



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103688151 B

(45) 授权公告日 2016.05.18

(21) 申请号 201280026907.4

(22) 申请日 2012.05.29

(30) 优先权数据

1154731 2011.05.31 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.12.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2012/051205 2012.05.29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/164221 FR 2012.12.06

(73) 专利权人 IMA 生物科技公司

地址 法国罗斯

(72) 发明人 乔纳森·斯陶贝尔 大卫·博内尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

(51) Int. Cl.

G01N 1/28(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56) 对比文件

Dieter M. Drexler 等. Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues. 《Journal

of Pharmacological and Toxicological Methods》. 2007, 第 55 卷 (第 3 期), 279-288.

Basak Kukrer Kaletas 等. Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS. 《Proteomics》. 2009, 第 9 卷 (第 10 期), 2622-2633.

Stefania Notari 等. Determination of anti-HIV drug concentration in human plasma by MALDI-TOF/TOF. 《Journal of Chromatography B》. 2006, 第 833 卷 (第 1 期), 109-116.

J. Sa. Becker 等. Elemental imaging mass spectrometry of thin sections of tissues and analysis of brain proteins in gels by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. 《phys. stat. sol. (c)》. 2007, 第 4 卷 (第 6 期),

Masoud Zabet-Moghaddam 等. Qualitative and quantitative analysis of low molecular weight compounds by ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrices. 《RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY》. 2004, 第 18 卷 (第 2 期), 141-148.

审查员 郑义智

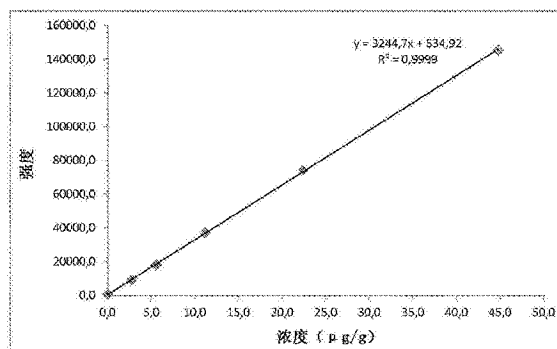
权利要求书3页 说明书15页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测和定量组织中的靶分子的方法

(57) 摘要

本发明涉及制备用于组织的至少一种标准分子的稀释范围的方法,所述方法包括对组织进行研磨,向其加入所述标准分子,对得到的混合物进行调制并切片,然后对所述组织的切片进行分析。本发明还涉及使用本发明的标准范围来检测和定量至少一种组织中的至少一种靶分子的方法。



1. 用于定量至少一种组织中的至少一种靶分子的方法,所述方法包括下列步骤:
 - a) 分析组织切片,以便获得代表所述切片中靶分子的量的信号;
 - b) 使用用于所述组织的标准分子的稀释范围来确定所述组织中靶分子的量,所述稀释范围按照下列步骤获得:
 - (i) 对与必须应用检测和定量方法的组织相一致的组织进行研磨,以获得组织匀浆物;
 - (ii) 将所述标准分子与来自于步骤(i)的第一组织匀浆物样品混合,所述标准分子具有第一已知浓度;
 - (iii) 调制从步骤(ii)获得的第一组织匀浆物样品,以便能够对所述组织匀浆物样品进行切片;
 - (iv) 使用来自于步骤(i)的至少一个第二组织匀浆物样品和与第一已知浓度不同的第二已知浓度的标准分子,重复步骤(ii)和(iii);
 - (v) 分析从步骤(iii)获得的每个调制过的组织匀浆物样品的至少一个切片,以便为所述标准分子的每种浓度,获得代表所述组织中标准分子的量的信号。
2. 权利要求1的定量方法,其中调制组织匀浆物样品的步骤(iii),由对所述组织匀浆物样品进行冷冻和/或包被构成。
3. 权利要求1和2之一的定量方法,其中分析步骤(v)由经质谱术分析或经荧光分析或经放射自显影术分析构成。
4. 权利要求1和2之一的定量方法,其还包括下面的步骤:
 - (vi) 在调制步骤(iii)之前,对来自于步骤(ii)的组织匀浆物样品和标准分子进行均质化。
5. 权利要求1和2之一的定量方法,其中从步骤(iii)获得的组织匀浆物样品表现出与相应的完整组织相一致的密度和/或组织消光系数。
6. 权利要求1和2之一的定量方法,其中对所述组织中至少两种不同的靶分子同时进行检测和定量,对于制备稀释范围的步骤(ii)来说,使用至少两种不同的标准分子产生每种靶分子的稀释范围,所述至少两种不同的标准分子添加到每个组织匀浆物样品中;对每种标准分子进行步骤(v)的分析,以便为每种浓度获得代表所述组织中每种标准分子的量的信号;并且对于每种靶分子,使用相应的稀释范围来进行确定靶分子的量的步骤b)。
7. 权利要求1和2之一的定量方法,其中对至少两种不同组织进行分析,对每种组织进行制备稀释范围的步骤(i)至(v),以便为每种组织获得代表所述标准分子的信号,对于每种组织,使用相应的稀释范围进行确定靶分子的量的步骤b)。
8. 权利要求1和2之一的定量方法,其中所述靶分子是蛋白质、肽、氨基酸、核酸、脂类、药物、药学活性分子或生物活性分子或代谢物。
9. 权利要求1和2之一的定量方法,其中被分析的组织是动物生物组织或植物生物组织。
10. 权利要求1和2之一的定量方法,其中步骤a)由经质谱术分析构成,与所述靶分子的质谱相关的信号对应于所述质谱的峰强度、峰面积或信噪比。
11. 权利要求1和2之一的定量方法,其中用于制备所述稀释范围的标准分子对应于所述靶分子。
12. 权利要求1和2之一的定量方法,其中使用质谱成像,来自于所述靶分子的信号强度

能够同时使所述靶分子在所述组织切片中的分布和浓度可视化。

13. 权利要求1和2之一的定量方法, 其中在完整动物的切片上直接检测和定量所述靶分子, 以便利用每种组织特异性的稀释范围同时比较所述靶分子在所述动物的不同组织中的分布。

14. 用于从组织切片检测和/或定量所述组织中的至少一种靶分子的方法的验证方法, 所述验证方法包括下列步骤:

(x) 对与必须应用检测和/或定量方法的组织相一致的组织进行研磨, 以获得组织匀浆物;

(xi) 将标准分子与来自于步骤(x)的至少两个组织匀浆物样品混合, 对于所述至少两个组织匀浆物样品来说, 所述标准分子具有相同的已知浓度;

(xii) 调制从步骤(xi)获得的组织匀浆物样品, 以便能够对所述组织匀浆物样品进行切片;

(xiii) 分析从步骤(xii)获得的每个组织匀浆物样品的至少一个切片, 以便为每个切片获得代表所述组织中的标准分子的信号;

(xiv) 将从每个切片获得的信号进行相互比较。

15. 用于评估组织中可以检测到的靶分子的最小量的方法, 通过所述方法, 从按照下列步骤获得的所述靶分子的特异性稀释范围和所述组织, 鉴定到表现出大于或等于3的信噪比值的可以检测到的最小信号:

(i) 对组织进行研磨, 该组织与将要评估可以检测到最小量靶分子的组织相一致, 以获得组织匀浆物;

(ii) 将标准分子与来自于步骤(i)的第一组织匀浆物样品混合, 所述标准分子具有第一已知浓度;

(iii) 调制从步骤(ii)获得的第一组织匀浆物样品, 以便能够对所述组织匀浆物样品进行切片;

(iv) 使用来自于步骤(i)的至少一个第二组织匀浆物样品和与第一已知浓度不同的第二已知浓度的标准分子, 重复步骤(ii)和(iii);

(v) 分析从步骤(iii)获得的每个调制过的组织匀浆物样品的至少一个切片, 以便为所述标准分子的每种浓度, 获得代表所述组织中标准分子的量的信号。

16. 用于评估组织中可以定量检测到的靶分子的最小量的方法, 通过所述方法, 从按照下列步骤获得的所述靶分子的特异性稀释范围和所述组织, 鉴定到表现出大于或等于最小可检测信号的信噪比值的3倍的信噪比值的的最小信号:

(i) 对组织进行研磨, 该组织与将要评估可以被定量最小量靶分子的组织相一致, 以获得组织匀浆物;

(ii) 将标准分子与来自于步骤(i)的第一组织匀浆物样品混合, 所述标准分子具有第一已知浓度;

(iii) 调制从步骤(ii)获得的第一组织匀浆物样品, 以便能够对所述组织匀浆物样品进行切片;

(iv) 使用来自于步骤(i)的至少一个第二组织匀浆物样品和与第一已知浓度不同的第二已知浓度的标准分子, 重复步骤(ii)和(iii);

(v)分析从步骤(iii)获得的每个调制过的组织匀浆物样品的至少一个切片,以便为所述标准分子的每种浓度,获得代表所述组织中标准分子的量的信号。

17.用于从目标组织的切片检测和/或定量所述组织中的至少一种靶分子的方法的质量和/或可重复性的控制方法,所述控制方法包括下列步骤:

(xx)对与所述目标组织相一致的组织进行研磨,以获得组织匀浆物;

(xxi)将已知浓度的标准分子与来自于步骤(xx)的组织匀浆物样品混合;

(xxii)调制从步骤(xxi)获得的组织匀浆物样品,以便能够对所述调制过的组织匀浆物样品进行切片;

(xxiii)对于待分析的目标组织的每个切片,对来自于步骤(xxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片同时进行分析,以便每次获得代表来自于步骤(xxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片中的标准分子的信号和代表所述目标组织中的靶分子的信号;

(xxiv)对由来自于步骤(xxii)的调制过的组织匀浆物样品的每个切片获得的信号进行比较。

18.用于对目标组织中的至少一种靶分子进行相对定量的方法,所述方法包括下列步骤:

(xxx)对与所述目标组织相一致的组织进行研磨,以获得组织匀浆物;

(xxxi)将已知浓度的标准分子与来自于步骤(xxx)的组织匀浆物样品混合;

(xxxii)对从步骤(xxxi)获得的组织匀浆物样品进行调制,以便能够对所述调制过的组织匀浆物样品进行切片;

(xxxiii)对于待分析的目标组织的每个切片,对来自于步骤(xxxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片同时进行分析,以便每次获得代表来自于步骤(xxxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片中的标准分子的信号和代表所述目标组织中的靶分子的信号;

(xxxiv)对于待分析的目标组织的每个切片,计算来自于所述目标组织中的靶分子的信号与来自于重构组织中的标准分子的信号的比率;

(xxxv)对由所述目标组织的每个切片获得的比率进行比较,以获得所述靶分子的相对定量。

用于检测和定量组织中的靶分子的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于组织的分子的稀释范围的制备,以及这样的稀释范围在例如通过质谱术定量所述组织中的所述分子中的应用。本发明的稀释范围考虑到了待定量分子在目标组织中的特异性行为。更具体来说,本发明提供了一种方法,其使得能够通过使用质谱成像、尤其是MALDI成像,直接在组织表面上检测和/或定量靶分子。本发明还涉及用于验证检测和/或定量方法的方法,以及用于控制检测和/或定量方法的质量和/或可重复性的方法。

[0002] 总的来说,本发明适用于其中对组织中的分子进行检测和/或定量是有用/必需的所有领域。例如,本发明适用于药学领域,用于研究药物在不同生物组织中的分布和药物动力学。类似地,本发明适用于生物医学领域,例如用于在给定时刻检测、鉴定和追踪病理组织中的给定生物标志物。本发明还适用于农业化学领域,例如用于评估分子例如植物检疫产品在植物中的毒性和降解。

背景技术

[0003] 目前,各种技术被用于检测和鉴定样品、尤其是组织中的分子。例如,质谱术是广为人知并在化学和生物化学分析中用于检测和鉴定样品中的目标分子的技术。经过一些年,目前,已开发出使用质谱术的分子成像例如MALDI成像,其使得能够直接在生物组织的切片上将目标分子的分布可视化。MALDI成像,由于其非常高的灵敏度,能够直接在组织表面上同时将非常大量的不同分子的分布可视化。在药学领域中,这种技术使得能够例如比较分子在不同治疗时间时在不同器官中的分布。

[0004] 然而,在需要在时刻 t 时对此检测到的分子进行定量的情形中,这种成像技术必须与基于常规或仪器方法的定量化学分析相结合。该第二定量步骤是操作和解译误差的来源。此外,它不允许将目标分子的存在与其在组织中的定量分布直接相关联。

[0005] 此外,取决于进行检测的组织,给定浓度的给定分子不发出相同强度的信号。类似地,给定组织中浓度相同的两种不同分子表现出不同的信号强度。

[0006] 这种现象可以由对每种分子和每种组织来说特异性的组织消光系数(TEC)或组织效应或甚至离子抑制效应的存在来解释。TEC表示与给定分子在惰性分析支持物上的信号相比,来自于所述分子的信号强度随着组织和/或其在组织中的位置而变的损失或增益。TEC依赖于许多因素,尤其是组织的性质(动物或植物)、化学环境、组织是否进行化学处理等。这种TEC的存在使得在分析期间、尤其是在质谱术中,解译由组织中的分子发出的信号强度变得困难。

发明内容

[0007] 本发明提出了一种方法,所述方法使得能够制备用于给定组织的给定分子的稀释范围或标准范围。使用来自于破碎后组织的目标组织的重构物的切片来制备本发明的标准范围。本发明人发现,给定分子在这样的重构组织和相应的完整组织中的表现相同。在通过质谱术进行分析的情形中,重构组织中分子的质谱与相应的完整组织中同样浓度的同一分

子的质谱基本上一致。类似地,在通过荧光进行分析的情形中,由重构组织中的标记分子发出的荧光信号的强度,与相应的完整组织中相同浓度的同一标记分子发出的荧光信号的强度基本上一致。此外,通过将本发明的标准范围用于给定组织中给定分子的定量分析,不需考虑TEC。在所述组织中所述分子的分析中获得的信号,可以直接与相应标准范围的信号相关联。

[0008] 本发明还提出了用于检测和/或定量组织中的靶分子的方法,而不论检测方法是何种方法,尤其是通过电离、放射活性或荧光进行检测。例如,本发明的方法使用质谱术或质谱成像,其允许直接在所述组织的切片上自动获取与所述分子的质谱相关的信号,以便重构所述靶分子在所述组织中的分布和量的图像。为此,根据本发明,使用靶分子或表现出相似物理化学特征的分子的稀释范围,所述稀释范围通过使用从与待分析的组织相一致的组织重构的组织的切片来产生。然后通过与来自于所述稀释范围的结果进行直接比较,可以对所述组织中的分子进行准确定量。

[0009] 本发明还提出了对使用组织切片检测和/或定量组织中的靶分子的方法进行验证的方法。对于给定组织和给定分子来说,本发明的验证方法使得能够不依赖于组织效应,检查在所述组织的切片上直接获得的所述分子的分析结果是否代表所述组织。

[0010] 本发明还提出了用于控制使用组织切片检测和/或定量组织中的靶分子的方法的质量和/或可重复性的方法。这样的方法使得能够追踪实验可变性和/或将其考虑在内,尤其是通过将为每个分析获得的值相对于该质量对照进行归一化,以便例如在不同分析之间对目标化合物进行相对定量。

[0011] 因此,本发明的主题是制备用于组织的至少一种标准分子的稀释范围的方法,所述方法包括下列步骤:

[0012] (i)对组织进行研磨以获得组织匀浆物;

[0013] (ii)将所述标准分子与来自于步骤(i)的第一组织匀浆物样品混合,所述标准分子具有第一已知浓度;

[0014] (iii)调制从步骤(ii)获得的第一组织匀浆物样品,以便能够对所述调制过的组织匀浆物样品进行切片;

[0015] (iv)使用来自于步骤(i)的至少一个第二组织匀浆物样品和与第一浓度不同的第二已知浓度的标准分子,重复步骤(ii)和(iii);

[0016] (v)分析从步骤(iii)获得的每个调制过的组织匀浆物样品的至少一个切片,以便为所述标准分子的每种浓度,获得代表所述组织中标准分子的量的信号。

[0017] 本发明的方法可以应用于任何生物组织,不论是动物还是植物。“组织”一般应该被理解为是同一来源的细胞集合,它们聚集在一起成为对同一功能有贡献的功能性集合体。在某些情形中,组织可以被理解为器官或器官的一部分。

[0018] 标准分子可以是肽、多肽、蛋白质、氨基酸、核酸、脂类、代谢物、小分子例如药物等。更通常地,标准分子可以是任何药理学活性分子、生物学活性分子或其他活性分子。取决于步骤(v)中必须进行的分析,标准分子可以是未标记的或标记的,尤其是放射性标记的或用荧光分子例如GFP(绿色荧光蛋白)标记的。

[0019] 在研磨步骤(i)中,可以将组织破碎以便形成在一定程度上细的匀浆物,尤其是液体、半液体、糊状物等。组织匀浆物可能不是均质的,并且可以例如包括不同尺寸的组织碎

片。如果需要,可以向获得的匀浆物添加均质化溶液、尤其是水性溶液,以便稀释所述匀浆物并使其致密性下降。可以在研磨步骤上游、下游或期间添加均质化溶液。

[0020] 可以通过任何手段、尤其是手动或机械手段进行研磨。例如,通过使用搅拌机剪切或使用研杵压碎来获得组织匀浆物。

[0021] 根据本发明,在步骤(i)中使用的组织有利地是器官,例如肾、肝等。可以使用完整器官或仅仅所述器官的一部分来产生标准范围而没有任何差别。可以将组织研磨,然后细分成至少与将要产生的标准范围中的稀释点一样多的组织匀浆物样品。也可以在研磨前进行所述组织的分割,将每个样品单独研磨。还可以为标准范围的每个稀释点使用一个或多个不同的完整或不完整的器官,每次用于产生同一系列稀释的器官是相同性质和来源的。例如,为了产生大鼠肝中的分子的包含4个稀释点或浓度的标准范围,对于每种浓度使用新的大鼠肝。

[0022] 产生至少两种不同浓度的标准分子制备物。例如,将标准分子以不同的已知浓度在增溶溶液(水性或含有溶剂)中制成悬液。然后向每个组织匀浆物样品加入相同量的溶液,其各自具有不同且已知浓度的所述标准分子。在另一个实例中,将标准分子在增溶溶液中制成悬液,向每个组织匀浆物样品加入不同量的所述溶液,使得从步骤(ii)获得的每个组织匀浆物样品具有不同且已知浓度的所述标准分子。优选地,稀释范围包含2至10个稀释点。

[0023] 有利的是,在调制步骤(iii)之前提供均质化步骤,以便获得标准分子在组织匀浆物样品中的均匀分布。可以例如使用混合器例如涡旋混合器来完成该均质化步骤。

[0024] 在实施方式中,连续地执行步骤(i)、(ii)和视情况而定的均质化步骤;显然,可以同时地进行所有或部分这些步骤。例如,使用含有标准分子的溶液对组织进行研磨。

[0025] 调制步骤(iii)由以下构成:对组织匀浆物样品进行处理和/或塑形以使其可以被切割,以便获得所述匀浆物的至少一个切片。

[0026] 例如,调制包括将组织匀浆物样品冷冻的步骤。为此,将组织匀浆物样品例如置于任何形状的模具中,然后通过任何适合的技术将整体冷冻。例如,将所述模具浸没在液氮中以便引起所有物质的即时冷冻,然后保持在-18°C直至切割步骤。

[0027] 在另一个实例中,调制步骤由将所述组织匀浆物样品包被在尤其是石蜡、树脂或胶质中构成。包被应该被理解为是指完全包围组织匀浆物样品的覆盖物。包被步骤尤其可以通过使用模具来进行。

[0028] 显然,冷冻步骤之后可以是包被步骤。

[0029] 调制的选择尤其可以取决于组织匀浆物样品的状态。例如,如果从步骤(ii)获得的组织匀浆物是液体,选择将组织匀浆物样品冷冻以允许随后的切割将是有利的。在匀浆物由粗研磨组织或密实糊状物构成的情形中,在石蜡等中包被可能足以允许它被切割。

[0030] 在一种实施方式中,可以使用同一模具调制同一标准范围的所有或部分组织匀浆物样品。在这种情形中,模具包含不同小室,以允许不同样品之间的物理分隔。有利情况下,划定小室的隔板是可移除的和/或由可以在与组织匀浆物样品相同的条件下切割的材料制成。因此,可以从模具的内含物产生切片,所述内含物各自包含将要产生稀释范围的连续的组织匀浆物样品。优选地,以连续增加(或降低)的浓度将组织匀浆物样品布置在连续的小室中。

[0031] 在调制后,可以在模具中或从模具剥离出,将组织匀浆物样品无优选性地维持在调制条件例如冷冻条件下,或者保留在确保它们的完整性得以维持的条件下(例如在约+5℃的温度下),直至将它们切割和/或用于分析步骤(v)中。

[0032] 有利情况下,从步骤(iii)获得的组织匀浆物样品表现出与相应的完整组织相一致的密度。类似地,有利情况下,从步骤(iii)获得的组织匀浆物样品表现出与相应的完整组织相一致的组织消光系数(TEC)。

[0033] “密度”应该被理解为是指组织或组织匀浆物样品的单位体积质量。

[0034] “完整组织”应该被理解为是指与用于产生组织匀浆物样品的组织相一致的组织,其保留所述组织的固有品质/性质。

[0035] 分析步骤(v)在之前从调制过的匀浆物样品产生的组织匀浆物样品的切片上进行。允许对组织切片进行分子分析的任何技术可用于步骤(v),例如质谱术、经荧光分析、放射自显影术等。

[0036] 一般来说,切片被理解是(重构或完整的)组织的切片。此外,可以使用与分子分析以及尤其是定量分子分析例如分光光度计或显微镜中的定量分子分析相容的所有切片维度。有利情况下,切片具有2μm至50μm的厚度,尤其是约20μm。厚度被理解为是与切片平面成直角延伸的维度。

[0037] 根据本发明方法的实施方式的实例,在分析步骤之前可以对切片进行处理。例如,可以对从以前冷冻或包被的组织匀浆物样品获得的切片进行干燥。在从以前冷冻的组织匀浆物样品获得切片的情形中,可以对所述切片进行低温干燥。例如,在分析步骤之前将切片在-18℃下放置过夜。

[0038] 组织切片可以从仍然冷冻的组织匀浆物样品或解冻后的所述样品产生。为了产生给定的稀释范围,有利的是对所有组织匀浆物样品使用相同的调制和可能的后续处理。优选地,用于产生给定的标准范围的所有切片具有基本上一致的厚度。

[0039] 有利情况下,将组织匀浆物样品的切片置于支持物例如载片上,这允许将它们导入分光光度计、显微镜等中。优选地,对于将要进行的分析来说,用于产生给定的标准范围的所有切片被布置在一致的支持物上。

[0040] 一般来说,将相同的分析条件有利地应用于同一稀释范围的所有组织匀浆物样品。分析条件应该被理解为尤其是指施加于用于分析的装置的设置和参数,以及样品制备条件,例如可能的洗涤步骤、在通过分光光度法分析的情形中基质的沉积等。

[0041] 在为一系列组织匀浆物样品的每个切片获得代表分子的量的信号之后,可以产生代表稀释范围的校准曲线。

[0042] 例如,在通过质谱术进行分析的情形中,为所有稀释点选择与靶分子的质谱相关的同一个信号,来绘制校准曲线。信号尤其可以是所述质谱的峰强度、峰面积或信噪比。

[0043] 在通过放射自显影术进行分析的情形中,使用由例如用碳14放射性标记的标准分子发出的放射活性的强度。在通过荧光进行分析的情形中,使用由荧光分子标记的标准分子的光发射强度。

[0044] 在本发明方法的一种实施方式中,同时产生至少两个不同的标准范围。

[0045] 例如,在步骤(ii)中向每个组织匀浆物样品添加至少两种不同的标准分子,对每种标准分子进行步骤(v)的分析,以便为每种浓度获得代表组织中每种标准分子的标准分

子的量的信号。

[0046] 向给定的组织匀浆物样品添加给定浓度的每种标准分子,所述浓度可以与所述组织匀浆物样品中的另一种分子的浓度不同。

[0047] 本发明的稀释范围可用于计算在给定的置信度水平下,组织中可以检测到的标准分子的最小量或LOD(检测限)。为此,在稀释范围内鉴定可以在检测限内检测到的最小信号,即表现出大于或等于3的信噪比值的最小信号。

[0048] 类似地,标准范围可用于计算在给定的置信度水平下,组织中可以定量标准分子的最小量或LOQ(定量限)。该(信噪比)值在国际水平上被固定为必须等于LOD值的三倍($LOQ=3LOD$)并且至少等于10。

[0049] 本发明的稀释范围也可用于评估切片厚度和/或基质性质和/或所述基质的沉积方式对分子的检测和/或定量的影响。因此可以根据组织和/或分子确定最佳的切片厚度和/或最适合的基质。

[0050] 按照本发明方法获得的稀释范围也可用于在组织的分析中定量所述组织中的靶分子。

[0051] 因此,本发明的主题是重构组织中标准分子的稀释范围在定量与所述稀释范围的重构组织相一致的目标组织中的靶分子中的应用。

[0052] 类似地,本发明的主题是用于检测和定量至少一种目标组织中的至少一种靶分子的方法,所述方法包括下列步骤:

[0053] a)分析目标组织的切片,以便获得代表所述切片中靶分子的量的信号;

[0054] b)使用与目标组织相一致的重构组织中标准分子的稀释范围,来确定所述组织中靶分子的量。

[0055] 可以通过使用与目标组织相一致的组织产生组织匀浆物,按照上面描述的步骤(i)至(v)来获得所使用的稀释范围。

[0056] 组织被理解为是至少一种生物组织(植物或动物)的至少一部分。

[0057] 在一种实施方式中,可以对包含生物体内的许多组织、尤其是许多相邻组织的组织样品中的至少一种靶分子进行定量。例如,组织样品切片可以由完整动物的切片或动物的一部分(包括至少一种器官或至少一个器官部分)的切片构成。尤其是,对完整动物的切片进行的分析,可以使得能够在同一样品上比较一种或多种靶分子在所述动物的不同组织中的分布。在这种情形中,为了确定组织样品的每种组织中给定靶分子的量,使用对所考虑的组织来说特异性的所述靶分子的稀释范围。

[0058] 分析靶分子的步骤a)可以通过任何分析方法来进行,例如质谱术以及尤其是通过使用直接质谱术(MS)或串联质谱术(MS^n 、MRM、SRM)、经荧光分析、放射自显影术等。

[0059] 本发明的方法可以有利地与质谱术一起使用。在这种情形中,可以使用不同的电离源MALDI(基质辅助激光解吸电离)、LDI(激光解吸电离)、LESA(液体提取表面分析)、LAESI(激光消融电喷雾电离)、DESI(电喷雾解吸电离)、NanoDESI等,以及不同类型的分析仪TOF(飞行时间)、Orbitrap、FTICR(傅里叶变换离子回旋共振)等。这种成像技术使得能够在为组织样品获得的对应于靶分子在所述组织样品中的空间分布的离子密度图上直接定量靶分子。事实上,可以将所述离子密度图上获得的信号转变成相应的稀释范围。

[0060] 某些质谱技术例如MALDI或ME-SIMS要求将待分析的组织样品的切片首先用包含

在UV中有吸收的有机小分子的基质进行覆盖。这种基质允许样品上存在的分子的解吸和电离。

[0061] 不论所选择的基质如何,都可使用本发明的方法。这些基质采取固体形式(在样品上结晶)或液体形式,被称为是离子性或非离子性的。基质的选择根据待分析的物质系列来进行。它们往往在溶剂-水性溶液混合物中即时制备。

[0062] 可以使用数种基质沉积方法,尤其是使用移液器手动沉积,这使得可以将准确体积的基质直接沉积在组织上。也可以通过喷雾或气化来沉积基质,使用机器人或人工将基质直接喷雾或气化在组织样品上。类似地,可以设想通过微滴进行沉积,由此通过压电、声学或注射泵系统将基质以斑点形式施加到组织样品。还可以通过筛网来沉积基质,以便沉积固体形式的基质。

[0063] 有利情况下,对实验参数例如质量范围和/或激光强度进行设置,以便在强度、灵敏度和分辨率方面优化靶分子的检测。

[0064] 下一个步骤是获取道标所述切片中靶分子的量的信号。

[0065] 在分析由获取质谱构成的情形中,可以使用不同的光谱特征,例如步骤b)中的信号,尤其是质谱的峰强度、信噪比(S/N)、峰面积等。显然,用于定量靶分子的光谱特征与用于制备标准范围的光谱特征相同。并且,更通常地,被考虑用于定量靶分子的信号特征与用于制备标准范围的信号特征相同。

[0066] 此外,在某些情况下,可以根据通过所述技术确定的归一化因子对一种或多种光谱特征进行归一化。

[0067] 例如,在本发明的方法使用MALDI类型的质谱成像的情形中,提供了评估基质在样品上沉积的均匀性的步骤。在实践中,与所使用的基质相对应的信号可以提供关于所述基质的沉积的质量/均匀性的信息。然后将样品表面上的基质缺陷与所考虑的样品中未检测到来自于靶分子的信号或该信号的强度损失相关联。

[0068] 可以按照定性判据,通过使用光学显微镜观察在样品表面上沉积的均匀性,和/或按照定量判据,通过追踪样品上信号相对于基质本身的变差,来进行基质均匀性的评估。

[0069] 对于定性判据来说,必需确保基质尽可能均匀地沉积在所考虑的表面上,以致没有不含基质的区域并且它的结晶是最佳的。

[0070] 为了定量评估基质沉积的均匀性,基质被认为是在样品分析时,将其信号与来自于靶分子的信号相同的方式进行检测的特定分子。然后将来自于基质分子的信号与其参比信号进行比较。在这种情形中,基质的参比信号对应于在参比基质沉积物上、也就是说在样品上和特异性用于测定基质的参比信号的分析支持物上,由基质发出的信号。

[0071] 通过这些附加步骤来验证来自于靶分子的信号并将所述信号进行归一化,以将可能影响所述信号的光谱特征的基质沉积的质量变差考虑在内。

[0072] 在希望追踪靶分子的存在随时间、能够在不同样品之间变化的基质沉积的质量而变化的趋势的情形中,这种将基质效应包含在内的做法可能是特别有利的。

[0073] 可以使用与靶分子相一致的标准分子来产生所使用的标准范围。也可以使用与靶分子不同并具有相似的物理化学性质的标准分子。还可以使用同位素标记的靶分子作为制备稀释范围的标准分子。

[0074] 取决于所使用的分析方法,靶分子可以被标记。例如,在荧光分析的情形中,用荧

光分子标记靶分子。类似地,在通过放射自显影术进行分析的情形中,靶分子被放射性标记。

[0075] 本发明的方法可用于分析所有类型的分子,例如肽、多肽、蛋白质、氨基酸、核酸、脂类、代谢物等,并且总的来说用于分析任何药理学活性分子或其他活性分子,尤其是在通过质谱术进行分析的情形中,用于分析任何可以被离子化的分子。

[0076] 在靶分子是高分子量蛋白质的情形中,可以对靶分子进行酶解预处理,以便将其分裂成许多肽。然后对从所述酶解消化获得的代表所述蛋白质的至少一种肽进行检测和定量。例如,可以使用胰蛋白酶,以便将靶蛋白分裂成许多以前鉴定过的肽。

[0077] 类似地,可以在检测步骤之前用至少一种溶剂和/或至少一种去污剂处理待分析的组织,以便消除造成背景噪音的分子。例如,在氯仿中洗涤使得可以去除某些类型的脂类。在乙醇中洗涤,就其本身而言,允许更好地检测低质量分子。有利情况下,这两种洗涤使得可以去除某些分子、尤其是脂质分子,从而有利于直接在组织样品上检测新的离子。

[0078] 本发明的方法也可用于同时或不同时地对同一组织和/或包含许多组织的同一组织样品上的至少两种不同的靶分子进行定量。于是使用不同的稀释范围,每种稀释范围对所考虑的靶分子和所考虑的组织而言是特异性的。

[0079] 类似地,通过用质谱术进行分析,可以在不同组织或包含许多组织的组织样品上同时检测和定量同一靶分子。在这样的情形中,对于每种样品组织例如完整动物切片中的器官来说,使用在相应组织/器官中为所述靶分子产生的稀释范围。

[0080] 本发明还提出了用于从组织切片检测和/或定量所述组织中的至少一种靶分子的方法的验证方法,所述验证方法包括下列步骤:

[0081] (x)对与必须应用检测和/或定量方法的组织相一致的组织进行研磨,以获得组织匀浆物;

[0082] (xi)将标准分子与来自于步骤(x)的至少两个组织匀浆物样品混合,对于所述至少两个组织匀浆物样品来说,所述标准分子具有相同的已知浓度;

[0083] (xii)调制从步骤(xi)获得的组织匀浆物样品,以便能够对所述调制过的组织匀浆物样品进行切片;

[0084] (xiii)分析从步骤(xii)获得的每个调制过的组织匀浆物样品的至少一个切片,以便为每个切片获得代表所述标准分子的信号;

[0085] (xiv)将为每个切片获得的信号进行相互比较。

[0086] 这样的方法使得能够尤其是在检测和/或定量方法的上游,检查给定的重构组织、也就是说调制过的组织匀浆物是否代表相应的完整组织。这种方法使得能够尤其是利用LOD来评估本发明的检测和/或定量方法对给定分子和给定样品的灵敏度。

[0087] 有利情况下,在至少三个组织匀浆物样品上进行步骤(xi)。

[0088] 有利情况下,步骤(xiv)中进行的信号比较使得可以通过计算以小数值和百分率给出的相对标准偏差RSD来评估给定组织中给定分子的检测和/或定量的可重复性。

[0089] 显然,如上为制备稀释范围所解释的产生组织匀浆物、调制、制备标准分子、分析等的的所有具体方式,如组织和/或标准分子的性质,均可以适用于验证方法的实施。

[0090] 本发明还提出了从目标组织的切片检测和/或定量所述组织中的至少一种靶分子的方法的质量和/或可重复性的控制方法,所述控制方法包括下列步骤:

- [0091] (xx)对与所述目标组织相一致的组织进行研磨,以获得组织匀浆物;
- [0092] (xxi)将已知浓度的标准分子与来自于步骤(xx)的组织匀浆物样品混合;
- [0093] (xxii)调制从步骤(xxi)获得的组织匀浆物样品,以便能够对所述调制过的组织匀浆物样品进行切片;
- [0094] (xxiii)对于待分析的目标组织的每个切片,对来自于步骤(xxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片同时进行分析,以便每次获得代表来自于步骤(xxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片中的标准分子的信号和代表所述目标组织中的靶分子的信号;
- [0095] (xxiv)比较为来自于步骤(xxii)的调制过的组织匀浆物样品的每个切片获得的信号。
- [0096] 因此,根据本发明,含有一种或多种化合物的掺杂组织(尤其是器官、血液、血浆、血清、尿液、植物组织等)的切片,可用作在检测和/或定量研究的情形中执行的每种分析的质量对照,和/或用于监测分析仪器的性能。
- [0097] 目标组织应该被理解为是即将进行检测和/或定量的组织。
- [0098] 有利情况下,步骤(xxiii)通过将待分析的目标组织切片和掺杂/调制的组织匀浆物样品的切片沉积在同一个支持物上,尤其是在同一个载片上来进行。因此,相同的支持物制备条件(例如所使用的基质、基质的沉积质量)和分析条件适用于两个切片。
- [0099] 可以例如使用相应的加权平均值对步骤(xxiv)中获得的信号的变差进行归一化,以将参数例如基质效应的变差考虑在内。
- [0100] 这样的方法可用于例如通过将来自于一个切片与来自于另一个切片的信号进行简单比较来进行分子的相对定量,用于及时监测分子的生物可利用性趋势等。
- [0101] 因此,本发明的另一个目的是提出用于对目标组织中的至少一种靶分子进行相对定量的方法,所述方法包括下列步骤:
- [0102] (xxx)对与所述目标组织相一致的组织进行研磨,以获得组织匀浆物;
- [0103] (xxxi)将已知浓度的标准分子与来自于步骤(xxx)的组织匀浆物样品混合;
- [0104] (xxxii)对从步骤(xxxi)获得的组织匀浆物样品进行调制,以便能够对所述调制过的组织匀浆物样品进行切片;
- [0105] (xxxiii)对于待分析的目标组织的每个切片,对来自于步骤(xxxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片同时进行分析,以便每次获得代表来自于步骤(xxxii)的调制过的组织匀浆物样品的切片中的标准分子的信号和代表所述目标组织中的靶分子的信号;
- [0106] (xxxiv)对于待分析的目标组织的每个切片,计算来自于所述目标组织中的靶分子的信号与来自于重构组织中的标准分子的信号的比率;
- [0107] (xxxv)比较为所述目标组织的每个切片获得的比率,以获得所述靶分子的相对定量。
- [0108] 显然,如上为制备稀释范围制备所解释的产生组织匀浆物、调制、制备标准分子、分析等的所有具体方式,如组织和/或标准分子的性质,均可以适用于实施本发明的控制质量和/或可重复性的方法、相对或绝对定量方法以及本发明的用于评估组织中可以检测到的和/或组织中可以被定量的靶分子的最小量的方法。
- [0109] 根据本发明,出于定量的目的,可以利用合并有所有或部分这些因素的计算机程序来进行源数据的归一化,即,来自于组织中靶分子的信号与来自于一致的重构组织中

标准分子的稀释范围的相应浓度之间的关联性。

[0110] 有利情况下,在通过质谱术进行成像的情形中,在处理图像时,该计算机程序或数据重新处理软件可以通过基质效应或通过标准品(同位素或非同位素的)对这些值进行加权。

[0111] 有利情况下,本发明的计算机程序可以将目标组织上靶分子的强度与重构组织上标准分子的强度进行比较以便获得比率,使得能够通过比较为它们各自获得的比率,来进行不同组织之间目标化合物的相对定量。

[0112] 因此,本发明的另一个主题是一种计算机可读数据介质,其包含能够被计算机执行的指令,例如读取从质谱术分析获得的原始数据,和/或确定校准曲线,和/或通过后者对所述原始数据进行归一化以便获得靶分子的定量值。有利情况下,这些能够被计算机执行的指令适合于使计算机系统至少执行本发明的定量方法的步骤b)和/或用于控制检测/定量方法的质量/可重复性的方法的步骤(xxiv),以及视情况而定使用步骤(xxiv)的结果进行的加权步骤,如本发明的相对定量方法的步骤(xxxiv)和/或步骤(xxxv)。

[0113] 有利情况下,数据介质包含至少两种不同组织中至少一种靶分子的至少一个标准范围。优选地,在生物样品例如完整动物的切片的情形中,数据库包含所述样品的不同组织中至少一种靶分子的稀释范围。

[0114] 数据介质还可以包含质谱成像中使用的至少一种基质的参比信号的数据库。因此,当通过成像执行数据介质来分析样品时,可以将基质效应考虑在内。

附图说明

[0115] 图1A和1B.具有多个区室的模具的实施方式的示意图(图1A),所述模具可以在执行本发明的制备稀释范围的方法时使用,每个区室能够接收掺杂有特定浓度的标准分子的组织匀浆物样品;以及调制过并在模具中冷冻后从模具剥离出的组织匀浆物样品的示意图(图1B),每个组织匀浆物样品通过隔板与相邻的样品隔开。

[0116] 图2:按照本发明的制备方法获得的组织(肾)中标准分子(普萘洛尔)的校准曲线,其代表普萘洛尔的浓度($\mu\text{g/g}$ -x轴)随质谱术中由普萘洛尔发出的强度(y轴)的变化。

[0117] 图3:一条加权的直线,其示出了使用重构并掺杂有同一浓度的普萘洛尔的肾组织类型的质量对照测量到的MSI的分析可变性。

实施例

[0118] 设备和方法

[0119] 设备

[0120] 使用来自于Sigma-Aldrich的普萘洛尔来产生 $1 \cdot 10^{-10} \text{ mol}/\mu\text{l}$ 的普萘洛尔溶液。

[0121] 精确量取6份不同子体积的该溶液,将其各自添加到组织匀浆物样品中,以便在样品中获得0、2.8、5.6、11.2、22.4和44.8 $\mu\text{g/g}$ 的浓度(表1)。

[0122] 组织匀浆物样品

[0123] 使用来自于Charles River(法国)的体重为25-40g的雄性Swiss类型的小鼠。

[0124] 为了制备稀释范围,从对照小鼠(也就是说没有经历任何特定治疗)取出两个肾脏。使用解剖刀将两个肾脏在事先灭菌并置于冰上的容器中进行机械研磨。在获得肾脏匀

浆物后,将所述匀浆物大致分配在6个1.5ml管中,并对6个组织匀浆物样品中的每个进行称重(表1)。

[0125] 向每个组织匀浆物样品加入特定子体积的普萘洛尔溶液之一。

[0126] 下面的表1给出了6个肾脏匀浆物样品中的所有具体数据。

[0127] 表1:制备用于产生代表肾脏中的普萘洛尔的稀释范围的肾脏匀浆物样品。

[0128]

肾脏匀浆物样品的编号	匀浆物重量(g)	每个样品添加的 1.10^{-10} mol/ μ l 普萘洛尔溶液的普萘洛尔体积(μ l)	样品中普萘洛尔的终浓度(μ g/g)
1	0.7	61.7	2.8
2	0.4	66.4	5.6
3	0.7	246.8	11.2
4	0.4	265.8	22.4
5	0.4	637.8	44.8
6	0.5	0.0	0.0

[0129] 重构组织的制备

[0130] 将含有肾脏匀浆物样品的每个管在室温下涡旋振荡1小时,以使普萘洛尔均匀分布在所述样品中。

[0131] 使用如图1A中所示的铝制模具100,其提供有7块横隔板101,以形成在所述模具的较大维度上连续延伸的6个区室102(在图1A的模具中仅形成3个区室)。将模具置于液氮中,以便快速冷冻肾脏匀浆物。然后将模具在 -80°C 下放置1小时。

[0132] 然后将重构或调制过的组织块200(也就是说冷冻的肾脏匀浆物样品)从模具中剥离出(图1B)。使用冷却至 -22°C 的低温槽将重构的组织201切成 $20\mu\text{m}$ 厚度的切片。根据需要,在同一切片上,一系列的所有组织201通过隔板101保持彼此隔开,或者将对应于所需的重构组织的部分与切片的其余部分分开。

[0133] 实施例1:“重构组织”模型的验证

[0134] 在本实施例中,目的是证实由已被冷冻的组织匀浆物形成的重构组织形成代表相应的完整组织的模型。

[0135] 为此,测量并比较了本发明的重构肾脏和完整肾脏的密度和分子消光系数(TEC)。

[0136] 将6号重构组织(对照,表1)的10个切片分开并各自放置在支持物(载片IT02)上。

[0137] 从另一只对照小鼠获取的保持在室温下的完整肾脏也产生10个 $20\mu\text{m}$ 的组织切片。将每个切片布置在支持物(载片IT03)上。

[0138] 在HP Scanjet G4010扫描仪中以2400dpi对支持物进行同时扫描,并将图像以jpeg格式储存。

[0139] 然后如下面表2中所解释的,计算重构肾脏切片和完整肾脏切片的平均密度。更具体来说,根据为对照重构组织的10个切片中的每个切片获得的值,计算重构肾脏的表面积、高度、体积和重量的平均值。类似地,根据为10个相应切片中的每个切片获得的值,计算完

整肾脏的表面积、高度、体积和重量的平均值。

[0140] 发现两种组织的密度是基本上一致的,因为它们的差异仅为 $0.04\text{mg}/\text{mm}^3$ (表2)。

[0141] 为了计算重构组织和完整组织的TEC,使用自动化系统(SunCollect)将含有 10pmol 普萘洛尔的MALDI DHB基质($40\text{mg}/\text{ml}$ 甲醇/TFA $0.1\%/1$)喷雾到用于计算密度的两批10个载片IT02和IT03上。

[0142] 然后使用Autoflex speed LRF(Bruker,Daltonics)通过MALDI成像对每个组织切片进行分析。

[0143] 对组织切片和支持物上每批切片的普萘洛尔($m/z260.2$)强度进行平均。

[0144] 然后可以使用分别由载片上和组织上的普萘洛尔发出的信号强度的值,按照下面的数学公式计算TEC:

$$[0145] \quad TEC = \frac{Int(\text{载片}) \times}{Int(\text{组织}) \times}$$

[0146] 如表2中所示,发现为重构肾脏和完整肾脏获得的TEC的平均值是一致的。

[0147] 因此,重构肾脏具有与完整肾脏相同的密度和相同的组织消光系数。

[0148] 表2:重构肾脏和完整肾脏中密度和TEC的比较。

	重构肾脏切片	完整肾脏切片
像素	121637	229374.2
表面积 (mm^2)	12.1637	22.93742
高度 (mm)	0.02	0.02
体积 (mm^3)	0.243274	0.4587484
重量 (mg) /切片	0.17	0.305
密度 (mg/mm^3)	0.7	0.66
TEC	1.9361	1.922125
标准偏差	0.162580886	0.408923827
TEC 误差%	8.4	21.3

[0150] 因此,在重构肾脏和完整肾脏中,普萘洛尔表现一致。因此,使用重构组织制备本发明的分子的稀释范围,随后可以可靠地定量相应完整组织中的所述分子。

[0151] 实施例2:用于肾脏的普萘洛尔稀释范围的制备

[0152] 将包含连续的肾脏匀浆物样品并因此具有6种连续的普萘洛尔浓度(以表1中示出的顺序)的切片,放置的支持物(载片IT01)上。

[0153] 使用自动化系统(SunCollect)将MALDI DHB基质($40\text{mg}/\text{ml}$ 甲醇/TFA $0.1\%/1$)喷雾到组织切片上。

[0154] 然后使用Autoflex speed LRF(Bruker,Daltonics),通过质谱成像对代表肾脏匀浆物样品的切片的每个部分进行分析。

[0155] 然后为每个组织匀浆物样品,在通过质谱术获得的图像上划分出许多相等尺寸的

目标区域(ROI)。

[0156] 选择质谱的峰强度用作参比信号。为每个组织匀浆物样品的每个ROI取得普萘洛尔的质谱的峰强度。此外,对于每个组织匀浆物样品,从为所有相应ROI获得的强度计算平均强度(平均ROI)。

[0157] 表3中列出了对于稀释范围的每个点,也就是说对于每个组织匀浆物样品,普萘洛尔的质谱的峰的平均强度。

[0158] 表3:通过MALDI成像为重构肾脏中普萘洛尔(m/z260.2)的稀释范围的每个点获得的平均强度

[0159]	肾脏匀浆物样品的编号	重构组织中普萘洛尔的终浓度 ($\mu\text{g/g}$)	强度
	1	2.8	9273.9
	2	5.6	18223.0
	3	11.2	37269.0
	4	22.4	74191.0
	5	44.8	145396.6
	6	0.0	500.3

[0160] 然后可以绘出校准曲线。该校准曲线随后可用于定量肾脏中的普萘洛尔的方法。将为所分析的肾脏中的普萘洛尔获得的质谱的峰强度与所述校准曲线上的浓度相关联,就已足够。

[0161] 例如,绘制校准曲线,其代表组织中普萘洛尔的浓度($\mu\text{g/g}$)随质谱的峰强度的变化(图2)。使用图形重加工软件例如excel,以 $y=ax+b$ 的格式计算稀释范围的所有点或点云(cloud of points)的趋势曲线的方程。

[0162] 在所描述的实施例中,趋势曲线的方程为 $y=3244.7x+534.92$ 。该方程随后允许对分子进行定量。

[0163] 类似地,计算决定系数(在这里 $R^2=0.9999$),其是使得能够判断线性、单次或多次回归的质量的指标。该系数越接近1,趋势曲线变得越线性。

[0164] 实施例3:对处理过的小鼠肾脏中的普萘洛尔进行定量

[0165] 获取用7.5mg/kg普萘洛尔处理并在给药后20分钟处死的小鼠的肾脏。

[0166] 从所述肾脏产生3个20 μm 厚的组织切片,并将它们各自沉积在支持物(载片ITO)上。

[0167] 使用自动化系统(SunCollect),将MALDI DHB基质(40mg/ml甲醇/TFA0.1%/1)喷雾到切片上。

[0168] 使用Autoflex speed LRF(Bruker,Daltonics),通过质谱成像来分析每个切片。再次使用每个切片上尺寸全都相同的许多ROI,计算普萘洛尔(m/z260.2)的质谱的峰的平均强度。

[0169] 获得的平均强度值是19633.3。

[0170] 使用校准曲线方程(图2),通过将获得的平均强度值包含在所述直线上,对肾脏中的普萘洛尔浓度进行定量。在这里,普萘洛尔的浓度为5.9 μ g/g组织。

[0171] 实施例4:肾脏中普萘洛尔的检测限的评估

[0172] 在这种用法的情形中,使用重构组织中一种或多种目标分子的稀释范围或稀释点,以便评估使用所选择的分析方法对一种或多种分子进行的检测。

[0173] 在本实施例中,从9种不同精确子体积的普萘洛尔溶液产生稀释范围,将所述溶液各自添加到肾脏匀浆物样品中,以便在样品中获得0、0.3、0.7、1.4、2.8、5.6、11.2、22.4和44.8 μ g/g的浓度。

[0174] 将包含连续的肾脏匀浆物样品并因此具有9种连续的普萘洛尔浓度(以表4中示出的顺序)的切片,放置在支持物(载片ITO)上。

[0175] 在通过MALDI-TOF成像分析载片的情形中,可以利用本发明来精细调节将要在初步阶段进行分析的组织的制备流程。在实践中,可以使用制备的系列并进行大量制备试验,以评估例如切片厚度或甚至基质和/或其沉积方法的选择对获得的信号的影响。

[0176] 在本实施例中,最佳厚度被设定为20 μ m,最有效的MALDI基质是40mg/ml 甲醇/TFA0.1%1/1下的DHB。

[0177] 然后使用Autoflex speed LRF(Bruker,Daltonics),通过质谱成像或通过直接分析对代表肾脏匀浆物样品的切片的每个部分进行分析。

[0178] 在以成像模式获取的情形中,为每个组织匀浆物样品,在通过质谱术获得的图像上划分出许多相等尺寸的目标区域(ROI)。

[0179] 在以直接分析模式获取的情形中,获得代表系列中的每个点的平均谱。

[0180] 选择质谱的峰强度用作参比信号。为每个组织匀浆物样品取得普萘洛尔的质谱的峰强度。因此,也为每个组织匀浆物样品获得平均强度。

[0181] 表4中列出了对于稀释范围的每个点,也就是说对于每个组织匀浆物样品,普萘洛尔的质谱的峰的平均强度。

[0182] 表4:通过MALDI成像为重构肾脏中普萘洛尔(m/z260.2)的稀释范围的每个点获得的平均强度

[0183]	肾脏匀浆物样 品的编号	重构组织中普萘洛尔的终浓度 ($\mu\text{g/g}$)	强度
	1	0.0	500.3
	2	0.3	520.6
	3	0.7	2806.2
	4	1.4	5077.5
	5	2.8	9273.9
	6	5.6	18223.0
	7	11.2	37269.0
	8	22.4	74191.0
	9	44.8	145396.6

[0184] 然后可以评估化合物在所选介质中的检测限,其在这里是 $0.7\mu\text{g/g}$ 。在本实施例中,该检测限被设定为以大于3的信噪比检测到化合物时的最低浓度。注意,也可以确定定量限。

[0185] 此外,如果必须对处理过的组织中的化合物进行定量,在本实施例中可以评估到所述分析方法在3个log范围内是线性的。

[0186] 更广义来说,本发明使得能够在制备体内测试系统之前评估许多参数,例如:

[0187] -组织切片的厚度

[0188] -最适合于化合物的解吸和电离的MALDI基质

[0189] -基质沉积方法

[0190] -参比介质中一种或多种化合物的检测限和定量限

[0191] -为了执行一种或多种化合物的定量,分析方法的线性范围,等等。

[0192] 实施例5: MALDI质谱成像分析的质量和可重复性的控制

[0193] 在本实施例中,目的是评估MALDI成像分析的质量和可重复性。

[0194] 将包含已知浓度的普萘洛尔($5.6\mu\text{g/g}$)的肾脏匀浆物的切片沉积在同一支持物(载片ITO)上作为目标样品。注意,在将要评估可重复性的所有分析的情形中,均使用这种重构的肾脏匀浆物。

[0195] 在使用相同制备方法和相同分析方法进行的目标样品的每个分析期间,在MALDI成像中同时对质量对照的切片进行分析。

[0196] 由此为每个分析获得普萘洛尔的平均强度值,并因此可以监测分析的可重复性。因此,在对目标组织进行10次分析的情形中,添加掺杂有 $5.6\mu\text{g/g}$ 普萘洛尔的重构肾脏的切片。图3示出了在同一研究中,在10次连续分析的情形中获得的可变性。

[0197] 因此,可以监测实验可变性,或者甚至可以将为每个分析获得的值相对于该质量对照进行归一化,以便在不同分析之间对目标化合物进行相对定量。

[0198] 也可以判断组织制备(更具体来说,MALDI基质的沉积)质量和所使用的仪器的分

析性能水平的质量。注意,可以根据这些质量对照的结果来确定维护。

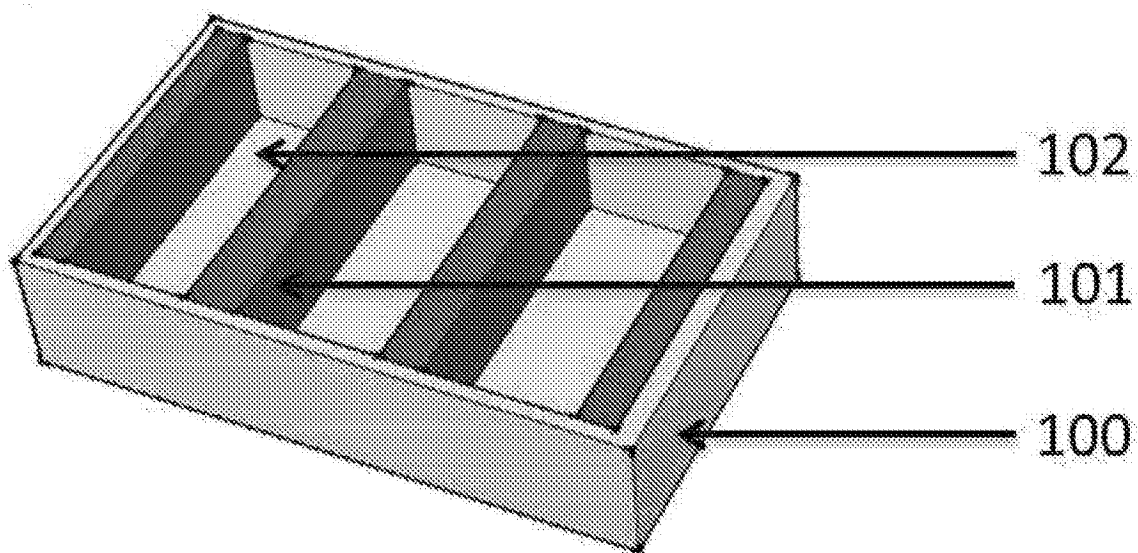


图1A

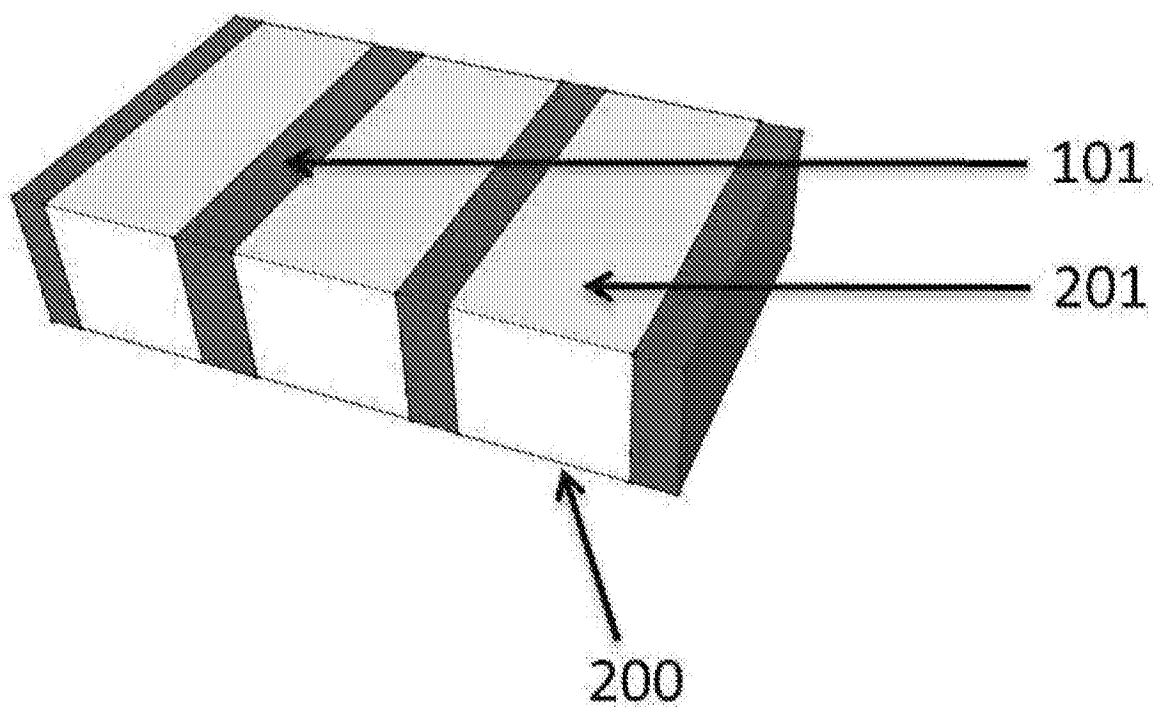


图1B

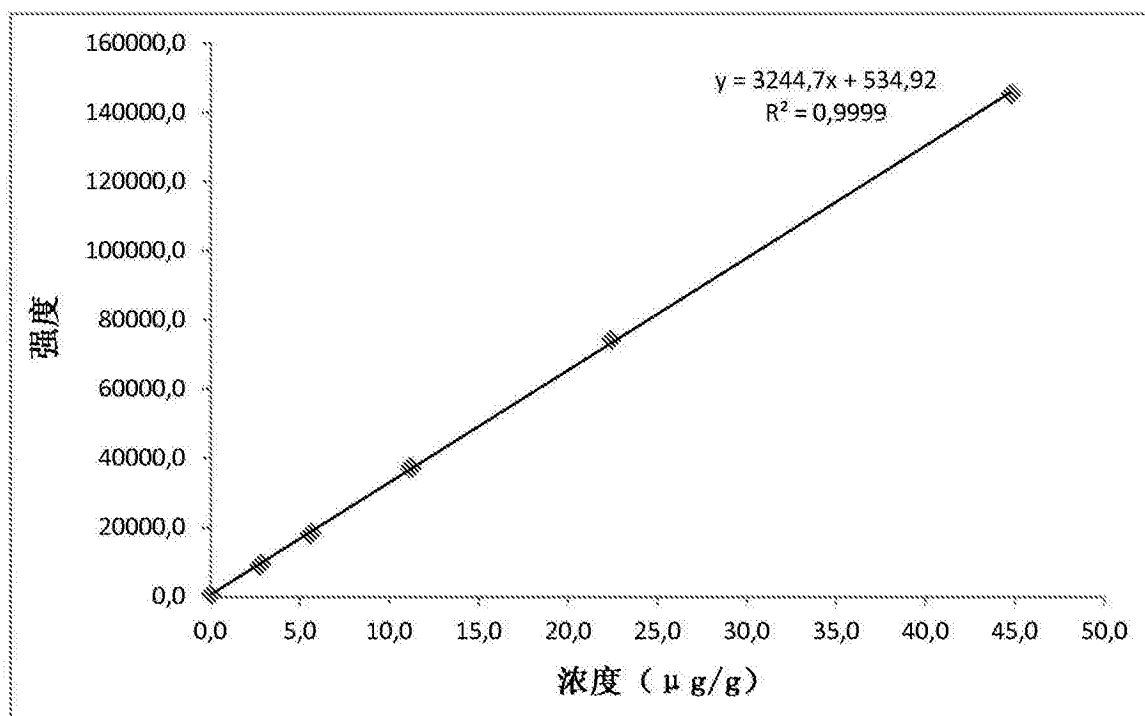


图2

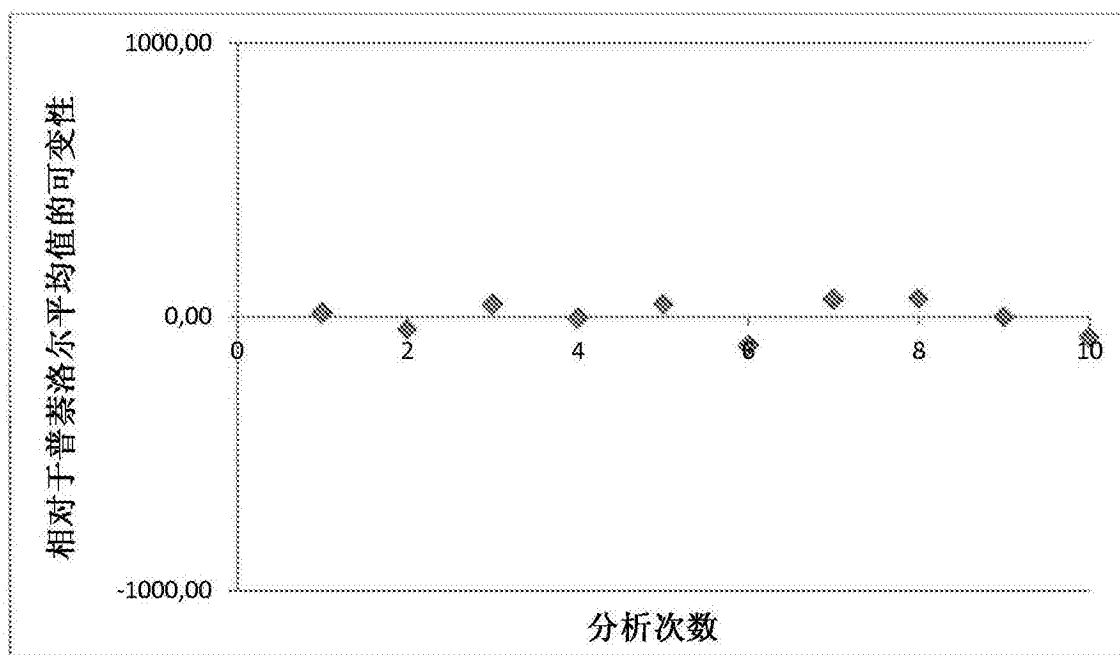


图3