



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104884605 B

(45)授权公告日 2018.05.18

(21)申请号 201380055627.0

(22)申请日 2013.08.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104884605 A

(43)申请公布日 2015.09.02

(30)优先权数据
61/692,895 2012.08.24 US
61/779,299 2013.03.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.04.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2013/056454 2013.08.23

(87)PCT国际申请的公布数据
W02014/031997 EN 2014.02.27

(73)专利权人 耶鲁大学
地址 美国康涅狄格州

(72)发明人 R·范 陆瑶 J·陈

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266
代理人 崔佳佳 马莉华

(51)Int.Cl.
C12M 1/34(2006.01)
C12M 3/00(2006.01)

(56)对比文件

US 2006013031 A1,2006.01.19,
CN 1186513 A,1998.07.01,
US 6377721 B1,2002.04.23,
US 6429027 B1,2002.08.06,
US 2003068637 A1,2003.04.10,
WO 0248676 A2,2002.06.20,
CN 2577283 Y,2003.10.01,
Chih-Hui Yang等.Using a cross-flow
microfluidic chip and external
crosslinking reaction for monodisperse
TPP-chitosan microparticles.《Sensors and
Actuators B》.2007,第124卷(第2期),第510-
516页.

Chao Ma等.A clinical microchip for
evaluation of single immune cells reveals
high functional heterogeneity in
phenotypically similar T cells.《nature
medicine》.2011,第17卷(第6期),第738-744页.

Jonghoon Choi等.Immuno-Hybridization
Chain Reaction for Enhancing Detection of
Individual Cytokine-Secreting Human
Peripheral Mononuclear Cells.《Analytical
chemistry》.2011,第83卷(第17期),第6890-
6895页.

审查员 马妍妍

权利要求书3页 说明书43页 附图77页

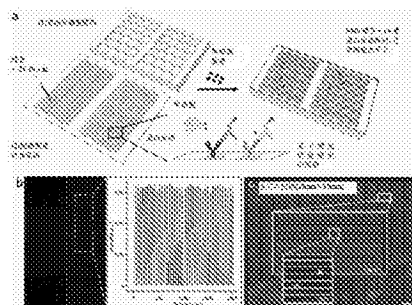
(54)发明名称

用于高通量多重检测的系统、装置和方法

(57)摘要

本发明涉及用于高通量多重检测多种化合物的系统、装置和方法。本发明包括微孔阵列,所述微孔阵列与捕获试剂阵列结合以在微孔阵列和一组固定化捕获试剂之间形成多个界面。捕获试剂组包括多个可区别特征,每个特征与特定的感兴趣化合物的检测相对应。在特定实施方式中,每个微孔被配置为包含单个细胞。本发明因而能够进行单细胞谱包括分泌化合物谱的高通

量分析。



1. 一种用于对分泌自一细胞的化合物进行多重检测的装置,所述装置包括:
多个密封的封闭的界面,其中各封闭的界面包括(a)被配置为用于含有一细胞的微室和(b)含有至少十个空间上可识别的分离的特征的基板,其中,至少十个所述分离的特征中的每个分离的特征包含至少两种固定化抗体,并且其中位于一分离的特征中的各固定化抗体识别一不同的感兴趣的蛋白。
2. 如权利要求1所述的装置,其中所述的封闭的界面平行排布。
3. 如权利要求1所述的装置,其中所述分离的特征平行排布于所述封闭的界面中。
4. 如权利要求1所述的装置,其中所述装置每平方厘米包括200至20,000个微室。
5. 如权利要求1所述的装置,其中所述装置包括100至100,000个微室。
6. 如权利要求1所述的装置,其中所述基板包括10个至100个分离的特征。
7. 如权利要求1所述的装置,其中基板上的至少一个所述分离的特征包括5至100种不同的捕获抗体。
8. 如权利要求1所述的装置,其中各微室长度为100 μm 至2000 μm ,宽度为10 μm 至100 μm ,并且深度为10 μm 至100 μm 。
9. 如权利要求1所述的装置,其中各分离的特征的宽度为5 μm 至50 μm 。
10. 如权利要求1所述的装置,其中所述分离的特征各自之间相距5 μm 至50 μm 。
11. 如权利要求1所述的装置,其中各分离的特征包含至少三种固定化的捕获抗体。
12. 如权利要求1所述的装置,其中所述分离的特征是微孔道。
13. 如权利要求1所述的装置,其中所述分离的特征通过错流构图技术制造。
14. 如权利要求1所述的装置,其中所述分离的特征通过微尺度印刷技术制造。
15. 如权利要求14所述的装置,其中所述微尺度印刷技术是微点样或喷墨印刷。
16. 如权利要求1所述的装置,其中所述装置包括在至少一个封闭的界面的微室中的至少一个细胞。
17. 如权利要求16所述的装置,其中所述微室包括分泌自所述至少一个细胞的蛋白。
18. 如权利要求17所述的装置,其中所述蛋白结合于所述基板的分离的特征的捕获抗体。
19. 如权利要求1所述的装置,其中所述微室具有1-2mm长和5-50 μm 深的尺寸。
20. 如权利要求18所述的装置,其中在一分离的特征中的每个固定化捕获抗体对应于一第二捕获试剂,该第二捕获试剂具有不同的可检测标记。
21. 如权利要求1所述的装置,其中所述基板包括多于40种不同的捕获抗体,从而允许检测多于40种的不同蛋白。
22. 如权利要求1所述的装置,其中所述装置的微室密度为200微室/ cm^2 至20,000微室/ cm^2 。
23. 一种用于对来自单细胞的多种化合物进行多重检测的系统,包括:
权利要求1所述的装置;以及
多种第二抗体,其中各第二抗体包括可检测标记并且配置为结合固定化抗体-蛋白复合物,所述固定化抗体-蛋白复合物是通过多种蛋白中的蛋白与多种固定化抗体中的固定化抗体相结合而在分离特征处形成的。
24. 如权利要求23所述的系统,其中多个分离的特征中的每一个具有可区分的空间定

位。

25. 如权利要求23所述的系统,其中多个分离的特征的每一个是选自下组的特征:线、形状或点。

26. 如权利要求23所述的系统,其中各分离的特征的形状能够与所有其它分离的特征的形状相区分。

27. 如权利要求23所述的系统,其中至少部分的所述多个微室是高纵横比矩形孔,具有1-2mm长和5-50 μm 深的尺寸。

28. 如权利要求23所述的系统,其中至少一个分离的特征包含一种或多种固定化抗体,其中在分离的特征中的各固定化抗体具有相对应的第二抗体,该第二抗体具有不同的可检测标记。

29. 如权利要求23所述的系统,其中各微室是矩形的,长度为10-2000 μm ,宽度为10-100 μm ,并且深度为10-100 μm 。

30. 如权利要求23所述的系统,其中所述装置包含10-100个分离的特征,每个分离的特征包含至少一种特异性结合一种化合物的固定化捕获试剂。

31. 如权利要求23所述的系统,其中各分离的特征的宽度为25-30 μm 。

32. 如权利要求23所述的系统,其中各分离的特征与在同一组中的另一个分离的特征分开25 μm 的距离,形成50 μm 或更大的间距尺寸。

33. 如权利要求23所述的系统,其中装置包括多于10种不同的抗体,从而允许检测多于10种的不同蛋白。

34. 如权利要求23所述的系统,其中所述装置包括多于40种不同的抗体,从而允许检测多于40种的不同蛋白。

35. 如权利要求23所述的系统,其中所述装置包括的微室密度为200微孔/ cm^2 至20,000微孔/ cm^2 。

36. 如权利要求23所述的系统,其中所述可检测标记选自下组:荧光标记、放射性标记、铁磁标记、顺磁标记、发光标记、磷光标记、和颜色标记。

37. 如权利要求23所述的系统,其中所述多种第二抗体的每一个包含相同的可检测标记。

38. 如权利要求23所述的系统,其中各第二抗体标记有多种可检测标记中的一种,其中各第二抗体配置成用于结合分离的特征上的固定化抗体-蛋白复合物以形成固定化抗体-蛋白-第二抗体复合物,从而使得分离的特征的固定化抗体-蛋白-第二抗体复合物各具有光谱上可区别的标记。

39. 如权利要求23所述的系统,其中所述可检测标记为电化学发光标记。

40. 一种鉴别分泌自单个细胞的蛋白的方法,所述方法包括:

(a) 在细胞分泌蛋白的孵育条件下,孵育权利要求1所述装置的封闭的界面,并且将分泌自细胞的所述蛋白与位于所述基板的所述分离的特征上的固定化的捕获抗体结合,从而形成所述基板的部位,所述部位包含被抗体捕获的细胞分泌的蛋白并对应于封闭界面;

(b) 在检测抗体的存在下,在导致检测抗体和捕获的蛋白发生结合的孵育条件下,孵育(a)中的所述基板,其中各检测抗体识别一不同的捕获蛋白,其中至少十个分离的特征与每个分离的特征的至少两种检测抗体相关联,并且其中在一分离的特征中的各检测抗体包含

相对于在同一分离的特征中的所有其它检测抗体而言光谱-特异的标签;并且

(c) 检测对应于 (a) 中封闭的界面的所述基板的部位中结合至被捕获的蛋白的检测抗体,从而鉴别出包含在相应封闭的界面中的细胞所分泌的蛋白。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述的封闭的界面平行排布。

42. 如权利要求40所述的方法,其中所述分离的特征平行排布于所述封闭的界面中。

43. 如权利要求40所述的方法,其中所述装置每平方厘米包括200至20,000个微室。

44. 如权利要求40所述的方法,其中所述装置包括100至100,000个微室。

45. 如权利要求40所述的方法,其中所述基板包括10个至100个分离的特征。

46. 如权利要求40所述的方法,其中基板上的至少一个所述分离的特征包括5至100种不同的捕获抗体。

47. 如权利要求40所述的方法,其中各微室长度为100 μm 至2000 μm ,宽度为10 μm 至100 μm ,并且深度为10 μm 至100 μm 。

48. 如权利要求40所述的方法,其中各分离的特征的宽度为5 μm 至50 μm 。

49. 如权利要求40所述的方法,其中所述分离的特征各自之间相距5 μm 至50 μm 。

50. 如权利要求40所述的方法,其中各分离的特征包含至少三种固定化的捕获抗体。

51. 如权利要求40所述的方法,其中所述分离的特征是微孔道。

52. 如权利要求40所述的方法,其中所述分离的特征通过错流构图技术制造。

53. 如权利要求40所述的方法,其中所述分离的特征通过微尺度印刷技术制造。

54. 如权利要求53所述的方法,其中所述微尺度印刷技术是微点样或喷墨印刷。

用于高通量多重检测的系统、装置和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据35 U.S.C. § 119(e), 本申请依法享有如下优先权: 美国临时专利申请申请号: 61/692,895, 申请日: 2012年8月24日; 和美国临时专利申请申请号: 61/779,299, 申请日: 2013年3月13日。上述优先权申请通过全文引用的方式包含在本申请中。

[0003] 关于联邦资助研究或开发的声明

[0004] 本发明使用了由国立卫生研究院 (NIH) 授予的 NIH U01 CA164252, NIH 4R00 CA136759, NIH U54CA143868, NIH R01 GM084201, 和 NIH U54CA143798 的政府支持。政府在本发明中享有某些权利。

背景技术

[0005] 分泌性蛋白, 包括细胞因子、趋化因子和生长因子, 代表了介导一系列的细胞行为和细胞-细胞旁分泌/自分泌信号的重要的功能调节子, 例如, 在免疫系统 (Rothenberg, 2007, 自然免疫学杂志 8 (5): 441-4), 肿瘤微环境 (Hanahan 和 Weinberg, 2011, 细胞杂志 144 (5): 646-74), 或干细胞壁龛 (Gnecchi 等, 2008, 循环研究杂志 103 (1): 1204-19)。对这些蛋白的检测, 不仅在基础细胞学上而且在疾病诊断和治疗监控上具有巨大的价值。然而, 因为从单个细胞一同产生多个效应蛋白, 称为多功能性, 因此, 在单细胞水平上测量一组分泌蛋白、或分泌组标记 (secretomic signature) 可以提供很多生物学信息。最近的证据进一步表明, 基因相同的细胞群能够产生多种的表型差异 (Niepel 等., 2009, Curr Opin Chem Biol 杂志 13 (5-6): 556-561)。非基因异质性也成为了精确监控细胞免疫和有效的药物治疗的潜在障碍 (Gascoigne 和 Taylor, 2008, 肿瘤细胞杂志 14 (2): 111-22; Cohen 等, 2008, 自然杂志 322 (5907): 1511-6), 表明需要实用的工具进行蛋白质组学标记的单细胞分析。

[0006] 荧光激活细胞分选法 (FACS) 代表了本领域中单细胞分析的现状 (Sachs 等, 2005, 自然杂志 308 (5721): 523-9)。FACS 典型地用于通过细胞表面的标记物检测和分选细胞表型。该技术也已经延伸到通过阻断囊泡运输 (Prussin, 1997, 临床免疫杂志 17 (3): 195-204) 来检测细胞内蛋白 (Sachs 等, 2005, 自然杂志 308 (5721): 523-9; Kotecha 等, 2008, 肿瘤细胞杂志 14 (4): 335-43; Irish 等, 2004, 细胞杂志 118 (2): 217-28), 包括细胞质中的细胞因子。然而, 细胞内细胞因子染色 (ICS) 并不是真正的分泌分析, 并且它需要细胞固定, 这意味着经过流式细胞检测分析后细胞不再存活, 不能够回收后用于进一步的研究。ICS 的一个进一步的缺陷是光谱重叠和细胞内染色抗体的非特异性结合的可能性, 这将最终阻止精确的多重检测 (multiplexing) 超过现有的 12-重 (12-plexing) 的能力。至今, 真正的单细胞分泌分析主要依靠一种称为 ELISpot 的简单方法, 该方法是使用标准 ELISA 检测的、基于平板的细胞培养实验, 其使用基于免疫夹心的实验来检测个体细胞的分泌印迹 (Sachdeva 和 Asthana, 2007, Front Biosci 杂志 12: 4682-95)。将免疫细胞加载于微量滴定板, 该微量滴定板上被预涂了一层第一抗体。经孵育后, 分泌性蛋白被细胞附近的抗体捕获, 产生表明单细胞分泌印迹的斑点, (Stratov 等, 2004, Curr Drug Targets 杂志 5 (1): 71-88)。最近, ELISpot 的变化形式, 称为 FLUOROSpot, 其利用两种荧光染料来显像蛋白分泌印迹, 实现了

同时双功能分析,但该技术限于低水平的多重检测能力。细胞群分泌的蛋白的高度多重检测可以使用编码珠实验(encoded bead assay),例如Illumina VeraCode系统(Henshall和Gorfain,2007,Genet Eng Biotechnol News杂志27(17):1)或使用钉-斑点技术制成的抗体微列阵(pin-spotting technique,Chen等,2007,Nat Methods杂志4(5):437-44;Liotta等,2003,Cancer Cell杂志3(4):317-25)。然而,这些高度多重技术不能够用来进行单个细胞检测。微组装芯片(Microfabricated chips)作为一类新的单细胞检测技术(Wang和Bodovitz,2010,Trends Biotechnol杂志28(6):281-90;Cheong等,2009,Sci Signal杂志2(75):p12;Love等,2006,Nat Biotechnol杂志24(6):703-7;Lee等,2012,Integr Biol (Camb)杂志4(4):381-90;Rowat等,2009,Proc Natl Acad Sci USA杂志106(43):18149-54;Lecault等,2011,Nat.Methods杂志8(7):581-6)已经出现了。一种雏形的微芯片已经显示了多重蛋白分泌实验的可行性,并且揭示了患者的表型相似的免疫细胞中显著的多功能异质性(Shin等,2011,Biophys J杂志100(10):2378-86;Ma等,2011,Nat Med杂志17(6):738-43),指出急需在临床诊断和治疗监测中进行单细胞分泌谱分析。然而,这些微芯片要么缺乏足够的通量或多重性要么需要复杂的操作,阻碍了在细胞生物学和细胞功能临床评价上的广泛应用。这些技术不能够对单细胞进行高度多重蛋白分析。例如,迄今为止,没有技术能够对单个细胞水平上的分泌蛋白进行高容量(>1000个细胞)和高度多重的(>35个蛋白)检测。

[0007] 因此,本领域中需要一种装置和方法对来自单细胞的大量的化合物进行多重分析。本发明满足了这一未被满足的需求。

发明概要

[0008] 本发明包括一种用于对来自单细胞(single cells)的多种化合物进行多重检测的装置,包括微孔阵列和捕获试剂阵列。所述微孔阵列包括均匀排布的多个个体微孔,至少部分的所述多个个体微孔长度大于50 μ m并配置成用来包含在亚-纳升体积内容物中的分离的单细胞。所述捕获试剂阵列包含多种固定化捕获试剂,每种固定化捕获试剂能够特异性结合所述多种化合物中的一种。固定化捕获试剂排布在均匀的捕获试剂组(set)中,其中每个捕获试剂组包含在空间上可识别的位置的多个分离的特征(部),每个分离的特征包括至少一种固定化捕获试剂。所述微孔阵列与捕获试剂阵列结合以形成多个封闭界面,每个封闭界面包括微孔和捕获试剂组从而各微孔的内容物能够接触到至少一个组的所有分离的特征,从而接触到所有固定化捕获试剂。

[0009] 在一实施方式中,所述多个分离的特征中的每一个具有可区分的空间位置。在一实施方式中,所述多个分离的特征中的每一个是选自下组的特征:线、形状和点。例如,在一实施方式中,每个分离的特征的形状能够与所有其它分离的特征的形状相区分。

[0010] 在一实施方式中,至少部分的所述多个微孔是高纵横比矩形孔,具有约1-2mm长和约5-50 μ m深的尺寸。

[0011] 在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种选自下组的化合物:蛋白、肽、肽片段、细胞表面受体、核酸、激素、抗原和生长因子。在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种由微孔中包含的单细胞分泌的蛋白。

[0012] 在一实施方式中,所述多种捕获试剂包括至少一种选自下组的化合物:抗体、蛋

白、肽、肽片段,和核酸。

[0013] 在一实施方式中,至少一个分离的特征包括一种或多种固定化捕获试剂,其中在分离的特征中的每个固定化捕获试剂具有相对应的第二捕获试剂,该第二捕获试剂具有不同的可检测标记。

[0014] 在一实施方式中,各微孔是矩形的,长度为约10-2000 μm ,宽度为约10-100 μm ,并且深度为约10-100 μm 。

[0015] 在一实施方式中,每个捕获试剂组包含约10-100个分离的特征,每个分离的特征包含至少一种固定化捕获试剂,该固定化捕获试剂能够特异性结合一种化合物。

[0016] 在一实施方式中,每个分离的特征的宽度为约25-30 μm 。在一实施方式中,在同一组中的每个分离的特征与其它分离的特征分开约25 μm 的距离,形成约50 μm 或更多的间距尺寸(pitch size)。

[0017] 在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于10种不同的捕获试剂,因此允许检测多于10种的不同化合物。在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于40种不同的捕获试剂,因此允许检测多于40种的不同化合物。

[0018] 在一实施方式中,所述微孔阵列包括的微孔密度为约200微孔/ cm^2 至20,000微孔/ cm^2 。

[0019] 本发明中也包括对来自单细胞的多种化合物进行空间编码的多重检测的方法,所述方法包括,提供微孔阵列,所述微孔阵列包括均匀排布的多个个体微孔;将流体施加到所述微孔阵列表面以便包含单细胞的亚-纳升体积的所述流体流入至少一个微孔;提供捕获试剂阵列,所述捕获试剂阵列包含多种固定化捕获试剂,各捕获试剂能够特异性结合所述多种化合物中的一种,其中所述固定化捕获试剂排布在捕获试剂组中,其中每个捕获试剂组在空间上可识别的位置包含多个分离的特征,各分离的特征包括至少一种固定化捕获试剂;将所述微孔阵列与捕获试剂阵列接触以形成多个封闭的界面,每个封闭的界面包括微孔和捕获试剂组从而每个微孔中的流体能够接触到一个组的所有分离的特征并从而接触到所有固定化捕获试剂。该方法进一步包括提供合适的条件来允许所述多种化合物结合至固定化捕获试剂以形成固定化捕获试剂-化合物复合物;从所述微孔阵列移除所述捕获试剂阵列;将所述捕获试剂阵列与多种标记的第二捕获试剂接触,其中每个标记的第二捕获试剂特异性结合于形成的固定化捕获试剂-化合物复合物,以形成固定化捕获试剂-化合物-标记的第二捕获试剂复合物;检测捕获试剂阵列上可检测标记的存在;并将捕获试剂阵列上可检测标记的存在与至少一种化合物的存在相关联。

[0020] 在一实施方式中,所述多个分离的特征中的每一个为选自下组的特征:线、形状或点。例如,在一实施方式中,每个分离的特征的形状能够与所有其它分离的特征的形状相区分。

[0021] 在一实施方式中,施加至微孔表面的流体包含细胞。在一实施方式中,所述流体仅在重力作用下流入个体微孔。

[0022] 在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种选自下组的化合物:蛋白、肽、肽片段、细胞表面受体、核酸、激素、抗原和生长因子。在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种由微孔中包含的单细胞分泌的蛋白。

[0023] 在一实施方式中,所述多种捕获试剂包括至少一种选自下组的化合物:抗体、蛋

白、肽、肽片段、和核酸。

[0024] 在一实施方式中,至少一个分离的特征包含多于一种的固定化捕获试剂,其中在分离的特征中的每个固定化捕获试剂具有关联的第二捕获试剂,该第二捕获试剂具有不同的可检测标记。

[0025] 在一实施方式中,每个微孔均是矩形的,长度为约10-2000 μm ,宽度为约10-100 μm ,并且深度为约10-100 μm 。

[0026] 在一实施方式中,每个捕获试剂组包含约10-100个分离的特征,每个分离的特征包含至少一种特异性结合一种化合物的固定化捕获试剂。

[0027] 在一实施方式中,每个分离的特征的宽度为约25-30 μm 。在一实施方式中,每个分离的特征与在同一组中的另一个分离的特征分开约25 μm 的距离。

[0028] 在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于10种不同的捕获试剂,因此允许检测多于10种的不同化合物。在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于40种不同的捕获试剂,因此允许检测多于40种的不同化合物。

[0029] 在一实施方式中,所述微孔阵列包括的微孔密度为约200微孔/ cm^2 至20,000微孔/ cm^2 。

[0030] 在一实施方式中,将流体施加到所述微孔阵列表面产生了包含单细胞的多个个体微孔。

[0031] 在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的空间位置与所述多种化合物中的至少一种的种类(identity)相关联,并且与在其中检测到该化合物的个体微孔相关联。在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的形状与所述多种化合物中的至少一种的种类相关联。在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的光谱特性与所述多种化合物中的至少一种的种类相关联。在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的空间位置和检测到的可检测标记的光谱特性与所述多种化合物中的一种的种类相关联,并且与在其中检测到所述化合物的个体微孔相关联。在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的空间位置、检测到的可检测标记的形状、和检测到的可检测标记的光谱特性与所述多种化合物中的一种的种类相关联,并且与在其中检测到所述化合物的个体微孔相关联。

[0032] 在一实施方式中,所述方法通过检测单细胞分泌的5种或更多的化合物来检测样品中多个单细胞的表型。

[0033] 在一实施方式中,将悬液加载到微孔阵列表面形成多个个体微孔,每个微孔包含一单细胞,从而提供了对多个单细胞分泌的化合物进行多重检测的高通量方法。

[0034] 在一实施方式中,在个体微孔中检测到的化合物的组合标示了该微孔中所含的单细胞的表型。在一实施方式中,所述细胞的表型定义了所述细胞为癌症细胞。在一实施方式中,所述细胞的表型定义了所述细胞为转移性癌症细胞。在一实施方式中,所述细胞的表型定义了癌症细胞的攻击性。

[0035] 在一实施方式中,所述多个单细胞包含免疫细胞群体,并且所述方法检测所述免疫细胞的异质性。在一实施方式中,一个或多个单细胞的表型标示了疾病的进程或划分了个体疾病阶段。

[0036] 本发明还包括对来自单细胞的多种化合物进行空间上或光谱上编码的多重检测

的方法,所述方法包括,提供微孔阵列,所述微孔阵列包括均匀排布的多个个体微孔;将流体施加到所述微孔阵列表面以便包含单细胞的亚-纳升体积的所述流体流入至少一个微孔;提供捕获试剂阵列,所述捕获试剂阵列包括多个固定化捕获试剂,每种捕获试剂能够特异性结合所述多种化合物中的一种,其中所述固定化捕获试剂排布在捕获试剂组中,其中每个捕获试剂组在空间可识别的位置包含多个分离的特征,各分离的特征包括多于一种固定化捕获试剂;将所述微孔阵列与捕获试剂阵列接触以形成多个封闭界面,各封闭界面包括微孔和捕获试剂组以便每个微孔中的流体能够接触到一组的所有分离的特征并从而接触到所有固定化捕获试剂。该方法还包括提供合适的条件来允许所述多种化合物结合至固定化捕获试剂以形成固定化捕获试剂-化合物复合物;从所述微孔阵列移除所述捕获试剂阵列;将所述捕获试剂阵列与多种标记的第二捕获试剂接触,其中各第二捕获试剂标记有多种可检测标记的一种,其中各第二捕获试剂被配置为用于结合分离的特征上的固定化捕获试剂-化合物复合物,以形成固定化捕获试剂-化合物-第二试剂复合物,从而每个分离特征在各固定化捕获试剂-化合物-第二捕获试剂复合物均具有光谱上可区别的标记;检测捕获试剂阵列上所述多种可检测标记的存在;并将所述捕获试剂阵列上各检测到的可检测标记的空间位置和光谱特性与至少一种化合物的存在相关联。

[0037] 在一实施方式中,所述多个分离的特征中的每一个为选自下组的特征:线、形状或点。例如,在一实施方式中,每个分离的特征的形状能够与所有其它分离的特征的形状相区分。

[0038] 在一实施方式中,施加至微孔表面的流体包含细胞。在一实施方式中,所述流体仅在重力作用下流入个体微孔。

[0039] 在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种选自下组的化合物:蛋白、肽、肽片段、细胞表面受体、核酸、激素、抗原和生长因子。在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种由微孔中包含的单细胞分泌的蛋白。

[0040] 在一实施方式中,所述多种捕获试剂包括至少一种选自下组的化合物:抗体、蛋白、肽、肽片段、和核酸。

[0041] 在一实施方式中,至少一个分离的特征包含多于一种的固定化捕获试剂,其中在分离的特征中的每个固定化捕获试剂具有关联的第二捕获试剂,该第二捕获试剂具有不同的可检测标记。

[0042] 在一实施方式中,每个微孔均是矩形的,长度为约10-2000 μm ,宽度为约10-100 μm ,并且深度为约10-100 μm 。

[0043] 在一实施方式中,每个捕获试剂组包含约10-100个分离的特征,每个分离的特征包含至少一种特异性结合一种化合物的固定化捕获试剂。

[0044] 在一实施方式中,每个分离的特征的宽度为约25-30 μm 。在一实施方式中,每个分离的特征与在同一组中的另一个分离的特征分开约25 μm 的距离。

[0045] 在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于10种不同的捕获试剂,因此允许检测多于10种的不同化合物。在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于40种不同的捕获试剂,因此允许检测多于40种的不同化合物。

[0046] 在一实施方式中,所述微孔阵列包括的微孔密度为约200微孔/ cm^2 至20,000微孔/ cm^2 。

[0047] 在一实施方式中,将流体施加到所述微孔阵列表面产生了包含单细胞的多个个体微孔。

[0048] 在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的空间位置与所述多种化合物中的至少一种的种类相关联,并且与在其中检测到该化合物的个体微孔相关联。在一实施方式中,在所述捕获试剂阵列上检测到的可检测标记的空间位置、检测到的可检测标记的形状、和检测到的可检测标记的光谱特性与所述多种化合物中的一种的种类相关联,并且与在其中检测到所述化合物的个体微孔相关联。

[0049] 在一实施方式中,所述方法通过检测单细胞分泌的5种或更多的化合物来检测样品中多个单细胞的表型。

[0050] 在一实施方式中,将悬液加载到微孔阵列表面形成多个个体微孔,每个微孔包含一单细胞,从而提供了对多个单细胞分泌的化合物进行多重检测的高通量方法。

[0051] 在一实施方式中,在个体微孔中检测到的化合物的组合标示了该微孔中所含的单细胞的表型。在一实施方式中,所述细胞的表型定义了所述细胞为癌症细胞。在一实施方式中,所述细胞的表型定义了所述细胞为转移性癌症细胞。在一实施方式中,所述细胞的表型定义了癌症细胞的攻击性。

[0052] 在一实施方式中,所述多个单细胞包含免疫细胞群体,并且所述方法检测所述免疫细胞的异质性。在一实施方式中,一个或多个单细胞的表型标示了疾病的进程或划分了个体疾病阶段

[0053] 本发明也提供了用于对来自单细胞的多种化合物进行多重检测的系统,该系统包括装置,所述装置包括微孔阵列和捕获试剂阵列,以及多种第二捕获试剂。所述微孔阵列包括均匀排布的多个个体微孔,至少部分的所述多个个体微孔配置用来包含在亚-纳升体积内容物中的单细胞。所述捕获试剂阵列包含多种固定化捕获试剂,每种固定化捕获试剂能够特异性结合所述多种化合物中的一种,固定化捕获试剂排布在均匀的捕获试剂组中,其中每个捕获试剂组在空间上可识别的位置包含多个分离的特征,每个分离的特征包括至少一个固定化捕获试剂。所述微孔阵列和捕获试剂阵列相结合以形成多个封闭的界面,每个封闭的界面包括微孔和捕获试剂组以便每个微孔的内容物能够接触到至少一个组的所有分离的特征,从而接触到所有固定化捕获试剂。每个第二捕获试剂包括可检测标记并且配置为结合固定化捕获试剂-化合物复合物,所述固定化捕获试剂-化合物复合物是通过所述多种化合物中的化合物与所述多种固定化捕获试剂中的固定化捕获试剂相结合而在分离特征上形成的。

[0054] 在一实施方式中,多个分离的特征中的每一个具有可区分的空间定位。在一实施方式中,所述多个分离的特征中的每一个为选自下组的特征:线、形状或点。例如,在一实施方式中,每个分离的特征能够与所有其它分离的特征的形状相区分。

[0055] 在一实施方式中,至少部分的所述多个微孔是高纵横比矩形孔,具有约1-2mm长和约5-50 μ m深的尺寸。

[0056] 在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种选自下组的化合物:蛋白、肽、肽片段、细胞表面受体、核酸、激素、抗原和生长因子。在一实施方式中,所述多种化合物包括至少一种由微孔中包含的单细胞分泌的蛋白。

[0057] 在一实施方式中,所述多种捕获试剂包括至少一种选自下组的化合物:抗体、蛋

白、肽、肽片段、和核酸。

[0058] 在一实施方式中,至少一个分离的特征包含一种或多种的固定化捕获试剂,其中在分离的特征中的每个固定化捕获试剂具有关联的第二捕获试剂,该第二捕获试剂具有不同的可检测标记。

[0059] 在一实施方式中,每个微孔均是矩形的,长度为约10-2000 μm ,宽度为约10-100 μm ,并且深度为约10-100 μm 。

[0060] 在一实施方式中,每个捕获试剂组包含约10-100个分离的特征,每个分离的特征包含至少一种特异性结合一种化合物的固定化捕获试剂。

[0061] 在一实施方式中,每个分离的特征的宽度为约25-30 μm 。在一实施方式中,每个分离的特征与在同一组中的另一个分离的特征分开约25 μm 的距离,从而间距尺寸约50 μm 或更多。

[0062] 在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于10种不同的捕获试剂,因此允许检测多于10种的不同化合物。在一实施方式中,所述捕获试剂阵列包括多于40种不同的捕获试剂,因此允许检测多于40种的不同化合物。

[0063] 在一实施方式中,所述微孔阵列包括的微孔密度为约200微孔/ cm^2 至20,000微孔/ cm^2 。

[0064] 在一实施方式中,所述可检测标记选自下组:荧光标记、放射性标记、铁磁标记、顺磁标记、发光标记、电化学标记、磷光标记、颜色标记。

[0065] 在一实施方式中,各所述多个第二捕获试剂包含相同的可检测标记。

[0066] 在一实施方式中,各第二捕获试剂被多个可检测标记之一标记,其中各第二捕获试剂被配置用于在分离特征上结合至固定化捕获试剂-化合物复合物,以形成固定化捕获试剂-化合物-第二试剂复合物,从而分离的特征上的固定化捕获试剂-化合物-第二捕获试剂复合物具有光谱上可区分的标记。

附图说明

[0067] 本发明的优选实施方式的以下详细描述在结合附图来阅读时,将被更好地理解。为了说明本发明的目的,在附图中示出的实施方式,是目前优选的。然而,应该理解的是,本发明并不限于附图中所示的实施方式的精确安排和装置。

[0068] 图1,包括图1A至图1C,该组图片描述了一典型的高通量多重单细胞分泌组实验的结构。图1A描述了一个结构示意图,显示了用于在单细胞水平上进行高通量多重蛋白分泌实验的高密度捕获试剂阵列芯片和亚纳升微室阵列芯片的整合。图1B是扫描的荧光图像,显示了在整个捕获试剂微阵列(1in. $\times$ 2in.)上蛋白加载的高度均匀性。该检测中使用了荧光标记的牛血清白蛋白(FITC-BSA)。图1C是一个从很多个由自动机械化相差显微镜采集的个体图片拼合的照片。合在一起,它覆盖了加载有人免疫细胞(U937)的整个亚纳升微室芯片。比例尺为2mm。第一个放大图片显示了微室阵列的一栏(比例尺300 μm)。第二个放大图片显示了加载于微室中的个体细胞(比例尺50 μm)。

[0069] 图2,包括图2A和图2B,例举了在本发明的典型装置中检测的一个典型的蛋白板。图2A是单细胞微芯片中检测的所有22个蛋白以及它们的人体生理功能列表。图2B是使用重组蛋白获得的一组滴定曲线。在滴定曲线中,总计验证了18对抗体对,由于缺乏工作

(working) 重组子而放弃了其余的4对。荧光强度代表了每个蛋白的16个斑点原始光子计数的平均值。误差棒表示 $3 \times \text{SD}$ 。

[0070] 图3,包括图3A至图3D,是一系列的图像描述了对U87细胞系的单细胞分泌组分析的结果。图3A描述了扫描图像的典型区域,显示了单细胞分泌组检测的原始数据。右侧三个子图为16个微室的光学显微照片、荧光图片、和叠加图片。图3B描述了热图,显示了分泌自1278个单细胞(U87)的14个蛋白的图谱。每排是一个单细胞,每栏与一个感兴趣的蛋白相对应。图3C是一组散点图,显示了6个选定蛋白(FGF, VEGF, MIF, IL-6, IL-8, MCP-1)的测得的荧光强度,相对于一个微室中的细胞数目。 $(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)$ 图3D描述了U87细胞系的群体动力学。对照(MEM培养基),不同时间(0h, 1h, 2h, 3h, 6h, 9h, 12h, 24h)的群体分泌物上清。

[0071] 图4,包括图4A至图4D,是一组描述了实验结果的图片,证明A549细胞的蛋白分泌谱和细胞迁移之间的相关性。图4A的图片描述了代表性的光学图片,显示了蛋白分泌实验之前(0小时)和之后(24小时)的三个单细胞($n=384$)。图4B是一散点图,显示与IL-8分泌对应的荧光强度,相对于个体细胞的迁移距离($P<0.05$)。图4C是一散点图,显示了对MCP-1的类似分析($P=0.14$)。图4D是一散点图,显示了对IL-6的类似分析($P=0.75$)。每个点代表一单细胞。

[0072] 图5,包括图5A至图5E,是一组描述来自患者的原发肿瘤细胞的单细胞分泌组分析的图片。图5A示意性描述了处理组织试样、准备单细胞悬液以及将原代细胞施加于亚纳升微室阵列芯片的程序。图5B描述了患者1扫描图片的代表性区域。图5C和图5D是热图,分别显示了来自于两个患者(患者1和2)的原发肿瘤细胞的单细胞分泌组标志(signatures)。该数据表示为无监督分级聚类(unsupervised hierarchical clustering)分析的结果。图5E是一组散点矩阵显示在单细胞中的蛋白-蛋白相关性。每个子图是散点图,显示了检测的所有单细胞中一蛋白的水平相对于另一个蛋白的水平。蛋白在对角线处示出。通过线性回归分析将相关系数计算为R。使用红色(正相关)和蓝色(负相关)对整个矩阵进行颜色编码。颜色强度与R值成比例。

[0073] 图6的一组图片描述了典型的完整的单细胞分泌组分析装置的装配。利用带有具有施加的弹簧力的钳子的装置壳体系统,用两个透明板将高密度抗体阵列玻璃片和5440-微室PDMS板夹在一起。

[0074] 图7的图描述了对捕获试剂阵列的全芯片均匀性的评价。对整个流动构图的多聚-L-赖氨酸玻璃片($3\text{cm} \times 2\text{cm}$)的荧光强度定量显示了固定化蛋白(FITC-BSA)的良好均匀性,这种良好的均匀性确保了使用该高密度阵列技术来评估单细胞异质性的有效性。

[0075] 图8的图描述了跨越整个微芯片的细胞数目分布。使用不同数量的细胞悬液(细胞密度: 10^6 细胞/mL)进行了4个实验。

[0076] 图9,包括图9A至图9C,是一组描述U937细胞系单细胞分泌组分析的图片。图9A是描述扫描图片的代表性区域的图片,显示单细胞分泌组检测的原始数据。右侧三个子图为14个微室的光学显微照片、荧光图片、和叠加图片。图9B描述了热图,显示了分泌自551个单细胞(U937)的14个蛋白的图谱。每排是一个单细胞,每栏与一个感兴趣的蛋白相对应。图9C是一组散点图,显示了4个选定蛋白(IL8, MCP-1, RANTES和TNF α)的测得的荧光强度,相对于一个微室中的细胞数目。使用 $20\mu\text{g/mL}$ 的PMA刺激细胞至分化为巨噬细胞,然后用 1mg/mL 的

LPS激发为活化的细胞,然后将它们加载于微芯片上进行分泌分析。

[0077] 图10是一组热图,显示了具有U87细胞系的小室分泌的14种蛋白的图谱。每排是一个细胞室,每栏与感兴趣的蛋白相对应。零细胞(n=1821)、单细胞(n=1278)、两个细胞(n=544)、三个细胞(n=214)、四个细胞(n=100)、和五个细胞(n=35)。

[0078] 图11的图描述了U87细胞系的群体动力学。对照(MEM培养基),在不同时间点(0hr, 1hr, 2hr, 3hr, 6hr, 9hr, 12hr, 24hr)的群体分泌物上清。

[0079] 图12的图像描述了平均水平。单细胞平台内U87细胞的平均信号接近大群体模式(顶部)以及U87细胞的24小时大群体分泌图谱(底部)。

[0080] 图13是一组描述检测U937群体分泌的对照实验结果图片。通过常规的抗体微阵列检测了分泌自一大群U937细胞的蛋白(上图)。下图显示了所有23个蛋白的定量。

[0081] 图14是一个热图,显示了在没有刺激情况下的A549单细胞在基础水平上的蛋白分泌谱。

[0082] 图15是一组描述检测A549群体分泌的对照实验结果图片。通过常规的抗体微阵列检测了分泌自一大群A549细胞的蛋白(上图)。下图显示了所有23个蛋白的定量。

[0083] 图16是一个热图,显示了A549单细胞的迁移距离和它的对应蛋白分泌信号之间的相关性。

[0084] 图17是一组直方图,显示自患者1样本中检测的个体蛋白。(浅灰色=零细胞,深灰色=单细胞)。

[0085] 图18是一组散点图显示了来自患者2的8个选定蛋白的荧光强度检测。(FGF, IL-6, IL-8, MCP-1, MIF, PDGF, RANTES, TNF- α)。

[0086] 图19是一个热图,描述了来自患者#3(一个过渡型脑膜瘤患者)的样本的单细胞蛋白分泌谱。

[0087] 图20是获自患者3的单细胞分泌数据的一组散点图和蛋白相关性分析。

[0088] 图21是一组描述本发明典型装置的图片。

[0089] 图22是示意图,描述了本发明的典型微孔阵列和捕获探针阵列。

[0090] 图23,包括图23A和图23B,描述了本发明典型的分离的特征。图23A描述了一典型的分离特征组。特征按每条线25微米并具有25微米的间隔以实现每非平行线组50微米的间距尺寸。图23B示意性描述了本发明典型的分离的特征,特征具有明显的几何图形。

[0091] 图24是一组描述超高密度抗体微阵列的图片。每个微孔的形状是可以变化的(例如,正方形相对于菱形形状),且该阵列能够与单细胞微孔细胞捕获芯片接合(interfaced)来执行单细胞高重蛋白谱分析。该阵列通过错流构图(cross-flow patterning)技术制造,也可以通过微尺度印刷技术例如微点样和注入印刷来制造。

[0092] 图25的一组图片描述了检测个体微孔(右下)内的细胞和检测感兴趣的特定化合物的存在(右中)。

[0093] 图26是使用本发明装置进行3-颜色光谱检测45-重细胞因子、趋化因子和胞外蛋白(如,生长因子)的相关图分析。

[0094] 图27描述了,使用三种不同的初级抗体和各标记有不同荧光标签的三种不同的检测抗体,来提供本发明单细胞实验中捕获的单细胞化合物的空间和光谱(如,荧光色度)编码。

[0095] 图28是一组图片,描述了在抗体阵列的同一视野的三种不同的可检测标记的图像,显示了该阵列的空间编码和多重检测大量化合物的能力。

[0096] 图29是一组图片,描述使用了许多不同的可检测标记的装置在成像上的均匀性。扫描的荧光图片(混合的和分离的)显示了在多聚-L-赖氨酸玻璃片上多个抗体共-固定化的结果。插图显示了横跨整个捕获试剂玻璃片的蛋白涂覆的高度均匀性(在 $1\text{in.} \times 2\text{in.}$ 区域 $\text{C.V.} < 5\%$)。在该测试中使用了荧光标记的牛血清白蛋白(分别为488-BSA, 532-BSA, 647-BSA)。

[0097] 图30是一个表格,显示典型的一组42种不同的细胞因子、胞外蛋白、生长因子和抗原,使用了14个空间位置(行)和每个位置3种颜色。

[0098] 图31描述了实验结果,通过捕获试剂显示的非-交叉反应性显示了该实验的特异性,其中仅包含EGF的样品仅导致了在与EGF相对应的位置/波长出现了荧光。

[0099] 图32,包括图32A到图32C,是一组获自重组蛋白的校正曲线,所述重组蛋白针对488组(图32A)、532组(图32B)和635组(图32C)中的化合物组。这些曲线可以被用来基于检测的强度定量样品中每种细胞因子的浓度。

[0100] 图33描述了使用本发明的光谱实验从488nm成像波长获得的原始数据。

[0101] 图34描述了使用本发明的光谱实验从532nm成像波长获得的原始数据。

[0102] 图35描述了使用本发明的光谱实验从635nm成像波长获得的原始数据。

[0103] 图36描述了使用本发明的光谱实验从488nm、532nm、和635nm成像波长获得的联合原始数据。

[0104] 图37描述了使用基于群体的微-ELISA进行细胞因子检测的原始数据。

[0105] 图38的图描述了基于群体的微-ELISA和本发明的单细胞检测的对比。

[0106] 图39描述了实验结果,使用45-重单细胞实验比较未刺激的相对于LPS (100ng/mL) 刺激的细胞的单细胞分泌。数据呈现为平均信号的直方图(上部)、热图(中间)和2-d柱状图(底部)。

[0107] 图40是一表格,在检测未刺激的(对照)和LPS刺激的细胞的细胞因子方面,比较了本发明的单细胞实验(SCMA)和细胞内细胞因子染色(ICS)。

[0108] 图41是一图表,在检测未刺激的(对照)和LPS刺激的细胞的细胞因子方面,比较了本发明的单细胞实验(SCMA)和细胞内细胞因子染色(ICS)。

[0109] 图42是一组图表,通过展示如本发明的单细胞实验检测到的每个细胞(对照和刺激的细胞)分泌的细胞因子的数量,描述了细胞的多功能性。

[0110] 图43展示了45-重单细胞蛋白分泌谱系统的工作流程。

[0111] 图44,包括图44A至图44D,描述的实验结果示出了在45-重蛋白分泌物谱平台上得到的U937巨噬细胞的单细胞结果。图44A描述了U937衍生的巨噬细胞单细胞蛋白分泌结果和群体细胞分泌结果之间的对比。图44B描述了获自单细胞分泌平台和ICS(细胞内细胞因子染色)的蛋白分泌频率的对比。图44C是一组图表,示出了通过SCMA(左)和ICS(右)获得的由IL-8和MCP-1蛋白分泌结果界定的相似的细胞亚群定义。图44D描述了基于其蛋白分泌结果的U937巨噬细胞单细胞多功能性分析。

[0112] 图45,包括图45A至图45C,描述的实验结果证明了巨噬细胞响应TLR4配体LPS刺激。图45A描述的热图显示了未处理的和LPS刺激的U937单核细胞衍生的巨噬细胞的蛋白分

泌谱的对比。图45B描述了使用VISNE可视化的单细胞分泌结果。图45C描述了使用VISNE可视化的个体蛋白(MIF, IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1a, MIP-1b)分泌结果。

[0113] 图46,包括图46A至图46D,描述的实验结果表明巨噬细胞响应不同TLR配体(LPS, PAM3, 多聚IC)的刺激。图46A描述的热图显示了在未处理的和刺激的(LPS, PAM3, 多聚IC) U937单核细胞衍生的巨噬细胞之间蛋白分泌谱的对比。图46B描述的热图显示了U937巨噬细胞在不同刺激情况下分泌任一个体蛋白的频率。图46C描述了使用VISNE可视化单细胞结果。图46D描述了使用VISNE可视化个体蛋白(MIF, IL-8, MCP-1, MIP-1b)分泌的结果。

[0114] 图47,包括图47A和图47B,描述了实验结果,所述实验研究了Alexa荧光488和532偶联物之间的补偿(compensation)。图47A:Alexa荧光488偶联的BSA点样在多聚-L-赖氨酸玻片上。488通道信号和532通道信号显示了彼此之间具有良好的和稳定的相关性($R^2 \approx 98\%$)并且可提取补偿方程;图47B:对于Alexa荧光532偶联的BSA,来自532通道的实际信号和来自488通道的串扰信号之间的相关性。

[0115] 图48是一组图表描述了用巨噬细胞标记物CD11b (FL4) 和CD14 (FL2) 来鉴定U937单核细胞的48h PMA (50ng/mL) 分化。

[0116] 图49是一图表,描述了实验结果,该实验结果比较了U937单核细胞衍生的巨噬细胞群体细胞蛋白分泌结果,这些结果来自包括96孔板和分别为5:1、10:1、20:1比例的PDMS的不同基板。结果在不同的基板上显示了相似的变化倍数,无论对于高水平分泌蛋白像IL-8、MCP-1、IL-6还是低水平分泌蛋白像IL-1a、IL-3、IL-4。

[0117] 图50是一代表性的整体微芯片热图(来自一个实验),显示了从不同细胞数包括0细胞、单细胞、2细胞和多细胞(≥ 3)的分泌结果。各排是一单细胞,各栏与感兴趣的蛋白相对应。从0细胞微室中获得的信号可以用来作为阳性分泌的阈值(平均信号加上两倍标准偏差)。

[0118] 图51,包括图51A和图51B,是一组图表,比较了来自两个平行芯片上的U937单核细胞衍生的巨噬细胞的单细胞蛋白分泌结果。图51A:这两个芯片上的单细胞信号相对于零细胞信号的比值非常类似。图51B:这两个芯片上的单细胞分泌信号的比值非常接近于1。

[0119] 图52是一组图表描述了U937巨噬细胞蛋白分泌(例如IL-8, MCP-1, MIP-1b, MIF)和细胞数目(0, 1, 2, 3...)的相关性。

[0120] 图53,包括图53A和图53B,描述了U937巨噬细胞的多功能性分析结果(对照和LPS刺激)。图53A示出的条形和线状图表明分泌的蛋白的数量变化很大。图53B描述了一组饼形图,表明了分泌各种范围的蛋白的细胞百分比。

[0121] 图54描述了VISNE和聚类结果的比较。使用这两种方法,未处理的和LPS刺激的U937单个细胞均能够基于它们的蛋白分泌模式而分组至3个亚群中。

[0122] 图55,包括图55A和图55B,是一组图表表明了0-48h间的U937巨噬细胞蛋白分泌动力学。图55A:对照;图55B:LPS刺激的。结果表明,在所选的刺激条件下,不同蛋白在分析的不同时间点具有不同的分泌动力学。

[0123] 图56,包括图56A至图56F,描述的实验结果表明了100ng/mL LPS刺激之前(未处理)和之后的U937衍生巨噬细胞蛋白分泌谱。图56A:刺激之前和之后的所有同样的细胞。图56B:刺激之前和之后的同样的单细胞的对比。图56C-图56E:散点图表现了IL-8(处理之前和之后)和IL-6、IL-10、TNF- α 之间的关系。图56F:LPS刺激之前和之后,来自相同细胞的IL-

8、MCP-1、Rantes、MMP-9的变化。

[0124] 图57描述了本发明的单细胞多重实验 (IsoPlexis) 和CyTOF®质谱细胞仪系统 (Mass Cytometer system) 之间的对比。

[0125] 详细描述

[0126] 本发明一般地涉及一种用于高通量单细胞分析的系统、装置和方法。在一实施方式中,本发明用于定量检测来源于单细胞的很多种化合物的存在。例如,在一实施方式中,本发明用于单细胞分泌的化合物的多重检测。在特定实施方式中,本发明允许来自于单细胞的分泌蛋白的多重检测,包括趋化因子、细胞因子、生长因子、抗原、等等。对单细胞分泌的化合物的分析能力允许评估细胞群体中细胞表型的变异性。进而,本发明提供了有效的机制,用于鉴定群体中表型稀有的和/或潜在有害的细胞类型,这些细胞类型的活性在传统的基于群体的分析中可能是被隐藏的。在一实施方式中,本发明的装置是微芯片,所述微芯片包括两个独立的部件:(1) 高密度亚纳升微孔阵列和(2) 包括高密度捕获试剂阵列的基板。在一实施方式中,本发明使用化合物捕获的空间和光谱编码。

[0127] 定义

[0128] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语,具有与本发明所属的技术领域中的本领域普通技术人员的通常理解相同的含义。虽然与本文描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料均可用于本发明的实践或测试中,本文仍然描述了优选的方法和材料。

[0129] 如本文所用,每一个下列术语具有与在本节相关联的含义。

[0130] 冠词“一(a)”和“一(an)”在本文中用于指一个或多于一个(即,至少一个)冠词的语法对象。以举例的方式,“一个元件(an element)”意指一个元件或多于一个元件。

[0131] 本文中使用的“约”当指可测量的值时,例如量、持续时间、等等,是指包含规定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、甚至更优选 $\pm 1\%$ 、并且还更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为这样的变化在执行所公开的方法时是合适的。

[0132] 如本文所用术语“抗体”,是指免疫球蛋白分子,其能够特异性结合到抗原的特定表位上。抗体可以是来自天然来源或来自重组来源的完整免疫球蛋白,也可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体通常是免疫球蛋白分子的四聚体。本发明中的抗体可以存在于各种形式,包括例如,多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab)₂,以及单链抗体和人源化抗体(Harlow等,1988;Houston等,1988;Bird等,1988)。

[0133] 如本文所用术语“多核苷酸”被定义为核苷酸链。此外,核酸是核苷酸的聚合物。因此,核酸和如本文中使用的多核苷酸可以互换。本领域技术人员通常知晓核酸是多核苷酸,其可水解成单体“核苷酸”。单体的核苷酸可以被水解成核苷。本文所用的多核苷酸包括,但不限于,通过本领域任何可用的方法获得的所有的核酸序列,包括但不限于,重组方法,即,使用普通的克隆技术和PCR™等从重组文库或细胞基因组中克隆核酸序列,以及通过合成方法。

[0134] 如本文所用,术语“多肽”被定义为氨基酸残基链,通常具有有限的序列。如本文所用,术语多肽是和术语“肽”和“蛋白”相互包括的。

[0135] 如本文所用,术语“特异性结合”,是指捕获试剂识别样品中的特定化合物,但不显著识别或结合样品中的其它化合物。例如,特异性结合来自一个物种的抗原的抗体也可能

结合来自一个或多个物种的该抗原。但是,这样的跨物种反应性本身不改变抗体作为特异性的分类。在另一个例子中,特异性结合一抗原的抗体也可能结合该抗原的不同等位形式。然而,这样的交叉反应性本身不改变抗体作为特异性的分类。在一些情况下,当提及抗体、蛋白或肽与第二化学物质的相互作用时,术语“特异性结合”或“特异地结合”可以用来指该相互作用依赖化学物质上特定结构(如,抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合特定的蛋白结构而不是通常的蛋白。如果抗体是特异性针对表位“A”的,在含有标记的“A”和抗体的反应中,含表位A(或游离的,未标记的A)的分子的存在,将减少结合于抗体的标记的A的量。

[0136] 如本文所使用,“分离的特征”或“特征”指的是在此描述的捕获试剂组内的可区分的元件。在某些实施方式中,分离的特征是连续的线、不连续的线、点、正方形、三角形,或其它可区分的几何图形,或几何图形的组合。几何图形可以是任何的,其中捕获试剂组包括可重复数目和布置的分离的特征。

[0137] 如本文所用,“界面”是指一单元,它包括本文所述的一个微孔和捕获试剂组。当本发明的微孔阵列和捕获试剂阵列以一致和重复的模式接触在一起时,便形成了界面。

[0138] 范围:贯穿本公开,本发明的各个方面可以在一个范围内的形式呈现。但是应当理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,不应被解释为对本发明的范围的硬性限制。因此,范围的描述应当被认为已经具体公开了所有可能的子范围以及在该范围内的单个数值。例如,范围的描述,如1至6,应认为具体公开了子范围如从1到3,从1至4,从1到5,从2至4,从2至6,从3到6等等,以及在该范围内的单个数字,例如,1,2,2.7,3,4,5,5.3和6。不论范围的宽度,这都是适用的。

[0139] 描述

[0140] 本发明一般地涉及用于高通量单细胞分析的系统、装置和方法。在某些实施方式中,本发明用于定量多重检测来源于单细胞的很多种分泌化合物。本发明提供了有效的机制,用于鉴定细胞群体中的单细胞表型,其中单细胞表型在传统的基于群体的检测中可能是被隐藏的。例如,本发明允许鉴定表型稀有的或具有诊断价值的单细胞。在一个实施方式中,本发明允许对刺激或激发后的单细胞的多功能性进行鉴定和定量。在某些实施方式中,本发明允许鉴定细胞群内的潜在有害的单细胞。分析从单个细胞分泌的化合物的能力允许对细胞群中的细胞表型的变异性进行评估。

[0141] 在一实施方式中,本发明的装置是微芯片,所述微芯片包括两个独立的部件:(1)高密度亚纳升微孔阵列和(2)包括高密度捕获试剂阵列的基板。

[0142] 捕获试剂阵列包括多种捕获试剂,各捕获试剂特异性识别感兴趣的化合物。捕获试剂排布在沿着基板的可区分的分离的特征中以提供各种捕获试剂之间的空间区别,本文描述为“空间编码”。例如,在一实施方式中,捕获试剂阵列包括多个线,各线包括一种或多种特异性的捕获试剂。在一实施方式中,捕获试剂阵列包括重复的分离特征组,其中每个组包括涵盖所有的所述多种捕获试剂所需的所有特征。如本文中其它地方所述,本发明的装置允许用于5-100种不同化合物的检测和定量。因而,本发明的捕获试剂阵列包括5-100种捕获试剂,各特异性地针对一感兴趣的化合物。在特定实施方式中,本发明的捕获试剂特异性地结合感兴趣的分泌蛋白。在一实施方式中,本发明的捕获试剂特异性地结合在一个微孔中捕获的45种分泌蛋白或感兴趣抗原之一。

[0143] 本发明的多重能力允许用于2或更多、3或更多、4或更多、5或更多、10或更多、20或更多、40或更多、50或更多、100或更多种等等化合物的检测。例如,如本文中他处所描述,本发明提供的空间和光谱编码使得能够检测大量的不同化合物。

[0144] 在本文中指出,虽然本文中所呈现的描述中描述了具有一种或一种以上的捕获试剂的特征,但并不意味着该特征具有捕获试剂的一个分子。相反,本领域技术人员将理解,具有固定的捕获试剂的特征描述了所述特征包括若干数目或浓度的特定捕获试剂。此外,具有三种捕获试剂的特征是指该特征包括若干数目或浓度的具体三种不同的特定捕获试剂。

[0145] 微孔阵列包含多个亚纳升尺寸的微孔,各被配置成容纳一个单细胞。各微孔允许将单个细胞限制于微孔中,同时,在某些实施方式中,将单细胞分泌的分泌化合物限制于微孔中。这样,本发明的微孔阵列允许分析分泌蛋白,具体是由受限制的单细胞分泌的分泌蛋白。

[0146] 本发明的装置包括连接到所述捕获试剂阵列的微孔阵列,以在各微孔和配置在捕获试剂阵列上的一整套捕获试剂之间形成界面。在某些实施方式中,从安置在微孔中的单细胞分泌的化合物,特异性结合于捕获试剂阵列上的捕获试剂。然后可视化结合的蛋白,例如,通过在夹心ELISA中使用一组标记的第二捕获试剂。

[0147] 在某些实施方式中,将结合的化合物可视化是通过使用第二捕获试剂。在一个实施方式中,结合化合物的可视化是通过使用一组标记的第二捕获试剂,其中一个或多个不同标记的第二捕获试剂定向结合到特定的线或特征,本文中称为“光谱编码”,如本文别处所描述的。

[0148] 在一个实施方式中,本发明的装置允许利用多个分离的特征的空间位置或形状进行多重检测,以确定每个感兴趣化合物的存在或不存在。例如,在特定的空间位置和/或可区分的特征内观察可检测的标记(通过结合标记的第二检测试剂)提供了关于特定化合物的存在的信息。

[0149] 在另一个实施方式中,本发明的装置允许多重的空间和光谱检测,其中所述可区分的空间特征以及在特征上的选择的标签的颜色确定了各个感兴趣化合物的存在或不存在。

[0150] 例如,在某些实施方式中,各特征包括多于一种的捕获试剂,每种捕获试剂对应于不同的颜色标签。例如,在一个实施方式中,该检测可以用于测定感兴趣的 $m \times n$ 个化合物,其中 m 等于可区分的分离的特征的数量, n 等于每个特征所用的可检测标记的数量。重要的是,该检测不要求 $m \times n$ 个化合物中的每一个都具有独特的标签。相反,空间特征和颜色标签的组合提供了仅需要 n 个不同的标签。例如,在一个实施方式中,三种不同的捕获试剂被定位在每个分离的特征中,使用了三种不同标记的第二捕获试剂,各不同标记的第二捕获试剂对应于三个定位的捕获试剂之一。在一个实施方式中,每组包括15个分离的特征,由此允许每单细胞45 (15×3) 种化合物的检测。

[0151] 本发明还提供了用于分析单细胞的分泌组的方法。该方法包括提供微孔阵列和将该阵列与包含细胞的溶液接触。该溶液遍布于所述阵列从而细胞流入阵列的孔中。该方法进一步包括将捕获试剂阵列贴附(affix)到微孔阵列,以使孔内的细胞和溶液与固定在捕获试剂阵列上的捕获试剂的群体接触。从单个细胞中分泌的化合物(如,蛋白)因此能够特

异性结合于位于捕获试剂阵列上的捕获试剂。在一个实施方式中，该方法进一步包括向捕获试剂阵列施加一组用可检测的标记物加标签的第二捕获试剂，以在分泌的化合物和固定化捕获试剂之间结合的位点形成可检测的复合物。

[0152] 本发明还提供了在获得自受试者的样品中鉴定特定表型的细胞的存在的方法。如本文别处所描述，本发明的装置允许检测来自个体细胞的分泌化合物的特定图谱。因此，本发明的装置和方法允许鉴定一个或多个细胞，它们的图谱标示了特定细胞表型。例如，在一个实施方式中，该方法包括：鉴定细胞，该细胞的分泌蛋白的图谱标示癌细胞、恶性癌细胞、等等。在一个实施方式中，该方法鉴定了具有特定特性的个体细胞的亚群。

[0153] 装置

[0154] 在一实施方式中，本发明的装置包括与捕获试剂阵列接合的微孔阵列。示例性装置的图像被描绘在图21中，而该装置及其部件的示例性示意图示于图1和图22中。如图22所示，装置100包括结合到捕获试剂阵列20的微孔阵列10。装置100将个体微孔11与捕获试剂的一套完整的组21结合，以形成多个界面101。各界面101包括个体微孔11和捕获阵列组21，其用于执行微孔11中存在的很多种化合物的多重检测。因此微孔阵列10和捕获试剂阵列20因此被配置为精确结合以允许个体微孔中的高通量检测和分析。在一个实施方式中，该装置包括与捕获试剂组结合的约1,000-100,000个微孔。下面提供了微孔阵列10和捕获试剂阵列20的进一步描述。

[0155] 微孔阵列

[0156] 在某些实施方式中，本发明的装置包括微孔阵列。微孔阵列捕获并限制细胞及其分泌的化合物在每个孔的限定空间内，从而防止实施过程中细胞逃逸。此外，微孔阵列允许细胞在分泌化合物的释放方面具有正常的功能。在一个实施方式中，微孔内的细胞保持存活（即，未固定的）并且功能正常。

[0157] 本发明的微孔阵列包括多个个体微孔。在某些实施方式中，所述微孔阵列包括个体微孔的高密度阵列以提供允许高通量分析的装置。微孔阵列可以是适应于该装置的所需的应用的任何形状或尺寸。在一个实施方式中，微孔阵列是矩形的，具有限定的长度和宽度。

[0158] 在一个实施方式中，微孔阵列长度是0.5-10cm。在另一个实施方式中，微孔阵列长度是1-5cm。在另一个实施方式中，微孔阵列长度是2-3.5cm。

[0159] 在一个实施方式中，微孔阵列宽度是0.5-10cm。在另一个实施方式中，微孔阵列宽度是1-5cm。在另一个实施方式中，微孔阵列宽度是2-3.5cm。

[0160] 在一个实施方式中，所述微孔阵列包含约10-1,000,000个个体微孔。在另一个实施方式中，所述微孔阵列包含约500-500,000个个体微孔。在另一个实施方式中，所述微孔阵列包含约100-100,000个个体微孔。

[0161] 在一个实施方式中，所述微孔阵列包含的微孔的密度为约200微孔/cm²到约20,000微孔/cm²。

[0162] 如本文所用，微孔是一个腔室，捕捉和限制细胞在一环境内，在该环境中这些细胞仍保持存活并具备功能。各微孔被配置用以确保细胞的合理生存。例如，微孔内的细胞具有与在体内环境中的预期存活率相似的存活率。另外，各微孔被配置用于允许捕获的细胞在本发明的装置的实施期间具有正常的功能。

[0163] 微孔阵列的每个微孔的尺寸被设计为有效地限制细胞和分泌的化合物,同时促进被限制细胞的正常功能和存活。微孔被设计成覆盖一个或多个接合的捕获试剂组的整个区域。这样,各微孔的尺寸和形状没有限制,而是可以采用适应于所用的细胞类型和所需的多重能力的任何尺寸和形状。在一个实施方式中,各微孔是矩形的,具有限定的长度,宽度和深度。各微孔捕获亚纳升体积的流体,包括例如细胞悬浮液,生理液体,液体样品,可能的试剂,等等。

[0164] 在一个实施方式中,每个微孔长度是1-10,000 μm 。在另一个实施方式中,每个微孔长度是5-5,000 μm 。在另一个实施方式中,每个微孔长度是10-2,000 μm 。

[0165] 在一个实施方式中,每个微孔宽度是1-1,000 μm 。在另一个实施方式中,每个微孔宽度是5-500 μm 。在另一个实施方式中,每个微孔宽度是10-100 μm 。

[0166] 在一个实施方式中,每个微孔深度是1-1,000 μm 。在另一个实施方式中,每个微孔深度是5-500 μm 。在另一个实施方式中,每个微孔深度是10-100 μm 。

[0167] 在一个实施方式中,每个微孔是高纵横比矩形孔。例如,在一个实施方式中,各微孔为约1.8毫米长和约20 μm 宽。

[0168] 在一个实施方式中,各微孔宽度为约10-100 μm ,深度为约20-200 μm ,并且长度为约100-2,000 μm 。

[0169] 在某些实施方式中,个体微孔都以行和/或栏的阵列横向和纵向间隔开。在一个实施方式中,个体微孔规则地间隔在约10-100 μm 的间距。

[0170] 可以利用任何合适的方法或必要的方法构建本文所述的阵列,来完成微孔阵列的制造。例如,在一个实施方式中,微孔阵列是由负性光刻晶片成型和随后的软聚合物(PDMS, Sylgard184)使用标准程序进行沉积制成。在一个实施方式中,使用软光刻技术进行所述阵列的弹性体冲压和成型。

[0171] 在一个实施方式中,微孔阵列是光学透明的,以允许阵列或阵列内的(一个或多个)细胞的成像。在本发明的某些实施方式中,阵列的成像用于微孔内的细胞计数、微孔校准、和/或测定细胞位置。

[0172] 在一个实施方式中,微孔阵列被制造和配置成用于单次使用。在另一个实施方式中,微孔阵列被制造和配置为可重复使用。例如,在某些实施方式中,微孔阵列是在使用水、盐水、缓冲液、或它们的组合进行标准洗涤程序后可以重复使用的。在某些实施方式中,微孔阵列是适合于灭菌的,例如通过使用高压釜或紫外线照射。

[0173] 在一个实施方式中所述微孔是官能化的或经过其他处理以实现细胞系留或其它固定的目的。

[0174] 各微孔被配置用于在所附的捕获试剂阵列的区域上捕获和限制(一个或多个)个体细胞。例如,各微孔可以特别设计成使得微孔含有特定细胞类型的期望数目的细胞。在某些实施方式中,每个微孔包含1,2,3,5,10,15,20,50,或100个细胞。在一个具体的实施方式中,各微孔被配置为包含一个单细胞。如本文所使用的,单细胞定义为任何的细胞类型或细胞系的个体细胞。在某些实施方式中,所述细胞是分泌型细胞。在其他实施方式中,所述细胞是非分泌型细胞。在一个优选的实施方式中,在所述装置的一些、大部分、或所有的实施时间内,单细胞保持存活。在一个更优选的实施方式中,在所述装置的实施的整个持续时间内,所述单细胞保持存活。例如,在某些实施方式中,该装置用于在24小时期间内检测来自

单细胞的分泌蛋白的图谱。优选的是,所述微孔允许单细胞在该24小时期间存活。

[0175] 在一个实施方式中,所述微孔阵列被配置成与捕获试剂阵列兼容,使得当微孔阵列贴附到捕获试剂阵列时,各个体微孔,和包含在其中的细胞和蛋白,与至少一个全套捕获试剂特征(如,线、点等)接触,以确保所有的多个捕获试剂能够接触到微孔的内容物。

[0176] 捕获试剂阵列

[0177] 在某些实施方式中,本发明的装置包括捕获试剂阵列。所述捕获试剂阵列包括多个捕获试剂组,其中,各捕获试剂组包括化合物多重检测所需要的所有的多种捕获试剂。如本文别处所描述,各组均被配置为能够接触到单个微孔的内容物。

[0178] 在某些实施方式中,捕获试剂阵列包括重复的捕获试剂组。在一个实施方式中,各组是与所有其它组在空间上区分的。在一个实施方式中,各组之间分开约10-100 μm 。

[0179] 在一个实施方式中,捕获试剂阵列包括10-1,000,000个个体捕获试剂组。在另一个实施方式中,捕获试剂阵列包括约500-500,000个个体捕获试剂组。在另一个实施方式中,捕获试剂阵列包括约100-100,000个个体捕获试剂组。

[0180] 使各组的尺寸和形状对应于一个或多个微孔,如上所述。例如,在一个实施方式中,各组对应于单个微孔。通过将微孔阵列与捕获试剂阵列接触从而形成多个界面来组装成装置,各界面包括微孔和捕获试剂组。该装置仅限定各微孔的内容物必须能够接触到(accessible to)包括在一组内的所有分离的特征,如进一步在本文别处所描述。在某些实施方式中,各组是根据所需的多重性大小来配置的。因此,在一个实施方式中,各组是矩形的具有限定的长度和宽度。

[0181] 在一个实施方式中,每个组的长度是1-10,000 μm 。在另一个实施方式中,每个组的长度是5-5,000 μm 。在另一个实施方式中,每个组的长度是10-2,000 μm 。

[0182] 在一个实施方式中,每个组的宽度是1-1,000 μm 。在另一个实施方式中,每个组的宽度是5-500 μm 。在另一个实施方式中,每个组的宽度是10-100 μm 。

[0183] 如图23A所示,在某些实施方式中,每个组21包括多个在空间上分离的特征22,该特征包括一个或多个不同的固定化捕获试剂。组装装置10从而在各组21和各微孔11之间形成界面101,从而各微孔11的内容物可以接触到所述多个特征22的每一个。例如,在一个实施方式中,组21包括多个特征22,每个特征22是一条线,其中每条线包括一个或多个固定化捕获试剂。特征22不局限于任何特定的尺寸或形状。例如,在一个实施方式中,特征22是直线。在另一个实施方式中,特征22为之字形线(如图23中所示)。每个特征22包括一个或多个固定化捕获试剂用于感兴趣化合物的检测。例如,在一个实施方式中,组21包括二十个独立的特征22,每个特征包括特定的捕获试剂来检测二十个感兴趣的化合物之一。在一个实施方式中,固定在一个特征22上的捕获试剂不包括在另一个特征22上。因此,检测结合在特定特征22上的化合物,如本文其他地方所述,提供了关于感兴趣的特定化合物的存在的信息。

[0184] 图23B中,描绘了一个包括多个分离的特征122的可选实施方式。在该实施方式中,每个特征122包括独特的形状或几何图形。每个特征122包括一个或多个固定在特征122的特定形状中的固定化捕获试剂。可以使用微构图技术,来制备具有很高分辨率的特征尺寸和形状。示例性的技术包括微注射印刷,微接触印刷,蘸笔平版印刷,微通道导流构图,等等。然而,该装置并不限于固定捕获试剂至分离的特征的任何特定方法。例如,图24中,描绘了示例性的捕获试剂阵列,其包括排布为正方形或菱形特征的捕获试剂。这种阵列是通

过交叉流动构图技术制造的,并且也可以通过微尺度印刷技术制造,诸如微点样和注射印刷。

[0185] 分离的特征允许确定哪种化合物(或化合物组合)存在于各微孔中。例如,特征的空间/位置、特征的形状、和/或它们的组合用于识别哪个感兴趣的化合物(或感兴趣的化合物的组合)结合于固定在该特征的特定捕获试剂。此外,由于每个组对应于一个个体微孔,捕获试剂阵列上捕获试剂组的空间位置允许确定所述化合物(或化合物的组合)存在于哪个个体微孔中。因此,这允许确定源自各微孔的内容物的个体化的图谱。在某些实施方式中,分离的特征是重复的,每个微孔中包含至少一组全部的分​​离特征。在一个实施方式中,每个微孔可以包含两个或更多组,例如作为对照。

[0186] 在一个实施方式中,检测结合的感兴趣化合物是用基于ELISA的免疫测定,如本文别处所述。重要的是,使用可区分的分离的特征(空间上可区分的和/或通过形状或几何图形区分的)允许来自单细胞的大量化合物的多重检测,因为不需要为每个化合物配置独特的第二抗体标记。这种类型的“空间编码”允许通过观察化合物在与特定微孔接合的分离特征组内结合的空间位置来检测各微孔的相关的分泌化合物,而不是如在传统的ELISA中通过特异性针对化合物的各第二捕获试剂上的特定标记。例如,传统的检测需要化合物与可检测标记之间1:1的关系,以便将标记与感兴趣的特定化合物相关联。如本文所述,利用分离的特征允许每个化合物关联于相同的可检测标记(或至少在光谱测定中使用的同一组标记,如本文其他地方所述)。

[0187] 如本文其它地方所述,每个特定的捕获试剂特异性结合到感兴趣的化合物(蛋白,抗原,受体,核酸等)。在捕获试剂组内每个分离的特征具有限定的空间位置和/或形状,由此允许简单而有效的确定感兴趣的特定化合物是否存在于相应的微孔中。例如,在一个实施方式中,每个分离的特征彼此隔开约2-25 μm 。在一个实施方式中,各组包括多个分离的特征中的至少一个。也就是说,每一个分离的特征在每一组中展现至少一次。在一些实施方式中,一个或多个分离的特征在各界面内重复多次。例如,在一个实施方式中,界面可以包括与多个组结合的单个孔。

[0188] 在一个实施方式中,每个组包括总共约5-100种不同的捕获试剂。在另一个实施方式中,每个组包括总共约10-75种不同的捕获试剂。在另一个实施方式中,每个组包括总共约20-50种不同的捕获试剂。例如,在一个实施方式中,本发明提供了45-重的化合物检测,其中,每个组包括45种不同的捕获试剂。

[0189] 在一个实施方式中,每个组包含约5-100个分离的特征。在另一个实施方式中,每个组包含大约10-50个分离的特征。在另一个实施方式中,每个组包含大约20-30个分离的特征。

[0190] 在某些实施方式中,分离的特征是连续的,跨过多个捕获试剂组。例如,在一些制造技术中,可能更容易制造跨越多个组的连续的线或形状。将捕获试剂阵列与微孔阵列接触则将连续特征打破为对应于个体微孔的个体的组。在另一个实施方式中,捕获阵列被制造成分离的特征是不连续的,并因此仅设置在将对应于微孔和捕获试剂组之间的界面的位置处。

[0191] 在某些实施方式中,各分离的特征(如线,形状等),包括单一的特异性捕获试剂。在另一个实施方式中,每个分离的特征包括2、3、5、10、或更多种不同的捕获试剂。在这些实

施方式中,通过使用基于ELISA的实验中使用的第二组捕获试剂上的不同可检测标记(各标记对应于特定的捕获试剂,)来测定特征内与特定捕获试剂的特异性结合,本文中称为“光谱编码”。

[0192] 例如,在一个实施方式中,所述阵列包括包含15个特征(例如线、点、或类似的)的至少一个组。在一个实施方式中,第一特征包括一个或多个分子的第一捕获试剂,第二特征包括一个或多个分子的第二捕获试剂,第三特征包括一个或多个分子的第三捕获试剂,以此类推。重复以上直到第十五特征,其包括一个或多个分子的第十五捕获试剂。

[0193] 在一个实施方式中,每一个特征包括多于一种的捕获试剂。例如,在一个实施方式中,第一特征包括一个或多个分子的第一捕获试剂,一个或多个分子的第二捕获试剂,以及一个或多个分子的第三捕获试剂;而第二特征包括一个或多个分子的第四捕获试剂,一个或多个分子的第五捕获试剂,和一个或多个分子的第六捕获试剂。重复以上直到第十五特征,其包括一个或多个分子的第四十三捕获试剂,一个或多个分子的第四十四捕获试剂,以及一个或多个分子的第四十五捕获试剂。在本实施方式中,在一个特征中的每种捕获试剂通过靶向该捕获试剂的第二捕获试剂的颜色相区分,定义为光谱编码,如本文其它地方所述。

[0194] 例如,在一个实施方式中,分离的特征包括三种不同的捕获试剂,各特异性针对不同的感兴趣化合物。通过在基于ELISA的反应中将第二组三种不同的捕获试剂(一种标记有红色标签、一种具有绿色标签、以及一种具有蓝色标签)施加至固定化捕获试剂以在特征上产生可检测的复合物,从而确定三种感兴趣化合物中的哪一个(或感兴趣化合物的组合)存在于微孔中。在捕获试剂阵列中的每个分离的特征的空间位置检测红色、绿色和蓝色标记的存在,从而允许确定三种感兴趣化合物中的哪一个(或感兴趣化合物的组合)存在于各个所述分离的特征中。放大这个原则至存在于捕获试剂组的所有分离的特征,这允许多重检测非常大量的化合物。例如,装置已被配置并证明可以检测多达60种不同的化合物。

[0195] 在某些实施方式中,本发明提供了感兴趣化合物的空间和光谱多重检测。例如,在一个实施方式中,多重的能力部分地由每捕获试剂组的空间上可区分的分离特征的数量来限定。在一个实施方式中,每个分离的特征的宽度为约5-50 μm 。在一个实施方式中,每个分离的特征的宽度为约25-30 μm 。在一个实施方式中,每个分离的特征的长度为约500-2000 μm 。在一个实施方式中,每个分离的特征分开约5-50 μm 。在一个实施方式中,每个分离的特征分开约25-30 μm 。在一个实施方式中,每个分离的特征宽度约为25 μm 并且与下一个特征分开约25微米,从而得到约50 μm 的间距尺寸。本发明表明其能够产生非常小的空间上可区分的分离的特征以从而增加装置的空间多重能力。

[0196] 在一个实施方式中,多重的能力部分地由光谱上不同的标签的数量限定,从而每个分离的特征可以包含多于一个的捕获试剂,因此允许每个分离的特征检测多于一种类型的感兴趣化合物。例如,在一个实施方式中,捕获阵列组包括15个空间上可区分的特征,每个特征包括3种不同的捕获试剂,所述3种不同的捕获试剂可通过使用偶联有不同的可检测标记的3种不同的ELISA-基第二捕获试剂来区分。因此这种配置允许45-重检测。

[0197] 通过结合于分离单细胞的微孔,捕获试剂阵列执行每个单细胞的多重、高度定量的分泌分析。由于设计的均匀性,重复的组用于允许各微孔捕获每个单细胞的完整检测范围的5-100个化合物,而不在各微孔之间出现捕获的准确性的显著偏差。

[0198] 捕获试剂在分离的特征和组上的构图,可以通过任何合适的技术来实现。例如,可以通过以下技术高精度地实现捕获试剂构图:喷墨印刷、精细印刷点样(fine print spotting)、在官能化的基板上的流动构图、在官能化的玻璃基板上的接触印刷、或者使用环氧镀膜玻璃基板或聚胺玻璃基板的微印刷(使用2-30 μ m特征分辨率的印刷针或带)。在某些实施方式中,所述官能化的基板包括多聚L-赖氨酸涂覆的基板。然而,能够提供物理和/或化学亲和性从而以高度的再现性固定捕获试剂并且与本发明的阵列中的捕获试剂具有有限的交叉反应性的任何官能化基板都可以使用。

[0199] 如上所述,各捕获试剂组包括多种捕获试剂,其中各捕获试剂特异性结合在所需的实施中被测定的感兴趣化合物。示例性的感兴趣化合物,包括但不限于蛋白,肽,抗体,酶,表面受体,核酸,肽片段,细胞因子,生长因子,激素,等等。在某些实施方式中,感兴趣的(一种或多种)化合物是已知或被认为由包含于装置的微孔中的(一个或多个)细胞分泌的化合物。然而,本发明并不限于检测分泌的化合物,而是能够接触到捕获试剂阵列的任何化合物。例如,感兴趣的化合物可以包括在细胞裂解(通过细胞死亡或经用户处理)后能够接触到的化合物。

[0200] 捕获试剂包括但不限于,抗体、抗体片段、蛋白、肽和核酸。在某些实施方式中,捕获试剂与它们的靶化合物具有约1pM至约150pM的捕获亲和力。如本文别处所描述的,检测阵列上固定化捕获试剂和其靶化合物的结合是通过使用第二组捕获试剂的ELISA-基偶联,其中第二组捕获试剂的每一个特异性结合捕获试剂-化合物复合物。在某些实施方式中,第二组捕获试剂的各成员标有可检测标记,包括但不限于,染料或荧光团。第二捕获试剂可以包括抗体、抗体片段、蛋白、肽和核酸。在一些实施方式中,第二捕获试剂特异性结合捕获试剂阵列的固定化捕获试剂。在另一个实施方式中,第二捕获试剂,诸如检测抗体,特异性结合感兴趣的化合物。

[0201] 在一个实施方式中,本发明的捕获试剂包括肽。在某些实施方式中,肽捕获试剂特异性结合感兴趣的化合物,例如感兴趣的分泌化合物。

[0202] 本发明的肽可以使用化学方法制备。例如,肽可通过固相技术(Roberge J Y等(1995) Science 269:202-204)来合成,从树脂上切下,并通过制备型高效液相色谱纯化。可以实现自动化合成,例如,根据由制造商提供的说明书使用ABI431A肽合成仪(Perkin Elmer)。

[0203] 肽也可以通过重组方法或通过从一个较长的多肽裂解制得。肽的组成可通过氨基酸分析或测序来确认。

[0204] 根据本发明的肽的变体可以是(i)在其中的一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸残基取代(优选保守氨基酸残基)并且这种取代的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码编码的,(ii)在其中有一个或多个修饰的氨基酸残基,例如,通过连接取代基团而修饰的残基,(iii)本发明的肽的选择性剪接变体,(iv)所述肽的片段和/或(v)在其中所述肽与另一种肽融合,所述另一种肽诸如前导或分泌序列,或用于纯化的序列(如,His-标签)或用于检测的序列(如,Sv5表位标签)。片段包括通过蛋白水解切割(包括多位点蛋白水解)原始序列产生的肽。变体可以是翻译后或化学修饰的。这样的变体被认为在本领域技术人员从本文所教导的范围之内。

[0205] 如本领域已知的,两个肽之间的“相似性”是通过将一个肽的氨基酸序列和其保守

氨基酸取代物与第二个肽的序列进行比较来确定的。变体被定义为包括与原始序列不同的肽序列,优选地与原始序列相比每个感兴趣的片段中残基具有少于40%的不同,更优选地与原始序列相比每个感兴趣的片段中残基具有少于25%的不同,更优选地与原始序列相比每个感兴趣的片段中残基具有少于10%的不同,最优选地与原始蛋白序列相比每个感兴趣的片段中仅有几个残基不同,并且同时与原始序列具有足够的同源性以保持原始序列的功能性。本发明包括与原始氨基酸序列相比至少60%、65%、70%、72%、74%、76%、78%、80%、90%、或95%类似或相同的氨基酸序列。两个肽之间的同一性程度使用计算机算法和方法测定,这是本领域技术人员公知的。两个氨基酸序列之间的同一性优选通过使用BLASTP算法测定[BLAST指南,Altschul,S.,等,NCBI NLM NIH Bethesda,Md.20894,Altschul,S.,等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990)]。

[0206] 本发明的肽可以是翻译后修饰的。例如,落在本发明范围之内的翻译后修饰包括信号肽切除,糖基化,乙酰化,异戊二烯化,蛋白水解,豆蔻酰化,蛋白质折叠和蛋白水解加工等。一些修饰或处理事件需要引入另外的生物机制。例如,诸如信号肽切除和核心糖基化的处理事件是通过将犬微粒体膜或爪蟾卵提取物(美国专利No.6,103,489)加入标准的翻译反应来检测的。

[0207] 本发明的肽可包括通过翻译后修饰或通过翻译过程中引入非天然氨基酸而形成的非天然氨基酸。

[0208] 在一个实施方式中,本发明的捕获试剂包括抗体,或抗体片段。在某些实施方式中,抗体捕获试剂特异性结合到感兴趣的化合物,例如感兴趣的分泌化合物。此类抗体包括多克隆抗体,单克隆抗体,Fab和单链Fv(scFv)片段,双特异性抗体,杂合偶联抗体(heteroconjugates),人类和人源化抗体。

[0209] 此类抗体可以以多种方式制备,包括杂交瘤培养物,细菌或哺乳动物细胞培养物重组表达,和在转基因动物中重组表达。制造方法的选择取决于几个因素,包括所需的抗体结构、抗体上糖部分的重要性、培养和纯化的容易性、以及成本。许多不同的抗体的结构可以使用标准表达技术产生,包括全长抗体,抗体片段,如Fab和Fv片段,以及包含来自不同物种的组分的嵌合抗体。小尺寸的抗体片段,如Fab和Fv片段,不具有效应子功能和有限的药物动力学活性,可以在细菌表达系统中产生。单链Fv片段显示出低的免疫原性。

[0210] 在一个实施方式中,本发明的捕获试剂包含分离的核酸,包括例如DNA寡核苷酸和RNA寡核苷酸。在某些实施方式中,所述核酸捕获试剂特异性结合感兴趣的化合物,例如感兴趣的分泌化合物。例如,在一个实施方式中,所述核酸包含特异性结合感兴趣化合物的核苷酸序列。例如,在一个实施方式中,所述核酸与感兴趣的分泌核酸互补。

[0211] 或者,核酸捕获试剂的核苷酸序列可包括相对于原始的核苷酸序列的序列变异,例如,一个或多个核苷酸的取代、插入和/或缺失,条件是所得到的核酸具有原始核酸的功能并特异性结合感兴趣的化合物。

[0212] 在本说明书中所使用的意义上,当一核苷酸序列与在此描述的任何的核苷酸序列具有至少60%的、较佳地至少70%的、优选地至少85%的、和更优选地至少95%的同一性程度时,该核苷酸序列与在此描述的任何的核苷酸序列是“实质上同源”的。其它可能的修饰的实例包括在序列中插入一个或多个核苷酸,在序列的任何末端添加一个或多个核苷酸,在序列的任何末端或序列内删除一个或多个核苷酸。两个多核苷酸之间的同一性程度使用

本领域技术人员公知的计算机算法和方法测定。两个氨基酸序列之间的同一性优选使用 BLASTN 算法测定 [BLAST Manual, Altschul, S., 等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., 等, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)]。

[0213] 多重检测系统

[0214] 在一个实施方式中, 本发明包括用于多重检测单细胞分泌的化合物的系统。在某些实施方式中, 该系统包括在本文别处详细描述的设备。即, 在一个实施方式中, 该系统包括含有微孔阵列和捕获试剂阵列的设备, 如上所述。

[0215] 在一个实施方式中, 该系统的设备包括具有多个组的捕获试剂阵列, 每个组包括多个分离的特征, 其中每个特征包括结合于特定的感兴趣化合物的一种或多种固定化捕获试剂。

[0216] 在一个实施方式中, 该系统包括一组第二捕获试剂, 在单细胞群体与捕获试剂阵列的固定化捕获试剂孵育后, 所述的一组第二捕获试剂被施加到设备上。第二捕获试剂特异性结合固定化捕获试剂、感兴趣的化合物、或固定化捕获试剂-化合物复合物。即, 第二捕获试剂被用于夹心式检测中, 在某些实施方式中, 辅助检测结合到捕获试剂阵列的化合物。

[0217] 在某些实施方式中, 第二捕获试剂包括抗体、抗体片段、蛋白、肽和核酸。在一个实施方式中, 第二捕获试剂标记有可检测标记。第二捕获试剂, 特异性结合固定化捕获试剂-化合物复合物, 可以带有任何可检测的标记, 包括但不限于, 荧光标记、放射性标记、铁磁标记、顺磁标记、发光标记、电化学发光标记、磷光标记、颜色标记、等等。荧光标记物的非限制性实例包括, 绿色荧光蛋白 (GFP)、青色荧光蛋白 (CFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)、红色荧光蛋白 (RFP)、橙色荧光蛋白 (OFP)、eGFP、mCherry、hrGFP、hrGFP11、链霉亲和素 APC、Alexa 的 488、Alexa532、Alexa 594、等等。荧光标记还可以是光转化的, 诸如像激发红色荧光蛋白 (KFP-红)、PS-CFP2、Dendra2、CoralHue Kaede 和 CoralHue Kikume。

[0218] 在一个实施方式中, 第二捕获试剂用标签区域包括例如肽或其它表位标记。例如, 在一个实施方式中, 第二捕获试剂用生物素标记 (即生物素化), 从而使用荧光标记的链霉亲和素, 或其他可检测标记的链霉亲和素, 用于可视化生物素化的第二捕获试剂。

[0219] 在一个实施方式中, 所有第二捕获试剂都标以相同的可检测标记。在另一个实施方式中, 第二捕获试剂被不同地标记, 以便区分一个第二捕获试剂的结合与另一个第二捕获试剂的结合。在一个实施方式中, 捕获试剂阵列上固定的每个捕获试剂被分配一个相应的标记的 ELISA 检测第二捕获试剂, 使得在一个给定的特征的每个捕获试剂具有不同的相应的标签。在某些实施方式中, 对应于给定的特征内的多个固定化捕获试剂的多个标签在本文所述的光谱编码实施方式中不显示任何交叉反应性。

[0220] 例如, 在一个实施方式中, 第二捕获试剂组包括一个或多个亚组, 每个亚组具有特定的可检测标记。该系统如此设计, 使得各亚组的第二捕获试剂被配置成结合在特定特征上形成的单个的特定固定化捕获试剂-化合物复合物。因此, 如果, 例如, 所有的化合物都存在于一个给定的微孔中, 则所有的不同的可检测标记都将在每个特征中观察到。差异化标记的第二捕获试剂允许对给定的化合物的存在进行光谱编码。即, 标签的空间位置和标签的确切类型 (即, 颜色) 的组合, 识别了存在的化合物。

[0221] 在一个实施方式中, 该系统包括检测器, 用于检测每个检测标记的种类和位置。该检测器可以是任何合适的检测器, 其能够检测每个标签, 包括但不限于荧光显微镜, 荧光检

测器或荧光扫描仪。

[0222] 在一个实施方式中,该系统包括计算装置。该计算装置可以包括台式计算机,笔记本电脑,平板电脑,智能电话或其他装置,并包括用于控制系统组件、显示原始数据、并且对所获得的数据进行分析的软件平台。该计算装置可以包括至少一个处理器,标准输入和输出装置,以及在用于存储数据和运行程序、以及用于通过网络发送和接收数据的计算装置上通常见到的所有硬件和软件。

[0223] 在某些实施方式中,本发明的系统包括硬件和软件,其检测和定量来自阵列的检测信号。该信号可以使用任何合适的分析软件包或者使用定制的分析算法进行定量。示范性的数据分析和图形输出在本文别处示出。

[0224] 多重检测的方法

[0225] 本发明提供了在小样品中同时检测大量的感兴趣化合物的方法。例如,在一个实施方式中,本发明允许来自容纳在微孔中的单细胞的蛋白的多重检测,如本文其它地方所述。该方法允许测定来自单细胞的个体化的图谱,其在某些实施方式中,比来自细胞群的图谱更加优选。区分个体细胞图谱的能力可有助于确定隐藏于总群体中的特定细胞的表型。这会,例如,有助于在组织样品中检测癌细胞、恶性细胞或转移性细胞,这些细胞否则很难或几乎不可能检测到。在某些实施方式中,该方法提供了计算(一个或多个)平均单细胞参数的能力,提供了比基于群体的分析更多的信息。这样的分析可以用于,例如,鉴定亚群体和/或分组表型。分离个体细胞的这些亚群(依据单细胞多重参数分组)对于在组织样本中分离恶性癌细胞和响应的免疫细胞的重要活性群体是有价值的。本发明的多重能力因此允许表型亚型的分离或鉴定。例如,该方法鉴定群体内给定表型的相对量。此外,这样的分析可提供,但不限于,分泌化合物或细胞产物之间的相互关联的量化,创立群体或整个芯片化合物分布的统计学,和对测试的群体上在单细胞水平上表达的多功能性的评价。

[0226] 在一个实施方式中,该方法包括:加载单细胞至本文所述的微孔中。本发明的装置允许不需要活细胞的活动流体(即泵,增压流等)或外力操纵来进行微孔装载。相反,该方法包括仅使用重力将单细胞加载到微孔中。这允许该方法中在活的状态下分离单细胞并测谱,而无需耗时和/或昂贵的大量的操作。

[0227] 通过本发明的方法进行测谱的细胞,可以是任何合适的细胞类型。适用的细胞包括粘附和非粘附细胞,原代细胞和永生化细胞系,来自器官组织的细胞,以及离体生长的细胞。在某些实施方式中,以含有细胞的溶液的形式将细胞施加到微孔中。例如,该溶液可以是单细胞悬浮液,培养基细胞悬浮液,或自然包含细胞的生理液体。所述细胞可来自细胞系或分离自受试者,包括人。在一个实施方式中,所述溶液来自从受试者中分离的组织。例如,所述溶液来自均质化的组织。

[0228] 在一个实施方式中,用于加载细胞至微孔中的方法包括将包含细胞的溶液直接添加到微孔阵列的润湿表面。例如,该微孔阵列的表面可以被水、盐水、缓冲液、或合适的细胞培养基润湿。在一个实施方式中,通过单次运动在微孔阵列约中间位置的上方至少约0.1mm处进行添加。可根据本领域已知用于标准的细胞培养物制备的任何标准移液或液体转移方法来将溶液添加到表面。相比于现有的多重分析工具,添加到微孔阵列表面上的溶液的体积是极小的。在一个实施方式中,该方法包括施用约1-500 μ L到表面。溶液中细胞的数目取决于细胞的可用性和期望的通量。例如,该溶液可包含低至约 10^3 、 10^2 、或 10^1 个细胞。加溶液

至微孔阵列表面之后,溶液中的细胞仅依靠重力落入各个体微孔,每孔的细胞表现为泊松分布。在某些实施方式中,具有零细胞或多个细胞的孔可以从后续分析中排除,或包括在分析中用于对照和/或背景信号处理。

[0229] 在某些实施方式中,所述溶液包含在实施过程中促进细胞的存活和/或正常功能的一种或多种组分。例如,该溶液可以包括通常用在细胞培养中的生长因子、激素、蛋白、酶、小分子、抗微生物剂、等等。在一些实施方式中,所述溶液包括合适的细胞培养基。在一些实施方式中,所述溶液包含测试试剂或测试化合物,在本发明的实施中希望检测它们的效果。例如,测试试剂可以包括小分子、蛋白、核酸、肽、等等,其在检测到的图谱上可以具有或不具有效果。例如,所述试剂可以或不增加一个或多个感兴趣化合物的分泌或降低一个或多个感兴趣化合物的分泌。

[0230] 该方法还包括将该捕获试剂阵列与微孔阵列接触。在微孔阵列和捕获试剂阵列之间创建适当的界面,其中个体微孔与它们对应的捕获试剂阵列组对准,在一个实施方式中,通过使用集成的装置壳体(integrated device housing)通过加压钳机构完成该操作。应注意本文中,然而,微孔阵列和捕获试剂阵列不需要精确地对准。例如,阵列的均匀性允许松散对准,这并不一定需要特定微孔对准于捕获阵列上的特定组。此外,在某些实施方式中,实验后进行的自动化分析执行信号匹配,这可以克服非精确对准。然而,本方法不限于形成该界面的任何特定的方法。例如,永久和非永久粘合剂、螺钉、夹子、等等,也可以使用。

[0231] 该加载方法仅依赖于个体细胞的大小和微孔的大小,这两个大小决定了每微孔中单细胞的平均数目。在一些实施方式中,本文所述的加载过程确保每微孔中限制约0至20个细胞。每孔细胞数的整体分布近似于泊松分布。

[0232] 在一个实施方式中,将细胞限制在装置内所需的时间段,该时间段可以跨越一个或多个时间点。在一个实施方式中,该方法包括将细胞限制在装置内约1分钟、5分钟、10分钟、30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时、16小时、1天、2天、4天、1周、2周、1个月、一年或更长时间。

[0233] 在一个实施方式中,该方法包括:获取记录每个微孔中细胞数目和位置的图像。在某些实施方式中,这允许确定测定的谱是由单细胞产生的还是由单细胞的群体产生的。图像采集可以通过本领域已知的任何方法来进行。

[0234] 在一个实施方式中,所需的时间过程过去之后,拆解该装置以移除捕获试剂阵列。然后对所述捕获试剂阵列进行已知的ELISA免疫测定程序,以在化合物结合位点产生可检测的复合物。例如,在一个实施方式中,各特异性针对不同的固定化捕获试剂-化合物复合物的多个第二捕获试剂,如本文别处所述,在促进特异性结合的合适条件下施加到捕获试剂阵列的表面。如在本文别处详细描述,每个第二捕获试剂标均标记有可检测标记,例如,荧光标记。在某些实施方式中,多个第二捕获试剂中的每一个均标以相同的标记。在其他实施方式中,第二捕获试剂标有不同的标记,以在可能在相同的空间位置形成的复合物之间进行光谱区分。

[0235] 在一个实施方式中,施加第二捕获试剂组后,对捕获试剂阵列成像以在不同的空间位置检测一个或多个可检测标记的存在。图25描绘了示范性读出结果,表明(1)一组微孔的明场图像,用来检测每微孔中细胞的存在和/或数量,(2)荧光图像,用来检测在特定空间位置的可检测标记的存在,各位置对应于特定的感兴趣化合物,和(3)明场和荧光图像的叠

加。

[0236] 捕获试剂阵列的成像可通过本领域中已知的任何合适方法来完成。例如,在某些实施方式中,捕获试剂阵列的成像包括使用荧光显微镜、荧光检测器、和/或荧光扫描仪。然后用图像分析,包括确定各捕获试剂组的哪些空间特征具有可检测标记,来构建各组的多重谱,其因此对应于来自各微孔的谱。在使用了多个可检测标记的某些实施方式中,分析之前图像可能是颜色合并的。

[0237] 单细胞表型测定的方法

[0238] 本发明提供了一种方法以阐明单细胞谱。例如,在一个实施方式中,本发明提供了一种方法以测定来自单细胞的蛋白质组图谱。在另一个实施方式中,本发明提供了一种方法以测定来自单细胞的基因组图谱。在另一个实施方式中,本发明提供了一种方法以测定来自单细胞的分泌组(即分泌的蛋白和化合物)。在另一个实施方式中,本发明提供了一种方法以测定来自单细胞的组合的蛋白质组、基因组、和/或分泌组图谱。此外,该方法提供了同时测定大量单细胞的图谱的高通量方法。

[0239] 在一个实施方式中,本发明的方法用于评估免疫细胞的异质性或多功能性。免疫细胞在预防和防止各种感染中起重要作用(Seder等,2008,Nature Reviews Immunology, 8:247)。尽管使用功能强大的流式细胞技术,免疫细胞的分型快速发展,但仍然难以完全剖析不同表型的功能,部分由于包括在T细胞和单核细胞/巨噬细胞中的极高水平的细胞异质性(Gordon等,2005,Nature Reviews Immunology,5:953-964)。此外,这样的异质性不仅存在于表型的水平,而且存在于细胞行为水平,如通过各种效应子功能和激活状态反映出来的(Seder等,2008,Nature Reviews Immunology,8:247)。免疫细胞常常显示许多功能,被称为多功能性,多种功能的组合决定了个单细胞的免疫性和该细胞抵抗给定感染的“质量”。在Th1细胞的简化线性分化模型中,在CD4⁺T-细胞细胞因子应答中均观察到了表型和功能的异质性。应该注意的是,在不同阶段这些细胞显示了不同的效应子功能(细胞因子谱),而且这些功能模式随时间动态地演变。还发现,具有多功能的细胞能够作为具有强力效应潜力的最好的记忆CD4⁺T细胞。事实很可能远比这个线性分化模型复杂,超过40种效应子功能与辅助性T细胞有关。与进展性患者相比,非进展AIDS患者发展了HIV特异性T细胞谱,能够分泌更多数目的不同细胞因子,这进一步例证了多功能性的重要。然而,没有可用的技术来在单细胞水平上评估免疫效应子功能的完整谱,并且对这些动态演变细胞的细胞免疫学仍然知之甚少。在某些实施方式中,通过使用现在描述的多重系统,本发明方法通过检测一个或多个单免疫细胞的分泌组而允许评价免疫细胞的异质性。例如,能够评估未处理的或使用一种或多种测试化合物刺激的单个免疫细胞的分泌组。这因此可用于评估受试者的免疫应答的质量。

[0240] 单数术语“癌症”不是一种疾病,而是包含了大量的异质性疾病状态,这使得不可能采用通用的方法完全治疗癌症。这部分由于显著的瘤内异质性(Furnari等,2007,Genes Dev,21:2683-2710)。此外,这样的异质性是如此深刻,它存在于肿瘤微环境内的单细胞水平。例如,在人脑多形性成胶质细胞瘤中,不仅有胶质瘤细胞,还包括其他关键的细胞类型,例如引发肿瘤的免疫细胞(Bao等,2006,Cancer Research,66:7843-7848;Singh等,2004,Nature,432:396-401)、神经/神经胶质祖细胞、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞和脑驻留的免疫细胞-小胶质细胞。成胶质细胞瘤微环境的显著异质性和在实体人肿瘤内的不

同细胞的谱系关系,可以是肿瘤细胞能力的重要决定因素。个体GBMs可带有一系列促进各种肿瘤生长模式的不同表型的自我更新细胞类型(Chen等,2010,Cancer Cell,17:362-375)。因此,关键的是要揭示在GBM中胶质瘤干/启动细胞的分级的异质结构,并描述细胞-细胞间的相互作用网络。

[0241] 这种相互作用很大程度上是由分泌自不同细胞类型的可溶性介质介导的。神经胶质瘤细胞分泌细胞因子和趋化因子以招募和颠覆与其相邻的未转换的小胶质细胞,它们进而产生炎症因子促进肿瘤的发生(Leung等,1997,Acta Neuropathol,93:518-527;Prat等,2000,Neurosci Lett,283:177-180;Platten等,2003,Annals of Neurology,54:388-392;Galasso et al,2000,Experimental Neurology,161:85-95),反映出小胶质细胞与神经胶质瘤细胞之间的相互旁分泌刺激。在一个高度异质的肿瘤微环境中,这一复杂的细胞-细胞对话是癌症免疫学中一个最重要的管控机制,但仍难以研究,由于缺乏可以执行单细胞蛋白谱信息分析的技术,特别是,调节细胞-细胞通讯的分泌蛋白。在某些实施方式中,本发明的方法允许对肿瘤内部或附近的细胞的分泌蛋白进行单细胞分析,以评估微环境内的细胞-细胞信号。这可以允许基于所观察到的信号表型对肿瘤进行表征,包括肿瘤的攻击性、或肿瘤的阶段。

[0242] 本发明的装置和方法可用于确定任何化合物的存在和/或数量。合适的化合物类型包括蛋白、核酸、蛋白片段、表面受体、激素、生长因子、等等。最终用户可以简单地控制和定义通过本发明的方法测定的感兴趣化合物的确切组合。例如,对特定化合物的检测仅受限于特异性结合该化合物的捕获试剂(例如,抗体、肽、核酸序列,等)的可用性。在某些实施方式中,感兴趣化合物的组合为用户提供了有关包含在装置的微孔中的细胞的表型的信息。在一个实施方式中,所述装置被配置用于多重检测分泌性蛋白。例如,在一个实施方式中,所述装置被配置用于多重检测以下的一个或多个:MIF、IL-1RA、IL-15、IL-13、IL-12、IL-10、IL-8、IL-7、IL-6、IL-5、IL-4、IL-3、IL-1b、IL-1a、VEGF、PDGF、NGFβ、HGF、EGF、MCSF、SCF、MIP-1b、IL-22、TNFβ、TNFα、RANTES、MCP-1、IL-17A、TSLP、IL-27、IL-27-1、MMP9、MMP2、IL-23、IL-9、GMCSF、IFN、GCSF、TGFβ、TGFα、MIP-1a、和IL-2。

[0243] 如本文中所详述的,本发明的装置和方法允许多重同时检测大量的化合物。通过利用分离的特征的空间位置/形状和各特征中的不同的可检测标记,本发明提供同时检测,在某些实施方式中,高达20、高达30、高达40、高达50、高达75、高达100、高达200,或更多的化合物。例如,图26示出了45个化合物的关联图,使用本文所述的装置和方法进行检测。

[0244] 由于单细胞的异质性,即使是在给定的组织,本发明的方法提供了一个有力的工具以迅速有效地确定群体内的多种表型的存在。例如,本发明的方法和装置允许测定是否所有细胞共享相同或相似的蛋白质组、基因组、和/或分泌组图谱,或者群体中是否存在具有改变的图谱的分离的单细胞。

[0245] 该方法允许确定不同的细胞表型,这可用于确定特定的有害表型的存在(以及其他用途)。在单细胞的基础上确定图谱允许检测特定表型,这些特定表型的个体化图谱在群体图谱中被隐藏。另外,在多重检测大量化合物的基础上确定的图谱能够鉴定出在仅检测一个或几个化合物的方法中被隐藏的表型。

[0246] 这可以用于,例如,测定具有指示癌细胞的图谱的细胞的存在。在一个实施方式中,该方法用于基于观察到的一个或多个单细胞的表型阶段来评价特定疾病的进展。在另

一个实施方式中,该方法可用于检测特定类型的癌细胞或表征癌细胞的攻击性或侵袭性。在另一个实施方式中,该方法可用于检测具有指示转移性细胞的表型的细胞。例如,本文所描述的多重单细胞测谱可以用于研究来自肿瘤的单细胞分泌组图谱,它可以鉴定具有指示转移性的图谱的个体细胞亚组的存在。因此,这将允许非常早期的诊断,在否则几乎不可能检测到的阶段。

[0247] 实验实施例

[0248] 本发明被进一步详细地参照以下实施例进行说明。提供这些实施例用于说明的目的而已,并且不旨在是限制性的,除非另有规定。因此,本发明不应以任何方式被解释为仅限于以下实施例,而是应被解释为包括任何和所有变化,这些变化作为本文所提供的教导的结果,是显而易见的。

[0249] 无需进一步说明,据信本领域普通技术人员可利用前面的描述和下面的说明性实施例,制备和使用本发明化合物和实践所要求保护的方法。以下工作实施例因此特别指出了本发明的优选实施方式,并且不应当被解释为以任何方式限制本公开的其余部分。

[0250] 实施例1:单细胞的高通量分泌组分析以评估功能性的细胞异质性

[0251] 分泌蛋白主导了一系列的细胞功能,在人类健康和疾病方面。由于高度的细胞异质性和,更重要的,个体细胞的多功能性,本领域仍然需要同时检测源自单细胞的多个蛋白并快速并行的测试大量的单细胞(1000以上)。本文描述了一种简单的生物分析检测平台,该平台包括大量的亚纳升微室,所述微室与高密度的捕获试剂微阵列整合,用来高度多重地并行检测来自上千个单细胞的蛋白。已在细胞系和复杂生物样品例如来自患者的原始细胞上测试了本平台。在单细胞分泌组标志之间观察到了显著的异质性,这种异质性第一次能够直接地关联于细胞物理行为,如迁移。与本领域现有的分泌蛋白检测如ELISpot和新兴的基于微技术的试验相比,本文描述的方法既提供了高通量又提供了高多重性。它还具有许多临床友好的特点,例如易于操作、低样品消耗、和标准化的数据分析,展现了一个用于患者细胞功能和免疫力信息监控的潜在革命性的工具。本文示出的数据的进一步描述可以在Lu等,2013,Anal Chem杂志,85(4):2518-2556中发现,并在本文中全文引用。

[0252] 试验中使用的材料和方法描述如下。

[0253] 制备捕获试剂阵列

[0254] 用于PDMS复制的模具是一硅母模,使用深反应离子蚀刻(DRIE)方法蚀刻。使用三甲基氯硅烷(Aldrich)蒸汽预处理过夜来促进PDMS的释放。PDMS预聚物和固化剂(RTV615, Momentive)充分混合(组分A和B比例为10:1)后倾泻到硅母模上。真空干燥1h去除气泡,在烘箱中80℃固化PDMS 2hrs。固化后,从母模上剥脱PDMS层并在入口和出口小孔上穿孔。将该装置置于乙醇和2-异丙醇中超声处理进行清洗,然后与多聚-L-赖氨酸微阵列片(Erie Scientific)键合(bonding)。该装配物在烘箱中80℃烘烤2hrs以加强键合。用于抗体流动构图的PDMS微芯片包含20个分离的微通道,能够分别构图多达20个不同的抗体。在PDMS流动构图芯片上,线组的典型的宽度和间距分别为25μm、50μm。

[0255] 为了捕获试剂阵列的流动构图,1.5μL的不同抗体被分别地注射到微通道中,并通过微流通道流动直到干掉。实验中用到的所有的抗体概括在表1中。抗体被固定在多聚-L-赖氨酸玻璃片上以形成捕获试剂阵列。在流动构图后,可将玻璃片储存在4℃冰箱中,在使用之前将PDMS层释放。

[0256] 表1:所有使用的抗体

[0257]

第一抗体(供货商:克隆)(目录号)	第二抗体(供货商:克隆)(目录号)
小鼠抗人IFN- γ (ebio: NIB42)(14-7318)	生物素化抗人IFN- γ (ebio: 4S.B3)(13-7319)
纯化的抗人TNF α (ebio: MAb1)(14-7348)	生物素化抗人TNF α (ebio: MAb11)(13-7349)
大鼠抗人IL-2(ebio: MQ1-17H12)(14-7029)	生物素化兔抗人IL-2(ebio: Polyclonal) (13-7028)
小鼠抗人IL-4(ebio: 8D4-8) (14-7049)	生物素化小鼠抗人IL-4(ebio: MP4-25D2)(13-7048)
抗人IL-1 β (ebio: CRM56)(16-7018)	生物素化小鼠抗人IL-1 β (ebio: CRM57)(13-7016)
小鼠抗人TNF β (ebio: 359-238-8)(14-7329)	生物素化小鼠抗人TNF β (ebio: 359-81-11) (13-7327)
小鼠抗人RANTES (R&D) (DY278)	山羊抗人RANTES(R&D) (DY278)
大鼠抗人IL-6(ebio: MQ2-13A5) (14-7068)	生物素化大鼠抗人IL-6(ebio: MQ2-39C3)(13-7068)
大鼠抗人IL-10(ebio: JES3-9D7)(14-7108)	生物素化大鼠抗人IL-10(ebio: JES3-12G8)(13-7109)
小鼠抗人IL-12(ebio: B-T21 (BT21))(14-7128)	生物素化小鼠抗人IL-12(ebio: C8.6)(13-7129)
抗人GMCSF(BD)(555126)	生物素化抗人GMCSF(BD)(555126)
小鼠抗 CCL2 (MCP-1)(ebio: 5D3-F7)(14-7099)	生物素化亚美尼亚仓鼠抗 CCL2 (MCP-1) Biotin(ebio: 2H5)(13-7096)
小鼠抗人EGF(R&D) (DY236)	生物素化山羊抗人EGF(R&D) (DY236)
小鼠抗人 FGF basic(R&D) (DY233)	生物素化小鼠抗人FGF basic(R&D) (DY233)
小鼠抗人HGF (R&D) (DY294)	生物素化山羊抗人HGF(R&D) (DY294)
小鼠抗人PDGF-AB (R&D) (DY222)	生物素化山羊抗人PDGF-AB(R&D) (DY222)
生物素化山羊抗人TGF- α (R&D) (DY239)	生物素化山羊抗人TGF- α (R&D) (DY239)
小鼠抗人VEGF (R&D) (DY293B)	生物素化山羊抗人VEGF (R&D) (DY293B)
小鼠抗人MIF (R&D) (DY289)	生物素化山羊抗人MIF (R&D) (DY289)
小鼠抗人IL-5(ebio: TREK5)(14-7052)	生物素化大鼠抗人IL-5(ebio: JES1-5A10)(13-7059)
小鼠抗人IL-13(ebio: PVM13-1)(14-7139)	生物素化兔抗人IL-13(ebio: Polyclonal)(13-7138)

[0258] 制备亚纳升微室阵列芯片

[0259] 亚纳升微室阵列的模具为硅母模,使用DRIE方法蚀刻。同样使用三甲基氯硅烷(Aldrich)蒸汽预处理过夜以促进PDMS的释放。用于单细胞捕获的亚纳升微流室阵列芯片用PDMS(RTV615,Momentive,组分A和B比例为10:1)使用软光刻技术制备。真空干燥1h去除气泡,在烘箱中80℃固化PDMS 2hrs。该亚纳升微室阵列芯片包含5044个细胞捕获室,共14列,每列约550个微孔。光刻掩膜上具有图像“标记物”,用于在所得的微孔阵列上自动识别不同空间位置上的微孔和细胞。

[0260] 细胞培养和刺激

[0261] 在F12/K培养基中培养人A549细胞系,补加10%的胎牛血清(FBS,ATCC)。人U937细胞系购自ATCC(美国典型培养物保藏中心,TACC),在RPMI 1640培养基(Gibco,Invitrogen)中培养,补加10%的胎牛血清(FBS,ATCC)。每100uL的U937细胞悬液使用1 μ L 20 μ g/mL的12-肉豆蔻酸-13-乙酸佛波酯(Fisher)分化,并使用1 μ L 1mg/mL的脂多糖(Calbiochem)刺激来激活Toll-样受体4(TLR4)信号,然后将悬液吸取到PDMS微孔阵列上。

[0262] 人组织样本

[0263] 人样本取自脑膜瘤个体。患者原发组织用解剖刀切碎后置于1x TrypLE Select

(Invitrogen) 中。用火抛光的玻璃吸管粉碎组织并在37℃下孵育5mins。再用火抛光的玻璃吸管粉碎组织悬液并在37℃下继续孵育5mins。使用40μm细胞滤器(BD Falcon)过滤细胞悬液并使用DMEM-F12(Gibco, Invitrogen)清洗。悬液300RCF离心5min。在DMEM-F12中重悬固体。使用红血细胞裂解液(Miltenyi Biotec)去除红细胞, 300RCF离心5min。在DMEM-F12中重悬细胞至 10^6 细胞/mL。

[0264] 使用PDMS微孔阵列捕获单细胞

[0265] 在执行单细胞捕获实验前, PDMS微孔阵列和捕获试剂阵列玻璃片分别使用3%BSA溶液(Sigma)封闭2hrs, 然后用新鲜细胞培养基冲洗。在即将细胞捕获前, 将细胞悬浮在新鲜培养基中。将PDMS微孔阵列面朝上放置, 移除细胞培养基溶液直至一薄层保留在PDMS微孔阵列表面。将细胞悬液吸取(50–200μL)到微孔阵列上并静置10min以便细胞能够落入微孔中。抗体玻璃片置于PDMS微孔阵列的上方, 捕获试剂阵列位于细胞捕获室上。然后用螺丝夹紧PDMS微孔阵列和玻璃片, 通过弹簧分布压力。单细胞将被捕获在微孔阵列中, 孵育将装配物24小时以便细胞分泌。在孵育捕获的细胞24小时后, 松开螺丝以移开捕获试剂阵列玻璃片, 并进行ELISA免疫检测步骤, 使用Genepix扫描仪和软件检测并分析结果。

[0266] 群体微阵列

[0267] 在定制印刷的抗体微阵列上进行细胞群体分析, 所述抗体微阵列是使用Spotbot 3微阵列点样仪(Arrayit)在多聚-L-赖氨酸玻璃片上点样。具有相同抗体图案的十二个同样的亚组被印刷在每个玻璃片上。印刷后, 该抗体玻璃片在湿润箱体中(含有饱和NaCl溶液, 75%相对湿度)存放5小时。在细胞群体分析前, 将玻璃片和PDMS微孔板键合, 并用3%BSA溶液封闭2小时。然后将细胞培养上清添加到不同微孔中并孵育1小时。孵育后, 执行ELISA免疫检测步骤, 使用Genepix扫描仪和软件检测并分析结果。

[0268] 免疫检测程序

[0269] 随后的ELISA步骤, 将单细胞分泌的细胞因子翻译为可检测信号。将生物素化的检测抗体(表1)混合物吸取到玻璃片上, 并在室温下孵育45min以完成夹心免疫检测, 随后使用3%BSA溶液清洗。将APC染料标记的链霉亲和素(eBioscience, 200μL, 5μg/mL)添加到玻璃片上并继续孵育45min。随后, 使用3%BSA再次清洗玻璃片, 并用3%BSA封闭0.5hr。BSA封闭后, 将玻璃片依次浸泡在DPBS、DPBS、去离子水、去离子水中, 并最终吹干。

[0270] 荧光检测和分析

[0271] 使用Genepix 4000B和4200A扫描仪(Molecular Devices)获得扫描的荧光图像, 以FITC和APC通道。使用双颜色通道488(蓝)和635(红)收集荧光信号。使用GenePix Pro软件(Molecular Devices)分析图像, 通过加载并校准微孔阵列模板随后提取荧光信号强度。使用GenePix Pro中的图像分析工具提取荧光结果。然后将荧光结果匹配到亚纳升微室阵列芯片的每个腔室, 通过光学成像分析。

[0272] 自动化光学图像分析和细胞计数

[0273] 在一自动显微镜载片台(Prior)上给装配物成像, 获得记录有每个微孔中细胞的数目和位置的图像。使用连接于Nikon Diaphot SA光学显微镜(Nikon)的Paxcam(Paxit!)进行自动化的完整芯片光学成像, 并用Paxcam软件(Paxit!)缝合在一起。成像后, 将装配物置于温箱中37℃下24h以使细胞分泌。在24小时孵育后, 细胞被再次成像以观察细胞功能。利用OpenCV(Intel)自主开发的软件来自动细胞计数, 将细胞计数与它们各自的细胞室中

提取出的荧光数据相匹配。

[0274] 数据和统计学分析

[0275] 所有的荧光扫描过的阵列,使用Genepix软件处理,以对各组中的所有特征提取背景削减的平均荧光信号。自主开发了Matlab (MathWorks) 编码以自动化的提取荧光数据并生成散布图。使用Excel (Microsoft) 和OriginPro 8 (OriginLab) 编辑提取的数据。使用Cluster/Treeview (Eisen Laboratory) 软件将所提取的数据生成热图和无监督聚类。在Excel, OriginPro 8, 和R (R Development Core Team) 中进行统计分析。

[0276] 实验结果如下。

[0277] 本文描述了一种高通量单细胞分泌组分析平台,其整合了亚纳升微室阵列和高密度捕获试剂阵列来并行同时检测源自多于1000个单细胞的14种细胞因子。该芯片可以在简单的检测“试剂盒”中操作,而无需进行复杂的流体处理或大型仪器。证明了本装置对分析人细胞系和从患者新鲜肿瘤分离的原代样本的分泌的实用性。结果表明,在群体的单细胞分泌组标志之间具有显著的异质性,并且在所研究的多种蛋白之间获得的相关性与它们的功能分类一致。通过使用简化的细胞捕获方案 (Balaban等, 2004, Science杂志305 (5690) : 1622-5)、定量、自动数据分析、并消除了大型流体处理系统,本发明的技术背离了以前的基于抗体条形码的蛋白分泌物检测技术 (Ma等, 2011, Nat Med杂志17 (6) : 738-43), 产生了一个真正实用并且能够提供丰富信息的工具,该工具可在实验室研究和临床诊断中立即使用。

[0278] 设计、制备、并装配单细胞分泌组分析芯片

[0279] 单细胞分泌组分析装置由两个独立的部分组成 (图1A) : 用于表面结合的免疫检测的高密度捕获试剂阵列玻璃基板和用于捕获单细胞的亚纳升微室阵列。该捕获试剂阵列片包括30个特征重复,每个重复包含多达20个不同抗体条带,固定在多聚-L-赖氨酸-涂覆的表面。抗体条带是20 μ m宽,整个阵列的间距尺寸为1mm。微室阵列是单层微芯片,通过软光刻技术 (Unger等, 2000, Science杂志288 (5463) : 113-6) 从聚二甲硅氧烷 (PDMS) (Unger等, 2000, Science 288 (5463) : 113-6) 制备, PDMS为一种光学透明的硅酮弹性体广泛用于生物微流体领域。它包含5440个矩形微室,每个长度、宽度和深度分别为1.8mm、20 μ m、和15 μ m。独立制作这两个部分并在检测中组合起来,以便捕获试剂阵列片作为一次性测试条,而微室阵列作为可重复使用的装置。为了使用这一平台,直接吸取一滴单细胞悬液 (10⁶细胞/mL) 至微室阵列芯片表面。细胞在重力作用下落入微室中,然后前述的捕获试剂阵列片以抗体面向下放置到微室的上面,以使所述线与微室的长度方向垂直。微室被设计的足够长,以便能够包含至少一个完整的特征集,从而不需要精确对准。最后,这一装配物通过具有4个弹力调整螺丝 (spring-adjusted screws) 用两个透明塑料板固定 (图6) 并被放置在常规的组织培养箱中,以进行单细胞分泌检测。个体细胞分泌的蛋白被捕获试剂阵列捕获并通过与生物素化的检测抗体孵育和与随后的荧光探针 (如, Cy5) 偶联的链霉亲和素孵育而读出。与锥形的单细胞蛋白质组学芯片 (Ma等, 2011, Nat Med 17 (6) : 738-43) 相比,该装置不需要复杂的微流体控制系统或任何大型装置来操作,因此更易于被具有较少工程背景的研究者和临床医生广泛地应用。

[0280] 高密度捕获试剂阵列是利用既定的微通道导引图案化技术 (Fan等, 2008, Nat Biotechnol杂志26 (12) : 1373-8) 制造,并且原则上可以通过几种其他的高密度微阵列印刷

技术来创建,诸如喷墨印刷或纳米级别尖端点样(nanoscale tip-based spotting)。流动构图芯片是一个单独的PDMS板,它有一些进口通向20个独立的弯曲微通道,在这些微通道中,单独的抗体溶液(各1 μ L)被精确的量取、添加、并行流经所有微通道以确保抗体在表面上的均匀加载。使用异硫氰酸荧光素标记的牛血清白蛋白(FITC-BSA)溶液评价构图的质量。如荧光强度线谱(图1B和图7)所显示,结果表明在大面积上(1in. $\times$ 2in.)成功的制备出了高密度蛋白阵列,并且具有良好的均匀性(在荧光强度中<5%)。这样保证了从随后的单细胞分泌组检测中观察到的蛋白信号差异(>10%)是由细胞异质性引起的,而不是由原代的捕获试剂阵列不均匀性引起的。

[0281] 电动相差成像系统已经开发出来,以给细胞捕获芯片中的所有细胞在10分钟(图1C)内成像,图像分析算法允许鉴定每个微室中的单个细胞和它们的x/y坐标并对细胞计数。选择该简单的微室阵列芯片格式是因为其易于操作,但其因而并不能确保每个室中捕获一个细胞。然而,优化储液中的细胞密度可容易地在微芯片上得到多于1000个单细胞室(图8),允许单细胞的高通量分析。

[0282] 蛋白组和验证

[0283] 在图2A中列出了通过捕获试剂阵列检测的蛋白。这些由单细胞分泌的特定蛋白的评价具有特别的重要性,因为它们的功能涉及了一系列的细胞过程(Raman等,2007,Cancer Lett 256(2):137-65;Wu等,2012,PLoS Comput Biol 8:e1002355;Zou,2005,Nat Rev Cancer 5(4):263-74;Dranoff 2004,Nat Rev Cancer 4(1):11-22)。它们包括细胞因子,趋化因子,和生长因子,涉及范围广泛的免疫或病理生理过程。在细胞免疫和细胞-细胞信号转导网络的研究中,评估这些由单细胞分泌的蛋白是重要的。为了同时检测来自单细胞的这些蛋白,捕获抗体固定在基板上作为高密度捕获试剂阵列。进行单细胞分析之前,使用重组蛋白验证该实验。将个体重组蛋白加入(spiked into)新鲜的细胞培养基中超出4-log范围的浓度,并暴露于所有种类的抗体,以便评估交叉反应,检测限度(LOD),和动态范围。去除或替换具有超过5%(在5ng/mL蛋白浓度下)交叉反应性的抗体。最后获得了总结于表1中的一组抗体对。滴定曲线(图2B)证明了在多重测试中对这些蛋白进行定量检测的可行性,典型的检测范围是3个数量级。LOD范围为400pg/mL至低于10pg/mL,取决于抗体对的亲和力。在微室($\sim$ 0.54nL)的体积和代表性检测灵敏度($\sim$ 10pg/mL)的基础上,微室中可以通过捕获试剂阵列检测到的蛋白的量在5.4ag的量级,这约等于 $\sim$ 160个分子。因此,该平台具有检测单细胞分泌的蛋白的灵敏度(典型拷贝数 $\sim 10^{2-5}$)。

[0284] 细胞系的单细胞蛋白分泌组分析

[0285] 首先使用该单细胞分泌组分析芯片检测来自人类多形性成胶质细胞瘤细胞系(U87)的14种蛋白。在该实验中,最多在每个微室中捕获了10个细胞,1278个微室捕获了单个细胞。在捕获试剂阵列的流动构图中,总是使用FITC-BSA(0.5mg/mL)流经通道1以形成一个连续的荧光信号线作为位置参考和内部质量/均匀性控制。如扫描荧光图像的代表性区域(图3A和图9A)显示的那样,蓝色的FITC-BSA参考线和对应于蛋白分泌水平的红色构图信号均明显看到。同一图中还显示了加载有细胞的14个微室的明场图像、相应的荧光阵列图像、以及两者的叠加。孵育24h后观察到的主要蛋白(FGF,VEGF,MIF,IL-6,IL-8,以及MCP-1)主要是促炎细胞因子或趋化蛋白。

[0286] 使用图像分析软件Genepix 6.0进行微室中各蛋白的荧光强度的自动定量。只有

那些包含单个细胞的微室的分泌组图谱被提取出来,得到的分泌组图谱的热图(图3B和图10)表明存在细胞-细胞间的变化。虽然大多数的细胞产生IL-6和IL-8,单在细胞个体中这些蛋白的水平不同,并且其它低丰度蛋白如MCP-1和FGF的分泌明显地表现出了异质性标志;只有小部分的细胞在高水平表达这些蛋白。为了验证单细胞检测,对收集自相同细胞、孵育了相同的时间的上清用常规的针点(pin-spotted)微阵列检测并行进行了动态大群体(kinetic bulk population)分泌检测。结果(图3D和图11)同样表明FGF,VEGF,IL-6,IL-8,和MCP-1是最高的5种蛋白,均与单细胞分析一致,虽然相对水平有差异。然而,MIF没有在群体实验中表现出来。有趣的是,通过荧光强度检测的蛋白水平与细胞数目不总是相称,并且有时不能通过叠加效应解释(图3C和图12)。分泌组分析芯片加载了多得多的细胞,MIF信号随着捕获室中细胞数目的增加而减弱,揭示了旁分泌信号的可能性以及细胞数目的增加对MIF的调控(图12)。这一微小的差异是可以预期的,因为这两种实验在生物学上是不同的(例如,大群体实验检测了蛋白谱的终点,而单细胞实验检测在孵育期间积累的信号;群体实验受到旁分泌信号的影响而单细胞检测没有)。总之,这些对比研究彼此之间吻合良好并展示了单细胞分泌组分析微芯片的有效性。这个平台的另一个优点是,它也同时测量从多个细胞中分泌的蛋白。虽然IL-6和IL-8的分泌量随着微室中细胞数目的增加而增加,但当细胞数目超过2时,MCP-1或MIF增加的量并没有显著的变化,这表明存在一个可能的机制类似“群体感应”,其中在多细胞系统中的旁分泌机制控制着稳态。

[0287] 该单细胞分泌组分析芯片也用来检测两种另外的细胞系,来评估该平台的适用宽度。首先是免疫细胞系(U937)。该细胞为人单核细胞,可在肉豆蔻酸乙酸佛波酯(PMA)的刺激下分化为功能性的巨噬细胞,然后用细胞毒素脂多糖(LPS)激发以刺激细胞因子的产生。该过程模拟人巨噬细胞对格兰氏-阴性细菌的炎症性免疫反应(Aderem和Ulevitch,2000,Nature 406 (6797):782-7)。观察到的主要蛋白为RANTES,TNF- α ,MCP-1,IL-6,和IL-8(图9B)。在大多数的细胞产生RANTES,IL-8,和TNF- α 的同时,在个体细胞之间这些蛋白的水平具有差异,并且低丰度蛋白诸如MCP-1和IL-6的分泌表现出了异质性标志。对收集自相同细胞的上清液并行进行了大群体分泌检测以验证单细胞实验(图13)。结果也表明RANTES,IL-8,MCP-1,IL-6,和TNF- α 是前五位的蛋白,与单细胞分析一致。IL-8和RANTES分泌随微室中细胞数目的增加而增加,当细胞数目超过4时MCP-1或TNF- α 增加的量没有显著改变(图9C)。第二个是肺癌细胞系(A549),其组成性地产生细胞因子或生长因子。因此,在没有刺激的情况下检测了这些细胞分泌的基础水平。观察到的主要蛋白是MCP-1,IL-6,IL-8,VEGF,和FGF(图14),同样使用标准的针点抗体微阵列实验进行大群体检测来验证(图15)。A549细胞分泌的蛋白包括促炎性细胞因子和生长因子,与肺癌细胞维持肿瘤生长和促进炎性微环境的角色一致。总之,细胞系的研究证明了,与现有的常规方法如ELISpot相比,该平台能够快速、定量和高通量分析单细胞的蛋白分泌谱。使用细胞系验证该平台使得能够扩展样品库以包括更复杂的样品例如来自患者的组织样本。

[0288] 分泌组标志和迁移性能的相关性

[0289] 虽然基于流式细胞术的单细胞分析允许多重的细胞检测,但是检测的蛋白谱并不能够直接的与细胞行为和活性例如迁移特性相关。本文描述的平台利用活细胞成像来计算捕获的细胞,因此允许同步检测细胞行为以及随后与同一细胞的相应的蛋白谱相关联。本文中通过检测在孵育之前和孵育24h后的移动距离来检测加载在单细胞分泌组分析芯片中

的肺癌细胞 (A549) 的迁移 (图4A)。观察到这些细胞贴附在通道壁上并以不同的速率迁移。这些结果被总结在了热图中, 示出了单细胞分泌组谱, 以递增的细胞迁移距离排序 (图16)。进行了高迁移性 (观测范围的顶部20%) 相对低迁移性 (相同范围的底部20%) 细胞的细胞因子水平的P值分析。虽然大多数的细胞不迁移, 但是高迁移性细胞在统计上与高表达IL-8相关 ($P < 0.01$) (图4B)。MCP-1的分泌和细胞迁移的相关性不太显著 (图4c, d)。使用前述的测试, 在散点图中IL-6表现出了与细胞运动的负相关性, 但是没有表现出统计相关性。已在不同的肿瘤中将这蛋白与运动和转移潜能的增加相关 (Singh等, 1994, Cancer Res 54 (12): 3242-7; Li等, 2003, J Immunol 170 (6): 3369-76; Waugh和Wilson, 2008, Clin Cancer Res 14 (21): 6735-41), 通过对单细胞IL-8分泌的研究, 可能能够研究与迁移相关的个体细胞分泌组标志。简而言之, 使用本平台首次同步检测了单个活细胞的蛋白分泌组标志和表型特性 (如, 迁移), 这能够增加对细胞功能以及潜在的分子机制的理解。

[0290] 来自临床患者样本的单肿瘤细胞分泌组谱

[0291] 为了扩展本平台的应用至检测衍生自复杂生物样本的细胞中的多重分泌, 我们的装置也被应用到了来自三个患者 (患有一种恶性脑瘤即多形性成胶质细胞瘤 (患者1和2)、或脑膜瘤 (患者3)) 的新鲜原发肿瘤组织的检测上 (表2)。手术切除的肿瘤组织的一部分 ($< 0.2\text{g}$) 用冰冷的磷酸盐缓冲液冲洗, 切成小块并用胶原酶处理成单细胞悬液 (图5A)。将细胞离心下来并重新悬浮在培养基中, 在 $\sim 10^6$ 细胞/ml 的密度。在获得组织1小时内, 通过吸液管将单细胞悬浮液加载至单细胞分泌组分析装置。使细胞分泌细胞因子12h之后, 使用检测抗体显现阵列的图案并扫描。与细胞系扫描图像相比, 原始荧光图像 (图5B, 患者1) 显示出优良的蛋白信号和相似的背景。抗体阵列包括图5b中所示的14种蛋白。在该实验中, 微室中捕获的细胞在0和22之间, 1058微室捕获了单细胞。各独立通道的每个分泌的细胞因子的荧光强度均被定量, 然后生成单细胞分泌谱的热图 (图5C)。单细胞分泌谱的无监督分级聚类表明了具有不同的活动性的三个独立的细胞群体。总体具有更高活性的一群细胞 (图5C, 蓝色集群), 分泌范围较广的蛋白, 可能对应于更具侵袭性的表型, 而用绿色表示的细胞表现出了最低的细胞因子生产水平, 可能代表了更静止的表型如肿瘤干/祖细胞 (Wicha等, 2006, Cancer Res 66 (4): 1883-90)。黄色显示的大部分是各种功能表型。患者2 (图5D) 的结果与患者1的结果类似, 例如MIF和IL-8为主要的蛋白, 但是图案不同之处在于它的炎性细胞因子产量更低并且EGF的水平更高。第二级蛋白都显示不同的细胞异质性。图17和图18展现了单个蛋白的直方图和散点图, 其显示了蛋白的相对水平与细胞群中的分布。

[0292] 表2: 患者病历概要

[0293]

患者	样品编码	性别	年龄	肿瘤类型	等级	位置
1	RFa 10-28-11	女	64	成胶质细胞瘤	4	左前额
2	RFa 06-11-12	女	66	成胶质细胞瘤	4	右侧未指明
3	RFa 04-02-12	女	47	过渡型脑膜瘤	1	右侧

[0294] 以流式细胞图的方式编辑了患者原发肿瘤单细胞细胞因子检测值的仿三维散布图, 形成一个 14×14 的镶嵌矩阵 (图5E)。蛋白显示在对角线上, 各嵌块是两两相关的图, 我们通过线性回归分析对其每个都得出了R值。然后整个矩阵进行颜色编码为红色 (正相关) 和蓝色 (负相关), 并且颜色强度正比于R。在患者1矩阵, 所有的炎性细胞因子显然在一个集

群相关联,,几种生长因子被分组在一个单独的集群中,反映了他们在功能上的差异。在患者2的结果中,促炎性细胞因子,尽管通常在低水平表达,也表现出了相互关联。有趣的是,EGF的分泌与促炎性蛋白和趋化蛋白(MCP-1,GM-CSF,和IL-8)是负相关的。同样分析了来自过渡型脑膜瘤患者(患者3)的第三个样本,其被认为是更具有均质性和更少炎症性的肿瘤。患者3(图19和图20)的结果确实表明促炎性细胞因子信号的减少。这些研究暗示了这些结果和这些细胞生理功能或病理状态的相关性。目前外科疗法仍然是人成胶质细胞瘤的最有效的治疗手段。以后,化疗可能全身进行或通过将含有药物的薄片放入手术腔,以进一步消除已扩散到正常脑组织的侵袭性肿瘤细胞(Lesniak和Brem,2004 Nat Rev Drug Discovery 3(6):499-508)。该平台有可能可以区分和定量侵袭性细胞表型,因为它们通常产生更多的细胞因子以及不同的细胞因子谱,其具有临床应用价值以确定肿瘤侵袭和给个体患者定制化疗策略。此外,在肿瘤微环境中作为可溶性信号介导细胞-细胞通信的这些蛋白,可以被认为是新的治疗靶点,用于个性化治疗(Dvorak 2002,J Clin Oncol 20(21):4368-80;Rich和Bigner,2004,Nat Rev Drug Discovery 3(5):430-46;Reardon和Wen,2006,Oncologist 11(2):152-64)。

[0295] 单细胞蛋白质组学

[0296] 由于缺乏等效的蛋白扩增方法如用于核酸的聚合酶链式反应(PCR),单细胞蛋白质组学分析普遍要比单细胞的基因组学分析更具挑战性。流式细胞仪分析的最新进展允许对单细胞蛋白标记物进行34-重检测,但大多数蛋白或者是表面受体或者是胞浆蛋白(Bendall等,2011,Science 332(6030):687-96)。细胞内的细胞因子染色(ICS)能够间接评价“分泌的”蛋白,但目前能够被检测的细胞因子数目实际上低于10,推测原因为在单细胞的有限体积情况下的大量抗体增加了非特异性结合。进一步的,由于各个标记之间的光谱重叠,增加使用ICS检测的化合物的数量与精确度降低和噪声增加相关。此外,不像蛋白分泌,它不是细胞功能的直接检测。因此,多重蛋白分泌检测是单细胞功能性表征中缺失的一块。越来越明显的是,即使是遗传同质的细胞也可能是极其异质的,在研究他们的生物学时导致许多悬而未决的问题(Bendall等,2011,Science332(6030):687-96)。相对于研究群体细胞的信号模式(其中信号被平均化并且缺失了所有重要的(defining)信息),研究单细胞的分泌谱可以揭示的关于肿瘤异质性的信息要多很多,凸显了对研究单细胞分泌的需求(Bendall和Nolan,2012,Nat Biotechnol 30(7):639-47;Michor和Polyak,2010,Cancer Prev Res3(11):1361-4)。

[0297] 本文描述了亚纳升多重免疫检测芯片,其能够高通量、同步并行检测分泌自超过1000个单细胞的一组14个细胞因子。该平台提供了针对分泌蛋白检测的显著优势,并提供了与通过流式细胞仪获得的信息互补的信息。该装置提供了独特优势的一个示例情况是,当使用细胞分离工具利用特定的表面标记物分选出表型相同的细胞群后,可以将这些细胞置于本发明装置中以进一步揭示功能水平上的细胞异质性。例如,人类T细胞谱系常常显示许多功能,单个T细胞的多种功能的复杂组合决定了该细胞响应特定抗原的“质量”。最近的研究表明,多功能性T细胞常常表现出更大的效力和持久性(Seder等,2008,Nat Rev Immunol 8(4):247-58)。最新的HIV疫苗试验中使用ELISpot技术来对分泌干扰素- γ (IFN- γ)的T细胞计数,以评估疫苗的功效,但事实证明,大部分的IFN- γ 分泌细胞是末端分化的效应子T细胞,具有很小的抵抗病毒感染的保护效果。该平台展现了一个有前景的工具,能

够执行对从流式细胞仪或其它分离技术,例如,磁辅助细胞分选(Adams等,2008,Proc Natl Acad Sci USA 105(47):18165-70)分离的细胞的多功能分析,以将单细胞蛋白分析引领至功能性分析的另一水平。该平台的一个潜在的问题是,细胞被隔离在密封微室,并可能经历影响离体原代细胞的正常功能的条件。作为一种生物分析工具,该微芯片的目的不是为了进行细胞的长期培养,典型检测时间为几小时至1天。已有报道,在密封和隔离的环境下,原代细胞离体实验表明在长时间内产生的蛋白如预期的那样,具有其固有的生理活性(Ma等,2011,Nat Med 17(6):738-43);Han等,2012,Proc Natl Acad Sci USA 109(5):1607-12),有趣的是,在一个密封的纳升室中这些细胞可能获得更强的生存力,因为这种纳升室重现了原发组织中的拥挤并保持了足够的细胞因子浓度以进行更有效的自分泌信号转导。因此,该芯片对于高通量分析来自单个原代细胞的蛋白分泌谱来说是一个有前景的平台,并可能有助于区别性诊断和监控患者的细胞功能。

[0298] 实施例2:空间和光谱编码的45-重检测

[0299] 此处描述的是本发明装置的一个实施方式,使用空间位置和可检测标记的颜色来检测多达45种不同的感兴趣化合物的存在。采用不同标记的第二抗体极大地增加了可以同时检测的感兴趣化合物的数目。

[0300] 图27是一个描述该实验如何工作的图表。每个空间线(或其它分离的特征)具有三个不同的第一抗体,各特异性的用于三个不同的感兴趣化合物的检测。用于在化合物结合位点上提供可检测标记的检测抗体(第二抗体),每个都标记有不同颜色的荧光标记。该测定的分析因此包括使用多色激光扫描的方法来观察整个装置的每个检测标记的空间位置。

[0301] 图28和29表明了检测来自该装置的3种不同的颜色的能力。图28示出了抗体阵列和微孔的叠加。在右边,用三个不同的波长对同一视野进行成像。用特定波长在特定位置进行检测从而确定特定的感兴趣化合物的存在。图29表明,许多不同的波长均能够使用,并显示了波长检测的一致性。另外,如图29所示,该装置在整个玻璃片上提供了均匀的蛋白编码。

[0302] 在图30中显示了一个典型的组(panel),其表明使用了14种不同的线,每个具有3种不同的颜色标记来检测42种感兴趣的化合物。也包括了作为对照的第十五条线。本实验中用到的抗体列于下表3中。

[0303] 表3:45-重空间和光谱实验中使用的抗体

[0304]

蛋白	捕获抗体 同种型/克隆/供应商/目录号	检测抗体 同种型/克隆/供应商/目录号
<i>IL-1a</i>	小鼠 IgG2A /4414/RD/MAB200	小鼠 IgG1, κ /364-3B3-14/Biolegend/500104
<i>IL-1b</i>	小鼠 IgG1 /JK1B-1/Biolegend/508202	鼠 IgG2b, κ /JK1B-2/Biolegend/508304
<i>IL-3</i>	小鼠 IgG1 /653A10B1/Invitrogen/ AHC0832	大鼠 IgG1, κ /BVD8-3G11/Biolegend/500502
<i>IL-4</i>	小鼠 IgG1, κ /8D4-8/Biolegend/ 500702	大鼠 IgG1, κ /MP4-25D2/Biolegend/ 500802
<i>IL-5</i>	大鼠 IgG2a, κ/JES1-39D10/Biolegend/500902	大鼠 IgG2a, κ /JES1-5A10/Biolegend/ 501006
<i>IL-6</i>	大鼠 IgG2a, κ /MQ2-39C3/Biolegend/501204	大鼠 IgG1, κ /MQ2-13A5/Biolegend/ 501102
<i>IL-7</i>	大鼠 IgG2a, κ /BVD10-11C10/Biolegend/506604	大鼠 IgG1, κ /BVD10-40F6/Biolegend/501302
<i>IL-8</i>	小鼠 IgG1, κ /H8A5/Biolegend/511502	小鼠 IgG1, κ /E8N1/Biolegend/ 511402
<i>IL-10</i>	大鼠 IgG2a, κ/JES3-12G8/Biolegend/ 501504	大鼠 IgG1, κ /JES3-9D7/Biolegend/501402
<i>IL-12(p70)</i>	小鼠 IgG1/24945/RD/MAB611	大鼠 IgG1, κ /7B12/Biolegend/511002
<i>IL-13</i>	小鼠 IgG1/32116/RD/MAB213	大鼠 IgG1, κ /JES10-5A2/Biolegend/ 501902
<i>IL-15</i>	小鼠 IgG/RD duoset 捕获抗体/DY247	小鼠 IgG1/AM00959PU-N/Acris/AM00959P

[0305]

		U-N
IL-1RA	小鼠 IgG1 /JK1RA-1/Biolegend/ 509902	小鼠 IgG/RD duoset 捕获抗体/DY280
MIF	小鼠 IgG1 Kappa/2A10-4D3/Abnova/H00004282-M01	小鼠 IgG1 Kappa/2A10-4D3/Abnova/H00004282-M01
IL-17A	小鼠 IgG2a, κ /BL127/Biolegend/512603	小鼠 IgG1, κ /BL23/Biolegend/512702
MCP-1	小鼠 IgG1, κ /5D3-F7/Biolegend/502607	亚美尼亚仓鼠 IgG /2H5/Biolegend/505902
Rantes	小鼠 IgG2b kappa/VL1/Invitrogen/AHC1052	小鼠 IgG1 /21418/RD/MAB678
TNF-α	小鼠 IgG1, κ /Mab11/Biolegend /502902	小鼠 IgG1, κ /MAb1/Biolegend/502802
TNF-β	小鼠 IgG2A /5807/RD/MAB621	小鼠 IgG1, κ /359-238-8/Biolegend/503002
IL-22	大鼠 IgG2a, kappaIL22JOP/Ebioscience/16-7222-85	小鼠 IgG1 /142928/RD/MAB7821
MIP-1b	小鼠 IgG1 kappa/A174E 18A7/Invitrogen/AHC6114	小鼠 IgG2B /24006/RD/MAB271
SCF	小鼠 IgG1 /J231/Peprotech/500-M44	小鼠 IgG1/13302/RD/MAB655
M-CSF	小鼠 IgG2b/AM09180PU-N/Acris/AM09180P U-N	小鼠 IgG2A/ 21113/RD/MAB616
EGF	小鼠 IgG1/AM09146PU-N/Acris/AM09146PU -N	小鼠 IgG1 /10827/RD/MAB636
HGF	小鼠 IgG1 /SBF5 C1.7/Novus/NB100-2696	小鼠 IgG1 /24516/RD/MAB694
NGF-β	小鼠 IgG1, κ /JKhNGF-1/biolegend/509602	小鼠 IgG1, κ /JKmNGF-1/Biolegend/509702
PDGF	兔 IgG/ polyclonal/Acris/PP1061P2	小鼠 IgG1 /108128/RD/MAB1739
VEGF	小鼠 IgG1/A183C/Invitrogen/ AHG0114	小鼠 IgG2B/26503/RD/MAB293
IL-2	小鼠 IgG2A /5355/RD/MAB602	山羊 IgG /RD duoset 检测抗体/DY202
MIP-1α	小鼠 IgG1/14D7 1G7/Invitrogen/AHC6034	山羊 IgG /RD duoset 检测抗体 /DY270
TGF-α	山羊 IgG /RD duoset 捕获抗体/DY239	山羊 IgG /RD duoset 检测抗体/ DY239
TGF-β	BD 559119	BD 559119
G-CSF	小鼠 IgG1/3316/RD/MAB214	山羊 IgG /多克隆/RD/BAF214
IFN-γ	小鼠 IgG1, κ /MD-1/Biolegend/507502	小鼠 IgG1, kappa/4S.B3/ebioscience/13-7319-85
GM-CSF	大鼠 IgG2a, κ /BVD2-23B6/Biolegend/502202	大鼠 IgG2a, κ /BVD2-21C11/Biolegend/502304
IL-9	Ebioscience Ready sets go	Ebioscience Ready sets go
IL-23	Ebioscience Ready sets go	Ebioscience Ready sets go
MMP-2	小鼠 IgG/RD duoset 捕获抗体/DY902	小鼠 IgG/RD duoset 检测抗体/DY902
MMP-9	小鼠 IgG1 /36020/RD/MAB936	山羊 IgG /多克隆/RD/BAF911
IL-27	Ebioscience Ready sets go	Ebioscience Ready sets go
IL-29	Ebioscience Ready sets go	Ebioscience Ready sets go
TSLP	Ebioscience Ready sets go	Ebioscience Ready sets go
BSA-488 偶联的	488 偶联的 BSA	
BSA-532 偶联的	532 偶联的 BSA	
BSA-635 偶联的	635 偶联的 BSA	

[0306] 进行了实验以确保在相同空间线上的抗体的交叉反应性均在阈值以下。在这些实

验中,使用仅包含EGF的溶液检验抗体阵列。如图31所示,使用所述的空间和光谱检测方案,EGF是检测到的唯一种类。据观察,对应于EGF的位置和颜色显著超出了用作背景的1000强度阈值。这确保了任何观察到的响应仅由感兴趣的特定细胞因子结合事件引起。该数据证明,基于光谱数据,在光谱测定中的三重空间编码是可行的,并且不会在分泌组细胞因子的定量方面产生显著误差。

[0307] 为校准,测定了每个感兴趣的化合物的滴定曲线(图32A-C),以正确地将检测到的信号强度与样品中的感兴趣化合物的浓度定量得关联。

[0308] 使用人巨噬细胞进行实验,所述人巨噬细胞是使用50ng/mL的PMA诱导分化U937细胞系48小时衍生出来的。实验比较了用无FBS的培养基饥饿的细胞与饲喂10%FBS的细胞。饥饿和非饥饿细胞要么是未刺激的,要么使用10 μ g/mL LPS(一种革兰氏阴性细菌中常见的致病分子)刺激。将本文所描述的空间/光谱实验检测到的响应与微ELISA进行比较。化合物结合的检测如本文其他地方所述,但重复所用的3波长。图33示出了488nm波长的原始数据,图34示出了532nm波长的原始数据,图35示出了635nm波长的原始数据。为了便于分析,对3波长检测进行了“扩展”,如图36,它显示了所有感兴趣的种类的检测(即,在488nm,532nm和635nm检测到的组合的种类的原始数据)。如图所示,数据被人工上色成单一颜色(在此情况下为红色),为了便于后续的分析。将使用空间/光谱检测的单细胞分析与基于群体的微ELISA测定进行比较,数据示于图37。

[0309] 比较从空间/光谱实验获得的平均单细胞数据和基于群体的微ELISA数据,揭示了这些分析的重要差异(图38)。在某些情况下,在预测“表型”或“分泌组”上,有大于10倍的差异。例如,与平均单细胞数据相比,根据整个群体数据,IL12和IL10的分泌预期要高得多(~10倍)。这表明微ELISA评价单细胞响应不准确。这些大的差异可能是由于具有显著多功能性的亚群不能在群体水平示出,或基于群体的感知差异(如,细胞-细胞间通信),或基于分析的时间戳的不同的细胞因子分泌模式。

[0310] 使用对于大多数细胞因子来说具有高度一致性的微ELISA技术验证饥饿和非饥饿的差异。具体是,IL-8、MIP-1 β 、MCP-1、IL-1RA、GM-CSF、G-CSF、MIP-1 α 、IL-1 β 、IFN- γ :相关性良好(统计学显著);MIF、MMP-9、TSLP、Rantes:在平均单细胞中显示显著群体减少;IL-6、IL-10、TNF- α :由于上面所讨论的可能的差异,相关性不好。

[0311] 图39示出了实验结果,所述实验使用45重单细胞实验比较未刺激与LPS(100ng/mL)刺激的细胞的单细胞分泌。数据如平均信号的直方图(上),热图(中间)和2-d条形图(下部)所示。

[0312] 也使用细胞内细胞因子染色(ICS)验证了单细胞多重实验阵列(SCMA)(图40和图41)。可以看出,由ICS检测的“分泌”相比于本文所描述的单细胞分泌实验,是增加的。不希望受任何特定理论的束缚,ICS中的这些增加,可能是由于这样的事实,即该检测是预测的而不是实际分泌的蛋白。

[0313] 图42示出了描述细胞(未刺激相对LPS刺激)多功能性的一类数据输出。如图所示,图表表明了每个单细胞检测到的细胞因子数目。

[0314] 实施例3:IsoPlexis:45-重单细胞分泌谱平台测定功能性细胞异质性

[0315] ELISpot(包括其变化形式FLUOROSpot)是唯一一种广泛用于检测来自单细胞的免疫效应蛋白的真实分泌的技术,并因此是临床前和临床中评价细胞免疫的主要工具。然而,

它仅检测一种或两种蛋白,并提供极少的生物信息。因此它不能揭示免疫细胞的质量和保护能力,因为它不能捕获功能多样性的全貌或鉴定最有效的多功能群体。人们高度期望一种可以测量来自单个细胞的多种蛋白的技术,这种技术将有助于解决许多重要的生物学和医学问题,从免疫多样性,瘤内异质性,多功能性,到细胞-细胞通信网络。该技术需要满足以下所有要求。(i) 单细胞敏感性:蛋白能够从单细胞中分离并敏感地检测到。(ii) 高多重性:能够同时检测多个(35或更多)的蛋白。(iii) 高内容量:可以平行分析上千个单细胞。本文描述了一项新技术,其在基于亚纳升室的单细胞蛋白分泌物实验中结合了空间多重和光谱多重。它可以同时定量45种分泌蛋白,相比而言现有的ELISpot实验仅有1-2种蛋白,本发明的技术在单细胞蛋白质组实验中具有有记录的最高的多重能力。应用该平台研究了人巨噬细胞对致病配体LPS、多聚-IC和PAM3(分别激活三个toll-样受体(TLRs))的响应。单细胞、高重蛋白谱揭示了大的出乎意料的细胞-至-细胞的变异性以及三-级响应,其进一步地通过使用viSNE的压缩聚类分析进行了确认。

[0316] viSNE是最近发展起来的一种分析技术基于t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding(t-SNE)算法,是一个有力的工具,能够形象化、聚类高维单细胞数据并发现细胞间的表型异质性(Amir等,2013,Nature Biotechnology,31:545-552,通过参考整体纳入本文)。鉴定了三个功能性的细胞子集,并且响应与原始状态强烈相关。第一群体减少或恢复到惰性状态。第二群体在它们的效应子功能方面基本保持不变。第三群体与升高的细胞因子的产生强烈相关,并表现为高度多功能性。这种三级响应在巨噬细胞系和单核细胞衍生的原代巨噬细胞中均是如此(preval),并且似乎是一个固有的非遗传异质性,这种异质性决定了对致病配体的细胞免疫应答的质量(多功能)和程度(分数)。本文中所呈现的研究表明了单细胞、高重蛋白谱在揭示深层功能表型和对干扰(perturbagens)的异质性反应上的能力,这些无法通过现有技术检测。该平台在临床前和临床研究中具有很大的潜力,用来评估细胞的异质性,例如,在免疫系统中或肿瘤微环境中。

[0317] 在这些实验中使用的材料和方法描述如下。

[0318] 制造抗体特征

[0319] 用于PDMS复制的模具是一硅母模,使用深反应离子蚀刻(DRIE)方法蚀刻。使用三甲基氯硅烷(Aldrich)蒸汽预处理过夜来促进PDMS的释放。PDMS预聚物和固化剂(RTV615, Momentive)充分混合(组分A和B比例为10:1)后倾泻到硅母模上。真空干燥1h去除气泡,在烘箱中80℃固化PDMS 2hrs。固化后,从母模上剥脱PDMS层并在入口和出口小孔上穿孔。将该装置置于乙醇和2-异丙醇中超声处理进行清洗,然后与多聚-L-赖氨酸微阵列片(Erie Scientific)键合(bonding)。然后该装配物在烘箱中80℃烘烤2hrs以加强键合。用于抗体流动构图的该PDMS微芯片包含20个分离的微通道,能够分别构图多达20个不同的抗体。在PDMS流动构图芯片上,一组特征的典型的宽度和间距分别为25μm、50μm。

[0320] 为了抗体特征的流动构图,2μL的不同抗体混合物(表3和图30)被分别地注射到微通道中,并通过微流通道流动直到干掉。实验中用到的所有的抗体概括在表3中。抗体被固定在多聚-L-赖氨酸玻璃片上以形成抗体构图特征。在流动构图后,释放PDMS层并用3%BSA(Sigma)封闭玻璃片,储存在4℃冰箱中,待用。

[0321] 制备微室阵列芯片

[0322] 微室阵列的模具为硅母模,使用DRIE方法蚀刻。同样使用三甲基氯硅烷(Aldrich)

蒸汽预处理过夜以促进PDMS的释放。用于单细胞捕获的微流室阵列芯片以PDMS (RTV615, Momentive, 组分A和B比例为10:1) 使用软光刻技术制备。真空干燥1h去除气泡, 在烘箱中80℃固化PDMS 2hrs。

[0323] 抗体偶联

[0324] 使用供应商提供的方法, 将488nm群和532nm群检测抗体分别共价偶联于Alexa荧光488和Alexa荧光532染料。使用生物素标记635nm群检测抗体, 其能够通过链霉亲和素/抗生物素蛋白与生物素的结合而用荧光APC或Cy5偶联的链霉亲和素或抗生物素蛋白读出。

[0325] 细胞培养和刺激

[0326] 人U937细胞系购自ATCC (美国典型培养物保藏中心, TACC), 在RPMI1640培养基 (Gibco, Invitrogen) 中培养, 补加10%的胎牛血清 (FBS, ATCC)。使用50ng/mL的12-肉豆蔻酸-13-乙酸佛波酯 (Fisher) 分化U937细胞48h。然后更换培养基并替换为正常培养基培养36h。使用胰蛋白酶收获细胞用于单细胞实验。使用100ng/mL的脂多糖 (Calbiochem) 刺激细胞, 来激活Toll样受体4 (TLR4) 信号转导 (或者其它激活试剂, 如PAM3、多聚IC), 然后马上将悬液吸取到PDMS微孔阵列上。

[0327] 细胞内细胞因子染色

[0328] 收获对照和处理的细胞并以 10^6 的密度接种到组织培养的培养皿中。2小时后, 加入分泌抑制剂布雷菲德菌素A (Brefeldin A, Biolegend)。细胞孵育22h, 然后收获用于细胞内流式细胞检测。根据制造商的说明书, 固定和染色细胞。

[0329] 使用PDMS微孔阵列捕获单细胞

[0330] 在执行单细胞捕获实验前, PDMS微孔阵列和包含抗体的玻璃片分别使用3%BSA溶液 (Sigma) 封闭2hrs, 然后用新鲜细胞培养基冲洗。在即将细胞捕获前, 将细胞悬浮在新鲜培养基中。将PDMS微孔阵列面朝上放置, 移除细胞培养基溶液直至一薄层保留在PDMS微孔阵列表面。将细胞悬液吸取 (50–200μL) 到微孔阵列上并静置10min以便细胞能够落入微孔中。抗体玻璃片置于PDMS微孔阵列上面, 抗体面对着细胞捕获室。然后用螺丝夹紧PDMS微孔阵列和玻璃片。单细胞因而被捕获在微孔阵列中, 孵育装配物以便细胞分泌蛋白。在孵育捕获的细胞24小时后, 松开螺丝以移开抗体玻璃片, 并进行ELISA免疫检测步骤, 使用Genepix扫描仪和软件检测并分析结果。

[0331] 群体微阵列

[0332] 在定制印刷的抗体微阵列上进行细胞群体分析, 所述抗体微阵列是使用Spotbot 3微阵列点样仪 (Arrayit) 在多聚-L-赖氨酸玻璃片上点样。具有相同抗体图案的十二个同样的亚组被印刷在每个玻璃片上。印刷后, 抗体玻璃片在湿润箱体中 (含有饱和NaCl溶液, 75%相对湿度) 存放5小时。在细胞群体分析前, 将玻璃片和PDMS微孔板键合, 并用3%BSA溶液封闭2小时。然后将细胞培养上清添加到不同微孔中并孵育1小时。孵育后, 执行ELISA免疫检测步骤, 使用Genepix扫描仪和软件检测并分析结果。

[0333] 免疫检测程序

[0334] 随后的ELISA步骤, 将单细胞分泌的细胞因子翻译为可检测信号。将生物素化的检测抗体 (表3) 混合物吸取到玻璃片上, 并在室温下孵育1小时以完成夹心免疫检测, 随后使用3%BSA溶液清洗。将APC染料标记的链霉亲和素 (eBioscience, 200μL, 5μg/mL) 添加到玻璃片上并继续孵育30min。随后, 使用3%BSA再次清洗玻璃片, 并用3%BSA封闭0.5hr。BSA封

闭后,将玻璃片依次浸泡在DPBS、DPBS、去离子水、去离子水中,并最终吹干。

[0335] 荧光检测和分析

[0336] 使用Genepix 4200A扫描仪 (Molecular Devices) 获得扫描的荧光图像,以FITC和APC通道。使用三颜色通道488 (蓝)、532 (绿) 和635 (红) 收集荧光信号。使用GenePix Pro软件 (Molecular Devices) 分析图像,通过加载并校准微孔阵列模板随后提取荧光信号强度。使用GenePix Pro中的图像分析工具提取荧光结果。然后将荧光结果匹配到亚纳升微室阵列芯片的每个腔室,通过光学成像分析。

[0337] 自动化光学图像分析和细胞计数

[0338] 在具有自动化显微镜载片台的Nikon Eclipse Ti显微镜上对装配物成像,来获得光学图像 (暗视野和斜视野 (oblique view)), 记录每个微孔中细胞的数目和位置。暗视野图像将被用来鉴定每个微室的位置和顺序,斜视野图像将被用来鉴定细胞数目和它们的位置。两种图像均使用Nikon软件 (NIS-Elements Ar Microscope Imaging Software) 处理,通过在每个图像上定义阈值来实现自动化细胞计数。然后将细胞计数与它们各自细胞腔室中提取的荧光数据相匹配。

[0339] 数据和统计学分析

[0340] 所有的荧光扫描过的阵列,使用Genepix软件处理,以对各组中的所有特征提取平均荧光信号。自主开发了Matlab (MathWorks) 编码以自动化的提取荧光数据并生成散布图。使用Excel (Microsoft) 和OriginPro 8 (OriginLab) 编辑提取的数据。使用Cluster/Treeview (Eisen Laboratory) 软件将所提取的数据生成热图和无监督聚类。在R (R Development Core Team) 中进行统计分析。

[0341] 实验结果现描述如下。

[0342] 使用45-重单细胞蛋白分泌谱平台进行了实验,描述如下 (图43)。将细胞悬液吸取到PDMS微孔阵列芯片的表面,该过程中细胞在重力作用下落入微室。然后将该流动构图的45-重抗体固定的玻璃片面朝下置于微室的上方,来确保抗体特征与微室垂直。在该过程中,零至几十个细胞被捕获于微室中。捕获的细胞数目符合泊松分布。最后,使用6个螺丝用两个透明塑料板将该装配物夹紧在一起。使用一个机械化的相差显微镜对装配物成像,来记录每个微室中的细胞数目和位置。然后将其置于组织培养箱中24小时,以便细胞分泌蛋白。再此期间个体细胞分泌的蛋白,被抗体捕获、然后通过与相关检测抗体反应转换为可检测信号并最终被荧光扫描仪读出。将荧光信号进行量化,对应于每个单细胞,并分析以通过热图、散点图或VISNE呈现结果。

[0343] 考虑了488和532通道之间的串扰或光谱重叠。由于Alexa 488和532荧光染料之间的光谱重叠,在该玻璃片上将获取488通道 (实际信号) 和532通道 (串扰) 两者的荧光信号。488通道信号和532通道信号之间显示出了彼此之间良好和稳定的相关性 ($R^2 \approx 98\%$) 并能够提取补偿方程 (图47A)。当观察532通道实际信号和488通道串扰时,获得了类似的结果 (图47B)。

[0344] 通过检测巨噬细胞标记物CD11b (FL4) 和Cd14 (FL2) 的表达,来评估PMA诱导的U937单核细胞分化 (图48)。

[0345] 通过实验检测来自不同的基板 (包括96孔板,分别为5:1、10:1、20:1比例的PDMS) 的U937单核细胞衍生的巨噬细胞群细胞蛋白分泌。结果在不同的基板中表现出了相似的倍

数变化,无论是高水平分泌蛋白如IL-8、MCP-1、IL-6还是低水平分泌蛋白如IL-1 α 、IL-3、IL-4(图49)。

[0346] 分泌物的热图可被可视化为由包含于腔室的细胞数目组织的(图50)。0细胞室的信号可被用作阳性分泌的阈值(平均信号加上2倍标准偏差)。对数据进行分析,以检验分泌物和细胞数之间的相关性(图52)。还进行了比较两个不同芯片的单细胞分泌结果的实验(图51),表明了这些芯片产生了非常相似的结果。

[0347] 使用该装置分析U937巨噬细胞蛋白的分泌。在图55中表明了跨越48小时的蛋白分泌动力学,显示出了不同蛋白具有不同的分泌物动力学。图44表明了使用不同方法刺激或未刺激(对照)的U937巨噬细胞的蛋白分泌。例如,图44A描述了U937衍生的巨噬细胞单细胞蛋白分泌结果与它的群体细胞分泌结果的比较。通常来讲,这两个结果表现了彼此之间良好的相关性。有趣的是,也观察到了几处不同。例如,在群体结果中,在对照和刺激细胞之间观察到的IL-8强度非常相似。然而,在使用所描述的单细胞阵列观察到的单细胞结果中,表明LPS刺激的细胞相比于对照细胞实际上具有高得多的分泌频率。这也通过了细胞内细胞因子染色的确认(图44B)。在图44B描述了获自单细胞分泌平台和ICS(细胞内细胞因子染色)的蛋白分泌频率对比。

[0348] 通过SCMA和ICS(图44C)均观察到了由IL-8和MCP-1蛋白分泌结果定义的相似的细胞亚群定义。使用单细胞分泌平台来检测细胞的多功能性。基于其蛋白分泌结果的U937巨噬细胞单细胞多功能性分析,表明观察到了多种多样的单细胞多功能性,并且U937衍生的巨噬细胞在通过LPS刺激而激活TLR-4后展现了更多的多功能性(图44D)。

[0349] 在图53中进一步证明了细胞的多功能性,其表明了多种多样的单细胞多功能性和在LPS刺激后增加的多功能性。该结果经三个独立实验验证。

[0350] 在图45中,展示了在TLR4配体LPS刺激后,巨噬细胞应答的单细胞分泌分析的结果。热图显示了未处理和LPS刺激的U937单核细胞衍生的巨噬细胞蛋白分泌谱的对比(图45A)。用VISNE来可视化单细胞分泌结果(图45B)。VISNE将高维的单细胞数据转换成两维的,但仍保留了原始数据的高维结构。它将个体细胞可视化类似为散点图,其中高维中的所有成对距离被用于散点图中各细胞位置的定位。X和Y轴为任意数(arbitrary number),表明了2D位置。从该分析中可以得知,未处理的和LPS刺激的U937单细胞能够在它们的蛋白分泌基础上归类到3个亚群(与传统的聚类分析一致(图54))。这在图45C中得到了进一步的证明,VISNE得到的个体蛋白(MIF, IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1a, MIP-1b)分泌结果。它清晰地证明了,不同的蛋白表征了不同的细胞亚群。例如,一些蛋白,像IL-8、MIP-1b对LPS刺激是敏感的,而其它一些,像MIF,不敏感。

[0351] 分析用LPS刺激之前和之后的个体细胞表明了每个个体细胞是如何可能具有特定的分泌谱的。例如,图56中包括了一系列散点,表明了个体细胞是如何响应LPS刺激的。该数据表明了,在研究群体的不同单细胞之间,当细胞间一些蛋白的分泌相似时,另一些蛋白的分泌可能具有很大的不同。

[0352] 实验检测了巨噬细胞对不同TLR配体(LPS、PAM3、或多聚IC)刺激的响应。图46A描述的热图显示了未处理的和处理的(LPS、PAM3、多聚poly IC)U937单核细胞衍生的巨噬细胞的蛋白分泌谱。进而,在各条件下分析了每个给出的蛋白的细胞分泌频率(图46B)。通过VISNE可视化单细胞结果,可以观察到无论是未处理的还是刺激的单细胞都能够基于它们

的分泌而归类到3个亚群中(图46C)。当用VISNE观察个体蛋白(MIF、IL-8、MCP-1、和MIP-1b)的分泌时,进一步证明了该结论。

[0353] 本文描述的系统提供了对单细胞水平上的细胞分泌的有效测定,其能够鉴别细胞群中重要的单细胞差异。本系统的优点列于图57中。对比本文描述的单细胞分泌实验和ICS,两者具有数个不同。首先,注意到蛋白表达不等同于蛋白分泌是非常重要的。本单细胞实验检测了一个细胞分泌的蛋白数量,而ICS检测细胞内封闭的蛋白。另外,在ICS中,使用的高尔基封闭剂可能会改变细胞功能,并且对细胞是有毒的。相反的,本单细胞实验使用物理障碍来阻挡信号,其是无毒的。另外,本单细胞实验使用夹心免疫模式,其与ICS相比具有更强的特异性,因为蛋白的两个不同的表位必须被识别出来以提供夹心技术中的信号。因此,在这两个系统中,对阳性细胞的检测阈值可具有很大的不同。

[0354] 在此引用的每个和所有的专利、专利申请和出版物的公开内容在此通过全文引用整体并入本文。本发明虽然已经公开了相关具体实施方式,显而易见的是,本发明的其他实施方式和变型可以由本领域技术人员在不脱离本发明的真实精神和范围的情况下而设计出来。所附权利要求意在被解释为包括所有这样的实施方式和等同变化。

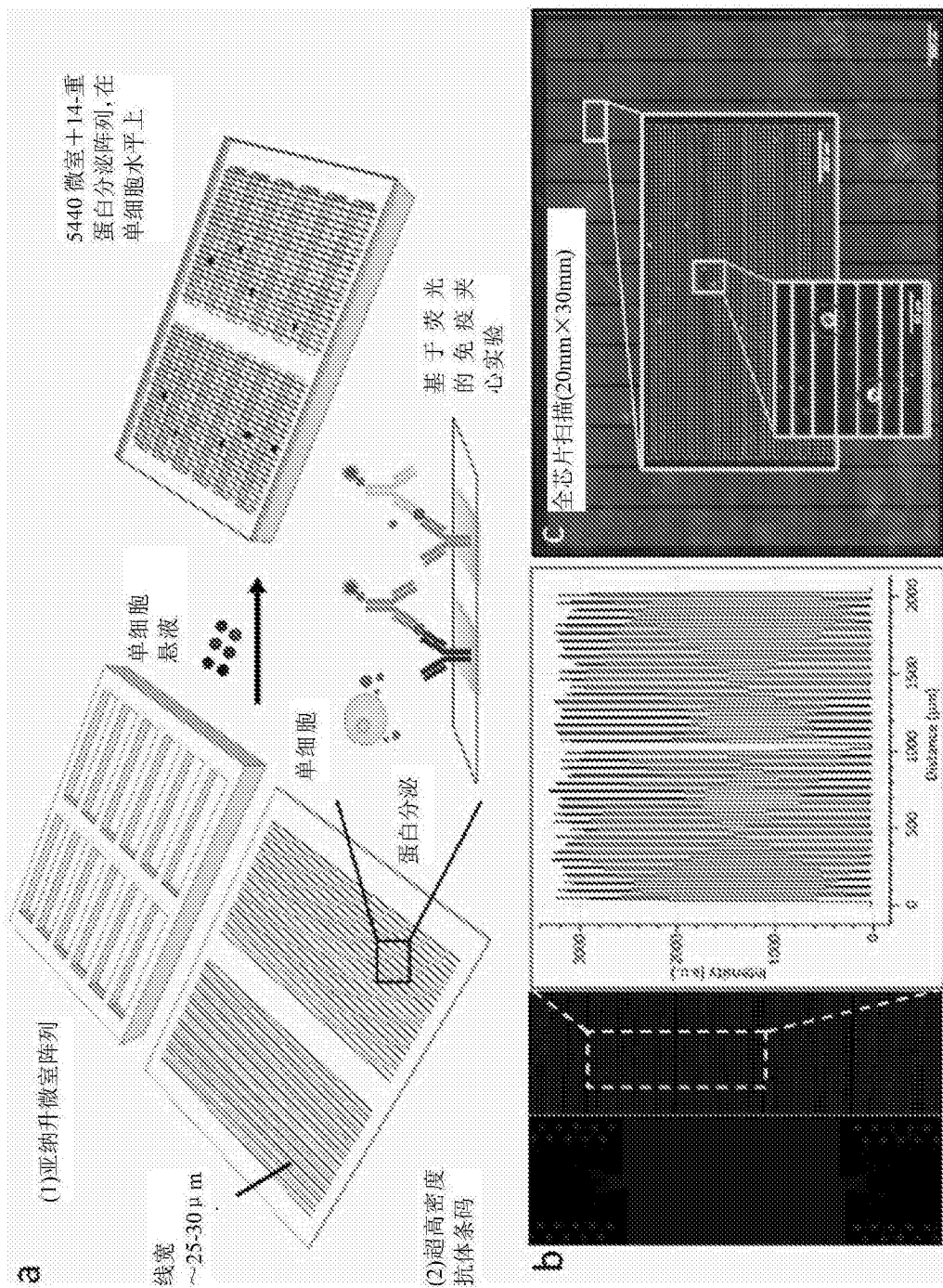


图1

a

蛋白	功能	蛋白	功能
EGF	细胞生长、增殖、分化	IL-10	抑制炎症细胞因子合成
FGF	血管生成	IL-12	刺激 NK 和 T 细胞的生长和功能
GM-CSF	粒细胞和单核细胞产生	IL-13	天然杀伤细胞的增殖
HGF	有丝分裂，细胞迁移，基质侵袭	MCP-1	招募单核细胞，记忆 T 细胞，和树突细胞
IFN-γ	巨噬细胞活化	MIF	巨噬细胞功能
IL-1b	细胞增殖，分化，凋亡	PDGF	细胞增殖，细胞迁移，血管生成
IL-2	T 细胞的生长和功能	RANTES	趋化性
IL-4	刺激 B 细胞和 T 细胞的生长和增殖	TGF-α	上皮发展，神经细胞增殖
L-5	B 细胞生长，免疫球蛋白分泌	TNF-α	急性期反应
IL-6	急性期反应	TNF-b	急性期反应
IL-8	趋化性	VEGF	血管发生 (Vasculogenesis)，血管生成 (angiogenesis)

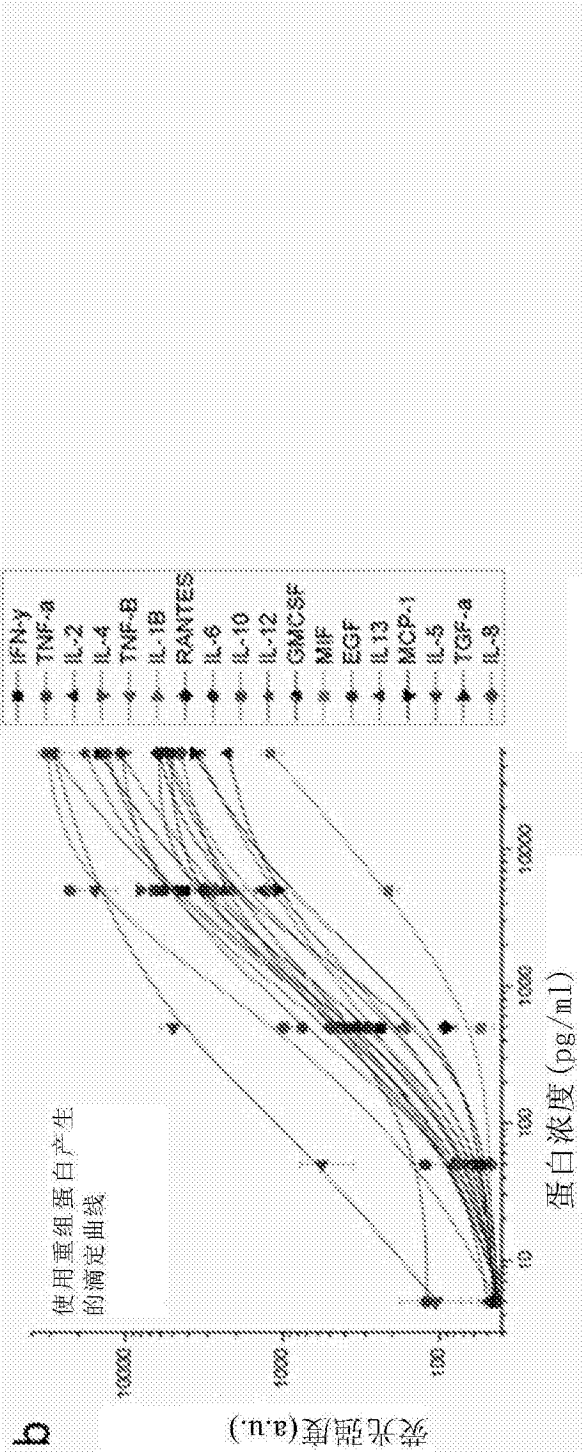


图2

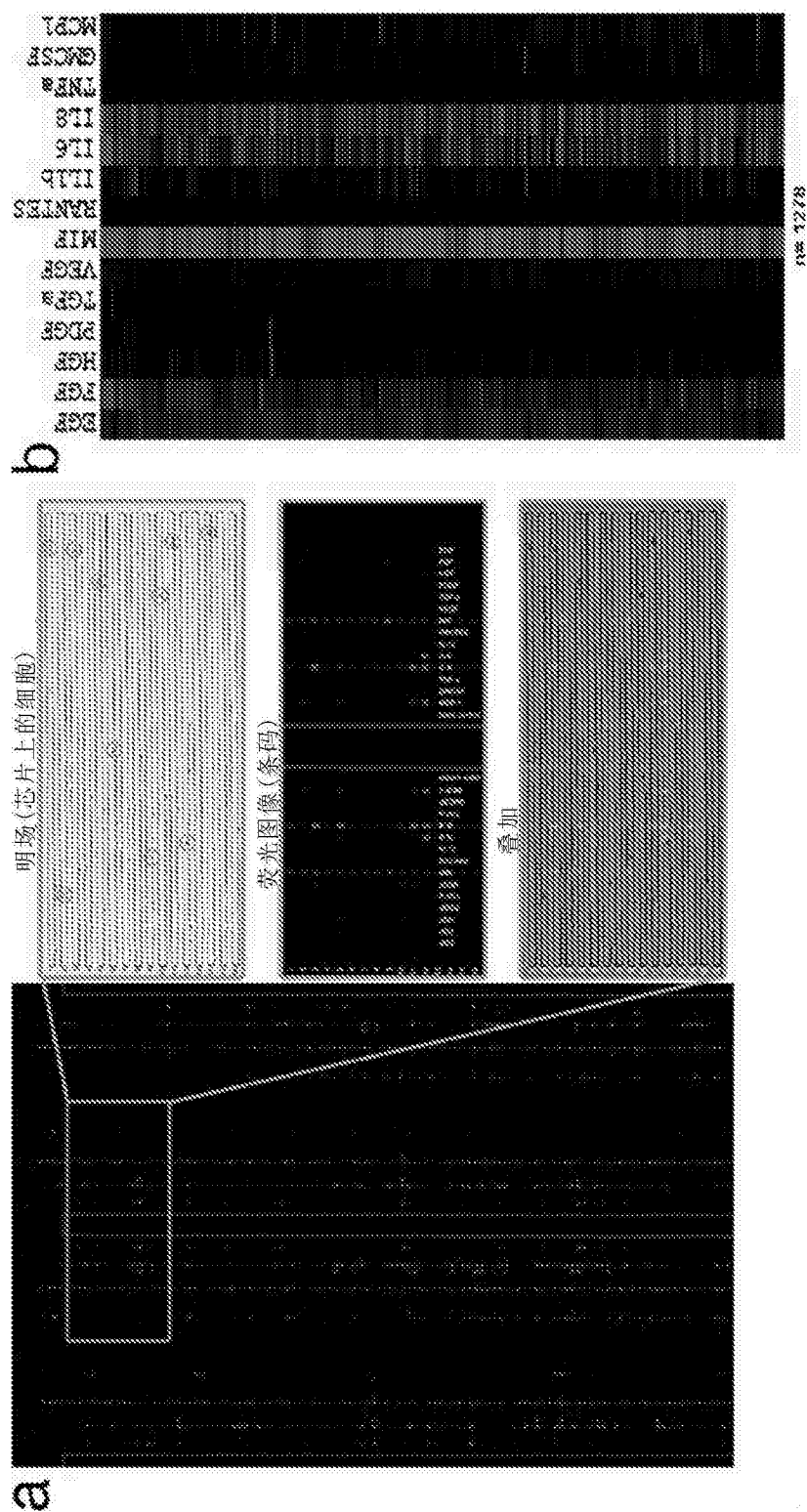


图3A-3B

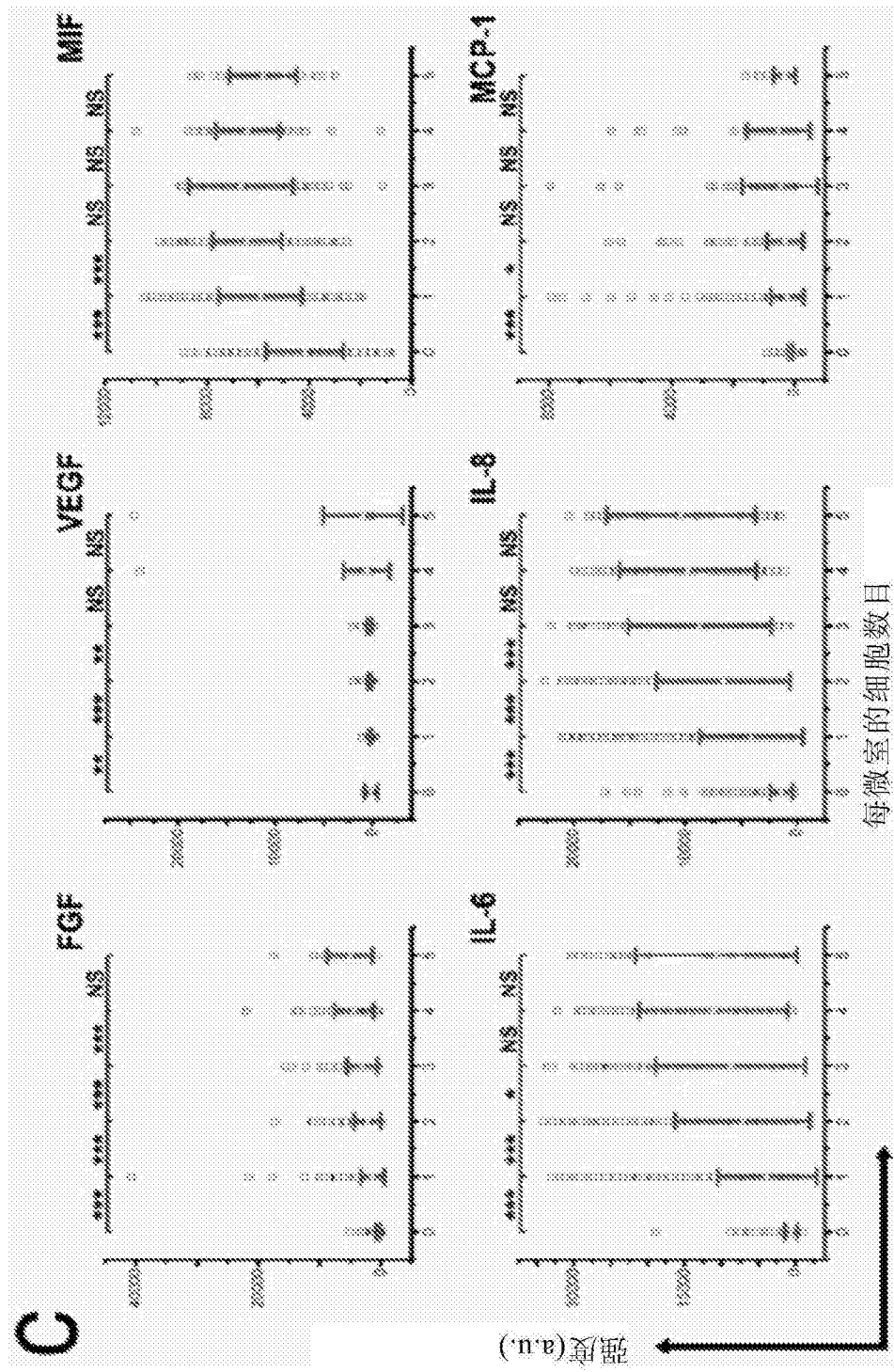


图3C

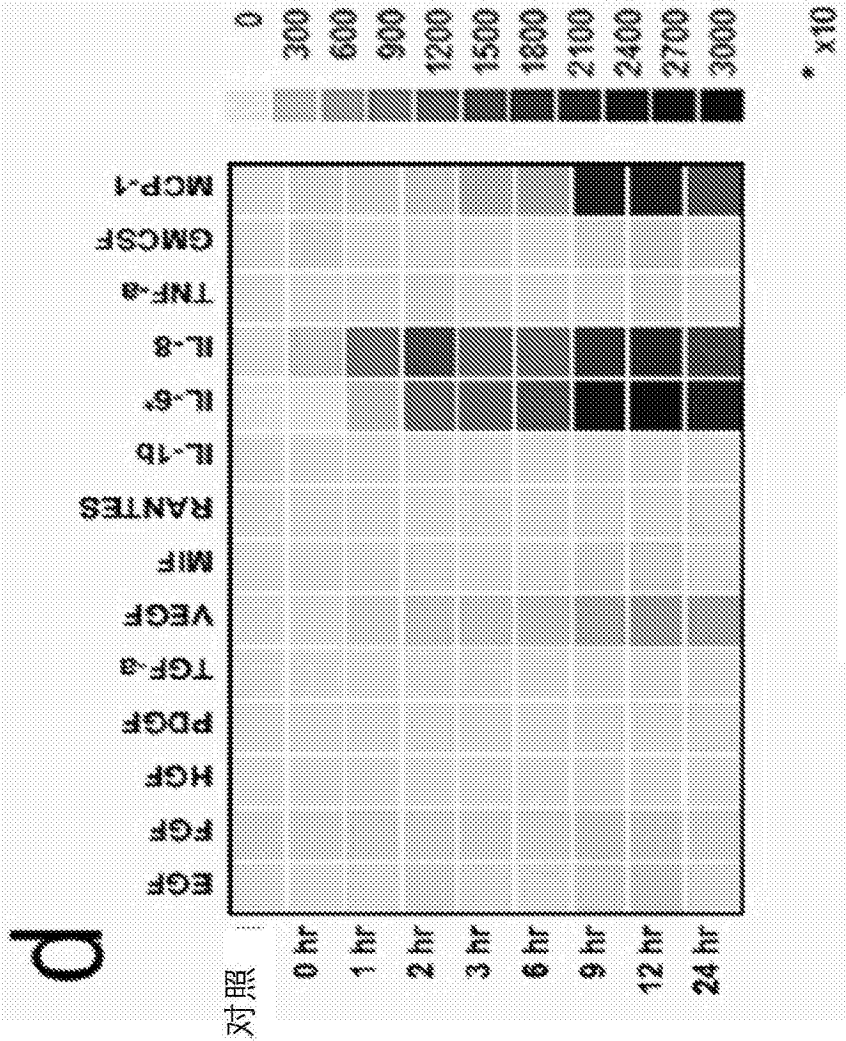


图3D

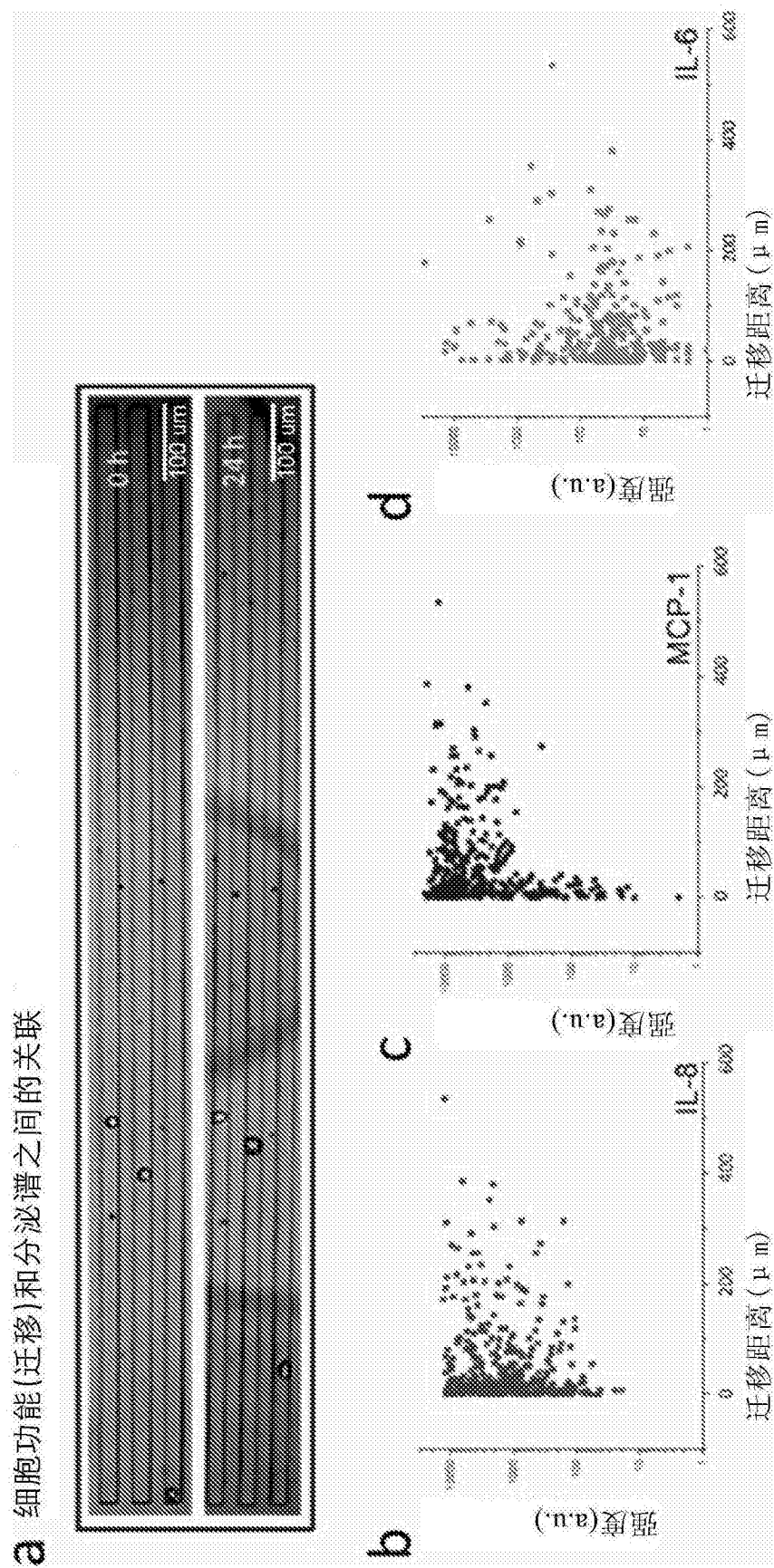


图4

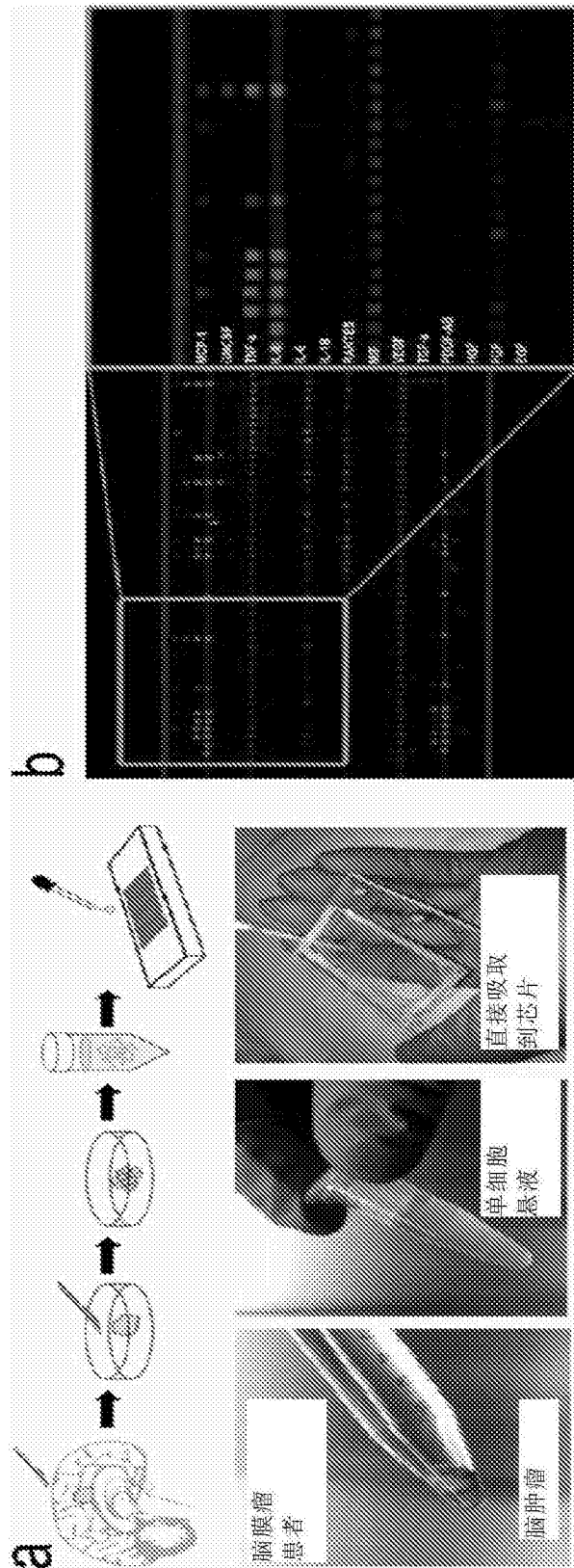


图5A-5B

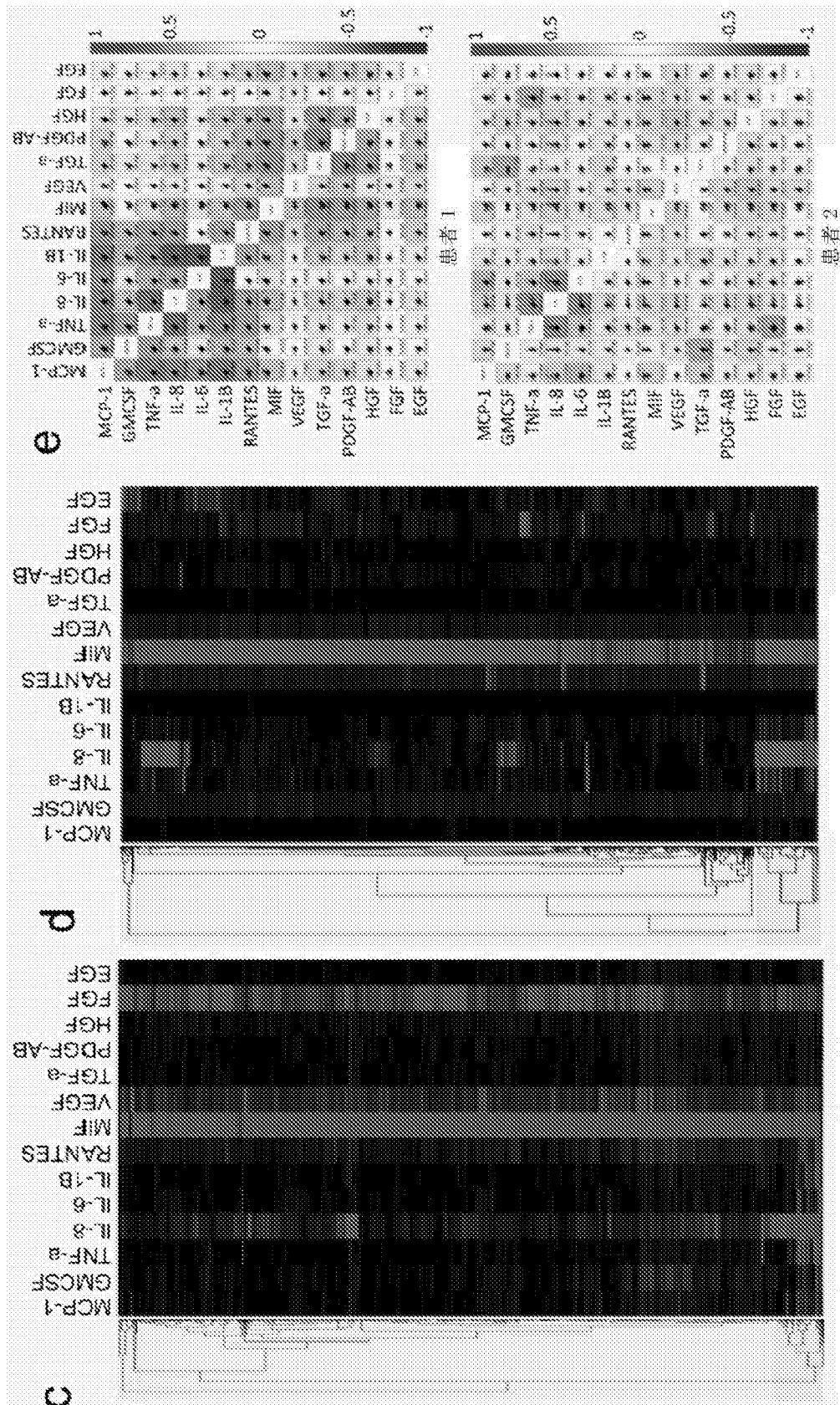


图5C-5E

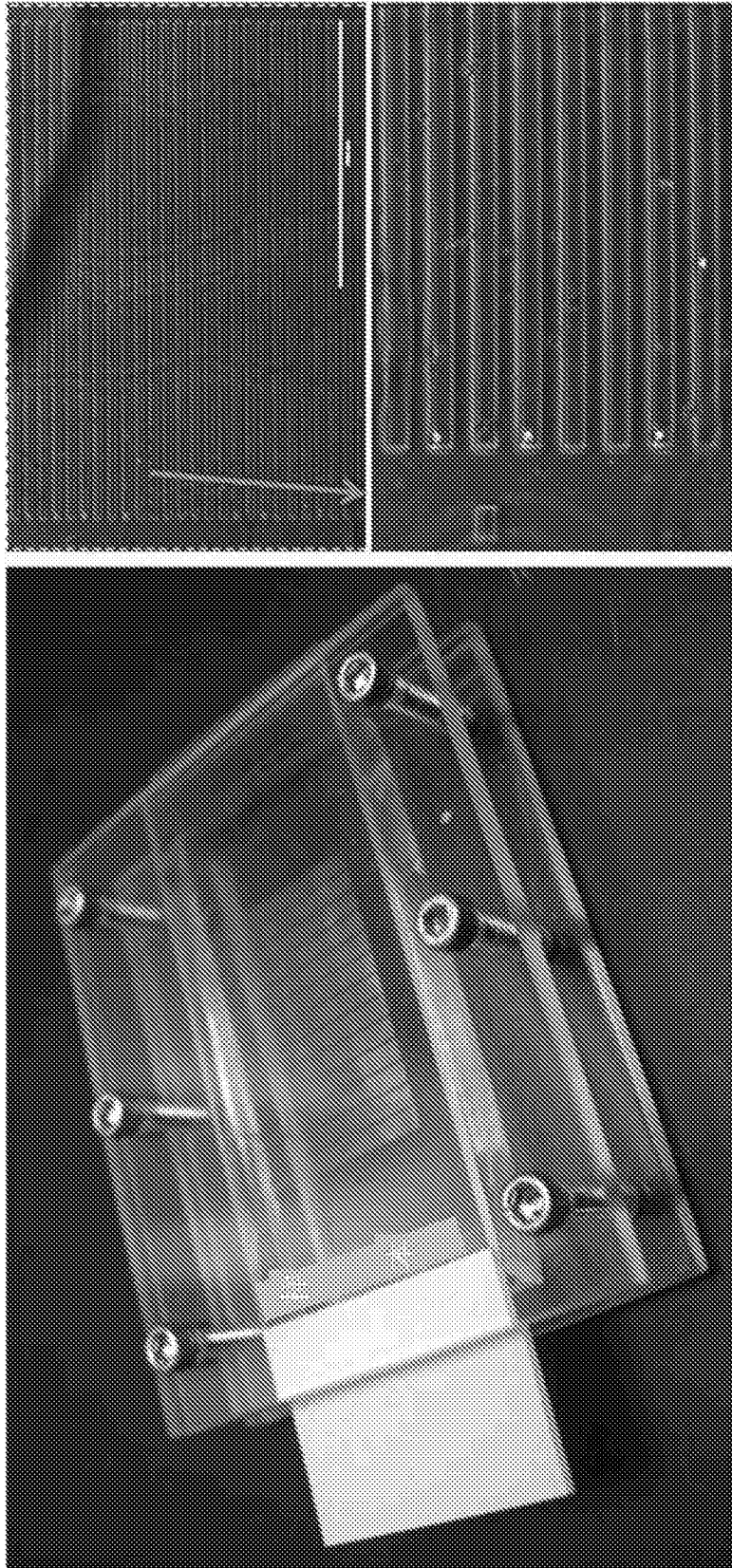


图6

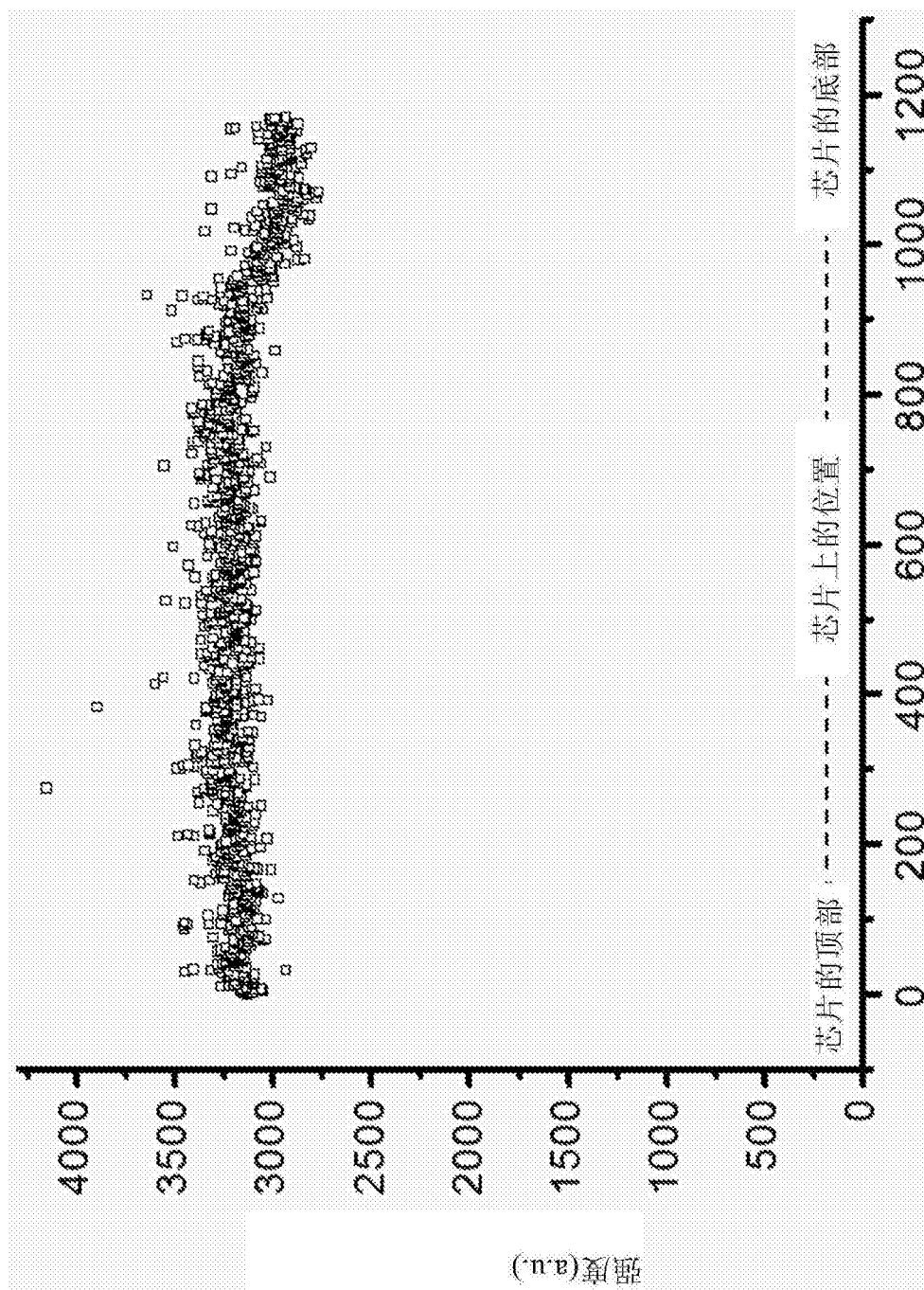


图7

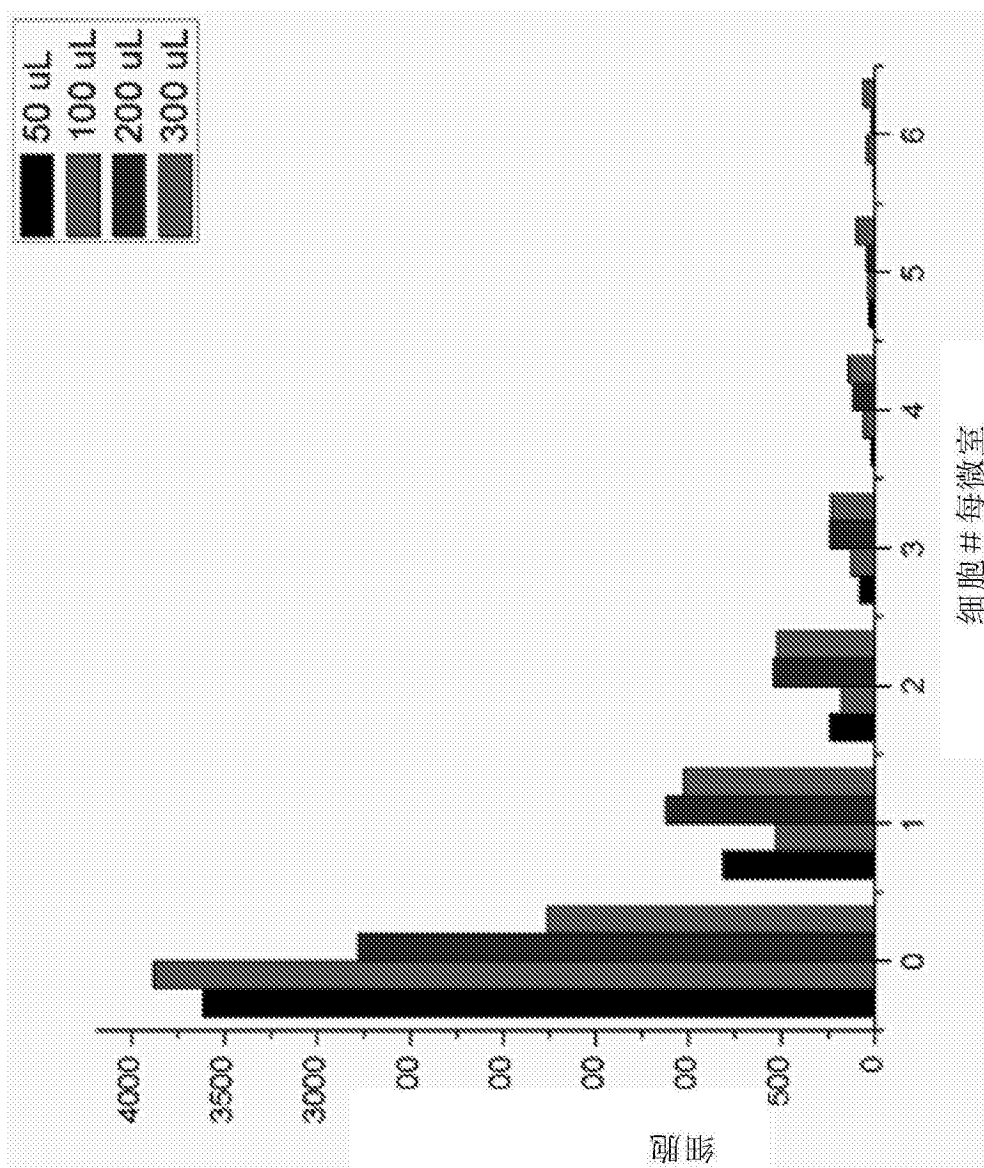


图8

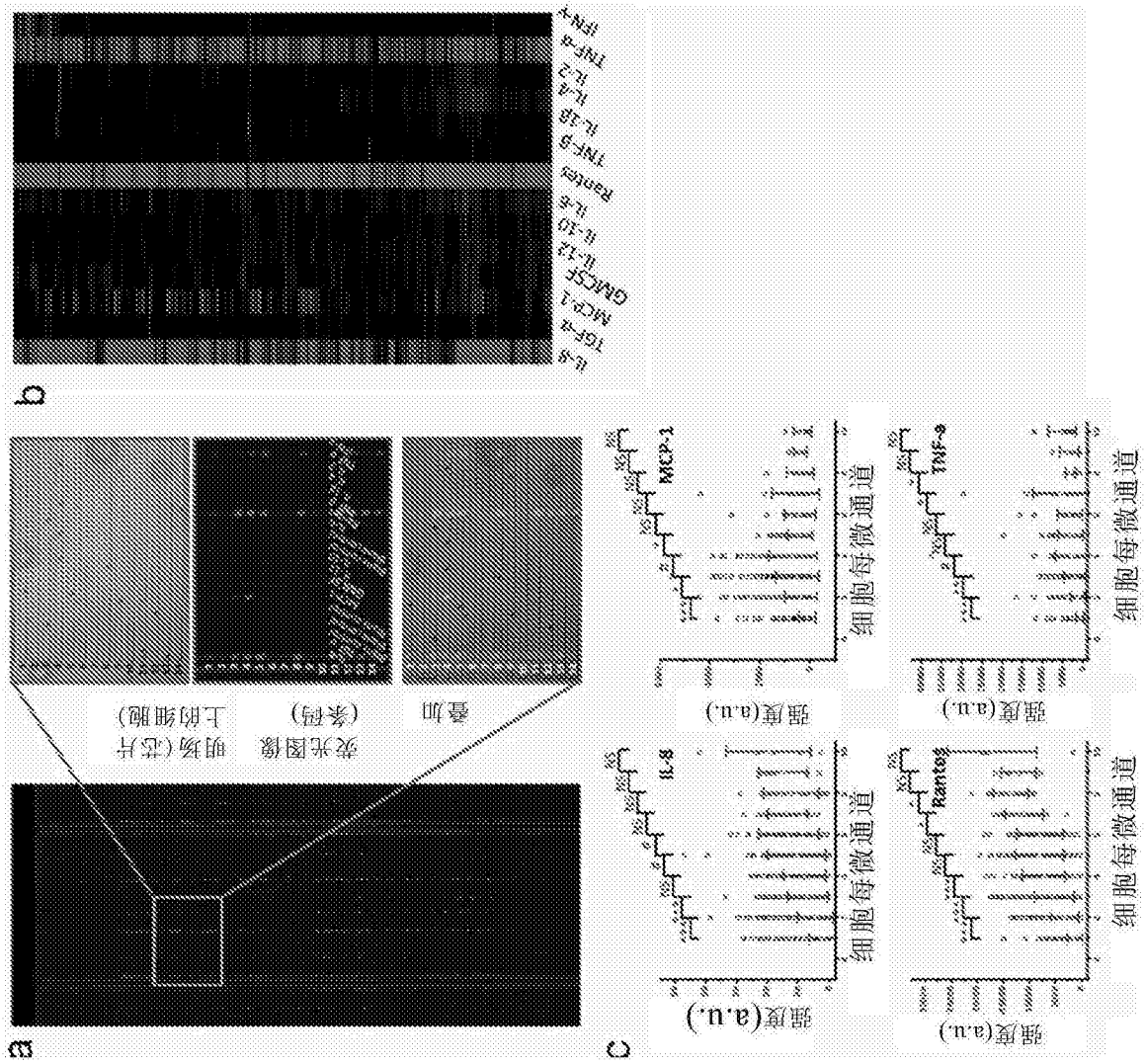


图9

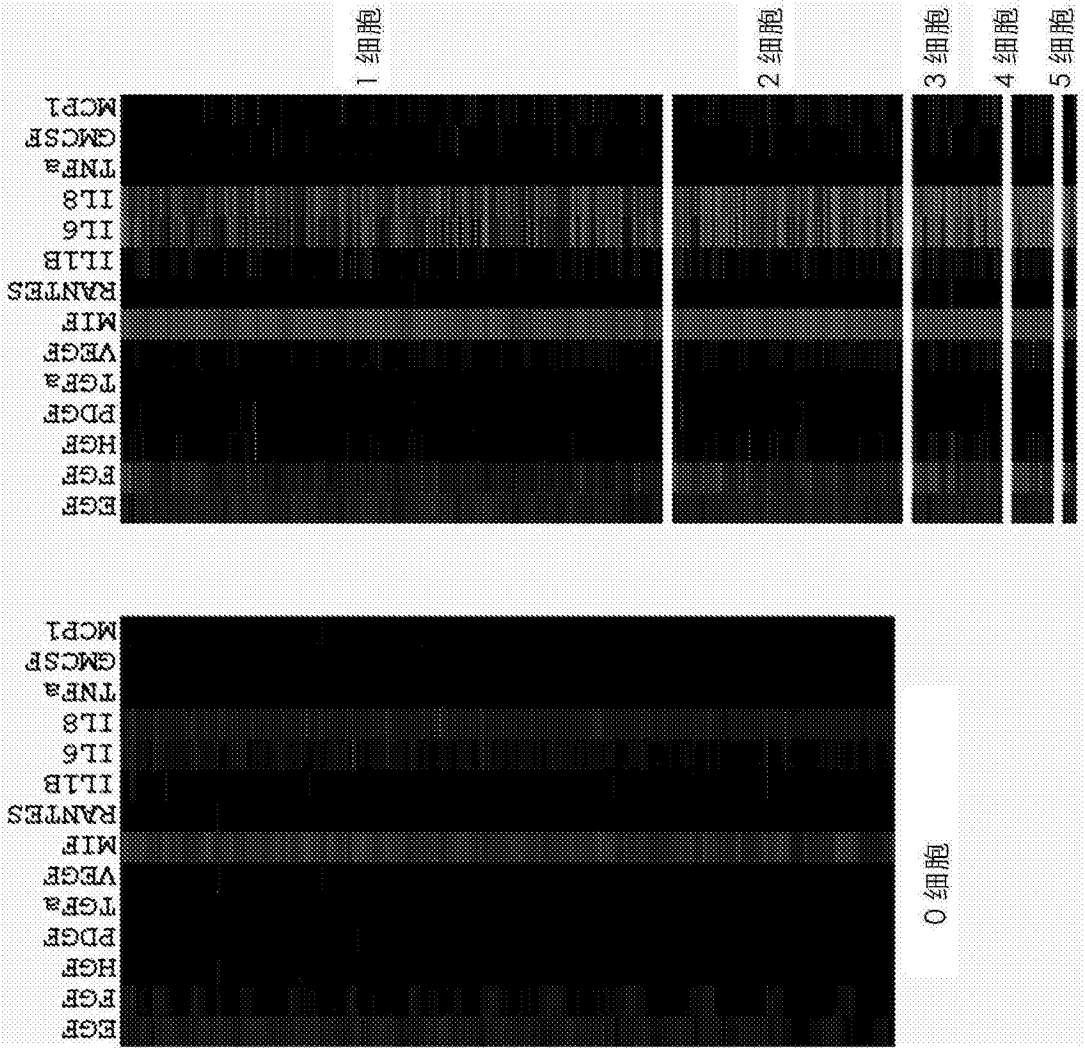


图10

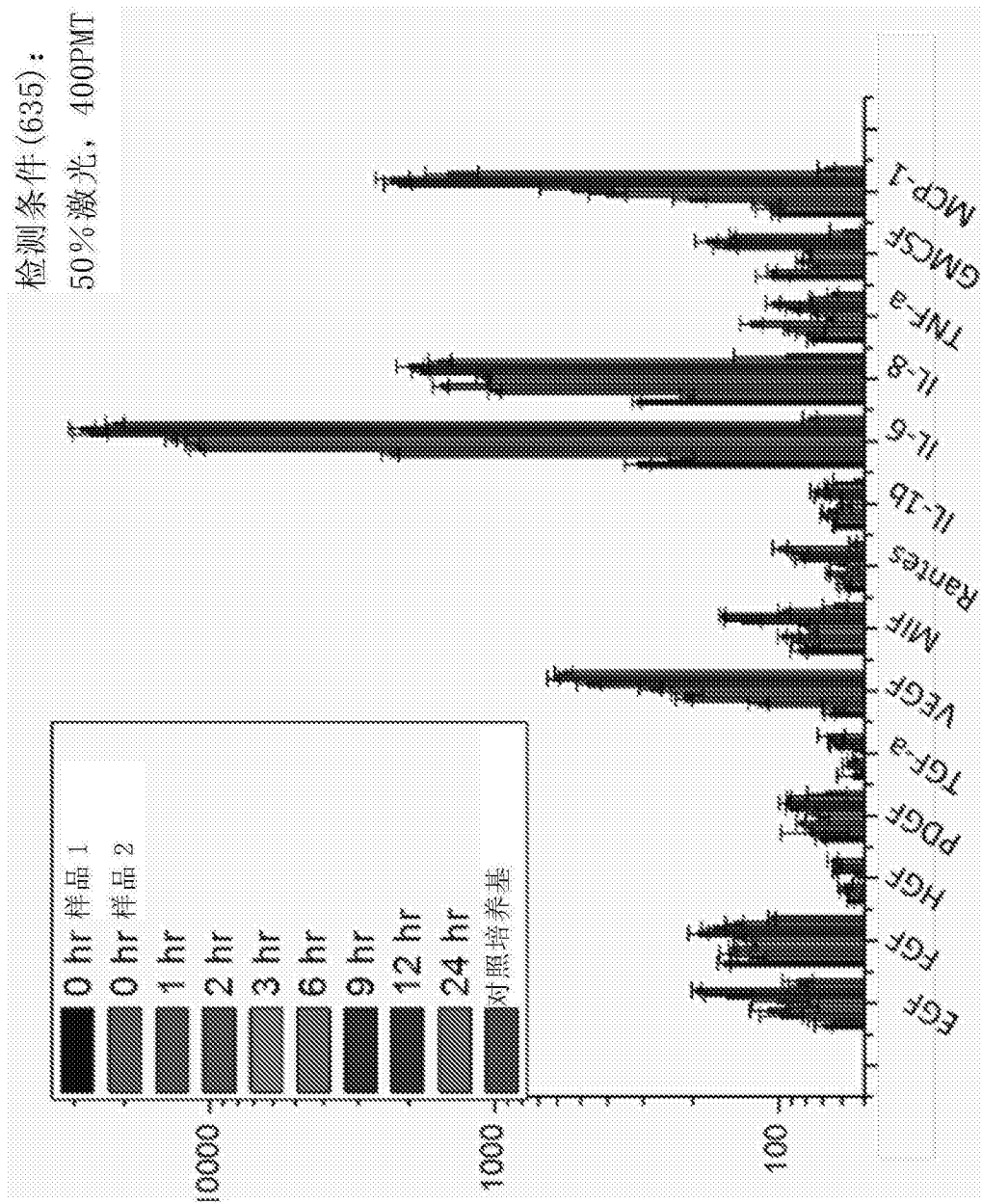


图11

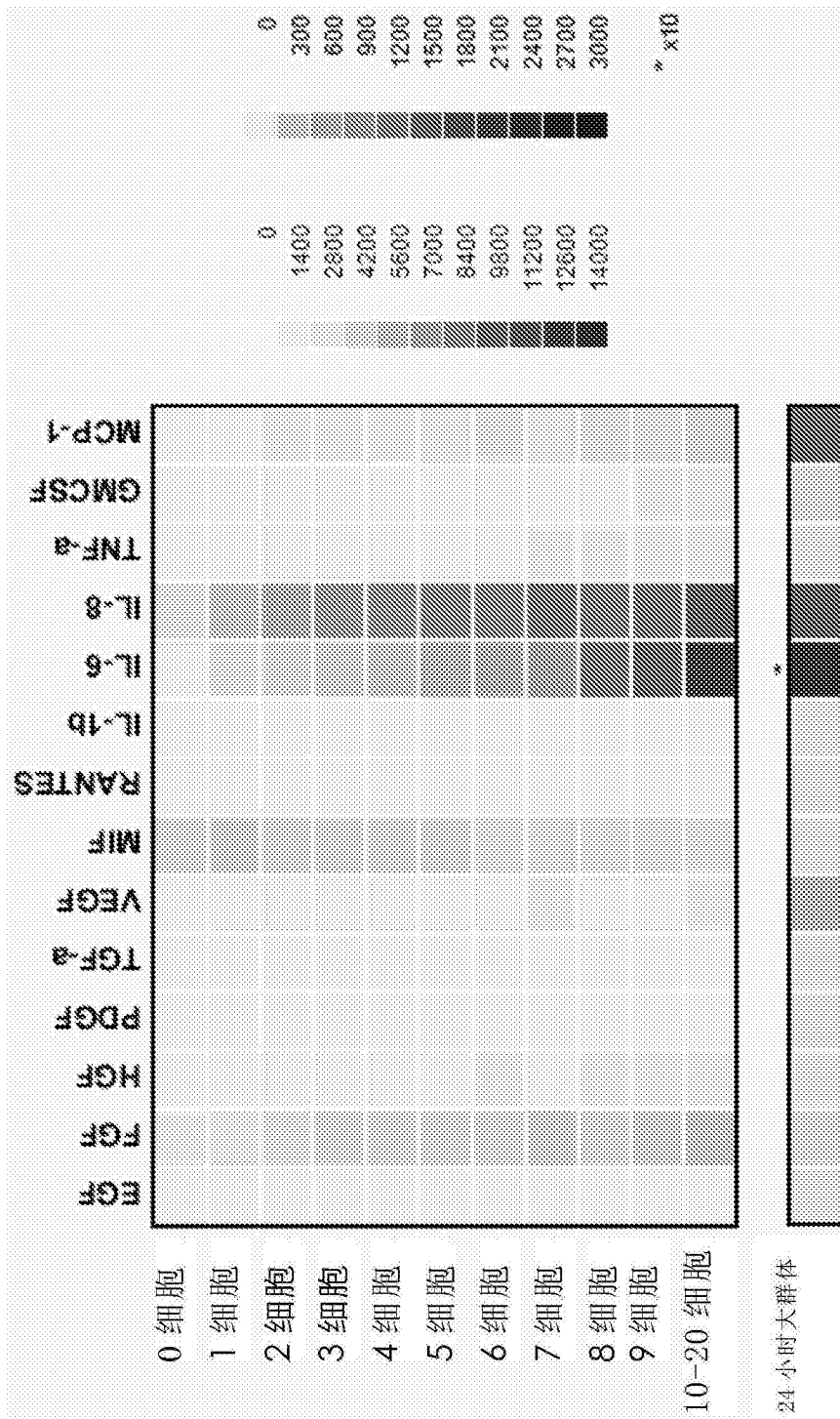


图12

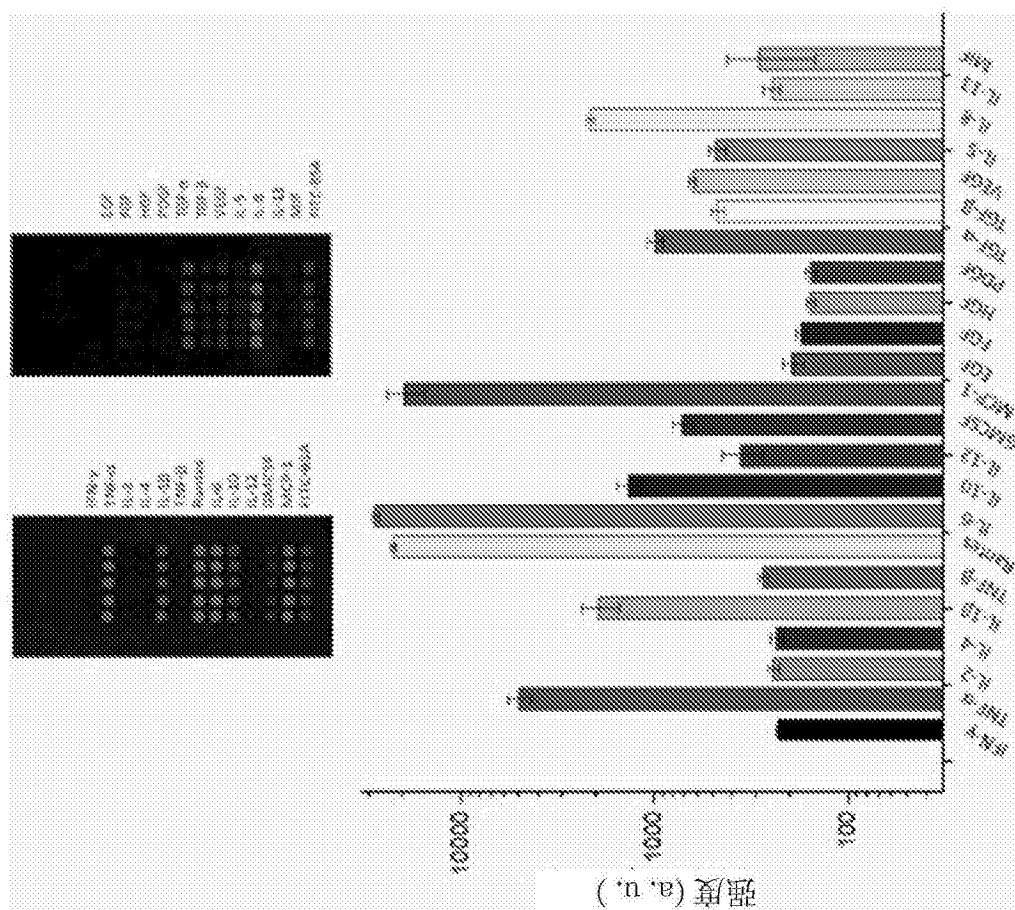


图13

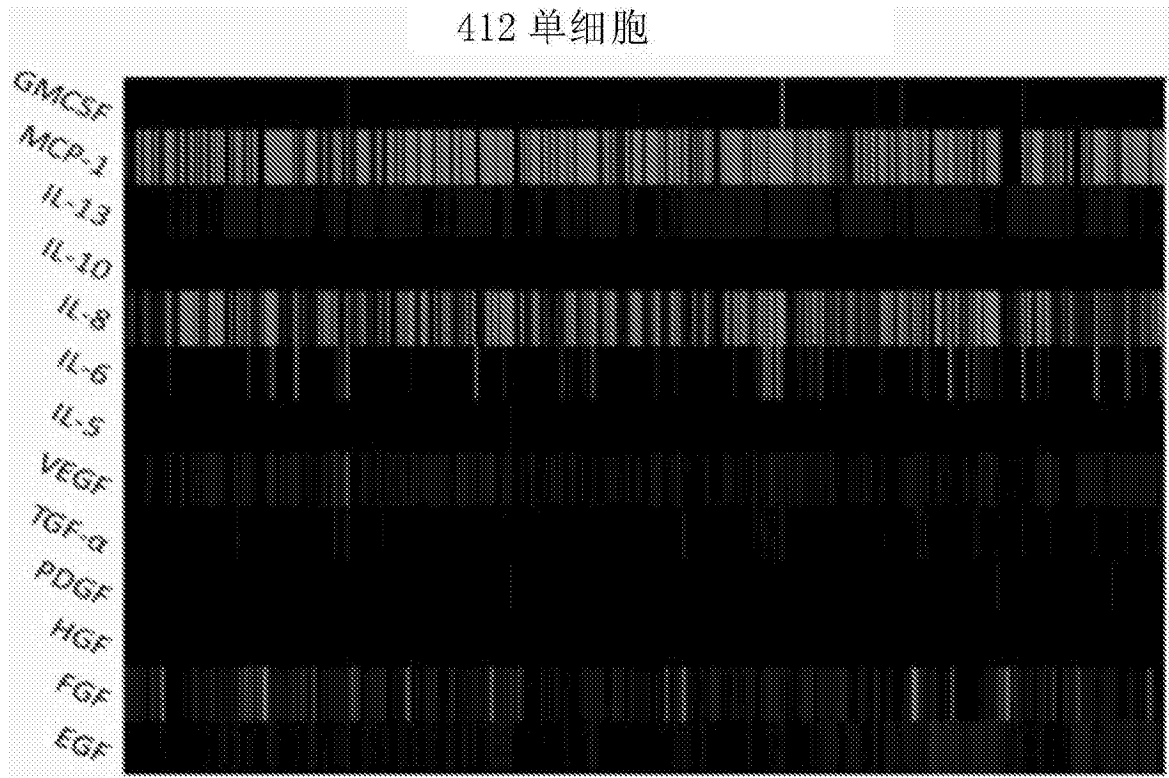


图14

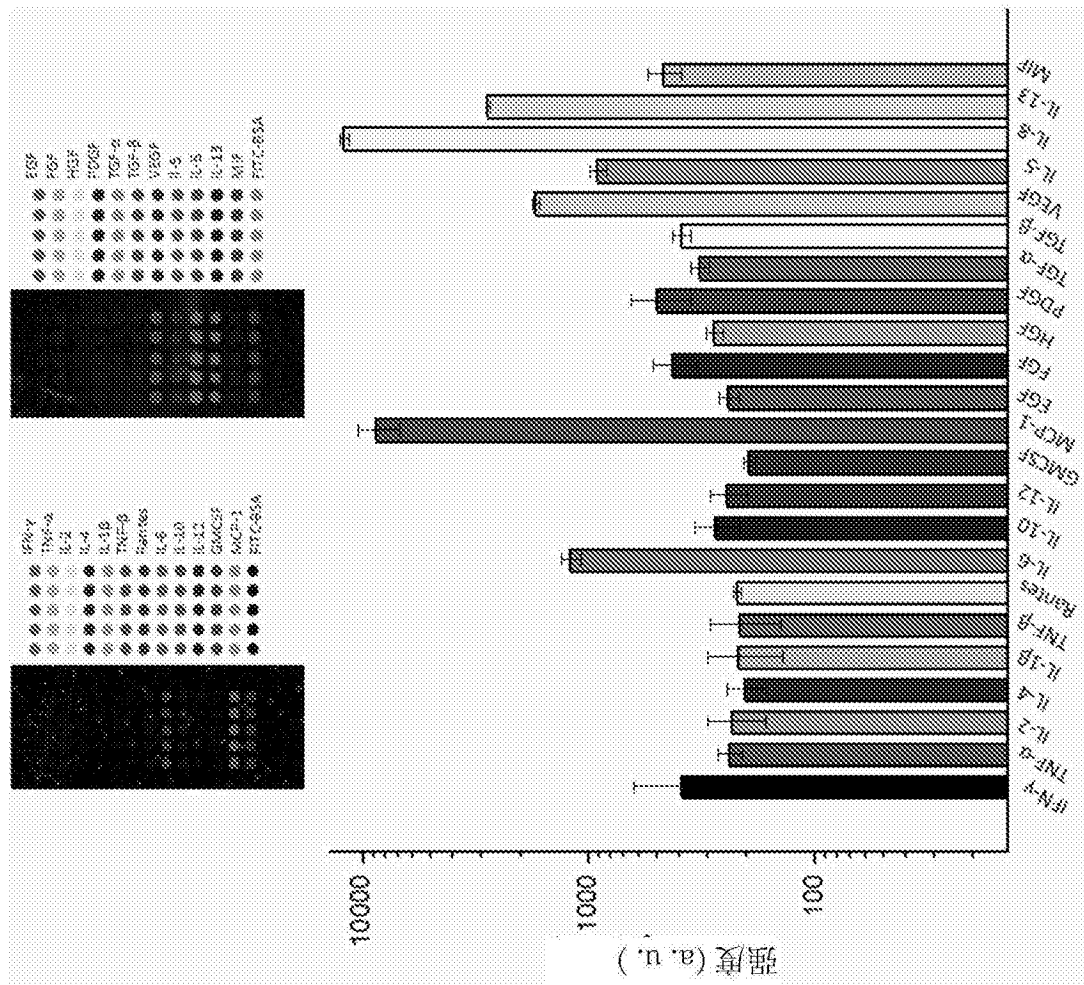


图15

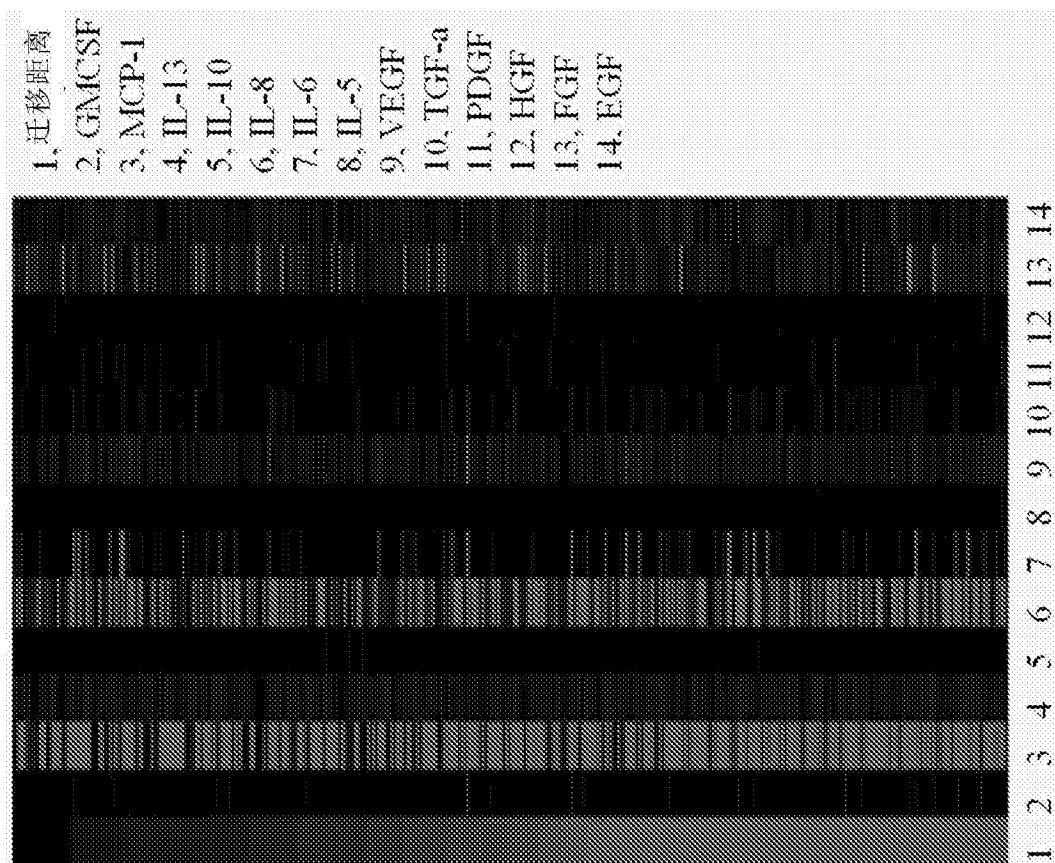


图16

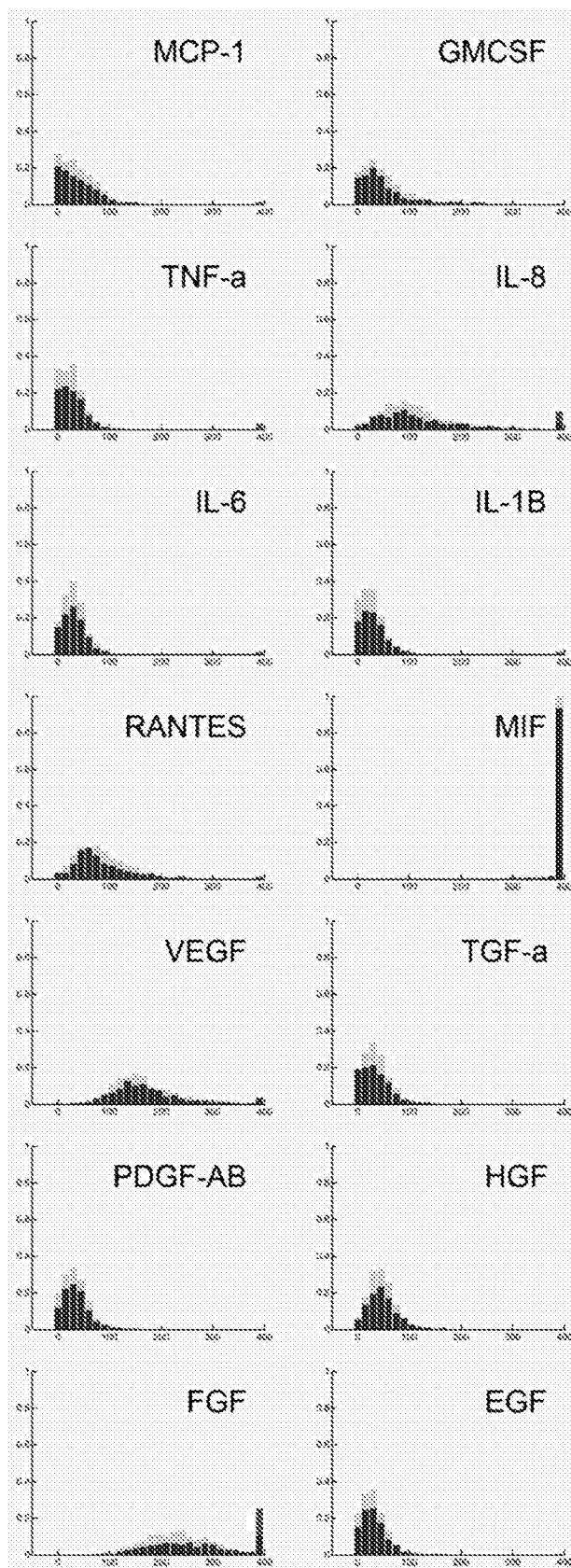


图17

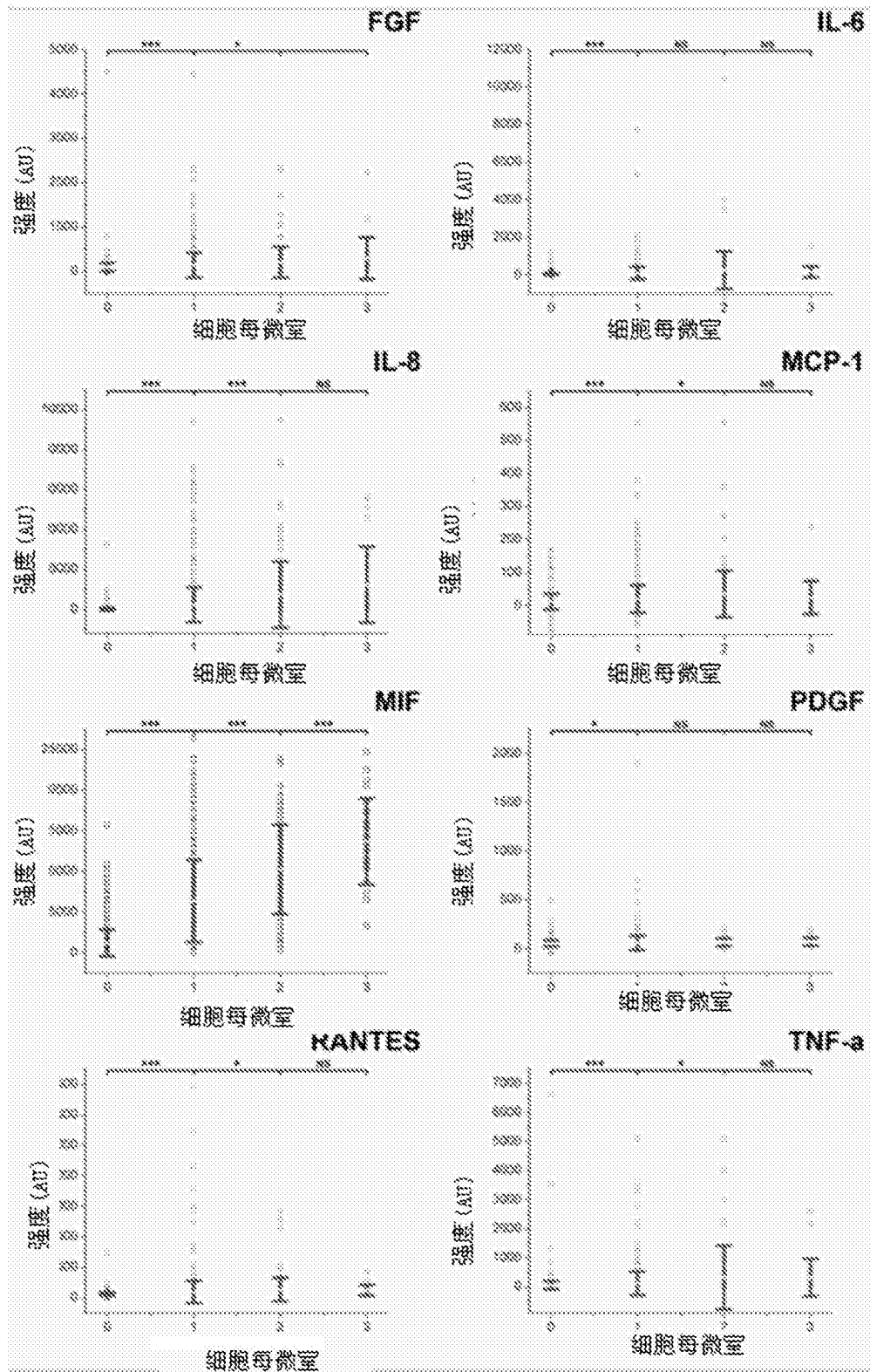


图18

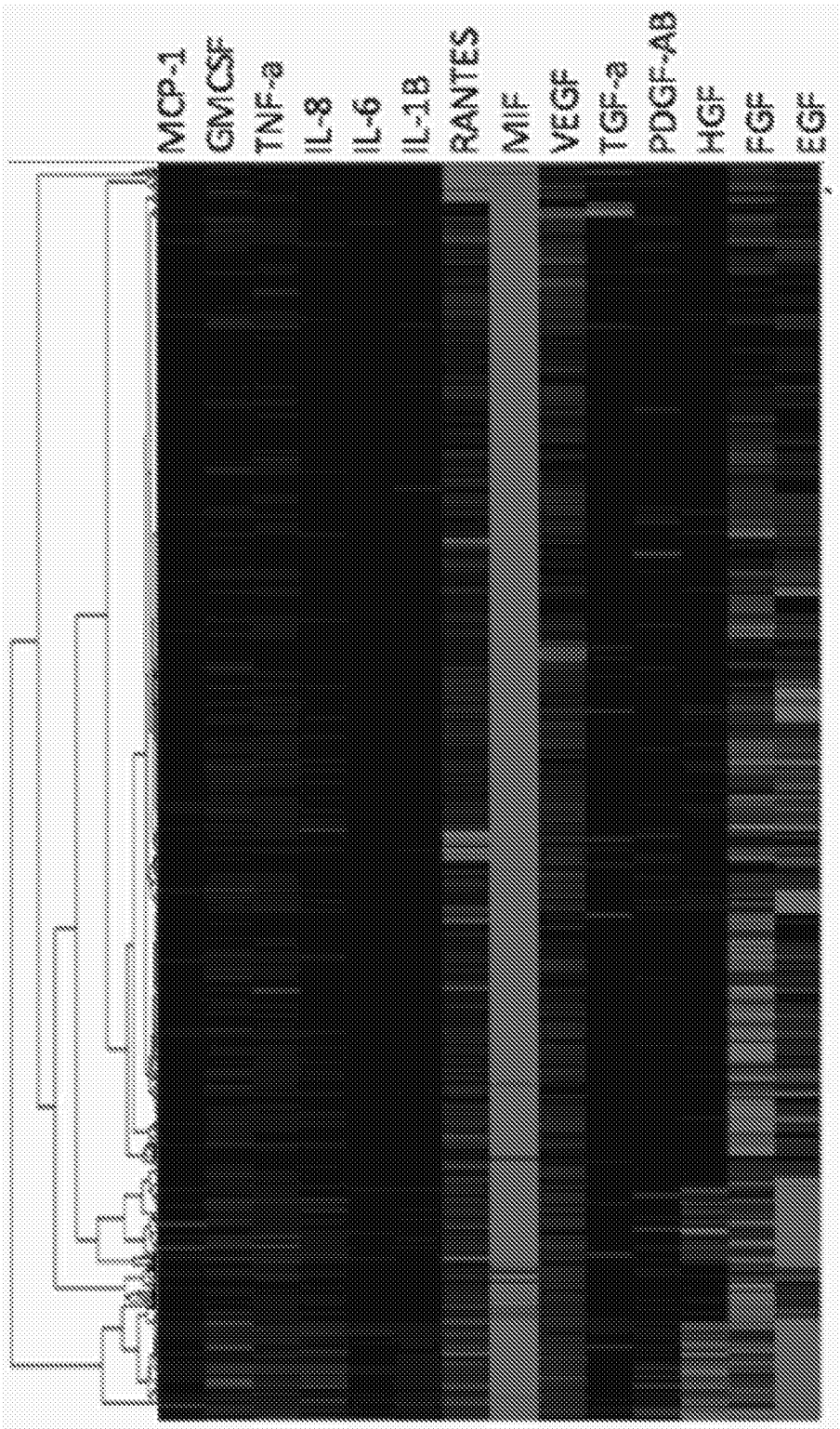


图19

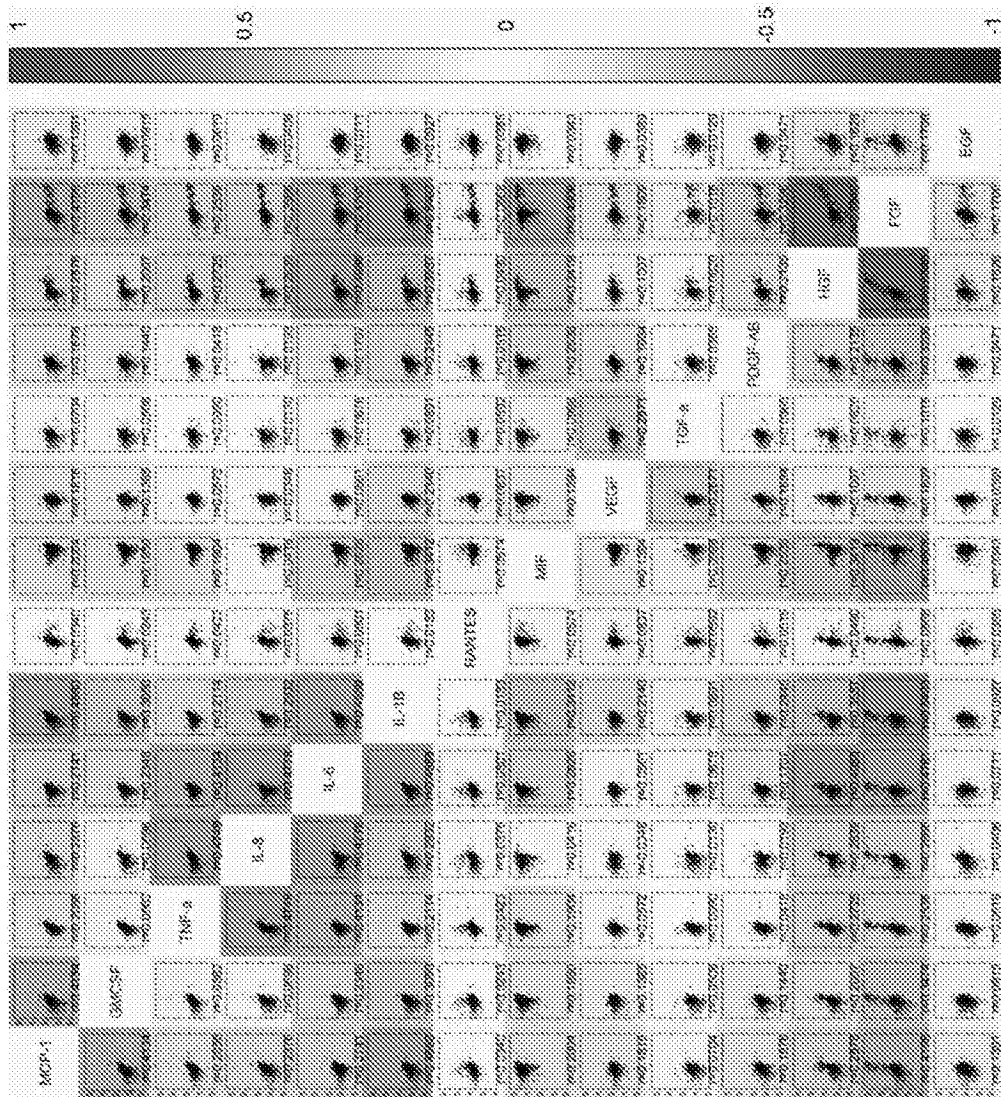


图20

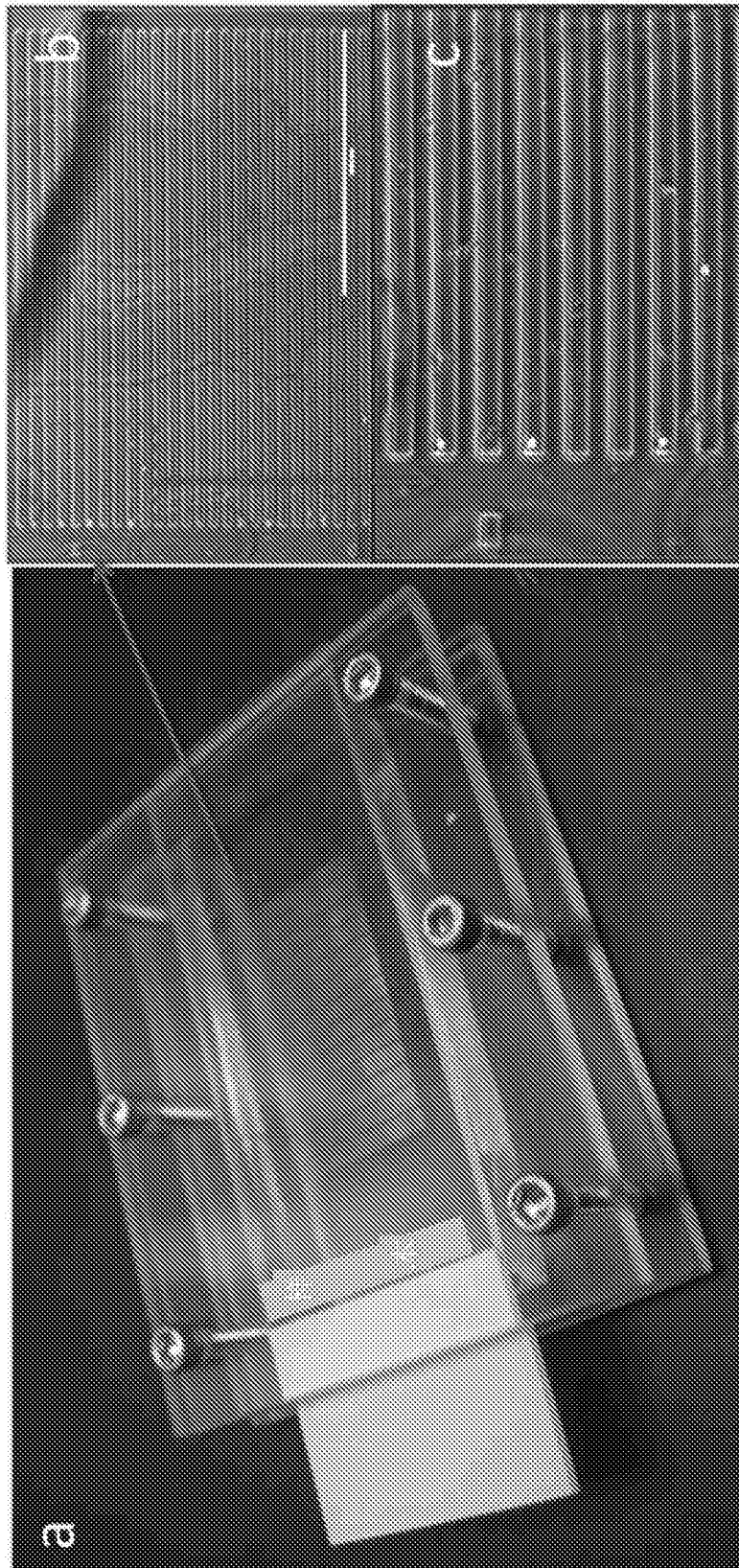


图21

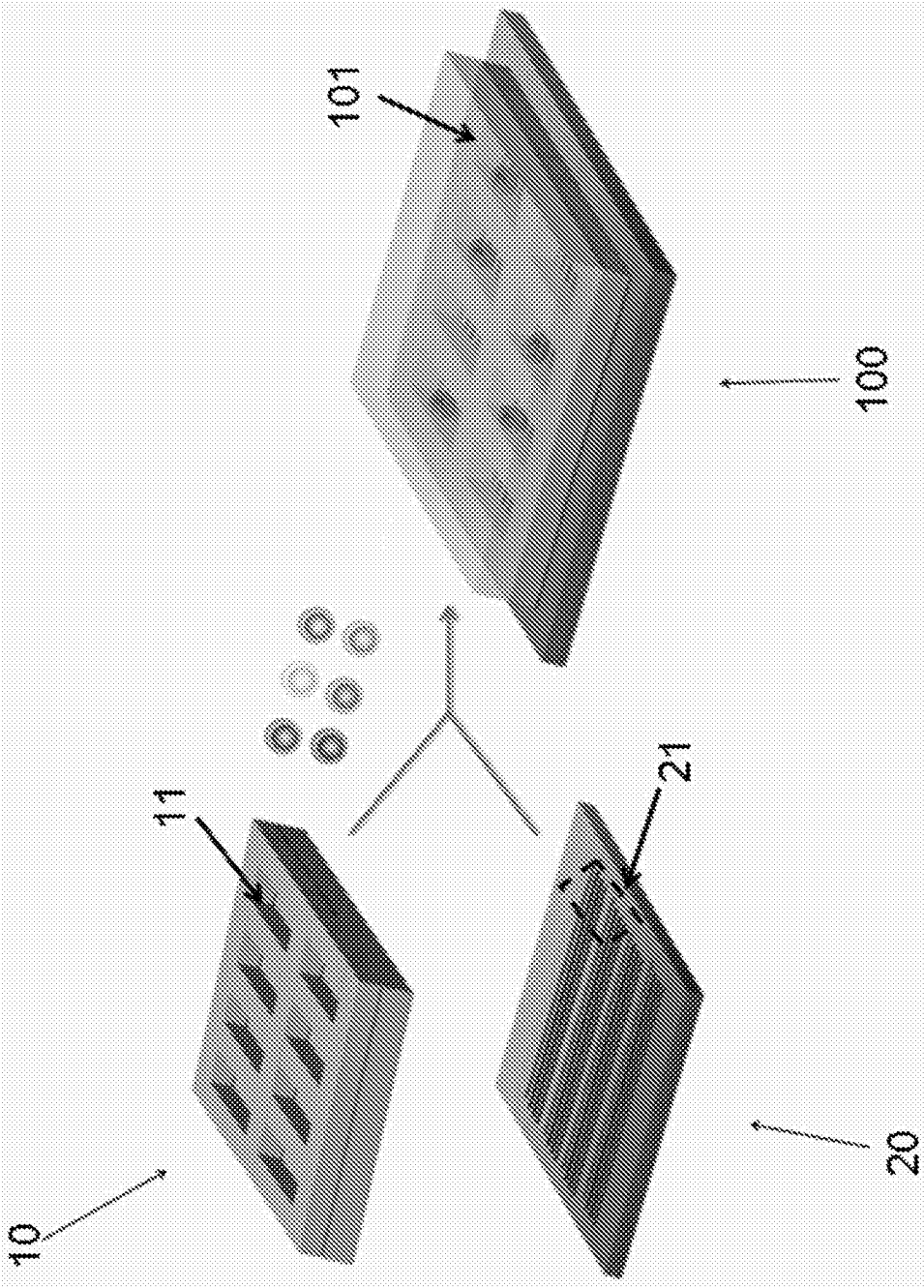


图22

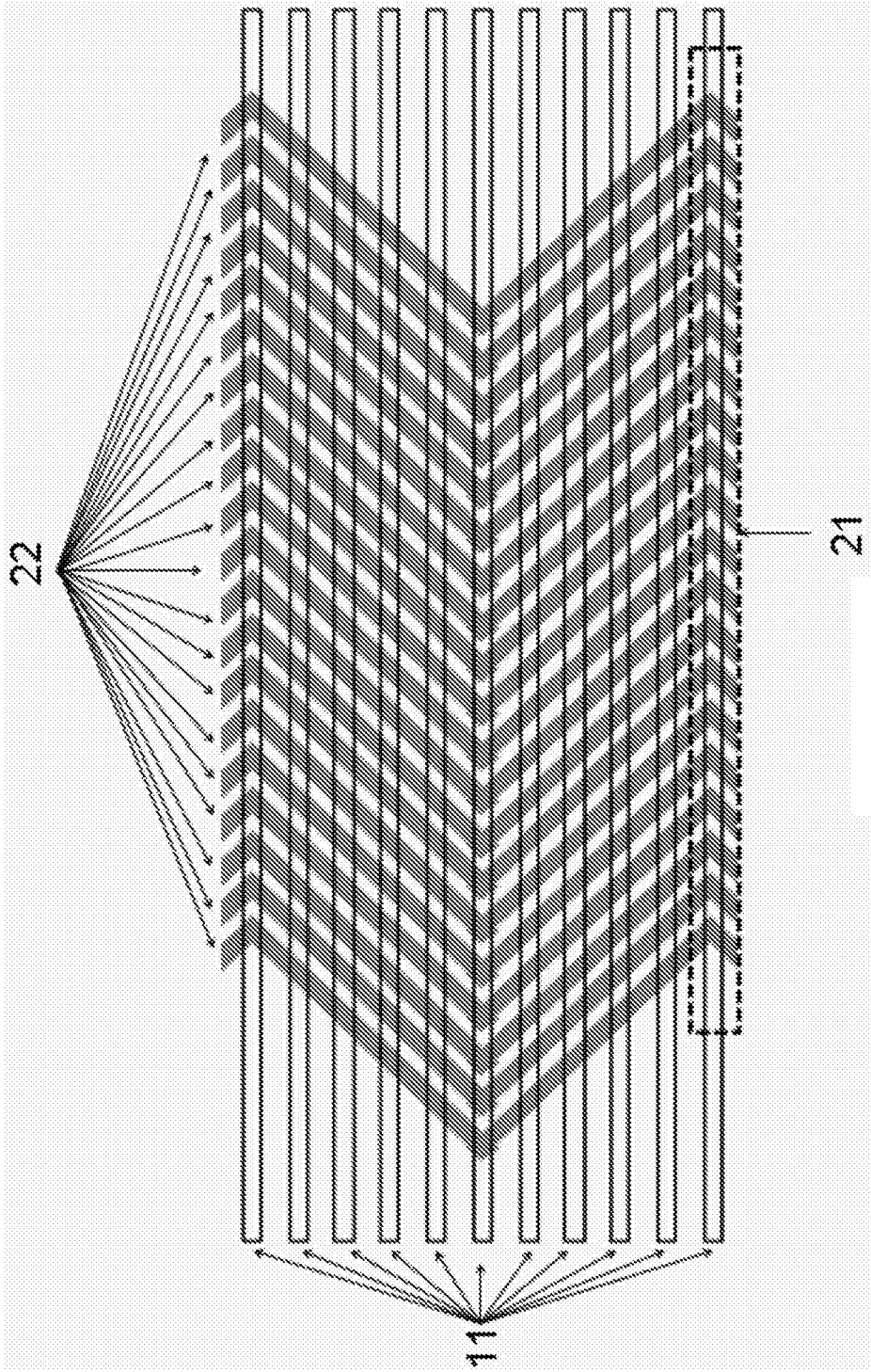


图23A

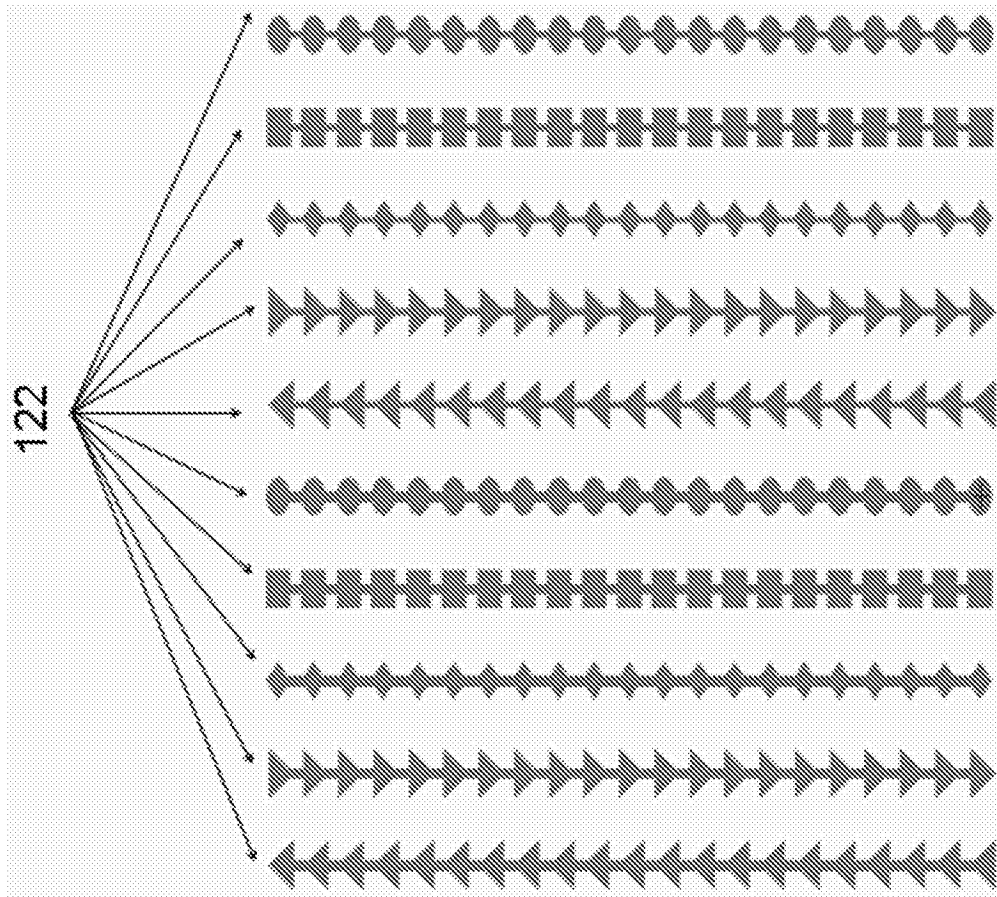
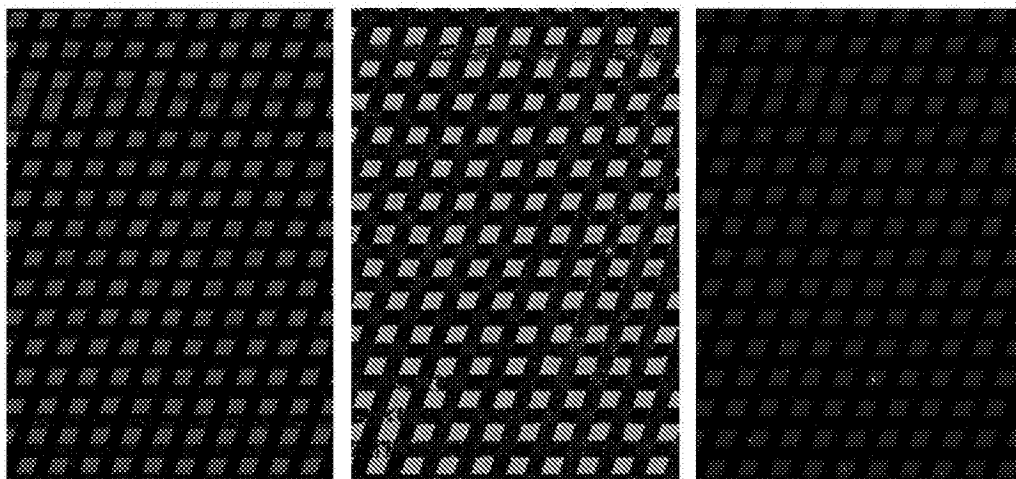


图23B

菱形



正方形

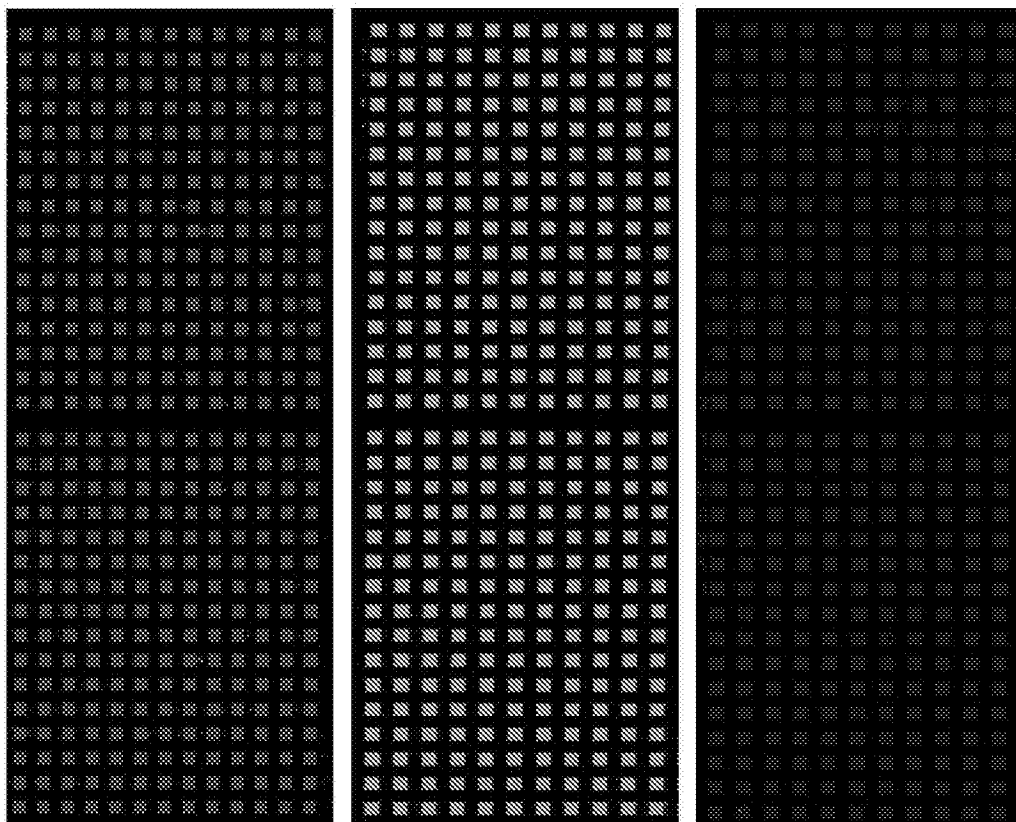


图24

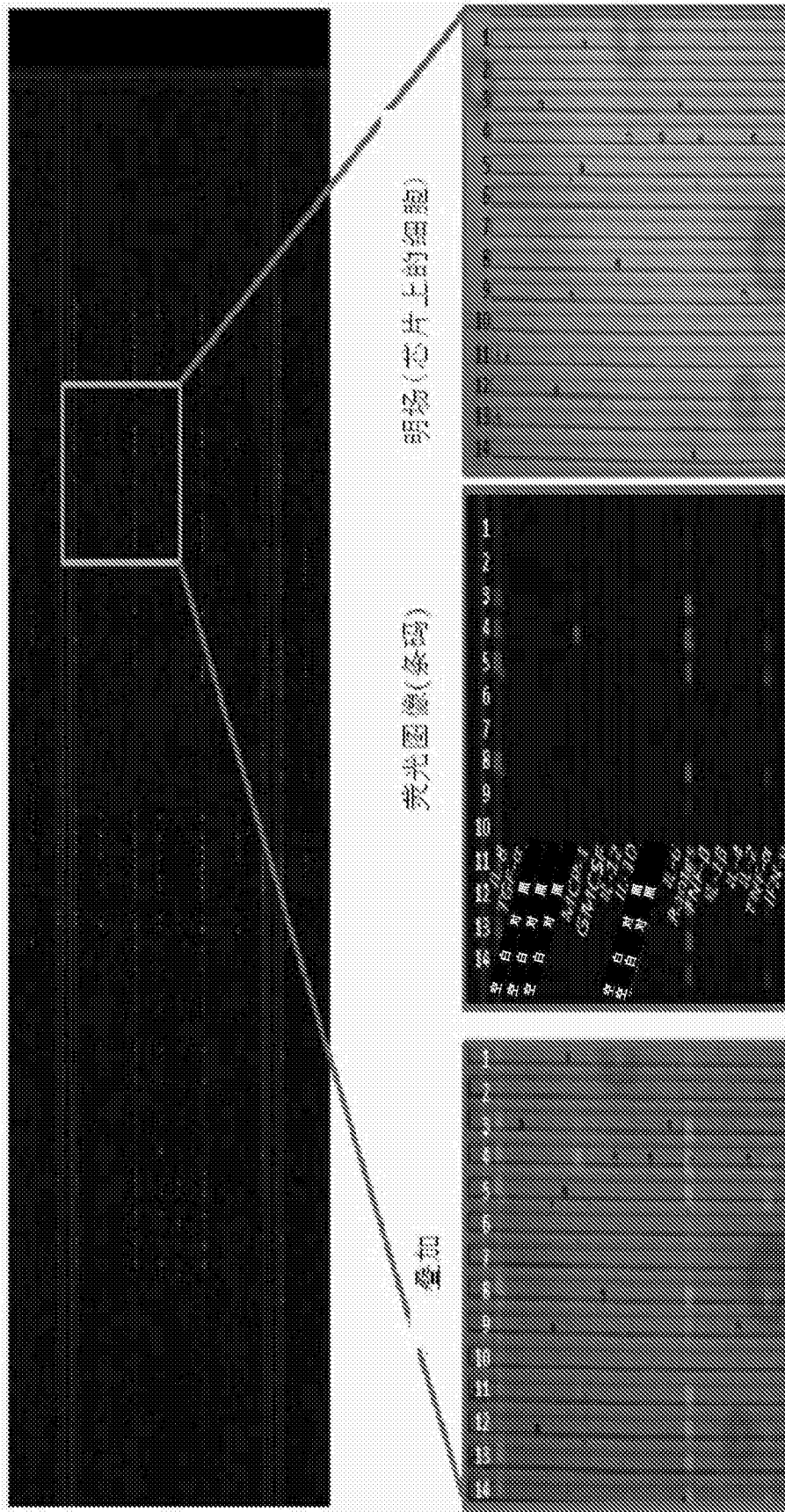


图25

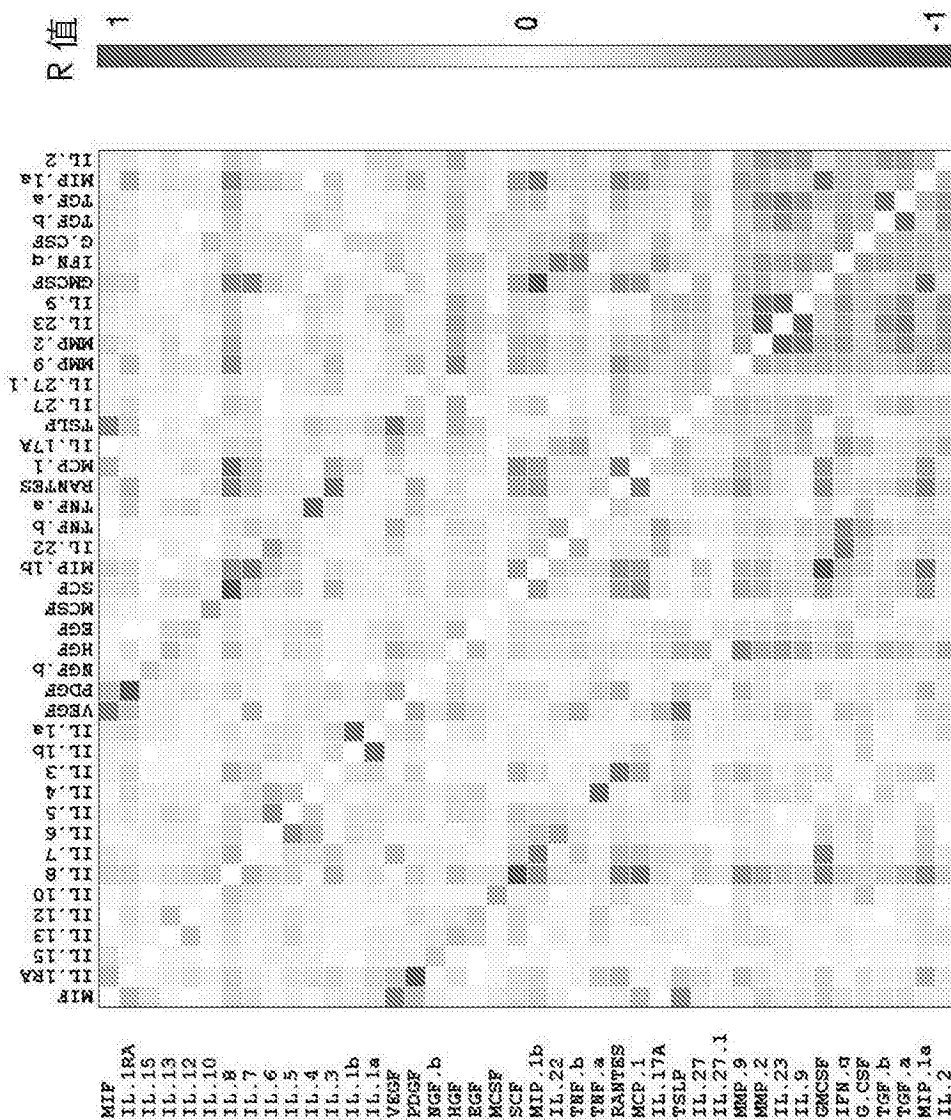


图26

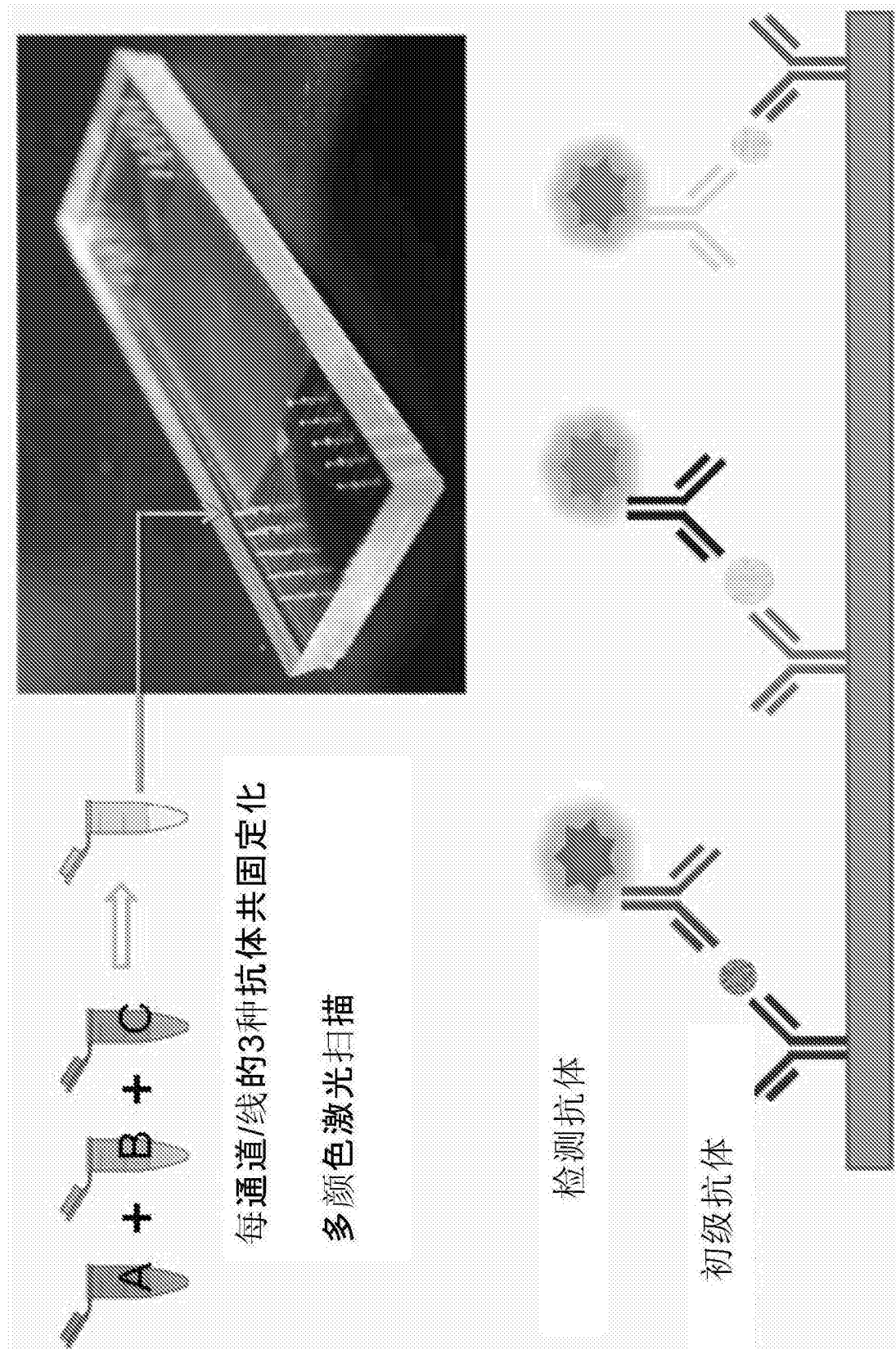


图27

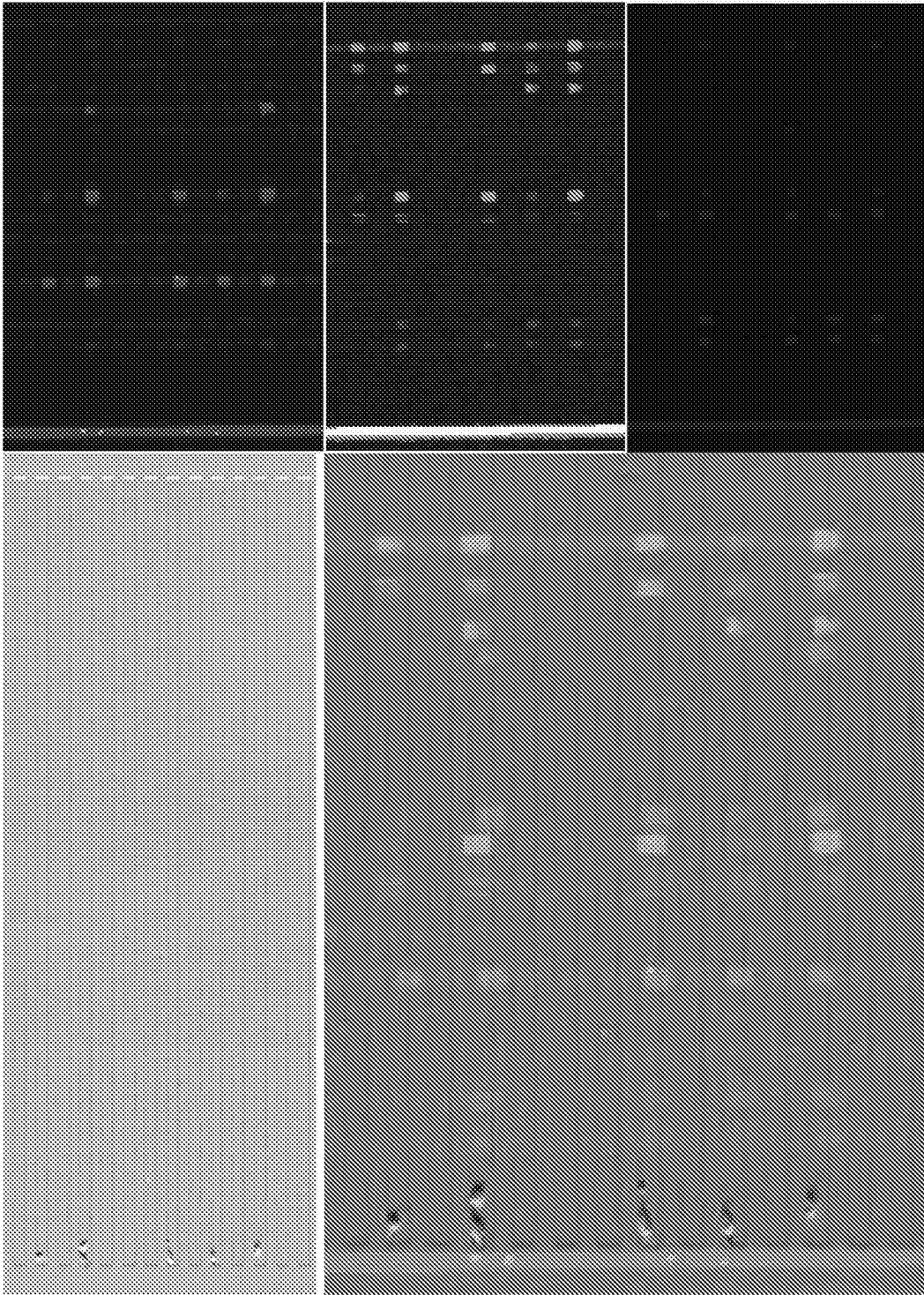


图28

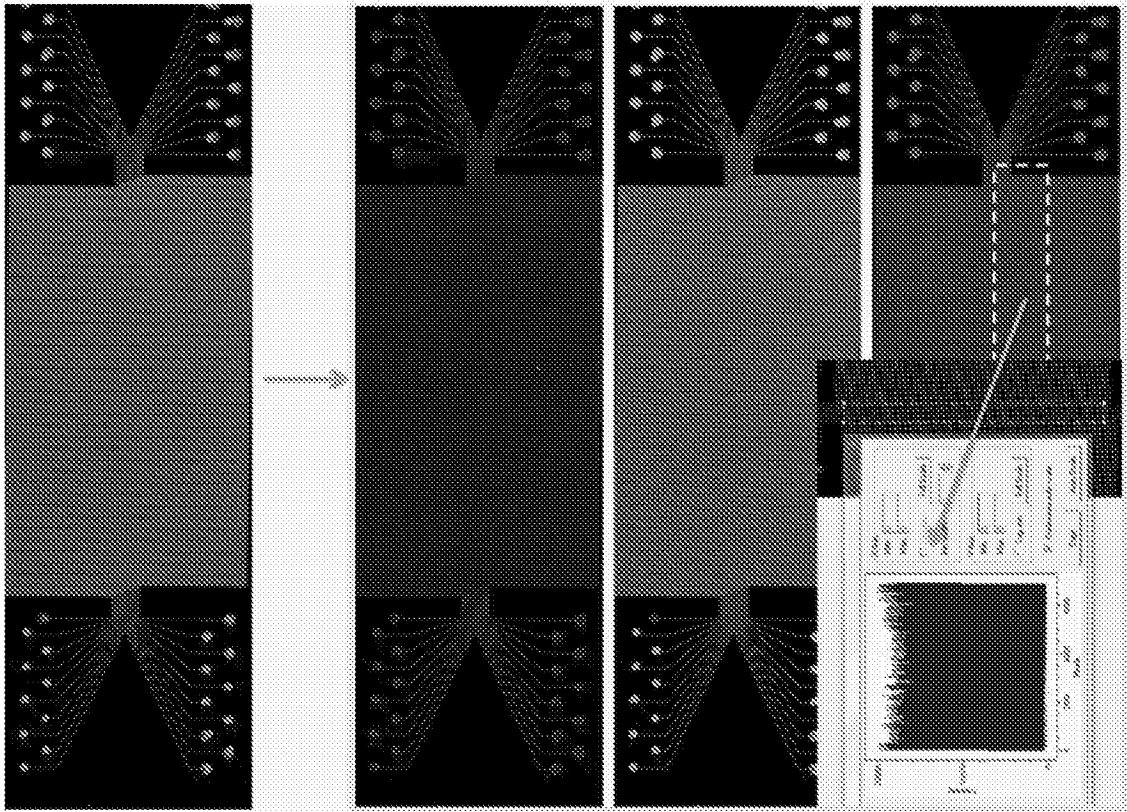


图29

	488 颜色	532 颜色	生物黄组 635 颜色
1	IL-1a	IL-17A	IL-2
2	IL-1b	MCP-1	MIP-1a
3	IL-3	Rantes	TGF-a
4	IL-4	TNF-a	TGF-b
5	IL-5	TNF-b	G-CSF
6	IL-6	IL-22	IFN-g
7	IL-7	MIP-1b	GM-CSF
8	IL-8	SCF	IL-9
9	IL-10	M-CSF	IL-23
10	IL-12	EGF	MMP-2
11	IL-13	HGF	MMP-9
12	IL-15	NGF-b	IL-27
13	IL-1RA	PDGF	IL-29
14	MIF	VEGF	TSLP
15	488-BSA	532-BSA	635-BSA

图30

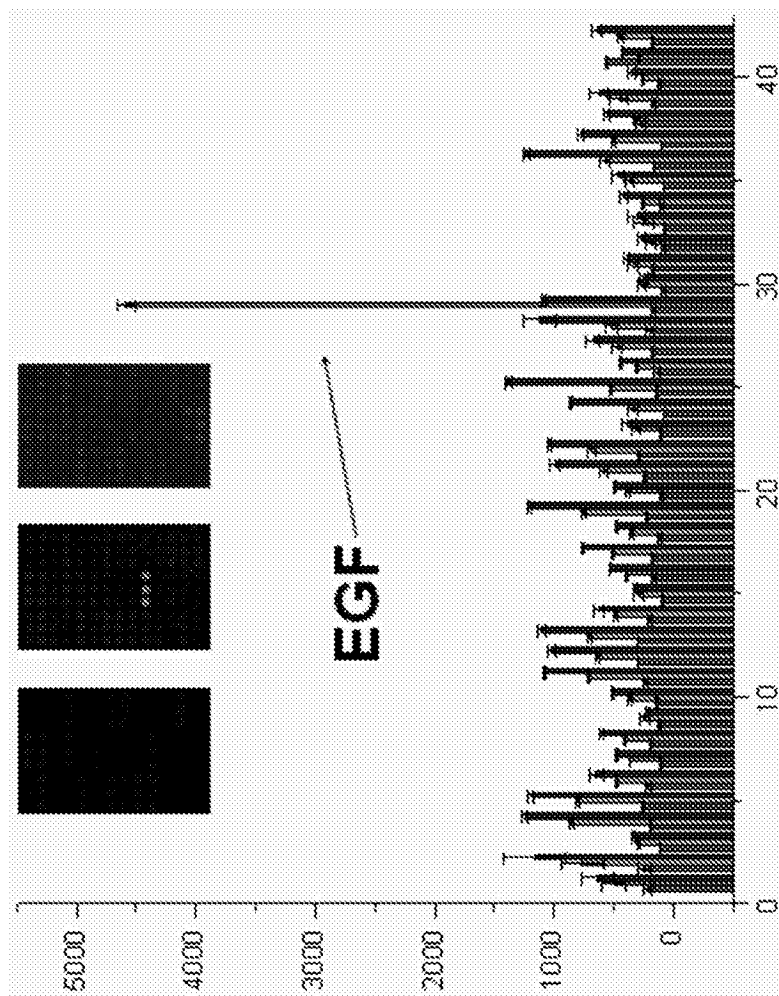


图31

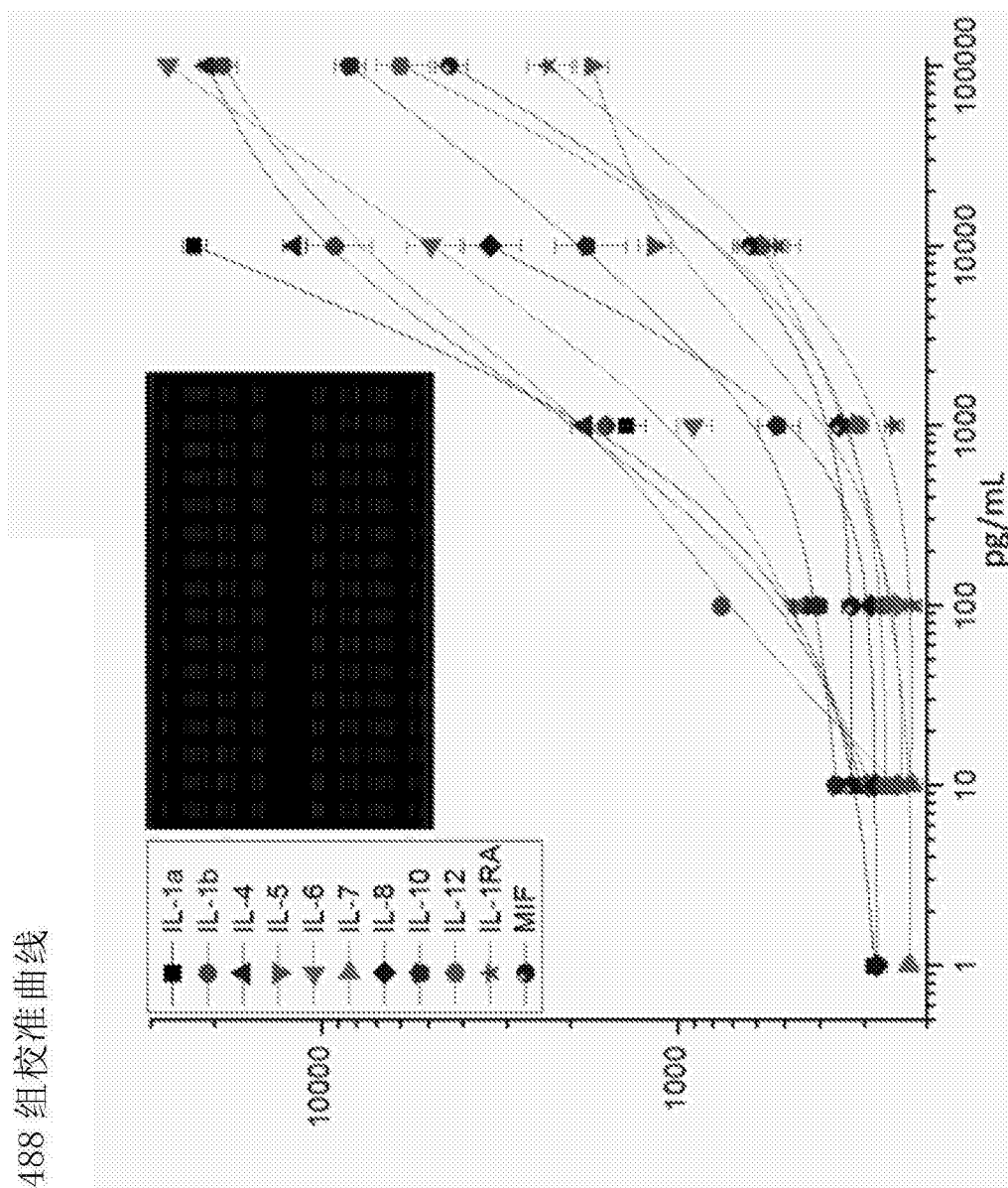


图32A

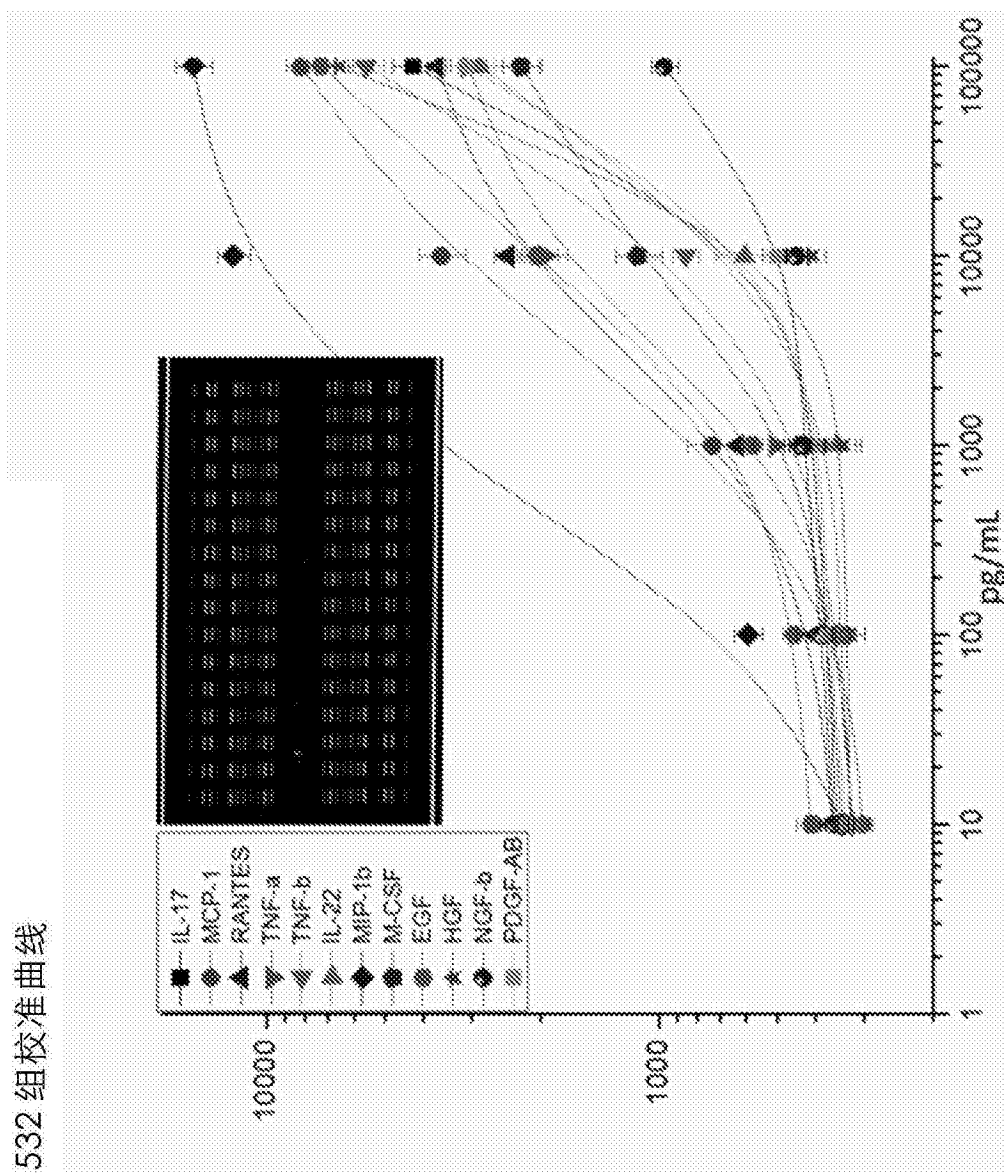


图32B

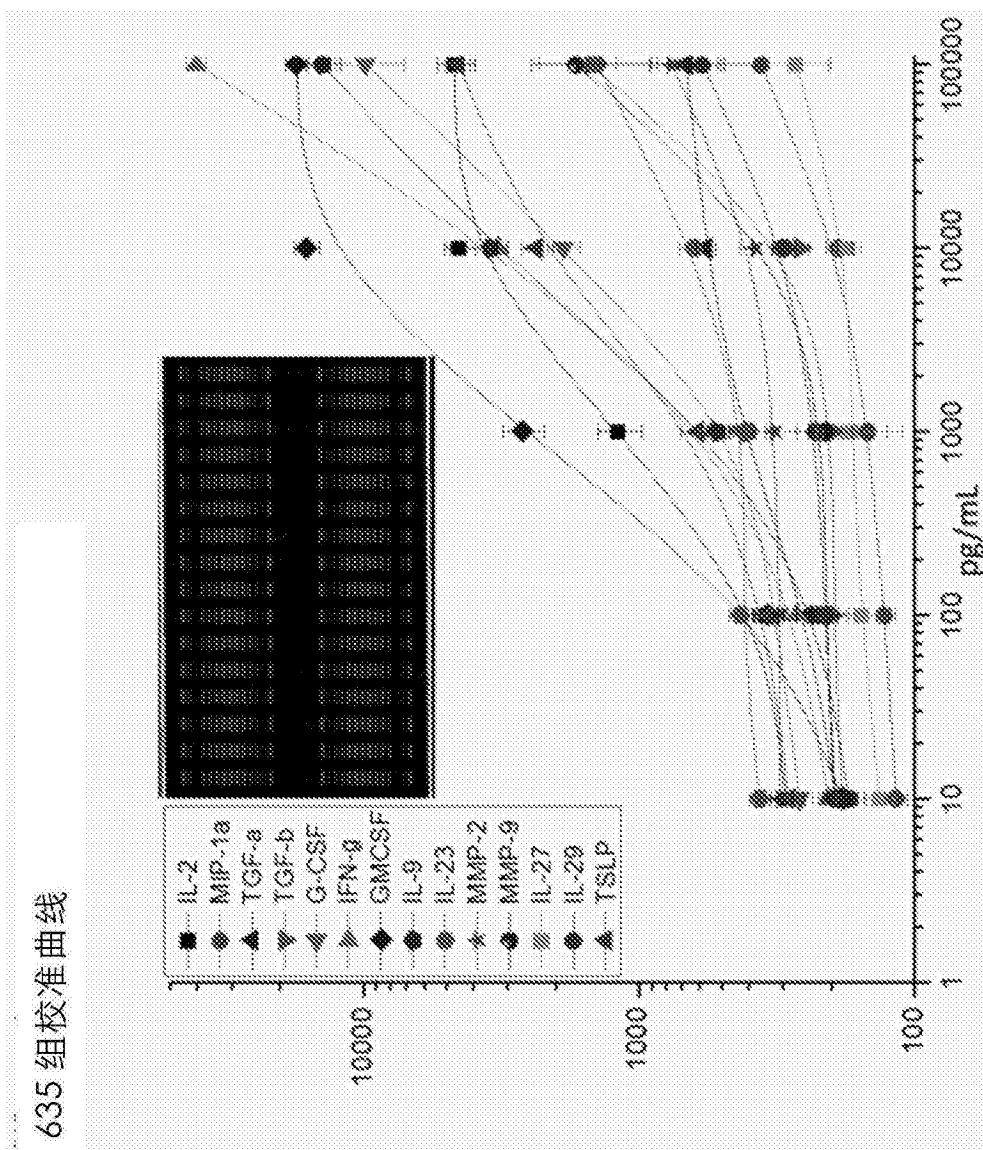
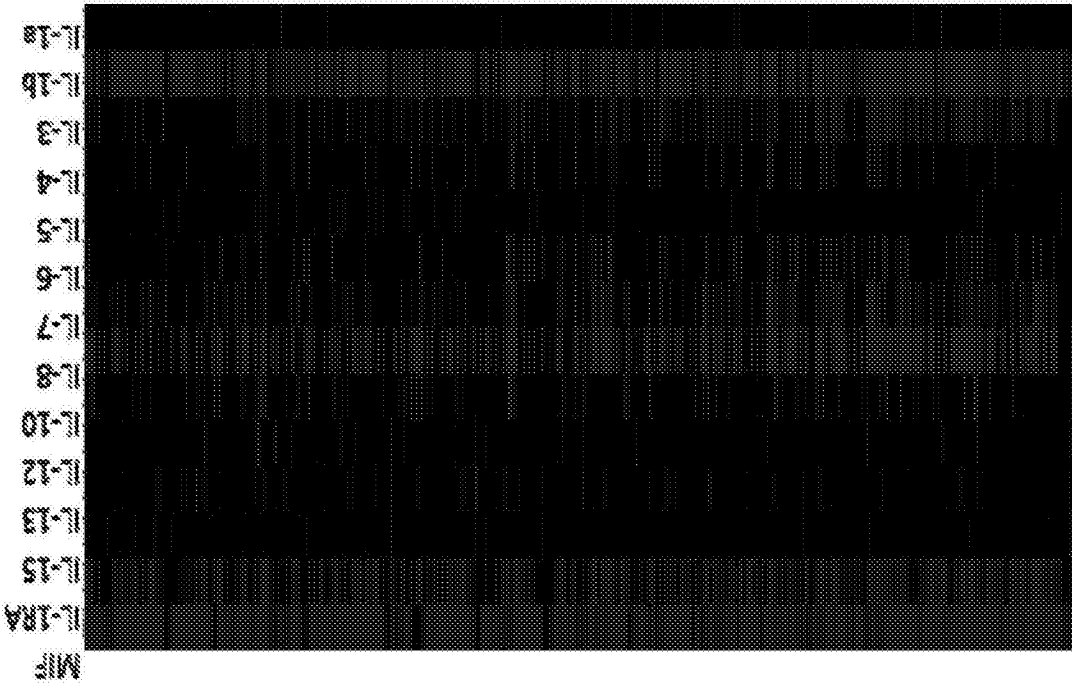


图32C



单细胞

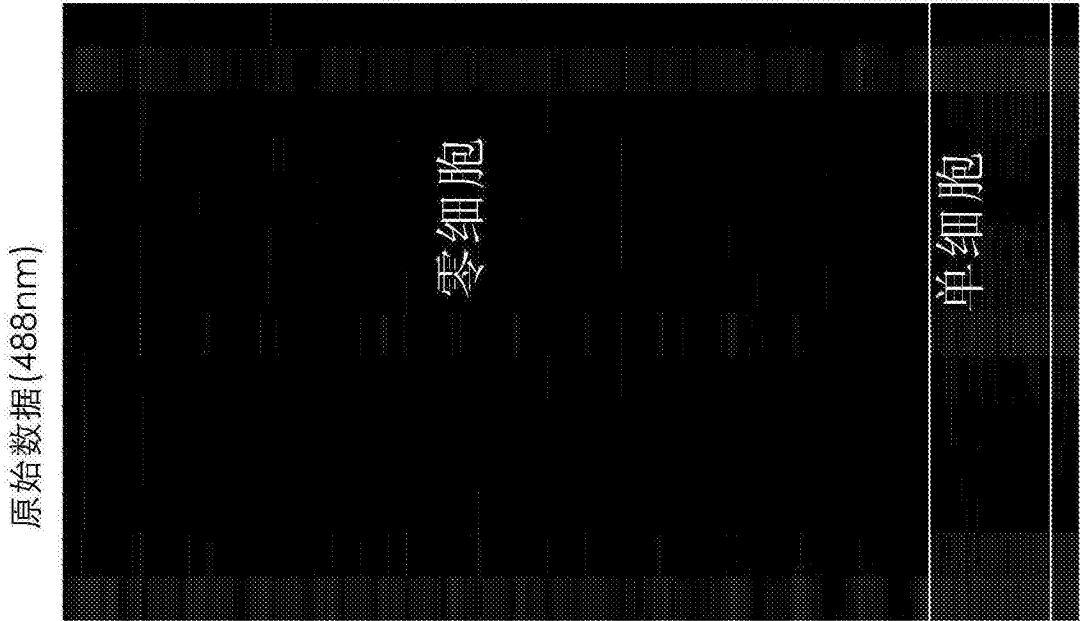
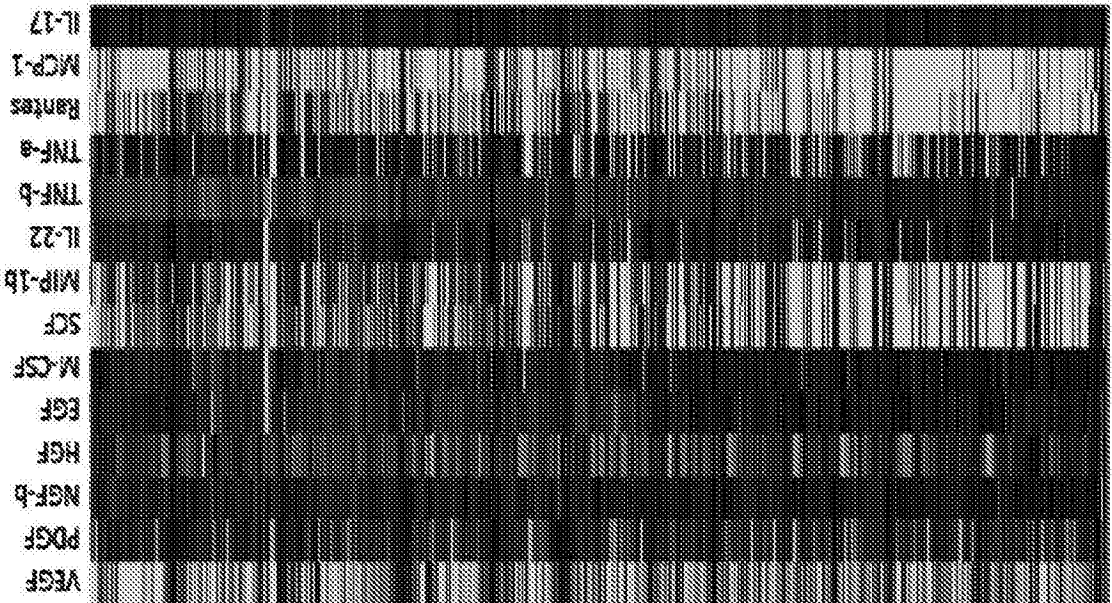


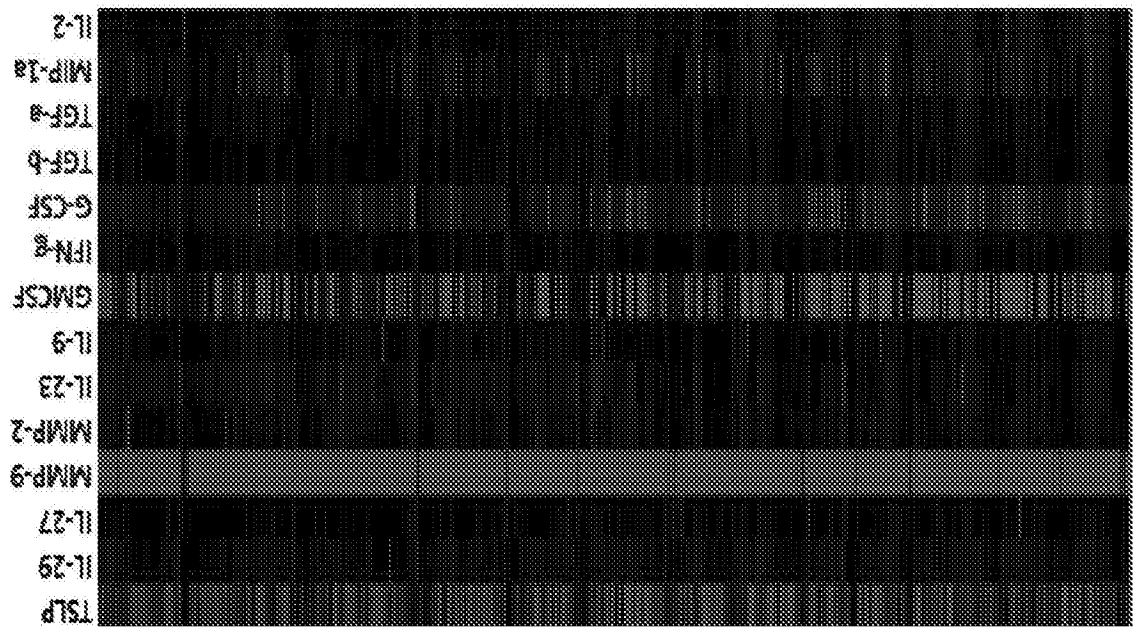
图33



单细胞



图34



单细胞

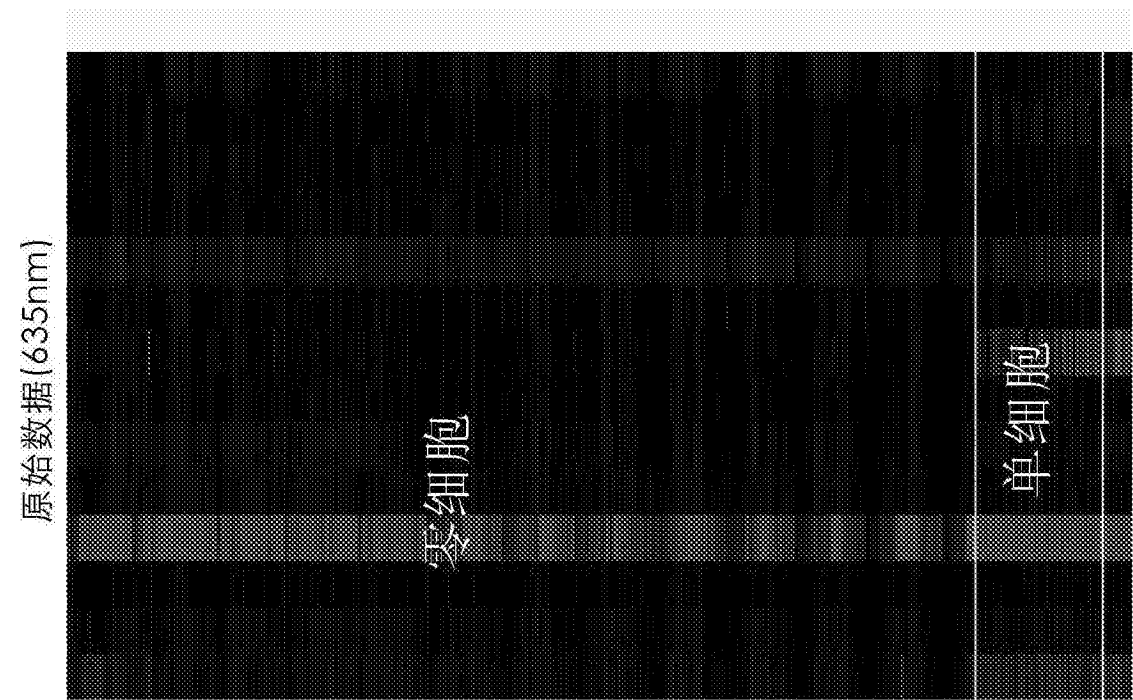


图35

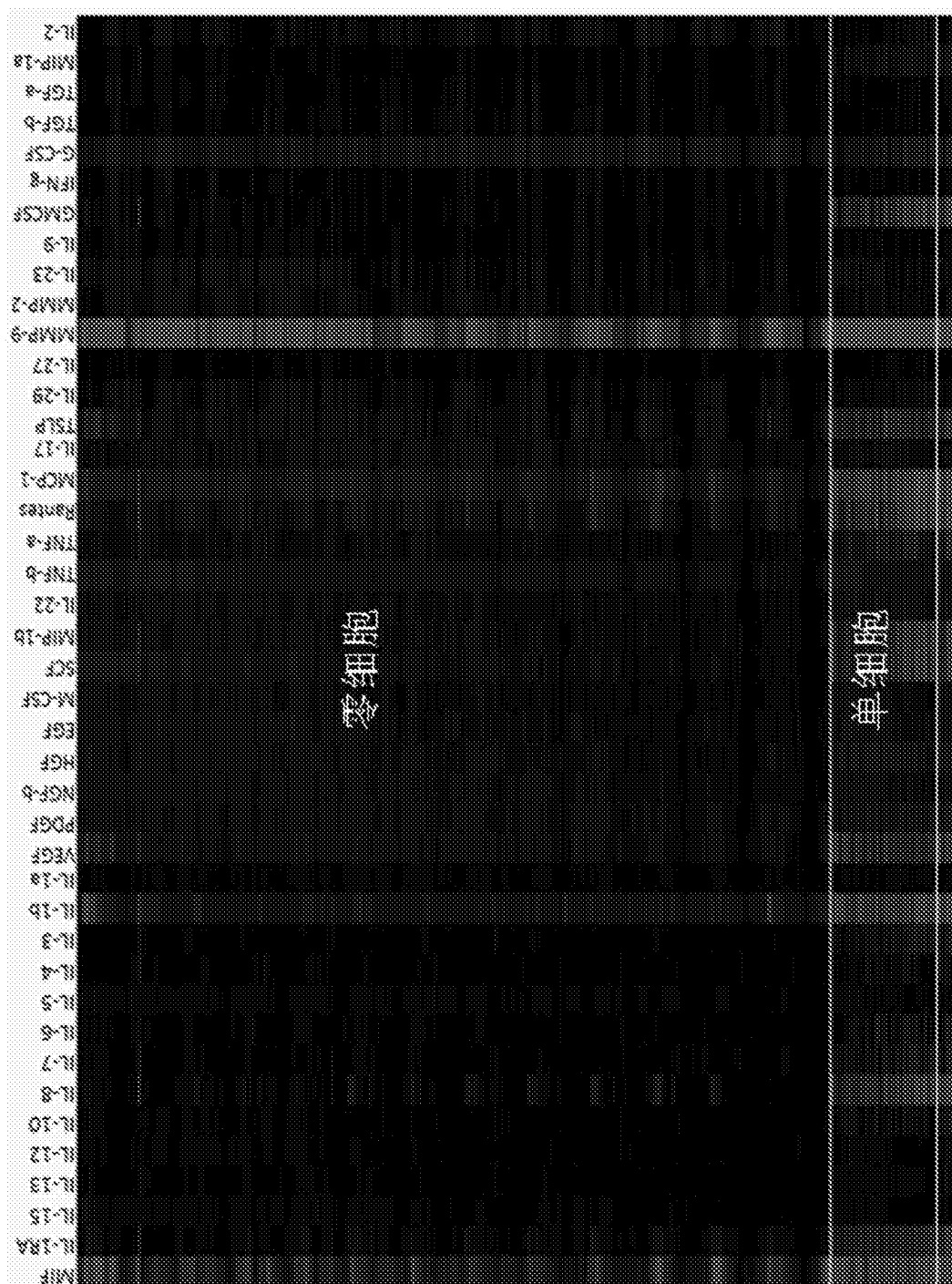


图36

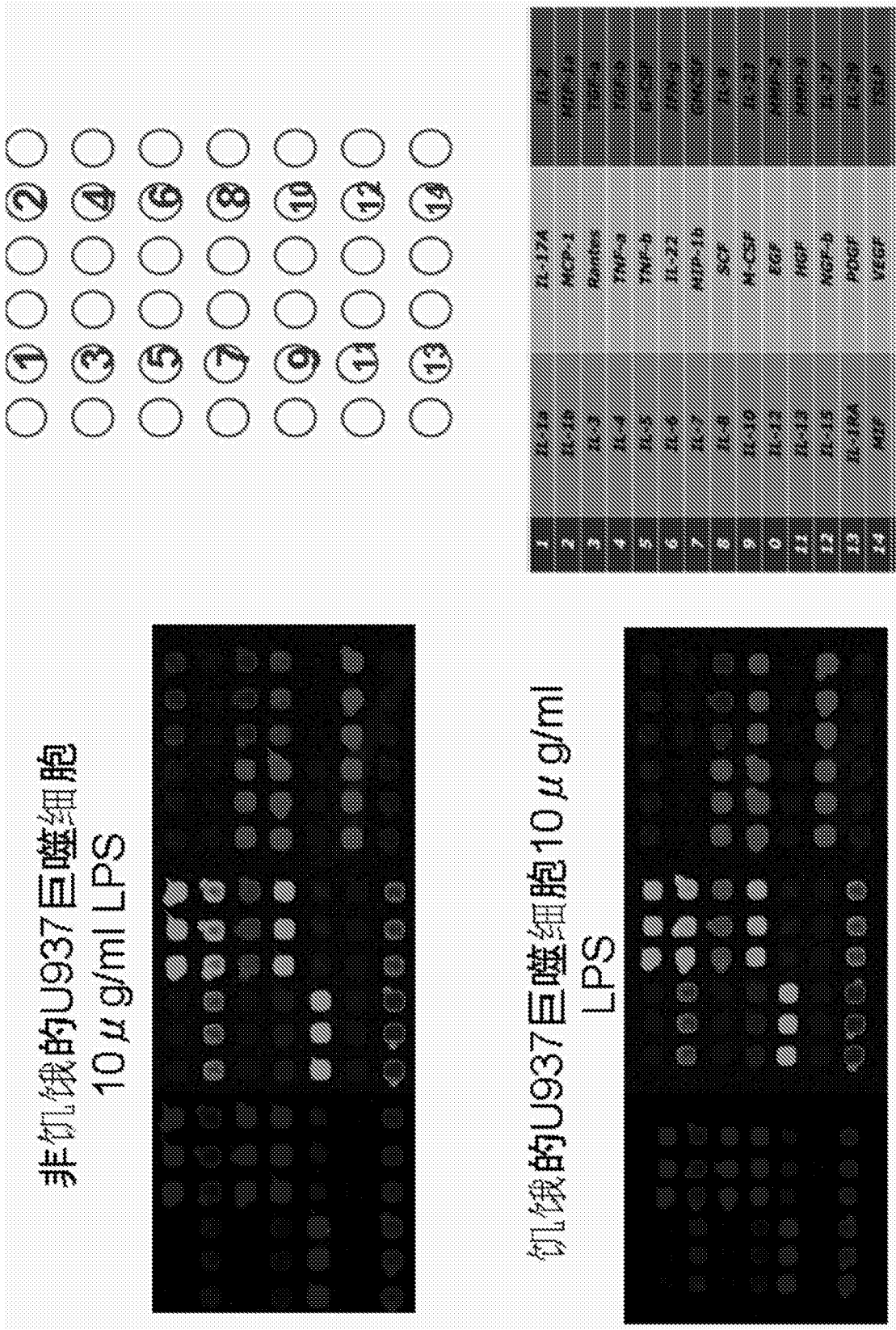


图37

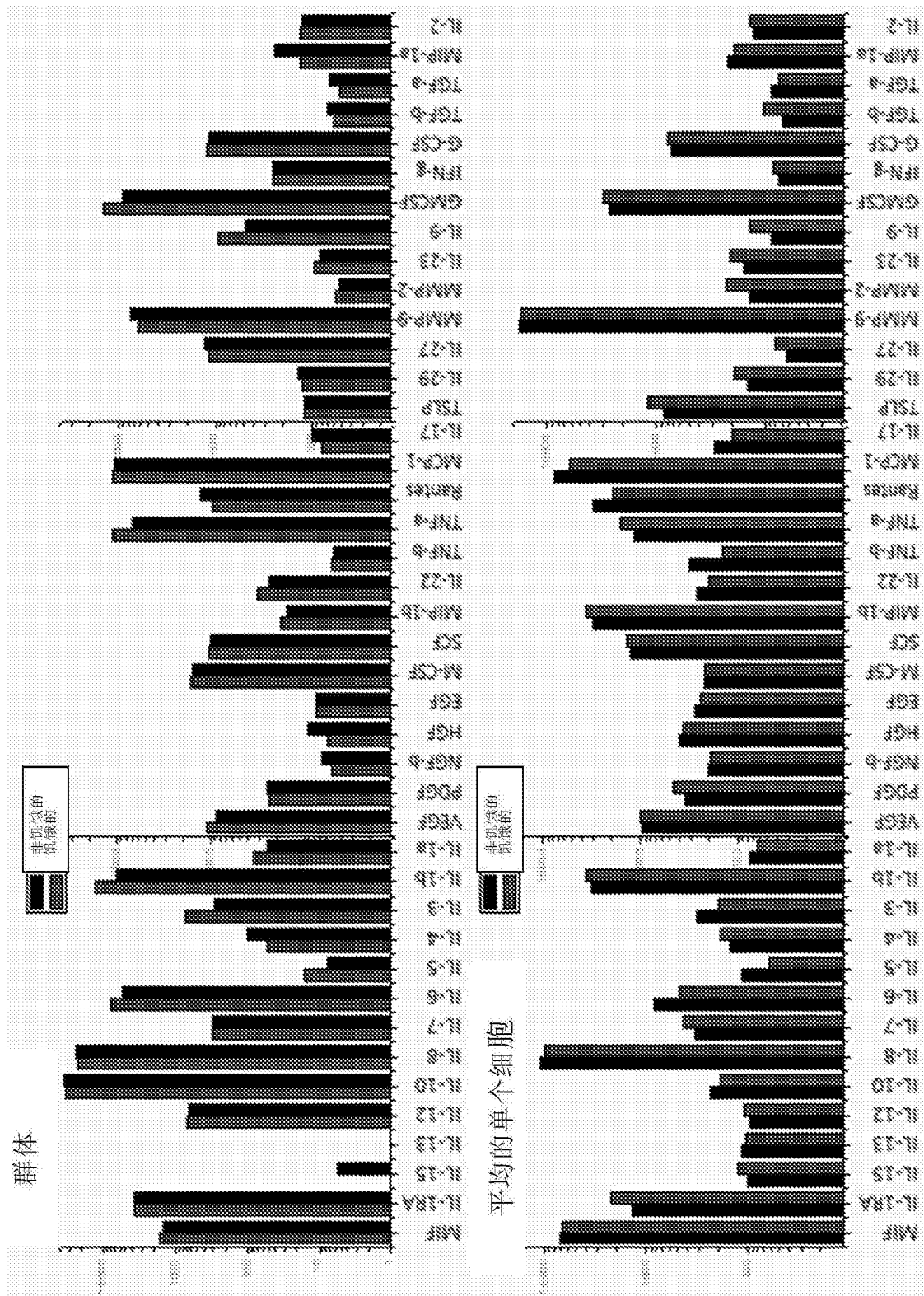


图38

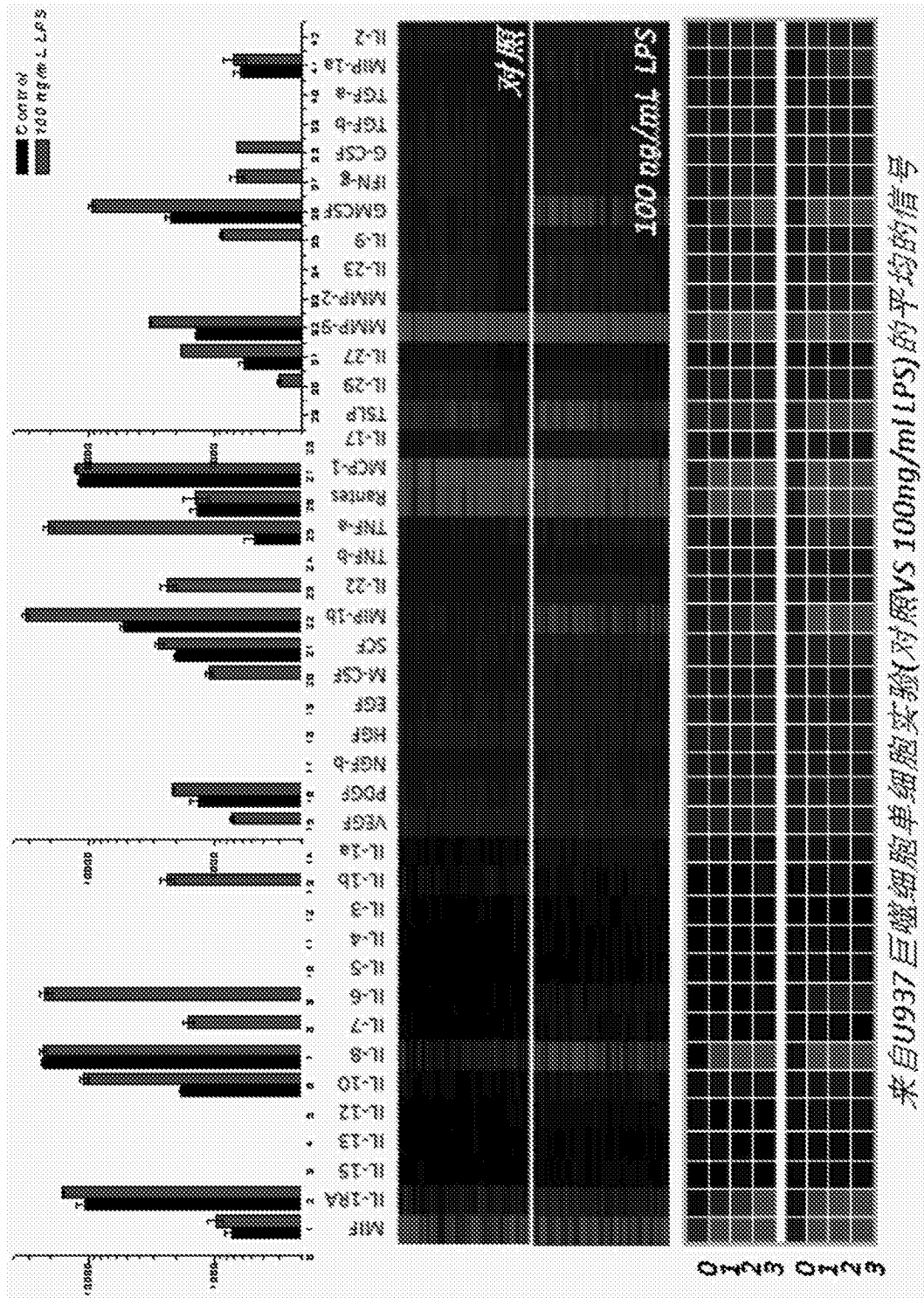


图39

	MIF		IL-1b		IL-4		GMCSF	
ICS 对照: LPS	99%	99.7%	92.8%	97.4%	63.9%	66.8%	6.5%	44.5%
SCMA 对 照: LPS	32.4%	33.2%	12.9%	11.9%	2.5%	0.8%	30.4%	46.4%
	IL-8		IL-13		MIP-1a		MIP-1b	
ICS 对照: LPS	18.2%	90.4%	3.7%	2.5%	99%	99.7%	29.3%	99.4%
SCMA 对 照: LPS	28.8%	54.7%	0%	2.5%	23.5%	40.2%	14.9%	41.3%
	Rantes		G-CSF		MCP-1		TNF-a	
ICS 对照: LPS	12.6%	20.3%	66.6%	50.7%	98.6%	99.7%	0%	7.1%
SCMA 对 照: LPS	64.1%	62.5%	7%	3.1%	61.8%	53.8%	3.7%	15.1%
	TNF-b		EGF		IL-6		IL-10	
ICS 对照: LPS	0%	0.4%	95.1%	92.6%	89.3%	78.8%	17.9%	41.2%
SCMA 对 照: LPS	0%	0.5%	0%	1.2%	2.1%	14.3%	4.9%	16.7%

阈值定义: 0 细胞 平均 + 2sd

图40

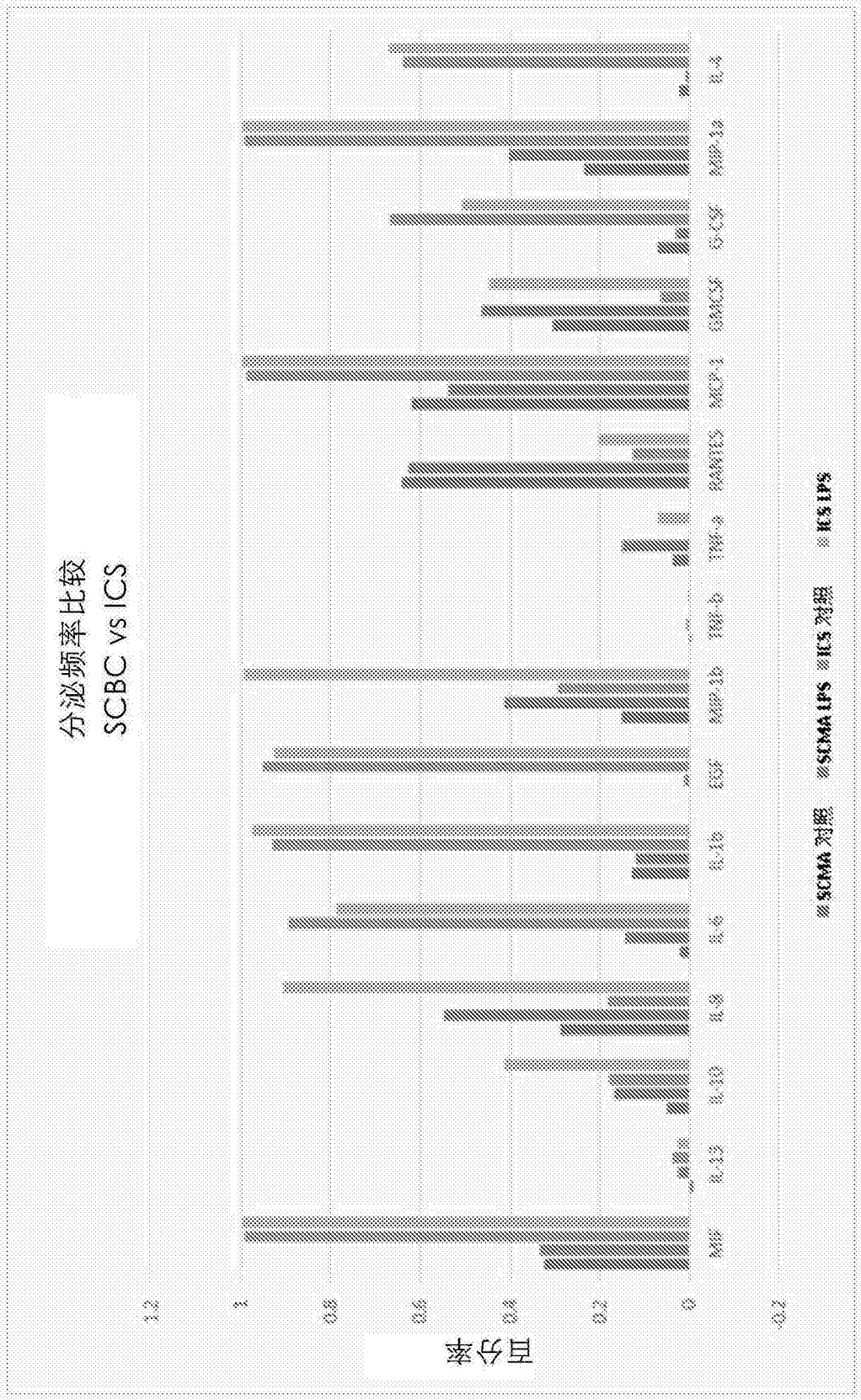


图41

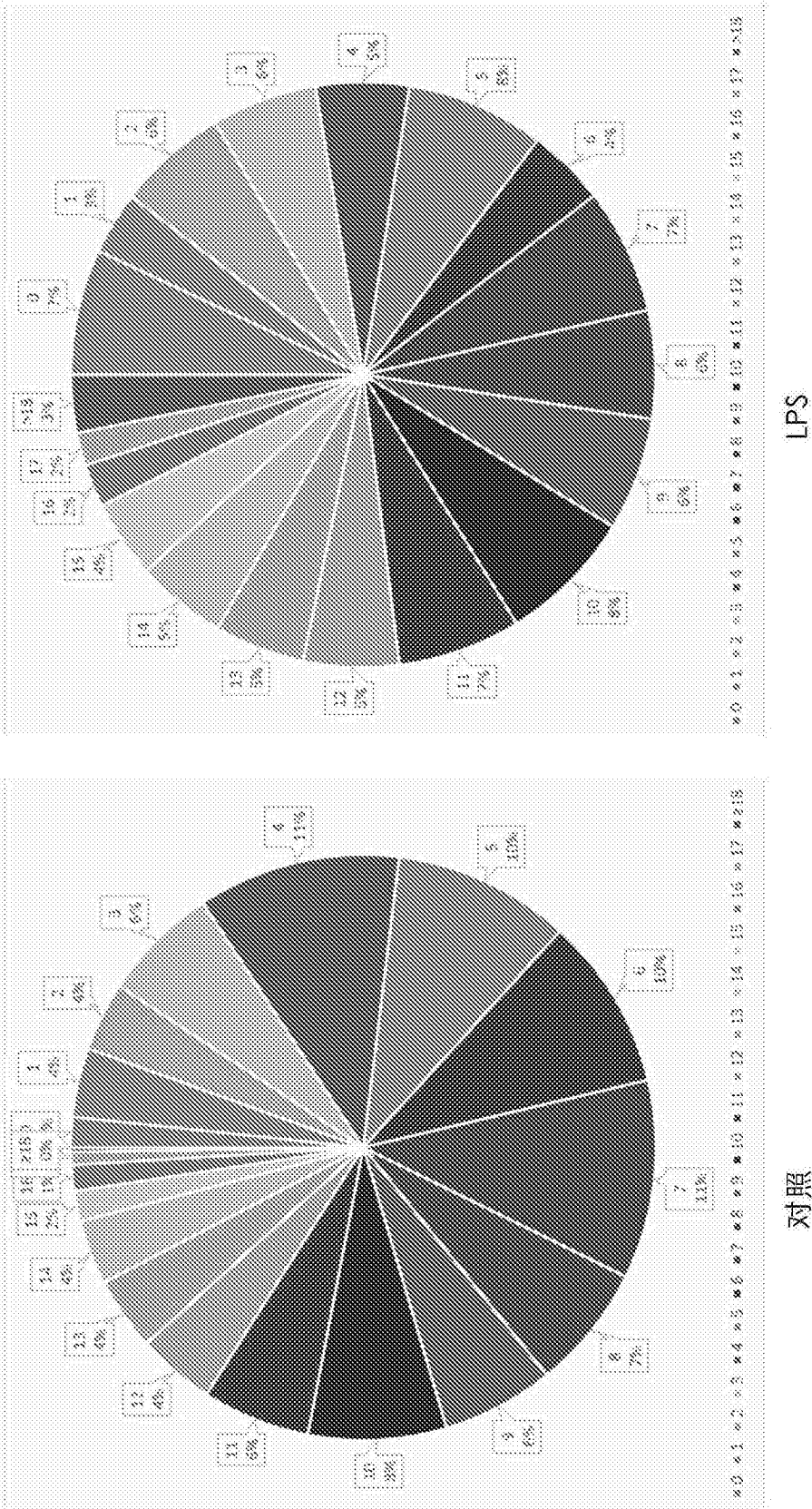


图42

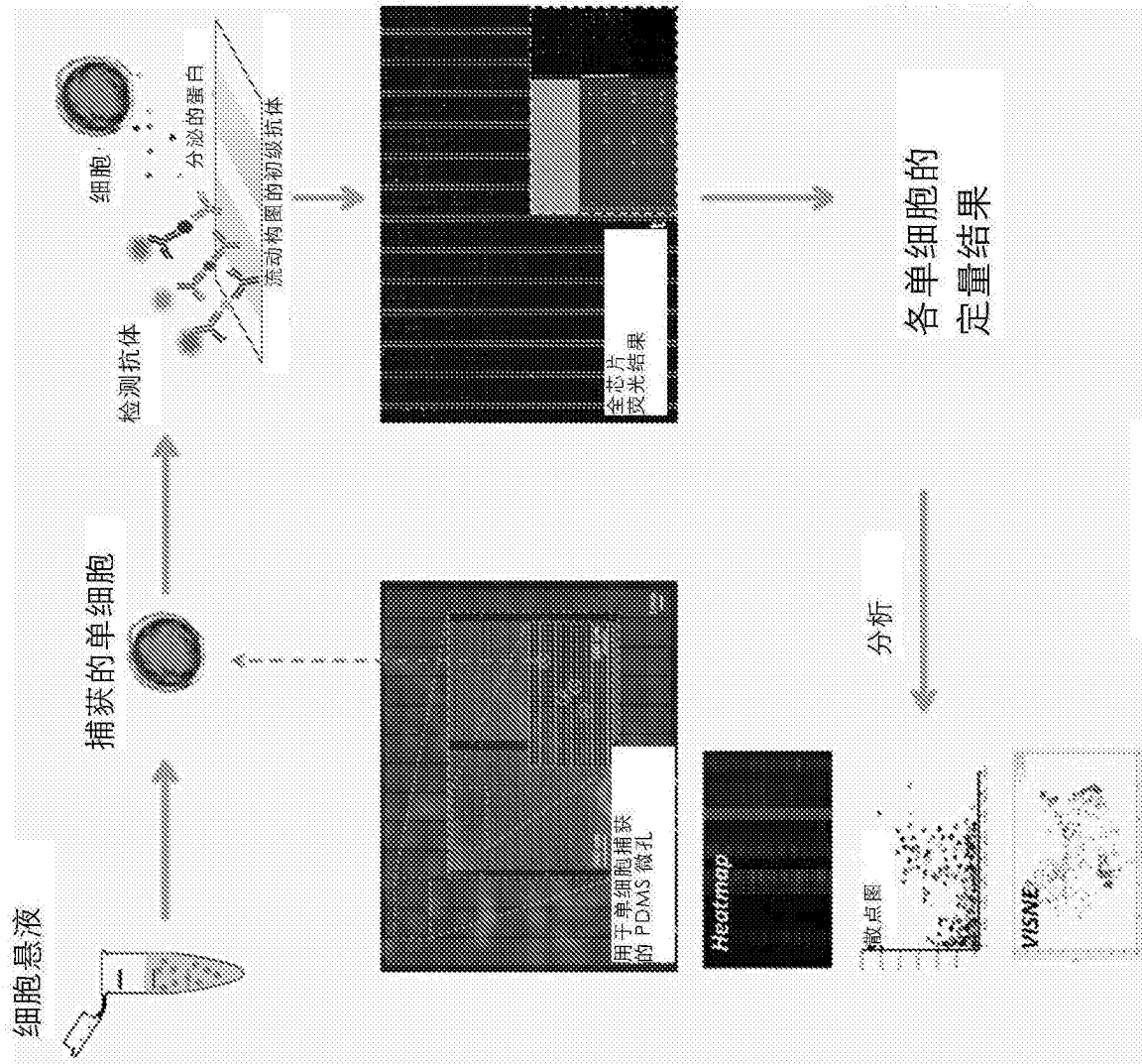


图43

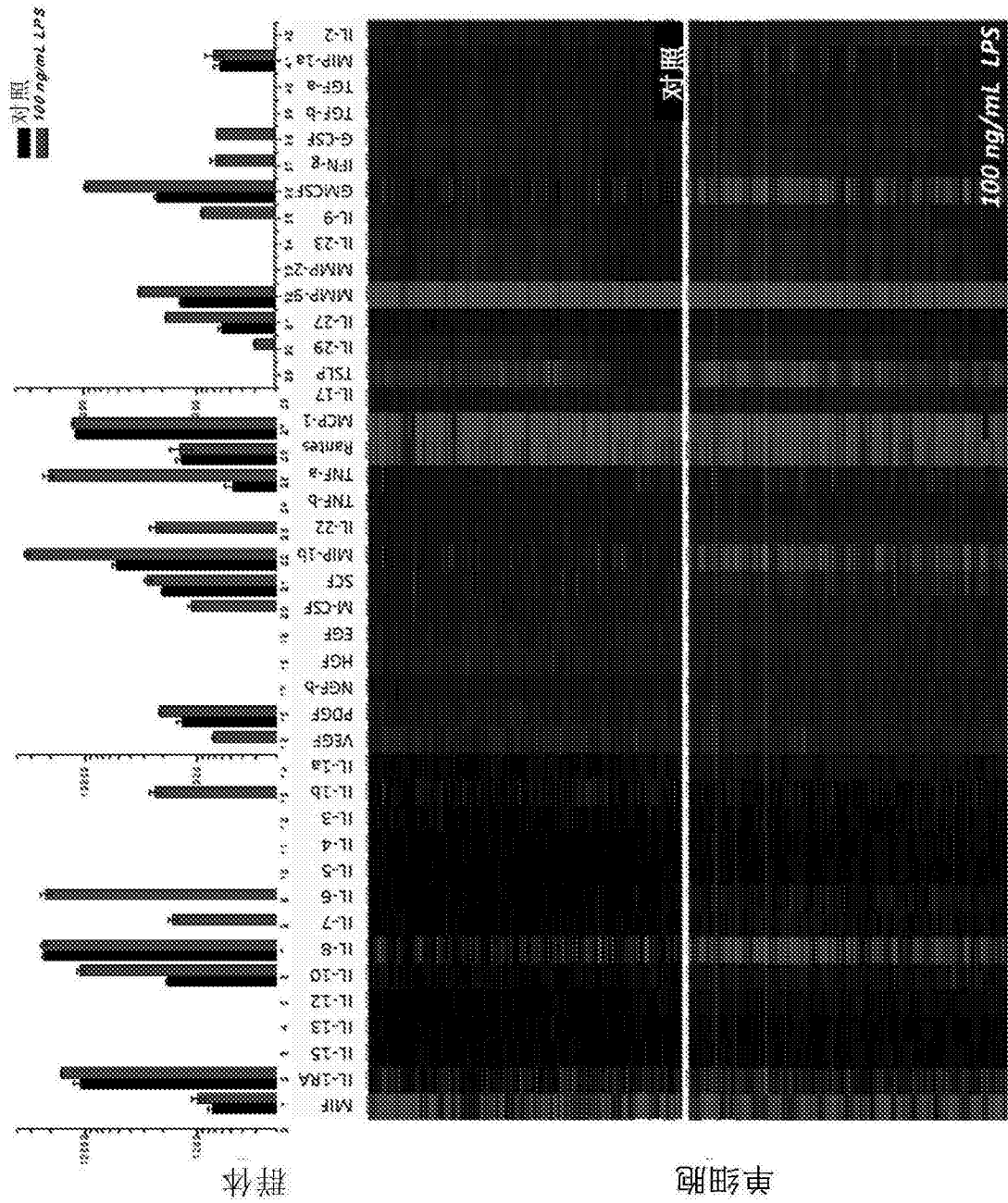


图44A

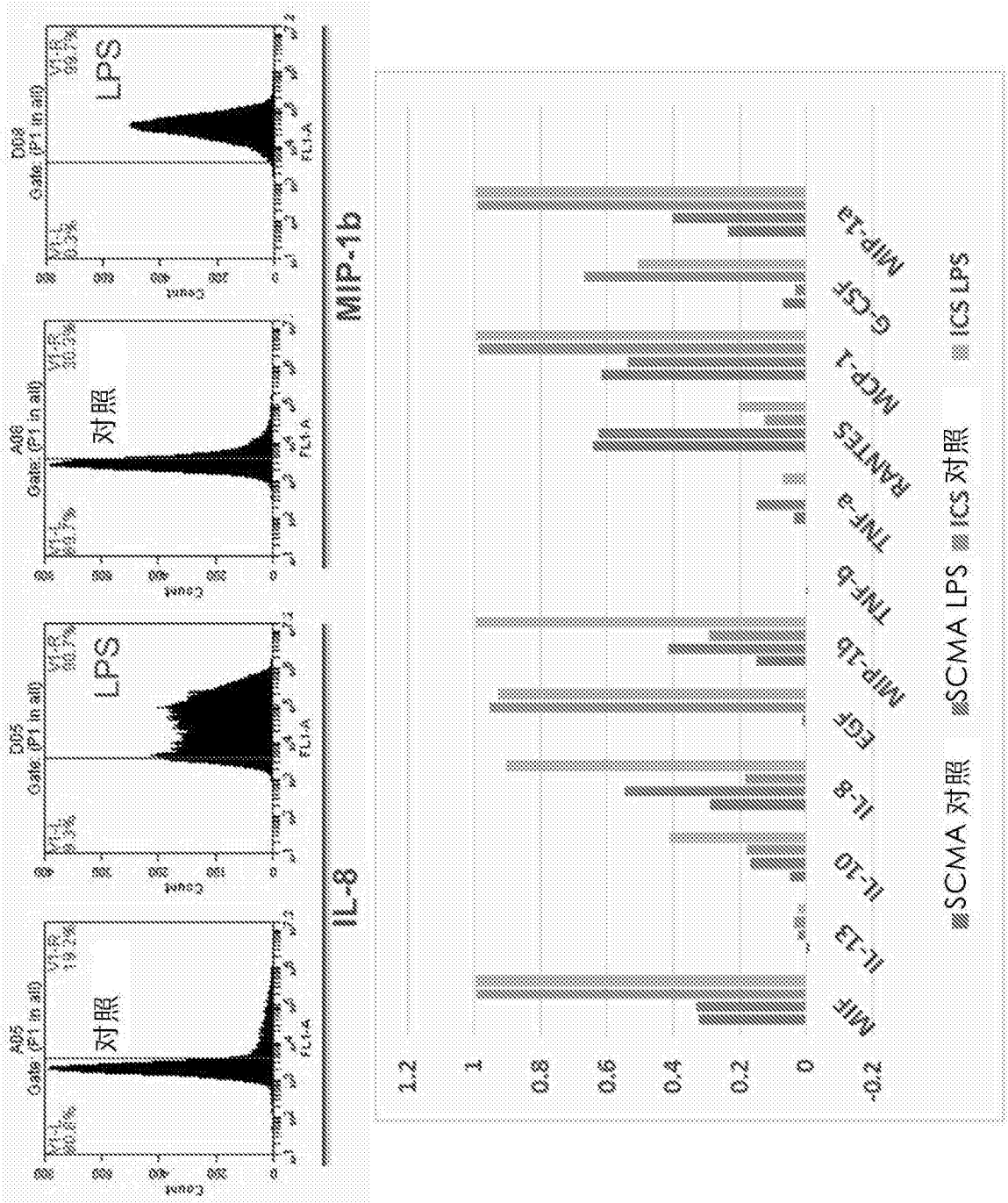
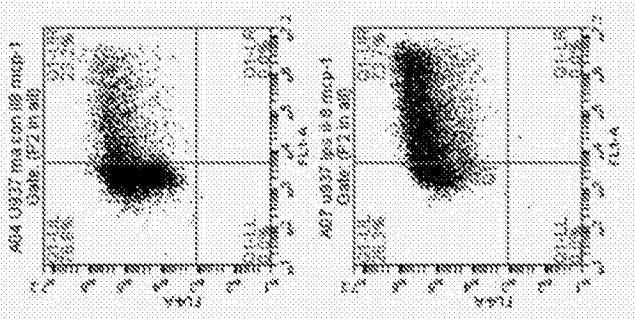


图44B

ICS IL-8 vs MCP-1



SCBC IL-8 vs MCP-1

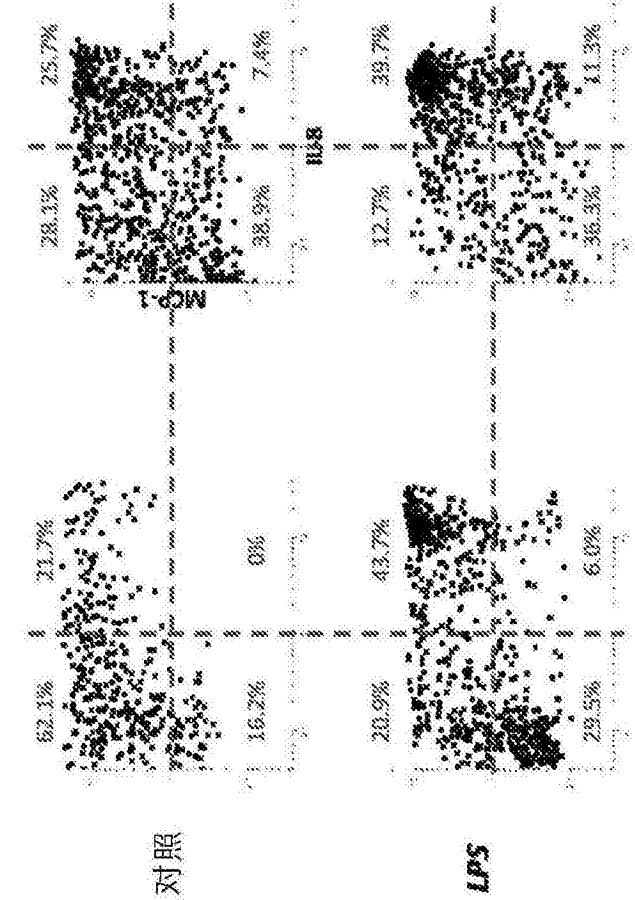


图44C

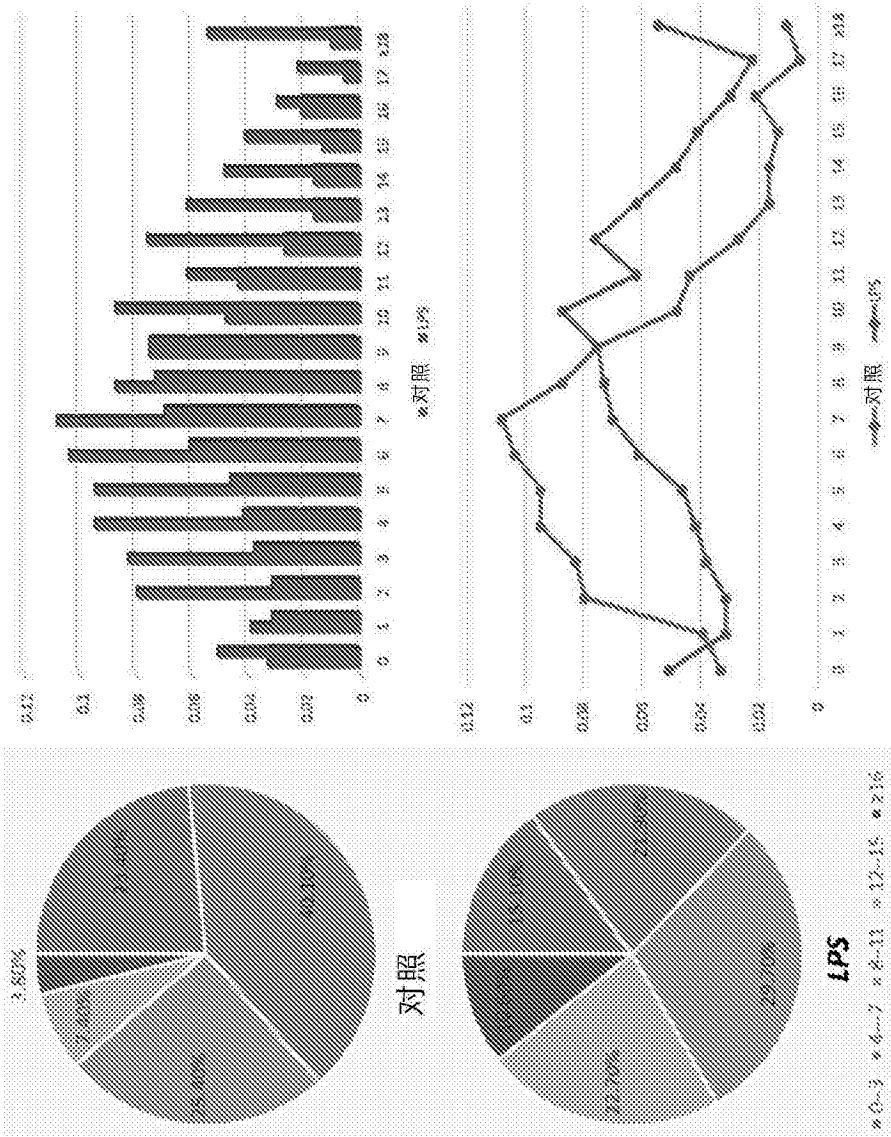


图44D

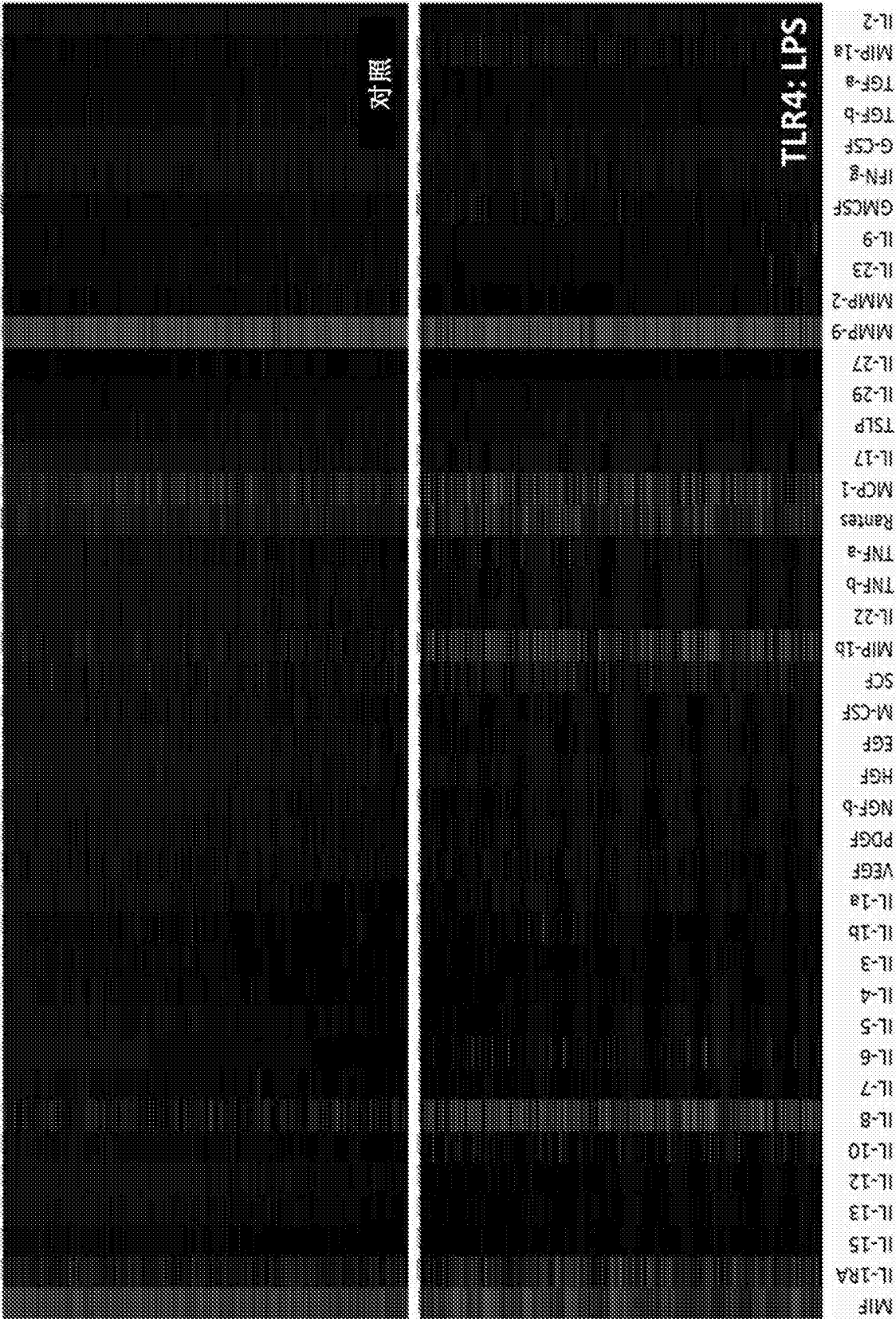


图45A

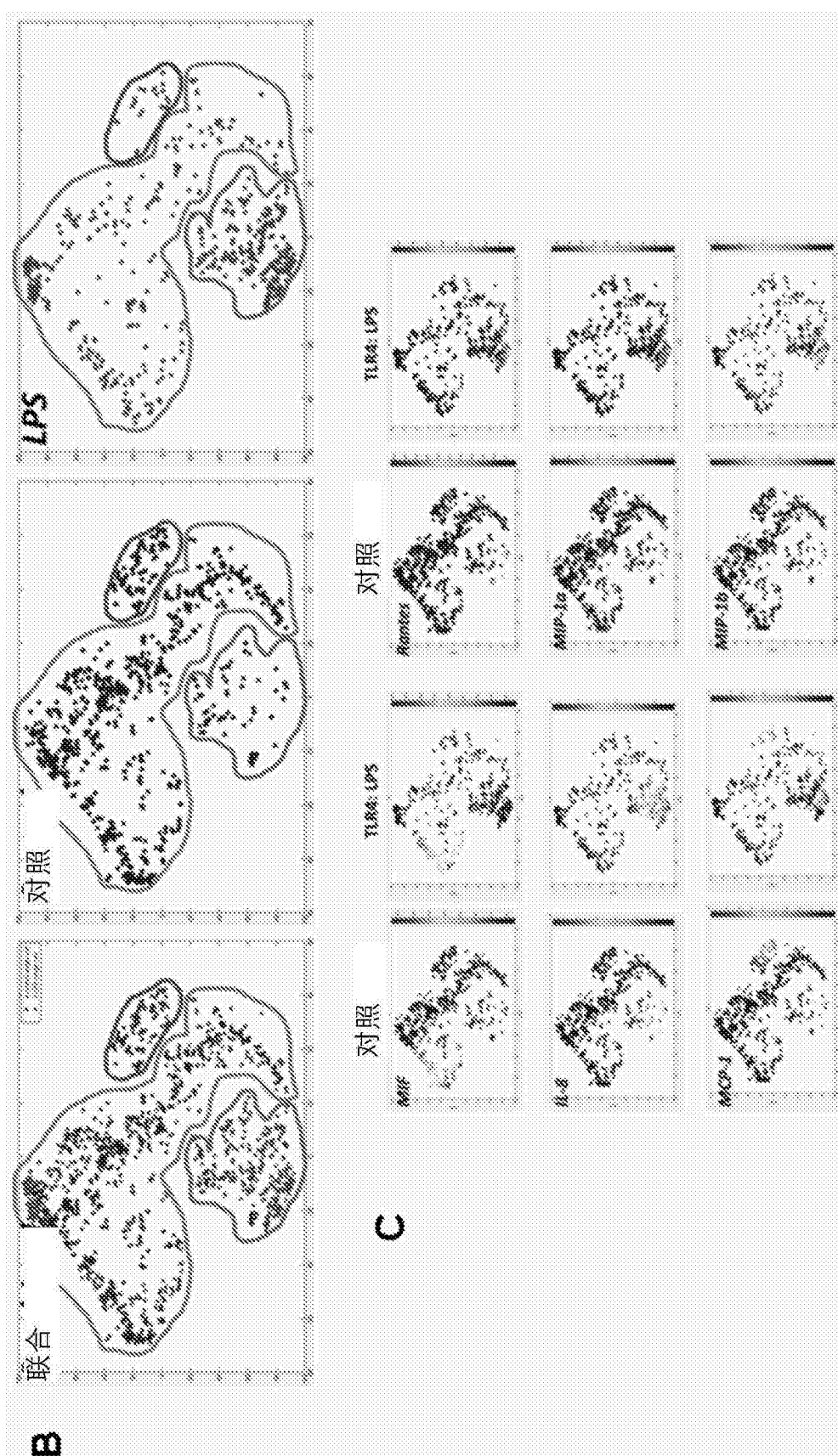


图 45B-C

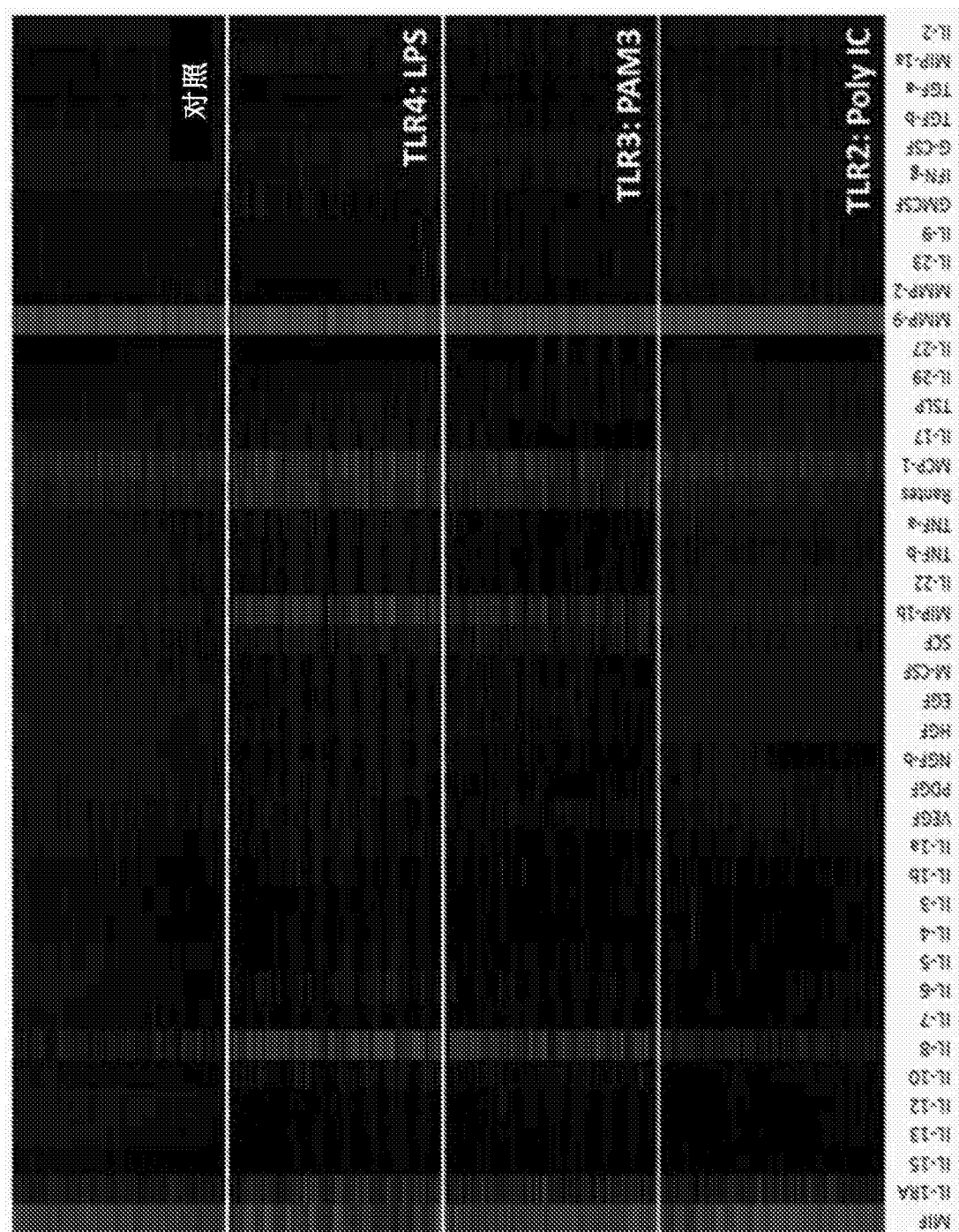


图46A

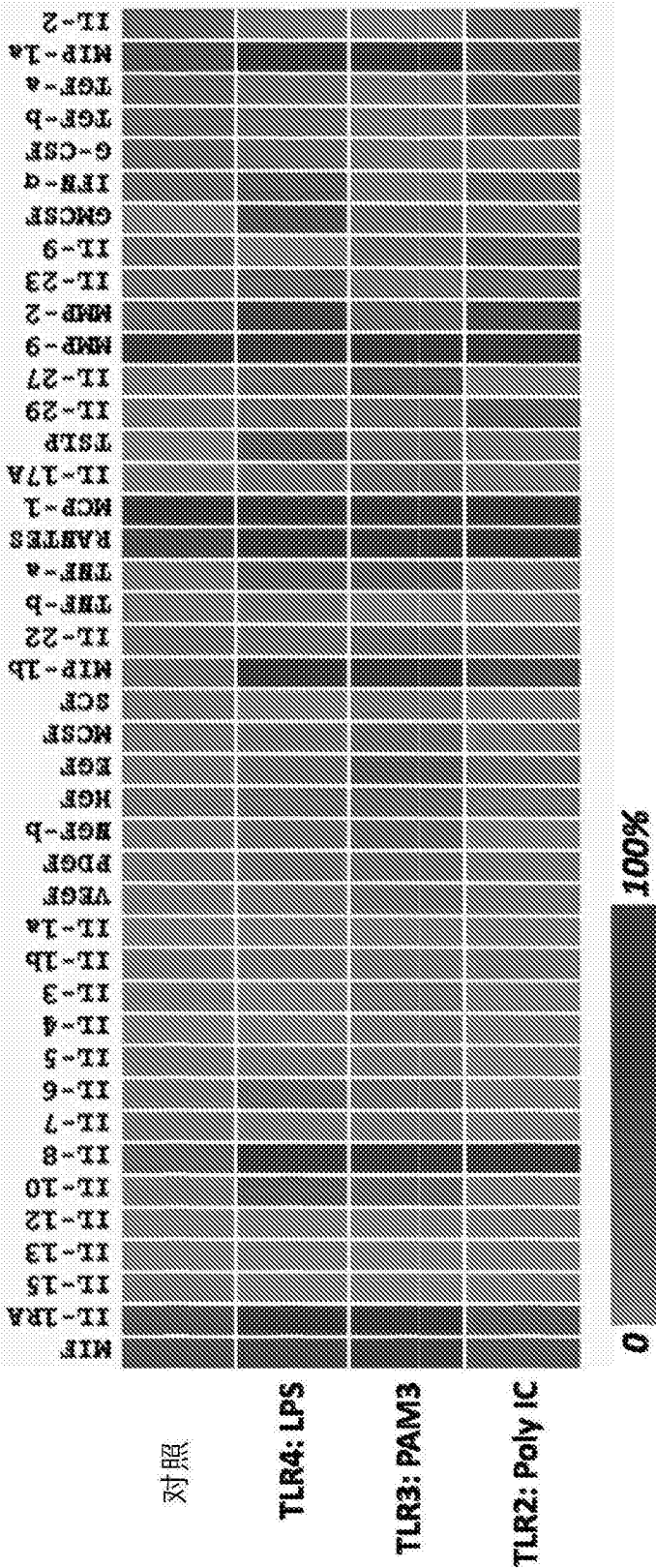


图46B

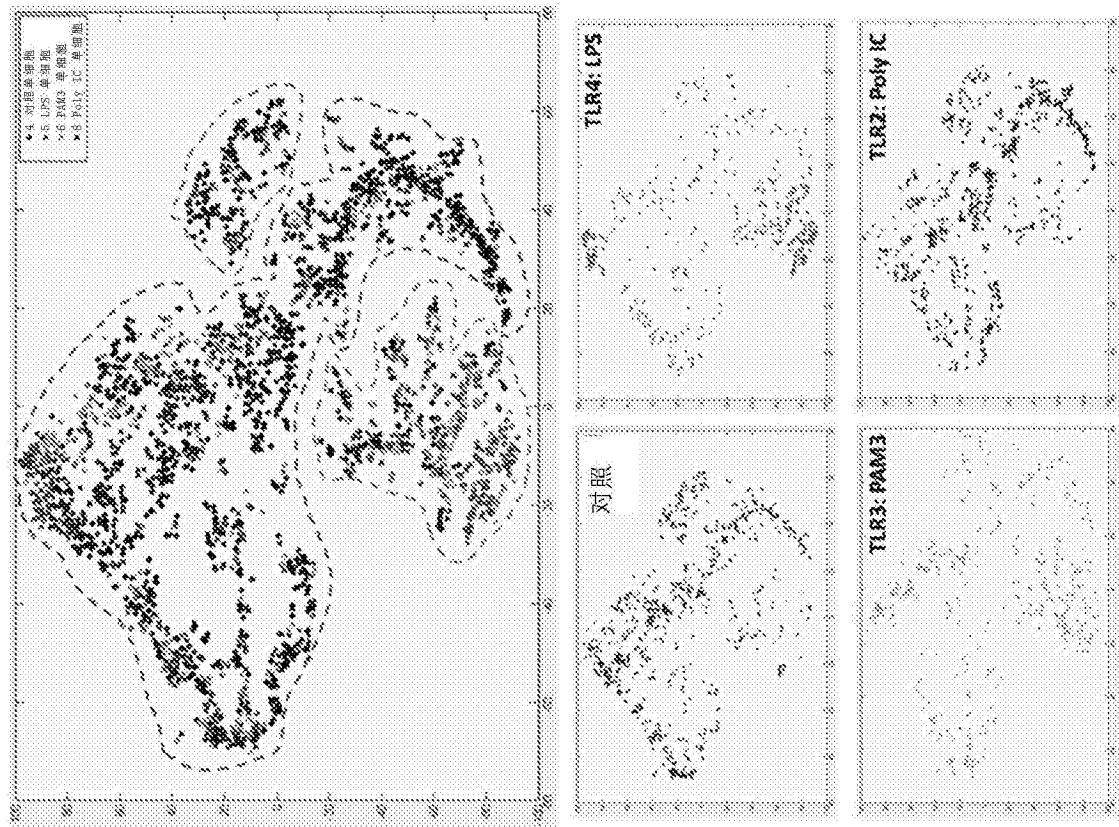


图46C

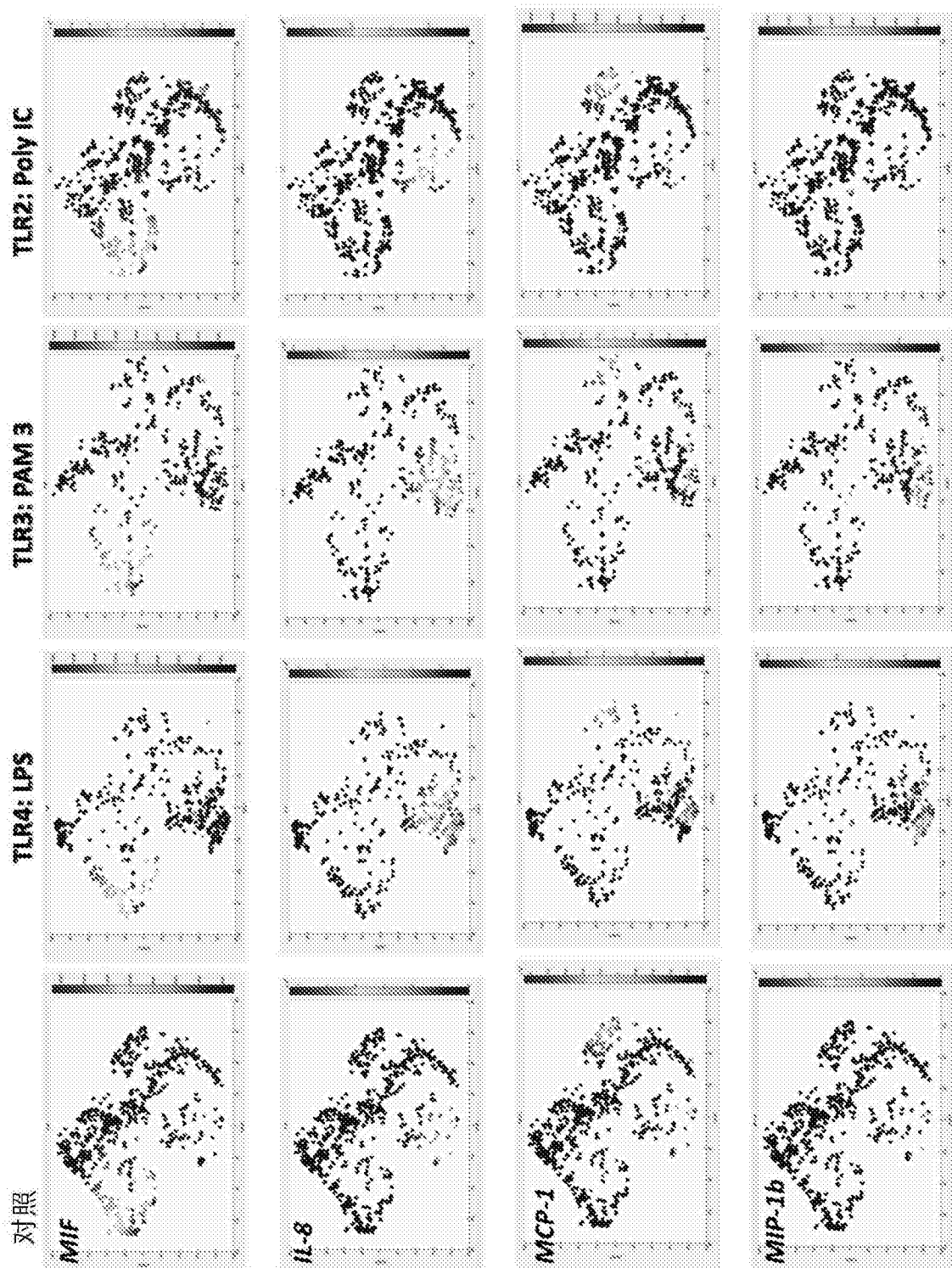


图46D

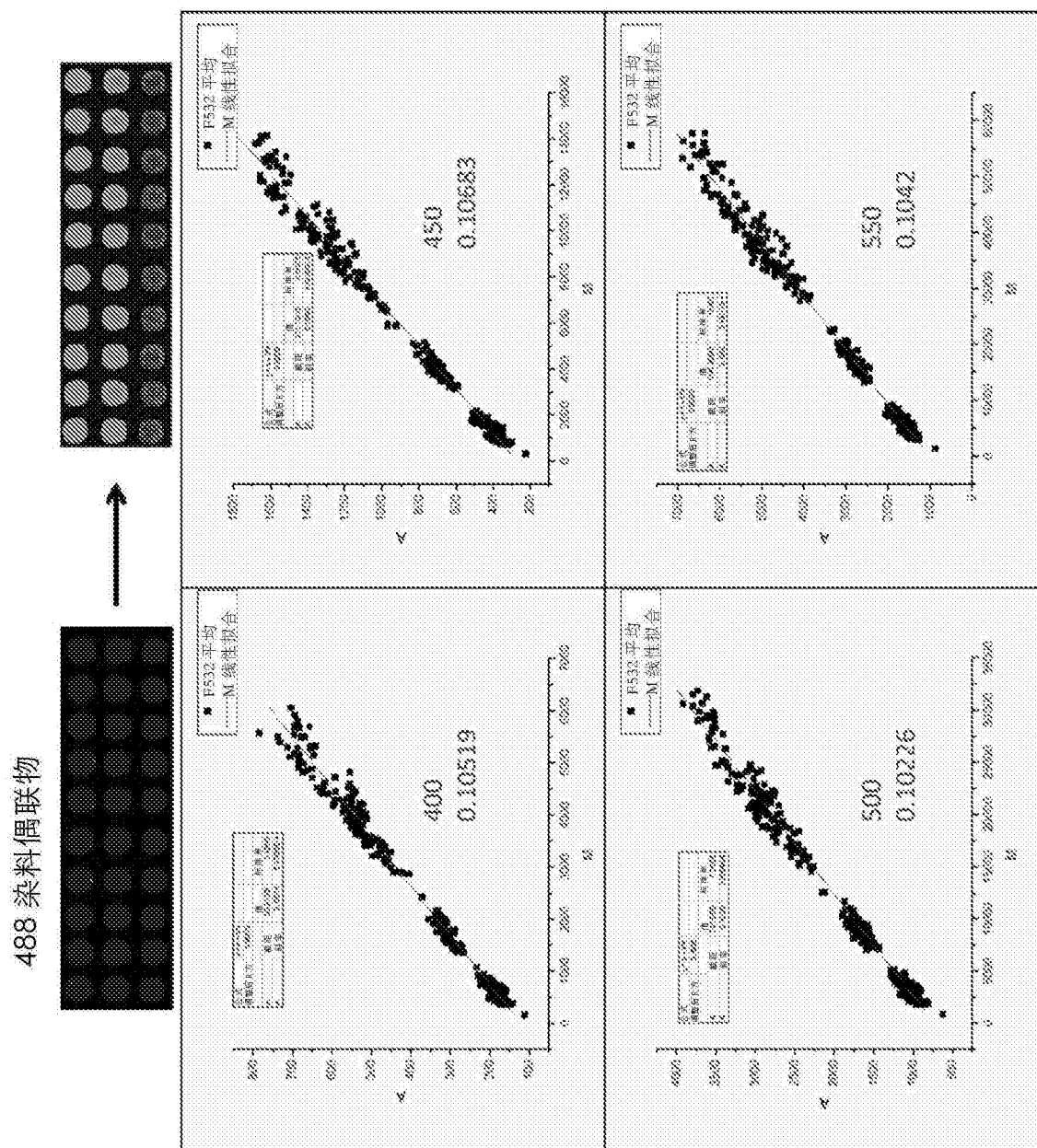


图47A

532 染料偶联物

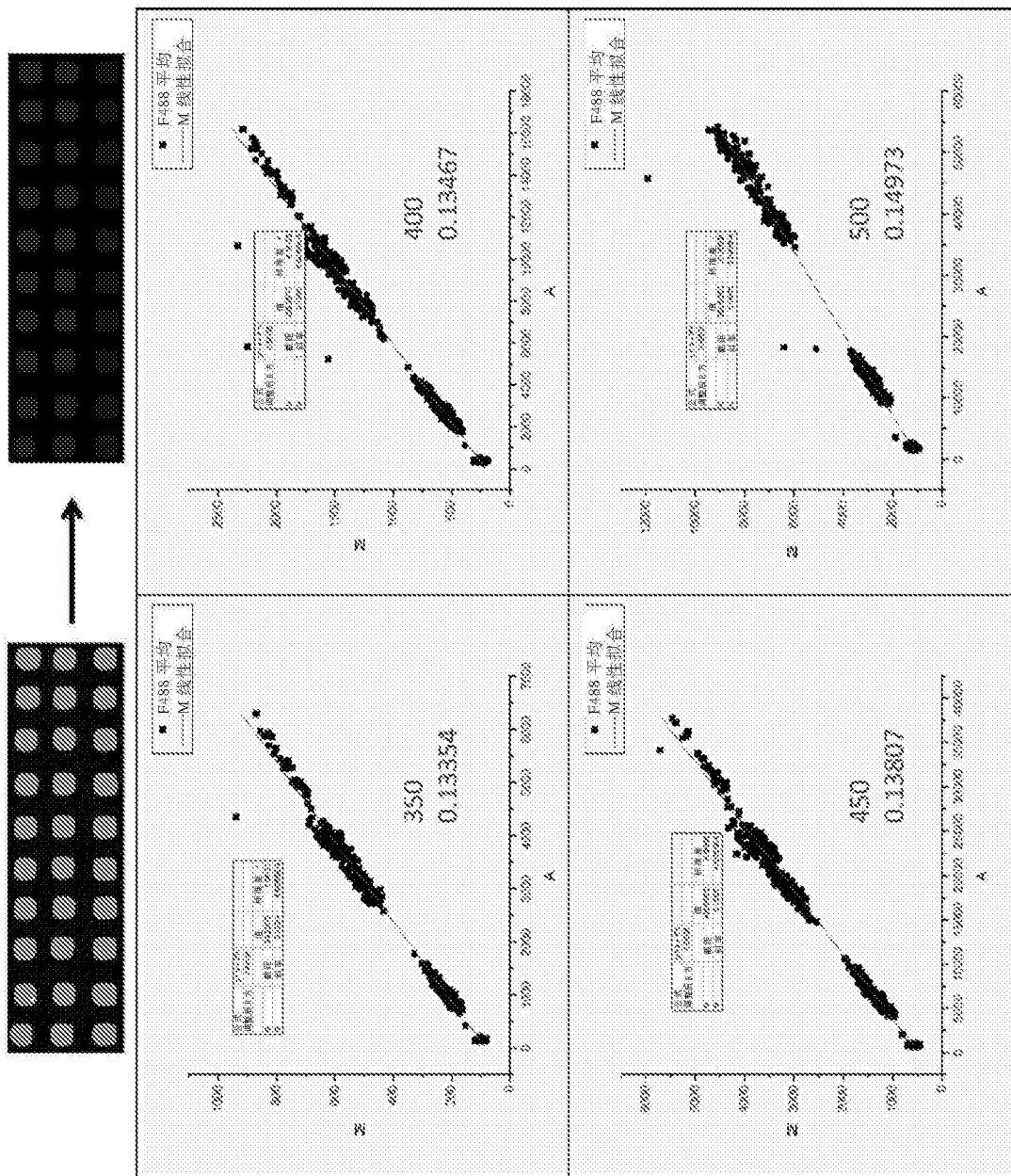


图47B

通过 CD11b(FL4)和 CD14(FL2)检测 U937 分化

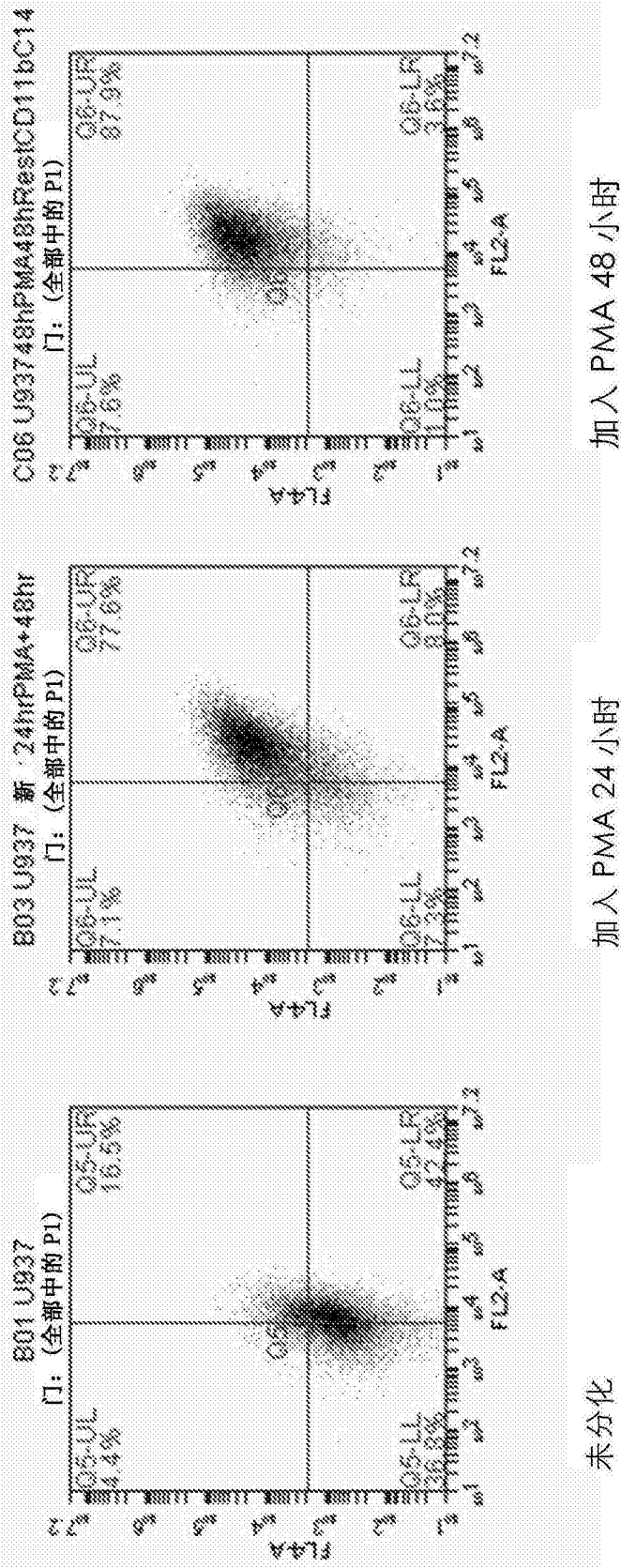


图48

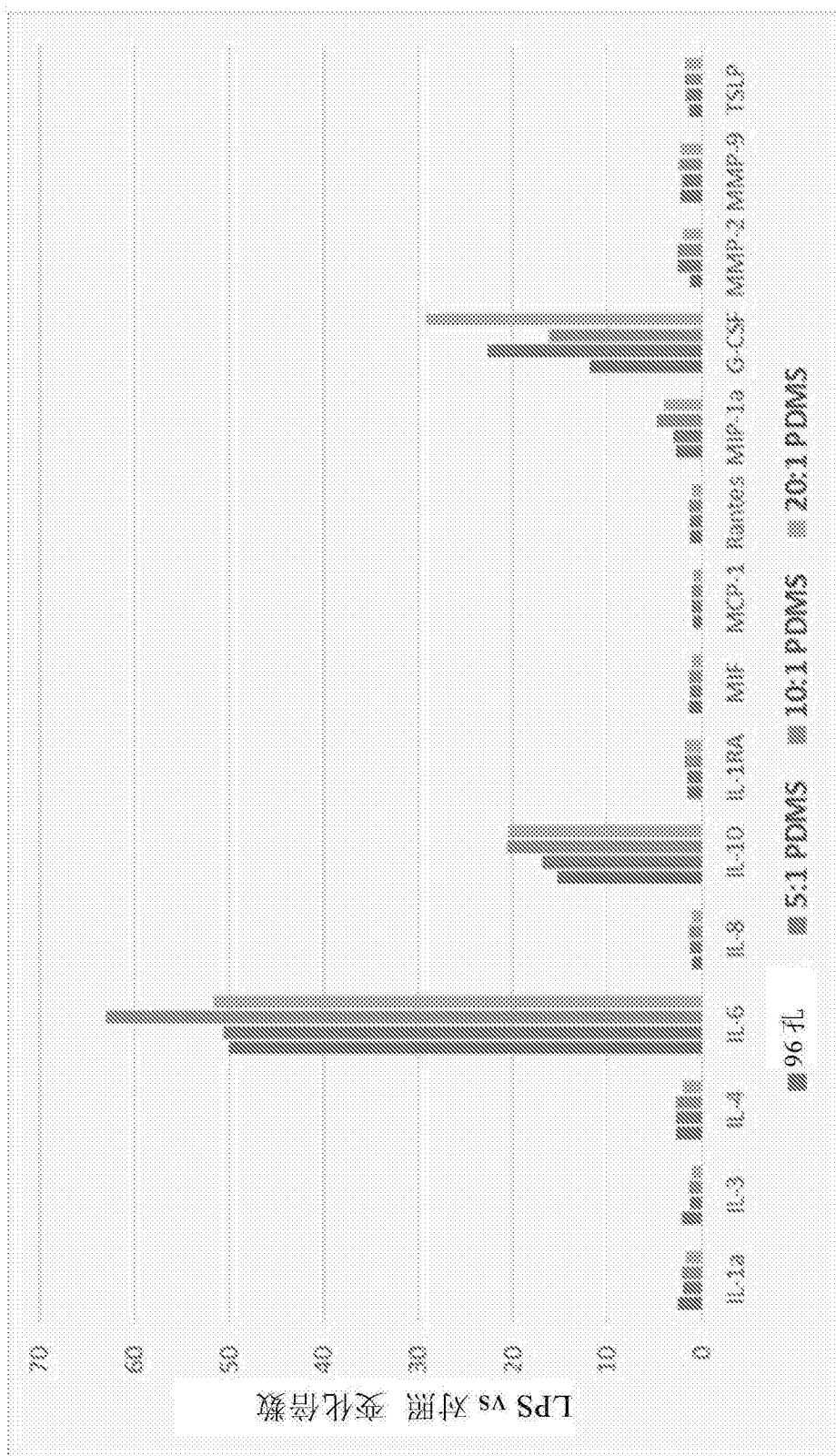


图49

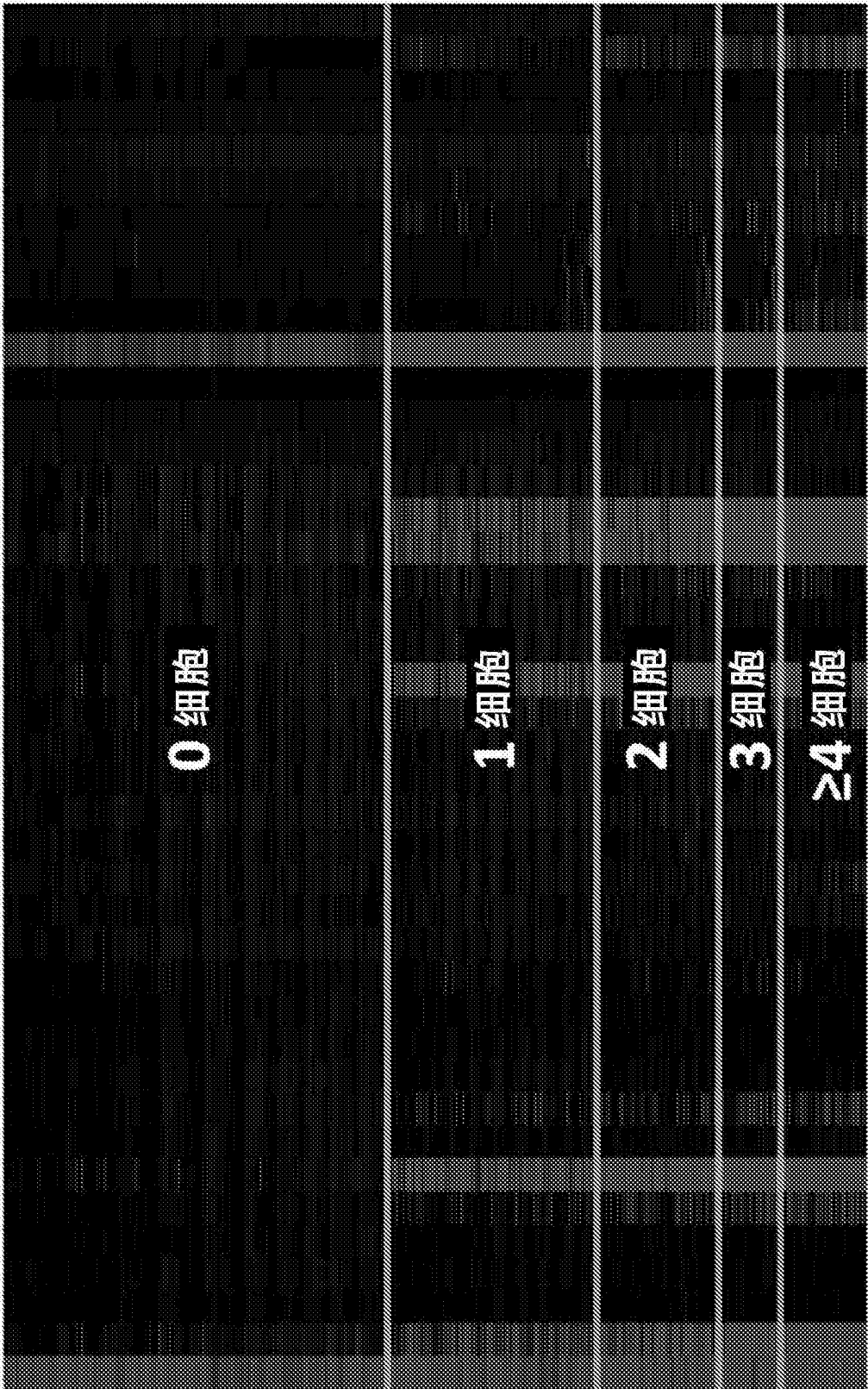


图50

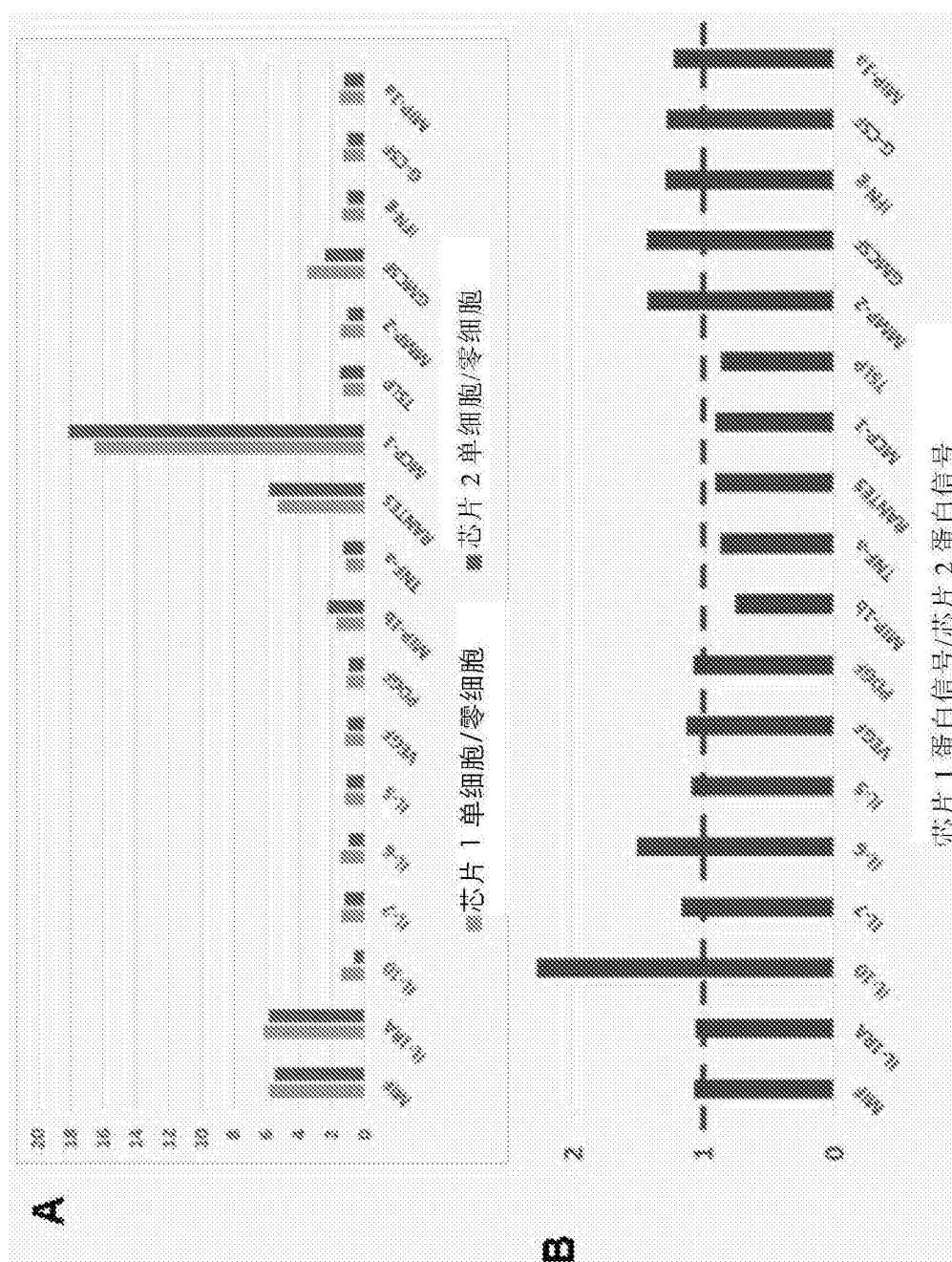


图51

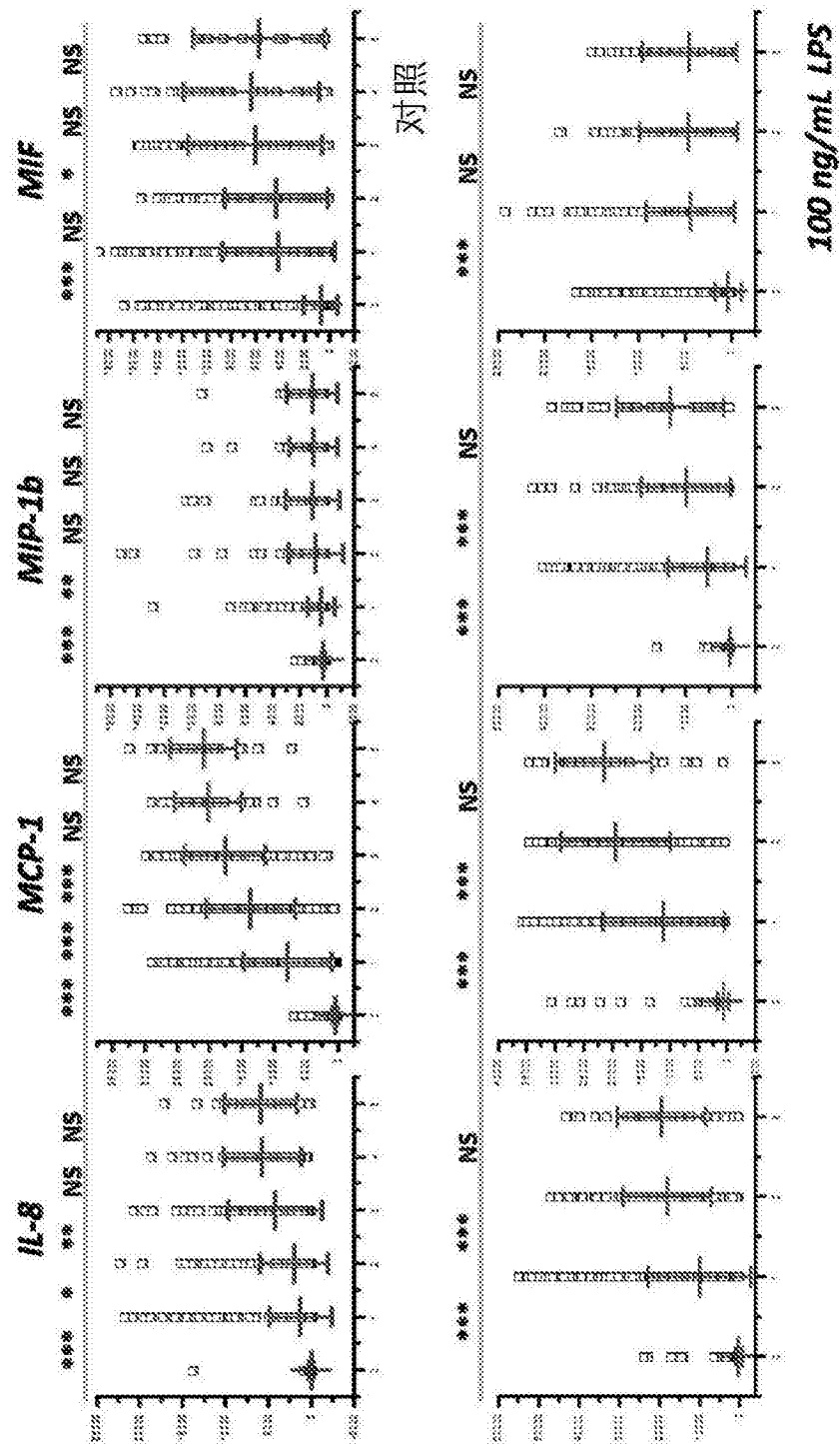
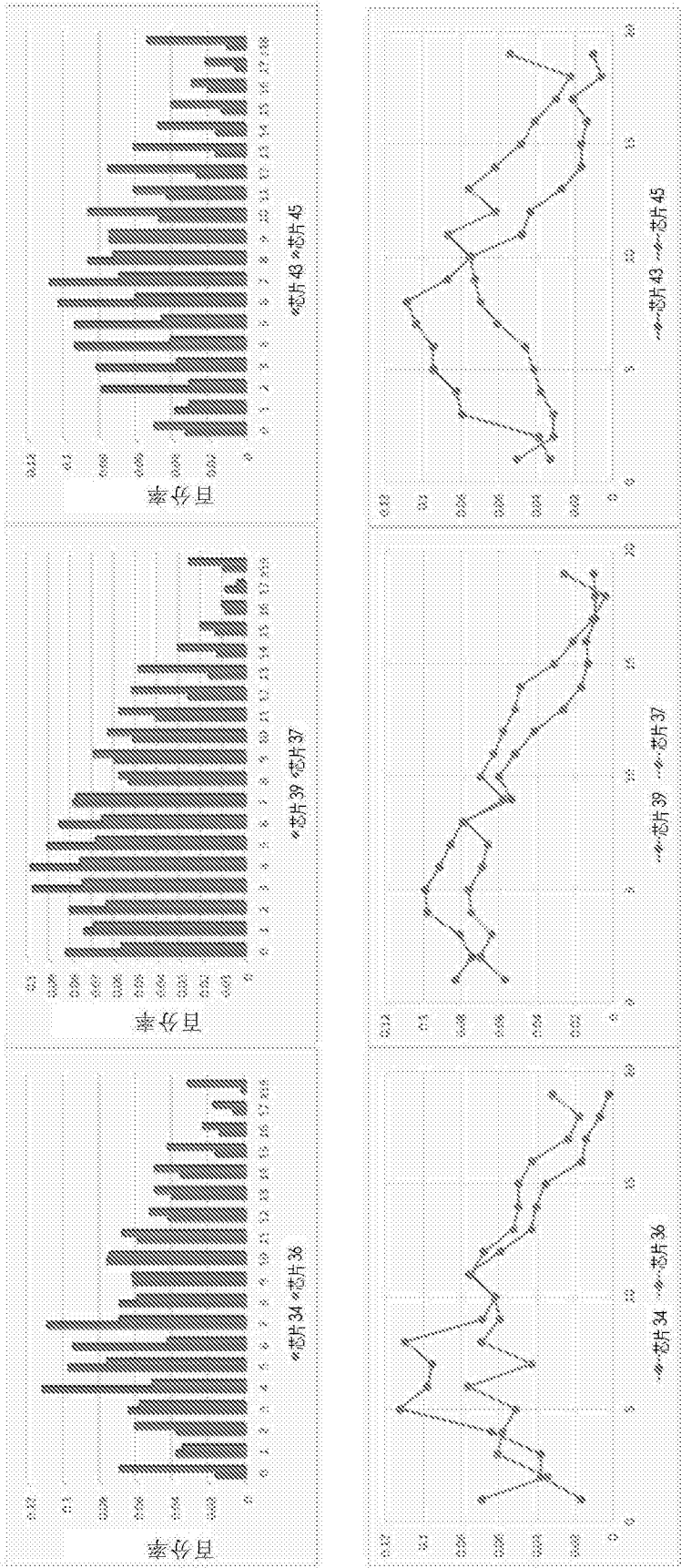


图52



蛋白分泌数量

蓝色：对照
桔色：LPS 刺激

图53A

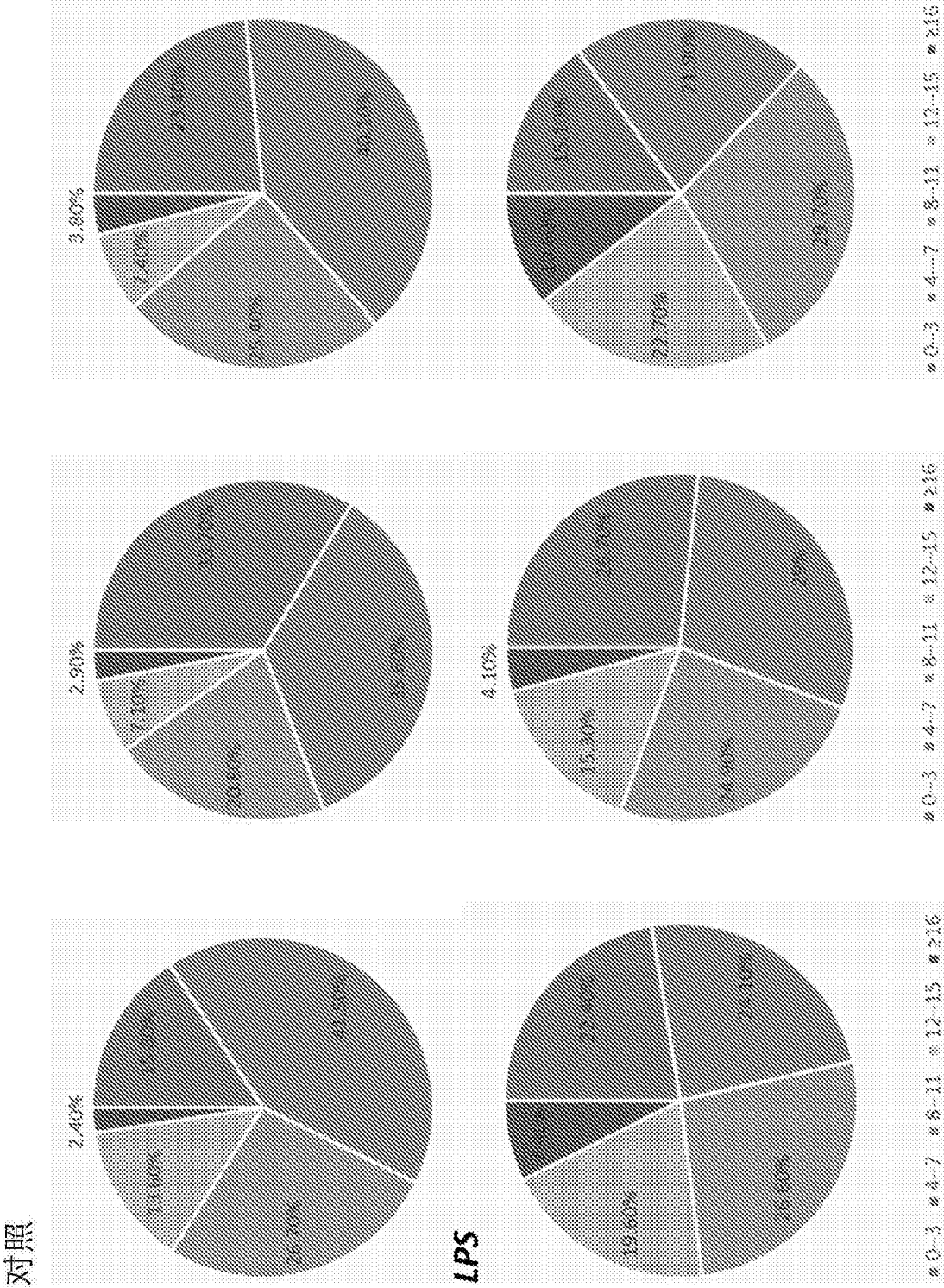


图53B

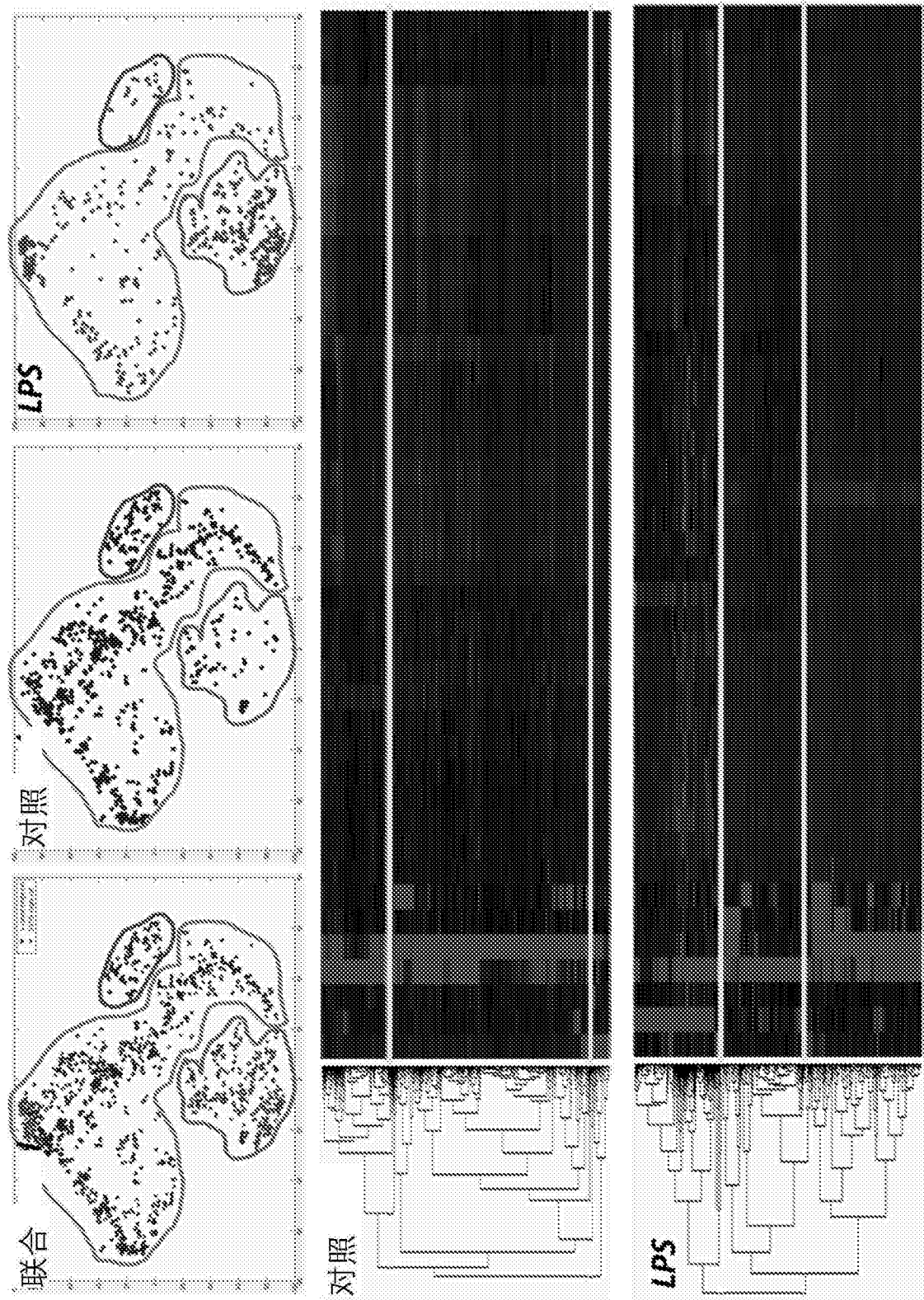


图54

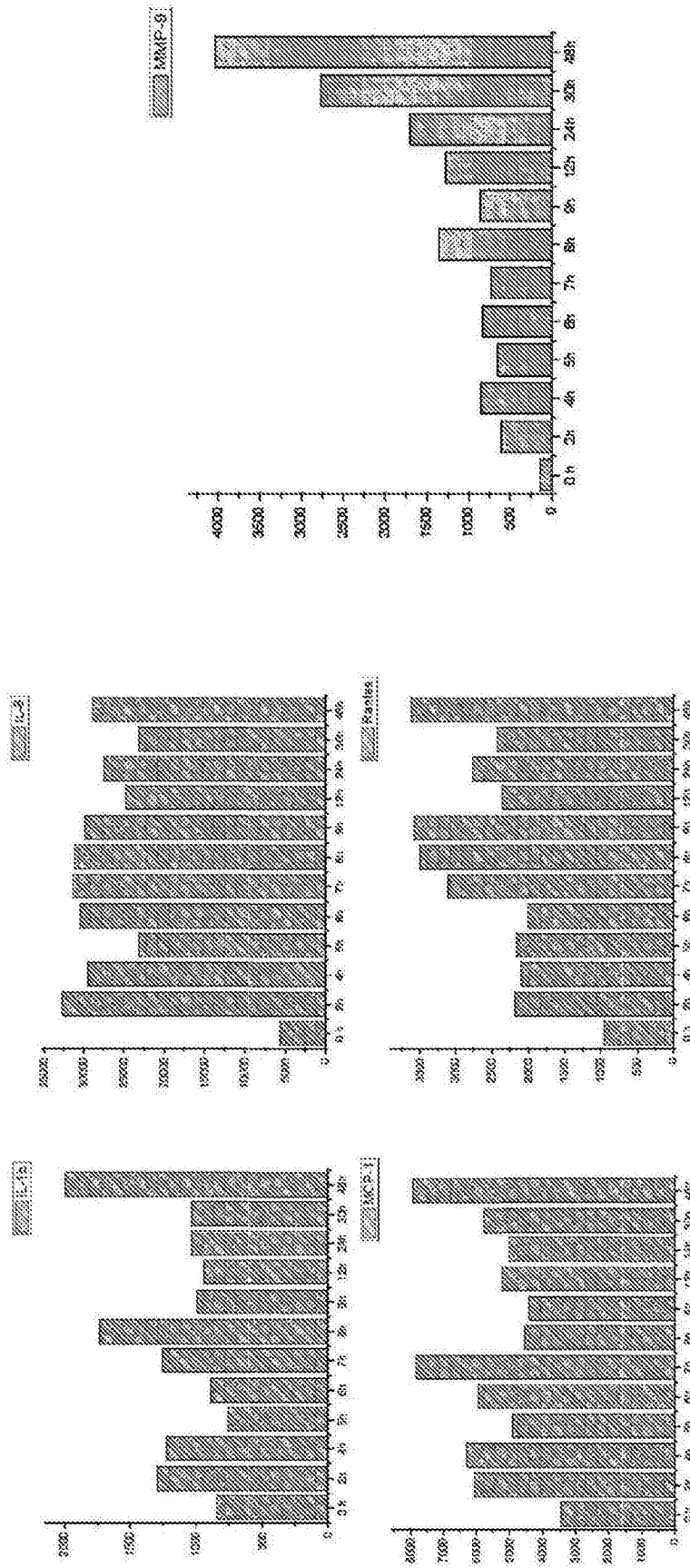
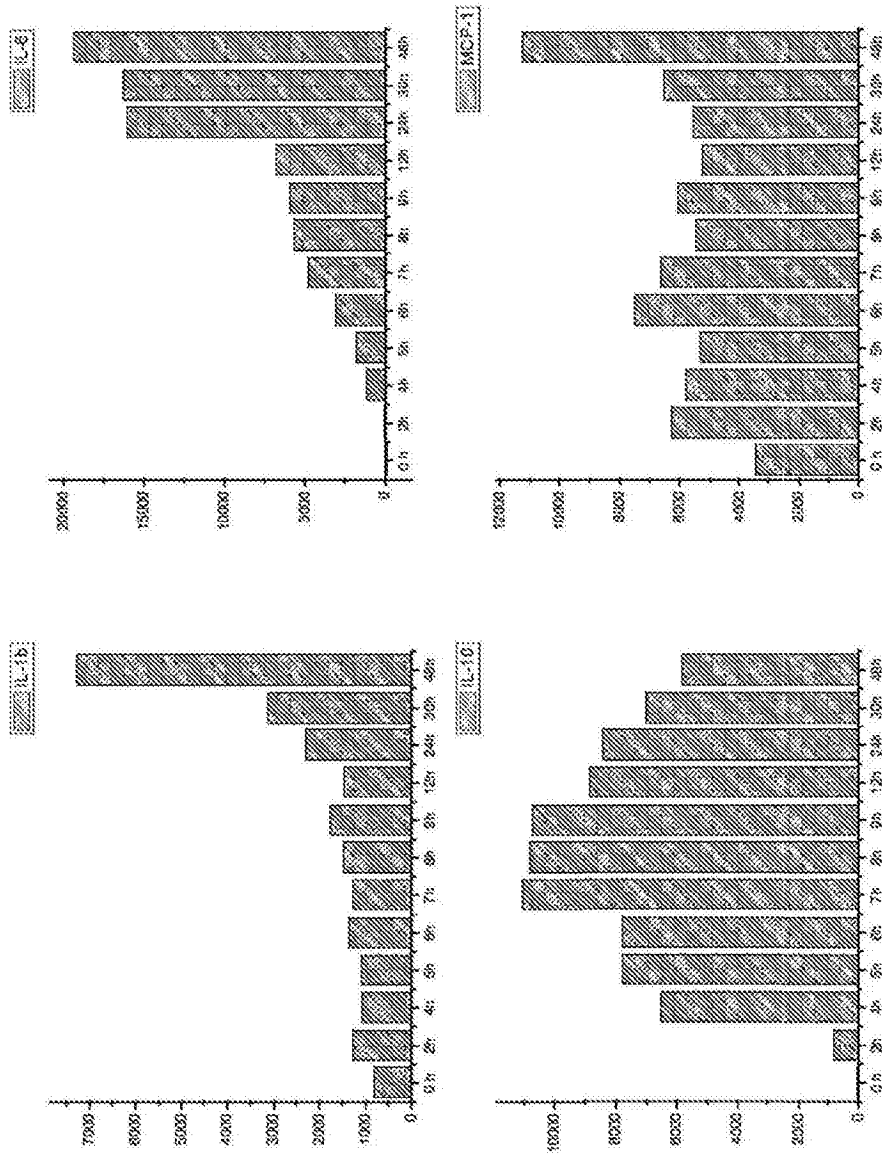


图55A



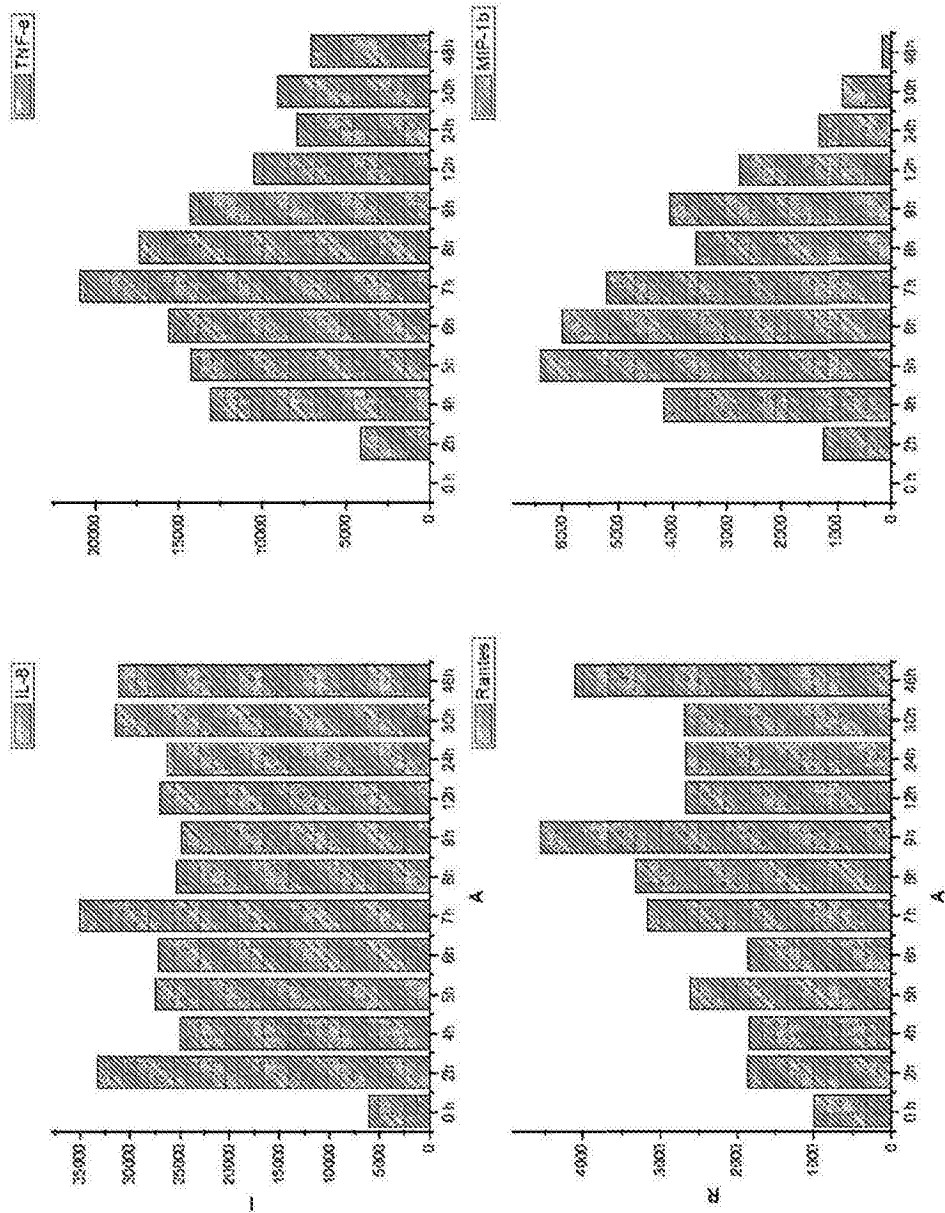


图55B(续)

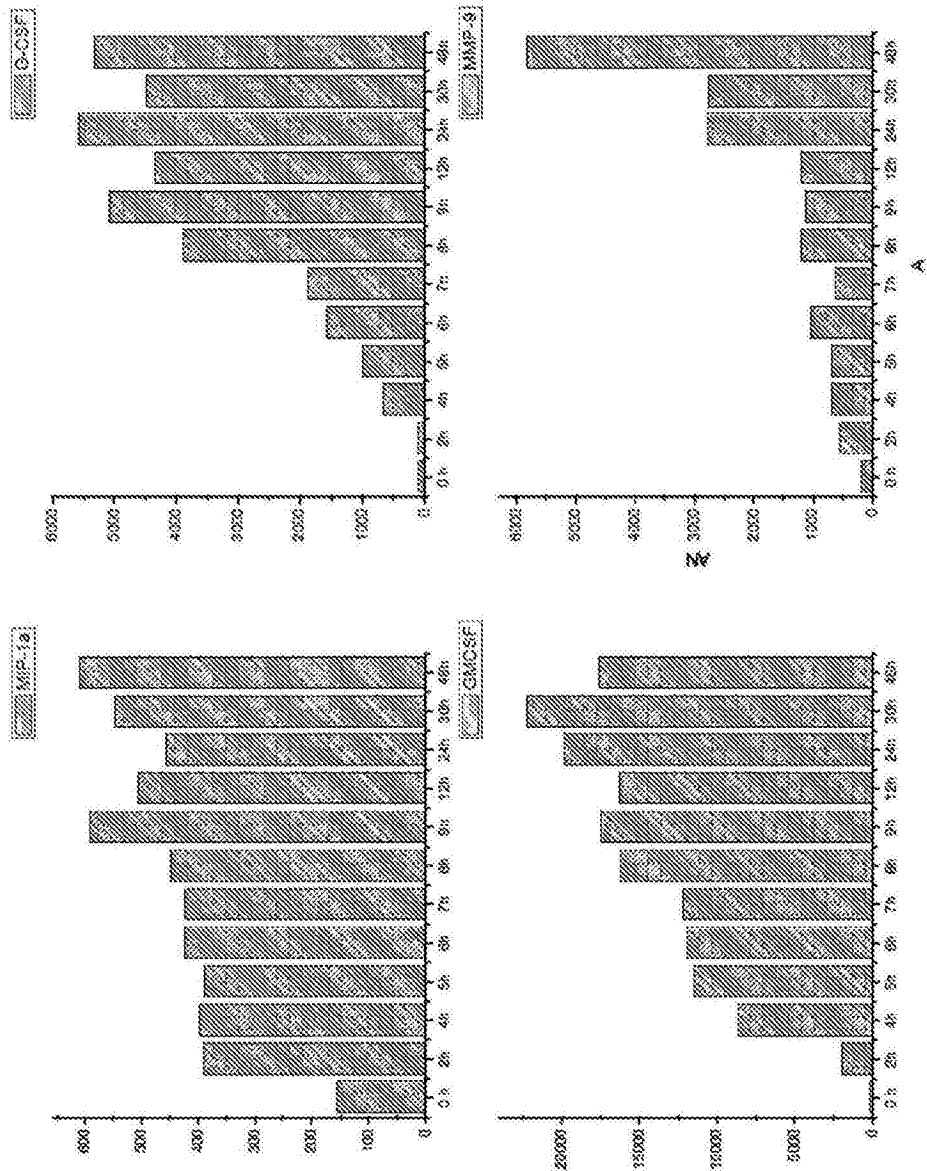


图55B(续)

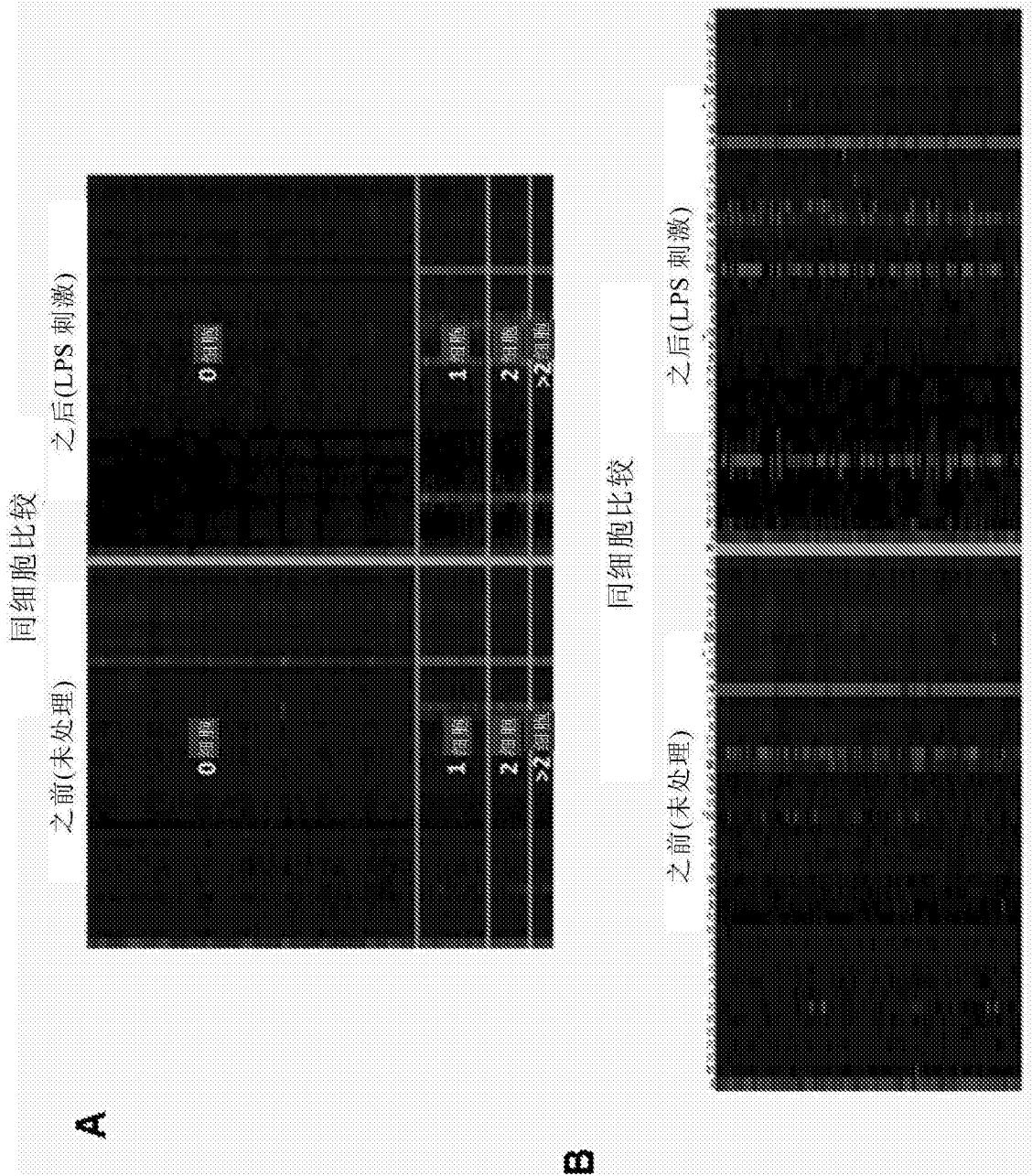


图56A-B

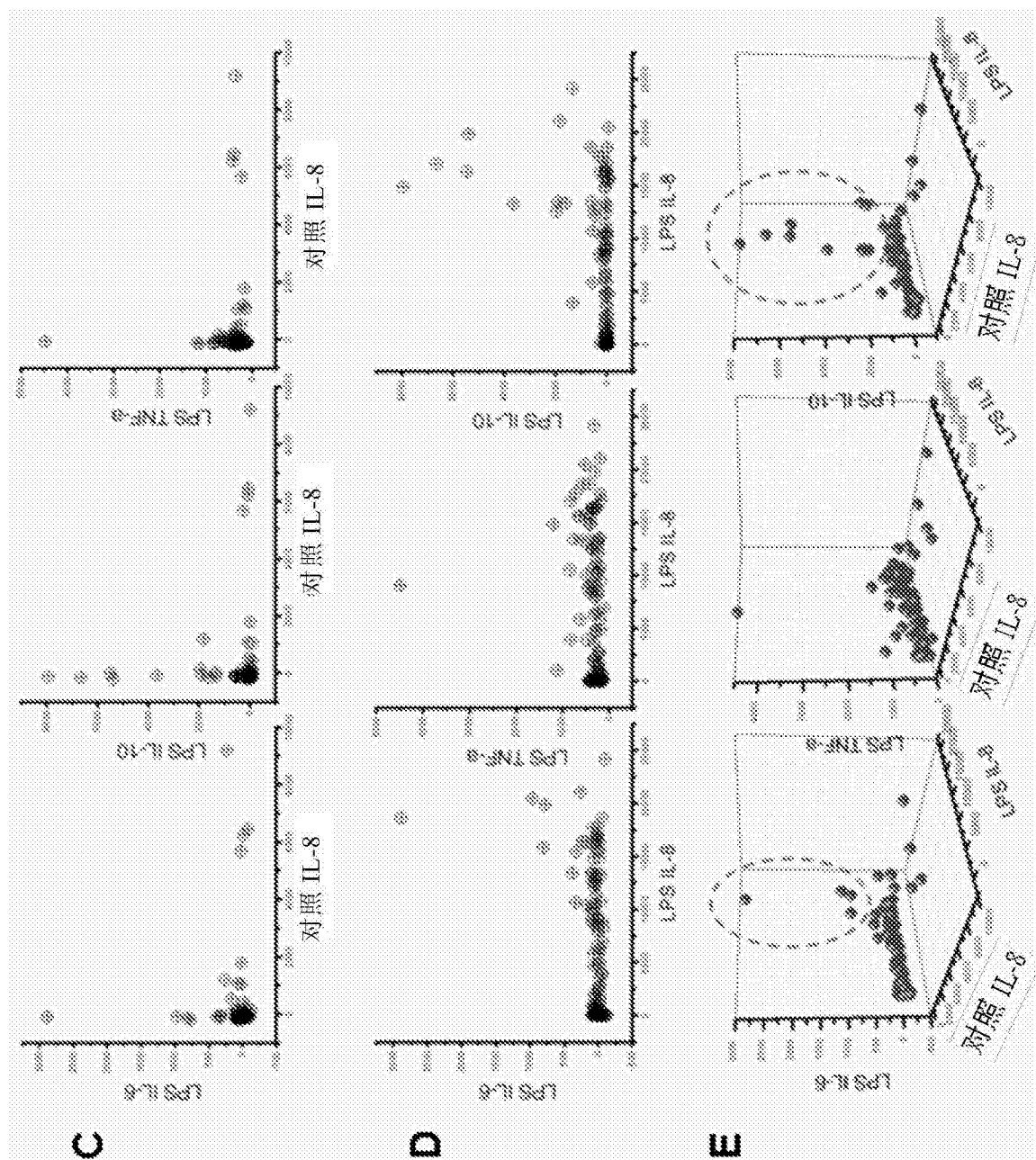


图56C-E

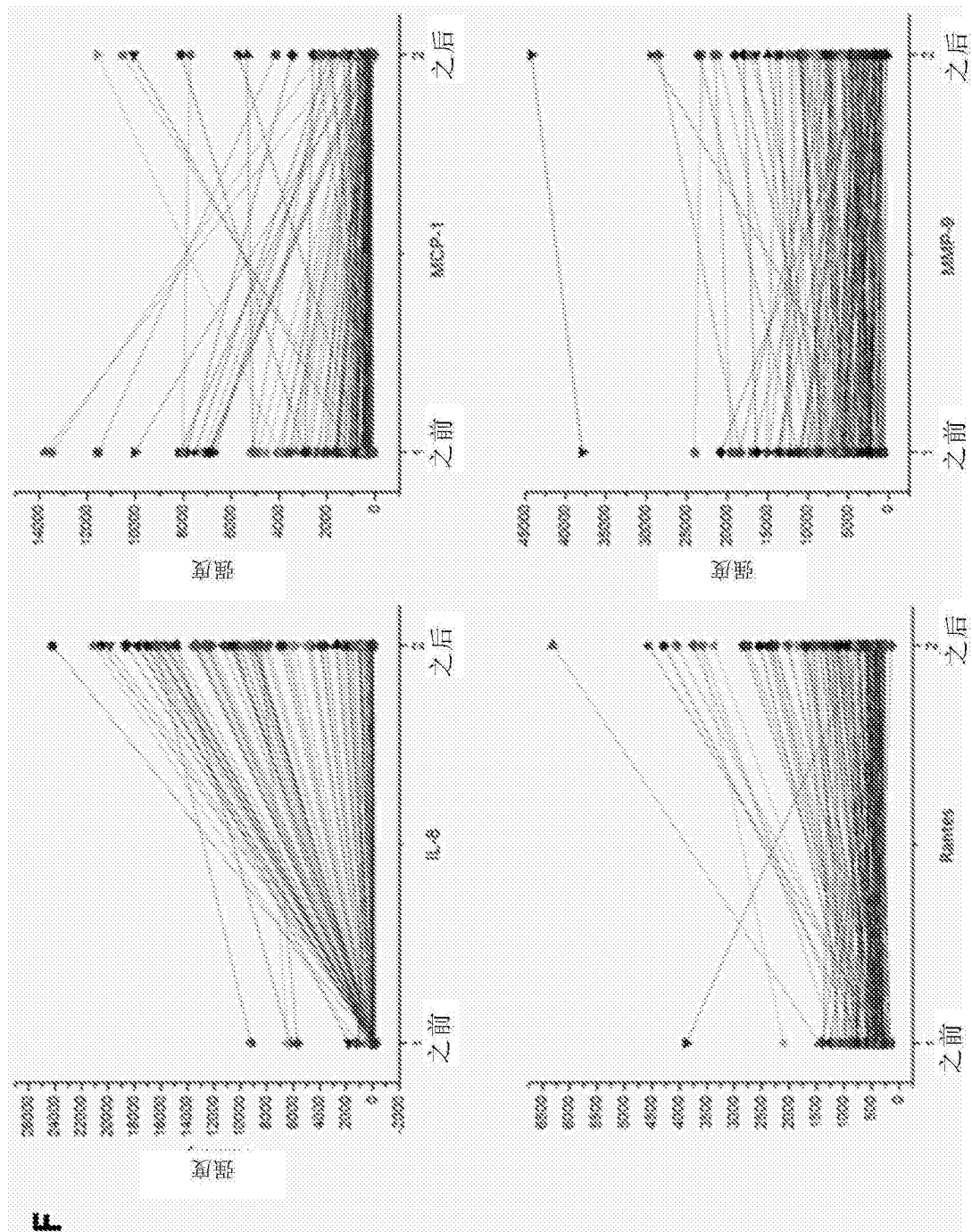


图56F

单细胞功能蛋白质组学工具	质谱细胞法 (Mass Cytometry)	IsoPlexis 微芯片装置
多重性	42-重, 可扩展	45-重, 可扩展
蛋白	表面蛋白, 胞内蛋白, “分泌”蛋白	分泌蛋白(能够延伸至表面和胞内蛋白)
通量	高(10^6 细胞每批 (per run))	低(~ 1000 每批)
成本	高($> \$1M$), 要求员工和在核心实验室中运行	低($< \$10K$), 甚至用于床边 (point of care) 应用
样品消耗	大(出色的统计力量)	小(当样本体积有限时非常有用)
活细胞回收	否(所有的细胞在 ICP 中破坏)	是(分泌的蛋白); 否(胞内蛋白)
	相互补充	

图57