



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107709574 B

(45) 授权公告日 2021.10.01

(21) 申请号 201680034754.6

(72) 发明人 M.范德里伊  
R.维姆伯格-弗里伊德  
A.皮尔里克

(22) 申请日 2016.04.13

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
代理人 李唐 陈岚

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107709574 A

(43) 申请公布日 2018.02.16

(51) Int.CI.

C12Q 1/6869 (2018.01)

(30) 优先权数据

15163481.3 2015.04.14 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.12.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/058067 2016.04.13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/166128 EN 2016.10.20

(73) 专利权人 皇家飞利浦有限公司

(56) 对比文件

WO 2012140224 A1, 2012.10.18

RONGQIN HE等. In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells.《NATURE METHODS》.2013,第10卷(第9期),第857-858,861-862页.

地址 荷兰艾恩德霍芬

审查员 张艳霞

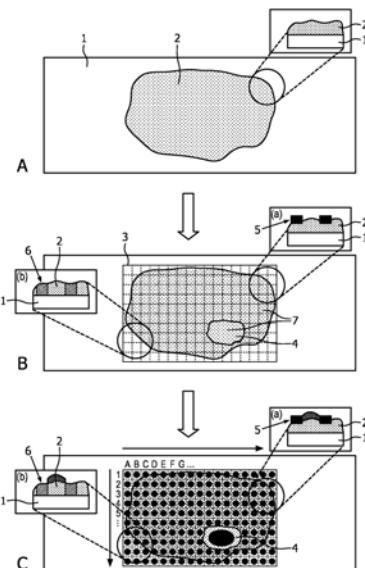
权利要求书2页 说明书21页  
序列表3页 附图3页

(54) 发明名称

生物组织样品的分子概况的空间作图

(57) 摘要

提供了一种方法，其能够以高分辨率对组织样品的核酸进行空间作图，而不会牺牲从下一代测序中可获得的多重化程度。该方法基于将条形码化的寡核苷酸探针的图案应用至组织样品中的目标区域中的预定义位置上。基于条形码，可以将每种分析的核酸分配至样品内的特定位置。可以使用各种印刷技术，并且可以采用不同的图案化方式，如具有特定间距的规则阵列，或者替代地，具有有限定的目标区域而没有形状限制的基于对象的图案化。



1. 用于空间检测组织样品中的核酸的方法,其包括以下步骤:
  - a) 鉴定样品内的至少一个目标区域(ROI);
  - b) 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上,且使所述寡核苷酸探针结合样品的核酸,其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列;
  - c) 提取核酸-寡核苷酸探针复合物;
  - d) 将提取的核酸分子测序;
  - e) 将测序的核酸分子与ROI内相应的靶向的核酸分子的初始位置相关联,以产生靶向的核酸分子的空间分布,其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定;

其中所述方法用于非诊断目的。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤d)之前经由DNA扩增从所述核酸-寡核苷酸探针复合物产生DNA分子。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中DNA分子的产生在逆转录反应之后发生。
4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中在步骤b)中,所述寡核苷酸探针与所述样品的核酸的结合经由杂交发生,且其中所述寡核苷酸探针用作引物。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤b)中,所述寡核苷酸探针与所述样品的核酸的结合经由连接发生。
6. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中步骤e)还包括将靶向的核酸分子的空间分布与ROI的图像或在步骤b)之前或之后获得的鉴定了ROI的组织样品的图像相关联。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述方法还包括提供二维空间图以显现所述靶向的核酸分子的空间分布。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述方法还包括将所述二维空间图与ROI的图像或在步骤b)之前或之后获得的鉴定了ROI的组织样品的图像叠加。
9. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中将至少两个不同种类的寡核苷酸探针与步骤b)中的一种靶向的核酸分子结合,且其中使用至少两个不同种类的寡核苷酸探针的独特组合来鉴定ROI内的靶向的核酸分子的位置。
10. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针包含通用序列,其中任选地所述通用序列与所述靶向的核酸互补。
11. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针包含额外序列,其中所述额外序列是纯化序列或引物比对序列。
12. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述预定义的位置通过分隔掩蔽物来定义。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述分隔掩蔽物是任选地印刷在样品上的顶部部分隔掩蔽物、或完全分隔掩蔽物,其中所述分隔掩蔽物是网格分隔掩蔽物、自由格式分隔掩蔽物或其组合。
14. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中在步骤b)中,通过液体转移技术,优选地通过接触印刷技术或非接触印刷技术,将所述寡核苷酸探针应用至预定义的位置上,使得应用的寡核苷酸探针不在不同的预定义的位置之间混杂。
15. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述样品是组织病理学样本,优选脱

石蜡的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样品、新鲜冷冻(FF)样品或新鲜样品或细胞学样品。

## 生物组织样品的分子概况的空间作图

### 发明领域

[0001] 提出了一种能够以高分辨率将组织样品的核酸进行空间作图的方法。该方法基于应用考虑组织信息的结合样品中的核酸的包含条形码序列的寡核苷酸探针的图案。

### [0002] 发明背景

[0003] 目前,病理学家正在进行各种形式的组织和细胞的显微镜检查。显微镜图像揭示了作为诊断基础的关于形态(例如细胞类型、分化等)的信息。在病理学家想要更详细地检查组织/细胞的情况下,使用生物标志物特异性染色方案,诸如在乳腺癌的情况下ER、PR和HER2。某些分子测试通过所谓的原位杂交对DNA和RNA进行。然而,以此方法,靶标的数量是有限的。为了改善分层,进行分子诊断测试以测试基因表达(例如OncotypeDX, Mammaprint)或者借助于测序(例如Sanger或下一代测序)和表达概况分析(例如,微阵列、RNAseq, RT-PCR)来寻找可作用的突变,如KRAS、EGFR等。

[0004] 肿瘤组织在组成上是异质的,并且被基质和浸润性免疫细胞包围。这种空间异质性可以影响分子分析,因为肿瘤细胞的DNA和RNA被未被分析靶向的细胞的DNA和RNA所稀释。为了克服该问题,在载片上选择组织/细胞的目标区域(ROI),并且例如通过刮擦或(激光捕获)微解剖技术从载片上移除,以在分子测定和/或蛋白质组学测定(蛋白组合物等)中处理和分析。当收集ROIs时,仅储存有限的位置信息,而收集的材料经常源自不同的ROIs,或将ROIs合并,随后一起分析。在激光捕获微解剖的情况下,可以分开收集小区域,但这是耗时的并且不允许对组织/细胞的系统分析。分子分析耗时且昂贵。对于分子概况的更高分辨率作图,这导致大量的分子测试,其成本对于临床实践将太高。肿瘤异质性和组织结构还可以是潜在的诊断参数,因为它们可以提供关于肿瘤的克隆进化及其侵袭性的线索。因此,通过从载片去除ROI以进行进一步分子分析,该信息丢失。

[0005] 已经基于对分子和蛋白生物标志物的原位染色创建了异质性图。参见例如Almendro, 等人, 2014, Cell Reports, 6: 514-527. Armani等人, Lab Chip, 2009, 9 (24): 3526-3534和Armani等人, Anal Bioanal Chem, 2011, 400: 3383-3393描述了不同的方法,其中将组织切片压入孔板中,其中在每孔中进行单次qPCR或RT-qPCR反应。随后,生成扩增的靶标的2D图。

[0006] US20140066318 A1描述了在其上放置组织样品的基底上的探针阵列。所述探针结合靶核酸,并且提取结合的探针和靶核酸且用于分子诊断。

[0007] 在本申请中,我们描述了一种方法,其通过有效地使用每个样品的多重化ROIs而允许核酸的高空间分辨率作图,而不会牺牲从下一代测序可得的多重化程度。本发明的方法基于应用考虑组织信息的包含条形码序列的寡核苷酸探针的图案,其中所述寡核苷酸探针结合样品中的核酸。可以使用各种应用技术,并且可以采用不同的图案化方式,如具有特定间距(pitch)的规则阵列,或者替代地,具有限定的目标区域而没有形状限制的基于对象的图案化。

[0008] 本发明的一个关键方面是基于组织信息和待回答的问题鉴定ROI并个别地定义图案的空间分辨率。目标区域以及图案的空间分辨率可以响应于在应用试剂之前对组织的基

于图像的分析来选择。通过鉴定至少一个ROI并且仅向ROI提供寡核苷酸探针，需要较少种类的寡核苷酸探针来提供空间图。此外，单独设计空间分辨率图案而不限于阵列格式，允许个别确定待使用的寡核苷酸探针的数量。因此，本发明的方法比常用现有技术方法便宜得多，并且与选择性概况分析相容。

[0009] 本发明的方法的另一个优点是其顺利地适合当前的数字病理学工作流程。常见的数字病理学工作流程是：

[0010] 1. 制备苏木精和伊红染料染色的载片，

[0011] 2. 扫描苏木精和伊红染料载片以获得数字图像

[0012] 3. 进行图像分析以达到病理学诊断(良性或恶性)，和

[0013] 4. 同时鉴定ROIs用于进一步分子诊断，以提供更精确的诊断结果。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及用于空间检测组织样品中的核酸的方法，其包括以下步骤：

[0016] 鉴定样品内的至少一个目标区域(ROI)；

[0017] 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上，且使所述寡核苷酸探针结合样品的核酸，其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列；

[0018] 提取核酸-寡核苷酸探针复合物；

[0019] 将提取的核酸分子测序；

[0020] 将测序的核酸分子与ROI内相应的靶向的核酸分子的初始位置相关联，以产生靶向的核酸分子的空间分布，其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。

[0021] 在一个实施方案中，在步骤d)之前经由DNA扩增从核酸-寡核苷酸探针复合物产生DNA分子。

[0022] 在另一个实施方案中，DNA分子的产生在逆转录反应之后发生。

[0023] 在一个实施方案中，步骤b)中的寡核苷酸探针与样品的核酸的结合经由杂交发生，其中所述寡核苷酸探针用作引物。

[0024] 在一个替代实施方案中，步骤b)中的寡核苷酸探针与样品的核酸的结合经由连接发生。

[0025] 在一个实施方案中，步骤e)还包括将靶向的核酸分子的空间分布与ROI的图像或在步骤b)之前或之后获得的鉴定了ROI的组织样品的图像相关联。

[0026] 在一个实施方案中，所述方法还包括提供二维空间图以显现靶向的核酸分子的空间分布。

[0027] 在一个实施方案中，所述方法还包括将二维空间图与ROI的图像或在步骤b)之前或之后获得的鉴定了ROI的组织样品的图像叠加。

[0028] 在一个实施方案中，将至少两个不同种类的寡核苷酸探针与步骤b)中的一种靶向的核酸分子结合，其中使用至少两个不同种类的寡核苷酸探针的独特组合来鉴定ROI内的靶向的核酸分子的位置。

[0029] 在一个实施方案中，结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针包含通用序列，其中任选地所述通用序列与所述靶向的核酸互补。

[0030] 在一个实施方案中，结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针包含额外序列，

其中所述额外序列是纯化序列或引物比对序列。

[0031] 在一个实施方案中,所述预定义的位置通过分隔掩蔽物(separation mask)来定义。

[0032] 在一个实施方案中,所述分隔掩蔽物是任选地印刷在样品上的顶部部分隔掩蔽物、或完全分隔掩蔽物,其中所述分隔掩蔽物是网格分隔掩蔽物、自由格式分隔掩蔽物或其组合。

[0033] 在一个实施方案中,通过液体转移技术,优选地通过接触印刷技术或非接触印刷技术,在步骤b)中将所述寡核苷酸探针应用至预定义的位置上,使得应用的寡核苷酸探针不在不同的预定义的位置之间混杂。

[0034] 在一个实施方案中,所述样品是组织病理学样本,优选脱石蜡的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)样品、新鲜冷冻(FF)样品或新鲜样品或细胞学样品。

[0035] 在一个实施方案中,所述靶向的核酸分子是RNA。

[0036] 在一个实施方案中,所述靶向的核酸分子是DNA。

#### [0037] 附图简述

[0038] 图1 本发明的概述。(A) 支持材料1和组织样品2以俯视图显示,并且以侧视图显示于小图中。(B) 已将分隔掩蔽物应用至组织样品的顶部上,生成预定义的位置7。所描绘的分隔掩蔽物组合网格分隔掩蔽物3和自由格式分隔掩蔽物4。然而,也可以单独使用网格分隔掩蔽物和自由格式分隔掩蔽物4。具有不同横截面结构的两种类型的分隔掩蔽物显示于提供侧视图的小图中:(a) 顶部分隔掩蔽物5,(b) 完全分隔掩蔽物6。(C) 将寡核苷酸探针已经在液相中应用至组织样品的预定义的位置上。小图提供侧视图:(a) 顶部分隔掩蔽物5,(b) 完全分隔掩蔽物6。

[0039] 图2 (A) 经由连接结合的寡核苷酸探针的示例性组成。显示了包含通用序列9、分别条形码序列10a和10b以及与核酸12结合的额外序列11的两种寡核苷酸探针8a和8b。(B) 标准寡核苷酸探针连接反应方案(改编自<http://rnaseq.uoregon.edu/#library-prep-addition-of-adapters-via-ligation>)。所述核酸是片段化的RNA。在第一个步骤中,将一种寡核苷酸探针连接至RNA的3'-末端。在第二个步骤中,将另一种寡核苷酸探针连接至RNA的5'-末端。在第三个步骤中,经由逆转录反应产生cDNA,其中包含用于下一代测序的序列的引物(NGS-衔接子)与寡核苷酸探针的引物比对序列杂交。在第四个步骤中,通过PCR扩增cDNA。

#### [0040] 实施方案的详述

[0041] 如本说明书和随附权利要求中所使用,“—(a)”和“—(an)”的单数形式还包括相应的复数形式,除非上下文另有清楚指明。

[0042] 在本发明的上下文中,术语“约”和“近似”表示本领域技术人员将理解仍确保讨论中的特征的技术效果的精确度的区间。该术语通常表示与所示数值的±20%、优选±15%、更优选±10%、且甚至更优选±5%的偏差。

[0043] 应当理解的是,术语“包含”不是限制性的。为了本发明的目的,术语“由...组成”被认为是术语“包含”的一个优选实施方案。如果组群在下文被定义为包含至少特定数目的实施方案,这意指也涵盖优选仅由这些实施方案组成的组群。

[0044] 此外,在说明书和权利要求中的术语“第一”、“第二”、“第三”或“(a)”、“(b)”、

“(c)”、“(d)”等用于区分类似的要素,而不一定用于描述依次或时间顺序。应当理解的是,如此使用的术语在适当情况下是可互换的,并且本文描述的本发明的实施方案能够以不同于本文描述或说明的其他顺序操作。

[0045] 在术语“第一”、“第二”、“第三”或“(a)”、“(b)”、“(c)”、“(d)”、“i”、“ii”等涉及方法或使用或测定的步骤的情况下,在所述步骤之间没有时间或时间间隔一致性,即这些步骤可以同时进行,或者在此类步骤之间可以存在数秒、数分钟、数小时、数天、数周、数月或者甚至数年的时间间隔,除非在本申请中如上文或下文中所述另外指出。

[0046] 应当理解的是,本发明不限于本文所述的具体方法学、方案、试剂等,因为这些可以变化。也应当理解的是,本文所用的术语仅仅是为了描述具体实施方案的目的,并且不意图限制仅由所附权利要求限制的本发明的范围。除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0047] 本发明涉及样品中核酸的空间作图。

[0048] 如本文所用的术语“空间作图”涉及将靶向的核酸分配至其在样品中的空间位置。空间图可以提供来自组织样品中的多个细胞的转录或基因组信息,其中信息通过二维空间分辨表征。空间图可以基于阵列创建,或者可以具有独特的空间分辨,因为可以基于ROI的单独特征且响应于在应用试剂之前对组织进行基于图像的分析来选择图案。靶向的核酸的空间分布可以与ROI的图像或与其中鉴定了ROI的组织样品的图像相关联以提供空间图的显现。因此,根据本发明的方法提供了个性化空间图,其可以考虑组织信息基于待回答的问题来设计。

[0049] 如本文所用,术语“核酸”表示可以通过使用本文方法检测的任何核酸分子。核酸分子包括天然存在的核酸诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)以及人工设计的核酸,例如通过重组基因技术的方式化学合成或产生的核酸类似物(参见,例如,Sambrook, J.等人(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。人工设计的核酸的具体实例包括肽核酸(PNA)或锁核酸(LNA)。天然存在的核酸的具体实例包括DNA序列诸如基因组DNA或cDNA分子以及RNA序列诸如hnRNA、mRNA或rRNA分子或其反向互补核酸序列。所述核酸可以是任何长度的,且可以是单链或双链分子。如本文所用,术语“核苷酸”应理解为指核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸(即RNA和DNA分子)。在一个实施方案中,所述核酸是DNA。在另一个实施方案中,所述核酸是RNA。

[0050] 如本文所用,术语“靶向的核酸”或“靶核酸”表示待作图的一种或多种核酸。在一个实施方案中,所述靶核酸涉及样品中的所有核酸,优选涉及样品的所有DNA或所有RNA。在另一个实施方案中,所述靶核酸涉及样品中特定类型的所有核酸,例如mRNA、tRNA或rRNA。在另一个实施方案中,所述靶核酸是一种或多种特定目标核酸。目标核酸可以是基因组的任何基因,优选人类基因组的任何基因。例如,所述靶核酸可能与疾病,例如恶性疾病诸如癌症、炎症、细菌感染或病毒感染相关。此类核酸的实例包括对病原体或病变细胞或组织特异性或由其产生的核酸,以及响应于疾病产生的核酸,例如编码细胞因子或抗原的核酸。靶向的核酸可以具有任何大小。在一个实施方案中,所述靶向的核酸是DNA。在另一个实施方案中,所述靶向的核酸是RNA。在一个优选实施方案中,所述靶向的核酸是RNA,优选样品的所有mRNA。

[0051] 所述靶核酸可以是片段化的或完整的。在一个实施方案中，所述靶核酸是片段化的。片段化的核酸可以通过本领域已知的任何方式产生，诸如物理方法，例如声波处理或超声处理，化学方法或酶促方法，例如用核酸内切酶诸如限制酶。可以在鉴定组织样品中的ROI之前、期间或之后进行片段化。在一个实施方案中，在固定组织的步骤中实现片段化。例如，样品的冷冻或用福尔马林固定样品可导致核酸的至少部分片段化。其他固定剂可产生类似的结果。片段化的核酸长度可以最高达约20000个核苷酸。通常，片段化的核酸长度为10至10000个核苷酸，例如，20至2000个核苷酸，30至1000个核苷酸或50至500个核苷酸。核酸的片段化不会导致所有核酸被片段化。因此，在片段化之后，核酸可以被部分片段化。在一个优选实施方案中，核酸被至少部分片段化。在另一个实施方案中，所述核酸是完整的。在一个实施方案中，所述靶向的核酸是片段化的DNA或片段化的RNA。在另一个实施方案中，所述靶向的核酸是完整的DNA或完整的RNA。在一个优选实施方案中，所述靶向的核酸是至少部分片段化的RNA，优选样品的所有mRNA。

[0052] 如本文所用，术语“核酸分子”是指存在于ROI内的预定义位置的一种特定核酸分子。例如，在其中ROI内的所有mRNA都被靶向的实施方案中，核酸分子代表一种mRNA分子。

[0053] 如本文所用，术语“样品”表示可以源自任何生物体例如植物、动物、真菌、人类的任何生物样品、或任何人工样品。在一个优选实施方案中，所述样品是组织样品。“组织样品”可以是收获的、培养的或活检的组织样品或其一部分。组织样品可以源自患病组织，诸如癌组织、发炎组织或感染组织，邻近患病组织的组织或健康组织。在一个优选实施方案中，所述组织样品源自患病组织或与其相邻的组织。

[0054] 所述组织样品可以是生物组织样品或人工组织样品。“生物组织样品”是指天然存在的细胞集合，且包括源自活检或手术的临床样品，细胞学样品或形成组织的培养细胞。生物组织样品可以通过组织样品制备的任何常规方法来制备。在一个实施方案中，所述生物组织样品是组织病理学样本。在另一个实施方案中，所述生物组织样品是细胞学样品。“人工组织样品”由不是天然形成实体组织的细胞（例如，血液或悬浮细胞培养物）制备。人工组织样品可以由获得自临床样品诸如全血、淋巴或CSF的细胞悬浮液或通过体外方法获得的细胞悬浮液制备。所述细胞可以被捕获在基质诸如凝胶基质中，并且通过如例如Andersson等人，2006，J Histochem Cytochem 54 (12) :1413-23所述的常规方法进行切片。所述人工组织样品可以是单细胞层或包含多个细胞层。在一个实施方案中，所述人工组织样品由获得自临床样品的细胞悬浮液制备。在另一个实施方案中，所述人工组织样品由通过体外方法获得的细胞悬浮液制备。在一个优选实施方案中，所述组织样品是生物组织样品，优选临床样品，甚至更优选组织病理学样品或细胞学样品。

[0055] 所述组织样品可以具有近似1个细胞或更小的厚度的细胞层。在一个实施方案中，所述组织样品的厚度将小于细胞的横截面的0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2或0.1。在另一个实施方案中，所述组织样品可以具有大于1个细胞的厚度。在一个实施方案中，所述组织样品切片的厚度将为至少约0.1 $\mu\text{m}$ ，优选至少约0.2、0.3、0.4、0.5、0.7、1.0、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10  $\mu\text{m}$ 。在其他实施方案中，所述组织样品切片的厚度为至少约10、11、12、13、14、15、20、30、40或50  $\mu\text{m}$ 。如果需要或方便，也可以使用较厚的样品，例如，所述组织样品可以具有约70或100 $\mu\text{m}$ 或更大的厚度。典型地，组织样品切片的厚度在约1-100  $\mu\text{m}$ 、1-50  $\mu\text{m}$ 、1-30  $\mu\text{m}$ 、1-25  $\mu\text{m}$ 、1-20  $\mu\text{m}$ 、1-15  $\mu\text{m}$ 、1-10  $\mu\text{m}$ 、3-10  $\mu\text{m}$ 、2-8  $\mu\text{m}$ 、3-7  $\mu\text{m}$ 或4-6  $\mu\text{m}$ 之间。

在一个优选实施方案中，所述组织样品具有3-10 $\mu\text{m}$ 的范围内的厚度。对于本发明的方法，组织样品的厚度不是关键的，并且这些值仅是代表性值。

[0056] 所述组织样品可以具有约2 cm<sup>2</sup>的大小。在一个实施方案中，所述组织样品具有约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2.0、2.5、3.0、3.5或4.0 cm或其之间的任何数字的长度和约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7或2.0 cm或其之间的任何数字的高度。所述样品的高度和长度是可互换的。在一个具体实施方案中，所述组织样品具有2.0×4.0cm的最大大小。在另一个实施方案中，所述组织样品具有约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.2、1.5、1.7、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5或8.0 cm<sup>2</sup>或其之间的任何数字的面积。在一个优选实施方案中，所述组织样品具有约2.0×4.0cm的最大大小，优选地，所述组织样品具有范围为约1.0至5.0 cm<sup>2</sup>的面积，更优选地面积为约2.0 cm<sup>2</sup>。

[0057] 所述组织样品可以是新鲜的，冷冻的，固定的或不固定的。在一个实施方案中，所述组织样品是新鲜样品。在另一个实施方案中，所述组织样品是新鲜冷冻的样品。在又另一个实施方案中，所述组织样品是固定的组织样品。本领域已知的任何程序可用于冷冻、固定或包埋组织样品。具体而言，可以使用任何已知的固定剂或包埋材料。在一个实施方案中，所述组织样品是脱石蜡的福尔马林固定且石蜡包埋(FFPE)样品。在一个优选实施方案中，所述组织样品是FFPE样品、新鲜冷冻样品或组织病理学样本的新鲜样品或细胞学样品，优选组织病理学样本的FFPE样品。

[0058] 在一个方面，本发明涉及用于空间检测组织样品中的核酸的方法，其包括以下步骤：

[0059] 鉴定样品内的至少一个目标区域(ROI)；

[0060] 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上，且使所述寡核苷酸探针结合样品的核酸，其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列；

[0061] 提取核酸-寡核苷酸探针复合物；

[0062] 将提取的核酸分子测序；

[0063] 将测序的核酸分子与ROI内相应的靶向的核酸分子的初始位置相关联，以产生靶向的核酸分子的空间分布，其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。

[0064] 如本文所用，术语“用于空间检测的方法”涉及用于检测靶核酸并鉴定所述核酸在样品中的初始位置的方法。

[0065] “靶向的核酸分子”对应于在步骤b)中由寡核苷酸探针结合的样品的核酸。

[0066] 考虑到可以根据本领域已知的任何程序获得的组织信息，可以在组织样品中鉴定目标区域(ROI)。例如，所述组织样品可以通过合适的标记物进行成像、染色或标记。在一个实施方案中，所述ROI通过染色来鉴定。在另一个实施方案中，所述ROI通过用合适的标记物进行标记来鉴定。在又另一个实施方案中，所述ROI通过成像来鉴定。在一个优选实施方案中，ROI基于图像分析来鉴定。图像分析可以自动或手动完成。在自动ROI选择的情况下，需要图像分析。可以使用所有进行图像分析的常用方法。

[0067] 如本文所提及的ROI也可以包含鉴定的ROI的周围区域，即与被鉴定为感兴趣的区域直接相邻的区域。ROI可以具有与组织样品(最大大小)和网格单元大小(最小大小)相同

大小的任何大小。优选的是，ROI的大小小于组织样品。

[0068] 在组织样品中，可以鉴定至少一个ROI。在组织样品中，也可以鉴定多于一个ROI。例如，所述组织样品可以包含两个、三个、四个、五个、十个或更多个ROI。不同的ROI可以通过不同的方式来鉴定，例如，一些ROI通过图像分析软件自动鉴定，并且病理学家也可以手动指定ROI。在一个优选实施方案中，在组织样品中鉴定至少一个ROI，优选在组织样品中鉴定两个ROI，更优选在组织样品中鉴定多于两个ROI。

[0069] 在一个具体实施方案中，所述组织样品可以被切成两层。在一层上应用用于成像步骤的标记。基于该参考层的图像，选择ROI并应用于第二层(核酸提取载片)。在第二层上，进行包含条形码序列的寡核苷酸探针的结合。该方法具有以下优点，与方案的以下步骤(例如寡核苷酸探针的结合、核酸分子提取或测序)不相容的成像标记可以在参考载片上使用，并且因此不干扰组织样品(核酸提取载片)的第二层上进行的反应。

[0070] 如本文所用，术语“寡核苷酸探针”表示包含条形码序列的核酸分子。寡核苷酸探针可以是例如RNA探针或DNA探针。包含相同条形码序列的寡核苷酸探针被称为“寡核苷酸探针的种类”。每种寡核苷酸探针都含有独特的条形码序列。条形码序列可以使用随机序列生成来设计或生成。可以分析设计或随机生成的序列以确保条形码序列不会干扰核酸的捕获。条形码序列可以连接至样品中的核酸。条形码序列不充当引物。所述条形码序列可以具有约1-8个核苷酸的范围内的大小。

[0071] 所述寡核苷酸探针可以进一步包含“通用序列”。所述通用序列可用于通过与待靶向的核酸杂交来捕获样品中的核酸。在一个实施方案中，所述通用序列用于选择性扩增样品中的核酸。在此实施方案中，所述通用序列被称为“引物序列”。引物序列与待靶向的样品中的核酸互补。例如，如果样品的总mRNA被靶向，则引物序列可以包含聚-T序列，或者如果仅由所述基因表达的核酸被靶向，则引物序列可以包含与特定基因的序列区段互补的核苷酸。在一个替代实施方案中，所述通用序列用于确保条形码序列与样品中的核酸的稳定连接，即通用序列可以连接至待靶向的样品中的核酸。在此实施方案中，所述通用序列被称为“连接序列”。在一个实施方案中，所述条形码序列直接连接至样品中的核酸，且不需要通用序列。在一个实施方案中，所述寡核苷酸探针包含至少一个通用序列。所述通用序列可以具有约0至100个核苷酸、优选0至50个核苷酸、更优选0至30个核苷酸、甚至更优选约5至30个核苷酸的范围内的大小。

[0072] 所述寡核苷酸探针可以进一步包含一个或多个“额外序列”。在一个实施方案中，可以使用额外序列来富集核酸(“富集序列”)或纯化核酸(“纯化序列”)。在另一个实施方案中，可以使用额外序列来富集和纯化核酸。额外序列也可以是用于测序过程的序列，例如用于下一代测序的衔接子或用于选择或鉴定的序列。在一个实施方案中，所述额外序列可以是引物比对的序列(“引物比对序列”)。在其中寡核苷酸探针包含连接序列的实施方案中，所述寡核苷酸探针可以进一步包含引物比对序列。所述引物序列可以与引物比对序列互补。

[0073] 所述寡核苷酸探针可以进一步包含一个或多个间隔区序列，也称为间隔区。所述间隔区可以在寡核苷酸探针的不同序列元件之间排列。所述间隔区可以具有约0至20个核苷酸的范围内的大小。所述寡核苷酸探针的长度可以在约15至150个核苷酸之间。在一个优选实施方案中，所述寡核苷酸探针的长度为约15至100个核苷酸，优选约20至50个核苷酸。

[0074] 所述寡核苷酸探针可以是干燥形式或液体形式。在一个优选实施方案中，所述寡核苷酸探针在液相中，优选在缓冲溶液或油墨(ink)中。油墨是指适于印刷的任何溶液。在其中寡核苷酸探针为干燥形式的实施方案中，所述寡核苷酸探针在应用之前溶解。

[0075] 在一个实施方案中，所述寡核苷酸探针结合样品中的所有DNA分子。在一个优选实施方案中，所述寡核苷酸探针结合样品中的所有RNA分子以提供转录组的空间图。在另一个优选实施方案中，所述寡核苷酸探针仅结合特定RNA分子，例如mRNA、rRNA、tRNA或其他非编码RNA，优选地，所述寡核苷酸探针特异性结合mRNA。

[0076] 术语“使寡核苷酸探针结合样品的核酸”是指产生核酸-寡核苷酸探针复合物。寡核苷酸探针与样品的核酸的结合通过不同的方法实现。

[0077] 在一个实施方案中，将寡核苷酸探针连接至样品中的靶向的核酸。连接可以经由条形码序列或通用序列(连接序列)发生。因此，在一个优选实施方案中，寡核苷酸探针与样品的核酸的结合经由连接发生。可以通过本领域已知的任何方法将寡核苷酸探针连接至靶核酸。例如，与mRNA的连接可以经由多聚-A尾，而与DNA的连接可以在产生与寡核苷酸探针杂交的粘性末端的消化步骤之后进行。在一个具体实施方案中，所述寡核苷酸探针包含(i)连接序列、(ii)条形码序列和任选地(iii)一个或多个额外序列。不同的序列可以通过间隔区分开。此外，额外序列也可以位于连接序列和条形码序列之间。如果靶核酸将被扩增，则存在引物比对序列。因此，在另一个具体实施方案中，所述寡核苷酸探针包含(i)连接序列、(ii)条形码序列和(iii)引物比对序列。所述寡核苷酸探针可以包含间隔区和/或另外的额外序列。序列以这样的方式排列在寡核苷酸探针内，所述方式使得在扩增或逆转录反应中条形码分别并入扩增的DNA或cDNA中。在另一个优选实施方案中，所述寡核苷酸探针包含条形码序列，所述条形码序列连接至可以随后为一个或多个通用序列和/或额外序列的核酸。

[0078] 在一个替代实施方案中，所述寡核苷酸探针包含引物序列。在这种情况下，需要核酸的扩增和/或逆转录。因此，在一个优选实施方案中，寡核苷酸探针与样品的核酸的结合经由杂交发生，其中所述寡核苷酸探针用作用于扩增或逆转录的引物。在其中寡核苷酸探针充当引物的实施方案中，所述寡核苷酸探针包含(i)引物序列、(ii)条形码序列和任选地(iii)一个或多个额外序列，其中所述引物序列充当用于扩增或逆转录反应的引物。所述寡核苷酸探针可以包含间隔区和/或另外的额外序列。序列以这样的方式排列在寡核苷酸探针内，所述方式使得在扩增或逆转录反应中条形码分别并入扩增的DNA或cDNA中。

[0079] 应当理解的是，所述寡核苷酸探针与样品中的核酸的结合不限于上述实施方案，并且可以经由多种其他方式发生。例如，可以将通用引物比对序列连接至靶向的核酸，并且所述寡核苷酸探针可以用作扩增或逆转录反应中的引物。另一个实例可以是连接至核酸，例如连接至消化之后的DNA的粘性末端，其上在第二连接反应中连接寡核苷酸探针。技术人员将意识到捕获待靶向的核酸的不同分子技术以及并入条形码序列的不同选择。

[0080] 寡核苷酸探针与样品中核酸的结合包括一种或多种寡核苷酸探针与ROI内预定义位置的核酸分子的结合。在一个实施方案中，将一种寡核苷酸探针应用至ROI内的每个预定义位置上。因此，在一个具体实施方案中，一种寡核苷酸探针在一个预定义位置结合一种靶向的核酸分子。该方法对于少数预定义位置或低分辨率方法是优选的。

[0081] 在另一个实施方案中，将至少两个不同种类的寡核苷酸探针应用至ROI内的一个预定义位置上。因此，在一个具体实施方案中，至少两个不同种类的寡核苷酸探针在一个预

定义位置结合一种靶向的核酸分子。该方法允许复杂分子概况的高空间分辨率作图，其有效地使用每个样品的多重ROI。在一个具体实施方案中，结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针经由其条形码序列经由连接而结合。在另一个具体实施方案中，结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针包含通用序列，其中任选地，所述通用序列与靶向的核酸互补。例如，一种寡核苷酸探针可以包含连接序列，而第二种寡核苷酸探针可以包含用于扩增或逆转录核酸的引物序列。在另一个实例中，一种寡核苷酸探针可以不包含通用序列，而第二种寡核苷酸探针可以包含通用序列；因此没有通用序列的寡核苷酸探针可以经由其条形码序列经由连接结合核酸分子，而具有通用序列的寡核苷酸探针可以经由其引物或连接序列经由杂交结合。在另一个实施方案中，结合一种核酸分子的至少一种寡核苷酸探针包含额外序列，其中所述额外序列是纯化序列或引物比对序列。例如，一种寡核苷酸探针可以包含连接序列和纯化序列，而第二种寡核苷酸探针可以包含引物序列。在另一个实例中，一种寡核苷酸探针可以不包含通用序列但包含额外序列，和第二种寡核苷酸探针可以仅包含通用序列；因此没有通用序列的寡核苷酸探针可以经由其条形码序列经由连接结合核酸分子并且包含正向引物与其杂交的引物比对序列，且具有通用序列的寡核苷酸探针可以经由杂交结合，其中所述通用序列充当反向引物。应当理解的是，一种寡核苷酸探针内的序列的组合不限于上述实施方案。技术人员将意识到，对于捕获待靶向的核酸并用相应的条形码标记它们，许多其他组合是可能的。因此，明确涵盖当与适合于有效标记靶向的核酸的至少另外一种寡核苷酸探针组合时一种寡核苷酸探针内的序列的进一步组合。

[0082] 其上应用寡核苷酸探针的“预定义位置”代表ROI内的一个或多个位置。取决于研究者的问题，整个ROI可以被分成单独的预定义位置，即一个预定义位置紧挨着另一个预定义位置，使得它们共享边界，或者可以选择ROI的部分，即，ROI内的预定义位置可代表其上没有应用探针的ROI中的区域分开的小岛。优选地，预定义的位置是指ROI内多于一个位置。

[0083] 在一个实施方案中，ROI内的预定义位置例如以行和列系统地排列。在一个实施方案中，ROI包含至少1、2、5、10、50、100、500、750、1000、1500、3000、5000、10000、20000、40000、50000、75000、100000、150000、200000、300000、400000、500000、750000、800000、1000000或更多个预定义位置。在一个优选实施方案中，ROI包含至少1、2、5、10、20、30、40、50或100个预定义位置，优选地，ROI包含至少10个预定义位置。在另一个实施方案中，每个预定义位置的面积可以是约 $1 \mu\text{m}^2$ 、 $2 \mu\text{m}^2$ 、 $3 \mu\text{m}^2$ 、 $4 \mu\text{m}^2$ 、 $5 \mu\text{m}^2$ 、 $10 \mu\text{m}^2$ 、 $12 \mu\text{m}^2$ 、 $15 \mu\text{m}^2$ 、 $20 \mu\text{m}^2$ 、 $50 \mu\text{m}^2$ 、 $75 \mu\text{m}^2$ 、 $100 \mu\text{m}^2$ 、 $150 \mu\text{m}^2$ 、 $200 \mu\text{m}^2$ 、 $250 \mu\text{m}^2$ 、 $300 \mu\text{m}^2$ 、 $400 \mu\text{m}^2$ 或 $500 \mu\text{m}^2$ 。向每个预定义位置应用寡核苷酸探针的独特种类或两个或多个不同种类的寡核苷酸探针的独特组合。如果应用两种或更多种寡核苷酸探针，则优选将不同种类的寡核苷酸探针应用于每一行，并将不同种类的寡核苷酸探针应用于每一列。例如，第1行包含一种寡核苷酸探针，所述寡核苷酸探针与第2行中的寡核苷酸探针的种类不同，所述第2行中的寡核苷酸探针的种类又与第3行中的寡核苷酸探针不同，等等。第A列包含与各行中应用的任何寡核苷酸探针的种类不同的寡核苷酸探针的种类，第B列再次包含寡核苷酸探针的另外不同种类等。第A列、第1行(A1)中的预定义位置因此具有寡核苷酸探针的独特组合，其不同于A2、B1或B2等的组合。使用这种方法，需要采用较少种类的寡核苷酸探针，降低了测定的成本。可以添加另外种类的寡核苷酸探针，例如在对角线上或向自由定义的预定义位置、诸如子-ROI添加不同种类的寡核苷酸探针。在一个优选实施方案中，向每个预定义位置应用至少两种寡核

昔酸探针的独特组合,优选两种寡核昔酸探针的独特组合。

[0084] 在一个替代实施方案中,ROI内的预定义位置是自由定义的。预定义位置的自由排列具有以下优点:可以定义ROI内的其他目标子区域(子-ROI)而没有任何限制。因此,与具有相同大小的规则特征的列和行的阵列的传统排列相比,自由排列允许具有任何形状和大小的预定义位置以及具有不同形状和大小的不同预定义位置。例如,在组织样品中,可以基于特定细胞类型的存在来鉴定ROI。在所述ROI内,可以基于形态特征来鉴定进一步的子-ROI。这些子-ROI可以在ROI内形成不同形状和大小的独特岛。可以定义ROI内的预定义位置,使得每个子-ROI代表单独的预定义位置。在这种情况下,剩余的ROI减去由子-ROI覆盖的区域可能是不感兴趣的,并且没有寡核昔酸探针被应用至该区域上,或者它可以代表另外的预定义位置,或者其可以通过行和列的系统性排列来进一步分成预定义位置。可以向每个预定义位置应用寡核昔酸探针的独特种类或两种或多种的寡核昔酸探针的独特组合。代表单独的预定义位置的子-ROI可以彼此不同或可以部分重叠。在其中子-ROI部分重叠的情况下,重叠的区域可通过对第一个子-ROI特异性的至少一种寡核昔酸探针和对第二个子-ROI特异性的至少一种寡核昔酸探针的独特组合来鉴定。在一个实施方案中,至少两个子-ROI部分重叠。在另一个实施方案中,多于两个子-ROI部分重叠。在又一个实施方案中,所述子-ROI不重叠。任何信息都可以用于鉴定子-ROI,而子-ROI的鉴定不限于通过鉴定ROI获得的信息。可以用于鉴定子-ROI的特征包括但不限于细胞类型、形态、颜色、透明度、特定分子(例如抗体、细胞因子或药物)的存在/不存在或者在从患者取组织样品之前将辐射应用至组织样品的特定区域。

[0085] 在一个进一步实施方案中,通过应用掩蔽物(mask)来定义预定义位置。所述掩蔽物可以是“分隔掩蔽物”。分隔掩蔽物可以具有任何图案来标记ROI。在一个实施方案中,所述分隔掩蔽物是提供用于ROI的系统位置表征的行和列的“网格分隔掩蔽物”(图1)。在另一个实施方案中,所述分隔掩蔽物可以是基于ROI和子-ROI的形状的“自由格式分隔掩蔽物”(图1)。在另一个实施方案中,所述分隔掩蔽物可以是如图1中示例性显示的网格分隔掩蔽物和自由格式分隔掩蔽物的组合。

[0086] 所述分隔掩蔽物可以以不同的方式应用。在一个实施方案中,所述分隔掩蔽物通过提供通过组织样品的整个厚度应用的完全沟槽(“完全分隔掩蔽物”),优选地通过刮擦、激光烧蚀或通过创建物理屏障诸如金属栅格来限定预定义区域。在另一个实施方案中,所述分隔掩蔽物通过提供顶部屏障(“顶部分隔掩蔽物”)来限定预定义区域。所述顶部分隔掩蔽物可以通过物理屏障来限定预定义位置。顶部分隔掩蔽物还可以通过将试剂限制在期望区域中的结构化过程(“位置掩蔽物”),优选地通过拓扑约束或者通过将组织的可润湿性局部图案化来限定预定义区域。光刻技术可以用于使此类层结构化。在一个优选实施方案中,ROI的表面在ROI表面上蒸发的薄金层上用自组装的单层(SAM)结构化。SAM层可以通过在金层的蚀刻中用作抗蚀剂的有机硫醇的微接触印刷来应用。SAM是疏水性的且防止喷墨印刷期间的寡核昔酸探针的扩散。顶部分隔掩蔽物也可以被印刷在ROI的顶部,其中油墨充当物理屏障。图1在侧视图中示例性显示顶部分隔掩蔽物5和完全分隔掩蔽物6。在一个实施方案中,所述预定义的位置通过分隔掩蔽物来定义。在一个优选实施方案中,所述分隔掩蔽物是任选地印刷在样品上的顶部分隔掩蔽物或完全分隔掩蔽物,其中所述分隔掩蔽物是晶格分隔掩蔽物、自由格式分隔掩蔽物或其组合。在一个更优选实施方案中,所述分隔掩蔽物是通

过印刷应用的顶部分隔掩蔽物。可以使用用加热喷墨印刷头对蜡进行喷墨印刷，或者用UV可固化油墨进行喷墨印刷。两者都是图形行业的众所周知的技术。

[0087] 顶部掩蔽物也可以作为预先制造的整体部件(像具有开放式基底的微量滴定板一样)来应用。微量滴定板可以是384孔板或1536孔板，或当为此目的制造时的任何其他数目。孔板可以夹在组织样品上以确保孔板的塑料壁和组织样品之间良好的物理接触。然后可以将寡核苷酸探针添加并溶解在与预定的ROI重叠的每个孔中的缓冲液中。每个孔可以接受不同的油墨，即不同的寡核苷酸探针。多次沉积可能提供所有试剂。可以使用喷墨印刷或微量给料来将试剂提供给各孔。此顶部掩蔽物的壁的高度大约为0.5至5 mm。这意味着每个孔中的分配体积可以是约100nL至10μL，更优选0.5至2μL。

[0088] 在另一个实施方案中，不使用分隔掩蔽物(其为物理、化学或机械掩蔽物)，并且通过局部应用寡核苷酸探针来限定预定位置，使得它们不在样品上不同的预定义位置之间混杂。在一个实施方案中，寡核苷酸探针使用不容易扩散或其中体积保持足够小以维持所需空间分辨率的印刷油墨应用，其中所述印刷图案限定预定义位置。在该实施方案中，应用寡核苷酸探针和限定预定义位置同时发生。油墨可以在施用后凝胶化以确保固定在所需位置上，而寡核苷酸探针仍能够扩散至组织样品的ROI中。现有技术的液体转移技术可用于在ROI上以特定图案应用寡核苷酸探针。在一个实施方案中，通过液体转移技术，优选地通过接触印刷技术或非接触印刷技术，将所述寡核苷酸探针应用至预定义的位置上，使得应用的寡核苷酸探针不在不同的预定义的位置之间混杂。在一个优选实施方案中，所述液体转移技术是接触印刷技术，优选蘸-笔绘图(dip-pen plotting)或微-接触印刷。在另一个优选实施方案中，所述液体转移技术是非接触式印刷技术，优选喷墨。在一个实施方案中，寡核苷酸探针以水平线或定位在水平线(代表行)中的点印刷。然后，使用垂直移动以垂直线印刷寡核苷酸探针，或者将其置于已经存在的点(代表列)的顶部。可以使用可以同时印刷不同印刷油墨的多喷嘴印刷机。可以使用热喷墨或压电驱动的喷墨头。压电驱动的印刷机对于避免印刷油墨中的蛋白的可能降解是优选的。所选择的液体转移技术可以基于期望的分辨率进行调整。在另一个实施方案中，所述寡核苷酸探针根据鉴定的子-ROI的形状来印刷。

[0089] 印刷油墨含有溶解在溶剂(如水或盐水缓冲液，任选地含有表面活性剂和稳定剂)中的寡核苷酸探针。油墨中寡核苷酸探针的浓度可以在1nM至1mM之间、优选在100nM至10μM之间的范围内。不同的寡核苷酸可以溶解在相同的油墨中。还优选将酶溶解在相同的油墨中。为了酶的稳定性，BSA或其它血清可以对于稳定储存典型的浓度(例如，在0.5和5 % w/w之间)添加。

[0090] 选择对于所使用的沉积技术典型且取决于所需的空间分辨率的印刷体积。对于喷墨印刷，所述印刷体积可以在50pL和5μL之间、更优选在100pL和1μL之间的范围内。对于蘸-笔绘图，转移的体积取决于笔大小和停留时间。典型的转移体积在1pL和1μL之间、优选在10pL和100nL之间的范围内。

[0091] 如针对其中未使用分隔掩蔽物的实施方案所描述的寡核苷酸探针的应用也可以用于其中预定义位置由分隔掩蔽物限定的实施方案。例如，在第一个步骤中，可以印刷限定预定义位置的分隔掩蔽物，并且在第二个步骤中，寡核苷酸探针可以通过印刷至预定义位置上来应用。因此，在一个实施方案中，通过印刷来应用寡核苷酸探针。在另一个实施方案

中,通过与印刷不同的方法(诸如移液)来应用所述寡核苷酸探针。

[0092] 寡核苷酸探针也可以在凝胶样层或凝胶层中制备,其中将该层应用至ROI内的预定义位置上。可以在单一步骤中在ROI上应用凝胶层,并通过扩散将寡核苷酸探针转移至ROI。如本文所用,术语“凝胶样”或“凝胶”表示可以具有范围为软和易破(weak)到硬和韧(tough)的特性的固态果冻样材料,其中寡核苷酸探针能够从凝胶扩散进入ROI。因此,在一个实施方案中,所述寡核苷酸探针为应用至样品上的凝胶层或凝胶样层的形式。

[0093] 寡核苷酸探针也可以应用于分开的一次性物品(例如,具有小孔,如孔板),其在后面将连接至ROI上。该方法具有以下优点:其可以离线生产,包括相关的质量控制措施,以检查是否所有液体都已经存放。寡核苷酸探针在单独的一次性物品中的离线沉积使得在病理学实验室中使用液体转移设备过时。在一个实施方案中,可以将ROI压入孔板中,如Armani等人,2009,Lab Chip 9(24):3526-3534和Armani等人,2011,Anal Bioanal Chem 400:3383-3393中所述。可以通过点样将寡核苷酸探针或寡核苷酸探针的独特组合添加至每个孔的底部。所述寡核苷酸探针可以在使用前干燥。

[0094] 寡核苷酸探针也可以通过上述方式的组合和/或不使用分隔掩蔽物和使用分隔掩蔽物的组合来应用。例如,在第一个步骤中,可以将寡核苷酸探针印刷至不同的子-ROI上,由此在不使用分隔掩蔽物的情况下限定预定义位置,并且在第二个步骤中,可以通过移液将寡核苷酸探针应用至由顶部分隔掩蔽物限定的预定义位置上。因此,所述寡核苷酸探针可以依次或同时应用。应当理解的是,许多进一步的组合是可能的,并且寡核苷酸探针的应用不限于上述实施方案。

[0095] 在其中多于两种寡核苷酸探针被应用至ROI内的预定义位置上的实施方案中,所述应用可以是依次的。例如,可以在第一个步骤中应用待连接至核酸分子的寡核苷酸探针,提供探针与核酸分子连接的条件,并且在第二个步骤中,可以应用与核酸分子杂交的寡核苷酸探针和/或与核酸分子连接的寡核苷酸探针。因此,在一个实施方案中,将不同种类的寡核苷酸探针依次应用至ROI内的预定义位置上。在另一个实施方案中,将不同种类的寡核苷酸探针同时应用至ROI内的预定义位置上。

[0096] 在一个优选实施方案中,将寡核苷酸探针以液相应用至ROI内的预定义位置上。在一个进一步优选的实施方案中,将寡核苷酸探针在液相中应用至ROI内的预定义位置上,其中考虑组织信息而鉴定预定义位置。在一个进一步优选的实施方案中,将寡核苷酸探针在具有高离子强度的液相中应用以实现与靶分子的杂交。在另一个优选实施方案中,将寡核苷酸探针通过应用的温度步骤或辐射在应用至样品后立即凝胶化的液相中应用。这可以通过添加聚合物(如在溶液中经历热可逆凝胶化的聚丙烯酰胺)和/或添加可以在照射下聚合且以这种方式导致凝胶化的单体来实现。凝胶化应当避免在不同的预定义位置处探针的可能混杂。

[0097] 可以将ROI中的核酸分子预处理。在一个实施方案中,将样品的核酸预处理以靶向正确类型的核酸分子和/或用于有效连接寡核苷酸探针。在其中待靶向的核酸是DNA分子的实施方案中,预处理可以涵盖根据本领域众所周知的方法消化DNA以提供更小大小的DNA片段。

[0098] 在将寡核苷酸探针应用至ROI内的预定义位置之后,寡核苷酸探针扩散至ROI中。寡核苷酸探针的大小允许在短时间内深度渗透组织样品。然后,ROI的其预定义位置内的寡

核苷酸探针结合样品的核酸，由此产生核酸-寡核苷酸探针复合物。如本文所用，术语“核酸-寡核苷酸探针复合物”表示待检测的核酸和至少一种寡核苷酸探针的复合物。待检测的核酸可以与多于一种寡核苷酸探针复合，例如与两种寡核苷酸探针复合。在扩散和结合的过程期间，在表面提供潮湿的气氛以避免溶剂的蒸发。在该时段期间可以应用温度步骤以实现反应的良好转化。分隔掩蔽物可以在该步骤期间保持在原位，或者任选地在应用探针之后被移除。升高的温度加速扩散和结合反应。在使用杂交用于结合的情况下，温度应当保持低于探针的解链温度。或者，应当选择温度，使得连接酶表现良好。在一个优选实施方案中，所述温度在约20至45°C之间，优选在约30至40°C之间的范围内。

[0099] 在寡核苷酸探针与样品的核酸结合之后，从ROI提取核酸-寡核苷酸探针复合物。在一个实施方案中，所述提取通过在升高的温度下将ROI浸入提取缓冲液中来进行。可以使用在用于分子测定的样品制备中常用且本领域已知的提取缓冲液。提取的核酸可以收集在单个管中用于进一步分析。提取的核酸-寡核苷酸探针复合物的溶液被称为空间分子概况(SMP)提取物。

[0100] 在一个实施方案中，提取的核酸通过本领域已知的方法纯化。在另一个实施方案中，提取的核酸通过本领域已知的方法富集。在一个进一步实施方案中，将提取的核酸纯化和富集。

[0101] 在又一个进一步实施方案中，经由DNA扩增从提取的核酸-寡核苷酸探针复合物产生DNA分子，任选地，其中DNA分子的产生在逆转录反应之后发生。在一个优选实施方案中，提取的核酸是逆转录和扩增的RNA分子。

[0102] 核酸扩增可以通过循环扩增的方式来实现。循环扩增可以包含等于或大于2的任何数目的扩增循环。通常，循环扩增反应包含至少10个或至少20个循环。示例性的循环扩增是聚合酶链式反应(PCR)。PCR是分子生物学中已建立的标准方法，其例如详细描述于Sambrook等人(同上)中。典型地，通过采用热稳定的DNA聚合酶，PCR用于扩增双链DNA分子。在一个优选实施方案中，所述核酸扩增是循环扩增，优选PCR。

[0103] 在替代实施方案中，核酸扩增通过等温扩增方法来实现。在等温条件下扩增核酸使得可能避免使用热循环装置。存在技术人员已知的几种类型的等温核酸扩增方法，包括切口酶扩增反应、转录介导的扩增、基于核酸序列的扩增、RNA技术的信号介导的扩增、链置换扩增、滚环扩增、环介导的等温扩增、等温多重置换扩增、解旋酶依赖性扩增、单引物等温扩增和环状解旋酶依赖性扩增。等温核酸扩增技术综述于例如P. Gill和A. Ghaemi, 2008, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids 27 (3) :224-243。

[0104] 如果核酸是RNA，则DNA分子的产生还包括使核酸在使它们进行扩增之前进行逆转录。逆转录是分子生物学中的另一种标准方法，并且也描述于例如Sambrook等人，同上。

[0105] 在提取核酸-寡核苷酸探针复合物且任选地进行上述任何方法之后，将SMP提取物测序。如本文所用的术语“将提取的核酸分子测序”应当广义地理解，即是指提供序列信息的任何方法。例如，序列信息可以通过与特异性探针或微阵列杂交来获得。在一个实施方案中，将提取的核酸分子测序是指DNA分子、任选地通过逆转录获得自RNA的DNA分子的测序。适于将DNA分子测序的方法是本领域已知的，并且包括但不限于Sanger测序、焦磷酸测序或下一代测序(NGS)。在另一个实施方案中，将提取的核酸分子测序是指通过纳米孔测序、微RNA测序或全转录组鸟枪法测序将RNA分子测序。在一个优选实施方案中，所述测序是DNA测

序,优选NGS。

[0106] 在通过NGS获得序列信息的情况下,在其中寡核苷酸探针充当NGS中的引物的实施方案中,寡核苷酸探针包含NGS衔接子作为额外序列。

[0107] 在已经获得测序的核酸分子的序列信息之后,测序的核酸分子与ROI内相应的靶向的核酸分子的初始位置相关联,以产生靶向的核酸分子的空间分布。因此,生成空间二维图,其中所测序的核酸根据预定的位置来显示,例如通过由它们所源自的分隔掩蔽物来定义。因此,在一个实施方案中,将测序的核酸分子与ROI内预定义位置内相应的靶向的核酸分子的初始位置相关联,以产生靶向的核酸分子的空间分布,其中每个位置通过结合至ROI内的预定义位置中的样品的核酸的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。在另一个实施方案中,使用至少两个不同种类的寡核苷酸探针的独特组合来鉴定ROI内的靶向的核酸分子的位置。提取和测序的核酸分子包含与ROI内预定义位置中的样品的靶核酸结合的寡核苷酸探针的条形码序列。由于向ROI内的每个预定义位置都应用结合样品的靶核酸的寡核苷酸探针的独特种类或寡核苷酸探针的独特组合,因此提取和测序的核酸分子涵盖寡核苷酸探针的条形码序列。每个核酸分子可基于其包含的条形码序列与应用包含所述条形码序列的寡核苷酸探针的种类的预定义位置相关联。所得的关联性提供了显示ROI内的靶向的核酸的初始位置的空间图。此空间图可以例如提供关于核酸的表达状态、突变状态、降解状态、甲基化状态、表观遗传状态或其组合的信息。

[0108] 在一个实施方案中,靶向的核酸分子的空间分布可以与ROI的图像或与其中鉴定了ROI的组织样品的图像相关联。可以显现靶向的核酸分子的空间分布,其提供二维空间图。在一个实施方案中,将靶向的核酸分子的空间分布与获得自ROI的图像的空间图案相关联。因此,在一个实施方案中,所述方法提供二维空间图以显现靶向的核酸分子的空间分布。在一个进一步实施方案中,所述方法还包括将二维空间图与ROI的图像或其中鉴定了ROI的组织样品的图像叠加。可以在鉴定ROI之前或之后获得ROI的图像。因此,在一个实施方案中,在鉴定至少一个ROI之前从组织样品获得图像。在另一个实施方案中,在鉴定至少一个ROI之后获得组织的图像。在又另一个实施方案中,在将寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义位置之前或之后,从ROI获得图像。所述图像可以通过本领域已知的任何方法(例如数字病理学或具有照相机的显微镜)获得。在一个实施方案中,将靶向的核酸分子的空间分布与位于ROI内且通过分隔掩蔽物限定的预定义位置相关联,其中在应用分隔掩蔽物之后以及在将寡核苷酸探针应用至ROI内的预定义位置上之前或之后,优选在应用寡核苷酸探针之前,获得所述图像。在一个优选实施方案中,将靶向的核酸分子的空间分布与在将寡核苷酸探针应用至ROI内的预定义位置上之前或之后、优选在应用寡核苷酸探针之前获得的ROI的图像相关联。在另一个优选实施方案中,将靶向的核酸分子的空间分布与在应用分隔掩蔽物之后和将寡核苷酸探针应用至通过分隔掩蔽物限定的预定义位置之前获得的ROI的图像相关联。

[0109] 空间图可以例如通过展现假色来显现,其中每个预定义的位置通过代表相同颜色的区域的网格来限定。空间图可以与ROI的图像或组织样品的图像叠加。例如,空间图被配置为半透明图像,并且被叠加在ROI的图像上或与组织样品的图像叠加。或者反之,ROI的图像或组织样品的图像被配置为半透明图像,并且被叠加在空间图上。在一个优选实施方案中,在用相同种类的寡核苷酸探针的测定法中测定的相同的靶向的核酸分子的数量或量与

相应预定义位置中的图的颜色相关。在另一个实施方案中，靶向的核酸分子的特定组合，如例如携带已知致癌突变的那些的子集，与颜色相关。在又另一个实施方案中，与特定基因相关的靶向的核酸分子的特定集合的过表达可以与图上的颜色相关联。应当理解的是，取决于所解决的生物学和/或临床问题，可以定义许多不同的概况并且与视觉显示的方式相关。可以在空间图中显示其他注释来代替颜色或与颜色组合。

[0110] 靶向的核酸分子的空间分布与初始图像的空间图案(即空间图)的关联性可用于回答临床问题并为临床决策提供指导。通过由本发明的方法创建的空间图获得的结果可以用于临床诊断或监测患者中的临床反应。靶向的核酸分子的空间分布与初始图像的空间图案的关联性也可用于研究领域中。

[0111] 在一个优选实施方案中，将组织样品和/或ROI成像。拍摄的组织样品的图像可用于基于在应用试剂之前对组织的基于图像的分析来鉴定目标区域以及图案的空间分辨率。

[0112] 本发明的另一个方面涉及一种反应，其将5' - 寡核苷酸探针和3' - 寡核苷酸探针连接至RNA分子的5' - 末端和3' - 末端，且同时应用在寡核苷酸探针二聚体的连接位点上引入限制性位点的DNA分子和适于切割限制性位点的限制酶，其中DNA分子的5' - 末端和3' - 末端被修饰，使得它们不参与连接反应。由此，当寡核苷酸探针彼此反应时在它们之间存在的二聚体(即寡核苷酸探针二聚体)被切割成完全活性的单个5' - 寡核苷酸探针和3' - 寡核苷酸探针。可以在连接反应中重新使用切割的寡核苷酸探针以连接至RNA分子的5' - 末端和3' - 末端。

[0113] 一个具体实施方案涉及在FFPE组织样品上的连接反应，其将5' - 寡核苷酸探针和3' - 寡核苷酸探针连接至RNA分子的5' - 末端和3' - 末端，且同时应用在寡核苷酸探针二聚体的连接位点上引入限制性位点的DNA分子和适于切割限制性位点的限制酶，其中DNA分子的5' - 末端和3' - 末端被修饰，使得它们不参与连接反应。

[0114] 在如图2B中所示的标准寡核苷酸探针连接反应方案中，通过逆转录反应猝灭连接反应，由此避免形成寡核苷酸探针二聚体。逆转录反应在FFPE组织样品上相当低效。在本发明的寡核苷酸探针连接方案中，寡核苷酸探针二聚体被限制酶切割，因此可以避免FFPE组织样品上的逆转录反应步骤。此外，使用本发明的方案，T4 RNA连接酶I和II反应可以在一个步骤中组合，如实施例和图3中所述。因此，本发明的寡核苷酸探针连接反应方法优于现有技术。

[0115] 在一个具体实施方案中，本发明涉及连接反应，其将5' - 寡核苷酸探针和3' - 寡核苷酸探针连接至RNA分子的5' - 末端和3' - 末端，且同时应用在寡核苷酸探针二聚体的连接位点上引入HaeIII限制性位点的DNA分子和在限制性位点处切割的HaeIII限制酶。

[0116] 上述连接反应可以用于如本文所述的用于空间检测组织样品中的RNA分子的方法的步骤b) 中。

[0117] 具体而言，上述连接反应可以用于如本文所述的用于空间检测FFPE组织样品中的RNA分子的方法的步骤b) 中。由此可以避免逆转录反应必须在FFPE组织样品上进行。该方法是有利的，因为其避免了对于FFPE样品而言相当低效的逆转录反应。此外，使用该方案，可以在一个步骤中组合T4 RNA连接酶I和II反应。

[0118] 在一个具体实施方案中，空间检测组织样品中的核酸的方法包括以下步骤：

[0119] a1) 获取组织样品的图像；

- [0120] a2) 鉴定样品内的至少一个ROI；
- [0121] a3) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI；
- [0122] b) 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上，且使所述寡核苷酸探针结合样品的核酸，其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列；
- [0123] c) 提取核酸-寡核苷酸探针复合物；
- [0124] d) 将提取的核酸分子测序；
- [0125] e) 将测序的核酸分子与ROI内相应的靶核酸分子的初始位置相关联，以产生靶向的核酸分子的空间分布；其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。
- [0126] 在另一个具体实施方案中，空间检测FFPE组织样品中的核酸的方法包括以下步骤：
- [0127] a1) 将FFPE组织样品脱石蜡；
- [0128] a2) 获取组织样品的图像；
- [0129] a3) 鉴定样品内的至少一个ROI；
- [0130] a4) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI；
- [0131] b) 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上，且使所述寡核苷酸探针结合样品的核酸，其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列；
- [0132] c) 提取核酸-寡核苷酸探针复合物；
- [0133] d) 将提取的核酸分子测序；
- [0134] e) 将测序的核酸分子与ROI内相应的靶核酸分子的初始位置相关联，以产生靶向的核酸分子的空间分布；其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。
- [0135] 在一个具体实施方案中，空间检测组织样品中的RNA的方法包括以下步骤：
- [0136] a1) 获取组织样品的图像；
- [0137] a2) 鉴定样品内的至少一个ROI；
- [0138] a3) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI；
- [0139] b) 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上，且使所述寡核苷酸探针结合样品的RNA分子，其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列；
- [0140] c) 提取RNA-寡核苷酸探针复合物；
- [0141] d) 将提取的RNA分子测序；
- [0142] e) 将测序的RNA分子与ROI内相应的靶RNA分子的初始位置相关联，以产生靶向的RNA分子的空间分布；其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。
- [0143] 在一个具体实施方案中，空间检测FFPE组织样品中的RNA分子的方法包括以下步骤：
- [0144] a1) 将FFPE组织样品脱石蜡；
- [0145] a2) 获取组织样品的图像；
- [0146] a3) 鉴定样品内的至少一个ROI；
- [0147] a4) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI；

- [0148] b) 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上,且使所述寡核苷酸探针结合样品的RNA分子,其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列;
- [0149] c) 提取RNA-寡核苷酸探针复合物;
- [0150] d) 将提取的RNA分子测序;
- [0151] e) 将测序的RNA分子与ROI内相应的靶RNA分子的初始位置相关联,以产生靶向的RNA分子的空间分布;其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸来鉴定。
- [0152] 在一个具体实施方案中,空间检测FFPE组织样品中的RNA的方法包括以下步骤:
- [0153] a1) 将FFPE组织样品脱石蜡;
- [0154] a2) 获取组织样品的图像;
- [0155] a3) 鉴定样品内的至少一个ROI;
- [0156] a4) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI;
- [0157] b) 将5' -RNA探针和3' -RNA探针应用于ROI内的预定义的位置上,且允许RNA探针连接至样品的RNA分子的5' -末端和3' -末端,其中所述RNA探针包含条形码序列;
- [0158] c) 提取RNA -RNA探针复合物;
- [0159] d) 将提取的RNA分子测序;
- [0160] e) 将测序的RNA分子与ROI内相应的靶RNA分子的初始位置相关联,以产生靶向的RNA分子的空间分布;其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种RNA探针来鉴定。
- [0161] 在一个具体实施方案中,空间检测FFPE组织样品中的RNA的方法包括以下步骤:
- [0162] a1) 将FFPE组织样品脱石蜡;
- [0163] a2) 获取组织样品的图像;
- [0164] a3) 鉴定样品内的至少一个ROI;
- [0165] a4) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI;
- [0166] b) 将5' -RNA探针和3' -RNA探针应用于ROI内的预定义的位置上,且允许RNA探针连接至样品的RNA分子的5' -末端和3' -末端,其中所述RNA探针包含条形码序列,且同时应用在RNA探针二聚体的连接位点上引入限制性位点的DNA分子和适于切割限制性位点的限制酶;
- [0167] c) 提取RNA -RNA探针复合物;
- [0168] d) 将提取的RNA分子测序;
- [0169] e) 将测序的RNA分子与ROI内相应的靶RNA分子的初始位置相关联,以产生靶向的RNA分子的空间分布;其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种RNA探针来鉴定。
- [0170] 在一个具体实施方案中,空间检测FFPE组织样品中的RNA的方法包括以下步骤:
- [0171] a1) 将FFPE组织样品脱石蜡;
- [0172] a2) 获取组织样品的图像;
- [0173] a3) 鉴定样品内的至少一个ROI;
- [0174] a4) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI;
- [0175] b) 将5' -RNA探针和3' -RNA探针应用于ROI内的预定义的位置上,且允许RNA探针连接至样品的RNA分子的5' -末端和3' -末端,其中所述RNA探针包含条形码序列,且同时应用在RNA探针二聚体的连接位点上引入HaeIII限制性位点的DNA分子和HaeII限制酶,
- [0176] c) 提取RNA -RNA探针复合物;

- [0177] d) 将提取的RNA分子测序；
- [0178] e) 将测序的RNA分子与ROI内相应的靶RNA分子的初始位置相关联，以产生靶向的RNA分子的空间分布；其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种RNA探针来鉴定。
- [0179] 在一个具体实施方案中，空间检测组织样品中的DNA的方法包括以下步骤：
- [0180] a1) 获取组织样品的图像；
- [0181] a2) 鉴定样品内的至少一个ROI；
- [0182] a3) 将掩蔽物应用于包括不同预定义的位置的ROI；
- [0183] b) 将至少一种寡核苷酸探针应用于ROI内的预定义的位置上，且使所述寡核苷酸探针结合样品的DNA分子，其中所述寡核苷酸探针包含条形码序列；
- [0184] c) 提取DNA -寡核苷酸探针复合物；
- [0185] d) 将提取的DNA分子测序；
- [0186] e) 将测序的DNA分子与ROI内相应的靶DNA分子的初始位置相关联，以产生靶向的DNA分子的空间分布；其中每个位置通过在步骤b)中结合的一种或多种寡核苷酸探针来鉴定。

## 实施例

- [0187] 寡核苷酸探针与核酸分子结合的方案类型

		RNA	DNA
杂交		[A] 靶探针/寡聚dT, PCR	[B] 片段化, 变性, 杂交, PCR
连接	平端	[C] 末端特异性连接	[D] 片段化, 连接
	粘端		[E] 消化, 连接

- [0189] 用于空间检测FFPE组织样品中的RNA的方法  
 [0190] (根据方案类型[C]的实施例)  
 [0191] 材料：载片上的FFPE组织样品  
 [0192] 用蛋白酶K(ProtK)在37°C下，例如如Tullis和Rubin (Analytical Biochemistry, 1980, 107(1):260-264)所述或根据制造商的说明书使用来自共附生白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*)的蛋白酶K(Sigma-Aldrich)，随后在80°C下热失活ProtK 15分钟来处理组织样品。  
 [0193] 例如根据制造商的说明书使用脱石蜡溶液(例如Qiagen)，将组织样品脱石蜡。  
 [0194] 获取完整载片的图像(Philips Digital Pathology Scanner UFS)，并在图像内鉴定ROI。  
 [0195] 在ROI内选择不同的位置，并通过喷墨印刷(印刷头XAAR)UV可固化油墨(Sunjet ink Crystal UFE 7573(黑色))应用顶部选择掩蔽物，产生分隔不同反应孔的网格。用UV-LED在360至380 nm下进行掩蔽物的UV固化30s至60s。  
 [0196] 通过喷墨印刷(使用FUJIFILM Dimatix印刷头)将包含条形码序列的两种寡核苷酸探针(5' - RNA探针和3' - RNA探针)的独特组合应用至每个预定义的位置。使用针对Illumina®(NEB)的NEBNex™小RNA文库制备集合的修改方案，将5' - RNA探针和3' - RNA探针

在单一步骤中连接至mRNA分子。在图2B) 中描绘的标准方案中, RNA探针在单一步骤中连接至RNA分子。在该反应期间, 5'-RNA探针与3'-RNA探针反应并形成二聚体。在修改的方案中, 采取不同的方法来替代使用RT-引物用于淬灭反应: 为了切割这些二聚体, 使用与5'-RNA探针的3'-末端和3'-RNA探针的5'-末端的连接位点互补的DNA分子, 其在RNA探针二聚体的连接位点上引入HaeIII限制性位点。DNA分子在两端被修饰, 使得其不参与连接反应。通过添加HaeIII限制酶, 具有互补RNA-DNA杂双链体的RNA探针二聚体将在两个RNA探针的连接位点上仅在RNA链上被切割, 而DNA分子保持完整。切割的RNA探针可以再次参与连接反应。

[0197] 应用连接混合物之后, 用盖子覆盖载片(Grace Bio-Labs HybriWell™密封系统, SecureSeal™粘合室)。

[0198] 在连接寡核苷酸探针之后, 将提取缓冲液应用于浸渍所有孔的样品, 并使用RNA膜纯化, 例如根据制造商的说明书使用RNeasy FFPE试剂盒(Qiagen)进行RNA提取。样品在提取期间加热并保持密封, 以避免样品的脱水。或者, 可以在纯化过程期间, 例如, 使用磁珠, 来使用寡核苷酸探针的序列。在连接RNA纯化期间或之后进行与DNA酶的孵育(例如在37℃下15分钟), 然后在80℃下DNA酶失活15分钟。或者, 可以与上述蛋白酶K处理步骤平行进行DNA酶处理。

[0199] 根据制造商的说明书使用例如ScriptSeq v2 RNA-Seq文库制备试剂盒(Illumina)来进行RNA测序文库制备。进行RNA测序, 并从序列鉴定条形码转录物。然后将该信息与从ROI获得的原始图像组合以构建空间转录图。

[0200] 用于空间检测FFPE组织样品中的DNA的方法

[0201] (根据方案类型[B]的实施例)

[0202] 材料: 载片上的FFPE组织样品

[0203] 例如根据制造商的说明书使用脱石蜡溶液(例如Qiagen)将组织样品脱石蜡并干燥。

[0204] 用蛋白酶K(ProtK)在37℃下, 例如如Tullis和Rubin (Analytical Biochemistry, 1980, 107(1):260-264)所述或根据制造商的说明书使用来自共附生白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*)的蛋白酶K(Sigma-Aldrich), 随后在80℃下热失活ProtK 15分钟来处理组织样品。

[0205] 将组织样品用EtOH洗涤并在40℃下干燥30分钟。获取完整载片的图像(Philips Digital Pathology Scanner UFS), 并在图像内鉴定ROI。

[0206] 通过添加变性溶液(2X SSC中的70%甲酰胺, pH 7.0-8.0)使DNA分子变性, 并在75℃下孵育5分钟, 然后在70% EtOH中孵育1分钟, 在85% EtOH中孵育1分钟, 并在100% EtOH中孵育1分钟。然后将载片干燥并置于45-50℃以使剩余的EtOH蒸发。

[0207] 在ROI内选择不同的位置, 并通过喷墨印刷(印刷头XAAR)UV可固化油墨(Sunjet ink Crystal UFE 7573(黑色))应用顶部选择掩蔽物, 产生分隔不同反应孔的网格。用UV-LED在360至380 nm下进行掩蔽物的UV固化30s至60s。

[0208] 通过喷墨印刷(使用FUJIFILM Dimatix印刷头)将包含条形码序列的寡核苷酸探针应用至每个预定义的位置上。

[0209] 将组织样品在40℃下孵育2小时(潮湿条件)。

[0210] 孵育之后, 使用寡核苷酸探针的引物序列进行延伸反应以扩增杂交的靶序列。

[0211] 延伸反应之后,用盖子覆盖载片(Grace Bio-Labs HybriWell™ 密封系统, SecureSeal™ 粘合室)。

[0212] 引入提取缓冲液,并将样品在60°C下孵育30分钟。

[0213] 进行DNA测序文库制备和DNA测序,并从序列鉴定条形码转录物。然后将该信息与从ROI获得的原始图像组合以构建空间转录图。对于上述步骤的反应,根据制造商的方案应用众所周知的标准试剂盒。

[0214] 在FFPE载片上用两个不同条形码进行一步3' 和5' RNA连接的方法

[0215] 该实验的目标是在FFPET载片上在单一反应中,在RNA的3'侧连接miRNA克隆接头,并且在RNA的5'侧连接RNA 5'衔接子。这根据下面描述的方案进行。对提取的RNA进行RT-qPCR测定以确定连接反应是否成功。

[0216] 作为样品,我们使用5μM切块(coups),其从乳腺癌FFPE块切割,并在55-60°C下烘烤30分钟。然后将载片转移至烘箱以确保样品完全干燥(在55°C下过夜)。RNA必须在载片上可用/暴露以使连接反应成功。这通过首先在二甲苯(Xylyene)中洗涤载片(2x 10分钟 1x 8分钟),将其用100% EtOH (1x 5分钟,1x 1分钟)冲洗来进行。然后将载片空气干燥5分钟,并使用疏水屏障笔在组织周围生成圆圈,流体留在其中(将载片空气干燥另外15-30分钟)。载片固定器填充有1x预处理溶液(Quantigene® View RNA测定试剂盒Affimetrix; P/N: 17428)。将载片固定器放置在水浴(95°C)中,并将载片小心地置于具有加热的1x预处理溶液的该载片固定器中20分钟。将载片用MiliQ水(2x 1分钟)和PBS(1x 5秒)冲洗。将200-400 μL等份的蛋白酶QS溶液(Quantigene® View RNA测定试剂盒Affimetrix; P/N:16742)添加在组织上并在40°C下在湿度箱中孵育20分钟。将载片在PBS中洗涤(2x5秒)以除去蛋白酶QS溶液。然后将载片在室温下在4%缓冲的甲醛中固定5分钟,并通过在PBS中洗涤载片(2x5秒)来再次除去过量溶液。我们使用两种可商购的连接试剂盒:i) T4 RNA连接酶2,截短的(New England BioLabs - M0242S)和ii)T4 RNA连接酶1,ssRNA连接酶(New England BioLabs - M0204S)。另外,使用可商购的miRNA克隆接头(New England BioLabs - S1315S, SEQ ID=1)用于3'连接,并使用由IDT (SEQ ID=2)产生的RNA寡聚体用于5'连接。如下表中所述制备反应混合物:

	溶液	体积(μL)
	10x T4 RNA 连接酶反应缓冲液	6
	50% PEG 8000	12
	100 μM 通用 miRNA 克隆接头	1.2
	10 mM ATP	6
[0217]	100 μM RNA 寡聚体	3
	DMSO	6
	T4 RNA 连接酶 2, 截短的(T4 Rnl2tr)	3
	T4 RNA 连接酶 1	6
	ddH2O	16.8

[0218] 将60μL等份的连接溶液添加至载片上的组织，并在湿度箱中孵育(25℃下1小时，和37℃下1小时)。通过在PBS中洗涤载片(2x5秒)来停止连接溶液。通过在组织上4次添加200μL可商购的裂解缓冲液(Siemens Versant RNA分离试剂盒)并将其转移至PCR清洁的1.5mL离心管来收集RNA。根据制造商方案(Siemens Versant RNA分离试剂盒)进一步分离RNA。

[0219] 然后用专门针对连接产物设计的RT-qPCR测定法确定连接产物的检测。参见图3中的扩增曲线和下表中使用的寡核苷酸。RT-qPCR测定法检测B-肌动蛋白mRNA上的连接产物。我们使用阴性对照，其为以红色显示的如上所述相同处理、但没有实际添加连接序列(克隆接头和RNA寡聚体)的载片。我们使用以黑色显示的无模板对照(NTC)用于PCR对照。我们使用1种RT-qPCR测定法来确定3'连接产物，使用1种RT-qPCR测定法来确定5'连接产物的存在和使用最终RT-qPCR测定法作为对照以测定总B-肌动蛋白mRNA水平。

图	寡聚体	功能	SEQ ID	
[0220]	3A	F1	正向引物	3
	3A	R1	反向引物	4
	3A	P1	Taqman 探针	5
	3B	F4	正向引物	6
	3B	R2	反向引物	7
	3B	P1	Taqman 探针	8
	3C	F1	正向引物	9
	3C	R1	反向引物	10
	3C	FAM	Taqman 探针	11

[0001]	序列表	
[0002]	<110> Koninklijke Philips N.V.	
[0003]	<120> 生物组织样品的分子概况的空间作图	
[0004]	<130> 2014P01407W0	
[0005]	<160> 11	
[0006]	<170> PatentIn version 3.5	
[0007]	<210> 1	
[0008]	<211> 18	
[0009]	<212> DNA	
[0010]	<213> 人工序列	
[0011]	<220>	
[0012]	<223> 通用miRNA克隆接头 (New England BioLabs - S1315S), 位置1的 = rApp, 位置23的n = -NH2	
[0013]	<220>	
[0014]	<221> 尚未归类的特征	
[0015]	<223> 位置1的n = rApp 位置18的n = -NH2	
[0016]	<400> 1	
[0017]	ntgttaggcac catcaatn	18
[0018]	<210> 2	
[0019]	<211> 52	
[0020]	<212> RNA	
[0021]	<213> 人工序列	
[0022]	<220>	
[0023]	<223> RNA寡聚体	
[0024]	<400> 2	
[0025]	rgrururcra rgrargruru rcrurarcra rgrurcrcrg rarcgraru rc	52
[0026]	<210> 3	
[0027]	<211> 17	
[0028]	<212> DNA	
[0029]	<213> 人工序列	
[0030]	<220>	
[0031]	<223> 用于3'连接验证的正向引物	
[0032]	<400> 3	
[0033]	gaggcagcca gggctta	17
[0034]	<210> 4	
[0035]	<211> 23	
[0036]	<212> DNA	
[0037]	<213> 人工序列	

[0038]	<220>	
[0039]	<223>	用于3'连接验证的反向引物
[0040]	<400>	4
[0041]	attgatggtg cctacagtca ttt	23
[0042]	<210>	5
[0043]	<211>	28
[0044]	<212>	DNA
[0045]	<213>	人工序列
[0046]	<220>	
[0047]	<223>	用于3'连接验证的Taqman探针，n = /ZEN/
[0048]	<220>	
[0049]	<221>	尚未归类的特征
[0050]	<223>	n = ZEN (猝灭剂)
[0051]	<400>	5
[0052]	cctgtacacn tgacttgaga ccagttga	28
[0053]	<210>	6
[0054]	<211>	17
[0055]	<212>	DNA
[0056]	<213>	人工序列
[0057]	<220>	
[0058]	<223>	用于5'连接验证的正向引物
[0059]	<400>	6
[0060]	acagtccgac gatcacc	17
[0061]	<210>	7
[0062]	<211>	18
[0063]	<212>	DNA
[0064]	<213>	人工序列
[0065]	<220>	
[0066]	<223>	用于5'连接验证的反向引物
[0067]	<400>	7
[0068]	agcgccgcga tatcatca	18
[0069]	<210>	8
[0070]	<211>	23
[0071]	<212>	DNA
[0072]	<213>	人工序列
[0073]	<220>	
[0074]	<223>	用于5'连接验证的Taqman探针，n = /ZEN/
[0075]	<220>	
[0076]	<221>	尚未归类的特征

[0077]	<223>	n = ZEN (猝灭剂)	
[0078]	<400>	8	
[0079]	acagaggctn	cgcccttgcc gat	23
[0080]	<210>	9	
[0081]	<211>	18	
[0082]	<212>	DNA	
[0083]	<213>	人工序列	
[0084]	<220>		
[0085]	<223>	用于总β-肌动蛋白测定的正向引物	
[0086]	<400>	9	
[0087]	ccaaccgcga	gaagatga	18
[0088]	<210>	10	
[0089]	<211>	20	
[0090]	<212>	DNA	
[0091]	<213>	人工序列	
[0092]	<220>		
[0093]	<223>	用于总β-肌动蛋白测定的反向引物	
[0094]	<400>	10	
[0095]	ccagaggcgt	acagggatag	20
[0096]	<210>	11	
[0097]	<211>	23	
[0098]	<212>	DNA	
[0099]	<213>	人工序列	
[0100]	<220>		
[0101]	<223>	用于总β-肌动蛋白测定的Taqman探针	
[0102]	<400>	11	
[0103]	ccatgtacgt	tgcttatccag gct	23

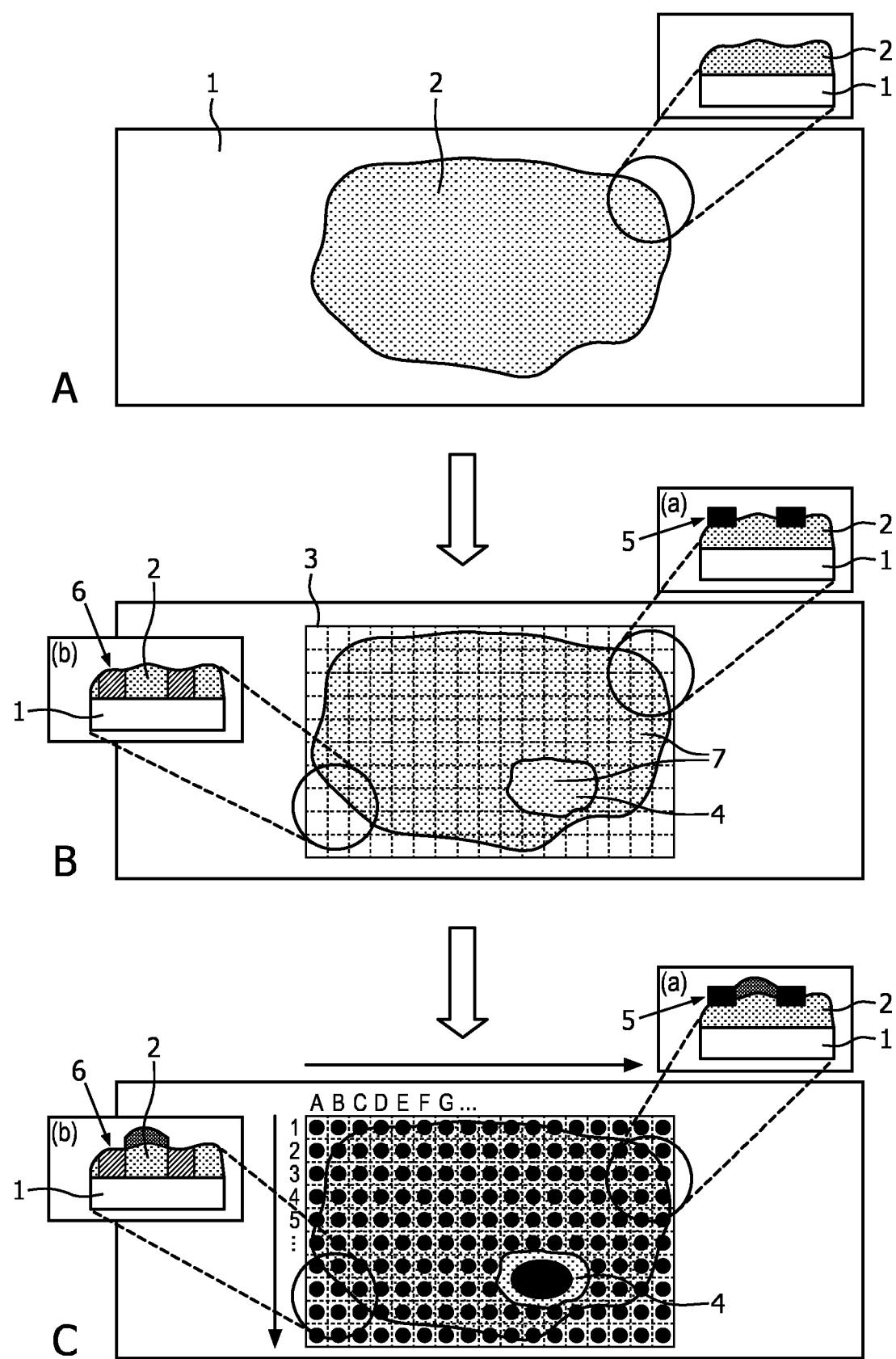


图 1

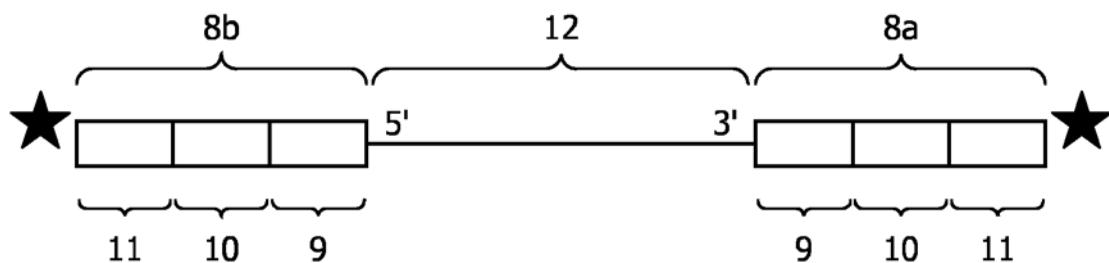


图 2A

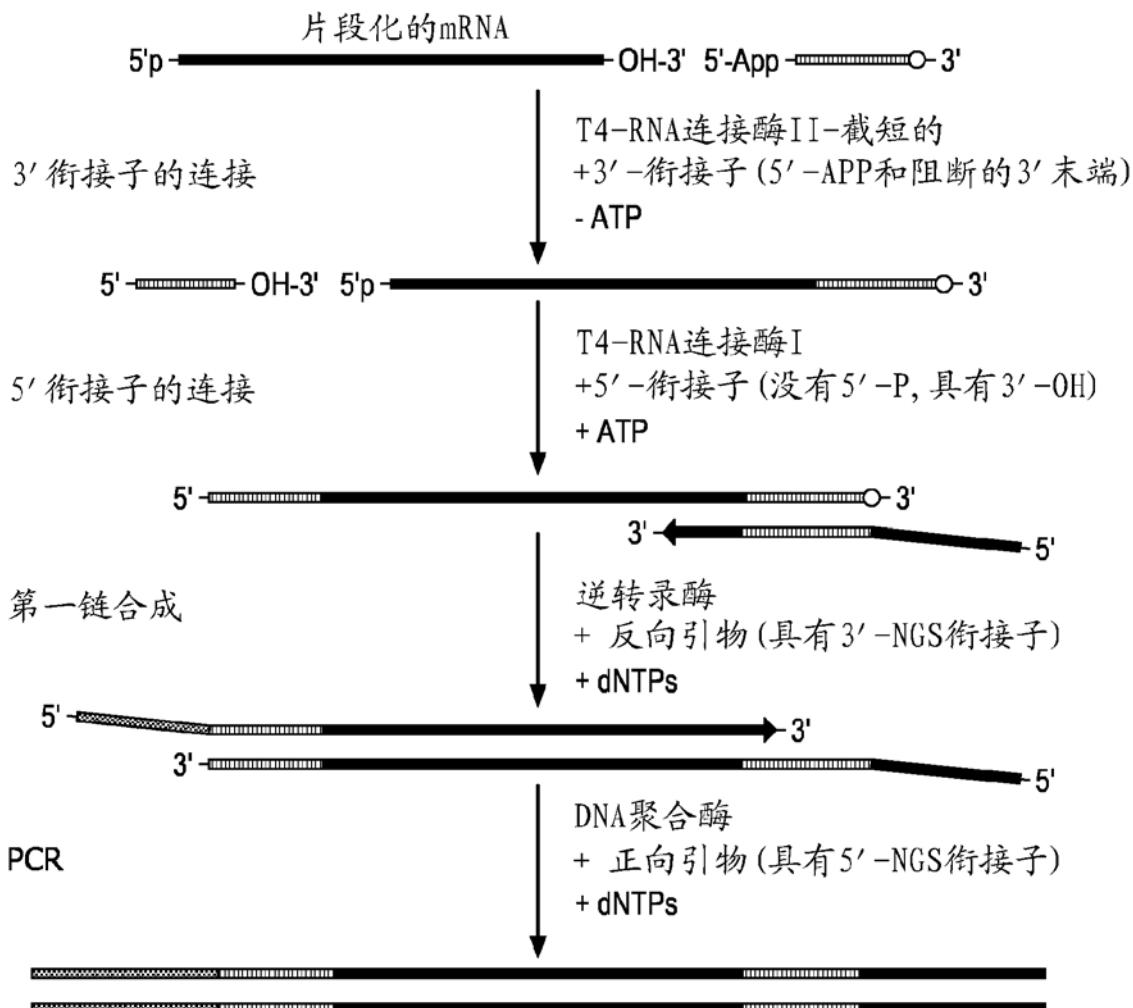


图 2B

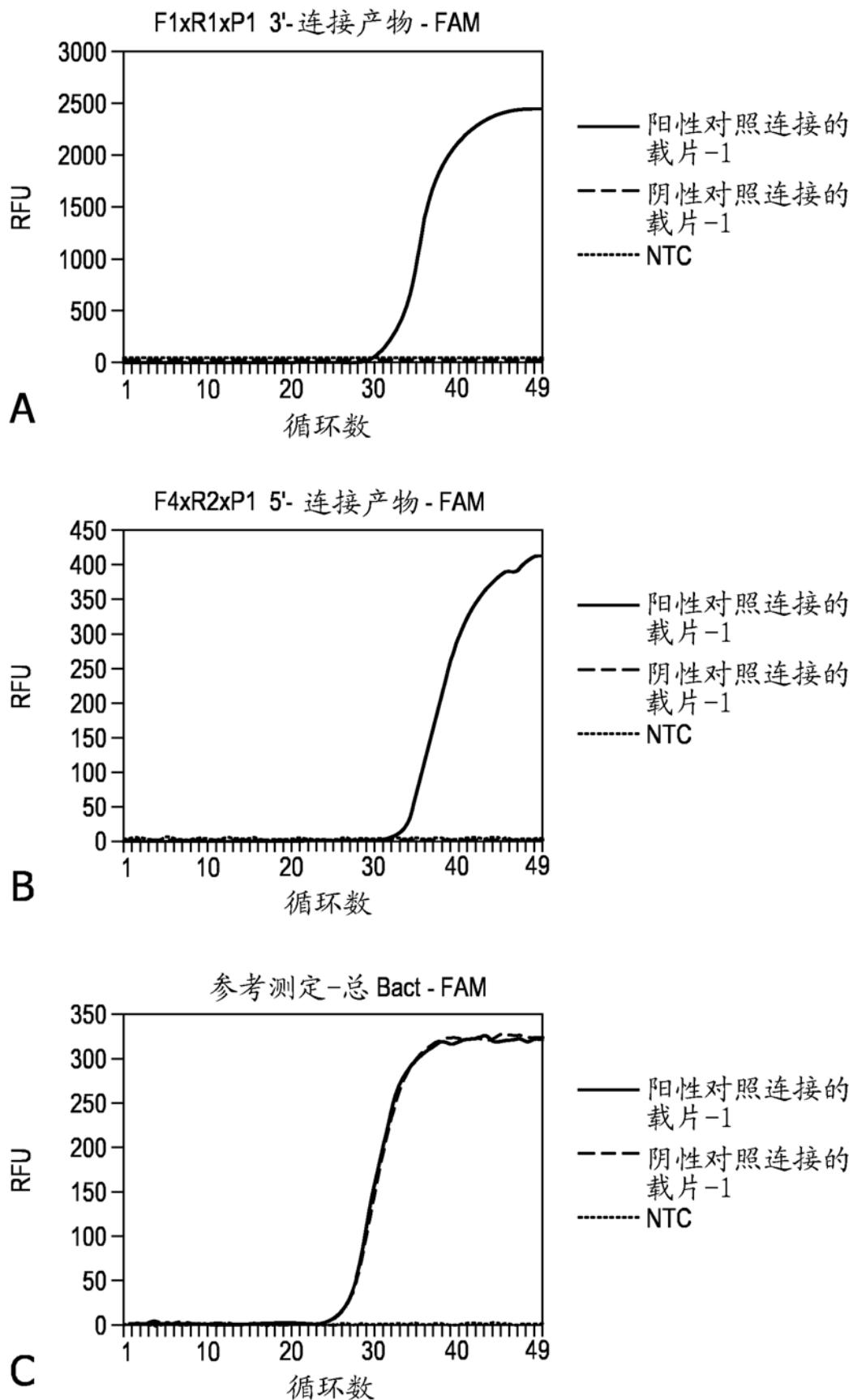


图 3