



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113834869 B

(45) 授权公告日 2024.12.06

(21) 申请号 202111105100.7

A · 扎赫迪瓦施

(22) 申请日 2017.08.31

(74) 专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 卓霖 刘娟

申请公布号 CN 113834869 A

(43) 申请公布日 2021.12.24

(51) Int.CI.

G01N 27/62 (2021.01)

(30) 优先权数据

62/383,234 2016.09.02 US

(56) 对比文件

62/411,321 2016.10.21 US

US 2005233367 A1, 2005.10.20

62/462,524 2017.02.23 US

US 2010224013 A1, 2010.09.09

(62) 分案原申请数据

审查员 谭丽娟

201780059604.5 2017.08.31

(73) 专利权人 得克萨斯大学体系董事会

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 L · S · 爱柏林 T · 米尔纳 J · 张

权利要求书2页 说明书31页 附图40页

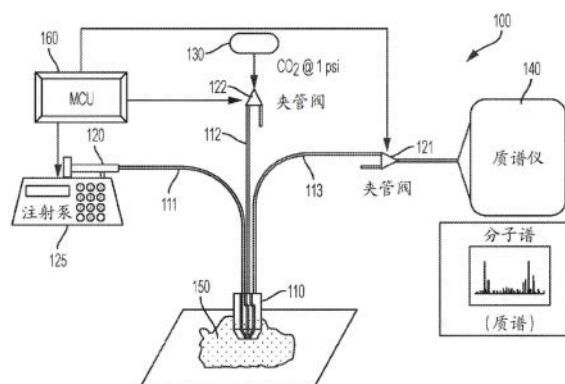
J · 林 J · 雷克托 N · 卡塔

(54) 发明名称

收集探针及其使用方法

(57) 摘要

提供了用于使用分子分析评价来自受试者的多个组织部位的组织样品的方法和装置。在某些方面，实施方案的装置允许收集液体组织样品和递送所述样品以用于质谱法分析。



1. 一种用于获得质谱法分析谱的方法,所述方法包括:

(a) 使用探针将固定或离散体积的溶剂施加到测定部位,其中所述固定或离散体积的溶剂以液滴形式施加,所述探针结构上与组织部位分开并且与所述组织部位流体接触,并且其中所述溶剂的液滴没有作为解吸电喷雾电离(DESI)喷雾而被施加;

(b) 利用所述探针收集所施加的溶剂的液滴以获得液体样品,其中在施加步骤后0.1秒与30秒之间收集所述施加的溶剂的液滴;以及

(c) 对所述液体样品进行质谱法分析,

其中,使用所述探针的第一导管将所述溶剂施加到测定部位,使用所述探针的第二导管将气体供应到所述测定部位,并且使用所述探针的第三导管收集所施加的液滴,并且

其中,所述第一导管、所述第二导管和所述第三导管结构上彼此分开,并且所述第一导管、所述第二导管和所述第三导管的端部组合为储液器,其中单个液滴被保留在所述储液器中。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述第一导管为溶剂导管,并且使用机械泵施加所述溶剂的液滴,以便使所述溶剂移动穿过所述溶剂导管。

3. 如权利要求1所述的方法,其中,所述第三导管为溶剂导管,收集所施加的溶剂的液滴包括施加负压以将所述液体样品拉入收集导管中和/或施加气压以将所述液体样品推入所述收集导管中。

4. 如权利要求3所述的方法,其中,所述第二导管为气体导管,并且所述气压通过气体导管施加。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述溶剂的液滴具有在0.1与100微升之间的体积。

6. 如权利要求1所述的方法,其中在施加步骤后1秒与10秒之间收集施加的溶剂。

7. 如权利要求1所述的方法,其中在施加步骤后0.5秒与5秒之间收集施加的溶剂。

8. 如权利要求1所述的方法,其中所述组织部位是受试者中的内部组织部位。

9. 如权利要求1所述的方法,其还包括从多个组织部位收集多个液体样品。

10. 如权利要求9所述的方法,其中所述探针在从所述多个组织部位各自的液体样品的收集之间进行洗涤。

11. 如权利要求9所述的方法,其中所述探针为一次性的并且在从所述多个组织部位各自的液体样品的收集之间进行更换。

12. 如权利要求9所述的方法,其中所述探针包括收集尖端,并且所述方法还包括在收集各自的液体样品后从所述探针中弹出所述收集尖端。

13. 如权利要求9所述的方法,其中所述多个组织部位围绕已手术切除的组织切片。

14. 如权利要求1所述的方法,所述方法还包括:

(d) 基于所述质谱法分析来表征所述液体样品。

15. 如权利要求14所述的方法,其中表征所述液体样品包括确定所述组织部位的组织类型。

16. 如权利要求1所述的方法,其中,

所述储液器与所述第一导管、所述第二导管和所述第三导管流体连通;

所述第一导管与包含溶剂的腔室流体连通;

所述第二导管与气体供应流体连通;并且

- 所述第三导管与质谱仪流体连通。
17. 如权利要求1述的方法,其中所述溶剂为无菌的。
 18. 如权利要求1述的方法,其中所述溶剂为水。
 19. 如权利要求1述的方法,其中当所述固定或离散体积的溶剂被施加到所述组织部位时,所述探针与所述组织部位接触。
 20. 如权利要求1述的方法,其中在获得所述液体样品之后,所述探针被冲洗。
 21. 如权利要求16述的方法,其中所述储液器具有在1微升与500微升之间的体积。
 22. 一种用于获得组织部位的质谱法分析谱的方法,所述方法包括:
 - (a) 使用探针将固定或离散体积的溶剂施加到受试者的组织部位,其中固定或离散体积的溶剂以液滴形式施加,所述探针在结构上与所述组织部位分开并且与所述组织部位流体接触,并且其中所述溶剂的液滴没有作为解吸电喷雾电离(DESI)喷雾而被施加;
 - (b) 利用所述探针收集所施加的溶剂的液滴以获得液体样品,其中在施加步骤后0.1秒与30秒之间收集所施加的溶剂的液滴;以及
 - (c) 对所述液体样品进行质谱法分析,
- 其中,使用所述探针的第一导管将所述溶剂施加到测定部位,使用所述探针的第二导管将气体供应到所述测定部位,并且使用所述探针的第三导管收集所施加的液滴,并且
- 其中,所述第一导管、所述第二导管和所述第三导管结构上彼此分开,并且所述第一导管、所述第二导管和所述第三导管的端部组合为储液器,其中单个液滴被保留在所述储液器中。

收集探针及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2017年8月31日,申请号为201780059604.5,申请人为得克萨斯大学体系董事会,发明名称为“收集探针及其使用方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2016年9月2日提交的美国临时专利申请号 62/383,234;2016年10月21日提交的62/411,321;以及2017年2月 23日提交的62/462,524的权益,每个所述美国临时专利申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 本发明在美国国立卫生研究院授予的批准号R01 CA190783政府资助下进行。政府对本发明具有一定的权利。

背景技术

[0004] 1. 发明领域

[0005] 本发明总体上涉及医学、分子生物学和生物化学领域。更具体地说,本发明涉及用于使用质谱法评价组织样品的方法和装置。

[0006] 2. 相关技术描述

[0007] 临床诊断通常通过在患者的治疗过程的若干个其他阶段,在术前、术中和术后评估组织样品来进行。组织评估在癌症患者的诊断和管理中非常关键。例如,通常进行切除组织的术中病理学评价以用于各种癌症手术中的诊断和手术切缘评估。切除的组织标本被送到附近的房间,通常称为“冷冻室”,用于组织制备、染色和评估。对组织标本进行冷冻、切片、染色,并且使用光学显微镜由病理学专家仔细评估手术切缘是否包含癌细胞(阳性边缘)或不包含癌细胞(阴性边缘)来进行询问。虽然术中冷冻切片分析已在临床实践中进行了数十年,但它提出了许多挑战。在组织处理过程中发生冷冻伪影(freezing artifact)并且干扰组织结构和细胞形态,因此使病理解释复杂化。此外,某些肿瘤细胞由于其非典型的生长和形状模式而非常难以识别。分子方法可以提供组织样品的高度准确和潜在的实时评价。然而,迄今尚未开发出提供组织样品的有效分子评价的适合装置或方法。

发明内容

[0008] 在第一实施方案中,提供了一种用于获得质谱法分析谱(profile) 的方法,所述方法包括使用探针将固定或离散体积的溶剂施加到测定部位(例如,组织部位);使用探针收集所施加的溶剂以获得液体样品;并且对液体样品进行质谱法分析。在另外的实施方案中,提供了一种用于评价组织样品的方法,所述方法包括从受试者中的多个组织部位获得多个液体样品并且对多个液体样品进行质谱法分析。

[0009] 另一个实施方案提供了一种用于获得样品(例如,从组织中)以用于质谱法分析的装置,装置包括:包含溶剂的腔室;加压气体供应;质谱仪;探针,其包括储液器、第一导管、第二导管和第三导管,其中:储液器与第一导管、第二导管和第三导管流体连通;第一(溶剂) 导管与腔室流体连通;第二(气体) 导管与加压气体供应流体连通;并且第三(收集) 导管与质谱仪流体连通。在另外方面,质谱仪与提供样品分析的计算机通信。在某些方面,每个样品分析的结果由来自计算机的视觉或听觉输出提供。例如,由计算机提供的每个样品

分析的结果可以通过照射的不同颜色的光或通过产生的不同频率的声音来指示。在一些方面，质谱仪为移动式质谱仪。在另外方面，质谱仪可以包括不间断电源(例如，电池电源)。在另外方面，质谱仪包括可以关闭以保持仪器真空的入口。在另外方面，质谱仪通过网状过滤器与探针分离(例如，以阻止污染)。

[0010] 在一些方面，储液器被配置成形成溶剂的液滴。在某些方面，加压气体供应在0.1psig与5.0psig之间的压力下向探针提供气体。在另外方面，加压气体供应在0.5psig与2.5psig之间的压力下向探针提供气体。在若干个方面，加压气体供应向探针提供空气。在其他方面，加压气体供应向探针提供惰性气体，诸如氮气或二氧化碳。

[0011] 在另外方面，装置还包括泵，所述泵被配置成将溶剂从腔室转移到第一导管。在另外方面，装置可包括第一阀门，所述第一阀门被配置成控制从第三导管到达质谱仪的流动。在一些方面，当第一阀门处于打开位置时，第三导管处于真空下。在其他方面，装置可包括第二阀门，所述第二阀门被配置成控制穿过第二导管的加压气体流动。

[0012] 在某些方面，溶剂可包括水和/或乙醇。在若干个方面，探针由聚二甲基硅氧烷(PDMS)和/或聚四氟乙烯(PTFE)形成。在一些方面，探针为一次性的。在具体方面，探针可包括可弹出(例如能够从探针中弹出)的收集尖端。在另外方面，探针包括跟踪装置，所述跟踪装置被配置成跟踪探针的位置。在一些方面，储液器的体积在1微升与500微升之间，在约1微升与100微升之间或在约2微升与50微升之间。在另外方面，储液器的体积在5.0微升与20微升之间。

[0013] 在另外方面，装置可另外地包括控制系统，所述控制系统被配置成控制：从腔室穿过第一导管到达储液器的溶剂流动(例如，固定或离散体积的溶剂的流动)；从加压气体供应穿过第二导管到达储液器的加压气体流动；以及从储液器穿过第三导管到达质谱仪的样品流动。在一些方面，控制系统被配置成：控制溶剂流动在每分钟100与5000微升之间(例如，每分钟200微升与400微升之间)的流速下，持续1与3秒之间的时间段；控制加压气体流动在1psig与10psig之间的流速下，持续10秒与15秒之间的时间段；并且控制样品流动持续10与15秒之间的时间段。例如，在一些方面，控制系统包括触发器或按钮以启动溶剂流动。在另外方面，控制系统包括踏板(即，可以通过脚的动作操作)以启动溶剂流动。本领域技术人员将认识到，可调节第一导管和/或第二导管的长度以符合系统的具体用途。在另外方面，控制系统被配置成控制：从腔室穿过第一导管到达储液器的溶剂流动(例如，固定时间段的流速)。在另外方面，实施方案的装置不包括用于产生超声波或振动能(例如，以足以破坏组织的量)的装置。

[0014] 另一个实施方案提供了一种用于评价来自受试者的组织样品的方法，所述方法包括将溶剂施加到受试者的组织部位，收集所施加的溶剂以获得液体样品，并且对样品进行质谱法分析。在某些方面，溶剂可为无菌的。在一些方面，溶剂为药学上可接受的制剂。在具体方面，溶剂为水溶液。例如，溶剂可为无菌水或基本上由水组成。在其他方面，溶剂可包含约1%至5%、10%、15%、20%、25%或30%的醇。在一些方面，溶剂包含0.1%至20%的醇、1%至10%的醇或1%至5%、1%至10%的醇(例如，乙醇)。在一些情况下，醇可为乙醇。

[0015] 在一些方面，将溶剂施加到组织包括将离散体积的溶剂施加到组织部位。在一些方面，溶剂以单个液滴施加。在另外方面，溶剂以1至10个离散液滴数量施加。在一些实施方案中，经由独立于加压气体的通道将溶剂从储液器中施加到样品。在另外的实施方案中，

在低压下将溶剂施加到样品。例如,在一些方面,通过机械泵施加溶剂,使得以最小的力将溶剂施加到组织部位(例如,移动进入其中与组织部位接触的储液器中),从而在组织部位处施加最小的压力(并且产生最小的损伤)。低压可小于100psig、小于90psig、小于80psig、小于70psig、小于60psig、小于50psig、或小于25psig。在一些实施方案中,低压为约0.1psig至约100psig、约0.5psig至约50psig、约0.5psig至约25psig、或约0.1psig至约10psig。在具体方面,离散体积的溶剂为约0.1μL与100μL之间,或约1μL与50μL之间。在另外方面,收集所施加的溶剂是在施加步骤后0.1秒与30秒之间。在具体方面,收集所施加的溶剂是在施加步骤后1秒与10秒之间(例如,至少1、2、4、5、6、7、8或9秒)。在另外方面,实施方案的方法不涉及将超声波或振动能施加到样品或组织。在一些方面,内部组织部位中的组织部位正在通过手术评价。

[0016] 在另外方面,实施方案的方法包括通过溶剂导管将固定或离散体积的溶剂(例如,使用机械泵)施加到组织部位。在一些方面,固定或离散体积的溶剂穿过溶剂导管移动进入储液器中,在所述储液器中溶剂与组织部位直接接触(例如,持续0.5-5.0秒)。在另外方面,收集所施加的溶剂包括施加负压以将样品拉入收集导管中和/或施加气压以将样品推入收集导管中。在一些方面,通过溶剂导管施加溶剂,所述溶剂导管与收集导管分开。在另外方面,其中施加气压以将样品推入收集导管中,通过气体导管施加气压,所述气体导管与溶剂导管和收集导管分开。在某些方面,其中施加气压以将样品推入收集导管中,所施加的气压小于100psig。例如,气压优选小于10psig,诸如0.1至5psig。在另外方面,实施方案的方法被定义为对所评价的组织不产生可检测的物理损伤。

[0017] 在另外方面,方法可另外地包括从多个组织部位收集多个液体样品。在一些情况下,在每次样品收集之间洗涤用于收集样品的装置(例如,探针)。在其他方面,用于收集样品的装置包括在每次样品收集之间可更换的一次性收集尖端(探针)。在具体方面,收集尖端可为可弹出的(例如能够从装置中弹出)。在某些方面,多个组织部位包括在体内的2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个组织部位。在另一方面,多个组织部位围绕已手术切除(例如,离体)的组织切片。在具体方面,切除的组织为肿瘤。在一些方面,方法可被定义为术中方法。

[0018] 另外的实施方案提供了一种鉴定所取样的组织部位的方法和一种将所述部位的位置传达给装置(探针)操作者的方法。所取样的组织部位的鉴定允许操作者获取在取样从组织收集的分子后的某个时间在所取样的组织部位处记录的分子信息。识别出至少三种类型的鉴定方法。在第一种方法中,外源材料附着到所取样的组织部位,其鉴定所取样的分子信息。在第二种方法中,装置(探针)配备有跟踪传感器/发射器,其允许在取样分子信息时记录探针(装置)的位置并且传送到成像装置。在第三种方法中,修饰组织区域,使得在收获组织分子后可容易地鉴定所述部位。在第一种方法中,可附着到所取样的组织部位的材料包括例如缝合线、手术夹、粘附到组织的生物相容性聚合物、或附着到磁珠的RFID芯片,所述芯片允许容易阅读和移除。在第二种方法类型中,探针可包含RF发射器,其为RF手术跟踪系统的一部分;超声发射器或反射器,其为术中US成像系统的一部分。在此第二种方法中,当操作者启动组织分子的收集时,跟踪系统记录相关成像系统(例如,RF、US、CT、MRI)中的探针位置,所述跟踪系统可与装置通信。然后操作者可通过参考所记录的图像来稍后鉴定任何所取样的组织部位,所述记录的图像可向操作者指示所取样的部位的位置。在第三种方法中,组织被修饰。在此第三种方法中,与探针连通的激光源可用于将图案烧蚀或凝结到

组织中,鉴定所取样的部位。可组合任何这三种方法。例如,方法1、2和3可以组合,其中在收获组织分子后将外源材料附着到组织部位并且激光图案化外源组织,同时RF传感器记录收获部位的位置并且传送到成像装置。

[0019] 在另外方面,质谱法包括环境电离MS。在若干个方面,对样品进行质谱法分析可包括确定对应于组织部位的分析谱。在另一方面,方法可另外地包括将分析谱与参考分析谱进行比较以鉴定包含患病组织的组织部位。在其他方面,方法还包括切除被鉴定为包含患病组织的组织部位。在一些方面,使用根据上述任何实施方案和方面的装置来执行所述方法。

[0020] 在另外的实施方案中,本发明提供了一种用于评价组织样品的离体方法,所述方法包括从受试者中的多个组织部位获得多个液体样品,对多个液体样品进行质谱法分析以获得对应于组织部位的多个分析谱,并且将多个分析谱与参考分析谱进行比较以鉴定包含患病组织的组织部位。在某些方面,液体样品包含在溶剂中。在另外方面,患病组织包含癌细胞。

[0021] 在实施方案的一些方面,通过实施方案的方法和装置进行评价的患病组织部位包含(或怀疑包含)癌细胞。可根据实施方案评价的癌细胞包括但不限于来自以下的细胞或肿瘤组织:甲状腺、淋巴结、膀胱、血、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食道、胃肠、牙龈、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈部、卵巢、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌头或子宫(或此类肿瘤周围的组织)。在一些方面,癌症可为恶性赘生物;癌瘤;未分化癌瘤;巨细胞癌和梭形细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛基质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;恶性胃泌素瘤;胆管癌;肝细胞癌;混合型肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤性息肉中的腺癌;腺癌,家族性结肠息肉;实体癌;恶性类癌瘤;支气管肺泡腺癌;乳头状腺癌;嫌色细胞癌;嗜酸性粒细胞癌;嗜酸性腺癌;嗜碱性粒细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡性腺癌;乳头状和滤泡性腺癌;非包膜性硬化癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜样癌;皮肤附属器癌;大汗腺癌;皮脂腺癌;耵聍腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;乳腺佩吉特病;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴鳞状化生;恶性胸腺瘤;恶性卵巢间质瘤;恶性肉瘤;恶性颗粒细胞瘤;恶生成骨细胞瘤;支持细胞癌;恶性莱狄希细胞瘤;恶性脂质细胞瘤;恶性副神经节瘤;恶性乳腺外副神经节瘤;嗜铬细胞瘤;皮肤丝球肉瘤;恶性黑色素瘤;无色素性黑色素瘤;浅表扩散性黑色素瘤;巨大色素痣中的恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑色素瘤;恶性蓝色痣;肉瘤;纤维肉瘤;恶性纤维组织细胞瘤;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎性横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;恶性混合瘤;苗勒管混合瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;肉瘤;恶性间质瘤;恶性布伦纳瘤;恶性叶状肿瘤;滑膜肉瘤;恶性间皮瘤;无性细胞瘤;胚胎癌;恶性畸胎瘤;恶性卵巢肿瘤;绒毛膜癌;恶性中肾瘤;血管肉瘤;恶性血管内皮瘤;卡波西肉瘤;恶性血管外皮细胞瘤;淋巴管肉瘤;骨肉瘤;皮质旁骨肉瘤;软骨肉瘤;恶性软骨母细胞瘤;间充质软骨肉瘤;骨巨细胞瘤;尤因氏肉瘤;恶性牙源性肿瘤;成釉细胞牙肉瘤;恶生成釉细胞瘤;成釉细胞纤维肉瘤;恶性松果体瘤;脊索瘤;恶性胶质瘤;室管膜瘤;星形细胞瘤;原生质星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突神经胶质细胞瘤;成少突神经胶质细胞瘤;原始神经外胚层;小脑肉瘤;成神经节细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅神经源性肿瘤;恶性脑膜瘤;神经纤维

肉瘤；恶性神经鞘瘤；恶性颗粒细胞瘤；恶性淋巴瘤；霍奇金病；霍奇金；或副肉芽肿。在另外方面，癌症为甲状腺癌、脑癌(例如，神经胶质瘤)、前列腺癌、乳腺癌(例如，三阴性乳腺癌)、胰腺癌(例如，胰腺导管腺癌)、急性髓性白血病(AML)、黑色素瘤、肾细胞癌或已转移至淋巴结的癌症。

[0022] 如本文所用，“样品”或“液体样品”可以指通过使组织或生物样本与根据实施方案的溶剂接触而获得的来自组织或其他生物样本的提取物(例如，包含蛋白质和代谢物的提取物)。在一些方面，样品可以是来自非生物样本的提取物，诸如物体上的表面(例如，法医样品)。

[0023] 如本文所用，就指定组分而言，在本文中使用“基本上不含”意指没有指定组分被有目的地配制成组合物和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此，由组合物的任何无意污染导致的指定组分的总量远低于0.01%。最优选的是一种组合物，其中用标准分析方法检测不到指定组分的量。

[0024] 如本说明书和权利要求书中所用，“一个”或“一种”可意指一个或多个。如本说明书和权利要求书中所用，当与词语“包括”一起使用时，词语“一个”或“一种”可意指一个或多于一个。如本说明书和权利要求书中所用，“另一个”或“另外一个”可意指至少第二或更多个。

[0025] 如本说明书和权利要求书中所用，术语“导管”和“管”可互换使用，并且是指可以用于引导气体或液体流动的结构。

[0026] 如本说明书和权利要求书中所用，术语“约”用于指示值包括装置、采用以确定值的方法的固有误差变化或研究对象之间存在的变化。

[0027] 本发明的其他目的、特征和优点将通过以下详细描述变得明显。然而，应该理解，详细描述和具体实施例(虽然指示本发明的某些实施方案)仅通过说明的方式给出，因为本发明的精神和范围内的各种变化和修改将通过此详细描述对于本领域技术人员来说变得明显。

附图说明

[0028] 以下附图形成本说明书的一部分，并且被包括在内以进一步证明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个并且结合本文给出的具体实施方案的详细描述，可更好地理解本发明。

[0029] 图1A-1Q：MasSpec Pen系统和操作步骤的示意图。A) 钢笔大小的手持装置通过PTFE管道(或另一种高度疏水的材料)直接整合到实验室建立的质谱仪接口中。接口容纳夹管阀、微控制器和管道，以将系统连接到质谱仪入口。使用者通过脚踏板自动触发系统。B) MasSpec Pen设计有PDMS 3D打印尖端和三个PTFE导管，所述三个PTFE导管为尖端提供进水、气体和水滴流出导管。C) 尖端接触组织进行分析，并且它设计有3个导管和1个储溶剂器。当通过踏板使用而触发系统($t=0$ 秒)时，注射泵将控制的量的水递送到储液器。离散的水滴与组织相互作用以提取分子。在这种情况下，在3秒的提取后，同时打开真空导管和气体导管以通过管道系统将液滴从MasSpec Pen输送到质谱仪以进行分子分析。D) 示出MasSpec Pen 装置的示例性功能元件的示意图。E-F) 示出示例性MasSpec Pen的尖端的放大视图。G-Q) 示出实施方案的系统的替代配置。

[0030] 图2A-2B:使用Q Exactive Orbitrap质谱仪的从MasSpec Pen得到的小鼠脑组织切片的质谱。A) 小鼠脑切片的质谱,B) 总离子色谱,插入的光谱来自干净的载玻片背景(背景和小鼠脑组织的强度等级设定为相同)。

[0031] 图3A-3B:A) 示出使用由乙醇:H₂O (1:20) 或乙醇:H₂O (1:5) 组成的溶剂获得的生物样品的质谱的比较。B) 使用各种比率下的水和乙醇的混合物,从小鼠脑组织切片获得的代表性负离子模式MasSpec Pen质谱。

[0032] 图4A-4B:使用MasSpec Pen,从a) 小鼠脑切片和b) 小鼠脑新鲜组织收集的质谱的比较。

[0033] 图5A-5E:针对以下各种不同癌症类型的癌症与正常组织的质谱的比较:乳腺癌(A);肾癌(B);癌性淋巴结(C);卵巢癌(D)和甲状腺癌(E)。

[0034] 图6A-6C:从A) MasSpec Pen和B) DESI收集的质谱的比较。C) 从小鼠脑组织切片获得的MasSpec Pen与DESI负离子模式质谱之间的比较。

[0035] 图7:在负离子模式下在人组织中检测到的胸腺素β-4的光谱。

[0036] 图8A-8B:A) 从新鲜甲状腺正常和癌症样本获得的光谱的比较。B) 乳头状甲状腺癌和正常组织切片的MasSpec Pen分析。示出了(上) 从正常甲状腺组织切片获得的代表性负离子模式MasSpec Pen质谱,以及(下) 从乳头状甲状腺癌组织切片获得的代表性负离子模式 MasSpec Pen质谱。提供了最丰富的分子离子的鉴定。插图示出通过组织病理学评估的H&E染色组织切片的光学图像。

[0037] 图9:针对人组织切片(包括正常和肿瘤甲状腺和乳腺组织切片) 所获得的数据的PCA。如在分数图中所观察到的,PC1和PC3解释了乳腺组织数据集的总方差为46.1%,而PC1和PC2解释了甲状腺组织数据集的总方差为47.9%。对于所分析的每种组织类型,还包括载荷图/loading plot)。

[0038] 图10A-10B:人新鲜组织的主成分分析结果。A) 辨别正常和肿瘤的甲状腺。B) 辨别正常和肿瘤的淋巴结。

[0039] 图11:使用MasSpec Pen从组织样品获得的分子信息诊断人癌症。共分析了253个患者组织样品,包括乳腺癌、甲状腺癌、卵巢癌和肺癌以及正常组织样品。3D PCA (PC1、PC2 和PC3) 图示出所获得的癌症与正常质谱之间的分离。

[0040] 图12A-12E:样品点1(图12A)、样品点2(图12B)、样品点3(图 12C)、样品点4(图 12D) 和样品点5(图12E) 的绘图。

[0041] 图13A-13E:样品点1-5在全质量范围(图13A)、500-1800质量范围(图13B)、500-1000质量范围(图13C)、785至809质量范围(图 13D) 和870至920质量范围(图13E) 下的质谱。

[0042] 图14A-14C:具有混合组织学组成的HGSC组织样品的MasSpec Pen分析。A) 光学图像示出了使用1.5mm直径MasSpec Pen在标定点(1-5) 处分析的组织样品。在MasSpec Pen分析后,将组织样品冷冻,切片并且H&E染色。示出了在点3处获得的H&E染色的组织切片的光学图像,呈现包括癌症和相邻的正常基质组织的混合组织学组成。B) 示出了点1(正常基质)、点3(正常基质和癌症的混合物) 和点 5(癌症) 的MasSpec Pen负离子模式质谱。C) 分析了五个点的病理学诊断,并且示出了此独立数据集的Lasso预测结果。

[0043] 图15A-15B:MasSpec Pen允许对组织样品进行温和和非破坏性的分子分析。A) 光

学图像示出了在MasSpec Pen分析之前、期间和之后的肺腺癌组织样品。组织样本的放大示出了通过MasSpec Pen分析的组织区域没有宏观损伤。B)示出了针对所分析的组织区域获得的负离子模式质谱，所述质谱包括最丰富的分子离子的鉴定。

[0044] 图16A-16B:在鼠动物模型的手术期间肿瘤组织和正常组织的体内分析。A)在麻醉下对小鼠进行实验。光学图像示出了在体内，在MasSpec Pen分析之前、期间和之后的动物。B)代表性负离子模式质谱示出了来自正常组织和肿瘤组织的不同分子谱。

[0045] 图17:使用各种取样直径的MasSpec Pen获得的代表性负离子模式MasSpec Pen质谱。

[0046] 图18:来自小鼠脑组织的代表性正离子模式质谱。使用串联质谱法，将高相对丰度下观察到的离子鉴定为甘油磷酸胆碱和二酰基甘油脂脂质的钾(K+)和钠(Na+)加合物，如质谱中所注释的。

[0047] 图19:从包含正常组织和癌症组织区域的HGSC组织样品获得的代表性负离子模式MasSpec Pen质谱。

[0048] 图20:体内分析后的光学图像和MasSpec Pen分析后从相同区域获得的H&E染色组织切片的光学图像。

[0049] 图21:来自小鼠模型的相同肿瘤样品的体内和离体获得的MasSpec Pen负离子模式质谱之间的比较。

[0050] 图22:使用不同提取时间5秒、3秒和1秒，从小鼠脑组织切片获得的代表性负离子模式质谱。

具体实施方式

[0051] I.本发明的实施方案

[0052] 在某些方面，本申请提供了用于分子评价样品诸如组织样品的方法和装置。在具体方面，方法可以用于在组织的手术(或活组织检查)期间评价多个组织部位。这个特征允许“实时”准确鉴定患病组织(例如，保留癌细胞的组织部位)，从而允许外科医生更准确地仅相对于周围正常组织处理患病组织。在具体方面，在此公开的方法可以涉及将固定或离散体积的溶剂递送到组织部位，接着从所述部位收集液体样品并且通过质谱法分析液体样品。重要的是，不是在高压喷雾中施加，而是在低压下以离散液滴形式施加溶剂。这些方法允许从不同组织部位准确收集样品，同时避免对所评价组织的损伤。从所收集的样品得到的质谱法分析谱允许辨别患病组织部位与正常组织部位。所述方法可以在感兴趣的多个部位处重复，以非常准确地绘制出分子变化(例如，在组织中)。重要的是，即使不使用电离源，也可以辨别样品的分析谱。因此，虽然实施方案的方法可以与电离源结合使用，但是不要求使用这种源。这些方法可以允许在短时间范围内评价多个组织部位，从而允许非常准确地评价患病组织与正常组织的边界。

[0053] 在一些方面，本文详述的方法可以用于收集并且分析来自范围广泛的来源的样品。例如，方法可以用于评价法医、农业、滥用药物、药品和/或油/石油样品。

[0054] 在一些方面，在实施方案的装置中使用的材料(PDMS和PTFE)和溶剂(例如，仅水溶剂)为生物相容的，使得它们可以在手术中使用以用于实时分析。此外，因为装置可以非常紧凑，所以它可以手持或整合到机器人手术系统，诸如达芬奇手术系统(例如，在自动化

系统中)。因此,可以在手术期间快速取样人体腔的许多区域,并且进行分析(例如,通过使用分子签名和机器学习算法的数据库)。因此,可以针对每个所取样的区域实时提供诊断结果。用于这些方法的示例性装置详述如下。

[0055] 首先参考图1D,示出了用于对组织进行取样以用于质谱法分析的装置100。在此实施方案中,装置100包括探针110、具有溶剂的腔室120、加压气体供应130和质谱仪140。在一些方面,探针包含在壳体中(例如,在手持装置的情况下为了提供抓握)。在另外方面,壳体可以包括遥控器特征件(例如,触发器、按钮或踏板),其可以用于控制穿过探针的流体和/或气体流动。在一些方面,探针包含一种材料,所述材料包括PDMS和/或PTFE。在一些方面,探针通过3D 打印方法产生。

[0056] 图1E提供了探针110的更详细的横截面视图,并且示出了探针 110包括第一导管111、第二导管112、第三导管113和储液器115。在所示的实施方案中,第一导管111与腔室120流体连通,第二导管 112与加压气体供应130流体连通,并且第三导管113与质谱仪140流体连通。图1F提供了具有用于具体实施方案的尺寸的探针的另外横截面视图。

[0057] 应该理解,在某些实施方案中,导管111、112和113中的每一个(其可以具有任何期望的长度)可包括单独的部件。例如,探针110 内的每个导管的部分可在探针110的制造过程中形成为整体通道。另外,探针110与腔室120、加压气体供应130以及质谱仪140之间的每个导管的部分可为管道或适用于提供流体流动的其他部件。

[0058] 在此实施方案中,装置100可包括泵125,泵125被配置成将溶剂从腔室120转移到第一导管111和储液器115。在所示的实施方案中,装置100还可以包括第一阀门121,第一阀门121被配置成控制从储液器115穿过第三导管113到达质谱仪140的样品流动。装置100 还可以包括第二阀门122,第二阀门122被配置成控制穿过第二导管 112到达储液器115的加压气体流动。

[0059] 控制系统160可以被配置成控制装置100的操作参数。例如,控制系统160可以被配置成通过控制泵125的操作来控制从腔室120穿过第一管道111到达储液器115的溶剂流动。另外,控制系统160可以被配置成通过控制第一阀门121的打开和关闭来控制从储液器115到达质谱仪140的样品流动。控制系统160可以被进一步配置成通过控制第二阀门122的打开和关闭来控制从加压气体容器130到达储液器115的加压气体流动。

[0060] 在装置100的操作过程中,使用者可以定位探针110,使得储液器115放置在样品部位150上。控制系统160可以操作泵125持续具体的时间段,以经由第一导管111将所期望体积的溶剂从腔室120转移到储液器115。在示例性实施方案中,腔室120中的溶剂可以有助于从组织样品部位150有效提取分子以用于分析。

[0061] 另外,控制系统160可以允许泵125的操作与第一阀门121的打开之间有具体的时间段。这可以允许来自质谱仪140(或单独的辅助真空系统)的真空将样品材料(例如,来自组织样品部位150的分子) 经由第三导管113从储液器115抽吸到质谱仪140。

[0062] 当第一阀门121打开时,控制系统160还可以打开第二阀门122 以允许惰性气体(例如,N₂或CO₂) 经由第二导管112从加压气体供应 130转移到储液器115。惰性气体可以在分析之前有助于样品组织干燥,以及防止第一导管111中的溶剂间隙(例如,由于当储液器115 接触样品部位150时由质谱仪140抽真空而引起的)。惰性气体还可以有助于溶剂从样品部位150穿过第三导管113输送到质谱仪140。

[0063] 控制系统160可包括适合于操作装置100的各种部件的软件和硬件。图1的示意图中所示的各种部件的具体实施方案提供在下面讨论的实施例中，包括标题为实施例1的部分。

[0064] 图1G示出了装置100的实施方案，其类似于先前图1D中示出的实施方案。然而，在图1G的实施方案中，装置100还包括与导管113流体连通的泵141。在某些实施方案中，泵141可为外部真空泵，其可以被操作以增加样品部分穿过导管113到达质谱仪的速度。应该理解，在先前实施方案中描述的装置100的部件以此实施方案（以及随后描述的实施方案）中等同的方式操作。出于清楚的目的，并非所有部件都在每个附图中用参考号标记。另外，在对此实施方案或随后实施方案的讨论中，将不再重复与先前描述的实施方案中的部件等同的部件的操作方面。

[0065] 图1H示出了装置100的另一个实施方案，其类似于先前描述的实施方案，但还包括阀门142、废物容器143和与导管113流体连通的泵144。在某些实施方案中，阀门142可用于在清洁步骤过程中将溶剂或其他清洁溶液从导管113分散（diverge）到废物容器143。废物容器143可以经由泵144的操作而清空。在示例性实施方案中，可以在样品分析的任何阶段使用清洁或洗涤步骤以降低续存效应，所述清洁或洗涤步骤使用水、乙醇、任何比率下的水和乙醇的混合物以及其他溶剂。在某些实施方案中，探针110也可在每次使用之间切换。此外，可将探针110插入含有溶剂的小瓶中，以用于使用气体（鼓泡）来帮助自动洗涤步骤之前或之后清洁的洗涤步骤。也可使用其他清洁方法，包括用无菌溶液擦拭。例如，某些实施方案可使用以下清洁方案：1. 替换探针；2. 用50/50乙醇/水溶液洗涤；3. 用100%乙醇洗涤。

[0066] 图1I示出了装置100的另一个实施方案，其类似于先前描述的实施方案，但还包括导管113上的加热元件145。在某些实施方案中，加热元件145被配置为可缠绕在导管113周围的加热丝。在其他实施方案中，可包括不同的加热元件配置，包括例如陶瓷加热器。在本文描述的任何示例性实施方案中，可加热导管113以改善水或溶剂向质谱仪140的输送，以及有助于电离。加热可以通过整个导管系统或在具体位置处实施。

[0067] 图1J示出了组合先前描述的实施方案的特征的装置100的实施方案。具体地说，此图中示出的实施方案包括导管113上的加热元件145和泵141。加热元件145和泵141的操作方面先前已分别在图1I 和图1G的描述中讨论，并且为了简洁起见，这里将不再重复。

[0068] 图1K示出了装置100的实施方案，其类似于先前描述的实施方案，但还包括电离装置146，以在质谱仪140的入口附近形成喷雾。在某些实施方案中，电离装置146可为例如电喷雾电离（ESI）装置、纳米ESI装置或大气压化学电离（APCI）装置。在具体实施方案中，导管113不直接连接到质谱仪140，并且文丘里装置147可以用于将样品150的液滴输送到电离装置146和质谱仪140的接口。质谱法分析谱示出在包括文丘里装置的装置100的实施方案的图1L中。如图1L 所示，获得的分析谱类似于将导管113直接耦合到质谱仪140的入口的实施方案。

[0069] 现在参考图1M，装置100的实施方案包括所示的外部泵141（如先前在图1G中所示和所述）和电离装置146以及文丘里装置147（如先前在图1K中所示和所述）。

[0070] 如图1N的实施方案中所示，装置100的实施方案包括所示的加热元件145（如先前在图1I中所示和所述）和电离装置146以及文丘里装置147（如先前在图1K中所示和所述）。

[0071] 如图1O的实施方案中所示，装置100的实施方案包括所示的加热元件145（如先前

在图1I中所示和所述) 和电离装置146以及文丘里装置147(如先前在图1K中所示和所述)。另外,此实施方案还包括外部泵141(如先前在图1G中所示和所述)。

[0072] 如图1P的实施方案中所示,装置100的实施方案包括阀门142、废物容器143和泵144(如先前在图1H中所示和所述)。另外,此实施方案还包括所示的电离装置146和文丘里装置147(如先前在图1K 中所示和所述)。

[0073] 如图1Q的实施方案中所示,装置100的实施方案包括阀门142、废物容器143和泵144(如先前在图1H中所示和所述)。另外,此实施方案还包括所示的电离装置146和文丘里装置147(如先前在图1K 中所示和所述)。此实施方案还包括加热元件145(如先前在图1I中所示和所述)。

[0074] II. 测定方法

[0075] 在一些方面,本公开提供了通过鉴定质谱法分析谱的具体图案来确定患病组织(例如,肿瘤组织)的存在或检测生物样本的分子签名的方法。用于分析的生物样本可以来自动物、植物或与生物分子或生物体接触的任何物质(活体的或非活体的)。生物样本可以是体内样品(例如在手术期间)或离体样品。

[0076] 通过实施方案的方法获得的分析谱可以对应于例如来自所分析的生物样本或组织部位的蛋白质、代谢物或脂质。这些图案可通过使用质谱法测量具体离子的存在来确定。可以耦合到此装置的电离方法的一些非限制性实例包括化学电离、激光电离、大气压化学电离、电子电离、快速原子轰击、电喷雾电离、热电离。另外的电离方法包括电感耦合等离子体源、光电离、辉光放电、场解吸、热喷雾、硅上的解吸/电离、实时直接分析、二次离子质谱法、火花电离和热电离。

[0077] 具体地说,本发明的方法可应用或耦合到环境电离源或用于获得质谱数据的方法,诸如提取环境电离源。在这种情况下,提取环境电离源为具有液体提取方法,动态地随后进行电离的方法。提取环境电离源的一些非限制性实例包括气流辅助解吸电喷雾电离(AFADESI)、实时直接分析(DART)、解吸电喷雾电离(DESI)、通过电荷交换解吸电离(DICE)、电极辅助解吸电喷雾电离(EADESI)、电喷雾激光解吸电离(ELDI)、静电喷雾电离(ESTASI)、喷射解吸电喷雾电离(JeDI)、激光辅助解吸电喷雾电离(LADESI)、激光解吸电喷雾电离(LDESI)、基质辅助激光解吸电喷雾电离(MALDESI)、纳米喷雾解吸电喷雾电离(纳米DESI)、或透射模式解吸电喷雾电离(TM-DESI)。

[0078] 与许多质谱方法一样,可以通过修改收集或溶剂条件(诸如溶剂组分、pH、气体流速、所施加的电压和影响样品溶液电离的其他方面)来优化电离效率。具体地说,本发明的方法想到使用与人切口相容的溶剂或溶液。可用作电离溶剂的溶剂的一些非限制性实例包括水、乙醇、甲醇、乙腈、二甲基甲酰胺、酸或其混合物。在一些实施方案中,方法想到乙腈和二甲基甲酰胺的混合物。可改变乙腈和二甲基甲酰胺的量以增强从样品中提取分析物以及增加样品的电离和挥发性。在一些实施方案中,组合物含有约5:1(v/v)二甲基甲酰胺:乙腈至约1:5(v/v)二甲基甲酰胺:乙腈,诸如1:1(v/v)二甲基甲酰胺:乙腈。然而,在优选的实施方案中,根据实施方案使用的溶剂为药学上可接受的溶剂,诸如无菌水或缓冲水溶液。

[0079] III. 实施例

[0080] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应该理解,下面的实施例中公开的技术表示本发明人发现在本发明的实践中作用良好的技术,因此可以被

认为构成其实践的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应该了解可在不脱离本发明的精神和范围的情况下对所公开的具体实施方案进行许多改变并且仍然获得相似或类似的结果。

[0081] 实施例1-智能MasSpec Pen设计

[0082] MasSpec Pen(图1A)被开发作为自动化和生物相容的手持式取样探针,其允许使用离散的水滴从组织样品中温和地、时间和体积控制地提取分子。为了最小化组织损伤,最大化组织分析物提取并且最大化溶剂转移到质谱仪的目的,工程改造了系统的若干个原型。

[0083] 所开发的系统由三个主要部分组成:1)注射泵,其被编程为使用控制的流速递送离散的溶剂体积;2)管道系统,其被整合到双向夹管阀以用于控制的溶剂输送;3)探针尖端,其用于直接取样生物组织。为了最小化组织损伤,最大化组织分析物提取并且最大化溶剂传送到质谱仪的最终目的,探索并且优化了系统的若干个迭代(iteration)。图1A示出了装置的一个实例的示意图,所述装置包括用于分析生物组织的诊断笔(MasSpec Pen)装置。

[0084] 优化的系统包含三个主要部件:1)注射泵,其被编程为向取样探针递送限定的水体积(4-10 μ L);2)小直径(内径800 μ m)聚四氟乙烯(PTFE)管道导管,其整合到快速(8ms)双向夹管阀以用于从泵到达组织并且从组织到达质谱仪的控制的溶剂输送;3)手持式钢笔大小的探针,其用于直接取样生物组织。

[0085] 手持式钢笔大小的探针的主要部件为3D打印的聚二甲基硅氧烷(PDMS)尖端(图1B),其中溶剂在与组织相互作用的过程中被保留下来。尖端使用3D打印制造,并且由生物相容的聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成。尖端设计有三个主要端口:用于进入(溶剂)导管系统(管111或导管1)的一个端口、用于气体(N₂、CO₂或空气)递送的中心端口(管112或导管2)、以及将水滴中的分子成分从组织输送到质谱仪的流出端口(管113或导管3)。在探针尖端处,所有端口组合成小储液器,其中单个液滴被保留并且暴露于组织样品,持续控制的量的时间(3秒),从而允许有效的分析物提取。储液器的直径决定了暴露于组织的溶剂的体积以及装置的空间分辨率。使用当前工具,MasSpec Pen尖端被设计具有取样大小范围为1.5mm至5.0mm,这由储液器直径决定。在2.77mm储液器直径处,10 μ L的溶剂体积保留在储液器中并且与组织样品接触持续限定的时间段,而4.4 μ L保留在直径为1.5 mm的储液器中。在3秒提取期后,将MasSpec Pen从组织中移除。同时,打开导管3,允许将液滴真空抽取到质谱仪,通过导管2提供来自低压气体递送(<10psi)的正压,接着进行冲洗步骤以清洁系统。注意到,评估了液滴与组织样品之间的1秒、3秒和5秒的接触时间(图22)。为所有实验选择3秒接触时间,因为它允许使用者易于操作并且产生具有足够总离子强度的质谱。由第二管提供的气体不参与提取过程,而是用于防止由于所采用的真空引起的系统坍塌并且帮助溶剂从组织输送到质谱仪。类似地,冲洗步骤不用于从组织中提取生物分子,因为在此过程中没有与组织接触。导管3直接连接到高质量分辨率Orbitrap质谱仪的转移管,使得质谱仪真空系统的负压驱动液滴从储液器移动到质谱仪以用于电离和质量分析。尽管可以将各种连接和电离方法耦合到我们的系统,但此设置简化了操作步骤并且排除了电离源的使用。所有导管采用1.5米的管长度,以允许操作者在没有几何或空间限制的情况下自由地手持使用装置。

[0086] 所使用的三个导管由聚四氟乙烯(PTFE)制成,其也是生物相容的。管111用于将溶剂从注射泵递送到探针尖端。在一些情况下,管 112用于将惰性气体(N_2 或 CO_2)递送到探针尖端。气体有三个主要目的:1)分析前的组织干燥;2)防止当通过接触组织样本关闭储液器时,由于质谱仪的真空引起的管111中的溶剂间隙;2)通过管113 帮助溶剂从组织输送到质谱仪。然而,在某些情况下,不需要使用气体。管113直接连接到质谱仪的入口,使得质谱仪真空系统的正压用于驱动液滴从储液器到达质谱仪入口以用于电离。

[0087] 装置操作中涉及的时间事件为自动化的,并且由与Arduino系统和两个双向夹管阀通信的软件精确控制。所有夹管阀都关闭,直到当以下情况时开始所述方法:1. 在 $300\mu L/min$ 下,脉冲被发送到泵以注入溶剂持续两秒并且停止,在MasSpec Pen储液器中产生 $10\mu L$ 的液滴填充;2. 关闭管112和113,允许储液器中的溶剂与组织相互作用持续三秒以提取分子;3. 控制管112和113的夹管阀同时打开,允许液滴转移到质谱仪以用于电离和分子分析。4. 脉冲被发送到泵以再注入溶剂12秒并且停止,以将所有提取的分子完全驱动到质谱仪中。5. 使管112和113再打开20秒以允许管113中的所有溶剂进入质谱法分析。总分析时间为37秒。

[0088] 使用三个导管和高速致动夹管阀的尖端设计允许精确控制液滴运动,并且示出优异的性能和稳健性。从取样到质谱获取的整个过程在10秒或更短时间内完成并且使用Arduino微控制器完全自动化,使得每次获取和分析通过使用脚踏板一步点击来单独触发。系统自动化确保了每个溶剂液滴被单独递送到入口,产生若干个质谱,针对样品的最终分子谱对所述若干个质谱进行平均。此外,控制的液滴递送允许质谱仪在没有任何明显性能退化的情况下操作。每次使用后,如果观察到残留物,可以通过快速和自动化的清洁冲洗或通过替换一次性尖端来清洁MasSpec Pen。

[0089] 实施例2-分子谱和分析

[0090] 本文描述的系统通过将收集导管直接连接到质谱仪入口以将含分析物的溶剂输送到质谱仪用于分子分析来操作。此设置大大简化了操作细节,并且排除了电离源的使用。在探针与组织相互作用后,然后将溶剂输送到质谱仪并且直接输注,而无需额外的电离源。因为系统为完全自动化的,所以每个 $10\mu L$ 溶剂液滴被单独递送到入口,质谱仪在不会对其性能产生任何影响的情况下操作。以此方式获得的丰富分子信息,类似于从其他溶剂提取环境电离技术诸如解吸电喷雾电离中观察到的。电离机理可类似于入口电离。对于入口电离方法,电离发生在大气与真空之间的入口压降区域。可以在装置中使用若干个溶剂系统。在本实施例中,为了确保装置的完全生物相容性,使用水作为唯一的溶剂,尽管也探索了不同比率下的乙醇和水的混合物并且产生类似的结果。为了证明这些样品在用5:1和20:1 ($H_2O:EtOH$)组成的溶剂提取后进行分析,并且发现EtOH将有助于提取更多的PE脂质,像PE (40:6) (m/z 790.539) 和PE (38:4) (m/z 766.540) (参见图3中的结果)。

[0091] 通过分析薄组织切片和组织样品片来测试MasSpec Pen在获得分子信息方面的有效性。首先,使用纯水作为溶剂,按照上述MasSpec Pen的自动化操作步骤,在标准组织载玻片上分析 $16\mu m$ 厚的组织切片。测试了MasSpec Pen的具有不同储液器直径的若干个探针尖端,产生了呈现脂质种类的质谱,所述质谱特征在于小鼠脑组织灰质、白质或用于更大的取样大小的混合组合物。图2示出了使用来自小鼠脑组织切片的灰质区域的 $2.7mm$ 笔尖在负离子模式中获得的代表性质谱,以及从载玻片区域(无样品)获得的代表性背景质谱。测试了

若干种直径的MasSpec Pen,产生类似的质谱分析谱,其中针对更大的笔尖直径观察到增加的总离子计数(图17)。

[0092] 图2B示出了在总分析期间获得的总离子色谱图。在0.5min处(参见图2B中的插图),通过接触纯玻璃获取背景质谱。如在质谱中所见,在此质量范围处获得了非常干净的背景信号。在3.4min处(图2A),按照上述相同的程序将MasSpec Pen应用于小鼠脑组织切片。值得注意的是,观察到了丰富的分子谱。在负离子模式质谱中以高相对强度观察到使用生物组织的环境电离质谱法通常检测到的脂质信号,包括脂肪酸(FA)、神经酰胺(Cer)、甘油磷酸肌醇(PI)、甘油磷酸乙醇胺(PE)、甘油磷酸丝氨酸(PS)和固醇脂质(ST)。在质谱中也观察到一级和二级内源代谢物。在正离子模式中,还检测到二酰基甘油(DG)、甘油磷酸胆碱(PC)和鞘氨醇磷脂(SM)。使用高分辨能力质量分析仪(分辨能力设定为140,000)来鉴定光谱中的大部分脂质。

[0093] 从小鼠脑组织切片的灰质区域获得的负离子模式质谱呈现丰富的分子信息,包括对应于使用基于溶剂的环境电离MS技术从生物组织中通常检测到的脂质种类的去质子化或氯化物加合物的各种离子。高相对丰度的峰被鉴定为来自m/z 120-350的脂肪酸(FA)、鞘脂诸如来自m/z 700-1100的硫苷脂和来自m/z 500-700的神经酰胺(Cer)的氯化物加合物、以及甘油磷脂(GL),诸如来自m/z 700-1100的甘油磷酸肌醇(PI)、甘油磷酸乙醇胺(PE)、甘油磷酸丝氨酸(PS)和双电荷心磷脂(CL)。在m/z 1100-1800的更高质量范围内,观察到GL二聚体和单电荷CL。基于高质量准确度测量和串联质谱法数据(表1),在来自m/z 120-250的更低质量范围内检测到被暂定鉴定为小代谢物的各种峰,所述小代谢物包括m/z 145.061处的谷氨酰胺、m/z 146.045处的谷氨酸酯、m/z 174.041处的N-乙酰基天冬氨酸和m/z 215.033处的己糖的氯化物加合物。重要的是,从相同小鼠脑的不同组织切片的灰质获得的负离子模式质谱为可再现的($RSD=9.3\%, n=9$),与使用相同的DESI-MSI方法报道的相当($RSD=8.0\%, n=5$)。在正离子模式中,所获得的质谱呈现出高相对丰度的通常观察到的分子种类,所述分子种类被鉴定为二酰基甘油(DG)、PE和甘油磷酸胆碱(PC)(图18)。当达到适当强度的碎片离子以用于结构解释时,使用高质量准确度测量以及串联MS分析进行暂定归属。针对在表1、2、3、4和5中的整个手稿中鉴定的所有种类,描述通过串联MS实验获得的质量误差和碎片离子的m/z。注意到,复杂脂质的FA链中双键的异构化使精确的结构归属复杂化,这就是为什么FA链被暂定归属为脂质种类的原因(Dill等人,Analytical and Bioanalytical Chemistry, 12, 2011)。

[0094] 将MasSpec Pen光谱与在类似的MS参数下获得的DESI光谱进行比较,但使用通常应用的乙腈和二甲基甲酰胺溶剂系统,因为其从生物组织中提取脂质的效率高。有趣的是,在负离子模式中,来自使用水作为提取溶剂的MasSpec Pen的光谱与来自使用ACN和DMF的DESI的光谱共享大量的从m/z 500至m/z 1800的分子种类,其中PE脂质的比率略高,诸如PE(40:6)(m/z 790.539)和PE(38:4)(m/z 766.539)。图6A-B示出了PI(38:4)(m/z 885.550)和PS(38:6)(m/z 834.529)为来自MasSpec Pen和DESI两者的光谱中的主要峰。此外,在光谱中,在从m/z 1500至m/z 1600的质量范围内见证了具有更高m/z的一组离子,其暂定归属为单电荷心磷脂(CL)和/或甘油磷脂二聚体。

[0095] 进一步分析比较了在负离子模式中检测到的分子种类与在使用水作为溶剂和类似实验条件的从相同小鼠脑的一系列组织切片获取的DESI质谱中观察到的那些分子种类。

使用MasSpec Pen和DESI 获得的质谱类似,其中计算的余弦相似度为0.9,在相当的相对丰度和信噪(S/N)比下共享大量分子种类(图6C)。还探索了其他溶剂系统,包括各种比率下的水与乙醇的混合物,作为MasSpec Pen的溶剂系统。所获得的质谱呈现与使用纯水所获得的质谱中观察到的那些类似的脂质种类,其中它们的相对丰度有变化(图3B)。因此,为了确保装置的完全生物相容性,选择水作为溶剂以用于所有以下进行的MasSpec Pen实验。

[0096] 为了评估系统性能,对相同的组织切片和不同的组织切片进行连续分析,并且证明系统在样品内和不同样品中具有高度可再现性。

[0097] 人癌症组织切片和正常组织切片的分子分析。已广泛研究了环境电离质谱法以用于人癌组织的分子诊断。为了测试本文描述的 MasSpec Pen系统用于辨别正常样品和肿瘤样品的能力,分析了包括乳腺、肾、淋巴结、甲状腺和卵巢的五种不同组织类型的62个人组织样品。使用水作为每种组织类型的溶剂系统在负离子模式中获得的质谱示出了通过 DESI-MS通常观察到的分子离子,其中具有高相对丰富的代谢物和脂质。采用主成分分析(PCA)来统计评估MasSpec Pen在人样本的种间种内分析中的性能。应该注意的是,均包含大于85%的总方差的前三个成分用于本发明的工作。如在图9中可见,很好地将正常的甲状腺和肾组织与肿瘤组织进行辨别。令人惊讶的是,在负离子模式下分析人组织切片的过程中,检测到一系列多电荷种类,并且通过高质量准确度测量和串联质谱法分析将其鉴定为胸腺素 β -4(图7)。每个样本的代表性光谱示于图5中。值得注意的是,从人正常甲状腺和癌组织获得的分子谱示出了诊断疾病状态的不同分子图案。针对所分析的所有其他癌组织获得了类似的结果。

[0098] 测试MasSpec Pen的能力,以分析正常和肿瘤人乳腺($n=5$ 个正常乳腺, $n=5$ 个乳腺导管癌)和甲状腺($n=5$ 个正常甲状腺, $n=4$ 个乳头状甲状腺癌,以及 $n=1$ 个滤泡性甲状腺腺瘤)组织的20个薄组织切片。对于每种组织类型在负离子模式中获得的质谱呈现出通过DESI-MSI 通常从人组织观察到的丰富多样的分子离子,其中具有高相对丰度的代谢物、脂肪酸和复杂脂质。例如,针对乳头状甲状腺癌组织切片获得的质谱呈现出先前通过DESI-MSI被鉴定为诊断标志物的脂质种类(Zhang等人,Cancer Research,76,2016),包括各种双电荷的CL和其他甘油磷脂,诸如PI(38:4)(m/z 885.550)、PI(36:4)(m/z 857.518)、PE(38:4)(m/z 766.539)和PE(36:2)(m/z 742.539)(表2)。针对正常甲状腺组织切片获得不同的质谱分析谱,其呈现出高相对丰度的被鉴定为碘的m/z 126.904、被鉴定为谷氨酰胺的m/z 145.050、被鉴定为抗坏血酸的m/z 175.024、被暂定归属为C36H78O9N3I的m/z 822.472、以及被鉴定为PI(38:4)的m/z 885.551(图8B)。有趣的是,一系列不同电荷状态(z)下的多电荷分子离子,包括m/z 991.091(z=-5)、m/z 1239.113(z=-4)和m/z 1652.484(z=-3)在从所分析的所有组织切片获得的质谱中检测到。基于高质量准确度测量,这些离子被暂定鉴定为不同电荷状态的蛋白质胸腺素 β -4(图7和表1)。值得注意的是,对从所分析的人组织切片获得的数据进行的主成分分析(PCA)示出肿瘤组织与正常组织之间的分离(图9)。

[0099] 新鲜组织样品的分子分析。MasSpec Pen装置被设计成独立于形态而在新鲜组织样品上操作。为了测试用于新鲜组织分析的装置,在开始时使用新鲜小鼠脑组织。从小鼠脑组织切片或新鲜脑组织获得的光谱中未观察到显著差异。图4A-4B示出了来自小鼠脑新鲜组织和组织切片的几乎相同的质谱图案,这说明来自MasSpec Pen的提取过程对于不同的

样品制备步骤类似地起作用。然后,进一步分析两种类型的新鲜人标本,即甲状腺和淋巴结。来自正常和癌性的甲状腺新鲜组织样品的光谱示于图8中。

[0100] 应该注意的是,从组织库中获得的所有冷冻样本在-80°C下在冰箱中保存良好,并且在使用前在室温下解冻。从新鲜人样本收集的数据也由PCA处理。所记录的光谱的PCA示出了正常样品与肿瘤样品之间的明显区别(图10A-10B)。因此,确定MasSpec Pen可以用于辨别新鲜正常样品和患病样品。应该注意的是,由于取样过程而没有观察到对组织的损伤。

[0101] 表1:从小鼠脑组织中鉴定所选择的负离子模式分子离子所获得的数据。

提出的 鉴定		提出的 化学式	测量的 <i>m/z</i>	理论 <i>m/z</i>	质量误差 (ppm)	MS/MS^a后 的主要碎 片离子	
[0102]	胸腺素 β-4	$C_{212}H_{350}N_{56}O_7$ 8S ₁	991.091 (-5)	991.090 (-5)	<1 (-5)	NA	
			1239.113 (-4)	1239.114 (-4)	<1 (-4)		
			1652.484 (-3)	1652.488 (-3)	2.4 (-3)		
ST		$C_{48}H_{92}NO_{12}S$	906.634	906.635	-1.1	NA	
PI		$C_{47}H_{82}O_{13}P$	885.550	885.550	<1	152.995, 241.011,	

						283.264, 303.233, 419.257, 581.309
PS	40:6	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₀ P	834.529	834.529	<1	152.994, 283.264, 327.233, 419.256, 437.267, 747.497
[0103]	40:6	C ₄₅ H ₇₇ NO ₈ P	790.539	790.539	<1	283.243, 283.264, 327.232, 480.309
	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766.539	766.539	0	259.243, 283.263, 303.232, 480.309
	P-38:6	C ₄₃ H ₇₃ NO ₇ P	746.513	746.513	<1	283.243, 327.232, 436.282
	O-36:3	C ₄₁ H ₇₇ NO ₇ P	726.545	726.544	1.4	140.010, 152.994, 281.248, 444.288, 462.299
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.513	722.513	<1	152.994, 259.243, 303.233, 418.273, 436.283
	Cer	C ₃₆ H ₇₁ NO ₃ Cl	600.513	600.513	<1	NA
FA	22:6	C ₂₂ H ₃₁ O ₂	327.233	327.233	<1	229.195, 283.243, 309.174
	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.233	303.233	<1	205.195, 259.243, 284.991
	18:0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283.264	283.264	<1	265.130
	16:0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.233	255.233	<1	237.043
	N-酰基天冬氨酸	C ₆ H ₈ NO ₅	174.040	174.041	-5.7	58.028, 88.039, 130.049
己糖		C ₆ H ₁₂ O ₆ Cl	215.033	215.034	-4.7	NA
谷氨酸酯		C ₅ H ₈ NO ₄	146.045	146.046	-6.8	102.054, 128.034
谷氨酰胺		C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145.061	145.062	-6.9	127.050, 128.034

[0104] ^aNA(没有得到)意味着仅高质量准确度用于暂定离子鉴定。

[0105] 表2.从人甲状腺组织中鉴定所选择的负离子模式分子离子所获得的数据。

提出的 鉴定	提出的 化学式	测量的 <i>m/z</i>	理论 <i>m/z</i>	质量误差 (ppm)	MS/MS ^a 后 的主要碎 片离子
PI	40:5	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₃ P	911.566	911.566	<1 NA
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.550	885.550	152.994, 223.006, 241.011, 283.264, 303.233, 419.256, 581.310
	36:4	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	857.518	857.518	152.994, 241.011, 279.233, 415.226, 577.278
	34:1	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₃ P	835.534	835.534	152.994, 241.011, 255.232, 391.226, 553.277
[0106]	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766.539	766.539	<1 140.010, 152.995, 259.243, 283.264, 303.233, 480.309
	36:2	C ₄₁ H ₇₇ NO ₈ P	742.539	742.540	-1.3 140.010, 152.994, 281.248
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₅ NO ₇ P	722.513	722.513	<1 140.010, 196.037, 259.243, 303.233, 418.270, 436.283
CL	74:7	C ₈₃ H ₁₄₆ O ₁₇ P ₂	738.502	738.502	<1 NA
	72:8	C ₈₁ H ₁₄₀ O ₁₇ P ₂	723.479	723.479	<1 NA
Cer	34:1	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ C ₁	572.481	572.482	-1.7 NA
FA	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.233	303.233	<1 205.195, 259.243, 284.992
	18:0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283.265	283.264	3.5 265.130
	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.250	281.249	3.6 NA
	18:2	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	279.234	279.233	3.6 261.222
	16:0	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	255.233	255.233	<1 NA
抗坏血酸		C ₆ H ₇ O ₆	175.024	175.025	-5.7 87.007, 115.002
谷氨酰胺		C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145.050	145.062	-8.3 NA
I-			126.904	126.905	-7.9 NA

[0107] ^aNA (没有得到) 意味着仅高质量准确度用于暂定离子鉴定。

[0108] 表3. 从人卵巢组织中鉴定所选择的负离子模式分子离子所获得的数据。

[0109]

提出的 鉴定		提出的 化学式	测量的 <i>m/z</i>	理论 <i>m/z</i>	质量误差 (ppm)	MS/MS ^a 后 的主要碎 片离子
PI	40:4	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₃ P	913.581	913.581	<1	223.000, 241.011, 283.264, 331.264, 419.257, 581.309
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.549	885.550	-1.1	152.994, 223.000, 241.011, 283.264, 303.233, 419.256, 439.225, 581.309
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863.565	863.566	-1.2	152.995, 241.011, 281.248, 283.264, 419.256
	34:1	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	835.534	835.534	<1	152.994, 223.000, 241.011, 255.233, 281.248, 391.225, 553.278

[0110]

PS	38:3	C ₄₄ H ₇₉ NO ₁₀ P	812.544	812.545	-1.2	152.994, 283.264, 305.248, 419.256, 437.266, 725.514
	36:1	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₀ P	788.545	788.545	<1	281.248, 283.264, 417.242, 419.256, 437.268, 701.512
	38:4	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	766.539	766.539	<1	259.243, 283.264, 303.233, 480.309
	O-38:5	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750.544	750.544	<1	259.243, 303.233, 446.303, 464.313
PE	P-35:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.512	722.513	-1.4	259.243, 303.233, 418.273, 436.283
	FA	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255.232	255.233	-3.9	NA
	抗坏血酸	C ₆ H ₇ O ₆	175.024	175.024	<1	87.007, 115.002

[0111] ^aNA(没有得到)意味着仅高质量准确度用于暂定离子鉴定。

[0112] 表4.从人肺组织中鉴定所选择的负离子模式分子离子所获得的数据。

	提出的 鉴定	提出的 化学式	测量的 <i>m/z</i>	理论 <i>m/z</i>	质量 误差 (ppm)	MS/MS^a后 的主要碎 片离子
[0113]	PI	40:4	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₃ P	913.580	913.581	-1.1
		38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.550	885.550	<1

						283.264, 303.233, 419.256, 581.311	
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863.565	863.566	-1.2	152.994, 241.011, 281.248, 283.264, 419.256, 581.311	
	36:2	C ₄₅ H ₈₂ O ₁₃ P	861.548	861.549	-1.2	152.994, 223.000, 241.011, 281.256, 417.241	
	PG	36:2	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773.542	773.534	10	152.994, 281.256, 417.241, 491.278, 509.288
[0114]		34:1	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P	747.514	747.517	-4.0	152.994, 255.233, 281.256, 391.226, 417.241, 491.277
		38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766.535	766.539	-5.2	140.010, 283.256, 303.233, 480.309,
	PE	36:1	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744.552	744.555	-4.0	140.011, 281.256, 283.264, 480.307
		P-38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750.534	750.544	-13	259.243, 303.233, 464.314
		P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722.511	722.513	-2.8	259.243, 303.233, 418.273, 436.283
		O-34:2	C ₃₉ H ₇₅ NO ₇ P	700.527	700.529	-2.9	NA
	Cer	34:1	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ Cl	572.479	572.482	-5.2	NA
	FA	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.249	281.249	<1	NA
	抗坏血酸		C ₆ H ₇ O ₆	175.023	175.024	-5.7	115.002

[0115] ^aNA(没有得到)意味着仅高质量准确度用于暂定离子鉴定。

[0116] 表5.从人乳腺组织中鉴定所选择的负离子模式分子离子所获得的数据。

提出的鉴定		提出的化学式	测量的 m/z	理论 m/z	质量误差 (ppm)	MS/MS ^a 后的主要碎片离子	
[0117]	PI	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885.550	885.550	<1	152.994, 223.000, 241.011, 283.264, 303.233, 419.257, 581.310, 599.319
		36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863.565	863.566	-1.2	152.994, 223.000, 241.011, 281.248, 283.264, 419.256, 581.309
	PG	36:2	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773.542	773.534	10	152.994, 281.248, 417.240, 491.276
	FA	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303.233	303.233	<1	205.195, 259.243, 284.991
		18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281.249	281.249	<1	NA

[0118] ^aNA(没有得到)意味着仅高质量准确度用于暂定离子鉴定。

[0119] 表6. 用于本研究的253个人组织样品的患者人口统计资料。

患者诊断		中值年龄, 岁	年龄范围, 岁	按性别划分的患者数 (男性、女性)	按种族划分的患者数(白人、黑人、亚洲人、未知)
[0120]	乳腺	正常	47	24-76 (0、29)	(21、7、1、0)
		癌症	58	41-75 (2、14)	(10、2、4、0)
	肺	正常	57	12-82 (33、14)	(35、12、0、0)
		癌症	66	22-84 (25、23)	(35、7、0、6)
	卵巢	正常	50	31-80 (0、29)	(22、7、0、0)
		癌症	62	30-83 (0、28)	(25、2、0、1)
	甲状腺	正常	40	18-80 (10、17)	(18、7、0、2)
		肿瘤	49	16-81 (12、17)	(21、4、0、4)

[0121] 材料和方法。

[0122] 质谱仪。使用了Q Exactive复合四极杆-轨道阱质谱仪 (Thermo Scientific, San Jose, CA)。在 m/z 120-1800范围处进行全扫描, 并且其他质谱参数列出如下: 分辨能力140 000, 微扫描2, 最大注射时间300毫秒, 毛细管温度350°C和S-透镜RF水平100。

[0123] 生物组织。野生型小鼠脑购自Bioreclamation IVT。从联合人类组织样本库网络(Cooperative Human Tissue Network)和贝勒学院组织库(Baylor College Tissue Bank)获得62个冷冻人组织样本,包括乳腺、甲状腺、淋巴结、卵巢和肾。将样品储存在-80°C冰箱中。使用CryoStar™ NX50低温恒温器将组织片切成16μm。在使用前将冷冻组织样本在室温下解冻。

[0124] 统计分析。使用IBM SPSS Statistics 22.0(IBM公司,Armonk, NY,USA)来进行主成分分析(PCA)以揭示数据中的模式。使用原始数据直接进行分析。 m/z 范围为700-900的最高相对强度的10个峰用于PCA。通常,均包含大于85%的总方差的前三个成分用于本发明的结果。

[0125] 实施例3-用于手持和腹腔镜使用的系统自动化

[0126] 由于MasSpec Pen设计中使用的所有材料(PDMS和PTFE)和溶剂(仅水)均为生物相容性,所以系统具有很高的潜力用于手持式手术中进行实时分析。不仅如此,由于装置尺寸小,它甚至可以通过附件端口或其机械臂之一整合到机器人手术系统,诸如达芬奇手术系统。可以在手术期间快速取样人体腔的若干个区域,并且通过使用分子签名和机器学习算法的数据库来分析。因此,可针对每个所取样的区域实时提供诊断结果。系统可以广泛用于各种肿瘤和其他外科介入(诸如子宫内膜异位症),针对所述肿瘤和其他外科介入需要对组织进行实时表征和诊断。

[0127] 实施例4-组织样品的预测分析

[0128] MasSpec Pen设计用于分析来自患有乳腺癌、肺癌、卵巢癌或甲状腺癌的患者的组织样品以及正常组织样品。在分析这些样品前,通过将质荷比(m/z)四舍五入到最接近的0.01并且对总离子色谱图(TIC)进行归一化来处理样品。还除去了所有背景 m/z 峰和出现在小于10%的患者样品中的那些峰。在分析中使用整个质量范围。训练的分类器为套索逻辑回归模型(lasso logistic regression model)。针对正在分析的癌症存在的组织样品,所有分类器的总体性能结果示于表7中。总体结果准确度为96.3%,灵敏度为96.4%,并且特异性为96.2%。

[0129] 表7:相对于所有正常与所有癌症的真实确定的组织样品预测*

	预测的	
	正常	癌症
真实的	正常	127
	癌症	4
106		

*不包括良性甲状腺

[0131] 针对正在分析的肺癌存在的组织样品,表8示出了用于区分组织样品的质荷值(m/z)以及所述具体值的相关系数。

[0132] 表8:针对正常肺与肺癌的肺癌质荷值(m/z)和系数

<i>m/z</i>	系数
175.02	32.51042
187.01	492.94937
201.04	324.19856
215.03	-134.54101
313.16	-711.31964
330.98	31.73486
332.90	-49.54229
357.10	-903.32504
409.23	218.36836

615.17	-418.02900
722.51	42.39442
744.55	780.14488
747.52	-248.52283
748.52	-494.98929
771.52	6.80739
773.53	-292.30917
863.57	-722.21921
885.55	703.46083
886.55	8.82125

[0135] 表9示出了每个样品的分析速率和分类,其中行中为真实(组织学)确定并且列中为预测值。在癌组织样品中,鉴定样品的准确度为 96.8 % ,灵敏度为97.9 % ,特异性为 95.7 % 并且AUC为0.97。

[0136] 表9:相对于肺癌的真实确定的组织样品预测

真实的	预测的		正确率
	正常	癌症	
正常	45	2	0.957
癌症	1	47	0.979

[0138] 对正常肺样品与腺癌样品进行了类似的分析,如表10和表11所示。鉴定样品的准确度为92.2 % ,灵敏度为88.2 % ,特异性为93.6 % ,并且AUC为0.98。

[0139] 表10:针对正常肺与腺癌的肺癌质荷值(*m/z*)和系数

<i>m/z</i>	系数
175.02	78.79492
201.04	113.95819
747.52	-134.59620
773.53	-17.30482
885.55	205.16262

[0141] 表11:相对于肺鳞状细胞癌的真实确定的组织样品预测

		预测的		正确率
[0142]	真实的	正常	癌症	
		正常	44	0.936
[0143]		癌症	2	0.882

[0144] 对正常肺样品与鳞癌样品进行了类似的分析,如表12和表13所示。鉴定样品的准确度为93.8%,灵敏度为88.2%,特异性为95.7%,并且AUC为0.93。

[0145] 表12:针对正常肺与鳞状细胞肺癌的肺癌质荷值(m/z)和系数

[0146]	m/z	系数
	201.04	203.209288
	306.08	2.171805
	747.52	-83.325218
	773.53	-101.591552
	861.55	-22.995934
	885.55	248.475559

[0147] 表13:相对于肺癌的真实确定的组织样品预测

		预测的		正确率
[0148]	真实的	正常	癌症	
		正常	45	0.957
		癌症	2	0.882

[0149] 类似于上述针对肺癌进行的分析,对于卵巢、甲状腺和乳腺癌进行了类似的分析,并且示出每组样品的相应m/z峰和系数。检测卵巢癌样品的准确度为94.7%,灵敏度为100%,特异性为89.7%,并且 AUC为0.98。检测甲状腺癌样品的准确度为94.7%,灵敏度为90.9%,特异性为96.3%,并且AUC为0.93。最后,检测乳腺癌样品的准确度为95.6%,灵敏度为87.5%,特异性为100%,并且AUC为1.00。

[0150] 表14:卵巢癌质荷值(m/z)和系数

[0151]	m/z	系数
	124.01	-0.39418349
	175.02	-0.44099907
	175.03	-0.65091248
	283.27	-0.19534503
	313.16	0.13896620
	341.27	-0.01845538

[0152] 表15:相对于卵巢癌的真实确定的组织样品预测

		预测的		正确率
[0153]	正常的	癌症		
	正常	26	3	0.897
	癌症	0	28	1.000

[0154] 表16:针对正常甲状腺与良性肿瘤的甲状腺癌质荷值 (m/z) 和系数

[0155]

m/z	系数
175.02	0.050122579
191.02	-0.009462112
191.05	-0.354060964
283.27	-0.471995496
341.27	-0.151684619
615.17	-0.208451792
822.47	-1.009896669
822.48	-1.045185471

[0156] 表17:相对于正常甲状腺与良性肿瘤的真实确定的组织样品预测

[0157]

真实的	预测的		正确率
	正常	癌症	
正常	26	1	0.963
癌症	1	10	0.909

[0158] 表18:针对正常甲状腺与恶性肿瘤的甲状腺癌质荷值 (m/z) 和系数

[0159]

m/z	系数
175.02	-0.13520642
283.27	-0.41455282
341.27	-0.16730814
353.16	-0.06014487
432.20	-0.31647335
433.21	-0.07291166
615.17	-0.61749889
822.47	-0.53746679
822.48	-1.04230818

[0160] 表19:相对于正常甲状腺与良性肿瘤的真实确定的组织样品预测

[0161]

真实的	预测的		正确率
	正常	癌症	
正常	26	1	0.963
癌症	1	10	0.909

[0162] 表20:针对正常乳腺与乳腺癌的甲状腺癌质荷值 (m/z) 和系数

[0163]

m/z	系数
187.04	476.70006
268.80	-190.32304
279.92	79.49933
283.27	-31.45926
341.27	-11.77054

345.16	-154.78978
381.21	-68.13689
687.51	-39.13906
742.54	1771.27018
766.54	1663.80192

[0164] 表21:相对于正常乳腺与乳腺癌的真实确定的组织样品预测

真实的	预测的		正确率
	正常	癌症	
正常	29	0	1.000
癌症	2	14	0.875

[0166] 实施例5-MasSpec Pen系统的空间分辨率

[0167] 测试了MasSpec Pen系统的空间分辨率,并且确定可以使用具体点确定更高的空间分辨率。使用小鼠脑中的白质与灰质进行测试。图 11中所示的内容示出了用具体大小的点测试的脑部分。具体地说,样品点1示出了所述点主要包含灰质。

[0168] 实施例6-组织样品的非破坏性分子分析

[0169] MasSpec Pen被设计成独立于组织硬度和形态,直接在组织样本上操作。测试MasSpec Pen的性能以分析来自不同器官的软组织样品 (0.1g-5g),包括小鼠脑和人乳腺、甲状腺、肺和卵巢组织。在前述相同的自动化操作步骤后,通过简单的一步实验,在环境条件下进行组织分析。将MasSpec Pen尖端温和地接触组织样品表面3秒的时间,同时进行提取。从小鼠脑的灰质区域所获得的质谱为可再现的 ($RSD = 4.6\%$, $n=10$) 并且与小鼠脑组织切片质谱高度类似(余弦相似性为0.93) (图4),因此表明组织表面处的提取过程独立于组织形状和刚性而有效地发生。类似地,人组织样品的MasSpec Pen分析提供了丰富的分子信息,尤其是包含上皮细胞和癌细胞的组织。主要包含软结缔组织 (诸如基质) 的非癌组织样本提供了较不丰富的质谱分析谱。具体地说,所分析的许多正常乳腺癌组织样品呈现与水不混溶的脂肪含量,并且因此与乳腺癌组织或正常乳腺癌腺体相比时,在质谱中产生较不丰富的总离子计数。

[0170] 在MasSpec Pen分析后对所有组织样品进行的视觉和显微镜检查,揭示了在所探测的区域中对组织样品形态没有可检测的损伤。图 15示出了在MasSpec Pen分析之前、期间和之后从肺组织样品获得的光学图像。在所分析的区域处没有看到对组织的可观察的损伤,同时获得了丰富的质谱分析谱(图15)。注意到,MasSpec Pen的自动化和时间控制的操作步骤防止了组织损伤,因为组织仅暴露于小水滴,而非暴露于用于将液滴从储液器输送到质谱仪的真空。因此,这些结果提供了MasSpec Pen为从组织样品获得丰富分子信息的非破坏性方法的证据。

[0171] 实施例7-人组织中的癌症的分子诊断和统计学预测

[0172] 接下来评估使用MasSpec Pen从人组织样品获得的分子信息是否可诊断和预测疾病状态。总共253个人组织标本使用MasSpec Pen,包括95个肺样品(47个正常样品和48个癌症样品,包括17个腺癌、17个鳞状细胞癌和14个其他组织学亚型的癌症样品)、57个卵巢样品(29个正常和28个HGSC)、57个甲状腺样品(27个正常、11个滤泡性甲状腺腺瘤和18个乳头状甲状腺癌)和45个乳腺样品(29个正常和16个导管癌)(图11)。患者人口统计信息提供在

表6中。MasSpec Pen分析后,通过一系列光学图像标定并且记录所分析的区域。然后,将平行的样品片冷冻,在标定区域处进行切片,H&E染色并且通过组织病理学评估以得到诊断。仅使用具有主要细胞组成和明确诊断的样品来构建分子数据库。针对癌性样品获得的组织学验证的质谱呈现了使用环境电离MS技术鉴定为先前描述为潜在疾病标志物的若干种脂质和代谢物的分子种类。针对肺癌组织,观察到特征性分子标志物诸如鉴定为PI(36:1)的m/z 863.565、鉴定为PG(36:2)的m/z 773.542、鉴定为PG(34:1)的m/z 747.514,以及脂肪酸诸如鉴定为FA(18:1)的m/z 281.249(图15和表4)。针对正常肺,观察到鉴定为PI(38:4)的m/z 885.550和鉴定为PE(36:1)的m/z 744.552。针对乳腺癌组织所获得的质谱呈现出通过DESI-MSI(29,30)先前描述的诊断脂质标志物,包括鉴定为PI(38:4)的m/z 885.550、鉴定为PI(36:1)的m/z 863.565、鉴定为PG(36:2)的m/z 773.542,以及若干种FA,诸如鉴定为FA(20:4)的m/z 303.233和鉴定为FA(18:1)的m/z 281.249(表5)。对所分析的所有253个人组织样品获得的数据进行的PCA示出了每个器官的癌症组织与正常组织之间的分离(图11)。

[0173] 为了评估MasSpec Pen分子签名是否可预测癌症组织和正常组织,应用Lasso方法来建立使用组织学验证的质谱数据库的分类模型。通过留一患者交叉验证方法评估模型的性能,并且通过对癌症的灵敏度和特异性以及准确度和AUC来测量(表22)。针对乳腺癌(n=45),实现了87.5%灵敏度,100%特异性(AUC=1.0),95.6%总体准确度,与使用DESI-MSI(98.2%准确度,n=126)(Guenther等人,Cancer Research,75,2015))、智能手术刀(iKnife)(95.5%准确度,n=10)(Balog等人,Science Translational Medicine,5,2013)和脂质和蛋白质的MALDI成像(94.1%准确度,n=68)(31)报告的结果相当。针对HGSC(n=57),实现了100%灵敏度、89.7%特异性和94.7%准确度(AUC=0.98),这也与DESI-MSI获得的分类结果类似(97.1%准确度,n=31)(Sans等人,Cancer Research,2017)。针对肺癌(n=956),实现了98.097.9%灵敏度,95.7%特异性和96.89%准确度(AUC=0.97)。当基于肺癌组织学亚型进行预测时,鳞状细胞癌和腺癌的准确度分别达到93.8%和92.2%。所研究的甲状腺肿瘤样本包括良性滤泡性甲状腺腺瘤(FTA)和恶性乳头状甲状腺癌(PTC)样品。针对每种建立了分类器,针对FTA产生94.7%准确度,并且针对PTC产生97.8%准确度。总体而言,所研究的所有四种类型的癌症均实现了96.4%灵敏度,96.2%特异性和96.3%准确度。这些结果证明,通过MasSpec Pen从人组织样品获得的分子信息可高度预测癌症。此外,结果表明,建立在使用MasSpec Pen获取的分子数据上的统计分类器为稳健的,并且可用于快速临床诊断组织样品的自动化方法。

[0174] 表22:使用MasSpec Pen获得的样品和结果的描述。示出了使用留一法交叉验证方法获得的病理学诊断、患者样品数量和Lasso预测灵敏度、特异性、准确度和曲线下面积。

器官	病理评估			患者 数量	Lasso 预测			
	诊断	组织学 类型			灵敏度	特异性	准确度	AUC
[0175]	乳腺	正常		29				
		癌症	导管癌	16	87.5%	100.0%	95.6%	1.00
	肺 ^a	正常		47	98.0%	95.7%	96.9%	0.97
		癌症	腺癌	17	88.2%	93.6%	92.2%	0.98
			鳞状细胞	17	88.2%	95.7%	93.8%	0.93
			其他	14	-	-	-	-
[0176]	卵巢	正常		29				
		癌症	高级浆液性	28	100.0%	89.7%	94.7%	0.98
	甲状腺 ^b	正常		27	-	-	-	-
[0177]	甲状腺	肿瘤	乳头状癌	18	94.4%	100.0%	97.8%	0.99
			滤泡性腺瘤	11	90.9%	96.3%	94.7%	0.93

[0176] ^a针对正常与所有癌组织(第一行),接着是正常与肺腺癌(中间行) 和正常与鳞状细胞癌(最后一行),示出肺癌的Lasso预测结果。

[0177] ^b针对正常与恶性乳头状癌以及正常与良性滤泡性腺瘤,示出甲状腺癌的Lasso预测结果。

[0178] 实施例8-组织学差异和癌症边缘组织区域的样品内分析

[0179] 在单个人组织样品中评估MasSpec Pen鉴定组织学上不同区域的能力,所述单个人组织样品包含与正常卵巢基质组织相邻的HGSC 区域。使用具有1.5mm直径的MasSpec Pen分析组织样品中的五个连续点,如图14A中示出的光学图像中所标定的。将包括通过MasSpec Pen分析的区域的样品的组织切片进行H&E染色并且通过组织病理学评估。点1和2由专家病理学家诊断为正常基质,而区域 4和5被诊断为HGSC。点3位于癌症与正常基质组织区域之间的边缘,呈现大约50%的肿瘤组织和大约50%的正常基质组织。图14B 示出了针对点1、3和5所获得的质谱。针对点5,HGSC所获得的光谱,呈现了在离体分析的HGSC组织中检测到的特征性脂质标志物,以建立我们的统计分类器(表3)。针对诊断为正常卵巢基质组织的点1 所获得的质谱,呈现出较不丰富的分子离子,如针对离体分析的基质组织所观察到的那样。点3呈现出特征在于较低总丰度的HGSC的分子谱,这由于所分析区域内存在的正常基质组织的贡献而引起。然后通过我们的卵巢癌分子分类器作为独立的验证集来评估5个点所获得的质谱。值得注意的是,这种分类正确地将点1和2预测为正常,并且将点3、4和5预测为癌症(图14C)。针对具有组织学上不同的区域的不同组织样品获得了类似的结果(图19)。这些结果表明,通过 MasSpec Pen获得的分子信息可以用于检测具有正常细胞和癌细胞的混合组成的边缘区域中的癌症。

[0180] 实施例9-手术期间人乳腺癌的鼠模型的体内分析

[0181] MasSpec Pen设计有生物相容材料,以确保与体内分子诊断工具一样的完全相容性。使用人乳腺癌的鼠模型测试MasSpec Pen的体内组织分析。将BT474 HER2+乳腺癌细胞皮下植入无胸腺裸鼠($n=3$)。肿瘤在4周的时间内生长至平均 250mm^3 。所有手术和MasSpec Pen 分析程序均在麻醉下进行。使用手术刀片打开肿瘤周围的皮瓣,然后锐利地从肿瘤表面切下皮瓣。然后使用MasSpec Pen按照先前描述的相同自动化实验步骤分析所暴露的肿瘤。图16A示出了在开始手术之前、分析之前(并且手术除去皮肤之后)、MasSpec Pen分析期间和分析之后麻醉下的动物的光学图像。针对所研究的每只动物分析若干个组织区域,包括肿瘤顶部的多个位置、部分肿瘤切除后的肿瘤核心、以及相邻的正常软结缔组织。针对肿瘤区域所获得的质谱呈现出在人乳腺组织中观察到的许多分子种类,其中具有与针对相邻的正常软结缔组织区域所获得的明显不同的分析谱(图16B)。使用光学显微镜法,由于MasSpec Pen分析,未检测到对所分析的组织区域的可观察到的宏观或微观损伤,如通过H&E染色的组织切片获得的光学图像所证明(图20)。此外,由于手术期间的MasSpec Pen分析,未观察到对动物健康的明显影响。在体内分析后,还离体分析了新切除的肿瘤样本,产生与在体内分析中观察到的那些具有共同脂质种类的质谱,尽管在相对丰度上有变化,这可能是由于相同组织区域的再分析过程而引起的(图21)。这些结果表明MasSpec Pen适用于体内分子评估和癌症诊断。

[0182] 实施例10-材料和方法

[0183] 研究设计:本研究的目的是评估一种新的基于质谱法的探针在人组织样品中非破坏性地分析和诊断癌症的潜力。在本研究中,研究了从282名患者获得的人组织样品(包括正常和癌症的乳腺、肺、甲状腺和卵巢组织)的分子谱。所有患者样品均根据批准的机构审查委员会(IRB)协议,从联合人类组织样本库网络(CTHN)、Asterand Biosciences(Detroit, MI)、MD Anderson组织库和贝勒医学院组织库获得。将组织样品中使用MasSpec Pen获得的质谱归一化,扣除背景并且使用统计技术分析以建立分类模型。专家,职业资格认证的病理学家(J.L.、W.Y和N.C)评估了从所分析的组织样品获得的H&E染色的组织切片。病理学家对关于通过质谱法分析进行获取的任何信息视而不见。如果病理学家确定样品在细胞组成上具有显著的异质性,则样品被排除在统计分析之外,所述样品包括28个样品。体内动物模型实验在批准的机构动物护理和使用委员会(IACUC)方案下进行。

[0184] MasSpec Pen的设计和工程化改造:3D打印机(型号uPrint SE plus)用于打印关键部件--PDMS(道康宁, Midland, MI, USA)探针尖端。通过从阴模浇铸弹性体然后将模具溶解掉来制造笔尖。使用SolidWorks计算机辅助设计(CAD)软件设计阴模,然后使用ABS塑料(Stratasys, Eden Prairie, MN, USA)和可溶性载体材料用3D打印机建模熔融沉积。然后使用载体清洁装置(SCA-1200HT, SCA)和溶剂(EcoWorks)在70°C下洗涤部件以除去载体材料,持续24小时或直到载体材料完全溶解。针对浇铸,分别以10:1的重量比制备PDMS弹性体基料和固化剂(Sylgard 184,道康宁)的混合物。将混合物倾倒到3-D打印模具中,在烘箱(10GCE-LT, Quincy Lab)中在74°C下固化1小时,然后置于具有丙酮的密闭容器中(Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)以溶解。最后的洗涤步骤使尖端在丙酮中超声处理以除去任何剩余的ABS。将PTFE管道(内径1/32英寸,外径1/16英寸,Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA)直接插入探针尖端以用于实验。

[0185] 数据获取:所有实验均在Q Exactive复合四极杆-轨道阱质谱仪 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) 上进行。全扫描在m/z 120-1800的范围内进行, 使用分辨能力140,000, 毛细管温度350°C和S-透镜 RF水平100。野生型小鼠脑购自Bioreclamation IVT (Westbury, NY)。获得总共282个人组织样本(包括乳腺、甲状腺、卵巢和肺), 并且将其冷冻且储存在-80°C冰箱中直到分析, 此时它们在室温下解冻。将组织置于表面中并且使用描述的实验步骤通过MasSpec Pen进行分析。在实验之后, 所分析的组织区域被注释、冷冻并且使用CryoStar™ NX50低温恒温器制备16μm组织切片。获得组织片的不同区域处的另外组织切片以用于MS分析。将组织切片保持冷冻直到分析, 当它们处于室温下时, 通过MasSpec Pen分析。然后对组织切片进行H&E 染色并且通过组织病理学评估。病理学诊断用作我们分子数据库的参考。

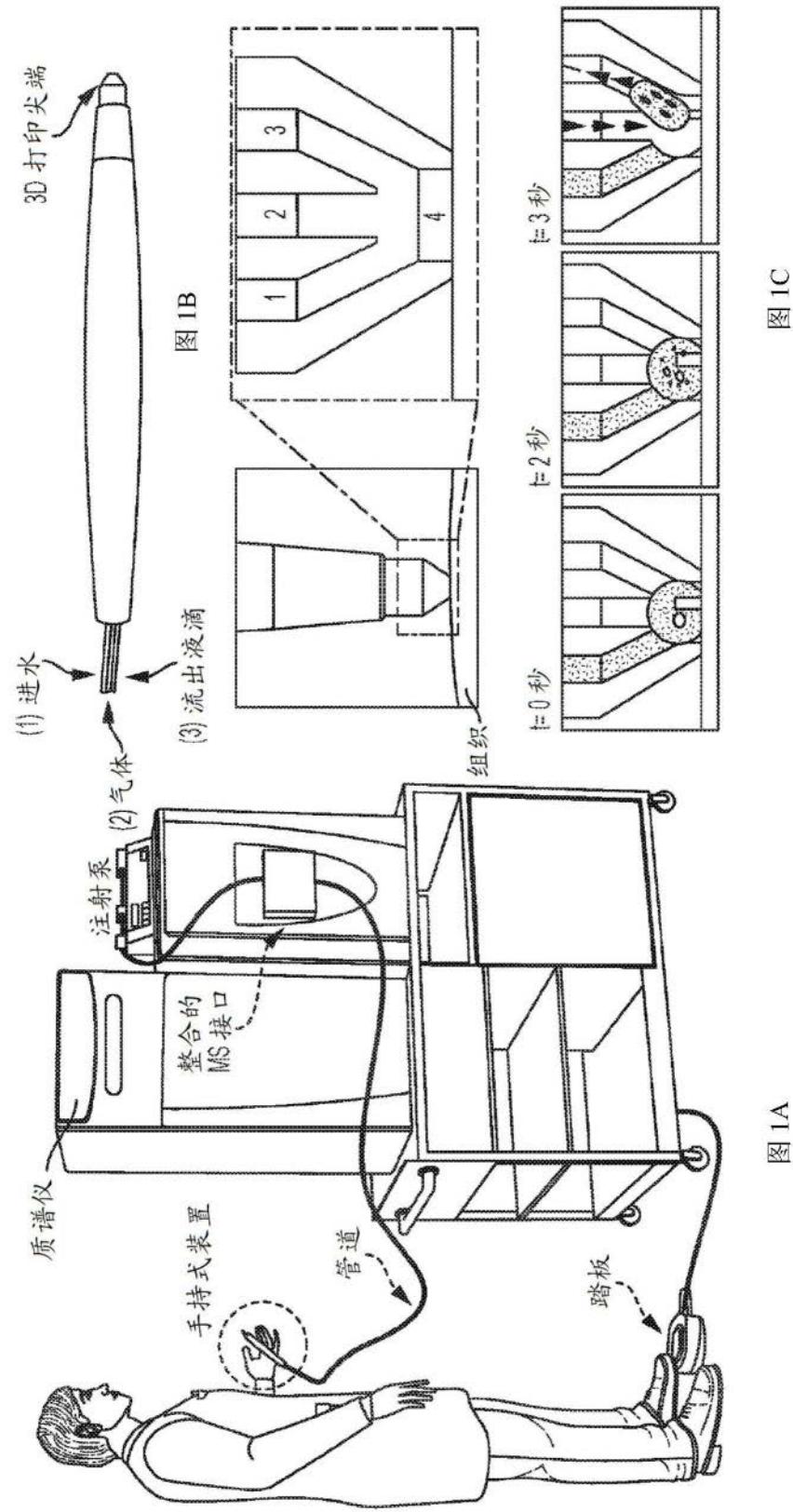
[0186] 体内实验: 使用鼠动物模型在肿瘤手术切除期间进行体内实验, 同时小鼠处于麻醉状态(2% 异氟烷, 98% O₂) 下。BT474 HER2+细胞在补充有10% FBS、1% L-谷氨酰胺和1% 胰岛素的改良的最小必需培养基 (IMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) 中、在5% O₂和37°C下生长至80%-90% 融汇。通过血细胞计数器和台盼蓝染料排除计数细胞。无胸腺雌性裸鼠 (N=3) 在颈背皮下植入0.72mg、60天释放的17β-雌二醇球丸 (Innovative Research of America, Sarasota, FL)。大约24小时后, 将具有20% 生长因子减少的基质胶的无血清IMEM 培养基中的 BT474乳腺癌细胞(10⁷) 皮下注射到小鼠的右侧(总注射量为100μL)。每周监测肿瘤的生长直到它们的直径达到0.7-1.0cm(平均250mm³)。在那个时间点, 进行所有手术程序, 同时小鼠处于麻醉状态(2% 异氟烷, 98% O₂) 下。使用手术刀片打开皮瓣, 留下估计1-2cm 的在肿瘤周围的空间, 然后锐利地从肿瘤表面切下皮瓣。皮瓣被拍打以暴露肿瘤和相邻的正常组织, 使用MasSpec Pen在若干个区域中对其进行分析。然后使用解剖刀切除肿瘤片并且离体分析。由MasSpec pen分析的肿瘤组织区域被注释、快速冷冻、切片并且进行H&E染色以用于诊断。

[0187] 统计分析: 使用在每10秒MasSpec Pen分析期间获得的三个质谱的平均值来建立分子数据库。Xcalibur原始数据已转换为Microsoft Excel电子表格格式。通过将m/z值四舍五入到最接近的百分数, 将光谱的整个质量范围划分成二进制(bin)。首先根据总离子计数(TIC) 或m/z 885.55的绝对强度对所有质谱进行归一化, 以解释实验之间可能发生的信号强度的轻微波动。然后, 排除背景峰以及在所分析的至少10%的样品中未出现的峰以减少随机噪声。

[0188] 针对每个组织切片(乳腺或甲状腺), 使用网站内置功能将所分析的每个组织切片的四个代表性质谱导入metaboanalyst (代谢物数据分析软件) (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 以用于主成分分析(PCA)。通过网站为每种组织类型生成分数图和载荷图。针对每种软组织样品类型(乳腺、甲状腺、肺和卵巢), 将数据导入R编程语言。通过将预处理的数据集中到平均数零并且使用R中的prcomp函数计算主成分来进行PCA。使用针对R的rgl和pca3d包对前三个主成分进行可视化。针对组织分类, 使用CRAN R语言库中的glmnet包应用Lasso方法。使用Lasso生成的模型比其他正则化方法更容易解释, 因为它产生“稀疏”模型, 即仅涉及特征的子集的模型。每个统计信息特征的数学权重由Lasso计算, 其取决于质谱特征在表征某一类别(癌症与正常、或癌症亚型与正常)之间的重要性。使用留一法交叉验证方法进行分类, 以评价训练组内的预测准确度。通过灵敏度、特异性、准确

度和AUC 来测量训练的分类器的性能。

[0189] 根据本公开,无需过度实验即可得到和执行本文公开和要求保护的所有方法。虽然已根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员显而易见的是,可在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下对本文描述的方法和方法的步骤或方法的步骤顺序进行变化。更确切地说,显而易见的是,化学和生理学相关的某些试剂可以替代本文所述的试剂,同时将实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这样类似的替代和修改都被认为是在由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。



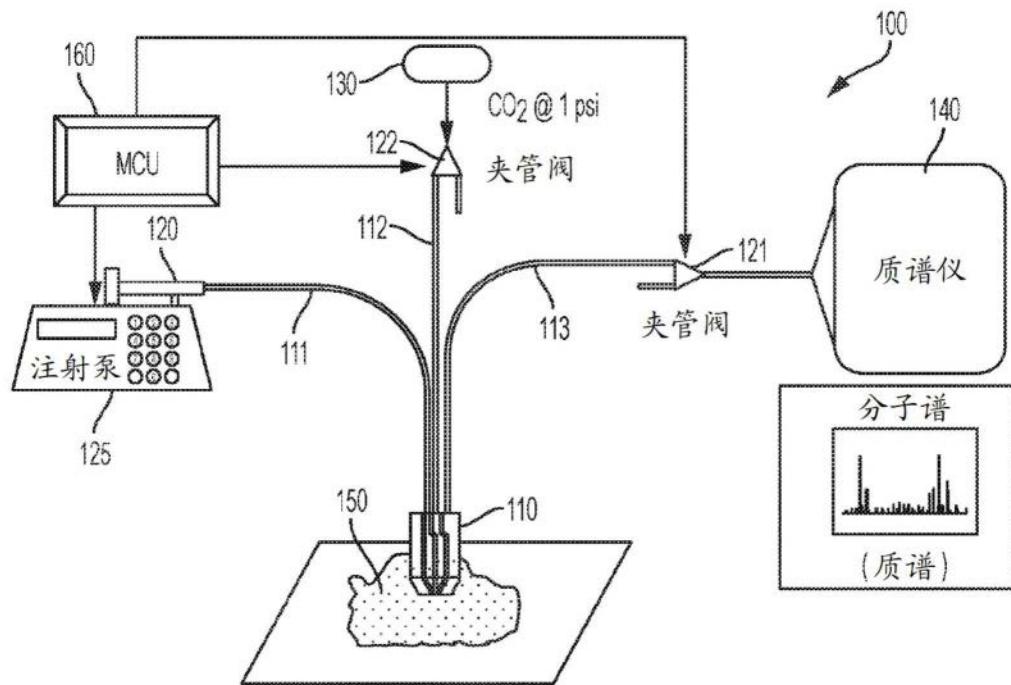


图1D

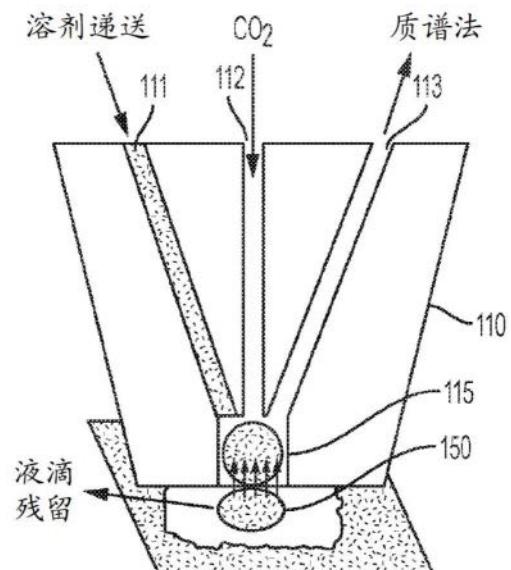


图1E

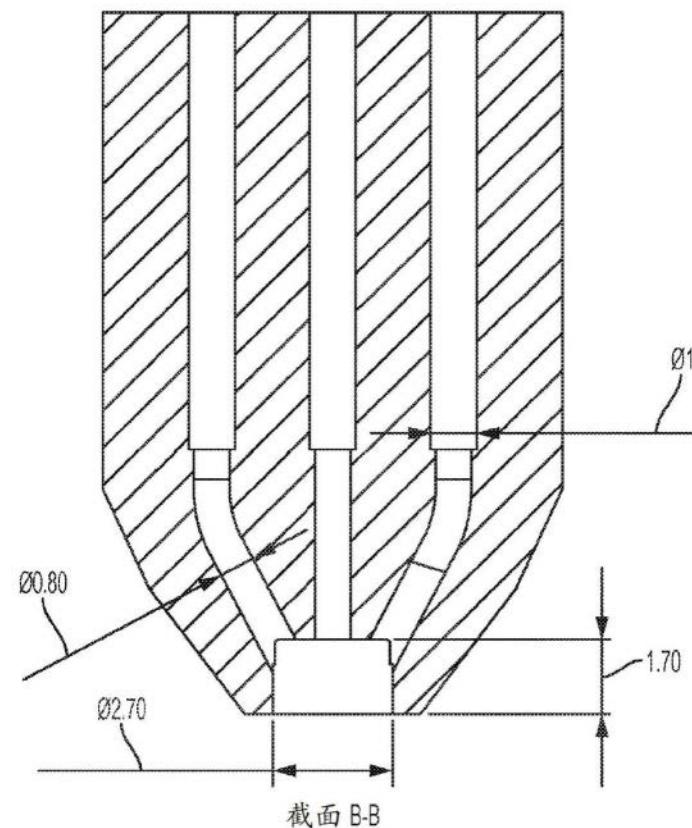


图1F

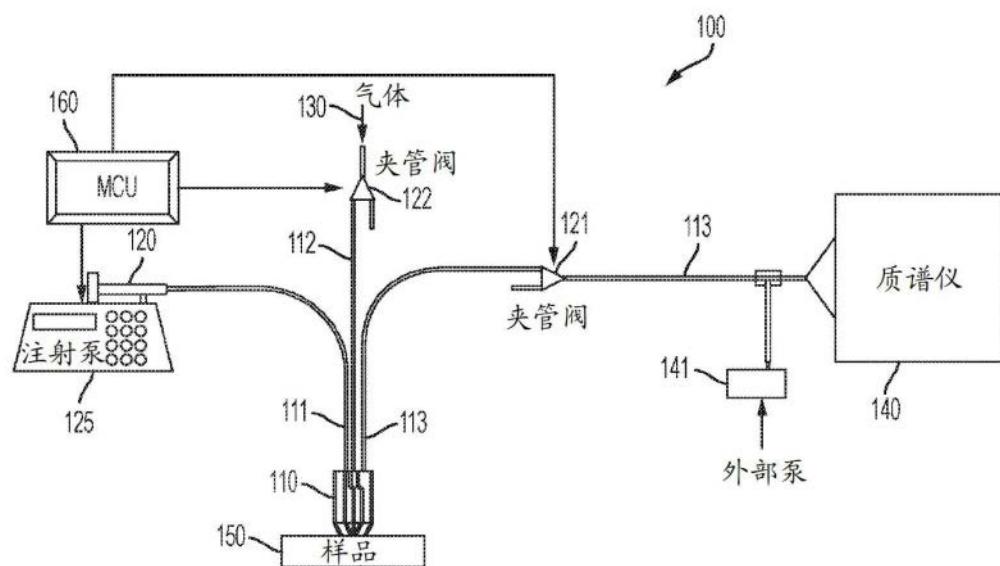


图1G

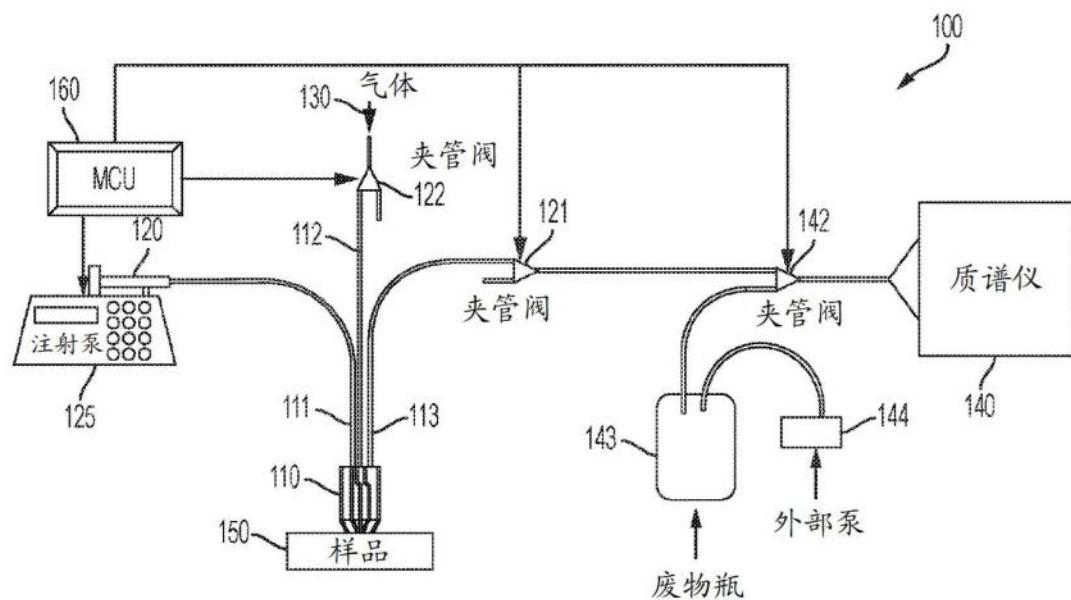


图1H

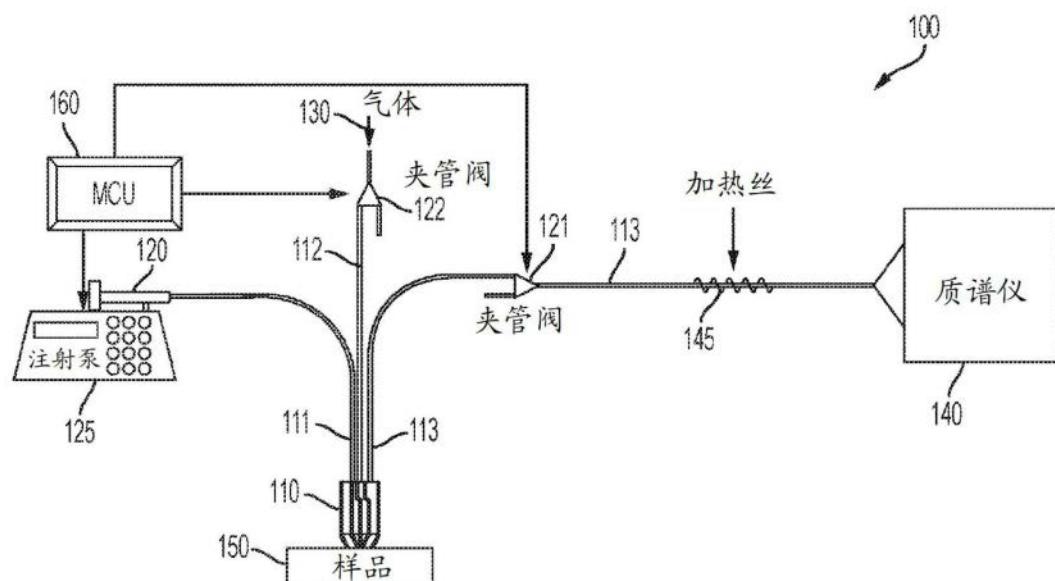


图1I

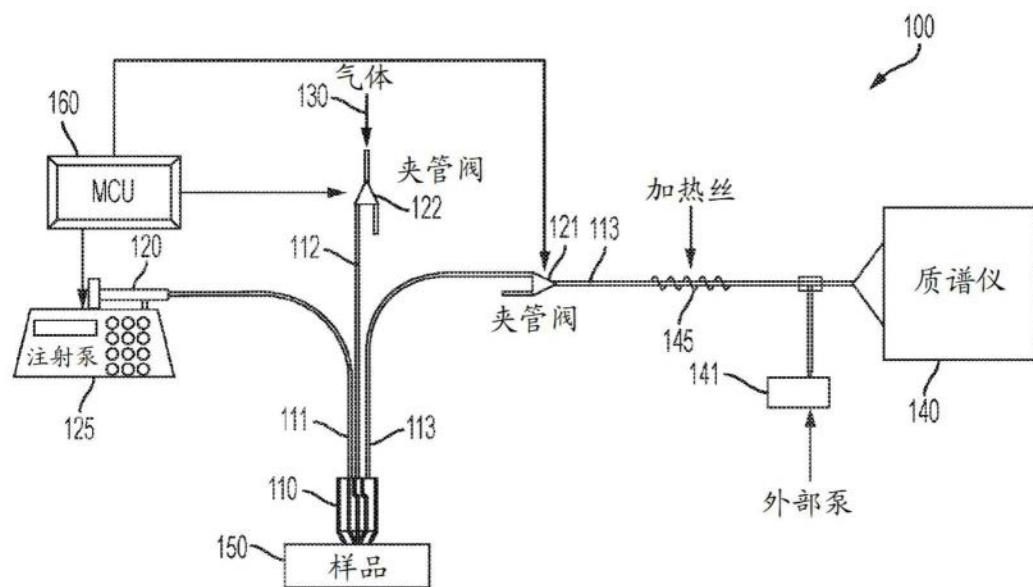


图1J

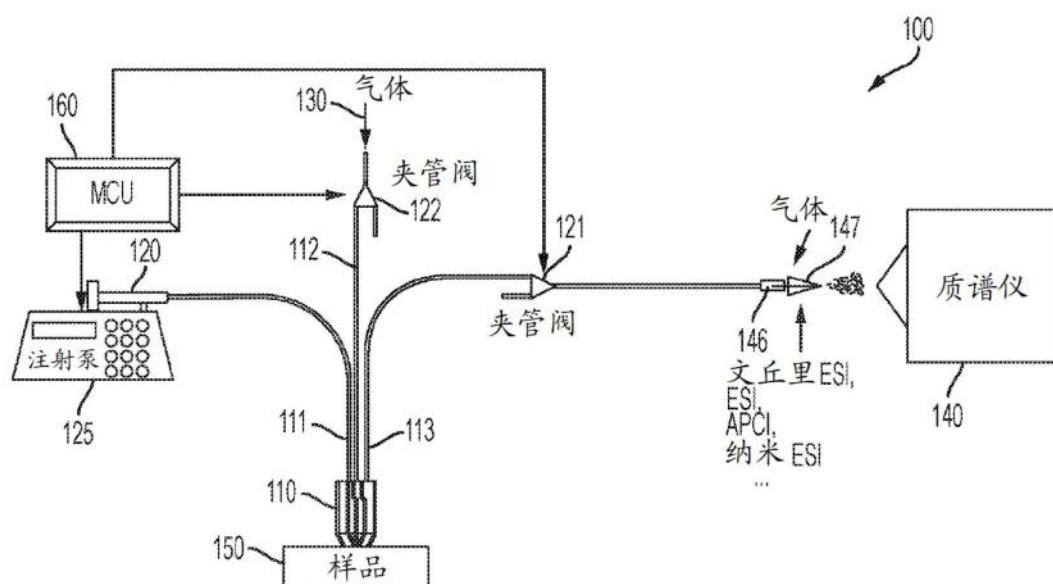


图1K

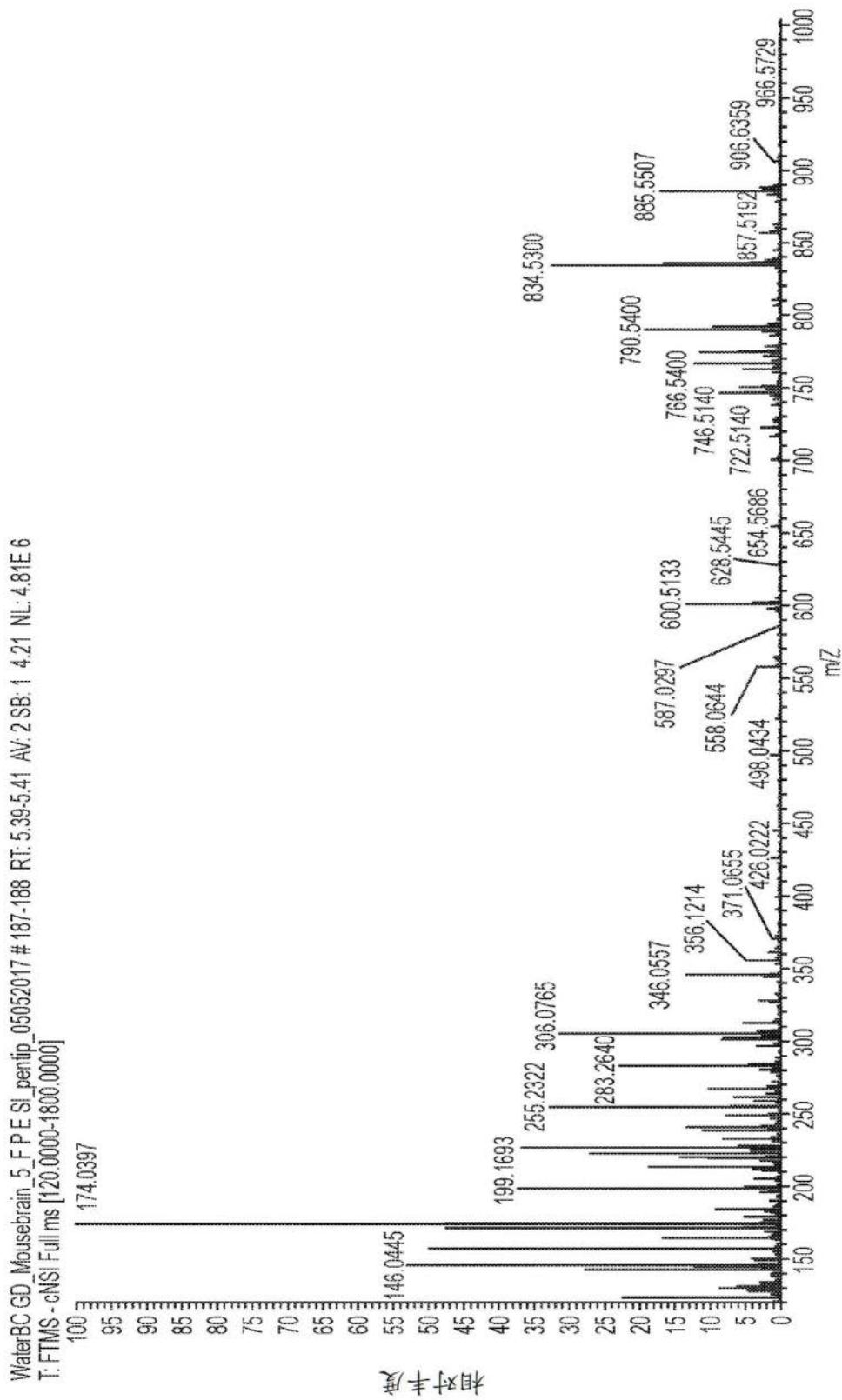


图1L 使用连接到文丘里ESI源的 MassSpec Pen 的来自小鼠脑组织切片的负离子模式质谱（与载玻片8相似的设计）

图1L

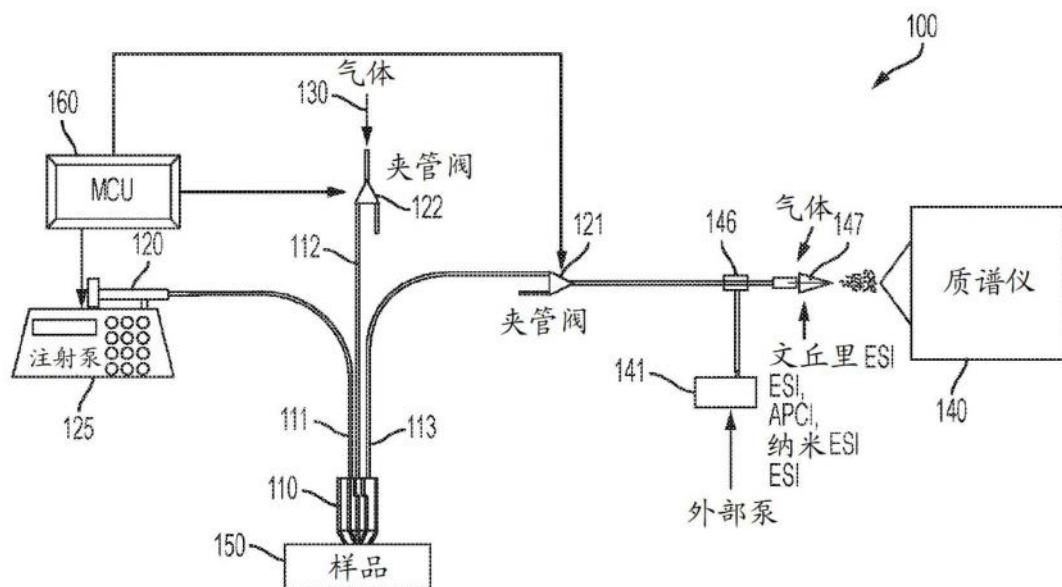


图1M

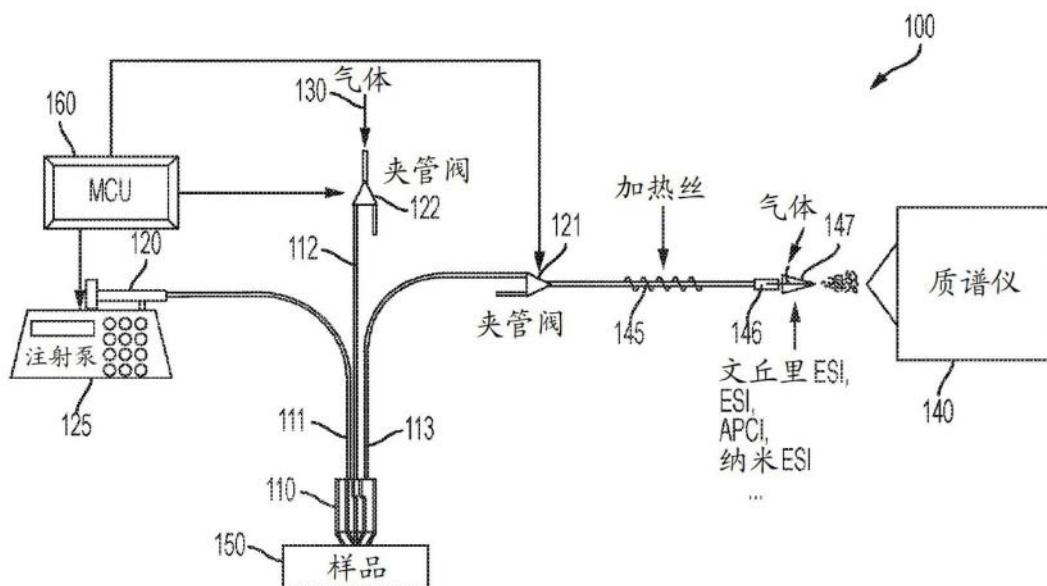


图1N

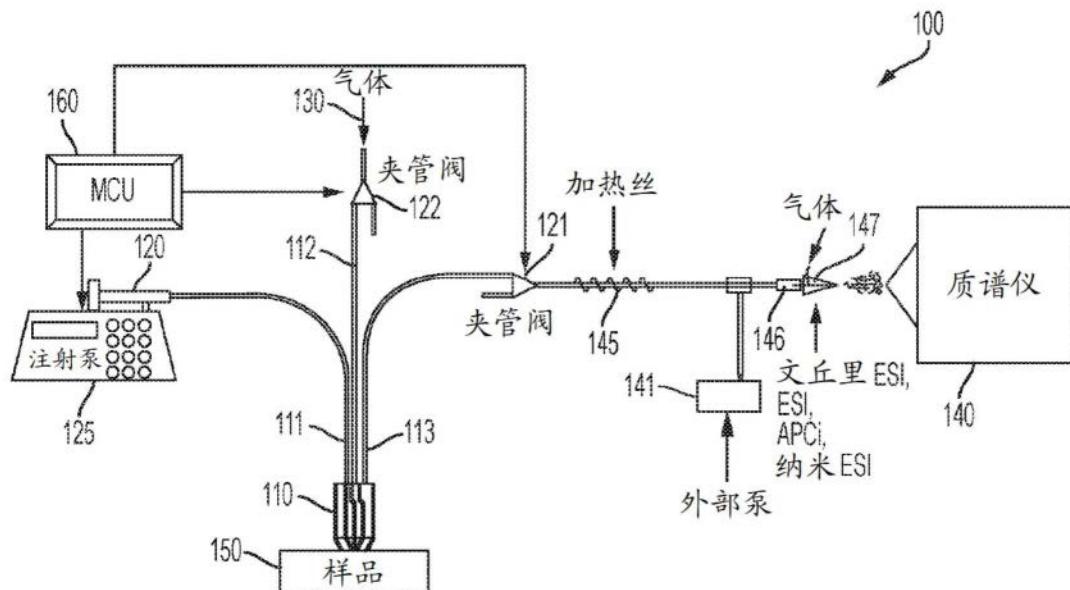


图10

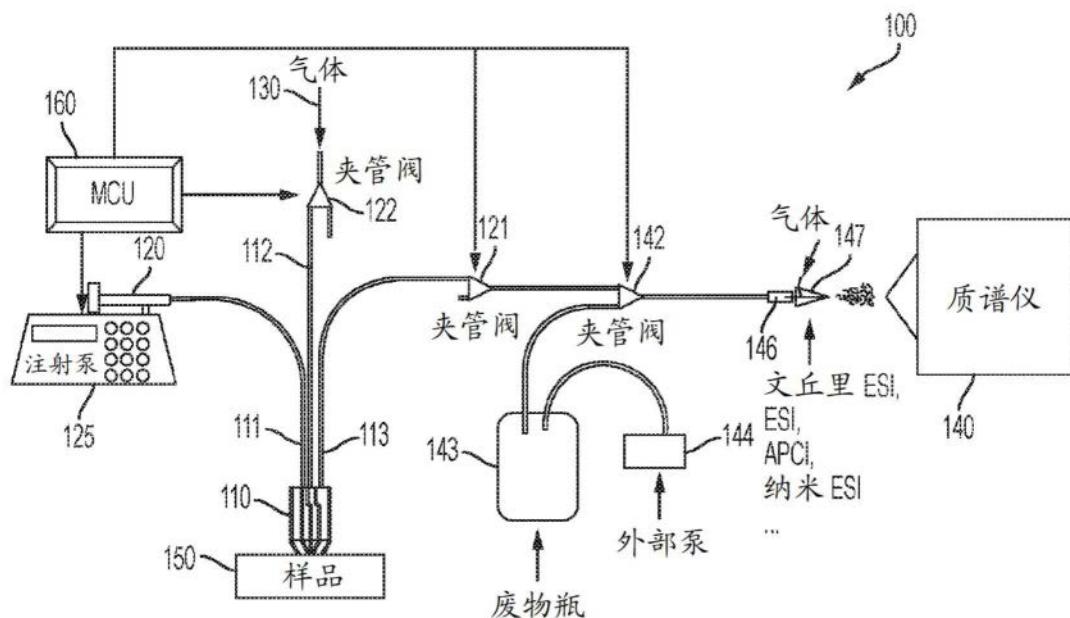


图1P

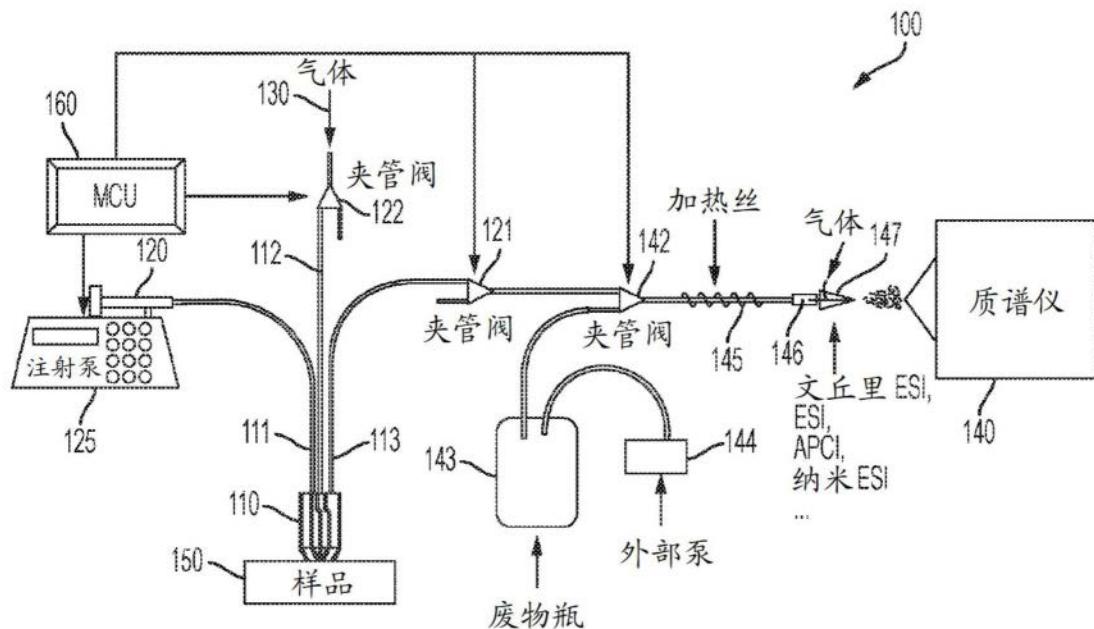


图1Q

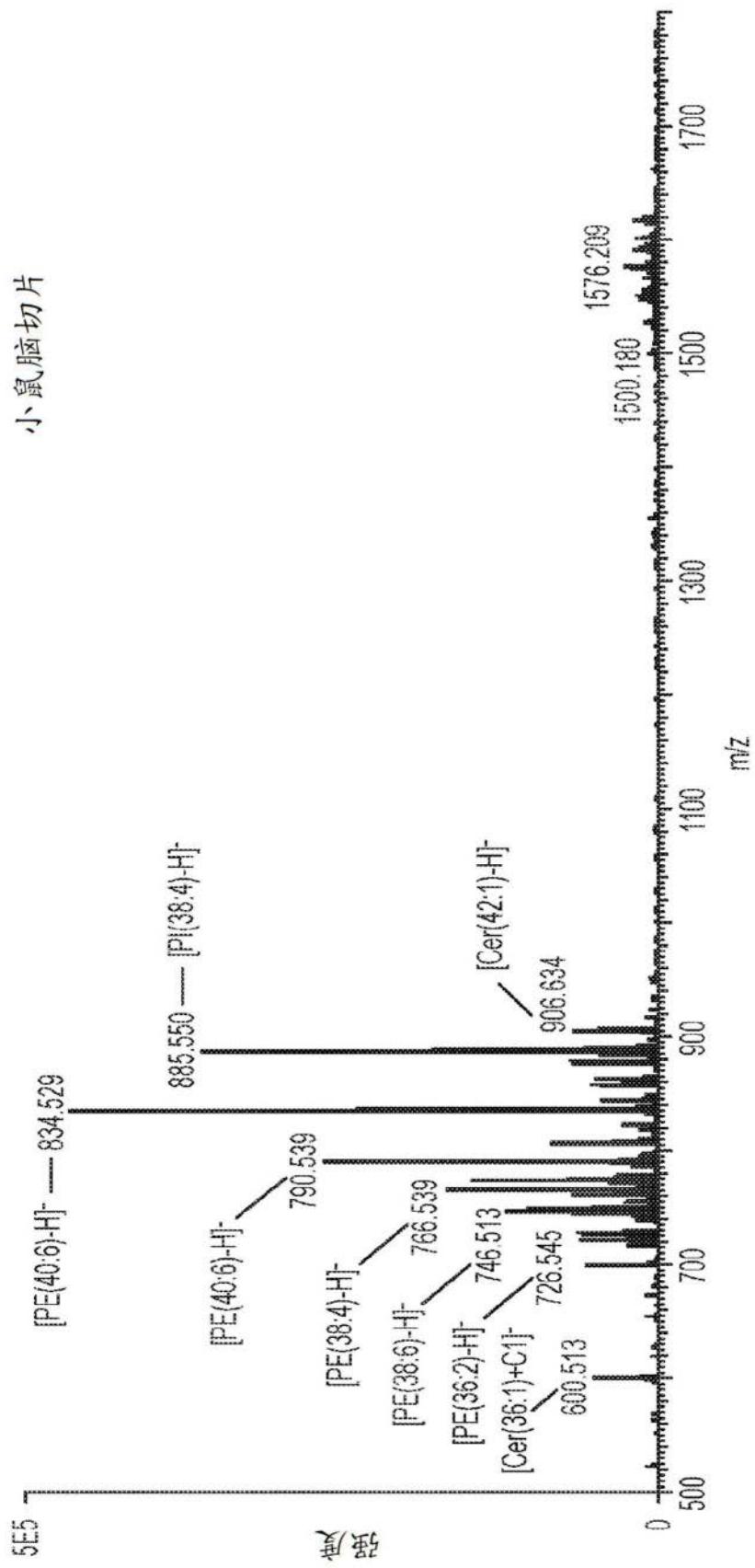


图2A

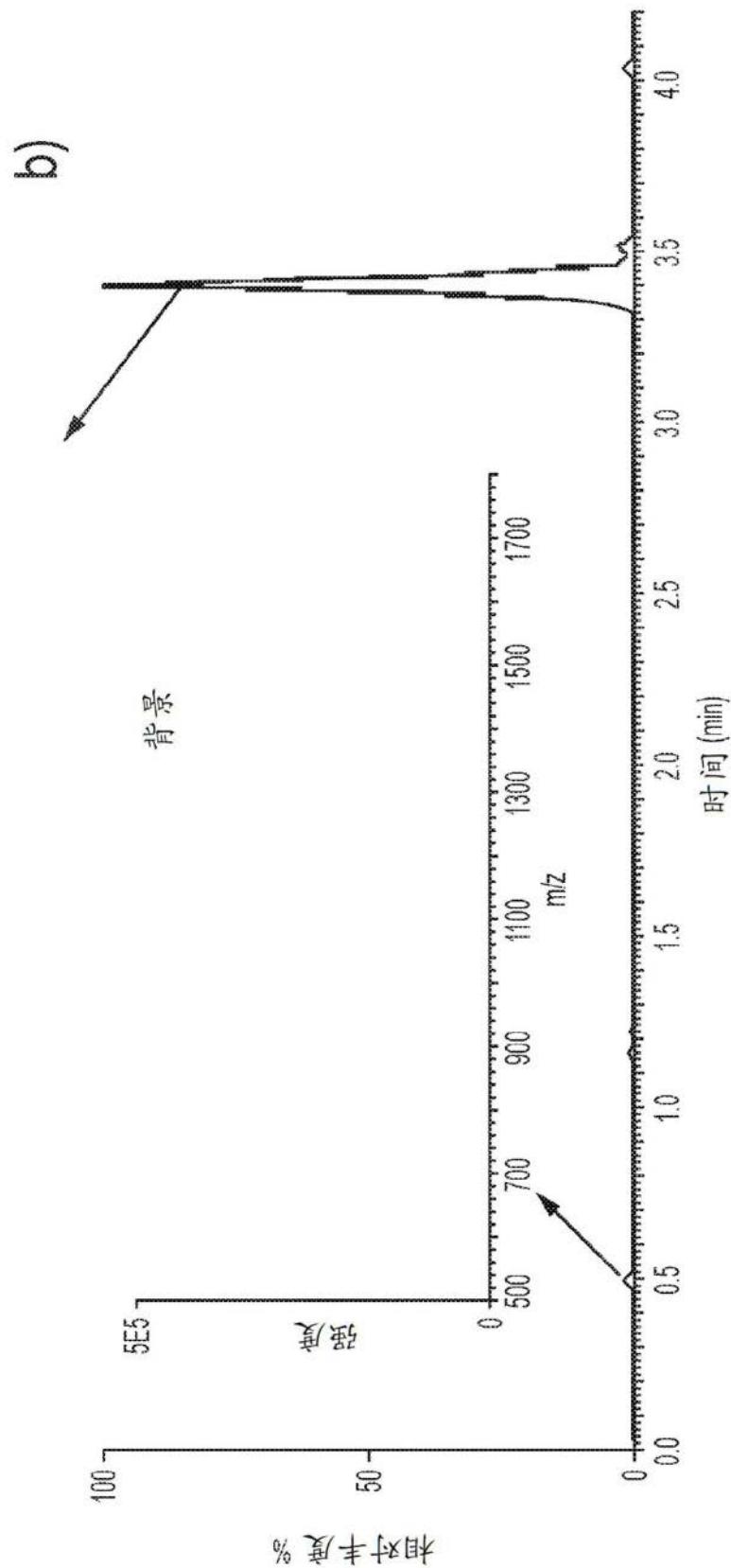


图2B

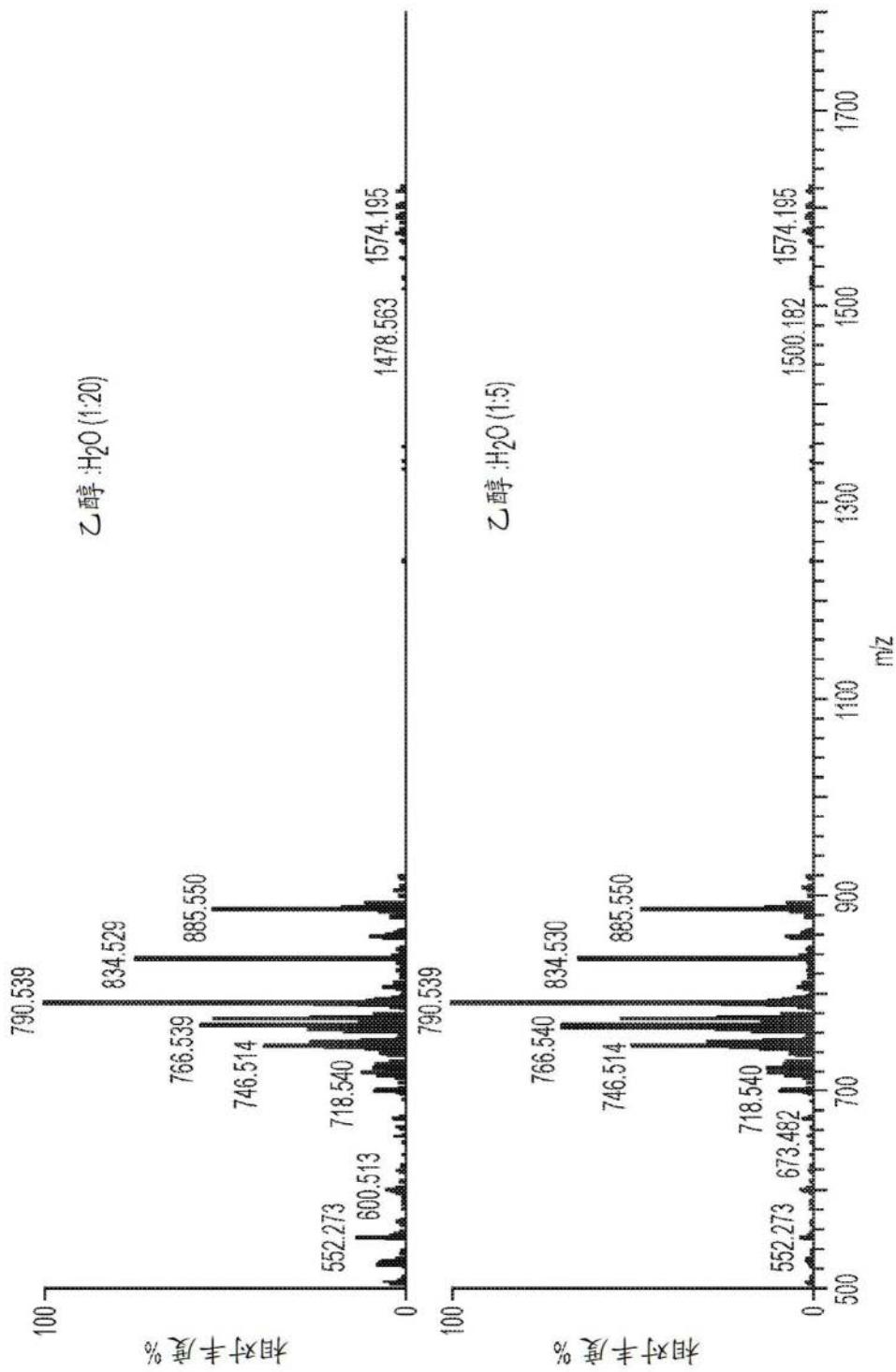


图3A

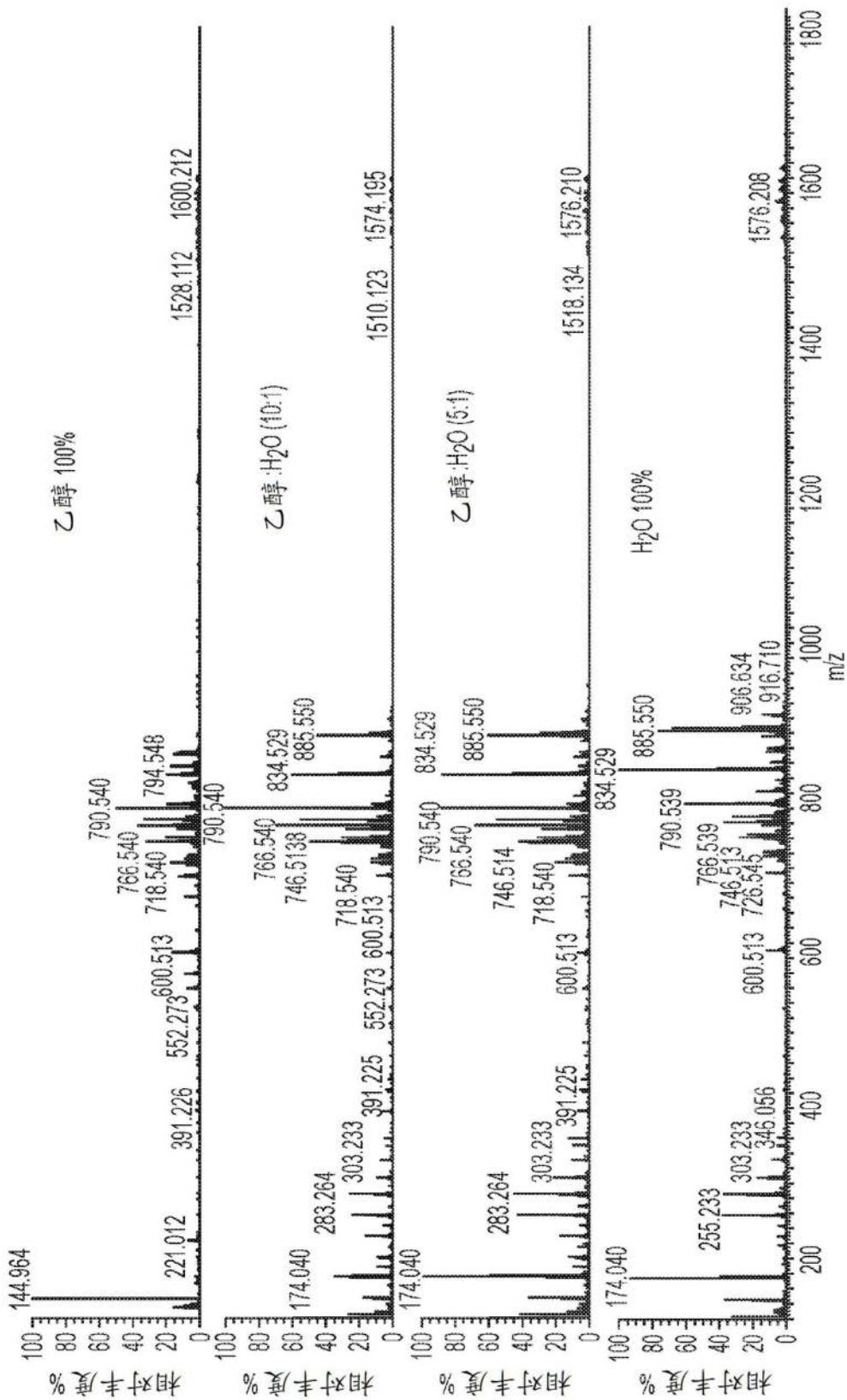


图3B

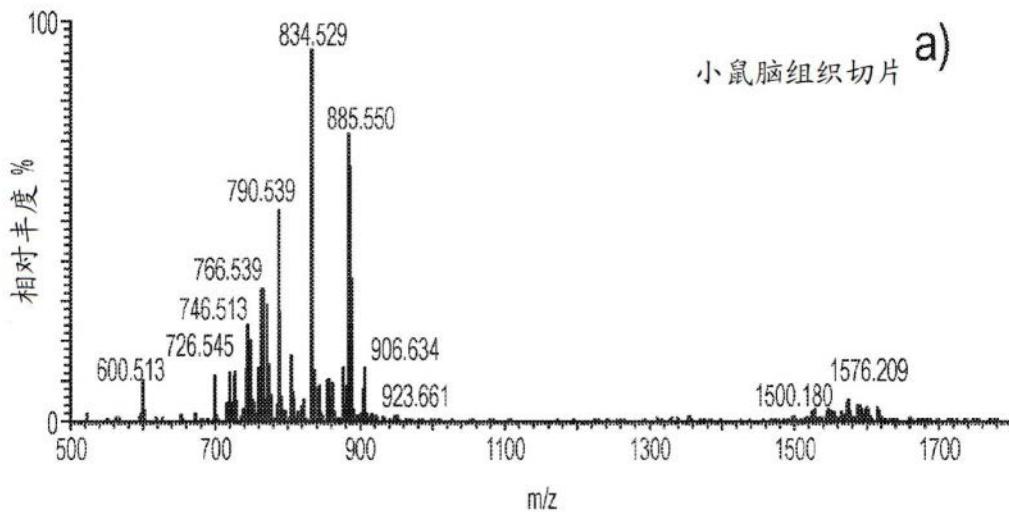


图4A

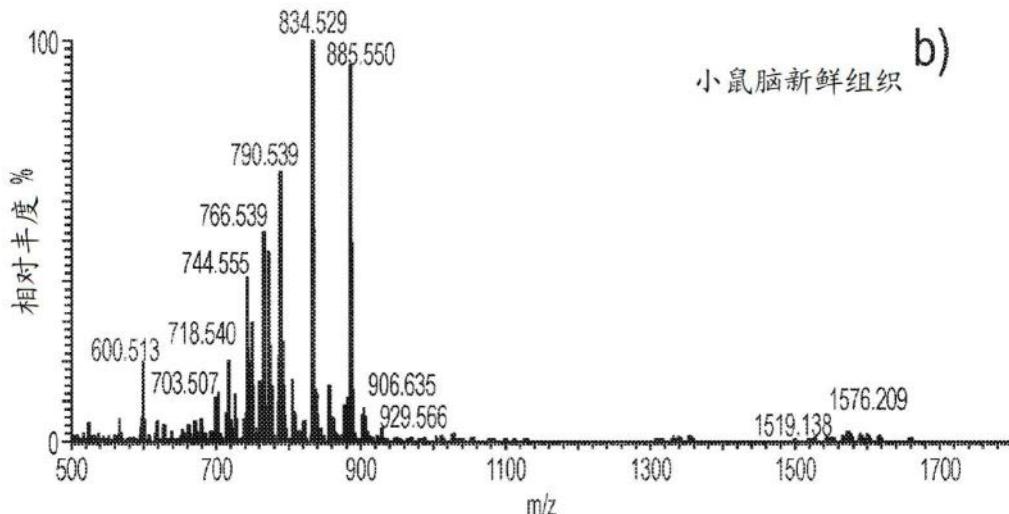


图4B

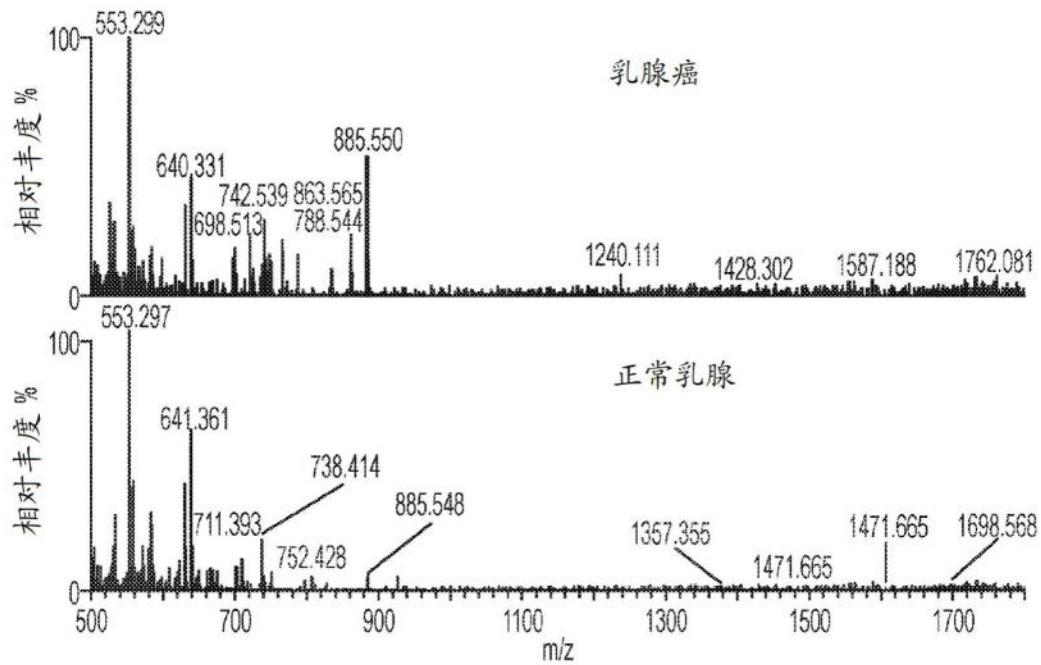


图5A

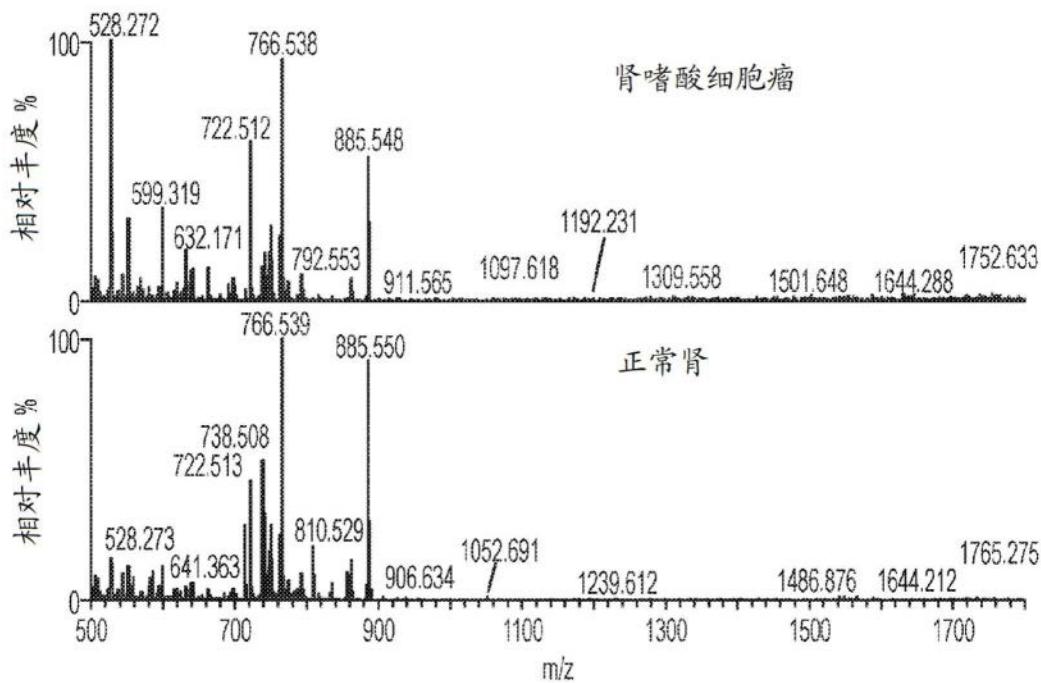


图5B

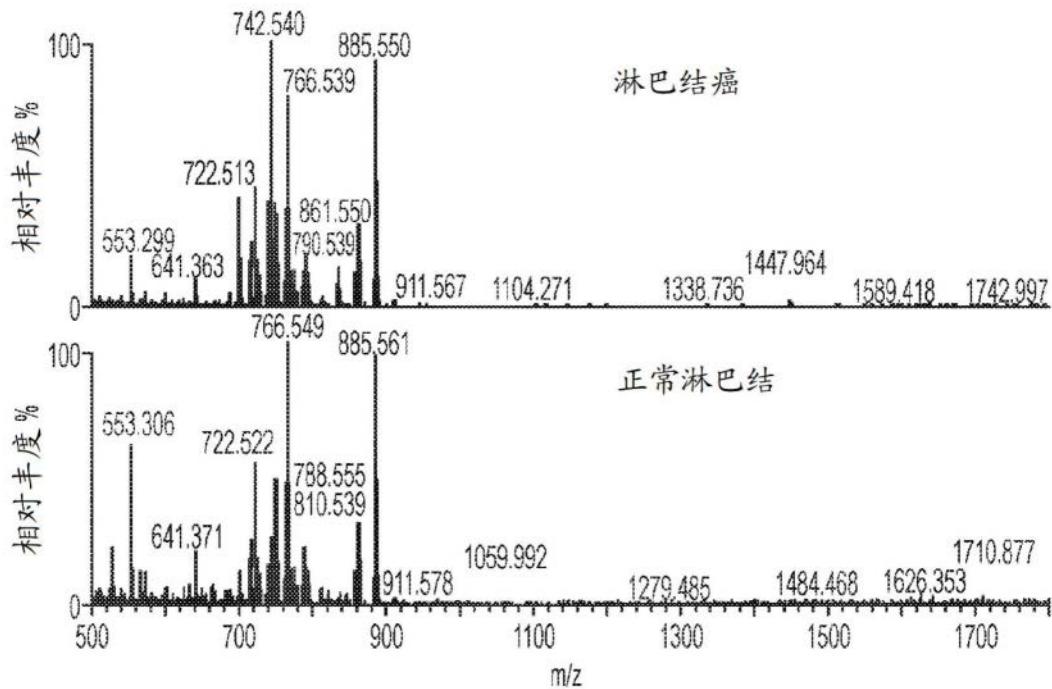


图5C

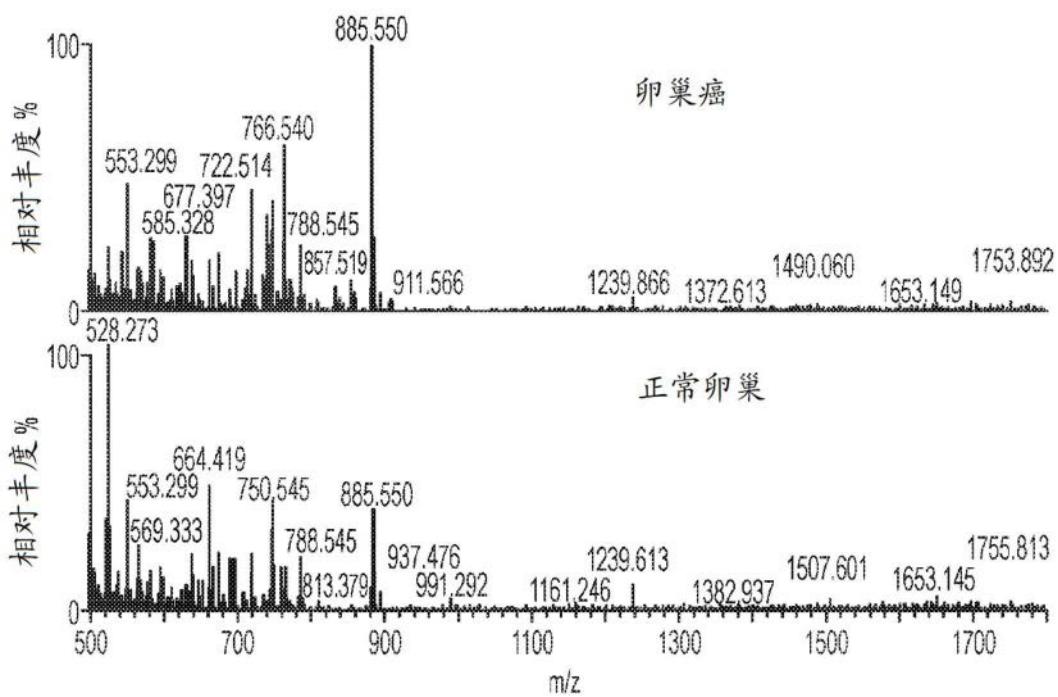


图5D

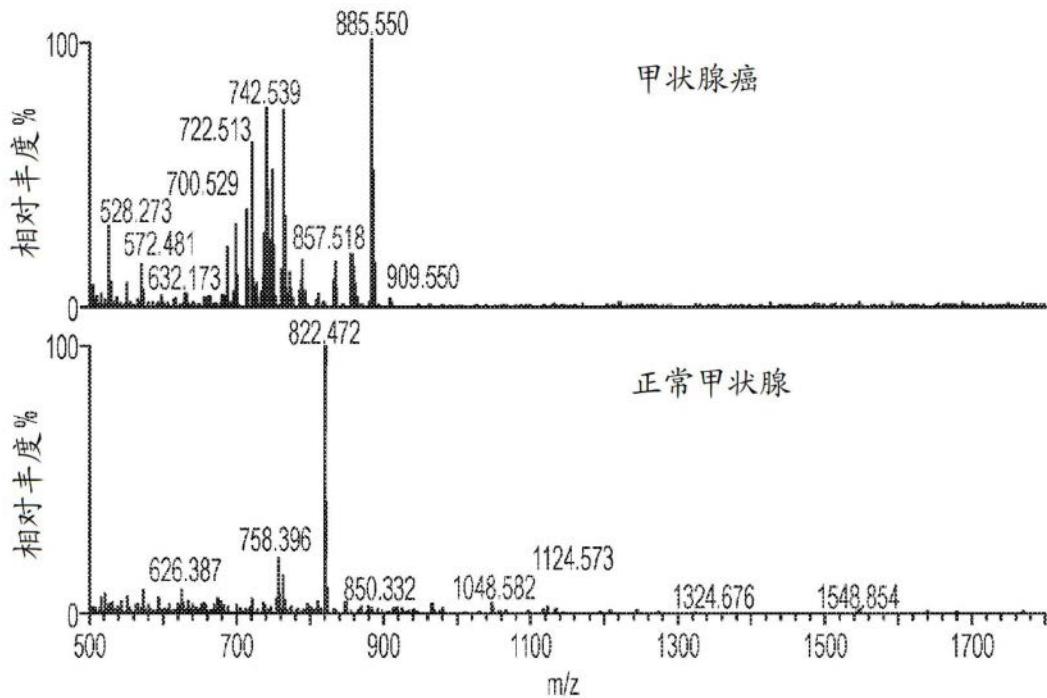


图 5E

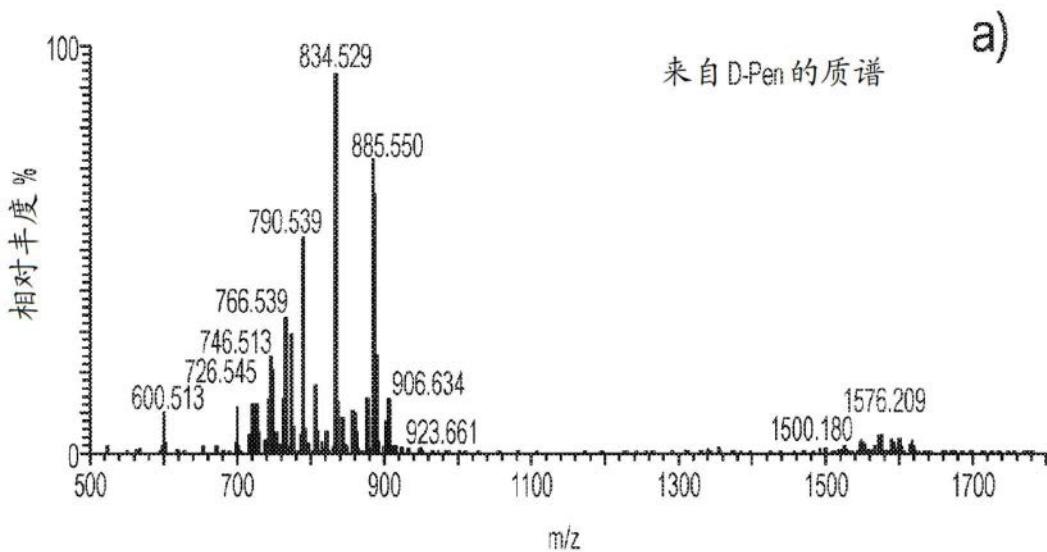


图 6A

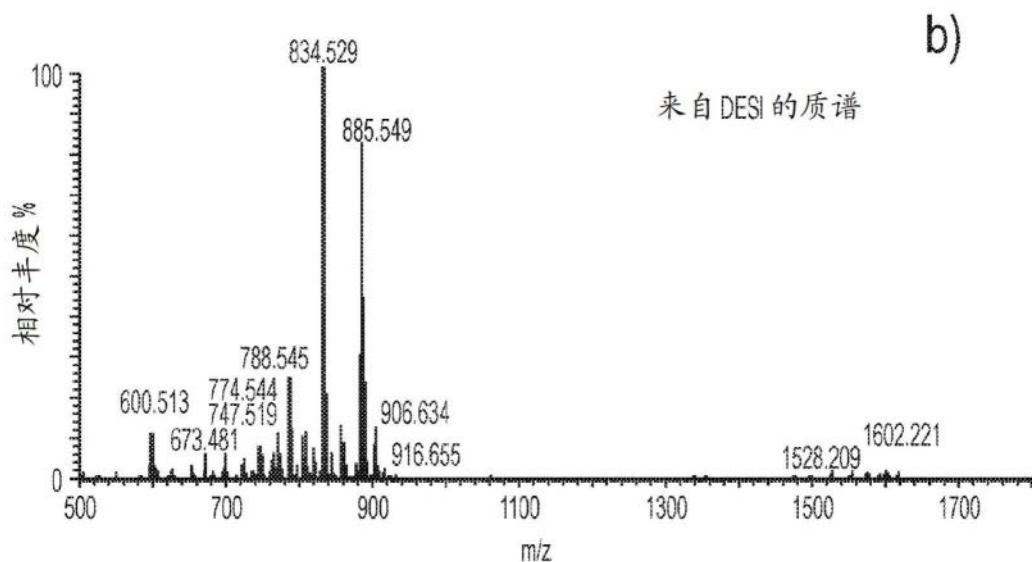


图6B

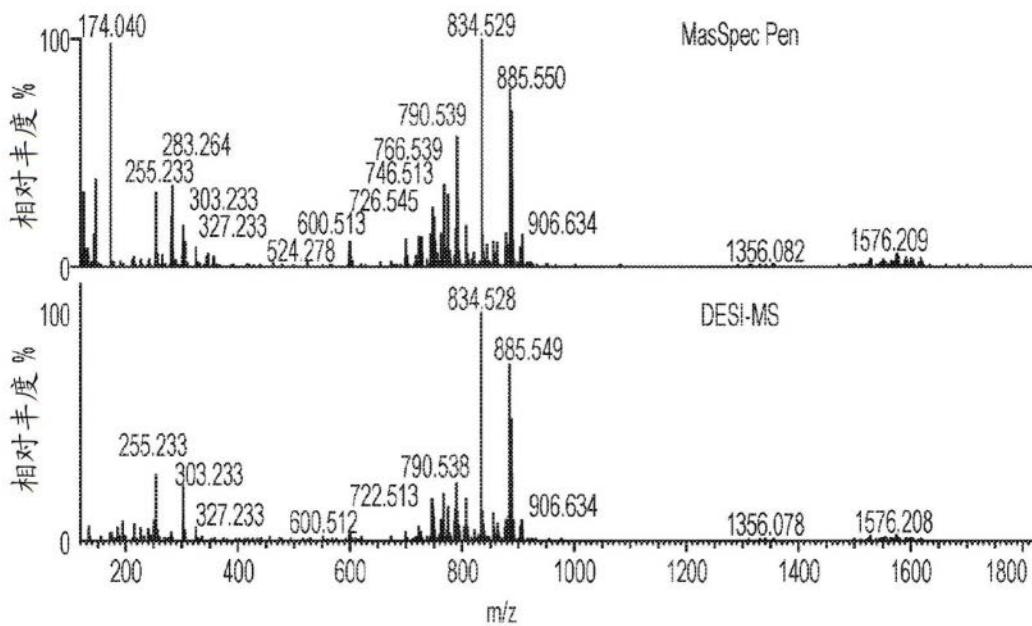


图6C

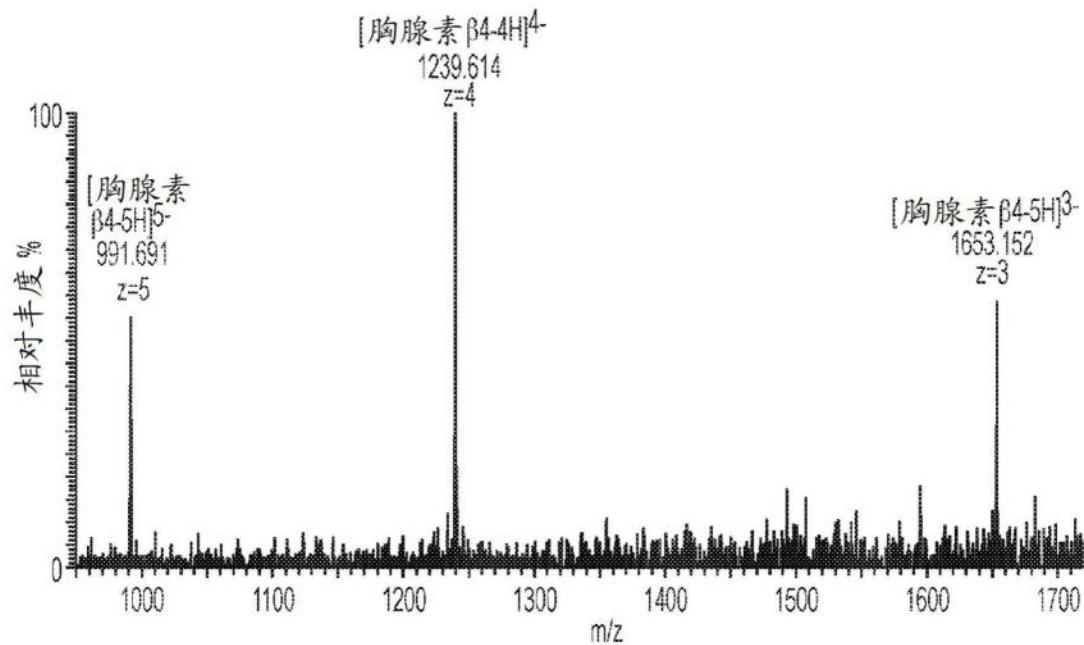


图7

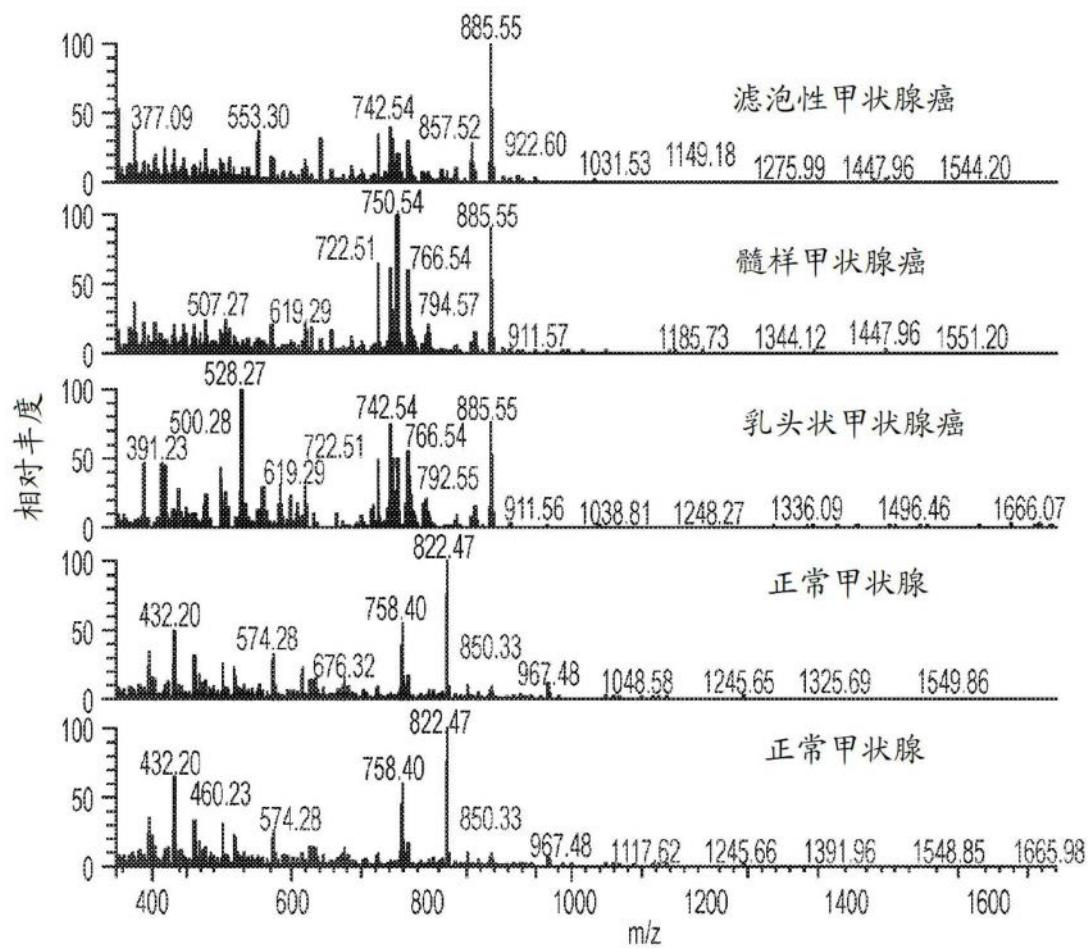


图8A

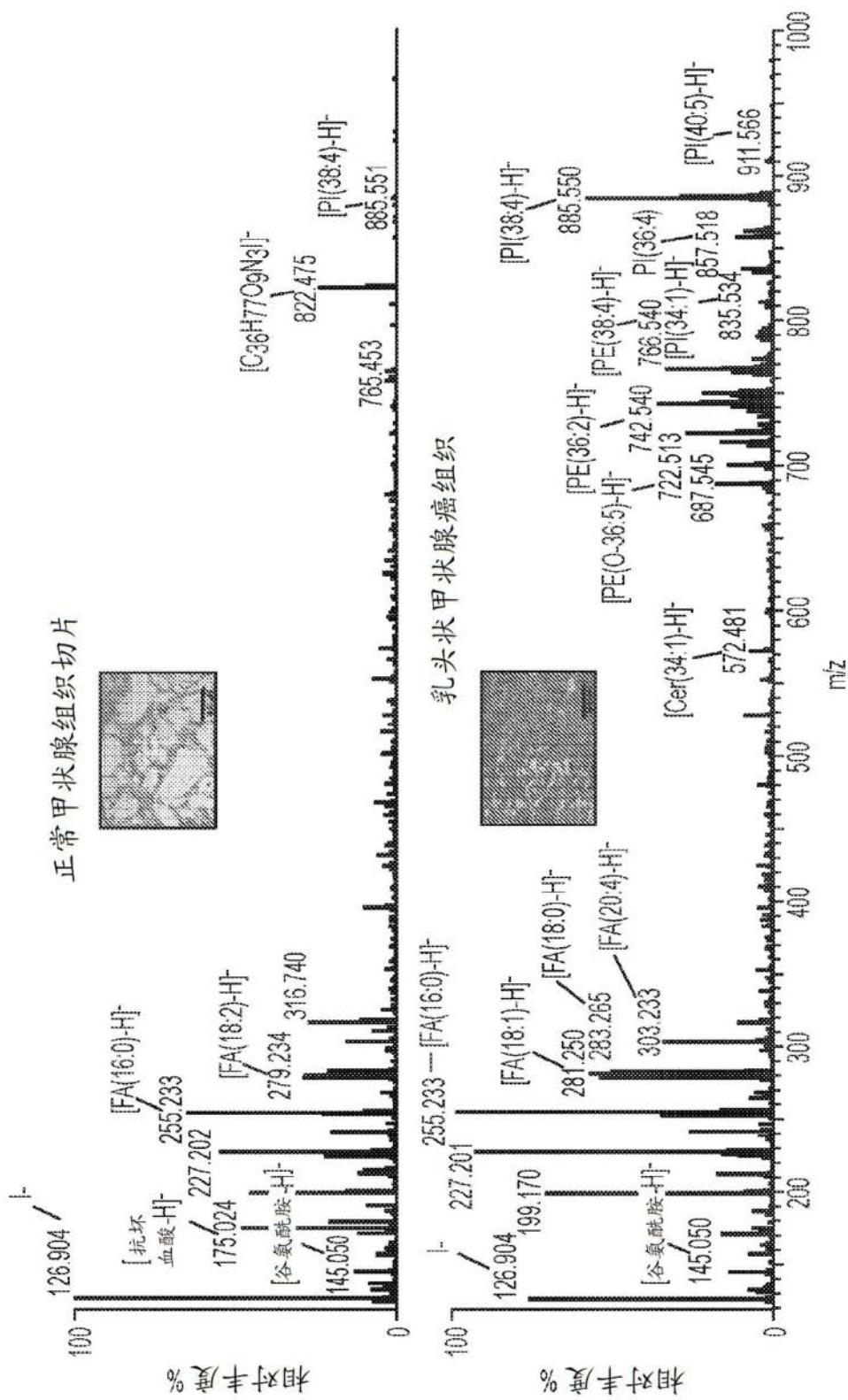


图8B

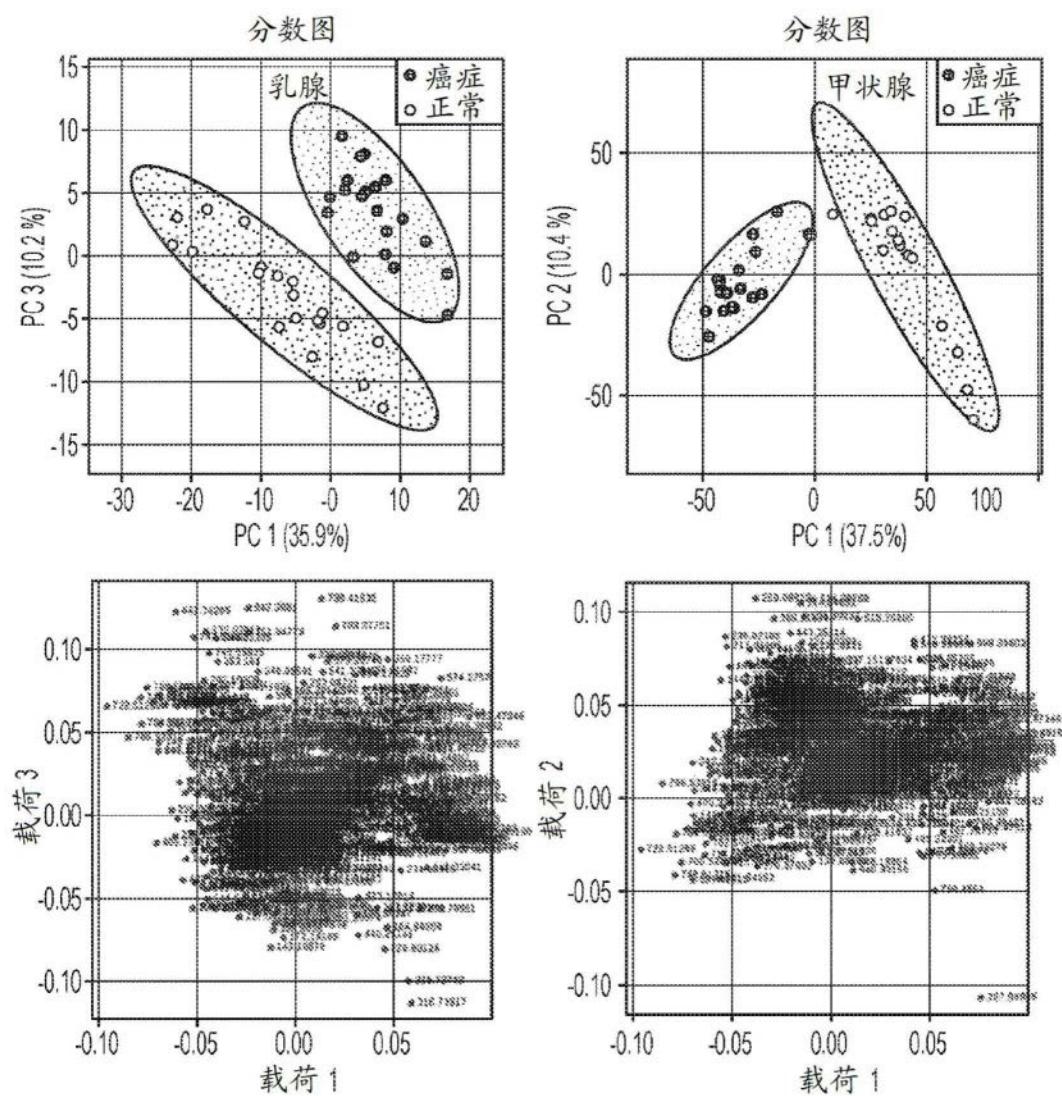


图9

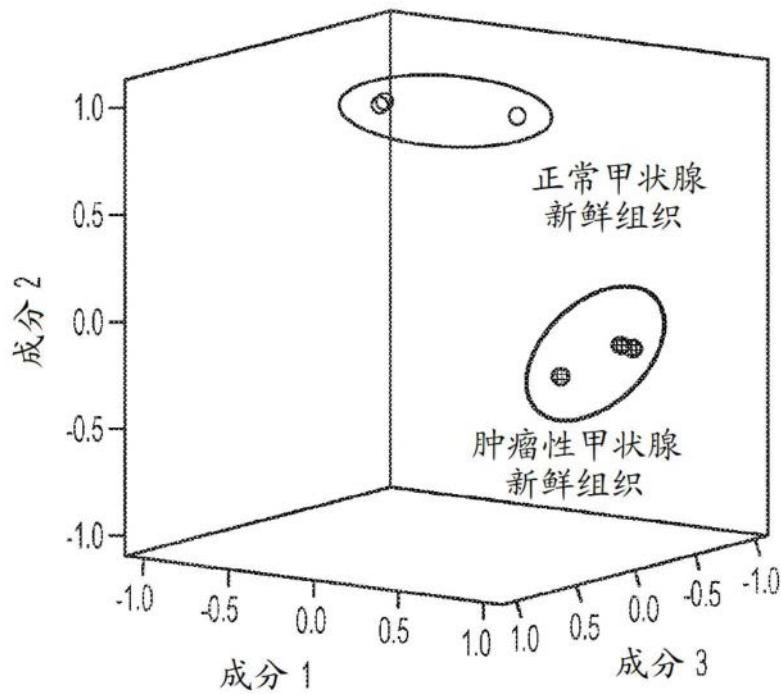


图10A

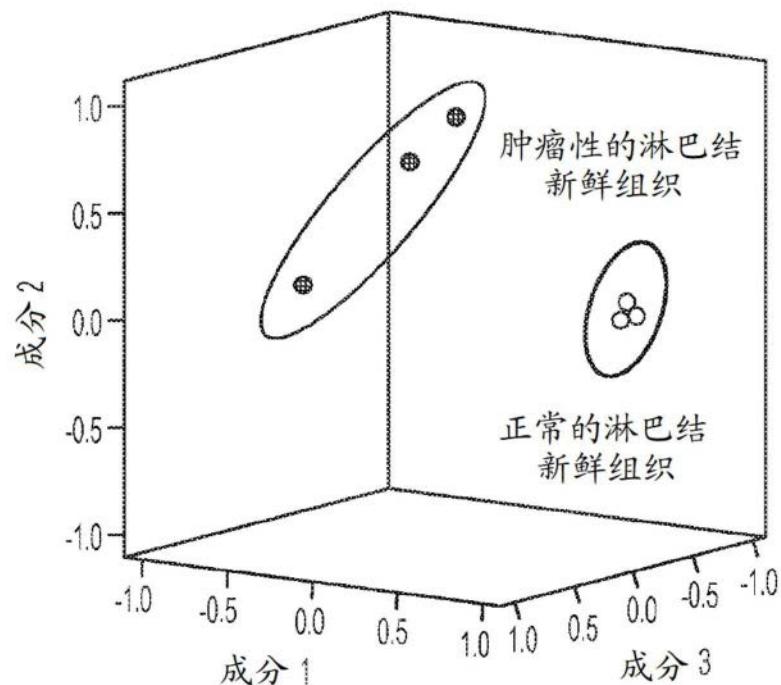


图10B

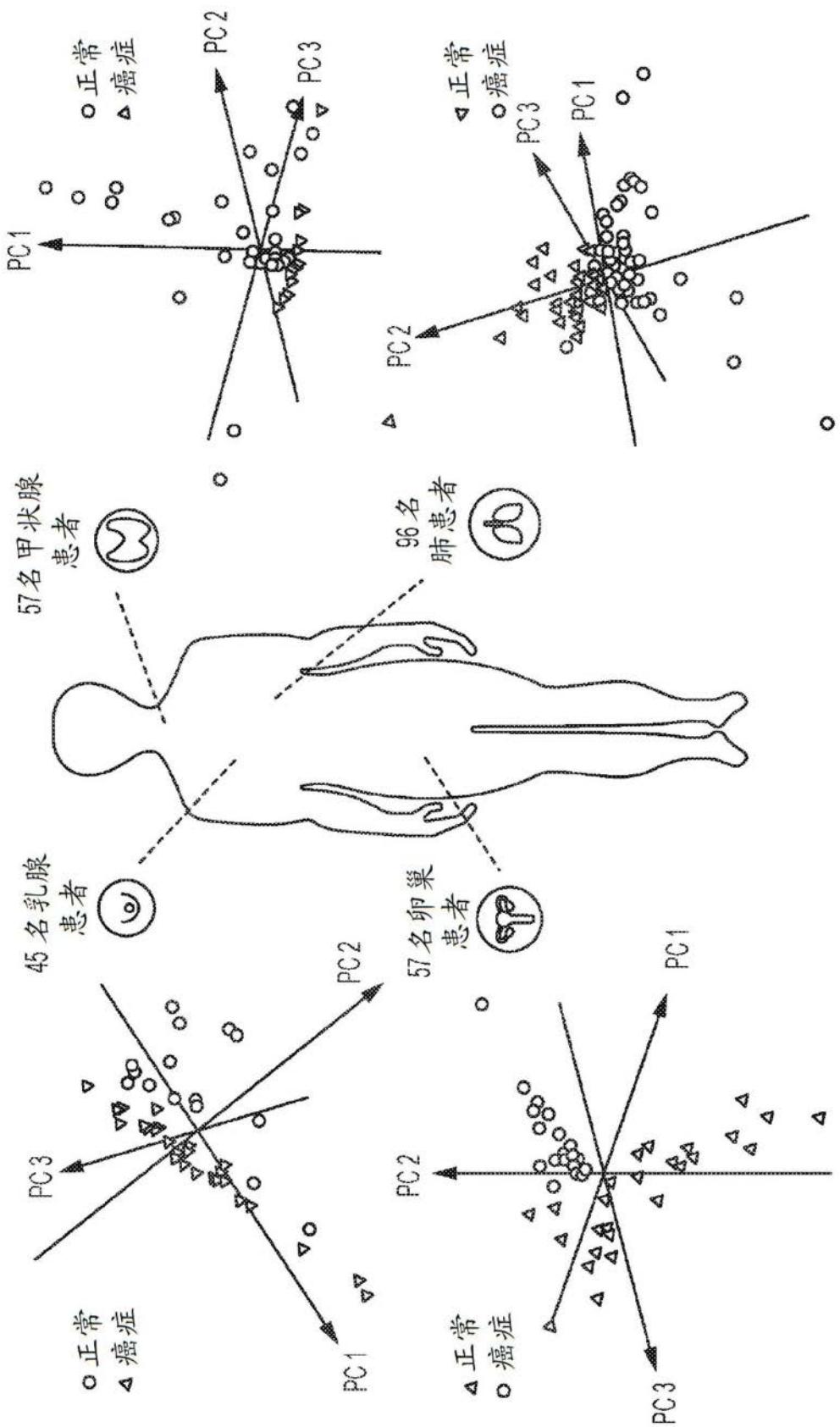


图11

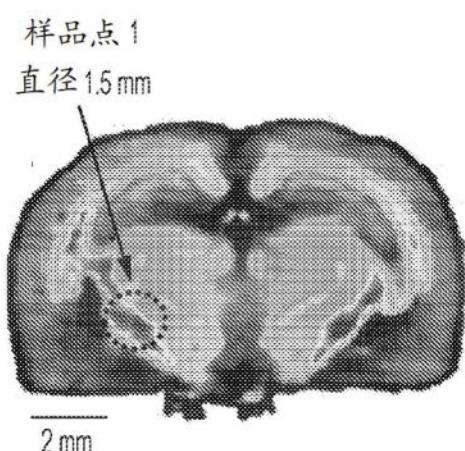


图12A

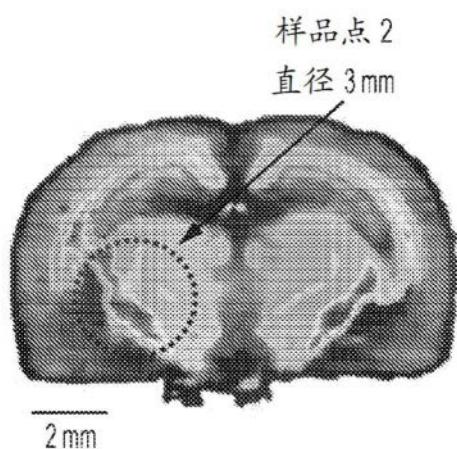


图12B

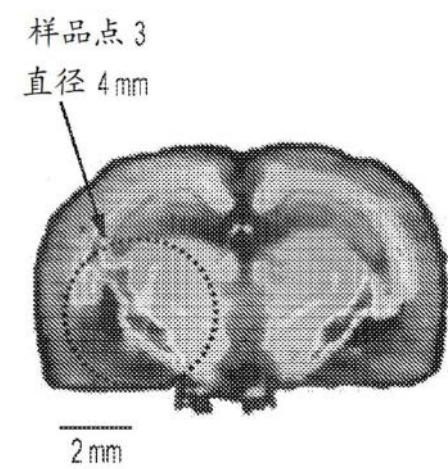


图12C

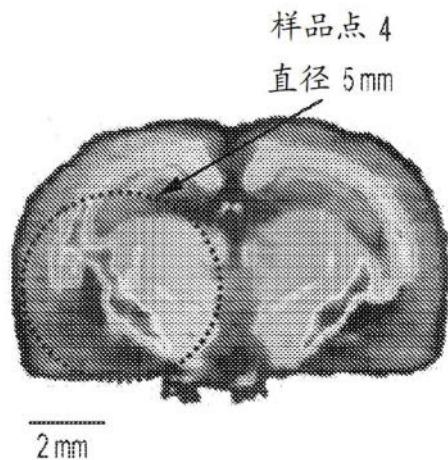


图12D

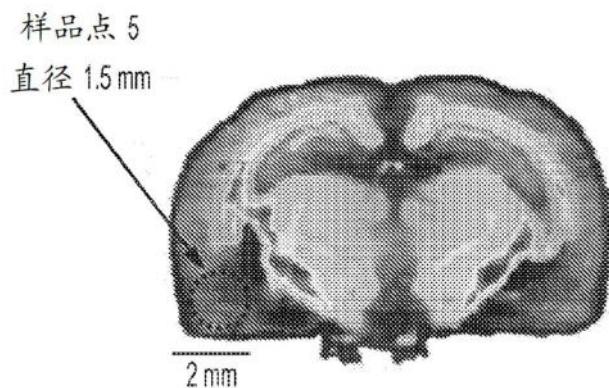
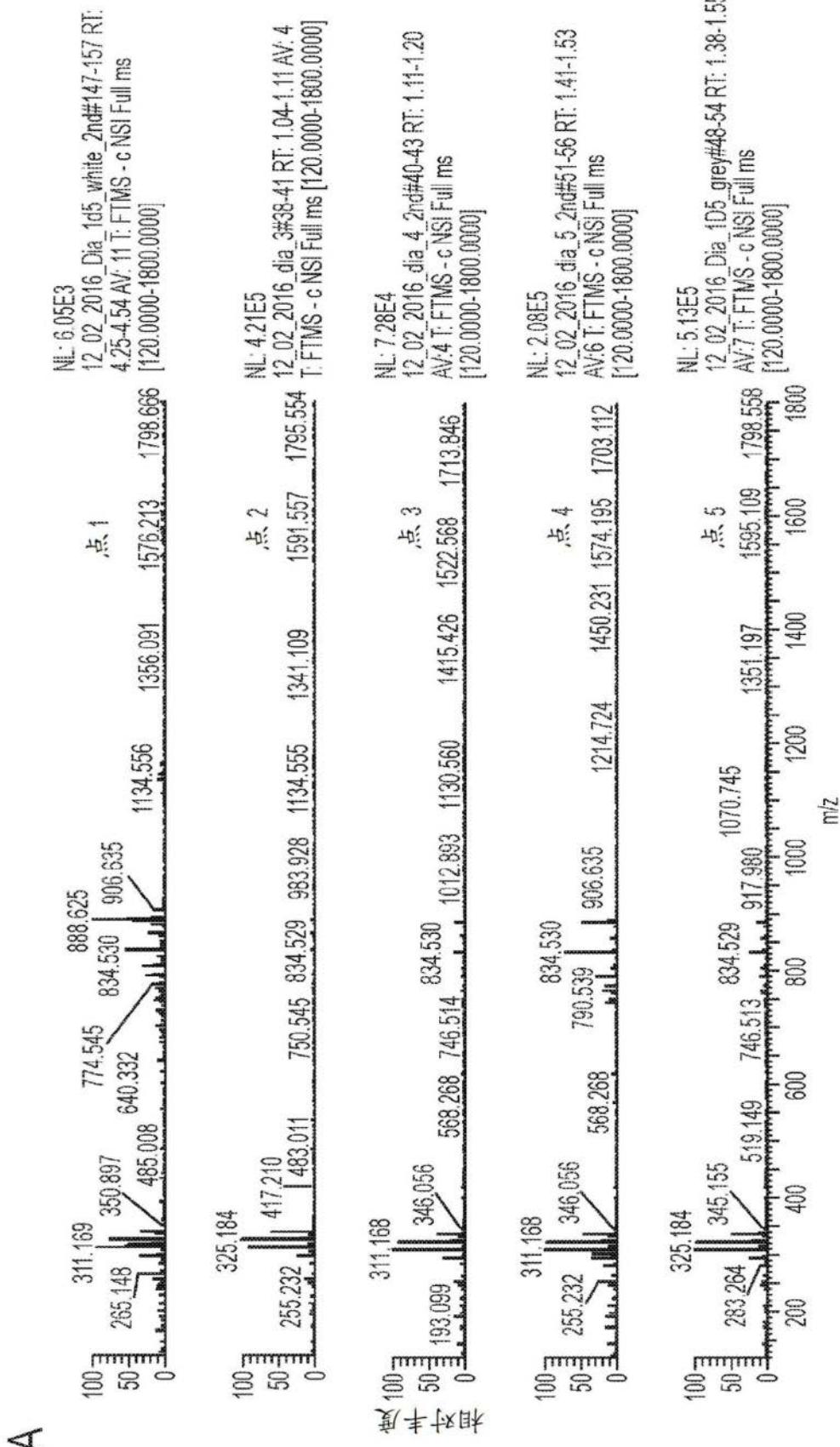


图12E



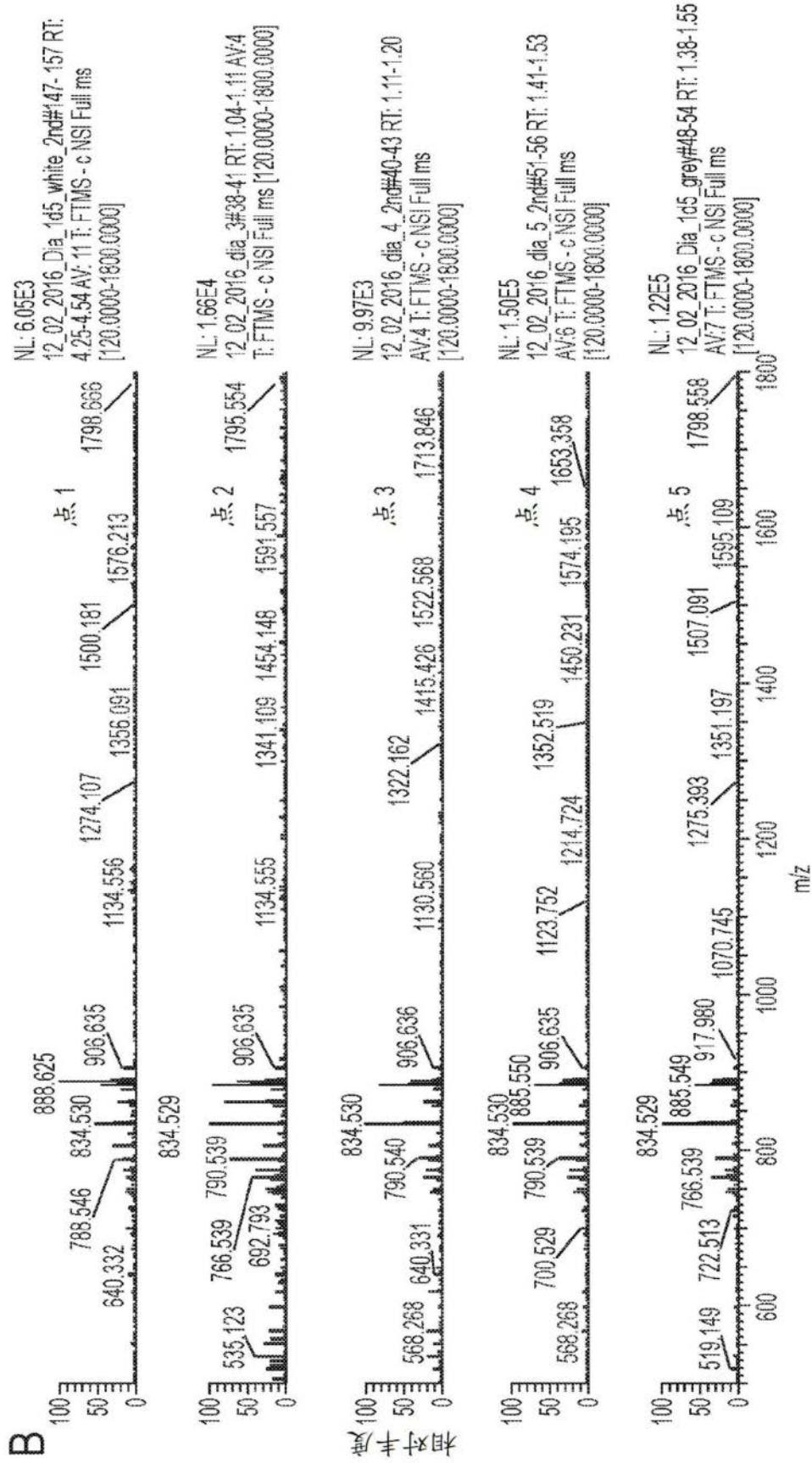


图 13B

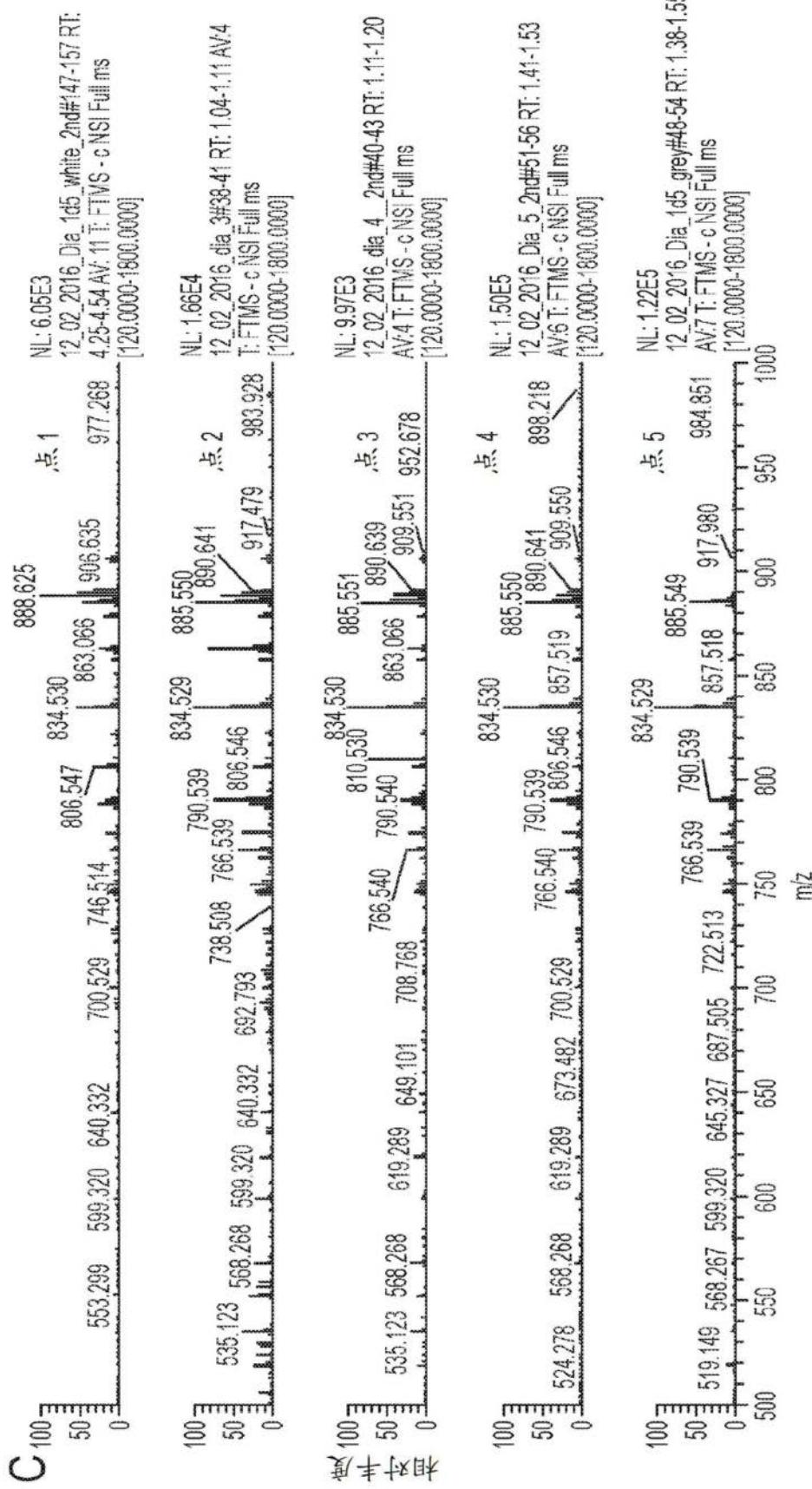


图13C

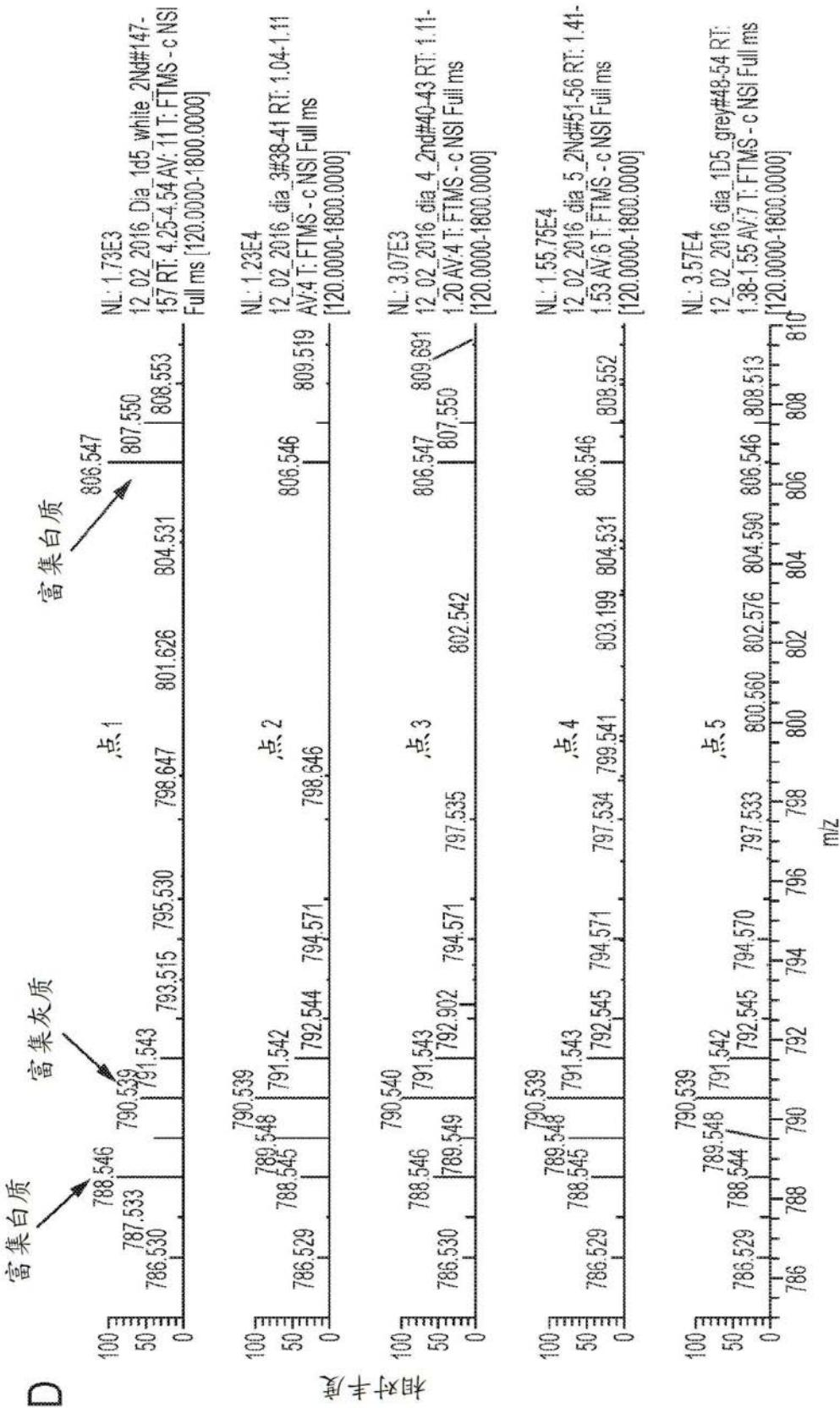


图13D

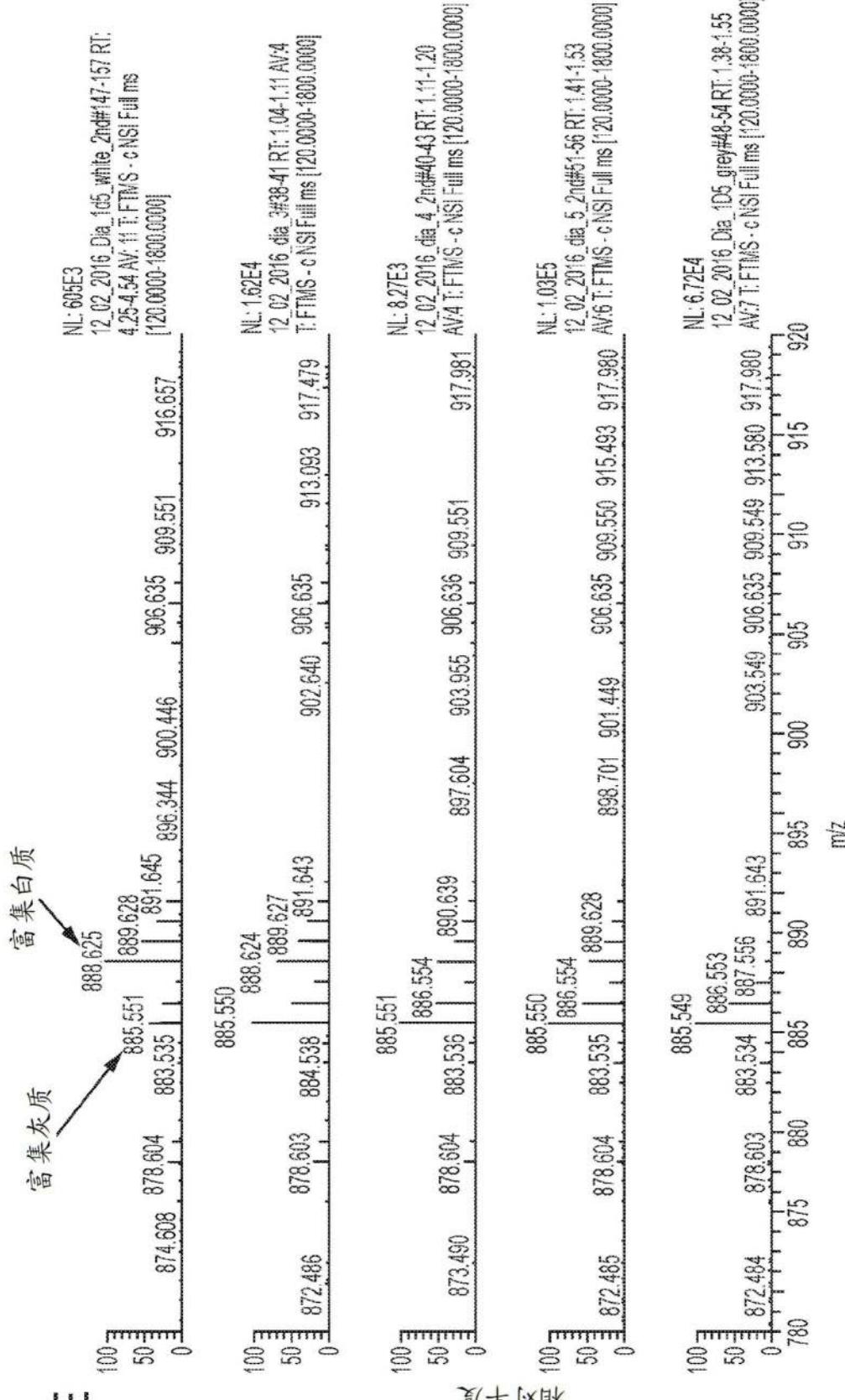


图 13E

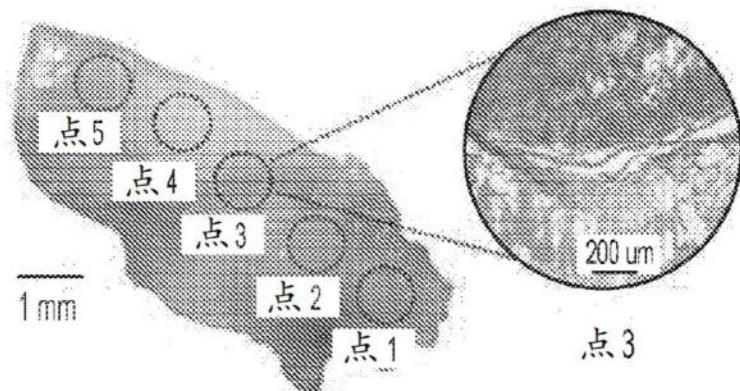


图14A

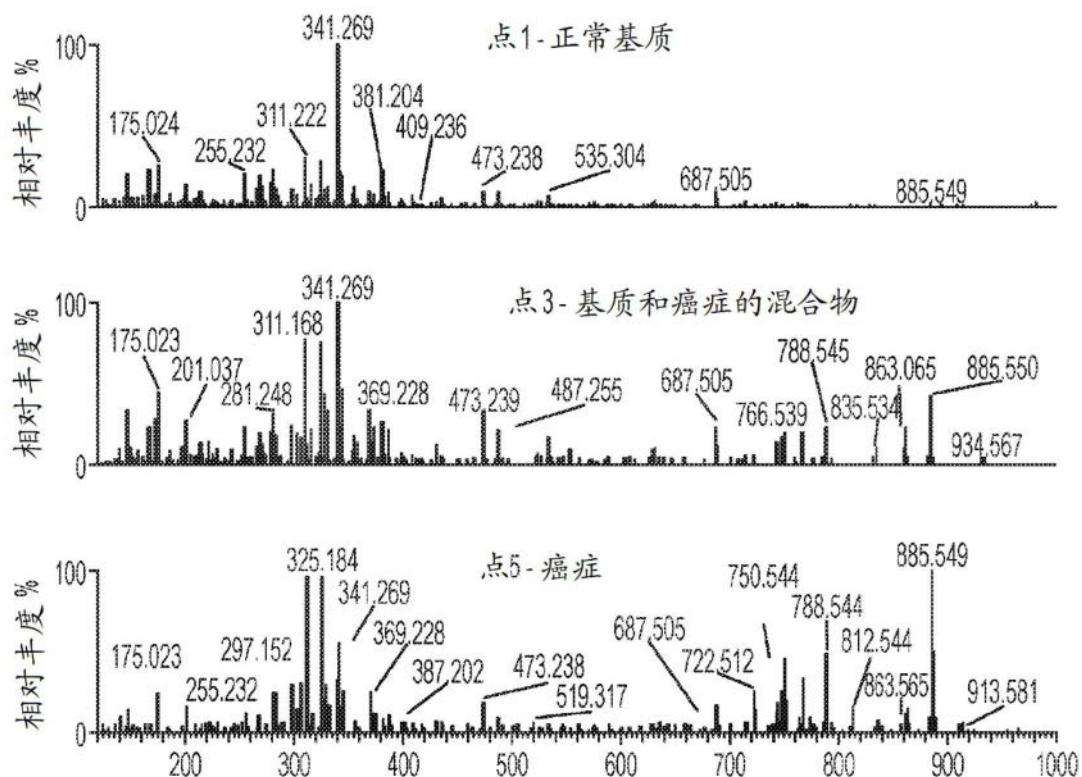


图14B

点	病理学诊断	Lasso 预测
1	正常基质	正常
2	正常基质	正常
3	基质 (约 50%) 和癌症 (约 50%)	癌症
4	卵巢癌	癌症
5	卵巢癌	癌症

图14C

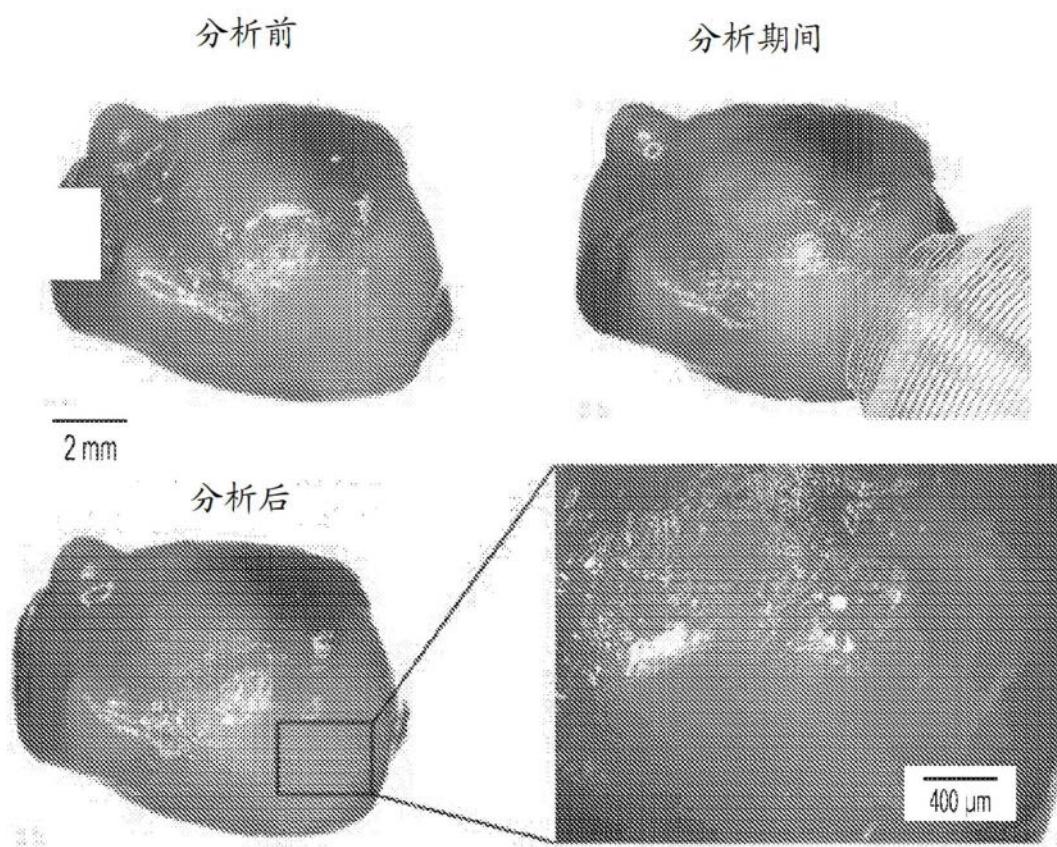


图15A

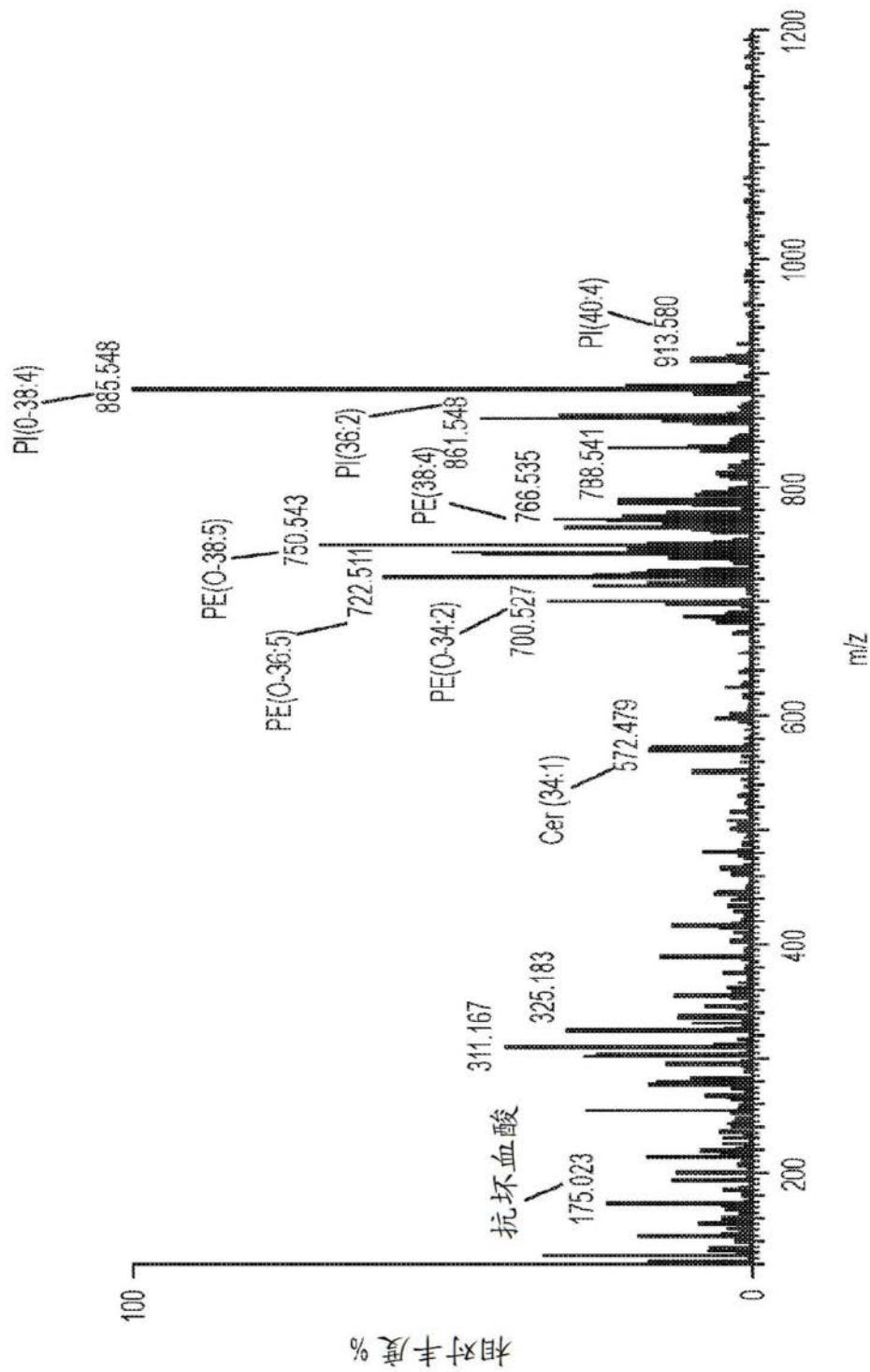


图15B

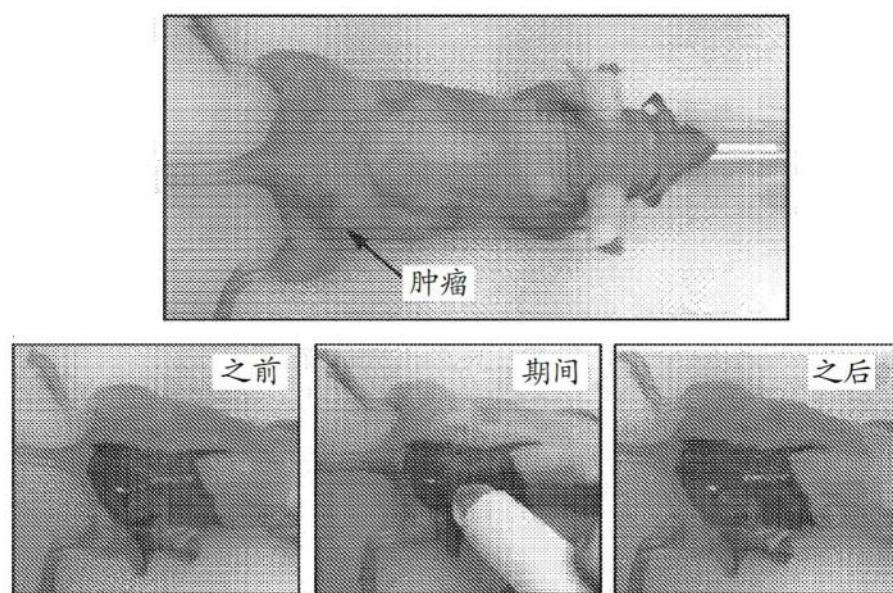


图16A

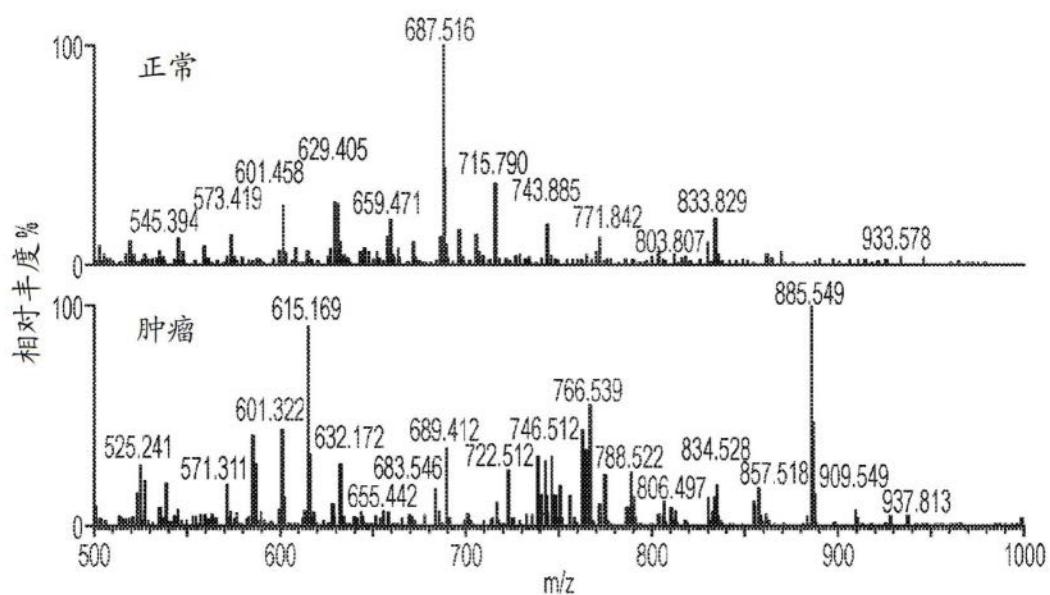


图16B

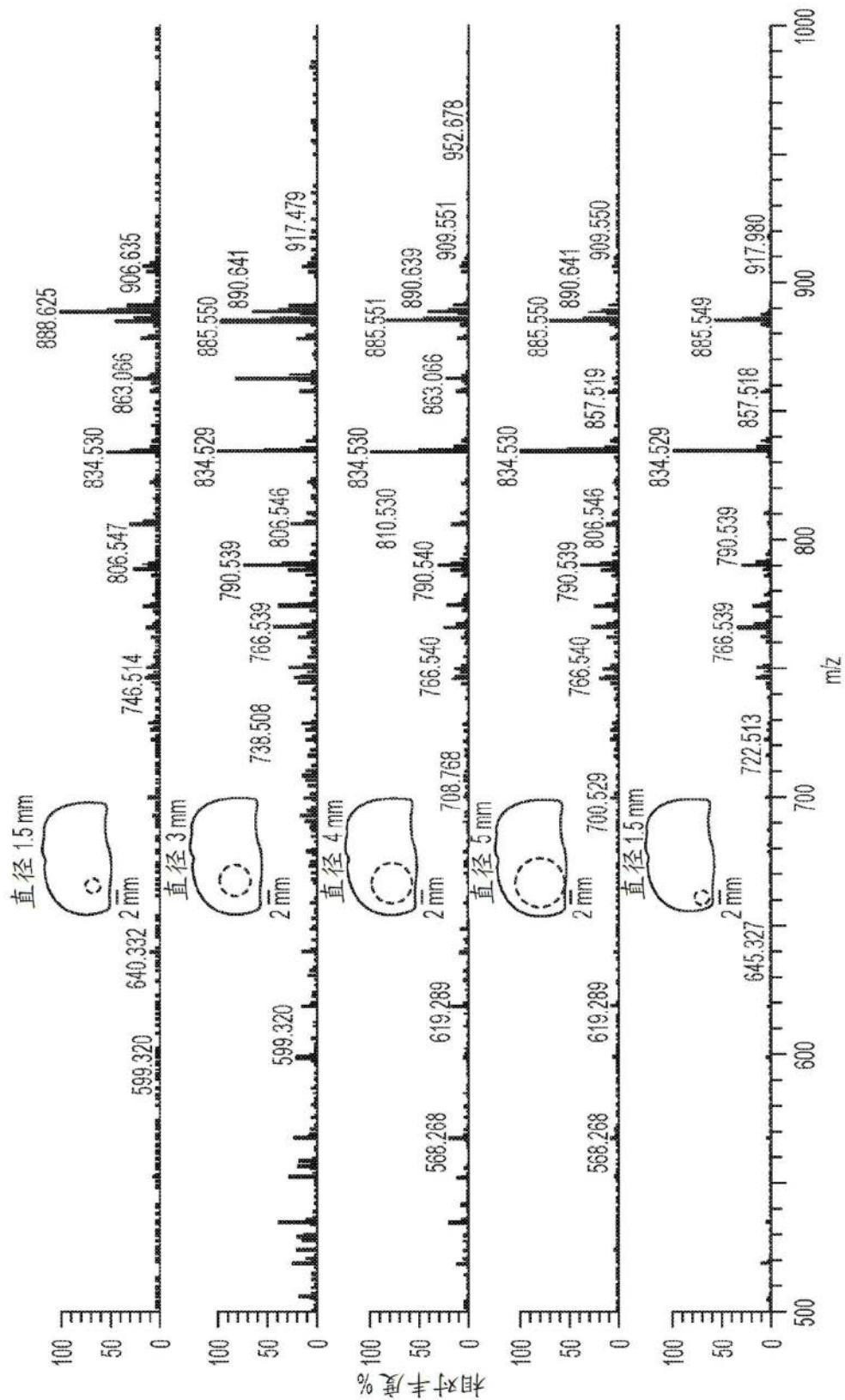


图17

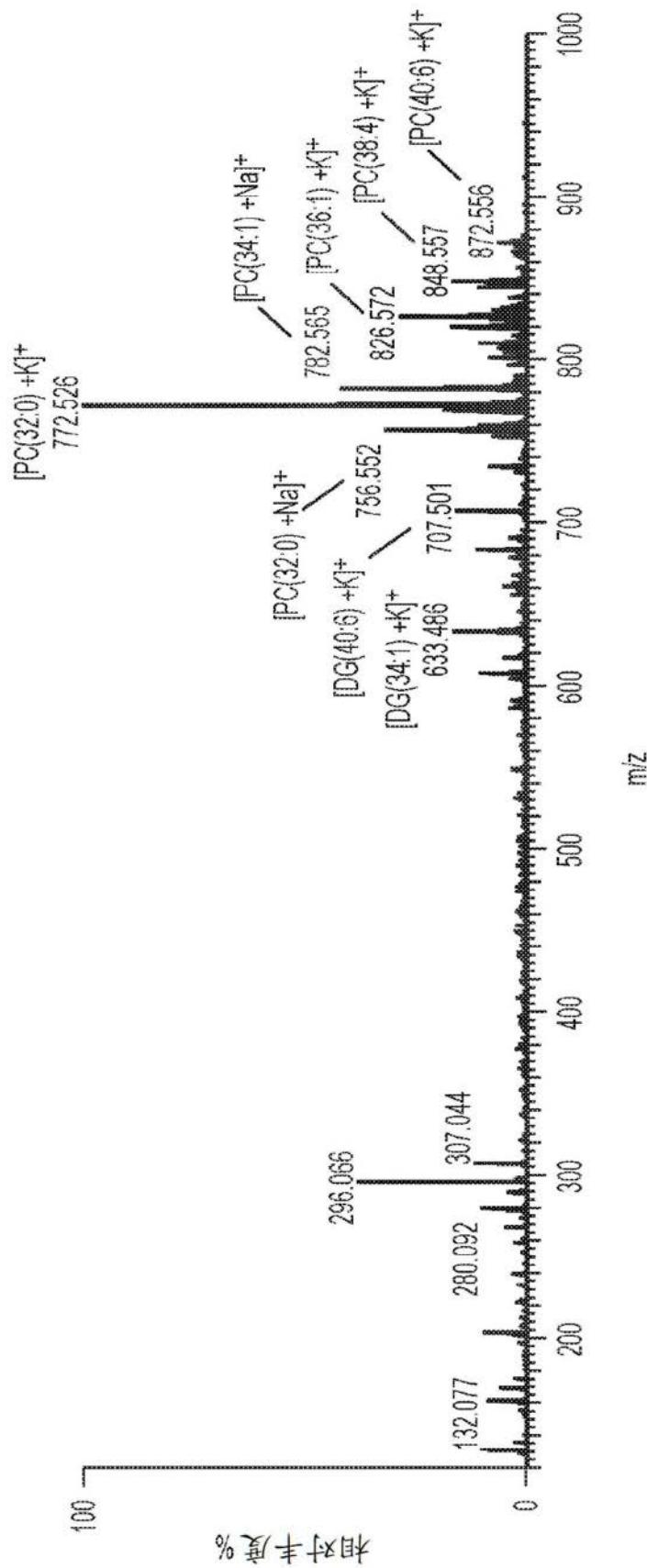


图18

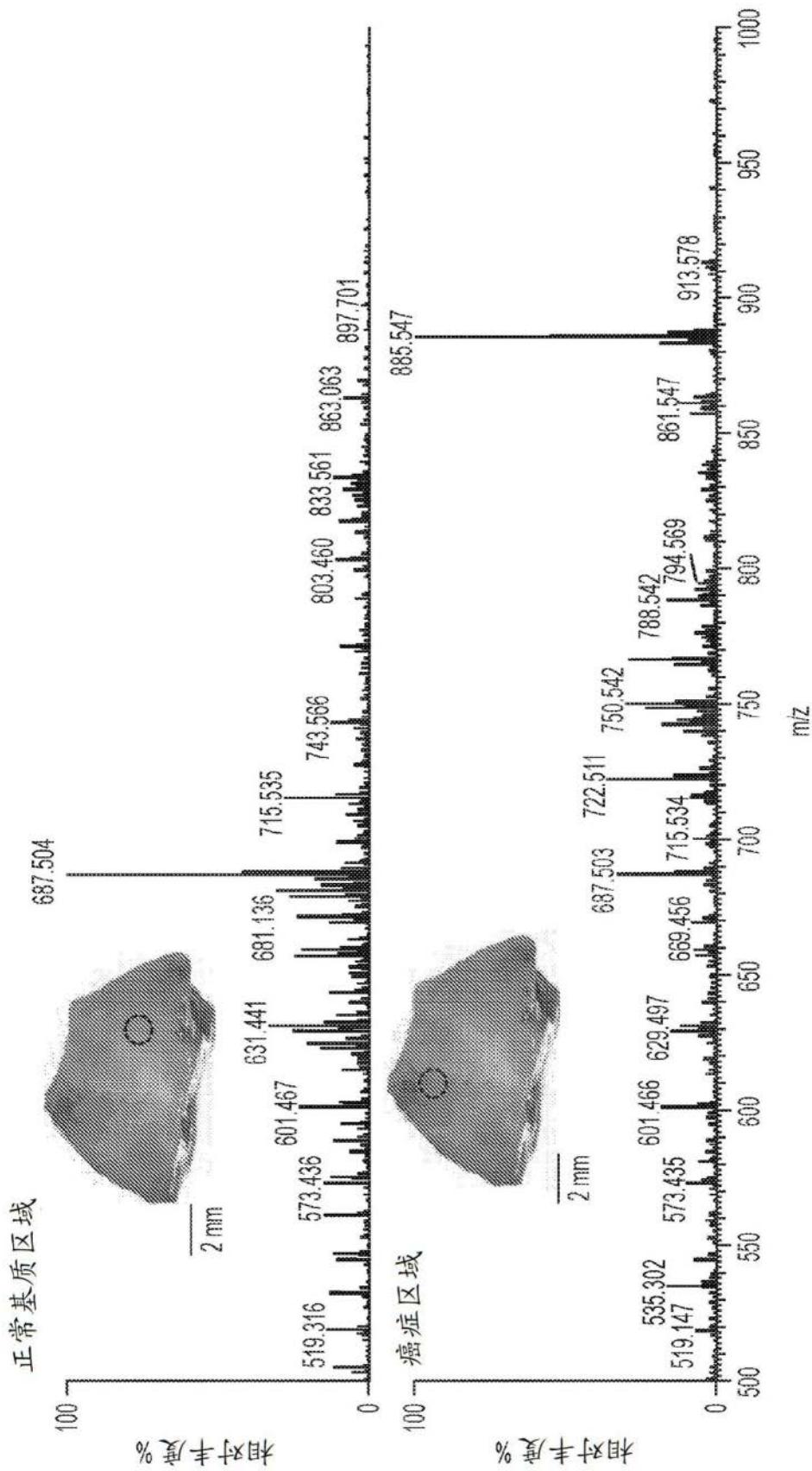


图19

H&E 染色的光学图像
分析期间 分析后

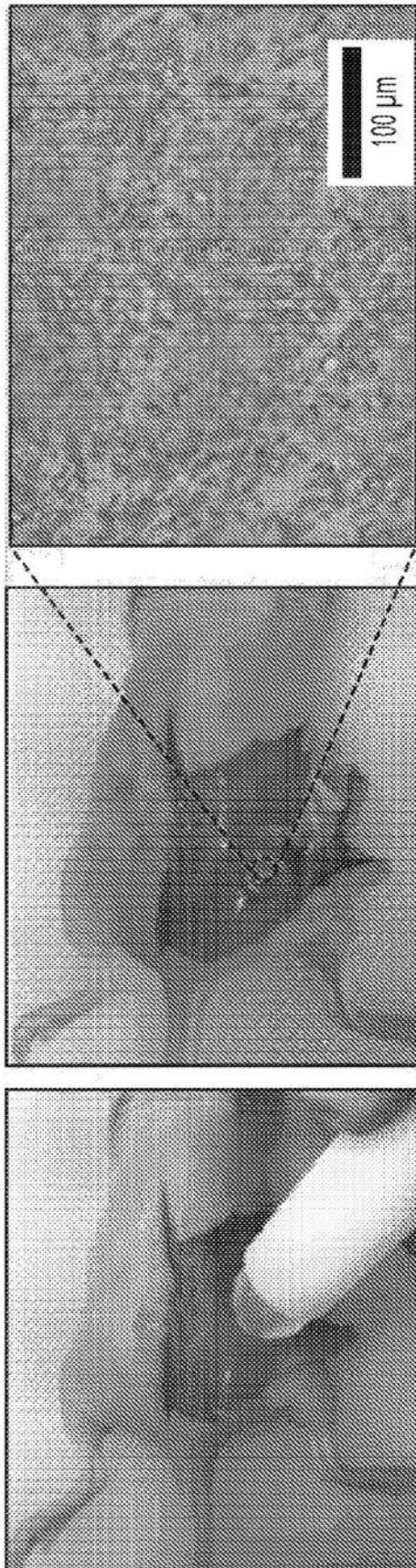
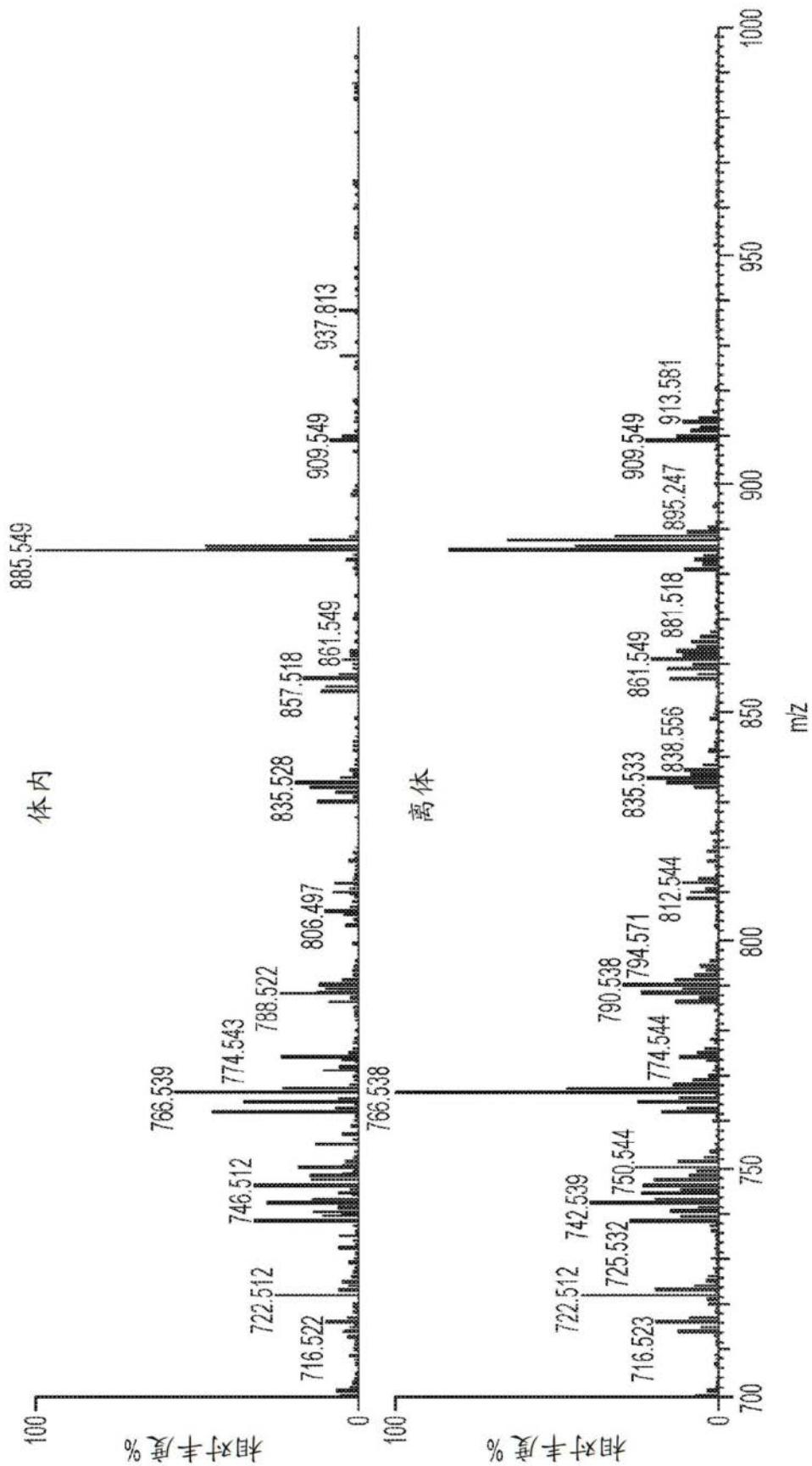


图20



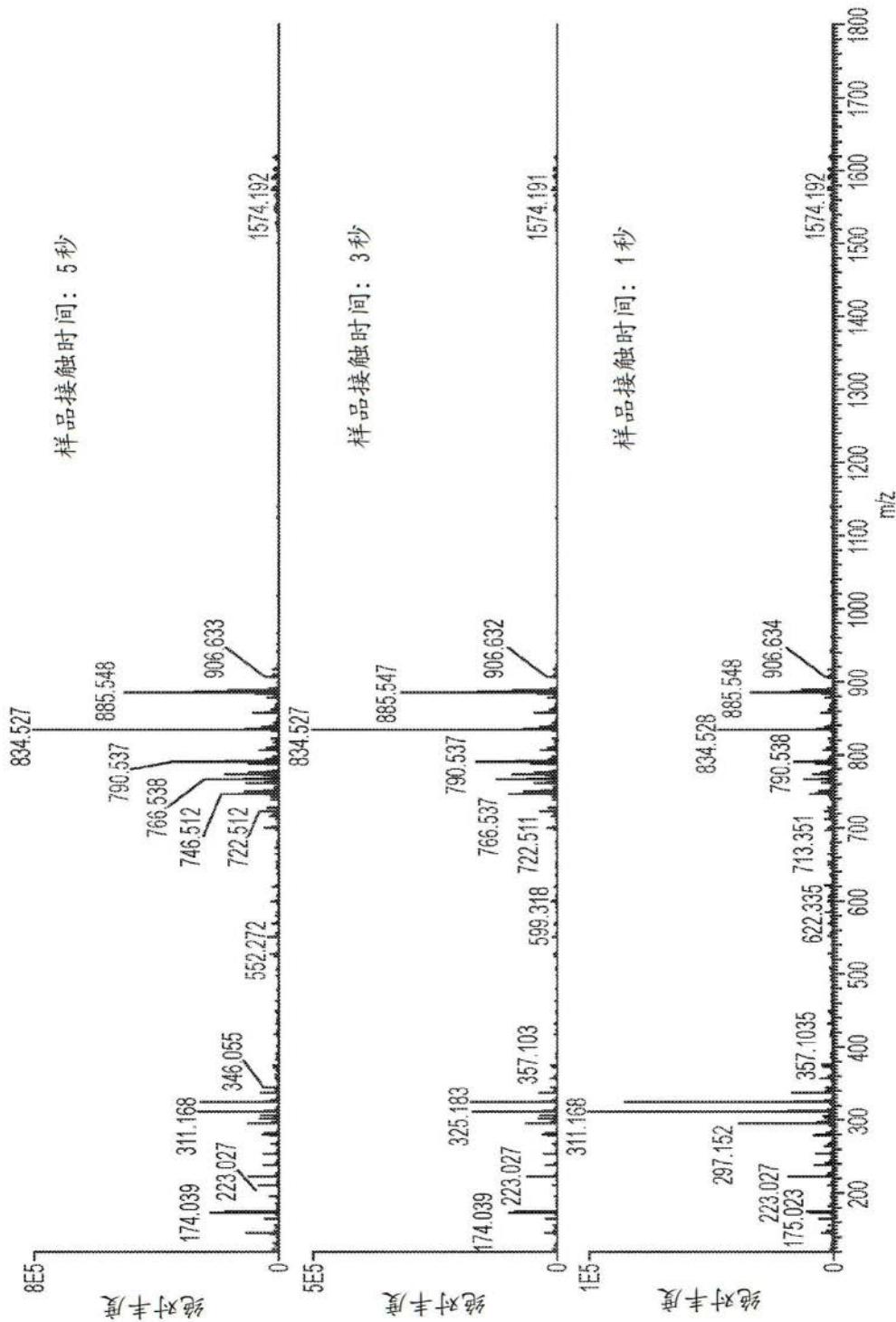


图22