



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0058900
(43) 공개일자 2016년05월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 1/30 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 1/30 (2013.01)
G01N 33/57492 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7010278
- (22) 출원일자(국제) 2014년07월30일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년04월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/048985
- (87) 국제공개번호 WO 2015/041755
국제공개일자 2015년03월26일
- (30) 우선권주장
61/880,401 2013년09월20일 미국(US)
61/992,103 2014년05월12일 미국(US)

- (71) 출원인
캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 캘리포니아 파사데나 엠씨 6-32 이스트 캘리포니아 블러바드 1200 (우: 91125)
- (72) 발명자
그라디나루, 비비아나
미국 91011 캘리포니아 라 캐나다 플린트리지 팜 드라이브 5306
양, 빈
미국 91125 캘리포니아 파사데나 이스트 캘리포니아 블러바드 1200
- (74) 대리인
특허법인 남앤드남

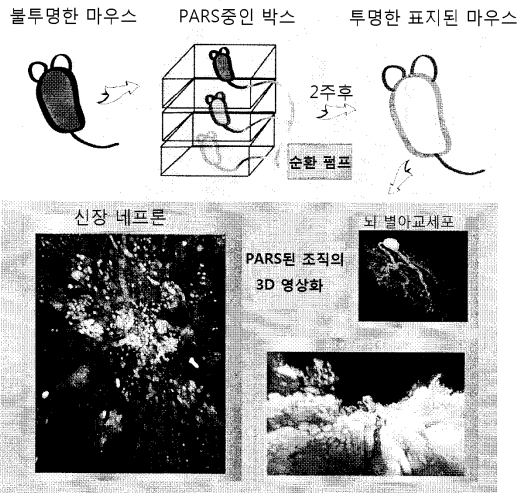
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 **온전한 전체 조직의 표현형분석을 위한 방법**

(57) 요약

다양한 구체예에서, 본 출원은 전체 기관 및 전신이 거대분자 투과화되고, 광학적으로 투명해지도록 함으로써 이들의 세포 구조를 온전한 연결도로 노출시키는 조직 투명화를 위한 방법 및 조성물을 교시한다. 일부 구체예에서, 본 출원은 온전한 기관의 수동 조직 투명화 및 면역염색을 위한 프로토콜인 PACT를 교시한다. 다른 구체예에서, 본 출원은 두꺼운 조직을 영상화시키기 위한 굴절 지수 매칭 매질인 RIMS를 교시한다. 또 다른 구체예에서, 본 출원은 전신 투명화 및 면역표지화를 위한 방법인 PARS를 교시한다.

대표도 - 도14



(52) CPC특허분류

G01N 2001/302 (2013.01)

G01N 2001/305 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 조직에 적용시킴으로써 고정된 조직을 형성시키는 단계, 및 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 고정된 조직에 적용시킴으로써 하이드로겔 처리된 조직을 형성시키는 단계를 포함하는, 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 고정된 조직에 적용시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 하이드로겔 단량체 용액이 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 하이드로겔 처리된 조직을 실질적 기밀 챔버에 배치하는 단계, 및 질소를 실질적 기밀 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 15℃ 내지 60℃에서 탈기된 조직을 인큐베이션시킴으로써 인큐베이션된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 인큐베이션된 조직을 PBS로 세척함으로써 세척되고 인큐베이션된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 세척되고 인큐베이션된 조직에 적용시킴으로써 투명화된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 세제 용액이 0.01M 내지 1M PBS 중 1% 내지 30%의 SDS를 포함하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, PBS를 투명화된 조직에 적용시킴으로써 투명화되고 세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 영상화 매질을 투명화되고 세척된 조직에 적용시키는 단계를 추가로 포함하고, 영상화 매질이 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미드]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미드)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20(tween-20); (4) 소듐 아지드; 및 임의로

(5) 소듐 하이드록시드를 포함하는, 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도가 10 내지 100% w/v인 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 조직이 생검으로부터 획득되는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 조직이 양성 또는 전암성 조직인 방법.

청구항 14

일차 항체를 포함하는 용액을 제 9항의 투명화되고 세척된 조직에 적용시킴으로써 항체-결합된 조직을 형성시키는 단계를 포함하는, 조직을 면역염색시키기 위한 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 항체-결합된 조직을 완충액으로 행구는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 이차 항체를 포함하는 용액을 상기 완충액으로 세척된 항체-결합된 조직에 적용시키는 단계를 추가로 포함하고, 이차 항체가 시각화 가능한 마커로 표지되는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 시각화 가능한 마커가 형광 마커인 방법.

청구항 18

제 14항에 있어서, 일차 항체가 시각화 가능한 마커로 표지되는 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 시각화 가능한 마커가 형광 마커인 방법.

청구항 20

제 14항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서, 조직이 생검으로부터 획득되는 방법.

청구항 21

제 16항의 방법에 따라 제조된 면역염색된 조직을 시각화시키기 위해 현미경을 이용하는 단계를 포함하는, 면역염색된 조직을 시각화시키기 위한 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 현미경이 공초점 현미경검사, 회전 디스크 현미경검사, 에피-형광 현미경검사, 라이트 필드 현미경검사(light field microscopy), 라이트-시트 현미경검사(light-sheet microscopy), 다광자 현미경검사로 구성된 군으로부터 선택된 현미경검사의 한 형태를 수행하기 위해 이용되는 방법.

청구항 23

파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된 조직을 형성시키는 단계; 및

아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로

써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 조직을 형성시키는 단계를 포함하는, 제자리에서 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 하이드로겔 단량체 용액이 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함하는 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서, PBS를 포함하는 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 PBS-세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 대상체를 실질적 기밀 챔버에 배치하는 단계, 및 질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 순환계에 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제 27항에 있어서, 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 세제 용액이 0.01M 내지 1M PBS 중 약 1% 내지 30%의 SDS를 포함하는 방법.

청구항 30

제 29항에 있어서, PBS를 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 31

제 30항에 있어서, 대상체의 순환계에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함하고, 영상화 매질이 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함하는, 방법.

청구항 32

제 31항에 있어서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3 디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도가 10 내지 100% w/v인 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 조직이 뇌 조직을 포함하는 방법.

청구항 34

제 33항에 있어서, 조직이 척수 조직을 포함하는 방법.

청구항 35

제 32항에 있어서, (1) 용액 중 하나 이상이 펌프에 연결된 제1 튜브를 통해 대상체의 순환계에 도입되고; (2) 용액 중 하나 이상이 하나 이상의 용액이 수거되는 저장소와 유체 연결된 제2 튜브를 통해 대상체의 순환계로부터 제거되고; 임의로 (3) 펌프가 저장소로부터 하나 이상의 수거된 용액을 퍼 올리고, 제1 튜브를 통해 대상체의 순환계에 하나 이상의 용액을 도입시키는 방법.

청구항 36

제 30항의 방법이 적용되는 대상체의 순환계에 일차 항체를 포함하는 용액을 도입시키는 단계를 포함하는, 제자리에서 조직을 면역염색시키기 위한 방법.

청구항 37

제 36항에 있어서, 대상체의 순환계에 완충액을 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, 대상체의 순환계에 이차 항체를 포함하는 용액을 도입시키는 단계를 추가로 포함하고, 이차 항체가 시각화 가능한 마커로 표시되는 방법.

청구항 39

제 38항에 있어서, 시각화 가능한 마커가 형광 마커인 방법.

청구항 40

제 36항에 있어서, 일차 항체가 시각화 가능한 마커로 표시되는 방법.

청구항 41

제 39항에 있어서, 시각화 가능한 마커가 형광 마커인 방법.

청구항 42

제 38항의 방법에 따라 제조된 조직과 관련된 마커를 시각화시키기 위해 현미경을 이용하는 단계를 포함하는, 제자리에서 면역염색된 조직을 시각화시키기 위한 방법.

청구항 43

(1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함하는 조성물.

청구항 44

제 43항에 있어서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도가 10 내지 100% w/v인 조성물.

청구항 45

파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 뇌척수액(CSF)에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된 뇌 조직을 형성시키는 단계; 및

아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 포함하는,

제자리에서 뇌 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법.

청구항 46

제 45항에 있어서, 하이드로겔 단량체 용액이 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함하는 방법.

청구항 47

제 46항에 있어서, PBS를 포함하는 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 PBS-세척된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제 47항에 있어서,
 대상체 또는 대상체의 뇌를 실질적 기밀 챔버에 배치하는 단계, 및
 질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제 48항에 있어서, 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 CSF에 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제 49항에 있어서, 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 51

제 50항에 있어서, 세제 용액이 0.01M 내지 1M의 PBS 중 약 1% 내지 30%의 SDS를 포함하는 방법.

청구항 52

제 51항에 있어서, 대상체의 CSF에 PBS를 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 53

제 52항에 있어서, 대상체의 CSF에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함하고, 영상화 매질이 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함하는, 방법.

청구항 54

제 53항에 있어서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3 디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도가 10 내지 100% w/v인 방법.

청구항 55

제 45항 내지 제 54항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 하나 이상이 두개내 뇌 선트를 통해 투여되는 방법.

청구항 56

제 45항 내지 제 54항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 하나 이상이 후각망을 바로 위의 영역 내의 경질막 아래에 삽입된 두개내 뇌 선트를 통해 투여되는 방법.

청구항 57

파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 뇌척수액(CSF)에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된

척수 조직을 형성시키는 단계; 및

아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 척수 조직을 형성시키는 단계를 포함하는,

제자리에서 척수 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법.

청구항 58

제 57항에 있어서, 하이드로겔 단량체 용액이 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함하는 방법.

청구항 59

제 58항에 있어서, PBS를 포함하는 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 PBS-세척된 척수 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 60

제 59항에 있어서,

대상체를 실질적 기밀 챔버에 배치하는 단계, 및

질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 61

제 60항에 있어서, 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 CSF에 도입시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 62

제 61항에 있어서, 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 척수 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제 62항에 있어서, 세제 용액이 0.01M 내지 1M PBS 중 약 1% 내지 30%의 SDS를 포함하는 방법.

청구항 64

제 63항에 있어서, PBS를 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 척수 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

제 64항에 있어서, 대상체의 CSF에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함하고, 영상화 매질이 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함하는 방법.

청구항 66

제 65항에 있어서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3 디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도가 10 내지 100% w/v인 방법.

청구항 67

제 57항 내지 제 66항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 하나 이상이 두개내 뇌 선트를 통해 투여되는 방법.

청구항 68

제 57항 내지 제 66항 중 어느 한 항에 있어서, 용액 중 하나 이상이 등 하구(dorsal inferior colliculus) 바로 위에 삽입된 두개내 뇌 선트를 통해 투여되는 방법.

청구항 69

명세서에 기재된 바와 같은 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **정부 권리**

[0002] 본 발명은 NIH 조성금 IDP20D017782-01; 1R01AG047664-01; 및 R01HD075605 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정한 권리를 갖는다.

[0003] **관련 출원의 전후 참조**

[0004] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 2013년 9월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 61/880,401호; 및 2014년 5월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 61/992,103호로부터 우선권을 주장하며, 상기 두 출원은 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 발명은 일반적으로 조직 제조 및 특성규명 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] **배경**

[0008] 하기 기재는 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본원에 제공된 정보 중 임의의 정보는 종래 기술이거나, 현재 청구된 본 발명과 관련 있는 것을 인정하는 것이 아니다.

[0009] 세포, 회로, 및 기관-범위에 걸친 규모로 구조-기능 관계를 이해하는 것은 종을 교차하여 많은 기관에 대해 현재 이용 가능하지 않은 3D 해부학적 및 표현형적 맵을 필요로 한다. 상기에서 본질적으로 지식 격차는 전체-기관 영상화를 가능케 하는 방법의 부재이다. 이 때문에, 조직 투명화 기술은 큰 잠재성을 보유한다. 전체-기관 및 신체 거대분자를 투과 가능하게 하고, 광학적으로 투명하게 하여 온전한 연결도로 이들의 세포 구조를 노출시키는 것을 가능케 하기 위해 이용될 수 있는 조성물 및 방법이 당 분야에 필요하다.

발명의 내용

[0010] **발명의 개요**

[0011] 다양한 구체예에서, 본 발명은 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 조직에 적용시킴으로써 고정된 조직을 형성시키는 단계, 및 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 고정된 조직에 적용시킴으로써 하이드로겔 처리된 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 고정된 조직에 적용시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 하이드로겔 처리된 조직을 실질적 기밀 챔버에 배치하는 단계, 및 질소를 실질적 기밀 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 15°C 내지 60°C에서 탈기된 조직을 인큐베이션시킴으로써 인큐베이션된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 인큐베이션된 조직을 PBS로 세척함으로써 세척되고 인큐베이션된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 세척되고 인큐베이션된 조직에 적용시킴으로써 투명한 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 세제 용액은 0.01M 내지 1M PBS 중 1% 내지 30%의 SDS를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 투명한 조직에 PBS를 적용시킴으로써 투명화되고 세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 투명화되고 세척된 조직에 영상화 매질을 적용시키는 단계를 추가로 포함하며, 영상화 매질은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로

필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20(tween-20); (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함한다. 일부 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다. 일부 구체예에서, 조직은 생검으로부터 획득된다. 특정 구체예에서, 조직은 암성 또는 전암성 조직이다.

[0012] 다양한 구체예에서, 본 발명은 조직을 면역염색시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 일차 항체를 포함하는 용액을 투명화되고 세척된 조직에 적용시킴으로써 항체-결합된 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 완충액으로 항체-결합된 조직을 행구는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 상기 완충액으로 세척된 항체-결합된 조직에 이차 항체를 포함하는 용액을 적용시키는 단계를 추가로 포함하며, 이차 항체는 시각화 가능한 마커로 표지된다. 특정 구체예에서, 시각화 가능한 마커는 형광 마커이다. 일부 구체예에서, 일차 항체는 시각화 가능한 마커로 표지된다. 일부 구체예에서, 시각화 가능한 마커는 형광 마커이다. 특정 구체예에서, 본원에 기재된 방법에서의 조직은 생검으로부터 획득된다.

[0013] 다양한 구체예에서, 본 발명은 면역염색된 조직을 시각화시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 면역염색된 조직을 시각화시키기 위해 현미경을 이용하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 현미경은 공초점 현미경검사, 회전 디스크 현미경검사, 에피-형광 현미경검사, 라이트 필드 현미경검사, 라이트-시트 현미경검사, 다광자 현미경검사로 구성된 군으로부터 선택된 현미경검사의 한 형태를 수행하기 위해 이용된다.

[0014] 다양한 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 조직의 구조적 및/또는 광학적 특성을 변형시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된 조직을 형성시키는 단계; 및 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함한다. 다양한 구체예에서, 상기 방법은 PBS를 포함하는 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 PBS-세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체를 실질적 기밀 챔버에 배치시키는 단계, 및 질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 순환계에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 세제 용액은 0.01M 내지 1M PBS 중 약 1% 내지 30%의 SDS를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 PBS를 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 방법은 대상체의 순환계에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함하며, 영상화 매질은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함한다. 특정 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다. 일부 구체예에서, 조직은 너 조직을 포함한다. 일부 구체예에서, 조직은 척수 조직을 포함한다. 상기 기재된 방법의 특정 구체예에서, (1) 용액 중 하나 이상은 펌프에 연결된 제1 튜브를 통해 대상체의 순환계에 도입되고; (2) 용액 중 하나 이상은 하나 이상의 용액이 수거되는 저장소와 유체 연결된 제2 튜브를 통해 대상체의 순환계로부터 제거되고; 임의로 (3) 펌프는 저장소로부터 하나 이상의 수거된 용액을 퍼 올리고, 제1 튜브를 통해 대상체의 순환계에 하나 이상의 용액을 도입시킨다.

[0015] 다양한 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 조직을 면역염색시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 기재된 방법이 적용된 대상체의 순환계에 일차 항체를 포함하는 용액을 도입시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 순환계에 완충액을 도입시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예

에서, 상기 방법은 이차 항체를 포함하는 용액을 대상체의 순환계에 도입시키는 단계를 추가로 포함하며, 이차 항체는 시각화 가능한 마커로 표지된다. 일부 구체예에서, 시각화 가능한 마커는 형광 마커이다. 특정 구체예에서, 일차 항체는 시각화 가능한 마커로 표지된다. 특정 구체예에서, 시각화 가능한 마커는 형광 마커이다.

[0016] 다양한 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 면역염색된 조직을 시각화시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 기재된 제자리 방법에 따라 제조된 조직과 관련된 마커를 시각화시키기 위해 현미경을 이용하는 단계를 포함한다.

[0017] 특정 구체예에서, 본 발명은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함하는 조성물을 교시한다. 일부 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다.

[0018] 특정 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 뇌 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 뇌척수액(CSF)에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된 뇌 조직을 형성시키는 단계; 및 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 PBS를 포함하는 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 PBS-세척된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체 또는 대상체의 머리를 실질적 기밀 챔버에 배치시키는 단계, 및 질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 CSF에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 세제 용액은 0.01M 내지 1M PBS 중 약 1% 내지 30%의 SDS를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 PBS를 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 뇌 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 CSF에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함하며, 영상화 매질은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함한다. 일부 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다. 일부 구체예에서, 용액 중 하나 이상은 두개내 뇌 선트를 통해 투여된다. 특정 구체예에서, 용액 중 하나 이상은 후각관을 바로 위의 영역 내의 경질막 아래에 삽입된 두개내 뇌 선트를 통해 투여된다.

[0019] 다양한 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 척수 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 뇌척수액(CSF)에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된 척수 조직을 형성시키는 단계; 및 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 척수 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 PBS를 포함하는 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 PBS-세척된 척수 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 대상체를 실질적 기밀 챔버에 배치시키는 단계, 및 질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 CSF에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 척수 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 세제 용액은 0.01M 내지 1M PBS 중

약 1% 내지 30%의 SDS를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 PBS를 대상체의 CSF에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 척수 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 CSF에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함하며, 영상화 매질은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함한다. 특정 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다. 특정 구체예에서, 용액 중 하나 이상은 두개내 뇌 선트를 통해 투여된다. 일부 구체예에서, 용액 중 하나 이상은 등 하구(dorsal inferior colliculus) 바로 위에 삽입된 두개내 뇌 선트를 통해 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0020]

예시적 구체예가 참조되는 도면에 예시되어 있다. 본원에 개시된 구체예 및 도면은 제한이 아니라 예시로 간주되어야 하는 것으로 의도된다.

도 1은 본 발명의 구체예에 따라 A4P0 조직-하이드로겔 하이브리드의 PACT 투명화가 기관 전체에 걸쳐 최적 투명도 및 면역조직화학 적합성을 달성하는 것을 입증한다. (a) 24시간 및 48시간 동안 투명화된 A2P0, A4P0, 및 A4P4 조직-하이드로겔 하이브리드의 3 mm의 성체 마우스 시상 블록의 광학 투명도 비교. (b) A4P4에 비해, A4P0 조직-하이드로겔 하이브리드는 더 신속한 항체 투과를 나타내었다(샘플 당 n=6 시계). (c) 1 mm 마우스 뇌 절편(각각의 투명화 조건에 대해 n=6 절편)으로부터의 단백질 손실의 백분율; 통계적 유의성은 각각의 조건 대 A4P0 8% SDS에 대해 제시된다(적색). (d) 투명화되지 않은 1 mm Thy1-eYFP 마우스 뇌 절편 및 투명화된 1 mm Thy1-eYFP 마우스 뇌 절편(n=6 절편)의 임의의 단위(A.U.)의 통합된 eYFP 형광 강도. (e) A4P4에 비해, A4P0 하이드로겔-조직 하이브리드는 투명화 후 더 높은 조직 팽창 및 중량 증가를 나타내었다. (f-h) 니슬로 염색된 Thy1-eYFP 마우스 색선: (f) 1 mm의 투명화된 뇌 절편, 전전두피질(PFC) 영역(좌측: z = 1 mm 영상화 스택 깊이); (g) 1 mm의 투명화되지 않은 뇌 절편, PFC(좌측: z = 100 μm 영상화 스택 깊이); (h) 1 mm 척수 절편(z = 500 μm). (i) 항-티로신 하이드록실라제(TH) 항체로 염색된 1 mm 마우스 뇌 절편의 후질 치밀부(SNc)(z = 1 mm). (j) GFAP, 마우스-IgG, 및 Iba1에 대한 항체로 염색된 1 mm 성체 마우스 뇌 절편의 PFC(z = 500 μm). (k) 항-인테그린 항체, SYTO24, 및 아크리딘 오렌지로 염색된 마우스 신장(z = 150 μm; 화살표 머리는 사구체를 나타냄), 심장(z = 320 μm), 폐(z = 550 μm) 및 장(z = 350 μm)의 1 mm 색선. (l) 기저세포암종(BCC)로부터의 PACT-투명화된 인간 조직 생검은 내피 세포를 표지시키기 위해 항-판(pan)-사이토크라틴(AE1/AE3) Alexa Fluor 488 일차 항체 및 DAPI로 염색되었다(700 μm 영상화 스택 깊이). 모든 그래프는 평균 ± SEM 통계적 유의성으로 제시되고; 쌍을 이룬 샘플에 대해, 양측 스튜던츠 t 검정(2-tailed Student's t test); 다수의 비교를 위해, 1원 ANOVA 후 본페로니 사후검정(Bonferroni posthoc)으로 제시된다(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005, 및 ****p < 0.0001). 모든 공초점 영상화; 목적상, 방법을 참조하라. 또한, 도 7-9 및 표 1 및 2를 참조하라.

도 2는 본 발명의 구체예에 따른 smFISH에 의한 PACT 조직 색선 내의 개별적 mRNA 전사물의 검출을 입증한다. 100μm-두께의 마우스 뇌 절편이 Alexaf luor 594로 표지된 β-액틴 mRNA에 대한 24개의 20머 올리고뉴클레오티드 프로브와 하이브리드되었다. (a) PACT-투명화된 smFISH 뇌 절편. 상부 패널은 30 μm 최대 강도 투영을 나타낸다. 단일한 베타-액틴 mRNA에 해당하는 많은 수의 회절 제한 스폿(적색)이 589nm 조명 하에서 30 μm 이하의 깊이에서 용이하게 검출되었다. 밝은 무정형 과립(황색)은 589nm(적색) 및 532nm 자가형광(녹색) 채널 둘 모두에서 나타나는 백그라운드 리포푸신 소포인 반면, smFISH 신호는 적색 채널에서만 존재하는 것을 인지하라. (b) PACT 투명화된 절편에 비해, 투명화되지 않은 뇌 절편에서의 smFISH는 유의하게 감소된 대조를 나타내었다(a 및 b에서의 하부 패널은 12 μm 깊이에서 0.5 μm의 단일 절편을 나타내고; 이미지는 동일한 대조도 비율 및 가우스 라플라시안 필터링(Laplacian of Gaussian filtering)을 이용하여 미가공 데이터로부터 처리되었다; 미가공 데이터에 대해, 도 8d 참조). (c) 깊이의 함수로서의 신호 대 노이즈 비는 PACT-투명화 조직이 투명화되지 않은 조직에 비해 샘플의 두께 전체에 걸쳐 smFISH의 신호 대 노이즈 비를 증가시키는 것을 나타낸다. (d) smFISH 강도는 19개의 투명화되지 않은 조직 및 PACT-투명화된 조직 사이에서 인지 가능한 차이를 나타내지 않는다. p = 0.8722; 양측 스튜던츠 t 검정. (e) 투명화되지 않은 조직과 PACT-투명화된 조직 사이의 백그라운드 강도의 비교는 PACT-투명화된 조직에서의 백그라운드 형광의 유의한 감소를 예시한다. p = 0.0006; 양측 스튜던츠 t 검

정. 모든 그래프는 평균 \pm SEM으로 제시된다. 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라.

도 3은 본 발명의 구체예에 따라 제자리 관류-보조 작용제 방출(perfusion-assisted agent release *in situ*)(PARS)를 이용한 뇌척수액 경로(CSF)를 통한 신속한 전뇌 또는 척수 투명화 및 표지화를 위한 프로토콜인 PARS-CSF를 입증한다. (a) CNS 조직은 후각망을 바로 위의 영역 내의 경질막 아래(좌측) 또는 대수조로 삽입된 (또는 등 하구 바로 위에 위치된, 우측) 두개내 뇌 선트를 통해 CSF로의 모든 PARS 시약의 직접 관류에 의해 광학적으로 투명해질 수 있다. 관류 라인에 연결된 삽입관은 치아 아크릴을 갖는 위치로 시멘트로 접합될 수 있다. (b) 4일(뇌) 또는 2주(척수) 동안 37°C에서 투명화된 PARS-CSF 래트로부터의 전뇌 및 상응하는 2 mm 두께의 절편(좌측) 및 전체-척수(우측)가 제시된다. 전뇌 투명화의 정도는 삽입관에 대한 뇌 조직 근접성에 좌우되며: 전두엽이 광학적으로 투명화된 반면, 중뇌-후뇌는 단지 약하게 투명화되었다(패널의 우측 상의 2 mm 절편 참조). RIMS에서의 24시간의 인큐베이션 후, PARS-CSF 뇌 절편은 추가 섹션화 없이 영상화를 위해 충분히 투명해졌다. (c) 이미지는 투명화 6개월 전에 AAV9:CAG-eGFP가 IV 주사된 마우스로부터 제조된 500 μ m PARS-CSF 투명화된 관상 뇌 절편에서 천연 eGFP 형광을 나타낸다. 피질 및 해마의 대표 섹션이 이미지 박스 내에서 더 높은 배율로 제시된다(우측). 층 V 관상 영상에서, 혈관에 인접한 AAV9 형질도입된 eGFP-발현 아교 세포 및 eGFP-뉴런이 명백히 보인다. 해마(하부)에서, eGFP-발현 CA1 뉴런의 더 미세한 신경세포 돌기가 고해상도로 시각화될 수 있으며, 이는 세포 형태에 대한 심각한 손상 없이 PARS-CSF가 완료될 수 있음을 암시한다. 현미경검사를 위해, 방법을 참조하라. 또한, 도 10을 참조하라.

도 4는 본 발명의 구체예에 따라 PARS가 전신 투명화를 달성하는 것을 입증한다. (a) PARS 투명화 및 면역염색의 개략도. (b) PARS 투명화 전 및 후의 마우스 뇌 및 말초 기관의 광학 투명도의 비교. (c) 2주의 PARS 투명화 전(좌측으로부터 첫번째 박스) 및 후(두번째 박스)의 상대 마우스 뇌 크기의 대표 이미지는 PARS가 투명화 과정 동안 하이드로겔 팽창 및 뇌 조직 팽창을 회피하는 것을 나타낸다. 뇌 조직은 RIMS에서의 침지 후에 서서히 팽창하고(세번째 박스); 이러한 부피 변화는 RIMS 마운팅 전 밤새 4% PFA에서의 PARS 샘플 후고정을 통해 완화될 수 있다(네번째 박스). (d) PARS가 얼마나 확장 가능한 방법인지를 나타내는 4일의 PARS 투명화 전(우측) 및 후(좌측)의 상대 래트 뇌 크기의 대표 이미지. 래트 전뇌 샘플의 관상 절편은 육안 조직 형태를 나타내며, 이는 미엘린화되지 않은 영역이 PARS-기반 투명화의 4일 이내에 투명화될 수 있음을 강조한다. (e) 다른 투명화 방법에 비한 PARS 투명화의 단백질 손실(각각에 대해 n = 4 마우스); 그래프는 평균 \pm s.e.m.을 나타내고; A4P0 8% SDS PARS 투명화에 대한 비교 20에서 통계적 유의성을 결정하기 위해 1원 ANOVA 후 본페로니 사후검정 시험이 이용되었다. *는 p<0.05를 나타내고, **는 p<0.01을 나타낸다. (b-d)에 대한 이미지는 명시야 카메라를 이용하여 찍었다. 또한, 도 10, 13, 및 9e를 참조하라.

도 5는 본 발명의 구체예에 따라 PARS가 세포해상도로 광범위하고 드문 유전학적으로 인코딩된 형광 신호의 전뇌 맵핑을 가능케 하는 것을 입증한다. 10일 동안의 PARS 투명화 후의 성체 Thy1-eYFP 마우스의 (a) 전뇌 이미지(z = 6 mm), 및 (b) 심부-뇌 영상화(z = 4 mm). 우측 상의 박스는 표시된 영역의 고배율 이미지를 제시한다. (c) 2주 동안 PARS 투명화 후의 성체 Thy1-eYFP 마우스의 척수 이미지(z = 2 mm). 하부 패널은 표시된 영역의 고배율 이미지를 제시한다(z = 1.2 mm). (d) 이미지는 AAV9:CAG-eGFP가 IV 주사된 PARS 투명화된 마우스로부터 제조된 1 mm 관상 뇌 절편(좌측) 및 간(우측)에서의 천연 eGFP 형광을 제시한다. 각각의 관상 뇌 이미지의 우측으로의 이미지 컬럼은 직교 영상을 제시한다(z = 0.5 mm). (e) 간 탈표적화된 변이체 AAV9BD1:CAG-eGFP가 주사된 PARS 투명화된 마우스로부터 제조된 1 mm 관상 뇌 절편(좌측) 및 간(우측)에서의 천연 eGFP 형광. 각각의 관상 뇌 이미지의 우측으로의 이미지 컬럼은 직교 영상을 제시한다(z = 0.5 mm). 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라. 또한, 도 11을 참조하라.

도 6은 본 발명의 구체예에 따라 PARS가 말초 기관의 신속하고 균일한 투명화 및 면역표지화를 가능케 하는 것을 입증한다. 투명화 및 면역조직화학 표지화가 PARS 단독을 통해 전체 마우스에서 달성되었다. (a) PARS-투명화된 마우스 장이 렉틴, 메틸렌 블루, 및 DAPI로 염색되었고, 500 μ m의 깊이를 통해 이미지화되었다. 하부 패널은 상기 렌더링의 최대 강도 투영을 제시한다, z = 50 μ m(z = 500 μ m). (b) 항-튜불린 항체 및 DRAQ5 표지화를 위해 1 mm 두께의 신장 섹션이 이미지화되었다(좌측). 우측 패널은 사구체의 표시된 영역 및 구조의 고배율 이미지를 제시하며, 이는 PARS가 신장 전체에 걸쳐 항체-기반 표지화를 가능케 하는 것을 입증한다(z = 1.2 mm). 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라. 또한, 도 12 및 13을 참조하라.

도 7은 본 발명의 구체예에 따라(도 1, 3 및 4; 및 표 2와 관련됨) 8% SDS를 이용한 PACT 투명화된 A4P0 조직-하이드로겔 하이브리드가 우수한 광학 투명도를 나타내는 것을 입증한다. 모든 샘플은 3일 동안 PACT 투명화되었다. (a) SDS 및 10% 소듐 데옥시콜레이트의 다양한 백분율을 이용하여 PACT 투명화된 3 mm 마우스 뇌 관상 블록의 광학 투명도의 비교(화살표는 불완전한 투명화를 나타낸다). (b) 다양한 하이드로겔 백분율과 하이브리

드화된 조직의 포어를 나타내는 주사 전자 현미경검사(SEM) 이미지; 아래의 히스토그램은 각각의 조건에 대한 포어 크기의 분포를 나타낸다. (c) A4P4에 비해, A4P0 조직-하이드로겔 하이브리드는 더 큰 조직 팽창 및 광학 투명도(1 mm 마우스 뇌 절편)를 나타낸다. (b) 및 (c)에 대한 샘플은 8% SDS에서 PACT 투명화되었다. (a) 및 (c)에 대한 이미지는 명시야 카메라로 찍었다.

도 8은 본 발명의 구체예에 따라(도 1 및 2와 관련됨) PACT 샘플이 육안 조직 병리 및 미세 전자 분석과 양립되는 것을 입증한다. (a-c) 인간 기저세포 암종(BCC) 조직 생검의 3mm-두께 섹션이 PACT로 투명화되었고, 항-판-사이토케라틴(AE1/AE3) 항체로 면역표지화되었고, DAPI로 대조염색되었다. (a) 인간 기저세포 암종(BCC) 조직 생검의 투명화되지 않은 3mm-두께 섹션(상부) 및 투명화된 3mm-두께 섹션(하부)의 사진(축척 막대 = 5 mm). 영역의 모든 세포(자홍색)와 관련하여 아포토시스 조직의 AE1/AE3 양성 세포 및 케라틴 섬유 잔유물의 위치(녹색)를 나타내는 (b) 저배율(5x) 및 (c) 고배율(25x) 3D 렌더링 및 최대 강도 투영(축척 막대 = 500 μ m 및 100 μ m). (d) PACT 투명화된(상부 패널) smFISH 뇌 절편 및 투명화되지 않은 (하부 패널) smFISH 뇌 절편의 처리 전(DAPI 채널 상의 백그라운드 공제 제외)(좌측 및 중간 패널) 및 처리 후(우측 패널) 이미지 사이의 백그라운드 차이. 좌측 패널: 30 μ m 최대 강도 투영(MIP). 중간 패널: 3 μ m의 깊이에서의 단일 0.5 μ m 이미지. 우측 패널: 중간 패널로부터의 가우스 라플라시안(Log) 필터링되고, 대조 조정된 이미지. 모든 이미지는 동일 대조 역치 및 Log 필터링 파라미터로 처리되었다. 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라.

도 9는 본 발명의 구체예에 따라(도 1 및 4; 및 표 2와 관련됨) sRIMS 및 RIMS가 투명화된 조직-하이드로겔 하이브리드의 굴절 지수를 매칭시킴으로써 더 나은 광학 투명도를 제공하고, 장기간 저장 및 영상화를 가능케 하는 것을 입증한다. (a) 다양한 매질에서 2주 동안 마운팅되고 저장된 PACT 투명화된 1 mm Thy1-eYFP 마우스 뇌 관상 절편의 광학 투명도(상부, 명시야 카메라) 및 공초점 이미지(하부). 80% 글리세롤에 마운팅된 샘플의 광학 투명도는 매우 불충분한 반면, RIMS 및 sRIMS, 소르비톨 용액-기반 마운팅 매질(방법 참조)은 마운팅된 샘플의 광학 투명도 및 영상화 해상도 깊이를 향상시켰다. 본 발명자는 1일 초과 동안 글리세롤 및 FocusClear™에 마운팅된 조직에서 용해된 염일 수도 있는 침전을 검출하였다. (b) 다양한 농도의 Histodenz™(인산염 완충액에서 희석됨)으로 제조된 RIMS의 굴절 지수. (c) RIMS에서의 2개월 인큐베이션 후, 투명화되지 않은 전뇌 조직은 표면의 불충분하게 미엘린화된 영역에서 광학적으로 투명해진다. 따라서, RIMS 침지는 두껍게 섹션화된(~50-300 μ m) 조직 절편에 대해 우수한 해상도가 요망되는 경우 더 복잡한 투명화 프로토콜에 대한 더 느낌에도 불구하고 더 가벼운 대안을 제공한다. (d) A4P0 및 A4P4 하이드로겔-조직 하이브리드에 대한 1일 동안 RIMS에서 인큐베이션된 후 PACT 투명화된(3일) 3 mm Thy1-eYFP 마우스 뇌 시상 블록(n = 4 블록)의 조직 수축의 대표 이미지(명시야 카메라) 및 상기 조직 수축의 백분율의 정량. (e) 3개월 동안 RIMS에 마운팅된 투명화되지 않은 Thy1-eYFP 전뇌와 PARS 투명화된 Thy1-eYFP 전뇌 사이의 크기 비교(명시야 카메라), 및 RI 1.43(60% Histodenz w/v) RIMS에서의 장기간 저장 후의 eYFP 형광 신호(z = 1 mm). 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라.

도 10은 본 발명의 구체예에 따른(도 3 및 4와 관련됨) 전신 투명화를 위한 PARS 시스템의 개발을 입증한다. (a) 좌측: 피펫 박스로부터 제조된 맞춤형-제작 관류 챔버에서 PARS가 수행되었다. 좌심실 또는 오른대동맥에 고정되는 피딩 니들(feeding needle)을 통한 4% PFA를 이용한 관류-고정 후, 설치류는 피펫 침단 격자에 고정된다. 우심방 내의 병소를 통해 설치류 신체를 나가는 관류액으로 충전됨에 따라 피펫 박스를 배출시키기 위해, 카테터 튜브의 한 말단이 피펫 침단 박스의 하부에 고정된다. 이후, 튜빙(tubing)이 연동 펌프를 통해 장착되고, 반대 말단이 피딩 니들에 연결된다. 이는 관류액이 피펫 박스에서 사이펀으로 옮겨지고, 심장 카테터를 통해 다시 재순환되도록 하여, 설치류 혈관구조를 통해 하이드로겔 단량체, 세척 완충액, 투명화 세제, 및 조직학적 염색제의 연속적 관류를 달성시킨다. 중요하게는, 이러한 PARS 장치는 카테터 튜빙을 피딩 니들이 아니라 두개내 삽입관에 부착시킴으로써 PARS-CSF에 적용될 수 있다(도 3a 참조). 우측: 하이드로겔 중합 직전, 전체 관류 챔버(카테터-연결된 대상체를 가짐)는 조직 탈기를 위해 ziplock 백(ziplock bag) 내에서 밀봉되고, 전체 장치는 PARS 프로토콜의 나머지 전체에 걸쳐 상기 백 내에 놓여진다. 상기 백은 관류 챔버가 얇은 수조 내에 배치되는 것을 가능케 하여 물이 관류 챔버로부터 넘치는 것을 방지하거나, PARS 시약이 수조를 오염시키는 것을 방지하는 장벽을 형성시킨다. (b) 설치류는 PARS 시약의 관류를 통한 전신 혈관구조 접근성을 연구하기 위해 Atto 488-컨쥬게이션된 GFAP 나노바디(nanobody)(좌측) 및 Alexa Fluor 647 컨쥬게이션된 항-마우스 IgG 항체(우측)로 관류되었다. 구체적으로, PARS 시약은 중추 기관 및 말초 기관 둘 모두, 불충분하게 혈관화된 조직 및 충분히 혈관화된 조직의 균일하고 신속한 투명화 및 표지화를 같이 달성하기 위해 주요 혈관 뿐만 아니라 조직 미세혈관구조 둘 모두를 통해 순환할 수 있어야 한다. 좌측: 피질 내의 주요 혈관 주위의 아교 세포의 광범위한 집단. 중간: 혈액뇌장벽의 형성에 관여하는 별아교세포 종족(astrocytic end feet)을 나타내는 고배율 부피 렌더링. 우측: 투명화되지 않은 조직으로의 전체 면역글로불린의 관류-기반 전달을 통해 달성된 1 mm 마우스 뇌 섹션(피질)의 충분히-보존된 혈관구조. 마우스 혈관구조의 광범위한 표지화는 PARS 압력 구배가 주요

혈관을 통해 항체 용액을 유도할 수 있음을 암시한다. 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라.

도 11은 본 발명의 구체예에 따른(도 4 및 5와 관련됨) 조직 보존 및 정량화를 입증한다. (a) 투명화되지 않은 마우스 뇌 색전(상부 좌측), PARS 투명화된 마우스 뇌 색전(상부 우측), PARS 투명화되고, 2주 RIMS 침지된 마우스 뇌 색전(하부 좌측), 및 PARS 투명화되고, 4% PFA 후고정되고, RIMS 마운팅된 마우스 뇌 색전으로부터의 1mm 두께의 마우스 뇌 절편의 명시야 이미지. 절편은 도 4c의 전뇌로부터 유래됨을 인지하라. (b) 피질, 선조체 및 시상 내의 세포 사이의 평균 최인접 거리가 투명화되지 않은 뇌 절편, PARS 투명화된 뇌 절편, 및 PARS 투명화된 후 후고정된 뇌 절편에서 정량되었다. 투명화되지 않은 대조군에 비해, PARS 투명화된 뇌 절편은 뇌의 3개 모두의 영역에서 세포 간격에서의 작지만 유의한 증가 및 피질 및 시상에서 세포 크기에서의 유의한 증가를 나타낸 한편, PARS 투명화된 후, 후고정된 뇌 절편은 그렇지 않았다. 통계적 유의성: 쌍을 이룬 샘플에 대해, 양측 스튜던츠 *t* 검정; 다수의 비교를 위해, 1원 ANOVA(***p* < 0.01, ****p* < 0.005, 및 *****p* < 0.0005, *ns* = 유의하지 않음).

도 12는 본 발명의 구체예에 따라(도 6과 관련됨) PARS가 주요 말초 기관을 광학적으로 투명하게 하는 것을 입증한다. PARS 투명화 및 관류-표지화 1주 후, 말초 기관은 절제되었고, 1-2 mm 섹션으로 절단되었고, 영상화 전 24시간 동안 RIMS에 침지되었다. (a) 렉틴 확산 및 DAPI 염색을 이용한, PARS 투명화되고 염색된 마우스 간 샘플의 500 μ m 영상화 스택은 PARS 시약이 간 조직의 밀도에도 불구하고 전체 기관에 접근할 수 있었음을 암시한다. (b) PARS 투명화되고 염색된 마우스 폐 샘플의 100 μ m 영상화 스택 및 (c) PARS 투명화된 마우스 체장 샘플의 600 μ m 두께의 영상화 스택 둘 모두는 높은-수준의 렉틴, 팔로이딘 및 DAPI 형광 신호를 줄곧 나타낸다. 세포 구조의 미세한 해상도가 3개 모두의 조직 샘플에서 관찰되었다. 다른 소분자 염료의 형광 신호와 조합된 혈관을 표시하는 렉틴 염색은 염색된 조직이 조직 혈관구조와 바로 인접하여 존재하는 것을 입증한다. 말초 기관에서, 면역표지화는 혈관구조 순환 및 혈관구조 주위의 조직으로의 관류액 누출의 수동 확산 둘 모두를 통해 발생한다(*z* = 100 μ m, 축척 막대 = 100 μ m). 현미경검사에 대해, 방법을 참조하라.

도 13은 본 발명의 구체예에 따라(도 4와 관련됨) PARS가 전신 투명화가 가능함을 입증한다. 1주 동안 8% SDS를 이용한 PARS 투명화 후의 전체 Thy1-eYFP 마우스의 (a) 등 및 (b) 복부 영상은 전신의 우수한 광학적 투명도를 나타내었다. (b)에서의 화살표 머리는 투명화된 신장을 나타낸다. (c) 동일 마우스에 대한 뇌의 이미지. 이미지는 명시야 카메라를 이용하여 찍었다.

도 14는 본 발명의 구체예에 따른 PARS 및 이후의 3D 영상화의 수행을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

발명의 설명

[0022]

본원에 인용된 모든 참고문헌은 완전히 기재된 것처럼 이들의 전체내용이 참조로서 포함된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 문헌[March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed.*; and Guyton and Hall, *Textbook of Medical Physiology 12th ed.*,]은 본 출원에서 사용되는 용어 중 많은 용어에 대한 일반적 지침을 당업자에게 제공한다.

[0023]

당업자는 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질을 인지할 것이다. 확실히, 본 발명은 기재된 방법 및 물질에 결코 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 특정 용어 하기에 정의된다.

[0024]

본원에서 사용되는 PACT는 수동 투명화 기술(PASSIVE CLARITY Technique)에 대한 약어이다.

[0025]

본원에서 사용되는 PARS는 제자리 관류-보조 작용제 방출(Perfusion-assisted Agent Release in Situ)에 대한 약어이다.

[0026]

본원에서 사용되는 RIMS는 굴절 지수 매칭법(Refractive Index Matching Solution)에 대한 약어이다.

[0027]

본원에서 사용되는 "포유동물"은 인간 및 비인간 영장류, 예를 들어, 침팬지 및 다른 유인원 및 원숭이 종; 농장 동물, 예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소 및 말; 애완동물, 예를 들어, 개 및 고양이; 실험 동물, 예를 들어, 설치류, 예를 들어, 마우스, 래트 및 기니아 피그 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 포유류 부류의 임의의 일원을 나타낸다. 상기 용어는 특정 연령 또는 성별을 나타내지는 않는다. 따라서, 수컷이거나 암컷이건 간에 성체, 신생아 대상체, 및 태어나지 않은 대상체가 상기 용어의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

- [0028] 본원에서 사용되는 "말초 기관"은 근육, 심장, 폐, 신장, 결장, 창자, 장 등을 포함할 수 있으나, 결코 이로 제한되지는 않는다.
- [0029] 추가 백그라운드로서, 온전한 조직에 대한 용이하고 생리학적으로 정보를 주는 광학적 접근이 생물학자의 오랜 목표였다. 1800년대 만큼 초기에, 베르너 슈팔테홀츠(Werner Spalteholz)와 같은 과학자에 의한 연구는 조직을 해부학적 및 생물의학적 연구를 위해 광학적으로 투명하게 만드는 것의 유용성을 나타내었다(Spalteholz, 1914). 슈팔테홀츠 기술 및 이의 변형은 조직 온전성 및 형태에 대한 손상을 초래하나, 이들은 1세기 이후에도 여전히 이용되며(Steinke and Wolff, 2001), 이는 더욱 최근의 조직-투명화 방법 및 현대의 현미경검사 기술의 채택에 대한 방해물 투드러지게 한다. 독립된 조직 투명화 프로토콜이 특정 상황의 적용에서 강점을 가지나, 어떠한 것도 가장 일반적인 난제인 뇌 또는 태아가 아닌 기관 전체에 걸쳐 확인된 일반화, 시행에서의 어려움, 및 내인성 형광 및/또는 사후(post-hoc) 면역조직화학과의 비양립성을 완전히 극복할 수 없었다(표 1). 따라서, 조직 투명화 프로토콜을 개선시킬 동기가 1) 중추 기관 및 말초 조직 둘 모두의 효과적인 투명화; 2) 다수의 기관 유형의 세포 및 세포하 구조의 보존; 및 3) 내인성 형광 단백질 발현 및 DNA, RNA, 및 단백질의 사후 검출과의 양립성의 대략 3개의 주요 목적으로 유지된다.
- [0030] 상기 방법의 결말은 보존된 조직 형태의 상황에서 세포간 공간 관계 및 긴-범위의 신경세포 연결도의 연구를 가능케 하는 큰 부피의 조직 전체에 걸친 광학적 접근이다(Chung and Deisseroth, 2013; Chung et al., 2013; Kim et al., 2013; Zhang et al., 2014). 형광 추적자와 관련하여, 조직 투명화는 신체 전체에 걸쳐 표적 부위에서 분기하거나 모여지는 신경 및 혈관구조를 포함하는 상호작용하는 세포 구조의 확인을 돕는다. 표준 단백질 및 핵산 프로브를 이용한 투명화된 검체의 미세-규모 세포하 분석이 또한 투명화된 조직의 상황에서 달성될 수 있다.
- [0031] 상기 기재된 기술을 진척시키기 위해, 일부 구체예에서, 본 발명은 CLARITY, SCALE, SeeDB, ClearT, 3DISCO, CUBIC, 디벤질 에테르(DBE), 및 BABB(Murray's Clear)와 같은 이전 기술에 의거하여 확립되는 전체-유기체 투명화를 위한 방법을 교시한다(Becker et al., 2012; Chung et al., 2013; Dodt et al., 2007; Erturk et al., 2012; Hama et al., 2011; Ke et al., 2013b; Kuwajima et al., 2013a; Susaki et al., 2014b). 이들 각각은 조직 구조를 안정화시키기 위한 하이드로겔 엠베딩(embedding)(Chung et al., 2013), 형광 단백질-양립성 투명화 시약(Susaki et al., 2014b), 및 크거나 처리하기 어려운 조직 샘플에 대한 영상화 접근법(Becker et al., 2013; Tseng et al., 2009)에 명백히 기여하였다. 이들 기술과 관련하여 몇몇의 특히 중요한 포인트가 있다. 첫째로, 이들 기술 각각에 대한 고유의 원리 증명(proof-of-principle)에서, 상세한 방법 및 최적화된 프로토콜은 단지 투명화 뇌 조직, 및 때때로 척수(Erturk et al., 2012; Zhang et al., 2014) 또는 전체 배아(Dodt et al., 2007; Hama et al., 2011)에 대해서만 제공되었다. 3DISCO는 현재까지 말초 조직에서의 투명화 방법의 가장 완전한 설명을 제공한다. 그러나, 많은 이전의 투명화 프로토콜(표 1)에서와 같이, 3DISCO의 투명화 시약(테트라하이드로푸란 및 DBE)은 조직 샘플에서의 형광 신호를 실질적으로 켜치시킨다(Erturk et al., 2012). CLARITY(Chung et al., 2013) 및 CUBIC(Susaki et al., 2014b)은 형광 켜치 문제를 회피하나, 본래의 형태의 CLARITY는 큰 샘플로부터 지질을 추출하기 위해 전기영동 조직 투명화(ETC)를 이용하였고, 이는 수행하기에 어려울 수 있고, 가열로 인한 에피토프 및 미세 처리 손상 및 조직 갈변(tissue browning)을 포함하는 최종 조직 품질에서 변화를 야기시킬 수 있다. 이는 투명화의 열 촉진 및 개선된 영상화와 함께 수동 지질 추출(Tomer et al., 2014)에 상세히 기재된 프로토콜과 함께 Zhang et al., 2014)을 이용한 CLARITY의 변화를 발생시켰다. CUBIC은 또한 수동 투명화 인지질에 의해 조직 투명도를 달성하며, 하이드로겔 엠베딩과 양립된다. 전통적인 수동 투명화 방법의 주요 약점은 이들의 느린 속도이며, 이는 이들을 큰 조직 부피 또는 전체 유기체를 투명화하기에 적합하지 않게 만든다.
- [0032] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 청징제(clarifying agent)를 직접 전달하기 위해 순환계 또는 뇌척수액 경로를 이용하여 신속한 전뇌 및 전신 투명화를 촉진한다. 이들 방법의 개발에서, 첫번째 단계는 하이드로겔 엠베딩, 투명화, 및 영상화 시약을 개선시키는 것이었고, 이는 1-3mm 두께의 조직의 더 신속한 수동 지질 추출을 위한 PACT(PAssive CLARITY Technique)를 발생시켰다. PACT-투명화된 조직을 이미지화시키기 위해, 맞춤형 경제적인 방법인 굴절률 지수 매칭법(Refractive Index Matching Solution)(RIMS)이 개발되었으며, 그 결과는 FocusClear™와 유사하다(Chung et al., 2013; Moy et al., 2013; Tseng et al., 2009). 본원에 더 상세히 기재된 바와 같이, PACT 시약은 뇌 및 신체 투명화 및 표지화를 달성하기 위해 두개내로 전달될 수 있거나, 혈관구조를 통해 전달될 수 있다. 후자는 PARS, 즉, 제자리 관류-보조 작용제 방출로 언급된다. 보존, 투명화, 및 표지화를 포함하는 PARS를 위한 모든 단계는 조직 추출 전에 제자리에서 수행된다. 하기에 입증되는 바와 같이, RIMS와 함께 PARS는 세포, 세포하, 및 심지어 단일-분자 전사물 수준에서의 통상적인 공초

점 현미경검사 및 표현형 분석을 이용한 시각화를 위해 불투명한 온전한 전체-유기체를 광학적으로 투명한 형광 표지된 샘플로 전환시킨다.

[0033] 상기 고려사항을 염두하면서, 본 출원의 추가의 특정한 구체예가 본원의 하기에 기재된다.

[0034] 다양한 구체예에서, 본 발명은 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 조직에 적용시킴으로써 고정된 조직을 형성시키는 단계, 및 이후 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 고정된 조직에 적용시킴으로써 하이드로겔 처리된 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 고정된 조직에 적용(0.01%-10% (w/v))시키는 단계를 추가로 포함한다. 당업자는 대안적 광개시제가 또한 이용될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 단지, 비제한적인 예로서, 수용성 아조 개시제 화학 부류의 임의의 화합물이 이용될 수 있다. 이용될 수 있는 효과적인 화합물은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디설페이트 데하이드레이트; 2,2'-아조비스(2-메틸프로피온아미딘)디하이드로클로라이드; 2,2'-아조비스[N-(2-카르복시에틸)-2-메틸프로피온아미딘]하이드레이트; 2,2'-아조비스[2-[1-(2-하이드록시에틸)-2-이미다졸린-2-일]프로판]디하이드로클로라이드; 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]; 2,2'-아조비스(1-이미노-1-피롤리디노-2-에틸프로판)디하이드로클로라이드; 2,2'-아조비스[2-메틸-N-[1,1-비스(하이드록시메틸)-2-하이드록시에틸]프로피온아미드]; 2,2'-아조비스[2-메틸-N-(2-하이드록시에틸)프로피온아미드] 등을 포함할 수 있으나, 결코 이에 제한되지 않는다. 일부 구체예에서, 광개시제 용액의 농도는 0.05 내지 10%(w/v)이다. 특정 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 PBS 중 1% 내지 20%의 아크릴아미드를 포함한다. 바람직한 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 PBS 중 4% 아크릴아미드를 포함한다. 일부 구체예에서, 하이드로겔 용액은 단백질 하이드로겔을 포함한다. 일부 구체예에서, 사용되는 하이드로겔은 문헌[Sun et al. PNAS Physical Sciences - Engineering - Biological Sciences - Biochemistry: Synthesis of bioactive protein hydrogels by genetically encoded SpyTag-SpyCatcher chemistry (2014)]에 기재된 바와 같은 하이드로겔일 수 있다. 당업자는 PBS가 유사한 특징을 갖는 또 다른 완충액으로 치환될 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 하이드로겔 단량체 처리된 조직을 실질적 기밀 챔버에 배치하는 단계, 및 질소를 실질적 기밀 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 질소는 0.1 내지 60분 동안 챔버로 도입된다. 당업자는 가공되는 조직을 수용하기에 적합한 크기의 챔버가 상기 방법의 상기 양태에 대해 선택되어야 하는 것을 용이하게 인지할 것이다. 단지 예로서, 실시예 섹션에 기재된 챔버가 이용될 수 있다. 대안적 구체예에서, 가스 이동과 관련하여 유사한 특징을 갖는 챔버가 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 0.5 내지 24 시간의 기간 동안 15 내지 60°C에서 탈기된 조직을 인큐베이션시킴으로써 인큐베이션된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 PBS로 인큐베이션된 조직을 세척함으로써 세척되고 인큐베이션된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 세척되고 인큐베이션된 조직에 적용시킴으로써 투명화된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 세제 용액은 6 내지 10의 pH에서 0.01 내지 1M PBS 중 0.5 내지 30%의 SDS(w/v)를 포함한다. 특정 구체예에서, 조직은 15 내지 60°C에서 0.1 내지 60일 동안 세제 용액 중에서 인큐베이션된다. 일부 구체예에서, 조직은 인큐베이션 동안 진탕된다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 0.1 내지 76 시간의 과정에 걸쳐 PBS로 1회 이상 투명화된 조직을 세척함으로써 투명화되고 세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 투명화되고 세척된 조직에 영상화 매질을 적용시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 영상화 매질은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함한다. 특정 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다. 특정 구체예에서, 조직은 생검으로부터 획득된다. 특정 구체예에서, 조직은 암성 또는 전암성 조직이다. 특정 구체예에서, 조직은 포유동물 조직이다. 일부 구체예에서, 조직은 인간 조직이다.

[0035] 다양한 구체예에서, 본 발명은 상기 기재된 방법에 따라 제조된 조직을 면역염색시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 기재된 방법의 투명화되고 세척된 조직에 일차 항체를 포함하는 용액을 적용시킴으로써 항체-결합된 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 완충액으로 항체-결합된 조직을 행구는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 완충액은 PBS를 포함한다. 당업자

는 동등한 특징을 갖는 대안적 완충액이 상기 단계에서 PBS를 대체할 수 있음을 용이하게 인지할 것이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 완충액으로 세척된 항체-결합된 조직에 이차 항체를 포함하는 용액을 적용시키는 단계를 추가로 포함하며, 이차 항체는 시각화 가능한 마커로 표시된다. 특정 구체예에서, 시각화 가능한 마커는 형광 마커이다. 당업자는 항체를 표시시키기에 적합한 다수의 시각화 가능한 마커 중 임의의 마커가 형광 마커에 대한 대체물로 이용될 수 있음을 인지할 것이다. 다양한 구체예에서, 일차 항체는 시각화 가능한 마커로 표시된다. 특정 구체예에서, 조직은 생검으로부터 획득된다.

[0036] 다양한 구체예에서, 본 발명은 면역염색된 조직을 시각화시키기 위한 방법을 교시한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 본원에 기재된 방법 중 임의의 방법에 따라 제조된 면역염색된 조직을 시각화시키기 위해 현미경을 이용하는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 현미경은 에피-형광 현미경검사, 공초점 현미경검사, 다광자 현미경검사, 회진 디스크 공초점 현미경검사, 라이트-시트 현미경검사, 라이트-필드 현미경검사, 형광 텔벗 현미경검사(Fluorescence Talbot Microscopy)(FTM)를 포함할 수 있으나, 결코 이에 제한되지는 않는 현미경검사의 한 형태를 수행하기 위해 이용된다.

[0037] 항체를 이용한 면역표지화의 상기 기재되고 하기 기재되는 구체예는 당 분야에 공지된 조직 및 세포를 질의하기 위한 많은 가능한 기술의 단지 제한적 예이다. 다양한 유형의 표지된 프로브를 이용하는 것을 포함하는 다수의 추가 기술이 실시예 섹션에 특별히 기재되나, 이들은 결코 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 확실히, 표지되거나 표지되지 않던 간에 조직, 세포, 또는 세포하 구조 또는 과정을 시각화시키기 위한 임의의 공지된 방법이 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0038] 다양한 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 조직의 구조적 및/또는 광학적 특징을 변형시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 파라포름알데하이드(PFA)를 포함하는 고정액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 고정된 조직을 형성시키는 단계; 및 아크릴아미드 및 인산염 완충 염수(PBS)를 포함하는 하이드로겔 단량체 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 하이드로겔-처리된 조직을 형성시키는 단계를 포함한다. 특정 구체예에서, 본 발명의 상기 양태에서 사용되는 고정액 및 하이드로겔 단량체 용액은 상기 섹션(및 실시예 섹션)에 기재된 고정액 및 하이드로겔 단량체 용액과 동일하다. 일부 구체예에서, 고정액은 0.1 내지 48시간 동안 대상체의 순환계에 도입된다. 특정 구체예에서, 하이드로겔 단량체 용액은 0.1 내지 48시간의 기간 동안 대상체의 순환계에 도입된다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 이후에 0.1 내지 48시간의 기간 동안 대상체의 순환계에 PBS를 포함하는 용액을 도입시킴으로써 대상체에서 PBS-세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 대상체를 실질적 기밀 챔버로 배치하는 단계, 및 질소를 챔버에 도입시킴으로써 탈기된 대상체를 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 질소는 0.5 내지 120분의 기간 동안 도입된다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드를 포함하는 광개시제 용액을 탈기된 대상체의 순환계에 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 광개시제 용액은 상기 섹션 및 실시예 섹션에 기재된 바와 같은 조직을 제조하기 위해 사용된 광개시제 용액과 동일한 특징을 갖는다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 소듐 도데실 설페이트(SDS)를 포함하는 세제 용액을 대상체의 순환계에 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 세제 용액은 0.01 내지 1M PBS 중 약 0.5 내지 30%의 SDS를 포함한다. 일부 구체예에서, 세제 용액은 20 내지 60°C에서 0.5 내지 30일 동안 대상체의 순환계에 도입된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 순환계에 PBS를 도입시킴으로써 대상체 내에서 투명화되고 세척된 조직을 형성시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, PBS는 0.5 내지 30일 동안 도입된다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 순환계에 영상화 매질을 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구체예에서, 영상화 매질은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함한다. 일부 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3 디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다. 일부 구체예에서, 영상화 매질은 0.1 내지 14일의 기간 동안 도입된다. 특정 구체예에서, 조직은 뇌 조직을 포함한다. 특정 구체예에서, 조직은 척수 조직을 포함한다. 일부 구체예에서, 조직은 포유동물 조직이다. 일부 구체예에서, 조직은 인간 조직이다.

[0039] 본원에 기재된 방법의 다양한 구체예에서, (1) 본원에 기재된 용액 중 하나 이상은 펌프에 연결된 제1 튜브를 통해 대상체의 순환계에 도입되고; (2) 용액 중 하나 이상은 하나 이상의 용액이 수거되는 저장소와 유체 연결

된 제2 튜브를 통해 대상체의 순환계로부터 제거되고; 임의로 (3) 펌프는 저장소로부터 하나 이상의 수거된 용액을 퍼 올리고, 제1 튜브를 통해 대상체의 순환계에 하나 이상의 용액을 도입시킨다.

[0040] 다양한 구체예에서, 본 발명은 제자리에서 조직을 면역염색시키기 위한 방법을 교시한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 상기 기재된 방법 중 임의의 방법에 따라 처리된 대상체의 순환계에 일차 항체를 포함하는 용액을 도입시키는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 면역염색은 영상화 매질을 이용하기 전에 수행된다. 일부 구체예에서, 일차 항체를 포함하는 용액은 0.5 내지 14일의 기간 동안 도입된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 순환계에 완충액을 도입시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 완충액은 PBS이다. 일부 구체예에서, 완충액은 0.5 내지 14일의 기간 동안 도입된다. 특정 구체예에서, 상기 방법은 대상체의 순환계에 이차 항체를 포함하는 용액을 도입시키는 단계를 추가로 포함하며, 이차 항체는 시각화 가능한 마커로 표지된다. 일부 구체예에서, 이차 항체를 포함하는 용액이 0.5 내지 14일의 기간 동안 도입된다. 특정 구체예에서, 시각화 가능한 마커는 형광 마커이다. 일부 구체예에서, 일차 항체는 시각화 가능한 마커로 표지된다. 일부 구체예에서, 조직은 포유동물 조직이다.

[0041] 일부 구체예에서, 본 발명은 (1) 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드, (2) 인산염 완충액; (3) 트윈-20; (4) 소듐 아지드; 및 임의로 (5) 소듐 하이드록시드를 포함하는 조성물을 교시한다. 특정 구체예에서, 1-N,3-N-비스(2,3-디하이드록시프로필)-5-[N-(2,3-디하이드록시프로필)아세트아미도]-2,4,6-트리아이오도벤젠-1,3-디카르복사미드 또는 5-(N-2,3-디하이드록시프로필아세트아미도)-2,4,6-트리아이오도-N,N'-비스(2,3-디하이드록시프로필)이소프탈아미드의 농도는 10 내지 100% w/v이다.

[0042] PARS, PACT, 및 본원에 기재된 관련 방법은 임의의 동물에 대해 이용될 수 있고, 본원에 특별히 기재된 예로만 결코 제한되지는 않는다. 추가로, 본원에 기재된 방법은 배아로부터 성체까지의 범위의 전체 유기체에 대해 이용될 수 있다.

[0043] 당업자는 본 발명의 실시에서 이용될 수 있는 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질을 인지할 것이다. 확실히, 본 발명은 본원에 기재된 방법 및 물질로 결코 제한되지는 않는다. 본 발명의 추가의 비제한적인 구체예는 하기 실시예에 포함된다.

[0044] **실시예**

[0045] 실시예 1

[0046] 결과

[0047] 전체 기관의 수동 투명화 및 면역염색을 위한 방법

[0048] 일부 구체예에서, 두꺼운 조직은 3개의 주요 단계로 영상화를 위해 광학적으로 투명해진다. 첫째로, 조직은 생체거대분자를 안정화시키기 위해 하이드로겔 단량체에 가교되고 하이브리드화된다. 둘째로, 조직 지질은 이온성 세제(들)을 이용하여 조직-하이드로겔 매트릭스로부터 추출된다. 셋째로, 투명화된 조직은 영상화를 위해, 또는 장기간 저장을 위해 RIMS에 엠베딩된다. 전신 투명화가 주요 목적이었으나, 작은 또는 특히 취약한 검체 및 기관의 처리가 가벼운 수동 투명화 프로토콜에 의해 최적으로 달성되는 것이 인지되었다. PACT는 뇌, 척수, 신장, 심장, 폐, 및 장, 또는 인간 조직 생검을 포함하는 1-3 mm 두께의 섹션의 설치류 전체 기관을 투명화시키기 위해 개발되었다. 투명화 속도는 세제 마이셀에 의한 지질 용매화의 속도, 및 조직 내에서의 세제 마이셀의 확산 속도에 부분적으로 의존한다(Hoffman, 2002). 그러나, 적용된 힘이 CLARITY의 ETC에서의 전기장과 같이 조직을 통한 이들의 확산을 촉진하지 않는 한(Chung et al., 2013; Tomer et al., 2014), 큰 마이셀에 의한 지질 추출은 비교적 느리다. 다양한 세제가 3일의 인큐베이션에 걸쳐 3 mm 관상 마우스 뇌 블록을 수동적으로 투명화시키는 이들의 능력에 대해 다양한 농도에서 시험되었다. 모든 농도에서의 소듐 도데실 설페이트(SDS)는 다른 세제에 비해 뇌 조직으로부터의 지질 용매화 및 제거에 대해 우수하였고, 또한 8%의 SDS 농도만이 전체 3 mm 블록 전체에 걸쳐 균일한 투명화를 달성하였다(도 7a).

[0049] 조직-하이드로겔의 가교 밀도에서의 감소는 지질 추출 및 이후의 면역조직화학 동안 두꺼운 고도로 미엘린화 또는 섬유성 조직으로의 거대분자 투과 둘 모두를 촉진할 것으로 가정되었다. 이를 시험하기 위해, 3mm 뇌 섹션에 다양한 조합 및 농도의 포름알데하이드, 아크릴아미드, 및 비스-아크릴아미드를 주입하였고, 탈기시켰고, 37 °C에서 중합시켰다. 포름알데하이드 및 아크릴아미드의 더 낮은 농도가 이용되고, CLARITY(Tomer et al., 2014)에서 사용된 아크릴아미드 가교제인 비스-아크릴아미드가 하이드로겔 단량체의 카테일로부터 배제된 경우

에 조직 투명화의 효능(도 1a) 및 항체 투과의 깊이(도 1b)가 유의하게 증가하였다. 더 낮은 아크릴아미드 농도로 제조된 조직-하이드로겔에서의 조직 투명도에서 정성적 증가를 관찰하는 경우(도 1a), 최소 가교 설계가 조직 형태 및 분자 정보를 보존시키기에 충분한 것을 보장하기 위해 투명화 동안 단백질 손실, 조직 온전성, 및 중량 및 부피에서의 변화에 대해 다양한 PACT 조직 제조물을 검증하였다. SDS 투명화 완충액으로 조직 외부로 걸러진 단백질의 양은 대조군으로서 PBS에서 인큐베이션된 4% PFA-고정된, 투명화되지 않은 조직 샘플(A0P4)과 4% 아크릴아미드(A4P0) 또는 4% 아크릴아미드 + 4% PFA(A4P4)로 제조된 투명화된 조직-하이드로겔 매트릭스 사이를 통계적으로 구별할 수 없었다(도 1c). 특히, 모든 하이드로겔 엠베딩된 샘플에 대해 8% SDS 투명화 배스 용액에서 기록된 단백질의 양은 4% PFA 만으로 보존되고, 가벼운 세제-함유 완충액인 PBS-0.1% TritonX-100에서 인큐베이션된 샘플에 대한 단백질 손실보다 적었다(총중량 mg 당 0.57 ± 0.11 mg). 이는 하이드로겔 단량체가 조직 단백질을 효과적으로 가교시키고 안정화시키는 것을 의미하며, 이는 8% SDS에서 인큐베이션된 중합되지 않은 PFA-고정된 조직이 불충분한 단백질 보유를 나타냈다는 발견(총중량 mg 당 0.63 ± 0.02 mg 단백질 손실)에 의해 추가로 뒷받침된다(도 1c).

[0050] PACT 조직에서의 분자 함량의 보존에 대한 상기 결과를 확인하기 위해, Thy1-eYFP 트랜스제닉 마우스로부터의 PACT 뇌 샘플에서 천연 eYFP 형광의 상대 수준을 시각화시키고, 정량하였다. 평균 형광 강도에서의 감소가 둘 모두의 하이드로겔 제형(A4P0, A2P0) 하에서 관찰된 한편, 형광 측정이 조직 팽창에 대해 표준화된 경우(도 7c) PACT 샘플은 투명화되지 않은 조직에 비해 동등한 전체 강도를 나타내었다(도 1d). 확실히, 아크릴아미드 단독(A4P0)을 이용하여 제조된 조직-하이드로겔 매트릭스는 A4P4 대응물에 비해 각각 ~174% 및 ~223%의 조직 중량 및 부피 변화를 나타내었다(도 1e). 그러나, 투명화액으로부터 마운팅 매질로의 조직 샘플의 이동시, PACT 샘플은 수시간 이내에 이들의 본래의 크기로 다시 수축하였다(도 9d). 이러한 조직 팽창-수축은 이전의 뇌 투명화 프로토콜(Chung et al., 2013; Hama et al., 2011; Susaki et al., 2014b)에 기록되었고, 이들 크기 변화가 비록 차선이지만 육안 조직 형태 또는 세포 구조에 부정적으로 영향을 미치는 것으로 보이지 않은 것으로 결론 내려졌다. 조직 팽창을 제한하는 것으로 가정되는 조직-하이드로겔 매트릭스에서의 가교 밀도에 대한 PFA의 효과를 시각화시키기 위해, PACT-투명화된 뇌 절편을 주사 전자 현미경검사(SEM)를 통해 이미지화시켰다(도 7b). A2P0 매트릭스가 가장 큰 포어 크기를 갖고, 그 다음으로 A4P0인 한편, A4P4는 가장 작은 시각화된 포어 크기를 가지며; 포어 크기는 더 큰 포어를 갖는 조직-하이드로겔 매트릭스에서 더 신속한 거대분자 확산 시간으로 확산률에 직접 영향을 미치는 것이 인지되었다. PACT 처리 및 마운팅 동안 조직 변형(즉, 팽창 및 수축)은 통상적인 조직학적 처리에 비해 샘플의 전체 세포 구성 또는 단백질 함량에 영향을 미치는 것으로 보이지 않았다(도 1f-11). 따라서, A4P0가 투명화 속도, 단백질 보존, 및 중간 포어 크기 조직 사이의 균형을 가정하여 PACT에 대해 선택되었으며, 이는 조직학 동안 거대분자 조직 투과에 도움이 된다.

[0051] 조직학 및 내인성 형광색소와 양립되는 PACT 시약

[0052] 유전학적으로 인코딩된 형광 단백질로부터의 신호 강도가 PACT 처리 전체에 걸쳐 보존되는 것을 보장하기 위해, 1 mm-두께의 Thy1-eYFP 조직 섹션을 A4P0-하이드리브화시키고, PACT-투명화시키고, 공초점 현미경검사를 이용하여 이미지화시켰다. PACT 투명화 및 중요하게는 두꺼운 샘플에 대한 느린 이미지 획득 시간에도 불구하고, 유전학적으로 발현된 eYFP가 샘플 전체에 걸쳐 용이하게 검출되었다(도 1f, 1h). 또한, 조직-하이드로겔 매트릭스는 여전히 두꺼운 투명화된 섹션의 균일한 니슬 염색을 가능케 하였다(도 1f, 도 1g의 투명화되지 않은 80 μ m 섹션에 비함). 전체 조직 구조는 니슬 염색(적색)에 의해 나타난 마와 같이 투명화된 섹션과 투명화되지 않은 섹션 사이에 일정하게 유지되었고, 이는 조직의 연속적 팽창 및 이후 수축이 영구적인 조직 변형을 야기시킨다는 우려를 완화시킨다.

[0053] 조직 샘플의 구조적 온전함을 유지시키는 단백질을 포함하는 천연 단백질이 투명화 동안 조직-하이드로겔 매트릭스에 의해 보존되었을 뿐만 아니라(도 1c, 1f, 1h), 투명화된 조직 블록은 다양한 일반적인 조직학적 마커(예를 들어, 항체, 소분자, mRNA 프로브)를 이용하여 펩티드 및 핵산 에피토프의 표지화를 가능케 하기에 충분히 거대분자-투과적이었다. 예를 들어, 니슬을 제외하고, 마우스 뇌 및 척수로부터의 1 mm PACT 섹션을 항티로신 하이드록실라제(TH)(도 1i), 아교세포 섬유 산성 단백질(GFAP), 뮤린 면역글로불린 G(IgG), 및 이온화 칼슘 결합 어댑터 분자 1(Iba1)(도 1j)에 대한 항체로 면역표지화시켰다. 이들 표지화 모이어티는 광범위한 세포 위치를 차지하는 항원인 막-국소화 및 세포질, 신경세포 및 비신경세포 항원이다. PACT 투명화는 조직 샘플 내에서 광 산란을 감소시켜, 모든 표지가 단일-광자 형광 영상화 동안 전체 1 mm 섹션 전체에 걸쳐 용이하게 분해되었다.

[0054] PACT 방법이 말초 조직에 대해 또한 효과적인 것을 확인하기 위해, Thy1-eYFP 마우스의 신장, 심장, 폐, 및 장을 절제하고, 투명화하고, 항-인테그린 항체, 아크리딘 오렌지(AO), 및/또는 SYTO24로 표지하였다(도 1k). 중

추 기관 샘플에서 관찰되는 바와 같이(도 1f, 1h-j), 소분자 염료 및 항체가 마찬가지로 말초 기관의 1-3 mm 두께의 A4P0-가교되고 PACT-투명화된 섹션을 통해 신속하게 확산되었다. 두꺼운 섹션의 완전한 면역표지화를 위한 시간은 조직 유형, 하이드로겔 포어 크기(도 7b), 및 지질 제거의 정도(도 1a, 7a)를 포함하는 여러 요인에 좌우되는 한편, 균일한 항체 투과가 7-12일의 인큐베이션으로 PACT 샘플 전체에 걸쳐 달성되었다. 그러나, 소분자 형광 염료를 이용한 표지화만을 필요로 하는 연구를 위해, 1회의 밤새 내지 3일의 인큐베이션으로 각각 1-3 mm PACT 뇌 섹션의 신속한 염색을 획득할 수 있다. 일부 말초 조직은 더 신속히 염색되었고, 여기서 섹션화되지 않은 마우스 장 조직(~ 400um 두께) 내의 개별적 핵의 A0 표지화가 1시간 내에 달성되었다(도 1k). 다음의 문제는 PACT가 병리학적 샘플에 적용될 수 있는지 결정하는 것이었다. 인간 피부암 생검(도 8a)을 세척하고, 판-사이토케라틴(pan-cytokeratin)으로 염색하여, 종양 세포를 시각화시켰다(도 1l, 도 8 b-c). 요컨대, 전체 PACT-투명화된 조직 블록은 표준 면역조직화학 방법 및 통상적인 형광 현미경검사를 이용하여 분자 질의에 대해 세포학 수준으로 접근할 수 있었다.

[0055] PACT가 단일 mRNA 전사물을 시각화시키기 위한 확립된 절차와 양립되는지 결정하기 위해, PACT-처리된 조직을 단일-분자 형광 제자리 하이브리드화, smFISH에 적용시켰다(Femino et al., 1998; Raj et al., 2008). smFISH의 방법은 고정된 세포에서 높은 특이성으로 단일 RNA 분자를 검출할 수 있고, 이의 높은 민감성은 RNA 풍부함 및 세포화 국소화의 측정을 가능케 한다. 그러나, 조직 섹션에서의 smFISH는 조직 자가형광에 의해 야기되는 낮은 신호 대 노이즈 비로 인해 난제로 남아 있다. 여기서, 100 μm-두께의 투명화된 마우스 뇌 섹션 내의 β-액틴 전사물을 β-액틴 mRNA에 대한 24개의 Alexa 594-표지된 20mer(mer) 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용하여 표지시켰다. 조직 샘플을 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)을 함유하는 매질 중에 슬라이드-마운팅시키고, 단일-광자 현미경검사를 통해 이미지화시켰다. β-액틴 전사물은 PACT 및 smFISH 처리 전체에 걸쳐 뉴런의 세포 질에서 확실히 유지되었고, 세포에서의 β-액틴의 높은 카피수 및 이미지화된 뇌 섹션의 상당한 두께에도 불구하고 형광의 단일 포인트가 구별될 수 있었다(Buxbaum et al., 2014; Raj et al., 2008)(도 2a). PACT 조직은 투명화되지 않은 조직에 비해 조직 전체에 걸쳐 회절-제한된 스폿의 유의하게 증가된 대조를 나타내었다(도 2c). smFISH 강도는 PACT 투명화된 조직 및 투명화되지 않은 조직 사이에 매우 작은 차이를 나타낸 한편, 백그라운드 강도는 유의하게 감소된 것으로 결정되었다(도 2 a-b, 2d 및 2e, 8d). PACT 투명화된 조직에서 관찰된 smFISH 신호 대 노이즈 비에서의 증가와 함께 이들 발견은 두꺼운 샘플에서의 백그라운드 자가형광이 투명화되지 않은 조직에서 smFISH 신호를 혼란시키는 주요 요인임을 암시한다.

[0056] 투명화된 조직의 영상화 및 장기간 저장을 위한 굴절 지수 매칭법을 위한 방법

[0057] 효과적인 영상화는 이중성 조직 내에서 굴절 지수(RI) 변화를 감소시키고, 조직, 마운팅 매질 및 렌즈 침지 매질 계면 사이의 RI 미스매치를 완화시키는 마운팅 매질 중에서의 샘플 침지에 의존된다. 전통적인 제품의 매우 고비용 및 제한된 이용가능성에 대응하여, 조직 영상화에 적절한 RI(RI = 1.38-1.49), 생물학적 안전성, 및 조직 보존에 대한 생체적합성을 갖는 덜 비싼 대체물인 RIMS, 즉, 굴절 지수 매칭법을 포물레이션하였다(보조 실험 절차 참조). RIMS를 시험하기 위해, PACT-처리된 샘플을 80% 글리세롤, FocusClear, 또는 RIMS에 마운팅시킨 후, 동일 조건하에서 이미지화시켰다(도 9a). RIMS는 형광 현미경검사에 대해 우수한 광학 투명도를 제공하였고(도 9c), 3개월의 기간에 걸쳐 eYFP 신호의 최소의 퀴칭을 야기시켰다(도 9e). 이의 성능은 FocusClear와 동등하거나 더 나은 것으로 나타났고(도 9a), 이는 마운팅 비용에 있어서 10배 초과를 제공하였으므로, 이후의 모든 PACT 및 8개의 PARS 실험에 RIMS를 이용하였다. 정확한 RIMS 포물레이션은 조직 샘플의 RI에 대한 경우 특이적 방식으로 최적화될 수 있다(도 9b).

[0058] 성체 설치류에서의 혈관구조를 이용한 전신 투명화

[0059] PACT 프로토콜은 최종 조직 하이드로겔을 발생시키기 위해 4% 아크릴아미드 단량체 용액을 이용하며, 단백질 보존, 투명화의 속도 및 용이성, 및 광학적 투명성의 우수한 조합을 발생시킨다. 그러나, 수동 확산은 느리며, 이는 큰 부피 또는 전체 유기체 투명화에 대해 금지된다. 아크릴아미드 하이드로겔은 세체 투명화 단계 동안 현저히 팽창한 것이 또한 인지되었다(도 1a, 7c). 대부분의 투명화 프로토콜에 대해 혼란 이들 두 결점은 투명화의 속도를 높이고, 또한 투명화 동안 조직 팽창을 최소화시키는 대안적 방법의 개발을 촉진하였다. 현존하는 혈관구조 네트워크를 이용하였는데, 이는 제자리에서 전체 고정 및 투명화 절차를 수행함으로써 작용체를 조직에 직접 도입시키기 위해 심장 관류-고정에서 정기적으로 수행되기 때문이다(Gage et al., 2012; Jonkers et al., 1984). 이러한 방법은 제자리 관류-보조 작용제 방출(또는 PARS)로 언급된다. PARS는 이후에 관심 조직 전체에 걸쳐 확산되는 하이드로겔 단량체 및 투명화 용액을 직접 주입하기 위해 동물의 온전한 혈관구조를 이용한다. 주요 혈관 및 전체-유기체 미세혈관구조가 관류액에 의해 접근되었는지의 여부를 연구하기 위해(Leong and Ling, 1990; Li et al., 2012), 마우스 면역글로불린에 대한 AlexaFluor 647-컨쥬게이션된 항체(도 10b,

우측) 또는 GFAP에 대한 Atto 488-컨쥬게이션된 나노바디(도 10b, 좌측)를 24시간 동안 심장 카테터를 통해 관류-재순환시켰다. 마우스 뇌 혈관구조를 광범위하게 표지시켰고, 이는 관류액에 대한 혈관의 접근성을 나타낸다(도 10b). 관류액은 또한 혈관구조의 GFAP 표지화에 의해 제시된 바와 같이 주위 조직으로 확산하는 것으로 관찰되었다(도 10b).

[0060] 수일 내지 수주 동안 뇌 CSF로 또는 전신 혈관구조를 통해 PACT 시약을 재순환시키기 위해, 폐쇄-루프 관류 시스템을 개발하였다. 이러한 맞춤형 PARS 챔버를 이용하여(도 10a), PARS-CSF로 언급된 방법을 통한 CSF로의 8% SDS의 연속 두개내 관류(도 3)로 4일 내에 전뇌 투명화를 달성하였다(도 3a-3b). 대수조로 더욱 미부로 삽입관을 삽입하는 것(도 3a, 우측)은 래트 척수의 전체 길이의 투명화를 가능케 하였다(도 3b). 다음으로, AAV9-eGFP 주사되는 성체 마우스를 후각 망울 바로 위에 삽입된 경막하 삽입관으로 준비시키고(도 3a, 좌측), 37°C에서 8% SDS를 재순환시킨 지 4일 후, CSF 순환 주위의 미엘린화되지 않은 마우스 뇌 영역 및 치밀하게 미엘린화된 마우스 뇌 영역 둘 모두(피질의 대부분, 시상하부, 뇌실 및 척수 근처의 영역)를 투명화시켰다. 개별적 뉴런, 신경세포 돌기, 및 아교 세포의 GFP-표지화는 뇌 전체에 걸쳐 명백히 보였다(도 3c).

[0061] PARS-CSF의 동일한 관류-투명화 방법이 제자리 전신 투명화까지 확대될 수 있는 것으로 결정되었다. 또한, 지질 추출 및 항체 확산 각각 동안 조직에 대한 압력 구배의 적용은 개개의 절제된 전체-기관의 PACT-기반 투명화에 비해 투명화 및 면역표지화 단계를 촉진시키는 추가 이점을 유지시킬 수 있다. 투명화 시약을 전신 혈관구조를 통해 순환시켰고(타임라인(timeline) 참조, 도 4a), 마우스 및 래트에 대해 마찬가지로 모든 말초 기관 및 중추신경계의 완전한 투명화가 각각 1주 및 2주 이내에 달성되었다(도 4b-4d, 13). PARS 관류액의 최소 단백질 함량, 및 AOP4-주입된 마우스로부터의 관류액의 더 높은 단백질 함량(도 4e)은 전체-유기체 하이드로겔 중합이 전체 기관 구조 및 거대분자 함량을 안정화시키는데 필요하고 충분한 것을 암시하였다. PARS가 다수의 기관에서 희박하게 표지된 세포에서의 국소화 형광 단백질 발현의 시각화와 양립되는 것을 확인하기 위해, GFP 트랜스진을 아데노 관련 바이러스(AAV)의 전신 투여에 의해 전달하였다. AAV9:CAG-eGFP(도 5d) 또는 AAV9와 유사한 정도로 CNS 뉴런을 형질도입시키거나, 감소된 별아교세포 및 간세포 형질도입을 나타내는 AAV9의 변이체인 AAV9BD1:CAG-eGFP(도 5e)를 성체 마우스에서 혈관구조를 통해 전달하였다. 뇌 및 간 둘 모두에서, 천연 eGFP 발현은 용이하게 검출 가능하였고, AAV9에 비해 AAV9BD1에 의한 간 간세포의 감소된 형질도입이 용이하게 검출되었다(도 5d 대 5e).

[0062] PACT와 비교하여, 근골격 구조, 예를 들어, 두개골, 척주, 및 근육 벽이 조직 팽창을 물리적으로 구속시키므로 PARS 처리 동안 조직 부피 변화가 감소될 것으로 예측되었다. 확실히, 설치류 뇌의 PARS-기반 투명화가 투명화 동안 제한된 하이드로겔 팽창 및 조직 팽창으로 달성되었다(도 4c-4d, 11a). PARS-처리된 뇌가 두개골로부터의 추출 및 PBS 또는 RIMS 중의 배치 후에 약간 팽창하였으나(도 11a), 신경세포 형태에서의 육안 변화가 PARS 처리 및 PARS 팽창 후의 결과로서 발생한 것을 암시하는 증거가 없었다(도 5b). 그럼에도 불구하고, RIMS 마운팅 전에 밤새 4% PFA 중 PARS 샘플 후고정을 통해 RIMS에서의 조직 팽창의 완화를 시도하였다. 전체 조직 구조가 부피 변화에 의해 변경된 정도를 평가하기 위해, 투명화되지 않은 샘플, PARS-투명화된 샘플, 및 후고정된 PARS-투명화된 샘플의 다양한 뇌 영역(피질, 선조체, 시상) 내에서의 세포간 거리 및 평균 세포 크기를 측정하였다(도 11b). 개별적 영역이 PARS 처리 또는 RIMS 인큐베이션에 의해 차별적으로 영향을 받을 수 있는 것이 예측되었고; 예를 들어, 관류-관련 두개내 압력으로부터 발생하는 임의의 전단력이 덜 미엘린화된 조직에 대해 더 큰 손상을 가할 수 있거나, 뇌실 허탈을 야기할 수 있다. 후고정 PARS 샘플은 PARS 샘플 전체에 걸쳐 검출된 증가된 세포-크기 및 세포간 거리를 유의하게 방지하였다. 검정된 모든 뇌 영역에서 투명화되지 않은 샘플과 후고정된 샘플 사이의 세포 크기 또는 세포간 간격에서 유의한 차이가 없었다(도 11b).

[0063] 기관마다의 방식으로 표현형분석 및 영상화를 가능케 하는 전체-유기체 PARS

[0064] 전신 PARS 처리 및 표지화 후, 주요 기관을 절제하고, 두겹게 섹션화시키고, 공초점 현미경검사를 이용하여 이미징시켰다(도 5, 6, 12). Thy1-eYFP 마우스의 PARS-투명화된 전뇌(도 5a-b) 및 척수(도 5c)를 이미징시켰고, PARS 처리가 전체 기관을 세포 해상도로 심부-조직 구조를 시각화시키는 것이 가능한 정도로 광학적으로 투명화시킨 것으로 결정되었다. 투명화된 전뇌(도 5a-b) 및 신장(도 6b) 각각의 전체에 걸친 개별적 뉴런 및 네프론의 시각화를 통해, 조직 구조를 안정화시키는데 있어서 부분적으로 제자리 조직-하이드로겔 중합의 성공으로 인해 미세 세포 구조를 온전하게 남기고, 단백질 함량 및 내인성 형광을 보존시키고, 세포하 조직 성분과 세포 조직 성분 사이의 공간적 관계를 유지시키면서 상기 광학적 투명화가 달성된 것으로 보인다(도 5a-b). 예를 들어, 개별적 네프론의 개별적인 형광-표지된 사구체가 분해되었고, 이는 온전한 혈관구조를 통해 말초 기관에 접근하는 PARS의 능력을 확립한다(도 6b, 12).

- [0065] 중요하게는, 이는 블로킹 용액, 일차 및 형광-표지된 이차 항체 콕테일, 또는 형광-표지된 소분자, 및 세척 완충액을 포함하는 모든 면역조직화학 용액의 전달을 또한 포함한다. PARS-처리된 마우스 신장 섹션에서의 튜블린 및 DRAQ5 표지화(도 5b) 및 액틴, 섬유성 액틴 프로브 팔로이딘, 및 핵산 균주 DAPI를 이용한 간, 폐, 체장 내의 혈관의 관류-기반 표지화(도 12)에 의해 예시된 바와 같이 PARS를 이용한 면역표지화는 표적-특이적이었고, 말초 기관 전체에 걸쳐 균일하게 분포하였고, 낮은 백그라운드를 나타내었다.
- [0066] 실시예 2
- [0067] 논의
- [0068] 일부 구체예에서, 본 발명은 형광 및 단백질-기반 신호 및 조직 구조를 보존시키면서 단일 세포 해상도로 영상화시키기 위해 온전한 전체-유기체를 투명하게 하는 방법인 PARS를 교시한다. 기점인 CLARITY 방법(Chung et al., 2013)은 과학자에게 3D 세포 배열 및 커넥톰(connectome)을 전부 설명하기 위한 뇌-처리 플랫폼을 제공하였다. 다수의 실험실에서 CLARITY 전에 10년간 새로운 투명화 시약에 대해 이전에 보고하였으나, 이들 시약 중 많은 시약은 매우 적용-특이적이거나 조직-특이적이었다(표 1에 요약됨). 대조적으로, CLARITY는 조직 보존(하이드로겔 엠베딩) 및 투명화 효율(전기영동 조직 투명화, ETC)에 적합한 2개의 광범위하게 적용가능한 기술을 도입하였고, 이 둘 모두는 다른 투명화 절차의 설계 또는 재설계로 통합될 수 있다.
- [0069] 전통적으로, 조직을 투명하게 만드는 것은 다른 투명화 프로토콜에 보고된 바와 같이 약 수주 내지 수개월의 용매 인큐베이션을 필요로 한 과정이었다(Hama et al., 2011). 그러나, ETC는 조직 투명화의 속도가 조직을 신속히 용해화시키는 능력에 대한 많은 패널의 유기 용매의 검정을 통해서만 촉진될 수 있다는 일반적인 관점에 도전하였다. 종종, 이들 스크린에서 시험된 후보 용매는 신속한 조직 투명화를 달성하였으나, 조직 구조를 손상시켰거나(Hama et al., 2011), 천연 형광을 퀀칭시켰다(Becker et al., 2012; Erturk et al., 2012; Susaki et al., 2014b). CLARITY에 의해 도입된 시약은 비교적 더 순했으나, 신속한 투명화를 위해 요구되는 ETC 단계는 수행하기 복잡하고, 샘플 가열로부터 조직 분해를 야기시킨다. 이들 난제는 수동 CLARITY의 이용에 의해 회피될 수 있으나(Tomer et al., 2014), 투명화의 느린 속도는 상기 기술을 규모 확장 또는 전신 맵핑에 대해 실행할 수 없게 만든다.
- [0070] 시종일관 순한 세제 및 형광 비퀀칭 시약을 여전히 이용하면서 전체 유기체를 신속하게 투명화시키기 위한 목적으로, CLARITY의 기본 원리에 기반하나, 수동 확산을 통하는 것보다 신속한 투명화를 유지시키면서 ETC에 대한 필요성을 회피하려는 목적으로 PARS가 개발되었다. 첫째로, 비스아크릴아미드를 제거하고, 세제 농도를 8% SDS(PACT 시약)로 증가시킴으로써 수동 CLARITY에 대한 투명화 시약을 변형시켰다. 신속한 지질 추출을 유도하기 위해 CLARITY에 의해 이용되는 전기영동 힘을 관류-기반 압력 구배로 대체하도록 조직 투명화 단계를 재설계하였다. 온전한 조직 혈관구조 전체에 걸친 PACT 시약의 조절 유동은 전체-마우스 및 전체-랫트 뇌를 1-2주 이내에 투명하게 되도록 하면서 2-3일 이내에 가장 말초의 기관을 광학적으로 투명한 조직으로 전환시킨다. 또한, 제자리 투명화의 자체 포함된 특성은 또한 단량체 주입 및 지질 제거 동안 조직 팽창을 감소시켰다.
- [0071] PARS는 높은 표현형 내용으로 전체-기관 및 전체 유기체 맵핑을 가능케 한다. 이를 염두에 두고, 큰 조직 블록의 신속한 저해상도 스캐닝은 연구자들을 smFISH를 포함하는 느린 높은 표현형 내용 분석에 어울리는 제한되는 영역으로 유도할 수 있으며; 형광 마커를 장기간 보존시키는 방법이 이와 관련하여 특히 유용하다. PACT 및 PARS 방법 둘 모두는 확장 가능하고, 본래의 CLARITY 처리에 비해 비용 효과적이고, 다른 모델 유기체 또는 인간 조직으로 변경 가능한 것으로 보인다. 확실히, PARS는 설치류에서 심장 관류를 이용하여 표시되었으나, 전체적 방법은 분리된 인간 조직을 포함하는 더 큰 고등한 종의 포유동물에서의 전체-기관 관류와 같이 관류 경로를 발생시키기 위해 충분히 큰 혈관이 이용가능한 경우에도 적용될 수 있다. PARS는 조직 손상 없이 증가된 속도의 투명화 및 감소된 팽창을 달성하나(표 1), 상기 방법의 또 다른 유의한 강점은 이의 확장가능성에 있다. 데이터는, 예를 들어, PARS가 전신 전달 후에 다수의 기관에서 세포 수준에서 AAV-매개 형질도입을 평가하기 위해 이용될 수 있음을 입증한다.
- [0072] 개별적 조직을 섹션화시킬 필요성을 제거함으로써, PARS 접근법은 관심 세포 유형에서의 최적 발현을 위해 다수의 AAV 혈청형 및/또는 유전자 조절 요소를 스크리닝할 수고를 신속히 처리할 수 있다. 스크리닝 처리량 및 속도를 개선시키는 것에 더하여, PARS-기반 전신 방법은 또한 언더샘플링 오류(undersampling error)로 인해 표적 조직에서 AAV 형질도입을 과소평가할 위험을 없앨 수 있다. 유사하게, PARS는 이의 표적 전체-기관에서 말초 신경의 이해를 개선시킬 수 있다. 미주 신경에 대해서와 같이(George et al., 2000) 복잡한 긴-범위의 섬유 다발의 정확한 맵은 현존하는 요법에서 개선을 제공하는 것을 도울 수 있거나, 생물전자공학 약물(Famm, 2013)에 대해서와 같이 전적으로 새로운 치료 전략의 개발에 박차를 가할 수 있다. PARS는 또한 뇌-대-신체 상호연결,

표적외 및 표적내 작용제에 대한 전신 스크리닝 실험, 및 중앙 세포 또는 줄기 세포와 같은 희박한 요소에 대한 전체-기관 맵핑에서의 생물학적 작업을 도울 수 있다. 마지막으로, PARS 방법은 세포-충전 내골격 구조와 양립된다. PARS와 CLARITY에 대한 진단계인 TEMPEST(Deisseroth and Gradinaru, 2014)를 조합시킴으로써, 관심 집단 내에서 오래 지속되는 케라틴 섬유(형태의 충실한 청사진을 유지하면서 세포 자신보다 오래 지속됨)의 생체 내 발현은 뇌 전체에 걸친 정확한 사후 정량 및 장기-변성된 세포의 맵핑을 도울 수 있다.

[0073] 본원에 도입된 방법은 고유의 순환계를 이용함으로써 전체 유기체에 대한 조직 투명화 및 표현형분석을 확장시키기 위해 CLARITY에서의 종래 작업에 기반하여 확립된다. 혈관 네트워크는 균일하지 않아, 균일하지 않은 살포 유동을 발생시킴으로써, 관심 기관은 다양한 속도로 투명해질 것이다.

[0074] 혈액뇌장벽은 말초에 비해 뇌에 대한 항체(150 kDa)와 같은 특히 큰 분자의 효과적인 관류-기반 수송에 난제를 제공할 수 있다. 어느 한 특정 이론으로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 관류 효율을 개선시키기 위해, 한 해법은 면역표지화를 위한 더 작은 항체 스캐폴드를 개발(또는 이미 이용가능한 경우 이용)하는 것일 수 있으며; 이들은 면역글로불린의 단편-항원-결합 포맷(Fab ~50 kDa), 및 카멜리드 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체인 나노바디를 포함하며, 이의 더 작은 크기(~12-15 kDa)는 조직 투과성을 촉진시킨다(Harmsen and De Haard, 2007).

[0075] 개선된 영상화 플랫폼은 또한 최근의 조직 투명화 작업을 보완할 것이다(Becker et al., 2012; Chung et al., 2013; Dodt et al., 2007; Erturk et al., 2012; Erturk and Bradke, 2013; Hama et al., 2011; Ke et al., 2013a; Kuwajima et al., 2013b; Susaki et al., 2014a). 두꺼운 투명화된 조직에서 세포 및 세포하 정보를 획득하기 위해, 높은 개구수를 여전히 유지하면서 굴절 지수 매칭된 긴-작업 거리의 대물렌즈를 이용하는 것이 중요하다. 스캐닝 속도는 투명화된 조직 블록이 완전히 이미지화되기에 많은 날이 걸리게 하는 추가의 장벽이며, 공명 스캐너 또는 라이트-시트 현미경검사(Tomer et al., 2014)가 고해상도 데이터를 유지하면서 처리를 촉진시킬 수 있다.

[0076] 뇌와 말초 기관 사이의 연결고리에 대한 관심이 증가하는 상황에서(Birmingham et al., 2014), 뇌와 말초 기관 사이의 구고적 연결이 온전하게 남아있으면서 전신의 세그먼트화되지 않은 영상을 갖는 것이 중요해질 것이다. PARS 및 가능한 기술(나노바디, 영상화 플랫폼)의 개발을 통해, 뇌 커넥톰을 생성시키는 신경과학자의 우선적인 목적을 도울 뿐만 아니라 뇌-대-신체-및-등 커넥톰(brain-to-body-and-back connectome)의 설명 뿐만 아니라 건강하거나 병든 신체에서 그 밖의 모든 기관계의 표현형분석을 돕는 것이 가능해질 것이다.

[0077] 추가 적용

[0078] 당업자는 기관 팽창을 구축시키는 다수의 방식이 존재함을 용이하게 인지할 것이다. 단지 비제한적인 예로서, 3D 프린팅에 의해 용이하게 생성될 수 있는 바와 같이 슬롯화되거나 망 성형된 챔버 내에 조직을 넣음으로써 기관 팽창을 구축시키는 것은 하이브리드 PACT-PARS 투명화 절차의 수행을 가능케 할 수 있다.

[0079] 또한, 상기 챔버가 커버-슬립 등급의 유리 또는 광학 섬유로 제조되는 경우(Willis et al., 2012), 영상화는 봉입물을 완전히 제거할 필요가 없이 진행될 수 있어, 샘플이 이의 본래의 형태 및 크기를 유지하는 것을 가능케 할 수 있다. 확실히, PARS는 설치류에서 심장 관류를 이용하여 본원에 기재되었으나, 전체적 방법은 분리된 인간 조직을 포함하는 더 큰 고등한 종의 포유동물에서의 전체-기관 관류와 같이 관류 경로를 발생시키기 위해 충분히 큰 혈관이 이용가능한 경우에도 적용될 수 있다.

[0080] 상기 기술의 추가 적용은 바이러스 전파 맵핑 및 말초 신경계 맵핑을 포함한다.

[0081] 또 다른 중요한 고려사항은 PARS 챔버가 신속한 병행 투명화/표지화를 위해 필요한 만큼 많은 배수로 복제될 수 있다는 점이다.

[0082] PARS를 위한 프로브의 개발

[0083] 관류 효율을 개선시키기 위해, 한 해법은 면역표지화를 위한 더 작은 항체 스캐폴드를 개발(또는 이미 이용가능한 경우 이용)하는 것일 것이며; 이들은 면역글로불린의 단편-항원-결합 포맷(Fab ~50 kDa), 및 카멜리드 항체로부터 유래된 단일 도메인 항체인 나노바디(~12-15 kDa)를 포함하며, 이의 더 작은 크기는 조직 투과성을 촉진시킨다(Harmsen and De Haard, 2007). 생물학적 적용을 위한 관련된 인간 예피토프에 대한 큰 나노바디 라이브러리를 확립하기 위한 연구자의 현재의 작업은, 드문 표적의 민감한 표지화에 연구를 의존하는 과학자에 의해 CLARITY, PARS, CUBIC, 및 다른 유사한 방법의 채택을 장려할 것이다. 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 조성물과 함께 모노바디(monobody)가 이용될 수 있음을 추가로 인지할 것이다.

- [0084] PARS 및 PACT에 의해 독특하게 가능해지는 추가의 생물의학 적용
- [0085] PARS는 이들의 표적 기관에서의 말초 신경의 우리의 이해를 개선시킬 뿐만 아니라 뇌-신체 상호연결의 맵핑을 돕는 것을 가능케 할 수 있다. 전자와 관련하여, 미주 신경(George et al., 2000)에 대해서와 같은 복잡한 긴-범위의 섬유 다발의 정확한 맵은 현존하는 요법에서 개선을 제공하는 것을 도울 수 있거나, 생물전자공학 약물(Famm, 2013)에 대해서와 같이 전적으로 새로운 치료 전략의 개발에 박차를 가할 수 있다. 본원에서, 잠재적 적용은 신경 회로가 말초 기관에서의 동통을 검출하는 방식(Iyer et al., 2014) 또는 심지어 말초에서 압 결과를 조절하는 방식(Magnon et al., 2013)의 연구를 포함한다. 후자와 관련하여, 신경 활성화는 또한 말초 가소성 및 운동 기능에 대한 큰 효과를 가질 수 있다. 예를 들어, 전운동피질 자극은 신경소세포생성(oligodendrogenesis) 및 미엘린화를 촉발시키는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 신경가소성(nerveplasticity) 및 신경계가소성(neuroplasticity)은 상응하는 수족의 개선된 운동 기능과 상관 관계가 있다(Gibson et al., 2014). 탈수초 장애(다발경화증, 또는 외상성 뇌손상 후의 병변) 또는 정신행동학적 병리(자폐증)와 같은 확인 가능한 신경해부학적 병리를 특징으로 하는 질병에서, 말초 신경 탈수초(Zoukos et al., 1992) 또는 말초 면역활성화(Hsiao et al., 2012; Hsiao and Patterson, 2011; Lucas et al., 2006; Zoukos et al., 1992) 각각과 같은 질병의 말초 증상을 패닝(panning)하기 위해 PARS가 이용될 수 있다. 신경발달과 관련된 뇌-신체 상호연결의 다른 최근의 설명은 태반-태아 연결(Hsiao and Patterson, 2012), 뇌-장 축, 및 자폐(Hsiao et al., 2013) 또는 불안(Foster and McVey Neufeld, 2013) 거동에 대한 장 미생물총(Flight, 2014)이다.
- [0086] 마찬가지로, 많은 말초 해부학적 맵은 전체-기관 프레임워크 내에서 미세-규모 해상도가 결핍되어 있다. 예를 들어, 균막의 형성이 중이 감염(Hall-Stoodley et al., 2006) 및 카테터-관련 요로 감염(Cole et al., 2014)과 같은 인간에서의 많은 만성 감염과 관련된 것이 연구에서 밝혀졌으나, 주위의 두꺼운 세포의 중합체 물질 및 균막 내의 다양한 층의 높은 복잡성으로 인해 조직 내의 균막의 구조를 영상화시키기 위한 방법은 여전히 제한되어 있다(Ramsey and Wozniak, 2005; Tan et al., 2014). 상기 영상화 능력은 매우 이로운 것이나, 항생제가 인체에서의 해로운 박테리아 감염을 제거하기 위해 균막으로 용이하게 투과할 수 없다는 보고가 제공되어 있다(George et al., 2009; Jain et al., 2008). 또한, 말초 조직의 고해상도 구조 정보는 소장 음화에 위치한 장 줄기 세포의 미세환경 신호전달 조절에 대해서와 같이 때때로 조직 내에 드물게 엠베딩되는 줄기 세포 미세환경을 연구하는 것을 또한 돕는다(Bach et al., 2000; Barry et al., 2013).
- [0087] 중요하게는, PARS는 또한 표적외 및 표적내 결합에 대한 치료제의 전신 스크리닝, 및 약동학-약역학(PK/PD) 특성의 정성적 결정을 위한 방법으로서 투여된 작용제의 생체분포 영상화를 도울 수 있다. 비슷하게, 본원에 제시된 데이터는 PARS가 전신 전달 후에 다수의 기관에서 세포 수준에서 AAV-매개 형질도입을 평가하는데 이용될 수 있음을 입증한다. 개별적 조직을 제조하고 선택화시킬 필요를 제거함으로써, PARS 접근법은 관심 세포 유형에서의 최적 발현을 위해 다수의 AAV 혈청형 및/또는 유전자 조절 요소를 스크리닝할 수고를 신속히 처리할 수 있다. 또한, PARS를 이용한 전체 기관 스크리닝은 상기 PK/PD 스크리닝의 처리량을 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라 언더샘플링 오류로 인해 표적 조직에서 AAV 형질도입을 과소평가할 위험을 없앨 수 있다.
- [0088] 전체-기관을 투명화하고 신속하게 표현형검사하는 능력은 또한 생물의학 연구를 진척시킬 수 있고, 조직 병리학에서의 변화를 모니터링함으로써 질병 진행의 연구를 도울 수 있다. PARS의 의학적으로 관련된 용도는 질병 또는 발달 상태 동안 발생하는 점진적 전신 생리학적 변화를 연구하는 것과 같은 병리학적 또는 진단학적 목적을 위한 전체-기관 및 전체-유기체 맵핑, 또는 중앙 구조 맵핑 각각에 대한 이의 적용에 있다(Birmingham et al., 2014). 다양한 3D 중앙 영상화 플랫폼이 암 진행을 추적하기 위해 보고되었다(Colomba and Ridley, 2014). 이들 새로운 플랫폼 및 의학에서의 해부학적 병리의 증명된 진단학적 유용성(예를 들어, 중앙 경계 결정에서의 유용성(Fukamachi et al., 2010))에도 불구하고, 새로운 생검 샘플 및 동결된 생검 샘플의 통상적인 조직학적 처리 및 선택화가 비용 및 시간 구속으로 인해 표준으로 남아 있다. 대부분의 예에서, 단지 소량의 선택이 시각화되며, 이는 중요한 특징의 언더샘플링 및 잠재적 오진을 발생시킬 수 있다(Zarbo et al., 2005). 상기 강조된 바와 같이, 조직 검체의 PACT 또는 PARS-기반 투명화는 이들 위험을 없애는 것을 도울 수 있다. 또한, PARS는 동물 모델에서의 전체-중앙 형태, 특히 조직-수준 혈관화, 중앙 전체에 걸친 세포 및 세포하 세부사항에서의 이질성(예를 들어, 경계 대 코어), 및 중요하게는 전체 유기체에 걸친 전이성 병터의 연구를 가능케 할 수 있다. 중앙 투명화를 위한 방법(3DISCO (Erturk et al., 2012b))이 이전에 기재되었으나, RIMS-2에서의 형광 마커에 대한 연장된 수명 및 전체-유기체로의 용이한 PARS 규모확장성은 PARS를 바람직한 대안으로 만든다(표 1).
- [0089] 최종적으로, PARS 방법은 세포-충전 내골격 구조와 양립된다. 예를 들어, 현재의 신경변성 연구(파킨슨병, 알츠하이머병, 간질, 뇌졸중)에서의 한 장애는 설치류 모델에서 변성된 세포의 분포를 정확하게 맵핑하기의 어려

음인데, 이는 죽은지 오래되고 대식세포에 의해 청소되는 것을 시각화시키는 것이 불가능하기 때문이다. 또한, 제거 실험은 규정된 신경세포 집단(치밀하거나 드물게 분포됨)과 뇌 활성 및 거동 사이의 인과 관계를 연구하기 위한 대중적인 방식이며; 상기 세포를 손상시키기 위해 독소가 이용되나, 정량 후는 좀처럼 정확하지 않은데, 이는 위약 처리된 뇌에 대한 비교에 의존하고, 제거된 세포의 정확한 분포를 아는 것이 불가능하기 때문이다. PARS와 CLARITY에 대한 전단계인 TEMPEST(Deisseroth and Gradinaru, 2014)를 조합시킴으로써, 관심 집단 내에서 오래 지속되는 케라틴 섬유(형태의 충실한 청사진을 유지하면서 세포 자신보다 오래 지속됨)의 생체내 발현은 뇌 전체에 걸친 정확한 사후 정량 및 장기-변성된 세포의 맵핑을 도울 수 있다.

[0090] 실시예 3

[0091] 방법

[0092] PACT 투명화

[0093] 4% 파라포름알데하이드(PFA)-고정된 조직 섹션을 0.25% 광개시제 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판] 디하이드로클로라이드(VA-044, Wako Chemicals USA, Inc.)가 보충된 하이드로겔 단량체 용액 A4P0(PBS 중 4% 아크릴아미드)에서 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. A4P0-주입된 샘플을 1-5분 동안 질소로 탈기시킨 후, 37°C에서 2-3시간 동안 인큐베이션하여 조직-하이드로겔 하이브리드화를 개시시켰다. 간단한 PBS 세척을 통한 과량의 하이드로겔 제거 후, 조직-하이드로겔 매트릭스를 0.1M PBS(pH 7.5) 중 8% SDS를 함유하는 50 mL 코니컬 튜브로 옮기고, 조직 크기에 따라, 진탕과 함께 37°C에서 2-5일 동안 인큐베이션하였다. 면역염색을 위해, 1-3 mm 두께의 PACT-처리된 샘플을 하루 과정에 걸쳐 4-5회 완충액 교환으로 PBS 중에서 세척한 후, 3-7일 동안 소분자 염료 또는 일차 항체 후 형광 컨주게이션된 이차 항체(1:200-400, 2% 일반 당나귀 혈청, 0.1% TritonX-100 및 0.01% 소듐 아지드를 함유하는 PBS 중)를 함유하는 완충액 또는 1-3일 동안 소분자 염료를 갖는 완충액으로 옮겼다. 항체 또는 소분자 염료 용액은 매일 대체되는 것을 필요로 하였다. 결합되지 않은 항체를 이전과 같이 PBS 세척을 통해 제거한 후, 샘플을 2-5일 동안 이차 항체(Fab 단편 이차 항체가 바람직함, 1:200-400)와 함께 인큐베이션한 후, PBS 또는 인산염 완충액 (PB) 중에서 1일 동안 세척하고, 영상화 매질(RIMS) 중에서 인큐베이션하였다. 모든 염색 및 마운팅 단계는 가벼운 진탕과 함께 실온에서 수행하였다.

[0094] 하이드로겔 단량체 특성

[0095] 특정한 하이드로겔 조성물이 본원에서 수행된 실험에서 사용되는 것으로 보고되었다. 고정제/하이드로겔 조성물은 임의의 통상적인 하이드로겔 서브유닛, 비제한적인 예로, 폴리(에틸렌 글리콜) 및 이의 유도체(예를 들어, PEG-디아크릴레이트(PEG-DA), PEG-RGD), 다중지방족 폴리우레탄, 폴리에테르 폴리우레탄, 폴리에스테르 폴리우레탄, 폴리에틸렌 공중합체, 폴리아미드, 폴리비닐 알콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리테트라메틸렌 옥사이드, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리아크릴아미드, 폴리(하이드록시에틸 아크릴레이트), 및 폴리(하이드록시에틸 메타크릴레이트), 콜라겐, 히알루론산, 키토산, 텍스트란, 아가로스, 젤라틴, 알기네이트, 단백질 중합체, 메틸셀룰로스 등을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 하이드로겔 서브유닛은 하이드로겔에 특정한 특성을 추가하도록 변형될 수 있고; 예를 들어, 분해를 유도하거나(예를 들어, West and Hubbell, 1999, *Macromolecules*, 32:241 참조), 세포 부착을 변형시키기 위해(예를 들어, Hem and Hubbell, 1998, *J. Biomed. Mater. Res.*, 39:266 참조) 펩티드 서열이 통합될 수 있다. 친수성 나노입자, 예를 들어, 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PLG), 폴리(락틱-코-글리콜산)(PLGA), 폴리스티렌, 폴리(디메틸실록산)(PDMS) 등과 같은 작용제가 패턴성을 유지하면서 하이드로겔의 투과성을 개선시키기 위해 이용될 수 있다(예를 들어, US Patent Application No. 13/065,030; Lee W. et al. 2010 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 20709-20714 참조). PEG, 분해가능한 PEO, 폴리(락트산)(PLA), 및 다른 유사한 물질의 블록 공중합체와 같은 물질이 하이드로겔에 특정한 특성을 추가하기 위해 이용될 수 있다(예를 들어, Huh and Bae, 1999, *Polymer*, 40:6147 참조). 가교제(예를 들어, 비스-아크릴아미드, 디아지린 등) 및 개시제(예를 들어, 아조비스이소부티로니트릴(AIBN), 리보플라빈, L-아르기닌 등)이 이후의 중합 단계에서 상호작용하는 거대분자 사이의 공유 결합을 촉진하기 위해 포함될 수 있다.

[0096] 하이드로겔 네트워크 특성

[0097] 통상적으로, 하이드로겔 서브유닛(들) 및 개질제의 농도 및 분자량은 선택된 중합체 및 중합될 하이드로겔 네트워크의 요망되는 특징, 예를 들어, 포어 크기, 팽창 특성, 전도도, 탄성/강성도(영 계수), 생물분해성 지수 등에 좌우될 것이다. 예를 들어, 하이드로겔이 거대분자, 예를 들어, 단백질, 핵산, 또는 하기에 더 상세히 기재되는 바와 같은 소분자의 검체로의 통과를 가능케 하기에 충분한 크기의 포어를 포함하는 것이 요망될 수 있다. 당업자는 포어 크기가 일반적으로 하이드로겔 서브유닛의 농도 증가에 따라 감소하고, 일반적으로 하이드로겔

서브유닛 대 가교제의 비가 증가함에 따라 증가하는 것을 인지할 것이며, 상기 거대분자의 통과를 가능케 하는 하이드로겔 서브유닛의 농도를 포함하는 고정제/하이드로겔 조성물을 제조할 것이다. 또 다른 예로서, 하이드로겔이 특정 경직성, 예를 들어, 엠베딩된 검체를 취급하는데 있어서 안정성을 제공하는 경직성, 예를 들어, 약 2-70kN/m², 예를 들어, 약 2 kN/m², 약 4 kN/m², 약 7 kN/m², 약 10 kN/m², 약 15 kN/m², 약 20 kN/m², 약 40 kN/m², 통상적으로 약 70 kN/m² 이하의 영 계수를 갖는 것이 요망될 수 있다. 당업자는 하이드로겔 네트워크의 탄성이 중합체의 분지, 하이드로겔 서브유닛의 농도, 및 가교의 정도를 포함하는 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있음을 인지할 것이고, 상기 요망되는 탄성을 제공하는 하이드로겔 서브유닛의 농도를 포함하는 고정제/하이드로겔 조성물을 제조할 것이다.

[0098] 하이드로겔 단량체

[0099] 고정제/하이드로겔 조성물은 약 1% w/v 내지 약 20% w/v, 예를 들어, 약 2% 내지 약 15%, 약 3% 내지 약 10%, 약 4% 내지 약 8% 농도의 아크릴아미드 단량체, 및 약 0.01% 내지 약 0.075%, 예를 들어, 0.01%, 0.02%, 0.025%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 또는 0.075%의 범위의 비스-아크릴아미드 가교제의 농도를 포함할 수 있거나; 예를 들어, 고정제/하이드로겔 조성물은 약 1% w/w 내지 약 50% w/w, 예를 들어, 1% 이상, 5% 이상, 7.5% 이상, 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 및 일반적으로 약 50% 이하의 범위의 농도로 적어도 약 2.5K 내지 약 50K, 예를 들어, 2.5K 이상, 3.5K 이상, 5K 이상, 7.5K 이상, 10K 이상, 15K 이상, 20K 이상, 통상적으로 약 50K 이하의 범위의 분자량을 갖는 PEG 프리폴리머를 포함할 수 있다. 요망되는 하이드로겔 특성을 제공하는 하이드로겔 서브유닛 및 개질제의 농도는 당 분야의 방법 또는 하기 실시예에 기재된 바와 같은 방법에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0100] 고정제/하이드로겔 용액은 임의의 편리한 방법, 예를 들어, 관류, 주입, 점적주입, 흡수, 도포, 침지/침수 등에 의해 검체로 전달될 수 있다. 검체는 통상적으로 15분 이상, 예를 들어, 30분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 12시간 이상, 일부 예에서, 16시간 이상, 20시간 이상, 또는 24시간 이상 동안 하이드로겔의 존재하에서 고정될 것이다.

[0101] 하이드로겔 중합

[0102] 검체의 고정 후, 하이드로겔 서브유닛은 중합되고, 즉, 공유적 또는 물리적으로 가교되어, 하이드로겔 네트워크를 형성할 수 있다. 중합은 열 가교, 화학 가교, 물리적 가교, 이온성 가교, 광-가교, 방사선조사 가교(예를 들어, x-선, 전자 빔) 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 임의의 방법에 의해 이루어질 수 있고, 당 분야에서 사용되는 하이드로겔의 유형 및 당 분야의 지식을 기초로 하여 선택될 수 있다. 예를 들어, 중합되지 않거나 부분적으로 중합된 수지와 특정 가교 화합물의 혼합은 가교를 형성하는 화학 반응을 발생시킨다. 가교는 방사선원에 대한 노출, 예를 들어, 전자 빔 노출, 감마-방사선, 또는 UV 광에 대한 노출을 통해 일반적으로 열가소성이 되는 물질에서 유도될 수 있으며; 예를 들어, 전자 빔 처리는 가교된 폴리에틸렌의 C 유형을 중합시키는데 이용된다. 다른 유형의 가교된 폴리에틸렌은 압출(타입 A) 동안 과산화물의 첨가 또는 압출 동안 가교제(예를 들어, 비닐실란) 및 촉매의 첨가 및 이후 압출후 경화를 수행함으로써 제조된다.

[0103] 자유-라디칼 스캐빈저를 통한 중합의 억제

[0104] 많은 중합체는 통상적으로 대기 산소에 노출되는 경우 산화적 가교를 겪는다. 일부 경우에, 반응은 요망되는 것보다 더 신속하며, 따라서 중합 반응은 산화적 가교의 형성을 늦추기 위해 항산화제의 사용을 수반할 수 있다. 다른 경우에, 예를 들어, 산화에 의한 가교의 더욱 신속한 형성이 요망되는 경우, 처리의 속도를 높이기 위해 산화제, 예를 들어, 과산화수소가 이용될 수 있다. 중합을 위한 시간의 길이는 사용되는 하이드로겔 서브유닛의 유형 및 선택된 중합 방법에 좌우될 것이나, 통상적으로 약 15분 내지 약 48시간, 예를 들어, 15분 이상, 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 6시간 이상, 12시간 이상, 16시간 이상, 24시간 이상, 또는 일부 예에서, 48시간일 것이다. 최적 시간 및 시약의 조합은 당업자에게 공지되어 있을 것이거나, 경험적으로 또는 임의의 수의 공적으로 이용가능한 자원(예를 들어, piercenet.com의 월드 와이드 웹 상; 또한, Macroporous Polymers: Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications. Edited by Bo Mattiasson, Ashok Kumar, and Igor Yu. Galeaev. CRC Press 2010; 및 Crosslinking Reagents Technical Handbook, Pierce Biotechnology, Inc., 2006 참조)으로부터 결정될 수 있다.

[0105] 투명화

[0106] 중합시, 하이드로겔-엠베딩된(즉, 하이드로겔-하이브리드화된) 검체가 투명화될 수 있다. 검체를 "투명화"하는 것은, 검체가 광에 대해 실질적으로 투과성, 즉, 투명하게 만드는 것을 의미한다. 즉, 검체를 조명하기 위해

사용되는 시각(즉, 백색) 광, 자외선 또는 적외선의 약 70% 이상은 검체를 통해 통과할 것이며, 세포 내의 단지 선택된 세포 성분을 조명할 것이며, 예를 들어, 광의 75% 이상, 광의 80% 이상, 광의 85% 이상, 일부 예에서, 광의 90% 이상, 광의 95% 이상, 광의 98% 이상, 예를 들어, 광의 100%가 검체를 통해 통과할 것이다. 검체의 광학 특성에서의 상기 변화는 조직 내부의 세포 및 세포하 구조의 시각화를 제공한다.

[0107] 검체로부터 세포 성분, 예를 들어, 지질을 유도하거나, 검체로부터 세포 성분, 예를 들어, 지질을 채취하거나, 검체 내에서 세포 성분, 예를 들어, 지질을 파괴, 즉, 용해시키는 임의의 처리, 비제한적인 예로, 유기 용매, 예를 들어, 자일렌, 에탄올 또는 메탄올에 대한 노출, 세제, 예를 들어, 사포닌, Triton X-100 및 Tween-20에 대한 노출, 이온성 계면활성제, 예를 들어, 소듐 도데실 설페이트 (SDS)에 대한 노출 - 특히 분원에 기재된 바와 같은, 전기영동, 수력학적 압력, 초음파 진동, 용질 대조, 마이크로파 방사선, 혈관 순환 등이 검체를 투명화시키기 위해 이용될 수 있다. 일부 예에서, 투명화는 형광 단백질을 켜지시키지 않는 용매를 이용하여 수행된다. 형광 단백질을 켜지시키는 것으로 공지된 유기 용매의 예는 테트라하이드로푸란, 헥산, 벤질알콜/벤질벤조에이트(BABB), 및 디벤질 에테르를 포함한다. 따라서, 다양한 단백질의 형광을 보존시키기 위해, 일부 구체예에서, 투명화는 상기 나열된 것이 아닌 용매를 이용하여 수행되고, 예를 들어, 비-유기 용매를 이용하여 수행된다.

[0108] RIMS 영상화 매질(RI 1.46)

[0109] NaOH를 이용하여 pH를 7.5로 만든 0.1% tween-20 및 0.01% 소듐 아지드를 갖는 30ml의 0.02M PB 중 40 g의 Sigma D2158(Histodenz)은 88% Histodenz w/v의 최종 농도를 발생시킨다. 샘플은 투명해질 때까지(PACT 샘플에 대해 ~1일, PARS 투명화된 뇌에 대해 1주 이하) RIMS에서 인큐베이션된 후, 새로운 RIMS에 마운팅된다.

[0110] smFISH

[0111] 100 μ m PACT 섹션을 공개된 프로토콜에 따라 에탄올-투과화시키고, B-액틴에 대한 24개의 Alexa 594-표지된 20 머 올리고 프로브로 표지화시키고(37°C에서 밤새 인큐베이션), 세척하고, Slowfade Gold + DAPI로 커버슬립을 덮었다(Buxbaum et al., 2014; Lyubimova et al., 2013). 3의 반지름을 갖는 가우스 라플라시안 필터링을 적용시켜 투명화된 샘플 및 투명화되지 않은 샘플 둘 모두에서 전사물을 시각화시켰다.

[0112] PARS 프로토콜

[0113] 4% PFA(PBS 중, pH 7.4)를 이용한 표준 심장 관류 직후, 고정된 설치류를 연동 펌프를 통해 설치류 혈관구조를 통해 연속적으로(1 ml/분) 모든 이후의 PACT 및 면역표지화 시약(상기 기재된 바와 같음)을 재순환시키는 관류 챔버(도 10a)로 옮겼다. 피딩 니들에 챔버를 연결시킨 관류 튜빙을 좌심실을 통해 대동맥으로 삽입하고, 적소에 느슨하게 봉합하였다. 설치류를 1시간 동안 4% PFA로 후고정시킨 후, 1시간 동안 PBS로 관류-세척하였다. A4PO 단량체를 밤새 혈관구조를 통해 순환시킨 후, 2시간 PBS 관류 세척하였다. 중합 전 관류 라인을 분리함이 없이, 관류 챔버를 집록 백에 두고(도 10a), 설치류와 함께 챔버를 함유하는 백을 질소 가스 하에서 2분 동안 탈기시켰다. 2-3시간 동안 37°C에서 PBS 중 200mL의 0.25% VA-044 개시제의 관류-재순환을 통해 중합을 개시시켰다. 전신을 37-42°C에서 PBS, pH 7.5 중 8% SDS로 2주 이하의 관류 후, 2-3일에 걸친 광범위한 PBS 관류-세척을 통해 투명화시켰다. 항체 및 소분자 염료(PACT에서 상기 기재된 바와 같음)를 이후 3일 관류 및 1일 세척을 통해 전달하였다. 뇌 또는 척수 투명화의 PARS-CSF 변화를 위해(도 3a-b), 경심-고정된 설치류의 목을 베고, 경막하 삽입관을 관심 영역 위에 삽입하고, 두개골에 시멘트로 접합시켰다. 모든 PACT 시약을 1ml/분으로 PARS와 동일한 순서 및 기간으로 전달하였다.

[0114] AAV 생성 및 전신 전달

[0115] AAV9 또는 AAV9 변이체 캡시드 AAV2/9BD1로 패키징된 단일 가닥 ssAAV-CAG-eGFP 벡터를 기재된 바와 같이 생성시키고, 정제하였다(Lock et al., 2010). AAV2/9BD1 캡시드는 간 형질도입을 감소시키기 위해 특히 N498Y 돌연변이로 AAV2/9(U. Penn)로부터 변형시켰다(Pulicherla et al., 2011). 어느 한 바이러스의 1×10^{12} 개의 벡터 유전체(vg)를 마우스에 정맥내 전달하고, 조직을 천연 eGFP 형광에 대해 PARS에 의해 6개월 후에 평가하였다.

[0116] 형광현미경검사

[0117] 투명화된 조직 샘플을 샘플 두께에 따라 0.5 mm - 7 mm의 스페이서(iSpacer, SunJin Lab Co.; Silicone Isolator, Electron Microscopy Sciences, PA)를 이용하여 실온에서 RIMS에 마운팅시키고, 커버슬립을 덮었다. 도 3b에 대해, 샘플을 Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR 대물렌즈(작업 거리, w.d. 6.0 mm)를 갖는 Leica TCS SP8 2-광자 현미경을 이용하여 Leica Microsystems에 의해 이미지화시켰다. 다른 이미지를 Fluor 5x/0.25

M27 건성 대물렌즈(w.d. 12.5 mm), Plan-Apochromat 10x/0.45 M27 공기 대물렌즈(w.d 2.0 mm), LD SC Plan-Apochromat 20x/1.0 Corr M32 85mm 스케일-침지 대물렌즈(w.d. 5.6 mm), 또는 LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈(w.d 0.57 mm)를 갖는 Zeiss LSM 780 현미경을 이용하여 찍었다. 이미지 재구성을 Imaris 영상화 소프트웨어(Bitplane)를 이용하여 수행하였다. 영상화 후, 샘플을 실온에서 RIMS에 저장하였다.

[0118] 연장된 보충 절차 & 추가 시약 및 완충액

[0119] 표 1 - 최근 10년의 주요 투명화 프로토콜의 방법론적 고찰

기술	전뇌에 대한 투명화 시간	완전한 투명도	형광 켄칭	확인된 조직	분야에 대한 유의한 기여	결점
<i>BABB</i> , <i>THF</i> , <i>DBE</i> (Becker et al., 2012; Dodt et al., 2007)	수시간-수일	있음, 그러나 조직 수축	있음(Ertürk et al., 2012; Ke et al., 2013)	설치류 뇌, 척수, 말초 조직	첫번째 투명화 시약	가혹한 시약(Ke et al., 2013), IHC
<i>ClearT</i> (Kuwajima et al., 2013)	수일	없음	없음-부분적(Ke et al., 2013)	설치류 뇌 및 배아	BABB 보다 덜한 켄칭; 신규 시약	IHC: 120 um를 통해서만 면역표지화
<i>Scale</i> (<i>A2</i> , <i>U2</i>)(Hama et al., 2011)	수주-수개월 (가장 느림)	있음, 그러나 조직 팽창(Chung et al., 2013; Ke et al., 2013; Kuwajima et al., 2013)	없음-최소(Ke et al., 2013; Kuwajima et al., 2013)	마우스 뇌, 배아(Hama et al., 2011)	켄칭이 없는 투명도; IHC/F	느림; 조직 변형; 투명화와 함께 잠재적 단백질 손실(Ke et al., 2013)
<i>3DISCO</i> (Ertürk et al., 2012; Ertürk and Bradke, 2013)	< 1주	있음	없음, 그러나 수일 이내에 신호 감소 w(Ertürk et al., 2012; Ertürk and Bradke, 2013)	말초/중추 기관, 배아, 종양(Ertürk and Bradke, 2013); 중추(Ertürk et al.,	신속성과 투명화된 조직의 품질 사이의 균형; 영상화 프로토콜	즉시의 샘플 영상화를 필요로 함; IHC-매우 제한됨

[0120]

				2012) 및 말초(Jung et al., 2014) 신경		
CLARITY(Chung and Deisseroth, 2013; Chung et al., 2013; Kim et al., 2013)	10 일	있음	없음	설치류, 인간 및 비-인간 영장류 뇌, 척수, 제브라피쉬(Zhang et al., 2014)	하이드로겔-임베딩; 정확하게 수행되는 경우 최고 조직 품질; IHC/F	ETC 어려움, 맞춤형 장치, 고비용(Chung et al., 2013)
Advanced CLARITY(Tomer et al., 2014; Zhang et al., 2014)	3 주	있음	없음	전체 마우스 뇌	ETC 없음 - 수동 열 CLARITY, COLM, CLARITY 대물렌즈, 신속한 영상화 프로토콜	COLM 장치를 필요로 함
SeeDB(Ke et al., 2013; Ke and Imai, 2014)	수일 (가장 빠름)	없음	없음	어린 설치류 뇌(Ke et al., 2013)	조직 변형 없음, 신속함	조직 갈변화, 불완전한 투명화, IHC
CUBIC(Susaki et al., 2014)	2 주	대부분 있음	없음	설치류 및 비-인간 영장류 뇌	CUBIC 정보학, 최적화된 scale(Susaki et al., 2014)	뇌 단독; 투명화 동안 잠재적 단백질 손실
PACT, PARS	수일-수주	있음	없음	모든 주요 설치류 기관; 전신 투명화	최적화/간소화된 CLARITY; 장기간 조직 저장 가능케 함; IHC/F	3DISCO 보다 느림

[0121]

<p>IHC: 면역조직화학 및 양립됨</p> <p>IHC/F: 면역조직화학, 면역형광 표지화와 양립됨; 항체 투과에 대해 확인됨 (> 0.5 mm)</p> <p>IHC: IHC-비양립됨, IHC-입증되지 않음, 또는 강한 제한, 예를 들어, 친지질성 조직 염료와만 양립되거나, 불충분한 항체 투과 (<< 0.5 mm)</p> <p>COLM: CLARITY-최적화된 광 시트 현미경검사; CLARITY 대물렌즈는 진뇌 또는 두꺼운 절편 영상화를 가능케 하는 수-밀리미터의 작업 거리를 갖는다. COLM 장치는 신속한 샘플 영상화를 가능케 하며, 따라서 진뇌 분석의 처리량을 개선시킨다. 그러나, 후속된 영상화 방법, 예를 들어, COLM, 3DISCO 및 CUBIC 프로토콜에 제공된 것과 관계없이, 진뇌 및 큰 샘플 영상화는 전문화된 고비용의 현미경검사 장치를 필요로 한다.</p>
--

[0122]

[0123] 표 2 - PACT, PARS 및 RIMS에 대한 예시적 시약.

시약	제형 및/또는 공급처
0.1 M 인산염-완충 염수 (PBS)	기재하지 않는 한, 모든 세척 단계 및 희석액은 PBS에서 준비됨 1 L의 전체 부피로 증류된 H ₂ O (dH ₂ O) 중에서 8g NaCl, 0.2g KCl, 1.42g Na ₂ HPO ₄ , 0.245g KH ₂ PO ₄ 를 조합하고; 7.4로 pH 조정하고, 멸균 여과하고, 4°C에서 저장함.
0.1 M 인산염 완충액 (PB)	pH 7.4에서 1 L의 전체 부피로 dH ₂ O 중에서 3.1 g NaH ₂ PO ₄ (모노하이드레이트) 및 10.9 g Na ₂ HPO ₄ (무수)를 첨가하고; 멸균 여과시키고, 4°C에서 저장함.
심장 관류-고정에 대해	
4% 파라포름알데하이드 (PFA)	최종 농도 0.1 M PBS 중 4% PFA로 32% (wt/vol) PFA 희석
PBS 플러쉬(flush)	0.5% 소듐 니트레이트 (wt/vol) 및 10 유닛/ml 헤파린을 갖는 0.1 M PBS 제조
하이드로겔 단량체 용액	
A2PO	0.1 M PBS 중 2% 아크릴아미드, 0% PFA 200 ml에 대해, 100 ml의 0.2 M PBS 및 90 ml의 dH ₂ O에 10 ml의 40% (wt/vol) 아크릴아미드 첨가
A4PO	0.1 M PBS 중 4% 아크릴아미드, 0% PFA 200 ml에 대해, 100 ml의 0.2 M PBS 및 80 ml의 dH ₂ O에 20 ml의 40% (wt/vol) 아크릴아미드 첨가
A4P4	0.1 M PBS 중 4% 아크릴아미드, 4% PFA 200 ml에 대해, 100 ml의 0.2 M PBS 및 55 ml dH ₂ O에 20 ml의 40% (wt/vol) 아크릴아미드 및 25 ml의 32% (wt/vol) PFA 첨가
AOP4	0.1 M PBS 중 4% PFA 200 ml에 대해, 100 ml의 0.2 M PBS 및 75 ml의 dH ₂ O에 25 ml의 32% (wt/vol) PFA 첨가
0.25% VA-044 개시제	2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드 (VA-044, Wako Chemicals USA, Inc.)

[0124]

	<ul style="list-style-type: none"> • 사용(PACT) 직전 50 ml 코니컬 중 40 ml 하이드로겔 단량체 용액에 100 mg 첨가 (PACT) • 사용(PARS) 직전 200 ml 0.1 M PBS 에 0.5 g 첨가
N ₂	<ul style="list-style-type: none"> • PACT: 가스 공급원(조정기 및 호스를 갖는 N₂ 탱크)에 긴 니들(22 G x 4-인치 피하 니들, Air-Tite (#N224) Virginia Beach, VA)을 부착하고, 하이드로겔 단량체 및 조직을 함유하는 배큐테이너 또는 코니컬의 하부로 니들을 낮추고, 1+ 분 동안 하이드로겔 용액을 통해 가스를 버블링시키고; 하이드로겔 중합 단계로 즉시 진행시킴 • PARS: N₂ 탱크 조정기/호스에 튜빙을 부착시키고, 반대 말단을 집록 백으로 삽입하고; 과량의 가스가 새 나갈 수 있도록 튜빙 주위의 집록 백을 느슨히 밀봉하고; 관류 챔버 및 집록을 충전시키기 위해 N₂ 가스 유동을 향하게 하고; 2 분 동안 대기 교환시키고; 추가로, 관류액이 재순환됨에 따라 관류 챔버 박스 내의 PBS 를 통해 N₂ 를 버블링시킬 수 있고; 하이드로겔 중합 단계로 즉시 진행시킴
PACT 및 PARS 세제	
PBS 중 0.1% tritonX-100 (vol/vol)	1 L의 전체 부피에 대해 0.1M PBS 에 1 ml tritonX-100 첨가, 7.5 로 pH 조정
4% 소듐 도데실 설페이트 (SDS)	1 L의 전체 부피에 대해 0.1M PBS 에 40 g SDS 첨가, 7.5 로 pH 조정
8% SDS	1 L의 전체 부피에 대해 0.1M PBS 에 80 g SDS 첨가, 7.5 로 pH 조정
20% SDS	1 L의 전체 부피에 대해 0.1M PBS 에 200 g SDS 첨가, 7.5 로 pH 조정
10% 테옥시콜레이트	1 L의 전체 부피에 대해 0.1M PBS 에 100 g 소듐 테옥시콜레이트 첨가, 7.5 로 pH 조정
PARS 챔버	
C&B Metabond	Parkell Inc. (#S380) Edgewood, NY
재사용가능한 피딩 니들	Fine Science Tools, Foster City, CA
삽입관, 튜빙	PlasticsOne, Roanoke, VA
PARS 챔버	피펫 팁 박스 (마우스, 래트에 대해 분류된 크기), PTFE 튜빙, 연동 펌프, 집록 백
조직학 및 영상화	
항체 인큐베이션 완충액	2% 일반 당나귀 혈청, 0.1% TritonX-100 및 0.01% (wt/vol) 소듐 아지드를 함유하는 0.1M PBS 중에 모든 항체(~1:200-400) 및/또는

[0125]

	염색 시약 회석
RIMS	0.01% 소듐 아지드를 갖는 30mL 의 0.02M 인산염 완충액 중 40 g Histodenz™ (Sigma-Aldrich # D2158), NaOH 를 이용하여 7.5 로 pH 조정; \$3/ml 의 순 비용
sRIMS	0.01% 소듐 아지드를 갖는 0.02M 인산염 완충액 중 70% 소르비톨 (w/v) (Sigma-Aldrich #S1876), NaOH 를 이용하여 7.5 로 pH 조정; \$0.2/ml 의 순 비용
80-90% 글리세롤	dH ₂ O 중에서 80-90% (vol/vol) 글리세롤(Sigma-Aldrich #G5516) 제조
FocusClear™	CellExplorer Labs, Taiwan \$36/ml
조직학을 위한 항체 및 소분자 염료	
DAPI (4',6-디아미디노-2-페닐인돌, 디하이드로클로라이드)	Life technologies (#D-1306), Grand Island, NY 0.1-10 µg/ml
항-판-사이토크라틴 (AE1/AE3) Alexa Fluor 488 일차 항체	eBiosciences (#53-9003) San Diego, CA 1:100 회석
Atto 488-컨쥬게이션된 항-GFAP 나노바디	<ul style="list-style-type: none"> • 공개된 방법에 따라 GFAP 나노바디 생성 (Li et al., 2012; Perruchini et al., 2009) • 정제된 GFAP 나노바디를 Atto 488 (Sigma-Aldrich)에 컨쥬게이션시키고, dH₂O 중에서 1 mg/ml 스톱으로 회석시킴 • 1:100 회석
닭 항-티로신 하이드록실라제 (TH) IgY	Aves Labs (#TYH) Tigard, OR 1:400 회석
닭 항-아교세포 섬유 산성 단백질 (GFAP) IgY	Aves Labs (#GFAP) Tigard, OR 1:400 회석
토끼 항-이온화 칼슘-결합 어댑터 분자 1 (Iba1) IgG	Biocare medical (#CP 290A) Concord, CA 1:200 회석

[0126]

토끼 항-인테그린 β 4 및 항-인테그린 β 5 IgGs	Santa Cruz Biotechnology (β 4: sc-9090, β 5: sc-14010) Dallas, Texas 1:200 희석
토끼 항- β 튜블린 IgG	Santa Cruz Biotechnology (#sc-9104) Dallas, Texas 1:200 희석
Alexa Fluor 647 컨쥬게이션된 당나귀 항-마우스 IgG	Jackson ImmunoResearch (#715-606-150) West Grove, PA 1:200 희석
NeuroTrace 530 / 615 적색 형광 니슬 염색	Life Technologies (#N-21482), Grand Island, NY 1:50 희석
SYSTO 24	Life technologies (#S-7559), Grand Island, NY 1:200 희석
아크리딘 오렌지	Life technologies (#A-1301), Grand Island, NY 100 μ g/ml 희석
렉틴	Vector laboratories (#L-1174), Burlingame, CA 1:100 희석
메틸렌 블루	Sigma-Aldrich (#66720) St. Louis, MO 1 μ g/ml
DRAQ5	Cell signaling (#4084) Danvers, MA 1:200 희석
Atto-565 컨쥬게이션된 팔로이딘	Sigma-Aldrich (#94072) St. Louis, MO 1:100 희석
7.0 mm or 3.0 mm 스페이서 또는	iSpacer, SunJin Lab Co.
0.5 mm or 2.5 mm 스페이서	Silicone Isolator, Electron Microscopy Sciences, PA
smFISH	
에탄올	에탄올의 등급화된 희석: RNase-비함유 멸균 H ₂ O 로 제조된 100%, 95%, 70% 에탄올

[0127]

투과화 완충액	70% 에탄올 용액 중 0.5% 소듐 보로하이드라이드 (wt/vol)
하이브리드화 완충액	10% 덱스트란 설페이트 (wt/vol, Sigma D8906), 10% 포름아미드 (vol/vol), 2X SSC
β-액틴에 대한 20 머 올리고 프로브	하이브리드화 완충액에서 제조된 β-액틴에 대한 24 개의 Alexa 594 표지된 20 머 올리고 프로브 각각 당 1nM
2X SSC, 염수 소듐 시트레이트 완충액	20X SSC 스톡에 대해, 800 ml dH ₂ O 중에 175.3 g NaCl 및 88.2 g 소듐 시트레이트를 용해시키고, 7.0 으로 pH 조정하고, 1 L 의 전체 부피로 맞춤. 오토클레이브로 멸균. 2X SSC 에 대해, 100 mL 20X SSC 와 850 ml dH ₂ O 를 조합시키고, 7.0 으로 pH 조정한 후, 1 L 의 전체 부피로 dH ₂ O 첨가
30% 포름아미드 2X SSC	500 ml 에 대해, 150 ml 포름아미드와 50 ml 20X SSC 및 300 ml dH ₂ O 를 조합시키고, 7.0 으로 pH 조정
Stowfade Gold + DAPI	Life technologies (#S-36938), Grand Island, NY smFISH 샘플에 대한 마운팅 매질
아미노실란-처리된 커버슬립	커버슬립을 연속적으로 사이에 전달하고, 먼저 1M NaOH, 이후 100% EtOH, 및 최종적으로 아세톤의 3 개의 용액에서 음과 처리. 세척된 커버슬립을 즉시 2 분 동안 아세톤 중 (3-아미노프로필)트리에톡시실란(Sigma 440140)의 2% 용액에 침지시켰다. 아민-변형된 커버슬립을 행구고, 실온에서 초순수에 저장. (Lubeck et al., 2014)

[0128]

[0129] 표 3 - PARS 및 PACT의 생물의학 적용

적용	투명화되는 조직	추가 정보
말초 면역활성화: 인지 및 건강에 대한 효과	사이토카인, 염증, 및 신경 마커에 대해 IHC 를 이용하여 전신	(Hsiao et al., 2012; Hsiao and Patterson, 2011; Lucas et al., 2006)
시간 경과에 걸친 미엘린화 경로; 탈수초 장애(자폐증, 외상성 뇌손상, 다발경화증): 생리학적 증상 및 신경병리학	전신 투명화 (주 ¹ 참조)	(Gibson et al., 2014; Hsiao et al., 2012; Hsiao and Patterson, 2011; Kaya et al., 2012; Zoukos et al., 1992)
신경발생: 신경 줄기 세포, 신경/축삭 재생의 집단 맵핑	전신 투명화	(Bartzokis et al., 2012; Erturk et al., 2012; Gibson et al., 2014; Jung et al., 2014)
복잡한 긴-범위 섬유 다발, 예를 들어, 미주신경에 대한 추적	전신 투명화, 말초 및 척수에 집중	(Berthoud and Neuhuber, 2000; Birmingham et al., 2014; George et al., 2000)
뇌-장 연결, 마이크로바이옴(microbiome)	전신 투명화	(Hsiao et al., 2013)
뇌졸중	특정 기관/조직 내의 혈관구조를 시각화시키기 위한	

[0130]

	혈관구조 고정, 면역표지화, 전신 투명화를 위한 PARS	
중양 구조 맵핑	중양 생검의 PACT, 설치류 암 모델에 대한 PARS	(Colomba and Ridley, 2014; Fukamachi et al., 2010; Magnon et al., 2013; Vakoc et al., 2009)
균막: 균막 구조, 및 다양한 층의 조절 및 상호작용 특성규명	조직/균막 샘플의 PACT	(Ernst et al., 1999; Singh et al., 2000)
확산 텐서 영상 (DTI)	(주 ² 참조)	(Alexander et al., 2007; Bartzokis et al., 2012; Huppi et al., 1998; Schain et al., 2014)

[0131]

[0132] ¹중추신경계 및 말초신경계 둘 모두에서, 미엘린은 주로 지질(75-80 건조 중량%)로 구성된다(Morell and Quarles, 1999). 미엘린 기본 단백질(MBP)은 미엘린초의 단연히 가장 풍부한 단백질이며, 이는 중에 따라 전체

단백질 함량의 대략 60-80%의 비율을 차지한다. MBP와 달리, 다른 미엘린 단백질은 일반적으로 수용액에서 불용성이고, 따라서 용이하게 추출되지 않는다. 그러나, MBP와 함께 이들은 막 단백질 분리를 위한 표준 프로토콜을 이용하여 SDS를 이용하여 추출될 수 있다. 따라서, 투명화 프로토콜의 주요 우려는 조직 샘플에서 미엘린 단백질을 안정화시키기 위한 부적절한 PFA 및/또는 하이드로겔 단량체 가교이다. 미엘린-관련 단백질(MAP)에 대한 면역표지화는, 예를 들어, CLARIFIED 인간 조직에서 제시된 바와 같이(Chung et al., 2013) 투명화된 조직 내의 축삭 또는 신경 섬유의 윤곽을 나타내기 위해 여전히 실행 가능한 반면, 탈수초 및 재미엘린화에 대한 정량적 연구가 일부 미엘린 성분이 투명화 동안 잠재적으로 세척되는 PACT/PARS-처리된 조직에서 정확하게 평가될 수 있는지의 여부는 불확실하게 남아 있다. 확실히, 일부 저자는 지질-풍부 미엘린초의 용해화 및 제거의 상기 두려움으로 인해 미엘린화에 대한 이들의 연구에서 조직을 투명화하는 것을 특별히 피하는 것으로 보고하였다(Jung et al., 2014). 다양한 공개된 투명화 프로토콜 중, SeeDB, CLARITY 및 PACT/PARS는 특정 미엘린 구조 요소를 온전하게 남길 가장 큰 잠재성을 갖는다. 즉, SeeDB(Ke et al., 2013)는 친지질성 염료와의 적합성을 입증한 한편, CLARITY/PACT/PARS 모두는 SDS를 이용한 투명화 동안 미엘린 단백질의 손실을 방지하는 것으로 예상되는 하이드로겔-조직 엠베딩 단계를 포함한다. 최종적으로, 척수구조를 재구성하기 위한 광학 투명화 현미경검사의 사용을 연구한 연구에서, 뇌 샘플을 광학적으로 투명화시키고, OCM 전에 ScaleA2를 마운팅하였다(Leahy et al., 2013). 그러나, 저자는 이들의 투명화 방법에 대한 세부사항을 제공하지 않았으므로, 조직이 ScaleA2에서 광범위하게 투명화되었는지의 여부, 또는 ScaleA2가 미엘린 손실의 위험이 최소화될 굴절 지수 마운팅 매질로 주로 사용되었는지의 여부를 평가할 수 없다. ²최근에, 스펙트럼 공초점 반사도 현미경검사(spectral confocal reflectance microscopy)(SCoRe)를 이용한 미엘린화된 축삭의 표지-비함유 생체내 영상화를 위한 방법이 확산 텐서 영상(DTI)에 대한 더욱 용이하게 수행되는 대안으로 보고되었다(Schain et al., 2014). 지질-풍부 미엘린의 높은 굴절 지수 덕에, SCoRe 방법은 단지 통상적인 레이저 스캐닝 공초점 현미경을 이용한 축삭 미엘린화에서의 변화의 미세-규모 영상화를 가능케 한다. PARS-처리되고 면역염색된 샘플에서 살아 있는 유기체 내의 물질의 확산을 물질의 전체-유기체 PARS-기반 전달로 대체하는 생체의 영상화를 위한 새로운 접근법이 수행될 수 있음이 명백하다.

[0133] 동물

[0134] 야생형 마우스(C57BL/6N 및 FVB/N, 수컷 및 암컷 둘 모두), *Thy1-YFP* 마우스(계통 H), 및 *Th-cre*(1Tmd/J) 마우스를 새로운 투명화 프로토콜 및 투명화 시약의 개발 및 시험에서 이용하였다. 다수의 주(multi-week)의 투명화 단계 전체에 걸쳐 그리고 RIMS에서의 장기간의 샘플 저장하에 내인성 형광 신호의 유지를 평가하기 위해 *Thy1-YFP* 마우스를 이용하였다. 더 큰 조직 샘플에 대해 투명화 프로토콜을 최적화시키고, 긴 관류-기반 투명화 및 항체 염색 단계 동안 혈관구조의 보존을 표현하기 위해 새끼로부터 성체의 야생형 래트(Long-Evans 및 Wistar, 수컷 및 암컷)를 이용하였다. 경심 관류를 위해, 대상체를 먼저 0.5% NaNO₂를 함유하는 헤파린 처리된 PBS(0.1 M PBS 중 10U/mL 헤파린) 및 이후 4% PFA를 이용한 심장내 관류 전에 과량의 유탄솔(Euthasol)(100 mg/kg IP 주사)로 깊이 마취시켰다. PACT를 위해, 뇌 및/또는 요망되는 기관을 절제하고, 하이드로겔 단량체 주입 및 투명화 단계 전에 수시간 동안 4% PFA에서 후고정시켰다. PARS-기반 전신 투명화를 위해, 심장내 카테터를 대동맥판막을 바로 지나 걸쳐 있는 좌심실로 삽입하고, 봉합사의 느슨한 루프로 대동맥 내부에 안정시켰다. PARS-기반 전신 투명화를 위해, 내림대동맥을 마이크로클램프로 결찰시켰다. AAV9-CAG-eGFP 형질 도입된 세포의 시각화를 수반하는 실험을 위해, 어린 성체 암컷 C57B1/6 마우스에 안와후 동굴을 통해 바이러스를 주사하고, 바이러스 형질도입 및 eGFP 발현을 위해 6개월 지연 후, 마우스를 PACT 및 PARS 연구를 위해 안락사시켰다.

[0135] AAV 생성 및 전신 전달

[0136] 마우스에 형광-표지된 트랜스젠(transgene)을 갖는 아데노-관련 바이러스 벡터를 주사함으로써, *Thy1* 프로모터에 의해 유도되는 것보다 더욱 드문 국소화된 형광 표지화와 PARS 처리 및 RIMS 마운팅의 양립성을 관찰하는 것이 가능하였다(도 5a-c 대 도 5d-e). 특정 뉴런 유형 및 아교세포의 드문 표지화 뿐만 아니라 별개의 기관에서의 국소화된 eGFP 발현(예를 들어, 간 및 해마 도 5d-e)이 명백히 보였다. AAV9 또는 AAV9 변이체 캡시드 AAV9BD1으로 패키징된 단일 가닥 ssAAV-CAG-eGFP 벡터를 기재된 바와 같이 생성시키고, 정제하였다(Lock et al., 2010). AAV9BD1 캡시드를 다음과 같은 돌연변이(VP1 넘버링)로 AAV9(U. Penn)로부터 변형시켰다: 1) 간 형질도입을 감소시키기 위해 N498Y 돌연변이를 발생시키고(Pulicherla et al., 2011), 2) 아미노산 서열 AAADSPAHPs(Chen et al., 2009)를 AA588-589 사이에 삽입하고, 3) Y731F 돌연변이를 생성시켰다(Pulicherla et al., 2011). 어느 한 바이러스의 1x10¹²개의 벡터 유전체(vg)를 안와후 동굴을 통해 어린 성체 암컷 C57B1/6

마우스에 정맥내 전달하고, 마우스를 PARS에 의한 천연 eGFP 형광의 평가를 위해 6개월 후에 안락사시켰다. AAV9-주사된 마우스로부터의 PARS 뇌 및 간 조직의 모든 영상화를 RIMS에서의 2주 조직 저장 후에 수행하였다.

[0137] PACT 및 PARS 시약의 선택

[0138] 다양한 하이드로겔 단량체 제형 및 투명화 조건을 스크리닝하기 위해, 여러 성체 C57 및 Thy-1 eYFP 마우스 (Jackson)를 과량의 유타솔(100 mg/kg, IP 주사)로 마취시키고, 0.5% NaNO₂ 및 10U/mL 헤파린을 함유하는 PBS, 및 이후 PBS 중 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 먼저 경심 관류시켰다. 절제된 전뇌를 1 mm 및 3 mm 시상 색선 및 관상 색선으로 절편화시키고, 2-6시간 동안 실온에서 4% PFA에서 후고정시키고(밤새 4°C에서 전뇌 및 색선을 후고정시키는 것 또한 유효한 옵션임), 이후 색선을 0.25% 광개시제 2,2'-아조비스[2-(2-이미다졸린-2-일)프로판]디하이드로클로라이드(VA-044, Wako Chemicals USA, Inc.)를 각각 함유하는 A2P0(PBS 중 2% 아크릴아미드 및 0% 파라포름알데하이드), A4P0(PBS 중 4% 아크릴아미드 및 0% 파라포름알데하이드), 또는, A4P4(PBS 중 4% 아크릴아미드 및 4% 파라포름알데하이드) 하이드로겔 단량체 용액 중에서 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 하이드로겔 단량체에 여전히 침지시키면서, 1분 동안 배큐테이너 또는 5 mL 에펜도르프(Eppendorf) 튜브에서 샘플-하이드로겔 용액을 통해 질소를 버블링시킴으로써 하이드로겔-주입된 샘플을 탈기시켰다. 본래의 CLARITY 프로토콜 및 진척된 CLARITY 프로토콜에서 필요한 것으로 간주된 바와 같은 산소 대기를 비활성 가스로 대체하는 여러 더욱 엄격한 방법이 시험된 것이 인지되어야 한다(Chung et al., 2013; Tomer et al., 2014)(예를 들어, 1. 얼음 상에 샘플을 함유하는 배큐테이너를 배치하고; 2. 배큐테이너를 수분 동안 가볍게 볼텍싱시키면서 하우스 진공 라인으로 탈기시키고; 3. 얼음으로부터 샘플을 분리시키고, 수분 동안 하이드로겔 단량체 용액을 통해 질소를 버블링시키고; 4. 단계 1-3을 수회 반복한다). 그러나, 산소의 질소로의 간단한 1분의 교환이 적절한 중합을 지지하고, 잔여 산소가 조직과 아크릴아미드 단량체 사이의 완전한 하이브리드화를 방해할 수 있으나, 조직-하이드로겔 매트릭스가 조직 구조 및 단백질 함량을 보존시키기에 충분한 것으로 결정되었다. 하이드로겔-조직 매트릭스를 중합시키기 위해, 샘플을 37°C의 수조 또는 히팅 블록으로 옮기고, 상기 상승된 온도에서 2-3 시간 동안 인큐베이션하였다. 중합된 샘플을 PBS로 간단히 세척하여 과량의 하이드로겔을 제거하고, 50 mL 코니컬 튜브로 옮기고, PBS, PBS 중 0.1% tritonX-100, 또는 모두 0.1M PBS, pH 7.5에서 제조된 4% SDS, 8% SDS, 20% SDS, 또는 10% 데옥시콜레이트의 투명화 용액 중에서 진탕과 함께 37°C에서 2-5일 동안 인큐베이션하였다. 낮은 PFA 농도로 제조된 조직 하이드로겔 매트릭스에 대한 더 큰 조직 팽창과 높은 PFA(및 아크릴아미드) 농도로 제조된 조직-하이드로겔 매트릭스에 대한 더 느린 조직 투명화 사이의 트레이드-오프(trade-off)를 제시하기 위해 3 mm 뇌 색선의 이미지를 24시간 및 48시간에서 찍었고(도 1a); 이후의 PACT 및 PARS 실험에서의 일반적인 사용을 위해 A4P0 하이드로겔 제형을 선택하였다. 8% SDS 투명화 용액에서의 뇌 색선의 72시간의 인큐베이션은 우수한 조직 투명화를 발생시켰고(도 7a), 따라서 8% 투명화 용액을 이후의 PACT 및 PARS 실험을 위해 선택하였다. 투명화 시간과 관련하여, 이러한 파라미터는 경우-특이적 방식으로 최적화되어야 한다. 24시간 투명화는 작은 조직 샘플 또는 매우 다공성인 조직에 충분할 수 있는 반면, 더 큰 매우 미엘린화되거나 치밀 조직 색선 및 전체 기관은 96시간 초과를 필요로 할 수 있다. 샘플이 과도하게 투명해지지 않거나, 또한 샘플이 장기간 저장되어야 하는 경우 과도한 팽창에 대해 주기적으로 확인하는 것이 주의되어야 하는데, 팽창은 장기 작업시 하이드로겔 연화 및 분해에 기여하여 샘플 손실의 위험이 있기 때문이다. 이는 샘플 제조 및 취급 동안 상승된 온도 및 기계적 스트레스에 의해 촉진된다. 조직-하이드로겔 샘플의 가벼운 처리 및 인큐베이션 용액으로의 항미생물제의 첨가는 하이드로겔이 2주 이하 동안 안정적인 채로 남아 있도록 한다. 또한, 1-2% PFA를 이용한 조직 가교 또는 투명화 후의 조직-하이드로겔 재중합의 추가 라운드가 마운팅 매질에서의 조직 팽창 및 조직 분해 둘 모두를 방지하는데 이로운 것으로 결정되었다.

[0139] PACT 면역조직화학

[0140] PACT-처리된 조직을 면역염색시키기 위해, 투명화된 샘플을 1일에 걸쳐 PBS의 4-5회 교환으로 세척하여 잔여 SDS를 제거하였다. 이후, 샘플을 3-7일 동안 진탕과 함께 실온에서 2% 일반 당나귀 혈청, 0.1% TritonX-100 및 0.01% 소듐 아지드를 함유하는 PBS 중에서 일차 항체(1:200-400)와 함께 인큐베이션하였다. 6개의 A4P0-중합 및 6개의 A4P4-중합 3-mm 시상 색선을 24시간, 48시간 및 72시간에서 상기 항체 인큐베이션으로부터 분리시켜, 투명화된 조직에서 IgG 투과 깊이를 측정하였다(도 1b 참조). 나머지 색선에 대해, 하루의 과정에 걸쳐 4-5회의 PBS 완충액 교환의 색선 세척을 통해 결합되지 않은 일차 항체를 제거하였다. 이후, 샘플을 2-5일 동안 진탕과 함께 실온에서 2% 일반 당나귀 혈청, 0.1% TritonX-100 및 0.01% 소듐 아지드를 함유하는 PBS 중에서 이차 항체(Fab 단편 이차 항체가 바람직함, 1:200-400)와 함께 인큐베이션하였다. 1일에 걸쳐 PBS의 4-5회 교환을 이용한 세척 후, 샘플을 이들이 투명해질 때까지 실온에서 RIMS 용액(30mL의 0.01% 소듐 아지드를 갖는 0.02M 인산염 완충액 중 40 g의 Sigma D2158(Histodenz™), NaOH를 이용하여 7.5로 pH 조정 - 이는 88% Histodenz

w/v의 최종 농도를 발생시킴) 중에서 인큐베이션하였다. 항체, 소분자 염색, 또는 RIMS에서의 조직의 긴 인큐베이션(4일 초과) 동안, 용액을 인큐베이션을 통해 중간에 새로운 용액으로 교환하였다. 추가의 주의로서 그리고 박테리아 성장을 예방하기 위해, 조직은 완충액 교환시 새로운 50 ml 코니컬 튜브 또는 염색 용기로 옮겨질 수 있다. RIMS 인큐베이션 및 마운팅이 박테리아 오염을 최소화시키기 위해 깨끗한 환경에서, 즉, 후드에서 또는 불길 위의 새로운 코니컬로 RIMS를 따름으로써 수행되는 것을 권장된다.

[0141] 수동 염색에 사용된 일차 항체는 닭 항-티로신 하이드록실라제(TH) IgY, 닭 항-아교세포 섬유 산성 단백질(GFAP) IgY(Aves Labs, Tigard, OR), 토끼 항-이온화 칼슘-결합 어댑터 분자 1(Iba1) IgG(Biocare medical, Concord, CA), 토끼 항-인테그린 b4, b5 IgG, 및 토끼 항베타 튜블린 IgG(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas)였다. AlexaFluor 647 컨쥬게이션된 당나귀 항-마우스 IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)를 항체 투과 실험에 이용하였다(도 1b). 니슬 염색을 NeuroTrace 530 / 615 적색 형광 니슬 염색(PBS 중 1:50, Life Technologies, Grand Island, NY)으로 수행하였고, 샘플을 밤새 RT에서 인큐베이션한 후, 마운팅 전에 PBS에서 세척하였다. 아크리딘 오렌지를 이용한 소분자 염색을 위해, 샘플을 10분 동안 아크리딘 오렌지의 100 µg/mL 용액에 둔 후, 1시간 동안 PBS 중에서 세척하였다. 이후, 조직을 영상화 전에 4시간 동안 RIMS 용액에 두었다. 모든 단계를 실온에서 수행하였다.

[0142] PARS 챔버 설계

[0143] 투명화 및 면역표지화 단계를 위해 혈관구조를 통해 PARS 시약을 관류시키는 것은 지질 추출 및 항체 확산 동안 수일 내지 수주 동안 조직에 대해 연속적 압력 구배로 시약을 재순환시키는 간단한 장치의 제작을 필요로 하였다. 따라서, 전달 방법으로서 전통적인 심장 관류 고정 기술(Gage et al., 2012; Jonkers et al., 1984)을 이용하여, 다음과 같은 구성요소로 구성된 PARS 챔버가 고안되었다: 1) 대상체의 좌심실 내에 적소에 클램핑된 피딩 니들 카테터, 2) 병변이 있는 우심방을 통해 혈관구조를 나가는 재순환 시약을 잡기 위한 관류액 수거 웰(피펫 박스), 및 3) 연동 펌프를 통한 통과를 통해 수거 웰로부터 다시 대상체 혈관구조로 재순환 시약을 전달하는 카테터 튜브(PTFE 튜빙)(도 10a). 상기 장치가 전체-유기체 투명화에 대해 기능적인지 입증하기 위해, 여러 상이한 백분율의 SDS, 다양한 농도의 소듐 라우릴 사르코신, 및 소듐 데옥시콜레이트를 포함하는 여러 다양한 세제를 2주 이하 동안 경동맥을 통해 전체 마우스 및 래트를 통해 연속적으로 관류시켰다. PACT에서와 같이(도 7a), SDS 만이 효과적으로 조직을 광학 영상화를 위해 투명하게 만들 수 있었다. 마찬가지로, PARS 챔버 장치를 이용하여 전달되는 경우, 8% SDS는 조직 내 깊은 곳에 있는 지질을 효과적으로 용해시킬 수 있었으며, 큰 조직 샘플의 균일한 투명화를 달성할 수 있었다. 따라서, PARS 챔버 장치를 이후의 PARS 실험을 위해 채택하였다.

[0144] PARS 투명화 및 염색

[0145] 성체 마우스 또는 래트의 경심 관류 고정을 위해, 피딩 니들을 좌심실을 통해 대동맥으로 삽입하고, 대동맥궁의 수준에서 혈관에 대해 적소에 느슨하게 봉합하였다. PACT에 대해 요약된 바와 같이 PBS 및 4% PFA를 이용한 관류 후, 고정된 전체 설치류를 챔버 내의 용액이 설치류로 관류되고, 연동 펌프를 통해 재순환되는 맞춤형 제작 관류 챔버로 옮겼다. 설치류를 실온에서 1-2시간 동안 1 mL/분의 유속으로 동일 피딩 니들을 통해 대동맥으로 4% PFA로 후고정시켰다. 래트 뇌 및 척수의 투명화를 위해, 동맥 순환을 전신 결찰시켜, 경동맥을 온전하게 남기고, 이들 혈관에 의해 직접적으로 관류되지 않는 조직을 제거하였다. PFA가 아크릴아미드 단량체를 가교시키는 것을 방지하기 위해, PBS를 실온에서 2시간 동안 관류시켜 잔여 PFA를 세척하고, 4% 아크릴아미드(A4P0)를 밤새 실온에서 PBS 중에 주입하였다. 다음날, PBS를 다시 관류시켜 혈관구조 내에 임의의 남아 있는 PFA/아크릴아미드 중합체/단량체를 제거하였다. 중합 전 그리고 관류 라인을 분리함이 없이, 관류 챔버를 집록 백에 두고, 별개의 연결을 통해 관류 챔버로 질소 가스를 주입하여 샘플을 탈기시켰다. PBS와 함께 200mL의 0.25% VA-044 개시제를 첨가하고, 2-3시간 동안 37-42°C 수조에서 탈기된 관류 챔버를 침지시킴으로써 중합 과정을 개시시켰다. 납 추를 관류 챔버의 상부에 두어 관류 챔버가 뒤집어지는 것을 방지하였다. 중합 후, 용액을 0.1M PBS, pH 7.5 중 8% SDS 투명화 완충액으로 대체하고, 마우스/래트를 2주 이하 동안 관류시켰다. PARS IHC를 위해, 투명화된 마우스/래트를 먼저 2일의 기간에 걸쳐 200mL PBS의 8회의 완충액 교환으로 관류시켜 잔여 SDS를 제거하였다. 이후, PACT 프로토콜에 기재된 동일 항체 제형을 이용하여, 일차 항체 각테일을 이용한 3일 관류, PBS 세척을 이용한 1일 관류, 이차 항체 각테일을 이용한 3일 관류, 및 1일 PBS 세척을 수행하여 투명화된 마우스/래트의 말초 기관을 염색하였다.

[0146] 뇌 및 척수 투명화를 위한 PARS-CSF 방법

[0147] 뇌 및 척수 맵핑으로 제한된 적용을 위해, 두개내 뇌 셉트를 통한 CSF로의 하이드로겔 단량체 및 투명화 시약의

직접 주입에 의한 전뇌 및 전체 척수의 충분한 투명화를 제공하는 두개내 PARS 전략을 개발하였다. 특정 상황 (예를 들어, 생체내 약리학적, 신경생물학적, 또는 광유전학적 연구로부터의 대상체에서의 가이드 삽입관의 기존에 존재하는 이용가능성)하에서, PARS-CSF는 존재하는 삽입관 근처의 영역에 대해 자동적으로 최적화되고, 동등한 전체 기관 PACT 절차보다 시간 및 시약을 덜 필요로 하는 전뇌 투명화 및 조직학을 가능케 할 것이다. 본원에서, PARS 시약의 두개내 전달을 위한 2개의 경로가 확인되었다. 척수를 투명화시키기 위해, 삽입관이 대수조로 삽입되거나, 등 하구 바로 위의 거미막밑 공간까지 두개골을 통해 낮추어질 수 있다(관심 영역 내에 구멍을 천공시키고, 경질막 내에 개구를 생성시키기 위해 검자를 이용함)(도 3a 참조). PARS-CSF가 상승된 온도에서 장기간의 투명화 동안 수행되는 경우 래트 척수 샘플(우측)이 투명화될 수 있다. 전뇌를 투명화시키기 위해, 삽입관은 두개골을 통해 낮추어져, 경질막을 관통하고, 후각망을 바로 위의 영역에 배치될 수 있다(도 3b 참조). 삽입관(21G, PlasticsOne)은 치아 아크릴을 이용하여 두개골 표면 상에 적소에 시멘트 접합된다(C&B-Metabond, Parkell Inc.). 이후, PARS 절차를 상기 두개내 제조물에 적용시켰고; 카테터 튜빙을 심장 공급 튜브와 대조적으로 경막하 삽입관에 연결시키고, 모든 PACT 시약을 PARS에서와 동일한 순서 및 기간을 이용하여 1 ml/분으로 주입하였다. 전뇌 투명화를 위해, 대상체를 경심-관류 고정시키고, 목을 베고, 머리만 PARS 챔버로 옮기고, 주입 라인에 연결시켰다. 피켓 박스 및 카테터 라인을 4% 아크릴아미드 단량체 용액(A4P0)으로 예비충전시키고, 튜빙을 삽입관에 연결시키고, A4P0를 실온에서 밤새 1 ml/분 유량으로 두개내 주입하였다(도 10a, 좌측). 혈관구조가 중합되지 않은 채로 유지되는 것을 보장하는데 매우 중요한 결합되지 않은 PFA 및 아크릴아미드 단량체의 뇌 플라싱(PBS의 2시간 주입) 후, 검록 백으로의 PARS 챔버 전달 및 2분 동안 비활성 대기(N₂) 하에서의 챔버 배치를 통해 전뇌를 탈기시켰다(도 10a, 우측). 이후, 백에 넣은 PARS 챔버를 37-42°C 수조로 옮기고, 열 개시제가 보충된 탈기된 PBS를 전체 2-3시간 인큐베이션 동안 뇌를 통해 주입하였다. 이러한 전뇌-하이드로겔 매트릭스의 형성 후, 전체 과정 동안 37-42°C 수조에 PARS 챔버를 유지시키면서 4일 동안 삽입관을 통한 8% SDS의 일정한 관류-재순환을 통해 두개골내 조직 투명화를 달성하였다. 최종적으로, 광범위한 PBS 세척(2-3일) 후, 카테터 라인을 분리시키고, 뇌를 분리시키고, 섹션화하고, 영상화를 위해 RIMS에 마운팅하였다(도 3b).

[0148] AAV9-eGFP가 IV-주입된 마우스를 이용하여, 전체-기관 투명화를 위한 PARS-CSF 절차를 다음과 같은 조건과 관련하여 확인하였다: 1) 삽입관 배치에 관하여 영역이 얼마나 충분히 투명한지에 있어서 단지 제한된 편향, 2) 높은 두개내 압력을 야기시키는 너무 많은 유량 또는 관류된 액체의 부적절한 배출로부터의 과도한 유압으로 인한 삽입관 근처 영역 내에 구조적 손상이 없음, 3) 세포하 구조 형태의 보존, 및 4) 드물게 표지된 세포 집단 및 형광의 우수한 시각화. 이는 뇌내(IC) 또는 뇌실내(ICV) 삽입관 삽입된 마우스 또는 래트 대상체의 사용을 이미 수반하고, 각각의 대상체에 대한 사후 뇌 조직학을 필요로 하는 연구를 수행하는 과학자에게 있어서 특별한 적절성을 가질 수 있다.

[0149] 향체 투과

[0150] 4개의 경심 관류되고, 4% PFA 후고정된 성체 마우스(4-12주령) 뇌를 2 mm 시상 절편으로 절단하고, 이들 절편을 PACT 처리하였다. 특히, 각각의 PFA-고정된 뇌 절편을 A4P4 하이드로겔과 하이브리드화시키는 반면, 나머지 절편을 4AOP 하이드로겔에서 하이브리드화시켰다. 모든 샘플을 PACT 프로토콜에 기재된 바와 같이 PBS 중 8% SDS로 수동적으로 투명화하고, 잔여 SDS를 1일 동안 PBS 세척에 의해 제거하였다. 이후, 샘플을 24-72시간에 걸친 일정 범위의 기간 동안 일차 향체 각테일(2% 일반 당나귀 혈청, 0.1% Triton-X100 및 0.01% 소듐 아지드를 함유하는 PBS 중 당나귀 항마우스-IgG 항체, 1:200)에서 인큐베이션하였다. 이후, 샘플을 1일에 걸쳐 0.1M PBS의 4-5회 완충액 교환으로 세척하고, RIMS 용액에 마운팅하였다. 이미지를 W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC M27을 이용한 Zeiss LSM 780 공초점 현미경(작업 거리 1.8mm)으로 찍었다. 향체 투과의 깊이(도 1b)를 Reslice 및 Z 프로젝트 플러그인과 함께 Fiji를 이용하여 y-z 투영된 이미지에 표시하였다.

[0151] PACT 및 PARS 샘플에 대한 RIMS (굴절 지수 매칭법)

[0152] 영상화를 위한 조직 제조에서의 최종 단계로서, 샘플 마운팅은 조직 섹션을 대물렌즈의 굴절 지수를 정렬시키는 것을 도울 매질, 렌즈 침지 매질, 및 고해상도 및 영상화 깊이를 제공하는 조직 내에 침지시키는 것을 포함한다. PACT 및 PARS 마운팅에서 매우 고비용의 시약인 FocusClear™의 사용을 피하기 위해, 새로운 마운팅 용액 대체물을 포플레이팅시켰다. 조직 광학 투명화의 원리를 기초로 하여, 광학 투명화 작용제의 요망되는 특징(높은 수용해도, 낮은 점도, 높은 밀도, 낮은 오스몰농도, 낮은 자가형광, 비-형광단 켄칭, 생체적합성, 낮은 비용)을 갖는 2개의 주요 그룹의 화학물질(당 알콜 및 방사성 조영제)을 합리적으로 스크리닝하였다. 적당하고, 널리 이용 가능한 당 알콜인 소르비톨을 확인하였다. 70-80%(w/v) 용액에서, 소르비톨은 형광의 적은 켄칭과 함께 200 μm 두께의 투명화되지 않은 뇌 섹션 및 1mm 이하의 두께의 PACT 투명화된 뇌 섹션을 효과적인

으로 투명화할 수 있다. 포물레이션(sRIMS로 명명됨, 설명에 대해서는 하기 참조)을 0.02-0.05 M 인산염 완충액(pH 유지), 0.1% tween-20(조직 투과 향상), 및 소듐 아지드(박테리아 성장을 억제하기 위한 보존제)를 포함하도록 이후에 변형시켰다. 당 알콜에 더하여, 방사성 조영제, 특히 혈관내 전달된 비이온성 요오드화 조영제(밀도 구배 매질로서의 용도에 대해서도 인가됨)를 또한 평가하였는데, 이는 이들의 물리적 및 화학적 특성이 이상적인 굴절 지수 매칭 매질의 물리적 및 화학적 특성과 면밀히 매칭되기 때문이다. 비용 및 이용가능성을 기초로 하여, 이오딕사놀(iodoxanol)(Optiprep) 및 이의 단량체 이오헥솔(iohexol)(Nycodenz, 이오헥솔의 유도체인 HistodenzTM으로도 이용가능함)을 시험하였고, 이오헥솔이 훨씬 더 큰 PARS 투명화된 샘플 지수 매칭에서 소르비톨보다 우수한 것으로 밝혀졌다.

[0153] 다음으로, 일반적으로 사용되는/상업적으로 이용 가능한 마운팅 옵션인 80-90% 글리세롤 및 FocusClearTM과 본원에 기재된 매질 마운팅 매질 제형인 표준 공초점 현미경검사를 이용한 본 발명의 영상화 장치에 적합화된 마운팅 매질인 sRIMS 및 RIMS 사이에서 병행 비교(도 9a 참조)를 수행하였다. 30 mL의 전체 부피에 대해 0.01% 소듐 아지드를 갖는 0.02M 인산염 완충액에 40 g의 HistodenzTM(Sigma D2158)을 용해시킴으로써 RIMS 용액을 제조하였고, NaOH를 이용하여 7.5로 pH 조정하였으며, 이는 RI = 1.46을 갖는 88% Histodenz(w/v)의 최종 농도를 발생시켰다(달리 표시하지 않는 한 본 작업 전체에 걸쳐 사용함).

[0154] RIMS의 굴절 지수(RI)는 특정 조직/영상화 시스템에 매칭되도록 조정될 수 있음을 기재하는 것은 가치가 있으며, 매우 우수한 샘플 해상도를 획득하기 위해 RIMS RI는 1.38(30% Histodenz w/v) 내지 1.48(95% Histodenz w/v) 범위일 수 있을 것으로 예상된다. RIMS에서의 광 투과(도 9b)를 Reichert AR200 Refractometer로 측정하였다. RIMS 마운팅을 위해, 샘플을 먼저 이들이 투명해질 때까지 실온에서 RIMS에 침지시켰다. 이러한 기간 동안, 투명해진 조직은 처음 몇시간 동안 먼저 수축한다(도 3b, 9d 참조). RIMS에서의 지속된 인큐베이션은 RIMS가 조직에 완전히 투과할 때까지 시간 경과에 걸쳐 점진적 조직 팽창을 발생시킬 것이며(도 4c, 11a 참조); 가장 큰 샘플(예를 들어, 래트 뇌)이 RIMS-침지 1주일 이내에 투명해진 것이 관찰되었고, 이후 이들의 팽창은 중단되었다. 그러나, RIMS 인큐베이션으로 진행시키기 전에 실온에서 1-2시간 동안(작은 샘플) 또는 밤새(큰 샘플) 동안 투명화되고 염색된 샘플을 4% PFA 중에서 후고정시킴으로써 조직 팽창이 성공적으로 제한되었다(도 4c, 우측 박스; 도 11a, 하부 우측 박스 참조). PARS 조직을 후고정시키는 것은 점진적 조직 부피 팽창을 단축시켰으나(도 9), 추가 가교는 또한 조직 투명도에서의 약간의 감소를 촉진시켰다(도 11a). 그러나, 형광 강도, 세포 표현형분석, 또는 영상화의 분해가능한 깊이는 불리하게 영향을 미치지 않았다.

[0155] sRIMS: RIMS에 대한 비용 효과적인 소르비톨 기반 대안

[0156] 0.01% 소듐 아지드를 갖는 0.02M 인산염 완충액 중 70% 소르비톨(w/v)(Sigma S1876), NaOH를 이용하여 7.5로 pH 조정; \$0.2/ml의 순 비용. RIMS는 수행된 특정 실험에서 sRIMS보다 성능이 우수한 반면, 분해 가능한 영상화 깊이와 관련하여, 소르비톨은 과학 실험실 전체에 걸쳐 일반적으로 이용 가능한 화합물이며, 따라서 글리세롤-기반 마운팅 용액에 대한 편리하고, 비용 효과적이고, 우수한 대안을 제공한다.

[0157] 혈관구조 보존

[0158] 래트를 해파린 처리된 PBS, 4% PFA, 및 마지막으로 추가의 PBS 세척으로 경심 관류시켰다. 이후, PARS에서와 같이 임의의 하이드로겔 단량체 주입 또는 투명화 전, 래트를 이의 대동맥내 카테터를 통해 밤새 실온에서 100 mL Atto 488 컨쥬게이션된 항-GFAP 나노바디(PBS 중 1:100)로 관류시켰다. GFAP 나노바디를 공개된 방법에 따라 제조하였다(Li et al., 2012). 이를 사용 전에 Atto 488 형광 염료에 컨쥬게이션시켰다. 뇌를 두개골로부터 분리시키고, 밤새 4°C에서 4% PFA 중에서 인큐베이션하여 나노바디를 가교시켰다. 이후, 뇌를 1 mm 관상 절편으로 절단하고, 하이드로겔 단량체 주입, 하이브리드화, 및 3일 동안 37°C에서 0.1M PBS, pH7.5 중 8% SDS에서의 수동 샘플 투명화를 포함하는 표준 PACT 프로토콜에 따라 처리하였다. 투명화된 샘플을 1일 동안 RIMS 용액 중에서 인큐베이션시키고, 영상화를 위해 RIMS 용액 중에 마운팅하였다. 이미지를 LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈를 갖는 Zeiss LSM 780 공초점 현미경을 이용하여 찍었다. 상기 방법을 Alexa Fluor 647-컨쥬게이션된 항마우스 IgG를 이용한 혈관구조의 표시화를 위해 마우스에서 반복하였다. 간단히, 4% PFA-고정된 마우스를 4% PFA 고정을 위해 설치된 동일한 대동맥내 카테터를 이용하여 밤새 Alexa Fluor 647-컨쥬게이션된 항 마우스 IgG로 경심 관류시켰다. 뇌를 절제하고, 밤새 4°C에서 4% PFA 중에 후고정시키고, 1 mm 관상 절편으로 섹션화시키고, 3일 동안 37°C에서 0.1M PBS, pH7.5 중 8% SDS에서 PACT 투명화시켰다. 투명화된 샘플을 1일 동안 RIMS 용액에서 인큐베이션시키고, 영상화를 위해 RIMS 용액 중에 마운팅하였다.

[0159] 절편화된 조직 팽창 및 중량 증가 측정

[0160] PFA-고정된 성체 마우스(4-12주령) 뇌를 6개의 1 mm 두께의 관상 절편으로 절단하였다. 뇌의 절반으로부터의 절편을 PBS에 저장한 반면, 뇌의 절반으로부터의 절편을 4일 동안 PACT-투명화시켰다. 절편을 칭량하고, 투명화 전 및 후에 통상적인 카메라로 이미지화시켰다. 절편의 크기를 표시하고, Image J를 이용하여 계산하였다. 투명화 전 및 후에 절편의 크기 및 중량에서의 변화를 계산하고(도 1e), 이들을 PACT 전 측정으로 표준화시킴으로써 조직 팽창 및 중량 증가를 결정하였다.

[0161] 단백질 손실 측정

[0162] 각각의 용액으로 블랭킹(blanking)된 NanoDrop으로 PACT 또는 PARS 투명화로부터 수거된 투명화 용액 중의 전체 단백질의 양을 측정함으로써 각각의 샘플에 대한 단백질 손실의 백분율(도 1c, 2e)을 획득하고, 투명화 전에 마우스(PARS에 대함) 또는 절편(PACT에 대함)의 중량에 대해 표준화시켰다.

[0163] 전뇌 조직 형태 보존 및 정량화

[0164] 뇌 부피에 대한 PARS 처리 및 RIMS 마운팅의 효과를 관찰하기 위해, PFA-고정된 성체 마우스 뇌를 즉시 추출하거나(투명화되지 않은 대조군) PARS-처리한 후; 이들 2개의 그룹으로부터의 뇌를 하기 조건 중 하나에 따라 처리하였다: 1일 동안 PBS 중에서 인큐베이션하거나, 1주 동안 PBS 중에서 인큐베이션하거나, 1일 동안 RIMS에서 마운팅시키거나, 2주 동안 RIMS에서 마운팅시키거나, 2주 동안 후고정시키고, RIMS에서 마운팅시켰다. 모든 조건으로부터의 투명화된 뇌 및 투명화되지 않은 뇌를 이후 이들의 상대 크기 변화를 평가하기 위해 사진을 찍고(도 4c), 투명화 깊이를 시각화시키기 위해 섹션으로 절단하고(도 11a), 슬라이드-마운팅시키고, 조직 구조에서의 육안 변화(예를 들어, 주요 뇌 영역의 형태적 변형, 심실 및 혈관구조의 구조적 온전성)를 평가하기 위해 공초점 현미경검사를 통해 이미지화시켰다(도 11b). 조직의 PACT 또는 PARS-처리 후에 수거된 투명화 용액 분취량의 단백질 농도를 NanoDrop을 통해 측정함으로써 각각의 샘플에 대한 단백질 손실의 백분율(도 1c, 2e)을 획득하였다. 이후, 순 단백질 손실이 상기 농도 및 처리 동안 사용된 투명화 용액의 공지된 전체 부피를 기초로 하여 평가될 수 있다. 샘플 및 조직 처리 조건 전체에 걸친 단백질 손실이 비교될 수 있도록 각각의 샘플에 의해 손실된 단백질의 양을 투명화 전에 마우스(PARS에 대함) 또는 조직 절편(PACT에 대함)의 중량에 대해 표준화시켰다.

[0165] 단일-분자 RNA FISH

[0166] 조직 샘플을 광 진공하에서 1시간 동안 탈수시킴으로써 아미노실란-처리된 커버슬립에 부착시켰다. 샘플을 하기 프로토콜에 따라 하이브리드화 전에 투과화시켰다: 먼저, 샘플을 실온에서 10분 동안 100% 에탄올 중에서 2회 세척하였다. 다음으로, 샘플을 실온에서 10분 동안 95% 에탄올 중에서 세척하였다. 이후, 샘플을 4°C에서 2시간 동안 70% 에탄올 중에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 조직을 실온에서 10분 동안 0.5% 소듐 보로하이드라이드(w/v) 70% 에탄올 용액 중에 두었다. 최종적으로, 조직을 PBS의 3회 세척으로 재수화시켰다. 10% 텍스트란 설페이트(w/v, Sigma D8906), 10% 포름아미드(v/v), B-액틴에 대한 24개의 Alexa 594 표지된 20머 올리고 프로브 각각 당 1nM을 함유하는 2X SSC로 구성된 하이브리드화 완충액 중에서 37°C에서 밤새 하이브리드화를 수행하였다. 다음날, 샘플을 30분 동안 실온에서 30% 포름아미드 2X SSC 중에서 세척한 후, 2X SSC로 4회 세척하였다. 세척 후, 샘플을 Slowfade Gold + DAPI(Life S36938)를 이용하여 2개의 커버슬립 사이에 마운팅시켰다. 샘플을 추가의 1.5x 배율로 Andor Ikon-M 카메라 및 60X/1.4NA Plan Apo λ 대물렌즈를 갖는 Nikon Ti Eclipse 현미경에서 이미지화시켰다. 이미지를 30μm 상에서 0.5μm 단계 크기로 Z-스택으로 획득하였다. 샘플을 Shanghai Dream Laser에 의해 제조된 589nm(SDL-589-XXXI), 532nm(SDL-532-200TG) 및 405nm(SDL-405-LM-030) 레이저에 의해 여기시켰다.

[0167] smFISH 이미지(도 2)를 MATLAB에 기재된 이미지 분석 스크립트를 이용하여 분석하였다. 샘플의 평균 백그라운드를 결정하기 위해, 이미지를 50x50 픽셀 커널을 이용하여 중간값 필터링시키고, 중심 200x200 픽셀 서브-이미지의 평균 픽셀 강도를 이미지의 평균 백그라운드 값으로 이용하였다. 가우스 라플라시안 필터를 적용시키고, 평균 백그라운드 값을 기초로 하여 이미지를 역치화시키고, 국소 최대값을 찾기 위해 결과로서 발생한 이미지와 확장된 이미지를 비교함으로써 smFISH 도트를 발견하였다. 오차 막대를 발생된 측정치의 표준 편차를 이용하여 계산하였다.

[0168] 인간 조직 생검 제조

[0169] 인간 기저 세포 암종 피부 조직 샘플을 적절한 사전 동의 후에 UCLA IRB #12-01195의 승인 하에 암의 절제를 받

는 환자로부터 획득하였다. 조직 샘플을 진단 또는 마진 제어(margin control) 목적에 필요하지 않은 종양의 섹션으로부터 획득하였고, 이는 본래의 피부암의 크기에 따라 크기가 다양하였다. 생검된 종양 샘플을 4% 아크릴아미드 용액(A4P0)을 이용하여 설치류 조직에 대해 기재된 바와 같은 PACT 방법을 이용하여 처리하여 고정된 조직에 대한 하이드로겔 지지 매트릭스를 생성시켰다. 이후, 중합된 조직-하이드로겔 매트릭스를 37°C에서 8% SDS 중에서 2-7일(즉, 조직 두께에 따름) 동안 수동으로 투명화하였다. 일반적으로, 3 mm 두께의 인간 피부 섹션은 3-4일 이내에 투명해질 수 있었다.

[0170] PACT-처리된 샘플을 2일 동안 1:100 희석으로 항-판-사이토케라틴(AE1/AE3) Alexa Fluor 488 일차 항체 (eBiosciences)로 면역표지화시킨 후, PBS 중에서 1일 세척하였다. 모든 표지화 및 세척 단계를 실온에서 수행하고, 최종 PACT-처리된 생검 샘플을 RIMS에 마운팅시켰다. 영상화를 상기 기재된 바와 같이 20x 긴 작업 거리 대물렌즈를 갖는 Zeiss 780 공초점 현미경에서 수행하였다. 조직-하이드로겔 샘플에 대한 일정 범위의 투명화 시간(8% SDS 중 2-7일)의 시험에도 불구하고, 피하층(주로 지방세포로 구성됨)은 지방세포에서의 모든 패키징된 지질의 불완전한 마이셀 용매화로 인해 일관된 투명화를 방해하였다(황색 조직, 도 8a).

[0171] 주사 전자 현미경검사

[0172] 샘플을 ESEM 모드로 FEI Quanta 200F 환경 주사 전자 현미경(ESEM)에서 이미지화시켰다. PACT-처리된 뇌 조직의 얇은 절편을 챔버 내의 샘플 홀더 상에 두고, 가스형 이차 전자 검출기(GSED)를 이용하여 3 또는 4의 스폿 크기로 5 kV의 전압 및 7.7 내지 8.3 mm의 작업 거리에서 이미지화시켰다. 절단/SEM 처리 동안 스트레칭(stretching)이 조직-하이드로겔 하이브리드의 포어를 더 크게 만들 것임을 인지하라. SEM 이미지의 실제 유효 포어 크기는 본원에 제시된 것보다 작아야 한다.

[0173] 정량화 방법

[0174] 평균 최인접 거리(NND): 1mm 두께의 관상 절편을 DAPI로 염색하고, w/10x 0.45N.A. plan-apo 대물렌즈로 이미지화시켰다. 24개의 3 μ m-두께의 이미지를 피질 시상 및 선조체의 다양한 영역으로부터 찍었다. 30-픽셀 롤링 볼(rolling ball) 반지름 차감 필터를 이용하여 백그라운드를 제거하였다. 모든 이미지는 개별적으로 역치화되고, 2진 이미지로 전환된다. 2진 워터셰드 분할(binary watershed segmentation)을 적용시켜 함께 집락되는 세포를 나누었다. 생성된 이미지를 Image J에서 분석 입자 옵션으로 정량하였다. 각각의 세포의 도심(centroid)을 측정치에서 확인하였고, imageJ에서 "nnd" 플러그인을 적용시킴으로써 NND를 계산하였다.

[0175] GFP 크기 정량화: AAV9-eGFP IV 주사된 마우스 뇌의 1mm 두께의 관상 절편을 5x 0.25N.A. Fluar 대물렌즈로 이미지화시켰다. Z-스택의 최대 투영을 정량화에 이용하였다. 각각의 GFP 양성 뉴런의 영역을 분리시키고, ImageJ에서 분석 입자 옵션으로 정량하였다.

[0176] 최인접 거리 측정 및 GFP 크기 계산 둘 모두를 투명화되지 않은 마우스 뇌 절편, PARS 투명화된 마우스 뇌 절편, 및 PARS 투명화된 후 후고정된 마우스 뇌 절편에서 피질, 선조체, 및 시상의 3개의 뇌 영역에 대해 수행하였다(대표적 뇌 절편에 대해 도 11a 및 데이터 결과에 대해 도 11b 참조). 모든 카운팅된 세포에 대한 평균 세포 크기 및 평균 NND를 각각의 영역에 대해 계산하고, 데이터를 세포 크기 또는 영역 사이의 NND에서 통계적으로 유의한 차이에 대해 분석하였다.

[0177] 형광 현미경검사

[0178] 투명화된 조직 샘플을 1일 동안 RIMS 용액에서 인큐베이션하였다. 이후, 샘플을 커버유리와 함께 7.0 mm 또는 3.0 mm 스페이서(iSpacer, SunJin Lab Co.), 또는 0.5 mm 또는 2.5 mm 스페이서(Silicone Isolator, Electron Microscopy Sciences, PA)를 이용하여 각각의 용액에 마운팅시켰다. 커버슬립된 샘플을 실온에서 저장하고, 영상화 전에 광으로부터 보호하였다. 중요하게는, 대부분의 형광 이미지 및 최초 샘플 시각화를 Fluar 5x/0.25 M27 건성 대물렌즈(작업 거리 12.5 mm), Plan-Apochromat 10x/0.45 M27 공기 대물렌즈(작업 거리 2.0 mm), LD SC Plan-Apochromat 20x/1.0 Corr M32 85mm 스케일-침지 대물렌즈(작업 거리 5.6 mm), 또는 LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈(작업 거리 0.57 mm)를 갖는 통상적인 현미경(Zeiss LSM 780)에서 수행하였다. 유일한 예외는 Andor Ikon-M 카메라 및 60X/1.4NA Plan Apo 1 대물렌즈를 갖는 Nikon Ti Eclipse 현미경을 사용하고, 도 3c에 세지된 이미지의 획득을 위한 smFISH 실험에 대한 것이며, 여기서 샘플은 Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR 대물렌즈(작업 거리 6.0 mm)를 갖는 Leica TCS SP8 2-광자 현미경을 이용한 Leica Microsystems에 의해 이미지화시켰다. Imaris 영상화 소프트웨어(Bitplane)를 이용하여 이미지 재구성을 수행하였다. 영상화 후, 샘플을 저장을 위해 실온에서 RIMS에 엠베딩시켰다.

- [0179] 도면에 의한 모든 공초점 영상화에 사용된 대물렌즈의 요약:
- [0180] 도 1: (F 좌측) Fluar 5x/0.25 M27 건성 대물렌즈; (F 우측; G; H; K) LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈; (I, J) LD SC Plan-Apochromat 20x/1.0 Corr M32 85mm 스케일-침지 대물렌즈. (1) Zeiss Plan-Apochromat 10x/0.45 공기 대물렌즈.
- [0181] 도 2: (a-b) 추가의 1.5x 배율로 Andor Ikon-M 카메라 및 60X/1.4NA Plan Apo 1 대물렌즈를 갖는 Nikon Ti Eclipse 현미경에서 이미지화된 샘플. 30 μ m 상에서 0.5 μ m 단계 크기로 Z-스택으로 획득된 이미지. 샘플을 640nm Coherent Cube, 및 532nm(SDL-532-200TG) 및 405 nm(SDL-405-LM-030) 레이저에 의해 여기시켰다.
- [0182] 도 3: (c) Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR 대물렌즈. 도 5: (a) Fluar 5x/0.25 M27 건성 대물렌즈; (b) Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR 대물렌즈, 6.0 mm의 작업 거리; (c) 상부: Fluar 5x/0.25 M27 건성 대물렌즈 및 하부(삽입물): LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈; (d) Leica HC FLUOTAR L 25x/1.00 IMM CORR 대물렌즈; (e) LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈. 도 6: (a) 10x 0.45 N.A. Plan-Apochromat을 갖는 Zeiss LSM 780 공초점 현미경; (b) LD SC Plan-Apochromat 20x/1.0 Corr M32 85mm 스케일-침지 대물렌즈(작업 거리 5.6 mm, Zeiss).
- [0183] 도 8: (b-c) Zeiss 5x 0.25 N.A Fluar 대물렌즈 및 LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 N.A. 다중-침지 대물렌즈를 갖는 Zeiss 780 공초점 현미경. (d) 추가의 1.5x 배율로 Andor Ikon-M 카메라 및 60X/1.4NA Plan Apo 1 대물렌즈를 갖는 Nikon Ti Eclipse 현미경에서 이미지화된 smFISH 샘플.
- [0184] 도 9: (a) LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈. (e) Fluar 5x/0.25 M27 건성 대물렌즈.
- [0185] 도 10: (b) 좌측: LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 다중-침지 대물렌즈; 우측: 10x 0.45 N.A. Plan-Apochromat을 갖는 Zeiss LSM 780 공초점 현미경.
- [0186] 도 12: 10x 0.45 N.A. Plan-Apochromat을 갖는 Zeiss LSM 780 공초점 현미경.
- [0187] 상기 기재된 다양한 방법 및 기술은 본 발명을 수행하기 위한 다수의 방식을 제공한다. 물론, 본원에 기재된 임의의 특정 구체예에 따라 기재된 모든 목적 및 장점이 반드시 달성될 수 있는 것이 아님이 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어, 당업자는 상기 방법이 본원에 교시되거나 암시된 다른 목적 또는 장점을 반드시 달성하지 않으면서 본원에 교시된 한 장점 또는 장점의 그룹을 달성하거나 최적화시키는 방식으로 수행될 수 있음을 인지할 것이다. 다양한 대안이 본원에 언급되어 있다. 일부 바람직한 구체예가 하나의 특징, 또 다른 특징, 또는 여러 특징을 특별히 포함하고, 다른 구체예가 하나의 특징, 또 다른 특징, 또는 여러 특징을 특별히 배제하는 한편, 또 다른 구체예가 하나의 이로운 특징, 또 다른 이로운 특징, 또는 여러 이로운 특징의 포함에 의해 특정 특징을 완화시키는 것이 이해되어야 한다.
- [0188] 또한, 당업자는 다양한 구체예로부터 다양한 특징의 적용가능성을 인지할 것이다. 유사하게, 상기 논의된 다양한 요소, 특징 및 단계 뿐만 아니라 각각의 상기 요소, 특징 또는 단계에 대한 다른 공지된 동등물이 본원에 기재된 원리에 따른 방법을 수행하기 위해 상기 분야의 당업자에 의해 다양한 조합으로 이용될 수 있다. 다양한 요소, 특징, 및 단계 중에서, 다양한 구체예에서 일부가 특별히 포함될 것이며, 나머지는 특별히 배제될 것이다.
- [0189] 본 출원은 특정 구체예 및 실시예와 관련하여 개시되었으나, 본 출원의 구체예가 특별히 개시된 구체예를 넘어 이의 다른 대안적 구체예 및/또는 용도 및 변형 및 이들의 동등물까지 미치는 것이 당업자에 의해 이해될 것이다.
- [0190] 일부 구체예에서, 본 출원의 특정 구체예를 기재하는 상황(특히, 하기 청구항의 특정 상황)에서 사용되는 단수 용어 및 유사한 언급은 단수 및 복수 둘 모두를 포함하는 것으로 해석될 수 있다. 본원의 값의 범위의 언급은 단지 상기 범위 내에 해당하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 언급하는 속기 방법으로 제공하는 것으로 의도된다. 본원에 달리 표시하지 않는 한, 각각의 개별적 값은 개별적으로 본원에 언급되는 것과 같이 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에 달리 표시하지 않거나 문맥에 의해 달리 명백히 부인되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원의 특정 구체예와 관련하여 제공된 임의의 및 모든 예, 또는 예시적 용어(예를 들어, "예를 들어")의 사용은 단지 본 출원을 더 잘 예시하기 위한 것이며, 달리 청구되는 출원의 범위에 대한 제한을 제기하는 것이 아니다. 명세서 내의 용어가 본 출원의 실시예 필수적인 임의의 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어선 안된다.

[0191] 본 출원을 수행하기 위해 본 발명자에게 공지된 최적 방식을 포함하는 본 출원의 바람직한 구체예가 본원에 기재된다. 바람직한 구체예에 대한 변화는 상기 설명을 읽는 경우 당 분야의 당업자에게 명백해질 것이다. 당업자가 상기 변화를 적절하게 이용할 수 있으며, 본 출원이 본원에 특별히 기재된 것과 달리 실시될 수 있음이 고려된다. 따라서, 본 출원의 많은 구체예는 적용법에 의해 허용되는 바와 같은 본원에 첨부된 청구항에 언급된 주제의 모든 변형 및 동등물을 포함한다. 또한, 모든 가능한 변화에서의 상기 기재된 요소의 임의의 조합은 본원에 달리 표시되거나 문맥에 의해 달리 명백히 부인되지 않는 한 본 출원에 포함된다.

[0192] 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원, 특허 출원의 공개, 및 다른 자료, 예를 들어, 논문, 서적, 명세서, 공보, 문헌, 물건 등은 이들과 관련된 임의의 수행 파일 이력, 본 발명의 문헌과 불일치하거나 상충하는 임의의 것들, 또는 본 발명의 문헌과 관련된 현재 또는 이후의 청구항의 가장 넓은 범위에 관하여 제한된 영향을 미칠 수 있는 임의의 것들을 제외하고는 모든 목적상 이들의 전체내용이 참조로서 본원에 포함된다. 예를 들어, 포함된 자료 중 임의의 자료와 관련된 용어의 기재, 정의, 및/또는 사용과 본 발명의 문헌과 관련된 용어의 기재, 정의, 및/또는 사용 사이에 임의의 불일치 또는 상충이 존재하는 경우, 본 발명의 문헌 내의 용어의 기재, 정의 및/또는 사용이 우선할 것이다.

[0193] 마지막으로, 본원에 개시된 출원의 구체예는 본 출원의 구체예의 원리의 예시임이 이해되어야 한다. 이용될 수 있는 다른 변형은 본 출원의 범위 내일 것이다. 따라서, 예를 들어, 비제한적인 예로, 본 출원의 구체예의 대안적 형태가 본원의 교시에 따라 이용될 수 있다. 따라서, 본 출원의 구체예는 엄밀하게 제시되고 기재된 것으로 제한되지 않는다.

[0194] **참고문헌**

Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS ONE* 7, e33916.

Becker, K., Jahrling, N., Saghafi, S., and Dodt, H.U. (2013). Ultramicroscopy: light-sheet-based microscopy for imaging centimeter-sized objects with micrometer resolution. *Cold Spring Harbor protocols* 2013, 704–713.

Buxbaum, A.R., Wu, B., and Singer, R.H. (2014). Single b-actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science* 343, 419–422.

Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nat. Methods* 10, 508–513.

Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., et al. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332–337.

Deisseroth, K.A., and Gradinaru, V. (2014). Functional Targeted Brain Endoskeletonization. U.S. patent US2014030192.

Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jahrling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Ziegler, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat. Methods* 4, 331–336.

Ertürk, A., and Bradke, F. (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Exp. Neurol.* 242, 57–64.

Ertürk, A., Becker, K., Jahrling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012a). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat. Protoc.* 7, 1983–1995.

Famm, K., Litt, B., Tracey, K.J., Boyden, E.S., and Slaoui, M. (2013). Drug discovery: a jump-start for electroceuticals. *Nature* 496, 159–161.

Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K., and Singer, R.H. (1998). Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science* 280, 585–590.

Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *J. Vis. Exp.* 65, 3564.

[0195]

- George, M.S., Sackeim, H.A., Rush, A.J., Marangell, L.B., Nahas, Z., Husain, M.M., Lisanby, S., Burt, T., Goldman, J., and Ballenger, J.C. (2000). Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy. *Biol. Psychiatry* 47, 287–295.
- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* 14, 1481–1488.
- Harmsen, M.M., and De Haard, H.J. (2007). Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 13–22.
- Hoffman, A.S. (2002). Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 3–12.
- Jonkers, B.W., Sterk, J.C., and Wouterlood, F.G. (1984). Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven device. *J. Neurosci. Methods* 12, 141–149.
- Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat. Neurosci.* 16, 1154–1161.
- Kim, S.Y., Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends Cogn. Sci.* 17, 596–599.
- Kuwajima, T., Sitko, A.A., Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., and Mason, C. (2013). ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* 140, 1364–1368.
- Leong, S.K., and Ling, E.A. (1990). Labelling neurons with fluorescent dyes administered via intravenous, subcutaneous or intraperitoneal route. *J. Neurosci. Methods* 32, 15–23.
- Li, T., Bourgeois, J.P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A.M., Mecheri, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., Rougeon, F., and Lafaye, P. (2012). Cellpenetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB J.* 26, 3969–3979.
- Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L.H., Samanta, A., Toelen, J., Debyser, Z., and Wilson, J.M. (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum. Gene Ther.* 21, 1259–1271.
- Lyubimova, A., Itzkovitz, S., Junker, J.P., Fan, Z.P., Wu, X., and van Oudenaarden, A. (2013). Single-molecule mRNA detection and counting in mammalian tissue. *Nat. Protoc.* 8, 1743–1758.
- Moy, A.J., Wiersma, M.P., and Choi, B. (2013). Optical histology: a method to visualize microvasculature in thick tissue sections of mouse brain. *PLoS ONE* 8, e53753.

[0196]

- Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje- McKenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Mol. Ther.* 19, 1070–1078.
- Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S.A., van Oudenaarden, A., and Tyagi, S. (2008). Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat. Methods* 5, 877–879.
- Spalteholz, W. (1914). *U"ber das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Pra"paraten* (Leipzig: S. Hierzel).
- Steinke, H., and Wolff, W. (2001). A modified Spalteholz technique with preservation of the histology. *Ann. Anat.* 183, 91–95.
- Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., et al. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157, 726–739.
- Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., and Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat. Protoc.* 9, 1682–1697.
- Tseng, S.J., Lee, Y.H., Chen, Z.H., Lin, H.H., Lin, C.Y., and Tang, S.C. (2009). Integration of optical clearing and optical sectioning microscopy for three dimensional imaging of natural biomaterial scaffolds in thin sections. *J. Biomed. Opt.* 14, 044004.
- Zhang, M.D., Tortoriello, G., Hsueh, B., Tomer, R., Ye, L., Mitsios, N., Borgius, L., Grant, G., Kiehn, O., Watanabe, M., et al. (2014). Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, E1149–E1158.

[0197]

[0198]

보충 참고문헌

- Becker, K., Jährling, N., Saghafi, S., Weiler, R., and Dodt, H.-U. (2012). Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS one* 7, e33916.
- Chen, Y.H., Chang, M., and Davidson, B.L. (2009). Molecular signatures of disease brain endothelia provide new sites for CNS-directed enzyme therapy. *Nature medicine* 15, 1215-1218.
- Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). CLARITY for mapping the nervous system. *Nature methods* 10, 508-513.

[0199]

- Chung, K., Wallace, J., Kim, S.Y., Kalyanasundaram, S., Andalman, A.S., Davidson, T.J., Mirzabekov, J.J., Zalocusky, K.A., Mattis, J., Denisin, A.K., *et al.* (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* 497, 332-337.
- Dodt, H.-U., Leischner, U., Schierloh, A., Jährling, N., Mauch, C.P., Deininger, K., Deussing, J.M., Eder, M., Zieglänsberger, W., and Becker, K. (2007). Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature methods* 4, 331-336.
- Ertürk, A., Becker, K., Jährling, N., Mauch, C.P., Hojer, C.D., Egen, J.G., Hellal, F., Bradke, F., Sheng, M., and Dodt, H.-U. (2012). Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nature protocols* 7, 1983-1995.
- Ertürk, A., and Bradke, F. (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Experimental neurology* 242, 57-64.
- Ertürk, A., Mauch, C.P., Hellal, F., Forstner, F., Keck, T., Becker, K., Jährling, N., Steffens, H., Richter, M., Hubener, M., *et al.* (2012). Three-dimensional imaging of the unsectioned adult spinal cord to assess axon regeneration and glial responses after injury. *Nature medicine* 18, 166-171.
- Gage, G.J., Kipke, D.R., and Shain, W. (2012). Whole animal perfusion fixation for rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., and Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature neuroscience* 14, 1481-1488.
- Jonkers, B., Sterk, J., and Wouterlood, F. (1984). Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven device. *Journal of neuroscience methods* 12, 141-149.
- Jung, Y., Ng, J.H., Keating, C.P., Senthil-Kumar, P., Zhao, J., Randolph, M.A., Winograd, J.M., and Evans, C.L. (2014). Comprehensive Evaluation of Peripheral Nerve Regeneration in the Acute Healing Phase Using Tissue Clearing and Optical Microscopy in a Rodent Model. *PLoS ONE* 9, e94054.
- Ke, M.-T., Fujimoto, S., and Imai, T. (2013). SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature neuroscience* 16, 1154-1161.
- Ke, M.T., and Imai, T. (2014). Optical clearing of fixed brain samples using SeeDB. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley [et al]* 66, Unit 2.22.

[0200]

Kim, S.Y., Chung, K., and Deisseroth, K. (2013). Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends in Cognitive Sciences* *17*, 596-599.

Kuwajima, T., Sitko, A.A., Bhansali, P., Jurgens, C., Guido, W., and Mason, C. (2013). ClearT: a detergent-and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development* *140*, 1364-1368.

Li, T., Bourgeois, J.P., Celli, S., Glacial, F., Le Sourd, A.M., Mecheri, S., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.O., Rougeon, F., *et al.* (2012). Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* *26*, 3969-3979.

Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L.H., Samanta, A., Toelen, J., Debyser, Z., and Wilson, J.M. (2010). Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Hum Gene Ther* *21*, 1259-1271.

Lubeck, E., Coskun, A.F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M., and Cai, L. (2014). Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Meth* *11*, 360-361.

Perruchini, C., Pecorari, F., Bourgeois, J.P., Duyckaerts, C., Rougeon, F., and Lafaye, P. (2009). Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies. *Acta neuropathologica* *118*, 685-695.

Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* *19*, 1070-1078.

Susaki, E.A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T.M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., and Yamaguchi, S. (2014). Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell*.

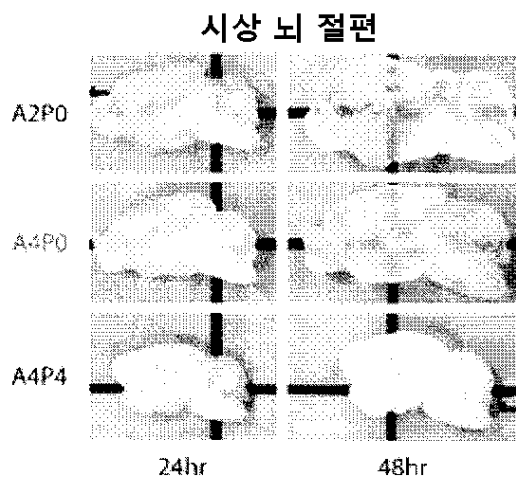
Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B., and Deisseroth, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature protocols* *9*, 1682-1697.

Zhang, M.D., Tortoriello, G., Hsueh, B., Tomer, R., Ye, L., Mitsios, N., Borgius, L., Grant, G., Kiehn, O., Watanabe, M., *et al.* (2014). Neuronal calcium-binding proteins 1/2 localize to dorsal root ganglia and excitatory spinal neurons and are regulated by nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, E1149-1158.

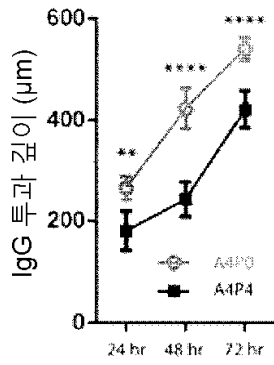
[0201]

도면

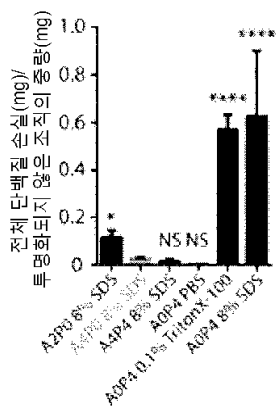
도면1a



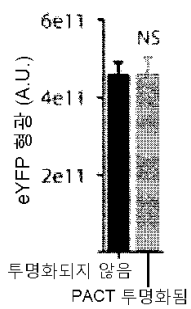
도면1b



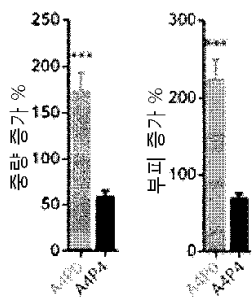
도면1c



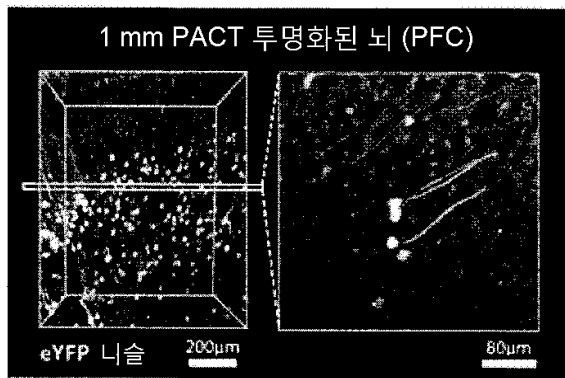
도면1d



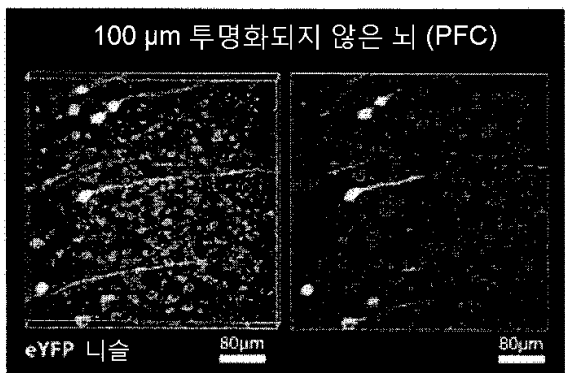
도면1e



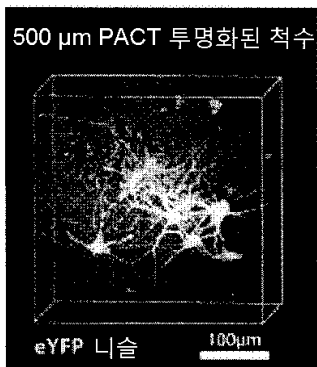
도면1f



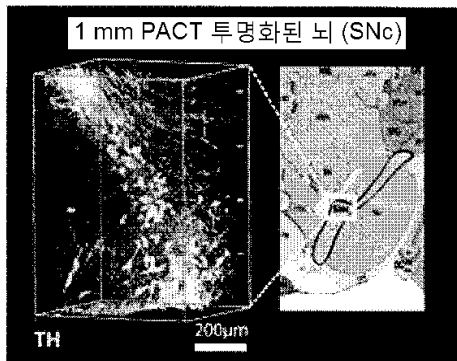
도면1g



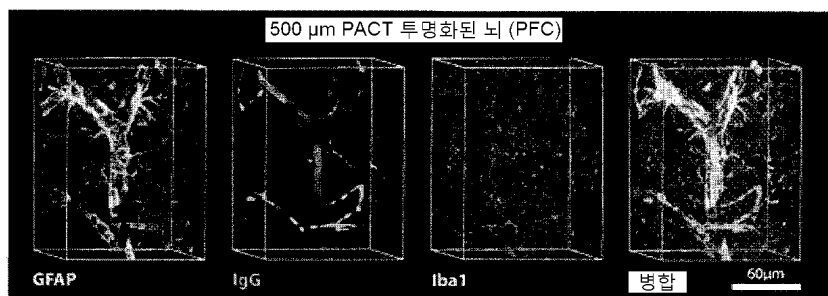
도면1h



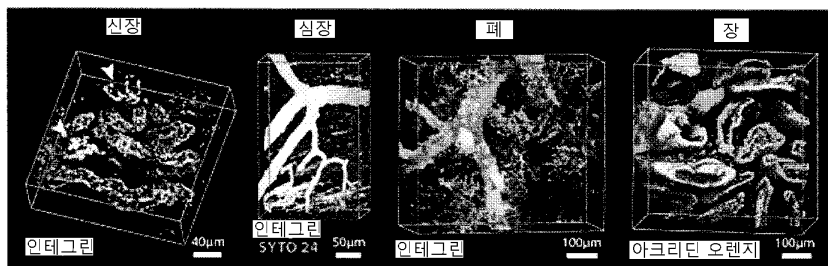
도면1i



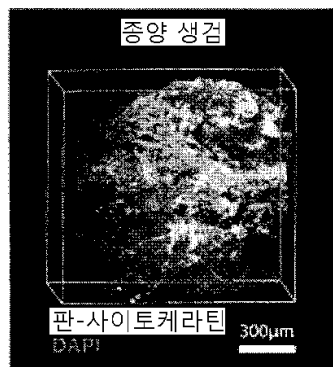
도면1j



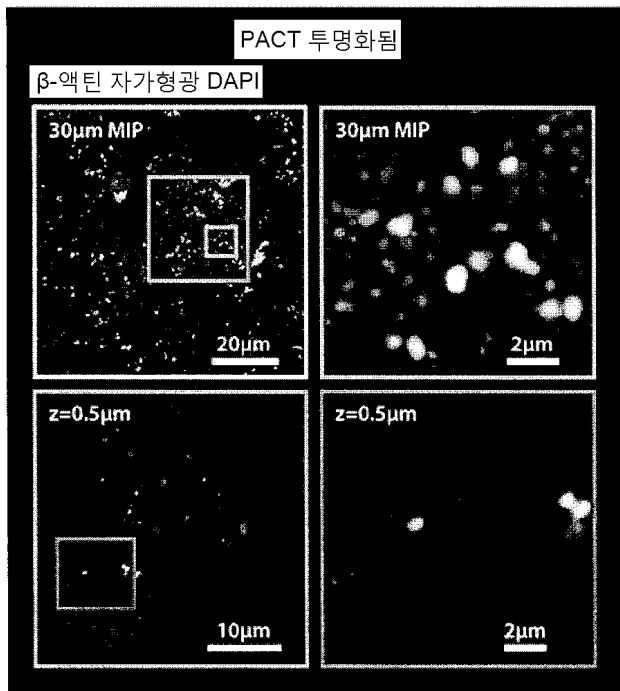
도면1k



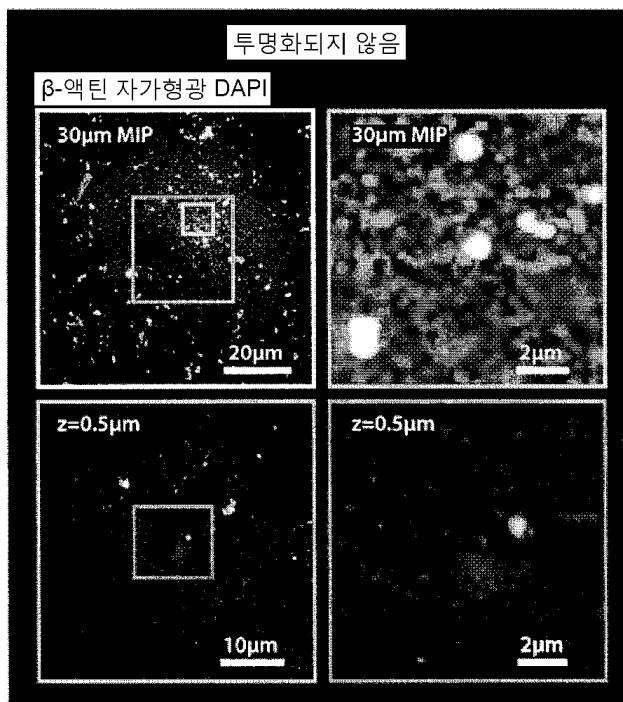
도면1l



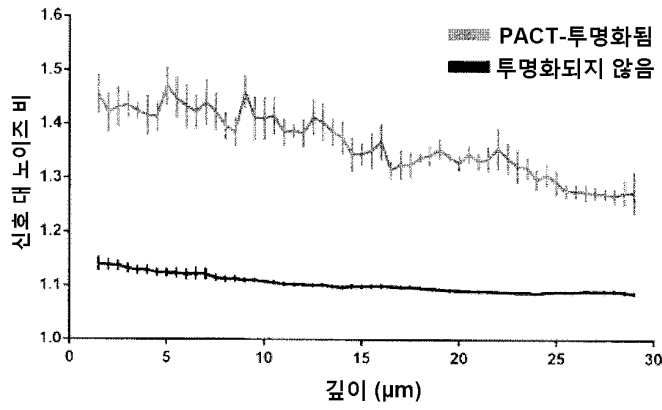
도면2a



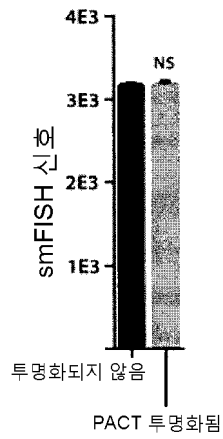
도면2b



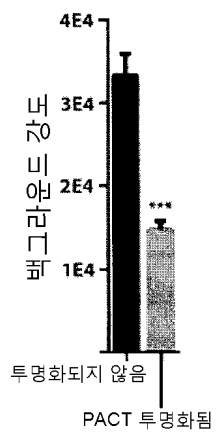
도면2c



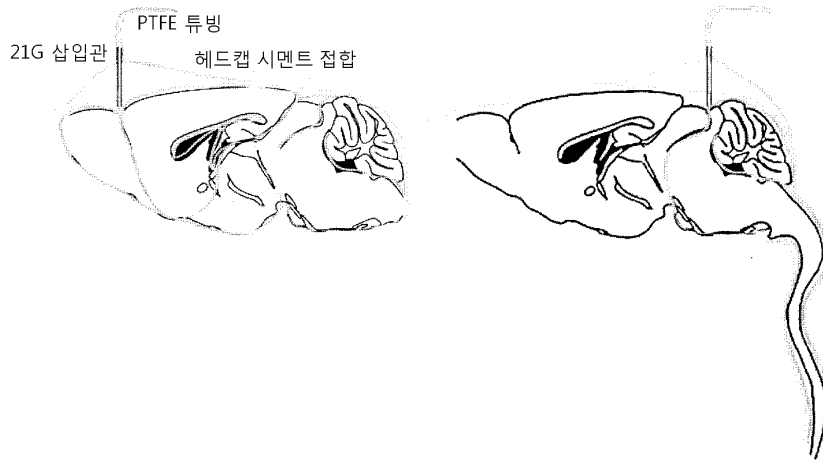
도면2d



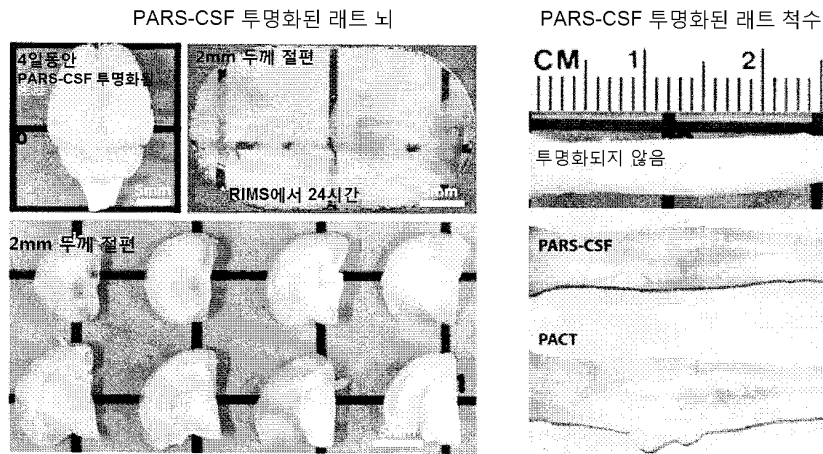
도면2e



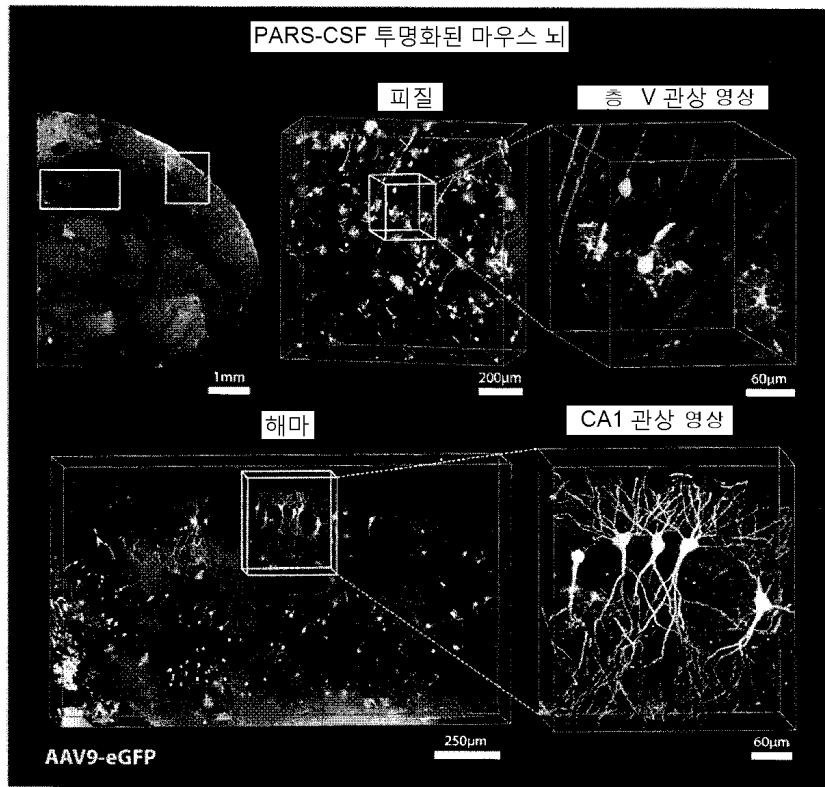
도면3a



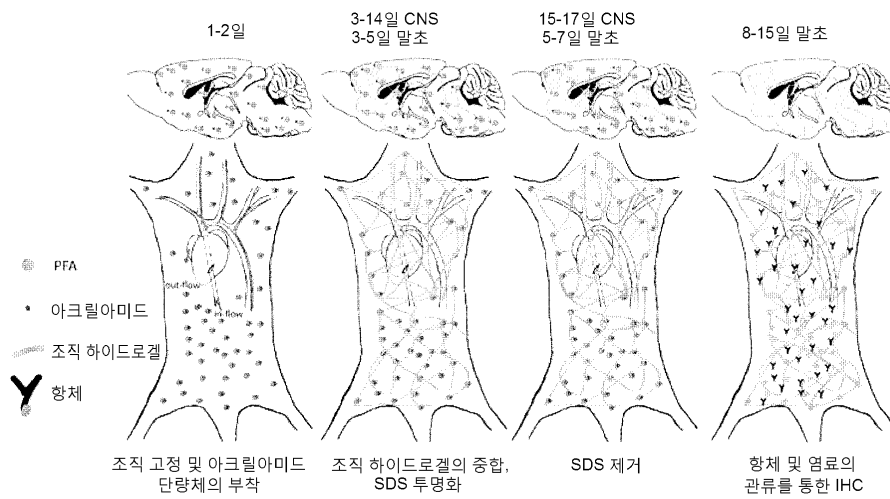
도면3b



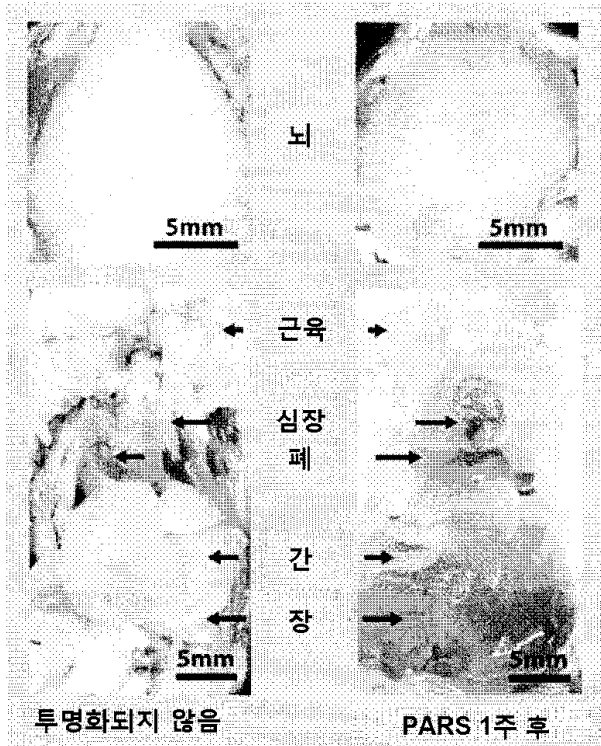
도면3c



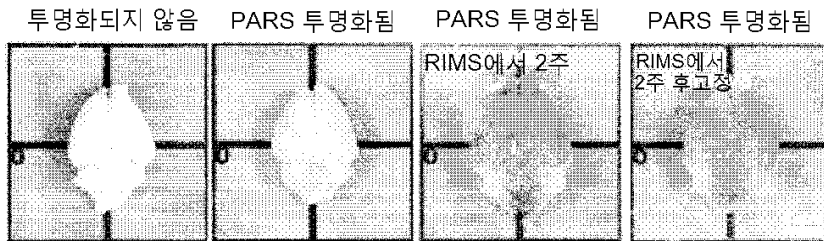
도면4a



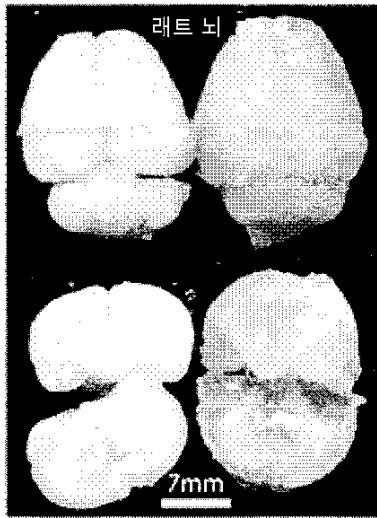
도면4b



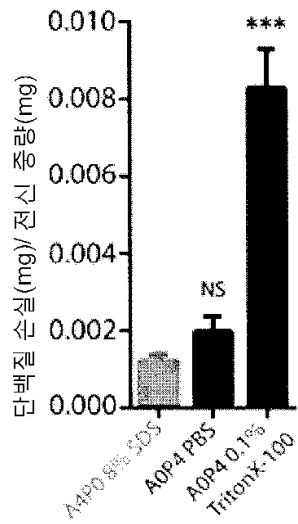
도면4c



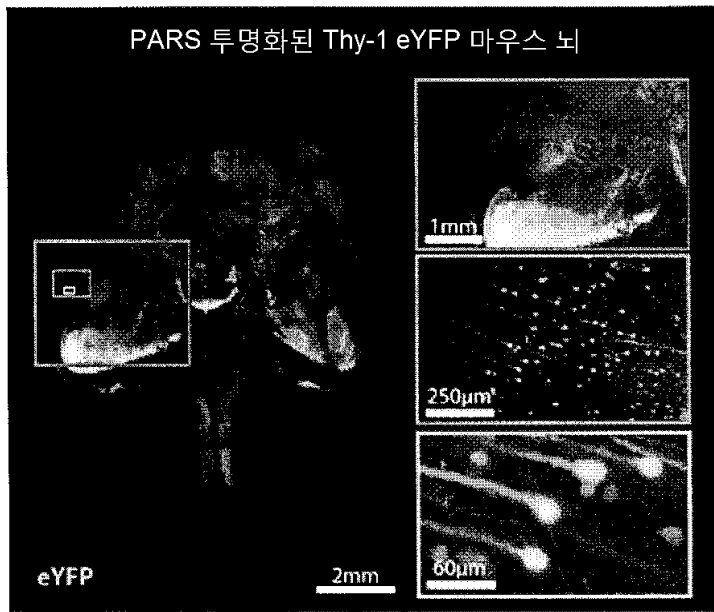
도면4d



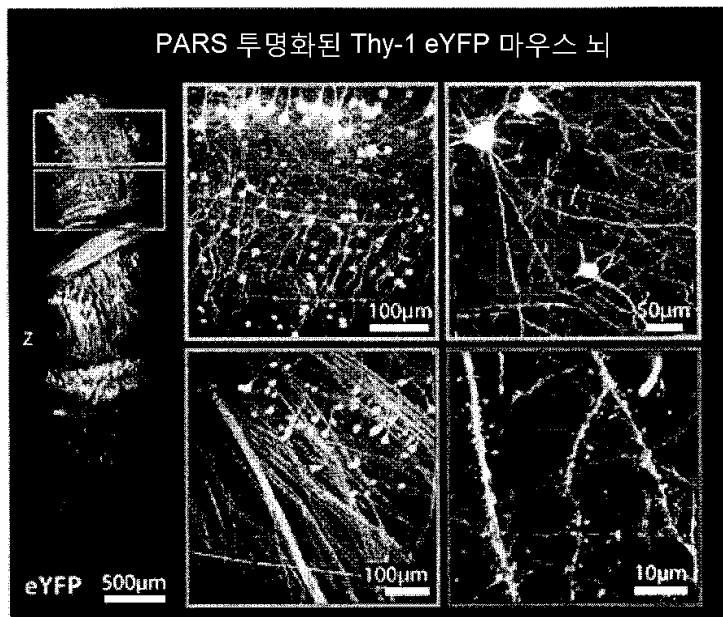
도면4e



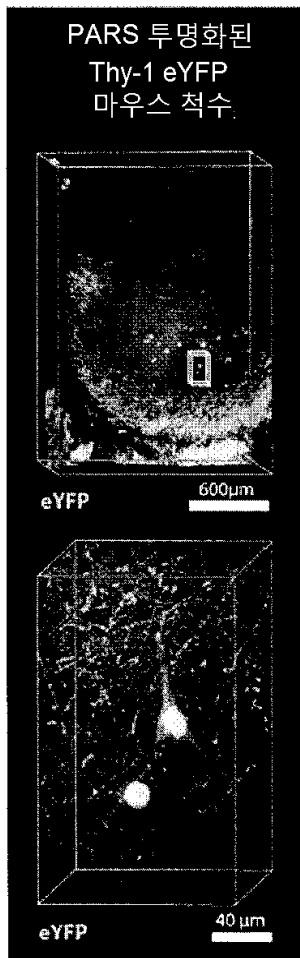
도면5a



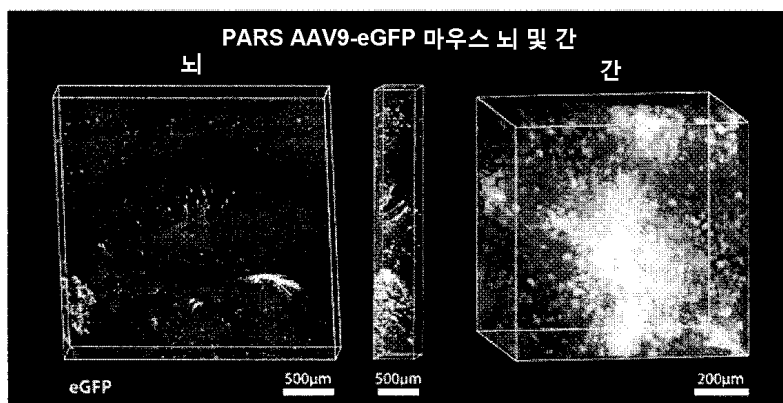
도면5b



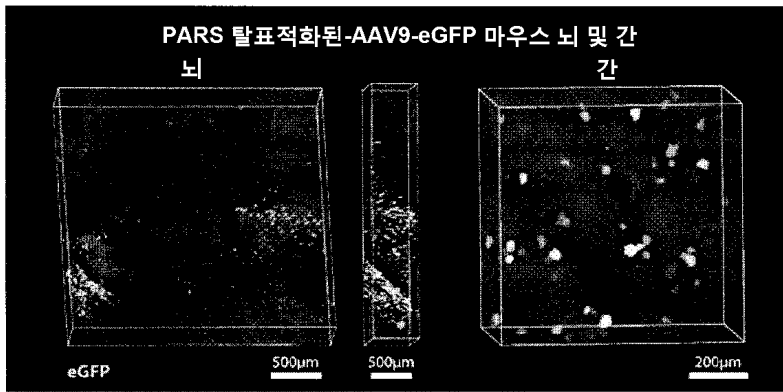
도면5c



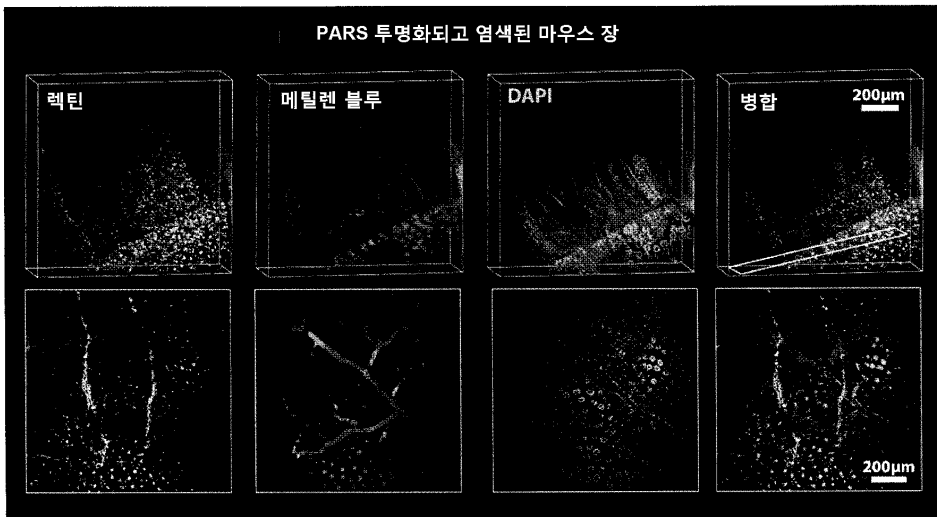
도면5d



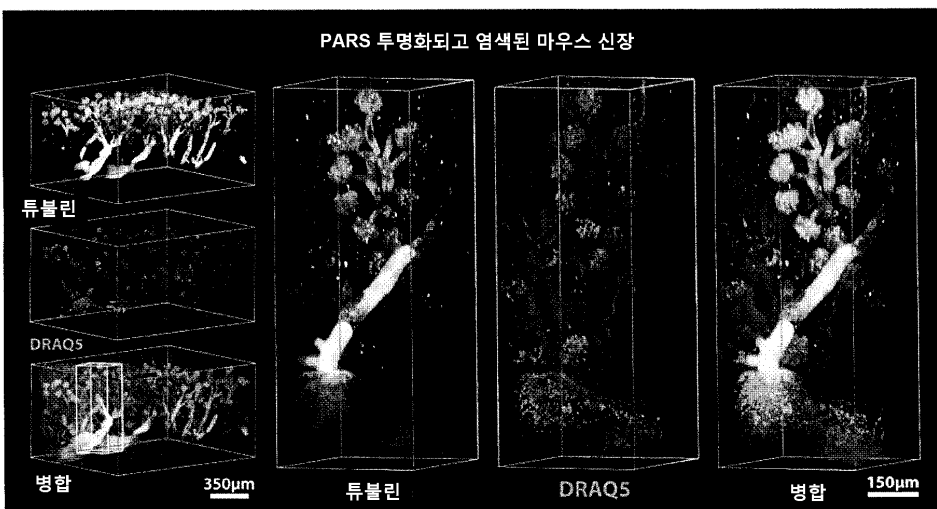
도면5e



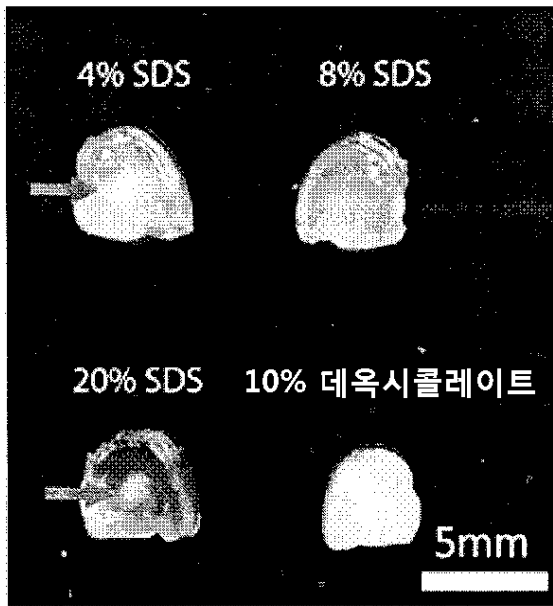
도면6a



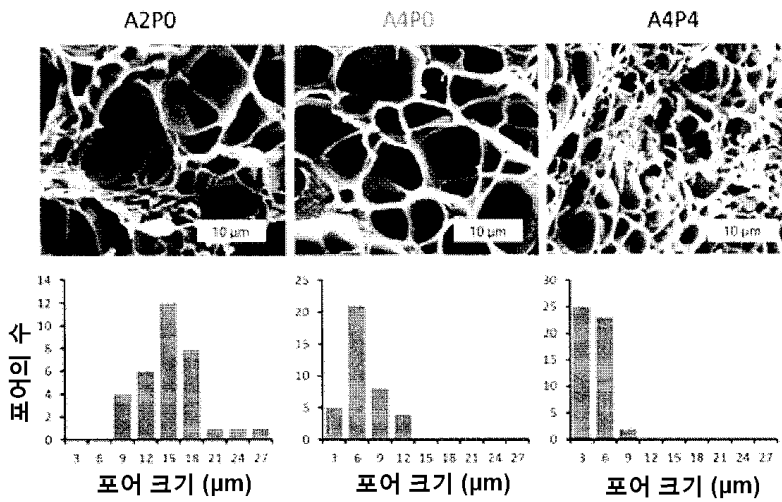
도면6b



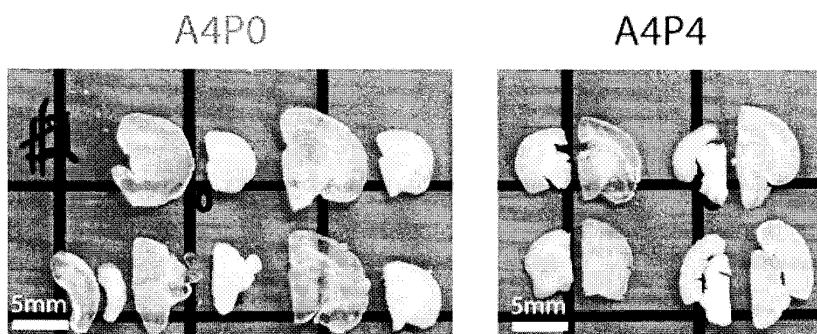
도면7a



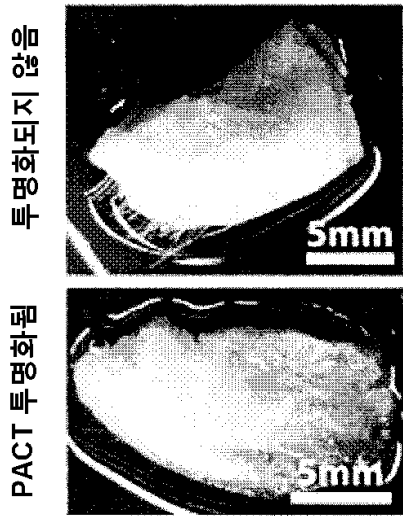
도면7b



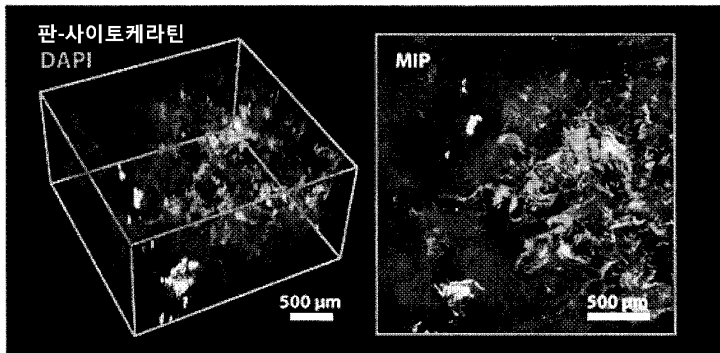
도면7c



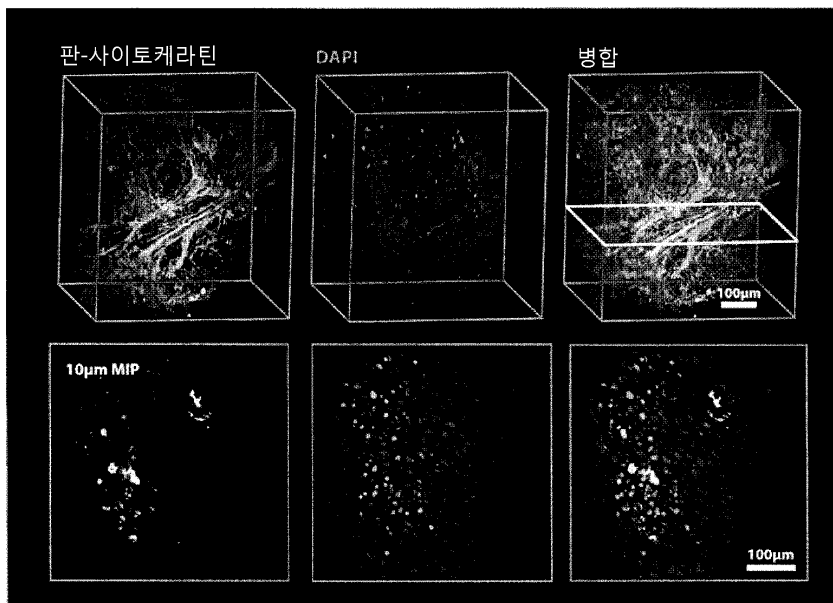
도면8a



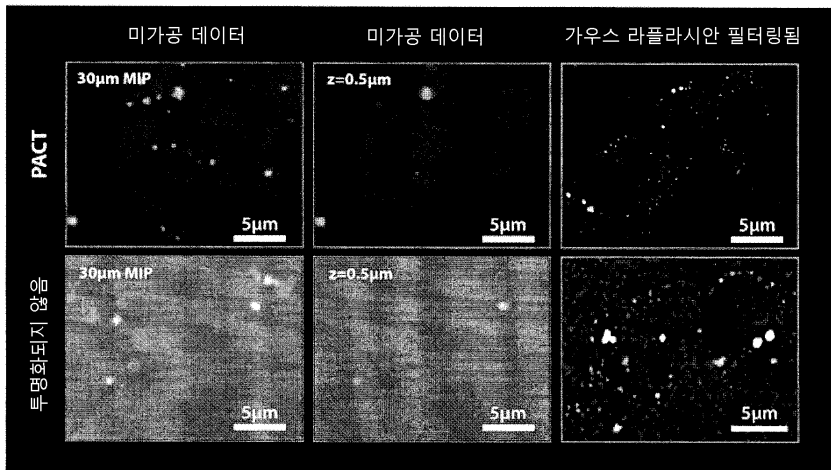
도면8b



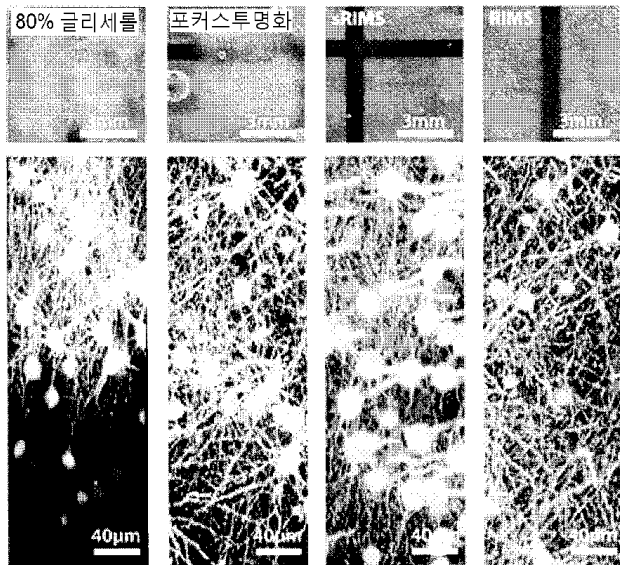
도면8c



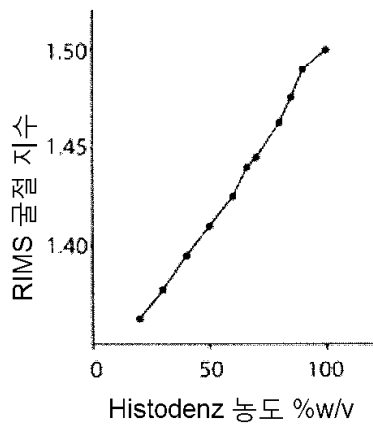
도면8d



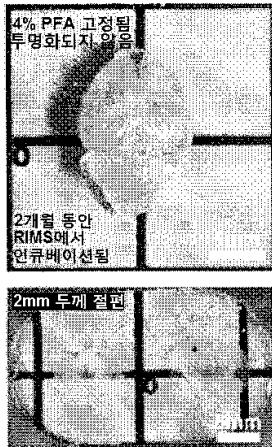
도면9a



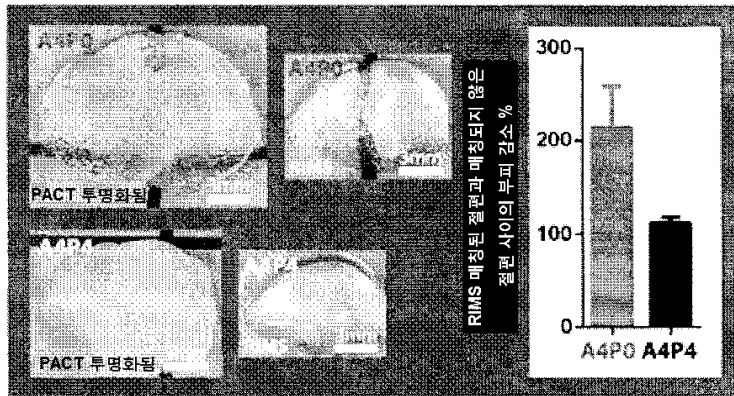
도면9b



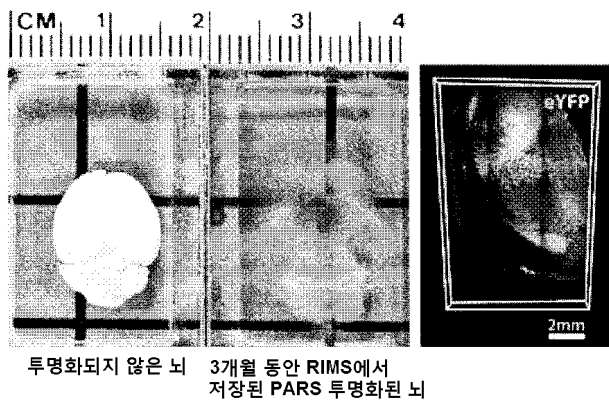
도면9c



도면9d

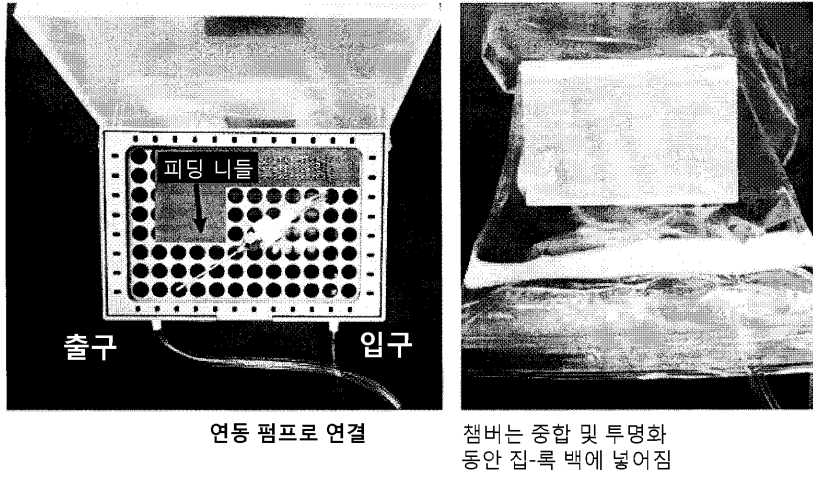


도면9e

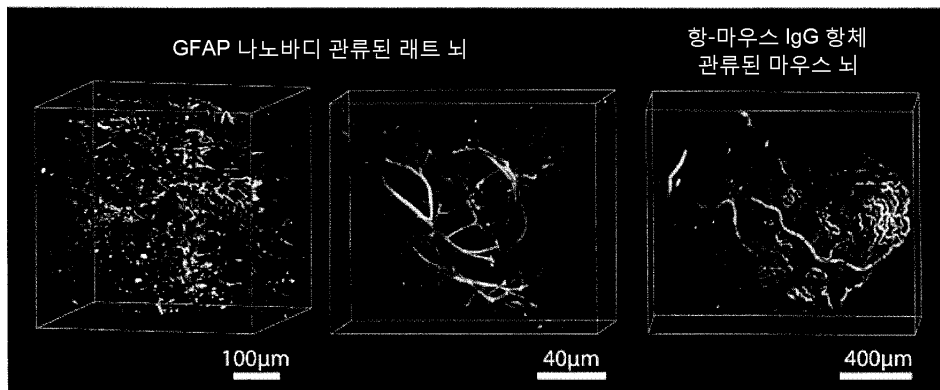


도면10a

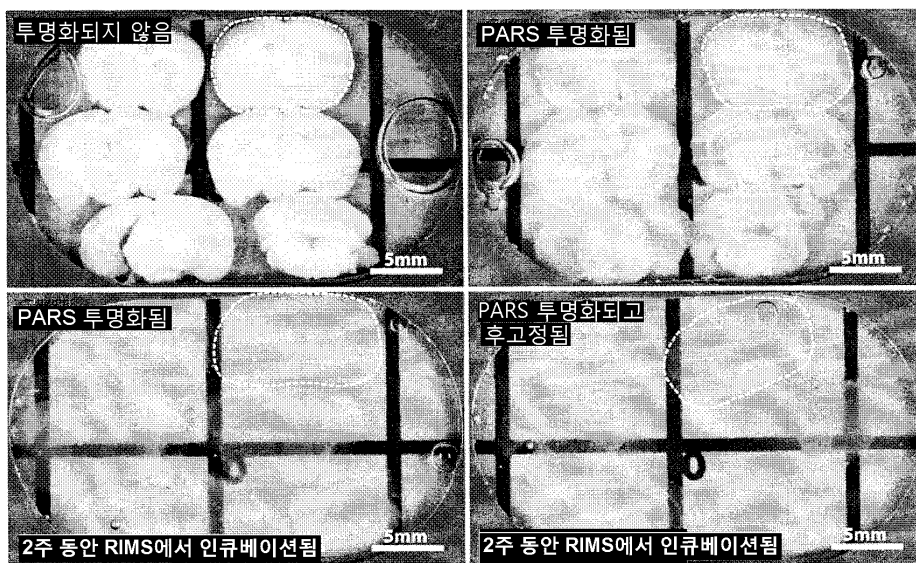
PARS 관류 챔버 장치



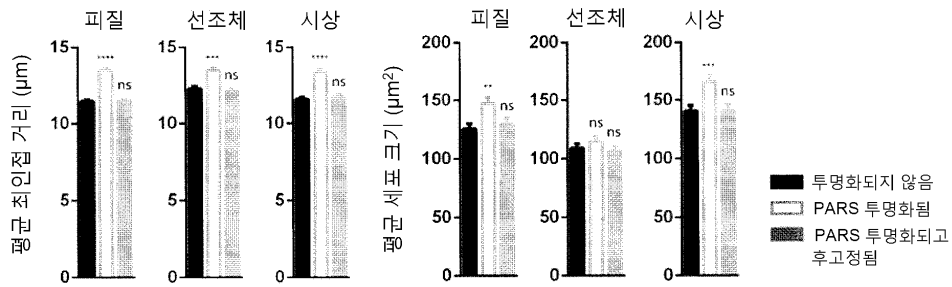
도면10b



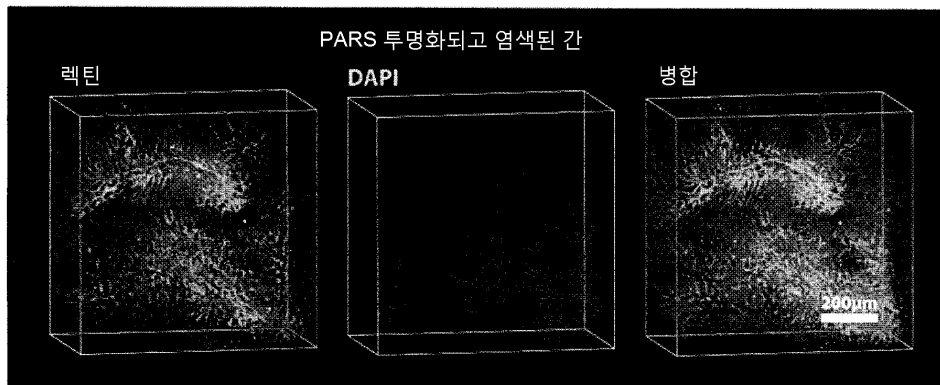
도면11a



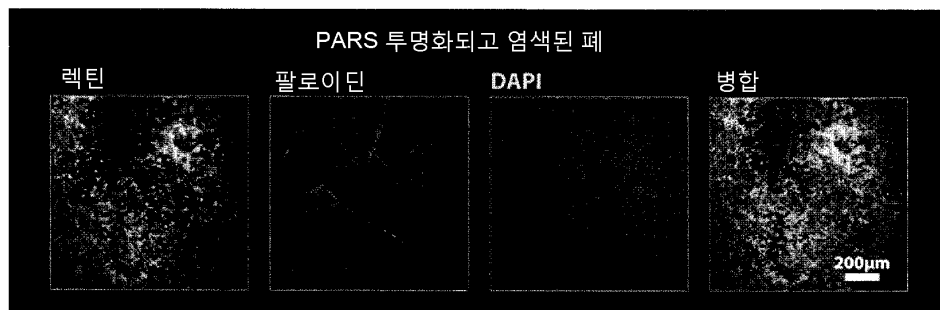
도면11b



도면12a



도면12b



도면12c



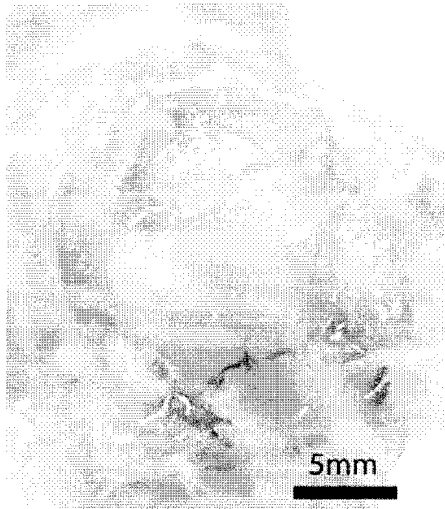
도면13a



도면13b



도면13c



도면14

불투명한 마우스 PARS중인 박스 투명한 표지된 마우스

