(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0158013
(43) 공개일자 2023년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6804 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12Q 1/682 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6804 (2018.05)
C12N 15/1075 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7034646
(22) 출원일자(국제) 2022년03월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/057187
(87) 국제공개번호 WO 2022/195089
국제공개일자 2022년09월22일
(30) 우선권주장
21315047.7 2021년03월19일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
파리 사이언스 엣 레트레스
프랑스 75006 파리 뤼 매저린 60
썽뜨르 나쇼날르 드 라 르쉐르쉐 씨엉띠삐끄
프랑스, 75016 파리, 뤼 미셸-앙쥐 3
에꼴 슈뻬리어르 드 피지끄 에 드 쉬미 엥뒤스트리엘르 드 라 빌 드 빠리
프랑스공화국, 에프-75005 빠리, 뤼 보끌랭 10
(72) 발명자
론델레스 야닉
프랑스 75010 파리 뤼 뒤 포부흐크 생-드니 62
그리피스 앤드류
프랑스 75006 파리 1 뤼 드 보우지하르
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

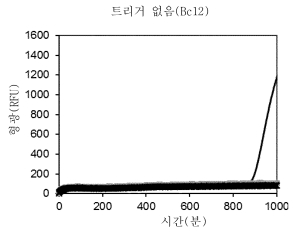
전체 청구항 수 : 총 29 항

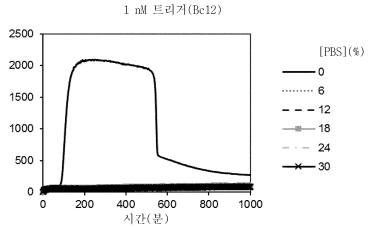
(54) 발명의 명칭 **세포 또는 소기관의 선택적 분석 방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포 또는 소기관 마커의 존재를 신호로 전환할 수 있는 적합화된 DNA 툴박스(toolbox)의 구현을 통해 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단(subpopulation)을 선택적으로 분석하기 위한 방법에 관한 것이다. 이 방법은, 관심 대상의 표현형을 갖는 세포 또는 소기관을 선택하는 것, 상기 세포 또는 소기관의 단백질을 분석하는 것, 그리고/또는 상기 세포의 DNA 및/또는 RNA를 서열분석하는 것에 특히 유용하다. 본 발명은 또한 상기 정의된 바와 같은 세포 또는 소기관의 선택적 분석 방법을 구현하기 위한 키트에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1





(52) CPC특허분류
C12N 15/1096 (2013.01)
C12Q 1/682 (2018.05)
C12Q 2521/107 (2013.01)
C12Q 2521/301 (2013.01)
C12Q 2537/159 (2013.01)
C12Q 2537/162 (2013.01)
C12Q 2537/163 (2019.08)
C12Q 2563/159 (2013.01)
C12Q 2563/179 (2013.01)

(72) 발명자
블리벳-베일리 가엘르
프랑스 75005 파리 15 뤼 뒤 푸이 드 레르미트
이바네즈 파블로
프랑스 95100 아르장퇴유 스퀘어 미슐레 5
바네르지 사티얌
프랑스 75014 파리 메종 데 프로방스 드 프랑스 룸 누메로 646 55 불러바흐 조르당
기네스 기욤
프랑스 75014 파리 뤼 레이몽 로세랑 166
마주리에 앙투안
프랑스 75008 파리 뤼 피에르 엣 마리 퀴리 22

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 방법:

a) 상기 세포 또는 소기관을 복수의 구획으로 분할하여, 대부분의 구획이, 적어도 하나의 활성자(activator) 올리고뉴클레오티드 또는 억제자(repressor) 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드, 및 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 제한 또는 닉-형성 효소(nicking enzyme) 및 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드를 포함하는 DNA 툴박스(toolbox) 혼합물과 함께, 하나의 세포 유형의 단일 세포 또는 하나의 세포 유형의 단일 소기관을 초과하여 포함하지 않도록 하는 단계,

b) 각 구획에서, 세포 또는 소기관 마커에 결합된 활성자 올리고뉴클레오티드(들) 및/또는 억제자 올리고뉴클레오티드(들)가 함께 상호작용하고 DNA 툴박스 혼합물의 성분과 상호작용하여 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)를 증폭하는 단계,

c) 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포 또는 소기관을 분석하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DNA 툴박스 혼합물은 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 하나 이상의 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 세포 또는 소기관 마커는 표면 마커, 내부 마커, 분비되거나 방출된 마커 및 막 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준은 적어도 2개의 공동-구획화된 세포 또는 소기관 사이의 상호작용에 의해 개질되고, 단계 c)는 상기 세포 또는 소기관 사이의 상호작용을 분석하게 하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 마커는 분비되거나 방출된 마커가 아니고, 상기 방법은 단계 a) 이전에, 하기 단계를 포함하는, 방법:

- 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드와 상기 세포 또는 소기관을 혼합하는 단계, 및

- 선택적으로, 세포 또는 소기관을 세척하여, 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 결합되지 않은 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드를 제거하는 단계.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

- 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드에 커플링된 활성자 올리고뉴클레오티드는 중합효소에 대한 주형 및/또는 프라이머로 작용하여 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고/하거나

- 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드에 커플링된 억제자 올리고뉴클레오티드는 중합효소에 대한 주형 및/또는 프라이머로 작용하여 하나 이상의 항신호 올리고뉴클레오티드를 생성하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 활성자 올리고뉴클레오티드 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 적어도 한 쌍의 리간드를 포함하고, 상기 리간드 쌍은 제1 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드 및 제2 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드를 포함하며, 이들의 마커에 대한 상기 제1 및 제2 리간드의 결합은 상기 제1 리간드에 커플링된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드와 상기 제2 리간드에 결합된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드 사이의 근접성 연장 또는 근접성 결찰을 유도하고, 상기 근접성 연장 또는 근접성 결찰은 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드(들)의 생성 및 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)의 증폭에 이르게 하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 막 앵커이며, 단계 b)에서 구획에 존재하는 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드(들)의 양은 봉입된 세포(들)의 막의 표면에 비례하므로, 단계 c)에서 신호 올리고뉴클레오티드(들)의 농도는 구획화된 세포의 존재 또는 부재 및/또는 구획화된 세포(들)의 수 및/또는 구획화된 세포(들)의 크기의 함수인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 신호 올리고뉴클레오티드는 적어도 2개의 상이한 신호 올리고뉴클레오티드로부터 생성된 마스터 신호 올리고뉴클레오티드인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서, DNA 툴박스 혼합물은 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 역전사효소, 리가아제, 재조합효소, 글리코실라아제 및 DNA-가공 효소로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 효소를 더 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 구획은 미세소적, 미세구획 또는 케이지(cage)인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 b)는 20℃ 내지 45℃를 포함하는 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)는, 리포터 프로브를 추가함으로써 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정하며, 여기서 상기 리포터 프로브는 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 의해 특이적으로 활성화되는, 단계, 및 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 결합된 리포터 프로브에 의해 방출된 신호를 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)는, 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 내용물을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 회수된 내용물의 함량은 세포 또는 소기관 핵산의 서열분석 및/또는 표지화 핵산 서열(들)에 의해 분석되는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)는, 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과

또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포를 회수하는 단계, 및 추가 분석 전에 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 동일한 구획에 위치한 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산 서열(들)은 구획-특이적 바코드 서열과 연관되어 있는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산은 바코딩된 프라이머 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 어댑터의 결찰, 또는 바코딩된 재조합 부위와의 재조합에 추가로 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 적어도 하나의 광불안정성(photolabile) 보호기를 포함하고, 단계 c)에서 리포터 프로브(들)로부터의 신호(들)가 임계값 초과 또는 미만인 구획에 대해, 상기 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위의 광탈보호가 발생하여, 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산이 구획-특이적 바코드 서열과 선택적 회합하도록 하는, 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 광절단성 연결을 포함하고, 단계 c)에서 리포터 프로브(들)로부터의 신호(들)가 임계값 초과 또는 미만인 구획에 대해, 상기 바코딩된 프라이머 서열, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위의 광절단이 발생하여, 프라이머 서열, 주형-전환 올리고 서열, 어댑터 서열 또는 재조합 부위 및 구획-특이적 서열 바코드를 포함하는 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산이 고체 지지체로부터 선택적 방출되도록 하는, 방법.

청구항 21

제16항에 있어서, 단계 c)에서, 신호 올리고뉴클레오티드의 결합 및 선택적으로 연장은 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위 및 구획-특이적 서열 바코드를 포함하는 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산이 고체 지지체로부터 선택적 방출되도록 하는, 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 고체 지지체가 비드이고, 각각의 구획은 단일 비드만을 포함하고, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 상기 구획의 비드에 특이적인 바코드 서열을 보유하는, 방법.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 고체 지지체가 미세구획 또는 케이지의 벽이며, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 구획-특이적 바코드 서열을 보유하는, 방법.

청구항 24

제17항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

- 단계 a)에서 DNA 툴박스 혼합물은 역전사효소 활성을 갖는 중합효소를 포함하고,

- 단계 a)에서 각 구획은 구획-특이적 바코드 서열 및 RNA에 결합할 수 있는 영역을 보유하는 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 고체 지지체에 부착되고,

- 단계 c)에서, 세포 또는 소기관은 용해되어 RNA를 방출하고, 구획-특이적 바코드 서열 및 RNA에 결합할 수 있

는 영역을 보유하는 올리고뉴클레오티드는 방출된 RNA 상에서 역전사효소 활성을 갖는 중합효소에 의해 촉매되는 cDNA 합성을 프라이밍하는 데 사용되어, 구획-특이적 바코드를 보유하는 cDNA를 생성하게 되고,

- 단계 c)에서, 적어도 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 경우 구획-특이적 바코드를 보유하는 cDNA가 고체 지지체로부터 방출되고, 방출된 바코딩된 cDNA 및/또는 미방출된 바코딩된 cDNA가 서열분석에 의해 분석되는, 방법.

청구항 25

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 구획의 회수된 내용물은 서열분석에 의해 분석되어 상기 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정하는, 방법.

청구항 26

제14항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 c)는, 정량화 올리고뉴클레오티드를 추가함으로써 상기 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 정량화 올리고뉴클레오티드는 상기 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재할 경우 특이적으로 증폭되는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 동일한 구획에 위치한 정량화 올리고뉴클레오티드는 구획-특이적 바코드 서열과 연관되어 있는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 정량화 올리고뉴클레오티드는 바코딩된 프라이머 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 어댑터의 결찰, 또는 바코딩된 재조합 부위와의 재조합에 추가로 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 29

하기를 포함하는, 제1항 내지 제28항 중 어느 한 항의 방법을 구현하기 위한 키트:

a) 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 닉-형성 효소 또는 제한 효소, 및 선택적으로, 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 역전사효소, 리가아제, 재조합효소, 글리코실라아제 및 DNA-가공 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소,

b) 적어도 하나의 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드,

c) 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 비특이적 증폭을 피하기 위한 누출-흡수 올리고뉴클레오티드, 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드를 신호 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드로 전환시킬 수 있는 전환 올리고뉴클레오티드, 신호 올리고뉴클레오티드의 검출을 가능하게 하는 리포팅 프로브 및 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정할 수 있게 하는 정량화 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드,

d) 선택적으로, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위를 포함하는 바코딩된 핵산의 세트, 및

e) 선택적으로, 미세유체 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 또는 소기관의 선택적 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 단일 세포 다중-오믹스(multi-omics) 분석은 성장하는 분야이다. 2018년 시장은 3억 달러이며, 2022년에는 16억 달러가 될 것으로 예상된다(BioInformatics, LLC).

[0003] 단일 세포 분석은 건강한 조직과 악성 조직의 세포 이질성을 극복하는 데 없어서는 안 될 도구가 되었는데, 이는 세포 집단을 분석하면 이의 이질성을 밝힐 수 없기 때문이다.

[0004] 게다가, 복잡하고 이질적인 생물학적 시스템에 대한 더 나은 이해가 절실히 필요하며 이는 그들의 표현형(발현된 리간드, 막 수용체, 발현된 단백질 등)에 의해 정의되고 거의 표현되지 않는(예를 들어 시작 샘플의 1% 미만) 관심 대상의 하위 집단의 -오믹(-omic) 정보를 필요로 한다.

[0005] 오믹 또는 표현형의 분석은 이제 단일 세포 규모에서 높은 유속으로 가능하지만 샘플의 모든 세포를 서열분석해야 한다.

[0006] 서열분석될 세포 수를 줄이는 것은 희귀한 사건, 세포 집단의 복잡한 세트에 집중하거나 치료 목적을 위한 경쟁 도구를 제공하는 것을 가능하게 한다. 서열분석을 위한 하위 집단을 선택할 가능성은, 단일 세포 분석 전에 유세포 분석법을 사용하는 것을 제외하고는 현재 임의의 상업적 솔루션에 의해 제안되지 않는다. 그러나, 유세포 분석 후 단일 세포 분석은 고가의 장비가 필요하고 일부 세포에는 적합하지 않으며 세포의 시간적 추적에도 적합하지 않다.

[0007] 따라서, 서열분석에 의해 분석할 하위 집단을 선택하는 높은 처리량 능력을 갖는 단일 세포 구획화 기술은 현재 존재하지 않는다. 예를 들어 기존 기술은 하기와 같은 단점이 있다:

[0008] - 유세포 분석, FACS: 소정의 시간에 특정 막 마커의 존재에 대해 많은 수의 세포를 분류해야 한다. 단일 세포 분석을 수행하기 위해서는 다른 기술과의 커플링이 필요하며,

[0009] - 낙하 미세유체학, "10X 유전체학": 시간적 시각화 또는 분류 없이 단일 세포 수준에서 분석,

[0010] - 미세유체 트랩, "플루이다임(Fluidigm) C1": 시각화하되 분류하지는 않고 최대 수백 내지 수천 개의 단일 세포를 분석,

[0011] - 마이크로-웰1, 나노-디스펜서, "CellenONE": 시간적 시각화 및 분류를 통해 단 몇 개의 단일 세포만 분석.

[0012] 따라서 기존 시스템은 세포를 분리하고 개별적으로 표시하고 서열분석을 수행할 수 있지만 세포의 표현형을 그-omic 특징(예를 들어, 게놈 특징, 트랜스크립토믹(transcriptomic) 특징 등)에 커플링하거나 이기종 풀(heterogenous pool)로부터 관심 대상의 세포를 선택하고 이를 개별적으로 서열분석할 수 없다.

[0013] 따라서 세포 또는 소기관의 선택적 분석을 위한 개선된 방법이 필요하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명자들은 적합화된(adapted) DNA-툴박스(toolbox)의 구현을 통해 세포 또는 소기관의 표현형 마커를 증폭된 DNA 신호로 "변환"하는 방법으로서, 이러한 세포 또는 소기관의 선택적 분석을 위해, 예를 들어, 서열분석을 위해 신호가 이 표현형 마커를 표시하는 구획화된 단일 세포 또는 소기관을 선택하는 데 사용되는 방법을 디자인하였다. 표현형 선택은 유리하게는 표면 마커, 내부 마커, 분비되거나 방출된 마커, 막 마커 또는 여러 마커의 조합에 따라 이루어질 수 있다. 표현형 기준에 따라 하위 집단을 분류하고 서열분석하도록 하는 이 새로운 방법은 기술적 혁신으로 보인다.

[0015] 본 발명은 유리하게는 매우 경쟁적인 비용 조건 하에서 고속 세포 선택 작업(분석당 10,000개 초과의 세포)을 수행하는 것을 가능하게 한다.

[0016] 본 발명은 도쿄 대학의 Yannick Rondelez와 ESPCI Paris의 팀이 개발한 DNA-toolbox라는 분자 생물학 반응의 동적 회로를 기반으로 한다(문헌[Baccouche *et al.* (2014) *Methods* 67:234-249]). 이러한 회로는 짧은 길이의 올리고뉴클레오티드 서열(주형이라고도 함)과, 중합효소, 엑소뉴클레아제(exonuclease) 및 닉카아제(nickase)를 포함한 효소로부터 제조된다.

[0017] 따라서 본 발명에 따른 방법은 DNA 증폭 반응에 의존하며, 이에 대한 구현 조건은 살아 있는 세포의 표현형 분석과 양립할 수 없는 것으로 보인다. 그러나, 놀랍게도, 본 발명의 방법은 또한 살아있는 세포의 선택적 분석에 사용될 수 있다.

[0018] 따라서 본 발명의 제1 목적은 하기 단계를 포함하는, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준 결정에 기초

하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 방법이다:

[0019] a) 상기 세포 또는 소기관을 복수의 구획으로 분할하여, 대부분의 구획이, 적어도 하나의 활성자(activator) 올리고뉴클레오티드 또는 억제자(repressor) 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드, 및 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 제한 또는 닉-형성 효소(nicking enzyme) 및 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드를 포함하는 DNA 툴박스 혼합물과 함께, 하나의 세포 유형의 단일 세포 또는 하나의 세포 유형의 단일 소기관을 초과하여 포함하지 않도록 하는 단계,

[0020] b) 각 구획에서, 세포 또는 소기관 마커에 결합된 활성자 올리고뉴클레오티드(들) 및/또는 억제자 올리고뉴클레오티드(들)가 함께 상호작용하고 DNA 툴박스 혼합물의 성분과 상호작용하여 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)를 증폭하는 단계,

[0021] c) 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포 또는 소기관을 분석하는 단계.

[0022] 본 발명의 다른 목적은 상기 정의된 바와 같은 방법을 구현하기 위한 키트로서, 상기 키트는 하기를 포함한다:

[0023] a) 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 닉-형성 효소 또는 제한 효소, 및 선택적으로, 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제(endonuclease), 역전사효소, 리가아제, 재조합효소, 글리코실라아제 및 DNA-가공 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소,

[0024] b) 적어도 하나의 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드,

[0025] c) 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 비특이적 증폭을 피하기 위한 누출-흡수 올리고뉴클레오티드, 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드를 신호 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드로 전환시킬 수 있는 전환 올리고뉴클레오티드, 신호 올리고뉴클레오티드의 검출을 가능하게 하는 리포팅 프로브 및 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정할 수 있게 하는 정량화 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드,

[0026] d) 선택적으로, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위를 포함하는 바코딩된 핵산의 세트, 및

[0027] e) 선택적으로, 미세유체 장치.

[0028] 본 발명의 다른 목적은 특히 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 상기 정의된 바와 같은 키트의 용도이다.

[0029] 세포 또는 소기관

[0030] 본 발명은 특히 그들의 표현형, 예컨대 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준에 기초하여 관심 대상의 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택할 수 있게 한다.

[0031] "그들의 표현형에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택하는 것"은 본원에서 특히 세포 또는 소기관의 이기종 집단 중에서 관심 대상의 표현형을 갖는 일련의 세포 또는 소기관을 선택하는 것을 의미한다.

[0032] 세포는 예를 들어 살아있는 세포, 냉동 세포 또는 투과성 세포, 예를 들어 고정된 투과성 세포일 수 있다.

[0033] 세포는 당업자에게 잘 알려진 임의의 방법에 의해 투과될 수 있다.

[0034] 세포는 예를 들어 진핵 세포 또는 원핵 세포일 수 있다.

[0035] 세포는 바람직하게는 진핵 세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포이다.

[0036] 비인간 포유동물 세포의 비제한적 예는 래트 세포, 뮤린 세포, 햄스터 세포 또는 원숭이 세포를 포함한다.

[0037] 포유동물 세포는 바람직하게는 인간 세포이다.

[0038] 세포는 세포주로부터 또는 대상체의 샘플로부터 수득될 수 있다.

[0039] 세포는 바람직하게는 대상체, 예를 들어 인간 대상체의 샘플로부터 수득된다. 상기 대상체는 건강한 대상체 또

는 질병에 걸릴 위험이 있거나 질병을 앓고 있는 대상체일 수 있다.

[0040] 샘플은 예를 들어 조직 샘플 또는 혈액 샘플과 같은 유체 샘플일 수 있다.

[0041] 조직 샘플은 예를 들어 종양 샘플 또는 염증 조직 샘플일 수 있다.

[0042] 세포는 예를 들어 T 세포 및 항원 제시 세포(APC: antigen-presenting cell)와 같은 2가지 상이한 종류의 세포를 포함할 수 있다.

[0043] 소기관은 예를 들어 미토콘드리아 또는 핵일 수 있다.

[0044] 소기관은 특히 당업자에게 잘 알려진 임의의 방법에 의해 상기 정의된 바와 같은 세포로부터 수득될 수 있다.

[0045] 세포 또는 소기관 마커

[0046] 특히 그들의 표현형에 기초하여 상기 정의된 바와 같이, 관심 대상의 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택하기 위해, 본 발명은 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 존재 또는 부재를 검출할 수 있게 한다.

[0047] 세포 또는 소기관 마커는 예를 들어 수용체일 수 있다.

[0048] 세포 또는 소기관 마커는 예를 들어 단백질, 당단백질, 지질단백질, 당지질 또는 탄수화물일 수 있다.

[0049] 세포 마커는 관심 대상의 세포의 하위 집단을 선택하는 데 사용된다.

[0050] 세포 마커는 예를 들어 표면 마커, 내부 마커, 분비되거나 방출된 마커 및/또는 막 마커로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0051] 관심 대상의 표현형이 내부 마커의 존재 또는 부재에 기초할 경우, 세포는 바람직하게는 투과성이다.

[0052] 관심 대상의 표현형이 세포 분비되거나 방출된 마커의 존재 또는 부재에 기초할 경우, 세포는 살아있는 세포이다.

[0053] 방법이 선택된 세포 하위 집단의 DNA 또는 RNA를 서열분석하기 위해 추가로 사용되는 경우, 세포는 바람직하게는 살아있는 세포이다.

[0054] 소기관 마커는 관심 대상의 소기관의 하위 집단을 선택하는 데 사용된다.

[0055] 소기관 마커는 예를 들어 표면 마커, 막 마커, 내부 마커, 분비 또는 방출 소기관 마커로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0056] 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드

[0057] 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 상기 정의된 바와 같은 세포 또는 소기관 마커를 검출하기 위해 사용된다.

[0058] 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 상기 세포 또는 소기관 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자일 수 있다

[0059] 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 예를 들어 단백질, 펩티드, 항체 또는 이의 단편, 앱타머, RNA(*리보핵산*), DNA(*데옥시리보핵산*), 렉틴 및 막 앵커(anchor)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0060] 항체는 바람직하게는 단일클론 항체이다.

[0061] 용어 "앱타머"는 본원에서 특이적인 3차원 형태를 채택하는 능력을 통해 표적, 예를 들어 상기 정의된 바와 같은 세포 또는 소기관 마커에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 앱타머는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 두 유형 모두의 뉴클레오티드 잔기의 혼합물을 포함할 수 있다. 앱타머는 하나 이상의 개질된 염기, 당 또는 인산염 백본 단위를 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 라모스(Ramos) 세포에 특이적인 앱타머는 예를 들어 서열 번호 16 또는 서열 번호 17의 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0063] 막 앵커는 세포막에 결합한다. 막 앵커는 예를 들어 콜레스테롤일 수 있다. 콜레스테롤과 같은 비특이적 막 앵커를 사용하는 경우 세포의 하위 집단은 전체 세포 집단에 해당한다.

[0064] 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 바람직하게는 상기 정의된 바와 같이 항체 또는 앱타머이다.

[0065] 본 발명에 따라 사용되는 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 공유 또는 비공유 결합을 사용하여 적어도 하나의 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된다.

[0066] 마커-특이적 리간드에 대한 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드의 커플링은 당업자에게 잘 알려진 임의의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0067] 예를 들어, DNA 스페이서 또는 비핵성 스페이서일 수 있는 스페이서가 사용될 수 있다. 상기 스페이서는 단백질 펩티드 리간드(예컨대, 항체)의 경우 3' 또는 5'에 부착될 수 있다. 커플링은 비오틴 스트렙타비딘 연결 또는 공유 개질에 의해 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[Dovgan, Igor, et al. "Antibody-oligonucleotide conjugates as therapeutic, imaging, and detection agents." Bioconjugate chemistry 30.10 (2019): 2483-2501] 참조).

[0068] 앱타머의 경우, 두 서열은 단순히 함께 또는 선택적으로 스페이서 또는 링커와 함께 융합될 수 있다.

[0069] 본원에서 "활성자 올리고뉴클레오티드"는 신호 올리고뉴클레오티드, 또는 신호 올리고뉴클레오티드의 생성을 야기할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0070] 신호 올리고뉴클레오티드의 생성을 야기할 수 있는 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 (i) 전구체 올리고뉴클레오티드, (ii) 전환 올리고뉴클레오티드 또는 (iii) 전환 올리고뉴클레오티드에 결합 또는 융합되거나 신호 서열에 상보적인 서열에 결합되거나 융합된 전구체 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0071] "억제자 올리고뉴클레오티드"는 본원에서 항-신호 올리고뉴클레오티드의 생성을 야기할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0072] 항-신호 올리고뉴클레오티드의 생성을 야기할 수 있는 올리고뉴클레오티드는 예로서 (i) 전구체 올리고뉴클레오티드, (ii) 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드 또는 (iii) 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드에 결합 또는 융합되거나 항-신호 서열에 상보적인 서열에 결합되거나 융합된 전구체 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0073] 전구체 올리고뉴클레오티드는 전환 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드의 영역, 특히 전환 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드의 3'에 위치한 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드이다.

[0074] 용어 "전환 올리고뉴클레오티드"("전환 주형" "전환자(converter) 주형" 또는 "cT"라고도 지칭됨)는 본원에서 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 존재를 신호 올리고뉴클레오티드(본원에서 "트리거 올리고뉴클레오티드" 또는 "트리거 신호"라고도 함)로 전환시키는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0075] 용어 "항-신호 전환 올리고뉴클레오티드"는 본원에서 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 존재를 항-신호 올리고뉴클레오티드(또한 본원에서 "트리거 올리고뉴클레오티드" 또는 "트리거 신호"라고도 함)로 전환시키는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0076] 전환 올리고뉴클레오티드에 결합되거나 융합된 전구체 올리고뉴클레오티드는 중합을 위해 이미 프라이밍된 전환 올리고뉴클레오티드이다.

[0077] 전환 올리고뉴클레오티드에 결합되거나 융합된 전구체 올리고뉴클레오티드는 본원에서 또한 "소스 주형", "sT" 또는 "자기 프라이밍된(self-primed) 주형"이라고 한다.

[0078] 소스 주형은 바람직하게는 5'에서 3'으로 하기를 포함한다:

[0079] - 신호 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 영역,

[0080] - 선택적으로, 최적화 서열, 예를 들어, GTTT 또는 GAGA,

[0081] - 효소 인식 부위, 바람직하게는 닉-형성 효소 인식 부위, 및

[0082] - 소스 주형의 3' 말단(extremity)이 제한 부위에 혼성화되고 중합효소에 의해 연장될 준비가 되도록 하는 루프.

[0083] DNA 툴박스 혼합물이 존재하는 경우, 소스 주형은 구성적으로 신호 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성한다.

[0084] 소스 주형은 바람직하게는 5" 말단을 통해, 예를 들어 비오틴-스트렙타비딘 연결을 통해 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드에 결합된다.

[0085] 비오틴은 바람직하게는 소스 주형의 5'에 부착된다.

[0086] 항-신호 올리고뉴클레오티드는 신호 올리고뉴클레오티드에 적어도 실질적으로 상보적이고 5' 오버행을 포함하는 올리고뉴클레오티드이다.

[0087] 상기 5' 오버행은 신호 올리고뉴클레오티드를 연장하기 위해 중합효소에 의해 주형으로 사용될 수 있으며, 이로써 증폭 주형에서 연장을 위해 이를 비활성화할 수 있다.

[0088] 따라서, 5' 오버행은 신호 올리고뉴클레오티드에 비활성화 꼬리를 추가할 수 있게 한다.

[0089] 따라서, 항-신호 올리고뉴클레오티드는 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있고, 신호 올리고뉴클레오티드를 비활성화할 수 있지만 신호 올리고뉴클레오티드를 증폭할 수는 없다.

[0090] 유리하게는, 5' 오버행이 짧아서 (i) 억제자 올리고뉴클레오티드로부터의 항-신호 생성 속도가 높고 (ii) 연장된 신호 올리고뉴클레오티드가 작업 온도에서 항-신호 올리고뉴클레오티드로부터 자발적으로 탈혼성화할 수 있기 때문에, 하나의 항-신호 올리고뉴클레오티드가 복수의 신호 올리고뉴클레오티드의 복수의 라운드의 비활성화를 수행할 수 있도록 한다.

[0091] 항-신호 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 10 내지 22개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 10 내지 15개의 뉴클레오티드, 예를 들어 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0092] 항-신호 올리고뉴클레오티드가 신호 올리고뉴클레오티드를 비활성화할 수 있는 메커니즘은 예를 들어 문서 국제공개 WO2017141067호 또는 문헌[Montagne et al., 2016, Nat Commun 7, 13474 (doi.org/10.1038/ncomms13474)]에 기재되어 있다.

[0093] 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 8 내지 80개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 50개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 10 내지 30개의 뉴클레오티드, 예를 들어 15 내지 25개의 뉴클레오티드 또는 16 내지 22개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0094] 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 부분 이중 가닥 올리고뉴클레오티드이다.

[0095] 본원에서 표현 "올리고뉴클레오티드 Y에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 X"는 올리고뉴클레오티드 X가 특히 청구된 방법의 조건 하에서 상기 올리고뉴클레오티드 Y의 서열의 영역에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함하고, 상기 상보성은 특이적 결합을 산출하기에 충분함을 의미한다.

[0096] 제2 서열에 적어도 부분적으로 상보적인 서열은 상기 제2 서열에 상보적이거나 상기 제2 서열에 부분적으로 상보적이다.

[0097] 제2 서열에 "상보적인" 서열은 본원에서 제2 서열의 역상보적 대응물을 의미한다. 하나 이상의 미스매치, 바람직하게는 최대 4개의 미스매치가 있거나 제1 서열이 제2 서열보다 짧은 경우 서열은 제2 서열에 "부분적으로 상보적"이다.

[0098] 본 발명에 따라 사용하기 위한 활성자 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 서열 번호 6의 서열, 서열 번호 18의 서열, 서열 번호 10의 서열 또는 이의 단편, 예를 들어 서열 번호 10의 서열의 뉴클레오티드 11 내지 32로 구성된 단편을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0099] 본 발명에 따라 사용하기 위한 활성자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 라모스 세포에 특이적인 앱타머는 예를 들어 서열 번호 8 또는 서열 번호 9의 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0100] DNA 툴박스

[0101] 상기에서 설명된 바와 같이, 본 발명의 방법은 적응된 DNA 툴박스의 구현을 통해 세포 또는 소기관 마커의 존재를 증폭된 DNA 신호로 "변환"한다.

[0102] DNA 툴박스는 본원에서 주형으로도 지칭되는 짧은 올리고뉴클레오티드의 세트 및 DNA 툴박스의 다른 구성요소를 활성화하거나 억제하는 DNA 가닥을 생성 및 분해하여 정보의 흐름(flux)을 처리하는 적어도 2개의 효소의 혼합물에 의존한다.

[0103] 따라서, 본 발명의 방법은 DNA 툴박스 혼합물의 사용을 포함한다.

[0104] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 적어도 2개의 효소 및 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0105] 효소

[0106] DNA 툴박스 혼합물은 적어도 2개의 효소, 바람직하게는 적어도 하나의 중합효소 및 적어도 하나의 제한 또는 닉-형성 효소를 포함한다.

[0107] 용어 "효소"는 본원에서 촉매 기능을 갖고 분자 기질의 변형을 촉매할 수 있는 단백질을 의미한다.

[0108] 상기 정의된 바와 같은 효소는 바람직하게는 중합효소, 닉-형성 효소, 제한 효소, 엔도뉴클레아제, 엑소뉴클레아제, 역전사효소, 리가아제, 재조합효소, 글리코실라아제 및 DNA-가공 효소로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0109] 중합효소 및 닉-형성 효소 및/또는 제한 효소는 특히 신호 올리고뉴클레오티드의 생성 및 증폭을 허용한다.

[0110] 본 발명에 따라 사용하기 위한 중합효소는 바람직하게는 Bst 2.0 DNA 중합효소, Bst 거대 단편 DNA 중합효소, Klenow 단편(3'->5'엑소-), Phi29 DNA 중합효소, Vent(엑소-) DNA 중합효소로 이루어진 군으로부터 선택되며, 보다 구체적으로 중합효소는 Vent(엑소-) DNA 중합효소(예를 들어 New England Biolabs(NEB)에서 구입)이다. 하나 초과의 중합효소가 동시에 사용될 수 있다.

[0111] 본 발명에 따라 사용하기 위한 닉카아제라고도 불리는 닉-형성 효소는 바람직하게는 Nb.BbvCI, Nb.BstI, Nb.BssSI, Nb.BsrDI, Nb.BsmI 및 Nt.BstNBI, 보다 바람직하게는 Nb.BsmI 및/또는 Nt.BstNBI(예를 들어, New England Biolabs(NEB)에서 구입)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 하나 초과의 닉카아제가 동시에 사용될 수 있다.

[0112] 하나의 실시형태에 따르면, 닉-형성 효소는 제한 효소로 대체될 수 있다.

[0113] DNA 듀플렉스의 한 가닥만 절단하는 닉-형성 효소와 달리 제한 효소는 두 가닥을 절단한다. 따라서, 닉-형성 효소 대신에 제한 효소를 사용하는 경우, 본 발명의 방법에서 사용되는 주형을 보호하는 것이 필요할 수 있다. 이러한 보호는 예를 들어 주형의 화학적 개질을 수행함으로써 수행될 수 있다. 이러한 개질은 포스포로티오에이트 연결과 같은 백본 개질을 포함한다.

[0114] 하나 초과의 제한 효소 또는 닉킹 효소와 제한 효소의 조합이 동시에 사용할 수 있다.

[0115] DNA-가공 효소의 비제한적 예는 APE1 또는 UDG이다.

[0116] 엑소뉴클레아제는 특히 시스템의 포화를 회피하게 한다.

[0117] 본 발명에 따라 사용하기 위한 엑소뉴클레아제는 바람직하게는 RecJf, 엑소뉴클레아제 I, 엑소뉴클레아제 VII 및 ttRecJ 엑소뉴클레아제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 엑소뉴클레아제는 바람직하게는 야마가타(Yamagata)(문헌[Yamagata et al., 2001])에 의해 기재된 프로토콜에 따라 얻어진 것과 같은 ttRecJ 엑소뉴클레아제이다. 하나 초과의 엑소뉴클레아제가 동시에 사용될 수 있다.

[0118] DNA 툴박스 혼합물은 특히 방법이 선택된 세포 집단의 DNA 또는 RNA를 서열분석하기 위해 추가로 사용될 경우 역전사효소를 추가로 포함할 수 있다.

[0119] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 제한 효소 및 닉-형성 효소 중에서 선택되는 적어도 하나의 효소 및 적어도 하나의 중합효소를 포함한다.

[0120] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 하기를 포함한다:

[0121] - 특히, 하기와 같은 목적의, 적어도 하나의 중합효소,

[0122] ○결합된 또는 융합된 전구체 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 전환 올리고뉴클레오티드의 상보적 가닥을 합성하여 이중 가닥 전환 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위함,

[0123] ○결합된 또는 융합된 전구체 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드의 상보적 가닥을 합성하여 이중 가닥 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위함,

[0124] ○결합된 신호 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 증폭 올리고뉴클레오티드의 상보적 가닥을 합성하여 이중 가닥 증폭 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위함,

[0125] ○결합된 신호 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 누출-흡수 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드의 상보적 가닥을 합성하여 이중-가닥 누출 흡수 올리고뉴클레오티드 또는 이중-가닥 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위함,

[0126] ○결합된 신호 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하여 리포팅 프로브의 상보적 가닥을 합성하기 위함,

[0127] ○사용된 중합효소가 가닥 치환 활성을 갖는 경우, 프라이머의 연장에 의해 주형 올리고뉴클레오티드에 결합된 올리고뉴클레오티드를 가닥-치환하기 위함, 및/또는

[0128] - 특히 이중 가닥 전환 올리고뉴클레오티드로부터 신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고/하거나 이중 가닥 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드로부터 항-신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고/하거나 이중 가닥 증폭 올리고뉴클레오티드로부터 신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고/하거나 이중 가닥 누출-흡수 또는 이중 가닥 항-신호 올리고뉴클레오티드로부터 미스매치된 신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고/하거나 고체 지지체로부터 바코딩된 프라이머를 방출하도록 허용하는, 절단 효소 및/또는 닉카아제로부터 선택된 적어도 하나의 효소,

[0129] - 선택적으로, 적어도 하나의 엑소뉴클레아제, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제, 적어도 하나의 리가아제, 적어도 하나의 재조합효소, 적어도 하나의 글리코실라아제 및/또는 적어도 하나의 DNA-가공 효소, 및

[0130] - 선택적으로, 적어도 하나의 역전사효소.

[0131] *올리고뉴클레오티드*

[0132] DNA 툴박스 혼합물은 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0133] 당업자에게 명백한 바와 같이, "DNA 툴박스 혼합물은 올리고뉴클레오티드 X를 포함한다"라는 표현은 상기 혼합물이 상기 올리고뉴클레오티드 X의 분자를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, DNA 툴박스 혼합물은 원하는 농도, 예를 들어 0.1 nM 내지 100 nM의 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0134] 올리고뉴클레오티드는 전환 올리고뉴클레오티드, 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드, 증폭 올리고뉴클레오티드, 누출-흡수 올리고뉴클레오티드 및 리포팅 프로브로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0135] DNA 툴박스 혼합물에 사용되는 전환 올리고뉴클레오티드, 증폭 올리고뉴클레오티드 및 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 적어도 하나의 영역을 포함한다.

[0136] 결과적으로, 이들 올리고뉴클레오티드는 신호 올리고뉴클레오티드의 서열에 의해 연결된다.

[0137] 신호 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 인공 올리고뉴클레오티드이다. 신호 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 하기 특징을 갖도록 디자인된다:

[0138] - 낮은 용융 온도,

[0139] - 짧은 서열, 바람직하게는 8 내지 20개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 10 내지 15개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오티드, 및

[0140] - 높은 비율의 AT/CG.

[0141] 이러한 특징은 특히 증폭 반응이 37℃의 온도에서 작동하도록 하며, 이 온도는 방법이 살아있는 세포에서 수행될 때 특히 적합하다.

[0142] 신호 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다.

[0143] 신호 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 서열 번호 1 또는 서열 번호 11의 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0144] DNA 툴박스 혼합물에 사용되는 각각의 올리고뉴클레오티드는 최종적으로 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 존재를 신호 올리고뉴클레오티드로 전환하고 얻어진 신호 올리고뉴클레오티드의 증폭을 바람직하게는 동시에 배경 증폭, 즉 세포 또는 소기관 마커가 없을 때 발생하는 신호 증폭 반응을 유도하지 않으면서 가능하게 하는, 특이적인 기능을 갖는다.

[0145] 따라서 DNA 툴박스는 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0146] 용어 "증폭 올리고뉴클레오티드"("자가촉매 주형" 또는 "aT"로도 지칭됨)는 본원에서 상기 정의된 바와 같은 신호 올리고뉴클레오티드를 기하급수적으로 증폭시킬 수 있는 올리고뉴클레오티드를 의미한다.

[0147] 증폭 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 분해, 특히 5'에서 1개 내지 5개의 제1 뉴클레오티드, 예를 들어 5'에서 3개 또는 4개의 제1 뉴클레오티드에 대해 보호된다.

[0148] 증폭 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 5'에서 3'으로 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 제1 영역, (예를 들어 제한 효소 또는 닉-형성 효소의) 효소 인식 부위 및 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 제2 영역을 포함한다.

[0149] 증폭 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 16 내지 45개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 20 내지 40개의 뉴클레오티드, 예를 들어 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0150] 신호 올리고뉴클레오티드와 증폭 올리고뉴클레오티드의 결합 및 중합효소에 의한 후속 증폭 시, 이중 가닥 증폭 올리고뉴클레오티드가 수득된다. 상기 효소 인식 부위를 인식하는 효소의 작용 시, 적어도 2개의 신호 올리고뉴클레오티드가 방출된다.

[0151] 바람직한 일 실시형태에 따르면, 증폭 올리고뉴클레오티드의 3' 말단은 바람직하게는 신호 올리고뉴클레오티드에 대해 감소된 친화도를 갖는다.

[0152] DNA 툴박스 혼합물은 적어도 하나의 전환 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0153] 상기 개시된 바와 같이, "전환 올리고뉴클레오티드"는 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 존재를 신호 올리고뉴클레오티드로 전환시킨다.

[0154] 일부 실시형태에서, 전환 올리고뉴클레오티드는 DNA 툴박스 혼합물에 존재하지 않지만, 세포 또는 소기관 특이적 리간드에 결합된 활성자 올리고뉴클레오티드의 형태로 제공된다.

[0155] 전환 올리고뉴클레오티드는 8 내지 50개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 45개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 10 내지 30개의 뉴클레오티드, 예를 들어 15 내지 25개의 뉴클레오티드 또는 16 내지 22개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0156] 전환 올리고뉴클레오티드는 분해(특히 제한 효소 또는 뉴클레아제에 의해)에 대해 보호되거나 보호되지 않을 수 있다.

[0157] 전환 올리고뉴클레오티드는 상기 정의된 바와 같이 전구체 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있다.

[0158] 전환 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 5'에서 3'으로 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 제1 영역, 효소 인식 부위, 바람직하게는 닉-형성 효소 인식 부위, 선택적으로 임의 서열의 스페이서 영역, 및 전구체 올리고뉴클레오티드와 결합할 수 있는 제2 영역을 포함한다.

[0159] 전환 올리고뉴클레오티드는 또한 5'에서 3'으로 제1 전구체 올리고뉴클레오티드에 상보적인 영역, 링커, 스페이서, 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 제1 영역, 효소 인식 부위, 바람직하게는 닉-형성 효소 인식 부위, 선택적으로 임의의 서열의 스페이서 영역, 및 제2 전구체 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 제2 영역을 포함할 수 있다. 그러한 전환 올리고뉴클레오티드는 한 쌍의 리간드가 사용될 경우 유용할 수 있으며, 여기서:

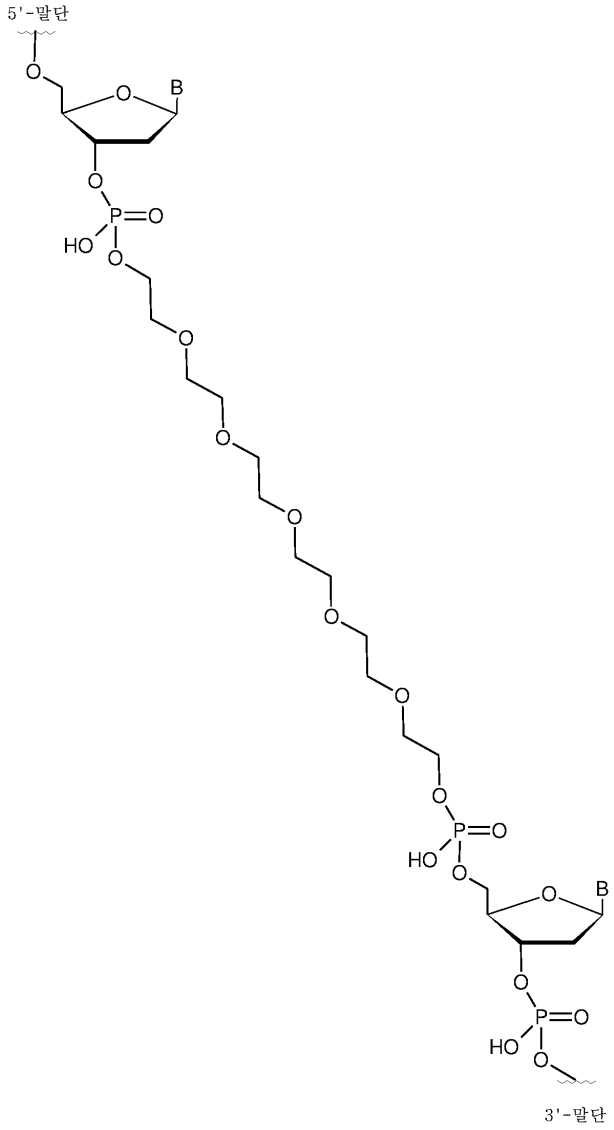
[0160] - 전환 올리고뉴클레오티드는 상기 리간드에 커플링된 제1 전구체 올리고뉴클레오티드에 혼성화에 의해 상기 쌍의 하나의 리간드에 결합되고,

[0161] - 제2 전구체 올리고뉴클레오티드는 상기 리간드에 커플링된 제3 전구체 올리고뉴클레오티드에 혼성화함으로써 상기 쌍의 제2 리간드에 결합되며, 여기서 제2 전구체 올리고뉴클레오티드는 제3 전구체 올리고뉴클레오티드에 상보적인 영역, 링커 및 상기 전환 올리고뉴클레오티드에 상보적인 영역을 포함한다. 제1 및 제3 전구체 올리고뉴클레오티드는 동일하거나 상이할 수 있다. 쌍의 제1 리간드 및 제2 리간드는 동일할 수 있다.

[0162] 링커는 예를 들어 n T로 구성된 서열일 수 있으며, 여기서 n은 서열 번호 25의 서열과 같이 2 이상의 정수, 바람직하게는 5 이상의 정수, 보다 바람직하게는 10 이상의 정수이다.

[0163] 스페이서는 예를 들어 임의의 서열의 스페이서 영역 또는 스페이서 sp18일 수 있다.

[0164] 스페이서 sp18(본원에서 intsp18이라고도 지칭됨)은 하기 화학식의 화합물이다:



[0165]

[0166] 상기 정의된 바와 같은 전환 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 부분 이중 가닥 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0167] 전환 올리고뉴클레오티드와 전구체 올리고뉴클레오티드의 결합 및 중합효소에 의한 후속 증폭 시, 이중 가닥 전환 올리고뉴클레오티드가 수득된다. 상기 효소 인식 부위를 인식하는 효소, 바람직하게는 닉-형성 효소의 작용 시, 신호 올리고뉴클레오티드라고 하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드가 수득된다.

[0168] DNA 툴박스 혼합물은 적어도 하나의 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0169] 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 8 내지 50개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 10 내지 45개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 10 내지 30개의 뉴클레오티드, 예를 들어 15 내지 25개의 뉴클레오티드 또는 16 내지 22개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0170] 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 분해(특히 제한 효소 또는 뉴클레아제에 의해)에 대해 보호되거나 보호되지 않을 수 있다.

[0171] 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 상기 정의된 바와 같이 전구체 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있다.

[0172] 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 5'에서 3'으로, 제2 올리고뉴클레오티드에 융합된 신호 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 영역(전체적으로 항-신호 서열의 상보적 서열을 형성함), 효소 인식 부위, 바람직하게는 닉-형성 효소 인식 부위, 선택적으로 임의의 서열의 스페이서 영역 및 전구체 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 제2 영역을 포함한다.

[0173] 상기 정의된 바와 같은 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 부분 이중 가닥 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0174] 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다.

[0175] 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드와 전구체 올리고뉴클레오티드의 결합 및 중합효소에 의한 후속 증폭 시, 이중 가닥 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드가 수득된다. 상기 효소 인식 부위를 인식하는 효소, 바람직하게는 닉-형성 효소의 작용 시, 항-신호 올리고뉴클레오티드인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드가 수득된다.

[0176] 일부 실시형태에서, 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드는 DNA 툴박스 혼합물에 존재하지 않지만, 세포 또는 소기관 특이적 리간드에 결합된 억제자 올리고뉴클레오티드의 형태로 제공된다.

[0177] DNA 툴박스 혼합물은 적어도 하나의 전구체 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0178] 전구체 올리고뉴클레오티드는 상기 정의된 바와 같다.

[0179] 일부 실시형태에서, 전구체는 DNA 툴박스 혼합물에 존재하지 않지만, 세포 또는 소기관 특이적 리간드에 결합된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드의 형태로 제공된다.

[0180] DNA 툴박스는 적어도 하나의 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0181] 용어 "누출-흡수 올리고뉴클레오티드"("유사주형(pesudotemplate)" 또는 "pT"로도 지칭됨)는 본원에서 증폭 올리고뉴클레오티드의 3' 영역보다 더 강하게 신호 올리고뉴클레오티드를 결합하고 3' 말단에 몇 개의 뉴클레오티드를 첨가하여 따라서 증폭 올리고뉴클레오티드에 대한 추가 프라이밍을 위해 이를 비활성화하는 올리고뉴클레오티드를 의미한다(이의 3' 말단이 이제 증폭 올리고뉴클레오티드 상에서 미스매치되기 때문이다). 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 본원에서 배경 증폭(즉, 세포 또는 소기관 마커의 부재에서 발생하는 증폭)이라고도 하는 비특이적 증폭을 회피할 수 있게 한다. 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 누출 반응으로부터 합성된 신호 서열의 비활성화를 유도한다. 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 증폭 올리고뉴클레오티드와 완전히 동일하게 분해로부터 보호될 수 있다.

[0182] 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 10 내지 22개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 10 내지 15개의 뉴클레오티드, 예를 들어 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0183] 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 5'에서 3'으로 신호 올리고뉴클레오티드에 비활성화 꼬리를 첨가할 수 있는 제1 영역 및 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 제2 영역을 포함한다.

[0184] 따라서 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 억제자 올리고뉴클레오티드로부터 생성되는 대신 DNA 툴박스 혼합물에 직접 첨가되는 항-신호 올리고뉴클레오티드이다.

[0185] 증폭 및 누출 흡수 올리고뉴클레오티드의 농도는 바람직하게는 증폭 올리고뉴클레오티드의 반응이 증폭된 서열의 고농도에서 누출-흡수 올리고뉴클레오티드에 대한 반응보다 더 빠르지만 누출-흡수 올리고뉴클레오티드에 대한 반응이 증폭된 서열의 낮은 농도에서 증폭 올리고뉴클레오티드의 반응보다 빠르므로 자극 임계값을 넘지 않는 한 효과적으로 증폭을 제거하도록 선택된다.

[0186] 상기 개시된 바와 같이, DNA 툴박스 혼합물의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 효소 분해에 대해 보호된다.

[0187] 분해로부터 상기 정의된 바와 같은 올리고뉴클레오티드의 보호는 적어도 하나의 화학적 개질과 같은 당업자에게 잘 알려진 임의의 방법에 의해 수득될 수 있다.

[0188] 상기 화학적 개질은 (i) 백본 개질, 예를 들어 포스포로티오에이트의 혼입, (ii) 염기 개질 또는 (iii) 말단 개질로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 그의 5' 말단에 적어도 하나, 적어도 둘, 적어도 셋 또는 적어도 4개의 포스포로티오에이트의 혼입에 의해 및/또는 비오틴-스트렙타비딘 변형(들), 반전 뉴클레오티드(들) 및/또는 변형된 뉴클레오티드(들)와 같은 다른 엑소뉴클레아제-차단 수단에 의해 보호될 수 있다.

[0189] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 (i) 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드, (ii) 선택적으로, 적어도 하나의 전환 올리고뉴클레오티드 또는 적어도 하나의 전구체 올리고뉴클레오티드 및 (iii) 선택적으로, 적어도 하나의 누출 흡수 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0190] DNA 툴박스 혼합물은 리포팅 프로브를 추가로 포함할 수 있다.

[0191] "리포팅 프로브"("리포팅 주형" 또는 "rT"로도 지칭됨)는 본원에서 상기 정의된 바와 같은 신호 올리고뉴클레오티드의 존재를 검출가능한 신호로 번역할 수 있는 화합물을 의미한다. 이러한 검출 가능한 신호는 예를 들어 입자 응집, 매질 젤리화, 전기화학적 신호, 화학발광 신호 또는 형광 신호이다.

[0192] 리포팅 프로브는 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0193] 하나의 바람직한 실시형태에서, 리포팅 프로브는 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 형광단과 같은 검출가능한 화합물에 커플링되는 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0194] 또 다른 바람직한 실시형태에서, 리포팅 프로브는 형광단 및/또는 소광제에 의해 양 말단 모두에서 변형되고 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하는 영역을 추가로 포함하는 자가-상보적 DNA 가닥이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "자가-상보적"은 동일한 분자의 2개의 상이한 부분이 염기 상보성(A-T 및 G-C)으로 인해 서로 혼성화할 수 있음을 의미한다. 본 발명의 경우, 단일 가닥 프로브의 두 말단(예를 들어, 3' 및 5' 부분 상의 몇 개의 뉴클레오티드)은 서로 혼성화할 수 있고 소광제에 의한 형광단의 소광을 유도할 수 있다. 리포팅 프로브의 일부에 대한 신호 올리고뉴클레오티드의 결합은 스템-루프 구조의 개방 및 따라서 형광 신호의 향상을 초래한다.

[0195] 리포팅 프로브는 또한 닉-형성 인식 부위를 포함하는 루프를 포함할 수 있다.

[0196] DNA 툴박스 혼합물은 특히 토큰 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위해 적어도 하나의 정량화 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.

[0197] 토큰 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 인공 올리고뉴클레오티드이다. 토큰 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 서열분석에 의해 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드 농도의 정량화를 가능하게 한다.

[0198] 토큰 올리고뉴클레오티드는 8 내지 50개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 15 내지 45개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 20 내지 40개의 뉴클레오티드, 예를 들어 25 내지 35개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0199] 토큰 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 5'에서 3'으로 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 영역, 선택적으로 서열분석 후 토큰을 식별하기 위한 임의의 서열을 포함하는 영역 및 선택적으로, 하기에 정의된 바와 같이, 바코팅된 핵산에 상보적인 단일 가닥 영역을 포함한다.

[0200] 토큰 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드이다.

[0201] 정량화 올리고뉴클레오티드는 임계값 초과 또는 미만 농도에서 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드의 존재를 토큰 올리고뉴클레오티드로 전환시킨다. 따라서 정량화 올리고뉴클레오티드는 토큰 올리고뉴클레오티드의 생성을 통해 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정할 수 있게 한다.

[0202] 정량화 올리고뉴클레오티드는 16 내지 70개의 뉴클레오티드, 바람직하게는 25 내지 55개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 30 내지 50개의 뉴클레오티드, 예를 들어 35 내지 45개의 뉴클레오티드 또는 36 내지 42개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0203] 정량화 올리고뉴클레오티드는 분해(특히 제한 효소 또는 뉴클레아제에 의해)에 대해 보호되거나 보호되지 않을 수 있다.

[0204] 정량화 올리고뉴클레오티드는 상기 정의된 바와 같이 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있다.

[0205] 정량화 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 5'에서 3'으로 토큰 올리고뉴클레오티드에 상보적인 제1 영역, 효소 인식 부위, 바람직하게는 닉-형성 효소 인식 부위, 선택적으로 임의 서열의 스페이서 영역, 및 신호 올리고뉴클레오티드와 결합할 수 있는 제2 영역을 포함한다.

[0206] 상기 정의된 바와 같은 정량화 올리고뉴클레오티드는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 부분 이중 가닥 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0207] 정량화 올리고뉴클레오티드와 신호 올리고뉴클레오티드의 결합 및 중합효소에 의한 후속 증폭 시, 이중 가닥 정량화 올리고뉴클레오티드가 수득된다. 상기 효소 인식 부위를 인식하는 효소, 바람직하게는 닉-형성 효소의 작용 시, 토큰 올리고뉴클레오티드라고 하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드가 수득된다.

[0208] 본 발명에 따라 사용하기 위한 DNA 툴박스 혼합물은 예를 들어 서열 번호 5의 서열의 전환 올리고뉴클레오티드, 서열 번호 2의 서열의 증폭 올리고뉴클레오티드, 선택적으로 서열 번호 3의 서열의 누출 흡수 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 서열 번호 4의 서열의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리포팅 프로브를 포함한다. 이 DNA 툴박스 혼합물은 서열 번호 6의 서열 또는 서열 번호 18의 서열의 활성자 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 서열 번호 1의 서열의 신호 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있다.

[0209] 본 발명에 따라 사용하기 위한 다른 DNA 툴박스 혼합물은 예를 들어 서열 번호 7의 서열의 전환 올리고뉴클레오티드, 서열 번호 2의 서열의 증폭 올리고뉴클레오티드, 선택적으로 서열 번호 3의 서열의 누출 흡수 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 서열 번호 4의 서열의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리포팅 프로브를 포함한다. 이 DNA 툴박스 혼합물은 서열 번호 10의 서열의 활성자 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 서열 번호 1의 서열의 신호 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있다.

[0210] 본 발명에 따라 사용하기 위한 또 다른 DNA 툴박스 혼합물은 예를 들어 서열 번호 15의 서열의 전환 올리고뉴클레오티드, 서열 번호 12의 서열의 증폭 올리고뉴클레오티드, 선택적으로 서열 번호 13의 서열의 누출 흡수 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 서열 번호 14의 서열의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 리포팅 프로브를 포함한다. 이 DNA 툴박스 혼합물은 서열 번호 18의 서열의 활성자 올리고뉴클레오티드의 존재 하에 서열 번호 11의 서열의 신호 올리고뉴클레오티드를 생성할 수 있다.

[0211] 따라서 상기 정의된 바와 같은 DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 하기를 포함한다:

[0212] - 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 중합효소,

[0213] - 특히 이중 가닥 전환 올리고뉴클레오티드로부터 신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고, 이중 가닥 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드로부터 항-신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고/하거나 이중 가닥 증폭 올리고뉴클레오티드로부터 신호 올리고뉴클레오티드를 방출하고/하거나 리포팅 주형으로부터 신호 뉴클레오티드를 방출하고/하거나 고체 지지체로부터 바코딩된 프라이머를 방출하도록 허용하는, 상기 정의된 바와 같은 절단 효소 및/또는 닉카아제로부터 선택된 적어도 하나의 효소,

[0214] - 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드,

[0215] - 선택적으로, 상기 정의된 바와 같이, 적어도 하나의 엑소뉴클레아제, 적어도 하나의 엔도뉴클레아제, 적어도 하나의 리가아제, 적어도 하나의 재조합효소, 적어도 하나의 글리코실라아제 및/또는 적어도 하나의 DNA-가공 효소,

[0216] - 선택적으로, 상기 정의된 바와 같이, 적어도 하나의 역전사효소,

[0217] - 선택적으로, 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 전환 올리고뉴클레오티드 또는 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 전구체 올리고뉴클레오티드,

[0218] - 선택적으로, 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드,

[0219] - 선택적으로, 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 누출 흡수 뉴클레오티드,

[0220] - 선택적으로, 적어도 하나의 정량화 올리고뉴클레오티드,

[0221] - 선택적으로, 상기 정의된 바와 같은 적어도 하나의 리포터 프로브, 및/또는

[0222] - 선택적으로, 하기에 정의된 바와 같은 바코팅된 프라이머 세트.

[0223] *다른 구성요소*

[0224] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 또한 완충제를 포함한다.

[0225] 완충제는 DNA 툴박스 혼합물에 존재하는 올리고뉴클레오티드에 적합하며 바람직하게는 세포 또는 소기관에도 적합하다. 일 실시형태에서, 완충제는 세포 또는 소기관에 어떠한 스트레스도 유도하지 않고 살아있는 세포 또는 소기관을 온전하게 유지하는데 특히 적합하다.

[0226] 완충제는 바람직하게는 특히 반응의 억제를 회피하기 위해 PBS를 포함하지 않는다.

[0227] 그러나, 완충제는 반응을 억제하지 않고 낮은 수준의 인산염 이온을 포함할 수 있다. 예를 들어, 완충제는 약 0.7 mM 인산염 이온인 6% 미만의 PBS를 포함할 수 있다.

[0228] 보다 일반적으로, 완충제는 바람직하게는 인산염 이온을 포함하지 않는다.

[0229] 완충제는 바람직하게는 Tris-HCl를 포함한다.

[0230] 완충제는 바람직하게는 특히 방법이 서열분석에 사용되는 경우에 역전사효소에 의한 역전사에 적합하다.

[0231] 따라서 완충제는 바람직하게는 예를 들어 3 mM 내지 6 mM의 농도로 $MgSO_4$를 추가로 포함한다.

[0232] 완충제는 특히 살아있는 세포를 사용할 경우, 백분율은 v/v로 표시되는, 예를 들어, 50% 이하, 바람직하게는 25% 이하, 바람직하게는 15% 이하의 농도, 바람직하게는 12.5% 이하의 농도에서의 세포 배지를 더 포함할 수 있다.

[0233] 예를 들어 RPMI, 우태아혈청(FBS: Fetal Bovine Serum) 및 적어도 하나의 항생제(예를 들어 페니실린 및/또는 스트렙토마이신)를 포함하는 세포 배양 배지와 같은 임의의 적합한 세포 배양 배지가 사용될 수 있다.

[0234] 상기 정의된 바와 같은 완충제는 예를 들어 Tris-HCl pH 8.3, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$ 및 선택적으로, 세포 배양 배지를 포함할 수 있다.

[0235] 예를 들어, 살아있는 세포의 하위 집단을 선택하는 데 적합한 완충제는 50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM $MgSO_4$ 및 선택적으로, 세포 배양 배지를 포함할 수 있다.

[0236] 예를 들어, 고정된 세포의 하위 집단을 선택하는 데 적합한 완충제는 50 mM Tris HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT 및 6 mM $MgSO_4$를 포함할 수 있다.

[0237] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 dNTP(데옥시리보뉴클레오티드 삼인산) 믹스, 즉 dATP, dTTP, dCTP 및 dGTP를 포함하는 믹스를, 예를 들어 각 dNTP에 대해 25 μM 내지 500 μM의 농도로 추가로 포함한다.

[0238] dNTP는 중합효소에 의한 DNA 합성 및/또는 역전사효소에 의한 역전사에 특히 필요하다.

[0239] DNA 툴박스 혼합물은 예를 들어 2 μM의 농도로 네트롭신을 추가로 포함할 수 있다.

[0240] DNA 툴박스는 특히 본 발명의 방법이 서열분석에 사용될 경우 바코딩된 프라이머 세트를 추가로 포함할 수 있다.

[0241] 바코딩된 프라이머 세트는 바코딩된 프라이머의 서브세트를 포함하며, 한 서브세트의 바코딩된 프라이머는 동일하지만 다른 서브세트와는 상이하다.

[0242] DNA 툴박스 혼합물을 복수의 구획으로 분할할 때, 각 구획은 따라서 이 구획에 특이적인 바코딩된 프라이머의 하위 집합을 포함한다.

[0243] 대안적으로, 바코딩된 프라이머는 DNA 툴박스 혼합물에 제공되지 않는다.

[0244] 바코딩된 핵산은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 또는 이중 가닥 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0245] 바코딩된 핵산은 바람직하게는 하기를 포함한다:

[0246] - 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 영역,

[0247] - 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI: unique molecule identifier)로 사용되는 무작위 서열,

[0248] - 선택적으로, 바코드 서열을 포함하는 영역,

[0249] - 선택적으로, 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 단일 가닥 영역,

[0250] - 선택적으로, RNA 분자 또는 DNA 분자 상의 상보적 서열에 결합할 수 있는, 바람직하게는 3'에서의 영역, 또는

[0251] - 선택적으로, 토큰 올리고뉴클레오티드에 상보적인, 바람직하게는 3'에서의 단일 가닥 영역, 및

[0252] - 선택적으로, 바람직하게는 고체 지지체와 모든 바코딩된 프라이머에서 동일한 영역 사이에 위치하는 광-절단성 링커, 화학적-절단성 링커 및/또는 효소 인식 부위.

[0253] 예를 들어, RNA 분자 상의 상보적 서열에 결합할 수 있는 영역은 RNA의 폴리(A) 꼬리에 결합하게 하는 polyT 서열을 포함한다.

[0254] 예를 들어, 상기 정의된 바와 같은 바코딩된 핵산은 하기를 포함할 수 있는 바코딩된 프라이머이다:

[0255] - 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 단일 가닥 영역,

[0256] - 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 단일 가닥 무작위 서열,

[0257] - 바코드 서열을 포함하는 단일 가닥 영역,

[0258] - 선택적으로, 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 단일 가닥 영역,

[0259] - RNA 분자 또는 DNA 분자 상의 상보적 서열에 결합할 수 있는, 바람직하게는 3'에서의 단일 가닥 영역,

[0260] - 선택적으로, 토큰 올리고뉴클레오티드에 상보적인, 바람직하게는 3'에서의 단일 가닥 영역, 및

[0261] - 선택적으로, 바람직하게는 고체 지지체와 모든 바코딩된 프라이머에서 동일한 영역 사이에 위치하는 광-절단성 링커, 화학적-절단성 링커 및/또는 효소 인식 부위.

[0262] 예를 들어, 상기 정의된 바와 같은 바코딩된 핵산은 하기를 포함할 수 있는 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드이다:

[0263] - 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 단일 가닥 영역,

[0264] - 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 단일 가닥 무작위 서열,

[0265] - 선택적으로, 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 단일 가닥 영역,

[0266] RNA 상의 상보적 서열에 결합할 수 있는, 바람직하게는 3'에서의 단일 가닥 영역,

[0267] - 선택적으로, 토큰 올리고뉴클레오티드에 상보적인, 바람직하게는 3'에서의 단일 가닥 영역, 및

[0268] - 선택적으로, 바람직하게는 고체 지지체와 모든 바코딩된 프라이머에서 동일한 영역 사이에 위치하는 광-절단성 링커, 화학적-절단성 링커 및/또는 효소 인식 부위.

[0269] 이러한 경우, 바코딩된 프라이머는 5'에서 바코드 서열을 포함하는 영역 및 3'에서 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 영역 및 선택적으로, UMI를 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드와 조합하여 사용된다.

[0270] 예를 들어, 상기 정의된 바와 같은 바코딩된 핵산은 하기를 포함할 수 있는 바코딩된 어댑터이다:

[0271] - 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 이중 가닥 영역,

[0272] - 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 이중 가닥 무작위 서열,

[0273] - 바코드 서열을 포함하는 이중 가닥 영역, 및

[0274] - 선택적으로, 바람직하게는 고체 지지체와 모든 바코딩된 프라이머에서 동일한 영역 사이에 위치하는 광-절단성 링커, 화학적-절단성 링커 및/또는 효소 인식 부위.

[0275] 예를 들어, 상기 정의된 바와 같은 바코딩된 핵산은 하기를 포함할 수 있는 바코딩된 재조합 부위이다:

[0276] - 이중 가닥 모자이크 종료 서열(Mosaic End Sequence),

[0277] - 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 영역,

[0278] - 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI: unique molecule identifier)로 사용되는 무작위 서열,

[0279] - 바코드 서열을 포함하는 영역, 및

[0280] - 선택적으로, 바람직하게는 고체 지지체와 모든 바코딩된 프라이머에서 동일한 영역 사이에 위치하는 광-절단성 링커, 화학적-절단성 링커 및/또는 효소 인식 부위.

[0281] 바코딩된 프라이머는 바람직하게는 비드 또는 DNA 마이크로어레이와 같은 고체 지지체에 부착된다.

[0282] 고체 지지체가 DNA 마이크로어레이일 경우, 바코드는 고체 지지체 상의 바코딩된 프라이머의 위치, 예를 들어 구획의 위치를 인코딩한다. DNA 마이크로어레이의 각 구획은 다른 구획의 하위 집합과 상이한, 동일한 바코딩된 프라이머의 하위 집합을 포함한다.

[0283] 고체 지지체가 비드인 경우 각 고체 비드는 다른 비드의 하위 집합과 상이한, 동일한 바코딩된 프라이머의 하위 집합을 포함한다.

[0284] 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택하는 방법

[0285] 본 발명은 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0286] 상기 방법은 예를 들어 관심 대상의 표현형을 갖는 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택하고, 세포 또는 소기관의 하위 집단에서 특이적인 단백질의 존재를 검출하고/하거나 이러한 세포 하위 집단의 게놈 DNA 또는 RNA를 서열분석할 수 있게 한다.

[0287] "세포 또는 소기관" 및 "세포 또는 소기관 마커"는 특히 상기 정의된 바와 같다.

[0288] 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준은 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드의 농도에 의해 결정되며, 이의 생성은 상기 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준에 따라 달라진다.

[0289] 따라서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 방법에 관한 것이다:

[0290] a) 상기 세포 또는 소기관을 복수의 구획으로 분할하여, 대부분의 구획이, 적어도 하나의 활성자 올리고뉴클레오티드 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드, 및 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 제한 또는 닉-형성 효소 및 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드를 포함하는 DNA 툴박스 혼합물과 함께, 하나의 세포 유형의 단일 세포 또는 하나의 세포 유형의 단일 소기관을 초과하여 포함하지 않도록 하는 단계,

[0291] b) 각 구획에서, 세포 또는 소기관 마커에 결합된 활성자 올리고뉴클레오티드(들) 및/또는 억제자 올리고뉴클레오티드(들)가 함께 상호작용하고 DNA 툴박스 혼합물의 성분과 상호작용하여 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)를 증폭하는 단계,

[0292] c) 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포 또는 소기관을 분석하는 단계.

[0293] 단계 a)

[0294] 단계 a는 상기 세포 또는 소기관을 복수의 구획으로 분할하여, 대부분의 구획이, 적어도 하나의 활성자 올리고뉴클레오티드 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드, 및 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 제한 또는 닉-형성 효소 및 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드를 포함하는 DNA 툴박스 혼합물과 함께, 하나의 세포 유형의 단일 세포 또는 하나의 세포 유형의 단일 소기관을 초과하여 포함하지 않도록 하는 단계를 포함한다.

[0295] 구획은, 예를 들어, 미세소적, 미세구획, 미세챔버 또는 케이지(cage)일 수 있다.

[0296] "활성자 올리고뉴클레오티드", "억제자 올리고뉴클레오티드", "DNA 툴박스 혼합물", "중합효소", "제한 또는 닉-형성 효소" 및 "신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 증폭 올리고뉴클레오티드"는 특히 상기 정의된 바와 같다.

[0297] "대부분의 구획"이라는 표현은 본원에서 구획의 적어도 50%, 바람직하게는 구획의 적어도 70%, 보다 바람직하게는 구획의 적어도 75%, 및 더욱 더 바람직하게는 구획의 적어도 80%를 의미한다.

[0298] "구획이 하나의 세포 유형의 단일 세포 또는 하나의 세포 유형의 단일 소기관을 초과하여 포함하지 않는다"라는 문장은, 구획이 적어도 2개의 세포를 포함하는 경우, 각각의 상기 세포는 상이한 세포 유형이거나, 구획은 적어도 2개의 소기관을 포함하는 경우, 각각의 상기 소기관은 상이한 세포 유형임을 의미한다.

[0299] 단계 a)에서, 세포 또는 소기관은 상기 세포 또는 소기관, 상기 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드 및/또는 상기 DNA 툴박스 혼합물을 포함하는 혼합물의 형태로 제공될 수 있거나, 이들은 상기 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드(들) 및/또는 DNA 도구상자 혼합물로부터 별도로 제공될 수 있다.

[0300] 세포 또는 소기관 마커는 바람직하게는 표면 마커, 내부 마커, 분비되거나 방출된 마커 및 막 마커로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0301] 적어도 2개의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드가 사용될 경우, 이들은 상기 정의된 바와 같은 2개의 상이한 유형의 마커를 결합할 수 있다.

[0302] 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드가 막 앵커일 경우, 단계 b)에서 구획에 존재하는 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드(들)의 양은 봉입된 세포(들)의 막의 표면에 비례하므로, 단계 c)에서 신호 올리고뉴클레오티드(들)의 농도는 구획화된 세포의 존재 또는 부재 및/또는 구획화된 세포(들)의 수 및/또는 구획화된 세포(들)의 크기의 함수이다.

[0303] 마커가 분비되거나 방출된 마커가 아닌 일 실시형태에서, 상기 정의된 바와 같은 방법은 단계 a) 전에 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0304] - 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드와 상기 세포 또는 소기관을 혼합하는 단계, 및

[0305] - 선택적으로, 세포 또는 소기관을 세척하여 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 결합되지 않은 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드를 제거하는 단계.

[0306] 단계 a)에서, DNA 툴박스 혼합물은 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제, 역전사효소, 리가아제, 재조합효소, 글리코실라아제 및 DNA-가공 효소로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 효소를 더 포함할 수 있다.

[0307] 활성자 올리고뉴클레오티드가 신호 올리고뉴클레오티드 자체인 경우, DNA 툴박스 혼합물에서 상응하는 전환 올리고뉴클레오티드가 필요하지 않고 전구체 올리고뉴클레오티드도 필요하지 않는다. 따라서 DNA 툴박스 혼합물은 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 증폭 올리고뉴클레오티드 및 선택적으로 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0308] 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드가 전구체 올리고뉴클레오티드인 경우, DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 (i) 상기 전구체 올리고뉴클레오티드에 상응하는 전환 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드, (ii) 선택적으로, 상기 전구체 올리고뉴클레오티드에 상응하는 항-신호 올리고뉴클레오티드, (iii) 각각 상기 전환 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드로부터 생성되거나 비활성화된 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 증폭 올리고뉴클레오티드(그것이 생성하는 항-신호 올리고뉴클레오티드를 통해) 및 (iv) 선택적으로, 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0309] 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드가 전환 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드인 경우, DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 상기 전환 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드에 상응하는 전구체 올리고뉴클레오티드, 상기 전환 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드(그것이 생성하는 항-신호 올리고뉴클레오티드를 통해) 각각 생성되거나 비활성화된 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 증폭 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0310] 활성자 올리고뉴클레오티드가 상응하는 전구체 올리고뉴클레오티드에 융합된 전환 또는 항-신호 전환 올리고뉴클레오티드인 경우, DNA 툴박스 혼합물에서 전환/항-신호 전환 올리고뉴클레오티드가 필요하지 않고 전구체 올리고뉴클레오티드도 필요하지 않다. 따라서 DNA 툴박스 혼합물은 상기 변환 올리고뉴클레오티드 또는 항-신호 변환 올리고뉴클레오티드(그것이 생성하는 항-신호 올리고뉴클레오티드를 통해)로부터 각각 생성되거나 비활성화된 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 증폭 올리고뉴클레오티드 및 선택적으로 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 상응하는 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0311] 일 실시형태에서, 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드에 커플링된 활성자 올리고뉴클레오티드는 중합효소에 대한 주형 및/또는 프라이머로서 작용함으로써 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고/하거나 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드에 커플링된 억제자 올리고뉴클레오티드는 중합효소에 대한 주형 및/또는 프라이머로 작용함으로써 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성한다.

[0312] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 활성자 올리고뉴클레오티드 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드는 적어도 한 쌍의 리간드를 포함할 수 있고, 상기 리간드 쌍은 제1 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드 및 제2 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드를 포함하며, 이들의 마커에 대한 상기 제1 및 제2 리간드의 결합은 상기 제1 리간드에 커플링된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드와 상기 제2

리간드에 결합된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드 사이의 근접성 연장 또는 근접성 결찰을 유도하고, 상기 근접성 연장 또는 근접성 결찰은 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드(들)의 생성 및 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)의 증폭에 이르게 한다.

[0313] 한 쌍의 리간드는 분비되거나 방출된 마커를 사용할 경우, 세척의 필요성을 제거하거나 세척 단계의 수를 제한하거나 동일한 세포 또는 소기관 상에서 복수의 마커의 존재를 연구하기 위해 특히 사용된다.

[0314] 한 쌍의 리간드가 예를 들어 (예를 들어 단 하나의 리간드로서, 상기 리간드 분자의 절반은 제1 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드로 태그되고 상기 리간드 분자의 절반은 하나의 제2 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드로 태그되는 리간드를 사용하여) 하나의 세포 표면 마커 또는 (각각 하나의 활성자 올리고뉴클레오티드 또는 억제자 올리고뉴클레오티드로 태그된, 2개의 상이한 표적 마커에 특이적인 2개의 상이한 리간드를 사용하여) 2개의 세포 표면 마커를 표적화는 데 사용될 수 있다.

[0315] 마커-특이적 리간드는 바람직하게는 상기 정의된 바와 같은 리간드의 적어도 한 쌍을 포함하고, 상기 쌍의 제1 및 제2 리간드는 분비되거나 방출된 마커에 특이적이고, 따라서 상기 쌍의 제1 및 제2 리간드는 상기 분비된 마커에 동시에 결합할 수 있음으로써, 상기 제1 리간드에 커플링된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드와 상기 제2 리간드에 커플링된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드 사이의 근접성 연장 또는 결찰을 유도하여, 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드(들)의 생성을 야기하고 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)의 증폭을 야기하게 된다.

[0316] 근접성 연장 및 근접성 결찰은 예를 들어, 문헌[Gullberg et al., 2004, PNAS, 101 (22) (doi.org/10.1073/pnas.0400552101)], 문헌[Fredriksson et al., 2002, Nature Biotechnology vol 20, p473-477 (https://doi.org/10.1038/nbt0502-473)], 문헌[Di Giusto et al., 2005, Nucleic Acids Research, Vol 33(6), p e64 (https://doi.org/10.1093/nar/gni063)] 또는 문헌[Lundberg, 2011, Nucleic Acids Research, Vol 39(15), p e102, (doi.org/10.1093/nar/gkr424)]에서와 같이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0317] 한 쌍의 두 리간드가 동일한 세포 또는 소기관 상에 존재하는 마커에 결합하면 결합되지 않은 올리고뉴클레오티드의 효과와 비교하여 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드(들)의 생성 속도를 증가시키므로, 단계 a) 이전의 세척 단계를 감소시키거나 억제할 수 있다.

[0318] DNA 툴박스 혼합물은 바람직하게는 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 하나 이상의 누출-흡수 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0319] 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 특히 상기 정의된 바와 같다.

[0320] 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 활성자 올리고뉴클레오티드(들)에 의해 생성된 자극이 임계값 미만인 경우 거짓 양성을 회피하도록 하고/하거나 신호 증폭을 방지한다.

[0321] 사용될 수 있는 누출 흡수 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 문서 국제공개 WO2017141067호 또는 문헌[Montagne et al., 2016, Nat Commun 7, 13474 (doi.org/10.1038/ncomms13474)]에 기재되어 있다.

[0322] 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 신호 올리고뉴클레오티드에 특이적이다.

[0323] 따라서, 적어도 2개의 신호 올리고뉴클레오티드가 생성되고 누출-흡수 올리고뉴클레오티드가 DNA 툴박스 혼합물에 존재할 경우 각 누출-흡수 올리고뉴클레오티드는 하나의 신호 올리고뉴클레오티드에 특이적이다.

[0324] 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드가 상기 정의된 바와 같은 소스 주형인 경우, 방법은 바람직하게는 단계 a) 전에 하기 단계를 포함한다:

[0325] - 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드와 상기 세포 또는 소기관을 혼합하는 단계, 및

[0326] - 세포 또는 소기관을 세척하여 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 결합되지 않은 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드를 제거하는 단계.

[0327] 단계 b)

[0328] 단계 b)는 각 구획에서, 세포 또는 소기관 마커에 결합된 활성자 올리고뉴클레오티드(들) 및/또는 억제자 올리고뉴클레오티드(들)가 함께 상호작용하고 DNA 툴박스 혼합물의 성분과 상호작용하여 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고 상기 신호 올리고뉴클레오티드(들)를

증폭하는 단계를 포함한다.

[0329] "하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드를 생성한다"라는 표현은 하나의 유형의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 적어도 2개의 상이한 유형의 신호 올리고뉴클레오티드가 생성됨을 의미한다.

[0330] "하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성한다"라는 표현은 하나의 유형의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 적어도 2개의 상이한 유형의 신호 올리고뉴클레오티드가 생성됨을 의미한다.

[0331] 단계 b)에서는 신호 올리고뉴클레오티드만 증폭된다. 항-신호 올리고뉴클레오티드는 증폭되지 않는다.

[0332] 단계 b)는 20℃ 내지 65℃, 바람직하게는 20℃ 내지 55℃, 보다 바람직하게는 20℃ 내지 45℃, 예를 들어 35℃ 내지 40℃에 포함되는 온도에서 수행될 수 있다.

[0333] 단계 c)

[0334] 단계 c)는 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포 또는 소기관을 분석하는 단계를 포함한다.

[0335] 단계 c)에서, 단계 b)에서 적어도 2개의 상이한 유형의 신호 올리고뉴클레오티드가 생성될 수 있는 경우, 구획 내의 세포 또는 소기관은 각각의 신호 올리고뉴클레오티드가 그의 상응하는 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재할 경우 분석된다. 임계값은 실제로 바람직하게는 각 신호 올리고뉴클레오티드에 대해 독립적으로 설정된다.

[0336] 상기 정의된 바와 같은 단계 c)는 각각의 신호 올리고뉴클레오티드 또는 신호 올리고뉴클레오티드의 조합이 그의 상응하는 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포 또는 소기관을 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0337] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준은 적어도 2개의 공동-구획화된 세포 또는 소기관 사이의 상호작용에 의해 개질될 수 있고 단계 c)는 세포 또는 소기관 사이의 상호작용을 분석하게 한다.

[0338] 하나 이상의 신호 올리고뉴클레오티드 및 하나 이상의 항-신호 올리고뉴클레오티드의 생성에 이은 신호 올리고뉴클레오티드(들)의 증폭은 마스터 신호 올리고뉴클레오티드라고 하는 새로운 신호 올리고뉴클레오티드의 증폭을 야기할 수 있으며, 여기서 마스터 신호 올리고뉴클레오티드의 서열은 활성자 올리고뉴클레오티드(들)로부터 직접 생성된 임의의 신호 올리고뉴클레오티드와 관련이 없다.

[0339] 일 실시형태에서, 신호 올리고뉴클레오티드는 따라서 적어도 2개의 상이한 신호 올리고뉴클레오티드에 따라 생성된 마스터 신호 올리고뉴클레오티드이다.

[0340] 그러한 경우에, 상기 정의된 바와 같은 단계 b)는 다수의 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드로부터의 입력을 통합하도록 하여 마스터 신호 올리고뉴클레오티드의 형태로 단일 출력을 생성할 수 있다.

[0341] 상기 정의된 바와 같은 단계 c)는 리포터 프로브를 추가함으로써 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정하여, 상기 리포터 프로브는 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 의해 특이적으로 활성화되는 단계, 및 상기 신호 올리고뉴클레오티드에 결합된 리포터 프로브에 의해 방출된 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0342] 리포터 프로브는 상기 정의된 바와 같을 수 있다.

[0343] 리포터 프로브는 바람직하게는 광학 리포터 프로브, 더욱 더 바람직하게는 형광 리포터 프로브이다.

[0344] 본원에서 "활성화된"이라는 용어는, 리포터 프로브와 특이적 신호 올리고뉴클레오티드 사이의 상호작용이 리포터 프로브의 형광 강도의 변화에 이르게 한다는 것을 의미한다.

[0345] 상호작용은 단순 혼성화, 가닥 치환 또는 중합효소 연장 및/또는 제한 효소 분해와 같은 효소 활성이 뒤따르는 혼성화를 포함할 수 있다.

[0346] 따라서 상기 정의된 바와 같은 단계 c)는 리포터 프로브(들)에 의해 방출된 신호(들)가 임계값 초과 또는 미만인 구획의 세포 또는 소기관을 선택적으로 분석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0347] 상기 정의된 바와 같은 단계 c)는 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 내용물을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.

[0348] 상기 정의된 바와 같은 단계 c)는 정량화 올리고뉴클레오티드를 추가함으로써 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 정량화 올리고뉴클레오티드는 상기 적어도 하

나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재할 경우 특이적으로 증폭된다.

[0349] 정량화 올리고뉴클레오티드는 특히 상기 정의된 바와 같다.

[0350] 정량화 올리고뉴클레오티드의 상기 증폭은 바람직하게는 선형 증폭으로 이루어지며, 더 바람직하게는 적어도 하나의 중합효소 및 적어도 하나의 제한 또는 닉-형성 효소를 사용함으로써 이루어진다.

[0351] 동일한 구획에 위치한 정량화 올리고뉴클레오티드(들)는 구획 특이적 바코드 서열과 연관된다.

[0352] 정량화 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 바코딩된 프라이머 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 어댑터의 결찰, 또는 바코딩된 재조합 부위와의 재조합에 추가로 구획-특이적 바코드 서열을 포함한다.

[0353] 그런 다음 상기 회수된 내용물은 세포 또는 소기관 핵산의 서열분석 및/또는 표지화 핵산 서열(들)에 의해 분석될 수 있다.

[0354] "표지화 핵산"은 본원에서 세포 또는 소기관 마커에 결합하는 리간드를 통해 세포 또는 소기관에 결합된 핵산, 또는 세포 또는 소기관 마커와 반응하는 분자를 의미하며, 여기서 상기 핵산의 서열은 리간드 또는 반응하는 분자에 특이적이다. 바람직한 일 실시형태에서, 표지화 핵산은 세포 또는 소기관 마커에 결합하는 항체와 연관된다.

[0355] 상기 정의된 바와 같은 단계 c)는, 적어도 하나의 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 구획의 세포를 회수하는 단계, 및 추가 분석 전에 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0356] 하나의 바람직한 실시형태에서, 동일한 구획에 위치한 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산 서열(들)은 구획-특이적 바코드 서열과 연관되어 있다.

[0357] 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산은 예를 들어 바코딩된 프라이머 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드 상의 cDNA의 연장, 바코딩된 어댑터의 결찰, 또는 바코딩된 재조합 부위와의 재조합에 추가로 구획-특이적 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0358] 상기 정의된 바와 같은 바람직한 일 방법에서, 신호 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 마스터 신호 올리고뉴클레오티드의 축적은 세포 또는 소기관 핵산의 선택적 서열분석 및/또는 동일한 구획에 위치한 표지화 핵산 서열(들)을 야기한다.

[0359] 세포는 단계 b)의 끝에서, 특히 신호 올리고뉴클레오티드의 축적 후에 용해될 수 있다.

[0360] 상기 정의된 바와 같은 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 적어도 하나의 광불안정성(photolabile) 보호기를 포함할 수 있고, 단계 c)에서 리포터 프로브(들)로부터의 신호(들)가 임계값 초과 또는 미만인 구획에 대해, 상기 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위의 광탈보호가 발생하여, 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산이 구획-특이적 바코드 서열과 선택적 회합하도록 한다.

[0361] 상기 정의된 바와 같은 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 광절단성 연결을 포함할 수 있고, 단계 c)에서 리포터 프로브(들)로부터의 신호(들)가 임계값 초과 또는 미만인 구획에 대해, 상기 바코딩된 프라이머 서열, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위의 광절단이 발생하여, 프라이머 서열, 주형-전환 올리고 서열, 어댑터 서열 또는 재조합 부위 및 구획-특이적 서열 바코드를 포함하는 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산이 고체 지지체로부터 선택적 방출되도록 한다.

[0362] 상기 정의된 바와 같은 단계 c)에서, 신호 올리고뉴클레오티드의 결합 및 선택적으로 연장은 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위 및 구획-특이적 서열 바코드를 포함하는 세포 또는 소기관 핵산 및/또는 표지화 핵산이 고체 지지체로부터 선택적 방출되도록 할 수 있다.

[0363] 일 실시형태에서, 신호 올리고뉴클레오티드의 결합 및 선택적으로 연장은 제한 효소 또는 엔도뉴클레아제에 대한 인식 부위의 생성을 초래하고 고체 지지체로부터의 방출은 상응하는 제한 효소 또는 엔도뉴클레아제로 절단함으로써 이루어진다.

[0364] 다른 실시형태에서, 가닥 치환 활성을 갖는 중합효소에 의한 신호 올리고뉴클레오티드의 결합 및 연장은 가닥

침입 및 고체 지지체로부터 방출을 초래한다.

[0365] 본원에서 표현 "가닥 침입"은 방출될 핵산이 표면 테더링된(tethered) 올리고뉴클레오티드에 대한 혼성화에 의해 지지체에 부착되고, 여기서 상기 표면 테더링된 올리고뉴클레오티드는 신호 올리고뉴클레오티드 결합 도메인을 포함하는 것을 의미하며, 테더링된 올리고뉴클레오티드 (따라서 주형으로 작용하는) 상의 신호 올리고뉴클레오티드의 중합효소 연장은 방출될 핵산을 가닥-치환하는 것을 의미한다.

[0366] 고체 지지체가 비드일 경우, 각각의 구획은 바람직하게는 단일 비드만을 포함하고, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 상기 구획의 비드에 특이적인 바코드 서열을 보유한다.

[0367] 고체 지지체가 미세구획 또는 케이지의 벽일 경우, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형-스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위는 바람직하게는 구획-특이적 바코드 서열을 보유한다.

[0368] 미세구획 또는 케이지의 벽은 미세구획 또는 케이지의 상단, 바닥 또는 측면일 수 있다.

[0369] 일 실시형태에서,

[0370] - 단계 a)에서 DNA 툴박스 혼합물은 역전사효소 활성을 갖는 중합효소를 포함하고,

[0371] - 단계 a)에서 각 구획은 구획-특이적 바코드 서열 및 RNA에 결합할 수 있는 영역을 보유하는 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 상기 올리고뉴클레오티드는 고체 지지체에 부착되고,

[0372] - 단계 c)에서, 세포 또는 소기관은 용해되어 RNA를 방출하고, 구획-특이적 바코드 서열 및 RNA에 결합할 수 있는 영역을 보유하는 올리고뉴클레오티드는 방출된 RNA 상에서 역전사효소 활성을 갖는 중합효소에 의해 촉매되는 cDNA 합성을 프라이밍하는 데 사용되어, 구획-특이적 바코드를 보유하는 cDNA를 생성하게 되고,

[0373] - 단계 c)에서, 적어도 신호 올리고뉴클레오티드가 임계값 초과 또는 미만의 농도로 존재하는 경우 구획-특이적 바코드를 보유하는 cDNA가 고체 지지체로부터 방출되고, 방출된 바코딩된 cDNA 및/또는 미방출된 바코딩된 cDNA가 서열분석에 의해 분석되며,

[0374] - 선택적으로, 단계 c)에서, 토큰 올리고뉴클레오티드는 구획-특이적 바코드에 혼성화되고, 선택적으로 DNA 중합효소에 의해 촉매되는 DNA 합성을 프라이밍하는 데 사용되어 구획-특이적 바코드를 보유하는 DNA를 생성한다.

[0375] 본 발명의 방법의 비제한적 실시형태는 도 11 내지 도 14에 예시되어 있다.

[0376] **도 11**은 DNA 툴박스 구성요소, 표면 마커, 분비된 마커 또는 표면 마커에 대한 근접성 효과 및 마커 조합에 관한 상이한 실시형태를 예시한다.

[0377] **도 11의 A**는 DNA 툴박스 구성요소를 예시한다. DNA 툴박스(용액 내)에 존재하는 효소와 올리고뉴클레오티드의 조합을 사용하여 유입하는 올리고뉴클레오티드(여기서는 a)에 다양한 기능을 수행할 수 있고: 전환(예를 들어, 올리고뉴클레오티드 a에서 올리고뉴클레오티드 b로)은 중합효소(P) 및 닉카아제(N)의 작용 하에 전환 주형(전환 올리고뉴클레오티드라고도 함)에 의해 수행된다; 억제는 유입하는 올리고뉴클레오티드에 3' 꼬리를 추가함으로써 중합효소(P)의 작용 하에 항-신호 올리고뉴클레오티드 또는 누출-흡수 올리고뉴클레오티드에 의해 수행된다(예를 들어 여기에서 a를 ad로 전환); 증폭은 예를 들어, a의 하나의 카피(copy)로부터 시작하여 a의 2개의 카피를 생성함으로써 중합효소(P) 및 닉카아제(N)의 작용 하에 증폭 주형에 의해 수행된다. 전환/증폭과 억제 효과 사이의 균형에 따라 올리고뉴클레오티드가 증폭되거나 증폭되지 않을 수 있다. 증폭된 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 리포터 주형을 사용하여 형광 판독값을 생성하고, 고체 지지체로부터 프라이머를 방출하거나, 프라이머를 탈보호하기 위해 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

[0378] **도 11의 B**는 올리고뉴클레오티드-접합된 마커-특이적 리간드를 DNA 툴박스에 커플링하는 것을 예시한다. 1)에서 항체-접합된 활성자 올리고뉴클레오티드의 3' 부분은 증폭 주형에 직접 프라이밍하고; 2)에서 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 (용액에서) 동족 전환자 주형(전환 올리고뉴클레오티드라고도 함)과 조합하여 신호 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드 $\overline{da}$를 생성한다. 3)에서 전환자 주형 ($\overline{ba}$ or $\overline{bda}$)은 마커 특이적 리간드(항체) 및 용액에 제공된 상응하는 전구체 올리고뉴클레오티드(b) 상에 부착될 수 있다. 이전과 마찬가지로 이 아키텍처는 전환자 주형의 출력에 따라 신호 올리고뉴클레오티드 $\overline{a}$ 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드 $\overline{da}$를 생성할 수 있다. 4) 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 중합을 위해 이미 프라이밍된 전환자 주형

(전환 올리고뉴클레오티드라고도 함)일 수 있다. 이 디자인을 소스 주형이라고 한다. 소스 주형은 안정적인 듀플렉스(미도시)일 수 있거나 프라이밍 부분(*b*)은 주형 부분에 공유 융합될 수 있다(예를 들어, DNA 루프 또는 비-DNA 링커 사용). 이 자가-프라이밍된 주형은 신호 올리고뉴클레오티드 a 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드 $\overline{da}$를 구성적으로 생성한다(소스 주형의 출력에 따라 다름).

[0379] **도 11의 C**는 분비된 마커 또는 표면 마커에 대한 근접성 효과를 예시한다. 1)에서, 근접성 연장 디자인: 2개의 마커-특이적 리간드가 활성자 올리고뉴클레오티드로 작용화된다. 가용성 표적에 대한 결합에 의해 근접하게 되면, 2개의 활성자 올리고뉴클레오티드들 사이의 상호작용은 신호 올리고뉴클레오티드 (또는 억제자 올리고뉴클레오티드의 경우 항-신호 $\overline{da}$)의 생성을 유도한다. 다양한 기하 도형적 배열이 가능하다(왼쪽에서 오른쪽으로): 하나의 리간드는 활성자 올리고뉴클레오티드(b)의 5' 말단에 커플링되고 다른 하나는 전환 올리고뉴클레오티드($\overline{ba}$)의 5' 말단에 커플링되고; 동일하지만, 전환 올리고뉴클레오티드는 이의 3' 말단을 통해 커플링되며; 두개의 마커 특이적 리간드 모두는 상호 상보적인 3' 말단을 가진 전환 주형의 5' 말단에 결합되어 서로 프라이밍할 수 있다. 2) 근접성-결찰 디자인에서, 2개의 마커 특이적 리간드-결합된 활성자 올리고뉴클레오티드 사이의 표적-유도된 근접성은 전환 올리고뉴클레오티드(여기서, b로 프라이밍됨)를 생성하는 결찰 반응(L)을 가능하게 한다. 3) 근접성 효과는 또한 2개의 마커 특이적 리간드가 동일한 표적이 아니라 동일한 세포에 결합함으로써 유도될 수도 있고; 2개 표적 마커는 화학적으로 동일하거나(위), 화학적으로 상이할 수 있다(아래).

[0380] **도 11의 D**는 마커의 조합을 예시한다. 마커의 특이적인 조합을 검출하기 위해(즉, 다중 마커의 각 수준이 특정 조건에 맞는 경우 증폭의 촉발). 여기서, 1 내지 3의 경우 모두 2개의 마커로 예시를 나타내었지만, 3개 이상의 마커에 대해서도 동일한 원리가 적용된다. 1) 2개의 리간드-결합된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 병렬로 작용하여 특이적으로 다중 신호 올리고뉴클레오티드를 활성화하거나 억제한다. 패널 B에서와 같이, 각각의 리간드-결합된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 패널 B에 나타낸 바와 같이 신호(a), 전환 올리고뉴클레오티드 ($\overline{ba}$ or $\overline{b}da$) 또는 ($\overline{abb}$ or $a\overline{dbb}$), 등일 수 있다. 2) 2개의 리간드-결합된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드는 동일한 신호 및/또는 항-신호 올리고뉴클레오티드를 생성하고 둘 사이의 균형이 신호 올리고뉴클레오티드가 결국 증폭되는지 여부를 결정한다. 3) 보다 복잡한 마커 패턴을 표시하는 세포 또는 소기관을 선택하기 위해, 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드 및 DNA 툴박스 구성요소가 최종적으로 마스터 신호 *m*의 증폭을 유도하는 중간 종을 생성하는, 보다 정교한 생체분자 구조가 디자인될 수 있다.

[0381] **도 12**는 단일-세포 바코팅을 예시한다.

[0382] **도 12a**에서, 단일 세포, 소기관 또는 결정된 수의 세포 또는 소기관을 함유하는 구획에 존재하는 효소와 올리고뉴클레오티드의 조합을 사용하여 프라이머 혼성화를 통해 관심 대상의 단일 가닥 서열의 바코딩을 수행할 수 있다.

[0383] (i)에서, 핵산은 RNA 분자 상의 상보적 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A", 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 포함한다. RNA에 대한 프라이머의 혼성화 및 프라이머의 연장은 증폭 및/또는 서열분석을 위한 PCR 프라이머 부위, 구획-특이적 바코드 및 선택적으로, UMI를 보유하는 cDNA를 생성하게 된다.

[0384] (ii)에서, 제1 핵산은 RNA 분자 상의 상보 서열과 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A" 및 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C"를 포함한다. 제2 핵산은 전장 cDNA의 말단에 역전사효소에 의해 추가된 비주형(non-templated) "CCC" 3'-오버행에 상보적인 서열(바람직하게는 rGrGrG), 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "D" 및 선택적으로, UMI을 포함한다. RNA에 대한 제1 핵산의 혼성화 및 프라이머의 연장은 비주형 "CCC" 3'-오버행이 있는 제1 가닥 cDNA 분자를 생성하게 된다. 제2 핵산을 "CCC" 3'-오버행에 혼성화한 후 역전사효소의 "주형 스위칭"으로 인해, 증폭 및/또는 서열분석을 위한 PCR 프라이머 부위, 구획-특이적 바코드 및, 선택적으로 UMI를 보유하는 cDNA의 생성을 초래한다.

[0385] (iii)에서, 핵산은 DNA 분자 상의 상보적 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A", 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보

적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 포함한다. DNA에 대한 프라이머의 혼성화 및 프라이머의 연장은 증폭 및/또는 서열분석을 위한 PCR 프라이머 부위, 구획-특이적 바코드 및 선택적으로, UMI를 보유하는 DNA를 생성하게 된다.

[0386] **도 12b**에서, 단일 세포, 소기관 또는 결정된 수의 세포 또는 소기관을 함유하는 구획에 존재하는 효소와 올리고뉴클레오티드의 조합을 사용하여 어댑터 결찰을 통해 바코딩을 수행할 수 있다. 일 구획에서 세포 또는 소기관으로부터의 DNA가 단편화되어 점착(sticky) 또는 평활(blunt) 말단을 갖는 이중 가닥 DNA 단편을 생성한다. 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 및 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 함유하는, (평활-말단 점착-말단 결찰을 통해) 이중 가닥 DNA 단편의 결찰과 상용성인 DNA 어댑터 분자는 동일한 구획에 존재한다. 세포로부터 어댑터로 단편화된 DNA의 결찰은 증폭 및/또는 서열분석을 위한 PCR 프라이머 부위, 구획-특이적 바코드 및 선택적으로 UMI를 보유하는 DNA를 생성하게 된다.

[0387] **도 12c**에서, 단일 세포, 소기관 또는 결정된 수의 세포 또는 소기관을 함유하는 구획에 존재하는 효소와 올리고뉴클레오티드의 조합을 사용하여 재조합을 통해 관심 대상의 이중 가닥 핵산의 바코딩을 수행할 수 있다. 재조합효소(예를 들어, Tn5 유전자전위효소)는 이중 가닥 모자이크 종료 서열 "E", 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 포함하는 핵산으로 로딩된다. 재조합은 세포 또는 소기관으로부터의 이중 가닥 핵산의 동시 단편화 및 바코딩("태그화")을 초래한다.

[0388] **도 13**은 형광 리포터 주형을 사용하여 형광 판독 후 광-절단 매개 선택을 예시한다.

[0389] **도 13의 A**에서, DNA 툴박스의 증폭된 신호 올리고뉴클레오티드는 리포터 주형을 사용하여 형광 판독값을 생성하는 데 사용될 수 있다. 구획에서 형광 신호의 검출에 의해 제공된 정보는 관심 대상의 구획의 선택적인 UV 조사에 의해 광-절단성 스페이서 탈보호(a.) 또는 고체 지지체로부터의 방출(b.)을 통해 촉발하는 데 사용된다. 방출된 핵산은 RNA 또는 DNA 분자 상의 상보적 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A", 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 포함한다. 방출된 핵산의 구조는 결찰 및 재조합에 의해 세포 핵산의 바코딩을 허용하도록 적합화될 수 있다(도 12 참조). 이 경우, 방출된 핵산은 서열 "B" 및 "C"만을 포함하고 단편화된 세포 DNA에 결찰되거나 추가로 이중 가닥 모자이크 종료 서열 "E"를 포함하여 세포 핵산과 재조합을 하게 하는 어댑터로서 기능한다.

[0390] **도 13의 B**에서, DNA 툴박스의 증폭된 신호 올리고뉴클레오티드는 리포터 주형을 사용하여 형광 판독값을 생성하는 데 사용될 수 있다. 구획에서 형광 신호의 검출에 의해 제공된 정보는 엔도뉴클레아제를 위한 제한 부위 "X"를 함유하는 이중 가닥 DNA의 스트레치를 형성하여 고체 지지체(a.)로부터 핵산을 방출하기 위해 관심 대상의 구획에서 광-케이지 핵염기의 선택적인 UV 조사에 의해, 혼성화를 촉발하는 데 사용된다. 대안적으로, 광-케이지 핵염기의 UV 조사는 RNA 또는 DNA 분자(b.) 상의 상보적 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A"의 탈보호 또는 혼성화를 통한 보호를 촉발하여 단일 가닥 DNA 또는 RNA(c.)에 대한 혼성화를 차단할 수 있다. 대안적으로, 광-케이지 핵염기의 UV 조사는 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용된 무작위 서열, 및 RNA 분자(d.) 상에 상보적인 서열과 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A"를 분리함으로써 증폭 또는 서열분석을 방지하기 위해 바코딩된 프라이머의 탈보호를 촉발할 수 있다. 방출된 핵산은 RNA 또는 DNA 분자 상의 상보적 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A", 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 포함한다. 방출된 핵산의 구조는 결찰 및 재조합에 의해 세포 핵산의 바코딩을 허용하도록 적합화될 수 있다(도 12 참조). 이 경우, 방출된 핵산은 서열 "B" 및 "C"만을 포함하고 단편화된 세포 DNA에 결찰되거나 추가로 이중 가닥 모자이크 종료 서열 "E"를 포함하여 세포 핵산과 재조합을 하게 하는 어댑터로서 기능한다.

[0391] **도 14**는 DNA 툴박스 기반 직접 선택을 예시한다.

[0392] **도 14의 A**에서, DNA 툴박스의 증폭된 신호 올리고뉴클레오티드는 혼성화 시 엔도뉴클레아제가 고체 지지체(a.)로부터 핵산을 방출하기 위한 제한 부위 "X"를 함유하는 이중 가닥 DNA의 스트레치를 형성하기 위해 중합을 개시할 수 있거나, 가닥 치환 활성이 있는 중합효소가 사용되면 가닥 치환(b.)에 의해 고체 지지체 상에 이식된 핵산에 이전에 혼성화된 단일 가닥 핵산을 방출한다. 방출된 핵산은 RNA 또는 DNA 분자 상의 상보적 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A", 동일한 구획에 존재하는 핵산의 식별을 위한 구획-특이적 바코드 서열을 포함하

는 서열 "B", 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용되는 무작위 서열을 포함한다. 방출된 핵산의 구조는 결찰 및 재조합에 의해 세포 핵산의 바코딩을 하도록 적합화될 수 있다(도 12 참조). 이 경우, 방출된 핵산은 서열 "B" 및 "C"만을 포함하고 단편화된 세포 DNA에 결찰되거나 추가로 이중 가닥 모자이크 종료 서열 "E"를 포함하여 세포 핵산과 재조합을 하게 하는 어댑터로서 기능한다.

[0393] **도 14의 B**에서, DNA 툴박스의 증폭된 신호 올리고뉴클레오티드는 혼성화 시 이중 가닥 DNA의 스트레치를 형성할 수 있다. 이 이중 가닥 DNA 스트레치는 바코딩된 프라이머(a.)를 탈보호하기 위한 엔도뉴클레아제에 대한 제한 부위 "X"를 함유한다. 대안적으로, 이중 가닥 DNA는 증폭 및/또는 서열분석을 위한 프라이머에 상보적인 서열 "C" 및 선택적으로, 고유 분자 식별자(UMI)로 사용된 무작위 서열, 및 RNA 분자(b.) 상에 상보적인 서열과 혼성화하는 단일 가닥 서열 "A"를 분리함으로써 증폭 또는 서열분석을 방지하기 위해 바코딩된 프라이머를 탈보호하기 위한 엔도뉴클레아제에 대한 제한 부위 "X"를 함유한다. 대안적으로, DNA 툴박스의 증폭된 신호 올리고뉴클레오티드의 혼성화는 단일 가닥 DNA 또는 RNA(c.)에 대한 혼성화를 직접 차단한다. 이 프로토콜은 결찰 및 재조합에 의해 세포 핵산의 바코딩을 하도록 적합화될 수 있다(도 12 참조). 이 경우, 방출된 핵산은 서열 "B" 및 "C"만을 포함하고 단편화된 세포 DNA에 결찰되거나 추가로 이중 가닥 모자이크 종료 서열 "E"를 포함하여 세포 핵산과 재조합을 하게 하는 어댑터로서 기능한다.

[0394] 청구된 방법 및 이의 용도를 구현하기 위한 키트

[0395] 본 발명은 상기 정의된 바와 같이, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 방법을 구현하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0396] 예를 들어 상기 정의된 바와 같은 키트는 하기를 포함한다:

[0397] a) 적어도 하나의 중합효소, 적어도 하나의 닉-형성 효소 또는 제한 효소, 및 선택적으로, 엑소뉴클레아제, 엔도뉴클레아제(endonuclease), 역전사효소, 리가아제, 재조합효소, 글리코실라아제 및 DNA-가공 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효소,

[0398] b) 적어도 하나의 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드,

[0399] c) 신호 올리고뉴클레오티드에 결합하고 증폭할 수 있는 적어도 하나의 증폭 올리고뉴클레오티드, 및 선택적으로, 비특이적 증폭을 피하기 위한 누출-흡수 올리고뉴클레오티드, 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드를 신호 또는 항-신호 올리고뉴클레오티드로 전환시킬 수 있는 전환 올리고뉴클레오티드, 신호 올리고뉴클레오티드의 검출을 가능하게 하는 리포팅 프로브 및 신호 올리고뉴클레오티드의 농도를 결정할 수 있게 하는 정량화 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드,

[0400] d) 선택적으로, 바코딩된 프라이머, 바코딩된 주형 스위칭 올리고뉴클레오티드, 바코딩된 어댑터 또는 바코딩된 재조합 부위를 포함하는 바코딩된 핵산의 세트, 및

[0401] e) 선택적으로, 미세유체 장치.

[0402] a)의 효소, 적어도 하나의 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드, b)의 올리고뉴클레오티드 및 바코딩된 핵산의 세트는 특히 상기 정의된 바와 같다.

[0403] 바코딩된 핵산은 바람직하게는 비드와 같은 고체 지지체 또는 미세구획 또는 케이지의 벽에 부착된다.

[0404] 바코딩된 프라이머는 바람직하게는 DNA 툴박스 혼합물의 성분에 의해 생성된 신호 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 서열, 광-절단성, 효소-절단성 또는 화학적 절단성 영역 및 RNA에 결합할 수 있는 영역을 포함한다.

[0405] 상기 정의된 바와 같은 키트는 b)에서 적어도 한 쌍의 세포 또는 소기관 마커 특이적 리간드를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 리간드 쌍은 제1 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드 및 제2 세포 또는 소기관 마커-특이적 리간드를 포함하고, 여기서 이들의 마커에 대한 상기 제1 및 제2 리간드의 결합은 특히 상기 정의된 바와 같이 상기 제1 리간드에 커플링된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드와 상기 제2 리간드에 커플링된 활성자 또는 억제자 올리고뉴클레오티드 사이의 근접성 연장 또는 근접성 결찰을 유도한다.

[0406] 키트는 분할제, 바람직하게는 운데칸-1-올, 실리콘 오일, 광유 및/또는 퍼플루오르화 오일과 같은 연속 소수성 상을 추가로 포함할 수 있다.

[0407] 본 발명은 또한 특히 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 상기 정의된 바와 같은 키트의 용도에 관한 것이다.

[0408] 본 발명은 특히 상기 정의된 바와 같이, 적어도 하나의 세포 또는 소기관 마커의 수준을 결정하는 것에 기초하여 세포 또는 소기관의 하위 집단을 선택적으로 분석하기 위한 방법에서 상기 정의된 바와 같은 키트의 용도에 관한 것이다.

[0409] 본 발명은 하기 도면 및 실시예에 의해 추가로 예시될 것이다. 그러나, 이들 실시예 및 도면은 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0410] **서열에 대한 간략한 설명**

[0411] 서열 번호 1의 서열은 본원에서 B11a라고 하는 신호 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0412] 서열 번호 2의 서열은 본원에서 CB11a-2PS3라고 하는 증폭 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0413] 서열 번호 3의 서열은 본원에서 pTB11a PS3라고 하는 누출 흡수 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0414] 서열 번호 4의 서열은 리포팅 프로브의 뉴클레오티드 서열에 해당한다. 본원에서 MBB11aBsmIAtto633이라고 하는 리포팅 프로브는 5'에서 형광단 Atto633에 커플링되고 3'에서 소광제 BHQ2에 커플링된 서열 번호 4의 서열의 올리고뉴클레오티드로 구성된다.

[0415] 서열 번호 5의 서열은 본원에서 TSBtoB11a-2+2P라고 하는 전환 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0416] 서열 번호 6의 서열은 본원에서 TotalSeqB라고 하는 활성자 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0417] 서열 번호 7의 서열은 본원에서 Let7atoB11a-2+2P라고 하는 전환 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0418] 서열 번호 8의 서열은 본원에서 TD05_TotalSeqB라고 하는 활성자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 앱타머의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0419] 서열 번호 9의 서열은 본원에서 TE02_TotalSeqB라고 하는 활성자 올리고뉴클레오티드에 커플링된 앱타머의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0420] 서열 번호 10의 서열은 활성자 올리고뉴클레오티드(3'에서)에 연결된 링커 서열$(T)_{10}$(5'에서)의 뉴클레오티드 서열에 해당한다. (6-아미노-6-옥소헥실) 카르밤산 링커에 의해 프롤리놀에 연결된 콜레스테롤 모이어티는 본원에서 DLet7a T10 ChoPro라고 하는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 부착된다.

[0421] 서열 번호 11의 서열은 본원에서 Bc12라고 하는 신호 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0422] 서열 번호 12의 서열은 본원에서 CBc12-2PS4라고 하는 증폭 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0423] 서열 번호 13의 서열은 본원에서 pTBc12T5SP라고 하는 누출 흡수 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0424] 서열 번호 14의 서열은 리포팅 프로브의 뉴클레오티드 서열에 해당한다. 본원에서 MBBcBsmIAtto633이라고 하는 리포팅 프로브는 5'에서 형광단 Atto633에 커플링되고 3'에서 소광제 BHQ2에 커플링된 서열 번호 14의 서열의 올리고뉴클레오티드로 구성된다.

[0425] 서열 번호 15의 서열은 본원에서 TSBtoBc-2+2P라고 하는 전환 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0426] 서열 번호 16의 서열은 앱타머의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0427] 서열 번호 17의 서열은 앱타머의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0428] 서열 번호 18의 서열은 활성자 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0429] 서열 번호 19의 서열은 입자에 부착될 수 있고 신호 올리고뉴클레오티드에 상보적인 3' 부분을 갖는 올리고뉴클레오티드의 DNA 서열에 해당한다.

[0430] 서열 번호 20의 서열은 신호 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0431] 서열 번호 21의 서열은 신호 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열에 해당한다.

[0432] 서열 번호 22 및 23의 서열은 표 8에 제시되어 있다.

[0433] 서열 번호 24의 서열은 서열 번호 22와 서열 번호 23 사이의 공통적인 올리고뉴클레오티드 서열이다.

[0434] 서열 번호 25의 서열은 가요성 링커이다.

[0435] 서열 번호 26 내지 27의 서열은 표 13에 제시되어 있다.

[0436] 서열 번호 29 내지 31의 서열은 표 15에 제시되어 있다.

[0437] 서열 번호 32 내지 35의 서열은 표 18에 제시되어 있다.

[0438] 서열 번호 36 내지 38의 서열은 표 19에 제시되어 있다.

[0439] 서열 번호 39 내지 42의 서열은 표 20에 제시되어 있다.

[0440] 서열 번호 43 내지 45의 서열은 표 21에 제시되어 있다.

[0441] 서열 번호 46 내지 98의 서열은 표 22에 제시되어 있다.

[0442] 서열 번호 99의 서열은 표 24에 제시되어 있다.

[0443] 서열 번호 100 내지 102의 서열은 표 25에 제시되어 있다.

[0444] 서열 번호 103 내지 107의 서열은 표 26에 제시되어 있다.

[0445] 서열 번호 108 및 109의 서열은 표 27에 제시되어 있다.

[0446] 서열 번호 110 및 111의 서열은 표 28에 제시되어 있다.

[0447] 서열 번호 112 및 113의 서열은 표 29에 제시되어 있다.

[0448] 서열 번호 114의 서열은 표 8에, 서열 번호 115의 서열은 표 15에 제시되어 있다.

[0449] **도면**

[0450] **도 1. 인산염 완충 식염수는 DNA 툴박스의 등온 증폭 반응에 독성이 있다**

[0451] 자가촉매 반응은 올리고뉴클레오티드 Bc12를 증폭하기 위해 설정된다. 증폭 혼합물은 다양한 농도의 PBS를 함유하도록 개질된다. 트리거 Bc12의 부재(좌측) 또는 존재(1 nM, 우측) 하의 증폭 곡선.

[0452] **도 2. 37℃에서 작동시키기 위한 분자 프로그램의 개조**

[0453] (a) 50℃에서 TotalSeqB를 검출하도록 최적화된 분자 프로그램에 온도 범위가 사용되었다. 비율 Cq_{NC}/Cq_{10pM}는 검출 효율을 특징짓는다: 비율이 높을수록 TotalSeqB 검출이 더 양호하다. TotalSeqB 표적의 농도와 고온(46.3℃ 초과)에서의 증폭 시간(Cq) 사이에 명확한 용량 반응이 있다. 더 낮은 온도에서는 TotalSeqB의 농도가 상이한 샘플의 증폭 시간 간에 실질적인 차이가 없으므로 이 증폭 시스템에서 온도의 중요성을 강조한다.

[0454] (b) $MgSO_4$의 범위는 도 a에서와 동일한 분자 프로그램에 대해 46℃에서 실현되었지만 역전사에 사용된 것과 가까운 완충제에서 실현되었다. 비율 Cq_{NC}/Cq_{10pM}는 검출 효율을 특징짓는다: 비율이 높을수록 TotalSeqB 검출이 더 양호하다. 이 경우, 3 mM의 $MgSO_4$가 최선의 선택인 것 같다.

[0455] (c) TotalSeqB의 범위는 최적화된 새 완충제에서 새로운 분자 프로그램으로 37℃에서 실현되었다: DNA 툴박스의 출력은 TotalSeqB의 농도와 상관 관계가 있다: Cq가 낮을수록 TotalSeqB의 농도는 더 높다.

[0456] **도 3: 분자 프로그램에 의한 세포 생존율과 증폭 반응 둘 다에 대한 세포 배지의 영향**

[0457] (a) TotalSeq B 없음, 1 pM의 TotalSeq B 및 10 pM의 TotalSeq B로 각각 세포 배지의 범위(RPMI + 10% FBS + 1% P/S)가 실현되었다. Atto633 형광을 모니터링했다(기록된 시간: 1002분). (i) 10 pM TotalSeqB 샘플에 대한 Atto633(좌측) 및 Evagreen 삽입 염료(우측)의 증폭 곡선. 이 곡선에서 증폭 시작 시간 Cq(ii) 및 발산 시간(iii)을 추출한다: 세포 배지의 50%에서는 증폭이 시작되지 않았고, 25% 이하에서 세포 배지는 TotalSeqB 서열에 의해 촉발된 증폭 반응을 방해하지 않았다. 50%와 25%에서는 발산이 관찰되었던 반면에 12.5% 이하에서는 발산이 관찰되지 않았다.

[0458] (b) 완충제가 세포 생존에 미치는 영향. 3T3(i) 및 주르캇(Jurkat)(ii) 세포를 12.5%의 세포 배지가 보충되거나 보충되지 않은 3 mM $MgSO_4$가 포함된 FS 완충제 1x에서 RT에서 밤새(16시간) 두었다. 세포를 프로피디움 요오드로 염색하고 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율을 추출하기 위해 유세포 분석법으로 분석하였다. 12.5%의 세포 배지를 첨가하면 3T3 및 주르캇 세포의 경우 각각 살아있는 세포의 비율이 27%에서 79%(i)로, 6%에서 25%(ii)로 증가하였다.

[0459] (c) 일정 범위의 염색되지 않거나 DLet7aT10ChoPro로 염색된 라모스 세포를 12.5%의 (RPMI + 10% FBS + 1% P/S)를 함유하는 증폭 혼합물과 함께 인큐베이션하였다: DNA 툴박스의 출력은 세포 수의 함수에서 Cq의 음의 상관 계수에 의해 제안된 바와 같이 세포의 양과 상관 관계가 있는 반면 염색되지 않은 세포의 농도와 독립적으로 증폭은 관찰되지 않았다. 세포 배지는 염색된 세포의 검출에 영향을 미치지 않는다.

[0460] **도 4. 유리 올리고뉴클레오티드뿐만 아니라 항체-이식된 올리고뉴클레오티드도 DNA 툴박스에 의해 검출된다**

[0461] (a) TotalSeqB 올리고 검출. 다양한 농도의 TotalSeqB로 스파이킹된 샘플의 증폭 곡선(좌측)을 37℃에서 모니터링하고 Cq를 추출하였다(좌측).

[0462] (b) TotalSeqB-접합된 항체 검출. 다양한 농도의 AntiCD3-TotalSeqB 항체로 스파이킹된 샘플의 증폭 곡선(좌측)을 37℃에서 모니터링하고 Cq를 추출하였다(좌측).

[0463] **도 5. 올리고뉴클레오티드 접합된 항체를 이용한 라모스 세포의 검출**

[0464] (a) TotalSeqB-접합 항CD3 항체로 염색된 라모스 세포를 ToalSeqB-특이적 분자 프로그램에서 다양한 농도로 인큐베이션하였다. 증폭 곡선을 실시간으로 모니터링하고(좌측) 증폭 시간을 추출하였다(우측). 증폭 곡선의 Cq 값은 염색된 세포 수에 반비례한다.

[0465] (b) 다양한 농도의 염색되지 않은 세포로 음성 대조군을 수행하였다. 증폭 곡선의 Cq 값은 세포 수를 구별하지 않고 서로 매우 가깝다.

[0466] **도 6: 세포-특이적 앱타머로 염색된 세포의 검출**

[0467] (a) DNA 툴박스를 활성화하기 위해 앱타머가 개질된 방식을 보여주는 개략적 구조: 특이적인 서열(TotalSeqB)이 리포팅된 앱타머 서열의 3'에 첨가되었다.

[0468] (b) 세포는 특이적인 앱타머로 염색된다. 세포가 표적 마커를 제시하면, 앱타머가 세포에 결합하므로 DNA 툴박스의 입력으로 사용할 수 있다.

[0469] (c) 염색되지 않은 세포와 비교하여 더 낮은 Cq에 의해 제안된 바와 같이, 두 앱타머 모두는 라모스 세포에 결합한다. TD05_TotalSeqB는 증폭을 가장 잘 개시하는 것으로 나타났다.

[0470] (d) 일정 범위의 TD05_TotalSeqB 염색된 라모스 세포가 실현되었다: DNA 툴박스의 출력은 세포의 양에 비례하는 반면 세포 수의 함수에서 Cq의 상관 계수에 의해 제안된 바와 같이 앱타머 라모스 세포 없이 염색된 경우는 아니다.

[0471] **도 7: 콜레스테롤과 접합된 올리고뉴클레오티드로 인해 염색된 세포의 검출**

[0472] (a) 사용된 올리고뉴클레오티드의 개략적 구조: 콜레스테롤 분자는 T10 링커를 사용하여 원하는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에 부착된다.

[0473] (b) 세포는 콜레스테롤-개조된 올리고뉴클레오티드로 염색된다. 그 특성으로 인해 콜레스테롤은 세포막에 삽입된다.

[0474] (c) 콜레스테롤-개질된 올리고뉴클레오티드로 염색된 세포는 DNA 툴박스로 검출될 수 있다: 콜레스테롤 개질된 올리고뉴클레오티드는 입력으로 사용된다. 세포가 이 올리고뉴클레오티드로 염색되지 않는다면, DNA 툴박스에

대한 입력이 없다.

[0475] (d) 일정 범위의 염색되지 않거나 DLet7aT10ChoPro로 염색된 라모스 세포를 증폭 혼합물과 함께 인큐베이션하였다: DNA 툴박스의 출력은 세포 수의 함수에서 Cq의 상관 계수에 의해 제안된 바와 같이 세포의 양과 상관 관계가 있는 반면 염색되지 않은 세포의 농도와 독립적으로 증폭은 관찰되지 않았다.

[0476] **도 8. 올리고뉴클레오티드-접합된 항체 및 DNA 툴박스 검출을 사용한 단일 세포 식별.**

[0477] (a) 소적 실험의 개략도.

[0478] (b) 소적에서 생성된 형광 신호를 2D 챔버에서 7시간의 기간에 걸쳐서 10분마다 캡처하였다. 염색된 집단의 소적은 항-PD1 TotalseqB 항체로 염색되고 FITC로 바코딩된 T 세포인 마스터 믹스를 함유하였다. 이 집단을 FITC+Cy5 형광을 사용하여 게이팅하였다.

[0479] 염색되지 않은 집단의 소적은 염색되지 않은 T 세포인 Cascade Blue로 바코딩된 마스터 믹스를 함유하였다. 이 집단을 Cascade Blue+Cy5 형광을 사용하여 게이팅하였다.

[0480] 양성 대조군 집단의 소적은 마스터 믹스, 항-PD1 Totalseq B 항체를 가지며 Cascade Blue 및 FITC로 바코딩되었다. 이 집단을 Cascade Blue+FITC+Cy5 형광을 사용하여 게이팅하였다.

[0481] 음성 대조군 집단의 소적은 마스터 믹스만 가졌다. 이 집단을 Cy5 형광을 사용하여 게이팅하였다.

[0482] 각 반응 조건에 존재하는 소적의 평균 형광. 평균을 각 집단의 형광 값으로부터 계산하였다.

[0483] **도 9. 고정 세포 및 역전사와의 상용성의 존재 하의 DNA 툴박스 반응**

[0484] (a) 각각 10 pM 및 100 fM TotalSeqB에 의해 촉발된 5×10^4 고정 주르캇 세포, DNA 툴박스 및 역전사 구성요소를 함유하는 반응에 의해 생성된 형광 신호.

[0485] (b) 5×10^4 고정 주르캇 세포, DNA 툴박스 및 역전사 구성요소를 함유하는 반응으로부터 2 μl 반응 믹스를 함유하는 반응으로부터 생성되고 유전자 특이적 하우스키핑 유전자 프라이머로 PCR을 수행한 증폭 곡선.

[0486] **도 10. 미립자로부터 단일 가닥 DNA 방출**

[0487] (a) DNA-접합 입자를 반응 혼합물에 침지한다. α 가닥의 존재 하에, 입자-결합된 올리고의 3' 말단이 DNA 중합효소(Bst) 및 제한 효소(BsmI)를 사용하여 용액에서 방출된다.

[0488] (b) 한 입자 단면의 Kymogram(시간 대 위치)(Evagreen 형광).

[0489] (c) 6개의 올리고뉴클레오티드-접합 입자의 형광 시간 추적.

[0490] **도 11. A. DNA 툴박스 구성요소, B. 표면 마커, C. 분비된 마커 또는 표면 마커에 대한 근접성 효과, 및 D. 마커 조합의 상이한 실시형태**

[0491] **도 12. 단일-세포 바코딩 전략.** 화살촉은 핵산의 3' 말단을 나타낸다

[0492] **도 13. 형광 판독 후 광-절단 매개 선택** (형광 리포터 주형을 사용)

[0493] **도 14. DNA 툴박스 기반 직접 선택**

[0494] **도 15. 한 쌍의 올리고-접합된 항체를 사용하여 2개의 표면 마커를 표적으로 하는 세포 표현형의 개략적 표현.** 올리고는 항체가 표적에 결합할 경우 서로를 보완하고 DNA 중합효소 및 닉카아제 활성으로 인해 B11a를 생성한다. B11a는 특정 2-마커 표현형의 세포의 존재를 확인하는 형광 판독값을 생성하는 DNA 툴박스를 촉발한다.

[0495] **도 16 및 17: 근접성 올리고-접합된 항체 쌍을 사용하여 2개의 표면 마커를 표적화하는 세포 유형의 표현형 분석.**

[0496] 도 16: CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2 및 CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2toa(CD3-CD3), CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2 및 CD45-totalseqB-aTSB-B11b-2toa(CD3-CD45)로 표현형이 결정된 주르캇 세포의 증폭 곡선. CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2 단독(CD3)으로 표지된 주르캇 세포는 음성 대조군으로 사용되었다.

[0497] 도 17: 증폭 곡선으로부터의 Cq 값은 항체 쌍에 접합된 근접성 올리고를 사용하여 2개의 표면 마커를 표적으로 하는 세포의 성공적인 표현형을 보여준다.

[0498] **도 18: 올리고뉴클레오티드-접합된 항체 쌍 및 DNA 툴박스를 사용한 단일 세포 식별.** 개별 소적의 Cy5 형광 강도를 소적 분석 파이프라인을 사용하여 디지털 방식으로 획득하였다. 형광 강도를 각 시점에서의 소적의 형광 강도 값을 시점 0에서의 형광 강도 값으로 나누어 정규화하였다. 영상의 기간에 걸쳐서 임계값을 초과하는 각 집단의 액적 수를 플로팅하기 위해 임계값 1.5를 고려하였다.

[0499] **도 19: 표적 단백질의 근접성 검정 기반 검출의 개념을 설명하는 개략도**

[0500] **도 20: 근접성 검정을 사용한 rTNFα 검출을 위한 항체 희석의 측정.** 각각의 올리고-접합된 항체의 1:10^4배 희석은 0 nM과 15 nM 사이의 rTNFα를 검출하고 구별하는 것으로 알게 되었다. 항체의 낮은 희석은 허위 근접성(false proximity)을 생성하였다.

[0501] **도 21: 30과 0 nM 사이의 TNFα를 함유하는 근접성 검정 반응의 증폭 곡선의 평균 Cq 값.**

[0502] **도 22: 소적에서의 근접성 검정에 의한 30 nM rTNFα 검출.** 개별 소적의 Cy5 형광 강도를 소적 분석 파이프라인을 사용하여 디지털 방식으로 획득하였다. 형광 강도를 각 시점에서의 소적의 형광 강도 값을 시점 0에서의 형광 강도 값으로 나누어 정규화하였다. 영상의 기간에 걸쳐서 임계값을 초과하는 각 집단의 액적 수를 플로팅하기 위해 임계값 1.5를 고려하였다. 30 nM rTNFα를 함유하는 대부분의 액적은 30 내지 48분 이내에 Cy5 형광 임계값을 넘었다. 30 nM rTNFα를 함유하는 극소수의 액적이 다양한 나중 시점에서 Cy5 형광 임계값을 넘었다. TNFα를 함유하지 않는 액적은 430분 후에 Cy5 형광 임계값을 넘었다.

[0503] **도 23: 근접성 연장 검정 기반 PUMA의 원리 체계.** 각각 회색 별과 회색 직사각형으로 표시되는 단백질의 일부를 인식하는 2개의 앱타머(흑색 및 회색)가 선택된다. 앱타머 중 하나는 5' 말단에서 cT를 보유하는 반면에 다른 하나는 3' 말단에서 cT에 혼성화할 수 있는 활성자를 보유하고 있다. 앱타머와 cT 또는 활성자 사이에 링커가 존재한다. 표적 단백질의 존재 하에, 앱타머는 우선 각각의 표적에 결합하여 cT와 활성자를 근접하게 한다. 그런 다음, 활성자는 cT에 혼성화되고 중합효소에 의해 연장되며 닉-형성되어 트리거 분자를 생성한다. 디자인이 가역적이기 때문에 올리고뉴클레오티드는 초기 상태로 돌아간다. 표적 단백질의 부재 하에, 활성자와 cT는 혼성화되지 않아 트리거가 생성되지 않게 된다.

[0504] **도 24. 근접성 연장 검정.** 인간 알파-트롬빈 검출을 위한 상이한 앱타머 조합. 인간 알파-트롬빈의 검출을 위해, 2개의 앱타머인 15량체 및 29량체를 선택하였다. **ii** 15량체가 cT를 보유하고 29량체가 활성자를 보유하는 동안 일정한 범위의 인간 알파-트롬빈이 실현되었다. 등몰 범위의 앱타머를 수행하였다. **i.** 15량체가 활성자를 보유하고 29량체가 cT를 보유하는 동안 인간 알파-트롬빈의 범위. 등몰 범위의 앱타머를 수행하였다. 상이한 인간 알파-트롬빈 농도에 대한 증폭 시간은 막대 차트(좌축)로 제공되고 점수$_{100\ nM}$은 흑점(우축)으로 제공된다.

[0505] **도 25. 근접성 연장 검정: 인간 알파-트롬빈 검출 최적화.** **i.** 10 nM의 15량체-cT 및 29량체-활성자(29량체-act)의 존재 하에 mir완충제 1x 또는 FS 완충제 1x에서 일정 범위의 인간 알파-트롬빈이 실현되었다. **ii.** 일정 범위의 인간 알파-트롬빈은 10 nM의 15량체-cT 및 10 nM의 29량체-act 또는 29량체-act-V2의 존재 하에 FS 완충제 1x에서 실현되었다. 29량체-act-V2는 29량체-act보다 염기가 하나 적은 cT와 일치한다. 상이한 인간 알파-트롬빈 농도에 대한 증폭 시간은 막대 차트(좌축)로 제공되고 점수$_{100\ nM}$은 흑점(우축)으로 제공된다. **iii.** 10 nM의 15량체-cT 및 29량체-act를 함유하는 FS 완충제에서 일정 범위의 인간 알파-트롬빈을 실현하였다. 10 nM의 스크램블된 앱타머로 대조군을 실현하였다. 스크램블된 앱타머는 앱타머의 명칭 앞에 "S"로 표시된다.

[0506] **도 26. 근접성 연장 검정: 인간 알파-트롬빈 검출.** 100 nM의 15량체-cT-GAGA/ 29량체-act-GAGA(a.) 및 100 nM의 15량체-cT-GATT/ 29량체-act-GATT(b.)를 갖는 FS 완충제에서 일정 범위의 인간 알파-트롬빈을 실현하였다. 상이한 인간 알파-트롬빈 농도에 대한 증폭 시간은 막대 차트(좌축)로 제공되고 점수$_{1\ \mu M}$은 흑점(우축)으로 제공된다.

[0507] **도 27. 최적화. a.** 자가-프라이밍된 주형의 개략도. Nt.Bst.NBI 닉-형성 부위와 트리거 상보적 서열 사이에 4개의 염기가 존재한다. N은 A, T, C 또는 G 염기를 나타낸다. **b.** PUMA에 사용되는 전환 모듈: sT는 중합/닉-형성 주기를 거쳐 트리거를 생성한다. **c.** 생성 속도 실험의 원리. sT는 rT의 존재 하에 중합/닉-형성 주기를 거친다. 트리거는 선형적으로 생성되며 rT의 개방률은 sT의 생성 속도와 상관 관계가 있다. **d.** 각각의 시험된 서열에 대해 수득된 증폭 시간의 역수의 함수에서의 생성 속도.

[0508] **도 28. 자가-프라이밍된 주형: 포스포로티오에이트 최적화. e.i.** sT의 개략도. "*"로 표시되는 포스포로티오

에이트는 sT의 백본(backbone)에 첨가될 수 있다. 트리거 상보적 부분에 해당하는 5' 말단에 일부를 첨가하도록 선택하였다. **ii.** sT 백본에 첨가된 포스포로티오에이트의 수의 함수에서의 생성 속도. 포스포로티오에이트의 수를 제외하고, sT의 서열은 모든 시험 조건에 대해 동일하였다.

[0509] **도 29. 자가-프라이밍된 주형: 비오틴 위치 최적화.** f. sT 비오틴(흑색 원) 위치. 비오틴은 T5-Sp18 링커를 통해 5' 말단(i.) 또는 아미노-dT 빌딩 블록을 통해 자가-프라이밍된 주형(ii.)의 스템 루프 내부에 배치되었다. g. sT 범위. h. 스트렙타비딘의 존재 하 sT 범위.

[0510] **도 30.** **i.** 상이한 sT에 대해 Vent로 수득된 생성 속도의 함수에서의 Bst 2.0 WS로 수득된 생성 속도. 점선은 생성 속도의 등식을 나타낸다: 그 위의 점들은 Vent(엑소-)보다 Bst 2.0 WS에서 더 높은 생성 속도를 갖는다. **j.** 상이한 자가-프라이밍된 주형에 대해 50℃에서 Vent로 수득된 Bc 트리거의 생성 속도의 함수에서 37℃에서 Bst LF로 수득된 B11a 트리거의 생성 속도. 점선은 생성 속도의 등식을 나타낸다.

[0511] **도 31. 0.25 당량의 스트렙타비딘의 존재 하에 자가-프라이밍된 주형 범위.** 트리거 상보적 부위와 Nt.BstNBI 닉-형성 부위 사이의 두 염기 조합을 시험하였다: GTTT 및 GAGA.

[0512] **도 32. 자가-프라이밍된 주형의 TSB_full_toB11a-2+2 디자인.**

[0513] **도 33. 자가-프라이밍된 주형의 NBItoB11a-2+2Sp18T5Biot GAGA 디자인.**

[0514] **도 34. TSB_full_toB11a-2+2 및 DNA 툴박스에 혼성화된 항-CD3 totalseqB 항체를 사용한 단일 세포 식별.** 개별 소적의 Cy5 형광 강도를 소적 분석 파이프라인을 사용하여 디지털 방식으로 획득하였다. 형광 강도를 각 시점에서의 소적의 형광 강도 값을 시점 0에서의 형광 강도 값으로 나누어 정규화하였다. 영상의 기간에 걸쳐서 임계값을 초과하는 각 집단의 액적 수를 플로팅하기 위해 임계값 1.5를 고려하였다.

[0515] **도 35. NBItoB11a-2+2Sp18T5Biot GAGA와 접합된 스트렙타비딘 태그된 항-CD3 항체를 사용한 주르캇 세포의 표현형 분석.** 자가-프라이밍된 주형 태그된 항체의 존재/부재로 표지된 표현형 주르캇 세포의 DNA 툴박스 벌크 반응의 증폭 곡선의 Cq 값.

[0516] **도 36. 0분 및 20분 시점에서 마우스 세포 및 주르캇 세포를 함유하는 액적의 2D 시간 경과 영상의 스냅샷.**

[0517] **도 37. 37℃에서 2시간 후 농도 범위의 합성 seqshave로 처리 시 프라이머 방출의 백분율을 보여주는 그래프.** 30 pmol 합성 seqshave는 하이드로겔 비드로부터 바코딩된 프라이머의 77% 방출로 이어진다. 40 pmol seqshave는 대략 90% 방출을 유발하고 seqshave 농도의 추가 증가는 방출의 백분율을 유의하게 변경하지 않는다.

[0518] **도 38: 하이드로겔 비드로부터의 DNA 툴박스 매개 프라이머 방출.** 그래프는 증가하는 농도의 seqshave 전환자 주형(B11a-3toseqshave-6TTS4)을 함유하는 DNA 툴박스에 의한 프라이머 방출의 백분율을 보여준다. 방출의 백분율은 전환자 주형의 농도가 증가함에 따라 선형적으로 증가한다.

[0519] **도 39.** Cy5 표지 형광 프라이머 및 자가-프라이밍된 주형 태그된 항체 표지된 세포를 함유하는 하이드로겔 비드를 함유하는 **소적의 시간 경과 영상의 스냅샷.** 2시간 후 표지된 세포 및 바코딩된 하이드로겔 비드를 함유하는 액적만이 형광 프라이머의 방출을 나타내는 반면에 표지된 세포를 함유하지 않는 액적은 프라이머 방출을 나타내지 않는다.

[0520] **도 40.** 표지된 세포, 바코딩된 하이드로겔 비드 및 DNA 툴박스를 함유하는 액적에서 **시간 경과에 따른 평균 Cy5 형광 강도**를 계산하고 시간 경과에 따라 플로팅하였다. 액적의 시간 경과 영상을 10분마다 촬영하였다. 모든 시점에서 액적의 Cy5 형광 강도는 ImageJ를 사용하여 평가하였다. 세포 표면 상에 결합된 자가-프라이밍된 주형 접합된 항체는 하이드로겔 비드로부터 형광 프라이머의 DNA 툴박스 매개 방출을 촉발한다. 액적에서 Cy5 강도는 반응이 시간이 경과함에 따라 증가한다. 프라이머의 방출은 10분에서 120분으로 유의하게 증가하고 시간이 경과함에 따라 포화한다.

[0521] **도 41.** 바코딩된 하이드로겔 비드 및 DNA 툴박스를 함유하는 액적에서 **시간 경과에 따른 평균 Cy5 형광 강도.** 자가-프라이밍된 주형 표지된 세포의 부재로 인하여, 이러한 액적에서 DNA 툴박스는 비활성화된 상태로 유지된다; 따라서 시간 경과에 따른 Cy5 형광 강도의 증가가 없는 것으로 나타난 바와 같이 프라이머 방출이 관찰되지 않는다.

[0522] **도 42. 낮은 농도의 인산염 이온은 DNA 툴박스의 등온 증폭 반응과 상용성이다.** 자가촉매 반응은 다양한 농도의 PBS(0, 0.5, 0.9, 1.9, 3.8 또는 30%)의 존재 하에 올리고뉴클레오티드 Bc12를 증폭하도록 설정된다. (a)

트리거 Bc12의 부재(좌측) 또는 존재(1 nM, 우측) 하의 증폭 곡선. (b) 패널 (a)로부터 추출된 증폭 시간은 낮은 농도의 PBS가 증폭 반응을 억제하지 않는다는 것을 보여준다.

[0523] **실시예**

[0524] **방법 및 재료**

[0525] ***올리고뉴클레오티드***

[0526] 본 발명에 사용된 모든 올리고뉴클레오티드(주형 및 앱타머)는 Biomers(독일)에서 구입하여 고순도 무염 등급(카트리지 정제)의 HPLC 또는 Eurofins로 정제하였다. 주형 서열은 5' 포스포로티오에이트 개질을 사용하여 엑소뉴클레아제 ttRecJ에 의한 분해로부터 보호된다.

[0527] 상기 올리고뉴클레오티드는 하기 표 1에 제시되어 있다:

[0528] [표 1] 본 발명에 사용된 올리고뉴클레오티드 서열. "*"는 포스포로티오에이트 백본 개질을 나타낸다. "p"는 3' 인산염 개질을 나타낸다. "ChoPro"는 올리고뉴클레오티드의 5' 말단에서 (6-아미노-6-옥소헥실) 카르밤산 링커에 의해 프롤리놀에 연결된 콜레스테롤을 나타낸다. "aT", "pT", "rT" 및 "cT"는 각각 자가촉매 주형, 유사 주형, 리포팅 주형 및 전환 주형에 해당한다. Atto633 및 BHQ2는 형광단/소광제 쌍에 해당한다. 밑줄 친 서열은 리포팅된 앱타머 서열에 해당한다(문헌[Tang et al. (2007) *Analytical Chemistry*, **79**:4900-4907]).

표 1

서열 번호	명칭	서열	기능
1	B11a	CATTCAGTTAG	트리거/신호
2	CB11a-2PS3	C*T*A*ACTGAATGCTAACTGAA p	aT
3	pTB11a PS3	A*A*C*TAACTGAATG p	pT
4	MBB11aBsmIAtto633	Atto663-C*A*T*CGATATACTAACTGAATGCGATG-BHQ2	rT
5	TSBtoB11a-2+2P	TGCTAACTGAAGTTTGACTCATTGCTAGGACCGGCTT p	cT
6	TotalSeqB	GCTTTAAGGCCGGTCCTAGCAA	표적
7	Let7atoB11a-2+2P	TGCTAACTGAAGTTTGACTCAAACTATACAACCTACTACCTCA p	cT
8	TD05_TotalSeqB	AAGGAGCAGCGTGGAGGATAAACACCGTGGAGGATAGTTCGG TGGCTGTTCAGGGTCTCCTCCCGGTGTTAGGGTGTGTCGTCGTG GTAAGCCGGTCCTAGCAA	개질된 앱타머
9	TE02_TotalSeqB	AAGGAGCAGCGTGGAGGATATAGGCAGTGGTTTGACGTCCGCA TGTTGGGAATAGCCACGCCTTTAGGGTGTGTCGTCGTGGTAAGC CGGTCCTAGCAA	개질된 앱타머
10	DLet7a T10 ChoPro	ChoPro TTTTTTTTTTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	콜레스테롤 올리고뉴클레오티드
11	Bc12	CATTCTGGACTG	트리거/신호
12	CBc12-2PS4	C*A*G*T*CCAGAATG - CAGTCCAGAA p	aT
13	pTBc12T5SP	T*T*T*TT-CAGTCCAGAATG p	pT
14	MBBcBsmIAtto633	Atto633*A*T*TCTGAATGCAGTCCAGAAT BHQ2	rT
15	TSBtoBc-2+2P	TGCAGTCCAGAAGTTTGACTCATTGCTAGGACCGGCTT p	cT
16	TD05	AAGGAGCAGCGTGGAGGATAAACACCGTGGAGGATAGTTCGG TGGCTGTTCAGGGTCTCCTCCCGGTGTTAGGGTGTGTCGTCGTG GTAA	앱타머
17	TE02	AAGGAGCAGCGTGGAGGATATAGGCAGTGGTTTGACGTCCGCA TGTTGGGAATAGCCACGCCTTTAGGGTGTGTCGTCGTGGTAA	앱타머
18	Part_TotalSeqB	GCCGGTCCTAGCAA	활성자 올리고뉴클레오티드
19	Cbe12-1S4bioteg	Bioteg *C*G*A*TCCTGAATGCGATCCTGAAT *p*	올리고뉴클레오티드

[0529]

[0530] ***세포 배양***

[0531] 라모스 및 주르캇 세포주에 대한 기본 배지는 ATCC 공식화된 RPMI-1640 배지(ATCC 30-2001)이다. 완전 배지는 10% 우태아혈청(ATCC 30-2020)이 보충된 RPMI-1640으로 구성된다. 세포를 완전 배지에 현탁시키고 25 cm^2 또는 75 cm^2 배양 플라스크에 접종한다. 배양물은 5% CO_2로 37℃의 인큐베이터에서 유지된다. 75 내지 80% 컨플루언스에 도달 시, 세포를 계대배양한다. 세포 배양물로부터 회수한 후, 세포를 최종적으로 2.10^6개 세포.mL^{-1}의 농도로 TBS 1x에 재현탁시켰다.

[0532] ***앱타머 폴딩***

[0533] 앱타머를 앱타머 폴딩 완충제(1× Tris 붕산염 식염수(TBS: tris borate saline), 5 mM $MgCl_2$, 4.5 $g.L^{-1}$ 글루코오스)에서 500 nM로 희석하고 95℃로 5분 동안 가열(Thermomixer, Eppendorf)한 다음 얼음 상에서 10분간 냉각하였다. 이 프로토콜을 문헌[Delley *et al.* (2018) *Scientific Reports* 8 :1-8])으로부터 채택하였다.

[0534] ***세포 염색***

[0535] *앱타머 염색:*

[0536] 모든 염색 단계를 0.5 mL DNA LoBind 튜브(Eppendorf)에서 4℃에서 수행하였다. 2.10^5개의 세포를 21 nM의 앱타머 농도를 갖는 500 µL의 염색 완충액(1× TBS, 5 mM $MgCl_2$, 4.5 $g.L^{-1}$ 글루코오스, 1 $mg.ml^{-1}$ BSA(SigmaAldrich) 및 0.1 $mg.ml^{-1}$ 연어 정자 DNA)에 재현탁시켰고 얼음 상에서 30분 동안 방치하였다. 그런 다음 세포를 염색 완충제로 3회 세척(원심분리 300 rpm, 5분, 4℃, 염색 완충제에 재현탁)하고 TBS 1X로 2회 더 세척하였다. 세포를 최종적으로 TBS 1X에서 원하는 농도로 튜브에서 희석하였다.

[0537] *항체 염색*:

[0538] 각각의 배지에 재현탁된 200만 개의 세포(주르캇/라모스/인간 T 세포)를 세포 배양물로부터 회수하였다. 세포를 37℃에서 5분 동안 250 rcf에서 원심분리하고 상청액을 버리고 세포를 1 ml 1X TBS에 재현탁한다. 세포를 다시 37℃에서 5분 동안 250 rcf에서 원심분리하고, 상층액을 버리고 최종적으로 200 µl 1X TBS에 재현탁한다. 2.7 pmol 항체를 함유하는 100 µl Biolegend 염색 완충제를 세포 현탁액에 첨가하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션한다. 인큐베이션 후 세포를 4℃에서 5분 동안 250 rcf에서 원심분리하고, 상청액을 버리고 세포를 1 ml 1X TBS에 재현탁한다. 결합되지 않은 항체를 완전히 제거하기 위해 세척 단계를 1 ml 1X TBS로 5회 반복한다. 최종적으로, 세포를 100 µl 1X TBS에 재현탁하고 추가 사용을 위해 얼음 상에 둔다.

[0539] ***반응 혼합물 회합(assembly)***

[0540] 모든 반응 혼합물을 200 µL PCR 튜브(Bio-Rad)에서 4℃에서 회합하였다. 주형(cT, aT, pT 및 rT) 및 세포를 1% Evagreen 20X(Biotium) 및 효소(200 $U.\ ml^{-1}$ Nb.BsmI(NEB), 10 $U.ml^{-1}$ Nt.BstNBI(NEB), 80 $U.ml^{-1}$ Vent(엑소-)(NEB) 또는 36 $U.ml^{-1}$ Bst 거대 단편(NEB) 및 23 nM ttRecJ(인하우스 조합됨))와 함께 반응 완충제(FS 완충제 1X(NEB), TBS 0.2X(세포 현탁액에서 유래) 또는 12.5% 세포 배지(RPMI + 10% 우태아혈청 + 1% 페니실린/스트렙토마이신), 각각 25 µM dNTP(NEB), 3 mM $MgSO_4$ 및 200 $U.µl^{-1}$ BSA(NEB))와 혼합하였다.

[0541] 그런 다음 혼합물을 37℃의 열순환기(CFX 96 웰, Biorad) 및 Atto633에서 인큐베이션하였을 뿐만 아니라 Evagreen 형광을 모니터링하였다.

[0542] **실시예 1: 세포 존재 하 DNA 툴박스 반응의 상용성 및 반응 중 세포 생존율의 유지**

[0543] DNA 툴박스 반응을 일반적으로 특정 이온 농도와 함께 특이적인 완충제에서 45℃ 내지 50℃ 사이에서 수행한다. Bst 중합효소 거대 단편, Vent(엑소-) 중합효소, Nt.BstNBI, Nb.BsmI 및 ttRecJ에 대해 각각 최적 온도가 65℃, 75℃, 55℃, 65℃ 및 60℃인 호열성 효소를 사용한다. 본 발명자들은 또한 소량의 파열된 세포가 DNA 툴박스 반응을 억제한다는 것을 발견하였다. 따라서 세포 파열을 방지하기 위해, DNA 툴박스를 생리학적 온도 및 조건에 맞게 조정하고 일부 구성요소를 첨가하여 세포를 안정화해야 했다. 또한, 본 발명자들은 일반적으로 세포 현탁액을 위한 재현탁 배지로 사용되는 인산염 완충 식염수가 DNA 툴박스 반응에 대해 강력한 억제 효과를 갖는다는 것을 관찰하였다(**도 1**).

[0544] 실험 조건은 하기와 같다:

[0545] 증폭 믹스

Tris-HCl pH 8.41	50 mM
KCl	75 mM
$MgCl_2$	3 mM
DTT	3 mM
dNTP(각각)	25 μM
Evagreen	0.2 X
BSA9000S	200 μg/ml
Nb.BSMI	200 U/ml
Vent(엑소-)	80 U/ml
ttRecJ	13 nM
Nt.BstNBI	10 U/ml
PBS	0-30%
네트롭신	2 μM

[0546] 온도 45℃

[0547] 올리고뉴클레오티드

CBc12-2PS4	50 nM
pTBc12T5SP	10 nM
MBBcBsmIAtto633	50 nM

[0548] Bc12 0-1 nM

[0549] 본 발명자들은 PBS의 부재 하에, 증폭 반응이 일어나는 것을 관찰하였다(Bc12의 부재 하에 약 800분 및 1 nM의 Bc12로 약 100분 동안으로 자가촉매작용을 개시함). 6%만큼 낮은 PBS 농도의 존재 하에 실험 기간(1000분) 동안 증폭이 기록되지 않았다. 염 농도가 반응을 억제하지 않는 것으로 알려진다는 것을 감안하면(6% PBS의 경우 8.2 mM Na^+, 0.3 mM K^+ 및 8.4 mM Cl^-), 독성 효과는 인산염 이온(6% PBS의 경우 0.7 mM)의 존재에 기인할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 0.7 mM(6% PBS) 미만의 인산염 이온의 농도는 증폭 반응을 억제하지 않는다(**도 42** 참조).

[0550] 따라서, DNA 툴박스 반응의 적절한 기능을 하게 하면서 세포를 취급하도록 하고 세포 생존율을 유지하게 하는 조건을 찾아야 했다.

[0551] 첫째, 세포 조작용 완충제 조성물을 Tris 완충 식염수(50 mM Tris, 150 mM 염화나트륨)로 변경하고, 세포의 생존과 분자 회로의 적절한 기능을 위한 영양분을 제공할 수 있도록 주의 깊게 제조하였다.

[0552] 둘째, 42℃와 50℃ 사이에서만 수행되는 이전에 사용된 분자 프로그램(문헌[Baccouche *et al.* (2014) *Methods* **67**:234-249]; 문헌[Montagne *et al.* (2011) *Molecular Systems Biology* **7**:466]; 문헌[Padirac *et al.* (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**:E3212-E3220])을 37℃에서 작동하도록 적합화시켰다. 50℃에서 TotalSeqB를 검출하도록 최적화된 분자 프로그램에 온도 범위가 실현되었다. **도 2a**에서 볼 수 있듯이, TotalSeqB 표적의 농도와 고온(46.3℃ 초과)에서의 증폭 시간(Cq) 사이에 명확한 용량 반응이 있다. 더 낮은 온도에서는 TotalSeqB의 농도가 상이한 샘플의 증폭 시간 간에 실질적인 차이가 없으므로 이 증폭 시스템에서 온도의 중요성을 강조한다. 특히, 본 발명자들은 온도가 낮을수록 음성 대조군의 증폭이 더 빨리 일어난다는 것을 관찰하였다(표적의 부재 하에 위양성이라 함). 위양성은 몇 가지 트리거 올리고뉴클레오티드를 비특이적으로 생성하는 가짜 반응으로 인한 것이다. 누출로 알려진 이 현상은 온도가 더 낮을 경우 증가하고 TotalSeqB 표적의 민감한 검출을 방지한다. 또한, 최적 온도 보다 훨씬 미만의 온도에서 효소를 사용하는 경우 활성이 약해지고 생성물이 억제되기 쉽다. 전체적으로, 본 발명자들은 고전적인 DNA 툴박스 디자인이 37℃에서 작동하지 않는다는 결론을 내릴 수 있다.

[0553] 그러나, 트리거를 단축하거나 더 높은 AT/GC 함량으로 서열을 조정하여 얻을 수 있는 상응하는 자가촉매 주형 상에서 트리거의 용융 온도를 낮추면 이 문제를 해결하는 것으로 밝혀졌다. 더 낮은 용융 온도의 결과는, 비특이적으로 생성된 트리거가 자가촉매 주형 상에서 효율적으로 다시 캡처되지 않는 다는 것과, 이전에 보고된 동적 공정 하에서 유사 주형에 의해 비활성화될 가능성이 가장 높다는 것이다(문헌[Montagne *et al.* (2016) *Nature Communications* **7** :13474]). 또한, 이 변화는 효소 억제를 회피하면서 닉-형성된 생성물이 자발적으로 탈혼성화할 수 있기 때문에 효소 문제도 해결하였다.

[0554] 또한, 공정의 후속 단계, 예를 들어 세포 RNA의 전사체 분석과의 상용성을 보장하기 위해, DNA 툴박스 시스템(문헌[Gines et al., (2020) Science Advances])에 고전적으로 사용되는 것과 상이한 완충제를 사용해야 하고 이를 역전사와 상용하는 완충제로 변경하여야 했다. 우선, RT 완충제에 dNTP와 $MgSO_4$를 보충해야 했다. 필요

한 농도를 보정하기 위해 일정 범위의 $MgSO_4$가 실현되었다(**도 2b**). 3 mM의 $MgSO_4$로 완충제를 보충하면 최상의 신호-대-잡음비를 제공한다. 이 최적화된 완충제에서, 일정 범위의 TotalSeqB가 새로운 분자 프로그램으로 37℃에서 실현되었다. TotalSeqB의 농도가 높을수록 Cq가 낮아지는 것으로 관찰되었으며, 이는 세포 무결성 및 역전사와 상용성인 이 완충제에서 37℃에서 100 fM까지 표적을 효율적으로 감지함을 보여주고 있다(**도 2c**).

[0555] 셋째, 분자 프로그램 완충제에 일정 비율의 세포 배지를 첨가하면 분자 프로그램 효율에 부정적인 영향을 회피하면서 세포 생존율을 유지할 수 있음을 알게 되었다.

[0556] 첫째, 세포 배지가 증폭 반응의 특이성에 미치는 영향을 평가하기 위해 일정 범위의 세포 배지(RPMI + 10% FBS + 1% 페니실린/스트렙토마이신[P/S])를 각각 0, 1 및 10 pM의 TotalSeqB로 테스트하였다(**도 3**). Atto633 및 EvaGreen 형광을 모니터링하여, 증폭의 시작 시간과, 시스템의 궁극적인 비특이적 DNA 생성("발산(divergence)"이라고 함, 문헌[(Urtel *et al.* (2019) *Biochemistry* **58**:2675-2681]) 둘 다를 살펴보았다. 12.5% 이하의 세포 배지에서, 분자 프로그램의 특이적인 증폭이 발생하고 발산은 모니터링되지 않는 것으로 나타났다. 그러나, 12.5% 초과(이 경우 25% 및 50%)의 세포 배지에서 발산이 발생했으며, 그 중 50%에서는 특이적인 증폭이 발생하지 않았다.

[0557] 다음으로, 본 발명자들은 3 mM $MgSO_4$를 갖는 FS 완충제 1x에서 12.5%의 세포 배지가 존재하거나 존재하지 않으면서 세포 사멸을 모니터링하였다. 주르캇 및 3T3 세포를 실온에서 이 두 완충제에 밤새(16시간) 방치하고 요오드화프로피듐으로 염색하였다. 유세포 분석을 통해 세포를 분석하고 살아있는 세포와 죽은 세포의 비율을 추정하였다(**도 3**b, 3T3 세포(i) 및 주르캇 세포(ii)). 본 발명자들은 12.5% 세포 배지의 존재 하에 살아있는 세포의 비율이 3T3 세포의 경우 27%에서 79%로, 주르캇 세포의 경우 6%에서 25%로 증가하고 있음을 관찰하였다.

[0558] 최종적으로, 본 발명자들은 12.5% 세포 배지의 존재 하에 분자 프로그램을 사용하여 염색되지 않았거나 콜레스테롤-개질된 올리고뉴클레오티드로 염색된(실시예 5 참조) 라모스 세포의 검출을 수행하였다. 염색되지 않은 세포에서는 증폭이 관찰되지 않았지만(모니터링 시간 = 730분), 염색된 세포의 농도는 증폭 시간과 반비례 관계가 있었다(즉, 세포가 많을수록 증폭이 빨라짐). 이러한 결과는 반응 완충제에 세포 배지를 포함시킴으로써 세포 생존율을 유지하면서 세포 결합된 올리고뉴클레오티드의 특이적 검출을 위한 분자 프로그램을 사용하는 것이 가능함을 보여준다.

[0559] **실시예 2: DNA 툴박스는 항체 표지된 올리고뉴클레오티드뿐만 아니라 유리 올리고뉴클레오티드를 검출할 수 있다.**

[0560] DNA 툴박스로 특이적인 세포 유형을 표현형 분석하는 공정은 표적 세포의 세포 표면 마커에 특이적인 DNA 태그된 항체를 사용하여 달성할 수 있다; 그런 다음 DNA 태그를 DNA 툴박스에 의한 검출용 입력으로 사용할 수 있다. 본 발명자들은 상업적으로 이용 가능한 TotalSeqB 태그된 항체(Biolegend로부터)를 사용하여 타당성을 시험하였다. 실험의 목적은 태그된 DNA가 툴박스 반응에 대한 트리거 역할을 하는 DNA 툴박스를 사용하여 DNA 표지된 항체를 검출하는 것이다.

[0561] 본 발명자들은 먼저 역전사 완충제에서 37℃에서 분자 프로그램에 의한 미접합 트리거 올리고뉴클레오티드(TotalSeqB)의 검출을 조사하였다. TotalSeqB 올리고 및 항체의 milliQ 물(water)에서 10배 연속 희석액을 역전사 완충제, 4개의 올리고뉴클레오티드 및 분자 프로그램의 4개의 효소로 구성된 증폭 혼합물에서 스파이킹하였다. 10 μL의 샘플을 BioRad CFX96 실시간 PCR에서 37℃로 인큐베이션하고 프로브(Atto633)의 형광을 2분마다 기록하였다. 도 4a는 증폭 시간 추적을 보여준다. 예상한 바와 같이, TotalSeqB 올리고뉴클레오티드 표적이 더 농축될수록 더 빨리 증폭되어 증폭 반응의 특이성을 보여준다.

[0562] 그런 다음 본 발명자들은 항체가 접합된 올리고뉴클레오티드가 증폭 반응을 촉발하는 능력을 유지한다는 것을 검증하였다. 도 4b는 다양한 농도의 연속 희석된 TotalSeqB 항-PD1 항체(Biolegend 카탈로그 번호 329961)로 스파이킹된 샘플에 대한 증폭 시간 추적을 도시한다. 항체의 부재 하에, 증폭이 관찰되지 않았다. 예상한 바와 같이, 증폭 시간(Cq)은 항체 결합 올리고뉴클레오티드와 음의 상관관계가 있으며, 이는 테더링된 TotalSeqB 서열이 증폭을 촉발할 수 있음을 보여준다.

[0563] 결론적으로, DNA 툴박스는 TotalSeqB 표지된 항체뿐만 아니라 유리 부동 DNA 태그 TotalSeqB를 검출할 수 있다. 분자 회로는 명확하게 구분된 시점에서 형광 신호를 생성하는 올리고/항체의 다양한 농도를 명확하게 구별한다. 이 시스템은 반응에서 매우 낮은 농도의 올리고(100 fM) 및 항체(50 g)를 감지할 만큼 충분히 민감하였다.

[0564] *반응 설정: 100 μl 반응용*

표 2

구성요소	농도
완충제	
Tris-HCl(pH 8.3)	50 mM
KCl	75 mM
$MgCl_2$	3 mM
$MgSO_4$	3 mM
DTT	10 mM
분자 프로그램	
CB11a-2PS3	50 nM
pTB11aPS3	12 nM
MBB11aBsmIAtto633	50 nM
TSBtoB11a-2+2P	0.5 nM
DNA 툴박스 효소	
BSA	200 μg/mL
Nb.BsmI	200 u/mL
Bst 거대 단편	36 u/mL
ttRecJ	13 nM
Nt.BstNBI	10 u/mL
dNTP 각각	50μM
네트롭신	2 μM

[0565]

[0566] **실시예 3: DNA 툴박스는 세포 특이적 올리고 표지된 항체로 염색된 세포를 검출할 수 있다**

[0567] 이 실시예에서는 DNA 툴박스를 사용하여 세포 표현형을 위한 DNA 태그된 항체의 사용을 시험하였다(**도 5**).

[0568] 재료 및 방법: 결합되지 않은/약하게 결합된 항체(Biolegend 세포 염색 완충제(카탈로그 번호 420201))를 제거하기 위해 세척 단계를 반복하면서 TotalSeqB 항-CD3 항체(카탈로그 번호 300477)로 1×10^6개의 라모스 세포를 표지하였다. 세포를 최종적으로 1X FS 완충제에 재현탁하였다. 8 μl의 마스터 믹스와 2 μl의 올리고/항체 희석액을 혼합하고 BioRad CFX96 실시간 PCR에서 37℃로 실행하였다.

[0569] *반응 설정*

표 3

구성요소	농도
완충제	1X
Tris-HCl(pH 8.3)	50 mM
KCl	75 mM
$MgCl_2$	3 mM
DTT	10 mM
$MgSO_4$	6 mM
분자 프로그램	
CB11a-2PS3	50 nM
pTB11aPS3	12 nM
MBB11aBsmIAtto633	50 nM
TSBtoB11a-2+2P	0.5 nM
DNA 툴박스 효소	
BSA9000S	200 μg/mL
Nb.BSMI	200 u/mL
Bst 거대 단편/5	36 u/mL
ttRecJ	13 nM
NBI	10 u/mL
dNTP	0.5mM
네트롭신	2 μM

[0570]

[0571] 도 5에 표시된 결과에서 알 수 있듯이, DNA 툴박스는 라모스 세포를 발현하는 CD3을 표현형 분석할 수 있었으며 세포의 표면에 존재하는 CD3 양성 항체의 수를 기준으로 세포 수를 구별할 수 있었다. 시스템을 이기종 세포의

표면 상의 표면 마커의 발현에 대해 성공적으로 시험할 수 있다.

[0572] **실시예 4: DNA 툴박스는 세포 특이적 앱타머로 염색된 세포를 감지할 수 있다**

[0573] 이 실시예에서는 DNA 툴박스를 사용하여 세포 표현형을 위한 개질된 세포-특이적인 앱타머의 사용을 시험하였다.

[0574] 개념 실증을 라모스 세포로 수행하였다: 문헌(문헌[Tang et al. (2007) Analytical Chemistry **79**:4900-4907])에 보고된 2개의 라모스-특이적 앱타머(TD05 및 TE02)를 시험하였다. cT "TSBtoB11a-2+2P"의 3' 말단의 상보적 서열을 이러한 앱타머 서열의 3' 부분에 부가하였다(**도 6**a). 결과적으로, 앱타머의 존재는 cT "TSBtoB11a-2+2P"에 의한 트리거 B11a의 생성으로 이어질 것이다. (**도 6**b). 라모스 세포를 앱타머 중 하나로 염색하였을 경우, 염색되지 않은 세포보다 증폭이 더 빨리 발생하였다. 그 효과는 TE02와 비교하여 TD05에서 유의하게 더 높았으며, 이는 세포-결합된 TD05에 의한 증폭의 특이적인 촉발을 보여준다. (**도 6**c). **도 6**d는 염색되지 않았거나 TD05_TotalSeqB 가닥으로 염색된 라모스 세포의 농도의 증가가 존재할 시 증폭 시작을 보여준다. 각 세포 농도가 0을 초과하는 경우, 염색된 세포는 염색되지 않은 세포에 비해 더 빠른 증폭(더 낮은 Cq)을 유도하였다. 또한, 더 높은 농도의 염색된 세포는 더 이른 증폭과 상관관계가 있었다. 전체적으로, 이러한 결과는 본 발명자들이 개질된 특이적인 앱타머로 세포를 염색하는 데 성공하고 세포-결합된 개질된 앱타머가 증폭을 구체적으로 촉발할 수 있음을 보여준다.

[0575] **실시예 5: 콜레스테롤로 접합된 올리고뉴클레오티드를 이용한 비특이적으로 염색된 세포의 검출**

[0576] 이 실시예에서는 콜레스테롤-접합된 올리고뉴클레오티드(DLet7aT10ChoPro)를 사용한 세포의 염색 및 검출을 보여주었다(**도 7a**). 그 특성으로 인해, 콜레스테롤 모이어티가 세포막에 삽입되어(문헌[You *et al.* (2017) *Nature Nanotechnology* **12**:453-459]) 올리고뉴클레오티드를 표면에 부착시키는 것으로 이미 알려져 있다(**도 7b**). DLet7aT10ChoPro 올리고뉴클레오티드의 3' 부분은 cT Let7atoB11a에 대한 입력으로 사용되어 B11a 트리거 생성을 유도한다(**도 7c**). **도 7d**는 염색되지 않았거나 콜레스테롤-개질된 올리고뉴클레오티드로 염색된 다양한 농도의 라모스 세포가 증폭 혼합물과 함께 인큐베이션된 실험을 도시한다. 염색되지 않은 세포에서는 증폭이 관찰되지 않은 반면에(최대 730분) 염색된 세포는 증폭을 촉발할 수 있다. 또한, 염색된 세포의 농도는 증폭 시간과 반비례 관계가 있었다(즉, 세포가 많을수록 증폭이 빨라짐). 이러한 결과는 세포-앵커링된 DNA 가닥에 의한 증폭의 특이적인 촉발을 보여준다.

[0577] **실시예 6: DNA 툴박스에 의한 미세소적에 캡슐화된 단일 세포의 표현형 분석.**

[0578] 이기종 집단에서 개별 세포를 표현형 분석하기 위해, 검정은 단일 세포에 대해 디자인되어야 한다. 따라서, 단일 세포의 표현형 분석을 위한 DNA 툴박스를 구현하기 위해 분자 프로그램을 소적 미세유체 시스템에서 사용하였다(**도 8a**). 각각의 소적이 DNA 툴박스 시약과 함께 단일 세포를 캡슐화하는 수천 개의 소적을 생성하도록 실험을 디자인하였다.

[0579] 재료 및 방법

[0580] *세포 염색*: 2×10^6개의 T-세포(PD-1 양성 및 음성 세포 둘 다를 함유)를 200 μl 1x TBS 완충제에 재현탁하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 Anti-PD1 TotalSeqB 항체(Biolegend 카탈로그 329961)로 염색하였다. 인큐베이션 후, 세포를 4℃, 300g에서 10분 동안 원심분리하여 펠릿화하고 상청액을 버렸다. 결합되지 않은 항체를 제거하기 위해 세포 펠릿을 1 ml 1X TBS(얼음 상에 둠)에 재현탁하고 4℃, 300g에서 10분 동안 원심분리하고 상청액을 버렸다. 결합되지 않은 항체를 완전히 제거하기 위해 이 세척 단계를 3회 반복하였다. 세척 후, 세포를 1X FS 완충제(Invitrogen)에 재현탁하였다.

[0581] *마스터 믹스*: 마스트 믹스를 하기와 같이 제조하였다:

표 4

[0582]

구성요소	농도
완충제 Tris-HCl(pH 8.3) KCl $MgCl_2$ $MgSO_4$	 50 mM 75 mM 3 mM 3 mM
분자 프로그램 CB11a-2PS3 pTB11aPS3 MBB11aBsmIAtto633 TSBtoB11a-2+2P	 50 nM 12 nM 50 nM 0.5 nM
DNA 툴박스 효소 BSA Nb.BsmI Bst 거대 단편 Nt.BstNBI	 200 μg/mL 200 u/mL 36 u/mL 10 u/mL
dNTP 각각	50μM
네트롭신	2 μM

[0583] 마스터 믹스를 4개의 동일한 부분으로 나누어 하기와 같이 다양한 시험 집단의 소적을 생성하였다:

[0584] **수성상**: 소적 캡슐화를 위해 하기 반응 혼합물을 제조하였다:

[0585] *a. 양성 대조군*: 이 반응 믹스는 마스터 믹스, 항-PD1 TotalseqB 항체, 캐스케이드 블루(Cascade blue) 및 FITC로 구성되었다. 이 반응 혼합물을 항-PD1 항체에 존재하는 DNA 태그에 의해 촉발되는 분자 프로그램에 의해 Cy5 형광을 생성하는 DNA 툴상자 양성 대조군 역할을 하는 소적을 생성하는 데 사용하였다. 이 모집단의 소적을 다른 것으로부터 분리하기 위해, 반응 믹스를 캐스케이드 블루와 FITC의 믹스로 바코딩하였다. 따라서, 분석 중에 캐스케이드 블루 및 FITC 양성인 소적으로부터 생성된 Cy5 형광만이 양성 대조군으로 간주된다.

[0586] *b. 음성 대조군*: 이 반응 믹스는 마스터 믹스로만 구성되었다. 반응을 촉발하는 신호 분자는 제공하지 않았다. 따라서, 이 믹스로부터 생성된 소적은 자가 촉발로 인해 매우 늦은 시점에 Cy5 형광을 생성할 것이다. 분석 중에 유일하게 Cy5 양성인 소적으로부터 생성된 형광이 음성 대조군으로 간주된다.

[0587] *c. 염색됨*: 이 반응 믹스는 마스터 믹스, 항-PD1 TotalseqB 항체로 염색된 T-세포 및 FITC로 구성되었다. 반응 믹스에 첨가된 세포 수를 조정하여 67% 빈(empty) 소적, 하나의 세포를 함유하는 27% 및 하나 초과의 세포를 함유하는 6%의 푸아송 분포를 제공하는 0.2 내지 0.4의 λ를 달성하였다. 분석 중에 FITC 및 Cy5 양성인 소적으로부터 생성된 형광이 스테인드 테스트로 간주된다.

[0588] *d. 염색되지 않음*: 이 반응 믹스는 마스터 믹스, 염색되지 않은 T-세포 및 캐스케이드 블루로 구성되었다. 여기에서도 반응에 첨가된 세포 수를 조정하여 0.2 내지 0.4의 λ를 달성하였다. 분석 중에 캐스케이드 블루 및 Cy5 양성인 소적으로부터 생성된 형광이 염색되지 않은 것으로 간주된다.

[0589] **소적 생성 및 챔버 충전:** 폭 25 μm, 깊이 30 μm, 길이 40 μm의 노즐이 있는 미세유체 장치에서 유체역학적 흐름 집속으로 소적을 생성하였으며 폴리-(디메틸실록산)(PDMS: poly-(dimethylsiloxane))에서 소프트 리소그래피를 사용하여 제작하였다. 연속상은 HFE7500 플루오르화 오일에 2%(w/w) 008-FluoroSurfactant(RAN Biotechnologies)로 구성되었다. 수성상의 각 집단을 PDMS 장치의 개별 칩 상에서 함께 유동시켜 50 내지 80 pL 부피의 소적을 생성하고 별도로 수집하였다. 최종적으로, 각 집단의 소적을 함께 모으고 1000 μl 팁을 사용하여 피펫팅하여 혼합하였다. 소적 파손으로 이어지는 압력을 생성하지 않도록 더 큰 오리피스를 만들기 위해 팁의 입구를 절단하였다. 2 내지 3회 부드럽게 혼합한 후 풀링된 소적을 챔버에 주입하여 챔버 내에서 z 방향으로 약간의 물리적 제한을 두어 시간 경과에 따라 관찰할 수 있도록 하며 소적의 동적 분석에 의해 2차원(2D) 어레이로 소적을 고정시켰다.

[0590] **데이터 획득 및 분석.** 전동 스테이지가 있는 Nikon(Ti-E) 도립 현미경을 사용하여 영상화를 수행하였다. LED 광원(SOLA 광 엔진, Lumencor Inc.)에 의해 여기광을 제공하였다. 37℃ 및 주변 산소 농도에서 적절한 대역-통과 필터(GFP 및 TRITC 필터 세트, Nikon 및 Cy5 필터 세트, Semrock) 및 카메라 설정(Orca R2, Hamamatsu)을

사용하여 특이적인 채널에 대한 형광을 기록하였다. 10× 대물렌즈(NA 0.45)를 사용하여 이미지를 획득하였다. 7시간 동안 청색(캐스케이드 청색 바코드), 녹색(FITC 바코드), 적색(프로브 신호) 및 명시야 채널을 사용하여 10분마다 이미지를 촬영하도록 형광 현미경을 프로그래밍하였다. 어레이는 전체적으로 하나의 채널에서 영상화되었으며 채널은 나중에 변경되었고 어레이는 다시 영상화되었다. 그런 다음 맞춤형 Matlab 스크립트(Mathworks)를 사용하여 이미지를 분석하였다. 각각의 집단에 사용된 형광 바코드에 따라 형광 게이팅을 수행하였다(즉, 염색된 테스트 = FITC + Cy5; 염색되지 않음 = 캐스케이드 블루 + Cy5; 양성 대조군 = FITC + 캐스케이드 블루 + Cy5; 음성 대조군 = Cy5). 각 시점에서 특정 집단의 각각의 소적의 평균 형광을 계산하였다. 상이한 반응 조건 사이의 시간 차이를 분석하기 위해 평균 형광 대 시점을 플로팅하였다.

[0591] 결과

[0592] 피코리터 소적에 캡슐화된 DNA 툴박스는 형광 판독값을 성공적으로 생성하였으며, 각 반응 집단은 이들의 할당된 각각의 색상 바코드에 따라 식별될 수 있다(**도 8**). 형광 신호는 염색되지 않은 세포를 함유하는 소적에서보다 염색된 세포를 함유하는 소적에서 평균적으로 더 일찍 나타났다(**도 8b**). 양성 대조군 소적의 형광 신호는 양성 대조군 소적에서 항체의 더 낮은 농도로 인해 염색된 세포보다 평균적으로 약간 늦게 나타났다(이는 세포를 함유하는 소적뿐만 아니라 모든 소적에 걸쳐 분포됨). 대부분의 음성 대조군 소적은 신호를 나타내지 않았지만, 일부 소적은 세포 파편 또는 소적 융합으로 인해 발생할 수 있는 위양성 신호를 생성하였다. 산점도(데이터 미도시)에 의해 반영된 바와 같이, 염색된 집단(bc1)의 일부 소적의 형광 신호는 음성 집단(bc3)으로 분류되었을 가능성이 있으며, 또한 위양성 관찰을 설명한다.

[0593] **실시예 7: 고정 세포 및 역전사와의 상용성의 존재 하에 DNA 툴박스.**

[0594] DNA 툴박스에 의한 고정 세포의 검출을 또한 시험하였다. 세포 표면 마커 특이적 항체를 사용하여 고정된 세포의 표현형 분석을 위해 실험을 디자인하였다. 표현형 분석 후 추가적인 유전형 분석을 위해, 본 발명자들은 DNA 툴박스가 역전사 시약의 존재 하에 기능할 수 있는지, cDNA 합성 공정이 동일한 반응 설정에서 발생할 수 있는지 확인하기를 원했다.

[0595] 재료 및 방법:

[0596] **고정화:** 800 μl 절대 메탄올(-20℃에서 사전 냉각됨)을 200 μl Tris-완충 식염수(50 mM Tris, 150 mM 염화나트륨, pH 7.4)에 재현탁된 10^6개 세포에 적가하였다. 그런 다음 1000 μl 현탁액을 -20℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0597] **고정된 세포의 재현탁:** 고정된 세포를 300g에서 10분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 펠릿화된 세포를 Tris-완충 식염수(50 mM Tris, 150 mM 염화나트륨, pH 7.4)에 재현탁시켰다.

[0598] **100 μl 반응을 위한 마스터 믹스**

표 5

구성요소	농도
완충제 Tris-HCl(pH 8.3) KCl $MgCl_2$ DTT $MgSO_4$	1X 50 mM 75 mM 3 mM 10 mM 6 mM
분자 프로그램 CBc12-2PS3 pTBc12T5SP MBB11aBsmIAtto633 BL_Total_Seq_BtoBc-2+2P	 50 nM 12nM 50nM 0.5nM
DNA 툴박스 효소 BSA9000S Nb.BSMI Vent ttRecJ/140 NBI/10	 1% 2% 4% 1.5% 1%
역전사 시약 역전사효소 올리고 dT	 10U/μl 5μM
dNTP	0.5mM
네트롭신	2mM

[0599]

[0600] 8 μl의 상기 마스터와 5.10^4개의 고정 주르캇 세포(1x FS 완충제에 재현탁됨)를 Biorad CFX 튜브에서 혼합하고 하기 프로그램을 사용하여 BioRad CFX 실시간 PCR 기계에서 실행하였다:

표 6

반응	온도	시간
DNA 툴박스	37℃	180 분
역전사	55℃	60 분
효소의 비활성화	72℃	10 분

[0601]

[0602] 상기 반응 완료 후, 2 μl 반응 혼합물을 주형으로 취하고 SYBR 녹색 염료, ampliTaq 금 DNA 중합효소, dNTP 및 하우스키핑 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[0603] 결과

[0604] 주르캇 세포는 **도 9a**에 도시된 양성 형광 신호에 의해 반영되는 DNA 툴박스 반응 중에 생존할 수 있었다. 37℃에서 55℃로 온도가 상승하면 세포가 용해되고 역전사에 의해 cDNA로 전환되는 mRNA를 방출하게 된다. 역전사의 성공은 PCR에서 양성 증폭 곡선에 의해 반영된다(**도 9b**). 이러한 결과는 DNA 툴박스와 역전사가 순차적으로 진행될 수 있고 살아있는 세포의 표현형 분석이 수행된 후 유전형 분석이 수행될 수 있음을 명확하게 반영한다.

[0605] **실시예 8: 미립자로부터의 단일 가닥 DNA 방출**

[0606] 이 실시예에서는 내인성 DNA-툴박스 증폭 반응에 의해 생성된 입력 가닥의 존재에 조건부인 하이드로겔 입자로부터 단일 가닥 올리고데옥시리보뉴클레오티드를 방출하는 것을 보여준다(**도 10a**). 스트렙타비딘-개질된 하이드로겔 입자(스트렙타비딘 세파로오스 고성능 친화성 수지, GE Healthcare)는 입자당 375 아토몰(약 $2.3.10^8$개 가닥)의 평균 밀도의 비오티닐화 올리고뉴클레오티드(Cbe12-1S4bioteg, Biomers)로 이식되었다. 올리고뉴클레오티드는 방출 가능한 3' 입력 부위(서열 α에 상보적임, 여기서 α는 5'ATTCAGGATCG3'임, 서열 번호 20) 및 서열 α'(여기서 α'는 5'CATTCAGGATCG3'임, 서열번호 21)에 상보적인 5' 출력 부위를 포함하도록 디자인된다. 올리고뉴클레오티드는 또한 입력 부위와 출력 부위 사이에 효소 BsmI(New England Biolabs, NEB)의 제한 부위를 포함한다. 이러한 DNA-이식된 입자는 반응 완충제를 함유하는 반응 혼합물 및 DNA 툴박스 증폭 혼합물(가닥 α

에 대한 증폭 주형, DNA 중합효소[Bst 웜 스타트(warm start), NEB], 닉-형성 효소[Nb.BsmI, NEB], 제한 효소[BsmI, NEB], 엑소뉴클레아제[ttRecJ] 및 이중 가닥 특이적 염료[Evagreen, Biotium])에 침지한다(하기 표 참조).

표 7

[0607]

구성요소	농도
효소	
Nb.BsmI 닉카아제	400 u/ml
Bst 2.0 웜 스타트 중합효소	2.8 u/ml
ttRecJ 엑소뉴클레아제	25 nM
BsmI	500 u/ml
스트렙타비딘-접합된 세파로오스 입자	
Cbe12-1S4bioteg	375 amol/부
Bioteg *C*G*A*TCCTGAATGCGATCCTGAAT *p*	
서열 번호 19 의 서열에 해당	
반응 완충제 및 온도	
Tris-HCl(pH 7.9)	20 mM
$(NH_4)_2SO_4$	10 mM
KCl	10 mM
$MgSO_4$	8.4 mM
NaCl	50 mM
디티오트레이톨	3 mM
Synperonic F108	0.1%
BSA	800 μg/ml
Evagreen	0.4X
dATP, dCTP, dGTP, dTTP,	50 μM
dUTP	5 μM
온도	45℃

[0608] 반응을 인큐베이션하고 비드를 형광 현미경으로 관찰한다(**도 10b 및 도 10c**). 처음에는 소량의 가닥 알파만 있고 EvaGreen에 의해 유도된 비드의 형광은 안정적이다. 이어서, 중합/닉-형성 사이클에 의해 구동되는 증폭 반응이 시작되고 많은 α' 가닥이 생성된다. 이러한 α' 가닥은 비드-그래프팅된 올리고뉴클레오티드의 상보적 서열에 결합하고 중합효소에 의해 연장된다. 이 반응은 단일 가닥 올리고뉴클레오티드를 이중 가닥 형태로 전환하여 입자의 형광을 일시적으로 증가시키게 된다. 새로 형성된 듀플렉스는 제한 효소에 의해 절단되어 용액에서 입자-결합된 올리고뉴클레오티드의 3' 부분을 방출하며, 이는 비드의 형광 강도 감소로 관찰된다. 입자의 형광 시간 추적의 종 모양(**도 10c**)으로부터, 단일 가닥 DNA가 제한 효소의 존재 하에서 가닥 α의 생성에 조건부로 하이드로겔 입자로부터 효율적으로 방출된다는 결론을 내릴 수 있다.

[0609] **실시예 9: 근접성 올리고-접합된 항체 쌍을 사용하여 2개의 표면 마커를 표적화하는 세포 유형의 표현형 분석.**

[0610] 한 쌍의 올리고-접합된 항체를 사용하여 2개의 표면 마커를 표적으로 하는 세포 표현형의 개략적 표현이 **도 15**에 도시되어 있다.

[0611] 이전에 실시예 2에 기재된 바와 같이, 특이적인 세포 유형이 totalseqB 올리고 태그된 항체를 사용하여 세포 표면 마커를 표적으로 하는 표현형 분석될 수 있다. 여기서, 본 발명자들은 항체가 근접한 세포 표면 마커에 결합할 경우 서로를 보완하는 단일 가닥 올리고로 태그된 한 쌍의 항체를 사용하여 세포 표현형 분석을 위한 2개의 표면 마커를 표적하였다. 단일 가닥 올리고는 이들의 상보적 혼성화가 Bst 거대 단편 중합효소에 의한 가닥 연장으로 이어져 NbBsmI 닉-형성 부위를 생성한 다음 연장(B11a)의 닉카아제 매개 방출로 이어져, 차례로 DNA 툴박스를 촉발하도록 디자인된다. 이 접근법은 하나의 세포 표면 마커(단지 하나의 항체를 사용, 분자의 절반은 상보적 가닥 중 하나로 태그됨, 나머지 절반은 다른 가닥으로 태그됨) 또는 2개의 세포 표면 마커(상보적인 가닥 중 하나로 각각 태그된 2개의 상이한 표면 마커에 특이적인 2개의 상이한 항체를 사용)를 표적하는 데 사용될 수 있다. 이것은 본 발명자들이 이기종 집단으로부터 세포의 훨씬 더 특이적인 아형을 표현형 분석할 수 있게 할 것이다.

[0612] 본 발명자들은 먼저 근접성 올리고 디자인 및 반응 매개변수를 대량으로 조사했다. 세포 표면 마커 CD3 및 CD45를 표적으로 하는 검정에 인간 항-CD3-TotalseqB 및 인간 항-CD45-TotalseqB 항체를 사용하였다. 하기 올리고 서열은 totalseqB 상보적 서열을 함유하도록 디자인되어 올리고가 totalseqB 항체에 혼성화될 수 있다.

표 8

[0613]

명칭	서열	기능
aTSB-B11b-2	TTGCTAGGACCGGCCTTAAAGCTTTTTTTTTTTTCTTCAAGTAG (서열 번호 22)	활성자
aTSB-B11b-2toa	TTGCTAGGACCGGCCTTAAAGCTTTTTTTTTTTT/sp18/CTAACTGA ATGCTACTTGAATG/Phos/ (서열 번호 23/sp18/서열 번호 114/Phos/)	cT

[0614] *aTSB-B11b-2* 및 *aTSB-B11b-2toa*의 일반적인 올리고뉴클레오티드 서열(5'TTGCTAGGACCGGCCTTAAAGC, (서열 번호 24))은 TotalseqB 서열에 상보적이며 항체 상의 가닥을 혼성화하는 데 사용된다. TTTTTTTTTTT(서열 번호 25)는 가요성 링커로 작용한다. DNA 중합효소에 의해 연장되는 *aTSB-B11b-2*에서 활성자 서열은 공통 서열에 하류이다. *aTSB-B11b-2toa* 가닥에서, 비(non)-올리고 뉴클레오티드 스페이서 sp18(18-원자 헥사-에틸렌글리콜 스페이서)에 이어 B11b에서 B11a로의 전환자 서열은 공통 서열에 하류이다. sp18은 활성자 서열이 DNA 중합효소에 의해 전환자 서열로 연장되는 것을 허용하지 않는다.

[0615] 주르캇 세포는 하기를 사용하여 CD3 및 CD45 표면 마커를 표적으로 하는 표현형 분석되었다:

[0616] *CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2* 및 *CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2toa (CD3-CD3)* 조합 또는,

[0617] *CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2* 및 *CD45-totalseqB-aTSB-B11b-2toa (CD3-CD45) 조합*

[0618] 상기 올리고 접합된 항체를 하기와 같이 제조하였다:

[0619] ***CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2***

표 9

[0620]

구성요소	부피(μl)
10μM aTSB-B11b-2	4
항-인간 CD3-totalseqB Ab(0.5 mg/ml) [UCHT1, 300477]	2
1x TBS	14
총계	20

[0621] ***CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2toa***

표 10

[0622]

구성요소	부피(μl)
10μM aTSB-B11b-2toa	4
항-인간 CD3-totalseqB Ab(0.5 mg/ml) [UCHT1, 300477]	2
1x TBS	14
총계	20

[0623] ***CD45-totalseqB-aTSB-B11b-2toa***

표 11

[0624]

구성요소	부피(μl)
10μM aTSB-B11b-2toa	4
항-인간 CD45-totalseqB Ab(0.5 mg/ml) [HI30, 304066]	2
1x TBS	14
총계	20

[0625] 상기 접합체를 실온에서 밤새 인큐베이션하고 사용하기 전에 4℃에서 보관하였다. 200 μl 1X TBS 및 200 μl Biolegend 염색 완충제에 현탁된 1x10^{6}개의 주르캇 세포를 2 μl의 각 항체 쌍으로 염색하고 4℃에서 30분 동안 인큐베이션했다. 1 ml 1X TBS에서 2회 세척하고 250 rcf에서 5분 동안 원심분리하여 결합되지 않은 항체를 세포 현탁액으로부터 제거했다. 세포 펠릿을 최종적으로 50 μl 1X TBS에 재현탁시켰다.

[0626] 하기 마스터 믹스를 제조하였다:

표 12

구성요소	μl 의 부피 및 최종 농도
5x FS 완충제(Invitrogen)	20
120mM MgSO4 (NEB B1003S)	2.5 (3mM)
1mM dNTP	1.5(각각 15 μM)
200 μM 네트롭신	1 (2μM)
10μM CB11a-2noPS3	1.5 (150nM)
10 μM rT B11aAtto633S++	1 (100nM)
1μM pTB11aA3	0.4 (4nM)
BSA (NEB B9000S)	1
NbBsmI (NEB R0706S)	2.5
Nt.BstNBI (NEB 0607S)	1
Bst LF (M0275S)	1
물	36.6
총계	70

[0627]

[0628] 개질된 서열:

표 13

명칭	서열	기능
CB11a-2noPS3	5'C*T*A*ACTGAATGCTAACTGAA3' (서열 번호 26, PTO 개질을 나타내지 않음)	aT
rT B11aAtto633S++	5'-Atto663*C*A*T*CGATATAC*TA*AC*TG*AA*TGCGA*T*G*BHQ2-3' (Atto663 서열 번호 27 BHQ2-3', PTO 개질을 나타내지 않음)	rT
pTB11aA3	5'A*A*A*C*TAACTGAATG3' (서열 번호 28, PTO 개질을 나타내지 않음)	pT

''''는 염기에 대한 포스포티오에이트(PTO) 개질을 나타낸다*

[0629]

[0630] 대략 50000개의 표지된 세포를 상기 마스터 믹스로 구성된 증폭 혼합물에 스파이킹하였다. 10 μL의 샘플을 BioRad CFX96 실시간 PCR에서 37℃로 인큐베이션하고 프로브(Atto633)의 형광을 2분마다 기록하였다.

[0631] 증폭 곡선으로부터의 Cq 값은 항체 쌍에 접합된 근접성 올리고를 사용하여 2개의 표면 마커를 표적으로 하는 세포의 성공적인 표현형을 보여준다(**도 16 및 도 17 참조**). CD3-CD3 및 CD3-CD45 실험에서 Cq 값의 유사성은 항체 표적에 관계없이 근접성 올리고의 재현성을 반영한다. 두 올리고 접합체 모두가 존재할 경우에만 반응을 촉발한다; 하나의 접합체의 존재는 음성 대조군(CD3)에 의해 나타난 바와 같이 분자 프로그램을 촉발하지 않는다.

[0632] **실시예 10: 소적에서 근접성 올리고-접합된 항체 쌍을 사용하여 2개의 표면 마커를 표적화하는 미세소적 캡슐화된 단일 세포의 표현형 분석.**

[0633] 이기종 집단으로부터의 단일 세포 아형의 표현형 특이성을 증가시키기 위해, 본 발명자들은 미세소적에서 캡슐화된 세포 상의 2개의 표면 마커를 표적으로 하는 근접성 연장 검정을 사용하여 단일 세포 표현 분석을 도입하였다. 상기 실시예에서 기재된 바와 같이, 항체-올리고 접합체 쌍을 사용하여 소적 캡슐화된 단일 세포의 표현형을 분석하였다. *CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2* 및 *CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2toa*(*CD3-CD3*) 조합을 사용하여 1×10^{6}개의 주르캇 세포를 염색하였고 상기 설명한 바와 같이 결합되지 않은 세포를 제거하였다. *CD3-totalseqB-aTSB-B11b-2*(CD3)를 사용하여 1×10^{6}개의 주르캇 세포를 염색하였다; 이 집단은 음성 대조군으로 역할하였다. 하기 마스터 믹스를 제조하였다:

표 14

[0634]

구성요소	μl의 부피 및 최종 농도
5x FS 완충제(Invitrogen)	20
120mM MgSO4 (NEB B1003S)	2.5 (3mM)
1mM dNTP	1.5(각각 15 μM)
200 μM 네트롭신	1 (2μM)
10μM CB11a-2noPS3	1.5 (150nM)
10 μM rT B11aAtto633S++	1 (100nM)
1μM pTB11aA3	0.4 (4nM)
BSA (NEB B9000S)	1
NbBsmI (NEB R0706S)	2.5
Nt.BstNBI (NEB 0607S)	1
Bst LF (M0275S)	1
카르복시메틸셀룰로오스(20 mg/ml)	20
물	16.6
총계	70

[0635] 20% 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)를 사용하여 마스터 믹스의 밀도를 유지하고 소적 캡슐화 공정 중 세포 침전을 회피하였다. CMC는 분자 프로그램에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다(데이터 미도시). 마스터 믹스로 세포 캡슐화, 챔버 충전, 데이터 획득 및 분석을 이전에 설명한 대로 수행하였다. CD3-CD3 표지된 세포를 함유하는 소적 에멀젼은 무색으로 바코딩된 반면 CD3 표지된 세포를 함유하는 소적 에멀젼은 1% 캐스케이드 블루를 사용하여 청색으로 색상 바코딩되었다.

[0636] **도 18**에서 볼 수 있듯이, 개별 소적의 Cy5 형광 강도를 소적 분석 파이프라인을 사용하여 디지털 방식으로 획득하였다. 형광 강도를 각 시점에서의 소적의 형광 강도 값을 시점 0에서의 형광 강도 값으로 나누어 정규화하였다. 영상의 기간에 걸쳐서 임계값을 초과하는 각 집단의 액적 수를 플로팅하기 위해 임계값 1.5를 고려하였다. 근접성 올리고 태그된 항체 쌍(CD3-CD3)으로 표지된 세포를 함유하는 최대수의 액적이 촉발되고 20 내지 38분 시점 사이에서 임계값을 넘는 반면, 하나의 항체(CD3)로 표지된 세포를 함유하는 단지 몇개의 액적은 70분 후에 임계값을넘는다. 이것은 특이적 반응과 비특이적 반응 사이의 대략 30분의 시간 창을 나타낸다. 이는 또한 검정이 3% 미만의 위양성 액적이 있음을 나타낸다.

[0637] **실시예 11: 벌크 반응에서 근접성 연장 검정 및 DNA 툴박스를 사용한 분비 사이토카인의 검출**

[0638] 사이토카인을 분비하는 능력에 기초한 세포의 표현형 분석은 올리고-접합된 항체를 사용하여 달성될 수 있다. 이기종 집단의 세포 유형 또는 집단 내 세포의 아형의 사이토카인을 방출하는 능력은 이의 활성화 상태 및 신호 전달에 대한 정보를 제공한다. 본 발명자들은 세포 분비 분자를 검출하기 위해 근접성 연장과 DNA 툴박스의 조합을 사용한다. 분비 분자 상에 있는 2개의 상이한 에피토프에 특이적인 한 쌍의 단일 가닥 올리고 접합된 항체는 항체가 표적에 결합할 경우 혼성화하여 중합효소 매개 가닥 연장 및 신호 서열(B11a)의 닉카아제 매개 방출을 하도록 하여 DNA 툴박스를 촉발하고 차례로 세포에 의한 사이토카인의 분비를 확인하는 형광 판독값을 생성한다.

[0639] **도 19**는 표적 단백질의 근접성 검정 기반 검출의 개념을 설명하는 개략도이다. 표적 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 특이적인 한 쌍의 항체를 사용한다. 이들 항체는 염기 상보적 말단을 갖는 단일 가닥 올리고와 공유적으로 이식된다. 표적 단백질에 결합하는 항체는 올리고의 상보적 염기쌍 형성으로 이어질 것이다. DNA 중합효소 매개 가닥 연장은 이중 가닥 닉-형성 부위의 생성으로 이어질 것이다. 연장된 가닥의 닉카아제 매개 방출은 표적 단백질의 존재를 확인하는 형광 판독값을 생성하는 DNA 툴박스를 활성화한다. 표적 단백질의 부재 하에서는, 항체 쌍이 상호 작용하지 않으므로 DNA 툴박스가 비활성화되어 형광을 유발하지 않는다.

[0640] 형광 판독값은 세포에 의해 생성된 사이토카인 농도의 함수이며 사이토카인 수준이 높을수록 더 빠른 형광 스위칭으로 이어진다. 이 접근법을 사용하여 세포는 사이토카인 발현에 기초하여 표현형 분석 및 분류될 수 있다. 복수의 사이토카인에 특이적인 올리고 접합된 항체의 캐스케이드를 또한 DNA 툴박스와 함께 사용할 수 있다.

[0641] 본 발명자들은 TNFα 상의 2개의 상이한 에피토프에 특이적인 Biolegend 항-인간 단일클론성 TNFα 항체(MAb1 및 MAb11; 1 mg/ml)를 사용하였다. Abcam 올리고뉴클레오티드 접합 키트(ab218260)를 사용하여 "link30"이라고 하는 5' 아민화 30 bp 공통 서열을 항체에 부착하였다. 항체-올리고 접합 후, link30 상보적인 cLink30-T12-B11b-2는 MAb1에 혼성화되었고 cLink30-T12-B11b-2toa는 실온에서 밤새 인큐베이션함으로써 MAb11에 혼성

화되었다. 올리고-접합된 항체를 침전시키고(결합되지 않은 올리고를 제거하기 위함) 제조사 프로토콜에 따라 재현탁시켰다.

표 15

명칭	*서열*	*기능*
링크 30-아민화됨	/5AmMC6/CCCACAGGCACGCTCAACGCTAACCAAACC (/5AmMC6/서열 번호 29, 여기서 5AmMC6는 헥산 스페이서가 있는 5' 아미노 링커임	링커(항체의 공유 개질용)
cLink30-T12-B11b-2	GGT TTG GTT AGC GTT GAG CGT GCC TGT GGG TTT TTT TTT TTT CTT CAA GTA G (서열 번호 30)	활성자
cLink30-T12-B11b-2toa	GGT TTG GTT AGC GTT GAG CGT GCC TGT GGG TTT TTT TTT TTT /Sp18/CT AAC TGA ATG CTA CTT GAA TG/3Phos/ (서열 번호 31/Sp18/서열 번호 115/3Phos/)	cT

[0642]

[0643] 상기 설명한 바와 같이, 두 올리고 모두에서의 공통 서열은 항체에 접합된 cLink30 상의 가닥을 혼성화하는 데 사용되며 비-올리고 뉴클레오티드 스페이서 sp18은 상보적 가닥이 전환자 서열을 넘어 연장되는 것을 방지한다.

[0644] 본 발명자들은 결합되지 않은 항체를 제거하기 위한 세척 단계가 없기 때문에 검정에 사용된 올리고-접합된 항체의 농도가 중요한 매개변수라는 것을 알게 되었다. 반응에 항체 분자가 너무 많으면 잘못된 근접성을 촉발할 수 있다. 그래서, 허위 근접성을 촉발하지 않는 항체의 최대 농도를 우선 연구했다. 항-TNF 항체-올리고 접합체를 연속 희석하고 15 nM 재조합 TNFα(rTNFα)와 존재 또는 부재로 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 하기 마스터 믹스를 추가하고 CFX96을 사용하여 37℃에서 2분마다 DNA 툴박스 리포터 프로브의 형광 강도를 기록하였다. 각 반응의 증폭 곡선의 Cq 값을 추출하고 플로팅하였다. 각각의 올리고-접합된 항체의 $1:10^4$배 희석은 0 nM과 15 nM 사이의 rTNFα를 검출하고 구별한다는 것을 알게 되었다. 더 높은 농도의 항체는 허위 근접성을 생성하였다.

[0645] **마스터 믹스:**

표 16

구성요소	부피(μl)
5x FS 완충제(Invitrogen)	20
120mM MgSO4 (NEB B1003S)	2.5 (3mM)
1mM dNTP	1.5(각각 15 μM)
200 μM 네트롭신	1 (2μM)
10μM CB11a-2noPS3	1.5 (150nM)
10 μM rT B11aAtto633S++	1 (100nM)
1μM pTB11aA3	0.2 (2nM)
BSA (NEB B9000S)	1
NbBsmI (NEB R0706S)	2.5
Nt.BstNBI (NEB 0607S)	1
Bst LF (M0275S)	1
물	36.8
총계	70

[0646]

[0647] 이는 근접성 검정을 사용하여 rTNFα 검출을 위한 우선 결정된 항체 희석도였다(**도 20** 참조). 각각의 올리고-접합된 항체의 $1:10^4$배 희석은 0 nM과 15 nM 사이의 rTNFα를 검출하고 구별하는 것으로 알게 되었다. 항체의 낮은 희석은 허위 근접성을 생성하였다.

[0648] 그런 다음, 본 발명자들은 다양한 농도의 rTNFα를 검출하기 위해 항체의 $1:10^4$ 희석을 사용하였다. 마스터 믹스 조성물, 반응 설정 및 데이터 획득을 상기에 기재된 바와 같이 수행하였다. 검정은 반응 혼합물에서 rTNFα를 명확하게 검출할 수 있었다. 시스템의 자가 촉발은 적어도 40분의 시간 창을 제공하는 90분 후에 발생하였다.

[0649] 30 nM TNFα의 존재는 접합된 올리고의 근접성 매개 혼성화를 유발하여 대략 50분에 DNA 툴박스를 촉발하게 된

다. 반응의 자가-촉발은 적어도 90분 후에 발생한다(**도 21 참조**).

[0650] **실시예 12: 소적에서 근접성 연장 검정 및 DNA 툴박스를 사용한 rTNFα의 검출**

[0651] 소적에서 근접성 검정에 의해 분비 사이토카인을 검출할 목적으로, 본 발명자들은 30 nM 재조합 TNFα를 검출하기 위해 항-TNFα 항체(MAb1 및 MAb11) 접합된 근접성 올리고(이전에 설명된 바와 같음)를 사용하였다. 30 nM rTNFα를 각 항체의 1:10^4 희석액과 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하고 하기 마스터 믹스와 혼합하였다. 1X TBS와 혼합된 항체를 음성 대조군으로서 항체와 유사하게 인큐베이션하였다. 1% 캐스케이드 블루를 음성 대조군 반응과 혼합하였다. 별도의 PDMS 장치를 사용하여 마스터 믹스, 30 nM rTNFα 및 항체(드롭 코드 무색)를 함유하는 믹스와 마스터 믹스, 1X TBS 및 항체(드롭 코드 청색)를 함유하는 믹스로부터 80 pL 소적을 생성하였다. 두 믹스 모두로부터의 소적 에멀젼을 함께 수집하고, 이전에 설명된 바와 같이 2D 시간 경과 영상화에 의해 분석하였다. 근접성 올리고 접합된 항체는 **도 22**에 도시된 바와 같이 액적에서 rTNFα를 성공적으로 검출하였다. 30 nM 사이토카인을 함유하는 대부분의 액적은 30 내지 48분 이내에 형광 신호를 생성하였다. 사이토카인을 함유하지 않은 액적은 430분 후에 형광 신호를 생성하였다. 이는 항체에 접합된 올리고를 함유하는 근접성 검정이 사이토카인을 검출하는데 효율적이며 표적의 존재 하에 1시간 이내에 특이적인 반응을 촉발한다는 것을 입증한다. 허위 근접성 촉발된 반응은 매우 늦은 시점에 발생한다.

[0652] **마스터 믹스:**

표 17

[0653]

구성요소	부피(μl)
5x FS 완충제(Invitrogen)	20
120mM MgSO4 (NEB B1003S)	2.5 (3mM)
1mM dNTP	1.5(각각 15 μM)
200 μM 네트롭신	1 (2μM)
10μM CB11a-2noPS3	1.5 (150nM)
10 μM rT B11aAtto633S++	1 (100nM)
1μM pTB11aA3	0.3 (2nM)
BSA (NEB B9000S)	1
NbBsmI (NEB R0706S)	2.5
Nt.BstNBI (NEB 0607S)	1
Bst LF (M0275S)	1
물	36.7
총계	70

[0654] **실시예 13: 앱타머 기반 근접성 연장 검정**

[0655] 도 23은 근접성 연장 검정 기반 PUMA의 원리 체계를 도시한다.

[0656] 이 실시예에서, 본 발명자들은 앱타머-근접성 연장 검정을 통해 인간 알파-트롬빈 검출의 가능성을 조사하였다. 이 디자인은 FS 완충제 1x에서 37℃에서 Nb.BsmI 닉카아제 효소와 Bst 거대 단편(Bst LF) 중합효소와 함께 작동한다. cT와 활성자는 9개의 염기 상에서 서로 혼성화한다. Nb.BsmI 닉-형성 부위 서열로 인해, 디자인은 가역적이다. 이 경우, 활성자가 cT에 혼성화되고 중합효소에 의해 연장된 후 트리거를 방출하기 위해 닉-형성되는 경우, 올리고뉴클레오티드는 초기 상태, 즉 중합효소에 의해 신장되기 전에서와 같다. 따라서, 트리거 생성은 2개의 올리고뉴클레오티드 사이의 평형을 이동시키지 않아 배경 증폭을 감소시킨다.

[0657] 앱타머로 원리를 실증하기 위해, 본 발명자들은 동일한 리뷰(문헌[Deng, 2014])에서 보고된 2개의 앱타머(15량체 및 29량체)로 인간 알파-트롬빈을 표적으로 하기로 결정하였다. 도 23에 도시된 바와 같이, 본 발명자들에 의해 최적화된 활성자 및 cT 서열뿐만 아니라 T12 링커가 2개의 선택된 앱타머의 서열에 첨가되었다.

표 18

명칭	서열	기능
15량체-cT	CTAACTGAATGCTACTTGAATGTTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG (서열 번호 32)	cT
29량체-cT	CTAACTGAATGCTACTTGAATGTTTTTTTTTTTTAGTCCGTGGTAGGG CAGGTTGGGGTGACT (서열 번호 33)	cT
15량체-act	GTTGGTGTGGTTGGTTTTTTTTTTTTTTCAAGTAG (서열 번호 34)	활성자
29량체-act	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTTTTTCAAGTAG (서열 번호 35)	활성자

[0658]

[0659] cT는 앱타머의 5' 말단에 첨가되고 활성자는 3' 말단에 첨가된다. 15량체-활성자(15량체-act)/29량체-cT의 Kd 뿐만 아니라 15량체-cT/29량체-act의 Kd가 계산되어(표 2 참조), 두 올리고뉴클레오티드 세트 모두에 대해 37℃에서 104 nM의 Kd를 제공하게 된다. 제1 단계는 0, 1, 10 및 100 nM의 등몰 믹스의 15량체-act/29량체-cT의 존재 하(**도 24의 b.i.**) 또는 0, 1, 10 및 100 nM의 등몰 믹스의 15량체-ct/29량체-acT의 존재 하(**도 24의 b.ii.**)에 각각 0., 1, 10 및 100 nM 범위의 인간 알파-트롬빈을 보유하는 것이었다. 15량체-act/29량체-cT 조합은 인간 알파-트롬빈의 검출을 허용하지 않았다. 그러나, 10 nM 및 100 nM의 15량체-cT/29량체-act는 100 nM의 인간 알파-트롬빈을 검출하게 하였다. 0 및 1 nM의 15량체-cT/29량체-act는 인간 알파-트롬빈의 검출을 허용하지 않았다. 100 nM의 인간 알파-트롬빈의 검출을 위한 점수$_{100\ nM}$이 계산되어 도 24의 b.ii에 보고되어 있다. 최고 점수는 10 nM의 15량체-cT/29량체-act로 수득되므로 본 발명자들은 추가 최적화를 위해 이러한 조건을 선택하였다. 15량체-cT/29량체-act 조합과 15량체-act/29량체-cT 조합 둘 다를 시험해야 할 필요성이 설명된다: 올리고뉴클레오티드의 공간적 형태로 인해 이들 조합 중 하나만 작동하는 것이 가능하다. 또한, 앱타머에 링커, cT 또는 활성자를 추가하면 특성을 개질하여 표적 단백질에 대한 결합을 방지하는 것도 가능하다.

[0660] 모든 반응 혼합물을 200 μL PCR 튜브에서 4℃에서 회합하였다. miR완충제 4x를 mQ 물에 희석하여 1x 최종 농도로 하였다. 그런 다음 주형을 첨가하여 앱타머1-cT 및 앱타머2-act의 원하는 농도, aT의 100 nM, pT의 30 nM 및 rT의 50 nM로 하였다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nb.BsmI(300 U/mL), Bst 거대 단편(36 U/mL), ttRecJ(23 nM)]. 인간 알파-트롬빈을 먼저 mQ 물에 10배 희석하고 낮은 결합 팁(Eppendorf)을 사용하여 5% 글리세롤에서 파라필름 상에 연속 희석하였다.

[0661] 표적 단백질을 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 37℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고 At를 최대 형광 신호의 20%로 결정하였다.

[0662] 도 24에 표시된 결과는 miR 완충제 1x로 수득된 것이므로 본 발명자들은 FS 완충제 1x 및 miR완충제 1x에서 10 nM의 15량체-cT/29량체-act를 사용하여 일정 범위의 인간 알파-트롬빈을 실현하기로 결정하였다(**도 25의 c.i.**). 100 nM의 인간 알파-트롬빈의 검출을 위한 점수$_{100\ nM}$이 계산되어 도면에 보고되어 있다. FS 완충제 1x에서 최고 점수를 수득하였기 때문에 본 발명자들은 이 완충제에서 PEA를 계속 수행하기로 결정했다. 주목할만한 점은 LOD가 **도 24의 b.ii**의 결과보다 낮다는 것이다. 이는 Corning의 새로운 저 결합 피펫 팁을 사용하여 본 발명자들이 보다 정확한 단백질 희석을 실현하게 할 수 있기 때문이다. 또한, 1 μM의 인간 알파-트롬빈에 대해 고유한 억제 효과가 나타난다. 트리거의 비특이적 생성을 감소시키기 위해, 본 발명자들은 인간 알파-트롬빈의 검출을 10 nM의 15량체-cT 및 10 nM의 29량체-act 또는 29량체-act-V2와 비교하였다. 29량체-act-V2는 29량체-act보다 하나 적은 염기인 8개의 염기에서 cT와 일치하는 활성자를 갖는다(**도 25의 c.ii.**). 이 누락된 염기는 활성자의 5'에 있으므로 중합효소 연장으로 복구될 수 없다. 점수$_{100\ nM}$이 계산되어 도면에 보고되어 있다. 점수는 15량체-cT/29량체-act 올리고뉴클레오티드 세트에서 더 높다. 또한, 15량체-cT/29량체-act-V2로 10 nM의 인간 알파-트롬빈을 검출하는 것은 15량체-act/29량체-cT로 검출하는 것보다 대략 5배 더 느리다. 15량체-cT/29량체-act-V2의 Kd를 계산하여(표 21 참조), 37℃에서 156 nM의 Kd를 제공하였다. 15량체-cT/29량체-act 올리고뉴클레오티드 세트보다 Kd가 높으면 트리거의 생성이 느려지고 따라서 증폭 시간이 더 길어지는 논리이다.

[0663] 최종적으로, 10 nM의 15량체-cT 및 29량체-act를 함유하는 FS 완충제에서 일정 범위의 인간 알파-트롬빈을 실현하였다. 10 nM의 스크램블된 앱타머로 대조군을 실현하였다. 스크램블된 앱타머는 앱타머의 명칭 앞에 "S"로

표시된다(**도 25의 c.iii.**). 100 nM의 인간 알파-트롬빈의 검출은 스크램블된 버전이 아닌 앱타머에 대해서만 달성되어 검출의 특이성을 보여준다.

표 19

[0664]

명칭	서열	기능
S-29 량체-act	GAGTCGGGAGCGCTAGAGGTGTGGTTCG TTTTTTTTTTTTT TTCAAGTAG (서열 번호 36)	활성자
S-15 량체-cT	CTAACTGAATGCTACTTGAATGTTTTTTTTTTTT GGTGTTGGTTTGGGG (서열 번호 37)	cT
29 량체-act-V2	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGAC TTTTTTTTTTTTT ATCAAGTAG (서열 번호 38)	활성자

[0665] 모든 반응 혼합물은 1x 최종 농도가 되도록 mQ 물에 희석되고 25 μM의 dNTPS, 3 mM의 $MgSO_4$ 및 2 μM의 네트롭신으로 보충된 FS 완충제 5x(NEB)에서 또는 1x 최종 농도가 되도록 mQ 물에 4x 희석된 mir완충제에서 200 μl PCR 튜브에서 4℃에서 회합되었다.

[0666] 그런 다음 주형을 첨가하여 10 nm의 앱타머1-cT, 10 nM의 앱타머2-act, 100 nM 의 aT, 30 nM의 pT 및 50 nM의 rT의 원하는 농도로 하였다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nb.BsmI(300 U/mL), Bst 거대단편(36 U/mL), ttRecJ(23 nM)]. 인간 알파-트롬빈을 먼저 mQ 물에 10배 희석하고 낮은 결합 팁(Eppendorf)을 사용하여 5% 글리세롤에서 파라필름 상에 연속 희석하였다.

[0667] 표적 단백질을 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 37℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고 At를 최대 형광 신호의 20%로 결정하였다.

[0668] 인간 알파-트롬빈의 검출 속도를 가속화하기 위한 시도에서, 본 발명자들은 Nt.BstNBI와 함께 작동하는 활성자/cT의 두 세트를 디자인하였다: 하나는 상보적인 트리거와 Nt.BstNBI 닉-형성 부위 사이에 서열 GAGA를 함유하고 다른 하나는 서열 GATT을 함유한다(실시예 자가-프라이밍된 주형 참조). GAGA 활성자/cT 및 GATT 활성자/cT 세트의 Kd를 계산하여(표 21 참조), 37℃에서 각각 29 및 69 nM의 Kd를 제공하였다. Kd가 낮을수록 2개의 올리고뉴클레오티드의 친화도가 높아지고 트리거의 비특이적 생성 가능성이 높아진다. Nt.BstNBI PEA 디자인은 가역적이지 않다는 점에 유의해야 한다. 따라서 Nb.BmsI 디자인에 비해 비특이적 트리거 생성이 증가된다.

[0669] 이 두 세트를 시험하였다(**도 26의 d.**). GAGA 활성자/cT 세트는 인간 알파-트롬빈이 존재하고 인간 알파-트롬빈이 부재한 GATT 활성자/cT 세트보다 더 빠르다. 1 μM의 인간 알파-트롬빈의 검출을 위한 점수$_{1\ \mu M}$이 계산되어 도면에 보고되어 있다. GAGA 올리고뉴클레오티드 세트에 대해 더 높은 점수를 수득한다. 또한, GAGA 올리고뉴클레오티드 세트는 10 nM의 인간 알파-트롬빈을 검출하게 하고 1 μM에 의해 유도된 억제 효과에 민감하지 않다. GATT 올리고뉴클레오티드 세트는 10 nM의 인간 알파-트롬빈의 검출을 허용하지 않으며, 1 μM에 의해 유도된 억제 효과에 민감하다.

표 20

[0670]

명칭	서열	기능
15 량체-cT-GAGA	CTAACTGAATG GAGA GACTC TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG (서열 번호 39)	cT
29 량체-act-GAGA	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTTTTT GAGTCTCTC (서열 번호 40)	활성자
15 량체-cT-GATT	CTAACTGAATG GATT GACTC TTTTTTTTTTTTGGTTGGTGTGGTTGG (서열 번호 41)	cT
29 량체-act-GATT	AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTTTTTTTTTTTTTT GAGTCAATC (서열 번호 42)	활성자

[0671] 모든 반응 혼합물을 200 μL PCR 튜브에서 4℃에서 회합하였다. FS 완충제 5x(NEB)를 mQ 물에 희석하여 1x 최종 농도로 하고 25 μM의 dNTPS, 3 mM의 $MgSO_4$ 및 2 μM의 네트롭신으로 보충하였다. 그런 다음 주형을 첨가하여 10 nm의 앱타머1-cT, 10 nM의 앱타머2-act, 100 nM 의 aT, 30 nM의 pT 및 50 nM의 rT의 최종 농도가 되었다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nb.BsmI(300 U/mL), Nt.BstNBI(10 U/mL), Bst 거대단편(36 U/mL), ttRecJ(23 nM)]. 인간 알파-트롬빈을 먼저 mQ 물에 10배 희석하고 낮은 결합 팁(Eppendorf)을 사용하여 5% 글리세롤에서 파라필름 상에 연속 희석하였다.

[0672] 표적 단백질을 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 37℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고 At를 최대 형광 신호의 20%로 결정하였다.

표 21

소정의 온도에서 2 개의 상이한 올리고뉴클레오티드에 대한 Kd. 데이터를 Nupack 을 통해 수득하였다. Na+ 농도는 0.08 M, Mg++ 농도는 0.01 M 로 설정하였다. 상이한 올리고뉴클레오티드의 농도를 최대 1 μM 로 설정하였다.

[0673]

올리고뉴클레오티드 n°1	서열	올리고뉴클레오티드 n°2	서열	T (°C)	dG kcal/몰 (Nupack)	Kd (Nupack)
15 량체-cT	CTAACT*GAATGC*TAC TTGAATGTTTTTTTT TTTTGGTTGGTGTGG TTGG (서열 번호 32)	29 량체-act -V2	AGTCCGTGGTAGGGCAG GTTGGGGTGACTTTTTTT TTTTTTATCAAGTAG (서열 번호 43)	37	-9,66	1,56E-07
15 량체-cT	CTAACT*GAATGC*TAC TTGAATGTTTTTTTT TTTTGGTTGGTGTGG TTGG (서열 번호 32)	29 량체-act	AGTCCGTGGTAGGGCAG GTTGGGGTGACTTTTTTT TTTTTTTCAAGTAG (서열 번호 44)	37	-9,91	1,04E-07
15 량체-act	GGTTGGTGTGGTTG GTTTTTTTTTTTTTTC AAGTAG (서열 번호 45)	29 량체-cT	CTAACT*GAATGC*TACTTG AATGTTTTTTTTTTTTAGT CCGTGGTAGGGCAGGTTG GGGTGACT (SEQ ID NO: 33)	37	-9,91	1,04E-07
15 량체-cT-GAGA	CTAACT*GAATG GAGA GACTC* TTTTTTTTTTTTGGTT GGTGTGGTTGG (서열 번호 39)	29 량체-act-GAGA	AGTCCGTGGTAGGGCAG GTTGGGGTGACTTTTTTT TTTTTTTT GAGTCTCTC (서열 번호 40)	37	-12,11	2,93E-09
15 량체-cT-GATT	CTAACT*GAATG GATT GACTC* TTTTTTTTTTTTGGTT GGTGTGGTTGG (서열 번호 41)	29 량체-act-GATT	AGTCCGTGGTAGGGCAG GTTGGGGTGACTTTTTTT TTTTTTT GAGTCAATC(서열 번호 42)	37	-11,58	6,92E-09

[0674] **실시예 14: 자가-프라이밍된 주형**

[0675] cT는 트리거의 비특이적 증폭을 담당하는 주요 구성요소이다. 이 문제를 해결하기 위해, 본 발명자들은 cT가 없는 방법으로 지향하였다. 실제로, 세포 염색의 세척 단계를 활용하여 자가-프라이밍된 주형(sT)을 포함할 수 있다. 이 주형은 각각 5'에서 3' 순서로 3개의 부분으로 구성된다: 트리거에 상보적인 부분, Nt.BstNBI 닉-형성 부위 및 3' 말단이 닉-형성 부위에 혼성화되고 중합효소에 의해 연장되도록 준비되게 하는 스템 루프. 비오틴은 스트렙타비딘을 통해 비오티닐화 항체에 결합하기 위해 sT의 5'에 첨가되어야 한다. 따라서, 표적 단백질의 존재 하에, sT가 존재하는 반면에, 표적 단백질의 부재 하에, sT는 부재한다. 그런 다음, 다양한 PUMA 구성요소를 첨가하여, sT로부터 트리거가 생성하도록 한다. 원리가 **도 27의 a**에 예시되어 있다.

[0676] 본 발명자들은 트리거의 생성에 미치는 닉-형성 인식 부위의 주변 염기의 효과를 조사하였다. 이를 수행하기 위해, 본 발명자들은 sT의 서열(표 1의 서열 n° 1)을 선택하고 서열 n° 1 및 더 많은 개질을 갖는 5개의 서열(표 1에서 서열 n° 49 내지 n° 53)과 비교하여 2개의 염기 개질이 있는 48개의 서열을 주문하였다. 그런 다음 PUMA를 사용하여 1 pM의 sT에 대한 증폭 시간(**도 27의 b**)을 살펴보고 50℃에서 Bc 스위치에 대한 1 nM의 sT에 대한 선형 트리거 생성 속도(**도 27의 c**)를 살펴보았다. 그런 다음 증폭 시간의 역수의 함수로 생성 속도를 플로팅하여 상관 관계가 있는지 알아 보았다(**도 27의 d**). 예상된 바와 같이, 이 2개 매개변수 사이에는 상관관계가 있다: 생성 속도가 높을수록 증폭 시간이 짧아진다. 이것은 sT의 생성 속도가 PUMA에 의한 검출 효율을 평가하기 위한 관련 매개변수임을 확인시켜 준다. 서열에 따른 생성 속도 면에서 매우 강한 격차가 관찰되었다(표 1).

표 22

Bc 스위치에 대한 2 개의 상이한 중합효소에 대한 sT 서열의 함수에서의 sT 생성 속도.

N°	서열	**Vent를 이용한 생성 속도** (분당 sT 당 생성된 트리거의 수)	**Bst 2.0 WS를 이용한 생성 속도**(분당 sT당 생성된 트리거의 수)	기능
1	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 46)	0,68	3,36	sT
2	TGCAGTCCAGAA AAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 47)	0,03	0,0s1	sT
3	TGCAGTCCAGAA ATAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 48)	0,04	0,04	sT
4	TGCAGTCCAGAA AGAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 49)	0,53	2,46	sT
5	TGCAGTCCAGAA ACAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 50)	0,45	1,41	sT
6	TGCAGTCCAGAA TAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 51)	0,06	0,06	sT
7	TGCAGTCCAGAA TTAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 52)	0,04	0,05	sT
8	TGCAGTCCAGAA TGAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 53)	0,63	3,21	sT
9	TGCAGTCCAGAA TCAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 54)	0,31	1,30	sT
10	TGCAGTCCAGAA GTAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 55)	0,42	2,22	sT
11	TGCAGTCCAGAA GGAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 56)	0,57	2,99	sT
12	TGCAGTCCAGAA GCAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 57)	0,60	2,99	sT
13	TGCAGTCCAGAA CAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 58)	0,50	0,96	sT
14	TGCAGTCCAGAA CTAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 59)	0,41	1,52	sT
15	TGCAGTCCAGAA CGAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 60)	0,72	1,38	sT
16	TGCAGTCCAGAA CCAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 61)	0,65	1,45	sT

[0677]

17	TGCAGTCCAGAA GAAA GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 62)	0,72	2,25	sT
18	TGCAGTCCAGAA GAAG GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 63)	0,42	2,23	sT
19	TGCAGTCCAGAA GAAC GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 64)	0,51	3,48	sT
20	TGCAGTCCAGAA GATA GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 65)	0,56	3,26	sT
21	TGCAGTCCAGAA GATT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 66)	0,41	3,01	sT
22	TGCAGTCCAGAA GATG GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 67)	0,60	3,42	sT
23	TGCAGTCCAGAA GATC GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 68)	0,53	3,00	sT
24	TGCAGTCCAGAA GAGA GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 69)	1,04	1,56	sT
25	TGCAGTCCAGAA GAGT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 70)	0,98	3,17	sT
26	TGCAGTCCAGAA GAGG GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 71)	0,68	3,07	sT
27	TGCAGTCCAGAA GAGC GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 72)	0,78	3,09	sT
28	TGCAGTCCAGAA GACA GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 73)	0,80	4,07	sT
29	TGCAGTCCAGAA GACT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 74)	0,57	3,68	sT
30	TGCAGTCCAGAA GACG GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 75)	0,61	3,41	sT
31	TGCAGTCCAGAA GACC GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 76)	0,40	2,44	sT
32	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC AA ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 77)	0,49	2,67	sT
33	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC AT ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 78)	0,46	2,68	sT
34	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC AG ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 79)	0,52	2,79	sT

[0678]

35	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC TA ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 80)	0,49	2,59	sT
36	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC TT ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 81)	0,93	1,82	sT
37	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC TG ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 82)	0,56	2,44	sT
38	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC TC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 83)	1,00	1,42	sT
39	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC GA ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 84)	0,41	2,43	sT
40	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC GT ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 85)	0,31	1,44	sT
41	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC GG ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 86)	0,44	2,68	sT
42	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC GC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 87)	0,49	3,00	sT
43	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC CA ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 88)	0,34	1,99	sT
44	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC CT ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 89)	0,61	2,79	sT
45	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC CG ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 90)	0,51	2,65	sT
46	TGCAGTCCAGAA GAAT GACTC CC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 91)	0,82	1,01	sT
47	TGCAGTCCAGAA GGTT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 92)	0,65	3,19	sT
48	TGCAGTCCAGAA GGAA GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 93)	0,71	2,89	sT
49	**TGCAGTCCAGAA GGGA GACTC TC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT** (서열 번호 94)	0,57	0,70	sT
50	**TGCAGTCCAGAA CGGA GACTC TC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT** (서열 번호 95)	0,25	0,06	sT
51	**TGCAGTCCAGAA GGGA GACTC TT ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT** (서열 번호 96)	0,62	0,87	sT
52	**TGCAGTCCAGAA GCGA GACTC TC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT** (서열 번호 97)	0,51	0,12	sT
53	**TGCAGTCCAGAA GGGA GACTC TG ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT** (서열 번호 98)	0,94	1,77	sT

[0679]

[0680] **생성 속도:**

[0681] 모든 반응 혼합물을 200 μl PCR 튜브에서 4℃에서 회합하였다. miR완충제 4x를 mQ 물에 희석하여 1x 최종 농도로 하였다. 그런 다음 50 nM의 rT(MBBcBsmIAtto633)를 첨가하였다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nt.BstNBI(10 U/mL) 및 Vent(엑소-)(80 U/mL)]. 낮은 결합 DNA 팁(Eppendorf)을 사용하여 1X Tris-EDTA 완충제(Sigma Aldrich)에 파라필름 상에 표적 sT를 연속적으로 희석하였다. sT를 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하여 1 nM의 최종 농도로 하였고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 50℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고, 도출하고, 생성 속도를 추출하였다.

표 23

mir 완충제 4x 조성물

구성요소	최종 농도
Tris HCl pH8.9	20mM
(NH4)2SO4	10mM
KCl	160mM
NaCl	40mM
MgSO4	40mM
dNTP	100μM
Synperonic	0.4%-
네트롭신	8μM

[0682]

[0683] **증폭 시간:**

[0684] 모든 반응 혼합물을 200 μl PCR 튜브에서 4℃에서 회합하였다. miR완충제 4x를 mQ 물에 희석하여 1x 최종 농도로 하였다. 그런 다음 주형을 첨가하여 50 nM의 CBc12-2PS4, 10 nM의 pTBc12T5SP 및 50 nM의 MBBcBsmIAtto633의 최종 농도로 하였다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nb.BsmI(300 U/mL), Nt.BstNBI(10 U/mL), Vent(엑소-)(80 U/mL), ttRecJ(23 nM)]. 낮은 결합 DNA 팁(Eppendorf)을 사용하여 1X Tris-EDTA 완충제(Sigma Aldrich)에 파라필름 상에 표적 sT를 연속적으로 희석하여 sT의 1 pM의 최종 농도로 하였다. sT를 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 50℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고 At를 최대 형광 신호의 20%로 결정하였다.

표 24

명칭	서열	기능
NBItoBc-2+2_GAAT_AC S1	T*GCAGTCCAGAAGAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (제 1 염기 상에 PTO 개질을 갖는 서열 번호 99)	sT
NBItoBc-2+2_GAAT_AC S2	T*G*CAGTCCAGAAGAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (2 개의 제 1 염기 상에 PTO 개질을 갖는 서열 번호 99)	sT
NBItoBc-2+2_GAAT_AC S3	T*G*C*AGTCCAGAAGAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (3 개의 제 1 염기 상에 PTO 개질을 갖는 서열 번호 99)	sT
NBItoBc-2+2_GAAT_AC S4	T*G*C*A*GTCCAGAAGAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (4 개의 제 1 염기 상에 PTO 개질을 갖는 서열 번호 99)	sT
NBItoBc-2+2_GAAT_AC S5	T*G*C*A*G*TCCAGAAGAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (5 개의 제 1 염기 상에 PTO 개질을 갖는 서열 번호 99)	sT
NBItoBc-2+2_GAAT_AC S6	T*G*C*A*G*T*CCAGAAGAAT GACTC AC ATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (6 개의 제 1 염기 상에 PTO 개질을 갖는 서열 번호 99)	sT

‘’’’는 염기에 대한 포스포티오에이트(PTO) 개질을 나타낸다*

[0685]

[0686] 그런 다음, 본 발명자들은 생성된 트리거와 자가-프라이밍된 주형 사이의 용융 온도를 낮춤으로써 트리거 생성을 가속화하기 위해 sT의 5' 말단에 포스포로티오에이트를 추가할 가능성을 살펴보았다(문헌[Jaroszewski, 1996]). 이를 위해 동일한 자가-프라이밍된 주형에 1 내지 6개의 포스포로티오에이트를 추가하여 생성 속도 실험을 수행하였다(**도 28의 e.i.**). 결과는 **도 28의 e.ii**에 도시되어 있다.

[0687] 본 발명자들은 포스포로티오에이트의 존재가 생성 속도를 더 증가시키지 않는다는 것을 알게 되었다. 이는 sT로부터 트리거의 방출이 출력의 탈혼성화 속도에 의해 제한되지 않음을 시사한다.

[0688] 상기 설명된 바와 같이 생성 속도를 수득하였다.

표 25

[0689]

명칭	서열	기능
NBItoBc-2+2 Sp18-T5-Biot	TTTTT/intsp18/ TGCAGTCCAGAA GTTT GACTCACATTGCTTCATTTTGAAGCAATGT GAGT (TTTTT/intsp18/서열 번호 100)	sT
NBItoBc-2+2 int-Biot-dT	TGCAGTCCAGAA GTTT GACTCACATTGCTTCATTT/biot/TTTGAAGCAATGT GAGT (서열 번호 101/biot/서열 번호 102)	sT

[0690] 본 발명자들은 비오틴-스트렙타비딘 연결을 통해 이 sT를 검출 항체에 이식하기를 원했다. 따라서, 본 발명자들은 sT에 비오틴을 추가해야 했다. 이 비오틴에 대한 2개 위치를 시험하였다: T5-Sp18 링커(TTTTT-sp18 링커)(**도 29의 f.i.**)가 있는 5' 말단에서 및 아미노-dT 빌딩 블록을 통해 루프의 내부 위치에서(**도 29의 f.ii.**). 0.25 스트렙타비딘 등가물의 존재 또는 부재 하에 이들 2개의 상이한 올리고뉴클레오티드의 범위를 수행하였다. **도 29의 g**에서 볼 수 있는 바와 같이, 스트렙타비딘 없이는 두 가지 가능성 사이에 유의한 차이가 없다. 그러나, 스트렙타비딘의 존재 하에, 5' 말단에 비오틴이 있는 올리고뉴클레오티드가 내부 위치에 비오틴이 있는 올리고뉴클레오티드보다 훨씬 더 잘 검출된다(**도 29의 h**). 발명자들에 의해 이미 밝혀진 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 상의 비오틴-스트렙타비딘 기의 존재는 중합효소를 방해할 수 있다(문헌[Gines, 2017]). sT의 5' 말단에 있는 T5-Sp18 링커는 입체 장애를 유도하지 않는 것으로 보인다.

[0691] 증폭 시간은 실시예 d에 대해 설명된 바와 같이 수득된다. 스트렙타비딘에 접합된 sT-Biot의 경우, 40 nM의 sT-Biot : Streptavidin(1 : 0.25)의 용액을 제조하고 낮은 결합 DNA 팁(Eppendorf)을 사용하여 1X Tris-EDTA 완충제(Sigma Aldrich)에서 파라필름 상에 연속 희석하였다.

[0692] 더 빠른 검출을 얻기 위한 시도로, 이후 본 발명자들은 또 다른 중합효소: Bst 2.0 WS의 사용을 검토하였다. 본 발명자들은 표 1에 제시된 모든 서열에 대해 0.5% Bst 2.0 WS의 존재뿐만 아니라 4% Vent(엑소-)의 존재 하에서 생성 속도 실험을 수행하였다. **도 30의 i.**에서 볼 수 있는 바와 같이, 대부분의 시험된 서열에 대해, 생성 속도는 Bst 2.0 WS의 존재 하에서 더 높다. 이는 sT의 검출에 대해 고무적이다. 주목할 만하게도, Bst 2.0 WS로 얻은 생성 속도는 두 경우 모두 매우 느린 몇 개의 서열을 제외하고 Vent(엑소-)로 수득된 생성 속도와 강한 상관관계가 없다는 것이다. 이는 자가-프라이밍된 주형의 서열이 생성 속도에 미치는 영향이 대부분 중합효소 때문임을 시사한다.

[0693] 50℃에서 Bc 스위치에 대한 sT 서열 최적화에 대해 수득된 결과를 기반으로, 본 발명자들은 37℃에서 작동하는 B11a 스위치로 전이들을 전환할 가능성을 조사하였다. 따라서, 본 발명자들은 상이한 sT에 대해 50℃에서 Vent로 수득된 Bc 트리거의 생성 속도의 함수에서 37℃에서 Bst LF로 수득된 B11a 트리거의 트리거 생성 속도를 살펴보았다. sT의 Nt.BstNBI 닉-형성 부위를 둘러싸는 염기에 대해 5개의 상이한 서열을 시험하였다. 이 서열은 표 3에 제공되어 있다. **도 30의 j.**에서 볼 수 있는 바와 같이, 결과는 2개의 생성 속도 사이에서 상당히 유사하다: B11a 트리거에 대한 더 높은 생성 속도를 갖는 Nt.BstNBI 닉-형성 부위를 둘러싸는 서열은 또한 Bc 트리거로 더 높은 생성 속도가 주어진 서열이다.

표 26

B11a 스위치에 대한 sT 서열의 함수에서의 sT 생성 속도.

명칭	서열	생성 속도(분당 sT당 생성된 트리거의 수)	기능
NBItoB11a-2+2_GAGT_AC	TGCTAACTGAA GAGT GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 103)	0,80	sT
NBItoB11a-2+2_GAGA_AC	TGCTAACTGAA GAGA GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 104)	1,45	sT
NBItoB11a-2+2_GAGC_AC	TGCTAACTGAA GAGC GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 105)	0,83	sT
NBItoB11a-2+2_GATT_AC	TGCTAACTGAA GATT GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 106)	0,66	sT
NBItoB11a-2+2_TCAT_AC	TGCTAACTGAA TCAT GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (서열 번호 107)	0,34	sT

[0694]

[0695] Bst 2.0 WS를 사용하여 50℃에서 Bc 스위치에 대한 생성 속도를 상기에서 설명된 바와 같이 수득하였다. Vent (엑소-)(80 U/mL)를 Bst 2.0 WS(40 U/mL)로 대체하였다.

[0696] 37℃에서 B11a 스위치에 대한 생성 속도는 하기와 같이 수득하였다.

[0697] 모든 반응 혼합물을 200 μl PCR 튜브에서 4℃에서 회합하였다. FS 완충제 5x(NEB)를 mQ 물에 희석하여 1x 최종 농도로 하고 25 μM의 dNTPS 및 3 mM의 MgSO4로 보충하였다. 그런 다음 50 nM의 rT(MBB11aBsmIAtto633)를 첨가하였다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nt.BstNBI(10 U/mL) 및 Bst 거대 단편(36 U/mL)]. 낮은 결합 DNA 팁(Eppendorf)을 사용하여 1X Tris-EDTA 완충제(Sigma Aldrich)에 파라필름 상에 표적 sT를 연속적으로 희석하였다. sT를 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하여 1 nM의 최종 농도로 하였고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 37℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고, 도출하고, 생성 속도를 추출하였다.

표 27

명칭	서열	기능
NBItoB11a-2+2 Sp18-T5-Biot GTTT	TTTTT\intsp18\TGCTAACTGAA GTTT GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAATGTGAGT (TTTTT\intsp18\서열 번호 108)	sT
NBItoB11a-2+2 Sp18-T5-Biot GAGA	TTTTT\intsp18\TGCTAACTGAA GAGA GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (TTTTT\intsp18\서열 번호 109)	sT

[0698]

[0699] 37℃에서 Bst LF로 B11a 트리거를 생성하기 위한 Nt.BstNBI 닉-형성 부위와 트리거 상보적 부위 사이 염기의 서열 최적화에 대해 수득된 결과에 따라, 본 발명자들은 이러한 최적화된 자가-프라이밍된 주형을 사용하기로 결정하였다. B11a 스위치 자가-프라이밍된 주형의 2개의 디자인을 0.25 당량의 스트렙타비딘의 존재 하에 시험하였다(**도 31의 k.**): 5' 말단에 Sp18-T5 링커와 비오틴이 있는 GTTT 및 GAGA 디자인. 더 빠른 디자인은 GAGA이며, 검출 속도에 대한 sT 서열의 중요성을 강조한다. 이 결과는 NBItoB11a-2+2 Sp18-T5-Biot GAGA 올리고뉴클레오티드가 세포 표현형 분석에 사용될 수 있음을 시사한다.

[0700] **증폭 시간:**

[0701] 모든 반응 혼합물을 200 μl PCR 튜브에서 4℃에서 회합하였다. FS 완충제 5x(NEB)를 mQ 물에 희석하여 1x 최종 농도로 하고 25 μM의 dNTPS, 3 mM의 $MgSO_4$ 및 2 μM의 네트롭신으로 보충하였다. 그런 다음 주형을 첨가하여 50 nM의 CB11a-2PS3, 10 nM의 pTB11aPS3 및 50 nM의 MBB11aBsmIAtto633의 최종 농도로 하였다. 균질화 후, BSA(200 mg/mL) 및 효소를 첨가하였다[Nb.BsmI(300 U/mL), Nt.BstNBI(10 U/mL), Bst 거대 단편(36 U/mL), ttRecJ(23 nM)]. 낮은 결합 DNA 팁(Eppendorf)을 사용하여 1X Tris-EDTA 완충제(Sigma Aldrich)에 파라필름

상에 표적 sT를 연속적으로 희석하였다. sT를 먼저 열순환기 튜브(Bio-rad)에 첨가하고 완충제, 주형 및 효소를 함유하는 혼합물을 첨가하여, 최종 부피 10 μL로 하였다. 샘플을 열순환기(CFX96 Touch, Bio-Rad)에서 37℃로 인큐베이션하고 형광을 실시간으로 기록하였다. 시간 추적을 정규화하고 At를 최대 형광 신호의 20%로 결정하였다.

[0702] **실시예 15: 표현형 분석을 위한 항체 접합된 자가-프라이밍된 주형**

표 28

[0703]

명칭	서열	기능
NBItoB11a-2+2 Sp18-T5-Biot GAGA	비오틴 TTTTT Sp18 TGCTAACTGAA GAGA GACTC ACATTGCTTCATTTTGAAGCAAT (비오틴 TTTTT Sp18 서열 번호 110)	sT
TSB_full_toB11a-2+2	TGCTAACTGAA GAGA GACTC ACTTGCTAGGACCGGCCTTAAAGC (서열 번호 111)	cT

[0704] 항체에 접합될 주형의 두 가지 새로운 디자인을 도입하여 TotalseqB 전환자 주형 TSBtoB11a-2+2P를 시스템으로부터 제거하였다:

[0705] NBItoB11a-2+2 Sp18-T5-Biot GAGA는 전환자 주형의 필요없이 DNA 중합효소의 존재 하에 DNA 툴박스 트리거 B11a를 생성하는 비오티닐화 헤어핀 주형이다(**도 33**). sp18의 존재는 헤어핀 루프가 더 연장되는 것을 방지하면서 약간의 유연성을 제공하여 B11a 서열을 생성하게 된다. 비오티닐화 주형은 상온에서 밤새 인큐베이션하여 streptavidin 태그된 항체에 접합될 수 있다. 이 디자인은 항체에 대한 TotalseqB 태그의 요구 사항을 제거한다.

[0706] TSB_full_toB11a-2+2는 totalseqB 태그에 상보적인 전환자 주형이며 실온에서 밤새 인큐베이션하여 항체에 혼성화될 수 있다(**도 32**). 항체 접합된 전환자 주형은 추가적인 전환자 주형의 필요 없이 B11a를 생성한다.

[0707] 주형을 "자가-프라이밍된 주형"이라고 한다. 이들 2개 디자인은 이전에 설명된 바와 같이 소적 반응뿐만 아니라 대량의 표현형 세포에 대해 성공적으로 시험되었다.

[0708] **도 34**는 TSB_full_toB11a-2+2 및 DNA 툴박스에 혼성화된 항-CD3 totalseqB 항체를 사용한 단일 세포 식별을 도시한다. CD3 자가-프라이밍된 주형 표지된 세포를 함유하는 95% 초과의 액적이 20 내지 50분 내에 Cy5 형광 임계값을 넘었으며; 반면 표지되지 않은 세포를 함유하는 대부분의 액적은 200분 후에 임계값을 넘는다.

[0709] **도 35**는 NBItoB11a-2+2Sp18T5Biot GAGA와 접합된 스트렙타비딘 태그된 항-CD3 항체를 사용한 주르캇 세포의 표현형 분석을 도시한다. 표지된 세포는 24분 안에 DNA 툴박스를 촉발하는 반면에 표지되지 않은 세포는 반응을 촉발하지 않는다.

[0710] **실시예 16: 이기종 집단에서 DNA 툴박스 매개 표현형 분석 특이적인 세포 유형**

[0711] 본 발명자들은 주르캇 및 마우스(P388D1) 세포(각각 $1x10^6$개 세포)를 혼합하여 이기종 세포 풀을 생성하였다. Anti-CD3-자가-프라이밍된 주형 항체(이전에 설명된 바와 같이)를 이기종 풀에서 주르캇 세포의 표현형 분석에 사용하였다. 마우스 세포를 CalceinAM으로 염색하여 영상화하는 동안 주르캇 세포와 마우스 세포를 구별할 수 있게 한다. 4℃에서 30분 동안 인큐베이션하여 항-CD3-자가-프라이밍된 주형 항체로 세포의 이기종 풀을 표지한 후, 200 g에서 5분 동안 원심분리하여 1X TBS로 세포를 3회 세척하여 결합되지 않은 항체를 제거하였다. 그런 다음 세포를 DNA 툴박스 마스터 믹스를 함유하는 80 pL 액적에 캡슐화하였다. 소적 에멀젼을 이전에 설명된 바와 같이 2D 시간 경과 이미징으로 분석하였다. Anti-CD3-자가-프라이밍된 주형 항체는 이기종 풀에서 주르캇 세포를 발현하는 CD3을 선택적으로 표지하였다. 따라서, 주르캇 세포를 함유하는 액적만 DNA 툴박스를 촉발하고 20분 안에 Cy5 형광을 생성할 수 있었다. 세포가 없는 액적은 검정의 특이성을 나타내는 어떠한 Cy5 형광도 생성하지 않았다. 따라서, DNA 툴박스는 이기종 집단에서 특이적인 세포 유형을 선택적으로 표현형 분석하는 데 효율적이다.

[0712] **도 36**에 도시된 바와 같이, 시점 0(T=0분)에서, 모든 액적은 Cy5 형광이 0이었다(즉, 소적에 배경이 없음). 20분 반응 후(T = 20분) 주르캇 세포를 함유하는 액적은 DNA 툴박스 매개 형광(즉, 소적에서 배경색)을 생성하는

반면 마우스 세포를 함유하는 액적은 DNA 툴박스를 활성화하지 않고 외관이 변경되지 않은 상태로 유지되었다.

[0713] **선택적 표현형 분석 및 유전형 분석**

[0714] **개념:**

[0715] 이기종 집단으로부터 세포를 선택적으로 표현형 분석하는 최종 목표는 서열분석이다. 이를 통해 관심 대상의 하위 집단의 게놈 또는 전사체 정보를 수득하도록 할 것이다. 단일 세포 선택적 표현형 분석 및 유전형 분석은 세포의 소적 캡슐화, 바코딩된 하이드로겔 비드 및 DNA 툴박스 마스터 믹스에 의해 달성될 것이다. 하나의 소적은 하나의 세포, 하나의 바코딩된 하이드로겔 비드 및 DNA 툴박스 주형, 완충제 및 효소를 함유하는 마스터 믹스를 함유할 것이다. DNA 툴박스를 촉발할 단일/다중 올리고 접합된 항체 또는 앱타머 또는 콜레스테롤 접합된 올리고를 사용하여 세포 표면 마커, 분비 분자, 세포 소기관 등을 표적으로 하여 세포를 표현형 분석할 것이다. DNA 툴박스(B11a)의 출력은 형광 판독값을 위해 리포터 형광 프로브와 함께 사용하거나 바코딩된 프라이머가 있는 하이드로겔 비드와 함께 사용하여 특이적인 유전자 또는 총 mRNA를 캡처할 수 있다. 선택적 프라이머 방출을 위해, DNA 툴박스(B11a)의 출력은 전환자 템플릿에 의해 "seqshave"라 불리는 서열로 전환된다. 바코딩된 프라이머 상의 영역에 대한 seqshave의 상보적 혼성화는 BclI 제한 부위를 생성하는 중합효소 매개 가닥 연장으로 이어지고 이후 마스터 믹스에 존재하는 BclI 제한 효소로 인해 프라이머가 방출하게 된다. 형광 판독값과 마찬가지로, 바코딩된 프라이머 방출은 표현형 분석된 세포를 함유하는 액적에서 발생할 것이다. 캡처된 유전자는 선형으로 증폭되거나 mRNA가 액적에서 cDNA로 전환될 것이다. 선택적 프라이머 방출로 인해, 표현형 분석된 세포의 바코딩된 DNA는 용액에 있는 반면 표현형 분석되지 않은 세포로부터의 DNA는 비드 상에 혼성화된 상태로 유지할 것이다. 에멀젼 브레이크(emulsion break) 후 원심분리는 표현형 분석되지 않은 세포로부터 표현형 분석된 세포의 유전 정보를 분리할 것이다. 바코딩된 DNA는 서열분석 라이브러리로 전환되고 서열분석될 것이다.

[0716] 하이드로겔 비드는 BclI 제한 부위, DNA 툴박스 출력 혼성화 부위, 바코드, 고유 분자 지수, 프라이머가 뒤따르는 아크리다이트화된(acrydited) 무작위 서열을 함유하는 10 pL 아크릴아미드 비드이다. 분할 및 풀 방식으로 바코딩을 수행한다(문헌[Grosselin, K. *et al, 2019*]). 따라서 각 비드는 이와 함께 캡슐화된 세포의 정보를 제공하는 특이적인 바코드를 가지며 UMI는 PCR 복제물을 제거하는 데 도움이 된다.

[0717] **실시예 17: 하이드로겔 비드로부터의 표현형 분석된 세포 매개 선택적 프라이머 방출**

[0718] 바코딩된 프라이머의 DNA 툴박스 매개 방출을 관찰하기 위해, 본 발명자들은 하이드로겔 비드 상에 Cy5 형광단(3' 말단에서)으로 표지된 200 μM 합성 프라이머를 결찰하였다. 상이한 농도의 합성 seqshave, Cy5 표지된 프라이머가 있는 20000개의 비드 및 하기와 같은 마스터 믹스를 함유하는 20 μl 벌크 반응을 수행하였다:

표 29

[0719]

구성요소	부피(μl)
5X FS 완충제	4
바코딩된 비드	1
합성 Seqshave	2
BclI HF	1
BstLF	1
1mM dNTP	2
120mM MgSO4	1
물	8
총계	20

[0720] 반응 혼합물을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하고 유세포 분석기를 사용하여 비드의 형광 중앙값을 평가하였다. 시점 0과 시점 2시간에서 비드의 형광 중앙값의 차이를 이용하여 일정 범위의 합성 seqshave 농도로 처리했을 때 방출된 프라이머의 백분율을 계산하고 플로팅하였다. 40 pmol 합성 seqshave는 대략 90% 프라이머 방출로 이어지며 이는 농도 증가에 따라 유의하게 변하지 않는다(**도 37**). 이는 본 발명자들에게 초기 개념 실증을 제공하였다.

[0721] seqshave 전환자 주형(B11a-3toseqshave-6TTS4)을 사용하여, DNA 툴박스 매개 프라이머 방출의 가능성을 유세포 분석기 판독값을 사용하여 평가하였다. 본 발명자들은 벌크 반응에서 seqshave 전환자 주형(B11a-

3toseqshave-6TTS4)의 디자인을 최적화했으며 바코딩된 프라이머의 방출이 전환자 주형의 농도에 정비례함을 알게 되었다(**도 38**).

[0722] **실시예 18: 소적에서 표현형 분석된 세포 매개 프라이머 방출**

[0723] CD3-자가-프라이밍된 주형 항체(TSB 표지된 항체 혼성화된 TSB_full_toB11a-2+2로 구성됨)로 표지된 주르캇 세포는 하나의 소적이 최대 하나의 세포와 하나의 하이드로겔을 함유하도록 Cy5 프라이머 결찰된 하이드로겔 비드 및 마스터 믹스로 100 pL 소적에 캡슐화되었다. 소적 에멀젼을 2D 챔버에 충전하고 이전에 설명된 바와 같이 3시간 동안 5분마다 시간 경과 이미징으로 평가하였다. 형광 하이드로겔 비드가 없는 소적 공간의 평균 형광 강도를 ImageJ를 사용하여 평가하였다. 비드 및 항체 표지된 세포를 함유하는 소적 및 비드만을 함유하는 소적의 평균 형광 강도를 시간에 따라 플로팅하였다. 비드 및 표지된 세포를 함유하는 액적에서 Cy5 형광의 강도는 시간이 지남에 따라 증가한 반면 비드만 함유하는 액적에서는 Cy5 형광의 변화가 없었다(**도 39 내지 41**). 이것은 하이드로겔 비드로부터 프라이머의 표현형 분석된 세포 매개 방출을 증명한다.

[0724] 마스터 믹스:

표 30

[0725]

구성요소	부피(μl)
5x FS 완충제(Invitrogen)	20
120mM MgSO4 (NEB B1003S)	2.5 (3mM)
1mM dNTP	3 (각각 30 μM)
200 μM 네트롭신	1 (2μM)
10μM CB11a-2noPS3	1 (100nM)
B11a-3toseqshave-6TTS4	5 (500nM)
1μM pTB11aA3	1.2 (12nM)
BSA (NEB B9000S)	1
NbBsmI (NEB R0706S)	2.5
Nt.BstNBI (NEB 0607S)	1
Bst LF (M0275S)	1
Superscript III(Invitrogen)	2
SuperaseIn	1
BclIHF	4
카르복시메틸셀룰로오스(20 mg/ml)	20
물	30
총계	100

표 31

[0726]

명칭	서열	기능
TSB_full_toB11a-2+2	TGCTAACTGAA GAGA GACTC ACTTGCTAGGACCGGCCTTAAAGC (서열 번호 112)	cT
B11a-3toseqshave-6TTS4	G*T*G*G*TCTGAGTTTGACTCTAACTG (서열 번호 113, PTO 개질을 나타내지 않음)	cT (B11a 존재 하에 seqshave 를 생성함)

""는 염기에 대한 포스포티오에이트(PTO) 개질을 나타낸다*

[0727] **서지사항:**

[0728] K. Grosselin, A. Durand, J. Marsolier, A. Poitou, E. Marangoni, F. Nemati, ... & A. Gérard. High-throughput single-cell ChIP-seq identifies heterogeneity of chromatin states in breast cancer. *Nature genetics*, *51*(6), 1060-1066, 2019

[0729] G. Gines, A. S. Zadorin, J.-C. Galas, T. Fujii, A. Estevez-Torres, and Y. Rondelez. Microscopic agents programmed by DNA circuits. *Nature Nanotechnology*, 12(4):351— 359, May 2017.

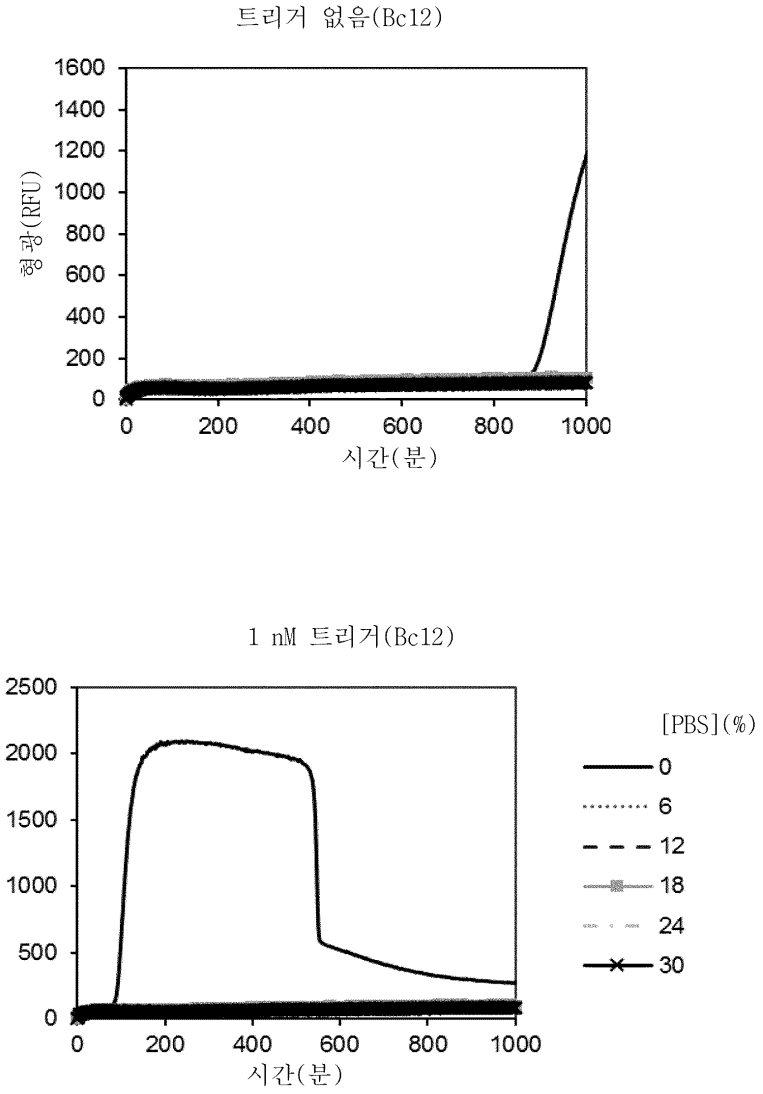
[0730] Bin Deng, Yanwen Lin, Chuan Wang, Feng Li, Zhixin Wang, Hongquan Zhang, Xing- Fang Li, and X. Chris Le. Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example—A review. *Analytica Chimica Acta*, 837:1

－15, July 2014.

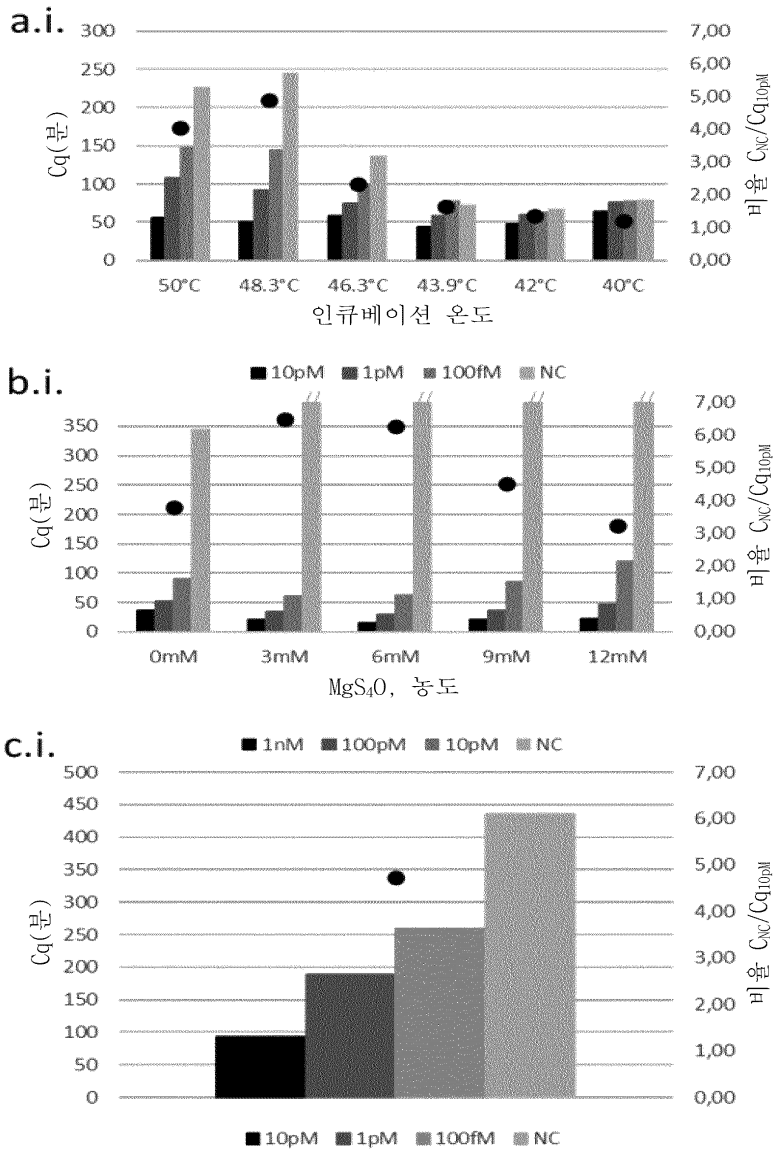
[0731] J. W. Jaroszewski, V. Clausen, J. S. Cohen, and O. Dahl. NMR investigations of duplex stability of phosphorothioate and phosphorodithioate DNA analogues modified in both strands. *Nucleic Acids Research*, 24(5):829－834, March 1996.

도면

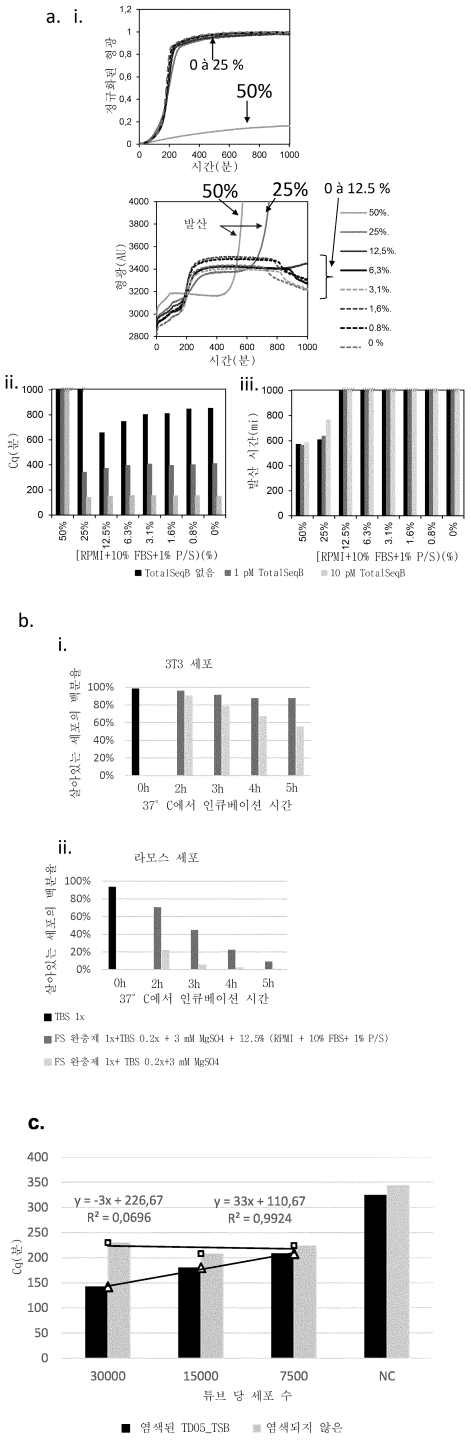
도면1



도면2

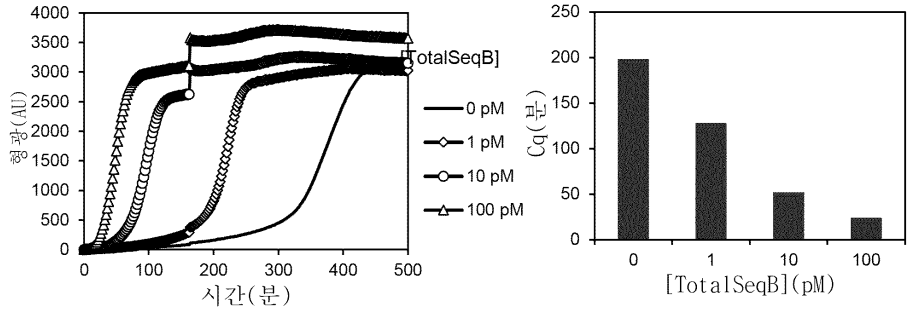

a.i.
300
250
200
150
100
50
0
Cq(분)
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
비율 CNC/Cq10pM
50°C
48.3°C
46.3°C
43.9°C
42°C
40°C
인큐베이션 온도
b.i.
10pM
1pM
100fM
NC
350
300
250
200
150
100
50
0
Cq(분)
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
비율 CNC/Cq10pM
0mM
3mM
6mM
9mM
12mM
MgS4O, 농도
c.i.
1nM
100pM
10pM
NC
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Cq(분)
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
비율 CNC/Cq10pM
10pM
1pM
100fM
NC

도면3

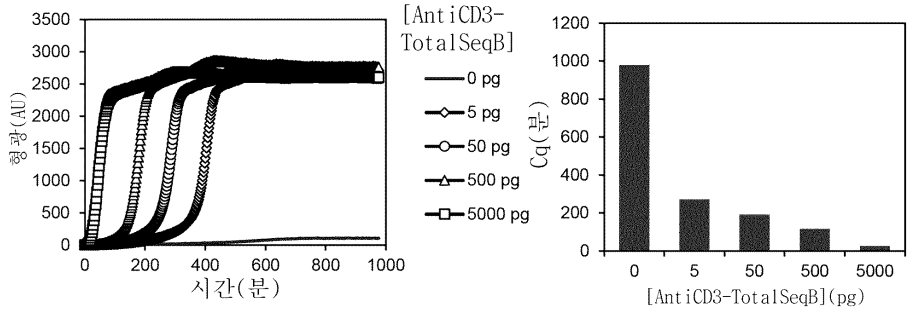

a. i.
정규화된 형광
0 à 25 %
50%
시간(분)
50%
25%
0 à 12.5 %
발산
형광(AU)
50%.
25%.
12.5%.
6.3%.
3.1%.
1.6%.
0.8%.
0 %
시간(분)
ii.
Cq(분)
[RPMI+10% FBS+1% P/S)(%)
iii.
발산 시간(mi)
[RPMI+10% FBS+1% P/S)(%)
TotalSeqB 없음
1 pM TotalSeqB
10 pM TotalSeqB
b.
i.
3T3 세포
살아있는 세포의 백분율
37° C에서 인큐베이션 시간
ii.
라보스 세포
살아있는 세포의 백분율
37° C에서 인큐베이션 시간
TBS 1x
FS 완충제 1x+TBS 0.2x + 3 mM MgSO4 + 12.5% (RPMI + 10% FBS+ 1% P/S)
FS 완충제 1x+ TBS 0.2x+3 mM MgSO4
c.
y = -3x + 226,67
R² = 0,0696
y = 33x + 110,67
R² = 0,9924
Cq(분)
30000
15000
7500
NC
튜브 당 세포 수
염색된 TD05_TSB
염색되지 않은

도면4

a.

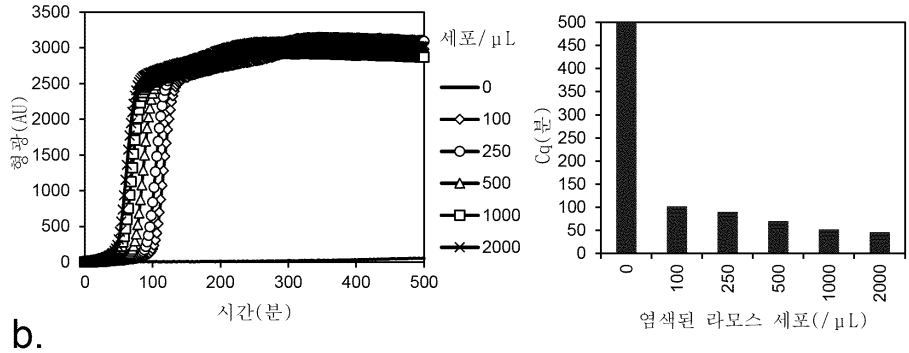

형광(AU)
시간(분)
[TotalSeqB]
0 pM
1 pM
10 pM
100 pM
Cq(균)
[TotalSeqB](pM)

b.

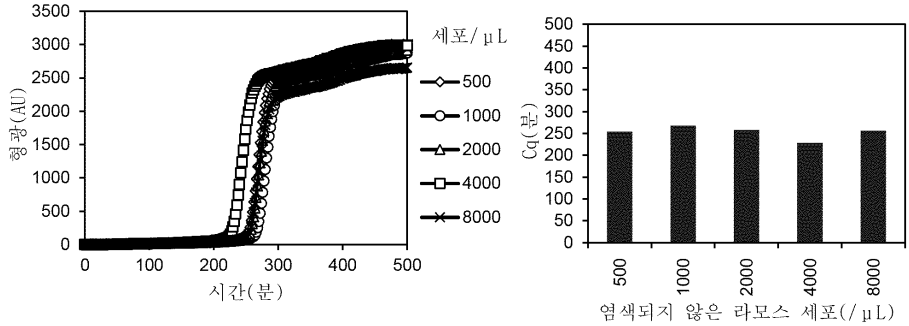

형광(AU)
시간(분)
[AntiCD3-TotalSeqB]
0 pg
5 pg
50 pg
500 pg
5000 pg
Cq(균)
[AntiCD3-TotalSeqB](pg)

도면5

a.

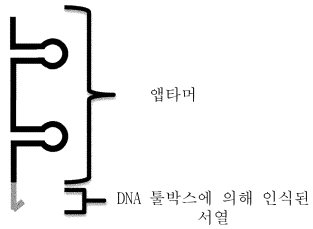

형광(AU)
시간(분)
세포/μL
0
100
250
500
1000
2000
Cq(균)
염색된 라모스 세포(/μL)

b.

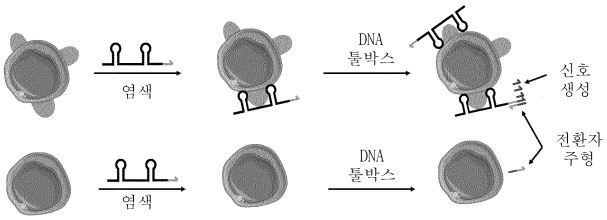

형광(AU)
시간(분)
세포/μL
500
1000
2000
4000
8000
Cq(균)
염색되지 않은 라모스 세포(/μL)

도면6

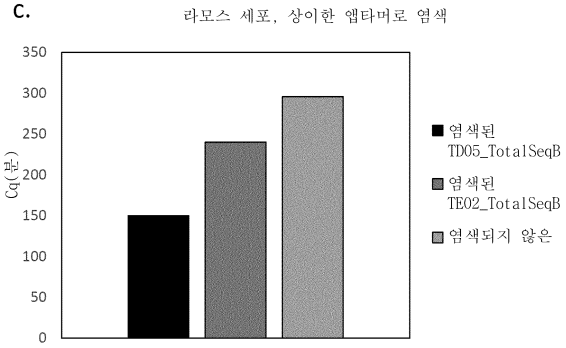
a.


앱타머
DNA 툴박스에 의해 인식된 서열

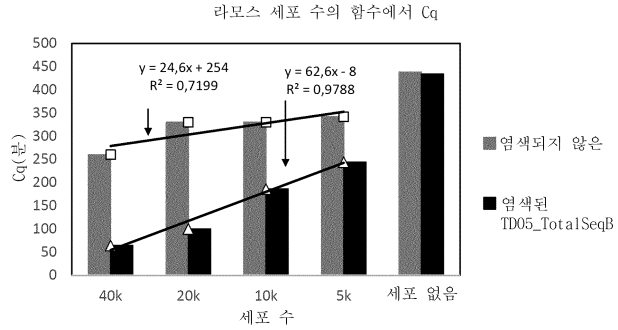
b.


염색
DNA 툴박스
신호 생성
염색
DNA 툴박스
전환자 주형

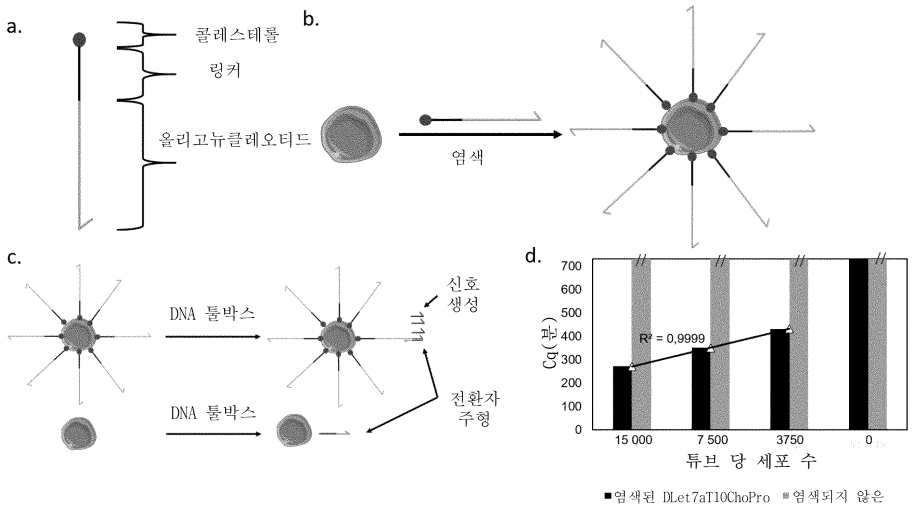
c.


라모스 세포, 상이한 앱타머로 염색
Cq(분)
350
300
250
200
150
100
50
0
염색된 TD05_TotalSeqB
염색된 TE02_TotalSeqB
염색되지 않은

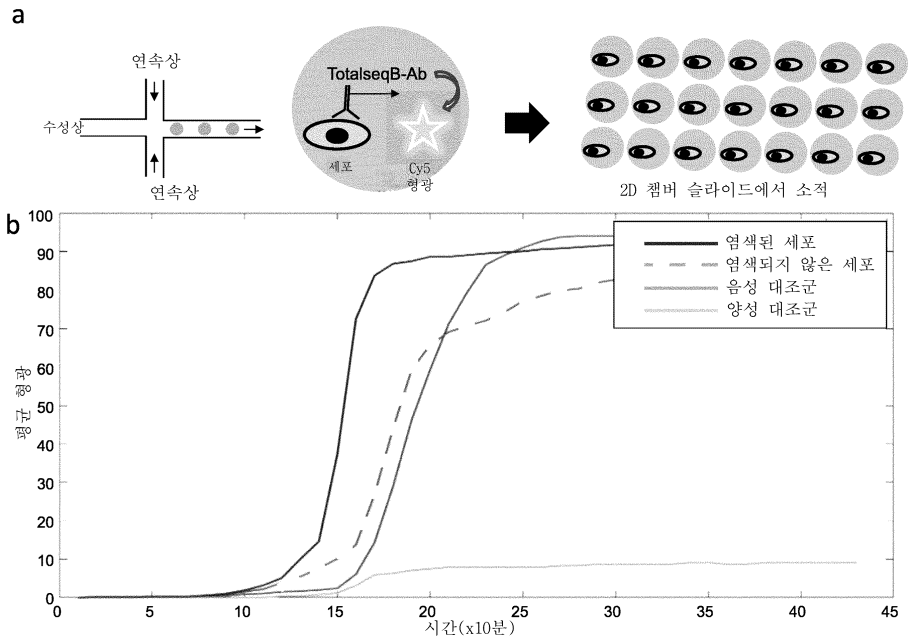
d.


라모스 세포 수의 함수에서 Cq
y = 24,6x + 254
R² = 0,7199
y = 62,6x - 8
R² = 0,9788
Cq(분)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
40k
20k
10k
5k
세포 없음
세포 수
염색되지 않은
염색된 TD05_TotalSeqB

도면7

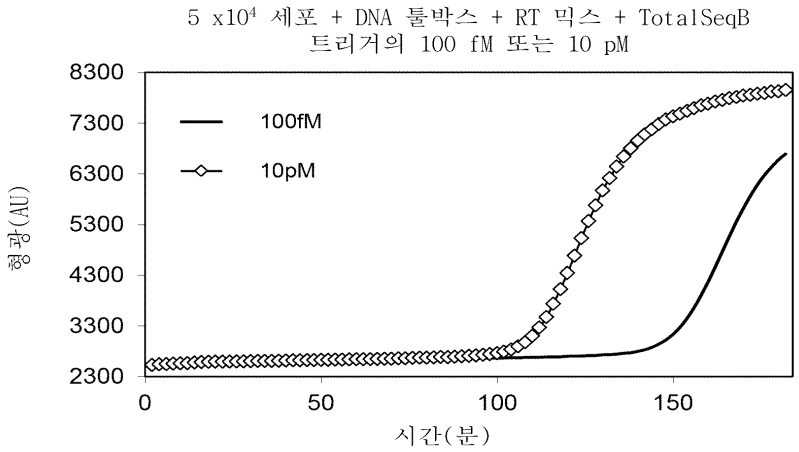

a.
콜레스테롤
링커
올리고뉴클레오티드
b.
염색
c.
DNA 툴박스
신호 생성
DNA 툴박스
전환자 주형
d.
Cq(분)
R² = 0,9999
15 000
7 500
3750
0
튜브 당 세포 수
염색된 DLet7aT10ChoPro
염색되지 않은

도면8

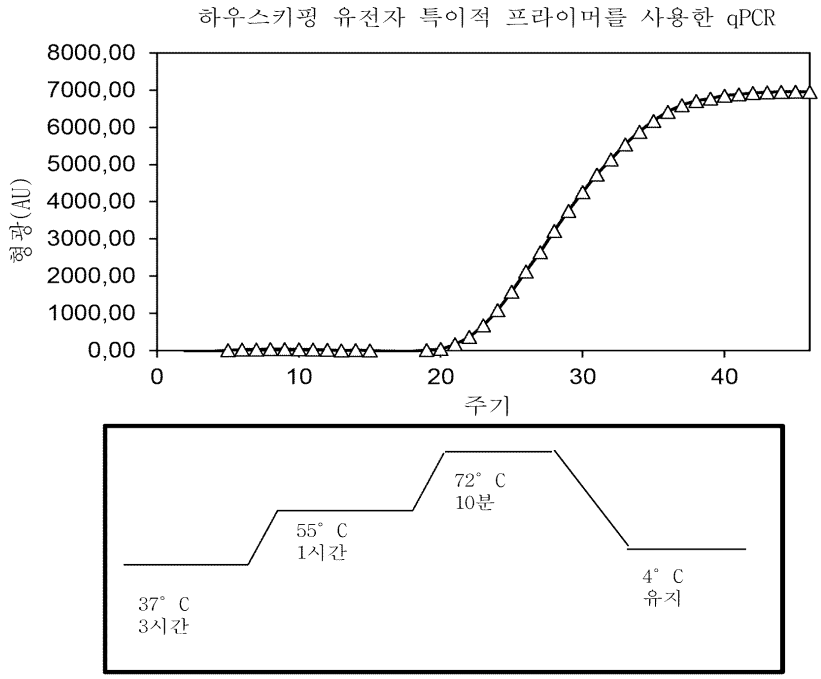

a
연속상
수성상
연속상
TotalseqB-Ab
세포
Cy5 형광
2D 챔버 슬라이드에서 소적
b
염색된 세포
염색되지 않은 세포
음성 대조군
양성 대조군
형광 강도
시간(x10분)

도면9

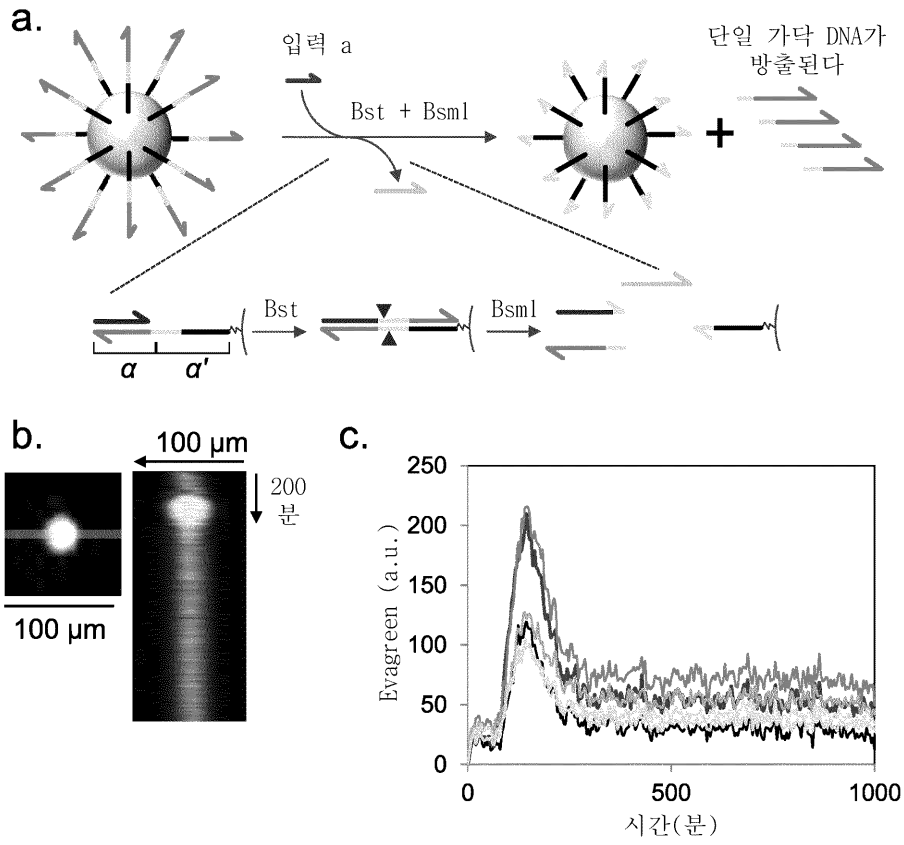
a


5 x10⁴ 세포 + DNA 툴박스 + RT 믹스 + TotalSeqB
트리거의 100 fM 또는 10 pM
8300
7300
6300
5300
4300
3300
2300
100fM
10pM
형광(AU)
0
50
100
150
시간(분)

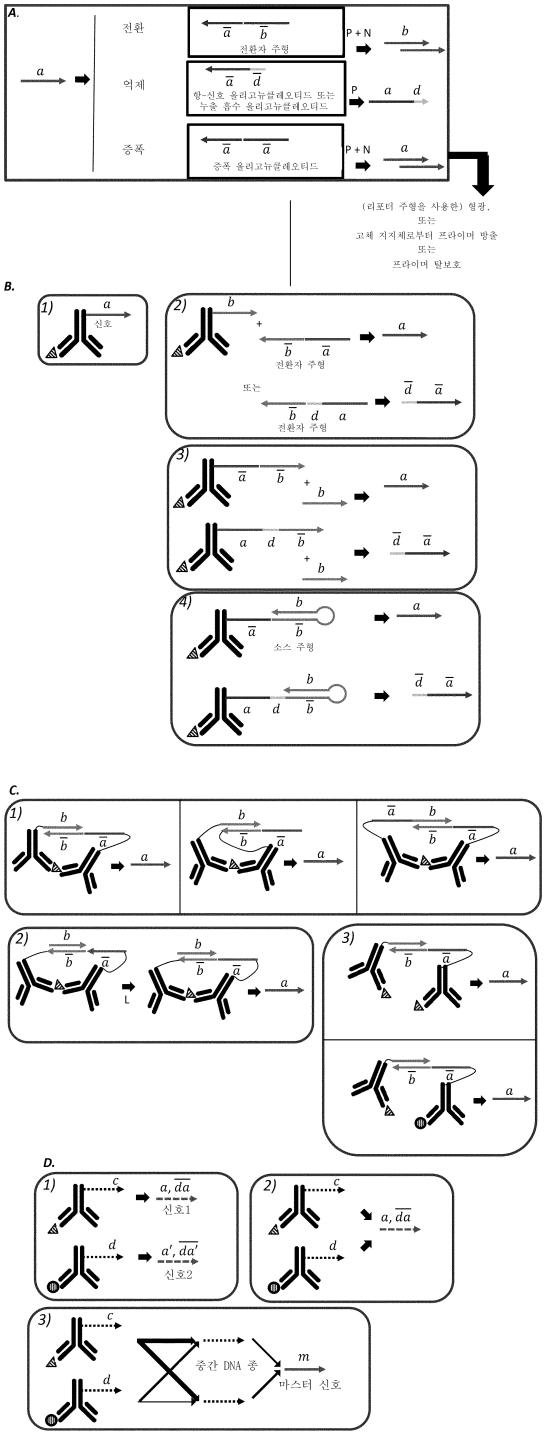
b


하우스키핑 유전자 특이적 프라이머를 사용한 qPCR
8000,00
7000,00
6000,00
5000,00
4000,00
3000,00
2000,00
1000,00
0,00
형광(AU)
0
10
20
30
40
주기
72° C
10분
55° C
1시간
37° C
3시간
4° C
유지

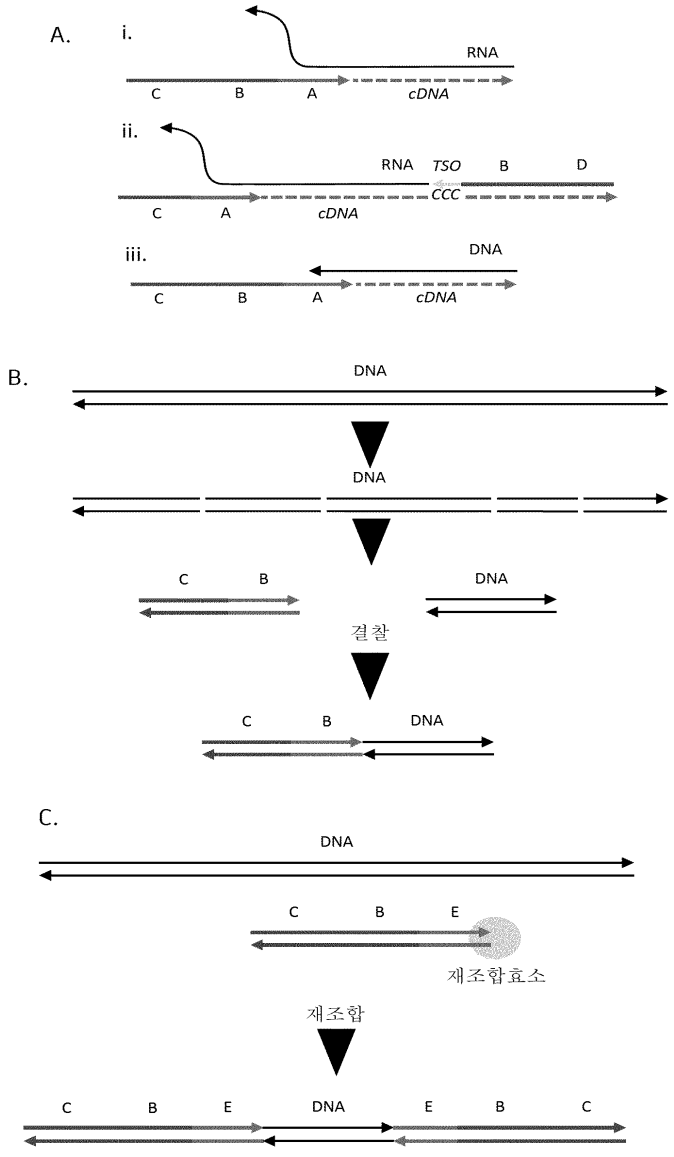
도면10


a.
입력 a
Bst + BsmI
단일 가닥 DNA가
방출된다
Bst
BsmI
α
α'
b.
100 μm
200
분
100 μm
c.
250
200
150
100
50
0
Evagreen (a.u.)
0
500
1000
시간(분)

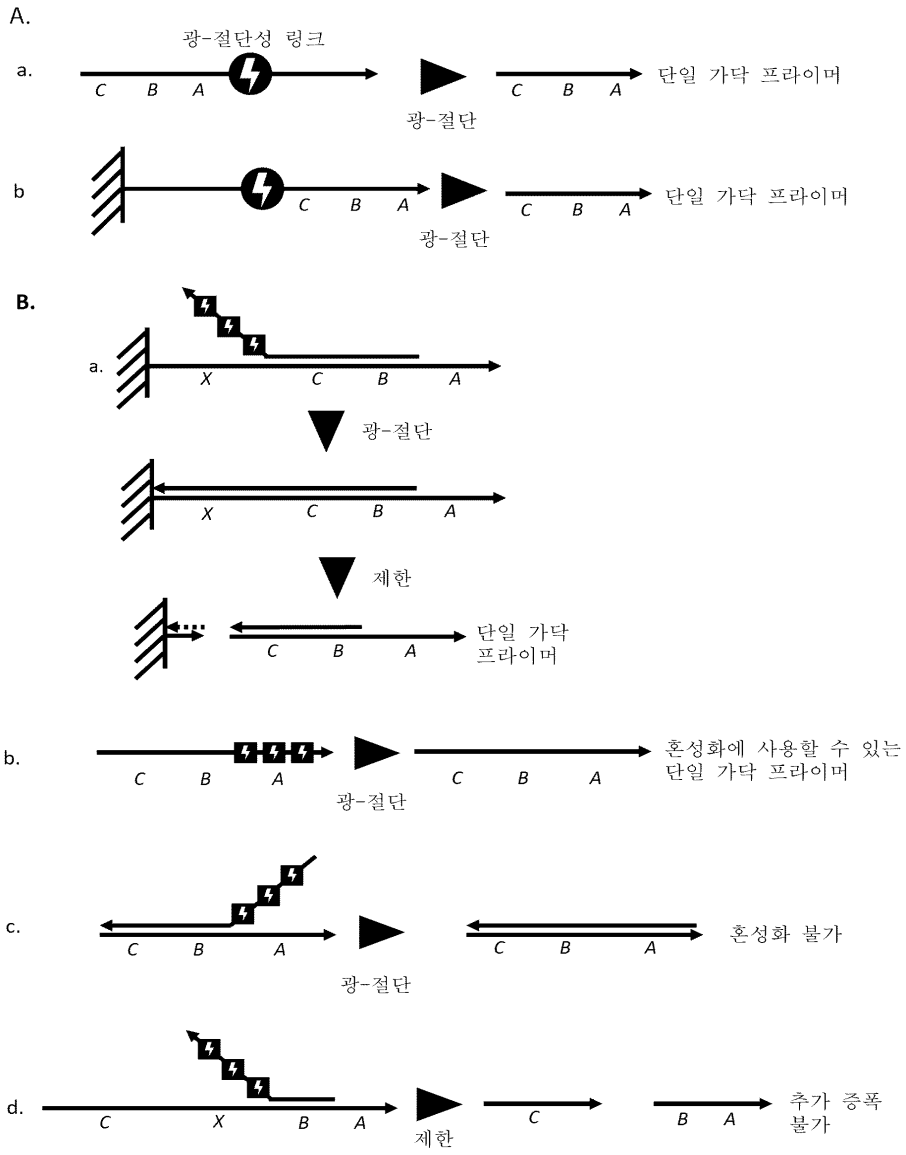
도면11


A.
전환
억제
증폭
전환자 주형
항-신호 올리고뉴클레오티드 또는 누출 흡수 올리고뉴클레오티드
증폭 올리고뉴클레오티드
P + N
P
(리포터 주형을 사용한) 형광,
또는
고체 지지체로부터 프라이머 방출
또는
프라이머 탈보호
B.
1)
신호
2)
전환자 주형
또는
3)
4)
소스 주형
C.
1)
2)
3)
D.
1)
신호1
신호2
2)
3)
증간 DNA 종
마스터 신호

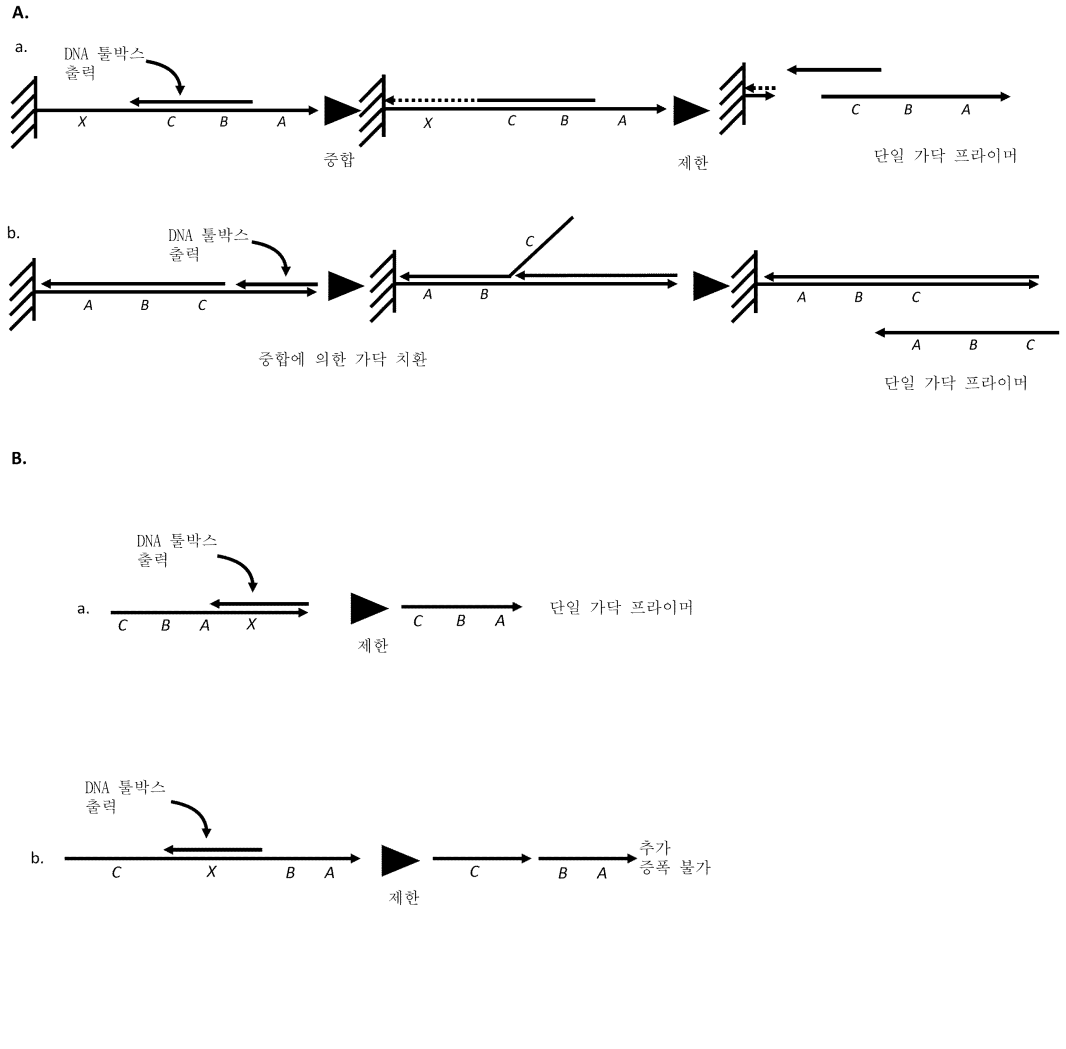
도면12


A.
i.
RNA
C
B
A
cDNA
ii.
RNA
TSO
B
D
CCC
C
A
cDNA
iii.
DNA
C
B
A
cDNA
B.
DNA
DNA
C
B
DNA
결찰
C
B
DNA
C.
DNA
C
B
E
재조합효소
재조합
C
B
E
DNA
E
B
C

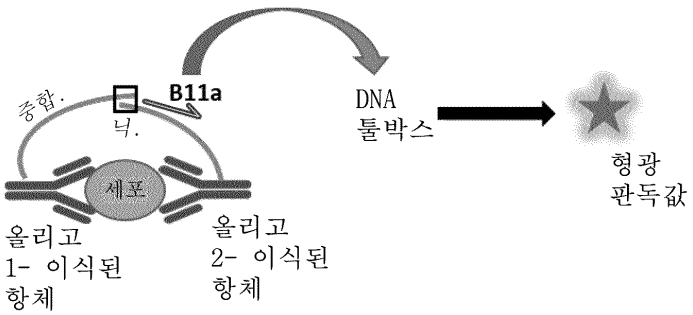
도면13


A.
광-절단성 링크
a.
C B A
광-절단
C B A
단일 가닥 프라이머
b
C B A
광-절단
C B A
단일 가닥 프라이머
B.
a.
X C B A
광-절단
X C B A
제한
C B A
단일 가닥
프라이머
b.
C B A
광-절단
C B A
혼성화에 사용할 수 있는
단일 가닥 프라이머
c.
C B A
광-절단
C B A
혼성화 불가
d.
C X B A
제한
C
B A
추가 증폭
불가

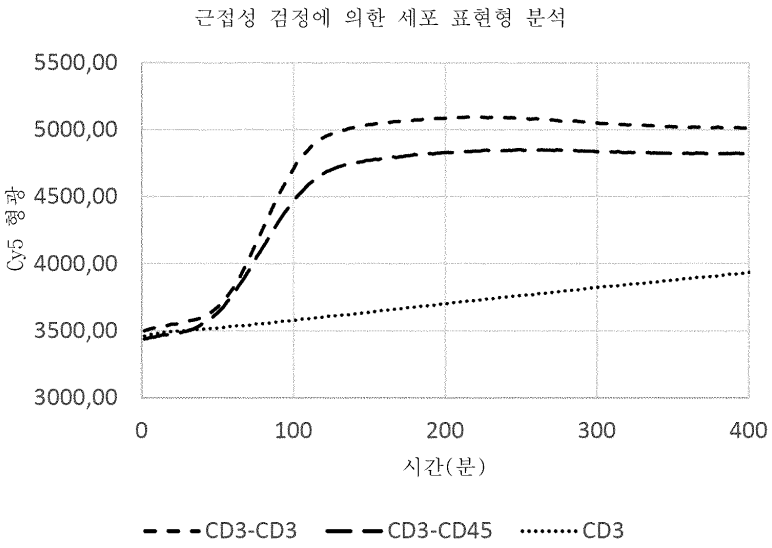
도면14


A.
a.
DNA 툴박스 출력
X C B A
증합
X C B A
제한
C B A
단일 가닥 프라이머
b.
DNA 툴박스 출력
A B C
C
A B
A B C
증합에 의한 가닥 치환
A B C
단일 가닥 프라이머
B.
DNA 툴박스 출력
a.
C B A X
제한
C B A
단일 가닥 프라이머
DNA 툴박스 출력
b.
C X B A
제한
C
B A
추가 증폭 불가
DNA 툴박스 출력
c.
C B A
혼성화 불가

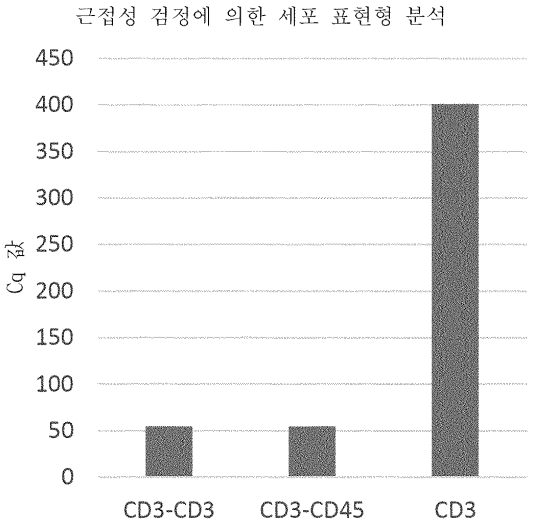
도면15


증합.
닉.
B11a
세포
올리고 1- 이식된 항체
올리고 2- 이식된 항체
DNA 툴박스
형광 판독값

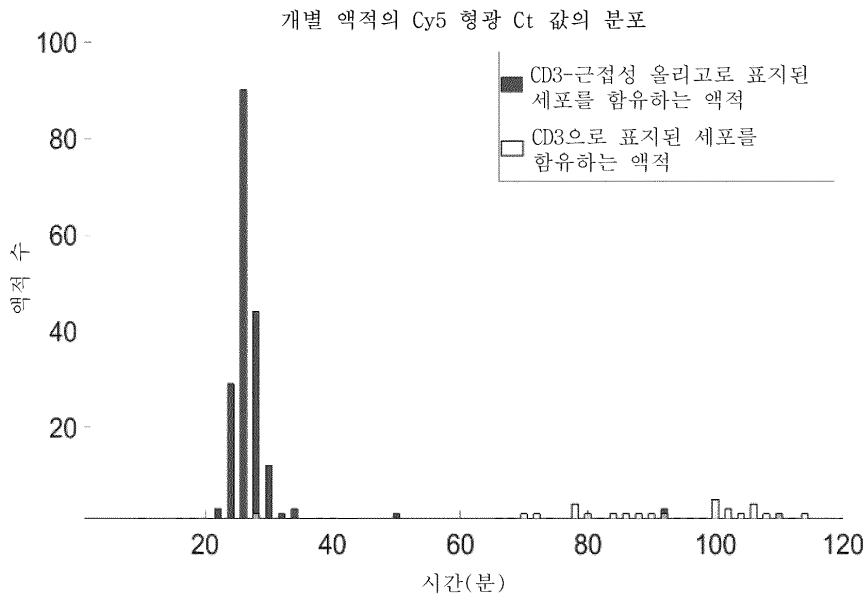
도면16


근접성 검정에 의한 세포 표현형 분석
5500,00
5000,00
4500,00
4000,00
3500,00
3000,00
Cy5 형광
0
100
200
300
400
시간(분)
CD3-CD3
CD3-CD45
CD3

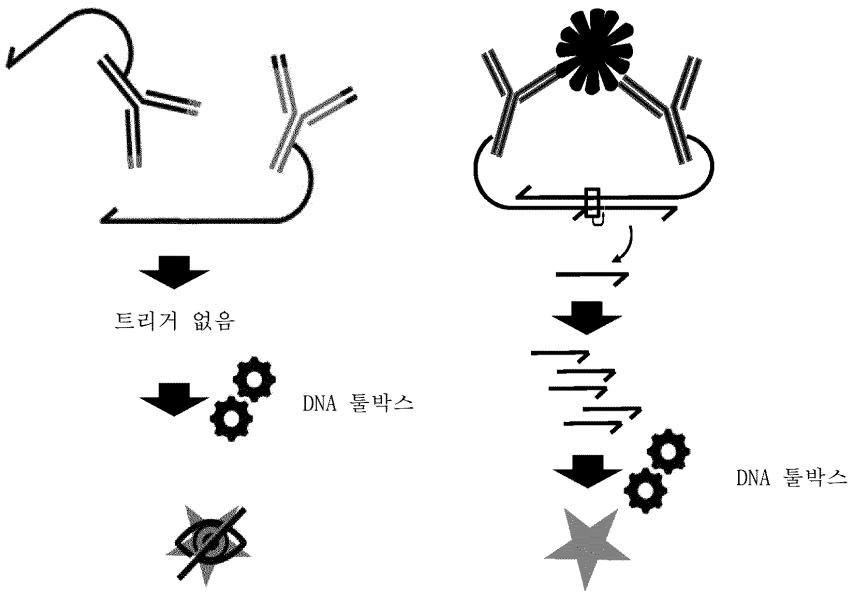
도면17


근접성 검정에 의한 세포 표현형 분석
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Cq 값
CD3-CD3
CD3-CD45
CD3

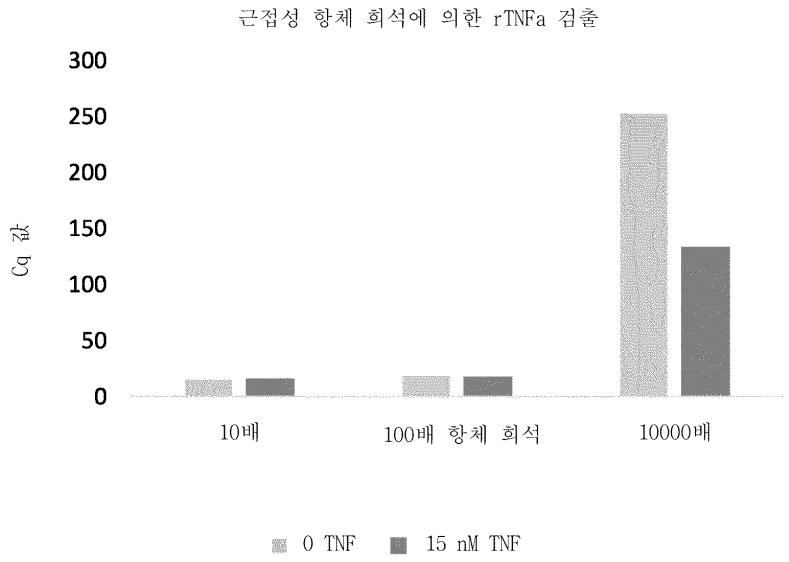
도면18


개별 액적의 Cy5 형광 Ct 값의 분포
CD3-근접성 올리고로 표지된 세포를 함유하는 액적
CD3으로 표지된 세포를 함유하는 액적
액적 수
100
80
60
40
20
20
40
60
80
100
120
시간(분)

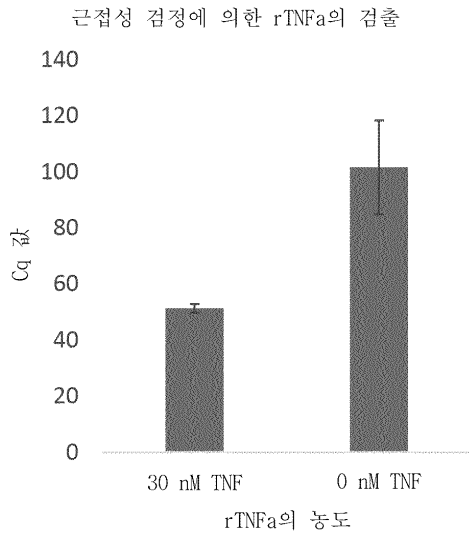
도면19


트리거 없음
DNA 툴박스
DNA 툴박스

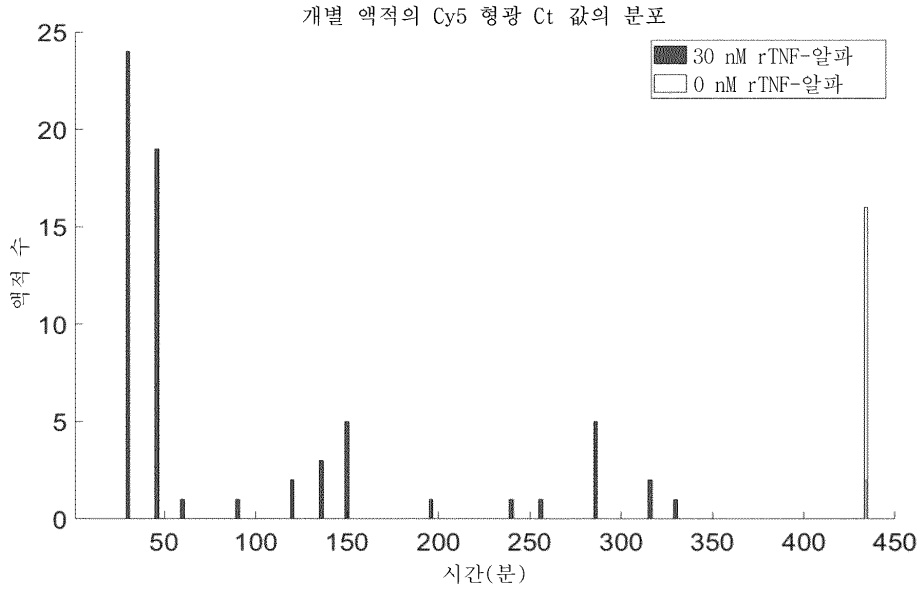
도면20


근접성 항체 희석에 의한 rTNFa 검출
300
250
200
150
100
50
0
Cq 값
10배
100배 항체 희석
10000배
0 TNF
15 nM TNF

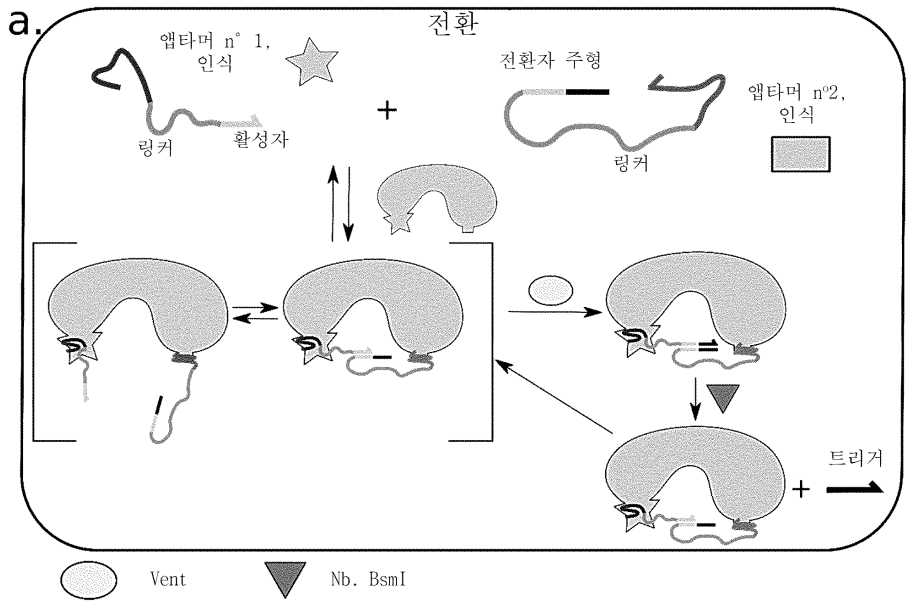
도면21


근접성 검정에 의한 rTNFa의 검출
140
120
100
80
60
40
20
0
Cq 값
30 nM TNF
0 nM TNF
rTNFa의 농도

도면22

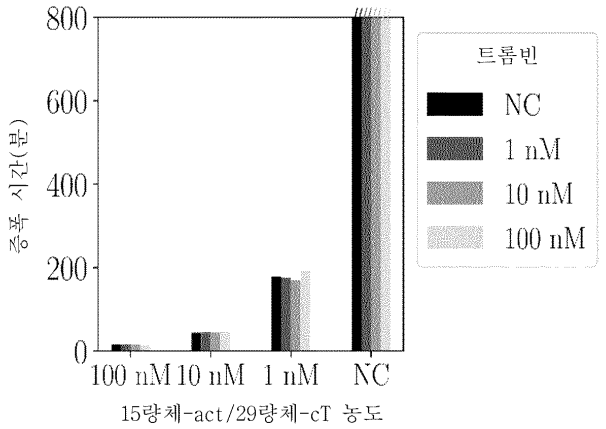

개별 액적의 Cy5 형광 Ct 값의 분포
30 nM rTNF-알파
0 nM rTNF-알파
액적 수
시간(분)
0
5
10
15
20
25
50
100
150
200
250
300
350
400
450

도면23

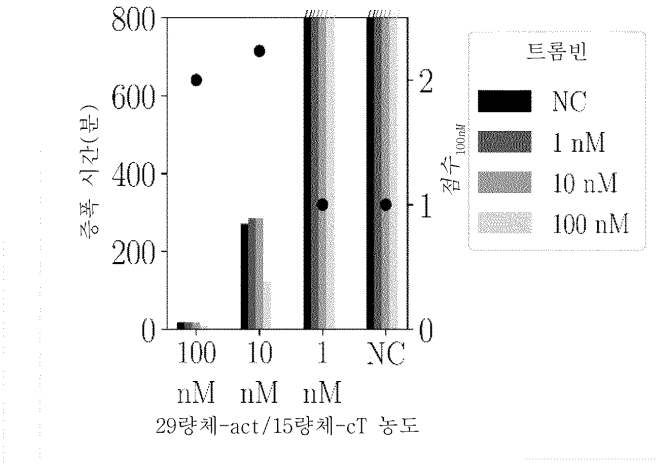

a.
전환
앱타머 n° 1, 인식
링커
활성자
+
전환자 주형
링커
앱타머 n°2, 인식
트리거
+
Vent
Nb. BsmI

도면24

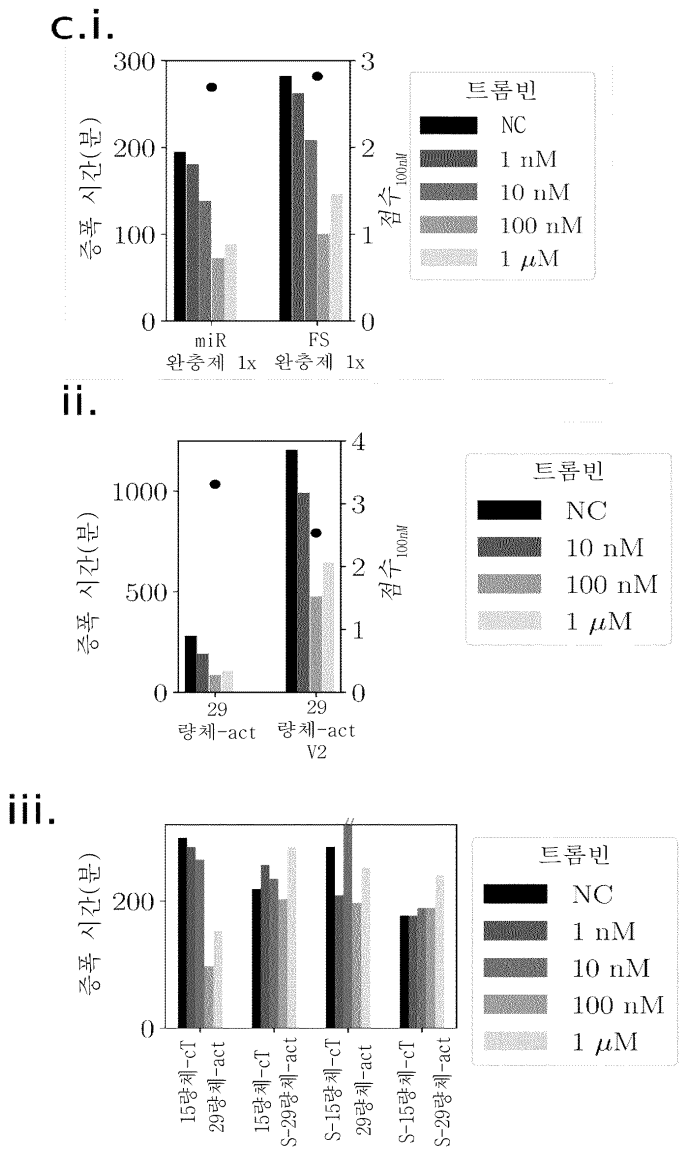
b.i.


800
600
400
200
0
증폭 시간(분)
100 nM
10 nM
1 nM
NC
15량체-act/29량체-cT 농도
트롬빈
NC
1 nM
10 nM
100 nM

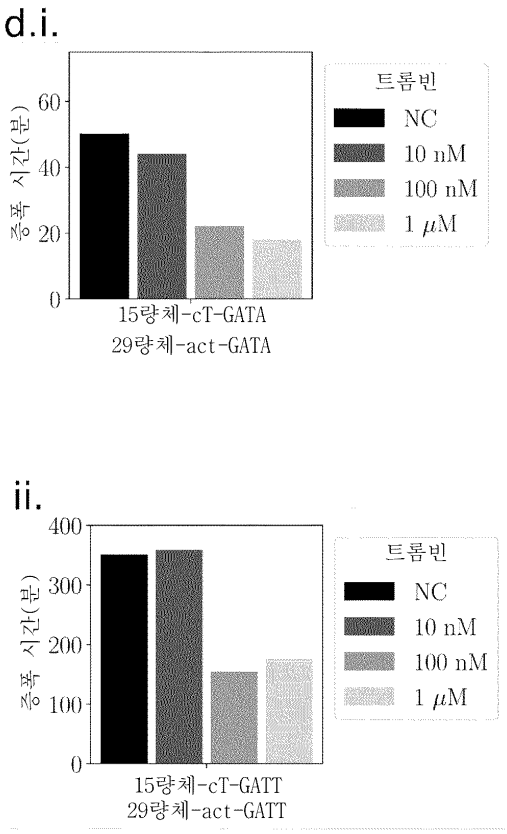
ii.


800
600
400
200
0
증폭 시간(분)
2
1
0
점수100nM
100 nM
10 nM
1 nM
NC
29량체-act/15량체-cT 농도
트롬빈
NC
1 nM
10 nM
100 nM

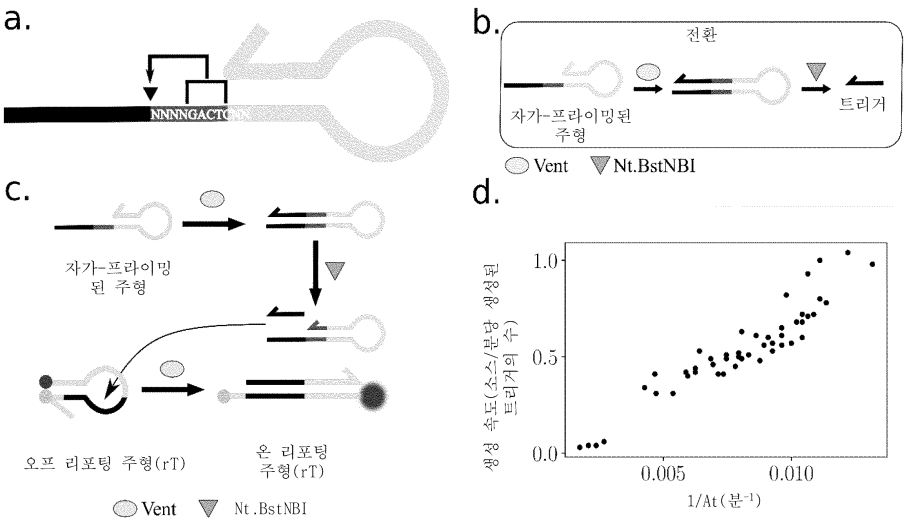
도면25


c.i.
증폭 시간(분)
300
200
100
0
3
2
1
0
점수100nM
miR
완충제 1x
FS
완충제 1x
트롬빈
NC
1 nM
10 nM
100 nM
1 μM
ii.
증폭 시간(분)
1000
500
0
4
3
2
1
0
점수100nM
29
량체-act
29
량체-act
V2
트롬빈
NC
10 nM
100 nM
1 μM
iii.
증폭 시간(분)
200
0
15량체-cT
29량체-act
15량체-cT
S-29량체-act
S-15량체-cT
29량체-act
S-15량체-cT
S-29량체-act
트롬빈
NC
1 nM
10 nM
100 nM
1 μM

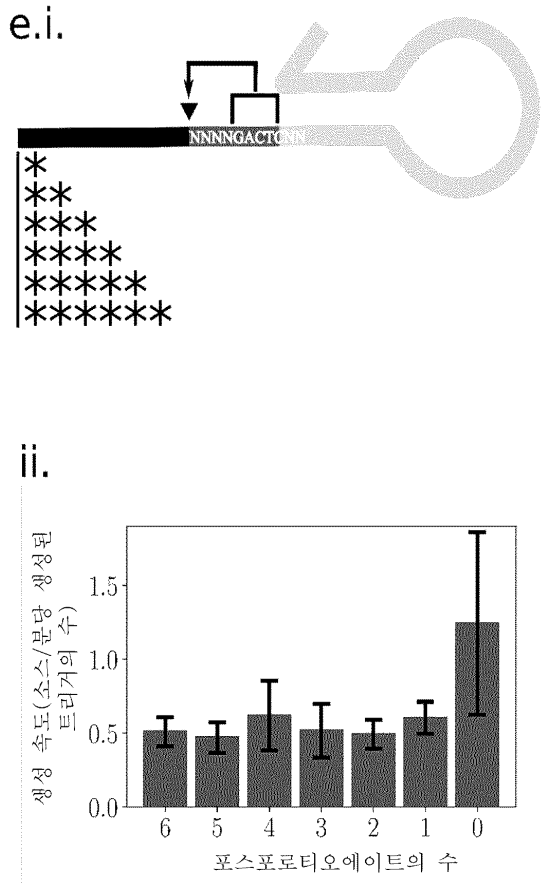
도면26


d.i.
증폭 시간(분)
60
40
20
0
15량체-cT-GATA
29량체-act-GATA
트롬빈
NC
10 nM
100 nM
1 μM
ii.
증폭 시간(분)
400
300
200
100
0
15량체-cT-GATT
29량체-act-GATT
트롬빈
NC
10 nM
100 nM
1 μM

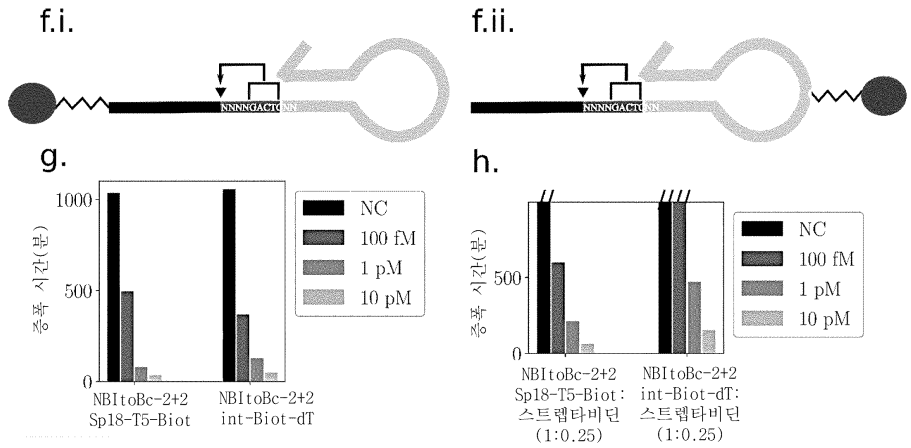
도면27


a.
NNNNGACTG
b.
전환
자가-프라이밍된 주형
트리거
Vent
Nt.BstNBI
c.
자가-프라이밍된 주형
오프 리포팅 주형(rT)
온 리포팅 주형(rT)
Vent
Nt.BstNBI
d.
생성 속도(소스/분당 생성된 트리거의 수)
1.0
0.5
0.0
0.005
0.010
1/At(분-1)

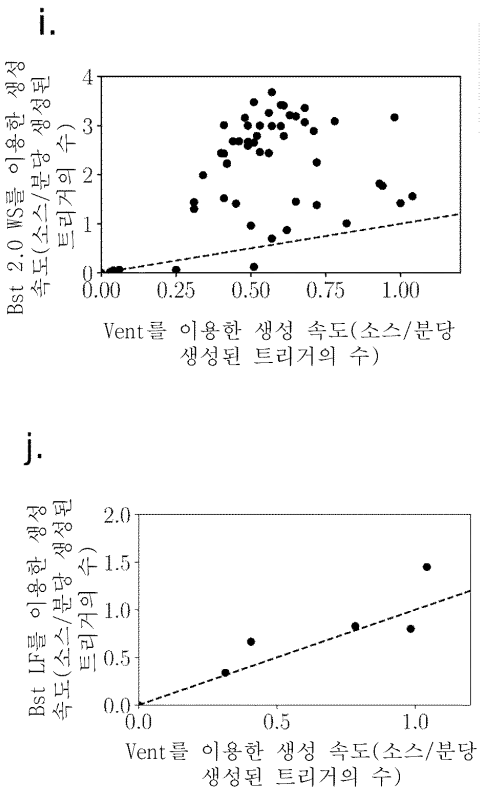
도면28


e.i.
NNNNGACTCNN
*
**
***
****
*****
******
ii.
생성 속도(소스/분당 생성된 트리거의 수)
1.5
1.0
0.5
0.0
6
5
4
3
2
1
0
포스포로티오에이트의 수

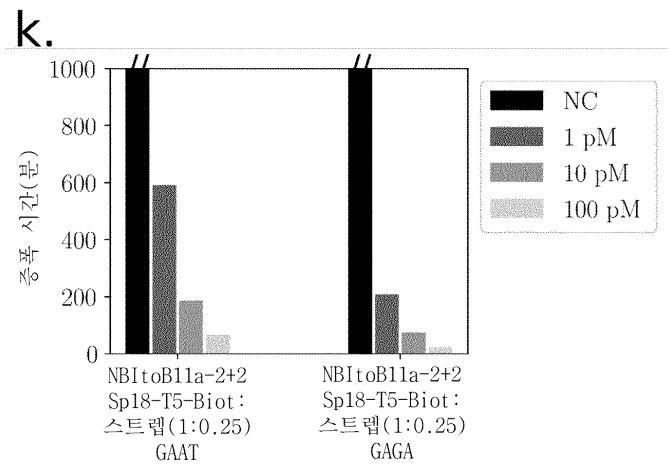
도면29


f.i.
NNNNGACTCNN
f.ii.
NNNNGACTCNN
g.
증폭 시간(분)
1000
500
0
NC
100 fM
1 pM
10 pM
NBItoBc-2+2 Sp18-T5-Biot
NBItoBc-2+2 int-Biot-dT
h.
증폭 시간(분)
500
0
NC
100 fM
1 pM
10 pM
NBItoBc-2+2 Sp18-T5-Biot: 스트렙타비딘 (1:0.25)
NBItoBc-2+2 int-Biot-dT: 스트렙타비딘 (1:0.25)

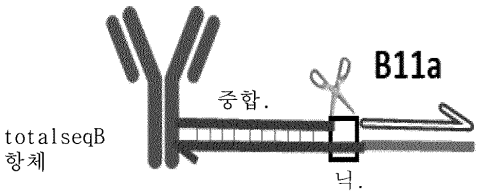
도면30



도면31

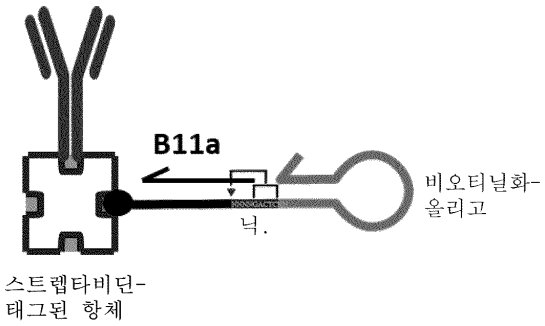


도면32

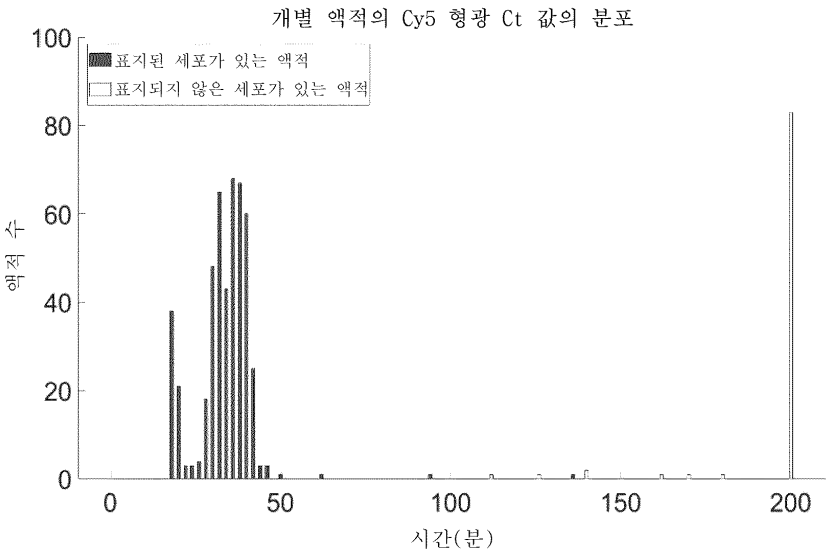


totalseqB에서 B 11a로의 전환자

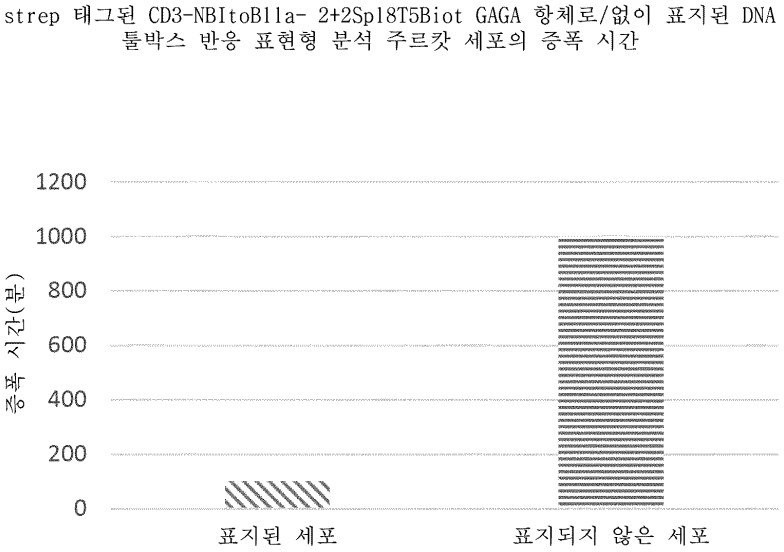
도면33



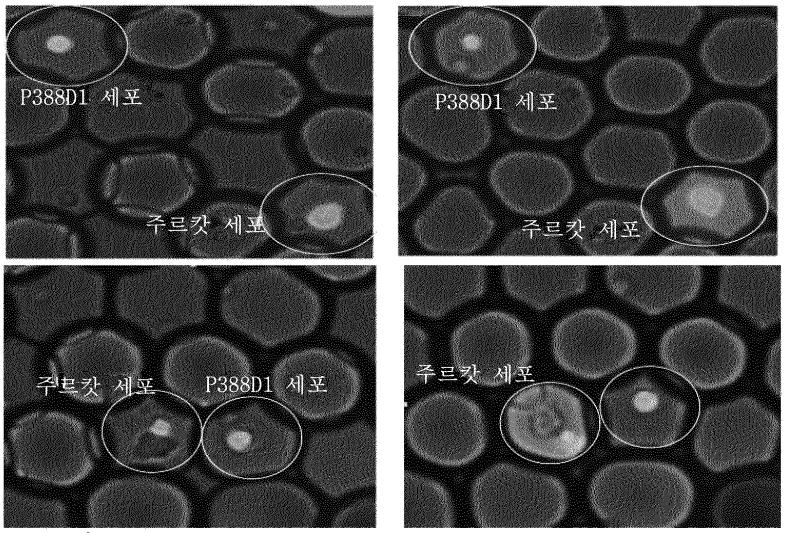
도면34



도면35



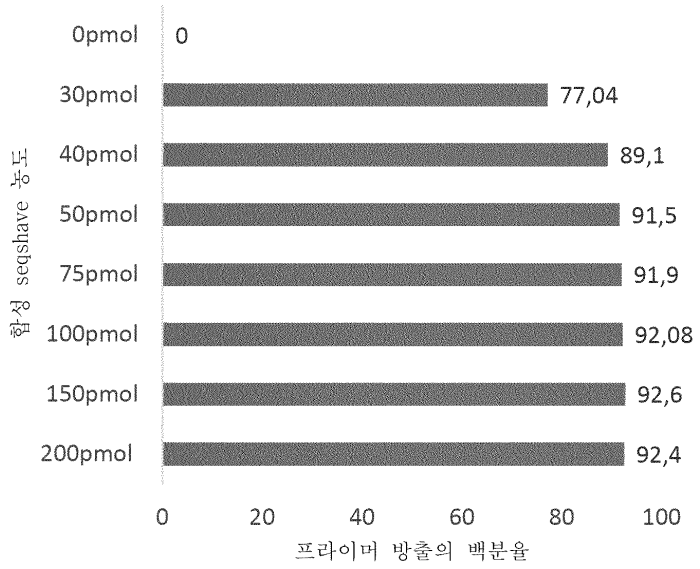
도면36



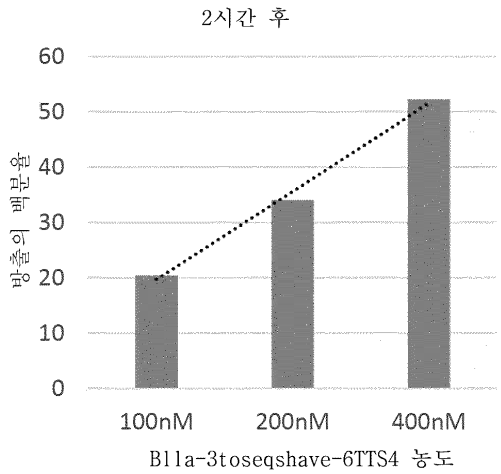
T = 0분 T = 20분

도면37

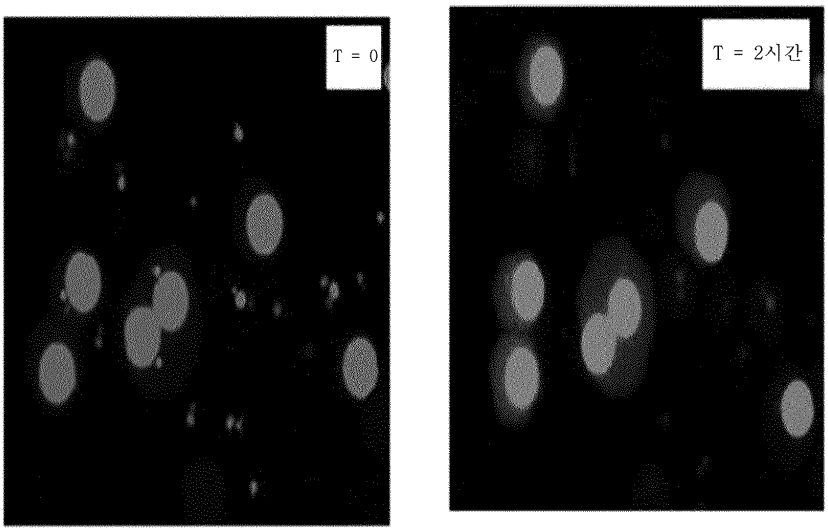
합성 seq는 비드로부터 매개 바코딩된 프라이머 방출을 갖는다



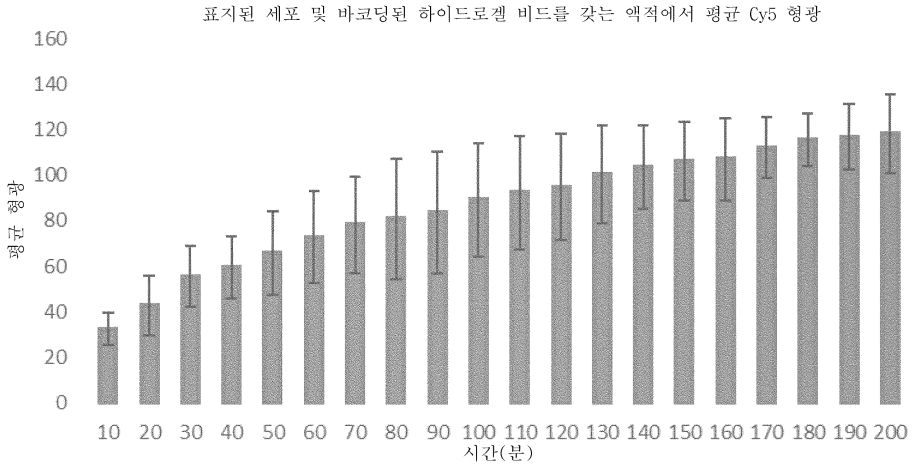
도면38



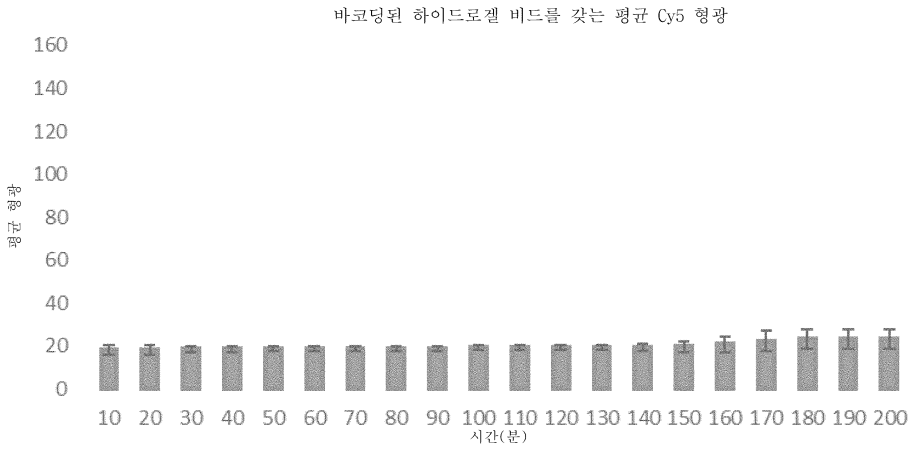
도면39



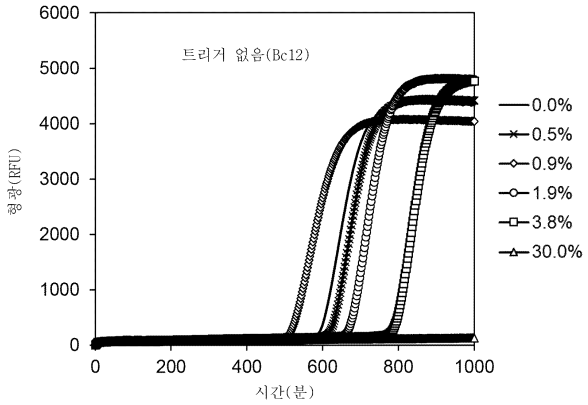
도면40

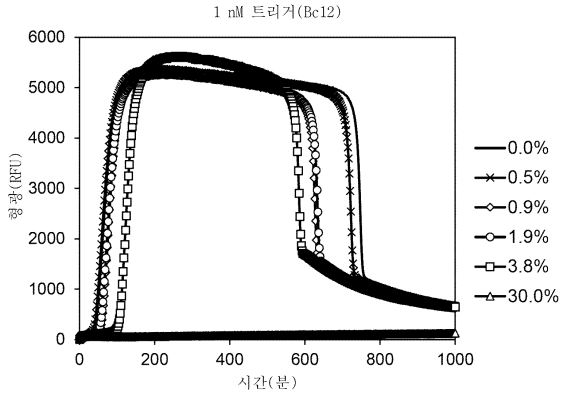


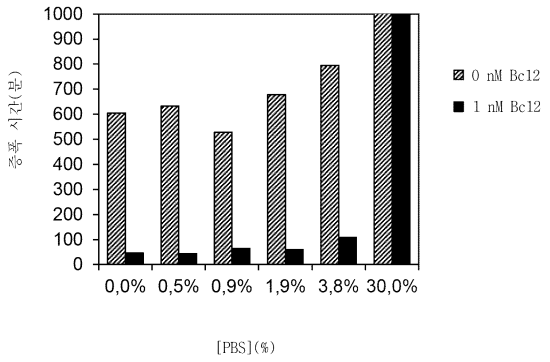
도면41


바코딩된 하이드로겔 비드를 갖는 평균 Cy5 형광
160
140
120
100
80
60
40
20
0
평균 형광
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
시간(분)

도면42







서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PARIS SCIENCES ET LETTRES - QUARTIER LATIN

ECOLE SUPERIEURE DE PHYSIQUE ET DE CHIMIE INDUSTRIELLES DE LA VILLE DE PARIS

Centre national de la recherche scientifique

<120> METHODS FOR THE SELECTIVE ANALYSIS OF CELLS OR ORGANELLES

<130> WO2022/195089

<140> PCT/EP2022/057187

<141> 2022-03-18

<150> EP 21315047.7

<151> 2021-03-19

<160> 115

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trigger oligonucleotide

<400> 1

cattcagtta g 11

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amplification oligonucleotide

<400> 2

ctaactgaat gctaactgaa 20

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> leak absorption oligonucleotide

<400> 3

aactaactga atg 13

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reporting probe

<400> 4

catcgatata ctaactgaat gcgatg 26

<210> 5

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> conversion oligonucleotide

<400> 5

tgctaactga agtttgactc attgctagga ccggctt 37

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator oligonucleotide

<400> 6

gctttaaggc cggtcctagc aa 22

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> conversion oligonucleotide

<400> 7

tgctaactga agtttgactc aaactataca acctactacc tca 43

<210> 8

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer coupled to an activator oligonucleotide

<400> 8

aaggagcagc gtggaggata aacaccgtgg aggatagttc ggtggctgtt cagggtctcc 60

tcccggtgtt agggtgtgtc gtcgtggtaa gccggtccta gcaa 104

<210> 9

<211> 99

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer coupled to an activator oligonucleotide

<400> 9

aaggagcagc gtggaggata taggcagtgg tttgacgtcc gcatgttggg aatagccacg 60

cctttagggt gtgtcgtcgt ggtaagccgg tcctagcaa 99

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator oligonucleotide

<400> 10

ttttttttt tgaggtagta ggttgtatag tt 32

<210> 11

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trigger oligonucleotide

<400> 11

cattctggac tg 12

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> amplification oligonucleotide

<400> 12

cagtccagaa tgcagtccag aa 22

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> leak absorption oligonucleotide

<400> 13

tttttcagtc cagaatg 17

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reporting probe

<400> 14

attctgaatg cagtccagaa t 21

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> conversion oligonucleotide

<400> 15

tgcagtccag aagtttgact cattgctagg accggctt 38

<210> 16

<211> 90

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 16

aaggagcagc gtggaggata aacaccgtgg aggatagttc ggtggctgtt cagggtctcc 60

tcccggtgtt agggtgtgtc gtcgtggtaa 90

<210> 17

<211> 85

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 17

aaggagcagc gtggaggata taggcagtgg tttgacgtcc gcatgttggg aatagccacg 60

cctttagggt gtgtcgtcgt ggtaa 85

<210> 18

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator oligonucleotide

<400> 18

gccggtccta gcaa 14

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> oligoucleotide

<400> 19

cgatcctgaa tgcgatcctg aat 23

<210> 20

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trigger oligonucleotide

<400> 20

attcaggatc g 11

<210> 21

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> trigger oligonucleotide

<400> 21

cattcaggat cg 12

<210> 22

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 22

ttgctaggac cggccttaaa gctttttttt ttttcttcaa gtag 44

<210> 23

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> first part cT

<400> 23

ttgctaggac cggccttaaa gcttttttt tttt 34

<210> 24

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> common oligonucleotide

<400> 24

ttgctaggac cggccttaaa gc 22

<210> 25

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> flexible linker

<400> 25

tttttttttt tt 12

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aT

<400> 26

ctaactgaat gctaactgaa 20

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rT

<400> 27

catcgatata ctaactgaat gcgatg 26

<210> 28

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pT

<400> 28

aaactaactg aatg 14

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 29

cccacaggca cgctcaacgc taaccaaacc 30

<210> 30

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 30

ggtttggtta gcgttgagcg tgcctgtggg ttttttttt ttcttcaagt ag 52

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> first part cT

<400> 31

ggtttggtta gcgttgagcg tgcctgtggg ttttttttt tt 42

<210> 32

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 32

ctaactgaat gctacttgaa tgttttttt ttttggttgg tgtggttgg 49

<210> 33

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 33

ctaactgaat gctacttgaa tgttttttt ttttagtccg tggtagggca ggttggggtg 60

act 63

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 34

gttggtgtgg ttggtttttt tttttttca agtag 35

<210> 35

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 35

agtccgtggt agggcaggtt ggggtgactt ttttttttt tttcaagtag 50

<210> 36

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 36

gagtcgggag cgctagaggt gtggttcgtt ttttttttt tttcaagtag 50

<210> 37

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 37

ctaactgaat gctacttgaa tgttttttt ttttggtgtt ggtttgggg 49

<210> 38

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 38

agtccgtggt agggcaggtt ggggtgactt ttttttttt tatcaagtag 50

<210> 39

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> cT

<400> 39

ctaactgaat ggagagactc ttttttttt ttggttggtg tggttgg 47

<210> 40

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 40

agtccgtggt agggcaggtt ggggtgactt ttttttttt tttgagtctc tc 52

<210> 41

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 41

ctaactgaat ggattgactc ttttttttt ttggttggtg tggttgg 47

<210> 42

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 42

agtccgtggt agggcaggtt ggggtgactt ttttttttt tttgagtcaa tc 52

<210> 43

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 43

agtccgtggt agggcaggtt ggggtgactt ttttttttt tatcaagtag 50

<210> 44

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 44

agtccgtggt agggcaggtt ggggtgactt ttttttttt tttcaagtag 50

<210> 45

<211> 36

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> activator

<400> 45

ggttggtgtg gttggttttt ttttttttc aagtag 36

<210> 46

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 46

tgcagtccag aagaatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 47

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 47

tgcagtccag aaaaatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 48

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 48

tgcagtccag aaatatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 49

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 49

tgcagtccag aaagatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 50

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 50

tgcagtccag aaacatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 51

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 51

tgcagtccag aataatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 52

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 52

tgcagtccag aattatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 53

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 53

tgcagtccag aatgatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 54

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 54

tgcagtccag aatcatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 55

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 55

tgcagtccag aagtatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 56

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 56

tgcagtccag aaggatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 57

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 57

tgcagtccag aagcatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 58

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 58

tgcagtccag aacaatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 59

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 59

tgcagtccag aactatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 60

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 60

tgcagtccag aacgatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 61

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 61

tgcagtccag aaccatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 62

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 62

tgcagtccag aagaaagact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 63

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 63

tgcagtccag aagaaggact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 64

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 64

tgcagtccag aagaacgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 65

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 65

tgcagtccag aagatagact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 66

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 66

tgcagtccag aagattgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 67

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 67

tgcagtccag aagatggact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 68

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 68

tgcagtccag aagatcgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 69

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 69

tgcagtccag aagagagact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 70

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 70

tgcagtccag aagagtgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 71

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 71

tgcagtccag aagagggact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 72

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 72

tgcagtccag aagagcgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 73

tgcagtccag aagacagact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 74

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 74

tgcagtccag aagactgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 75

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 75

tgcagtccag aagacggact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 76

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 76

tgcagtccag aagaccgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 77

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 77

tgcagtccag aagaatgact caaattgctt cattttgaag caat 44

<210> 78

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 78

tgcagtccag aagaatgact catattgctt cattttgaag caat 44

<210> 79

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 79

tgcagtccag aagaatgact cagattgctt cattttgaag caat 44

<210> 80

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 80

tgcagtccag aagaatgact ctaattgctt cattttgaag caat 44

<210> 81

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 81

tgcagtccag aagaatgact cttattgctt cattttgaag caat 44

<210> 82

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 82

tgcagtccag aagaatgact ctgattgctt cattttgaag caat 44

<210> 83

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 83

tgcagtccag aagaatgact ctcattgctt cattttgaag caat 44

<210> 84

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 84

tgcagtccag aagaatgact cgaattgctt cattttgaag caat 44

<210> 85

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 85

tgcagtccag aagaatgact cgtattgctt cattttgaag caat 44

<210> 86

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 86

tgcagtccag aagaatgact cggattgctt cattttgaag caat 44

<210> 87

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 87

tgcagtccag aagaatgact cgcattgctt cattttgaag caat 44

<210> 88

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 88

tgcagtccag aagaatgact ccaattgctt cattttgaag caat 44

<210> 89

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 89

tgcagtccag aagaatgact cctattgctt cattttgaag caat 44

<210> 90

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 90

tgcagtccag aagaatgact ccgattgctt cattttgaag caat 44

<210> 91

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 91

tgcagtccag aagaatgact cccattgctt cattttgaag caat 44

<210> 92

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 92

tgcagtccag aaggttgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 93

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 93

tgcagtccag aaggaagact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 94

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 94

tgcagtccag aagggagact ctcattgctt cattttgaag caat 44

<210> 95

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 95

tgcagtccag aacggagact ctcattgctt cattttgaag caat 44

<210> 96

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 96

tgcagtccag aagggagact cttattgctt cattttgaag caat 44

<210> 97

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 97

tgcagtccag aagcgagact ctcattgctt cattttgaag caat 44

<210> 98

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 98

tgcagtccag aagggagact ctgattgctt cattttgaag caat 44

<210> 99

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 99

tgcagtccag aagaatgact cacattgctt cattttgaag caat 44

<210> 100

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 100

tgcagtccag aagtttgact cacattgctt cattttgaag caatgtgagt 50

<210> 101

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> first part sT

<400> 101

tgcagtccag aagtttgact cacattgctt cattt 35

<210> 102

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> second part sT

<400> 102

tttgaagcaa tgtgagt 17

<210> 103

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 103

tgctaactga agagtgactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210> 104

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 104

tgctaactga agagagactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210

> 105

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 105

tgctaactga agagcgactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210> 106

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 106

tgctaactga agattgactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210> 107

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sT

<400> 107

tgctaactga atcatgactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210> 108

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> second part of sT

<400> 108

tgctaactga agtttgactc acattgcttc attttgaagc aatgtgagt 49

<210> 109

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> second part of sT

<400> 109

tgctaactga agagagactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210> 110

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> second part sT

<400> 110

tgctaactga agagagactc acattgcttc attttgaagc aat 43

<210> 111

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 111

tgctaactga agagagactc acttgctagg accggcctta aagc 44

<210> 112

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 112

tgctaactga agagagactc acttgctagg accggcctta aagc 44

<210> 113

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cT

<400> 113

gtggtctgag tttgactcta actg 24

<210> 114

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> second part cT

<400> 114

ctaactgaat gctacttgaa tg 22

<210> 115

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> second part cT

<400> 115

ctaactgaat gctacttgaa tg 22