



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0081462
(43) 공개일자 2022년06월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B01L 3/02 (2006.01) B01L 9/00 (2006.01)
C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
B01L 3/0293 (2013.01)
B01L 9/52 (2019.08)
(21) 출원번호 10-2020-0170938
(22) 출원일자 2020년12월09일
심사청구일자 2020년12월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
천홍구
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 206동 2101호
(신천동, 파크리오)
(74) 대리인
윤대웅, 특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 11 항

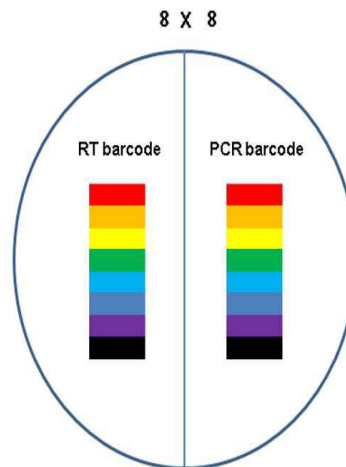
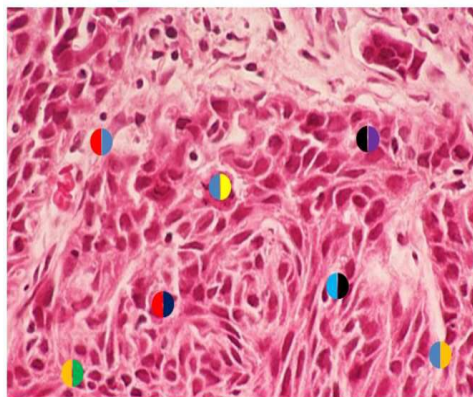
(54) 발명의 명칭 위치기반 단일 세포 유전자 발현 분석 방법 및 장치

(57) 요약

본 발명은 위기기반 세포의 유전자 발현 분석 방법 및 장치에 관한 것으로서, 본 발명은 병렬 액적 분사기를 포함하는 위치기반 세포의 유전자 발현 분석장치를 제공하여 조직 샘플 내에 세포의 위치정보를 포함한 위치기반 세포의 유전자 발현 분석이 가능하고, 종래의 microfluidic, microwell, split-pool 등의 방법과 달리 세포를 물리적으로 분리하여 세포를 정렬하는 과정이 필요치 않은 바 간단하고 빠르게 다중 세포 유전체 프로파일링이 가능하다.

대표도 - 도5

5'- P5 [PCR barcode] [indexing site] [Unique molecular identifiers] [RT barcode] (dT)XXXX...XXXXXXXXXXXX CTGTCCTCTATACATCT CCAGCCGACGAGAC [PCR barcode] P7 - 3'
3'- P5 [PCR barcode] [indexing site] [Unique molecular identifiers] [RT barcode] (pA)BXXX...XXXXXXXXXXXX GACAGAGATATGTGTAGA GGCTCGGGTGCTCTG [PCR barcode] P7 - 5'



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6869 (2018.05)

B01L 2200/0663 (2013.01)

B01L 2200/18 (2013.01)

C12Q 2565/619 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711092930
과제번호	2018M3A9D7079485
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(원천)바이오의료기술개발사업
연구과제명	마이크로비드 기반 초병렬 DNA 어레이 플랫폼을 이용한 전사체-위치정보 복합 염기
서열 분석 기술 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.04.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

조직에 액적을 분사하는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치에 있어서,

조직 샘플 슬라이드를 고정하는 고정부;

고정수단에 의해 슬라이드 상에 조직에 RT 바코드 프라이머 및 PCR 바코드 프라이머 중 적어도 하나를 분사하는 디스펜서;

디스펜서 및 고정수단 중 적어도 하나를 움직이는 이동부;

조직을 촬영하는 이미지촬영부; 그리고,

이미지촬영부에서 촬영한 이미지에 분사되는 RT 바코드 프라이머 및/또는 PCR 바코드 프라이머의 위치를 입력하는 입력부;를 포함하는 조직에 액적을 분사하는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

고정부는

조직이 담긴 슬라이드; 그리고

슬라이드를 고정하는 슬라이드 홀더;를 포함하는 조직에 액적을 분사하는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치.

청구항 3

제1 항에 있어서,

디스펜서는

RT 바코드 프라이머를 분사하는 제1 디스펜서; 그리고

PCR 바코드 프라이머를 분사하는 제2 디스펜서;를 포함하며,

RT 바코드와 PCR 바코드를 모두 분사하는 조직에 액적을 분사하는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

이동부는 X축 및 Y축 이동이 가능한 조직에 액적을 분사하는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치.

청구항 5

(1) 조직 샘플을 고정하는 단계;

(2) 상기 조직 샘플의 2 이상의 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 분사하는 단계;

(3) 상기 조직 샘플의 유전자를 풀링하는 단계; 및

(4) 상기 풀링된 유전자의 서열분석을 수행하는 단계;를 포함하는 위치기반 세포의 유전자 발현 분석 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (1) 단계는 조직 샘플에 메탄올 또는 포름알데히드(formaldehyde)을 처리하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 (2) 단계는 하기 (a) 및 (b) 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법:

(a) 상기 샘플의 2 이상의 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 포함하는 역전사 프라이머(RT 바코드 프라이머)를 분사하는 단계; 및

(b) 상기 각 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 포함하는 유전자 증폭 프라이머(PCR 바코드 프라이머)를 분사하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (b) 단계의 PCR 바코드 프라이머는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 RT 바코드 프라이머 또는 PCR 바코드 프라이머는 1~100 pL 분사하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 RT 바코드 프라이머 또는 PCR 바코드 프라이머가 분사되는 영역의 직경은 1~99 μm 인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제5항에 있어서,

상기 RT 바코드 프라이머 또는 PCR 바코드 프라이머의 분사는 압전 또는 열전사 액적 분사기를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 위치기반 세포의 유전자 발현 분석용 액적분사기와 이를 이용하여 조직 샘플 내의 세포의 위치 정보를 포함하는 위치기반 세포의 유전자 발현 분석 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명체에 대한 DNA 염기서열 분석 및 유전자 해독 등 다양한 정보 수집하는 도구의 개발이 이루어지면서 시스템 생물학에 대한 접근이 시작되었다. 이는 다양한 생체 기능을 이해함에 있어 구성 세포의 기능을 결정짓는 동역학 특성을 분석하고 복잡한 상호작용을 밝혀내는데 필수적이다.

[0003] 세포간의 가변성은 단일 세포의 기능 및 환경을 적응하는데 사용하는 역동적인 분자 메커니즘을 해결하는 통로를 제공한다. 이를 위해서는 단일 mRNA와 단백질 분자를 정량화하고 추적하는 기술 개발이 필요하다. 예를 들어, 세포의 이질성은 세포 분화가 생존을 보장하는 후생 동물에서 유전자 조절의 복잡한 모델링을 증가시킨다. 단일 세포 분야의 연구는 FACS (Fluorescence-activated cell sorting), 단일 세포 RNA 시퀀싱 (scRNA-seq) 및 형광 현미경 검사의 세 가지 방법이 많이 개발되어 활용되고 있다.

[0004] 기존의 벌크 측정과 달리 단일 세포 RNA 시퀀싱(scRNA-seq)은 개별 세포의 전사체 분석을 가능하게 하여 종양 이질성(heterogeneity)과 같은 세포 집단의 변화를 밝혀준다. 대표적으로, Drop-Seq, inDrop 및 10X Genomics Chromium과 같은 플랫폼은 수천 개의 셀에서 높은 처리량의 단일 세포 정보를 제공한다.

[0005] Drop-seq 방법은 미세유체 채널의 droplet에서 세포와 세포분석에 필요한 비드를 1:1 정렬이 필요하고, 하나의 droplet 안에 두개 이상의 세포가 포함되지 않도록 낮은 농도의 세포 이용이 필수적이다. 마찬가지로, microwell을 이용하여 세포와 비드를 1:1 정렬하는 microwell-seq도 각 well에 세포와 비드 1개씩 포함되게 하도록 낮은 농도의 세포 사용이 필요하다. 상기 방법은 낮은 농도의 세포 샘플 제조를 위하여 물리적으로 세포를 조직에서 떼어내야 하고, 이 과정에서 세포의 조직 내에서의 위치 정보 소실이 수반된다.

[0006] 2017년 Jay Shendure에 의해 제시된 split-pool 방법은 조직에서 분리한 세포를 96 well 또는 384 well에 넣고, 각 well에 서로 다른 바코드 프라이머를 혼합하여 이후 바코딩된 세포의 유전 정보를 분석하는 방법으로, 물리적으로 세포를 1개씩 구분할 필요가 없게 되었다. 그러나, split-pool 방법도 FACS 장비를 이용하여 제한된 수의 세포를 well에 넣어야 하는 과정이 필요하고, Drop-seq 및 microwell-seq 방법과 마찬가지로 조직 샘플에서 세포의 위치 정보를 포함하는 분석결과를 얻을 수 없다는 문제가 있다.

[0007] 이에, 본 발명자는 단일 세포 분리의 어려움을 해소하고 분리시 소실되는 세포의 위치정보를 확보하기 위한 방법을 개발하기 위하여 예의연구한 결과 세포의 위치정보를 보존한 상태에서 원하는 지점의 단일 세포 분석 방법과 이를 위한 장치를 완성하게 되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Cao et al., Science 357, 661-667 “Comprehensive single-cell transcriptional profiling of a multicellular organism”

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 조직 내에서 세포의 위치정보를 포함하는 위치기반 세포의 유전자 발현 분석장치와 이를 이용한 위치기반 세포의 유전자 발현 분석 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 조직을 고정하는 고정부; 고정수단에 의해 고정된 조직에 RT 바코드 프라이머 및 PCR 바코드 프라이머 중 적어도 하나를 분사하는 디스펜서; 및 디스펜서 및 고정수단 중 적어도 하나를 움직이는 이동부를 포함하는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예로서, 조직을 촬영하는 이미지촬영부를 추가로 포함할 수 있으며, 이미지촬영부에서 촬영한 이미지에 분사되는 RT 바코드 프라이머 및/또는 PCR 바코드 프라이머의 위치를 입력하는 입력부를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 고정부는 조직이 담긴 슬라이드; 그리고 슬라이드를 고정하는 슬라이드 홀더를 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 디스펜서는 RT 바코드 프라이머를 분사하는 제1 디스펜서; 그리고 PCR 바코드 프라이머를 분사하는 제2 디스펜서를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예로서 상기 이동부는 X축 및 Y축 이동이 가능할 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 위치기반 세포의 유전자 발현 분석 방법을 제공한다:
- [0017] (1) 조직 샘플을 고정(fixation)하는 단계;
- [0018] (2) 상기 조직 샘플의 2 이상의 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 분사하는 단계;
- [0019] (3) 상기 조직 샘플의 유전자를 풀링하는 단계; 및
- [0020] (4) 상기 풀링된 유전자의 서열분석을 수행하는 단계.
- [0021] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (2) 단계는 하기 (a) 및 (b) 단계를 포함할 수 있다:
- [0022] (a) 상기 샘플의 2 이상의 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 포함하는 역전사 프라이머(RT 바코드 프라이머)를 분사하는 단계; 및
- [0023] (b) 상기 각 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 포함하는 유전자 증폭 프라이머(PCR 바코드 프라이머)를 분사하는 단계.
- [0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (b) 단계의 PCR 바코드 프라이머는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (2) 단계에서 분사하는 각 바코드 프라이머의 분사량은 1~100 pL일 수 있고, 분사되는 영역의 직경이 1~99 μm 가 되도록 분압을 조절할 수 있으며, 상기 분사는 압전 또는 열전사 액적 분사기를 이용하여 수행될 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명은 액적 분사기를 포함하는 위치기반 세포의 유전자 발현 분석장치를 제공하여 조직 샘플 내에 세포의 위치정보를 포함한 위치기반 세포의 유전자 발현 분석이 가능하고, 종래의 microfluidic, microwell, split-pool 등의 방법과 달리 세포를 물리적으로 분리하여 세포를 정렬하는 과정이 필요치 않은 바 간단하고 빠르게 다중 세포 유전체 프로파일링이 가능한 장점이 있다. 또한, 본 발명은 조직검사 슬라이드를 그대로 이용할 수 있는 바 조직검사와 본 발명에 의한 분자생물학적 진단과 그 결과를 비교하여 더욱 정밀한 진단 정보를 제공할 수 있다. 아울러, 조직검사 슬라이드의 유전자 분석 데이터 축적을 통해 precision medicine을 더욱 향상시킬 수 있는 새로운 big data를 제공할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 위치기반 단일 세포 유전체 분석 방법에 이용되는 장치의 모식도 이다.
- 도 2는 본 발명의 장치가 포함하는 RT 바코드 분사 헤드와 상기 헤드에 포함된 분사 노즐, 그리고 분사되는 올리고뉴클레오티드 구조의 모식도 이다. RT 바코드 분사 헤드에서 분사되는 올리고뉴클레오티드는 다른 것과 구별되는 유니크 서열(RT 바코드 서열)과 범용적 프라이머 서열(poly (T))을 포함하고, Unique molecular identifiers과 추후 PCR 프라이머가 결합할 annealing site를 포함한다.
- 도 3은 본 발명의 위치기반 단일 세포 유전체 분석 방법에서 RT 바코드 분사에 의해 특정 위치에 세포 유전체가

RT 바코드로 역전사 과정에서 표지되는 과정의 개략도 이다.

도 4는 본 발명의 장치가 포함하는 PCR 바코드 분사 헤드와 상기 헤드에 포함된 분사 노즐, 그리고 분사되는 올리고뉴클레오타이드 구조의 모식도 이다. PCR 바코드 분사 헤드에서 분사되는 올리고뉴클레오타이드는 다른 것과 구별되는 유니크 서열(PCR 바코드 서열)과 프라이머 서열을 포함한다.

도 5는 본 발명 방법에 의해 최종 생산물이 cDNA 증폭 산물의 구조와 상기 증폭 산물의 NGS 수행 결과에 따라, 2개 헤드와 8개 노즐을 갖는 장치에서 복수 개의 세포를 위치 정보를 포함한 유전체 분석 결과 획득 원리를 간단하게 나타낸 그림이다.

도 6은 본 발명 장치가 3개 헤드와 8개 노즐을 갖는 경우 분석가능한 세포의 수를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

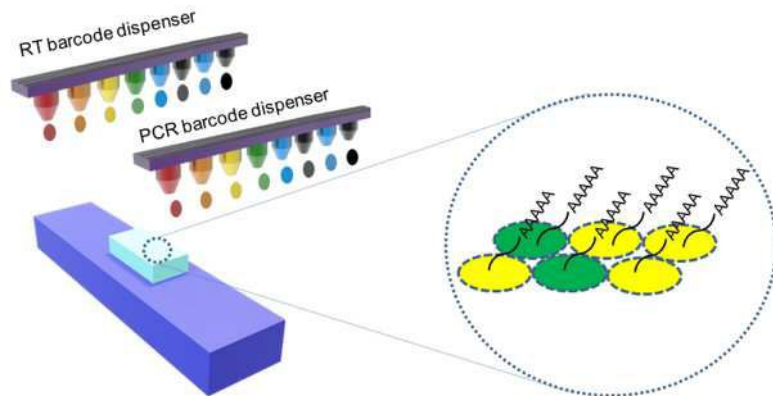
- [0030] 현재까지 개발된 단일세포 유전체 분석 (single cell transcriptome analysis) 방법들은 droplet 1개에 세포 1개와 세포로부터 분출된 RNA를 포획하기 위한 solid support가 위치되도록 하는데, 이 과정을 통해 각각의 세포들에 대한 위치정보를 손실하게 된다. 한편, 조직 세포의 위치에 따른 유전자 발현 정보 차이 분석 기술로서 Spatial transcriptome analysis이 개발되었으나, 이는 단일 세포 수준의 유전자 발현 정보 차이를 분석할 수 없음에 한계가 있다. 이에, 본 발명자들은 조직 샘플 내에서 위치 정보를 포함한 단일 세포의 유전체 분석 결과를 획득할 수 있는 방법에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.
- [0031] 구체적으로, 본 발명의 위치기반 단일 세포 분석 방법은 하기의 단계를 포함한다:
- [0032] (1) 조직 샘플을 고정하는 단계;
- [0033] (2) 상기 조직 샘플의 2 이상의 위치에 서로 구별되는 염기 서열로 이루어진 바코드를 분사하는 단계;
- [0034] (3) 상기 조직 샘플의 유전자를 풀링(pooling)하는 단계; 및
- [0035] (4) 상기 풀링된 유전자의 서열분석을 수행하는 단계.
- [0036] 세포의 분리 작업 없이, 슬라이드 상에 조직 샘플에서 2 이상의 특정 위치에 세포를 표지하기 위해 각 위치마다 서로 다른 바코드 서열을 포함하는 프라이머를 분사한다. 이때 세포 내부의 전사체(mRNA)가 상기 프라이머와 상보적인 결합을 할 수 있도록 조직을 고정한다.
- [0037] 상기 (2) 단계에서 수행되는 바코드의 분사는 조직 샘플에 직접 분사하는 것으로서 최소 분사 액적을 2pL로 하고, 분사 영역의 직경을 20 내지 40 μm (바람직하게는 30 μm)가 되도록 조절하여 1종의 바코드가 1개 세포 전사체를 표지할 수 있다. 이때, 조직 샘플과 샘플 내에 바코드 분사 위치는 이미지로 기록되어 최종적으로 획득되는 유전체 분석 결과에 위치 정보를 추가할 수 있다.
- [0038] 상기 (2) 단계와 (3) 단계 사이에는 역전사 및 유전자 증폭 단계가 위치하여 (3) 단계에서 풀링되는 유전자는 단일 세포의 cDNA이다.
- [0039] 상기 (4) 단계에서 서열 분석은 유전자 증폭 산물을 이용한 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing) 방법을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 방법에 따르면, 위치정보를 포함하는 다중 단일세포 분석이 가능하다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 방법에 이용되는 위치기반세포의 유전자 발현 분석 장치를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 위치기반 세포의 유전체 분석 장치는 조직 샘플 슬라이드를 고정하는 고정부; 고정수단에 의해 슬라이드 상에 조직에 RT 바코드 프라이머 및 PCR 바코드 프라이머 중 적어도 하나를 분사하는 디스펜서; 디스펜서 및 고정수단 중 적어도 하나를 움직이는 이동부; 조직을 촬영하는 이미지촬영부; 그리고, 이미지촬영부에서 촬영한 이미지에 분사되는 RT 바코드 프라이머 및/또는 PCR 바코드 프라이머의 위치를 입력하는 입력부;를 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 디스펜서는 각각 독립적으로 X축 및 Y축 이동이 가능한 2개 이상의 분사 헤드를 포함할 수 있고, 상기 분사 헤드는 RT 바코드 프라이머 분사 헤드 및 PCR 바코드 프라이머 분사 헤드로 구분될 수 있다. 상기 각 헤드는 복수 개의 분사 노즐을 포함하고, 각 분사 노즐은 서로 구별되는 바코드를 분사할 수 있다.
- [0044] 상기 장치는 조직의 슬라이드 글라스 샘플을 고정할 수 있는 슬라이드 홀더(slide holder)를 포함하며, 상기 헤

드는 상기 분사 노즐이 슬라이드 상에 조직 샘플에 분사될 수 있도록 이동할 수 있고, 상기 장치는 조직의 이미지를 촬영하는 촬영장치를 추가로 포함할 수 있다. 각 노즐의 바코드 분사 위치는 촬영된 조직의 이미지 상에서 특정할 수 있도록 신호 입력 및 출력 장치를 추가로 포함할 수 있다.

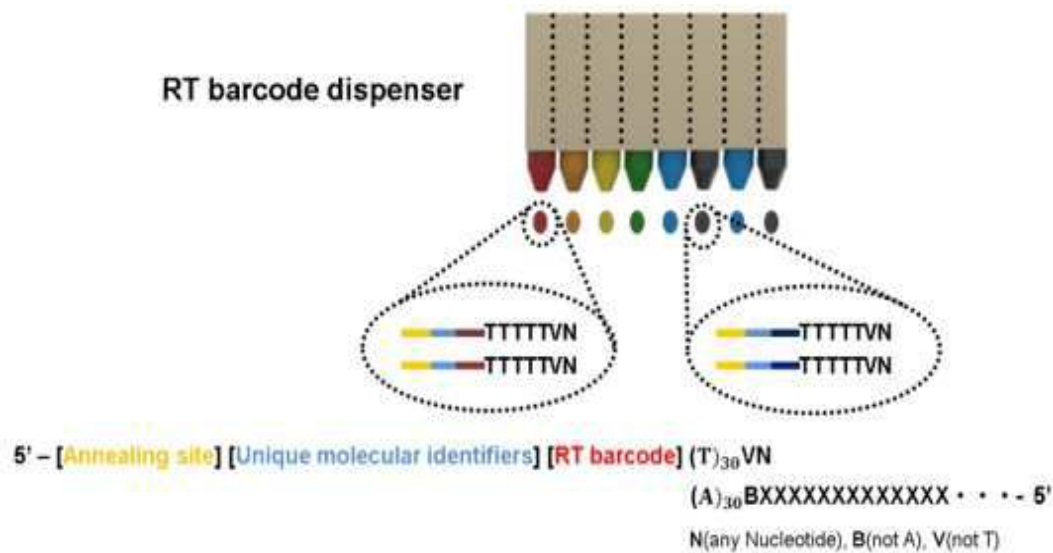
- [0045] 상기 장치에서 2 이상의 노즐은 서로 구분되는 염기서열로 이루어진 바코드를 분사하고, 각 바코드와 노즐의 위치, 및 조직 샘플 상에서 바코드가 분사되는 위치를 매칭할 수 있는 기록매체가 상기 장치에 추가로 포함될 수 있다.
- [0046] 이때 장치에서 바코드의 분사 형태는 열전사 및 압전 등의 방법을 이용할 수 있으나, μL 단위로 바코드를 분사할 수 있고 $\pm 1.5 \mu\text{m}$ 의 정확도를 나타내는 방법이라면 제한되지 아니한다.
- [0047] 상기 장치에 포함된 헤드와 노즐의 개수에 따라서 한꺼번에 유전체 분석을 수행할 수 있는 세포의 개수가 결정된다. 예를 들어, 상기 헤드가 2개, 각 헤드에 포함된 노즐이 8개라면 최대 8^2 개의 세포의 유전체 분석 결과를 위치정보와 함께 획득할 수 있다(도 5).
- [0048] 본 발명의 장치는 2개 이상의 헤드를 포함할 수 있는데, 가령 헤드가 3개 이고 각 헤드에 포함된 노즐이 8개라면 최대 8^3 개의 단일 세포 유전체 분석 결과를 위치정보와 함께 획득할 수 있다(도 6).
- [0049] 한편, 본 발명의 장치는 1개의 RT 바코드 프라이머 디스펜서 및 2개의 PCR 바코드 프라이머 디스펜서를 포함할 수 있고, 상기 2개의 PCR 바코드 디스펜서는 각각 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 분사하고, 상기 각 프라이머는 서로 구별되는 바코드 서열과 연결되어 특정 영역의 세포의 위치기반 단일세포 분석을 수행할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 각 분사 노즐에 offset을 미세하게 주어 노즐에서 분사되는 droplet이 서로 완전하게 겹치지 않도록 하고, 3개 노즐에서 분사된 바코드를 모두 포함하는 유전체 분석 프로파일을 채택함으로써 '단일' 세포 분석을 수행하는 것을 보다 확실하게 할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 "바코드(barcode)"란 복수 개의 세포를 풀링한 이후에 확보되는 유전자 발현 분석 결과에서 전사체(mRNA)의 기원 세포를 구분하기 위한 3~22nt 길이의 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드이다. 한편, 상기 장치의 각 노즐을 통해 분사되는 바코드와 상기 방법에서 분사하는 각 바코드는 서로 상이한 염기서열을 가지며, 각 각 역전사 또는 유전자 증폭에 프라이머로 이용하기 위한 범용적 서열을 포함한다.
- [0052] 즉, 본 발명은 슬라이드 상에 조직샘플의 특정 위치에 바코드로 이용되는 유니크한 서열(이하 '바코드 서열'이라고 함)과 프라이머로 기능하는 서열(이하 '프라이머 서열'이라고 함)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 분사하여 역전사 및 유전자 증폭 과정을 수행한 후 단일세포에서 유전자 발현 프로파일을 제작할 수 있다. 이에, 본 명세서에서는 편의상 상기 바코드 서열과 프라이머 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 RT 바코드, PCR 바코드, 바코드 프라이머, 역전사 프라이머, 또는 유전자 증폭 프라이머 용어와 혼용될 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 RT 바코드를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 세포 내의 모든 전사체(또는 역전사체: cDNA)와 상보적인 결합을 할 수 있는 범용적 프라이머 서열을 포함하고 있고, 상기 범용적 프라이머 서열은 모든 mRNA가 가지는 poly (A) tail과 상보적인 poly (T) 서열을 의미한다. 이때, poly (T) 서열의 길이는 역전사 및 유전자 증폭 과정을 수행할 수 있을 정도라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 20~40 nt, 더욱 바람직하게는 30nt 일 수 있다.
- [0054] 또한, 상기 RT 바코드를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 유전자 증폭시 프라이머가 결합할 annealing site를 포함한다. 따라서, PCR 프라이머는 상기 annealing site와 상보적인 서열로 이루어지고, 추후 유전체가 기원되는 세포를 구분하기 위한 PCR 바코드 서열이 연결된다.
- [0056] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

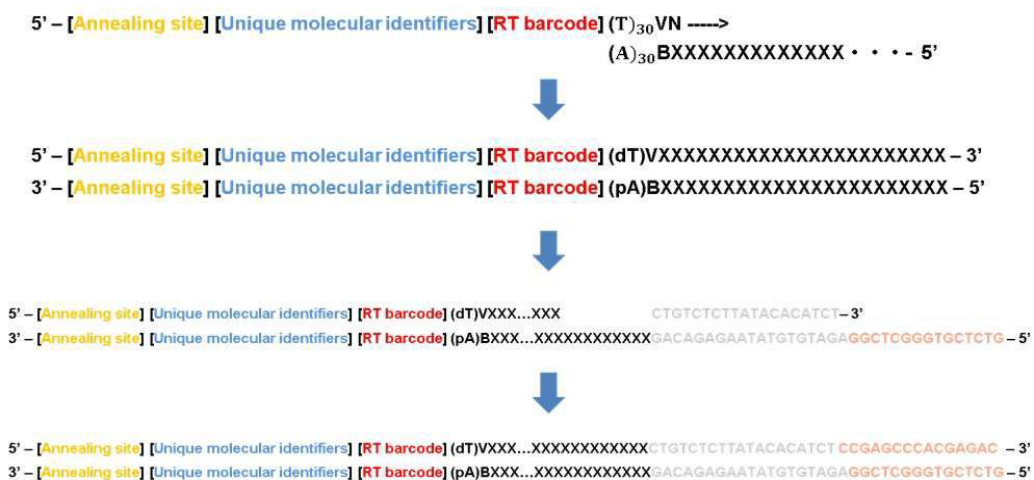
도면1



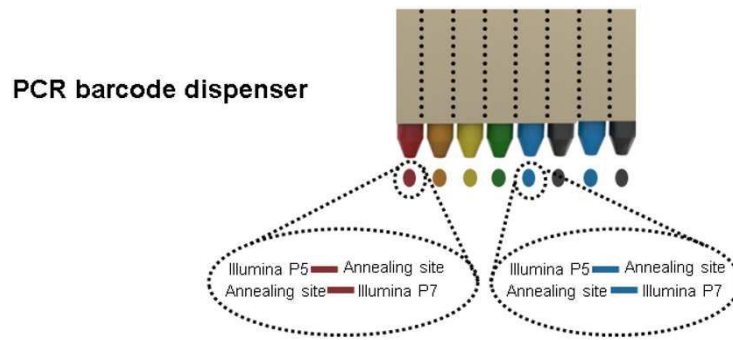
도면2



도면3



도면4

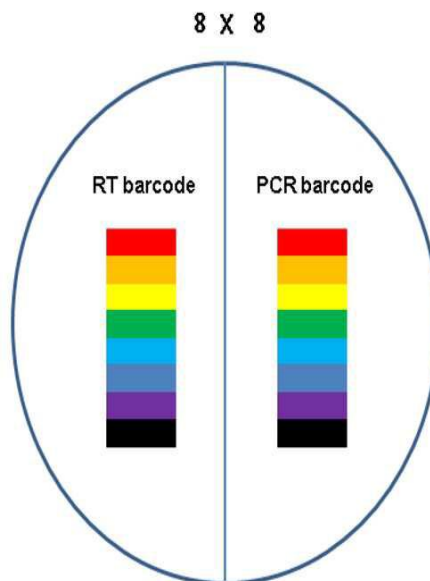
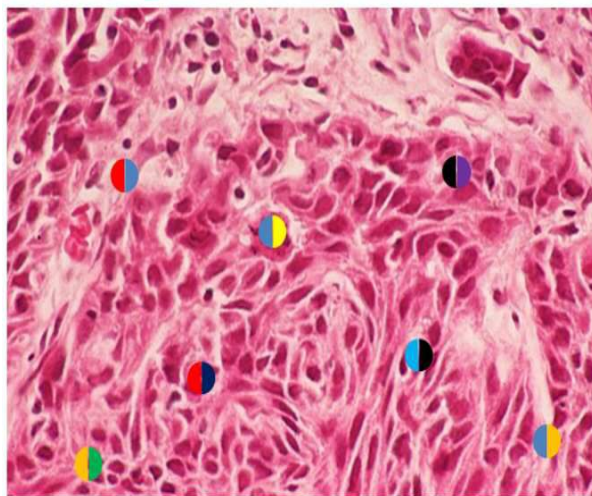


P5 PCR barcode Annealing site -->-->

5' - [Annealing site] [Unique molecular identifiers] [RT barcode] (dT)VXXX...XXXXXXXXXXXX CTGTCTTATACATCT CCGAGCCACGAGAC - 3'
3' - [Annealing site] [Unique molecular identifiers] [RT barcode] (pA)BXXX...XXXXXXXXXXXX GACAGAGAATATGTGTAGA GGCTCGGGTGCTCTG - 5'
<- <- <- Annealing site PCR barcode P7

도면5

5' - P5 [PCR barcode] [Annealing site] [Unique molecular identifiers] [RT barcode] (dT)VXXX...XXXXXXXXXXXX CTGTCTTATACATCT CCGAGCCACGAGAC [PCR barcode] P7 - 3'
3' - P5 [PCR barcode] [Annealing site] [Unique molecular identifiers] [RT barcode] (pA)BXXX...XXXXXXXXXXXX GACAGAGAATATGTGTAGA GGCTCGGGTGCTCTG [PCR barcode] P7 - 5'



도면6

