(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0045920
(43) 공개일자 2023년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6813 (2018.01) *B01L 3/00* (2023.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6813 (2018.05)
B01L 3/5085 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0128780
(22) 출원일자 2021년09월29일
심사청구일자 2021년09월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
천홍구
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 206동 2101호(신천동, 파크리오)
(74) 대리인
특허법인남촌

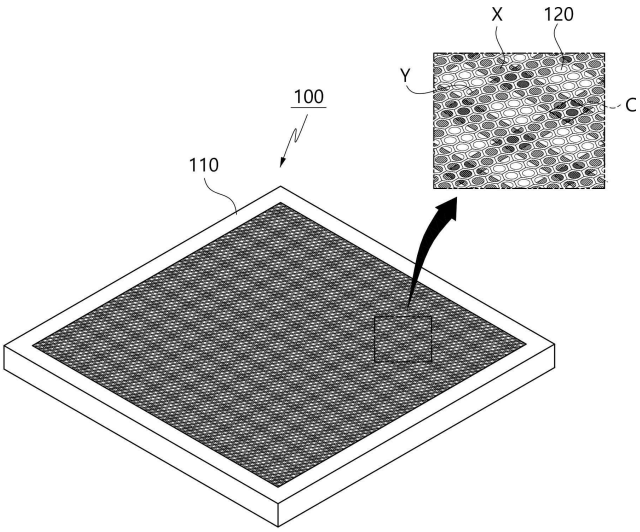
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **위치 정보를 갖는 ＤＮＡ 바코드 장치**

(57) 요 약

본 발명은 위치 정보를 갖는 DNA 바코드 장치에 관한 것으로, 판면에 상호 이격된 복수의 마이크로 웰이 형성된 기판과; 각각의 상기 마이크로 웰에 형성된 코드 수용체와; 각각의 상기 코드 수용체에 도입된 DNA 바코드 세트를 포함하며; 각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 기판의 판면 방향으로의 적어도 2 이상의 방향으로의 위치 정보에 해당하는 위치 바코드를 포함하는 것을 특징으로 하는 한다. 이에 따라, 유전자 또는 단백질의 발현 정도를 쉽게, 고해상도로 저렴한 비용으로 분석하면서도, 유전자 또는 단백질의 위치 정보를 확인할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2018.05)
B01J 2219/00547 (2013.01)
C12Q 2523/30 (2019.08)
C12Q 2525/173 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2563/179 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

위치 정보를 갖는 DNA 바코드 장치에 있어서,

판면에 상호 이격된 복수의 마이크로 웰이 형성된 기판과;

각각의 상기 마이크로 웰에 형성된 코드 수용체와;

각각의 상기 코드 수용체에 도입된 DNA 바코드 세트를 포함하며;

각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 기판의 판면 방향으로의 적어도 2 이상의 방향으로의 위치 정보에 해당하는 위치 바코드를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 기판 상에 검사 대상 조직이 놓일 때,

각각의 상기 DNA 바코드 세트가 해당 위치의 상기 검사 대상 조직에 유입되어 상기 위치 바코드의 상기 위치 정보가 상기 검사 대상 조직의 해당 위치로 유입되거나,

상기 검사 대상 조직의 mRNA가 해당 위치의 상기 마이크로 웰로 유입되어 상기 mRNA가 해당 마이크로 웰의 상기 위치 바코드의 상기 위치 정보를 갖는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 위치 바코드는

X-축 방향으로의 위치 정보를 갖는 X-축 바코드 올리고와,

Y-축 방향으로의 위치 정보를 갖는 Y-축 바코드 올리고를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 위치 바코드는

제3의 위치 정보를 갖는 제3 위치 바코드 올리고를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제3 위치 바코드 올리고는 상기 기판에 대한 정보를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 기판은 실리콘, 유리, 쿼츠(Quartz), 알루미늄, 지르코니아 중 적어도 하나의 소재로 마련되며;

상기 마이크로 웰은 상기 소재의 식각을 통해 형성되는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 기판은 표면에 다수의 구멍이 형성된 AAO 막 또는 산화 지르코늄 막을 포함하며;

다수의 상기 구멍이 마이크로 웰을 형성하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 기판은 마이크로포스트로 구성된 주형에서 복제된 PDMS(Poly-dimethylsiloxane)를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 9

제1항에 있어서,

종이 또는 셀룰로오스 막에 포토리소그래피 공정을 통해 포토레지스트로 상기 마이크로 웰이 형성되어 상기 기판이 형성되는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 코드 수용체는 아가로스 겔(Agarose gel) 등의 하이드로겔(Hydrogel)인 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 11

제1항에 있어서,

복수의 상기 마이크로 웰 중 적어도 일부에, 상기 기판 상에서의 위치가 시각적으로 확인 가능하도록 도입되는 형광체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 12

제2항에 있어서,

상기 기판 상에 상기 검사 대상 조직이 놓일 때, 상기 기판과 상기 검사 대상 조직을 사이에 두고 상기 기판과 상기 검사 대상 조직의 양측에 인접하게 각각 배치되어, 각각의 상기 DNA 바코드 세트가 해당 위치의 상기 검사 대상 조직에 유입되는 유입력 또는 상기 검사 대상 조직의 mRNA가 상기 마이크로 웰로 유입되는 유입력을 제공하는 한 쌍의 전극을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 13

제4항에 있어서,

상기 X-축 바코드 올리고 및 상기 Y-축 바코드 올리고는 상기 코드 수용체 내부에 분산된 상태로 도입되는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 14

제4항에 있어서,

상기 DNA 바코드 세트는

상기 X-축 바코드 올리고와 상기 Y-축 바코드 올리고 중 어느 하나를 상기 코드 수용체 구조에 공유 결합(Covalent bond)시키는 링커와;

상기 X-축 바코드 올리고와 상기 Y-축 바코드 올리고 중 어느 하나와 다른 하나를 결합시키는 스플린트(Splint) 올리고를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 15

제2항에 있어서,

각각의 상기 DNA 바코드 세트는 폴리 A-테일(Poly A-tail)을 더 포함하고;

각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 검사 대상 조직에 유입된 후 상기 검사 대상 조직의 mRNA에 대응하게 작동하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

청구항 16

제2항에 있어서,

각각의 상기 DNA 바코드 세트는 폴리 T-테일(Poly T-tail)을 더 포함하고;

각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 검사 대상 조직에 유입된 후, 상기 폴리 T-테일(Poly T-tail)이 상기 검사 대상 조직의 mRNA의 폴리 A-테일(Poly A-tail)과 결합하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DNA 바코드 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유전자 또는 단백질의 발현 정도를 쉽게, 고해상도로 저렴한 비용으로 분석할 수 있는 DNA 바코드 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] mRNA 또는 단백질 발현을 단일세포 수준으로 분석하는 것은 생명 현상 연구 뿐 아니라 암 진단 등 임상에서도 큰 의미가 있다. 특히, 이는 H&E 염색(Hematoxylin-Eosin staining)이 된 조직검사 슬라이드를 현미경을 통해 눈으로 주관적 진단을 하던 예전의 방식을 벗어나, 각 세포의 유전자 발현 정도에 따른 정확한 진단을 가능케 하여, 맞춤형 정밀 의료(Personalized/precision medicine)를 구현하는데 큰 역할을 하고 있다.

[0003] 현재까지 단세포에서 발현된 mRNA를 분석하기 위한 방법으로는 Drop-seq 방법, 10x Visium 방법 등이 상용화되어 있으며, 세계 선도대학의 연구실을 중심으로 빠르게 발전하고 있다.

[0004] 도 1에 도시된 Drop-seq 방법은 조직으로부터 세포를 단세포 수준으로 분리하고 미세유체 칩에 흘리면서 유니크(Unique)한 DNA 바코드(barcode)가 포함된 미세구슬(micro-bead)과 1:1로 water-in-oil 형태의 방울(Droplet)을 형성한다. 그리고, 각 방울 안에서 mRNA가 폴리-T 테일 올리고(Poly-T tail oligo)에 붙어 역전사(Reverse-transcript)되어 cDNA를 만들고, 그 뒤 NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 통해 한 세포에서 추출된, 즉 한 방울 내의 하나의 미세구슬의 유니크한 바코드를 가진 mRNA를 분석하여, 각 세포 들간의 차이를 알 수 있게 한다.

[0005] 그러나, Drop-seq 방법은 미리 세포를 단세포 수준으로 분리하여 검사하기 때문에, 해당 세포가 어느 부분에서 왔는지 알 수 없는 한계가 있다.

[0006] 이에, 조직 내 세포의 위치 정보와 유전자 발현을 동시에 분석하기 위한 공간적 전사체학(Spatial transcriptomics)에 대한 수요가 높으며, 10x genomics 사에서는 10x Visium을 사용화 하였다.

[0007] 도 2은 기존의 10x Visium을 설명하기 위한 도면이다. 도 2를 참조하여 설명하면, 슬라이드 글라스의 네 개로 구분된 사각형 안에는 각각 5000여개의 X-Y 좌표에 따른 유니크한 DNA barcode가 부착되어 있다.

[0008] 각각의 DNA 바코드는 폴리-T 테일 올리고를 포함하고 있어, 슬라이드 글라스의 사각형 위에 올려놓은 투과성(permeabilized) 조직에서 확산되어 나온 mRNA가 붙어 cDNA를 생성하게 된다. 그런 다음, NGS 분석을 통해 각 부분의 유전자 발현을 분석할 수 있다.

[0009] 따라서, 10x Visium의 경우, 조직의 이미지와 각 부분에서의 유전자 발현을 함께 분석할 수 있는 장점이 있다.

[0010] 10x Visium 방법과 유사한 기술도 제안되고 있다. 도 3은 기존의 HDST(High density spatial transcriptomics)와 Slide-seq를 나타낸 도면이다.

[0011] 10x Visium과의 차이점은 10x Visium은 슬라이드 글라스에 올리고를 직접 고정시킨 반면, HDST와 Slide-seq은 미세구슬에 올리고를 부착한 뒤, 슬라이드 글라스의 홈에 위치시키거나(HDST), 슬라이드 글라스 위에 모노-레이어 (Mono-layer)로 놓은 것(Slide-seq)이다. 두 방법에서 미세구슬의 크기는 각각 2um, 10um로, 10x Visium의 55um에 비해 작은 것이 장점이다.

[0012] 그러나, 상기의 3가지 방법은 모두 조직에서 mRNA가 빠져나와, 하부에 위치하는 기판의 DNA에 와서 결합(Hybridization)해야 하는데, 포집 효율(Capture efficiency)가 2% 수준으로 매우 낮은 단점이 있다.

[0013] 이와 같은 낮은 포집 효율의 원인으로는 세포에서 확산(Diffusion)되어 나오는 것 자체의 효율이 낮을 수 있다는 점과, 슬라이드 글라스 또는 미세구슬에 고정된 올리고가 조밀한 상태에서, 모두 음전하(negative charge)를 가져 상호간 반발(Repulsion)이 발생할 수 있다는 점, 그리고, 한 스팟(Spot)의 표면에 고정된 올리고의 개수가 충분치 않다는 점을 들 수 있다.

[0014] 앞서 설명한, Drop-seq 방법, 10x Visium 방법, HDST 방법, Slide-seq 방법은 모두 한 세포를 레이블(Label)하는 방법이 mRNA의 폴리-A 테일을 이용하여 폴리-T 테일을 포함하는 바코드를 결합시켜 cDNA를 생성하는 것이다. 따라서, 분석하고자 하는 세포의 수만큼 많은 바코드를 미리 구비하고 있어야 하므로, 많은 수의 서로 다른 바코드가 준비되어야 하는 단점이 있다.

[0015] 반면, DNA 바코드를 조합을 통해 만들 수 있으면 미리 구비하고 있어야할 바코드의 수를 크게 낮출 수 있다. 이에 Cao 및 Junyue 등의 논문 "Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism(Science 357.6352 (2017): 661-667.)"에서는 이와 같은 바코드의 조합을 제안하고 있다. 설명의 편의를 위해, Cao 및 Junyue 등의 논문에서 제안하는 방법을 'RT-P5/P5 기법'라 명명하여 설명한다.

[0016] 도 4는 기존의 RT-P5/P7 기법을 설명하기 위한 도면이다. 도 4를 참조하여 설명하면, 세포를 미리 조직에서 단세포(또는 핵) 단위로 분리하고, 96개의 웰(Well)에 FACS(Fluorescence activated cell sorter)를 이용해 나누어 넣되, 하나의 웰에 수십 개 미만이 수용되도록 한다.

[0017] 그리고, 각 웰에 구분되는 DNA 바코드를 가진 폴리-T 테일을 갖는 올리고를 넣어, cDNA를 생성한다. 그런 다음, 이를 다시 모두 섞고 FACS를 이용해 96개의 웰에 나누어 넣는다.

[0018] 이러한 과정에서, 예를 들어, 처음 96개의 웰 중 1행 1열에 위치한 웰에 20개의 세포가 있었다면, 이들이 섞여서 두 번째로 96개의 웰에 나뉘어 들어갈 때에는 20개의 세포가 각기 다른 웰에 하나씩 들어가는 것이 바람직하다. 그런 다음 NGS 분석을 위한 P5, P7를 붙이는 과정을 시행하는데, 각 웰에 각기 다른 P5, P7의 인덱스를 부여해준다.

[0019] 이와 같은 과정을 통해 완성된 라이브러리(Library)가 도 5에 도시된 바와 같다. 도 5를 참조하여 설명하면, 가운데의 파란색 cDNA가 원래 분석하고자 하는 mRNA의 정보를 갖고 있고, 그 왼쪽의 초록색 RT 바코드는 처음 96개의 웰의 각 웰에 대한 인덱스이며, 양쪽의 파란색 i5, i7은 두 번째 96개의 웰의 각기 다른 웰에 해당하는 인덱스이다. 즉, 인덱스를 두 번 부여함으로써, RT 바코드 96개, P5/P7 바코드 96개로, 총 192개만 준비해 놓으면, 96x96 = 9216개의 유니크한 조합 인덱싱(Combinatorial indexing)이 가능한 장점이 있다.

[0020] 그러나 RT-P5/P7 기법은 세포의 조직 내 위치 정보를 소실하는 단점을 가지고 있어, 바람직하지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 상기한 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 유전자 또는 단백질의 발현 정도를 쉽게, 고해상도로 저렴한 비용으로 분석하면서도, 유전자 또는 단백질의 위치 정보를 확인할 수 있는 DNA 바코드 장치를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적은 본 발명에 따라, 위치 정보를 갖는 DNA 바코드 장치에 있어서, 판면에 상호 이격된 복수의 마이크로 웰이 형성된 기판과; 각각의 상기 마이크로 웰에 형성된 코드 수용체와; 각각의 상기 코드 수용체에 도입된 DNA 바코드 세트를 포함하며; 각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 기판의 판면 방향으로의 적어도 2 이상의 방향으로의 위치 정보에 해당하는 위치 바코드를 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 바코드 장치에 의해서 달성된다.

[0023] 여기서, 상기 기판 상에 검사 대상 조직이 놓일 때, 각각의 상기 DNA 바코드 세트가 해당 위치의 상기 검사 대상 조직에 유입되어 상기 위치 바코드의 상기 위치 정보가 상기 검사 대상 조직의 해당 위치로 유입되거나, 상기 검사 대상 조직의 mRNA가 해당 위치의 상기 마이크로 웰로 유입되어 상기 mRNA가 해당 마이크로 웰의 상기

위치 바코드의 상기 위치 정보를 가질 수 있다.

[0024] 또한, 상기 위치 바코드는 X-축 방향으로의 위치 정보를 갖는 X-축 바코드 올리고와, Y-축 방향으로의 위치 정보를 갖는 Y-축 바코드 올리고를 포함할 수 있다.

[0025] 그리고, 상기 위치 바코드는 제3의 위치 정보를 갖는 제3 위치 바코드 올리고를 더 포함할 수 있다.

[0026] 그리고, 상기 제3 위치 바코드 올리고는 상기 기판에 대한 정보를 포함할 수 있다.

[0027] 여기서, 상기 기판은 실리콘, 유리, 쿼츠(Quartz), 알루미늄, 지르코니아 중 적어도 하나의 소재로 마련되며; 상기 마이크로 웰은 상기 소재의 식각을 통해 형성될 수 있다.

[0028] 다른 예로, 상기 기판은 표면에 다수의 구멍이 형성된 AAO 막 또는 산화 지르코늄 막을 포함하며; 다수의 상기 구멍이 마이크로 웰을 형성할 수 있다.

[0029] 또 다른 예로, 상기 기판은 마이크로포스트로 구성된 주형에서 복제된 PDMS(Poly-dimethylsiloxane)를 포함할 수 있다.

[0030] 또 다른 예로, 종이 또는 셀룰로오스 막에 포토리소그래피 공정을 통해 포토레지스트로 상기 마이크로 웰이 형성되어 상기 기판이 형성될 수 있다.

[0031] 그리고, 상기 코드 수용체는 아가로스 겔(Agarose gel) 등의 하이드로겔(Hydrogel)일 수 있다.

[0032] 또한, 복수의 상기 마이크로 웰 중 적어도 일부에, 상기 기판 상에서의 위치가 시각적으로 확인 가능하도록 도입되는 형광체를 더 포함할 수 있다.

[0033] 그리고, 상기 기판 상에 상기 검사 대상 조직이 놓일 때, 상기 기판과 상기 검사 대상 조직을 사이에 두고 상기 기판과 상기 검사 대상 조직의 양측에 인접하게 각각 배치되어, 각각의 상기 DNA 바코드 세트가 해당 위치의 상기 검사 대상 조직에 유입되는 유입력 또는 상기 검사 대상 조직의 mRNA가 상기 마이크로 웰로 유입되는 유입력을 제공하는 한 쌍의 전극을 포함할 수 있다.

[0034] 여기서, 상기 X-축 바코드 올리고 및 상기 Y-축 바코드 올리고는 상기 코드 수용체 내부에 분산된 상태로 도입될 수 있다.

[0035] 다른 예로, 상기 DNA 바코드 세트는 상기 X-축 바코드 올리고와 상기 Y-축 바코드 올리고 중 어느 하나를 상기 코드 수용체 구조에 공유 결합(Covalent bond)시키는 링커와; 상기 X-축 바코드 올리고와 상기 Y-축 바코드 올리고 중 어느 하나와 다른 하나를 결합시키는 스플린트(Splint) 올리고(Sp)를 더 포함할 수 있다.

[0036] 그리고, 각각의 상기 DNA 바코드 세트는 폴리 A-테일(Poly A-tail)을 더 포함하고; 각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 검사 대상 조직에 유입된 후 상기 검사 대상 조직의 mRNA에 대응하게 작동할 수 있다.

[0037] 다른 예로, 각각의 상기 DNA 바코드 세트는 폴리 T-테일(Poly T-tail)을 더 포함하고; 각각의 상기 DNA 바코드 세트는 상기 검사 대상 조직에 유입된 후, 상기 폴리 T-테일(Poly T-tail)이 상기 검사 대상 조직의 mRNA의 폴리 A-테일(Poly A-tail)과 결합할 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따르면, 유전자 또는 단백질의 발현 정도를 쉽게, 고해상도로 저렴한 비용으로 분석하면서도, 유전자 또는 단백질의 위치 정보를 확인할 수 있는 DNA 바코드 장치가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1 내지 도 5는 기존의 유전자 또는 단백질 발현을 분석하는 방법을 설명하기 위한 도면이고,

도 6 내지 도 16은 본 발명의 실시예에 따른 위치 정보를 갖는 DNA 바코드 장치를 설명하기 위한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 제한되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0041] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소 외에 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다. 명세서 전체에 걸쳐 동일한 도면 부호는 동일한 구성 요소를 지칭하며, "및/또는"은 언급된 구성요소들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.

[0042] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다.

[0043] 이하, 첨부 도면을 참조하여 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0044] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 위치 정보를 갖는 DNA 바코드 장치(100)의 구성을 나타낸 도면이다.

[0045] 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 장치(100)는 기판(110), 코드 수용체(130) 및 DNA 바코드 세트를 포함한다.

[0046] 본 발명의 실시예에 따른 기판(110)에는 판면에 상호 이격된 복수의 마이크로 웰(120)이 형성될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는, 도 1에 도시된 바와 같이, 복수의 마이크로 웰(120)이 N*M 매트릭스 형태로 형성되는 것을 예로 한다.

[0047] 각각의 마이크로 웰(120)은 격벽을 통해 상호 물리적으로 독립된 공간을 형성하게 된다. 예를 들어, 마이크로 웰(120)은 기판(110)에 함몰된 형태를 가져 상호 물리적으로 독립된 형태를 가질 수 있다.

[0048] 본 발명의 실시예에서, 복수의 마이크로 웰(120)이 형성된 기판(110)은 다양한 형태로 구현될 수 있다.

[0049] 일 예로, 기판(110)을 실리콘, 유리, 쿼츠(Quartz), 알루미늄, 지르코니아 중 적어도 하나의 소재로 마련될 수 있다. 그리고, 상기 소재의 기판(110)에 식각 공정을 통해 마이크로 웰(120)을 형성할 수 있다.

[0050] 다른 예로, 기판(110)은 표면에 다수의 구멍이 형성된 AAO(anodized aluminium oxide) 막, 또는 산화 지르코늄 막 형태로 마련될 수 있다. 여기서, 다수의 구멍이 각각의 마이크로 웰(120)을 형성하게 된다.

[0051] 즉, 알루미늄을 양극 산화 처리하는 경우, 표면에 나노미터 크기의 구멍이 규칙적으로 배열 형성된 AAO 막이 형성되는데, 이와 같은 구조에 의해 다수의 마이크로 웰(120)이 형성된 기판(110)의 제작이 가능하게 된다.

[0052] 여기서, AAO 막 또는 산화 지르코늄 막은 별도의 평면 기판(110) 위에 고정시킬 수 있다.

[0053] 다른 예로, 기판(110)은 마이크로포스트로 구성된 주형에서 복제된 PDMS(poly dimethyl siloxane)를 포함할 수 있다. 여기서, 마이크로포스트가 복수의 마이크로 웰(120)에 대응하여 형성됨으로써, 복제된 PDMS에 복수의 마이크로 웰(120)이 형성 가능하게 된다.

[0054] 또 다른 예로, 기판(110)은 종이 또는 셀룰로오스 막에 포토리소그래피(photolithography) 공정을 통해 포토리지스트(photoresist)로 마이크로 웰(120)을 형성하여 제작될 수 있다.

[0055] 상기와 같이, 본 발명의 실시예에서는 기판(110) 내에 서로 물리적으로 독립된 공간을 형성하는 다수의 마이크로 웰(120)이 형성될 수 있는 다양한 방식이나 소재로 기판(110)의 제작이 가능하며, 본 발명의 기술적 사상이 상술한 예시에 국한되지 않음은 물론이다.

[0056] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 코드 수용체(130)는 각각의 마이크로 웰(120)에 형성된다. 본 발명의 실시예에서는 코드 수용체(130)로 아가로스 겔(Agarose gel)을 포함한 하이드로겔(Hydrogel)이 적용되는 것을 예로 한다.

[0057] 여기서, DNA 바코드 세트는 각각의 코드 수용체(130)에 도입된다. 즉, DNA 바코드 세트는 코드 수용체(130) 구조에 결합되어 코드 수용체(130) 내부로 도입될 수 있다. 이 때, 하나의 마이크로 웰(120)에는 하나 또는 다수의 DNA 바코드 세트가 도입될 수 있으며, 많은 양의 DAN 바코드 세트가 도입되는 것이 mRNA 또는 단백질의 발현 분석에 바람직할 것이다.

[0058] 본 발명의 실시예에 따른 각각의 DNA 바코드 세트는 기판(110)의 판면 방향으로의 적어도 2 이상의 방향으로의 위치 정보에 해당하는 위치 바코드를 포함하는 것을 예로 한다.

[0059] 일 예로, 위치 바코드는 X-축 바코드 올리고(X)와, Y-축 바코드 올리고(Y)를 포함할 수 있다. 여기서, X-축 바코드 올리고(X)는 X-축 방향으로의 위치 정보를 포함한다. 즉, X-축 방향으로, 예컨대, N개의 서로 다른 바코드 정보를 갖는 X-축 바코드 올리고(X)가 X축 방향으로 일정 간격으로 도입될 수 있다.

[0060] 마찬가지로, Y-축 바코드 올리고(Y)는 Y-축 방향으로의 위치 정보를 포함한다. 즉, Y-축 방향으로, 예컨대, M개의 서로 다른 바코드 정보를 갖는 Y-축 바코드 올리고(Y)가 Y축 방향으로 일정 간격으로 도입될 수 있다.

[0061] 상기와 같은 구성을 통해, N+M개의 서로 다른 바코드 정보만을 준비하는 경우, X-축 위치 정보와 Y-축 위치 정보 간의 조합을 통해, N*M개의 위치 정보가 기판(110) 상의 마이크로 웰(120)에 도입 가능하게 된다.

[0062] 도 7 내지 도 9는 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 장치(100)에서 각각의 마이크로 웰(120)에 DNA 바코드 세트를 도입하는 과정의 예를 설명하기 위한 도면이다.

[0063] 먼저, 도 7에 도시된 바와 같이, 일 방향으로 다수의 채널(210)이 일정 간격으로 형성된 미세유체 칩(200)을 기판(110) 위에 안착시킨다. 이 때, 도 7의 (a)에 도시된 바와 같이, 다수의 채널(210)의 배열 방향이 X-축 방향으로 배열되도록 안착시킨 후, 각각의 채널(210)에 서로 다른 바코드 정보를 포함하는 DNA 바코드 올리고가 포함된 용액을 흘려준다. 본 발명의 실시예에서는 채널(210)별로 순서대로 용액을 흘려주는 것을 예로 한다.

[0064] 채널(210)을 통해 흐르는 용액 내의 DNA 바코드 올리고는 해당 채널(210) 하부에 위치하는 마이크로 웰(120) 내의 코드 수용체(130)로 도입되거나, 코드 수용체(130)의 구조에 결합됨으로서, DNA 바코드 올리고가 마이크로 웰(120) 내부로 유입 가능하게 된다.

[0065] 여기서, 채널(210)별로 서로 다른 DNA 바코드 정보를 갖는 DNA 바코드 올리고가 도입됨으로써, 도 7의 (a)에 도시된 바와 같이, X-축 방향으로 각 채널(210)별로 유입되는 DNA 바코드 정보를 알고 있으면, 해당 DNA 바코드 올리고가 X-축 방향으로의 위치 정보를 갖는 X-축 바코드 올리고(X)로 작용 가능하게 된다.

[0066] 도 8은 X-축 방향으로 X-축 바코드 올리고(X)가 일정 간격으로 도입된 예를 나타낸 도면이다. 도 8에 도시된 바와 같이, X-축 방향으로 하나의 열, 즉, 하나의 채널(210)에 해당하는 열의 마이크로 웰(120)에는 동일한 DNA 바코드 정보를 갖는 DNA 바코드 올리고가 도입되어 X-축 방향으로 하나의 위치 정보를 형성하게 된다.

[0067] 본 발명의 실시예에서는 X-축 방향으로의 하나의 열에 해당하는 위치 정보는, 도 8에 확대 영역에 도시된 바와 같이, X-축 방향으로 다수의 마이크로 웰(120)에 도입되는 것을 예로 하는데, 이를 통해, 마이크로 또는 나노 단위 간격의 마이크로 웰(120)에 대응하여, 미세유체 칩(200)의 채널(210) 간격을 맞추지 않아도 무방하게 된다. 반면, 위치 정보의 해상도를 향상시키기 위해 마이크로 웰(120) 간의 간격과 미세유체 칩(200)의 채널(210) 간의 간격을 상호 대응할 정도로 맞춰 구성할 수 있음은 물론이다.

[0068] 상기와 같이, X-축 바코드 올리고(X)가 도입되면, 도 7의 (b)에 도시된 바와 같이, 미세유체 칩(200)의 채널(210)이 Y-축 방향으로 배열되도록 미세유체 칩(200)의 방향을 바꾼 상태로 기판(110) 위에 안착시킨다. 여기서, 도 7의 (a) 과정과 (b) 과정을 동일한 미세유체 칩(200)을 이용할 수 있으며, 서로 다른 미세유체 칩(200)을 사용하여도 무방하다.

[0069] X-축 방향과 마찬가지로, 각각의 채널(210)에 서로 다른 바코드 정보를 포함하는 DNA 바코드 올리고가 포함된 용액을 흘려준다. 이 때, X-축 방향으로 흘려준 바코드 정보는 Y-축 방향으로 흘려주는 바코드 정보와 상이하다.

[0070] 채널(210)을 통해 흐르는 용액 내의 DNA 바코드 올리고는 해당 채널(210) 하부에 위치하는 마이크로 웰(120) 내의 코드 수용체(130)로 도입되거나, 코드 수용체(130)의 구조에 결합됨으로서, DNA 바코드 올리고가 마이크로 웰(120) 내부로 유입 가능하게 된다.

[0071] 여기서, 채널(210)별로 서로 다른 DNA 바코드 정보를 갖는 DNA 바코드 올리고가 도입됨으로써, 도 7의 (b)에 도시된 바와 같이, Y-축 방향으로 각 채널(210)별로 유입되는 DNA 바코드 정보를 알고 있으면, 해당 DNA 바코드 올리고가 Y-축 방향으로의 위치 정보를 갖는 Y-축 바코드 올리고(Y)로 작용 가능하게 된다.

[0072] 도 9는 X-축 방향으로 X-축 바코드 올리고(X)가 일정 간격으로 도입된 후, Y-축 방향으로 Y-축 바코드 올리고(Y)가 일정 간격으로 도입된 예를 나타낸 도면이다. 도 9에 도시된 바와 같이, X-축 방향의 열과, Y-축 방향의 열이 교차하는 교차 영역(C)에 위치하는 마이크로 웰(120) 내부에는 X-축 바코드 올리고(X)와 Y-축 바코드 올리고(Y)가 모두 도입된 상태이므로, 해당 마이크로 웰(120)의 DNA 바코드 세트는 기판(110) 상에서의 위치 정보, 즉 X축 방향 및 Y축 방향으로의 위치 정보를 갖게 된다.

[0073] 여기서, 상술한 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 마이크로 웰(120)은 상호 물리적으로 독립된 공간을 형성하고 있는 바, X-축 방향 및 Y축 방향으로 DNA 바코드 올리고를 도입시킬 때 서로 인접한 마이크로 웰(120)로 교차되어 유입되는 것이 방지할 수 있어, 마이크로 웰(120) 간의 간격을 보다 조밀하게 줄일 수 있다. 이는 분석에 있어, 고해상도의 분석을 가능하게 하는 효과를 제공하게 된다.

[0074] 도 10은 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 세트가 마이크로 웰(120) 내부의 코드 수용체(130)에 도입되는 예들을 나타낸 도면이다.

[0075] 도 10의 (a)에 도시된 예에서는 X-축 바코드 올리고(X) 및 Y-축 바코드 올리고(Y)가 코드 수용체(130) 내부에서 서로 독립적으로 분산된 상태로 도입된 예를 나타낸 도면이다.

[0076] 다른 예로, 도 10의 (b)에 도시된 바와 같이, X-축 바코드 올리고(X) 및 Y-축 바코드 올리고(Y)가 링커(L)(Linker)를 통해 각각 독립적으로 코드 수용체(130)의 구조에 결합된 예를 나타낸 도면이다. 여기서, 링커(L)는 UV 조사, pH의 조절, 온도 조절, 전압, 전류 등의 외부 자극을 통해 코드 수용체(130)와의 결합이 끊어질 수 있는 소재로 마련되는 것을 예로 한다.

[0077] 도 10의 (b)에 도시된 예의 구현을 위해, 도 7에 도시된 과정에서 X-축 방향으로의 채널(210)로 흘려주는 용액 내에는 링커(L)가 포함될 수 있으며, 마찬가지로, Y-축 방향으로의 채널(210)로 흘려주는 용액 내에도 링커(L)가 포함될 수 있다. 다른 방법으로, DNA 바코드 올리고를 도입하기 전에 미리 링커(L)를 각각의 코드 수용체(130) 내부에 유입시킬 수 있다. 또 다른 예로, 링커(L)가 DNA 바코드 올리고 말단에 부착된 상태로 각각 유입될 수 있다.

[0078] 여기서, 링커(L)는 X-축 바코드 올리고(X) 또는 Y-축 바코드 올리고(Y)를 코드 수용체(130) 구조에 공유 결합(Covalent bond)시키는 것을 예로 한다.

[0079] 또 다른 예로, 도 10의 (c)에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 세트는 링커(L)와, 스플린트(Splint) 올리고(SP)를 더 포함하여 구성될 수 있다. 여기서, 링커(L)는 별도로 도입될 수 있으나, X-축 바코드 올리고(X)의 말단에 결합된 상태로 코드 수용체(130) 내부로 도입될 수 있다.

[0080] 앞서 설명한 바와 같이, 링커(L)는 X-축 바코드 올리고(X)를 코드 수용체(130)에 공유 결합시킨다. 그리고, 스플린트 올리고(Sp)는 Y-축 바코드 올리고(Y)를 X-축 바코드 올리고(X)에 결합시키는데 적용된다. 즉, 스플린트 올리고(Sp)는 Y-축 바코드 올리고(Y)의 말단을 X-축 바코드 올리고(X)의 말단에 가까이 위치시키며, DNA ligase를 추가하게 되면, Y-축 바코드 올리고(Y)와 X-축 바코드 올리고(X)가 결합 가능하게 된다.

[0081] 이를 위해, Y-축 바코드 올리고(Y)를 유동시킬 때 스플린트 올리고(Sp)를 함께 유동시킴으로써, X-축 바코드 올리고(X)와 Y-축 바코드 올리고(Y)가 스플린트(Sp)를 통해 상호 결합 가능하게 된다.

[0082] 여기서, 본 발명의 실시예에서는 X-축 바코드 올리고(X)를 먼저 도입한 후, Y-축 바코드 올리고(Y)를 도입하는 과정을 예로 하고 있어, X-축 바코드 올리고(X)가 링커(L)를 통해 코드 수용체(130) 조직에 결합되고, Y-축 바코드 올리고(Y)가 스플린트(Sp)를 통해 X-축 바코드 올리고(X)와 결합되는 것을 예로 하고 있으나, 그 순서가 바뀔 수 있음은 물론이다.

[0083] 상기와 같은 과정을 통해 형성된 DNA 바코드 장치(100)에, 도 11에 도시된 바와 같이, 생체 조직을 올려놓게 되면, 각각의 DNA 바코드 세트가 해당 위치의 검사 대상 조직(T)에 유입되어 위치 바코드의 위치 정보가 검사 대상 조직(T)의 해당 위치로 유입 가능하게 된다.

[0084] 또 다른 예로, 검사 대상 조직(T)의 mRNA가 확산되어 조직 외부로 나와, 각각의 마이크로 웰(120)로 유입되어 코드 수용체(130) 내부의 DNA 바코드 세트와 결합될 수 있다.

[0085] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 각각의 DNA 바코드 세트는 mRNA 또는 단백질의 발현을 분석하기 위해, 폴리 T-테일(Poly T-tail)을 더 포함하여 구성될 수 있다. 여기서, DNA 바코드 세트의 폴리 T-테일은 DNA 바코드 세트의 말단에 부착되는 것을 예로 한다.

[0086] 그리고, 각각의 DNA 바코드 세트는 검사 대상 조직(T)에 유입되면, 폴리 T-테일(Poly T-tail)이 검사 대상 조직(T)의 mRNA의 폴리 A-테일(Poly A-tail)과 결합하게 된다.

[0087] 이를 통해, 검사 대상 조직(T)에 DNA 바코드 세트가 유입된 후, 검사 대상 조직(T)을 단세포 단위로 분리하여 NGS 분석을 통해 분석하게 되면, 단세포 단위로 분리되더라도 mRNA의 폴리 폴리 A-테일(Poly A-tail)에 폴리 T-테일(Poly T-tail)을 통해 붙은 DNA 바코드 세트의 X-축 바코드 올리고(X) 및 Y-축 바코드 올리고(Y)에 의한 위

치 정보에 기초하여, 해당 세포(또는 핵)의 검사 대상 조작 상에서의 위치를 확인 가능하게 된다.

[0088] 또 다른 예로, 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 세트는 폴리 A-테일(Poly A-tail)을 포함할 수 있다. 여기서, DNA 바코드 세트는 검사 대상 조직(T)에 유입되면, DNA 바코드 세트의 폴리 A-테일(Poly A-tail)이 검사 대상 조직(T)의 mRNA에 대응하게 작동하게 된다.

[0089] 그런 다음, 검사 대상 조직(T)은 단세포 수준으로 분리하고, 앞서 설명한 RT-P5/P7 방법과 동일하게 각 핵을 구분하여 인덱싱한 후 NGS 분석을 통해 분석하게 되면, 위치 정보의 확인 또한 가능하게 된다.

[0090] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 제3의 위치 정보를 갖는 제3 위치 바코드 올리고(S)를 더 포함할 수 있다. 여기서, 제3 위치 바코드 올리고(S)는 기판(110)에 대한 정보를 포함하는 것을 예로 한다.

[0091] 도 12는 X-축 및 Y-축 방향에 대해 대각 방향으로 하나의 제3 위치 바코드 올리고(S)가 도입된 예를 나타낸 것이고, 도 13은 X-축 및 Y-축 방향에 대해 대각 방향 양측으로 2 방향으로 제3 위치 바코드 올리고(S)가 도입된 예를 나타내고 있다.

[0092] 여기서, 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 장치(100)를 이용하여 분석을 진행할 때, 다수의 기판(110)을 이용하여 서로 다른 조직을 검사한 후, 이를 한번에 분석할 때, 각각의 제3 위치 바코드 올리고(S)의 DNA 바코드 정보를 통해 해당 기판(110)의 종류를 확인할 수 있다.

[0093] 여기서, 하나의 기판(110)에 도입되는 제3 위치 바코드 올리고(S)는 동일한 DNA 바코드 정보를 갖도록 구성될 수 있음은 물론이다.

[0094] 한편, 본 발명의 실시예에서는, 도 7에 도시된 바와 같이, DNA 바코드 올리고를 도입하는데 있어, 다수의 채널(210)이 형성된 미세유동 칩을 이용하는 것을 예로 하였다.

[0095] 다른 예로, 도 14에 도시된 바와 같이, 잉크젯 방식 등을 이용하여, DNA 바코드 올리고를 포함한 용액을 각 위치에 한 방울씩 떨어뜨려 도입할 수 있다. 여기서, 도 14에 도시된 예에서는 X-축 바코드 올리고(X), Y-축 바코드 올리고(Y) 및 제3 위치 바코드 올리고(S)가 도입되는 것을 예로 하고, 상호 간이 일부만 중첩되도록 용액을 떨어뜨린 것을 예로 하고 있으나, 전체가 겹치도록 구성할 수 있음은 물론이다.

[0096] 한편, 본 발명의 실시예에서는 도 15에 도시된 바와 같이, 복수의 마이크로 웰(120) 중 적어도 일부에, 기판(110) 상에서의 위치가 시각적으로 확인 가능하도록 도입되는 형광체(F)를 더 포함하는 것을 예로 한다.

[0097] 도 15에서는 복수의 마이크로 웰(120) 중 가장자리 테두리에 위치하는 마이크로 웰(120)에 형광체(F)가 도입된 것을 예로 하고 있으나, X-축 방향으로 일정 간격으로, 및/또는 Y-축 방향으로 일정 간격으로 형광체(F)가 도입될 수 있다. 여기서, 형광체(F)의 도입은 X-축 바코드 올리고(X) 및 Y-축 바코드 올리고(Y)의 도입 과정에서 함께 도입할 수 있으며, 이 경우, X축 및 Y축 방향으로 바코드 올리고(X,Y)의 위치와 정확히 일치시킬 수 있어 바람직하다.

[0098] 이를 통해, 검사 대상 조직(T)이 기판(110) 위에 어느 위치에 안착되어 있는지를 보다 명확하게 인식 가능하게 된다.

[0099] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 DNA 바코드 장치(100)는, 도 16에 도시된 바와 같이, 기판(110) 상에 검사 대상 조직(T)이 놓일 때, 기판(110)을 사이에 두고 기판(110)의 양측에 인접하게 배치되는 한 쌍의 전극(E1,E2)을 더 포함하여 구성될 수 있다.

[0100] 이를 통해, 한 쌍의 전극(E1,E2)을 통해 전원을 인가하게 되면, 한 쌍의 전극(E1,E2) 사이에 전기장이 형성되고, 전기 이동(electrophoresis) 현상에 따라, 각각의 DNA 바코드 세트가 해당 위치의 검사 대상 조직(T)으로 유입되는 유입력의 제공이 가능하게 된다.

[0101] 따라서, DNA 바코드 세트의 검사 대상 조직(T)으로의 확산 효율을 높힐 수 있어, 보다 정확한 분석이 가능하게 된다.

[0102] 도 15의 미설명 참조번호 P1, P2는 각 전극(E1,E2)을 지지하는 지지판이다.

[0103] 이상, 첨부된 도면을 참조로 하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 제한적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

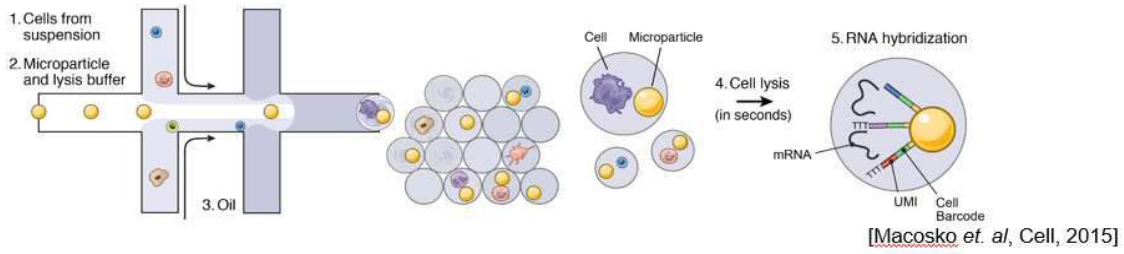
부호의 설명

[0104]

100	: DNA 바코드 장치	110	: 기판
120	: 마이크로 웰	130	: 코드 수용체
200	: 미세유체 칩	210	: 채널
X	: X-축 바코드 올리고	Y	: Y-축 바코드 올리고
C	: 교차 영역	S	: 제3 위치 바코드 올리고
L	: 링커	Sp	: 스플린트
T	: 검사 대상 조직	F	: 형광체
E1,E2	: 전극	P1,P2	: 지지판

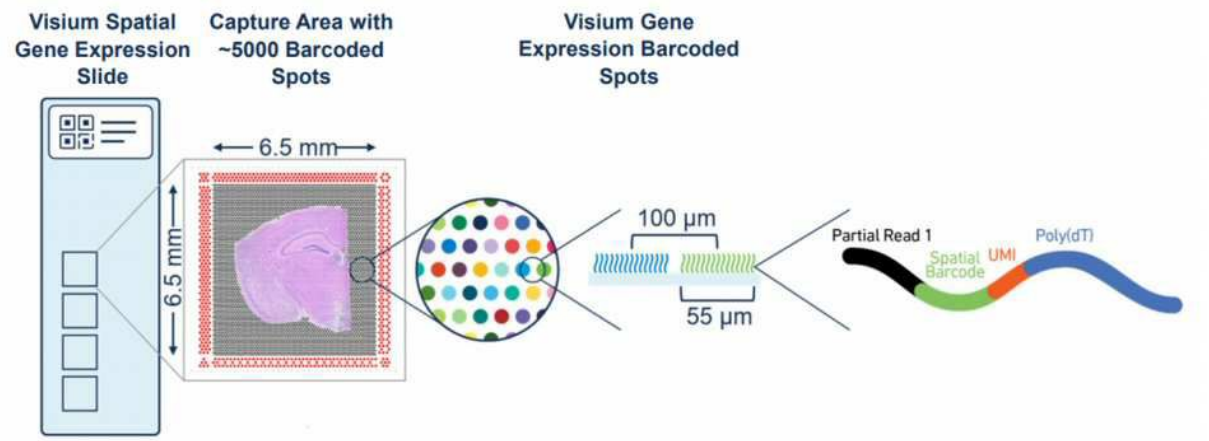
도면

도면1

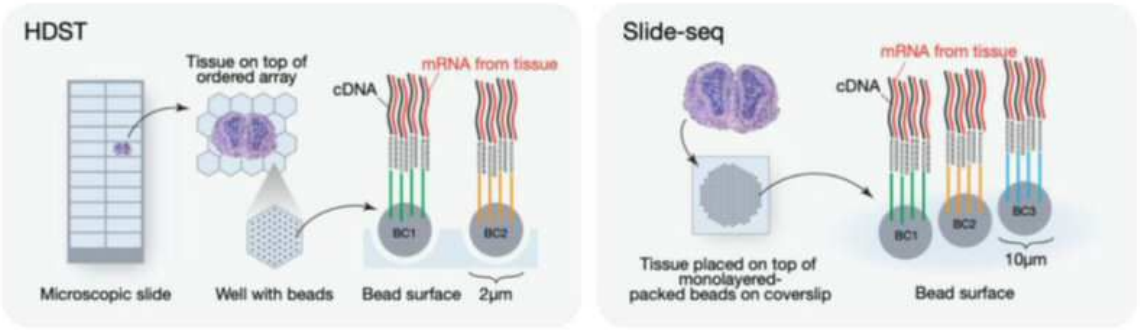


[Macosko *et. al*, Cell, 2015]

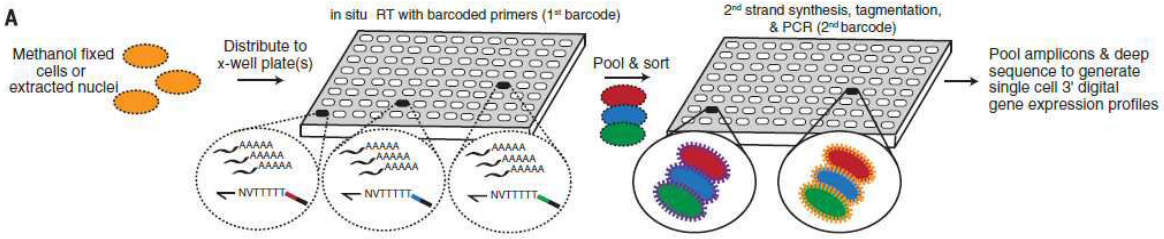
도면2



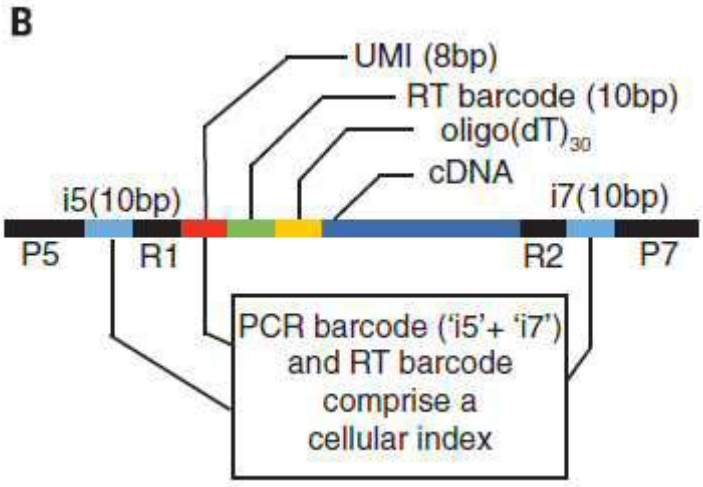
도면3


HDST
Tissue on top of ordered array
cDNA
mRNA from tissue
BC1
BC2
Microscopic slide
Well with beads
Bead surface
2μm
Slide-seq
mRNA from tissue
cDNA
BC1
BC2
BC3
10μm
Tissue placed on top of monolayered-packed beads on coverslip
Bead surface

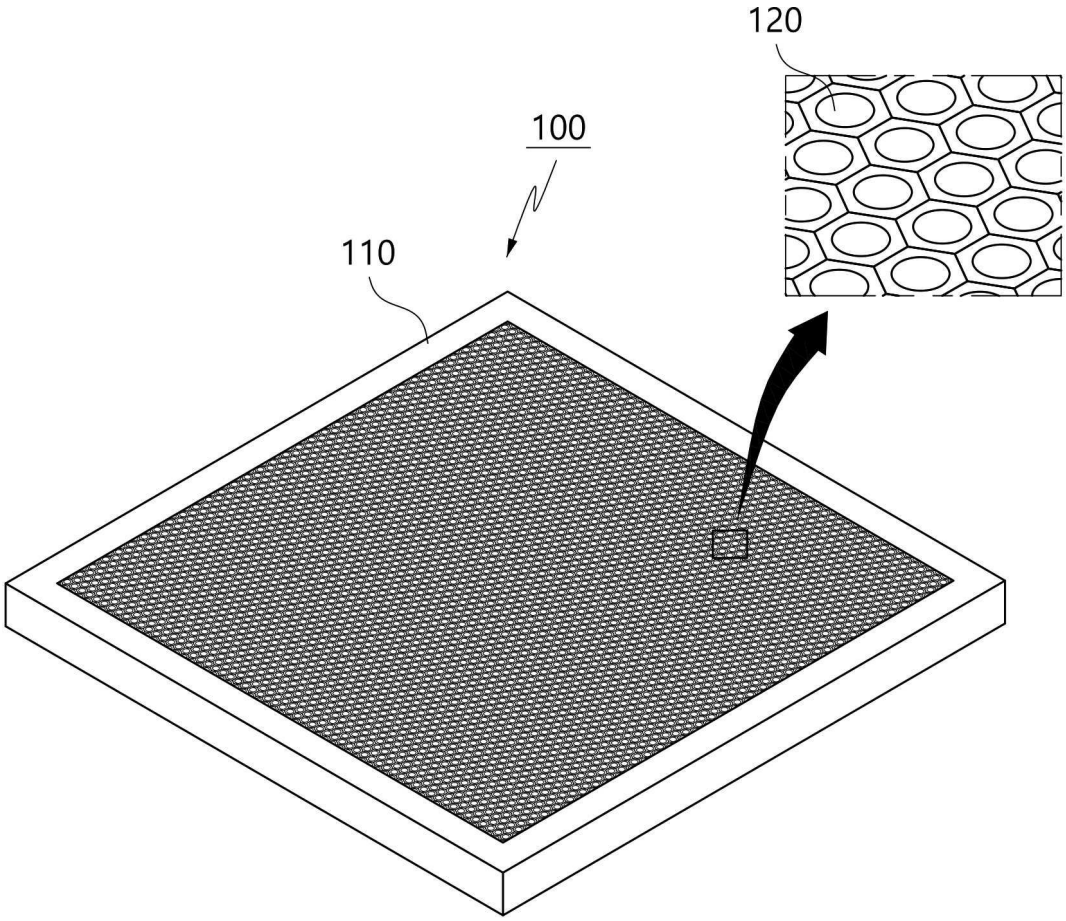
도면4


A
Methanol fixed cells or extracted nuclei
Distribute to x-well plate(s)
in situ RT with barcoded primers (1st barcode)
Pool & sort
2nd strand synthesis, tagmentation, & PCR (2nd barcode)
Pool amplicons & deep sequence to generate single cell 3' digital gene expression profiles
AAAAA
NVTTTTT

도면5

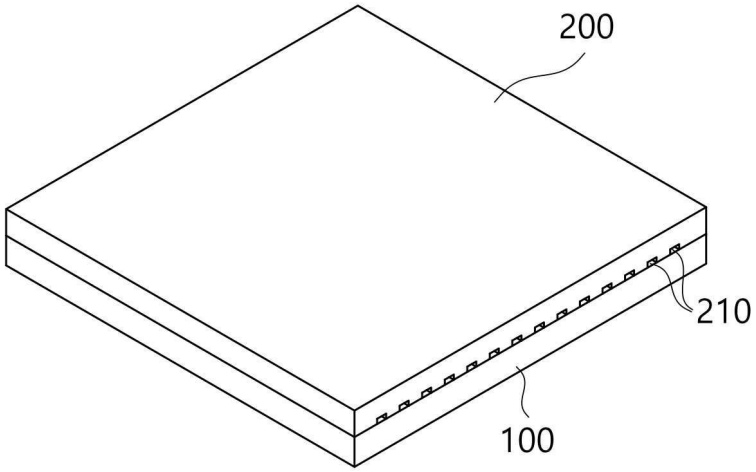

B
UMI (8bp)
RT barcode (10bp)
oligo(dT)30
cDNA
i5(10bp)
i7(10bp)
P5
R1
R2
P7
PCR barcode ('i5'+ 'i7') and RT barcode comprise a cellular index

도면6

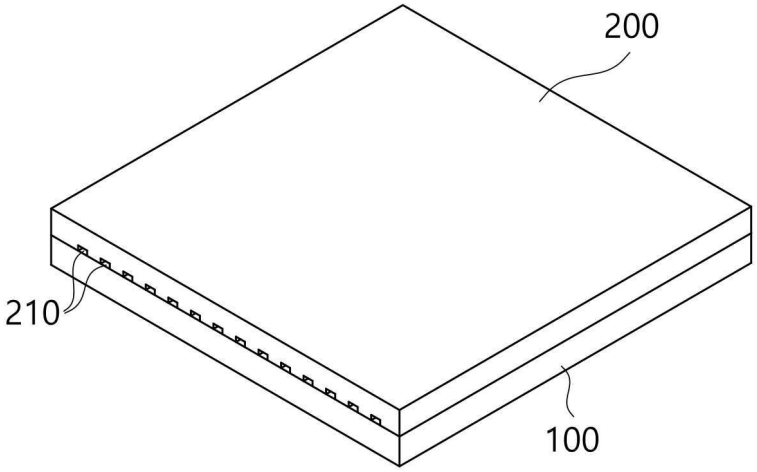


도면7

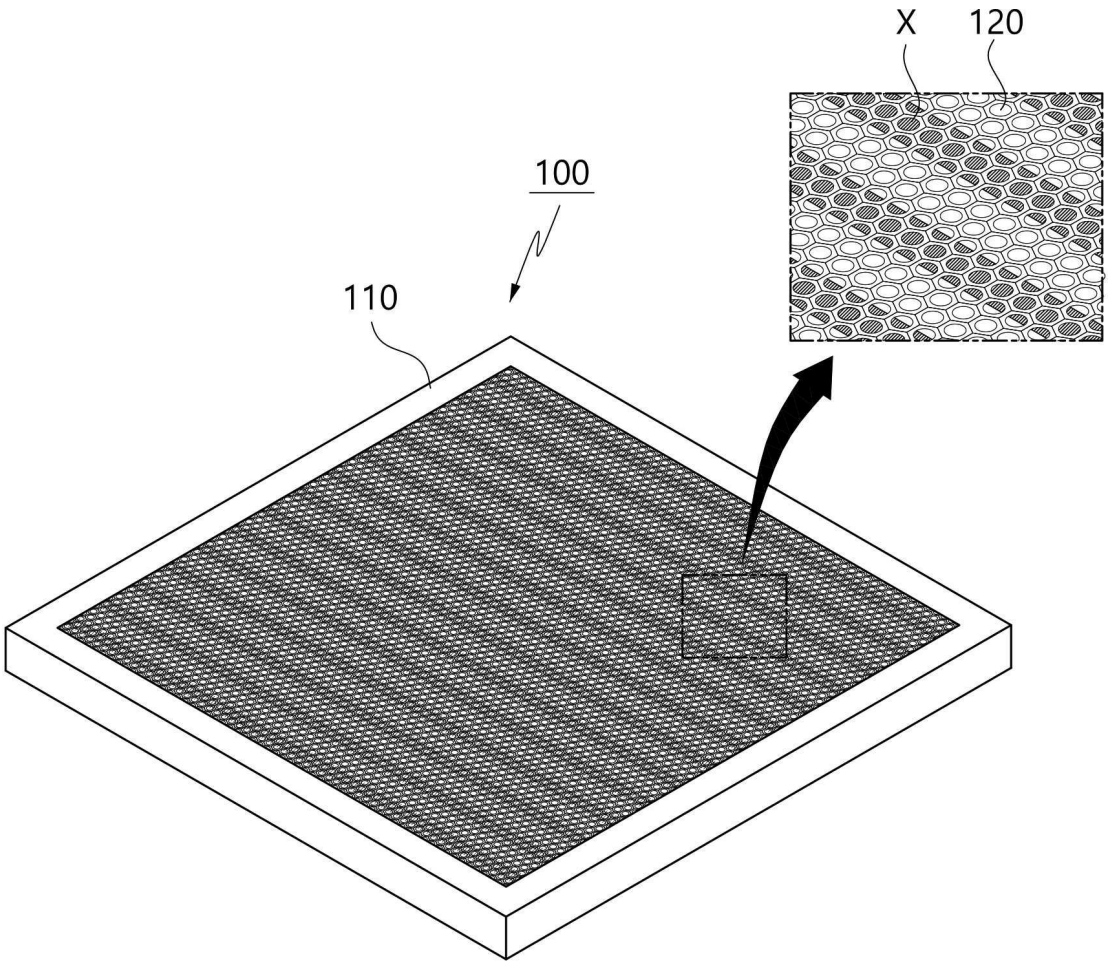
(a)



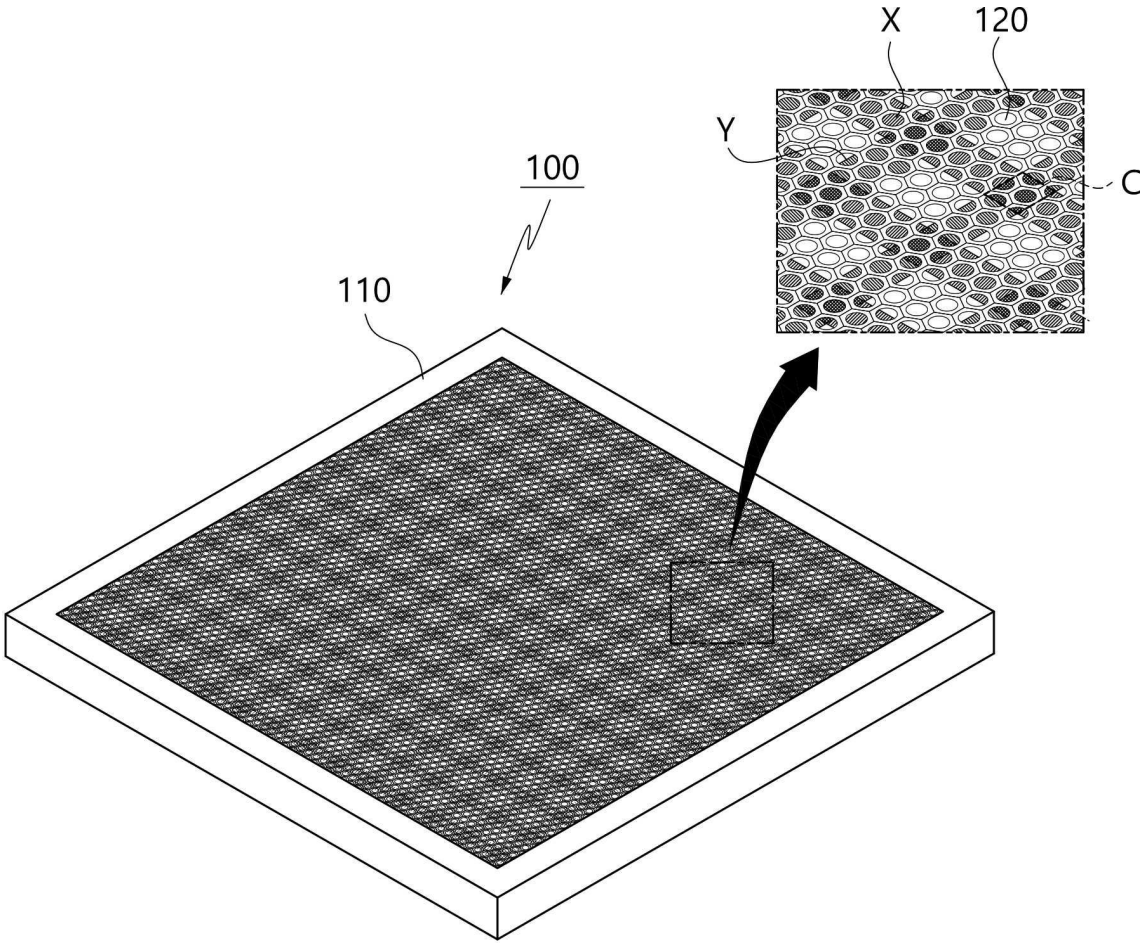
(b)



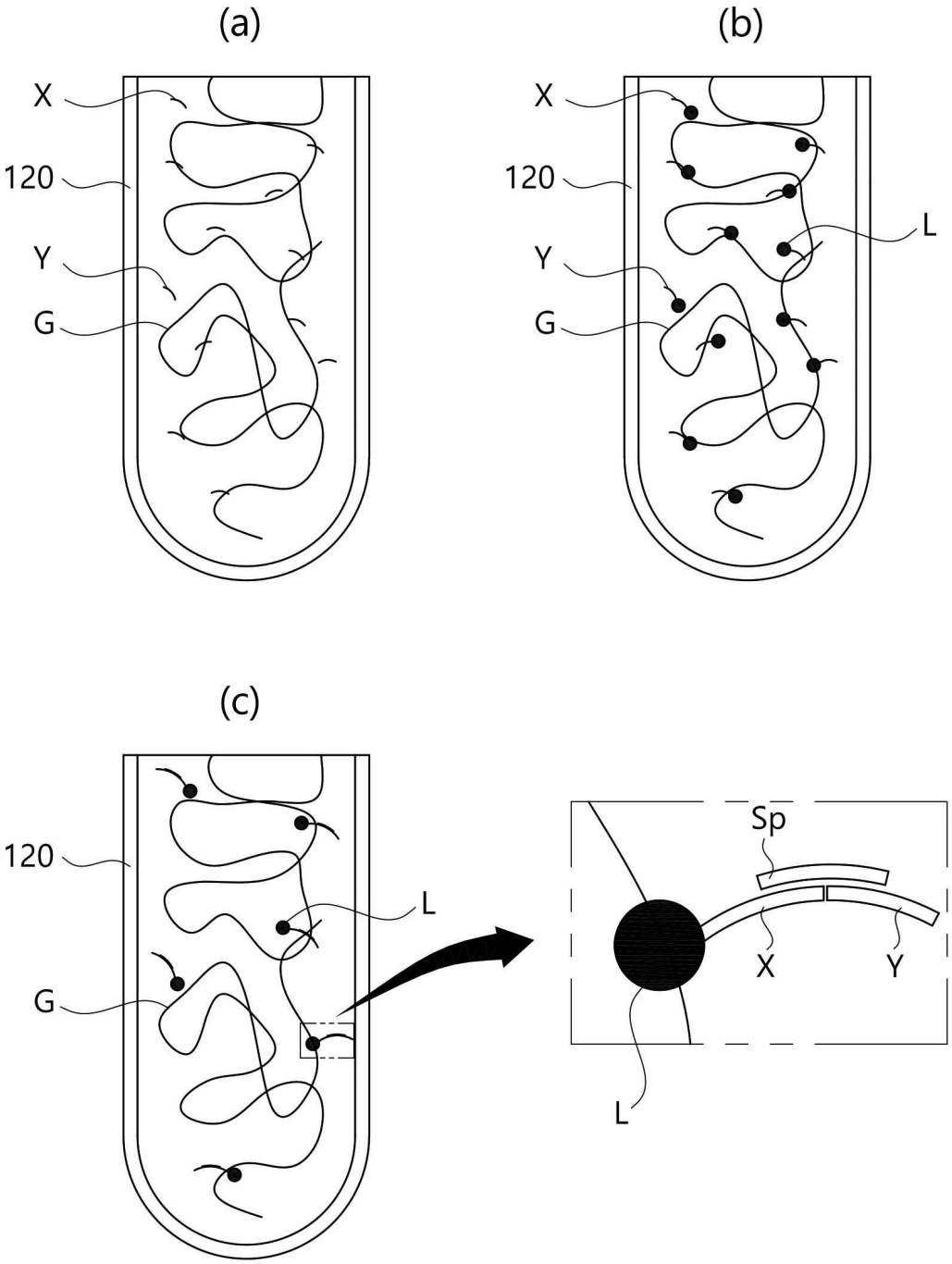
도면8



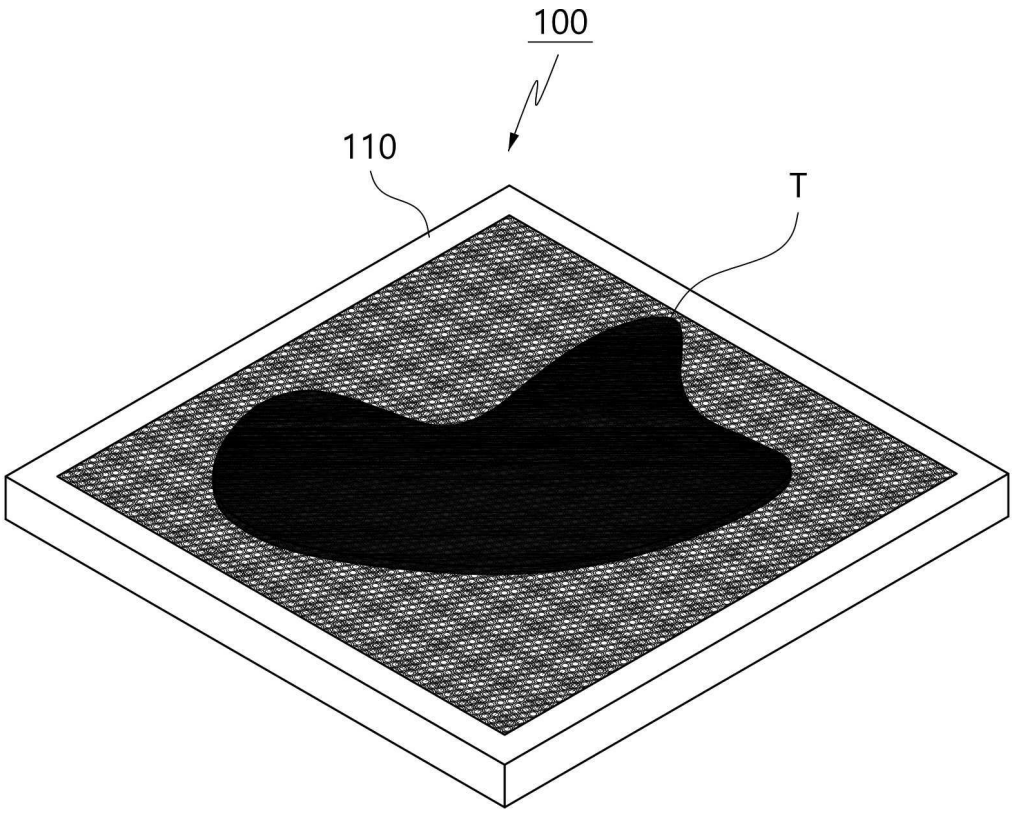
도면9



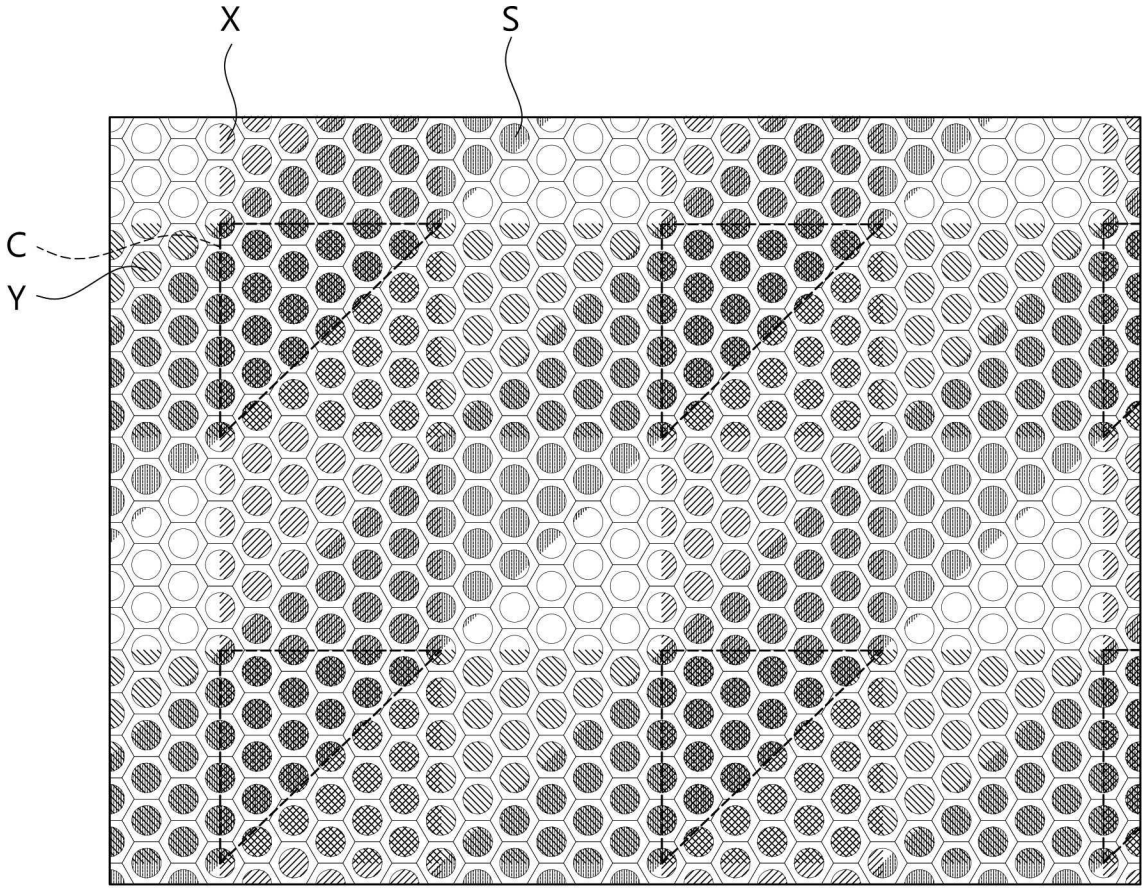
도면10



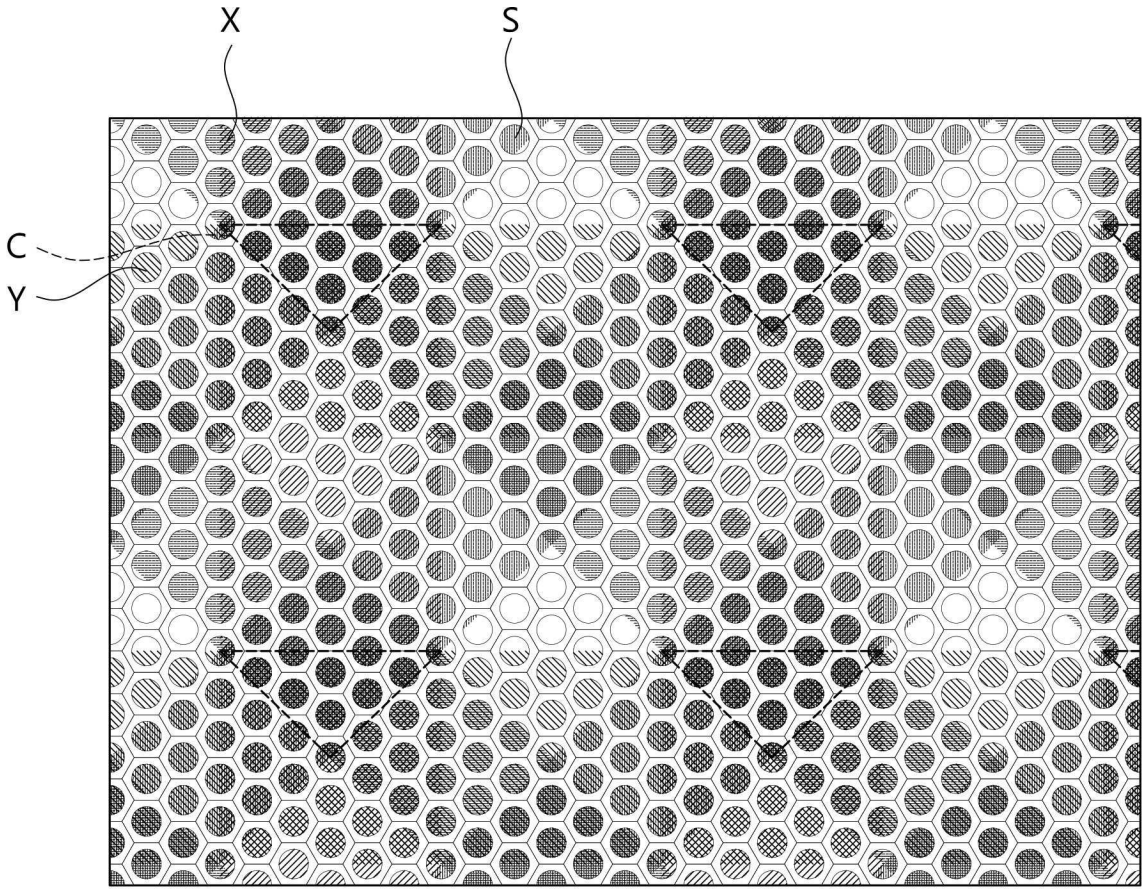
도면11



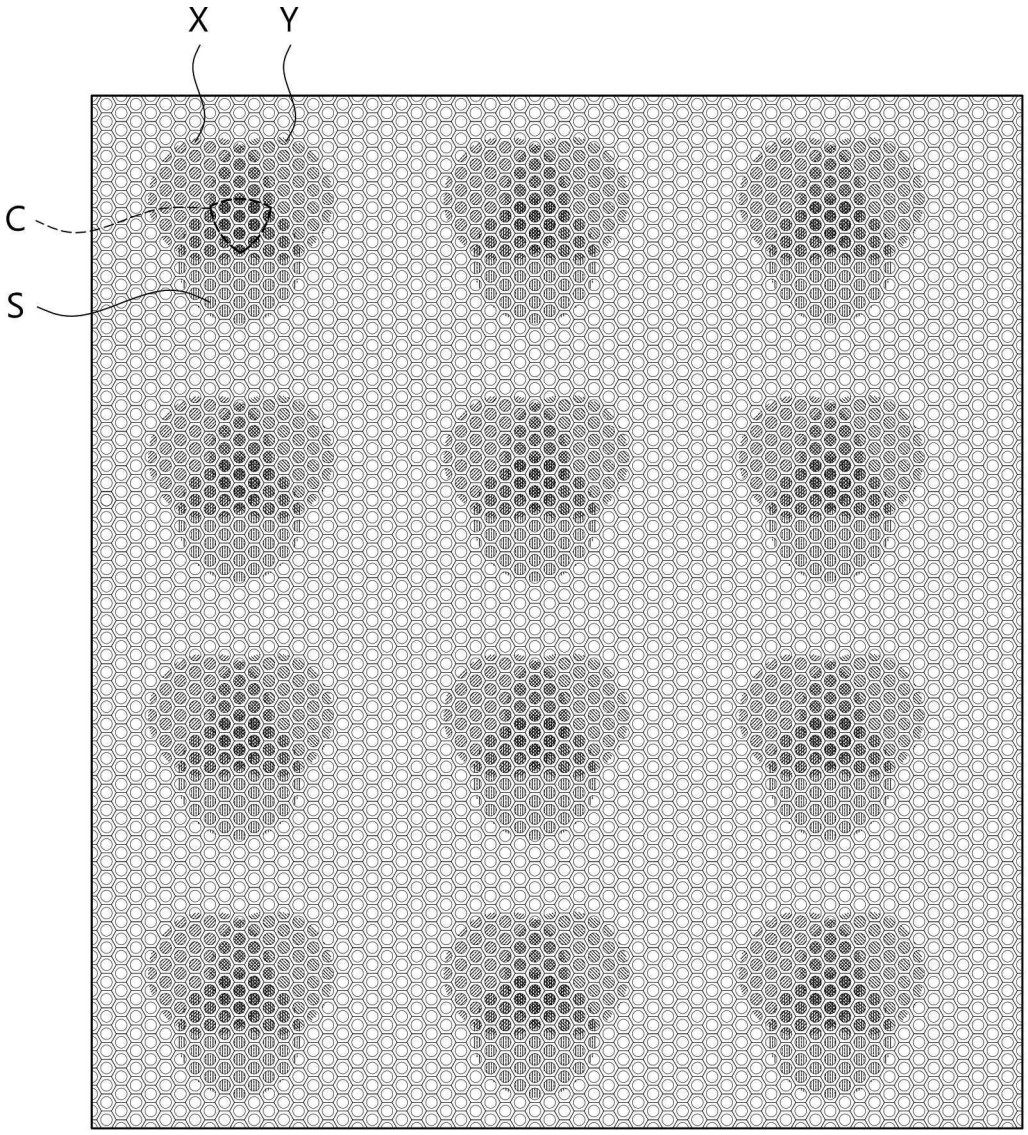
도면12



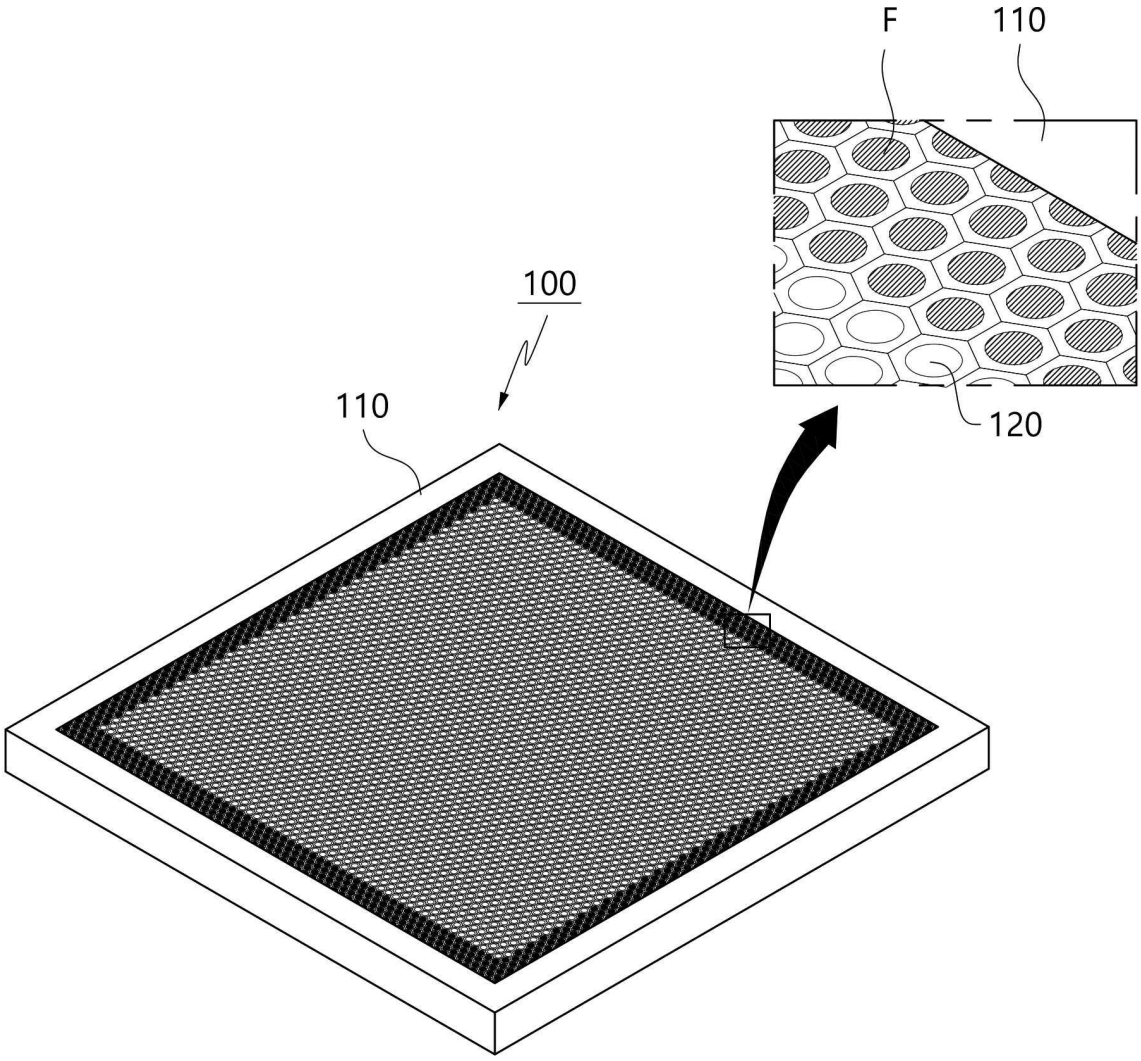
도면13



도면14



도면15



도면16

