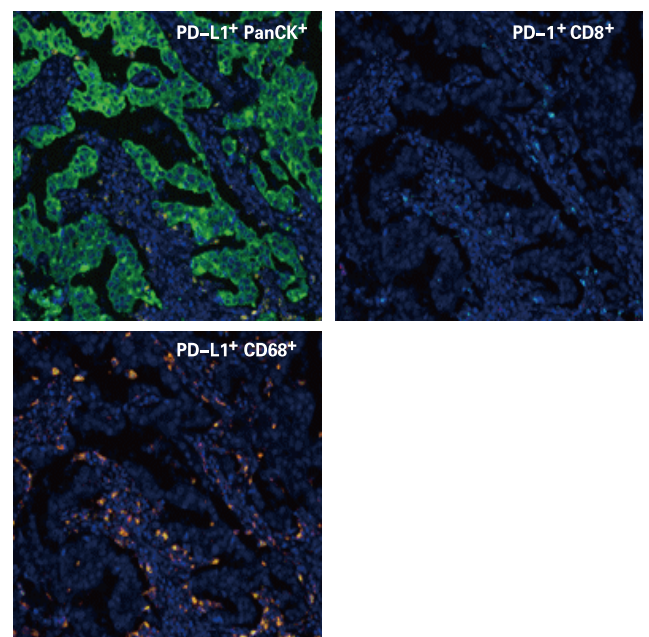
数据分析

## 基础分析结果

### 1、多靶标Merge及拆分图像



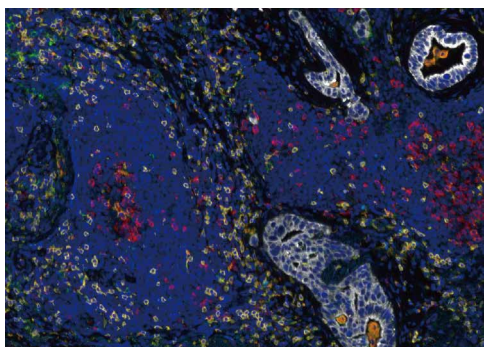
### 2、指定双阳共表达的结果



## 3、组织区域划分及细胞数/密度/百分比统计分析

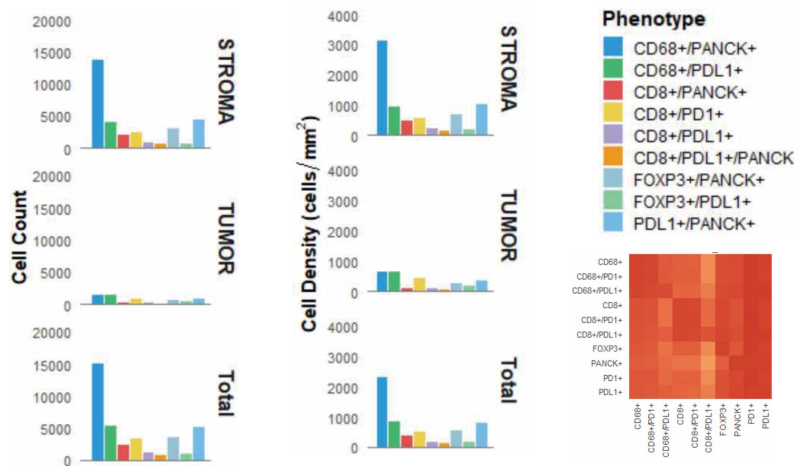
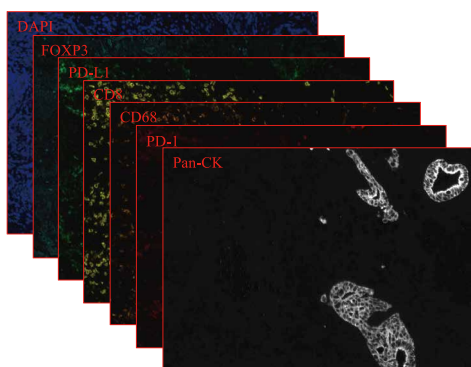
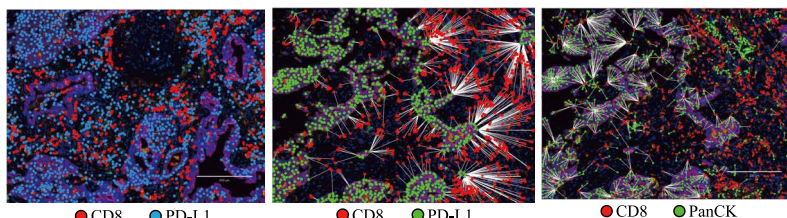
检测目标	肿瘤区		间质区		
	检测细胞	密度(个数/mm <sup>2</sup> )	%	密度(个数/mm <sup>2</sup> )	%
CD8 <sup>+</sup> T 细胞		27	0.82	124	2.18
PD-L1 <sup>+</sup> 细胞		125	3.8	132	2.02
PD1 <sup>+</sup> 细胞		27	0.8	227	3.48
CD68 <sup>+</sup> 细胞		50	1.49	355	5.44
FoxP3 <sup>+</sup> 细胞		3	0.08	76	1.16
PD-1 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> 细胞		1	0.04	12	0.19
PD-L1 <sup>+</sup> CD68 <sup>+</sup> 细胞		42	1.29	89	1.37
PD-L1 <sup>+</sup> PanCK <sup>+</sup> 细胞		55	1.62	3	0.05
DAPI (总细胞)		3394		6524	

## 高级分析结果



### 细胞表型

### 不同细胞之间的空间距离



单通道图片

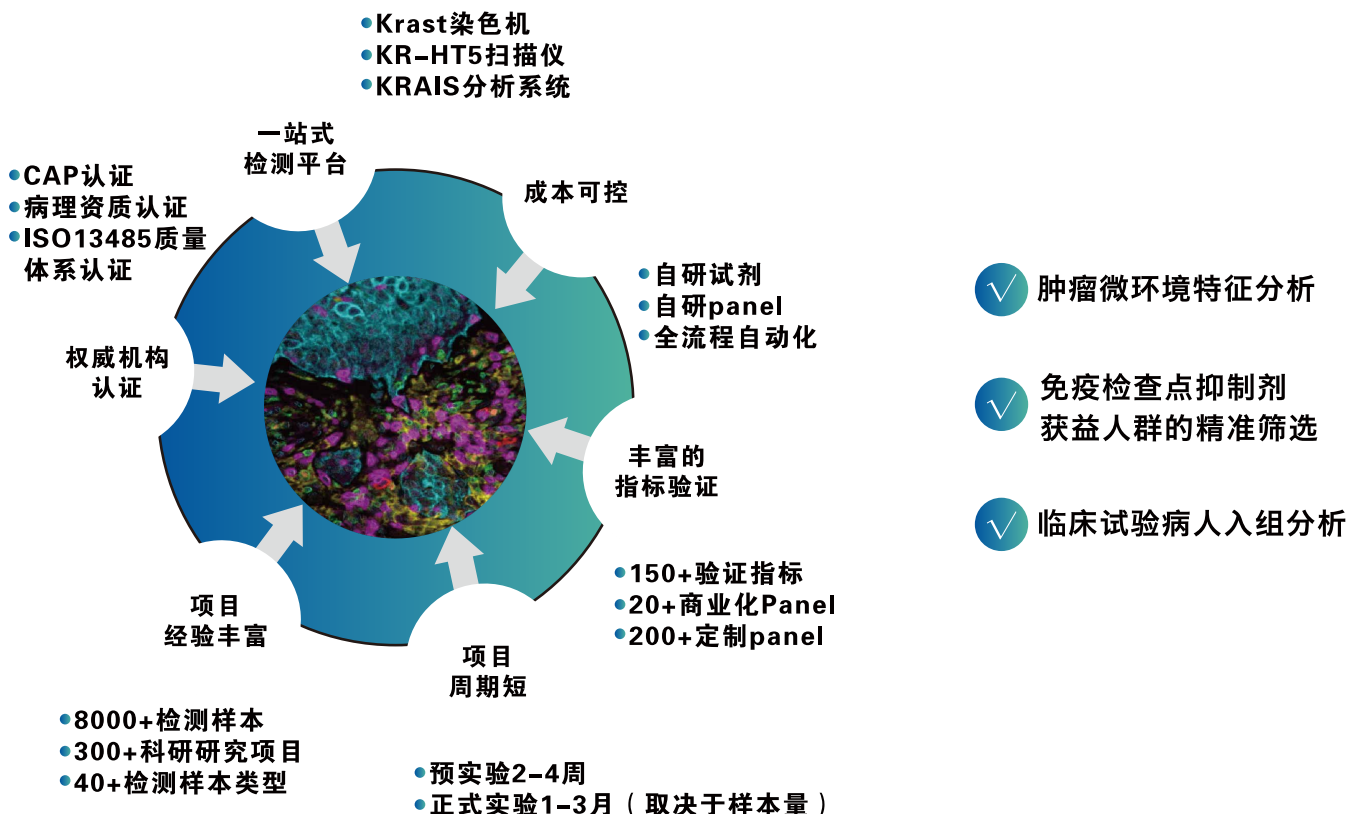
细胞计数

细胞密度统计

细胞距离热图

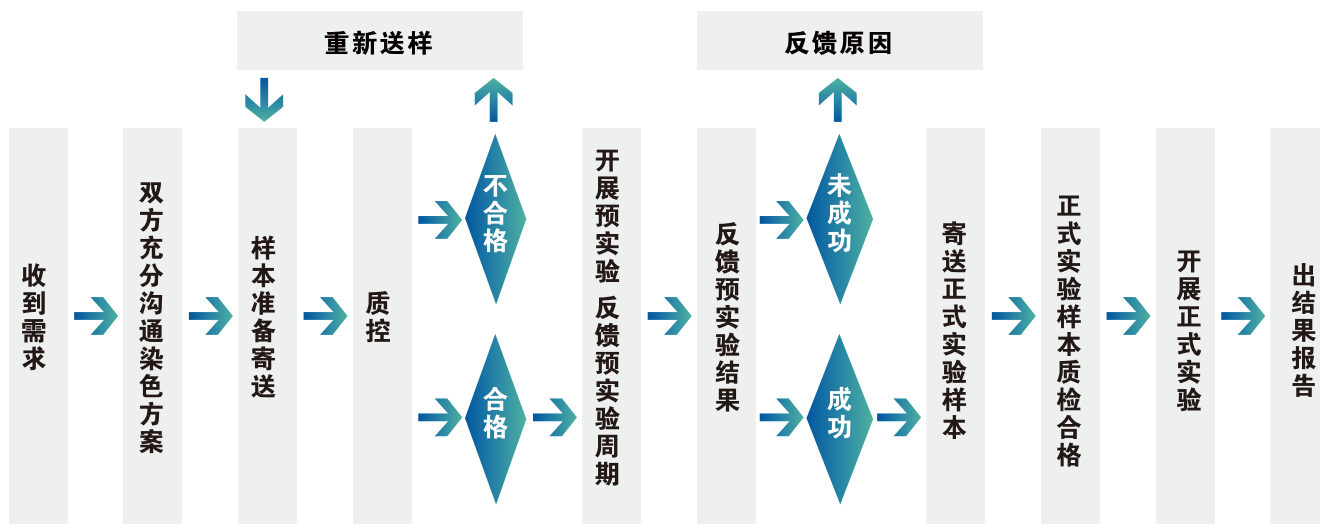
# 产品优势

## 产品优势



## 实验流程及送样要求

### 1、实验流程



## 2、送样要求



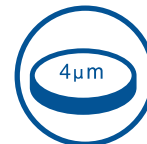
样本类型：蜡块、石蜡切片、新鲜样本



建议组织样本应在离体后（半小时内）尽快固定



使用防脱载玻片



切片厚度为4 µ m



组织无褶皱、破损、刮伤、污渍



红细胞 < 20%  
坏死 < 20%



样本位置：  
玻片正面、中央



组织须有  
客户关注的区域

☆ 固定液为组织体积的 15 倍至 20 倍的10% 福尔马林来固定组织

## mIHC检测方案

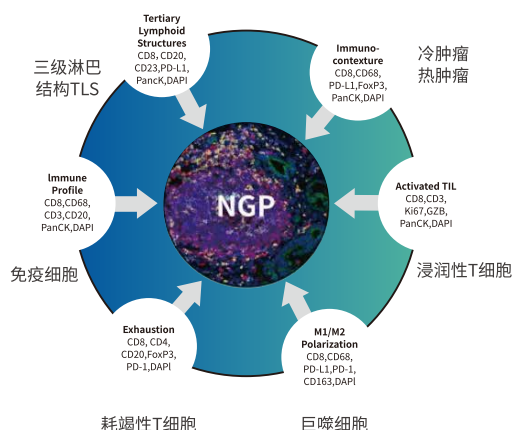
产品名称	检测方案	产品名称	检测方案
NGP-TLS	CD8、PD-L1、CD20、CD23、PanCK、DAPI	TME-B	CD68、CD56、PanCK、CD8、PD-1、PD-L1、DAPI
KRmIHC-5	PD-L1、PD-1、CD8、PanCK、DAPI	TME-C	PanCK、PD-1、CD163、PD-L1、CD68、CD8、DAPI
KRmIHC-7	PD-L1、PD-1、CD8、CD68、PanCK、Foxp3、DAPI	TME-D	CD56、CD4、PanCK、CD20、CD3、FoxP3、DAPI
TME-TAM	PD-L1、CD68、CD163、CD86、PanCK、DAPI	TME-E	Ki67、CD4、GZMB、FoxP3、CD8、PanCK、DAPI
TME-CTL	PD-L1、CD8、GZMB、IFNG、PanCK、DAPI	TME-F	CD68、CD20、CD163、PanCK、DAPI
TME-Tex	PD-1、PD-L1、CD8、CTLA-4、TIM3、PanCK、DAPI	Mac	CD68、PanCK、CD163、PD-L1、DAPI
TME-A	CD68、CD3、PanCK、CD20、Ki67、DAPI	NK	CD56、PanCK、CD16、GZMB、CD3、DAPI
mIHC-7	PD-1、PD-L1、CD68、CD3、PanCK、DAPI	EX-TC	CD8、TIM3、PanCK、PD1、DAPI

### 个性化定制方案

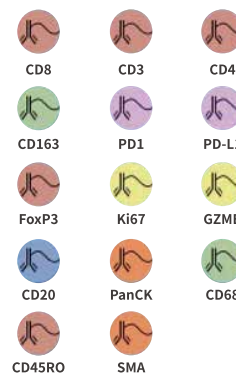
### 可行性评估

### 预实验：定制Panel开发

### 正式实验



#### Options for Customization



## 应用场景一：单细胞+mIHC

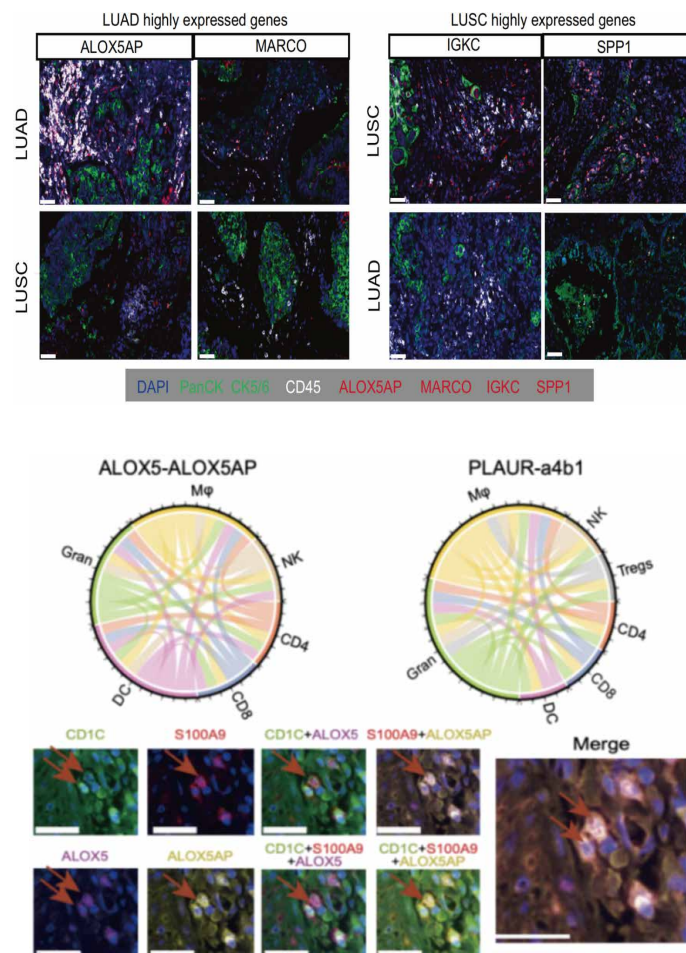
## The heterogeneous immune landscape between lung adenocarcinoma and squamous carcinoma revealed by single-cell RNA

发表期刊： Signal Transduction and Targeted Therapy sequencing

影响因子： IF=38.104

发表时间： 2022年8月

2022年8月，四川大学华西医院李为民教授团队通过单细胞转录组测序剖析了LUAD和LUSC之间免疫景观的异质性，应用基因差异表达分析得出不同肺癌亚型中免疫特征的共性和差异，并揭示免疫细胞在微环境中的作用，使用单细胞调控网络推断和聚类分析了基因调控的免疫异质性并证实了巨噬细胞(M $\phi$ )的作用，通过细胞间相互作用分析，构建了细胞相互作用网络图。



通过mIHC发现LUAD中的免疫调节信号相互作用比LUSC更丰富，经过数据分析，发现了一个新的亚群。为肿瘤微环境(TME)中肺癌临床工作流程的未来治疗靶点开发铺平道路。

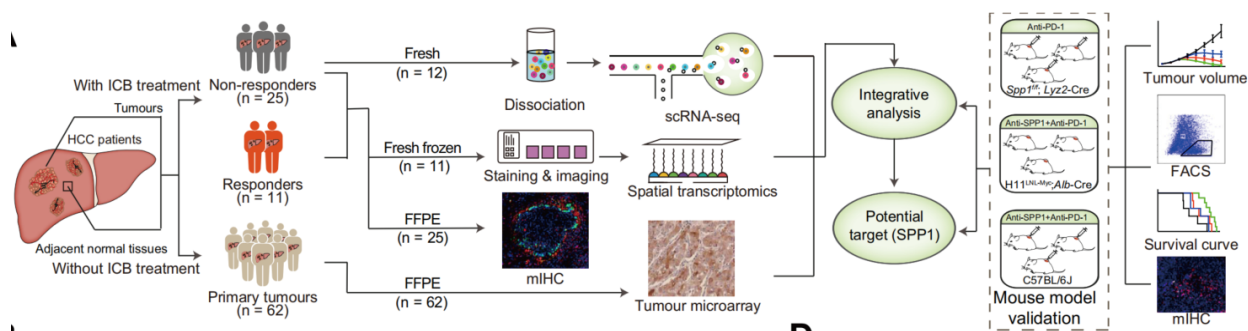
## 应用场景二：单细胞+空间转录组+ mIHC

Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy

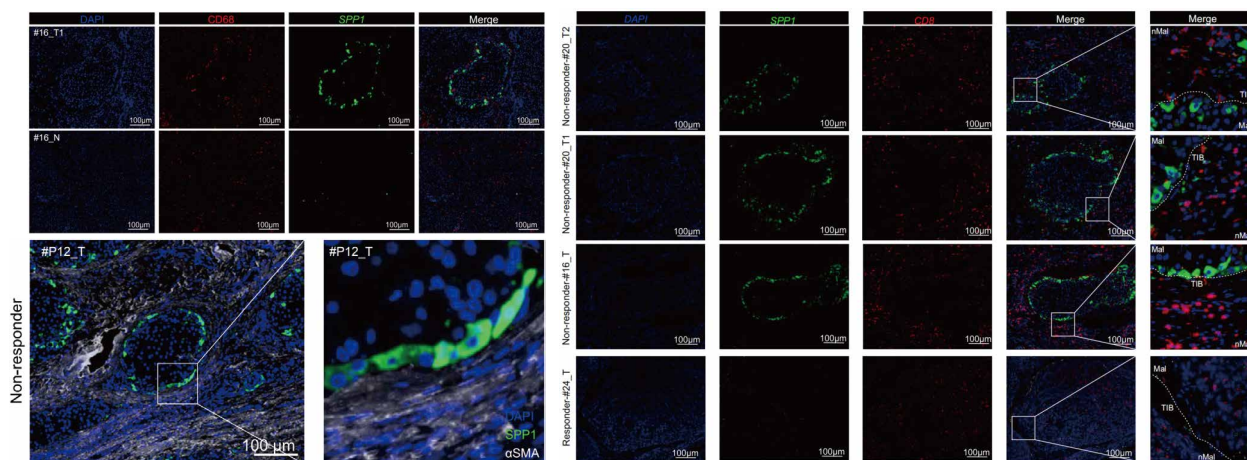
发表期刊： Journal of Hepatology

影响因子： IF=30

发表时间： 2023年



研究人员将空间转录组学(ST)，单细胞RNA测序(scRNA-seq)和抗PD-1治疗的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者的多重荧光免疫组化结合起来，揭示了与免疫治疗疗效相关的TME中的特定空间结构。研究结果揭示了肿瘤免疫屏障(tumour immune barrier, TIB)结构，这是一个由位于肿瘤边界附近的SPP1+巨噬细胞和癌症相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAFs)组成的空间生态位，与免疫检查点封锁(immune checkpoint blockade, ICB)治疗的有效性有关。



通过mIHC的染色结果显示 免疫治疗无响应的患者肿瘤周围存在TIB结构，进而对免疫疗效进行更加精准的评估。

## 应用场景三：蛋白质组(OLINK)+mIHC

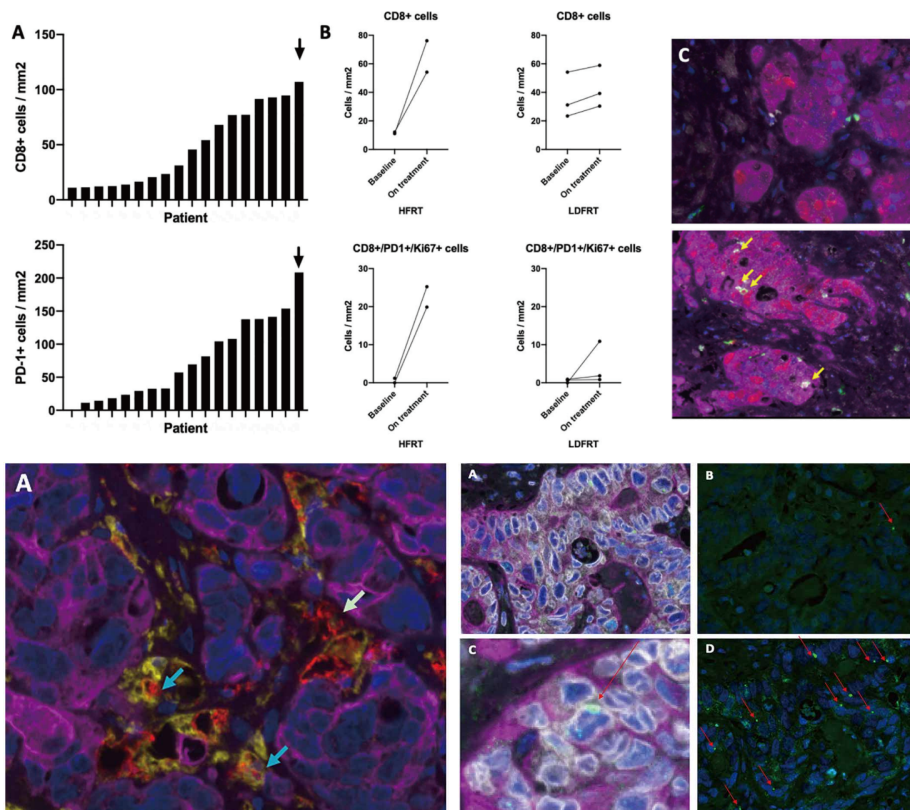
A randomized trial of combined PD-L1 and CTLA-4 inhibition with targeted low-dose or Hypofractionated radiation for patients with metastatic colorectal cancer

发表期刊: Clinical cancer research

影响因子: IF=11.5

发表时间: 2021年

该文章进行了一项多中心II期研究，将转移性微卫星稳定的结直肠癌患者随机分配到不同的辐射剂量治疗组（重复低剂量分次照射法（LDFRT）或低分次照射法（HFRT））中，并伴随PD-L1 / CTLA-4抑制剂治疗，主要终点是放疗区域外的响应。研究中使用了多种研究方法，包括多重荧光免疫组化（mIHC），Olink（肿瘤-免疫Panel 和炎症Panel）进行细胞相关样品的分析。特别是结合Olink高通量蛋白定量的功能和多重免疫荧光空间定位的功能，来检测治疗过程中循环系统和肿瘤微环境的变化。



通过mIHC，作者发现在经过HFRT治疗的患者，其CD8<sup>+</sup>单阳和CD8<sup>+</sup> / PD-1<sup>+</sup> / Ki-67<sup>+</sup>三阳性细胞的数量有了显著提升，其巨噬细胞中M1/M2的比值都出现了下降，而经过LDFRT治疗的3位患者其对应M1/M2比值都出现了上升。利用Olink联合多重荧光免疫组化对于肿瘤微环境在治疗前后的变化做了更全面的评估，结合可以更好的为疗效评估服务。

## 应用场景四：宏基因组+mIHC

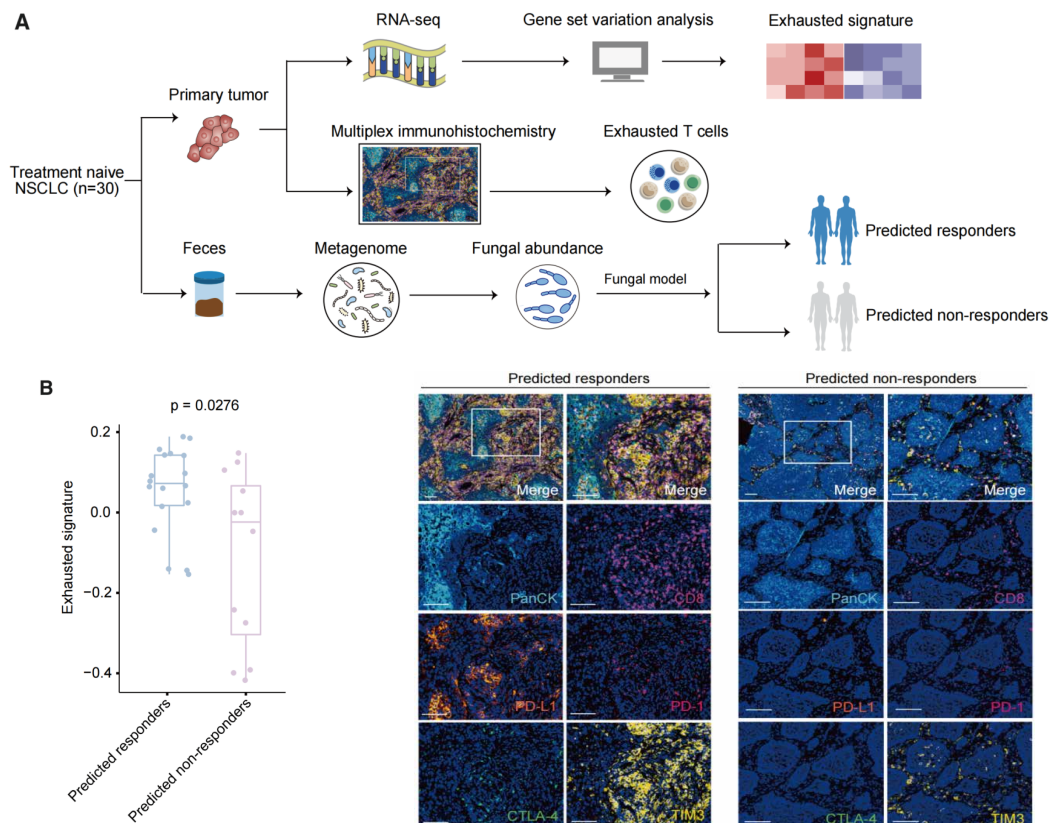
### Multi-kingdom gut microbiota analyses define bacterial-fungal interplay and microbial markers of pan-cancer immunotherapy across cohorts

发表期刊： cell host & microbe

影响因子： IF=31.316

发表时间： 2023年11月

2023年11月8日，上海交通大学医学院附属仁济医院消化科陈豪燕教授团队在著名学术期刊（Cell Host & Microbe, IF=30.3）在线发表了一项重要的研究成果。这项研究首次揭示了肠道真菌谱的构成对于预测肿瘤免疫治疗的疗效具有关键作用。通过构建随机森林模型，研究人员能够相对准确地预测肿瘤患者对免疫检查点抑制剂的应答情况，而真菌表现出更优异的预测效能，甚至超过了细菌。此外，当结合细菌和真菌的标志物进行预测时，效果最佳。研究发现，在接受ICI治疗之前，与PD-1阻断非应答者相比，PD-1阻断应答者通常表现出较高水平的耗竭型CD8 T细胞，且这些细胞表达较高水平的PD-1和/或CTLA-4。



通过mIHC，发现真菌标记预测的响应者比非响应者表达更高的耗竭标志物（PD-1，PD-L1，CTLA-4和TIM-3），肿瘤微环境的免疫特征与已发表文献结论一致，进一步证实真菌是ICI反应的强力预测因子。



---

上海伯豪生物技术有限公司

上海微距阵生物技术有限公司

地址:上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路999号1号楼

电话 :400-820-3699

邮箱:market@shbio.com

官网:www.shbio.com