



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108350486 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201680054038.4

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22) 申请日 2016.07.15

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 梁谋 罗文锋

申请公布号 CN 108350486 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2018.07.31

C12Q 1/6816 (2018.01)

(30) 优先权数据

(56) 对比文件

62/193809 2015.07.17 US

US 2008/0038734 A1, 2008.02.14

62/261657 2015.12.01 US

US 2011/245111 A1, 2011.10.06

62/277289 2016.01.11 US

WO 2014/200767 A1, 2014.12.18

62/323023 2016.04.15 US

WO 2015/128272 A2, 2015.09.03

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

US 2011/151451 A1, 2011.06.23

2018.03.16

Gary K Geiss等. Direct multiplexed

(86) PCT国际申请的申请数据

measurement of gene expression with

PCT/US2016/042460 2016.07.15

color-coded probe pairs.《NATURE

(87) PCT国际申请的公布数据

BIOTECHNOLOGY》.2008, 317-325.

W02017/015099 EN 2017.01.26

Gwendoline Thiery-Lavenant等. Targeted

(73) 专利权人 纳米线科技公司

Multiplex Imaging Mass Spectrometry in

地址 美国华盛顿州

Transmission Geometry for Subcellular

(72) 发明人 J.M.贝彻姆 C.沃伦 C.梅里特

Spatial Resolution.《J. Am. Soc. Mass

J.姜 D.L.杜纳维 S.克劳德

Spectrom》.2013, 609-614.

K.索尔格

Nicola Crosetto等. Spatially resolved

transcriptomics and beyond.《Nature

Reviews Genetics》.2015, 57-66.

审查员 李佳栋

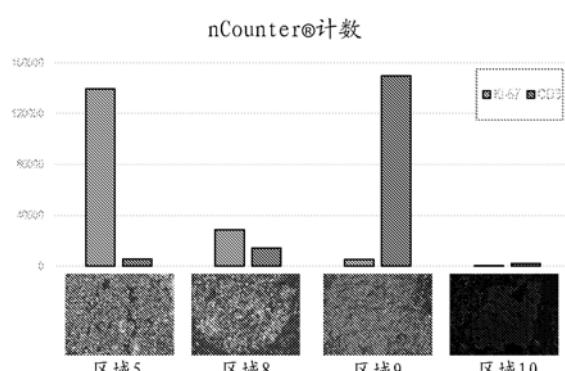
权利要求书3页 说明书21页 附图41页

(54) 发明名称

在横切面组织的用户定义区域中的基因表达的同时定量

(57) 摘要

本发明尤其涉及探针、组合物、方法和试剂盒，其用于同时、多重检测和定量用户定义的组织区域、用户定义的细胞，和/或用户定义的细胞内亚细胞结构中的蛋白和/或核酸表达。



1. 一种方法, 其包括:

(1) 使在组织样品中的至少一个核酸靶标与至少一种探针接触, 所述探针包含靶结合结构域、信号寡核苷酸和位于所述靶结合结构域和所述信号寡核苷酸之间的光可切割的基序;

(2) 用足以释放所述信号寡核苷酸的光照射所述组织样品的特定位置;

(3) 通过用毛细管抽吸直接在被照射的位置上方的溶液收集释放的信号寡核苷酸; 和

(4) 确定所述释放的信号寡核苷酸, 从而检测在被照射的所述组织样品的特定位置中的至少一个核酸靶标。

2. 权利要求1的方法, 其中检测包括测定所述至少一个核酸靶标的特征和丰度。

3. 权利要求2的方法, 其中所述至少一个核酸靶标包括至少两个不同的核酸靶标或相同核酸靶标的至少两个拷贝。

4. 权利要求3的方法, 其中检测包括比较每个不同核酸靶标的丰度。

5. 权利要求1的方法, 其进一步包括在所述组织样品的至少第二特定位置重复至少步骤(2) - (4)。

6. 权利要求5的方法, 其中检测包括将所述特定位置中的所述至少一个核酸靶标的丰度, 与至少第二特定位置中的所述至少一个靶标的丰度进行比较。

7. 权利要求6的方法, 其中所述特定位置和所述至少第二特定位置包含相同的细胞类型。

8. 权利要求6的方法, 其中所述特定位置和所述至少第二特定位置包含不同的细胞类型。

9. 权利要求7或权利要求8的方法, 其中所述细胞类型独立地选自正常细胞和异常细胞。

10. 权利要求1-8中任一项的方法, 其中将所述组织样品直接固定至表面, 或间接固定至所述表面。

11. 权利要求10的方法, 其中所述组织样品是厚2至1000 μm的组织切片。

12. 权利要求11的方法, 其中所述组织切片从福尔马林-固定的石蜡包埋(FFPE)样品获得。

13. 权利要求1-8的任一项的方法, 其中所述组织样品包含至少一个细胞, 其中所述至少一个细胞是培养的细胞、原代细胞或来自外植体的离散细胞。

14. 权利要求1的方法, 其中所述组织样品是固定或未固定的。

15. 权利要求1-8中任一项的方法, 其中所述组织样品在步骤(2)之前被染色或标记, 从而允许所述染色或标记的组织样品中的亚细胞、细胞或组织相关的结构可视化。

16. 权利要求1-8中任一项的方法, 其中所述信号寡核苷酸是单链核酸或部分双链的核酸。

17. 权利要求1-8中任一项的方法, 其中使用负纯化以从释放的信号寡核苷酸除去完整的探针分子。

18. 权利要求17的方法, 其中所述负纯化包含亲和纯化, 其包括使完整探针接触与所述完整探针的一部分互补的固定的寡核苷酸, 或接触识别并结合所述完整探针的一部分的固定抗体或蛋白结合基序。

19. 权利要求18的方法,其中所述完整探针的靶标结合结构域包含通用纯化标签,或与固定的寡核苷酸部分互补或能够被固定的抗体或蛋白结合基序识别或结合的序列。

20. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述照射由选自以下的光源提供:弧光灯、激光、聚焦的UV光源和发光二极管(LED)。

21. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述照射照射所述组织样品的特定位置中的至少一个亚细胞结构。

22. 权利要求21的方法,其中检测包括测定所述组织样品的特定位置中的至少一个亚细胞结构中的至少一个核酸靶标的丰度。

23. 权利要求5-8中任一项的方法,其中所述照射由选自以下的光源提供:弧光灯、激光、聚焦的UV光源和发光二极管(LED),并且所述光源照射所述组织样品的特定位置中的至少一个亚细胞结构和所述组织样品的至少第二特定位置中的至少一个亚细胞结构。

24. 权利要求23的方法,其中检测包括将所述组织样品的特定位置中的至少一个亚细胞结构中的所述至少一个核酸靶标的丰度,与所述组织样品的至少第二特定位置中的至少一个亚细胞结构中的所述至少一个核酸靶标的丰度进行比较。

25. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述靶标结合结构域包含单链核酸或部分双链的核酸。

26. 权利要求1-8中任一项的方法,其中检测包括聚合酶反应、逆转录酶反应、与寡核苷酸微阵列的杂交、质谱、与荧光分子信标的杂交、测序反应或分子条码。

27. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述核酸靶标是DNA或RNA。

28. 权利要求27的方法,其中所述RNA是cRNA、mRNA或miRNA。

29. 权利要求27的方法,其中所述DNA是cDNA。

30. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述毛细管包含光学设备,其能够将光传送至所述组织样品的特定位置。

31. 权利要求30的方法,其中所述光是UV光。

32. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述直接在被照射的特定位置上方的溶液包含阴离子聚合物。

33. 权利要求1-8中任一项的方法,其中将收集的信号寡核苷酸添加至包含阴离子聚合物的溶液。

34. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述方法进一步包括使用激光扫描设备照射目标区域。

35. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述方法进一步包括使用数字微镜设备(DMD)照射目标区域。

36. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述方法提供样品的同时的空间分辨的DNA和/或RNA检测。

37. 权利要求1-8中任一项的方法,其中检测包括提供数字化读出,所述数字化读出包括> 5对数的线性动态范围。

38. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述组织样品连接到载片,并且首先使用荧光成像,并且随后数字化计数来自所述样品的核酸表达。

39. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述探针以5 nM或更低的浓度提供。

40. 权利要求39的方法,其中所述探针以1 nM或更低的浓度提供。
41. 权利要求40的方法,其中所述探针以0.4 nM或更低的浓度提供。
42. 权利要求41的方法,其中所述探针以0.2 nM或更低的浓度提供。
43. 权利要求32的方法,其中所述阴离子聚合物是硫酸葡聚糖或鲑鱼精DNA。
44. 权利要求33的方法,其中所述阴离子聚合物是硫酸葡聚糖或鲑鱼精DNA。

## 在横切面组织的用户定义区域中的基因表达的同时定量

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2015年7月17日提交的美国临时申请号62/193,809;于2015年12月1日提交的美国临时申请号62/261,657;于2016年1月11日提交的美国临时申请号62/277,289;和于2016年4月15日提交的美国临时申请号62/323,023的优先权和权益。上述各申请以其整体通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 标准免疫组织化学和原位杂交方法允许同时检测最多六至十个蛋白或核酸靶标，通常为三至四个靶标。在此存在对于探针、组合物、方法和试剂盒的需求，其用于同时、多重检测和定量用户定义的组织区域、用户定义的细胞，和/或用户定义的细胞内亚细胞结构中的蛋白和/或核酸表达。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明涉及探针、组合物、方法和试剂盒，其用于同时、多重检测和定量用户定义的组织区域、用户定义的细胞，和/或用户定义的细胞内亚细胞结构中的蛋白和/或核酸表达。

[0007] 本发明的一个方面涉及一种方法，其包括以下步骤：(1)使在组织样品中的至少一个细胞中或来自组织样品中的至少一个细胞的至少一个靶标与至少一种探针接触，所述探针包含靶标结合结构域和信号寡核苷酸；(2)向组织样品的位置提供力，足以释放所述信号寡核苷酸；和(3)收集并确定所释放的信号寡核苷酸，从而检测在被提供力的组织样品的特定位置中或来自被提供力的组织样品的特定位置的至少一个靶标。所述特定位置是用户定义的组织区域、用户定义的细胞，和/或用户定义的细胞内的亚细胞结构。所述靶标可以是核酸(例如mRNA和miRNA)和/或蛋白。所述靶标结合结构域可以是单链核酸，部分双链核酸，或蛋白结合分子，例如抗体、肽、适体和类肽。在实施方案中，检测两个或更多个靶标(即蛋白、核酸及其组合)。在实施方案中，检测3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个或更多个靶标，以及其中的任何数量，例如，可检测800个或更多个不同的靶标。在实施方案中，检测包括每个靶标的丰度的定量。

[0008] 在实施方案中，所述方法进一步包括在所述组织样品的至少第二特定位置重复至少步骤(2)和(3)，所述第二特定位置包含至少第二细胞。在实施方案中，检测包括将第一特定位置中或来自第一特定位置的所述至少一个靶标的丰度，与至少第二特定位置中或来自第二特定位置的所述至少一个靶标的丰度进行比较。所述至少一个细胞和至少第二细胞可以是相同的细胞类型或不同的细胞类型。在一些实施方案中，检测包含定量第一细胞类型中或来自第一细胞类型的，和第二细胞类型中或来自第二细胞类型的所述至少一个靶标的丰度。在实施方案中，所述第一和第二细胞类型独立地选自正常细胞和异常细胞，例如患病的和癌细胞。

[0009] 在实施方案中，将所述至少一个细胞直接固定至表面，或通过至少一个其他细胞间接固定至所述表面。组织样品可以是2至1000 μm厚的组织切片，例如从福尔马林-固定的

石蜡包埋(FFPE)样品或从未固定样品获得。所述至少一个细胞可以是固定的或未固定的。所述至少一个细胞可以在步骤(2)之前染色或标记,以允许在染色或标记的细胞中的亚细胞或细胞结构可视化。可选地,对于组织切片,可以在步骤(2)之前,将与接触探针的切片的临近切片染色或标记,从而允许评估与探针接触的切片中的对应细胞或附近细胞中的亚细胞、细胞或组织相关的结构。这种染色或标记技术是本领域中熟知的。

[0010] 在上述方面,至少一个探针进一步包括接头(例如可切割的接头),其位于靶标结合结构域和信号寡核苷酸之间。所述可切割的接头可以是光可切割的,其通过由适合的相干光源(例如,激光和UV光源)或适合的非相干光源(例如弧光灯和发光二极管(LED))提供的光而被切割。光源可以照射所述至少一个细胞的至少一个亚细胞结构,并且可以检测所述至少一个细胞的至少一个亚细胞结构中,或来自所述至少一个细胞的至少一个亚细胞结构的至少一个核酸靶标的丰度。同样,光源可以首先照射所述至少一个细胞的至少一个亚细胞结构,并且随后照射至少第二细胞中的至少一个亚细胞结构,允许将所述至少一个细胞的至少一个亚细胞结构中,或来自所述至少一个细胞的至少一个亚细胞结构的所述至少一个靶标的丰度,与至少第二细胞中的至少一个亚细胞结构中,或来自至少第二细胞中的至少一个亚细胞结构的所述至少一个靶标的丰度进行比较。

[0011] 在实施方案中,所述信号寡核苷酸是单链核酸或部分双链核酸。

[0012] 在实施方案中,所述样品可以是已经固定到载片上的培养细胞或分离细胞(固定或未固定的)。所述样品可以包含细胞(包括原代细胞和培养的细胞系)和/或组织(包括培养或外植的)。所述样品可以包含培养细胞、原代细胞或来自外植体的分离细胞。

[0013] 在实施方案中,照射小于视野的目标区域(例如单个细胞或细胞内的亚细胞结构)包括使用激光扫描设备(例如共焦)或数字显微镜设备(DMD)以引导光。

[0014] 在实施方案中,通过半胱氨酸生物缀合方法制备探针,其稳定,优选对于抗体的铰链区重链为位点特异性的。在实施方案中,探针可包含多个(即多于一个,例如2、3、4、5或更多个)标记的寡核苷酸/抗体。

[0015] 检测包括聚合酶反应、逆转录酶反应、与寡核苷酸微阵列的杂交、质谱、与荧光分子信标的杂交、测序反应,或nCounter<sup>®</sup>分子条码。在优选的实施方案中,使用nCounter<sup>®</sup>系统和来自NanoString Technologies<sup>®</sup>的方法。

[0016] 在实施方案中,通过液体层流、涡流或过渡流,从组织收集信号寡核苷酸。所述流可以经过在组织和放置在所述组织上的流体装置或不可渗透的屏障之间的,例如具有25至500 μm深度的通道。

[0017] 在实施方案中,从所述至少一个细胞的近端,例如至少紧临正上方处的溶液收集信号寡核苷酸。所述近端溶液可以通过抽吸,例如通过移液管、毛细管、微阵列针、包含孔的流动池,或本领域中已知的另一适合的抽吸系统,或其任意组合来收集。毛细管可以包含光学设备,其能够将光力,例如UV光传送至所述至少一个细胞。移液管或微阵列针可以连接至包含多个移液管或微阵列针的阵列。近端溶液可包含阴离子聚合物,例如硫酸葡聚糖和/或鲑鱼精DNA和/或可将收集的信号寡核苷酸添加至包含阴离子聚合物,例如硫酸葡聚糖和/或鲑鱼精DNA的溶液。除了鲑鱼精DNA之外,或代替鲑鱼精DNA,可以使用本领域中已知的其他非特异性阻断剂。

[0018] 在实施方案中,所述方法提供对组织样品的同时的空间分辨的DNA、RNA和/或蛋白

检测。

[0019] 在实施方案中,数字化读出包括大于或等于 $5 \log$ 的线性动态范围。

[0020] 在实施方案中,提供至样品的探针的浓度通常小于用于免疫组织化学(IHC)或用于原位杂交(ISH)的浓度。可选地,所述浓度可显著低于用于IHC或ISH的浓度。例如,探针浓度可以是小2倍、小5倍、小10倍、小20倍、小25倍、小30倍、小50倍、小60倍、小70倍、小80倍、小90倍、小100倍、小200倍、小300倍、小400倍、小500倍、小600倍、小700倍、小800倍、小900倍、小1000倍、小2000倍,或更小,以及其中任何的数量。在实施方案中,探针以100 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM、0.01 nM,和更小的浓度,以及其间的任何的浓度提供。

[0021] 在实施方案中,组织样品连接到载片,并且首先使用荧光(例如,荧光标记的抗体和荧光染料(例如DAPI))成像,并且随后数字化计数来自样品的蛋白和/或核酸表达。

[0022] 在实施方案中,使用负纯化,例如包括亲和纯化方法,包括使完整探针分子接触与所述完整探针的一部分互补的固定的寡核苷酸或识别并结合所述完整探针的一部分的固定抗体或蛋白结合基序,以从释放的信号寡核苷酸除去完整的探针分子。在实施方案中,完整探针的靶标结合结构域包含通用纯化标签,或与固定的寡核苷酸部分互补或能够被固定的抗体或蛋白结合基序识别或结合的序列。在这些实施方案中,可以使用本领域中熟知的任何此类标签或序列。

[0023] 本文所述的任何方面或实施方案可以与本文公开的任何其他方面或实施方案组合。尽管已经连同其详细描述对公开内容进行了描述,但上述描述旨在说明并且不限制公开内容的范围,所述范围由后附的权利要求的范围所限定。其他的方面、优点和改变在下文的权利要求书范围之内。

[0024] 本文提及的专利和科学文献构成本领域技术人员可得的知识。本文引用的所有美国专利以及公开或未公开的美国专利申请通过引用并入。本文引用的所有公开的外国专利和专利申请通过引用并入本文。本文引用的所有其他公开参考资料、文件、手稿和科学文献通过引用并入本文。

[0025] 附图简述

[0026] 本专利或申请文件包含用颜色绘制的至少一副图。具有彩色图的本专利或专利申请公开副本可根据请求并支付必须费用后由官方提供。

[0027] 图1:显示两个示例性探针。核酸骨架(单链DNA或单链RNA)显示为黑色直线。探针各自包括以红色显示的靶标结合结构域。上部的探针包括与核酸骨架杂交的标记的RNA区段,而下部的探针包括与核酸骨架杂交的标记的DNA寡核苷酸。可切割的基序(例如,可切割的接头,未显示)可位于骨架与靶标结合结构域之间,或在骨架内。可切割基序允许从结合的靶标核酸或蛋白释放信号寡核苷酸;随后,收集并检测所述信号寡核苷酸。

[0028] 图2:显示可以与靶标核酸直接结合的第一类型的探针(上部)。在下部的图中,探针已经结合至显示为蓝色曲线的靶标核酸。在这个图以及后面的图中,报告探针包括与标记寡核苷酸杂交的六个位置(以红色圆圈标出)。由于探针包含可以与标记寡核苷酸杂交的位置,所述探针也可称作报告探针。

[0029] 图3:显示本发明的第一类型的双-探针组合物。在此,第一类型的探针与靶标核酸直接结合,并且第一类型的捕获探针与靶标核酸直接结合。捕获探针可以包括至少一个亲和试剂,其以星号显示。样品中的靶标核酸显示为蓝色曲线。

[0030] 图4:显示可以与样品中的靶标核酸间接结合的第二类型的探针(或报告探针)(上部)。在此,在下部的图中,探针的靶标是以绿色显示的中间寡核苷酸,其进而结合样品中的显示为蓝色曲线的靶标核酸。可以说,所述中间寡核苷酸是如本文定义的探针,因为其包含核酸骨架,并且能够结合靶标核酸。

[0031] 图5:显示本发明的第二类型的双-探针组合物。在此,第二类型的探针与样品中的靶标核酸间接结合(通过中间寡核苷酸,显示为绿色),并且第二类型的捕获探针与样品中的靶标核酸间接结合(通过另一中间寡核苷酸,显示为橙色)。捕获探针可以包括至少一个亲和试剂,其以星号显示。

[0032] 图6:显示从与样品中的靶标核酸间接结合的第二类型探针(图4中所示)释放信号寡核苷酸。探针中(或报告探针中)的可切割基序的定位影响哪些物质与释放的信号寡核苷酸一起包含。

[0033] 图7:显示用于检测蛋白的三种类型的探针。在上部的配置中,探针包含连接至蛋白结合结构域的核酸;在此配置中,可切割基序(例如,可切割的接头,未显示)可包括在核酸与蛋白结合结构域之间或在核酸本身之内。在中部的配置中,蛋白结合结构域连接至核酸,并且探针与所述核酸杂交。探针(包含靶标结合结构域和连接至蛋白结合结构域的核酸(显示为绿色))可以在靶标结合结构域与蛋白靶标结合之前或之后,与探针结合(如图8中所示)。可以在骨架或连接至蛋白结合结构域的核酸中的一者或二者中包含可切割的基序。在此配置中,可以使用图2和4中所示的第一或第二类型探针,用于检测蛋白。在下部的配置中,蛋白结合结构域连接至核酸,并且中间寡核苷酸(显示为红色)与探针和连接至蛋白结合结构域的核酸二者杂交。在此配置中,可以使用图2和4中所示的第一或第二类型探针,用于检测蛋白。

[0034] 图8:显示图7的中间和下部探针。上部的两个图显示在已经结合蛋白之前和之后的探针。下一图显示在其可切割基序已经被切割后的探针;在此图中,可切割基序在核酸与靶标结合结构域之间。一旦核酸已经被释放,可将其视为信号寡核苷酸。在下部的图中,信号寡核苷酸(释放的探针核酸)被报告探针(例如,如图2和4中所示)结合。

[0035] 图9:显示从图7中所示的中间配置的探针和图8的探针释放信号寡核苷酸。探针内或在报道探针内的可切割基序的定位影响与释放的信号寡核苷酸一起包含的那些物质。

[0036] 图10:显示本发明的方法中的步骤,其中检测来自一个目标区域(ROI)的信号寡核苷酸。

[0037] 图11:显示本发明的方法中的步骤,其中目标区域位于组织样品的第一连续切片上,并且探针应用于组织样品的第二连续切片。从结合到第二连续切片的第一目标区域中的靶标的探针释放并收集信号寡核苷酸。随后,从结合到第二连续切片的第二(直到第n)目标区域中的靶标的探针释放并收集信号寡核苷酸。

[0038] 图12:显示来自第一目标区域的多个靶标核酸和/或蛋白的多重检测,随后来自第二目标区域的多个靶标核酸和/或蛋白的多重检测。

[0039] 图13:图示说明本发明的方法中的步骤。所显示的方法在本文中可称为“nCounter

<sup>®</sup>数字化多重免疫组织化学(IHC)”。

[0040] 图14:是流程图,其显示与标准的基于TSA的多重IHC(下部)相比较时,使用nCounter<sup>®</sup>数字化多重IHC(上部)而允许的简化流程和更高的多重化。

[0041] 图15:为显示连接至Ti-E显微镜的数字微镜设备(DMD)的照片(上部)和FFPE组织切片的亮视野图像(下部)。FFPE组织(亮视野图像)上的光照(白点)显示大小约~10-20 μm(即单细胞的大小)的多个ROI。

[0042] 图16:图示说明所述方法包括数字微镜设备(DMD)的使用时,参与本发明的组件和光路。使用DMD的宽视场照射聚焦在样品上。LED提供足够的照射,以立刻激发整个视野,并且具有单细胞照射,以使~80-600 DMD像素照射10 μm直径的细胞。普通级别的DMD将提供足够的单细胞分辨。DS:二向色镜;FW:滤光轮;和DMD:数字微镜设备。

[0043] 图17:图示说明所述方法包括激光扫描设备(例如,共焦扫描设备)的使用时,参与本发明的组件和光路。在共焦扫描配置中,由振镜(galvo-mirrors)引导光。这种方法需要便宜的405 nm激光。DS:二向色镜;FW:滤光轮;和MM:机动微镜。

[0044] 图18:显示确定扁桃体样品的整体组织形态学的显微照片,其首先使用Ki-67(细胞增殖标记物;绿色)和CD3(免疫细胞标记物;红色)的双色荧光成像。使用白色框确定12个区域(包括在图19中放大的四个区域)。

[0045] 图19:是对图18中所示的四个区域的Ki-67和CD3的nCounter<sup>®</sup>数据计数的图。图像从连续切片获得(以允许检查各种额外的对照)。大体上,可以使用荧光抗体使样品成像,并且随后使用相同的载片进行数字化计数(通过UV暴露)。跨接12个区域(包括在此显示的四个区域)分析的多个靶标显示出Ki-67和CD3定位的不同概况。图下方是四个区域的放大倍数。

[0046] 图20:显示来自图18中所示的扁桃体样品的12个目标区域(ROI)上的30种寡聚物-抗体(30-plex oligo-antibody)混合物的示例计数。数据从连续切片获得(以允许检查各种额外的对照)。

[0047] 图21:显示确定来自淋巴结的黑色素瘤样品中的T细胞的整体组织形态学的显微照片,其首先使用CD3(红色)、CD8(绿色),和DAPI(蓝色)的三色荧光成像。白色圈的直径为25 μm,并且在包围三个细胞。

[0048] 图22:显示作为UV照射区域(直径100 μm至1mm)的函数,从FFPE淋巴结组织切片(厚5μm)释放的CD3缀合物的nCounter<sup>®</sup>数据。视野光圈大小在图下方显示。

[0049] 图23:显示作为UV照射区域(直径100 μm至1mm)的函数,并且来自如图21和22中所示相同实验的,从FFPE淋巴结组织切片(厚5μm)释放的CD45缀合物的nCounter<sup>®</sup>数据。

[0050] 图24:显示作为UV照射区域(直径100 μm至1mm)的函数,并且来自如图21至23中所示相同实验的,从FFPE淋巴结组织切片(厚5μm)释放的PD1缀合物的nCounter<sup>®</sup>数据。

[0051] 图25:显示包含可变水平的Her2蛋白的乳房肿瘤组织的组织微阵列(TMA;左侧小图),所述Her2蛋白如在通过IHC染色确定Her2荧光的显微照片(中间小图)中所示。右侧小图显示了中间小图的单个区域的放大。

[0052] 图26:显示48个典型区域对比Her2状态(ASCO-CAP指南)的nCounter<sup>®</sup>计数数据。

[0053] 图27:针对图26提及的48个区域,nCounter<sup>®</sup>计数相对总像素强度(x10<sup>3</sup>)的绘图。

[0054] 图28:是确定黑色素瘤样品的整体组织形态学的显微照片,其首先使用CD3(红

色)和DAPI (蓝色)的双色荧光成像。使用白色框确定10个示例性区域。

[0055] 图29:显示来自图28中所示样品的10个目标区域(ROI)上的30种寡聚物-抗体混合物的示例计数。

[0056] 图30A和图30B:为显示使用数字显微镜设备(DMD)的UV照射的扁桃体组织样品(绿色)中的单细胞(蓝色)的显微照片。

[0057] 图31A至31D:是显示使用数字显微镜设备(DMD)的UV照射的扁桃体组织样品中的单细胞(亮白色)的显微照片。图31B突出显示了图31A中提及的单细胞;图31D突出显示了图31C中提及的单细胞。

[0058] 图32:显示空间分辨的FFPE组织蛋白测定中的步骤。所述步骤与核酸检测测定的那些步骤类似,但在核酸检测测定中,样品与包含核酸靶标结合结构域的探针结合而不是与抗体结合。

[0059] 图33:显示空间分辨的FFPE组织蛋白测定中的步骤。

[0060] 图34:显示来自如下实施方案的数据,其中例如使用标准UV凝胶盒照射全部组织或全部样品,以释放此前连接至探针的信号寡核苷酸。

[0061] 图35:显示如下实施方案,其中例如使用显微镜照射部分的组织或样品,即在显微镜下的UV切割(时间滴定试验)。

[0062] 图36:显示如下实施方案,其中例如使用显微镜照射部分的组织或样品,即在显微镜下的UV切割(照射区滴定试验)。

[0063] 图37:显示如下实施方案,其中例如使用显微镜照射部分的组织或样品,即在显微镜下的UV切割(照射区滴定试验-多个靶标)。

[0064] 图38:显示如下实施方案,其中首先确定组织(例如乳腺癌样品)中的目标区域的标记物表达,并且随后照射(例如使用UV)这个目标区域,以从探针释放探针寡核苷酸。

[0065] 图39:显示其中组织包埋在流动池中的实施方案。显示多个级分的数据。如同对于图38的数据,在此预先确定目标区域的荧光标记的标记物的表达。还显示了显示仪器配置的照片和示意图。

[0066] 图40:显示其中组织包埋在具有小孔的流动池中的实施方案。还显示了显示仪器配置的照片和示意图。

[0067] 图41A至41C:显示使用具有小孔的流动池(而不是从整个组织表面收集洗脱液)的实施方案具有显著的信噪比改进。还显示了显示仪器配置的照片和示意图。

[0068] 图42A至42C:显示使用具有小孔(12或96孔形式)的流动池的实施方案中的数据。

[0069] 图43A和B:显示数据,以将来自其中进行全组织洗脱的流动池的背景信号(图43A)与来自其中洗脱直接发生在目标区域上的流动池的背景信号(图43B)进行比较。

[0070] 图44:是示意图,其显示对于多个目标区域的抽吸实施方案,使用开放表面的洗脱液收集。在此显示具有回转阀选择的用于抽吸/分配洗脱液的多管阵列。

[0071] 图45:包括显示其中通过毛细管(微抽吸器)收集洗脱液的实施方案的照片和示意图。

[0072] 图46A和B:包括显示来自图45的通过毛细管(微抽吸器)收集洗脱液的实施方案的数据。

[0073] 图47:是示意图,其显示对于多个目标区域的抽吸实施方案或对于单个目标区域,

使用开放表面的洗脱液收集。在此显示使用吸取对比毛细管作用,用于抽吸/分配的多管阵列和具有固定位置的单个管/移液器。

[0074] 图48:是显示通过组合的毛细管和透镜进行照射和流体收集的示意图。

[0075] 图49:是示意图,其显示包含96孔栅格的空间分辨的FFPE组织测定的实施方案中的步骤。

[0076] 图50:显示使用本文所述的方法和装置,从单个细胞或两个细胞获得的蛋白表达数据。

[0077] 图51:确定位于来自单个肿瘤样品的连续切片上的目标区域。

[0078] 图52:显示从实施例16的测定中包含的9个RNA探针中的6个获得的计数。

[0079] 图53:显示图52中所示计数的平均值和标准偏差。

[0080] 图54:显示同时杂交至nCounter<sup>®</sup>分子条码,并且通过来自NanoString Technologies<sup>®</sup>的nCounter<sup>®</sup>系统数字化计数的探针的RNA表达数据和蛋白数据。

[0081] 图55:显示从单链DNA探针和部分双链DNA探针获得的RNA表达数据。

[0082] 图56:显示从在鲑鱼精DNA存在下杂交的探针获得的RNA表达数据。

[0083] 图57:显示来自PSA (前列腺特异性抗原) 特异性探针的RNA表达数据。

[0084] 图58:显示探针的特异性在非标准的亚nM浓度下提高。

[0085] 发明详述

[0086] 本发明部分基于探针、组合物、方法和试剂盒,其用于同时、多重检测和定量用户定义的组织区域、用户定义的细胞,和/或用户定义的细胞内亚细胞结构中的蛋白和/或核酸表达。

[0087] 本发明提供了存在于第一目标区域(例如,组织类型,细胞(包括正常和异常细胞),和细胞内的亚细胞结构)中的靶标蛋白和/或靶标核酸的特征和丰度,与存在于第二目标区域中的靶标蛋白和/或靶标核酸的特征和丰度的比较。对于目标区域的数量和可以进行的比较,没有预定的上限;所述上限涉及相对于样品大小的目标区域的大小。例如,当单细胞代表目标区域时,则切片可具有数百至数千个目标区域;然而,如果组织切片仅包括两种细胞类型,那么切片可仅具有两个目标区域(每个仅包括一种细胞类型)。

[0088] 本发明提供了与使用标准免疫组织化学或原位杂交方法相比,更高的多重程度。标准免疫组织化学方法允许同时检测最多6至10个蛋白靶标,更通常为3至4个蛋白靶标。类似地,原位杂交方法限于同时检测少于10个核酸靶标。本发明提供了来自样品的限定区域的核酸靶标和/或蛋白靶标的大组合的检测。本发明通过数字化定量和提高的可靠性和一致性,提供了客观量度的提高,从而能够进行在多个中心之间的结果比较。

[0089] 本发明的探针可具有核酸骨架(单链DNA或RNA),其具有能够与至少一个标记寡核苷酸杂交(非共价结合)的限定的位置。参见图1。这种探针(其具有能够与至少一个标记寡核苷酸杂交(非共价结合)的限定的位置)在本文中也称作报告探针。报告探针上的位置数量范围在1至100个或更多。在实施方案中,所述位置数量范围从1、2、3、4、5、6、7、8、9、10至15、20、30、40或50个,或其间的任何范围。实际上,骨架上的位置数量(用于检测靶标核酸和/或用于检测靶标蛋白)没有限制,因为对这种骨架的工程改造完全是在技术人员能力之内的。通过一组探针可检测的靶标核酸和/或蛋白的数量取决于在探针骨架中包含的位置数量。

[0090] 如本文使用的,标记的寡核苷酸是指包括可检测标记的RNA区段,或包括可检测标记的DNA寡核苷酸。

[0091] 核酸骨架的位置可以与至少一个标记的寡核苷酸杂交(非共价结合)。可选地,位置可以与缺少可检测标记的至少一个寡核苷酸杂交。每个位置可以杂交至1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21至100个标记(或未标记)的寡核苷酸或更多。与每个位置杂交的标记寡核苷酸的数量取决于位置的长度和寡核苷酸的大小。位置的长度可以在约300至约1500个核苷酸之间。标记(或未标记)的寡核苷酸的长度可以在约20至约1500个核苷酸的长度变化。在实施方案中,标记(或未标记)的寡核苷酸的长度可以在约800至约1300个核糖核苷酸变化。在其他实施方案中,标记(或未标记)的寡核苷酸的长度可以在约20至约55个脱氧核糖核苷酸变化;这种寡核苷酸经设计具有约65和约85°C间,例如约80°C的解链/杂交温度。例如长度约1100个核苷酸的位置可以杂交至约25和约45个之间的寡核苷酸,每个寡核苷酸包含约45至约25个脱氧核糖核苷酸的长度。在实施方案中,每个位置杂交至长度约33个脱氧核糖核苷酸的约34个标记寡核苷酸。标记寡核苷酸优选为单链DNA。

[0092] 每个标记寡核苷酸可使用一个或多个可检测的标记单体标记。所述标记可以在寡核苷酸的末端,在寡核苷酸内的位点,或其组合。寡核苷酸可以包含具有胺-修饰的核苷酸,其允许可检测标记至所述核苷酸的偶联。

[0093] 本发明的标记寡核苷酸可以使用多种标记单体的任一种标记,例如荧光染料、量子点、染料、酶、纳米颗粒、化学发光标记物、生物素,或本领域中已知的可以直接(例如,通过光发射)或间接(例如通过荧光标记抗体的结合)检测的其他单体。可以由本发明利用的标记的优选实例为荧光团。多种荧光团可以用作用于标记核苷酸的标记单体,包括但不限于GFP-相关的蛋白、花青染料、荧光素、罗丹明、ALEXA Flour™、Texas Red、FAM、JOE、TAMRA和ROX。多种不同的荧光团是已知的,并且将继续生产更多跨越整个光谱的荧光团。

[0094] 与每个位置结合(通过位置与标记寡核苷酸的杂交)的标记是空间上可分离的,并且可以在光谱上与前面位置或随后位置的标记相分辨。探针的一系列有序的空间可分离且光谱可分辨的标记在本文中称作条码或标记码。条码或标记码允许确定已经与具体探针结合的靶标核酸或靶标蛋白。

[0095] 标记寡核苷酸与其位置在标准杂交反应(例如65°C,xSSPE)下杂交;这允许自发组装报告探针或探针。使用较长的RNA分子作为标记寡核苷酸的探针(例如在US2003/0013091中所述)必须在制造现场而不是由最终用户预组装,并且在较高的温度下预组装,以避免通过所述较长RNA分子的多个骨架的交联;所述预组装步骤之后为纯化,以除去过量的未杂交的RNA分子,其将增加背景。短的单链标记寡核苷酸(例如,包含脱氧核糖核苷酸)的应用极大地简化了探针的制造,并降低了与其制造相关的成本。

[0096] 在实施方案中,提供至样品的探针的浓度通常小于用于免疫组织化学(IHC)或用于原位杂交(ISH)的浓度。可选地,所述浓度可显著低于用于IHC或ISH的浓度。例如,探针浓度可以是小2倍、小5倍、小10倍、小20倍、小25倍、小30倍、小50倍、小60倍、小70倍、小80倍、小90倍、小100倍、小200倍、小300倍、小400倍、小500倍、小600倍、小700倍、小800倍、小900倍、小1000倍、小2000倍,或更小,以及其间的任何的数量。在实施方案中,探针以100 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2

nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM、0.01 nM, 和更小的浓度, 以及其中任何的浓度提供。

[0097] 可以使用商购可得的试剂盒、软件、系统, 例如使用nCounter<sup>®</sup>盒的nCounter<sup>®</sup>系统, 检测和定量探针。

[0098] 可以通过进行完整探针分子的负纯化, 减少蛋白检测期间的背景噪音。这可以通过在从目标区域收集洗脱液后, 进行抗体或光可切割接头的亲和纯化而完成。通常, 释放的信号寡核苷酸将不会从溶液脱离。对于这个步骤, 可以采用在移液器尖端, 管或板中的蛋白-G或-O方法。此类设备和试剂是商业可得的。

[0099] 可以通过进行完整探针分子的负纯化, 减少核酸检测期间的背景噪音。这可以通过在从目标区域收集洗脱液后, 进行靶标结合结构域或光可切割接头的亲和纯化而完成。通常, 释放的信号寡核苷酸将不会从溶液脱离。为了辅助负纯化, 在探针, 例如在靶标结合结构域中可包括通用纯化序列。

[0100] 图1显示了包括单链核酸骨架和靶标结合结构域的两个示例性探针, 显示为红色。上部探针包括与骨架中的位置杂交的标记RNA区段, 而下部探针包括与核酸骨架中的位置杂交的标记DNA寡核苷酸。图1以及本公开中他处显示的颜色是非限定性的; 本领域中已知的其他有色标记和其他可检测标记可以用在本发明的探针中。

[0101] 本发明的探针可用于检测靶标核酸。图2和4说明了这个方面。这种探针至少包括骨架和靶标核酸结合区域。靶标核酸结合区域优选长度至少15个核苷酸, 并且更优选长度至少20个核苷酸。在具体实施方案中, 靶标核酸结合区域的长度约10至500、20至400、30至300, 35、40至200, 或50至100个核苷酸。用于结合并及鉴定靶标核酸的探针和方法已经描述于例如US2003/0013091、US2007/0166708、US2010/0015607、US2010/0261026、US2010/0262374、US2010/0112710、US2010/0047924和US2014/0371088, 每篇均以其全文通过引用并入本文。靶标核酸可以是DNA或RNA, 并且优选cRNA, 信使RNA (mRNA) 或miRNA; 优选所述DNA是cDNA。

[0102] 本发明的探针可用于与靶标核酸直接杂交。图2图示说明了这个实施方案的探针(或组合物)。所述探针包括靶标核酸结合结构域, 显示为红色。所述靶标核酸显示为蓝色曲线。图3图示说明了双探针组合物, 包括图2的探针和捕获探针。捕获探针包含至少一个亲和试剂, 显示为星号。所述至少一个亲和部分可以通过共价或非共价的方式连接至捕获探针。适合用于纯化和/或用于固定的各种亲和部分是本领域中已知的。优选地, 所述亲和部分是生物素、亲和素或链霉亲和素。其他亲和标签被特异性结合伴侣识别, 并因此通过与可以固定在固体支持物上的结合伴侣的亲和结合而促进分离或固定。在这些图中, 每个探针包含与标记寡核苷酸杂交的6个位置, 每个位置通过有色的圆圈确定。

[0103] 本发明的任何探针都可包含亲和部分。

[0104] 本发明的探针可以用于与样品中存在的靶标核酸间接杂交(通过中间寡核苷酸)。图4图示说明了这个实施方案的探针(或组合物)。所述探针包括显示为红色的靶标核酸结合结构域, 其结合至合成的寡核苷酸(中间寡核苷酸; 显示为绿色), 合成的寡核苷酸进而结合生物样品中的靶标核酸。可以说, 所述中间寡核苷酸是如本文所定义的探针, 因为其包含核酸骨架并且能够结合靶标核酸。存在于生物样品中的靶标核酸显示为蓝色曲线。图5图示

说明了双探针组合物，包括图4的探针和捕获探针。在这些实施方案中，探针的靶标核酸结合区域与不同于存在于样品中的靶标核酸的中间寡核苷酸(即，合成的寡核苷酸)的区域杂交。因此，探针的靶标结合区域不依赖于样品中的最终靶标核酸。这允许测定设计中的经济和快速的灵活性，因为测定的靶标(存在于样品中)-特异性组分包括在便宜且广泛可得的合成DNA寡核苷酸中，而不是更昂贵的探针中。这种合成的寡核苷酸通过包括与存在于样品中的靶标核酸杂交的区域和与探针杂交的区域而简单地设计。因此，可以通过简单地替换测定的靶标-特异性(合成)寡核苷酸部分，而在不同实验中使用单一的间接结合探针组检测无限多样的靶标核酸(存在于样品中)。

[0105] 探针或本发明的探针可以包含如下的区域，其允许在应用适合的力后，释放信号寡核苷酸。在一个非限定性实例中，所述区域是可切割的基序(例如，限制性酶位点或可切割的接头)。所述可切割的基序允许从结合的靶标核酸或蛋白释放信号寡核苷酸，并且随后收集并检测所述信号寡核苷酸。如本文使用的信号寡核苷酸是当前具有与至少一个标记寡核苷酸杂交的位置的探针区域，或者是可以从探针的靶标结合结构域释放的探针区域(例如，核酸分子)。当其可以与探针的其它部分分离(即，切割并释放)时，将信号寡核苷酸称作可释放的。可切割部分的实例包括但不限于光可切割的接头。

[0106] 在本发明的探针(如本文所述)中，可切割的基序可以位于核酸和靶标结合结构域之间，骨架和靶标结合结构域之间，或在骨架内。在图6中，可切割基序的位置的非限定选择可以从探针内的缺口或中间寡核苷酸内的缺口推导。

[0107] 本发明的探针可以用于检测靶标蛋白。图7图示说明了这种实施方案的探针(或组合物)。这种探针至少包括骨架和靶标蛋白结合区域。在本发明的蛋白靶向探针中，信号寡核苷酸可以是连接至蛋白结合结构域的核酸。在这些探针中，通过包含用于杂交标记寡核苷酸的位置的探针，靶向并结合信号寡核苷酸。这种探针显示在图7的中间小图中。在此，可见作为绿色线的信号寡核苷酸。在探针(通过其蛋白结合结构域)结合蛋白之前或在其结合蛋白之后，所述探针可以被探针结合。信号寡核苷酸不需要被探针结合，直到其已经从靶标结合结构域释放(这个实施方案没有显示)。

[0108] 能够结合靶标蛋白的探针区域包括分子或组装物，其被设计以结合至少一种靶标蛋白、至少一种靶标蛋白代替物或二者，并且能够在适当的条件下行程包含蛋白探针和靶标蛋白的分子复合物。能够结合靶标蛋白的区域包括抗体、肽、适体或类肽。抗体可以从多种来源获得，包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、单特异性抗体、重组表达抗体、人源化抗体、植物抗体等。在本文中，术语蛋白、多肽、肽和氨基酸序列可交换地使用，是指任何长度的氨基酸的聚合物。所述聚合物可以使线性或分支的，其可以包含修饰的氨基酸，并且其可以被非氨基酸或合成氨基酸打断。这些术语还包括已经被修饰的氨基酸聚合物，例如通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化，或任何其他操作，例如使用标记组分缀合。如本文使用的术语氨基酸是指天然和/或非天然或合成的氨基酸，包括但不限于甘氨酸，以及D或L光学异构体二者，和氨基酸类似物和拟肽。用于结合和鉴定靶标蛋白的探针和方法已经描述于例如US2011/0086774中，其内容以整体通过引用并入本文。

[0109] 在实施方案中，通过稳定，优选对抗体铰链区重链位点特异性的半胱氨酸生物缀合方法制备探针。这种制备方法提供相对可以控制的标记寡核苷酸对抗体的化学计量比例。探针可以包含多个(即，多于1个，例如2、3、4、5或更多)标记寡核苷酸/抗体。通常，包含3

或4个标记寡核苷酸/抗体的“较重”探针的敏感性显著低于缺少标记寡核苷酸的抗体,或包含1或2个标记寡核苷酸/抗体的“较轻”探针。

[0110] 蛋白靶向探针和核酸靶向探针可以同时应用,只要条件允许蛋白靶标和核酸靶标二者的结合。可选地,当允许蛋白靶标和核酸靶标二者的结合的条件是不可能时,蛋白靶向探针和核酸靶向探针可以顺次应用。

[0111] 探针组与探针组合物是同义的。探针组包括至少一个种类的探针,即指向一个靶标。探针组优选包括至少两个,例如3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个或更多种类的探针。探针组可以包括每个种类的探针的一个或多个拷贝。

[0112] 可以向样品应用仅第一探针组。可选地,可以随后向样品应用第二(或更高数量)的探针组。第一组和第二(或更高数量)可以仅靶向核酸,仅靶向蛋白,或其组合。

[0113] 在本发明中,检测两个或更多靶标(即,蛋白、核酸或其组合);检测3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000个或更多靶标,以及其间的任何数量的靶标。

[0114] 可以被靶向的细胞类型或组织类型,预定探针组。例如,如果组织是乳腺癌,那么探针组将包括指向与乳腺癌细胞相关的蛋白(例如Her2、EGFR和PR)的探针和/或指向与正常乳房组织相关的蛋白的探针。此外,可以基于被靶向的细胞或组织的发育状态,预定探针组。可选地,可以基于目标的亚细胞定位,例如细胞核、细胞质和细胞膜,预定探针组。例如,指向Foxp3、组蛋白 H3或P-S6的抗体标记细胞核,指向CD3、CD4、PD-1或CD45R0的抗体标记细胞质,并且指向PD-L1的抗体标记细胞膜。

[0115] 探针可以是化学合成的,或者可以使用已经克隆入编码探针的核酸的载体,通过生物方式生产的。

[0116] 本文描述的任何探针或探针组均可用于本发明的方法和试剂盒中。

[0117] 对于本文描述的探针,标记代码与靶标核酸或靶标蛋白的关联不是固定的。

[0118] 本发明的探针可以用于检测存在于任何样品(例如生物样品)中的靶标核酸或蛋白。如本领域技术人员可以理解的,样品可以包含任何数量的事物,包括但不限于:细胞(包括原代细胞和培养的细胞系)和组织(包括培养或外植的)。在实施方案中,组织样品(固定或未固定的)是包埋的,连续切片的,并且固定到显微载片上。众所周知,一对连续切片将包括存在于两个连续切片中的至少一个细胞。位于第一连续切片上的结构和细胞类型将在相邻的连续切片上具有类似的定位。样品可以是已经固定到载片上的培养细胞或离散的细胞(固定或未固定)。

[0119] 在实施方案中,组织样品是活检肿瘤或其部分,即临床相关的组织样品。例如,肿瘤可以来自乳腺癌,样品可以是切除的淋巴结。

[0120] 样品可以得自几乎任何生物,包括多细胞生物,例如植物、真菌和动物界的样品;优选样品得自于动物,例如哺乳动物。人类样品是特别优选的。

[0121] 在一些实施方案中,本文描述的探针、组合物和试剂盒用于病况的诊断。如本文所用的术语诊断或病况的诊断包括预测或诊断病况,确定易患病况的体质,监测病况的治疗,诊断疾病的治疗响应,和病况的预后,病况进展,以及对病况的具体治疗的响应。例如,可以根据本文所述的探针、方法或试剂盒的任一种,测定组织样品,以确定样品中的疾病或恶性

细胞类型的标记物(相对于非患病的病况)的存在和/或量,从而诊断或分级疾病或癌症。

[0122] 通常,可以首先使用荧光(例如荧光抗体或荧光染料(例如DAPI))对连接至载片的样品成像,以鉴定形态学,目标区域、目标细胞类型和单细胞,并且随后可以从相同载片上的样品以数字方式计数蛋白和/或核酸的表达。

[0123] 本发明的组合物和试剂盒可以包括探针和其他试剂,例如,缓冲剂和本领域中已知的其他试剂,以促进样品中蛋白和/或核酸的结合,即用于进行杂交反应。

[0124] 试剂盒还将包括关于使用试剂盒的组分的说明书,包括但不限于标记寡核苷酸与探针杂交、探针与靶标特异性寡核苷酸杂交,靶标特异性寡核苷酸与靶标核酸杂交,和/或探针与靶标蛋白杂交所必需的信息。

[0125] 用于检测靶标核酸和/或靶标蛋白的示例性方案如下文所述,并且显示在图10至14(上部)中。

[0126] 制备与多重免疫组织化学方法和/或核酸原位杂交方法一致制备的细胞(活或固定的)或组织切片(例如,福尔马林-固定石蜡包埋(FFPE)),并固定到玻璃载片或适合的固体支持物上。保持对细胞或组织切片表面的通道,允许流体交换;这可以通过使用流体室试剂交换系统(例如Grace™ Bio-Labs, Bend OR)而实现。在连续切片上或在相邻的连续切片上,确定将提供探针的目标区域(ROI)。在第一例中,对目标细胞/组织进行完全“宏观特征”成像方法,例如DAPI染色、膜染色、线粒体染色、特异性表位染色,和特异性转录物染色,以测定目标细胞/组织的整体宏观特征。可选地,在于连续切片相邻的连续切片上,确定将提供探针的目标区域(ROI);在此,在第一连续切片(图11和12中的切片#1)上进行完全“宏观特征”成像(如上所述)。这种程序将大致确定相邻连续切片上的目标区域(图10中小图B中的红线,和图11和12中切片#2的绿色椭圆和绿色三角),其中在应用适合且定向的力后,信号寡核苷酸将从探针释放。连续切片可以彼此相距约5μm至15μm。

[0127] 图13和14(上部)进一步图示说明了本发明的步骤。图13中显示的步骤包括以下。

(1) 加工:将FFPE载片封装组织与通过光可切割接头缀合至DNA寡聚物的第一抗体混合物,连同有限数量的可见光波长成像剂一起温育。(2) 检视:在低倍(low-plex)下使用基于可见光的成像剂确定目标区域(ROI),以制定肿瘤载片的整体“架构”(例如,成像细胞核和/或使用一个或两个关键肿瘤生物标记物)。(3) 概况分析:选择选出的ROI用于高分辨率多重概况分析,并且在暴露于UV光后,从选出的区域释放寡聚物。(4) 平板化:随后收集游离的光切割寡聚物,例如,通过基于微毛细股的“吸管”,并贮存在微板孔中,用于后续的定量。(5) 数字化计数:在数字化计数步骤期间,微板中来自空间分辨的ROI的光切割寡聚物与4-色,6-点光学条码杂交,允许使用标准NanoStringCounter®读出仪器(例如SPRINT、Flex,和MAX),在单个ROI中高至~1百万的蛋白靶标的数字化计数(分散于高至800-种标记物)。

[0128] 目标区域可以是存在于细胞中的组织类型、细胞类型、细胞或细胞内的亚细胞结构。

[0129] 向连续切片应用包含一组探针的组合物,每个探针包含可释放的信号寡核苷酸。探针组或者可以包括靶向蛋白、靶向核酸或二者的探针。组合物可包括捕获探针。当探针与靶标(蛋白和/或核酸)间接结合时,所应用的组合物包括中间寡核苷酸。组合物将包括本领域中已知的其他试剂以促进样品中蛋白和/或核酸的结合。

[0130] 在应用组合物之前和/或之后进行封闭步骤。

[0131] 对于包括光可切割接头的探针,将固体支持物(例如显微载片)放置在显微镜中,所述显微镜能够提供在能够切割所述光可切割接头波长的激发光。使用所述光激发第一目标区域(图10中小图B中的红线和图11和12中的ROI<sub>i</sub>),从而切割光可切割接头,并释放信号寡核苷酸。如图6和9中所示,信号寡核苷酸包括至少一个探针区域,其当前具有与至少一个标记寡核苷酸结合的位置,或者包括来自探针的核酸,其结合或可以结合报告探针。通过仅向ROI<sub>i</sub>引导激发光,仅从ROI<sub>i</sub>内的探针释放信号寡核苷酸,并且不从位于ROI<sub>i</sub>外的探针释放,位于ROI<sub>i</sub>外的探针保留其信号寡核苷酸。因此,仅对与ROI<sub>i</sub>内的靶标结合的探针,收集信号寡核苷酸,从而允许检测位于ROI<sub>i</sub>内的靶标(蛋白和/或核酸)的特征和量。

[0132] 使用少量的缓冲剂(~5至30 μl)洗涤切片表面,并将洗脱液(包含释放的信号寡核苷酸)收集到第一样品容器中(图12中显示为样品“i”)。进一步清洗切片表面,以除去从洗脱液省略的任何释放的信号寡核苷酸。

[0133] 用光激发第二目标区域(图11和12中的ROI<sub>j</sub>),从而切割光可切割接头,并从第二目标区域释放信号寡核苷酸。再次通过仅向ROI<sub>j</sub>引导激发光,仅从ROI<sub>j</sub>内的探针释放信号寡核苷酸,并且不从位于ROI<sub>j</sub>外的探针释放,位于ROI<sub>j</sub>外的探针保留其信号寡核苷酸。因此,仅对与ROI<sub>j</sub>内的靶标结合的探针,收集信号寡核苷酸,从而允许检测位于ROI<sub>j</sub>内的靶标(蛋白和/或核酸)的特征和量。

[0134] 使用少量的缓冲剂(~5至30 μl)洗涤切片表面,并将洗脱液(包含释放的信号寡核苷酸)收集到第一样品容器中(图12中显示为样品“j”)。进一步清洗切片表面,以除去从洗脱液省略的任何释放的信号寡核苷酸。

[0135] 重复提取步骤、洗涤步骤和清洗步骤,直到已经从所有目标区域(直到ROI<sub>n</sub>)收集信号寡核苷酸。

[0136] 本发明的其他优点、特征和实施方案在随本文提交的附件中说明。显示了用于收集信号寡核苷酸的各种方法和设备以及用于提供力的各种方式。此外,附件还提供了由本发明的具体实施方案获得的超出其他实施方案的预想不到的改进结果。显示了证实约7倍至约200倍的信噪比改进的数据。

[0137] 检测可以使用本领域中已知的任何显微镜型设备或系统。设备或系统可以包括宽视野照射和数字微镜设备(DMD;参见图15和16);其优点包括降低的费用,因为DMA和控制器还可以驱动LED(其将探针光切割)并且实质上不增加额外的费用,提供方便的操作,允许~1 mm的小特征尺寸,其将包括10-40 mm的细胞,并且充分利用可得的消费电子产品(如投影仪)。设备或系统可包括激光扫描设备,例如共焦的,参见图16。这个的优点是可以照射并成像较小的形态特征;然而,使用这些设备涉及额外的费用。

[0138] 使用聚合酶反应、逆转录酶反应、与寡核苷酸微阵列的杂交、质谱、与荧光分子信号的杂交、测序反应,或nCounter<sup>®</sup>分子条码,在每个洗脱液样品中,确定存在于样品中的每个目标区域中的多种靶标蛋白和/或靶标核酸。如US2003/0013091、US2007/0166708、US2010/0015607、US2010/0261026、US2010/0262374、US2010/0112710、US2010/0047924、US2014/0371088和US2011/0086774中所述的nCounter<sup>®</sup>系统和来自NanoString Technologies<sup>®</sup>的方法是用于确定靶标蛋白和/或靶标核酸的优选方式。nCounter<sup>®</sup>系统和来自NanoString Technologies<sup>®</sup>的方法允许多种(800或更多)不同靶标蛋白和/或靶标核酸的同时多重确定。

[0139] 共同地,可以进行存在于第一目标区域(例如,组织类型,细胞(包括正常和异常细胞),和细胞内的亚细胞结构)中的靶标蛋白和/或靶标核酸的特征和丰度,与存在于第二目标区域或更多目标区域中的靶标蛋白和/或靶标核酸的特征和丰度的比较。

[0140] 本发明提供来自(例如)肿瘤及其相邻正常组织的多至800种目标蛋白的多重检测和比较;因此,能够系统性探究肿瘤及其微环境。

[0141] 本发明可以用于正在进行的临床研究,以说明对免疫疗法和其他靶向疗法的新响应。

[0142] 本发明还能够发现(例如)肿瘤中的免疫生物标记物,其可用于伴侣诊断的开发中。

[0143] 免疫组织化学是用于分析FFPE组织切片中的蛋白表达和定位的有力技术。然而,其受困于多种挑战,包括缺少动态范围、难以定量,以及用于非常有限多重化的劳动力密集型工作流程。本文公开了基于nCounter<sup>®</sup>条码化技术的新型平台,其能够在高度多重(高至800-种)测定(即nCounter<sup>®</sup>数字化多重免疫组织化学(IHC)测定)中,进行蛋白的空间分辨的数字化表征。所述测定依赖于与光可切割的寡核苷酸标签偶联的抗体,使用聚焦通过物镜UV(例如,~365nm)暴露,从组织的离散区域释放所述寡核苷酸标签偶联。在nCounter<sup>®</sup>测定中定量切割的标签,并将计数绘制回到组织定位,产生蛋白丰度的空间分辨的数字化概况。蛋白检测可以与核酸检测测定一起或分离进行,所述核酸检测测定使用包含光可切割的寡核苷酸标签的核酸探针。因此,本发明可以提供蛋白丰度的空间分辨的数字化概况、蛋白和核酸丰度的空间分辨的数字化概况,或核酸丰度的空间分辨的数字化概况。

[0144] 所述测定的优点包括但不限于:高敏感性(例如~1至4个细胞),全数字化计数,和大动态范围(>10<sup>5</sup>),高度多重化(例如,30个靶标,并且拓展至800个靶标,而不改变仪器),简单的工作流程,与FFPE相容,没有第二抗体(用于蛋白检测)或扩增试剂,以及用于临床测定的前景。

[0145] 除非上下文另有清楚说明,本说明书和后附权利要求书中使用的单数形式“一个/种、所述”(“a,” “an” 和“the”)包括复数的指代物。

[0146] 除非特别指出或从上下文明显可见,如本文使用的术语“或”应被理解为包含性的,并且涵盖“或”与“和”二者。

[0147] 除非特别指出或从上下文明显可见,如本文使用的术语“约”应被理解为在本领域正常公差范围之内,例如在平均值的2标准偏差之内。约可被理解为在所述数值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%之内。除非另外从上下文清楚可见,本文提供的所有数值都通过术语“约”修饰。

[0148] 除非另有限定,本文使用的所有技术和科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。本文描述了优选的材料和方法,但与本文所述那些相似或等同的其他探针、组合物、方法和试剂盒也可以用于本发明的实施。应理解本文使用的术语仅出于描述具体实施方案的目的,并且不旨在进行限制。

## 实施例

[0149] 实施例1:本发明提供了定量FFPE组织切片中多重靶标的“条码化前景”。

[0150] 肿瘤内的异质性已经成为实施靶向治疗剂的主要挑战。在历史上,免疫组织化学

(IHC) 已经用于评估蛋白的空间异质性;然而,其难以用于以高多重性和宽的动态范围定量蛋白丰度。

[0151] 在这个实施例中,使用含抗体的探针标记福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织切片中的蛋白,所述探针包括光可切割接头和荧光条码。随后,在FFPE组织切片的用于限定ROI中的探针暴露于聚焦的UV光,从而从ROI释放信号寡核苷酸(包含所述荧光条码)。从FFPE样品洗出并收集释放的信号寡核苷酸。随后,通过来自NanoString Technologies®的nCounter®系统识别并数字化计数来自所述释放的信号寡核苷酸的荧光条码,从而定量组织切片的用户限定空间区域中的每种靶向蛋白的丰度。在释放并收集来自第一ROI的信号寡核苷酸后,使聚焦的UV光暴露于FFPE组织切片的第二用于限定ROI,从而从第二ROI释放信号寡核苷酸。在这个非限定性实施例中,观察到在观察计数的数值相对于UV照射面积的高度线性( $0.97 < R^2 < 0.99$ ),并且具有约 $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ ,或约100个细胞的检测空间分辨率。预想不到地,本发明提供了定量单个FFPE组织切片中多至800个靶标的“条码化前景”,其具有5.5对数(以10为底)的动态范围。

[0152] 实施例2:本发明提供了用于定量蛋白表达而无需信号放大以及用于实现FFPE组织切片中更高质量级的靶标抗原多重化的实用和可行的方法。

[0153] 可定量的多重免疫组织化学已经作为肿瘤学中备受关注的领域出现,因为其具有确定时空组织和相互依赖性的独特能力,这进一步定义了检查点阻断如何影响肿瘤微环境。这个实施例描述了使用光可切割寡聚物标签的第一抗体的一步式无扩增的染色方法,所述第一抗体与FFPE组织切片内的靶标抗原相互作用。应用使寡聚物从抗体释放的紫外(UV)光照射,并且随后收集洗脱液,定量,并数字化计数,其对应于抗原丰度。

[0154] 首先研究了多种缀合方法;这确定了半胱氨酸生物缀合方法,其是稳定的,主要对铰链区重链位点特异性的,并且在寡核苷酸与抗体的化学计量比例方面是相对可控的。

[0155] 随后进行线性回归分析,以确定UV-诱导切割面积与测量的数字化蛋白计数之间的关系;由此观察到高度的线性( $0.97 < R^2 < 0.99$ ),确认了与这种对FFPE组织的多重蛋白计数方法相关的基本机制/前提。

[0156] 为了测定缀合寡核苷酸的存在对抗体-抗原相互作用的影响,将在FFPE组织切片中的标记寡核苷酸-缀合抗体与未修饰抗体在相同条件下的以下方面的性能进行比较:敏感性、特异性和信号强度。选择靶向定位于细胞核、细胞质或膜的抗原的抗体,以测定抗体性能与靶标抗原的亚细胞定位之间的关系。选择的抗体靶向Foxp3、组蛋白 H3、P-S6(细胞核抗原)、CD3、CD4、PD-1、CD45RO(细胞抗原),和PD-L1(膜抗原)。在敏感性方面,大体上,发现“较重”的寡核苷酸缀合抗体(具有3或4个标记寡核苷酸/抗体)在于未缀合抗体或“较轻”的寡核苷酸缀合抗体(具有1或2个标记寡核苷酸/抗体)相比时,敏感性显著较低。未缀合或“较轻”的寡核苷酸缀合抗体之间,没有观察到在细胞核、细胞质和膜的靶标抗原之间,敏感性、特异性和强度方面的显著差异。

[0157] 本发明提供了高多重化的蛋白质概况分析,其使用实用且可行的方法测量绝对蛋白表达水平,以全面地限定免疫治疗干预之前和期间肿瘤中的免疫景观。

[0158] 实施例3:本发明提供了来自FFPE组织的空间分辨的,多重蛋白检测。

[0159] 方法

[0160] 抗体:这个实施例以及实施例4-6中使用的抗体可以包括:“靶标(克隆ID,供

应商))”：H3 (D1H2, CST)、CD8 (OTI3H6, Origene)、CD4 (SP35, Spring Bio)、FOXP3 (D2W8E, CST)、B7-H3 (D9M2L, CST)、S6 (54D2, CST)、B7-H4 (D1M8I, CST)、Granzyme B (OTI4E4, Origene)、Ki67 (8D5, CST)、PD-1 (Nat105, Cell Marque)、CD3 (MRQ-39, Cell Marque)、Vista (D1L2G, CST)、Her2 (29D8, CST)、PR (D8Q2J, CST)、ER (SP1, Spring Bio)、EGFR (D38B1, CST)、CD56 (MRQ-42, Cell Marque)、PD-L1 (E1L3N, CST)、CD45 (2B11&PD7/26, Cell Marque)、TIM-3 (D5D5R, CST)、和Pan-角蛋白 (C11, CST)、CD45RO (UCHL1, Cell Marque)。

[0161] 扁桃体显微镜观察：将扁桃体FFPE块(Amsbio)的5  $\mu\text{m}$ 切片封装在载片上。使用标准方法进行IHC。使用压力锅进行抗原修复。使用CD3第一抗体MRQ-39 (Rabbit mAb, Cell Marque) 和Ki-67第一抗体8D5 (Mouse mAb, CST) 进行扁桃体切片的染色。使用Alexa594标记的山羊 $\alpha$ 兔 (Life Tech.) 和Alexa488标记的山羊 $\alpha$ 小鼠 (Life Tech.) 进行第二温育。

[0162] 在此，首先使用荧光抗体对连接到载片的样品成像，并且随后从样品数字化计数蛋白的表达。

[0163] 使用类似于图10至图14 (上部) 中所示那些的步骤。所选ROI的UV切割允许全部30-种的数字化概况分析(nCounter<sup>®</sup>计数)。

#### [0164] 结果

[0165] 图18显示了确定扁桃体样品的整体组织形态学的显微照片，其首先使用Ki-67 (细胞增殖标记物；绿色) 和CD3 (免疫细胞标记物；红色) 的双色荧光成像。跨12个区域(包括在图19中放大的四个区域)分析的多个靶标，显示Ki-67和CD3定位的3种不同概况。图19显示了图18中所示的四个区域的Ki-67和CD3的nCounter<sup>®</sup>数据计数。图20显示了来自图18中所示的扁桃体样品的12个目标区域(ROI)上的30种寡聚物-抗体混合物的示例计数。数据从连续切片获得(以允许检查各种额外的对照)。如图所示，可以基于表达的标记物的强度和特征，将组织样品的区域分类。示例性的分类显示为：“CD3-富集的”、“Ki67-富集的”，“混合的”，和“结缔组织”。

[0166] 这些数据显示本发明提供了多种(在此为至少30种)蛋白标记物的空间分辨检测。通过拓展使用的蛋白探针(抗体)数量，可以检测多至800种不同的蛋白标记物，并且具有类似的分辨率。

[0167] 实施例4：本发明提供了来自FFPE的多重蛋白检测并且达到单细胞分辨。

#### [0168] 方法

[0169] 黑色素瘤显微镜观察：将黑色素瘤(淋巴结衍生) FFPE块(Asterand)的5  $\mu\text{m}$ 切片封装在载片上。使用标准方法进行IHC。使用压力锅进行抗原修复。

[0170] 在此，首先使用荧光对样品成像，并且随后从样品数字化计数蛋白的表达。

[0171] 使用类似于图10至图14 (上部) 中所示那些的步骤。

#### [0172] 结果

[0173] 图21：显示确定来自淋巴结的黑色素瘤样品中的T细胞的整体组织形态学的显微照片，其首先使用CD3 (红色)、CD8 (绿色)，和DAPI (蓝色) 的三色荧光成像。白色圈的直径为25  $\mu\text{m}$ ，并且在包围三个细胞。

[0174] 图22：显示作为UV照射区域(直径100  $\mu\text{m}$ 至1mm)的函数，从FFPE淋巴结组织切片(厚5 $\mu\text{m}$ )释放的CD3缀合物的nCounter<sup>®</sup>数据。检测计数的极限(LOD = 背景计数 + 2x标准

偏差)对应于直径26  $\mu\text{m}$ 的空间分辨率。视野光圈大小在图下方显示。图23和图24显示了对于CD45和PD1的数据(分别来自相同的实验)。

[0175] 数据显示了本发明的空间检测能力对应于约1至4个细胞。

[0176] 实施例5:本发明提供了临床相关测定的定量性能

[0177] 方法

[0178] 使用类似于图10至图14 (上部) 中所示那些的步骤。

[0179] 乳腺癌组织微阵列(TMA):TMA BR1504a得自US Biomax, Inc., H&E染色图像得自US Biomax网页(万维网([www.biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a](http://www.biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a)))。来自与图25的左侧小图中显示的切片相同的块的切片,使用Her2第一抗体29D8 (Rabbit mAb, CST) 和 Alexa594标记的山羊 $\alpha$  兔(Life Tech.)染色。还获得了组蛋白 H3、核糖体蛋白 S6、雌激素受体、孕酮受体、小鼠 IgG同种型对照和兔IgG同种型对照的计数(数据未显示)。对于TMA BR1504a的Her2病理评分由US Biomax, Inc.提供(万维网([www.biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a](http://www.biomax.us/tissue-arrays/Breast/BR1504a)))。使用Her2第一抗体29D8 (Rabbit mAb, CST) 和Alexa594标记的山羊 $\alpha$  兔(Life Tech.)进行染色。尽管在第一混合物中使用了其他兔第一抗体,但来自这些抗体的荧光相比于Her2荧光是可以忽略的。使用ImageJ软件获得总像素强度(在 $\lambda = 594$ )。为此,将背景数值设定为强度= 0,并且最高强度设定为强度=255。显示了每个ROI的所有像素强度的总和。

[0180] 在此,首先使用荧光对样品成像,并且随后从样品数字化计数蛋白的表达。

[0181] 结果

[0182] 图25 (左侧小图)显示了包含可变水平的Her2蛋白的乳房肿瘤组织的组织微阵列(TMA),所述Her2蛋白如在通过IHC染色确定Her2荧光的显微照片(中间小图)中所示。右侧小图显示了中间小图的单个区域的放大;这类区域使用多重抗体混合物染色。

[0183] 图26显示了48个代表性区域对比Her2状态(ASCO-CAP指南)的nCounter<sup>®</sup>计数数据。图27绘制了针对以上提及的48个区域,nCounter<sup>®</sup>计数相对总像素强度( $x10^3$ )的图示。

[0184] 这些数学计数数据显示了与通过ASCO-CAP指南的目测Her2状态( $R^2 = 0.51$ ,图26)相比,与荧光强度( $R^2 = 0.92$ ,图27)的高相关性。

[0185] 实施例6:本发明揭示了特定细胞类型在组织样品中的丰度。

[0186] 使用类似于图10至图14 (上部) 中所示那些的步骤;首先使用荧光对连接至载片的黑色素瘤样品成像,并且随后从样品数字化计数蛋白的表达。

[0187] 图28显示了使用CD3 (免疫细胞标记物;红色) 和DAPI (细胞核;蓝色) 的双色荧光,确定黑色素瘤样品的整体组织形态学的显微照片。从由白色框确定10个区域获得试用30种抗体混合物的表达数据。图29显示了来自图28中所示黑色素瘤样品的10个目标区域(ROI)上的30种寡聚物-抗体混合物的示例nCounter<sup>®</sup>计数。显示了对于13种标记物的计数,其各自具有高于背景的表达计数。确定为“免疫渗入物富集的”区域5、6、7,具有T-细胞标记物和T-细胞调控标记物的最高表达。

[0188] 这些数据显示本发明提供了多种(在此为至少30种)蛋白标记物的空间分辨检测。通过拓展使用的蛋白探针(抗体)数量,可以检测多至800种不同的蛋白标记物,并且具有类似的分辨率。

[0189] 实施例7:数字微镜设备(DMD)能够照射单细胞。

[0190] 图30和图31是显微照片,其显示了使用数字微镜设备(DMD)的UV照射能够照射扁桃体组织样品中单细胞。

[0191] 这些数据显示本发明在使用DMD时能够具有单细胞分辨率。

[0192] 实施例8:凝胶盒能够照射整个样品并且从结合于整个样品的探针释放信号寡核苷酸。

[0193] 图34显示了如下实施方案,其中例如使用标准实验室UV凝胶盒照射全部组织或样品。在此,将FFPE组织载片放置在光板上,使用蜡笔保持缓冲溶液(TBS)覆盖FFPE组织,并且通过玻璃载片(厚1 mm)向组织应用UV光暴露(276 - 362nm,例如302nm;~5mW/cm<sup>2</sup>)。数据显示在UV暴露约1分钟之内,大多数信号寡核苷酸从FFPE结合抗体释放。计数对阳性对照归一化。

[0194] 实施例9:来自显微镜的照射能够照射样品中的目标区域并且从结合于目标区域的探针释放信号寡核苷酸。

[0195] 图35显示了如下实施方案,其中例如使用显微镜照射部分的组织或样品,即在显微镜下的UV切割(时间滴定试验)。这与实施例8中照射全部样品的实验相对照。在此,以约~150mW/cm<sup>2</sup>和20x物镜,应用UV LED (在365nm)。UV照射扫描通过此前荧光(~590nm激发)亮场成像确定的全部组织面积。在每个视野(FOV) UV暴露约1秒之内,大多数信号寡核苷酸从FFPE结合探针释放。计数对阳性对照比率归一化。蓝色:具有可变暴露时间长度的显微镜数据;红色:凝胶盒2.5分钟暴露数据。还显示了显示显微镜仪器配置的照片和示意图。

[0196] 图36显示了从均匀分布的结合于肺组织样品的抗-组蛋白(H3)抗体释放信号寡核苷酸。组织暴露于1秒的UV (365nm, ~150mW/cm<sup>2</sup>和20x物镜)/约450μm x 330μm = 0.15 mm<sup>2</sup>的视野(FOV)。用于收集流出物的“宏观体积”为约70 μl。这使检测限降低至(FOV / 5) ~ 99μm X 99μm,并且收集约5μl的流出物。因此,在这个实施例中,检测限为约10个细胞X10个细胞的区域(niche)。这些数据显示抗体信号与空间分辨的照射区域FOV成比例,并且推算了“宏观流体”检测限(LOD)。

[0197] 图37显示了如下实施方案,其中例如使用显微镜照射部分的组织或样品,即在显微镜下的UV切割(照射区滴定试验-多个靶标)并且用于多个靶标。显示了组织中多个靶标的UV切割:两个阳性靶标(组蛋白H3和核糖体S6),和八(8)个阴性靶标。仅一个阴性靶标(0x40)显示了高背景。显示了来自0、1、4、9和16个视野的数据。

[0198] 实施例10:可以通过标记技术预先确定目标区域,并且随后照射所述目标区域,从结合于预先确定的目标区域的探针释放信号寡核苷酸。

[0199] 图38显示了如下实施方案,其中首先确定组织(例如乳腺癌样品)中的目标区域的标记物(在此为Her2)表达,并且随后照射(例如使用UV)这个目标区域,以从结合的探针释放探针寡核苷酸。显示的数据比较了对于两个靶标(在此为Her2和组蛋白H3),从两个位置:一个预先确定为Her2+的目标区域和一个预先确定为Her2-的目标区域,释放的信号寡核苷酸的量。

[0200] 实施例11:包埋在流动池中的样品提供了来自整个样品而不仅来自目标区域的洗脱液的收集,所述目标区域被照射并且从该目标区域释放信号寡核苷酸。

[0201] 图39显示了其中组织包埋在流动池中的实施方案。在此,包埋在微流体流动池(9mm环形室,具有100 μm高度的体积和接近25μl体积[当流动池具有300μm高度时,近似体

积为 $75\mu\text{l}$ ])受注射泵控制。流动池内部的UV切割,显示洗脱概况,照射一个区域(9个FOV)并洗脱,随后照射另一区域(9个FOV)并洗脱。显示多个级分的数据。如同对于实施例10的数据,在此预先确定目标区域的荧光标记的标记物的表达。

[0202] 实施例12:包埋在包含在目标区域上的小孔的流动池中的样品,提供来自被照射的目标区域的洗脱液的有效收集,并且从所述目标区域而不是从整个样品释放信号寡核苷酸。

[0203] 图40显示了其中组织包埋在具有小孔的流动池中的实施方案。在此,洗脱直接发送在目标区域上方。流体室上的直径0.4-1mm的孔允许洗脱液的收集(例如,5 $\mu\text{l}$ 收集体积)。所测试的是9孔,96孔形式,和12孔形式(用于组织微阵列(TMA))。荧光图像通过组合多个视野而产生。还显示了显示仪器配置的照片和示意图。

[0204] 图41A至41C显示了使用具有小孔的流动池(而不是从整个组织表面收集洗脱液)的实施方案具有显著的信噪比改进。数据显示通过在目标区域上方的小孔收集洗脱液使信噪比提高约7倍。在这个实施方案中,使用流体流动池(25 $\mu\text{l}$ 室)上方直径1mm的孔收集洗脱液(5 $\mu\text{l}$ 级分)。显示了多个级分的数据。

[0205] 图42A至42C显示了使用具有小孔(12或96孔形式)的流动池中的数据。数据显示通过在目标区域上方的小孔收集洗脱液使信噪比提高约7倍。在这个实施方案中,视野照射聚焦在孔的中心;5 $\mu\text{l}$ 洗脱体积/孔。

[0206] 图43A和B显示了数据,以将来自其中进行全组织洗脱的流动池的背景信号(图43A;如在实施例11中)与来自其中洗脱直接发生在目标区域上方的流动池的背景信号(图43B)进行比较。如在图43A中可见,相对于在图43B中所见的背景,对于全组织洗脱存在较高的背景。此外,图43B显示流动池内与非流动池温育之间没有差别。

[0207] 实施例13:可以通过单管/吸管,多个管/吸管,或多管/吸管阵列,选择释放的信号寡核苷酸。

[0208] 图44是示意图,其显示对于多个目标区域的抽吸实施方案,使用开放表面的洗脱液收集。在此显示具有回转阀选择的用于抽吸/分配洗脱液的多管阵列。另参见图47。

[0209] 图45包括显示其中通过毛细管(微抽吸器)收集洗脱液的实施方案的照片和示意图。另参见图47。图46A和B显示了来自图45的通过毛细管(微抽吸器)收集洗脱液的实施方案的数据。这个实施方案具有信噪比的显著改进:与通过孔洗脱的流动池相比,信噪比提高约10倍,并且与全组织洗脱相比,信噪比提高约200倍。在此,LOD面积是大约 $60 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ 。

[0210] 实施例14:包含照明和洗脱两种能力的设备能够有效且准确地从限定的目标区域获得核酸和/或蛋白表达数据。

[0211] 图48是显示通过组合的毛细管和透镜进行照射和流体收集的示意图。

[0212] 实施例15:可以检测和定量来自单细胞的蛋白表达。

[0213] 图50显示使用本文所述的方法和装置,从单个细胞或两个细胞获得的蛋白表达数据。在上部小图中,检测并定量来自至少一个细胞的S6蛋白,并且在下部小图中,检测并定量来自至少一个细胞的CD45蛋白。

[0214] 实施例16:本文描述的方法和装置提供了空间分辨的多重RNA靶标和/或蛋白靶标表达的准确且有效的检测和定量。

[0215] 进行原位杂交 (ISH), 以使基于DNA寡聚物的探针 (“RNA探针”) 与内源RNA杂交, 所述探针各自包含靶标结合结构域、信号寡核苷酸和光可切割的接头。将5 μm FFPE HER2 3+ 乳房组织切片在二甲苯中脱蜡, 在梯度乙醇中部分再水合, 并在70%乙醇中在室温下温育1小时。随后, 将切片在37°C在40μg/ml蛋白酶K中温育25分钟。随后, 将组织在室温下在50%甲酰胺/2X SSC中温育15分钟, 并在37°C在1nM探针、40%甲酰胺、1mg/ml酵母tRNA、10%硫酸葡聚糖, 和0.2% BSA在2X SSC的溶液中, 杂交过夜。杂交后, 再50%甲酰胺/2X SSC中进行两次严格洗涤, 每次在37°C进行25分钟。使用T0-PRO®-3 (Thermo Fisher Scientific) 荧光核酸染料将切片染色, 以使组织形态可见。随后, 使用由数字显微镜设备引导的聚焦UV光, 从用户限定的目标区域 (ROI) 中的探针切割DNA信号寡核苷酸。对于每个组织切片, 两个ROI包含肿瘤组织, 两个ROI包含正常组织, 并且两个ROI完全不含组织 (组织学载片本身)。在切割后, 收集信号寡核苷酸, 与nCounter®分子条码杂交, 并且通过来自NanoString Technologies®的nCounter®系统数字化计数。在组织切片上进行H&E, 以核实肿瘤和正常组织ROI。

[0216] 在连续切片上, 使用“蛋白探针”进行标准免疫组织化学 (IHC), 所述探针各自包含作为靶标结合结构域的抗体、DNA信号寡核苷酸和光可切割的接头。随后, 使用抗兔Alexa 594第二抗体和T0-PRO®-3 (Thermo Fisher Scientific) 荧光核酸染料将切片染色, 以使组织形态可见。随后, 使用由数字显微镜设备引导的聚焦UV光, 从用户限定ROI中的探针切割DNA信号寡核苷酸。对于每个组织切片, 两个ROI包含肿瘤组织, 一个ROI包含正常组织, 并且两个ROI完全不含组织 (组织学载片本身)。ROI与选择用于ISH探针切割的ROI匹配。在切割后, 来自蛋白靶标的信号寡核苷酸与来自RNA靶标的信号寡核苷酸混合, 并且所有都如上所述定量。在组织切片上进行H&E, 以核实肿瘤和正常组织ROI, 并且核实ISH和IHC组织之间的正确匹配。

[0217] 图51显示了从相同肿瘤样品的连续切片取样的ROI。区域1-4没有在这个图像中显示, 并且代之以取自不含组织的组织部分 (阴性对照 - “无组织”)。区域5-8包含少量的肿瘤细胞 (“正常组织”)。区域9-12包含大量的肿瘤细胞 (“肿瘤”)。

[0218] 图52显示了从这个测定中包含的9个RNA探针中的6个获得的计数。对于每个ROI, 在应用UV照射之前 (“-UV”数据组), 并且在从相同区域收集加UV样品之前收集样品 (“+UV”数据组)。在没有向样品应用UV时, 获得背景计数水平; 由此显示获得的信号的UV依赖性。为+UV但不指向组织的ROI (即ROI 1-4 - “无组织”)给出背景计数。主要为正常组织的区域 (即ROI 5-8 - “正常组织”)对HER2探针给出低计数 (图上的橙色条)。主要为肿瘤组织的区域 (即ROI 9-12 - “肿瘤”) 对HER2探针给出较高的计数。类似但较低显著地, 看到核糖体S6探针 (图中的绿色条) 的增加。靶向预期不在这个组织类型中高度表达的RNA的其他对照探针给出一致的计数, 其在正常和肿瘤组织之间没有显示差别的水平。这些对照探针设计为靶向CD45、PSA (前列腺特异性抗原), 和两个独特ERCC序列。为了清楚考虑, 图53显示了图52中所示数据的平均值和标准偏差。

[0219] 这些RNA探针样品也与分析肿瘤样品的样品区域的蛋白探针同时运行。为此, 将RNA和蛋白探针同时杂交至nCounter®分子条码, 并通过来自NanoString Technologies®的nCounter®系统数字化计数。这个测定的计数显示在图54中。与正常区域相比, 在肿瘤区域中看到HER2 RNA探针计数 (上部小图中的红色条) 和蛋白探针计数 (下部小图中的红色和橙

色条)的增加。显示了仅+ UV样品。如上所述,- UV对照样品在这个图中没有显示,因为它们给出背景计数(类似于“无组织”计数)。从这个分析删除了ROI 6和ROI 8,因为没有获得匹配的蛋白探针样品。因此,来自蛋白探针的信号寡核苷酸和来自RNA探针的信号寡核苷酸可以在一起检测和定量。

[0220] 实施例17:部分双链的探针在与单链探针相比时,具有更高的信噪比。

[0221] 如实施例16中所述,将DNA探针(识别并结合mRNA)与5 μm FFPE组织中的RNA原位杂交。使用UV灯箱(凝胶盒),在2X SSC + 0.1% Tween 20中,对封装在分离的载片上的全组织切片进行UV切割3分钟。在切割并释放信号寡核苷酸后,如在实施例16中所述,通过吸管收集信号寡核苷酸并检测。在图55(上部小图)中显示了HER2 3+乳房组织和扁桃体组织的单链DNA探针、部分双链DNA探针和无探针对照的计数。通过将计数除以平均背景计数(平均ERCC计数),测定信噪比;参见图55,下部小图。

[0222] 图18:鲑鱼精DNA的添加改进探针杂交。

[0223] 如上所述,将DNA探针(识别并结合mRNA)与5 μm FFPE组织中的RNA原位杂交。在杂交期间,使用1 mg/ml超声处理的变性鲑鱼精DNA代替酵母tRNA。使用1nM探针、40%甲酰胺、1mg/ml超声处理的变性鲑鱼精DNA、10%硫酸葡聚糖,和0.2% BSA在2X SSC中的溶液,杂交载片。如在实施例17中所述,进行UV切割以及信号寡核苷酸收集和检测。在HER2 3+乳房和扁桃体(图56)中显示单链DNA探针。通过将计数除以平均背景计数(平均ERCC计数),测定信噪比。

[0224] 实施例19:PSA(前列腺特异性抗原) RNA探针是高度特异性的。

[0225] 如上所述,将DNA探针(识别并结合mRNA)与FFPE前列腺的5 μm切片中的RNA原位杂交。使用在97°C的MES中的10分钟温育代替1小时乙醇温育。如在实施例17中所述,进行UV切割、信号寡核苷酸收集和检测,以及信噪比计算。计数和比例显示在图57中。

[0226] 图20:探针特异性在非标准的亚nM浓度下提高。

[0227] 典型地,用于识别RNA的原位杂交(ISH)探针在5-200 nM杂交。预想不到地,本发明的核酸识别探针在0.2 nM或低于0.2 nM的表现最好,这比标准ISH探针浓度低25-1000倍。

[0228] 如上所述,将DNA探针与FFPE HER2 3+乳房样品的5 μm切片中的RNA原位杂交。探针以5、1、0.2和0.4 nM使用。如在实施例17中所述,进行UV切割、信号寡核苷酸收集和检测,以及倍数变化计算。

[0229] 图58显示计数随着探针浓度降低而减少(上部小图)。然而,预想不到地,探针在亚nM浓度下杂交时,在将阳性探针计数与阴性对照探针相比时,存在显著的信号比收益。

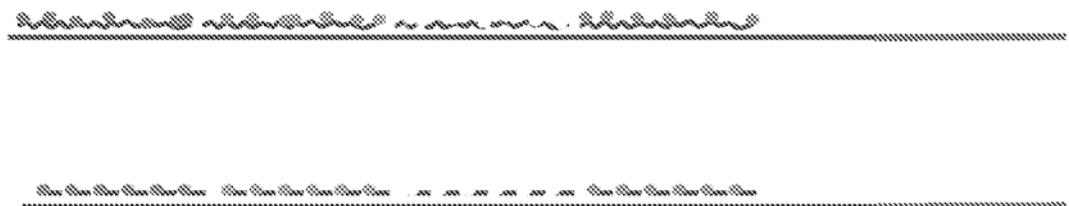


图 1

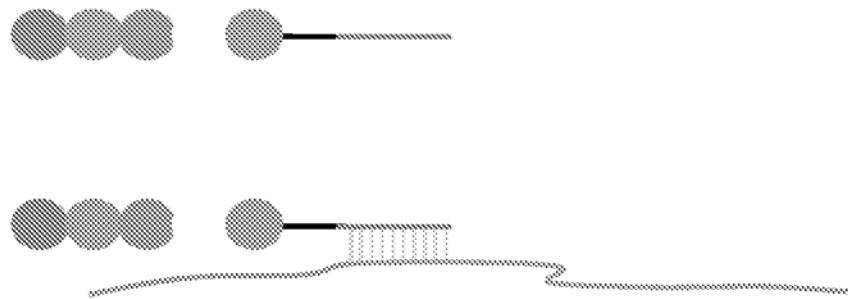


图 2

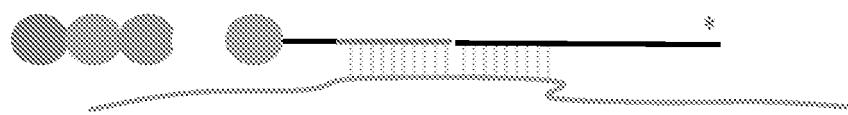


图 3

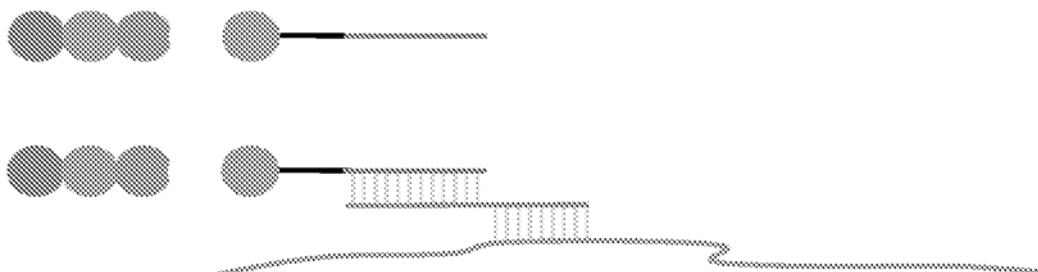


图 4

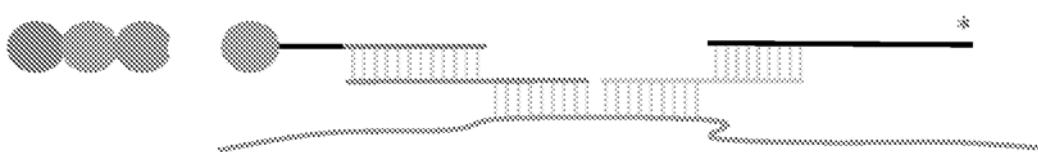


图 5

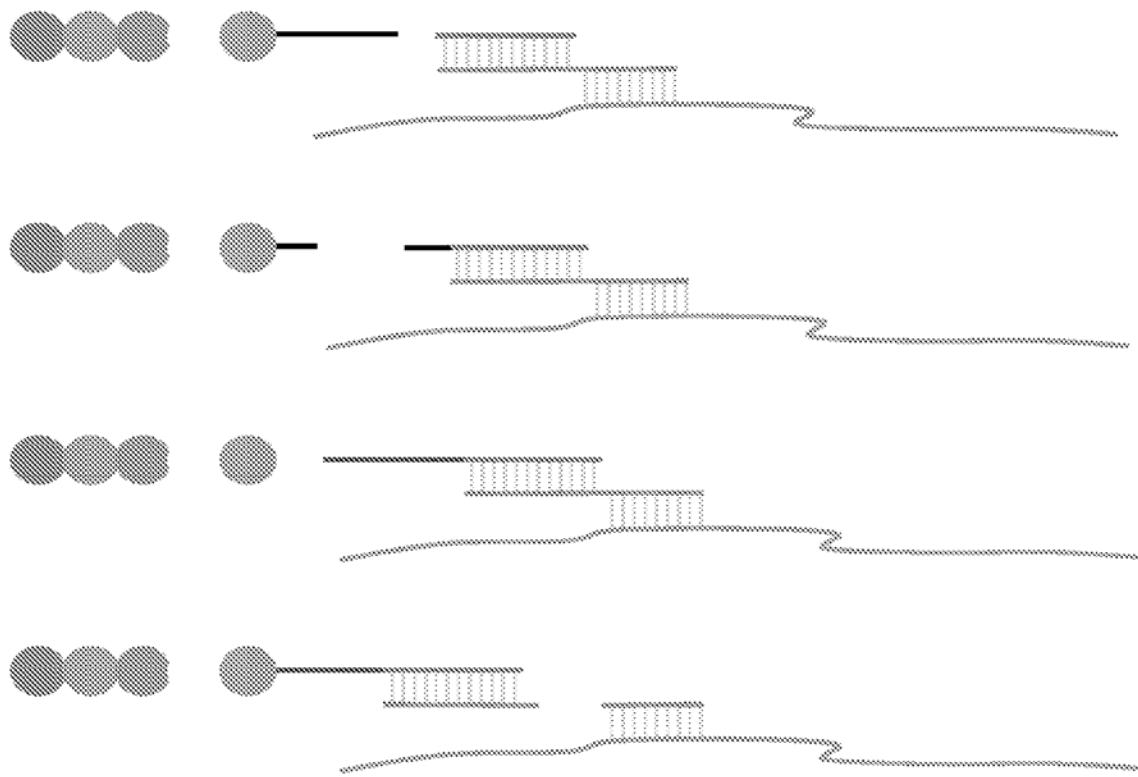


图 6

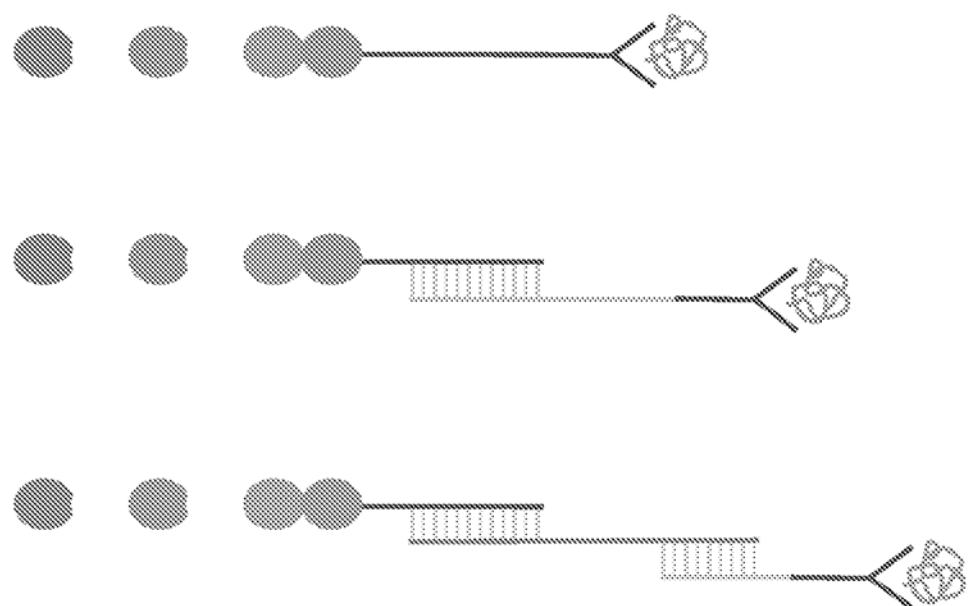


图 7

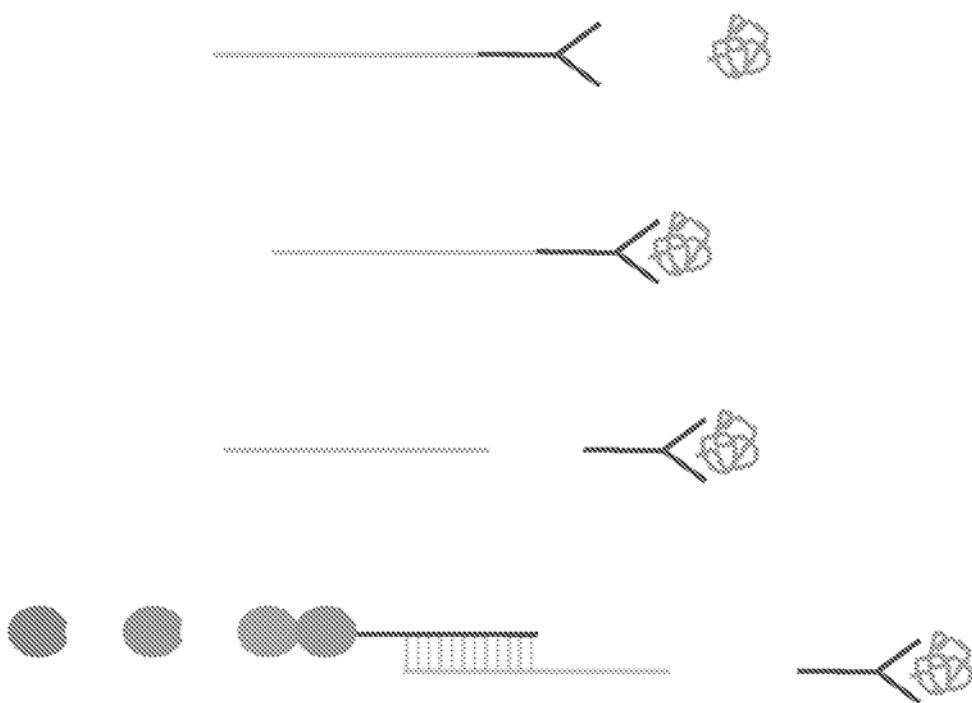


图 8

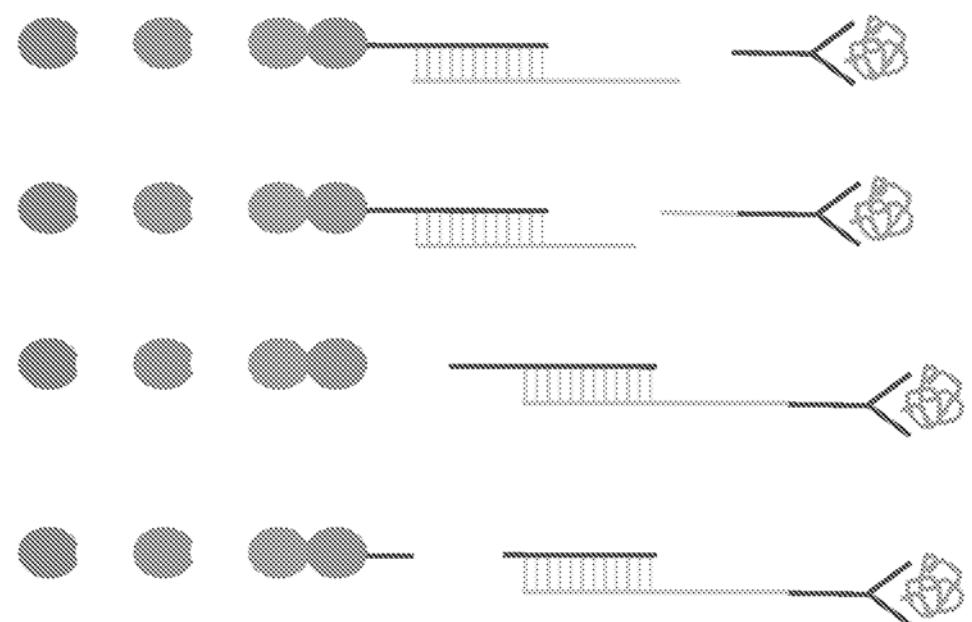


图 9

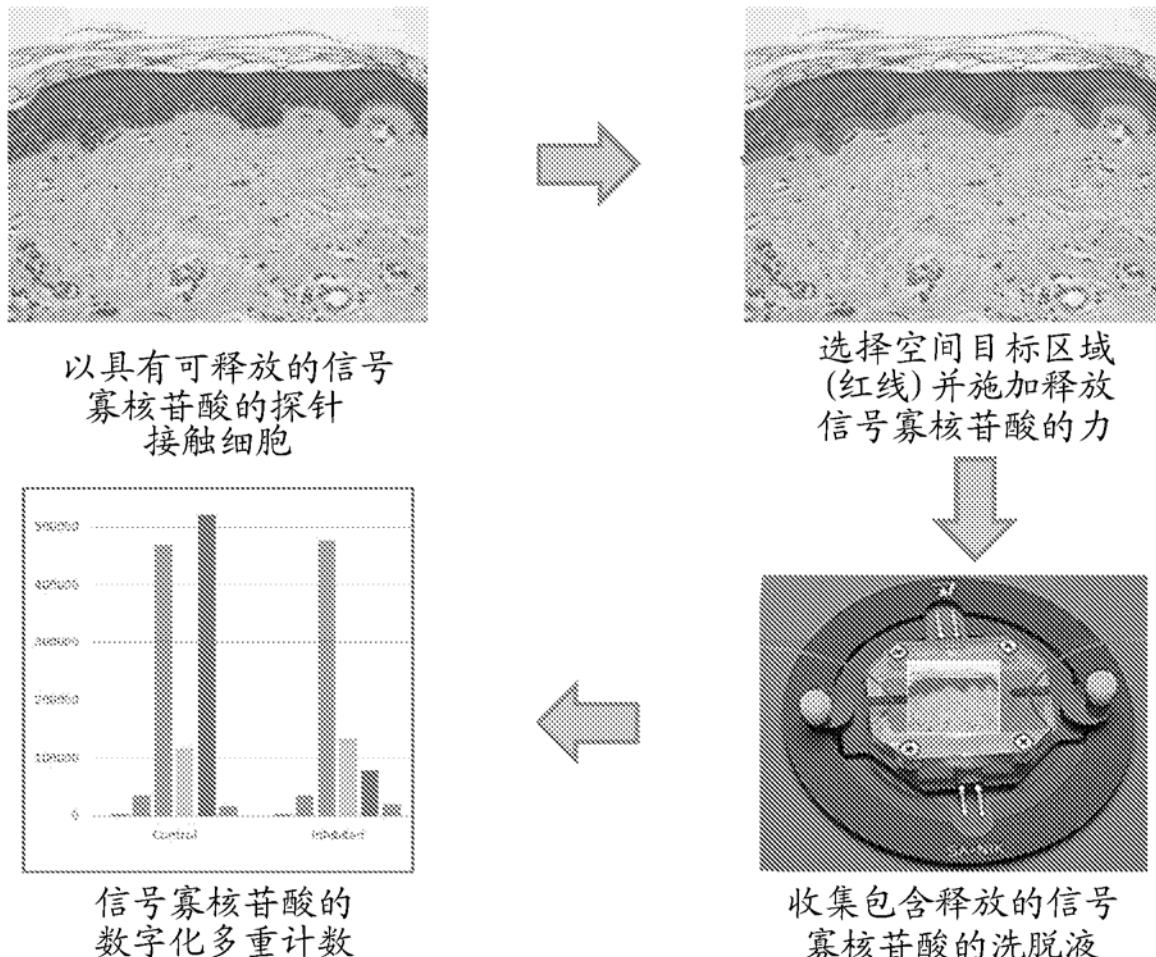


图 10

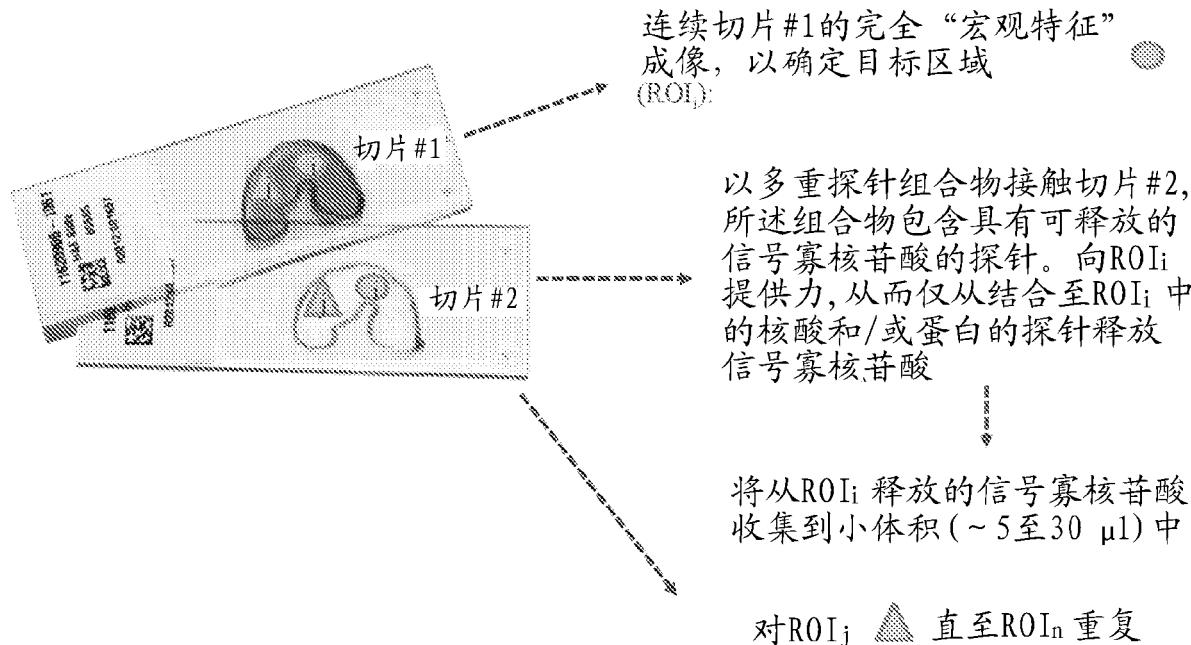


图 11

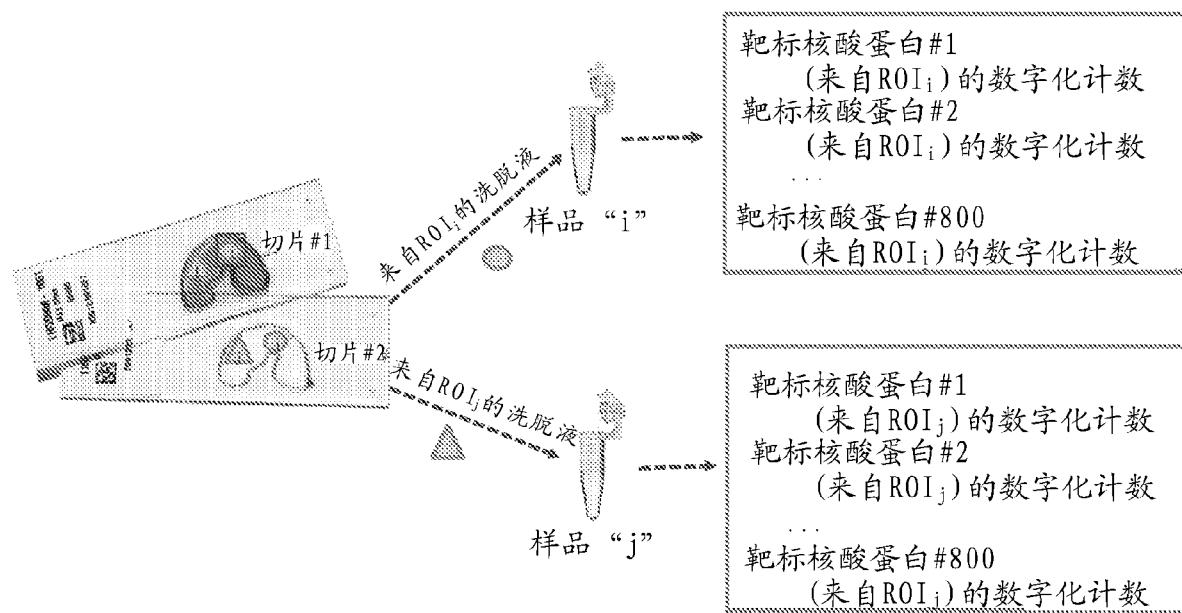


图 12

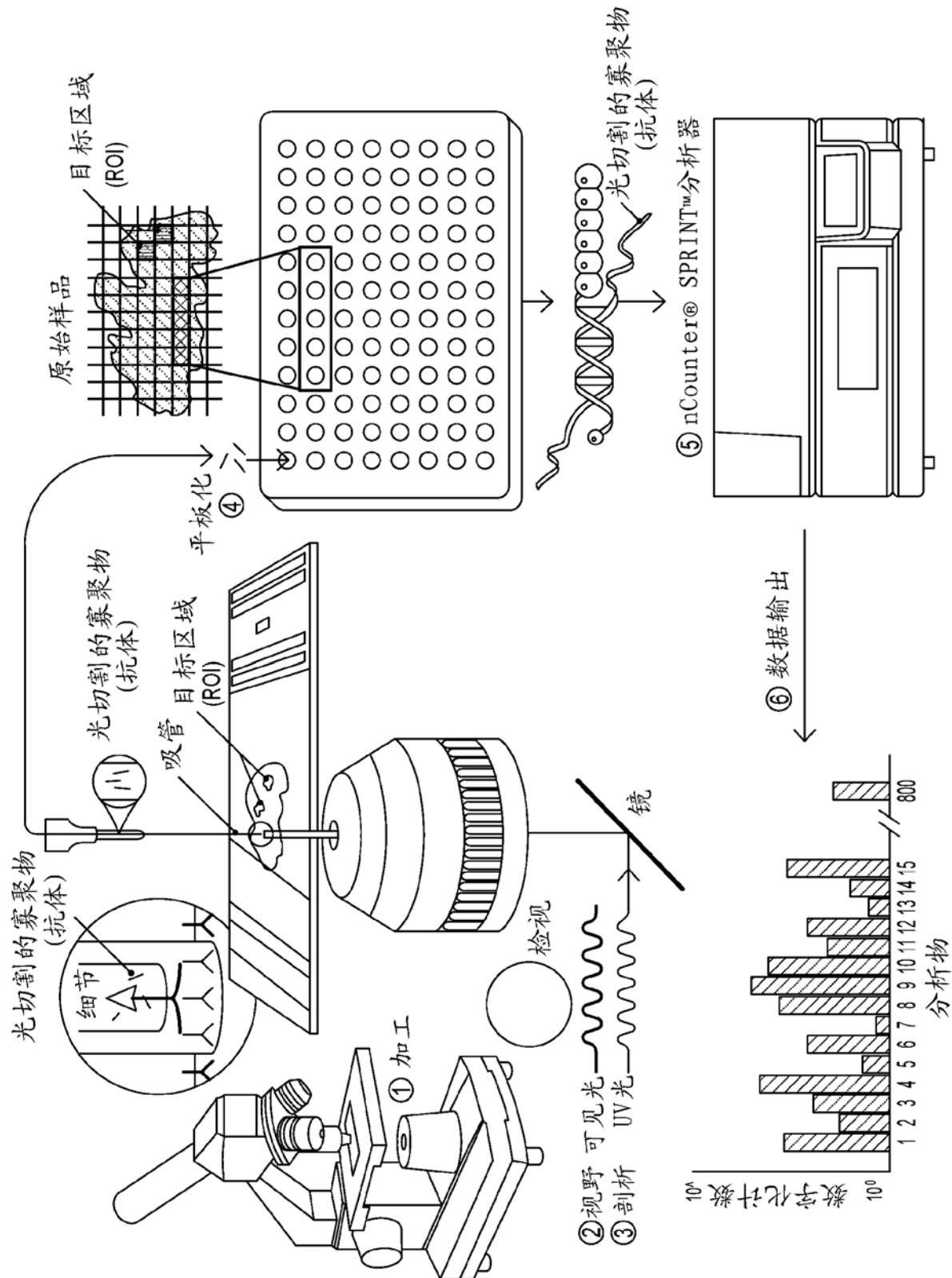


图 13

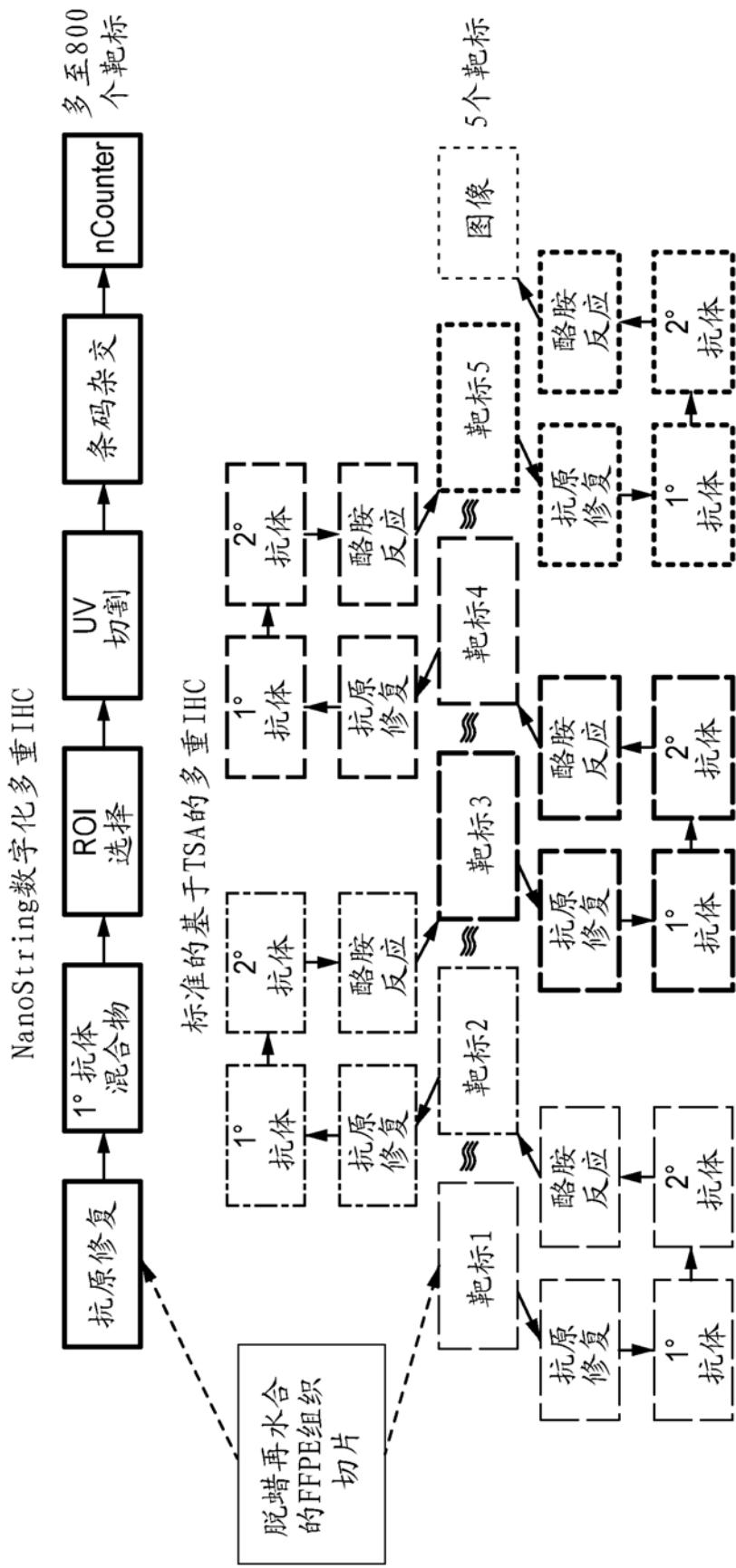


图 14

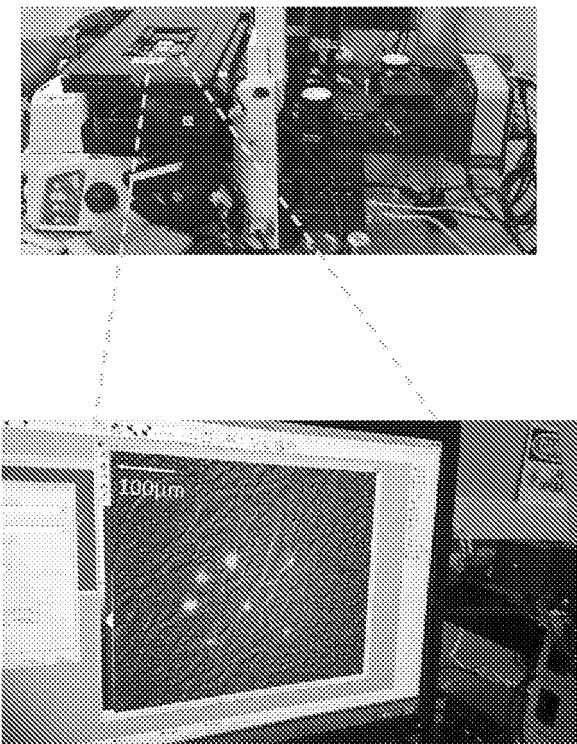


图 15

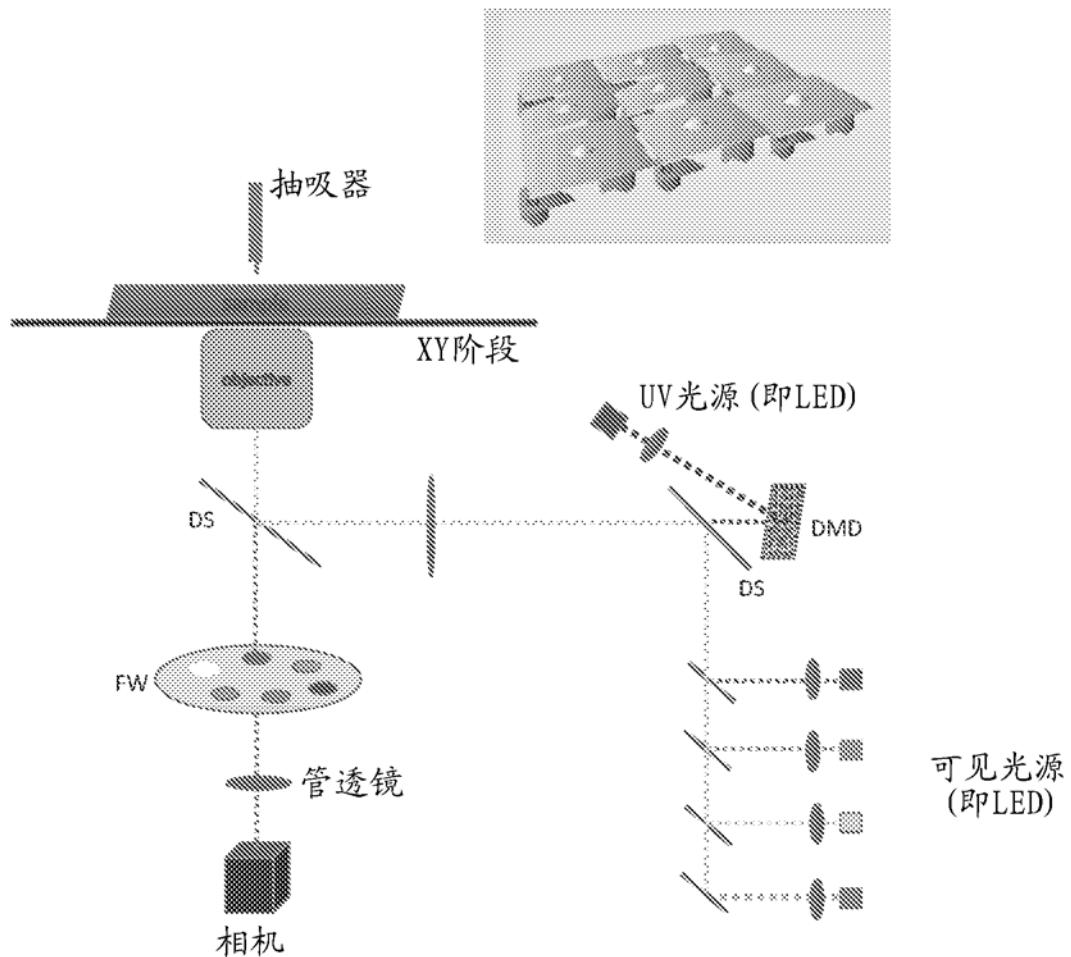


图 16

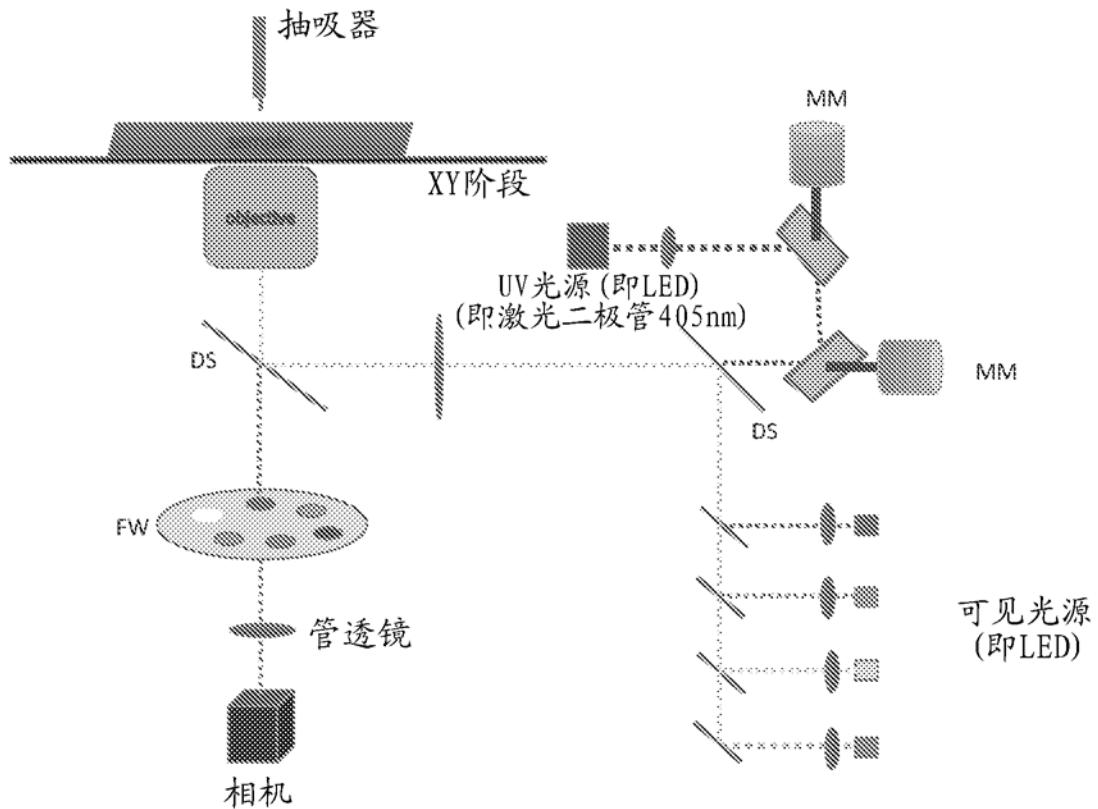


图 17

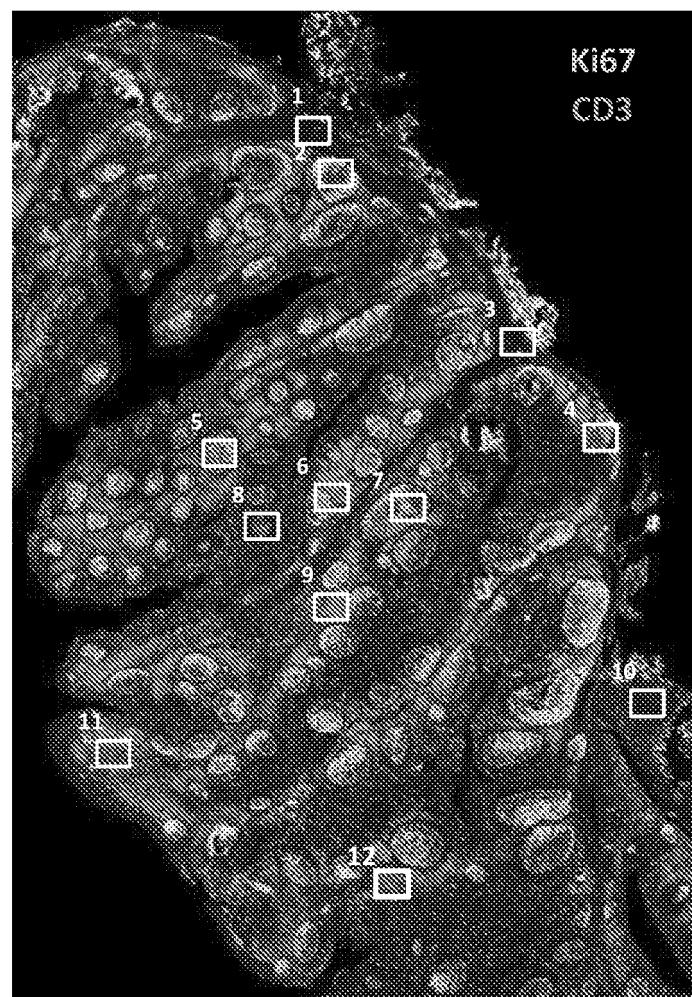


图 18

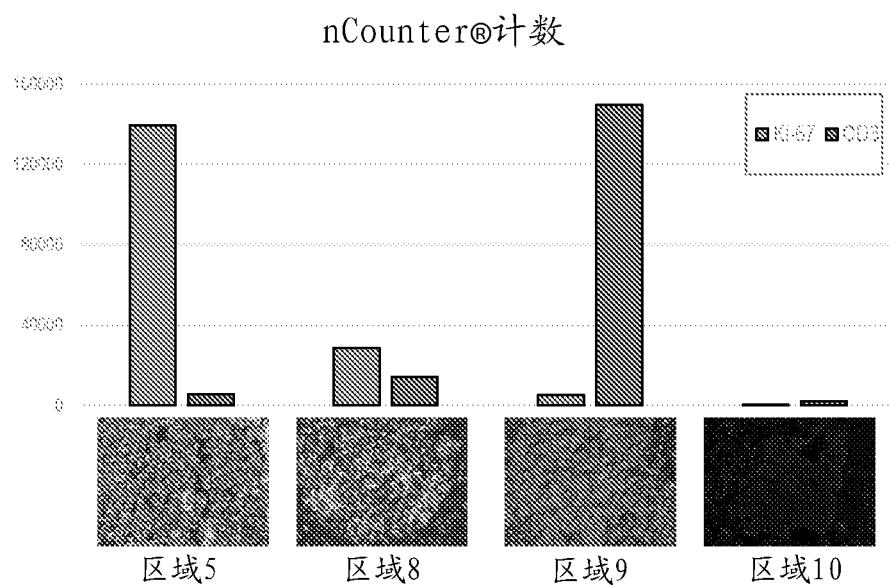


图 19

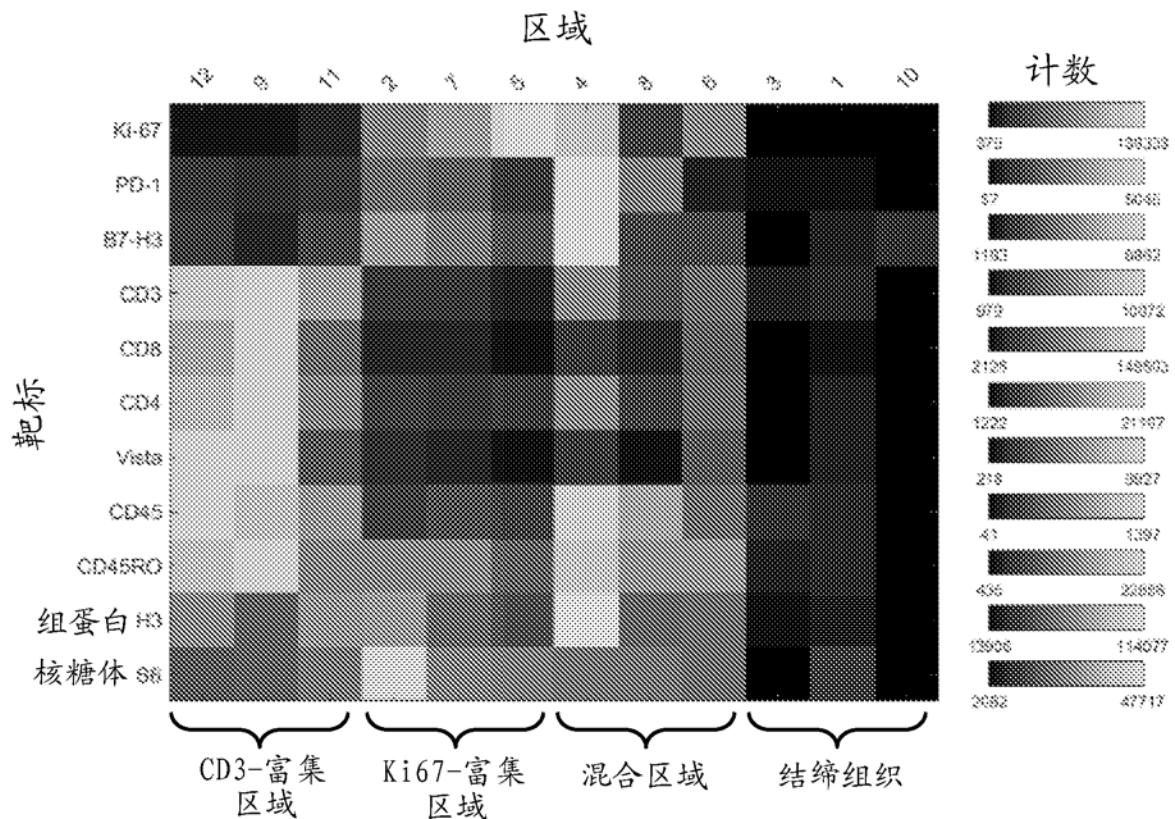


图 20

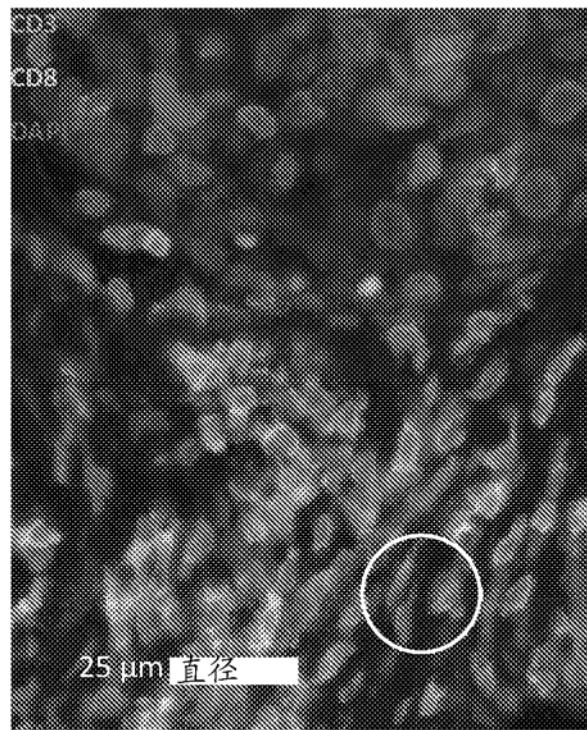


图 21

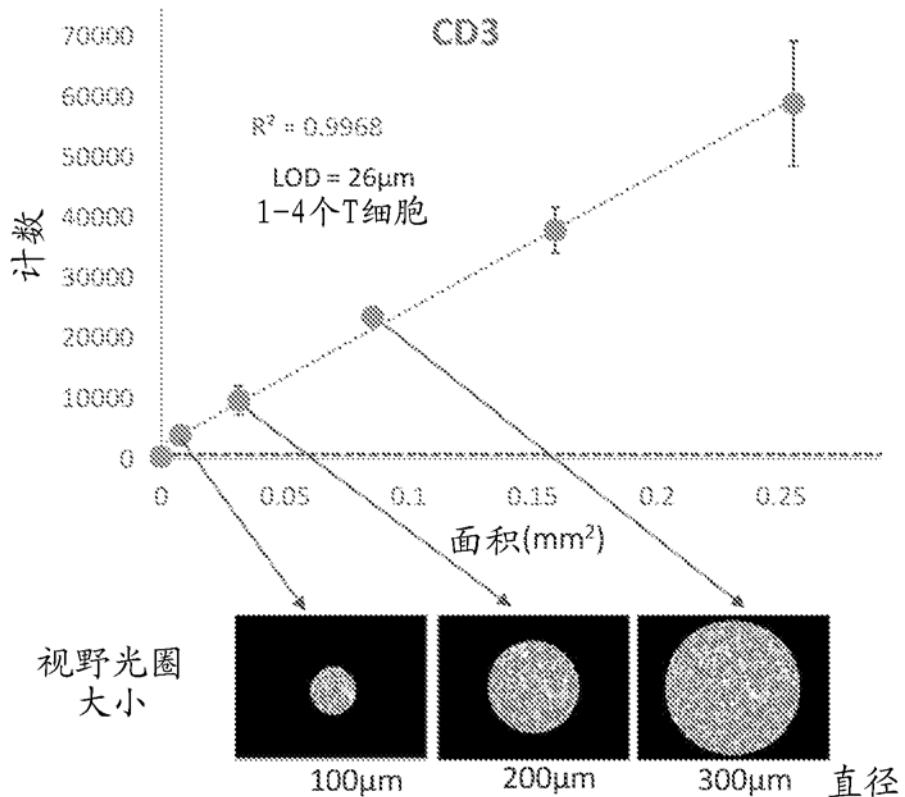


图 22

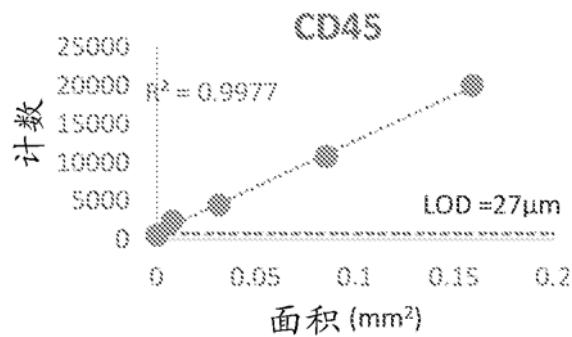


图 23

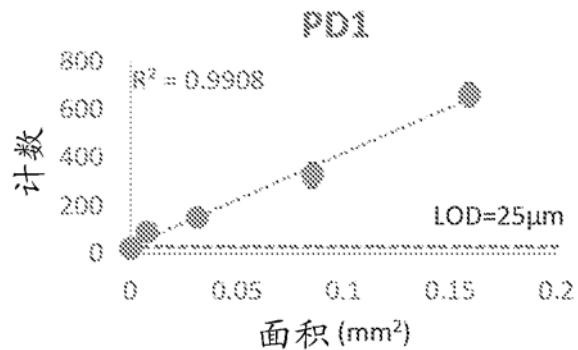


图 24

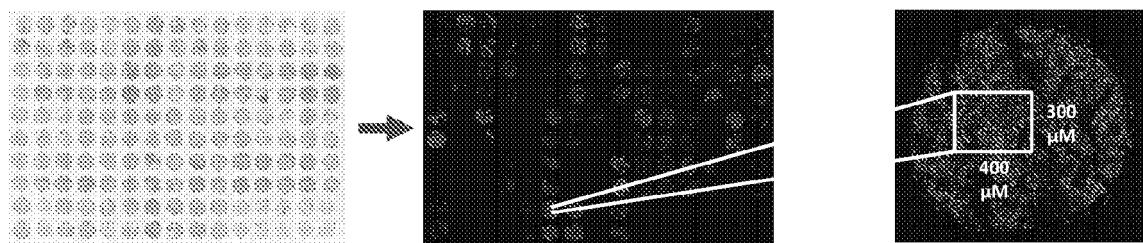


图 25

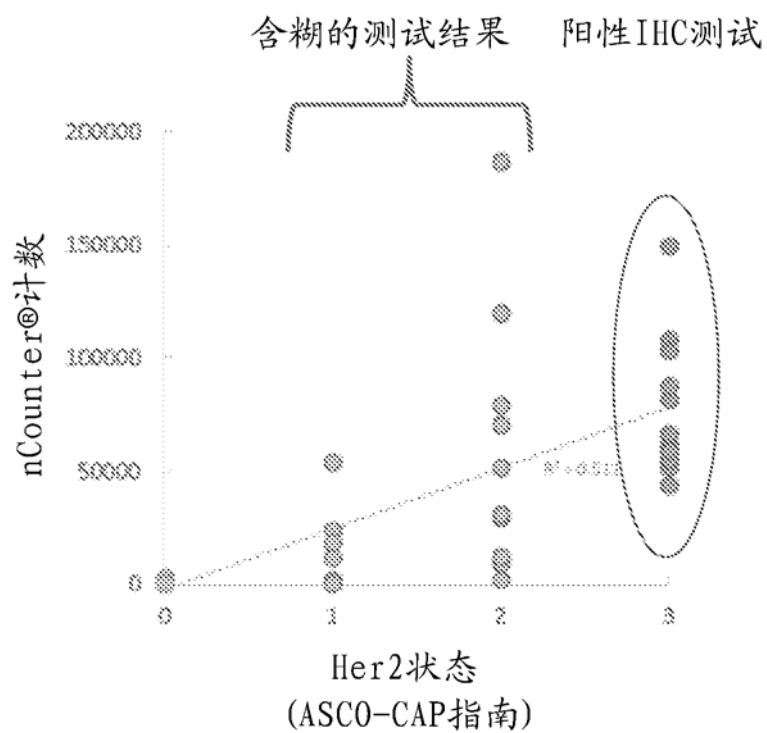
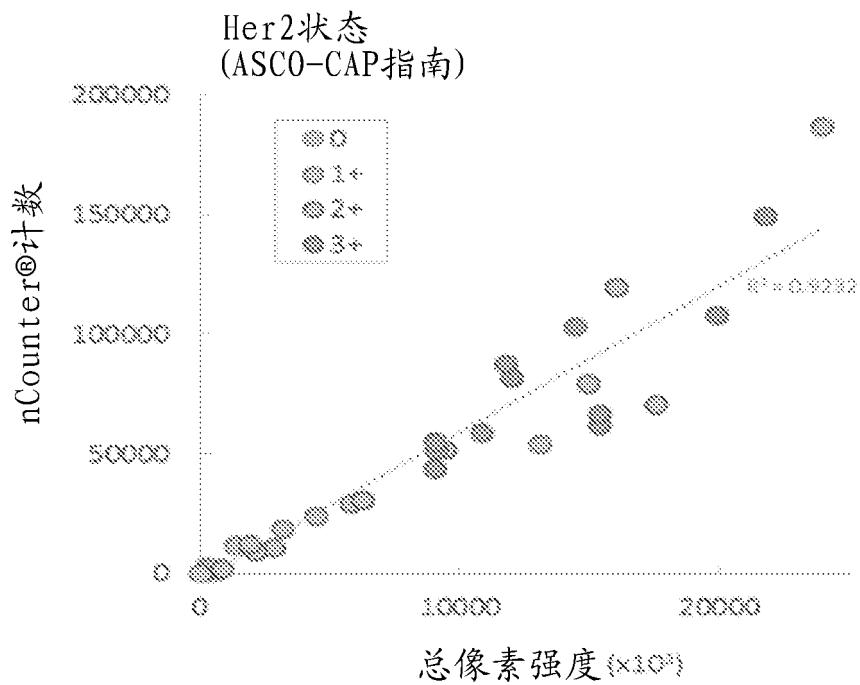


图 26



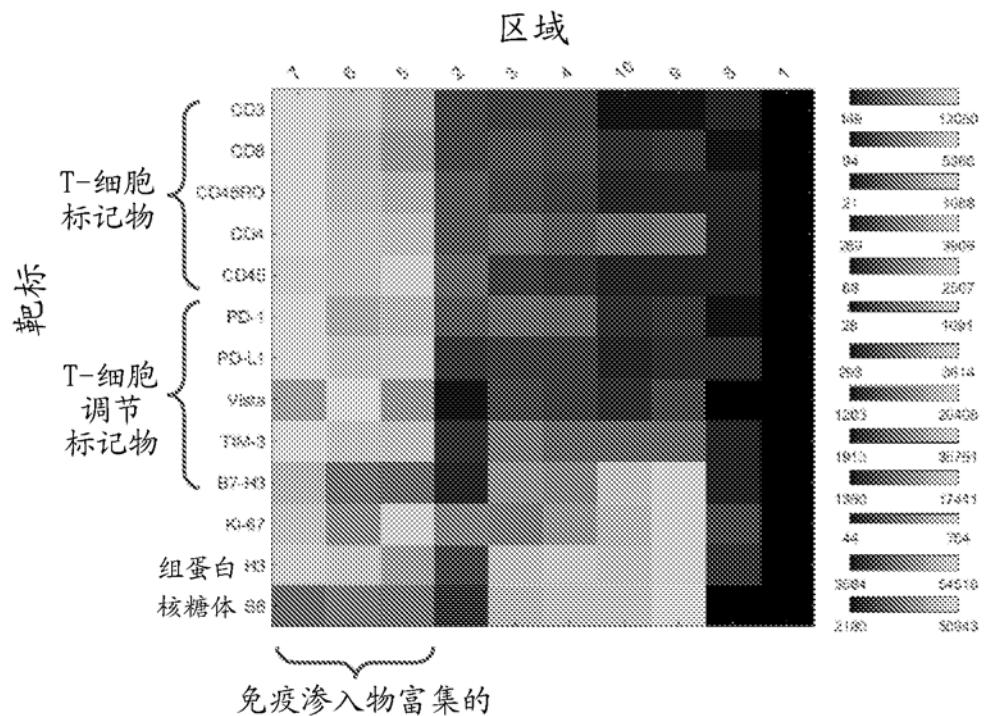


图 29

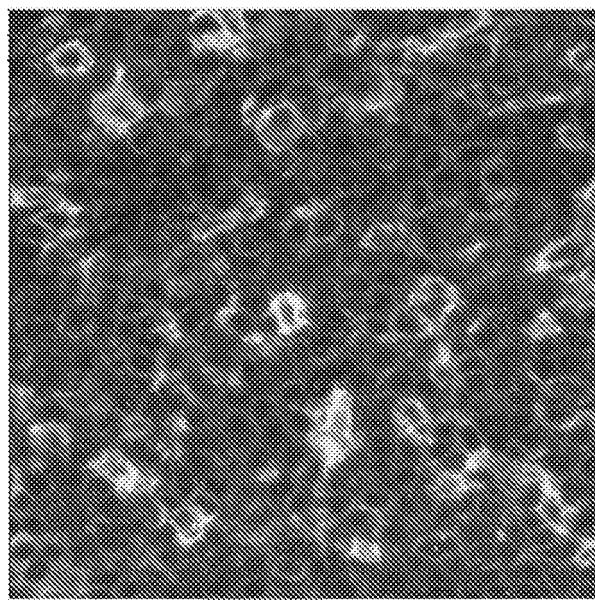


图 30A

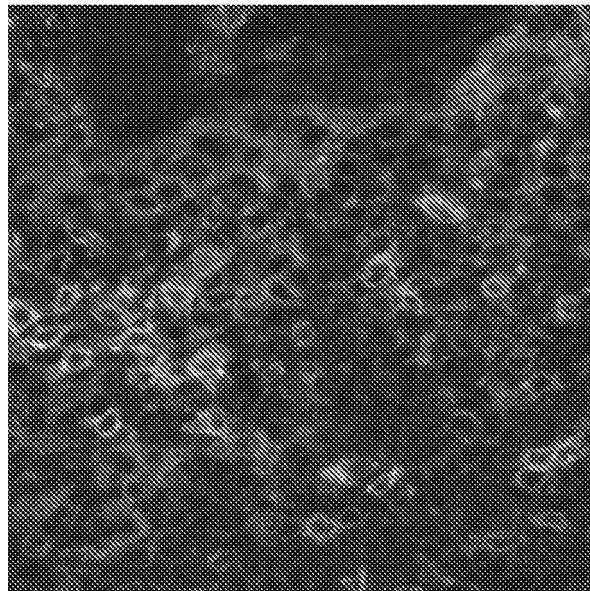


图 30B

图 31B

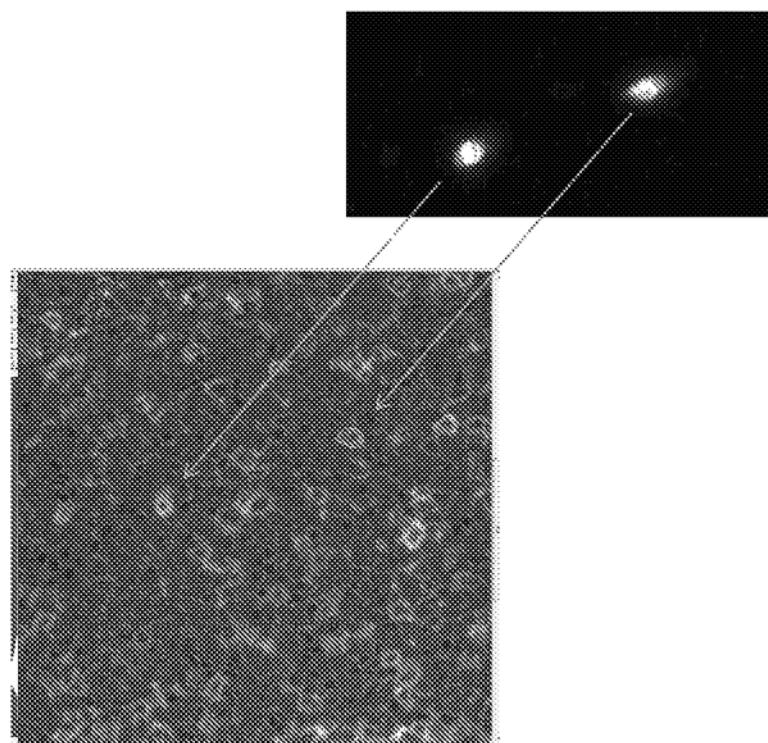


图 31A

图 31D

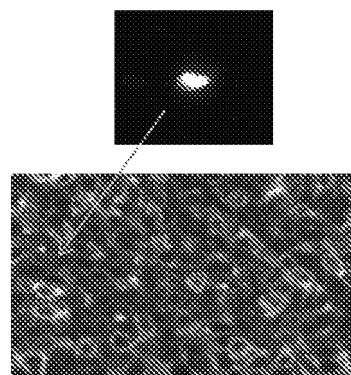


图 31C

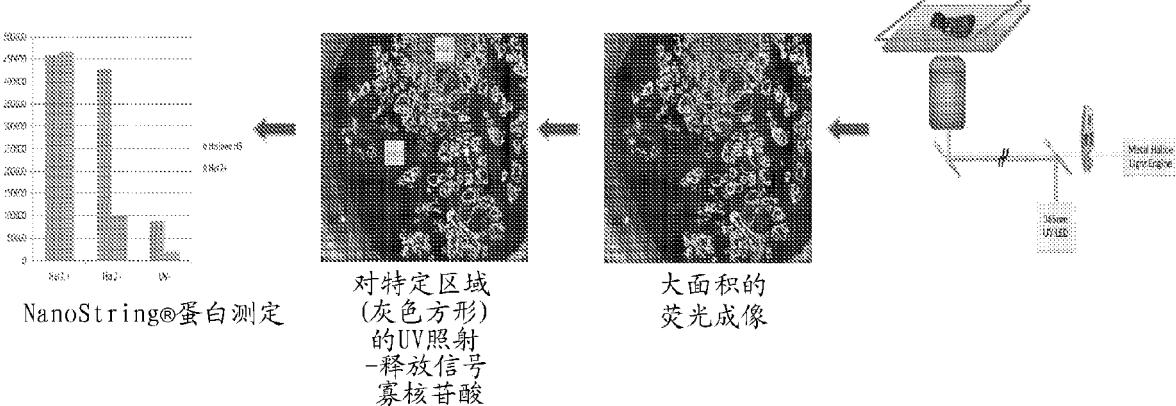
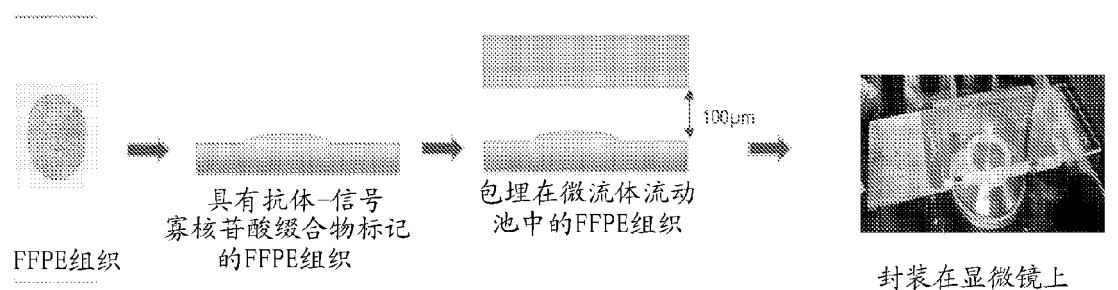


图 32

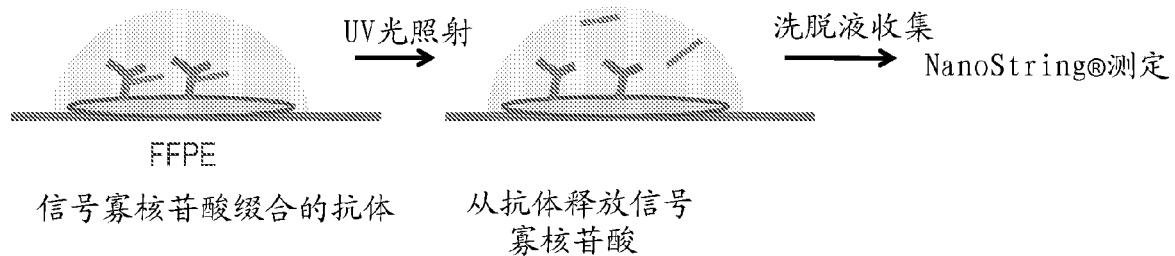


图 33

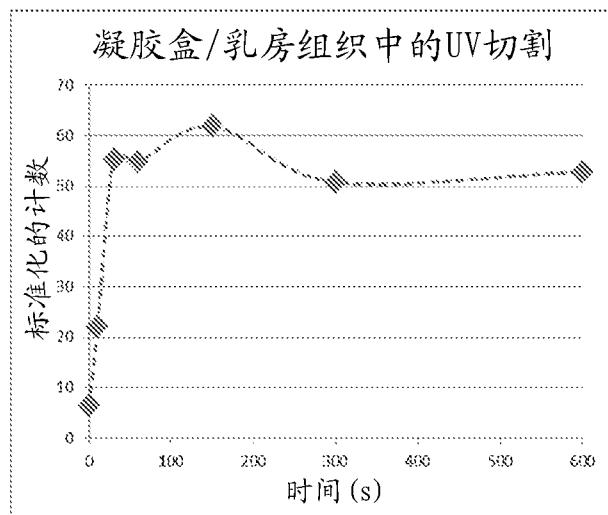
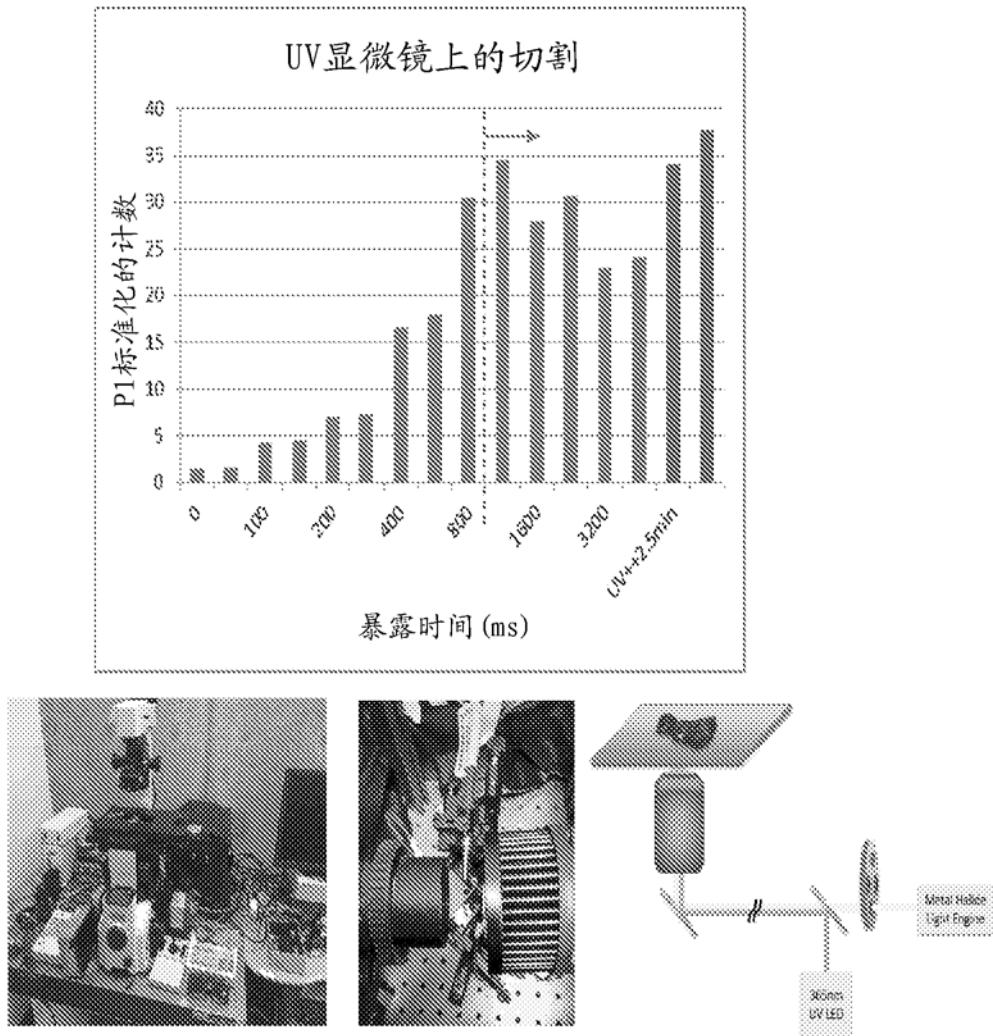


图 34



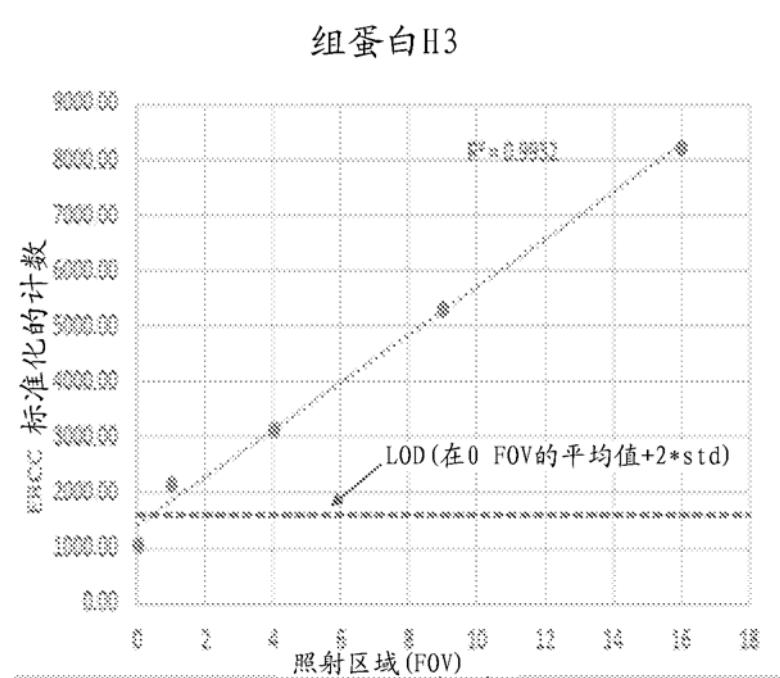


图 36

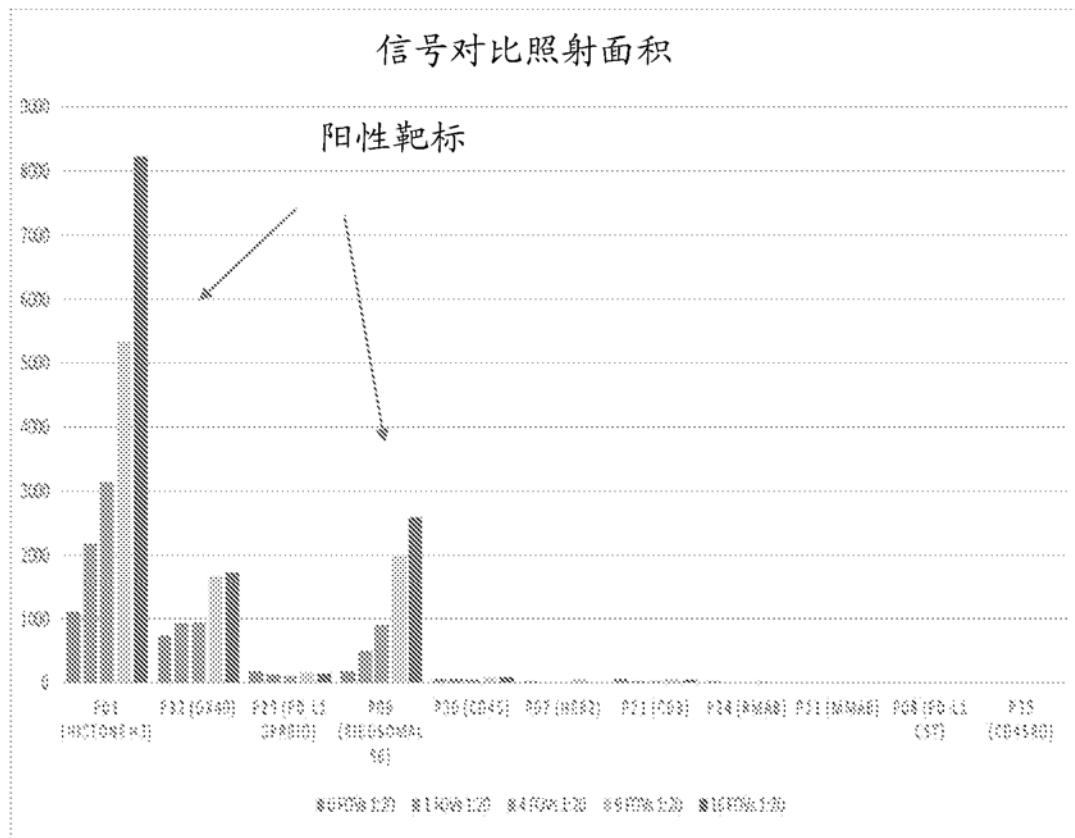


图 37

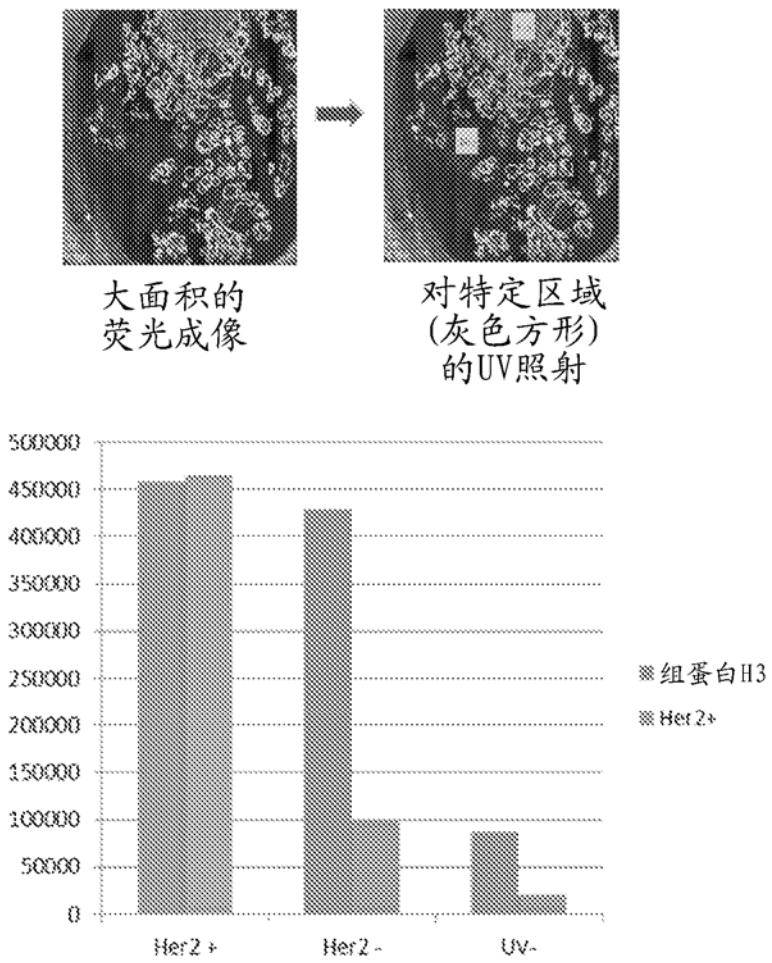


图 38

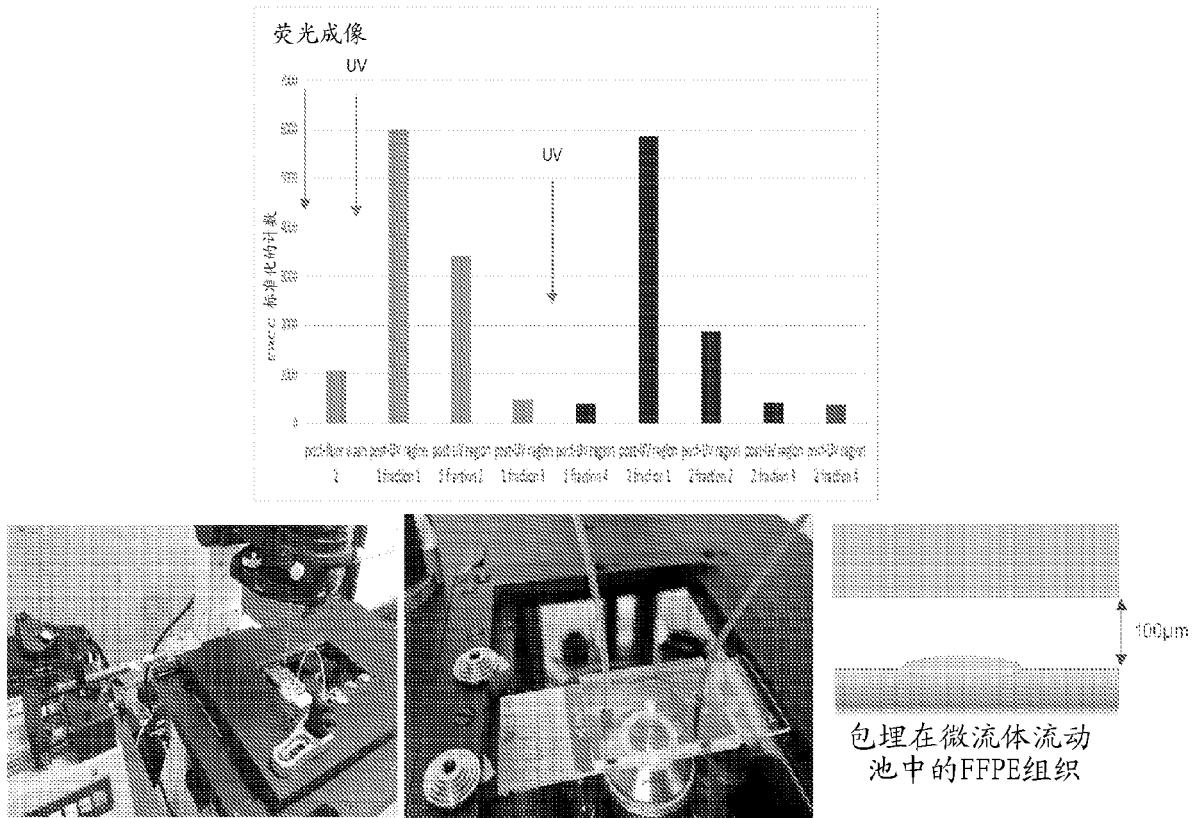


图 39

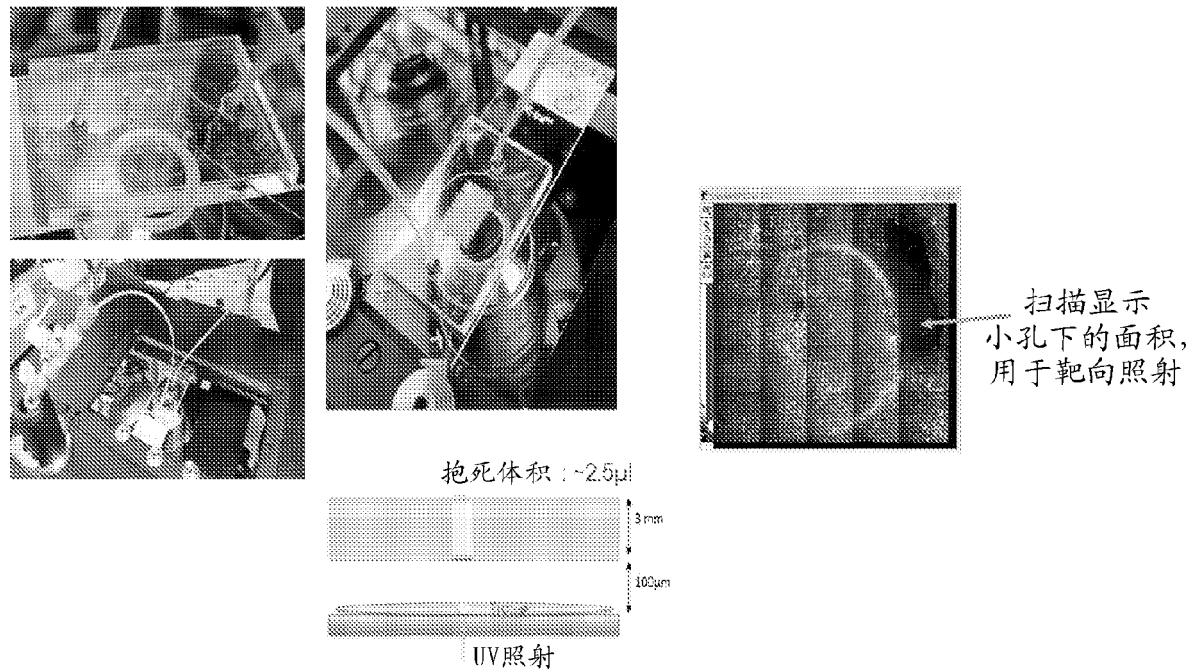


图 40

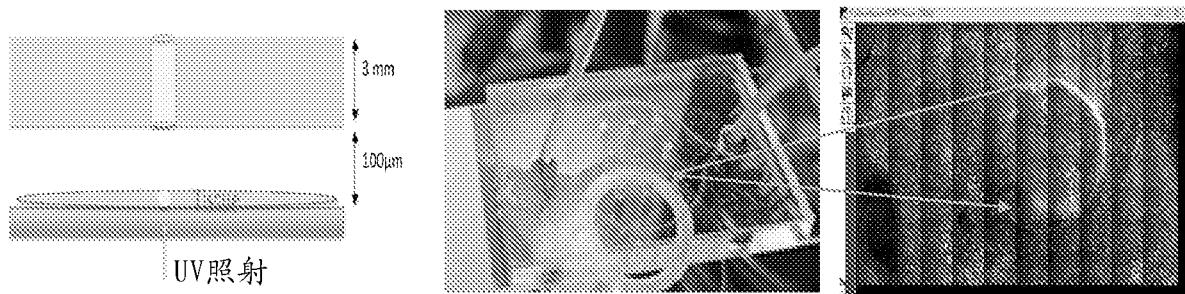


图 41A

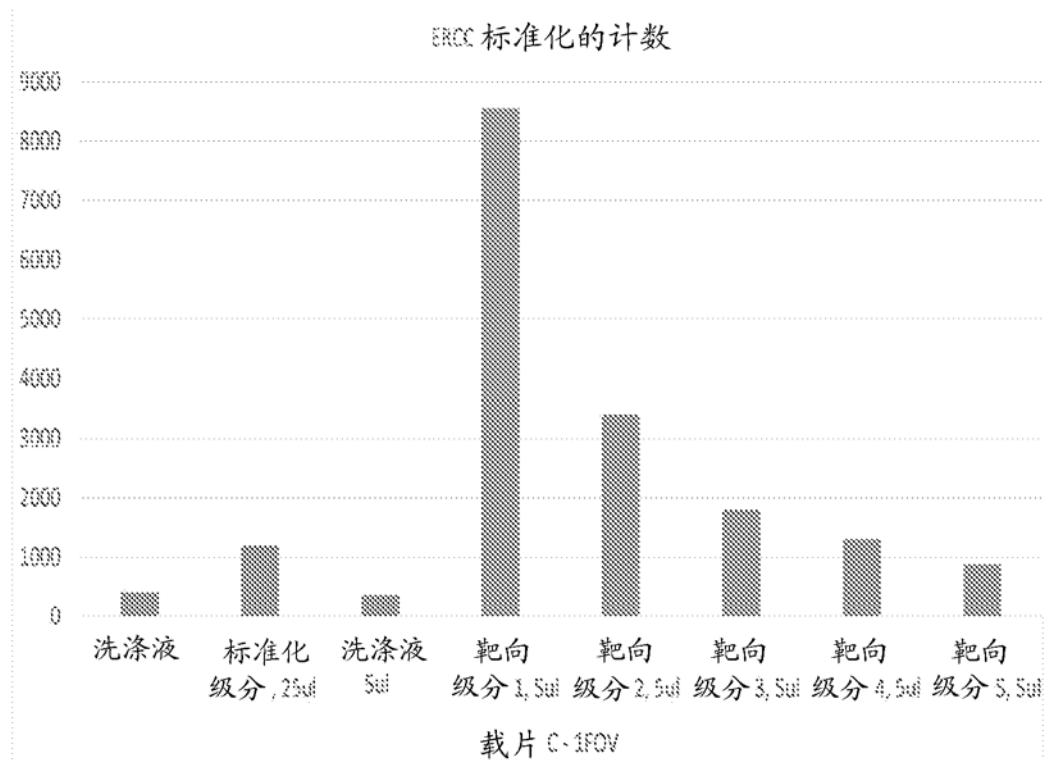


图 41B

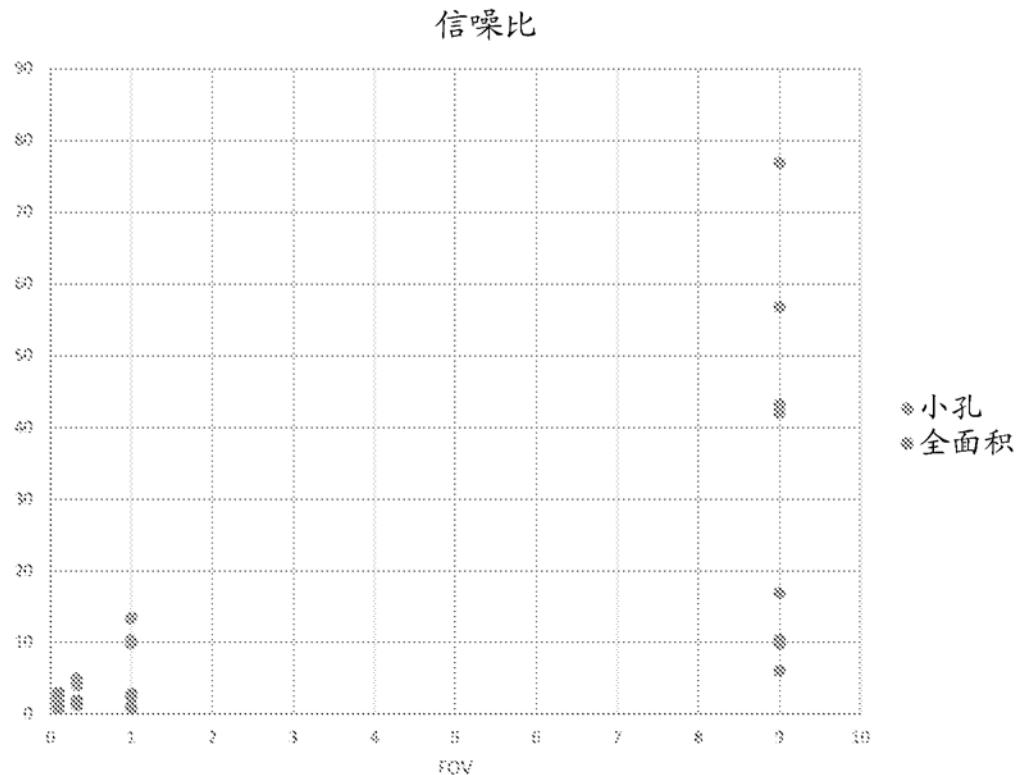


图 41C

12孔形式

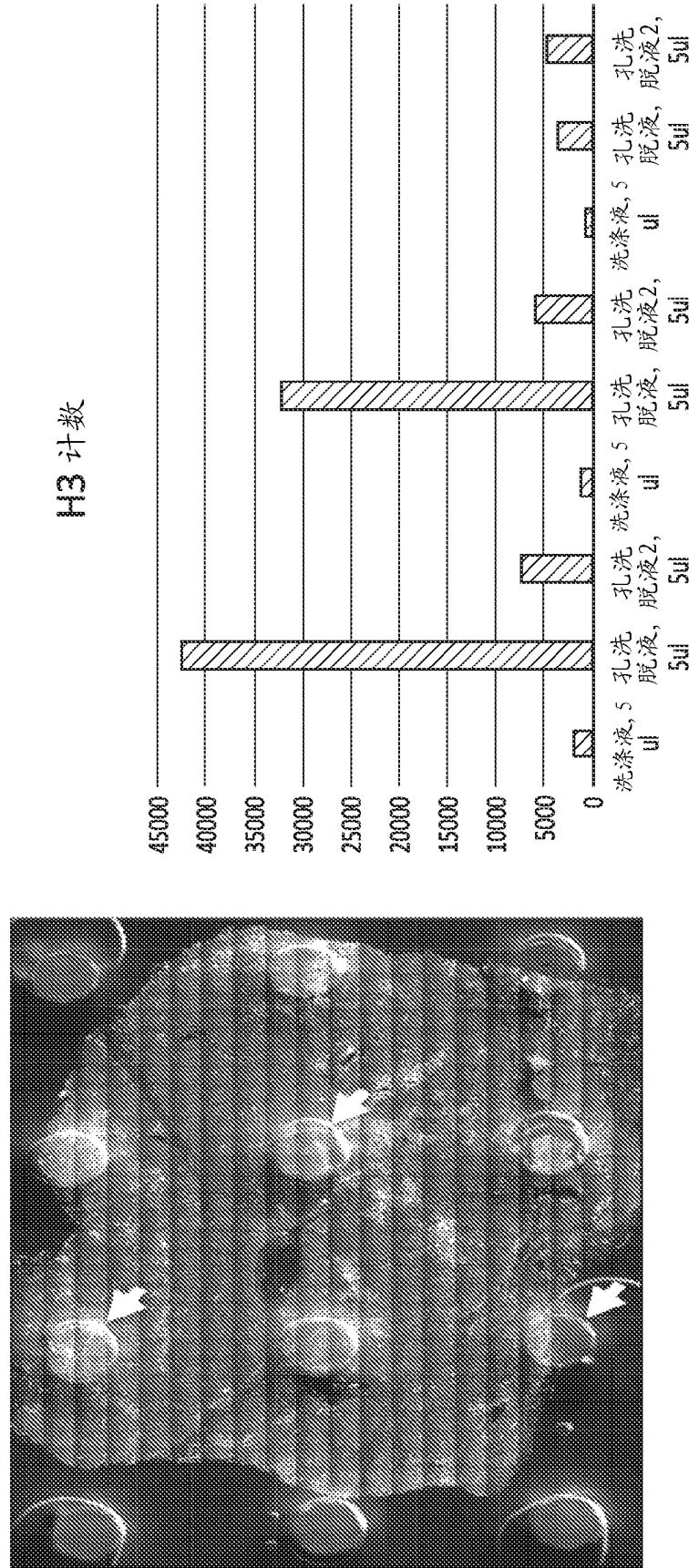
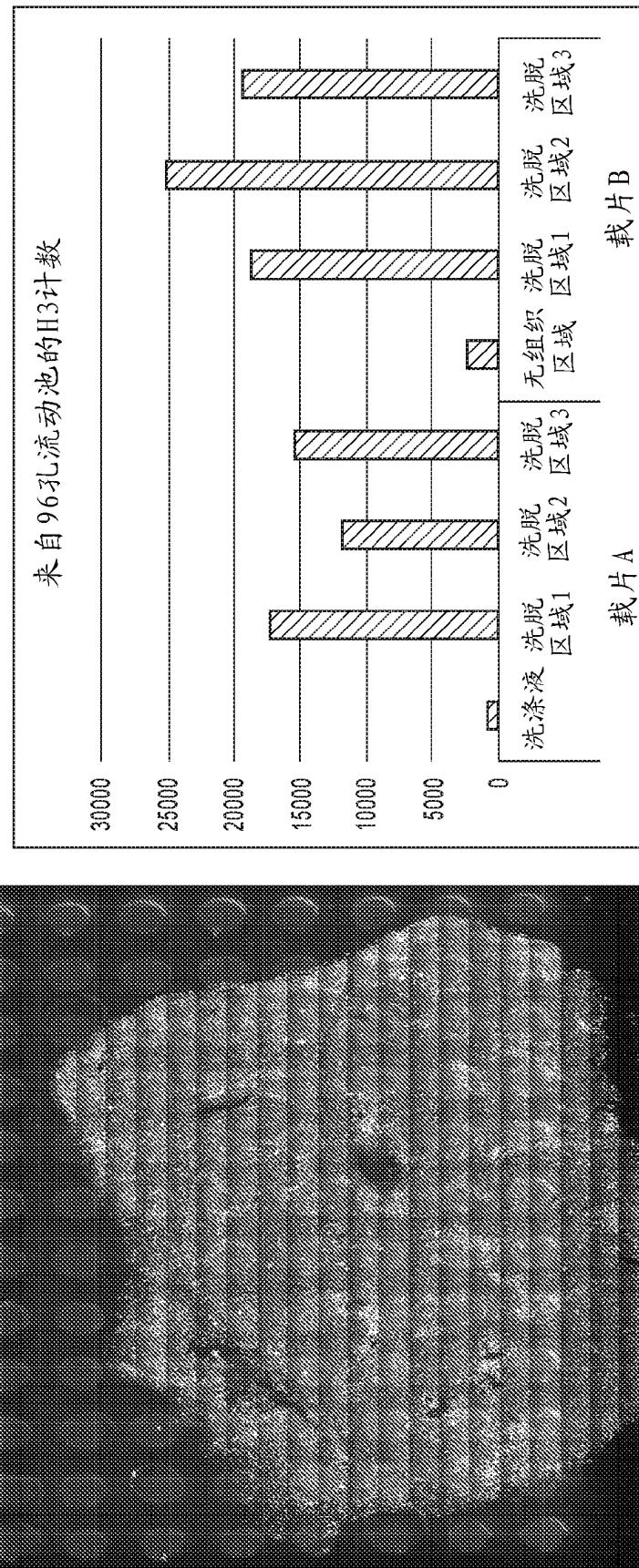


图 42A

96孔形式



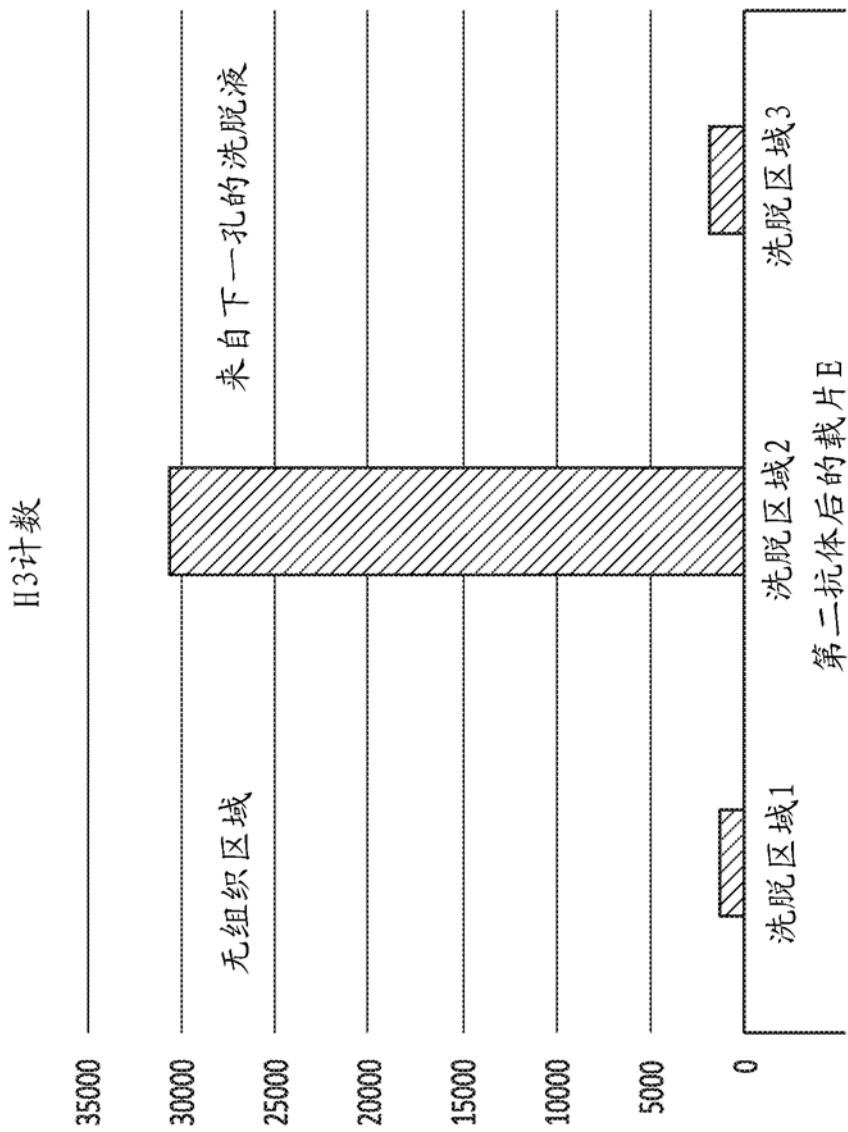


图 42C

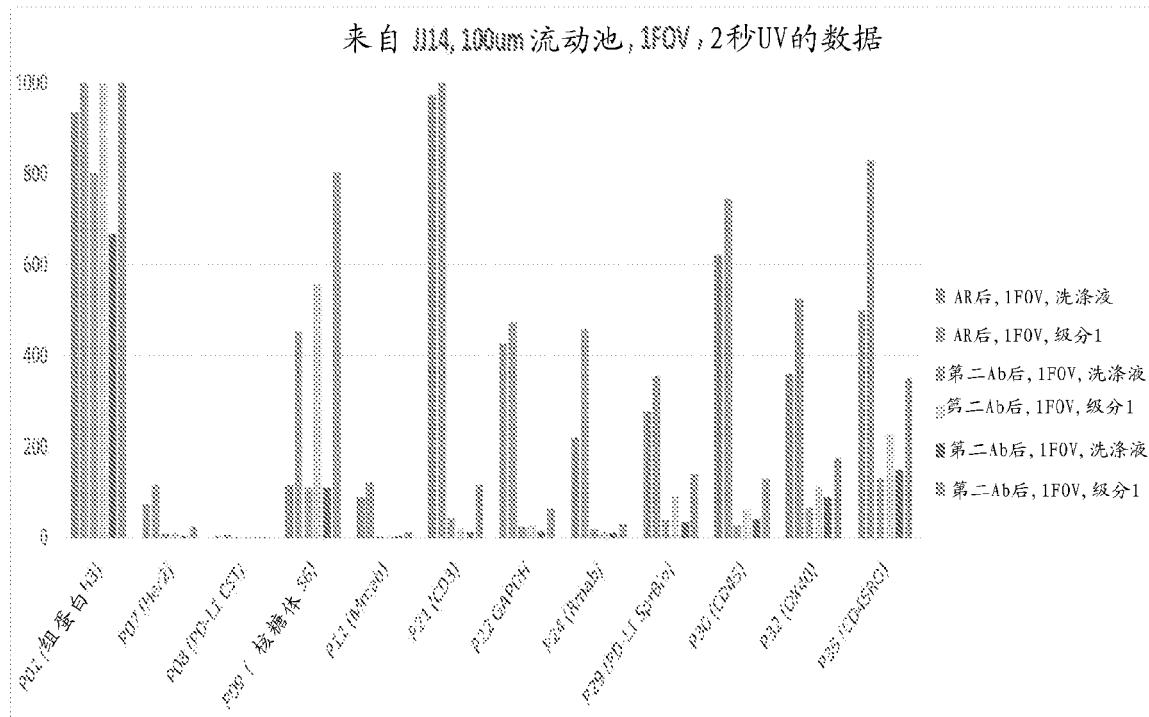


图 43A

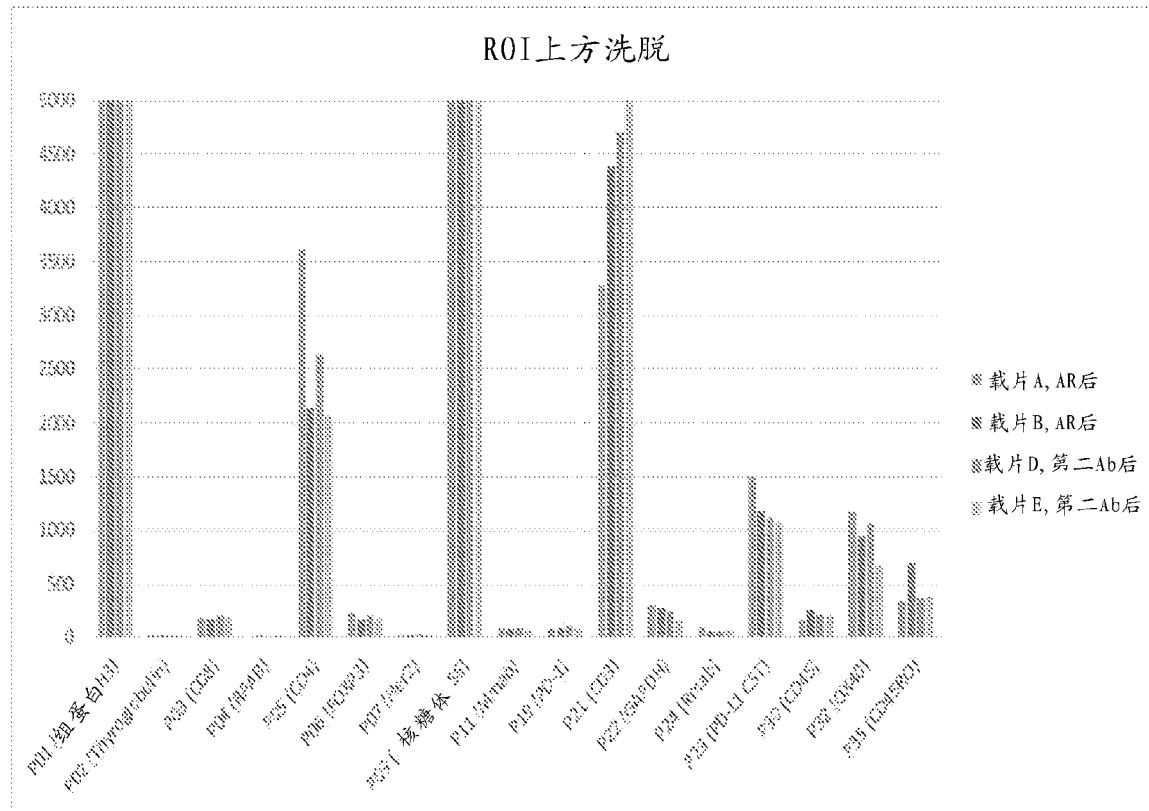


图 43B

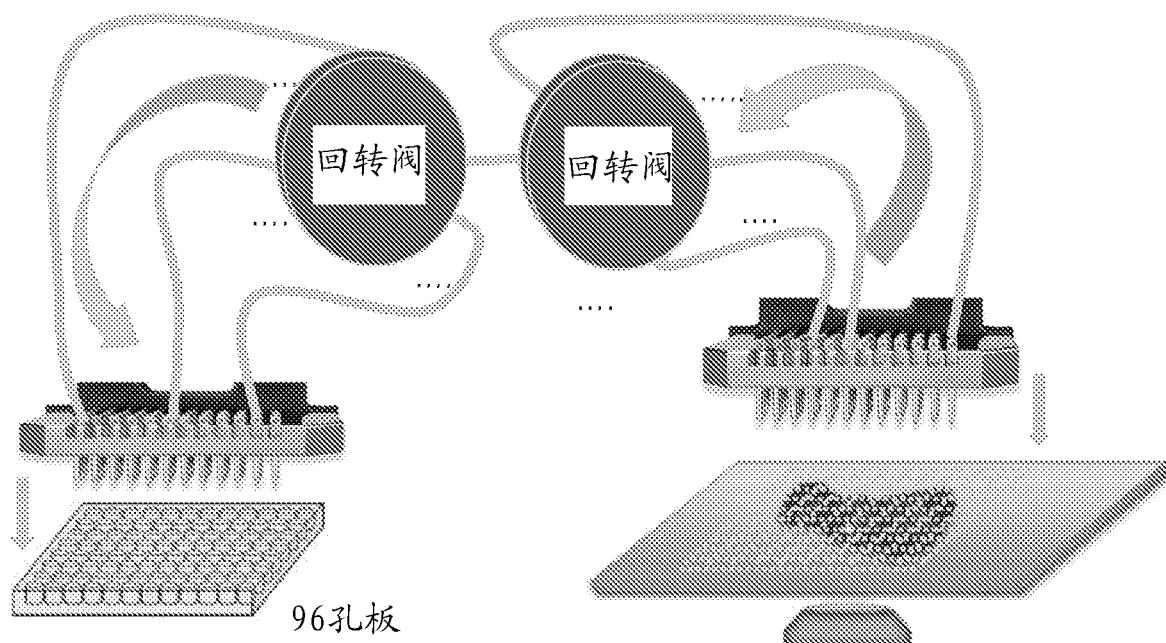


图 44

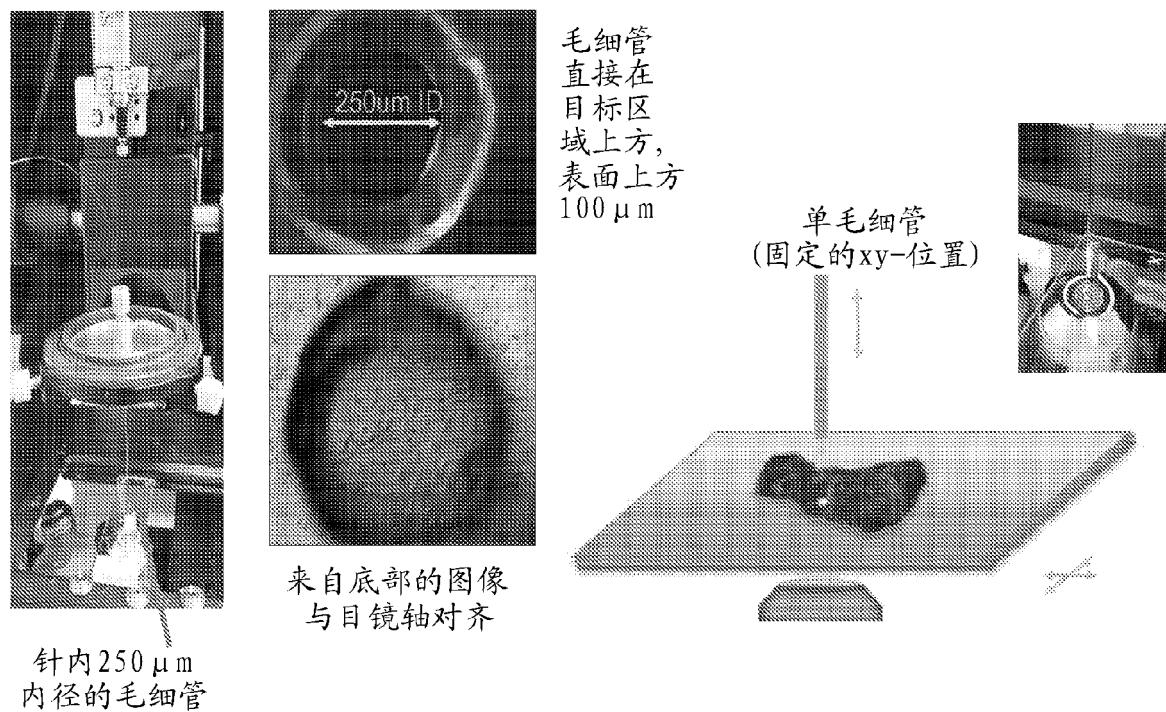


图 45

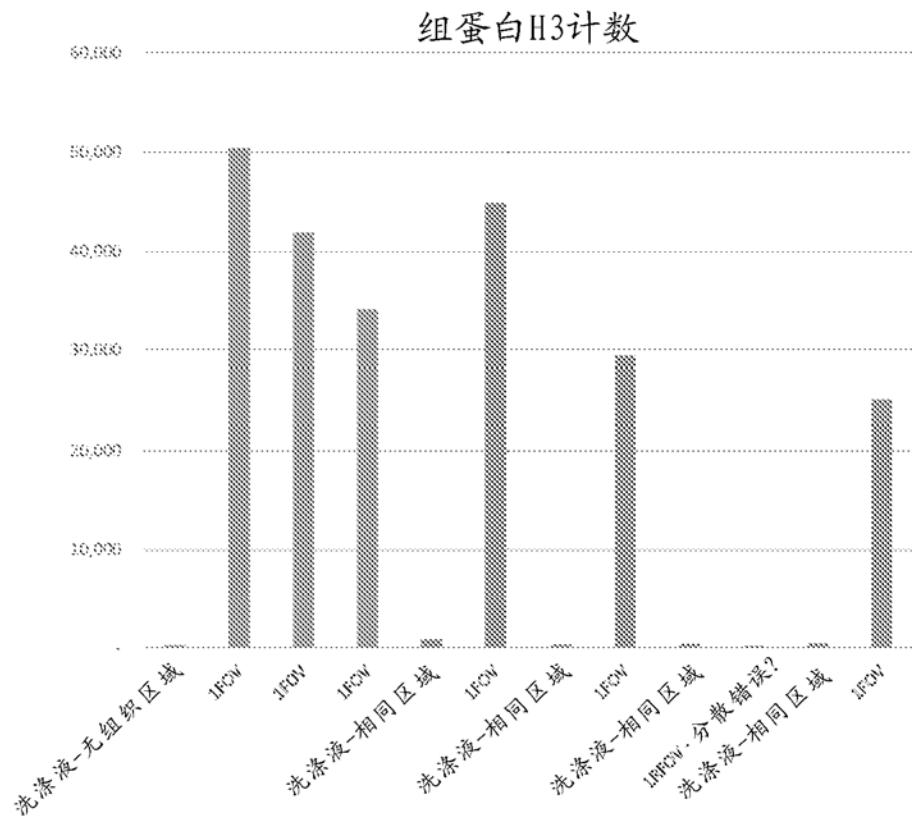


图 46A

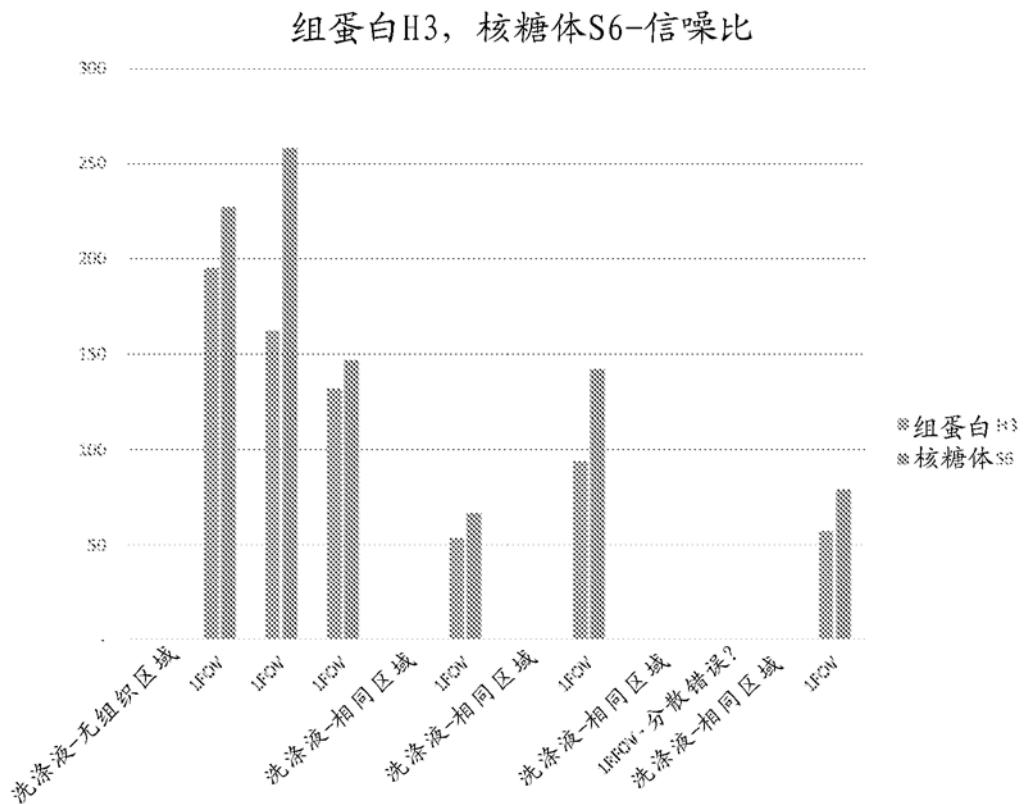


图 46B

## 微管阵列

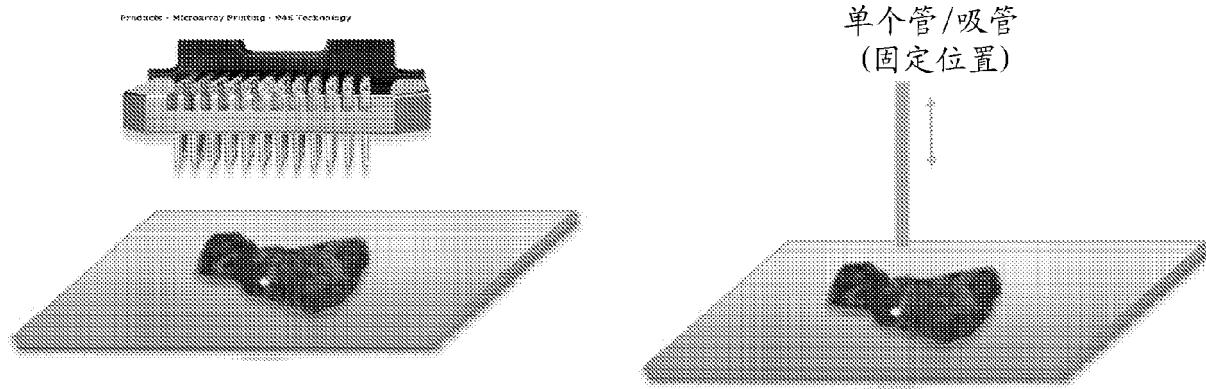


图 47

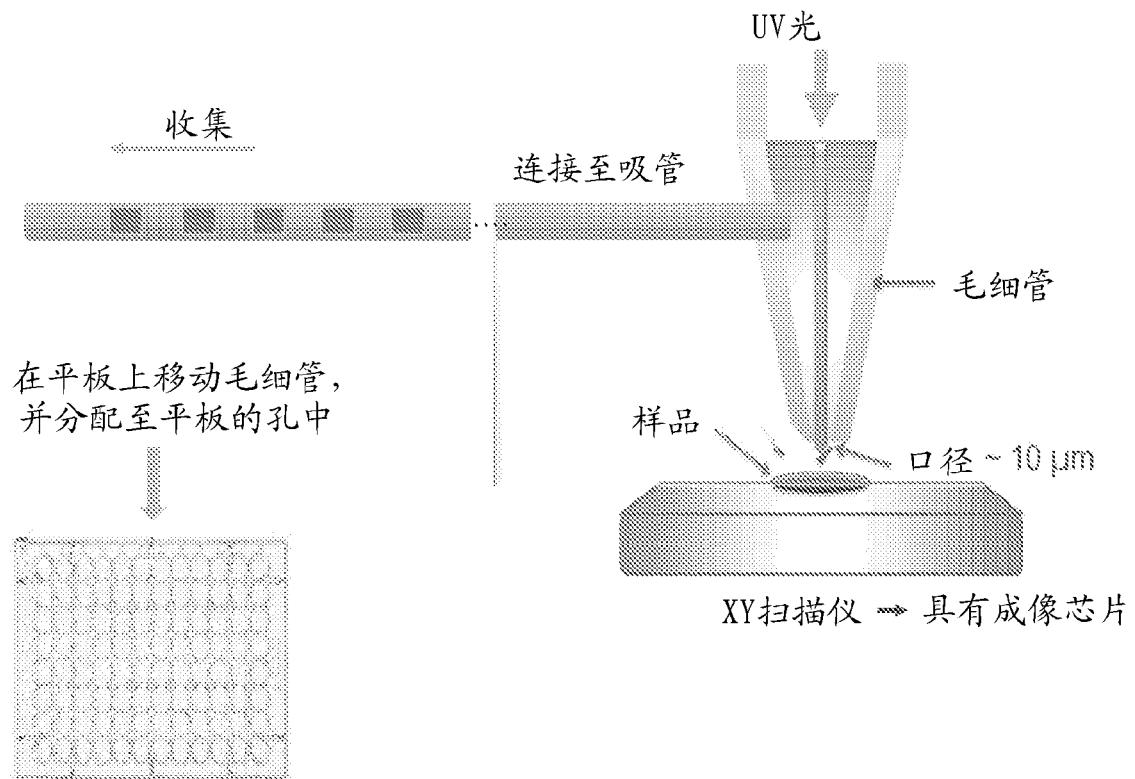


图 48

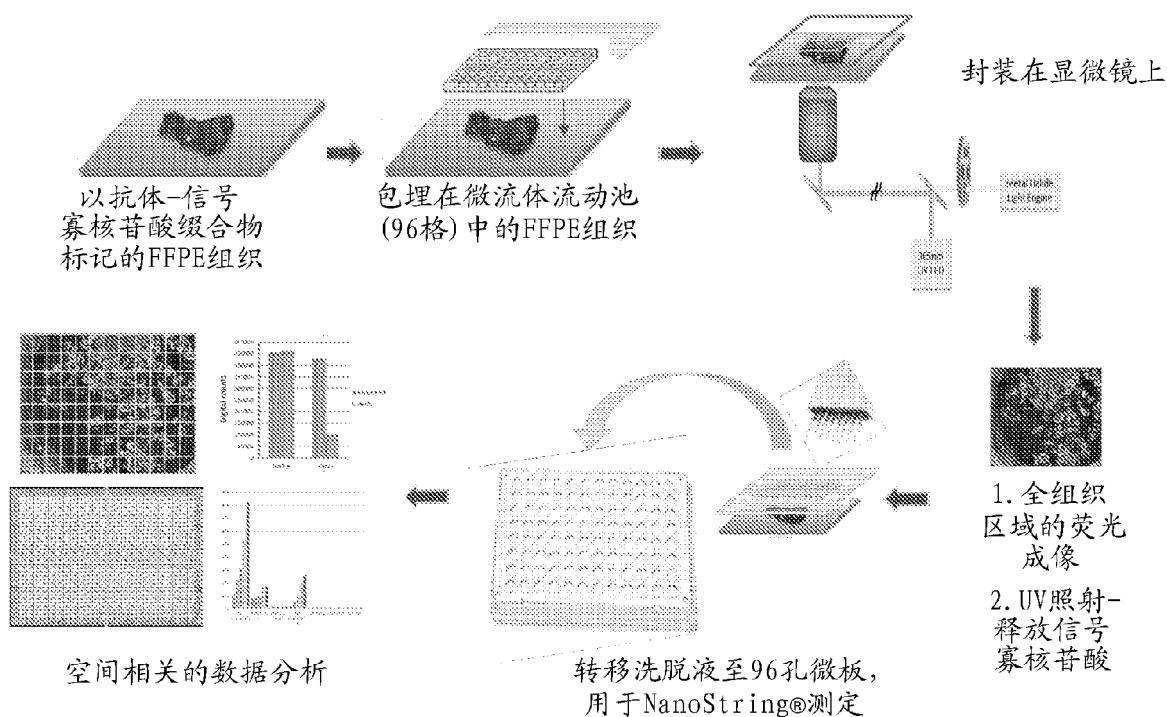


图 49

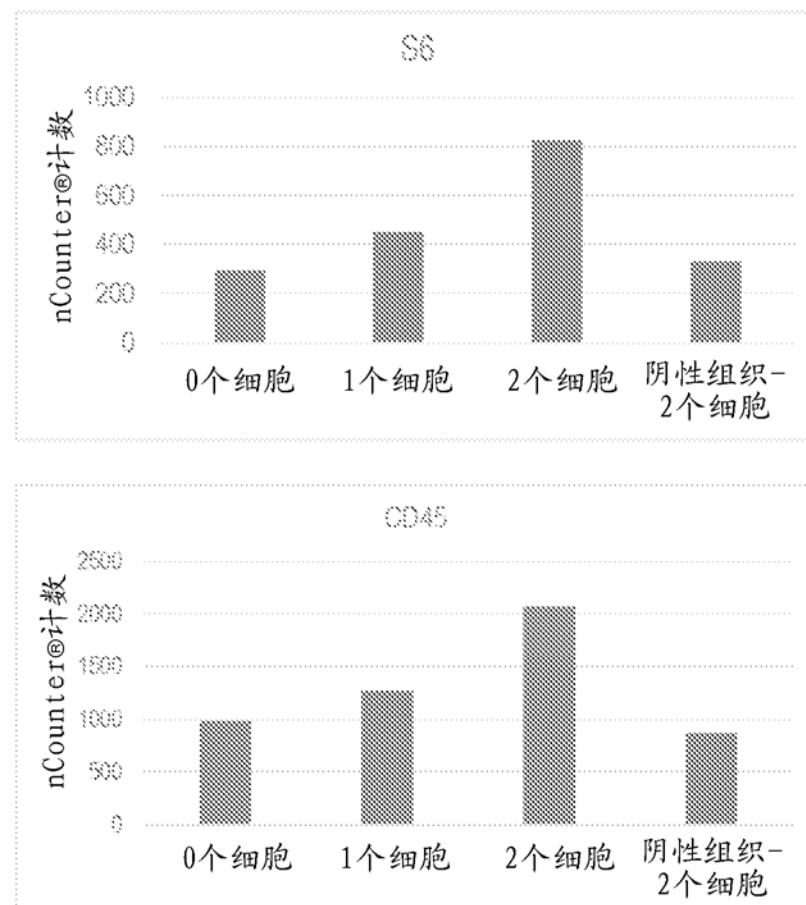


图 50

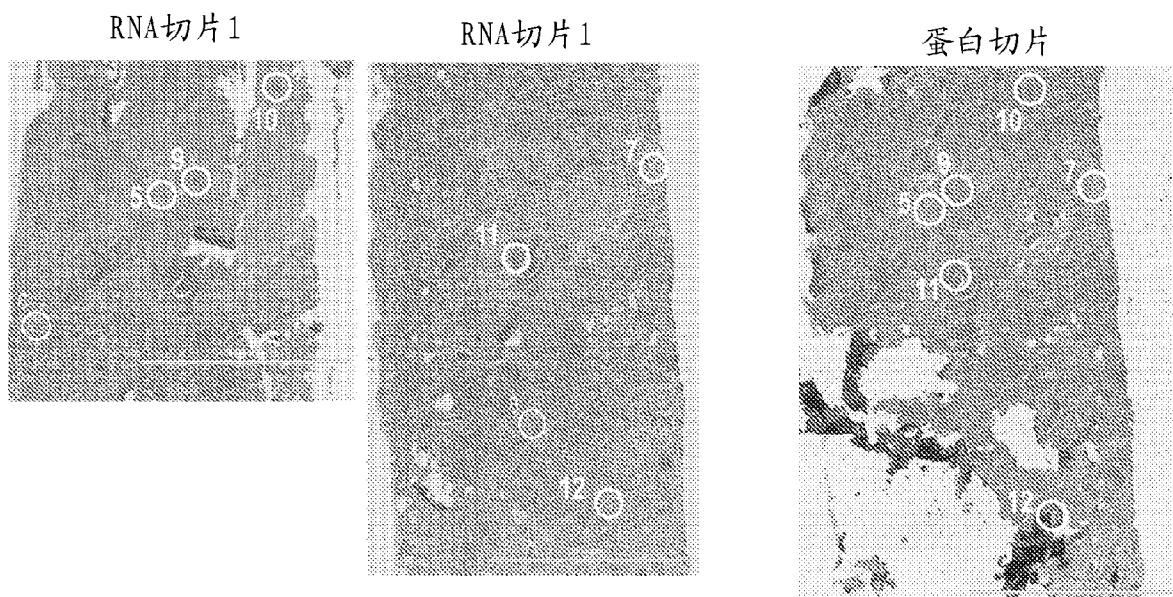


图 51

在HER2 3+乳房组织中的RNA探针计数

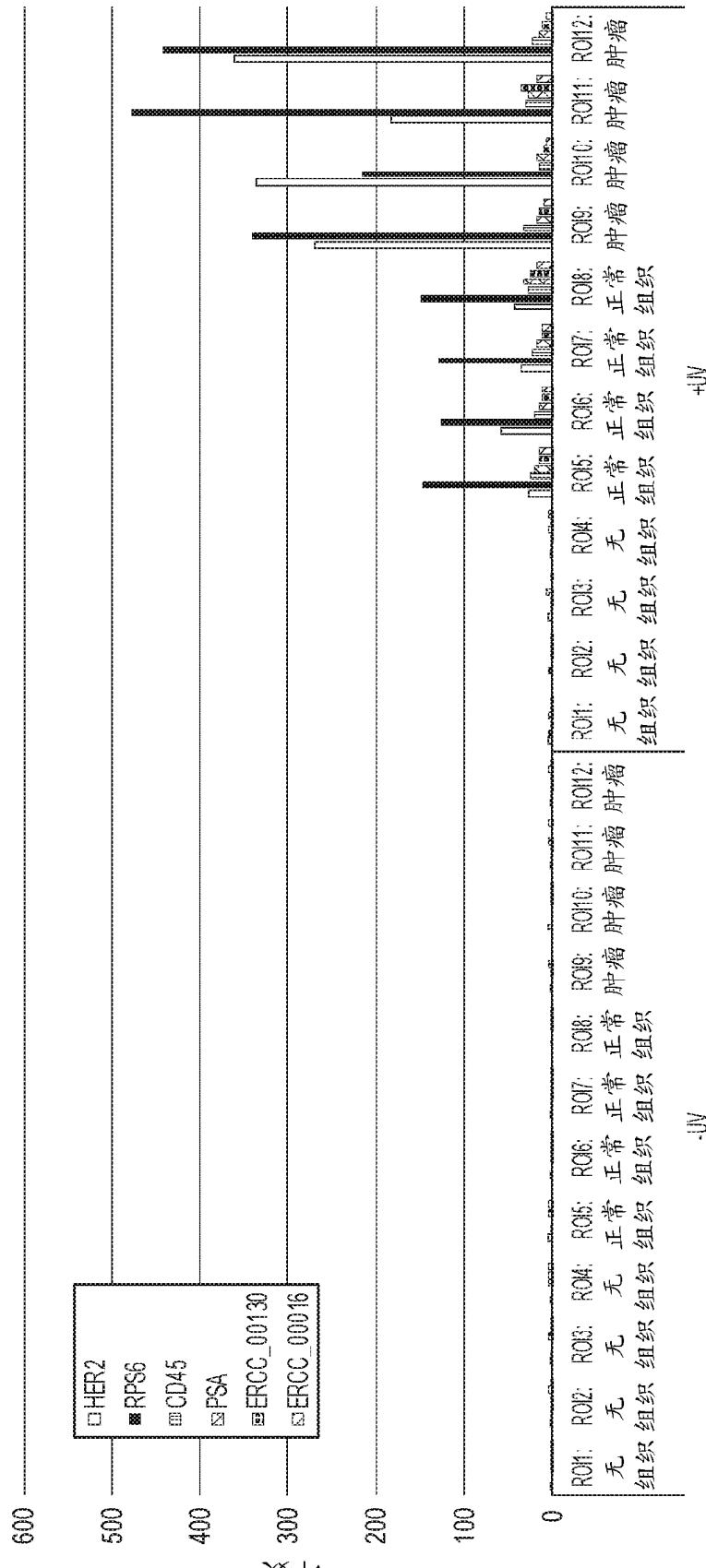


图 52

在HER2 3+乳房中的RNA探针计数

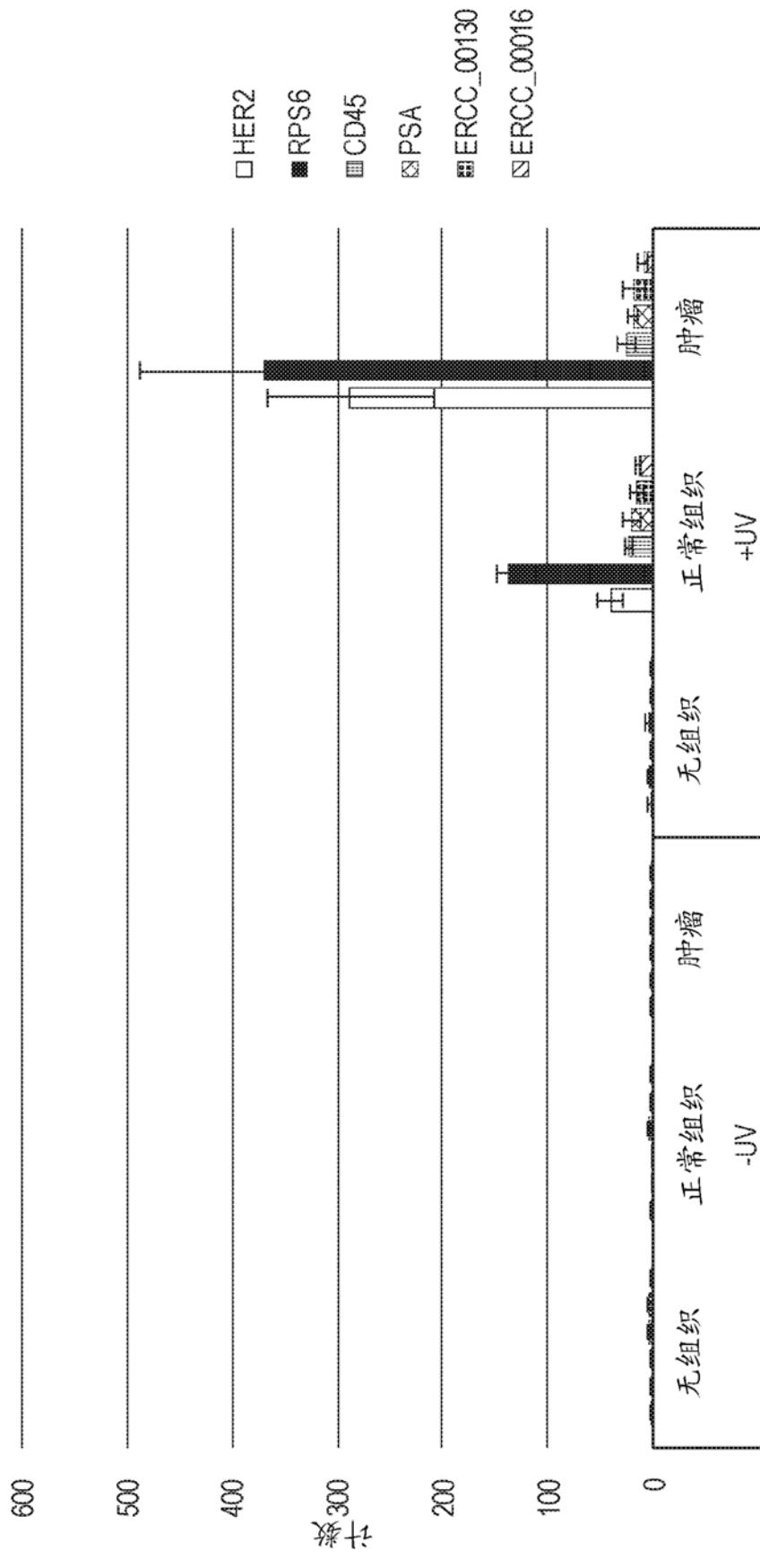


图 53

在HER2 3+乳房中的RNA探针计数

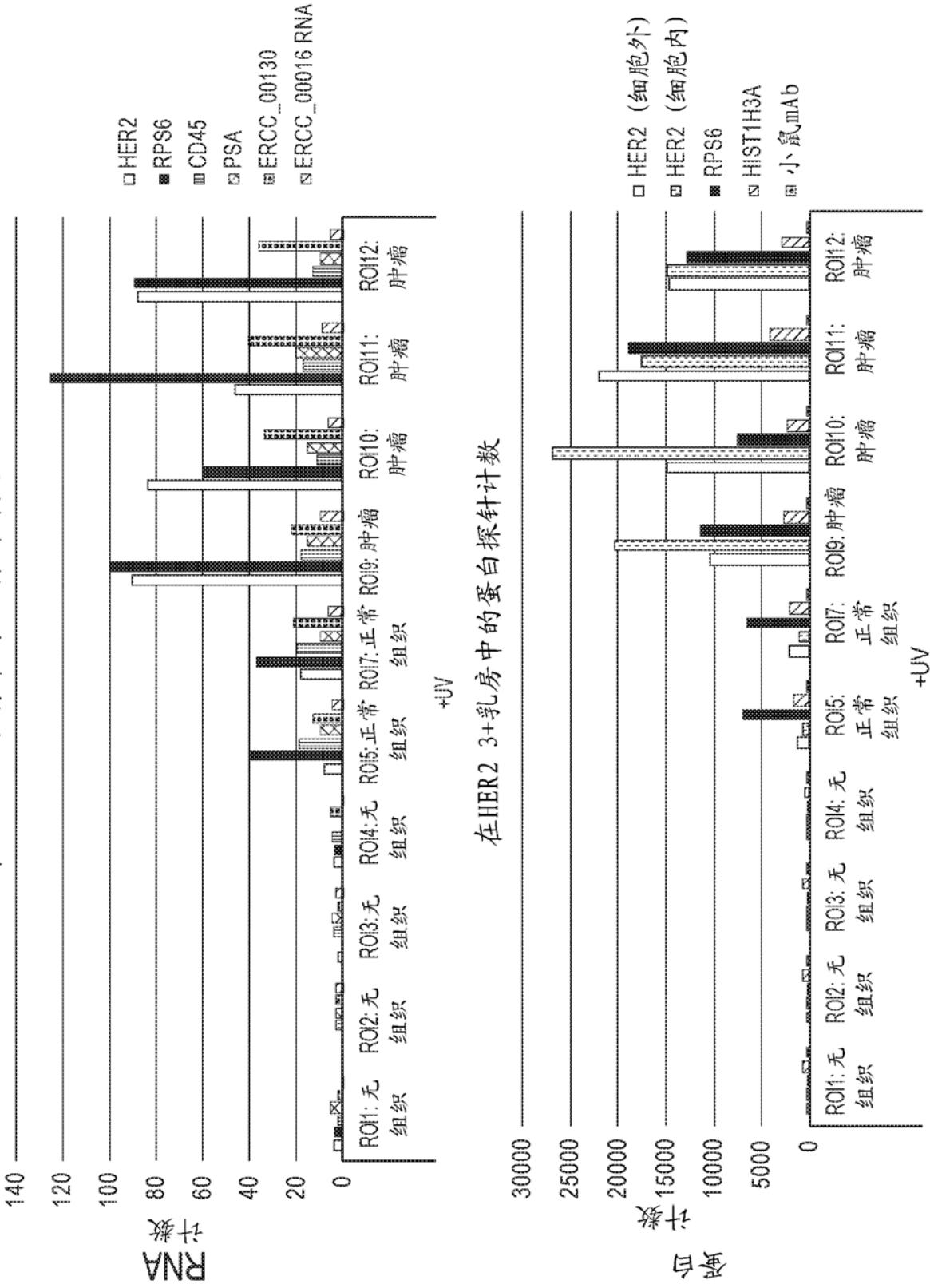
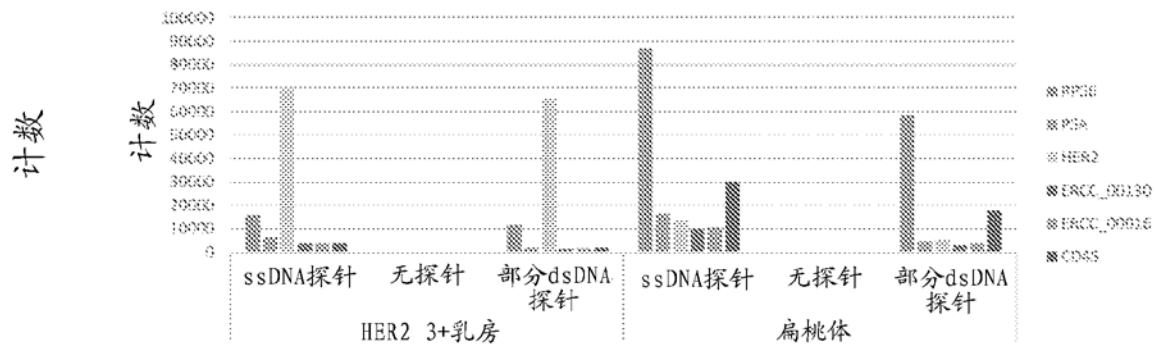


图 54

### 通过单链DNA和部分双链探针检测的RNA表达



### 通过单链DNA和部分双链探针检测的RNA表达

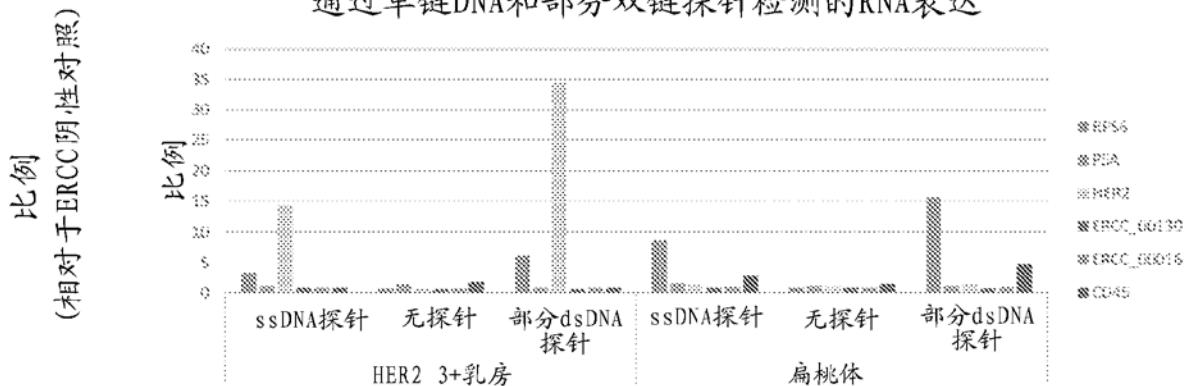


图 55

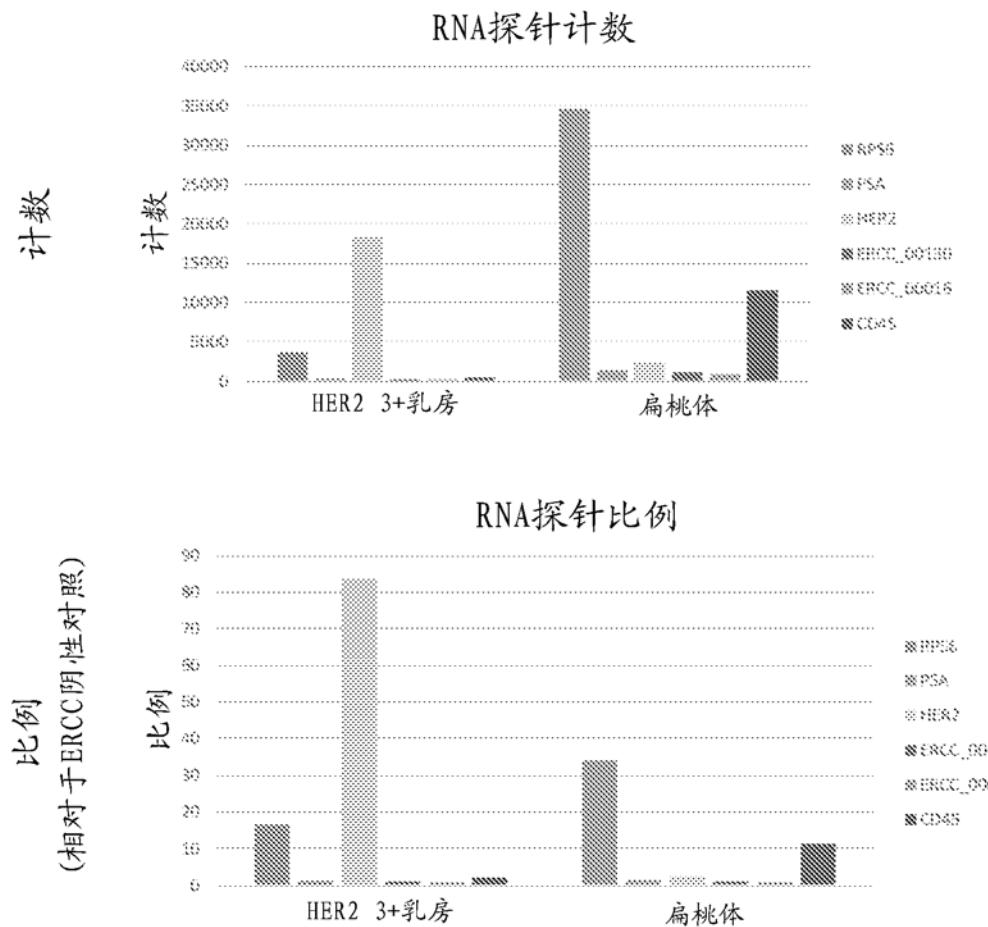


图 56

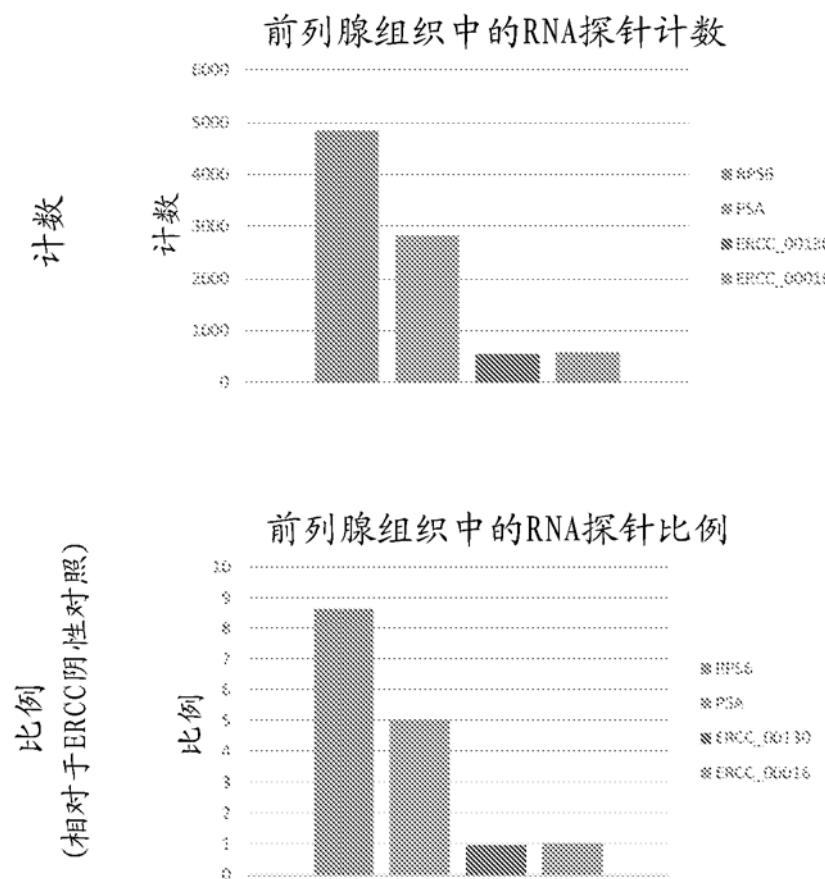


图 57

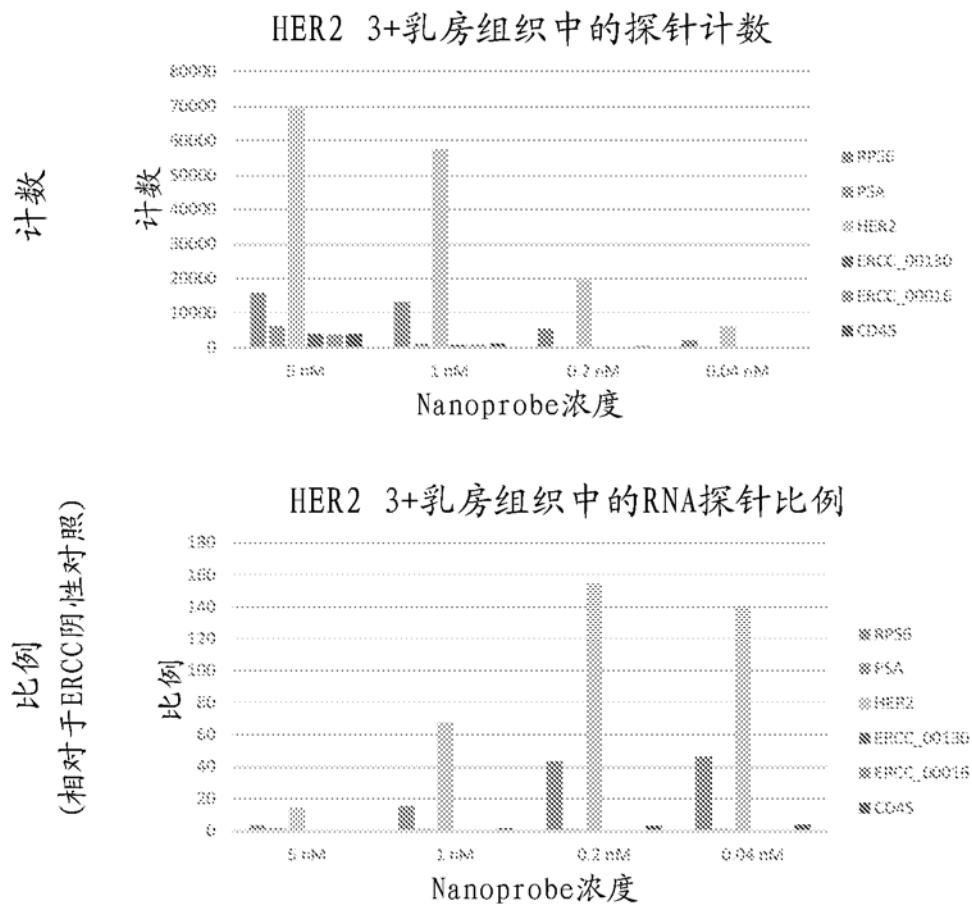


图 58