

(11) 공개번호 10-2021-0097522  
(43) 공개일자 2021년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12Q 1/6869* (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)

(52) CPC특허분류  
*C12Q 1/6869* (2018.05)  
*C12N 15/1065* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0011319

(22) 출원일자 2020년01월30일  
 심사청구일자 2020년01월30일

(71) 출원인  
**경희대학교 산학협력단**  
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경  
 희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자  
**이지현**  
 서울특별시 종로구 송월길 99, 206-1303(홍파동,  
 경희궁자이 2단지)

**방두희**  
 서울특별시 종로구 송월길 99, 206-1303(홍파동,  
 경희궁자이 2단지)  
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인  
**특허법인(유한)아이시스**

전체 청구항 수 : 총 9 항

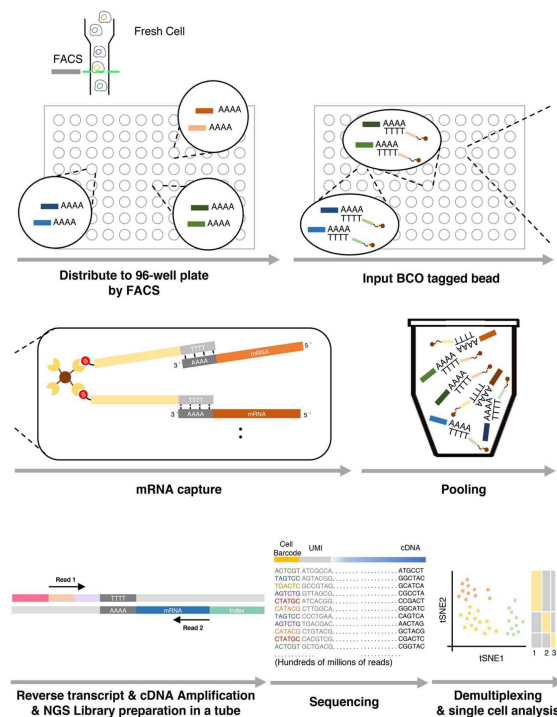
(54) 발명의 명칭 자성 비드를 이용한 단일세포 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 자성 비드를 이용한 단일세포 분석방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 비오틴화된 세포 특이적 프라이머가 결합되어 있는 스트렙타비딘 자성 비드를 이용한 마이크로웰 기반의 단일세포 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단일세포 분석 방법(MAPS-seq)은 비오틴화된 세포 특이적 프라이머가 결합되어 있는 스트렙타비

(뒷면에 계속)

## 대표도 - 도2



단이 코팅된 자성 비드를 이용하여 다중 세포에서 정확성 높은 단일세포의 전사체 분석이 가능하며, 역전사 과정 전인 분석 초기 단계에서 샘플을 하나의 튜브로 한꺼번에 풀링(pooling)하기 때문에 고가의 장비나 고도의 기술적 조작 없이 분석을 수행하기 용이하고 시약의 낭비를 줄여 비용절감의 효과가 있다. 또한 구체적인 검증 실험을 통해 상기 방법으로 인간과 마우스 세포주를 각 종으로 효과적으로 분리 가능하며, 상기 방법이 약물 반응 연구에 적용될 수 있음을 구체적으로 확인하였는바, 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법은 향상된 편리함과 우수한 비용절감 효과를 갖는 마이크로웰 기반 분석법으로 관련 분야에서 다양한 연구에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2525/173 (2013.01)  
C12Q 2537/143 (2013.01)  
C12Q 2563/143 (2013.01)  
C12Q 2563/149 (2013.01)  
C12Q 2563/185 (2013.01)  
C12Q 2565/519 (2013.01)

**박문수**

전라남도 나주시 호수로 10, 102동 1303호 (빛가람동, 빛가람이지더원 아파트)

(72) 발명자

**이동인**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 과학관 431B (신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711084002                    |
| 과제번호        | 2018R1A2B2001322              |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                     |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                        |
| 연구사업명       | 개인기초연구사업 중견연구                 |
| 연구과제명       | 단일 세포 빅데이터 기반 항암제 스크리닝 플랫폼 개발 |
| 기 여 율       | 50/100                        |
| 과제수행기관명     | 경희대학교 산학협력단                   |
| 연구기간        | 2018.03.01 ~ 2021.02.28       |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| 과제고유번호      | 1465030520                       |
| 과제번호        | HI18C2282030020                  |
| 부처명         | 보건복지부                            |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                        |
| 연구사업명       | 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)       |
| 연구과제명       | 말초혈액 유래 면역세포 프로파일링을 통한 암 진단도구 개발 |
| 기 여 율       | 30/100                           |
| 과제수행기관명     | 경희대학교 산학협력단                      |
| 연구기간        | 2019.01.01 ~ 2020.12.31          |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                |
|-------------|--------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711109363                     |
| 과제번호        | 2018R1A2A1A05079172            |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                         |
| 연구사업명       | 개인기초연구                         |
| 연구과제명       | 종양 세포의 진화와 치료에 관한 차세대 플랫폼기술 개발 |
| 기 여 율       | 20/100                         |
| 과제수행기관명     | 연세대학교                          |
| 연구기간        | 2019.03.01 ~ 2020.02.29        |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기의 단계를 포함하는, 단일세포 분석 방법:

- (a) 세포를 각각의 단일세포로 분주하고 용해시키는 단계;
- (b) 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고(Biotinylated cell specific barcode oligo; BCO)가 결합된 스트렙타비딘 자성 비드(Streptavidin magnetic bead)를 세포 용해물에 첨가하여 각 세포 샘플을 바코딩하는 단계;
- (c) 바코딩된 샘플들을 하나의 튜브로 풀링(pooling)하는 단계; 및
- (d) 상기 풀링된 세포 샘플들에 대하여 단일세포 RNA 서열분석을 실시하는 단계.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고는 비오틴(Biotin), 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드, 세포 특이적 바코드, 각 mRNA의 고유 분자 식별자(unique molecular identifier; UMI) 및 폴리 T(poly T) 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)에서, 단일세포로 분주하는 과정은 형광표지세포분류기(Fluorescence activated cell sorter; FACS)를 이용해 수행되는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)에서, 단일세포는 96웰 플레이트의 각 웰 내로 분주되는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)에서, 상기 스트렙타비딘 자성 비드는 10 내지 50  $\mu$ g의 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석은 풀링된 세포 샘플에 대하여 한번에 이루어지는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

## 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석 전에 mRNA의 역전사 및 cDNA를 증폭시키는 과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

## 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing)을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

## 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석 이후에 역다중화(demultiplexing)하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일세포 분석 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 자성 비드를 이용한 단일세포 분석 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 비오틴화된 세포 특이적 프라이머가 결합되어 있는 스트렙타비딘 자성 비드를 이용한 마이크로웰 기반의 단일세포 분석 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 유기체 또는 조직은 독특한 기능을 가진 다양한 유형의 세포로 구성된 집합체이다. 세포의 전사 상태가 세포 기능과 밀접하게 관련되어 있다는 것을 고려할 때, 세포 내 전사체를 프로파일링함으로써 세포를 조사할 수 있으며, 특히 개별 세포의 전사체를 프로파일링하여 세포 정체성을 확립할 수 있다. 이러한 측면에서, 최근 식물의 이종 조직에서 발달 과정을 프로파일링하거나 암 세포의 회귀 아종을 연구하는 것과 같은 다양한 분야에서 단일 세포의 전사체에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0003] 한편, 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS) 기술은 다양한 생물학적 응용 분야에서 이용되어 오고 있다. 특히, 단일세포에 대한 연구의 필요성이 중요해짐에 따라 다양한 scRNA-seq(single cell RNA-sequencing) 방법이 개발되고 있다. 대표적인 scRNA-seq 라이브러리 생성 방법으로는 마이크로웰-기반의 CEL-seq 및 MARS-seq와 Drop-seq 및 10x genomics와 같은 미세유체 플랫폼이 알려져 있다. 마이크로웰 기반 플랫폼은 마이크로웰로 분리된 세포의 전사체가 개별적으로 역전사된다는 공통된 특징을 갖는다. 그러나 샘플을 풀링하기 전에 개별적으로 다루어야 하므로 많은 노력과 시약들이 필요한 한계점이 있다. 또한 미세유체 플랫폼은 나노리터의 액적(droplets)을 사용하여 개별 세포를 분리하는 기술을 기반으로 하는데, 이를 위해서는 고급 장비가 필요하기 때문에 높은 설치 비용이 필요하다. 더욱이, 유체를 제어하기 위해 초기 작동 중에 샘플과 시약을 소비하기 때문에 적은 수의 세포에 적용하는데 한계를 가진다(Molecular cell, 2019. 73(1): p. 130-142. e5.).

[0004] 따라서 종래의 단일세포 분석 방법의 한계점을 극복할 수 있는 향상된 편의성과 절감된 비용을 바탕으로 수백 개 이상의 세포를 동시에 분석할 수 있는 방법의 개발이 요구 되어진다.

### 발명의 내용

## 해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 상기와 같은 종래의 한계점을 극복할 수 있는 단일세포 분석법을 개발하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 자성 비드를 이용한 마이크로웰 기반의 단일세포 분석 방법을 개발하였으며 상기 방법은 향상된 편 의성 및 우수한 비용절감 효과로 효율적인 단일세포의 전사체 분석이 가능한바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0006] 이에, 본 발명은 마이크로웰 기반의 자성 비드를 이용한 단일세포 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

## 과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 단일세포 분석 방법을 제공한다.
- [0010] (a) 세포를 각각의 단일세포로 분주하고 용해시키는 단계;
- [0011] (b) 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고(Biotinylated cell specific barcode oligo; BCO)가 결합된 스트렙타비딘 자성 비드(Streptavidin magnetic bead)를 세포 용해물에 첨가하여 각 세포 샘플을 바코딩하는 단계;
- [0012] (c) 바코딩된 샘플들을 하나의 튜브로 풀링(pooling)하는 단계; 및
- [0013] (d) 상기 풀링된 세포 샘플들에 대하여 단일세포 RNA 서열분석을 실시하는 단계.
- [0014] 본 발명의 일구현예로, 상기 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고는 비오틴, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드, 세포 특이적 바코드, 각 mRNA의 고유 분자 식별자(unique molecular identifier; UMI) 및 폴리 T(poly T) 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 단계 (a)에서, 단일세포로 분주하는 과정은 형광표지세포분류기(Fluorescence activated cell sorter; FACS)를 이용해 수행될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (a)에서, 단일세포는 96웰 플레이트의 각 웰 내로 분주되는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (b)에서, 상기 스트렙타비딘 자성 비드는 10 내지 50  $\mu$ g의 농도로 처리될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석은 풀링된 세포 샘플에 대하여 한번에 이루어지는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석 전에 mRNA의 역전사 및 cDNA를 증폭시키는 과정을 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (d)에서, 단일세포의 RNA 서열분석은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing)을 통해 수행되는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단계 (d)에서 단일세포의 RNA 서열분석 이후에 역다중화(demultiplexing)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

## 발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 단일세포 분석 방법(MAPS-seq)은 비오틴화된 세포 특이적 프라이머가 결합되어 있는 스트렙타비딘이 코팅된 자성 비드를 이용하여 다중 세포에서 정확성 높은 단일세포의 전사체 분석이 가능하며, 역전사 과정 전인 분석 초기 단계에서 샘플을 하나의 튜브로 한꺼번에 풀링(pooling)하기 때문에 고가의 장비나 고도의 기술적 조작 없이 분석을 수행하기 용이하고 시약의 낭비를 줄여 비용절감의 효과가 있다. 또한 구체적인 검증 실험을 통해 상기 방법으로 인간과 마우스 세포주를 각 종으로 효과적으로 분리 가능하며, 상기 방법이 약물 반응 연구에 적용될 수 있음을 구체적으로 확인하였는바, 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법은 향상된 편리함과 우수

한 비용 절감 효과를 갖는 마이크로웰 기반 분석법으로 관련 분야에서 다양한 연구에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 본 발명에 따른 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고의 구조를 그림으로 도시한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 단일세포 분석 방법(MAPS-seq)의 원리 및 전반적인 수행과정을 그림으로 도시한 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 MAPS-seq을 이용한 종-혼합 실험결과를 나타낸 것으로, 도 3a는 종-특이적 전사체의 비율을 이용해 특이도(specificity)가 > 0.9인 종을 확인한 결과이고, 도 3b는 각 세포에 대하여 특이도를 분석하여 나타낸 결과이며, 도 3c는 단일 종에서 전사체(왼쪽) 및 유전자(오른쪽)의 총 수를 나타낸 결과이고, 도 3d는 필터링 전(왼쪽)과 후(오른쪽)의 단일세포에 대한 t-SNE 분석 결과 및 종에 대한 t-SNE 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 MAPS-seq의 조건을 최적화하기 위한 실험 결과를 나타낸 것으로서, 도 4a는 웰 당 스트렙타비딘 비드의 처리 양을 4가지로 달리한 각 조건에서 전사체 수(왼쪽) 및 유전자 수(오른쪽)를 분석하여 나타낸 결과이고, 도 4b는 각각 8개의 HEK293T 및 NIH/3T3 세포를 이용해 상기 도 4a와 동일한 4개 조건에서 종 특이도를 분석한 결과이며, 도 4c는 역전사를 위한 PCR 혼합물 당 스트렙타비딘 비드의 양을 달리한 각 조건에서 유전자 발현과의 상관관계를 분석한 결과이고, 도 4d는 도 4c와 동일한 각 조건에서 얻어진 전사체 및 유전자의 수를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 K562 세포에 이마티닙(Imatinib), 라파마이신(Rapamycin) 및 비노렐빈(Vinorelbine) 약물을 각각 처리하고 배양한 후 MAPS-seq 분석을 실시한 결과로서, 도 5a는 각 세포에서 얻어진 차등적으로 발현되는 유전자 데이터를 이용한 단일세포의 t-SNE 분석 결과(왼쪽) 및 상기 분석 결과에 샘플 정보를 오버랩하여 나타낸 것이고, 도 5b는 각각의 K562 세포에서 약물 처리에 의한 유전자 발현 프로파일을 계층적 클러스터링 히트맵으로 나타낸 결과이며, 도 5c 및 도 5d는 DMSO를 처리한 대조군과 비교해 각각 이마티닙(Imatinib)(도 5c), 라파마이신(Rapamycin) 및 비노렐빈(Vinorelbine)(도 5d)을 처리한 군에서 차등적으로 변화한 유전자들을 나타낸 결과이고, 도 5e는 각각 본 발명에 따른 MAPS-seq 분석 및 종래 Drop-seq 분석법을 이용해 이마티닙 약물이 처리된 세포를 분석하여 도출된 유전자 발현 결과를 비교하여 두 방법 간의 상관관계를 분석한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

본 발명자들은 자성 비드를 이용한 마이크로웰 기반의 단일세포 분석법을 개발하였으며 상기 방법은 향상된 편의성 및 우수한 비용절감 효과로 효율적인 단일세포의 전사체 분석이 가능한바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0025]

이에, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 단일세포 분석 방법을 제공한다.

[0026]

(a) 세포를 각각의 단일세포로 분주하고 용해시키는 단계;

[0027]

(b) 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고(Biotinylated cell specific barcode oligo; BCO)가 결합된 스트렙타비딘 자성 비드(Streptavidin magnetic bead)를 세포 용해물에 첨가하여 각 세포 샘플을 바코딩하는 단계;

[0028]

(c) 바코딩된 샘플들을 하나의 튜브로 풀링(pooling)하는 단계; 및

[0029]

(d) 상기 풀링된 세포 샘플들에 대하여 단일세포 RNA 서열분석을 실시하는 단계.

[0030]

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하고자 한다.

[0031]

상기 단계 (a)는 세포를 마이크로웰의 각 웰 당 한 개씩 단일세포로 분주하고 세포를 용해시켜 세포 내 mRNA가 노출되도록 하기 위한 단계이다.

[0032]

본 발명에 있어서, 상기 세포는 동일하거나 또는 다른 조건에서 배양 및 조작된 것일 수 있다.

[0033]

상기 단일세포로 분주하는 과정은 FACS 분류기를 이용해 수행될 수 있으며, FACS를 통해 살아있는 세포만을 선별하여 분주하므로 고품질의 세포를 대상으로 분석이 가능하다. 또한 상기 단일세포는 96웰 플레이트 상에 분주될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034]

상기 세포를 용해시키는 과정은 세포를 분주하기 전 미리 세포 용해 완충액을 각 웰에 첨가함으로써 이루어질



수 있으며, 세포 완충액은 그 종류에 한정 없이 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다. 또한 세포를 분주한 후에는 세포가 용해 완충액에 가라앉도록 원심분리를 수행할 수 있다.

- [0035] 상기 단계 (b)는 BCO가 결합된 스트렙타비딘 자성 비드를 세포 용해물에 첨가하여 BCO에 의해 각 세포 내 mRNA가 포획되어 각 mRNA를 세포 특이적 바코드 및 UMI로 표지하는 과정이다.
- [0036] 상기 BCO가 결합된 스트렙타비딘 자성 비드는, 96웰 플레이트에 세척된 스트렙타비딘 비드를 먼저 분주하고, 상기 분주된 웰에 상기 BCO를 첨가함으로써 이루어지며 구체적인 실험과정은 해당 기술분야에서 공지된 방법에 따라 이루어질 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 BCO는 비오틴, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드, 세포 특이적 바코드, 각 mRNA의 고유 분자 식별자(unique molecular identifier; UMI) 및 폴리 T(poly T) 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 BCO의 구조는 하기와 같으며 도 1에 그림으로 도시된 바와 같다.
- [0038] 5' -/비오틴/AGTGGTATCAACGCAGAGTACJJJJJNNNNNN(T)26-3';
- [0039] 상기 비오틴(Biotin)은 스트렙타비딘에 결합하므로 스트렙타비딘 자성 비드에 BCO가 결합될 수 있도록 한다.
- [0040] 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 올리고 뉴클레오티드는 PCR 수행 시 프라이머 쌍이 결합하는 부위로 비드에 결합된 mRNA 및 BCO를 역전사하고 이를 증폭하는데 이용될 수 있다.
- [0041] 상기 'JJJJJ'는 세포 특이적 바코드로 6 bp로 이루어져 있으며, 각 세포마다 상이한 서열이 부여되는 것을 특징으로 한다.
- [0042] 상기 'NNNNNN'은 개별세포 내 각 mRNA의 고유 분자 식별자(unique molecular identifier; UMI) 서열을 의미하는 것을 특징으로 한다.
- [0043] 또한, 상기 BCO는 폴리 T(poly T) 서열을 포함하여 각 세포 내 mRNA의 폴리 A 테일과 상보적으로 결합함으로써 mRNA를 포획하며, 역전사가 시작되는 부위로 작용한다.
- [0044] 상기 스트렙타비딘 자성 비드는 10 내지 50  $\mu$ g의 농도로 처리될 수 있고, 바람직하게는 10 내지 30  $\mu$ g, 더욱 바람직하게는 10 내지 20  $\mu$ g, 가장 바람직하게는 10  $\mu$ g의 농도로 처리될 수 있으나, 이것으로 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 단계 (c)는 세포 특이적 바코드 및 UMI가 표지된 mRNA들을 하나의 튜브로 모두 모으기 위한 과정이며, 스트렙타비딘 자성 비드를 자성 스탠드 상에 고정시키고 상층액을 제거하고 완충액으로 세척하는 과정을 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 단계를 통해 샘플의 수가 96개에서 1개로 줄어들기 때문에 이전의 마이크로웰 기반의 방법과 달리 시간과 노동적 측면에서 효율성이 높아지는 장점이 있다.
- [0047] 상기 단계 (d)는 풀링되어 모인 세포 특이적 바코드 및 UMI가 표지된 mRNA들을 이용하여 단일세포 RNA 서열분석을 실시하는 단계에 관한 것이다.
- [0048] 상기 RNA 서열분석을 위해, 이러한 과정 전에 mRNA의 역전사 및 cDNA를 증폭시키는 과정을 더 포함할 수 있으며, 당업자가 해당 기술분야에서 단일세포의 전사체 분석법에 이용될 수 있는 공지된 방법을 바탕으로 하여 실시할 수 있다.
- [0049] 상기 RNA 서열분석은 차세대 염기서열 분석법을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명에 따른 단일세포 분석 방법은 상기 단일세포에 대한 RNA 서열분석 이후에 역다중화(demultiplexing)를 통해 세포 샘플 및 세포를 분류할 수 있으며, 분류된 세포 샘플 및 세포는 후속적인 다양한 단일 세포 분석 방법을 통해 조사될 수 있다.
- [0051] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해, 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법의 성능을 검증하고, 약물이 처리된 세포에서 전사체 분석을 실시하여 세포의 약물 반응 분석에 대한 적용가능성을 확인하였다.
- [0052] 본 발명의 일실시예에서는, MAPS-seq 방법의 성능을 검증하기 위해 인간 배아 신장 HEK293T 세포와 마우스 NIH/3T3 세포를 대상으로 인간/마우스 중 혼합 실험을 실시하였다. 그 결과, MAPS-seq 방법을 이용해 하나로 모아진 세포에 대하여 인간 및 마우스 종을 명확히 분리할 수 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0053] 본 발명의 다른 실시예에서는, 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법의 성능을 더욱 향상시키기 위해 조건을 최적화하

기 위한 분석을 실시하였다. 먼저 세포 당 스트렙타비딘 비드의 낭비를 줄이고 세포에 대한 정보 수집을 최대화하기 위해 초기 스트렙타비딘 비드의 양을 최적화하기 위한 분석을 실시한 결과, 효과적으로 mRNA를 포획하고 우수한 품질의 데이터를 확보하기 위해 세포 당 적어도 10 µg의 비드가 필요함을 확인하였다. 이에 더하여, 스트렙타비딘 비드가 PCR 수행 시 cDNA의 증폭을 방해할 가능성을 검증한 결과, 스트렙타비딘의 농도가 높아질수록 앰플리콘의 농도가 감소하였으나 비드의 유무에 따라 유전자 발현에 유의미한 영향을 미치지 않는 것을 확인함으로써 본 발명에서 사용되는 비드의 양이 MAPS-seq에 의한 결과에 중요한 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다(실시예 4 참조).

[0054] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, MAPS-seq을 이용하여 약물 스크리닝 분석을 실시함으로써 상기 분석법의 적용 가능성을 입증하고자 하였다. BCR-ABL를 표적하는 항-백혈병 약물(이마티닙), 다른 두 개의 비 BCR-ABL 표적화 항-종양 약물(라파마이신 및 비노렐빈) 및 DMSO가 각각 처리된 K562 백혈병 세포주를 이용하여 MAPS-seq 분석을 실시하고 각 약물이 처리된 세포주에서 차등적으로 발현되는 유전자를 분석하였으며, 나아가 종래 알려진 Drop-seq을 사용하여 분석된 K562-약물 스크리닝 데이터와 MAPS-seq을 이용해 얻어진 데이터를 비교한 결과 두 방법 사이의 강한 상관관계가 있음을 통해 본 발명에 따른 MAPS-seq이 종래 단일세포 전사체 분석법을 대체할 수 있으며, 단일세포 수준에서 전사적 변화를 통해 다중 세포 약물반응을 분석하는데 효과적으로 적용될 수 있음을 확인하였다(실시예 5 참조).

[0055] 이에 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[0056] (a) 상이한 약물이 처리된 세포를 각각의 단일세포로 분주하고 용해시키는 단계;

[0057] (b) 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고(Biotinylated cell specific barcode oligo; BCO)가 결합된 스트렙타비딘 자성 비드(Streptavidin magnetic bead)를 세포 용해물에 첨가하여 각 세포 샘플을 바코딩하는 단계; 및

[0058] (c) 바코딩된 샘플들을 하나의 튜브로 풀링(pooling)하는 단계;

[0059] (d) 상기 풀링된 세포 샘플들에 대하여 단일세포 RNA 서열분석을 실시하는 단계.

[0060] 아울러 구체적인 실시예와 함께, 본 발명자들은 본 발명에 따른 MAPS-seq이 비용적 측면에서 경제적인임을 입증하기 위하여 상기 분석을 수행하는데 사용된 구성 및 이를 준비하는데 소요되는 비용을 정리하여 하기 표 1에 나타내었으며, 본 발명에 따른 MAPS-seq을 수행하는데 세포 당 1달러(1\$) 미만의 비용이 소요되어 매우 경제적인 분석 방법임을 확인할 수 있었다.

표 1

[0061]

| Product                               | Cat#        | Supplier          | Cost for 96 cells (\$) | Cost for 384 cells (\$) |
|---------------------------------------|-------------|-------------------|------------------------|-------------------------|
| Streptavidin C1 bead                  | 65001       | Invitrogen        | 18.67                  | 74.69                   |
| Maxima H- Reverse Transcriptase       | EP0753      | Thermo Scientific | 6.48                   | 6.48                    |
| dNTP mix                              | N0447L      | NEB               | 0.25                   | 0.25                    |
| RNase inhibitor                       | Y9240L      | Enzynomatics      | 0.74                   | 0.74                    |
| Exonuclease I                         | 0293L       | NEB               | 3.68                   | 3.68                    |
| KAPA Hifi HotStart ReadyMix           | KK2602      | KAPA biosystems   | 10.94                  | 43.76                   |
| Nextera XT DNA sample preparation kit | FC-131-1024 | Illumina          | 45.83                  | 45.83                   |
| Ampure XP beads                       | A63881      | Beckman Coulter   | 1.66                   | 1.66                    |
| Total costs                           |             |                   | 88.25                  | 177.09                  |
| Costs per cell                        |             |                   | 0.92                   | 0.46                    |

[0063] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0065] [실시예]



### 실시예 1. 실험재료 및 실험방법

### 1-1. 세포 및 세포배양

실험에 사용된 모든 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB)에서 확보하여 5% CO<sub>2</sub> 및 37°C 조건하에서 배양하였다. 구체적으로, 인간 배아 신장 HEK293T 및 마우스 배아 섬유아세포 NIH/3T3는 10% FBS(Gibco, USA) 및 1% 페니실린/스트렙토 마이신(Thermo Fisher)이 보충된 DMEM(Gibco, USA) 배지를 이용해 배양하였고, 인간 만성 골수성 백혈병 K562 세포주는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute, Gibco, USA) 배지를 이용해 배양하였다.

### 1-2. 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고의 서열

본 발명자들은 비오틴화된 세포 특이적 바코드 올리고(Biotinylated Cell specific barcode Oligo; BCO)를 설계하였으며, 도 1에 상기 BCO의 구조를 도시하였다. BCO에 대한 보다 자세한 구조는 하기에 기재된 바와 같다: 5' -/비오틴/AGTGGTATCAACGCAGAGTACJJJJJNNNNNNN(T)26-3' ; 'AGTGGTATCAACGCAGAGTAC': 5' 말단상에 하나의 비오틴 분자가 결합하며, SMART PCR 프라이머가 결합하는 부위, 'JJJJJJ': 세포 특이적 바코드, 'NNNNNN': 개별 세포 내 각 mRNA의 고유 분자 식별자(unique molecular identifier; UMI), '(T) 26': mRNA의 폴리-A 테일을 포획하고 역전사가 시작되는 부위인 폴리티미딘 테일(Integrated DNA Technologies, USA).

### 1-3. MAPS-seq 과정

스트렙타비딘(Streptavidin) C1 비드(Invitrogen, USA)를 세척하고 웰 당  $10\text{ }\mu\text{g}$  ( $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )로 96웰 플레이트에 분주하였다. 다음으로, 세척된 스트렙타비딘 비드가 분주된 각 웰에 실시예 1-2에 따른 BCO를 첨가하여, BCO가 결합된 스트렙타비딘 비드를 제조하였다. 상기 과정은 제조사에 따른 방법으로 수행하였다.

4  $\mu$ L의 세포 용해 완충액(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.1 % IGEPAL CA-630)을 새로운 96 웰 플레이트의 각 웰에 첨가하고, Aria II FACS sorter(BD Biosciences, USA)를 사용하여 각 웰 당 하나의 세포를 분주하였다. 이를 위해 먼저 샘플에서 죽은 세포 또는 잔해물을 제거하기 위해 (FSC-A vs. SSC-A)를 이용하여 게이트를 설정하였고, (FSC-H vs. FSC-W) 및 (SSC-H vs. SSC-W)를 이용하여 세포가 겹쳐진 것(doublet)을 제거하였다. 이후 플레이트 상에 세포를 분주하고 완충용액에 가라앉도록 원심분리하였다.

다음으로, BCO가 접합된 스트렙타비딘 비드를 각각의 지정된 세포 웰에 첨가하고 최종 부피를 10  $\mu$ L로 조정하였다. 이어서 55°C에서 5분 동안 BCO에 의해 mRNA가 포획되도록 하고, 96웰 플레이트를 즉시 얼음 위에 1분 이상 두었다. 이후 비드를 자성 스탠드 상에 고정시키고 상층액을 제거하였으며, 비드를 2회 세척하고 차가운(ice cold) 6X SSC 완충액으로 재현탁시켰다. 96웰 플레이트의 모든 비드를 하나의 튜브로 모으고 차가운 6X SSC 완충액으로 다시 한번 세척하였다.

다음으로, 역전사효소(Reverse transcriptase; RTase) 혼합물을 하기 조성으로 제조하고 모아진(pooled) 비드에 첨가하였다(마이크로튜브 당 50  $\mu$ L): 20  $\mu$ L nuclease-free water(Invitrogen, USA), 10  $\mu$ L 20% Ficoll PM400, 10  $\mu$ L 5X Maxima RT 완충액, 5  $\mu$ L 10mM dNTP, 1.25  $\mu$ L RNase 억제제, 1.25  $\mu$ L 100  $\mu$ M 주형 전환 올리고(Template switching oligo; TSO)(5' -AAGCAGTGGTATCAACAGAGTGAACGTrGrGrG-3' ) 및 2.5  $\mu$ L Maxima H-RTase(Thermo Scientific, USA). 25°C에서 30분 동안 역전사를 수행하였으며, 이어서 반응된 비드를 TE-TW 완충액(10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA + 0.01% Tween-20)으로 2회 세척하고 10mM Tris pH 8.0으로 1회 세척하였다.

이어서 엑소 I 뉴클레아제(Exo I nuclease) 혼합물을 하기 조성으로 제조하고, 모아진 비드에 첨가하였다(마이크로튜브 당 50  $\mu$ L): 42.5  $\mu$ L의 nuclease-free water, 5  $\mu$ L 10X 엑소 I 완충액 및 2.5  $\mu$ L 엑소 I 뉴클레아제(NEB, USA). 다음으로 37°C에서 45분 동안 반응을 수행하고, 비드를 TE-TW 완충액으로 2회 및 nuclease-free water로 1회 세척하였다.

PCR 혼합물은 하기 조성으로 준비하였다: 24.6  $\mu$ L nuclease-free water로, 0.4  $\mu$ L SMART 프라이머(Integrated DNA Technologies, USA)(5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ) 및 2X KAPA HiFi Hotstart ReadyMix(Roche, Switzerland). 다음으로, 120  $\mu$ g의 비드씩 총 8개의 PCR 튜브에 분취하고, 50  $\mu$ L의 PCR 혼합물을 각 튜브에 첨가한 후 비드를 PCR 혼합물에 완전히 재현탁시켰다. PCR 증폭은 하기의 조건에 따라 수행되었다: 95°C에서 3분; 4 사이클(98°C에서 20초, 60°C에서 45초, 72°C에서 3분); 12-15 사이클(98°C에서 20초, 67°C에서 20초, 72°C에

서 3분); 72℃에서 5분. 이어서, PCR 생성물을 30  $\mu$ L의 AMPure XP 비드(Beckman Coulter, USA)로 이중 정제하였다.

[0080] 0.6ng의 cDNA를 Nextera XT DNA 라이브러리 준비 키트(Illumina, USA)로 전치 및 PCR 증폭시켰다. 이어서, 증폭된 cDNA를 정제하고 정량화하였으며, 맞춤 절차에 따라 Illumina NextSeq 500/550 상에서 서열분석을 실시하였다: "리드 1"-20 bp, "리드 2"-50 bp.

#### [0082] 1-4. K562 세포에서 약물 스크리닝 분석

[0083] K562 세포를 6웰 플레이트에 30% 컨플루언시로 분주하고 이마티닙(Imatinib), 라파마이신(Rapamycin) 및 비노렐빈(Vinorelbine) 약물을 각각 1  $\mu$ M로 처리하였다. 대조군 샘플은 약물 대신 DMSO를 동일한 농도로 처리하였다. 약물을 처리하고 48시간 후, 약물이 처리된 세포를 회수하여 본 발명에 따른 MAPS-seq 분석을 실시하였다.

#### [0085] 1-5. 단일세포 전사체 데이터 처리

[0086] 태깅 바코드 및 UMI, 트리밍, 정렬 및 주석 태그의 추가는 수정된 Drop-Seq 파이프라인(<http://mccarrollab.com/dropseq>)에 따라 수행되었다. 간략하게, 표준 Drop-seq 파이프라인에서 관독은 6-bp 세포 바코드 서열 및 7-bp UMI에 따라 "리드 1"으로 태그되도록 수정되었다. 다음으로, "리드 2"로 태그된 리드들은 실험에 따라 hg19 또는 hg19-mm10 연결 참조에 정렬시키고 개별 세포에 상응하는 6-bp 세포 바코드로 collapse시켰다. 1의 해밍 거리(Hamming distance)는 각 전사체 내 UMI 및 각 세포 내 세포 바코드를 collapse 키는데 사용되었다. 디지털 발현 매트릭스는 각 세포 바코드 내에서 UMI 서열에 의해 각 유전자에 대한 여과 및 맵핑된 리드를 collapse시킴으로써 획득되었다.

[0087] 단일세포 약물 스크리닝 실험에 대한 디지털 발현 매트릭스를 얻은 후, R 패키지, Seurat을 통해 다음 분석 단계를 수행하였다. 역다중화(demultiplexing) 후, 각각의 세포에 대하여 미토콘드리아 관독 비율 및 유전자 수에 기초하여 품질 제어하였다. 세포를 500개 이상의 많은 유전자(실험에 따라 6,000 내지 10,000 중에서 선택) 및 0.05 미만의 미토콘드리아 관독 비율로 여과하였다. 가변 유전자를 이용하여 주성분 분석(Principal Component Analysis; PCA)을 수행하였고, t-SNE(t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) [t]를 수행하여 클러스터를 시각화했다.

#### [0089] 1-6. 약물 스크리닝 데이터 분석

[0090] 1에서 4까지의 PC 구성요소를 이용하여 PCA 및 t-SNE를 수행한 후 Seurat's FindCluster function을 사용하여 해상도 1.5로 6개의 클러스터를 발견하였다. 계층적 클러스터 히트 맵을 그리기 위해 Wilcoxon rank-sum test의 p-값을 0.05로 조정하고 각 약물에 대한 발현을 확인하였으며, 3가지 약물에 의해 총 262개의 유전자가 확인되었다. 각 세포의 세포주기 단계를 결정하기 위해 세포주기 마커를 사용하여 세포주기 단계 점수를 할당하고 각 세포를 G2M, S 또는 G1 단계로 분류하였다.

[0091] MAPS-seq으로 분석된 데이터세트와 Drop-seq 분석법을 이용해 얻어진 데이터세트를 비교하기 위해 edgeR, R 패키지를 사용하여 데이터세트 간의 배치 효과를 제거하였다. 이들을 비교하기 전에 removeBatchEffect를 사용하여 두 가지 방법의 데이터 간 배치 효과를 감소시켰다. 각 약물에 대한 단일세포 데이터의 평균 발현 수준을 데이터 세트로부터 계산하고, 각 약물의 발현 수준을 로그 (CPM + 1)로 처리하였다.

#### [0093] 실시예 2. MAPS-seq 개요

[0094] 도 2에 도시된 본 발명에 따른 MAPS-seq의 프로토콜은 하기 단계에 따라 수행된다. (i) FACS를 이용하여 세포를 96 웰 플레이트에 웰 당 한 개씩 분주한다. 이어서, 각 웰에서 미리 분주된 세포 용해 완충액으로 세포를 용해시킨다. (ii) BCO를 스트렙타비딘이 코팅된 자성 비드에 부착하고, BCO가 접합된 스트렙타비딘 비드를 세포가 용해되어 있는 웰에 첨가한다. 각 웰에서 mRNA는 BCO에 의해 포획되고 세포 특이적 바코드 및 UMI로 표지된다. 이것은 스트렙타비딘 비드에 의해 각 웰에 존재하는 전사체가 포획될 수 있게 하고, 상기 전사체들은 독립적인 바코드 및 UMI를 가지며, 모든 웰을 하나의 튜브 내로 모을 수 있다. (iii) 96웰 플레이트로부터의 모든 BCO가

접합된 스트렙타비딘 비드를 모은다. 이 단계 후에 처리된 샘플의 수가 96개에서 1개로 줄어들어 이전의 마이크로 웰 기반 방법과 달리 시간과 노동적 측면에서 효율성이 높아진다. 역전사(RT)는 각각의 mRNA의 첫 번째 cDNA 가닥을 합성하고 TSO의 상보적 서열로 3'-말단을 연장시킨다. 또한, 자성을 사용하여 비드를 고정시켜 세척 공정을 용이하게 하여 RT 후에 남아있는 결합되지 않은 mRNA 및 올리고 또는 원하지 않는 잔류 시약을 제거할 수 있다. (iv) 주형 전환 반응은 3'-말단에 도입된 TSO 서열과 RT 동안 5'-말단에 도입된 BCO 서열 사이의 일치를 이용하여 단일 프라이머를 사용하여 PCR 공정으로 진행한다. PCR 공정으로 인해 소량의 mRNA를 사용하여 충분한 cDNA 샘플을 얻을 수 있다. (v) PCR 증폭 후, cDNA 라이브러리를 트랜스포존 5(Tn5) 트랜스포사제로 전치시키고, 대량 병렬 시퀀싱을 위해 최종 PCR 증폭시킨다. 이때 Tn5 효소를 이용해 cDNA를 절단하고 특정 서열을 전치하여 NGS 라이브러리를 쉽게 만들 수 있다. (vi) 앰플리콘에 대하여 NGS를 통해 서열분석하고 mRNA의 3'-말단 서열이 생성된다. 이들 서열은 각 세포 특이적 유전자 발현 번호를 포함하는 디지털 유전자 발현(digital gene expression; DGE) 매트릭스로 변형된다. 그런 다음 상기 매트릭스를 사용하여 추가 분석을 수행한다.

### [0096] 실시예 3. MAPS-seq의 검증

[0097] 본 발명에 따른 MAPS-seq의 성능을 평가하기 위해 인간/마우스 종 혼합 실험을 수행하고자 하였다. 이를 위해, 96개의 인간 배아 신장 HEK293T 세포와 96개의 마우스 NIH/3T3 세포를 이용해 MAPS-seq을 수행하였다. 또한, 세포가 FACS에 의해 각각의 웰에 올바르게 분주되었는지 또는 BCO에 의해 포획되었는지를 확인하기 위해, 세포를 첨가하지 않은 32개의 음성 대조군 웰을 추가하였다. cDNA 라이브러리의 NGS 후, 음성을 제외한 192 세포의 바코드 당 평균  $6.0 \times 10^4$  판독 값을 얻었다. 본 발명자들은 각 세포 특이적 바코드에 유전자와 UMI 수 필터를 적용하였고, 도 3a에 나타난 바와 같이 192개의 분류된 세포 중 179개가 최종적으로 얻어졌다. 96개 HEK293T 세포 중 95개와 96개 NIH/3T3 세포 중 84개가 각각의 지정된 종으로 명확하게 분리되었음을 관찰하였다. 또한 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이 이러한 세포들 중에서 162개의 세포가 95% 이상의 종 특이도(Specificity)를 나타냈다.

[0098] 결과적으로 도 3c에 나타난 바와 같이 각 세포 당 평균  $2.4 \times 10^4$  개 전사체 및 6,236개의 유전자를 얻었다. 필터링된 바코드( $500 < \text{유전자 수} < 10,000$ ,  $5,000 < \text{UMI 수}$ )의 경우, 모든 음성 바코드와 13개 세포 바코드가 제거되었다. 이들 여과된 바코드 중, 음성 바코드는 평균 891개의 유전자 및  $1.1 \times 10^3$  개 전사체를 기록하였고, 세포 바코드는 2204 개의 유전자 및  $7.5 \times 10^3$  개 전사체를 나타냈다. 비정상적으로, 다른 바코드와 비교하여 비교적 많은 수의 전사체를 갖는 하나의 바코드가 포함되었으며, 이는 이중 세포의 단일 바코드에 할당된 것으로 가정하였다. 따라서 이 세포 바코드를 제거하면, 음성 바코드와 유사한 수준인 평균 1136개의 유전자 및  $1.7 \times 10^3$  전사체를 나타내었다.

[0099] 다음으로, 224개 세포 MAPS-seq 전사체 데이터에 대하여 PCA 및 t-SNE를 수행 하였다. 결과적으로, 도 3d의 중간 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 각 종 또는 음성 대조군에 따라 3개의 클러스터가 뚜렷하게 형성되었다. 흥미롭게도, 유전자 수 필터링 후, 도 3d의 오른쪽 결과와 같이 제거된 세포 바코드의 대부분이 음성 대조군 클러스터에 포함되는 것으로 나타났다. 제거된 이들 13개의 세포 바코드는 FACS 오류로 인해, 각각의 웰에서 mRNA를 포획할 수 없고 RT 단계 동안 다른 세포로부터 mRNA를 수득할 수 있음을 나타낸다. 그리고 유전자 번호 필터를 이용하여 사전에 발생할 수 있는 오류를 제거할 수 있음을 보여주었다.

[0100] 전반적으로, 본 발명자들은 MAPS-seq가 기본적으로 하나로 모아진 세포에 대하여 각 종에 따라 명확히 분리할 수 있음을 입증하였다. 또한, FACS 오류로 인한 세포 데이터가 유전자 수 컷으로 쉽게 제거될 수 있으며, 이는 전체 데이터 품질이 방해되는 것을 방지할 수 있다.

### [0102] 실시예 4. MAPS-seq의 최적화

[0103] 본 발명자들은 MAPS-seq 방법의 성능을 향상시키기 위해 다양한 실험 조건에서 분석법을 최적화하고자 하였다. 최적화 연구를 위해, 본 발명자들은 각 조건에 대하여 8개의 HEK293T 세포 및 8개의 NIH/3T3 세포를 사용하였다. 먼저 세포 당 스트렙타비딘의 초기 양을 최적화하여 비드의 낭비를 줄이면서 세포 정보의 수집을 최대화하고자 하였다. 이를 위해, 세포 당 4가지 다른 양의 스트렙타비딘 비드(5, 10, 20, 25  $\mu\text{g}$ )를 테스트하여

세포 당 평균  $5.8 \times 10^4$  판독 값을 얻었다. 구체적으로, 도 4a에 나타낸 바와 같이 세포 당 10, 20 및 25  $\mu\text{g}$ 의 스트렙타비딘 비드를 사용할 때, 세포 당 전사체의 수가 유사하게 나타난 반면에(평균  $9.1 \times 10^3$  (5ug),  $2.3 \times 10^4$  (10ug),  $2.7 \times 10^4$  (20ug),  $2.4 \times 10^4$  (25ug), 5  $\mu\text{g}$ 의 스트렙타비딘 비드를 사용하는 경우에는 전사체의 수가 심각하게 감소하였으며, 세포 당 유전자 수에서도 유사한 경향이 관찰되었다. 이를 통해 10ug의 스트렙타비딘 비드를 사용할 때 얻어진 데이터가 포화된 것임을 확인할 수 있었다. 더 나아가, 본 발명자들은 상기 스트렙타비딘 비드 양에 따른 각 조건에서 중 특이성을 조사하였다. 그 결과, 도 4b에 나타낸 바와 같이 세포 당 5ug 조건의 경우 심하게 비 정상화된 세포가 2개 관찰되었으며, 같은 조건의 다른 세포들은 다른 3 가지 조건(10, 20, 25  $\mu\text{g}$ )과 비교할 때 특이성이 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 이와는 대조적으로, 세포 당 10ug 이상을 스트렙타비딘 비드를 사용하는 경우, 25ug 조건에서 하나의 수차로 특이성 값이 균일하였다. 결과적으로, mRNA를 효과적으로 포획하기 위해 적어도 10  $\mu\text{g}$ 의 스트렙타비딘 비드가 필요함을 알 수 있었다. 10  $\mu\text{g}$  이상의 스트렙타비딘 비드를 이용한 샘플을 비교할 때, 스트렙타비딘 비드의 양이 증가함에 따라 데이터 품질이 유의미하게 향상되는 경향은 나타나지 않았다. 따라서 본 실시예의 모든 후속 실험에 대해 세포 당 10  $\mu\text{g}$ 의 스트렙타비딘 비드를 사용하기로 결정하였다.

[0104]

다음으로, 본 발명자들은 하나의 PCR 반응 혼합물에서 상대적으로 과도한 양의 스트렙타비딘 비드가 PCR 증폭을 방해할 수 있는 가능성이 있기 때문에, 50  $\mu\text{l}$ 의 PCR 반응 믹스 당 cDNA가 효율적으로 증폭되는 스트렙타비딘 비드의 양을 조사하였다. 최적의 양을 찾기 위해, 각 50ul PCR 혼합물에서 동일한 양의 주형과 다른 양의 비드를 이용해 실험하였다. 비드가 없는 상태에서 증폭을 확인하기 위해, 대조군은 비드 없이 동일한 조건에서 PCR을 수행하였다. PCR 증폭 후, 각 조건의 앰플리콘을 개별적으로 정량화한 다음 유전자와 전사체 정보를 각 조건과 비교하였다. 그 결과 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 예상한바대로 PCR 반응 동안 비드가 없을 때 앰플리콘의 농도는 높게 나타났으며(control: > 50 ng/ul), 스트렙타비딘 비드의 양이 점차 증가함에 따라 앰플리콘의 농도가 감소하였고, PCR 혼합물 당 스트렙타비딘 비드 양이 200 ug 일 때 앰플리콘 농도는 2.5ng/ul까지 감소하였다.

표 2

[0105]

| Bead amount per PCR Mix. | Control (0 ug) | 80 ug | 100 ug | 120 ug | 140 ug | 160 ug | 180 ug | 200 ug |
|--------------------------|----------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Conc. (ng/ul)            | > 50           | 23.1  | 10.9   | 5.79   | 4.4    | 3.82   | 3.01   | 2.5    |

[0107]

상기 결과를 통해 PCR 튜브 당 스트렙타비딘 비드의 양이 증가함에 따라, 앰플리콘의 총량은 감소하며, 스트렙타비딘 비드의 존재가 PCR 반응을 억제하는 것을 알 수 있었다. 그러나 도 4c에서 볼 수 있는 바와 같이 비드가 없는 상태와 비드가 있는 상태간에 유전자 발현의 상관관계를 비교할 때, 전사체 데이터에 대한 피어슨 상관 계수 R은 모든 조건에서 0.95 보다 더 높게 나타났다. 또한, 도 4d에 나타낸 바와 같이 비드가 존재하는 경우, 비드가 존재하는 모든 조건에서 유사하게 평균  $2.3 \times 10^4$  유전자 및 전사체의 평균  $9.6 \times 10^5$  전사체를 얻었다. 요약하면, 본 발명자들의 조사 범위 내에서, PCR 믹스 당 스트렙타비딘의 양은 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법의 결과에 미치는 영향이 적다는 것을 확인할 수 있었다.

[0109]

#### 실시예 5. MAPS-seq을 이용한 약물이 처리된 세포의 분석

[0110]

약물에 대한 세포의 전사체 반응은 약물의 작용을 밝혀내는 강력한 증거가 될 수 있다. 본 발명자들은 본 발명에 따른 MAPS-seq의 넓은 적용성을 입증하기 위해, MAPS-seq이 단일세포 약물 스크리닝 분석에 적용될 수 있는지 여부를 검증하고자 하였다. 본 실험에서, BCR-ABL 융합 유전자를 갖는 K562 백혈병 세포주에 BCR-ABL를 표적하는 항-백혈병 약물(이마티닙), 다른 두 개의 비 BCR-ABL 표적화 항-종양 약물(라파마이신 및 비노렐빈) 및 DMSO를 각각 처리하였다. 이전 연구에서, 본 발명자들은 발현에서 현저한 변화를 야기한 약물을 확인하였고 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법을 적용해보고자 하였다.

[0111]

이를 위해, 각 약물을 처리한 48개 세포 및 DMSO를 처리한 144개 세포를 이용해 MAPS-seq를 수행하였다. 유전자



수 데이터 및 미토콘드리아 유전자 퍼센트 비율로 데이터를 여과한 후, 분류된 세포의 82%인 총 237개의 세포를 얻었다. 이후 상기 237개 세포 데이터를 이용하여 PCA 및 t-SNE 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이 이마티닙 또는 비노렐빈으로 처리된 K562 세포는 개별적으로 클러스터를 형성하는 반면, 라파마이신 및 DMSO 처리된 세포는 하나의 클러스터로 구별되어 나타나지 않았다. 동시에, G1 단계는 이마티닙이 처리된 세포에서 지배적으로 나타났으며, 이마티닙은 세포 외 신호 조절 키나아제의 불활성화 및 AKT 신호전달 경로의 차단을 통해 세포 증식을 억제하고 G0/G1기에서 세포주기 정지를 유도하는 것으로 알려져 있는 것에 상응하는 결과이다. 나아가 도 5b에 나타난 바와 같이 각각의 약물 처리 조건 간에 차등적으로 발현된 유전자가 관찰되었다.

[0112] 다음으로, DMSO 처리 세포와 비교하여 각 약물 조건에 대해 차등적으로 발현된 유전자를 면밀히 조사하였다. 본 페로니(bonferroni) 보정에 따라 조정된 p-값인 FDR(False Discovery Rate)을 사용하여 중요한 유전자들을 발견하였다. 그 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이 이마티닙이 처리된 세포에서, 18개의 유전자가 상향 조절되고 92개의 유전자가 하향 조절되는 것으로 나타났다( $FDR < 10^{-0.05}$ ). 특히, 가장 유의하게 상향 조절된 유전자는 *HBA*, *HBG* 및 *HBZ*와 같은 헤모글로빈 관련 유전자였으며, *ENO1*, *SLC25A5* 및 *HSPD1*은 하향 조절되었다. 또한, 도 5d에 나타난 바와 같이 mTOR(mammalian target of rapamycin) 키나아제의 억제제인 라파마이신은 리보솜 단백질을 암호화하는 *RPL* 및 *RPS* 유전자의 발현을 증가시키고 mTOR 신호전달 경로에 관여하는 *DDIT4* 유전자의 발현을 억제시켰다( $FDR < 10^{-0.05}$ ). 비노렐빈은 튜블린과의 상호 작용을 통해 유사 분열을 억제함으로써 항종양 효과를 나타내는 작용기전에 따라, *TUBA*, *TUBB* 및 *BEX4*와 같은 튜블린 관련 유전자들이 하향 조절되는 것을 확인하였다.

[0113] 나아가 본 발명에 따른 단일세포-약물 스크리닝 분석에 대한 MAPS-seq의 성능을 평가하기 위해, 종래 알려진 Drop-seq을 이용하여 이전 연구에서 분석된 K562-약물 스크리닝 데이터와 MAPS-seq을 이용해 얻어진 데이터를 비교하였다. 본 실시예에서는 Drop-seq을 이용하여 이마티닙, 라파마이신 및 비노렐빈을 포함하는 여러 약물을 처리한 K562 세포를 분석하였다. 상기 두 가지 방법으로 분석하여 도출된 유전자 발현 데이터를 비교한 결과, 도 5e에서 볼 수 있는 바와 같이 두 방법 사이의 강한 상관관계가 있는 것으로 나타났다(모든 3 가지 약물 조건에 대해  $R^2 > 0.9$  결정 계수). 이러한 결과는 본 발명에 따른 MAPS-seq 방법이 종래 다른 단일세포 전사체 분석 방법들을 대체할 수 있음을 시사하는 것이다.

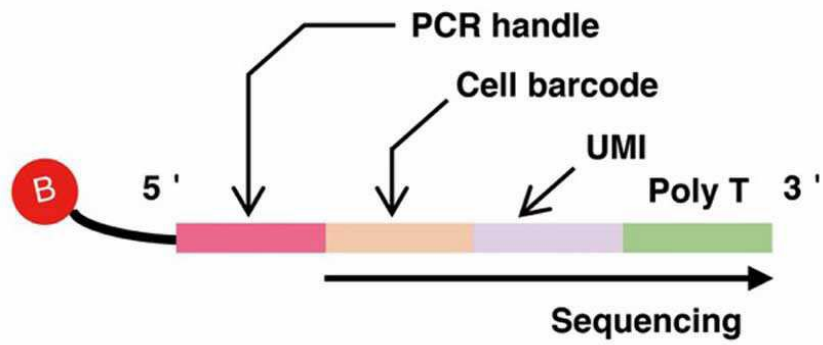
[0114] 종합적으로, 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 방법으로 각각의 약물이 처리된 세포의 전사적 변화를 단일세포 수준에서 분석할 수 있고, 각각의 약물에 대하여 세포의 반응을 나타내는 마커 유전자를 확인할 수 있음을 알 수 있었다.

[0116] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

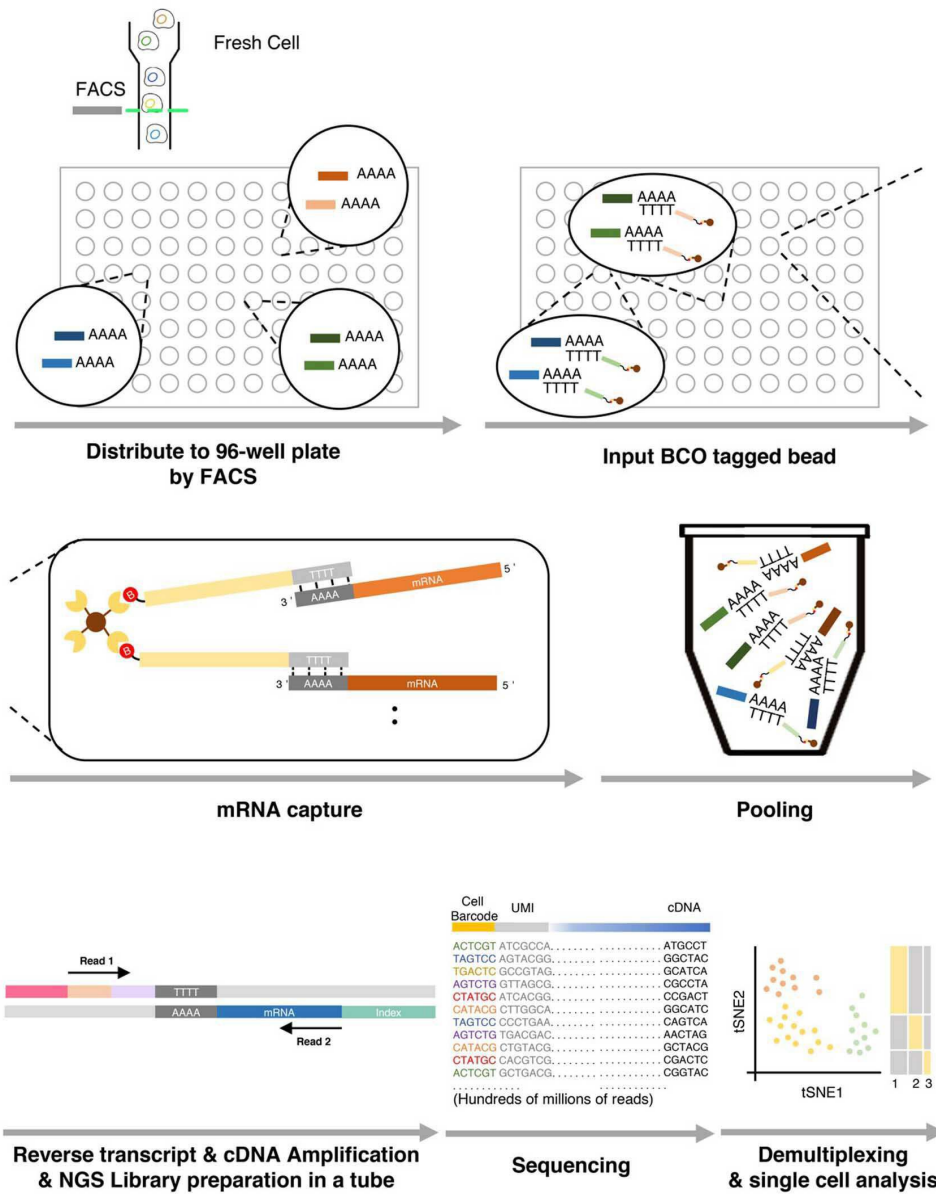
도면1

## Biotinylated cell specific barcode oligo (BCO)

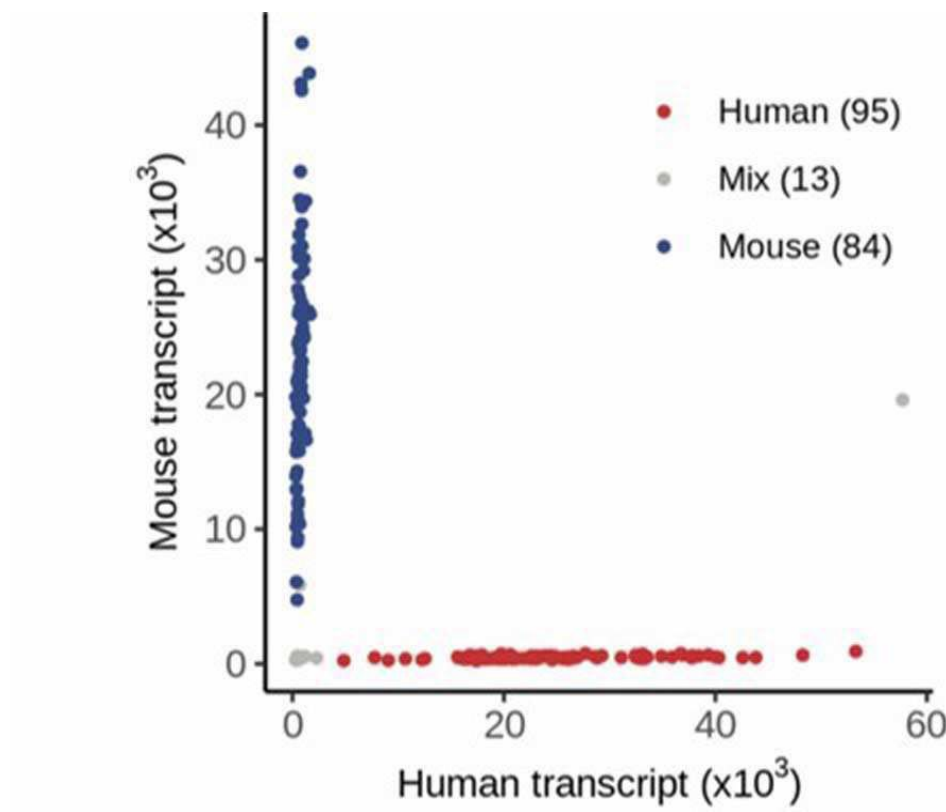




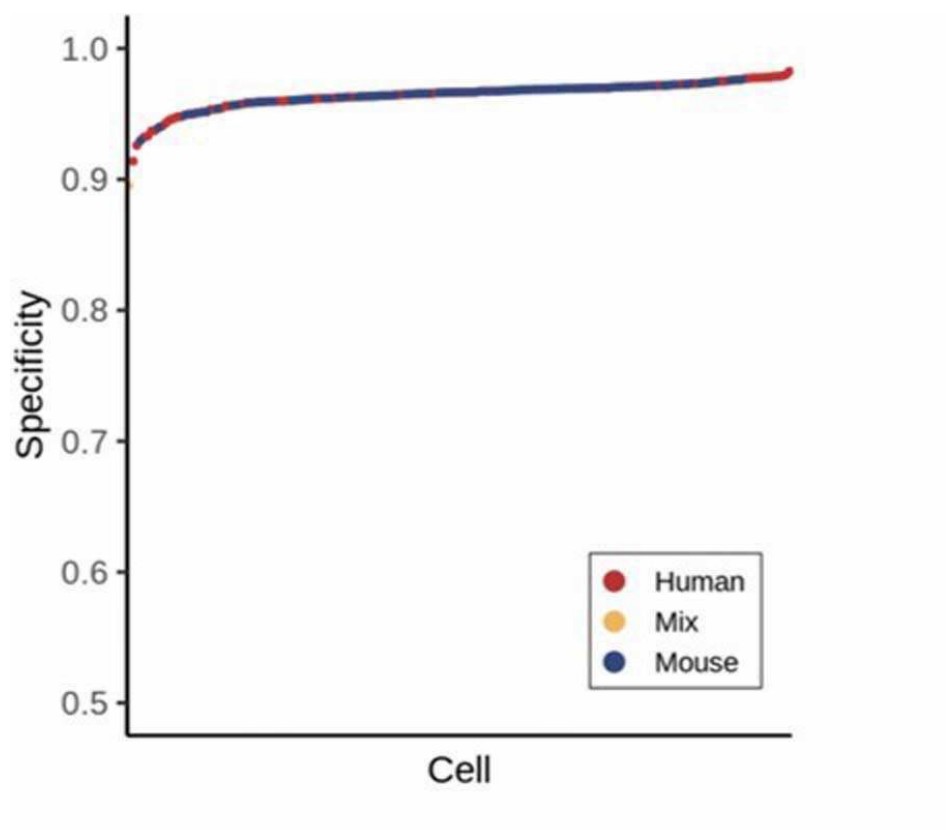
도면2



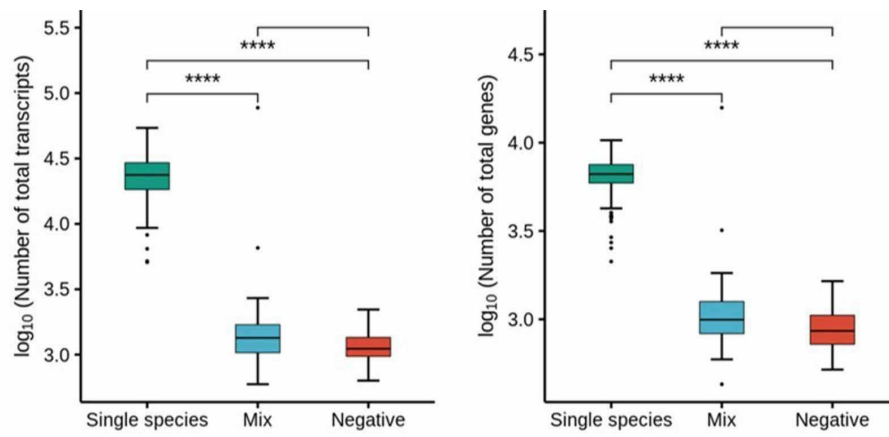
도면3a



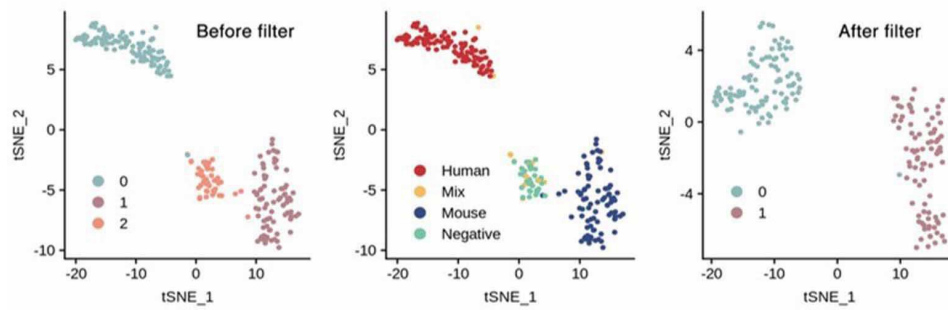
도면3b



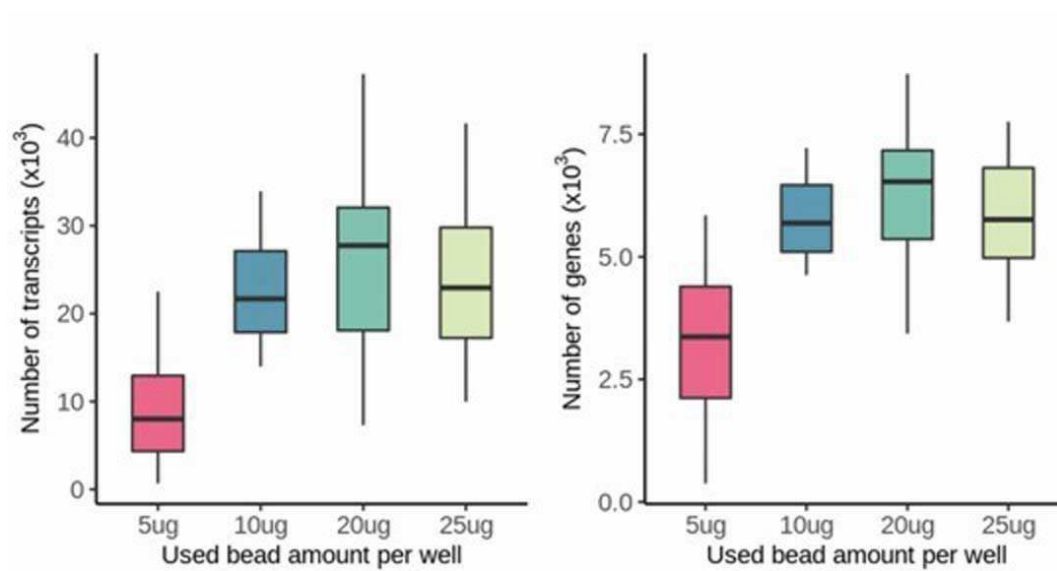
도면3c



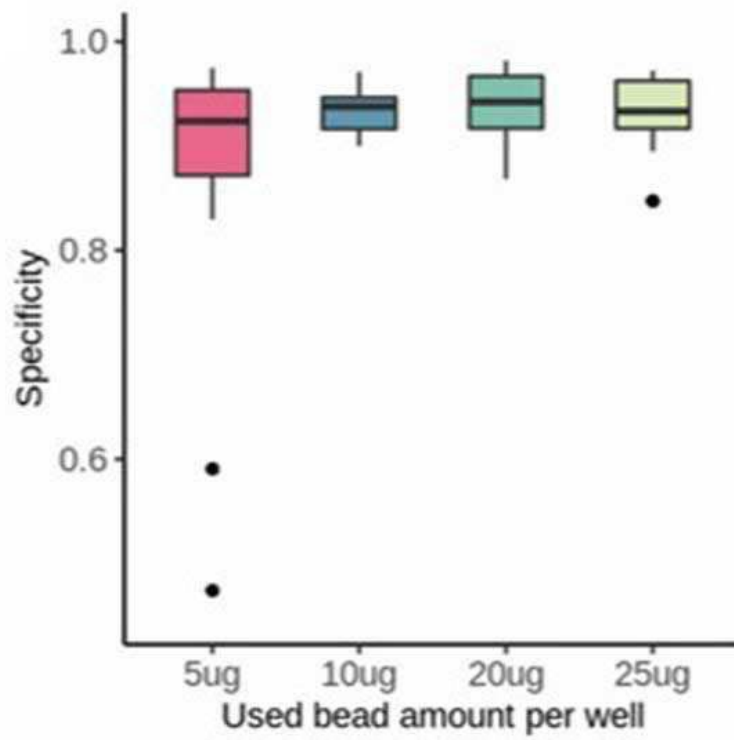
도면3d



도면4a



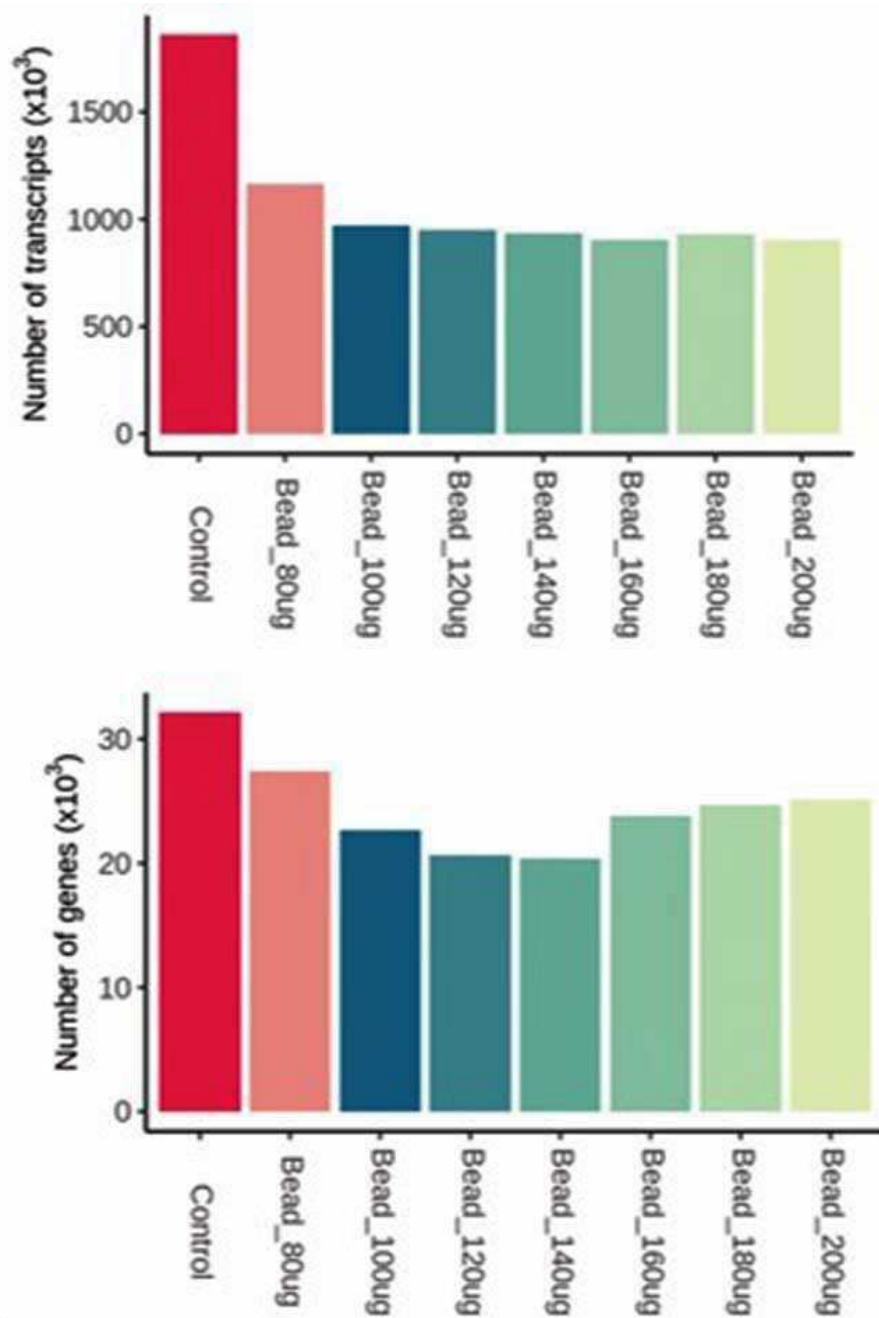
도면4b



도면4c

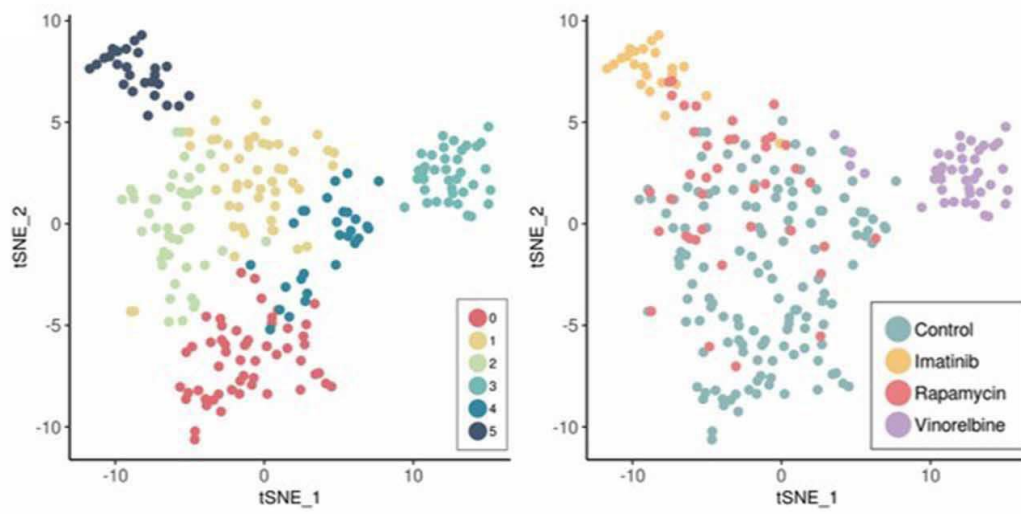


도면4d

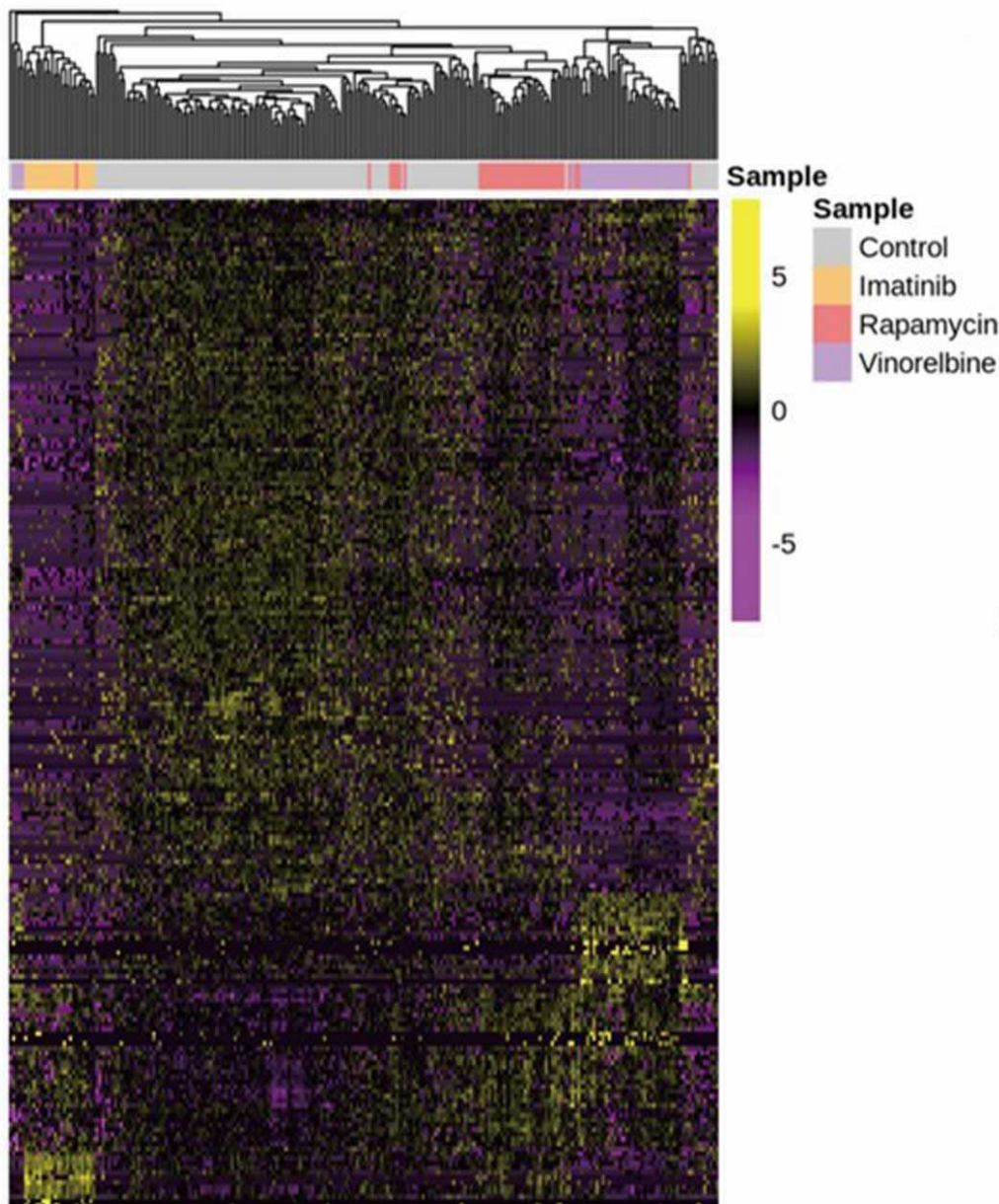




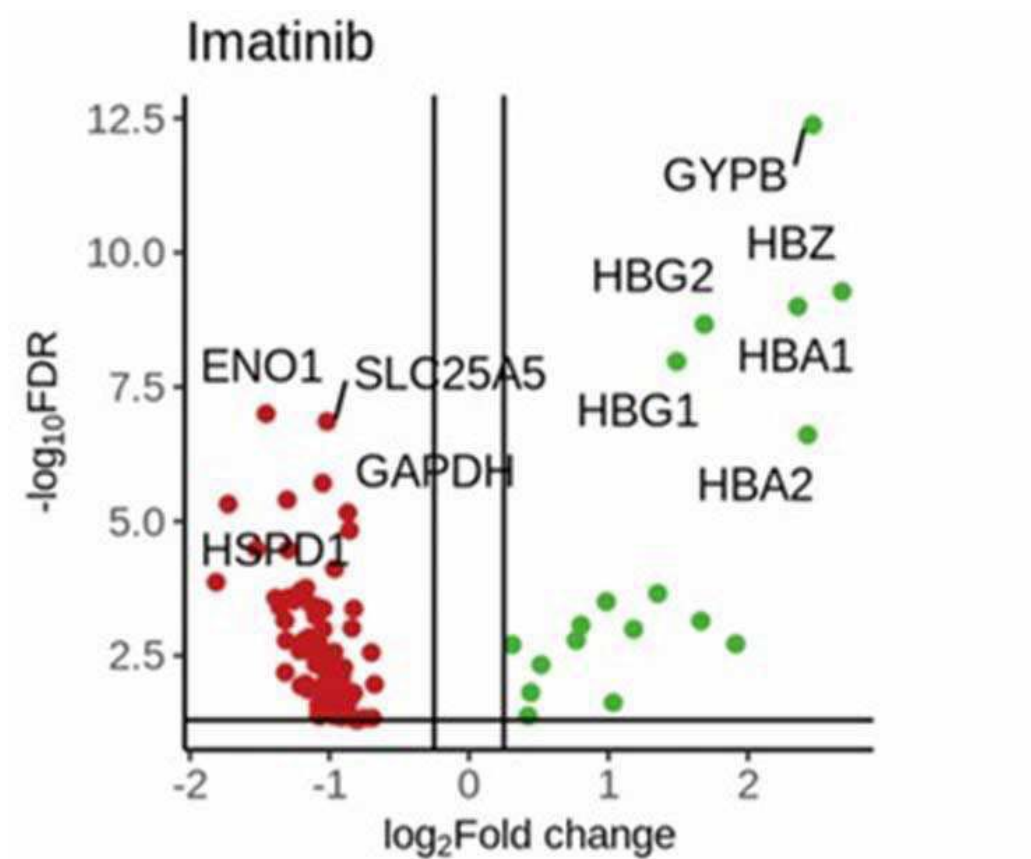
도면5a



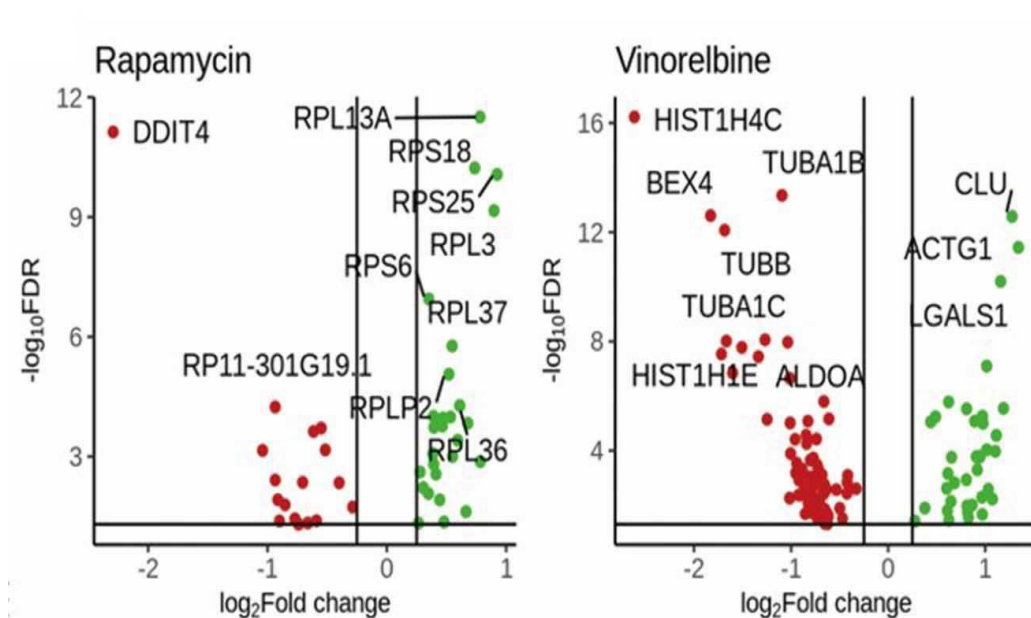
도면5b



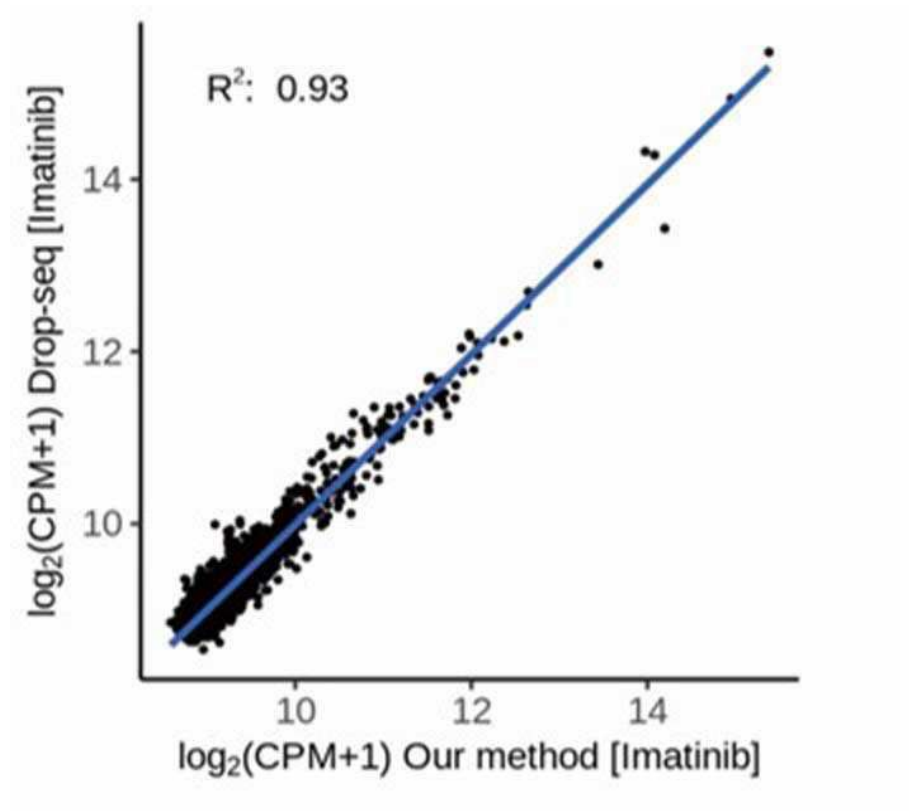
도면5c



도면5d



도면5e



## 서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Method for single cell analysis via magnetic beads

<130> PD19-303

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BCO\_oligonucleotide

<400> 1

agtggatatca acgcagagta c

21