(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0025672
(43) 공개일자 2024년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6841 (2018.01) *C12Q 1/6804* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6841 (2018.05)
C12Q 1/6804 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2024-7003127
(22) 출원일자(국제) 2022년06월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년01월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/035271
(87) 국제공개번호 WO 2023/278409
국제공개일자 2023년01월05일
(30) 우선권주장
63/216,315 2021년06월29일 미국(US)

(71) 출원인
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사 추세츠주 캠브리지 메인 스트리트 415
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
왕, 샤오
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
쩡, 후
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
런, 징이
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
(74) 대리인
양영준, 김영

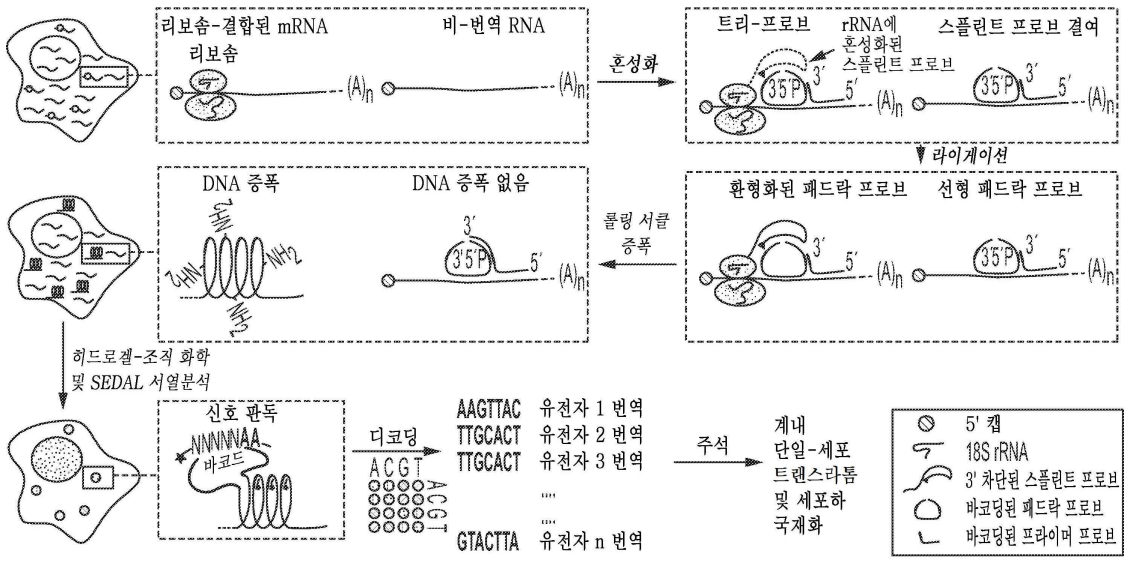
전체 청구항 수 : 총 211 항

(54) 발명의 명칭 **RNA 번역 상태의 단일-세포 프로파일링**

(57) 요 약

본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하기 위한 방법 및 시스템을 제공한다. 또한, 무손상 조직 내의 세포를 포함하여, 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일에 기초하여 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법이 본 개시내용에 의해 제공된다. 1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 후보 작용제를 스크리닝하거나 시험하는 방법이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용할 수 있는, 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 프로브 쌍 및 프로브 세트가 또한 본 개시내용에 의해 기재된다. 추가적으로, 본 개시내용은 본원에 기재된 프로브 중 임의의 것을 포함하는 키트를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2533/107 (2019.08)
C12Q 2563/179 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법으로서,

a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 항체가 2차 항체인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 리보솜을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 결합될 수 있는 1차 항체와 세포를 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 1차 항체가 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 리보솜 내의 rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오

티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 약 25개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 중합 블로커가 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제3 프로브의 부분에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-3'.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 폴리-A 뉴클레오티드 링커에 의해 연결되는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커가 20-80, 30-70 또는 40-60개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커가 약 50개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 번역되는 RNA가 다중 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 번역되는 RNA가 100개 초과의 세포, 200개 초과의 세포, 300개 초과의 세포, 400개 초과의 세포, 500개 초과의 세포, 1000개 초과의 세포, 10,000개 초과의 세포, 20,000개 초과의 세포, 30,000개 초과의 세포, 40,000개 초과의 세포 또는 50,000개 초과의 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 세포가 복수의 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 세포 유형이 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포, 간 세포, 평활근 및 골격근 세포, 조혈 세포, 림프구, 단핵구, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 및 뉴런으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 무손상 조직 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 무손상 조직이 고정된 조직 샘플인 방법.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, 조직이 뇌 조직인 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 3000개의 RNA, 4000개 초과의 RNA, 또는 5000개 초과의 RNA의 번역이 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 유전자 특이적 서열인 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 서열분석 단계가 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석 (SEDAL)을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, SEDAL이 2, 3, 4, 5회 또는 5회 초과로 수행되는 것인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스가 히드로겔인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 히드로겔이 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 소듐 폴리아크릴레이트 히드로겔, 아크릴레이트 중합체 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 롤링 서클 증폭을 수행하는 단계가 아민-변형된 뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 아민-변형된 뉴클레오티드는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계가 1개 이상의 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오티드를 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 추가의 분자가 비-번역 RNA, 다른 세포하 위치의 RNA, 단백질, 지질 또는 소분자인 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 세포들의 RNA 번역 프로파일을 다양한 세포 유형의 세포의 RNA 번역 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써, 프로파일링된 세포의 세포 유형, 또는 다중 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 또는 세포들의 RNA 번역 프로파일을 다양한 세포 상태의 세포의 RNA 번역 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써, 프로파일링된 세포의 세포 상태, 또는 다중 프로파일링된 세포의 세포 상태를 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 세포에서 1개 이상의 유전자를 과다발현시키거나 또는 녹아웃시켜 1개 이상의 유전자가 관심 RNA의 번역을 조절하는 데 수반되는지 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 세포하 구조, 세포 형태, 및/또는 조직 구성의 공간 정보를 방해하지 않는 방법.

청구항 58

세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법으로서,

a) 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 항체가 2차 항체인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 리보솜을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 세포를 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 1차 항체가 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체인 방법.

청구항 64

제58항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 리보솜 내의 리보솜 RNA (rRNA)의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 약 25개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 68

제58항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 69

제58항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 70

제58항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'.

청구항 71

제58항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'.

청구항 72

제58항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 유전자 특이적 서열인 방법.

청구항 73

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 단계

를 포함하며, 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 RNA 번역 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 74

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

를 포함하며, 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 RNA 번역 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서 번역되는 RNA가 대조군 실험으로서 대상체로부터 채취한 세포와 함께 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 76

제73항 또는 제74항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일이 참조 데이터를 구성하는 것인 방법.

청구항 77

제73항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 78

제73항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 조직에 존재하는 것인 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, 조직이 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직인 방법.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 조직이 뇌 조직인 방법.

청구항 81

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 조직이 대상체로부터 채취한 조직 샘플인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 대상체가 비-인간 실험 동물인 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, 비-인간 실험 동물이 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류인 방법.

청구항 84

제81항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 85

1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

a) 후보 작용제로 처리 중이거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 단계

를 포함하며, 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 번역되는 RNA의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 1개 이상의 RNA의 번역을 조정한다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 86

1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

a) 후보 작용제로 처리 중이거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포 내의 리보솜에 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

를 포함하며, 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 번역되는 RNA의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 1개 이상의 RNA의 번역을 조정한다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서, 후보 작용제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 88

제85항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 후보 작용제가 공지된 약물 또는 FDA-승인된 약물인 방법.

청구항 89

제87항 또는 제88항에 있어서, 단백질이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편인 방법.

청구항 90

제87항 또는 제88항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)인 방법.

청구항 91

제85항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 번역을 조정하는 것이 질환 또는 장애의 증상을 감소, 완화 또는 제거하는 것과 연관된 것인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 93

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 리보솜에 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 단계; 및

f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 94

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포 내의 리보솜에 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및

f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 1개 이상의 RNA의 번역이 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 96

제93항 또는 제94항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 1개 이상의 RNA의 번역 프로파일이 참조 데이터를 구성하는 것인 방법.

청구항 97

제93항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료제, 수술 또는 방사선 요법을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제93항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 99

제93항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제가 공지된 약물 또는 FDA-승인된 약물인 방법.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 단백질이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편인 방법.

청구항 101

제98항 또는 제99항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)인 방법.

청구항 102

제93항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 103

제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 프로브 쌍으로서, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 104

제103항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 105

제103항 또는 제104항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 106

제105항에 있어서, 항체가 2차 항체인 프로브 쌍.

청구항 107

제106항에 있어서, 2차 항체가 리보솜을 인식하고 그에 결합하는 1차 항체에 결합하는 것인 프로브 쌍.

청구항 108

제107항에 있어서, 1차 항체가 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체인 프로브 쌍.

청구항 109

제103항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 리보솜 내의 rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 110

제109항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 111

제109항 또는 제110항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 프로브 쌍.

청구항 112

제109항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 약 25개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 쌍.

청구항 113

제103항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 쌍.

청구항 114

제103항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 쌍.

청구항 115

제103항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 프로브 쌍:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'.

청구항 116

제103항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 프로브 쌍:

5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'.

청구항 117

제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 프로브 세트로서, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 프로브 세트.

청구항 118

제117항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 119

제117항 또는 제118항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 120

제119항에 있어서, 항체가 2차 항체인 프로브 세트.

청구항 121

제120항에 있어서, 2차 항체가 리보솜을 인식하고 그에 결합하는 1차 항체에 결합하는 것인 프로브 세트.

청구항 122

제121항에 있어서, 1차 항체가 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체인 프로브 세트.

청구항 123

제117항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 리보솜 내의 rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 124

제123항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 125

제123항 또는 제124항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 126

제123항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 약 25개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 127

제117항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 128

제127항에 있어서, 중합 블로커가 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 프로브 세트.

청구항 129

제127항 또는 제128항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 130

제129항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 프로브 세트.

청구항 131

제117항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 132

제117항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 133

제117항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 프로브 세트.

청구항 134

제117항 또는 제133항에 있어서, 제1 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 프로브 세트:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제3 프로브의 부분에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-3'.

청구항 135

제117항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 136

제117항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 137

제117항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 프로브 세트.

청구항 138

제117항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 139

제117항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 140

제117항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 141

제117항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 142

제117항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 프로브 세트:

5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'.

청구항 143

제117항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 144

제117항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 145

제117항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 폴리-A 뉴클레오티드 링커에 의해 연결되는 것인 프로브 세트.

청구항 146

제145항에 있어서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커가 20-80, 30-70 또는 40-60개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 147

제145항 또는 제146항에 있어서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커가 약 50개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 148

제117항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 프로브 세트:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'.

청구항 149

제117항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 150

제117항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 151

제117항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 152

제117항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 프로브 세트.

청구항 153

제103항 내지 제116항 중 어느 한 항의 다중 프로브 쌍 또는 제117항 내지 제152항 중 어느 한 항의 다중 프로브 세트를 포함하며, 여기서 각각의 프로브 쌍 또는 프로브 세트는 상이한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 복수의 프로브.

청구항 154

제103항 내지 제116항 중 어느 한 항의 프로브 쌍 또는 제117항 내지 제152항 중 어느 한 항의 프로브 세트를 포함하는 키트.

청구항 155

제154항에 있어서, 제103항 내지 제116항 중 어느 한 항의 다중 프로브 쌍 또는 제117항 내지 제152항 중 어느 한 항의 다중 프로브 세트를 포함하며, 여기서 각각의 프로브 쌍 또는 프로브 세트는 상이한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 키트.

청구항 156

제154항 또는 제155항에 있어서, 세포를 추가로 포함하는 키트.

청구항 157

제154항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 효소를 추가로 포함하는 키트.

청구항 158

제157항에 있어서, 1종 이상의 효소가 리가제를 포함하는 것인 키트.

청구항 159

제157항 또는 제158항에 있어서, 1종 이상의 효소가 폴리머라제를 포함하는 것인 키트.

청구항 160

제154항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 아민-변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함하는 키트.

청구항 161

제154항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스를 제조하기 위한 시약 및 단량체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 162

세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하기 위한 시스템으로서,

a) 세포;

b) 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 쌍, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함함;

c) 현미경; 및

d) 컴퓨터

를 포함하는 시스템.

청구항 163

제162항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 시스템.

청구항 164

제162항 또는 제163항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함하는 것인 시스템.

청구항 165

제164항에 있어서, 항체가 2차 항체인 시스템.

청구항 166

제165항에 있어서, 2차 항체가 리보솜을 인식하고 그에 결합하는 1차 항체에 결합하는 것인 시스템.

청구항 167

제166항에 있어서, 1차 항체가 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체인 시스템.

청구항 168

제162항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 리보솜 내의 rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 시스템.

청구항 169

제168항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 시스템.

청구항 170

제168항 또는 제169항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 171

제168항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 약 25개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 172

제162항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 173

제162항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 174

제162항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 시스템:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'.

청구항 175

제162항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 시스템:

5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'.

청구항 176

세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하기 위한 시스템으로서,

a) 세포;

b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적임;

c) 현미경; 및

d) 컴퓨터

를 포함하는 시스템.

청구항 177

제176항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 시스템.

청구항 178

제176항 또는 제177항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체 또는 단편을

포함하는 것인 시스템.

청구항 179

제178항에 있어서, 항체가 2차 항체인 시스템.

청구항 180

제179항에 있어서, 2차 항체가 리보솜을 인식하고 그에 결합하는 1차 항체에 결합하는 것인 시스템.

청구항 181

제180항에 있어서, 1차 항체가 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체인 시스템.

청구항 182

제176항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 리보솜 내의 rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 시스템.

청구항 183

제182항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 시스템.

청구항 184

제182항 또는 제183항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 185

제176항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 약 25개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 186

제176항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 187

제186항에 있어서, 중합 블로커가 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 시스템.

청구항 188

제186항 또는 제187항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 시스템.

청구항 189

제188항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 시스템.

청구항 190

제176항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 191

제176항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 192

제176항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 시스템.

청구항 193

제176항 내지 제192항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 시스템:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제3 프로브의 부분에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-3'.

청구항 194

제176항 내지 제193항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 195

제176항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 196

제176항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 시스템.

청구항 197

제176항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 198

제176항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 199

제176항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 200

제176항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 201

제176항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 시스템:

5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'.

청구항 202

제176항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 203

제176항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 204

제176항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 폴리-A 뉴클레오티드 링커에 의해 연결되는 것인 시스템.

청구항 205

제204항에 있어서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커가 20-80, 30-70 또는 40-60개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 206

제204항 또는 제205항에 있어서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커가 약 50개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 207

제176항 내지 제206항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 시스템:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'.

청구항 208

제176항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 209

제176항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 210

제176항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

청구항 211

제176항 내지 제210항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C § 119(e) 하에 2021년 6월 29일에 출원된 미국 가출원, U.S.S.N. 63/216,315에 대한 우선권을 주장하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 단일 세포에서의 전사 프로파일은 동일한 세포로부터의 프로테옴 프로파일과 일관되게 상관되지 않는다. 이는 아직 특징화되지 않은 일부를 포함하여, 단백질 생산 및 분해를 조절하기 위한 다양한 메카니즘이 전사후 수준에서 존재한다는 것을 시사한다. 따라서, mRNA 수준은 단백질 생산을 추정하기 위한 불완전한 프록시이고, 세포 상태를 규정하는 데 편향될 가능성이 있다. 단일-세포 프로테옴을 직접 정량화하는 추가의 방법은 세포 유형 및 환경에 대한 세포-유형-특이적 반응을 해석하기 위한 보다 기능적으로 관련된 기반을 제공할 수 있다. 세포에서의 단백질 생산의 정확한 결정은 다양한 생리학적 상태를 연구하는 데 또는 심지어 다양한 질환을 치료하는 데, 뿐만 아니라 약물 개발에 유용할 수 있다. 따라서, 단일 세포에서 단백질 생산을 정확하게 정량화하기 위한 추가의 보다 우수한 시스템이 필요하다.

발명의 내용

[0004] 계내 리보솜 프로파일링 (즉, 활발하게 번역되는 관심 RNA의 프로파일링)을 위한 방법, 조성물, 키트 및 시스템이 본원에 기재된다. 이러한 시스템은 활발하게 번역되는 mRNA를 정량화/프로파일링함으로써 세포의 트랜스크립톰과 프로테옴 사이의 갭을 가교하는 결정적인 기술을 나타낸다. 단일-세포 프로테옴의 추정으로서 계내 RNA 번역 상태의 특이적이고 고처리량의 특징화를 달성하기 위해 근접 라이게이션에 기초한 전략이 본원에 기재된다. 본 발명의 시스템은 리보솜에 의해 결합된 mRNA 분자에 어닐링된 상응하는 프로브의 서열을 인식하는 올리고뉴클레오티드 프로브에 접합된 리보솜을 인식하는 작용제를 이용한다 (도 1). 간략하게, 본 발명의 시스템은 관심 mRNA 내의 표적 서열을 확인하기 위해 고유한 분자 바코드를 포함하는 프로브 또는 프로브 세트를 이용한다. 후속적으로, 리보솜은 리보솜의 한 부분에 상보적인 프라이머의 올리고뉴클레오티드 서열 부분에 의해, 또는 DNA 프라이머에 접합된 2차 항체에 의해 결합되는 리보솜-특이적 1차 항체에 의해 결합된다. 리보솜의 한 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 서열에, 또는 2차 항체에 접합된 (따라서 리보솜에 결합된) DNA 프라이머는 프로브에 라이게이션된다. 프로브를 프라이머로서 사용하여, 관심 mRNA를 롤링 서클 증폭에 의해 증폭시켜 측정가능한 서열 신호를 생성한다. 추가적으로, 항체는 항체 염색을 통해 검출가능하여 이에 공간 정보를 제공한다. 리보솜을 표지하고 관심 mRNA를 국재화함으로써, 건강상태 및 질환상태 둘 다에서 번역의 시공간적 패턴을 이해하기 위한 중요한 판독물인 고도로 선택적인 RNA-리보솜 공동국재화에 의해, 활발하게 번역되는 mRNA의 정확한 공간 정보를 추출할 수 있다. 리보솜과 mRNA 사이의 상호작용을 프로빙하여 관심 mRNA의 번역을 결정할 수 있다.

[0005] 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법을 제공한다 (예를 들어, 도 1, 3, 및 6 참조). 본원에 개시된 방법에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍 또는 프로브 세트와 접촉될 수 있고, 이는 본원에 추가로 기재되며, 리보솜에 의해 활발하게 번역되는 RNA를 (예를 들어, 롤링 서클 증폭에 의해) 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키고, 서열분석하여 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석 (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석)을 통함). 관심 전사체의 위치를 사용하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링할 수 있고, 시공간적 정보를 수득하여 번역 위치 및 시기가 건강상태 및 질환상태에서 세포 기능에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 기술분야의 이해를 개선시킬 수 있다. 방법은 예를 들어 이환된 조직 샘플 및 건강한 조직 샘플로부터의 세포 (또는 다중 세포)에서의 RNA 번역을 비교하는 데; 또는 예를 들어 작용제로 처리된 세포 및 비처리 세포에서의 RNA 번역을 비교하는 데 유용할 수 있다.

[0006] 중요하게는, 본원에 기재된 방법은 번역 동안 mRNA 분자를 프로파일링하기 위한 2개의 프로브 또는 3개의 프로브를 포함할 수 있다. 각각의 방법은 번역 동안 mRNA 분자를 프로파일링하는 데 유용하지만, 3-프로브 방법은 보다 우수한 신호-대-잡음 비를 생성하는 것으로 입증되었다.

[0007] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 2-프로브 방법을 제공하며, 이는:

[0008] a) 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

[0009] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0010] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0011] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0012] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0013] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0014] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0015] 를 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 3-프로브 방법을 제공하며, 이는:

[0017] a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

[0018] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0019] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0020] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0021] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0022] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0023] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0024] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0025] 를 포함한다.

[0026] 본원에 기재된 방법, 조성물 및 시스템은 조직 (예를 들어, 발생 조직, 정상 조직, 이환 조직)에서 RNA 번역을 연구하는 데, 다양한 질환을 진단 및 치료하는 데, 연구 목적을 위해, 및 약물 발견에 유용할 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각되거나 또는 가질 위험이 있는 대상체, 또는 건강하거나 또는 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 세포 또는 다중 세포에 대해 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 RNA의 발현을 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다중 세포)에서의 동일한 관심 RNA의 발현과 비교할 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 RNA 번역 프로파일 (관심 단일 RNA 또는 다중 RNA, 예를 들어 특이적 질환 서명 포함)에서의 임의의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포 (예를 들어, 정상 세포)에서의 RNA 번역은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포 (예를 들어, 정상 세포)에서의 RNA 번역은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 발현은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 1개 이상의 관심 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법은 세포에서 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 수행될 수 있다. 이어서, 세포 (예를 들어, 정상 세포, 또는 이환 세포)에서의 번역되는 다양한 관심 RNA의 발현을 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 관심 RNA의 발현과 비교할 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에서의 번역에 비해 RNA 번역 프로파일에서의 임의의 차이는, 1개 이상의 관심 RNA의 번역 (또는 잠재적으로 전사)이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환의 치료와 연관된 것으로 공지된 특정한 서명 (예를 들어, 번역되는 다중 관심 RNA의 서명)은 목적하는 방식으로 번역을 조정하여 질환을 치료할 수 있는 다른 작용제를 확인하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한, 예를 들어 1개 이상의 세포를 후보 작용제 또는 공지된 약물로 처리하는 경우 특이적 RNA 번역 서명을 조사함으로써, 특정 부작용을 갖는 약물을 확인하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한 세포 번역 및 단백질 생산의 기초 생물학을 연구하는 데 유용할 수 있는 연구 시약 또는 화학적 프로브를 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애 (예를 들어, 암)를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 또는 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다.

이어서, 세포에서 번역되는 1개 이상의 RNA의 프로파일을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 RNA의 번역 상태와 비교할 수 있다. 이어서, 비-이환 세포에 비해 RNA 번역 프로파일에서 임의의 차이가 관찰되는 경우에 질환 또는 장애에 대한 치료가 대상체에게 투여될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 RNA 번역과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포(예를 들어, 정상 세포)에서의 RNA 번역은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 번역은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0029] 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 프로브 쌍을 제공하며, 여기서:

[0030] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0031] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함한다.

[0032] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨), 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브" 또는 "블록 프로브"로도 지칭됨) 및 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공하며, 여기서:

[0033] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0034] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0035] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적이다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 키트 (예를 들어, 본원에 개시된 프로브 쌍 또는 세트 중 임의의 것을 포함하는 키트)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 프로브의 다중 쌍 또는 세트를 포함하며, 이들 각각은 번역되는 특이적 관심 RNA를 확인하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 키트는 또한 세포, 효소, 예컨대 리가제 및/또는 폴리머라제, 아민-변형된 뉴클레오티드, 1차 항체, 2차 항체, 완충제, 시약(염료, 염색제 등 포함), 및 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 단량체를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용한 임의의 다른 시약 또는 성분을 포함할 수 있다.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 RNA 번역을 프로파일링하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 시스템은

[0038] a) 세포;

[0039] b) 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 쌍, 여기서

[0040] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0041] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함함;

[0042] c) 현미경; 및

[0043] d) 컴퓨터

[0044] 를 포함한다.

[0045] 일부 실시양태에서, 이러한 시스템은

[0046] a) 세포;

[0047] b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서

[0048] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0049] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0050] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적임;

[0051] c) 현미경; 및

[0052] d) 컴퓨터

[0053] 를 포함한다.

[0054] 본원에 기재된 프로브 (즉, 프로브 쌍 또는 프로브 세트) 중 임의의 것이 본 개시내용에 의해 고려되는 시스템에서 사용될 수 있다.

[0055] 본 개시내용이 이러한 측면으로 제한되지 않기 때문에, 상기 개념 및 하기 논의된 추가의 개념은 임의의 적합한 조합으로 배열될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 추가로, 본 개시내용의 다른 이점 및 신규 특색은 첨부 도면과 함께 고려할 경우에 다양한 비제한적 실시양태의 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0056] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본원에 제시된 구체적 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하는 것에 의해 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1은 계내에서 RNA 번역을 특징화/프로파일링하는 방법에 대한 개략도이다. DNA-접합된 2차 항체는 동일한 RNA 상에 매우 근접하게 존재하는 패드락 프로브를 인식하여, 그의 증폭을 가능하게 하는 데 사용된다. 각각의 패드락 프로브는 RNA 부위의 정체를 코딩하는 고유한 바코드를 함유한다. 바코드 정보는 롤링 서클 증폭에 의해 증폭되고, SEDAL 계내 서열분석에 의해 디코딩된다.

도 2a-2d는 계내 RNA 번역의 단일-세포 프로파일링의 영상이다. 도 2a는 도 2b (1차 항체 없음), 도 2c (DNA가 접합되지 않은 2차 항체), 및 도 2d (2차 항체 없음)의 음성 대조군과 비교하여 활발하게 전사된 베타-액틴 (ACTB) RNA의 검출을 보여준다.

도 3은 리보솜 항체 및 3-부분 DNA 프로브를 사용한 계내 리보솜 프로파일링 방법의 개략도이다. DNA-접합된 2차 항체는 동일한 RNA 상에 매우 근접하게 존재하는 패드락 프로브를 인식하여, 라이게이션을 가능하게 하는 데 사용된다. 각각의 패드락 프로브는 RNA 부위의 정체를 코딩하는 고유한 바코드를 함유한다. 바코드 서열은 롤링 서클 증폭에 의해 증폭되어 최적으로 측정가능한 신호를 생성한다. 방법은 세포하 소기관 (예를 들어, 내형질 세망 및 미토콘드리아)을 표지하기 위한 면역형광 염색과 상용성이다.

도 4a-4c는 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체를 사용한 리보솜 단백질 항체-기반 계내 리보솜 프로파일링의 영상이다. 도 4a는 ACTB에 대한 계내 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다. 도 4b는 항-RPS3 항체 대신 IgG를 사용한 음성 대조군 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다. 도 4c는 비-코딩 RNA 전이 연관 폐 선암종 전사체 1 (MALAT1)에 대한 계내 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다.

도 5a-5c는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체를 사용한 리보솜 단백질 항체-기반 계내 리보솜 프로파일링의 영상이다. 도 5a는 ACTB에 대한 계내 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다. 도 5b는 항-RPL4 항체 대신 IgG를 사용한 음성 대조군 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다. 도 5c는 비-코딩 RNA MALAT1에 대한 계내 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다.

도 6은 rRNA 및 mRNA에 혼성화하는 3-부분 DNA 프로브를 사용한 계내 리보솜 프로파일링 방법의 개략도이다. rRNA-혼성화 프로브는 동일한 RNA 상에 매우 근접하게 존재하는 패드락 프로브를 인식하여, 라이게이션을 가능하게 하는 데 사용된다. 각각의 패드락 프로브는 RNA 부위의 정체를 코딩하는 고유한 바코드를 함유한다. 바

코드 정보는 롤링 서클 증폭에 의해 증폭되고, SEDAL 계내 서열분석에 의해 디코딩된다. 방법은 세포하 소기관(예를 들어, 내형질 세망 및 미토콘드리아)을 표지하기 위한 면역형광 염색과 상용성이다.

도 7a-7c는 rRNA-혼성화된 프로브-기반 계내 리보솜 프로파일링 방법의 영상이다. 도 7a는 ACTB에 대한 계내 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다. 도 7b는 리보솜 내의 rRNA에 혼성화하는 부분이 없는 프로브를 사용한 음성 대조군 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다. 도 7c는 비-코딩 RNA MALAT1에 대한 계내 리보솜 프로파일링 신호를 보여준다.

도 8은 본원에 기재된 RNA 프로파일링 방법에 유용한 예시적인 프로브의 상세한 설계를 보여준다.

도 9a-9j는 세포하 해상도에서 mRNA 번역의 계내 프로파일링에 대한 RIBO맵을 보여준다. 도 9a는 RIBO맵의 개략도를 제공한다. 샘플 (세포주 또는 조직 샘플)을 제조한 후, 한 쌍의 바코딩된 패드락 프로브 및 프라이머를 표적화된 세포내 RNA에 혼성화시키고, 스플린트 프로브를 18S rRNA를 통해 리보솜에 혼성화시킨다. 스플린트 프로브는 패드락 프로브를 환형화하기 위한 근접 라이게이션을 위한 주형으로서 사용된다. 스플린트 프로브는 롤링 서클 증폭 RCA 동안 그의 연장을 차단하기 위해 3' 역전된 dT 변형을 갖도록 설계된다. 이어서, 무손상 패드락 프로브를 증폭시켜 계내에서 아민-변형된 DNA 앰플리콘을 생성할 수 있다. 다음에, 이들 DNA 앰플리콘은 계내 맵핑을 위해 조직-히드로겔 화학을 통해 히드로겔 내로 공중합된다. 이어서, cDNA 앰플리콘 내의 유전자-특이적 식별자 서열 ("바코드"로 라벨링됨)을 순환 계내 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류 감소 서열분석 (SEDAL)을 통해 판독할 수 있다. 도 9b는 트리-프로브 전략의 예를 보여준다. (좌측) 트리-프로브 샘플의 형광 영상은 HeLa 세포에서 ACTB mRNA의 RIBO맵 신호를 보여준다. (중간) 프라이머 또는 스플린트 프로브의 부재 하의 음성 대조군 샘플의 형광 영상은 최소 DNA 앰플리콘 신호를 보여준다. (우측) rRNA 혼성화 절편이 없는 스플린트 프로브를 사용한 대조군 샘플의 형광 영상은 DNA 앰플리콘 신호를 보여주지 않는다. 축척 막대, 10 μm. 도 9c는 도 9b의 DAPI 신호에 대해 정규화된 DNA 앰플리콘 신호 강도의 정량화를 보여준다. 오차 막대, 표준 편차. 조건당 n = 3개의 영상. 스튜던트 t-검정, **P < 0.01. 도 9d는 mRNA (ACTB) 및 비-코딩 RNA (MALAT1 및 vtRNA1-1) 표적화에 의한 RIBO맵 신호 검증의 개략적 표현을 제공한다. 도 9e는 STAR맵에 의한 RNA 검출 결과 및 RIBO맵에 의한 RNA 번역의 검출 결과를 보여주는 형광 영상을 제공한다. 축척 막대, 10 μm. 도 9f는 도 9e에 제시된 DAPI 신호에 대해 정규화된 DNA 앰플리콘 신호 강도의 정량화를 보여준다. 오차 막대, 표준 편차. 조건당 n = 3개의 영상. 스튜던트 t-검정, ****P < 0.0001. 도 9g는 해링토닌에 의한 번역 조절의 개략도를 제공한다. 도 9h는 ACTB mRNA의 상이한 부위를 표적화하는 3쌍의 SNAIL 프로브를 보여준다. 프로브 쌍 1은 개시 코돈 근처에 있는 한편, 프로브 쌍 2 및 프로브 쌍 3은 각각 CDS 영역에서 개시 코돈의 115 nt 하류 및 405 nt 하류에 있다. 도 9i는 해링토닌 처리 전 및 후의 HeLa 세포에서의 ACTB mRNA의 상이한 영역에 대해 표적화된 3개의 프로브 세트의 RIBO맵 신호를 보여주는 형광 영상을 제공한다. 축척 막대, 10 μm. 도 9j는 도 9i에 제시된 DAPI 신호에 대해 정규화된 RIBO맵 신호 강도의 정량화를 보여준다. 오차 막대, 표준 편차. 조건당 n = 3개의 영상. 스튜던트 t-검정, **P < 0.01.

도 10a-10k는 RIBO맵이 인간 HeLa 세포에서 981개 유전자의 세포하 번역을 동시에 측정하는 것을 보여준다. 도 10a는 국재화된 mRNA 번역을 측정하기 위한 HeLa/FUCCI 세포에서의 RIBO맵 검출의 개략도를 제공한다. RIBO맵은 리보솜-결합된 mRNA 신호를 판독하고, STAR맵은 표적화된 RNA를 검출한다. 소기관 염색을 절차에서 조합하여 핵, ER, 및 세포 형태를 시각화하였다. 도 10b는 HeLa 세포에서의 FUCCI 형광 신호, cDNA 앰플리콘, 및 소기관 염색 신호의 동시 맵핑을 보여주는 대표적인 영상을 제공한다. 좌측, RIBO맵 (상부) 및 STAR맵 (하부)에 대한 세포의 FUCCI 형광 영상화 결과. 형광 신호는 HeLa 세포의 세포 주기 단계를 나타낸다. 중간, 6회의 서열분석 사이클에 걸친 대표적인 세포의 확대 도면 및 대표적인 세포의 단일-프레임 도면으로, 981개의 유전자에 대한 제1 서열분석 사이클의 최대-강도 투영 (MAX)을 보여주는 대표적인 영상. 우측: 대표적인 세포의 소기관 염색 신호의 확대 도면. 제공된 범례에 따라 ER의 콘카나발린 A (ConA) 알렉사 플루오르 594 접합체 염색, 세포 형태의 플라밍고 형광 염색, 및 핵의 DAPI 염색이 제시된다. 도 10c는 STAR맵 (좌측 상단) 및 RIBO맵 (우측 상단) 측정을 위한 41개의 세포-주기 마커 유전자의 단일-세포 발현 프로파일을 사용하여 결정된 세포-주기 단계 클러스터의 확산 맵 임베딩을, 단량체 쿠사비라-오렌지 2 (mKO2)-hCDT1 및 단량체 아자미-그린 (mAG)-hGEN FUCCI 세포-주기 마커 (STAR맵, 좌측 하단; RIBO맵, 우측 하단)의 상응하는 단일-세포 단백질 형광 프로파일과 함께 보여준다. 도 10d는 평균 발현 수준과 함께 제시된, 981개의 측정된 유전자에 걸친 세포-대-세포 변동의 쌍별 피어슨 상관 계수를 보여주는 단일-세포 트랜스라톰 공변동 매트릭스를 보여준다. 유전자의 5개의 강하게 상관되는 모듈이 매트릭스에서 회색 박스로 표시되고, 이들 중 2개, 모듈 3 및 5는 우측에 확대된다. 번역 복합체에 수반되고 세포 주기 마커로서 확인된 유전자는 확대된 매트릭스에 주석을 달았다. 도 10e는 2개의 유전자의 판독물이, 이들 유전자의 발현 수준과 함께 제시된 RIBO맵 결과 (좌측) 및 STAR맵 결과 (우측)에서 동일한

세포에서 3-um 반경의 구체로 공존하는 경향이 있는 정도를 기재한 쌍별 공동국재화 p-값의 매트릭스를 보여준다. STAR맵 매트릭스는 RIBO맵 매트릭스와 동일한 순서의 유전자를 사용한다. 유전자의 5개의 강하게 상관되는 모듈이 매트릭스에서 회색 박스로 표시된다. 도 10f는 5개의 유전자 모듈 각각에서 가장 유의하게 풍부화된 GO 용어 (최대 3)를 시각화한 막대 플롯을 보여준다. 도 10g는 유전자 모듈 3 및 유전자 모듈 4의 확대된 매트릭스를 보여준다. 도 10h는 ER 영상 상에 오버레이한, 모듈 3 및 모듈 4 유전자의 RIBO맵 신호의 공간 분포를 보여준다. 영상은 유전자 도트 및 ER 신호의 MAX이다. 도 10i는 모듈 3 유전자, 모듈 4 유전자, 및 모든 검출된 유전자의 ER-국재화된 백분율의 정량화를 보여준다. 윌콕슨 부호-순위 검정, ****P < 0.0001. 도 10j는 공간 파라미터 거리 비 (DR)의 계산을 보여주는 다이어그램을 제공한다. 도 10k는 m^6A 유전자 및 비-m^6A 유전자에 대한 리보솜-결합된 RNA DR 및 RNA DR 값에 대한 바이올린 플롯을 제공한다. 윌콕슨 부호-순위 검정, ****P < 0.0001.

도 11a-11n은 마우스 뇌에서의 5,413개 유전자의 공간 해상된 단일-세포 트랜스라톰 프로파일링을 보여준다. 도 11a는 RIBO맵을 위한 표적화된 마우스 관상 반뇌 영역 (박스로 표시됨)의 다이어그램을 제공한다. 도 11b는 마우스 관상 반뇌 슬라이스에서의 RIBO맵에 의한 5,413개 유전자의 국재화된 번역의 측정을 보여주는 대표적인 영상을 제공한다. (좌측) 모든 5개의 채널을 동시에 보여주는, 5,413개 유전자의 제1 서열분석 라운드의 최대-강도 투영. 정사각형, 확대 영역. (중간) 제1 서열분석 라운드의 MAX 도면을 보여주는 3개의 세포의 확대 도면. (우측) 9회 서열분석 라운드에 걸친 단일 z-프레임에서의 앰플리콘의 공간 배열을 보여주는 3개의 세포의 확대 도면. 도 11c는 3개의 세포-유형 마커 유전자의 RIBO맵 영상을, 상응하는 유전자의 발현 패턴을 보여주는 알렌 뇌 ISH 영상과 비교하여 제공한다. 도 11d는 마우스 관상 반뇌로부터 수집된 62,753개 세포의 번역 프로파일의 균일 매니폴드 근사 및 투영 (UMAP) 플롯 시각화를 보여준다. 라이덴 클러스터링을 사용하여 57개의 세포 유형을 확인하였다. 도 11e는 대표적인 공간 세포-유형 아틀라스를 제공한다. (좌측) 영상화된 관상 마우스 뇌 슬라이스의 상이한 뇌 영역을 강조표시한 개략도. (중간) 도 11d의 동일한 코드를 사용한, 영상화된 관상 반뇌 영역에서의 대표적인 공간 세포-유형 아틀라스. 축척 막대, 500 μm. (우측) 상이한 세포 유형 및 사이틈을 보여주는 해마 및 CA1 영역에서의 확대 절편. 축척 막대, 200 μm. 도 11f는 해마 뉴런의 세포체 및 돌기를 보여주는 해마 슬라이스의 개략도를 제공한다. 도 11g는 세포체 판독 및 뉴런 및 신경교 돌기 판독을 보여주는 CA1 영역에서의 절편을 보여준다. 축척 막대, 50 μm. 도 11h는 5,413개-유전자 RIBO맵 측정에서의 개별 유전자의 돌기 판독 백분율을 보여주며, 유전자는 그의 돌기 판독 백분율에 기초하여 순위화된다. 9개의 예시적인 유전자를 삽도로 라벨링하였다. 도 11i는 돌기-풍부화된-번역 유전자에 대한 상위 10개의 유의하게 풍부화된 GO 용어를 보여준다. 도 11j는 세포체-풍부화된-번역 유전자에 대한 상위 10개의 유의하게 풍부화된 GO 용어를 보여준다. 도 11k-11l은 세포체 판독 및 돌기 판독을 보여주는, 해마 영역에서의 예시적인 돌기-풍부화된-번역 유전자 (도 11k) 및 세포체-풍부화된-번역 유전자 (도 11l)의 공간 번역 맵을 보여준다. 도 11m-11n은 세포체 판독 및 돌기 판독을 보여주는, 해마 영역에서의 돌기-풍부화된-번역 유전자 (m) 및 세포체-풍부화된-번역 유전자 (n)의 신경교 세포 마커 유전자 예의 공간 번역 맵을 보여준다.

도 12a-12f는 항체-기반 RIBO맵 전략의 예를 보여준다. 도 12a는 스플린트 프로브-접합된 단백질 A/G 제조에 대한 합성 반응식을 제공한다. 도 12b는 HeLa 세포에서의 ACTB mRNA의 항-리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체-기반 RIBO맵 신호를 보여준다. RPS3 항체는 리보솜의 소형 유닛 내의 RPS3 단백질에 결합하고, 단백질 A/G-접합된 스플린트 프로브를 번역 mRNA로 가져온다. 이어서, 번역 mRNA에 대해 표적화된 패드락 프로브가 라이게이션 및 증폭되어 계내 아민-변형된 DNA 앰플리콘이 생성될 수 있다. 도 12c는 HeLa 세포에서의 ACTB mRNA의 항-리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체-기반 RIBO맵 신호를 보여준다. 도 12d는 HeLa 세포에서의 ACTB mRNA의 항체-기반 RIBO맵 신호의 IgG 제어를 보여준다. 도 12e는 도 12b-12d에서의 DAPI에 대해 정규화된 항체-보조 RIBO맵 신호 강도의 정량화를 보여준다. 오차 막대, 표준 편차. 조건당 n = 3개의 영상. 스튜던트 t-검정, **P < 0.01, ***P < 0.001. 도 12f는 rRNA 프로브-기반 RIBO맵 전략 및 항체-기반 RIBO맵 전략의 신호-대-잡음 비의 정량화된 비교를 보여준다. 오차 막대, 표준 편차. 조건당 n = 3개의 영상. 스튜던트 t-검정, **P < 0.01.

도 13a-13b는 세포-주기-관련 변동의 트랜스크립톰 및 트랜스라톰 정밀분석을 보여준다. 도 13a는 세포-주기 단계 클러스터 임베딩 상에서의 세포-주기 마커 유전자 발현을 보여준다. 도 13b는 세포-주기 단계 클러스터 임베딩 상에서의 세포-주기 마커 유전자 번역을 보여준다.

도 14a-14f는 단일-세포 트랜스라톰의 공변동 분석을 보여준다. 도 14a는 단일-세포 트랜스라톰 공변동 매트릭스에서 확인된 5개의 모듈 각각에서의 상위 3개의 유의하게 풍부화된 GO 용어를 보여준다. 도 14b-14d는 단일-세포 트랜스라톰 공변동 매트릭스에서 확인된 확대된 모듈 1 (도 14b), 모듈 2 (도 14c), 및 모듈 4 (도 14d)를 보여준다. 도 14e는 유전자 모듈 3 (G2M 마커 유전자)과 유전자 모듈 5 (G1S 마커 유전자) 사이의 상관관계를

보여주는 확대 도면을 제공한다. 도 14f는 세포-주기 마커 유전자 모듈과 번역 기구 유전자 모듈 사이의 상관관계를 보여주는 확대 도면을 제공한다.

도 15a-15f는 공동-국재화된 유전자 모듈의 단백질-단백질 상호작용 분석 및 공간 분포를 보여준다. 도 15a는 모듈 3 (좌측) 및 모듈 4 (우측)에서의 유전자의 스트링 단백질 네트워크 분석을 보여준다. 도 15b는 리보솜-결합된 RNA 세포하 공동국재화 매트릭스 내의 확대된 모듈 1 (좌측), 모듈 2 (상부 우측), 및 모듈 5 (하부 우측)를 보여준다. 도 15c는 모듈 1 (상부), 모듈 2 (중간), 및 모듈 5 (하부)에서의 유전자의 스트링 단백질 네트워크 분석을 보여준다. 도 15d는 ER 영상 상에 오버레이된, 모듈 1, 모듈 2, 및 모듈 5 유전자의 RIBO맵 신호의 공간 분포를 보여준다. 도 15e는 모듈 1 유전자, 모듈 2 유전자, 모듈 5 유전자, 및 모든 검출된 유전자의 ER-국재화된 백분율의 정량화를 보여준다. 윌콕슨 부호-순위 검정, ****P < 0.0001. 도 15f는 공변동 분석의 계층적 클러스터링 매트릭스 상의 공동국재화 쌍별 상관관계 p-값을 보여준다.

도 16a-16c는 계내 혼성화 및 면역형광을 사용한 RIBO맵 측정의 교차-검증을 보여준다. 도 16a는 6개의 예시적인 세포 마커 유전자의 RIBO맵 영상을, 상응하는 유전자의 발현 패턴을 보여주는 알렌 뇌 ISH 영상과 비교하여 제공한다. 도 16b-16c는 Sst (도 16b) 및 Nefl (도 16c)의 RIBO맵으로부터 수득된 번역 프로파일, 알렌 뇌 아틀라스로부터의 계내 혼성화 (ISH) 데이터, 및 HPA 뇌 아틀라스로부터의 항체-기반 면역형광 (IF) 프로파일링을 보여준다.

도 17a-17b는 RIBO맵 마우스 뇌 데이터의 품질 관리 및 세포 유형 마커 발현 수준을 보여준다. 도 17a는 RIBO맵 마우스 뇌 데이터세트의 로그 변환 후 각각의 세포에서의 전사체 및 유전자의 수를 보여주는 히스토그램을 제공한다. 수직선은 중앙 절대 편차 (MAD)에 의해 추정된 필터링 역치를 나타낸다. 도 17b는 RIBO맵 데이터세트에서 마우스 뇌의 주요 세포 유형에 대한 정규 마커의 발현 수준을 보여주는 UMAP를 제공한다.

도 18a-18d는 단일-세포 번역 프로파일링에 기초한 세포-유형 클러스터링을 보여준다. 도 18a는 수준 1-3 세포 클러스터링을 보여주는 세포 유형의 계층적 분류를 보여준다. 도 18b는 세포를 뉴런 세포 및 신경교 세포로 분류하기 위한 수준 1 클러스터링의 균일 매니폴드 근사 및 투영 (UMAP) 플롯 시각화를 제공한다. 도 18c는 세포를 흥분성 뉴런, 억제 뉴런, 성상세포, 핍지교세포, 핍지교세포 전구체 세포, 소교세포 및 혈관 세포로 분류하기 위한 수준 2 클러스터링의 UMAP 플롯 시각화를 제공한다. 도 18d는 수준 2 클러스터링-확인된 세포 유형과 정렬된 대표적인 마커에 대한 유전자 발현 히트맵을 제공한다. 각각의 유전자에 대한 발현을 각각의 세포 내의 모든 유전자에 걸쳐 z-점수화한다.

도 19a-19c는 흥분성 뉴런의 유전자 발현 및 공간 맵을 제공한다. 도 19a는 흥분성 뉴런 하위유형과 정렬된 대표적인 마커에 대한 유전자 발현 히트맵을 제공한다. 각각의 유전자에 대한 발현은 각각의 세포의 모든 유전자에 걸쳐 z-스코어링된다. 도 19b는 21개의 흥분성 뉴런 하위유형의 UMAP 플롯 시각화를 보여준다. 도 19c는 영상화된 관상 반뇌 영역에서의 흥분성 뉴런 하위유형의 공간 세포 맵을 제공하고, 확대 도면은 피질 및 해마 영역에서의 공간 세포 맵을 보여준다.

도 20a-20c는 억제 뉴런의 유전자 발현 및 공간 맵을 제공한다. 도 20a는 억제 뉴런 하위유형과 정렬된 대표적인 마커에 대한 유전자 발현 히트맵을 제공한다. 각각의 유전자에 대한 발현은 각각의 세포의 모든 유전자에 걸쳐 z-스코어링된다. 도 20b는 18개의 억제 뉴런 하위유형의 UMAP 플롯 시각화를 보여준다. 도 20c는 영상화된 관상 반뇌 영역에서의 억제 뉴런 하위유형의 공간 세포 맵을 보여주고, 확대 도면은 피질 및 선조체 영역에서의 공간 세포 맵을 보여준다.

도 21a-21c는 신경교 세포의 유전자 발현 및 공간 맵을 제공한다. 도 21a는 신경교 세포 하위유형과 정렬된 대표적인 마커에 대한 유전자 발현 히트맵을 제공한다. 각각의 유전자에 대한 발현은 각각의 세포의 모든 유전자에 걸쳐 z-스코어링된다. 도 21b는 18개의 신경교 세포 하위유형의 UMAP 플롯 시각화를 보여준다. 도 21c는 영상화된 관상 반뇌 영역에서의 신경교 세포 하위유형의 공간 세포 맵을 제공하고, 확대 도면은 피질 및 해마 영역에서의 공간 세포 맵을 보여준다.

도 22a-22d는 돌기-풍부화된-번역 유전자의 예의 공간 맵을 제공한다. 도 22a-22b는 해마 영역에서의 돌기-풍부화된-번역 유전자 (도 22a) 및 세포체-풍부화된-번역 유전자 (도 22b)의 추가의 예의 번역 공간 맵을 보여준다. 세포체 판독 및 돌기 판독이 제시된다. 도 22c-22d는 해마 영역에서 돌기-풍부화된-번역 유전자 (도 22c) 및 세포체-풍부화된-번역 유전자 (도 22d)의 추가의 신경교 세포 마커 유전자 예의 번역 공간 맵을 제공한다. 세포체 판독 및 돌기 판독이 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 정의

[0058] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고문헌은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명에 사용된 많은 용어의 일반적 정의를 제공한다: 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al., (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용된 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 대해 부여된 의미를 갖는다.

[0059] 용어 "투여하다", "투여하는" 및 "투여"는 대상체 내에 또는 대상체 상에 치료제 또는 요법제, 또는 치료제 또는 요법제의 조성물을 이식, 흡수, 섭취, 주사, 흡입 또는 달리 도입하는 것을 지칭한다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "앰플리콘"은 증폭 반응 (즉, 유전자 단편 또는 표적 서열의 1개 이상의 카피의 생산) 또는 복제 반응의 산물인 핵산 (예를 들어, RNA)을 지칭한다. 앰플리콘은, 예를 들어 PCR 또는 다른 중합 반응을 사용하여 인공적으로 형성될 수 있다. 용어 "연쇄된 앰플리콘"은 함께 연결되어 단일 핵산 분자를 형성하는 다중 앰플리콘을 지칭한다. 연쇄된 앰플리콘은, 예를 들어 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 연쇄된 다중 앰플리콘을 포함하는 단일 핵산 분자로서 올리고뉴클레오티드의 다중 선형 카피를 생산하는 롤링 서클 증폭 (RCA)에 의해 형성될 수 있다.

[0061] "항체"는 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 당단백질을 지칭한다. 용어 항체 및 이뮤노글로불린은 상호교환 가능하게 사용된다. 일부 예외로, 포유동물 항체는 전형적으로 각각 2개의 큰 중쇄 및 2개의 작은 경쇄를 갖는 기본 구조 단위로 제조된다. 여러 상이한 유형의 항체 중쇄, 및 여러 상이한 종류의 항체가 존재하며, 이들은 이들이 보유하는 중쇄에 기초하여 상이한 이소형으로 함께 그룹화된다. 포유동물에서 5종의 상이한 항체 이소형 (IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM)이 공지되어 있으며, 이는 상이한 역할을 수행하고, 이들이 마주치는 각각의 상이한 유형의 이물질에 대해 적절한 면역 반응을 지시하는 것을 돕는다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 항체 단편 및 나노바디, 뿐만 아니라 항체의 변이체 및 항체 단편 및 나노바디의 변이체를 포괄한다. 일부 실시양태에서, 항체는 질환 또는 장애 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일에서의 변화와 연관된 것)에 대한 치료로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 본원에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오티드 프로브에 접합된다. 특정 실시양태에서, 항체는 리보솜에 결합한다 (예를 들어, 항체는 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 또는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체임).

[0062] 용어 "암" (본원에 기재된 방법을 사용하여 연구, 특징화, 진단 및/또는 치료될 수 있는 암 포함)은 제어불가능하게 증식하고 정상 신체 조직을 침윤 및 파괴하는 능력을 갖는 비정상적 세포의 발생을 특징으로 하는 질환의 부류를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990]을 참조한다. 암은 증식성 질환의 한 예이다. 예시적인 암은 청신경종; 선암종; 부신암; 항문암; 혈관육종 (예를 들어, 림프관육종, 림프관내피육종, 혈관육종); 충수암; 양성 모노클로날 감마글로불린병증; 담도암 (예를 들어, 담관암종); 방광암; 유방암 (예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두상 암종, 유방암, 유방의 수질성 암종); 뇌암 (예를 들어, 수막종, 교모세포종, 신경교종 (예를 들어, 성상세포종, 핍지교종), 수모세포종); 기관지암; 카르시노이드 종양; 자궁경부암 (예를 들어, 자궁경부 선암종); 융모막암종; 척삭종; 두개인두종; 결장직장암 (예를 들어, 결장암, 직장암, 결장직장 선암종); 결합 조직암; 상피 암종; 상의세포종; 내피육종 (예를 들어, 카포시 육종, 다발성 특발성 출혈성 육종); 자궁내막암 (예를 들어, 자궁암, 자궁 육종); 식도암 (예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종); 유잉 육종; 안구암 (예를 들어, 안내 흑색종, 망막모세포종); 가족성 과다호산구증가증; 담낭암; 위암 (예를 들어, 위 선암종); 위장 기질 종양 (GIST); 배세포암; 두경부암 (예를 들어, 두경부 편평 세포 암종, 구강암 (예를 들어, 경구 편평 세포 암종), 인후암 (예를 들어, 후두암, 인두암, 비인두암, 구인두암)); 조혈암 (예를 들어, 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병 (ALL) (예를 들어, B-세포 ALL, T-세포 ALL), 급성 골수구성 백혈병 (AML) (예를 들어, B-세포 AML, T-세포 AML), 만성 골수구성 백혈병 (CML) (예를 들어, B-세포 CML, T-세포 CML), 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL) (예를 들어, B-세포 CLL, T-세포 CLL)); 림프종, 예컨대 호지킨 림프종 (HL) (예를 들어, B-세포 HL, T-세포 HL) 및 비-호지킨 림프종 (NHL) (예를 들어, B-세포 NHL, 예컨대 미만성 대세포 림프종 (DLCL) (예를 들어, 미만성 대 B-세포 림프종), 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종 (CLL/SLL), 외투 세포 림프종 (MCL), 변연부 B-세포 림프종 (예를 들어, 점막-연관 림프성 조직 (MALT) 림프종, 결절성 변연부 B-

세포 림프종, 비장 변연부 B-세포 림프종), 원발성 종격 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포성 림프종 (즉, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종 및 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종; 및 T-세포 NHL, 예컨대 전구체 T-림프모구성 림프종/백혈병, 말초 T-세포 림프종 (PTCL) (예를 들어, 피부 T-세포 림프종 (CTCL) (예를 들어, 균상 식육종, 세자리 증후군), 혈관면역모세포성 T-세포 림프종, 결절외 자연 킬러 T-세포 림프종, 장병증 유형 T-세포 림프종, 피하 지방층염-유사 T-세포 림프종, 및 역형성 대세포 림프종); 상기 기재된 바와 같은 1종 이상의 백혈병/림프종; 및 다발성 골수종 (MM)의 혼합물, 중쇄 질환 (예를 들어, 알파 쇄 질환, 감마 쇄 질환, 뮤 쇄 질환); 혈관모세포종; 하인두암; 염증성 근섬유모세포성 종양; 면역세포성 아밀로이드증; 신장암 (예를 들어, 윌름스 종양으로도 공지된 신모세포종, 신세포 암종); 간암 (예를 들어, 간세포성암 (HCC), 악성 간세포암); 폐암 (예를 들어, 기관지원성 암종, 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 선암종); 평활근육종 (LMS); 비만세포증 (예를 들어, 전신 비만세포증); 근육암; 골수이형성 증후군 (MDS); 중피종; 골수증식성 장애 (MPD) (예를 들어, 진성 다혈구혈증 (PV), 본태성 혈소판증가증 (ET), 골수섬유증 (MF)으로도 공지된 원인불명 골수화생 (AMM), 만성 특발성 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병 (CML), 만성 호중구성 백혈병 (CNL), 과다호산구성 증후군 (HES)); 신경모세포종; 신경섬유종 (예를 들어, 제1형 신경섬유종증 (NF) 또는 제2형 슈반세포종증); 신경내분비암 (예를 들어, 위장췌장 신경내분비 종양 (GEP-NET), 카르시노이드 종양); 골육종 (예를 들어, 골암); 난소암 (예를 들어, 낭선암종, 난소 배아성 암종, 난소 선암종); 유두상 선암종; 췌장암 (예를 들어, 췌장 선암종, 관내 유두상 점액성 신생물 (IPMN), 도세포 종양); 음경암 (예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병); 송과체종; 원시 신경외배엽 종양 (PNT); 형질 세포 신생물; 부신생물성 증후군; 상피내 신생물; 전립선암 (예를 들어, 전립선 선암종); 직장암; 횡문근육종; 타액선암; 피부암 (예를 들어, 편평 세포 암종 (SCC), 각화극세포종 (KA), 흑색종, 기저 세포 암종 (BCC)); 소장암 (예를 들어, 충수암); 연부 조직 육종 (예를 들어, 악성 섬유성 조직구종 (MFH), 지방육종, 악성 말초 신경초 종양 (MPNST), 연골육종, 섬유육종, 근육종); 피지선 암종; 소장암; 한선 암종; 활막종; 고환암 (예를 들어, 정상피종, 고환 배아성 암종); 갑상선암 (예를 들어, 갑상선의 유두상 암종, 유두상 갑상선 암종 (PTC), 수질성 갑상선암); 요도암; 질암; 및 외음부암 (예를 들어, 외음부의 파제트병)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0063] 본원에 사용된 "세포"는 세포 집단 (예를 들어, 조직, 샘플, 생검, 기관 또는 기관양)에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포의 집단은 복수의 상이한 세포 유형으로 구성된다. 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 세포는 유기체, 유기체로부터 유래된 단일 세포 유형, 또는 세포 유형의 혼합물 내에 존재할 수 있다. 자연 발생 세포 및 세포 집단, 유전자 조작된 세포주, 트랜스제닉 동물로부터 유래된 세포, 대상체로부터의 세포 등이 포함된다. 실질적으로 임의의 세포 유형 및 크기가 본원에 기재된 방법 및 시스템에 수용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 (예를 들어, 복합 세포 집단, 예컨대 자연 발생 조직)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간으로부터의 것이다. 특정 실시양태에서, 세포는 의료 절차, 예컨대 생검을 통해 대상체 (예를 들어, 인간)로부터 수집된다. 대안적으로, 세포는 배양된 집단 (예를 들어, 복합 집단으로부터 유래된 배양물, 또는 세포가 다중 계통으로 분화된 것인 단일 세포 유형으로부터 유래된 배양물)일 수 있다. 세포는 또한 조직 샘플에서 계내 제공될 수 있다.

[0064] 본 개시내용의 방법에 사용하기 위해 고려되는 세포 유형은 줄기 및 전구 세포 (예를 들어, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 신경 능선 세포 등), 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 및 골격근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 조혈 세포, 림프구, 예컨대 T-세포 (예를 들어, Th1 T 세포, Th2 T 세포, ThO T 세포, 세포독성 T 세포) 및 B 세포 (예를 들어, 프리-B 세포), 단핵구, 수지상 세포, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 면역 세포, 뉴런, 간세포, 및 특정한 기관과 관련된 세포 (예를 들어, 흉선, 내분비선, 췌장, 뇌, 뉴런, 신경교, 성상세포, 수지상세포, 및 그의 유전자 변형 세포)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 세포는 또한 상이한 유형의 형질전환된 또는 신생물성 세포 (예를 들어, 상이한 세포 기원의 암종, 상이한 세포 유형의 림프종 등) 또는 임의의 종류의 암성 세포 (예를 들어, 본원에 개시된 임의의 암으로부터의 것)일 수 있다. 상이한 기원의 세포 (예를 들어, 외배엽, 중배엽, 및 내배엽)가 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위해 또한 고려된다. 일부 실시양태에서, 세포는 소교세포, 성상세포, 핍지교세포, 흥분성 뉴런 또는 억제 뉴런이다. 일부 실시양태에서, 다중 세포 유형의 세포가 동일한 샘플 내에 존재한다.

[0065] 용어 "상보적"은 서로 수소 결합하는 염기를 포함하는 2개의 올리고뉴클레오티드 서열 (예를 들어, DNA 또는 RNA)을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 2개의 올리고뉴클레오티드 서열 사이의 상보성의 정도는 완전한 상보성 내지 상보성 없음까지 다양할 수 있다. 예를 들어, 2개의 올리고뉴클레오티드 서열은 서로 단지 부분적으로 상보적일 수 있다 (예를 들어, 본원에 기재된 프로브에서, 프로브의 단지 한 부분만이 또 다른 프로브 또는 관심 RNA에 상보적임). 2개의 올리고뉴클레오티드 서열은 예를 들어 서로 70% 이상 상보적, 서로 75% 이상 상보

적, 서로 80% 이상 상보적, 서로 85% 이상 상보적, 서로 90% 이상 상보적, 서로 95% 이상 상보적, 서로 96% 이상 상보적, 서로 97% 이상 상보적, 서로 98% 이상 상보적, 서로 99% 이상 상보적, 또는 서로 100% 상보적일 수 있다.

[0066] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산", "핵산 분자", "핵산 서열", 및 "올리고뉴클레오티드"는 DNA 및 RNA 내의 일련의 뉴클레오티드 염기 ("뉴클레오티드"로도 불림)를 지칭하고, 2개 이상의 뉴클레오티드의 임의의 쇄를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 그의 변형된 버전, 및 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 분자의 안정성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시키기 위해 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다.

[0067] "단백질", "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 포함한다. 상기 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 단백질은 적어도 3개의 아미노산 길이일 것이다. 단백질은 개별 단백질 또는 단백질의 집합을 지칭할 수 있다. 본 발명의 단백질은 비록 관련 기술분야에 공지된 비-천연 아미노산 (즉, 자연에서 발생하지 않지만 폴리펩티드 쇄에 혼입될 수 있는 화합물) 및/또는 아미노산 유사체를 대안적으로 이용할 수 있지만, 바람직하게는 천연 아미노산만을 함유한다. 또한, 단백질 내의 아미노산 중 1개 이상은, 예를 들어 화학 물질, 예컨대 탄수화물 기, 히드록실 기, 포스페이트 기, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 접합 또는 관능화를 위한 링커의 첨가, 또는 다른 변형에 의해 변형될 수 있다. 단백질은 또한 단일 분자일 수 있거나 또는 다중-분자 복합체일 수 있다. 단백질은 자연 발생 단백질 또는 펩티드의 단편일 수 있다. 단백질은 자연 발생, 재조합, 합성, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다. 단백질은 또한 질환 또는 장애 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일에서의 변화와 연관된 것)에 대한 치료로서 투여되는 치료 단백질일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다.

[0068] "전사체" 또는 "RNA 전사체"는 DNA 서열의 RNA 폴리머라제-촉매된 전사로부터 생성된 생성물이다. RNA 전사체가 DNA 서열의 상보적 카피인 경우, 이는 1차 전사체로 지칭되거나, 또는 이는 1차 전사체의 전사후 프로세싱으로부터 유래된 RNA 서열일 수 있고 성숙 RNA로 지칭된다. "메신저 RNA (mRNA)"는 인트론이 없고 세포에 의해 폴리펩티드로 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다. "cRNA"는 재조합 cDNA 주형으로부터 전사된 상보적 RNA를 지칭한다. "cDNA"는 mRNA 주형에 상보적이고 그로부터 유래된 DNA를 지칭한다.

[0069] 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 조직 샘플 (예컨대, 조직 절편, 외과적 생검, 및 조직의 바늘 생검); 세포 샘플 (예를 들어, 세포학적 도말표본 (예컨대, Pap 또는 혈액 도말표본) 또는 미세절제에 의해 수득된 세포의 샘플); 또는 세포 분획, 단편 또는 소기관 (예컨대, 세포를 용해시키고 그의 성분을 원심분리 등에 의해 분리함으로써 수득됨)을 포함한 임의의 샘플을 지칭한다. 생물학적 샘플의 다른 예는 혈액, 혈청, 소변, 정액, 분변물, 뇌척수액, 간질액, 점액, 눈물, 땀, 고름, 생검 조직 (예를 들어, 외과적 생검 또는 바늘 생검에 의해 수득됨), 유두 흡인물, 유액, 질액, 타액, 스왑 (예컨대, 협측 스왑), 또는 제1 생물학적 샘플로부터 유래된 생체분자를 함유하는 임의의 물질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 채취한 외과적 생검, 예를 들어 본원에 기재된 조직 중 임의의 것의 생검이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 종양 생검 (예를 들어, 암으로 진단되거나, 암을 갖는 것으로 의심되거나, 또는 암을 갖는 것으로 생각되는 대상체로부터의 것)이다. 일부 실시양태에서, 종양 생검은 직접 연구를 위해 원발성 종양 세포 및 조직을 포획한다. 일부 실시양태에서, 액체 생검은 혈액 또는 다른 체액 (CNS 유체, 림프 등)으로부터 전통적인 방법 (예를 들어, FACS, 친화도 포획 등)을 통해 포획되고/거나 분류된 종양 세포에 대해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 뇌 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 심장 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 근육 조직이다.

[0070] 용어 "소분자"는 비교적 낮은 분자량을 갖는 자연 발생 또는 인공적으로 생성된 (예를 들어, 화학적 합성을 통함) 분자를 지칭한다. 전형적으로, 소분자는 유기 화합물이다 (예를 들어, 이는 탄소를 함유함). 소분자는 다중 탄소-탄소 결합, 입체중심, 및 다른 관능기 (예를 들어, 아민, 히드록실, 카르보닐, 및 헤테로시클릭 고리 등)를 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 소분자의 분자량은 약 1,000 g/mol 이하, 약 900 g/mol 이하, 약 800 g/mol 이하, 약 700 g/mol 이하, 약 600 g/mol 이하, 약 500 g/mol 이하, 약 400 g/mol 이하, 약 300 g/mol 이하, 약 200 g/mol 이하, 또는 약 100 g/mol 이하이다. 특정 실시양태에서, 소분자의 분자량은 적어도 약 100 g/mol, 적어도 약 200 g/mol, 적어도 약 300 g/mol, 적어도 약 400 g/mol, 적어도 약 500 g/mol, 적어도 약 600 g/mol, 적어도 약 700 g/mol, 적어도 약 800 g/mol, 적어도 약 900 g/mol, 또는 적어도 약 1,000 g/mol이다. 상기 범위의 조합 (예를 들어, 적어도 약 200 g/mol 및 약 500 g/mol 이하)이 또한 가능하다. 특정 실시양태에서, 소분자는 치료 활성제, 예컨대 약물 (예를 들어, 미국 식품 의약품국에 의해 승인된 분자)이

다. 소분자는 또한 1개 이상의 금속 원자 및/또는 금속 이온과 착물화될 수 있다. 바람직한 소분자는 이것이 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 생물학적 효과를 생성한다는 점에서 생물학적으로 활성이다. 특정 실시양태에서, 소분자는 약물이다. 바람직하게는, 반드시는 아니지만, 약물은 적절한 정부 기관 또는 규제 조직에 의해 인간 또는 동물에서 사용하기에 안전하고 효과적인 것으로 이미 간주된 것이다.

[0071] 투여가 고려되는 "대상체"는 인간 (즉, 임의의 연령군의 남성 또는 여성, 예를 들어 소아 대상체 (예를 들어, 영아, 소아 또는 청소년) 또는 성인 대상체 (예를 들어, 청년, 중년 성인 또는 노년 성인)) 또는 비-인간 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물 (예를 들어, 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이) 또는 마우스)이다. 용어 "환자"는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 환자는 인간이다. 인간은 임의의 발달 단계의 남성 또는 여성일 수 있다. 질환 또는 장애의 치료를 "필요로 하는" 대상체 또는 환자는 비제한적으로 질환 또는 장애의 임의의 위험 인자 또는 증상을 나타내는 것들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 또는 비-인간 영장류)이다.

[0072] 치료 또는 치료제의 "치료 유효량"은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하거나 또는 상태와 연관된 1종 이상의 증상을 지연 또는 최소화하기에 충분한 양이다. 치료 또는 치료제의 치료 유효량은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하는, 단독의 또는 다른 요법과 조합된 요법의 양을 의미한다. 용어 "치료 유효량"은 전체 요법을 개선시키고/거나, 상태의 증상, 징후 또는 원인을 감소 또는 회피하고/거나, 또 다른 치료제의 치료 효능을 증진시키는 양을 포괄할 수 있다.

[0073] 본원에 사용된 "조직"은 동일한 기원으로부터의 세포 및 그의 세포외 매트릭스의 군이다. 함께, 세포는 특정 기능을 수행한다. 다중 조직 유형의 연합은 함께 기관을 형성한다. 세포는 상이한 세포 유형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조직은 상피 조직이다. 상피 조직은 기관 표면 (예를 들어, 피부의 표면, 기도, 연기관, 생식관, 및 소화관의 내부 내층)을 덮는 세포에 의해 형성된다. 상피 조직은 보호 기능을 수행하고, 또한 분비, 배출 및 흡수에 수반된다. 상피 조직의 예는 단순 편평 상피, 중층 편평 상피, 단순 입방 상피, 이행 상피, 가성중층 상피, 원주 상피 및 선상피를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 조직은 결합 조직이다. 결합 조직은 무생물 물질 (예를 들어, 세포외 매트릭스)에 의해 분리된 세포로 구성된 섬유성 조직이다. 결합 조직은 기관에 형상을 제공하고, 기관을 제자리에 유지시킨다. 결합 조직은 섬유성 결합 조직, 골격 결합 조직 및 유체 결합 조직을 포함한다. 결합 조직의 예는 혈액, 골, 힘줄, 인대, 지방, 및 윤문상 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 조직은 근육 조직이다. 근육 조직은 근육 세포로부터 형성된 활성 수축 조직이다. 근육 조직은 힘을 생성하고 운동을 유발하는 기능을 한다. 근육 조직은 평활근 (예를 들어, 기관의 내부 내층에서 발견되는 바와 같음), 골격근 (예를 들어, 전형적으로 골에 부착된 바와 같음), 및 심장 근육 (예를 들어, 심장에서 발견되는 바와 같음, 여기서 이는 수축하여 유기체 전반에 걸쳐 혈액을 펌핑함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조직은 신경 조직이다. 신경 조직은 중추 신경계 및 말초 신경계를 포함하는 세포를 포함한다. 신경 조직은 뇌, 척수, 두개 신경 및 척수 신경 (예를 들어, 운동 뉴런)을 형성한다. 특정 실시양태에서, 조직은 뇌 조직이다. 특정 실시양태에서, 조직은 태반 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 심장 조직이다.

[0074] 용어 "트랜스라톰"은 특정한 세포 또는 유기체 내의 모든 오픈 리딩 프레임 (즉, 개시 및 종결 코돈 사이에 속하는 DNA 서열)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법, 프로브 및 키트는 트랜스라톰을 연구 및/또는 프로파일링하는 데 유용하다.

[0075] 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 질환 (예를 들어, 암)의 역전, 완화, 그의 발병의 지연 또는 그의 진행의 억제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 질환의 1종 이상의 징후 또는 증상이 발생하였거나 또는 관찰된 후에 (예를 들어, 예방적으로 (본원에 추가로 기재될 수 있음) 또는 질환의 의심 또는 위험 시에) 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 치료는 질환의 징후 또는 증상의 부재 하에 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는 증상의 발병 전에 (예를 들어, 대상체 또는 대상체의 가족 구성원에서의 증상의 병력에 비추어) 감수성 대상체에게 투여될 수 있다. 치료는 또한 증상이 해결된 후에, 예를 들어 재발을 지연시키거나 또는 방지하기 위해 계속될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 본원에 개시된 방법을 사용하고 건강한 세포 또는 조직과 비교하여 세포 또는 조직에서 발현되는 RNA의 프로파일의 변화를 관찰한 후에 투여될 수 있다.

[0076] 특정 실시양태의 상세한 설명

[0077] 본원에 기재된 측면은 구체적 실시양태, 시스템, 조성물, 방법, 또는 구성에 제한되지 않고, 따라서 물론 달라질 수 있다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 측면을 기재하기 위한 것이며, 본원에 구체적으로 정의되지 않

는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0078] 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하기 위한 방법, 조성물 및 시스템을 제공한다. 본 개시내용은 또한 무손상 조직 내의 세포를 포함하여, 세포에서 번역되는 RNA의 프로파일에 기초하여 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 후보 작용제를 스크리닝하거나 시험하는 방법이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 쌍 및 세트, 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용에 의해 기재된다.

[0079] 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법

[0080] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법을 제공한다. 본원에 개시된 방법에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍 또는 프로브 세트와 접촉될 수 있고, 이는 본원에 추가로 기재되며, 리보솜에 의해 활발하게 번역되는 RNA를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키고, 서열분석하여 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석을 통함). 관심 전사체의 위치를 사용하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링할 수 있다. 본원에 제공된 방법은 이전에 개시된 방법 및 시스템에 비해, 샘플에서 세포하 구조, 세포 형태, 및/또는 조직 구성의 공간 정보를 방해하지 않으면서 샘플에서 RNA 번역을 프로파일링하는 능력을 포함하나 이에 제한되지는 않는 여러 이점을 갖는다.

[0081] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법을 제공하며, 이는:

[0082] a) 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

[0083] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0084] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0085] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0086] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0087] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0088] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0089] 를 포함한다.

[0090] 본원에 개시된 방법은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 한 쌍의 프로브의 사용을 고려한다. 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 리보솜 (즉, 관심 RNA에 결합하여 이를 활발하게 번역하는 리보솜)을 인식하는 부분을 포함한다. 리보솜을 인식하는 프로브의 부분은 단백질, 펩티드, 핵산 또는 소분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제이다. 특정 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함한다. 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 2차 항체인 경우에, 방법은 임의로, 리보솜을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 세포를 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 1차 항체는 리보솜의 임의의 부분, 예를 들어 리보솜의 임의의 단백질, 핵산 (예를 들어, rRNA), 또는 그의 조합을 인식할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체 (예를 들어, 항-RPS3 모노클로날 항체)이다. 일부 실시양태에서, 항체는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체 (예를 들어, 항-RPL4 폴리클로날 항체)이다. 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 프로브 상의 리보솜을 인식할 수 있는 임의의 작용제의 사용을 고려한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 리보솜 내의 리보솜 RNA (rRNA)의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 40S 소형 리보솜 서브유닛 (예를 들어, 18S rRNA 포함)의 부

분 또는 60S 대형 리보솜 서브유닛 (예를 들어, 5S rRNA, 28S rRNA, 및 5.8S rRNA 포함)의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 약 25개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0091] 리보솜을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 본 개시내용은 제2 프로브의 부분의 임의의 배열을 고려한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 제2 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0092] 5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3' 또는

[0093] 5'-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[리보솜을 인식하는 부분]-3';

[0094] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0095] 본원에 기재된 방법에 사용되는 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 특이적 뉴클레오티드 서열로 구성된 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 약 3 내지 약 20, 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드는 번역되는 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다 (즉, 각각의 바코드 서열은 특이적 유전자 또는 전사체와 회합됨). 본원에 기재된 것과 유사한 프로브 상의 바코드의 사용은, 예를 들어 2019년 10월 17일에 공개된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579 및 문헌 [Wang et al., Science 2018, 361, 380]에 추가로 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0096] 제1 프로브는 또한 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이 또는 그 초과이다. 임의의 순서로의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0097] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3' 또는

[0098] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3' 또는

[0099] 5'-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3' 또는

[0100] 5'-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3' 또는

[0101] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3' 또는

[0102] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3';

[0103] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0104] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법을 제공하며, 이는:

[0105] a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

[0106] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3

프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0107] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0108] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0109] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0110] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0111] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0112] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0113] 를 포함한다.

[0114] 본원에 개시된 방법은 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 프로브 세트의 사용을 고려한다. 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)의 첨가는 제3 프로브가 사용되지 않는 방법의 실시양태와 비교하여 증가된 특이성 및/또는 감소된 오프 타겟 증폭을 발생시킬 수 있다.

[0115] 본원에 기재된 바와 같이, 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브" 또는 "블록 프로브"로도 지칭됨)는 리보솜 (즉, 관심 RNA에 결합하여 그를 활발하게 번역하는 리보솜)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브는 중합 블로커를 추가로 포함한다. 중합 블로커의 첨가는 제2 프로브가 단계 (c)의 증폭에서 프라이머로서 사용되는 것을 방지하여, 제3 프로브가 증폭 동안 프라이머로서 사용될 것을 보장한다. 제2 프로브 상의 중합 블로커는 본원에 기재된 방법의 단계 (c)의 증폭에서 제2 프로브가 프라이머로서 사용되는 것을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 제2 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블로커는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제2 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 차단된 3' 히드록실 기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실 기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 3' 히드록실 기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 추가의 뉴클레오티드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실 기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 티민 잔기이다.

[0116] 리보솜을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분 및 제1 프로브에 상보적인 제2 프로브의 부분은 폴리-A 뉴클레오티드 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커는 20-80, 30-70 또는 40-60개의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 약 50개의 뉴클레오티드 길이)이다.

[0117] 본 개시내용은 제2 프로브의 부분의 임의의 배열을 고려한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 제2 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0118] 5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3' 또는

[0119] 5'-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[리보솜을 인식하는 부분]-3';

[0120] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결을 나타낸다.

[0121] 일부 실시양태에서, 제2 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0122] 5'-[리보솜 인식 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3';

[0123] 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다.

[0124] 본원에 기재된 방법에 사용되는 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 특이적 뉴클레오티드 서열로 구성된 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브 상의 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열의 존재는 본원에 기재된 방법에서 관심 RNA의 검출의 특이성을 증가시킬 수 있다 (즉, 방법이 제2 바코드 서열을 포함하지 않는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 수행된 경우와 비교 시). 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 추가의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열의 사용은 또한 본원에 기재된 방법에서 관심 RNA의 비-특이적 증폭을 감소시키는 역할을 할 수 있다. 이는 본원에 기재된 방법에 사용되는 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 제1 프로브 상의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적이어서, 증폭 전에 요구되는 추가의 특이성의 층을 부가하는 것이 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 이루어질 수 있기 때문에 달성된다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브에 상보적인 제1 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브에 상보적인 제1 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0125] 제1 프로브는 또한 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분 및 관심 RNA에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 부분은 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 부분은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이 또는 그 초과이다.

[0126] 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0127] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제3 프로브의 부분에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-3';

[0128] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0129] 본원에 개시된 방법에 사용되는 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)는 특이적 뉴클레오티드 서열로 구성된 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브의 바코드 서열은 약 3 내지 약 20, 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브의 바코드 서열은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 프로브의 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0130] 제3 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제3 프로브는 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적이고, 이에 결합한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-

11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0131] 일부 실시양태에서, 제3 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0132] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'

[0133] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제3 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결을 나타낸다. 제3 프로브의 부분의 임의의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다.

[0134] 본원에 개시된 방법에서 임의의 세포 유형의 사용이 본 개시내용에 의해 고려된다 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 세포 유형). 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 본 개시내용은 또한 다중 세포에서 동시에 (예를 들어, 100개 초과의 세포, 200개 초과의 세포, 300개 초과의 세포, 400개 초과의 세포, 500개 초과의 세포, 1000개 초과의 세포, 10,000개 초과의 세포, 20,000개 초과의 세포, 30,000개 초과의 세포, 40,000개 초과의 세포, 또는 50,000개 초과의 세포에서 동시에) 본원에 기재된 방법을 수행하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 방법은 동일한 세포 유형의 다중 세포 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상이한 세포 유형의 세포를 포함하는 다중 세포 상에서 수행된다. 번역되는 RNA가 본원에 개시된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있는 세포 유형은 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포, 간 세포, 평활근 및 골격근 세포, 조혈 세포, 림프구, 단핵구, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 및 뉴런을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포들은 무손상 조직 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조직 유형) 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 무손상 조직은 고정된 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 무손상 조직은 다중 세포 유형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직은 심장 조직, 림프절 조직, 간 조직, 근육 조직, 골 조직, 눈 조직 또는 귀 조직이다. 특정 실시양태에서, 조직은 뇌 조직이다.

[0135] 본원에 기재된 방법에서 유전자 발현이 프로파일링되는 관심 RNA는 세포의 게놈 DNA로부터 발현된 전사체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA는 mRNA이다. 본원에 기재된 방법은 한 번에 세포에서 번역되는 1개의 RNA, 또는 다중 관심 RNA를 동시에 프로파일링하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 또는 다중 세포에서의 RNA 번역은 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 3000개 초과의 RNA, 4000개 초과의 RNA 또는 5000개 초과의 RNA에 대해 동시에 프로파일링된다.

[0136] 중합체 매트릭스는 세포에서 번역되는 관심 RNA의 서열분석 및 영상화를 용이하게 하기 위해 롤링 서클 증폭 후에 본원에 기재된 방법에 사용된다. 다양한 중합체 매트릭스의 사용이 본 개시내용에 의해 고려되고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘이 포매될 수 있는 임의의 중합체 매트릭스가 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 히드로겔 (즉, 친수성인 가교된 중합체의 네트워크)이다. 일부 실시양태에서, 히드로겔은 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 소듐 폴리아크릴레이트 히드로겔, 아크릴레이트 중합체 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔이다. 특정 실시양태에서, 히드로겔은 폴리아크릴아미드 히드로겔이다. 이러한 히드로겔은, 예를 들어 아크릴아미드 및 비스-아크릴아미드를 포함하는 완충제 중에서 샘플을 인큐베이션하고, 완충제를 제거하고, 중합 혼합물 (예를 들어, 과황산암모늄 및 테트라메틸에틸렌디아민을 포함함) 중에서 샘플을 인큐베이션함으로써 제조될 수 있다.

[0137] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계는 반응성 화학적 기로 변형된 뉴클레오티드 (예를 들어, 아민 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 5-(3-아미노알릴)-dUTP)를 제공하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 화학적 기로 변형된 뉴클레오티드는 증폭 반응에 사용된 뉴클레오티드의 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 또는 약 10%를 구성한다. 예를 들어, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생성하는 단계는 아민-변형된 뉴클레오티드, 예컨대 5-(3-아미노알릴)-dUTP를 제공하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 증폭 과정 동안, 아민-변형된 뉴클레오티드는 이들이 생산될 때 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입된다. 생성된 앰플리콘은 1급 아민으로 관능화되고, 이는 또 다른 상용성 화학적 모이어티 (예를 들어, N-히드록시숙신이미드)와 추가로 반응하여 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계를 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오티드를 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시키고,

1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함한다.

[0138] 본원에 개시된 방법은 또한 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석 단계는 "동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석" (SEDAL 서열분석)을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, SEDAL은 특정한 샘플에 대해 2, 3, 4, 5회 또는 5회 초과로 수행된다. SEDAL 서열분석은 문헌 [Wang, X. et al., Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 2018, 361, 380], 및 2019년 10월 17일에 공개된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579에 추가로 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 간략하게, 검출가능한 표지 (즉, 예를 들어 영상화를 통해 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브의 위치를 시각화하는 데 사용될 수 있는 임의의 표지)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브가 세포에 제공된다. 특정 실시양태에서, 검출가능한 표지는 형광 (예를 들어, 형광단)이다. 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적이고, 따라서 관심 RNA 정체에 연결되고, 이는 세포 내의 관심 RNA의 위치를 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0139] 본원에 기재된 방법에 사용되는 (예를 들어, SEDAL 서열분석에 사용되는) 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 영상화 기술을 사용하여 판독될 수 있다. 예를 들어, 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브가 형광단을 포함하는 실시양태에서, 형광단은 관심 RNA를 확인하기 위해 영상화를 사용하여 판독될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심대상인 특정 RNA를 검출하기 위해 사용되는, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 형광단을 포함하는 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브의 위치를 영상화함으로써, 샘플 내의 관심대상인 특정 RNA의 위치를 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 영상화하는 단계는 형광 영상화를 포함한다. 특정 실시양태에서, 영상화하는 단계는 공초점 현미경검사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 영상화하는 단계는 에피형광 현미경검사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2 라운드의 영상화가 수행된다. 특정 실시양태에서, 3 라운드의 영상화가 수행된다. 특정 실시양태에서, 4 라운드의 영상화가 수행된다. 특정 실시양태에서, 5 라운드 이상의 영상화가 수행된다.

[0140] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 RNA 번역을 프로파일링하는 방법은 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 방법과 조합될 수 있다. 예를 들어, 비-번역 RNA의 발현은 리보솜을 인식하는 부분을 포함하지 않는 프로브를 사용하여 RNA 번역과 함께 프로파일링될 수 있다. 활발하게 번역되지 않는 다른 세포하 위치의 RNA도 또한 RNA 번역과 함께 프로파일링될 수 있다. 단백질 발현의 프로파일링 (예를 들어, 전통적인 단백질체학 방법을 사용함)은 또한 본원에 기재된 방법, 뿐만 아니라 트랜스크립톰, 지질 및/또는 소분자의 프로파일링과 조합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 중 임의의 것은 세포에서 1개 이상의 유전자를 과다발현시키거나 또는 녹아웃시켜 1개 이상의 유전자가 관심 RNA의 번역을 조절하는 데 수반되는지 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0141] 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 또한 1개 이상의 세포의 세포 유형 및/또는 세포 상태를 결정하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 중 임의의 것은 세포 또는 세포들의 RNA 번역 프로파일을 다양한 세포 유형의 세포의 RNA 번역 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써, 프로파일링된 세포의 세포 유형, 또는 다중 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 중 임의의 것은 세포 또는 세포들의 RNA 번역 프로파일을 다양한 세포 상태의 세포의 RNA 번역 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써, 프로파일링된 세포의 세포 상태, 또는 다중 프로파일링된 세포의 세포 상태를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0142] 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법

[0143] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각되거나 또는 가질 위험이 있는 대상체, 또는 건강하거나 또는 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 세포 또는 다중 세포에 대해 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 RNA의 발현을 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다중 세포)에서의 동일한 관심 RNA의 발현과 비교할 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 RNA 번역 프로파일 (관심 단일 RNA 또는 다중 RNA, 예를 들어 특이적 질환 서명 포함)에서의 임의의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역은 또한 이전에 프

로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 발현은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0144] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은

[0145] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

[0146] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0147] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0148] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0149] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0150] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0151] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 단계

[0152] 를 포함하며, 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 RNA 번역 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0153] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은

[0154] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

[0155] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0156] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0157] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0158] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0159] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0160] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0161] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0162] 를 포함하며; 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 RNA 번역 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0163] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-이환 세포에서 번역되는 RNA는 대조군 실험으로서 본원에 개시된 방법을 사용하여 대상체로부터 채취한 세포와 함께 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 이환 세포에서의 발현과 비교되는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 번역되는 RNA의 프로파일은 방법이 이전에 1개 이상의 비-이환 세포에 대해 수행된 때로부터 참조 데이터를 구성한다.

[0164] 임의의 질환 또는 장애의 진단이 본원에 기재된 방법에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장

애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환은 암이다.

[0165] 일부 실시양태에서, 세포는 조직 (예를 들어, 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직)에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 대상체로부터의 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 또는 비-인간 영장류)이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 가축이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 고정된 조직 샘플을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 생검 (예를 들어, 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육 또는 피부 생검)이다. 특정 실시양태에서, 생검은 종양 생검이다. 특정 실시양태에서, 조직은 뇌 조직이다. 특정 실시양태에서, 조직은 중추 신경계로부터의 것이다.

[0166] 1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법

[0167] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 1개 이상의 관심 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법은 세포에서 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 수행될 수 있다. 이어서, 세포 (예를 들어, 정상 세포, 또는 이환 세포)에서의 번역되는 다양한 관심 RNA의 발현을 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 관심 RNA의 발현과 비교할 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에서의 번역에 비해 RNA 번역 프로파일에서의 임의의 차이는, 1개 이상의 관심 RNA의 번역이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환의 치료와 연관된 것으로 공지된 특정한 서명 (예를 들어, 번역되는 다중 관심 RNA의 서명)은 목적하는 방식으로 번역을 조정할 수 있는 후보 작용제를 확인하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한, 예를 들어 1개 이상의 세포를 후보 작용제 또는 공지된 약물로 처리하는 경우 특이적 RNA 번역 서명을 조사함으로써, 특정 부작용을 갖는 약물을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0168] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공하며, 이는

[0169] a) 후보 작용제로 처리 중이거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

[0170] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0171] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0172] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0173] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0174] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0175] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 단계

[0176] 를 포함하고; 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 번역되는 RNA의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 1개 이상의 RNA의 번역을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0177] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공하며, 이는

[0178] a) 후보 작용제로 처리 중이거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

[0179] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0180] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0181] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0182] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0183] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0184] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0185] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포 내의 리보솜에 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0186] 를 포함하고, 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 번역되는 RNA의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 1개 이상의 RNA의 번역을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0187] 일부 실시양태에서, 후보 작용제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제는 공지된 약물 또는 FDA-승인된 약물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 단편 또는 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토카인이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다. 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 특히, 1개 이상의 RNA의 번역을 조정할 수 있는 것으로 생각되는 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제에 의한 1개 이상의 관심 RNA의 번역의 조정은 질환 또는 장애의 증상의 감소, 완화 또는 제거, 또는 질환 또는 장애의 발생 또는 진행의 예방과 연관된다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제에 의해 조정되는 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 후보 작용제에 의해 조정되는 질환 또는 장애는 암이다.

[0188] 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법

[0189] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 번역되는 RNA를 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 또는 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서 번역되는 1개 이상의 RNA의 프로파일을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 RNA의 번역 상태와 비교할 수 있다. 이어서, 비-이환 세포에 비해 RNA 번역 프로파일에서 임의의 차이가 관찰되는 경우에 질환 또는 장애에 대한 치료가 대상체에게 투여될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 RNA 번역과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 번역은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0190] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이는:

[0191] a) 후보 작용제로 처리 중이거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서

[0192] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0193] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0194] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0195] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0196] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0197] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하여, 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하는 단계

[0198] 를 포함하고; 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 번역되는 RNA의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 1개 이상의 RNA의 번역을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0199] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이는:

[0200] a) 후보 작용제로 처리 중이거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서

[0201] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0202] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0203] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0204] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0205] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0206] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0207] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포 내의 리보솜에 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

[0208] 를 포함하고; 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 번역되는 RNA의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 1개 이상의 RNA의 번역을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0209] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역은 대조군 실험으로서 본원에 개시된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 이환 세포에서의 번역과 비교되는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA 번역 데이터는 방법이 이전에 비-이환 세포에 대해 수행된 시점으로부터 참조 데이터를 구성한다.

[0210] 질환 또는 장애에 대한 임의의 적합한 치료가 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 수술을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 영상화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 추가의 진단 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 방사선 요법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 공지된 약물 및/또는 FDA-승인된 약물이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 단편 또는 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체, 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토카인이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다.

[0211] 임의의 질환 또는 장애의 치료는 본원에 기재된 방법에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환은 암이다.

[0212] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 조직 샘플을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 생검 (예를 들어, 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육 또는 피부 생검)이다. 특정 실시양태에서, 생검은 종양 생검이다. 특정 실시양태에서, 생검은 고형 종양 생검이다. 일부 실시양태에서,

조직 샘플은 뇌 조직 샘플이다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 중추 신경계 조직 샘플이다.

[0213] 프로브

[0214] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 방법 및 시스템에 사용하기 위한 프로브 쌍 및 세트를 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 프로브 쌍을 제공하며, 여기서:

[0215] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0216] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함한다.

[0217] 본원에 기재된 모든 프로브는 언급된 성분 각각의 사이에 다양한 뉴클레오티드 길이의 스페이서 또는 링커를 임의로 가질 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드 프로브의 성분은 서로 직접 (즉, 포스포디에스테르 결합에 의해) 연결될 수 있다. 본원에 기재된 모든 프로브는 표준 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 또는 표준 뉴클레오티드 중 일부는 관련 기술분야에 공지된 임의의 변형된 뉴클레오티드로 치환될 수 있다.

[0218] 본원에 기재된 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함한다. 제2 프로브는 리보솜 (즉, 관심 RNA에 결합하여 이를 활발하게 번역하는 리보솜)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체 또는 단편에 결합하는 작용제이다. 특정 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체 또는 단편을 포함한다. 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분이 2차 항체인 경우에, 2차 항체는 리보솜을 인식하는 1차 항체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항-40S 리보솜 단백질 S3 (RPS3) 항체이다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항-60S 리보솜 단백질 L4 (RPL4) 항체이다. 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 프로브 상의 리보솜을 인식할 수 있는 임의의 작용제의 사용을 고려한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 리보솜 내의 리보솜 RNA (rRNA)의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 40S 소형 리보솜 서브유닛 (예를 들어, 18S rRNA 포함)의 부분 또는 60S 대형 리보솜 서브유닛 (예를 들어, 5S rRNA, 28S rRNA, 및 5.8S rRNA 포함)의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분은 18S rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, rRNA의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 약 25개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0219] 본원에 기재된 프로브 쌍의 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 특이적 뉴클레오티드 서열로 구성된 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 약 3 내지 약 20, 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 리보솜에 의해 번역되는 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.

[0220] 제1 프로브는 또한 제2 프로브에 상보적인 부분, 및 관심 RNA에 상보적인 부분을 포함한다. 임의의 순서로의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0221] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3';

[0222] 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0223] 리보솜을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본 개시내용은 제2 프로브의 부분의 임의의 배열을 고려한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프로브 쌍의 제2 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0224] 5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3';

[0225] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결을 나타낸다.

[0226] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락 프로브"로도 지칭됨), 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브" 또는 "블록 프로브"로도 지칭됨) 및 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공하며, 여기서:

[0227] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0228] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0229] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적이다.

[0230] 본원에 기재된 프로브 쌍과 비교하여, 본 개시내용에 의해 고려되는 프로브 세트는 제3 프로브를 포함한다. 제3 프로브의 첨가는 제3 프로브가 사용되지 않는 실시양태와 비교하여 증가된 특이성 및/또는 감소된 오프 타겟 증폭을 발생시킬 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 제2 프로브는 리보솜 (즉, 관심 RNA에 결합하여 이를 활발하게 번역하는 리보솜)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브는 중합 블로커를 추가로 포함한다. 중합 블로커의 첨가는 제2 프로브가 단계 (c)의 증폭에서 프라이머로서 사용되는 것을 방지하여, 제3 프로브가 증폭 동안 프라이머로서 사용될 것을 보장한다. 제2 프로브 상의 중합 블로커는 본원에 기재된 방법의 단계 (c)의 증폭에서 제2 프로브가 프라이머로서 사용되는 것을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 제2 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블로커는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제2 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 차단된 3' 히드록실 기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실 기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 3' 히드록실 기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 추가의 뉴클레오티드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실 기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 티민 잔기이다.

[0231] 리보솜을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 리보솜을 인식하는 제2 프로브의 부분 및 제1 프로브에 상보적인 제2 프로브의 부분은 폴리-A 뉴클레오티드 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 뉴클레오티드 링커는 20-80, 30-70 또는 40-60개의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 약 50개의 뉴클레오티드 길이)이다.

[0232] 본 개시내용은 제2 프로브의 부분의 임의의 배열을 고려한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0233] 5'-[리보솜을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3';

[0234] 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결을 나타낸다.

[0235] 일부 실시양태에서, 제2 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0236] 5'-[리보솜 인식 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3';

[0237] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다.

[0238] 본원에 기재된 프로브 세트의 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 특이적 뉴클레오티드

서열로 구성된 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브 상의 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열의 존재는 본원에 기재된 방법에서 관심 RNA의 검출의 특이성을 증가시킬 수 있다 (즉, 방법이 제2 바코드 서열을 포함하지 않는 제1 프로브를 사용하여 수행된 경우와 비교 시). 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 추가의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열의 사용은 또한 리보솜에 의해 번역되는 관심 RNA의 비-특이적 증폭을 감소시키는 역할을 할 수 있다. 이는 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열이 제1 프로브 상의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적이어서, 증폭 전에 요구되는 추가의 특이성의 층을 부가하는 것이 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 이루어질 수 있기 때문에 달성된다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0239] 제1 프로브는 또한 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분 및 관심 RNA에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오티드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0240] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제3 프로브의 부분에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-3';

[0241] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0242] 본원에 개시된 프로브 세트의 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)는 특이적 뉴클레오티드 서열로 구성된 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브의 바코드 서열은 약 3 내지 약 20, 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브의 바코드 서열은 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 프로브의 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0243] 제3 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제3 프로브는 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적이고, 이에 결합한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0244] 일부 실시양태에서, 제3 프로브는 하기 구조를 포함하며:

[0245] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'

[0246] 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제3 프로브의 2개의 부분 사

이의 직접 연결을 나타낸다. 제3 프로브의 부분의 임의의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다.

[0247] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 다중 프로브 쌍을 포함하는 복수의 프로브를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 다중 프로브 세트를 포함하는 복수의 프로브를 제공한다. 특정 실시양태에서, 복수의 프로브에서 각각의 프로브 쌍 또는 세트는 상이한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함한다.

[0248] 키트

[0249] 키트가 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 한 측면에서, 제공된 키트는 본원에 기재된 바와 같은 프로브 중 1개 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 임의의 프로브 쌍, 또는 다중 프로브 쌍을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 임의의 프로브 세트, 또는 다중 프로브 세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 용기 (예를 들어, 바이알, 앰플, 병, 및/또는 분배기 패키지, 또는 다른 적합한 용기)를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 대조군 실험을 수행하기 위한 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 다른 시약 (예를 들어, 효소, 예컨대 리가제 또는 폴리머라제, 본원에 기재된 바와 같은 아민-변형된 뉴클레오티드, 1차 항체, 2차 항체, 완충제, 및/또는 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약 및 단량체)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 프로파일링하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환을 진단하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 RNA 번역을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용하다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 키트는 키트의 사용에 대한 지침서를 추가로 포함한다.

[0250] 시스템

[0251] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 번역되는 RNA를 프로파일링하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 시스템은

[0252] a) 세포;

[0253] b) 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 쌍, 여기서

[0254] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0255] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함함;

[0256] c) 현미경; 및

[0257] d) 컴퓨터

[0258] 를 포함한다.

[0259] 일부 실시양태에서, 이러한 시스템은

[0260] a) 세포;

[0261] b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서

[0262] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열, 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 제2 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고;

[0263] ii) 제2 프로브는 리보솜을 인식하는 부분, 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분을 포함하고;

[0264] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오티드 부분, 및 올리고뉴클레오티드 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 프로브의 올리고뉴클레오티드 바코드 서열은 제1 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 바코드 서열에 상보적임;

[0265] c) 현미경; 및

[0266] d) 컴퓨터

[0267] 를 포함한다.

[0268] 본원에 기재된 프로브 (즉, 프로브 쌍 또는 프로브 세트) 중 임의의 것이 본 개시내용에 의해 고려되는 시스템에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 현미경은 공초점 현미경이다. 일부 실시양태에서, 시스템은 CPU를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 컴퓨터 저장매체 및/또는 메모리, 또는 저장 장치를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 카메라를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 CCD를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 현미경검사를 수행하고/거나 영상 분석을 위한 소프트웨어를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 리가제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 폴리머라제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 아민-변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약을 추가로 포함한다. 본 개시내용의 시스템 내의 세포는 본원에 개시된 세포 유형 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 다중 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 상이한 세포 유형의 것이다. 특정 실시양태에서, 세포는 조직 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 대상체에 의해 또는 대상체로부터 제공된 조직 샘플이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0269] 실시예

[0270] 실시예 1: 계내 RNA 번역 상태의 단일-세포 프로파일링

[0271] 계내 리보솜 프로파일링을 사용하여 활성 번역 베타-액틴 (ACTB) mRNA를 시각화하였다 (도 2a-2d). 올리고뉴클레오티드-접합된 리보솜 항체는 리보솜의 결합을 용이하게 증폭될 수 있고 형광 방법에 의해 검출될 수 있는 증폭가능한 프라이머로 전환시킨다. 서열의 표적화된 절편을 고유한 바코드로 전환시키기 위해 패드락 프로브의 풀을 설계하였다. 이어서, 조합 및 순차적 SEDAL 서열분석 라운드를 수행하여 바코드를 판독하고, mRNA의 정체 및 그러한 mRNA 상의 리보솜의 수를 해독하였다.

[0272] 계내 리보솜 프로파일링의 검출 특이성을 추가로 개선시키기 위해, 3-부분 프로브 전략을 개발하고 이용하였다 (도 3). 항-리보솜 항체-접합된 DNA 프로브는 3' 단부에서 차단되고, 따라서 오직 패드락 프로브 라이게이션에만 사용될 수 있다. 이어서, 무손상 패드락 프로브는 이웃 부위에 혼성화하는 프라이머 프로브를 사용하여 증폭되어 DNA 앰플리콘을 생성할 수 있다. 따라서, 리보솜-결합된 RNA만이 cDNA 앰플리콘을 생성할 것이며, 리보솜에 결합되지 않은 mRNA는 라이게이션 또는 증폭될 수 없다. 각각의 유전자의 정체는 패드락 및 프라이머 프로브에서 코딩되고, SEDAL 계내 서열분석에 의해 판독된다. 세포하 국재화 정보를 수득하기 위해, 소기관 염색을 계내 리보솜 프로파일링 절차에 혼입시켰다 (도 3). 전반적으로, 세포하 국재화 정보와 함께 높은 특이성의 계내 단일-세포 번역 상태는 이러한 개선된 전략을 사용하여 수득될 수 있다.

[0273] 진핵 리보솜은 소형 40S 서브유닛 및 대형 60S 서브유닛으로 이루어지며, 이들은 함께 총 대략 80개의 구조적으로 별개의 단백질을 함유한다. 소형 서브유닛 단백질 RPS3 (리보솜 단백질 S3) 및 대형 서브유닛 단백질 RPL4 (리보솜 단백질 L4) 둘 다를 표적화하는 항체를 사용하여 3-프로브 계내 리보솜 프로파일링 방법을 시험하였다. 항-RPS3 항체 및 항-RPL4 항체 둘 다가 이 방법에서 작용하는 것으로 밝혀졌다 (도 4a-4c 및 5a-5c). 항-RPS3 항체 또는 항-RPL4 항체를 사용하여 ACTB에 대한 강한 계내 리보솜 프로파일링 신호 (도 4a 및 5a)를 관찰한 반면, 항체로서 이뮤노글로불린 G (IgG)를 사용한 음성 대조군 샘플은 약한 신호를 나타내었다 (도 4b 및 5b). 비-코딩 전이 연관 폐 선암종 전사체 1 (MALAT1) RNA를 또한 시험하였고, 항-RPS3 또는 항-RPL4 항체를 사용하여 MALAT1에 대해 거의 신호를 관찰하지 못했고 (도 4c 및 5c), 이는 이러한 접근법이 비-코딩 RNA가 아니라 번역 mRNA를 특이적으로 검출할 것이라는 가설을 지지한다.

[0274] 본원에 기재된 항체-기반 계내 리보솜 프로파일링 방법은 리보솜-결합된 mRNA를 정확하게 검출할 수 있지만; 절차는 항-리보솜 항체의 특이성에 의존하고, 항체-DNA 접합의 별도의 단계를 필요로 한다. 리보솜은 리보솜 RNA (rRNA) 및 리보솜 단백질로 이루어지기 때문에, 패드락 프로브 라이게이션을 위해 rRNA-혼성화된 프로브를 이용하는 절차를 개발하여 항체 결합 단계를 피하였다 (도 6). 절차는 본원에 기재된 3-프로브 전략을 이용하였고, 이는 또한 본원에 기재된 2-프로브 전략과도 상용성이다. 항체-기반 접근법과 유사하게, rRNA-혼성화된 프로브는 3' 단부에서 차단되고, 롤링-서클 증폭을 위한 프라이머로서 사용될 수 없다. 18S rRNA에 혼성화하는 프로브를 사용하여 계내 리보솜 프로파일링 방법을 시험하였다. 이 절차는 상기 언급된 접근법과 비교하여 최상의 신호-대-잡음 대비를 제공하는 것으로 밝혀졌다 (도 7a-7c). ACTB에 대한 강한 계내 리보솜 프로파일링 신호가 세포 막 근처에서 관찰되었고 (도 7a), 이는 ACTB RNA의 국재화된 번역과 일치한다. rRNA 혼성화 부분이 없거

나, 또는 비-코딩 MALAT1 유전자를 표적화하는 프로브를 이용한 음성 대조군 샘플은 둘 다 최소 신호를 나타내었다 (도 9b 및 9c).

[0275] 실시예 2: 세포하 해상도에서의 공간 해상된 단일-세포 트랜스라톰

[0276] mRNA 번역의 정확한 공간 제어는 세포 생리학의 전사후 및 번역 유전자 조절의 필수 부분이다. 그러나, 단일 세포에서 국재화된 mRNA 번역을 트랜스크립톰 규모로 체계적으로 연구하는 것은 주요 도전과제로 남아있다. 따라서, RIBO맵의 개발이 본원에 기재된다. RIBO맵은 무손상 세포 및 조직에서 세포하 해상도로 수천개의 유전자에 대한 mRNA 번역을 동시에 검출하기 위한 3차원 (3D) 계내 프로파일링 방법이다. RIBO맵을 사용하여, 981개의 유전자를 인간 HeLa 세포에서 맵핑하여, 세포-주기 의존성 및 세포하 국재화된 번역을 밝혀내었다. 또한, 62,753개 세포의 공간 세포 아틀라스를 사용하여 성체 마우스 뇌 조직에서의 5,413개 유전자의 단일-세포 공간 트랜스라톰을 생성하였다. 뉴런 및 신경교 세포에서 국부 번역이 또한 검출되었다. 종합하면, RIBO맵은 세포하 아키텍처, 세포 상태 및 조직 해부학과 관련하여 국재화된 단백질 합성의 이해를 가속화시키는, 최초의 공간 해상된 단일-세포 트랜스라톰 기술을 제시한다. 전반적으로, RIBO맵은 무손상 세포 및 조직에서 동시에 수천개의 유전자에 대한 mRNA 번역의 단일-세포 계내 프로파일링을 3D로 가능하게 한다.

[0277] 세포 단백질은 세포 기능을 실행하고 세포 유형 및 상태를 형상화하는 유전자 발현의 최종 산물이고, 단일-세포 및 공간 해상도로 게놈-전반 번역 패턴을 측정하는 것은 이종 세포 유형 및 상태에서 번역 조절에 대한 이해를 변환시킬 수 있는 가장 중요한 목표이다. 대규모 단일-세포 또는 공간 해상된 프로테옴 프로파일링은 도전과제로 남아있으며 (1), 단일 세포에서 상응하는 단백질 존재비를 추론하기 위해 mRNA 수준을 사용하는 것이 관례였다. 그러나, 유전자 발현은 전사 및 번역 수준 둘 다에서 조절되고, 다수의 연구는 mRNA와 단백질 수준 사이에서 불량한 상관관계를 결론내렸다 (2-5). 또한, 많은 유전자는 특정 세포하 유전자좌에서 국재화된 번역을 거친다 (6). 따라서, 번역 제어의 포괄적인 이해를 위해 단백질 합성의 확장가능한 단일-세포 및 공간-해상 프로파일링 방법이 필요하다.

[0278] 기존의 벌크 및 단일-세포 리보솜 프로파일링 방법은 트랜스크립톰에서 단백질 번역의 분석을 가능하게 하였다 (7-12). 그러나, 이들 방법은 세포하 구조, 세포 형태, 또는 조직 구성의 공간 정보를 보존할 수 없어서, 공간에서 단백질 합성을 차트화하는 능력을 제한한다. 대조적으로, 물리적 좌표로 mRNA 번역을 추적할 수 있는 영상화-기반 방법 (13-19)은 한 번에 1개의 유전자로 제한된다. 따라서, 세포하 해상도로 단일 세포에서 고도로 멀티플렉스화된 공간 리보솜 프로파일링을 달성하는 것은 도전과제로 남아있다. 이러한 갭을 채우기 위해, 세포하 해상도로 단백질 및 유전자 발현을 고도로 멀티플렉스화 차트화하기 위한 새로운 3D 계내 맵핑 방법 (RIBO맵)이 본원에 기재된다. 981개 유전자의 단백질 합성을 RIBO맵을 사용하여 무손상 세포에서 프로파일링하였고, 컴퓨터 파이프라인을 개발하여 국부 번역의 세포하 패턴화를 분석하였다. RIBO맵을 또한 세포하 해상도에서 무손상 마우스 뇌 조직 내의 5,413개의 유전자를 프로파일링하는 데 적용하여, 세포 유형 및 조직 영역에 걸친 단백질 합성의 공간 패턴을 밝혀내었다.

[0279] RIBO맵은 리보솜-결합된 mRNA를 선택적으로 검출하고 증폭시키는 트리-프로브의 고유한 설계, 이어서 히드로겔-조직 포매 및 고도로 멀티플렉스화된 계내 서열분석 판독을 사용하는 표적화된-서열분석 전략을 구축한다 (20). 특히, RIBO맵 트리-프로브 세트는 (1) 리보솜 RNA (rRNA)에 혼성화하고 근접한 패드락 프로브를 환형화하기 위한 스플린트로서의 역할을 하는 스플린트 DNA 프로브 (하기 참조); (2) 관심대상의 특이적 mRNA 종을 표적화하고 유전자-고유 식별자를 코딩하는 패드락 프로브; 및 (3) 동일한 mRNA 상의 패드락 프로브의 인접 부위를 표적화하고 롤링 서클 증폭 (RCA)을 통해 환형화된 패드락 프로브의 증폭을 가능하게 하는 프라이머로서의 역할을 하여 DNA 나노볼 (앰플리콘)을 생성하는 프라이머를 포함한다. 중요하게는, 프라이머-패드락 프로브의 유전자-특이적 혼성화 쌍은 단일 프로브의 비특이적 혼성화로부터 발생하는 가-양성 신호를 배제한다 (20) (도 9a). 종합하면, RNA의 신호는 3개의 모든 프로브가 근접하여 존재할 때만 DNA 앰플리콘으로 증폭될 것이다 (도 9b 및 9c). DNA 앰플리콘은 후속적으로 조직-히드로겔 접합 화학을 사용하여 폴리아크릴아미드 히드로겔 매트릭스에 계내 포매된다 (20). 이어서, DNA 앰플리콘 내의 유전자-고유 바코드는 계내 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석 (SEDAL, 도 9a)을 통해 디코딩된다 (20).

[0280] 리보솜 단백질을 표적화하는 1차 항체를 이용하는, RIBO맵 작업흐름을 위한 대안적 전략을 또한 설계하였으며, 이는 후속적으로 트리-프로브 증폭을 위해 스플린트-접합된 단백질 A/G에 의해 검출된다 (도 12a). 구체적으로, 이러한 전략을 항-RPS3 (소형 40S 서브유닛 리보솜 단백질 3) 항체 및 항-RPL4 (대형 80S 서브유닛 리보솜 단백질 4) 항체를 사용하여 평가하였다 (도 12b-12e). 항체-기반 전략의 신호-대-잡음 비 (SNR)는 13.6-16.7의 범위였다. rRNA-표적화 전략의 SNR은 93±17이었다 (도 12f).

[0281] 다음으로, 리보솜-결합된 mRNA에 대한 RIBO맵 트리-프로브 증폭의 특이성을 평가하였다. 먼저, 음성 대조군으로서 비-번역 긴 비-코딩 RNA (핵-국재화된 MALAT1 RNA 및 세포질 국재화된 vtRNA1-1 RNA)를 사용하여 검출 특이성을 시험하였다. RIBO맵 및 이전에 보고된 STAR맵 (20) 영상화를 HeLa 세포에서 ACTB 및 음성 대조군 RNA에 대해 수행하여 각각 리보솜-결합된 RNA 및 총 RNA를 검출하였다 (도 9d). RIBO맵은 ACTB mRNA만을 검출한 반면, STAR맵은 mRNA 및 비-코딩 RNA 둘 다를 검출한 것으로 발견되었다 (도 9e 및 9f). 다음으로, 리보솜-로딩 부위를 검출하는 데 있어서 RIBO맵의 서브-전사체 특이성을 검증하였다. 여기서는, 개시 코돈에서 번역-개시 리보솜을 포획하고 신장되고 있는 리보솜이 전사체로부터 떨어져 나오게 하는 번역 억제제인 해링토닌을 사용하였다 (도 9g). 개시 코돈으로부터 상이한 거리에 있는 (-16, 115, 및 405 nt) 서브-전사체 영역을 표적화하도록 3개의 트리-프로브 세트를 설계하였다 (도 1h). 해링토닌 처리 (2 μg/ml 최종 농도) 5분 후에, ACTB mRNA는 개시 코돈의 115 또는 405 nt 하류를 표적화하는 프로브에 의해 검출한 경우 RIBO맵 신호 강도에서 유의한 감소를 나타낸 반면 (각각 $p = 7.5 \times 10^{-5}$, 4.7×10^{-5}, 스튜던트 t-검정), 개시 코돈으로부터 -16 nt를 표적화하는 프로브에 의해 생성된 신호는 거의 감소를 나타내지 않았다 (도 9i 및 9j). 전체적으로, RIBO맵은 리보솜-결합된 mRNA를 특이적으로 검출할 수 있다는 것이 입증되었다.

[0282] RIBO맵의 SNR 및 특이성을 벤치마킹한 후, HeLa 세포에서 고도로 멀티플렉스화된 981-유전자 RIBO맵 실험을 수행함으로써 단일 세포에서 세포하 해상도에서 세포-주기 의존성 및 국재화된 mRNA 번역을 프로파일링하였다 (도 10a). 981개의 유전자는 세포-주기 유전자 마커, 다양한 세포하 패턴을 갖는 유전자, 및 다양한 RNA 안정성을 갖는 유전자로 구성된 선별된 목록으로 제시된다 (21-24). 세포-주기 단계 및 세포하 소기관의 정보를 추가로 포함하는 다중-모드 RIBO맵 실험을 설계하였다: (1) 각각의 세포의 세포-주기 상을 형광 유비퀴틴화-기반 세포 주기 표시자 (FUCCI)에 의해 포획하고 (25, 26); (2) 리보솜-결합된 mRNA (981개 유전자)를 FUCCI 영상화 후에 계내 서열분석하고 (20); (3) 최종적으로, 핵, 내형질 세망, 및 세포 형상을 염색하고 영상화하였다 (도 2b). 모든 3가지 영상화 양식을 핵 (DAPI) 염색 공유 채널에 등록하였다. 공간 트랜스라톰 대 공간 트랜스크립톰을 비교하기 위해, HeLa FUCCI 세포의 동일한 배치에 대해 STAR맵 (동일한 RNA 혼성화 서열을 가짐)을 사용하여 동일한 981개 유전자의 쌍형성된 총 RNA 맵핑을 수행하였다 (도 10a). 품질-관리 여과 후에 총 1,813개의 세포를 RIBO맵에 의해 서열분석하고 (평균 세포당 1,500개의 리보솜-결합된 RNA 판독), 1,757개의 세포를 STAR맵에 의해 서열분석하였다 (평균 세포당 2,349개의 RNA 판독).

[0283] 먼저, RIBO맵이 세포 주기-의존성 mRNA 번역을 정밀분석할 수 있는지 평가하였다. 이를 위해, RIBO맵에 의해 생성된 단일-세포 트랜스라톰 프로파일 및 STAR맵에 의해 생성된 단일-세포 트랜스크립톰 프로파일을 단일-세포 궤적 분석에 적용하였다 (21). RIBO맵 및 STAR맵 샘플 둘 다에서, 공지된 세포-주기 유전자 마커의 단일-세포 프로파일 (21)을 사용하여 확산 맵 상에 단일 세포를 가상시간 값으로 임베딩하여 세포-주기 진행을 파악하였다 (도 10c 및 도 13a 및 13b). 둘 다의 데이터세트에 대해, RNA-규정된 G1, S, 및 G2/M 세포-주기 상은 FUCCI 단백질 형광의 예상된 세포-주기-의존성 패턴과 일치하였고 (도 10c), 이는 세포 상태를 검출하는 데 있어서 RIBO맵의 능력을 입증한다.

[0284] 세포 주기 진행을 파악하는 데 있어서 RIBO맵의 정확도를 확인한 후, 공동-조절된 유전자 모듈을 공변동 분석에 의해 확인하였다. 단일-세포 트랜스라톰 발현에 기초하여 모든 유전자 쌍에 대해 쌍별 상관관계를 계산하고, 계층적 클러스터링을 사용하여 단일 세포에 걸쳐 높은 상관 계수를 갖는 유전자를 확인하였다. 특히, 5개의 유전자 모듈이 실질적인 모듈내 상관관계 및 별개의 기능적 경로의 풍부화를 갖는다는 것을 발견하였다 (모듈 1-5, 도 10d 및 도 14a 내지 14d). 특히, 모듈 3 및 5의 유전자는 각각 G2/M 및 G1/S 세포-주기 마커 유전자로 풍부화되었다 (도 10e). 이들 2개의 유전자 모듈은 또한 음의 상관관계가 있다 (도 14e). 이 결과는 이들 세포-주기 마커 유전자가 그의 유전자 기능의 동기화된 실행을 위해 세포-주기 진행 동안 공동-조절된다는 이전의 발견을 지지하는 단일-세포 수준 증거를 제공하였다 (27). 또한, 모듈 2는 단백질 번역 기구, 예컨대 리보솜 단백질 (RPS3, RPS28 및 RPL37) 및 번역 인자 (EEF2, EIF3B 및 ETF1)를 코딩하는 유전자를 함유한다 (도 14c). 이들 유전자는 모듈 5 (G1/S 마커 유전자)와 양의 상관관계 및 모듈 3 (G2/M 마커 유전자)과 음의 상관관계를 보여준다 (도 14f). 이는 세포하 소기관의 물리적 확장 및 복제를 위한 단백질 생산을 공급하기 위해 단백질 번역 기구가 G1/S 상에서 보다 활발하게 생산된다는 것을 암시한다.

[0285] 데이터세트의 높은 공간 해상도를 활용하여, RIBO맵이 세포하 번역 패턴을 검출할 수 있는지 조사하였다. 세포하 공간에서 공동-국재화되는 (공간적 근접성을 나타내는) 경향을 보이는 번역 유전자를 확인하기 위해, RIBO맵에서 각각의 RNA에 대한 가장 가까운 이웃 프로파일을 생성하고, 무작위화된 대조군에 대해 비교함으로써 유전자 공동국재화의 유의성을 평가하였다. 유전자 공동-국재화 매트릭스의 후속 계층적 클러스터링으로, 고도로 상관된 세포하 공간 구성 및 별개의 기능적 풍부화를 갖는 5개의 유전자 모듈을 확인하였다 (모듈 1-5, 도 10e-

10g 및 도 15a-15c). 이들 중에서, 모듈 2, 4 및 5는 막 단백질 및 분비 경로로 기능적으로 풍부화되고 (도 10f 및 10g 및 도 15a 및 15b), ER 염색과 물리적으로 공동-국재화되며 (도 10h 및 10i 및 도 14d 및 14e), 이는 이들이 ER-번역된 유전자임을 시사한다. 한편, 모듈 1 및 3 유전자는 각각 큰 단백질 복합체 유사분열 방추 (예를 들어, CDK1, NUSAP1, KIF23, SPAG5, TACC3, FAM83D) 및 번역 기구 (예를 들어, RPS3, RPS28, RPL36A, EEF2, DHX9)에서 풍부화된다 (도 10f 및 10g 및 도 15a 및 15c). 이러한 관찰은 단백질 복합체의 서브유닛이 효율적인 어셈블리를 위해 공간적으로 근접하여 생산될 수 있음을 나타낸다. 마지막으로, 공동-조절된 유전자가 번역을 위해 공동-국재화되는 경향이 있는지 조사하였다. 이를 위해, 세포하 공동국재화 분석으로부터의 공동국재화 p-값을 단일-세포 공변동 유전자 매트릭스에 플롯팅하였다. 높은 단일-세포 공변동 상관관계를 갖는 5개의 유전자 모듈이 또한 강한 세포하 공동국재화를 나타내는 것으로 발견되었다 (도 16f). 이들 결과는 기능적으로 관련된 유전자 군이 세포하 공동-국재화된 번역을 통해 공동-조절될 수 있음을 암시한다.

[0286] 다음으로, 중요한 전사후 RNA 변형인 N^6-메틸아데노신 변형 (m^6A) (28)을 갖는 RNA가 별개의 공간 번역 패턴을 갖는지 결정하였다. 이를 위해, 각각의 유전자의 번역 분포를 거리-비 (DR) 측정 기준으로 정량화하였고, 핵막 및 세포질 막 사이의 각각의 앰플리콘의 상대 위치를 추정하였다 (도 10j). 특히, m^6A 유전자의 DR 값이 비-m^6A 유전자의 것보다 유의하게 더 낮은 것으로 관찰되었고 (도 10k), 이는 m^6A 유전자가 핵막에 더 가깝게 물리적으로 번역된다는 것을 나타낸다. 이러한 차이는 보다 짧은 수명 및 따라서 시토졸에서 m^6A-변형된 RNA의 보다 짧은 트래픽킹 시간에 의해 설명될 수 있는 것으로 가설화되었다 (23). 종합하면, 세포하 수준에서 공간 트랜스라톰의 통합 분석을 위한 RIBO맵의 능력이 입증되었고, RNA 프로세싱 및 번역에 대한 향후 연구를 위한 전례없는 접근법을 제공하였다.

[0287] 조직 샘플을 분석하는 데 있어서 RIBO맵의 공간 프로파일링 능력을 추가로 입증하기 위해, 이러한 접근법을 마우스 뇌 슬라이스에 적용하여 계내 단일-세포 트랜스라톰 프로파일을 밝혀내었다. 여기서는, 마우스 세포 아틀라스의 이전에 공개된 단일-세포 서열분석 연구로부터 선별된 5,413개의 유전자의 표적화된 유전자 목록 (29-35)을 맵핑하였다. 9 라운드의 계내 서열분석을 통해, 다중 뇌 영역을 함유하는 마우스 좌반구의 10 um-두께 관상 절편 (27.6 mm^2, 62,753개 세포)을 90 nm X 90 nm X 300 nm 복셀 크기에서 영상화하였다 (도 1a). 예상된 바와 같이, 단백질 번역이 발생하는 시토졸에서의 조밀한 신호와 대조적으로, 핵에서 최소 RIBO맵 신호가 관찰되었다 (도 11b).

[0288] 먼저, 널리 공지된 세포-유형 마커 유전자 (예를 들어, Slc17a7, Gad2, 및 Pcp4)의 공간 번역 패턴을 알렌 뇌 데이터베이스로부터의 상응하는 유전자의 계내 혼성화 (ISH) 영상 (36)과 비교함으로써 조직 RIBO맵 데이터를 벤치마킹하였고 (도 11c 및 도 16a), 여기서 비교는 일치하는 공간 패턴을 나타내었다. 놀랍게도, 특정 유전자의 RIBO맵 판독은 특정 뇌 영역, 예컨대 해마의 CA3에서의 Sst 및 CA1에서의 Nefl에서 RNA 신호 (ISH)보다 단백질 신호와 더 우수하게 상관되는 것으로 관찰되었다 (도 16b 및 16c). 이러한 결과는 리보솜 프로파일링 결과가 RNA-seq 데이터보다 단백질 존재비와 더 우수하게 상관된다는 이전의 보고와 일치한다 (7, 11, 12). 다음으로, 모든 62,753 세포를 뇌 세포-유형 확인에 적용하였다 (도 17). 여기서는, 계층적 클러스터링 전략을 채택하였다 (20, 31): 세포를 뉴런 세포 및 신경교 세포로 분류하는 수준-1 클러스터링 (도 18a 및 18b); 흥분성 뉴런, 억제 뉴런, 성상세포, 핍지교세포, 핍지교세포 전구체 세포, 소교세포, 및 혈관 세포를 확인하는 수준-2 클러스터링 (도 18a, 18c, 및 18d); 57개의 별개의 하위유형을 확인하는 수준-3 클러스터링 (도 11d 및 도 19-21). 세포 유형화 결과에 기초하여, 영상화된 반뇌 영역으로부터의 공간 세포 맵을 생성하였다 (도 11e). 이들 트랜스라톰상 규정된 세포 유형의 공간 분포는 대체로 예상된 바와 같다. 예를 들어, 피질은 층 특이적 흥분성 뉴런으로 풍부화되고 (층 2/3: Cplx2$^+$, 층 4/5: Dkk3$^+$, 층 6: Nr4a2$^+$, 층 6: Pcp4$^+$), 뇌량은 핍지교세포로 풍부화되고 (Mbp$^+$, Mal$^+$, Cnp$^+$, Plp1$^+$), 선조체는 중형 돌기 뉴런으로 풍부화되고 (Tac1$^+$, Adora2a$^+$, Ppp1r1b$^+$, Penk$^+$, Rasd2$^+$), 시상은 흥분성 뉴런으로 풍부화되고 (Prkcd$^+$, Synpo2$^+$), 시상하부는 펩티드성 뉴런으로 풍부화된다 (Hap1$^+$, Tac1$^+$, Dlk$^+$). 각각 CA1-3의 피라미드 층 및 DG의 과립 층에서 영역-특이적 흥분성 뉴런이 또한 관찰되었다. 따라서, 공간 조직 아틀라제를 생성하기 위한 대안적 전략으로서 단일-세포 트랜스라톰에 기초하여 다양한 뇌 세포 유형을 확인하는 RIBO맵의 잠재력이 입증되었다.

[0289] 세포하 국재화된 mRNA 번역은 뉴런 세포 (37-39) 및 신경교 세포 기능 (40-42) 둘 다에 중요하다. 특히, RIBO맵의 세포하 해상도는 뉴런 및 신경교 세포의 세포체 및 돌기에서의 국재화된 번역의 조사를 가능하게 하였다. 이를 위해, RIBO맵 판독물을 세포체-판독물 (즉, 클러스터맵 (43)에 의해 확인된 세포 몸체 영역 내부) 및 돌기

-판독물 (즉, 나머지 판독물)로 나누었다 (도 11f 및 11g). 다음으로, 가장 높은 돌기-대-세포체 비를 갖는 유전자의 상위 10%를 돌기-풍부화된-번역 유전자로서 규정하는 반면, 가장 낮은 돌기-대-세포체 비를 갖는 유전자의 상위 10%는 세포체-풍부화된-번역 유전자로서 규정하였다 (도 11h). 유전자 온톨로지 (GO) 분석은 돌기-풍부화된-번역 유전자가 번역, 시냅스 및 시냅스후 밀도와 연관된다는 것을 보여주었다 (도 11i). 대조적으로, 세포체-풍부화된-번역 유전자는 형질 막, 세포외 매트릭스, 및 내형질 세망과 연관된다 (도 11j). 이러한 결과는, 막 단백질 및 분비된 단백질이 세포체 영역 내 ER에서 번역될 것으로 예상되기 때문에, 조직 샘플의 세포하 국재화된 번역을 검출하는 데 있어서의 RIBO맵의 능력을 추가로 검증하였다. 특히, 돌기-풍부화된-번역 신호의 예외적으로 높은 존재비가 해마 신경망, 예컨대 시냅스후 밀도 단백질 (예를 들어, Shank1, Dlg4, 및 Grik5), 번역 기구 단백질 (예를 들어, Eef2, Eef1a, Rpl3, 및 Rps5), 운동 단백질 (예를 들어, Kif5a 및 Kif1a), 및 칼슘 센서 및 신호전달 단백질 (예를 들어, Calm1 및 Camk2n1)에서 관찰되었다 (도 11k 및 도 22a). 비교로서, 세포체-풍부화된-번역 유전자는 막횡단 전구체 단백질을 코딩하고 알츠하이머병과 연관된 App, 및 내형질 세망과 연관된 것으로 공지된 Rtn4와 같은 해마 신경망에서 희박한 RIBO맵 신호를 나타내었다 (도 11l 및 도 22b). 뉴런에서 번역되는 이들 예시적인 유전자 이외에, 신경교 세포 마커 유전자의 국재화된 번역이 또한 관찰되었다 (도 11m 및 11n 및 도 22c 및 22d). 핍지교세포의 경우, 마커 유전자 Mbp 및 Plekhb1은 돌기-풍부화된-번역 유전자로서 확인된 한편, Mal 및 Cnp는 세포체-풍부화된-번역 유전자였다 (도 11m 및 11n 및 도 22c 및 22d). 성상세포는 많은 돌기를 가지며, 그의 마커 유전자는 돌기-풍부화된-번역 카테고리, 예컨대 Gfap, Ttyh1, Apoe 및 Clu에서 풍부화되었다 (도 11m 및 도 22c). 혈관 세포의 경우, 그의 마커 유전자는 세포체-풍부화된-번역 유전자 군, 예컨대 Ptgds, Itm2a, 및 Bsg에서 풍부화된다 (도 22c). 전반적으로, RIBO맵은 마우스 뇌 조직에서 뉴런 및 신경교 세포 둘 다의 돌기에서 국재화된 번역을 연구하기 위한 강력한 도구인 것으로 입증되었다.

[0290] 신규 공간-체학 방법인 RIBO맵의 개발로, 공간 mRNA 번역은 단일-세포 및 세포하 수준에서 맵핑될 수 있다. RIBO맵은 세포 주기 동안 981개 유전자의 번역을 검사하고 인간 세포에서 번역 RNA의 별개의 세포하 분포 패턴을 밝혀냄으로써 mRNA 조절 및 단백질 합성의 보다 포괄적인 이해를 향한 결정적인 단계를 가능하게 한다는 것이 본원에서 입증되었다. 이를 예시하기 위해, 본 개시내용은 무손상 조직 샘플에서의 계내 트랜스라톰 상태의 공간 프로파일링을 높은 3D 공간 해상도로 입증하여, 마우스 뇌 조직에서 트랜스라톰-규정된 공간 세포 맵을 생성한다. 또한, Ribo-STAMP 및 TRAP 방법과 비교하여, RIBO맵은 유전자 조작에 의존하지 않는다.

[0291] 물질 및 방법

[0292] 세포 배양

[0293] 인간 HeLa 세포를 ATCC (CCL-2)로부터 입수하고, 10% FBS가 보충된 DMEM에서 37℃ 및 5% CO_2에서 배양하였다. 해링토닌 처리는 약물을 2 μg/ml의 최종 농도로 첨가하고, 37℃에서 5분 동안 인큐베이션함으로써 수행하였다.

[0294] HeLa FUCCI 세포를 이전에 기재된 바와 같이 렌티바이러스 입자를 사용하여 생성하였다 (26). 간략하게, HEK 293T 세포를 pBOB-EF1-FastFUCCI-Puro (애드진(Addgene)으로부터 입수함, #86849) 및 패키징 플라스미드 (psPAX2 및 VSVG)로 형질감염시켰다. 바이러스를 함유하는 배양 배지로부터의 상청액을 형질감염 48시간 후에 수집하였다. 상청액을 0.45 μm PES 필터를 통해 여과하고, 바이러스 상청액을 사용하여 HeLa 세포를 형질도입하였다. 퓨로마이신 선택 후, 안정한 세포주를 확장시켰다.

[0295] 마우스

[0296] 모든 동물 절차는 동물 프로토콜 # 0255-08-19 하에 브로드 연구소(Broad Institute) MIT 및 하버드의 동물 실험 윤리 위원회 (IACUC)에 의해 승인된 동물 관리 가이드라인을 따랐다. 동물 실험을 IACUC 정책 및 NIH 가이드라인을 준수하여 수행하였다. 본 연구에서 RIBO맵에 사용된 C57BL/6 (수컷, 16주령) 마우스는 더 잭슨 래보러토리 (JAX)로부터 구입하였다.

[0297] 화학물질 및 효소

[0298] 화학물질 및 효소는 명칭 (판매업체, 카탈로그 번호)으로서 열거된다: DMEM (깁코(Gibco), 11995), 해링토닌 (압캠(Abcam), ab141941). 리포펙타민 메신저맥스 형질감염 시약 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), LMRNA003). 티슈-텍(Tissue-Tek) O.C.T. 화합물 (사쿠라(SAKURA), 4583). 유리 바닥 24-웰 플레이트 (셀비스(Cellvis), P24-1.5H-N). 유리 바닥 12-웰 및 24-웰 플레이트 (매트텍(MatTek), P12G-1.5-14-F). 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트 (시그마(Sigma), M6514). 폴리-D-리신 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), A-003-M). 16% PFA (일렉트론 마이크로스코프 사이언시스(Electron Microscope Sciences), 15710-S). 메탄올 (시그마-알드리치, 34860-1L-R). PBS (깁코, 10010-023). 트윈-20, 10% 용액 (칼바이오켐(Calbiochem),

655206). 효모 tRNA (써모 사이언티픽, AM7119). SUPERase·In RNase 억제제 (써모 사이언티픽, AM2696). 20xSSC (시그마-알드리치, S6639). 포름아미드 (칼바이오켐, 655206). 리보뉴클레오시드 바나딜 복합체 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), S1402S). T4 DNA 리가제, 5 바이스 U/μL (써모 사이언티픽, EL0012). Phi29 DNA 폴리머라제 (써모 사이언티픽, EP0094). 10 mM dNTP 믹스 (써모 사이언티픽, 18427089). 울트라퓨어 BSA (써모 사이언티픽, AM2618). 5-(3-아미노알릴)-dUTP (써모 사이언티픽, AM8439). 메타크릴산 NHS 에스테르, 98% (시그마-알드리치, 730300). DMSO, 무수 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes), D12345). 아크릴아미드 용액, 40% (바이오-라드(Bio-Rad), 161-0140). 비스 용액, 2% (바이오-라드, 161-0142). 과황산암모늄 (시그마-알드리치, A3678). N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민 (시그마-알드리치, T9281). 옴니푸르 SDS, 20% (칼바이오켐, 7991). 프로테이나제 K 용액, RNA 등급 (써모 사이언티픽, 25530049). 안타르크틱 포스파타제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, M0289L). DAPI (몰레큘라 프로브스, D1306). 10% 트리톤 X-100 (시그마-알드리치, 93443). 콘카나발린 A, 알렉사 플루오르 594 접합체 (써모 사이언티픽, C11253). 플라밍고 형광 단백질 겔 염색 (바이오-라드, 1610490). DL-디티오트레이톨 (시그마-알드리치, D9779). 0.5ml 30-kDa 아미콘 울트라 필터 (밀리포어, UFC503024). 리보솜 단백질 L4 폴리클로날 항체 (써모 사이언티픽, 11302-1-AP). RPS3 모노클로날 항체 (써모 사이언티픽, 66046-1-IG). 마이크로 바이오-스핀(Micro Bio-Spin)™ P-6 겔 칼럼, 트리스 완충제 (바이오-라드, 7326221). 피어스(Pierce)™ SM(PEG)$_2$, 노-웨이(No-Weigh)™ 포맷 (써모 사이언티픽, A35397). 제바(Zeba)™ 스핀 탈염 칼럼, 7K MWCO, 0.5 mL (써모 사이언티픽, 89882).

[0299] RIBO맵 및 STAR맵 프로브 설계

[0300] RIBO맵은 스플린트 프로브 및 SNAIL 프로브를 함유하는 트리-프로브 전략을 사용하여 수행하였다. 스플린트 프로브는 3개의 부분으로 이루어졌다: 18S 리보솜 RNA (rRNA)에 혼성화된 5' 단부의 25 nt 서열, 중간의 50 nt 데옥시아데노신 (dA) 서열, 및 3' 단부의 12 nt 스플린트-패드락 어닐링 서열. 18S rRNA에 혼성화된 25 nt 서열의 설계를 이전에 기재된 바와 같이 적용하였다 (44). 프로브는 비교적 비구조화되고 화학적 변형을 위해 접근 가능한 18S rRNA 상의 영역에 표적화된다. 총 5개의 고유한 프로브를 설계하였다. 스플린트 프로브의 3' 단부를 3' 역전된 dT 변형에 의해 차단하였고, 이는 RCA 증폭을 위한 프라이머로서 사용될 수 없다. 스플린트 프로브는 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스 (IDT)에 의해 합성되었다.

[0301] SNAIL 프로브의 설계를 이전에 기재된 바와 같이 적용하였다 (20). 간략하게, 피키(Picky) 2.2를 사용하여 40-46 nt로 설정된 길이를 갖는 각각의 SNAIL 프로브 쌍의 혼성화 서열을 설계한 다음, 생성된 서열을 20-25 nt의 절반으로 분할하고, 0-2 nt만큼 분리하였으며, 2개의 절반 사이에서 용융 온도 (Tm)가 가장 잘 매칭되었다. HeLa 세포 981-유전자 실험을 위해, 5 또는 6쌍의 SNAIL 프로브를 각각의 유전자에 대해 설계하였다. 마우스 뇌 5,433-유전자 실험을 위해, 4쌍의 SNAIL 프로브를 각각의 유전자에 대해 설계하였다. SNAIL 프로브를 합성하고, IDT에 의해 풀링하였다.

[0302] 세포 배양을 위한 RIBO맵 및 STAR맵의 샘플 제조

[0303] HeLa FUCCI 세포를 24-웰 플레이트에서 배양하고, PBS로 세척한 후에 샘플을 수집하고, PBS 완충제 중 1.6% PFA 300 μl로 실온에서 15분 동안 고정시켰다. 고정 후, 세포를 차가운 메탄올 450 μl로 투과화하고, -20℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, HeLa FUCCI 세포 샘플을 5분 동안 -20℃에서 실온으로 꺼내 둔 다음, 200 μl 켄칭 용액 (PBS 중 1 mg/ml 효모 tRNA, 0.1 U/μl SUPERase·In RNase 억제제, 100 mM 글리신, 0.1% 트윈-20)에 의해 실온에서 10분 동안 켄칭하였다. 켄칭 후, 샘플을 1X 혼성화 완충제 (2xSSC, 10% 포름아미드, 20 mM 리보뉴클레오시드 바나딜 복합체, 0.1 mg/ml 효모 tRNA, 0.5% SUPERaseIn, 0.1% 트윈-20, 올리고당 1 nM의 풀링된 SNAIL 프로브 및 프로브당 1μM의 RIBO맵 샘플용 스플린트 프로브) 200 μl와 함께 12시간 동안 파라필름 랩핑 및 진탕 하에 가습 오븐 내에서 40℃에서 인큐베이션하였다. 샘플을 37℃에서 300 μl PBSTR (PBS 중 0.1 U/μl SUPERase·In RNase 억제제, 0.1% 트윈-20)로 2회 및 300 μl 고염 세척 완충제 (PBSTR 중에 용해된 4X SSC)로 1회, 각각의 세척에 대해 20분 세척하였다. 최종적으로, 샘플을 실온에서 300 μl PBSTR로 1회 헹구었다.

[0304] 이어서, 샘플을 200 μl 라이게이션 혼합물 (1X T4 DNA 리가제 완충제 중 0.25 U/μl T4 DNA 리가제, 0.5 mg/ml BSA, 및 0.4 U/μl의 SUPERase·In RNase 억제제)과 함께 실온에서 2시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 라이게이션 반응 후에, 샘플을 300 μl PBSTR로 2회 세척한 다음, 200 μl 롤링 서클 증폭 (RCA) 혼합물 (1X Phi29 완충제 중 0.5 U/μl Phi29 DNA 폴리머라제, 250 μM dNTP, 20 μM 5-(3-아미노알릴)-dUTP, 0.5 mg/ml BSA 및 0.4U/μl의 SUPERase·In RNase 억제제)과 함께 4℃에서 30분 동안 및 30℃에서 2시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 그 후, 샘플을 PBST (PBS 중 0.1% 트윈-20)로 2회 세척하였다.

이어서, 영상화를 수행하여 RIBO맵 샘플 및 STAR맵 샘플에 대해 FUCCI 형광 신호를 동시에 기록하였다. 후속적으로, 샘플을 200 μl 변형 혼합물 (100 mM 중탄산나트륨 완충제 중 25 mM 메틸아크릴산 NHS 에스테르)로 실온에서 1시간 동안 처리한 다음, PBST에 의해 1회 헹구었다. 샘플을 150 μl 단량체 완충제 (2X SSC 중 4% 아크릴아미드, 0.2% 비스-아크릴아미드)와 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 완충제를 흡인하고, 25 μL 중합 혼합물 (단량체 완충제 중에 용해된 0.2% 과황산암모늄, 0.2% 테트라메틸에틸렌디아민)을 샘플의 중심에 첨가하고, 즉시 겔 슬릭-코팅된 커버슬립으로 덮었다. 중합 반응을 N_2 박스에서 실온에서 1시간 동안 수행한 다음, PBST에 의해 각각 5분 동안 2회 세척하였다.

[0305] 이어서, 조직-겔 하이브리드를 200 μl 프로테이나제 K 혼합물 (0.2 mg/ml 프로테이나제 K, 1% SDS, 100mM NaCl, 및 50 mM 트리스)로 37℃에서 1시간 동안 소화시킨 다음, PBST에 의해 각각 5분 동안 3회 세척하였다. 후속적으로, 샘플을 200 μl 탈인산화 혼합물 (1X 안타르크틱 포스파타제 완충제 중 0.25 U/μL 안타르크틱 포스파타제, 0.5 mg/mL BSA)로 37℃에서 1시간 동안 처리하고, PBST에 의해 각각 5분 동안 3회 세척하였다.

[0306] SEDAL 서열분석을 위해, 샘플을 200μl 스트리핑 완충제 (H_2O 중 60% 포름아미드, 0.1% 트리톤 X-100)로 실온에서 각각 10분 동안 2회 처리한 다음 PBST로 각각 5분 동안 3회 세척하는 것에 의해 각각의 서열분석 사이클을 시작하였다. 이어서, 샘플을 200 μl 서열분석 혼합물 (1X T4 DNA 리가제 완충제 중 0.1875 U/μl T4 DNA 리가제, 0.5 mg/ml BSA, 10 μM 판독 프로브, 및 5 μM 형광 올리고)과 함께 실온에서 적어도 3시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 300 μl 세척 및 영상화 완충제 (2X SSC 완충제 중 10% 포름아미드)에 의해 각각 10분 동안 3회 세척한 다음, 영상화를 위해 세척 및 영상화 완충제 중에 침지시켰다. 40X 유침 대물렌즈 (NA 1.3) 및 94.64 nm X 94.64 nm X 350 nm의 복셀 크기로 레이카 TCS SP8 공초점 현미경을 사용하여 영상을 획득하였다. DAPI 신호를 서열분석의 제1 라운드에서 영상화하였다. 6 사이클의 영상화를 수행하여 981개의 유전자를 검출하였다.

[0307] SEDAL 서열분석 후, 샘플을 200 μl 스트리핑 완충제로 실온에서 각각 10분 동안 3회 처리하였다. 이어서, 샘플을 PBST로 각각 5분 동안 3회 세척하고, 200 μl ER 염색 혼합물 (100 mM 중탄산나트륨 완충제 중에 희석된 0.05 mg/ml 콘카나발린 A)과 함께 인큐베이션한 다음, PBST로 각각 5분 동안 2회 세척하였다. 후속적으로, 샘플을 200 μl 플라밍고 염색 혼합물 (세척 및 영상화 완충제 중 1x 플라밍고 형광 겔 염색)과 함께 실온에서 밤새 인큐베이션한 다음, 300 μl PBST에 의해 3회 세척하였다.

[0308] 마우스 조직을 위한 RIBO맵의 샘플 제조

[0309] 본 연구에 사용된 마우스를 이소플루란으로 마취시킨 후, 신속하게 참수시켰다. 마우스 뇌 조직을 수집하고, 티슈-텍 O.C.T. 화합물에 넣었다. 이어서, O.C.T. 중의 뇌 조직을 액체 질소에서 동결시키고, -80℃에서 유지시켰다. 마우스 뇌 조직 절편화를 위해, 뇌 조직을 저온유지장치 (레이카 CM1950)로 옮기고, -20℃에서 20 μm 관상 절편으로 절단하였다. 슬라이스를 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트 및 폴리-D-리신으로 사전처리한 유리-바닥 12-웰 플레이트로 옮기고 이에 부착시켰다. 뇌 슬라이스를 PBS 중 4% PFA로 실온에서 15분 동안 고정시킨 다음, 차가운 메탄올로 투과화하고, -80℃에 1시간 동안 두었다. 마우스 뇌 조직에 대한 실험 절차는 HeLa 세포에 대한 것과 거의 동일하되, 뇌 조직이 12-웰 플레이트에서 제조됨에 따라 모든 반응 부피를 2배로 하였다. 형광 단백질에 대해 영상화 절차를 수행하지 않았고, 소기관 염색 절차를 수반하지 않았다. 63X 유침 대물렌즈 (NA 1.3) 및 90.14 nm X 90.14 nm X 300 nm의 복셀 크기로 레이카 TCS SP8 공초점 현미경을 사용하여 영상을 획득하였다. DAPI 신호를 서열분석의 제1 라운드에서 영상화하고, 9 사이클의 영상화를 수행하여 5,413개의 유전자를 검출하였다.

[0310] 세포 배양을 위한 항체-기반 RIBO맵 전략

[0311] 스플린트 프로브-접합된 단백질 A/G를 먼저 제조하였다. 간략하게, 5'-티올 변형된 스플린트 프로브 (IDT)를 실온에서 2시간 동안 DL-디티오트레이톨 (DTT)에 의해 활성화시키고, 마이크로 바이오-스핀(Micro Bio-Spin)™ P-6 겔 칼럼에 의해 정제하여 과량의 DTT를 제거하였다. 단백질 A/G를 PEG화 SMCC 가교제 [SM(PEG)$_2$]와 4℃에서 2시간 동안 반응시킨 다음, 제바 탈염 칼럼에 의해 정제하여 과량의 가교제를 제거하였다. 활성화된 스플린트 프로브를 단백질 A/G와 함께 (단백질 A/G 대 스플린트 프로브의 몰비 ~1:11) 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 최종 접합된 단백질 A/G를 0.5ml 30-kDa 아미콘 울트라 필터를 사용하여 5회 세척하여 비-반응된 DNA 올리고뉴클레오티드를 제거하였다.

[0312] 고정 단계는 rRNA 프로브-기반 RIBO맵 전략에 대한 것과 동일하다. 혼성화 단계를 위해, 스플린트 프로브가 아닌 SNAIL 프로브만을 첨가하였다. 이 단계를 위한 다른 시약은 rRNA 프로브-기반 RIBO맵 전략에 대한 것과 동

일하다. 혼성화 후, 리보솜 단백질 (RPS3 또는 RPL4) 항체 인큐베이션을 수행하였다. 세포 샘플을 차단 용액 (PBSTR 중 5 mg/ml BSA)으로 실온에서 30분 동안 차단한 다음, 차단 용액 중에 1:100 희석된 1차 항체 (RPS3 또는 RPL4, 대조군 샘플의 경우 IgG)로 4℃에서 1시간 동안 염색하였다. 샘플을 PBSTR로 실온에서 각각 5분 동안 3회 세척하였다. 이어서, 샘플을 스플린트 프로브-접합된 단백질 A/G와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, PBSTR로 실온에서 각각 5분 동안 3회 세척하였다. 라이게이션 단계 및 RCA 단계는 rRNA 프로브-기반 RIBOmap 전략에 대한 것과 동일하다. 이어서, 샘플을 PBST 중 DNA 앰플리콘에 상보적인 50 nM 형광 올리고 및 DAPI와 함께 인큐베이션하였다. DNA 앰플리콘 신호를 영상화에 의해 검출하였다.

[0313] RIBOmap 및 STARmap 영상화 프리프로세싱.

[0314] 영상 디컨볼루션은 휘겐스 에센셜 버전 21.04 (사이언티픽 볼륨 이미징(Scientific Volume Imaging), 네덜란드, svi.nl)에 의해 CMLE 알고리즘을 사용하여 SNR:10 및 10 반복으로 달성하였다. 이전의 보고에 따라, 유사한 영상 등록, 스팟 콜링, 및 약간 조정된 바코드 필터링을 적용하였다 (20).

[0315] RIBOmap/STARmap 세포 배양 샘플에 대한 데이터 프로세싱

[0316] 3D 세포 분할: 셀프로파일러(CellProfiler) v4.1.3에 의해 생성된 2D 참조 분할을 조합한 전략으로 영상 분할을 달성하고, 맞춤형 MATLAB 스크립트로 3D 염색 영상을 프로세싱하였다. 먼저, 앰플리콘 채널과 플라밍고 형광 겔 염색 영상을 조합한 복합 영상을 생성하여 세포 경계를 나타내었다. 3D DAPI 염색 영상 및 복합 영상 둘 다의 최대 투영을 셀프로파일러 v4.1.3에서 생성된 맞춤형 파이프라인에 공급하였다. 중앙값 필터를 사용하여 영상 상의 고주파 잡음을 제거하고, IdentifyPrimayObjects 함수를 사용하여 세포 핵을 검출하였다. 이어서, 확인된 핵에 기초하여, IdentifySecondaryObjects 함수를 필터링된 2D 복합 영상에 적용함으로써 세포 경계를 윤곽화하였다. 출력물 내의 핵 및 세포 분할 마스크 둘 다를 하기 절차에서 참조 분할로서 사용하여 3D 분할을 생성하였다.

[0317] 3D 분할을 위해, 먼저 상이한 세포 구획을 표적화하는 영상 (핵에 대한 DAPI 염색, 세포 경계에 대한 복합 영상, 및 ER에 대한 콘카나발린 A 염색)을 중앙값 필터에 의해 프로세싱하고, 수동으로 선별한 역치로 이진화하였다. 200개 미만의 복셀을 갖는 모든 연결된 성분 (대상)을 이진 영상으로부터 제거하였다. 이어서, 영상을 반경이 10인 디스크 구조 요소로 확장시켰다. 이어서, 이전 단계로부터의 이진 영상과 2D 참조 세포 분할 사이의 요소별 곱셈 프로세스에 의해 각각의 세포 영역을 표적화하는 3D 분할 마스크를 생성하였다. 핵 영역을 3D 세포 분할 마스크로부터 제거하여 세포질 분할을 생성하였다. 마지막으로, 3D에서 각각의 표지된 영역과 중첩되는 필터링된 앰플리콘을 정량화하여 각각의 세포 구획에서 세포당 유전자 발현 매트릭스를 생성하였다.

[0318] FUCCI 세포주의 단백질 신호 정량화: mAG 및 mKO2 형광 영상 둘 다를 이전 보고에 따른 영상 등록을 통해 서열 분석 영상과 정렬하였다. 각각의 단백질의 신호 수준을 3D 핵 분할 마스크와 중첩되는 복셀의 통합 강도로서 정량화하였다.

[0319] 단일 세포의 품질 관리: 고품질 라이브러리를 보장하기 위해, RIBOmap 및 STARmap 방법 둘 다에 의해 측정된 단일 세포 프로파일을 각각 하기 측정 기준 및 역치를 기초로 필터링하였다. 먼저, 3D 분할에 의해 규정된 물리적 부피가 목적하는 범위 ($0.5x10^6$ 내지 $2x10^6$ 복셀)를 벗어난 세포를 배제하였다. 이어서, 세포당 전사체의 수에 대한 샘플 특이적 역치를 사용하여 각각의 데이터세트에서 이상치를 제거하였다 (RIBOmap 하부 경계 (LB): 300, 상부 경계 (UB): 3500, STARmap LB: 500, UB: 6000). 추가적으로, 전사체 밀도를 전사체의 수와 각각의 세포의 물리적 부피 사이의 비로 규정하였으며, 이를 역치 측정 기준 (LB: 0.00055)으로서 사용하여 세포를 추가로 배제하였다. 유전자를 세포에서 이를 발현하는 세포의 백분율 (LB: 10%) 및 그의 최대 카운트 (RIBOmap LB: 2; STARmap LB: 4)에 기초하여 필터링하였다. RIBOmap 및 STARmap에 대한 필터링 기준의 차이는 각각의 기술에 대한 상이한 기대값으로부터 유래하였다. 필터링 후, RIBOmap 데이터세트의 경우 1,813개의 세포 및 STARmap의 경우 1,757개의 세포 897개의 유전자로 후속 분석에 진입하였다.

[0320] 공변동 분석: 공변동하는 유전자 모듈을 확인하기 위해, 발현 매트릭스를 먼저 세포당 전사체의 동일한 총수에 대해 정규화한 다음, 각각의 유전자 쌍에 걸쳐 피어슨 상관 계수를 계산하여 세포-대-세포 변동에서의 유사성을 측정하였다. 와드 연결법에 의한 계층적 클러스터링을 RIBOmap 상에서 수행하였고, n_클러스터는 10으로 설정하였다.

[0321] 공동국재화 분석: 공동국재화된 판독물 클러스터를 밝혀내기 위해 순열 분석을 수행하였다. 세포 내부의 1개의 판독물을 고려하여, 이웃 판독물 (3 μm 반경 내)의 유전자 정체를 기록하였다. 모든 세포를 스크리닝함으로써, 관찰된 카운트로서 확인된 각각의 이웃 유전자 쌍의 카운트를 수득하였다. 다음으로, 1000-

배 순열 검정을 수행하여 그의 세포하 위치를 건드리지 않으면서 RNA 판독물의 유전자 표지를 무작위로 셔플링하였다. 각각의 순열 라운드에 대해, 각각의 이웃 유전자 쌍의 카운트를 수집하여 순열 분포를 생성하였다. 그 후, 관찰된 카운트를 순열 분포와 비교함으로써 각각의 유전자 쌍의 단측 p-값을 추론하였다. 쌍별 p-값을 추가로 사용하여 히트맵을 구축하였다 (도 10e). RIBO맵 샘플의 히트맵에서의 행 및 열을 계층적 클러스터링에 의해 정렬하였다. STAR맵 샘플에 대한 히트맵도 RIBO맵과 동일한 정렬로 사용하여 공간 분포 차이를 갖는 유전자 모듈을 검출하였다. 유전자 모듈 사이에서 내형질 세망 (ER)-국재화 수준을 정량적으로 비교하기 위해, 단일 세포 수준에서 표적 유전자 모듈 내의 유전자에 대한 ER에 국재화된 판독물의 백분율을 계산하였다. 모든 유전자에 대해 동일한 백분율을 비교 기준선으로서 사용하였다. 통계적 유의성을 시험하기 위해 윌콕슨 부호-순위 검정을 수행하였다.

[0322] 세포 주기 및 가상시간: 세포 주기 진행을 나타내는 가상시간 궤적을 구축하기 위해, 세포 주기 상 (G1, G1S, G2M)을 먼저 주기 마커 유전자에 국한된 세포의 발현 프로파일을 사용하여 확인하였다 (스캔피(Scanpy)의 score_genes_cell_cycle 함수). 다음으로, STAR맵 세포를 동일한 유전자 세트의 발현에 의해 구축된 확산 맵에 임베딩하였다. 이 확산 맵을 극좌표계로 전환한 후, 세포 주기의 시작을 나타내는 '루트' 셀을 확인하고, 가상시간 값을 극좌표 상의 '루트' 셀에 대한 그의 각도에 따라 각각의 세포에 할당하였다. 동일한 궤적 상에서 RIBO맵 세포에 대해 가상시간 값을 할당하기 위해, 2개의 데이터세트로부터의 세포를 mAG 및 mKO2 형광 강도에 의해 규정된 동일한 임베딩 상에 등록하였다. 각각의 RIBO맵 세포의 가상시간 값을 STAR맵에서의 그의 가장 가까운 이웃 (k = 3)의 평균값으로서 규정하였다.

[0323] DR 계산: 세포질 내부의 RNA 판독물의 국재화를 정량적으로 분석하기 위해, 각각의 세포질 판독물에 대해 거리-비 (DR)를 계산하였다. 판독물에 대한 DR 값은 핵 분할에 의해 결정된 핵 경계에 대한 판독물의 최단 거리 (d_1)를, 이러한 거리와 세포 분할에 의해 결정된 세포 막에 대한 판독물의 최단 거리 (d_2)의 합계에 의해 정규화한 것으로 규정하였다. 사이피(Scipy)의 유클리드 거리 변환 함수 (distance_transform_edit)를 사용하여 3D 분할에 의해 규정된 각각의 판독물과 표적 표면 사이의 최단 거리를 계산하였다.

[0324] RIBO맵 뇌 조직 샘플에 대한 데이터 프로세싱

[0325] 클러스터맵을 사용한 세포 분할: RNA 앰플리콘-기반 분할 방법 (클러스터맵 (43))을 사용하여 단일-세포 신호 정량화를 달성하였다. 배경 신호 제거, DAPI 신호 샘플링, 및 밀도-기반 분할을 수반하는 기본 프로세싱 파이프라인을 각각의 영상 영역 (FOV)에 적용하였다. 구체적으로, RNA 신호의 10%가 국부적 저밀도 신호로서 확인되었고, 단일-세포 수준 정량화에서 배제하였다. 추가의 신호 스팟을 커플링된 DAPI 염색 영상으로부터 5와 동등한 설정 파라미터 dapi_grid_interval로 샘플링하여 분할 정확도를 추가로 개선시켰다. 3D로의 분할 동안, DAPI 염색과 비교한 정성적 시험에 기초하여 파라미터 cell_num_threshold를 0.02로 설정하였다. 5개 미만의 전사체를 갖거나 커플링된 DAPI 염색과 중첩되지 않는 알고리즘-확인된 세포는 배제하였다. 모든 FOV의 클러스터맵 신호 할당을 병합하여 세포-유전자 매트릭스를 생성하였다.

[0326] 품질 관리 및 프리프로세싱: 단일-세포 수준에서의 신호 정량화 후에, 세포당 전사체 및 유전자의 수를 사용하여 저품질 세포를 배제하였다. 상세하게, 중앙 절대 편차 (MAD)를 사용하여 하기 방정식에 의해 제시된 바와 같이 세포 필터링당 판독물에 대한 역치를 추정하였다:

[0327] $$\text{하부 경계} = \text{중앙값(세포당 판독물)} - 4 * \text{MAD}$$

[0328] $$\text{상부 경계} = \text{중앙값(세포당 판독물)} + 4 * \text{MAD}$$

[0329] 하기와 같은 다른 표준 필터링 전략을 또한 적용하였다:

[0330] 1. 세포가 필터링을 통과하는 데 최소 발현된 10개의 유전자가 요구됨; 및

[0331] 2. 유전자가 필터링을 통과하는 데 최소 발현된 10개의 세포가 요구됨.

[0332] 필터링 후, 62,753개의 세포 및 5,413개의 유전자를 갖는 트랜스크립톰 프로파일을 수득하였다. 고품질 유전자 라이브러리를 보장하기 위해, 최대 카운트가 3 미만인 유전자를 세포에 걸쳐 추가로 배제하여, 하류 분석, 예컨대 세포 유형 분류에 사용되는 3,995개의 유전자를 생성하였다. 이어서, 트랜스크립톰 프로파일을 pp.normalize_total 함수 (스캔피 v1.8.2)에 의해 세포당 전사체의 수의 중앙값에 따라 정규화하였다. 이어서, pp.log1p 함수로 데이터에 대해 로그 변환을 수행하였다. 마지막으로, 데이터 매트릭스를 pp.scale 함수에 의해 단위 분산으로 스케일링하고, 하류 분석, 예컨대 차원 감소, 및 무감독 클러스터링에 사용하였다.

[0333] 세포 유형 분류: 계층적 클러스터링 전략을 적용하여 RIBO맵 마우스 뇌 데이터세트에 대해 3-수준 세포-유형 주석을 생성하였다. 먼저, 3,995개의 고도로 풍부한 유전자로 국한된 스케일링된 매트릭스를 사용하여 주성분 분석 (PCA)을 수행하였다. 함수 tl.pca를 사용하여 상위 30개의 주성분을 계산하고, 이들 모두를 사용하여 k-최근접 이웃 (k-NN) 그래프를 구축하였고, 여기서 세포는 그의 트랜스크립톰 프로파일의 유사성에 기초하여 고차원 공간에서 그의 이웃과 연결되었다. 이어서, 라이덴 커뮤니티 검출 알고리즘을 kNN 그래프 상에 적용하여 세포 클러스터를 검출하였다. 뇌에서의 통상의 세포 유형에 대한 정규 마커 (즉, Slc17a7, Gad1, Gad2, Plp1, Slc1a3 등)의 발현 프로파일에 기초하여, 각각의 클러스터를 그의 제1 수준 주석으로서 뉴런 또는 신경교 세포로 분류하였다.

[0334] 보다 상세한 주석을 할당하기 위해, 이전에 기재된 동일한 분석을 제1-수준 주석 하에 각각의 집단 (뉴런, 신경교)에 적용하였다. 엘보우 방법을 사용하여 PCA 후의 유의한 주성분을 확인하였다. 각각의 주성분의 분산 비를 플롯팅함으로써 (pl.pca_variance_ratio 함수), 가장 높은 값을 갖는 상위 10 및 15개의 주성분을 선택하여 각각 뉴런 및 신경교 세포에 대한 하기 분석을 수행하였다. 뉴런의 경우, 이는 Slc17a7, Gad1, 및 Gad2의 발현 프로파일에 기초하여 흥분성 및 억제 뉴런으로 추가로 나뉘었다. 신경교 세포의 경우, 주요 신경교 세포 중 일부에 대해 다중 하위유형이 확인되었다 (즉, 성상세포에 대해 Astro1, Astro2, 및 Astro3). 이 경우에, 2개의 주석 수준이 각각의 클러스터에 주어졌고; 제2 수준 주석은 그의 주요 신경교 세포 유형 (즉, 성상세포, 핍지교세포, 혈관 세포 등)을 나타내고, 제3 수준 주석 (고유 식별자)은 주요 집단 내의 하위유형을 표시하였다.

[0335] 뉴런 세포 하위유형을 확인하기 위해, 동일한 무감독 클러스터링을 흥분성 및 억제 뉴런 집단 둘 다에 개별적으로 적용하였다. 구체적으로, 15 및 10개의 주성분을 사용하여 각각 흥분성 및 억제 뉴런에 대해 kNN 그래프를 구축하였다. 대다수의 뉴런 세포 클러스터는 뇌 절편에서의 그의 공간 표시에 기초하여 주석표시한 반면 (즉, 해부학적 영역, 예컨대 L2/3, L4, CA, DG, TH 등), 억제 뉴런 클러스터 중 일부는 상이한 뉴런 펩티드를 코딩하는 그의 유전자 마커에 기초하여 주석표시하였다 (즉, Sst 및 Npy).

[0336] 영역-풍부화된-번역 유전자 확인: 단일-세포 정량화에서 클러스터맵에 의해 배제된 RNA 앰플리콘을 세포의 세포체 영역 외부의 RNA로서 처리하였다. 세포체 및 돌기 영역 둘 다에서의 각각의 유전자에 대한 RNA 카운트를 계산하고, 각각의 유전자의 전체 RNA 수에 기초한 백분율로 정규화하였다. 각각의 영역에서 가장 높은 RNA 백분율을 갖는 상위 10% 유전자를 영역-풍부화된-번역 유전자로서 주석표시하고, 그의 RNA 공간 분포를 뇌 절편 상에 시각화하였다.

[0337] 유전자 온톨로지 (GO) 풍부화 분석

[0338] GO 풍부화 분석을 위해 DAVID 데이터베이스 (david.ncifcrf.gov) (45, 46)를 사용하였다. 다중 초기하 검정에서 p-값을 조정하기 위해 벤자미니(Benjamini) 및 호크베르크(Hochberg) 오류 발견율 (FDR)을 수행하였다. 생물학적 과정 (BP) 및 세포 성분 (CC)으로부터의 결과 (FDR < 0.05)를 풍부화된 GO 용어로서 선택하였다. 상위 3개의 가장 유의하게 풍부화된 GO 용어를 공변동 분석 및 유전자 공동국재화 조사를 위해 사용한 한편, 상위 10개의 풍부화된 용어를 세포체-풍부화된-번역 유전자 및 돌기-풍부화된-번역 유전자에서 추출하였다.

[0339] 참고문헌

1. J. A. Alfaro, P. Bohländer, M. Dai, M. Filius, C. J. Howard, X. F. van Kooten, S. Ohayon, A. Pomorski, S. Schmid, A. Aksimentiev, E. V. Anslyn, G. Bedran, C. Cao, M. Chinappi, E. Coyaud, C. Dekker, G. Dittmar, N. Drachman, R. Eelkema, D. Goodlett, S. Hentz, U. Kalathiya, N. L. Kelleher, R. T. Kelly, Z. Kelman, S. H. Kim, B. Kuster, D. Rodriguez-Larrea, S. Lindsay, G. Maglia, E. M. Marcotte, J. P. Marino, C. Masselon, M. Mayer, P. Samaras, K. Sarthak, L. Sepiashvili, D. Stein, M. Wanunu, M. Wilhelm, P. Yin, A. Meller, C. Joo, The emerging landscape of single-molecule protein sequencing technologies. *Nat. Methods*. **18**, 604–617 (2021).

2. T. Maier, M. Güell, L. Serrano, Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* **583**, 3966–3973 (2009).

3. R. de Sousa Abreu, L. O. Penalva, E. M. Marcotte, C. Vogel, Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol. Biosyst.* **5**, 1512–1526 (2009).

4. C. Vogel, E. M. Marcotte, Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 227–232 (2012).

5. B. Schwanhäusser, D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, M. Selbach, Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. **473**, 337–342 (2011).

[0340]

6. S. Das, M. Vera, V. Gandin, R. H. Singer, E. Tutucci, Intracellular mRNA transport and localized translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 483–504 (2021).

7. N. T. Ingolia, S. Ghaemmaghami, J. R. S. Newman, J. S. Weissman, Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*. **324**, 218–223 (2009).

8. C. H. Jan, C. C. Williams, J. S. Weissman, Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* (2014), doi:10.1126/science.1257521.

9. C. C. Williams, C. H. Jan, J. S. Weissman, Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science*. **346**, 748–751 (2014).

10. M. VanInsberghe, J. van den Berg, A. Andersson-Rolf, H. Clevers, A. van Oudenaarden, Single-cell Ribo-seq reveals cell cycle-dependent translational pausing. *Nature*. **597**, 561–565 (2021).

11. N. T. Ingolia, Ribosome Footprint Profiling of Translation throughout the Genome. *Cell*. **165**, 22–33 (2016).

12. Y. Liu, A. Beyer, R. Aebersold, On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. **165**, 535–550 (2016).

13. J. M. Halstead, T. Lionnet, J. H. Wilbertz, F. Wippich, A. Ephrussi, R. H. Singer, J. A. Chao, Translation. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science*. **347**, 1367–1671 (2015).

14. B. Wu, C. Eliscovich, Y. J. Yoon, R. H. Singer, Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science*. **352**, 1430–1435 (2016).

15. T. Morisaki, K. Lyon, K. F. DeLuca, J. G. DeLuca, B. P. English, Z. Zhang, L. D. Lavis, J. B. Grimm, S. Viswanathan, L. L. Looger, T. Lionnet, T. J. Stasevich, Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science*. **352**, 1425–1429 (2016).

16. X. Yan, T. A. Hoek, R. D. Vale, M. E. Tanenbaum, Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules *In Vivo*. *Cell*. **165**, 976–989 (2016).

17. S. Boersma, D. Khuperkar, B. M. P. Verhagen, S. Sonneveld, J. B. Grimm, L. D. Lavis, M. E. Tanenbaum, Multi-Color Single-Molecule Imaging Uncovers Extensive Heterogeneity in mRNA Decoding. *Cell*. **178**, 458–472.e19 (2019).

[0341]

18. Z. B. Katz, B. P. English, T. Lionnet, Y. J. Yoon, N. Monnier, B. Ovryn, M. Bathe, R. H. Singer, Mapping translation “hot-spots” in live cells by tracking single molecules of mRNA and ribosomes. *Elife*. **5**, e10415 (2016).

19. S. T. Dieck, L. Kochen, C. Hanus, M. Heumüller, I. Bartnik, B. Nassim-Assir, K. Merk, T. Mosler, S. Garg, S. Bunse, D. A. Tirrell, E. M. Schuman, Direct visualization of newly synthesized target proteins *in situ*. *Nature Methods*. **12** (2015), pp. 411–414.

20. X. Wang, W. E. Allen, M. A. Wright, E. L. Sylwestrak, N. Samusik, S. Vesuna, K. Evans, C. Liu, C. Ramakrishnan, J. Liu, G. P. Nolan, F.-A. Bava, K. Deisseroth, Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science*. **361** (2018), doi:10.1126/science.aat5691.

21. I. Tirosh, B. Izar, S. M. Prakadan, M. H. Wadsworth 2nd, D. Treacy, J. J. Trombetta, A. Rotem, C. Rodman, C. Lian, G. Murphy, M. Fallahi-Sichani, K. Dutton-Regester, J.-R. Lin, O. Cohen, P. Shah, D. Lu, A. S. Genshaft, T. K. Hughes, C. G. K. Ziegler, S. W. Kazer, A. Gaillard, K. E. Kolb, A.-C. Villani, C. M. Johannessen, A. Y. Andreev, E. M. Van Allen, M. Bertagnolli, P. K. Sorger, R. J. Sullivan, K. T. Flaherty, D. T. Frederick, J. Jané-Valbuena, C. H. Yoon, O. Rozenblatt-Rosen, A. K. Shalek, A. Regev, L. A. Garraway, Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. **352**, 189–196 (2016).

22. F. M. Fazal, S. Han, K. R. Parker, P. Kaewsapsak, J. Xu, A. N. Boettiger, H. Y. Chang, A. Y. Ting, Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. *Cell*. **178**, 473–490.e26 (2019).

23. X. Wang, Z. Lu, A. Gomez, G. C. Hon, Y. Yue, D. Han, Y. Fu, M. Parisien, Q. Dai, G. Jia, B. Ren, T. Pan, C. He, N^6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*. **505**, 117–120 (2014).

24. H. Shi, X. Wang, Z. Lu, B. S. Zhao, H. Ma, P. J. Hsu, C. Liu, C. He, YTHDF3 facilitates translation and decay of N^6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res.* **27**, 315–328 (2017).

25. A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, A. Miyawaki, Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell*. **132**, 487–498 (2008).

26. S.-B. Koh, P. Mascalchi, E. Rodriguez, Y. Lin, D. I. Jodrell, F. M. Richards, S. K. Lyons, Quantitative FastFUCCI assay defines cell cycle dynamics at single-cell level. *Journal of Cell Science.* **130(2)**, 512-520 (2016) doi:10.1242/jcs.195164.

[0342]

27. D. Mahdessian, A. J. Cesnik, C. Gnann, F. Danielsson, L. Stenström, M. Arif, C. Zhang, T. Le, F. Johansson, R. Shutten, A. Bäckström, U. Axelsson, P. Thul, N. H. Cho, O. Carja, M. Uhlén, A. Mardinoglu, C. Stadler, C. Lindskog, B. Ayoglu, M. D. Leonetti, F. Pontén, D. P. Sullivan, E. Lundberg, Spatiotemporal dissection of the cell cycle with single-cell proteogenomics. *Nature*. **590**, 649–654 (2021).

28. B. S. Zhao, I. A. Roundtree, C. He, Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 31–42 (2017).

29. A. Saunders, E. Z. Macosko, A. Wysoker, M. Goldman, F. M. Krienen, H. de Rivera, E. Bien, M. Baum, L. Bortolin, S. Wang, A. Goeva, J. Nemesh, N. Kamitaki, S. Brumbaugh, D. Kulp, S. A. McCarroll, Molecular Diversity and Specializations among the Cells of the Adult Mouse Brain. *Cell*. **174**, 1015–1030.e16 (2018).

30. Z. Yao, C. T. J. van Velthoven, T. N. Nguyen, J. Goldy, A. E. Sedeno-Cortes, F. Baftizadeh, D. Bertagnolli, T. Casper, M. Chiang, K. Crichton, S.-L. Ding, O. Fong, E. Garren, A. Glandon, N. W. Gouwens, J. Gray, L. T. Graybuck, M. J. Hawrylycz, D. Hirschstein, M. Kroll, K. Lathia, C. Lee, B. Levi, D. McMillen, S. Mok, T. Pham, Q. Ren, C. Rimorin, N. Shapovalova, J. Sulc, S. M. Sunkin, M. Tieu, A. Torkelson, H. Tung, K. Ward, N. Dee, K. A. Smith, B. Tasic, H. Zeng, A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell.* **184(12)**, 3222-3241 (2021), doi:10.1016/j.cell.2021.04.021.

31. A. Zeisel, H. Hochgerner, P. Lönnerberg, A. Johnsson, F. Memic, J. van der Zwan, M. Häring, E. Braun, L. E. Borm, G. La Manno, S. Codeluppi, A. Furlan, K. Lee, N. Skene, K. D. Harris, J. Hjerling-Leffler, E. Arenas, P. Ernfors, U. Marklund, S. Linnarsson, Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*. **174**, 999–1014.e22 (2018).

32. Tabula Muris Consortium, Overall coordination, Logistical coordination, Organ collection and processing, Library preparation and sequencing, Computational data analysis, Cell type annotation, Writing group, Supplemental text writing group, Principal investigators, Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature*. **562**, 367–372 (2018).

33. Tabula Muris Consortium, A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature*. **583**, 590–595 (2020).

34. X. Han, R. Wang, Y. Zhou, L. Fei, H. Sun, S. Lai, A. Saadatpour, Z. Zhou, H. Chen, F. Ye, D. Huang, Y. Xu, W. Huang, M. Jiang, X. Jiang, J. Mao, Y. Chen, C. Lu, J. Xie, Q. Fang, Y. Wang, R. Yue, T. Li, H. Huang, S. H. Orkin, G.-C. Yuan, M. Chen, G. Guo, Mapping the Mouse Cell Atlas by Microwell-Seq. *Cell*. **173**, 1307 (2018).

[0343]

35. J. Cao, M. Spielmann, X. Qiu, X. Huang, D. M. Ibrahim, A. J. Hill, F. Zhang, S. Mundlos, L. Christiansen, F. J. Steemers, C. Trapnell, J. Shendure, The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*. **566**, 496–502 (2019).

36. E. S. Lein, M. J. Hawrylycz, N. Ao, M. Ayres, A. Bensinger, A. Bernard, A. F. Boe, M. S. Boguski, K. S. Brockway, E. J. Byrnes, L. Chen, L. Chen, T.-M. Chen, M. C. Chin, J. Chong, B. E. Crook, A. Czaplinska, C. N. Dang, S. Datta, N. R. Dee, A. L. Desaki, T. Desta, E. Diep, T. A. Dolbeare, M. J. Donelan, H.-W. Dong, J. G. Dougherty, B. J. Duncan, A. J. Ebbert, G. Eichele, L. K. Estin, C. Faber, B. A. Facer, R. Fields, S. R. Fischer, T. P. Fliss, C. Frensley, S. N. Gates, K. J. Glattfelder, K. R. Halverson, M. R. Hart, J. G. Hohmann, M. P. Howell, D. P. Jeung, R. A. Johnson, P. T. Karr, R. Kawal, J. M. Kidney, R. H. Knapik, C. L. Kuan, J. H. Lake, A. R. Laramee, K. D. Larsen, C. Lau, T. A. Lemon, A. J. Liang, Y. Liu, L. T. Luong, J. Michaels, J. J. Morgan, R. J. Morgan, M. T. Mortrud, N. F. Mosqueda, L. L. Ng, R. Ng, G. J. Orta, C. C. Overly, T. H. Pak, S. E. Parry, S. D. Pathak, O. C. Pearson, R. B. Puchalski, Z. L. Riley, H. R. Rockett, S. A. Rowland, J. J. Royall, M. J. Ruiz, N. R. Sarno, K. Schaffnit, N. V. Shapovalova, T. Sivisay, C. R. Slaughterbeck, S. C. Smith, K. A. Smith, B. I. Smith, A. J. Sodt, N. N. Stewart, K.-R. Stumpf, S. M. Sunkin, M. Sutram, A. Tam, C. D. Teemer, C. Thaller, C. L. Thompson, L. R. Varnam, A. Visel, R. M. Whitlock, P. E. Wohnoutka, C. K. Wolkey, V. Y. Wong, M. Wood, M. B. Yaylaoglu, R. C. Young, B. L. Youngstrom, X. F. Yuan, B. Zhang, T. A. Zwingman, A. R. Jones, Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. **445**, 168–176 (2007).

37. M. S. Fernandopulle, J. Lippincott-Schwartz, M. E. Ward, RNA transport and local translation in neurodevelopmental and neurodegenerative disease. *Nat. Neurosci.* **24**, 622–632 (2021).

38. A. Biever, C. Glock, G. Tushev, E. Ciirdaeva, T. Dalmay, J. D. Langer, E. M. Schuman, Monosomes actively translate synaptic mRNAs in neuronal processes. *Science*. **367** (2020), doi:10.1126/science.aay4991.

39. C. Glock, A. Biever, G. Tushev, B. Nassim-Assir, A. Kao, I. Bartnik, S. Tom Dieck, E. M. Schuman, The translatome of neuronal cell bodies, dendrites, and axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **118** (2021), doi:10.1073/pnas.2113929118.

40. L. M. Meservey, V. V. Topkar, M.-M. Fu, mRNA Transport and Local Translation in Glia. *Trends Cell Biol.* **31**, 419–423 (2021).

41. K. Sakers, A. M. Lake, R. Khazanchi, R. Ouwenga, M. J. Vasek, A. Dani, J. D. Dougherty, Astrocytes locally translate transcripts in their peripheral processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E3830–E3838 (2017).

[0344]

42. C. Müller, N. M. Bauer, I. Schäfer, R. White, Making myelin basic protein - from mRNA transport to localized translation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. **7** (2013) doi:10.3389/fncel.2013.00169.

43. Y. He, X. Tang, J. Huang, J. Ren, H. Zhou, K. Chen, A. Liu, H. Shi, Z. Lin, Q. Li, A. Aditham, J. Ounadjela, E. I. Grody, J. Shu, J. Liu, X. Wang, ClusterMap for multi-scale clustering analysis of spatial gene expression. *Nat. Commun.* **12**, 5909 (2021).

44. K. S. Burke, K. A. Antilla, D. A. Tirrell, A Fluorescence in Situ Hybridization Method To Quantify mRNA Translation by Visualizing Ribosome–mRNA Interactions in Single Cells. *ACS Cent. Sci.* **3**, 425–433 (2017).

45. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).

46. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2008).

[0345]

[0346] 참조로서 포함됨

[0347] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 과학 학술지 논문, 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로서 포함된다. 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 세부사항이 본원에 제시된다. 본 발명의 다른 특색, 목적 및 이점은 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

[0348] 등가물 및 범주

[0349] 단수형태는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 실시양태 또는 기재는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 경우에 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 군 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 실시양태를 포함한다.

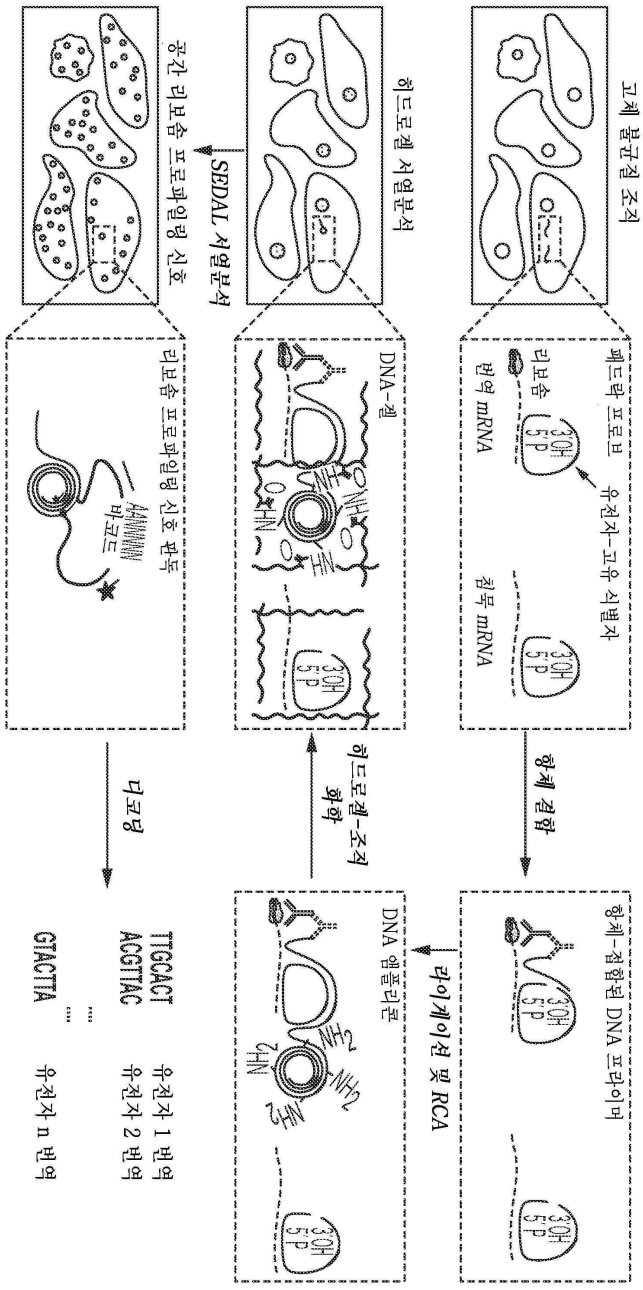
[0350] 또한, 본 개시내용은 열거된 청구항 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 조항 및 서술적 용어가 또 다른 청구항에 도입된 모든 변형, 조합 및 순열을 포괄한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속항인 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속항인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가 목록으로서, 예를 들어 마쿠쉬 군 포맷으로 제시된 경우, 요소의 각각의 하위군이 또한 개시되며, 임의의 요소(들)가 군으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정한 요소 및/또는 특색을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, 본 개시내용의 특정 실시양태 또는 본 개시내용의 측면은 이러한 요소 및/또는 특색으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 단순성의 목적을 위해, 이들 실시양태는 본원에 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방적이고 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도됨에 주목한다. 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 또한, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 본 발명의 상이한 실시양태에서 언급된 범위 내의 임의의 구체적 값 또는 하위범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 범위의 하한치 단위의 1/10까지 가정할 수 있다.

[0351] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개 특허 출원, 학술지 논문 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로서 포함된다. 임의의 포함된 참고문헌과 본 명세서 사이에 상충이 존재하는 경우, 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 선행 기술에 속하는 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 실시양태 중 어느 하나 이상으로부터 명백하게 배제될 수 있다. 이러한 실시양태는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 여겨지기 때문에, 이들은 배제가 본원에 명백하게 제시되지 않더라도 배제될 수 있다. 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 선행 기술의 존재와 관련되든 관련되지 않든 임의의 이유로 임의의 실시양태로부터 배제될 수 있다.

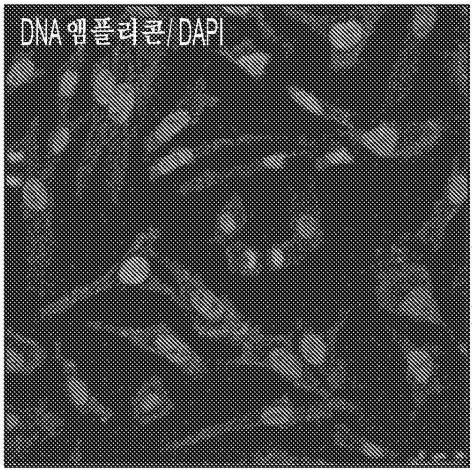
[0352] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범주는 상기 설명에 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 실시양태에 제시된 바와 같다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 하기 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 또는 범주로부터 벗어나지 않으면서 본 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음을 인지할 것이다.

도면

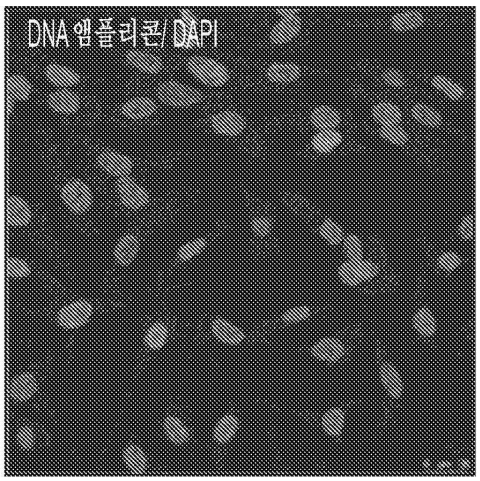
도면1


고체 불균질 조직
페드락 프로브
유전자-고유 식별자
리보솜
번역 mRNA
침묵 mRNA
항체 결합
항체-접합된 DNA 프라이머
라이게이션 및 RCA
DNA 앰플리콘
하드로겔-조직 화학
하드로겔 서열분석
DNA-겔
SEDAL 서열분석
공간 리보솜 프로파일링 신호
리보솜 프로파일링 신호 판독
바코드
디코딩
TTGCACT
ACGTTAC
....
GTACTA
유전자 1 번역
유전자 2 번역
유전자 n 번역

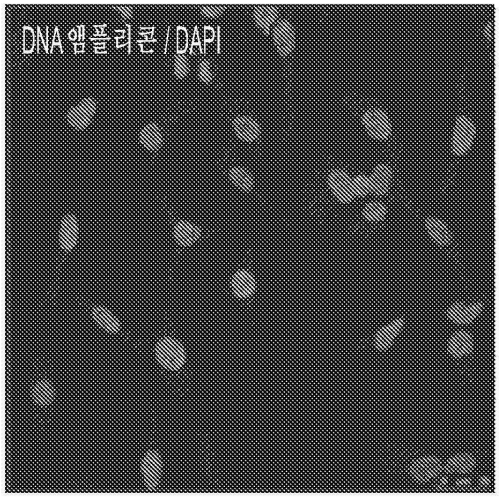
도면2a



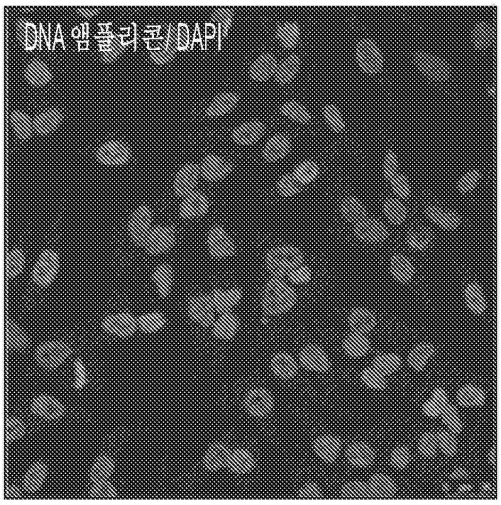
도면2b



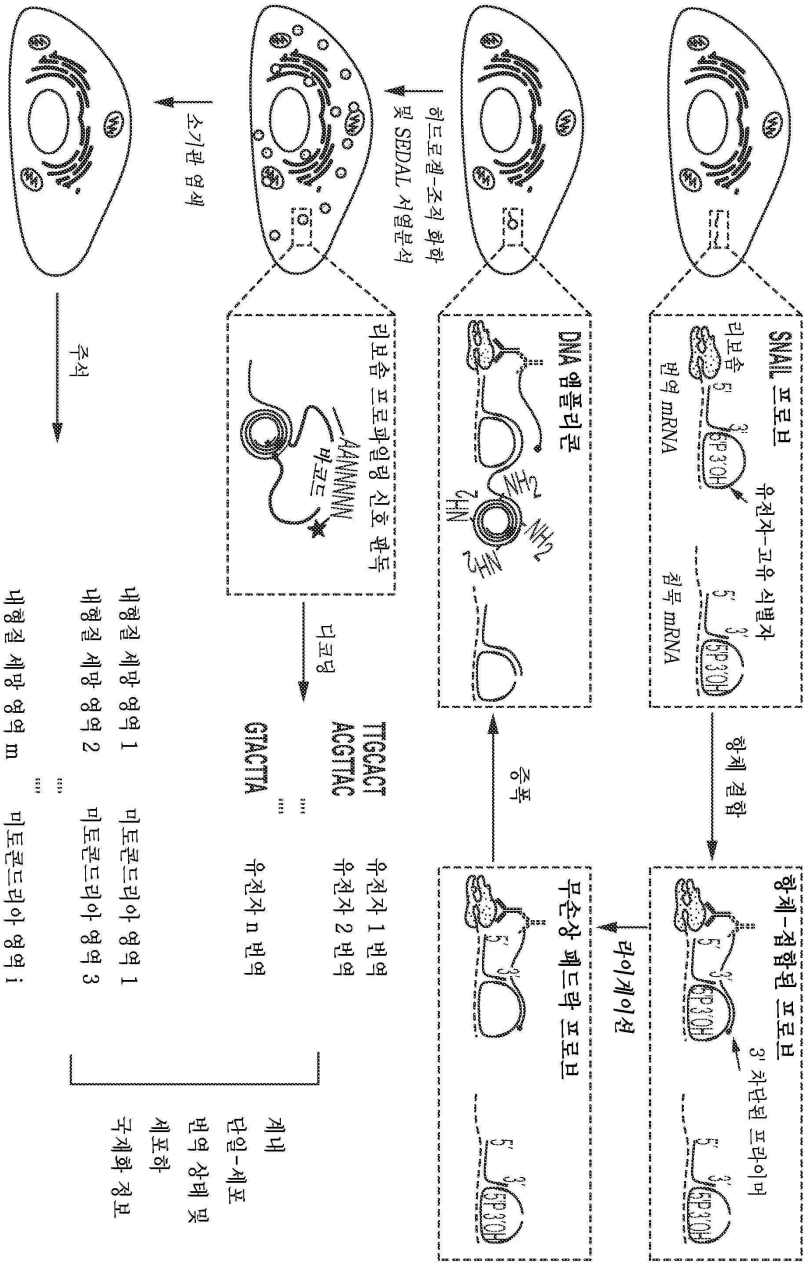
도면2c



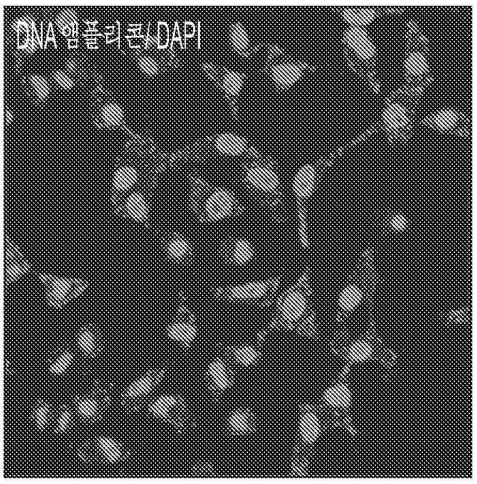
도면2d



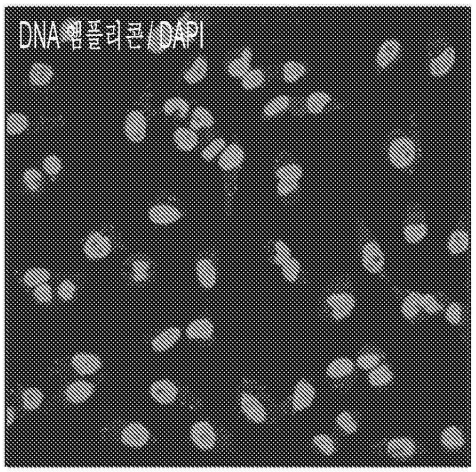
도면3


SNAIL 프로브
리보솜
번역 mRNA
유전자-고유 식별자
침묵 mRNA
항체 결합
항체-접합된 프로브
3' 차단된 프라이머
라이게이션
무손상 페드락 프로브
증폭
DNA 앰플리콘
히드로겔-조직 화학
및 SEDAL 서열분석
리보솜 프로파일링 신호 판독
바코드
디코딩
TTGCACT 유전자 1 번역
ACGTTAC 유전자 2 번역
GTACTTA 유전자 n 번역
소기관 염색
주석
내형질 세망 영역 1 미토콘드리아 영역 1
내형질 세망 영역 2 미토콘드리아 영역 3
내형질 세망 영역 m 미토콘드리아 영역 i
계내
단일-세포
번역 상태 및
세포하
국재화 정보

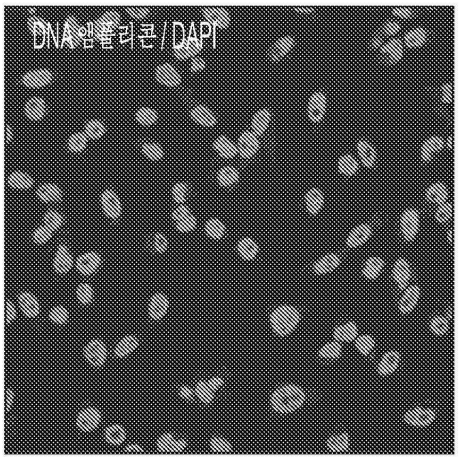
도면4a



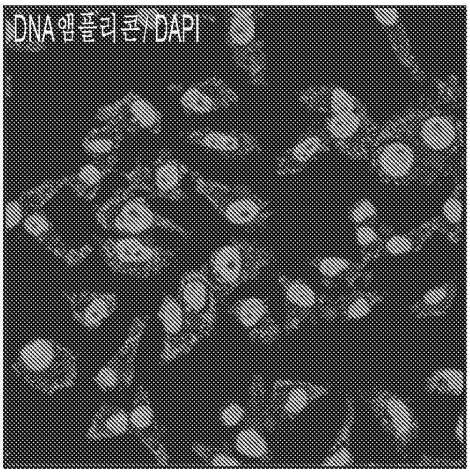
도면4b



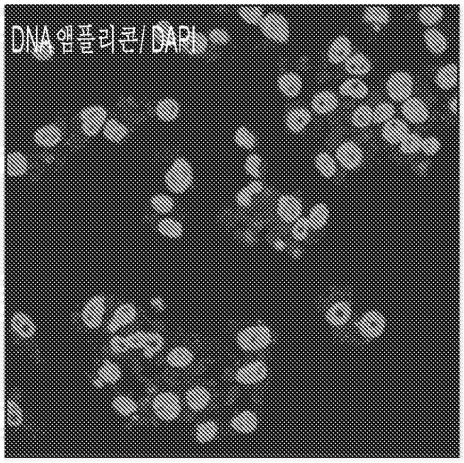
도면4c



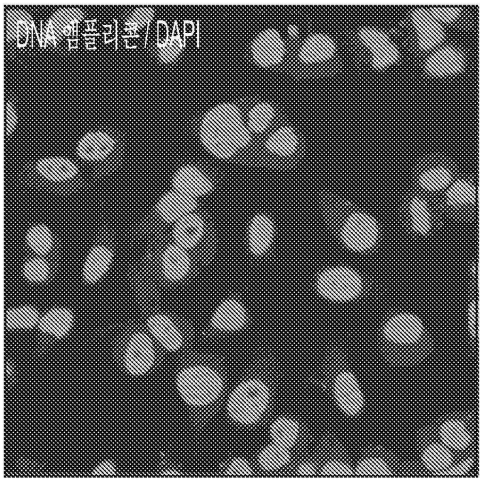
도면5a



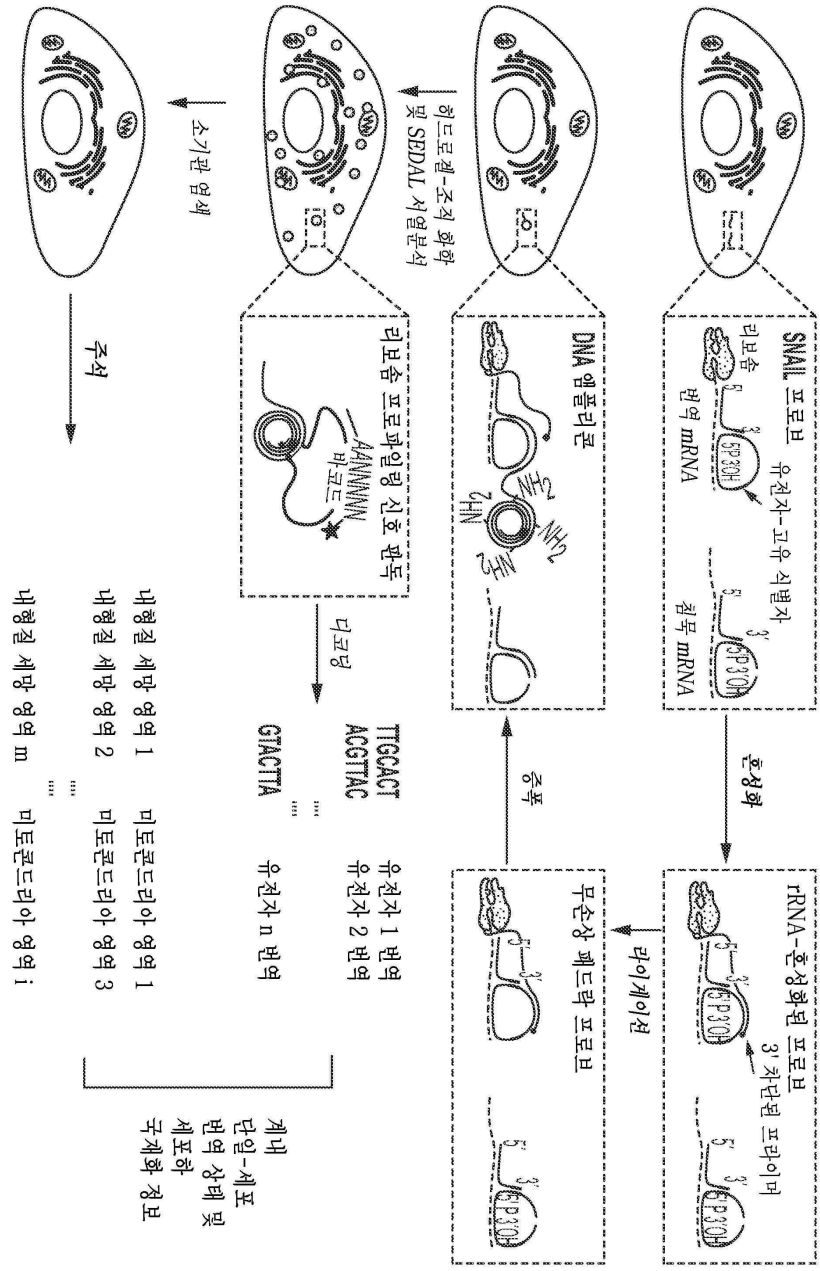
도면5b



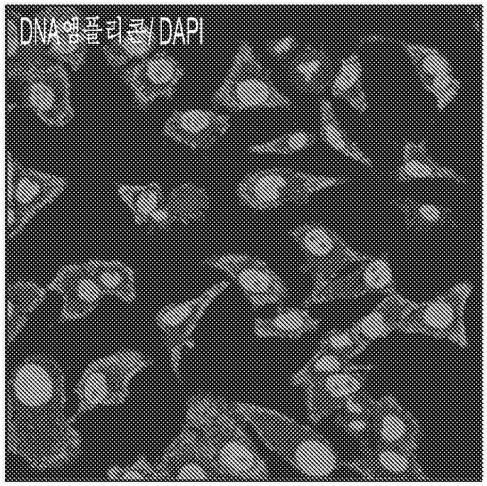
도면5c



도면6


SNAIL 프로브
리보솜
번역 mRNA
유전자-고유 식별자
침묵 mRNA
혼성화
rRNA-혼성화된 프로브
3' 차단된 프라이머
라이게이션
무손상 페드락 프로브
증폭
DNA 앰플리콘
히드로겔-조직 화학
및 SEDAL 서열분석
리보솜 프로파일링 신호 판독
바코드
디코딩
TTGCACT 유전자 1 번역
ACGTTAC 유전자 2 번역
GTACTTA 유전자 n 번역
소기관 염색
주석
내형질 세망 영역 1
내형질 세망 영역 2
내형질 세망 영역 m
미토콘드리아 영역 1
미토콘드리아 영역 3
미토콘드리아 영역 i
계내
단일-세포
번역 상태 및
세포하
국재화 정보

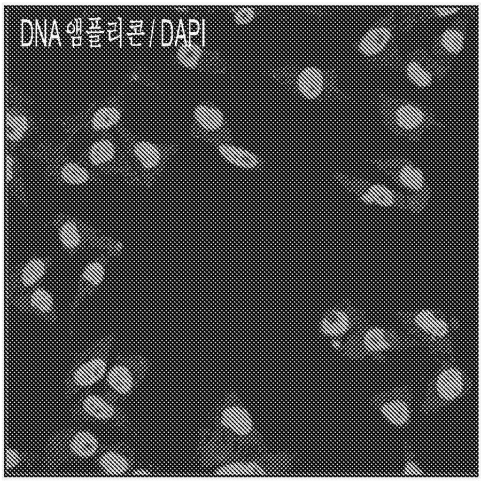
도면7a



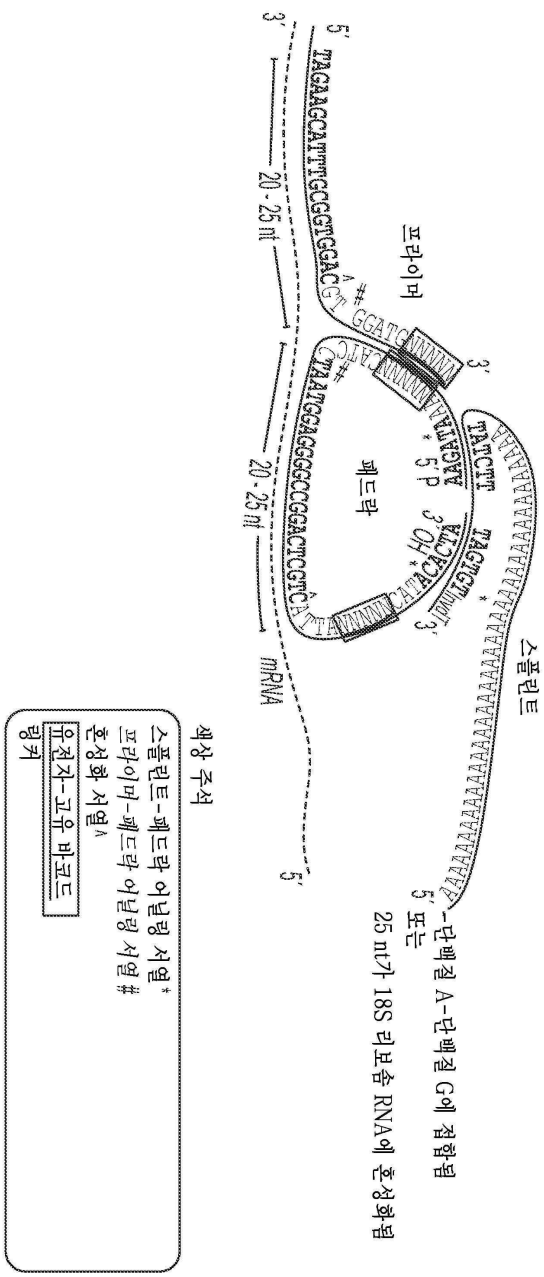
도면7b



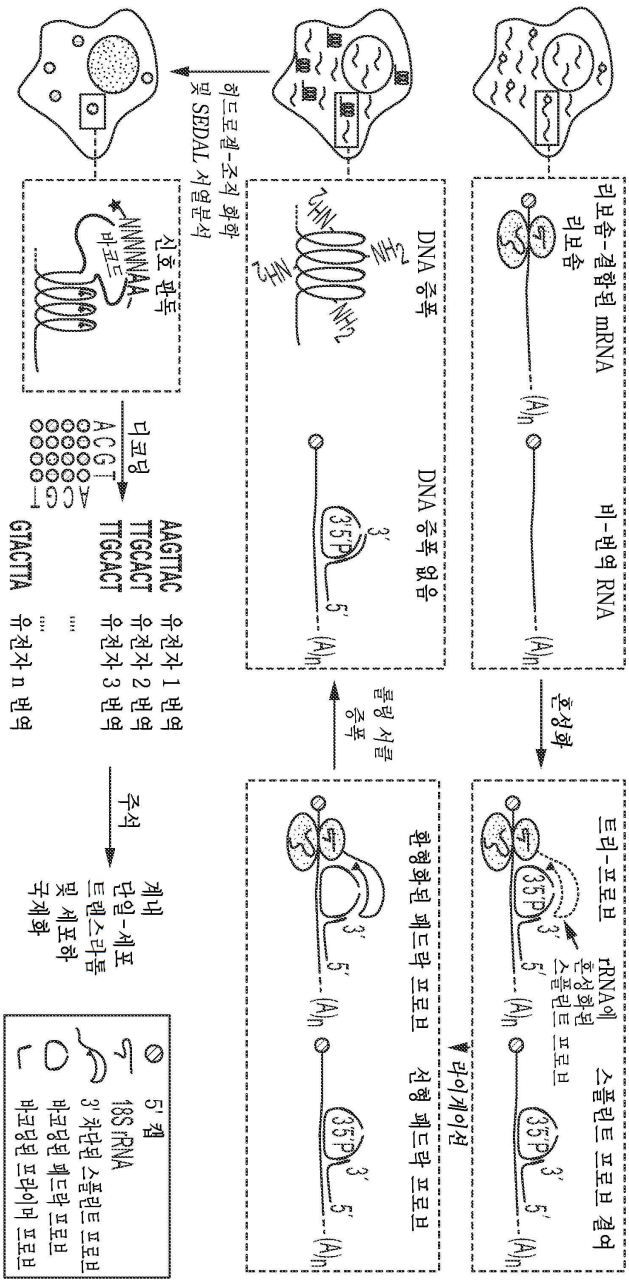
도면7c



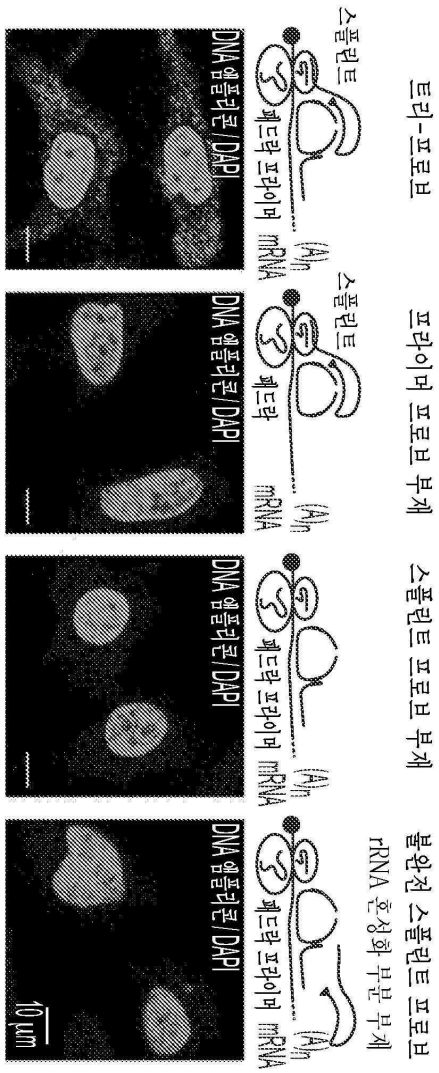
도면8


프라이머
페드락
스플린트
mRNA
20-25 nt
20-25 nt
5'
3'
-단빼질 A-단빼질 G에 접합됨
5' 또는
25 nt가 18S 리보솜 RNA에 혼성화됨
색상 주석
스플린트-페드락 어닐링 서열*
프라이머-페드락 어닐링 서열#
혼성화 서열^
유전자-고유 바코드
링커

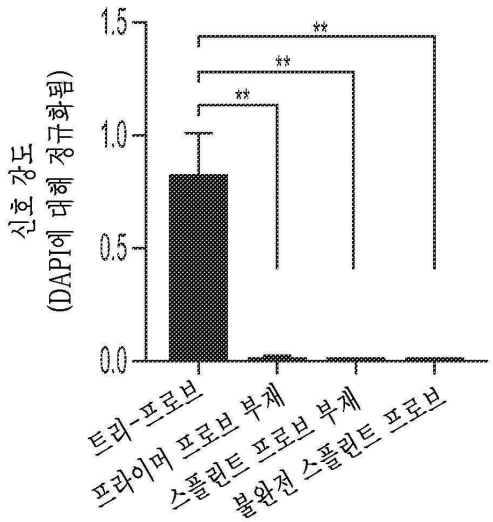
도면9a


리보솜-결합된 mRNA
리보솜
비-번역 RNA
혼성화
DNA 증폭
DNA 증폭 없음
롤링 서클 증폭
트리-프로브
rRNA에 혼성화된 스플린트 프로브
스플린트 프로브 결여
라이게이션
환형화된 패드락 프로브
선형 패드락 프로브
하드로겔-조직 화학 및 SEDAL 서열분석
신호 판독
NNNNAA
바코드
디코딩
ACGT
AAGTTAC
TTGCACT
TTGCACT
GTACTTA
유전자 1 번역
유전자 2 번역
유전자 3 번역
유전자 n 번역
주석
계내 단일-세포 트랜스크립톰 및 세포하 국재화
5' 캡
18S rRNA
3' 차단된 스플린트 프로브
바코딩된 패드락 프로브
바코딩된 프라이머 프로브

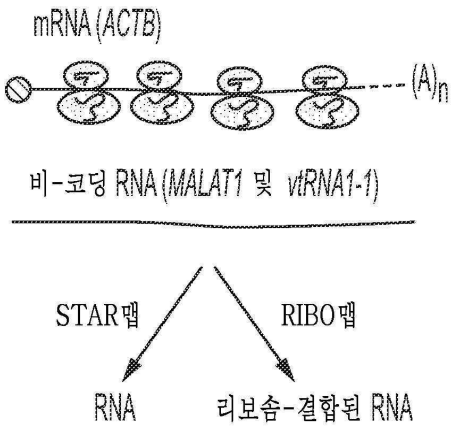
도면9b


트리-프로브
프라이머 프로브 부재
스플린트 프로브 부재
불완전 스플린트 프로브
rRNA 혼성화 부분 부재
스플린트
페드락 프라이머
mRNA
DNA 앰플리콘/DAPI
10 μm

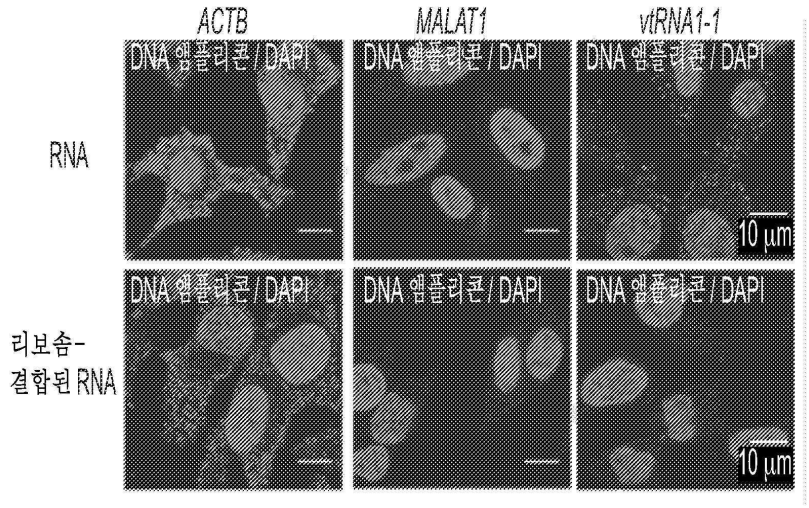
도면9c


신호 강도
(DAPI에 대해 정규화됨)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
**
트리-프로브
프라이머 프로브 부재
스플린트 프로브 부재
불완전 스플린트 프로브

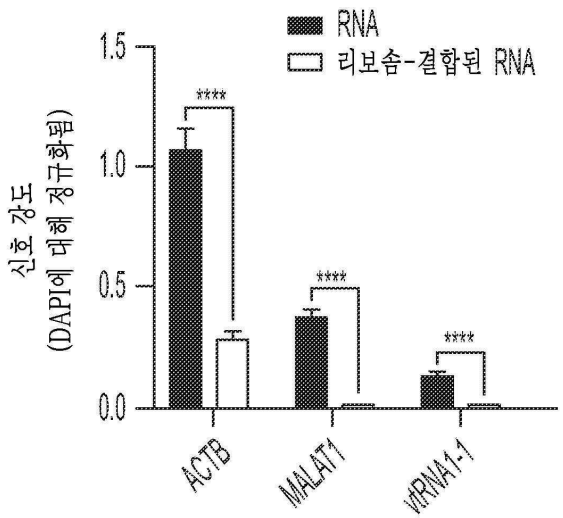
도면9d



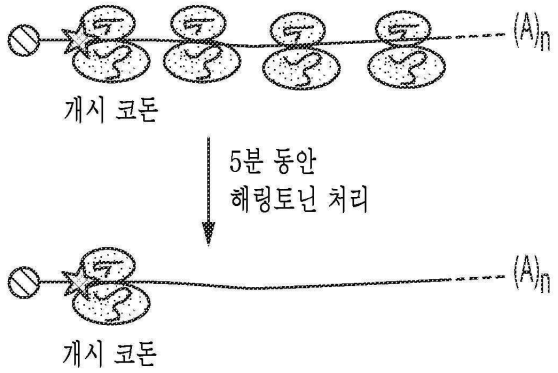
도면9e



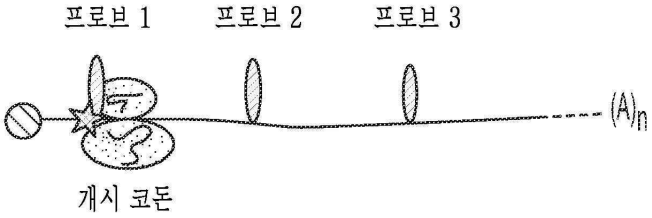
도면9f



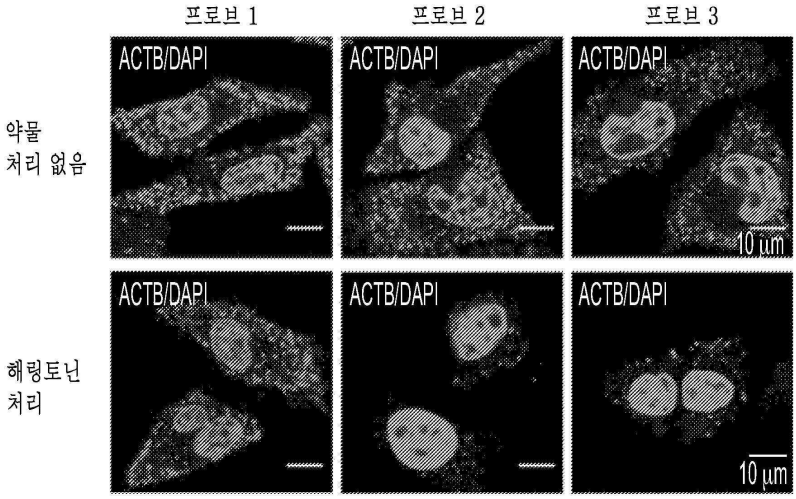
도면9g



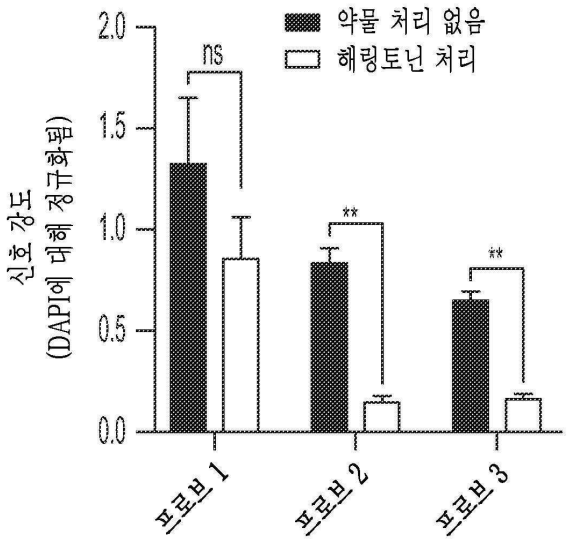
도면9h



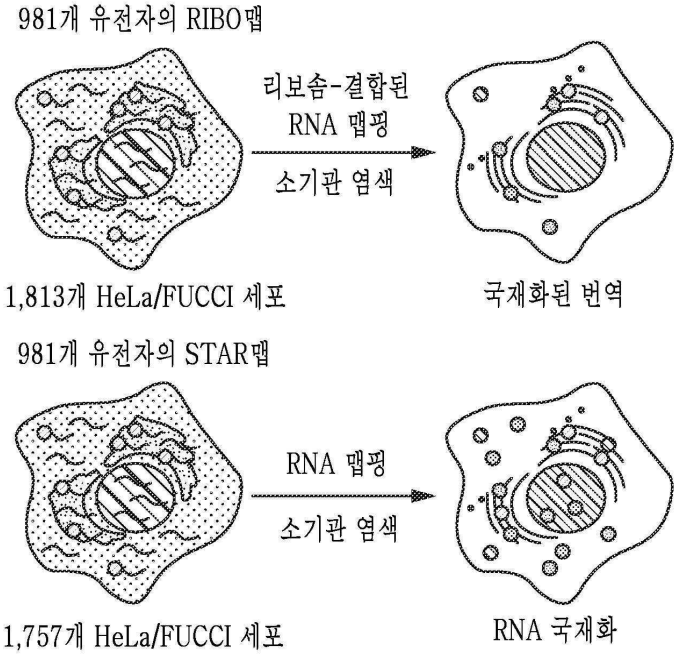
도면9i



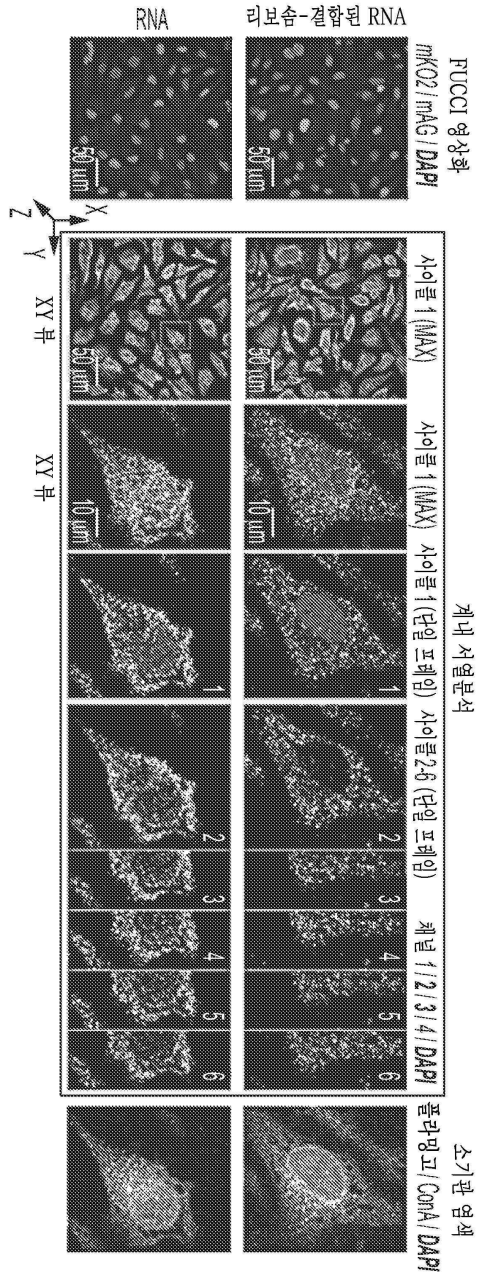
도면9j


약물 처리 없음
해링토닌 처리
신호 강도
(DAPI에 대해 정규화됨)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ns
**
**
프로브 1
프로브 2
프로브 3

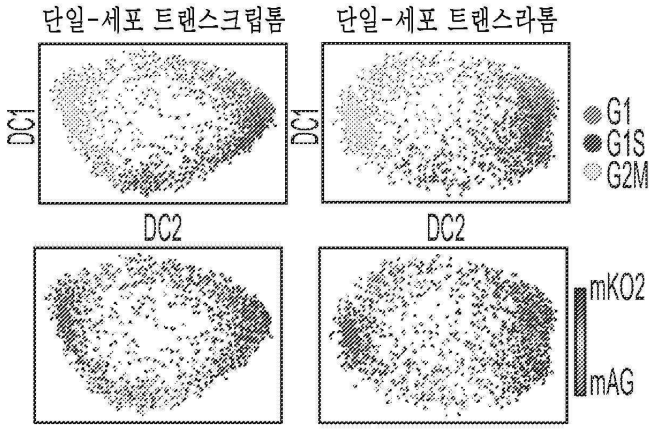
도면10a


981개 유전자의 RIBO맵
리보솜-결합된
RNA 맵핑
소기관 염색
1,813개 HeLa/FUCCI 세포
국재화된 번역
981개 유전자의 STAR맵
RNA 맵핑
소기관 염색
1,757개 HeLa/FUCCI 세포
RNA 국재화

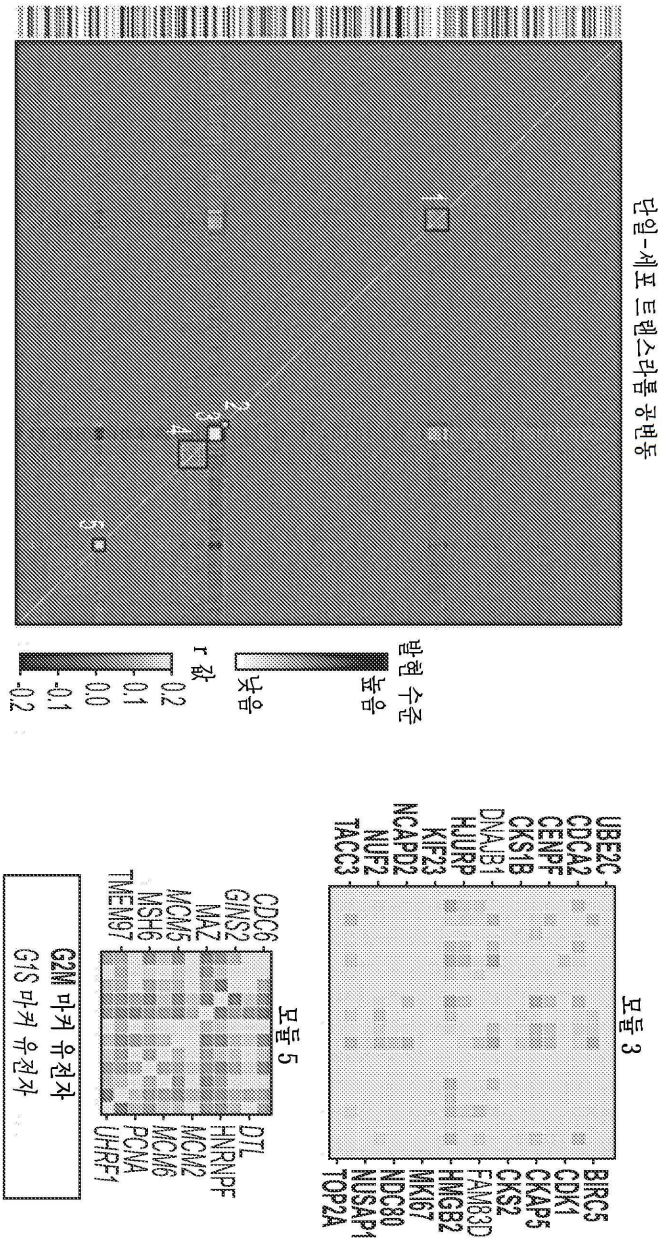
도면10b


RNA
리보솜-결합된 RNA
FUCCI 영상화
mKO2 / mAG / DAPI
50 um
Z
X
Y
XY 뷰
사이클 1 (MAX)
10 um
사이클 1 (단일 프레임)
사이클2-6 (단일 프레임)
채널 1 / 2 / 3 / 4 / DAPI
1
2
3
4
5
6
계내 서열분석
소기관 염색
플라밍고 / ConA / DAPI

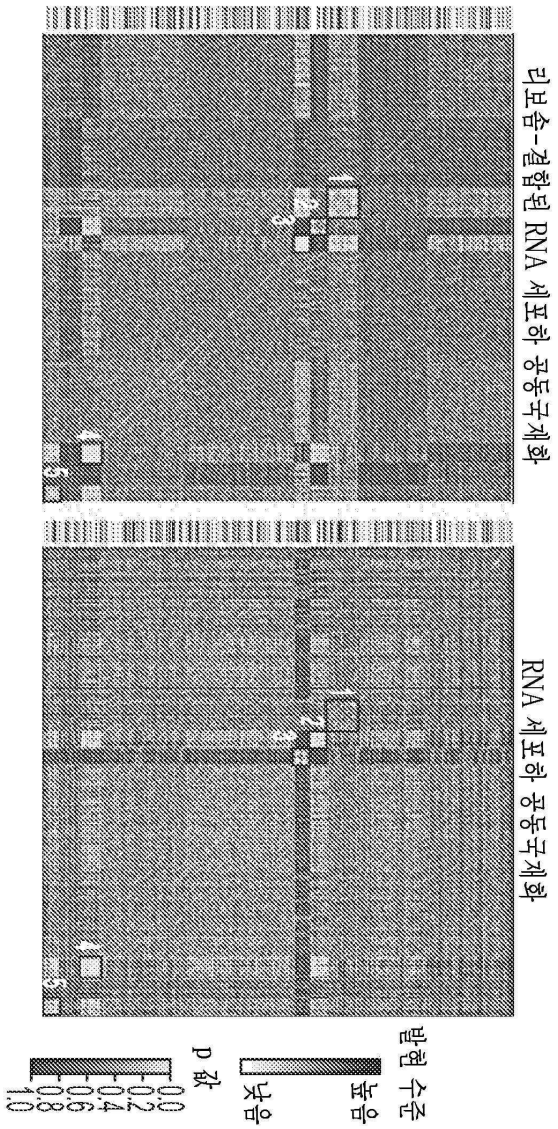
도면10c



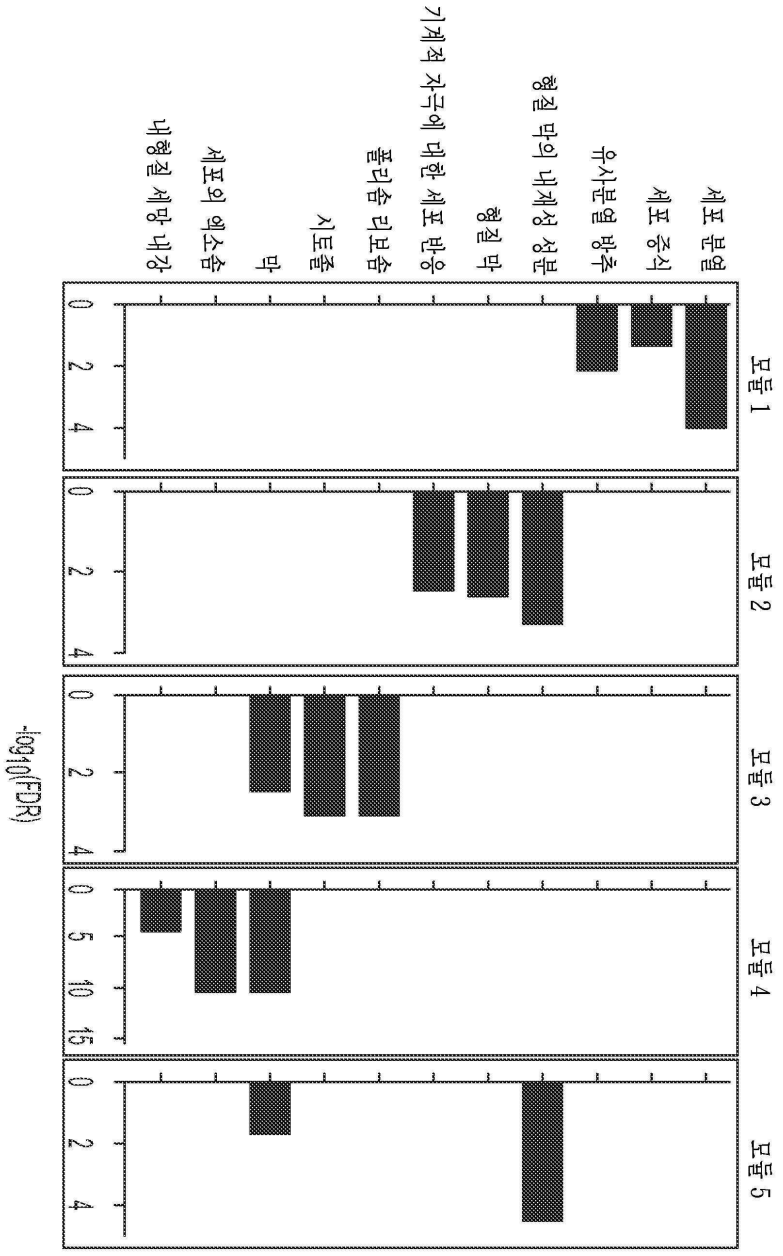
도면10d


단일-세포 트랜스라돔 공변동
발현 수준
높음
낮음
r 값
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
모듈 3
UBE2C
CDCA2
CENPF
CKS1B
DNAJB1
HJURP
KIF23
NCAPB2
NUF2
TACC3
BIRC5
CDK1
CKAP5
CKS2
FAM83D
HMGB2
MKI67
NDC80
NUSAP1
TOP2A
모듈 5
CDC6
GINS2
MAZ
MCM5
MSH6
TMEM97
DTL
HNRNPF
MCM2
MCM6
PCNA
UHRF1
G2M 마커 유전자
G1S 마커 유전자

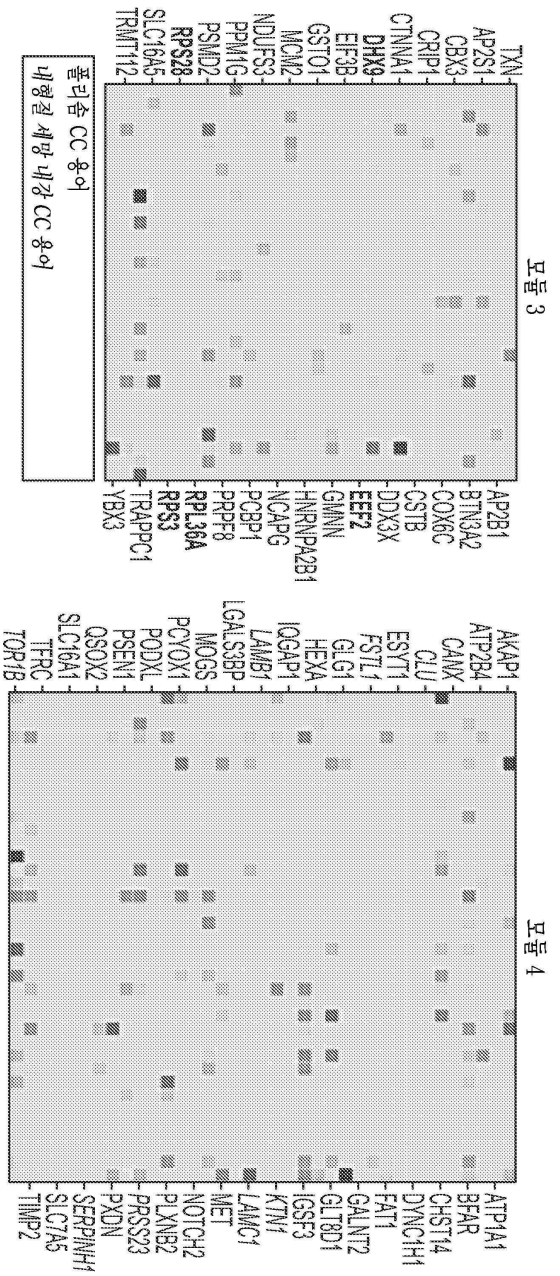
도면10e


리보솜-결합된 RNA 세포하 공동국재화
RNA 세포하 공동국재화
발현 수준
높음
낮음
p 값
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

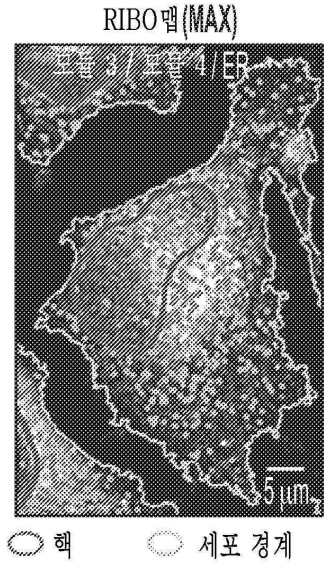
도면10f


세포 분열
세포 증식
유사분열 방추
형질 막의 내재성 성분
형질 막
기계적 자극에 대한 세포 반응
플리솜 리보솜
시토졸
막
세포의 엑소솜
내형질 세망 내강
모듈 1
모듈 2
모듈 3
모듈 4
모듈 5
-log10(FDR)
0
2
4
5
10
15

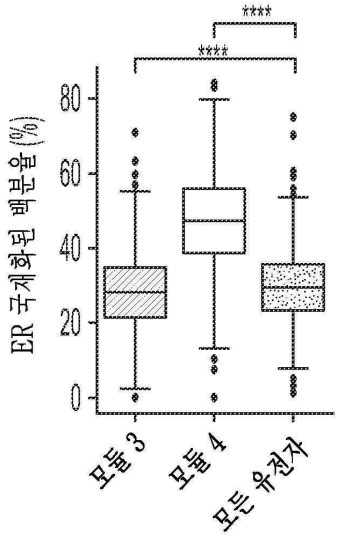
도면10g


모듈 3
TXN
AP2S1
CBX3
CRIP1
CTNNA1
DHX9
EIF3B
GSTO1
MCM2
NDUFS3
PPM1G
PSMD2
RPS28
SLC16A5
TRMT112
AP2B1
BTN3A2
COX6C
CSTB
DDX3X
EEF2
GMNN
HNRNPA2B1
NCAPG
PCBP1
PRPF8
RPL36A
RPS3
TRAPPC1
YBX3
모듈 4
AKAP1
ATP2B4
CANX
CLU
ESYT1
FSTL1
GLG1
HEXA
IQGAP1
LAMB1
LGALS3BP
MOGS
PCYOX1
PODXL
PSEN1
QSOX2
SLC16A1
TFRC
TOR1B
ATP1A1
BFAR
CHST14
DYNC1H1
FAT1
GALNT2
GLT8D1
IGSF3
KTN1
LAMC1
MET
NOTCH2
PLXNB2
PRSS23
PXDN
SERPINH1
SLC7A5
TIMP2
폴리솜 CC 용어
내형질 세망 내강 CC 용어

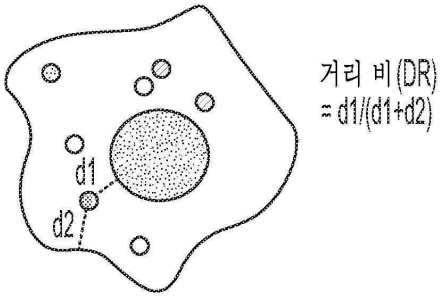
도면10h



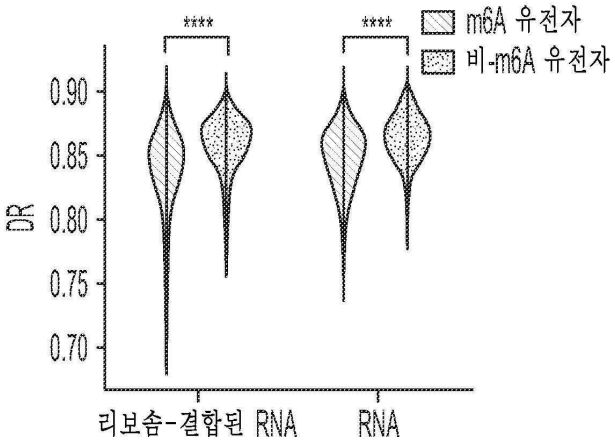
도면10i



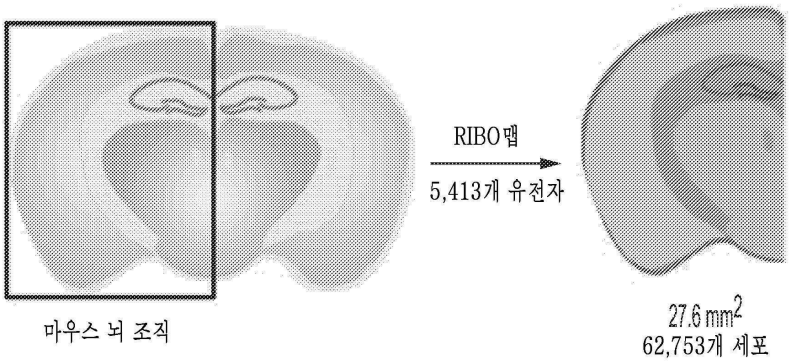
도면10j



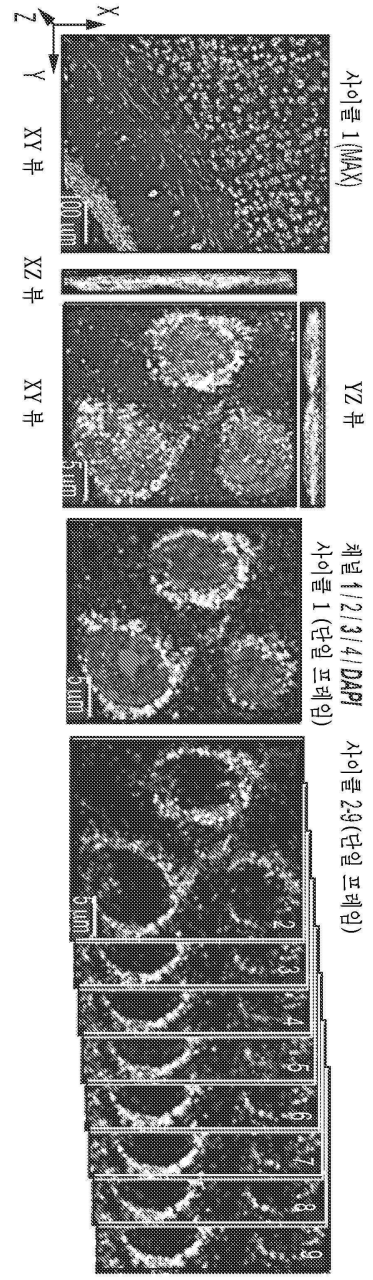
도면10k


****
****
m6A 유전자
비-m6A 유전자
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
DS
리보솜-결합된 RNA
RNA

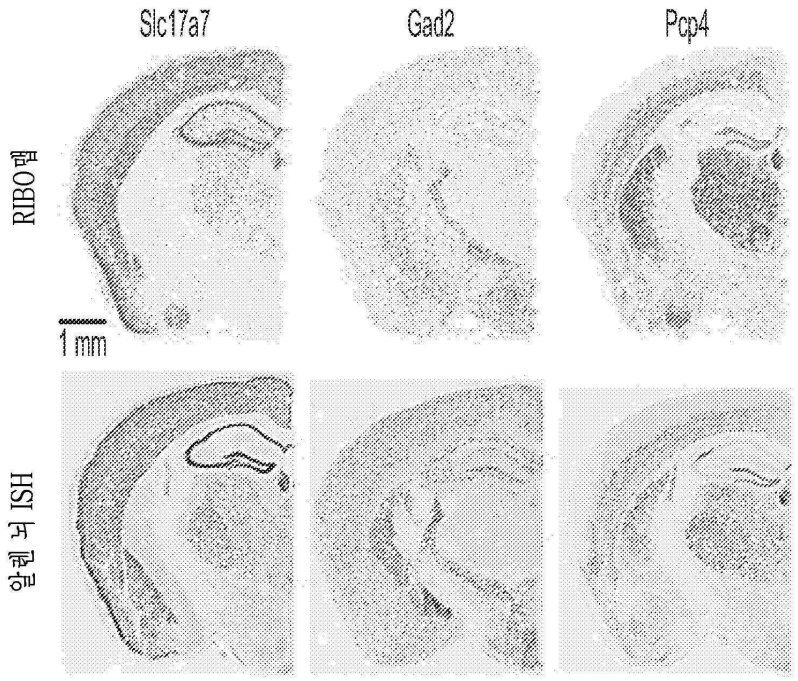
도면11a


RIBO맵
5,413개 유전자
마우스 뇌 조직
27.6 mm2
62,753개 세포

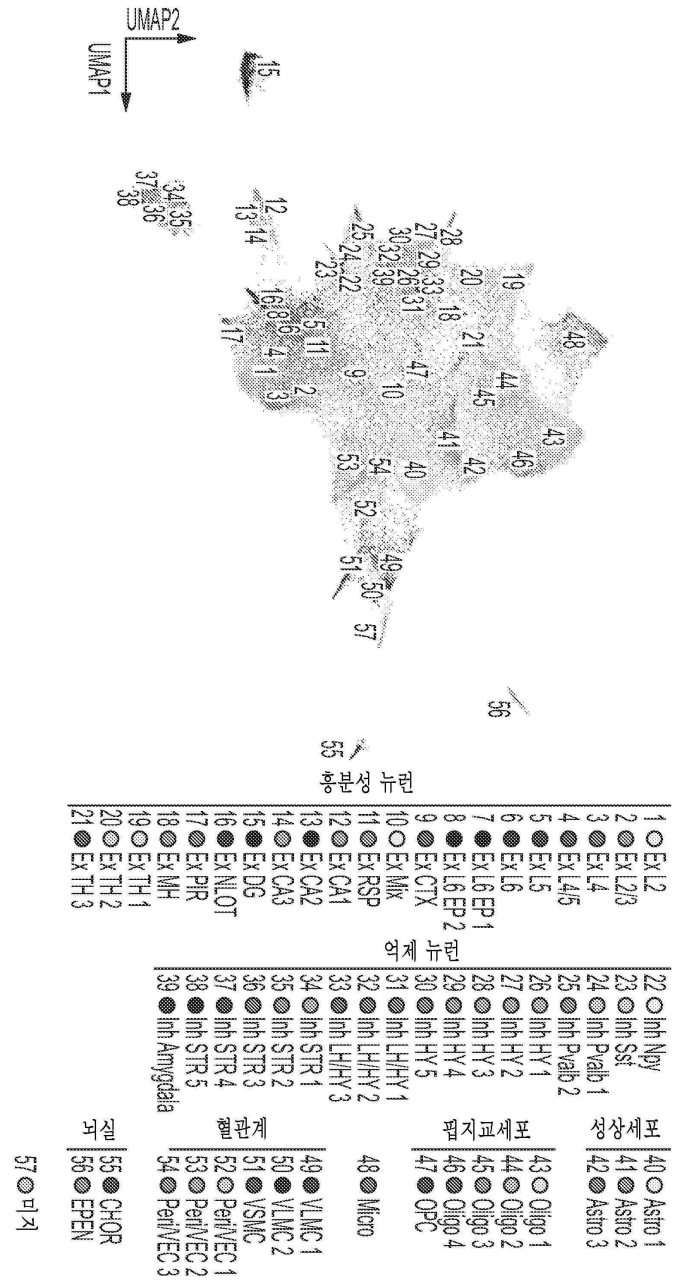
도면11b


Z
X
Y
XY 뷰
XZ 뷰
YZ 뷰
사이클 1 (MAX)
XY 뷰
사이클 1 (단일 프레임)
채널 1/2/3/4/DAPI
사이클 2-9 (단일 프레임)
50 μm
5 μm
2
3
4
5
6
7
8
9

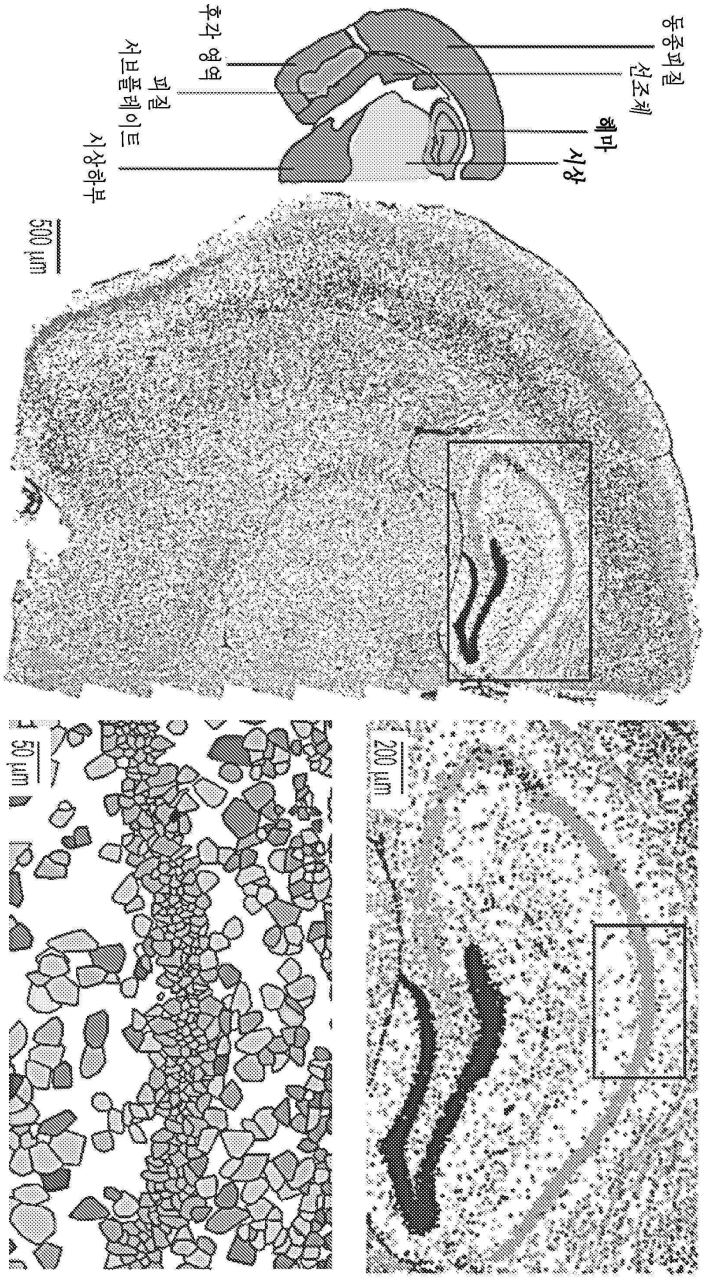
도면11c



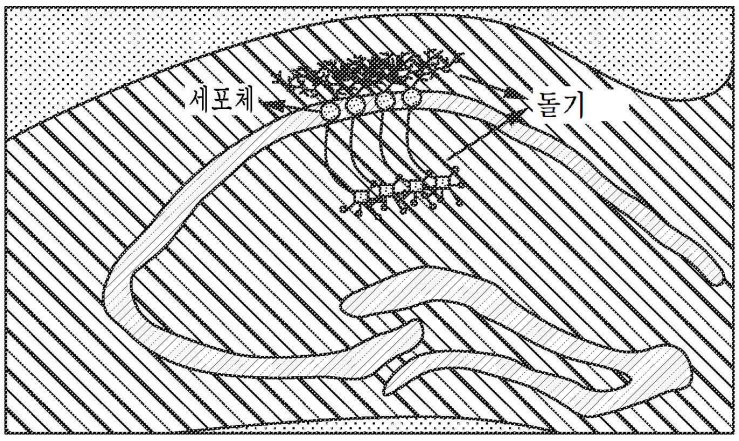
도면11d


UMAP2
UMAP1
흥분성 뉴런
억제 뉴런
성상세포
뭅지교세포
혈관계
뇌실
미지
1 Ex L2
2 Ex L2/3
3 Ex L4
4 Ex L4/5
5 Ex L5
6 Ex L6
7 Ex L6 EP 1
8 Ex L6 EP 2
9 Ex CTX
10 Ex Mix
11 Ex RSP
12 Ex CA1
13 Ex CA2
14 Ex CA3
15 Ex DG
16 Ex NLOT
17 Ex PIR
18 Ex MH
19 Ex TH 1
20 Ex TH 2
21 Ex TH 3
22 Inh Npy
23 Inh Sst
24 Inh Pvalb 1
25 Inh Pvalb 2
26 Inh HY 1
27 Inh HY 2
28 Inh HY 3
29 Inh HY 4
30 Inh HY 5
31 Inh LH/HY 1
32 Inh LH/HY 2
33 Inh LH/HY 3
34 Inh STR 1
35 Inh STR 2
36 Inh STR 3
37 Inh STR 4
38 Inh STR 5
39 Inh Amygdala
40 Astro 1
41 Astro 2
42 Astro 3
43 Oligo 1
44 Oligo 2
45 Oligo 3
46 Oligo 4
47 OPC
48 Micro
49 VLMC 1
50 VLMC 2
51 VSMC
52 PeriVEC 1
53 PeriVEC 2
54 PeriVEC 3
55 CHOR
56 EPEN
57 미지

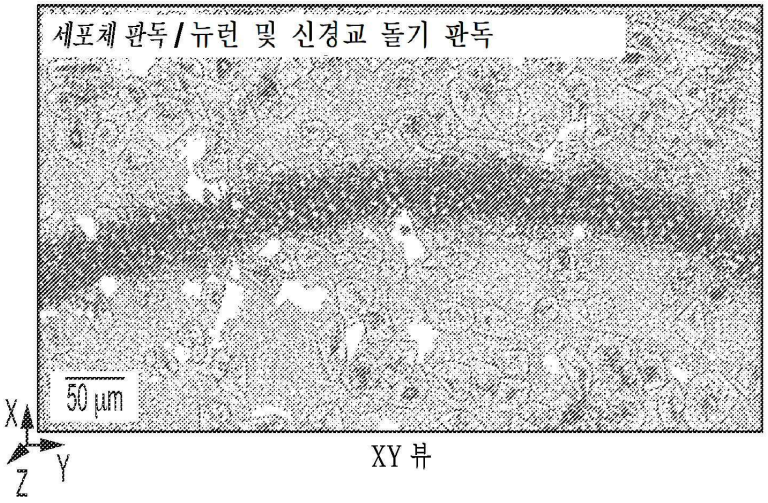
도면11e



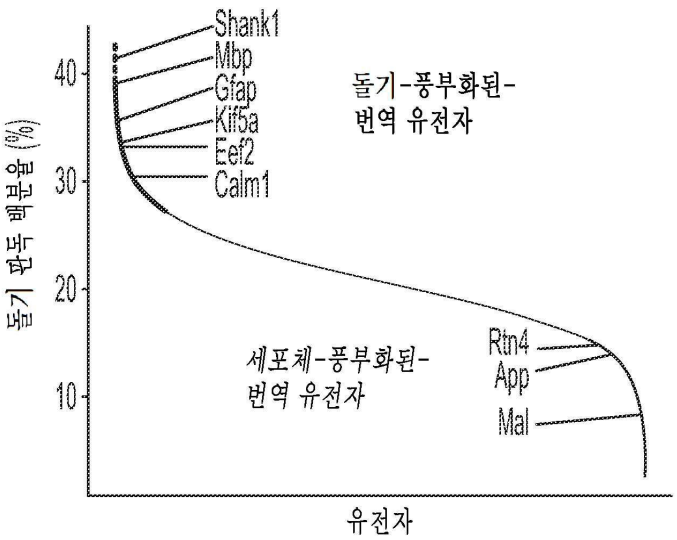
도면11f



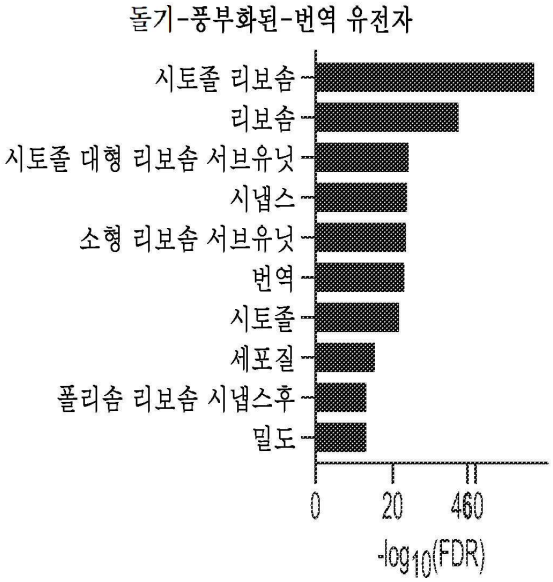
도면11g



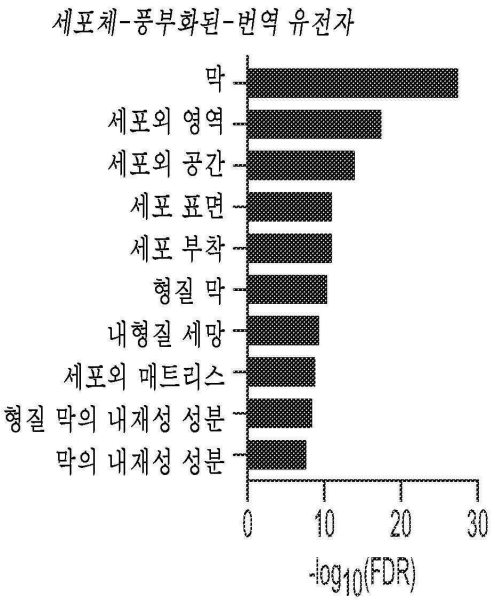
도면11h



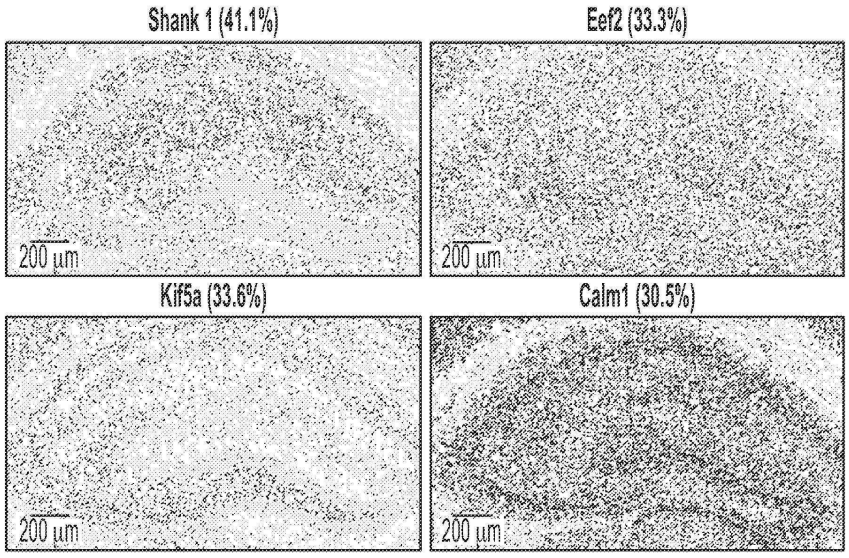
도면11i


돌기-풍부화된-번역 유전자
시토졸 리보솜
리보솜
시토졸 대형 리보솜 서브유닛
시냅스
소형 리보솜 서브유닛
번역
시토졸
세포질
폴리솜 리보솜 시냅스후
밀도
0
20
460
-log10(FDR)

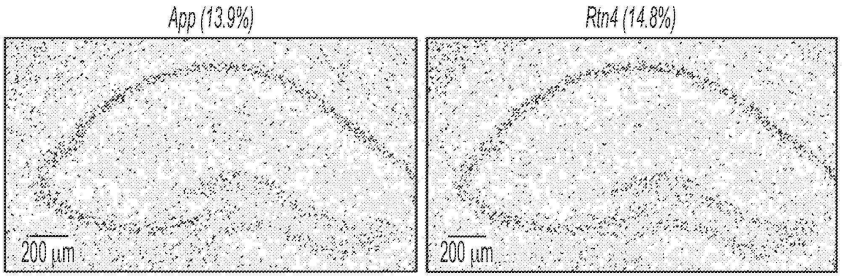
도면11j


세포체-풍부화된-번역 유전자
막
세포외 영역
세포외 공간
세포 표면
세포 부착
형질 막
내형질 세망
세포외 매트리스
형질 막의 내재성 성분
막의 내재성 성분
0
10
20
30
-log10(FDR)

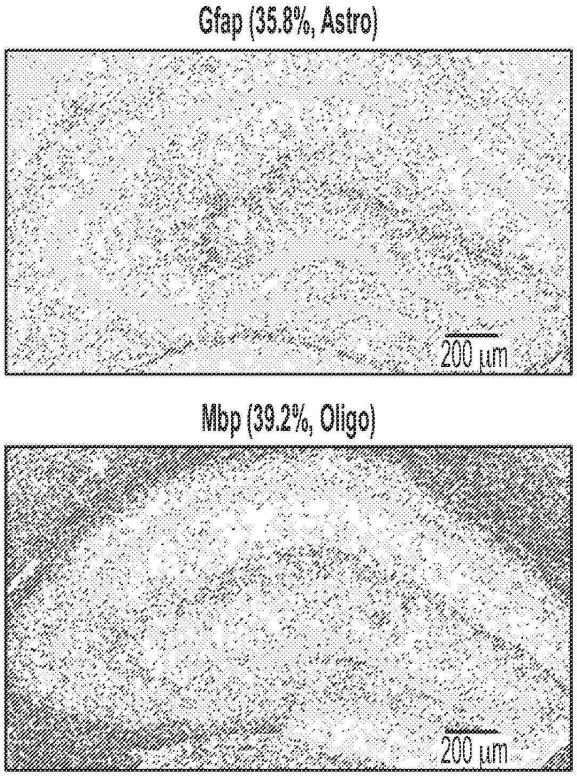
도면11k


Shank 1 (41.1%)
Eef2 (33.3%)
Kif5a (33.6%)
Calm1 (30.5%)
200 µm
200 µm
200 µm
200 µm

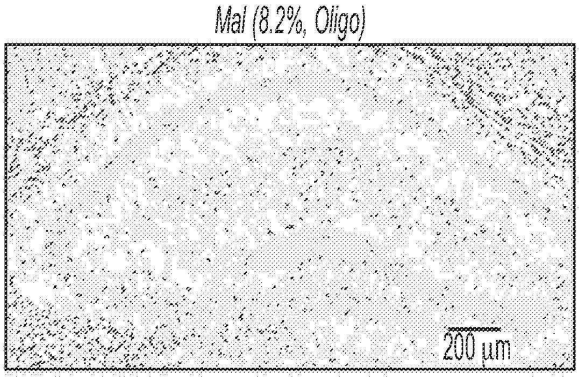
도면11l


App (13.9%)
Rtn4 (14.8%)
200 µm
200 µm

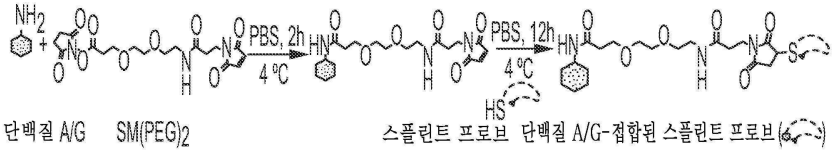
도면11m



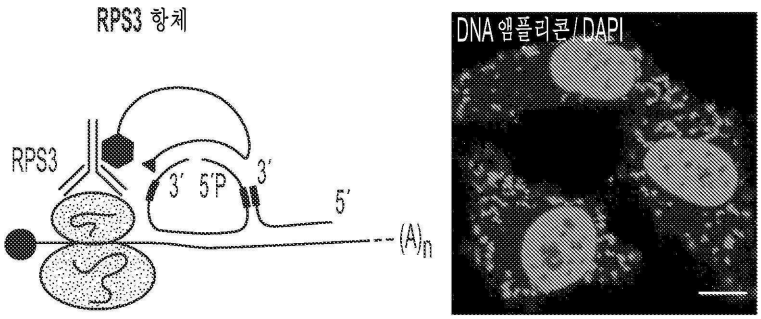
도면11n



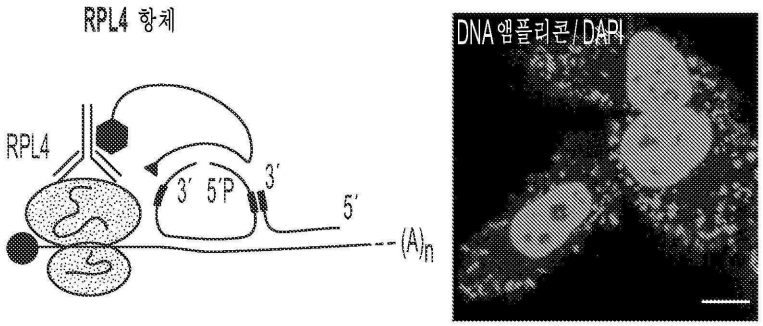
도면12a



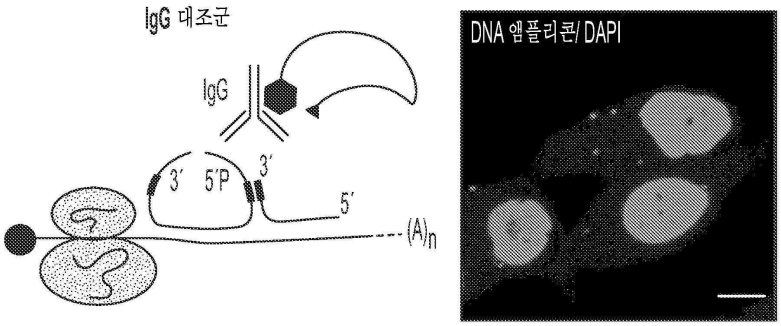
도면12b



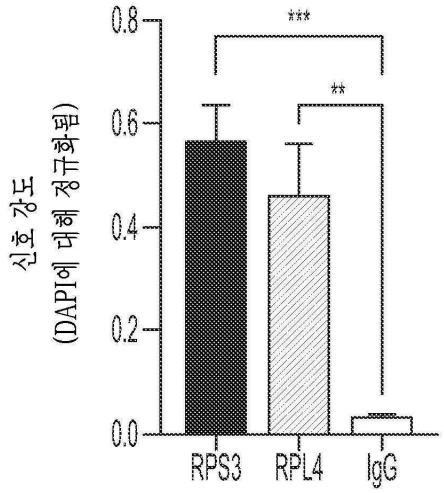
도면12c



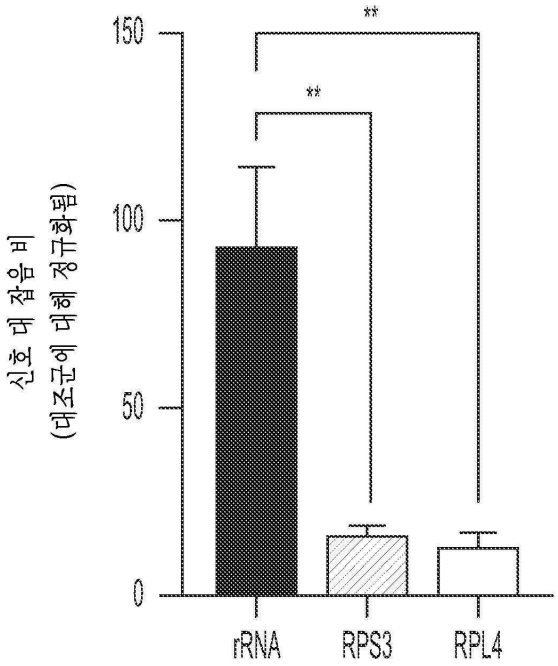
도면12d



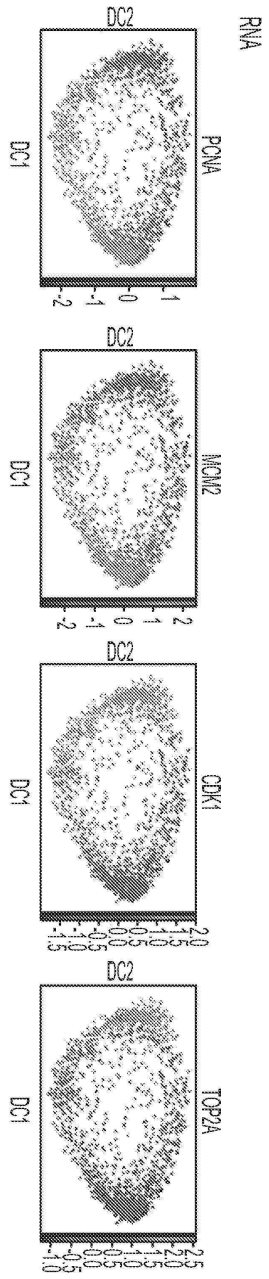
도면12e


신호 강도
(DAPI에 대해 정규화됨)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
**
RPS3
RPL4
IgG

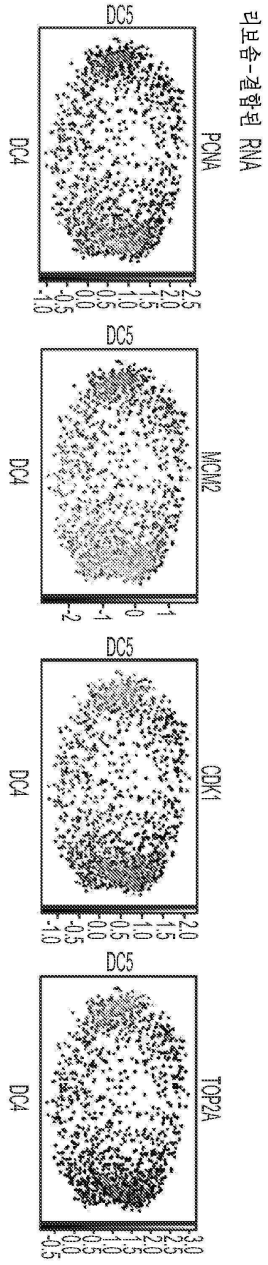
도면12f


신호 대 잡음 비
(대조군에 대해 정규화됨)
150
100
50
0
**
**
rRNA
RPS3
RPL4

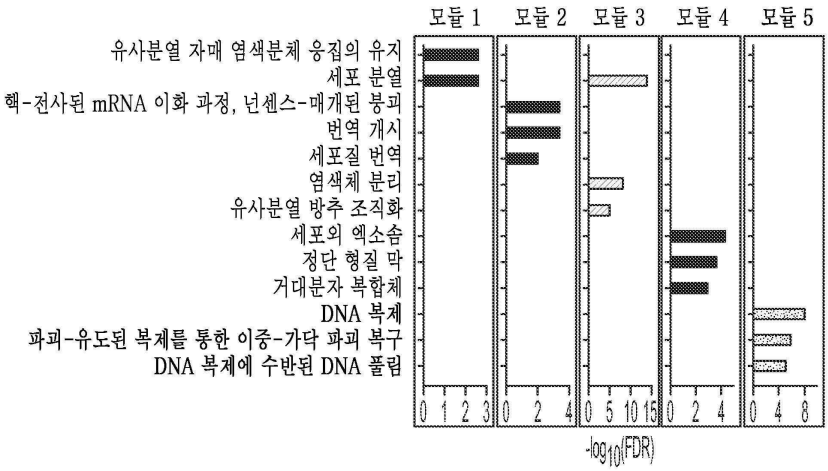
도면13a



도면13b

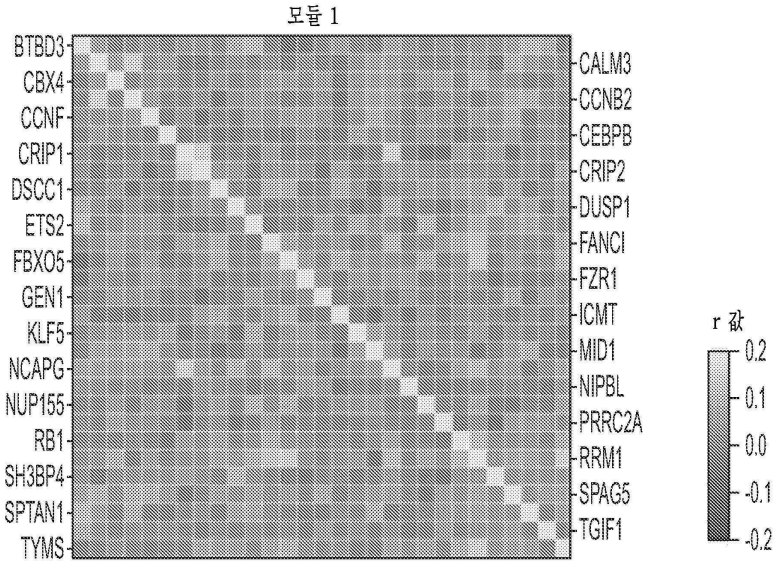


도면14a

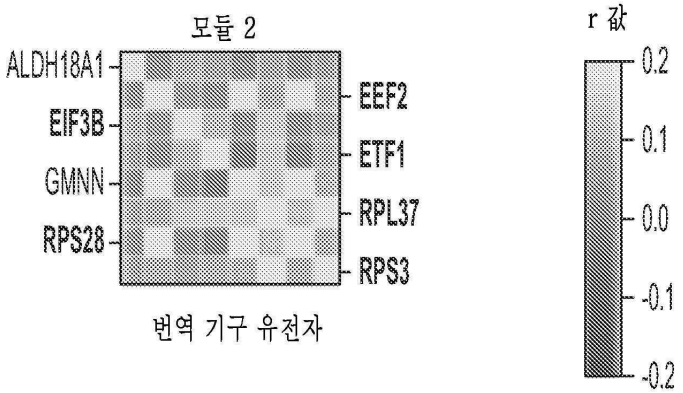


G2M 마커 유전자 풍부화된 모듈 G1S 마커 유전자 풍부화된 모듈

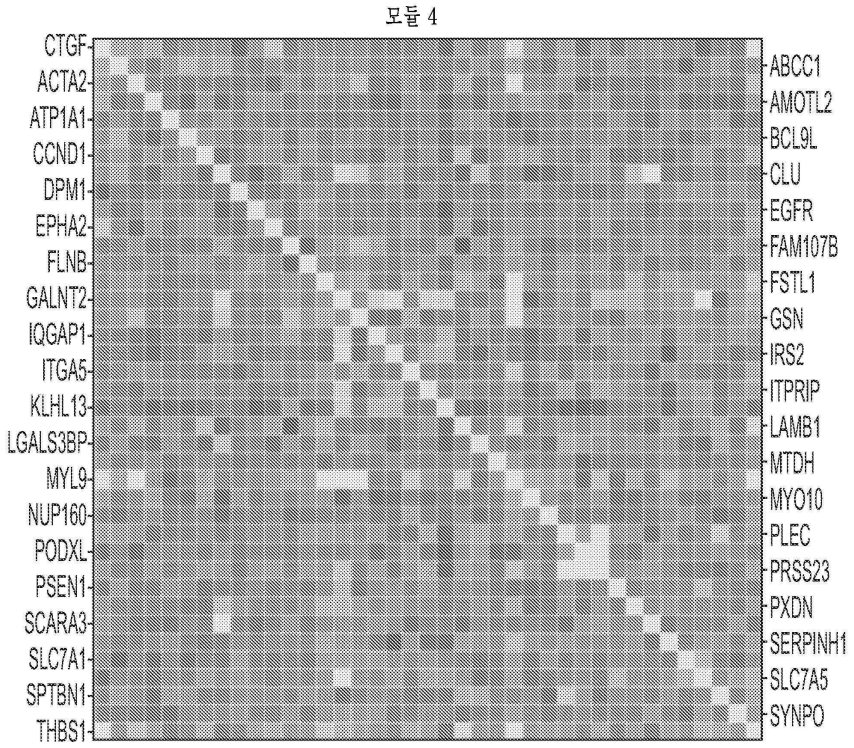
도면14b



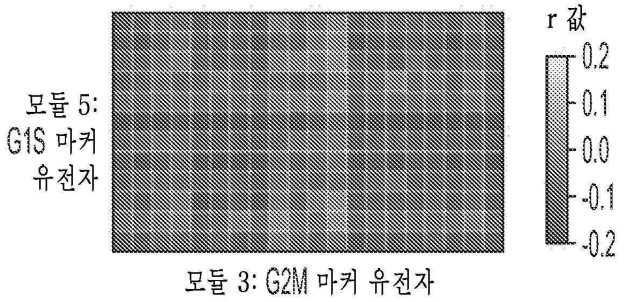
도면14c



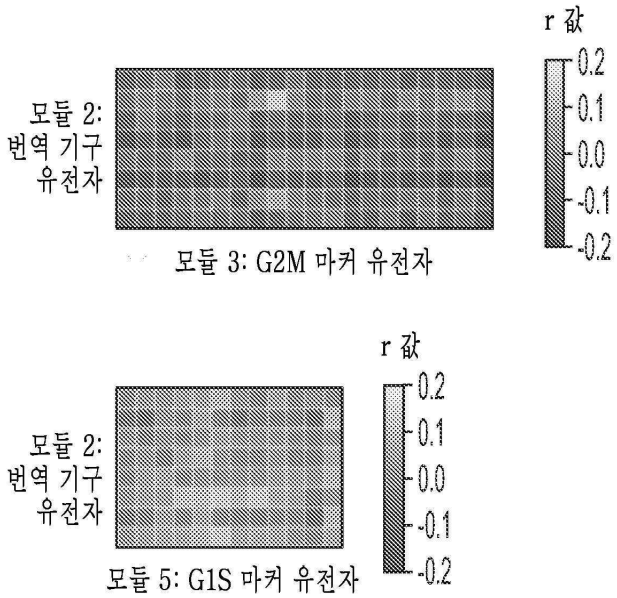
도면14d


모듈 4
CTGF
ACTA2
ATP1A1
CCND1
DPM1
EPHA2
FLNB
GALNT2
IQGAP1
ITGA5
KLHL13
LGALS3BP
MYL9
NUP160
PODXL
PSEN1
SCARA3
SLC7A1
SPTBN1
THBS1
ABCC1
AMOTL2
BCL9L
CLU
EGFR
FAM107B
FSTL1
GSN
IRS2
ITPRIP
LAMB1
MTDH
MYO10
PLEC
PRSS23
PXDN
SERPINH1
SLC7A5
SYNPO

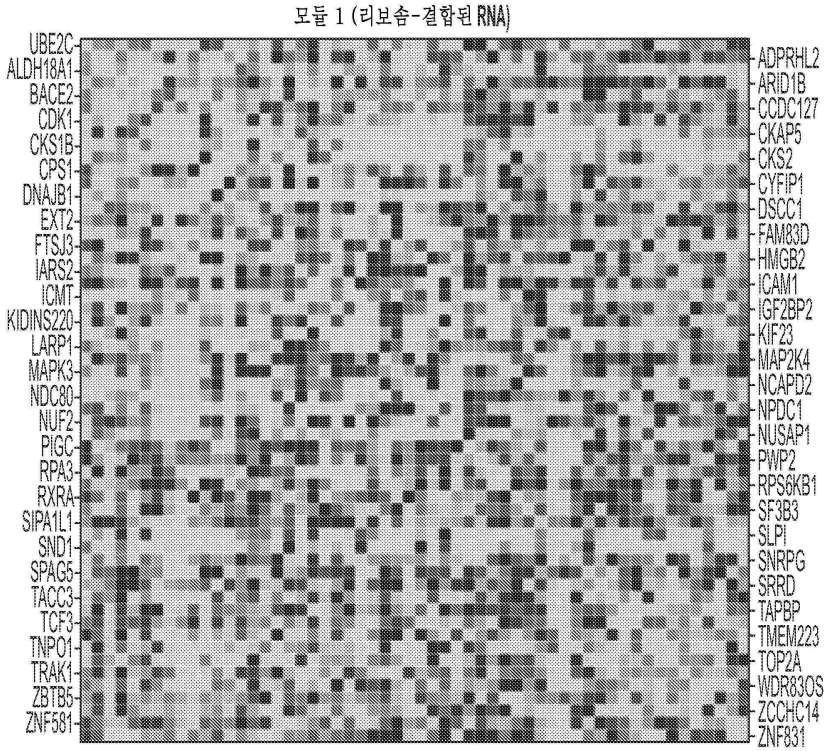
도면14e


모듈 5:
G1S 마커
유전자
r 값
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
모듈 3: G2M 마커 유전자

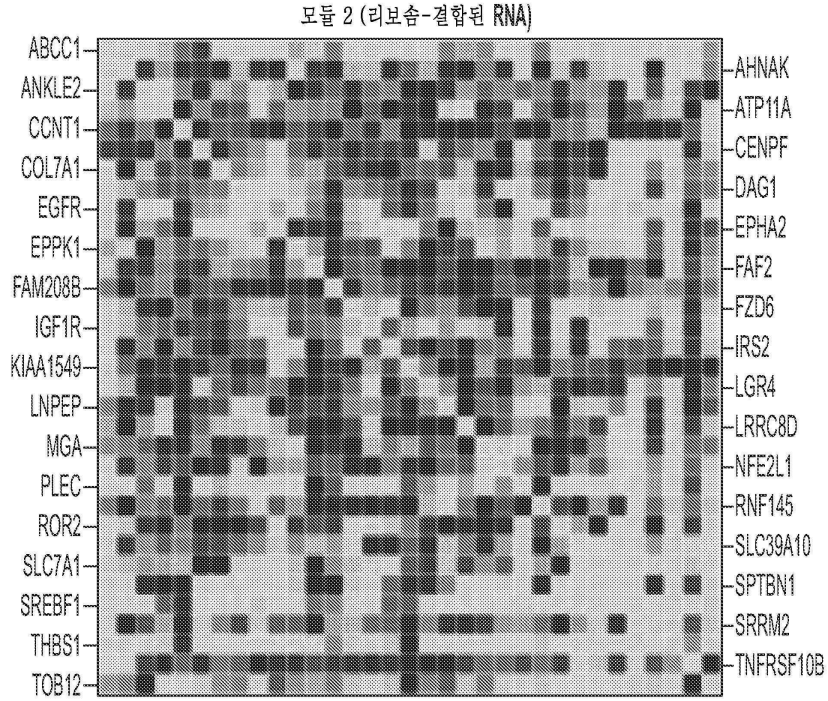
도면14f



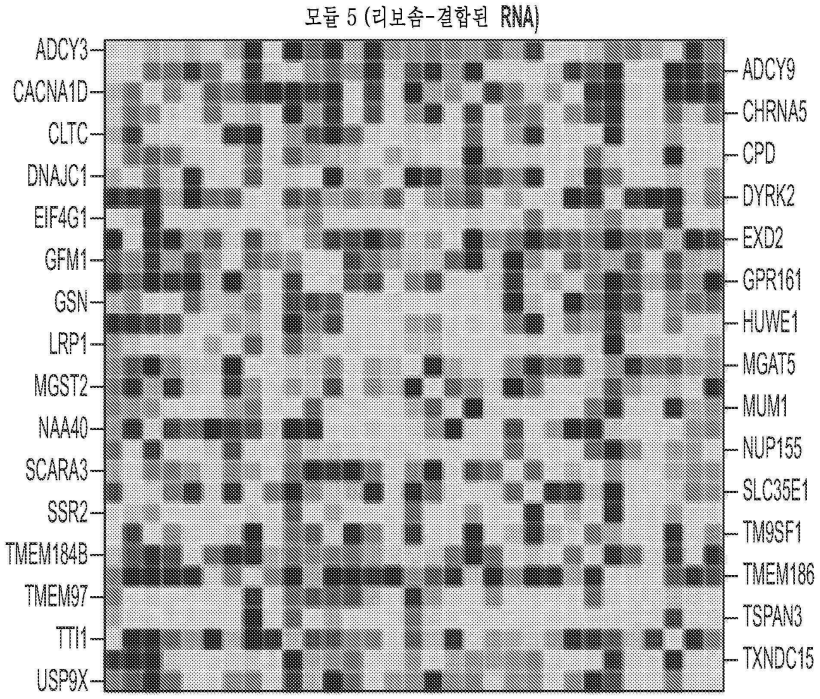
도면15aa



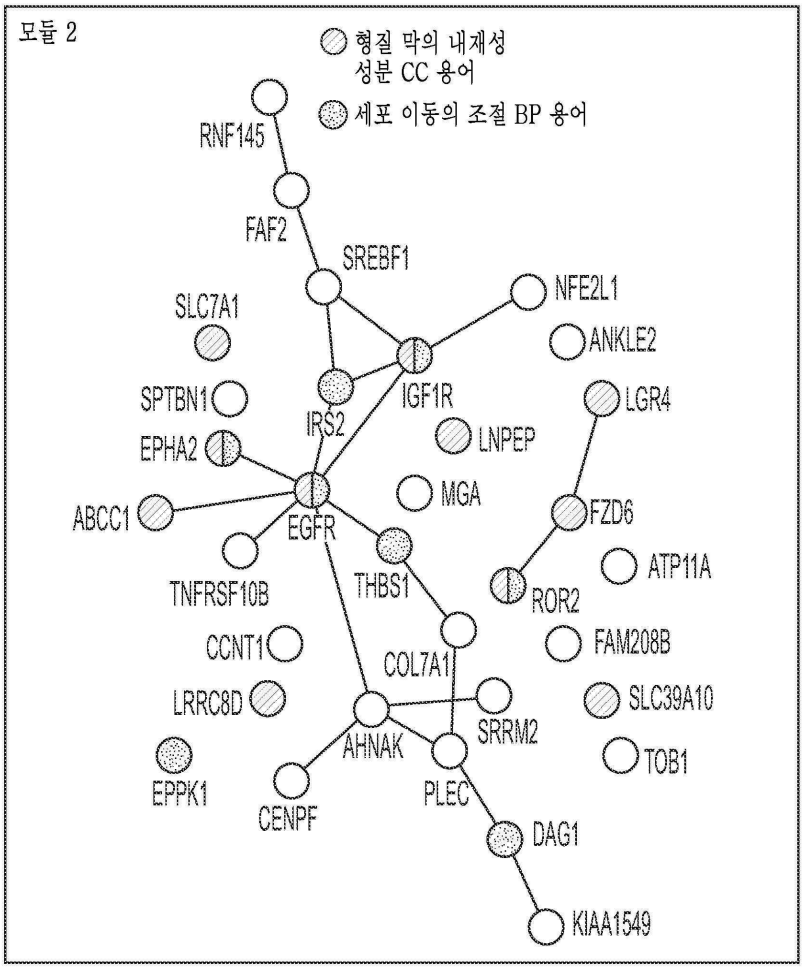
도면15ab



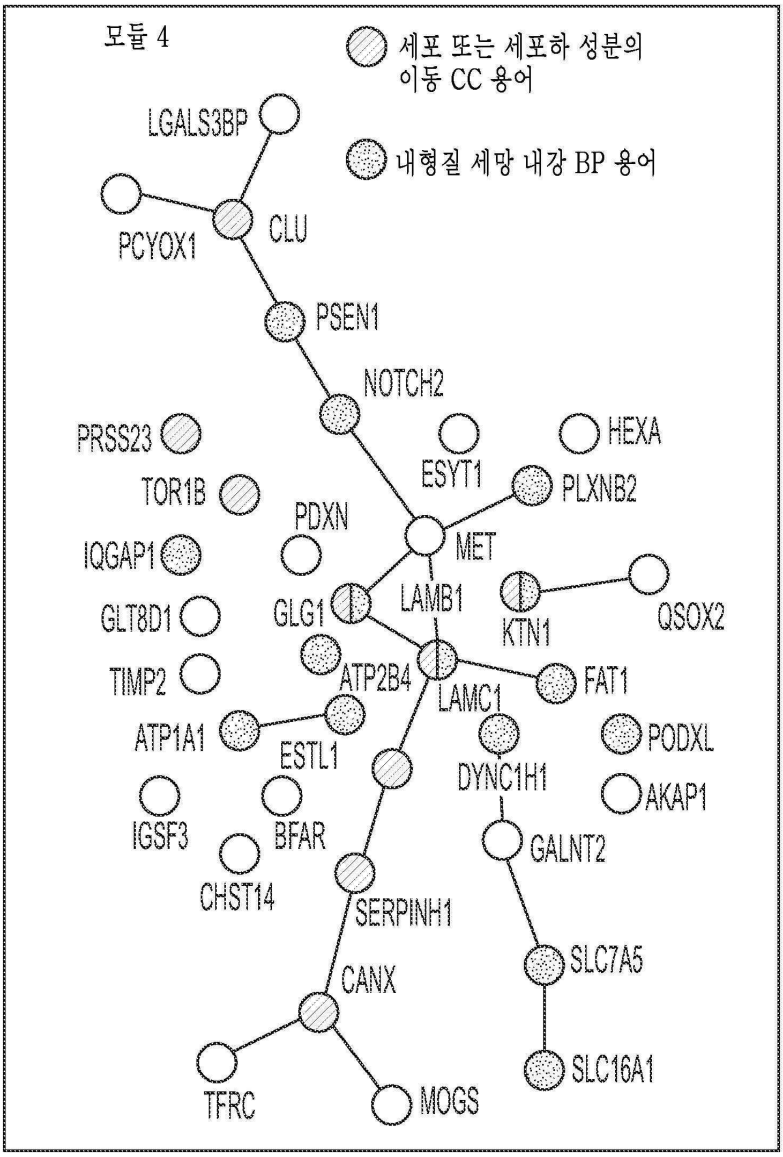
도면15ac



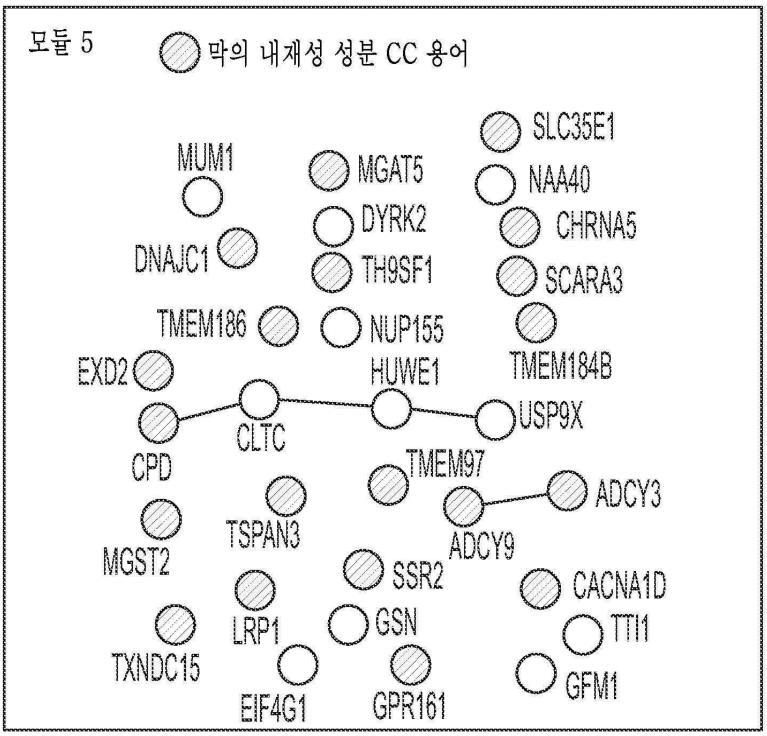
도면15ba


모듈 2
형질 막의 내재성 성분 CC 용어
세포 이동의 조절 BP 용어
RNF145
FAF2
SREBF1
NFE2L1
SLC7A1
ANKLE2
SPTBN1
IRS2
IGF1R
LGR4
EPHA2
LNPEP
MGA
ABCC1
EGFR
FZD6
TNFRSF10B
THBS1
ATP11A
ROR2
CCNT1
COL7A1
FAM208B
LRRC8D
SLC39A10
AHNAK
SRRM2
TOB1
EPPK1
CENPF
PLEC
DAG1
KIAA1549

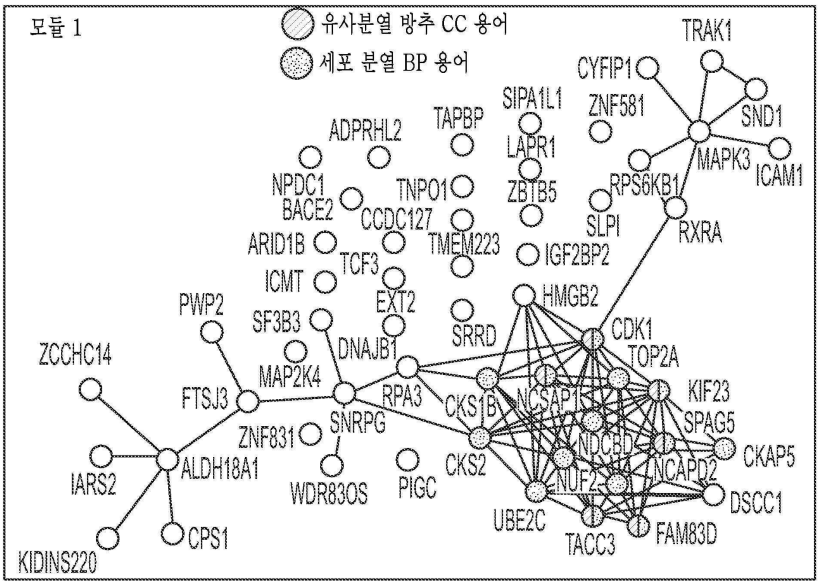
도면15bb


모듈 4
세포 또는 세포하 성분의 이동 CC 용어
내형질 세망 내강 BP 용어
LGALS3BP
PCYOX1
CLU
PSEN1
NOTCH2
PRSS23
HEXA
ESYT1
TOR1B
PLXNB2
PDXN
IQGAP1
MET
GLT8D1
GLG1
LAMB1
KTN1
QSOX2
TIMP2
ATP2B4
LAMC1
FAT1
ATP1A1
ESTL1
PODXL
DYNC1H1
AKAP1
IGSF3
BFAR
GALNT2
CHST14
SERPINH1
SLC7A5
CANX
SLC16A1
TFRC
MOGS

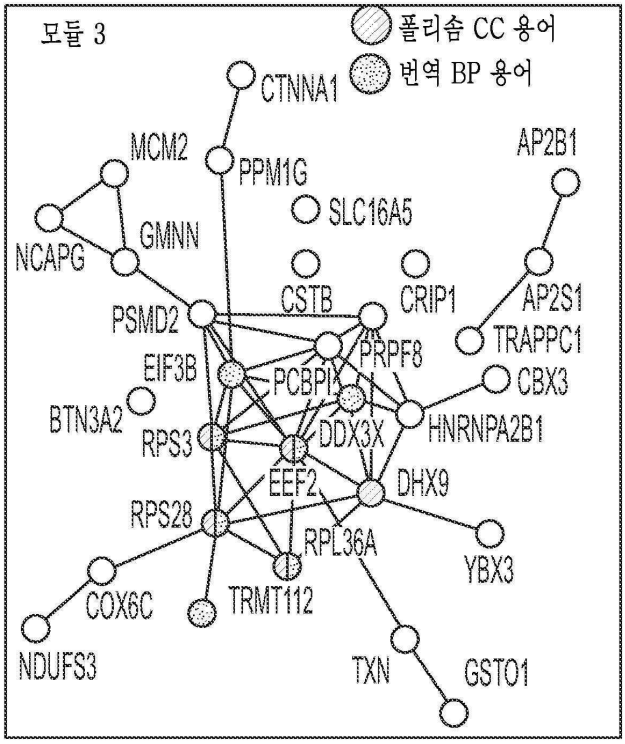
도면15bc



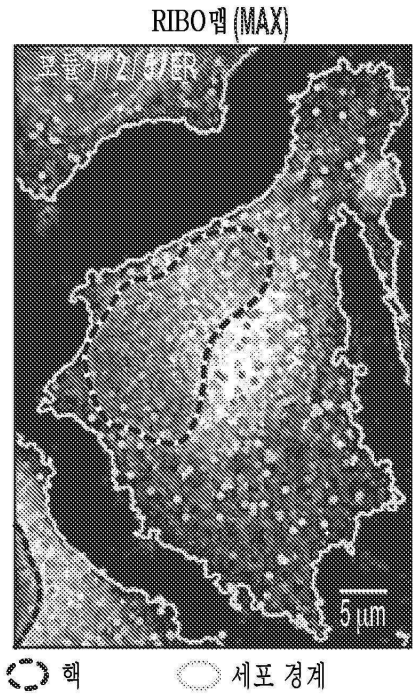
도면15ca



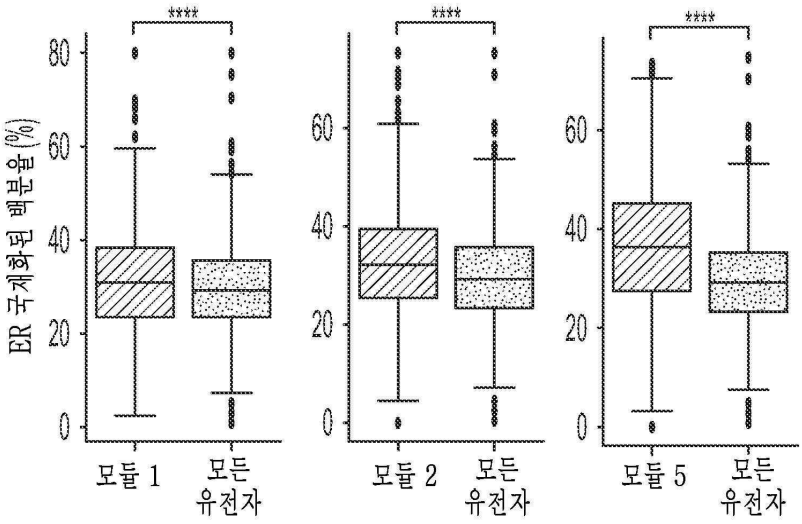
도면15cb



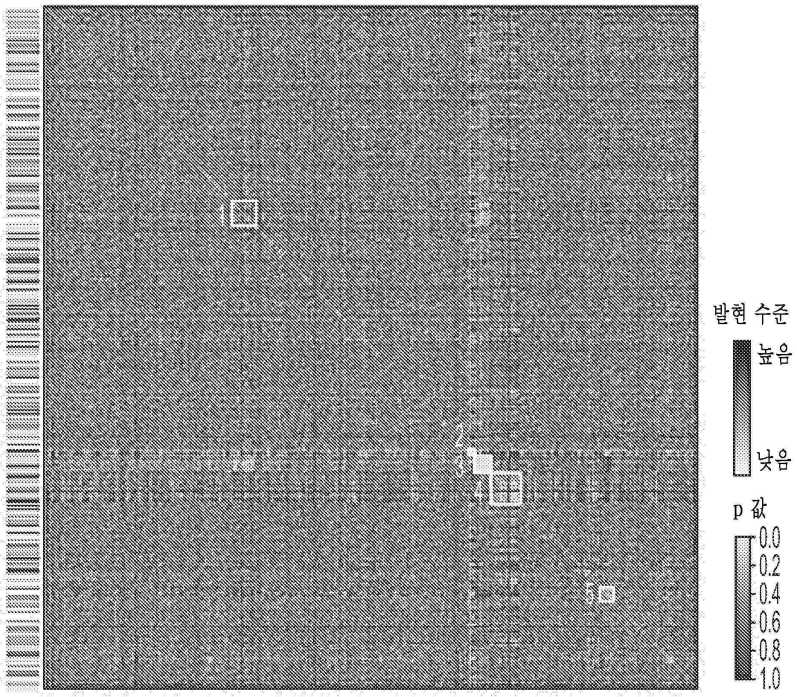
도면15d



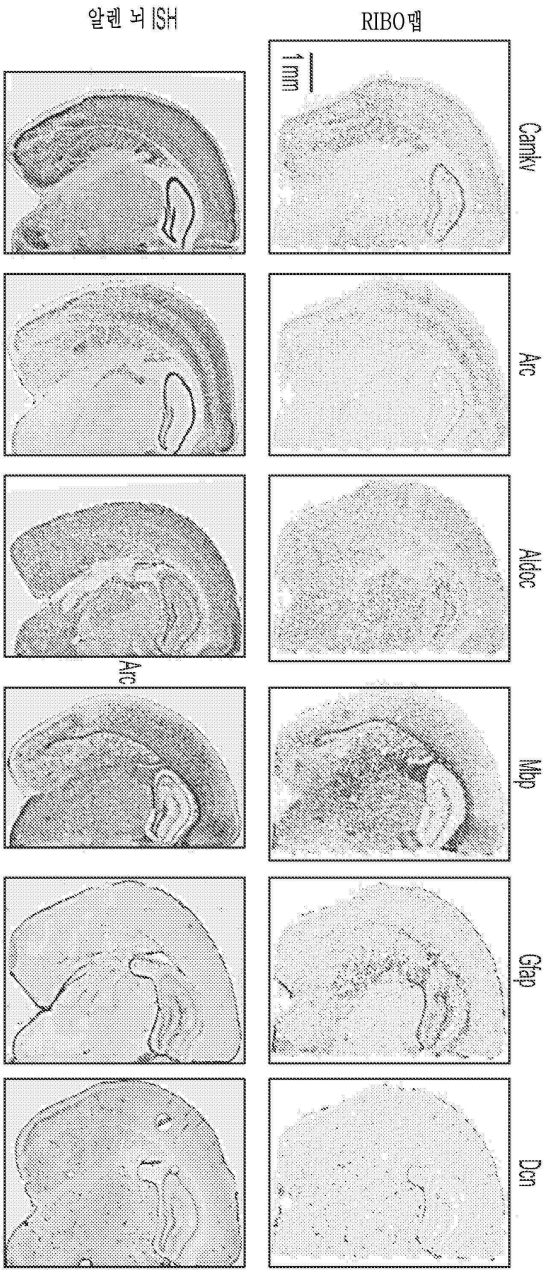
도면15e


ER 국제화된 백분율 (%)
****
****
****
0
20
40
60
80
모듈 1
모든 유전자
모듈 2
모든 유전자
모듈 5
모든 유전자

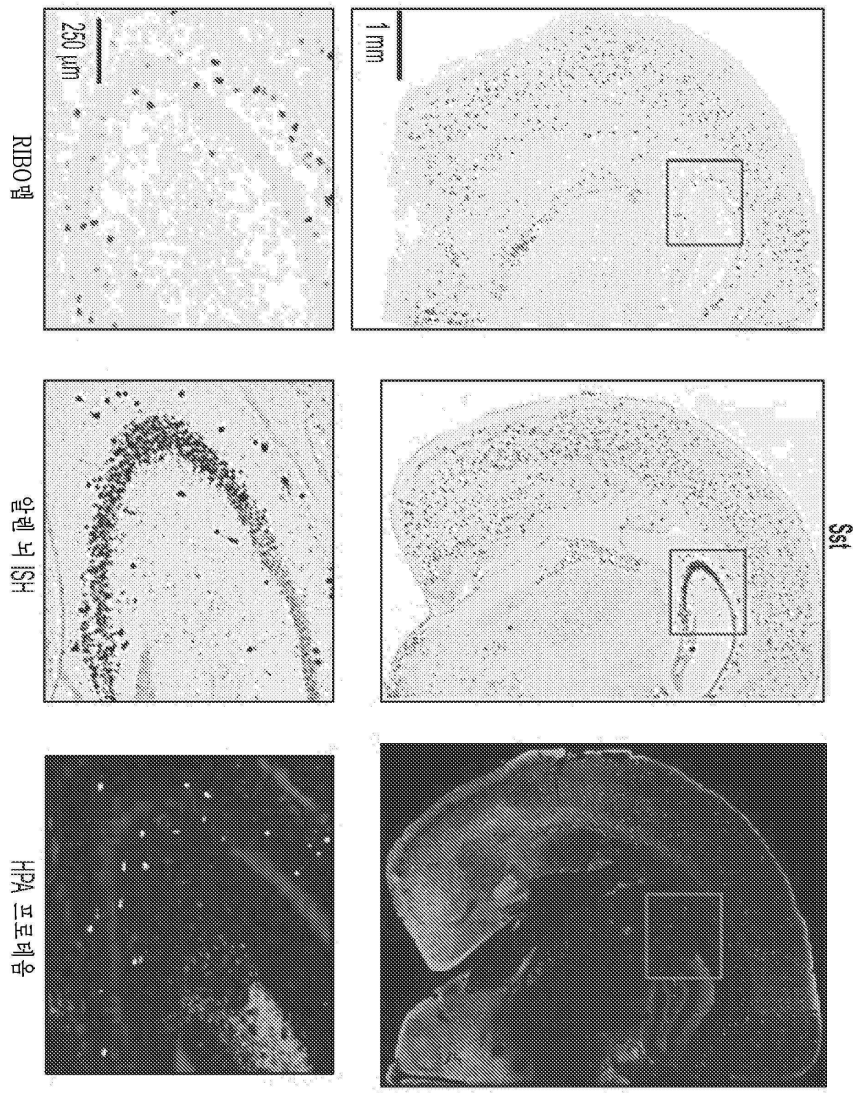
도면15f


발현 수준
높음
낮음
p 값
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

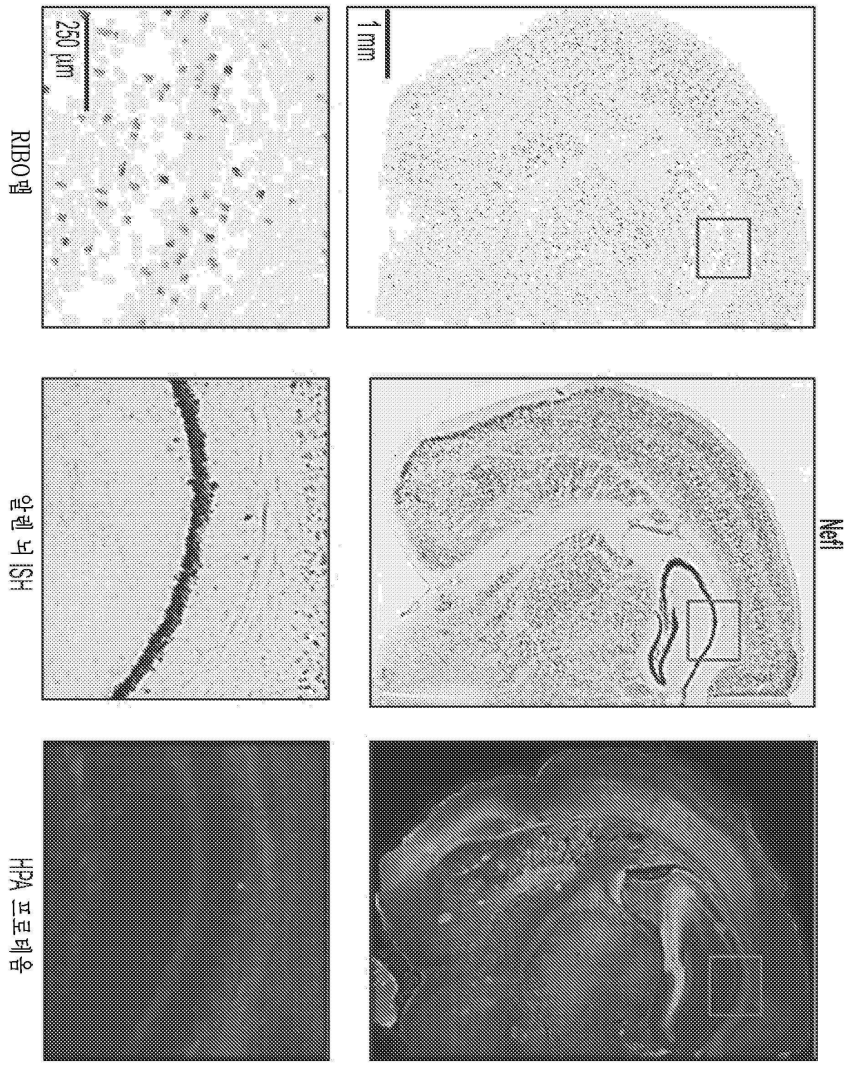
도면16a



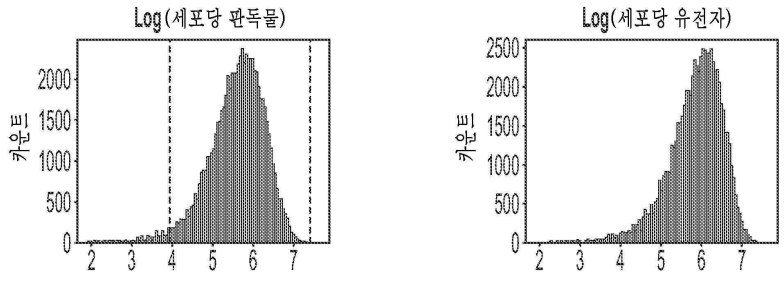
도면16b



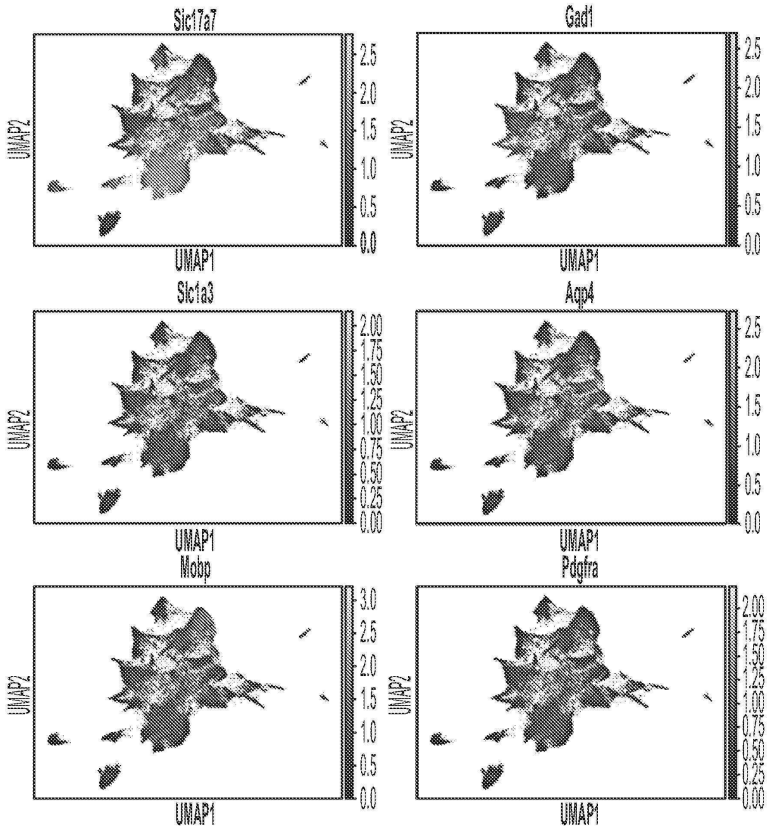
도면16c


250 μm
1 mm
RIBO탭
ISH 뇌 단일
Nefl
형광 프로테옴 HPA

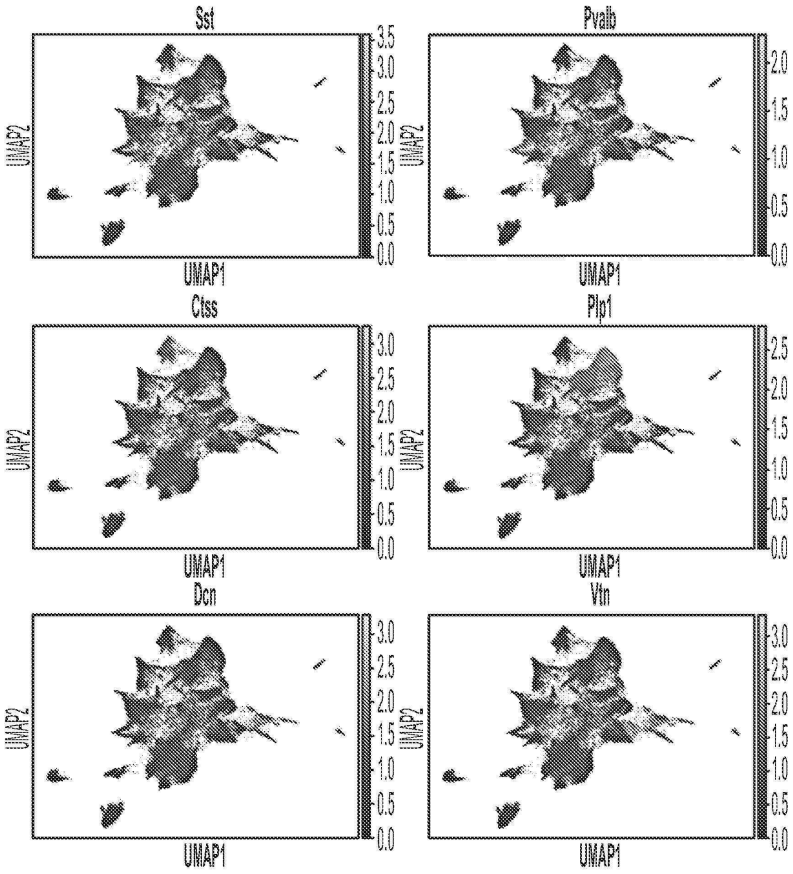
도면17a


Log(세포당 판독물)
카운트
2000
1500
1000
500
0
2
3
4
5
6
7
Log(세포당 유전자)
카운트
2500
2000
1500
1000
500
0
2
3
4
5
6
7

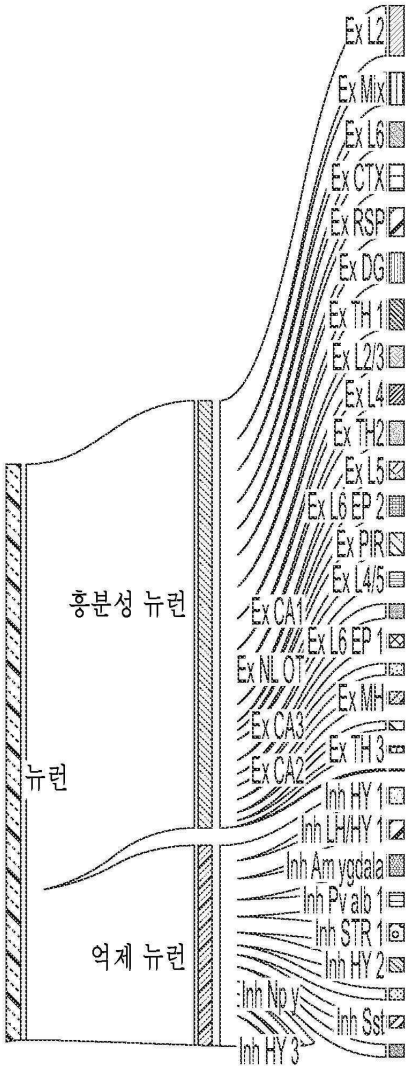
도면17ba



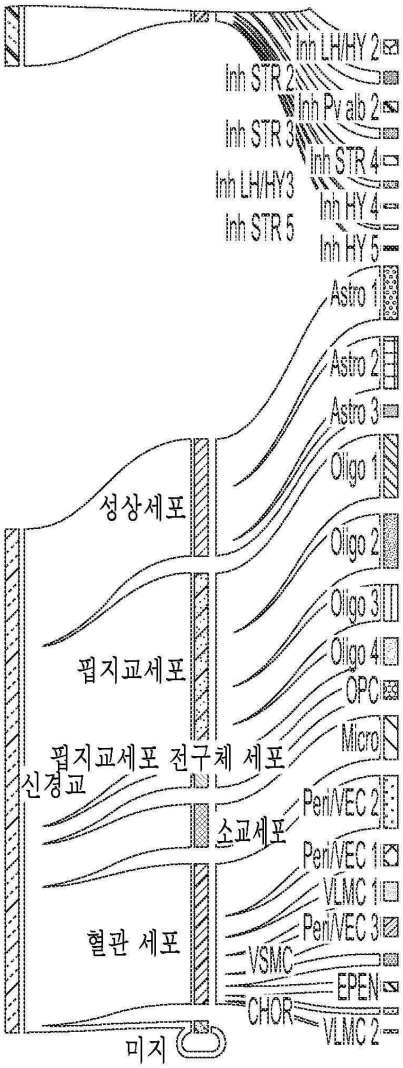
도면17bb



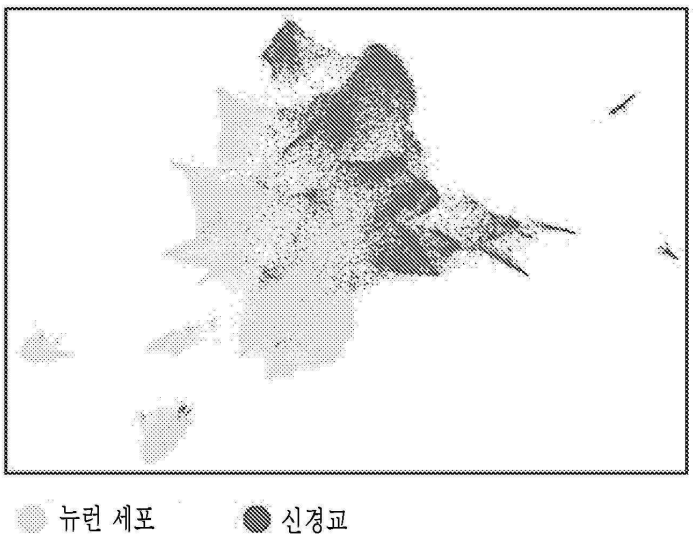
도면18aa


Ex L2
Ex Mix
Ex L6
Ex CTX
Ex RSP
Ex DG
Ex TH 1
Ex L2/3
Ex L4
Ex TH2
Ex L5
Ex L6 EP 2
Ex PIR
Ex L4/5
흥분성 뉴런
Ex CA1
Ex L6 EP 1
Ex NL OT
Ex MH
Ex CA3
Ex TH 3
Ex CA2
뉴런
Inh HY 1
Inh LH/HY 1
Inh Amygdala
Inh Pv alb 1
Inh STR 1
억제 뉴런
Inh HY 2
Inh Npy
Inh Sst
Inh HY 3

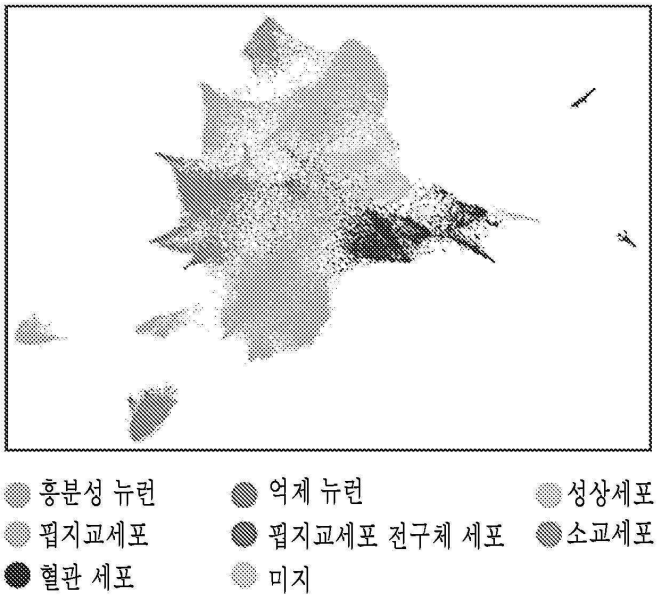
도면18ab



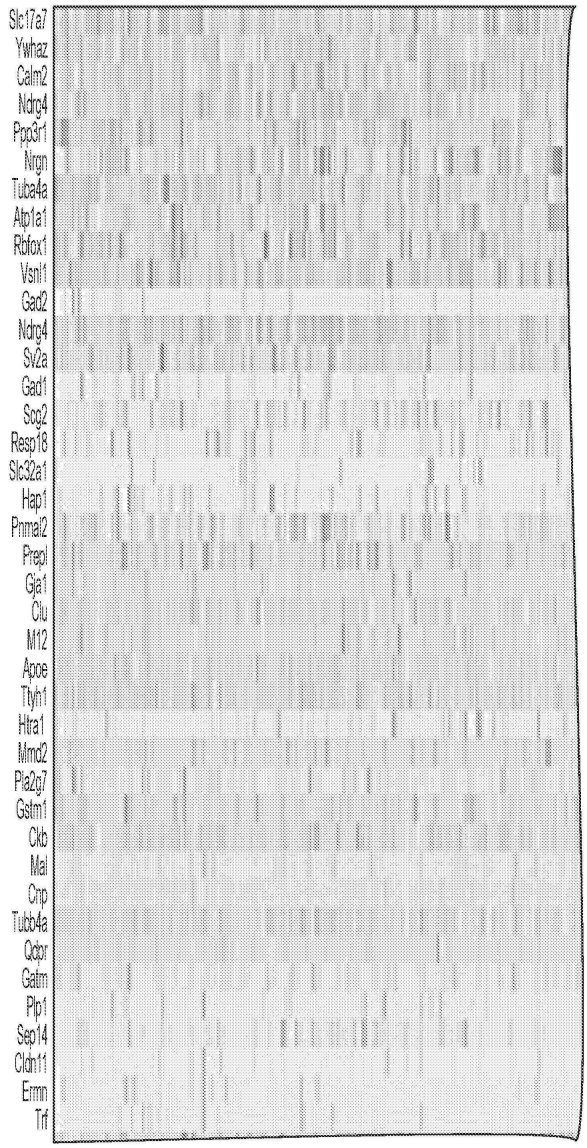
도면18b



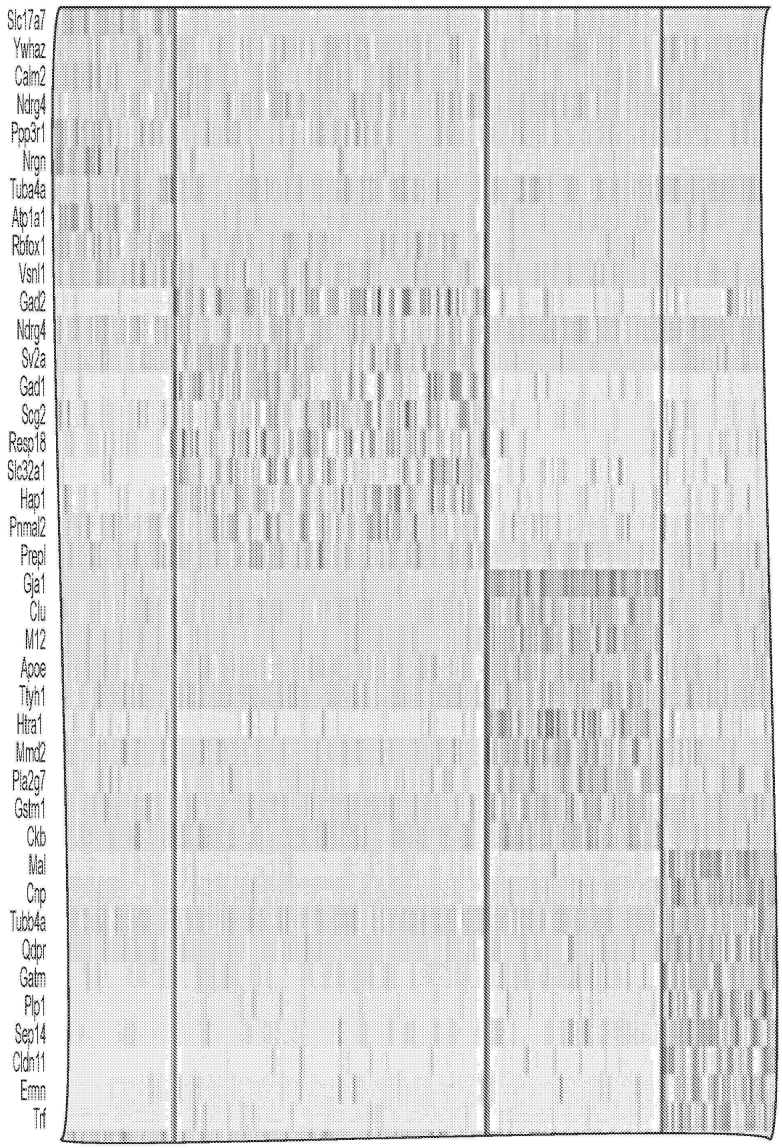
도면18c



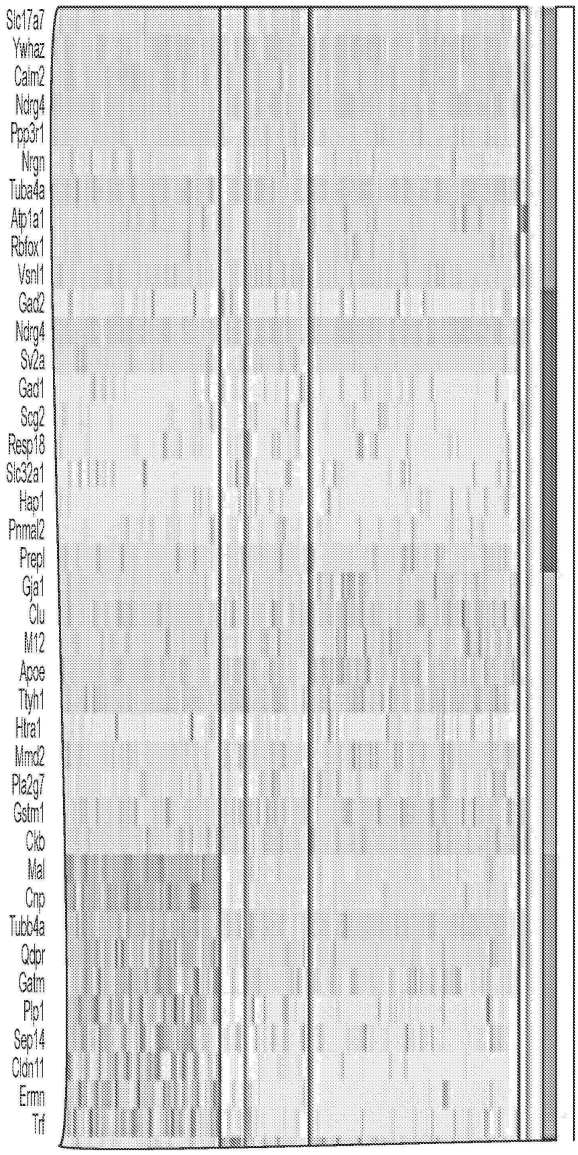
도면18da


Slc17a7
Ywhaz
Calm2
Ndrg4
Ppp3r1
Nrgn
Tuba4a
Atp1a1
Rbfox1
Vsnl1
Gad2
Ndrg4
Syt2a
Gad1
Scg2
Resp18
Slc32a1
Hap1
Pnmal2
Prepl
Gja1
Clu
M12
Apoe
Tyh1
Htra1
Mlmd2
Pla2g7
Gstm1
Ckb
Mal
Cnp
Tubb4a
Qdpr
Gatm
Plp1
Sep14
Cldn11
Ermn
Trf

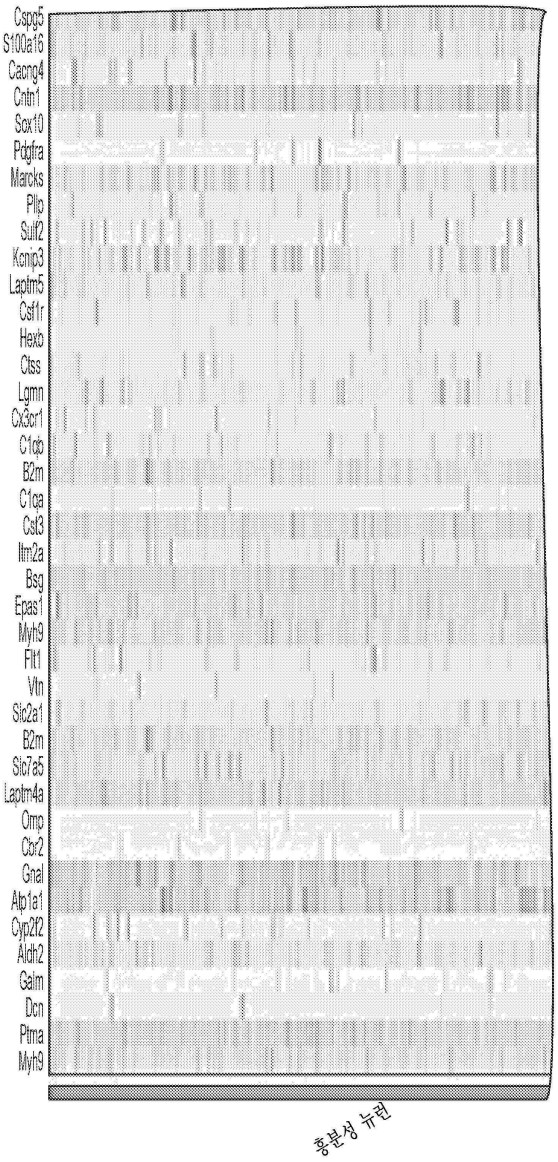
도면18db


Slc17a7
Ywhaz
Calm2
Ndrg4
Ppp3r1
Nrgn
Tuba4a
Atp1a1
Rbfox1
Vsnl1
Gad2
Ndrg4
Sv2a
Gad1
Scg2
Resp18
Slc32a1
Hap1
Pnmal2
Prepl
Gja1
Clu
M12
Apoe
Tlyh1
Htra1
Mmd2
Pla2g7
Gstm1
Ckb
Mal
Cnp
Tubb4a
Qdpr
Galm
Plp1
Sep14
Cldn11
Emn
Trf

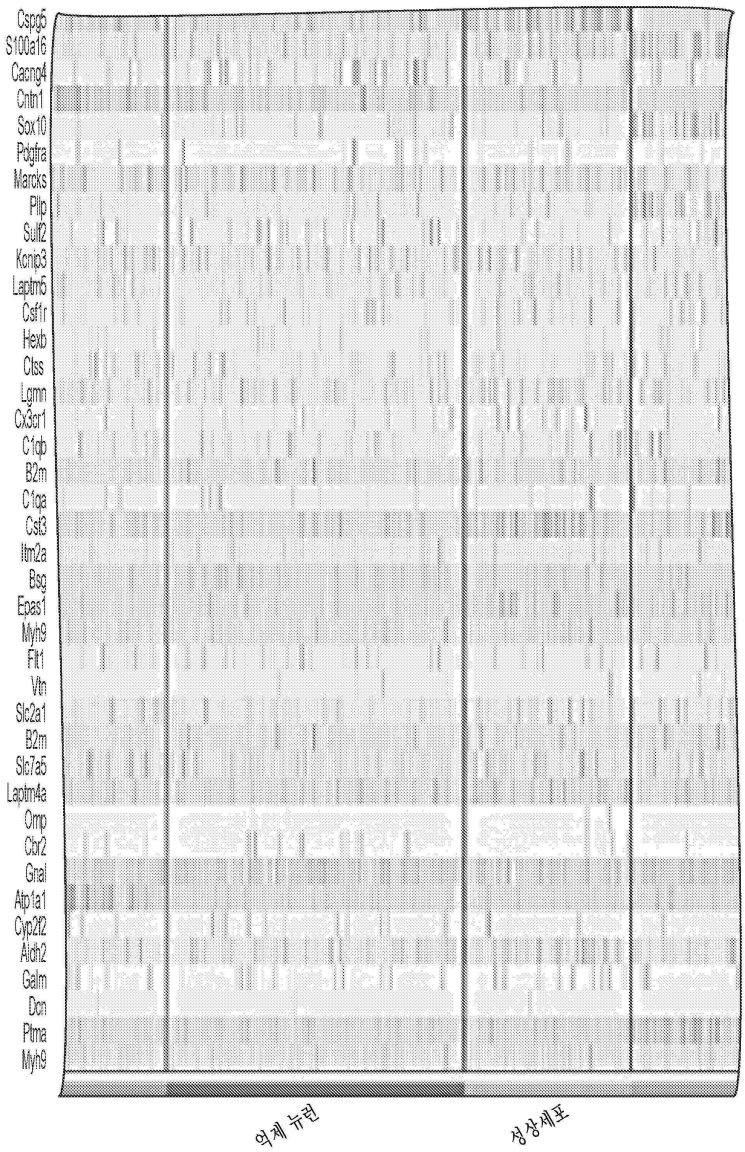
도면18dc


Slc17a7
Ywhaz
Calm2
Ndrg4
Ppp3r1
Nrgn
Tuba4a
Atp1a1
Rbfox1
Vsnl1
Gad2
Ndrg4
Sv2a
Gad1
Scg2
Resp18
Slc32a1
Hap1
Pnma2
Prepl
Gja1
Clu
Mt2
Apoe
Tlyh1
Htra1
Mmd2
Pla2g7
Gstm1
Clo
Mal
Cnp
Tubb4a
Qdpr
Gatm
Plp1
Sep14
Cldn11
Ermn
Tff

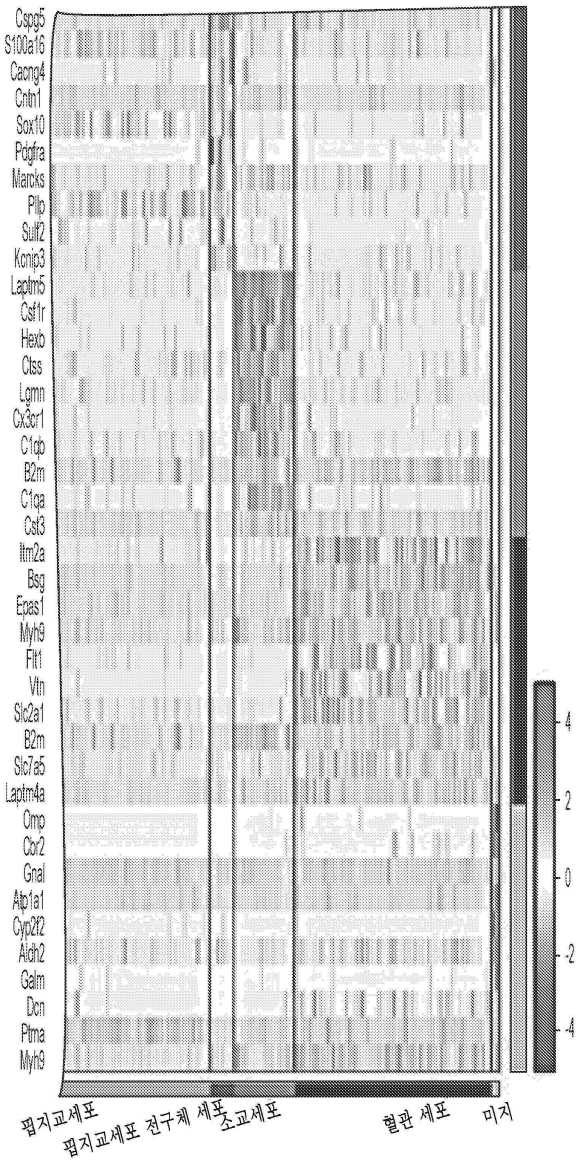
도면18dd


Cspg5
S100a16
Cacng4
Cntn1
Sox10
Pdgfra
Marcks
Plp
Sulf2
Kcnip3
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Cx3cr1
C1qb
B2m
C1qa
Cst3
Itm2a
Bsg
Epas1
Myh9
Flt1
Vtn
Slc2a1
B2m
Slc7a5
Laptm4a
Omp
Cbr2
Gnal
Atp1a1
Cyp2f2
Aldh2
Galm
Dcn
Ptma
Myh9
흥분성 뉴런

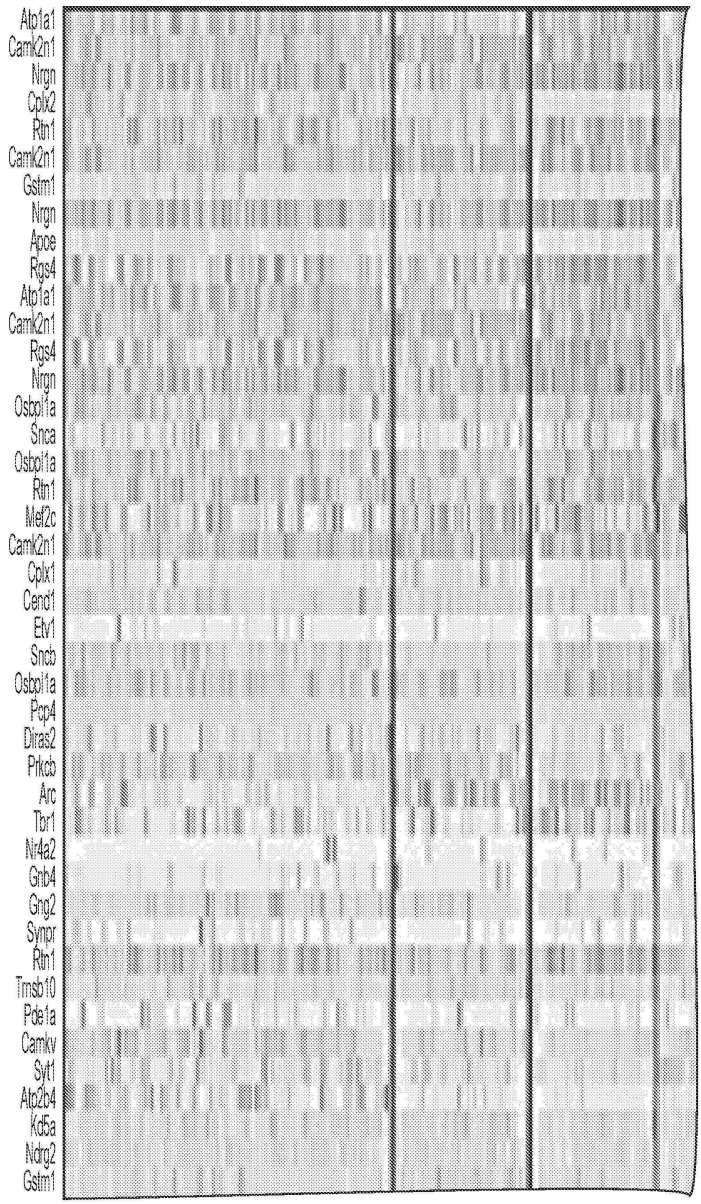
도면18de


Cspg5
S100a16
Cacng4
Cntn1
Sox10
Pdgfra
Marcks
Pllp
Sulf2
Kcnip3
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Cx3cr1
C1qb
B2m
C1qa
Cst3
Itm2a
Bsg
Epas1
Myh9
Flt1
Vtn
Slc2a1
B2m
Slc7a5
Laptm4a
Omp
Cbr2
Gnal
Atp1a1
Cyp2f2
Aldh2
Galm
Dcn
Ptma
Myh9
억제 뉴런
성상세포

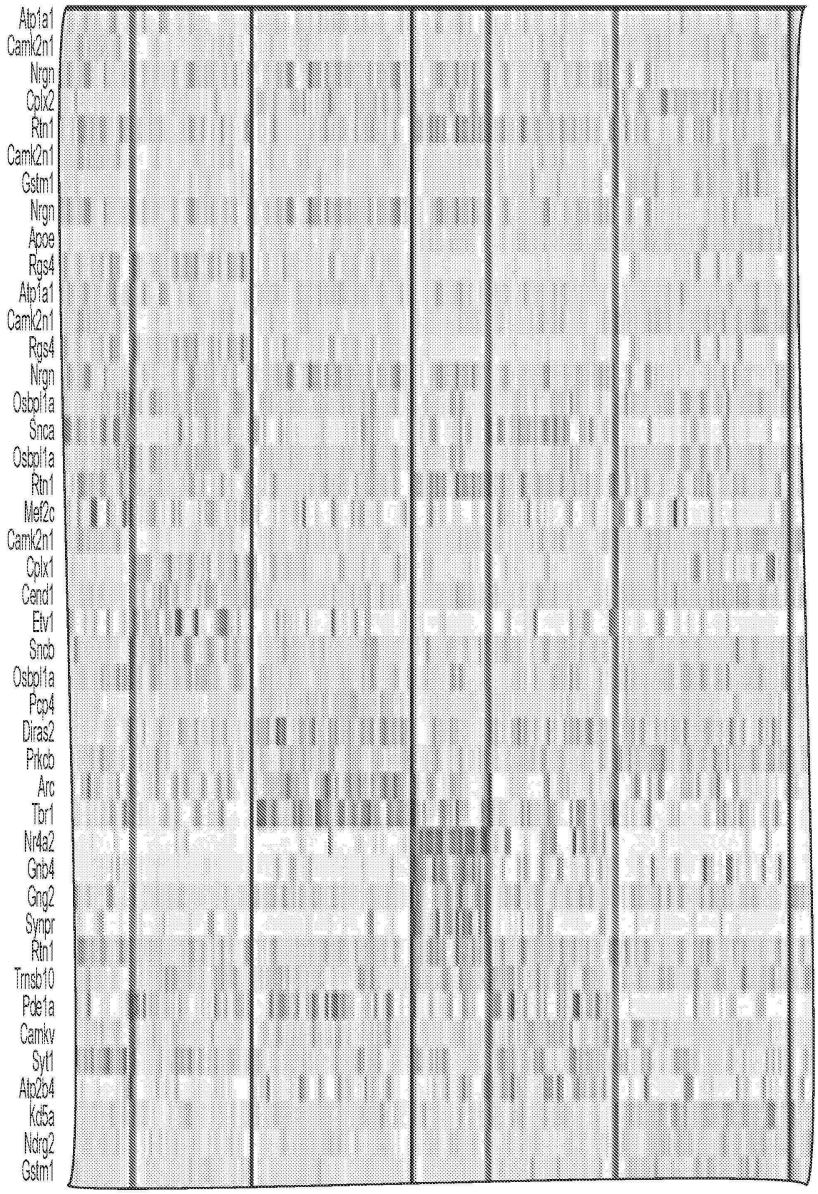
도면18df


Cspg5
S100a16
Cacng4
Cnfn1
Sox10
Pdgfra
Marcks
Plp
Sulf2
Kcnip3
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Cx3cr1
C1qb
B2m
C1qa
Cst3
Ifitm2a
Bsg
Epas1
Myh9
Flt1
Vtn
Slc2a1
B2m
Slc7a5
Laptm4a
Cmp
Cbr2
Gnal
Atp1a1
Cyp2f2
Aldh2
Galm
Dcn
Ptma
Myh9
4
2
0
-2
-4
피지교세포
피지교세포 전구체 세포
소교세포
혈관 세포
미지

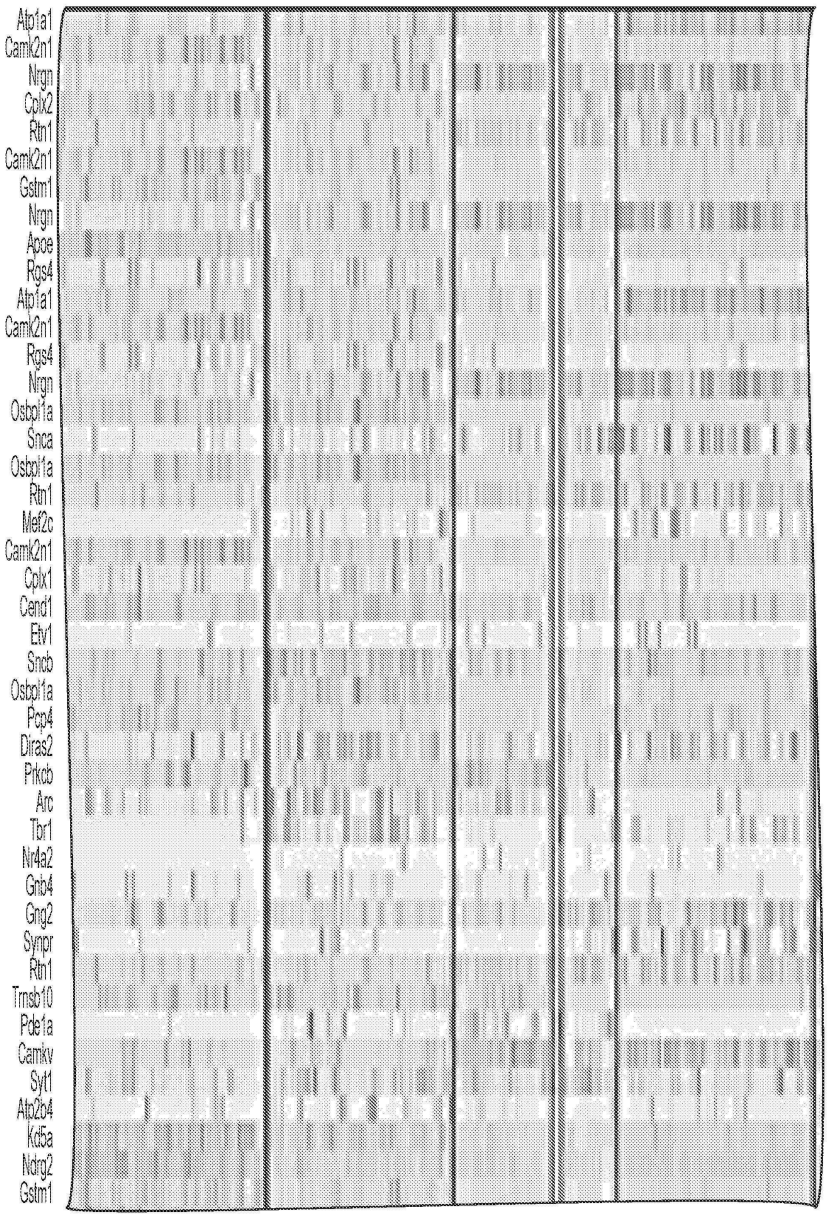
도면19aa


Atp1a1
Camk2n1
Nrgn
Cplx2
Rtn1
Camk2n1
Gstm1
Nrgn
Apoe
Rgs4
Atp1a1
Camk2n1
Rgs4
Nrgn
Ostpl1a
Snca
Ostpl1a
Rtn1
Mef2c
Camk2n1
Cplx1
Cend1
Etv1
Sncb
Ostpl1a
Pcp4
Diras2
Prkcb
Arc
Tbr1
Nr4a2
Gnb4
Gng2
Sypr
Rtn1
Tmsb10
Pde1a
Camkv
Syt1
Atp2b4
Kcb5a
Ndrg2
Gstm1

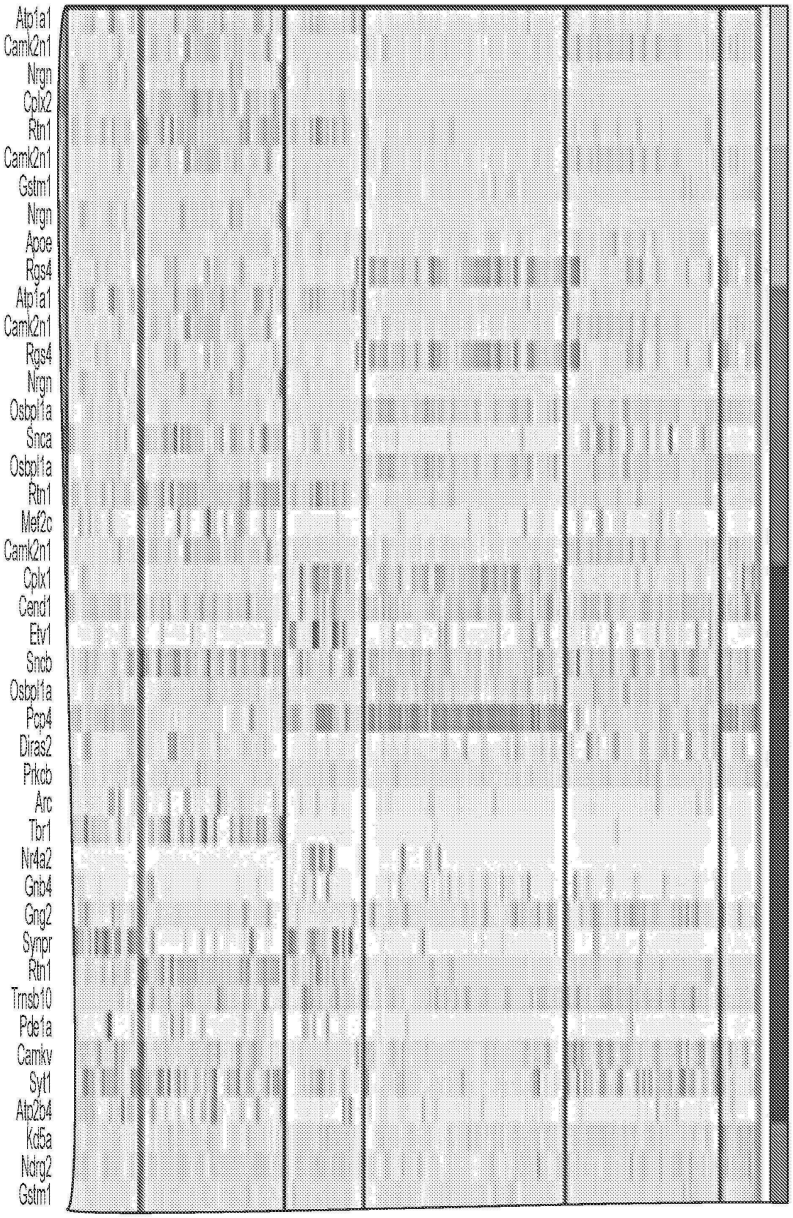
도면19ab


Atp1a1
Camk2n1
Nrgn
Cplx2
Rtn1
Camk2n1
Gstm1
Nrgn
Apoe
Rgs4
Atp1a1
Camk2n1
Rgs4
Nrgn
Osbpl1a
Snca
Osbpl1a
Rtn1
Mef2c
Camk2n1
Cplx1
Cend1
Etv1
Sncb
Osbpl1a
Pcp4
Diras2
Prkcb
Arc
Tbr1
Nr4a2
Gnb4
Gng2
Sympr
Rtn1
Tmsb10
Pde1a
Camkv
Syt1
Atp2b4
Kcf5a
Ndrg2
Gstm1

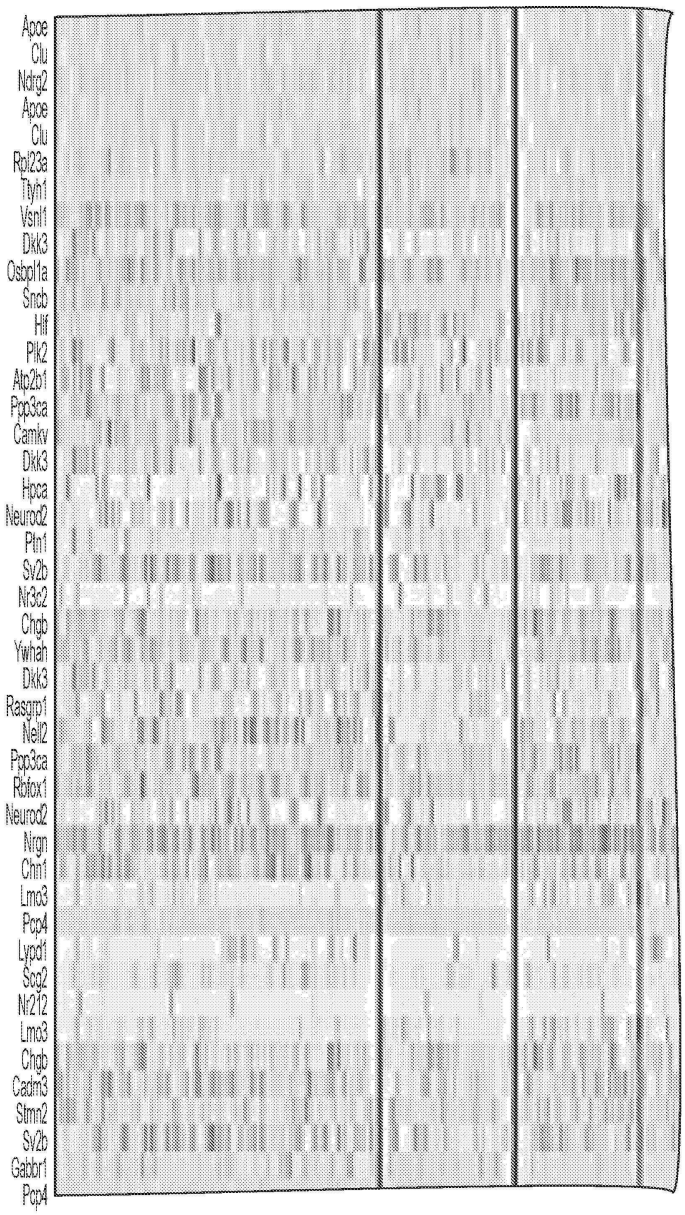
도면19ac


Atp1a1
Camk2n1
Nrgn
Cplx2
Rtn1
Camk2n1
Gstm1
Nrgn
Apoe
Rgs4
Atp1a1
Camk2n1
Rgs4
Nrgn
Osbpl1a
Snca
Osbpl1a
Rtn1
Mef2c
Camk2n1
Cplx1
Cend1
Etv1
Sncb
Osbpl1a
Pcp4
Diras2
Prkcb
Arc
Tbr1
Nr4a2
Gnb4
Gng2
Synpr
Rtn1
Tmsb10
Pde1a
Camkv
Syt1
Atp2b4
Kcnb1
Ndrg2
Gstm1

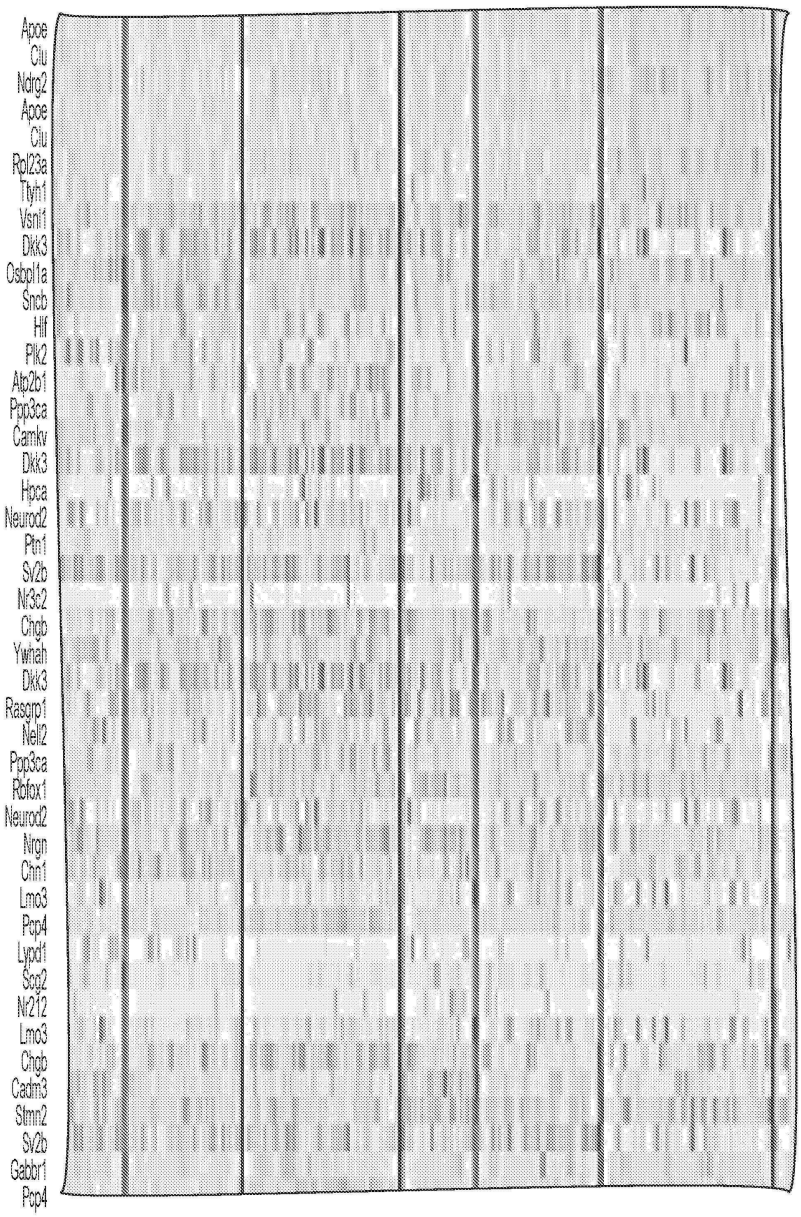
도면19ad


Atp1a1
Camk2n1
Nrgn
Cplx2
Rtn1
Camk2n1
Gstm1
Nrgn
Apoe
Rgs4
Atp1a1
Camk2n1
Rgs4
Nrgn
Osbpl1a
Snca
Osbpl1a
Rtn1
Mef2c
Camk2n1
Cplx1
Cend1
Etv1
Sncb
Osbpl1a
Pcp4
Diras2
Prkcb
Arc
Tbr1
Nr4a2
Gnb4
Gng2
Synpr
Rtn1
Tmsb10
Pde1a
Camkv
Syt1
Atp2b4
Kcl5a
Ndrg2
Gstm1

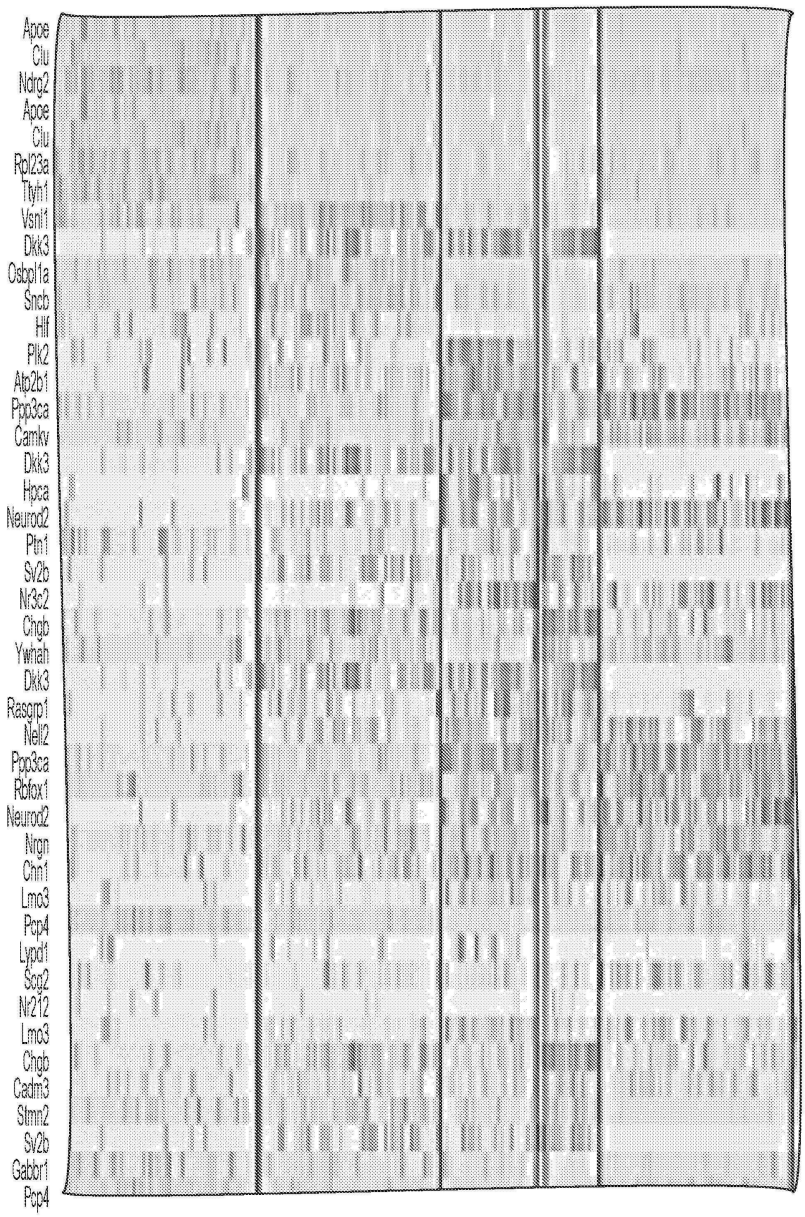
도면19ae


Apoe
Clu
Ndrg2
Apoe
Clu
Rpl23a
Tyh1
Vsn1
Dkk3
Osbpl1a
Snrb
Hif
Plk2
Atp2b1
Ppp3ca
Camkv
Dkk3
Hpca
Neurod2
Ptn1
Syt2b
Nr3c2
Chgb
Ywhah
Dkk3
Rasgrp1
Nell2
Ppp3ca
Rbfox1
Neurod2
Nrgn
Chn1
Lma3
Pcp4
Lypd1
Scg2
Nr2f2
Lma3
Chgb
Cadm3
Stmn2
Syt2b
Gabbr1
Pcp4

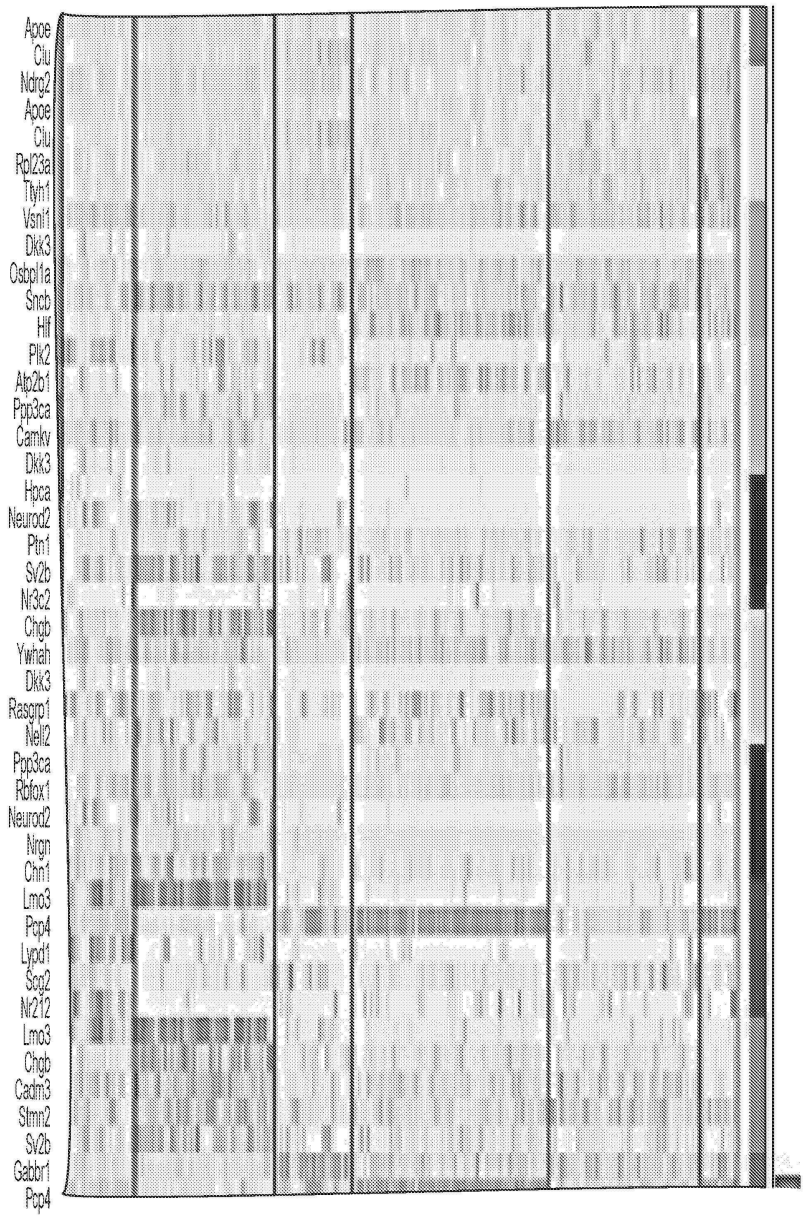
도면19af


Apoe
Clu
Ndrg2
Apoe
Clu
Rpl23a
Ttyh1
Vsnl1
Dkk3
Osbpl1a
Sncb
Hif
Plk2
Atp2b1
Ppp3ca
Camkv
Dkk3
Hpca
Neurod2
Ptn1
Sv2b
Nr3c2
Chgb
Ywhah
Dkk3
Rasgrp1
Nell2
Ppp3ca
Rbfox1
Neurod2
Nrgn
Chn1
Lmo3
Pcp4
Lypd1
Sog2
Nr2f2
Lmo3
Chgb
Cadm3
Stmn2
Sv2b
Gabbr1
Pcp4

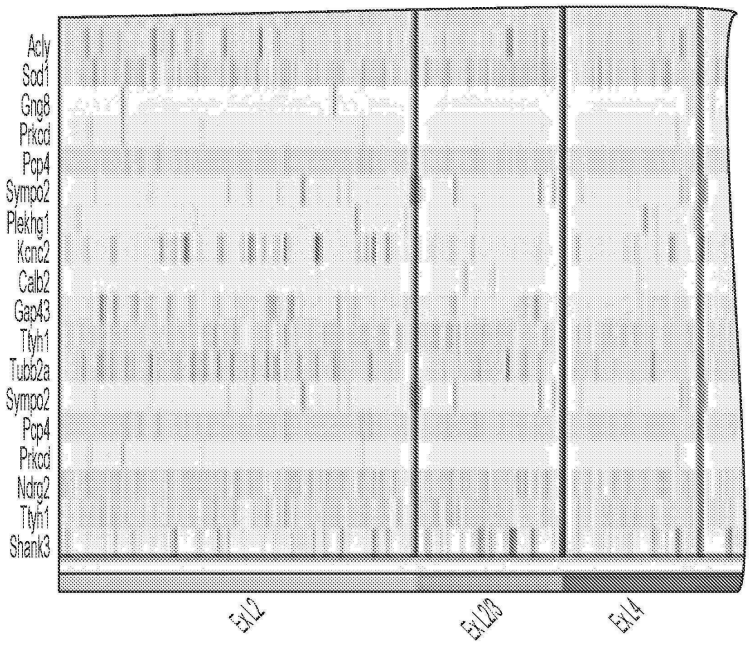
도면19ag


Apoe
Clu
Ndrg2
Apoe
Clu
Rpl23a
Tyh1
Vsnl1
Dkk3
Osbpl1a
Sncb
Hif
Plk2
Atp2b1
Ppp3ca
Camkv
Dkk3
Hpca
Neurod2
Ptn1
Sv2b
Nr3c2
Chgb
Ywhah
Dkk3
Rasgrp1
Nell2
Ppp3ca
Rbfox1
Neurod2
Nrgn
Chn1
Lmo3
Pcp4
Lypd1
Scg2
Nr2f2
Lmo3
Chgb
Cadm3
Stmn2
Sv2b
Gabbr1
Pcp4

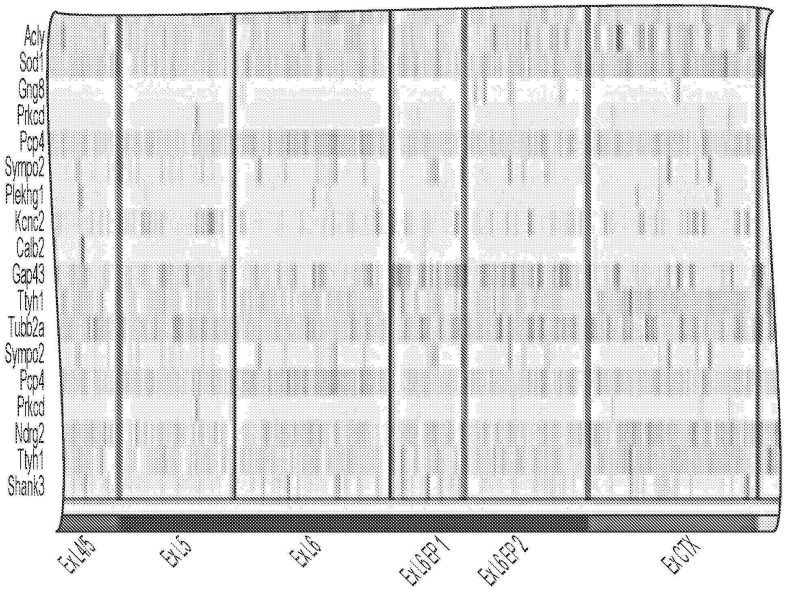
도면19ah


Apoe
Clu
Ndrg2
Apoe
Clu
Rpl23a
Tyrl1
Vsnl1
Dkk3
Gsbpl1a
Sncb
Hif
Plk2
Atp2b1
Ppp3ca
Camkv
Dkk3
Hpca
Neurod2
Ptn1
Sv2b
Nr3c2
Chgb
Ywhah
Dkk3
Rasgrp1
Nell2
Ppp3ca
Rbfox1
Neurod2
Nrgn
Chn1
Lmo3
Pcp4
Lypd1
Scg2
Nr2l2
Lmo3
Chgb
Cadm3
Stmn2
Sv2b
Gabbr1
Pcp4

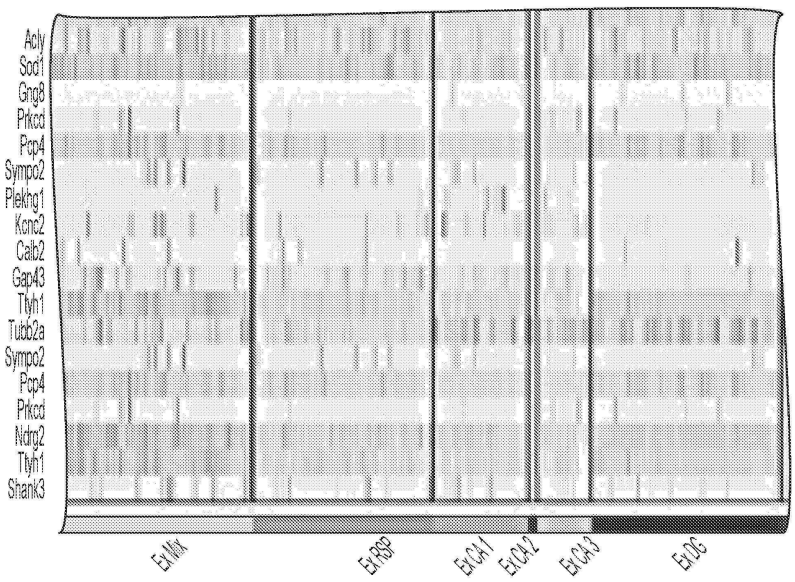
도면19ai



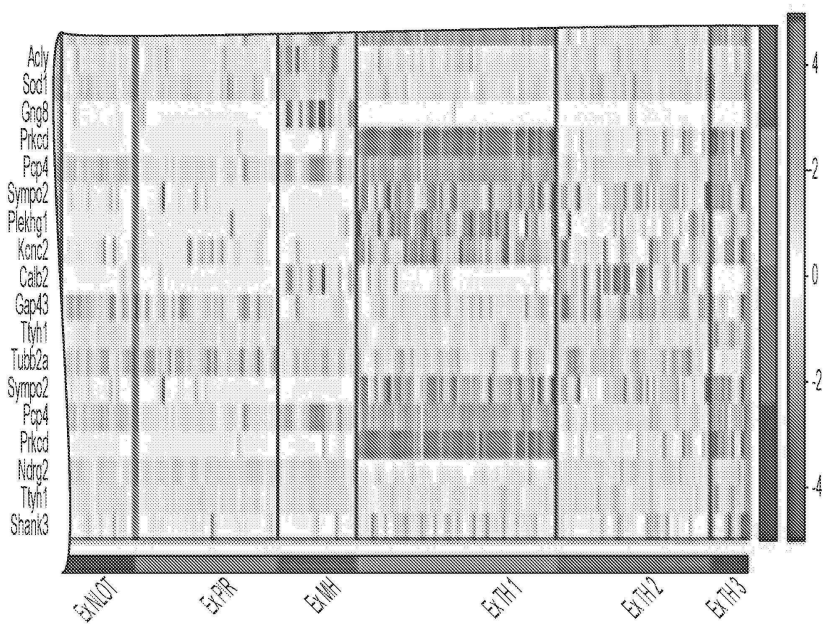
도면19aj



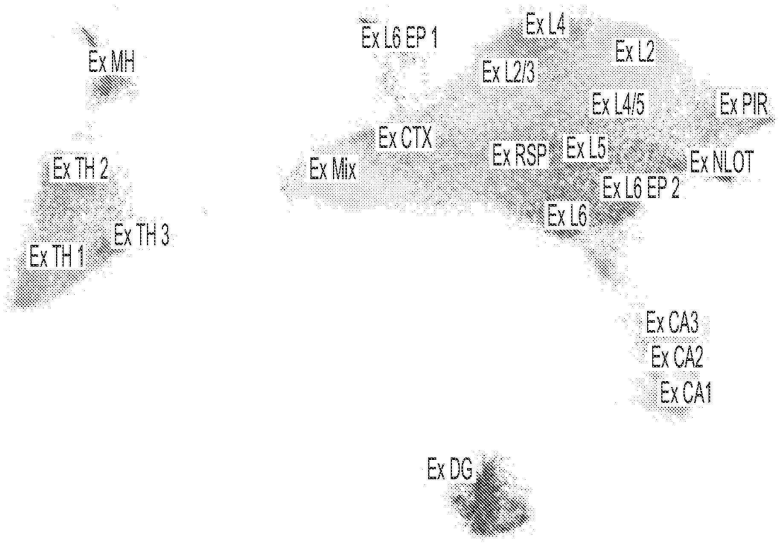
도면19ak



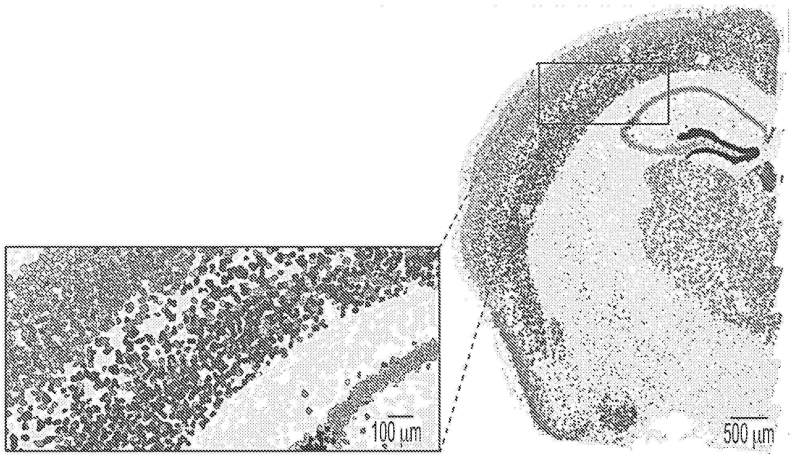
도면19al



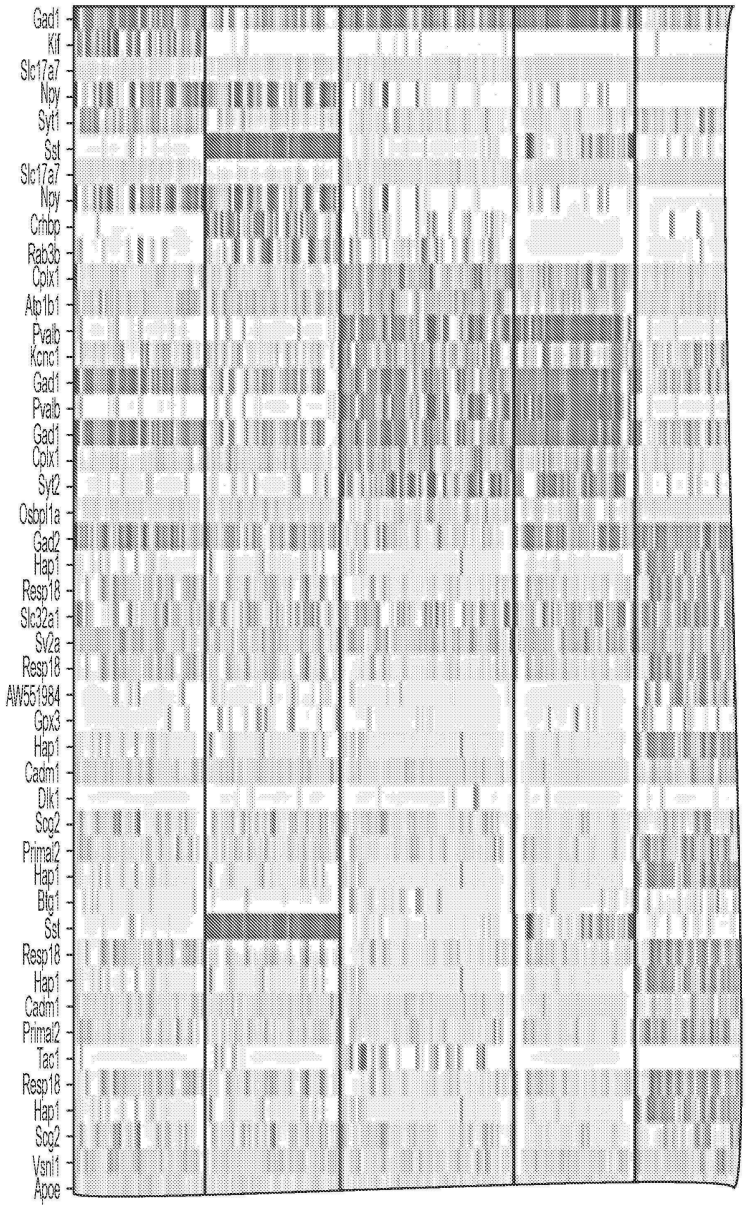
도면19b


Ex MH
Ex L6 EP 1
Ex L4
Ex L2
Ex L2/3
Ex L4/5
Ex PIR
Ex CTX
Ex RSP
Ex L5
Ex NLOT
Ex Mix
Ex L6 EP 2
Ex L6
Ex TH 2
Ex TH 3
Ex TH 1
Ex CA3
Ex CA2
Ex CA1
Ex DG

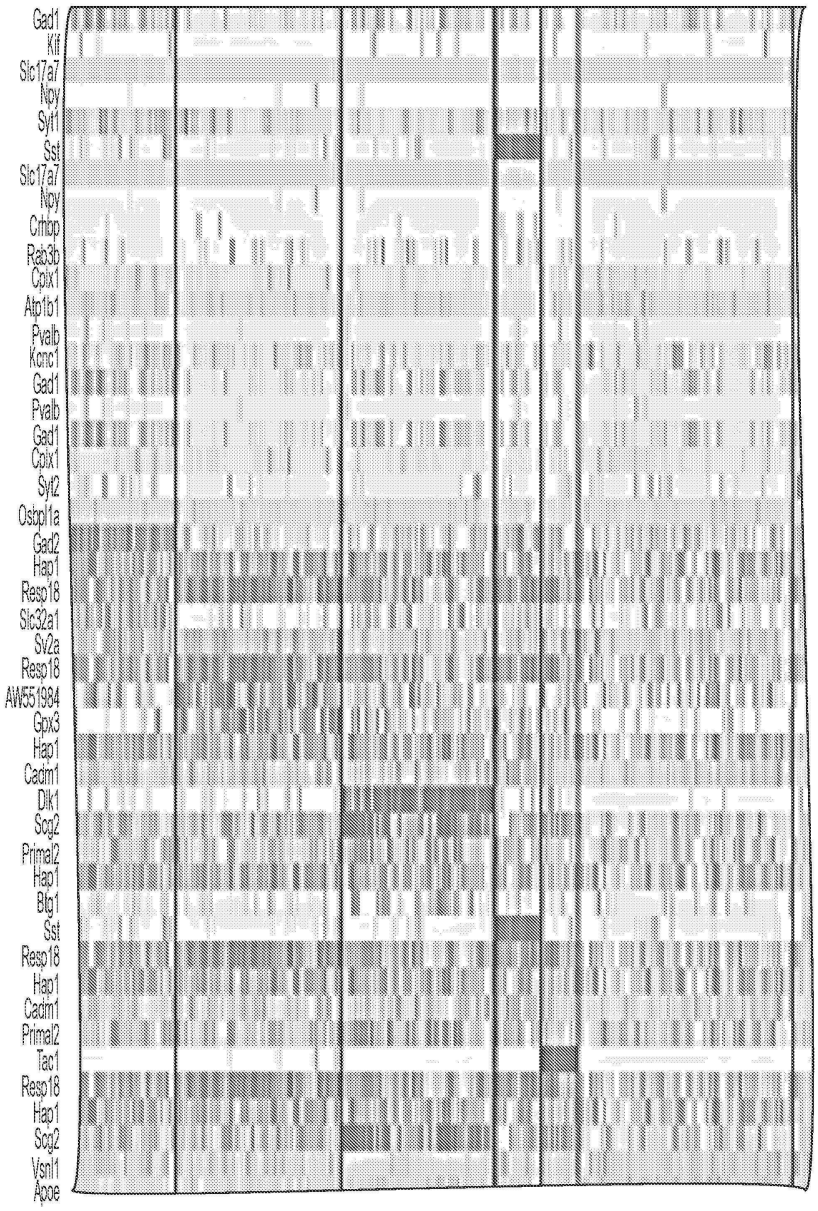
도면19c


100 μm
500 μm

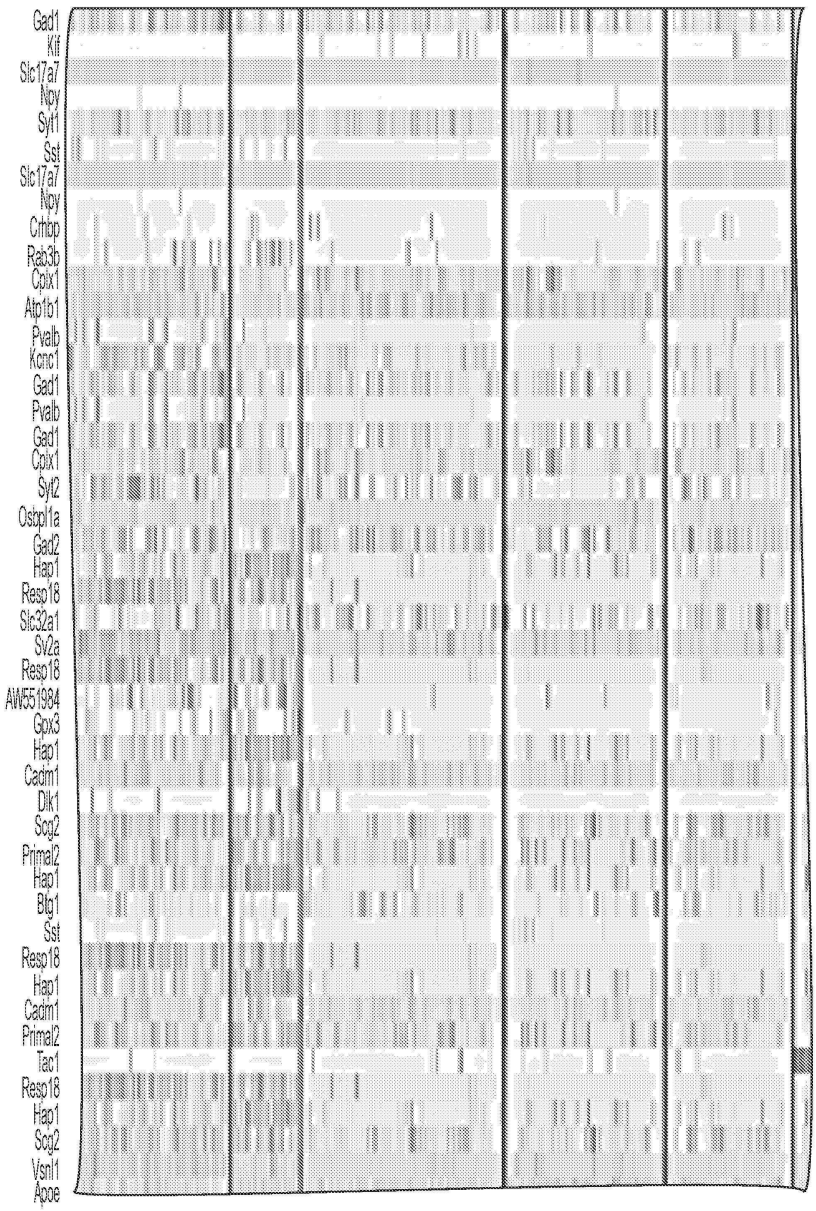
도면20aa


Gad1
Kif
Slc17a7
Npy
Syt1
Sst
Slc17a7
Npy
Cnbp
Rab3b
Cplx1
Atp1b1
Pvalb
Kcnc1
Gad1
Pvalb
Gad1
Cplx1
Syt2
Osbpl1a
Gad2
Hap1
Resp18
Slc32a1
Sv2a
Resp18
AW551984
Gpx3
Hap1
Cadm1
Dlk1
Scg2
Primal2
Hap1
Btg1
Sst
Resp18
Hap1
Cadm1
Primal2
Tac1
Resp18
Hap1
Scg2
Vsnl1
Apoe

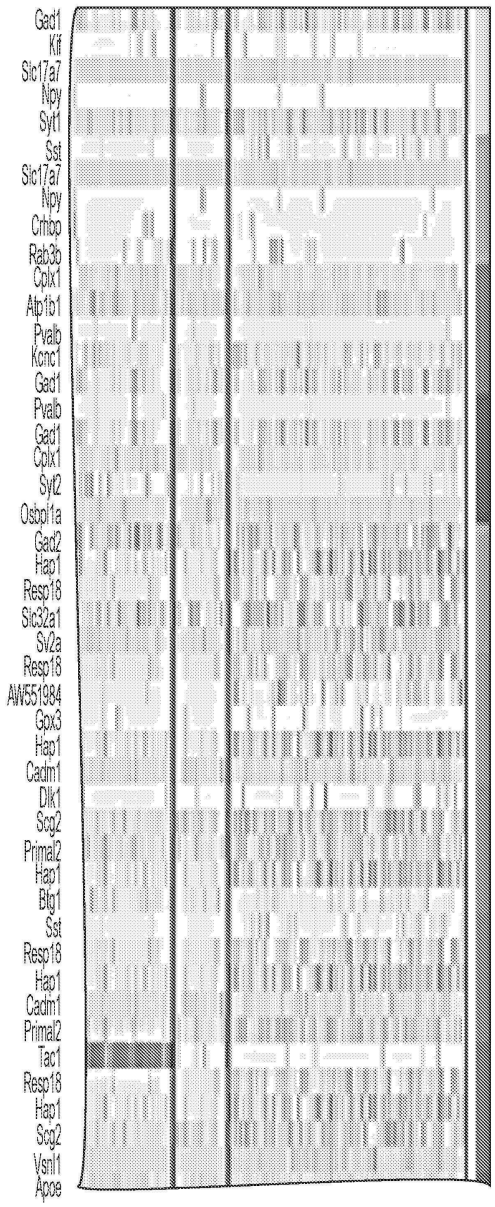
도면20ab


Gad1
Kif
Slc17a7
Npy
Syt1
Sst
Slc17a7
Npy
Crhbp
Rab3b
Cplx1
Atp1b1
Pvalb
Kcnc1
Gad1
Pvalb
Gad1
Cplx1
Syt2
Ostpl1a
Gad2
Hap1
Resp18
Slc32a1
Sv2a
Resp18
AW551984
Gpx3
Hap1
Cadm1
Dlk1
Scg2
Primal2
Hap1
Btg1
Sst
Resp18
Hap1
Cadm1
Primal2
Tac1
Resp18
Hap1
Scg2
Vsnl1
Apoe

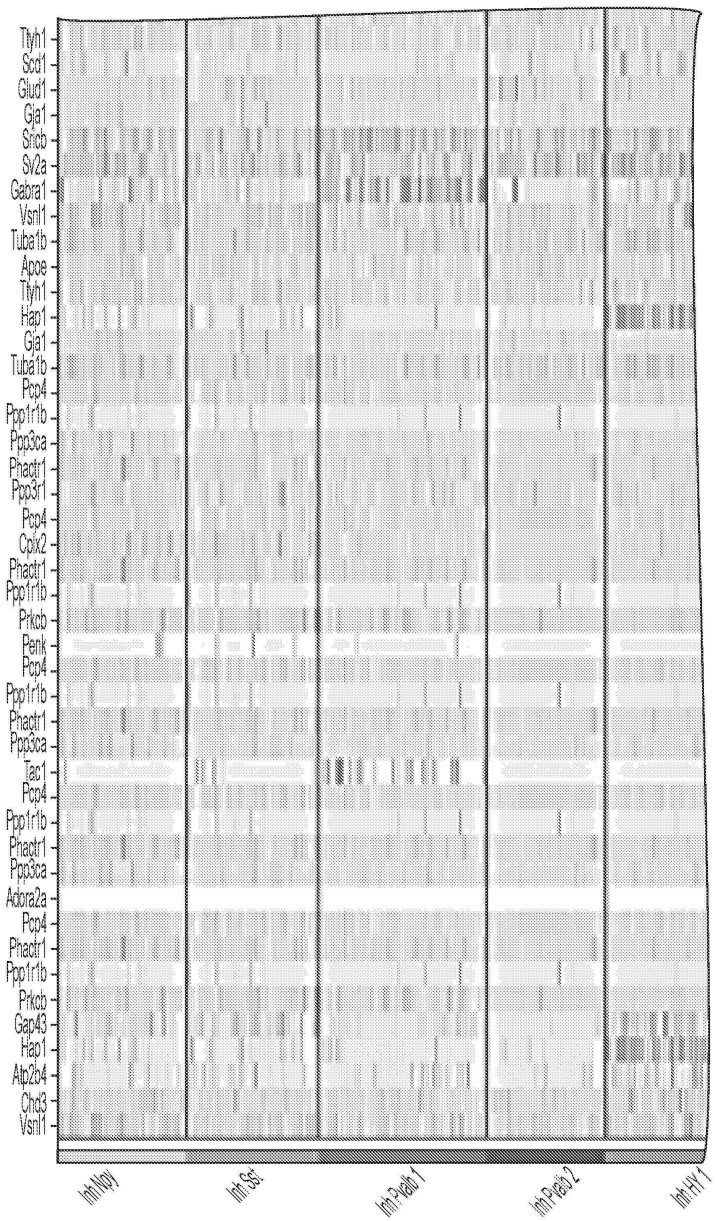
도면20ac


Gad1
Kif
Slc17a7
Npy
Syt1
Sst
Slc17a7
Npy
Cnbp
Rab3b
Cplx1
Atp1b1
Pvalb
Kcnc1
Gad1
Pvalb
Gad1
Cplx1
Syt2
Ostpl1a
Gad2
Hap1
Resp18
Slc32a1
Sv2a
Resp18
AW551984
Gpx3
Hap1
Cadm1
Dlk1
Scg2
Primal2
Hap1
Btg1
Sst
Resp18
Hap1
Cadm1
Primal2
Tac1
Resp18
Hap1
Scg2
Vsnl1
Apoe

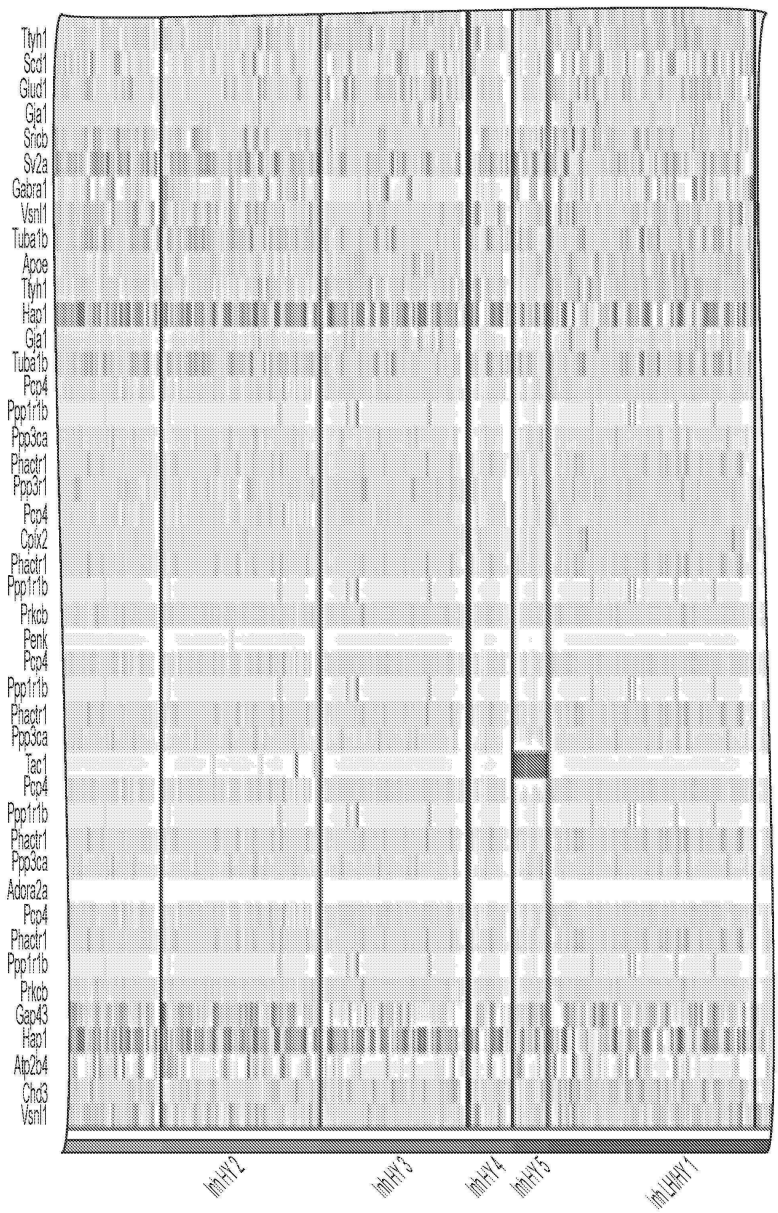
도면20ad


Gad1
Kif
Slc17a7
Npy
Syt1
Sst
Slc17a7
Npy
Cmbp
Rab3b
Cplx1
Atp1b1
Pvalb
Kcnc1
Gad1
Pvalb
Gad1
Cplx1
Syt2
Osbpl1a
Gad2
Hap1
Resp18
Slc32a1
Sv2a
Resp18
AW551984
Gpx3
Hap1
Cadm1
Dlk1
Scg2
Primal2
Hap1
Btg1
Sst
Resp18
Hap1
Cadm1
Primal2
Tac1
Resp18
Hap1
Scg2
Vsnl1
Apoe

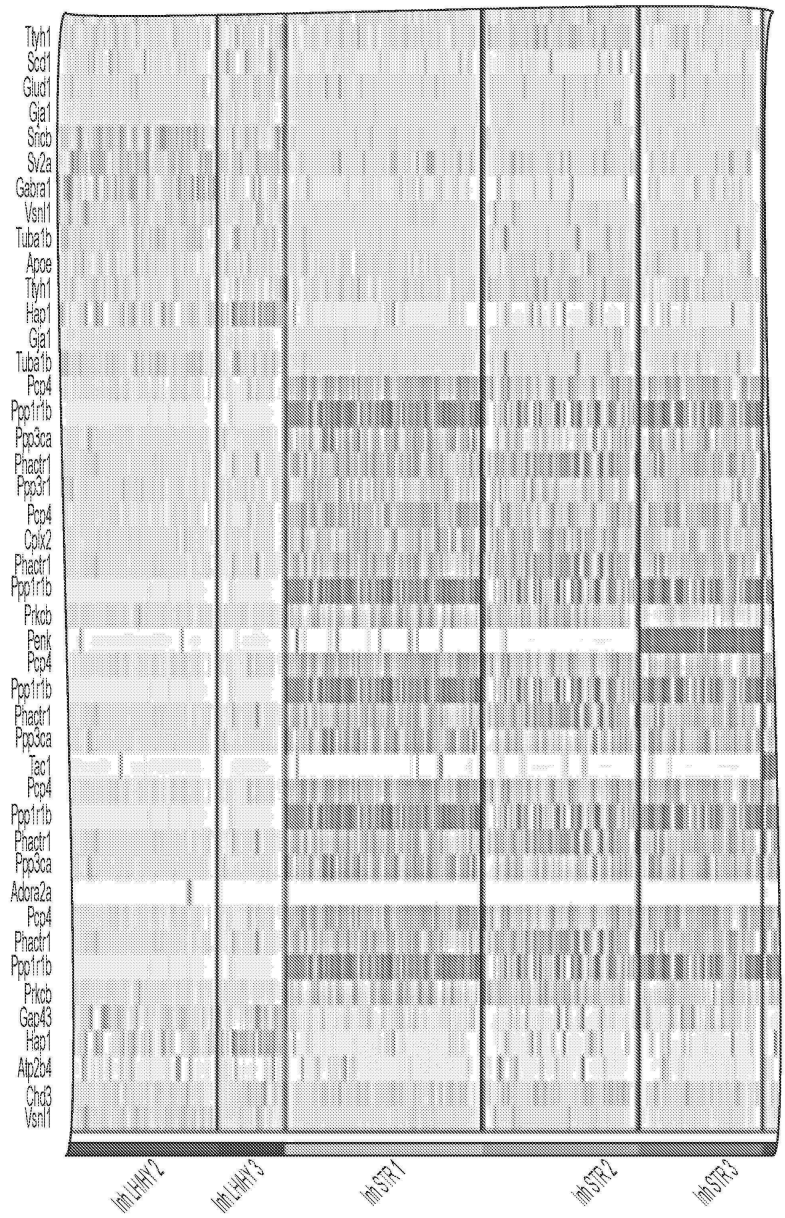
도면20ae


Thy1
Scd1
Glud1
Gja1
Snap
Syt2a
Gabra1
Vsnl1
Tubb1b
Apoe
Thy1
Hap1
Gja1
Tubb1b
Pcp4
Ppp1r1b
Ppp3ca
Phactr1
Ppp3r1
Pcp4
Cplx2
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Penk
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Tac1
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Adora2a
Pcp4
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Gap43
Hap1
Atp2b4
Chn3
Vsnl1
Int-Hpy
Int-Str
Int-Peak 1
Int-Peak 2
Int-HY 1

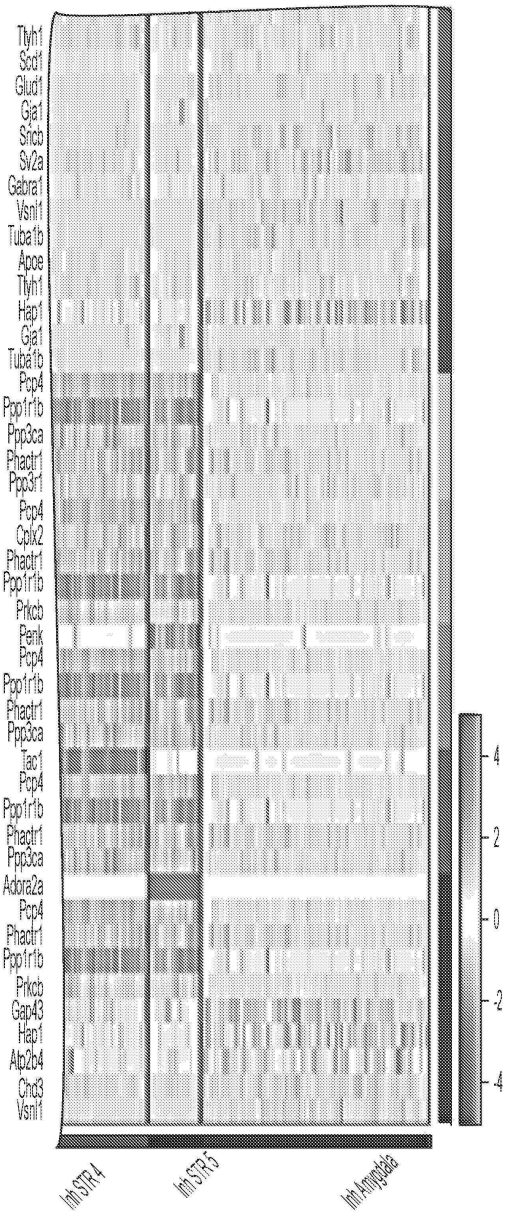
도면20af


Tbyh1
Scd1
Glud1
Gja1
Snca
Sv2a
Gabra1
Vsnl1
Tuba1b
Apoe
Tbyh1
Hap1
Gja1
Tuba1b
Pcp4
Ppp1r1b
Ppp3ca
Phactr1
Ppp3r1
Pcp4
Cplx2
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Penk
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Tac1
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Adora2a
Pcp4
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Gap43
Hap1
Atp2b4
Chd3
Vsnl1
클러스터 2
클러스터 3
클러스터 4
클러스터 5
클러스터 1

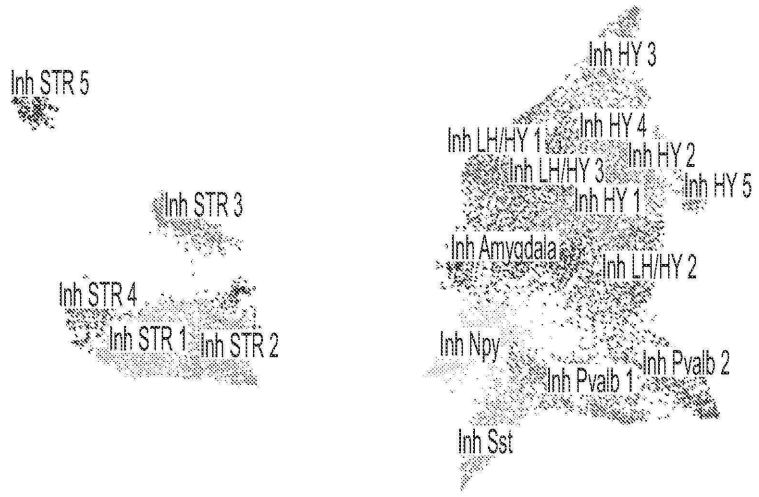
도면20ag


Tlyh1
Scd1
Glud1
Gja1
Snca
Sv2a
Gabra1
Vsnl1
Tuba1b
Apoe
Tlyh1
Hap1
Gja1
Tuba1b
Pcp4
Ppp1r1b
Ppp3ca
Phactr1
Ppp3r1
Pcp4
Colk2
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Penk
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Tac1
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Adora2a
Pcp4
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Gap43
Hap1
Atp2b4
Chd3
Vsnl1
lm1:HIPP 2
lm1:HIPP 3
lm1:STR 1
lm1:STR 2
lm1:STR 3

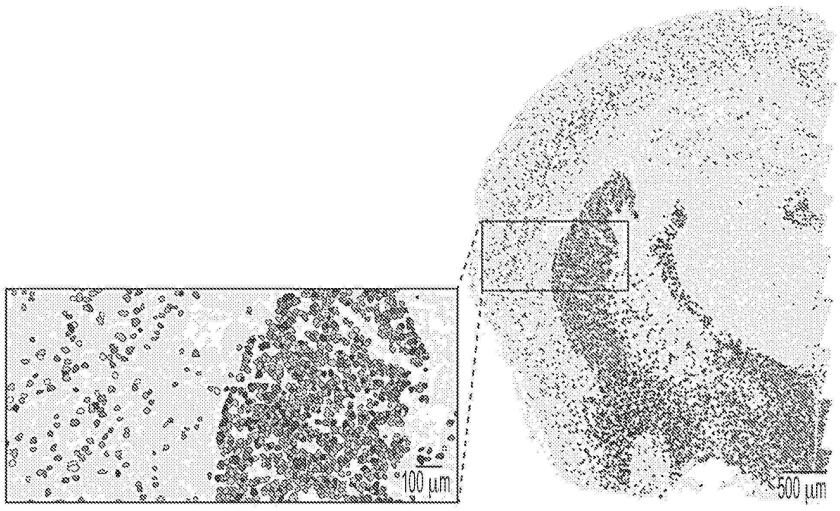
도면20ah


Tlyh1
Scd1
Glud1
Gja1
Sncb
Syt2a
Gabra1
Vsnl1
Tuba1b
Apoe
Tlyh1
Hap1
Gja1
Tuba1b
Pcp4
Ppp1r1b
Ppp3ca
Phactr1
Ppp3r1
Pcp4
Cplx2
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Penk
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Tac1
Pcp4
Ppp1r1b
Phactr1
Ppp3ca
Adora2a
Pcp4
Phactr1
Ppp1r1b
Prkcb
Gap43
Hap1
Atp2b4
Chd3
Vsnl1
4
2
0
-2
-4
Inh STR 4
Inh STR 3
Inh Amygdala

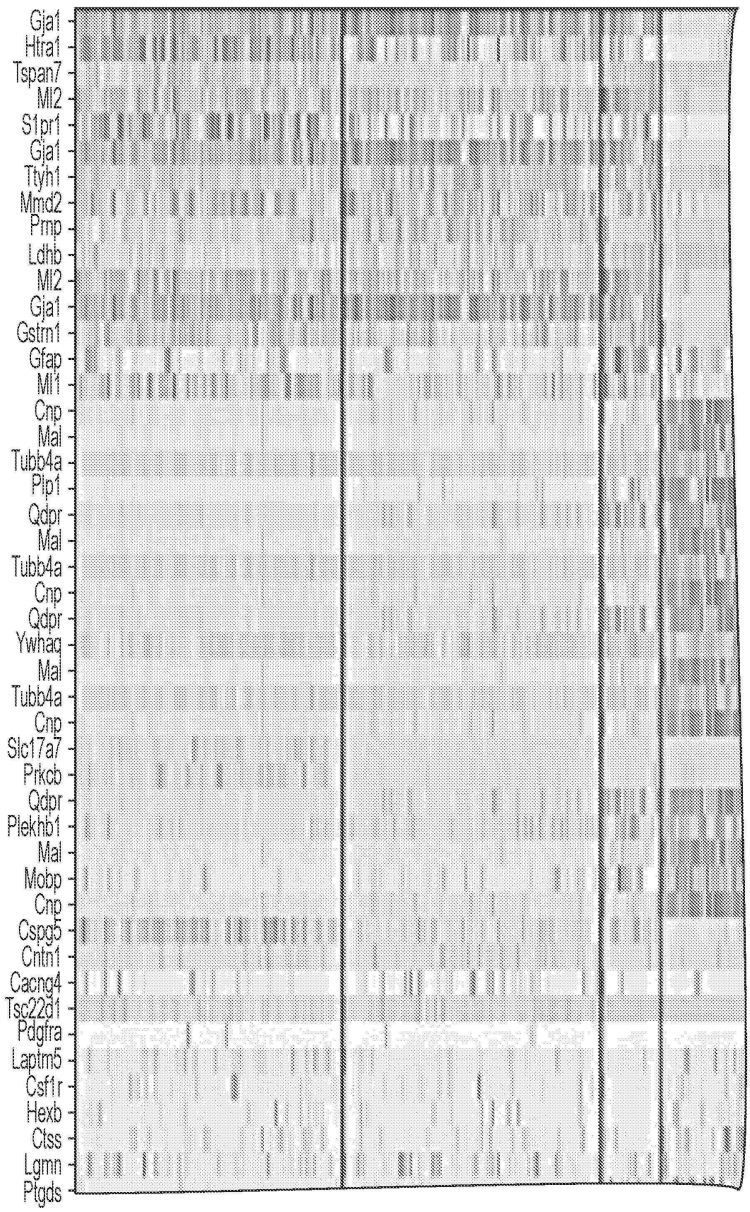
도면20b


Inh STR 5
Inh STR 3
Inh STR 4
Inh STR 1
Inh STR 2
Inh HY 3
Inh HY 4
Inh LH/HY 1
Inh HY 2
Inh LH/HY 3
Inh HY 5
Inh HY 1
Inh Amygdala
Inh LH/HY 2
Inh Npy
Inh Pvalb 2
Inh Pvalb 1
Inh Sst

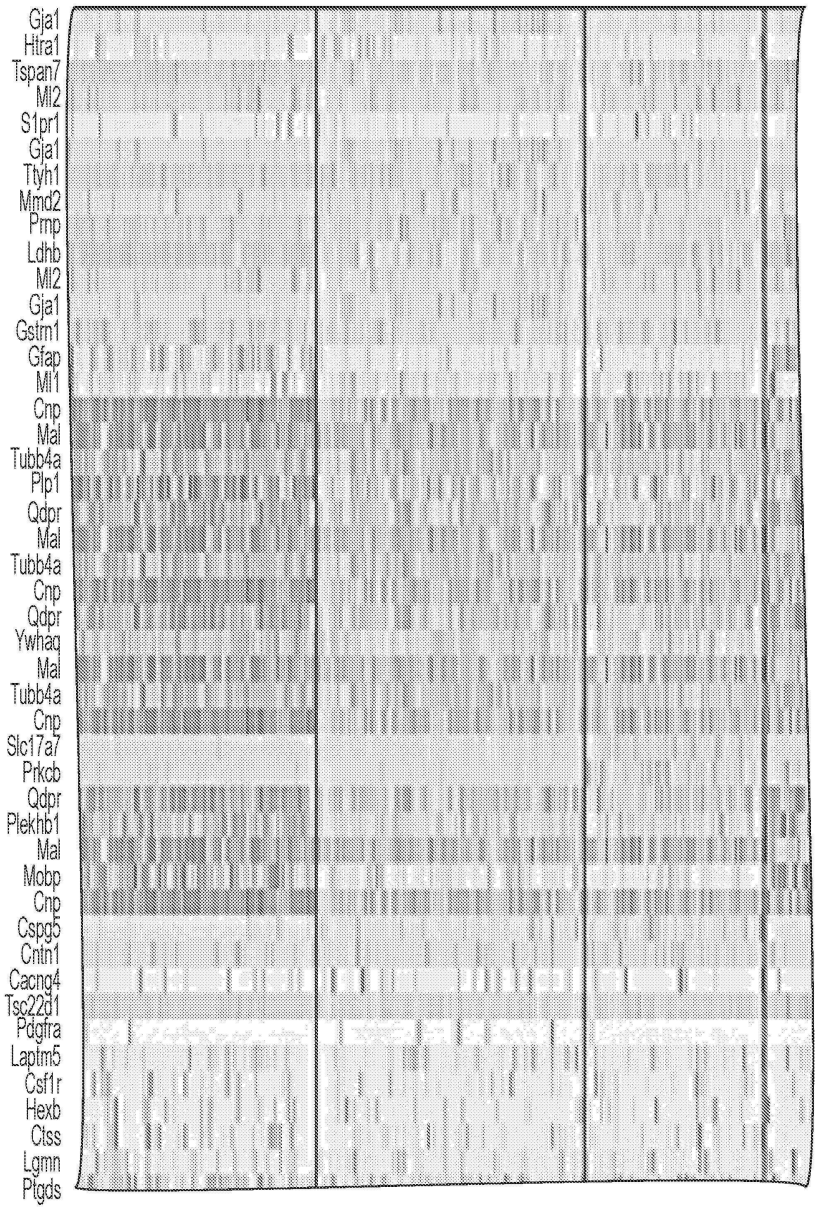
도면20c


100 μm
500 μm

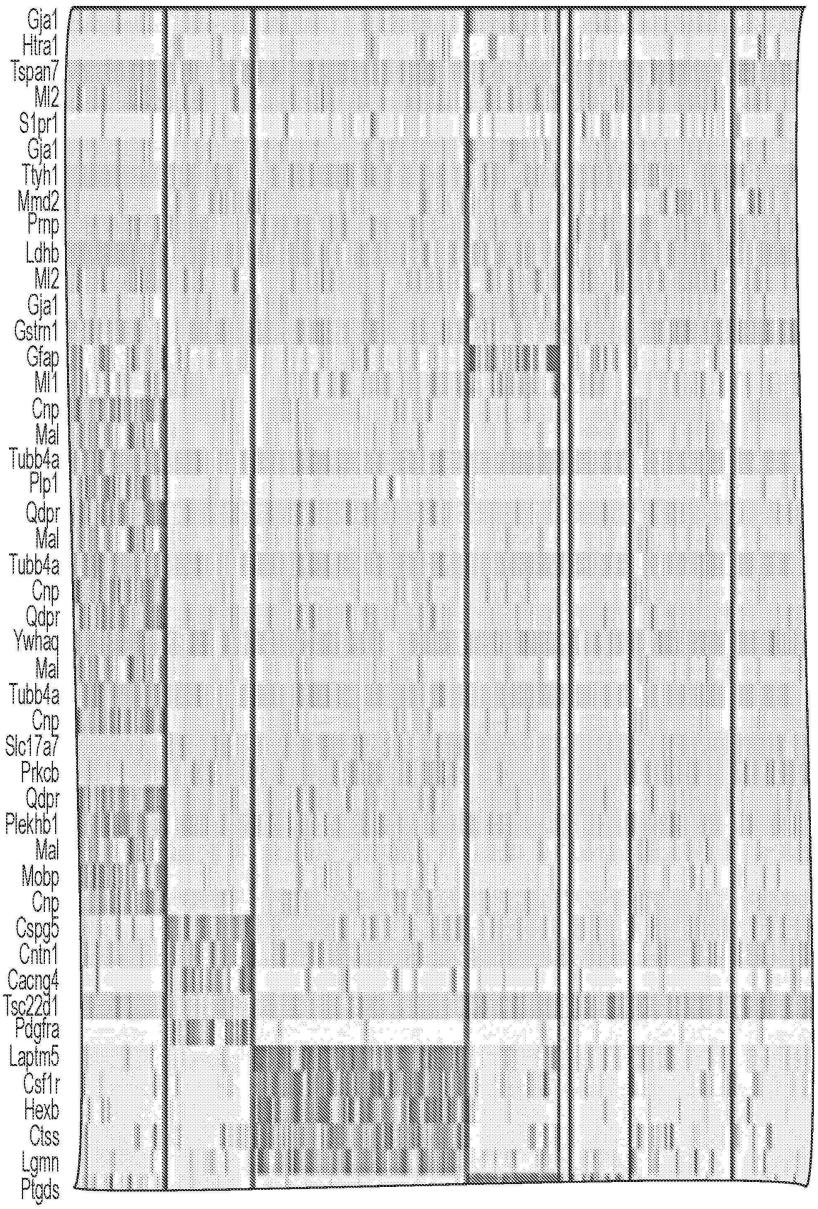
도면21aa


Gja1
Htra1
Tspan7
Ml2
S1pr1
Gja1
Ttyh1
Mmd2
Prnp
Ldhb
Ml2
Gja1
Gstm1
Gfap
Mlf1
Cnp
Mal
Tubb4a
Plp1
Qdpr
Mal
Tubb4a
Cnp
Qdpr
Ywhaq
Mal
Tubb4a
Cnp
Slc17a7
Prkcb
Qdpr
Plekhb1
Mal
Mobp
Cnp
Cspg5
Cntn1
Cacng4
Tsc22d1
Pdgfra
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Ptgds

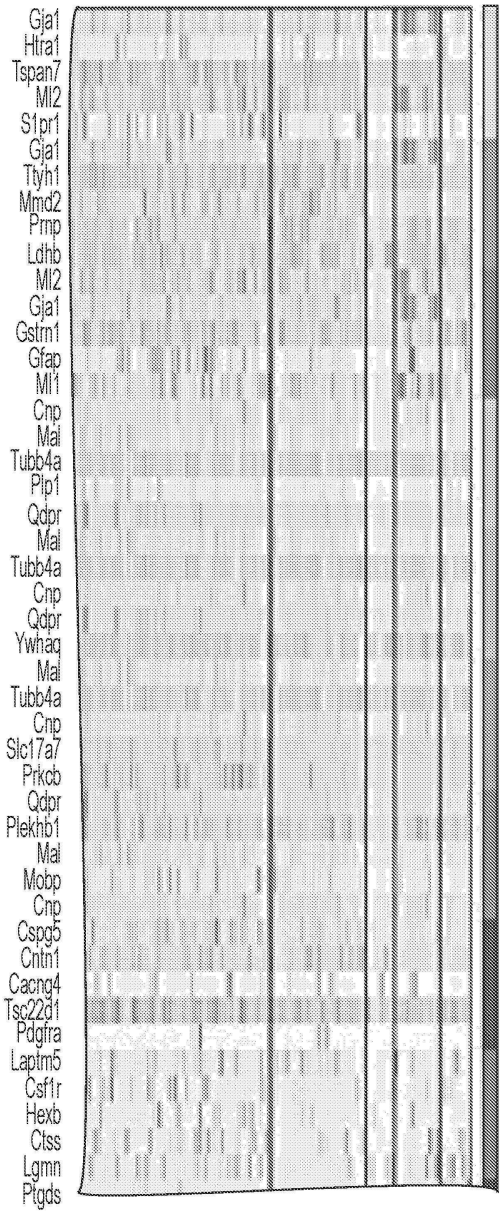
도면21ab


Gja1
Htra1
Tspan7
Ml2
S1pr1
Gja1
Ttyh1
Mmd2
Prnp
Ldhb
Ml2
Gja1
Gstm1
Gfap
Ml1
Cnp
Mal
Tubb4a
Plp1
Qdpr
Mal
Tubb4a
Cnp
Qdpr
Ywhaq
Mal
Tubb4a
Cnp
Slc17a7
Prkcb
Qdpr
Plekhb1
Mal
Mobp
Cnp
Cspg5
Cntn1
Cacng4
Tsc22d1
Pdgfra
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Ptgds

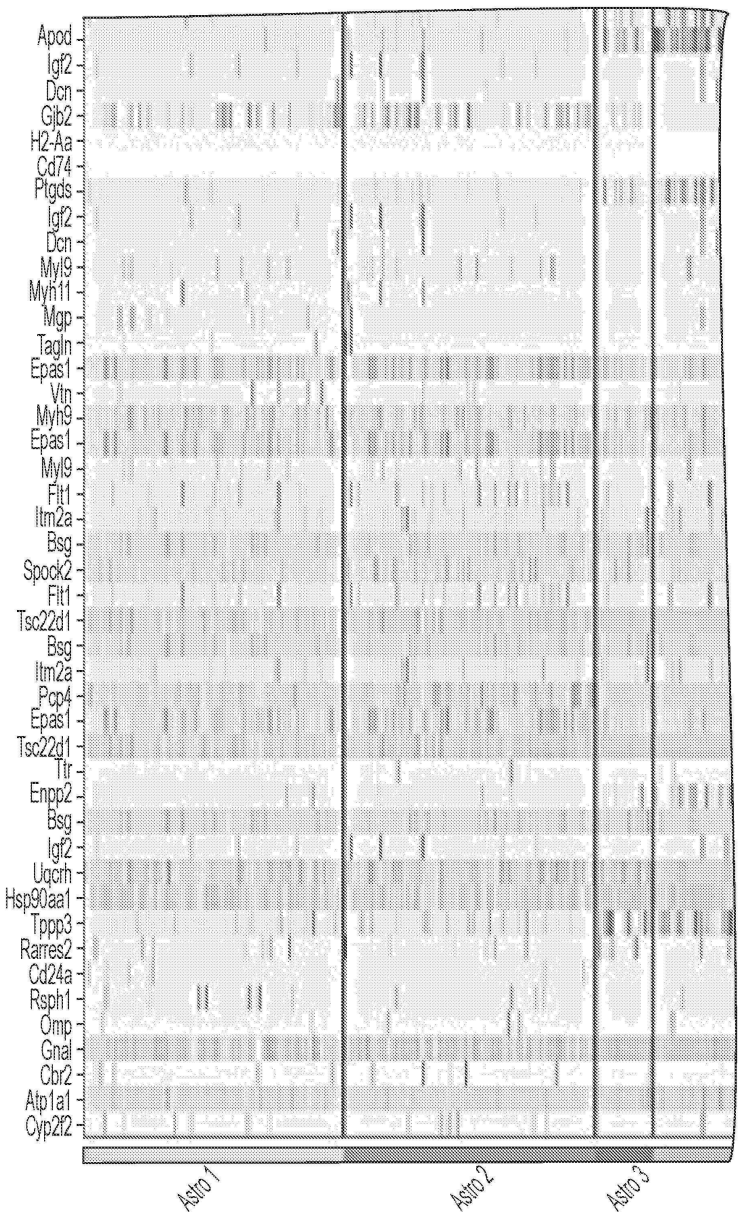
도면21ac


Gja1
Htra1
Tspan7
Ml2
S1pr1
Gja1
Ttyh1
Mmd2
Prnp
Ldhb
Ml2
Gja1
Gstm1
Gfap
Mt1
Cnp
Mal
Tubb4a
Plp1
Qdpr
Mal
Tubb4a
Cnp
Qdpr
Ywhaq
Mal
Tubb4a
Cnp
Slc17a7
Prkcb
Qdpr
Plekhb1
Mal
Mobp
Cnp
Cspg5
Cntn1
Cacng4
Tsc22d1
Pdgfra
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Ptgds

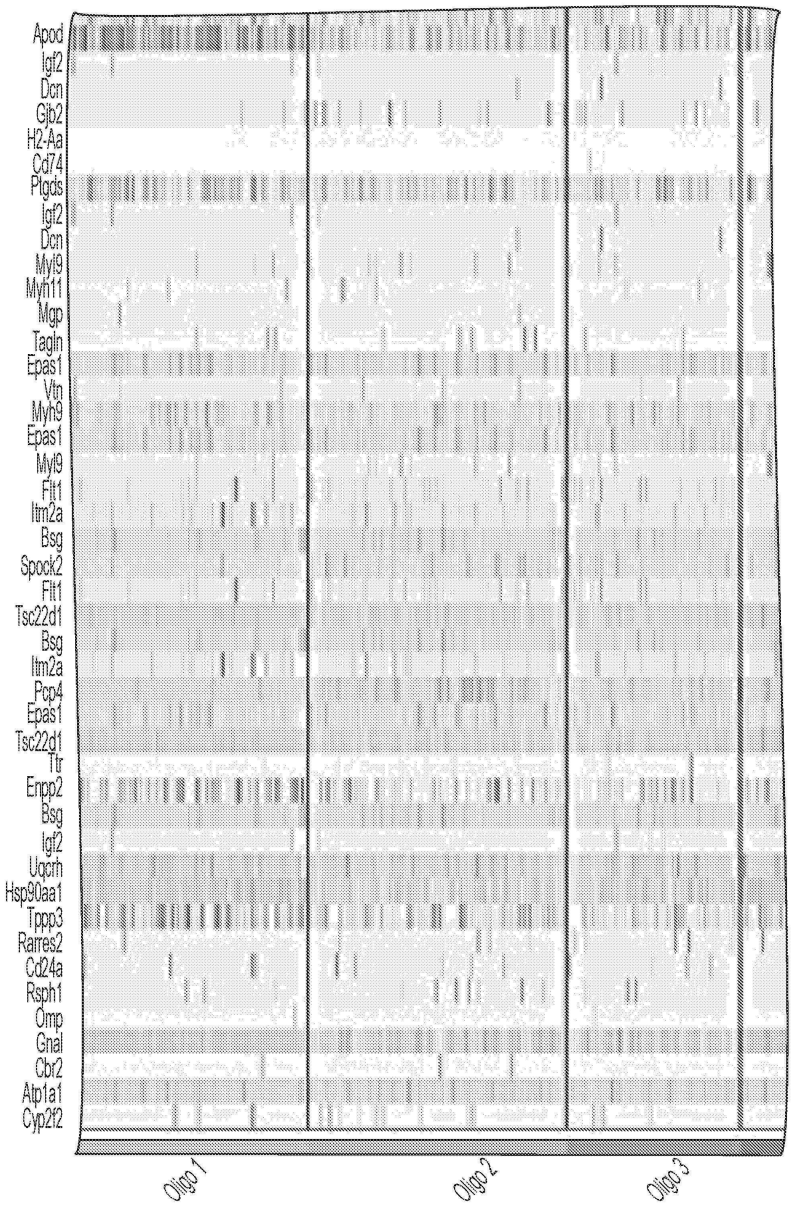
도면21ad


Gja1
Htra1
Tspan7
Ml2
S1pr1
Gja1
Ttyh1
Mmd2
Prnp
Ldhb
Ml2
Gja1
Gstm1
Gfap
Ml1
Cnp
Mal
Tubb4a
Plp1
Qdpr
Mal
Tubb4a
Cnp
Qdpr
Ywhaq
Mal
Tubb4a
Cnp
Slc17a7
Prkcb
Qdpr
Plekhb1
Mal
Mobp
Cnp
Cspg5
Cntn1
Cacng4
Tsc22d1
Pdgfra
Laptm5
Csf1r
Hexb
Ctss
Lgmn
Ptgds

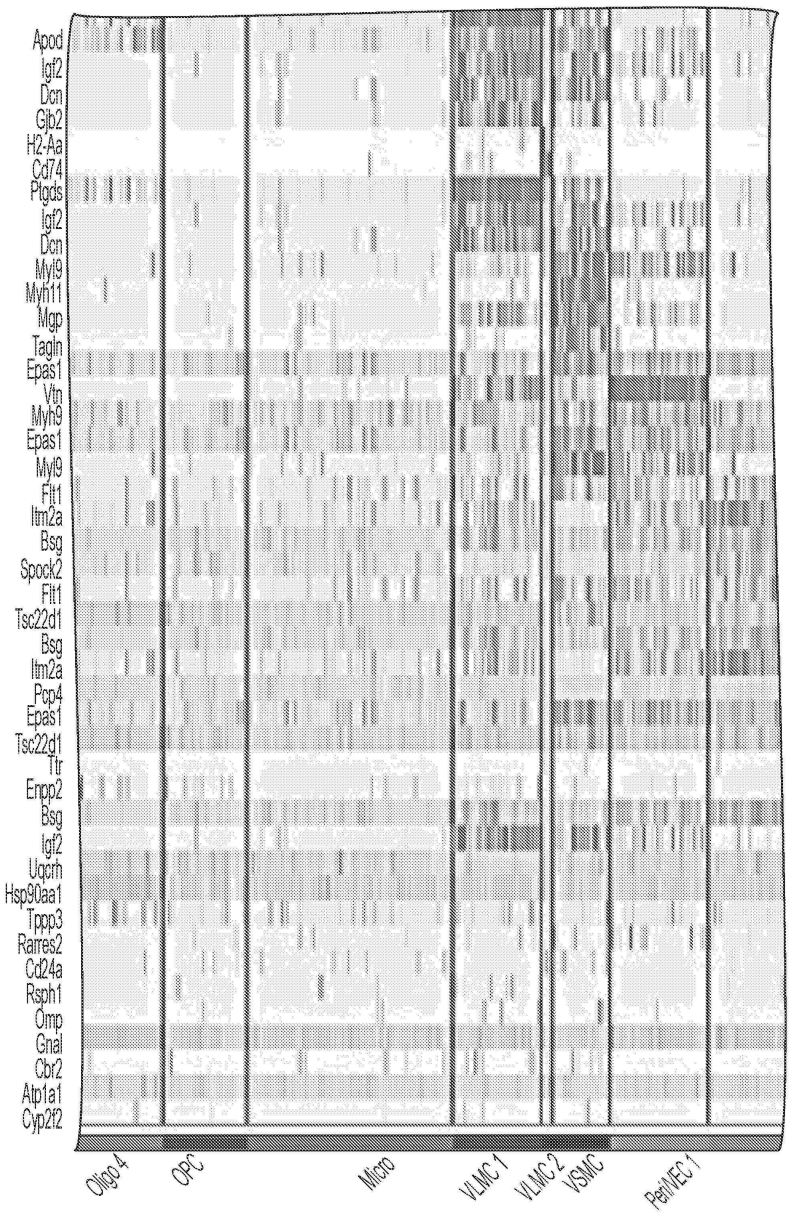
도면21ae


Apod
Igf2
Dcn
Gjb2
H2-Aa
Cd74
Ptgds
Igf2
Dcn
Myl9
Myh11
Mgp
Tagln
Epas1
Vtn
Myh9
Epas1
Myl9
Flt1
Itm2a
Bsg
Spock2
Flt1
Tsc22d1
Bsg
Itm2a
Pcp4
Epas1
Tsc22d1
Ttr
Enpp2
Bsg
Igf2
Uqcrh
Hsp90aa1
Tppp3
Rarres2
Cd24a
Rsph1
Omp
Gnal
Cbr2
Atp1a1
Cyp2f2
Astro 1
Astro 2
Astro 3

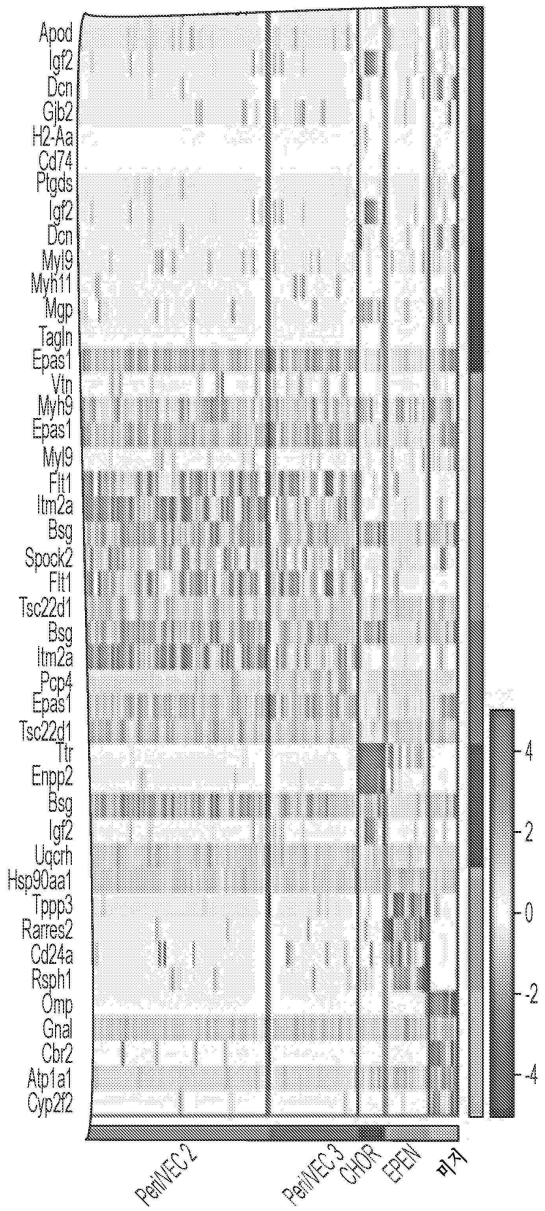
도면21af


Apod
Igf2
Dcn
Gjb2
H2-Aa
Cd74
Ptgds
Igf2
Dcn
Myl9
Myh11
Mgp
Tagln
Epas1
Vtn
Myh9
Epas1
Myl9
Flt1
Itm2a
Bsg
Spock2
Flt1
Tsc22d1
Bsg
Itm2a
Pcp4
Epas1
Tsc22d1
Tfr
Enpp2
Bsg
Igf2
Uqcrh
Hsp90aa1
Tppp3
Rarres2
Cd24a
Rsph1
Omp
Gnal
Cbr2
Atp1a1
Cyp2f2
Oligo 1
Oligo 2
Oligo 3

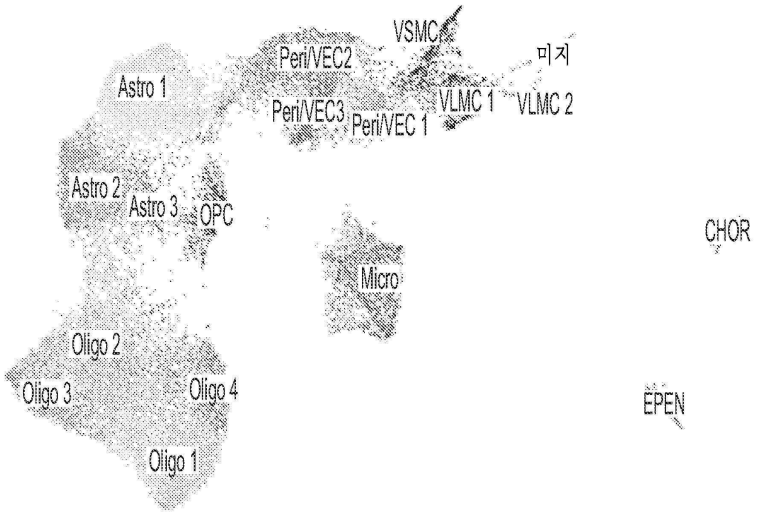
도면21ag


Apod
Igf2
Dcn
Gjb2
H2-Aa
Cd74
Ptgds
Igf2
Dcn
Myl9
Myh11
Mgp
Tagln
Epas1
Vtn
Myh9
Epas1
Myl9
Flt1
Itm2a
Bsg
Spock2
Flt1
Tsc22d1
Bsg
Itm2a
Pcp4
Epas1
Tsc22d1
Ttr
Enpp2
Bsg
Igf2
Uqcrh
Hsp90aa1
Tppp3
Rarres2
Cd24a
Rsph1
Omp
Gnai
Cbr2
Atp1a1
Cyp2f2
Oligo 4
OPC
Micro
VLMC 1
VLMC 2
VSMC
PeriVEC 1

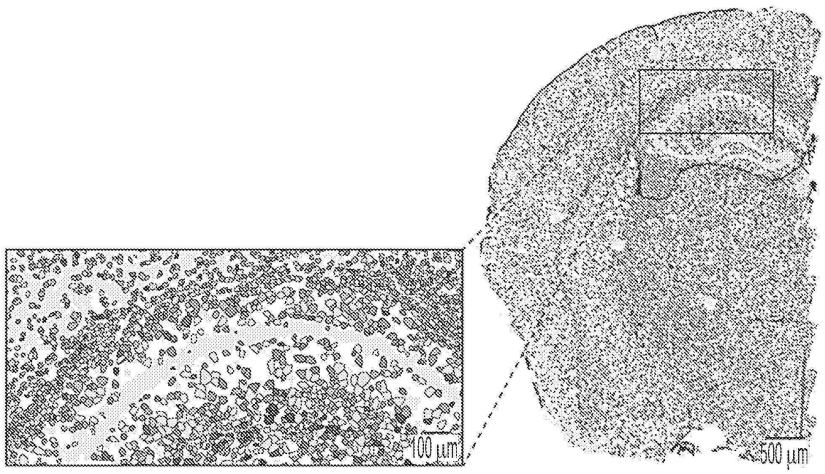
도면21ah


Apod
Igf2
Dcn
Gjb2
H2-Aa
Cd74
Ptgds
Igf2
Dcn
Myl9
Myh11
Mgp
Tagln
Epas1
Vtn
Myh9
Epas1
Myl9
Flt1
Itm2a
Bsg
Spock2
Flt1
Tsc22d1
Bsg
Itm2a
Pcp4
Epas1
Tsc22d1
Ttr
Enpp2
Bsg
Igf2
Uqcrh
Hsp90aa1
Tppp3
Rarres2
Cd24a
Rsph1
Omp
Gnal
Cbr2
Atp1a1
Cyp2f2
4
2
0
-2
-4
PerlVEC 2
PerlVEC 3
CHOR
EPEN
피거

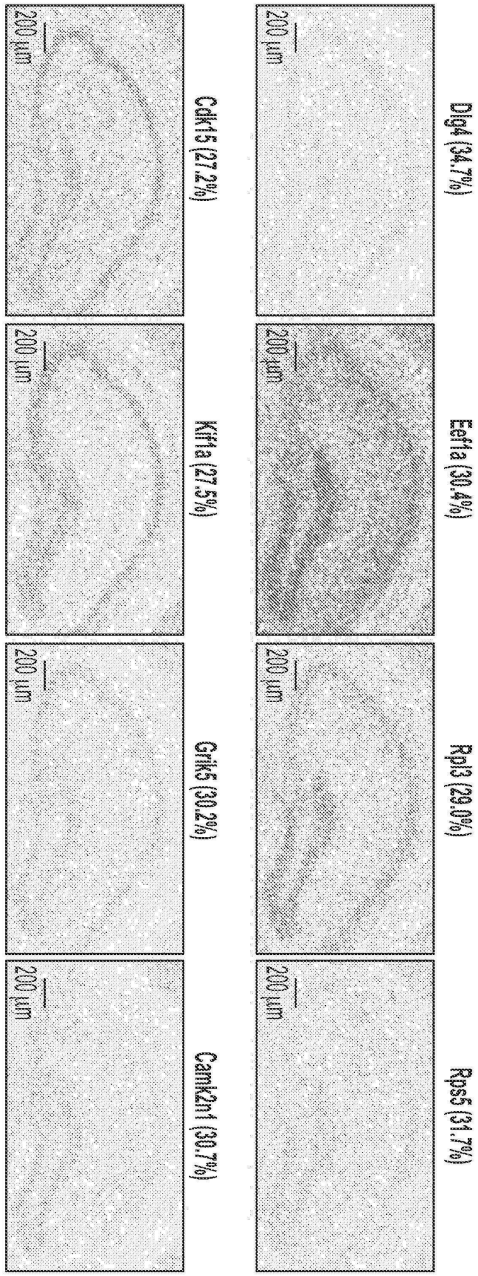
도면21b


VSMC
Peri/VEC2
미지
Astro 1
Peri/VEC3
VLMC 1
VLMC 2
Peri/VEC 1
Astro 2
Astro 3
OPC
CHOR
Micro
Oligo 2
Oligo 3
Oligo 4
EPEN
Oligo 1

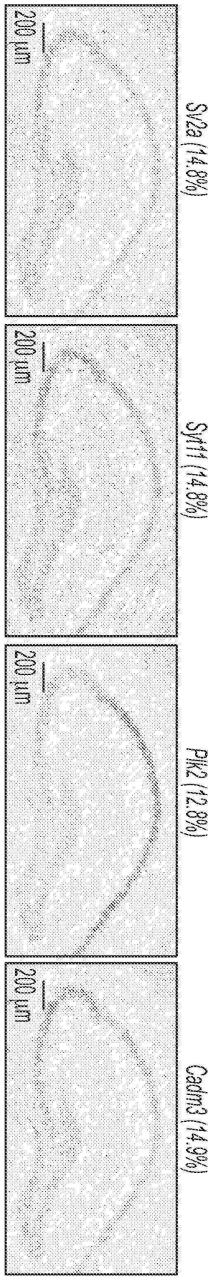
도면21c


100 μm
500 μm

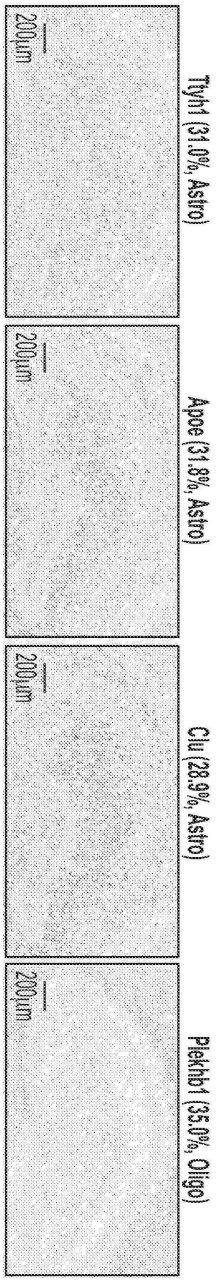
도면22a


Dlg4 (34.7%)
Eef1a (30.4%)
Rpl3 (29.0%)
Rps6 (31.7%)
Cdk15 (27.2%)
Kif1a (27.5%)
Grik5 (30.2%)
Camk2n1 (30.7%)
200 μm

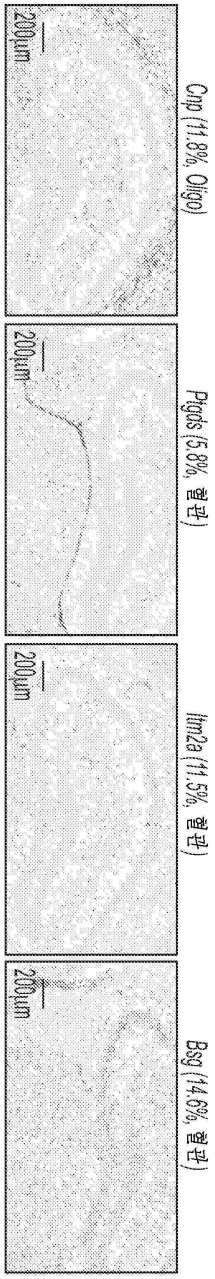
도면22b


200 μm
Sv2a (14.8%)
200 μm
Syt11 (14.8%)
200 μm
Plk2 (12.8%)
200 μm
Cadm3 (14.9%)

도면22c


Tyrobp (31.0%, Astro)
Apoe (31.8%, Astro)
Clu (28.9%, Astro)
Plekhb1 (35.0%, Oligo)
200μm
200μm
200μm
200μm

도면22d


Bsg (14.69% 병균)
200um
Hmo2a (11.5% 병균)
200um
Phgds (5.88% 병균)
200um
Chp (11.8% Oligo)
200um