



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105074003 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201380059319. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 09. 12

C12Q 1/24(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/04(2006. 01)

61/700, 517 2012. 09. 13 US

C12N 5/00(2006. 01)

61/729, 127 2012. 11. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 13

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/059485 2013. 09. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/043365 EN 2014. 03. 20

(71) 申请人 哈佛大学校长及研究员协会

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 阿列克谢·芬斯基 加文·麦克贝思

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

代理人 董世豪 张淑珍

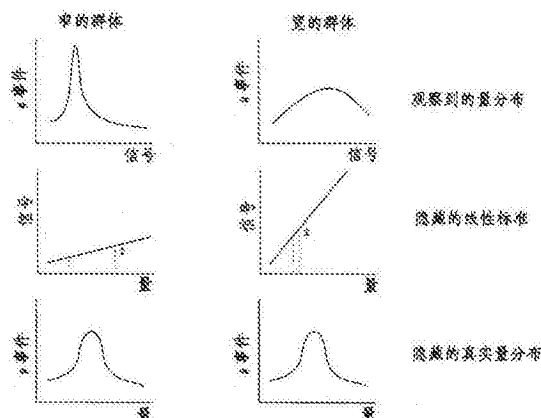
权利要求书1页 说明书45页 附图35页

(54) 发明名称

实体组织的单细胞中的多元分析测量的方法

(57) 摘要

本发明提供了用于对嵌入组织中的单细胞进行分离,同时使细胞的分子状态得以保留的方法,因此,本发明使得能够将活的组织中的单个靶细胞转化成可使用分析方法进行评价的样式。



1. 一种对存在于组织中的单细胞进行裂解的方法,所述方法包括:
 - a) 识别来自组织的细胞;
 - b) 将含去污剂的裂解缓冲液与所识别的细胞的胞内空间接触;
 - c) 使所述裂解缓冲液在所识别的细胞的胞内空间内扩散一段时间,其中,从所述细胞的内部将所述细胞裂解;以及
 - d) 收集裂解物,其中,所述裂解物含有以分析上定义的状态和分析上可接近的状态保留的细胞组分,所述分析上定义的状态和分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述方法在不存在组织固定和组织解聚的情况下发生。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中,分离的细胞处于器官型培养物中。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中,通过使用抽吸通道抽吸所述裂解物而收集所述裂解物。
5. 如权利要求 4 所述的方法,其中,所述抽吸通道为弯曲的抽吸微量移液器。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中,将所收集的裂解物进一步施用至硝化纤维素垫。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中,还将标准物施用至所述硝化纤维素垫。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中,使用分析方法对所述裂解物进行评价。
9. 如权利要求 8 所述的方法,其中,所述分析方法选自于由质谱法、蛋白质微阵列、RT-qPCR、RNA-Seq 和 MALDI-MS 所组成的组。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述细胞为活的实体组织的部分。
11. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述去污剂为十二烷基硫酸钠。
12. 一种对存在于组织中的细胞进行分析的方法,所述方法包括:
 - a) 识别来自组织的细胞;
 - b) 将含去污剂的裂解缓冲液与所识别的细胞的胞内空间接触;
 - c) 使所述裂解缓冲液在所识别的细胞的胞内空间内扩散一段时间,其中,从所述细胞的内部将所述细胞裂解;
 - d) 收集裂解物,其中,所述裂解物含有以分析上定义的状态和分析上可接近的状态保留的细胞组分,所述分析上定义的状态和分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态;
 - e) 将所收集的裂解物施用至固体支持物;以及
 - f) 使用分析方法评价所收集的裂解物。

实体组织的单细胞中的多元分析测量的方法

[0001] 关于政府资助的研究或开发的声明

[0002] 本发明是在美国国立卫生研究院给予的 RC1HG005354 的政府支持下进行。美国政府对本发明享有一定的权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求 2012 年 9 月 13 日提交的美国临时申请序列 No. 61/700, 517 和 2012 年 11 月 21 日提交的美国临时申请序列 No. 61/729, 127 的优先权, 以引用的方式将各自的内容整体并入本文。

背景技术

[0005] 在过去的 50 年里, 生物研究主要基于细胞系和分离的细胞培养物进行, 因为这些实验系统易于在实验室环境中进行处理, 并为研究提供了大量的材料。这一趋势导致开发了许多分析方法, 所述分析方法需要大量的生物材料并易于施用至细胞系和分离的细胞培养物。例如, 蛋白质印迹、质谱法以及裂解物微阵列均需要相对大量的生物材料, 以充分利用这些方法的分析能力的优势。大量的生物材料通常通过同时裂解培养皿中大量的分离细胞而获得。作为这一持续趋势的结果, 用于对实体组织中的单细胞进行取样和分析的方法的开发已远远落后。

[0006] 有可能接近当前的分析方法的能力并将它们施用至单细胞的一种方式是通过组织解聚将实体组织样品简化成分离的培养物或细胞悬浮液。组织解聚可通过将胶原蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、弹性蛋白酶和 / 或链霉菌蛋白酶施用至溶液中的实体组织样品数小时来实现, 有时跟随着将解聚的组织样品磨碎 (Waymouth, 1974, *In Vitro*. 10:97-111; Engelholm 等, 1985, S. A. ; Spang-Thomsen, M., Brüner, N., Nøhr, I. 和 Vindeløv, L.L. (1985) *Br J Cancer*. 51(1):93-98; Pallavicini, 1987 *Techniques in cell cycle analysis*. 139-162)。通过这种方式, 可将人实体肿瘤细胞简化为细胞悬浮液, 以通过流式细胞术进行分析 (Dalerba 等, 2011, *Nat. Biotechnol.* 29:1120-1127)。可将啮齿动物脑组织简化为分离的神经元培养物, 可由此而来取得单个神经元用于 RT-qPCR 分析 (Morris 等, 2011, *J. Vis. Exp.* 50:pii:2634. doi:10.3791/2634)。然而, 在组织解聚后, 关于细胞定位的信息丢失。同时, 实体组织的解聚可能并不会使组织样品的所有细胞分散开。实体组织的解聚有可能杀死许多天然细胞, 并有可能相对于其它细胞群体而选择特定的细胞群体。组织解集的细胞产量随组织类型而不同。1g 组织包含约 1×10^9 个细胞, 然而组织解聚程序的一般产量低于 1×10^8 细胞 /g (Pallavicini, 1987, *Techniques in cell cycle analysis*. 139-162)。此外, 由于缺乏胞外基质以及培养皿中或细胞悬浮液中的细胞环境改变, 在组织解聚中存活的细胞丧失了它们的细胞类型特异性生物化学和功能。例如, 在癌组织和 3D 模型中的细胞分裂率不同于在 2D 细胞系中观察到的细胞分裂率 (Fischbach 等, 2007, *Nat Methods*. 4(10):855-860)。由以 2D 培养的细胞形成的肿瘤中的恶性肿瘤 (malignancy) 低于由以 3D 培养的细胞形成的肿瘤中的恶性肿瘤 (Fischbach 等, 2007, *Nat Methods* 4(10):855-860)。另外, 公知的是, 实体组织的胞外基质在癌症中

起着至关重要的作用 (Bissell 等,2001, Nat Rev Cancer 1(1):46-54 ;Hanahan 等,2000, Cell. 100(1):57-70)。因此,分离的细胞培养物和细胞悬浮液并不等同于原始的实体组织。

[0007] 目前的大多数实体组织研究方法需要固定。激光捕获显微解剖和所有基于免疫标记的方法(免疫荧光、FACS、FISH等)均需要固定(Gutstein 等,2007, Expert Rev. Proteomics 4:627-637 ;Espina 等,2006, Nat. Protoc. 1:586-603 ;Mouledous 等,2002, J. Biomol. Tech. 13:258-264 ;Brandtzaeg 和 Rognum,1984, Histochem. Cell Biol. 81:213-219 ;Micheva 和 Smith,2007, Neuron 55:25-36)。后者可提供关于底物在整个组织结构甚至在细胞内的空间分布的有用信息。然而,问题并不是可用固定的组织做什么,而是固定的组织是否代表固定前的原始组织。如果固定组织并不代表原始的组织样品,那么基于固定的组织的任何研究均未提供信息。固定过程在 100 多年前首次记录 (Fish, 1896, Transactions of the American Microscopical Society,17:319-330)。基于醛和基于醇固定的过程并未被良好了解,但已知破坏了原始样品的分子保留,从而掩盖了单细胞间的真实的天然差异 (Schnell 等,2012, Nat. Meth. 9:152-158 ;Mouledous 等,2002, J. Biomol. Techniques 13:258-264 ;Melan 和 Sluder,1992, J. Cell Sci. 101:731-743 ;Holtfreter 和 Cohen,1990, Cytometry 11:676-685 ;Tanaka 等,2010, Nat. Methods 7:865-866 ;Collaud 等,2010, J. Biomol. Tech. 21:25-28)。不存在通用的固定方案,并且各特定的固定方案均被排他性地调谐至特定的细胞类型、特定的分子类别以及细胞类别中的特定分子 (Schnell 等,2012, Nat. Meth. 9:152-158 ;Mouledous 等,2002, J. Biomol. Techniques 13:258-264 ;Melan 和 Sluder,1992, J. Cell Sci. 101:731-743 ;Holtfreter 和 Cohen,1990, Cytometry 11:676-685)。

[0008] 为研究常见的固定和透化方案对生物样品的分子保留的影响, Schnell 及其同事在 293T 和 MDCK 细胞中表达了胞液可溶性 GFP (Schnell 等,2012, Nat. Meth. 9:152-158)。正如所预期的,基于醛的固定导致蛋白交联以及抗原遮蔽。甚至在对这些 GFP 表达细胞进行广泛的透化后,GFP 表达细胞中的大量 GFP 分子无法被所施用的特异性 GFP 抗体接触到。与在施用基于醛的固定前成像的相同 MDCK 细胞集相比,相同的基于醛的固定方案还引起固定的 MDCK 细胞中的 GFP 蛋白的空间重新分布。与 MDCK 细胞相比,在用相同的基于醛的固定方案固定 293T 细胞后,未观察到 GFP 的空间再分布。这些观察表明,基于醛的固定对于分子保留的影响是细胞类型依赖性的。需要透化过程以接近各醛固定的单细胞中的胞内蛋白,使得将 GFP 从所有的固定单细胞中广泛的提取 (Schnell 等,2012, Nat. Meth. 9:152-158)。类似地,如同通过荧光和电子显微镜所证实的,基于醇的固定从所有的单细胞中提取出大部分的 GFP 蛋白 (Schnell 等,2012, Nat. Meth. 9:152-158)。重要的是,在由 Schnell 等进行的的研究中,虽然当将 GFP 靶向至内质网时,所施用的 GFP 抗体是特异性的并正确地检测到了 GFP,但是给定单细胞集中的单细胞之间的真实的 GFP 量的差异不能通过在固定和透化后对同一单细胞集进行抗体染色来重复。

[0009] 在由 Melan 和 Sluder 进行的另一严格研究中,作者用荧光素-5-异硫氰酸盐 (FITC) 对具有不同大小和电荷的数种蛋白进行标记,然后将这些标记的蛋白装入 HeLa、3T3、PtK1 和 CHO 细胞中 (Melan 和 Sluder,1992, J. Cell Sci. 101:731-743)。他们观察到,由基于醛的固定和透化引起的蛋白提取的程度取决于具体的蛋白种类和具体的细胞类型 (Melan 和 Sluder,1992, J. Cell Sci. 101:731-743)。这些观察证明,基于醛和基于

醇的固定以及透化以不可预期的细胞类型和分子依赖的方式降低天然分子的分析可用性。检查固定和透化对分子保留的影响的另外的研究表明,基于醛和基于醇的固定以及透化以不可预期的细胞类型依赖和分子依赖的方式破坏了原始样品的分子保留 (Schne11 等,2012, Nat. Meth. 9:152-158 ;Mouledous 等,2002, J. Biomol. Techniques 13:258-264 ; Melan 和 Sluder,1992, J. Cell Sci. 101:731-743 ;Holtfreter 和 Cohen,1990, Cytometry 11:676-685)。

[0010] 所有基于固定的方法的第二个主要限制为难以构建标准曲线,并且通常无法构建标准曲线。标准曲线将记录的信号映射为量,并可通过并行滴定系列进行构建。在任何学科中,标准曲线都是分析测量的基础。基于亲合力的不同探针(如抗体)通常具有不同的解离常数(KD),因此不同探针的各自的标准曲线也具有不同的斜率。在不了解相应的标准曲线的情况下,大的信号差异是没有意义的,因为该信号差异可能是在量方面的小的差异的结果、或者在量方面的大的差异的结果,这取决于作为基础的标准曲线的斜率(图1)。标准曲线还使得能够进行绝对测量(因为可将信号映射为相应的靶分子的绝对计数)以及对单细胞中的低底物浓度下的基于亲合力的探针的非线性行为进行校正。对于将来自不同实验的数据点进行汇集而言,标准曲线是必要的,因为技术的演变以及实验程序的任何变化均可通过相应的标准曲线加以校正。

[0011] 重要的是注意到如下方面:标准曲线必须与实际测量并行,并且必须与未知样品中的感兴趣的测量量以相同的实验条件进行。在固定样品中,难以或者不可能建立标准曲线。例如,基于固定的实体组织方法(例如组织免疫荧光和阵列断层扫描术)(Micheva 和 Smith,2007,Neuron55:25-36)不允许构建并行的标准曲线。在固定的样品中,只能看到信号,但通常不能确定作为基础的量和/或量的差异。

[0012] 所有基于固定的方法通常受到不可预期的原始样品的分子修饰以及缺乏标准曲线的影响。作为这两方面的主要局限的结果,并由于大多数实体组织方法是基于固定的,至今不可能对实体组织的单细胞中的天然蛋白的量进行测量、或以多元分析的方式进行这一测量。同时,也不可能对实体组织的单细胞中的代谢物的量进行测量、或者对实体组织的单细胞中的代谢物进行可靠的多元分析。也不可能在实体组织的单细胞中的分子类型(蛋白、转录物、代谢物)间进行多元分析。

[0013] 虽然已知的是对于在生物学上进行提供信息的定性观察而言,没有必要测量真实的量或量的差异,但是实际上与简单的“信号”不同,正确的量和量的差异对于做出正确的定性观察是不可或缺的。图1和图2表明,在任何群体的测量(单细胞、组织样品或患者)中,为在存在或不存在亚群体的情况下进行准确的定性观察,具有基于亲合力探针的并行标准曲线的重要性。在群体的感兴趣的量具有相同的真的隐藏分布的前提下,具有小的斜率的线性标准曲线将使这一分布看起来更窄。相比之下,具有大斜率的线性标准曲线将使同一真的隐藏分布看起来更宽。在具有不同的KD值并因此具有不同的标准曲线斜率的两种不同的基于亲合力的探针(例如抗体)并且量的真的隐藏分布相同的前提下(尽管感兴趣的量的基础的真实分布相同),在观察到的分布中的上述差异仅是由于两种探针的KD值不同。因此,无论在群体中分布的不同量多宽还是多窄,在未了解相应的标准曲线的情况下不可能进行定性观察。

[0014] 在单细胞水平,很多蛋白、转录物或代谢物的量以小的数量存在,这可导致相应的

基于亲合力的探针的标准曲线的非线性。固定化诱导的差别提取以及靶分子的修改也可能导致标准曲线的非线性。图 2 示出了如果作为基础的未知标准曲线是非线性的,在群体测量中能够做出关于存在或不存在亚群体的何种错误定性观察。综合起来看,在不知道所施用的基于亲合力的探针的并行标准曲线的情况下,不可能知晓所观察到的定性观察是否准确。可以说,缺乏并行标准曲线是许多生物测量的非再生性和相互不兼容性的主要原因。

[0015] 有限的多元分析是光学方法的主要局限。有限的光谱导致不能同时对数十个信号进行分离,并因此使得难以通过活体成像方法对单细胞中的多变量分子机制进行测量。所有的活体成像方法是基于胞内荧光探针,所述胞内荧光探针自然而然的会扰乱成像活细胞的天然系统。例如,对活的单细胞中的蛋白进行成像的一个常见方式需要将 GFP 衍生物与感兴趣的蛋白融合,并随后使所得的融合蛋白表达。这一程序对于大规模的哺乳动物实体组织而言不实用。GFP 衍生物与感兴趣的蛋白的融合可改变感兴趣的蛋白的功能和细胞的天然状态 (Sigal 等,2006, Nat. Methods 3:525-531 ;Landgraf 等,2012, Nat. Methods 9:480-482 ;Schne11 等,2012, Nat. Methods, 3:825-831)。此类融合蛋白的过表达及其二聚化很常见。GFP 融合蛋白的扩散系数和动力学参数也可能改变。因此,融合的 GFP 并不会直接报告天然蛋白的丰度和活性。荧光细胞内离子传感器是细胞内荧光探针如何扰乱成像细胞的天然系统的另一实例 (Yasuda 等,2004, Sci STKE. 219:p15)。荧光细胞内离子传感器为螯合剂,通过改变各离子 (如 Ca^{2+}) 的天然浓度来扰乱细胞的天然系统。

[0016] 本领域中需要对来源于活的实体组织的单细胞组分进行检测的方法,其中,所述方法以分析上定义的状态或天然状态保留所述单细胞组分。本发明解决了本领域中这一未满足的需求。

发明内容

[0017] 本发明提供了对存在于组织中的单细胞进行裂解的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:a) 识别来自组织的细胞;b) 将含去污剂的裂解缓冲液与所识别的细胞的胞内空间接触;c) 使裂解缓冲液在所识别的细胞的胞内空间中扩散一段时间,其中,从该细胞的内部将该细胞裂解;以及 d) 收集裂解物,其中,所述裂解物含有以分析上定义的 (analytically defined) 状态或分析上可接近的状态 (analytically accessible state) 保留的细胞组分,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至 (map to) 天然状态。

[0018] 在一个实施方式中,该方法在不存在组织固定和组织解聚的情况下发生。

[0019] 在一个实施方式中,分离的细胞处于器官型培养物 (organotypic culture) 中。

[0020] 在一个实施方式中,通过抽吸通道抽吸裂解物而收集所述裂解物。

[0021] 在一个实施方式中,抽吸通道为弯曲的抽吸微量移液器。

[0022] 在一个实施方式中,将收集的裂解物进一步施用至硝化纤维素垫。

[0023] 在一个实施方式中,还将标准物施用至硝化纤维素垫。

[0024] 在一个实施方式中,使用分析方法对裂解物进行评价。

[0025] 在一个实施方式中,分析方法选自于由质谱法、蛋白质微阵列、RT-qPCR、RNA-Seq 以及 MALDI-MS 所组成的组。

[0026] 在一个实施方式中,细胞为活的实体组织的部分。

[0027] 在一个实施方式中,去污剂为十二烷基磺酸钠。

[0028] 本发明还提供了对存在于组织中的细胞进行分析的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:a) 识别来自组织的细胞;b) 将含去污剂的裂解缓冲液与所识别的细胞的胞内空间接触;c) 使裂解缓冲液在所识别的细胞的胞内空间中扩散一段时间,其中,从该细胞的内部将该细胞裂解;d) 收集裂解物,其中,所述裂解物含有以分析上定义的状态或分析上可接近的状态保留的细胞组分,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态;e) 将所收集的裂解物施用至固体支持物;以及 f) 使用分析方法评价所收集的裂解物。

附图说明

[0029] 当结合附图阅读时,将能够更好地理解下述对本发明的优选实施方式进行的详细描述。出于阐明本发明的目的,在附图中示出了当前优选的实施方式。然而,应当理解的是本发明并不限于附图中所示的实施方式的确切排列和手段。

[0030] 图 1 为示出线性标准曲线的不同斜率的一系列图表。真实隐藏分布 (ture hidden distribution) 在最下面一排示出。最上面一排中的分布通过将中间排的标准曲线应用到最下面一排的真实隐藏分布而获得。基于亲合力的探针(例如抗体)的不同 KD 值甚至在相同的探针浓度下引起它们的标准曲线的斜率不同。标准曲线附近的箭头表示,取决于作为基础的标准曲线的斜率,相同的信号差异可映射为大的量的差异或者小的量的差异。

[0031] 图 2 为示出不同的非线性标准曲线的一系列图表。真实隐藏分布在最下面一排示出。最上面一排中的分布通过将中间排的标准曲线应用到最下面一排的真实隐藏分布而获得。当基于亲合力的探针的底物以非常小的量存在于单细胞中时,出现非线性标准曲线(从左边开始第一情形)。在低抗原浓度时,在裂解物微阵列测量中,二价抗体可能不会通过抗原结合位点找到位于邻近的待结合抗原,由此导致从左边开始的第一情形中所呈现出的非线性情况。如本文别处所讨论的,固定和透化也会改变底物的可用性,并可能诱发非线性。

[0032] 图 3 为示出解决局限性的策略的示意图说明。该平台由如下构成:新的取样方法(由内而外的裂解)、用于测量实体组织的单细胞中的天然蛋白的新的分析方法(单细胞裂解物微阵列)、以及用于对实体组织的单细胞中的天然转录物和代谢物进行定量的成组的兼容的分析策略。这一平台解决了目前用于对实体组织中的单细胞进行取样和分析的方法的局限。

[0033] 图 4(包括图 4A-图 4B)描述了器官型培养。图 4A 为器官型培养方法的图解。将组织的解剖切片在多孔膜上培养。组织切片通过毛细管作用从膜的下面摄取营养物质(来自 Stoppini 等,1991, J Neurosci Methods,37(2):173-182)。图 4B 为示出小鼠海马的成功器官型培养的实例的照片(GAD67-GFP 染色,出生后第 6 天+体外 14 天)。

[0034] 图 5 为示出 SDS 的相图的图解。将 SDS 溶液维持在 pH 7.4,并包含 0.1M NaCl 和 0.05M 磷酸钠。将临界胶束温度命名为 CMT。将 SDS 的临界胶束浓度命名为 CMC(来自 Helenius 和 Simons,1975, Biochim Biophys. Acta 415:29-79)。

[0035] 图 6 为示出基于去污剂的裂解的简化模型的图解。可能需要高于 CMC 值的浓度来诱导膜溶解。同时,膜溶解的程度取决于膜的构成和整合入膜中的去污剂单体的数量。

[0036] 图 7 为示出活的实体组织中的单细胞由内而外的裂解的图解。上面的图示总结了由内而外的裂解的概念。在底部的框图中,将含 SDS 的裂解缓冲液与 SR101 混合。不实施抽吸。示出小鼠海马的器官型培养物 (GAD67-GFP 染色,出生后第 6 天 + 体外 7 天)。在所有的情况中,裂解缓冲液的递送以机械化完成,而无需任何人工投入。观察到来自底部的第二细胞具有小的表面积,并且所施用的裂解缓冲液通过流入暗细胞而进入相邻的暗细胞中。在所有其它情况中,递送的单细胞分辨率 (single-cell resolution) 很精确 (此外还可参见图 32)。底部右侧的框图还示出了裂解缓冲液开始递送至上部细胞 (第四细胞)。

[0037] 图 8 为示出可溶性蛋白快速变性的图解。该实验为与图 7 相同的实验。在含 SDS 的裂解缓冲液进入各靶细胞的胞内空间时,GFP 荧光就立即减少。在 GFP 荧光的这一减少期间,SR101 染料严格地停留在靶细胞的几何边界内 (细胞 2 例外),这意味着从裂解缓冲液递送的时间点至 GFP 荧光丧失的时间点,膜屏障是完整的。不实施抽吸。因此,GFP 荧光的减少表示胞内 GFP 变性。此处,裂解缓冲液的递送是完全机械化而无人工投入。在每种情况中施用的裂解缓冲液的量相同。当起始向第一细胞的递送时,由于物镜下的递送移液器的荧光,第二细胞的线 (与裂解缓冲液混合的 SR101) 显示出隆起。裂解缓冲液的流动与组织表面垂直。

[0038] 图 9 为示出在培养的海马切片的一组不同区域中的完全自动化的连续的裂解缓冲液递送的一系列照片 (GAD67-GFP, P4+5DIV)。在 200 秒的时间段内,以完全自动化的方式将裂解缓冲液递送至 3 个不同的海马区域中的 15 个细胞 (自动化的裂解缓冲液递送在成像开始后 40 秒触发)。通过光圈限制成像区域,以确保该区域内的切片表面的平面化。每个区域示出 3 张图像:1) 在裂解过程触发前获取的图像;2) 在图像分割后的相同图像;以及 3) 在该特定区域中的裂解缓冲液递送过程的时间点获取的图像。

[0039] 图 10 为示出裂解缓冲液递送期间的细胞膜生长的一系列照片。LB 代表裂解缓冲液。通过裂解缓冲液的局灶流 (focal stream) 将 SDS 递送至单细胞。使 GFP 变性,同时各靶细胞的膜生长。在 GFP 变性期间和膜生长期间,Alexa 555 染料停留在靶细胞的几何边界内。尽管不希望受任何具体理论的束缚,这表明从裂解缓冲液递送的时间点至大量的膜生长的时间点 (贯穿 GFP 变性的阶段),膜屏障是完整的。此外还可参见图 32。

[0040] 图 11 为示出部分且缓慢溶解的靶细胞的膜的照片。施用较小量的含 SDS 的裂解缓冲液而不进行后续的裂解物吸取 (无抽吸)。观察到,在 30 分钟 (上部图像) 或 11 分钟 (下部图像) 的等待期后,SR101 染料缓慢地扩散出单细胞的几何边界。残留的荧光区域为推定的部分膜溶解后的膜片 (membrane patches)。上部图像在 GAD67-GFP 切片 (P4+4DIV) 中于 20× 物镜下获取。下部图像在 GAD67-GFP 切片 (P4+6DIV) 中于 40× 物镜下获取。

[0041] 图 12 为示出通过活的实体组织中的由内而外的裂解而使单细胞膜完全且快速溶解的一系列照片。箭头显示出 GIN 小鼠的海马器官型切片中的表达 GFP 的靶细胞 (生长抑素中间神经元)。首先,施用少量的裂解缓冲液 (Alexa 555D 在此处用于可视化),并推测在将所施用的裂解缓冲液的局灶进入点封闭后,细胞膜是完整的。连续施用更多的裂解缓冲液,直至膜从内部完全溶解。通过垂直的同步的毛细管作用驱动的抽吸来吸取裂解物。递送微量移液器不弯曲,并且裂解缓冲液的递送在非垂直的一定角度下发生。

[0042] 图 13 (包括图 13A-图 13B) 示出了在安装于玻璃上的硝化纤维素垫上印制单细胞裂解物。图 13A 为示出将单细胞裂解物的蛋白富集在硝化纤维素上的 20-60 μm 斑点内的

方法的一系列图像。右侧的框图显示出溶剂扩散的范围。然而,在用于印制的微量移液器的正下方,单细胞裂解物分区(partition)中的蛋白富集在小得多的区域内。在由内而外的裂解中,将相同的微量移液器用于毛细管作用驱动的抽吸。图 13B 为示出来自相同的单个的表达 GFP 的生长抑素中间神经元(GIN 小鼠的器官型海马切片)的约 50 μm 斑点的一系列图像。将斑点彼此相邻地印制在硝化纤维素垫上(每斑点 10 次沉积)。另外将相应的基线斑点印制在同一硝化纤维素垫上(每斑点 10 次沉积)。在抗体孵育前,没有信号。正如所预期的,在抗体孵育后,仅在裂解物斑点中有信号。低分辨率框图中的短棒为 42 μm 。

[0043] 图 14 为示出证实由内而外的裂解的一系列图解。在 GIN 小鼠的同一切片中,两种细胞得以裂解。一种细胞表达 GFP(生长抑素中间神经元),而另一细胞不表达 GFP(CA3 锥体神经元)。所有并行的阴性对照均为阴性。所有并行的阳性对照均为阳性。将各单细胞的整个裂解物分区分别印制在三个裂解物斑点。各单细胞的裂解物斑点显示出预期的信号分布。基线斑点为阴性。这些结果表明单细胞裂解物亚分区的使用,因为实验中的各细胞的裂解物分区被细分为三个亚分区。

[0044] 图 15 为示出本发明的细胞取样和印制装置的一系列图像。

[0045] 图 16 为示出处于裂解物微阵列样式的抗体的两种可能类别的图解。与蛋白质印迹对比,在裂解物微阵列中不能根据大小对蛋白进行分离。作为结果,需要具有最佳结合概率(从左边开始的第二种情形)以及由此具有不变的低交叉反应性的抗体。一旦该类别中的成组抗体得以证实,可用裂解物微阵列完成未知样品中的分析蛋白测量。

[0046] 图 17 为示出单细胞裂解物微阵列的一系列图表,所述单细胞裂解物微阵列将裂解物微阵列的严谨分析(analytical rigor)与镧系元素标记的多元分析能力相结合。

[0047] 图 18 为示出另外的抗体验证的一系列照片。在 GIN 小鼠海马的平均裂解物上进行的蛋白质印迹中,各泛特异性(pan-specific)抗体产生了单一的主要条带,此前对用于裂解物微阵列的所述抗体通过如下进行验证:将 17 种人细胞系的裂解物微阵列中的信号分布与蛋白质印迹中的相应信号分布进行比较。该 GIN 小鼠与用于后面的实验中的 GIN 小鼠具有相同的年龄。PKC δ 、PKC α 、PAK1 和 β -连环蛋白印迹中的第二条带来自抗 β -肌动蛋白一抗的二抗的荧光。

[0048] 图 19(由图 19A-图 19C 组成)示出单细胞裂解物微阵列数据。在上方部分中,a555 代表 Alexa 555。图 19A 为示出单细胞裂解物微阵列数据的一系列图表。图 19B 为示出单细胞裂解物微阵列数据的一系列图表。图 19C 为示出单细胞裂解物微阵列数据的一系列图表。将所获得的单细胞裂解物及它们的基线印制在本文别处所述硝化纤维素垫上,但无亚分区。积分值在图 20 中示出。

[0049] 图 20 为示出图 19 中的测量结果的经积分的 LA-ICP-MS 计数的图解。在细胞 1 至细胞 4 中,从单细胞裂解物斑点的时间积分强度(从第 170 帧至第 370 帧)中减去基线斑点的时间积分强度(从第 170 帧至第 370 帧)。在细胞 5 至细胞 6 中,基线的印制并未完全成功,并且仅从相对于基线斑点和裂解物斑点的总的积分强度减去经积分的仪器噪声。将所有单细胞的各通道中的最大值指定为 1.0 的值。还包括在平均的海马裂解物的滴定系列上的一个斑点的测量。

[0050] 图 21 为示出展现标准曲线的并行的 PKC δ 和 PKC α 的滴定系列的图表。将 PKC δ 和 PKC α 的滴定系列印制在安装于玻璃上的同一硝化纤维素垫上,还将图 19 中的单细胞裂

解物印制在硝化纤维素垫上进行测量。通过高精度 Aushon Arrayer 对所有的滴定系列进行印制。线描绘了动态范围,在该动态范围内,在单细胞裂解物斑点中记录的 PKC δ 和 PKC α 信号受到限制(相比于图 19)。标准曲线的非线性性质还使得在任何的单细胞测量中包含此类并行标准变得必要(图 2)。

[0051] 图 22(包含图 22A-图 22B)示出了来自 GFP 滴定系列和测量的结果。图 22A 为示出展现各 GFP 抗体的具有不同斜率的两条标准曲线的同一滴定系列(相同的 4 个斑点)的一系列图表,所述滴定系列通过高精度 Arrayer 2470 印制。在 8 种抗体的总混合物中同时施用这两种 GFP 抗体。由于各 GFP 抗体的镧系元素缀合程序相同,并且由于在孵育程序期间 GFP 抗体中的任一种的浓度均相同,认为斜率方面的这种差异使这两种 GFP 抗体的 K_D 值方面的相应差异参数化。图 22B 为一系列图表,所述图表示出了图 19 的所有的取得的单细胞的单细胞裂解物微阵列中测量的 GFP 水平与体内 GFP 荧光之间的几乎完美相关。两个暗 CA3 神经元由两个最低的数据点表示。四个表达 GFP 的生长抑素中间神经元由其它的四个数据点表示。将图 22A 中的 GFP 滴定系列与图 22B 中的单细胞裂解物印制在同一硝化纤维素垫上。再次通过高精度 Aushon Arrayer 2470 对所有滴定系列进行印制。如本文其它地方所述,对所有的单细胞裂解物和相应的基线进行印制,而无亚分区。

[0052] 图 23 为示出贝叶斯网络拓扑的一系列图解。示出了具有增高的复杂度的 8 个贝叶斯网络拓扑及相应的正式的数学表述式。

[0053] 图 24 为示出最佳学习者(Learner)的选择(贝叶斯网络拓扑+ML 参数估计)的图表。通过针对维数为 10 并由 112 个数据点组成的数据集以各学习者运行 10 重交叉验证(10-fold cross-validation),从一组学习者中选择最佳学习者。在每 10 轮交叉验证中,将训练集用作学习者功能的输入,并将所得到的贝叶斯网络模型用于计算试验集和训练集中的分类准确度(classification accuracy)。在所有 10 轮交叉验证中实施这一程序,并在该图示出平均的癌分类准确度。以各学习者进行 10 重交叉验证。最佳学习者是 AXL+MET+AKT。朴素贝叶斯(Naïve Bayes)的最简单的拓扑良好实施,但明显不如 AXL+MET+AKT。增高贝叶斯网络拓扑的复杂度至超过 AXL+MET+AKT 的复杂度导致假设空间的次优扩张(suboptimal expansion),并由此导致过度拟合。

[0054] 图 25 为示出附加条件如何引起较好的试验集分类的一系列图表。通过以 Ax1 和癌症随机变量为条件实现 Met.p 数据的较好分离。在不以 Ax1 为条件的情况下,对于癌症=真以及癌症=假而言, Met.p 分布相似。当以 Ax1 = 高、癌症=假为条件时以及当以 Ax1 = 高、癌症=真为条件时,以 Ax1 为附加条件导致 Met.p 的不同的条件分布。当与图 24 中的 MET+AKT 模型相比时,这种差别使得在 AXL+MET+AKT 模型中有更好的平均分类准确度。线为用于将数据二值化的中位值。

[0055] 图 26 为示出去污剂浓度之间的关系以及由内而外的裂解的框架的图解。去污剂的烃链长度与 CMC 的头部基团(head-group) 电荷以及 CMC 与胶束大小之间的关系在其它的生物物理研究中已经建立,并为我们的由内而外的裂解模型参数化提供了基础。

[0056] 图 27 为示出蛋白变性/细胞均匀化的时间过程以及由随后的裂解物吸取进行的膜屏障破裂的一系列图表。

[0057] 图 28 为示出从体细胞和近端树突中吸取裂解物的一系列图表。

[0058] 图 29 为示出在自动化实验装置中的裂解产物(裂解物)吸取与裂解物在硝化纤

纤维素垫上的沉积之间的快速开关 (switching) 的照片。

[0059] 图 30 为示出裂解可视化与分析程序相分离的一系列照片。如果将光学方法用于信号检测,由内而外的裂解(取样)的可视化不应干扰光学信号检测,所述可视化对于确保单细胞分辨率以及记录细胞形态(如果靶细胞不是荧光的)而言是必要的。为鉴别在将裂解物印制在硝化纤维素上后可被冲洗掉的染料,尝试不同的荧光染料(SR101、Alexa 568 葡聚糖(MW 10000)、Alexa 555(MW 10000))。所有染料均为由内而外的裂解提供了足够的可视化能力。将不同的染料与裂解缓冲液(Tris·HCl(50mM)、SDS(2%)、甘油(5%)、NaF(1mM))进行混合。另外,还向含染料的裂解缓冲液中加入 7.4M 尿素。在另一实例中,将 Hank's 平衡盐溶液(HBSS)与各染料混合。总体而言,这一实例表明与上述 Alexa 染料相比,SR101 并不适于裂解后的光学信号的检测,因为 SR101 难以从硝化纤维素中漂洗掉。如果信号检测通过非光学方法(如 LA-ICP-MS)来实现,那么用于取样可视化的荧光染料的洗出能力应该不重要。

[0060] 图 31 为示出细胞中的局灶进入点的证据的一系列照片。这些图像以非常高的曝光量拍摄,从而使由内而外的裂解后的残余的染料分子(裂解缓冲液)和残余的膜碎片可视化。

[0061] 图 32 为示出在由内而外的裂解的裂解缓冲液递送阶段中如何使两个相邻的暗细胞不受明显影响的一系列照片。为捕获切片中的 GFP 分布的细节(GAD67-GFP 染色,出生后第 6 天+体外 7 天),在由内而外的裂解前用高曝光获得左侧的图像。右侧的两张图像对应于图 7 和图 8 中示出的第一细胞的由内而外的裂解过程的相同时间点。右侧上面的图像为 GFP 框图。右侧下面的图像为 SR101 框图,示出了含 SR101 的裂解缓冲液向靶细胞的递送。右侧下面的图像的左上角的明亮的背景部分为来自递送微量移液器的荧光。可在体细胞的旁边和靶向表达 GFP 的神经元的顶树突旁边观察到两个暗细胞(箭头)。将裂解缓冲液递送的局灶点指定为字母 D。甚至在大量的膜生长后,SR101 染料仍严格地包含在靶细胞的几何边界内,并且也没有进入两个邻近的暗细胞中。

具体实施方式

[0062] 本发明涉及开发裂解技术和分析技术以及分析策略,从而提供对来自实体组织的单细胞裂解物进行取样和评价的能力。在一个实施方式中,本发明包括取样程序,所述取样程序允许获得单细胞裂解物并通过与不同的分析方法结合来对所述裂解物进行分析。优选的是,分析方法基于裂解物形式。例如,分析方法包括但不限于固相支持方法(例如,微阵列、MALDAI)、非固相支持方法(例如,qPCR 或直接引入样品的其它质谱方式)等。

[0063] 本发明的一个优点在于,裂解方案使所有细胞分子以分析上定义的状态或分析上可接近的状态保留,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态,由此允许当细胞分子存在于细胞中时,对细胞分子进行更精确且更高的多元测量。在一个实施方式中,本发明提供了用于对来自单细胞的细胞分子进行分析的方法,所述方法包括:1) 裂解单细胞(例如,裂解步骤);2) 将裂解物施用至固体支持物上(例如,印制步骤);以及 3) 使用期望的技术对裂解物进行分析(例如,分析步骤)。

[0064] 本发明的方法还允许对来自嵌入实体组织中的单细胞的裂解物进行分离,并同时保留分子的分析上定义的状态和分析上可接近的状态,所述分析上定义的状态和分析上可

接近的状态以已知方式映射至在细胞中的天然状态,因此,允许将组织样品中的单个靶细胞转化成可使用以下分析方法进行评价的形式,所述分析方法包括但不限于:质谱法、裂解物微阵列、蛋白质微阵列、RT-qPCR、RNA-Seq、LA-ICP-MS、和 MALDI-MS 等。

[0065] 在一个实施方式中,本发明提供了“由内而外的裂解”平台,所述平台包括:1) 促进含去污剂的裂解缓冲液通过细胞膜中的局灶进入点(focal entry point)进入靶细胞的胞内空间;2) 允许裂解缓冲液扩散至整个胞内空间;3) 从内部裂解靶细胞,由此为处于活组织的复杂环境中的任何形状的靶细胞的裂解提供最高可能的单细胞分辨率。裂解技术的亮点在于裂解过程不同寻常的定向性,与现有技术方法相比时,该裂解技术使得能够具有优异的空间分辨率。本发明的“由内而外的裂解”方法以已知的方式使裂解物中的单细胞保留天然状态,然后可使用各种分析方法进行检测。本发明的方法还通过并入基于去污剂的裂解的技术优势,使 RNA 转录物、蛋白和代谢物得以保留。

[0066] 因此,本文所述的发明涉及新方法,所述方法用于裂解来源于实体组织的单细胞,同时使所述细胞内的分子以分析上定义的状态或分析上可接近的状态保留,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至它们在细胞中的天然状态。该方法包括裂解步骤,其中,将靶细胞从内部裂解,从而对处于活组织的复杂环境中的任何形状的靶细胞的裂解提供最高可能的单细胞分辨率,并收集裂解物。在一个实施方式中,在器官型培养物中包含靶细胞。在一个实施方式中,通过用抽吸通道将裂解物从系统中抽吸出来而收集裂解物。在一个实施方式中,该方法包括印制方法,所述印制方法包括将裂解物施用至固体支持物(例如,安装于玻璃上的硝化纤维素垫)。在一个实施方式中,该方法包括使用分析测量对印制的裂解物进行评价。

[0067] 本文所述的发明还涉及用于多元分析平台的新的分析方法,其中,对本文公开的裂解方法的产物进行分析。在一个实施方式中,该方法包括用于对天然蛋白进行多元分析测量的分析方法。在一个实施方式中,该方法包括将抗体的混合物施用至固体支持物(例如,硝化纤维素)上印制或成斑点的裂解物。在另一实施方式中,将抗体缀合至镧系金属。在另一实施方式中,该方法包括成组的兼容的分析策略,所述分析策略用于对单细胞裂解物中的转录物和代谢物进行的多元分析测量。

[0068] 本发明还提供了用于以一次来测量蛋白、转录物和/或代谢物的方法。可确定所有测量中的并行标准曲线,并可将信号映射为待评价的蛋白、转录物和/或代谢物的相应量。

[0069] 定义

[0070] 除非另有定义,本文中使用的所有技术术语和科学术语具有本发明所属领域普通技术人员普遍理解相同意义。虽然类似或等同于本文所描述的方法和材料的任何方法和材料均可用于本发明的实践或测试,对优选的方法和材料进行描述。

[0071] 本文所用的下列术语中的每一个均具有与在本部分中的含义相关的含义。

[0072] 冠词“a”和“an”在本文中用于指一个或一个以上(即,至少一个)的该冠词在语法上的对象。举例来说,“元件(an element)”意思是一个元件或多于一个的元件。

[0073] 当涉及可测量的值(例如,量和持续时间等)时,本文所用的“约”是指包含从规定值起的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 、甚至更优选 $\pm 1\%$ 、进一步更优选 $\pm 0.1\%$ 的变化,此类变化适于实施所公开的方法。

[0074] 当用于有机体、组织、细胞或其组分的情况时,术语“异常 (abnormal)”是指有机体、组织、细胞或其组分在至少一个可观察或可检测的特征(例如,年龄、处理、时间天数等)方面与显示“正常”(预期)的各特征的有机体、组织、细胞或其组分不同。对一种细胞或组织类型而言正常或预期的特征,对于不同的细胞或组织类型而言可能是异常的。

[0075] 本文所用的“分析物 (analyte)”是指接受分析的任何物质或化学成分。例如,“分析物”可指任何原子和 / 或分子;包括它们的复合物和碎片离子 (fragment ions)。该术语可指单一组分或成组的组分。在生物分子 / 大分子的情况下,此类分析物包括但不限于:多肽、多核苷酸、蛋白、肽、抗体、DNA、RNA、糖、类固醇和脂质、以及上述物质的任何可检测部分,例如免疫学上可检测的片段。

[0076] “分析 (assay/assaying)”或类似术语是指用来确定例如如下情况的分析:细胞针对外源刺激物(例如配体候选化合物、或病毒颗粒、或病原体)刺激的响应的类型、存在、缺失、量、程度、动力学、动态。

[0077] “生物传感器”或类似术语是指用于检测分析物的设备,所述设备将生物组分与物理化学检测器组分结合。生物传感器通常由三个部分组成:生物组分或元件(如组织、微生物、病原体、细胞、或上述物质的组合)、检测器元件(以物理化学方式(例如,光学方式、压电的、电化学方式、测温方式或磁方式)工作)、以及与这两种组分关联的变换器 (transducer)。生物组分或元件可为例如活细胞、病原体或它们的组合。在实施方式中,光学生物传感器可包含用于将活细胞、病原体或它们的组合中的分子识别或分子刺激事件转化成可量化的信号的光学变换器。

[0078] “细胞”或类似术语是指外部由半透膜束缚的原生质的小的且通常微观的团块,所述团块任选包含一个或多个核以及多种其它细胞器,能够单独或与其它类似团块相互作用而执行生命的所有基本功能,并形成能够独立起作用的生命物质 (living matter) 的最小结构单元(包括合成细胞结构、细胞模型系统、以及类人工细胞系统)。

[0079] “细胞系统”或类似术语是指多于一种类型的细胞(或单一类型细胞的分化形式)的集合,所述细胞彼此相互作用,由此执行生物功能、生理功能或病理生理功能。此类细胞系统包括器官、组织、干细胞、或分化的细胞等。

[0080] 本文使用的术语“细胞成分 (cellular constituent)”包括单独的基因、蛋白、mRNA、RNA、和 / 或任何其它可变的细胞成分,或者例如,通常由本领域技术人员在生物实验中测量的蛋白活性、蛋白改性(例如,磷酸化)的程度。

[0081] “疾病”是动物的健康状况,其中,动物不能维持稳态,并且其中,如果疾病得不到改善,那么动物的健康继续恶化。

[0082] 相比之下,动物中的“紊乱”为动物能够维持稳态的健康状况,但在紊乱中,动物的健康状况比起不存在该紊乱的动物而言更加不良。不加以治疗,紊乱并不一定在动物的健康状况方面引起进一步降低。

[0083] 如果疾病或紊乱的症状的严重程度、患者经历此类症状的频率、或上述两者减少,所述疾病或紊乱得以“缓和”。

[0084] 化合物的“有效量”或“治疗有效量”是足以向给予该化合物的受试者提供有益效果的化合物的量。递送载体的“有效量”为足以有效地结合或递送化合物的量。

[0085] 本文中使用的“说明材料 (instructional material)”包括出版物、记录、图表、或

任何其它表达媒介,所述说明材料可用于传达试剂盒中的本发明所述的化合物、组合物、载体、或递送系统用于影响本文所列举的疾病或紊乱的缓和的效用。任选或可替代的是,说明材料可描述缓解哺乳动物细胞或组织中的疾病或障碍的一种或多种方法。本发明的试剂盒的说明材料可例如粘附至装有本发明所识别的化合物、组合物、载体、或递送系统的容器,或者与装有所识别的化合物、组合物、载体,或递送系统的容器一起运送。可替代的是,说明材料可与容器分别运送,以为了接受者协同使用说明材料和化合物。

[0086] 本文中的术语“患者”、“受试者”、“个体”等可互换使用,并且是指无论是在体内还是体外适用于本文所述方法的任何动物、或其细胞。在某些非限制性实施方式中,患者、受试者或个体为人。

[0087] “治疗”处理是向表现出病理迹象的受试者给予以减少或消除这些迹象的处理。

[0088] 本文中使用的“治疗疾病或紊乱”意思是减少患者经历的疾病或紊乱症状的频率。本文所用的疾病和紊乱可互换使用。

[0089] 本文使用的短语“治疗有效量”是指足以或者有效地预防或治疗(延缓或预防疾病或病症的发作、预防疾病或病症的进展、抑制、降低或逆转)疾病或病症的量,包括缓和此类疾病的症状。

[0090] 范围:在本文的全部公开内容中,本发明的各方面能够以范围样式呈现。应该明白的是,范围样式的描述仅是为了方便和简洁,不应理解为对本发明范围的不可变限制。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及所述范围内的单独的数值。例如,应当认为例如 1-6 的范围的描述具体公开了子范围例如,1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6 等,以及所述范围内的单独的数字例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3 以及 6。不论范围的宽度均适合。

[0091] 说明

[0092] 后基因组时代的最大挑战之一是开发如下方法,所述方法能够可靠地分析单细胞裂解物中的转录物、代谢物、蛋白以及不同蛋白的翻译后修饰状态,所述单细胞裂解物通常从复杂活组织和复杂组织中以高空间和时间分辨率获得。

[0093] 本发明涉及开发微裂解技术和分析技术以及分析策略,以提供对来自活实体组织的单细胞裂解物进行取样和评价的能力,同时使所有细胞分子以分析上定义的状态或分析上可接近的状态保留,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态。在一个实施方式中,本发明提供了用于对来自单细胞的细胞分子进行分析的方法,所述方法包括:1) 裂解单细胞(例如,取样);2) 将所述裂解物施用至固体载体(例如,印制);以及 3) 使用期望的技术对裂解物进行分析。

[0094] 因此,本发明提供了能够对来源于生理相关的复杂活组织的单细胞裂解物进行蛋白质组学研究的组合物和方法。然而,本发明不应当被解释为仅限于蛋白质组学研究。更确切的是,可将单细胞裂解物用于任何分析,以评价核酸、多肽和任何代谢物。即,在根据本发明获得单细胞裂解物并印制在固体支持物上后,通过使用“标记-标记物检测方法”对(例如,“镧系元素标记-LA-ICP-MS 检测”对)对一个单斑点(无需样品细分)中的蛋白进行多元分析。在一些实例中,本发明的方法包括使用基于细胞的分析、基于蛋白的分析、以及基于 DNA 的分析。在一个实施方式中,当将此类技术用于对本发明的裂解物进行分析时,由此所获得的结果示出了在单细胞中所呈现的细胞组分的天然状态。

[0095] 在一个实施方式中,本发明包括向待裂解的活的实体组织中的单细胞提供“由内而外的裂解”的方法学,以提供包含所有类别分子的细胞分子的裂解物,所述细胞分子以分析上定义的状态或分析上可接近的状态保留,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态。本发明的“由内而外的裂解”的方法学与本领域的通常的实践(将细胞或组织浸没在增溶/解离溶液中)不同,由此本领域中的方法学的溶解/解离过程的定向性从外面开始。对本发明的由内而外的裂解方法的更详细讨论在本文别处进行讨论。

[0096] 在另一实施方式中,本发明提供了对存在于单细胞裂解物中的天然蛋白进行多元分析测量的分析方法。在本文中,该方法被称为“单细胞裂解物微阵列”。对本发明的单细胞裂解物微阵列法的更详细讨论在本文别处进行讨论。在一个实施方式中,该方法提供用于对单细胞裂解物中的转录物和代谢物进行多元测量的成组的兼容分析策略。

[0097] 裂解步骤

[0098] 本发明提供了用于从单细胞获得裂解物(在本文中称为单细胞裂解物)的方法。在一个实施方式中,单细胞裂解物具有小的体积(例如,约 10nl)。单细胞的裂解物样式可通过与基于裂解物样式的不同分析方法相互作用来开发。

[0099] 在一个实施方式中,本发明提供了对嵌入组织、优选实体组织、更优选活的实体组织中的单细胞进行裂解的方法。在一个实施方式中,本发明提供了用于对来自组织样品的单细胞进行裂解的“由内而外的裂解”的平台,其中,所述裂解物可进一步使用任何期望的分析方法进行分析。例如,根据本发明所述的“由内而外的裂解”方法对单细胞进行裂解,然后将裂解物印制在固体支持物上或者在固体支持物上成斑点,并使用期望的方案对印制的裂解物进行分析。

[0100] 在一个实施方式中,本发明的裂解方法采用了基于去污剂的单细胞裂解缓冲液。相比于固定方法,使用基于去污剂的裂解缓冲液的优势在于裂解物中的蛋白的状态为在分析上定义的状态。例如,SDS 裂解缓冲液使蛋白变性并使它们丧失活性,而 NP40 不会使蛋白变性。在这两种情况下,蛋白的状态是已知的,因为裂解缓冲液对分子的影响是已知的,因此状态是分析上定义的状态(不同于固定方法)。另外还可使用本发明的裂解方案在分析上接近所有的分子(不同于固定方法)。

[0101] 去污剂为两亲分子,意味着它们同时包含具有脂肪族特征或芳香族特征的非极性“尾巴”以及极性“头部”。极性头部基团的离子特性形成用于去污剂的广泛分类的基础;去污剂可为离子的(带电荷的,阴离子或阳离子)、非离子的(不带电荷的)或两性离子(同时具有带正电荷的基团和带负电荷的基团,但净电荷为零)。在任何情况下,去污剂分子都允许水不溶性的疏水性化合物分散(混溶)入水性介质中,包括对膜蛋白进行萃取和溶解。每份胶束的去污剂单体的数量(聚集数)和高于胶束形成的去污剂的浓度范围(称为临界胶束浓度,CMC)均为对各特定去污剂而言特有的特性。

[0102] 在一个实施方式中,裂解方法涉及以下顺序的事件:1) 含去污剂裂解缓冲液通过细胞膜中的局灶进入点进入靶细胞的胞内空间;2) 裂解缓冲液扩散至整个胞内空间;以及3) 靶细胞从内部裂解,从而使得对于活组织的复杂环境内的任何形状的靶细胞的裂解而言能够得到最高可能的单细胞分辨率。

[0103] 因此,本文描述的发明涉及对来源于实体组织的单细胞进行裂解的新方法,同时

使所有的细胞分子以分析上定义的状态或分析上可接近的状态保留,所述分析上定义的状态或分析上可接近的状态以已知方式映射至天然状态。该方法包括裂解步骤,所述裂解步骤包括通过细胞膜中的局灶进入点向系统中的靶细胞的胞内空间加入含去污剂的裂解缓冲液,以使裂解缓冲液在一段时间内扩散至遍布靶细胞的胞内空间,其中,所述靶细胞从内部裂解,从而为活组织的复杂环境内的任何形状的靶细胞的裂解提供最高可能的单细胞分辨率,并收集裂解物。在一个实施方式中,靶细胞包含在器官型培养物中。

[0104] 在一个实施方式中,将含去污剂的裂解缓冲液的局灶定向流施用至活组织中的靶细胞的细胞体。优选的是,所使用的去污剂的浓度高于其临界胶束浓度(CMC)值。这一特性使得所施用的裂解缓冲液能够进入胞内空间,而不溢出到组织中的邻近细胞。在细胞内部,将去污剂稀释至低于其 CMC 值的浓度值,使得裂解缓冲液能够在完整的胞内空间中积累,并分散和/或流遍靶细胞的复杂形状而不影响其复杂的组织周围。一旦在靶细胞中积累足够的裂解缓冲液,并且去污剂浓度重新接近其临界值,细胞膜从内部裂解,可将裂解物立即稀释并吸取入附近的抽吸通道中。在一个实施方式中,优选将裂解物立即稀释,从而在靶细胞的膜屏障一旦破裂时,不会影响其它细胞。因此,由内而外的裂解方法能够将复杂的实体组织中的任何形状单个活细胞转变成混合的裂解物溶液,其中,保留所有类别的分子。

[0105] 在一个实施方式中,所获得的单细胞裂解物的体积为约 1-500nL、优选 2-250nL、更优选 3-100nL、更优选 4-50nL、并最优选 5-10nL。

[0106] 在一个实施方式中,基于去污剂的单细胞裂解缓冲液包含一种或多种非离子去污剂,所述非离子去污剂包括但不限于:N-辛基-β-D-吡喃葡萄糖醛酸苷、N-辛基-β-D-麦芽糖苷、ZWITTERGENT 3.14、脱氧胆酸盐、n-十二烷基蔗糖、n-十二烷基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-十二烷基-β-D-麦芽糖苷、n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-辛基-β-D-吡喃麦芽糖苷、n-辛基-β-D-硫代吡喃葡萄糖苷、n-癸酰蔗糖、n-癸基-β-D-吡喃麦芽糖苷、n-癸基-β-D-硫代麦芽糖苷、n-庚基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-庚基-β-D-硫代吡喃葡萄糖苷、n-己基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-壬基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-辛酰蔗糖、n-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、n-十一烷基-β-D-麦芽糖苷、APO-10、APO-12、Big CHAP、Big CHAP(脱氧)、BRIJ® 35、C₁₂E₅、C₁₂E₆、C₁₂E₈、C₁₂E₉、环己基-n-乙基-β-D-麦芽糖苷、环己基-n-己基-β-D-麦芽糖苷、环己基-n-甲基-β-D-麦芽糖苷、毛地黄皂苷、ELUGENT™、GENAPOL® C-100、GENAPOL® X-080、GENAPOL® X-100、HECAMEG、MEGA-10、MEGA-8、MEGA-9、NOGA、NP-40、PLURONIC® F-127、TRITON® X-100、TRITON® X-114、TWEEN® 20、或TWEEN® 80。此外,可用本发明的方法使用离子去污剂,所述离子去污剂包括但不限于:BATC、十六烷基三甲基溴化铵、鹅脱氧胆酸、胆酸、脱氧胆酸、甘氨酸、甘氨酸脱氧胆酸、葡糖石胆酸、十二烷基肌氨酸、牛磺鹅去氧胆酸、牛磺胆酸、脱氢牛磺胆酸、牛磺石胆酸、牛磺石胆酸和 TOPPA。本发明的方法和组合物还可使用两性离子去污剂,所述两性离子去污剂包括但不限于:酰基硫代甜菜碱(amidosulfoobetaines)、CHAPS、CHAPSO、羧基甜菜碱和甲基甜菜碱。本发明的方法和组合物还可使用阴离子去污剂,所述阴离子去污剂包括但不限于:例如,SDS、N-十二烷基肌氨酸、脱氧胆酸钠、烷基-芳基磺酸盐/酯、长链(脂肪)醇硫酸盐/酯、烯基硫酸盐/酯和磺酸盐酯、α-烯基硫酸盐/酯和磺酸盐/酯、硫酸化单甘油酯、硫酸化醚、磺代琥珀酸酯(sulphosuccinates)、烷基磺酸盐/酯、

磷酸酯、烷基羟乙基磺酸盐和蔗糖酯。

[0107] 通常可将任何合适的液体用作本发明的裂解缓冲液中的溶剂。液体可为有机的或无机的,并可为纯的液体、液体的混合物或处于液体中的物质的溶液,并可包含另外的物质以增强溶剂的性质。可将适于使机体样品的细胞组分全部或部分溶液化的任何液体视为本文所用的裂解缓冲液。

[0108] 在一个实施方式中,对溶剂进行设计,以便于可能存在于样品中的细胞、细胞碎片、核酸、多肽、脂质和其它生物分子溶解。在本发明进一步的实施方式中,可将溶剂设计为确保机体样品的特定成分差别裂解,并让其它成分不溶解。

[0109] 在某些实例中,本发明的裂解缓冲液包含防止样品内的组分降解的一种或多种试剂。例如,此类试剂可包括酶抑制剂,如蛋白酶抑制剂、RNase 抑制剂、DNase 抑制剂、核酸酶(如核酸内切酶和核酸外切酶)抑制剂等。蛋白酶抑制剂可例如包括:丝氨酸蛋白酶的抑制剂、半胱氨酸蛋白酶的抑制剂、天冬氨酸蛋白酶的抑制剂、酸性蛋白酶的抑制剂、碱性蛋白酶的抑制剂、或中性蛋白酶的抑制剂。优选的是,裂解缓冲液包含不可逆蛋白酶抑制剂和可逆蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂以及 RNase 抑制剂的混合物。

[0110] 除了一种或多种的酶(如藤黄节杆菌酶、溶细胞酶、溶菌酶或溶葡萄球菌酶)外,可使用一种或多种无机盐(如氯化钠、氯化钾或氯化锂)、一种或多种酸和/或碱或缓冲剂(例如,以增加或减少 pH 值)、或者能帮助破坏细胞膜和/或细胞壁完整性(即,裂解或引起孔形成)的任何其它化合物或酶(例如,多粘菌素 B)。

[0111] 可将本发明的裂解方法施用至任何单一的细胞类型或细胞类型的混合。本发明适于使用任何细胞类型,包括原代细胞、活检组织、正常细胞系和转化细胞系、转导细胞、培养细胞,上述各种可为单一的细胞类型或细胞系;或上述细胞类型的组合。

[0112] 优选单细胞分离自组织。组织可来源于所有来源,特别是哺乳动物,并且有关于物种例如人、猿、啮齿动物等。组织来源可来自心、肺、肝、脑、血管、淋巴结、脾脏、胰腺、甲状腺、食道、肠、胃、胸腺等。本发明不应局限于细胞类型或组织类型。相反本发明应被理解为适用于任何细胞和任何组织。同时,适于通过组织工程化设计和构建的人工构建 3-D 组织样结构。

[0113] 例如,本发明对于检测细胞类型而言是有用的,所述细胞类型包括干细胞和祖细胞(如胚胎干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、神经嵴细胞等);内皮细胞;肌细胞;心肌细胞;平滑肌细胞和骨骼肌细胞;间充质细胞;上皮细胞;造血细胞;例如淋巴细胞,包括 T 细胞(如 Th1T 细胞、Th2T 细胞、Th0T 细胞、细胞毒性 T 细胞),B 细胞、前 B 细胞等,单核细胞,树突状细胞,中性粒细胞,巨噬细胞,自然杀伤细胞,肥大细胞等;脂肪细胞;涉及特定器官的细胞,所述特定器官如胸腺、内分泌腺、胰腺、脑(如神经元、神经胶质、星形胶质细胞、树突细胞等);以及转基因细胞。

[0114] 比起现有技术方法,本发明的由内而外裂解的方法的优势在于该方法不需要组织固定/透化以及组织解聚。

[0115] 在一个实施方式中,如本文别处所述,由内而外的裂解为完全自动化的。在另一实施方式中,由内而外裂解为用户驱动的部分自动化。在另一实施方式中,由内而外的裂解完全由用户驱动。

[0116] 印制步骤

[0117] 在裂解步骤后,可通过使用抽吸通道抽吸裂解物来收集裂解物,然后可将裂解物施用(即,印制或成斑点)至固体支持物,借此可使用期望的技术对裂解物进行评价。现有技术的印制方法(如,压电驱动(piezo-driven)印制以及接触印制)不适合以本发明的稀的裂解液使用,因为现有技术方法中的溶剂区域与分析区域几乎相同,因此导致每单位时间内较少的溶剂蒸发。现有技术方法也不适合小体积使用,因为现有技术的滴加递送工艺不是连续的递送工艺。滴加递送工艺使得每单位时间溶剂蒸发较少,因此通过在相同的斑点上重复沉积来印制整个样品要较长的时间,这导致在接触固体支持物前较大部分的小样品体积蒸发。即,现有技术印制方法不适合于印制小体积的稀释的单细胞裂解物(如约5-15n1、优选约10n1)。

[0118] 因此,本发明提供了以小体积使用的新的印制。在一个实施方式中,本发明的印制方法的毛细管组件并不必需接触固体支持物,但必须足够接近以确保连续递送。这种方法适合本发明的稀的裂解物,因为例如,溶剂区域比裂解物区域更大10-100倍时,导致在将裂解物连续递送至固体支持物上期间,每单位时间通过蒸发使得更多的溶剂移除。优选固体支持物为比起溶剂对分析物具有更高亲合力的多孔物。在另一实施方式中,本发明所述的印制方法的毛细管组件适于小的体积,因为在各沉积物内的连续递送导致更稀释的样品在各沉积物内沉积,由此需要较少的沉积物,以允许在接触固体支持物前仅小部分的小样品体积蒸发。因此,本发明的印制方法适合于印制小体积的稀的单细胞裂解物(如5-15n1、优选约10n1)。

[0119] 在一个实施方式中,本发明的印制方法适合以小体积的稀释的单细胞裂解物使用,所述单细胞裂解物包含本发明限定的分析物。在一个实施方式中,印制方法允许在多孔固体支持物(如硝化纤维素)上富集分析物。优选富集/印制方法包括使用对分析物具有较高亲合力并对溶剂或非分析物具有较低亲和力的任何多孔固体支持物。

[0120] 在一个实施方式中,本发明提供了释放含细胞流体样品的至少一个细胞的胞内内容物以用于分析的方法。例如,可将使用本发明的由内而外的裂解生成的裂解物在基板上成斑点以用于分析。在一个实施方式中,本发明提供了用于运输和裂解含细胞流体样品的至少一个细胞的微流体系统。

[0121] 在一个实施方式,将具有约10 μm 孔径的惯用的弯曲的玻璃微量移液器用于吸取单细胞裂解物。在一些实例中,孔径为约9 μm 、约8 μm 、约7 μm 、约6 μm 、约5 μm 、约4 μm 、约3 μm 、约2 μm 、约1 μm 。在一个实施方式中,孔径为1.5 μm 或更小。

[0122] 为分析各单细胞的蛋白含量,将由此吸取的各单细胞裂解物印制在固体支持物上。在某些实例中,固体支持物是可移动的材料(如金属溶胶或由乳胶或玻璃制成的珠)或者固定的基质(如玻璃纤维、纤维素条或硝化纤维素膜)。优选固体支持物为在安装于玻璃上的硝化纤维素垫。

[0123] 在一个实施方式中,本发明提供了用于递送或收集试验样品、稀释剂、试剂等的一个或多个储存器。用于实施本发明的微流体设备和系统可使用多种不同的基底材料制成,所述基底材料包括玻璃、熔融二氧化硅和多种聚合物材料,如PDMS或此类材料的组合。

[0124] 本发明包括本发明的细胞裂解物所附着至的任何表面,其中,细胞裂解物或其部分以预先确定的任意形状的空间阵列附着。

[0125] 多种固体支持物或基底均适合于本发明的目的(包括柔性基底和刚性基底)。柔

性意味着支持物能够弯曲、折叠或进行类似操作而不断裂。柔性固体支持物的实例包括丙烯酰胺、尼龙、硝化纤维素、聚丙烯、聚酯膜（如聚对苯二甲酸乙二酯）等。此外，柔性支持物还包括凝胶，例如胶原蛋白凝胶、基质凝胶和 ECM 凝胶。刚性支持物不容易弯曲，包括玻璃、熔融二氧化硅、石英、塑料（如聚四氟乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯和上述物质的混合物等）、金属（如金、铂、银等）等。

[0126] 基底能够以各种结构形成，包括滤器、纤维、膜、珠、颗粒、浸渍片 (dipsticks)、板、棒等。通常优选平面或平面的三维几何结构。除了一些优选非特异性的特定情况外，理想的是，制作基底的材料应该在结合事件期间展现出低水平的非特异性结合。

[0127] 在一些实施方式中，固体支持物为多孔的并可例如硝化纤维素（包括纯的硝化纤维素和改性的硝化纤维素）。硝化纤维素可为板或条的形式。此类板或条的厚度可在宽的界限内变化，例如约 0.01mm-0.5mm、约 0.02mm-0.45mm、约 0.05mm-0.3mm、约 0.075mm-0.25mm、约 0.1mm-0.2mm 或约 0.11mm-0.15mm。此类板或条的孔尺寸可在宽的界限内变化，例如约 0.025 微米-15 微米，或者具体而言，约 0.1 微米-3 微米；然而，孔尺寸并非意在成为选择固体支持物的限制因素。

[0128] 在一个实施方式中，多孔固体支持物材料的性质使得分析物分子能够快速结合。在一些实例中，将通过多孔固体支持物材料进行的分析物分子的这种快速结合用于在多孔固体支持物上的小（例如，约 5 微米-100 微米）的密集斑点的几何限制内富集分析物分子（如蛋白）。现有技术方法不能够将单细胞裂解物以密集的斑点（例如，来源于这一斑点的信号显著高于固体支持物材料的噪声和背景水平）印制在多孔固体支持物上。在本发明的一个实施方式中，将稀释的裂解物在固体支持物的相同斑点上重复成斑点，以使溶剂快速扩散至比起通过快速结合至多孔固体支持物材料而使分析物保留的区域大很多倍的区域。然后将溶剂蒸发，同时将分析物保留在多孔固体支持物的小的密集斑点内。在溶剂蒸发后，将稀释的裂解物的沉积物以上述方式在同一斑点上进行重复。如本文别处所述，此类富集使得能够在多孔固体支持物上对稀释的单细胞裂解物进行再浓缩。在小的密集斑点中对分析物的再浓缩使得固体支持物对在分析步骤中的整个记录信号的贡献微不足道。这一富集过程和由此将单细胞裂解物印制在多孔固体支持物上的密集斑点中的能力允许对来自单细胞裂解物的分析物进行分析（例如，单细胞微阵列样式）。

[0129] 在一个实施方式中，本发明包括使用标准曲线。不希望受任何具体理论的束缚，在选择目标时，有用的是寻找相对于给定病理样品中的所有其它蛋白而最大上调或下调的蛋白。因为标准曲线的斜率在不同的基于亲合力的探针（例如，抗体）中不同，所测量的“信号”导致蛋白目标的错误选择。通过将相应的标准曲线施用至信号而确定的测定量引起对蛋白目标的正确选择。因此，在不知道相应标准曲线的情况下，对一种分子的上调或下调是否比另一分子的上调或下调更显著进行定性观察是不可能的。

[0130] 在一个实施方式中，如本文别处所述，将裂解物和标准曲线印制在固体支持物（例如，硝化纤维素垫）上。

[0131] 可将纯化的重组蛋白和 / 或对照裂解物的标准曲线邻近于单细胞裂解物的印制斑点印制在同一硝化纤维素垫或另一固体支持物上。这一策略使得能够对多元测量的各维数构建标准曲线。这一策略使得能够在同一固体支持物上构建数个相同的标准曲线，以估算噪声水平并确定检测极限。这一策略使得能够将单细胞裂解物中记录的信号映射至并

行标准曲线上。在一个实施方式中,用传统的 Arrayer 印制标准曲线,因为标准曲线可从大量的材料进行构建。因此,在某些实例中,根据本发明的新的印制方法对稀释的单细胞裂解物进行印制,并将标准曲线以传统方式印制在同一固体支持物上。在这方面,整个印制程序包括两种印制方法,并与在传统的裂解物微阵列中使用的印制方法不同。

[0132] 在一个实施方式中,本发明的方法使得能够确定多元单细胞测量各维数的单细胞的噪声水平。这一策略使得能够确定多元测量的任何测量维数的高于检测极限的信号。

[0133] 如果结合合适的“标记-检测方法”对(例如,如本文别处所讨论的,镧系元素标记和 LA-ICP-MS 为“标记-检测方法”对),这一策略在如下方面消除了现有技术方法的缺点,本发明不需要为了多元分析的目的而对有限的单细胞材料进行亚分区。例如,结合 LA-ICP-MS 的镧系元素标记消除了对有限样品进行亚分区的需要。这是因为在本发明的单细胞裂解物微阵列中,来自沉积在一个斑点中的宝贵样品的这一个斑点的很多抗体标记可通过 LA-ICP-MS 读出。这一策略还在如下方面消除了现有技术方法的缺点,本发明不需要组织固定/透化和组织解聚。

[0134] 同时,这一策略具有优势。即,如本文别处所讨论,这一策略使得能够印制并行标准曲线,对微阵列中的抗体探针和其它基于亲合力的探针进行严格验证。该策略可结合施用至固体支持物的任何标记-标记物检测方法对。例如,如本文别处所述,可施用抗体的镧系元素-标记和 LA-ICP-MS 检测的对。

[0135] 在一个实施方式中,可将固体支持物以用于 MALDI 分析的基质进行预印制。

[0136] 在一个实施方式中,在施用裂解物前,通过将其它分子实体共价连接至固体支持物来制备该固体支持物(如,玻璃)。此类分子包括但不限于:抗体、酶、蛋白结构域。

[0137] 还可将裂解物释放入流体中用于进一步的分析。在将裂解物释放入流体中后,可通过分析方法对裂解物进行分析。可将裂解物汇集在一起进入一个流体容积中。例如,为增高总分析物的含量,可将来自细胞类型的细胞的裂解物合并在一个流体容积(例如,另一缓冲液)中。通过将许多裂解物汇集在一起进入一个流体容积中,可通过具有较高样品需求的分析方法实现分析。具有汇集的裂解物的流体容积还可通过蒸发进行浓缩。

[0138] 可在不预先印制在固体支持物上或预先释放入流体中的情况下,将裂解物施用至分析设备(例如,质谱)。

[0139] 分析步骤

[0140] 本发明的由内而外的裂解方法有利于以高的时间和空间分辨率从活的实体组织中获得单细胞裂解物的取样。由内而外的裂解使得能够对各取样单细胞中的“完整分子状态”进行分析,因为裂解物样式使得能够在任何种类的分子内部和之间进行分析。可将混合的裂解物细分成多个部分,从而以不同的方法对各部分进行分析。还可只用一种分析方法对整个裂解物进行分析。或者,可用一种方法并然后用另一种方法依次对整个裂解物进行分析。可将多于两种的分析方法依次施用至同一裂解物。

[0141] 在一个实施方式中,如在本文别处所述,将整个单细胞裂解物的天然蛋白富集在多孔固体支持物上的密集斑点内(如印制步骤中所述),并用单细胞裂解物微阵列进行分析。各自来源于一个细胞的多于一种的单细胞裂解物可在同一微阵列中进行分析。与任何的现有技术方法不同,单细胞裂解物微阵列使得能够用并行标准曲线对单细胞中的天然蛋白进行多元测量。

[0142] 在单细胞裂解物的情况中,将裂解物以单个斑点保留以用于蛋白的多元分析。因此,本发明部分基于如下方式的开发:通过使用“镧系元素标记-LA-ICP-MS检测”对作为“标记-标记物检测方法”对,在不具有样品亚分区的单一斑点中对蛋白进行多元分析。

[0143] 在一个实施方式中,可将其它的“标记-标记物检测方法对”(除了镧系元素-LA-ICP-MS)用于单细胞裂解物微阵列样式以对其它分子种类的蛋白或其它分子进行检测。例如,可将核苷酸序列缀合至抗体而非镧系元素螯合剂,并可用RT-qPCR反应而不是LA-ICP-MS来实现多元分析。

[0144] 在另一实例中,还可将mRNA结合至硝化纤维素,并能够以与蛋白相同的方式富集在硝化纤维素的小的密集斑点内。可运行qPCR反应来检测mRNA的丰度。

[0145] 在一个实施方式中,用单细胞裂解物微阵列对单细胞裂解物分区中的天然蛋白进行分析。用另一方法(例如,用于转录物分析的RT-qPCR、或用于代谢物分析的MALDI)对单细胞裂解物的其它分区进行分析、或将其它分区进一步细分为亚分区。该过程可持续至制备出所需数量的亚分区。然后,可用不同的分析方法对各个亚分区进行分析。为证实各亚分区确实代表整个裂解物,可用相同的分析方法对裂解物的亚分区进行分析。由于分析方法变得越来越灵敏以及分析方法的检测极限得以改善,可由一个单细胞裂解物生成更多的亚分区,并用不同的分析方法进行分析。

[0146] 在一个实施方式中,本发明允许跨越分子类别进行多元分析。例如,可将本发明的裂解物细分。在这种情况下,相比于仅为了在分子类别内进行多元分析的目的而进行的细分,优选为了在子部分上使用不同的分析方法的目的而进行的细分。

[0147] 在其它实施方式中,可将与裂解物样式兼容的任何其它分析方法用于裂解物的分析。此外,可将细胞类型的单细胞裂解物汇集在一定体积的液体中,然后施用至分析方法。在其它实施方式中,可将细胞类型的单细胞裂解物汇集在一定体积的溶剂(如缓冲液)中,并在施用至分析方法前通过溶剂蒸发来增高分析物的浓度。与裂解物样式兼容的分析方法包括但不限于:质谱法、基于PCR的方法、基于测序的方法等。

[0148] 本发明的方法和组合物提供了但不限于下述的一个或多个属性:(1)小的样品和抗体需求;以及(2)可规模化并适用于机械自动化和多元分析。可在单个支持物上对信号蛋白的表达和翻译后修饰进行探测,产生不同蛋白的量化表达数据以及独特修饰位点的磷酸化水平。

[0149] 对多元的蛋白微阵列平台提供方法和试剂盒,所述平台用于对细胞组分进行同步监测。特别感兴趣的是受翻译后修饰影响的组分,更特别是信号通路组分。微阵列包括单细胞裂解物,其中,所述细胞来自活的组织。

[0150] 本发明允许对改变的蛋白翻译后修饰(PTM)和PTM改变状态进行快速且大规模的诊断筛查。该方法部分涉及将来自单细胞的浓缩的细胞提取物或生物流体样品施用至不同的分析测试,并进行适当的补充以实施一种或多种特定的PTM或PTM改变反应。具体而言,通过对修饰的蛋白进行标记并对阵列进行扫描,然后来对一种或多种PTM或PTM改变进行检测。

[0151] 共价修饰的蛋白难以通过凝胶电泳这一标准的生化技术进行鉴定,这是因为经修饰的蛋白带条遍布整个凝胶,所述共价修饰的蛋白例如多泛素化蛋白、泛素化蛋白、磷酸化蛋白、糖基化蛋白、SUMO化(sumoylated)蛋白、乙酰化蛋白、S-亚硝基化蛋白或亚硝基化蛋

白、瓜氨酸化蛋白或脱亚氨化蛋白、neddylated 蛋白、添加 OC1cNAc 的蛋白、ADP-核糖基化蛋白、甲基化蛋白、羟甲基化蛋白、fattenylated 蛋白、ufmylated 蛋白、异戊二烯化蛋白、肉豆蔻酰化蛋白、S-棕榈酰化蛋白、酪氨酸硫酸化蛋白、甲酰化蛋白以及羧基化蛋白。同样难以使用此类标准的生物化学方法进行检测来鉴定 PTM 的相反改变,所述改变例如去泛素化 (DUB)、去磷酸化、去糖基化、去 SUMO 化、脱乙酰化、去 S-亚硝基化或去亚硝基化、去瓜氨酸化或去脱亚氨化 (dedeiminatation)、deneddylation、OC1cNAc 的移除、脱 ADP-核糖基化、去甲基化、脱羟基化、defattenylation、deufmylation、去异戊二烯化、去肉豆蔻酰化、去 S-棕榈酰化、酪氨酸脱硫酸化、脱甲酰化、脱羧和脱酰胺。相比之下,用本文所述的方法,在固体状态阵列上或使用多元分析样式(例如,裂解物微阵列)直接进行 PTM 或 PTM 改变反应,这也使得能够对数千种蛋白同时进行分析。因此,本发明克服了早前在鉴定 PTM 或 PTM 改变状态方面的障碍。

[0152] 在本发明的方法中可使用多种质谱系统来对单细胞裂解物进行鉴定和/或定量。具有高质量准确度、高灵敏度和高分辨率的质量分析仪包括但不限于:离子阱、三重四极质谱计、飞行时间质量分析仪、四极飞行时间质谱仪和傅里叶变换离子回旋质谱分析仪 (FT-ICR-MS)。质谱仪通常配备有基质辅助激光解吸附 (MALDI) 和电喷雾电离 (ESI) 离子源(尽管还可使用肽电离的其它方法)。在离子阱 MS 中,通过 ESI 或 MALDI 将分析物电离,然后放入离子阱中。随后可基于离子阱的选择性释放,通过 MS 对俘获离子分别进行分析。例如,可通过具有 MALDI-TOF 或 ESI-TOF 系统的单级质谱对蛋白进行分析。质谱分析方法为本领域技术人员所公知(参见例如, Yates, J., 1998, *Mass Spect* 33:1-19; Kinter 和 Sherman, 2000, *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, John Wiley&Sons, New York; Aebersold 和 Goodlett, 2001, *Chem. Rev.* 101:269-295; Banez 等, 2005, *Curr Opin Urol* 15:151-156)。对于高分辨率蛋白分离,可使用利用毛细管反相色谱法作为分离方法的液相色谱 ESI-MS/MS 或自动化的 LC-MS/MS (Yates 等, 1999, *Methods Mol. Biol.* 112:553-569)。

[0153] 在一个实施方式中,分析方法为质谱法。质谱法可包括但不限于:GC/MS、LC/MS、LC/MS/MS、MALDI-TOF、LC-ESI-MS/MS、MALDI-MS、串联 MS、TOF/TOF、TOF-MS、TOF-MS/MS、triple-quad MS 和 triple-quad MS/MS。

[0154] 在另一实施方式中,单细胞裂解物可使用基于免疫亲合力的分析法(例如 ELISA、蛋白质印迹和放射免疫分析法)进行分析。在这种情况下,可用的其它方法包括依次进行同位素编码的亲合力标签 (ICAT),以及多维色谱法和 MS/MS。

[0155] 在一个实施方式中,本发明所述分析阶段的分析组件可为免疫分析法,例如 ELISA、EIA、RIA、横流 (lateral flow) 和流过法样式 (flow-through formats)。

[0156] 在一个实施方式中,单细胞裂解物可通过施用至 RT-qPCR、RNA-Seq、MALDI-MS 等进行分析。

[0157] 本发明的方法包括使用任何组合物或试剂来检测和分析 PTM 以及蛋白的表达水平,所述组合物或试剂可通过光谱学手段、光化学手段、生物化学手段、免疫化学手段、电学手段、光学手段或化学手段进行检测,从而提供可检测的信号以鉴定 PTM 蛋白水平。可使用本文所述的方法对 PTM 和蛋白表达水平进行检测,例如,附着在每个蛋白分子的给定化学基团的平均数量是否有变化,附着在每个蛋白分子的基团或化学基团的类型是否有变化,

或者相对于对照样品而言患者样品中是否存在具有不同修饰类型的蛋白分子的不同混合物。蛋白 PTM 状态的改变包括：从未修饰的蛋白变成经修饰的蛋白，反之亦然；以及添加到蛋白中的化学部分的数量或类型的变化。在本文中使用的对照样品或水平用来描述对照患者、对照或参考数据、在较早的时期从同一患者获得的数据。例如，在一些实施方式中，对照样品为从生物样品获得的功能细胞提取物，所述生物样品从并未患在试验样品中检查到的疾病的受试者中获得。因此，在一些实施方式中，相比于背景或用对照进行的反应，来自固态阵列的信号增高表明了增加的 PTM 或蛋白表达水平。本文中使用的术语“增加 (increased/increase)”或“增强 (enhance)”通常意味着统计学上显著量的增加；为避免任何疑问，术语“增加”或“增强”意思是相比于参比水平，至少约 10%、至少约 15%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 30%、至少约 35%、至少约 40%、至少约 45%、至少约 50%、至少约 55%、至少约 60%、至少约 65%、至少约 70%、至少约 75%、至少约 80%、至少约 85%、至少约 90%、至少约 95%、或上至并包括 100% 的增加，或者相比于对照样品或水平，至少约 2 倍、或至少约 3 倍、或至少约 4 倍、或至少约 5 倍、至少约 6 倍、或至少约 7 倍、或至少约 8 倍、至少约 9 倍、或至少约 10 倍的增加，或者 10 倍以上的任何增加。

[0158] 实施例

[0159] 实验实施例

[0160] 通过参考下述实验实施例，对本发明进行进一步的详细描述。除非另有说明，这些实施例仅为了说明的目的而提供，并非意在限制。因此，不论以何种方式都不应将本发明解释为限于下述实施例，而是应该解释为本发明涵盖了由于本文提供的教导而变得明显的任何以及所有变型。

[0161] 无需进一步的描述，认为本领域技术人员能够使用先前的描述和下面的说明性实施例来制造和利用本发明的化合物并实施所要求保护的方法。因此，下面的操作实施例具体指出了本发明的优选实施方式，且不应以任何方式解释为限制该公开的其它内容。

[0162] 实施例 1：实体组织中的单细胞取样

[0163] 本文呈现的结果证明成功开发了新的取样方法，所述取样方法允许以高时间和空间分辨率从活的复杂实体组织中获得单细胞裂解物。

[0164] 将含去污剂的裂解缓冲液的局灶定向流施用至活组织中的靶细胞的胞体（图 7、图 26 和图 31）。该流的直径小于胞体的直径。去污剂的浓度高于临界胶束浓度 (CMC) 值。这两个特性使得所施用的裂解缓冲液能够进入胞内空间，而不溢出到组织中的邻近细胞。在细胞内，将去污剂稀释至低于 CMC 值的浓度值，以使裂解缓冲液能够在完整的胞内空间中积累并弥散至整个复杂形状的靶细胞，而不影响该细胞复杂的组织环境。一旦在靶细胞内积累足够的裂解缓冲液，并且去污剂浓度再次接近临界值，细胞膜从内部裂解（“由内而外的裂解”），并且裂解物立即通过附近的抽吸通道吸取。所获得的单细胞裂解物的估计体积为约 5n1-10n1。裂解缓冲液含有不可逆蛋白酶和可逆蛋白酶、磷酸酶和 RNAase 的抑制剂的混合物。一旦裂解缓冲液进入胞内空间，所述裂解缓冲液混合并匀化胞内组分。在 10-20 秒内，由内而外的裂解方法以完美的空间分辨率将复杂实体组织中的任何形状的单活细胞转变成具有所保留的所有类别分子的混合裂解物溶液（图 7）。

[0165] 现在对这些实验中使用的材料和方法进行描述。

[0166] 材料和方法

[0167] 成像装置

[0168] 取样装置以 Olympus BX51WI 荧光显微镜为基础而建立,所述荧光显微镜附加有 Hamamatsu Orca-R2 相机以及用于激发通道和发射通道二者的两个快速滤光盘 (Sutter Instrument 公司)。两个滤光盘均通过 Lambda10-3 控制器 (Sutter Instrument 公司) 加以控制。激发通道中的光路为 SmartShutter™ 控制器 (获得自 Sutter Instrument 公司)。成像过程由 Micromanager 软件控制。

[0169] 使用以下的水浸物镜:Olympus 10× (UMPLFLN 10XW, NA 0.3,工作距离 3.5mm)、20× (UMPLFLN 20XW, NA 0.5,工作距离 3.5mm) 以及 40× (LUMPLFLN 40XW, NA 0.8,工作距离 3.3mm)。选择这些物镜是因为在高数值孔径的情况下具有可接受的工作距离。将成像装置安装并牢固地固定至 TMC 气压表 (air-pressure table),以避免任何振动。

[0170] 动物和器官型培养

[0171] 所有动物程序遵从哈佛医学院 (HMS) 规定,并符合活跃动物方案 (active animal protocol) 下实施。GIN 小鼠购自 Jackson 实验室。GAD67-GFP 小鼠获得自 Murthy 实验室 (哈佛大学)。GIN 小鼠用于大多数实验。使用用于海马器官型培养的标准方案 (Stoppini 等,1991, J Neurosci Methods. 37(2):173-182)。使小鼠幼崽 (出生后第 5 天或第 6 天) 经历低温,并将其处死。在补充有 6.5g/L 葡萄糖的 Gey's 平衡盐溶液中对海马进行解剖。通过使用手动组织切片获得 300 μm 厚的海马切片。然后,将获得的海马切片迅速转移至 Millipore 插入物 (获得自 Millipore;0.4 μm 高,30mm 亲水性 PTFE),并在孵育器中于下列条件下进行培养:5% CO₂,37°C。培养介质含有热灭活的马血清,并按照如下进行制备:50ml MEM 2×、120mg Tris、910 μL 的 7.5% NaHCO₃ 溶液、50ml 热灭活马血清、50ml 1×HBSS 以及 ddH₂O (加至 200ml 总体积)。在裂解单细胞前,将海马切片血清剥夺 10 小时。将海马切片成功培养超过一个月的时间,其中,形态和组织构造特征得到出色保留。

[0172] 在由内而外的裂解过程期间,用于维持活组织的定制记录室 (recording chamber) 由 Sylgard® 184 (Dow Corning Corporation) 铸造。具有活的器官型切片的 Millipore 插入物可插入并可容易地从该室中移出。将组织切片洒入加热的 HBSS 溶液中。在由内而外的裂解过程期间以及之后立即停止洒入。

[0173] 由内而外裂解的装置

[0174] 微量移液器由 P-1000 微量移液器控制器 (Sutter Instrument 公司) 从丝状硼酸盐玻璃管 (Sutter Instrument 公司;OD:1.0mm, ID:0.78mm) 控制而成。微量移液器的定制在显微拉制仪 (Narishige MF-900) 的协助下得以实现。

[0175] 裂解缓冲液根据本文别处所述进行制备。在装载递送微量移液器之前,向裂解缓冲液中加入抑制剂的混合物 (Halt™ 蛋白酶抑制剂混合物 3×, Halt™ 磷酸酶抑制剂混合物 3×),并使该裂解缓冲液保留在冰上。AlexaD555 (MW 10,000) 购自 Invitrogen。SR101 购自 Sigma。

[0176] 成组的三个 MP-285 和一个 MP-225 显微操纵器获得自 Sutter Instrument,并在两个相联的 MPC-200 控制器 (Sutter Instrument 公司) 的基础上整合。然后,经由 USB 端口和用于 USB 端口控制的合适的 C++ 库将主要的 MPC-200 控制器与 Microsoft Visual Studio 中的 GUI 相连接。以如下方式对所有操纵器进行安排并对齐:使由内而外的裂解程序与印制程序之间的快速切换能够在数秒内完成 (图 29)。压力控制器获得自 MicroData

Instrument, 并通过并行端口和用于平行端口控制的 C++ 库与 GUI 相连接。

[0177] 记录室定位在一个 MP-285 操纵器上。具有硝化纤维素垫的所有玻璃载玻片获得自 GraceBioLabs。将具有硝化纤维素垫的玻璃载玻片附加至另一 MP-285 操纵器。将递送微量移液器安装在 MP-225 操纵器上, 并将抽吸 / 印制微量移液器安装在第三 MP-285 操纵器上。对成组运动进行预编程, 以在完成由内而外的裂解后从记录室快速切换至硝化纤维素载玻片。对成组运动进行预编程, 以使吸取微量移液器从记录室外快速缩回, 并正好在印制之前定位于硝化纤维素垫上方数微米处。印制手动进行, 但还可自动化进行。所有这些运动在数秒内完成。当对一个细胞上的由内而外的裂解过程进行成像时, 使用 40× 物镜。在对数个细胞上的自动化型式的由内而外的裂解进行成像时, 使用 20× 物镜。将 10× 物镜用于将单细胞裂解物印制在硝化纤维素上, 并对整个组织切片的概况进行成像。如本文别处所述, 所使用的显微操纵器的亚微米分辨率和可编程性允许单细胞裂解并以可重复的方式印制单细胞裂解物。

[0178] 印制并行滴定系列

[0179] 硝化纤维素载玻片获得自 GraceBioLabs。2470Aushon Arrayer 获得自 Aushon Biosystems, 以将滴定系列 (titration series) 邻近单细胞裂解物印制在硝化纤维素载玻片上。GFP 蛋白获得自 Millipore(14-392)。PKC δ 和 PKC α 获得自 Invitrogen(P2287, P2227)。将所有纯化蛋白稀释在用于单细胞裂解的相同的含 SDS 缓冲液中, 并在将单细胞裂解物印制在同一硝化纤维素垫上之前, 将所述纯化蛋白以 1:2 的稀释系列印制在硝化纤维素垫上。将每个斑点八次沉积用于高精度 Aushon Arrayer 的设置中, 以使滴定系列的各印制的 200 μm 斑点内的蛋白达到均匀分布。

[0180] 抗体

[0181] 使用由 Sevecka 等描述的用于漂洗具有印制的裂解物的硝化纤维素载玻片以及随后的抗体孵育的方案 (Sevecka 和 MacBeath, 2006, Nat. Methods 9:152-158; Sevecka 等, 2011, Mol. Cell Proteomics 10:M110.005363)。使用由 Sevecka 等描述的用于漂洗印制的硝化纤维素载玻片 (图 30) 以及随后的抗体孵育的方案 (Sevecka 等, 2011, Mol Cell Proteomics. 10(4):M110.005363; Sevecka 和 MacBeath, 2006, Nat Methods. 3(10):825-831)。将硝化纤维素载玻片首先在 PBST 中进行短暂的漂洗, 然后在 Tris 缓冲液 (pH 9) 中漂洗 48 小时。然后, 在 4°C 下, 将载玻片在由 LiCor 提供的 5% BSA/PBST 封闭溶液 (Odyssey 封闭缓冲液) 中封闭 1 小时。接下来, 将载玻片用一抗进行孵育。在 4°C 下, 将 β -肌动蛋白一抗 (A1978, Sigma) 和 GFP 一抗 (2956, Cell Signalling Technology) 以 1:1000 在 5% BSA/PBST 或 Odyssey 封闭缓冲液 (LiCor) 中孵育 24 小时。随后, 在 4°C 下, 将二抗 (抗兔 680 和抗小鼠 800) 以 1:1000 施用 12-24 小时。然后, 将硝化纤维素载玻片在 PBST 中迅速漂洗数次, 并在 LiCor Odyssey 扫描仪 (LiCor) 上进行扫描。

[0182] 现在对实验结果进行描述。

[0183] 基于去污剂的裂解

[0184] 本发明的取样方法适用于活的实体组织。因此, 本发明的取样方法避免了解聚过程, 并消除了人为假象以及各种固定方案的偏差。这一取样方法还通过并入基于去污剂的裂解的技术优势而保留转录物、蛋白和代谢物 (表 1)。

[0185] 表 1: 基于去污剂的裂解与固定之间的比较

[0186]

固定/染色/透化	活细胞的基于去污剂的裂解
未知的机制参数	已知去污剂/蛋白的生物物理学参数以及去污剂/膜相互作用
分子保留根据如下变化 ->细胞类型 ->分子类别 ->各类别内的分子	通过蛋白变性以及通过蛋白酶/RNase/磷酸抑制剂保留所有的蛋白、转录物、代谢物
除非还原为裂解物形式，否则与分析方法不兼容	对于所有的蛋白、转录物和代谢物，与MS、蛋白质印迹、裂解物微阵列、RT-qPCR 和测序方法兼容

[0187] 混合的裂解物样式和靶细胞的所有分子的保留使得能够通过将 RT-qPCR (或 RNA-Seq)、LA-ICP-MS 以及 MALDI-MS 施用至均匀稀释的裂解物的亚分区来对每个所取样单细胞中的“完整分子状态”进行测量 (图 3)。

[0188] 比起生命科学的任何其它领域,对可维持的活组织样品的需要在神经科学中更为急切。因为缺乏组织背景,难以对分离的神经元培养物中的神经元形态学与神经功能之间的关系进行研究。分离的神经培养物还使得对很多神经元细胞类型的形态发展和分子的时间进程进行研究变得有挑战性。由于对可维持的活组织系统的这一急切需求,在基础生物研究的其它领域出现对此类活组织系统的需求前,开发出器官型培养物并神经科学中广泛采用。

[0189] 可将啮齿动物脑区域的器官型培养物在孵育器中维护数月。在优化的程序中对感兴趣的小鼠脑区域进行快速解剖和切片后,可在专门的培养皿中的多孔膜上对收获的切片进行培养 (Stoppini 等,1991, J. Neurosci. Methods 37:173-182)。此类装置的实例在图 4A 中显示。在该装置中,培养基并非围绕着组织切片,而是通过组织切片的毛细管作用从多孔膜的下面吸取。培养基可为基于血清的或无血清的。以这种方式可成功培养海马、皮质、丘脑和小脑 (Gähwiler 等,1997, Trends Neurosci. 20:471-477 ;Banker 和 Goslin,1998, Culturing Nerve Cells, 第二版)。

[0190] 啮齿动物脑区域的器官型培养物中的相关分子 / 形态变化和发展的时间进程类似于体内 (在活的啮齿动物中) 的相关分子 / 形态变化和发展的时间进程。例如,在大鼠中,体内长时程增强效应 (LTP) 的起始发生在出生后第二周的末期 (Muller 等,1993, Brain Res. Dev. Brain Res. 71:93-100)。在 Muller 等的研究中,比起由 2 天龄的大鼠制备的器官型海马培养物,由 8 天龄的大鼠制备的器官型海马培养物表现出快得多的 LTP 起始。然而,在这两种情况中, LTP 的起始均发生在相当于在体内的出生后 12-14 天的时间

点的时间 (Muller 等, 1993, Brain Res. Dev. Brain Res. 71:93-100)。这一观察表明, 在器官型培养物中保留了分子发展的天然进程。这一观察与如下理论一致: 器官型培养物中的分子发展的进程并非是制备程序的结果。根据通过不同年龄大鼠的急性脑切片和器官型培养物中的比较性的电生理学和形态学测量结果进行的评估可知, 器官型海马培养物中的突触发生的时间进程也类似于体内的突触发生的时间进程 (Gähwiler 等, 1997, Trends Neurosci. 20:471-477; Muller 等, 1993, Brain Res. Dev. Brain Res. 71:93-100)。在 Muller 等的同一研究中, 器官型培养物中的海马的不同区域间的突触发生率的空间分布类似于体内的突触发生率的空间分布 (Muller 等, 1993, Brain Res. Dev. Brain Res. 71:93-100)。

[0191] 最近建立并优化了人结肠肿瘤、肺肿瘤和前列腺肿瘤的器官型培养物 (Vaira 等, 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107:8352-8356)。人肿瘤的培养程序与用于培养啮齿动物脑组织的上述培养程序类似。Vaira 示出: 在移出后, 经培养的人肿瘤的空间构造和形态在器官型培养物中保留 5 天, 并类似于原始的组织构造。在该 5 天培养期间, 增殖细胞和凋亡细胞的计数均未改变。Vaira 还示出: 在人肿瘤的器官型培养物中可进行药理研究和分析研究。对多种人肿瘤的成功培养表明, 器官型培养的方法学是通用的, 并可施用至人和动物中的不同器官。

[0192] 在分析生化研究中, 去污剂被广泛用于细胞裂解。所有严格的分析方法均需要样品的裂解物样式。表 1 总结了相比于细胞固定, 基于去污剂的细胞裂解的优势。存在大量的生物物理研究, 所述研究描述去污剂 / 蛋白相互作用的参数和去污剂 / 膜相互作用的参数 (Helenius 和 Simons, 1975, Biochim. Biophys. Acta 415:29-79, Lichtenberg 等, 1983, Biochim. Biophys. Acta 737:285-304)。

[0193] 去污剂属于两亲性脂质的分子类别。各去污剂单体包含极性区域 (头部) 和非极性区域 (尾部)。后者通常由烷基链和 / 或芳香族基团构成。去污剂单体的尾部的大小决定了与水相互作用的区域。尾部与水的相互作用区域决定了两亲性去污剂的整体疏水性 (归因于水中熵的减少)。通常, 具有高疏水性的两亲性脂质 (磷脂和胆固醇) 不溶于水, 而具有较低疏水性的两亲性脂质 (去污剂) 是可溶的并具有临界胶束浓度 (CMC)。当给定的去污剂的总浓度达到 CMC 值时, 任何过量的去污剂分子向溶剂中的添加均通过胶束形成过程来补偿, 从而使得游离的去污剂单体的浓度不会超过 CMC 值。去污剂的 CMC 值通过较高的疏水性而降低, 并因尾部区域的庞大而增加, 并且还通过头部区域的电荷而增加。因此, 不同的去污剂具有不同的 CMC 值。给定的去污剂的 CMC 值和胶束中的去污剂分子的数量 (聚集数) 还取决于温度、离子强度和溶液的 pH 值。

[0194] 借助于脂质体模型对去污剂与生物膜的相互作用进行了广泛研究 (图 6)。当具有脂质体的溶液中的去污剂分子的总浓度增加到高于 CMC 值, 游离的去污剂单体的浓度保持在低于 CMC 值的水平, 因为过量的去污剂分子整合入脂质体的磷脂双层中。随着去污剂分子总浓度进一步增加, 脂质体磷脂双层中的去污剂分子的数量达到饱和水平, 由此引起混合胶束的形成。这些混合胶束含有脂质体磷脂和去污剂分子。通过再进一步增加溶液中的去污剂分子的总浓度, 所有脂质体均溶解成混合胶束。因此, 在溶液中的去污剂各浓度下, 在游离单体与整合入磷脂双层中的单体之间存在平衡, 并且在整合入磷脂双层中的去污剂单体与混合胶束的形成之间存在平衡。胶束形成过程很快 (速率常数为 10s^{-1})。根据经验, 这也示出去污剂 (例如, 十二烷基硫酸钠 (SDS)) 的存在使得红细胞的膜面积增加, 并保护

红细胞免受渗透压休克。

[0195] 胶束形成对生物膜的溶解至关重要,但对去污剂与可溶性蛋白的结合而言并不关键。在浓度低于 CMC 值时,去污剂作为单体与可溶性蛋白结合。离子型去污剂(例如,SDS)通常具有变性的特性。去污剂先与蛋白表面上的疏水性区块结合,由此开始使蛋白展开。然后,该展开过程使更多疏水性区块暴露。因此,去污剂诱导的变性的整个过程是协同性的。结合至可溶性蛋白的去污剂分子不能用于胶束形成,并且结合至胶束的去污剂分子不能用于蛋白结合。因此,胶束形成的过程和蛋白结合的过程是竞争性的。

[0196] 研究最广泛的去污剂是 SDS。SDS 为将可溶性蛋白变性成直的多肽区的阴离子去污剂,并在大多数蛋白中具有恒定的结合比。重要的是,SDS 甚至在高于 CMC 值的浓度下不会使一些关键蛋白酶变性。当将 SDS 用于细胞裂解时,通常添加可逆蛋白酶和不可逆蛋白酶、以及激酶 / 磷酸酶抑制剂的混合物。SDS 的 CMC 值取决于溶液的组成而广泛变化。在纯水中,SDS 的 CMC 值为 8.2mM。在 0.5M NaCl 溶液,SDS 的 CMC 值为 0.52mM。图 5 显示了 SDS 的浓度 - 温度相图。这一相图也示出:在生物温度(高于临界胶束温度)下,SDS 不以结晶形态存在。

[0197] 由内而外的裂解的机制

[0198] 使用以下的裂解缓冲液制剂:50mM Tris · HCl、2% SDS、5% 甘油、1mM NaF、0.5mM AlexaD555(10,000)、Halt™蛋白酶抑制剂混合物 3×、和 Halt™磷酸酶抑制剂混合物 3×。在数个初始的实验中,用硫代罗丹明 101(SR 101) 代替 Alexa 555 葡聚糖。在实验中使用在海马中间神经元的不同子集中表达胞液可溶性 GFP 的两个小鼠品系。这些小鼠品系为:GAD67-GFP(广泛系列的推定中间神经元)和 GIN(生长抑素中间神经元)。在 GAD67-GFP 小鼠或 GIN 小鼠之一的器官型海马切片中实施实验。

[0199] 借助于附加至显微镜的快速滤光盘,通过获取 GFP 和 Alexa 555 荧光强度的框图对由内而外的裂解过程进行成像。裂解缓冲液的递送过程通过施行控制的玻璃微量移液器的不同配置进行优化。实验中使用的递送移液器的尖端孔径为 0.7 μm。以一定角度或从上面(垂直施用)将裂解缓冲液加入到靶细胞中。后一配置通过精心制作递送微量移液器并使其锥尖(taper)弯曲,从而使裂解缓冲液的局灶流垂直于组织切片的表面来实现。在一些实例中,尝试在递送起始时防止递送微量移液器的尖端接触到靶细胞的表面。

[0200] 在对单细胞裂解物实施最终吸取的实验中,使用具有 10 μm 孔径的惯用的弯曲玻璃微量移液器。使由该抽吸微量移液器产生的流动矢量垂直于组织切片表面。将抽吸微量移液器的孔定位在组织切片的表面上 20 μm 并正好位于靶细胞的上方。不施加主动负压,因为抽吸仅通过玻璃毛细管的毛细管作用而产生。使用控制的玻璃微量移液器,因为它们成本低且易于定制。

[0201] 含 SDS 的裂解缓冲液一进入表达 GFP 的靶细胞的胞内空间,就观察到 GFP 的快速变性。在两种小鼠品系(GAD67-GFP 和 GIN)中,GFP 自由扩散至整个胞液。并且 GFP 由于其相对小的尺寸还进入到细胞核中。在含 SDS 的裂解缓冲液进入胞内空间后,GFP 荧光立即降低到背景水平(图 8、图 10、图 19、图 27 和图 28)。在这些实例中,GFP 荧光持续减少,而 Alexa 555 葡聚糖(或 SR101)分子严格地位于单细胞的几何边界内。因此,GFP 变性看起来发生在胞内,而膜屏障仍然完好。在细胞膜溶解之前,GFP 荧光消失。图 8 示出了含 SDS 裂解缓冲液向单细胞的递送,而并不同时进行抽吸(图 9 描述了在完全自动化的连续微裂

解程序中的裂解细胞)。在图 8 描述的所有情况中,在裂解缓冲液进入靶细胞时以及在裂解缓冲液通过扩散 / 对流完全填满胞内空间之前,在同一时刻的 GFP 荧光开始下降。这些观察与生物物理学研究一致,表明去污剂单体甚至在浓度低于 CMC 值的情况下结合并使可溶性蛋白变性,这在本文别处加以讨论。

[0202] 在由内而外的裂解的所有实例中,由裂解缓冲液在靶细胞的几何边界内积累,观察到膜面积的可见增加(图 10)。这一观察与在使 SDS 单体饱和前并在引起混合胶束形成前,SDS 单体向靶细胞的磷脂双层中的整合相一致。膜面积的这一增加同时伴随生长细胞内的 GFP 荧光的降低。这与去污剂单体对蛋白的结合和膜溶解是竞争性过程的概念一致。

[0203] 重要的是,当将裂解缓冲液连续施用至靶细胞的胞内空间时,SR101 分子的 Alexa 555 葡聚糖分子(10,000MW)并未离开所述靶细胞的几何限制。尽管不希望受任何具体理论的束缚,但是这表明在膜生长阶段中,膜屏障是完整的。细胞膜的溶解可在细胞膜开始显著增长后观察到,同时观察到 Alexa 555 染料离开靶细胞的几何限制(图 12)。这些观察结果与以下研究一致,所述研究描述通过去污剂进行的生物膜的溶解过程,在本文别处加以讨论。

[0204] 在一些实例中,裂解缓冲液 / 溶解溶液的流优选起始较窄,施用通道的孔径为约 1.5 μm 或更小。不希望受任何具体理论的束缚,认为如果施用通道的孔径较大,那么较难将去污剂流直接引向细胞的中心,并从而产生聚焦的胞内源。然后,在使细胞核溶解前,去污剂更可能到达外膜并过早地危及外膜。

[0205] 与去污剂有关的另一重要特征是外部细胞膜的尺寸增加(生长),这是因为去污剂单体从内部掺入细胞膜中。随着膜生长,膜仍然完整,并仍然保留了细胞内部与组织环境之间的完整屏障。这一特征有效地增加了细胞内的可用体积,并允许在细胞内积累所施用的液体。

[0206] 不同的膜溶解模式

[0207] 接下来,对膜溶解的不同模式进行检查。如本文别处所讨论的,混合胶束形成的过程快速且在膜位点处发生,其中,用去污剂单体浸透靶细胞的膜。据推断,递送裂解缓冲液的总量在确定靶细胞的膜将被溶解至何种程度中应该至关重要。首先,向单细胞中递送较小量的裂解缓冲液,而无主动的裂解物吸取。观察到在上述时间段内,递送的 SR101 染料缓慢地扩散出单细胞几何边界而进入活组织中或从活组织中出去。细胞剩余物类似于细胞膜的区块(图 11)。这一观察与如下概念一致:基于 SDS 的裂解缓冲液可在胞内递送后溶解单细胞的膜。

[0208] 在下一组实验中,据推断,如果连续施用足够的裂解缓冲液,在连续递送期间的一些点,靶细胞的膜将更迅速溶解。图 12 示出当向靶细胞先施加较少量的裂解缓冲液时,没有观察到立即溶解。在图 12 较后面的框图中,在向同一靶细胞连续施加更多的裂解缓冲液时,观察到膜迅速溶解。在溶解过程中,观察到 Alexa 555 葡聚糖离开细胞的几何界限,并最终通过附近的毛细管作用驱动的抽吸通道吸取(图 12)。

[0209] 单细胞具有不同的膜面积和不同的体积。较小的细胞应该需要较少的去污剂以从内部开始裂解。重要的是,由内而外的裂解方法首先将基于去污剂的裂解缓冲液递送入靶细胞的胞内空间。因此,由内而外的裂解方法诱导了可溶蛋白的变性和胞内细胞器的匀化,与此平行的是在混合胶束形成之前,去污剂整合入膜的磷脂双层中。胞内可溶蛋白和靶细

胞的细胞膜之间存在对去污剂单体的竞争。因此,单细胞间的蛋白表达的不同水平也将影响细胞膜的完全且快速溶解所需的裂解缓冲液的数量。

[0210] 不希望受任何具体理论的束缚,认为任何溶解和 / 或化学解离过程均应与本方法兼容。从化学的角度来看,解离与溶解不同。溶解通常用去污剂完成。但是,不同的 PH 值、盐、其它化学品以及不同的浓度不仅可影响溶解过程本身,还可影响分子间的分子相互作用,从而引起解离。例如,可加入尿素以及其它变性或还原 (DTT) 化学品。严格来讲,这些化学品引起解离反应,然后促进溶解。因此,本发明涵盖直接解离和 / 或溶解细胞组分的所有过程,以及有利于前述解离和溶解过程的所有过程。

[0211] 有时候,不期望将外部细胞膜完全溶解。相反,可能期望将外部细胞膜用作屏障,首先溶解 / 解离胞内组分,然后将得到的液体通过膜中的小开口取出,同时保持整个膜屏障仍然完整或大部分完整。整体膜屏障存在大部分完整将能防止提取物受到周围组织中的其它可溶性分子污染。对于位于组织内深处的细胞,在收集期间更难以使所得到的液体移动穿过组织的厚层,这也会导致由组织中的其它可溶性分子引起污染。因此,对于组织深处的单细胞的取样而言,可能优选这一备选的样品收集策略。

[0212] 胞内组分溶解并解离的同时,完整膜屏障的存在 (至少暂时) 是本发明的核心。为适应归因于试剂流入的细胞内体积的增加,可使用去污剂。去污剂增加膜面积,同时仍然维持膜屏障。最终,外部膜可溶解并解离,或者在取出 (withdrawal) 期间,外部膜可保持大部分完整。

[0213] 单细胞分辨率

[0214] 如本文别处所述,通过荧光成像对由内到外的裂解的单细胞分辨率进行研究。尽管不希望受任何具体理论的束缚,细胞膜的生长以及 Alexa555 染料或 SR101 染料同时严格地限制在靶细胞的几何边界内 (参见图 8、图 10、图 12 和图 32) 表明,靶细胞的膜屏障在从裂解缓冲液递送的时间点至可见的膜生长的时间点是完整的,并且在由内而外的裂解过程中从裂解缓冲液递送的时间点至大量的膜生长的时间点,单细胞分辨率通过完整的膜屏障得以保留。由于 Alexa 555 或 SR 101 染料填充了表达 GFP 的靶细胞的胞内空间 (严格地在所述靶细胞的几何边界内),在这些细胞内的 GFP 荧光水平立即降低 (图 8、图 10、图 14 和图 32)。在图 8 和图 32 示出的实验中,并未施用毛细管驱动的抽吸。由于在 GFP 荧光丧失的时间点膜屏障是完整的,GFP 荧光丧失可能由胞内的 GFP 变性引起。不受任何具体理论的束缚,在从裂解缓冲液递送的时间点至可见的膜生长的时间点的间隔内,不能完全排除一些去污剂单体可穿过间隙连接到达周围的细胞。然而,Alexa 555 (MW 10000) 和 SR101 (MW 606) 均未观察到以可检测的水平穿过间隙连接到达周围的细胞 (图 12 和图 32)。

[0215] 在膜溶解的时间点,通过同步垂直的毛细管作用驱动的抽吸对裂解物进行吸取。如本文别处所述,将靶细胞的体积在垂直吸取进入抽吸通道期间稀释约 1000 倍 (从数皮升至 5-10 纳升)。在声称的单细胞分辨率中,很可能此类快速且同步的稀释 (最终 1000 倍) 将消除由内而外的裂解的这一最后步骤中的任何周边裂解。

[0216] 可进行实验以检查在裂解物吸取 (由内而外裂解的最后阶段) 期间的靶细胞的周边环境与稀释的去污剂之间的短暂接触 (1-4 秒) 是否引起污染。可获得 GAD67-GFP 海马的切片,并对表达 GFP 的细胞包围的暗细胞 (不表达 GFP) 进行检查。可将该暗细胞裂解并

进行测量以确定所得到的裂解物中是否不存在 GFP。

[0217] 印制单细胞裂解物

[0218] 通过附近的毛细管作用驱动的抽吸通道吸取通过由内而外的裂解取样的各单细胞的裂解物,并因此稀释于组织切片周围的样品溶液(Hank's 缓冲盐溶液(HBSS))中。各单细胞中吸取的稀释的裂解物的体积估计为约 5nl-10nl。这一体积估计按照如下方式进行计算:将定制的弯曲抽吸微量移液器保持在正压下直至裂解缓冲液的时间点,以确保在由内而外裂解触发之前该微量移液器是空的。然后释放正压,并通过微量移液器的毛细管作用来触发垂直抽吸。同时,靶细胞的由内而外的裂解也被触发。在靶细胞的裂解物完全吸取之后,在数秒内地将抽吸微量移液器机械化地从样品溶液中拉出。鉴于可见的吸取体积以及抽吸微量移液器已知的近似几何形状,推导出上述的上限为 5nl-10nl。

[0219] 为分析各单细胞的蛋白含量,将每个吸取的单细胞裂解物印制在安装在玻璃上的硝化纤维素垫。开发出将各稀释的单细胞裂解物(5nl-10nl)的蛋白富集在非常小的斑点的边界内(20 μm -50 μm)的硝化纤维素上的方法。该方法是基于硝化纤维素在小的区域内迅速结合所施加的提取物的蛋白的这一生物物理性质,而溶剂以径向方式自由展开(由硝化纤维素的毛细管作用驱动),并且从硝化纤维素上大得多的区域上自然蒸发(图 13A)。通过将总裂解物体积的部分以该方式反复施加至硝化纤维素上的同一点上,将各单细胞裂解物的蛋白内容物富集在 20 μm -50 μm 斑点的边界内(图 13)。由于将单细胞裂解物浓缩在硝化纤维素上的小的密集斑点内,预期通过硝化纤维素产生的噪声可忽略不计。

[0220] 活组织表面可含有细胞碎片。抽吸方案还收集了组织切片内的所有可溶性因子和周围介质(HBSS)。因此,开发了确保将单细胞裂解物印制在硝化纤维素上后所记录的信号的特异性的方案。在将由内而外的裂解的所有组分都定位至靶细胞后,通过释放平衡正压而触发毛细管作用驱动的抽吸。一分钟后,触发靶细胞的由内而外的裂解过程。这两个时间间隔之间的唯一不同是将裂解缓冲液递送至靶细胞。在吸取靶细胞的裂解物后,剩余总的吸取体积内的两个分区:基线分区和裂解物分区(图 13B)。然后,将这两个分区印制在同一硝化纤维素垫上彼此相邻的单独的斑点中。裂解物斑点表示由内而外的裂解的结果,并且基线斑点表示可能对在裂解物斑点中测量的信号有贡献的所有其它因子。将该方案用于所有的后续测量中。

[0221] 在同一硝化纤维素垫上,将一个表达 GFP 的生长抑素中间神经元的裂解物分区细分为 3 个单独的斑点(图 13B)。还将在同一硝化纤维素垫上的基线分区细分为 3 个斑点。如同通过根据各沉积期间硝化纤维素中的径向溶剂扩散的可视范围进行的估计,各斑点由 10 个视觉上相同的沉积物生成。认为所有斑点之间的总沉积体积大致相等。然而,在抗体孵育后,相应的 GFP 和 β 肌动蛋白信号仅在裂解物斑点中观察到,而在基线斑点中并未观察到。图 13B 中的这一实例表明,将各取样的单细胞的裂解物分区分成数个亚分区。在硝化纤维素上甚至较小的斑点边界内实现了高蛋白信号密度,这使得甚至更容易将单细胞裂解物分区的仅一个亚分区印制在硝化纤维素垫上以进行蛋白分析,并将同一单细胞裂解物分区的其它亚分区用于其它分子类别的分析。

[0222] 由内而外的裂解的验证

[0223] 对来自 GIN 小鼠的同一器官型海马切片的两个空间上分离的单细胞进行裂解。一个细胞表达 GFP(生长抑素中间神经元),而另一细胞不表达 GFP。如本文别处所述,将这两

种细胞的裂解物亚分区（每个细胞 3 个斑点，涵盖整个裂解物分区）以及相应的基线亚分区（每个细胞 3 个斑点）印制在同一硝化纤维素垫上。接着，添加阳性对照，以评价抗体特异性。借助于 Aushon Arrayer，将相同年龄的 GIN 小鼠的平均海马裂解物的滴定曲线以及纯化的重组 GFP 的滴定曲线邻近于单细胞裂解物斑点以及相应的基线斑点印制在同一硝化纤维素垫上。

[0224] 还印制了两个阴性对照。为获得第一阴性对照，在不存在组织切片的情况下，在 HBSS 填充的样品室中将递送微量移液器和抽吸微量移液器彼此相邻定位。

[0225] 然后，通过抽吸微量移液器以层流吸取来自递送微量移液器的裂解缓冲液，并以与上述单细胞裂解物相同的方式印制在同一硝化纤维素垫上，代表第一阴性对照（“无组织，LB”，图 14）。在通常用于由内而外的裂解的相同设置下，将与 Alexa 555 葡聚糖混合的 HBSS 流施用至 GIN 小鼠的海马切片中的单细胞，不会引起任何裂解。将所吸取的溶液以与上述单细胞裂解物相同的方式印制在同一硝化纤维素垫上，代表第二阴性对照（“组织，无 LB”，图 14）。总体而言，基线斑点和两个上述阴性对照涵盖了可能对两种单细胞的裂解物斑点中记录的信号有贡献的所有可能的非特异性因素。由基准斑点和两个阴性对照覆盖的非特异性因素包括：裂解缓冲液（50mM Tris • HCl、2% SDS、5% 甘油、1mM NaF、0.5mM AlexaD555 (10,000)、Halt™蛋白酶抑制剂混合物 3×、Halt™磷酸酶抑制剂混合物 3×）、所有印制 / 程序因素和人为假象、对流因素、组织切片中的可溶性因子和组织表面上的细胞碎片。未被成组的基线斑点和阴性对照覆盖的唯一事件是将裂解缓冲液施加至活的单细胞的事件，该事件排他性地由裂解物斑点覆盖（图 14）。

[0226] 图 14 中的数据表明，阴性对照和基线斑点并未产生显著高于背景水平的任何 GFP 或 β 肌动蛋白信号。在相应的滴定曲线（并行标准曲线）的斑点处对阳性对照进行测量，所述斑点具有处于裂解物斑点的信号强度范围内的信号强度。这些阳性对照表明抗体是特异性的（图 14）。正如预期，在对 GIN 小鼠海马的所有细胞进行平均后，平均裂解物中的 GFP 水平可忽略不计。图 14 中取样的表达 GFP 的单细胞为图 13 中示出的相同细胞。正如预期，表达 GFP 的细胞的三个裂解物斑点均显示出 GFP 和 β 肌动蛋白信号，而由暗细胞（CA3 神经元）产生的三个裂解物斑点仅显示出 β 肌动蛋白信号。在印制样品后，立即对图 14 中的 Alexa 555 痕迹进行测量，并且仅在裂解物斑点和主要的阴性对照斑点中观察到所述 Alexa 555 痕迹，但在基线斑点中并未观察到所述 Alexa 555 痕迹。由于所有的阴性对照均提供阴性结果，而所有的阳性对照均提供阳性结果，很可能裂解物斑点中的 GFP 和 β 肌动蛋白信号仅与将裂解缓冲液施用至活的单细胞的事件相关。因此，这些信号必然源于在海马中通过由内而外的裂解所裂解的单细胞。

[0227] 自动化和通量

[0228] 为将由而外的裂解方法与裂解物印制程序相连接，重新建立大规模的装置（图 15）。这一装置有利于所有程序组分的准确定位，并使得能够实现这些组分的迅速协调运动。需要快速可编程运动来将由内而外的裂解方法切换至硝化纤维素上的印制程序。由于裂解和印制过程中涉及的小的液体体积（约 10nL 裂解物 + 约 30nL 基线）和小的孔径（10 μ m），有必要在最终的单细胞裂解物吸取后的仅数秒钟内切换至印制程序。重要的是，已建立用于进一步广泛自动化的基础设施。编写由 Sutter Instrument 公司提供的基本命令库上的 C++ 库，从而编码亚微米分辨率下 4 个机械臂运动的任何序列。将这一库用于裂

解递送过程的完全自动化（图 7 和图 8）。为方便起见，还建立了用户界面（图 15）。

[0229] 对裂解缓冲液进行迅速递送，并且在一些实例中以完全自动化的方式进行（图 8）。鉴于裂解缓冲液的当前配方，在裂解缓冲液递送起始后约 10 秒的期间内，胞内 GFP 变性完成（图 8）。在膜溶解后，花费约 10 秒来吸取裂解物（图 12）。因此，在优化后，整个过程可能需要至少 10 秒并至多 20 秒。因为各初始组织样品可为数十个器官切片提供足够的材料，整个过程的并行化可产生对于给定组织样品而言的 2 秒 / 单细胞的有效通量。

[0230] 对靶单细胞的所有蛋白的吸取

[0231] 将单细胞裂解物完全沉积在硝化纤维素上（图 13 和图 14）。虽然不希望任何具体理论的束缚，但是图 22 表明胞液可溶性蛋白被完全吸取，因为在对如本文别处所述的四种 GFP 表达细胞和两种暗细胞的裂解物进行取样和分析后，体内 GFP 荧光与记录的 GFP 信号完全相关。可进行实验以确定是否靶单细胞的所有蛋白均被变性、溶解和吸取。可进行实验以确定在由内而外的裂解过程中是否所有的膜蛋白以及所有由膜蛋白群集的蛋白均被吸取。在由内而外的裂解过程中可使用含有强变性剂（如尿素）的不同裂解缓冲液制剂。

[0232] 实施例 2：单细胞裂解物微阵列

[0233] 如本文别处所述，将单细胞裂解物和基线印制在硝化纤维素垫上。将高准确度阵列仪用于将纯化的重组蛋白的滴定系列和 / 或对照裂解物印制在同一硝化纤维素垫上邻近单细胞裂解物的印制斑点。施用镧系元素标记的抗体的混合物，并在硝化纤维素上对各斑点进行取样，用 LA-ICP-MS (ICP-MS 的激光消融版本) 检测镧系元素信号。

[0234] 这一策略消除了裂解物微阵列和 CyTOF 的缺点。即，该策略不需要对有限的单细胞材料进行亚分部，并消除了硝化纤维素的自发荧光，从而解决裂解物微阵列相对于单细胞测量而言的局限性。该策略不需要组织固定 / 透化和组织解聚，从而解决了 CyTOF 相对于组织分析而言的局限性。

[0235] 同时，该策略并入了两种方法的优点。也就是说，如本文别处所讨论，该策略使得能够印制并行标准曲线以及如同在裂解物微阵列中一样对抗体探针进行严格验证。同时，该策略还并入了镧系元素标记的多元分析能力。

[0236] 现在对在这些实验中使用的材料和方法进行描述。

[0237] 材料和方法

[0238] 抗体的验证和缀合

[0239] 所有的细胞信号技术 (Cell Signaling Technology) 抗体均订购成标准的无 BSA 制剂和定制的非 BSA 制剂两种制剂。获得自 Sigma 的 β -肌动蛋白抗体和获得自 Epitomics 的 GFP 抗体能够以标准的非 BSA 制剂使用。为测量单细胞裂解物微阵列中的蛋白，将非 BSA 的抗体与携带不同镧系元素的聚合物缀合。将所有 8 种抗体以一对一的方式缀合至不同的镧系元素标记。聚合物和镧系元素获得自 DVS Sciences，随后为它们的缀合方案。将标准的含 BSA 制剂中的细胞信号技术抗体用于蛋白质印迹。

[0240] 为获得 GIN 小鼠的平均海马裂解物，对来自同一小鼠的两个海马样品进行解剖，并迅速放入 200 μ L 用于所有其它程序中的相同的含 SDS 的裂解缓冲液中。将具有裂解缓冲液浸渍的海马样品的管在 4°C 冷室中保持 2 小时。然后，将海马平均裂解物过滤以移出胞外基质和 DNA，并存储在 -80°C 冰箱中。平均裂解物中的蛋白浓度通过 Micro BCATM 蛋白分析法进行测量，并估计为约 3.1mg/ml。因为之前对用于单细胞裂解物微阵列实验中的泛特

异性抗体在裂解物微阵列样式内的通用性进行了预验证了,仅在平均海马裂解物上运行了蛋白质印迹实验以证实这些抗体在小鼠中的特异性。使用NuPAGE® SDS-PAGE 凝胶系统(Life Technologies)。将各平均裂解物印迹用感兴趣的一抗以及β肌动蛋白抗体进行孵育。在将所述印迹与相应的荧光标记的二抗孵育后,在LiCor Odyssey扫描仪上获得信号强度。

[0241] 通过LA-ICP-MS进行的检测

[0242] 将本文别处所述的由内而外的裂解程序、用于单细胞裂解物的印制程序、用于滴定系列的印制程序以及抗体孵育程序用于单细胞裂解物微阵列实验中。

[0243] 将Thermo Electron X-系列ICP-MS(ICP-MS)和New Wave 213nm UV激光器(LA)用于信号检测和斑点取样。在对硝化纤维素垫上的感兴趣的斑点进行取样前,对LA-ICP-MS仪器的灵敏度和稳定性二者进行优化。通常,LA-ICP-MS的灵敏度取决于氦气流。氦气流对于支撑经由氦离子化通过强的振荡磁场产生的感应耦合等离子体而言是必要的。在离子化元素进入质谱仪前,还将氦气流用于将样品引入等离子体中以用来雾化和离子化。因此,氦气流的优化对于实现高灵敏度是至关重要的。打开仪器后,在ICP-MS中用标准盐溶液对氦气流进行优化,以实现高的灵敏度。随后,将仪器切换到激光消融模式。所有激光烧融斑点的直径为80 μm。对激光强度进行优化,以使对各硝化纤维素垫下方的玻璃基体进行的取样最小化。

[0244] 现在对实验结果进行描述。

[0245] 多元测量

[0246] 通过消除在一个平台中的裂解物微阵列和镧系元素标记/CyTOF的缺点并通过结合优势,可实施对实体组织的单细胞中的天然蛋白质的多元分析测量(表2)。这一平台可称为单细胞裂解物微阵列(图17)。

[0247] 表2:单细胞裂解物微阵列使得能够对实体组织的单细胞中的天然蛋白进行多元分析蛋白质测量。白色:缺点,灰色:优势。

[0248]

单细胞裂解物微阵列	裂解物微阵列	CyTOF/质谱细胞计量术
大规模的蛋白多元分析	大规模的蛋白多元分析	大规模的蛋白多元分析
单细胞分辨率	非单细胞分辨率	单细胞分辨率
无自发荧光	自发荧光	无自发荧光
无组织固定/透化	无组织固定/透化	组织固定/透化
无组织解聚	无组织解聚	组织解聚
并行的滴定/标准	并行的滴定/标准	无并行的滴定/无标准
可靠的探针验证	可靠的探针验证	差的探针验证

[0249] 裂解物微阵列技术(也称为反相裂解物阵列)于2001年首次报道(Pawelcz等,2001,Oncogene 20:1981-1989)。通过在安装于玻璃上的硝化纤维素垫上机械化地印制具有高信号密度的小的裂解物斑点(~200 μm直径),并通过用预验证的抗体探测这些硝化

纤维素垫,在跨越样品和生理状况的广泛的组的高度多元的蛋白测量中实现了高的灵敏度和低的样品要求。可将对照裂解物和 / 或纯化的靶蛋白的滴定曲线邻近于未知样品印制在同一硝化纤维素垫上。这些并行的滴定曲线揭示出各抗体探针的标准曲线。因此,在低底物水平时,裂解物微阵列对信号的非线性进行补偿,并允许将所记录的信号差异映射为相应的量差异。

[0250] 在各种裂解物之间,裂解物微阵列的可扩展性的主要瓶颈在于具有不变的低交叉反应性的可用抗体的数量。大多数抗体与非特异性抗原发生交叉反应。与蛋白质印迹相比,不能通过蛋白尺寸分离将裂解物微阵列中交叉反应信号分量与特异性信号分量相区分。在裂解物微阵列中,任何给定的裂解物斑点均包含原始样品的所有蛋白的均匀混合物,因此,任何交叉反应信号都将对各裂解物斑点中的总的记录信号有贡献。下面的实例表明了裂解物微阵列测量中,抗体的交叉反应性如何能够掩盖特异性信号分量。

[0251]

Let

$$P(\text{Ab 结合} \mid \text{靶}) = 0.99,$$

$$P(\text{Ab 结合} \mid \text{非靶 1}) = 0.01,$$

$$P(\text{Ab 结合} \mid \text{非靶 2}) = 0.05,$$

$$\# \text{ 靶} = 1000,$$

$$\# \text{ 非靶 1} = 70,000,$$

$$\# \text{ 非靶 2} = 29,000.$$

然后

$$P(\text{Ab 结合}) = 0.0314,$$

$$E(\# \text{ 总的 Ab 结合}) = 3140,$$

$$E(\# \text{ 特异性的 Ab 结合}) = 990.$$

[0252] 上面的实例示出,鉴于抗体以及成斑点的均匀的蛋白混合物中的相对低的靶数量,交叉反应性信号分量(2150)比起特异性信号分量(990)至少大两倍。这一实例还表明,抗体交叉反应性可通过以下三个参数得以参数化:1)总混合物中的靶蛋白的比例;2)混合物中的各种非靶蛋白的分布;以及3)给定抗体与靶和非靶之间的固有的结合概率。许多关键的激酶和磷酸酶以低拷贝数(单细胞中为100-1000)存在。非靶蛋白的分布在细胞类型内的细胞与细胞之间以及细胞类型与细胞类型之间也发生变化。裂解物微阵列的目的是测量未知样品中的关键蛋白的水平。因此,为使裂解物微阵列中的抗体的交叉反应性最小化,抗体的结合概率是能够优化的唯一参数。需要广泛的筛选试验以确定具有最佳结合概率的抗体。

[0253] Sevecka 已设计出了用于泛特异性抗体的成组筛选试验(Sevecka 等,2011, Mol. Cell Proteomics 10:M110.005363)。对于各试验抗体,它们的第一试验要求在17种不同

的人细胞系的所有裂解物的蛋白质印迹中存在恰当尺寸的单个主条带,而它们的第二试验要求在蛋白质印迹中测量的靶水平也应该与相同的 17 种人细胞系的裂解物微阵列中的相应水平高度相关 (>0.75)。各细胞系表达不同水平的靶抗原以及可能不同水平的非靶蛋白。如果给定抗体的结合概率是最佳的,那么该抗体在不同的细胞系间将是特异的,因为交叉反应性组分的细胞系依赖的变化将不会影响不同靶水平的准确检测。这将使得蛋白质印迹与裂解物微阵列之间高度相关。如果给定抗体的结合概率差,那么细胞系依赖的差异以及交叉反应组分的噪声将会掩盖裂解物微阵列中真实的靶水平,从而导致低的相关性(图 16)。Sevecka 等的第二试验相当于 17 个独立的伯努利测试,因为可将每个不同的细胞系视为一个伯努利测试,并可将其试验抗体视为有偏硬币。考虑到 17 个独立测试后的 17 个或约 17 个“良好”的结果,概率很高,该具体的抗体(硬币)在任何其它细胞环境(未来的测试)中将均是特异性的(有偏=良好的结合概率),从而可将所述抗体用于跨越未知细胞类型的准确测量。由 Sevecka 等试验的 129 种泛特异性抗体中的 10%通过了这两个试验。这样选择的抗体组通常对于裂解物微阵列格式内的未知样品中的蛋白测量均有效。

[0254] 裂解物微阵列不适合单细胞测量。裂解物微阵列的多元分析能力基于将原始的均匀样品细分成它的子部分,并将这些子部分印制在多个空间上分离的硝化纤维素垫上,以用于具有不同抗体的各垫的后续孵育。在单细胞的情况下,原始蛋白物质非常有限,不应仅为了蛋白多元分析这一目的而被细分。在裂解物微阵列中的信号采集通过扫描荧光标记的二抗来实现。在这一设置中,当要对少量的单细胞材料进行分析时,硝化纤维素的自发荧光也可能过高。硝化纤维素的自发荧光是裂解物微阵列不适合单细胞测量的另一原因。

[0255] 在 2002 年首次报道了通过原子质谱来检测金属标记的探针的可能性(Quinn 等, 2002, *J. Anal. At Spectrom* 17:892-896)。通过以一对一的方式将不同的稀有金属标记缀合至不同的基于亲合力的探针,任何基于探针的测量的多元分析能力由于大量的现有稀有金属元素而能够显著增加。由于将探测的样品通过 5000-10000°C 的等离子体(电感耦合等离子体质谱, ICP-MS) 进行处理,该样品的所有分子在进入质谱模块之前被雾化和离子化。因为稀有金属并不以显著水平出现在大多数生物系统中,因此稀有金属的测量计数对应于存在于探测样品中的各标记探针的水平。例如,可将抗体缀合至含镧系元素螯合剂的聚合物。这些镧系元素标记的抗体使得能够对蛋白进行高度多元检测。已由 DVS Sciences 开发出了镧系元素标记并在 CyTOF/ 质谱细胞计量术仪器中得以商业化(Bendall 等, 2011)。该仪器效仿流式细胞仪。因此, CyTOF 还具有流式细胞仪在分析实体组织中的单细胞方面的所有限制(表 2)。

[0256] 抗体验证和镧系元素标记

[0257] 获得了成组的泛特异性抗体以用于单细胞裂解微阵列的开发,所述成组的泛特异性抗体已预先由 Sevecka 等验证了在本文别处所述的裂解物微阵列中的通用性。在跨越 17 个不同的人细胞系的经试验的 129 种泛特异性抗体中, Sevecka 等能够识别出 12 种具有高的全面的特异性的抗体,以用于以裂解物微阵列进行的分析研究(Sevecka 等, 2011, *Mol Cell Proteomics* 10:M110.005363)。将这 12 种抗体的子集用于开发单细胞裂解物微阵列。因为要使用用于对小鼠海马的器官型培养物中的单细胞进行取样的由内而外的裂解方法,还需要所选子集中的各抗体在小鼠中具有抗原性。由于激酶在细胞信号中的重要作用以及在单细胞中的预期的低相对丰度,选择激酶作为靶抗原。单细胞裂解物微阵列对这些激酶

的成功测量将构成对该方法高灵敏度的确认。选择 FAK、KC δ 、PKC α 和 PAK1 作为靶激酶抗原。还囊括了经验证的 β -连环蛋白的抗体。因为将对 GIN 小鼠的海马器官型培养物中的稀有的 GFP 标记的生长抑素中间神经元进行裂解,向整个抗体组中加入两种 GFP 特异性抗体。如本文别处所述,这些 GFP 特异性抗体之一为与用于由内而外的裂解的验证中的抗体相同的抗体。

[0258] 如本文别处所论述,由于此前已跨越 17 种的人细胞系预先对所选的抗激酶抗体和抗 β -连环蛋白的抗体进行了验证,并预期所述抗体在任何未知的情况下均表现良好,推断对抗体在小鼠中的特异性进行简单确认就已足够。在 6 天龄 GIN 小鼠的海马的平均裂解物上进行蛋白质印迹实验。所有这些抗体具有恰当尺寸的清晰的主条带,由此证实这些抗体对小鼠抗原的特异性(图 18)。如在后面的实验中所证实的,未对 GFP 抗体进行独立验证,并且预期所述 GFP 抗体是特异性的。

[0259] 接下来,获得所选抗体组的纯的无 BSA 制剂,用于随后的镧系元素缀合。根据所获得镧系元素聚合物的制造商(DVS Sciences)提供的方案进行镧系元素缀合。在表 3 中提供了抗体及相应的镧系元素标记的列表。

[0260] 表 3:所选择的抗体组的镧系元素标记,所述抗体此前验证了适于裂解物微阵列并且然后通过蛋白质印迹进行了证实

[0261]

抗原	抗体	镧系元素标记
β 肌动蛋白	A1978, Sigma	Nd145
PKC δ	2058, CST	Dy162
PKC α	2056, CST	Yb174
PAK1	2602, CST	Pr141
FAK	3285, CST	Tb159
β 连环蛋白	9582, CST	Sm147
GFP1	S2038, Epitomics	Nd142
GFP2	2956, CST	Sm154

[0262] 用单细胞裂解物微阵列对天然蛋白进行多元分析蛋白测量

[0263] 从 GIN 小鼠的活的器官型海马培养物(出生后第 5 天+体外 7 天)的 2 个切片中取四个表达 GFP 的生长抑素中间神经元。另外还从相同海马切片的 CA3 区域中取两个假定 CA3 锥体神经元。将这 6 个单细胞裂解物及其对应的基线斑点印制在安装于同一玻璃上的硝化纤维素垫上。如本文别处所述,对于各单细胞裂解物,将具有整个裂解物分区的一个斑点和具有基线分区的一个斑点各自印制。如本文别处所述,对于各单细胞裂解物,印制具有整个裂解物分区的一个斑点(30 次沉积)和具有基线分区的一个斑点(31-32 次沉积)。对

于各细胞,裂解物斑点中的液体沉积量约等于相应的基线斑点中的液体沉积量。在相同的成像装置的设置下,在单细胞裂解前还另外记录所有的体内 GFP 强度。因为所有经成像和取样的细胞均接近于两个海马切片的表面,光散射对这些细胞的体内 GFP 荧光的记录强度不应有任何显著影响。在成像装置的检测灵敏度水平,所取的 CA3 锥体神经元不表达任何 GFP。

[0264] 接下来,通过高精度 Aushon Arrayer 将经纯化的重组 PKC α 、PKC δ 和 GFP 的滴定系列邻近于所印制的单细胞裂解物及其基线印制在同一硝化纤维素垫上。另外,还将 GIN 小鼠的平均海马裂解物的滴定系列邻近于重组蛋白的滴定系列而印制。通过在硝化纤维素垫上邻近印制斑点处制造出 10 μm 大的切口,标示出所有的斑点,以在整个随后的漂洗和抗体孵育步骤中维持所有的印制斑点的视觉座标。

[0265] 如 Sevecka 所述,将相同组的漂洗步骤和抗体孵育步骤施加至印制的安装于玻璃上的硝化纤维素垫 (Sevecka 等,2011, Mol Cell Proteomics10:M110.005363)。在不同组的实验中,确定了 8 种镧系元素标记的抗体的以下浓度使由单细胞裂解物产生的相应信号进入 LA-ICP-MS 检测器的灵敏度范围:对于缀合的 β 肌动蛋白抗体而言的 0.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和对于所有其它缀合的抗体而言的 3.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在抗体孵育后,借助于在单个获取运行期间的经调谐和校准的 LA-ICP-MS 仪器,对印刷的单细胞裂解物的斑点、基线的斑点、以及所有的印制的滴定系列的斑点进行取样。通过调整激光强度并通过记录 85Rb 和 88Sr 的痕迹,确保了硝化纤维素垫的玻璃基底不会由激光消融取样至显著程度。还将高激光强度的对照脉冲施加至硝化纤维素垫的空白区域,以确保通过取得显著量的玻璃(由 85Rb 和 88Sr 痕迹表示)以及硝化纤维素(由细小的可见的硝化纤维素孔表示),无镧系元素的痕迹被检测到。因此,在漂洗和抗体孵育后,单独的玻璃和硝化纤维素并不会导致检测到镧系元素。

[0266] 将通过 LA-ICP-MS 获得的测量在图 19 中示出。在图 19A 的第一上部区段中,各行代表各取样细胞的由内而外的裂解过程的 3 个时间点(“之前”、“裂解”、“之后”)。对于各细胞,裂解过程的三个选择时间点表明,正如所预期的,在胞内空间填充含 SDS 的裂解缓冲液后,GFP 失去了其荧光。各行中的最后一个时间点(“之后”)表示,靶细胞的内容物通过同步的毛细管作用驱动的抽吸通道而被最终吸取。在图 19 的其它区段中,使用用于对各斑点进行取样的以下的 LA-ICP-MS 取样程序。通过 LA-ICP-MS 仪器对硝化纤维素垫上的各斑点进行取样的取样程序花费 3 分钟(图 19 中的时间轴是取样程序内由 LA-ICP-MS 检测器记录的时间帧的数量)。在各取样程序的第一间隔中,在激光消融之前,通过获取噪声数据对仪器噪声进行测量。然后,将激光脉冲序列施加至硝化纤维素垫上的斑点位置。将这一快速激光脉冲序列施加 60 秒的持续时间。将各取样程序中的剩余时间花费在等待上,直到来自最近取样的斑点的元件的连续测量的计数恢复到仪器的噪声水平。使用用于各斑点的这一取样程序在上述硝化纤维素垫上对滴定系列、基线和单细胞裂解物的所有斑点进行取样。

[0267] 含 HBSS 溶液的基线斑点、组织碎片和/或可溶性组织因子在大多数情况下示出低的信号(细胞 1-细胞 4;从左到右、从上到下对细胞进行编号)。最后两个生长抑素中间神经元(细胞 5 和细胞 6)的基线斑点示出显著的 β 肌动蛋白信号,而在相应的裂解物斑点中示出相对低的 β 肌动蛋白信号。其它 4 个细胞(细胞 1-细胞 4)的基线斑点在所有 8 个通道之间均未产生显著高于仪器噪声水平的任何信号。如本文别处所述,各基线斑点中

印制的体积大于或约等于各裂解物斑点中印制的体积。前 4 个细胞（细胞 1- 细胞 4）的各基线斑点涵盖了程序性噪声的所有可能来源，所述程序性噪声可能源于由内而外的裂解、印制和 / 或信号检测程序。这些程序性噪声的来源包括：HBSS 溶液、组织碎片、组织中的可溶性因子、印制过程、孵育 / 漂洗步骤、以及 LA-ICP-MS 噪声。因此，在前 4 个细胞的裂解物斑点中在激光发射（laser-firing）的时间记录的任何信号差异并非源自上述所述程序性噪声来源的任何子集。因此，前 4 个细胞（细胞 1- 细胞 4）的裂解物斑点中的信号水平并非源自基线组分的非特异性信号水平。前 4 个细胞的裂解物中的信号以及前 4 个细胞的裂解物之间的信号差异源自抗体与印制的单细胞裂解物的结合方面的差异。

[0268] 对跨越所有 8 个维数记录的信号进行的检查表明，在各维数内的单细胞之间的信号存在显著差异（图 19）。这些差异并非来自程序性噪声来源。这些信号差异很可能代表蛋白量的差异，因为图 14 中的数据示出了裂解缓冲液组分对抗体结合无可检测到的影响。由于在裂解物微阵列样式中于 17 种不同的细胞系背景下对所有激酶抗体和 β 连环蛋白抗体进行了验证，这些抗体在任何细胞类型中均具有非常少的交叉反应组分。图 21 描述了从同一硝化纤维素垫上的经纯化的 PKC δ 和 PKC α 的并行滴定系列中获得的预期信号，还在所述同一硝化纤维素垫上对单细胞裂解物及其相应的基线进行了印制和取样（图 19）。通过查看 PKC δ 和 PKC α 的并行滴定系列（图 21），观察到镧系元素标记并不会影响所验证的抗体的特异性。因此，在 8 个维数（通道）的各维数内，单细胞之间在信号方面测量的差异可能源自这些裂解物斑点中相应的靶蛋白量的差异。

[0269] 在由内而外的裂解前，由于在与成像装置相同的设置下对所取的生长抑素中间神经元和 CA3 神经元的体内 GFP 荧光水平进行了记录，在相同的 6 个取样单细胞间将所记录的体内 GFP 荧光水平与相应的测量结果进行比较。图 22B 显示出在由内而外的裂解之前记录的体内 GFP 荧光与在相应的单细胞裂解物中的测量的 GFP 水平之间几乎完全相关，在单细胞裂解物微阵列中用两种不同的 GFP 抗体对所述相应的单细胞裂解物同时进行探测。这是对由内而外的裂解方法的另外的验证。如本文别处所述，并且不受任何具体理论的束缚，高的相关值表明：在由内而外的裂解方法中，大多数可溶性蛋白吸取自单细胞。对 GFP 滴定系列的四个斑点进行取样，并获得两个 GFP 抗体各自的并行标准曲线。由于在孵育程序中，各 GFP 抗体的缀合程序均相同，并且由于这两种抗体的浓度相同，很可能 GFP 标准曲线（来源于图 22A 中的相同滴定系列的相同四个斑点）的不同斜率是由这两个 GFP 抗体间的 K_D 值的相应差异造成。

[0270] 在所有取样的单细胞间（除了一例以外）， β 肌动蛋白的整合水平均类似（图 20）。第二生长抑素中间神经元（图 20 中的细胞 4）的 β 肌动蛋白水平明显低于其它细胞。这一结果并不影响在单细胞裂解物微阵列中测出的 GFP 的高水平，所述 GFP 的高水平与同一细胞裂解前的体内荧光完全相关。不希望受任何具体理论的束缚，一个解释是用于由内而外的裂解程序中的当前裂解缓冲液对于肌动蛋白网络的溶解而言并不是最佳的。这可通过改变裂解缓冲液的配方或通过进一步优化裂解程序来补救。另一种解释是 β 肌动蛋白的水平在单细胞间是不同的，并且不能用于归一化。在未来的测量中，可将甘油醛 3- 磷酸脱氢酶（GAPDH）用作可选的归一化抗原。

[0271] 一些标准曲线在信号范围内是非线性的，这与单细胞测量有关（图 21 和图 22）。通过高精度 Aushon Arrayer 2470，对来自所制备的各抗原的稀释样品的 PKC δ 、PKC α 和

GFP 滴定系列 (图 21 和图 22) 进行印制。通过 Aushon Arrayer, 将来自所制备的各稀释样品的八次沉积印制在滴定系列的各斑点, 并因此预期滴定系列内的斑点中沉积的抗原量之间的差异代表该抗原的相应稀释样品之间的浓度差异 (参见 Sevecka 等, 2011, 例如, Aushon Arrayer 印制)。Aushon 并未公布印制噪声的数值, 但预期在当前设置中可忽略不计。每斑点高数量的沉积 (8) 还确保了各印制斑点内的裂解物分布均一。在 LA-ICP-MS 取样程序中的激光消融期间, 在滴定系列的各印制斑点内对子斑点取样。在所有的滴定系列的激光消融取样中, 子斑点在初始斑点内的位置保持不变。

[0272] 虽然不希望受任何具体理论的束缚, 这些实验参数表明, 在 PKC δ 和 GFP 标准曲线中于低抗原浓度时出现的非线性 (图 21 和图 22) 并不主要归因于通过 Aushon Arrayer 进行的印制的误差, 并且不主要归因于与通过 LA-ICP-MS 进行的取样程序有关的斑点定位的误差。在高抗原浓度时, 所有标准曲线中的信号降低的单调性和线性 (图 21 和图 22 中的高的 x 轴值) 也暗示了: 对于低抗原浓度时出现的非线性而言, 印制和移液误差不起主要作用。各标准曲线的最后的数据点的信号水平显著高于仪器噪声水平并高于四个基线斑点间的噪声 (细胞 1- 细胞 4, 图 19), 这在相同的 LA-ICP-MS 运行期间从同一硝化纤维素垫中获得。虽然不希望受任何具体理论的束缚, 这些实验参数表明, 通过 Aushon Arrayer 进行的印制的噪声、移液的噪声、以及通过 LA-ICP-MS 进行的取样程序的噪声对于 PKC δ 和 GFP 标准曲线中的低抗原浓度处出现的非线性不起主要作用 (图 21 和图 22)。非线性很可能源自硝化纤维素上的抗体分子结合稀释的抗原和 / 或保持与所述稀释的抗原结合的概率的降低。由于抗体为二价, 上述概率的降低可能与如下事实有关: 抗体的结合位点未被处于低抗原浓度的硝化纤维素上的邻近抗原饱和。单细胞裂解物微阵列使得能够校正这些非线性, 并因此使得能够对单细胞群体间的量分布进行准确测量 (图 1 和图 2)。

[0273] 实施例 3: 人实体组织中的分子类别间的多元分析

[0274] 可施行实验以在多个分子类别间进行多元分析。如本文别处所述, 裂解物样式与所有的严格分析方法兼容。如图 13 和图 14 中所示, 通过将取样的单细胞的裂解物分区细分成裂解物亚分区, 可获得来自同一单细胞的蛋白、转录物和 / 或代谢物的多元分析测量。为进一步降低单细胞裂解物微阵列的样品要求, 将各印制的裂解物斑点的直径从 50 μm 降低至 20 μm 。这将确保较小的 20 μm 斑点的信号密度大约相当于 50 μm 斑点的信号密度, 同时维持总的单细胞裂解物分区的较大亚分区以用于转录物 (RT-qPCR) 和 / 或代谢物 (MALDI) 的分析。在这一设置中, 可对用 LA-ICP-MS 进行的激光消融程序进行调整, 以充分利用较小的 20 μm 裂解物斑点中的高信号密度的优势, 其中, 可将激光束的直径调整到 20 μm , 并对激光的能量进行调谐, 从而可在仅 1 或 2 次的激光脉冲内对整个斑点进行取样。这两种调整在仅数秒的间隔内于 LA-ICP-MS 仪器的元素计量器处产生高的信号差异, 使得不必对取样期的长时间间隔内的信号曲线进行积分。相对于 LA-ICP-MS 仪器的固有噪声和由激光消融的硝化纤维素产生的噪声, 这可提供高的信噪比。因此, 可仅用总的单细胞裂解物分区的小的亚分区获得可比的单细胞裂解物微阵列测量。可将总的单细胞裂解物分区的另一亚分区用于转录物和 / 或代谢物的分析。还可对取样程序进行优化, 以在通过抽吸进行吸取之前以及将裂解物细分成亚分区之前将细胞内的裂解物更好的混合。

[0275] 在将总的单细胞裂解物分区的第一亚分区沉积在硝化纤维素上的 20 μm 斑点中以用于通过单细胞裂解物微阵列进行的多元蛋白分析后, 可通过在 RT-qPCR 反应中扩增转

录物实现对总的单细胞裂解物的剩余亚分区分析。例如,所述分析可在 Fluidigm 平台 (Fluidigm 公司) 的环境中进行。还可通过 MALDI 实现代谢物的多元分析。Amantonico 等已经测量了相当于约为酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的单个细胞的一半的裂解物量中的 ADP、UTP、ATP 和 GTP 的丰度 (Amantonico 等, 2008, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47:5382-5385)。酵母的单细胞的中位尺寸为 $82 \mu\text{m}^3$ (Jorgensen 等, 2002, *Science* 297:395-400)。单个的哺乳动物 COS-7 细胞的尺寸为 $2016 \pm 208 \mu\text{m}^3$ (Bohil 等, 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12411-12416)。因此, 将能预期的是, 在哺乳细胞的情况下, 单细胞材料的量可相当的大, 由此使得甚至能够进行更广泛的代谢物多元分析。

[0276] 此外, 可将该平台用于在实体人组织中进行单细胞分析。已证实, 人肿瘤的器官型培养物显示出在活检收集和切片后正常发育一周 (Vaira 等, 2010, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:8352-8356)。可将本文中所述的取样和分析方法与从人肿瘤的器官型培养物一起使用, 以定义诊断试验的新类别、使单细胞药理学个性化、以及迅速鉴定机械的生物标记和药物靶点。

[0277] 标准曲线

[0278] 可施行实验以通过二重复或三重复印制滴定系列得出标准曲线上的实际误差棒。在上述实验中印制滴定二重复, 但由于下述推测而不在相同的 LA-ICP-MS 运行内获得: 通过 Aushon Arrayer 进行的印制的噪声、移液的噪声和通过 LA-ICP-MS 进行的取样程序的噪声均可忽略不计。还可进行实验以确定 LA-ICP-MS 调谐中的来自日常操作的变化如何影响来源于同一滴定系列的二重复的信号。可将相同滴定序列的二重复或三重复印制在同一硝化纤维素垫上, 然后用 LA-ICP-MS 在不同天进行取样。

[0279] 图 19 中的四个基线斑点 (细胞 1-细胞 4) 涵盖了所有的程序性噪声来源。如本文别处所述, 这些程序性噪声来源包括: HBSS 溶液、组织碎片、组织中的可溶性因子、印制过程、孵育 / 漂洗步骤、以及 LA-ICP-MS 噪声。然而, 这 4 个基线斑点可能不会测量蛋白与硝化纤维素的结合的概率方面, 因为这些基线斑点并未显示出包含很多蛋白。在相同的抗体浓度下, 在抗体结合至硝化纤维素上的相同浓度的蛋白底物中可能还存在一些另外的噪声。可施行实验来解决这两个另外的噪声来源。可通过高精度 Aushon Arrayer 将平均组织裂解物的滴定曲线以二重复或三重复印制, 并可对这些二重复或三重复间的 8 个记录维数 (β 肌动蛋白、 β 连环蛋白、PKC α 、PKC δ 、PAK1、FAK、GFP2、GFP1) 中的各维数进行测量。

[0280] 还可施行实验以构建更好的标准曲线。可将不同的已知量的纯化抗原滴入感兴趣组织的抗原耗竭的平均裂解物中。此类标准物可捕获所验证抗体的交叉反应组分, 所述交叉反应组分可能对标准曲线的非线性起作用。

[0281] 实施例 4: 用贝叶斯网络进行的数据分析

[0282] 在相关的数据集上运行用于选择最佳学习者的试验 (贝叶斯网络拓扑 + 固定的 ML 子程序)。在通过单细胞裂解物微阵列和通过由内而外的裂解进行的单细胞测量的环境中, 施用相同的程序。

[0283] 现在对在这些实验中使用的材料和方法进行描述。

[0284] 材料和方法

[0285] 在 Python 中执行代码, 在 Python 2.6 上运行。

[0286] 由 112 个数据点构成的维数为 10 的癌症数据集的各维数编号如下: 0-Ax1、1-Met。

p、2-Stat3. p、3-Akt. p、4-cRaf. p、5-Src. p、6-Erk1. 2. p、7-S6. p1、8-MAPK. p1 以及 9- 癌症诊断。将各定向的非周期性图表表示为 Python 中的元组的列表：

```
[0287] N A I V E _ B A Y E S _ T U P L E S = m a p ( t u p l e, [[9], [9, 0], [9, 1], [9, 2], [9, 3], [9, 4], [9, 5], [9, 6], [9, 7], [9, 8]])
```

```
[0288] A X L _ M E T _ A K T _ B A Y E S _ T U P L E S = m a p ( t u p l e, [[9], [9, 0], [9, 0, 1], [9, 2], [9, 3], [9, 1, 3, 4], [9, 5], [9, 6], [9, 7], [9, 8]])
```

[0289] 将各元组用作多个词典中的一个词典的第一层中的钥匙 (key)。将第一层中的各钥匙的所有可能的真 / 假分配的元组用作多个词典中的所述一个词典的第二层中的钥匙。然后, 将第二层分配的元组映射为数值概率值。将贝叶斯网络类别创建成并入所有必要的功能, 例如用于数据导入的功能和用于通过最大似然法进行参数估计的功能。各贝叶斯网络拓扑由上述格式表示, 并可导入到这一类别中。在贝叶斯网络类别中还实施了交叉验证程序。通过 10 重交叉验证, 将贝叶斯网络类别用于对所有的 15 种贝叶斯网络拓扑进行评价。

[0290] 现在对实验结果进行描述。

[0291] 贝叶斯网络拓扑

[0292] 在高维数的数据集中, 各数据点都是多元测量的长矢量。例如, 通过测量 100 种不同样品各自中的 10 种蛋白, 获得由 100 个数据点构成的维度为 10 的数据集。可将此类数据集中的各维数视为随机变量。然后, 可将整个数据集通过所有的随机变量的联合概率分布来正式表示。在没有便利的图形化表示的情况下, 可能难以可视化并推理出高维数的数据集的联合概率分布中的许多可能的条件独立性假设。构成贝叶斯网络基础的理念是联合概率分布可由定向非周期性图表表示 (Pearl, 1982, Proceedings, AAAI-82)。此类图表易于进行可视化、分析和修改。贝叶斯网络中的边缘的方向可用来写下相应的联合概率分布的正式的数学表达式 (图 23)。贝叶斯网络中的随机变量有条件地独立于所有的非后代随机变量, 如果该非后代随机变量以所有的亲代随机变量为条件 (Pearl, 1982, Proceedings, AAAI-82)。贝叶斯网络的拓扑并入了所有的条件独立性假设。鉴于随机变量的固定集 (顶点), 条件独立性假设的相同集可通过不同的贝叶斯网络拓扑 (边缘) 进行表示 (Pfeffer 和 Parkes, 2010, CS181Lecture Notes, Harvard University)。因此, 可将条件独立性假设的相同集映射为不同的贝叶斯网络拓扑。

[0293] 由于计算机科学中的标准图表算法的可用性, 高维数的数据集的联合概率分布的图形表示也是有用的。与数据的联合概率分布有关的许多有趣的问题可简化成相应的图表问题, 由此可通过针对大的问题实例进行的图表算法得到有效地解决。由于贝叶斯网络代表了相应的联合概率分布, 还可将贝叶斯网络用于以生成方式进行的数据采集。

[0294] 存在学习来自数据集的给定的贝叶斯网络拓扑的参数值的标准方式。鉴于贝叶斯网络的拓扑, 可通过最大似然法 (ML) 对相应的参数值进行估算。如果针对参数值的先验分布合乎需要, 可使用最大后验法 (MAP)。如果在贝叶斯网络中存在隐藏的随机变量, 那么可将具有 ML 子程序或 MAP 子程序之一的预期最大化 (EM) 算法用于学习来自给定数据集的参数值。所有这些方法都能通过估算拟合参数值将给定的贝叶斯网络拓扑拟合至数据集。然而, 对于参数值和这一具体的贝叶斯网络的拓扑能够多好地捕获待学习的数据集中的真的隐藏概念, 贝叶斯网络与数据集的拟合是差的措施。数据集为来自可通过真的隐藏概念生

成的数据集的分布中的样本。为避免过度解读一个具体数据集中的模式,发现了具有最小过度拟合的最优贝叶斯网络。

[0295] 通常将过度拟合归因于数据集中的噪声的存在。然而,过度拟合还可在没有噪声的完全确定性域中发生。在确定性域中,过度拟合的主要原因是“维数诅咒 (curse of dimensionality)” (Pfeffer 和 Parkes, 2010, CS181Lecture Notes, Harvard University; Bishop, 2006, Pattern Recognition and Machine Learning, Springer, 第一版)。在非确定性 (噪声) 域中,“维数诅咒”也是过度拟合的主要原因。例如,在基因组学中,数以千计的噪声特征 (维数) 被记录在仅数个基因组 (数据点) 中。鉴于仅由几个数据点构成的高维数的数据集,感兴趣的模式很可能仅由于偶然而出现在数据集的多个维数中的一些维数之间,并且仅仅归因于取样数据点的小数量。这些模式都是假的,并不能准确地代表要学习的真的隐藏概念。此类假的模式可通过从相同的真的隐藏概念中采集更多的数据点来消除。然而,数据通常比计算更昂贵。优选在无需获取更多数据的情况下,最小化由测量的噪声和“维数诅咒”引起的过度拟合。

[0296] 贝叶斯网络拓扑 (在估计参数值之前代表假设空间) 不同于具有充分估计的参数值的最终贝叶斯网络模型,所述最终贝叶斯网络模型可用于不同的推理任务 (如分类)。用于测试具有充分估计的参数值的给定的贝叶斯网络模型的共性的最佳方式是评价所述贝叶斯网络模型针对采集自相同的隐藏概念的独立数据集的预测准确度。给定任意的数据集,可将该数据集细分成两个不相交的集:训练集和试验集。给定的贝叶斯网络拓扑的参数值可通过将参数估计程序 (ML、MAP 或 EM) 施用至训练集来确定。可用估计参数值通过测试贝叶斯网络模型针对试验集的预测准确度来对经学习的该贝叶斯网络模型的共性进行评估,所述试验集独立且相等地采集自相同的隐藏概念。然而,这并未解决过度拟合的问题,因为在真的隐藏概念的背景下和 / 或在给定的数据集的背景下,初始贝叶斯网络拓扑可代表过大或过小的假设空间 (Kearns 和 Vazirani, 1994, An Introduction to Computational Learning Theory, MIT 出版社)。为最小化过度拟合,必须首先选择代表最佳假设空间的最佳贝叶斯网络拓扑 (Pfeffer 和 Parkes, 2010, CS181Lecture Notes, Harvard University)。

[0297] 将学习算法 (学习者) 定义为将数据集映射至具有充分估计的参数值的模型的函数。显然,一个给定的学习者将可能针对不同的数据集产生不同的模型。在贝叶斯网络的情况下,学习算法通过参数估计方法 (ML、MAP 或 EM) 并通过该具体贝叶斯网络的拓扑 (条件独立性假设) 加以定义。给定固定的参数估计方法 (例如 ML), 可通过修改贝叶斯网络拓扑来生成不同的学习者。因此,对不同的贝叶斯网络拓扑进行比较的问题由此减少了选择最佳学习者的问题。选择最佳学习者的问题是机器学习的核心。

[0298] 一种方式是针对一个训练集训练各学习者,并针对一个独立且相等地取样的试验集测试由各学习者输出的学习模型。然后,输出对于试验集而言具有最好的预测准确度的模型的学习者为最佳学习者。然而,数据集也是随机变量。只有一个训练集和一个试验集可能会导致选择出非最佳学习者。因此,对各学习者的预期性能进行估计,并基于在许多独立且相等地 (iid) 取样的成对的训练集和试验集间的预期性能来选择最佳学习者。针对许多对的 iid 取样的训练集和试验集,用各学习者重复上述训练和试验过程,然后在这些成对的训练集和试验集间计算通过各学习者输出的模型的平均预测准确度。这一程序将提供各学习者的预期性能估计。输出在所有测试集间具有最好的平均预测精度的学习者最佳

学习者。

[0299] 就给定的有限大小的数据集而言,交叉验证是用于基于预期性能来选择最佳学习者的适当的近似法 (appropriate approximation) (Pfeffer 和 Parkes, 2010, CS181Lecture Notes, Harvard University)。交叉验证使得能够仅基于一个数据集选择最佳学习者。在 k 重交叉验证中,将数据集细分为等大小的 k 个子集。以这种方式获得了 k 个 iid 取样的试验集,将各 iid 取样的试验集用于 k 重交叉验证的 k 次运行中仅一次运行中。 k 重交叉验证的 k 次运行的各次运行中的训练集由排除当前的试验集以外的其它 $k-1$ 个子集构成。因此,训练集与 k 重交叉验证的 k 次运行重叠,并且并不独立 (与试验集相反)。然而,对于用有限的数据基于预期性能选择最佳学习者, k 重交叉验证提供了良好的近似法。最终,在选择最佳学习者后,可通过将所选的最佳学习者施用至整个数据集,用最小化的过渡拟合来学习最终的优化模型。重要的是,模型的平均试验集准确度 (在上述学习者选择程序中由最佳学习者输出) 不能被认为是最终的优化模型的预期的预测准确度。这可针对不用于学习者选择的另一独立数据集进行。然而,在实践中,在开始将最终输出模型用于真实的应用中之前,通常足以了解所选的学习者 (贝叶斯网络拓扑 +ML) 是最佳学习者,而并不实际确定该最终模型的预期预测精度。

[0300] 总体而言,通过选择具有最佳假设空间的最佳学习者函数来实现过度拟合的最小化。由最佳学习者定义的最佳假设空间使得最终模型中的过渡拟合程度最小化。最终模型 (由最佳学习者输出) 是通用的,并用最小过度拟合捕获真的隐藏概念。

[0301] 数据集

[0302] 用裂解物微阵列获得多元蛋白测量的数据集。将来自 56 名人类患者的快速冷冻的人组织样品在 RIPA 缓冲液中裂解。从各患者中收集肿瘤组织样品和邻近的正常组织的样品。总共获得 56 个肿瘤组织样品和 56 个正常组织样品。大多数肿瘤被鉴定为导管癌 (56 个中的 48 个)。通过 Aushon Arrayer,将 112 份样品各自印制在 100 个不同的安装于玻璃上的硝化纤维素垫上。然后,将这些垫各自与不同的一抗进行孵育,所述一抗此前从数千种抗体的初始集中对于裂解物微阵列进行了验证。该经验证的抗体的组包括:泛特异性抗体和磷酸特异性 (phospho-specific) 抗体。出于归一化的目的,还将各硝化纤维素垫与经验证的 β 肌动蛋白抗体进行孵育。在与相应的二抗进行随后的孵育后,将所有的信号强度记录并汇编在一个文件中。

[0303] 最佳贝叶斯网络拓扑

[0304] 与上述数据集相关的第一个问题是其高的维数 (101:100 蛋白 + 癌症 / 正常表型) 和相对低数量的数据点 (112)。鉴于如此高的维数,感兴趣的模式可能只是偶然出现,而不能适当地表示癌症的真的隐藏概念。为施行对最佳的贝叶斯网络拓扑的数据驱动选择,通过仅关注一个具体的信号通路来降低维数的数量。在 101 个维数中,选择 10 个:癌症 / 正常表型、Ax1、Met. p、Src. p、cRaf. p、Akt. p、Stat3. p、Erk1. 2. p、MAPK. p1 和 S6. p1。在不对数据集进行任何在先检查的情况下,做出这一选择。以这一方式将 112 个数据点各自的维数减少至 10。从经验来看,维数的数量与数据点数量之间的比率预期将会产生有意义的结果。

[0305] 对于给定的由 112 个数据点构成的维数为 10 的数据集,确定了哪些组的条件独立性假设优化了用于捕获癌症的真的隐藏概念的假设空间。通过选择各维数中的中位值作为

二值化阈值,将数据集二值化。根据经验选择 15 种不同的贝叶斯网络拓扑。各贝叶斯网络拓扑由相同的 10 个 Bernoulli 随机变量构成,但具有不同的定向边缘集,因此推测所述贝叶斯网络拓扑代表不同的条件独立性假设的集(图 23)。各 Bernoulli 随机变量代表数据集的一个维数:Ax1、Met. p、Src. p、cRaf. p、Akt. p、Stat3. p、Erk1. 2. p、MAPK. p1、S6. p1 和癌症/正常表型(图 23)。这 15 种不同的贝叶斯网络拓扑还具有不同的复杂性,所述复杂性通过对各拓扑中的自由参数的数量进行计数而确定。因为数据集是平衡后的,癌症随机变量的先验分布如下: $P(\text{癌症}=\text{真})=0.5$, $P(\text{癌症}=\text{假})=0.5$ (图 23)。

[0306] 通过 10 重交叉验证针对 15 种贝叶斯网络拓扑的集运行学习者选择的程序(在所有学习者中,ML 程序均相同)。这些拓扑中 8 种在图 23 中示出。针对在 10 重交叉验证的各次运行中的训练集,通过最大似然法对各贝叶斯网络拓扑的参数值进行估计。由于该 15 种贝叶斯网络拓扑的所有随机变量均为 Bernoulli 随机变量,将最大似然方法简化至训练集中的相应实例的简单计数和归一化程序(Bishop,2006,Pattern Recognition and Machine Learning,Springer,第一版)。为评价具有估计的参数值的各种经学习的贝叶斯网络模型能够多好地捕获癌症的真的隐藏概念,针对试验集选择对预测准确度的适当测量。判断出了癌症表型的分类准确度是对预测准确度的适当测量。在 10 重交叉验证的 10 次运行的各次运行中,针对训练集对给定的贝叶斯网络拓扑的参数值进行估计,然后,通过将癌症表型的预测值(真或假)与癌症表型的实际值进行比较,针对试验集,测试具有估计的参数值的贝叶斯网络模型。在形式上,可将该分类任务化为如下公式:

[0307] $\operatorname{argmax}_{c \in \{\text{真}, \text{假}\}} P(\text{癌症} = c, \text{证据} \mid \theta_{\text{ML}})$

[0308] 其中,证据表示在试验集的当前考虑的数据点中的蛋白随机变量的所有的现行分配,并且 θ_{ML} 表示在 10 重交叉验证的各次运行中通过最大似然法针对训练集而估计的参数。如果在测试集当前考虑的数据点中, argmax 的预测结果与癌症表型的实际值相同,那么这种情况被解读为匹配。否则,为不匹配。通过对 10 重交叉验证的当前运行的试验集中的匹配和不匹配数量进行计数,获得该试验集中的预测准确度。总体而言,对于 10 重交叉验证中的各学习者,对预测准确度测定 10 次。通过将所有 10 个试验集间的输出模型的准确率进行平均,计算各学习者(贝叶斯网络拓扑)的预期性能。整体而言,通过 10 重交叉验证对 15 种拓扑进行评价,并获得 15 个预期的性能值。

[0309] 图 24 示出了针对图 23 中显示的 8 种拓扑运行 10 重交叉验证的结果。这 8 种拓扑由于其逻辑进程而被选择用于示范。发现对于任何学习者而言,针对训练集的平均性能一直比针对试验集的平均性能更好(贝叶斯网络拓扑)。这一结果与如下输出模型已知,所述输出模型通常与训练集中的数据的拟合比起与看不见的独立的试验集中的数据的拟合更好。出乎预料的是,基于朴素贝叶斯拓扑的模型在预测正确的癌症表型方面平均做的很好。在这一数据集中,相比正常样品,在癌症样品中的所有蛋白间观察到较高的磷酸化水平。因此,针对癌症随机变量调节所有的蛋白随机变量足以捕获癌症样品中的磷酸化水平较高这一总体趋势。AXL+MET+AKT 为具有最好的预期性能的拓扑。该拓扑在朴素贝叶斯拓扑的顶部上具有三个另外的边缘。相比于通过仅基于癌症调节 Met. p 的磷酸化水平(MET+AKT),通过基于癌症和 Ax1 调节 Met. p 的磷酸化水平(AXL+MET+AKT) 获得更好的假设空间,假定在两种情况中基于 Met. p、Akt. p 和癌症调节 cRaf. p(图 23 和图 24)。相比于通过仅基于癌症调节 cRaf. p(朴素贝叶斯)或者仅基于癌症和 Met. p 调节 cRaf. p(MET),通过基于 Met. p、

Akt. p 和癌症调节 cRaf. p (MET+AKT) 获得更好的假设空间 (图 23 和图 24)。重要的是,向 AXL+MET+AKT 拓扑增加更多的复杂性将使所获得的学习者的假设空间扩展至超过复杂性的最优水平,并且由于过渡拟合而不会改善学习者的预期性能。

[0310] 图 25 中示出了如下问题的解释:为什么向贝叶斯网络拓扑中并入另外的边缘使得所获得的学习模型具有更好的分类准确度。癌症样品中的 Met. p 水平的分布与非癌症样品中的 Met. p 的分布类似。因此,在二值化后,在癌症样品和非癌症样品二者中, Met. p 被高度磷酸化的概率约等于 Met. p 被低水平磷酸化的概率。然而,当条件为 Ax1 = 高,癌症 = 假时,以及当条件为 Ax1 = 高,癌症 = 真时,通过添加另外的从 Ax1 至 Met. p 的调节箭头 (conditioning arrow), 获得 Met. p 的不同的条件分布 (图 25)。有效的是,观察到在具有高 Ax1 水平的样品中,癌症样品中的 Met. p 磷酸化水平更有可能低于非癌症样品。在向 MET+AKT 拓扑添加 Ax1-Met. p 边缘后,当用于分类任务的总的联合概率分布中的所有条件概率均增加时,此类区别引起较好的平均分类准确度 (图 24)。

[0311] 由于贝叶斯网络使得能够由人用对条件独立性假设的清楚理解对图表拓扑进行修改,上述方式可用来寻找优化用于捕获癌症的真的隐藏概念的假设空间的条件独立性假设。在蛋白相互作用的背景下,可对最佳贝叶斯网络拓扑的边缘进行因果关系解释。在单细胞水平,这一方式可允许寻找使得能够捕获细胞类型的基础概念 (underlying concepts) 的贝叶斯网络拓扑。考虑到从不同细胞类型取样的高维数的数据集,可鉴定贝叶斯网络 (拓扑和所得到的模型),所述贝叶斯网络准确地捕获各细胞类型的概念 (分子机制)。可将此类细胞类型特异性的贝叶斯网络用于数据插值,以预测在对药物的响应中的各细胞类型对此前未见过的刺激条件的机械响应。

[0312] 可施行实验,以在通过由内而外的裂解和通过单细胞裂解物微阵列使得能够进行单细胞测量的背景下实施选择最佳学习者的程序 (贝叶斯网络拓扑 + 固定的 ML 子程序)。还可基于动物实体组织或人肿瘤组织中的单细胞测量结果施行实验。通过在隐藏的随机变量中建立以及通过使用用于参数估计的 EM,还可基于单细胞数据施行实验来寻找和鉴定新的细胞类型。

[0313] 实施例 5:在精神疾病研究中由内而外的裂解技术

[0314] 可将本文所述的由内而外的裂解技术用于研究精神疾病。近年来,对数种小鼠进行工程化以使其携带在精神分裂症和孤独症中发现的基因修饰,并且所述小鼠现在可商购。可将本文别处所述的小鼠可用这些疾病模型进行繁殖,以生产具有疾病相关基因突变的小鼠,所述小鼠在中间神经元的确定子集中表达 GFP。切片培养物尤其是对研究脑发育相关的问题而言有关。在生出适当的小鼠品系后,可将由内而外的裂解技术用于获得来自脑的不同区域中的数个发育时间点的中间神经元裂解物。

[0315] 有趣的是,已发现 TrkB 信号在精神分裂症患者的表达小白蛋白的中间神经元中发生显著变化 (Lewis D 等, (2005) Nature Rev. Neurosci. 6, 312-324)。使用本文别处所述的技术,在前两个月的发育中,可对精神分裂症和孤独症小鼠模型中的中间神经元的不同子集中的 TrkB 信号的差异进行研究,提供对作为这些衰弱紊乱基础的分子事件的洞察。

[0316] 实施例 6:确定单细胞中的测量蛋白的绝对计数

[0317] 可施行实验以确定各单细胞中的测量蛋白的绝对计数。当将蛋白 (例如, GFP、PKC δ 和 PKC α) 的信号映射为绝对量,可获得这些计数。虽然在实际上难以确定印制的并

行滴定系列的各斑点中的通过 Aushon Arrayer 沉积的准确体积,但是可通过将对照裂解物的各自纯化的蛋白的明确定义的量手工地邻近于 Aushon 印制的滴定系列进行印制来解决。通过测量具有已知抗原量的斑点中的抗原量,可将 Aushon Arrayer 印制的滴定系列的斑点映射为各自的绝对量。因此,可得出绝对标准曲线,并可确定各印制单细胞裂解物中的蛋白的绝对水平。

[0318] 如本文别处所述,可从展示在硝化纤维素中或在硝化纤维素上成斑点的活的脑切片培养物中裂解生长抑素中间神经元。可用不同水平的肌动蛋白背景(平均海马裂解物)滴定的纯化 GFP 的广泛稀释系列(1:1.25 分辨率)制备硝化纤维素板。稀释系列的高分辨率可允许非线性函数可靠的拟合,而无过度拟合(在假设空间内,滴定数据限制了该假设)。还可对误差值进行可靠的估计,并可过滤掉交叉反应性。可将信号-量函数的非线性解释为具有高分辨率滴定系列并具有非线性拟合,所述信号-量函数对于恰当的群体大小估计而言至关重要。可实施磷酸-肽(磷酸特异性抗体的阻断肽)的滴定的印制。还能够以上述形式确定与蛋白的绝对总量结合的绝对的磷酸化水平。

[0319] 实施例 7:神经生物学中的分析化学技术

[0320] 根据最近的估计,单神经元中的 ATP 的量在质谱仪的灵敏度范围内。可实施实验以确定单神经元中的 ATP 的量。还可借助于 Dynal 珠或其它方法实施实验以提供广泛的多元分析。用非携带者与纯合子 GFP 携带者进行培育可生成在中间神经元中具有半数 GFP 量的小鼠。然后,可对绝对测量的特异性进行进一步评估。这些实验可确定当前的实验界限,并在其上可获得何种类型的数据。对于给定的这些界限,可完成病理学相关的调查,以使得能够在神经生物学中扩展分析化学技术。

[0321] 然而,大多数的人的疾病发生在实体组织(例如,除基于血液的疾病(例如白血病外)中,目前为止神经科学和系统生物学中的大多数分子性质研究在细胞系和经分离的培养物中进行,所述细胞系或经分离的培养物生长在天然组织环境外的皮氏培养皿中。在这些样品中并未保留细胞类型的天然异质性。

[0322] 本发明的取样技术使用复杂的化学法,以溶解来自胞内空间内部的实体组织中的单细胞。溶解过程的“由内”的方向性使得能够在复合组织中完美的空间和高的时间单细胞分辨率。溶解化学法使得能够收集各样品单细胞的所有分子,并用最灵敏的定量性方法对这些分子进行分析。

[0323] 以引用的方式将本公开的各专利/每个专利、专利申请和本文引用的出版物整体并入本文中。虽然本发明相对于具体实施方式而公开,但很明显的是,在不背离本发明真正的精神和范围后,本发明的其它实施方式和变型可由本领域技术人员设计出。所附的权利要求书旨在被解释为包括所有的此类实施方式和等同变型。

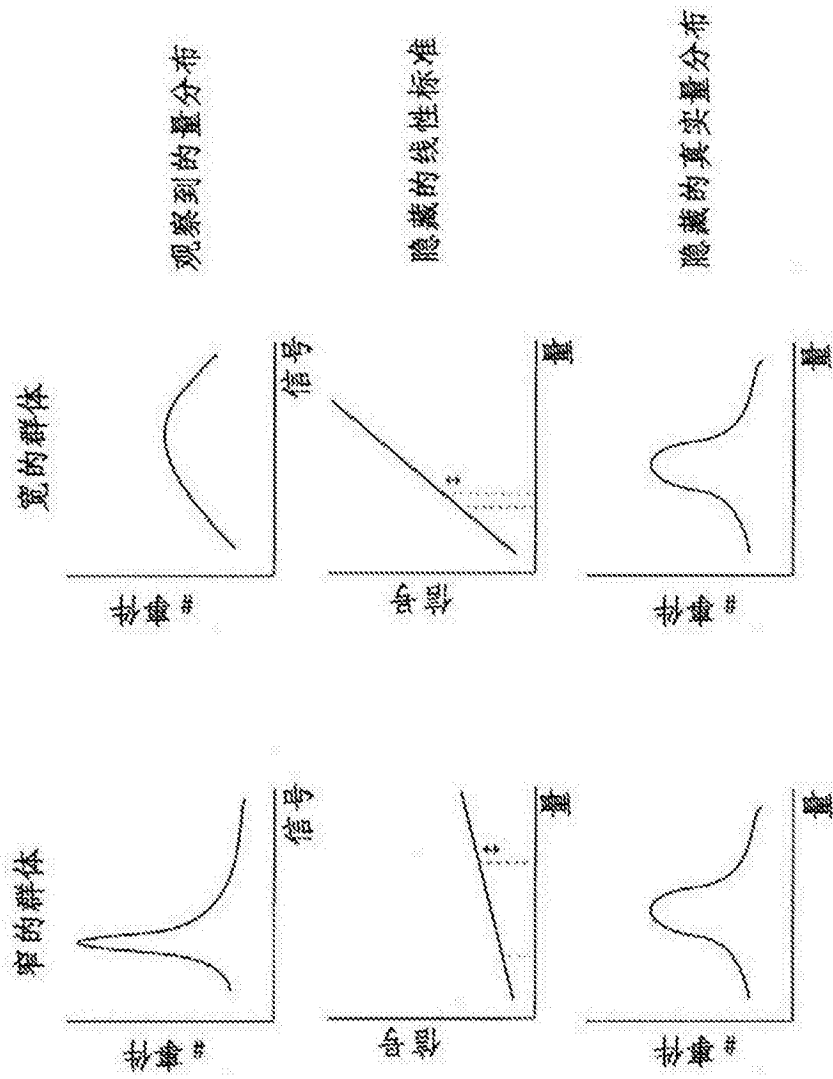


图 1

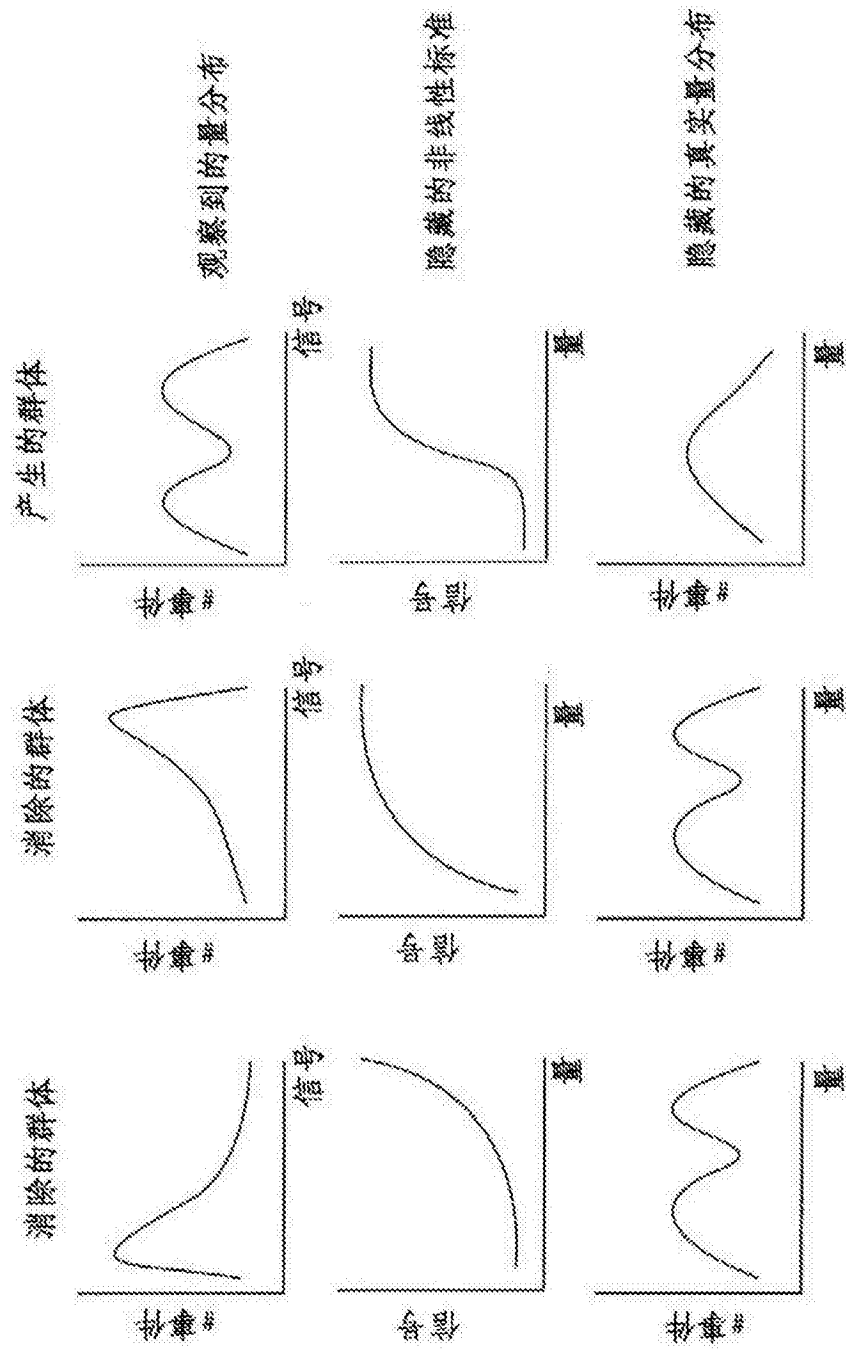


图 2

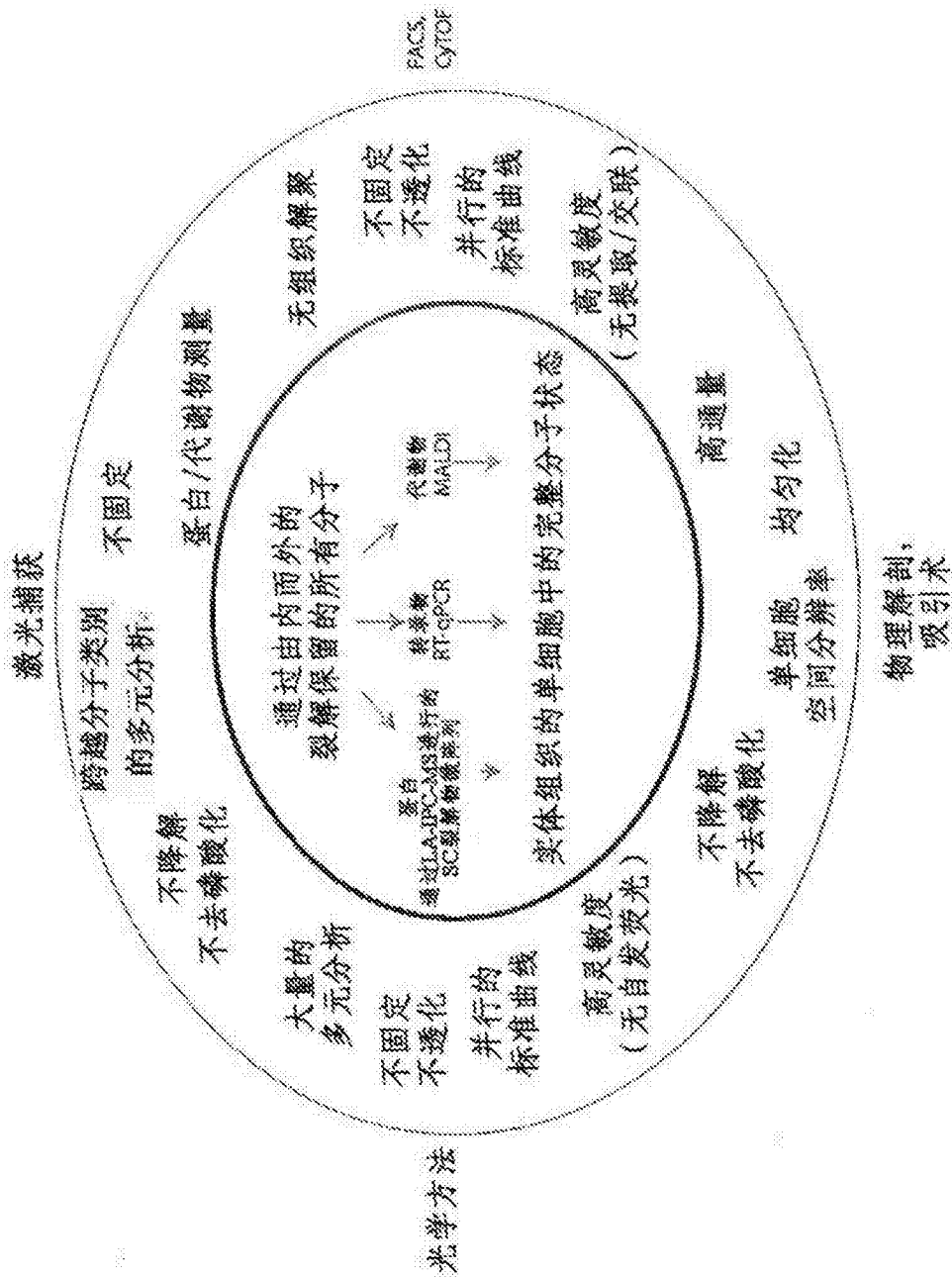


图 3

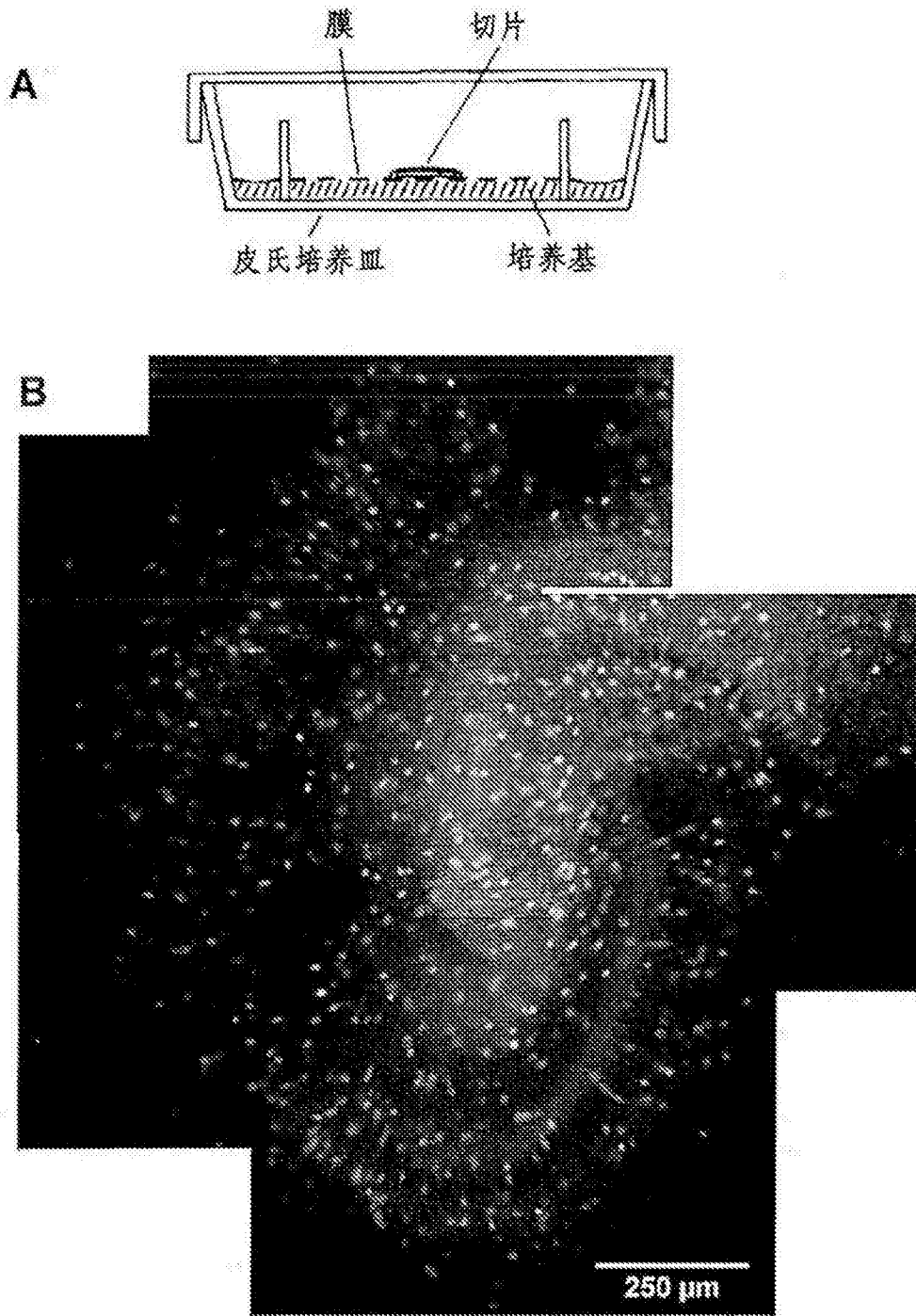


图 4

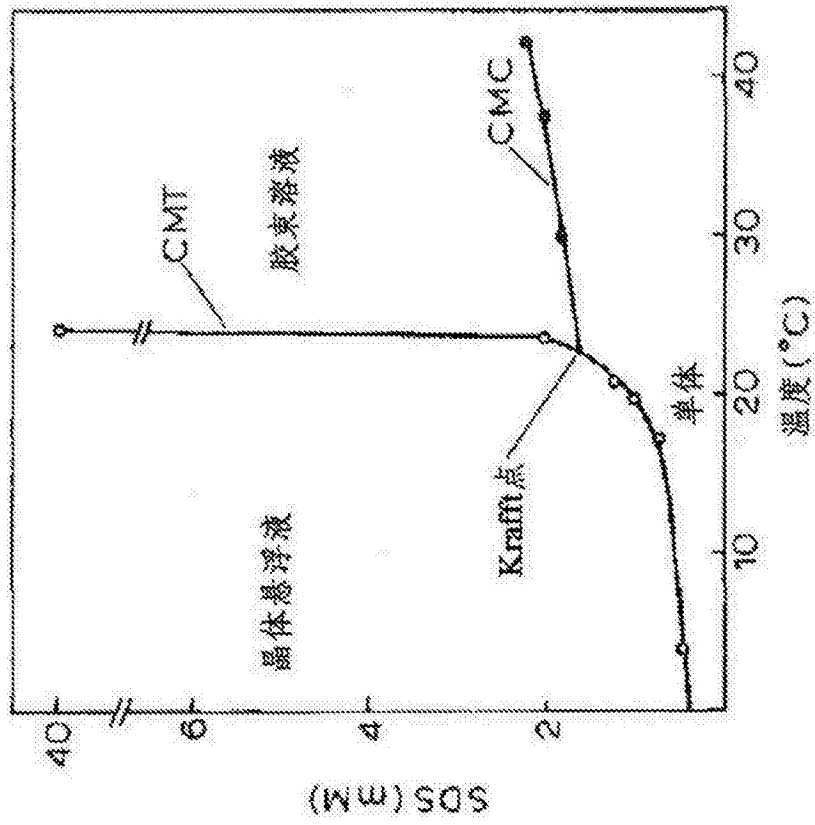


图 5

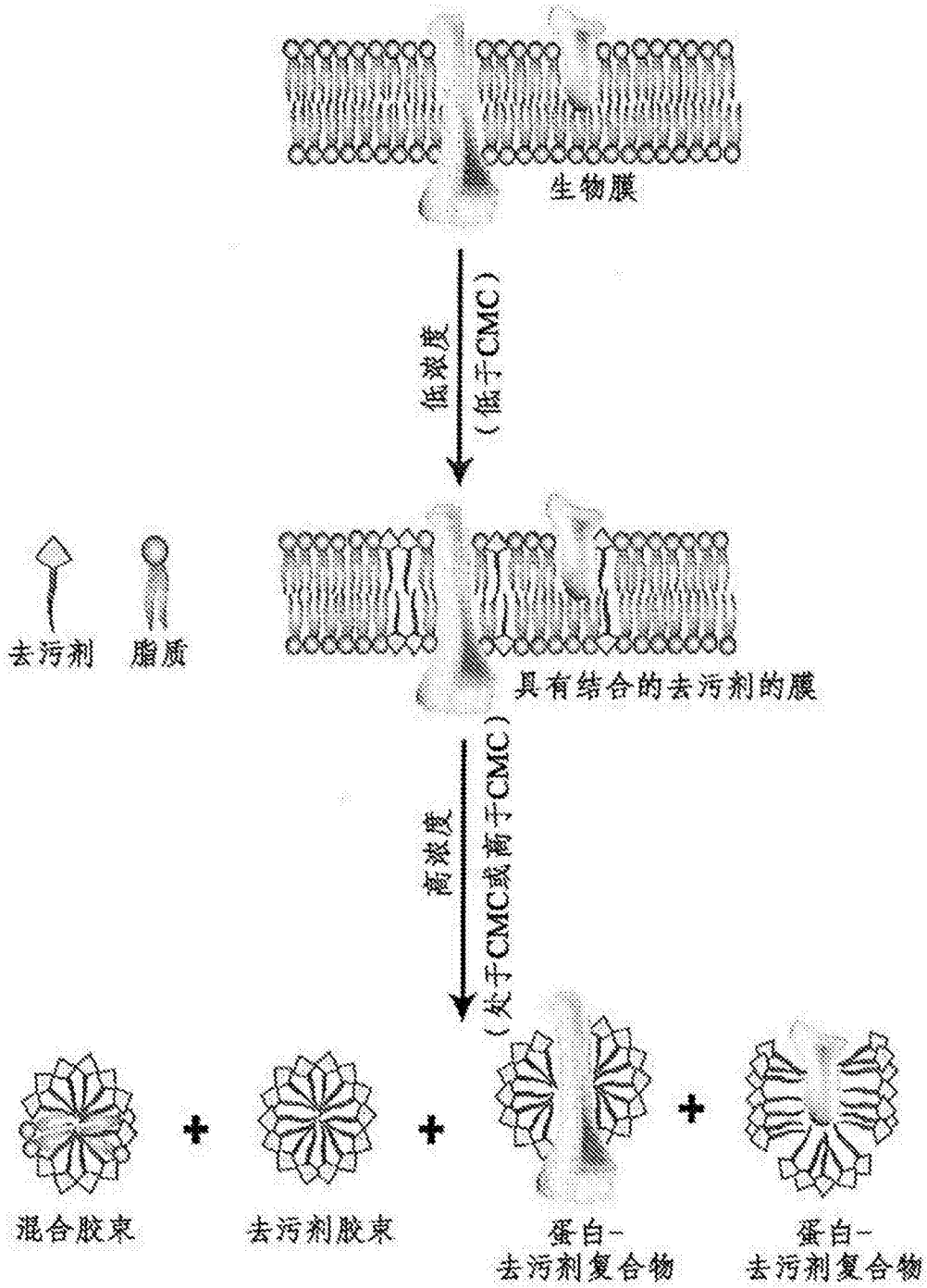


图 6

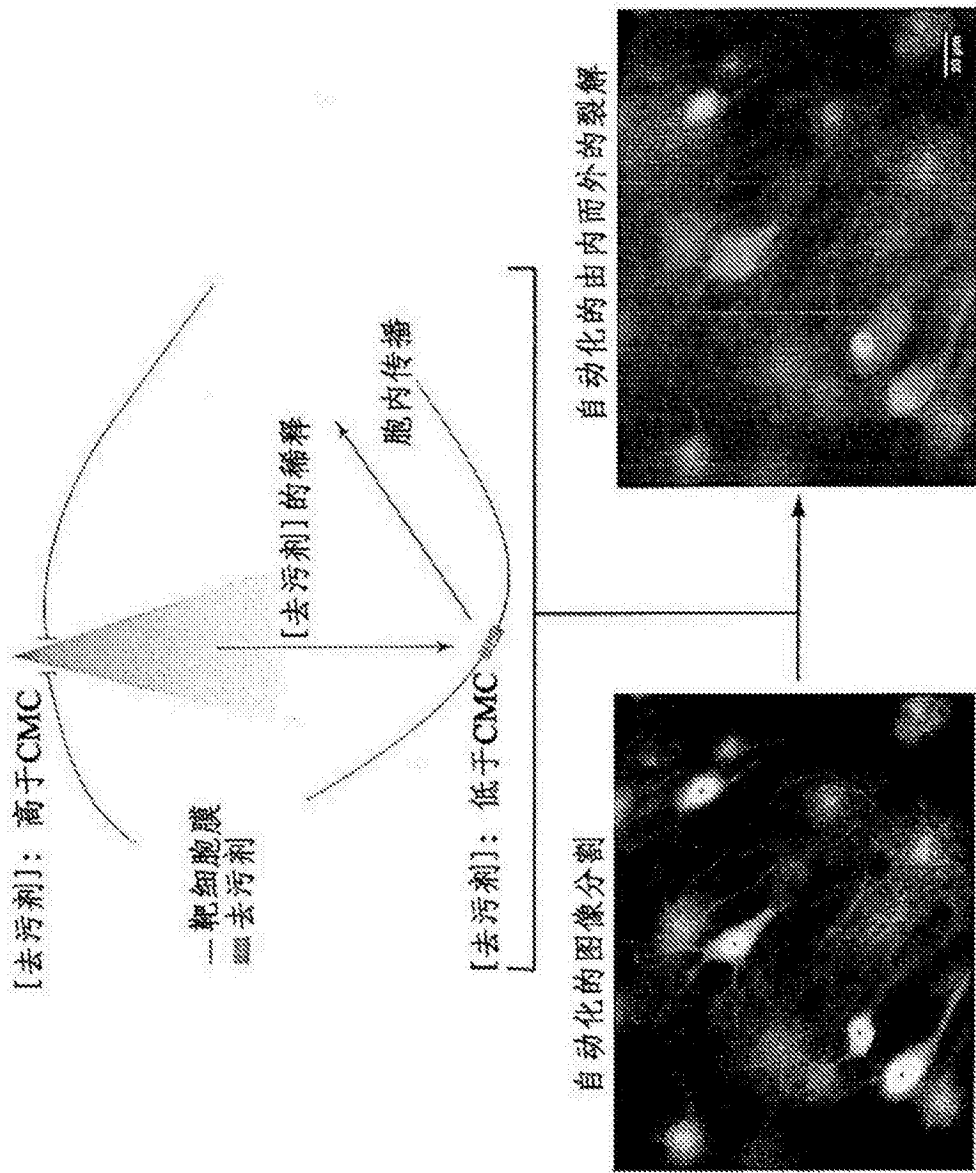


图 7

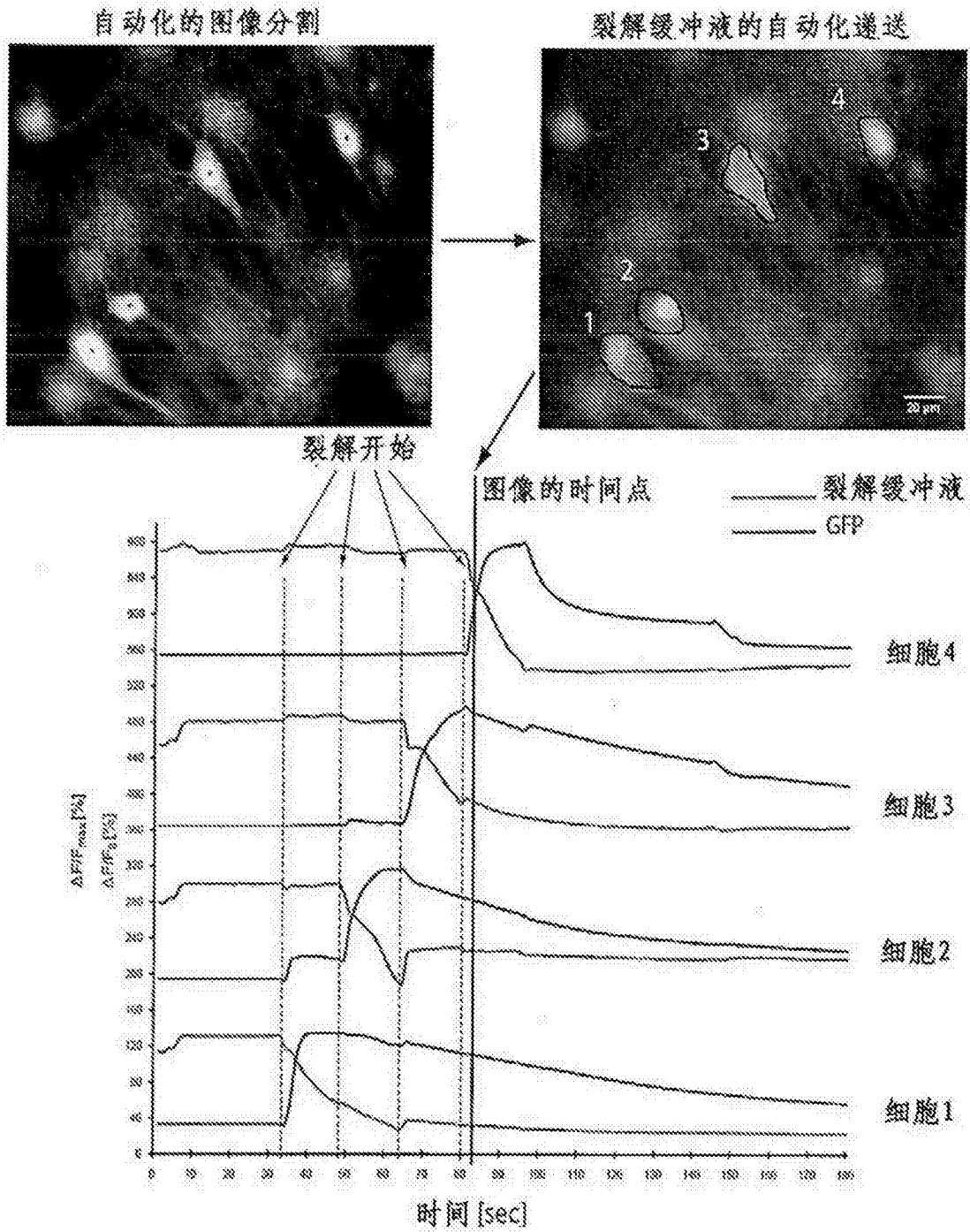


图 8

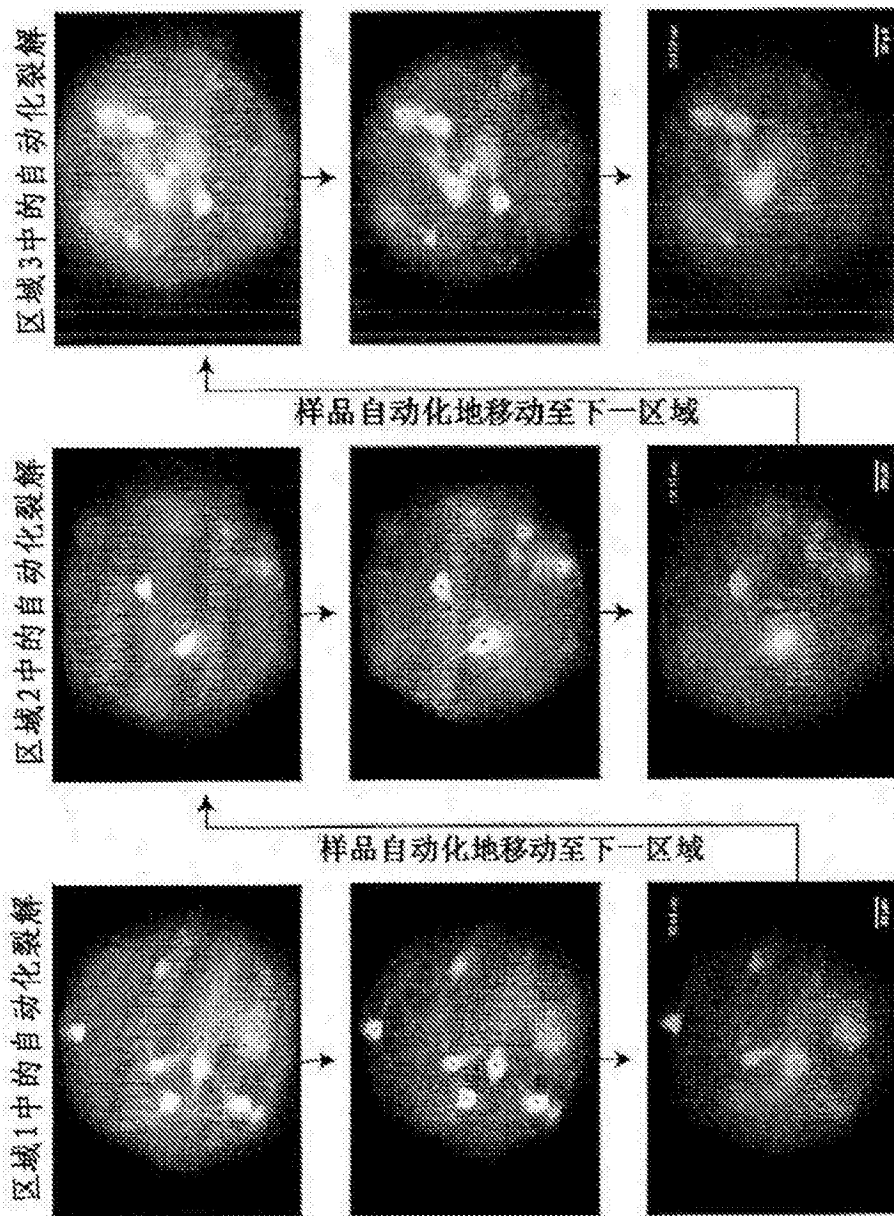


图 9

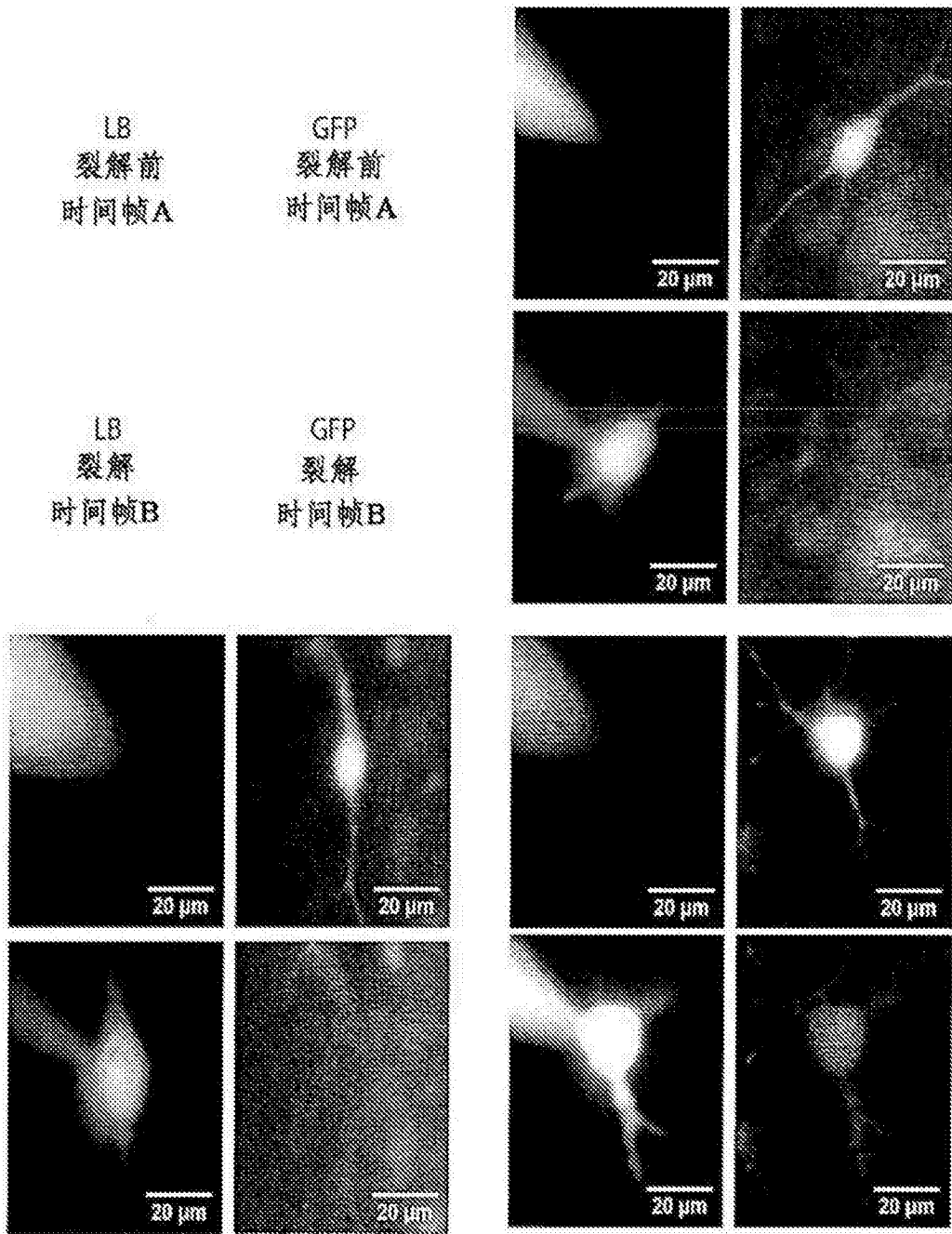


图 10

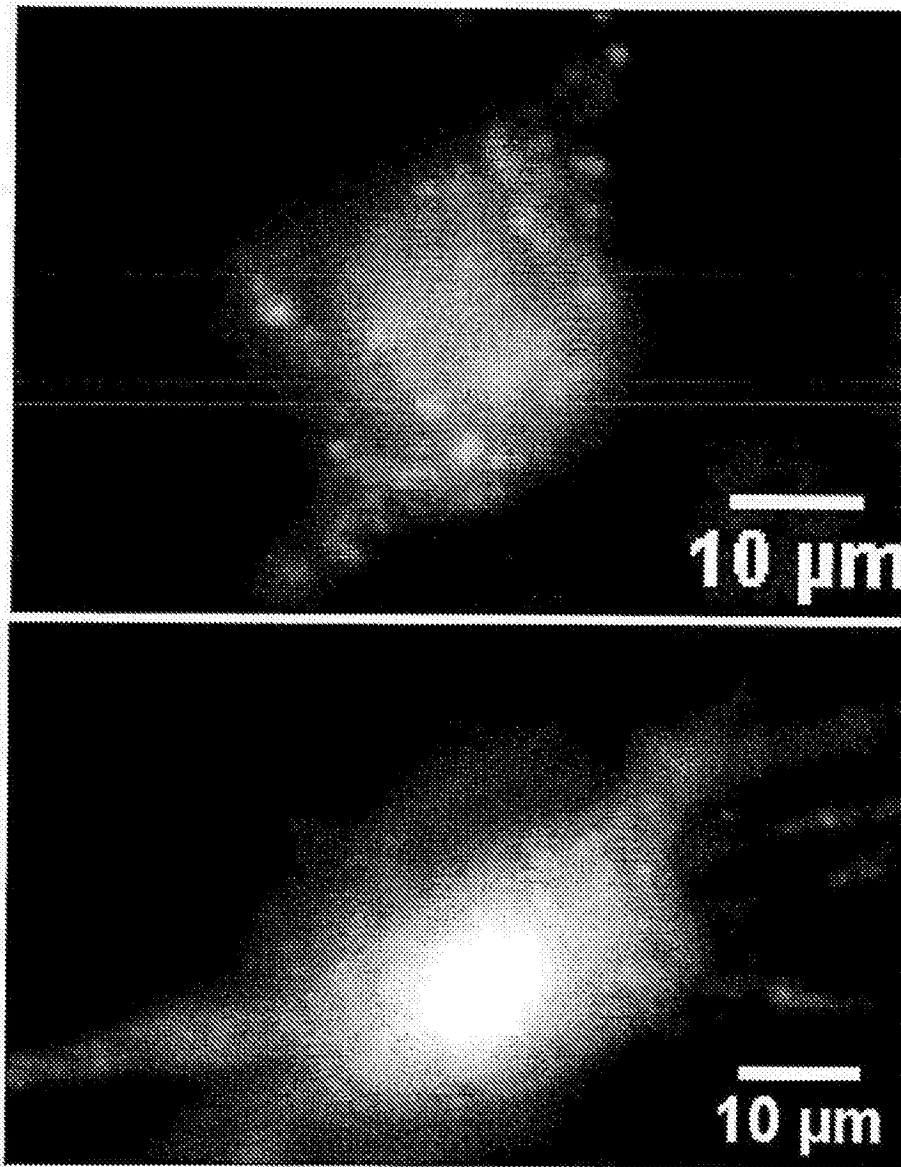


图 11

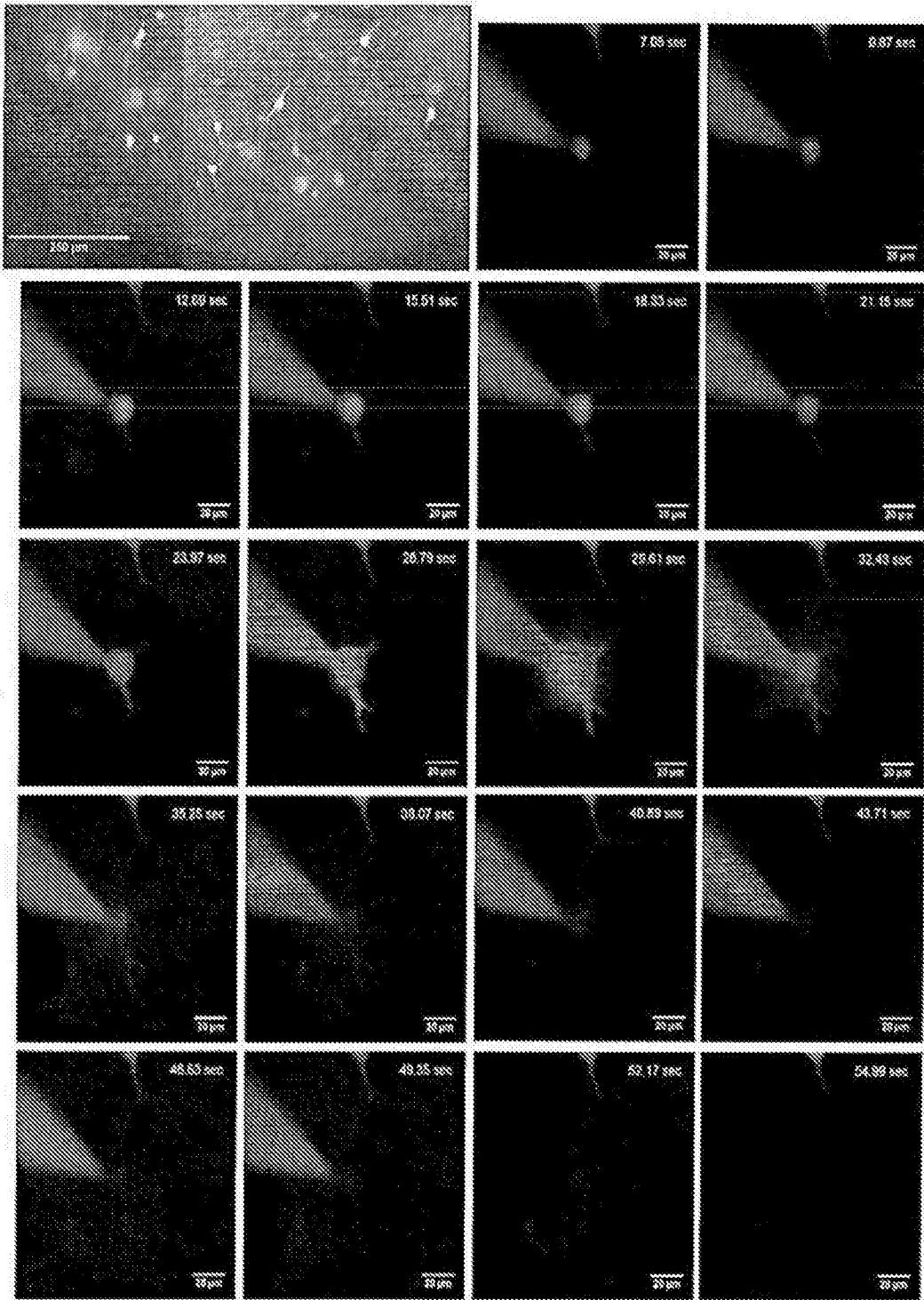


图 12

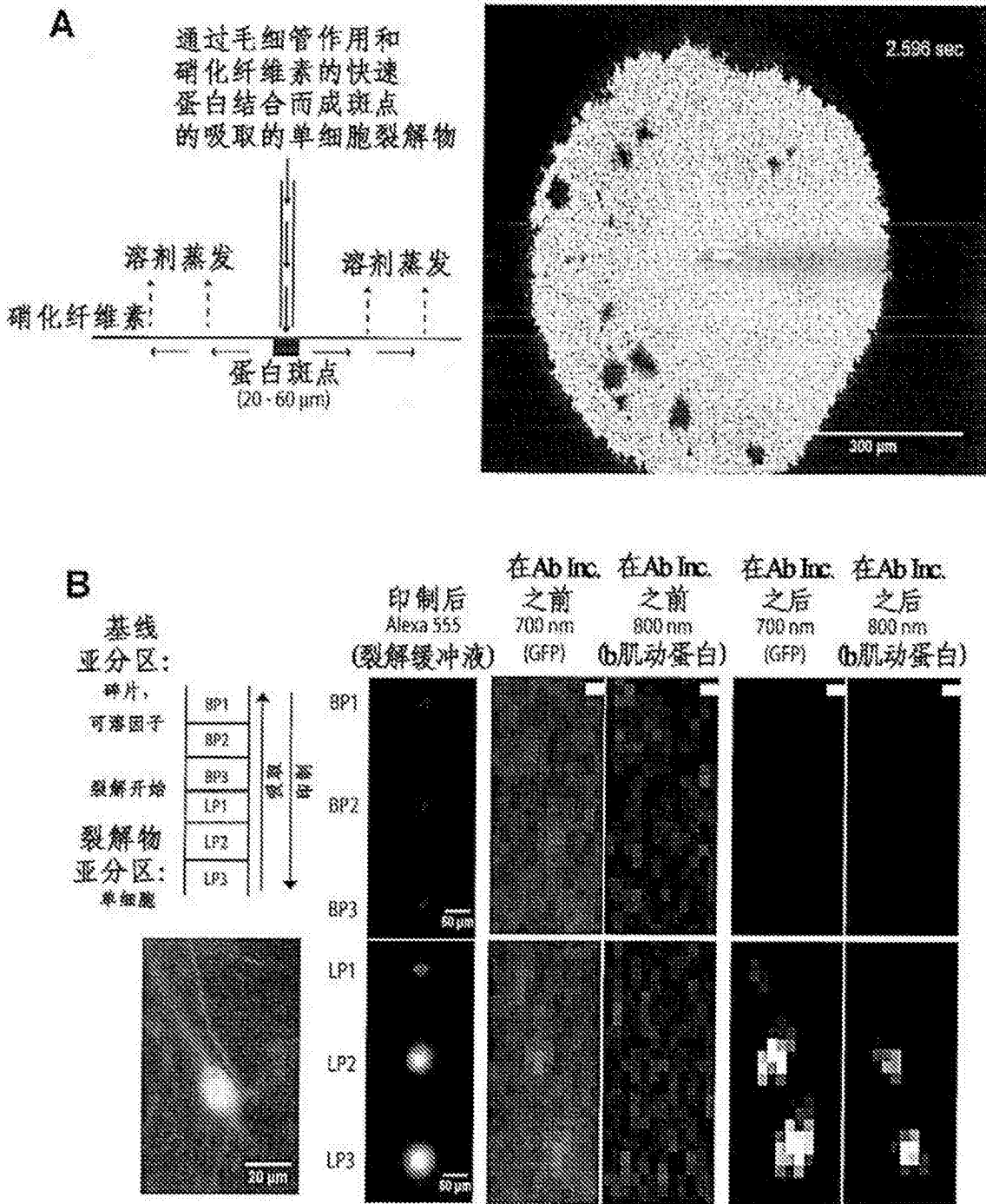


图 13

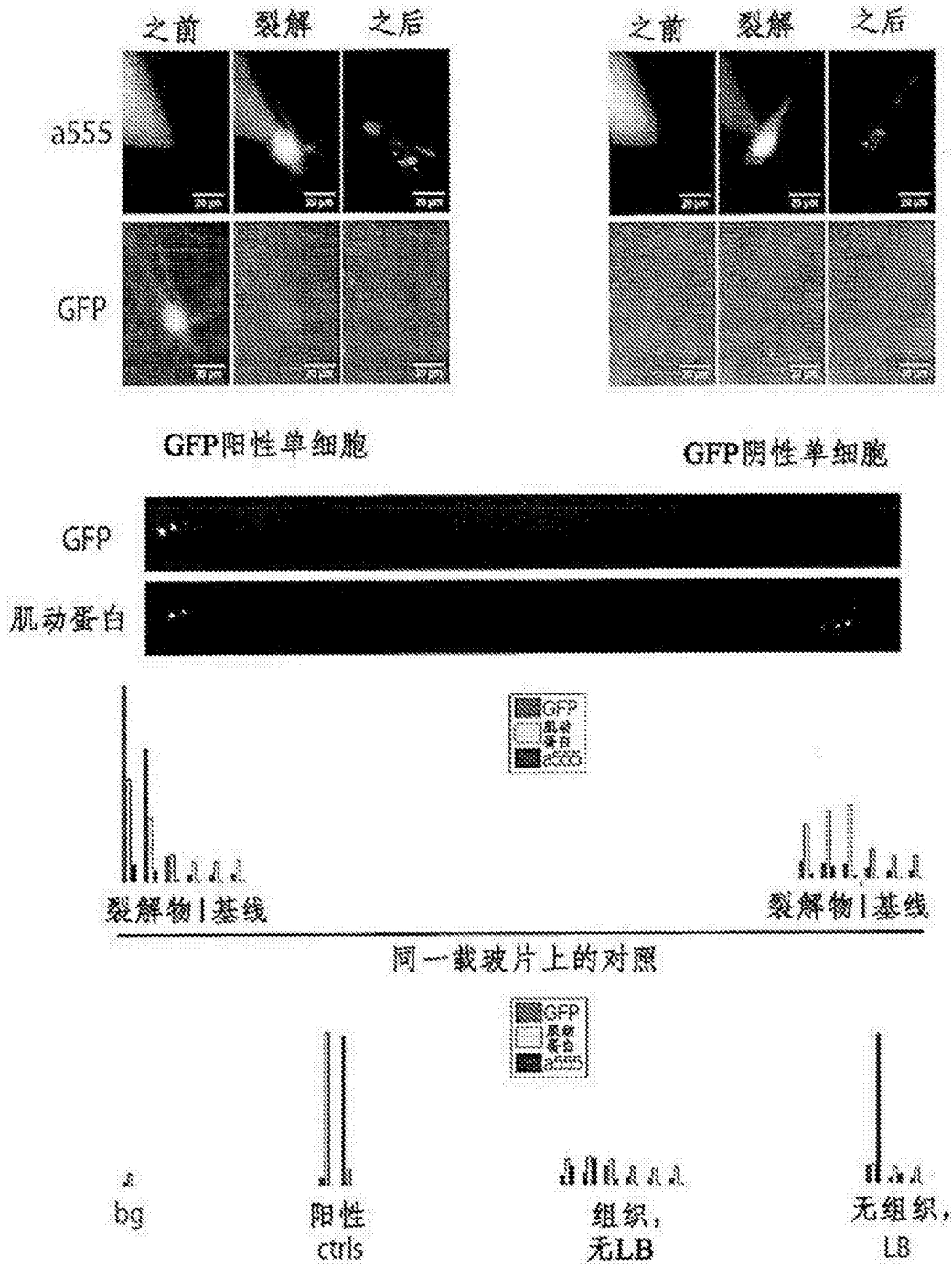


图 14

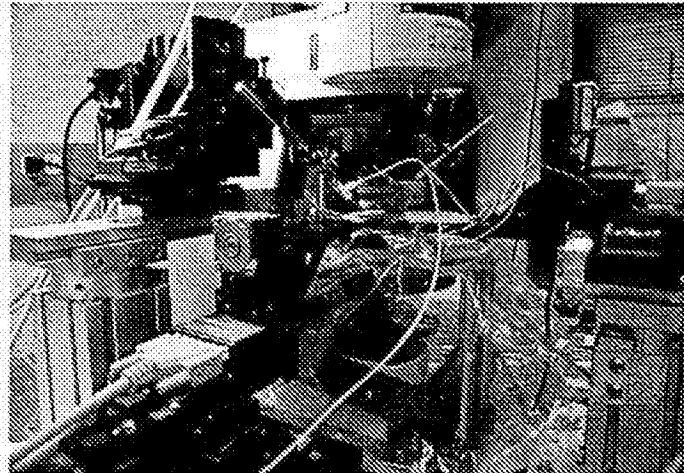
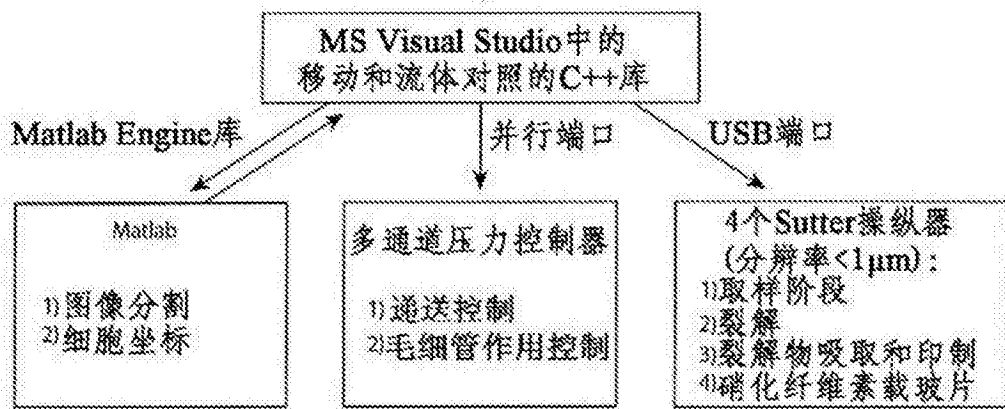
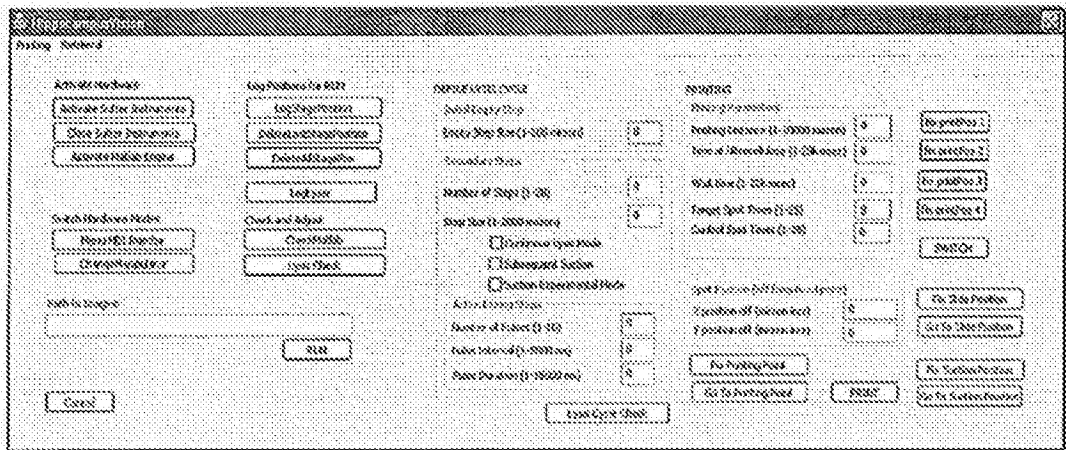


图 15

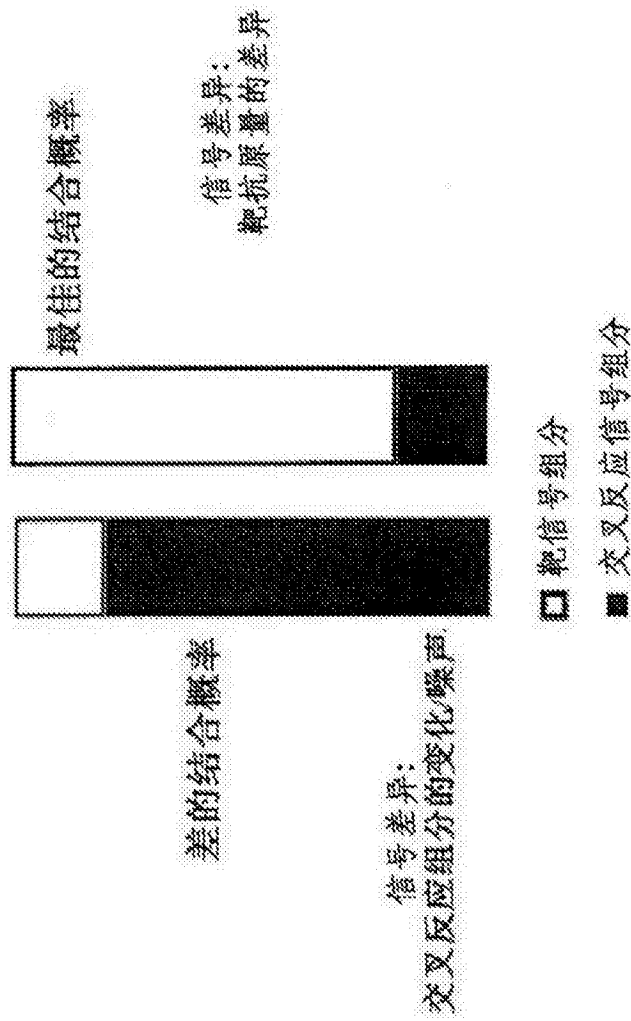


图 16

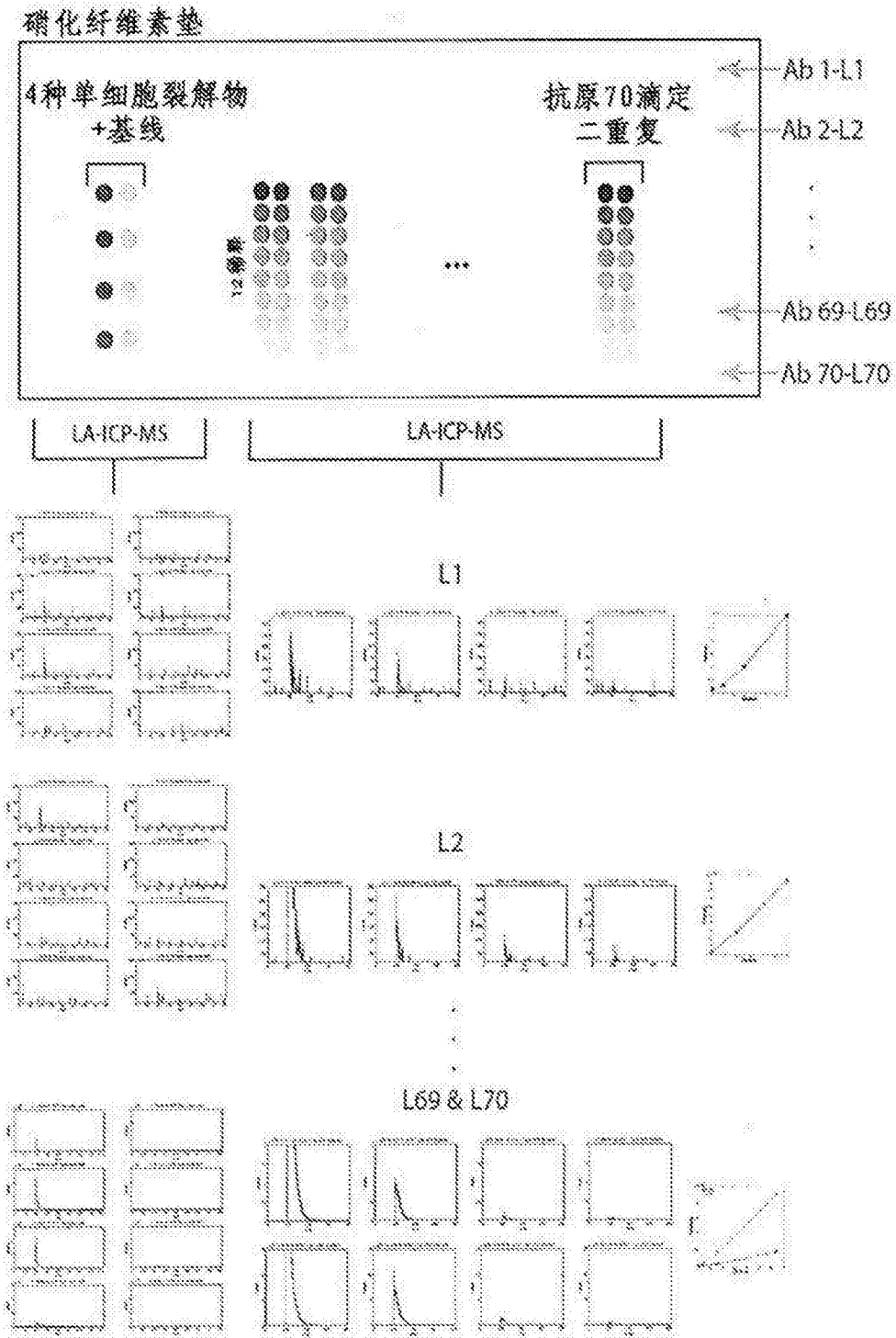


图 17

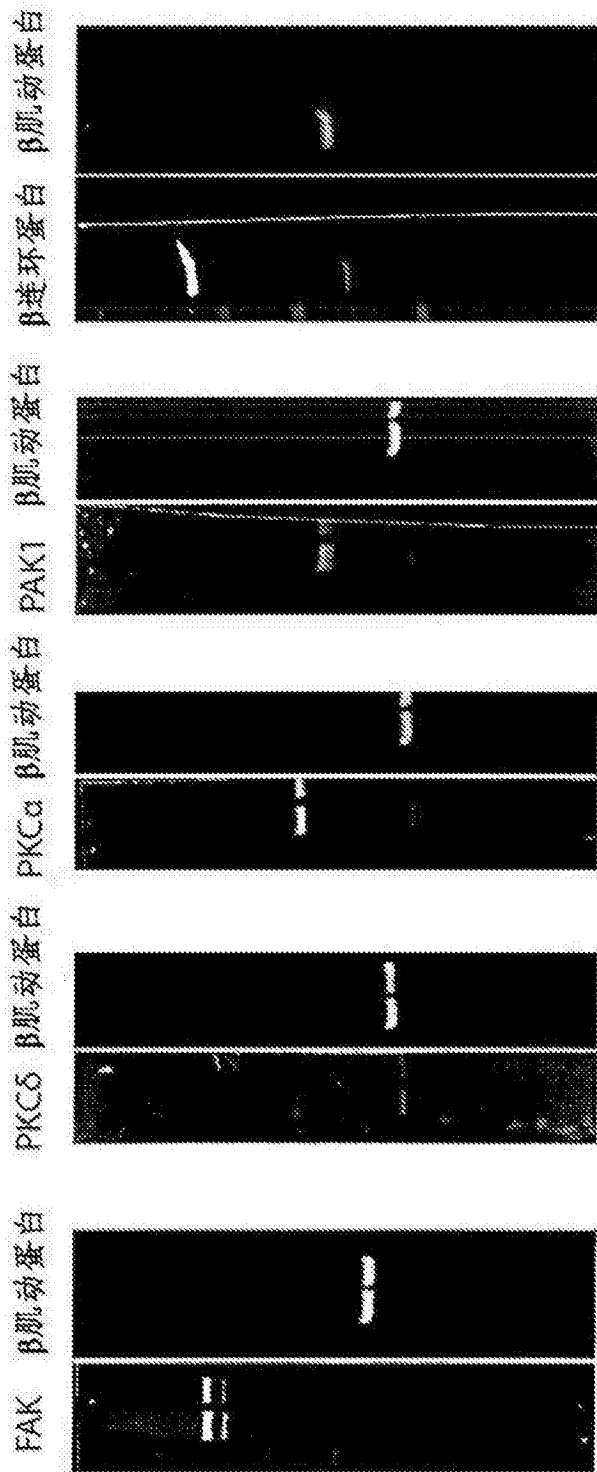


图 18

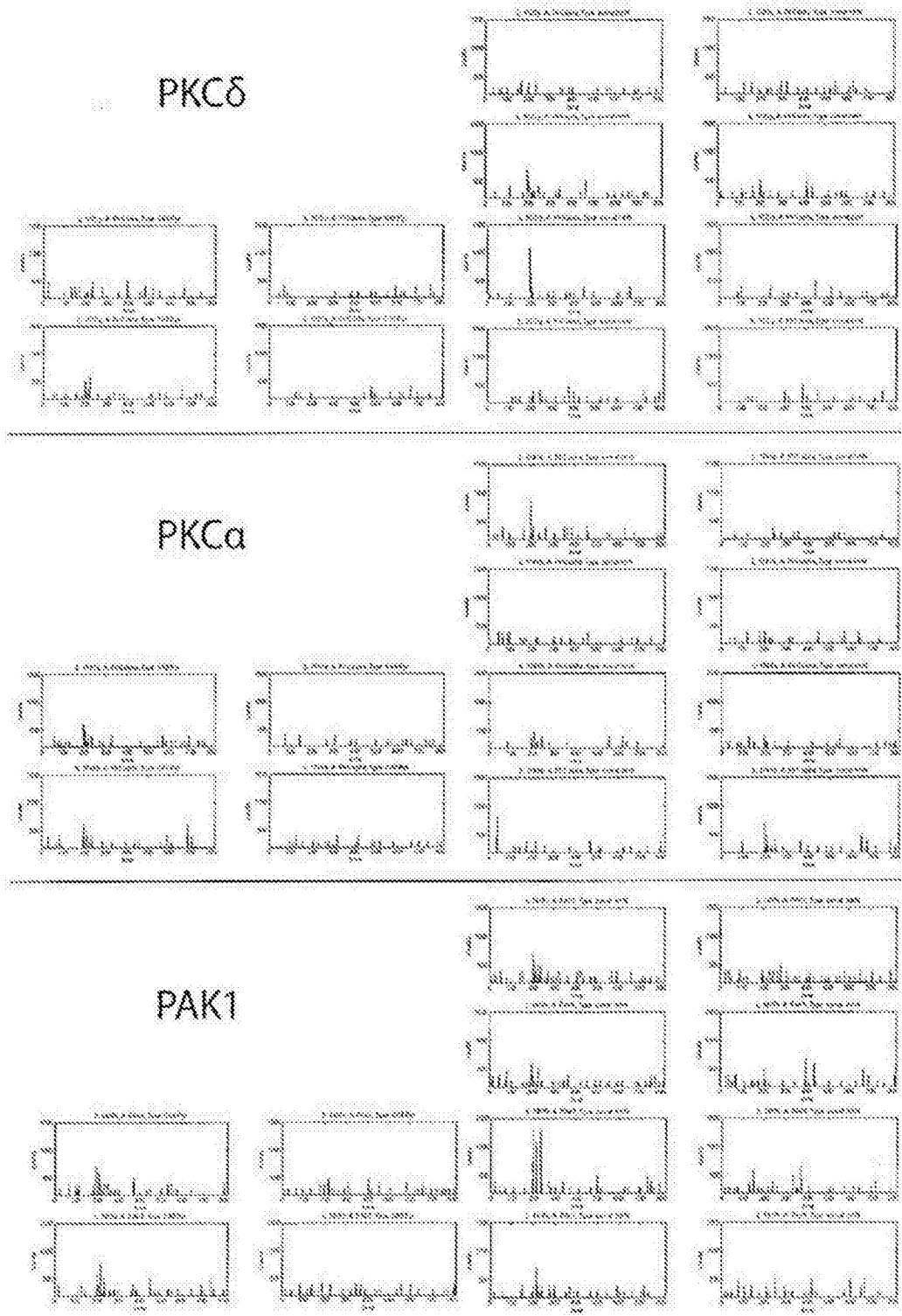


图 19B

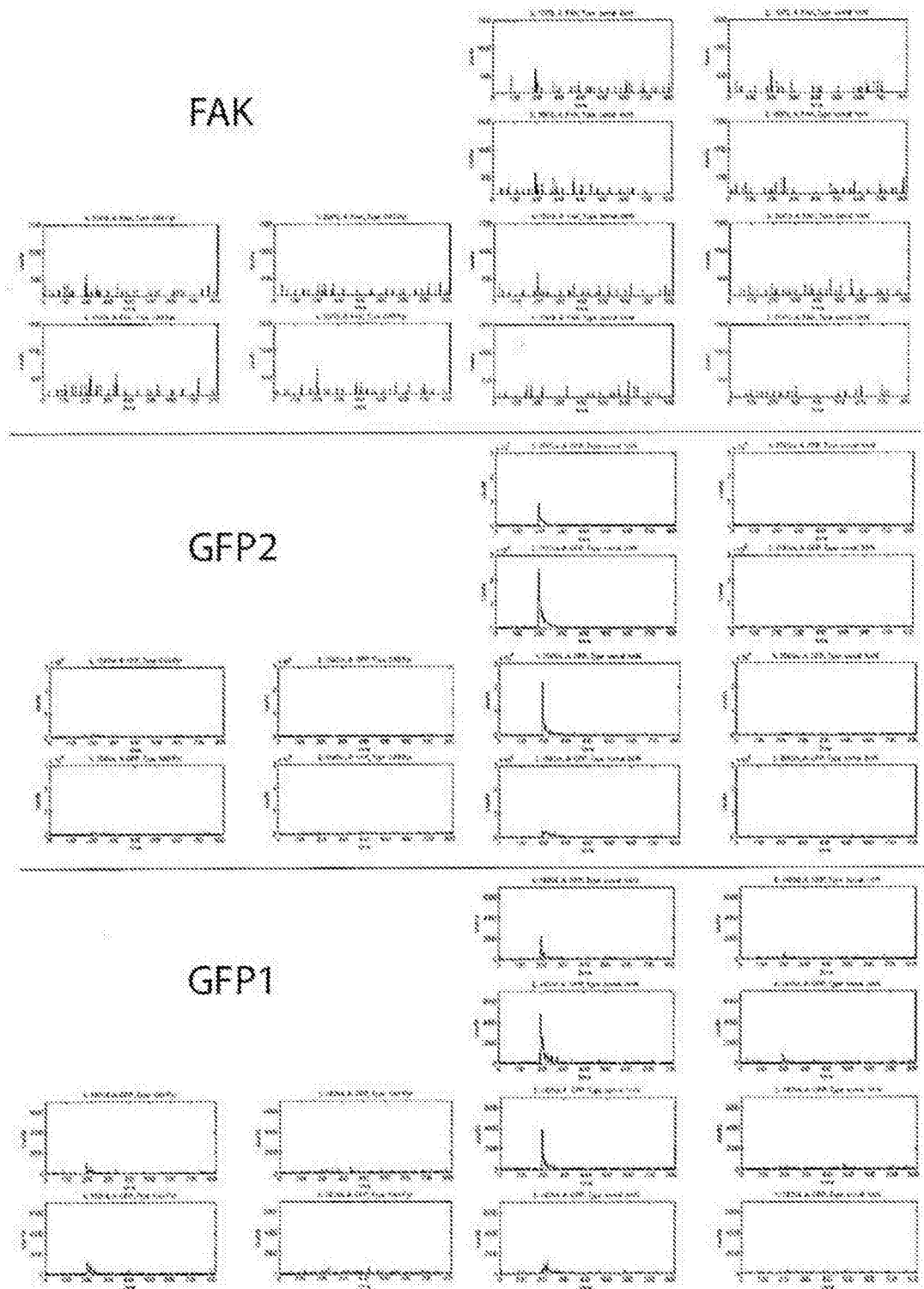


图 19C

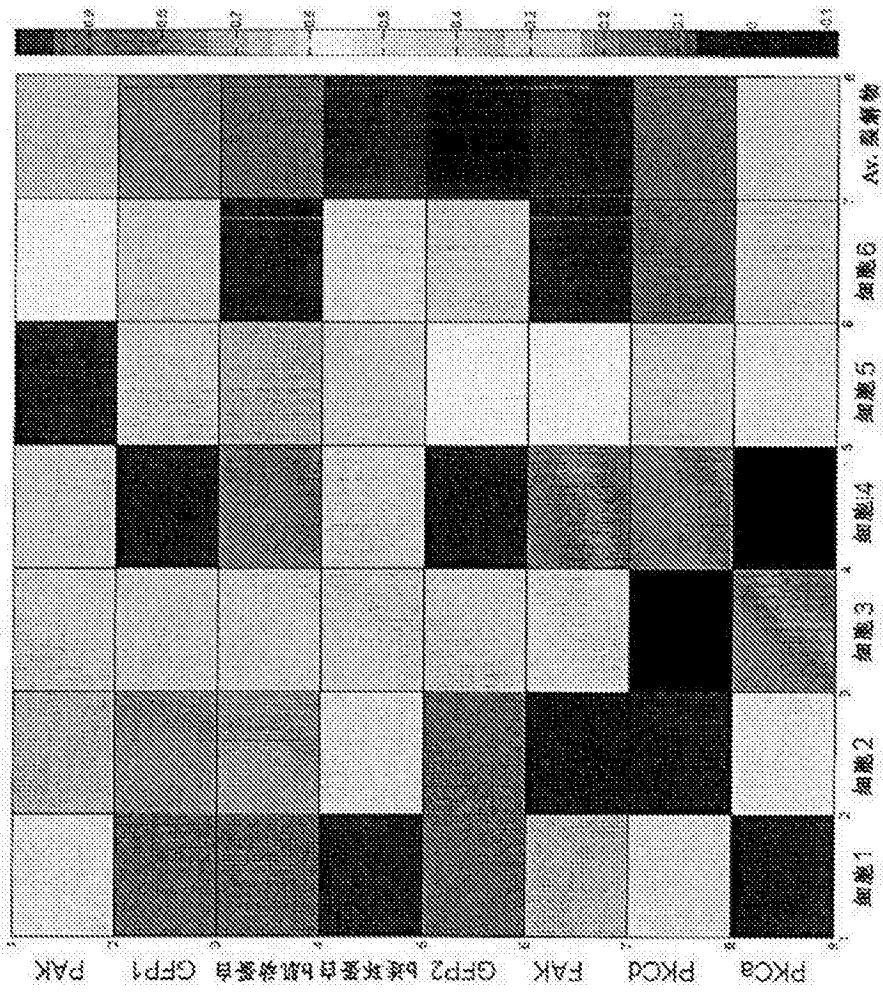


图 20

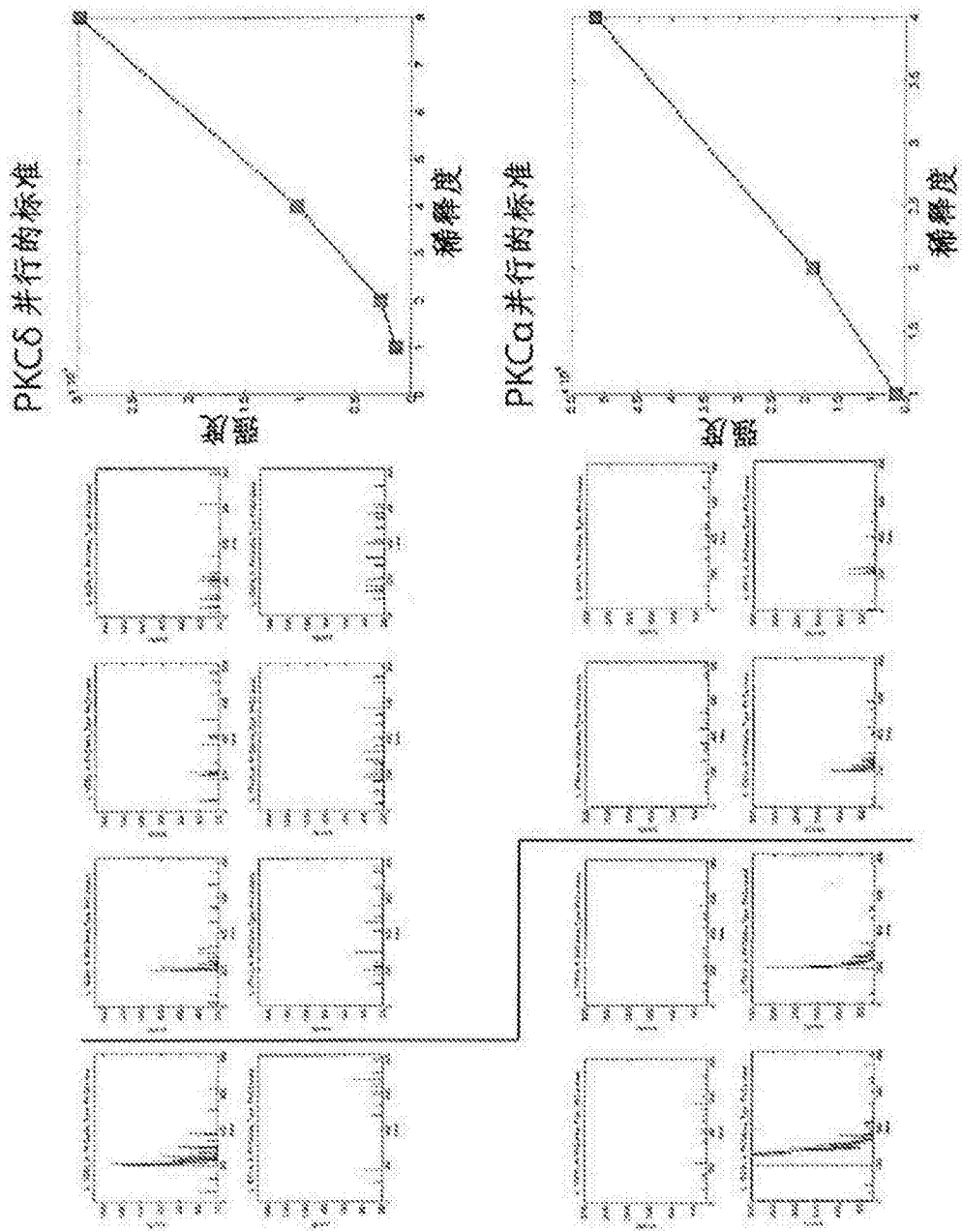


图 21

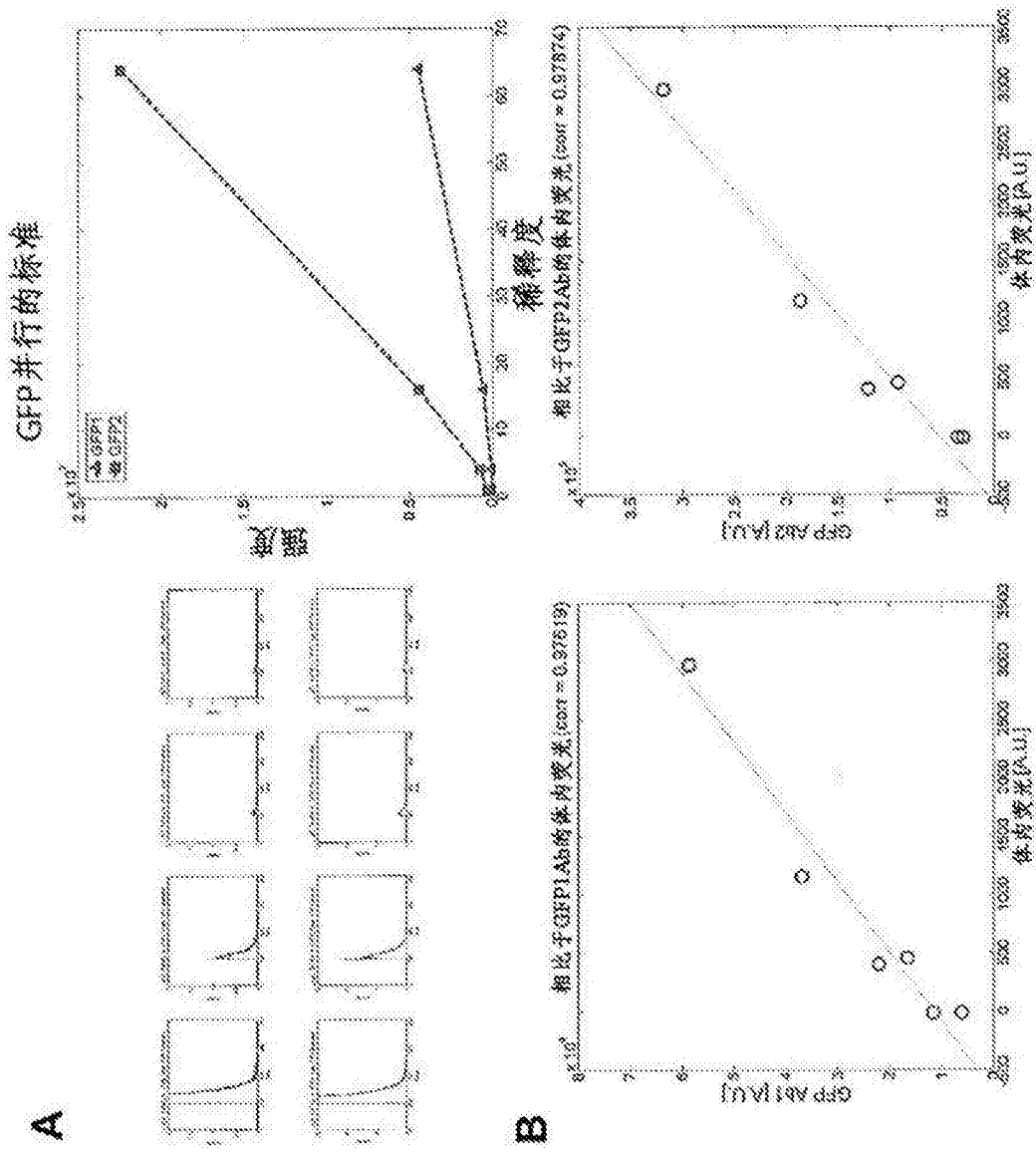
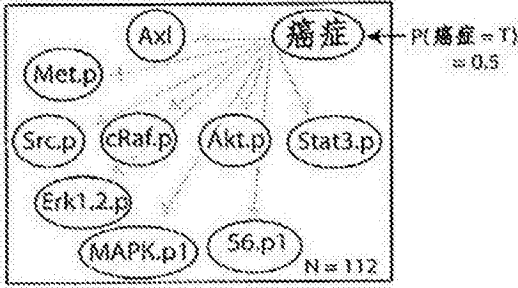


图 22

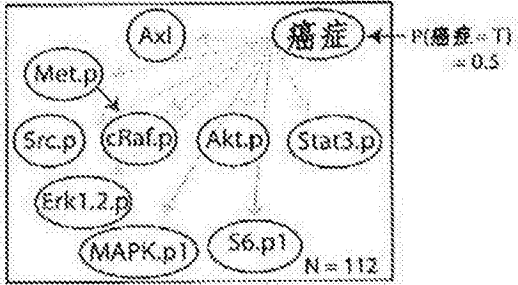
朴素贝叶斯



朴素贝叶斯:

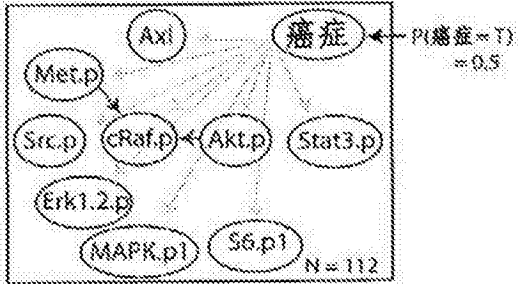
$P(\text{癌症}, \text{Axl}, \text{Met.p}, \text{Src.p}, \text{Erk1.2.p}, \text{MAPK.p1}, \text{S6.p1}) = P(\text{癌症})$
 $P(\text{Axl}|\text{癌症})$
 $P(\text{Met.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Src.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Akt.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Stat3.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{MAPK.p1}|\text{癌症})$
 $P(\text{S6.p1}|\text{癌症})$

MET



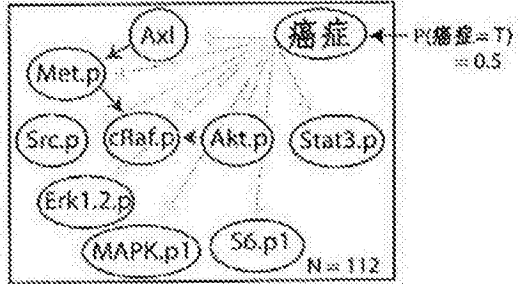
$P(\text{癌症}, \text{Axl}, \text{Met.p}, \text{Src.p}, \text{Erk1.2.p}, \text{MAPK.p1}, \text{S6.p1}) = P(\text{癌症})$
 $P(\text{Axl}|\text{癌症})$
 $P(\text{Met.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Src.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{Met.p}, \text{Src.p}, \text{癌症})$
 $P(\text{Akt.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Stat3.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{MAPK.p1}|\text{癌症})$
 $P(\text{S6.p1}|\text{癌症})$

MET + AKT



$P(\text{癌症}, \text{Axl}, \text{Met.p}, \text{Src.p}, \text{Erk1.2.p}, \text{MAPK.p1}, \text{S6.p1}) = P(\text{癌症})$
 $P(\text{Axl}|\text{癌症})$
 $P(\text{Met.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Src.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{Met.p}, \text{Akt.p}, \text{Src.p}, \text{癌症})$
 $P(\text{Akt.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Stat3.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{MAPK.p1}|\text{癌症})$
 $P(\text{S6.p1}|\text{癌症})$

AXL + MET + AKT



$P(\text{癌症}, \text{Axl}, \text{Met.p}, \text{Src.p}, \text{Erk1.2.p}, \text{MAPK.p1}, \text{S6.p1}) = P(\text{癌症})$
 $P(\text{Axl}|\text{癌症})$
 $P(\text{Met.p}|\text{Axl}, \text{癌症})$
 $P(\text{Src.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{Met.p}, \text{Akt.p}, \text{Src.p}, \text{癌症})$
 $P(\text{Akt.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Stat3.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{Erk1.2.p}|\text{癌症})$
 $P(\text{MAPK.p1}|\text{癌症})$
 $P(\text{S6.p1}|\text{癌症})$

图 23



图 23 续

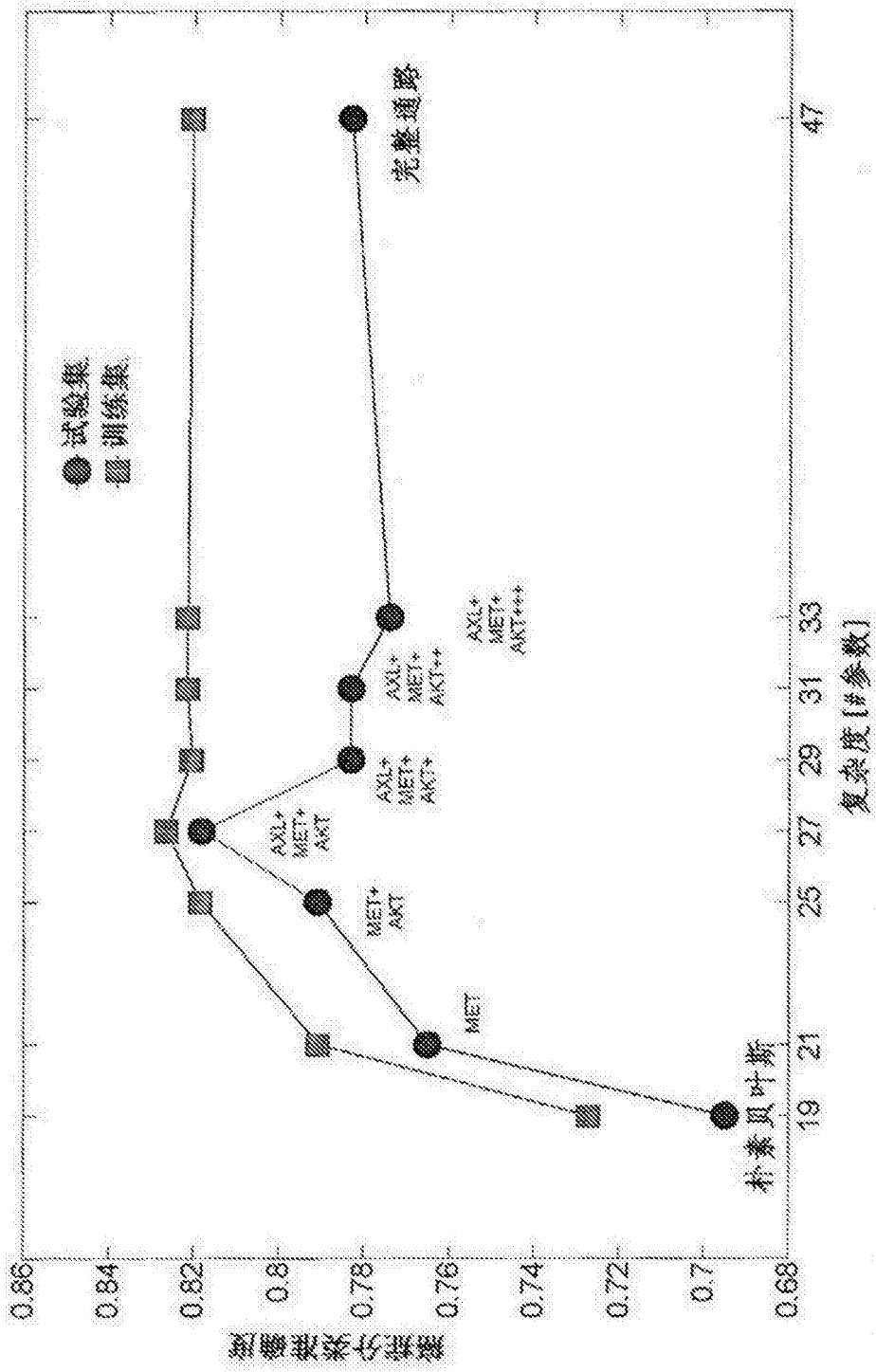


图 24

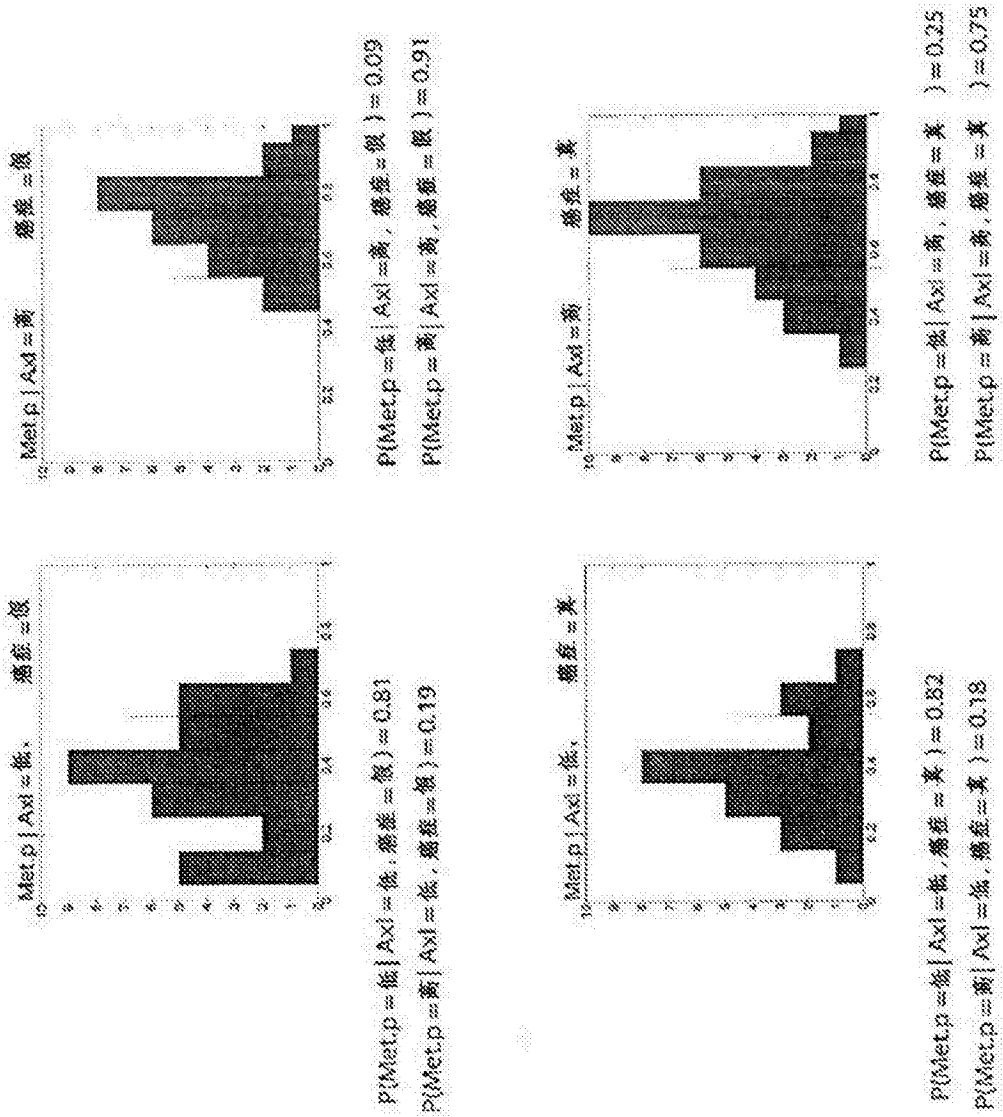


图 25

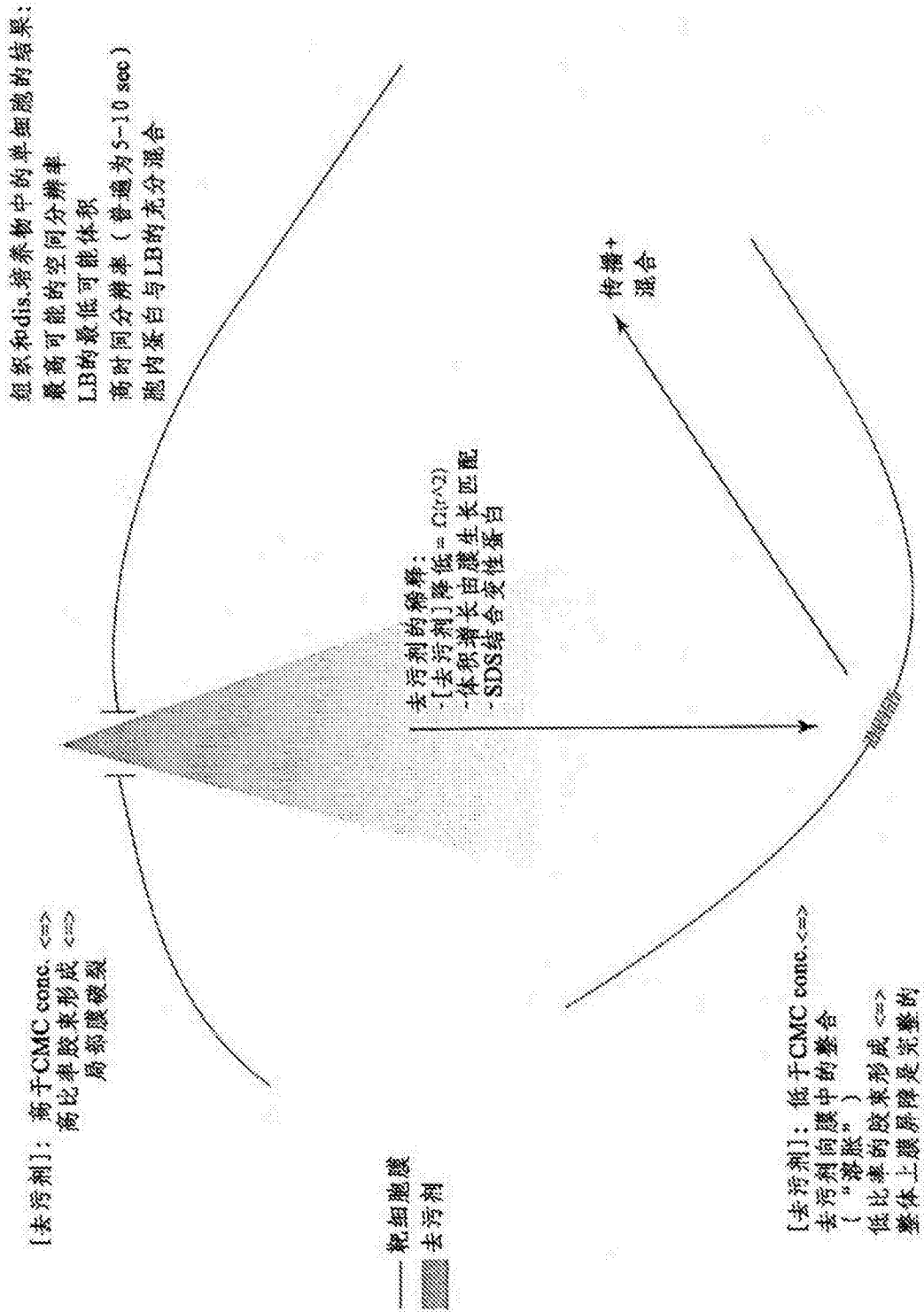


图 26

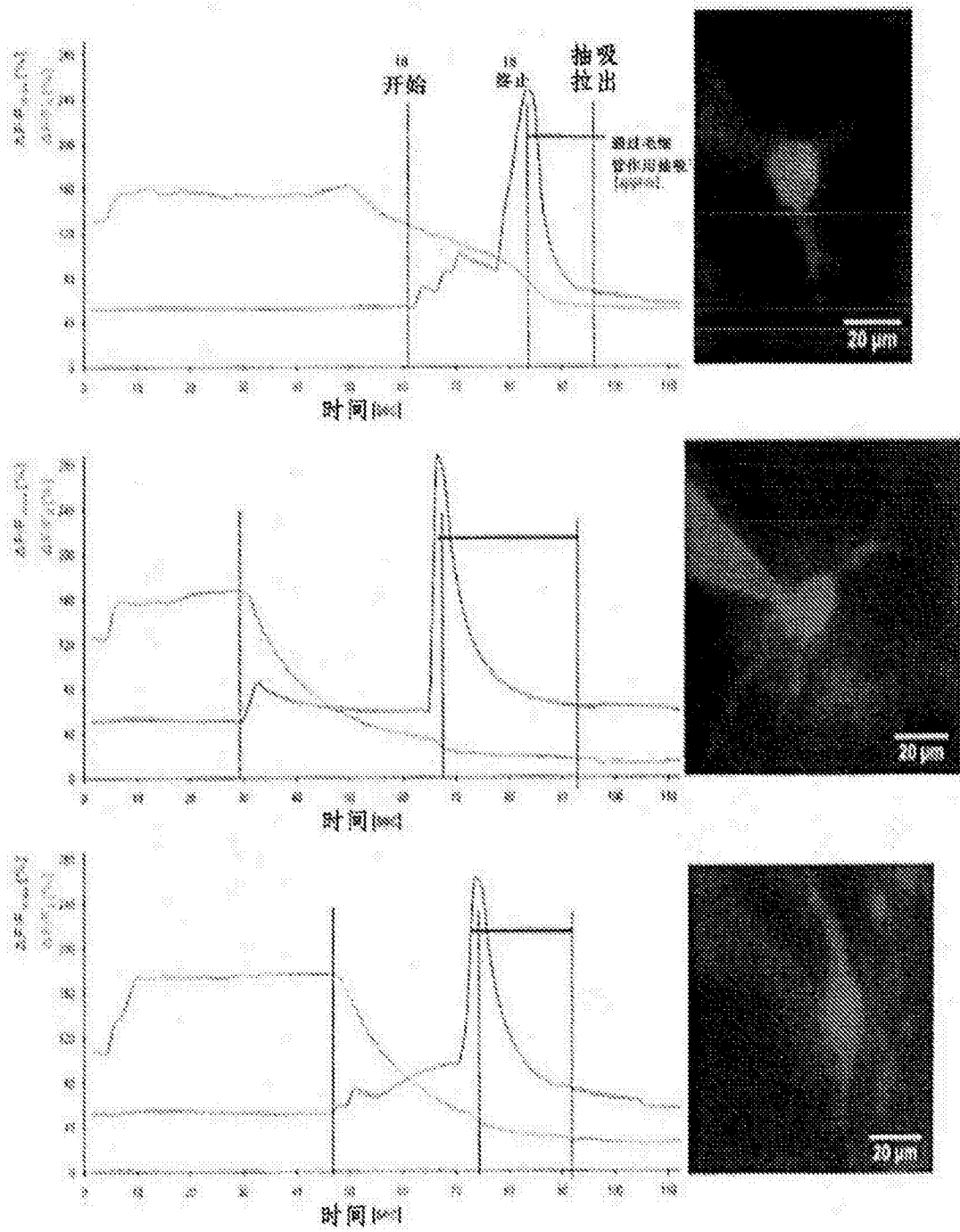


图 27

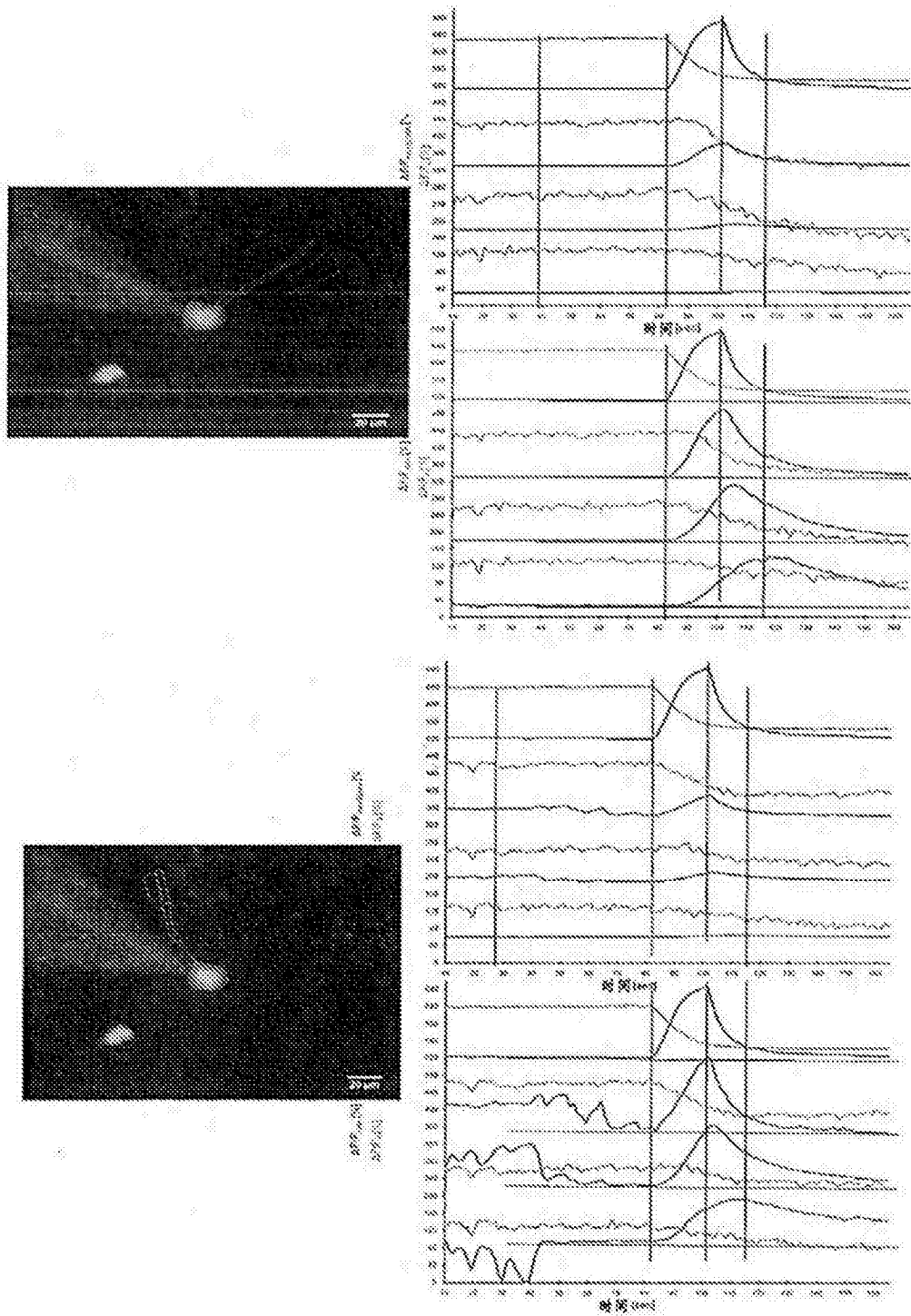


图 28

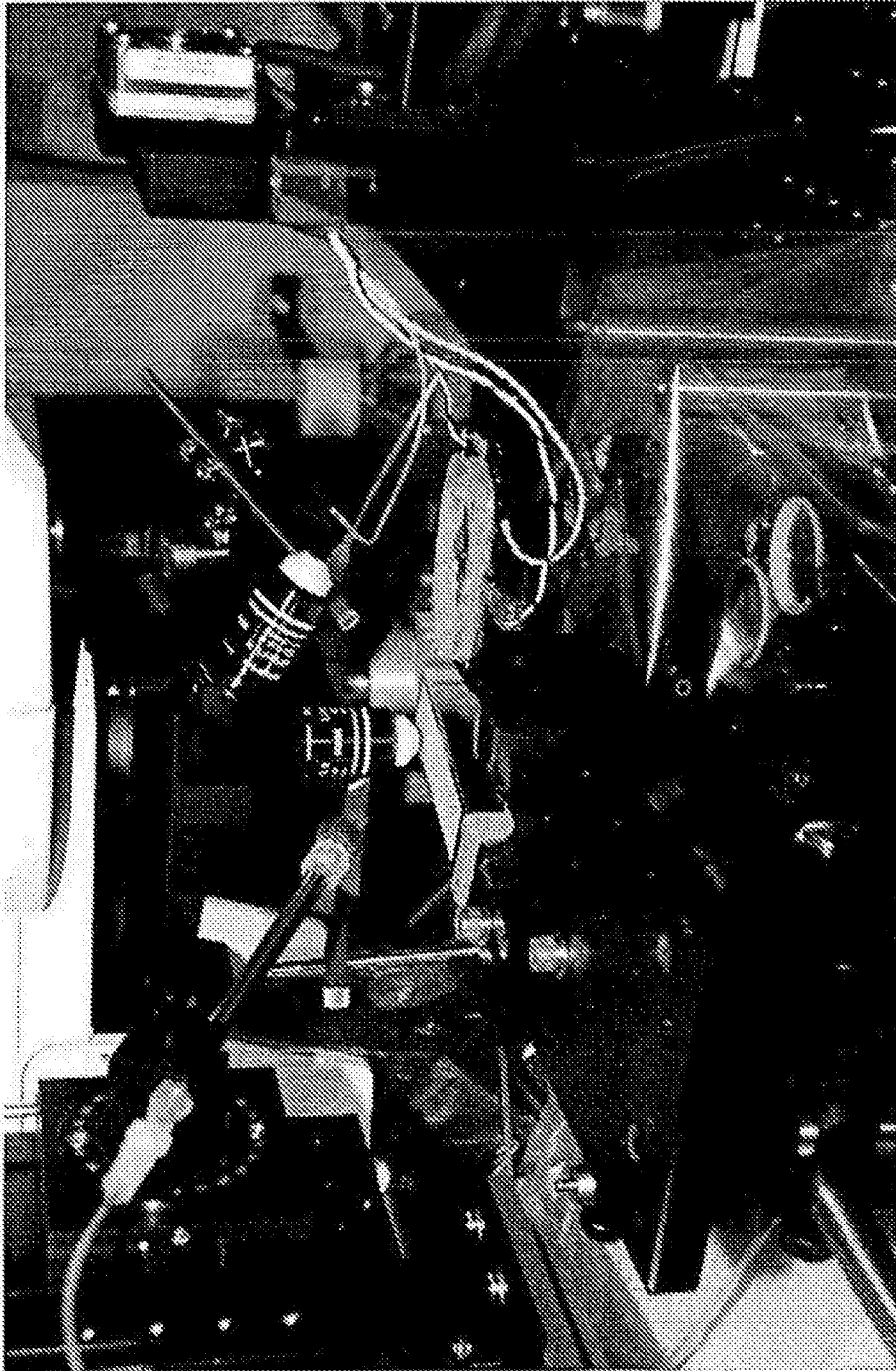


图 29

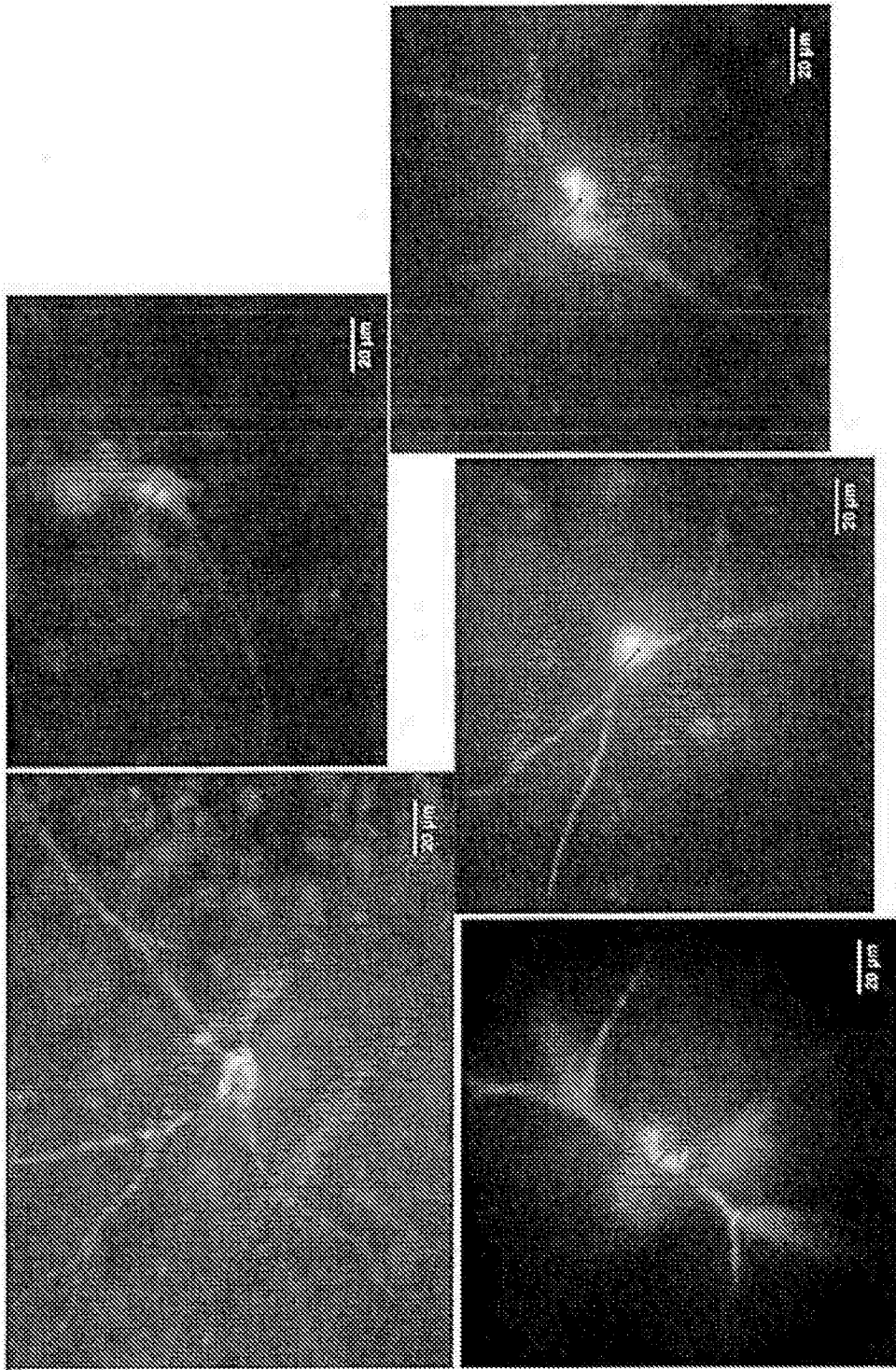


图 31

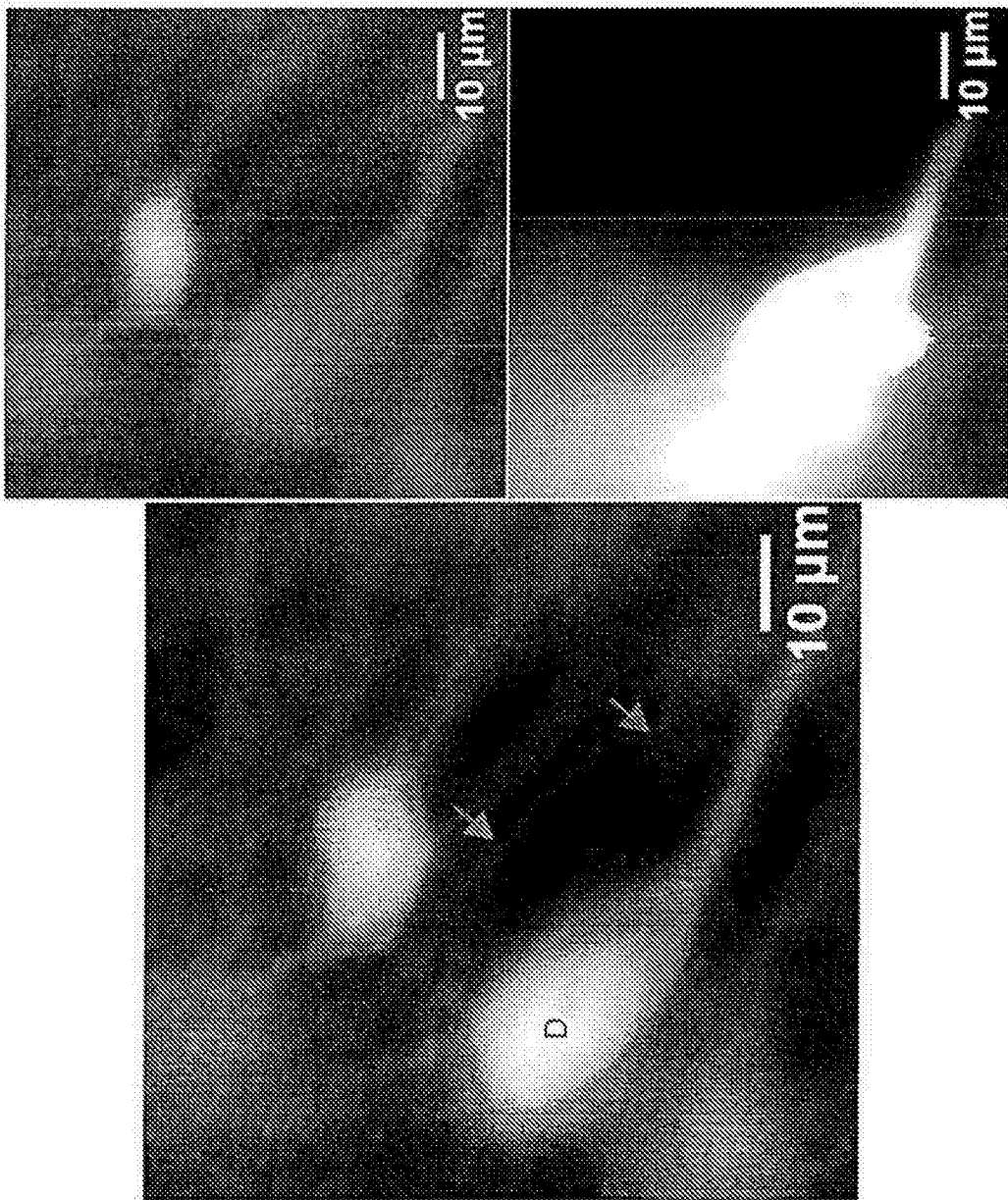


图 32