



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115497558 A

(43) 申请公布日 2022.12.20

(21) 申请号 202210684664.9

(22) 申请日 2022.06.17

(30) 优先权数据

21180189.9 2021.06.18 EP

(71) 申请人 美天施生物科技有限公司

地址 德国贝尔吉施格拉德巴赫

(72) 发明人 H·迈耶 R·皮纳德

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理人 罗文锋 初明明

(51) Int.Cl.

G16B 20/30 (2019.01)

G16B 20/50 (2019.01)

G16B 30/10 (2019.01)

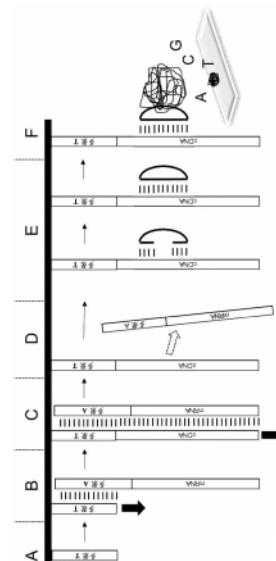
权利要求书2页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

在基质上使用具有间隙的挂锁对来自组织的基因进行空间测序的方法

(57) 摘要

本发明涉及在基质上使用具有间隙的挂锁对来自组织的基因进行空间测序的方法。具体而言，本发明涉及获得包含至少一条m-RNA链的样品中的靶序列的空间定位和序列信息的方法。



1. 获得包含至少一条m-RNA链的样品中的靶序列的空间定位和序列信息的方法，其包含以下步骤：

a. 提供具有能够与至少一条m-RNA链结合的数个间隔单元和具有至少一个基准标记物的表面

b. 向所述表面提供包含至少一条m-RNA链的样品，其中所述样品的至少一条m-RNA链与至少一个间隔单元结合，产生至少一种单链寡聚物

c. 拍摄所述表面的第一图像，以获得所述样品相对于所述基准标记物的空间信息

d. 将样品从表面移除

e. 将至少一种包含50 - 1000个核苷酸的寡核苷酸用其5' 和3' 末端与所述单链寡聚物的互补部分进行杂交，从而形成挂锁形状的结构，所述结构被连接以产生单链环状模板

f. 通过能够滚环扩增的聚合酶将单链环状模板扩增成数个DNA多联体，从而形成rolony

g. 获得所述rolony的序列信息

h. 将所述样品的空间信息与所述rolony的序列信息相联系。

2. 根据权利要求1的方法，其特征在于所述间隔单元选自抗体、抗体的Fab片段、单链Fv (scFv) 片段、二价单链抗体或双体抗体或适体。

3. 根据权利要求1的方法，其特征在于所述间隔单元选自包含至少5个胸腺嘧啶(多聚-T) 单分子的寡核苷酸，并且其中与至少一个间隔单元结合的所述单链寡聚物被逆转录成c-DNA链，以及其中所述mRNA链通过变性移除。

4. 根据权利要求1至3任一项的方法，其特征在于将所述至少一种寡核苷酸与所述至少一种单链寡聚物的互补部分进行杂交，从而产生在所述寡核苷酸的5' 和3' 末端之间具有间隙的挂锁单元，并且用互补的核酸作为靶序列填补所述挂锁单元的间隙并连接它们以产生所述单链环状模板。

5. 根据权利要求1至3任一项的方法，其特征在于将所述至少一种寡核苷酸与所述至少一种单链寡聚物的互补部分进行杂交，并连接所述寡核苷酸的5' 和3' 末端以产生所述单链环状模板，其中所述至少一种单链寡聚物的互补部分限定所述靶序列。

6. 根据权利要求1至5任一项的方法，其特征在于所述间隔单元随机分布于基质上。

7. 根据权利要求1至6任一项的方法，其特征在于所述样品在提供至所述表面后被透化。

8. 根据权利要求1至7任一项的方法，其特征在于在步骤d) 中，所述样品从表面上酶促或化学地移除。

9. 根据权利要求1至8任一项的方法，其特征在于所述寡核苷酸包含用于能够滚环扩增的聚合酶的至少一个引物序列。

10. 根据权利要求1至8任一项的方法，其特征在于通过引物寡核苷酸的连接向所述寡核苷酸提供用于能够滚环扩增的聚合酶的至少一个引物序列。

11. 根据权利要求1的方法，其特征在于所述样品的空间定位和所测序rolony的空间定位相对于所述基准标记物的定位进行叠加。

12. 根据权利要求1至11任一项的方法，其特征在于将所述样品提供至所述表面后，将所述样品进行染色以获得相对于所述基准标记物的空间定位。

13. 根据权利要求1至12任一项的方法，其特征在于所述测序信息通过测序经合成方法获得。

在基质上使用具有间隙的挂锁对来自组织的基因进行空间测序的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于在组织上在亚细胞水平上获得基因的测序和空间信息的方法。

背景技术

[0002] 在组织上在亚细胞水平上通过保持空间信息检测所有表达的基因和随后对于潜在的变体来测序那些基因已为具有挑战性的。尤其具有挑战性的是达到亚细胞分辨率。此申请中描述的方法允许低至数十纳米的理论分辨率并允许将组织上的空间信息与所表达基因的测序信息相联系。

[0003] 此技术由Spatial Transcriptomics和10X genomic公司开发。在此,由于用预先点标在阵列上的空间标识符给组织RNA分子加标签,因而空间信息得以维持。稍后,通过在例如Illumina上的标准体外NGS测序方法对所得文库进行测序。通过点标的过程,空间标识符在阵列上的位置在测序过程发生之前已知。在空间标识符的测序后,可将连接的感兴趣的RNA序列分配至组织定位。此方法的一个主要限制为该技术的分辨率,由于其依赖于目前仅在多细胞水平上的阵列上班点的特征尺寸。Spatial Transcriptomics具有多件授权的专利,然而分子被条形码标记且在基质外进行测序。对所有收集的带条形码的分子进行文库制备也是必要的。在此呈现的方法并不将分子从基质上移除,而是直接在基质上确定序列。参考文献为:US20150344942A1 METHODS AND PRODUCT FOR OPTIMISING LOCALISED OR SPATIAL DETECTION OF GENE EXPRESSION IN A TISSUE和W02016162309A1 SPATIALLY DISTINGUISHED, MULTIPLEX NUCLEIC ACID ANALYSIS OF BIOLOGICAL SPECIMENS。

[0004] 结合遗传和空间信息的另一种方法公开于W02012/140224、Fredrik Salmén等人在Nature protocols 2018 “Barcoded solid-phase RNA capture for Spatial Transcriptomics profiling in mammalian tissue”中和Sanja Vickovic等人,“High-density spatial transcriptomics arrays for in situ tissue profiling”, Nature methods, 2019年9月9日。

发明内容

[0005] 所描述的方法目前被用于检测组织上的mRNA,其具有300-500 nm的高空间分辨率,相较于目前市场上其他竞争方案具有简化的工作流且无需空间标识符。

[0006] 因此,本发明的目的为获得包含至少一条m-RNA链的样品中的靶序列的空间定位和序列信息的方法,其包含以下步骤:

- a. 提供具有能够与至少一条m-RNA链结合的数个间隔单元和具有至少一个基准标记物的表面
- b. 向该表面提供包含至少一条m-RNA链的样品,其中该样品的至少一条m-RNA链与至少一个间隔单元结合,产生至少一种单链寡聚物
- c. 拍摄该表面的第一图像,以获得该样品相对于基准标记物的空间信息

- d. 将样品从表面移除
- e. 将至少一种包含50 - 1000个核苷酸的寡核苷酸用其5' 和3' 末端与单链寡聚物的互补部分进行杂交,从而形成挂锁形状的结构,该结构被连接以产生单链环状模板
- f. 通过能够滚环扩增的聚合酶将单链环状模板扩增成数个DNA多联体(concatemer),从而形成rolony
- g. 获得该rolony的序列信息
- h. 将样品的空间信息与rolony的序列信息相联系。

[0007] 在如图1中所示的本发明的第一实施方案中,间隔单元选自包含至少5个,优选5至50个胸腺嘧啶单分子(被称为“多聚-T”)的寡核苷酸,其中与至少一个间隔单元结合的单链寡聚物被逆转录为c-DNA链,且其中mRNA链通过变性移除。

[0008] 在如图3中所示的本发明的第二实施方案中,间隔单元选自抗体、抗体的Fab片段、单链Fv (scFv) 片段、二价单链抗体或双体抗体或适体。优选地,重组人类抗体(eIF4E)或单克隆抗体(抗-7-甲基鸟苷(m7G) mAb)被用于靶向mRNA在5' 末端的帽末端。

附图说明

- [0009] 图1显示本发明第一实施方案的一般工作流。
- [0010] 图2显示本发明的表面上间隔单元、基准标记物和组织的空间排列。
- [0011] 图3显示本发明的第二实施方案的一般工作流。

具体实施方式

[0012] 本发明的方法以几个步骤实施,所述步骤详述如下:

步骤a)

首先,提供固体扁平二维基质,其具有官能化的表面,例如具有活化的羧酸酯基或琥珀酰亚胺酯。间隔基团连接至此活化的表面。在多聚T基团的变体中,这可通过胺修饰的寡核苷酸实现;在使用抗体的另一个变体中,可使用提供有氨基的寡核苷酸。该固体基质也含有至少一个,优选2个独立的基准标记。

[0013] 随后,将m-RNA分子用缓冲溶液加载于表面上。m-RNA分子将与官能化的表面相互作用并且空间上随机地分布于该表面的整个区域上。m-RNA分子的空间或表面密度可由加载的浓度控制。

[0014] 间隔单元和因此进而的m-RNA分子优选随机分布于基质上。分布密度可经浓度、温度、pH和表面官能化进行控制。优选地,该样品在提供至表面后被透化。

步骤b)

令组织样品与所有单分子都定位于此的固体基质接触。然后5-50个碱基长的多聚T尾将与在组织中表达的mRNA进行杂交。

步骤c)

组织可任选地例如用DAPI或苏木精或伊红进行染色并成像。还拍摄了那些基准标记的图像,并且记录X-Y位置。记录各单独的单分子的各序列,并将相对于基准标记的空间定位存储为X-Y距离。

[0017] 向表面提供样品后,可将该样品染色以获得相对于基准标记物的空间定位。任选

地,将该样品染色以允许确定样品的形态学。

[0018] 步骤d)

然后将组织从基质上酶促或化学地移除,例如用蛋白酶K移除。然后,可将其上含mRNA的单分子随后逆转录成cDNA。

[0019] 作为下一步骤,使其上具有单分子的固体基质变性,以使得双链DNA分子正在形成单链寡核苷酸。

[0020] 任选地,样品的空间定位和所测序rolony的空间定位相对于基准标记物的定位进行叠加。

[0021] 步骤e)

添加靶向各种基因的含间隙的挂锁探针。若该基因被表达,则挂锁探针将与不同mRNA结合。在那之后,间隙也被逆转录,且间隙填补的挂锁被连接成环形模板。然后在挂锁上实施滚环扩增。

[0022] 在一个变体中,通过以下实施本发明的方法:将至少一种寡核苷酸与至少一种单链寡聚物的互补部分进行杂交,从而产生在寡核苷酸的5' 和3' 末端之间具有间隙的挂锁单元,并且用互补的核酸作为靶序列填补挂锁单元的间隙并连接它们以产生单链环状模板。

[0023] 在另一个变体中,通过以下实施本发明的方法:将至少一种寡核苷酸与至少一种单链寡聚物的互补部分进行杂交,并连接寡核苷酸的5' 和3' 末端以产生单链环状模板,其中至少一种单链寡聚物的互补部分限定靶序列。

[0024] 优选地,寡核苷酸包含用于能够滚环扩增的聚合酶的至少一个引物序列。备选地,可通过引物寡核苷酸连接向该寡核苷酸提供用于能够滚环扩增的聚合酶的至少一个引物序列。

[0025] 在另一个变体中,寡核苷酸被提供有或包含有可使用的至少两个不同引物序列,其可被连续测序以及若多个rolony彼此相邻点亮则有助于防止光学拥挤。

[0026] 可通过拍摄一副或多幅第二图像,将各rolony在基质上的定位与组织的原始位置相关联。图2在左图中显示拍摄含组织和基准标记物的第一图像,并且在右图中显示在测序期间拍摄含rolony和基准标记物的第二图像。

[0027] 步骤f)

最后,添加测序引物,并然后对填补了间隙的挂锁进行测序,以及确定各碱基。各rolony在基质上的定位可稍后与组织的原始位置相关联。那意味着基因在组织上的定位可得到确定,并且可经测序检查该基因是否具有突变。

[0028] 步骤g)

优选地,测序信息通过测序经合成方法获得。通过随后将荧光标记的核苷酸与rolony进行杂交实施经合成测序,其中杂交的荧光标记的核苷酸提供可检测的荧光信号。

[0029] 如图1中所示基于含多聚T尾的变体的示例性工作流:

- 加载由长多聚T尾组成的相同的寡核苷酸(间隔单元)至官能化的固体表面(例如标准盖玻片25x75x1mm)上(图1A)

- 单分子多聚T将随机固定于官能化的表面上。图2中显示该表面的俯视图
- 单分子在表面上的密度经浓度控制
- 该单分子可具有约50-500 nm的彼此间最小距离

● 令组织样品与所有单分子都定位于此的固体基质接触。然后,30-50个碱基长的多聚T尾将与在组织中表达的mRNA进行杂交。(图1B)

● 该组织将进行染色 (DAPI/苏木精、伊红) 和成像。该固体基质还含有2个独立的基准标记。还拍摄了那些基准标记的图像,并且记录X-Y位置。记录各单独的单分子的各序列,并将相对于基准标记的空间定位存储为X-Y距离。

[0030] ● 任选的步骤将为用不同的荧光色素缀合的抗体实施循环染色以获得显微术数据,以进一步表征组织样品和鉴定组织上表达的一些不同蛋白。这给出了更多关于该组织的深入了解,且稍后蛋白信息可与基因表达和变体结果进行比较。

[0031] ● 然后将该组织从基质上移除。随后将其上含mRNA的单分子逆转录成cDNA。(图1C)

● 作为下一步骤,使其上具有单分子的固体基质变性,以使得双链DNA分子正在形成单链寡核苷酸。(图1D)

● 添加靶向各种基因的含间隙的挂锁探针。若该基因被表达,则挂锁探针将与不同mRNA结合。(图1E)

● 在那之后,间隙也被逆转录,且间隙填补的挂锁被连接成环形模板。然后在挂锁上实施滚环扩增。(图1F)

● 最后,添加测序引物,并然后对填补了间隙的挂锁进行测序,以及确定各碱基。各 colony 在基质上的定位可稍后与组织的原始位置相关联。那意味着基因在组织上的定位可得到确定,并且可经测序检查该基因是否具有突变。(图1F)

如图3中所示基于具有捕获mRNA帽末端的抗体的变体的示例性工作流

● 加载相同的抗体或适体至官能化的固体表面(例如标准盖玻片25x75x1mm)上(图3A)

● 抗体或适体将随机固定于官能化的表面上。图2中显示该表面俯视图

● 抗体或适体在表面上的密度经浓度控制

● 该抗体或适体可具有约50-500 nm的彼此间最小距离

● 令组织样品与所有抗体或适体都定位于此的固体基质接触,并且在透化后,7-甲基G将由连接于固体表面的抗体或适体进行识别

● 该组织将进行染色 (DAPI/苏木精或伊红) 和成像。该固体基质还含有2个独立的基准标记。还拍摄了那些基准标记的图像,并且记录X-Y位置。记录各单独的单分子的各序列,并将相对于基准标记的空间定位存储为X-Y距离。

[0032] ● 任选的步骤将为用不同的荧光色素缀合的抗体实施循环染色以获得显微术数据,以进一步表征组织样品和鉴定组织上表达的一些不同蛋白。这给出了更多关于该组织的深入了解,且稍后蛋白信息可与基因表达和变体结果进行比较。

[0033] ● 然后将该组织从基质上移除。(图3B)

● 添加靶向各种基因的含间隙的挂锁探针。若该基因被表达,则挂锁探针将与不同mRNA结合。(图3C)

● 在那之后,间隙也被逆转录,且间隙填补的挂锁被连接成环形模板。然后在挂锁上实施滚环扩增。(图3D)

● 最后,添加测序引物,并然后对填补了间隙的挂锁进行测序,以及确定各碱基。

各rolony在基质上的定位可稍后与组织的原始位置相关联。那意味着基因在组织上的定位可得到确定，并且可经测序检查该基因是否具有突变。(图3E)。

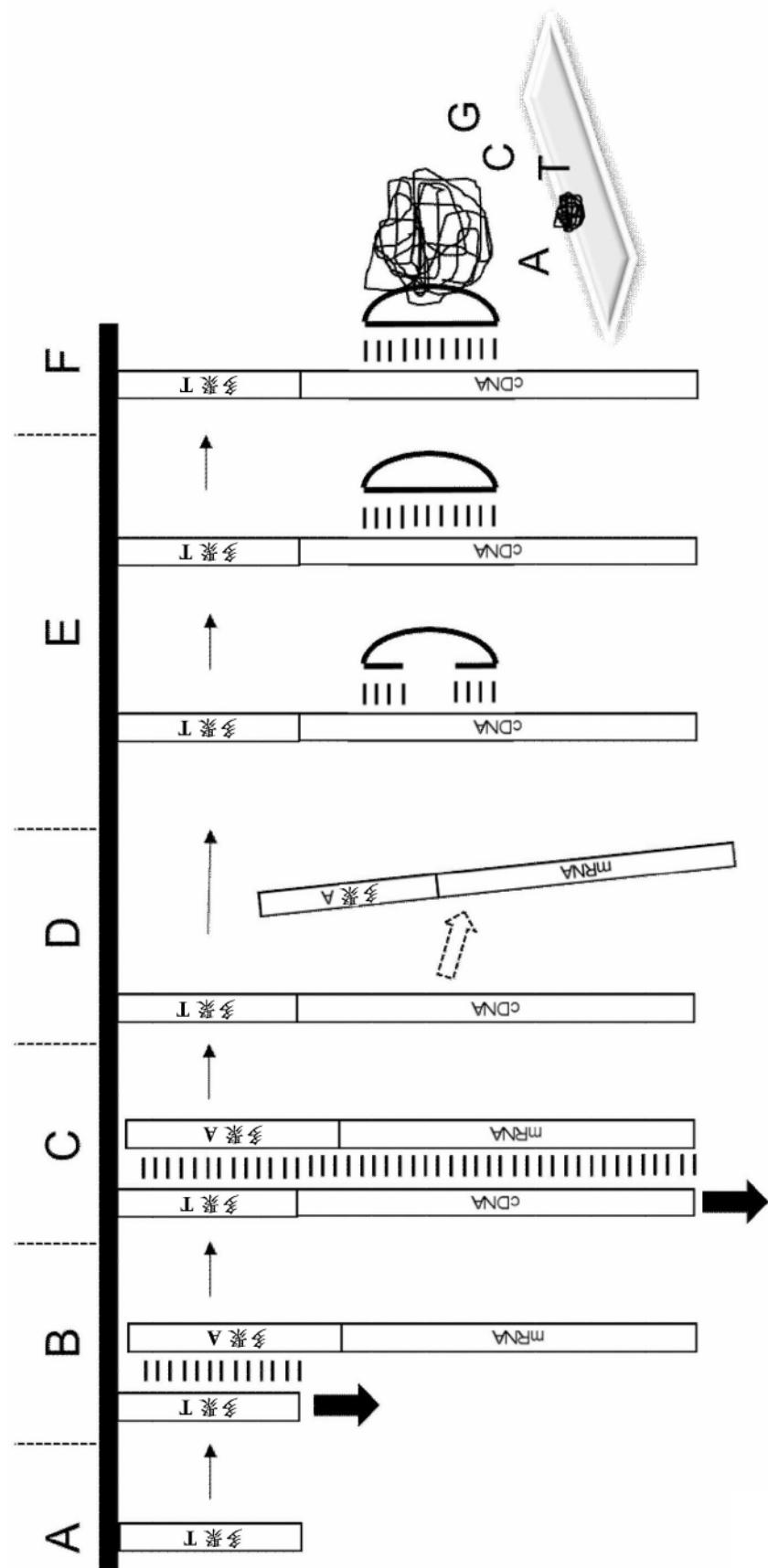


图 1

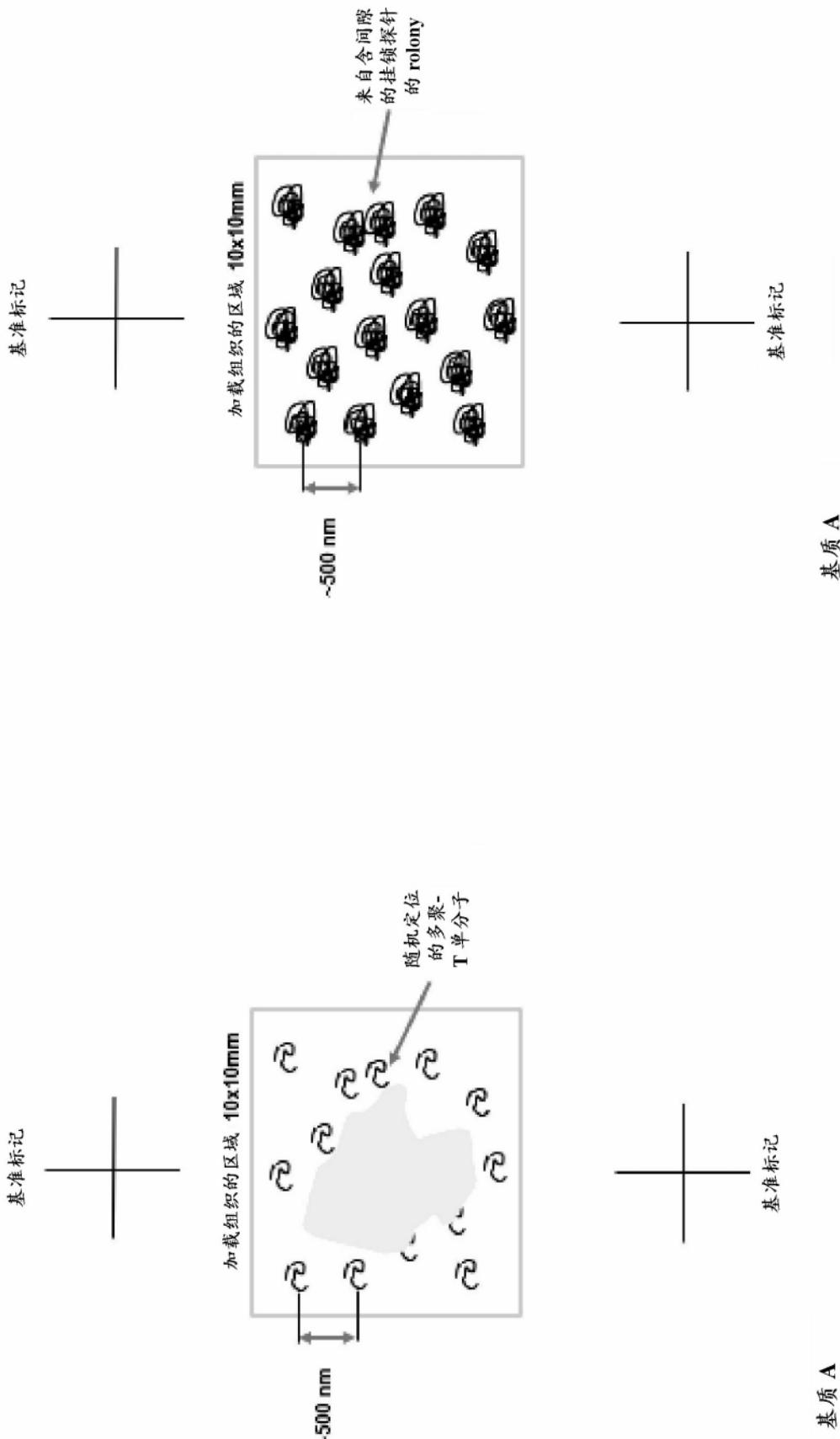


图 2

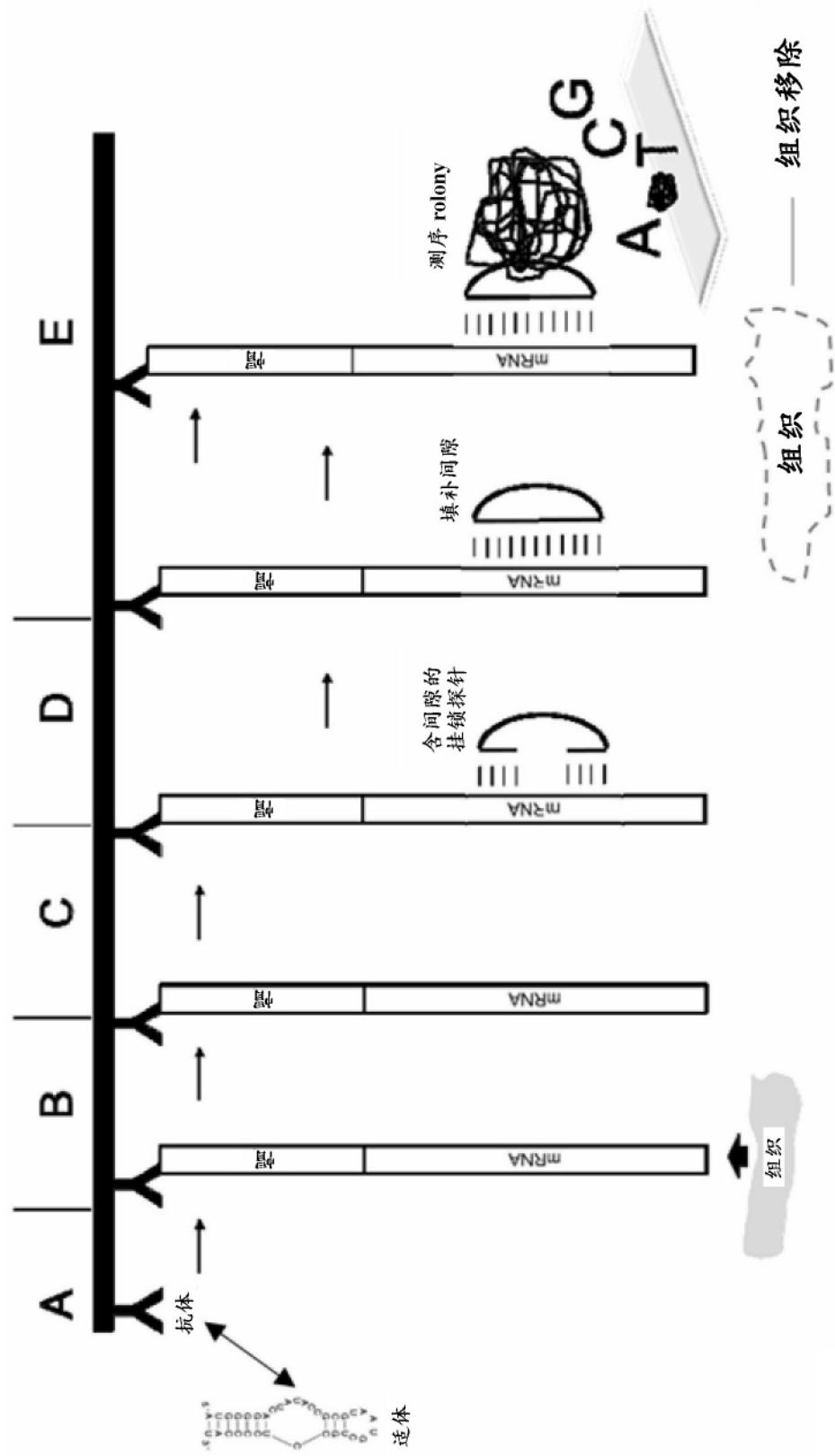


图 3