(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117813395 A
(43)申请公布日 2024.04.02

(21)申请号 202280038532.7
(22)申请日 2022.05.27
(30)优先权数据
63/194,536 2021.05.28 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.11.28
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/031275 2022.05.27
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/251586 EN 2022.12.01
(71)申请人 布罗德研究所股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州
申请人 麻省理工学院
(72)发明人 王潇 H·曾 J·任
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 涂滔
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6841(2006.01)

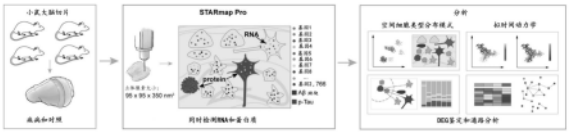
权利要求书14页 说明书48页 附图128页

(54)发明名称

转录状态和蛋白质组织学的联合绘图

(57)摘要

本公开提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱(即,同时绘制同一细胞内基因和蛋白质表达图谱)的方法和系统。本公开还提供了用于诊断受试者的疾病或病症(例如,神经病症如阿尔茨海默病)的方法。本公开还提供了筛选能够调节基因和/或蛋白质表达的候选药剂的方法。本公开还提供了用于在有此需要的受试者中治疗疾病或病症如阿尔茨海默病的方法。本公开还描述了可用于执行本文所述的方法的多种寡核苷酸探针,以及包含本文所述的任何寡核苷酸探针的试剂盒。另外,本公开提供了用于鉴定至少一个图像中细胞类型的空间变化的方法、装置和非暂时性计算机可读存储介质。



CN 117813395 A

1.绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方法,所述方法包括:

a)使所述细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分、与所述第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中所述第二寡核苷酸探针的所述条形码序列与所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列互补;

b)将所述第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

c)使用所述第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增所述环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

d)使所述细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

e)将所述一种或多种串联的扩增子和所述一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

f)使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子与包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

g)对嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子和嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种检测剂进行成像以确定所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质在所述细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱。

2.权利要求1的方法,其中在多个细胞中分析基因和蛋白质表达。

3.权利要求2的方法,其中所述细胞包含多种细胞类型。

4.权利要求3的方法,其中所述细胞类型选自干细胞、祖细胞、神经元细胞、星形胶质细胞、树突细胞、内皮细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、肌肉细胞、心肌细胞、间充质细胞、上皮细胞、免疫细胞和肝细胞。

5.权利要求1-4中任一项的方法,其中所述细胞是透化细胞。

6.权利要求1-4中任一项的方法,其中细胞存在于完整组织内。

7.权利要求6的方法,其中所述完整组织是固定的组织样品。

8.权利要求1-7中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸是DNA。

9.权利要求1-8中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸是RNA。

10.权利要求9的方法,其中所述RNA是mRNA。

11.权利要求1-10中任一项的方法,其中绘制多于100个、多于200个、多于500个、多于1000个、多于2000个或多于3000个感兴趣的核酸的基因表达图谱。

12.权利要求1-11中任一项的方法,其中绘制最多达一百万个感兴趣核酸的基因表达图谱。

13.权利要求1-12中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针上的所述条形码序列的长度为5-15、6-14、7-13、8-12或9-11个核苷酸。

14.权利要求1-13中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针上的条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。

15.权利要求1-14中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针上的所述条形码序列的长度为10个核苷酸。

16.权利要求1-15中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针结合所述感兴趣的核酸的不同部分。

17.权利要求1-16中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针包含以下结构:

5'-[与第二探针互补的部分]-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[第一条形码序列]-[第二条形码序列]-3'。

18.权利要求1-17中任一项的方法,其中所述第二寡核苷酸探针包含以下结构:

5'-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[与第一探针互补的部分]-[条形码序列]-3'。

19.权利要求1-18中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列增加了所述感兴趣的核酸的检测的特异性。

20.权利要求1-19中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列减少非特异性扩增。

21.权利要求1-20中任一项的方法,其中所述第三寡核苷酸探针包含可检测标记。

22.权利要求21的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

23.权利要求1-22中任一项的方法,其中所述一种或多种检测剂是各自包含可检测标记的抗体。

24.权利要求1-22中任一项的方法,其进一步包括使所述一种或多种检测剂与第二检测剂接触。

25.权利要求1-24中任一项的方法,其中所述一种或多种检测剂包含小分子。

26.权利要求25的方法,其中所述小分子是X-34。

27.权利要求24的方法,其中所述第二检测剂是二抗。

28.权利要求27的方法,其中所述二抗包含可检测标记。

29.权利要求28的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

30.权利要求1-22中任一项的方法,其中所述一种或多种检测剂是各自缀合至寡核苷酸序列并且各自结合至感兴趣的蛋白质的抗体。

31.权利要求30的方法,其进一步包括使与感兴趣的蛋白质结合的所述一种或多种抗体中的每一种与缀合至可检测标记的寡核苷酸接触,其中所述缀合至可检测标记的寡核苷酸与缀合至所述一种或多种抗体的寡核苷酸序列互补。

32.权利要求31的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

33.权利要求1-32中任一项的方法,其中所述成像步骤包括荧光成像。

34.权利要求1-33中任一项的方法,其中所述成像步骤包括共焦显微镜检查或落射荧光显微镜检查。

35.权利要求24-34中任一项的方法,其中使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种检测剂中的每一种与第二检测剂接触的步骤在进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸的步骤之后进行。

36.权利要求1-35中任一项的方法,其中使所述细胞与一种或多种检测剂接触的步骤在包埋步骤之前进行。

37.权利要求1-36中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质的位置在同一轮成像中确定。

38.权利要求1-36中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质的

位置在单独的成像轮次中确定。

39.权利要求1-38中任一项的方法,其中所述聚合物基质是水凝胶。

40.权利要求1-39中任一项的方法,其中所述水凝胶是聚乙烯醇水凝胶、聚乙二醇水凝胶、聚丙烯酸钠水凝胶、丙烯酸酯聚合物水凝胶或聚丙烯酰胺水凝胶。

41.权利要求1-40中任一项的方法,其中进行滚环扩增的步骤进一步包括提供胺修饰的核苷酸,其中所述胺修饰的核苷酸被掺入到所述一种或多种串联的扩增子中。

42.权利要求1-41中任一项的方法,其中将所述一种或多种串联的扩增子嵌入所述聚合物基质中的步骤包括使所述一种或多种扩增子的所述胺修饰的核苷酸与丙烯酸N-羟基琥珀酰亚胺酯反应并使所述一种或多种串联的扩增子和所述聚合物基质共聚。

43.权利要求1-42中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列是用于鉴定所述感兴趣的核酸的基因特异性序列。

44.权利要求1-43中任一项的方法,其中所述方法以亚细胞分辨率进行。

45.权利要求1-44中任一项的方法,其中所述方法以200nm、150nm、100nm、50nm、40nm、30nm、20nm或10nm的亚细胞分辨率进行。

46.权利要求1-45中任一项的方法,其中所述方法以200nm的亚细胞分辨率进行。

47.绘制细胞中基因表达图谱的方法,所述方法包括:

a)使所述细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分、与所述第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中所述第二寡核苷酸探针的所述条形码序列与所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列互补;

b)将所述第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

c)使用所述第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增所述环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

d)将所述一种或多种串联的扩增子嵌入聚合物基质中;

e)使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子与包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

f)对嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子进行成像,以确定所述感兴趣的核酸在所述细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱。

48.绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方法,所述方法包括:

a)使所述细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分和条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分和与所述第一寡核苷酸探针互补的部分;

b)将所述第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

c)使用所述第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增所述环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

d)使所述细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

e)将所述一种或多种串联的扩增子和所述一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

f)使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子与包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

g)对嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子和嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种检测剂进行成像以确定所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质在所述细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱。

49.用于诊断受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括以下步骤:

a)使取自所述受试者的细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分、与所述第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中所述第二寡核苷酸探针的所述条形码序列与所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列互补;

b)将所述第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

c)使用所述第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增所述环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

d)使所述细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

e)将所述一种或多种串联的扩增子和所述一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

f)使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子与包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

g)对嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子和嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种检测剂进行成像以确定所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质在所述细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱;

其中所述感兴趣的核酸和/或所述感兴趣的蛋白质的表达相对于一种或多种非患病细胞中的表达的改变指示所述受试者患有所述疾病或病症。

50.权利要求49的方法,其中作为对照实验同时分析一种或多种非患病细胞中的所述基因和蛋白质表达。

51.权利要求50的方法,其中一种或多种非患病细胞中的所述基因和蛋白质表达包含参考数据。

52.权利要求49-51中任一项的方法,其中所述疾病或病症是遗传性疾病、增殖性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、肝病、脾病、肺病、血液病、神经病、胃肠道(GI)疾病、泌尿生殖系统疾病、泌尿生殖系统疾病、感染性疾病、肌肉骨骼疾病、内分泌疾病、代谢紊乱、免疫紊乱、中枢神经系统(CNS)紊乱或心血管疾病。

53.权利要求49-52中任一项的方法,其中所述疾病或病症是阿尔茨海默病。

54.权利要求49-53中任一项的方法,其中所述细胞存在于组织中。

55.权利要求54的方法,其中所述组织是来自受试者的组织样品。

56.权利要求55的方法,其中所述受试者是非人类实验动物。

57.权利要求55的方法,其中所述受试者是人。

58.权利要求54-57中任一项的方法,其中所述组织是固定的组织样品。

59.权利要求54-58中任一项的方法,其中所述组织是脑组织。

60.权利要求54-59中任一项的方法,其中在多个细胞中分析基因和蛋白质表达。

61.权利要求60的方法,其中所述细胞包含多种细胞类型。

62.权利要求61的方法,其中所述细胞类型选自干细胞、祖细胞、神经元细胞、星形胶质细胞、树突细胞、内皮细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、肌肉细胞、心肌细胞、间充质细胞、上皮细胞、免疫细胞和肝细胞。

63.权利要求49-62中任一项的方法,其中所述感兴趣的蛋白质包含淀粉样蛋白β(Aβ)肽。

64.权利要求63的方法,其中所述Aβ肽以Aβ斑块的形式存在于所述细胞中。

65.权利要求49-64中任一项的方法,其中所述感兴趣的蛋白质包含tau蛋白。

66.权利要求65的方法,其中所述tau蛋白以包涵体(p-Tau)的形式存在于所述细胞中。

67.权利要求49-66中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸选自以下:Vsnl1、Snap25、Dnml、Slc6a1、Aldoc、Bsg、Ctss、Plpl、Cst7、Ctsb、Apoe、Trem2、C1qa、P2ry12、Gfap、Vim、Aqp4、Clu、Plp1、Mbp、C4b、Ccnb2、Gpm6a、Ddit3、Dapk1、Myo5a、Tspan7和Rhoc。

68.权利要求63-67中任一项的方法,其中所述Aβ肽使用小分子检测。

69.权利要求68的方法,其中所述小分子是X-34。

70.权利要求65-69中任一项的方法,其中所述tau蛋白使用p-Tau一抗检测。

71.权利要求70的方法,其进一步包括用二抗检测所述p-Tau一抗。

72.权利要求71的方法,其中所述二抗缀合至可检测标记。

73.权利要求72的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

74.权利要求46-73中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸的表达的改变用于鉴定紧邻斑块的细胞类型,并且其中如果紧邻斑块鉴定到特定细胞类型,则所述受试者患有或疑似患有阿尔茨海默病。

75.权利要求74的方法,其中所述斑块是Aβ斑块。

76.权利要求74或75的方法,其中对紧邻斑块的疾病相关小胶质细胞类型的所述鉴定表明所述受试者患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病的风险中。

77.权利要求74-76中任一项的方法,其中对紧邻斑块的疾病相关星形胶质细胞类型的所述鉴定表明所述受试者患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病的风险中。

78.权利要求74-77中任一项的方法,其中对紧邻斑块的疾病相关少突胶质细胞前体细胞类型的所述鉴定表明所述受试者患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病的风险中。

79.权利要求49的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

80.权利要求49-79中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸是DNA。

81.权利要求49-79中任一项的方法,其中所述感兴趣的核酸是RNA。

82.权利要求81的方法,其中所述RNA是mRNA。

83.权利要求49-82中任一项的方法,其中绘制多于100个、多于200个、多于500个、多于

1000个、多于2000个或多于3000个感兴趣的核酸的基因表达图谱。

84.权利要求49-83中任一项的方法,其中绘制最多达一百万个感兴趣核酸的基因表达图谱。

85.权利要求49-84中任一项的方法,其中所述寡核苷酸探针上的所述条形码序列的长度为5-15、6-14、7-13、8-12或9-11个核苷酸。

86.权利要求49-85中任一项的方法,其中所述寡核苷酸探针上的条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。

87.权利要求49-86中任一项的方法,其中所述寡核苷酸探针上的所述条形码序列的长度为10个核苷酸。

88.权利要求49-87中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针结合所述感兴趣的核酸的不同部分。

89.权利要求49-88中任一项的方法,其中所述第一寡核苷酸探针包含以下结构:

5'-[与第二探针互补的部分]-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[第一条形码序列]-[第二条形码序列]-3'。

90.权利要求49-89中任一项的方法,其中所述第二寡核苷酸探针包含以下结构:

5'-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[与第一探针互补的部分]-[条形码序列]-3'。

91.权利要求49-90中任一项的方法,其中所述第二条形码序列增加了所述感兴趣的核酸的检测的特异性。

92.权利要求49-91中任一项的方法,其中所述第二条形码序列减少了非特异性扩增。

93.权利要求49-92中任一项的方法,其中所述第三寡核苷酸探针包含可检测标记。

94.权利要求93的方法,其中所述可检测标记是荧光团。

95.权利要求49-94中任一项的方法,其中所述成像步骤包括荧光成像。

96.权利要求49-95中任一项的方法,其中所述成像步骤包括共焦显微镜检查或落射荧光显微镜检查。

97.筛选能够调节基因和/或蛋白质表达的药剂的方法,所述方法包括:

a)使正在用或已经用所述候选药剂处理的细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分、与所述第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中所述第二寡核苷酸探针的所述条形码序列与所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列互补;

b)将所述第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

c)使用所述第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增所述环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

d)使所述细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

e)将所述一种或多种串联的扩增子和所述一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

f)使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子与包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

g)对嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子和嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种检测剂进行成像以确定所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质在所述细胞中的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱;

其中在存在所述候选药剂的情况下所述感兴趣的核酸和/或所述感兴趣的蛋白质的表达相对于不存在所述候选药剂的情况下的表达的改变指示所述候选药剂调节基因和/或蛋白质表达。

98.权利要求97的方法,其中所述候选药剂是小分子、蛋白质、肽、核酸、脂质或碳水化合物。

99.权利要求98的方法,其中所述小分子是抗癌治疗剂。

100.权利要求98的方法,其中所述蛋白质是抗体。

101.权利要求98的方法,其中所述核酸是mRNA、反义RNA、miRNA、siRNA、RNA适体、双链RNA(dsRNA)、短发夹RNA(shRNA)或反义寡核苷酸(ASO)。

102.权利要求97-101中任一项的方法,其中所述候选药剂对基因和/或蛋白质表达的调节与减少、缓解或消除所述疾病或病症的症状相关。

103.权利要求102的方法,其中所述疾病或病症是遗传性疾病、增殖性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、肝病、脾病、肺病、血液病、神经病、胃肠道(GI)疾病、泌尿生殖系统疾病、泌尿生殖系统疾病、感染性疾病、肌肉骨骼疾病、内分泌疾病、代谢紊乱、免疫紊乱、中枢神经系统(CNS)紊乱或心血管疾病。

104.权利要求102或103的方法,其中所述疾病或病症是阿尔茨海默病。

105.权利要求102或103的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

106.用于治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括:

a)使取自所述受试者的细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分、与所述第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中所述第二寡核苷酸探针的所述条形码序列与所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列互补;

b)将所述第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

c)使用所述第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增所述环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

d)使所述细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

e)将所述一种或多种串联的扩增子和所述一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

f)使嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子与包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;

g)对嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种串联的扩增子和嵌入所述聚合物基质中的所述一种或多种检测剂进行成像以确定所述感兴趣的核酸和所述感兴趣的蛋白质在所述细胞中的位置;和

h)如果观察到所述感兴趣的核酸和/或所述感兴趣的蛋白质的表达相对于一种或多种

非患病细胞中的表达的改变,则向所述受试者施用所述疾病或病症的治疗。

107.权利要求106的方法,其中作为对照实验同时分析一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达。

108.权利要求106的方法,其中一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达包含参考数据。

109.权利要求106-108中任一项的方法,其中所述治疗包括施用治疗剂、手术或放射疗法。

110.权利要求109的方法,其中所述治疗剂是小分子、蛋白质、肽、核酸、脂质或碳水化合物。

111.权利要求110的方法,其中所述小分子是抗癌治疗剂。

112.权利要求110的方法,其中所述蛋白质是抗体。

113.权利要求110的方法,其中所述核酸是mRNA、反义RNA、miRNA、siRNA、RNA适体、双链RNA(dsRNA)、短发夹RNA(shRNA)或反义寡核苷酸(ASO)。

114.权利要求106-113中任一项的方法,其中所述疾病或病症是遗传性疾病、增殖性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、肝病、脾病、肺病、血液病、神经病、胃肠道(GI)疾病、泌尿生殖系统疾病、泌尿生殖系统疾病、感染性疾病、肌肉骨骼疾病、内分泌疾病、代谢紊乱、免疫紊乱、中枢神经系统(CNS)紊乱或心血管疾病。

115.权利要求106-114中任一项的方法,其中所述疾病或病症是阿尔茨海默病。

116.权利要求106-114中任一项的方法,其中所述疾病或病症是癌症。

117.包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针的多个寡核苷酸探针,其中

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)所述第二寡核苷酸探针包含与所述感兴趣的核酸互补的部分、与所述第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,

其中所述第二寡核苷酸探针的所述条形码序列与所述第一寡核苷酸探针的所述第二条形码序列互补。

118.权利要求117的多个寡核苷酸探针,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针上的所述条形码序列长度为5-15、6-14、7-13、8-12或9-11个核苷酸。

119.权利要求117或118的多个寡核苷酸探针,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针上的所述条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。

120.权利要求117-119中任一项的多个寡核苷酸探针,其中所述第一寡核苷酸探针和所述第二寡核苷酸探针上的所述条形码序列的长度为10个核苷酸。

121.权利要求117-120中任一项的多个寡核苷酸探针,其中所述第一寡核苷酸探针包含以下结构:

5'-[与第二探针互补的部分]-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[第一条形码序列]-[第二条形码序列]-3'。

122.权利要求117-121中任一项的多个寡核苷酸探针,其中所述第二寡核苷酸探针包含以下结构:

5'-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[与第一探针互补的部分]-[条形码序列]-3'。

123.权利要求117-122中任一项的多个寡核苷酸探针,其中所述第二条形码序列增加了所述感兴趣的核酸的检测的特异性。

124.权利要求117-123中任一项的多个寡核苷酸探针,其中所述第二条形码序列减少了非特异性扩增。

125.试剂盒,其包含权利要求117-124中任一项的多个寡核苷酸探针。

126.权利要求125的试剂盒,其中所述试剂盒还包含一种或多种抗体,其中每种抗体结合感兴趣的蛋白质。

127.权利要求125或126的试剂盒,其中所述抗体包含抗p-Tau抗体。

128.权利要求125-127中任一项的试剂盒,其进一步包含小分子检测剂。

129.权利要求128的试剂盒,其中所述小分子检测剂是X-34。

130.权利要求125-129中任一项的试剂盒,其中所述试剂盒还包含第三寡核苷酸探针。

131.权利要求130的试剂盒,其中所述第三寡核苷酸探针包含与所述第一寡核苷酸探针的所述第一条形码序列互补的序列。

132.权利要求130或131的试剂盒,其中所述第三寡核苷酸探针包含可检测标记。

133.权利要求132的试剂盒,其中所述可检测标记是荧光团。

134.鉴定至少一个图像中细胞类型的空间变化的方法,所述方法包括:

对于所述至少一个图像中的多个细胞中的每一个,接收所述细胞在所述至少一个图像中的空间位置;

对于所述至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个,接收所述蛋白质在所述图像中的空间位置;

对于所述多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与所述第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞数量,其中所述距离是基于所述多个细胞的空间位置中的至少一些和所述多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的;

基于所述第一细胞类型的细胞数量,鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的空间变化;和

输出所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化的指示。

135.权利要求134的方法,其中鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化包括:

对于所述多个细胞中与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的细胞,确定与所述第一细胞类型相关的所述细胞的第一百分比;

确定所述至少一个图像的所述多个细胞中与所述第一细胞类型相关的所述细胞的第二百分比;

比较所述第一百分比与所述第二百分比以获得比较结果;和

使用所述比较结果鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化。

136.权利要求135的方法,其中:

所述比较结果表明所述第一百分比大于所述第二百分比;和

使用所述比较结果鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化包括鉴定在与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的区域内存在所述第一细胞类

型的细胞的富集。

137.权利要求134的方法,其进一步包括使用相机捕获所述至少一个图像。

138.权利要求137的方法,其中所述至少一个图像包含多个图像,并且其中使用相机捕获所述至少一个图像包括:

捕获所述多个图像中的第一图像,所述第一图像用于确定所述多个细胞的所述空间位置;和

捕获所述多个图像中的第二图像,所述第二图像用于确定所述多个蛋白质的所述空间位置。

139.权利要求138的方法,其进一步包括:

将来自所述第一图像的所述多个细胞的所述空间位置与来自所述第二图像的所述多个蛋白质的所述空间位置进行空间对准;和

基于所述空间对准的空间位置,确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

140.权利要求134的方法,其中所述至少一个图像包含多个图像,所述多个图像包含:

用于确定所述多个细胞的所述空间位置的第一图像;和

用于确定所述多个蛋白质的所述空间位置的第二图像。

141.权利要求138的方法,其中:

所述第一图像和所述第二图像进行空间对准;和

基于所述空间对准的图像确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

142.权利要求134的方法,其中确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量包括确定从所述细胞的质心到所述第一蛋白质的边缘的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

143.权利要求134的方法,其中对于与所述第一细胞类型相关的每个细胞,确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量包括:

确定从所述第一细胞类型的细胞到所述多个蛋白质中最近的蛋白质的最小距离;和

将所述最小距离与所述阈值距离进行比较。

144.权利要求143的方法,其进一步包括基于与所述第一细胞类型相关的每个细胞从所述第一细胞类型的细胞到所述最近的蛋白质的所述最小距离,确定从所述第一细胞类型的细胞到最近的蛋白质的平均最小距离。

145.权利要求134的方法,其对于所述多个细胞中的每一个进一步包括:

接收所述细胞的遗传信息;和

基于所述细胞的遗传信息,将来自多种细胞类型的一种细胞类型与所述细胞相关联,其中所述多种细胞类型包括所述第一细胞类型。

146.装置,其包括:

至少一个计算机处理器;和

至少一个编码有多个指令的非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化的方法,所述方法包括:

对于所述至少一个图像中的多个细胞中的每一个,接收所述细胞在所述至少一个图像

中的空间位置;

对于所述至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个,接收所述蛋白质在所述图像中的空间位置;

对于所述多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与所述第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞数量,其中所述距离是基于所述多个细胞的空间位置中的至少一些和所述多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的;

基于所述第一细胞类型的细胞数量,鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的空间变化;和

输出所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化的指示。

147.权利要求146的装置,其中鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化包括:

对于所述多个细胞中与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的细胞,确定与所述第一细胞类型相关的所述细胞的第一百分比;

确定所述至少一个图像的所述多个细胞中与所述第一细胞类型相关的所述细胞的第二百分比;

比较所述第一百分比与所述第二百分比以获得比较结果;和

使用所述比较结果鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化。

148.权利要求147的装置,其中:

所述比较结果表明所述第一百分比大于所述第二百分比;和

使用所述比较结果鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化包括鉴定在与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的区域内存在所述第一细胞类型的细胞的富集。

149.权利要求146的装置,其中所述方法进一步包括使用相机捕获所述至少一个图像。

150.权利要求149的装置,其中所述至少一个图像包含多个图像,并且其中使用相机捕获所述至少一个图像包括:

捕获所述多个图像中的第一图像,所述第一图像用于确定所述多个细胞的所述空间位置;和

捕获所述多个图像中的第二图像,所述第二图像用于确定所述多个蛋白质的所述空间位置。

151.权利要求150的装置,其中所述方法进一步包括:

将来自所述第一图像的所述多个细胞的所述空间位置与来自所述第二图像的所述多个蛋白质的所述空间位置进行空间对准;和

基于所述空间对准的空间位置,确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

152.权利要求146的装置,其中所述至少一个图像包含多个图像,所述多个图像包含:

用于确定所述多个细胞的所述空间位置的第一图像;和

用于确定所述多个蛋白质的所述空间位置的第二图像。

153.权利要求150的装置,其中:

所述第一图像和所述第二图像进行空间对准;和

基于所述空间对准的图像确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

154.权利要求146的装置,其中确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量包括确定从所述细胞的质心到所述第一蛋白质的边缘的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

155.权利要求146的装置,其中对于与所述第一细胞类型相关的每个细胞,确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量包括:

确定从所述第一细胞类型的细胞到所述多个蛋白质中最近的蛋白质的最小距离;和

将所述最小距离与所述阈值距离进行比较。

156.权利要求155的装置,其中所述方法进一步包括基于与所述第一细胞类型相关的每个细胞从所述第一细胞类型的细胞到所述最近的蛋白质的所述最小距离,确定从所述第一细胞类型的细胞到最近的蛋白质的平均最小距离。

157.权利要求146的装置,其中所述方法对于所述多个细胞中的每一个进一步包括:

接收所述细胞的遗传信息;和

基于所述细胞的遗传信息,将来自多种细胞类型的一种细胞类型与所述细胞相关联,其中所述多种细胞类型包括所述第一细胞类型。

158.至少一个编码有多个指令的非暂时性计算机可读存储介质,当至少一个计算机处理器执行时,进行鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化的方法,所述方法包括:

对于所述至少一个图像中的多个细胞中的每一个,接收所述细胞在所述至少一个图像中的空间位置;

对于所述至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个,接收所述蛋白质在所述图像中的空间位置;

对于所述多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与所述第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞数量,其中所述距离是基于所述多个细胞的空间位置中的至少一些和所述多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的;

基于所述第一细胞类型的细胞数量,鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的空间变化;和

输出所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化的指示。

159.权利要求158的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化包括:

对于所述多个细胞中与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的细胞,确定与所述第一细胞类型相关的所述细胞的第一百分比;

确定所述至少一个图像的所述多个细胞中与所述第一细胞类型相关的所述细胞的第二百分比;

比较所述第一百分比与所述第二百分比以获得比较结果;和

使用所述比较结果鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化。

160.权利要求159的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中:

所述比较结果表明所述第一百分比大于所述第二百分比;和

使用所述比较结果鉴定所述至少一个图像中所述第一细胞类型的细胞的所述空间变化包括鉴定在与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的区域内存在所述第一细胞类型的细胞的富集。

161.权利要求158的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中所述方法进一步包括使用相机捕捉所述至少一个图像。

162.权利要求161的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中所述至少一个图像包含多个图像,并且其中使用相机捕获所述至少一个图像包括:

捕获所述多个图像中的第一图像,所述第一图像用于确定所述多个细胞的所述空间位置;和

捕获所述多个图像中的第二图像,所述第二图像用于确定所述多个蛋白质的所述空间位置。

163.权利要求162的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中所述方法进一步包括:

将来自所述第一图像的所述多个细胞的所述空间位置与来自所述第二图像的所述多个蛋白质的所述空间位置进行空间对准;和

基于所述空间对准的空间位置,确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

164.权利要求158的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中所述至少一个图像包含多个图像,所述多个图像包含:

用于确定所述多个细胞的所述空间位置的第一图像;和

用于确定所述多个蛋白质的所述空间位置的第二图像。

165.权利要求162的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中:

所述第一图像和所述第二图像进行空间对准;和

基于所述空间对准的图像确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

166.权利要求158的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量包括确定从所述细胞的质心到所述第一蛋白质的边缘的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量。

167.权利要求158的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中对于与所述第一细胞类型相关的每个细胞,确定与所述第一蛋白质的距离小于所述阈值距离的所述第一细胞类型的细胞的数量包括:

确定从所述第一细胞类型的细胞到所述多个蛋白质中最近的蛋白质的最小距离;和

将所述最小距离与所述阈值距离进行比较。

168.权利要求167的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中所述方法进一步包括基于所述第一细胞类型的每个细胞从与所述第一细胞类型相关的细胞到所述最近的蛋白质的所述最小距离,确定从所述第一细胞类型的细胞到最近的蛋白质的平均最小距离。

169.权利要求158的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,其中所述方法对于所述

多个细胞中的每一个进一步包括:

接收所述细胞的遗传信息;和

基于所述细胞的遗传信息,将来自多种细胞类型的一种细胞类型与所述细胞相关联,其中所述多种细胞类型包括所述第一细胞类型。

170.系统,其包含:

a)细胞;和

b)包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针的一对或多对寡核苷酸探针,其中:

i)所述第一寡核苷酸探针包含与所述第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补。

171.权利要求170的系统,其进一步包括显微镜。

172.权利要求171的系统,其中所述显微镜是共焦显微镜。

173.权利要求170-172中任一项的系统,其进一步包括计算机。

174.权利要求170-173中任一项的系统,其进一步包括一个或多个附加单元。

175.权利要求174的系统,其中所述细胞是组织样品的一部分。

转录状态和蛋白质组织学的联合绘图

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C.§119(e)要求于2021年5月28日提交的美国临时申请U.S.S.N.63/194,536的优先权,其通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 阿尔茨海默病(AD)是一种进行性神经退行性病症,也是老年人最常见形式的痴呆症(Masters et al.,2015)。β淀粉样蛋白(Aβ)斑块和神经纤维缠结(过度磷酸化tau沉积物)的广泛沉积,特别是在新皮质和海马体中的广泛沉积,是AD的神经病理学标志(Braak and Braak,1991;Hardy and Selkoe,2002;Masterset al.,2015)。此外,AD病理学还以神经胶质增生(小胶质细胞和星形胶质细胞的反应性变化)和白质异常为特征(Beach et al.,1989;Henstrindge et al.,2019;Butt et al.,2019)。AD研究的一个关键问题是形态特征如何与驱动神经退行性变的细胞基因通路相关联。全基因组关联研究(GWAS)已经揭示了与AD风险相关的基因,有助于揭示AD病理机制,并且大多数AD风险基因已被证明在小胶质细胞中高表达(Pimenova et al.,2018;Cauwenberghe et al.,2016)。来自AD小鼠模型和其他神经退行性变模型的多项批量和scRNA-seq研究发现了具有独特转录状态的小胶质细胞群体,称为DAM(疾病相关小胶质细胞)(Bohlen et al.,2019;Hansen et al.,2018)。除了DAM之外,还对与AD病理相关的星形胶质细胞群进行了表征。已经确立的分析方法不利于揭示AD的分子和细胞复杂性:批量组织分析掩盖了大脑中细胞群的异质性,而标准成像方法只能可视化少数基因和蛋白质,只能鉴定有限的细胞类型。最近,单细胞RNA测序(scRNA-seq)在AD脑组织中的应用揭示了主要脑细胞类型中基因表达的显著异质性变化(Grubman et al.,2019;Keren-Shaul et al.,2017;Mathys et al.,2019)。然而,尽管scRNA-seq研究获得了单细胞分辨率,但它们无法保留空间模式。以无偏的方式从大脑中分离出所有细胞类型的单细胞制剂也并不容易。为了真正了解不同细胞对淀粉样斑块、tau聚集、细胞死亡和突触丢失的反应的范围和异质性,并研究上述局部病理和细胞反应之间的空间关系,需要一个根本不同的技术平台。因此,空间分辨的单细胞转录组学和组织组织学的集成方法是AD研究中非常期望的,并且对于许多其他应用也很有用。

[0005] 许多现有的空间分辨的转录组学技术(例如,空间转录组学、STARmap等)与同一组织切片中的蛋白质检测不兼容(Ståhl et al.,2016;Stuart and Satija,2019;Wang et al.,2018)。使用空间转录组学(Ståhl et al.,2016;Stuart and Satija,2019;Wang et al.,2018)对相邻脑切片进行荧光染色,发现了斑块诱导基因(PIG)。然而,分辨率有限,并且只有一小部分基因在细胞分辨率上得到了验证。此外,由于每个切片的相对厚度,相邻切片策略的准确性较低,不能用于探索tau缠结对同一细胞中基因表达的影响。因此,需要新的方法来绘制同一组织样品中的基因表达和蛋白质组织学图谱,并且此类方法将可用于阿尔茨海默病的研究和治疗。

[0006] 发明概述

[0007] 本公开描述了用于分析同一细胞内基因和蛋白质表达的轮廓的方法。具体地,本公开中描述了本文中称为“STARmap Pro”的方法/系统的开发。STARmap Pro能够在同一组

织切片中同时进行高分辨率空间转录组学和特定蛋白质定位。该方法/系统可用于例如通过跨多种细胞类型的亚细胞分辨率的综合分子图谱来理解AD病理生理学(图1A)。该方法/系统还可用于研究、诊断或治疗涉及基因和/或蛋白质表达改变的任何疾病如癌症,以及用于研究组织发育。STARmap Pro还可用于表征与任何疾病相关的基因和蛋白质表达,研究正常组织的发育,或研究药剂对组织的影响(包括筛选对组织有特定影响的药剂)。例如,本公开描述了使用已建立的具有淀粉样斑块和tau病理学的AD小鼠模型(TauPS2APP三重转基因小鼠),其表达hPresenilin 2(PS2)、hAPP和hTAU的突变形式并显示与年龄相关的大脑淀粉样蛋白沉积、tau蛋白病、神经胶质增生和认知缺陷(Grueningeret al.,2010;Lee et al.,2021)。通过绘制从先前的批量和单细胞RNA-seq参考文献以及多种AD相关数据库中提取的2,766个基因的靶向列表,以亚细胞分辨率在细胞外Aβ斑块和细胞内磷酸Tau积累的背景下创建了8月龄和13月龄的TauPS2APP小鼠的空间细胞图谱。与对照样品相比,单细胞分辨转录组分析鉴定了TauPS2APP模型的皮质和海马体区域中跨越不同细胞类型的疾病相关基因通路。综合不同疾病阶段的不同细胞类型和状态的空间图谱,建立了AD疾病进展的综合时空模型并在本文中进行了描述。

[0008] 在一方面,本公开提供了用于在同一细胞中(即,以单细胞分辨率;参见例如图1A和1B)绘制(一种或多种基因和蛋白质的)基因和蛋白质表达图谱的方法和系统。基因和蛋白质表达也可以同时在多个细胞中绘制,例如在组织样品中存在的多个细胞中绘制。在本文公开的方法中,细胞可以与一对或多对寡核苷酸探针接触以扩增感兴趣的核酸并产生一种或多种串联的(concateated)扩增子。然后可以使细胞与一种或多种检测剂(例如,抗体、或抗体片段或变体)接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质。然后可以将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中,并且可以对一种或多种扩增子进行测序以确定转录物的身份及其在聚合物基质内的位置。与聚合物基质内的一种或多种感兴趣的蛋白质结合的检测剂的位置也可以通过成像(例如,通过共焦显微镜)来确定,从而允许同时绘制同一样品(例如,同一细胞)中感兴趣的转录物和蛋白质在细胞内的位置。使用感兴趣的转录物和蛋白质的位置,可以根据特定基因和蛋白质的位置和表达模式来鉴定单个细胞、亚细胞位置和细胞器。该方法可用于比较例如来自患病组织样品和健康组织样品的一个细胞(或多个细胞)。该方法还可用于药物发现(例如,筛选具有特定效果的候选药物)、研究药物副作用以及诊断和治疗疾病(例如阿尔茨海默病和癌症)。

[0009] 在一些实施方案中,本公开提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方法,包括以下步骤:

[0010] a)使细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针(本文也称为“锁式”探针)和第二寡核苷酸探针(本文也称为“引物”探针),其中

[0011] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;并且

[0012] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补;

[0013] b)将第一寡核苷酸探针的5’末端和3’末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0014] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生

一种或多种串联的扩增子;

[0015] d)使细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

[0016] e)将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

[0017] f)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

[0018] g)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子和嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂进行成像以确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质在细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱。

[0019] 本文所述的方法和系统可用于研究组织(例如,正在发育的组织)中的基因和蛋白质表达、用于诊断和治疗各种疾病、以及用于药物发现。因此,在另一方面,本公开提供了用于诊断受试者的疾病或病症(例如,阿尔茨海默病)的方法。例如,本文所述的分析基因和蛋白质表达轮廓的方法可以在取自受试者(例如,被认为患有疾病或病症的或处于患有疾病或病症风险的受试者,或者健康的或被认为是健康的受试者)的样品的细胞中进行。然后可以将细胞中各种感兴趣的核酸和蛋白质的表达与非患病细胞或来自非患病组织样品的细胞(例如,来自健康个体的细胞或来自健康个体群体的多个细胞)中相同的感兴趣的核酸和蛋白质的表达进行比较。感兴趣的核酸的表达相对于非患病细胞中的表达的任何改变可以指示受试者患有疾病或病症。作为对照实验,可以将一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达与患病细胞中的表达一起进行分析。一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达也可能先前已经进行了分析,并且可以将患病细胞中的表达与非患病细胞的该参考数据进行比较。

[0020] 在另一方面,本公开提供了筛选能够调节感兴趣的一种核酸或蛋白质或者感兴趣的多种核酸和/或蛋白质的基因和/或蛋白质表达的药剂的方法。例如,本文所述的用于绘制基因和蛋白质表达图谱的方法可以在存在一种或多种候选药剂的情况下在细胞中进行。然后可以将细胞(例如,正常细胞或患病细胞)中各种感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达与未暴露于一种或多种候选药剂的细胞中相同的感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达进行比较。相对于未暴露于一种或多种候选药剂的细胞中的表达,感兴趣的一种或多种核酸和/或一种或多种蛋白质的表达的任何改变可指示感兴趣的一种或多种核酸和/或蛋白质的表达由一种或多种候选药剂调节。

[0021] 在另一方面,本公开提供了用于治疗受试者的疾病或病症(例如,阿尔茨海默病)的方法。例如,本文所述的分析基因表达和蛋白质表达的方法可以在取自受试者(例如,被认为患有疾病或病症或处于患有疾病或病症的风险的受试者)的样品的一个细胞(或多个细胞,例如构成组织的多个细胞)中进行。然后可以将细胞中各种感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达与来自非患病组织样品的细胞中相同的感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达进行比较。如果观察到感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达相对于非患病细胞中的表达有任何改变,则可以对受试者施用疾病或病症的治疗。作为对照实验,可以将一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达与患病细胞中的表达一起进行分析。一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达也可先前已经进行了分析,并且可以将患病细胞(或怀疑是患病细胞的测试细胞)中的表达与非患病细胞的该参考数据进行比较。

[0022] 在另一方面,本公开提供了多种寡核苷酸探针,其包含第一寡核苷酸探针(本文也

称为“锁式”探针)和第二寡核苷酸探针(本文也称为“引物”探针),其中:

[0023] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0024] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,

[0025] 其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补。

[0026] 在另一方面,本公开提供了试剂盒(例如,包含本文公开的多种寡核苷酸探针中的任一种的试剂盒)。在一些实施方案中,试剂盒包含多个如本文所述的寡核苷酸探针的文库,其中每个寡核苷酸探针可用于鉴定特定的感兴趣的核酸。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含用于检测各种感兴趣的蛋白质的检测剂或检测剂文库。本文所述的试剂盒还可以包括可用于实施本文所述的方法的任何其他试剂或组分,包括但不限于细胞、连接酶、聚合酶、胺修饰的核苷酸、一抗、二抗、缓冲液和/或用于制备聚合物基质(例如,聚丙烯酰胺基质)的试剂。

[0027] 本公开的另一方面提供了用于鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化的方法(即,查看多个样品之间特定细胞类型相对于彼此的空间分布的变化,例如健康组织与患病组织相比)。在一些实施方案中,此方法包括以下步骤:

[0028] 对于至少一个图像中的多个细胞中的每一个,接收该细胞在该至少一个图像中的空间位置;

[0029] 对于至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个,接收该蛋白质在该图像中的空间位置;

[0030] 对于多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞的数量,其中距离是基于多个细胞的空间位置中的至少一些和多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的;

[0031] 基于第一细胞类型的细胞的数量,鉴定该至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化;和

[0032] 输出该至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化的指示。此方法可用于例如鉴定可与疾病相关的感兴趣蛋白质的特定距离内的细胞类型。例如,如本文进一步描述的,与Aβ和/或Tau包涵体有一定距离的特定细胞类型的存在可与阿尔茨海默病相关。

[0033] 在另一方面,本公开提供了一种装置,其包含至少一个计算机处理器;和至少一个编码有多个指令的非暂时性计算机可读存储介质,当该指令由至少一个计算机处理器执行时,进行鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化的方法,该方法包括:

[0034] 对于该至少一个图像中的多个细胞中的每一个,接收该细胞在该至少一个图像中的空间位置;

[0035] 对于该至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个,接收该蛋白质在图像中的空间位置;

[0036] 对于多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞的数量,其中距离是基于多个细胞的空间位置中的至少一些和多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的;

[0037] 基于第一细胞类型的细胞的数量,鉴定该至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化;和

[0038] 输出至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化的指示。

[0039] 在另一方面,本公开提供了至少一个编码有多个指令的非暂时性计算机可读存储介质,当该指令由至少一个计算机处理器执行时,进行鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化的方法,该方法包括:

[0040] 对于该至少一个图像中的多个细胞中的每一个,接收该细胞在该至少一个图像中的空间位置;

[0041] 对于该至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个,接收该蛋白质在图像中的空间位置;

[0042] 对于多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞的数量,其中距离是基于多个细胞的空间位置中的至少一些和多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的;

[0043] 基于第一细胞类型的细胞数量,鉴定该至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化;和

[0044] 输出该至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化的指示。

[0045] 应当理解,前述概念和以下讨论的附加概念可以以任何合适的组合排列,因为本公开在这方面不受限制。此外,当结合附图考虑时,从以下对各种非限制性实施方案的详细描述中,本公开的其他优点和新颖特征将变得显而易见。

附图说明

[0046] 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展示本公开的某些方面,通过参考这些附图中的一个或多个并结合本文呈现的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本公开的某些方面。

[0047] 图1A-1F显示了使用STARmap Pro对阿尔茨海默病中的单细胞转录状态与淀粉样蛋白-β和tau病理学进行联合绘图。显示了以200nm分辨率同时绘制细胞类型、单细胞转录状态和组织病理学图谱。图1A提供了STARmap Pro方法的概述,该方法是综合原位方法,能够以亚细胞分辨率(200nm)同时绘制同一完整三维(3D)组织中数千种RNA种类和蛋白质疾病标志物的图谱。STARmap Pro用于表征具有淀粉样蛋白-β和tau病理学的TauPS2APP转基因小鼠(阿尔茨海默病(AD)发病机制的小鼠疾病模型)。单细胞转录状态与组织病理学的综合分析(空间细胞分型、拟时间轨迹、差异基因表达和基因通路分析)用于揭示AD疾病进展过程中的关键细胞类型、细胞状态和基因程序。图1B提供了STARmap Pro方法的示意性流程图。解剖并固定脑组织,用一对SNAIL(经由分子内连接特异性扩增核酸)探针识别细胞内mRNA,并进行酶连接和滚环扩增,以原位合成胺修饰的cDNA扩增子。蛋白质靶标用一抗标记,然后将具有胺修饰cDNA扩增子、蛋白质和一抗的组织用丙烯酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(AA-NHS)进行官能化,并与丙烯酰胺共聚以生成水凝胶-组织杂化物,其固定生物分子(例如,扩增子、蛋白质和抗体)的位置以进行原位绘图。每个cDNA扩增子含有基因特异性标识符序列(如图1B上方标记),该标识符序列通过原位SEDAL(通过动态退火和连接减少误差的测序)读出,然后进行荧光蛋白染色(用二抗和小分子染料X-34)以可视化蛋白质信号。图1C

展示了STARmap Pro扩展的编码能力。STARmap Pro中的SNAIL探针含有两个5nt条形码(标记为“条形码A”和“条形码B”),理论上具有100万(4^10)个编码容量。图1D提供了13月龄的TauPS2APP小鼠大脑中细胞核、cDNA扩增子和蛋白质信号的成像结果。放大图像显示了海马体CA1区域中的p-Tau阳性细胞。细胞核的碘化丙啶(PI)染色、所有cDNA扩增子的荧光DNA探针染色、β淀粉样斑块的X-34染色和p-Tau的免疫荧光染色(AT8一抗,然后是荧光山羊抗小鼠二抗)根据提供的图例显示。图1E提供了代表性成像结果,显示了13月龄的TauPS2APP小鼠大脑切片中细胞核、cDNA扩增子和蛋白质信号的同步图谱。原始共焦荧光图像的3D投影显示了海马体CA1区域的p-Tau阳性细胞(左侧)。还提供了左图中虚线区域的放大视图(中部),其显示了检测蛋白质和cDNA扩增子两者的组织组织病理学成像的最后一个循环。细胞核的碘化丙啶(PI)染色、所有cDNA扩增子的荧光DNA探针染色、β淀粉样斑块的X-34染色和p-Tau的免疫荧光染色(AT8一抗,然后是荧光山羊抗小鼠二抗)根据提供的图例显示。还显示了中间图视图中原位RNA测序的八个循环(右侧)。显示了每个代表一轮原位测序的荧光通道。图1F显示了用于制备DNA标记抗体的示例性合成方案。

[0048] 图2A-2L显示了TauPS2AAPP和对照小鼠的大脑切片中的高水平细胞类型分类和空间分析。图2A提供了统一流形近似(UMAP)图,可视化来自四(4)个样品的33,106个细胞的转录组谱的非线性维数降低。莱顿算法用于将连接良好的细胞鉴定为转录组谱的低维表示中的聚类。通过每个聚类中富集的基因标志物来鉴定十三种细胞类型。如单个样品的UMAP中可视化的,由虚线矩形突出显示的聚类(星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和锯齿回)显示了TauPS2APP和对照样品之间细胞群的差异分布。图2B显示了细胞类型的分层分类法。提供的图显示了在细胞类型分类过程鉴定到的13个高水平聚类(皮质兴奋性神经元(CTX-Ex,8,687个细胞)、抑制性神经元(In,2,005个细胞)、CA1兴奋性神经元(CA1-Ex,2,754个细胞)、CA2兴奋性神经元(CA2-Ex,436个细胞)、CA3兴奋性神经元(CA3-Ex,1,878个细胞)、锯齿回(DG,4,377个细胞)、星形胶质细胞(Astro,2,884个细胞)、内皮细胞(Endo,1,849个细胞)、小胶质细胞(Micro,1,723个细胞)、少突胶质细胞(Oligo,4,966个细胞)、少突胶质细胞前体细胞(OPC,549个细胞)、平滑肌细胞(SMC,877个细胞)、外侧缰核神经元(LHb,121个细胞))和24个亚水平聚类。获取每个感兴趣的高水平聚类的基因表达谱,并使用相同的方法再次用于亚水平聚类。图2C显示了具有Aβ和tau病理学的TauPS2APP 13月龄样品的皮质和海马体区域的细胞图谱。高水平细胞类型和病理信号用阴影表示,如右上角的图例所示,而Aβ斑块和p-Tau蛋白分别着色为黑色和灰色,如提供的图例所示。手动将成像切片分为皮质和皮质下,边界用黑色虚线标记。比例尺,100μm。放大部分:(I)是皮质区域的放大部分,中间有黑色阴影的Aβ斑块;(II-III)是皮质下区域的放大切片,p-Tau蛋白在细胞顶部呈灰色阴影;比例尺,10μm。图2D提供了显示用于分析Aβ斑块周围细胞类型组成的策略的示意图。考虑到每个斑块的大小,生成五个具有不同半径(10、20、30、40和50μm)的同心圆,以量化距每个斑块边缘不同距离间隔的细胞类型组成。如果细胞存在于两个同心圆之间的边界上,则将它们合并以防止重复计数。比例尺,50μm。图2E显示了TauPS2APP 13月龄样品的Aβ斑块周围不同距离间隔的细胞类型组成。提供了堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每种高水平细胞类型的百分比。在每个区域中,包含总体(平均)细胞类型组成作为参考。图2F提供了统一流形近似(UMAP)图,可视化从8月龄和13月龄TauPS2APP和对照小鼠的冠状脑切片收集的72,165个细胞的转录组谱的

非线性维数降低。莱顿算法用于将连接良好的细胞鉴定为转录组谱的低维表示中的聚类。通过每个聚类中富集的基因标志物来鉴定十三种主要细胞类型。如单个样品的UMAP中可视化的,由虚线矩形突出显示的聚类(星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和锯齿回)显示了UMAP中TauPS2APP和对照样品之间细胞类型群的差异分布。图2G显示了细胞类型的分层分类。提供的图显示了在细胞类型分类过程根据其代表性基因标志物鉴定到的13个高水平聚类(皮质兴奋性神经元(CTX-Ex,18,483个细胞)、抑制性神经元(In,4,163个细胞)、CA1兴奋性神经元(CA1-Ex,3,225个细胞)、CA2兴奋性神经元(CA2-Ex,1,439个细胞)、CA3兴奋性神经元(CA3-Ex,3,225个细胞)、锯齿回(DG,9,562个细胞)、星形胶质细胞(Astro,6,789个细胞)、内皮细胞(Endo,4,168个细胞)、小胶质细胞(Micro,3,732个细胞)、少突胶质细胞(Oligo,11,265个细胞)、少突胶质细胞前体细胞(OPC,1,269个细胞)、平滑肌细胞(SMC,2,397个细胞)、外侧缰核神经元(LHb,204个细胞))和27个亚水平聚类。再次使用莱顿聚类分析每个感兴趣的高水平聚类的基因表达谱,以使用相同的方法鉴定亚水平聚类。图2H显示具有Aβ和tau病理学的TauPS2APP 13月龄样品的皮质和海马体区域的代表性空间细胞类型图谱。高水平细胞类型和病理信号用阴影表示,如右上角的图例所示,而Aβ斑块和p-Tau蛋白分别着色为黑色和灰色,如提供的图例所示。手动将成像切片分为皮质、胼胝体(CC)和海马体,边界用黑色虚线标记。比例尺,100μm。放大部分:(I)是皮质区域的放大部分,中间有黑色阴影的Aβ斑块,周围环绕着不同类型的细胞;(II)是海马体区域的放大部分,p-Tau蛋白在细胞顶部呈灰色阴影;比例尺,10μm。图2I提供了显示用于分析Aβ斑块周围的细胞类型组成的策略的示意图。考虑到每个斑块的大小,生成五个同心边界(距每个斑块10、20、30、40和50μm),以量化距每个斑块边缘不同距离间隔的细胞类型组成。如果细胞存在于两条线之间的边界上,则将它们合并以防止重复计数。比例尺,50μm。图2J显示了TauPS2APP 13月龄样品的Aβ斑块周围不同距离间隔的细胞类型组成的代表性空间分布。提供了堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每种高水平细胞类型的密度(每mm^2细胞计数)。在每个区域中,包括每种主要细胞类型的细胞密度作为参考用于比较。图2K提供了说明用于p-Tau信号量化的方法的示意图。将组织切片分成20μm x 20μm的网格。阴影代表每个方块中p-Tau的综合强度,并用作分析p-Tau与不同细胞类型共定位程度的指标。图2L显示了基于13个月龄TauPS2APP样品中的20μm x 20μm网格的细胞类型组成分析,按p-Tau密度排序。由网格线划分的块按照Tau阳性像素的百分比进行排序,并分为3个箱:0%(零p-Tau)、1-50%(低p-Tau)、51-100%(高p-Tau)。高p-Tau组进一步按斑块阳性组相对于阴性组进行划分,以剖析斑块和tau蛋白病对细胞类型分布的影响。堆积条形图显示每块的每种主要细胞类型的平均细胞数。

[0049] 图3A-3S展示了在Tau加斑块病理学下小胶质细胞群体的独特转录组反应和空间组成。显示了TauPS2APP和对照样品中小胶质细胞的时空基因表达分析。图3A提供了具有亚聚类注释的小胶质细胞群的UMAP。显示从图2A中鉴定的1723个小胶质细胞的转录组学谱的低维表示的图。通过莱顿算法鉴定出三个亚水平聚类(Micro1(n=779)、Micro2(n=415)和Micro3(n=529))。根据先前的报道和患病样品中的显著富集,Micro3聚类通过其基因标志物被注释为疾病相关小胶质细胞(DAM)群体。还包括具有每个样品(对照8月龄、TauPS2APP 8月龄、对照13月龄、TauPS2APP 13月龄)的亚水平细胞聚类的UMAP图。图3B显示了跨越不同亚聚类的代表性标志物的表达水平(行方向z得分)。图3C提供了具有拟时间轨迹的小胶质

细胞群的UMAP。提供了显示Monocle 3生成的小胶质细胞转录组谱的低维表示的图。颜色图表示拟时间值。在低维嵌入上构建并绘制了相应的轨迹,以说明细胞群的生物进展。还包括了每个样品的图。手动选择轨迹起始锚点(基于8月龄的对照样品)。图3D显示了具有亚聚类注释的小胶质细胞群的拟时间嵌入。提供了显示拟时间计算中使用的低维嵌入以及小胶质细胞亚聚类注释的图。图3E显示了拟时间分布。显示了小胶质细胞三个亚群的拟时间分布和四个样品中小胶质细胞的拟时间分布。Mann-Whitney-Wilcoxon检验,ns:p>0.05,*p≤0.05,**p≤0.01,***p≤0.001,****p≤0.0001。图3F提供了对照13月龄样品的小胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。图3G提供了TauPS2APP 13月龄样品的小胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。右上角显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图3H显示了斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组成。提供了显示每个样品的皮质和皮质下区域二者中每个小胶质细胞亚聚类的密度(每mm^2计数)的堆积条形图(上方)。条形图中的阴影对应于图3F中的细胞类型图例。该图显示DAM在8月龄和13月龄TauPS2APP样品中的显著富集。还提供了堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40、40-50μm)中每个小胶质细胞亚聚类的百分比(下方)。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图3I显示差异表达基因(DEG)的基因集富集分析(GSEA)结果。用统计显著性(标称p值<0.01)富集分数的符号进行阴影表示。术语按术语大小过滤:20-1000。图3J提供了矩阵图,显示了AD与对照比较中小胶质细胞群经验证的DEG子集。提供的图显示了2766个基因数据集中靠前的显著改变(按p值排序)的DEG的行方向缩放表达值和64个基因验证结果。图3K显示了小胶质细胞群的亚聚类。显示从图2A中鉴定的3732个小胶质细胞的转录组学谱的低维表示的图(上方)。通过莱顿算法鉴定出三个亚水平聚类(Micro1(n=1924)、Micro2(n=784)和Micro3(n=1024))。根据先前的报道和患病样品中的显著富集,Micro3聚类通过其基因标志物被注释为疾病相关小胶质细胞(DAM)群体。还包括每个样品的小胶质细胞群的亚水平细胞聚类的扩散图谱可视化(对照8月龄、TauPS2APP 8月龄、对照13月龄、TauPS2APP 13月龄,每种条件下n=2)。图3L显示了细胞群的跨越不同亚聚类的代表性基因标志物的表达水平。提供了显示每个小胶质细胞亚群代表性标志物的平均基因表达(阴影)和表达它们的细胞百分比(点大小)两者的点图。对每列的基因表达值进行归一化。图3M提供了具有拟时间轨迹的小胶质细胞群的扩散图谱。提供了显示Monocle 3生成的小胶质细胞转录组谱的低维表示的图(上方)。颜色图表示拟时间值。在低维嵌入上构建并绘制了相应的轨迹,以说明细胞群的生物进展。还包括了每个样品的图。手动选择轨迹起始锚点(基于8月龄的对照样品)。来自不同样品的细胞在扩散图谱嵌入中分别突出显示(下方)。图3N显示了具有亚聚类注释的小胶质细胞群的拟时间嵌入。提供了显示了拟时间计算中使用的低维嵌入以及具有图3M中鉴定的轨迹的图3K中鉴定的小胶质细胞的亚聚类注释的图。图3O提供了对照13月龄样品的小胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。图3P提供了TauPS2APP 13月龄样品的小胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。两个放大部分(I、II)以黑框突出显示。比例尺,10μm。黑色虚线标记了皮质、胼胝体(cc)和海马体之间的边界。图3Q显示了斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组成。提供的箱线图显示了对照小鼠和TauPS2APP小鼠在两个时间点的皮质和海马体区域两者中每个小胶质细胞亚聚类的密度(每mm^2计数)(上方)。条形图中的阴影对应于图3P中的细胞类型图例。该图显示在8月龄和13月龄TauPS2APP样品的两个大脑区域中DAM的显著富集。还提供了堆叠条形图,显示13月龄时Aβ斑块周围每个距离间隔(0-

10、10-20、20-30、30-40、40-50μm)中每个小胶质细胞亚聚类的百分比(下方)。在每个区域中,包括每个区域中每个亚群的总体细胞密度作为参考用于比较。图3R提供了显示小胶质细胞亚型的四种代表性基因标志物的表达的扩散图谱。阴影表示每个细胞中基因的$\log_{10}$(平均基因表达值)。图3S提供了显示跨越距离斑块的多个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40、40+μm)的小胶质细胞空间DEG的z分数的矩阵图。

[0050] 图4A-4T显示了Tau加斑块病理下的疾病相关群体和星形胶质细胞的空间组成。显示了TauPS2APP和对照样品中星形胶质细胞的时空基因表达分析。图4A提供了具有亚聚类注释的星形胶质细胞群的UMAP。提供了显示从图2A中鉴定的2884个星形胶质细胞的转录组谱的低维表示的图。通过莱顿算法鉴定出三个亚水平聚类(Astro1(n=1068)、Astro2(n=1271)和Astro3(n=545))。根据先前的报道和患病样品中的显著富集,Astro3聚类通过其基因标志物被注释为疾病相关星形胶质细胞(DAA)。还包括每个样品(对照8月龄、TauPS2APP 8月龄、对照13月龄、TauPS2APP 13月龄)的亚水平细胞聚类的UMAP图。图4B显示了跨越不同亚聚类的代表性标志物的表达水平。由行方向z分数进行阴影表示。图4C提供了具有拟时间轨迹的星形胶质细胞群的UMAP。提供了显示Monocle 3生成的星形胶质细胞转录组谱的低维表示的图。颜色图表示拟时间值。在低维嵌入上构建并绘制了相应的轨迹,以说明群体的生物进展。还包括了每个样品的图。图4D显示了具有亚聚类注释的星形胶质细胞群的拟时间嵌入。提供了显示拟时间计算中使用的低维嵌入以及星形胶质细胞亚聚类注释的图。图4E显示了拟时间分布。显示了星形胶质细胞三个亚群的拟时间分布和四个样品中星形胶质细胞的拟时间分布。Mann-Whitney-Wilcoxon检验,ns:$p>0.05$,*$p\leq0.05$,**$p\leq0.01$,***$p\leq0.001$,****$p\leq0.0001$。图4F提供了对照13月龄样品的星形胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。图4G提供了TauPS2APP 13月龄样品的星形胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。右上角显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图4H显示了斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组成。提供了显示每个样品的皮质和皮质下区域中每个星形胶质细胞亚聚类的密度(每mm^2计数)的堆积条形图(上方)。条形图中的阴影对应于图4F中的细胞类型图例。这些图显示了皮质中DAA的显著富集,尤其是在13月龄时。还提供了堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每个星形胶质细胞亚聚类的百分比(下方)。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图4I显示拟时间嵌入的DEG。显示了在拟时间嵌入上显示四种疾病上调基因表达的UMAP,并且按$\log_{10}$比例调整了原始计数的阴影比例。图4J显示了差异表达基因(DEG)的GSEA结果。术语按术语大小(20-1000)和标称p值(<0.01)进行过滤。图4K提供了矩阵图,显示了AD与对照比较中星形胶质细胞群经验证的DEG子集。提供的图显示了2766个基因数据集中靠前的显著改变(按p值排序)的DEG的行方向缩放表达值和64个基因验证结果。图4L显示了星形胶质细胞群的亚聚类。提供的图显示了从图2A中鉴定的6,789个星形胶质细胞的转录组谱的放大扩散图谱可视化(上方)。通过莱顿算法鉴定出星形胶质细胞的三个亚水平聚类(Astro1(n=2,547)、Astro2(n=3,278)和Astro3(n=964))。根据先前的报道和患病样品中的显著富集,Astro3聚类通过其基因标志物被注释为疾病相关星形胶质细胞(DAA)。还包括每个样品的星形胶质细胞亚水平细胞聚类的扩散图谱嵌入(对照8月龄、TauPS2APP 8月龄、对照13月龄、TauPS2APP 13月龄,每种条件下n=2)。图4M显示了跨越不同亚聚类的代表性标志物的表达水平。提供了显示每个星形胶质细胞亚群代表性标志物的平均基因表达(阴影)和表达它们

的细胞百分比(点大小)两者的点图。对每列的基因表达值进行归一化。图4N提供了具有拟时间轨迹的星形胶质细胞群的扩散图谱。提供了Monocle 3生成的星形胶质细胞转录组谱的扩散图谱可视化(上方)。颜色图表示拟时间值。在低维嵌入上构建并绘制了相应的轨迹,以说明群体的生物进展。还包括了每个样品的图。轨迹起始锚点是根据Astro1群体手动选择的。黑色箭头突出显示与疾病相关基因表达变化相关的轨迹上的分叉点。来自不同样品的细胞在扩散图谱嵌入中分别突出显示(下方)。图4O提供了显示图4O中鉴定的不同类型星形胶质细胞以及图4L中鉴定的轨迹的扩散图谱。显示了带有亚聚类注释的星形胶质细胞群的拟时间嵌入。提供了显示拟时间计算中使用的低维嵌入以及星形胶质细胞亚聚类注释的图。图4P提供了TauPS2APP 13月龄样品的星形胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。图4Q提供了TauPS2APP 13月龄样品的星形胶质细胞群的空间图谱。比例尺,100μm。显示了两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。黑色虚线标记了皮质、胼胝体(cc)和海马体之间的边界。图4R显示了斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组成。提供的箱线图显示了每个样品(对照小鼠和TauPS2APP小鼠)皮质和海马体区域中每个星形胶质细胞亚聚类在两个时间点的密度(每mm^2计数)(上方)。条形图中的阴影对应于图4Q中的细胞类型图例。这些图显示了皮质中DAA的显著富集,尤其是在13月龄时。还提供了堆叠条形图,显示13月龄时Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中星形胶质细胞亚聚类的密度(每mm^2计数)(下方)。在每个区域中,包括每个区域中每个亚群的细胞密度作为比较的参考。图4S显示拟时间嵌入的DEG。显示了显示星形胶质细胞亚群的四个代表性基因标志物在拟时间嵌入上的表达的扩散图谱,并且通过log_{10}变换调整了原始计数的阴影比例。图4T提供了矩阵图,显示了跨越距离斑块的多个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40、40+μm)的星形胶质细胞的空间DEG的z分数。

[0051] 图5A-5V显示了Tau加斑块病理学下少突胶质细胞和前体细胞的亚水平聚类和组成。显示了TauPS2APP和对照样品中少突胶质细胞和前体细胞的时空基因表达分析。图5A提供了少突胶质细胞和前体细胞(OPC)群体的UMAP以及亚聚类注释。提供的UMAP图显示了从图2A中鉴定的4966个少突胶质细胞和549个OPC的转录组谱的低维表示。通过莱顿算法鉴定出三个亚水平聚类(Oligo1(n=4,295)、Oligo2(n=181)、Oligo3(n=490))和OPC(n=549)。Oligo3聚类被注释为富病变的少突胶质细胞。还包括每个样品(对照8月龄、TauPS2APP 8月龄、对照13月龄、TauPS2APP 13月龄)的亚级细胞聚类的UMAP图。图5B显示了少突胶质细胞的跨越不同亚聚类的代表性标志物的表达水平(行方向z得分)。图5C提供了具有拟时间轨迹的少突胶质细胞相关细胞群的UMAP。提供了显示Monocle 3生成的少突胶质细胞和OPC转录组谱的低维表示的图。颜色图表示拟时间值。在低维嵌入上构建并绘制了相应的轨迹,以说明群体的生物进展。还包括了每个样品的图。图5D显示了具有亚聚类注释的少突胶质细胞相关细胞群的拟时间嵌入。提供的图显示了拟时间计算中使用的低维嵌入以及少突胶质细胞和前体细胞的亚聚类注释。图5E显示了少突胶质细胞和少突胶质细胞前体细胞的三个亚群的拟时间分布,以及四个样品中这些细胞的拟时间分布。Mann-Whitney-Wilcoxon检验,ns:$p>0.05$,*$p\leq0.05$,**$p\leq0.01$,***$p\leq0.001$,****$p\leq0.0001$。图5F提供了对照13月龄样品的少突胶质细胞相关群体的空间图谱。比例尺,100μm。图5G提供了TauPS2APP 13月龄样品的少突胶质细胞相关群体的空间图谱。比例尺,100μm。右上角提供两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图5H显示了斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组

成。提供了显示每个样品的皮质和皮质下区域中每个少突胶质细胞亚聚类和OPC的密度(每mm^2计数)的堆积条形图(上方)。条形图中的阴影对应于图5F中的细胞类型图例。还提供了堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每个少突胶质细胞亚聚类和OPC的百分比(下方)。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图5I显示了差异表达基因(DEG)的基因集富集分析(GSEA)结果。术语按术语大小20-1000和标称p值<0.01进行过滤。图5J显示了表达标志物基因的细胞的拟时间嵌入。提供了显示表达代表性标志物的细胞的拟时间分布的UMAP。图5K提供了矩阵图,显示了AD与对照比较中的少突胶质细胞相关群体经验证的DEG子集。提供的图显示了2766个基因数据集中靠前的显著改变(按p值排序)的DEG的行方向缩放表达值和64个基因验证结果。图5L显示了少突胶质细胞和前体细胞(OPC)群体的亚聚类。提供了从图2A中鉴定出的11,265个少突胶质细胞和1,269个OPC的放大扩散图谱可视化(上方)。显示了通过莱顿聚类鉴定的三个少突胶质细胞亚聚类:Oligo1(n=9,594)、Oligo2(n=910)、Oligo3(n=761)和OPC(n=1,269)。还提供了每个样品(对照8月龄、TauPS2APP 8月龄、对照13月龄、TauPS2APP 13月龄)的少突胶质细胞亚聚类和OPC的扩散图谱嵌入(下方)。图5M显示了少突胶质细胞的亚聚类和OPC中代表性标志物的表达水平。提供的点图显示了每个亚群代表性标志物的平均基因表达(阴影)和表达它们的细胞百分比(点大小)两者。对每列的基因表达值进行归一化。图5N显示了少突胶质细胞相关细胞群的扩散图谱拟时间轨迹可视化。提供了由Monocle 3生成的少突胶质细胞和OPC的拟时间轨迹的扩散图谱可视化(上方)。颜色图表示拟时间值。在扩散图谱嵌入上绘制了相应的拟时间轨迹。轨迹起始锚点是根据OPC群体手动选择的。黑色箭头突出显示与疾病相关基因表达变化相关的轨迹上的分叉点。来自不同样品的细胞在扩散图谱嵌入中分别突出显示(下方)。图5O提供了显示图5L中鉴定的不同类型的少突胶质细胞和OPC以及轨迹的扩散图谱。图5P提供了对照13月龄样品的少突胶质细胞相关群体的空间细胞图。比例尺,100μm。图5Q提供了TauPS2APP 13月龄样品的少突胶质细胞相关群体的空间细胞图。比例尺,100μm。提供了两个放大部分(I、II),显示黑框中突出显示的放大区域。比例尺,10μm。黑色虚线标记了皮质、胼胝体(cc)、海马体和海马白质之间的边界。图5R提供的箱线图显示对照小鼠和TauPS2APP小鼠的皮质、胼胝体和海马体区域中每种少突胶质细胞亚型和OPC在两个时间点的密度(每mm^2计数)。这些图显示Oligo2在胼胝体(cc)和海马体区域显著富集。图5S提供了堆积条形图,显示了13月龄时Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中少突胶质细胞亚聚类和OPC的密度(每mm^2计数)(下方)。包括每个区域中每个亚群的总体细胞密度作为比较参考(全部)。图5T显示了与p-Tau病理学相关的少突胶质细胞谱系的细胞类型组成分析。13月龄TauPS2APP样品中的组织区域被分为20μm x 20μm网格,按p-Tau密度排序。由网格线划分的块按p-Tau阳性像素的百分比进行排序,并分为3个箱:零(0%)、低(1%-50%)、高(50%-100%)。根据是否存在Aβ斑块,高p-Tau箱进一步分为两组。提供了显示每种少突胶质细胞相关亚型每块的平均细胞数的堆积条形图。图5U显示了海马白质区域中少突胶质细胞和OPC的细胞密度和亚型组成。图5V提供了矩阵图,显示了跨越距离斑块的多个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40、40+μm)的少突胶质细胞的空间DEG的z分数。

[0052] 图6A-6U显示了TauPS2APP和对照样品中差异基因表达分析和神经元的空间信息。图6A提供了兴奋性神经元群的空间图谱。比例尺,100μm。TauPS2APP 13月龄样品的(总细胞

计数:CTX-Ex1:2,292,CTX-Ex2:2,766,CTX-Ex3:1,184,CTX-Ex4:2,445,CA1:2,754,CA2:436,CA3:1,878,DG:4,377),其中下方为CA1区域的一个放大切片。比例尺,10μm。p-Tau蛋白信号在细胞顶部呈灰色。图6B提供了抑制性神经元群的空间图谱。比例尺,100μm。TauPS2APP的Cnr1:421,Lamp5:191,Pvalb:864,Sst:529。下方显示了CA1区域的13月龄样品和一个放大切片。比例尺,10μm。p-Tau蛋白信号在细胞顶部呈灰色。图6C显示了斑块周围的兴奋性神经元组成。提供的堆积条形图显示了来自AD 13月龄样品的皮质和皮质下区域的Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中兴奋性神经元群体的每个亚聚类的百分比。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图6D显示了斑块周围的抑制性神经元组成。提供的堆积条形图显示了来自AD 13月龄样品的皮质和皮质下区域的Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中抑制性神经元群体的每个亚聚类的百分比。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图6E显示了p-Tau阳性神经元的细胞类型组成。提供了堆叠条形图,显示了当前阈值下每个AD样品中tau阳性兴奋性神经元和抑制性神经元的组成。图6F显示了斑块周围的p-Tau信号定量。p-Tau+像素(强度>阈值)在来自TauPS2APP13月龄样品的皮质和皮质下区域的Aβ斑块周围的每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)内进行量化。通过环面积对值进行归一化。图6G提供了具有拟时间轨迹的锯齿回(DG)细胞群的UMAP。提供的图显示了Monocle 3生成的每个样品的锯齿回区域细胞群转录组学谱的低维表示。颜色图表示拟时间值。在低维嵌入上构建并绘制了相应的轨迹,以说明群体的生物进展。还包括了每个样品的图。图6H提供了DG群体由拟时间进行阴影表示的空间细胞图。比例尺,100μm。图6I显示拟时间嵌入的DEG。提供的UMAP显示了拟时间嵌入上DG神经元的DEG分析中四个显著改变的基因的表达。原始计数的阴影比例按$\log_{10}$比例进行调整。图6J提供了矩阵图,显示了来自AD与对照比较的兴奋性和抑制性神经元群体的经验证的DEG子集。提供的图显示了2,766个基因数据集中靠前的显著改变(按p值排序)的DEG的行方向缩放表达值和64个基因验证结果。图6K显示了皮层兴奋性神经元细胞群的亚聚类。UMAP可视化显示了通过莱顿聚类鉴定出的四个皮层兴奋性神经元细胞亚聚类:CTX-Ex1(n=4,972)、CTX-Ex2(n=6,049)、CTX-Ex3(n=4,158)和CTX-Ex4(n=3,304)。图6L显示了皮层兴奋性神经元细胞不同亚群中代表性基因标志物的表达水平。提供了显示每个亚群代表性标志物的平均基因表达(阴影)和表达它们的细胞百分比(点大小)两者的点图。对每列的基因表达值进行归一化。图6M显示了抑制性神经元细胞群的亚聚类。UMAP可视化显示了通过莱顿聚类鉴定出的六个抑制性细胞亚群:Cnr1(n=512)、Lamp5(n=573)、Pvalb(n=1,392)、Pvalb-Nog(n=410)、Sst(n=959)和Vip(n=317)。图6N显示了抑制性神经元细胞的跨越不同亚聚类的代表性基因标志物的表达水平。提供了显示每个亚群代表性标志物的平均基因表达(阴影)和表达它们的细胞百分比(点大小)两者的点图。对每列的基因表达值进行归一化。图6O提供了TauPS2APP 13月龄样品中兴奋性神经元群的Aβ斑块和p-Tau的空间图谱(上方)。比例尺,100μm。TauPS2APP 13月龄样品的总细胞计数:CTX-Ex1:2,292,CTX-Ex2:2,766,CTX-Ex3:1,184,CTX-Ex4:2,445,CA1:2,754,CA2:436,CA3:1,878,DG:4,377),其中下方显示了黑框中所示的CA1区域部分的高放大倍数视图。比例尺,10μm。p-Tau蛋白信号在细胞顶部呈灰色。图6O提供了TauPS2APP 13月龄样品中抑制性神经元群的Aβ斑块和p-Tau的空间图谱(上方)。比例尺,100μm。TauPS2APP的Cnr1:421,Lamp5:191,Pvalb:864,Sst:529。下方显示了13月龄样品,其中黑框显示了CA1区

域部分的高放大倍数视图。比例尺,10μm。p-Tau蛋白信号在细胞顶部呈灰色。图6Q显示了斑块周围的兴奋性神经元组成。提供的堆积条形图显示了来自AD TauPS2APP 13月龄样品的皮质和皮质下区域的Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中不同大脑区域的兴奋性神经元群的每个亚聚类的密度(每mm^2计数)。在每个区域中,包括每种细胞类型亚群的总体细胞密度作为参考比较标准。图6R显示了斑块周围的抑制性神经元组成。提供的堆积条形图显示了来自AD TauPS2APP 13月龄样品的皮质和皮质下区域的Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中不同大脑区域的抑制性神经元群的每个亚聚类的密度(每mm^2计数)。在每个区域中,包括每种细胞类型亚群的总体细胞密度作为参考比较标准。图6S提供了显示对照和TauPS2APP小鼠中每个皮质兴奋性神经元和抑制性神经元亚型的密度(每mm^2计数)的条形图。图6T显示了斑块周围的p-Tau信号定量。p-Tau+像素(强度>阈值)在来自TauPS2APP 13月龄样品的皮质和皮质下区域的Aβ斑块周围的每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)内进行量化。通过环面积对值进行归一化。Y轴值通过每个大脑区域的总p-Tau信号进行归一化。图6U显示了p-Tau阳性神经元的细胞类型组成。提供的堆叠条形图显示了每个AD样品(对照和TauPS2APP)中在当前阈值下在两个时间点由tau阳性像素与每个细胞面积的比率定义的p-Tau阳性兴奋性神经元和抑制性神经元的组成。

[0053] 图7A-7M显示了疾病相关细胞类型的综合通路和空间分析。图7A提供了GSEA热图,显示了AD 13月龄样品中每种感兴趣的细胞类型的DEG中富集的显著(标称p值<0.05)生物过程相关术语。术语按术语大小过滤:20-1000。图块的阴影代表归一化的富集分数。图7B提供了矩阵图,显示与25μm环外的细胞相比,来自25μm环内的细胞的AD 13月龄样品的近斑块区域中的基因上调(LogFC>0.1)(由行方向z分数进行阴影表示)。图7C提供了维恩图,突出显示了AD 13月龄样品中的斑块诱导基因(PIG)与AD 8月龄样品中的PIG以及先前报道的18月龄AppNL-G-F小鼠中的PIG的重叠。图7D提供了AD 8月龄样品(左)和13月龄样品(右)中Aβ斑块周围的疾病相关小胶质细胞(DAM)、疾病相关星形胶质细胞(DAA)、少突胶质细胞、OPC和神经元细胞群的空间直方图。在直方图上,细胞在每个斑块边缘的2D最大投影中以10μm的间隔进行计数。图7E提供了8月龄AD小鼠(左)和13月龄小鼠大脑中Aβ斑块周围的DAM、DAA、少突胶质细胞、OPC、小胶质细胞(DAM除外)、星形胶质细胞(DAA除外)和神经元细胞群的示意图。示意图中的细胞数量是计算出每个环中每种细胞类型的平均细胞数量的近似值。图7F-7G提供了矩阵图,显示了TauPS2APP 8月龄样品(图7F)和TauPS2APP 13月龄样品(图7G)中Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40、>40μm)的基因聚类结果。由行方向z分数进行阴影表示。图7H-7I提供了矩阵图,显示在TauPS2APP 8月龄样品(图7H)和TauPS2APP 13月龄样品(图7I)中的Aβ斑块周围的每个距离区间(0-10、10-20、20-30、30-40、>40μm)中的噬菌斑诱导基因(在0-40区间富集,调整p值<0.01)。由行方向z分数着色。图7J显示了维恩图,突出显示了TauPS2APP 8月龄和13月龄样品中的SDEG与TauPS2APP中的SDEG以及先前报道的18月龄App_{NL-G-F}小鼠中的PIG的重叠。图7K显示了TauPS2APP 8月龄和13月龄样品中的SDEG以及先前报道的PIG的显著富集的GO术语。图7L提供了AD TauPS2APP 8月龄样品(左侧)和13月龄样品(右侧)中Aβ斑块周围的Micro3疾病相关小胶质细胞(DAM)、Astro3疾病相关星形胶质细胞(DAA)、Oligo2/3少突胶质细胞、OPC和神经元细胞群的空间直方图。在直方图上,细胞在每个斑块边缘的2D最大投影中以10μm的间隔进行计数。图7M提

供了8月龄(左侧)和13月龄小鼠大脑海马白质中Aβ斑块和少突胶质细胞亚型周围不同细胞类型(例如DAM、DAA、少突胶质细胞、OPC、小胶质细胞(DAM除外)、星形胶质细胞(DAA除外)和神经元细胞群)的示意图。示意图中的细胞数量是每个环中每种细胞类型的细胞数量的近似比率。

[0054] 图8A-8E显示了STARmap Pro方法的发展。图8A显示了STARmap Pro程序,其中在mRNA原位杂交和扩增之后进行p-Tau一抗染色。成像结果显示来自cDNA扩增子和蛋白质两者的强烈信号。图8B显示了替代性程序,其中在mRNA原位杂交和扩增之前进行p-Tau一抗染色。成像结果显示来自cDNA扩增子的信号要弱得多,表明在抗体孵育和洗涤步骤期间发生了RNA降解。图8C提供了示意图,解释了STARmap Pro与先前的STARmap方法相比增强的特异性。在最初的STARmap方法设计中,所有基因的DNA探针在连接处共享相同的DNA序列,因此当附近有引物探针时,锁式探针仍然可以被环化和非特异性扩增。使用先前的STARmap方法时,这可能会导致错误信号。在STARmap Pro中,在连接位点放置了额外的5-nt条形码,可以防止非特异性结合探针的连接,从而提高特异性。图8D和8E显示了使用在连接位点附近具有(图8D)和不具有(图8E)条形码错配的SNAIL探针的STARmap Pro的成像结果。根据提供的图例显示细胞核的DAPI染色和所有cDNA扩增子的荧光DNA探针染色。

[0055] 图9A-9G显示了所有样品的高水平细胞类型分类结果。图9A提供了与2,766个基因数据集的每个高水平细胞类型比对的代表性基因标志物的堆叠小提琴图。图9B提供了与2,766基因和64基因数据集的每个高水平细胞类型比对的代表性标志物的基因表达热图。64个基因的数据成功地概括了高水平聚类结果。每个基因的表达在每个细胞中的所有基因上进行z评分。图9C提供了统一流形近似(UMAP)图,可视化来自验证数据集的四(4)个样品的36,625个细胞的转录组谱的非线性维数降低。提供的图显示了13个高水平聚类(皮质兴奋性神经元(CTX-Ex,8,640个细胞)、抑制性神经元(In,2,858个细胞)、CA1兴奋性神经元(CA1-Ex,2,967个细胞)、CA2兴奋性神经元(CA2-Ex,331个细胞)、CA3兴奋性神经元(CA3-Ex,1,751个细胞)、锯齿回(DG,4,560个细胞)、星形胶质细胞(Astro,3,423个细胞)、内皮细胞(Endo,1,661个细胞)、小胶质细胞(Micro,2,183个细胞)、少突胶质细胞(Oligo,5,268个细胞)、少突胶质细胞前体细胞(OPC,711个细胞)、平滑肌细胞(SMC,1,146个细胞)和混合未鉴定细胞(Mix,1126个细胞)。图9D和9E显示了2,766基因数据集(图9D)和64基因数据集(图9E)中的四(4)个样品的皮层和海马体区域中的高水平细胞类型的空间图谱。比例尺,100μm。图9F和9G显示了2,766基因数据集(F)和64基因验证数据集(G)的8月龄和13月龄样品中不同距离间隔的Aβ斑块周围的细胞类型组成。提供的堆叠条形图显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每种高水平细胞类型的百分比。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。

[0056] 图10A-10E显示了小胶质细胞群体的额外基因表达和空间信息。图10A提供了8月龄对照样品和TauPS2APP样品中小胶质细胞亚型的空间图谱。比例尺,100μm。右侧显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图10B显示了8月龄样品中TauPS2APP样品的Aβ斑块周围不同距离间隔的细胞类型组成。提供的堆叠条形图显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每种高水平细胞类型的百分比。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图10C提供了由拟时间着色的小胶质细胞的空间图谱。比例尺,100μm。右侧显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图10D显示了小胶质细胞相对于斑块的拟

时间值。提供的箱线图显示了Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中小胶质细胞的拟时间分布。包括所有小胶质细胞的分布作为参考。框阴影表示中值拟时间。图10E提供了小胶质细胞差异表达的火山图。绘图显示了8月龄和13月龄样品中跨越AD样品和对照样品中小胶质细胞的基因表达(y轴:-log调整的p值,x轴:平均对数倍数变化)。差异表达基因(调整后p值<0.05,logFC的绝对值>0.1)具有正倍数变化值(上调)或负倍数变化值(下调)。

[0057] 图11A-11E显示了星形胶质细胞群体的额外基因表达和空间信息。图11A提供了8月龄样品中的对照样品和TauPS2APP样品中的星形胶质细胞亚型的空间图谱。比例尺,100μm。右侧显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图11B显示了TauPS2APP 8月龄样品中的Aβ斑块周围不同距离间隔的细胞类型组成。提供的堆叠条形图显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每种星形胶质细胞亚群的百分比。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图11C提供了由星形胶质细胞群体的拟时间进行阴影表示的星形胶质细胞的空间图谱。比例尺,100μm。右侧显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图11D显示了与斑块相关的拟时间。提供的箱线图显示了Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中星形胶质细胞的拟时间分布。包括所有星形胶质细胞的分布作为参考。图11E提供了显示星形胶质细胞中差异基因表达的火山图。提供的图显示了跨越AD和对照8月龄和13月龄样品的星形胶质细胞的基因表达(y轴:-log调整的p值,x轴:平均对数倍数变化)。差异表达基因(调整后p值<0.05,logFC的绝对值>0.1)具有正倍数变化值(上调)或负倍数变化值(下调)。

[0058] 图12A-12F显示了少突胶质细胞和OPC细胞群的额外基因表达和空间信息。图12A提供了对照和TauPS2APP 8月龄样品的少突胶质细胞和OPC群体的细胞分辨空间图谱。比例尺,100μm。右侧显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图12B显示了TauPS2APP 8月龄样品中的Aβ斑块周围不同距离间隔的细胞类型组成。提供的堆叠条形图显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每种少突胶质细胞亚群和OPC的百分比。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图12C提供了由少突胶质细胞相关细胞群的拟时间进行阴影表示的空间图谱。比例尺,100μm。右侧显示两个放大部分(I、II)。比例尺,10μm。图12D显示了与斑块相关的拟时间。提供的箱线图显示了Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中少突胶质细胞的拟时间分布。包括所有少突胶质细胞的分布作为参考。图12E显示了与斑块相关的拟时间。提供的箱线图显示了Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中OPC的拟时间分布。包括所有OPC的分布作为参考。图12E提供了显示少突胶质细胞中差异表达的火山图。提供的图显示了跨越AD和对照8月龄和13月龄样品的少突胶质细胞的基因表达(y轴:-log调整的p值,x轴:平均对数倍数变化)。差异表达基因(调整后p值<0.05,logFC的绝对值>0.1)具有正倍数变化值(上调)或负倍数变化值(下调)。

[0059] 图13A-13G显示了神经元群体的额外基因表达和空间信息。图13A提供了四个样品的兴奋性神经元群的空间图谱。比例尺,100μm。图13B提供了四个样品的抑制性神经元群的空间图谱。比例尺,100μm。图13C显示了兴奋性神经元的斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组成。提供了显示每个样品的皮质和皮质下区域中每个兴奋性神经元亚聚类的密度(每mm^2计数)的堆积条形图(上方)。条形图中的阴影对应于图13A中的细胞类型图例。还提供了

堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每个兴奋性神经元亚聚类的百分比(下方)。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图13D显示了抑制性神经元的斑块周围的分区细胞密度和细胞类型组成。提供了显示每个样品的皮质和皮质下区域中每个抑制性神经元亚聚类的密度(每mm^2计数)的堆积条形图(上方)。条形图中的阴影对应于图13B中的细胞类型图例。还提供了堆叠条形图,显示Aβ斑块周围每个距离间隔(0-10、10-20、20-30、30-40和40-50μm)中每个抑制性神经元亚聚类的百分比(下方)。在每个区域中,都包含总体细胞类型组成作为参考。图13E-13G显示了使用SynGO对来自兴奋性神经元、抑制性神经元和具有Tau病理学的CA1细胞的DEG的突触基因本体术语富集。旭日图的阴影表示1% FDR时的富集-$\log_{10}$ Q值。

[0060] 图14A-14E显示了AD小鼠脑的通路和空间分析。图14A提供了基因本体热图,显示了AD 8月龄样品中每种感兴趣的细胞类型的上调基因中富集的生物过程相关术语。术语按术语大小过滤:20-1000。图块的阴影代表富集-$\log_{10}$(FDR)值。图14B提供了使用Cytoscape以及EnrichmentMap和AutoAnnotate apps从神经元细胞(兴奋性、抑制性神经元)和非神经元细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞)中的差异表达基因(abs(LogFC)>0.1,Wilcox检验p值<0.05)生成的功能富集图。每个圆圈代表一个GO术语,并用细胞类型进行阴影处理,以说明来自每个细胞聚类的DEG的共同和不同贡献。椭圆描绘了GO术语的集群,由Autoannotate app聚集。图14C(左侧)提供了热图,显示AD 13月龄样品中相关细胞类型与Aβ斑块之间的平均最近邻距离。平均最近邻距离计算如下:1)对于每个细胞和斑块,计算彼此之间的欧氏距离,然后找到每种细胞类型或斑块的最近的细胞并保存距离。2)对于每个感兴趣的比较(即,Micro与斑块),计算其距离分布的平均值。图14C(右侧)显示了与图14C(左侧)相同的距离但使用打乱(随机)的细胞类型标签。图14D(左侧)提供了热图,显示AD 8月龄样品中相关细胞类型与Aβ斑块之间的平均最近邻距离。计算与图14C中使用的相同。图14D(右侧)显示了与图14D(左侧)相同的距离但使用打乱(随机)的细胞类型标签。图14E提供了矩阵图,显示与25μm环外的细胞相比,AD 8月龄样品的近斑块区域中来自25μm环内的细胞的上调的基因。

[0061] 图15是与鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化有关的方法的一个实施方案的流程图。

[0062] 图16是与鉴定至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化有关的方法的一个实施方案的流程图。

[0063] 图17是与使用相机捕获至少一个图像有关的方法的一个实施方案的流程图。

[0064] 图18是对来自多个图像的空间位置进行空间对准的一个实施方案的流程图。

[0065] 图19是与确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的细胞类型的细胞数量相关的方法的一个实施方案的流程图。

[0066] 图20是与确定细胞的细胞类型有关的方法的一个实施方案的流程图。

[0067] 图21是可以在其上实现各种功能或方法的计算机系统的框图。

[0068] 定义

[0069] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常理解的含义。以下参考文献为本领域技术人员提供了本发明中使用的许多术语的一般定义:Singletonet al.,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology

(2nd ed.1994);The Cambridge Dictionary of Science and Technology(Walker ed., 1988);The Glossary of Genetics,5th Ed.,R.Rieger et al.(eds.),Springer Verlag (1991);以及Hale&Marham,The Harper Collins Dictionary of Biology(1991)。如本文所用,除非另有说明,否则以下术语具有它们所赋予的含义。

[0070] 术语“施用(administer)”、“施用(administering)”和“施用(administration)”是指将治疗或治疗剂、或治疗或治疗剂的组合物植入、吸收、摄取、注射、吸入或以其他方式引入受试者体内或受试者上。

[0071] 如本文所用,术语“扩增子”是指作为扩增反应的产物(即,遗传片段或靶序列的一个或多个拷贝的产生)或复制反应的产物的核酸(例如,DNA或RNA)。扩增子可以使用例如PCR或其他聚合反应人工形成。术语“串联的扩增子”是指连接在一起形成单个核酸分子的多个扩增子。串联的扩增子可以例如通过滚环扩增(RCA)形成,其中环状寡核苷酸被扩增以产生寡核苷酸的多个线性拷贝作为包含多个串联的扩增子的单个核酸分子。

[0072] “抗体”是指属于免疫球蛋白超家族的糖蛋白。术语抗体和免疫球蛋白可互换使用。除了一些例外,哺乳动物抗体通常由基本结构单元组成,每个基本结构单元具有两条大重链和两条小轻链。存在多种不同类型的抗体重链,以及多种不同种类的抗体,它们根据它们具有的重链被分为不同的同种型。已知哺乳动物中有五种不同的抗体同种型(IgG、IgA、IgE、IgD和IgM),它们发挥不同的作用,并帮助针对它们遇到的每种不同类型的外源物指导适当的免疫应答。在一些实施方案中,本文使用的抗体结合感兴趣的蛋白质(例如,在细胞中表达的任何感兴趣的蛋白质)。本文使用的术语“抗体”还涵盖抗体片段和纳米抗体,以及抗体的变体以及抗体片段和纳米抗体的变体。

[0073] 术语“癌症”是指一类以异常细胞发展为特征的疾病,这些异常细胞不受控制地增殖并具有渗透和破坏正常身体组织的能力。参见例如,Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.;Hensyled.;Williams&Wilkins:Philadelphia,1990。示例性癌症包括但不限于听神经瘤;腺癌;肾上腺癌;肛门癌;血管肉瘤(例如,淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、血管内皮瘤);阑尾癌;良性单克隆丙种球蛋白病;胆管癌(例如,胆管细胞型肝癌);膀胱癌;乳腺癌(例如,乳腺腺癌、乳腺乳头状癌、乳腺癌、乳腺髓样癌);脑癌(例如,脑膜瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤(例如,星形细胞瘤、少突胶质细胞瘤)、成神经管细胞瘤);支气管癌;类癌肿瘤;宫颈癌(例如,宫颈腺癌);绒毛膜癌;脊索瘤;颅咽管瘤;结直肠癌(例如,结肠癌、直肠癌、结直肠腺癌);结缔组织癌;上皮癌;室管膜瘤;内皮肉瘤(例如,卡波西肉瘤、多发性特发性出血性肉瘤);子宫内膜癌(例如子宫癌、子宫肉瘤);食管癌(例如,食管腺癌、巴雷特腺癌);尤因氏肉瘤;眼癌(例如,眼内黑色素瘤、视网膜母细胞瘤);普通嗜酸性粒细胞增多症;胆囊癌;胃癌(例如,胃腺癌);胃肠道间质瘤(GIST);生殖细胞癌;头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌、口腔癌(例如,口腔鳞状细胞癌)、咽喉癌(例如,喉癌、咽癌、鼻咽癌、口咽癌));造血系统癌症(例如,白血病,如急性淋巴细胞白血病(ALL)(例如B细胞ALL、T细胞ALL)、急性粒细胞白血病(AML)(例如B细胞AML、T细胞AML)、慢性髓细胞性白血病(CML)(例如B细胞CML、T细胞CML)和慢性淋巴细胞性白血病(CLL)(例如B细胞CLL、T细胞CLL);淋巴瘤,如霍奇金淋巴瘤(HL)(例如B细胞HL、T细胞HL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)(例如B细胞NHL,如弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)(例如,弥漫性大B细胞淋巴瘤)、滤泡性淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区B细胞淋巴瘤(例如粘膜相关淋巴组

织(MALT)淋巴瘤、结节边缘B细胞区淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤(即华氏巨球蛋白血症)、毛细胞白血病(HCL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴细胞性淋巴瘤和原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;以及T细胞NHL,如前体T淋巴细胞淋巴瘤/白血病、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)(例如皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)(例如蕈样肉芽肿、塞扎里综合征)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、结外自然杀伤T细胞淋巴瘤、肠病型T细胞淋巴瘤、皮下脂膜炎样T细胞淋巴瘤和间变性大细胞淋巴瘤);如上所述的一种或多种白血病/淋巴瘤的混合物;以及多发性骨髓瘤(MM))、重链疾病(例如,α链疾病、γ链疾病、μ链疾病);血管母细胞瘤;下咽癌;炎性肌纤维母细胞肿瘤;免疫细胞淀粉样变性;肾癌(例如,肾胚细胞瘤又名肾母细胞瘤、肾细胞癌);肝癌(例如,肝细胞癌(HCC)、恶性肝癌);肺癌(例如,支气管癌、小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌);平滑肌肉瘤(LMS);肥大细胞增多症(例如,系统性肥大细胞增多症);肌肉癌;骨髓增生异常综合征(MDS);间皮瘤;骨髓增殖性病症(MPD)(例如,真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET)、不明原因性髓样化生(AMM)又名骨髓纤维化(MF)、慢性特发性骨髓纤维化、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性中性粒细胞白血病(CNL)、嗜酸性粒细胞增多症(HES));成神经细胞瘤;神经纤维瘤(例如,神经纤维瘤病(NF)1型或2型、神经鞘瘤病);神经内分泌癌(例如,胃肠胰神经内分泌肿瘤(GEP-NET)、类癌瘤);骨肉瘤(例如,骨癌);卵巢癌(例如,囊腺癌、卵巢胚胎癌、卵巢腺癌);乳头状腺癌;胰腺癌(例如,胰腺腺癌、导管内乳头状粘液性肿瘤(IPMN)、胰岛细胞肿瘤);阴茎癌(例如,阴茎和阴囊佩吉特氏病);松果体瘤;原始神经外胚层肿瘤(PNT);浆细胞瘤形成;副肿瘤综合征;上皮内肿瘤;前列腺癌(例如,前列腺腺癌);直肠癌;横纹肌肉瘤;唾液腺癌;皮肤癌(例如,鳞状细胞癌(SCC)、角化棘皮瘤(KA)、黑色素瘤、基底细胞癌(BCC));小肠癌(例如,阑尾癌);软组织肉瘤(例如,恶性纤维组织细胞瘤(MFH)、脂肪肉瘤、恶性周围神经鞘瘤(MPNST)、软骨肉瘤、纤维肉瘤、肌肉瘤);皮脂腺癌;小肠癌;汗腺癌;滑膜瘤;睾丸癌(例如,精原细胞瘤、睾丸胚胎性癌);甲状腺癌(例如,甲状腺乳头状癌、乳头状甲状腺癌(PTC)、甲状腺髓样癌);尿道癌;阴道癌;和外阴癌(例如,外阴佩吉特氏病)。

[0074] 如本文所用,“细胞”可以存在于细胞群中(例如,在组织、样品、活检品、器官或类器官中)。在一些实施方案中,细胞群由多种不同的细胞类型组成。用于本公开的方法的细胞可以存在于生物体内、衍生自生物体的单一细胞类型内、或多种细胞类型的混合物内。包括天然存在的细胞和细胞群、基因工程细胞系、衍生自转基因动物的细胞、来自受试者的细胞等。实际上任何细胞类型和大小都可以适应本文所述的方法和系统。合适的细胞包括细菌、真菌、植物和动物细胞。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞(例如,复杂的细胞群,如天然存在的组织)。在一些实施方案中,细胞来自人类。在某些实施方案中,通过医疗程序如活组织检查从受试者(例如,人)收集细胞。替代性地,细胞可以是培养的群体(例如,衍生自复杂群体的培养物,或衍生自单一细胞类型的培养物其中细胞已分化成多个谱系)。细胞还可以在组织样品中原位提供。

[0075] 预期用于本公开的方法的细胞类型包括但不限于干细胞和祖细胞(例如,胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经嵴细胞等)、内皮细胞、肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞和骨骼肌细胞、间充质细胞、上皮细胞、造血细胞、淋巴细胞如T细胞(例如,Th1 T细胞、Th2 T细胞、Th0 T细胞、细胞毒性T细胞)和B细胞(例如,前B细胞)、单核细胞、树突状细胞、

中性粒细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、脂肪细胞、免疫细胞、神经元、肝细胞和涉及特定器官的细胞(例如,胸腺、内分泌腺、胰腺、脑、神经元、神经胶质细胞、星形胶质细胞、树突状细胞及其转基因细胞)。细胞还可以是不同类型的转化细胞或肿瘤细胞(例如,不同细胞来源的癌、不同细胞类型的淋巴瘤等)或任何种类的癌细胞(例如,来自本文公开的任何癌症)。不同来源的细胞(例如,外胚层、中胚层和内胚层)也预期用于本公开的方法中。在一些实施方案中,细胞是小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、兴奋性神经元或抑制性神经元。在一些实施方案中,多种细胞类型的细胞存在于同一样品中。

[0076] 如本文所用,术语“检测剂”是指可用于检测任何感兴趣的蛋白质或肽的存在或位置的任何药剂。在一些实施方案中,本文公开的方法包括使一种或多种细胞与一种或多种检测剂接触的步骤。本文公开的方法中使用的每种检测剂与感兴趣的蛋白质或肽结合。可用于本文所述方法的检测剂包括但不限于蛋白质、肽、核酸和小分子。在某些实施方案中,检测剂是与感兴趣的蛋白质结合的抗体。在某些实施方案中,检测剂包括抗体片段、抗体变体和纳米抗体。在某些实施方案中,检测剂包括适体。在某些实施方案中,检测剂包括受体或其片段。在一些实施方案中,检测剂包括小分子染料(例如,小分子X-34)。

[0077] 如本文所用,术语“基因”是指表达蛋白质的核酸片段,包括编码序列之前(5’非编码序列)和之后(3’非编码序列)的调节序列。

[0078] 如本文所用,“基因表达”是指将来自基因的信息用于基因产物的合成的过程。基因产物包括蛋白质和RNA转录物(例如,信使RNA、转运RNA或小核RNA)。基因表达包括转录和翻译。转录是DNA片段被RNA聚合酶转录为RNA的过程。翻译是RNA被核糖体翻译成肽或蛋白质的过程。如本文所用,术语“遗传信息”是指一种或多种基因和/或一种或多种RNA转录物(例如,任何数量的基因和/或RNA转录物)。

[0079] “神经退行性疾病”是指以神经细胞丧失为特征的一类神经系统疾病,包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化症、tau蛋白病(包括额颞叶痴呆)和亨廷顿病。在一些实施方案中,神经退行性疾病是阿尔茨海默病。对阿尔茨海默病的病因知之甚少,但大多数情况下认为包含遗传基础。该疾病的特征在于大脑皮层神经元和突触丧失,导致受影响区域萎缩。从生化角度来看,阿尔茨海默病的特征在于蛋白质错误折叠疾病,由大脑中异常折叠的淀粉样β蛋白和tau蛋白的斑块积累引起。阿尔茨海默病的症状包括但不限于难以记住最近发生的事件、语言问题、迷失方向、情绪波动、失去动力、自我忽视和行为问题。最终,身体机能逐渐丧失,阿尔茨海默病最终导致死亡。目前治疗旨在治疗由疾病引起的认知问题(例如,使用乙酰胆碱酯酶抑制剂或NMDA受体拮抗剂)、心理社会干预(例如,行为导向或认知导向方法)和一般护理。目前没有任何治疗方法可以完全阻止或逆转疾病的进展。

[0080] 术语“多核苷酸”、“核苷酸序列”、“核酸”、“核酸分子”、“核酸序列”和“寡核苷酸”是指DNA和RNA中的一系列核苷酸碱基(也称为“核苷酸”)且意指具有两个或更多个核苷酸的任何链。多核苷酸可以是嵌合混合物或其衍生物或修饰形式,并且可以是单链的或双链的。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸主链上进行修饰,例如以改善分子的稳定性、其杂交参数等。

[0081] “蛋白质”、“肽”或“多肽”包含通过肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。该术语指任何大小、结构或功能的蛋白质、多肽和肽。通常,蛋白质的长度为至少三个氨基酸。蛋白质可以指单个蛋白质或蛋白质的集合。本发明的蛋白质优选仅含有天然氨基酸,尽管也

可以替代性地使用本领域已知的非天然氨基酸(即,自然界中不存在但可以掺入多肽链的化合物)和/或氨基酸类似物。此外,蛋白质中的一个或多个氨基酸可以被修饰,例如,通过添加化学实体,如碳水化合物基团、羟基、磷酸基团、法呢基、异法呢基、脂肪酸基团、用于缀合或官能化的接头、或其他修饰。蛋白质还可以是单分子或者可以是多分子复合物。蛋白质可以是天然存在的蛋白质或肽的片段。蛋白质可以是天然存在的、重组的、合成的或这些的任意组合。

[0082] 如本文所用,“拟时间”是指对细胞中基因的差异表达进行建模的方法,并且在Van den Berge,K.et al.Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data.Nature Communications 2020,11,1-13中进一步描述,其通过引用并入本文。

[0083] “转录物”或“RNA转录物”是由RNA聚合酶催化的DNA序列转录产生的产物。当RNA转录物是DNA序列的互补拷贝时,其被称为原始转录物,或者其可以是衍生自原始转录物的转录后加工的RNA序列并被称为成熟RNA。“信使RNA(mRNA)”是指没有内含子并且可以被细胞翻译成多肽的RNA。“cRNA”是指从重组cDNA模板转录的互补RNA。“cDNA”是指与mRNA模板互补并衍生自mRNA模板的DNA。

[0084] 术语“样品”或“生物样品”是指包括以下在内的任何样品:组织样品(如组织切片、手术活检物和组织的针吸活检物);细胞样品(例如,细胞学涂片(如巴氏涂片或血涂片)或通过显微切割获得的细胞样品);或细胞级分、片段或细胞器(如通过裂解细胞并通过离心或其他方式分离其组分而获得)。生物样品的其他实例包括但不限于血液、血清、尿液、精液、排泄物、脑脊液、间隙液、粘液、泪液、汗液、脓液、活检组织(例如,通过手术活检或针刺活检获得)、乳头抽吸物、奶液、阴道液、唾液、拭子(如口腔拭子)或含有衍生自第一生物样品的生物分子的任何材料。在一些实施方案中,生物样品是取自受试者的手术活检物,例如本文所述的任何组织的活检物。在某些实施方案中,生物样品是肿瘤活检物(例如,来自诊断患有、怀疑患有或认为患有癌症的受试者)。在一些实施方案中,样品是脑组织。在一些实施方案中,组织是心脏组织。在一些实施方案中,组织是肌肉组织。

[0085] 考虑施用的“受试者”是指人类(即任何年龄组的男性或女性,例如儿科受试者(例如婴儿、儿童或青少年)或成人受试者(例如青年、中年人或老年人)或非人类动物。在一些实施方案中,非人动物是哺乳动物(例如,灵长类动物(例如,食蟹猴或恒河猴)或小鼠)。术语“患者”是指需要治疗疾病的受试者。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,患者是人。人类可以是处于任何发育阶段的男性或女性。“需要”治疗疾病或病症的受试者或患者包括但不限于表现出疾病或病症(例如,阿尔茨海默病)的任何风险因素或症状的受试者或患者。在一些实施方案中,受试者是非人类实验动物(例如,小鼠)。

[0086] 治疗或治疗剂的“治疗有效量”是足以在病况的治疗中提供治疗益处或延迟或最小化与病况相关的一种或多种症状的量。治疗或治疗剂的治疗有效量是指在病况的治疗中提供治疗益处的单独的疗法或与其他疗法组合的疗法的量。术语“治疗有效量”可以涵盖改善总体疗法、减少或避免病况的症状、体征或原因、和/或增强另一种治疗剂的治疗功效的量。

[0087] 如本文所用,“组织”是来自相同来源的一组细胞及其细胞外基质。细胞一起执行特定的功能。多种组织类型联合在一起形成一个器官。细胞可以是不同的细胞类型。在一些

实施方案中,组织是上皮组织。上皮组织由覆盖器官表面(例如,皮肤表面、气道、软器官、生殖道和消化道内壁)的细胞形成。上皮组织发挥保护功能,也参与分泌、排泄和吸收。上皮组织的实例包括但不限于单层鳞状上皮、复层鳞状上皮、单层立方上皮、移行上皮、拟复层上皮、柱状上皮和腺上皮。在一些实施方案中,组织是结缔组织。结缔组织是由被非生命物质(例如,细胞外基质)分隔的细胞组成的纤维组织。结缔组织为器官提供形状并将器官固定到位。结缔组织包括纤维结缔组织、骨骼结缔组织和液体结缔组织。结缔组织的实例包括但不限于血液、骨、肌腱、韧带、脂肪和网状结缔组织。在一些实施方案中,组织是肌肉组织。肌肉组织是由肌肉细胞形成的主动收缩组织。肌肉组织的功能是产生力并引起运动。肌肉组织包括平滑肌(例如,在器官的内壁中发现的)、骨骼肌(例如,通常附着在骨上的)和心肌(例如,在心脏中发现的,其收缩以将血液泵送到生物体全身)。在一些实施方案中,组织是神经组织。神经组织包括构成中枢神经系统和周围神经系统的细胞。神经组织形成脑、脊髓、脑神经和脊神经(例如,运动神经元)。在一些实施方案中,组织是脑组织。在一些实施方案中,组织是胎盘组织。在一些实施方案中,组织是心脏组织。

[0088] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”是指本文所述的疾病(例如,阿尔茨海默病)的逆转、减轻、延迟发作或抑制进展。在一些实施方案中,可以在已经出现或已经观察到疾病的一种或多种体征或症状之后施用治疗(例如,预防性地(如可以在本文中进一步描述的)或在怀疑疾病或有疾病风险时)。在其他实施方案中,可以在没有疾病体征或症状的情况下施用治疗。例如,可以在症状发作之前对易感受试者施用治疗(例如,根据受试者或受试者的家庭成员的症状史)。也可以在症状消退后继续治疗,例如,以延迟或预防复发。在一些实施方案中,可以在使用本文公开的方法并观察与健康细胞或组织相比细胞或组织中一种或多种感兴趣的核酸和/或蛋白质的基因和/或蛋白质表达的改变之后施用治疗。

[0089] 如本文所用,术语“肿瘤”和“赘生物”是指异常组织块,其中该块的生长超过正常组织的生长且与正常组织的生长不协调。肿瘤可能是“良性”或“恶性”,具体取决于以下特征:细胞分化程度(包括形态和功能)、生长速度、局部侵袭和转移。“良性肿瘤”通常分化良好,特征上比恶性肿瘤生长慢,并且仍然局限于起源部位。此外,良性肿瘤不具有浸润、侵入或转移至远处部位的能力。示例性良性肿瘤包括但不限于脂肪瘤、软骨瘤、腺瘤、软垂疣、老年性血管瘤、脂溢性角化病、雀斑样痣和皮脂腺增生。在一些情况下,某些“良性”肿瘤后来可能会发展为恶性肿瘤,这可能是由于肿瘤的赘生性细胞亚群中额外的基因变化所致,这些肿瘤被称为“恶变前肿瘤”。示例性的恶变前肿瘤是畸胎瘤。相比之下,“恶性肿瘤”通常分化不良(退行发育),并且具有快速生长的特征,并伴有周围组织的进行性浸润、侵袭和破坏。此外,恶性肿瘤通常具有转移至远处部位的能力。术语“转移(metastasis)”、“转移性”或“转移(metastasize)”是指癌细胞从原发性或原始肿瘤扩散或迁移至另一器官或组织,并且通常可通过原发性或原始肿瘤的组织类型而非继发性(转移性)肿瘤所在的器官或组织的组织类型的“继发性肿瘤”或“继发性细胞团”的存在来鉴定。例如,已经迁移到骨的前列腺癌被称为转移性前列腺癌,并且包括在骨组织中生长的癌性前列腺癌细胞。

[0090] 发明详述

[0091] 本文描述的方面不限于特定实施方案、系统、组合物、方法或配置,并且因此当然可以变化。本文使用的术语仅用于描述特定方面的目的,并且除非本文具体定义,否则并不

旨在进行限制。

[0092] 本公开提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱(即,同时绘制同一细胞内基因和蛋白质表达图谱)的方法和系统。本公开还提供了用于诊断受试者的疾病或病症(例如,阿尔茨海默病或癌症)的方法。本公开还提供了筛选或测试能够调节基因和/或蛋白质表达的候选药剂的方法。本公开还提供了用于在有此需要的受试者中治疗疾病或病症如神经病症(例如阿尔茨海默病)的方法。本公开还描述了可用于执行本文所述的方法的寡核苷酸探针对,以及包含本文所述的任何寡核苷酸探针的试剂盒。另外,本公开提供了用于鉴定至少一个图像中细胞类型的空间变化的方法、装置、系统和非暂时性计算机可读存储介质。

[0093] 绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方法

[0094] 在一方面,本公开提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方法(参见例如图1A和1B)。在本文公开的方法中,细胞可以与一对或多对寡核苷酸探针接触,寡核苷酸探针在本文中进一步描述并且可以用于扩增转录物(例如,通过滚环扩增)以产生一种或多种串联的扩增子。然后可以使细胞与一种或多种检测剂(例如,抗体)接触,其中每种检测剂结合细胞中的感兴趣的蛋白质。然后可以将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中,并且可以对一种或多种扩增子进行测序以确定转录物的身份(例如,通过本文进一步描述的SEDAL测序(通过动态退火和连接减少误差的测序)以及它们在聚合物基质内的位置。与聚合物基质内的一种或多种感兴趣的蛋白质结合的检测剂(例如,抗体)的位置也可以通过成像(例如,通过共焦显微镜)来确定,从而允许绘制转录物和感兴趣的蛋白质在细胞内的位置。使用转录物和感兴趣的蛋白质的位置,可以鉴定单个细胞、亚细胞位置和细胞器。该方法可用于比较例如来自患病组织样品和健康组织样品的一个细胞(或多个细胞)。

[0095] 在一些实施方案中,本公开提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方法,包括以下步骤:

[0096] a)使细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

[0097] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0098] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补;

[0099] b)将第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0100] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

[0101] d)使细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

[0102] e)将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

[0103] f)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

[0104] g)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子和嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂进行成像以确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质在细胞内的位置,并任选地

绘制基因和蛋白质表达图谱。在一些实施方案中,使用本文所述的方法绘制一种感兴趣的核酸和蛋白质的表达图谱。在一些实施方案中,本文所述的任何方法可用于绘制同一细胞(或多个细胞,例如组织样品中)内的多个目的核酸和目的蛋白的表达图谱。

[0105] 本公开考虑了在本文公开的方法中使用任何类型的细胞(例如,本文描述的任何细胞类型)。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方案中,细胞是人细胞。在一些实施方案中,细胞是来自神经系统的细胞。在一些实施方案中,细胞是癌细胞。本公开还考虑对多个细胞同时执行本文所述的方法。在一些实施方案中,该方法在相同细胞类型的多个细胞上进行。在一些实施方案中,该方法在包括不同细胞类型的细胞的多个细胞上进行。可以使用本文公开的方法绘制基因和蛋白质表达图谱的细胞类型包括但不限于干细胞、祖细胞、神经元细胞、星形胶质细胞、树突细胞、内皮细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、肌肉细胞、心肌细胞、间充质细胞、上皮细胞、免疫细胞和肝细胞。在某些实施方案中,细胞是小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、兴奋性神经元和/或抑制性神经元。在某些实施方案中,一个或多个细胞是透化细胞(例如,在与一对或多对寡核苷酸探针接触的步骤之前对细胞进行透化)。在某些实施方案中,一个或多个细胞存在于完整组织(例如,本文所述的任何组织类型)内。在某些实施方案中,完整组织是固定的组织样品。在一些实施方案中,完整组织包含多种细胞类型(例如,小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、兴奋性神经元和/或抑制性神经元)。在某些实施方案中,组织是心脏组织、淋巴结组织、肝组织、肌肉组织、骨组织、眼组织或耳组织。

[0106] 在本文所述的方法中对其基因表达进行分析的感兴趣的核酸可以是已经从细胞的基因组DNA表达的转录物。在一些实施方案中,感兴趣的核酸是DNA。在一些实施方案中,感兴趣的核酸是RNA。在一些实施方案中,感兴趣的核酸是mRNA。本文所述的方法可用于一次分析一种感兴趣的核酸在细胞中的基因表达,或同时分析多种感兴趣的核酸在细胞中的基因表达。在一些实施方案中,绘制一个细胞或多个细胞中多于100个、多于200个、多于500个、多于1000个、多于2000个、多于3000个、多于5000个、多于10,000个、多于15,000个、多于20,000个、多于25,000个或多于30,000个感兴趣的核酸的基因表达图谱。在某些实施方案中,同时分析最多达一百万个感兴趣的核酸在一个细胞或多个细胞中的基因表达。

[0107] 本文公开的方法还考虑使用作为一对寡核苷酸探针提供的第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针。本文所述的方法中使用的第一寡核苷酸探针(本文也称为“锁式”探针)包括第一条形码序列和第二条形码序列,每个条形码序列由特定的核苷酸序列组成。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第一条形码序列的长度为约5至约15、约6至约14、约7至约13、约8至约12、或约9至约11个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第一条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第一条形码序列的长度为10个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序列的长度为约5至约15、约6至约14、约7至约13、约8至约12、或约9至约11个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序列的长度为10个核苷酸。第二条形码序列提供第一和第二寡核苷酸探针之间的额外互补位点,提供优于先前寡核苷酸探针设计的优点。第一寡核苷酸探针的第二条形码序列可以增加本文所述的方法中感兴趣核酸的检测的特异性(即,与如果使用不包含第二条形码序列

的第一寡核苷酸探针进行该方法相比)。第一寡核苷酸探针的第二条形码序列还可以在减少本文所述方法中感兴趣的核酸的非特异性扩增中发挥作用。

[0108] 本文所述的寡核苷酸探针的条形码可包含用于鉴定感兴趣的核酸的基因特异性序列。本文所述的寡核苷酸探针上的条形码的使用进一步描述于例如国际专利申请公开号WO 2019/199579和Wanget al.,Science2018,361,380中,两者均通过整体引用并入本文。

[0109] 第一寡核苷酸探针还包含与第二寡核苷酸探针互补的部分和与感兴趣的核酸互补的部分。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的与第二寡核苷酸探针互补的部分在第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端之间分裂。在一些实施方案中,与感兴趣的核酸互补的第一寡核苷酸探针的部分的长度为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的长度为约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39或约40个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针包含以下结构:

[0110] 5'-[与第二探针互补的部分]-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[第一条形码序列]-[第二条形码序列]-3'

[0111] 其中]-[包含任选的接头(例如,任选的核苷酸接头)。在一些实施方案中,]-[代表第一寡核苷酸探针的两个部分之间的直接连接(即,磷酸二酯键)。

[0112] 本文公开的方法中使用的第二寡核苷酸探针(本文也称为"引物"探针)包括由特定核苷酸序列组成的条形码序列。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针的条形码序列的长度为约5至约15、约6至约14、约7至约13、约8至约12、或约9至约11个核苷酸。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针的条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在某些实施方案中,第二寡核苷酸探针的条形码序列的长度为10个核苷酸。

[0113] 第二寡核苷酸探针还包含与感兴趣的核酸互补的部分和与第一寡核苷酸探针的部分互补的部分。在一些实施方案中,第一和第二寡核苷酸探针与感兴趣的核酸的不同部分互补并结合。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针的与感兴趣的核酸互补的部分的长度为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针的长度为约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39或约40个核苷酸。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针包含以下结构:

[0114] 5'-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[与第一探针互补的部分]-[条形码序列]-3'

[0115] 其中]-[包含任选的核苷酸接头。在一些实施方案中,]-[代表第二寡核苷酸探针的两个部分之间的直接连接。

[0116] 本文公开的方法还包括使用第三寡核苷酸探针。在一些实施方案中,第三寡核苷酸探针包含可检测标记(即,可用于例如通过成像来可视化第三寡核苷酸探针的位置的任何标记)。在某些实施方案中,可检测标记是荧光的(例如,荧光团)。如本文所述,第三寡核苷酸探针与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序列是用于鉴定感兴趣的核酸的基因特异性序列。在一些实施方案中,进行将嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与第三寡核苷酸探针接触的步骤以

鉴定感兴趣的核酸。这种鉴定感兴趣核酸的方法称为通过动态退火和连接减少误差的测序(SEDAL测序),并进一步描述于Wang,X.et al.,Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states.Science 2018,36,eaat5691和国际专利申请公开号WO 2019/199579中,其中每篇通过引用并入本文。

[0117] 可以使用本领域已知的任何合适的成像技术读出本文所述的方法中使用的(例如,如SEDAL测序中使用的)第三寡核苷酸探针。例如,在第三寡核苷酸探针包含荧光团的实施方案中,可以使用成像读出荧光团以鉴定感兴趣的核酸。如上所述,第三寡核苷酸探针包含与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补的序列,其用于检测特定的感兴趣的核酸。通过对包含荧光团的第三寡核苷酸探针的位置进行成像,可以确定样品内那个特定的感兴趣的核酸的位置。在一些实施方案中,成像步骤包括荧光成像。在某些实施方案中,成像步骤包括共焦显微术。在某些实施方案中,成像步骤包括落射荧光显微术。在一些实施方案中,在同一轮成像中确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质的位置。在一些实施方案中,在分开的成像轮次中确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质的位置。在某些实施方案中,进行两轮成像。在某些实施方案中,进行三轮成像。在某些实施方案中,进行四轮成像。在某些实施方案中,进行五轮或更多轮成像。

[0118] 在一些实施方案中,本文公开的方法包括使细胞与一种或多种检测剂接触的步骤,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质。在一些实施方案中,检测剂是蛋白质、肽、核酸或小分子。在某些实施方案中,检测剂是抗体。在某些实施方案中,检测剂是抗体片段、抗体变体或纳米抗体。在某些实施方案中,检测剂是适体。在某些实施方案中,检测剂是受体或其片段。本公开考虑了与感兴趣的蛋白质结合的任何抗体的使用。可用于本文所述方法的抗体还包括抗体片段,以及全长抗体或抗体片段的变体。在一些实施方案中,一种或多种检测剂是各自包含独特的可检测标记(例如,荧光团)的抗体。在一些实施方案中,该方法还包括使一种或多种抗体与第二检测剂接触。例如,与感兴趣的蛋白质结合的每种抗体可以与不同的第二检测剂接触。在一些实施方案中,第二检测剂是二抗(即,与结合感兴趣的蛋白质的抗体之一结合的抗体)。在某些实施方案中,二抗包含可检测标记。在一些实施方案中,二抗的可检测标记是荧光团。在一些实施方案中,一种或多种检测剂是各自结合感兴趣的蛋白质的抗体,并且结合感兴趣的蛋白质的每种抗体缀合至独特的寡核苷酸序列。然后可以使一种或多种抗体与缀合至可检测标记(例如,荧光团)的寡核苷酸接触,所述缀合至可检测标记(例如,荧光团)的寡核苷酸与缀合至一种或多种抗体的寡核苷酸序列互补,从而使得一种或多种抗体的位置可视化(例如,通过共焦显微术或任何其他检测荧光的手段)。

[0119] 在一些实施方案中,与感兴趣的蛋白质结合的检测剂是小分子染料。在某些实施方案中,小分子染料是X-34。例如,X-34(一种荧光淀粉样蛋白特异性染料,通常用作β片层结构的高荧光标志物)可用于检测细胞内Aβ斑块的存在,以确定与阿尔茨海默病相关的病理变化。X-34在检测Aβ斑块中的用途是本领域众所周知的并且描述于例如Styren,S.D.et al.X-34,a fluorescent derivative of Congo red:a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology.J.Histochem.Cytochem.2000,48(9),1223-1232,其通过引用并入本文。在一些实施方案中,使嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂中的每一种与第二检测剂接触的步骤在进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸的步骤之后进行。在一些实施方案中,使细胞与一种或多种检测剂接触的步骤在嵌入步骤之前进行。

[0120] 本文提供的方法可用于以亚细胞分辨率绘制细胞中的基因和蛋白质表达图谱。例如,本文提供的任何方法可以以200nm、150nm、100nm、50nm、40nm、30nm、20nm或10nm的亚细胞分辨率进行。在某些实施方案中,本文提供的任何方法以200nm的亚细胞分辨率进行。

[0121] 本公开考虑了各种聚合物基质的使用,并且其中可以嵌入一种或多种串联的扩增子和检测剂的任何聚合物基质都适合用于本文所述的方法中。在一些实施方案中,聚合物基质是水凝胶(即,亲水性交联聚合物的网络)。在一些实施方案中,水凝胶是聚乙烯醇水凝胶、聚乙二醇水凝胶、聚丙烯酸钠水凝胶、丙烯酸酯聚合物水凝胶或聚丙烯酰胺水凝胶。在某些实施方案中,水凝胶是聚丙烯酰胺水凝胶。此类水凝胶可以通过例如在包含丙烯酰胺和双丙烯酰胺的缓冲液中孵育样品、除去缓冲液并在聚合混合物(包含例如过硫酸铵和四甲基乙二胺)中孵育样品来制备。

[0122] 在一些实施方案中,进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸以产生一种或多种串联的扩增子的步骤进一步包括提供用反应性化学基团(例如,5-(3-氨基烯丙基)-dUTP)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,用反应性化学基团修饰的核苷酸构成扩增反应中使用的核苷酸的约5%、约6%、约7%、约8%、约9%或约10%。例如,进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸以产生一种或多种串联的扩增子的步骤可以进一步包括提供胺修饰的核苷酸。在扩增过程中,胺修饰的核苷酸当一种或多种串联的扩增子被产生时被掺入一种或多种串联的扩增子中。所得扩增子用伯胺官能化,伯胺可以进一步与另一个相容的化学部分(例如,N-羟基琥珀酰亚胺)反应,以促进将串联的扩增子嵌入聚合物基质中的步骤。在一些实施方案中,将一种或多种串联的扩增子嵌入聚合物基质中的步骤包括使一种或多种串联的扩增子的胺修饰核苷酸与丙烯酸N-羟基琥珀酰亚胺酯反应并使一种或多种串联的扩增子和聚合物基质共聚。

[0123] 在某些实施方案中,本公开提供了用于绘制细胞中基因表达图谱的方法,包括以下步骤:

[0124] a)使细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

[0125] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0126] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补;

[0127] b)将第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0128] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

[0129] d)将一种或多种串联的扩增子嵌入聚合物基质中;

[0130] e)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

[0131] f)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子进行成像,以确定感兴趣的核酸在细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱。

[0132] 在某些实施方案中,本公开提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的方

法,包括以下步骤:

[0133] a)使细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

[0134] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分和条形码序列;和

[0135] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分和与第一寡核苷酸探针互补的部分;

[0136] b)将第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0137] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

[0138] d)使细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

[0139] e)将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

[0140] f)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

[0141] g)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子和嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂进行成像以确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质在细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱。

[0142] 用于诊断受试者的疾病或病症的方法

[0143] 在另一方面,本公开提供了用于诊断受试者的疾病或病症的方法。例如,本文所述的分析基因和蛋白质表达方法可以在取自受试者(例如,被认为患有疾病或病症的或处于患有疾病或病症风险的受试者,或者健康的或被认为是健康的受试者)的样品的一个细胞或多个细胞中进行。然后可以将细胞中各种感兴趣的核酸和蛋白质的表达与非患病细胞或来自非患病组织样品的细胞(例如,来自健康个体的细胞或来自健康个体群体的多个细胞)中相同的感兴趣的核酸和蛋白质的表达进行比较。相对于非患病细胞中的表达,感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质(或多种感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质,例如特定的疾病特征)的表达的任何改变可以表明受试者患有疾病或病症。作为对照实验,可以将一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达与患病细胞中的表达一起进行分析。一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达也可能先前已经进行了分析,并且可以将患病细胞中的表达与非患病细胞的参考数据进行比较。

[0144] 在一些实施方案中,用于诊断受试者的疾病或病症的方法包括以下步骤:

[0145] a)使取自受试者的细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中

[0146] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0147] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补;

[0148] b)将第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0149] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生

一种或多种串联的扩增子;

[0150] d)使细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

[0151] e)将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

[0152] f)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

[0153] g)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子和嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂进行成像以确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质在细胞内的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱;

[0154] 其中感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质的表达相对于一种或多种非患病细胞中的表达的改变指示受试者患有疾病或病症。

[0155] 在一些实施方案中,使用本文公开的方法作为对照实验同时分析一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达。在一些实施方案中,与患病细胞中的表达相比较的一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达数据包括来自先前在一种或多种非患病细胞上执行该方法时的参考数据。

[0156] 通过本文所述的方法预期任何疾病或病症的诊断。在一些实施方案中,疾病或病症是遗传性疾病、增殖性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、肝病、脾病、肺病、血液病、神经病、胃肠道(GI)疾病、泌尿生殖系统疾病、泌尿生殖系统疾病、感染性疾病、肌肉骨骼疾病、内分泌疾病、代谢紊乱、免疫紊乱、中枢神经系统(CNS)紊乱、神经系统紊乱、眼科疾病或心血管疾病。在某些实施方案中,疾病或病症是神经变性病症。在某些实施方案中,疾病或病症是阿尔茨海默病。在某些实施方案中,疾病或病症是癌症。

[0157] 在一些实施方案中,细胞存在于组织中。在一些实施方案中,组织是来自受试者的组织样品。在一些实施方案中,受试者是非人类实验动物(例如,小鼠)。在一些实施方案中,受试者是驯养动物。在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,组织样品包括固定的组织样品。在某些实施方案中,组织样品是活检组织(例如,骨、骨髓、乳腺、胃肠道、肺、肝、胰腺、前列腺、脑、神经、肾、子宫内膜、宫颈、淋巴结、肌肉或皮肤活检组织)。在某些实施方案中,活检是肿瘤活检。在某些实施方案中,组织是脑组织。在某些实施方案中,组织来自中枢神经系统。

[0158] 本公开考虑了在本文公开的用于诊断受试者中的疾病或病症的方法中使用任何类型的细胞。在一些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方案中,细胞是人细胞。在一些实施方案中,细胞是癌细胞。本公开还考虑对多个细胞同时执行本文所述的方法。在一些实施方案中,该方法在相同细胞类型的多个细胞上进行。在一些实施方案中,该方法在不同细胞类型的多个细胞上进行。可以使用本文公开的方法绘制基因和蛋白质表达图谱的细胞类型包括但不限于干细胞、祖细胞、神经元细胞、星形胶质细胞、树突细胞、内皮细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞、肌肉细胞、心肌细胞、间充质细胞、上皮细胞、免疫细胞和肝细胞。在某些实施方案中,细胞是小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、兴奋性神经元和/或抑制性神经元。

[0159] 可以使用本文公开的方法对各种感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质进行分析。例如,已知或被认为与疾病或病症(例如,阿尔茨海默病)相关的任何感兴趣的核酸或蛋白质的表达可以使用本文公开的方法进行绘图,并用于疾病或病症的诊断。在一些实施方案中,

感兴趣的核酸选自由以下组成的组:Vsnl1、Snap25、Dnml、Slc6a1、Aldoc、Bsg、Ctss、Plpl、Cst7、Ctsb、Apoe、Trem2、C1qa、P2ry12、Gfap、Vim、Aqp4、Clu、Plp1、Mbp、C4b、Ccnb2、Gpm6a、Ddit3、Dapk1、Myo5a、Tspan7和Rhoc。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质包含淀粉样蛋白β(Aβ)肽。在某些实施方案中,Aβ肽以Aβ斑块的形式存在。在一些实施方案中,感兴趣的蛋白质包括tau蛋白。在某些实施方案中,tau蛋白以包涵体(p-Tau)的形式存在于细胞中。Aβ斑块和/或p-Tau的存在可用于例如诊断受试者的神经退行性疾病(例如,阿尔茨海默病)。

[0160] 本公开考虑了使用各种检测剂来检测一种或多种感兴趣的蛋白质。在一些实施方案中,当一种或多种感兴趣的蛋白质包含Aβ肽时,使用小分子检测剂(例如,小分子荧光染料)检测Aβ肽。在某些实施方案中,小分子检测剂是X-34,如本文和例如Styren,S.D.et al.X-34,a fluorescent derivative of Congo red:a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology.J.Histochem.Cytochem.2000,48(9),1223-1232所描述的,其通过引用并入本文。在一些实施方案中,当感兴趣的蛋白质包含tau蛋白或p-Tau时,使用p-Tau一抗检测tau蛋白。在某些实施方案中,该方法进一步包括用二抗检测p-Tau一抗。在一些实施方案中,第二抗体缀合至可检测标记(例如,荧光团)。

[0161] 使用本文公开的方法来诊断受试者中的疾病或病症,所检查的感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质的表达相对于一种或多种非患病细胞中的表达的改变可以指示受试者患有疾病或病症。在一些实施方案中,感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质的表达的改变用于鉴定紧邻斑块的细胞类型。例如,如果在斑块附近鉴定到某些细胞类型,则受试者可能患有或怀疑患有阿尔茨海默病。在一些实施方案中,斑块是Aβ斑块。在某些实施方案中,对紧邻斑块的疾病相关小胶质细胞类型(包括例如C1qa、Trem2、Cst7、Ctsb和/或Apoe的高表达)的鉴定表明受试者患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病的风险中。在某些实施方案中,对紧邻斑块的疾病相关星形胶质细胞类型(包括例如Gfap、Vim和/或Apoe的高表达)的鉴定表明受试者患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病的风险中。在某些实施方案中,对紧邻斑块的少突胶质细胞前体细胞类型(包括例如Cldn11、Klk6、Serpina3n和/或C4b的高表达)的鉴定表明受试者患有阿尔茨海默病或处于患有阿尔茨海默病的风险中。紧邻斑块的细胞可以包括在斑块的约10μm内、约20μm内、约30μm内、约40μm内或约50μm内的细胞。

[0162] 本文公开的方法还可用于绘制已用感兴趣的翻译后修饰(例如,磷酸化、糖基化、泛素化、亚硝基化、甲基化、乙酰化、脂化等)修饰的蛋白质。研究此类修饰蛋白相对于特定细胞类型的位置可以为癌症研究、诊断和治疗等提供有用的工具,因为磷酸化等蛋白质修饰在癌症发生和进展过程中发挥着重要作用。

[0163] 筛选能够调节基因和/或蛋白质表达的药剂的方法

[0164] 在另一方面,本公开提供了筛选能够调节感兴趣的核酸或蛋白质或多种感兴趣的核酸和/或蛋白质的基因和/或蛋白质表达的药剂的方法。例如,本文所述的用于绘制基因和蛋白质表达图谱的方法可以在存在一种或多种候选药剂的情况下在细胞中进行。然后可以将细胞(例如,正常细胞或患病细胞)中各种感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达与未暴露于一种或多种候选药剂的细胞中相同的感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达进行比较。相对于未暴露于一种或多种候选药剂的细胞中的表达,感兴趣的一种或多种核酸和/或一种或多种蛋白质的表达的任何改变可能表明感兴趣的一种或多种核酸和/或蛋白质的表达由一

种或多种候选药剂调节。在一些实施方案中,已知与疾病的治疗相关的特定特征(例如,核酸和蛋白质表达的特征)可以用于鉴定能够以期望的方式调节基因和/或蛋白质表达的候选药剂。本文所述的方法还可用于鉴定具有某些副作用的药物,例如,通过当用候选药剂或已知药物处理一种或多种细胞时,寻找特定的核酸和蛋白质表达特征。

[0165] 在一些实施方案中,本公开提供了筛选能够调节基因和/或蛋白质表达的药剂的方法,包括以下步骤:

[0166] a)使正在用或已经用候选药剂处理的细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中:

[0167] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0168] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补;

[0169] b)将第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0170] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

[0171] d)使细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

[0172] e)将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

[0173] f)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;和

[0174] g)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子和嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂进行成像以确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质在细胞中的位置,并任选地绘制基因和蛋白质表达图谱;

[0175] 其中在存在候选药剂的情况下感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质的表达相对于不存在候选药剂的情况下的表达的改变指示候选药剂调节基因和/或蛋白质表达。

[0176] 在一些实施方案中,候选药剂是小分子、蛋白质、肽、核酸、脂质或碳水化合物。在某些实施方案中,小分子是抗癌治疗剂。在一些实施方案中,小分子包括已知药物。在一些实施方案中,小分子包括FDA批准的药物。在某些实施方案中,蛋白质是抗体。在某些实施方案中,蛋白质是抗体片段或抗体变体。在某些实施方案中,蛋白质是受体。在某些实施方案中,蛋白质是细胞因子。在某些实施方案中,核酸是mRNA、反义RNA、miRNA、siRNA、RNA适体、双链RNA(dsRNA)、短发夹RNA(shRNA)或反义寡核苷酸(ASO)。可以使用本文所述的方法来筛选任何候选药剂。具体地,可以使用本文所述的方法筛选被认为能够调节基因和/或蛋白质表达的任何候选药剂。在一些实施方案中,候选药剂对基因和/或蛋白质表达的调节与减少、缓解或消除疾病或病症的症状,或预防疾病或病症的发生或进展相关。在一些实施方案中,候选药剂调节的疾病或病症是遗传性疾病、增殖性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、肝病、脾病、肺病、血液病、神经病、胃肠道(GI)疾病、泌尿生殖系统疾病、泌尿生殖系统疾病、感染性疾病、肌肉骨骼疾病、内分泌疾病、代谢紊乱、免疫紊乱、中枢神经系统(CNS)紊乱、神经系统紊乱、眼科疾病或心血管疾病。在某些实施方案中,疾病或病症是阿尔茨海默病。在某些实施方案中,疾病或病症是癌症。

[0177] 用于治疗受试者的疾病或病症的方法

[0178] 在另一方面,本公开提供了用于治疗受试者的疾病或病症的方法。例如,本文所述的分析基因表达和蛋白质表达的方法可以在取自受试者(例如,被认为患有疾病或病症或处于患有疾病或病症的风险的受试者)的样品的一个细胞中进行。然后可以将细胞中各种感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达与来自非患病组织样品的细胞中相同的感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达进行比较。如果观察到感兴趣的核酸和/或蛋白质的表达相对于非患病细胞中的表达有任何改变,则可以对受试者施用疾病或病症的治疗。作为对照实验,可以将一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达与患病细胞中的表达一起进行分析。一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达也可能先前已经进行了分析,并且可以将患病细胞中的表达与非患病细胞的参考数据进行比较。

[0179] 在一些实施方案中,本公开提供了用于治疗受试者的疾病或病症的方法,包括以下步骤:

[0180] a)使取自受试者的细胞与一对或多对寡核苷酸探针接触,其中每对寡核苷酸探针包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针,其中:

[0181] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0182] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补;

[0183] b)将第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端连接在一起以产生环状寡核苷酸;

[0184] c)使用第二寡核苷酸探针作为引物进行滚环扩增以扩增环状寡核苷酸,从而产生一种或多种串联的扩增子;

[0185] d)使细胞与一种或多种检测剂接触,其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质;

[0186] e)将一种或多种串联的扩增子和一种或多种检测剂嵌入聚合物基质中;

[0187] f)使嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子与包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列的第三寡核苷酸探针接触;

[0188] g)对嵌入聚合物基质中的一种或多种串联的扩增子和嵌入聚合物基质中的一种或多种检测剂进行成像以确定感兴趣的核酸和感兴趣的蛋白质在细胞中的位置;和

[0189] h)如果观察到感兴趣的核酸和/或感兴趣的蛋白质的表达相对于一种或多种非患病细胞中的表达的改变,则向受试者施用疾病或病症的治疗。

[0190] 在一些实施方案中,使用本文公开的方法作为对照实验同时分析一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达。在一些实施方案中,与患病细胞中的表达相比较的一种或多种非患病细胞中的基因和蛋白质表达数据包括来自先前对非患病细胞执行该方法时的参考数据。

[0191] 可以向受试者施用针对疾病或病症的任何合适的治疗。在一些实施方案中,治疗包括施用治疗剂。在一些实施方案中,治疗包括手术。在一些实施方案中,治疗包括成像。在一些实施方案中,治疗包括进行进一步的诊断方法。在一些实施方案中,治疗包括放射疗法。在一些实施方案中,治疗剂是小分子、蛋白质、肽、核酸、脂质或碳水化合物。在某些实施方案中,小分子是抗癌治疗剂。在一些实施方案中,小分子是已知药物。在一些实施方案中,

小分子是FDA批准的药物。在某些实施方案中,蛋白质是抗体。在某些实施方案中,蛋白质是抗体片段或抗体变体。在某些实施方案中,蛋白质是受体或其片段或变体。在某些实施方案中,蛋白质是细胞因子。在某些实施方案中,核酸是mRNA、反义RNA、miRNA、siRNA、RNA适体、双链RNA(dsRNA)、短发夹RNA(shRNA)或反义寡核苷酸(ASO)。

[0192] 通过本文所述的方法预期任何疾病或病症的治疗。在一些实施方案中,疾病或病症是遗传性疾病、增殖性疾病、炎性疾病、自身免疫性疾病、肝病、脾病、肺病、血液病、神经病、胃肠道(GI)疾病、泌尿生殖系统疾病、泌尿生殖系统疾病、感染性疾病、肌肉骨骼疾病、内分泌疾病、代谢紊乱、免疫紊乱、中枢神经系统(CNS)紊乱、神经系统紊乱、眼科疾病或心血管疾病。在某些实施方案中,疾病或病症是神经退行性疾病。在某些实施方案中,疾病或病症是阿尔茨海默病。在某些实施方案中,疾病或病症是癌症。

[0193] 在一些实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,样品包含生物样品。在一些实施方案中,样品包含组织样品。在某些实施方案中,组织样品是活检组织(例如,骨、骨髓、乳腺、胃肠道、肺、肝、胰腺、前列腺、脑、神经、肾、子宫内膜、宫颈、淋巴结、肌肉或皮肤活检组织)。在某些实施方案中,活检是肿瘤活检。在某些实施方案中,活检是实体瘤活检。在一些实施方案中,组织样品是脑组织样品。在某些实施方案中,组织样品是中枢神经系统组织样品。

[0194] 寡核苷酸探针

[0195] 本公开还提供了用于本文所述的方法和系统中的寡核苷酸探针。

[0196] 在一方面,本公开提供了多种寡核苷酸探针,其包含第一寡核苷酸探针(本文也称为“锁式”探针)和第二寡核苷酸探针(本文也称为“引物”探针),其中:

[0197] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0198] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列;

[0199] 其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补。

[0200] 本文所述的所有寡核苷酸探针可以任选地在每个所提及的组分之间具有不同核苷酸长度的间隔区或接头,或者寡核苷酸探针的组分可以直接彼此连接。本文所述的所有寡核苷酸探针可以包含标准核苷酸,或一些标准核苷酸可取代本领域已知的任何修饰的核苷酸。

[0201] 本文所述的多个寡核苷酸探针中的第一寡核苷酸探针(本文也称为“锁式”探针)包括第一条形码序列和第二条形码序列,每个条形码序列由特定的核苷酸序列组成。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第一条形码序列的长度为约5至约15、约6至约14、约7至约13、约8至约12、或约9至约11个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第一条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第一条形码序列的长度为10个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序列的长度为约5至约15、约6至约14、约7至约13、约8至约12、或约9至约11个核苷酸。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在某些实施方案中,第一寡核苷酸探针的第二条形码序

列的长度为10个核苷酸。第二条形码序列提供第一和第二寡核苷酸探针之间的额外互补位点,提供优于先前寡核苷酸探针设计的优点。第一寡核苷酸探针的第二条形码序列可以增加使用多个寡核苷酸探针检测感兴趣的核酸的特异性(例如,当在本文公开的任何方法中使用多个寡核苷酸探针时)。第一寡核苷酸探针的第二条形码序列还可以在减少感兴趣的核酸的非特异性扩增中发挥作用。

[0202] 本文所述的寡核苷酸探针的条形码可包含用于鉴定感兴趣的核酸的基因特异性序列。本文所述的寡核苷酸探针上的条形码的使用进一步描述于例如国际专利申请公开号WO 2019/199579和Wang et al.,Science2018,361,380中,两者均通过整体引用并入本文。

[0203] 第一寡核苷酸探针还包含与第二寡核苷酸探针互补的部分和与感兴趣的核酸互补的部分。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针的与第二寡核苷酸探针互补的部分在第一寡核苷酸探针的5'末端和3'末端之间分裂。在一些实施方案中,与感兴趣的核酸互补的第一寡核苷酸探针的部分为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸长。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针为约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39或约40个核苷酸长。在一些实施方案中,第一寡核苷酸探针包含以下结构:

[0204] 5'-[与第二探针互补的部分]-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[第一条形码序列]-[第二条形码序列]-3'

[0205] 其中]-[包含任选的接头(例如,任选的核苷酸接头)。在一些实施方案中,]-[代表第一寡核苷酸探针的两个部分之间的直接连接(即,磷酸二酯键)。

[0206] 本文公开的多个寡核苷酸探针中的第二寡核苷酸探针(本文也称为"引物"探针)包括由特定核苷酸序列组成的条形码序列。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针的条形码序列的长度为约5至约15、约6至约14、约7至约13、约8至约12、或约9至约11个核苷酸。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针的条形码序列的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个核苷酸。在某些实施方案中,第二寡核苷酸探针的条形码序列的长度为10个核苷酸。

[0207] 第二寡核苷酸探针还包含与感兴趣的核酸互补的部分和与第一寡核苷酸探针的部分互补的部分。在一些实施方案中,第一和第二寡核苷酸探针与感兴趣的核酸的不同部分互补并结合。在一些实施方案中,与感兴趣的核酸互补的第二寡核苷酸探针的部分为约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29或约30个核苷酸长。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针为约20、约21、约22、约23、约24、约25、约26、约27、约28、约29、约30、约31、约32、约33、约34、约35、约36、约37、约38、约39或约40个核苷酸长。在一些实施方案中,第二寡核苷酸探针包含以下结构:

[0208] 5'-[与感兴趣的核酸互补的部分]-[与第一探针互补的部分]-[条形码序列]-3'

[0209] 其中]-[包含任选的接头(例如,任选的核苷酸接头)。在一些实施方案中,]-[代表第二寡核苷酸探针的两个部分之间的直接连接(即,磷酸二酯键)。

[0210] 在一些实施方案中,多个寡核苷酸探针包含第三寡核苷酸探针。在一些实施方案中,第三寡核苷酸探针包含可检测标记。在某些实施方案中,可检测标记是荧光团。如本文所述,第三寡核苷酸探针与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补。在一些实施方案中,

第一寡核苷酸探针的第二条形码序列是用于鉴定感兴趣的核酸的基因特异性序列。在一些实施方案中,第三寡核苷酸探针用于鉴定感兴趣的核酸(例如,通过SEDAL测序)。

[0211] 试剂盒

[0212] 本公开还提供了试剂盒。在一方面,所提供的试剂盒可以包含一种或多种如本文所述的寡核苷酸探针。在一些实施方案中,试剂盒还可以包含容器(例如,小瓶、安瓿、瓶子和/或分配器包装,或其他合适的容器)。在一些实施方案中,试剂盒包含多个如本文所述的寡核苷酸探针。在一些实施方案中,试剂盒还包含一种或多种检测剂(例如,肽、蛋白质如抗体、核酸如适体、或小分子如荧光染料),其中每种检测剂结合感兴趣的蛋白质。在某些实施方案中,一种或多种检测剂包含抗p-Tau抗体。在一些实施方案中,试剂盒还包含小分子检测剂(例如X-34,如本文所述)。在一些实施方案中,试剂盒进一步包含如本文所述的第三寡核苷酸探针。第三寡核苷酸探针可以包含与第一寡核苷酸探针的第一条形码序列互补的序列。在一些实施方案中,第三寡核苷酸探针包含可检测标记(例如,荧光团)。在一些实施方案中,试剂盒包含由两组或多组寡核苷酸探针组成的文库,其中每组寡核苷酸探针用于鉴定特定的感兴趣的核酸。在一些实施方案中,试剂盒包含用于检测多种感兴趣蛋白质的检测剂文库。在一些实施方案中,试剂盒还可以包含用于进行本文公开的方法的其他试剂(例如,细胞、连接酶、聚合酶、胺修饰的核苷酸、一抗、二抗、缓冲液和/或用于制备聚合物基质(例如,聚丙烯酰胺基质)的试剂)。在一些实施方案中,试剂盒可用于分析细胞中的基因和蛋白质表达。在一些实施方案中,试剂盒可用于诊断受试者的疾病(例如,阿尔茨海默病)。在一些实施方案中,试剂盒可用于筛选能够调节基因和/或蛋白质表达的药剂。在一些实施方案中,试剂盒可用于诊断受试者的疾病或病症。在一些实施方案中,试剂盒可用于治疗受试者的疾病或病症。在某些实施方案中,本文所述的试剂盒还包括使用该试剂盒的说明书。

[0213] 用于鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化的方法、装置和非暂时性计算机可读存储介质

[0214] 在各个方面,本公开提供了用于鉴定一个或多个图像中的细胞类型的空间变化的方法(即,查看多个样品之间特定细胞类型相对于彼此的空间分布的变化,例如健康组织与患病组织相比)。在一些实施方案中,使用本文公开的任何方法获得一个或多个图像。图15是与鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化有关的方法的一个实施方案的流程图。处理流程1500可以由至少一个计算机处理器进行。在一些实施方案中,可以存在编码有多个指令的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行处理流程1500。处理流程1500包括步骤1502、步骤1504、步骤1506、步骤1508和步骤1510。在步骤1502中,至少一个计算机处理器针对至少一个图像中的多个细胞中的每一个接收该细胞在至少一个图像中的空间位置。在步骤1504中,至少一个计算机处理器针对至少一个图像中的多个蛋白质中的每一个接收该蛋白质在图像中的空间位置。在步骤1506中,对于多个蛋白质中的第一蛋白质,确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞数量,其中距离是基于多个细胞的空间位置中的至少一些和多个蛋白质的空间位置中的至少一些来确定的。在步骤1508中,至少一个计算机处理器基于第一细胞类型的细胞的数量鉴定至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化。在步骤1510中,至少一个计算机处理器输出至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化的指示。

[0215] 图16是与鉴定至少一个图像中的第一细胞类型的细胞的空间变化(即,查看多个

样品之间特定细胞类型相对于彼此的空间分布的变化,例如健康组织与患病组织相比)相关的方法的一个实施方案的流程图。处理流程1600可以由至少一个计算机处理器进行。在一些实施方案中,可以存在编码有多个指令的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行处理流程1600。处理流程1600包括步骤1602、步骤1604、步骤1606和步骤1608。在步骤1602中,对于多个细胞中与第一蛋白质的距离小于阈值距离的细胞,至少一个计算机处理器确定与第一细胞类型相关的细胞的第一百分比。在步骤1604中,至少一个计算机处理器确定至少一个图像中的多个细胞中与第一细胞类型相关的细胞的第二百分比。在步骤1606中,至少一个计算机处理器将第一百分比与第二百分比进行比较以获得比较结果。在步骤1608中,至少一个计算机处理器使用比较结果来鉴定至少一个图像中的第一细胞类型的细胞的空间变化。

[0216] 图17是与使用相机捕获至少一个图像有关的方法的一个实施方案的流程图。处理流程1700可以由至少一个计算机处理器进行。在一些实施方案中,可以存在编码有多个指令的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行处理流程1700。处理流程1700包括步骤1702和步骤1704。在步骤1702中,至少一个计算机处理器捕获多个图像中的第一图像,该第一图像用于确定多个细胞的空间位置。在步骤1704中,至少一个计算机处理器捕获多个图像中的第二图像,该第二图像用于确定多个蛋白质的空间位置。

[0217] 图18是对来自多个图像的空间位置进行空间对准的一个实施方案的流程空间图谱处理流程1800可以由至少一个计算机处理器进行。在一些实施方案中,可以存在编码有多个指令的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行处理流程1800。处理流程1800包括步骤1802和步骤1804。在步骤1802中,至少一个计算机处理器将来自第一图像的多个细胞的空间位置与来自第二图像的多个蛋白质的空间位置空间对准。在步骤1804中,至少一个计算机处理器基于空间对准的空间位置确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞的数量。

[0218] 图19是与确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞数量相关的方法的一个实施方案的流程图。处理流程1900可以由至少一个计算机处理器进行。在一些实施方案中,可以存在编码有多个指令的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行处理流程1900。处理流程1900包括步骤1902和步骤1904。在步骤1902中,至少一个计算机处理器确定从第一细胞类型的细胞到多个蛋白质中最近的蛋白质的最小距离。在步骤1904中,至少一个计算机处理器将最小距离与阈值距离进行比较。

[0219] 图20是与将细胞与细胞类型相关联的方法的一个实施方案的流程图。处理流程2000可以由至少一个计算机处理器进行。在一些实施方案中,可以存在编码有多个指令的至少一种非暂时性计算机可读存储介质,当由至少一个计算机处理器执行时,进行处理流程2000。处理流程2000包括步骤2002和步骤2004。在步骤2002中,至少一个计算机处理器接收细胞的遗传信息(例如,关于基因和/或蛋白质表达的信息)。在步骤2004中,至少一个计算机处理器基于细胞的遗传信息将多种细胞类型中的一种细胞类型与细胞相关联,其中多种细胞类型包括第一细胞类型。

[0220] 图21中示出了可以结合本文提供的本公开的任何实施方案使用的计算机系统

2100的说明性实现。计算机系统2100可以包括一个或多个计算机处理器2110以及包含非暂时性计算机可读存储介质的一个或多个制品,例如存储器2120和一个或多个非易失性存储介质2130。计算机处理器2110可以以任何合适的方式控制向存储器2120和非易失性存储装置2130写入数据以及从存储器2120和非易失性存储装置2130读取数据。为了进行本文所述的任何功能或方法,诸如与处理流程1500、1600、1700、1800、1900、2000相关联的方法,或者例如鉴定至少一个图像中的细胞类型的空间变化(即,查看多个样品之间特定细胞类型相对于彼此的空间分布的变化,例如健康组织与患病组织相比),鉴定至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化,使用相机捕获至少一个图像,在空间上对准来自多个图像的空间位置,确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞的数量,或将细胞与细胞类型相关联等,处理器2110可以执行存储在一个或多个非暂时性计算机可读存储介质(例如存储器2120)中的一个或多个计算机处理器可执行指令,存储器2120可以用作存储由处理器2110执行的处理器可执行指令的非暂时性计算机可读存储介质。

[0221] 绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的系统

[0222] 本公开还提供了用于绘制细胞中基因和蛋白质表达图谱的系统。在一些实施方案中,该系统包括a)细胞;和b)包含第一寡核苷酸探针和第二寡核苷酸探针的一对或多对寡核苷酸探针,其中:

[0223] i)第一寡核苷酸探针包含与第二寡核苷酸探针互补的部分、与感兴趣的核酸互补的部分、第一条形码序列和第二条形码序列;和

[0224] ii)第二寡核苷酸探针包含与感兴趣的核酸互补的部分、与第一寡核苷酸探针互补的部分和条形码序列,其中第二寡核苷酸探针的条形码序列与第一寡核苷酸探针的第二条形码序列互补。

[0225] 在一些实施方案中,该系统还包括显微镜(例如,共焦显微镜)。在一些实施方案中,该系统还包括计算机。在一些实施方案中,该系统还包括用于进行显微镜检查和/或图像分析(例如,使用本文所述的任何图像分析方法)的软件。在一些实施方案中,该系统进一步包括连接酶。在一些实施方案中,该系统进一步包括聚合酶。在一些实施方案中,该系统进一步包括胺修饰的核苷酸。在一些实施方案中,该系统进一步包括用于制备聚合物基质(例如,聚丙烯酰胺基质)的试剂。本公开的系统中的细胞可以是本文公开的任何细胞类型。在一些实施方案中,系统包括多个单元。在一些实施方案中,细胞具有不同的细胞类型。在某些实施方案中,细胞存在于组织中。在一些实施方案中,组织是由受试者提供或来自受试者的组织样品。在某些实施方案中,受试者是人。

[0226] 啊

实施例

[0227] 实施例1:STARmap Pro方法的开发

[0228] β淀粉样蛋白斑块和神经原纤维tau蛋白缠结是阿尔茨海默病(AD)的神经病理学标志,但AD病理生理学背后的分子事件和细胞机制在空间和时间维度上仍然知之甚少。开发STARmap Pro方法并应用于同时检测AD小鼠模型脑组织中的单细胞转录状态和蛋白质疾病标志物(β淀粉样蛋白聚集体和tau病理学)。通过在亚细胞分辨率(200nm)下对拟时间轨迹构建和差异基因表达进行联合分析,构建了AD病理学细胞类型和状态的高分辨率空间图

谱。研究发现,疾病相关小胶质细胞(DAM)细胞在疾病进展早期就形成直接接触淀粉样蛋白-β斑块的内壳,而疾病相关星形胶质细胞(DAA)和少突胶质细胞前体细胞(OPC)在疾病后期阶段在围绕淀粉样蛋白-β斑块的外壳中富集。过度磷酸化的Tau主要出现在兴奋性神经元和轴突中。此外,在不同的细胞类型中精确定位和验证了与疾病相关的基因通路,表明神经胶质细胞中的炎症和神经胶质增生过程以及成人海马体神经发生的下降。

[0229] 先前的STARmap方法与组织学染色(免疫染色或小分子染色)不兼容,并且仅限于检测1024个基因。为了克服STARmap Pro中的此类限制,首先简化了实验方案,将抗体(AT8抗体,检测磷酸化tau)和染料染色(X-34,检测Aβ斑块)纳入文库制备和原位测序步骤(图1B、8A和8B)。通过一对DNA探针(引物和锁式,图1C)检测脑组织的细胞内mRNA,并酶促扩增为cDNA扩增子。蛋白质用一抗标记,然后将cDNA扩增子和一抗两者嵌入水凝胶基质中。每个cDNA扩增子都含有基因唯一标识符(条形码),可通过原位SEDAL(通过动态退火和连接减少误差的测序)测序读出(Wang et al.,2018),然后进行荧光蛋白染色(二抗染色和小分子染料X-34染色)以可视化蛋白质信号。

[0230] 然后,DNA探针中的基因编码条形码从5个核苷酸(nt)扩展到10nt(10^6编码容量),足以编码超过20,000个基因。此外,在连接位点附近策略性地设计了额外的5-nt条形码,这通过减少错配引物-锁式对的非特异性扩增来增加基因检测的特异性(图8C)。然后通过在连接位点附近并入错配来验证条形码设计。结果显示出不可检测的信号,表明STARmap Pro方法具有高特异性(图8D和8E)。

[0231] 为了研究AD相关病理学(包括淀粉样蛋白沉积和过度磷酸化tau)如何影响细胞水平的转录反应,进行了八轮原位测序以绘制2766个基因,并进行了一轮测序后成像(图1D)在TauPS2APP小鼠和对照小鼠的大脑薄冠状切片中定位Aβ斑块和磷酸化tau(p-Tau)。转基因TauPS2APP小鼠除了表达变得过度磷酸化并聚集的突变形式的人MAPT(P301L)外,还表达突变形式的人淀粉样前体蛋白(APP K670N/M671L)和早老素2(N141I),其产生高水平的Abeta(Aβ)肽,导致斑块形成。在8月龄(tau和Aβ病理学已经形成并正在扩大的年龄)和13月龄(更晚期的疾病阶段,具有严重病理学和升高的神经炎症活动)时对切片进行分析(Leeet al.,2021)。主要研究了AD中最易受影响的两个区域——皮质和海马体。TauPS2APP中的空间蛋白信号与先前报告的结果(Grueninger et al.2010),Lee et al.Neuron 2021)相匹配,即Aβ斑块信号分布在皮质和海马体区域,p-Tau免疫反应性主要分布在海马体的CA1区域(图1D),表明STARmap Pro中蛋白质检测的保真度。以亚细胞分辨率绘制来自两只TauPS2APP小鼠的19,932个细胞和来自两只对照小鼠(非转基因同窝小鼠)的17,135个细胞(体素大小为95nm x 95nm x 346nm,图1A)。在将三维RNA读数投影到二维平面、细胞分割和单细胞转录谱的质量控制过滤(面积>1000像素或9.025μm^2,每个细胞>68个RNA读数,另请参阅STAR方法)后,从所有4个样品中汇集的剩余33,106个细胞进行下游分析。

[0232] 实施例2:分层细胞分类和空间分析

[0233] 为了从STARmap Pro数据中鉴定细胞类型,采用了分层聚类策略,其中高水平聚类用于将细胞分类为所有样品共有的常见细胞类型,而亚水平聚类用于进一步鉴定与疾病相关的亚型。在高水平聚类过程中,莱顿算法通过统一流形近似和投影(UMAP)应用于所有转录组谱的低维表示(McInnes et al.,2018;Traag et al.,2019)。根据先前报道的基因标志物和组织形态学,用明确的注释鉴定了十三种主要细胞类型(图2A、图9A)。例如,兴奋性

神经元通过与离子通道和突触信号传导相关的基因(如Vsnl1、Snap25和Dnm1)的高表达水平来注释。抑制性神经元通过富含γ-氨基丁酸(GABA)转运蛋白Slc6a1来分离。其他非神经元细胞类型特异性标志物如星形胶质细胞的Aldoc、内皮细胞的Bsg、小胶质细胞的Ctss和少突胶质细胞的Plp1也用于注释相应的聚类(图9A)。TauPS2APP样品的UMAP图显示与对照样品相比星形胶质细胞、小胶质细胞、少突胶质细胞和锯齿回(DG)细胞的差异分布,表明与疾病相关的细胞亚型(图2A)。因此,研究了每种主要细胞类型内的异质性,并根据其转录组特征鉴定了24个亚水平聚类(图2B)。

[0234] 受益于以亚细胞分辨率保留的空间信息,生成了空间细胞类型图谱以及四个样品的皮质和海马体区域中的组织病理学标志(图2C和图9D)。不同样品的所有空间细胞图谱均显示出相似的皮质和海马体区域解剖结构,证实了高水平聚类结果的稳健性和可靠性。然而,在TauPS2APP样品中,一些主要细胞类型在Aβ斑块附近显示出不同的空间分布,并且p-Tau信号在13月龄时在海马体区域变得明显(图2C)。为了进一步量化细胞类型组成与Aβ斑块的空间关系,测量了每个细胞的质心到其最近斑块边缘的距离。然后根据距Aβ斑块的距离(在五个10μm同心环中)对细胞进行计数,并根据主要细胞类型注释进行分组(图2D、2E和9F)。与整体细胞类型组成相比,在13种主要细胞类型中,小胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞前体细胞(OPC)在TauPS2APP样品中的斑块周围富集。小胶质细胞是10μm环中最常见的细胞类型。OPC和星形胶质细胞在20-30μm距离处表现出中等富集。其余细胞类型在10-20μm环中相对贫乏。

[0235] 高水平细胞聚类和空间分析表明,小胶质细胞、星形胶质细胞、OPC、少突胶质细胞和神经元细胞在转录谱、空间位置或这两个特征上表现出变化。因此,选择这些细胞类型进行深入的亚水平聚类分析,以查明与疾病相关的细胞亚型和基因通路。AD本质上是进行性疾病,涉及持续的分子和细胞变异。然而,聚类分析只能鉴定不同的细胞类型,不能描述连续的细胞状态转变。为了捕获细胞状态随疾病进展的梯度并确定不同亚型之间的关系,Monocle拟时间分析(Cao et al.,2019)是一种广泛使用的用于重建细胞分化轨迹的计算工具,用于在以下部分中与亚聚类分析相补充。

[0236] 实施例3:疾病相关小胶质细胞从疾病早期就直接接触Aβ斑块

[0237] 在确认小胶质细胞紧邻斑块富集后(图2E),然后通过转录组谱的亚聚类分析来研究小胶质细胞群体内的异质性。鉴定出三个亚群并分别命名为Micro1(n=779)、Micro2(n=415)和Micro3(n=529)(图3A)。Micro1和Micro2亚型存在于所有四个样品中,而Micro3群体在TauPS2APP样品中从8月龄到13月龄大幅增加,并且在对照样品中几乎不存在(图3A)。此外,Micro3亚聚类表达高水平的C1qa、Trem2、Cst7、Ctsb和Apoe,这些是疾病相关小胶质细胞(DAM)的已知标志物,并与神经退行性变相关(Friedman et al.,2018;Keren-Shaul et al.,2017)(图3B)。鉴于其与疾病模型的密切相关性以及与已知DAM基因标志物的一致性,Micro3被注释为DAM。

[0238] 然后通过拟时间轨迹分析进一步重建小胶质细胞中细胞状态转换的连续梯度。小胶质细胞群体表现出线性拟时间轨迹,与真实的疾病进展时间线非常吻合。对照样品中的小胶质细胞在轨迹的起点处富集,而TauPS2APP样品中的小胶质细胞在8月龄至13月龄期间沿着连续路径不断移动(图3C-3E)。虽然Micro3亚聚类出现在沿着轨迹的较晚拟时间点处,但是Micro1和Micro2都沿着轨迹从早期拟时间值扩散到中期拟时间值(图3D-3E)。接下来,

分析了三个小胶质细胞亚聚类的空间分布。据观察发现:(i)所有三个亚聚类都存在于TauPS2APP样品的皮质和海马体区域中(图3F-3G);(ii)Micro3几乎只存在于TauPS2APP小鼠中,但不存在于对照样品中(图3H、图10A);(iii)在TauPS2APP和对照样品中,Micro2在海马体区域中显示出比皮质区域中更高的密度(图3H)。对于Aβ斑块周围的细胞类型组成分析,观察到:(i)在8月龄时,斑块周围10μm环内的所有细胞的64.5%是小胶质细胞,并且特别地,73.3%的小胶质细胞是Micro3(图10B);(ii)在13月龄时,该数字分别增加至75.8%和81.5%(图3H,底部)。此外,尽管Micro2并非严格意义上的疾病特异性,但与其他(非小胶质细胞)细胞类型相比,其在斑块附近的10μm环内显著富集(图3H和图10B),这表明Micro2也响应于Aβ斑块。小胶质细胞的空间细胞图谱进一步用拟时间值绘制,并使用与细胞类型分析类似的同心环定量计算斑块附近的拟时间分布。结果显示了预期的观察结果,其中靠近斑块(10μm内)的小胶质细胞比远离斑块的细胞具有更高的拟时间值,揭示了小胶质细胞在向Aβ斑块迁移时激活的时空轨迹(图10C和10D)。

[0239] 为了在分子水平上更全面地了解小胶质细胞对AD病理学的应答,随后比较了TauPS2APP小鼠与对照小鼠中小胶质细胞的基因表达(图10E)。AD样品中鉴定的大多数上调的DEG是参与生物过程的DAM基因标志物,如细胞活化调节(Cst7、Apoe、Cd9和Clec7a)、炎症反应(即Trem2、Ccl6和Cd68)、抗原加工和呈递(即Ctss和H2-k1)。在另一方面,患病样品中小胶质细胞下调的基因与解剖结构形态发生的调节(即Sparc、Numb、Cdc42)、内吞作用(Calm1和Bin1)以及运输的正调节(即P2ry12和Glud1)有关。选择最显著的DEG和细胞类型标志物的子集,并使用另一组小鼠在64个基因数据集中验证它们的表达变化(图3I)。

[0240] 实施例4:疾病相关星形胶质细胞在后期出现在斑块-DAM复合物附近

[0241] 星形胶质细胞是另一种非神经元细胞群,在TauPS2APP与对照样品之间存在显著差异。星形胶质细胞的亚水平聚类分析鉴定了三个转录组不同的亚群Astro1(n=1,068)、Astro2(n=1,271)和Astro3(n=545)(图4A)。在所有样品中均观察到所有三个亚聚类;然而,对照小鼠中存在的Astro3细胞很少,而TauPS2APP小鼠中的Astro3细胞群从8月龄到13月龄大幅增加(图4A)。先前的研究鉴定了与疾病相关的星形胶质细胞(DAA)具有Gfap的特征性上调,并且Astro3的基因标志物与DAA的基因标志物相似(Habib et al.,2020)(即Gfap、Vim和Apoe,图4B)。因此,Astro3聚类被注释为DAA,因为其转录组谱与DAA相似且与AD模型相关。此外,Astro1和Astro2对应于先前报道的低Gfap细胞群和中Gfap细胞群(Habib et al.,2020)。

[0242] 尽管Astro1-3亚型中的许多标志物基因存在明显的线性梯度,但从星形胶质细胞群的拟时间轨迹分析中观察到分叉路径(图4C)。通过沿拟时间轨迹可视化亚聚类注释,发现最长路径(下方路径)与Astro1(起点)和Astro 2(终点)的梯度匹配,与疾病进展没有明显关联。相反,从分叉点(上方路径)开始的短分支代表从非疾病状态(主要是Astro2)到Astro3(DAA)的转变(图4D)。

[0243] 星形胶质细胞的空间细胞图谱进一步显示Astro1位于皮质和海马神经元附近,而Astro2富集于胼胝体和间隙分子层(图4F-4H和图11A)。与组织病理学相关的细胞类型分析表明,虽然DAM直接与10μm内的斑块相互作用形成DAM-斑块复合物,但Astro3(DAA)在皮质和海马体区域中距离斑块相对较远的地方(20-40μm)富集。在皮质、胼胝体和海马体区域,13月龄的TauPS2APP样品中斑块周围20-40μm范围内的细胞分别约3.1%、7.8%或10.1%是

DAA(图4H)。此外,Astro2在8月龄时也在斑块附近富集,占20-40μm范围内所有细胞的3%-16%;然而,Astro2的存在在13月龄时下降至2%-7%(图4H和11B)。从8月龄到13月龄在斑块附近观察到Astro2群体到Astro3群体的转变,结合从Astro2到Astro3的疾病相关转录组拟时间轨迹(图4D,上方路径),表明在斑块附近随着疾病进展可能存在Astro2向Astro3(DAA)的转化。

[0244] TauPS2APP和对照样品的星形胶质细胞中的大多数DEG与神经胶质细胞分化(即,Gfap、Vim、Clu和Stat3)和细胞外基质(即,Ctsb和Bcan)相关(图11E)。通过显示拟时间嵌入上鉴定的头部DEG的基因表达水平,Gfap和Vim的表达谱显示出与DAA的最佳相关性以及沿着疾病相关分支的相似分子梯度(图4I,上方路径)。来自DEG的富集GO术语包括神经元投射发育的负调节和神经胶质细胞增殖的正调节以及中间丝组织(图4J),表明AD疾病模型中的整体神经胶质增生过程。再次,选择最显著的DEG和细胞类型标志物的子集,并且还在64个基因验证数据集中观察到它们的表达变化(图4K)。

[0245] 实施例5:少突胶质细胞亚型和前体细胞在斑块中间附近富集

[0246] 接下来对少突胶质细胞谱系细胞进行亚水平聚类分析,并鉴定出四个聚类(图5A和5B):Oligo1(n=4,295)、Oligo2(n=181)、Oligo3(n=490)和OPC(n=549)。少突胶质细胞的基因标志物Plp1在所有聚类中表现出相对均匀的表达,而Klk6和Cldn11分别标记Oligo2和Oligo3群体(图5B)。TauPS2APP疾病模型和对照样品在UMAP嵌入上显示所有四种细胞群的相似分布(图5A)。

[0247] OPC和少突胶质细胞组合群体的拟时间轨迹分析概括了从OPC到成熟少突胶质细胞的已知分化路径(图5C,下方轨迹)。与星形胶质细胞类似,与疾病相关的轨迹在从OPC到少突胶质细胞的主要路径旁边分叉(图5C,上方分支)。与8月龄的TauPS2APP和对照样品相比,来自TauPS2APP样品的少突胶质细胞在疾病相关轨迹分支周围大大富集(图5C)。此外,疾病相关轨迹含有所有三种Oligo1-3亚型(图5D)。总体而言,与13月龄的对照样品和8月龄时间点的患病样品相比,13月龄患病样品中细胞的拟时间分布具有显著更高的平均值(图5E)。

[0248] 根据空间图谱和细胞密度计算(图5F-5H上方和图12A),观察到TauPS2APP中的Oligo2和Oligo3群体的细胞密度在13月龄患病样品中与对照样品相比高出100%-200%。因此,Oligo2和Oligo3被注释为富病变的少突胶质细胞。根据Aβ斑块附近的细胞类型分布分析,发现8月龄和13月龄的TauPS2APP小鼠中OPC在斑块周围的20-40μm环中富集(图5H和14B)。此外,Oligo2和Oligo3也在TauPSAPP小鼠中距斑块20-40μm的距离处富集,特别是在皮质下区域。

[0249] 通过对TauPS2APP小鼠少突胶质细胞与对照小鼠的DEG分析进行比较,鉴定并验证了一组基因(即Cldn11、Klk6、Serpina3n和C4b),这些基因在13月龄的TauPS2APP小鼠中强烈上调。相反,8月龄的TauPS2APP和对照小鼠之间DEG的倍数变化不太显著,并且一些DEG在后来的实验验证中表现出不一致的变化(图5K和14F)。GO术语分析表明了少突胶质细胞在细胞因子产生、神经元死亡调节以及疾病进展过程中突触可塑性和髓鞘形成调节中的关键生物学过程。沿着疾病相关拟时间轨迹的进一步DEG分析进一步证实了少突胶质细胞中Klk6、Cldn11和C4b基因的疾病关联(图5J)。

[0250] 实施例6:神经元细胞对Aβ斑块和Tau缠结的反应

[0251] 除了非神经元细胞的细胞变化之外,神经元的转录组反应对于理解神经变性的机制也至关重要。对神经元细胞群进行亚水平聚类分析,确定了八个兴奋性神经元亚聚类和四个抑制性神经元亚聚类。如神经元空间细胞图谱(图6A、6B、13A和13B)中所示,皮质兴奋性神经元的四种亚型对应于不同的皮质层(CTX-Ex1-4)。海马体区域的兴奋性神经元类型与主要类型(DG、CA1、CA2和CA3)相同,并且在每个主要类型中没有鉴定到额外的亚群。在抑制性神经元的四种亚型中,Pvalb和Sst神经元在皮质中富集,而Cnr1和Lamp5神经元在海马体中更多。

[0252] 接下来研究了与Aβ斑块相关的神经元类型组成及其转录组谱。一般而言,由于斑块附近非神经元细胞(小胶质细胞、星形胶质细胞、OPC和少突胶质细胞)的迁移和扩增,斑块附近所有神经元细胞的百分比较低,并且与其距斑块的距离呈正相关。然而,在海马体区域,斑块周围的神经元群主要由DG细胞组成,这与大多数斑块出现在DG附近的观察结果一致。最近的一份报告表明,人类AD患者中DG中的成年海马体神经发生(AHN)活性急剧下降。因此,通过拟时间轨迹分析测试了TauPS2APP小鼠模型中的Aβ斑块是否也影响DG的AHN。8月龄时,由于DG附近的斑块非常少,因此TauPSAPP和对照小鼠中DG细胞的拟时间分布无法区分。然而,13月龄时,随着DG附近斑块数量的增加,拟时间轨迹分成两个分支,分别对应于TauPS2APP和对照样品中的DG群体。此外,进一步研究了DG区域神经元的分子反应,因为其与神经发生有关。根据拟时间分析,13月龄时的样品遵循两条不同的路径。在13月龄的患病样品中,Dapk1等基因上调,其也参与神经元死亡调节(图6I和6J)。

[0253] 为了研究tau缠结引起的改变,通过计算tau阳性像素数与每个细胞总像素面积的比率来量化每个细胞内的tau蛋白强度。由于轴突中的tau缠结可能被错误地归因于细胞,因此使用阈值来选择每个样品中的tau阳性神经元。在本例中,8月龄时样品中的大多数tau阳性兴奋性神经元位于CTX-Ex2群体中,而13月龄时,大多数tau阳性兴奋性神经元位于CA1区域。对于抑制性神经元,大多数tau阳性细胞来自Pvalb群体,而在13月龄时,它们大多数来自Sst群体(图6E)。斑块周围的tau信号也被量化,并且发现在皮质区域中,tau信号在斑块附近富集,但在皮质下区域中没有观察到图案(图6F)。

[0254] 最后,通过将所有亚型合并为兴奋性和抑制性神经元两大类,并分析TauPS2APP和对照样品之间的神经元DEG,检查Aβ斑块和tau缠结对神经元的综合影响。总体而言,从兴奋性和抑制性神经元细胞群中鉴定出的DEG高度一致。GO术语分析表明,所鉴定的DEG在细胞周期调节(Ccnb2)、神经元分化(Gpm6a)和神经元死亡调节(Ddit3)的生物过程中富集(图6G和6H)。

[0255] 实施例7:AD病理学中疾病相关细胞的综合分析

[0256] 上述分析的重点是剖析各个主要细胞类型内与疾病相关的亚型和DEG。为了综合多种细胞类型的AD基因通路的全面图景,使用四种主要细胞类型(小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元)的DEG进行基因集富集分析(GSEA)。如GO术语富集热图(图7A和图14A)所示,在13月龄时,生物过程中非神经元细胞显著富集的术语大部分是神经胶质细胞分化和神经胶质细胞发育,这概括了疾病相关群体的出现,而神经元则涉及突触信号传导、认知和突触可塑性的调节。然后,收集富含靶向细胞类型的所有注释,并根据它们的相似性进行分组。生成了GO富集图,并显示了AD主要参与者的细胞类型特异性和共有注释(图14B)。由于群体直接与病理部位相互作用,与免疫应答、炎症反应和溶酶体相关的细胞类型

特定术语在小胶质细胞中富集。与细胞运动、形态发生和分化相关的术语在多种细胞类型中共有。

[0257] 除了在AD和对照样品的比较中确定的DEG之外,还使用靠近斑块(25μm以内)的细胞与远离斑块(距离大于25μm)的细胞进行空间DEG计算。在斑块附近区域特异性上调的基因被认为是斑块诱导基因(PIG)。在8月龄AD样品中鉴定出16个PIG,在13月龄AD样品中鉴定出29个PIG(图7B和14G)。AD 8月龄样品中的所有16个PIG均包含在AD 13月龄样品中的PIG中(图7C)。发现斑块10μm以内富集的PIG主要是DAM标志物基因,例如Trem2、Cst7、Ctsb、Apoe和Cd9(图7B和14G)。在AD 13月龄样品中,DAA标志物Vim在距斑块20至30μm的区域中上调(图7B)。这与先前的发现一致,即DAA在AD 13月龄样品中斑块的20至30μm区域富集(图4H)。还将发现的PIG与先前报道的18月龄AppNL-G-F小鼠的PIG进行了比较。结果显示,AD 13月龄样品中58.9%(29个中的17个)的PIG和AD 8月龄样品中87.5%(16个中的14个)的PIG与报告的PIG重叠(图7C)。高重叠率意味着STARmap Pro检测空间保留RNA信号的准确性。

[0258] 为了更全面和定量地理解每种细胞类型和Aβ斑块之间的空间关系,计算斑块、DAM、DAA和神经元到它们最近邻居的平均欧几里得距离(图14C和14E)。与打乱的参考(图14D和14F)相比,发现DAM是淀粉样斑块的最近邻居。DAA与DAM而不是斑块的距离较短,这表明DAA与DAM-斑块复合物接触。为了进一步验证这一发现,随后对距每个斑块不同距离间隔的细胞进行定量,并根据它们的细胞类型身份进行分组(图7D)。总之,DAM最接近斑块,并且富集在0-20μm区域。DAA和OPC与斑块的距离相对接近,分布在20-40μm区域。少突胶质细胞和神经元在外部区域具有较高密度(图7D)。基于该空间信息,生成了AD 8月龄样品和AD 13月龄样品中斑块周围的细胞分布模式图(图7E)。在这两个阶段,DAM直接接触斑块形成内核。随着疾病进展,更多的DAA出现并在第二个最近的斑块区域富集。TauPS2APP 13月龄样品的图表中还显示了斑块附近区域中OPC的富集。这些靶细胞类型中的标志物基因或DEG也在图中进行了标记。

[0259] 讨论

[0260] STARmap Pro专为以单细胞分辨率原位检测同一组织切片中的RNA和蛋白质信号而开发。基于STARmap,其检测能力和特异性得到进一步提高,并提供了以单细胞分辨率同时分析RNA和蛋白质的新功能,同时保留了空间信息。STARmap Pro提供了以更全面的方式研究生物系统并实现多模式空间基因表达分析的机会。本文所述的方法有可能广泛用于病理学研究,因为蛋白质是最常见的疾病标志。使用STARmap Pro探索疾病标志附近的基因表达变化将促进对疾病发病机制的了解。原始的STARmap仅检测RNA信号,无法准确表示蛋白质的丰度或检测蛋白质修饰。相比之下,STARmap Pro的免疫染色策略不仅可以区分不同的蛋白质种类,还可以区分蛋白质修饰,为癌症研究提供了有用的工具,因为磷酸化等蛋白质修饰在癌症的发生和发展过程中发挥着重要作用。

[0261] 应用STARmap Pro检测AD小鼠模型中的RNA和AD病理蛋白信号。利用空间保留的单细胞RNA信号,生成细胞类型空间图谱,揭示与Aβ斑块相关的细胞分布模式,并发现小胶质细胞在斑块附近显著富集。然后对五种靶向细胞类型(小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞、兴奋性神经元和抑制性神经元)进行亚聚类分析。结果提供了全面的空间图谱,鉴定了DAM和DAA的出现,以及它们在Aβ斑块附近区域的富集行为。这与先前的研究一致,进一

步验证了STARmap Pro的检测准确性。在分析斑块周围的细胞分布时,发现DAM分布在Aβ斑块周围最近的区域,然后DAA分布在靠近DAM的外部区域。这意味着DAM的分布可能直接受到Aβ斑块的影响,进而DAA可能受到DAM的影响。事实上,先前的研究表明,DAA标志物基因Gfap和Vim高表达的反应性星形胶质细胞是由激活的小胶质细胞诱导的。至于细胞类型分布模式,还发现OPC在斑块附近区域富集。斑块附近的这些OPC可能分化为参与AD病理的少突胶质细胞。

[0262] 还提供了五种主要细胞类型的病理响应转录特征。研究发现,大多数基因标志物是细胞类型特异性的,并且可能参与特定的扰动,而一些DEG是跨细胞类型共有的。例如,Gfap在所有主要细胞类型中均上调。这与之前的单核研究一致,该研究也显示了各种细胞类型中阿尔茨海默病特异性的亚聚类中Gfap的高表达。小胶质细胞和星形胶质细胞也共享DEG如CTSB。通路分析还表明,来自不同细胞类型的DEG参与相似的生物过程。

[0263] 方法

[0264] 小鼠

[0265] 所有动物程序均遵循Genentech机构动物护理和使用委员会(IACUC)批准的动物护理指南,并且动物实验是按照IACUC政策和NIH指南进行的。用于STARmap Pro的小鼠包括表达人tau的P301L突变体和$PS2_{N141I}$和APP_{swe}($PS2APP^{homo}$;$P301L^{hemi}$)的pR5-183系以及非转基因对照。

[0266] 用于STARmap Pro的组织采集和样品制备

[0267] 用异氟烷麻醉动物并迅速去头。取出脑组织,置于O.C.T中,然后在液氮中冷冻并保存在-80℃。对于小鼠脑组织切片,将大脑转移至低温恒温器(Leica CM1950)并以冠状切片中切成20μm切片。将脑切片用4% PFA的1XPBS缓冲液在室温下固定15分钟,用冷甲醇透化,并在-80℃下放置一小时。

[0268] STARmap Pro用于检测空间RNA和蛋白质信号。

[0269] 样品从-80℃取到室温保持5分钟,然后用PBSSTR缓冲液(PBS中的0.1% Tween-20、0.1U/μL SUPERase•In RNase抑制剂)洗涤。洗涤后,将样品与300μl 1X杂交缓冲液(2X SSC、10%甲酰胺、1% Tween-20、0.1mg/ml酵母tRNA、20mM RVC、0.1U/μL SUPERase•In RNase抑制剂以及每个寡核苷酸1nM的合并的SNAIL探针)在40℃加湿烘箱中摇动孵育并用封口膜包裹36小时。在37℃下,用PBSSTR洗涤样品两次,并用高盐洗涤缓冲液(4X SSC溶解在PBSSTR中)洗涤一次。最后,在室温下用PBSSTR漂洗样品一次。然后将样品与连接混合物(T4 DNA连接酶在1X T4 DNA连接酶缓冲液中按1:10稀释,补充有0.5mg/ml BSA和0.2U/μL SUPERase-In RNase抑制剂)在室温下孵育两小时并温和摇动。连接后,用PBASR缓冲液洗涤样品两次,然后与滚环扩增(RCA)混合物(Phi29 DNA聚合酶在1X Phi29缓冲液中按1:10稀释,补充有250μM dNTP、20μM 5-(3-氨基烯丙基)-dUTP、0.5mg/ml BSA和0.2U/μL SUPERase-In RNase抑制剂)在30℃下孵育两小时并温和摇动。将样品用PBST(PBS中的0.1% Tween-20)洗涤两次,并用封闭液(PBST中的5mg/ml BSA)在室温下封闭30分钟。将样品与p-Tau一抗(在封闭液中1:100稀释)在室温下孵育2小时。将样品用PBST洗涤三次,每次5分钟。然后用PBST中的20mM丙烯酸NHS酯处理样品1小时,然后用PBST冲洗一次。将样品在单体缓冲液(2X SSC中的4%丙烯酰胺、0.2%双丙烯酰胺)中室温孵育15分钟。然后吸出缓冲液,将35聚合混合物(0.2%过硫酸铵、0.2%四甲基乙二胺溶解在单体缓冲液中)添加到

样品中心,并立即用Gel Slick涂层盖玻片覆盖。聚合反应在室温下进行1小时,然后用PBST洗涤两次,每次5分钟。将样品用去磷酸化混合物(虾碱性磷酸酶在1X CutSmart缓冲液中按1:100稀释,补充有0.5mg/ml BSA)在37℃下处理1小时,然后用PBST洗涤三次,每次5分钟。

[0270] 对于原位RNA测序,每个循环首先用剥离缓冲液(60%甲酰胺和0.1%Triton-X-100水溶液)在室温下处理样品两次10分钟,然后用PBST洗涤三次,每次5分钟。将样品与测序混合物(T4 DNA连接酶在1XT4 DNA连接酶缓冲液中按1:25稀释,补充有0.5mg/ml BSA、10μM读数探针和5μM荧光寡核苷酸)在室温下孵育至少3小时。将样品用洗涤和成像缓冲液(2XSSC中的10%甲酰胺)洗涤三次,每次10分钟,然后浸入洗涤和成像缓冲液中进行成像。使用Leica TCS SP8共焦显微镜获取图像。进行八个成像循环来检测2766个基因。

[0271] 对RNA信号进行原位测序后,将样品在X-34溶液(1X PBS中的10μM X-34、40%乙醇和0.02M NaOH)中室温孵育10分钟。然后用1X PBS洗涤样品3次,在80% EtOH中孵育1分钟,然后用PBS洗涤3次,每次1分钟。然后将样品与二抗(在封闭液中1:80稀释)在室温下孵育12小时。然后用PBST洗涤样品三次,每次5分钟。为了细胞分割的目的,按照制造商的说明进行碘化丙啶(PI)染色。进行另一轮成像以检测空间蛋白质信号。

[0272] 薄切片STARmap Pro数据处理。

[0273] 所有图像处理步骤均使用MATLAB R2019b和Python 3.6中的相关开源包实现,并根据Wang et al.,2018进行应用。

[0274] 图像预处理:使用MATLAB函数“imhistmatchn”对每个图块进行多维直方图匹配。以第一轮测序中第一个颜色通道的图像作为参考,使照明度和对比度水平均匀。

[0275] 图像配准:图像配准根据Wang et al.,2018应用。全局图像配准是使用三维快速傅立叶变换(FFT)来计算所有平移偏移处两个图像体积之间的互相关性来完成的。最大相关系数的位置被鉴定并用于平移图像体积以补偿偏移。

[0276] 点采集:配准后,在第一轮测序的每个颜色通道中单独鉴定各个点。通过查找3D中的局部最大值来鉴定直径为约6个像素的点。鉴定每个点后,在每个轮次中围绕点位置的5x5x3体素体积中确定所有四个通道中该点的主色。

[0277] 条形码过滤:首先根据质量得分过滤点。质量得分量化了每轮测序中每个点来自一种颜色而不是颜色混合的程度。根据条形码DNA序列的2碱基编码后的预期颜色序列,将条形码码本转换为颜色空间。通过质量阈值的点颜色序列和码本中的匹配序列被保留并用条码代表的特定基因进行鉴定;所有其他点都被拒绝。然后保存码本中的高质量点和相关基因身份以供下游分析。

[0278] 2D细胞分割:StarDist 2D机器学习模型(Schmidt et al.,2018)根据最后一轮测序后缝合的DAPI通道的最大强度投影自动鉴定细胞核。然后从分割的DAPI图像中提取细胞位置。细胞体由缝合的尼氏染色和合并的扩增子图像的叠加表示。最后,基于组合的阈值细胞体图和鉴定的细胞核位置,应用基于标志物的分水岭变换来分割阈值细胞体。然后将2D中与每个分段细胞区域重叠的点分配给该细胞,以计算每个细胞的基因表达矩阵。

[0279] 细胞类型分类:应用两级聚类策略来鉴定数据集中的主要和次级细胞类型。本节中的处理步骤是使用Scanpy v1.4.6(Wolf et al.,2018)和Python 3.6中的其他自定义脚本实现的,并根据Wang et al.,2018应用。经过过滤、归一化和缩放后,应用主成分分析(PCA)来降低细胞表达矩阵的维数。根据解释的方差比,使用头部PC来计算观测值的邻域

图。莱顿算法用于将连接良好的细胞鉴定为转录组谱的低维表示中的聚类。使用统一流形近似和投影(UMAP)显示细胞,并根据细胞类型进行颜色编码。然后使用PCA分解和莱顿聚类对每个高水平聚类的细胞进行亚聚类,以确定亚级细胞类型。

[0280] 空间分析

[0281] 斑块分割:空间分析从斑块分割开始。通过使用EBImage包中的“bwlabel”函数,可以从斑块通道的二值图像中分割出斑块。然后,使用“computeFeatures.moment”和“computeFeatures.shape”函数计算每个斑块的大小和中心。最后,面积小于400像素(约等于36.7μm^2)的斑块将被滤除。

[0282] 斑块周围的细胞分布:由于细胞位置PC是从数据预处理步骤获得的,考虑具有n个细胞和m个斑块的样品,对于每个细胞i∈{1,2,…,n},其最近的斑块距离为:

[0283] $ND_i = \min\{||PC_i - PP_j||_2\}, j \in \{1,2,...,m\}$

[0284] 接下来,我们计算属于不同范围的每种细胞类型的细胞数量。范围设置为0-10μm(环1)至40-50μm(环5)。为了消除细胞总数的差异,通过计算环中每种细胞类型的百分比来对统计数据进行归一化。该分析的图形解释如图2D所示。对于总体统计,计算每种细胞类型在整个样品中的百分比。

[0285] 类型间距离计算:在具有n个细胞和m个斑块的样品中,它们被视为具有坐标P和类型标签(斑块、DAA、DAM等)的对象。假设有t种类型的标签,每种类型的对象集合为S_1,S_2,...,S_t,则类型i到类型j的类型间距离为:

[0286] $$D_{ij} = \frac{\sum_{k \in S_i} min\{\|P_k - P_l\|_2\}}{\#S_i}, l \in S_j$$

[0287] 使用相同的算法进行改组对照分析,但随机分配标签(细胞/斑块的数量保持不变)。

[0288] 差异表达和通路分析

[0289] 差异表达分析:在执行DE分析之前,数据集通过以下方式归一化:1)将样品中的基因计数除以该样本的*每个细胞的总计数*的中位数,然后乘以比例因子,该比例因子定义为所有样品的*每个细胞的总计数*的中位数的平均值;和2)通过添加伪计数1来执行log2转换。

[0290] $$比例因子 = \frac{\sum(每个细胞总计数)\,中位数}{样品数}$$

[0291] DE基因是通过使用Seurat中的“FindMarkers”功能在两组细胞之间进行Wilcoxon Rank Sum检验来鉴定的。为了进行像“疾病与对照”这样的比较,两组细胞自然地从TauPS2APP和对照样品中提取某种类型的细胞。至于“靠近斑块与远离斑块”的比较,“靠近斑块”细胞是那些与最近斑块距离<25μm的细胞,所有其他细胞被定义为“远离斑块”。在“CA1 Tau+与Tau-”的比较中,根据Tau信号面积占细胞体面积的比例过滤Tau+CA1细胞。该分数的阈值设置为0.3。

[0292] 为了过滤掉一些低表达的基因,在任一细胞组中检测到表达的基因的细胞分数的最小阈值设置为0.1。以下阈值也应用于生成的基因列表以过滤掉不显著的基因:对数倍数变化的绝对值>0.1,p值<0.05。

[0293] 为了可视化DE结果,我们使用“EnhancedVolcanoplot”包来生成火山图。logFC>0

的DE基因呈红色,而其他基因呈蓝色。未能通过LogFC阈值的显著基因(p值<0.05)呈绿色。所有其他不显著的基因均呈灰色。请注意,一些具有极高-log(P值)或logFC的基因受到限制。

[0294] 基因本体(GO)富集分析:

[0295] 使用网站g:Profiler对各对比的DE基因进行GO富集分析:来自疾病和对照样品的细胞或Tau阳性和阴性或靠近斑块和远离斑块(以25μm作为阈值)的DE基因列表是GO分析的输入。统计领域范围仅限于注释基因。使用g:SCS确定显著性阈值,并将用户阈值设置为0.05。为了限制进行富集分析的功能类别的大小,过滤掉<20个或>1000个基因的GO术语。结果以通用富集图谱(GEM)格式下载,用作进一步功能富集分析的输入。

[0296] Cytoscape(v3.8.2)与EnrichmentMap(v3.3.1)和AutoAnnotate(v1.3.3)apps用于集成和可视化五种主要细胞类型的DEG(Ex/In/Astro/Micro/Oligo)的GO富集结果。使用g:Profiler获得的统计显著性GO和KEGG术语列表被导入Cytoscape,其中参数如下:节点(GO/KEGG术语)截止值设置为调整后的p值<0.05和FDR q值<0.1;边(表示每个节点的基因列表之间的相似性)使用的相似性阈值是0.375。每个节点都按细胞类型进行颜色编码,以说明每个细胞聚类中DEG的共同和不同贡献。使用AutoAnnotate自动注释富集图,并使用WordCould app创建每个聚类的三词标签。

[0297] SynGO富集工具用于进一步表征来自兴奋性神经元、抑制性神经元和具有Tau病理学的CA1细胞的DEG中富集的突触功能。脑表达基因用作背景基因列表。

[0298] 参考文献

[0299] 1.Braak,H.,and Braak,E.(1991).Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes.Acta Neuropathologica.82,239-259.

[0300] 2.Busche,M.A.,and Hyman,B.T.(2020).Synergy between amyloid-βand tau in Alzheimer's disease.Nature Neuroscience.23,1183-1193.

[0301] 3.Cao,J.,Spielmann,M.,Qiu,X.,Huang,X.,Ibrahim,D.M.,Hill,A.J.,Zhang,F.,Mundlos,S.,Christiansen,L.,Steemers,F.J.,et al.(2019).The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis.Nature.566,496-502.

[0302] 4.Chen,W.-T.,Lu,A.,Craessaerts,K.,Pavie,B.,Sala Frigerio,C.,Corthout,N.,Qian,X.,Laláková,J.,Kühnemund,M.,Voytyuk,I.,et al.(2020).Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease.Cell.182,976-991.e19.

[0303] 5.Grubman,A.,Chew,G.,Ouyang,J.F.,Sun,G.,Choo,X.Y.,McLean,C.,Simmons,R.K.,Buckberry,S.,Vargas-Landin,D.B.,Poppe,D.,et al.(2019).A single-cell atlas of entorhinal cortex fromindividuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation.Nat.Neurosci.22,2087-2097.

[0304] 6.Grueninger,F.,Bohrmann,B.,Czech,C.,Ballard,T.M.,Frey,J.R.,Weidensteiner,C.,von Kienlin,M.,and Ozmen,L.(2010).Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by Aβin TauPS2APP triple transgenic mice.Neurobiol.Dis.37,294-306.

[0305] 7.Habib,N.,McCabe,C.,Medina,S.,Varshavsky,M.,Kitsberg,D.,Dvir-

Szternfeld,R.,Green,G.,Dionne,D.,Nguyen,L.,Marshall,J.L.,et al.(2020).Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging.Nat.Neurosci.23,701-706.

[0306] 8.Hardy,J.,and Selkoe,D.J.(2002).The amyloid hypothesis of Alzheimer'sdisease:progress and problems on the road to therapeutics.Science.297,353-356.

[0307] 9.Keren-Shaul,H.,Spinrad,A.,Weiner,A.,Matcovitch-Natan,O.,Dvir-Szternfeld,R.,Ulland,T.K.,David,E.,Baruch,K.,Lara-Astaiso,D.,Toth,B.,et al.(2017).A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease.Cell.169,1276-1290.e17.

[0308] 10.Lau,S.-F.,Cao,H.,Fu,A.K.Y.,and Ip,N.Y.(2020).Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease.Proceedings of the National Academy of Sciences.117,25800-25809.

[0309] 11.Lee,S.-H.,Meilandt,W.J.,Xie,L.,Gandham,V.D.,Ngu,H.,Barck,K.H.,Rezzonico,M.G.,Imperio,J.,Lalehzadeh,G.,Huntley,M.A.,et al.(2021).Trem2 restrains the enhancement of tau accumulation and neurodegeneration byβ-amyloid pathology.Neuron.109,1283-1301.e6.

[0310] 12.Masters,C.L.,Bateman,R.,Blennow,K.,Rowe,C.C.,Sperling,R.A.,and Cummings,J.L.(2015).Alzheimer's disease.Nat Rev Dis Primers.1,15056.

[0311] 13.Mathys,H.,Davila-Velderrain,J.,Peng,Z.,Gao,F.,Mohammadi,S.,Young,J.Z.,Menon,M.,He,L.,Abdurrob,F.,Jiang,X.,et al.(2019).Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease.Nature.570,332-337.

[0312] 14.McInnes,L.,Healy,J.,Saul,N.,and Groβberger,L.(2018).UMAP:Uniform Manifold Approximation and Projection.Journal of Open Source Software.3,861.

[0313] 15.Ståhl,P.L.,Salmén,F.,Vickovic,S.,Lundmark,A.,Navarro,J.F.,Magnusson,J.,Giacomello,S.,Asp,M.,Westholm,J.O.,Huss,M.,et al.(2016).Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics.Science.353,78-82.

[0314] 16.Stuart,T.,and Satija,R.(2019).Integrative single-cell analysis.Nat.Rev.Genet.20,257-272.

[0315] 17.Traag,V.A.,Waltman,L.,and van Eck,N.J.(2019).From Louvain to Leiden:guaranteeing well-connected communities.Sci.Rep.9,5233.

[0316] 18.Wang,X.,Allen,W.E.,Wright,M.A.,Sylwestrak,E.L.,Samusik,N.,Vesuna,S.,Evans,K.,Liu,C.,Ramakrishnan,C.,Liu,J.,et al.(2018).Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states.Science.361.

[0317] 19.Zhou,Y.,Song,W.M.,Andhey,P.S.,Swain,A.,Levy,T.,Miller,K.R.,Poliani,P.L.,Cominelli,M.,Grover,S.,Gilfillan,S.,et al.(2020).Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent

cellular responses in Alzheimer's disease.Nat.Med.26,131-142.

[0318] 通过引用并入

[0319] 本申请涉及各种已发布的专利、已发布的专利申请、科学期刊文章和其他出版物，所有这些均通过引用并入本文。本文阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。本发明的其他特征、目的和优点将从从详细描述、附图、实施例和权利要求中显而易见。

[0320] 等效物和范围

[0321] 诸如“一”、“一个”和“该”的冠词可以表示一个或多个，除非另有相反指示或从上下文中明显看出。如果一个、多于一个或所有组成员存在于、使用于或以其它方式相关于给定产品或过程，则组中一个或多个成员之间包括“或”的实施方案或描述被视为满足，除非另有相反指示或从上下文中明显看出。本发明包括这样的实施方案，其中该组中恰好有一个成员存在于、使用于或以其他方式相关于给定的产品或过程。本发明包括这样的实施方案，其中多于一个或所有组成员存在于、使用于或以其他方式相关于给定的产品或过程。

[0322] 此外，本公开涵盖所有变体、组合和排列，其中一个或多个所列权利要求的一个或多个限制、元素、条款和描述性术语被引入到另一个权利要求中。例如，可以修改从属于另一权利要求的任何权利要求，以包括在从属于同一基础权利要求的任何其他权利要求中发现的一个或多个限制。在元素以列表形式例如以马库什组格式呈现的情况下，还公开了元素的每个亚组，并且可以从组中去除任何元素。应当理解，一般而言，在发明或发明的方面被称为包含特定元素和/或特征的情况下，本公开的某些实施方案或本公开的方面由此类元素和/或特征组成或基本上由此类元素和/或特征组成。为了简洁起见，那些实施方案在本文中没有具体阐述。还应注意的是，术语“包含”和“含有”旨在是开放式的并且允许包括额外的元素或步骤。在给出范围的情况下，端点也包括在内。此外，除非另有说明或从上下文和本领域普通技术人员的理解中可以明显看出，表示为范围的值可以采用本发明不同实施方案中所述范围内的任何特定值或亚范围，至范围下限单位的十分之一，除非上下文另有明确规定。

[0323] 本申请涉及各种已发布的专利、已公开的专利申请、期刊文章和其他出版物，所有这些均通过引用并入本文。如果任何并入的参考文献与本说明书之间存在冲突，则以本说明书为准。此外，落入现有技术范围内的本发明的任何特定实施方案可被明确排除在任何一项或多项实施方案之外。因为此类实施方案被认为是本领域的普通技术人员已知的，所以即使排除没有在本文中明确阐述，它们也可以被排除。本发明的任何特定实施方案可以出于任何原因从任何实施方案中排除，无论是否与现有技术的存在相关。

[0324] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所述的具体实施方案的许多等效物。本文所述的实施方案的范围并不旨在限于以上描述，而是如所附实施方案中所阐述的那样。本领域的普通技术人员将理解，在不脱离如所附权利要求所限定的本发明的精神或范围的情况下，可以对本描述进行各种改变和修改。

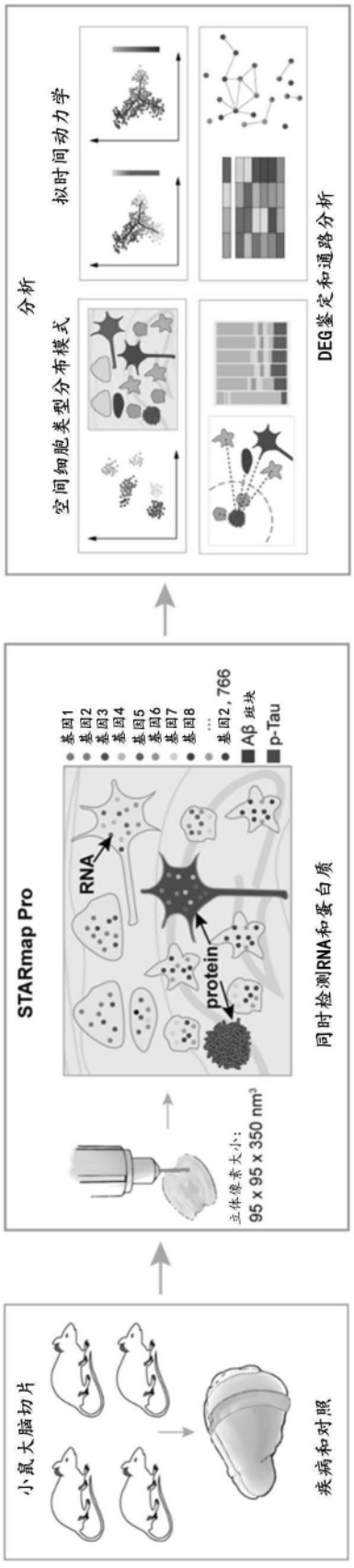

小鼠大脑切片
疾病和对照
STARmap Pro
RNA
protein
立体像素大小:
95 x 95 x 350 nm³
基因1
基因2
基因3
基因4
基因5
基因6
基因7
基因8
...
基因2,766
Aβ 斑块
p-Tau
同时检测RNA和蛋白质
分析
空间细胞类型分布模式
拟时间动力学
DEG鉴定和通路分析

图1A

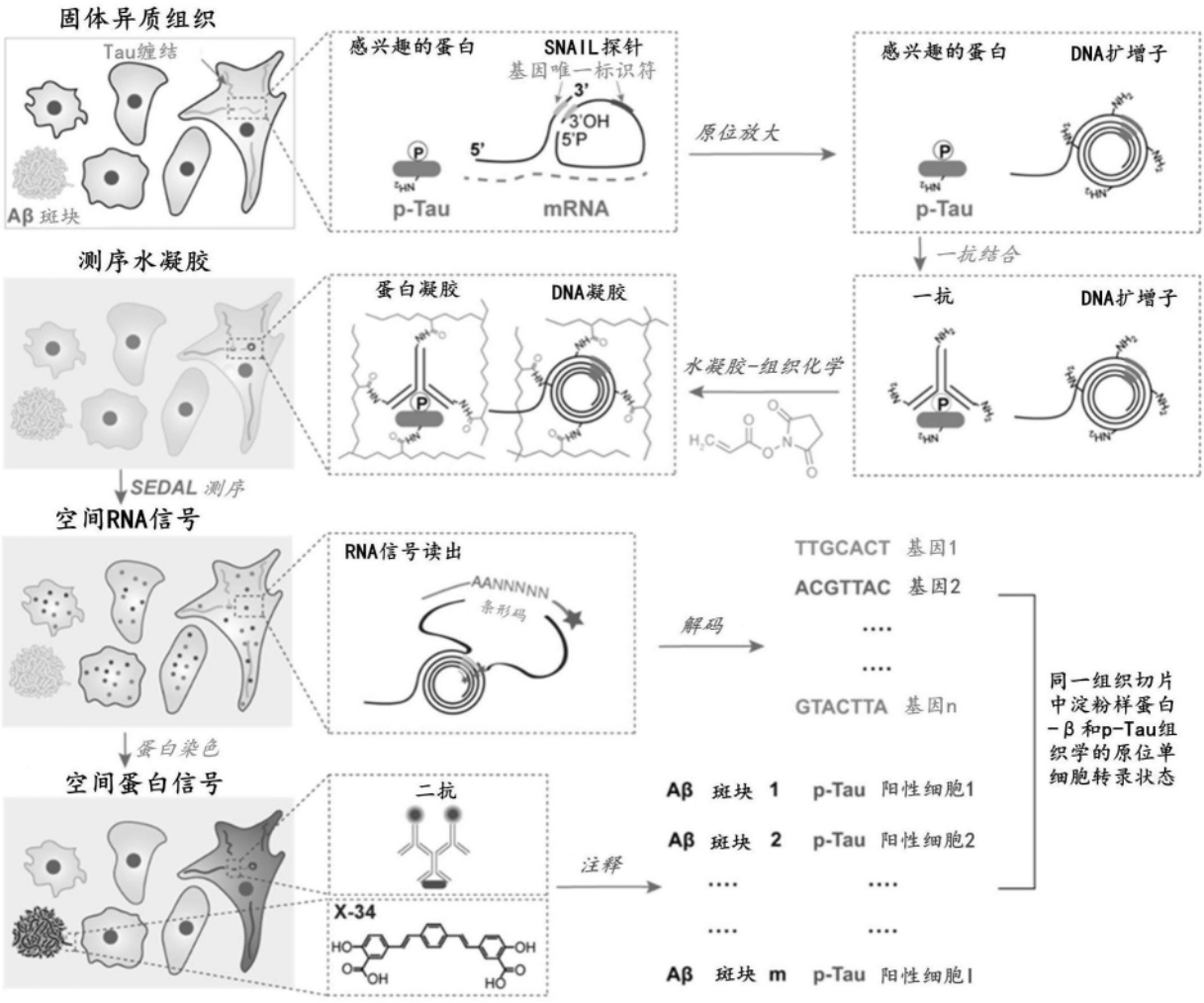

固体异质组织
Tau缠结
Aβ 斑块
测序水凝胶
SEDAL 测序
空间RNA信号
蛋白染色
空间蛋白信号
感兴趣的蛋白
SNAIL探针
基因唯一标识符
3'
3'OH
5'P
5'
p-Tau
mRNA
原位放大
感兴趣的蛋白
DNA扩增子
p-Tau
一抗结合
一抗
DNA扩增子
蛋白凝胶
DNA凝胶
水凝胶-组织化学
RNA信号读出
AANNNNN
条形码
解码
TTGCACT 基因1
ACGTTAC 基因2
....
....
GTACTTA 基因n
同一组织切片中淀粉样蛋白-β和p-Tau组织学的原位单细胞转录状态
二抗
X-34
注释
Aβ 斑块 1 p-Tau 阳性细胞1
Aβ 斑块 2 p-Tau 阳性细胞2
....
....
Aβ 斑块 m p-Tau 阳性细胞I

图1B

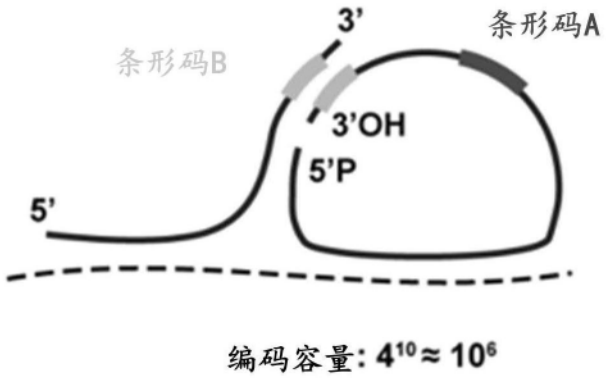

3'
条形码A
条形码B
3'OH
5'P
5'
编码容量: $4^{10} \approx 10^6$

图1C

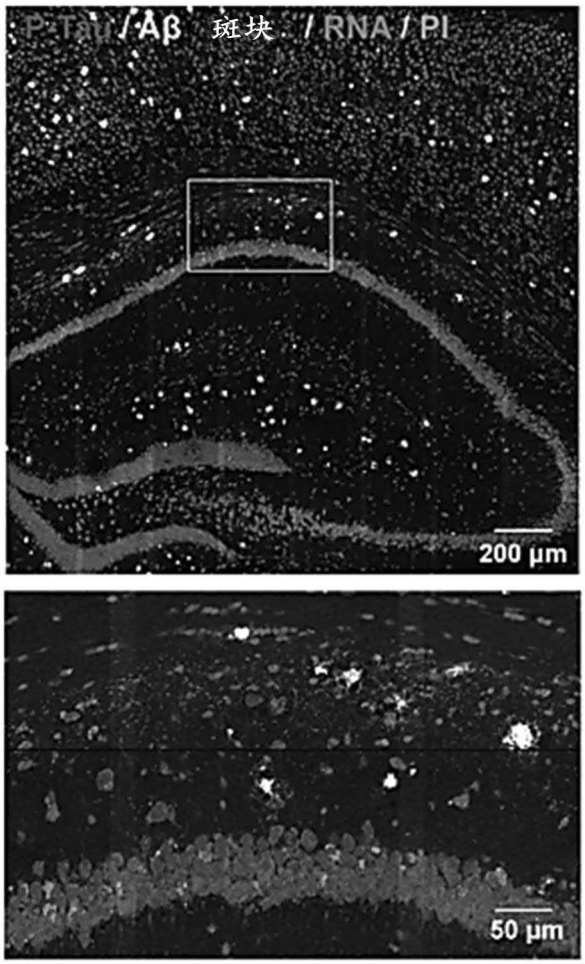

P-Tau / Aβ 斑块 / RNA / PI
200 μm
50 μm

图1D

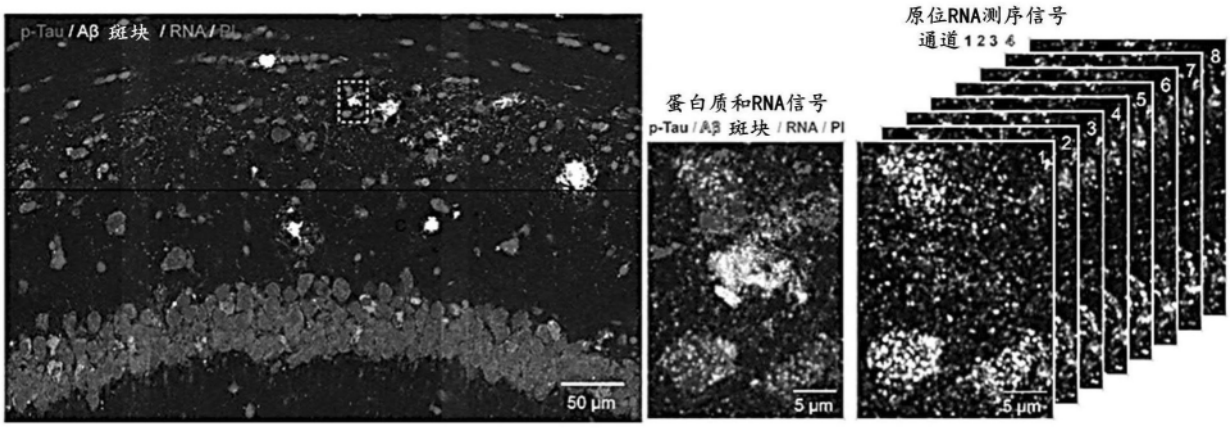

p-Tau / Aβ 斑块 / RNA / PI
50 μm
蛋白质和RNA信号
p-Tau / Aβ 斑块 / RNA / PI
5 μm
原位RNA测序信号
通道 1 2 3 4
1
2
3
4
5
6
7
8
5 μm

图1E

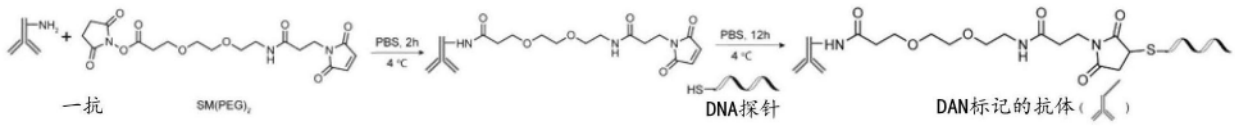


图1F

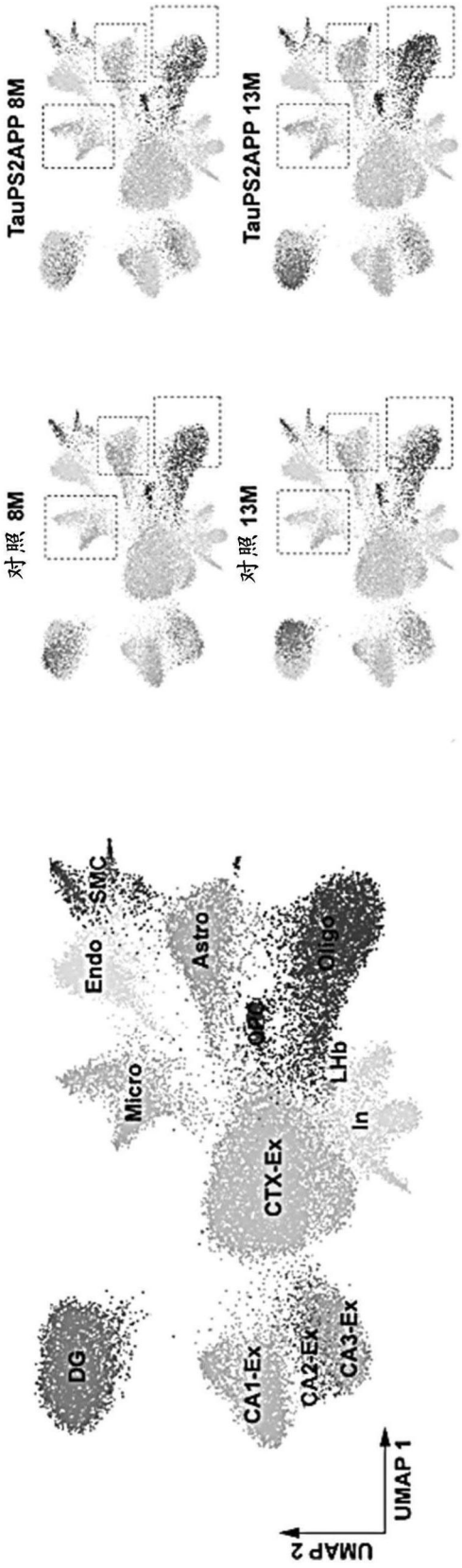

TauPS2APP 8M
TauPS2APP 13M
对照 8M
对照 13M
Endo
SMC
Astro
Oligo
OPC
LHb
Micro
In
CTX-Ex
DG
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
UMAP 1
UMAP 2

图2A

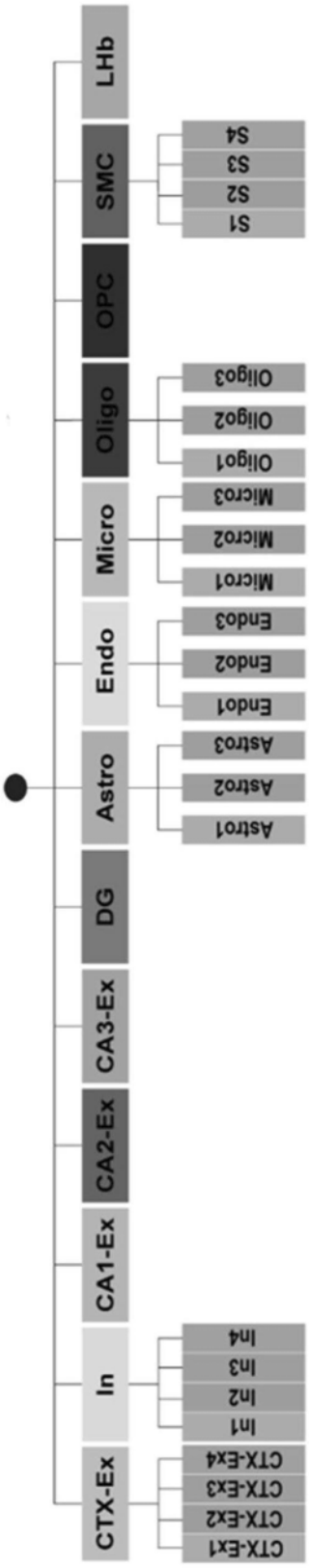

LHb
SMC
S4
S3
S2
S1
OPC
Oligo
Oligo3
Oligo2
Oligo1
Micro
Micro3
Micro2
Micro1
Endo
Endo3
Endo2
Endo1
Astro
Astro3
Astro2
Astro1
DG
CA3-Ex
CA2-Ex
CA1-Ex
In
In4
In3
In2
In1
CTX-Ex
CTX-Ex4
CTX-Ex3
CTX-Ex2
CTX-Ex1

图2B

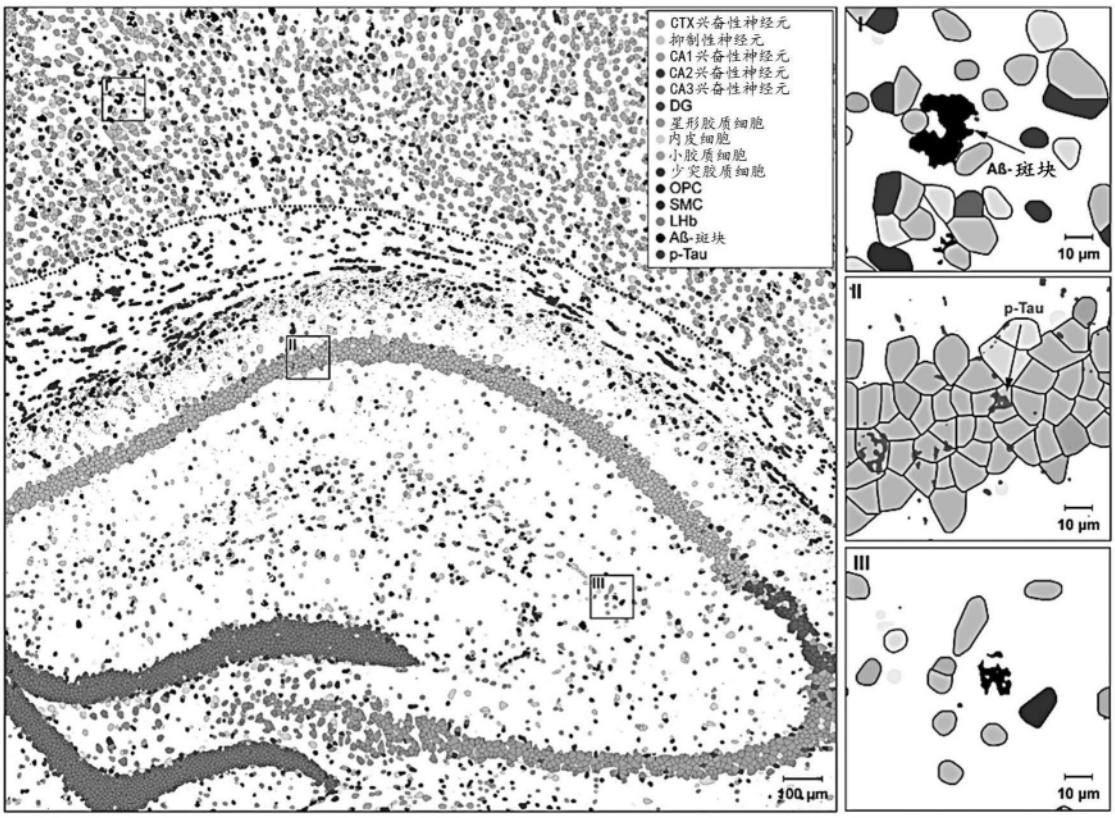

CTX兴奋性神经元
抑制性神经元
CA1兴奋性神经元
CA2兴奋性神经元
CA3兴奋性神经元
DG
星形胶质细胞
内皮细胞
小胶质细胞
少突胶质细胞
OPC
SMC
LHb
Aß-斑块
p-Tau
100 μm
I
Aß-斑块
10 μm
II
p-Tau
10 μm
III
10 μm

图2C

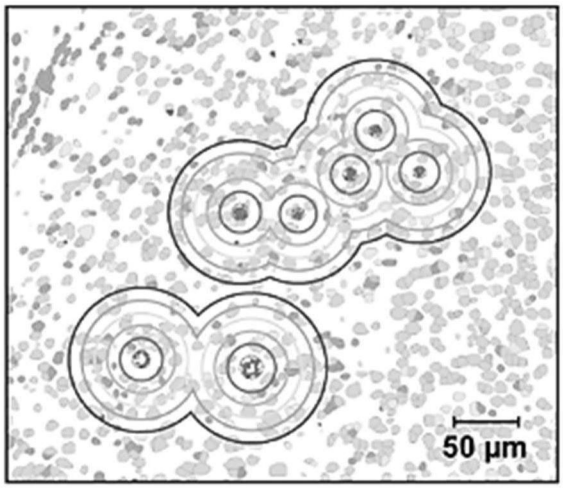

50 μm

图2D

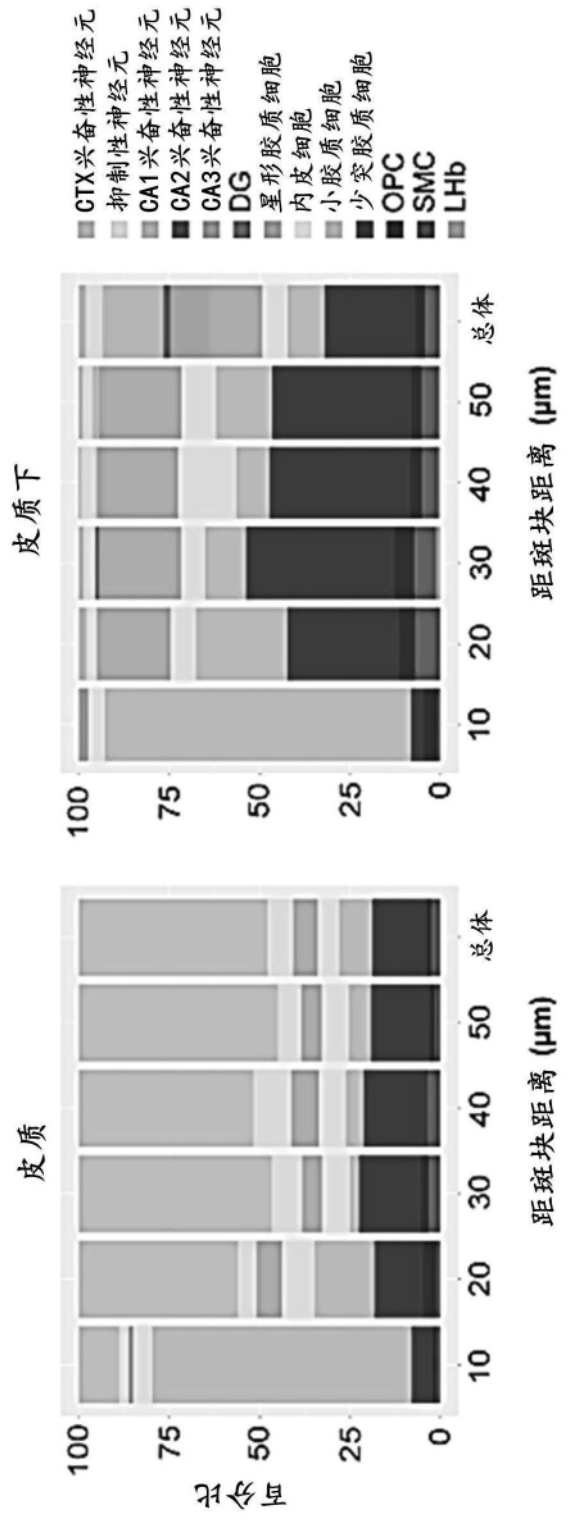

CTX兴奋性神经元
抑制性神经元
CA1兴奋性神经元
CA2兴奋性神经元
CA3兴奋性神经元
DG
星形胶质细胞
内皮细胞
小胶质细胞
少突胶质细胞
OPC
SMC
LHb
皮质下
皮质
百分比
100
75
50
25
0
10
20
30
40
50
总体
距斑块距离 (μm)

图2E

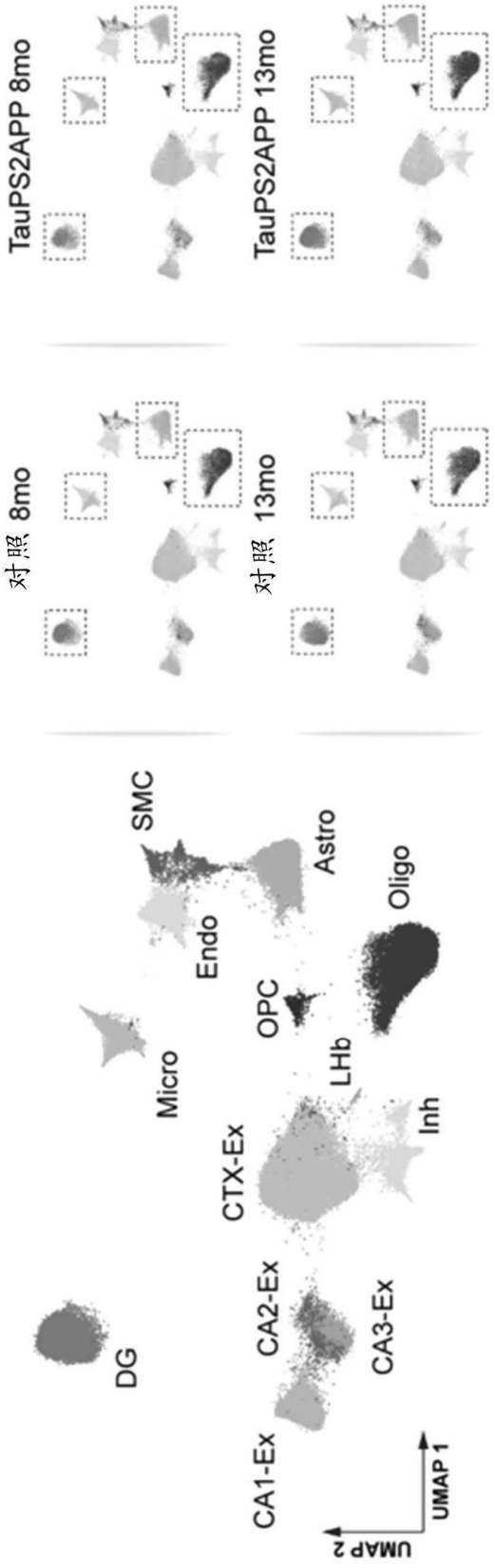

TauPS2APP 8mo
TauPS2APP 13mo
对照 8mo
对照 13mo
SMC
Astro
Endo
Oligo
OPC
Micro
LHb
Inh
CTX-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG
CA1-Ex
UMAP 1
UMAP 2

图2F

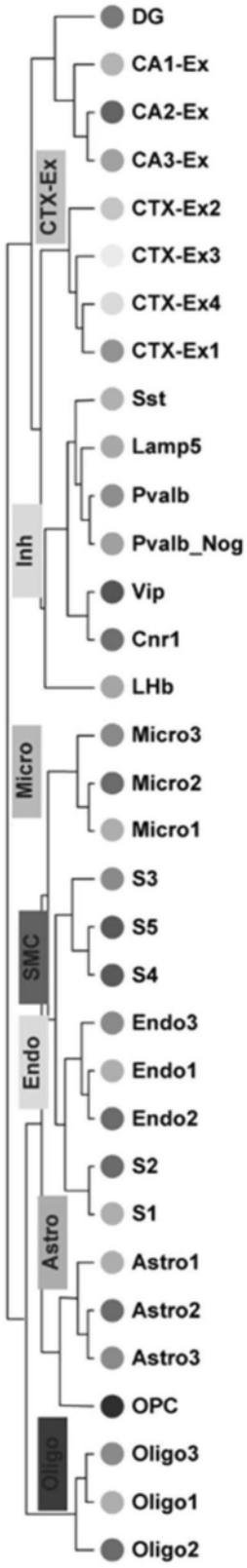

DG
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
CTX-Ex
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
CTX-Ex1
Sst
Lamp5
Pvalb
Pvalb_Nog
Inh
Vip
Cnr1
LHb
Micro3
Micro2
Micro1
Micro
S3
S5
S4
SMC
Endo3
Endo1
Endo2
Endo
S2
S1
Astro1
Astro2
Astro3
Astro
OPC
Oligo3
Oligo1
Oligo2
Oligo

图2G

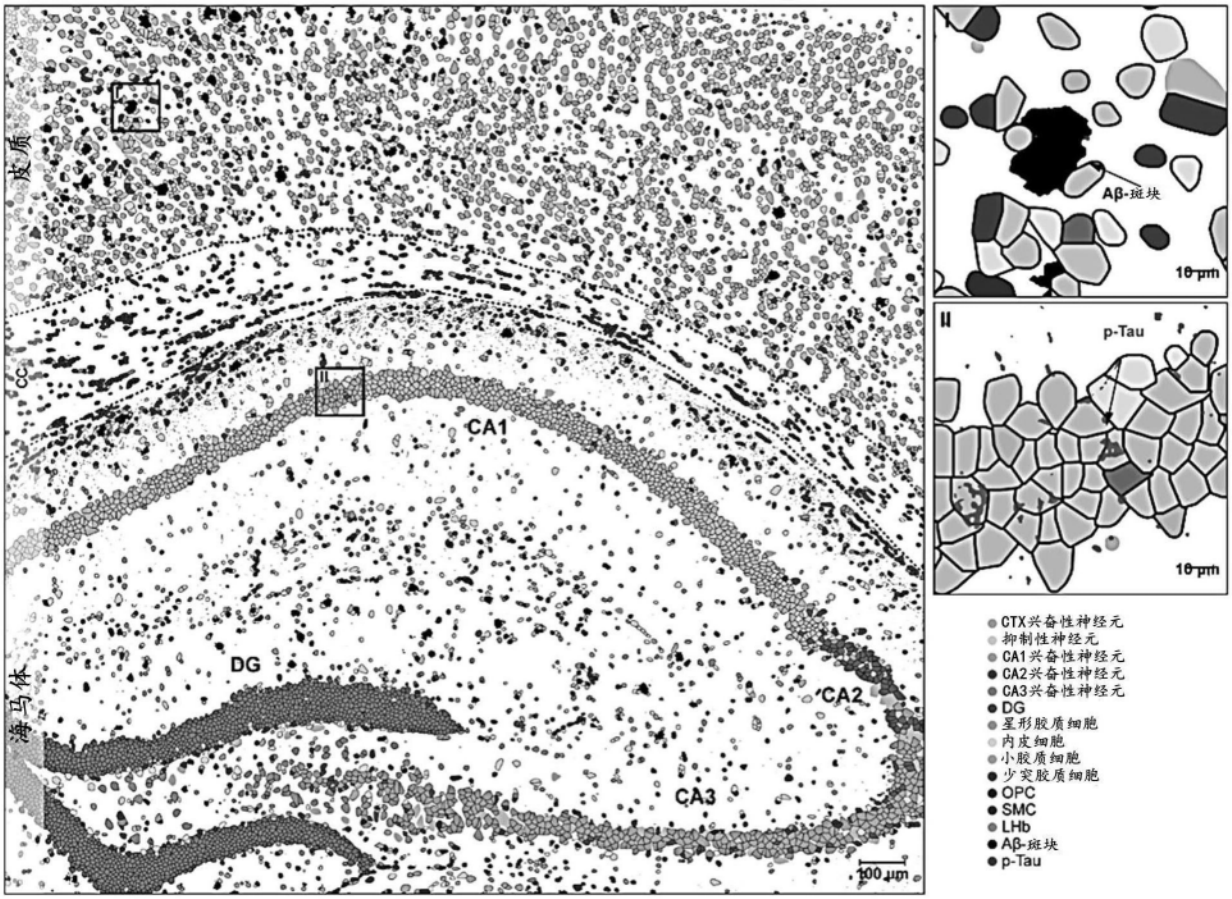

皮质
cc
海马体
CA1
DG
CA2
CA3
100 μm
I
Aβ-斑块
10 μm
II
p-Tau
10 μm
CTX兴奋性神经元
抑制性神经元
CA1兴奋性神经元
CA2兴奋性神经元
CA3兴奋性神经元
DG
星形胶质细胞
内皮细胞
小胶质细胞
少突胶质细胞
OPC
SMC
LHb
Aβ-斑块
p-Tau

图2H

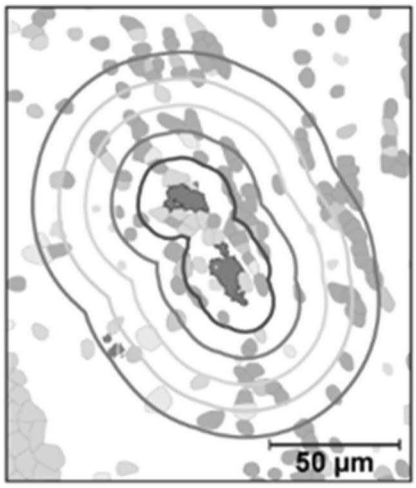

50 μm

图2I

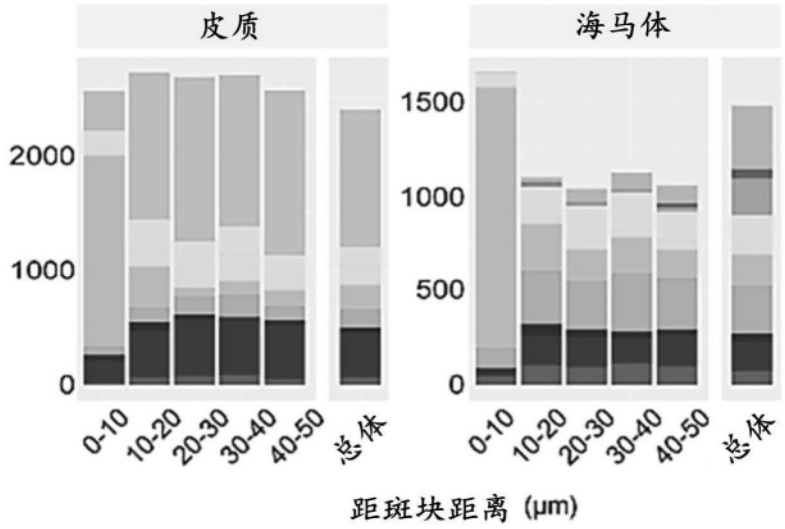

皮质
海马体
2000
1000
0
1500
1000
500
0
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
总体
距斑块距离 (μm)

图2J

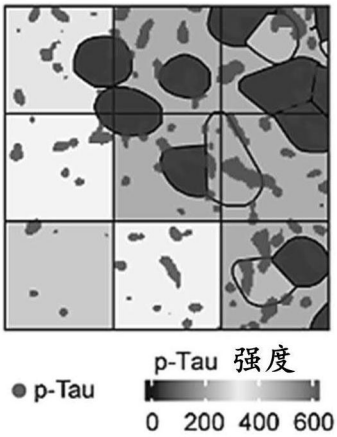

p-Tau
p-Tau 强度
0 200 400 600

图2K

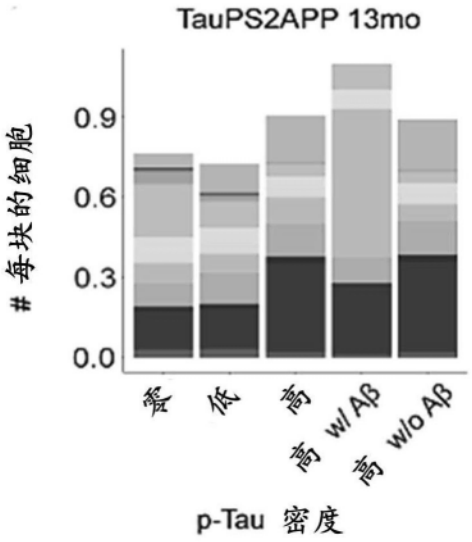

TauPS2APP 13mo
每块的细胞
0.9
0.6
0.3
0.0
低
高
高 w/ Aβ
高 w/o Aβ
p-Tau 密度

图2L

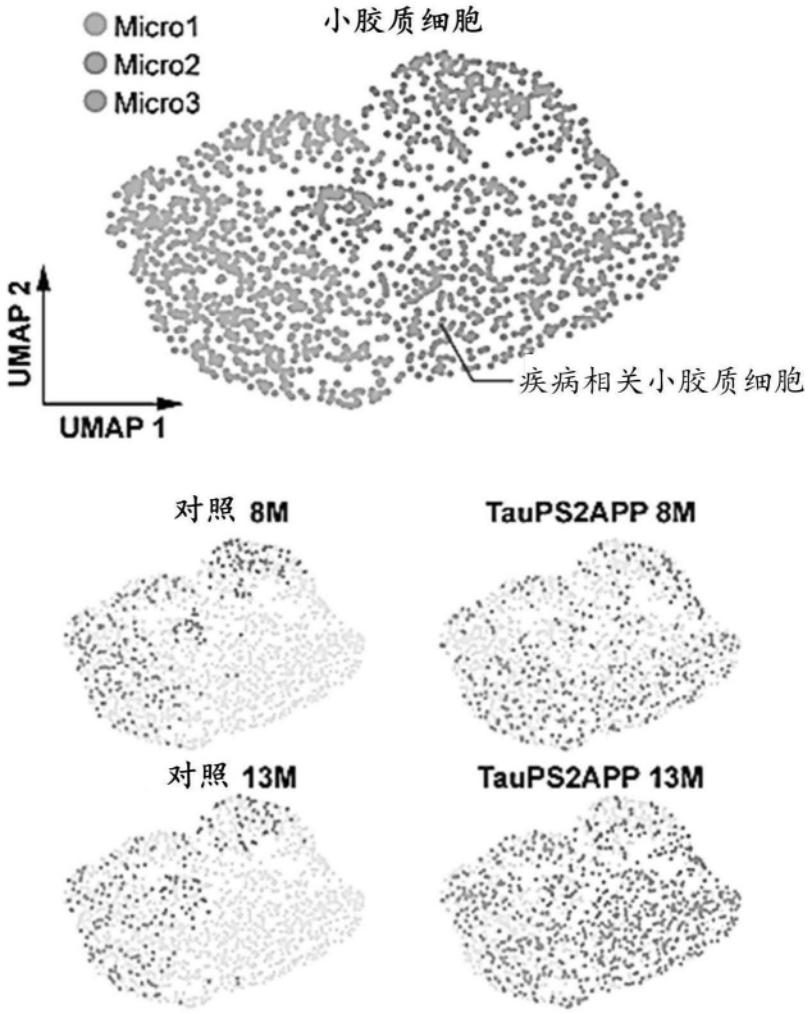

Micro1
Micro2
Micro3
小胶质细胞
UMAP 2
UMAP 1
疾病相关小胶质细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M

图3A

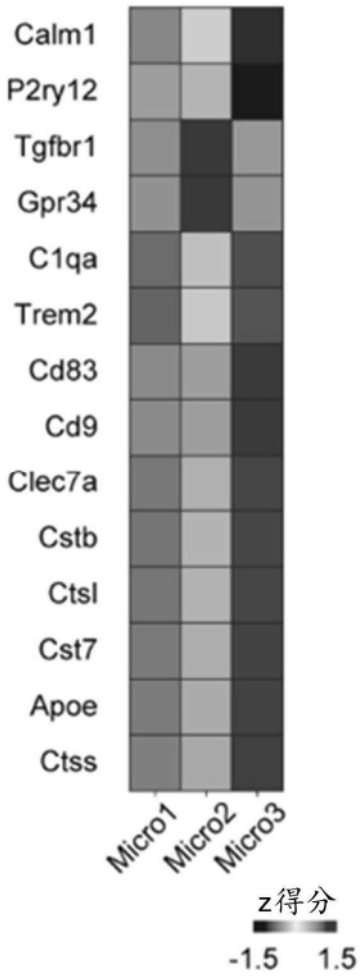

Calm1
P2ry12
Tgfbr1
Gpr34
C1qa
Trem2
Cd83
Cd9
Clec7a
Cstb
Ctsl
Cst7
Apoe
Ctss
Micro1
Micro2
Micro3
z得分
-1.5
1.5

图3B

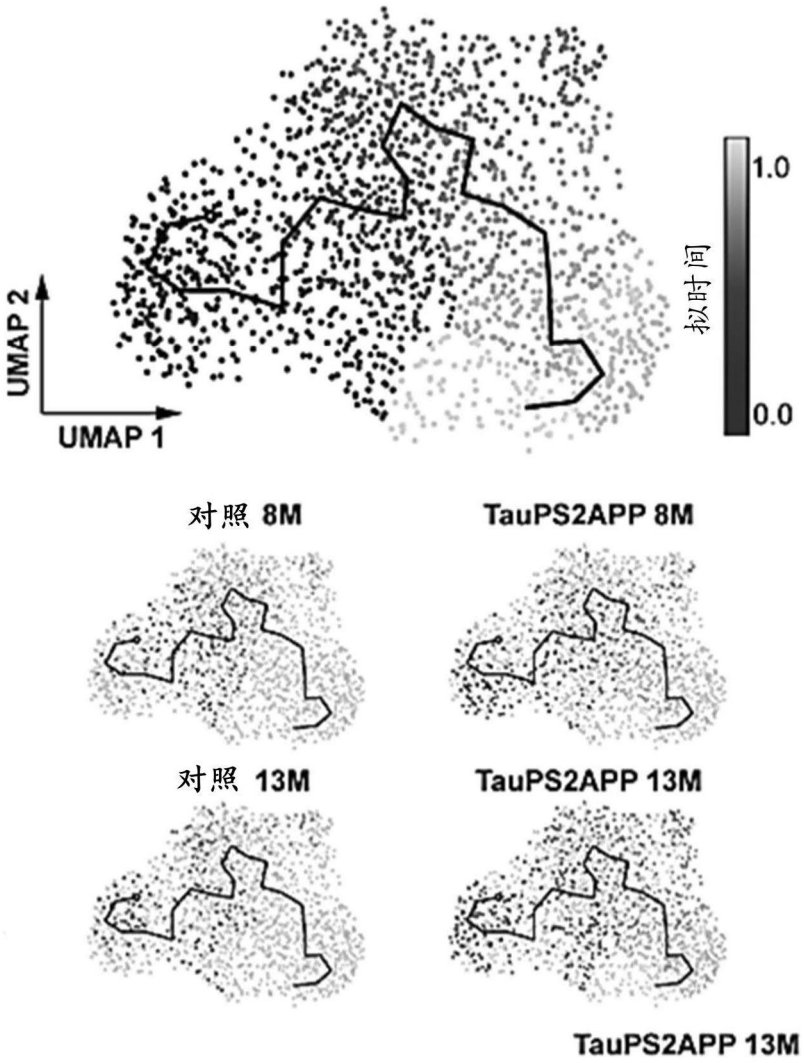

UMAP 2
UMAP 1
拟时间
1.0
0.0
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
TauPS2APP 13M

图3C

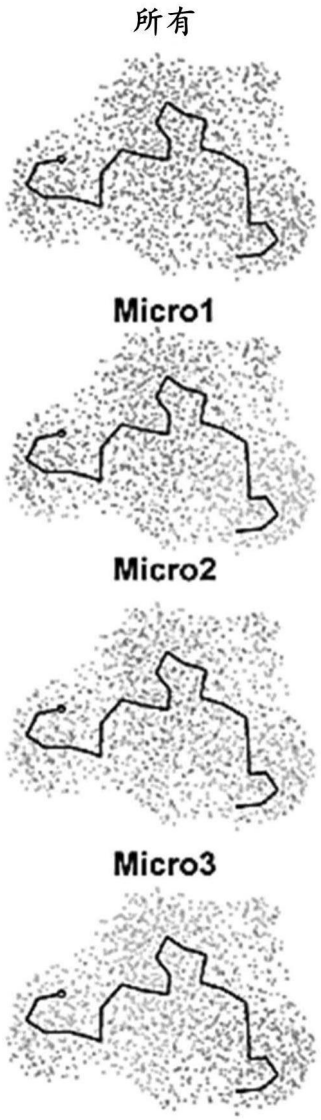


图3D

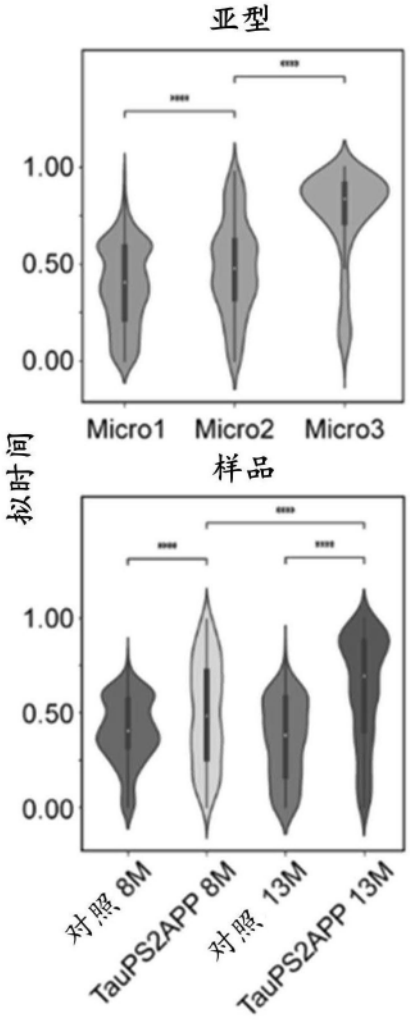

亚型
****
****
1.00
0.50
0.00
Micro1
Micro2
Micro3
拟时间
样品
****
****
1.00
0.50
0.00
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M

图3E

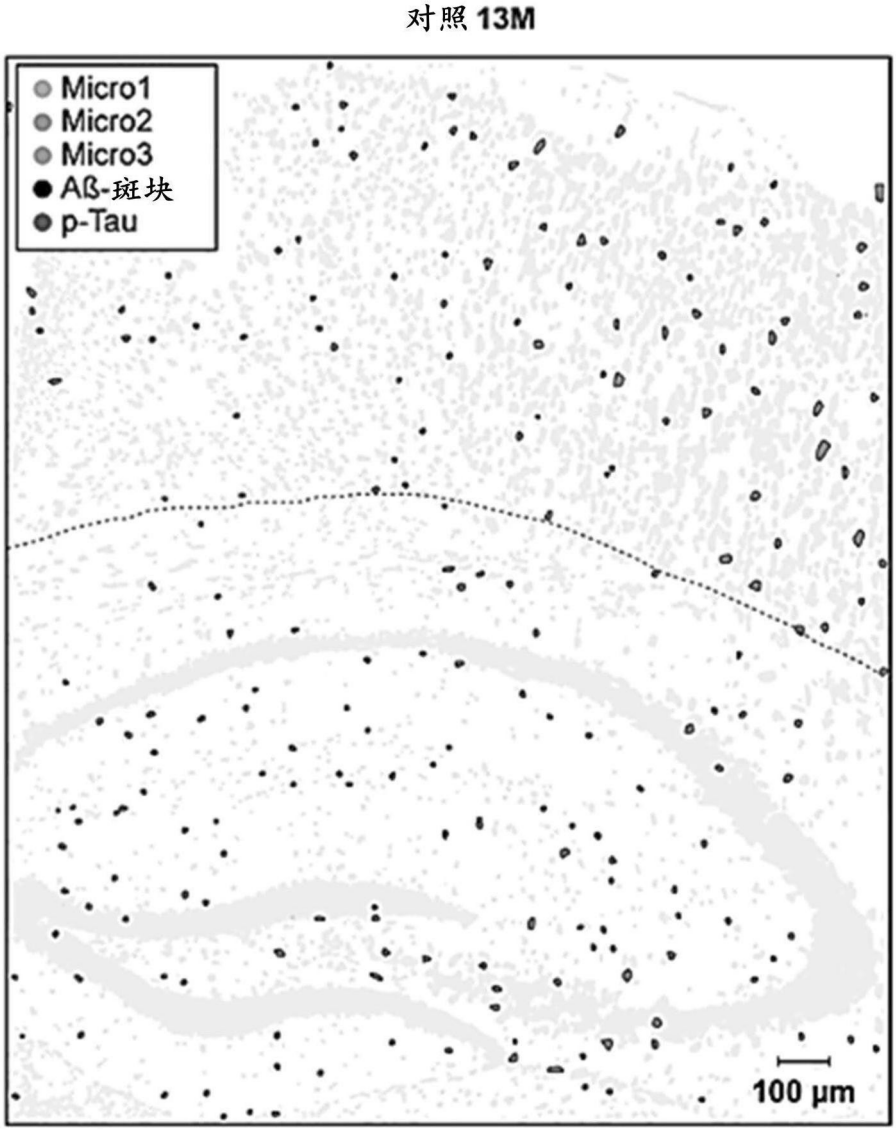


图3F

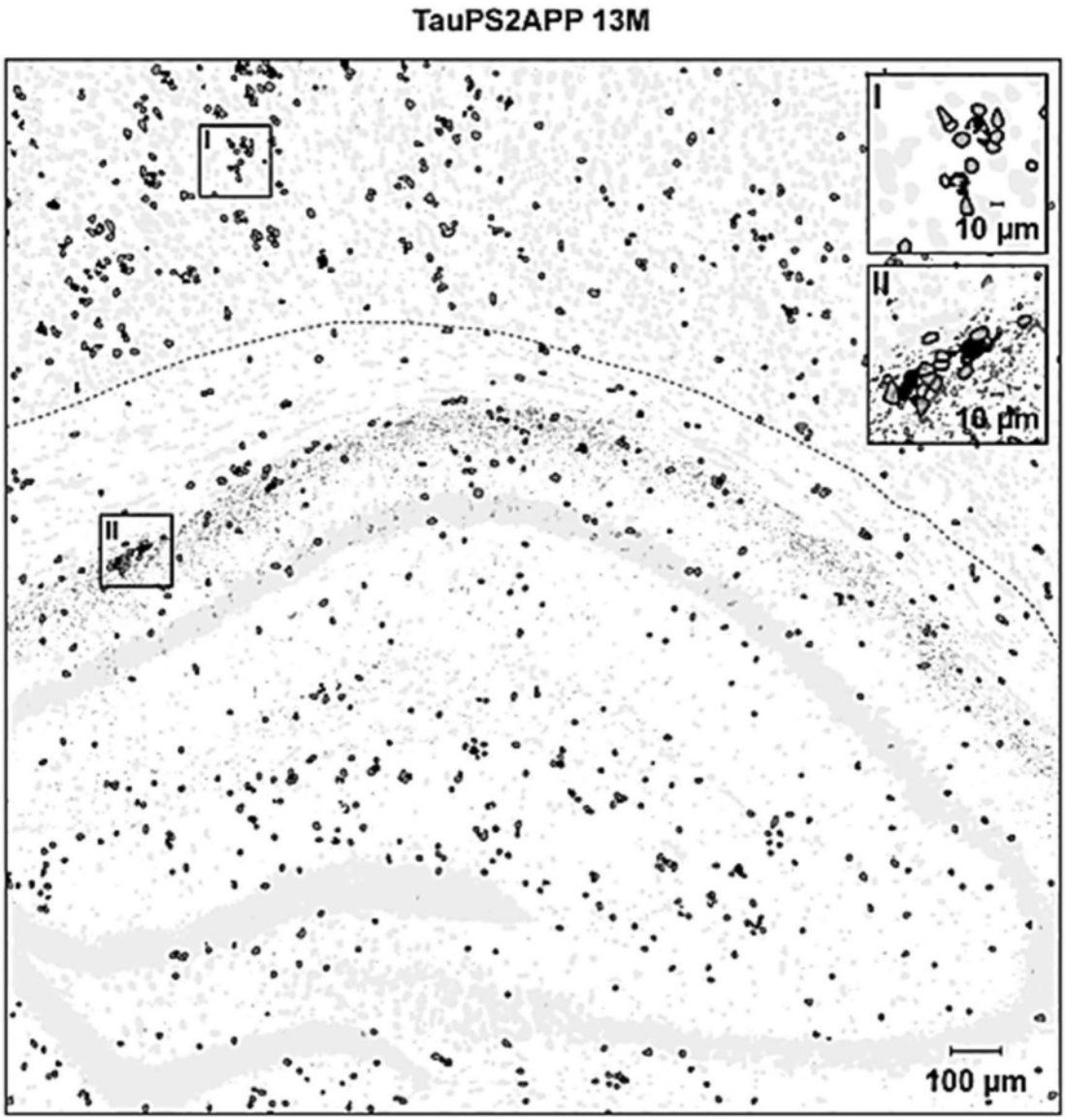


图3G

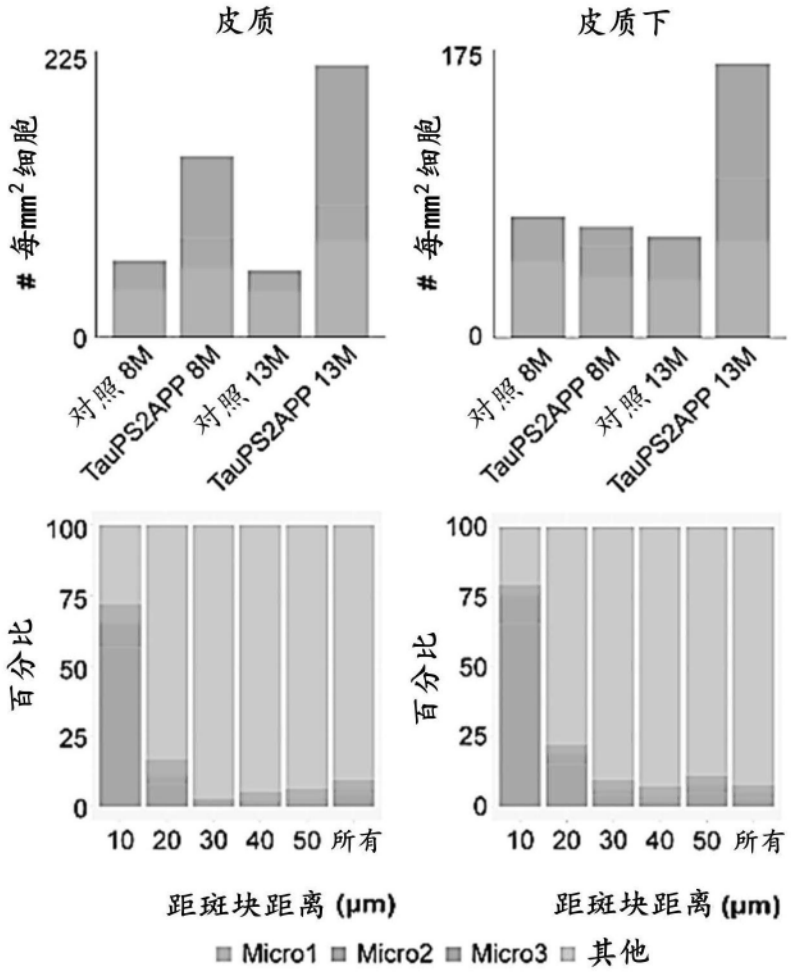

皮质
皮质下
225
175
0
每mm² 细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
100
75
50
25
0
百分比
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
Micro1 Micro2 Micro3 其他

图3H

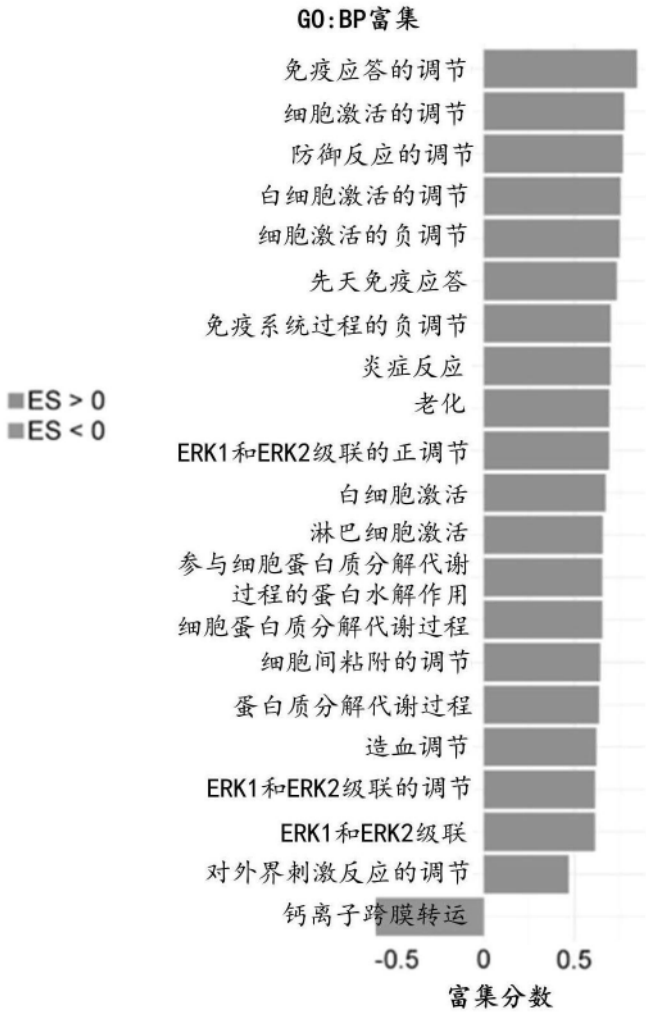

GO:BP富集
免疫应答的调节
细胞激活的调节
防御反应的调节
白细胞激活的调节
细胞激活的负调节
先天免疫应答
免疫系统过程的负调节
炎症反应
老化
ERK1和ERK2级联的正调节
白细胞激活
淋巴细胞激活
参与细胞蛋白质分解代谢过程的蛋白水解作用
细胞蛋白质分解代谢过程
细胞间粘附的调节
蛋白质分解代谢过程
造血调节
ERK1和ERK2级联的调节
ERK1和ERK2级联
对外界刺激反应的调节
钙离子跨膜转运
ES > 0
ES < 0
-0.5
0
0.5
富集分数

图3I

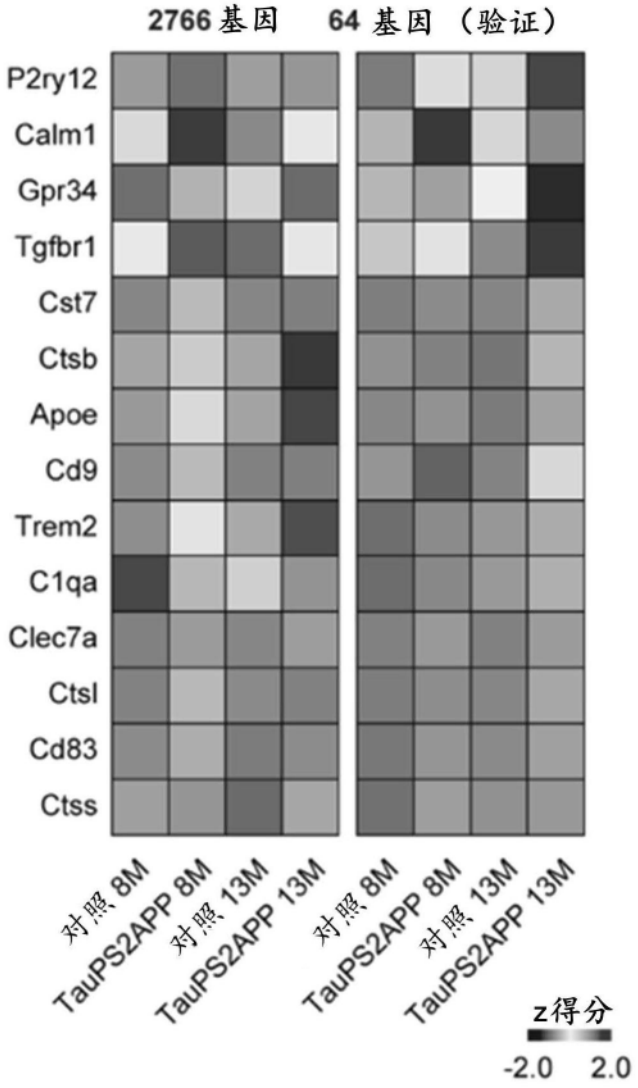

2766 基因
64 基因（验证）
P2ry12
Calm1
Gpr34
Tgfbr1
Cst7
Ctsb
Apoe
Cd9
Trem2
C1qa
Clec7a
Ctsl
Cd83
Ctss
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
z得分
-2.0
2.0

图3J

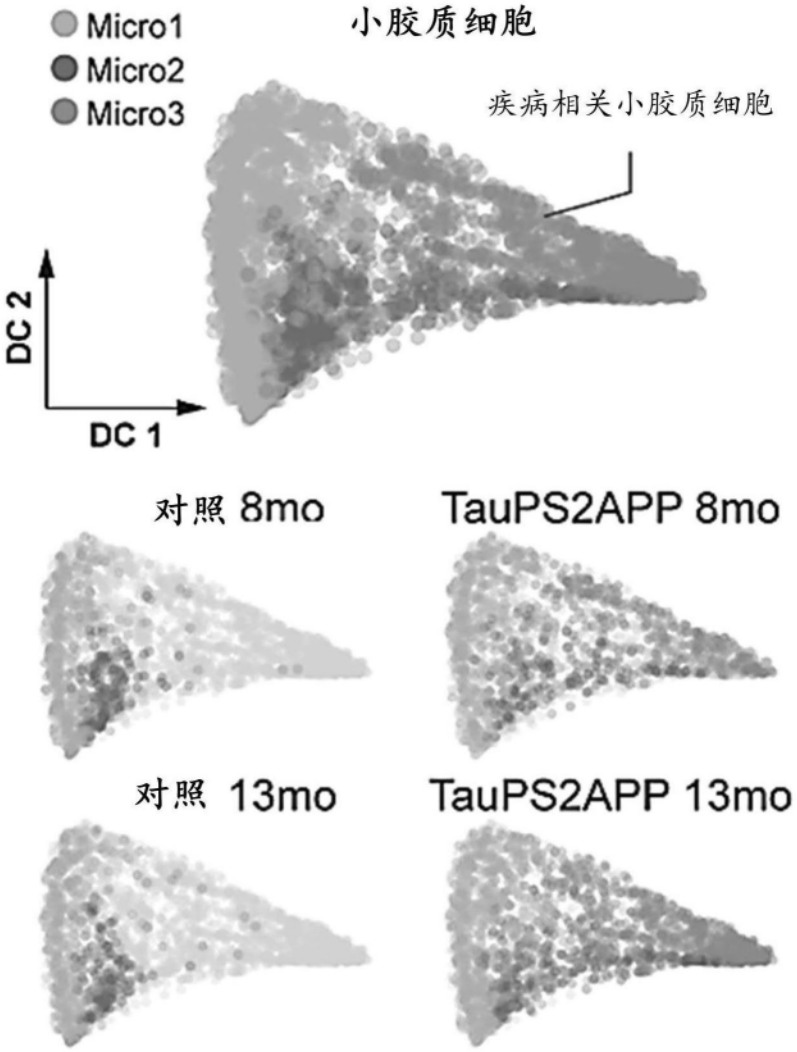

Micro1
Micro2
Micro3
小胶质细胞
疾病相关小胶质细胞
DC 2
DC 1
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图3K

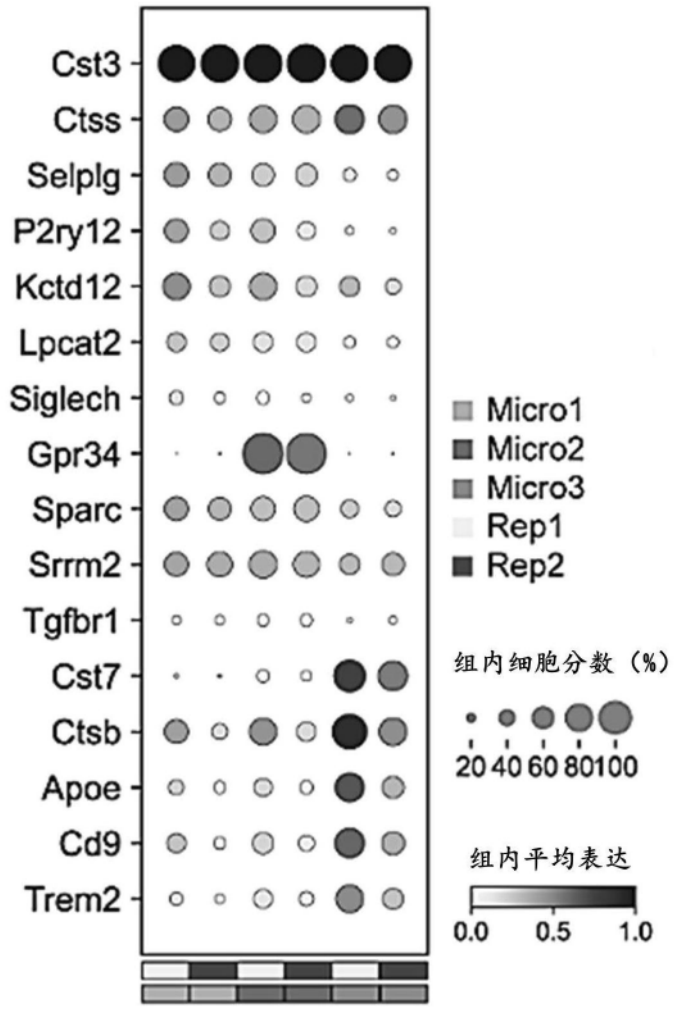

Cst3
Ctss
Selplg
P2ry12
Kctd12
Lpcat2
Siglech
Gpr34
Sparc
Srrm2
Tgfbr1
Cst7
Ctsb
Apoe
Cd9
Trem2
Micro1
Micro2
Micro3
Rep1
Rep2
组内细胞分数（%）
20 40 60 80 100
组内平均表达
0.0 0.5 1.0

图3L

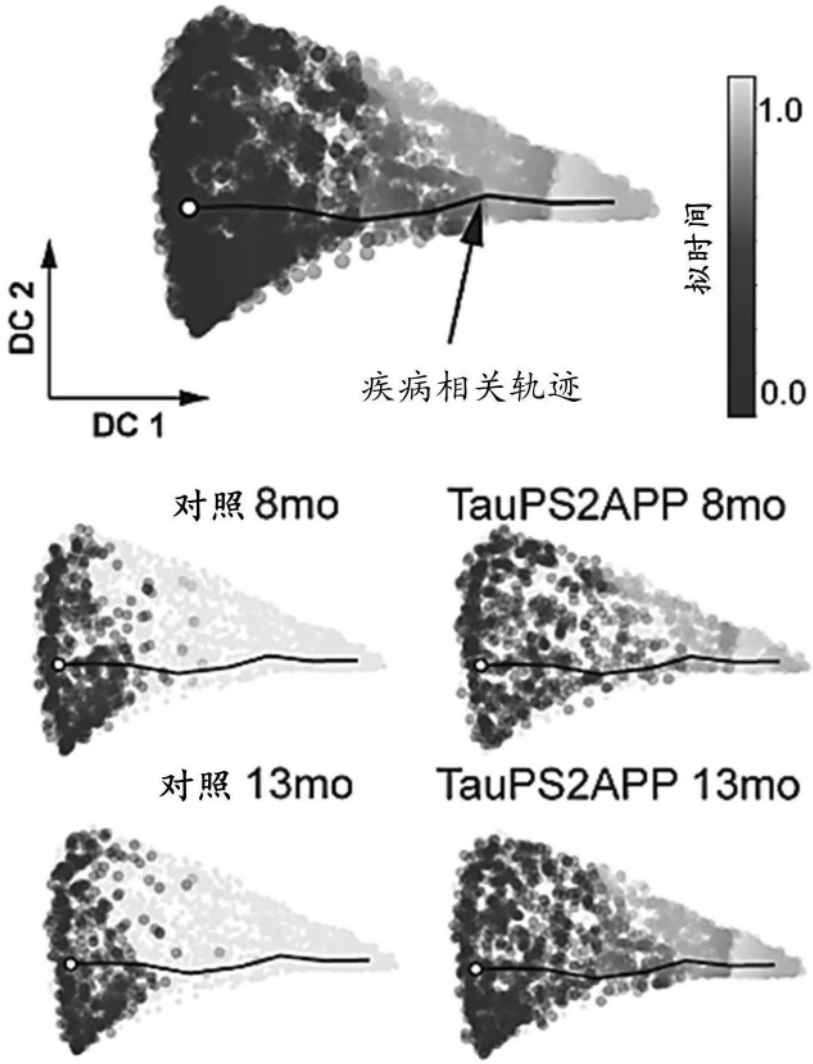

DC 2
DC 1
疾病相关轨迹
拟时间
1.0
0.0
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图3M



图3N

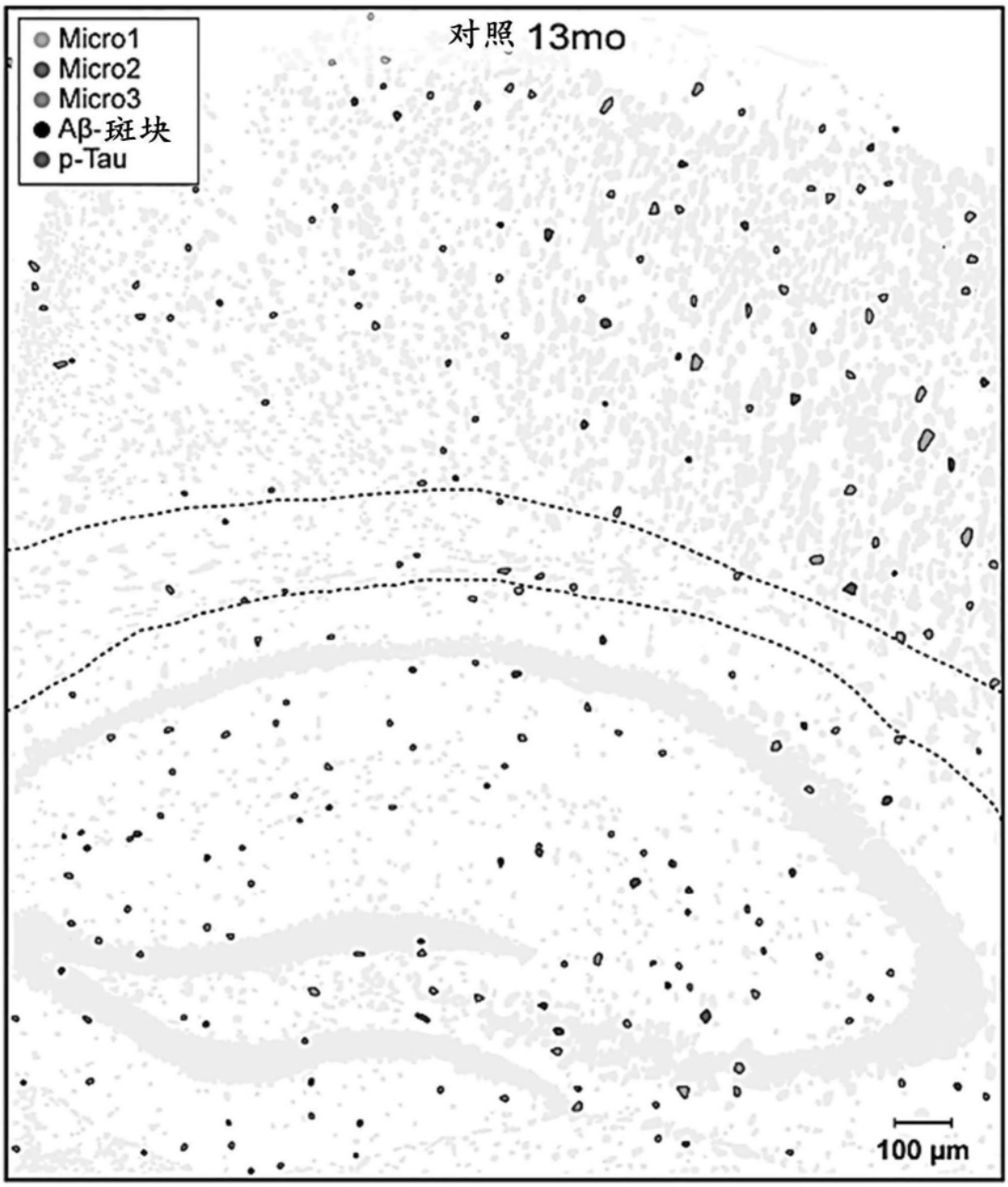


图30

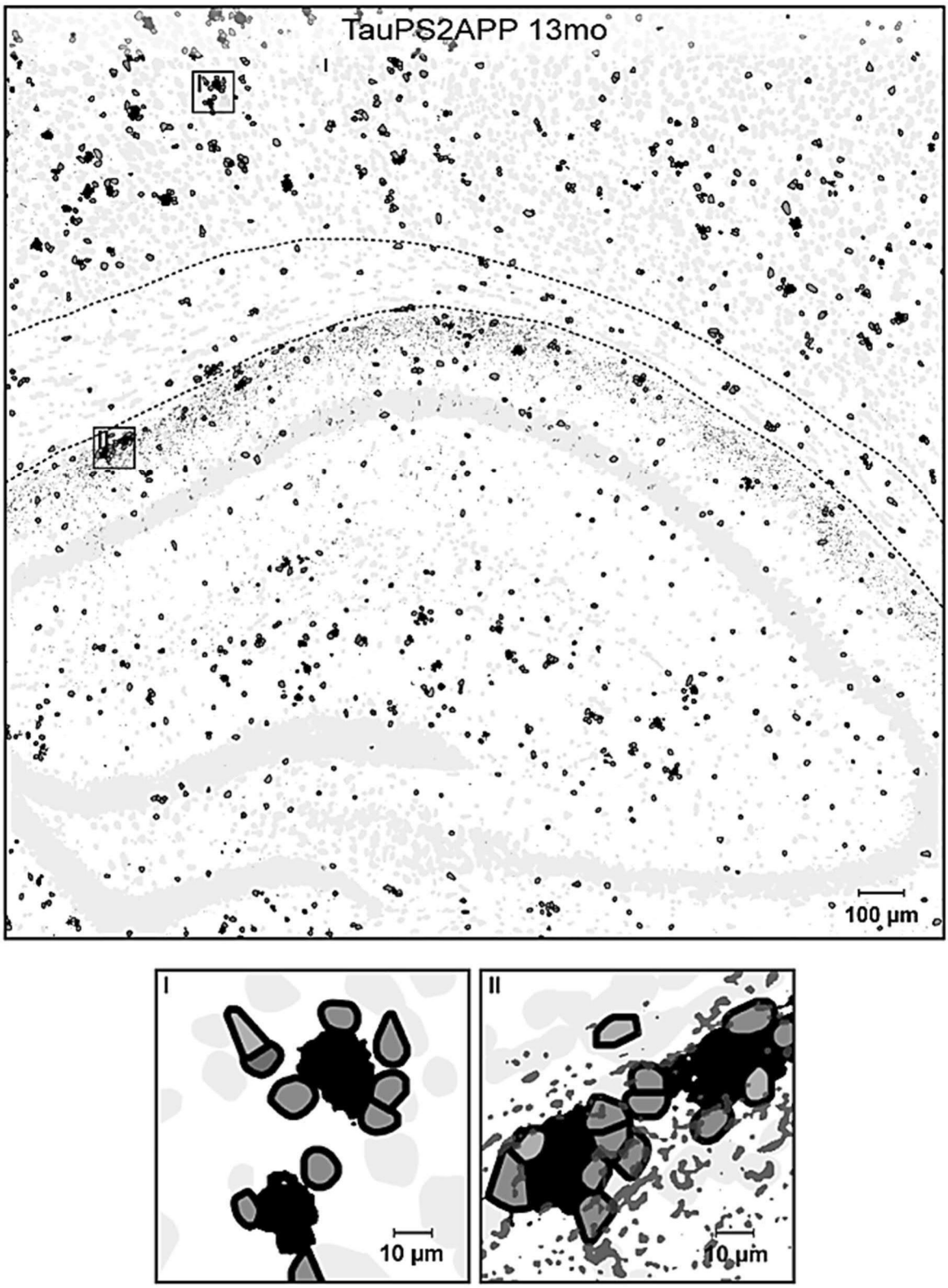


图3P

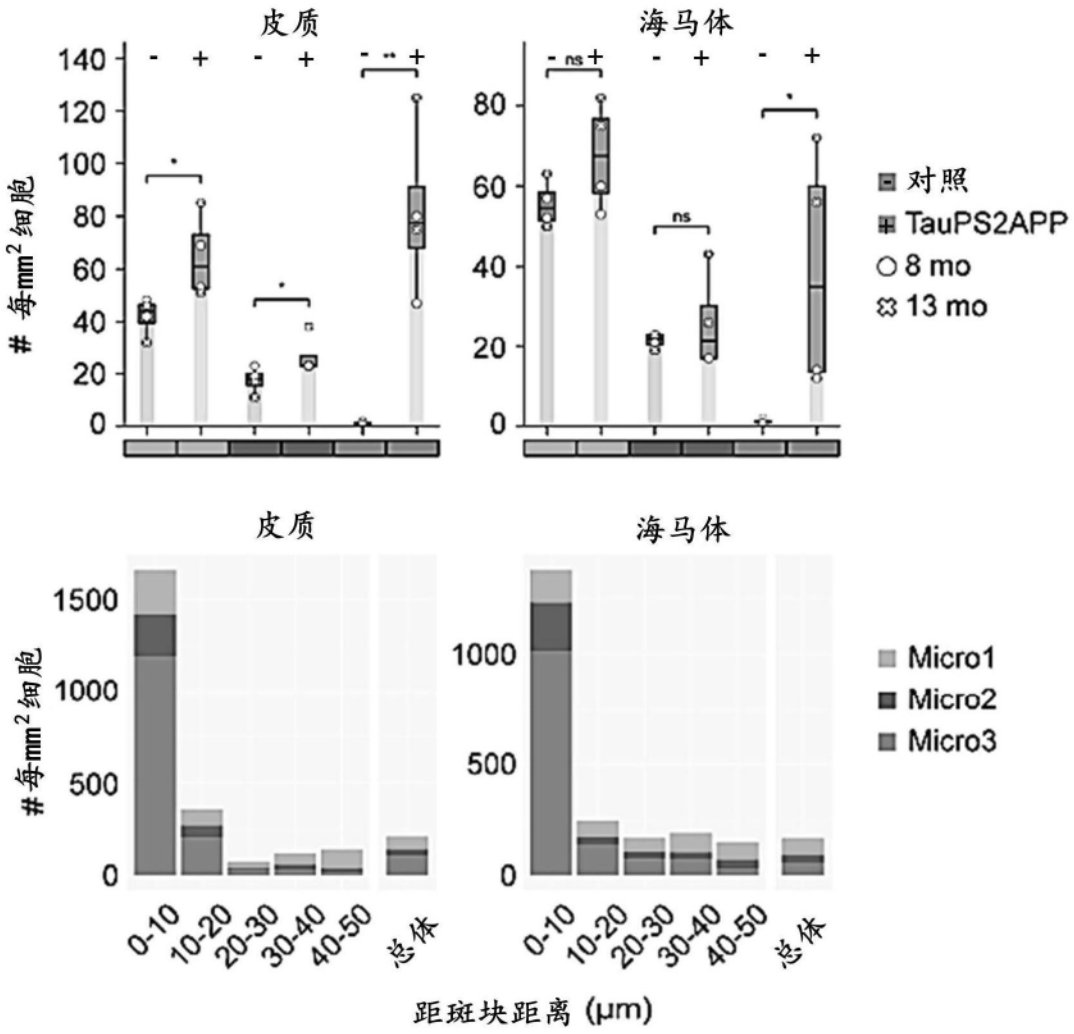

皮质
海马体
每mm² 细胞
对照
TauPS2APP
8 mo
13 mo
Micro1
Micro2
Micro3
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
总体
距斑块距离 (μm)

图3Q

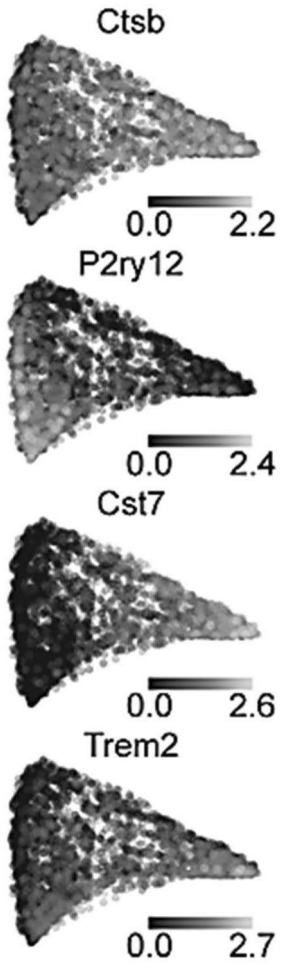


图3R

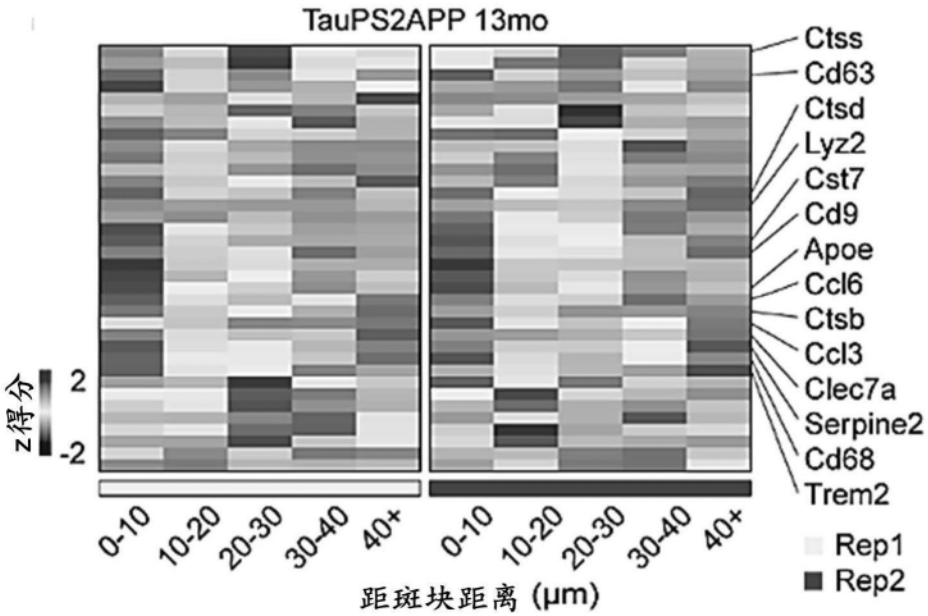

TauPS2APP 13mo
Ctss
Cd63
Ctsd
Lyz2
Cst7
Cd9
Apoe
Ccl6
Ctsb
Ccl3
Clec7a
Serpine2
Cd68
Trem2
z得分
2
-2
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
距斑块距离 (μm)
Rep1
Rep2

图3S

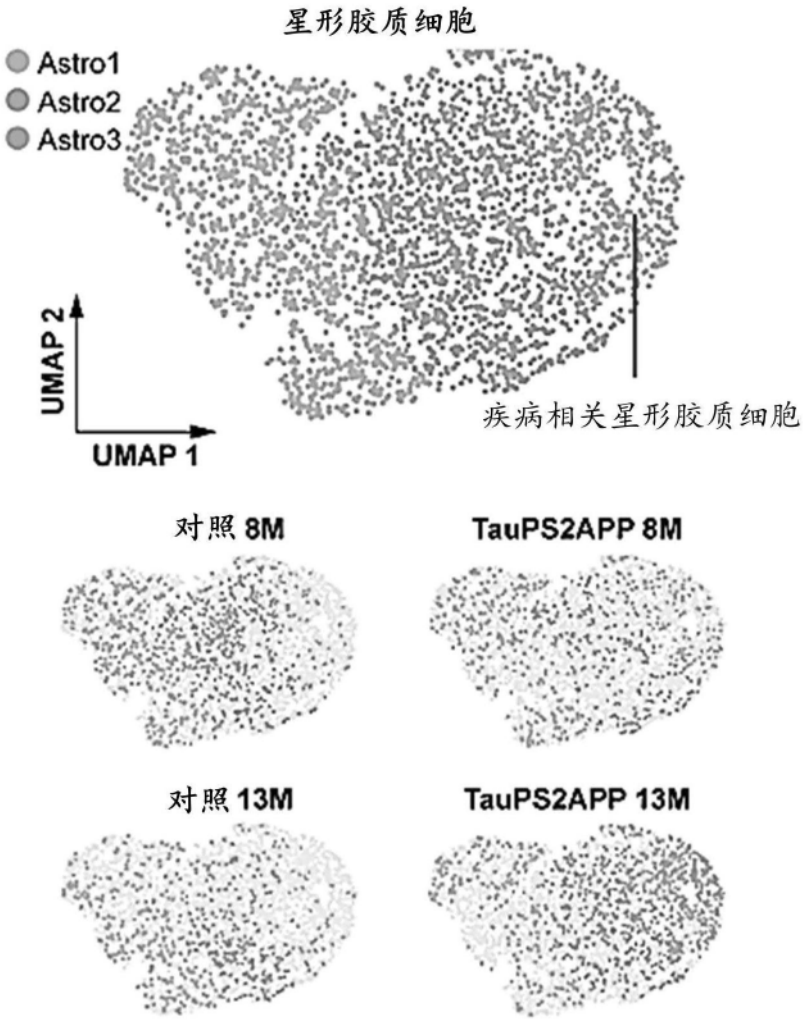

星形胶质细胞
Astro1
Astro2
Astro3
UMAP 2
UMAP 1
疾病相关星形胶质细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M

图4A

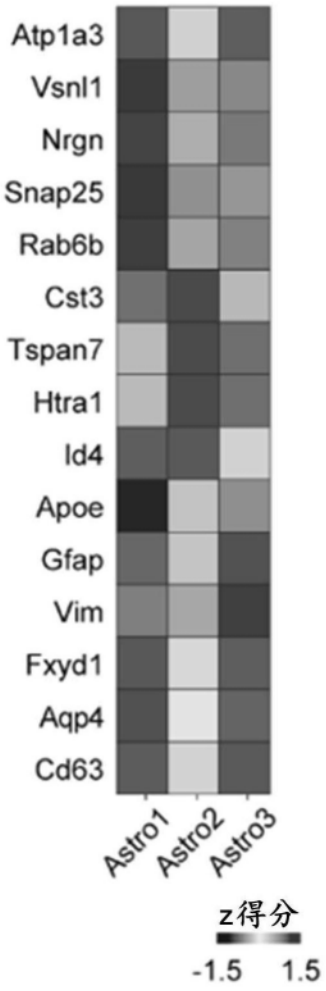

Atp1a3
Vsnl1
Nrgn
Snap25
Rab6b
Cst3
Tspan7
Htra1
Id4
Apoe
Gfap
Vim
Fxyd1
Aqp4
Cd63
Astro1
Astro2
Astro3
z得分
-1.5
1.5

图4B

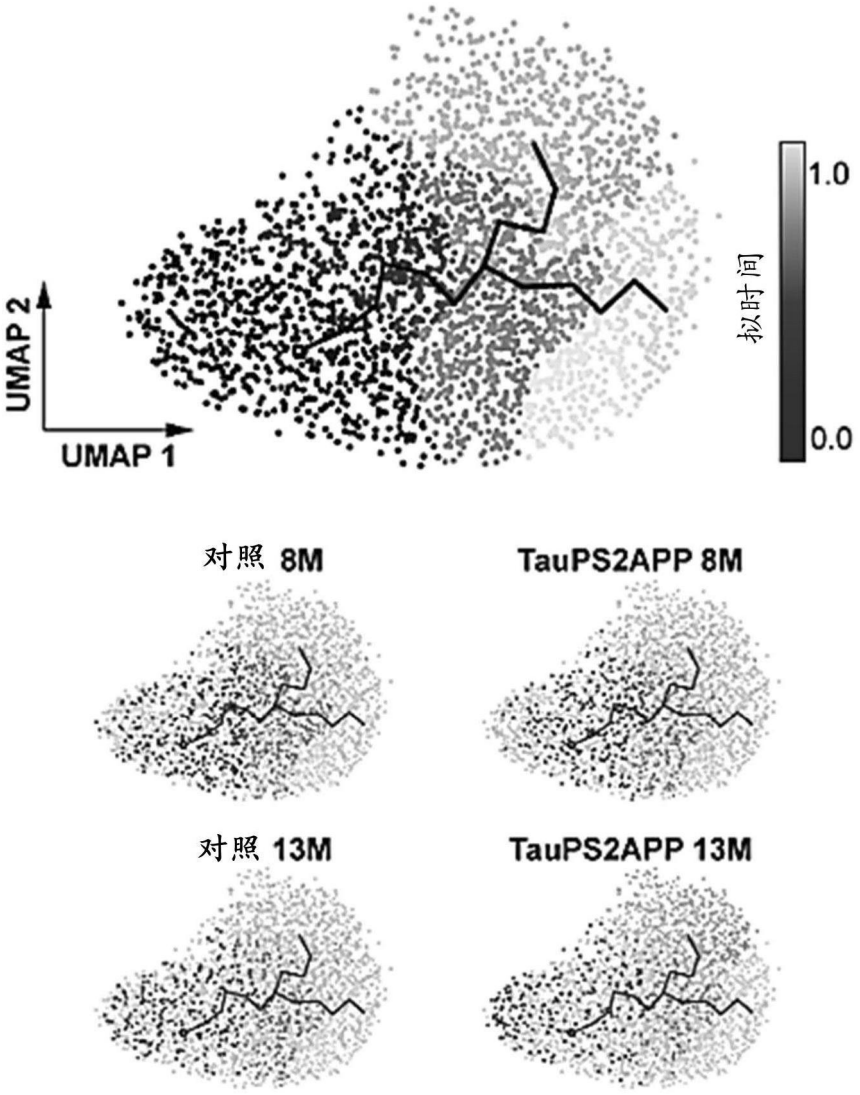


图4C

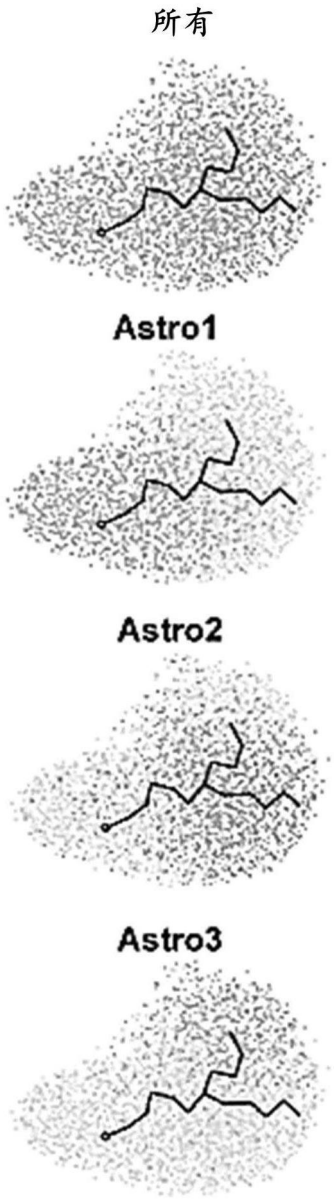


图4D

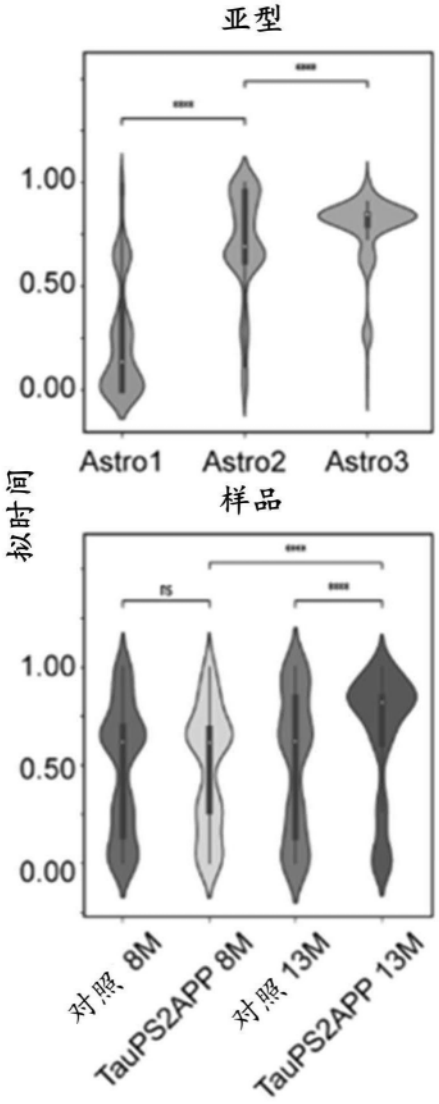

亚型
****
****
1.00
0.50
0.00
Astro1
Astro2
Astro3
样品
拟时间
****
ns
****
1.00
0.50
0.00
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M

图4E

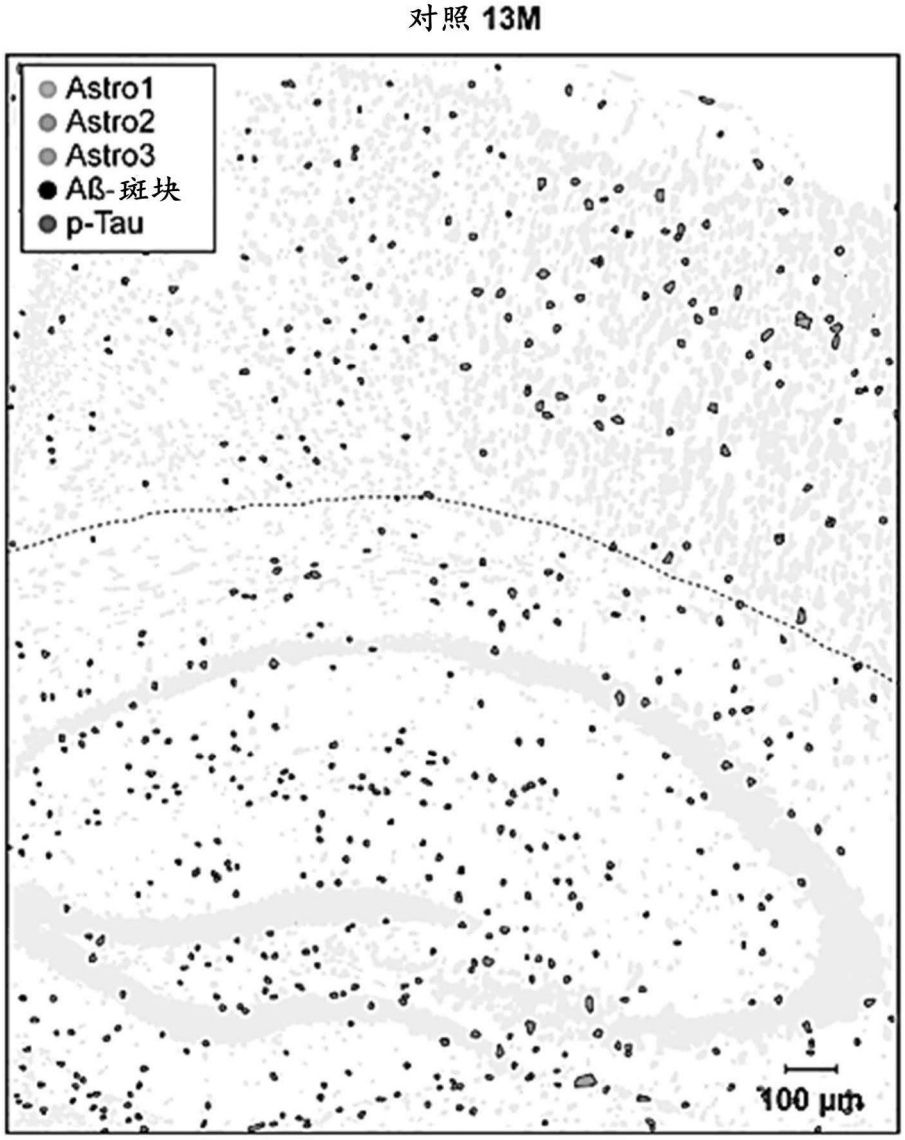


图4F

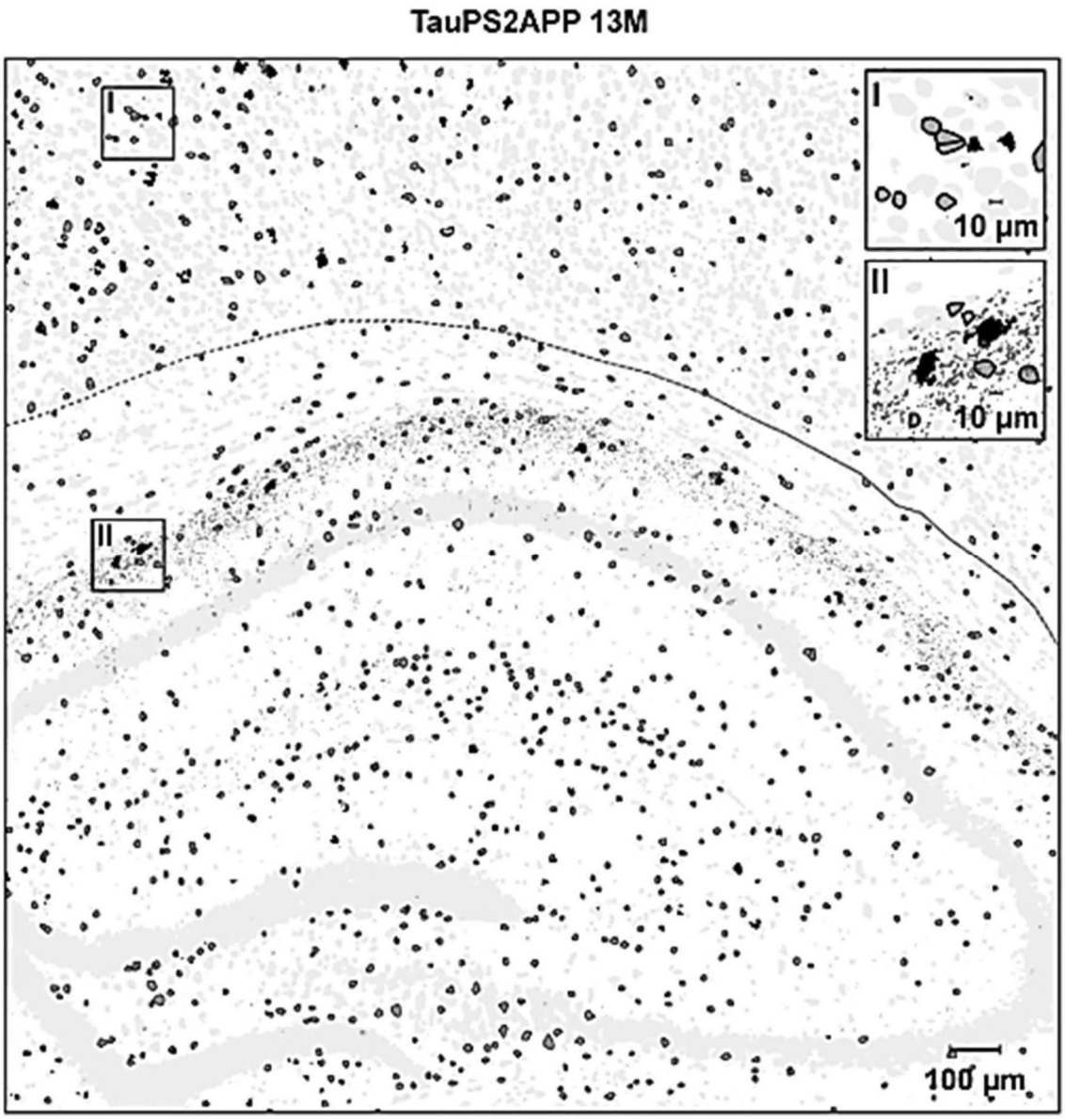


图4G

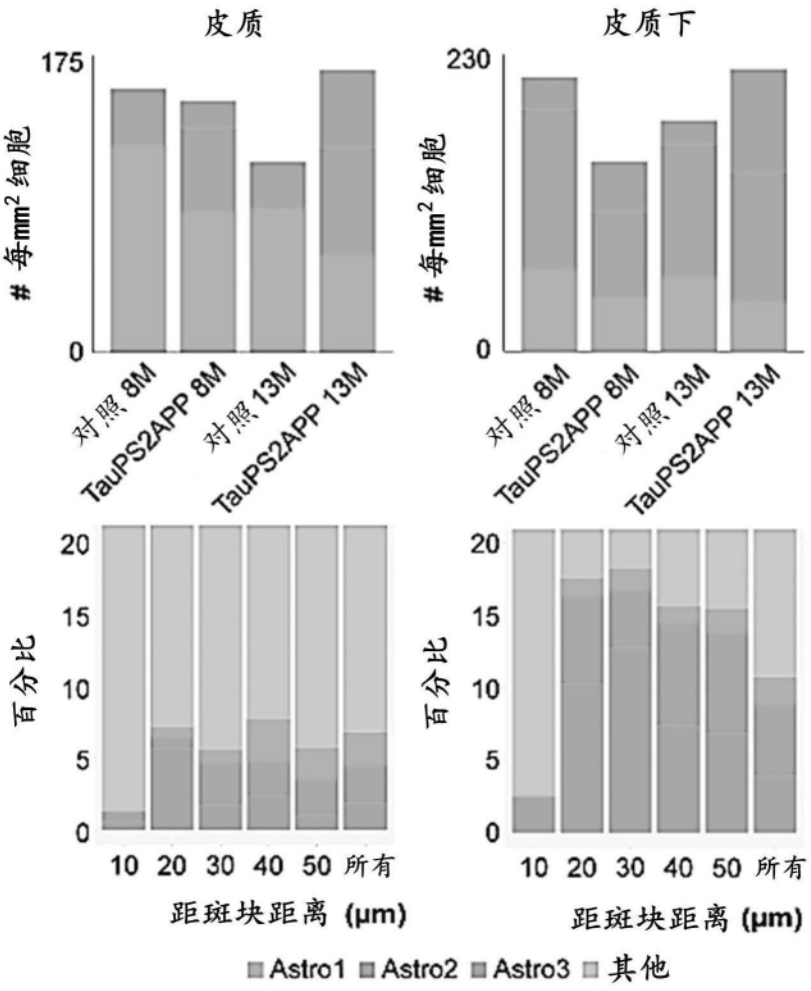

皮质
皮质下
175
230
0
每mm² 细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
20
15
10
5
百分比
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
Astro1 Astro2 Astro3 其他

图4H

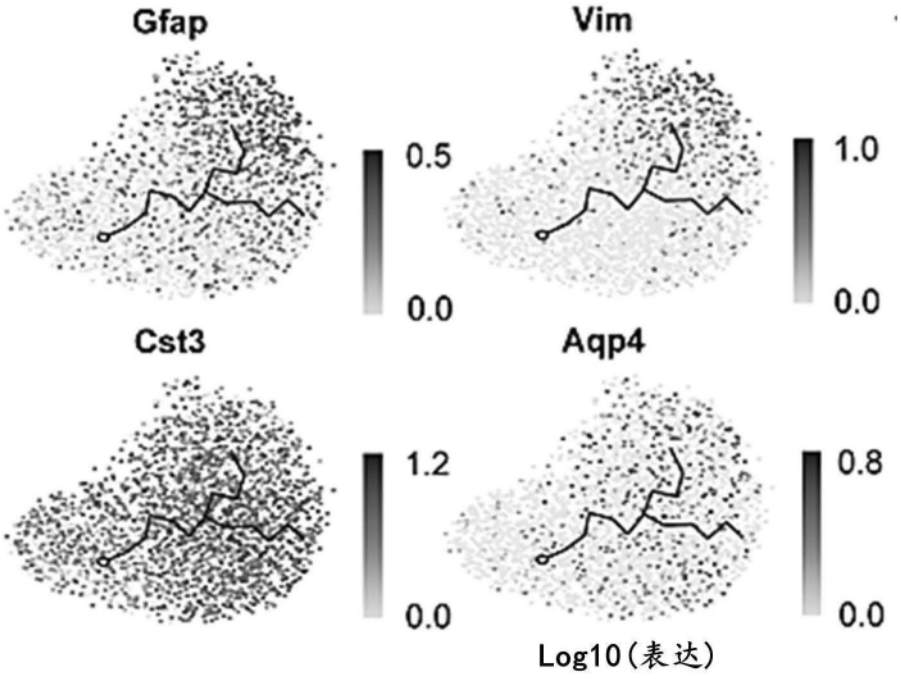

Gfap
0.5
0.0
Vim
1.0
0.0
Cst3
1.2
0.0
Aqp4
0.8
0.0
Log10(表达)

图4I

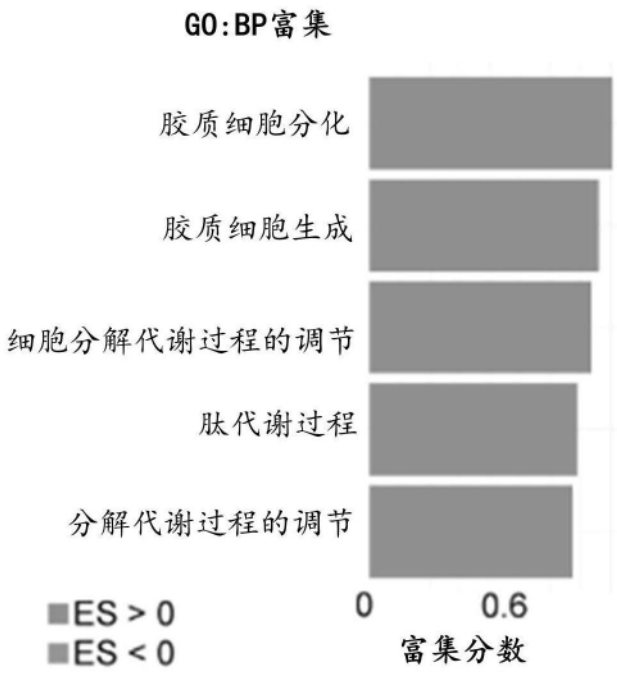

GO:BP富集
胶质细胞分化
胶质细胞生成
细胞分解代谢过程的调节
肽代谢过程
分解代谢过程的调节
ES > 0
ES < 0
0
0.6
富集分数

图4J

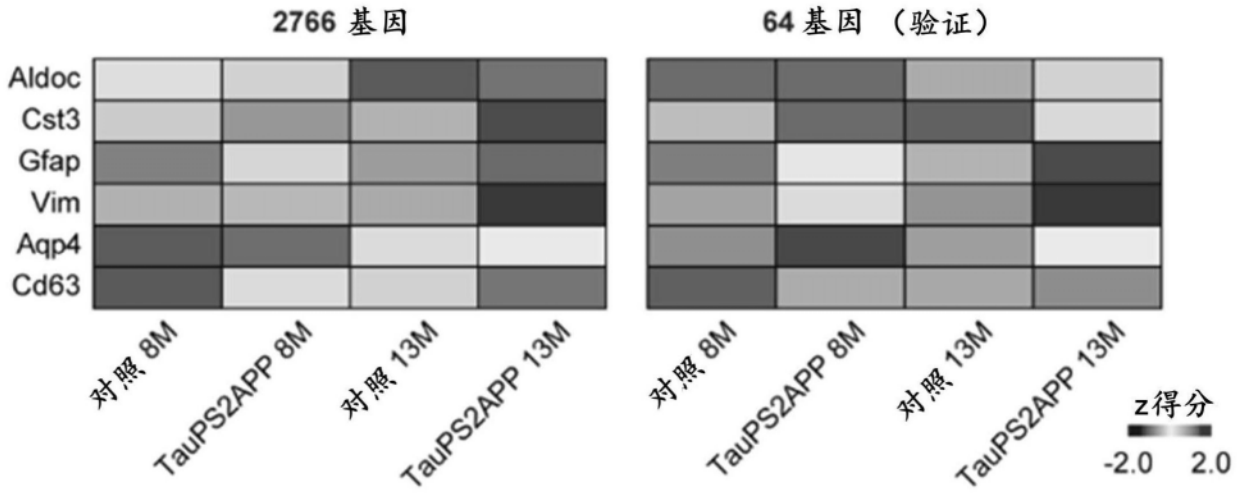

2766 基因
64 基因 （验证）
Aldoc
Cst3
Gfap
Vim
Aqp4
Cd63
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
z得分
-2.0
2.0

图4K

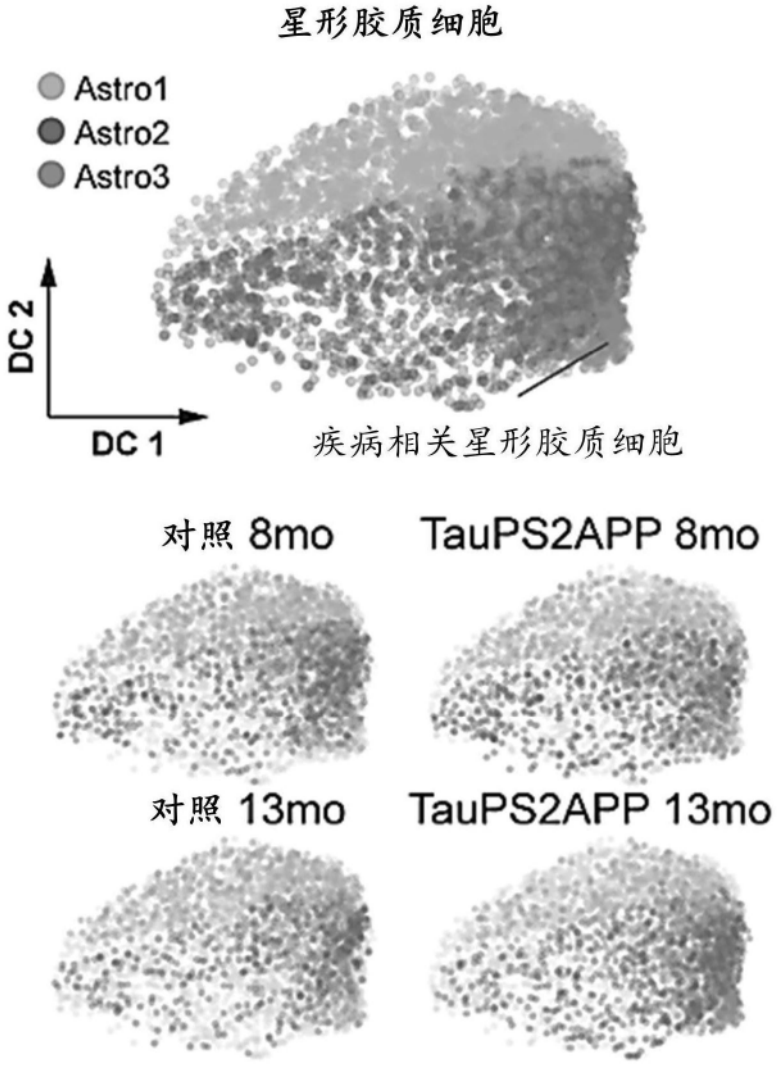

星形胶质细胞
Astro1
Astro2
Astro3
DC 2
DC 1
疾病相关星形胶质细胞
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图4L

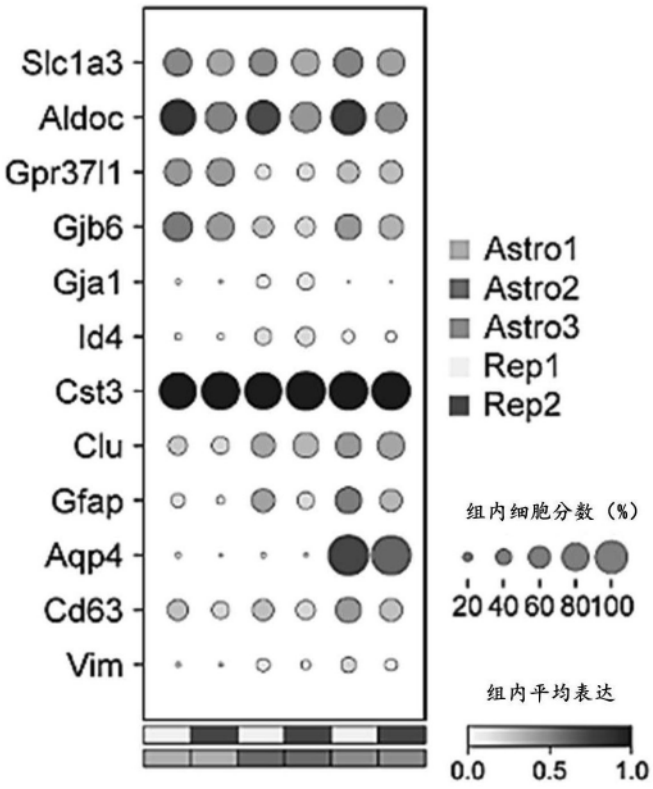

Slc1a3
Aldoc
Gpr37l1
Gjb6
Gja1
Id4
Cst3
Clu
Gfap
Aqp4
Cd63
Vim
Astro1
Astro2
Astro3
Rep1
Rep2
组内细胞分数（%）
20 40 60 80 100
组内平均表达
0.0 0.5 1.0

图4M

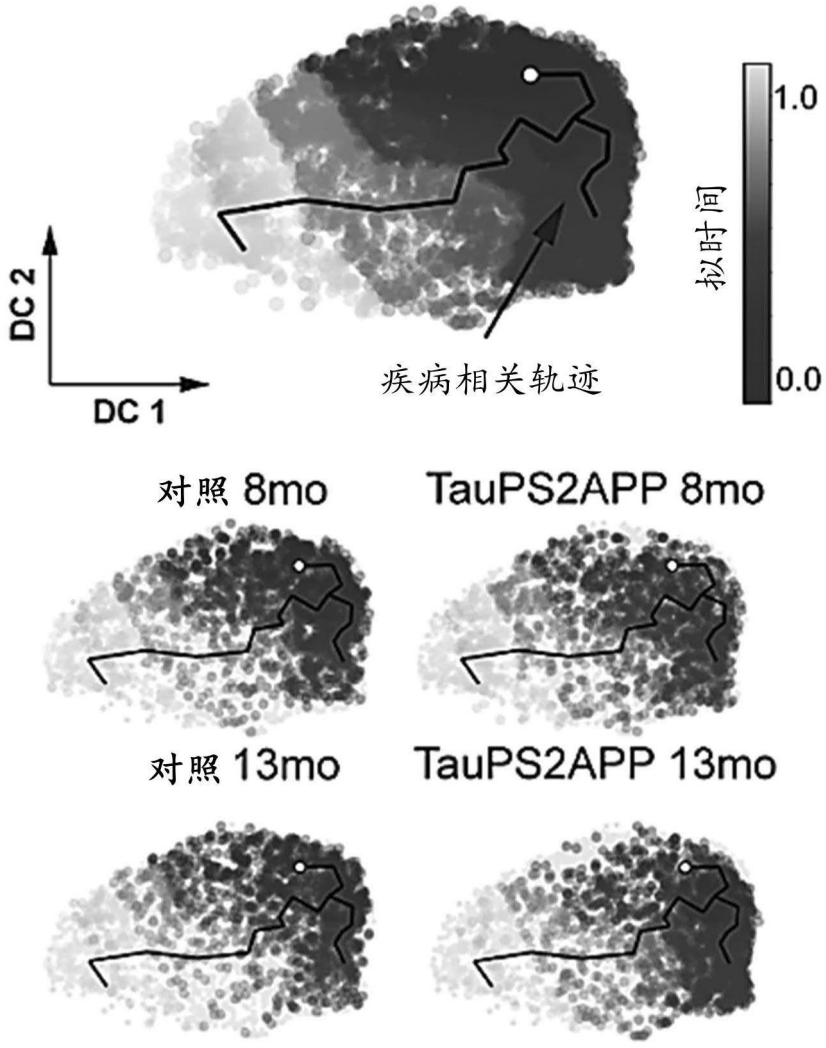

DC 2
DC 1
疾病相关轨迹
拟时间
1.0
0.0
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图4N



图40

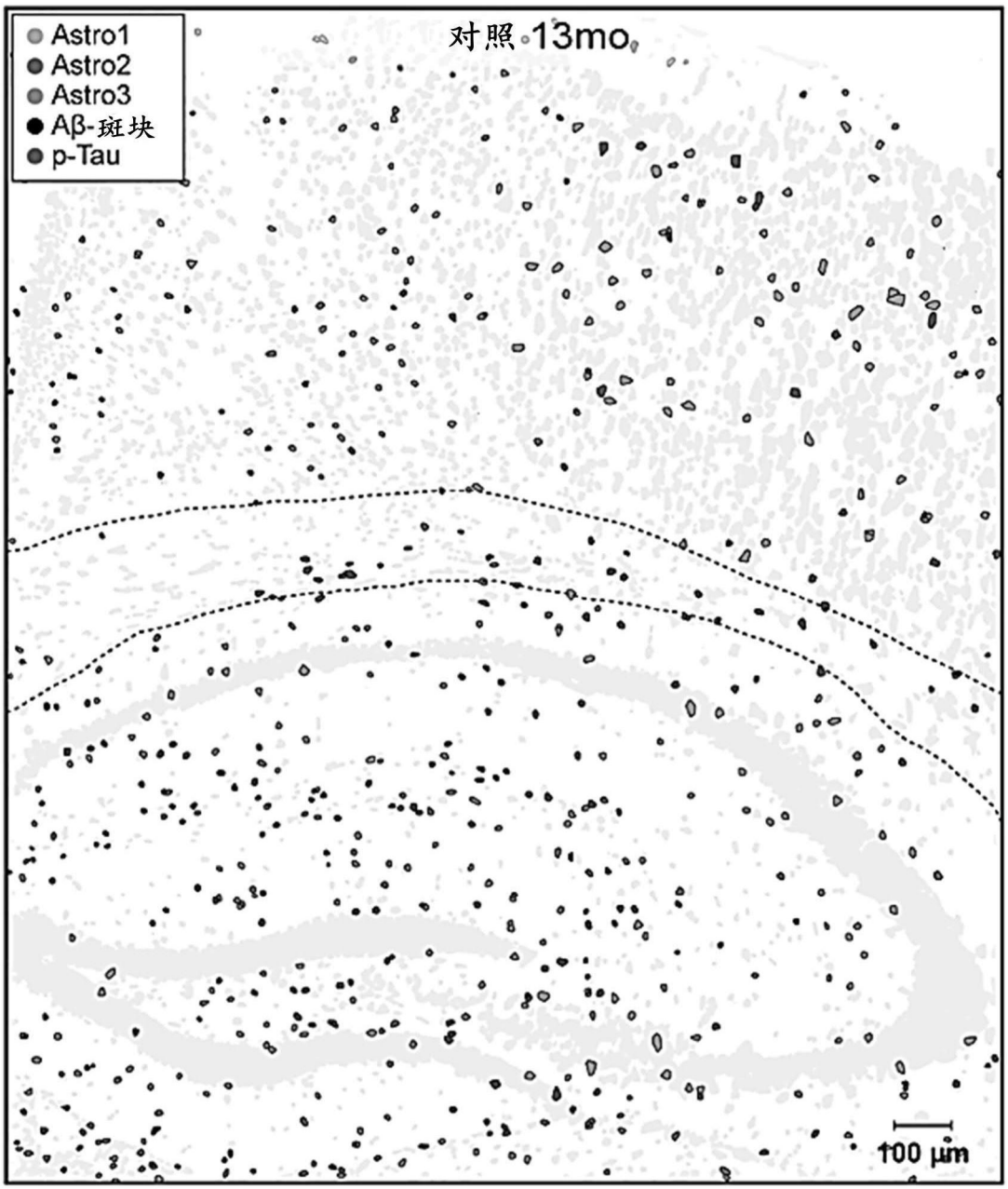


图4P

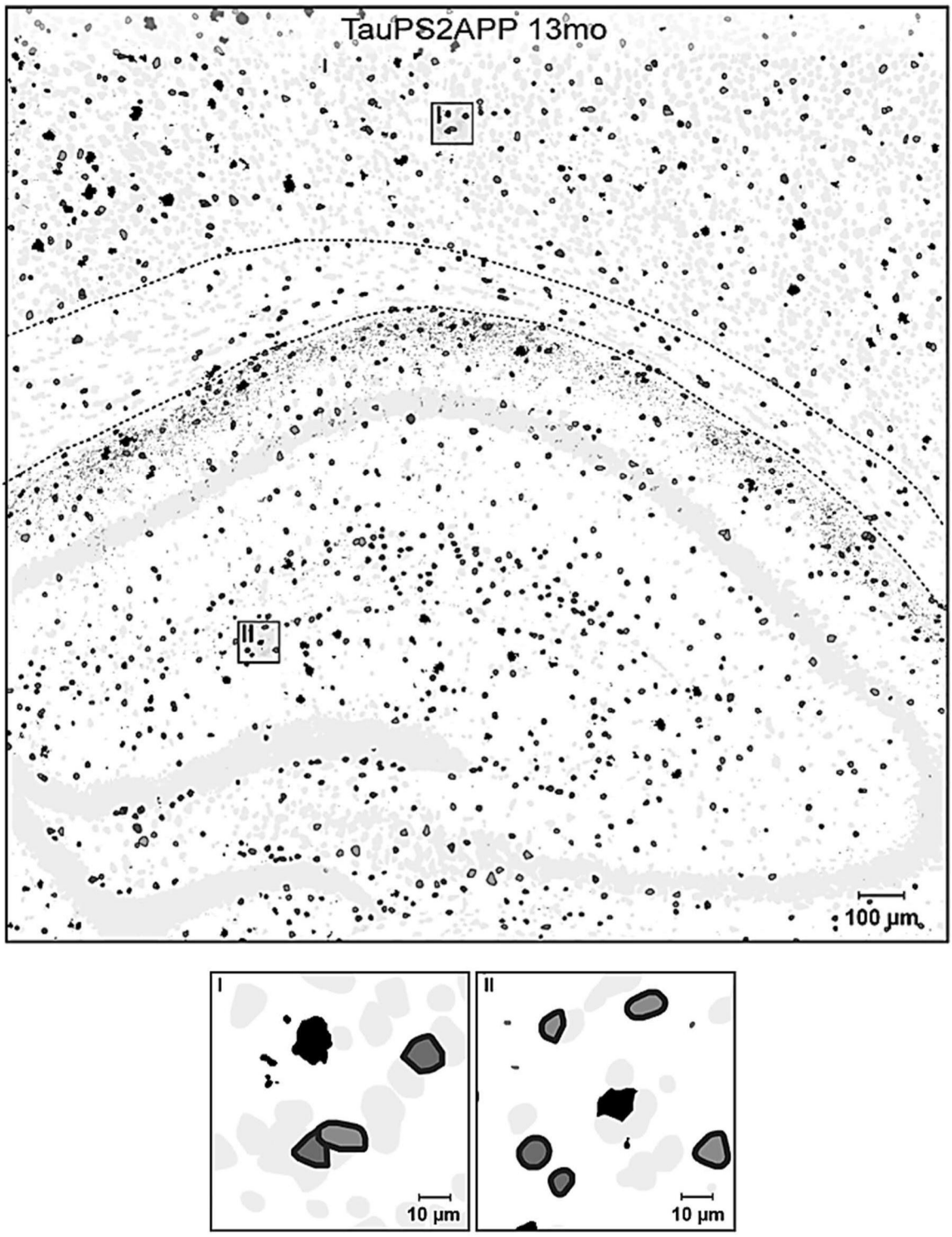


图4Q

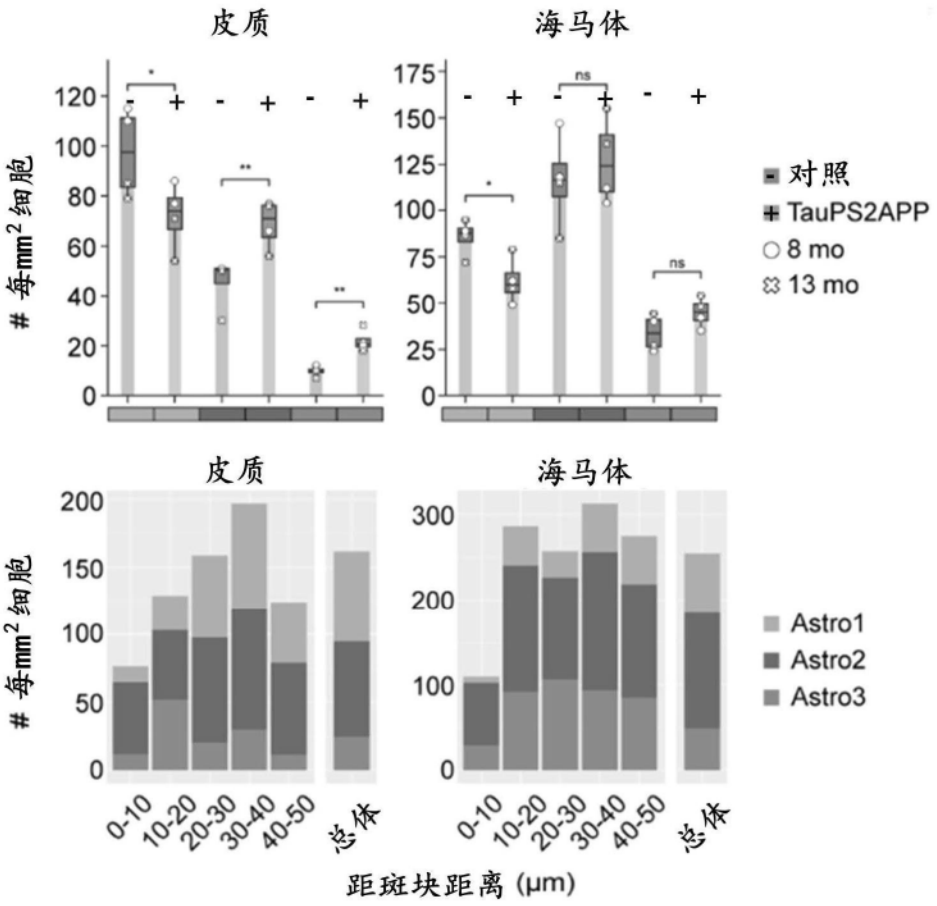

皮质
海马体
每mm² 细胞
对照
TauPS2APP
8 mo
13 mo
Astro1
Astro2
Astro3
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
总体
距斑块距离 (μm)

图4R

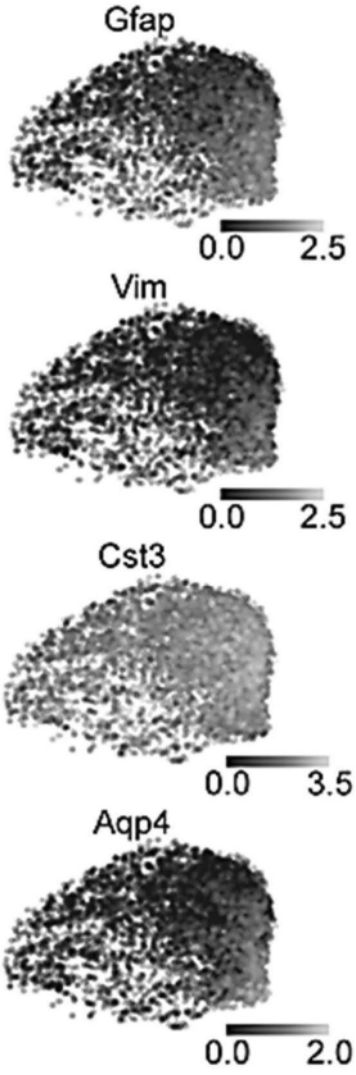


图4S

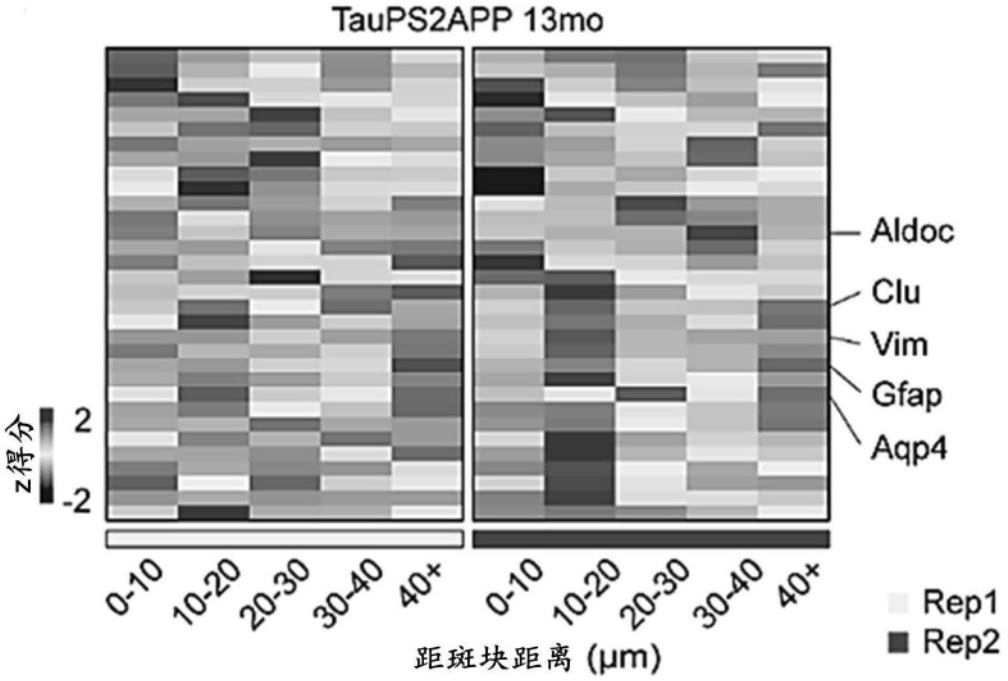

TauPS2APP 13mo
Aldoc
Clu
Vim
Gfap
Aqp4
z得分
2
-2
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
Rep1
Rep2
距斑块距离 (μm)

图4T

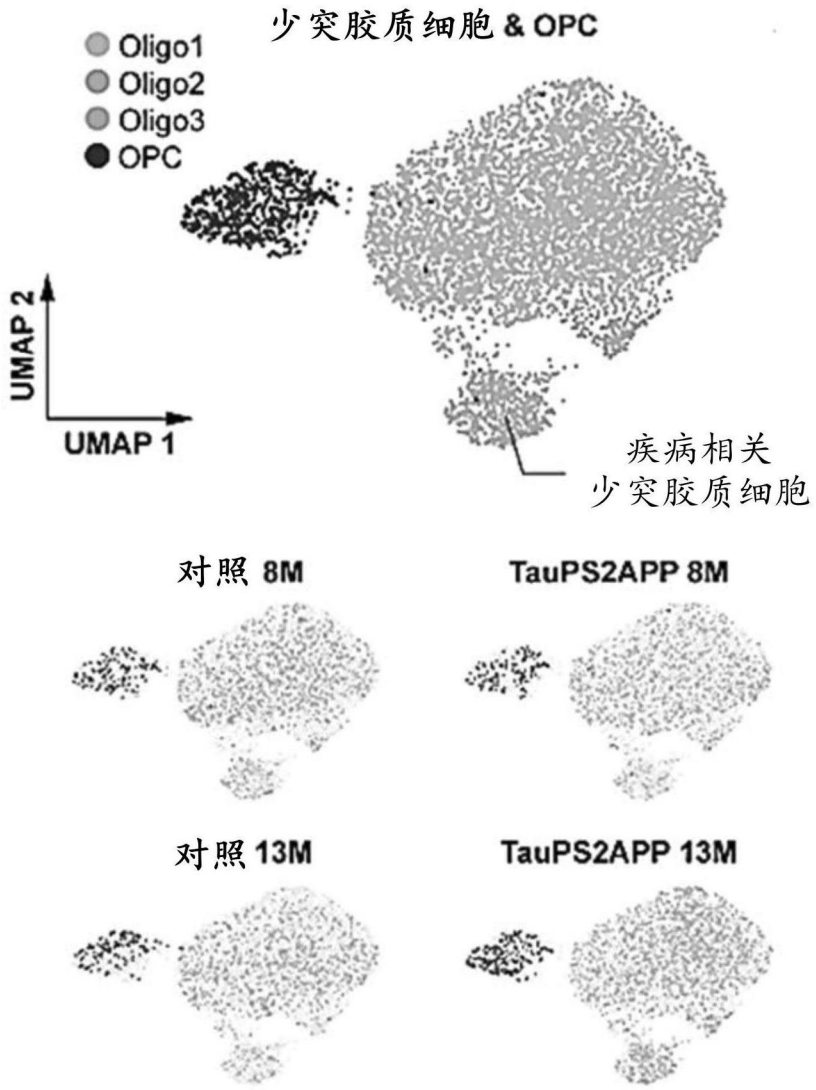

少突胶质细胞 & OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
UMAP 2
UMAP 1
疾病相关
少突胶质细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M

图5A

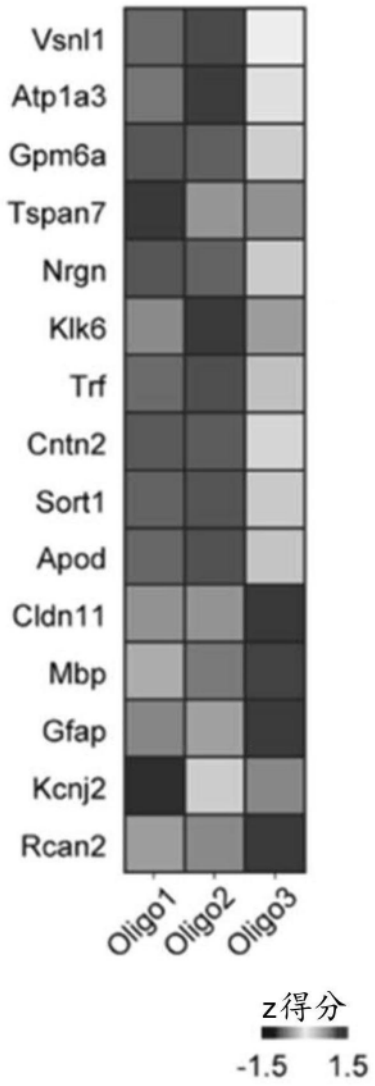

Vsnl1
Atp1a3
Gpm6a
Tspan7
Nrgn
Klk6
Trf
Cntn2
Sort1
Apod
Cldn11
Mbp
Gfap
Kcnj2
Rcan2
Oligo1
Oligo2
Oligo3
z得分
-1.5
1.5

图5B

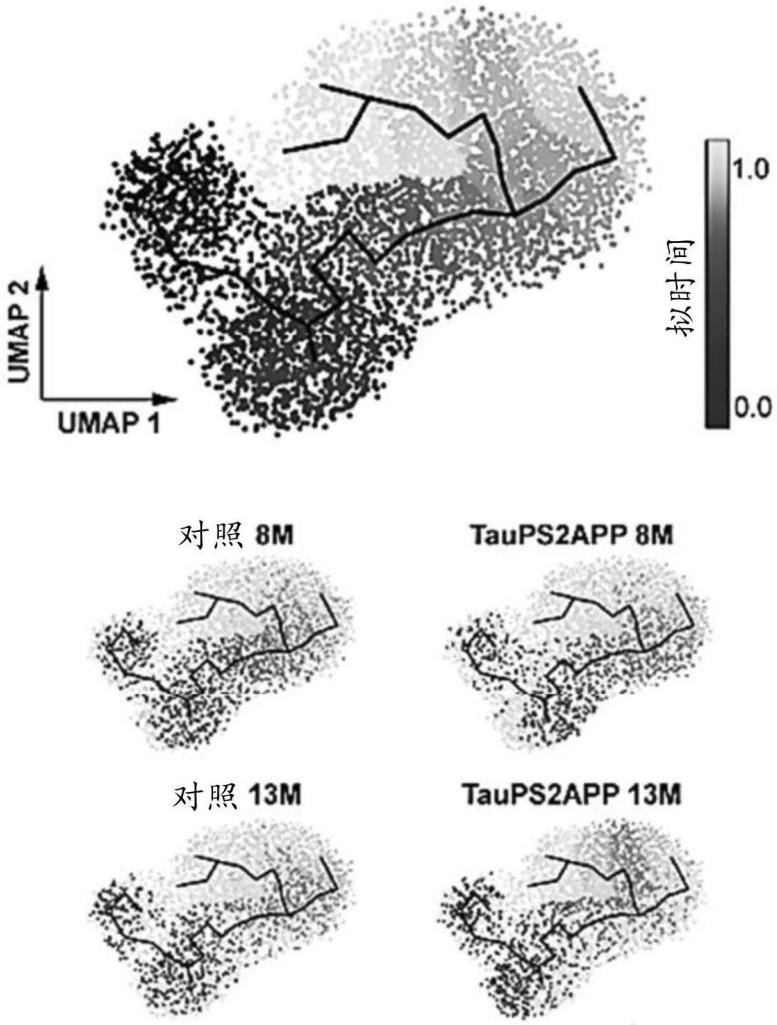


图5C

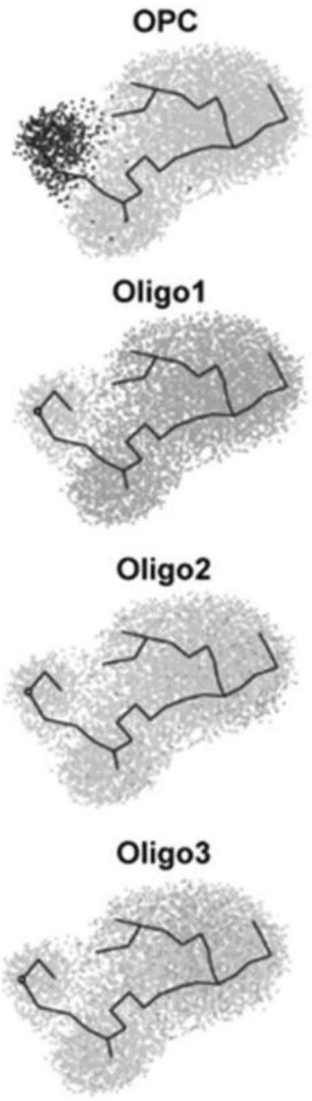


图5D

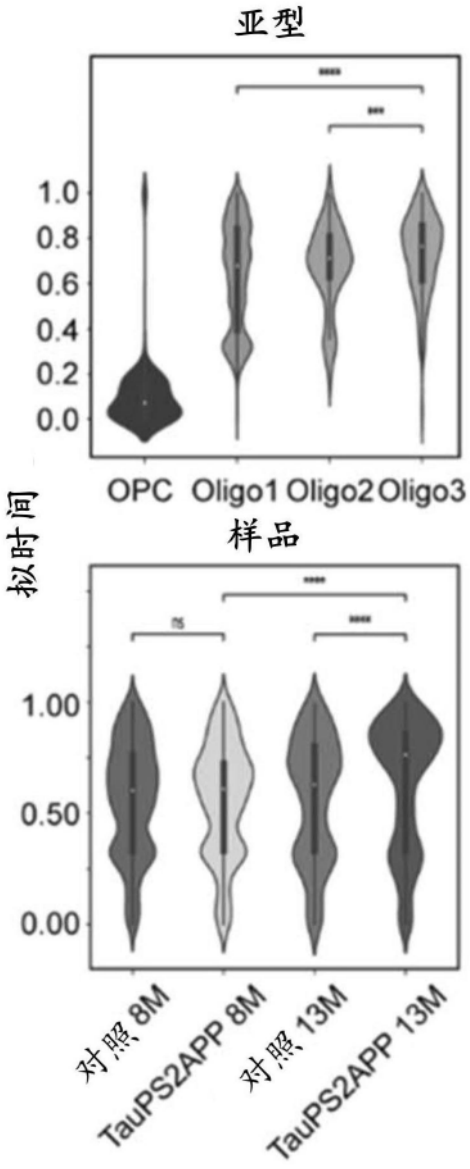

亚型
****
***
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3
拟时间
样品
****
ns
****
1.00
0.50
0.00
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M

图5E

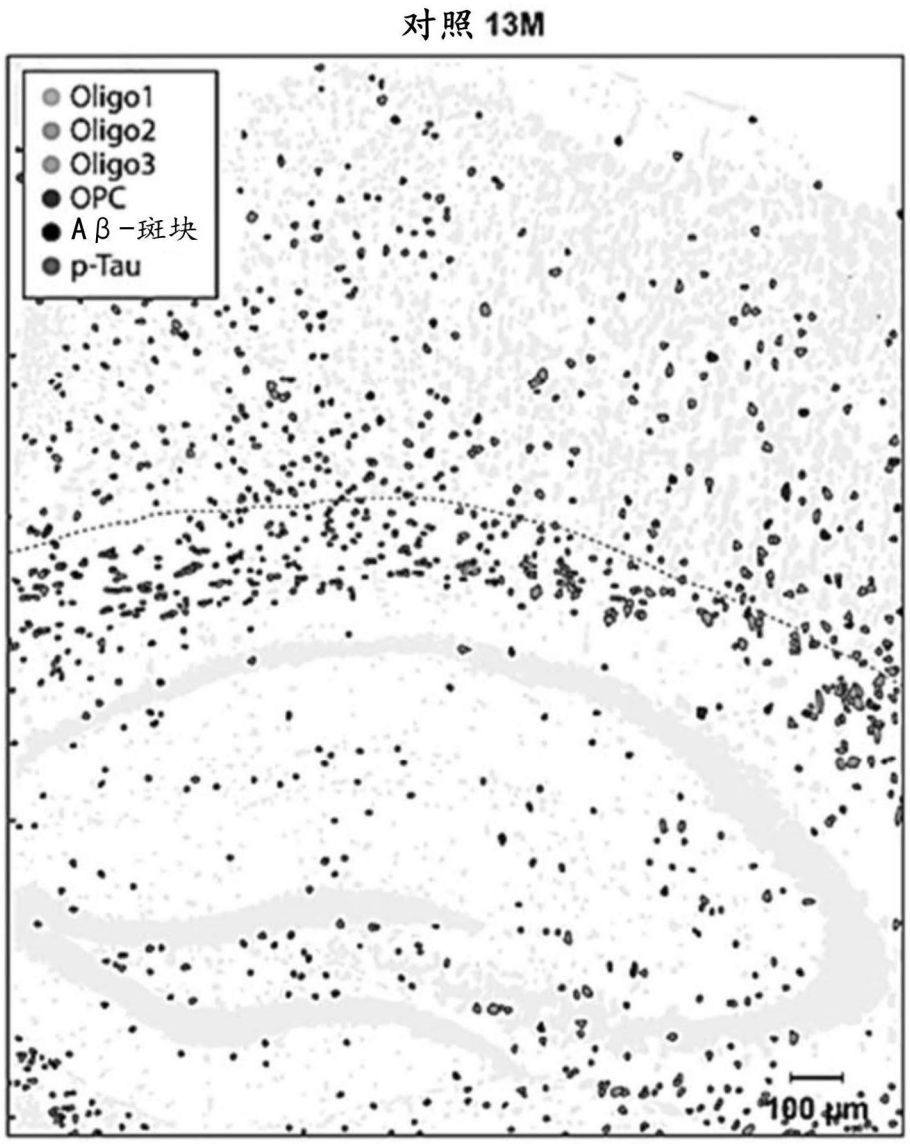


图5F

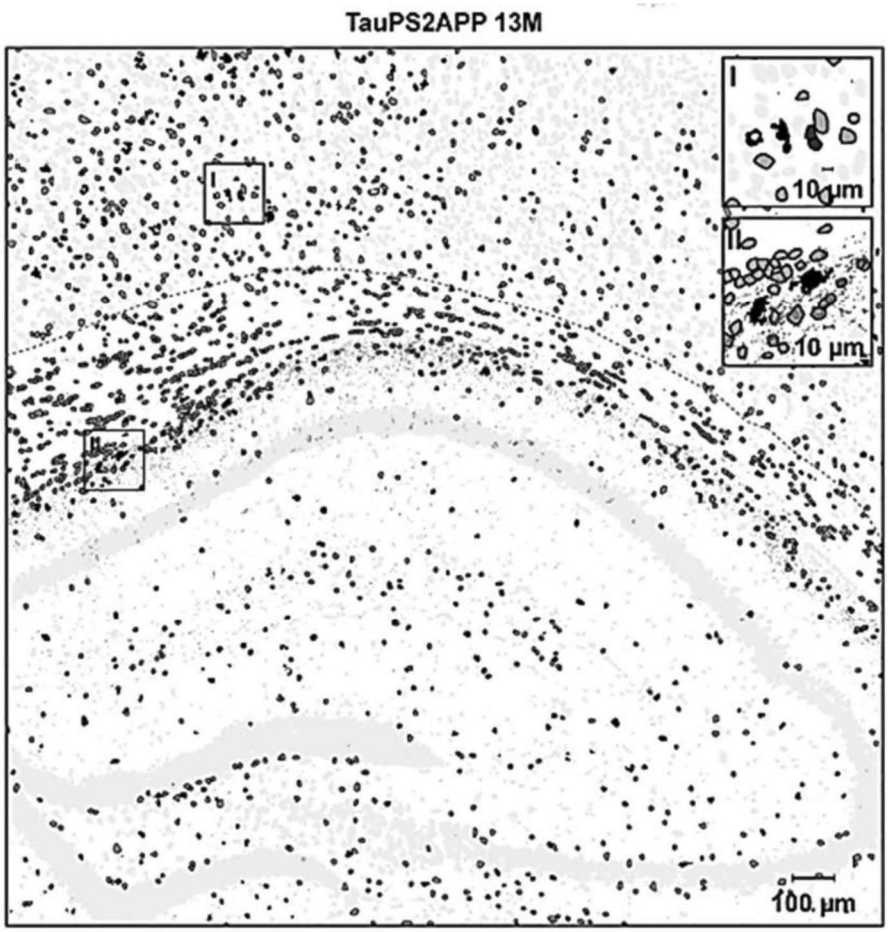


图5G

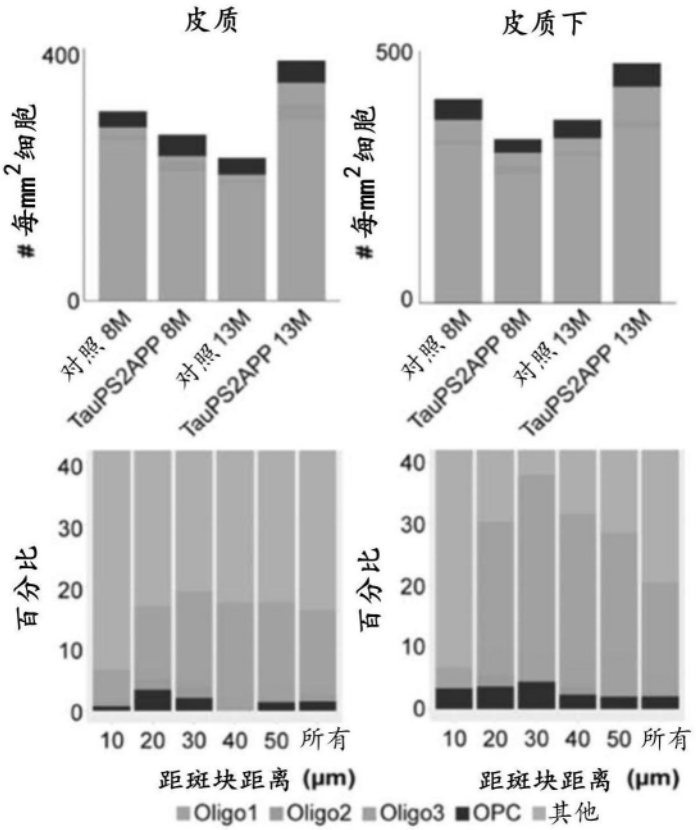

皮质
皮质下
400
500
0
每mm² 细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
40
30
20
10
百分比
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
Oligo1 Oligo2 Oligo3 OPC 其他

图5H

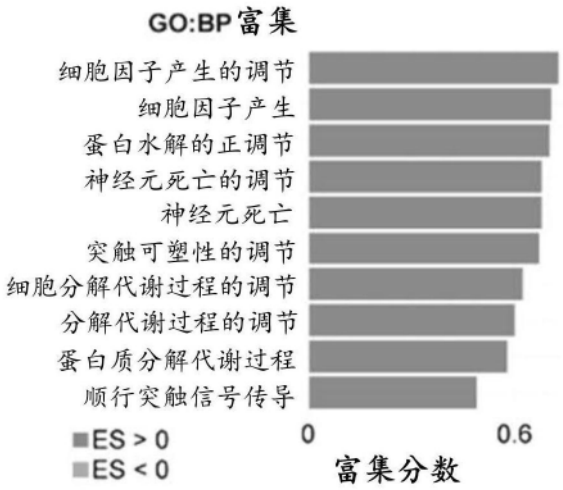

GO:BP富集
细胞因子产生的调节
细胞因子产生
蛋白水解的正调节
神经元死亡的调节
神经元死亡
突触可塑性的调节
细胞分解代谢过程的调节
分解代谢过程的调节
蛋白质分解代谢过程
顺行突触信号传导
ES > 0
ES < 0
0
0.6
富集分数

图5I

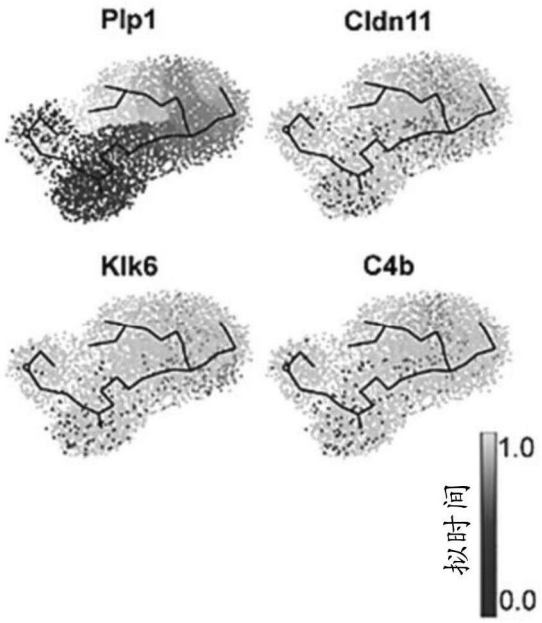

Plp1
Cldn11
Klk6
C4b
1.0
拟时间
0.0

图5J

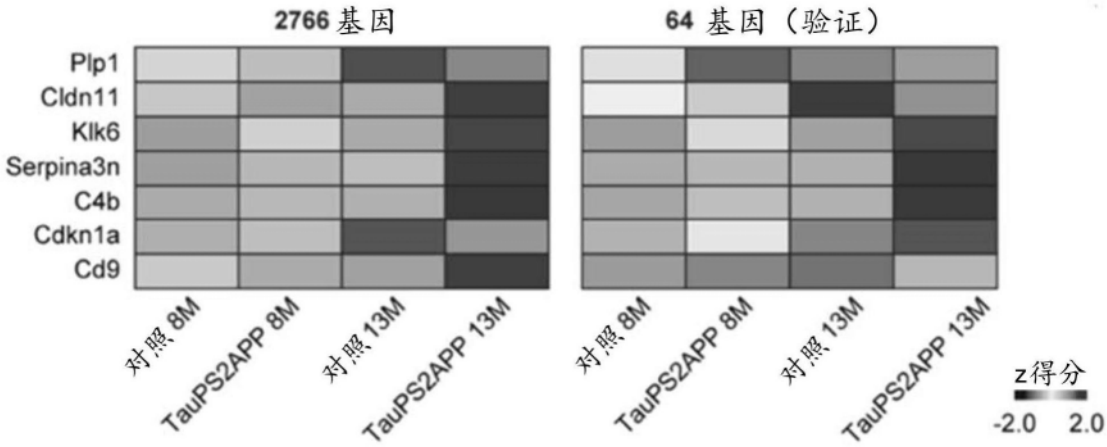

2766 基因
64 基因（验证）
Plp1
Cldn11
Klk6
Serpina3n
C4b
Cdkn1a
Cd9
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
z得分
-2.0
2.0

图5K

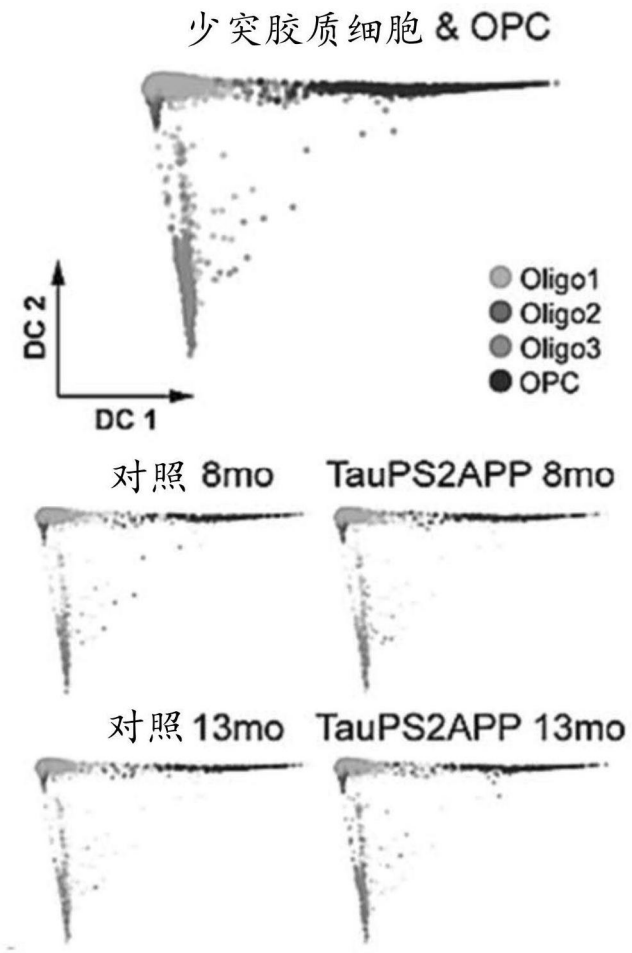

少突胶质细胞 & OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
DC 2
DC 1
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图5L

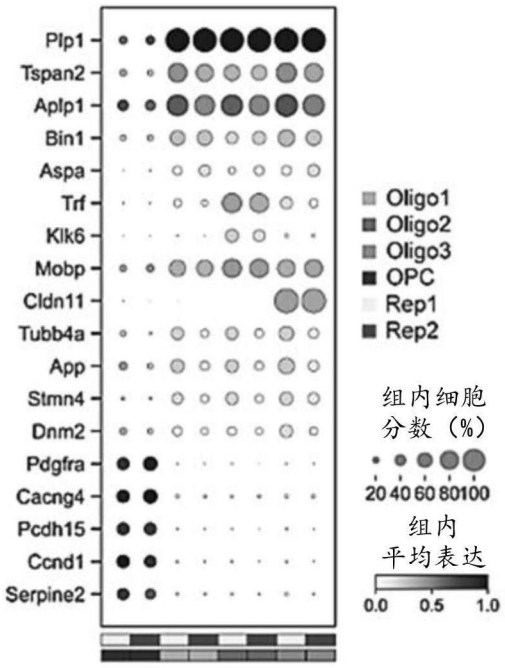

Plp1
Tspan2
Aplp1
Bin1
Aspa
Trf
Klk6
Mobp
Cldn11
Tubb4a
App
Stmn4
Dnm2
Pdgfra
Cacng4
Pcdh15
Ccnd1
Serpine2
Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
Rep1
Rep2
组内细胞
分数（%）
20 40 60 80 100
组内
平均表达
0.0 0.5 1.0

图5M

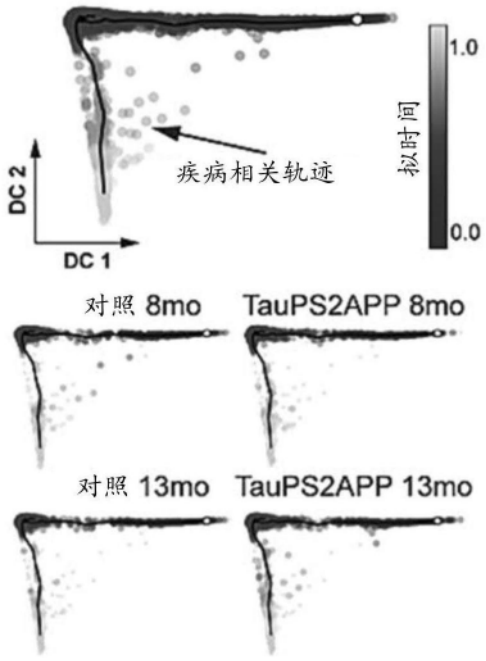

DC 2
DC 1
疾病相关轨迹
拟时间
1.0
0.0
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图5N

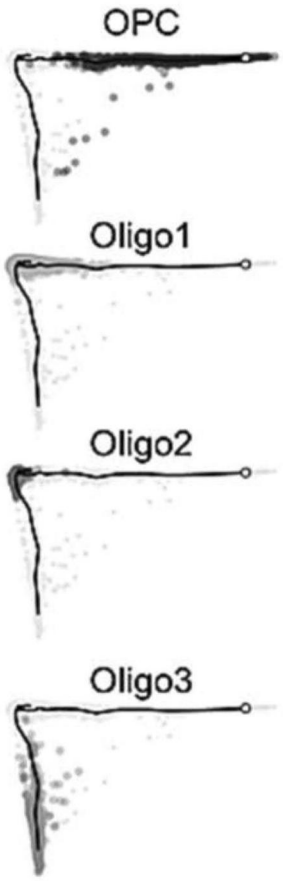


图50

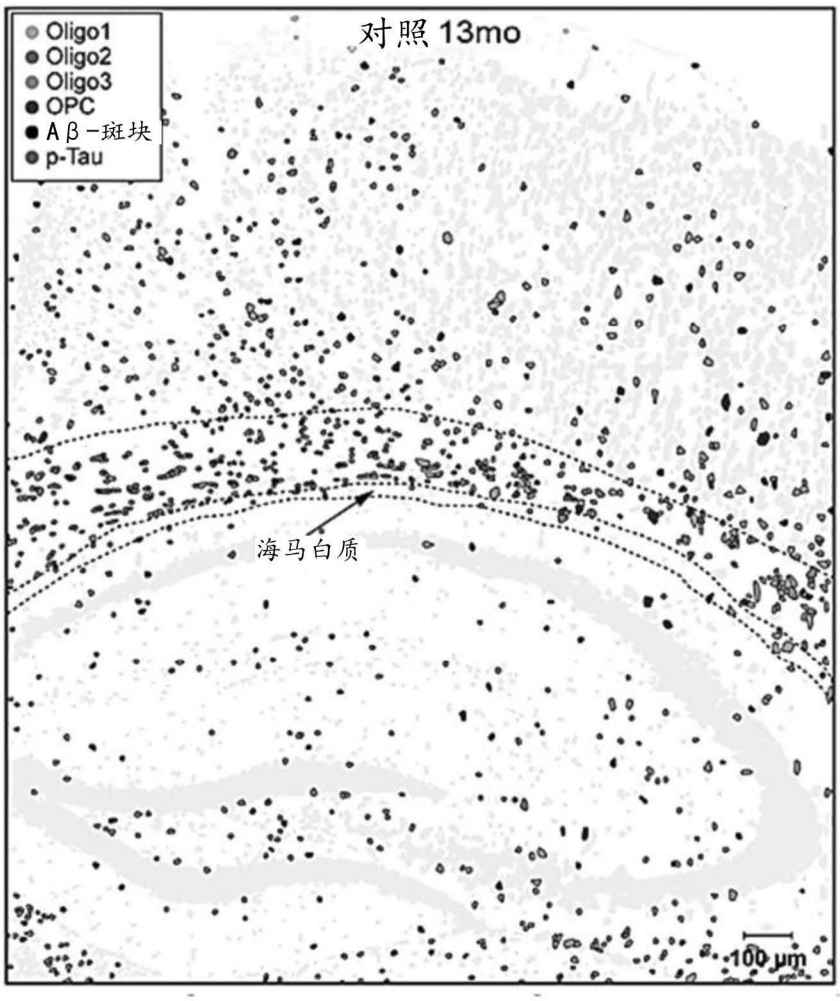


图5P

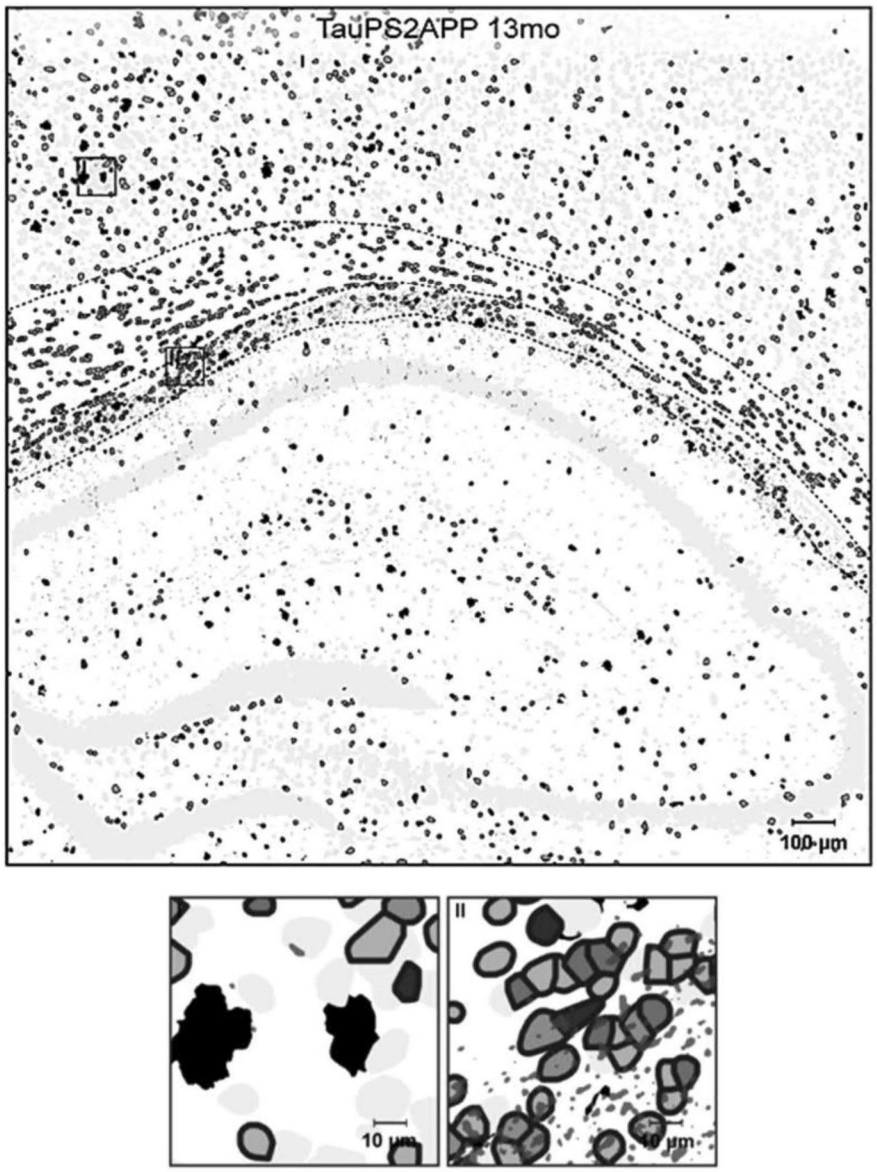

TauPS2APP 13mo
100 µm
I
II
10 µm
10 µm

图5Q

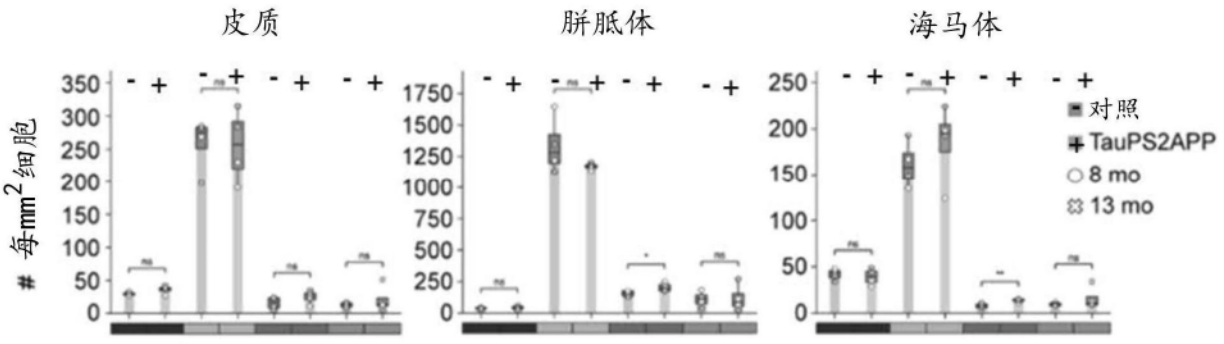

皮质
胼胝体
海马体
每mm²细胞
对照
TauPS2APP
8 mo
13 mo

图5R

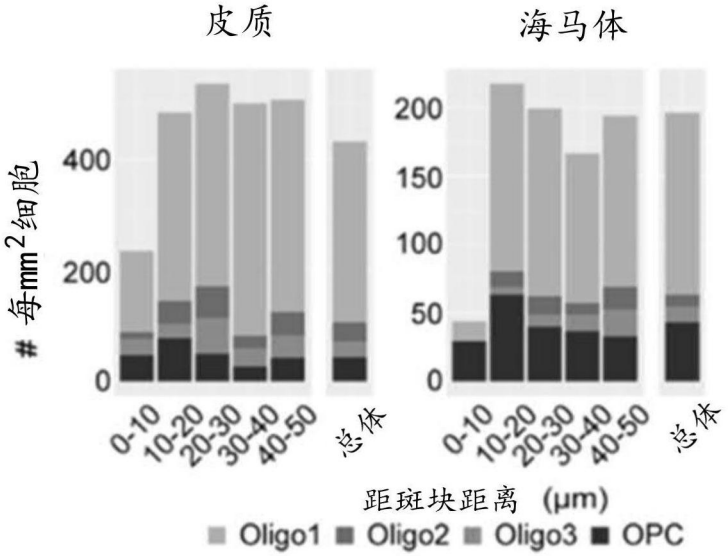

皮质
海马体
每mm²细胞
400
200
0
200
150
100
50
0
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
总体
距斑块距离 (μm)
Oligo1 Oligo2 Oligo3 OPC

图5S

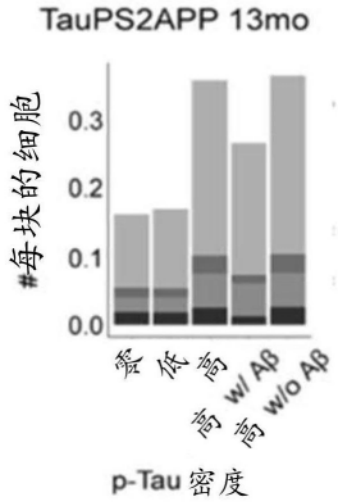

TauPS2APP 13mo
#每块的细胞
0.3
0.2
0.1
0.0
总体
高
高 w/ Aβ
高 w/o Aβ
p-Tau 密度

图5T

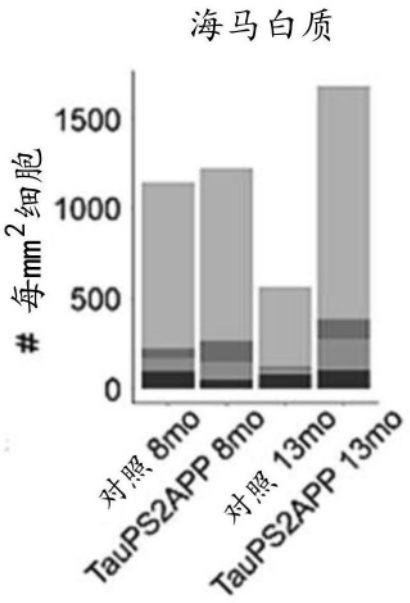

海马白质
每mm²细胞
1500
1000
500
0
对照 8mo
TauPS2APP 8mo
对照 13mo
TauPS2APP 13mo

图5U

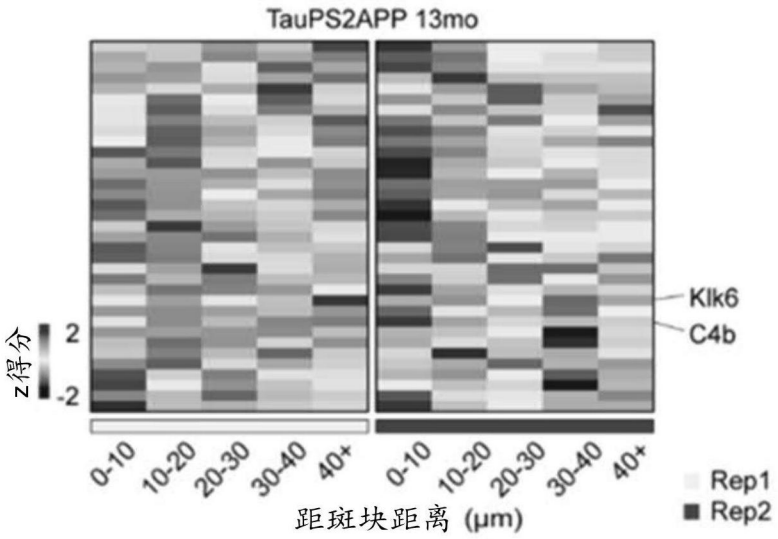

TauPS2APP 13mo
z得分
2
-2
Klk6
C4b
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
Rep1
Rep2
距斑块距离 (μm)

图5V

兴奋性神经元


CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG
Aβ-斑块
p-Tau
100 μm

图6A

抑制性神经元

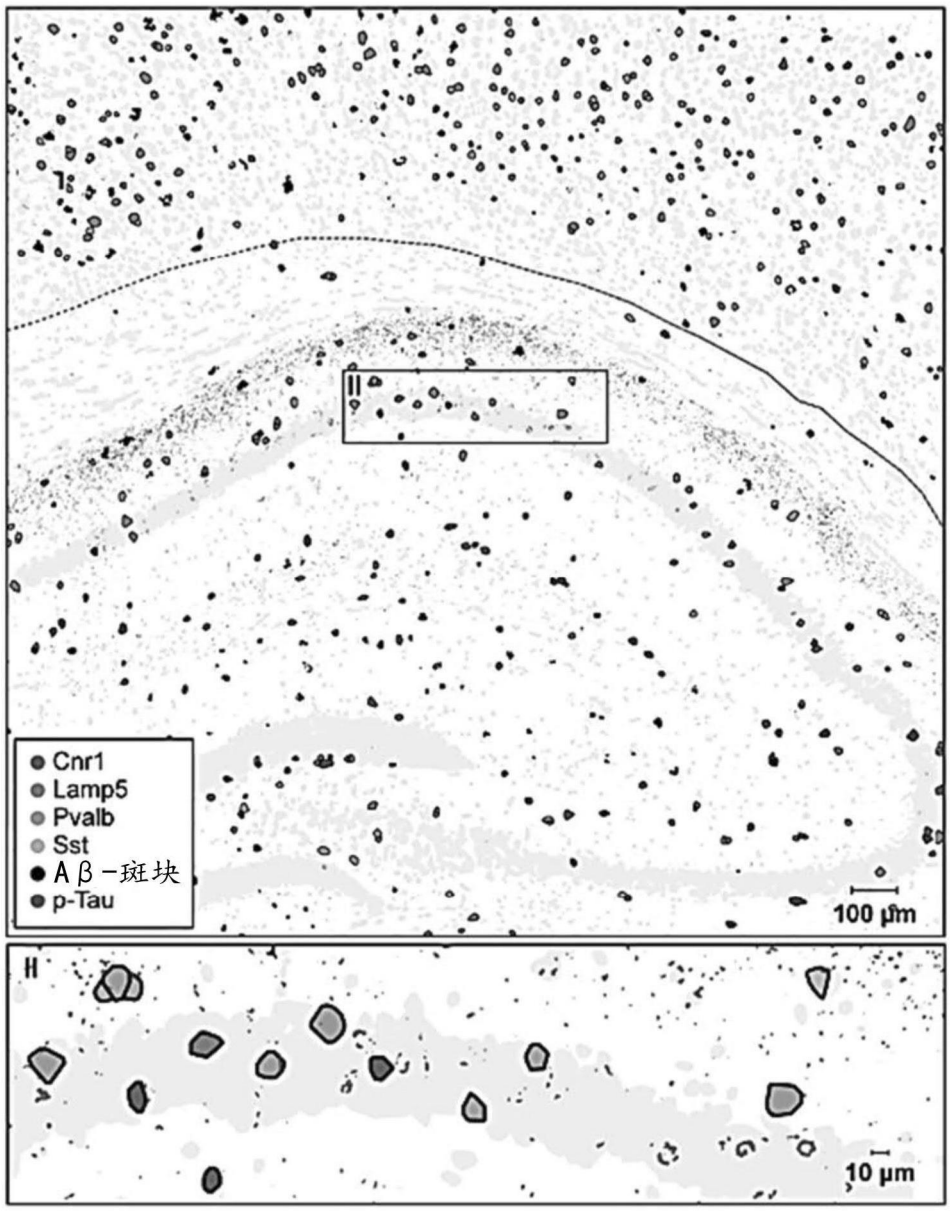


图6B

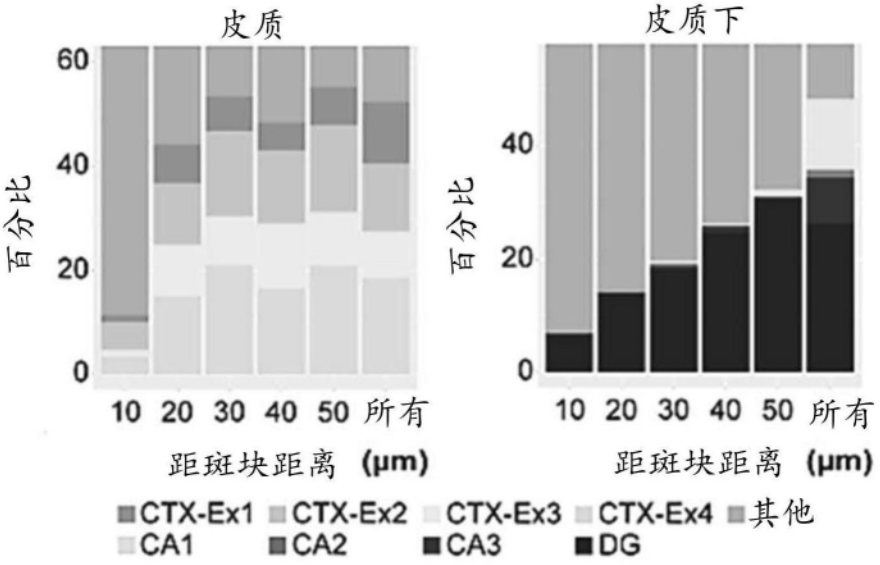

皮质
皮质下
百分比
60
40
20
0
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
CTX-Ex1 CTX-Ex2 CTX-Ex3 CTX-Ex4 其他
CA1 CA2 CA3 DG

图6C

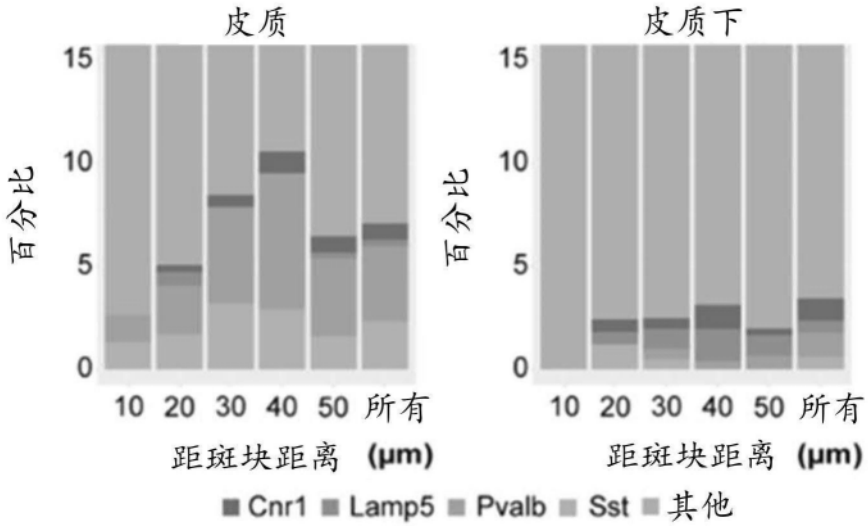

皮质
皮质下
百分比
15
10
5
0
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
Cnr1 Lamp5 Pvalb Sst 其他

图6D

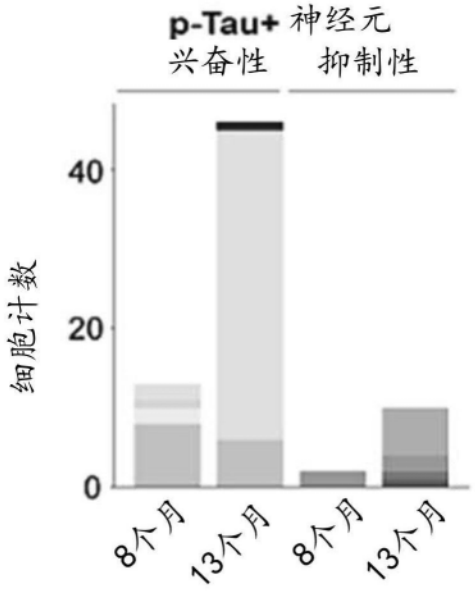

p-Tau+ 神经元
兴奋性
抑制性
细胞计数
40
20
0
8个月
13个月
8个月
13个月

图6E

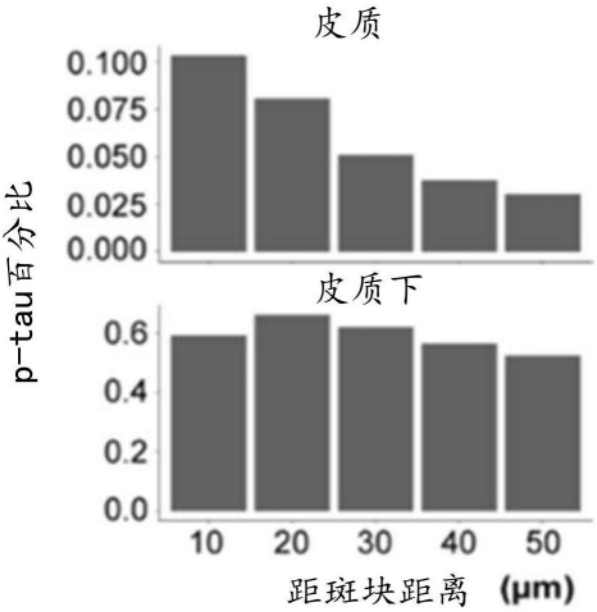

皮质
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
皮质下
p-tau百分比
0.6
0.4
0.2
0.0
10
20
30
40
50
距斑块距离 (μm)

图6F

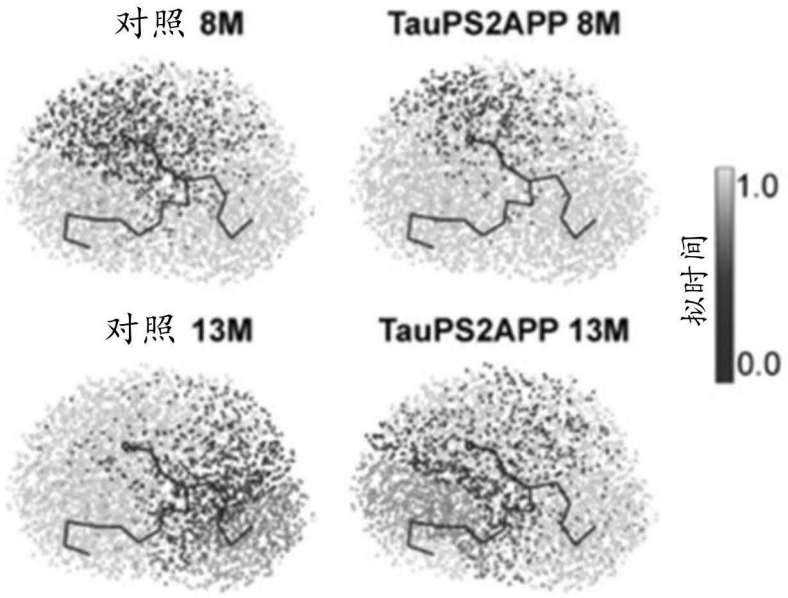


图6G

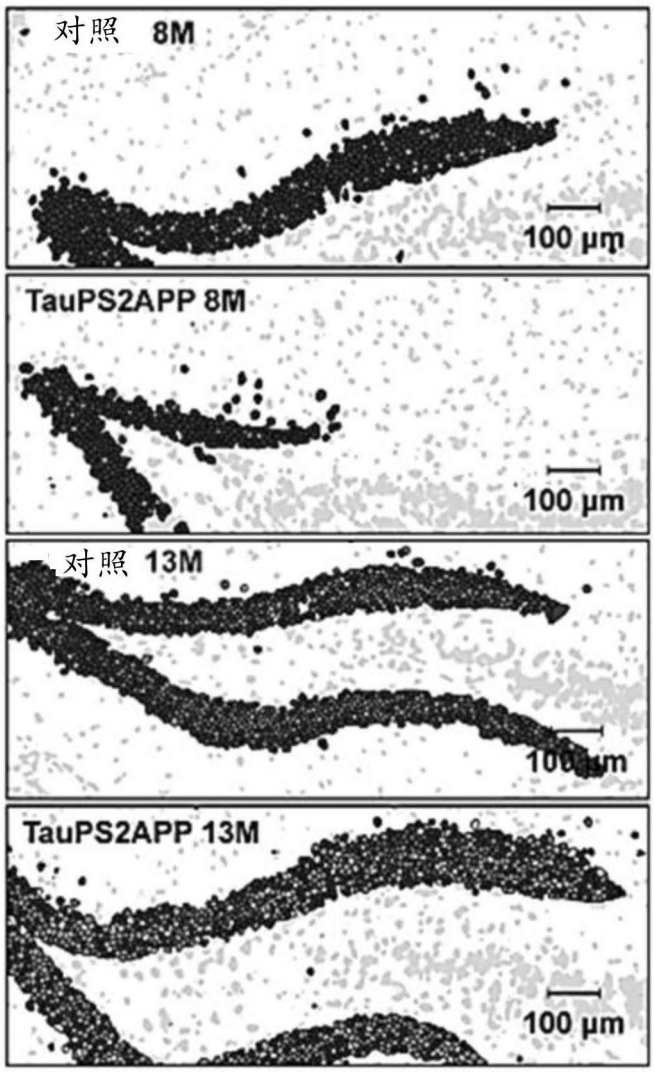

对照 8M
100 μm
TauPS2APP 8M
100 μm
对照 13M
100 μm
TauPS2APP 13M
100 μm

图6H

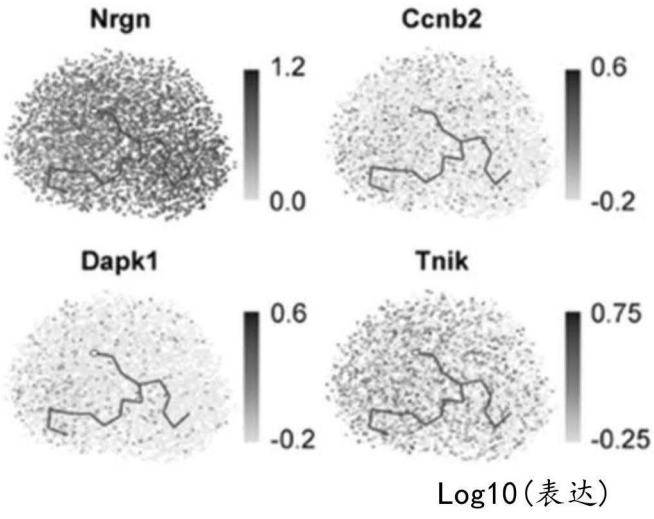

Nrgn
1.2
0.0
Ccnb2
0.6
-0.2
Dapk1
0.6
-0.2
Tnik
0.75
-0.25
Log10(表达)

图6I

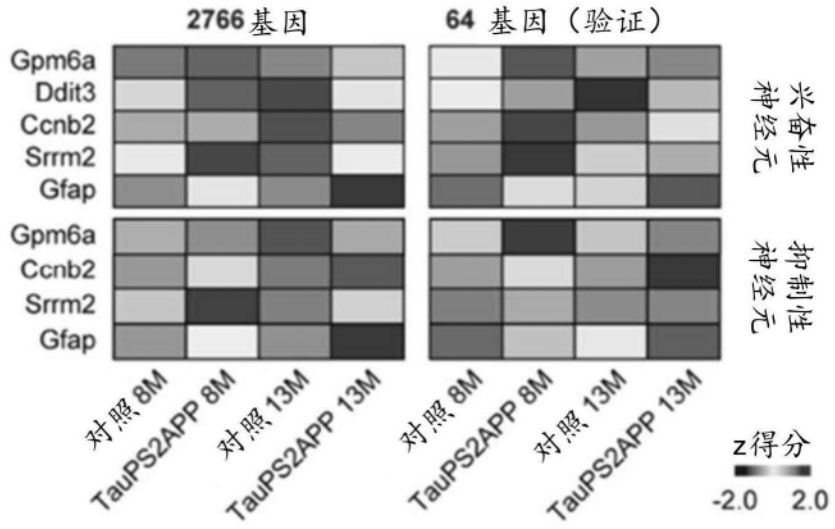


图6J

皮质兴奋性神经元

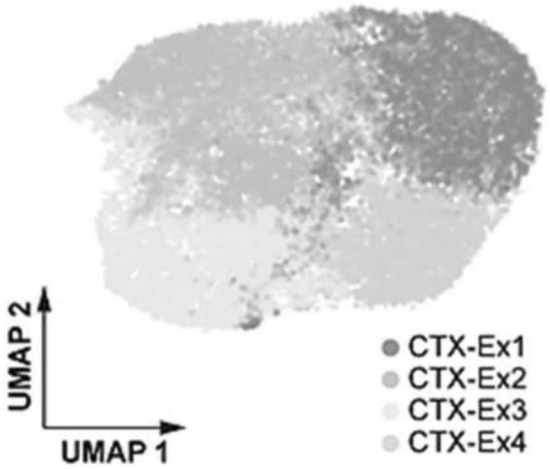


图6K

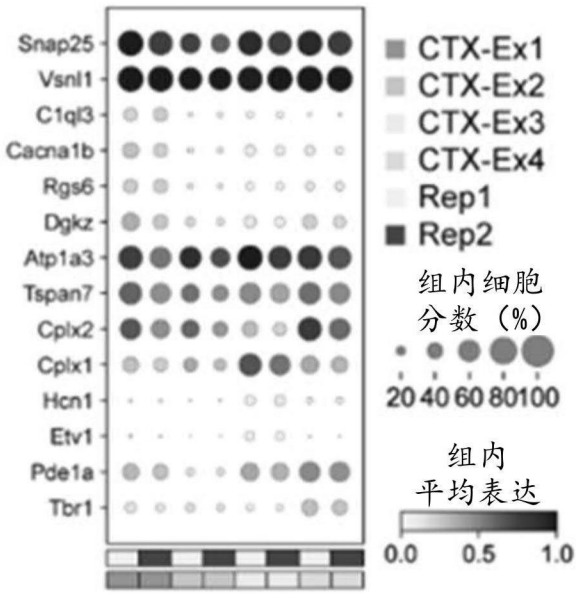


图6L

抑制性神经元

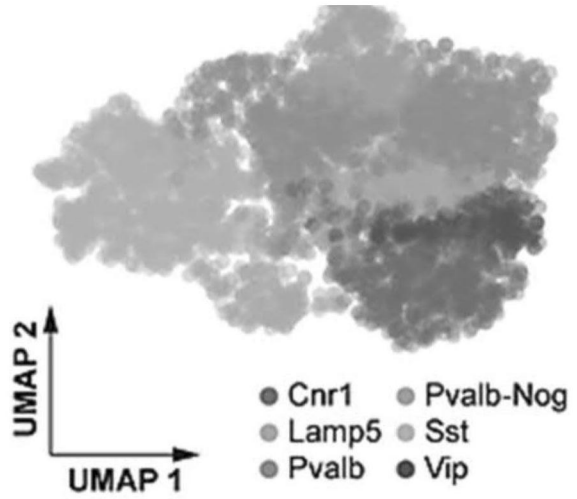


图6M

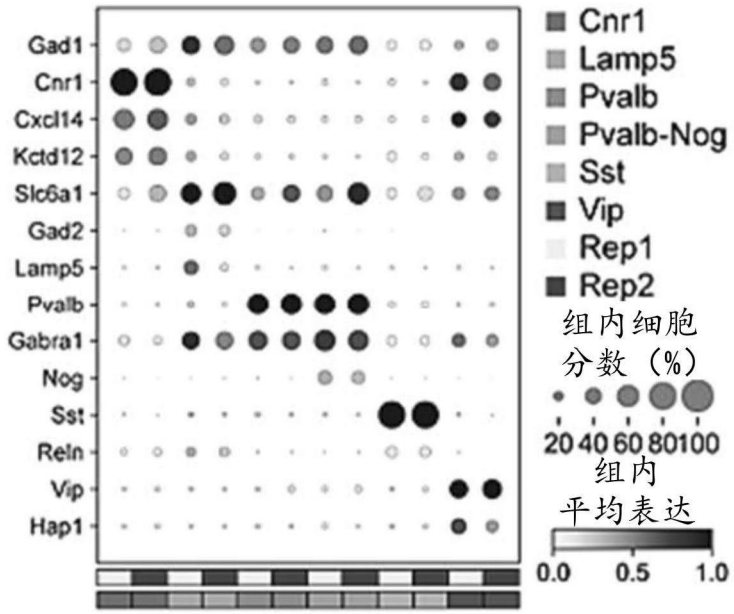

Gad1
Cnr1
Cxcl14
Kctd12
Slc6a1
Gad2
Lamp5
Pvalb
Gabra1
Nog
Sst
Reln
Vip
Hap1
Cnr1
Lamp5
Pvalb
Pvalb-Nog
Sst
Vip
Rep1
Rep2
组内细胞
分数（%）
20 40 60 80 100
组内
平均表达
0.0 0.5 1.0

图6N

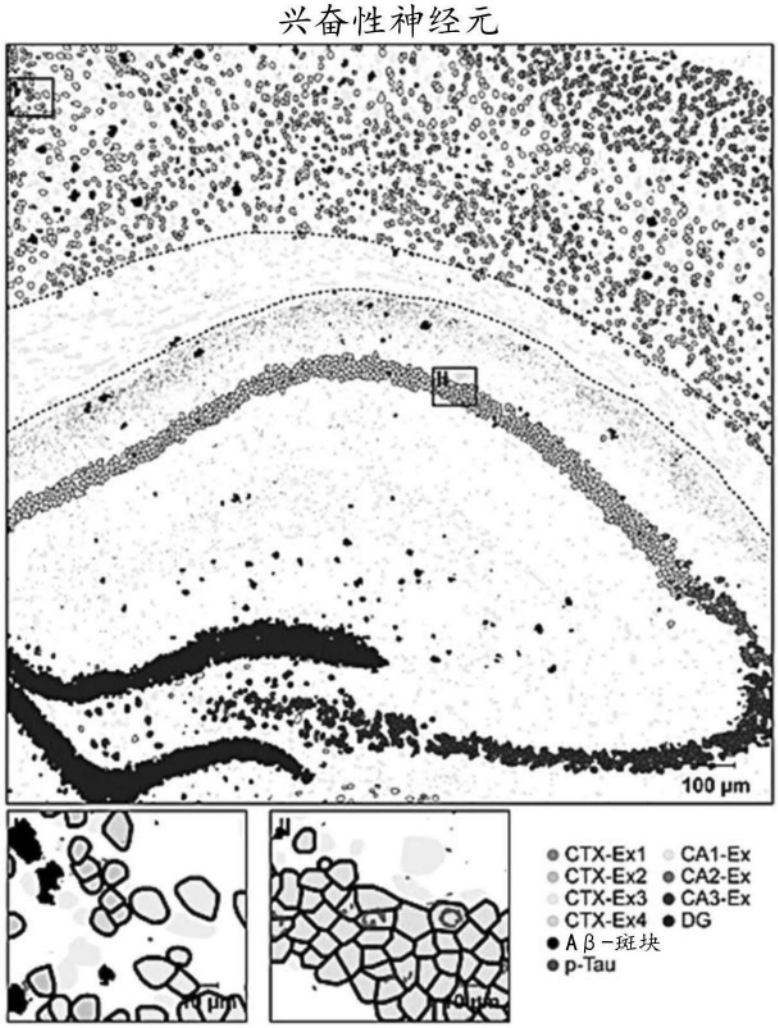

兴奋性神经元
100 μm
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG
Aβ-斑块
p-Tau

图60

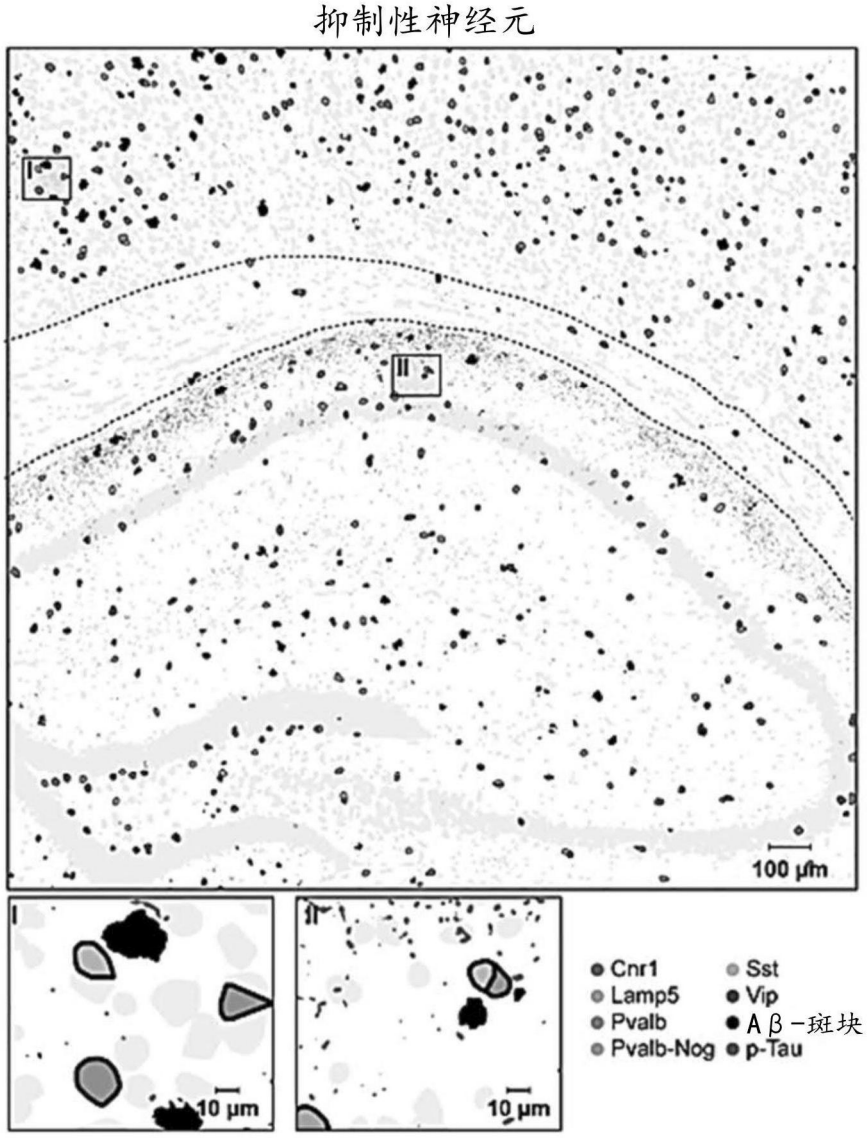

抑制性神经元
I
II
100 μm
I
II
10 μm
10 μm
Cnr1
Lamp5
Pvalb
Pvalb-Nog
Sst
Vip
Aβ-斑块
p-Tau

图6P

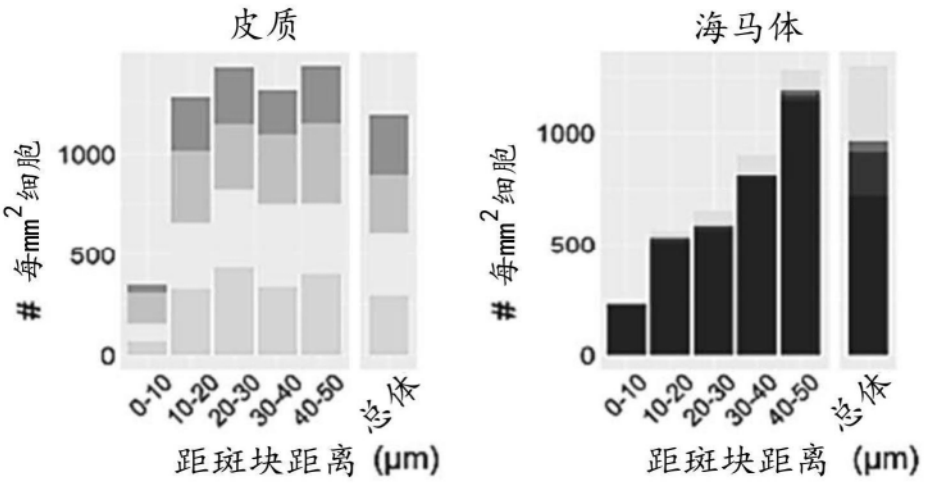

皮质
海马体
每mm² 细胞
1000
500
0
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
总体
距斑块距离 (μm)

图6Q

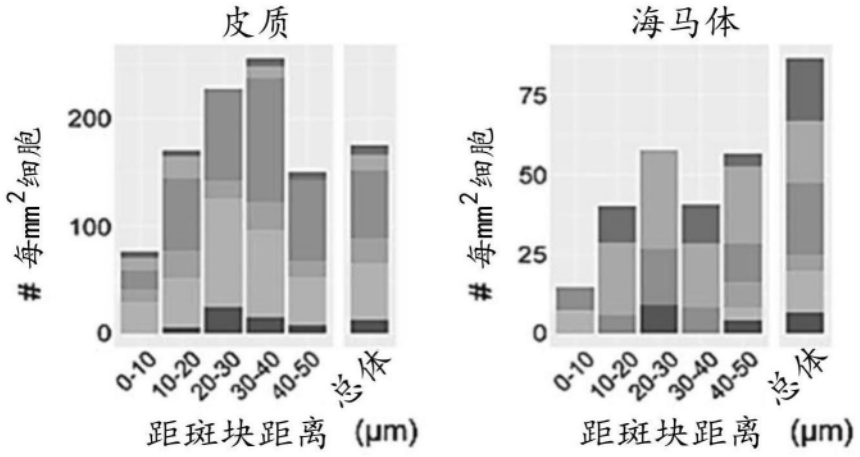

皮质
海马体
每mm² 细胞
200
100
0
75
50
25
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
总体
距斑块距离 (μm)

图6R

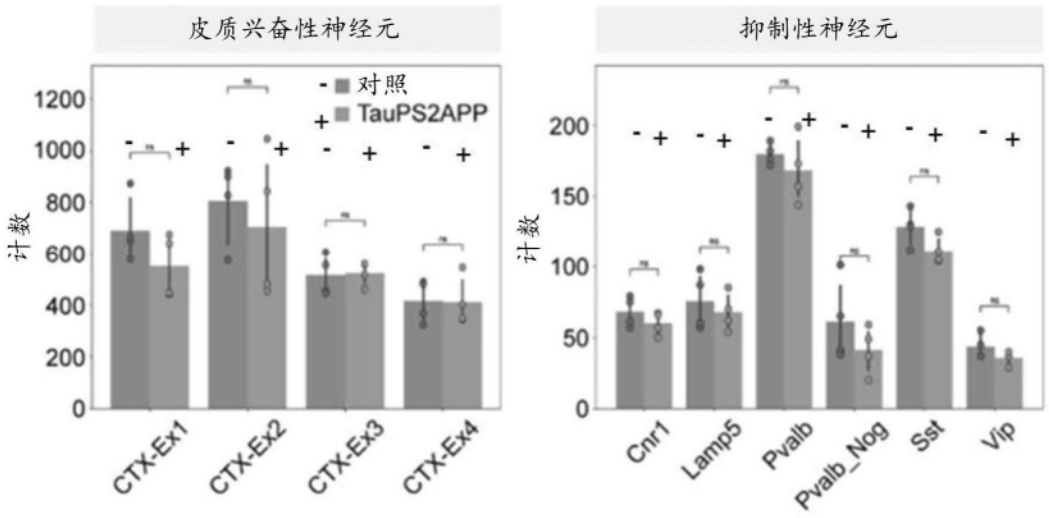

皮质兴奋性神经元
抑制性神经元
对照
TauPS2APP
计数
1200
1000
800
600
400
200
0
200
150
100
50
0
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
Cnr1
Lamp5
Pvalb
Pvalb_Nog
Sst
Vip

图6S

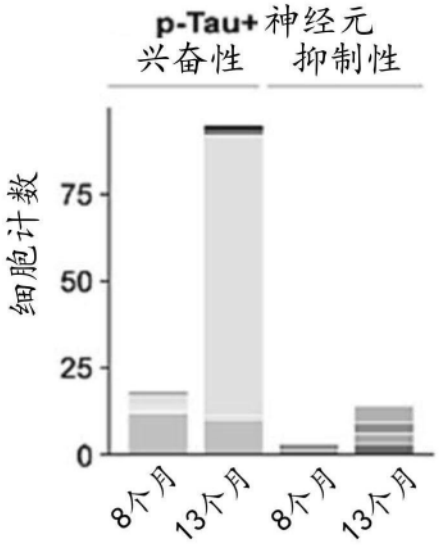

p-Tau+神经元
兴奋性
抑制性
细胞计数
75
50
25
0
8个月
13个月
8个月
13个月

图6T

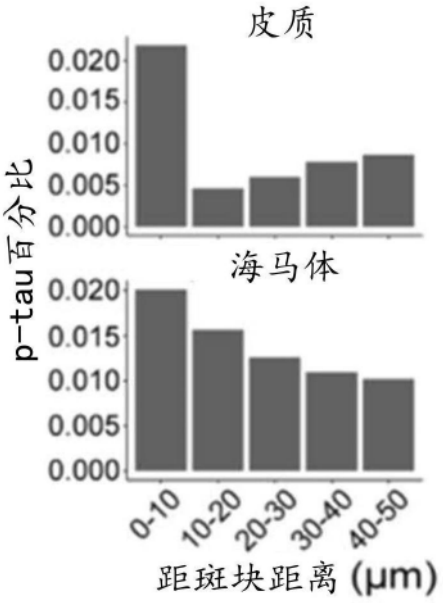

皮质
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
p-tau百分比
海马体
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
距斑块距离 (μm)

图6U

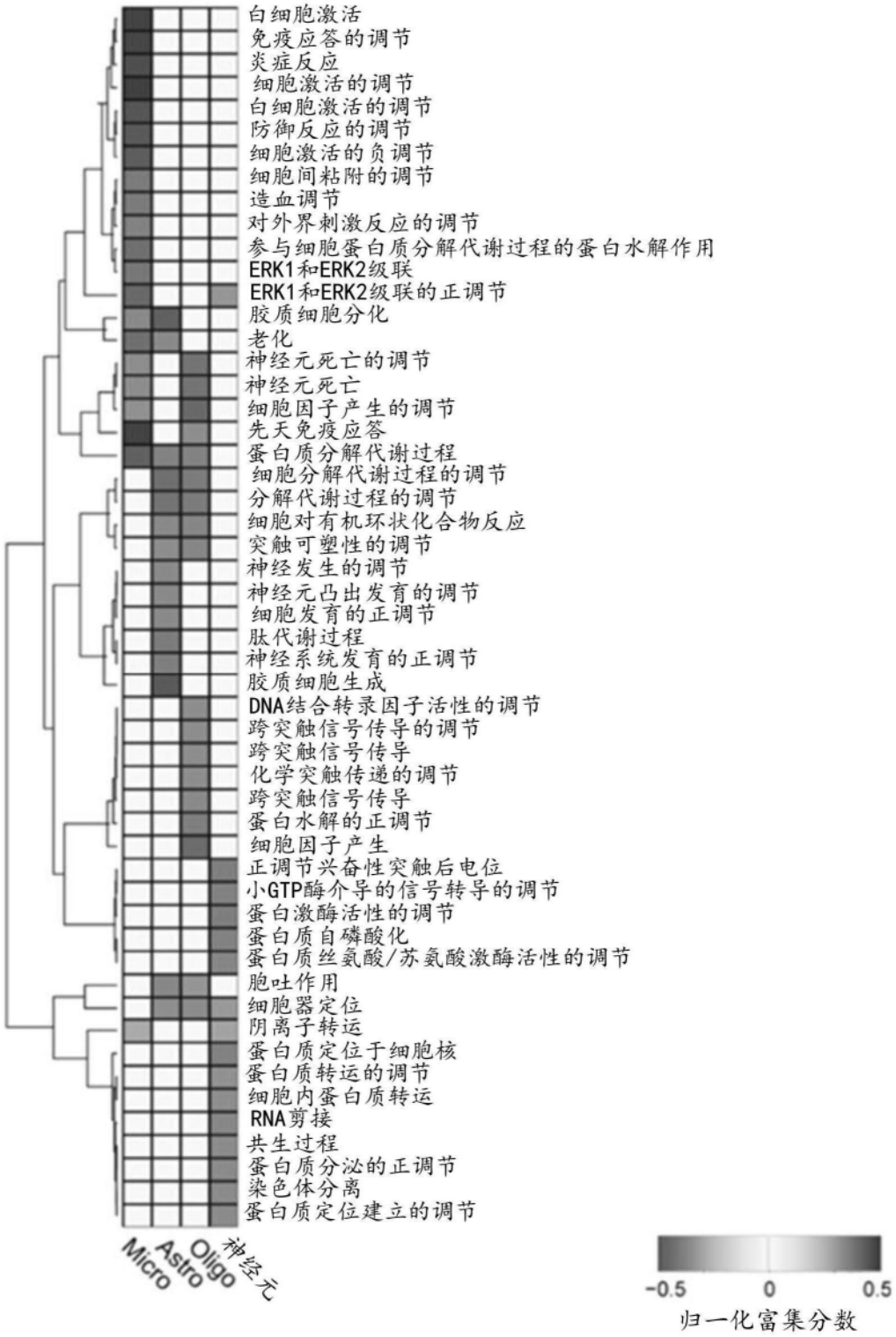

白细胞激活
免疫应答的调节
炎症反应
细胞激活的调节
白细胞激活的调节
防御反应的调节
细胞激活的负调节
细胞间粘附的调节
造血调节
对外界刺激反应的调节
参与细胞蛋白质分解代谢过程的蛋白水解作用
ERK1和ERK2级联
ERK1和ERK2级联的正调节
胶质细胞分化
老化
神经元死亡的调节
神经元死亡
细胞因子产生的调节
先天免疫应答
蛋白质分解代谢过程
细胞分解代谢过程的调节
分解代谢过程的调节
细胞对有机环状化合物反应
突触可塑性的调节
神经发生的调节
神经元凸出发育的调节
细胞发育的正调节
肽代谢过程
神经系统发育的正调节
胶质细胞生成
DNA结合转录因子活性的调节
跨突触信号传导的调节
跨突触信号传导
化学突触传递的调节
跨突触信号传导
蛋白水解的正调节
细胞因子产生
正调节兴奋性突触后电位
小GTP酶介导的信号转导的调节
蛋白激酶活性的调节
蛋白质自磷酸化
蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节
胞吐作用
细胞器定位
阴离子转运
蛋白质定位于细胞核
蛋白质转运的调节
细胞内蛋白质转运
RNA剪接
共生过程
蛋白质分泌的正调节
染色体分离
蛋白质定位建立的调节
Micro
Astro
Oligo
神经元
-0.5
0
0.5
归一化富集分数

图7A

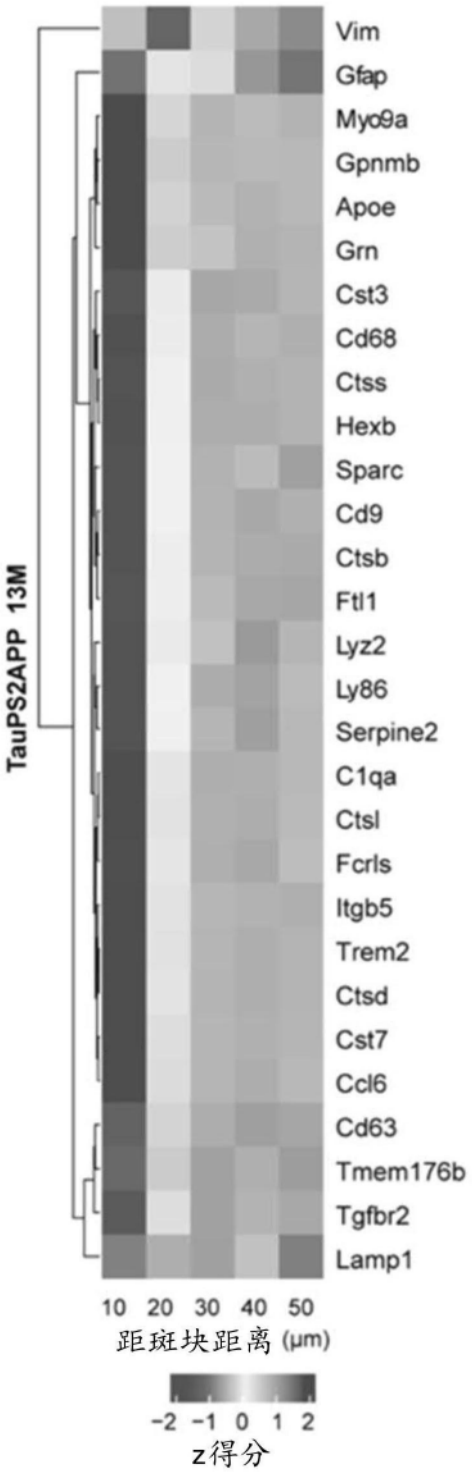

Vim
Gfap
Myo9a
Gpnmb
Apoe
Grn
Cst3
Cd68
Ctss
Hexb
Sparc
Cd9
Ctsb
Ftl1
Lyz2
Ly86
Serpine2
C1qa
Ctsl
Fcrls
Itgb5
Trem2
Ctsd
Cst7
Ccl6
Cd63
Tmem176b
Tgfbr2
Lamp1
TauPS2APP 13M
10 20 30 40 50
距斑块距离 (μm)
-2 -1 0 1 2
z得分

图7B

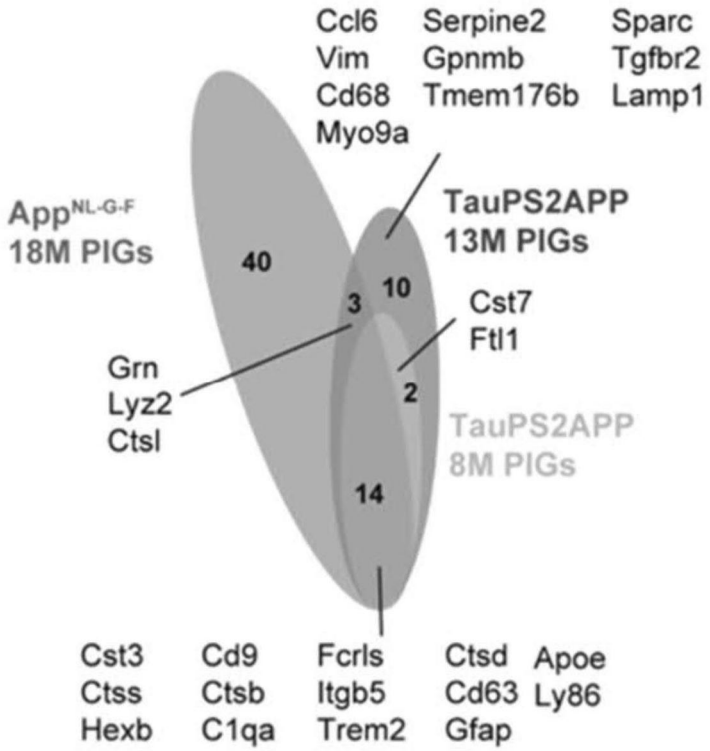

Ccl6 Serpine2 Sparc
Vim Gpnmb Tgfbr2
Cd68 Tmem176b Lamp1
Myo9a
App^NL-G-F
18M PIGs
40
TauPS2APP
13M PIGs
3
10
Cst7
Ftl1
Grn
Lyz2
Ctsl
2
TauPS2APP
8M PIGs
14
Cst3 Cd9 Fcrls Ctsd Apoe
Ctss Ctsb Itgb5 Cd63 Ly86
Hexb C1qa Trem2 Gfap

图7C

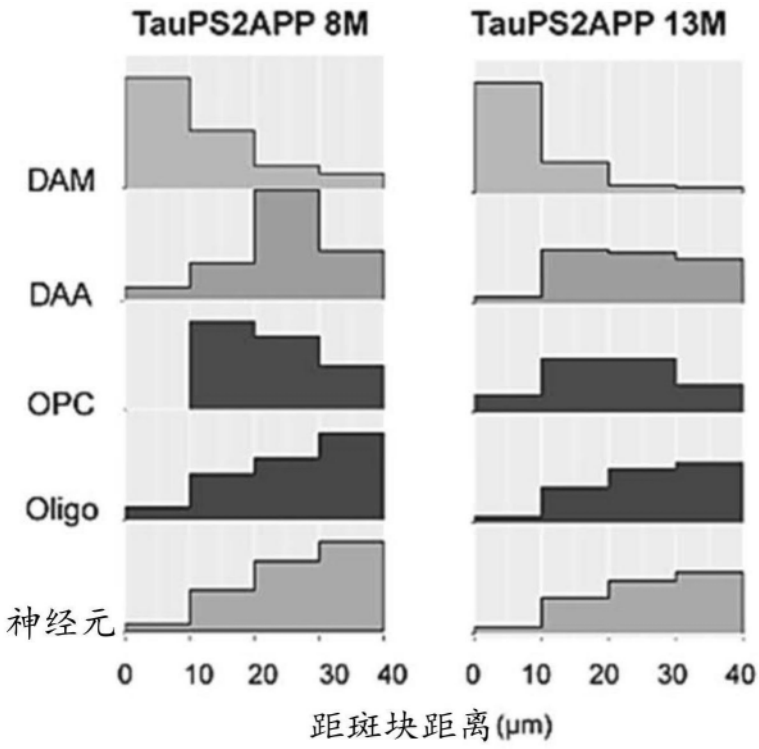

TauPS2APP 8M
TauPS2APP 13M
DAM
DAA
OPC
Oligo
神经元
0 10 20 30 40
0 10 20 30 40
距斑块距离(μm)

图7D

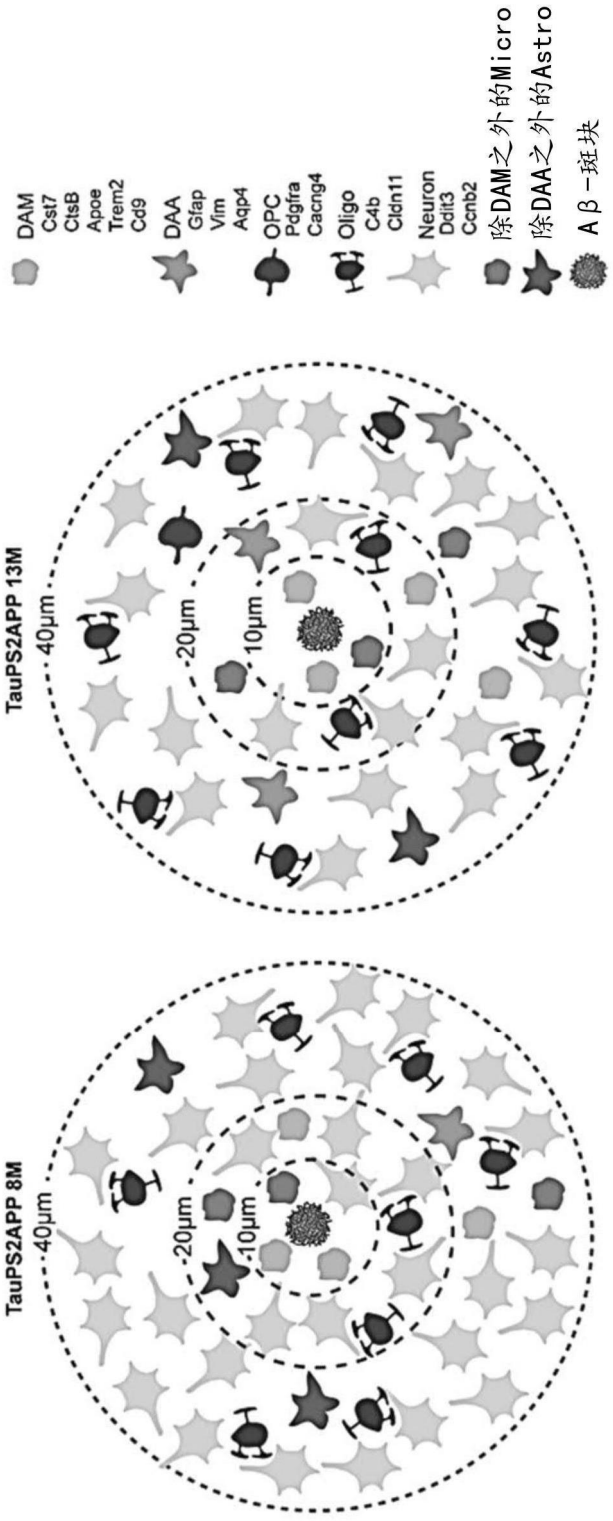

DAM
Cst7
CtsB
Apoe
Trem2
Cd9
DAA
Gfap
Vim
Aqp4
OPC
Pdgfra
Cacng4
Oligo
C4b
Cldn11
Neuron
Ddit3
Ccnb2
除DAM之外的Micro
除DAA之外的Astro
Aβ-斑块
TauPS2APP 13M
40μm
20μm
10μm
TauPS2APP 8M
40μm
20μm
10μm

图7E

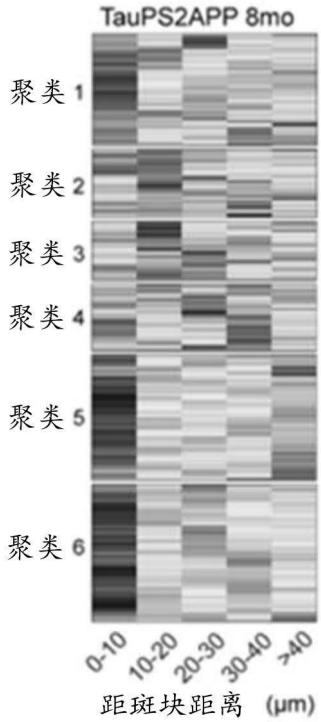

TauPS2APP 8mo
聚类 1
聚类 2
聚类 3
聚类 4
聚类 5
聚类 6
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
距斑块距离 (μm)

图7F

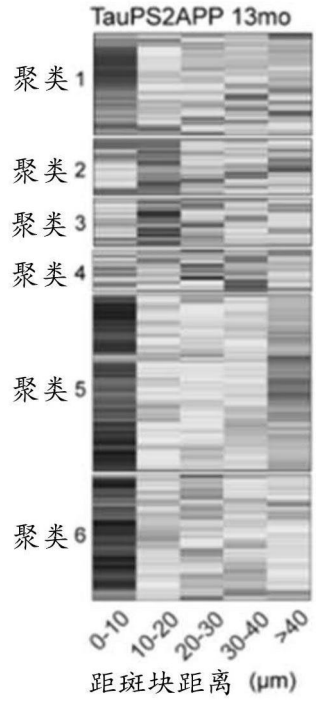

TauPS2APP 13mo
聚类 1
聚类 2
聚类 3
聚类 4
聚类 5
聚类 6
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
距斑块距离 (μm)

图7G

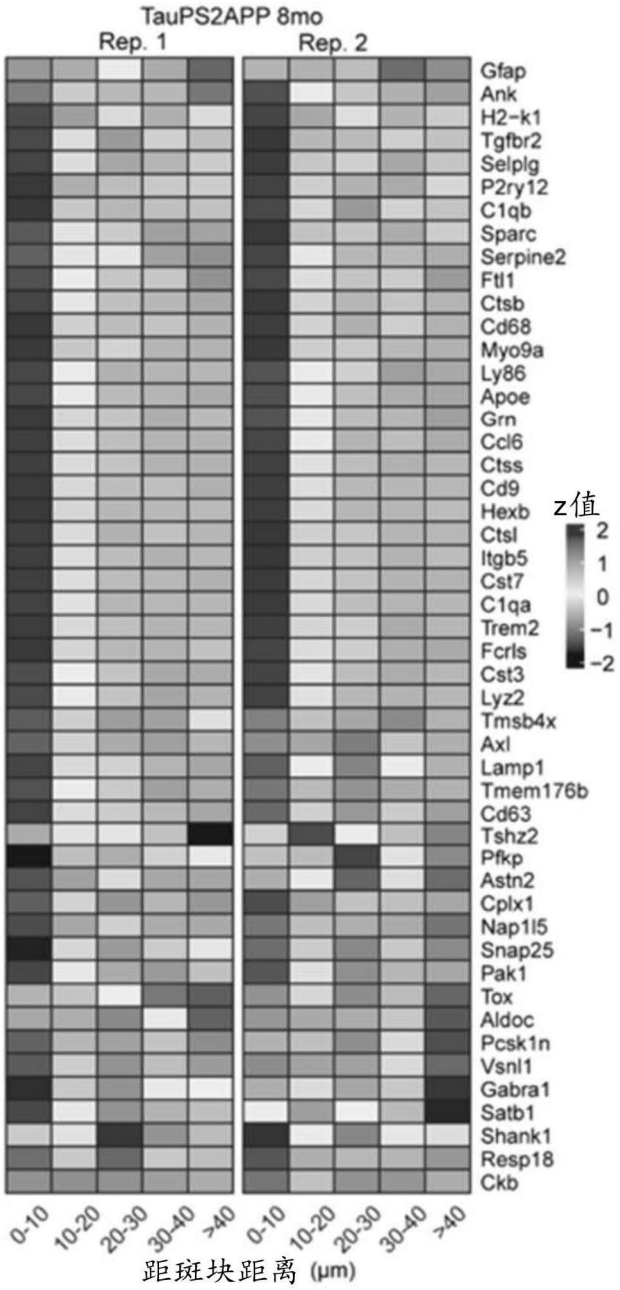

TauPS2APP 8mo
Rep. 1
Rep. 2
Gfap
Ank
H2-k1
Tgfbr2
Selplg
P2ry12
C1qb
Sparc
Serpine2
Ftl1
Ctsb
Cd68
Myo9a
Ly86
Apoe
Grn
Ccl6
Ctss
Cd9
Hexb
Ctsl
Itgb5
Cst7
C1qa
Trem2
Fcrls
Cst3
Lyz2
Tmsb4x
Axl
Lamp1
Tmem176b
Cd63
Tshz2
Pfkp
Astn2
Cplx1
Nap1l5
Snap25
Pak1
Tox
Aldoc
Pcsk1n
Vsnl1
Gabra1
Satb1
Shank1
Resp18
Ckb
z值
2
1
0
−1
−2
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
距斑块距离 (μm)

图7H

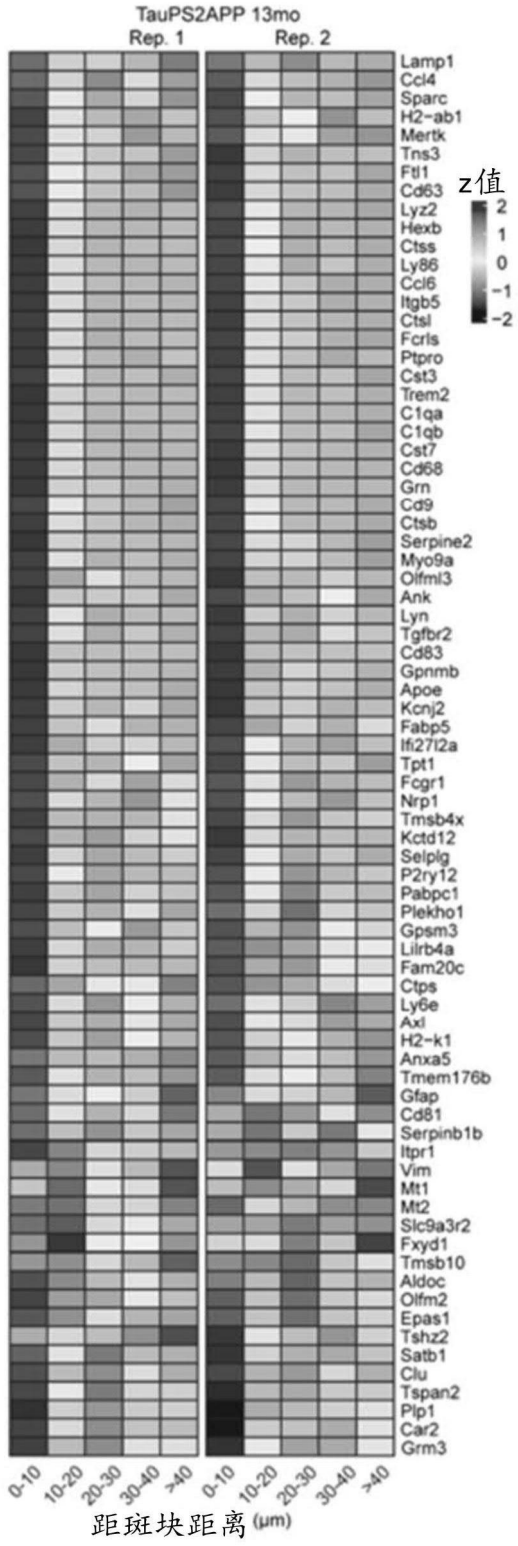

TauPS2APP 13mo
Rep. 1
Rep. 2
z值
2
1
0
−1
−2
Lamp1
Ccl4
Sparc
H2-ab1
Mertk
Tns3
Ftl1
Cd63
Lyz2
Hexb
Ctss
Ly86
Ccl6
Itgb5
Ctsl
Fcrls
Ptpro
Cst3
Trem2
C1qa
C1qb
Cst7
Cd68
Grn
Cd9
Ctsb
Serpine2
Myo9a
Olfml3
Ank
Lyn
Tgfbr2
Cd83
Gpnmb
Apoe
Kcnj2
Fabp5
Ifi27l2a
Tpt1
Fcgr1
Nrp1
Tmsb4x
Kctd12
Selplg
P2ry12
Pabpc1
Plekho1
Gpsm3
Lilrb4a
Fam20c
Ctps
Ly6e
Axl
H2-k1
Anxa5
Tmem176b
Gfap
Cd81
Serpinb1b
Itpr1
Vim
Mt1
Mt2
Slc9a3r2
Fxyd1
Tmsb10
Aldoc
Olfm2
Epas1
Tshz2
Satb1
Clu
Tspan2
Plp1
Car2
Grm3
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
距斑块距离 (μm)

图7I

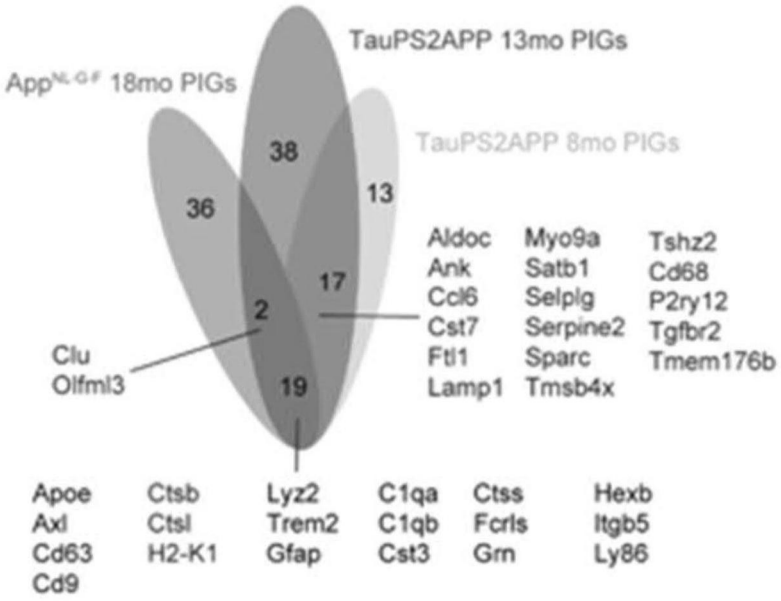

TauPS2APP 13mo PIGs
App^NL-G-F 18mo PIGs
TauPS2APP 8mo PIGs
38
36
13
17
2
19
Aldoc
Ank
Ccl6
Cst7
Ftl1
Lamp1
Myo9a
Satb1
Selplg
Serpine2
Sparc
Tmsb4x
Tshz2
Cd68
P2ry12
Tgfbr2
Tmem176b
Clu
Olfml3
Apoe
Axl
Cd63
Cd9
Ctsb
Ctsl
H2-K1
Lyz2
Trem2
Gfap
C1qa
C1qb
Cst3
Ctss
Fcrls
Grn
Hexb
Itgb5
Ly86

图7J

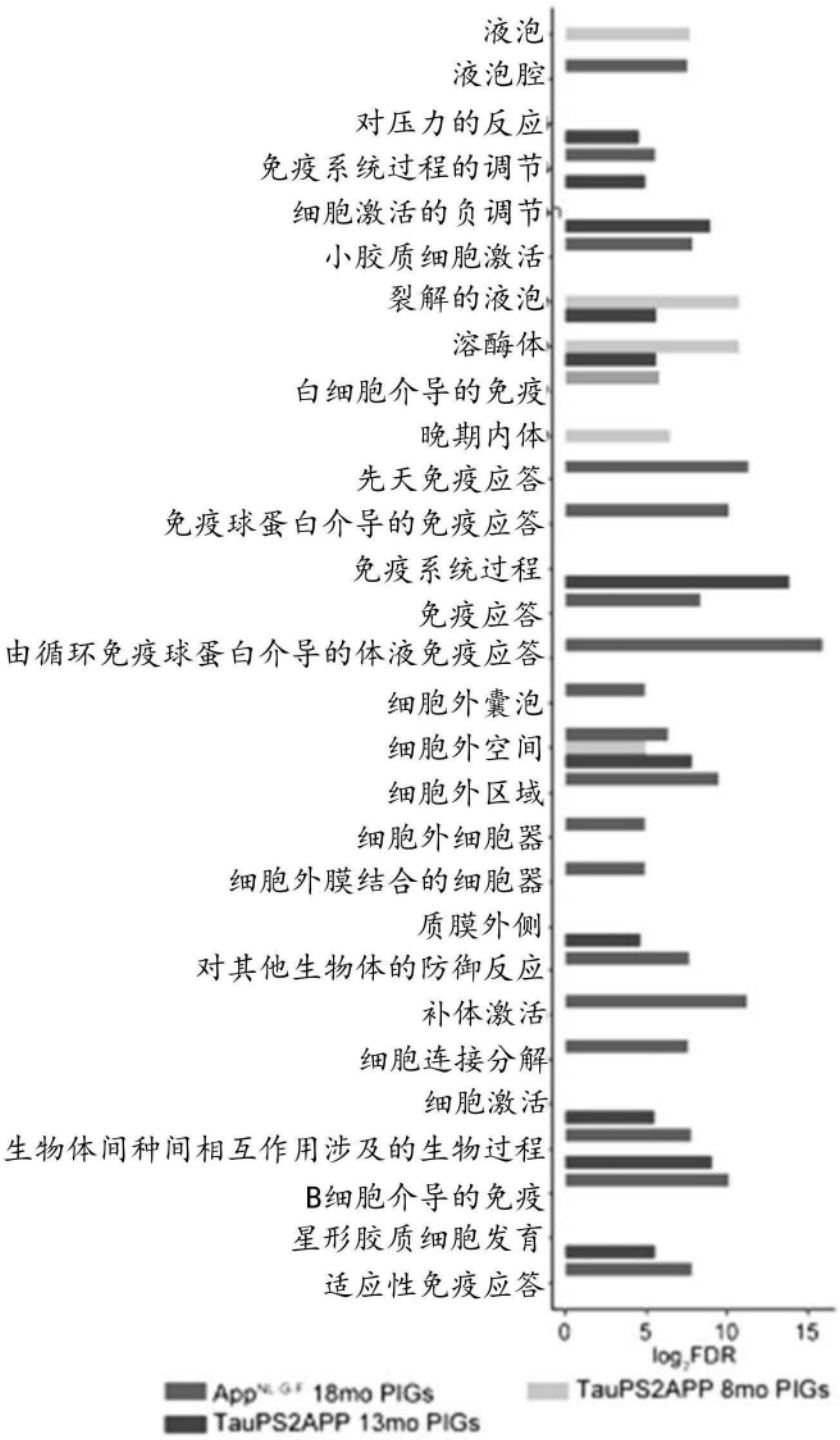

液泡
液泡腔
对压力的反应
免疫系统过程的调节
细胞激活的负调节
小胶质细胞激活
裂解的液泡
溶酶体
白细胞介导的免疫
晚期内体
先天免疫应答
免疫球蛋白介导的免疫应答
免疫系统过程
免疫应答
由循环免疫球蛋白介导的体液免疫应答
细胞外囊泡
细胞外空间
细胞外区域
细胞外细胞器
细胞外膜结合的细胞器
质膜外侧
对其他生物体的防御反应
补体激活
细胞连接分解
细胞激活
生物体间种间相互作用涉及的生物过程
B细胞介导的免疫
星形胶质细胞发育
适应性免疫应答
0
5
10
15
log2FDR
App 18mo PIGs
TauPS2APP 13mo PIGs
TauPS2APP 8mo PIGs

图7K

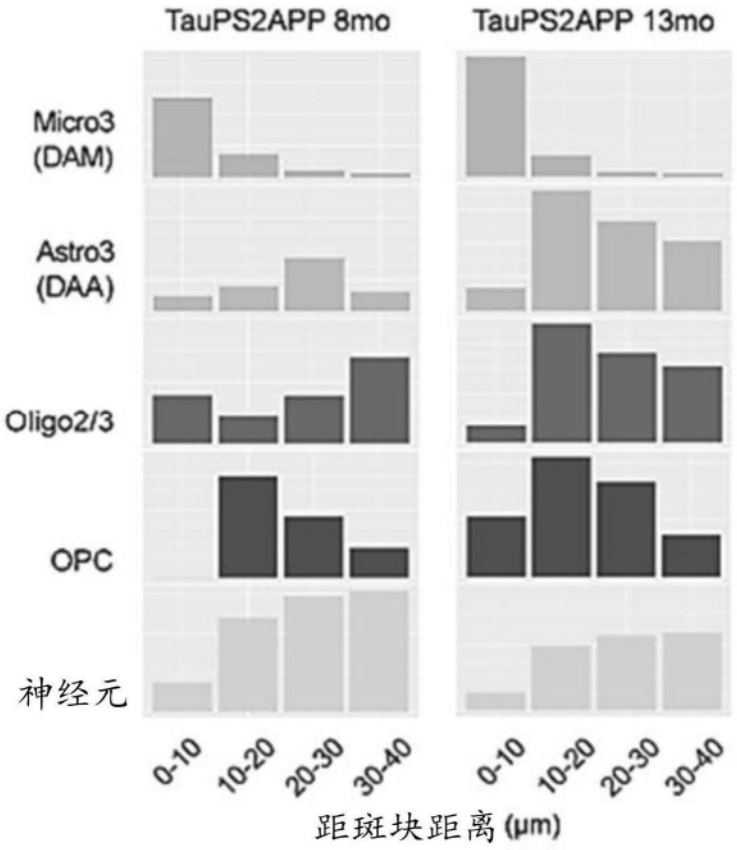

TauPS2APP 8mo
TauPS2APP 13mo
Micro3
(DAM)
Astro3
(DAA)
Oligo2/3
OPC
神经元
0-10
10-20
20-30
30-40
0-10
10-20
20-30
30-40
距斑块距离(μm)

图7L

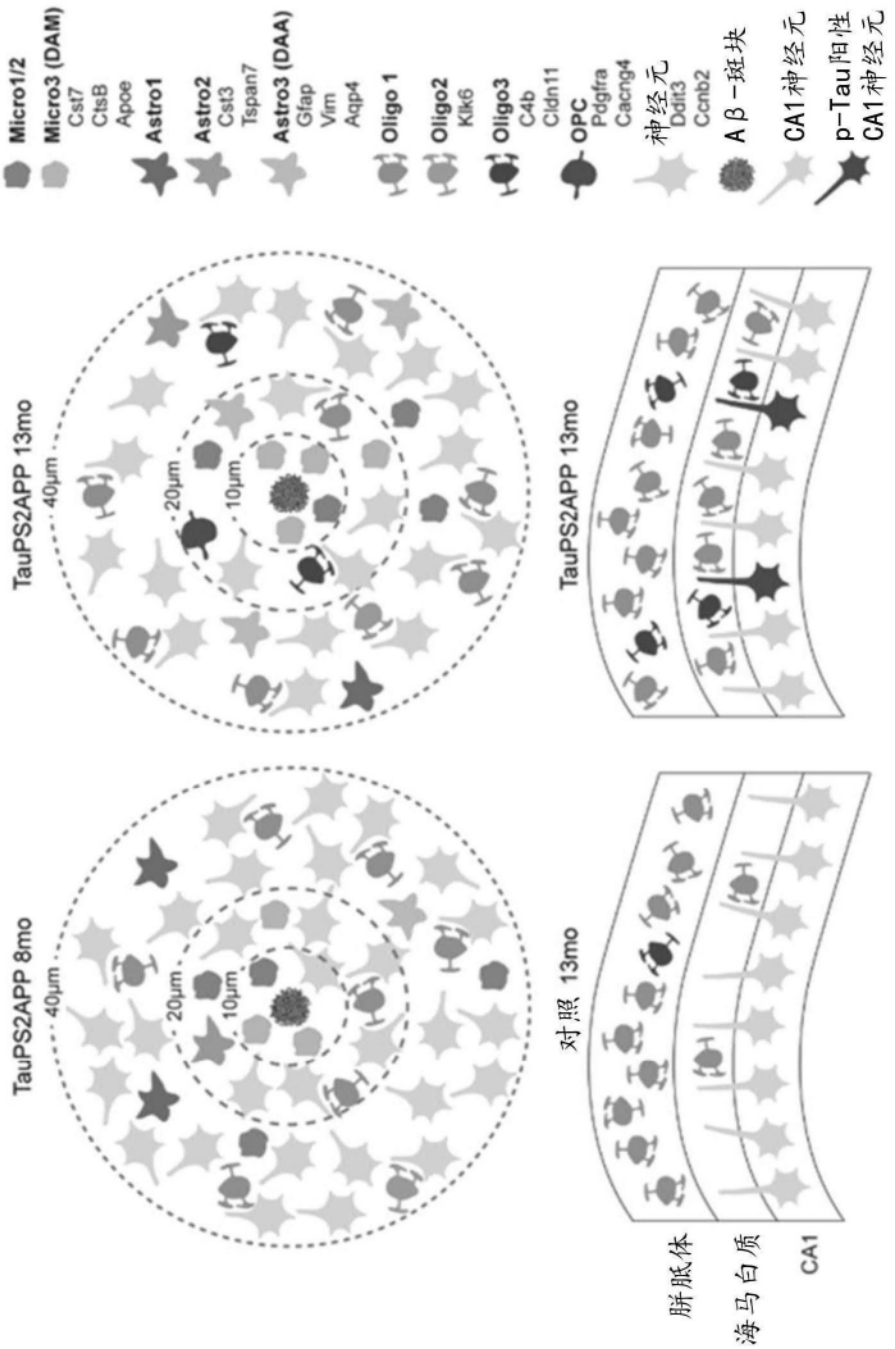

Micro1/2
Micro3 (DAM)
Cst7
CtsB
Apoe
Astro1
Astro2
Cst3
Tspan7
Astro3 (DAA)
Gfap
Vim
Aqp4
Oligo 1
Oligo2
Klk6
Oligo3
C4b
Cldn11
OPC
Pdgfra
Cacng4
神经元
Ddit3
Ccnb2
Aβ-斑块
CA1神经元
p-Tau阳性
CA1神经元
TauPS2APP 13mo
40μm
20μm
10μm
TauPS2APP 13mo
TauPS2APP 8mo
40μm
20μm
10μm
对照 13mo
胼胝体
海马白质
CA1

图7M

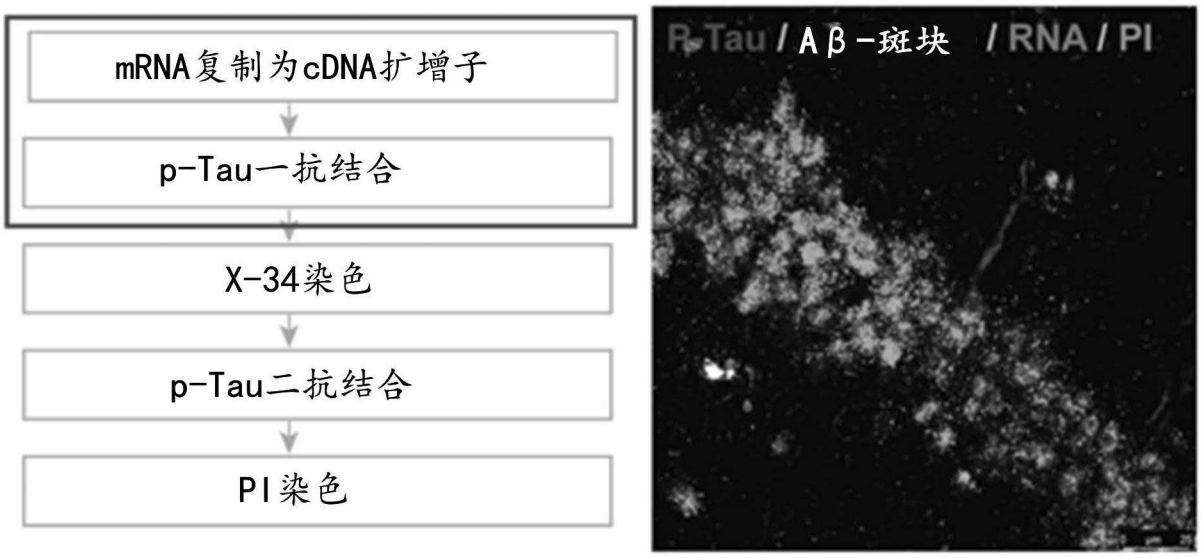

mRNA复制为cDNA扩增子
p-Tau一抗结合
X-34染色
p-Tau二抗结合
PI染色
P-Tau / Aβ-斑块 / RNA / PI

图8A

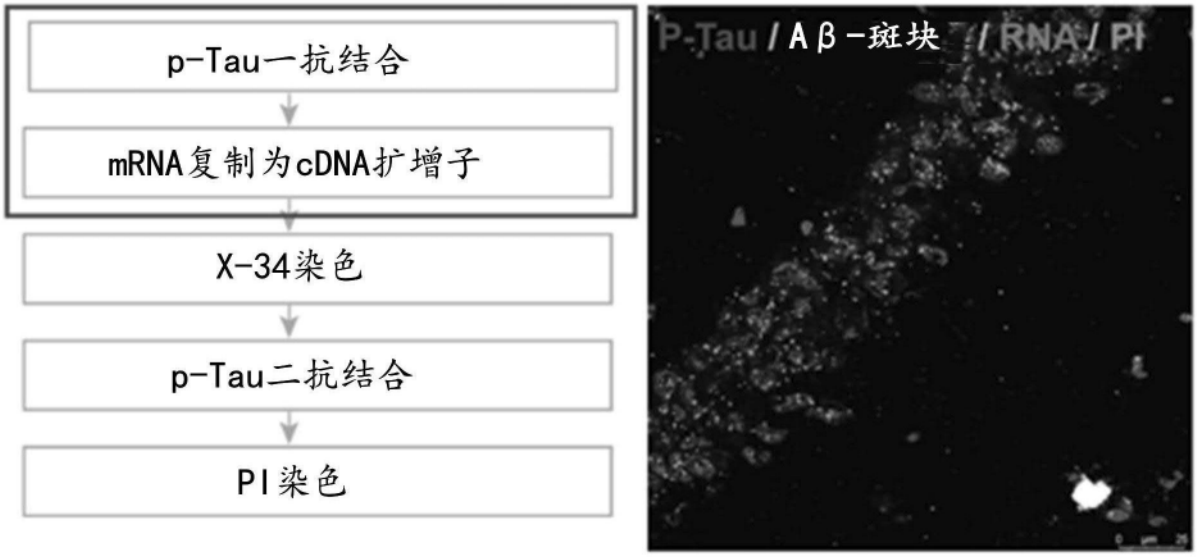

p-Tau一抗结合
mRNA复制为cDNA扩增子
X-34染色
p-Tau二抗结合
PI染色
P-Tau / Aβ-斑块 / RNA / PI

图8B

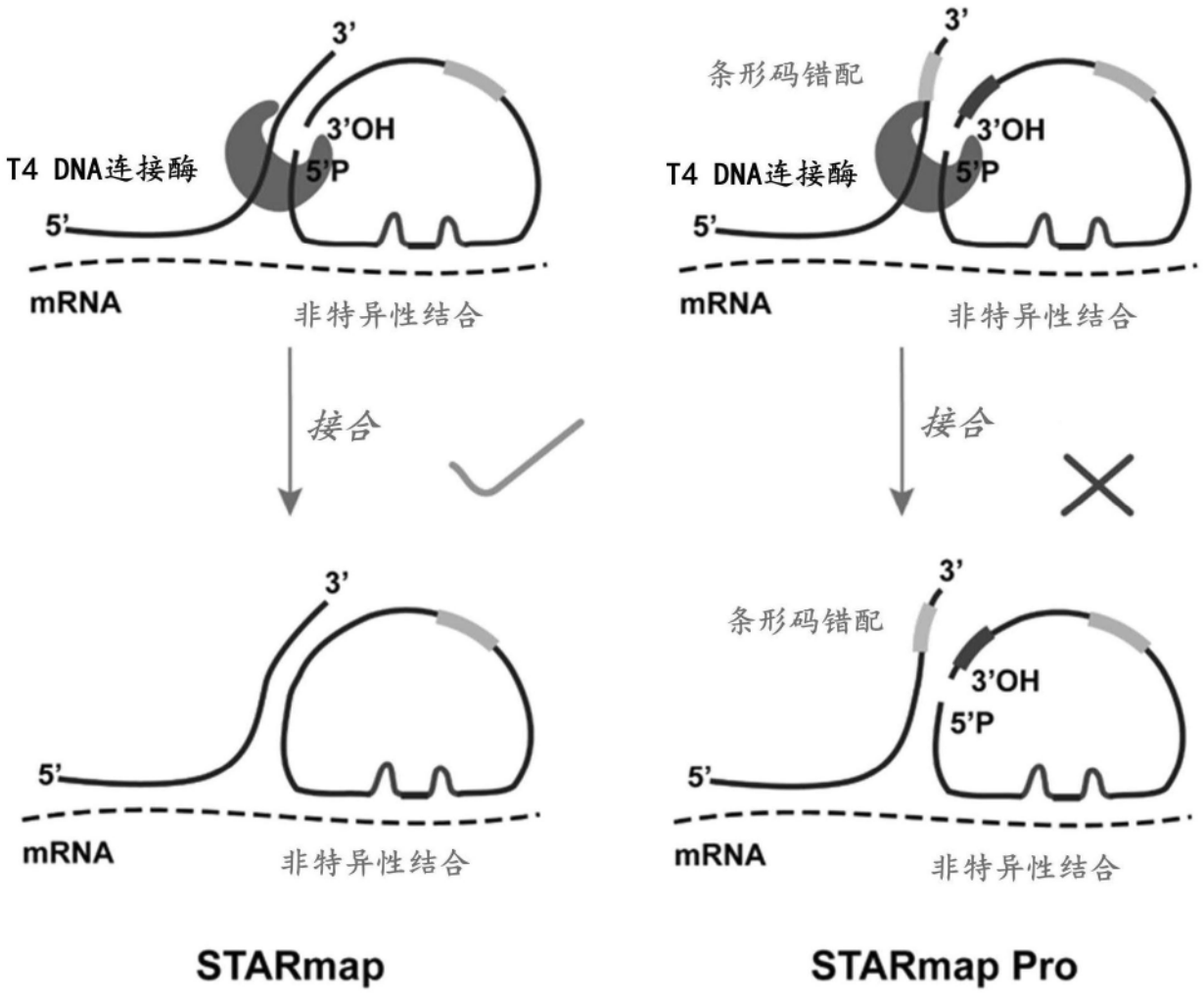


图8C

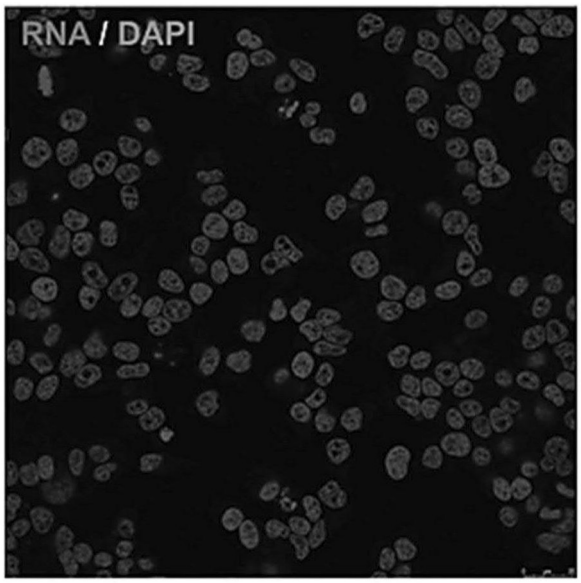


图8D

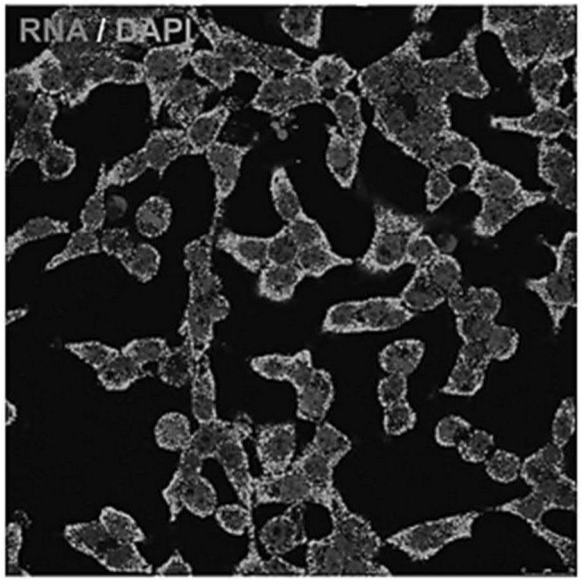


图8E

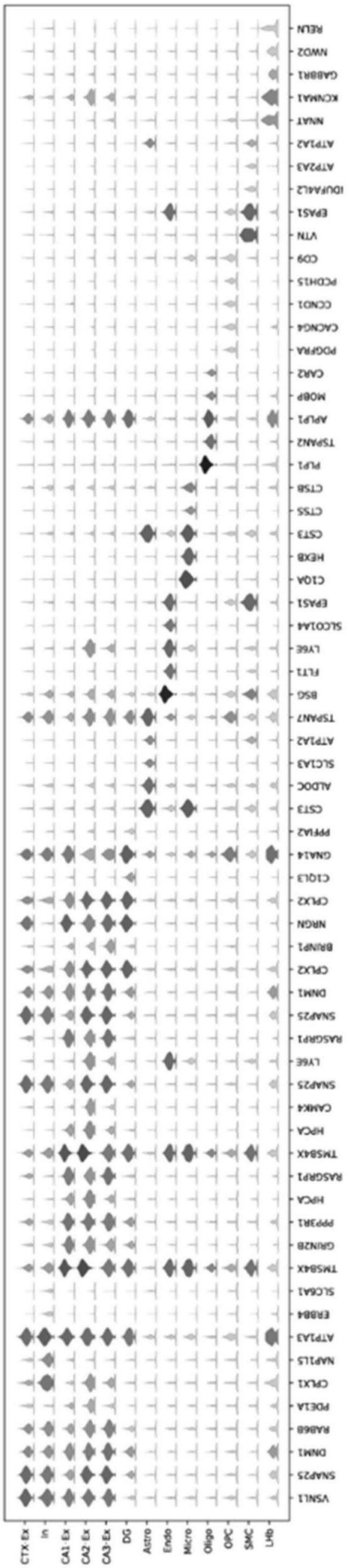

RELN
NWD2
GABBR1
KCNMA1
NNAT
ATP1A2
ATP2A3
IQUPAL2
EPAS1
VTN
CD9
PCDH15
CCND1
CACNG4
PDGFRA
CAR2
MOBP
APLP1
TSPAN2
PLP1
CTSB
CTSS
CST3
HEXB
C1QA
EPAS1
SLCO1A4
LY6E
FLT1
BSG
TSPAN7
ATP1A2
SLC1A3
ALDOC
CST3
PPP1R2
GNA14
C1QL3
CPLX2
NRGN
BRINP1
CPLX2
DNM1
SNAP25
RASGRP1
LY6E
SNAP25
CAMK4
HPCA
TMSB4X
RASGRP1
HPCA
PPP3R1
GRIN2B
TMSB4X
SLC6A1
ERBB4
ATP1A3
NAP1L5
CPLX1
PDE1A
RAB6B
DNM1
SNAP25
VSNL1
CTX Ex
In
CA1 Ex
CA2 Ex
CA3 Ex
DG
Astro
Endo
Micro
Oligo
OPC
SMC
Unk

图9A

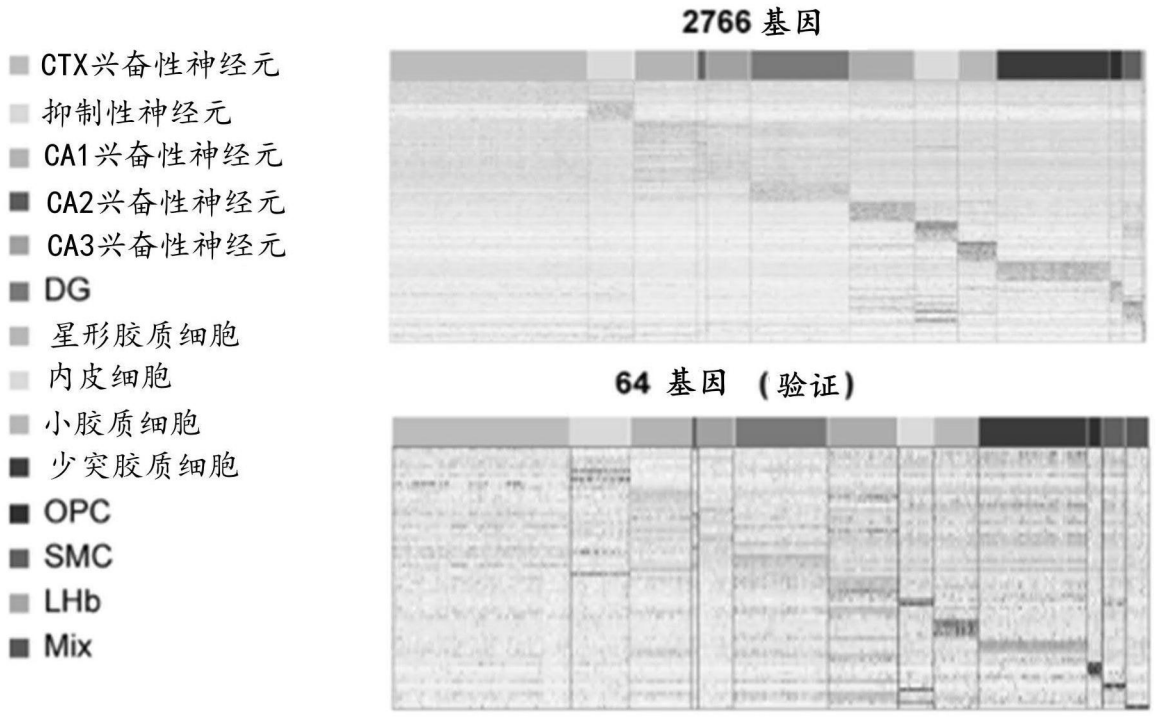

2766 基因
CTX兴奋性神经元
抑制性神经元
CA1兴奋性神经元
CA2兴奋性神经元
CA3兴奋性神经元
DG
星形胶质细胞
内皮细胞
小胶质细胞
少突胶质细胞
OPC
SMC
LHb
Mix
64 基因 (验证)

图9B

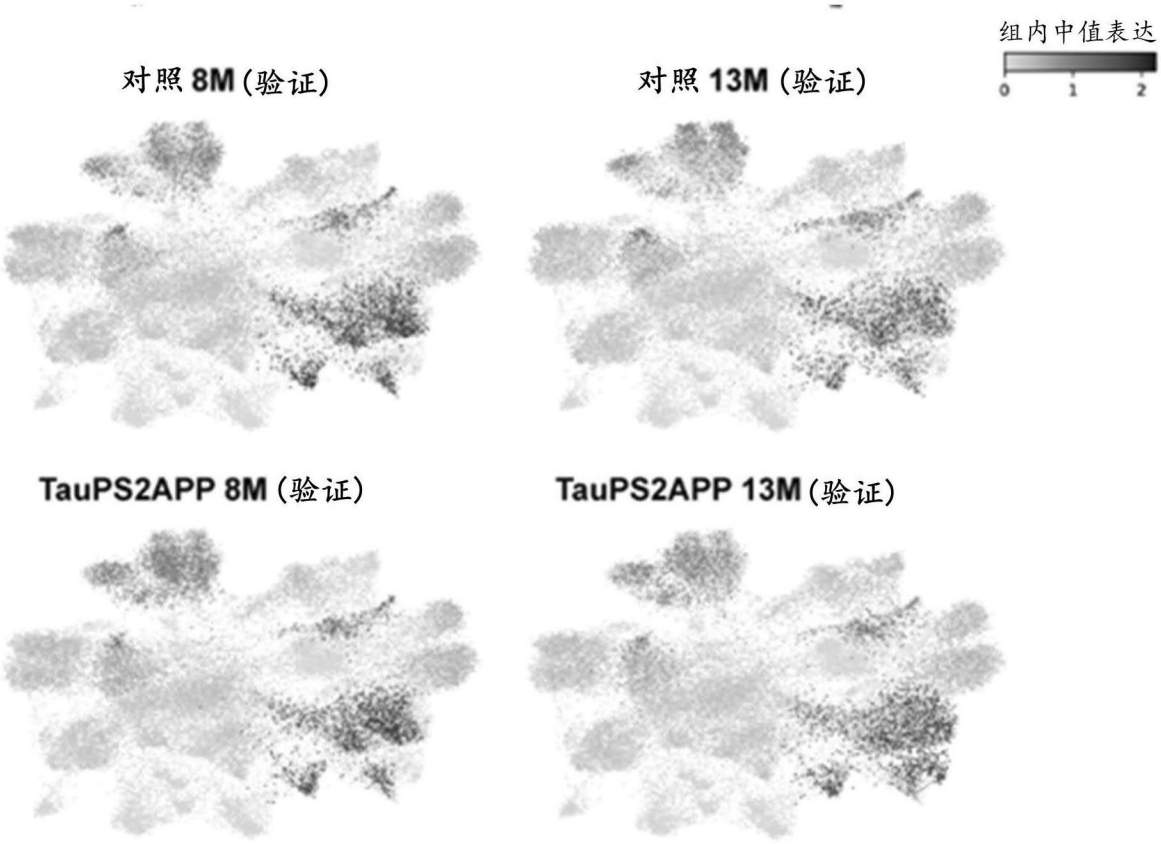

组内中值表达
0
1
2
对照 8M (验证)
对照 13M (验证)
TauPS2APP 8M (验证)
TauPS2APP 13M (验证)

图9C

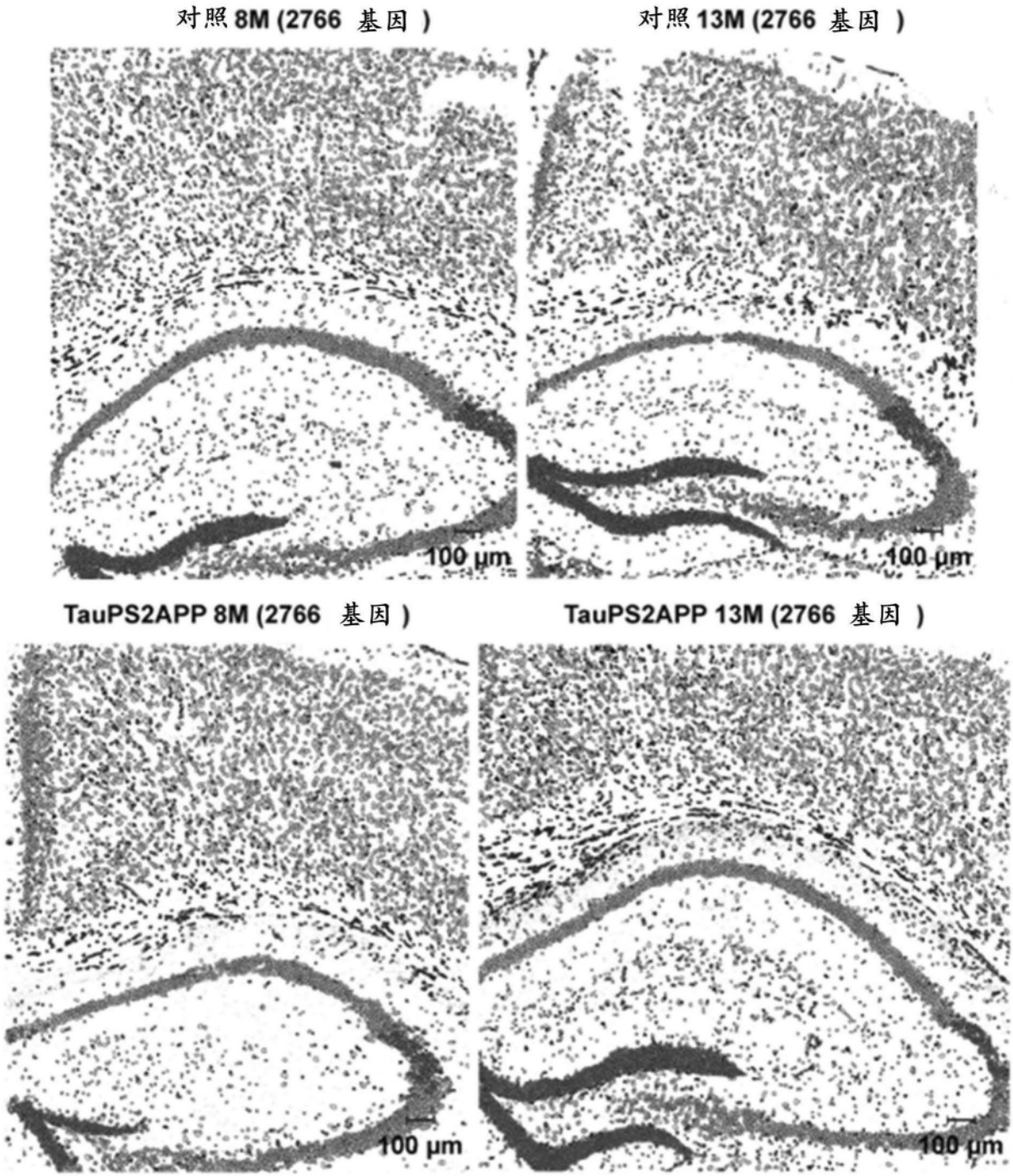

对照 8M (2766 基因)
对照 13M (2766 基因)
100 μm
100 μm
TauPS2APP 8M (2766 基因)
TauPS2APP 13M (2766 基因)
100 μm
100 μm

图9D

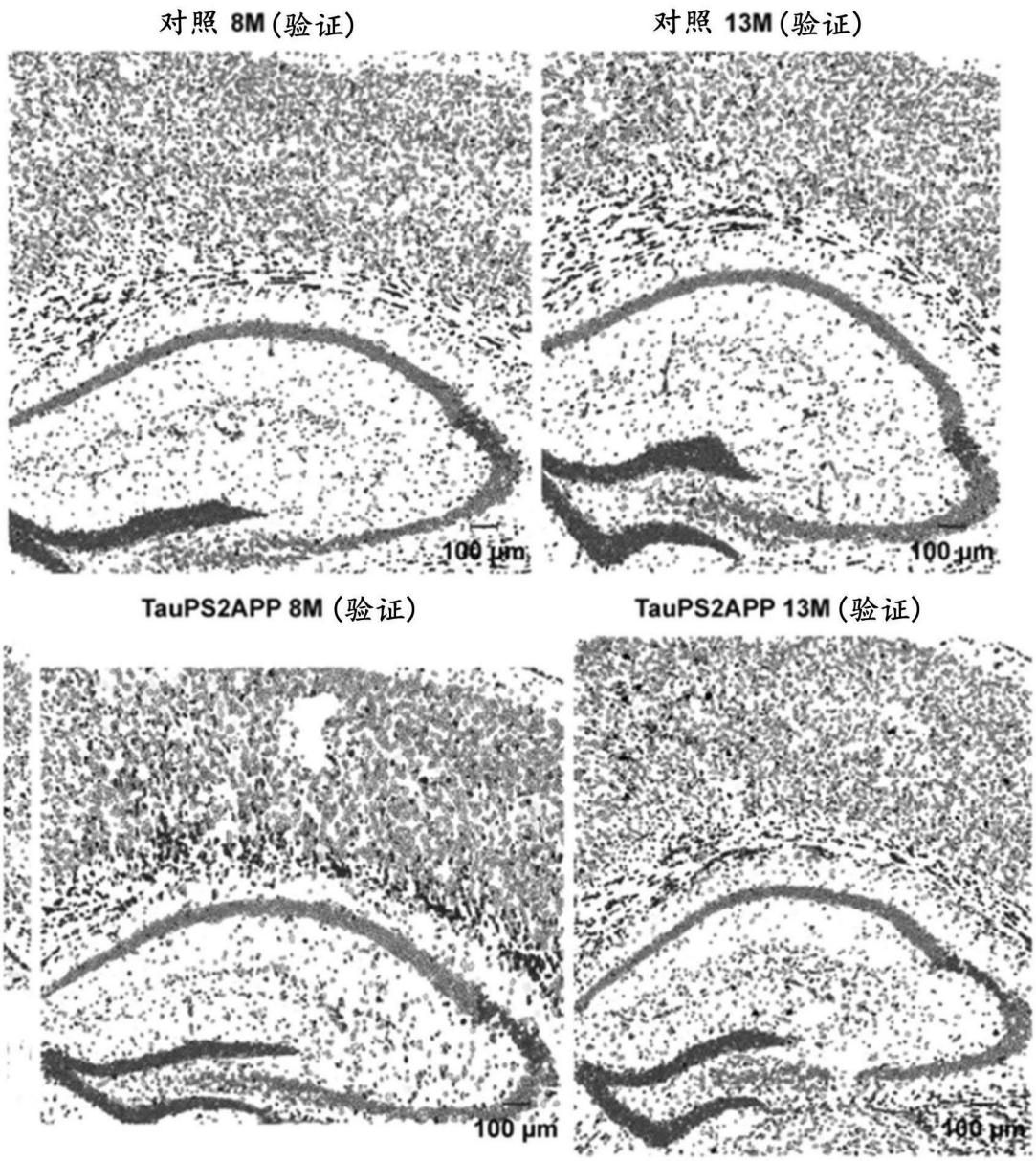

对照 8M (验证)
对照 13M (验证)
100 μm
100 μm
TauPS2APP 8M (验证)
TauPS2APP 13M (验证)
100 μm
100 μm

图9E

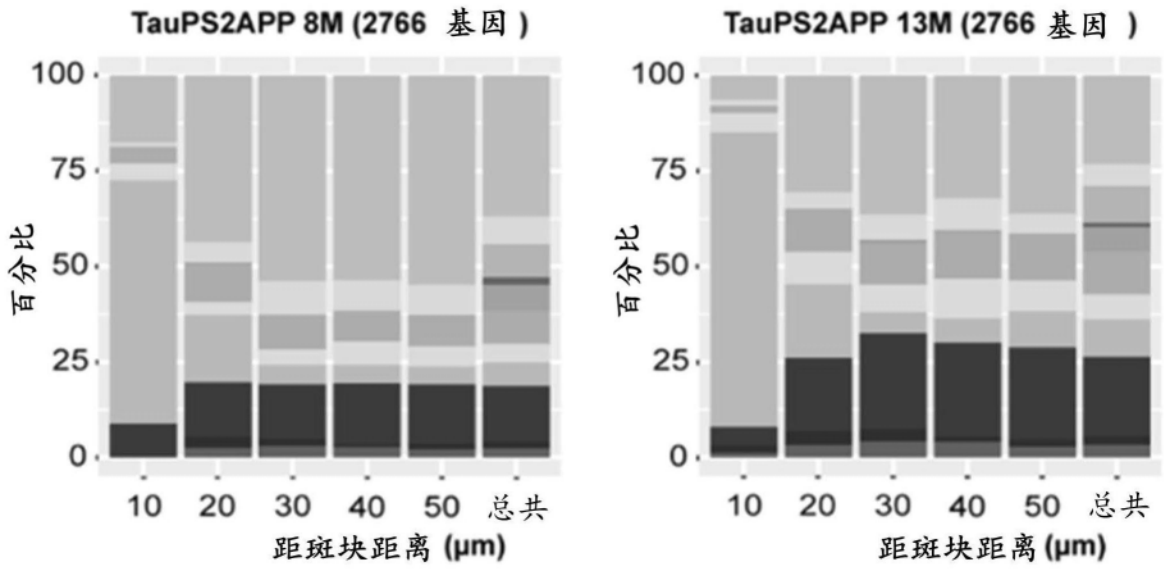

TauPS2APP 8M (2766 基因)
TauPS2APP 13M (2766 基因)
百分比
100
75
50
25
0
10
20
30
40
50
总共
距斑块距离 (μm)

图9F

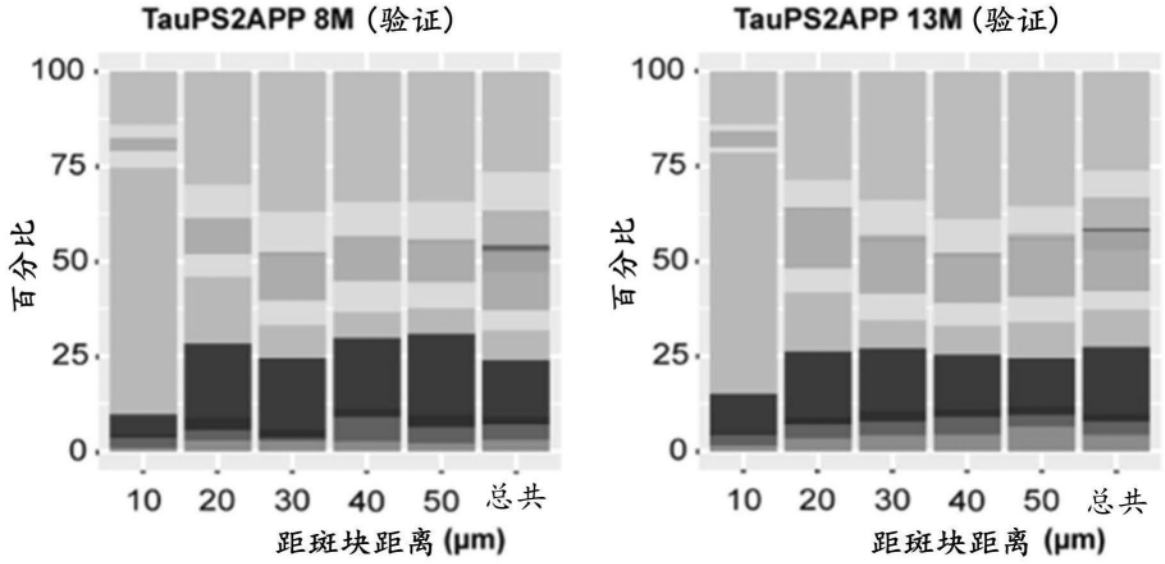

TauPS2APP 8M (验证)
TauPS2APP 13M (验证)
百分比
100
75
50
25
0
10
20
30
40
50
总共
距斑块距离 (μm)

图9G

小胶质细胞亚型空间图谱

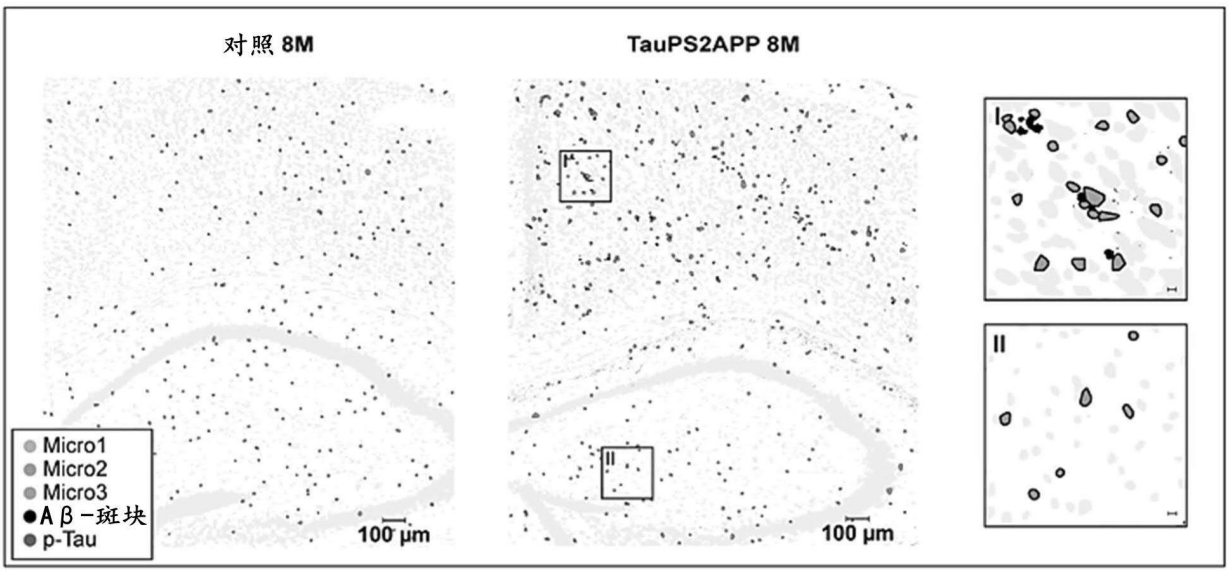


图10A

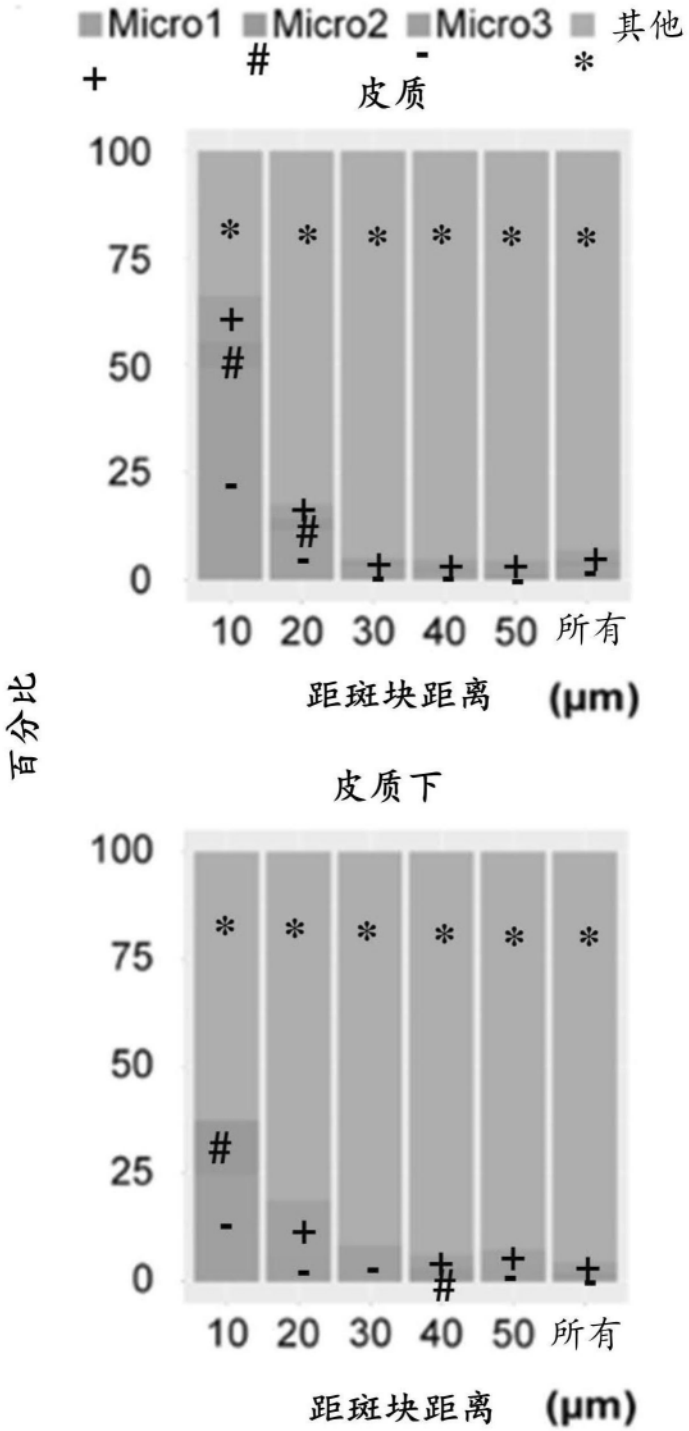

Micro1
Micro2
Micro3
其他
皮质
100
75
50
25
0
10
20
30
40
50
所有
距斑块距离 (μm)
百分比
皮质下
100
75
50
25
0
10
20
30
40
50
所有
距斑块距离 (μm)

图10B

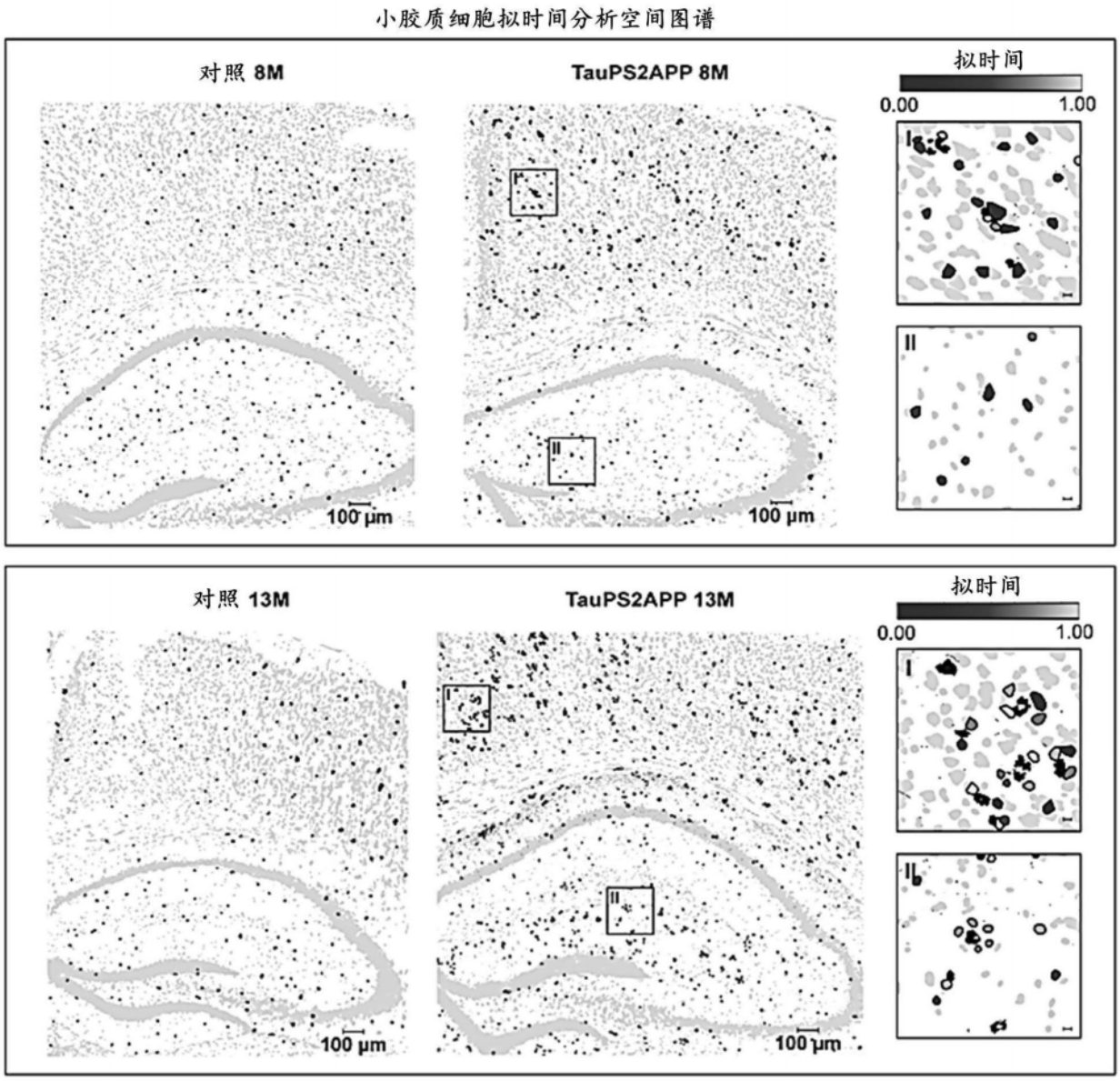

小胶质细胞拟时间分析空间图谱
对照 8M
TauPS2APP 8M
拟时间
0.00
1.00
100 μm
100 μm
对照 13M
TauPS2APP 13M
拟时间
0.00
1.00
100 μm
100 μm

图10C

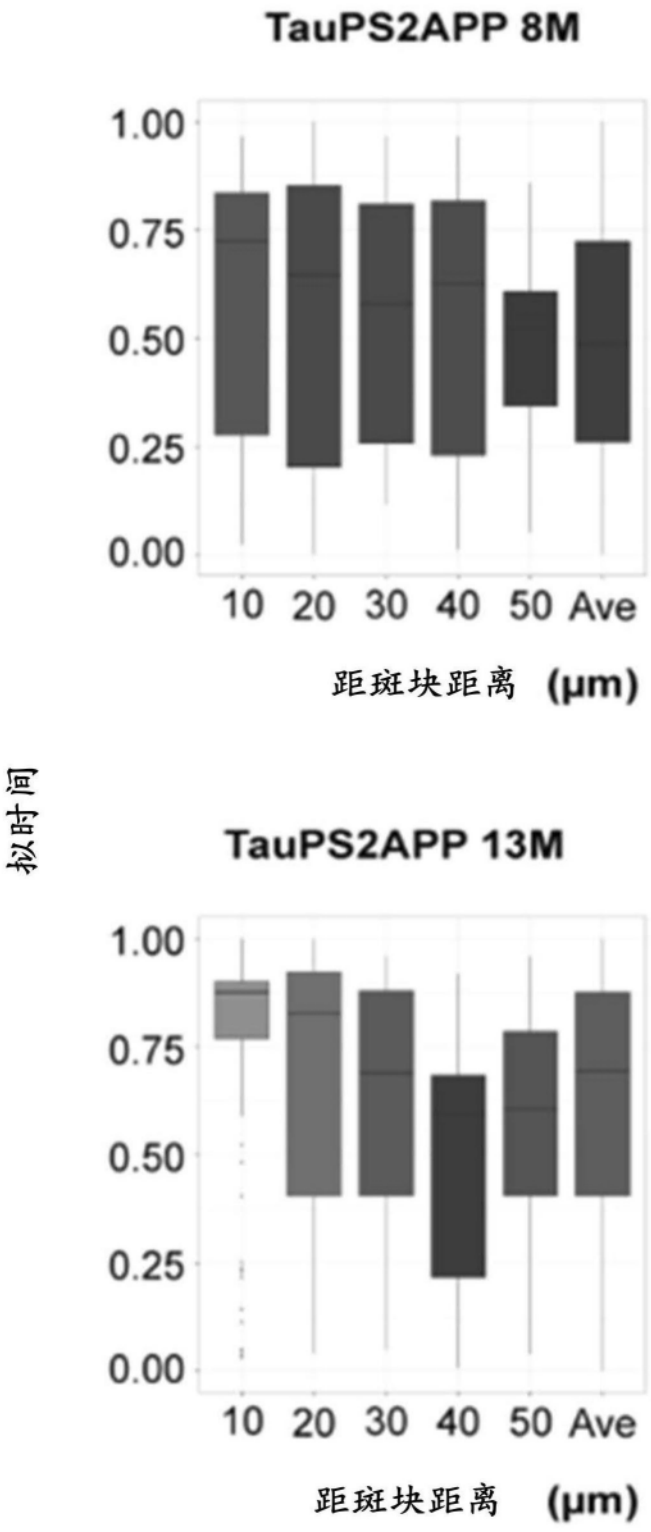

TauPS2APP 8M
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)
拟时间
TauPS2APP 13M
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)

图10D

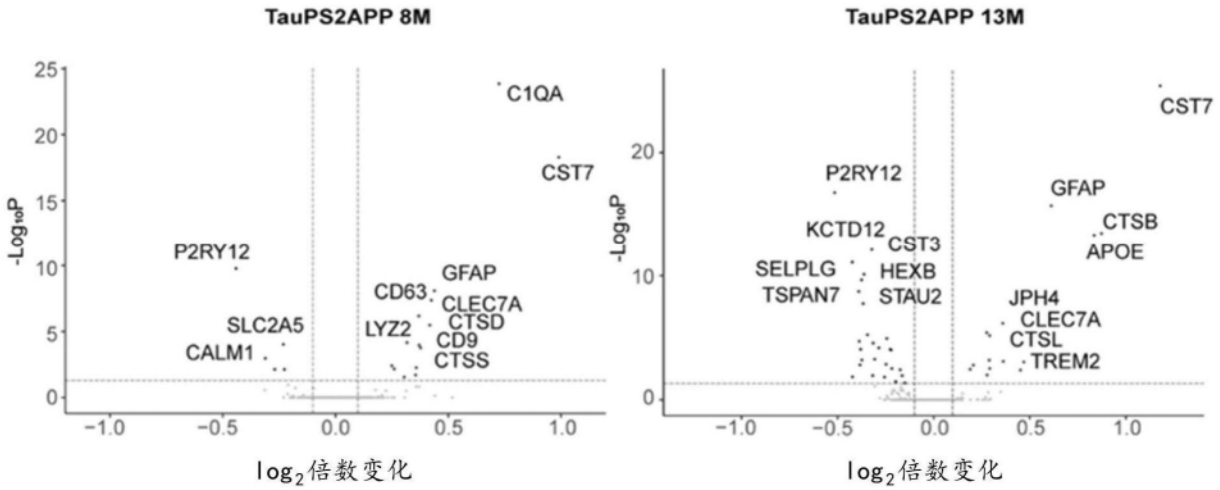

TauPS2APP 8M
TauPS2APP 13M
-Log10P
log2倍数变化
C1QA
CST7
P2RY12
GFAP
CD63
CLEC7A
CTSD
LYZ2
CD9
CTSS
SLC2A5
CALM1
KCTD12
CST3
SELPLG
HEXB
TSPAN7
STAU2
JPH4
CLEC7A
CTSL
TREM2
CTSB
APOE

图10E

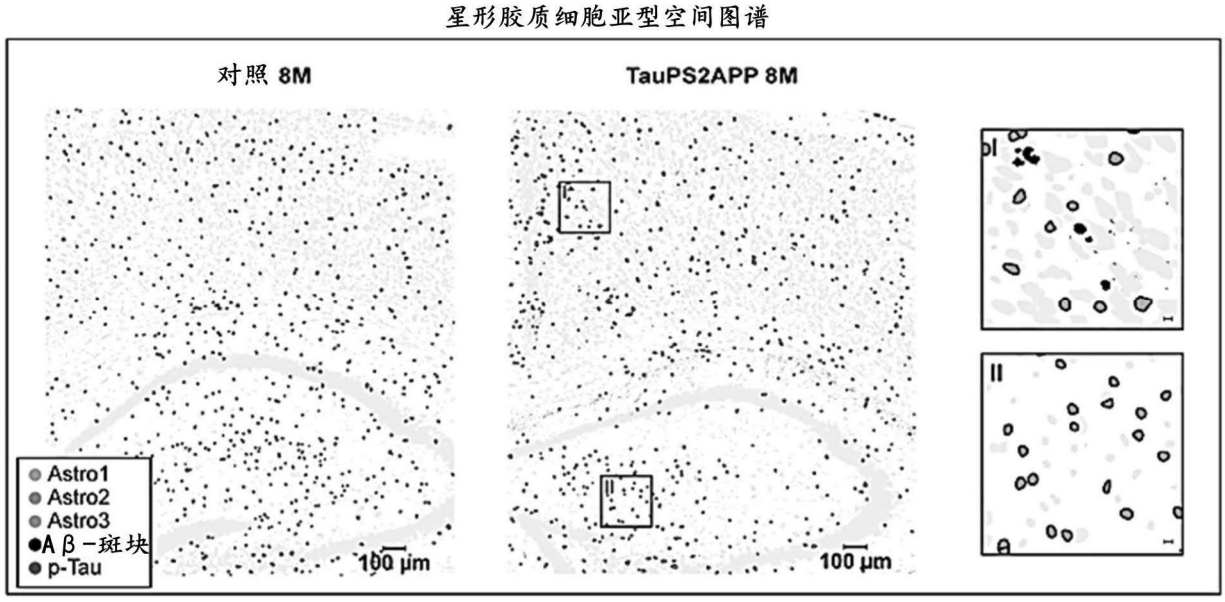

星形胶质细胞亚型空间图谱
对照 8M
TauPS2APP 8M
Astro1
Astro2
Astro3
Aβ-斑块
p-Tau
100 μm
100 μm
I
II

图11A

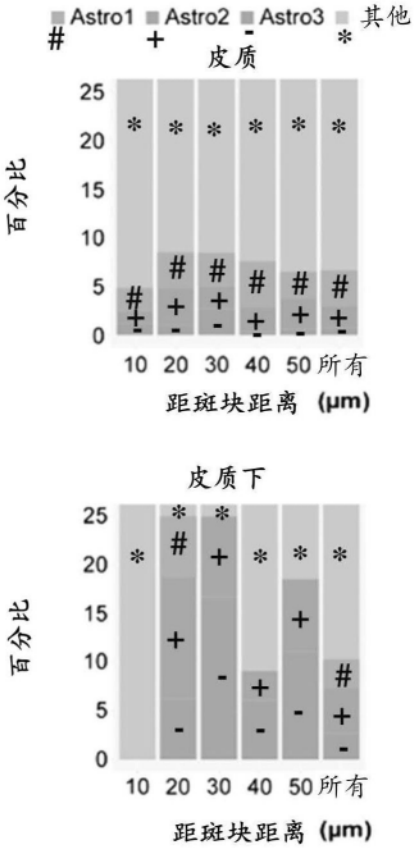

Astro1
Astro2
Astro3
其他
皮质
百分比
25
20
15
10
5
0
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
皮质下
百分比
25
20
15
10
5
0
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)

图11B

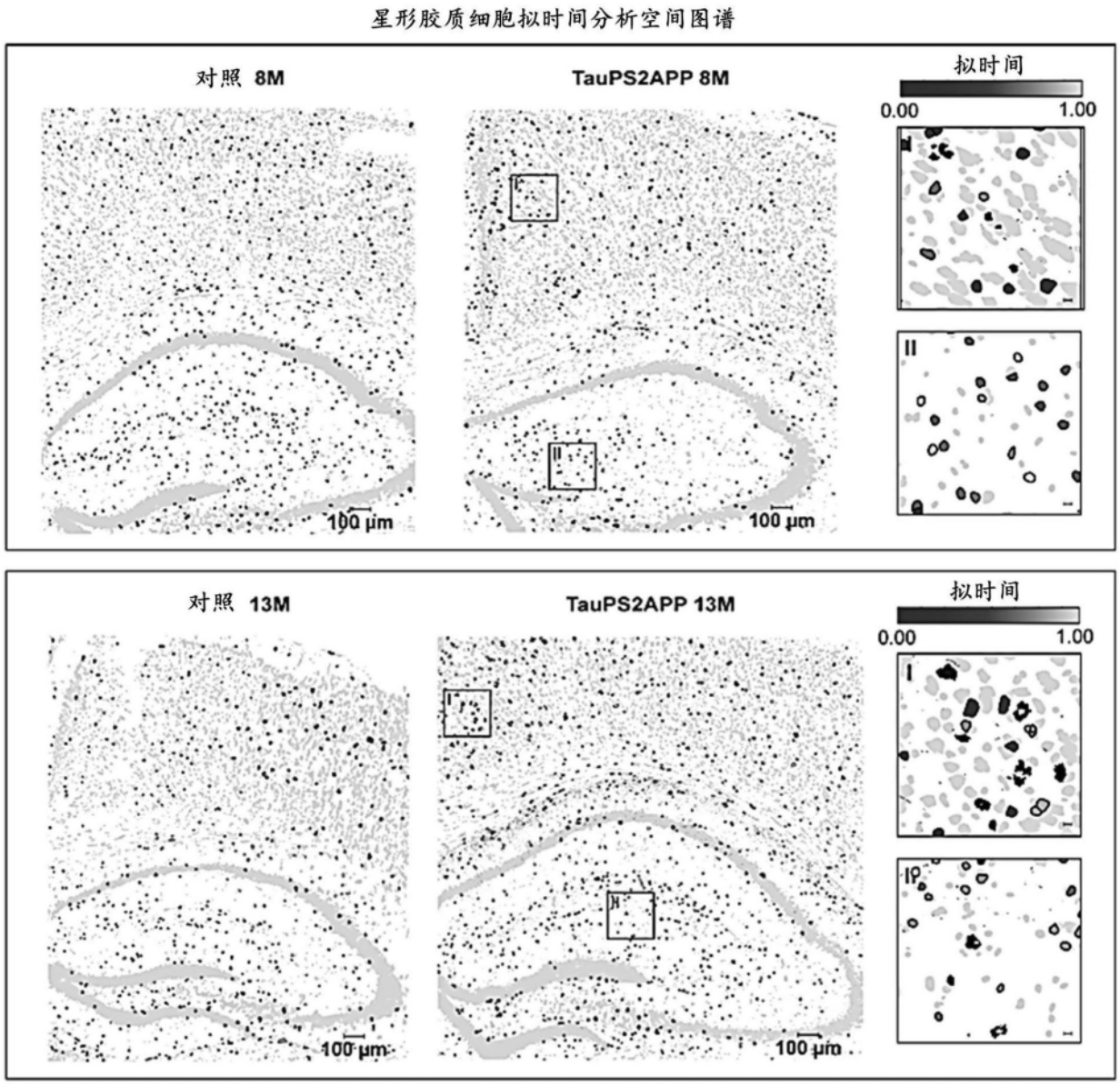

星形胶质细胞拟时间分析空间图谱
对照 8M
TauPS2APP 8M
拟时间
0.00
1.00
100 μm
100 μm
对照 13M
TauPS2APP 13M
拟时间
0.00
1.00
100 μm
100 μm

图11C

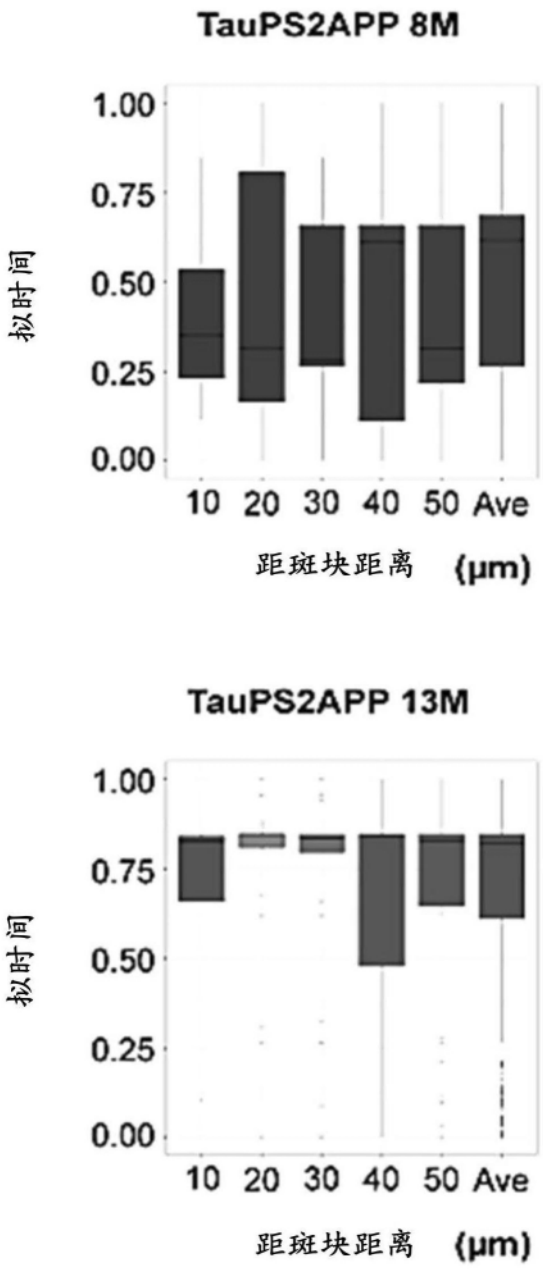

TauPS2APP 8M
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
拟时间
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)
TauPS2APP 13M
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
拟时间
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)

图11D

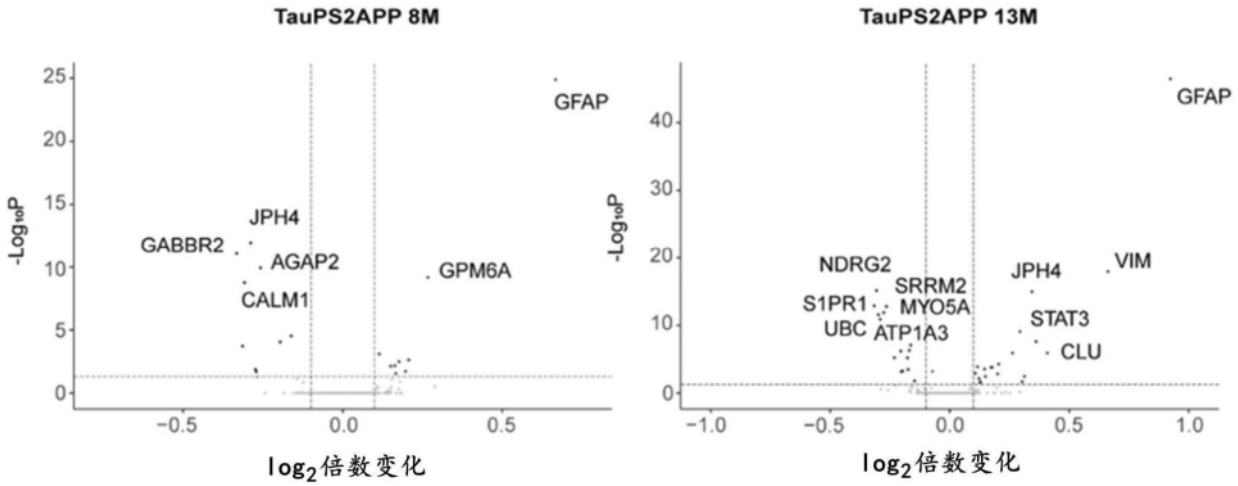

TauPS2APP 8M
TauPS2APP 13M
-Log10P
log2倍数变化
GFAP
JPH4
GABBR2
AGAP2
GPM6A
CALM1
NDRG2
SRRM2
S1PR1
MYO5A
UBC
ATP1A3
STAT3
CLU
VIM

图11E

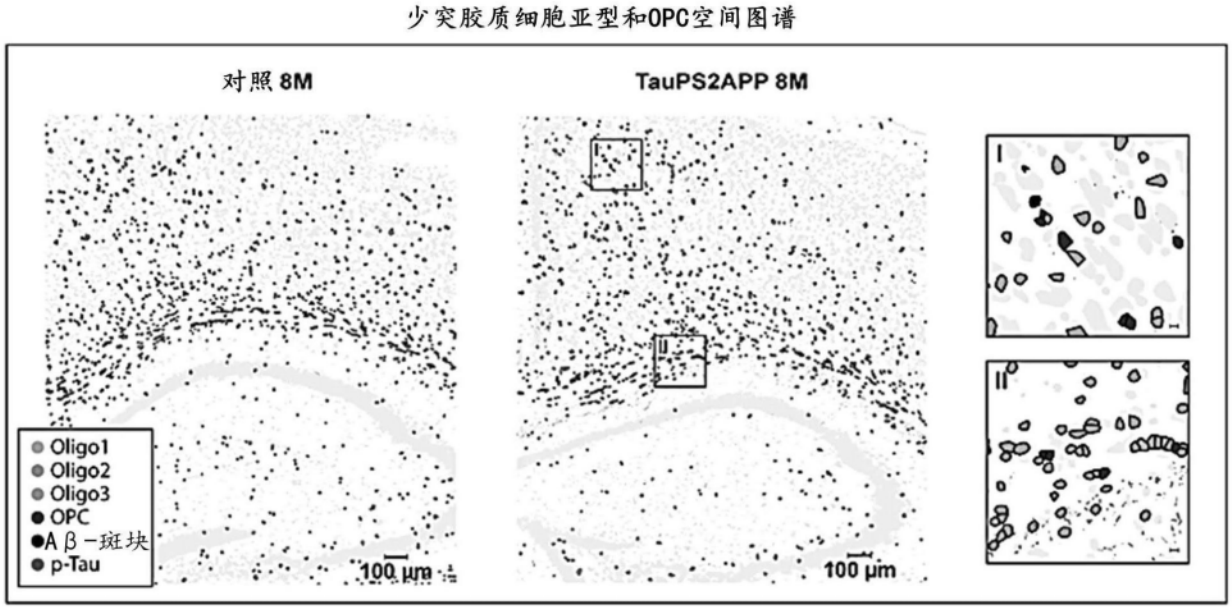

少突胶质细胞亚型和OPC空间图谱
对照 8M
TauPS2APP 8M
Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
Aβ-斑块
p-Tau
100 μm
100 μm
I
II

图12A

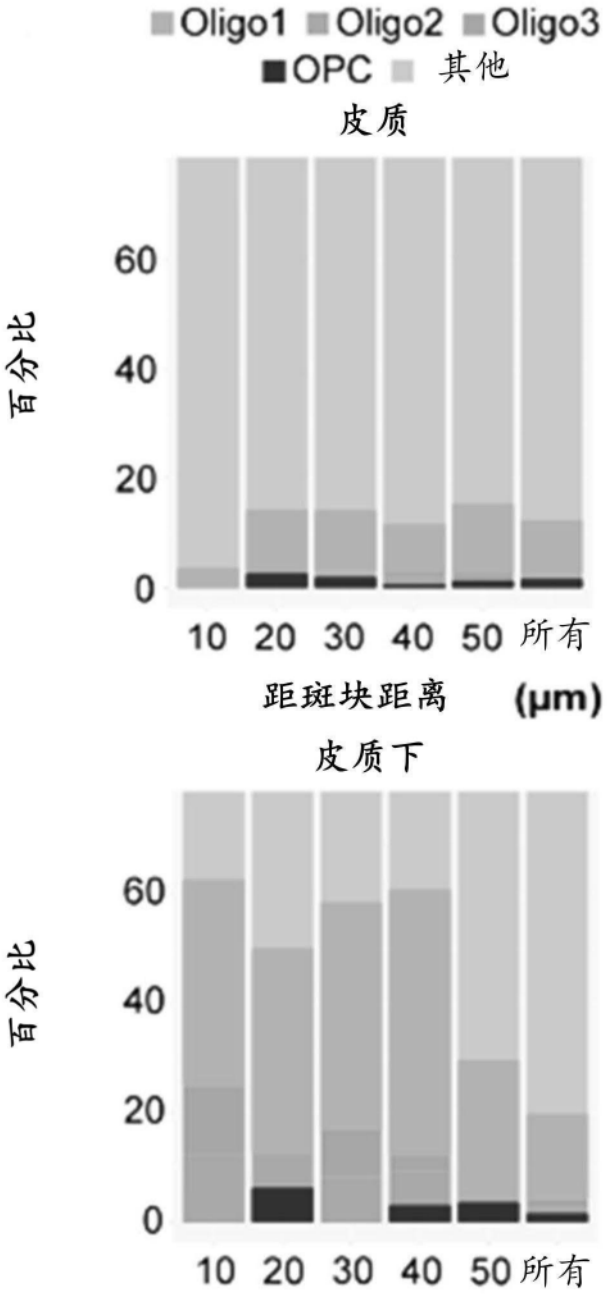

Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
其他
皮质
百分比
60
40
20
0
10
20
30
40
50
所有
距斑块距离
(μm)
皮质下
百分比
60
40
20
0
10
20
30
40
50
所有

图12B

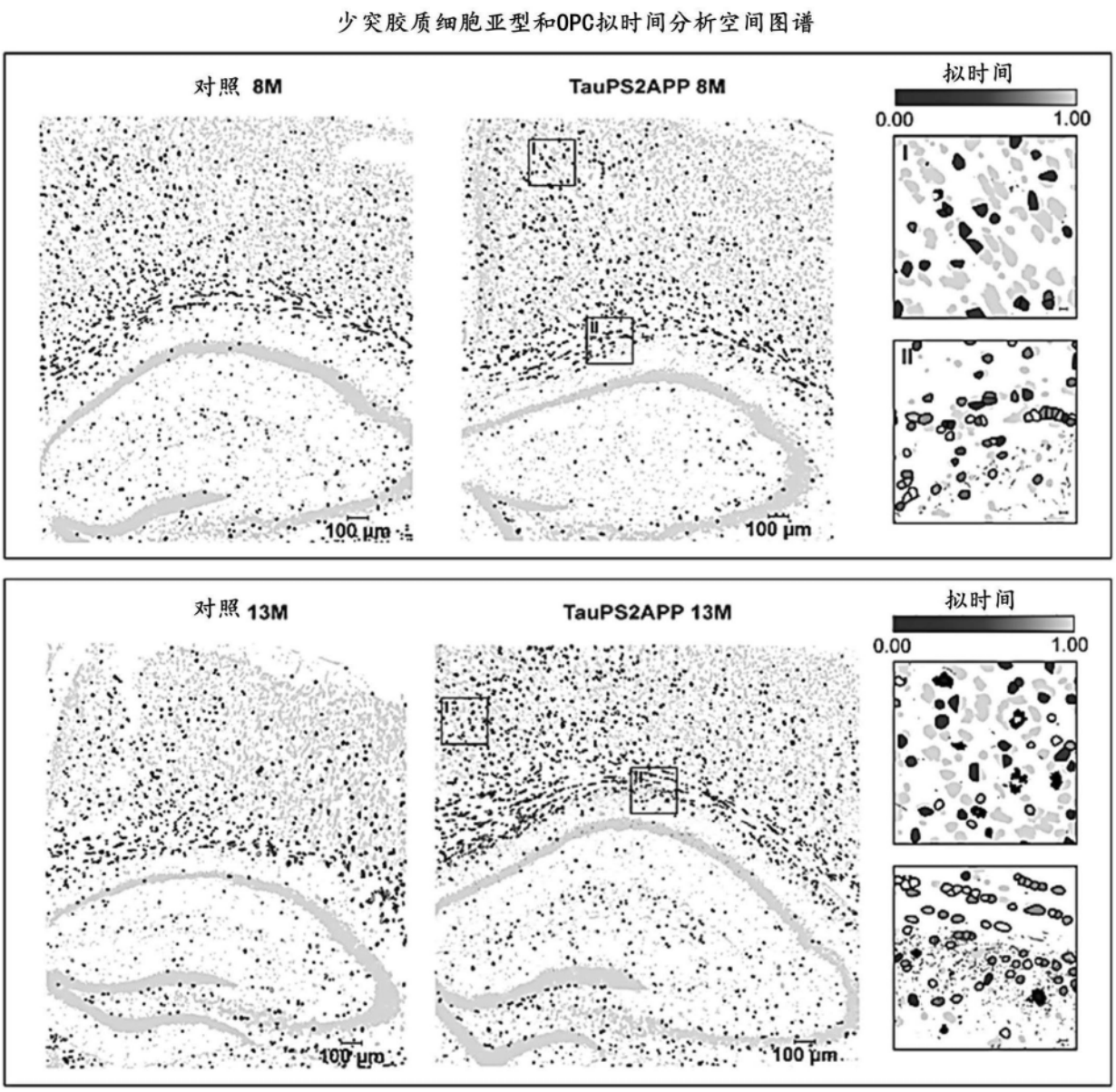

少突胶质细胞亚型和OPC拟时间分析空间图谱
对照 8M
TauPS2APP 8M
拟时间
0.00
1.00
I
II
100 μm
100 μm
对照 13M
TauPS2APP 13M
拟时间
0.00
1.00
100 μm
100 μm

图12C

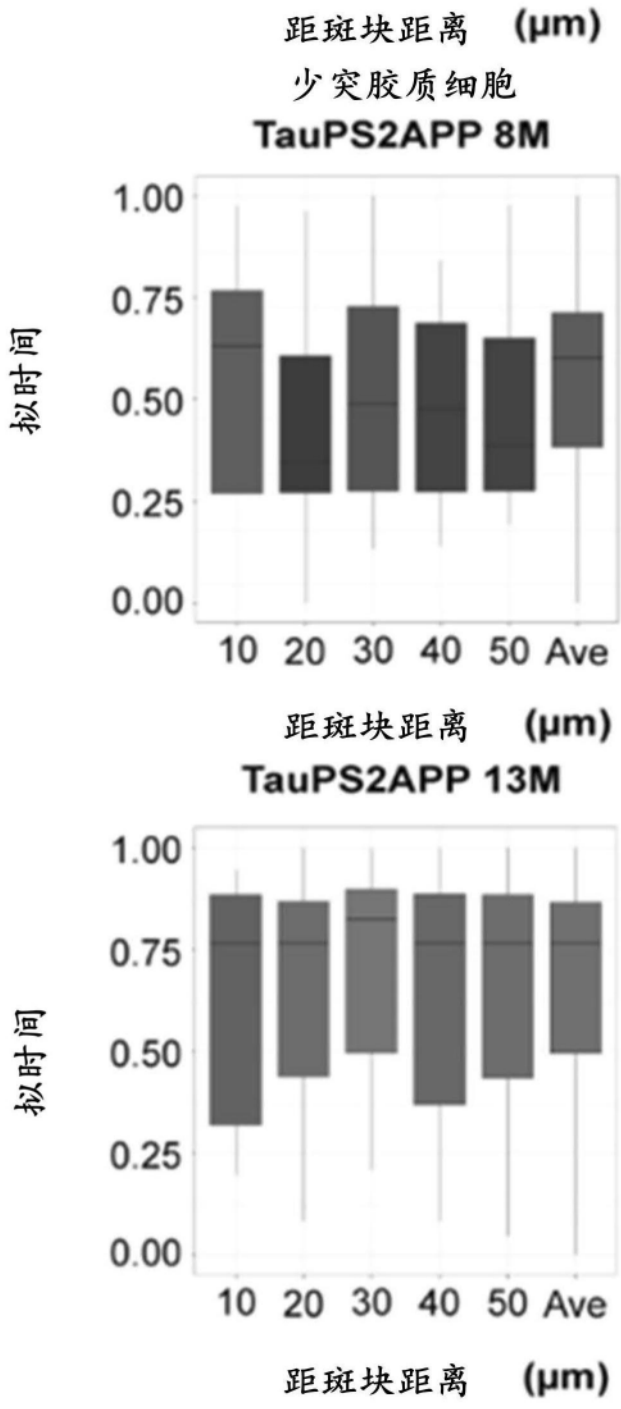

距斑块距离 (μm)
少突胶质细胞
TauPS2APP 8M
拟时间
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)
TauPS2APP 13M
拟时间
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)

图12D

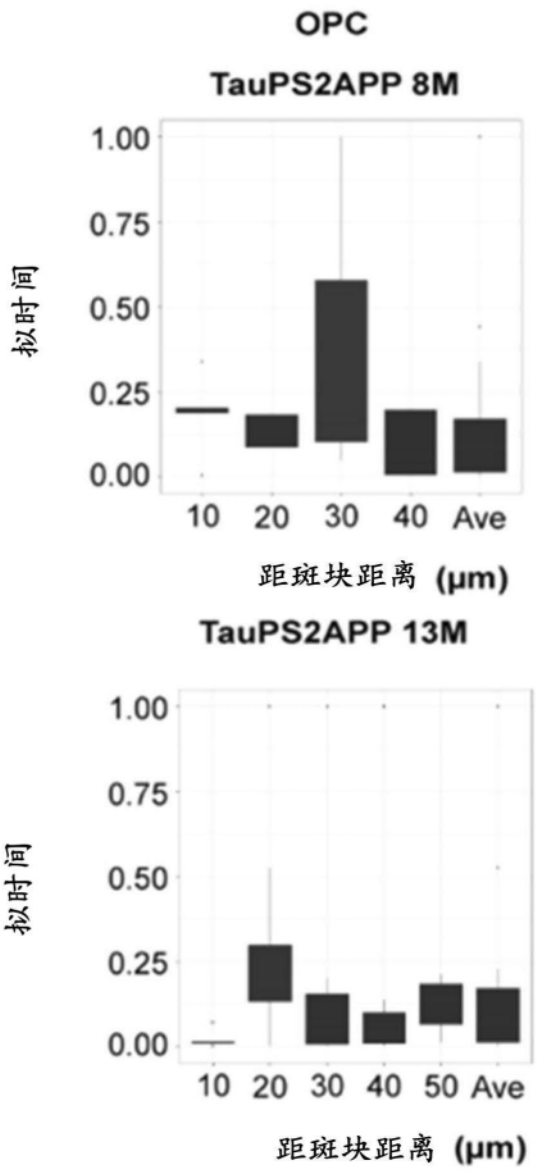

OPC
TauPS2APP 8M
拟时间
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 Ave
距斑块距离 (μm)
TauPS2APP 13M
拟时间
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
距斑块距离 (μm)

图12E

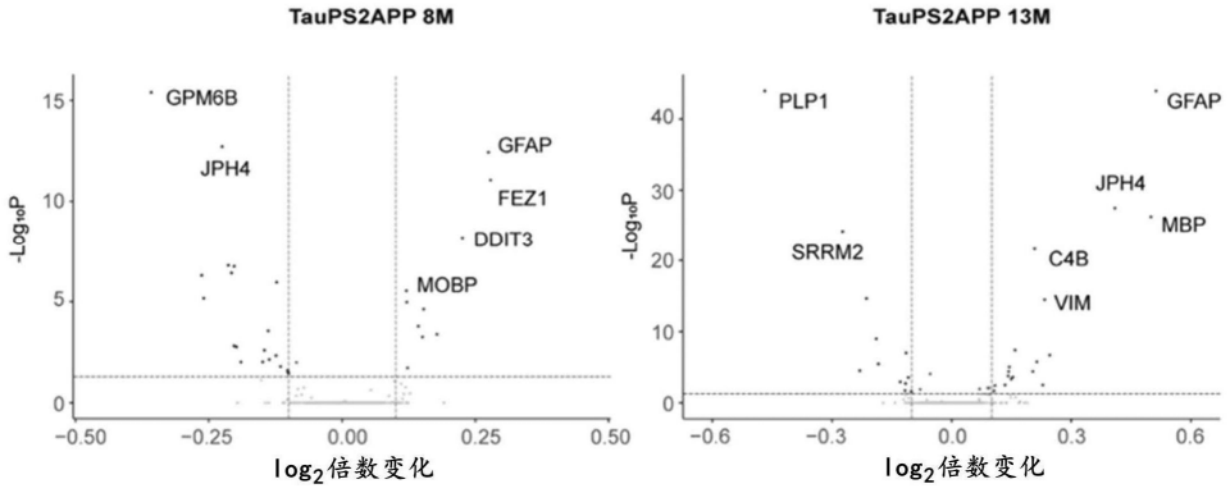

TauPS2APP 8M
GPM6B
JPH4
GFAP
FEZ1
DDIT3
MOBP
-Log10P
log2倍数变化
TauPS2APP 13M
PLP1
GFAP
JPH4
MBP
SRRM2
C4B
VIM
-Log10P
log2倍数变化

图12F

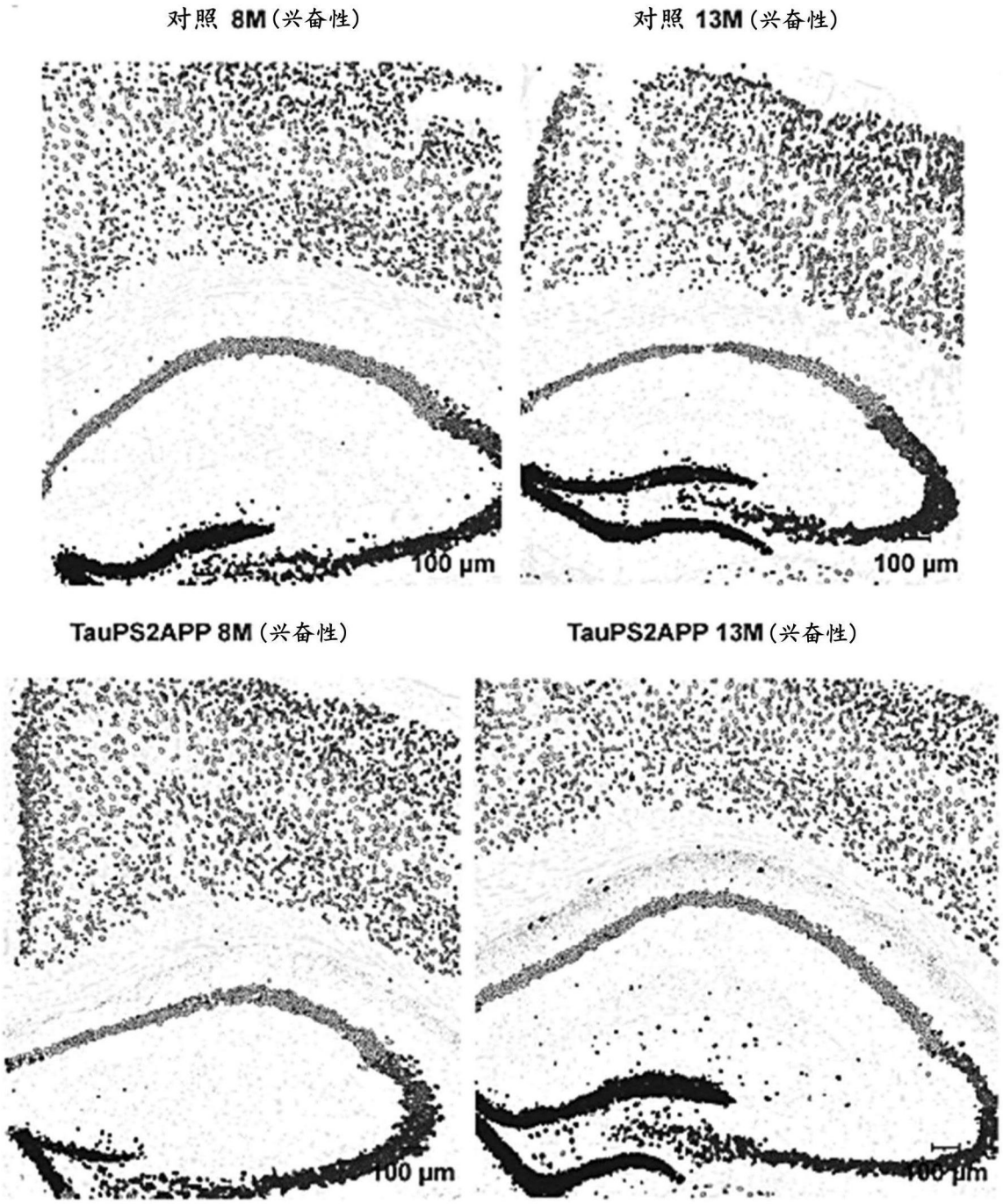

对照 8M(兴奋性)
对照 13M(兴奋性)
100 μm
100 μm
TauPS2APP 8M(兴奋性)
TauPS2APP 13M(兴奋性)
100 μm
100 μm

图13A

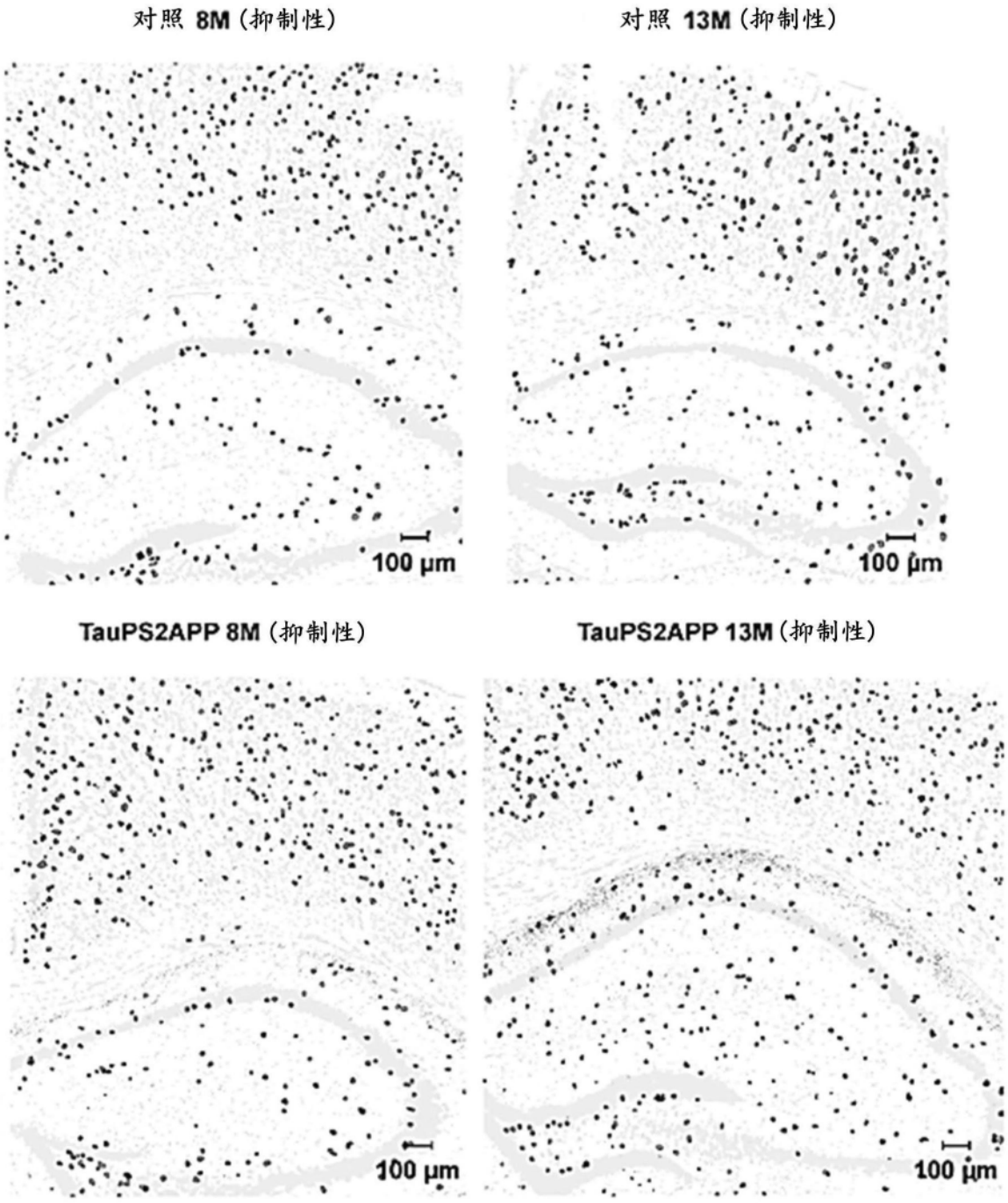

对照 8M (抑制性)
对照 13M (抑制性)
100 μm
100 μm
TauPS2APP 8M (抑制性)
TauPS2APP 13M (抑制性)
100 μm
100 μm

图13B

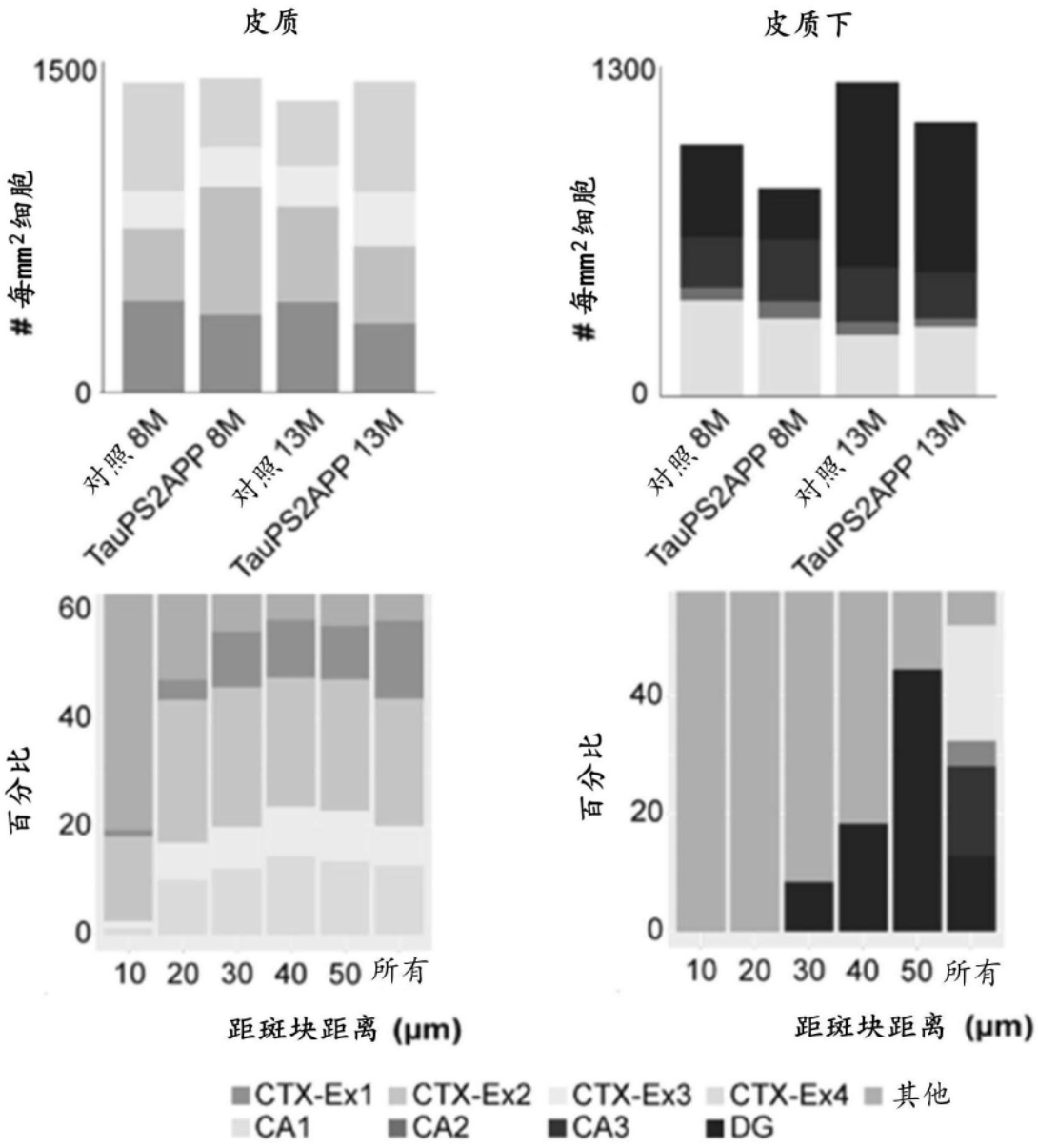

皮质
皮质下
1500
1300
0
每mm² 细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
60
40
20
0
百分比
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
其他
CA1
CA2
CA3
DG

图13C

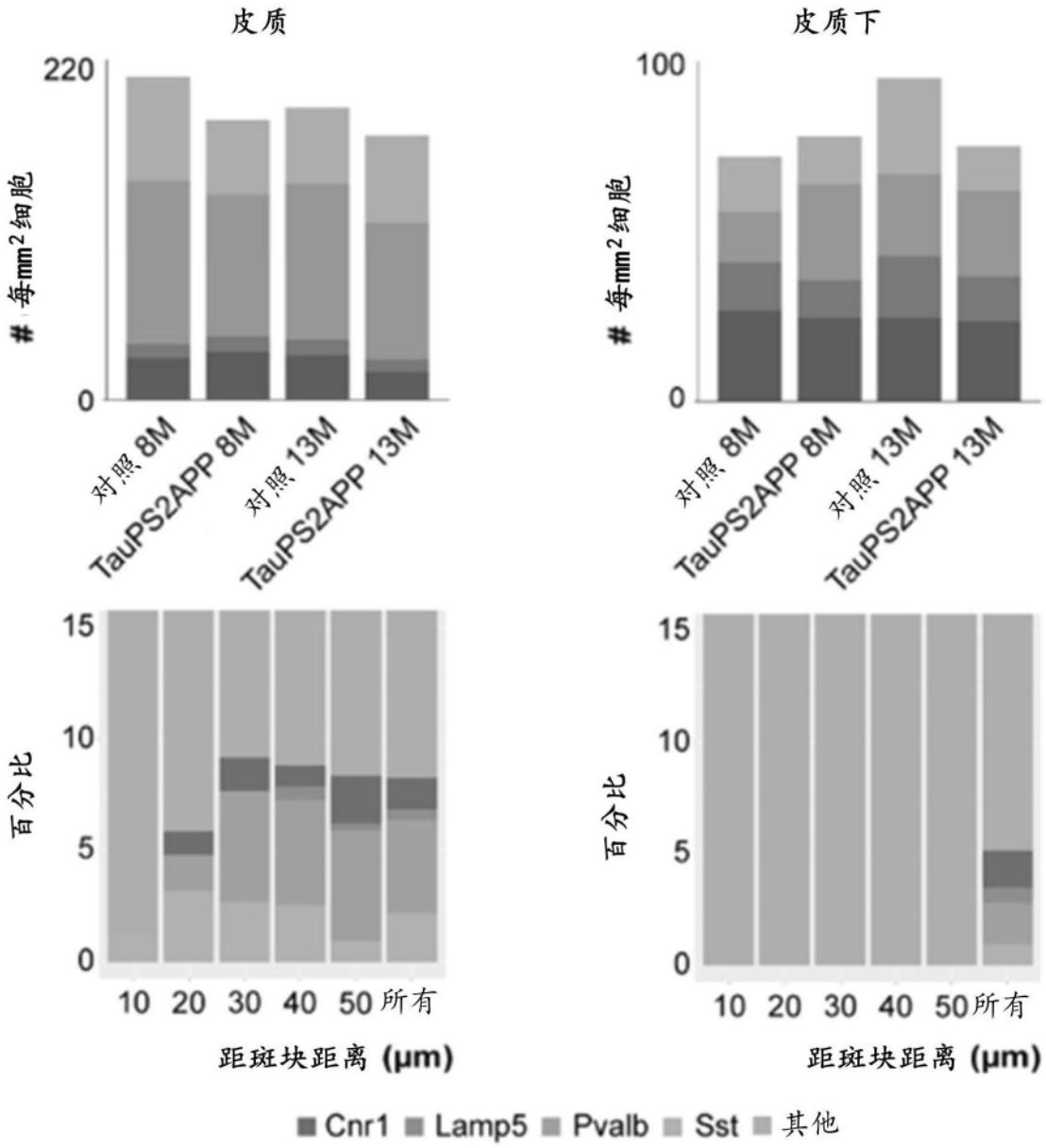

皮质
皮质下
220
100
0
每mm²细胞
对照 8M
TauPS2APP 8M
对照 13M
TauPS2APP 13M
15
10
5
0
百分比
10 20 30 40 50 所有
距斑块距离 (μm)
Cnr1 Lamp5 Pvalb Sst 其他

图13D

兴奋性神经元

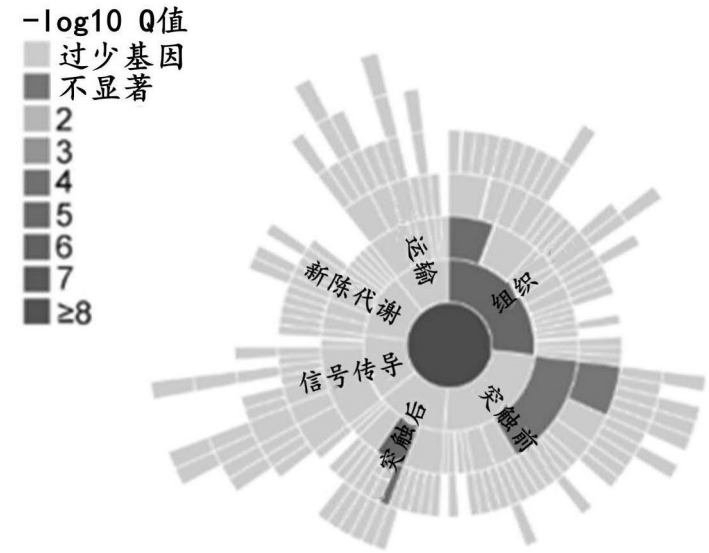


图13E

抑制性神经元

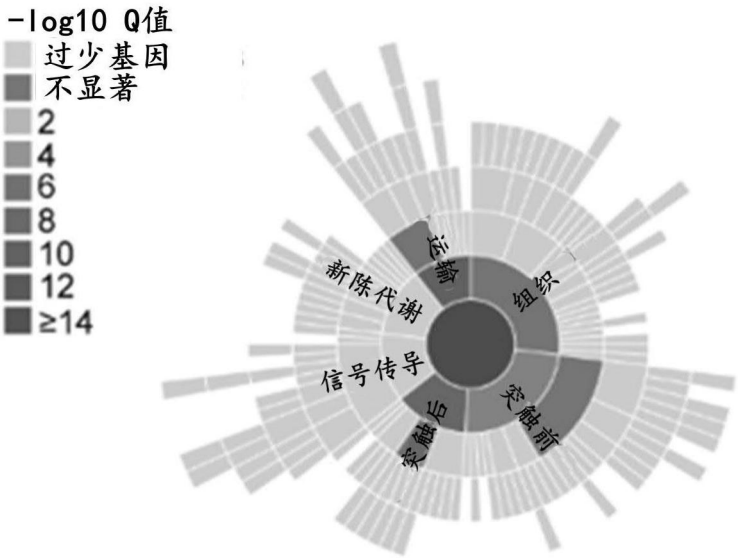


图13F

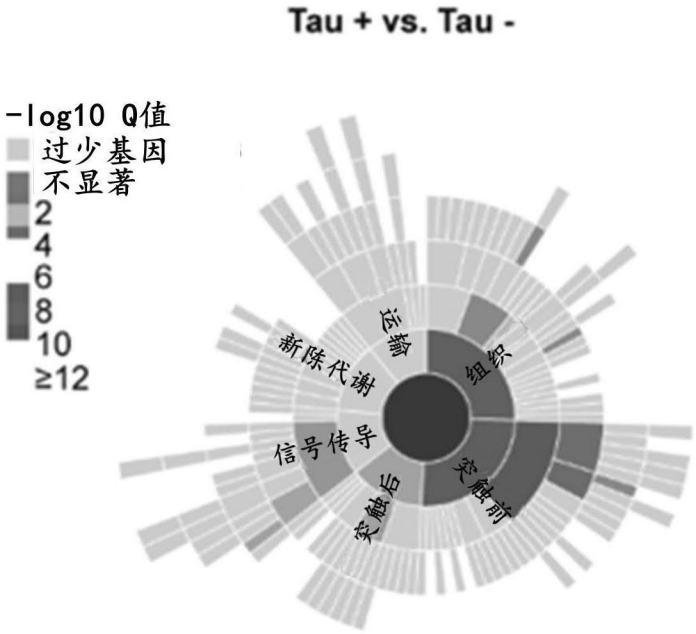


图13G

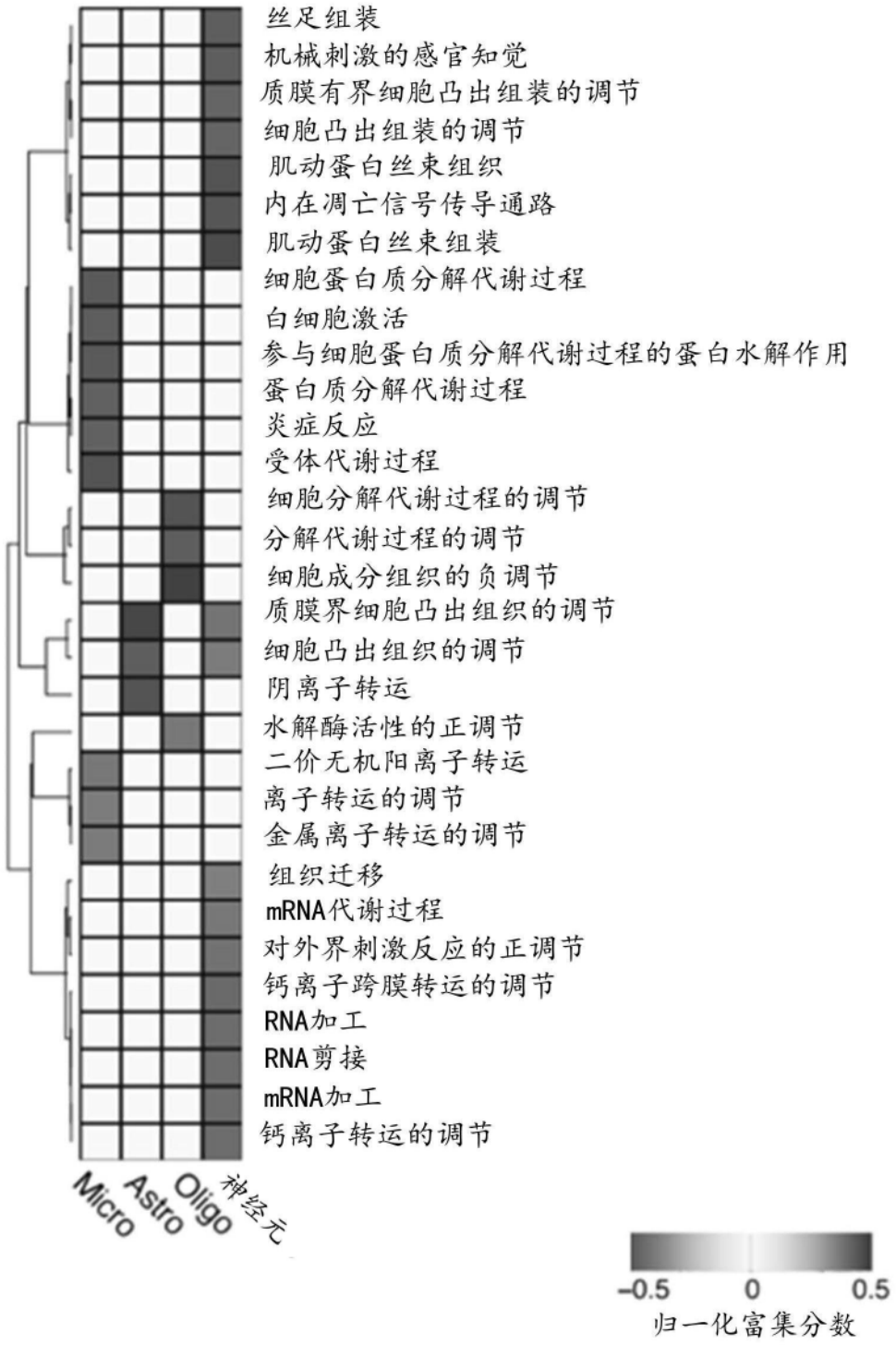

丝足组装
机械刺激的感官知觉
质膜有界细胞凸出组装的调节
细胞凸出组装的调节
肌动蛋白丝束组织
内在凋亡信号传导通路
肌动蛋白丝束组装
细胞蛋白质分解代谢过程
白细胞激活
参与细胞蛋白质分解代谢过程的蛋白水解作用
蛋白质分解代谢过程
炎症反应
受体代谢过程
细胞分解代谢过程的调节
分解代谢过程的调节
细胞成分组织的负调节
质膜界细胞凸出组织的调节
细胞凸出组织的调节
阴离子转运
水解酶活性的正调节
二价无机阳离子转运
离子转运的调节
金属离子转运的调节
组织迁移
mRNA代谢过程
对外界刺激反应的正调节
钙离子跨膜转运的调节
RNA加工
RNA剪接
mRNA加工
钙离子转运的调节
Micro
Astro
Oligo
神经元
-0.5
0
0.5
归一化富集分数

图14A

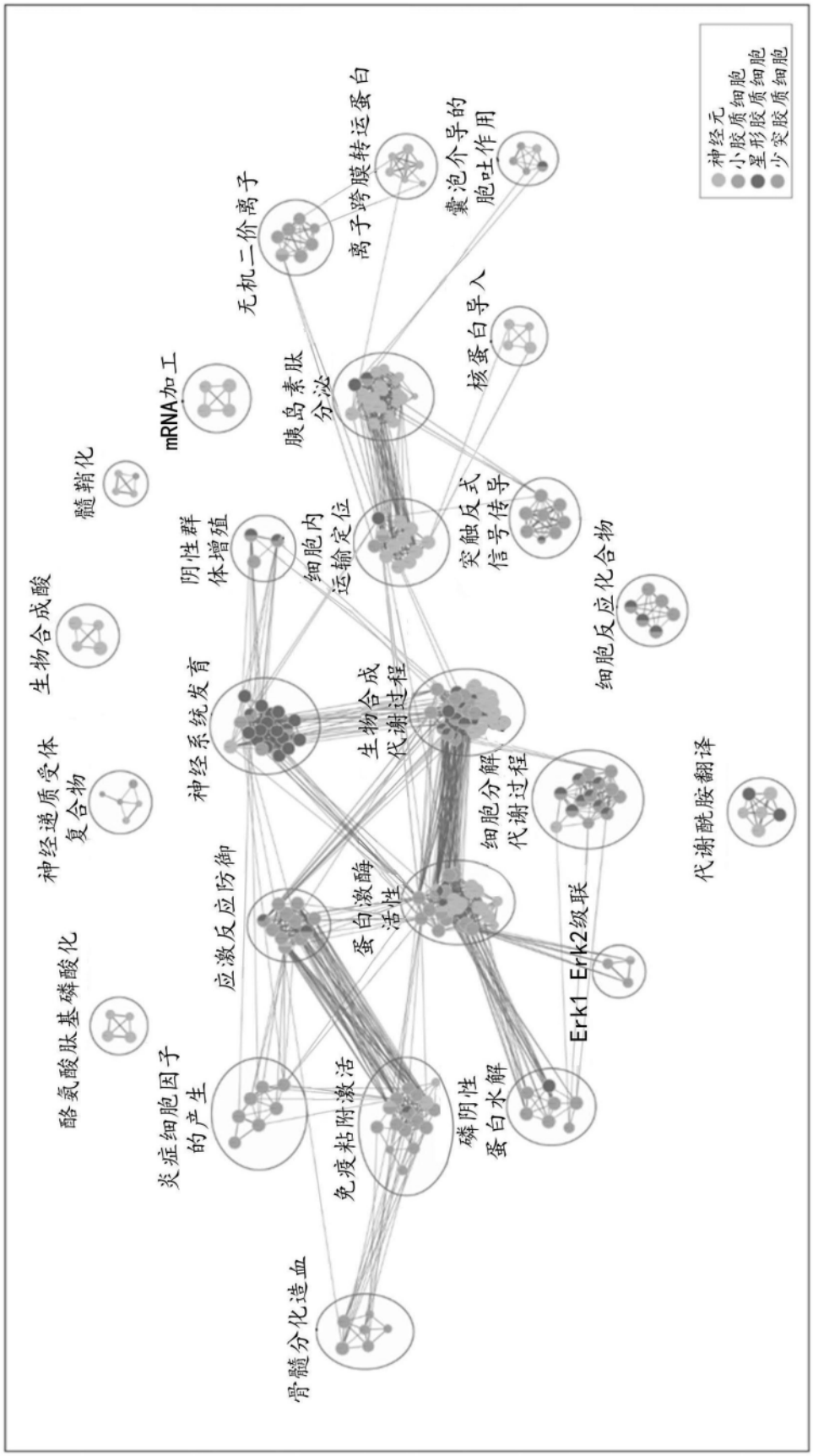

神经元
小胶质细胞
星形胶质细胞
少突胶质细胞
无机二价离子
离子跨膜转运蛋白
囊泡介导的胞吐作用
核蛋白导入
突触反式信号传导
细胞反应化合物
代谢酰胺翻译
胰岛素肽分泌
mRNA加工
阴性群体增殖
细胞内运输定位
髓鞘化
生物合成酸
神经递质受体复合物
神经系统发育
生物合成代谢过程
酪氨酸肽基磷酸化
应激反应防御
蛋白激酶活性
细胞分解代谢过程
炎症细胞因子的产生
免疫粘附激活
磷阴性蛋白水解
Erk1_Erk2级联
骨髓分化造血

图14B

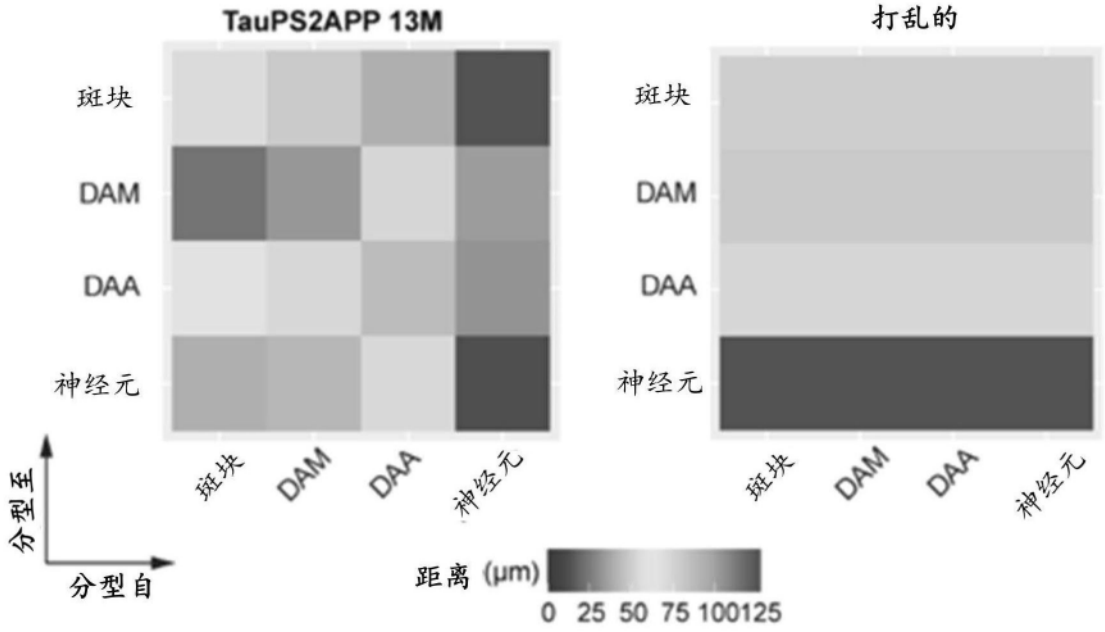

TauPS2APP 13M
打乱的
斑块
DAM
DAA
神经元
分型至
分型自
距离 (μm)
0 25 50 75 100125

图14C

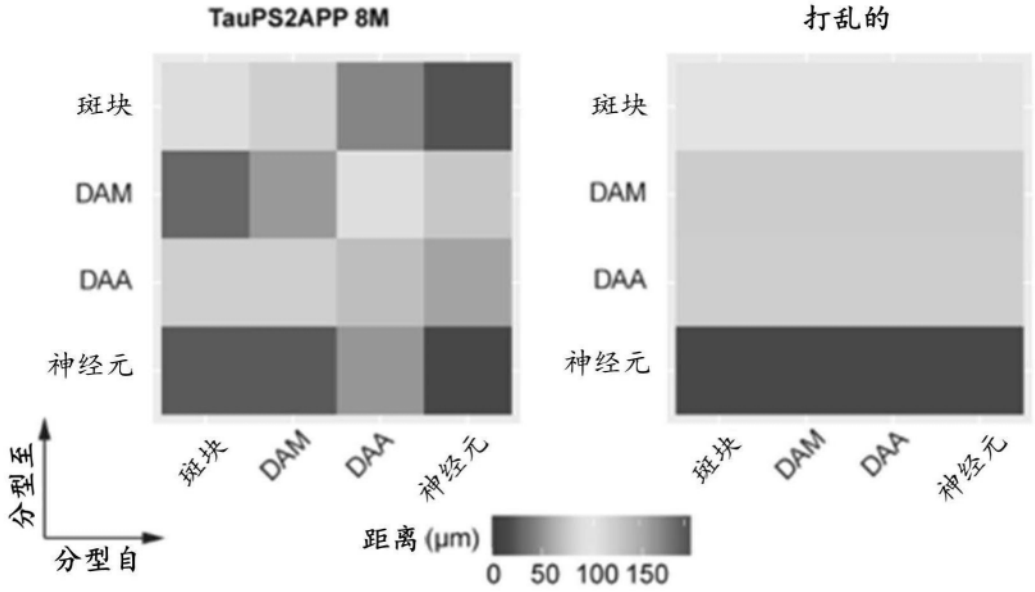

TauPS2APP 8M
打乱的
斑块
DAM
DAA
神经元
分型至
分型自
距离 (μm)
0 50 100 150

图14D

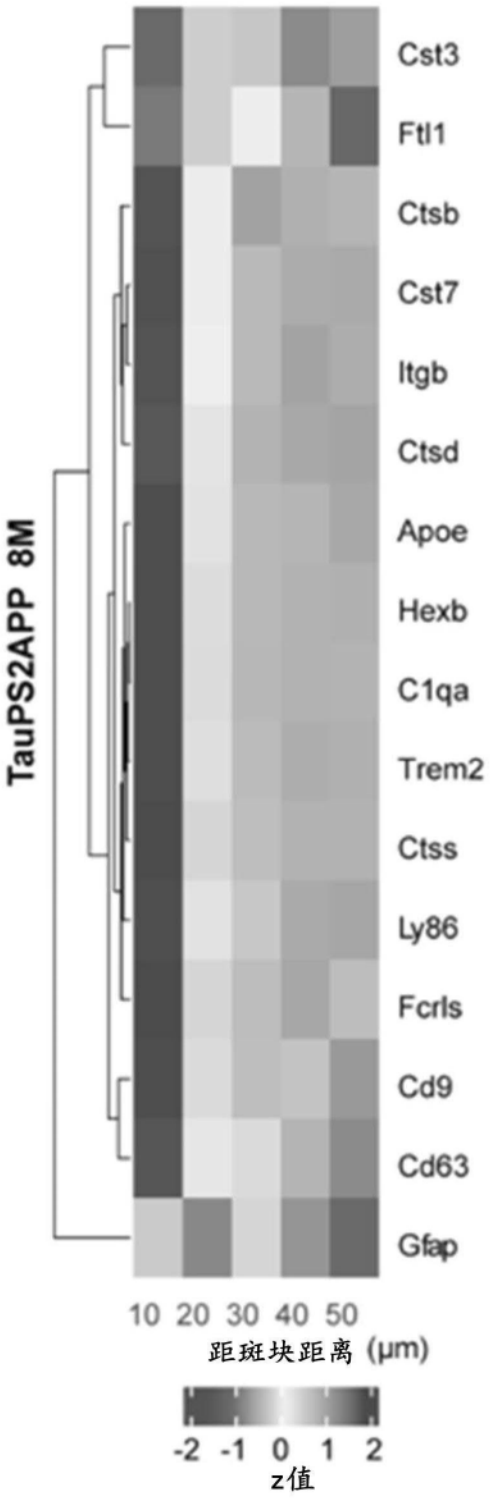

Cst3
Ftl1
Ctsb
Cst7
Itgb
Ctsd
Apoe
Hexb
C1qa
Trem2
Ctss
Ly86
Fcrls
Cd9
Cd63
Gfap
TauPS2APP 8M
10 20 30 40 50
距斑块距离 (μm)
-2 -1 0 1 2
z值

图14E

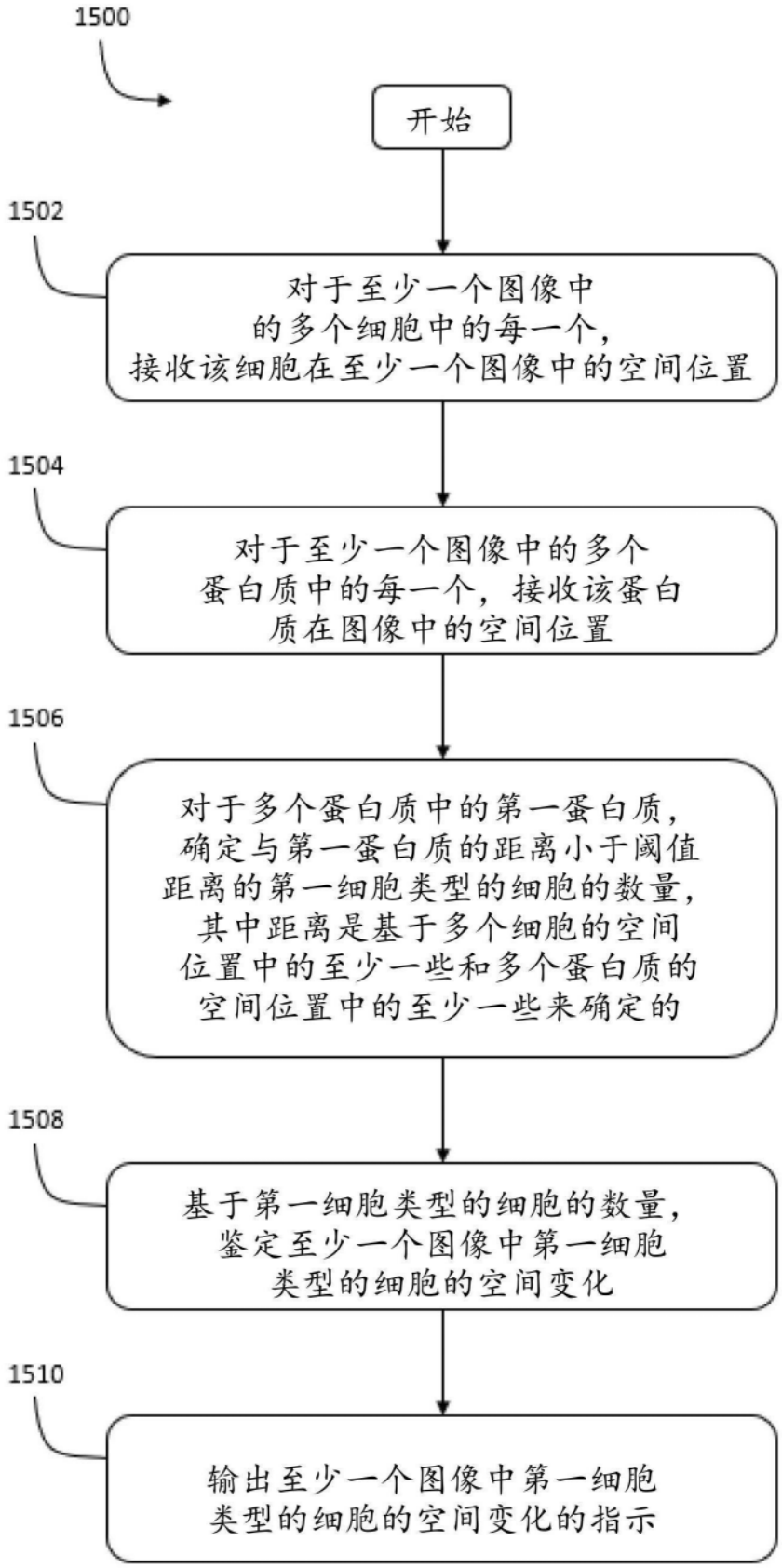

1500
开始
1502
对于至少一个图像中
的多个细胞中的每一个，
接收该细胞在至少一个图像中的空间位置
1504
对于至少一个图像中的多个
蛋白质中的每一个，接收该蛋白
质在图像中的空间位置
1506
对于多个蛋白质中的第一蛋白质，
确定与第一蛋白质的距离小于阈值
距离的第一细胞类型的细胞的数量，
其中距离是基于多个细胞的空间
位置中的至少一些和多个蛋白质的
空间位置中的至少一些来确定的
1508
基于第一细胞类型的细胞的数量，
鉴定至少一个图像中第一细胞
类型的细胞的空间变化
1510
输出至少一个图像中第一细胞
类型的细胞的空间变化的指示

图15

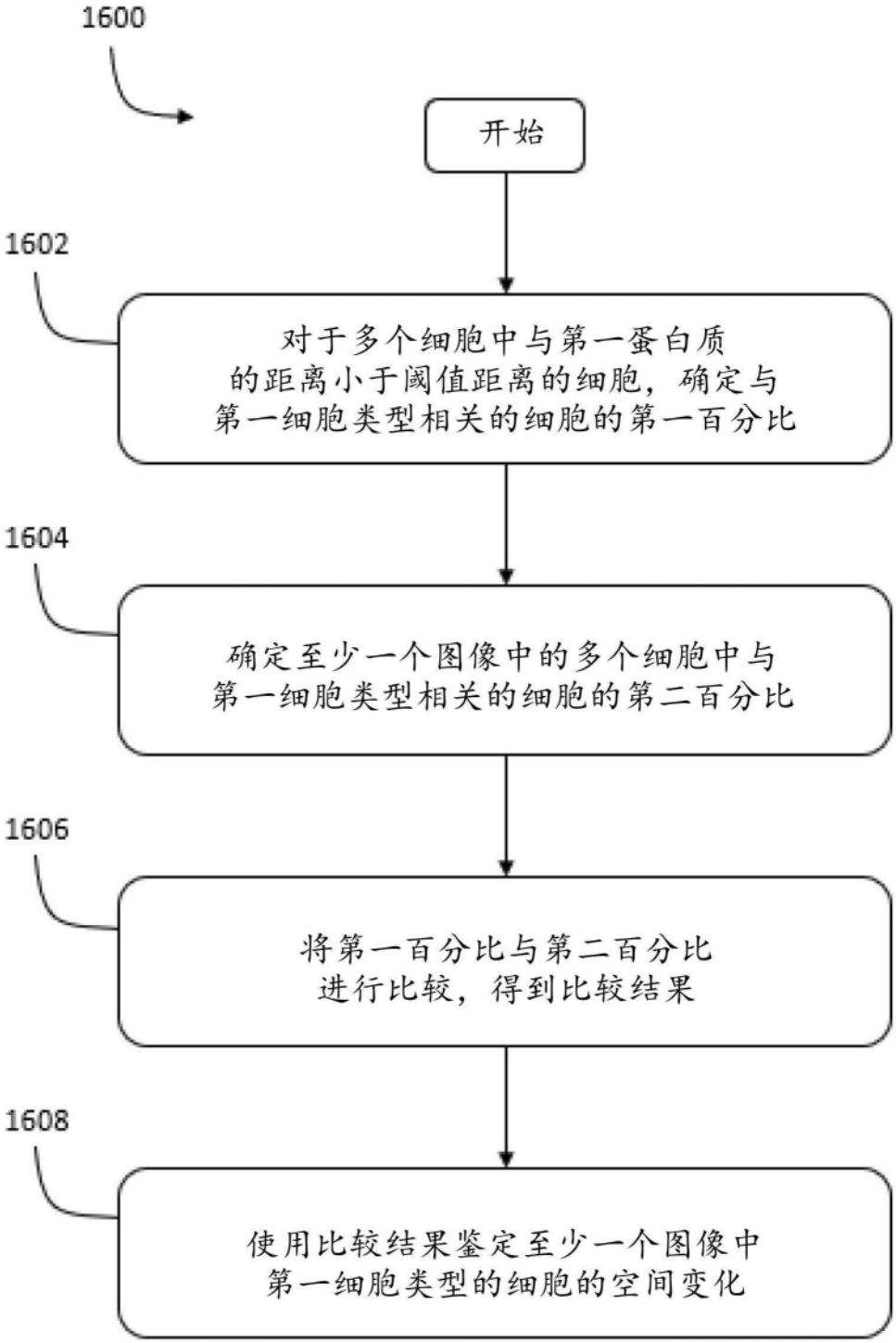

1600
开始
1602
对于多个细胞中与第一蛋白质的距离小于阈值距离的细胞，确定与第一细胞类型相关的细胞的第一百分比
1604
确定至少一个图像中的多个细胞中与第一细胞类型相关的细胞的第二百分比
1606
将第一百分比与第二百分比进行比较，得到比较结果
1608
使用比较结果鉴定至少一个图像中第一细胞类型的细胞的空间变化

图16

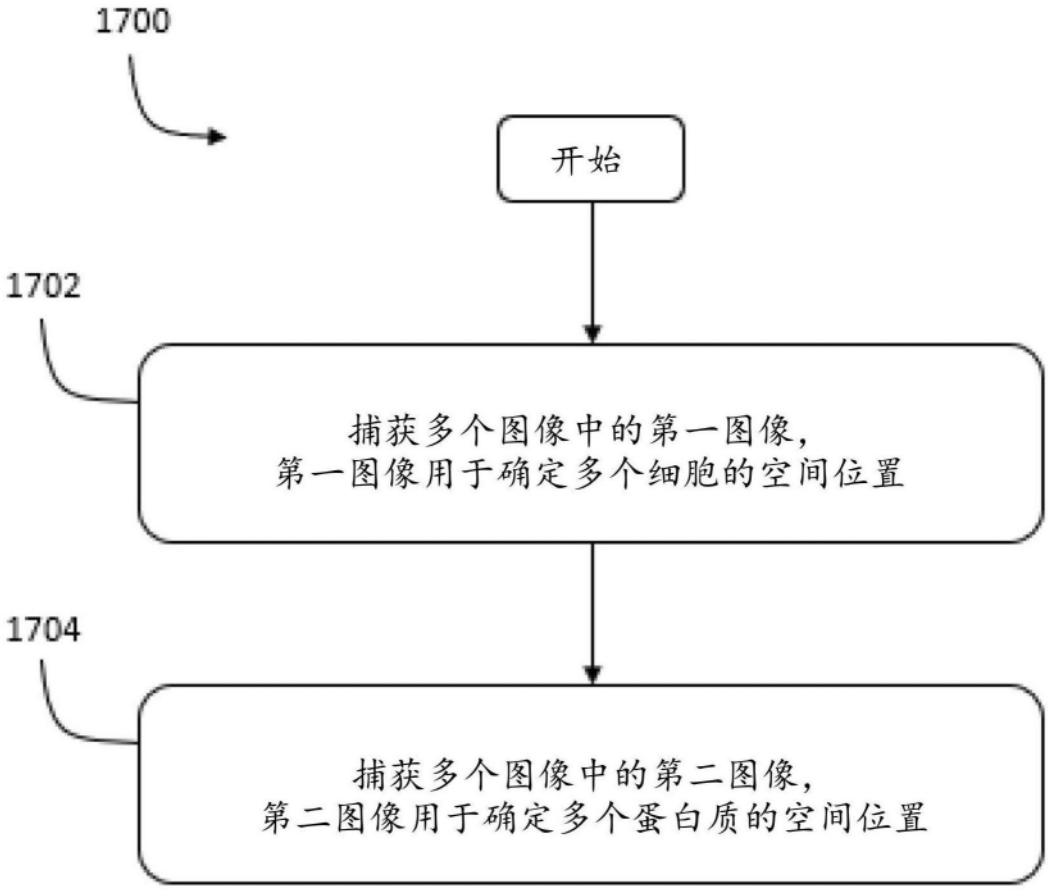

1700
开始
1702
捕获多个图像中的第一图像，
第一图像用于确定多个细胞的空间位置
1704
捕获多个图像中的第二图像，
第二图像用于确定多个蛋白质的空间位置

图17

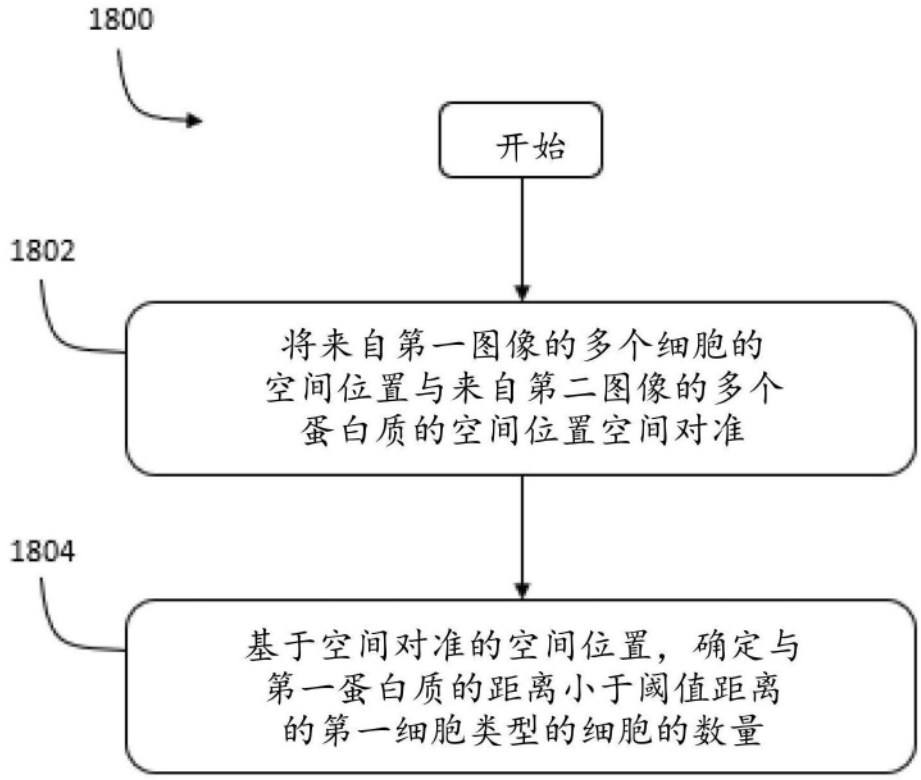

1800
开始
1802
将来自第一图像的多个细胞的空间位置与来自第二图像的多个蛋白质的空间位置空间对准
1804
基于空间对准的空间位置，确定与第一蛋白质的距离小于阈值距离的第一细胞类型的细胞的数量

图18

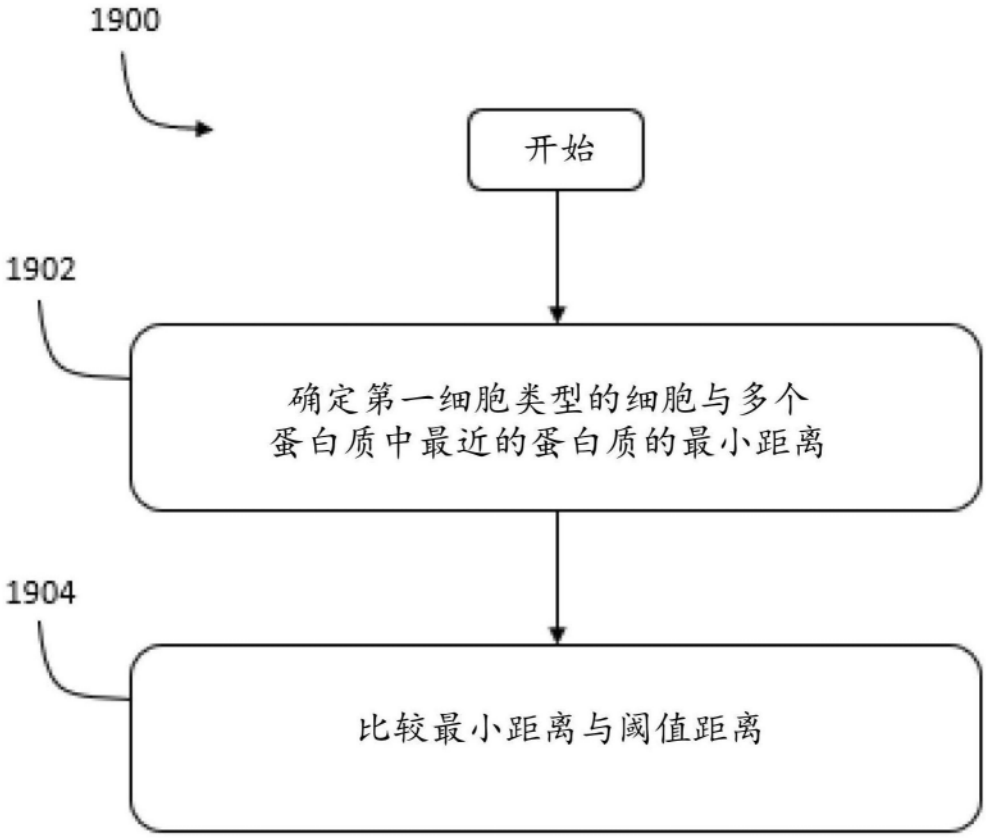

1900
开始
1902
确定第一细胞类型的细胞与多个
蛋白质中最近的蛋白质的最小距离
1904
比较最小距离与阈值距离

图19

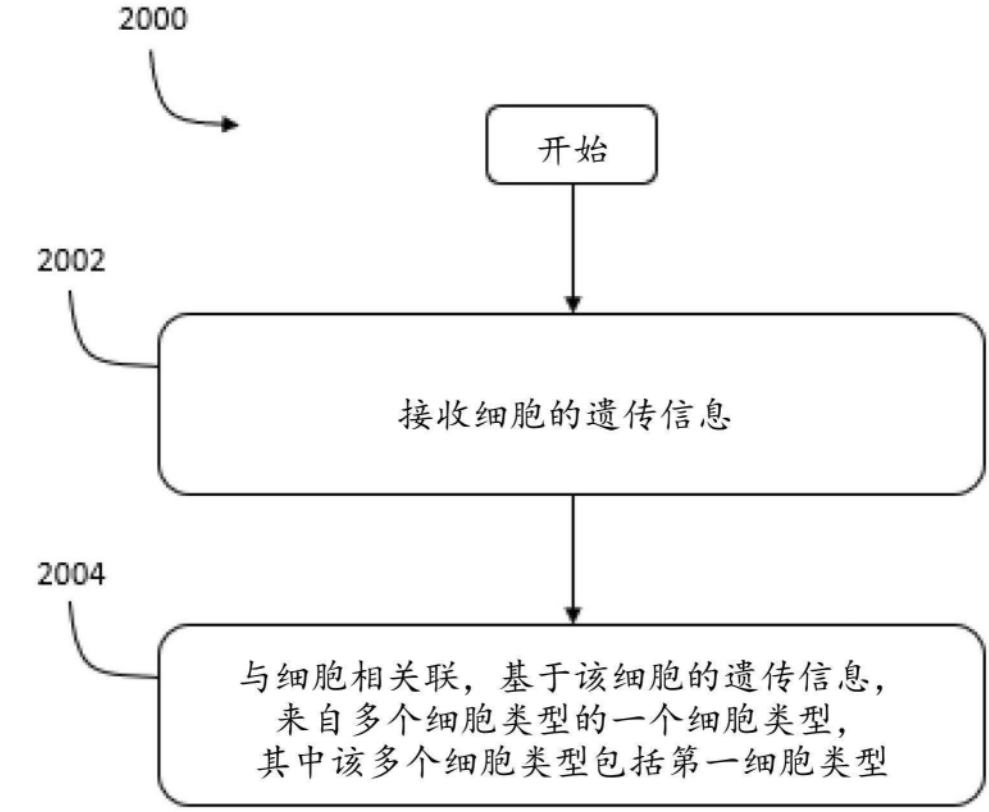

2000
开始
2002
接收细胞的遗传信息
2004
与细胞相关联，基于该细胞的遗传信息，
来自多个细胞类型的一个细胞类型，
其中该多个细胞类型包括第一细胞类型

图20

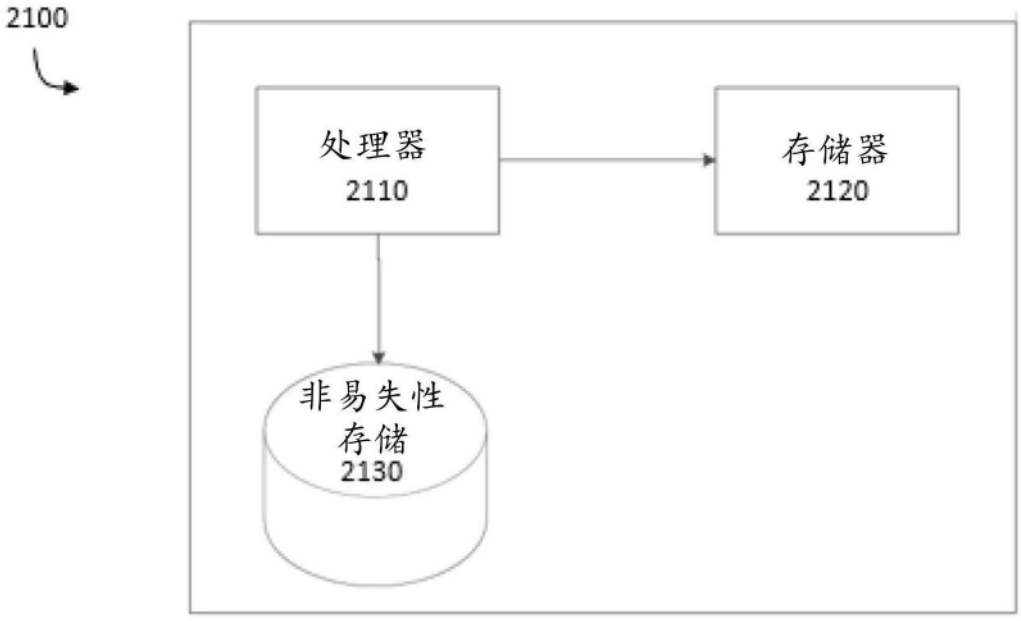

2100
处理器
2110
存储器
2120
非易失性
存储
2130

图21