



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0087749
(43) 공개일자 2016년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12M 3/00 (2006.01) *B01L 3/00* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12M 23/44 (2013.01)
B01L 3/502715 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7032933

(22) 출원일자(국제) 2014년04월18일

심사청구일자 **없음**

(85) 번역문제출일자 2015년11월18일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/034728

(87) 국제공개번호 WO 2014/172688

국제공개일자 2014년10월23일

(30) 우선권주장

61/814,090 2013년04월19일 미국(US)

61/903,156 2013년11월12일 미국(US)

(71) 출원인

캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지

미국 캘리포니아주 91125 패사데나 엠씨 210-85
이스트 캘리포니아 불바드 1200

더 유니버시티 오브 시카고

미국 일리노이 60637 시카고 5801 사우스 엘리스
애비뉴

(72) 발명자

판, 치차오

중국 200126 상하이 26#601 창리 로드 농 80

카리모브, 마카일

미국 91702 캘리포니아주 아주사 #19 이 애로우
하이웨이 543

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 김영

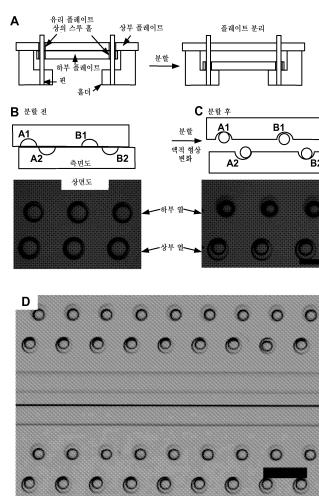
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 **병렬화된 샘플 취급**

(57) 요 약

본원에서는 샘플, 예컨대 세포 또는 다른 생물학적 샘플의 병렬적 취급을 위한 방법, 조성물 및 장치가 제공된다. 상기 방법, 조성물 및 장치는 샘플의 유전적 및 기능적 검정을 포함하는 다중 수준의 분석에 적합하다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12M 23/46 (2013.01)
C12M 25/06 (2013.01)
C12M 41/46 (2013.01)
C12Q 1/02 (2013.01)
C12Q 1/025 (2013.01)
C12Q 1/686 (2013.01)
G01N 35/00029 (2013.01)
B01L 2300/045 (2013.01)
G01N 2035/00158 (2013.01)

(72) 발명자

후인, 토안

미국 94041 캘리포니아주 마운틴 뷰 아파트먼트 11
치키타 애비뉴 490

사위키, 조지

미국 60637 일리노이주 시카고 아파트먼트 3009 이
스트 피프티식스쓰 스트리트 1700

베글로, 스테파노

미국 90292 캘리포니아주 마리나 텔 레이 #139 마
리나 포인테 드라이브 13701

두, 웬빈

중국 100101 차오양 디스트릭트 2에이-301 안리 가
든 넘버 66 안리 로드

이스마기로브, 루스템, 에프.

미국 91125 캘리포니아주 알타데나 모슬레이 로드
2397

마, 리양

미국 91106 캘리포니아주 파사데나 아파트먼트 비
노쓰 헬 애비뉴 86

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 제1 샘플을 포함하며 제2 기질에 의해 커버되는 제1 한정된 부피를 포함하는 기질을 제공하는 단계;
- (b) 제2 샘플을 포함하며 제1 기질에 의해 커버되는 제2 한정된 부피를 포함하는 제2 기질을 제공하는 단계;
- (c) 상기 제1 기질을 상기 제2 기질로부터 분리함으로써, 상기 제2 기질이 상기 제1 한정된 부피를 커버하는 것을 중단시키고, 상기 제1 기질이 상기 제2 한정된 부피를 커버하는 것을 중단시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 샘플이 겔화제를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2 샘플이 겔화제를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분리가 중력에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 분리가 모세관 압력에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 분리가 인가된 힘에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 분리가 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질이 액체에 침지되는 동안 일어나는 것인 방법.

청구항 9

- (a) 제1 한정된 부피를 포함하는 제1 기질을 제공하는 단계;
- (b) 제2 한정된 부피를 포함하며 상기 제1 기질에 커플링된 제2 기질을 제공하는 단계;
- (c) 샘플을 상기 제1 한정된 부피 내로 적하하는 단계;
- (d) 상기 제1 한정된 부피의 내용물을 상기 제2 한정된 부피에 유입시킴으로써 조합된 샘플을 생성하는 단계;
- (e) 상기 제1 기질을 상기 제2 기질로부터 탈커플링시키고, 여기서 상기 조합된 샘플의 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있고, 상기 조합된 샘플의 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있는 것인 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 탈커플링 전에 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피로부터 분리하는 것을 추가로 포함하며, 상기 조합된 샘플의 상기 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 조합된 샘플의 상기 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 제1 기질은 상기 제2 기질에 커플링되어 남아있

는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피와 유체 접촉시키는 것이 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 제1 한정된 부피 및 상기 제2 한정된 부피를 인덱싱하기 위한 플레이트를 포함하는 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 탈커플링이 중력에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 탈커플링이 모세관 압력에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 탈커플링이 인가된 힘에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질이 액체에 침지되는 동안 일어나는 것인 방법.

청구항 18

- (a) 제1 한정된 부피를 포함하는 제1 기질을 제공하는 단계;
- (b) 제2 한정된 부피를 포함하며 상기 제1 기질에 커플링된 제2 기질을 제공하는 단계;
- (c) 제1 샘플을 상기 제1 한정된 부피 내로 적하하는 단계;
- (d) 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피와 유체 접촉시키고, 여기서 상기 제1 기질은 상기 제2 기질에 커플링되어 남아있는 것인 단계;
- (e) 상기 제1 한정된 부피의 내용물을 상기 제2 한정된 부피의 내용물과 혼합함으로써 혼합된 샘플을 생성하는 단계;
- (f) 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피로부터 분리하고, 여기서 상기 혼합된 샘플의 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 혼합된 샘플의 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 제1 기질은 상기 제2 기질에 커플링되어 남아있는 것인 단계;
- (g) 상기 제1 기질을 상기 제2 기질로부터 탈커플링시키고, 여기서 상기 혼합된 샘플의 상기 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있고, 상기 혼합된 샘플의 상기 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있는 것인 단계를 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 혼합된 샘플이 젤화제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 혼합이 확산을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 혼합이 초음파처리를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피와 유체 접촉시키는 것이 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 24

제18항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행되는 것인 방법.

청구항 25

제18항에 있어서, 상기 탈커플링이 중력에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 26

제18항에 있어서, 상기 탈커플링이 모세관 압력에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 27

제18항에 있어서, 상기 탈커플링이 인가된 힘에 의해 일어나는 것인 방법.

청구항 28

제18항에 있어서, 상기 탈커플링이 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질이 액체에 침지되는 동안 일어나는 것인 방법.

청구항 29

- (a) 제1 한정된 부피 및 채널을 포함하는 제1 기질;
- (b) 제2 한정된 부피를 포함하며 상기 제1 기질에 커플링된 제2 기질; 및
- (c) 상기 제1 기질과 상기 제2 기질 사이에 배치된 불혼화성 유체 층을 포함하는 장치.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 채널에 함유된 기체가 상기 불혼화성 유체 층을 통한 확산에 의해 상기 제1 한정된 부피 및 상기 제2 한정된 부피에 유입되는 것인 장치.

청구항 31

제29항에 있어서, 상기 채널에 함유된 기체가 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질을 통한 확산에 의해 상기 제1 한정된 부피 및 상기 제2 한정된 부피에 유입되는 것인 장치.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 제2 기질이 채널을 추가로 포함하는 것인 장치.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 제1 기질과 상기 제2 기질 사이에 위치한 상기 제1 기질 상에 설치된 포스트를 추가로 포함하는 장치.

청구항 34

제29항에 있어서, 상기 제1 기질과 상기 제2 기질 사이에 위치한 상기 제2 기질 상에 설치된 포스트를 추가로 포함하는 장치.

청구항 35

제29항에 있어서, 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질의 온도 제어를 위한 수단을 추가로 포함하는 장치.

청구항 36

- (a) 샘플을 복수의 한정된 부피 중에 분산시키는 단계;
- (b) 상기 복수의 한정된 부피를 본질적으로 동시에 복수의 제1 딸 부피 및 복수의 매칭된 제2 딸 부피를 포함하는 복수의 매칭된 쌍의 딸 부피로 분할하고, 여기서 상기 분할은 펌핑력을 상기 한정된 부피에 인가하지 않고 수행되는 것인 단계;
- (c) 적어도 하나의 분석을 상기 복수의 상기 제1 딸 부피 상에서 수행하는 단계;
- (d) 상기 분석에 기초하여 상기 복수의 매칭된 제2 딸 부피의 하위세트를 선택하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 상기 분석이 유전자 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 분석이 기능적 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 샘플이 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제36항에 있어서, 상기 샘플이 박테리아 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제36항에 있어서, 상기 샘플이 포유동물 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 42

제36항에 있어서, 상기 샘플이 바이러스를 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제36항에 있어서, 상기 샘플이 핵산을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제36항에 있어서, 상기 샘플이 다중 종의 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제36항에 있어서, 상기 샘플이 항생제를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제36항에 있어서, 상기 샘플이 화학요법제를 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제36항에 있어서, 상기 샘플이 성장 배지를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제36항에 있어서, 상기 샘플이 성장 인자를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제36항에 있어서, 상기 샘플이 억제제를 포함하는 것인 방법.

청구항 50

- (a) 유체를 용기 내로 적하하는 단계;
- (b) 상기 용기 내의 개구를 샘플 유체 부피와 접촉시키는 단계;
- (c) 상기 샘플 유체 부피를 표면 장력에 의해 상기 용기 내의 상기 유체와 합류시켜 합류된 액체 부피를 생성하는 단계;
- (d) 상기 합류된 액체 부피를 상기 용기로부터 배출시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 51

- (a) 하기 프로토콜:
 - (i) 유체를 용기 내로 적하하고;
 - (ii) 상기 용기 내의 개구를 샘플 유체 부피와 접촉시키고;
 - (iii) 상기 샘플 유체 부피를 표면 장력에 의해 상기 용기 내의 상기 유체와 합류시켜 합류된 액체 부피를 생성하고;
 - (iv) 상기 합류된 액체 부피를 상기 용기로부터 배출시키는 것
- 을 자동화된 방식으로 수행할 수 있는 조립체를 포함하는 장치.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 프로토콜이 복수의 샘플 유체 부피에 대해 병렬적으로 수행되는 것인 장치.

청구항 53

제51항에 있어서, 상기 프로토콜이 복수의 샘플 유체 부피에 대해 연속적으로 수행되는 것인 장치.

청구항 54

제51항에 있어서, 상기 샘플 유체 부피의 부피가 5 마이크로리터 이하인 장치.

청구항 55

제51항에 있어서, 상기 샘플 유체 부피의 부피가 100 나노리터 미만인 장치.

청구항 56

- (a) 각각 복수의 샘플 중 하나를 포함하는 복수의 한정된 부피를 제공하는 단계;
- (b) 상기 복수의 샘플을 상기 복수의 한정된 부피로부터 공유된 용기로 수송함으로써 풀링된 샘플을 생성하는 단계;
- (c) 상기 풀링된 샘플 상에서 분석을 수행하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 복수의 한정된 부피가 하나의 기질에 의해 한정되는 것인 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 상기 복수의 한정된 부피가 다중 기질에 의해 한정되는 것인 방법.

청구항 59

제56항에 있어서, 상기 분석이 유전자 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제56항에 있어서, 상기 분석이 기능적 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 61

- (a) 각각 복수의 샘플 중 하나를 포함하는 복수의 한정된 부피를 제공하는 단계;
- (b) 상기 복수의 샘플을 조건의 세트로 처리하는 단계;
- (c) 상기 복수의 샘플 상에서 공정을 수행하는 단계;
- (d) 상기 복수의 샘플을 상기 복수의 한정된 부피로부터 공유된 용기로 수송함으로써 풀링된 샘플을 생성하는 단계;
- (e) 상기 풀링된 샘플 상에서 분석을 수행하는 단계;
- (f) 상기 분석으로부터 상기 조건의 세트가 상기 공정을 가능하게 했거나 또는 가능하게 하지 않았던 정도를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 항생제의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 화학요법제의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 주어진 온도를 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 주어진 대기 조성을 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 주어진 유기체의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 성장 인자의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 억제제의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제61항에 있어서, 상기 조건의 세트가 영양소의 부재를 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제61항에 있어서, 상기 공정이 세포 성장을 포함하는 것인 방법.

청구항 71

제61항에 있어서, 상기 공정이 핵산 증폭을 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제61항에 있어서, 상기 분석이 유전자 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 73

제61항에 있어서, 상기 분석이 기능적 검정을 포함하는 것인 방법.

청구항 74

제61항에 있어서, 상기 분석이 유방염과 관련된 유기체의 검출을 포함하는 것인 방법.

청구항 75

제61항에 있어서, 상기 분석이 IBD와 관련된 유기체의 검출을 포함하는 것인 방법

청구항 76

제61항에 있어서, 상기 분석이 슬레이트-환원과 관련된 유기체의 검출을 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제61항에 있어서, 상기 분석이 프로바이오틱스로서 유용한 유기체의 검출을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명**기술 분야****[0001] 상호 참조**

본 출원은 2013년 4월 19일에 출원된 미국 가 출원 제61/814,090호의 우선권 및 2013년 11월 12일에 출원된 미국 가 출원 제61/903,156호의 우선권을 주장하며, 이를 출원은 본원에 참고로 도입된다.

[0003] 연방자금 후원을 받는 연구에 대한 진술

본 발명은 미국 국립 보건원에 의해 계약 번호 HG005826 하에 미국 정부의 지원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

배경 기술

[0005] 젤 미세액적법 (Gel MicroDroplet) (GMD), 소형화된 페트리 (Petri) 디쉬 및 미세유체역학을 포함하나 이에 제한되지 않는 소형화 및 구획화를 채용하는 배양 방법은 처리량을 증가시키고, 고-밀도 거동을 개시하고, 급속하게 성장하는 "잡초" 세포로부터의 경쟁을 제거할 수 있다. 그러나, 이를 방법에 필요한 장비는 대개 대부분의 실험실에서 접근가능하지 않으며, 작동이 복잡하여, 실제로 생물학적 검정을 위한 그들의 사용을 제한한다.

[0006] 미생물은 토양 및 바다로부터 인간 장에 이르는 환경에서 중요한 역할을 한다. 배양-독립적 방법, 예컨대 범유전체학 및 단일-세포 유전체학은 미생물 군집의 조성 및 기능에 대한 풍부한 정보를 밝혔지만, 이를 미생물의 순수한 배양물을 얻는 것은 여전히 박테리아 유전체학 및 생리학을 이해하는 데 근본적이다. 박테리아는 매우 풍부하고 다양하기 때문에, 환경으로부터 모든 군주를 배양 및 단리하는 것은 비현실적이다.

발명의 내용**[0007] 발명의 요약**

[0008] 본원에서는 작은 부피의 생성 및 조작을 위한 방법, 장치, 시스템 및 키트가 개시된다. 일부의 경우, 이들은 액체 및 기체 환경 둘 다를 포함하는 미세-환경의 제어에 사용된다. 일부의 경우, 본원에 개시된 방법, 장치, 시스템 및 키트는 병렬화된 샘플 취급에 사용된다. 일부의 경우, 이들은 유기체의 단리 또는 배양에 사용된다.

[0009] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 샘플을 포함하며 제2 기질에 의해 커버되는 제1 한정된 부피를 포함하는 기질을 제공하는 단계; (b) 제2 샘플을 포함하며 제1 기질에 의해 커버되는 제2 한정된 부피를 포함하는 제2 기질을 제공하는 단계; (c) 상기 제1 기질을 상기 제2 기질로부터 분리함으로써, 상기 제2 기질이 상기 제1 한

정된 부피를 커버하는 것을 중단시키고, 상기 제1 기질이 상기 제2 한정된 부피를 커버하는 것을 중단시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 샘플은 젤화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 제2 샘플은 젤화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 분리는 중력에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 분리는 모세관 압력에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 분리는 인가된 힘에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 분리는 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질이 액체에 침지되는 동안 일어난다.

[0010] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 한정된 부피를 포함하는 제1 기질을 제공하는 단계; (b) 제2 한정된 부피를 포함하며 상기 제1 기질에 커플링된 제2 기질을 제공하는 단계; (c) 샘플을 상기 제1 한정된 부피 내로 적하하는 단계; (d) 상기 제1 한정된 부피의 내용물을 상기 제2 한정된 부피에 유입시킴으로써 조합된 샘플을 생성하는 단계; (e) 상기 제1 기질을 상기 제2 기질로부터 탈커플링시키고, 여기서 상기 조합된 샘플의 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있고, 상기 조합된 샘플의 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있는 것인 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 탈커플링 전에 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피로부터 분리하는 것을 추가로 포함하며, 상기 조합된 샘플의 상기 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 제1 기질은 상기 제2 기질에 커플링되어 남아있다. 일부 실시양태에서, 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피와 유체 접촉시키는 것은 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 제1 한정된 부피 및 상기 제2 한정된 부피를 인덱싱하기 위한 플레이트를 포함하는 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 중력에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 모세관 압력에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 인가된 힘에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질이 액체에 침지되는 동안 일어난다.

[0011] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 한정된 부피를 포함하는 제1 기질을 제공하는 단계; (b) 제2 한정된 부피를 포함하며 상기 제1 기질에 커플링된 제2 기질을 제공하는 단계; (c) 제1 샘플을 상기 제1 한정된 부피 내로 적하하는 단계; (d) 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피와 유체 접촉시키고, 여기서 상기 제1 기질은 상기 제2 기질에 커플링되어 남아있는 것인 단계; (e) 상기 제1 한정된 부피의 내용물을 상기 제2 한정된 부피의 내용물과 혼합함으로써 혼합된 샘플을 생성하는 단계; (f) 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피로부터 분리하고, 여기서 상기 혼합된 샘플의 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 혼합된 샘플의 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되고, 상기 제1 기질은 상기 제2 기질에 커플링되어 남아있는 것인 단계; (g) 상기 제1 기질을 상기 제2 기질로부터 탈커플링시키고, 여기서 상기 혼합된 샘플의 상기 제1 부분은 상기 제1 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있고, 상기 혼합된 샘플의 상기 제2 부분은 상기 제2 한정된 부피에 의해 함유되어 남아있는 것인 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 혼합된 샘플은 젤화제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 혼합은 확산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 혼합은 초음파처리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 상기 제1 한정된 부피를 상기 제2 한정된 부피와 유체 접촉시키는 것은 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 탈커플링 동안 상기 제1 기질의 상기 제2 기질에 대한 정렬을 유지하는 장치 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 중력에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 모세관 압력에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 인가된 힘에 의해 일어난다. 일부 실시양태에서, 상기 탈커플링은 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질이 액체에 침지되는 동안 일어난다.

[0012] 일부 실시양태에서, 상기 장치는 (a) 제1 한정된 부피 및 채널을 포함하는 제1 기질; (b) 제2 한정된 부피를 포함하며 상기 제1 기질에 커플링된 제2 기질; 및 (c) 상기 제1 기질과 상기 제2 기질 사이에 배치된 불혼화성 유체 층을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 채널에 함유된 기체는 상기 불혼화성 유체 층을 통한 확산에 의해 상기 제1 한정된 부피 및 상기 제2 한정된 부피에 유입된다. 일부 실시양태에서, 상기 채널에 함유된 기체는 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질을 통한 확산에 의해 상기 제1 한정된 부피 및 상기 제2 한정된 부피에 유입된다. 일부 실시양태에서, 상기 제2 기질은 채널을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 장치는 상기 제1 기질과 상기 제2 기질 사이에 위치한 상기 제1 기질 상에 설치된 포스트를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 장치는 상기 제1 기질과 상기 제2 기질 사이에 위치한 상기 제2 기질 상에 설치된 포스트를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 장치는 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질의 온도 제어를 위한 수단을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 장치는 상기 제1 기질 및 상기 제2 기질의 온도 제어를 위한 수단을 추가로 포함한다.

포함한다.

[0013]

일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 샘플을 복수의 한정된 부피 중에 분산시키는 단계; (b) 상기 복수의 한정된 부피를 본질적으로 동시에 복수의 제1 딸 부피 및 복수의 매칭된 제2 딸 부피를 포함하는 복수의 매칭된 쌍의 딸 부피로 분할하고, 여기서 상기 분할은 펌핑력을 상기 한정된 부피에 인가하지 않고 수행되는 것인 단계; (c) 적어도 하나의 분석을 상기 복수의 상기 제1 딸 부피 상에서 수행하는 단계; (d) 상기 분석에 기초하여 상기 복수의 매칭된 제2 딸 부피의 하위세트를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 유전자 검정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 기능적 검정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 박테리아 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 포유동물 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 바이러스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 다중 종의 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 항생제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 화학요법제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 성장 배지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 성장 인자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플은 억제제를 포함한다.

[0014]

일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 유체를 용기 내로 적하하는 단계; (b) 상기 용기 내의 개구를 샘플 유체 부피와 접촉시키는 단계; (c) 상기 샘플 유체 부피를 표면 장력에 의해 상기 용기 내의 상기 유체와 합류시켜 합류된 액체 부피를 생성하는 단계; (d) 상기 합류된 액체 부피를 상기 용기로부터 배출시키는 단계를 포함한다.

[0015]

일부 실시양태에서, 상기 장치는 하기 프로토콜: (a) 유체를 용기 내로 적하하고; (b) 상기 용기 내의 개구를 샘플 유체 부피와 접촉시키고; (c) 상기 샘플 유체 부피를 표면 장력에 의해 상기 용기 내의 상기 유체와 합류시켜 합류된 액체 부피를 생성하고; (d) 상기 합류된 액체 부피를 상기 용기로부터 배출시키는 것을 자동화된 방식으로 수행할 수 있는 조립체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 프로토콜은 복수의 샘플 유체 부피에 대해 병렬적으로 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 프로토콜은 복수의 샘플 유체 부피에 대해 연속적으로 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플 유체 부피는 5 마이크로리터 이하이다. 일부 실시양태에서, 상기 샘플 유체 부피의 부피는 100 나노리터 미만이다.

[0016]

일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 각각 복수의 샘플 중 하나를 포함하는 복수의 한정된 부피를 제공하는 단계; (b) 상기 복수의 샘플을 상기 복수의 한정된 부피로부터 공유된 용기로 수송함으로써 풀링된 샘플을 생성하는 단계; (c) 상기 풀링된 샘플 상에서 분석을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 한정된 부피는 하나의 기질에 의해 한정된다. 일부 실시양태에서, 상기 복수의 한정된 부피는 다중 기질에 의해 한정된다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 유전자 검정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 기능적 검정을 포함한다.

[0017]

일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 각각 복수의 샘플 중 하나를 포함하는 복수의 한정된 부피를 제공하는 단계; (b) 상기 복수의 샘플을 조건의 세트로 처리하는 단계; (c) 상기 복수의 샘플 상에서 공정을 수행하는 단계; (d) 상기 복수의 샘플을 상기 복수의 한정된 부피로부터 공유된 용기로 수송함으로써 풀링된 샘플을 생성하는 단계; (e) 상기 풀링된 샘플 상에서 분석을 수행하는 단계; (f) 상기 분석으로부터 상기 조건의 세트가 상기 공정을 가능하게 했거나 또는 가능하게 하지 않았던 정도를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 항생제의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 화학요법제의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 주어진 온도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 주어진 대기 조성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 주어진 유기체의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 성장 인자의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 억제제의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건의 세트는 영양소의 부재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 공정은 세포 성장을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 공정은 핵산 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 유전자 검정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 기능적 검정을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 유방염과 관련된 유기체의 검출을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 IBD와 관련된 유기체의 검출을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 술페이트-환원과 관련된 유기체의 검출을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 프로바이오틱스로서 유용한 유기체의 검출을 포함한다.

[0018]

참고로 도입

[0019]

미국 출원 61/516,628, 미국 출원 61/518,601, 미국 출원 13/257,811, 미국 출원 12/670,739, 국제 출원

PCT/US2010/028361, 미국 출원 61/262,375, 미국 출원 61/162,922, 미국 출원 61/340,872, 미국 출원 13/440,371, 미국 출원 13/467,482, 미국 출원 13/868,028, 미국 출원 13/868,009 및 국제 출원 PCT/US13/63594를 포함하는 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특히 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특히 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참고로 도입되는 것으로 지시되는 경우와 동일한 정도로 임의의 및 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

도면의 간단한 설명

[0020]

본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에서 특별히 설명된다. 본 발명의 특징 및 이점의 보다 양호한 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 설명하는 하기 상세한 설명 및 수반되는 도면을 참고로 얻어질 것이다:

도 1은 3개의 정렬 펀 및 2개의 유리 스페이서를 갖는 홀더를 나타낸다.

도 2A는 홀더를 사용한 분할의 측면 개략도를 나타낸다.

도 2B는 분할 전의 장치의 측면 개략도 및 상면 사진을 나타낸다.

도 2C는 분할 후의 장치의 측면 개략도 및 상면 사진을 나타낸다.

도 2D는 분할 후의 장치의 사진을 나타낸다.

도 3A는 피펫 팁을 갖는 액체 샘플을 포함하는 한정된 부피를 나타낸다.

도 3B는 피펫 팁에서 액체와 합류하는 액체 샘플을 나타낸다.

도 3C는 액체 및 샘플이 제거된 한정된 부피를 나타낸다.

도 4A는 칩 세척을 위한 장치 상에 수용액을 적하하는 것을 나타낸다.

도 4B는 칩 세척을 위한 장치 상의 구획화를 나타낸다.

도 4C는 칩 세척을 위한 장치 상의 잔류 수용액의 제거를 나타낸다.

도 4D는 구분된 샘플의 칩 세척을 가능하게 하는 장치의 구동을 나타낸다.

도 5A는 GFP 및 DsRed 유전자를 발현하는 단일 이. 콜라이 (*E. coli*)의 배양의 개략도, 이. 콜라이의 PCR 확인의 개략도 및 사진, 및 이. 콜라이의 형광 현미경검사 확인의 개략도 및 사진을 나타낸다.

도 5B는 현미경검사 및 PCR 결과의 몽타주를 나타낸다.

도 5C는 이. 콜라이의 현미경검사 및 PCR 확인의 가시화를 나타낸다.

도 6A는 디지털 PCR에 사용되는 슬립칩 (SlipChip)을 나타낸다.

도 6B는 기체 공급 채널을 갖는 슬립칩을 나타낸다.

도 7은 슬립칩 장치 상의 비. 테타 (*B. theta*)의 혐기성 배양의 도해 및 사진을 나타낸다.

도 8A는 박테리아 배양물로 적하된 수직 웰을 갖는 장치의 사진을 나타낸다.

도 8B는 박테리아 배양물로 적하된 수직 웰을 갖는 장치의 사진을 나타낸다.

도 8C는 900 nm 높이 나노포스트를 나타낸다.

도 8D는 나노포스트가 없는 슬립칩 장치에서의 이. 콜라이의 성장을 나타낸다.

도 8E는 400 nm 높이 나노포스트를 갖는 슬립칩 장치에서의 이. 콜라이의 성장을 나타낸다.

도 8F는 900 nm 높이 나노포스트를 갖는 슬립칩 장치에서의 이. 콜라이의 성장을 나타낸다.

도 9A는 제어된 대기 병 중의 장치의 개략도를 나타낸다.

도 9B는 산소 농도가 상이한 3개의 병 중의 장치를 나타낸다.

도 9C는 상이한 산소 조건 하에서의 비. 테타 및 이. 콜라이의 성장을 나타낸다.

- 도 10A는 분리된 구획의 라인 스캔을 나타낸다.
- 도 10B는 확산적으로 연결된 구획의 라인 스캔을 나타낸다.
- 도 10C는 분리된 구획의 단면 개략도를 나타낸다.
- 도 10D는 확산적으로 연결된 구획의 단면 개략도를 나타낸다.
- 도 11은 단독으로 및 비. 테타와 화학적으로 연락하는 에이. 카카에 (*A. caccae*)의 성장을 나타낸다.
- 도 12A는 중첩된 웰 및 채널을 갖는 비어있는 슬립칩을 나타낸다.
- 도 12B는 슬립칩 내로 적하된 샘플을 나타낸다.
- 도 12C는 2개의 플레이트 중의 웰을 중첩하도록 슬리핑된 슬립칩을 나타낸다.
- 도 12D는 공기로 풀려싱된 채널을 갖는 슬립칩을 나타낸다.
- 도 12E는 오일로 풀려싱된 채널을 갖는 슬립칩을 나타낸다.
- 도 12F는 중첩하는 웰을 분리하도록 슬리핑된 슬립칩을 나타낸다.
- 도 13은 슬립칩 분할 후의 아가로스가 없는 유체 부피를 나타낸다.
- 도 14A는 미생물 군집으로부터의 저속-성장 균주의 확률적 격리 하의 배양을 나타낸다.
- 도 14B는 분할 및 분리 후의 슬립칩의 2개의 측면 상의 세포의 분포를 나타낸다.
- 도 15A는 1x 부피 웰을 갖는 희석 장치의 상부 층을 나타낸다.
- 도 15B는 9x 부피 웰을 갖는 희석 장치의 하부 층을 나타낸다.
- 도 15C는 조립된 희석 장치의 상부 및 하부 층을 나타낸다.
- 도 15D는 샘플로 충전된 희석 장치를 나타낸다.
- 도 15E는 웰을 도관으로부터 분리하도록 슬리핑된 희석 장치의 상부 플레이트를 나타낸다.
- 도 15F는 희석의 제1 단계를 나타낸다.
- 도 15G는 희석의 5개의 단계 후의 100,000배 희석을 나타낸다.
- 도 16은 8배 총 희석을 위한 2배 연속 희석의 3개의 단계를 나타낸다.
- 도 17A는 친수성 웰을 제작하기 위한 단계를 나타낸다.
- 도 17B는 친수성 웰 중의 수용액을 나타낸다.
- 도 18은 온-디바이스 희석의 결과를 나타낸다.
- 도 19는 슬립칩 장치의 반 상의 1% 아가로스를 포함하는 유체 부피를 나타낸다.
- 도 20A는 장치 상의 미생물 표적 유기체의 표적화된 배양 및 단리를 위한 서열분석의 개략도를 나타낸다.
- 도 20B는 장치 상의 미생물 표적 유기체의 표적화된 배양 및 단리를 위한 칩 세척의 개략도를 나타낸다.
- 도 20C는 장치 상의 미생물 표적 유기체의 표적화된 배양 및 단리를 위한 분할 및 PCR의 개략도를 나타낸다.
- 도 21은 이. 콜라이를 사용한 칩 세척 qPCR의 결과를 나타낸다.
- 도 22A는 슬립칩 장치 상의 씨. 스신덴스 (*C. scindens*)의 성장을 나타낸다.
- 도 22B는 슬립칩 장치 상의 이. 파에칼리스 (*E. faecalis*)의 성장을 나타낸다.
- 도 22C는 한천 플레이트 상의 씨. 스신덴스의 성장을 나타낸다.
- 도 22D는 한천 플레이트 상의 이. 파에칼리스의 성장을 나타낸다.
- 도 22E는 비-성장 음성 대조군, 칩 세척 방법 및 플레이트 세척 방법으로부터 수집된 씨. 스신덴스 및 이. 파에칼리스의 게놈 DNA를 비교하는 그래프이다.

도 23은 샘플 수집 및 격리의 개략도를 나타낸다.

도 24는 표적 특이적 프라이머 및 유니버설 프라이머를 사용한 qPCR 결과를 나타낸다.

도 25A는 분할 슬립칩 상의 양성 및 음성 온-칩 콜로니 PCR을 나타낸다.

도 25B는 "칸디다투스 카에코코쿠스 미크로플루이디쿠스 (*Candidatus Caecococcus microfluidicus*)의 규모 확대 콜로니를 나타낸다.

도 25C는 "칸디다투스 카에코코쿠스 미크로플루이디쿠스"의 단일 콜로니의 현미경사진을 나타낸다.

도 25D는 "칸디다투스 카에코코쿠스 미크로플루이디쿠스"의 TEM 화상을 나타낸다.

도 26은 OTU158의 광학 현미경검사를 나타낸다.

도 27A는 "칸디다투스 카에코코쿠스 미크로플루이디쿠스"의 계통발생적 계열을 나타낸다.

도 27B는 FISH에 의한 "칸디다투스 카에코코쿠스 미크로플루이디쿠스"의 입증을 나타낸다.

도 28은 표적 유기체의 배양 및 단리의 개략도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] I. 개관

본 개시내용은 샘플의 병렬적 취급을 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 병렬적 샘플 취급은 다양한 수단에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 샘플 취급은 슬립칩 장치 상에서 일어날 수 있다. 슬립칩 장치는 각각 일련의 웰, 챔버 또는 다른 한정된 부피를 포함하는 2개의 대면하는 플레이트를 포함할 수 있다. 적하, 혼합, 반응, 분리, 희석, 결과의 제시 및 다른 단계를 포함하는 샘플 취급은 서로 상대적인 슬립칩 플레이트의 구동에 의해 일어날 수 있다. 샘플의 병렬화는 2개의 플레이트를 분할하고, 각각의 2개의 플레이트 상의 샘플의 공간적으로 정돈된 매칭 세트를 생성함으로써 일어날 수 있다. 분석물의 파괴적 또는 소비적인 분석을 포함하는 병렬적 샘플 세트의 추가의 분석은 샘플의 하나 또는 둘 다의 세트 상에서 수행될 수 있다.

[0023] 본 개시내용은 a) 단일 세포로부터의 확률적 격리 및 배양; b) 미세-콜로니의 복제물의 생성; c) 유전자-기반 검정을 사용한 미생물의 표적화된 단리; 및 d) 기능-기반 검정을 사용한 미생물의 표적화된 단리를 위한 방법을 기재한다. 상기 방법은 예를 들어 슬립칩 장치 상에서 수행될 수 있다. 슬립칩은 일부의 경우 복잡한 장비를 요구하지 않을 수 있는, 유체 부피, 예를 들어 피코리터- 내지 나노리터-크기의 유체 부피를 조작할 수 있는 미세유동 장치이다. 일부의 경우, 단일 세포를 확률적으로 격리하고 (예를 들어, 1,000-구획 슬립칩으로), 인큐베이션하여 콜로니를 성장시킬 수 있다. 격리 외에, 미생물 주위의 미세환경은 바람직할 경우 미생물 사이의 상호작용의 강도 및 방향을 제어함으로써 조정될 수 있다. 일부의 경우, 미세장치로부터의 배양종을 함께 풀링하고, 하나의 튜브 내로 수집하여 고 처리량 다중화 검정을 구동할 수 있다. 일부의 경우, 장치의 2개의 플레이트가 분리되는 경우, 각각의 구획화된 유체 부피는 2개로 분할되어, 각각의 대향하는 플레이트 상의 각각의 개별 콜로니의 카피를 생성한다. 유전자-기반 검정을 위해, 반응, 예컨대 PCR을 제1 플레이트 상에서 수행하여 관심의 유전자를 갖는 콜로니를 함유하는 구획을 확인할 수 있다. 그 후, 상응하는 콜로니는 관심의 단리체의 규모-확대 배양을 포함하나 이에 제한되지 않는 다른 적용을 위해 제2 플레이트로부터 회수될 수 있다.

[0024] II. 슬립칩

[0025] 본원에 개시된 방법, 조성물, 장치 및 키트는 슬립칩 장치와 함께 사용될 수 있다. 슬립칩 장치는 예를 들어 2010년 3월 23일에 출원된 국제 특허 출원 PCT/US2010/028361, "슬립 칩 장치 및 방법"; 2011년 9월 20일에 출원된 미국 출원 13/257,811, "슬립 칩 장치 및 방법"; 2009년 11월 18일에 출원된 미국 출원 61/262,375, "슬립 칩 장치 및 방법"; 2009년 3월 24일에 출원된 미국 출원 61/162,922, "슬립 칩 장치 및 방법"; 2010년 3월 22일에 출원된 미국 출원 61/340,872, "슬립 칩 장치 및 방법"; 2011년 4월 5일에 출원된 미국 출원 61/516,628, "슬립 칩 상의 리콤비나제 폴리미라제 증폭 (RPA) 반응의 동시 화학적 개시를 통한 핵산의 디지털 등온 정량화"; 및 2011년 5월 9일에 출원된 미국 출원 61/518,601, "바이러스 적하로 시험된 회전식 슬립 칩 상의 다중부피 디지털 역전사 PCR (RT-PCR)을 사용한 큰 동적 범위를 갖는 핵산의 정량화"에 기재되어 있다.

[0026] 간략하게, 슬립칩 장치는 서로 커플링된 플레이트를 포함할 수 있는 미세유동 장치이다. 각각의 플레이트는 복수의 웰, 구획 또는 다른 한정된 부피를 포함할 수 있다. 플레이트는 서로 상대적으로 이동할 수 있다. 플레이트의 이동은 다양한 온-칩 작동, 예컨대 하나의 플레이트 상의 한정된 부피를 또다른 플레이트 상의 웰 내로

또는 밖으로 유체 접촉시키는 것, 또는 한정된 부피를 입구 또는 출구 채널 내로 또는 밖으로 유체 접촉시키는 것을 초래할 수 있다.

[0027] 슬립칩 장치는 다양한 물질, 예컨대 유리, 실리콘, 중합체 (예를 들어 PMMA 또는 PDMS) 또는 금속으로부터 제작될 수 있다. 슬립칩 장치는 다양한 방법, 예컨대 포토리소그래피, 연성 리소그래피, 고온 엠보싱, 레이저 애블레이션, 습식 에칭, 플라즈마 에칭 (예를 들어 RIE 또는 DRIE) 또는 미세성형에 의해 제작될 수 있다.

[0028] 슬립칩 장치는 다양한 성분 사이의 윤활 상, 예컨대 퍼플루오르화된 화합물, 광물 오일 또는 다른 오일을 포함할 수 있다.

[0029] 슬립칩 장치는 다양한 표면 처리, 예컨대 실란화, 산소 플라즈마 활성화, 중합체 코팅 (예를 들어 PDMS 또는 파릴렌), 친화제, 금속, 전극, 유전체, 단백질, 친수성 코팅 및 처리, 또는 소수성 코팅 및 처리로 제조될 수 있다.

[0030] 슬립칩 장치는 다양한 추가의 기능적 성분, 예컨대 히터, 펠티에 (Peltier) 장치, 압전 구동기, 펌프, 광원, 광학 센서, CCD, 자석 및 다른 성분을 포함할 수 있다.

III. 샘플

[0032] 본 개시내용에서 취급되는 샘플은 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 단일 유형의 세포, 유기체 또는 바이러스를 포함할 수 있다. 샘플은 다중 유형의 세포, 유기체 또는 바이러스를 포함할 수 있다. 샘플은 다중 종의 미생물 또는 미생물 협력체를 포함할 수 있다. 샘플은 박테리아 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 진균 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 포유동물 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 곤충 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 종양 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 바이러스를 포함할 수 있다. 샘플은 조류를 포함할 수 있다. 샘플은 고세균류를 포함할 수 있다. 샘플은 이. 콜라이, 에프. 파에칼리스, 에이. 카카에, 비. 불가투스 (*B. vulgatus*), 비. 테타 또는 다른 종을 포함할 수 있다. 샘플은 인간 세포, 예컨대 HeLa, NCI60, DU145, HUVEC, Jurkat, Lncap, MCF-7, MDA-MB-438, PC3, T47D, THP-1, U87, SHSY5Y 또는 Saos-2를 포함할 수 있다. 샘플은 비-인간 동물 세포, 예컨대 베로 (Vero), GH3, PC12, MC3T3, 제브라파쉬 (Zebrafish) ZF4, 제브라파쉬 AB9, MDCK 또는 제노푸스 (*Xenopus*) A6을 포함할 수 있다. 샘플은 줄기 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 이전에 발견되지 않은 또는 특성화되지 않은 종을 포함할 수 있다. 샘플은 식물 세포, 예컨대 담배 BY-2를 포함할 수 있다. 샘플은 마커 또는 기능, 예컨대 유전자, 유전자의 세트, 유전적 마커 또는 유전적 마커의 세트, 표현형적 특징, 또는 관심의 활성, 예컨대 세룰로스 분해, 리그닌 분해, 발효, 감염, 술페이트 환원 또는 다른 활성을 기초로 선택되는 유기체 또는 유기체의 군집을 포함할 수 있다. 샘플은 임의의 상기 세포 또는 유기체로부터의 단리체를 포함할 수 있다.

[0033] 샘플은 시약, 예컨대 효소, 뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 표지, 프로브, 입자, 용해체, 서열분석 또는 차세대 서열분석을 위한 샘플 제조 시약, 인듀서 (예를 들어 IPTG), 리프레서 (예를 들어 LacI), 신호화 분자 (예를 들어 호르몬) 또는 다른 시약을 포함할 수 있다. 샘플은 반응 생성물, 예컨대 PCR 또는 디지털 PCR 생성물을 포함할 수 있다. 샘플은 다른 반응 생성물을 포함할 수 있다. 샘플은 핵산, 예컨대 DNA, RNA, PNA, 플라스미드, 조절 또는 비-코딩 RNA 또는 다른 핵산을 포함할 수 있다.

[0034] 샘플은 배지, 예컨대 조리된 육류 배지, AM2 배지, LB 배지, LB 밀러 (Miller) 배지, LB 레녹스 (Lennox) 배지, SOB 배지, SOC 배지, 2x YT 배지, TB 배지, SB 배지 또는 다른 시판 배지를 포함할 수 있다.

[0035] 샘플은 완충제, 예컨대 바이신 (Bicine), 트리스 (Tris), 트리신 (Tricine), TAPSO, HEPES, TES, TAPS, PBS, MOPS, PIPES, 카코딜레이트 (Cacodylate), SSC, MES, 숙신산, 굿 (Good) 완충제 또는 다른 시판 완충제를 포함할 수 있다.

[0036] 샘플은 기체, 예컨대 O₂, CO₂, CO, N₂, NO, NO₂, H₂O 또는 공기를 포함할 수 있다.

[0037] 샘플은 성장 인자 또는 사이토kin, 예컨대 아드레노메톨린 (AM), 안지오포이에틴 (Ang), 자가분비 운동성 인자, 골 형태형성 단백질 (BMP), 뇌-유래된 신경영양성 인자 (BDNF), 표피 성장 인자 (EGF), 에리트로포이에틴 (EPO), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경교세포 선-유래된 신경영양성 인자 (GDNF), 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF), 과립구 마크로파지 콜로니-자극 인자 (GM-CSF), 성장 분화 인자-9 (GDF9), 간세포 성장 인자 (HGF), 간암-유래된 성장 인자 (HDGF), 인슐린-유사 성장 인자 (IGF), 이동-자극 인자, 미오스타틴 (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF) 및 다른 뉴로트로핀, 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이에틴 (TPO), 전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 전환 성장 인자 베타 (TGF- β), 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), Wnt

신호화 경로, 태반 성장 인자 (PGF), 소 태아 소마토트로핀 (FBS), IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

[0038] 샘플은 항생제, 예컨대 암피실린, 카르베니실린, 클로람페니콜, D-시클로세린, 젠타마이신, 히그로마이신 B, 카나미신, 카수가마이신, 날리딕스산, 네오마이신, 리팜피신, 스펙티노마이신, 스트렙토미신, 테트라시클린 또는 다른 항생제를 포함할 수 있다.

[0039] 샘플은 항체, 항체 단편 또는 암타머를 포함할 수 있다. 샘플은 특정 표적에 결합할 수 있는 결합체를 포함할 수 있다. 샘플은 형광단을 포함할 수 있다.

[0040] 샘플은 유체 부피를 포함할 수 있다. 유체 부피는 액적일 수 있다. 유체 부피는 웰, 구획 또는 다른 구조에 완전히 또는 부분적으로 함유될 수 있다. 유체 부피는 기질 상에 있을 수 있다. 유체 부피는 에멀젼 중에 있을 수 있다. 유체 부피는 표면 장력에 의해 한정될 수 있다. 유체 부피는 하나 이상의 고체 기질에 의해 한정될 수 있다. 유체 부피는 하나 이상의 불흔화성 액체에 의해 한정될 수 있다. 유체 부피는 기체 상에 의해 한정될 수 있다. 유체 부피는 고체, 액체 및/또는 기체 상의 조합에 의해 한정될 수 있다.

IV. 샘플의 병렬적 취급

[0042] 많은 검정은 가치있는 정보를 제공하지만, 공정 중에 그들의 분석물을 파괴 또는 소비할 수 있다. 이러한 검정을 위해, 본 개시내용은 샘플의 하나의 원래의 세트로부터 샘플의 2개의 매칭된 세트를 생성하는, 한정된 부피에서의 병렬적 샘플 취급을 제공한다. 일부의 경우, 하나의 세트는 그의 분석물을 파괴 또는 소비하는 분석에 사용될 수 있으며, 또 다른 세트는 참고, 증폭 또는 성장, 또는 추가의 연구를 위해 보존될 수 있다. 일부의 다른 경우, 하나의 세트는 그의 분석물을 파괴 또는 소비하는 제1 분석에 사용될 수 있으며, 또 다른 세트는 그의 분석물을 파괴 또는 소비하는 제2 분석에 사용될 수 있다. 예를 들어, 유전자 검정, 예컨대 PCR 또는 FISH는 대개 그들의 유전적 물질을 분석하기 위해 세포가 용해될 것을 요구하지만, 미생물 단리를 위해 살아있는 미생물을 얻는 것이 바람직하다. 일부의 경우, 분석물의 다중 카피는 샘플의 원래의 세트에서 각각 한정된 부피로 제공되며, 생성된 샘플의 각각의 2개의 매칭된 세트는 원래의 부피보다 적은 분석물을 함유한다. 일부의 경우, 분석물의 적어도 하나의 카피는 샘플의 원래의 세트에서 각각 한정된 부피로 제공되며, 분석물의 증폭은 샘플의 2개의 매칭된 세트의 생성 전에 수행된다. 증폭은 세포 성장일 수 있다. 증폭은 혼란 증폭에 의한 것일 수 있다.

[0043] 병렬적 샘플 취급은 슬립칩 장치에 의해 수행될 수 있다. 슬립칩 장치는 각각 주어진 수의 한정된 부피를 갖는 대향하는 플레이트를 포함할 수 있다. 한정된 부피는 구획 또는 웰일 수 있다. 웰은 샘플로 적하될 수 있으며, 이어서 플레이트는 서로 상대적으로 슬리핑되어 하나의 플레이트 상의 구획 또는 웰을 또 다른 플레이트 상의 상응하는 구획 또는 웰과 접촉시킬 수 있다. 예를 들어, 세포의 혼탁액은 둘 다의 플레이트 상의 웰 내로 적하될 수 있으며, 그 후 웰은 슬립에 의해 함께 모여 조합된 웰을 형성할 수 있다. 대안적으로, 세포의 혼탁액은 하나의 플레이트 상의 웰 상으로 적하될 수 있으며, 상이한 용액, 예컨대 성장 배지는 또 다른 플레이트 상의 웰 상으로 적하될 수 있고, 그 후 웰은 슬립에 의해 함께 모여 조합된 웰을 형성할 수 있다. 이를 조합된 웰은 샘플의 원래의 세트를 형성할 수 있다. 그 후, 샘플의 매칭된 세트의 형성은 플레이트를 슬리핑하여 웰의 세트를 분리함으로써 형성될 수 있다.

[0044] 병렬적 샘플 취급은 액적 미세유동 장치에 의해 수행될 수 있다. 액적은 불흔화성 오일 상에 의해 구분된 수성 액적일 수 있다. 액적은 불흔화성 수성 상에 의해 구분된 오일 액적일 수 있다. 샘플의 원래의 세트를 포함하는 액적의 집단은 연속적으로 액적 분할되어, 딸 액적으로 샘플의 2개의 매칭된 세트를 생성할 수 있다.

[0045] 병렬적 샘플 취급은 다른 한정된 부피 시스템에 의해 수행될 수 있다. 일부의 경우, 샘플의 원래의 세트는 마이크로웰 플레이트 중에 수성 샘플을 포함한다. 샘플의 2개의 매칭된 세트는 원래의 샘플 부피의 분획을 샘플의 원래의 세트로부터 제2 마이크로웰 플레이트 내로 수송함으로써 생성될 수 있다. 수송은 예를 들어 피펫팅에 의해 수행될 수 있다.

V. 슬립칩 분할

[0047] 병렬적 샘플 취급은 각각 주어진 수의 한정된 부피를 갖는 2개의 대향하는 플레이트를 포함할 수 있는 슬립칩 장치에 의해 수행될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 샘플의 원래의 세트로부터의 샘플의 2개의 매칭된 세트의 형성은 2개의 플레이트를 슬리핑하여 한정된 부피의 2개의 세트를 분리함으로써 형성될 수 있다 (예를 들어 도 2B, 도 2C). 이들 샘플의 2개의 매칭된 세트는 슬립칩 장치의 2개의 대향하는 플레이트를 분리함으로써 더 분리될 수 있으며, 이는 한정된 부피의 어레이에서의 그들의 물리적 위치에 기초하여, 샘플의 2개의 매칭된 샘

풀의 구성원 사이의 쌍형성된 관계를 보존하면서 추가의 분석을 위해 각각의 샘플에 접근할 수 있게 한다.

[0048] 플레이트는 제1 한정된 부피를 제2 한정된 부피로부터 먼저 분리할 필요성 없이 탈커플링될 수 있다. 이러한 경우, 2개의 기질의 탈커플링은 2개의 부피의 분리를 제공한다. 샘플 내의 응집력은 샘플과 기질 사이의 부착 보다 작을 수 있다. 예를 들어, 기질의 전부 또는 일부는 친수성일 수 있으며, 샘플은 수성일 수 있다. 예를 들어, 웰의 내부에 친수성 표면을 갖고 웰의 외부에 소수성 표면을 갖는 기질이 생성된 (도 17A), 및 수성 샘플이 적하된 (도 17B) 도 17을 참조한다. 또다른 예에서, 소수성 표면에 의해 둘러싸인 친수성 웰을 단백질 검정에 사용하였다 (문헌 [Weishan Liu, Delai Chen, Wenbin Du, Kevin P. Nichols, and Rustem F. Ismagilov, "SlipChip for Immunoassays in Nanoliter Volumes," Analytical Chemistry 2010 82:3276-3282]을 참조함). 일부의 경우, 부피 내부의 물질은 기질에 부착성일 수 있다. 예를 들어, 물질은 표면에 부착성인 포유동물 세포일 수 있다.

[0049] 일부의 경우, 하나의 기질은 부피를 포함하고, 또다른 기질은 또다른 부피를 포함하고, 이들 부피는 유체적으로 연결되지 않으며, 동일하거나 상이한 내용물을 가질 수 있다. 2개의 기질은 탈커플링될 수 있다. 탈커플링은 부피에의 접근을 제공할 수 있다. 이는 예를 들어 슬립칩을 사용함으로써 제조될 수 있다. 이러한 부피는 혼합물을 함유하는 조합된 부피를 멀리 슬리핑함으로써 제조될 수 있다. 한 예로서 도 12를 참조한다.

[0050] 유체적으로 연결된 또는 유체적으로 연결되지 않은 부피를 포함하는 부피는 부피가 유사하거나 상이할 수 있다 (문헌 [Feng Shen, Bing Sun, Jason E. Kreutz, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Poluru L. Reddy, Loren J. Joseph, and Rustem F. Ismagilov, "Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load," JACS 2011 133: 17705-17712] 및 [Jason E. Kreutz, Todd Munson, Toan Huynh, Feng Shen, Wenbin Du, and Rustem F. Ismagilov, "Theoretical Design and Analysis of Multivolume Digital Assays with Wide Dynamic Range Validated Experimentally with Microfluidic Digital PCR," Analytical Chemistry 2011 83: 8158-8168]을 참조함). 부피는 핵산 증폭 반응을 위해 구성될 수 있다 (문헌 [Feng Shen, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Jason E. Kreutz, Olaf Piepenburg, and Rustem F. Ismagilov, "Digital Isothermal Quantification of Nucleic Acids via Simultaneous Chemical Initiation of Recombinase Polymerase Amplification Reactions on SlipChip," Analytical Chemistry 2011 83:3533-3540]; [Feng Shen, Bing Sun, Jason E. Kreutz, Elena K. Davydova, Wenbin Du, Poluru L. Reddy, Loren J. Joseph, and Rustem F. Ismagilov, "Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load," JACS 2011 133: 17705-17712]; [Jason E. Kreutz, Todd Munson, Toan Huynh, Feng Shen, Wenbin Du, and Rustem F. Ismagilov, "Theoretical Design and Analysis of Multivolume Digital Assays with Wide Dynamic Range Validated Experimentally with Microfluidic Digital PCR," Analytical Chemistry 2011 83: 8158-8168]; 및 [Feng Shen, Wenbin Du, Jason E. Kreutz, Alice Fok, and Rustem F. Ismagilov, "Digital PCR on a SlipChip," Lab Chip 2010 10: 2666-2672]을 참조함). 부피는 본원에 기재된 바와 같이 미생물, 세포 등을 포함하는 유기체의 성장을 위해 구성될 수 있다. 부피는 단백질 결정화를 포함하나 이에 제한되지 않는 결정화를 위해 구성될 수 있다 (문헌 [Liang Li and Rustem F. Ismagilov, "Protein Crystallization Using Microfluidic Technologies Based on Valves, Droplets, and SlipChip," Annu. Rev. Biophys 2010 39: 139-158] 및 [Liang Li, Wenbin Du, and Rustem F. Ismagilov, "Multiparameter Screening on SlipChip Used for Nanoliter Protein Crystallization Combining Free Interface Diffusion and Microbatch Methods," JACS 2010 132: 112-119]을 참조함). 부피는 단백질 검정을 위해 구성될 수 있다 (Weishan Liu, Delai Chen, Wenbin Du, Kevin P. Nichols, and Rustem F. Ismagilov, "SlipChip for Immunoassays in Nanoliter Volumes," Analytical Chemistry 2010 82:3276-3282). 단일 세포 및 분자는 증폭 및 회수될 수 있다. 표면은 친수성 또는 소수성일 수 있다 (Weishan Liu, Delai Chen, Wenbin Du, Kevin P. Nichols, and Rustem F. Ismagilov, "SlipChip for Immunoassays in Nanoliter Volumes," Analytical Chemistry 2010 82:3276-3282).

[0051] 2개의 슬립칩 플레이트의 분리는 유체 아래에서 수행될 수 있다. 유체는 불 hòa화성 오일, 예컨대 테트라데칸 오일, 퍼플루오르화된 오일 또는 임의의 다른 적합한 불 hòa화성 액체를 포함할 수 있다. 일부의 경우, 증발은 슬립칩 상에서 감소되거나 일어나지 않을 수 있다.

[0052] 2개의 슬립칩 플레이트를 분리하는 데 사용되는 힘은 중력일 수 있다. 2개의 슬립칩 플레이트를 분리하는 데 사용되는 힘은 모세관 힘일 수 있다. 2개의 슬립칩 플레이트를 분리하는 데 사용되는 힘은 수력학적일 수 있다. 2개의 슬립칩 플레이트를 분리하는 데 사용되는 힘은 기구, 예컨대 핀셋, 면도날 또는 손가락을 통해 인

가될 수 있다.

[0053] 슬립칩 플레이트는 샘플 부피 또는 액적의 분리를 보장하는 분리가 유지되는 동안 서로에 대해 상대적인 위치에서 유지될 수 있다. 슬립칩 플레이트는 수동으로 위치에서 유지될 수 있다. 슬립칩 플레이트는 클램프로 위치에서 유지될 수 있다. 슬립칩 플레이트는 홀더로 위치에서 유지될 수 있다 (예를 들어 도 1, 도 2A).

[0054] 슬립칩 플레이트의 분할은 또한 샘플의 점도를 증가시켜 샘플 부피 또는 액적이 분할 동안 제거되지 않도록 함으로써 가능해질 수 있다. 샘플의 점도는 중합체의 첨가에 의해 증가될 수 있다. 샘플의 점도는 젤의 첨가에 의해 증가될 수 있다. 샘플의 점도는 고 점도 액체의 첨가에 의해 증가될 수 있다. 샘플의 점도는 온도 변화에 의해 증가될 수 있다. 일부의 경우, 샘플의 점도는 글리세롤의 첨가에 의해 증가될 수 있다. 일부의 경우, 샘플의 점도는 아가로스의 첨가에 의해 증가될 수 있다. 아가로스는 초저 젤화 온도 아가로스일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.1%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.2%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.3%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.4%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.5%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.6%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.7%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.8%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 0.9%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 1.0%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 1.2%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 1.4%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 1.6%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 1.8%일 수 있다. 아가로스의 농도는 적어도 2.0%일 수 있다. 일부의 경우, 아가로스는 약 0.3% 내지 약 2.0%의 농도로 샘플에 첨가된다. 샘플의 온도는 아가로스를 젤화시키기 위해 저하될 수 있다. 슬립칩 플레이트는 샘플의 젤화에 후속으로 분할될 수 있다 (예를 들어 도 2D).

[0055] 일부의 경우, 하나의 슬립칩 플레이트 상의 한정된 부피는 유기체를 포함하는 용액으로 적하되고, 다른 슬립칩 플레이트 상의 한정된 부피는 아가로스를 포함하는 용액으로 적하된다. 유기체는 아가로스의 부재 하에서 배양될 수 있으며, 유기체 성장 후에 부피의 2개의 세트는 조합될 수 있다. 이들 조합된 부피는 샘플의 원래의 세트를 형성할 수 있다. 그 후, 샘플의 2개의 매칭된 세트의 형성은 2개의 플레이트를 슬리핑하여 부피의 2개의 세트를 분리함으로써 형성될 수 있다.

VI. 샘플의 회수

[0057] 병렬화에 후속으로, 샘플은 추가의 분석을 위해 회수될 수 있다. 샘플은 표면-대-표면 수송에 의해 회수될 수 있다. 샘플은 피펫팅에 의해 회수될 수 있다. 피펫팅은 완충제 용액의 부피를 한정된 부피 내로 먼저 피펫팅하고, 완충제를 샘플 부피와 혼합함으로써 수행될 수 있다. 그 후, 완충제 및 샘플의 전체 부피는 피펫팅 업 및 수송될 수 있다. 슬립칩 상의 웰 사이의 공간은 웰 사이의 상호-오염을 방지하기 위해 피펫 팀의 외경보다 클 수 있다. 대안적으로, 피펫팅은 용액, 예컨대 완충제로 충전된 피펫 팀을 샘플 부피와 접촉시켜, 샘플 부피가 피펫 팀 중의 액체와 합류되게 함으로써 수행될 수 있다 (예를 들어 도 3).

[0058] 샘플은 칩 세척 방법에 의해 회수될 수 있다. 칩 세척 방법은 다양한 조건 하에서 장치 상의 반응 또는 다른 공정을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 한정된 부피에 함유된 샘플은 장치, 예컨대 슬립칩 장치로부터 세척되고, 합쳐질 수 있다. 그 후, 분석은 합쳐진 샘플에 대해 수행될 수 있다. 분석은 검사되는 조건이 반응 또는 다른 공정을 가능하게 하거나 불가능하게 한 정도를 결정할 수 있다. 분석은 예를 들어 공정을 가능하게 하기 위한 최소 조건, 공정을 가능하게 하기 위한 최적 조건, 공정을 가능하게 하기 위한 중간 조건, 또는 공정을 불가능하게 하기 위한 최소 조건을 결정할 수 있다. 예를 들어, DNA를 장치 또는 칩 상의 한정된 부피 내로 구분하고, 증폭시키고, 조합된 부피 내로 세척할 수 있고, 그 후 조합된 생성물을 분석하여 증폭 조건이 목적하는 표적의 증폭을 지지하는지 여부를 결정할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포를 장치 또는 칩 상의 한정된 부피 내로 구분되고, 배양하고, 장치로부터 조합된 부피 내로 세척할 수 있고, 그 후 풀링된 세포로부터의 DNA를 서열 분석, 표적-특이적 프라이머, 또는 둘 다에 의해 분석하여, 사용된 배양 조건이 표적 미생물의 성장을 지지했는지 여부를 결정할 수 있다. 이 칩 세척 방법은 조건이 표적에 대해 확인될 때까지 연속적으로 또는 병렬적으로 반복될 수 있다. 예를 들어, 미세유동 장치에 기초한 슬립칩은 각각 약 6 nL의 규모로 3,200 이하의 미생물 배양 실험을 수행할 수 있는 이 칩 세척 방법을 위해 설계될 수 있다. 이러한 장치는 3가지 능력을 가능하게 할 수 있다: 샘플로부터의 단일 세포의 확률적 격리, 미생물 배양, 및 배양된 세포의 수집. 이러한 장치는 단일 출구로 칩 세척 용액을 수집하는 것을 허용할 수 있다. 설계는 도 4에 예시되어 있다. 설계 특징의 이 실시양태는 브리징 채널을 사용하여 수성 상의 유동을 지정할 수 있다 (예를 들어, 적하를 위한 환기구 또는 수집을 위한 출구)

[0059] 샘플 회수는 상이한 시점에서 수행될 수 있다. 일부의 경우, 예컨대 세포의 배양을 위해, 샘플 회수 시점은 샘

풀 중의 상이한 세포의 상이한 성장 속도로 인해 후속 분석의 결과에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어, 세포 배양을 위한 바이오매스의 최대 수율은 성장의 대수 증식기 말기 또는 성장의 초기 유도기에 일어날 수 있다. 샘플의 구분은 예전대 바이오매스의 수율에서 또는 계놈 DNA와 유사한 마커의 양에서 샘플 사이의 편향을 감소시키거나 제거할 수 있다. 이 편향의 감소 또는 제거는 샘플을 회수하는 특정 시점을 기다리는 것의 중요성을 감소시킬 수 있다.

[0060]

샘플 중의 세포의 초기 농도는 플레이트 계수 또는 현미경검사에 의해 추정될 수 있다. 세포는 부피 내로 캡슐화될 수 있다. 세포를 캡슐화하는 데 사용될 수 있는 다수의 접근법이 있다. 예를 들어, 세포는 확률적 격리에 의해 캡슐화될 수 있다. 예를 들어, 미생물 혼탁액은 먼저 확률적 격리의 공정에 의해 많은 액체 미세구획으로 분리될 수 있다 (문헌 [Meghan E. Vincent, Weishan Liu, Elizabeth B. Haney, and Rustem F. Ismagilov, "Microfluidic stochastic confinement enhances analysis of rare cells by isolating cells and creating high density environments for control of diffusible signals," *Chem. Soc. Rev.* 2010 39: 974-984. DOI: 10.1039/b917851a]; [James Q. Boedicker, Liang Li, Timothy R. Kline, and Rustem F. Ismagilov, "Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics," *Lab Chip* 2008 8: 1265-1272. DOI 10.1039/b804911d]; [Weishan Liu, Hyun Jung Kim, Elena M. Lucchetta, Wenbin Du, and Rustem F. Ismagilov, "Isolation, incubation, and parallel functional testing and identification by FISH of rare microbial single-copy cells from multi-species mixtures using the combination of chemistroke and stochastic confinement," *Lab Chip* 2009 9: 2153-2162. DOI: 10.1039/b904958d]을 참조함). 예를 들어, 미세구획의 수가 포이즌 (Poisson) 통계학에 기초하여 미생물 세포의 수보다 많은 경우, 대부분의 웰은 하나 또는 0의 세포를 함유할 수 있다. 예를 들어, 1 나노리터 웰을 사용하여 10^6 또는 10^5 개 세포/밀리리터 미만의 농도로 샘플을 확률적으로 가꿀 수 있다. 그러나, 포이즌 한계는 예를 들어 세포가 활성적으로 제어된 세포 분류에 의해 캡슐화될 수 있는 경우, 또는 세포가 자가-조직화에 의해 수동적으로 캡슐화될 수 있는 경우 극복될 수 있다 (문헌 [Jon F. Edd, Dino Di Carlo, Katherine J. Humphry, Sarah Koster, Daniel Irimia, David A. Weitz, and Mehmet Toner, "Controlled encapsulation of single cells into monodisperse picoliter drops," *Lab Chip* August 2008, 8 (8): 1262-1264. DOI 10.1039/b805456h]을 참조함). 또한, 세포는 샘플의 다른 성분에 비해 우선적으로 세포를 포획하도록 설계된 특징으로 포획될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Dino Di Carlo, Liz Y. Wu, and Luke P. Lee, "Dynamic single cell culture array," *Lab Chip*, 2006, 6, 1445-1449, DOI: 10.1039/B605937F] 및 [Alison M Skelley, Oktay Kirak, Heikyung Suh, Rudolf Jaenisch, and Joel Voldman, "Microfluidic control of cell pairing and fusion," *Nature Methods* 6, 147 - 152 (2009), DOI:10.1038/nmeth.1290]을 참조함).

[0061]

VII. 샘플로부터의 유기체의 배양

[0062]

본 개시내용에 기재된 방법, 조성물 및 장치는 샘플로부터의 유기체를 배양하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 환경으로부터의 유기체를 샘플링하고, 배양을 위한 장치 상으로 적하할 수 있다. 유기체를 포함하는 샘플을 샘플의 원래의 세트 내로 구분할 수 있다. 샘플을 인큐베이션하여 유기체의 콜로니 또는 집단을 성장시킬 수 있다. 콜로니 또는 집단 성장에 후속으로, 샘플의 원래의 세트를 각각 유기체의 콜로니 또는 집단을 함유하는 샘플의 매칭된 세트로 분할할 수 있다. 샘플의 하나의 세트를 유전자, 활성 또는 관심의 다른 특징을 포함하는 것을 확인하기 위해 검정할 수 있다. 그 후, 또 다른 세트로부터의 상응하는 샘플을 배양, 규모-확대 또는 다른 추가의 연구를 위해 선택할 수 있다.

[0063]

본 개시내용에 기재된 병렬적 샘플 취급은 샘플로부터의 표적화된 유기체를 단리 및 배양하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 관심의 유전자를 함유하는 환경으로부터의 유기체는 추가의 연구를 위해 확인 및 단리될 수 있다. 또 다른 예에서, 관심의 활성을 갖는 환경으로부터의 유기체는 추가의 연구를 위해 확인 및 단리될 수 있다. 적어도 하나는 표적화된 유기체를 포함하는 샘플을 샘플의 원래의 세트 내로 구분할 수 있다. 샘플을 인큐베이션하여 유기체의 콜로니 또는 집단을 성장시킬 수 있다. 콜로니 또는 집단 성장에 후속하여, 샘플의 원래의 세트를 각각 유기체의 콜로니 또는 집단을 함유하는 샘플의 매칭된 세트로 분할할 수 있다. 샘플의 하나의 세트를 관심의 유전자, 활성 또는 다른 특징을 포함하는 것을 확인하기 위해 검정할 수 있다. 그 후, 또 다른 세트로부터의 상응하는 샘플을 배양, 규모-확대 또는 다른 추가의 연구를 위해 선택할 수 있다.

[0064]

유기체를 포함하는 샘플은 한정된 부피 중에서 구분될 수 있다. 주어진 한정된 부피 중의 세포 또는 유기체의 수는 구분되는 샘플 중의 세포 또는 유기체의 초기 농도에 의해 제어될 수 있다. 포이즌 통계학과 같은 통계학

적 방법을 사용하여 한정된 부피 중의 유기체 또는 세포를 측정할 수 있다. 배양 또는 인큐베이션 전에, 한정된 부피는 적어도 1개의 세포 또는 유기체, 적어도 2개의 세포 또는 유기체, 적어도 3개의 세포 또는 유기체, 적어도 4개의 세포 또는 유기체, 적어도 5개의 세포 또는 유기체, 적어도 6개의 세포 또는 유기체, 적어도 7개의 세포 또는 유기체, 적어도 8개의 세포 또는 유기체, 적어도 9개의 세포 또는 유기체, 적어도 10개의 세포 또는 유기체, 적어도 15개의 세포 또는 유기체, 적어도 20개의 세포 또는 유기체 또는 적어도 25개의 세포 또는 유기체를 포함할 수 있다. 배양 또는 인큐베이션 전에, 한정된 부피는 최대한 1개의 세포, 최대한 2개의 세포 또는 유기체, 최대한 3개의 세포 또는 유기체, 최대한 4개의 세포 또는 유기체, 최대한 5개의 세포 또는 유기체, 최대한 6개의 세포 또는 유기체, 최대한 7개의 세포 또는 유기체, 최대한 8개의 세포 또는 유기체, 최대한 9개의 세포 또는 유기체, 최대한 10개의 세포 또는 유기체, 최대한 15개의 세포 또는 유기체, 최대한 20개의 세포 또는 유기체 또는 최대한 25개의 세포 또는 유기체를 포함할 수 있다.

[0065]

유기체를 포함하는 샘플은 배양될 수 있다. 배양은 다양한 배양 시간 동안 수행될 수 있다. 배양 시간은 적어도 30분, 적어도 1시간, 적어도 2시간, 적어도 3시간, 적어도 4시간, 적어도 5시간, 적어도 6시간, 적어도 7시간, 적어도 8시간, 적어도 9시간, 적어도 10시간, 적어도 11시간, 적어도 12시간, 적어도 18시간, 적어도 24시간, 적어도 36시간, 또는 적어도 48시간일 수 있다. 배양 시간은 최대한 30분, 최대한 1시간, 최대한 2시간, 최대한 3시간, 최대한 4시간, 최대한 5시간, 최대한 6시간, 최대한 7시간, 최대한 8시간, 최대한 9시간, 최대한 10시간, 최대한 11시간, 최대한 12시간, 최대한 18시간, 최대한 24시간, 최대한 36시간 또는 최대한 48시간일 수 있다. 배양은 다양한 온도에서 수행될 수 있다. 배양 온도는 적어도 -10°C, 적어도 -5°C, 적어도 0°C, 적어도 5°C, 적어도 10°C, 적어도 15°C, 적어도 20°C, 적어도 25°C, 적어도 30°C, 적어도 35°C, 적어도 37°C, 적어도 40°C, 적어도 45°C, 적어도 50°C, 적어도 55°C, 적어도 60°C 또는 적어도 65°C일 수 있다. 배양 온도는 최대한 -10°C, 최대한 -5°C, 최대한 0°C, 최대한 5°C, 최대한 10°C, 최대한 15°C, 최대한 20°C, 최대한 25°C, 최대한 30°C, 최대한 35°C, 최대한 37°C, 최대한 40°C, 최대한 45°C, 최대한 50°C, 최대한 55°C, 최대한 60°C 또는 최대한 65°C일 수 있다. 배양은 실온에서 수행될 수 있다. 배양은 37°C에서 수행될 수 있다.

[0066]

VIII. 검정 및 확인 방법

[0067]

관심의 유기체 또는 다른 샘플은 다양한 수단에 의해 확인될 수 있다. 확인은 샘플이 여전히 병렬적 샘플 취급 시스템 (예를 들어 슬립칩 장치, 미세유동 액적 장치, 마이크로웰 어레이 또는 다른 병렬적 샘플 취급 시스템) 내에 있는 동안 수행될 수 있다. 미세유동 액적 장치는 예를 들어 미국 특허 제7,129,091호에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참고로 도입된다. 확인은 병렬적 샘플 취급 시스템으로부터 제거된 샘플 상에서 수행될 수 있다.

[0068]

관심의 유기체는 유전적 마커에 의해 선택 또는 확인될 수 있다. 유전적 마커에 의한 확인은 PCR에 의해 수행될 수 있다. 관심의 유전적 영역 (예를 들어 유전자, 유전자의 세트, 프로모터 또는 유전자 구축물)을 표적화하는 PCR 프라이머를 사용하여 PCR을 수행할 수 있으며, PCR 생성물의 존재는 관심의 유전적 영역의 존재를 지시한다. 예를 들어, 유기체는 슬립칩 상의, 배양된 및 분할된 원래의 샘플 부피 내로 분산될 수 있다 (도 5A). 슬립칩의 하나의 플레이트는 PCR 시약을 포함하는 슬립칩 플레이트와 결합되고, 반응하여 PCR 생성물을 형성할 수 있으며 (도 5B), PCR 생성물의 존재는 관심의 유전적 영역의 존재를 지시한다. 등온 증폭 방법이 사용될 수 있다. 유전적 마커의 확인은 FISH에 의해 수행될 수 있다. 관심의 유전적 영역을 표적화하는 형광 프로브를 샘플에 첨가하고, 혼성화시킬 수 있다. 비결합된 프로브는 세척될 수 있으며, 형광 프로브의 존재는 관심의 유전적 영역의 존재를 지시한다. 유전적 마커의 확인은 서열분석에 의할 수 있다. 각각의 샘플로부터의 단일 핵산 문자는 서열분석될 수 있다. 각각의 샘플로부터의 핵산 문자는 증폭될 수 있으며, 증폭 생성물은 서열분석될 수 있다. 증폭 및 서열분석은 특정 영역을 표적화할 수 있거나, 전체 게놈을 표적화할 수 있다.

[0069]

기능-표적화된 접근법이 또한 사용될 수 있다. 기능적 검정은 유전자-기반 방법에서 개발된 일반적 작업흐름을 공유할 수 있다. 형광, 비색, 화학발광 또는 질량 분광 검정을 포함하는 (그러나 이에 제한되지 않는) 검정을 사용하여 특정 기능을 수행할 수 있는 미생물을 확인할 수 있다. 이러한 고 처리량 기능적 검정은 또한 바람직 할 경우 임상적 샘플 상에서 직접적으로 수행될 수 있다. 예를 들어 슬립칩의 분할로부터 생성된 미생물 세포 마이크로어레이를 생물학적 조직의 조각 (예를 들어 장으로부터의)과 결합하여 기능적 검정을 수행할 수 있다. 일부의 경우, 장으로부터의 조직은 관심의 기능을 위한 GFP 리포터를 갖는 트랜스제닉 마우스로부터 얻어질 수 있다. 조직을 미생물 세포 어레이와 결합하고, 인큐베이션한 후, 국재화된 GFP 발현을 표준 에피형광 현미경검사를 사용함으로써 가시화할 수 있다. 바람직할 경우, 그 후, 상응하는 콜로니를 또 다른 목적, 예컨대 관심의 단리체의 규모-확대 배양을 위해 제2 플레이트로부터 회수할 수 있다.

- [0070] 일부의 경우, 확인 또는 표적화되는 기능적 활성은 효소적이다. 기능적 활성은 가시 또는 UV-흡수 생성물을 생성할 수 있다. 효소적 방법은 콜레스테롤 옥시다제 활성을 검출하기 위한 CHOD-PAP 방법일 수 있다. 효소적 방법은 글루코스 옥시다제 활성을 검출하기 위한 GOD-페리드 (Perid) 방법일 수 있다. 효소적 방법은 락테이트 데히드로게나제 활성을 검출하기 위한 것일 수 있다. 효소적 활성은 셀룰로스 분해 염료를 사용한 셀룰로스의 분해일 수 있다. 효소적 활성은 리그닌 분해 염료를 사용한 리그닌의 분해일 수 있다. 일부의 경우, 기능적 활성은 형광원성 기질과 상호작용함으로써 검출된다. 예를 들어, N,N-디부틸 페닐렌 디아민을 사용하여 술페이트-환원 유기체의 활성을 검출하기 위한 H_2S 를 검출할 수 있다.
- [0071] 일부의 경우, 확인 또는 표적화되는 기능적 활성은 저항성 또는 저항성의 세트이다. 저항성은 항생제에 대한 것일 수 있다. 저항성은 특정 성장 조건, 예컨대 온도, 대기, 압력, 다른 유기체의 존재 또는 다른 조건에 대한 것일 수 있다. 확인은 선택된 조건 하에서의 성장의 존재, 부재, 규모 또는 속도에 기초할 수 있다.
- [0072] 일부의 경우, 확인되는 기능적 활성은 화학물질에 대한 반응이다. 반응은 음성, 예를 들어 성장의 억제일 수 있다. 반응은 양성, 예를 들어 성장의 촉진일 수 있다. 확인은 선택된 조건 하에서의 성장의 존재, 부재, 규모 또는 속도에 기초할 수 있다.
- [0073] **IX. 기체 제어**
- [0074] 액체 배양 배지는 미생물의 성장을 지지하는 데 중요할 수 있는 반면, 기체 상의 함량을 제어하는 것은 또한 미생물 배양에 중요할 수 있다. 일부 미생물은 특정 기체의 존재에 따라서는 성장할 수 없을 수 있다. 예를 들어, 완전 협기성미생물은 산소에 민감하며, 공기에 노출시 성장하지 않을 것이다. 일부의 미생물은 성장하기 위해 특정 유형의 기체를 필요로 한다. 예를 들어, 대부분의 고세균류는 세포 물질 내로 CO_2 를 동화하는 독립영양체이며, CO_2 의 부재 하에서는 성장하지 않을 것이다. 폐기물, 예컨대 열포균류로부터의 수소 또는 술페이트 환원 박테리아로부터의 황화수소의 축적은 그들의 성장에 대해 억제성일 수 있다.
- [0075] 기체 제어는 제어된 환경을 갖는 챔버, 예컨대 협기성 챔버 내에 장치를 설치함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 협기성 배양의 내용에서, 기체 상 중의 산소의 분압은 통상적으로 협기성 챔버 또는 형게이트 (Hungate) 를 투브 기술에 의해 제어된다. 협기성 챔버의 기체 상 중의 산소는 팔리듐 촉매를 갖는 수소에 의해 환원될 수 있다. 이 방법은 인간 장으로부터의 대부분의 미생물을 배양하는 것과 혼화성이며, 한천 플레이트의 사용을 허용한다. 형게이트 를 투브 방법은 보다 엄격한 협기성미생물, 예컨대 메탄생성미생물을 배양하는 데 폭넓게 사용되며, 여기서 유리 투브 및 부틸 고무 스토퍼의 사용은 용기 내로의 산소의 확산을 효과적으로 방지할 수 있다. 밀봉될 수 있는 용기 또는 병일 수 있는 임의의 유형의 환경은 배양을 위한 환경을 제공하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 장치를 유리 병 내에 정치할 수 있고, 그 후 바람직한 기체 또는 기체들을 주입할 수 있다.
- [0076] 기체 제어는 기체 공급 채널을 장치 그 자체 상으로 혼입함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 슬립칩 장치 (도 6A)는 오일 및 수성 상을 갖는 웰을 가질 수 있다. 슬립칩 장치는 기체 공급 채널을 포함하도록 설계될 수 있다 (도 6B). 채널과 웰 사이의 거리는 대략 수백 마이크로미터일 수 있으며, 이는 장치 기질을 통한 산소에 대한 대략 수 분의 특징적인 확산 시간을 초래한다.
- [0077] 기체 제어는 장치의 성분 사이의 간격의 크기를 증가시킴으로써 달성될 수 있다. 대면하는 플레이트를 갖는 슬립칩 장치는 스페이서 또는 포스트의 첨가 또는 제작에 의해 증가된 플레이트 사이의 거리를 가질 수 있다. 예를 들어, 플레이트 기질을 에칭하여 플레이트 사이의 간격 거리를 증가시는 포스트 특징을 생성할 수 있다. 대안적으로, 포스트 또는 스페이서는 금속, 플라스틱, 산화물 또는 포토레지스트와 같은 물질을 플레이트 표면에 첨가함으로써 제작될 수 있다. 포스트 또는 스페이서 높이는 약 100 nm 이하, 약 200 nm 이하, 약 400 nm 이하, 약 500 nm 이하, 약 700 nm 이하, 약 900 nm 이하, 약 1.5 μm 이하 또는 약 2 μm 이하일 수 있다. 포스트 높이는 약 100 nm 이상, 약 200 nm 이상, 약 400 nm 이상, 약 500 nm 이상, 약 700 nm 이상, 약 900 nm 이상, 약 1.5 μm 이상 또는 약 2 μm 이상일 수 있다. 스페이서 또는 포스트는 예컨대 플루오르화수소산을 사용한 습식 화학적 에칭에 의해 제작될 수 있다. 스페이서 또는 포스트는 플라즈마 에칭에 의해, 예컨대 반응성이온 에칭 또는 심부 반응성이온 에칭에 의해 제작될 수 있다. 스페이서 또는 포스트의 제작은 포토리소그래피, 연성 리소그래피, 레이저 애블레이션, 미세성형, 엠보싱 또는 다른 미세제작 기술로 수행될 수 있다. 간격은 대기 외부로부터, 온-칩 기체 공급 채널로부터, 또는 둘 다로부터 증가된 기체 수송을 허용할 수 있다. 세포 성장은 상이한 간격 거리에 의해 가능한 기체 수송에 기초하여 다양할 수 있다.

[0078] 기체 제어는 장치 물질의 선택에 의해 달성될 수 있다. 상이한 장치 물질, 예컨대 유리, PDMS, PMMA, 다른 플라스틱 및 금속은 기질을 통한 상이한 속도의 확산을 허용한다. 오일 상이 사용되는 경우, 상이한 오일, 예컨대 퍼플루오르화된 오일, 광물 오일 또는 다른 오일은 상이한 속도의 확산을 허용한다.

[0079] 제어된 기체는 폭넓은 범위의 단일 기체 또는 기체의 조합을 포함할 수 있다. 기체의 예로는 O₂, CO₂, CO, N₂, NO, NO₂, H₂O, 공기 또는 다른 기체를 들 수 있다. 제어된 기체는 대기압, 대기압보다 높은 압력 또는 대기압보다 낮은 압력을 포함하는 상이한 압력에서 제공될 수 있다.

X. 화학적 연락 제어

[0081] 장치는 한정된 부피 사이의 화학적 연락을 허용하면서 한정된 부피 내의 분석물을 함유하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 한 쌍의 웨л을 브리지에 의해 연결하여 (도 10B, 도 10D), 각각의 웨л의 내용물이 완전히 분리되기보다는 (도 10A, 도 10C) 그들의 각각의 웨л에 함유된 세포를 유지하면서 확산적 화학적 연결을 허용할 수 있다.

XI. 온침 희석

[0083] 희석은 온-침으로 수행될 수 있다. 희석은 선형일 수 있다. 희석은 대수적일 수 있다. 희석은 단일 희석 단계를 포함할 수 있다. 희석은 다중 희석 단계를 포함할 수 있다.

[0084] 희석은 슬립칩 장치로 수행될 수 있다. 희석은 슬립칩을 구동하여 샘플의 부피를 희석액의 부피와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 다중 단계의 희석은 슬립칩 다중 시간을 구동하여 샘플의 부피를 희석액의 일련의 부피와 접촉시킴으로써 수행될 수 있다. 슬립칩 웨л 표면은 친수성 또는 소수성일 수 있다. 희석은 하나의 장치 상에서 또는 다중 장치 상에서 수행될 수 있다.

[0085] 혼합은 희석 단계 사이에 일어날 수 있다. 혼합은 인가된 혼합력, 예컨대 초음파처리, 볼텍싱, 아지테이션, 교반, 전기유체역학적 힘, 부피 내에서의 유동의 생성 또는 다른 수단에 의한 능동적인 것일 수 있다. 혼합은 확산적 혼합을 위한 적당한 시간을 허용함에 의한 것과 같이 수동적인 것일 수 있다. 샘플의 부피 및 희석액의 부피는 부피가 동일할 수 있거나, 부피가 상이할 수 있다.

XII. 자동화

[0087] 본 개시내용에서 제공되는 방법, 장치 및 시스템은 자동화 장비 또는 로봇공학으로 사용될 수 있다. 병렬적 샘플 취급을 위한 시스템 및 장치, 예컨대 슬립칩 장치의 제작은 자동화될 수 있다. 장치 상으로의 샘플의 전처리 및 적하는 자동화될 수 있다. 원래의 샘플의 분할에 의한 샘플의 병렬화는 자동화될 수 있다. 온-디바이스 작동, 예컨대 혼합, 분할, 희석, 사이의 화학적 연락의 허용을 구동하기 위한 슬립칩 성분의 슬리핑 또는 구동은 자동화될 수 있다. 샘플의 배양 또는 증폭은 자동화될 수 있다. 병렬화된 샘플을 생성하기 위한 슬립칩 플레이트의 분할은 자동화될 수 있다. 관심의 샘플을 함유하는 한정된 부피를 확인하기 위한 검정 또는 다른 기술의 수행은 자동화될 수 있다. 관심의 샘플의 회수 또는 모든 샘플을 회수 및 풀링하기 위한 칩 세척의 수행은 자동화될 수 있다. 기체 분위기, 온도 및 다른 파라미터를 포함하는 샘플 환경의 제어는 자동화될 수 있다. 상이한 기질 상의 샘플의 매칭된 세트의 확인은 예를 들어 컴퓨터화된 화상 분석 방법을 사용하여 자동화될 수 있다.

XIII. 병원체 진단

[0089] 본원의 방법론 및 장치는 병원체성 미생물을 검출, 정량화 또는 분석하고, 이들 병원체와 관련된 상태를 진단하는 데 사용될 수 있다. 박테리아 병원체의 예로는 아에로모나스 히드로필라 (*Aeromonas hydrophila*) 및 다른 종 (종); 바실루스 안트라시스 (*Bacillus anthracis*); 바실루스 세레우스 (*Bacillus cereus*); 클로스트리디움 (*Clostridium*)의 종을 생성하는 보툴리눔 뉴로톡신 (*Botulinum neurotoxin*); 브루셀라 아보르투스 (*Brucella abortus*); 브루셀라 멜리텐시스 (*Brucella melitensis*); 브루셀라 수이스 (*Brucella suis*); 부르크홀데리아 말레이 (*Burkholderia mallei*) (이전에는 슈도모나스 말레이 (*Pseudomonas mallei*)); 부르크홀데리아 슈도말레이 (*Burkholderia pseudomallei*) (이전에는 슈도모나스 슈도말레이 (*Pseudomonas pseudomallei*)); 캄필로박ter 제주니 (*Campylobacter jejuni*); 클라미디아 프시타시 (*Chlamydia psittaci*); 클로스트리디움 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*); 클로스트리디움 보툴리눔 (*Clostridium botulinum*); 클로스트리디움 페르프린겐스 (*Clostridium perfringens*); 코키디오이데스 임미티스 (*Coccidioides immitis*); 코키디오이데스 포사다시이 (*Coccidioides posadasii*); 코우드리아 류미난티움 (*Cowdria ruminantium*) (하트워터 (*Heartwater*)); 콕시엘라 부르네티이 (*Coxiella burnetii*); 엔테로비러렌트 에스케리키아 콜라이 군 (*Enterovirulent Escherichia coli*

group) (EEC 군), 예컨대 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) - 장독소생성 (ETEC), 에스케리키아 콜라이 - 장병원성 (EPEC), 에스케리키아 콜라이 - 0157:1-17 장출혈성 (EHEC) 및 에스케리키아 콜라이 - 장침습성 (EIEC); 에를리키아 (*Ehrlichia*) 종, 예컨대 에를리키아 샤페엔시스 (*Ehrlichia chaffeensis*); 프란시셀라 툴라렌시스 (*Francisella tularensis*); 레지오넬라 뉴모필리아 (*Legionella pneumophila*); 리베로박터 아프리카누스 (*Liberobacter africanus*); 리베로박터 아시아티쿠스 (*Liberobacter asiaticus*); 리스테리아 모노시토게네스 (*Listeria monocytogenes*); 다양한 엔테릭스, 예컨대 클레브시엘라 (*Klebsiella*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 프로테우스 (*Proteus*), 시트로박터 (*Citrobacter*), 아에로박터 (*Aerobacter*), 프로비덴시아 (*Providencia*) 및 세라티아 (*Serratia*); 미코박테리움 보비스 (*Mycobacterium bovis*); 미코박테리움 투베르콜로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*); 미코플라스마 카프리콜룸 (*Mycoplasma capricolum*); 미코플라스마 미코이데스 종 미코이데스 (*Mycoplasma mycoides ssp mycoides*); 페로노스클레로스포라 필리피넨시스 (*Peronosclerospora philippensis*); 파코프소라 파키리지 (*Phakopsora pachyrhizi*); 플레시오모나스 시겔로이데스 (*Plesiomonas shigelloides*); 랄스토니아 솔라나케아룸 (*Ralstonia solanacearum*) 레이스 3, 생태형 2; 리케치아 프로와제키아 (*Rickettsia prowazekii*); 리케치아 리케치아 (*Rickettsia rickettsii*); 살모넬라 (*Salmonella*) 종; 스클레로프토라 라이스시아에 바르제아에 (*Schlerophthora rayssiae varzeae*); 시겔라 (*Shigella*) 종; 스타필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*); 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*); 신키트리움 엔도비오티쿰 (*Synchytrium endobioticum*); 비브리오 콜레라에 논-01 (*Vibrio cholerae non-01*); 비브리오 콜레라에 01; 비브리오 파라하에몰리티쿠스 (*Vibrio parahaemolyticus*) 및 다른 비브리오; 비브리오 불니피쿠스 (*Vibrio vulnificus*); 크산토모나스 오리자에 (*Xanthomonas oryzae*); 크실렐라 파스티디오사 (*Xylella fastidiosa*) (감귤류 다종 위황병 균주 (*citrus variegated chlorosis strain*); 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 및 예르시니아 슈도투베르콜로시스 (*Yersinia pseudotuberculosis*); 및 예르시니아 페스티스 (*Yersinia pestis*)를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0090]

유기체의 추가의 예로는 바이러스, 예컨대 아프리카 말역 바이러스; 아프리카 돼지 열 바이러스; 아카바네 (*Akabane*) 바이러스; 조류 인플루엔자 바이러스 (고 병원성); 반자 (*Bhanja*) 바이러스; 블루 텅 (Blue tongue) 바이러스 (외래성); 낙타 두창 바이러스; 세르코피테신 (*Cercopithecine*) 헤르페스바이러스 1; 치쿤군야 (*Chikungunya*) 바이러스; 고전적 돼지 열 바이러스; 코로나바이러스 (*Coronavirus*) (SARS); 크리민-콩고 (*Crimean-Congo*) 출혈열 바이러스; 뎅기 (*Dengue*) 바이러스; 더그비 (*Dugbe*) 바이러스; 에볼라 (*Ebola*) 바이러스; 뇌염 바이러스, 예컨대 동부 말 뇌염 바이러스, 일본 뇌염 바이러스, 머레이 밸리 (*Murray Valley*) 뇌염 및 베네수엘라 말 뇌염 바이러스; 말 모르빌리바이러스 (*Equine morbillivirus*); 플렉살 (*Flexal*) 바이러스; 발 및 입 질병 바이러스; 저미스톤 (*Germiston*) 바이러스; 산양 두창 바이러스; 한탄 (*Hantaan*) 또는 다른 한타 (*Hanta*) 바이러스; 헨드라 (*Hendra*) 바이러스; 이식-쿨 (*Issyk-kul*) 바이러스; 코우탕고 (*Koutango*) 바이러스; 라사 (*Lassa*) 열 바이러스; 도약병 바이러스; 괴피병 바이러스; 림프구성 맥락수막염 바이러스; 악성 카타르열 바이러스 (외래성); 마르부르크 (*Marburg*) 바이러스; 마야로 (*Mayaro*) 바이러스; 메낭글 (*Menangle*) 바이러스; 원숭이 두창 바이러스; 무캄보바이러스 (*Mucambovirus*); 뉴캐슬병 바이러스 (*WND*); 니파 (*Nipah*) 바이러스; 노워크 (*Norwalk*) 바이러스 군; 오로퓨스 (*Oropouche*) 바이러스; 오룽고 (*Orungo*) 바이러스; 페스테 테스 페티츠 (*Peste Des Petits*) 반추동물 바이러스; 페리 (*Piry*) 바이러스; 플럼 폭스 포티바이러스 (*Plum Pox Potyvirus*); 폴리오바이러스 (*Poliovirus*); 감자 바이러스; 포와산 (*Powassan*) 바이러스; 리프트 밸리 (*Rift Valley*) 열 바이러스; 우역 바이러스; 로타바이러스 (*Rotavirus*); 셈리키 포레스트 (*Semliki Forest*) 바이러스; 양 두창 바이러스; 남미 출혈열 바이러스, 예컨대 플렉살 (*Flexal*), 구아나리토 (*Guanarito*), 주닌 (*Junin*), 마추포 (*Machupo*) 및 사비아 (*Sabia*); 스폰드웨니 (*Spondweni*) 바이러스; 돼지 혈관병 바이러스; 진드기-매개 뇌염 복합 (*Tick-borne encephalitis complex*) (플라비) 바이러스, 예컨대 중부 유럽 진드기-매개 뇌염, 극동 진드기-매개 뇌염, 러시아 봄 및 여름 뇌염; 키아사누르 (*Kyasanur*) 삼립병 및 옴스크 (*Omsk*) 출혈열; 대두창 바이러스 (천연두 바이러스); 소두창 바이러스 (알라스트림 (*Alastrim*)); 수포성 구내염 바이러스 (외래성); 웨셀브론 (*Wesselbron*) 바이러스; 웨스트 나일 (*West Nile*) 바이러스; 황열 바이러스; 및 남미 출혈열 바이러스, 예컨대 주닌, 마추포, 사비아, 플렉살 및 구아나리토를 들 수 있다.

[0091]

유기체의 추가의 예로는 기생성 원충 및 별레, 예컨대 아칸트아메바 및 다른 독립-생활 아메바; 아니사키스 (*Anisakis*) 종 및 다른 관련된 별레 아스카리스 룸브리코이데스 (*Ascaris lumbricoides*) 및 트리쿠리스 트리키우라 (*Trichuris trichiura*); 크립토스포리디움 파르븀 (*Cryptosporidium parvum*); 시클로스포라 카에타넨시스 (*Cyclospora cayetanensis*); 디필로보트리움 (*Diphyllobothrium*) 종; 엔트아메바 히스톨리티카 (*Entamoeba histolytica*); 유스트롱길리데스 (*Eustrongylides*) 종; 지아르디아 람블리아 (*Giardia lamblia*); 나노피에투스 (*Nanophyetus*) 종; 시스토소마 (*Shistosoma*) 종; 톡소플라스마 곤디이 (*Toxoplasma gondii*); 필라리아 선충류

및 트리키넬라 (*Trichinella*)를 들 수 있다. 분석물의 추가의 예로는 알레르겐, 예컨대 식물 화분 및 밀 글루텐을 들 수 있다.

[0092] 유기체의 추가의 예로는 진균류, 예컨대 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 종; 블라스토미세스 더마티티디스 (*Blastomyces dermatitidis*); 칸디다 (*Candida*); 코키디오이데스 임미티스 (*Coccidioides immitis*); 콕시디오이데스 포사다시이 (*Coccidioides posadasii*); 크립토코쿠스 네오포르만스 (*Cryptococcus neoformans*); 히스토플라스마 카푸라툼 (*Histoplasma capsulatum*); 옥수수 녹병; 도열병; 벼 갈색점무늬병; 호밀 블라스트 (*Rye blast*); 스포로트릭스 쉘크키이 (*Sporothrix schenckii*); 및 밀 진균을 들 수 있다.

XIV. 마이크로바이옴 진단 및 단리

[0094] 본원에 기재된 방법론 및 장치는 마이크로바이옴의 조성 및 기능에 기초한 인간 질환의 개인화된 진단에 유용할 수 있다. 수백만의 미국인에게 영향을 미치는 다수의 질환, 예컨대 IBD, 감염, 당뇨병, 자가면역 상태 및 비만은 마이크로바이옴과의 관련성을 갖는다. 다른 과정, 예컨대 알레르기, 설사, 락토스 불내성, 콜레스테롤 수준의 제어, 혈압의 제어, 면역 기능 및 감염, 헬리코박터 필로리 (*Helicobacter pylori*), 염증, 스트레스 하의 박테리아 성장, 과민성 장 증후군 및 결장염, HIV 감염 및 다른 바이러스 감염, 괴사성 소장결장염, 비타민 생성, 습진, 박테리아성 질증, 약물 대사 및 부작용, 클로스트리디움 디피실레 (*Clostridium difficile*) 감염, 자폐증 및 다른 복합 신경계 장애는 또한 마이크로바이옴과 상관될 수 있다. 숙주의 건강한 또는 질환에 걸린 상태는 분류학적 또는 기능적 프로파일을 사용하여 분류될 수 있다 (문헌 [Shi Huang, Rui Li, Xiaowei Zeng, Tao He, Helen Zhao, Alice Chang, Cunpei Bo, Jie Chen, Fang Yang, Rob Knight, Jiquan Liu, Catherine Davis and Jian Xu, "Predictive modeling of gingivitis severity and susceptibility via oral microbiota," ISME J advance online publication, March 20, 2014; doi:10.1038/ismej.2014.32 [Epub ahead of print]] 및 [Nicola Segata, Jacques Izard, Levi Waldron, Dirk Gevers, Larisa Miropolsky, Wendy S Garrett, and Curtis Huttenhower, "Metagenomic biomarker discovery and explanation," *Genom Biol.* 2011; 12(6); R60; doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60]을 참조함). 이는 대상체로부터 살아있는 유기체를 함유하는 샘플을 얻고, 이 샘플을 미세제작된 기질 상으로 분포시키고, 박테리아, 진균류, 고세균류 및 바이러스, 및 원충을 포함하는 적어도 하나의 미생물을 성장시키고, 유전적 또는 기능적 검정을 수행하여 마커 분류군 또는 기능의 상대적 및/또는 절대적 풍부도를 검출하고, 이 정보를 사용하여 나중 단계에서 숙주의 건강 및 질환 상태를 결정하거나 예측함으로써 수행될 수 있다. 일부의 경우, 이 방법 및 장치는 또한 숙주의 히스토리를 결정하는 데 사용될 수 있으며, 법의학적 적용에 유용할 수 있다 (문헌 [Noah Fierer, Christian L. Lauber, Nick Zhou, Daniel McDonald, Elizabeth K. Costello, and Rob Knight, "Forensic identification using skin bacterial communities," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010 Apr 6;107(14):6477-81. doi: 10.1073/pnas.1000162107]을 참조함).

[0095] 본원에 기재된 방법에 의한 미생물의 단리는 IBD, 감염, 당뇨병, 자가면역 상태 및 비만을 포함하나 이에 제한되지 않는 수백만의 사람들에게 영향을 미치는 상태의 내용에서, 치료적 및 예방적 방식으로 인간 장의 이상을 조절함으로써 삶의 질을 개선시키고 건강관리 비용을 감소시킬 수 있다 (문헌 [Elaine O Petrof, Gregory B Gloor, Stephen J Vanner, Scott J Weese, David Carter, Michelle C Daigneault, Eric M Brown, Kathleen Schroeter, and Emma Allen-Vercoe, "Stool substitute transplant therapy for eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut," *Microbiome*. 2013 Jan 9;1(1):3. doi: 10.1186/2049-2618-1-3]을 참조함). 다수의 상태는 마이크로바이옴과의 연관성을 가지며, 본원에 기재된 방법론을 사용하여 단리된 미생물 및 미생물 군집으로 치료적으로 및/또는 예방적으로 처리될 수 있다. 이들로는 알레르기, 설사, 락토스 불내성, 콜레스테롤 수준의 제어, 혈압의 제어, 면역 기능 및 감염, 헬리코박터 필로리, 염증, 스트레스 하의 박테리아 성장, 과민성 장 증후군 및 결장염, HIV 감염 및 다른 바이러스 감염, 괴사성 소장결장염, 비타민 생성, 습진, 박테리아성 질증, 약물 대사 및 부작용, 클로스트리디움 디피실레 감염, 자폐증 및 다른 복합 신경계 장애를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이 방법론은 감염, 질환, 치료, 중독 또는 장 기능이상 성분 또는 부작용을 갖는 상태의 개선, 안정화, 치료 및/또는 예방, 또는 그의 증상의 감소 또는 지연을 위해, 또는 변비의 개선, 치료 및 또는 예방을 위해, 복통, 비-특이적 복통 또는 설사, 약물 부작용 또는 생리학적 상태 또는 크론병에 의해 유발되는 설사, 독, 독소 또는 감염, 독소-매개된 여행자의 설사, 또는 클로스트리디움 (*Clostridium*) 또는 씨. 페르프린겐스 웰치이 (*C. perfringens welchii*) 또는 씨. 디피실레 감염 또는 클로스트리디움 감염과 관련된 위막성 (pseudo-membranous) 결장염의 치료를 위해, 또는 척추관절병증, 척추관절염 또는 천장관절염 (하나 또는 둘 다의 천장 관절의 염증); 신염 증후군, 장 또는 장 성분을 갖는 염증성 또는 자가면역 상태; 루푸스; 과민성 장 증후군 (IBS 또는 경직성 결장); 또는 결장염; 궤양성 결장염 또는 크론 결장염;

변비; 자폐증; 퇴행성 신경 질환; 근위축성 측상 경화증 (ALS), 다발성 경화증 (MS) 또는 파킨슨병 (PD); 근간 대성경련 긴장이상증 (Myoclonus Dystonia); 스타이너트 (Steinert) 질환; 근위 근긴장성 근병증; 자가면역 질환; 류마티스 관절염 (RA) 또는 소아 특발성 관절염 (HA); 만성 피로 증후군; 양성 근육통성 뇌척수염; 만성 피로 면역 기능장애 증후군; 만성 감염성 단핵구증; 유행성 근육통성 뇌척수염; 비만; 저혈당증, 전-당뇨병 증후군, 제I형 당뇨병 또는 제II형 당뇨병; 특발성 혈소판감소성 자반증 (ITP); 급성 또는 만성 알레르기 반응; 두드러기 (hives), 발진, 두드러기 (urticaria) 또는 만성 두드러기; 및/또는 불면증 또는 만성 불면증, 대발작 또는 소발작을 갖는 개체의 예방, 또는 그의 증상의 감소 또는 지연, 또는 경감 또는 치료에 사용될 수 있다. 인간 및 동물 상태 둘 다는 본원에 기재된 방법론을 사용하여 치료적으로 또는 예방적으로 처리될 수 있다.

[0096] 장 미세생물학의 주요한 변화는 예전대 결장암에서 (A. C. Society Colorectal Cancer Facts and Figures 2008-2010; American Cancer Society: Atlanta, 2008.) 및 단독으로 미국에서 140만명 이하의 사람들에게 영향을 미치는 염증성 장 질환 (IBD)에서 (E. V. Loftus. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterolgy*. 2004 126 1504-1517), 인간의 수명 및 삶의 질을 유의하게 감소시킨다. 염증성 장 질환 (IBD)은 케양성 결장염 및 크론병 둘 다를 포함한다. 또한, 당뇨병, 비만 및 자가면역 장애는 또한 장 미생물에서의 변화와 관련되었다 (L. Wen, R. E. Ley, P. Y. Volchkov, P. B. Stranges, L. Avanesyan, A. C. Stonebraker, C. Hu, F. S. Wong, G. L. Szot, J. A. Bluestone, J. I. Gordon and A. V. Chervonsky. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. 2008 455 1109-1113). 마이크로바이옴의 바람직하지 않은 변화는 유익한 군집 - 예를 들어, 부티레이트를 생성하는 것, 숙주의 상피의 유전자 발현을 조절하고, 그의 주요 영양소로서 기능하는 신호 -의 소실 및 병원체성 미생물, 예전대 황화수소 (H_2S)를 생성하는 황-환원 박테리아, 숙주에 극심하게 영향을 미치는 강력한 신호의 개화를 포함한다. 현재의 프로바이오틱스 혼합물의 사용은 임상적 시도에서 놀랍게도 제한된 성공을 가졌다 (Vogel, G. Clinical trials. Deaths prompt a review of experimental probiotic therapy. *Science* 319, 557 (2008). O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee, G., O'Sullivan, G., Shanahan, F. & Collins, J. K. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 15, 1219-1225 2001).

[0097] 미생물은 신체 부위, 예전대 피부 또는 장으로부터, 또는 신체적 샘플, 예전대 대변, 타액 또는 생식기 면봉 샘플로부터 단리될 수 있다. 미생물은 하나 이상의 특징, 예전대 유전적 프로파일, 연령, 성별, 의학적 병력, 식이 또는 환경에서 환자로부터 또는 환자에게 매칭된 공여자로부터 단리될 수 있다. 미생물 단리는 선제적으로 (질환이 발달되기 전에) 수행될 수 있으며, 미생물은 임의로 추가의 사용을 위해 보존된다. 미생물은 질환 진행의 임의의 단계에서 단리될 수 있다. 이들 목적을 위해 단리될 수 있는 미생물로는 박테리아, 진균류, 고세균류 및 바이러스, 원충을 들 수 있다. 미생물은 또한 토양 환경, 건조 환경, 해양 환경을 포함하는 환경으로부터 단리될 수 있다.

[0098] 미생물의 단리는 유전자 검정에 의해 안내될 수 있다. 예를 들어, 미생물의 특정 종 또는 속과 관련된 마커 유전자 (예전대 16S RNA 유전자)는 단리를 표적화하는 데 사용될 수 있다 (Schloss P, Handelsman J (2005) Metagenomics for studying unculturable microorganisms: Cutting the gordian knot. *Genome Biology* 6(8):229. Fodor AA, DeSantis TZ, Wylie KM, Badger JH, Ye Y, Hepburn T, Hu P, Sodergren E, Liolios K, Huot-Creasy H, Birren BW, Earl AM 2012) The "most wanted" taxa from the human microbiome for whole genome sequencing. *PLoS ONE* 7(7):e41294. Kennedy J, O'Leary ND, Kiran GS, Morrissey JP, O'Gara F, Selvin J, Dobson ADW (2011) Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *J. Appl. Microbiol.* 111(4):787-799. Rooks DJ, McDonald JE, McCarthy AJ (2012) Chapter twenty - metagenomic approaches to the discovery of cellulases. *Methods in enzymology*, ed Harry JG (Academic Press), Vol Volume 510, pp 375-394. Reddy BVB, Kallifidas D, Kim JH, Charlop-Powers Z, Feng Z, Brady SF (2012) Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes. *Applied and Environmental Microbiology* 78(10):3744-3752. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, Griffin NW, Lombard V, Henrissat B, Bain JR, Muehlbauer MJ, Ilkayeva O, Semenkovich CF, Funai K, Hayashi DK, Lyle BJ, Martini MC, Ursell LK, Clemente JC, Van Treuren W, Walters WA, Knight R, Newgard CB, Heath AC, Gordon JI (2013) Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341(6150). Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007) Molecular-

phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences 104(34):13780-13785.). 예를 들어, 기능적 유전자 (예를 들어, 탄수화물 분해, 점막부착, 단쇄 지방산 생성, 리포폴리사카라이드, 예컨대 폴리사카라이드 A, PSA의 생성, 비타민 생성, 항-염증성 화합물의 생성, 비-리보솜 웨티드의 생성, 폴리케티드 천연 생성물의 생성)는 유기체의 단리 및 배양을 표적화하는 데 사용될 수 있다. 또한, 효소적 활성을 위한 검정을 포함하는 기능적 검정이 사용될 수 있다.

[0099] 표적 유전자는 예를 들어 고-처리량 시퀀싱 기술을 사용한 범유전체학적 분석에 의해 결정될 수 있다. 다른 유기체, 예컨대 선충 및 유사한 유기체는 표적화될 수 있다. 임상적 설정에서 개인화된 박테리아 단리를 위한 간단한 기술은 질환을 진단하는 능력을 개선시키기 위한 기회를 생성하고, 항상된 예방적 및 치료적 특성을 갖는 프로바이오틱스 치료의 발달을 초래할 수 있다.

[0100] 이 방법론은 환자에서 병원체성 또는 바람직하지 않은 유기체를 건강한 또는 바람직한 미생물군으로 대체하는 박테리아요법을 사용한다.

[0101] 대변 미생물군 이식은 질환 (예를 들어 클로스트리디움 디피실레 감염)을 치료하는 데 사용될 수 있다. 대변 미생물군 이식은 장 미생물군에서 바람직하지 않은 유기체를 대체하기 위해 대변 물질을 건강한 공여자로부터 환자에게 전달한다. 그러나, 이 방법은 병원체가 이식되는 대변 물질에 존재할 수 있으며, 면역손상된 환자에게 위험할 수 있기 때문에 위험할 수 있다. 각각의 개체는 건강한 또는 바람직한 장 미생물군을 함유할 수 있는 개인화된 장 미생물군을 갖는다. 살아있는 유기체를 함유하는 샘플은 개인으로부터 얻어질 수 있다. 개인적 프로바이오틱스는 이 방법론을 사용하여 발달될 수 있다. 한 예에서, 유기체는 질환 상태 이전의 개별 대상체 또는 환자로부터 얻어지고, 단리 및 저장되고, 동일한 대상체에게 다시 전달되고, 질환을 치료하거나 개체의 건강 상태를 개선시키는 데 사용될 수 있다. 유기체는 또한 친적으로부터 얻어지고, 환자에게 투여될 수 있다. 친적으로부터 얻어진 유기체는 유전학, 식이 및 생활 습관에서의 매칭으로 인해 환자에게 유익할 수 있다. 유기체는 또한 일부의 방식으로, 예를 들어 인종, 유전적, 식이, 신체 질량 지수 및 다른 파라미터로 환자에게 매칭된 공여자로부터 얻어질 수 있다. 환자, 친척 또는 다른 공여자로부터 얻어진 유기체의 임의의 조합은 질환을 치료하거나 환자의 건강 상태를 개선시키기 위해 이 방법론으로 사용될 수 있다.

[0102] 배양-독립적 기술은 개인의 미생물의 유전적 특징을 밝힘으로써 미생물 생태학으로의 통찰을 제공할 수 있다. 특정 미생물은 숙주 표현형, 예컨대 비만, 염증 및 위장의 무결성에 영향을 미칠 수 있음이 암시될 수 있다. 고-처리량 서열분석으로부터의 데이터 세트는 높은 생물의학적 중요성을 갖는 미생물 표적을 암시한다. 이들 표적으로는 유박테리움 리모솜 (*Eubacterium limosum*), 로세부리아 인테스티날리스 (*Roseburia intestinalis*), 에프. 프라우스니치이 (*F. prausnitzii*), 로세부리아 (*Roseburia*) 종, 유박테리움 렉탈레 (*Eubacterium rectale*), 비. 오바투스 (*B. ovatus*), 피. 디스타소니스 (*P. distasonis*), 유박테리움 엘리겐스 (*Eubacterium eligens*), 유박테리움 벤트리오솜 (*Eubacterium ventriosum*), 로세부리아 종, 블라우티아 (*Blautia*) 종, 도레아 (*Dorea*) 종, 알. 토르퀘스 (*R. torques*), 비피도박테리움 롱콤 (*Bifidobacterium longum*), 유박테리움 하드룸 (*Eubacterium hadrum*), 아나에로스티페스 콜라이 (*Anaerostipes coli*), 클로스트리디움 (*Clostridium*) 종 알데넨스 (*aldenense*), 클로스트리디움 종 하테와이이 (*hathewayi*), 심비오솜 (*symbiosum*), 오르비스신덴스 (*orbiscindens*), 써모셀룸 (*thermo cellulum*), 시트로니아에 (*citroniae*), 루미노코쿠스 오베움 (*Ruminococcus obeum*), 루미노코쿠스 프로도투스 (*Ruminococcus productus*), 루미노코쿠스 토르퀘스 (*Ruminococcus torques*), 루미노코쿠스 브로미이 (*Ruminococcus bromii*), 로세부리아 이눌리노보란스 (*Roseburia inulinovorans*), 블라우티아 코코이데스 (*Blautia coccoides*), 도레아 (*Dorea*) 종, 수테렐라 (*Sutterella*) 종, 디알리스터 인비수스 (*Dialister invisus*), 블라우티아 프로도타 (*Blautia producta*) 및 비피도박테리움 슈도카테눌라툼 (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 표적은 또한 진균류, 고세균류, 바이러스 또는 원충일 수 있다. 본원에 기재된 방법은 임상적 샘플로부터의 이들 미생물의 유전적으로 표적화된 단리 및 배양에 사용될 수 있다. 환자, 친척 및/또는 다른 공여자로부터의 것일 수 있는 샘플은 부피를 함유하는 미세제작된 기질 상으로 분포될 수 있다. 적어도 하나의 표적 미생물의 성장은 하기 2가지 방법 중 하나 또는 둘 다를 사용함으로써 달성될 수 있다: (i) 단지 소량으로만 이용가능한 성장 기질을 사용한 미생물에 대한 배양 조건의 확인, 및 "칩 세척" 기술을 사용한 샘플링 편향의 수정; 및 (ii) 개별적으로 다룰 수 있는 복제물 미생물 배양물의 어레이를 생성하는 분할 기술에 의해 가능해진 바람직한 미생물의 후속의 규모-확대 배양을 위한 살아있는 박테리아 세포를 또한 보존하면서 온-칩 유전자 검정을 수행하는 것. 하나 이상의 표적 미생물은 이 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 적어도 하나의 관심의 상기 미생물을 질환을 예방, 치유 또는 치료하려는 의도로 / 건강을 개선시키려는 의도로 인간에게 전달될 수 있다. 예를 들어, 이를 달성하는

하나의 방법은 대장내시경검사를 통해서이다. 예를 들어, 항생제 요법은 보류될 수 있으며 (예를 들어, 2일 동안), 환자는 대장내시경검사 전의 저녁에 표준 결장 세정을 겪을 수 있다. 대장내시경검사 동안의 다음 아침, 적어도 하나의 관심의 상기 미생물을 함유하는 용액의 반 (예를 들어 50 mL)은 맹장/근위 상행 결장의 영역에 침착될 수 있으며, 다른 반은 결장경이 취소될 때 횡행 결장 전반에 걸쳐 조금씩 부어질 수 있다. 환자는 섬유가 풍부한 식이를 먹고, 프로바이오틱스를 함유하는 생성물을 소비하지 않도록 지시될 수 있다. 환자는 대변 샘플을 얻고 그들의 임상적 반응을 면밀히 모니터링하기 위해 연구 간호사를 따를 수 있다.

XV. 적용

[0103] 본 개시내용에 기재된 방법 및 조성물은 관심의 유기체의 확인에 사용될 수 있다. 샘플은 한정된 부피 중에서 분산되고, 배양될 수 있다. 샘플은 병렬화될 수 있으며, 병렬화된 샘플의 하나의 세트를 분석하여 관심의 유기체를 함유하는 샘플을 확인할 수 있다. 분석은 본 출원에 기재된 바와 같은 다양한 방법에 의할 수 있다. 관심의 샘플의 확인시, 병렬화된 샘플의 제2 세트로부터의 상응하는 샘플이 선택될 수 있다.

[0104] 본 개시내용에 기재된 방법 및 조성물은 유기체에 대한 성장 조건의 확인에 사용될 수 있다. 샘플은 다중 장치 상의 한정된 부피 중에서 분산될 수 있다. 각각의 장치는 상이한 조건, 예컨대 성장 배지, 온도, 기체 분위기 및/또는 압력으로 처리될 수 있다. 다양한 조건 하에서의 배양 후, 샘플은 병렬화될 수 있으며, 주어진 조건의 세트 하에서 성장을 나타내는 이들 샘플은 병렬화된 샘플의 하나의 세트의 분석을 통해 확인될 수 있다.

[0105] 본 개시내용에 기재된 방법 및 조성물은 유전적 분석에 사용될 수 있다. 예를 들어, 핵산을 함유하는 샘플은 디지털 PCR을 위한 장치 상의 한정된 부피 중에서 분산될 수 있다. 디지털 PCR은 수행될 수 있으며, 샘플은 병렬화될 수 있다. 양성 신호를 갖는 이들 샘플은 서열분석에 사용되는 병렬화된 샘플의 하나의 세트를 가질 수 있다.

[0106] 본 개시내용에 기재된 방법 및 조성물은 유방염 (소 또는 인간)의 연구 또는 급속 진단에 사용될 수 있다. 샘플은 유방 조직, 우유 또는 다른 공급원으로부터 취해지고, 한정된 부피 중에서 분산되고, 배양될 수 있다. 샘플은 병렬화될 수 있으며, 병렬화된 샘플의 하나의 세트를 분석하여 유방염과 관련된 유기체를 확인할 수 있다. 배양은 항생제 민감성을 시험하기 위해 항생제의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0107] 본 개시내용에 기재된 방법 및 조성물은 술페이트 환원 유기체 및 파이프라인 부식을 초래하는 다른 유기체의 연구, 급속 성장, 검출 및/또는 확인에 사용될 수 있다. 샘플은 파이프라인, 유기체의 장 또는 또 다른 공급원으로부터 취해지고 한정된 부피 중에서 분산되고, 배양될 수 있다. 샘플은 병렬화될 수 있으며, 병렬화된 샘플의 하나의 세트를 분석하여 술페이트 환원 또는 파이프라인 부식과 관련된 유기체를 확인할 수 있다.

[0108] 샘플 (예컨대 환경적 또는 임상적 샘플)로부터의 단일 세포 또는 유기체의 혼합된 군집의 다수의 세포 (예를 들어 박테리아, 고세균류, 진균류, 바이러스, 원충 또는 본원에 기재된 다른 것들)는 장치 내로 도입되고, 부피 내로 캡슐화될 수 있다. 유전적 물질 (예를 들어 DNA 또는 RNA)은 부피 내부에서 증폭될 수 있다 (예를 들어, 다중 이동 증폭 또는 PCR, RT-PCR 또는 등온 증폭을 사용함). 2개의 기질을 분리하여 증폭된 물질을 회수할 수 있다. 이 방법은 단일 세포 유전체학 및 전사체학에 사용될 수 있다.

실시예

실시예 1 - 비. 테타에 대한 기체 제어

[0109] 세포 배양을 위한 웨를 갖는 슬립칩 장치는 유리 기질로 제작되었다. 박테로이데스 테타이오타오미크론 (*Bacteroides thetaiotaomicron*) (비. 테타) 및 조리된 육류 배지 세포 배양 배지를 혼기성 챔버 내부의 장치 상으로 적하하였다. 장치를 밀봉하고, 화상화를 위해 제거한 후, 배양을 위한 챔버로 복귀시켰다. 장치를 37 °C에서 8시간 동안 배양하였다. 비. 테타 세포는 밀집한 미세-콜로니로 성장하였다 (도 7).

실시예 2 - 이. 콜라이에 대한 나노포스트를 통한 기체 제어

[0110] 세포 배양을 위한 챔버를 갖는 슬립칩 장치를 제작하였다 (도 8A 내지 8B). 서브-마이크로미터 규모 나노-포스트 (도 8C)를 회석된 원충된 플루오르화수소산 (HF) 중의 침지에 의해 일부 장치 상에서 제작하였다. 이. 콜라이의 형광 표지된 군주를 각각 나노포스트를 갖지 않고, 400 nm 나노포스트를 갖고, 900 nm 나노포스트를 갖는 장치 상에 적하하고 (도 8D 내지 8F), 통합된 형광 강도를 사용하여 성장을 정량화하였다. 이 특정 모델 시스템에서, 이. 콜라이의 성장은 산소의 공급에 의해 제한되었다. 2개의 유리 플레이트 사이의 간격을 조정하고, 따라서 오일 상을 통한 기체 교환을 제어함으로써, 이. 콜라이의 보다 균일한 성장을 달성하였다.

[0115] 실시예 3 - 밀봉된 용기를 통한 기체 제어

웰 당 6 nL를 갖는 1600개의 웰을 함유하는 슬립칩 장치를 100-mL 코닝 (Corning) 유리 병 내로 펴팅되도록 설계 및 제작하였다 (도 9A 내지 9B). 장치를 세포 및 배지로 적하하고, 병에 놓고, 다양한 양의 산소 (0%, 1% 및 3% O₂)를 갖는 기체 혼합물을 병 내로 주입하였다. 2개의 모델 미생물을 이 설정으로 배양하였다. 염격한 혐기성미생물 종, 비. 테타를 배양하여 무산소 병 중의 산소의 존재에 대해 시험하였다. 0% 산소 병에서의 비. 테타의 성장 (도 9C, 상부 열의 제1 컬럼)은 용기가 잘 밀봉됨을 확인시켰다. 비. 테타는 산소가 주입된 경우 성장할 수 없었다. 양성 대조군으로서, 이. 파에칼리스 (*E. faecalis*)를 이들 3가지 조건 하에서 성장시켰다 (도 9C, 하부 열). 이. 파에칼리스는 모든 3가지 조건 하에서 성장하였다.

[0117] 실시예 4 - 에이. 카카에 및 비. 테타를 사용한 온침 공동배양

공동-배양을 위한 슬립칩 장치를 도 10에 나타낸 바와 같이 설계하였다. 이 장치는 확산에 의해 마이크로웰 사이의 화학적 연락을 허용하지만, 미생물 세포의 혼합을 방지하기에 충분히 좁은 나노미터-깊이 친수성 브리지를 제공한다. 단독 탄소 공급원으로서 이눌린을 갖는 최소 배지에서 배양된 혐기성미생물 하나에로스티페스 카카에 (에이. 카카에)는 비. 테타와 공동-배양할 경우 성장하지만, 단독으로 배양할 때는 성장하지 않는다. 에이. 카카에 및 비. 테타를 슬립칩 장치의 확산적으로-연결된 웰 내로 적하하고, 최소 배지로 배양하였다. 비교를 위해, 에이. 카카에를 한 쌍의 확산적으로-연결된 웰의 둘 다 내로 적하하고, 최소 배지로 배양하였다. 비. 테타를 함유하는 웰에 확산적으로 연결된 에이. 카카에를 함유하는 웰은 에이. 카카에를 함유하는 웰에 확산적으로 연결된 에이. 카카에를 함유하는 웰 (도 11, 하부)보다 유의하게 많은 성장을 나타내었다 (도 11, 상부).

[0119] 실시예 5 - 아가로스가 없는 슬립칩 분할의 작동

1,000개의 구획을 함유하는 슬립칩 장치를 설계 및 제작하였다. 각각의 구획은 제1 플레이트 상의 하나의 웰 및 제2 (대향하는) 플레이트 상의 복제 웰로 이루어진다. 배양 동안, 2개의 웰을 결합하여 단일 구획 내부의 콜로니를 성장시켰다. 그 후 2개의 플레이트를 분리하고, 각각의 콜로니를 2개로 분할하여, 한 카피는 세포 용해를 필요로 하는 과정적 검정에 사용될 수 있고, 다른 카피는 살아있는 미생물을 보존하는 데 사용될 수 있도록 분할 칩의 양 측면 상의 각각의 콜로니 어레이의 동일한 카피를 생성하였다.

이 기술적 공정의 가시화를 용이하게 하기 위해, 배양-슬립칩의 작동을 적색 염료 실험으로 예시화하였다 (도 12). 명확성을 위해, 하기 서술은 슬립칩의 작동 동안 세포 및 콜로니에 무엇이 일어나는지를 기재하기도 하고, 또한 적색 염료 실험의 상응하는 화상을 지적하기도 한다. 장치를 슬립칩의 하나의 측면 상의 웰이 다른 플레이트 상의 채널과 중복되고, 각각의 플레이트가 웰 및 채널 둘 다를 함유하도록 설계하였다 (도 12A). 먼저, 관심의 세포를 함유하는 혼탁액을 채널 및 웰 내로 적하하였다. 이 적하는 도 12B에 적색 염료의 적하로서 나타나 있다. 그 후, 적하 채널 및 웰을 슬리핑에 의해 분리하고, 단일 박테리아 세포를 웰에 확률적으로 격리하였다. 칩의 양 측면 상의 복제 웰을 하나의 구획으로서 결합하였다. 이 단계는 적색 염료 용액의 유체 부피의 형성으로서 나타나 있다 (도 12C). 적하 채널 중의 샘플을 공기가 박테리아 성장을 지지하는 채널을 충전할 수 있도록 진공으로 펴징함으로써 제거하였다 (도 12D). 공기는 채널 내로 도입될 수 있고, 수용액 (예를 들어, 적색 염료의)은 웰에 잔류하며, 진공에 의해 제거되지 않았음이 관찰되었다. 그 후, 장치를 인큐베이션 하여 박테리아 콜로니를 성장시켰다. 인큐베이션 동안 오일 및 물의 손실을 최소화하기 위해, 장치를 오일 및 물의 증기로 포화된 페트리 디쉬에 정착하였다. 후속의 분할 전에, 오일을 장치 채널 내로 적하하여 공기를 대체하였다 (도 12E). 그 후, 2개의 플레이트를 멀리 슬리핑하여 각각의 구획으로 구성된 2개의 웰을 분리하였다 (도 12F). 칩을 이 위치에서 상부 및 하부 플레이트 상의 스루-홀이 정렬되어 장치가 제어된 분할을 위한 홀더 상으로 정착될 수 있도록 설계하였다.

[0122] 유체를 진공으로 제거함으로써 공기를 적하 채널 내로 도입하였다. 슬립칩이 결합되지 않기 때문에, 2개의 반사이의 간격은 오일 저장기로서 기능할 수 있으며, 오일은 진공이 방출되었을 경우 채널로 다시 유동할 수 있었음이 관찰되었다. 공기 공급을 유지하고, 오일이 채널 내로 다시 유동하는 것을 방지하기 위해, 반복된 펴징을 수행하였고, 샘플을 적하하기 전 3 내지 5회 펴징하는 것 (도 12A)은 오일이 배양 동안 복귀하는 것을 방지하는데 충분하였다.

[0123] 분리의 공정 동안, 유체 부피는 구조로부터 부분적으로 방출될 수 있다. 동시에, 유체 부피의 증발을 방지하는데 사용되는 불흔화성 오일은 칩의 간격 내로 유동하고, 유체 부피의 합류 및 상호-오염을 유발할 수 있다. 또한, 슬립칩의 상부 및 하부 플레이트는 이동하고, 어긋날 수 있다. 이 문제를 해결하기 위해, 홀더를 상부 및 하부 플레이트가 분리 동안 수직으로 이동하지 않게 설계하였다 (도 1 및 도 2A). 홀더는 표준 기계가공에 의

해 제작되었다. 슬립칩을 정렬하기 위한 3개의 펀을 홀더 내로 삽입하였다. 홀더와 상부 플레이트 사이의 2개의 유리 스페이서를 1 mm 두께 현미경 슬라이드를 작은 조각으로 절단함으로써 제조하고, 5-분 에폭시로 연부상의 홀더에 접착시켰다. 하부 플레이트의 연부를 또한 제거하여 하부 부분 내로 유리 스페이서를 갖는 홀더를 피팅하였다. 홀더의 중앙 부분을 절단하여 화상화를 용이하게 하였다. 슬립칩 상의 스루 홀을 제작하여 슬립칩을 홀더에 정렬하였다. 스루 홀에 대한 위치를 한정하는 마커를 포토마스크의 설계 내로 훈입한 후, 포토리소그래피 및 습식-에칭에 의해 장치로 수송하였다. 스루 홀을 제작하기 위해, 장치를 먼저 에칭된 마커를 사용하여 레이저 스테이지에 정렬시킨 후, 75-mm 렌즈를 사용하여 80 Hz의 반복 속도로 100 mJ의 일정한 에너지 모드로 레이저 기계가공 (레소네틱스 래피드 (Resonetics Rapid) X250 시스템)에 의해 애블레이션하였다. 슬립칩을 테트라데칸 오일의 욕 하에서 분리하여 증발을 방지하고, 분리를 중력에 의해 달성하였다.

[0124] 분할 동안, 오일은 2개의 유리 플레이트 사이의 간격을 통해 슬립칩으로 유입되었다. 슬립칩 상의 미세-구조는 이 오일 유동으로 인해 더이상 각각의 유체 부피의 위치를 유지할 수 없었다. 홀더는 유리 플레이트의 2개의 조각이 잘 정렬될 수 있게 했지만, 마이크로-웰 중의 수성 유체 부피는 분할 전의 것과 동일한 위치에 머무르지 않을 수 있다 (도 13). 유체 부피는 오일 유동에 의해 마이크로-웰로부터 밀려지거나, 장치의 반대 측면 상에 고정될 수 있다.

[0125] 실시예 6 - 아가로스를 사용한 슬립칩 분할의 작동

[0126] 마이크로웰 중의 유체 부피를 유지하고, 오일 유동으로부터의 전단의 효과를 최소화하기 위해, 초저 겔화 온도 아가로스를 첨가하여 실시예 5에 기재된 바와 같은 슬립칩 시스템 중의 유체 부피의 점도를 증가시켰다. 아가로스의 첨가는 도 14B에 나타낸 바와 같이 박테리아 성장 또는 복제 카피의 생성을 억제하지 않았다. 이 설정이 분할 동안 마이크로웰 중의 유체 부피를 유지할 수 있는지를 시험하기 위해, 1% 아가로스 수용액을 가온하면서 (약 37°C) 슬립칩 상으로 적하하였다. 그 후, 장치를 10°C 냉각 플레이트 상에서 인큐베이션하여 테트라데칸의 용점 (8°C) 위로 유지하면서 아가로스를 겔화시켰다. 그 후, 슬립칩을 홀더 상에 정치한 후 3분 내에 분할이 일어났다. 유체 부피의 형상은 분할 동안 변화하였으며, 이는 유체 부피가 미세-구조로부터 부분적으로 방출되었음을 지시한다 (도 2B 및 2C). 이 형상 변화는 유체 부피의 증발로 인한 것이 아니었으며, 이는 유체 부피 형상이 2개의 플레이트를 다시 함께 클램핑함으로써 회복될 수 있었기 때문이다. 전체 장치 상의 2,000개의 웰을 입체경으로 분석하였고 (도 2D는 장치의 일부를 나타냄), 분할 동안 유체 부피의 유실 또는 웰 중에서의 상호-오염이 관찰되지 않았다. 그 후, 상기를 0.3 내지 2%로 변화하는 아가로스의 농도로 수행하였다. 1% 아가로스를 일부 예비 실험에 사용하였고, 0.5%가 신뢰할만한 결과를 제공한 최소 농도인 것으로 밝혀졌다.

[0127] 실시예 7 - 임상적 생검 샘플의 배양

[0128] 슬립칩 장치를 0.5% 초저 겔화 온도 아가로스로 보충된 AM2 배지를 사용하여 혐기성 챔버에서 제조하고, 건강한 인간 자원자의 결장으로부터의 점막 생검으로부터 얻어진 미생물 혼탁액으로부터의 미생물을 사용하여 혐기성미생물의 다양한 박테리아 군집으로 적하하였다. 그 후, 장치를 37°C에서 혐기성 챔버에서 8일 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 장치를 현미경으로 화상화하여 성장하는 미생물을 콜로니를 가시화하였다. 건강한 인간 자원자의 결장으로부터의 점막 생검으로부터 얻어진 미생물 혼탁액으로부터의 박테리아는 슬립칩 상에서 성장하는 것으로 관찰되었다. 또한, 임상적 샘플 중의 고속- 및 저속-성장 박테리아를 슬립칩 상에서 성공적으로 분리하였다 (도 14A). 또한, 성장 후 원래의 단일 세포가 10개 초과의 세포로 이루어진 콜로니를 발생시키는 경우, 슬리핑은 성공적으로 2개의 딸 콜로니를 생성하였다 (도 14B).

[0129] 실시예 8 - 온칩 희석

[0130] 슬립칩을 5개의 일련의 희석 단계를 병렬적으로 수행하도록 설계 및 제작하였다 (도 15). 이는 2개의 성분을 포함한다: 샘플을 함유하는 얇은 웰의 열, 및 희석용 완충제 용액으로 충전된 깊은 웰의 어레이. 일련의 희석을 수행하기 위해 슬립칩을 사용하는 것은 3개의 일반적 단계를 포함한다: (a) 완충제 적하, (b) 샘플 적하, 및 (c) 희석을 위한 다단계 슬리핑. 퍼펫팅에 의해 슬립칩을 충전한 후, 칩의 2개의 플레이트를 슬리핑하여 도관을 웰로부터 분리하였다. 도관을 웰로부터 분리할 때, 이는 또한 슬리핑 경로로부터 이동된다 (도 15D 및 도 17e 삽화). 샘플을 함유하는 웰을 완충제를 함유하는 웰과 접촉시키고, 샘플을 희석하였다. 혼합 비율 또는 희석 역가를 웰 크기의 비율에 의해 측정하였다. 슬리핑의 추가의 단계는 동일한 원리에 의해 작동하고, 따라서 일련의 희석을 수행하였다.

[0131] 슬립칩은 미세제작된 유리의 2개의 층으로 이루어진다: 상부 층은 샘플에 대한 모든 입구 및 출구, 도관, 및 완충제 용액에 대한 웰을 함유한다. 이 장치는 일련의 2배 희석을 수행하도록 설계되었다. 모든 웰 및 도관은

60 μm 깊이로 예치된다. 상부 및 하부 웰은 동일한 치수이며, 2배 희석은 슬리핑 및 혼합의 각각의 단계 후에 얻어졌다. 일련의 희석 장치의 작동을 가시화하기 위해, 적색 염료의 수용액 (0.1 M Fe(SCN)₃)을 슬립칩 상으로 적하하였다. 밀리포어 물을 희석액으로서 사용하였다. 3개의 슬리핑 단계 후, 도 16에서의 색 변화로부터 볼 수 있는 바와 같이 2³배 희석을 달성하였다. 10배 희석 후에 Fe(SCN)₃ 용액의 색이 희미해졌을 때, 단지 2³배 희석만이 나타난다.

[0132] 실시예 9 - 온칩 대수적 희석

실시예 8에서의 것과 같은 슬립칩 장치를 설계하여 폭넓은 동적 범위를 통한 대수적 일련의 희석을 수행하였다. 모든 웰은 76 μm 깊이이고, 도관은 30 μm 깊이이다. 상부 층은 샘플에 대한 모든 입구 및 출구, 도관, 및 완충제 용액에 대한 웰을 함유한다. 하부 층은 샘플에 대한 10 μm 얕은 웰 및 완충제 용액에 대한 30 μm 깊은 도관을 함유한다. 장치의 표면은 소수성이 되도록 실란화된 반면, 10 μm 깊이 웰은 친수성으로 유지된다. 10 μm 얕은 웰을 사용하여 웰의 안팎에서의 확산 시간을 감소시키고, 희석액 웰에 대한 부피를 최소화시켰다. 친수성 웰을 제조하기 위해, 유리 플레이트를 피라냐 세정하고 (부피로 1 부분 30% 과산화수소, 3부분 황산), 밀리포어 물로 2회 세척한 후, 220°C 핫 플레이트 상에서 2시간 초과 동안 탈수시켰다. 플레이트를 실온으로 냉각시키고, SU8 3010의 20 μm 두께 층으로 스핀-코팅하였다 (도 17A). 다음으로, 플레이트를 정렬시키고, 소수성인 플레이트 상의 영역을 보호하는 포토마스크로 커버하여, 현상 후 웰 중의 SU8만이 잔류하게 하였다. 웰 중의 SU8을 사용하여 웰을 보호하고, 이들이 소수성이 되는 것을 방지하였다. 마지막으로, 유리를 120°C에서 15분 동안 베이킹함으로써 건조시켰다. 유리 플레이트를 세정하고, 300 mTorr에서 5분 동안 공기 플라즈마 처리한 후, 표면을 진공 데시케이터에서 5시간 동안 트리데카플루오로-1,1,2,2-테트라히드로옥틸-1-트리클로로실란으로 실란화함으로써 소수성이 되게 하였다. 실란화 후, 유리 플레이트를 20 ml 무수 톨루엔으로 3회, 30 ml 무수 에탄올로 3회, 30 ml 에탄올/ H₂O (50%: 50%, v:v)로 3회, 및 30 ml 밀리포어 물로 3회 린스하였다. 플레이트를 120°C 오븐에서 15분 동안 베이킹하였다. 마지막으로, 웰 중의 SU8을 유리 플레이트를 피라냐에서 1분 미만 동안 침지함으로써 제거하였다. 그 후, 플레이트를 밀리포어 물로 2회 세척하고, 120°C에서 15분 동안 건조시켰다. 웰을 친수성 웰 내의 수성 유체 부피의 형상 및 부피를 제어하고, 또한 얕은 웰로부터의 탈습윤화를 방지함으로써 친수성으로 만들었다 (도 17B).

0134] 형광 염료의 용액을 사용하여 이 슬립칩 상의 폭넓은 동적 범위를 통한 대수적 일련의 희석의 성공을 정량화하였다. PBS 완충제 (1×, pH 7.4) 중 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor) 488 히드라지드 (2 mM, 인비트로젠 (Invitrogen))를 샘플 채널 내로 피랫팅함으로써 적하하였다. 1× PBS 완충제 용액을 완충제 채널 내로 적하하였다. 슬립칩을 레이카 (Leica) MZ 16 입체경 하에서 슬리핑하여 먼저 단리된 유체 부피를 형성하였다. 그 후, 샘플 웰을 연속적으로 완충제 웰과 결합하였다. 각각의 슬리핑 단계 후, 형광 염료의 확산을 허용하기 위한 10분의 대기 단계가 있었다. 슬리핑의 5개의 단계 후, 장치를 빨리 20× 0.7NA 레이카 대물렌즈 및 하마마츠 (Hamamatsu) ORCAER 카메라를 갖는 레이카 DMI6000 현미경 (레이카 마이크로시스템즈 (Leica Microsystems))로 수송하였다. 알렉사 플루오르 488의 저 농도 및 고 농도에 대해 상이한 설정을 사용하여 높은 동적 범위를 통한 형광 화상을 얻었다. 30 ms의 노출 시간 및 100% 램프 강도를 갖는 L5 필터를 사용하여 20 nM 내지 2000 nM의 알렉사 플루오르 488 형광을 수집하였다. 2 ms의 노출 시간 및 30% 램프 강도를 갖는 L5 필터를 사용하여 20 μm 내지 200 μm 의 알렉사 플루오르 488 형광을 수집하였다. 화상을 얻고, 메타모르프 (Metamorph) 화상화 시스템 버전 6.3r1 (유니버설 이미징 (Universal Imaging))을 사용함으로써 분석하였다. 온-칩 희석으로부터의 농도를 형광 강도로부터 계산하였다. 현미경을 보정하기 위해, L5 필터에 대한 형광 참조 슬라이드의 형광 강도를 기록하고, 배경 수정을 위해 사용하였다. PBS 완충제 중 20 nM, 50 nM, 200 nM, 500 nM 및 2000 nM 알렉사 플루오르 488 히드라지드 용액을 사용하여 농도 범위의 하부 종점 상의 형광 염료의 농도를 결정하기 위한 보정 곡선을 얻었다. PBS 완충제 중 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM 및 200 μM 알렉사 플루오르 488 히드라지드 용액을 사용하여 농도 범위의 상부 종점 상의 형광 염료의 농도를 결정하기 위한 또다른 보정 곡선을 얻었다. 웰 깊이를 비코 딕타크 (Veeco Dektak) 150 조면계로 측정하고, 웰의 부피를 예치이 등방성이라는 가정으로 계산하였다. 5개의 슬리핑 단계 후, 10⁵배 희석을 실험적 결과와 이론적 계산 사이의 양호한 일치로 달성하였다 (도 18).

[0135] 실시예 10 - 유체 부피의 희수

이전 실시예에 기재된 것과 같은 슬립칩 장치를 분할한 후, 장치의 하나의 카피를 정렬 홀더 상으로 실장하였다 (예를 들어 도 1, 도 2A). 완충제 수용액 1 μL 를 에펜도르프 (Eppendorf) 피페터로 흡입하였다. 슬립칩 상

의 웰 사이의 공간을 웰 사이의 상호-오염을 방지하기 위해 피펫 팀의 외부 반경보다 크게 되도록 설계하였다. 이 완충제 용액 부피는 총 계면 면적을 최소화하기 위해 접촉될 경우 슬립칩 상의 2 nL 유체 부피와 자발적으로 합류되었다 (도 3). 그 후, 결합된 유체 부피를 피펫 팀 내로 다시 흡입하고, 플레이트를 펼치거나 PCR 및 후속의 서열분석으로 시험하기 위해 사용할 수 있다. 이 방법은 보다 높은 밀도를 갖는 웰과 같은 상황 또는 피펫팅이 정확하게 제어될 수 없는 경우에 순응하도록 변형될 수 있다. 이 경우, 이웃하는 웰 중의 유체 부피를 먼저 이 방법에 의해 제거할 수 있으며, 이는 표적 유체 부피의 후속의 취급을 위한 보다 많은 공간을 제공한다.

[0137] 실시예 11 - 표적 콜로니의 PCR 확인

[0138] 이. 콜라이를 LB 중 암피실린 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 로 34°C에서 밤새 (12시간) 회전식 교반 인큐베이터에서 200 rpm으로 풍부화하여 정지 상에 도달하게 하였다. 그 후, 세포를 동기화하기 위해, 각각의 종의 밤샘 배양물을 100배로 희석하고, LB 배지 중 암피실린 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 및 IPTG 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 으로 3시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 3000 $\times\text{g}$ 에서 5분 동안 펠릿화하고, 얼음-냉각된 1× PBS 완충제 1 mL로 5회 세척하였다. 세포를 마지막으로 LB 배지 중 암피실린 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 및 IPTG 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 에 혼탁하고, 세포 혼탁액을 LB 배지 중 0.5%의 초저 겔화 온도 아가로스를 갖는 암피실린 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 및 IPTG 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 으로 연속적으로 희석하고, 각각 GFP 및 DsRed 유전자를 갖는 이. 콜라이 균주에 대해 2×10^4 및 2×10^3 CFU mL^{-1} 의 최종 밀도로 혼합하고, 슬립칩 장치 상으로 적하하였다. 개별 세포를 구획화하고, 슬립칩을 배양을 위해 34°C에서 3시간 동안 인큐베이션한 후, 딸 칩으로 분할하였다 (도 5A).

[0139] 하나의 칩을 DsRed의 플라스미드를 표적화하는 프라이머 (도 5B)를 함유하는 PCR 시약과 혼합하고 (도 19), 다른 것을 형광 현미경으로 화상화하여 형광 단백질의 존재 또는 부재에 대해 검사하였다 (도 5C). 형광 화상을 10 x/0.4NA 렌즈 및 1× 커플러를 갖는 하마마츠 ORCA-ER 카메라를 갖는 레이카 DMI6000 현미경 (레이카 마이크로시스템즈 (Leica Microsystems))로 획득하였다. 500 ms의 노출 시간을 갖는 L5 필터를 사용하여 화상을 수집하였다. 정량적 분석을 위해, L5 필터에 대한 형광 참조 슬라이드의 형광 강도를 기록하고, 배경 수정을 위해 사용하였다. 화상을 획득하고, 메타모르프 화상화 시스템 버전 6.3r1 (유니버셜 이미징) 및 미국 국립 보건원에 의한 이미지제이 (ImageJ)를 사용함으로써 분석하였다. DsRed를 발현하는 이. 콜라이를 함유하는 유체 부피는 박테리아를 함유하지 않는 블랭크 웰에 비해 및 GFP-표지된 이. 콜라이를 함유하는 웰에 비해 PCR 양성이었으며 (도 5B), 이는 단지 표적화된 유전자만이 증폭되었음을 지시한다. PCR 양성 웰이 정말로 DsRed의 플라스미드로부터의 것인지 확인하기 위해, 발현된 형광 단백질을 형광 현미경검사를 사용하여 모니터링하였다. 125개의 웰이 GFP를 갖는 콜로니를 함유하는 것으로 관찰되었고, 12개의 웰이 적색 형광성 이. 콜라이를 함유하는 것으로 관찰되었으며, 이는 PCR 결과와 매칭되었다 (도 5D 및 5E). 하나의 웰은 PCR 결과에서 증가된 형광 강도를 나타낸 것으로 관찰되었지만, 다른 카페에서는 박테리아 콜로니가 검출되지 않았으며, 이는 웰이 비-성장 세포 또는 용액으로부터의 유리 DNA를 함유할 수 있음을 나타낸다.

[0140] 실시예 12 - 임상적 샘플로부터의 비. 불가투스 (*B. vulgatus*)의 단리

[0141] 세포 스크래퍼를 사용하여 윌킨스-찰그렌 (Wilkins-Chalgren) 혐기성미생물 (WCA) 플레이트 상의 건강한 인간 자원자의 결장으로부터의 점막 생검으로부터 얻어진 동결된 미생물 혼탁액의 배양종을 수집하였다. DNA를 퀴아 앰프 DNA 미니 (QiaAmp DNA Mini) 키트를 사용하여 풀링된 세포로부터 정제하였다. DNA 50 ng 및 비. 불가투스 -특이적 프라이머를 PCR을 위해 사용하였다. 양성 PCR 생성물을 생거 (Sanger) 서열분석에 의해 입증하고, 진뱅크 (GenBank)로부터의 비. 불가투스의 서열에 대해 정렬하였다.

[0142] 이전에 기재된 바와 같은 슬립칩 장치를 0.5% 초저 겔화 온도 아가로스를 갖는 WCA 배지를 갖는 샘플의 적절한 희석으로 적하하였다. 슬립칩이 단지 10 내지 100개의 세포로 PCR 검정을 수행하는 능력을 갖기 때문에, 슬립 칩 상의 인큐베이션은 비. 불가투스를 단리하기 위해 밤새만큼 짧았다 (8시간) (도 5E). 이는 원액을 제조하고 콜로니로 검정을 구동하기 위한 충분한 바이오매스를 얻기 위해 통상적으로 한천 플레이트 상의 3 내지 5일의 인큐베이션이 소요되는, 한천 플레이트 상의 콜로니를 형성하기 위한 수천 내지 수백만의 세포에 대한 필요와 비교된다. 슬립칩 장치를 분할하고, PCR을 하나의 플레이트로부터의 샘플 상에서 수행하여 양성 콜로니를 확인하였다. 5개의 콜로니를 PCR 양성 웰에 대한 복제 웰로부터 선택하고, 이들 중 3개를 한천 플레이트 상에서 규모 확대할 수 있었다. 이들 2개의 허위 양성 결과는 용해된 또는 비-성장 세포로부터 유래할 수 있는데, 이는 이 예가 동결된 샘플로 수행되었고, 미생물의 생존력이 동결-해동 사이클 동안 절충되기 때문이다. 서열분석을

사용하여 이를 단리체가 정말로 비. 불가투스인지를 확인하였다.

[0143] **실시예 13 - 슬립칩 상의 플레이트 세척 ("칩 세척")**

임상적 샘플로부터의 단일 박테리아 세포를 확률적으로 격리하고, 이전에 기재된 바와 같이 슬립칩 장치 상에서 배양하였다. 그 후, 미세콜로니를 DNA 추출용 마이크로웰을 플러싱함으로써 단일 튜브에서 수집하였다. 슬립칩 상에서 성장한 배양종의 조성을 서열분석 또는 표적-특이적 프라이머에 의해 분석하여 그 칩에 대한 배양 조건이 표적 미생물의 성장을 허용하였는지 여부를 결정하였다. 이 칩 세척 방법은 표적에 대한 최적 성장 조건이 발견될 때까지 반복될 수 있다 (예를 들어 **도 20**).

[0145] **실시예 14 - 이. 콜라이를 사용한 슬립칩 상의 플레이트 세척 ("칩 세척")**

DsRed 형광성 단백질로 표지된 이. 콜라이 세포를 LB 중 암페실린 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 로 37°C 에서 밤새 (12시간) 회전식 교반 인큐베이터에서 200 rpm으로 풍부화시켰다. 그 후, 밤샘 배양물을 100배 희석하고, LB 배지 중 암페실린 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 및 IPTG $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 으로 3.5시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 $3000 \times g$ 에서 5분 동안 펠릿화하고, $1 \times$ PBS 완충제 1mL 로 3회 세척하였다. 세포를 음성 대조군으로서 박테리아의 성장을 지지하지 않는 LB 배지 또는 PBS 완충제 중 암페실린 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 및 IPTG $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 에서 10^5 의 최종 밀도로 연속적으로 희석하고, 이전에 기재된 바와 같이 슬립칩 장치 상으로 적하하였다. 슬립칩을 37°C 에서 밤새 인큐베이션하였다. 게놈 DNA를 퀴아앰프 마이크로카트를 제조자의 프로토콜에 따라 사용하여 칩 세척 용액으로부터 정제하였다. 보정을 위해, 게놈 DNA를 거시적 액체 배양물로부터 정제하고, 콘티-잇 (Quant-i-it) DNA 고 민감성 정량화 키트에 의해 정량화하고, BSA 0.01 mg mL^{-1} 을 함유하는 AE 완충제에서 연속적으로 희석하였다. 정량적 PCR (qPCR)을 27F 및 534R 프라이머로 수행하였다. DNA 농도의 10,000배 증가가 관찰되었으며 (**도 21**), 이는 이 특정 모델 시스템에 대해, 비-성장 세포가 칩 세척으로부터 회수된 유전적 물질 0.01%에 기여함을 암시한다.

[0147] **실시예 15 - 2종 모델 군집을 사용한 슬립칩 상의 플레이트 세척 ("칩 세척")**

클로스트리디움 스신덴스 및 엔테로코쿠스 파에칼리스의 혼합물을 5:1 비율로 슬립칩 장치 상 및 한천 플레이트 상에서 배양하였다. 출발 접종원의 게놈 DNA 및 칩 세척 용액을 추출하고, qPCR에 의해 정량화하였다. 칩 상의 배양 후 칩 세척은 비-성장 대조군으로서 사용된 출발 접종원으로부터의 DNA에 의해 각각의 군주에 대한 DNA의 약 1,000배 증가를 초래하였으며 (**도 22E**), 이는 칩 세척이 미생물 성장을 검출하는 데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0149] 제1일에 콜로니 크기의 차이로부터 관찰된 바와 같이, 이. 파에칼리스는 한천 플레이트 상에서 씨. 스신덴스보다 빨리 성장하였다 (**도 22C 내지 22D**). 배양 배지는 2개의 군주에 대해 유사한 운반 능력을 갖는다. 2개의 군주는 제1일에 필적할만한 밀도로 칩 상에서 성장하였다 (**도 22A 내지 22B**). 2개의 군주로부터 회수된 게놈 DNA의 양에 의해 나타난 바와 같이, 플레이트 세척에 의한 제1일의 샘플링은 급속하게 성장하는 박테리아에 대한 약 1,000배 편향을 초래한 반면, 게놈 DNA가 각각의 군주에 대해 필적할만하였기 때문에, 칩 세척 방법은 이 편향을 효과적으로 수정하였다 (**도 22E**).

[0150] **실시예 16 - 4종 모델 군집을 사용한 슬립칩 상의 플레이트 세척 ("칩 세척")**

4개의 구성원으로 이루어진 모델 군집을 선택하였다: 아나에로스티페스 카카에, 비피도박테리움 인판티스, 클로스트리디움 스신덴스 및 엔테로코쿠스 파에칼리스. 이 군집은 성인 인간 말단 장 미생물군의 2개의 우세한 문을 나타낸다: 후벽균류 (Firmicutes) 및 의간균류 (Bacteroidetes). 스카에들러 혐기성미생물 브로쓰 (Schaedler Anaerobe Broth) 배지를 모든 4개의 종의 성장을 지지하기 위해 선택하였다. 슬립칩이 4개의 종의 성장을 지지하지 않을 가능성을 배제하기 위해, 4개의 종을 상이한 장치에 별개로 적하하였다. 슬립칩 상의 배양의 1일 후, 모든 4개의 종은 밀집한 미세-콜로니로 성장하였다.

[0152] 다음으로, 아나에로스티페스 카카에, 비피도박테리움 인판티스, 클로스트리디움 스신덴스 및 엔테로코쿠스 파에칼리스를 스카에들러 혐기성미생물 브로쓰 배지에서 밤새 풍부화시킨 후, 8시간 동안 배양하여 세포를 중간-지수 상으로 동기화시켰다. 세포를 고르게 혼합하고, 스카에들러 혐기성미생물 브로쓰 배지에서 10^5 CFU mL^{-1} 로 희석하고, 슬립칩 상으로 적하하였다. 슬립칩을 24시간 동안 인큐베이션하고, 실시예 13 또는 14에서와 같은 칩 세척 방법을 사용하여 분석하였다. 게놈 DNA를 퀴아앰프 마이크로카트를 제조자의 프로토콜에 따라 사용하여 정제하였다. 게놈 DNA를 거시적 액체 배양물로부터 정제하고, 콘티-잇 DNA 고 민감성 정량화 키트에 의해 정량화하고, 보정을 위해 연속적으로 희석하였다. 출발 접종원을 비-성장 대조군으로서 사용함으로써, 성장으

로부터 대략 1,000배 증폭을 관찰하였다. 플레이트 세척은 제1일에 샘플링되는 경우 엔테로코쿠스 파에칼리스를 향해 강하게 편향된 반면, 클로스트리디움 스신텐스 및 엔테로코쿠스 파에칼리스 사이의 유의한 편향은 칩 세척으로 관찰되지 않았다 (도 22B). 이는 칩 세척 방법이 슬립칩 상에서 성장된 종을 신뢰성있게 검출할 수 있음을 입증한다.

[0153] **실시예 17 - OTU158에 대한 성장 조건의 확인**

샘플을 2가지 방법에 의해 인간 맹장으로부터 수집하였다 (도 23): 브러시 점막 생검을 브러싱 기술에 의해 얻었고, 세척 유체를 세척 기술에 의해 얻었다. 세척 유체를 오토클레이빙하고, 배양 배지 M2LC 내로 스파이크하였다. 브러시 샘플을 슬립칩 상으로 10^5 CFU mL⁻¹으로 적하하고, 3일 동안 인큐베이션하여 콜로니를 성장시켰다. 그 후, 배양종을 실시예 13 내지 15에서와 같이 이전에 기재된 칩 세척 방법을 사용하여 수집하였다. 동일한 양의 접종원을 또한 비교를 위해 한천 플레이트 상에서 배양하였다. 반추위 유체를 배지 M2GSC 내로 스파이크하였다.

배양종의 16S 고-처리량 서열분석 측량을 2개의 영역으로 수행하였다: V4 및 V1V3. 칩 세척 및 플레이트 세척으로부터의 OTU 테이블을 샘플 당 12599개 관독으로 하위-샘플링하고, 과 수준에서 요약하였다. 슬립칩 장치로부터의 배양종 성장은 미생물의 조성 및 상대 풍부도 둘다에서 플레이트 상의 배양종 성장과 상이하였다. 예를 들어, 보다 많은 클로스트리디움 XIII 및 비피도박테리움이 플레이트 세척으로부터 관찰될 수 있는 반면, 고르도니박터, 아나에로스티페스, 오스킬리박터 및 실라니모나스와 같은 일부 저 풍부도 구성원은 단지 칩 세척 방법으로부터만 관찰될 수 있다. 이 차이는 아마도 한천 플레이트 상 및 칩 상의 박테리아 성장 속도의 차이, 및 상이한 배양 조건 (관강내 유체가 온-칩 배양에 사용된 반면, 반추위 유체가 한천 플레이트에 사용되었음)에 기인한다. 오스킬리박터로서 분류된 관독은 OTU_158_V1V3으로 할당될 수 있었다. OTU158에 대한 종-특이적 프라이머를 사용한 PCR을 수행하고, 결과를 생거 서열분석에 의해 입증하였으며, 이는 OTU158이 배양종으로부터 발견될 수 있음을 확인시켰다.

[0156] 16S V4 고-처리량 서열분석의 결과를 또한 qPCR에 의해 입증하였다 (도 24). 귀무 가설은 블랭크 물, 배지 M2GSC로부터의 플레이트 세척, 및 배지 M2LC로부터의 칩 세척에서, OTU158로부터의 게놈 DNA의 농도가 동일하다는 것이었다. OTU158로부터의 게놈 DNA의 농도는 블랭크 음성 대조군 및 플레이트 세척으로부터의 배양종 둘다의 것보다 높았다. 플레이트 세척 및 칩 세척 둘 다가 박테리아 DNA를 함유하는지를 시험하기 위해, qPCR을 16S V4 유니버설 프라이머로 수행하였다. 플레이트 세척 및 칩 세척 용액 둘 다는 블랭크 음성 대조군보다 높은 DNA 농도를 가졌으며, 플레이트 세척 용액은 약간 낮은 Cq 값을 가졌다.

[0157] 관강내 유체가 OTU158의 성장에 필요한지를 시험하기 위해, M2GSC 배지 상에서 성장한 배양종을 칩 세척에 의해 얻고, qPCR로 시험하였다. 배양종과 블랭크 음성 대조군 사이의 차이는 통계학적으로 유의하지 않았으며, 이는 M2GSC 배지를 사용한 칩 세척이 OTU158을 회수할 수 없었음을 지시한다. M2LC은 OTU158를 성장시키는 데 적합한 배양 배지임이 결정되었다.

[0158] **실시예 18 - "칸디다투스 카에코코쿠스 미크로플루이디쿠스 (*Candidatus Caecococcus microfluidicus*)"의 단리**

[0159] 배양을 실시예 16에서 제조된 바와 같은 M2LC 배지로 수행하고, 이전에 기재된 바와 같은 슬립칩 장치 상으로 적하하였다. 배양 후, 2개의 슬립칩 플레이트를 이전에 기재된 바와 같이 분리하고, 콜로니 PCR을 관심의 OTU_158_V1V3 (OTU158) 영역을 표적화하는 프라이머를 갖는 각각의 미세-콜로니 상에서 수행하였다. 2개의 PCR 양성 히트를 약 500개의 미생물 콜로니로 적하된 단일 장치로부터 관찰하였다 (도 25A에 나타낸 것들 중 하나). 히트 다음의 PCR 음성 웨일 화상을 도 25A의 좌측에 나타낸다. 세포 물질은 SYBR 그린에 의해 염색되고, 형광을 나타내었지만, 용액 상은 명백하게 PCR 음성이었다. 양성 웨일 중 하나를 M2GSC 한천 상에서 규모-확대하였고, 배양의 3일 후 무손상 "규모-확대" 배양물의 사진을 도 25B에 나타낸다. 배양물은 나타낸 바와 같이 슬립칩으로부터 수송된 다중 시드의 존재로 인해 다중 세포를 함유하였다. 콜로니 PCR을 종-특이적 및 유니버설 프라이머 둘 다를 갖는 이 단리체 상에서 수행하였으며, 이는 OTU158의 존재를 확인시켰다.

[0160] 플레이트를 정제를 위한 표적 세포의 단일 콜로니 (예를 들어 도 25C)로 반복적으로 스트리킹하였다. 플레이트를 5회 스트리킹한 후, 16s rRNA 유전자를 사용하여 배양물의 순도를 측정하였다. PCR 증폭을 위한 게놈 DNA를 퀴아앰프 키트를 제조자의 프로토콜에 따라 사용하여 하기 변형으로 단리하였다: 미니-비드비터-16 (Mini-Beadbeater-16) (바이오스펙 프로덕츠, 인코포레이티드 (BioSpec Products, Inc.))을 사용하여 1분 동안 진탕시킨 용해 매트릭스 B (MP 바이오메디칼스 (MP Biomedicals) 6911-500)를 사용하는 비디-비팅 단계를 추가하였다. 16s rRNA 유전자를 아큐프라이머 (AccuPrimer) Pfx DNA 폴리머라제 (인비트로젠)을 사용한 PCR에 의해 증

폭시켰다. 프라이머 27F 및 1492R을 PCR 증폭에 사용하였다. PCR 증폭을 바이로래드 (Biorad) 씨모사이클러에 의해 95°C에서 2분 인큐베이션으로, 그 후 95°C에서 15초 동안, 55°C에서 30초 동안, 및 68°C에서 90초 동안 34 사이클에 의해 수행하였다. 증폭된 PCR 생성물을 TOPO 벡터 내로 클로닝하고, LB/Amp⁺ 배지 상에서 TOPO10 이. 콜라이 세포 내로 형질전환하였다. 플레이트를 37°C에서 밤새 인큐베이션하고, 단일 콜로니를 액체 배양을 위해 피킹하였다. 플라스미드를 퀴아젠 미니프렙 (Qiagen Miniprep) 키트를 사용하여 세포로부터 정제하였다. 그 후, 플라스미드 DNA를 상기 기재된 것과 동일한 프로토콜로 PCR에 의해 증폭시켰다. PCR 생성물을 퀴아퀵 (QIAquick) PCR 키트를 사용하여 정제하고, 라라겐 (Laragen)에 의해 서열분석하였다.

[0161] TEM을 화상 획득을 위한 가탄 (Gatan) 2k × 2k CCD 카메라가 구비된 TECNAI 120 keV TEM (FEI, 미국 오레곤주 헬스보로) 상에서 200 매쉬 포름바/탄소 그리드로 수행하였다 (도 25D). 단리체의 광학 현미경검사를 세포를 PBS 완충제 중에 혼탁시킴으로써 얻고, 레이카 DMI6000 현미경 (레이카 마이크로시스템즈) 및 하마마츠 ORCAER 카메라를 갖는 63× 1.2 NA 레이카 대물렌즈를 사용하여 화상화하였다. 막대-형상 박테리아 세포를 TEM 화상 (도 25D) 및 광학 현미경검사 (도 26) 둘 다로부터 얻었다.

[0162] 2개의 16S rRNA 유전자 서열 유형을 배양물로부터 얻었다. 이는 서로 99.4% 동일하며, 클로스트리디움 클러스터 IV로서 이전에 참조된 루미노코카씨 (Ruminococcaceae) 과에 연계된다. 16S rRNA 표적화된 FISH를 확립된 프로토콜에 따라 수행하였다. 간략하게, 포름알데히드- 및 에탄올-고정된 샘플을 46°C에서 FAM- 및 Cy3-표지된 올리고뉴클레오티드 프로브로 16시간 동안 포름아미드-함유 습식 챔버에서 혼성화시켰다. 세포벽 소화가 형광 검출 및/또는 표지 강도의 증가를 초래하는지 여부를 시험하기 위해, 혼성화 전에, 샘플을 (i) TE 완충제 중 10 mg mL⁻¹ 리소자임 (습식 챔버에서 37°C에서 1시간); (ii) TE 완충제 중 15 µg mL⁻¹ 프로테이나제 K (실온, 즉 23°C에서 10분) 후, 0.01 M HCl에 침지 (23°C에서 10분); 또는 (iii) 아세톤:메탄올의 1:1 혼합 (23°C에서 15 분) 중 하나로 전처리하였다. 혼성화 완충제 중 포름아미드 농도는 권고된 바와 같았다: 프로브 믹스 EUB338 I-III 및 대조군 프로브 NonEUB338에 대해 20 내지 35%; 프로브 Arch915에 대해 35%; 프로브 EUK516에 대해 20%. 2개의 세롭게 설계된 프로브 Clostr183-I 및 Clostr183-II를 15%에서 혼성화시켰다 (20% 초과의 농도에서 형광 신호가 관찰되지 않았음). 동일한 결합 부위에 대한 경쟁을 통해, 이들 프로브는 우리의 배양물로부터 얻어진 2개의 16S rRNA 유전자 서열 유형 사이를 구별할 수 있다. 혼성화 후, 슬라이드를 48°C로 미리 가온된 세척 완충제에서 10분 동안 세척하였다. 그 후, 이들을 미리 냉각된 탈이온수 (4°C) 내로 디핑하고, 가압된 공기를 사용하여 건조시켰다. 슬라이드를 DAPI/시티플루오르 (Citifluor)로 실장하고, 올림푸스 (Olympus) BX51 에피형광 현미경을 사용하여 분석하였다. 형광 화상을 현미경 제조자에 의해 제공된 소프트웨어 및 이미지제이를 사용하여 분석하였다. 대조군 프로브 NonEUB338이 샘플에 적용되었을 경우, 비특이적 표지화는 관찰되지 않았다.

[0163] 모든 FISH-양성 세포는 서열 유형-특이적 FISH-프로브 (Clostr183-SI 및 Clostr183-SII, 도 27), 및 박테리아의 대부분의 구성원을 특이적으로 검출하는 일반적 프로브 믹스 EUB338I-III 둘 다에 결합하였다. 고세균류 또는 진핵 세포는 배양물에서 검출될 수 없었던 반면, 일부 DAPI-염색된 세포는 FISH를 통해 염색될 수 없었다. 이것이 각각의 세포의 제한된 접근성으로 인한 것이었음을 배제하기 위해, 상이한 세포벽 투과화 처리를 시험하였다. 그러나, 어느 것도 이들 세포의 성공적인 FISH-염색을 초래하지 않았다. 따라서, 각각의 세포는 아마도 모노-FISH의 검출 한계 미만인 리보솜 함량을 가지며, 이는 각각의 세포의 포자형성으로 인한 것일 수 있다. 이 생각은 고정 상에서의 배양물의 분석에서, 투과화 단계가 수행될 경우에라도 대부분의 세포가 FISH를 사용하여 가시화될 수 없다는 발견에 의해 지지된다. 이들 FISH 결과는 배양물에서 단일 루미노코씨의 존재를 입증한다.

실시예 19 - 장 미생물의 배양 및 분석

[0165] 인간 및/또는 마우스 장 생검으로부터의 단일 미생물 세포를 장치 상에서 확률적으로 격리하고, 인큐베이션하여 콜로니를 성장시켰다. 세포주를 슬립칩 장치 상으로 적하하고, 인큐베이션하여 콜로니를 성장시켰다. 박테리아 배양물로부터의 장치의 2개의 플레이트를 분리하고, 각각의 구획화된 유체 부피를 2개로 분할하여, 각각의 대향하는 플레이트 상에 각각의 개체 콜로니의 동일한 카피를 생성하였다. 박테리아 세포를 함유하는 유리 플레이트와 포유동물 세포 배양물을 함유하는 유리 플레이트를 중첩시킴으로써 기능적 검정을 제1 플레이트 상에서 수행하여 관심의 기능을 갖는 콜로니를 함유하는 구획을 확인하였다. 유전자의 발현을 예를 들어 형광, 비색, 화학발광 또는 질량 분광 검정과 같은 검정을 수행함으로써 가시화하였다. 그 후, 상응하는 콜로니를 다른 목적, 예컨대 관심의 단리체의 규모-확대 배양을 위해 제2 플레이트로부터 회수하였다.

실시예 20 - 슬레이트 환원 박테리아의 배양

[0167]

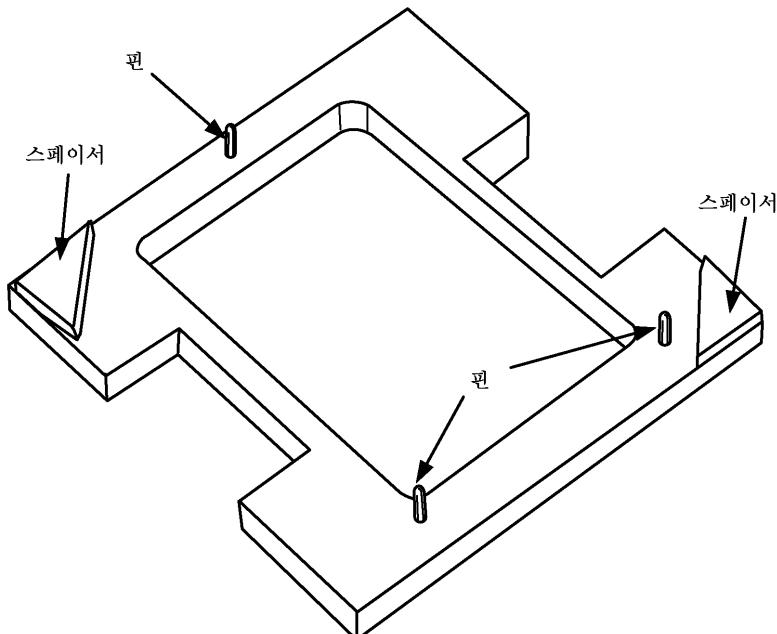
술페이트-환원 박테리아를 함유하는 것으로 예상된 샘플을 슬립칩 장치 상으로 적하하고, 확률적으로 격리하였다. 장치를 인큐베이션하고, 콜로니를 성장시켰다. 슬립칩 장치의 2개의 플레이트를 분리하고, 각각의 플레이트로부터 쌍형성된 웰에서 매칭 콜로니를 생성하였다. 하나의 플레이트로부터의 샘플을 관련 유전자를 표적화하는 유전자 검정 (예를 들어 도 28)에 의해, 또는 술페이트-환원 활성의 존재에 대한 기능적 검정에 의해 (예를 들어 H_2S 를 검출하기 위한 형광원성 기질 N,N-디부틸 페닐렌 디아민 (DBPDA)의 사용에 의해) 술페이트-환원 거동에 대해 검정하였다. 술페이트-환원에 대해 양성으로 밝혀진 콜로니를 주목하고, 다른 슬립칩 플레이트로부터의 그들의 매칭 콜로니를 추가의 연구를 위해 배양하였다. 이전에 알려지지 않은 술페이트-환원 박테리아가 샘플에서 발견되었다.

[0168]

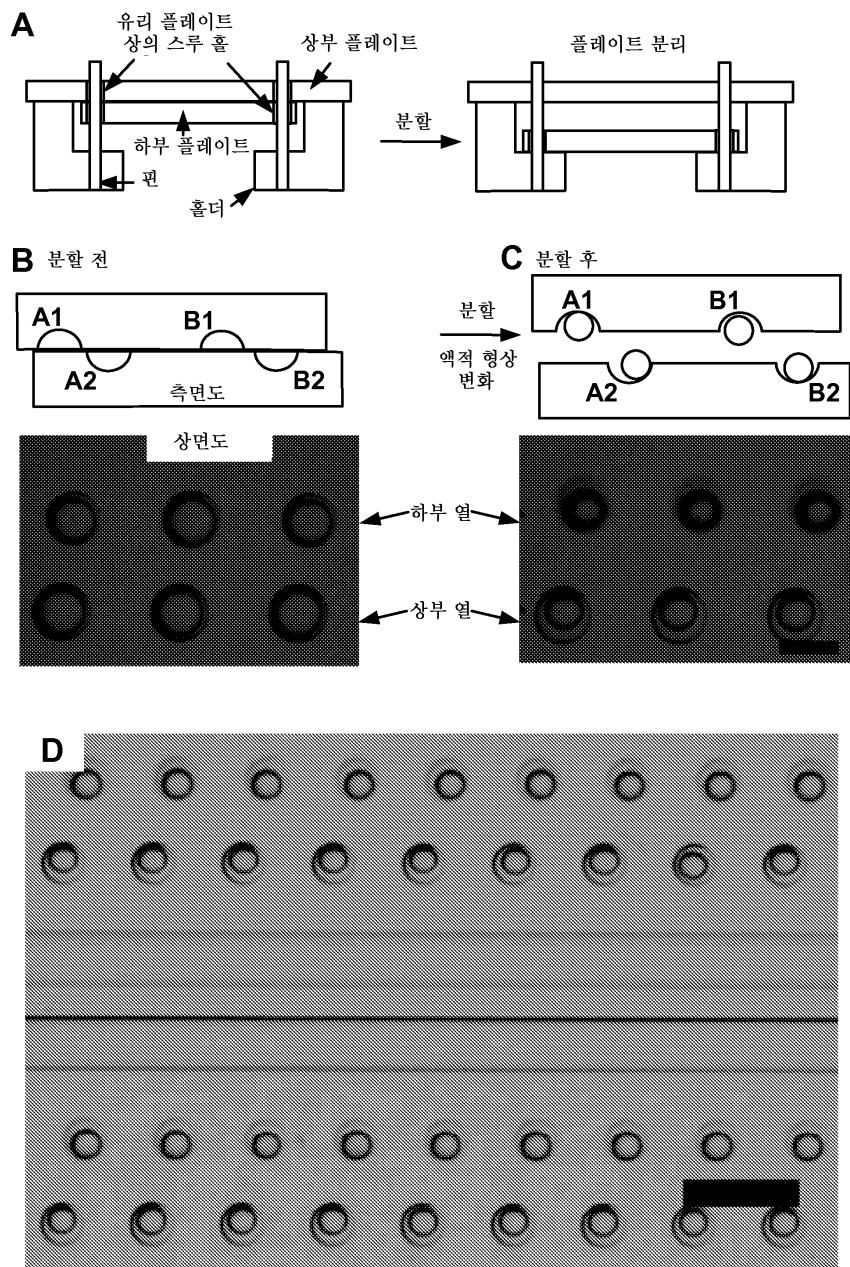
본 발명의 바람직한 실시양태를 본원에 나타내고 기재하였지만, 이러한 실시양태는 단지 예로써만 제공된다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 본 발명으로부터 벗어나지 않고 많은 변형, 변경 및 치환이 이제 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 일어날 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는 데 채용될 수 있음이 이해되어야 한다. 하기 청구범위는 본 발명의 범위를 한정하며, 이를 청구범위 및 그들의 등가물의 범위 내의 방법 및 구조가 그에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

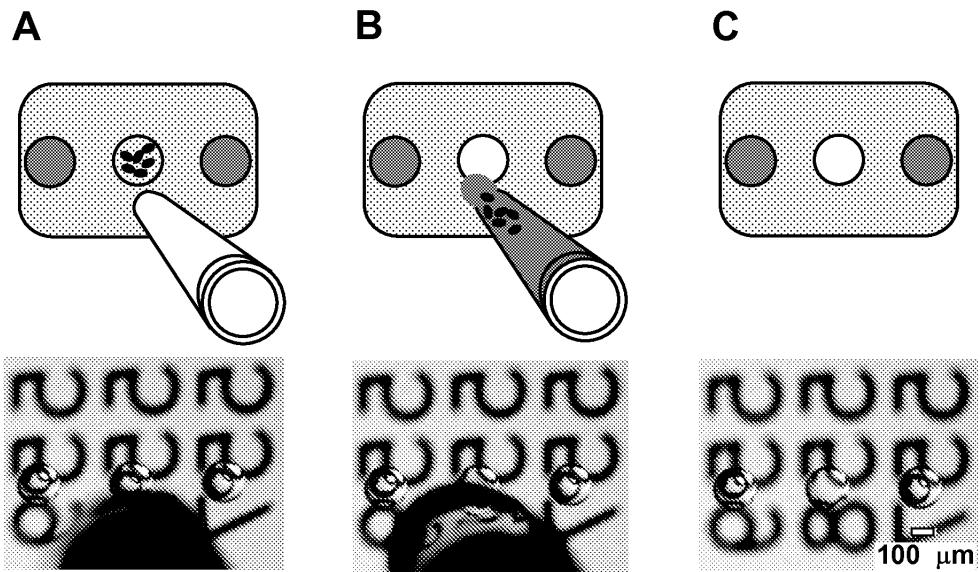
도면1



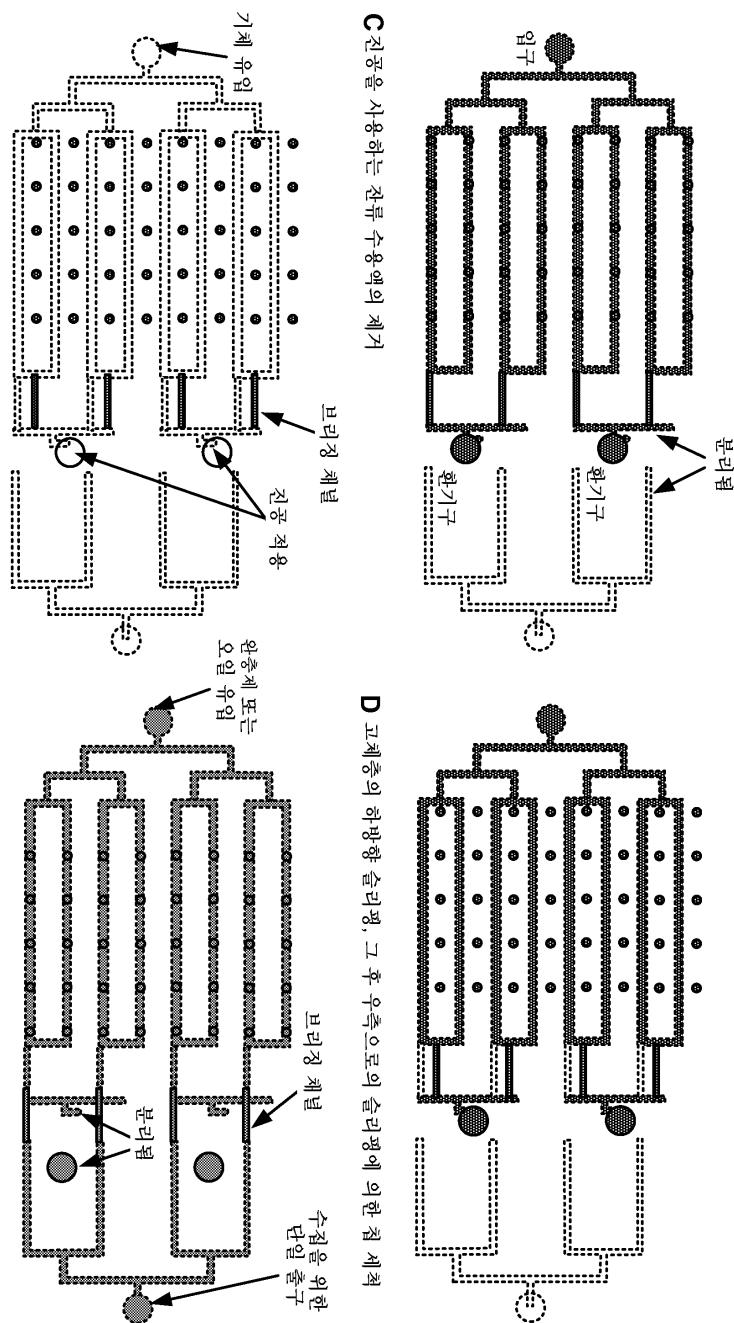
도면2



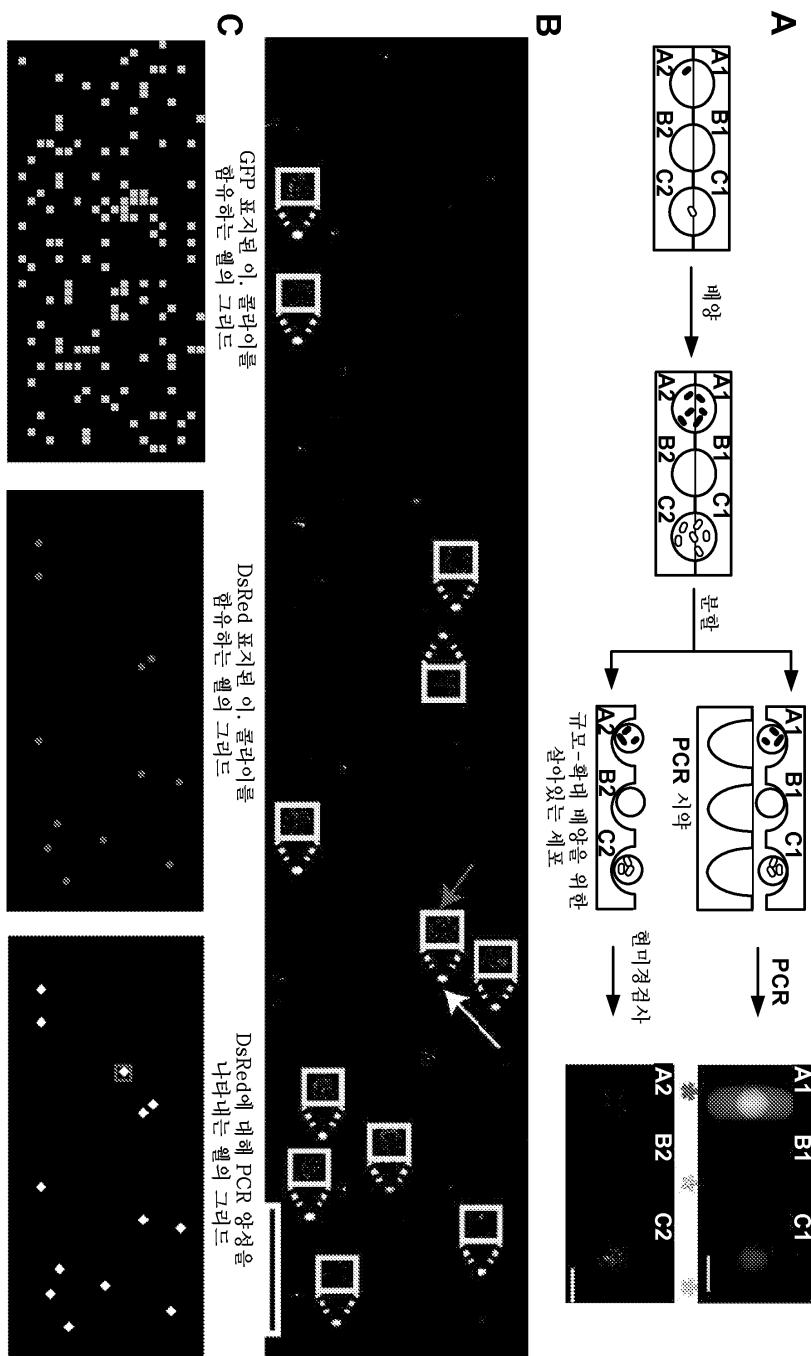
도면3



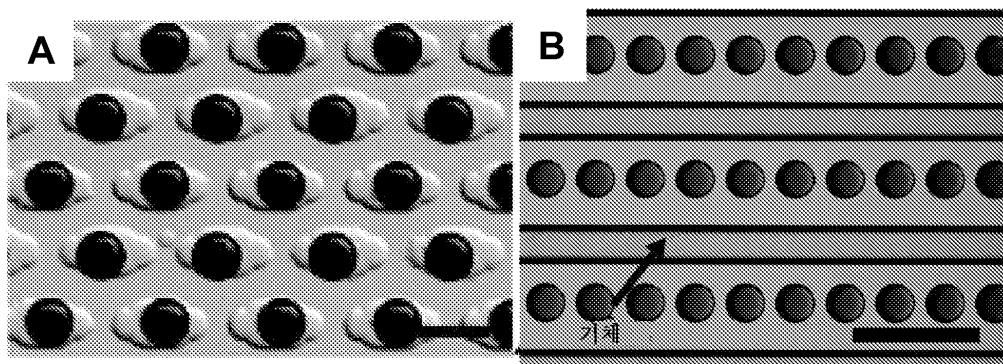
도면4



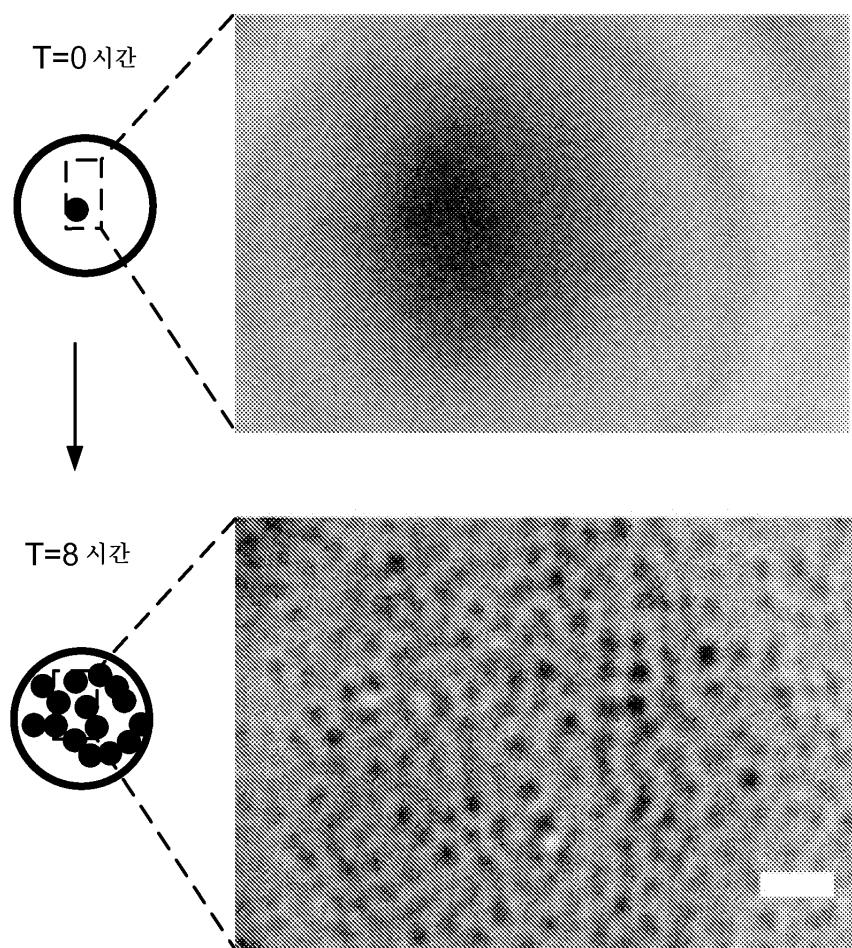
도면5



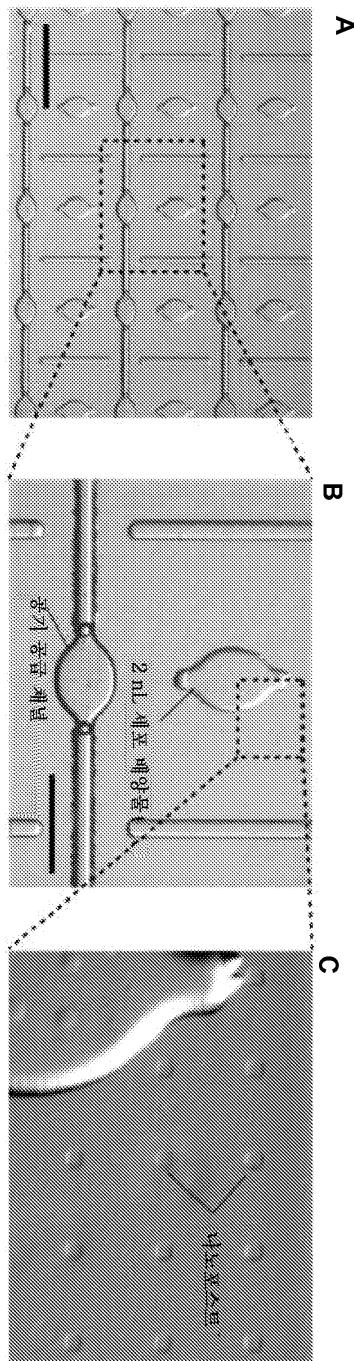
도면6



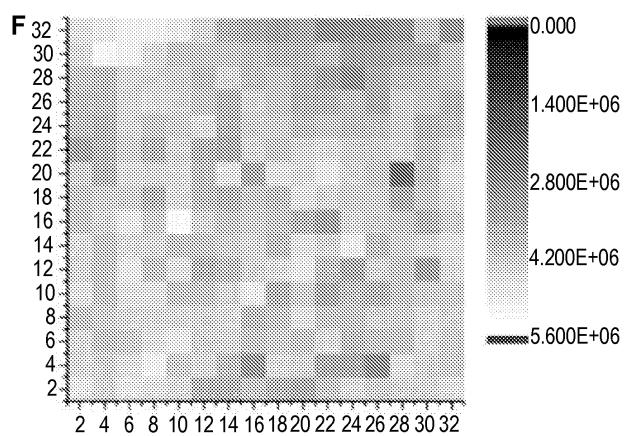
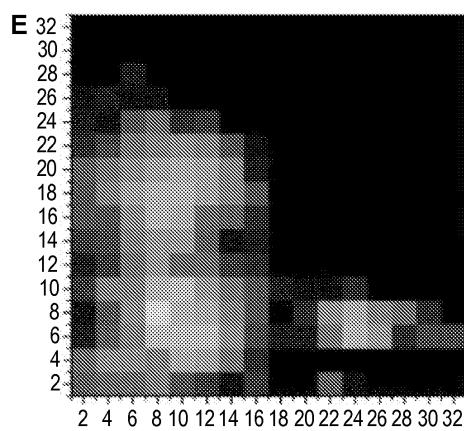
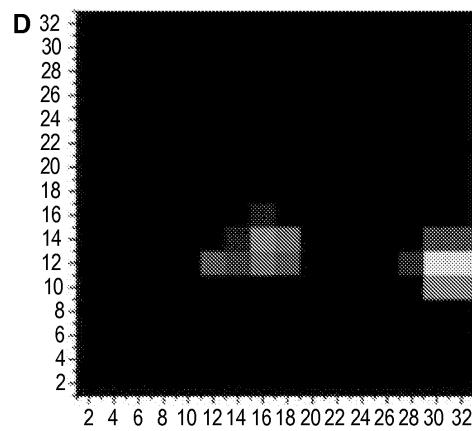
도면7



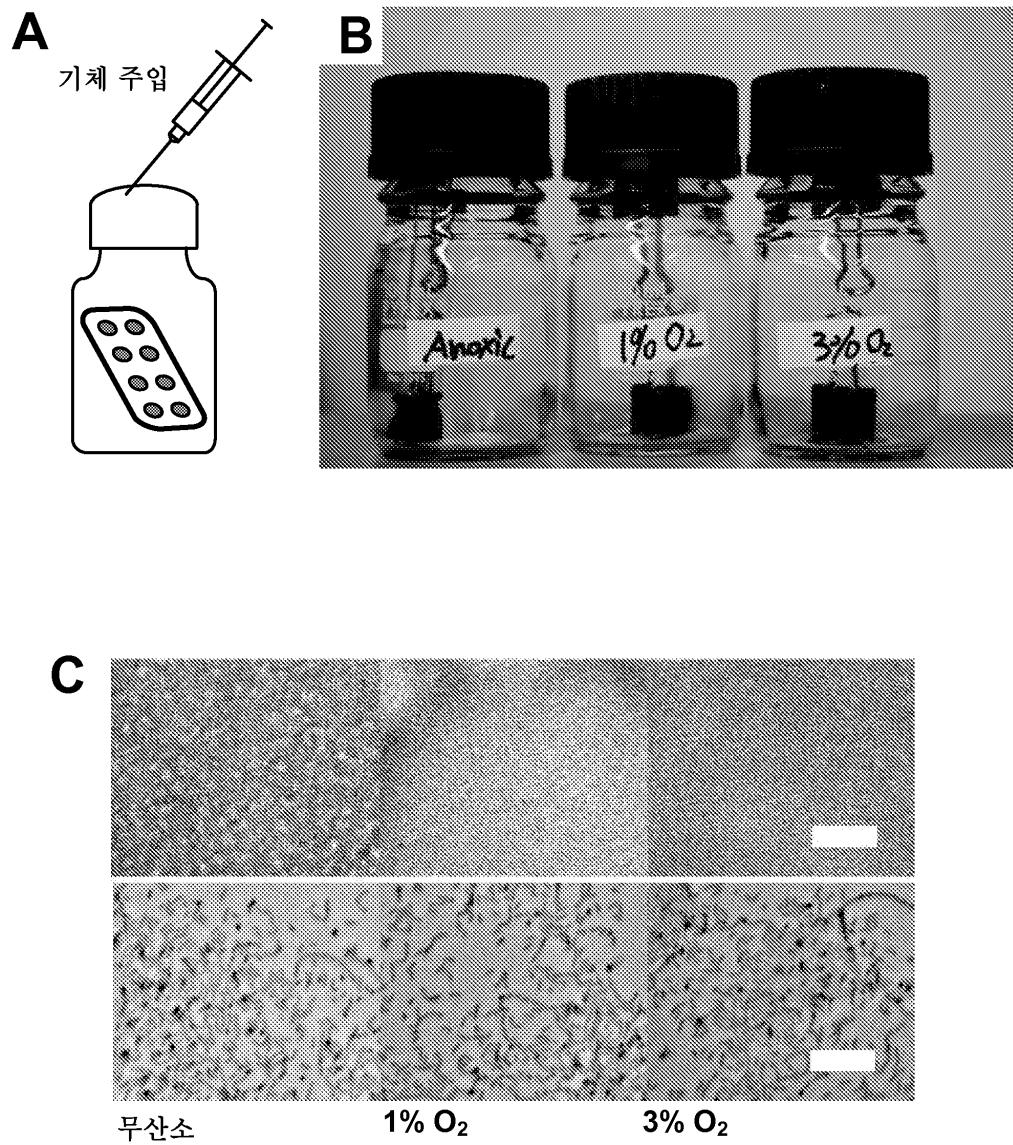
도면8i



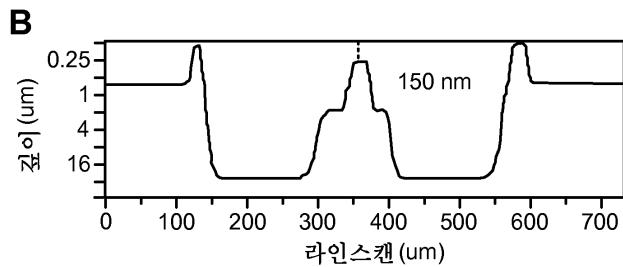
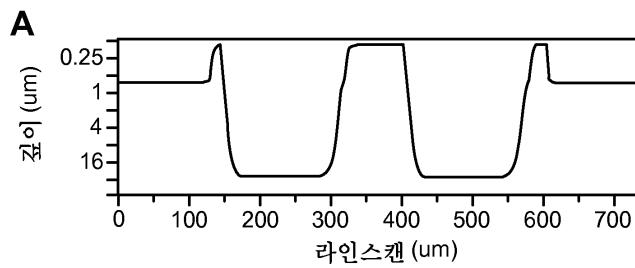
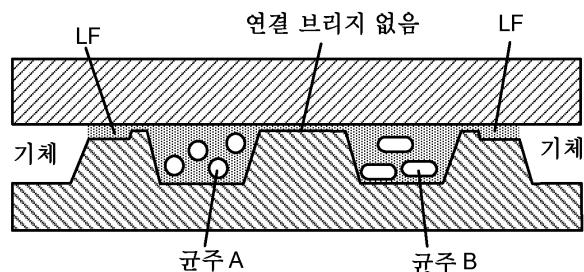
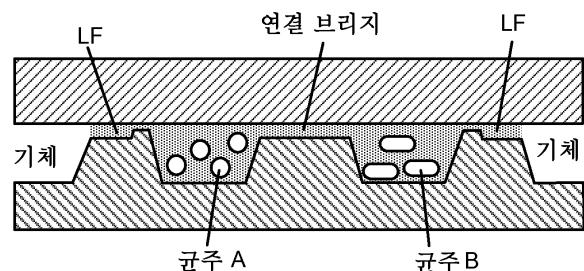
도면8ii



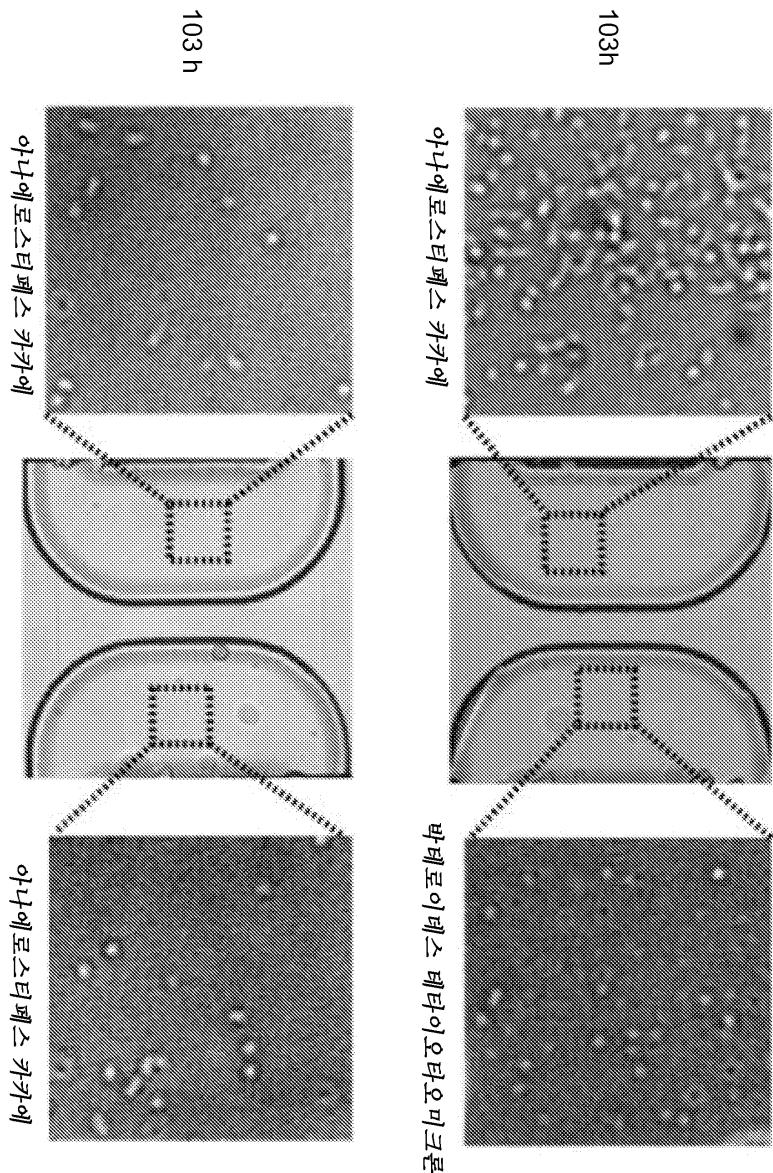
도면9



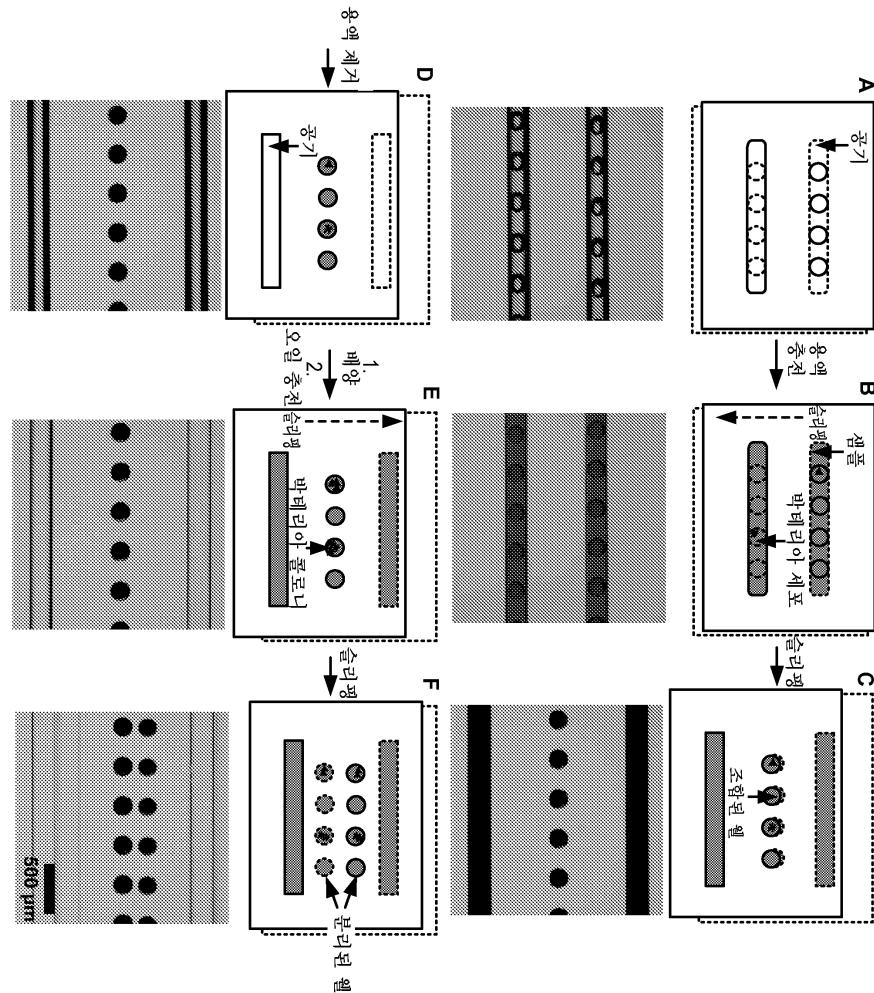
도면10

**C** 분리된 구획**D** 확산에 의해서만 연락함

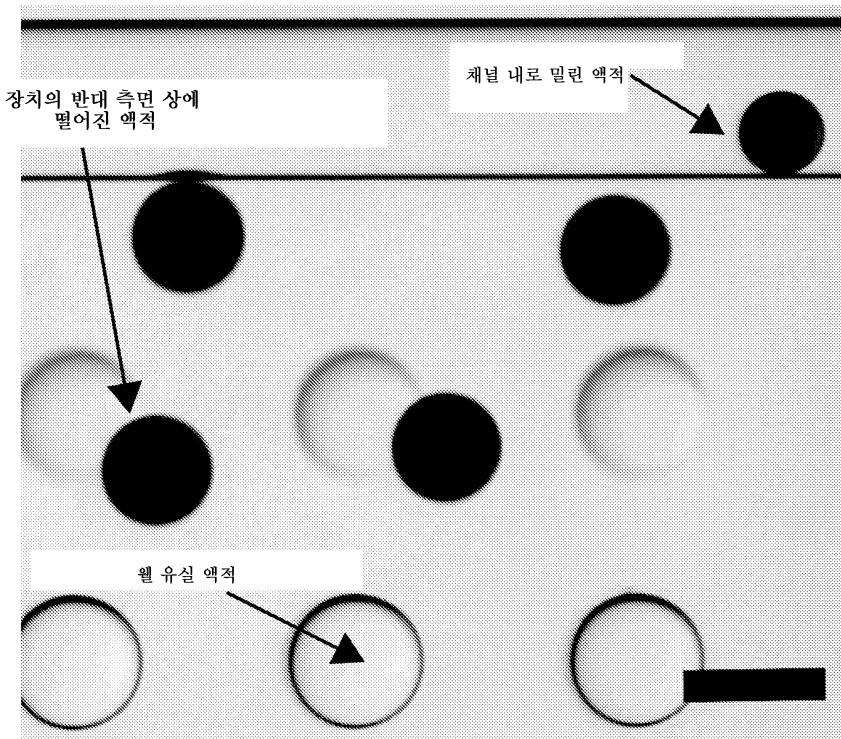
도면11



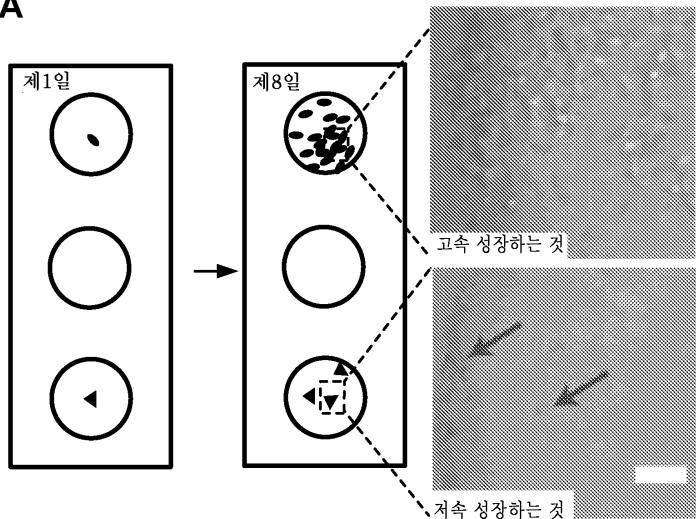
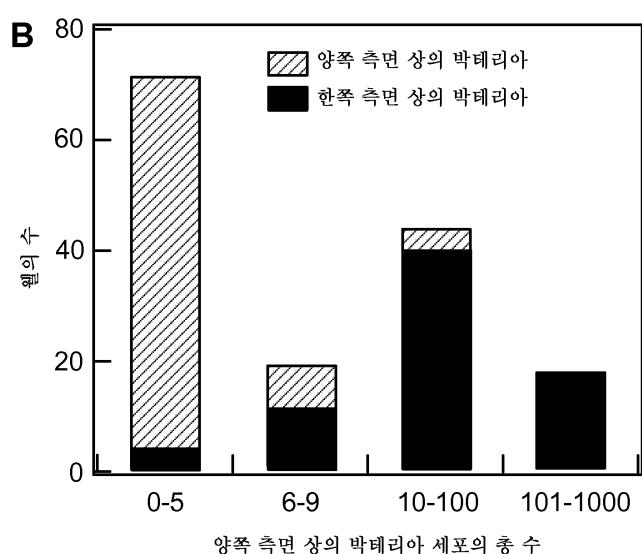
도면12



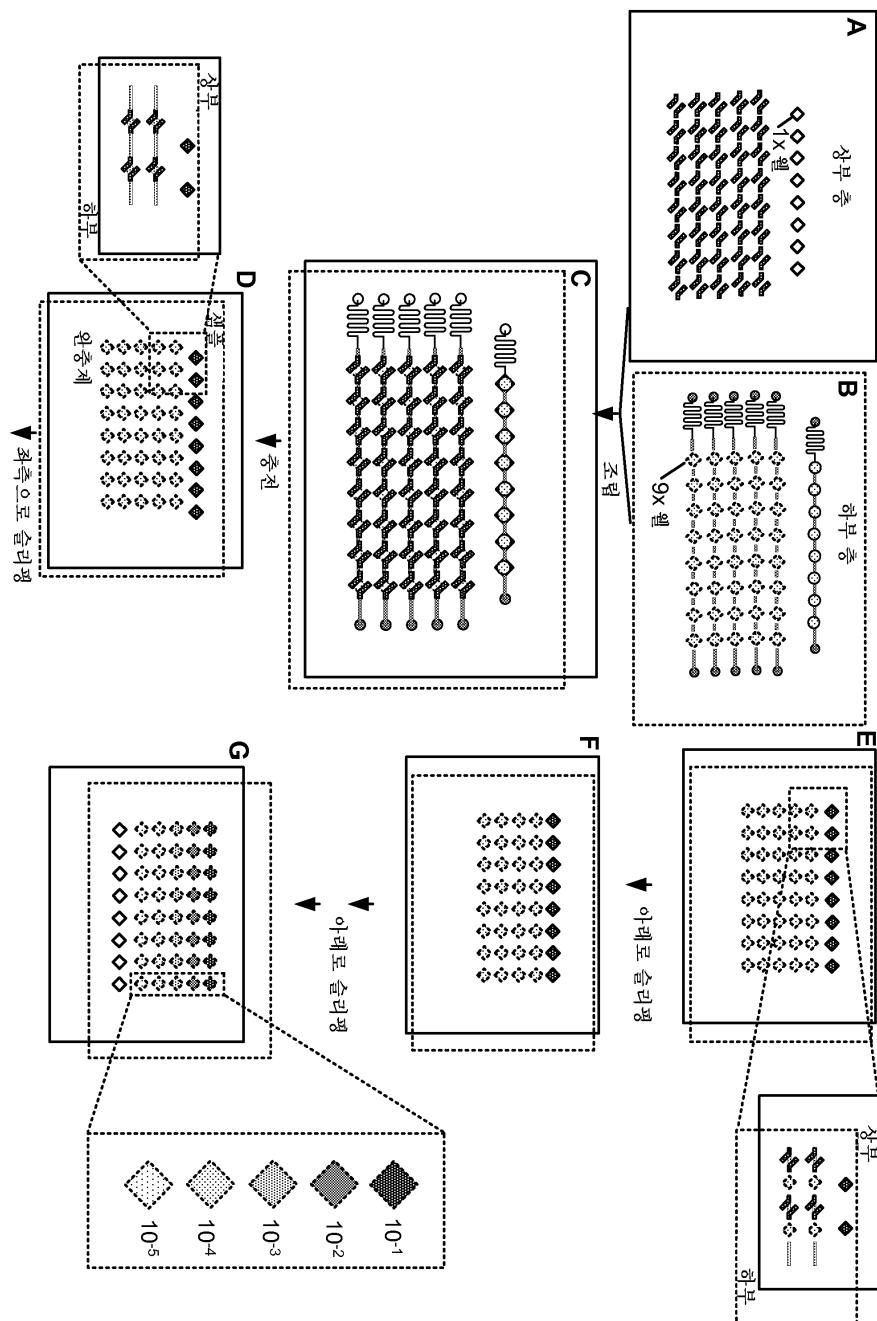
도면13



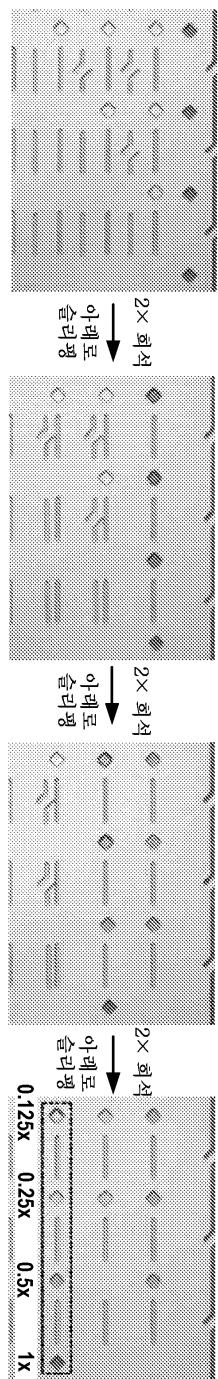
도면14

A**B**

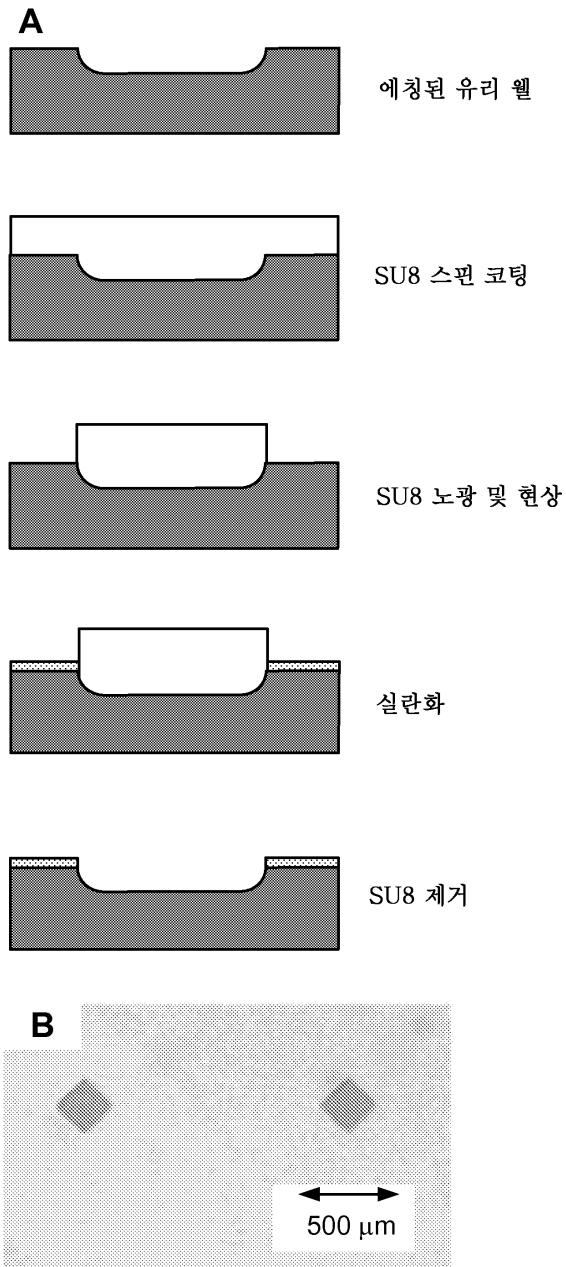
도면15



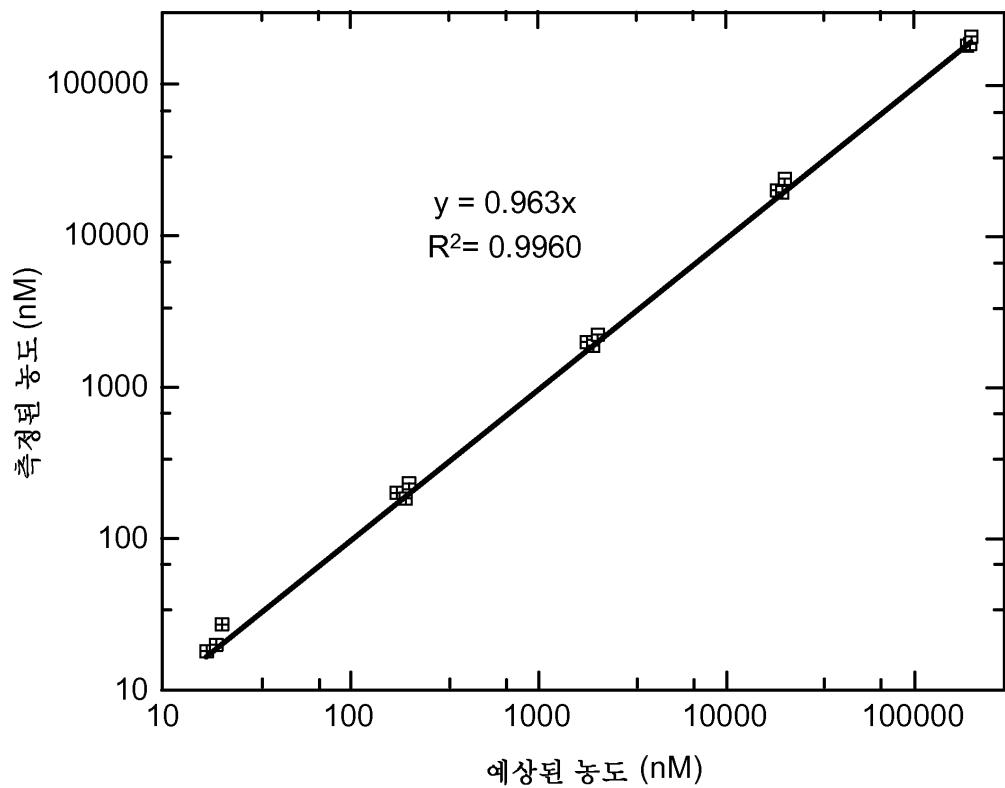
도면16



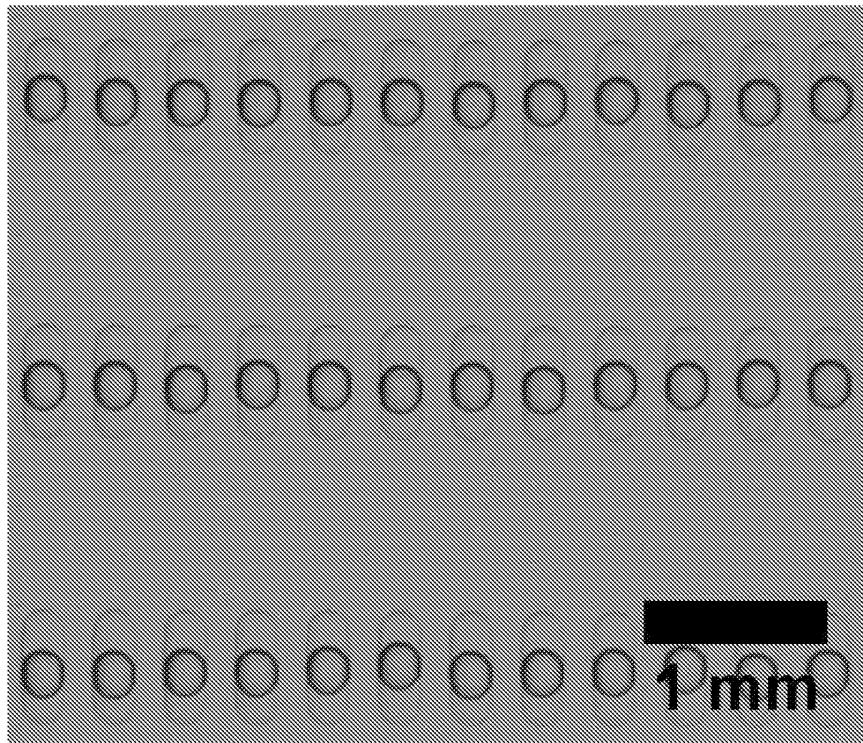
도면17



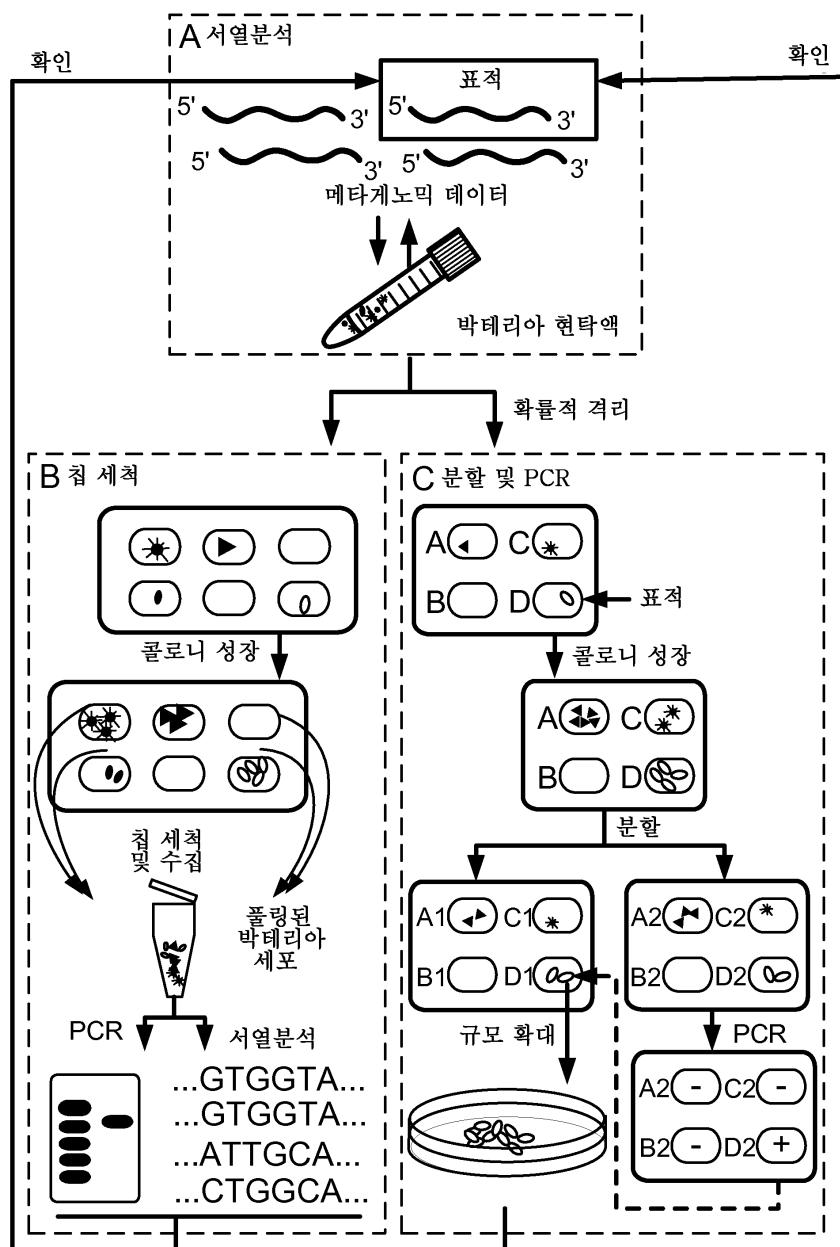
도면18



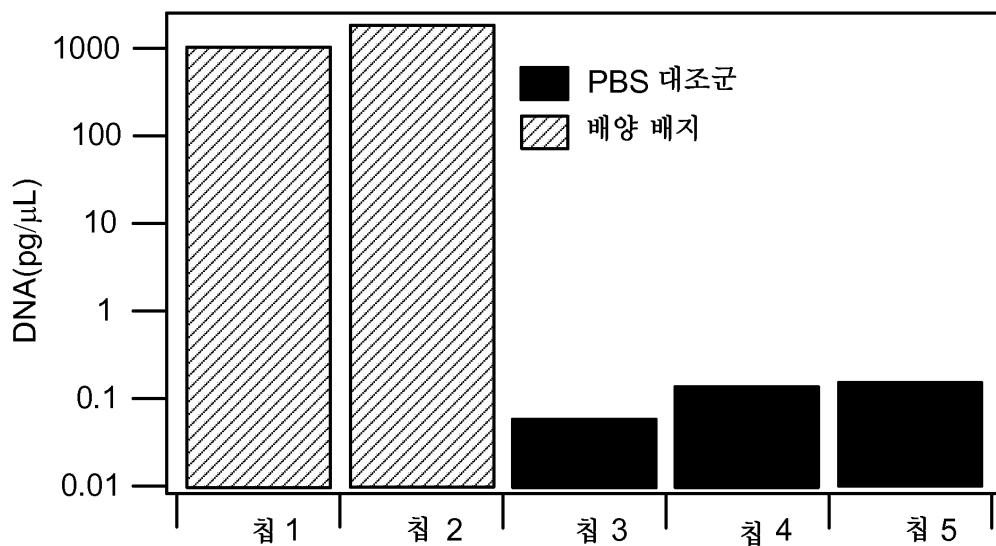
도면19



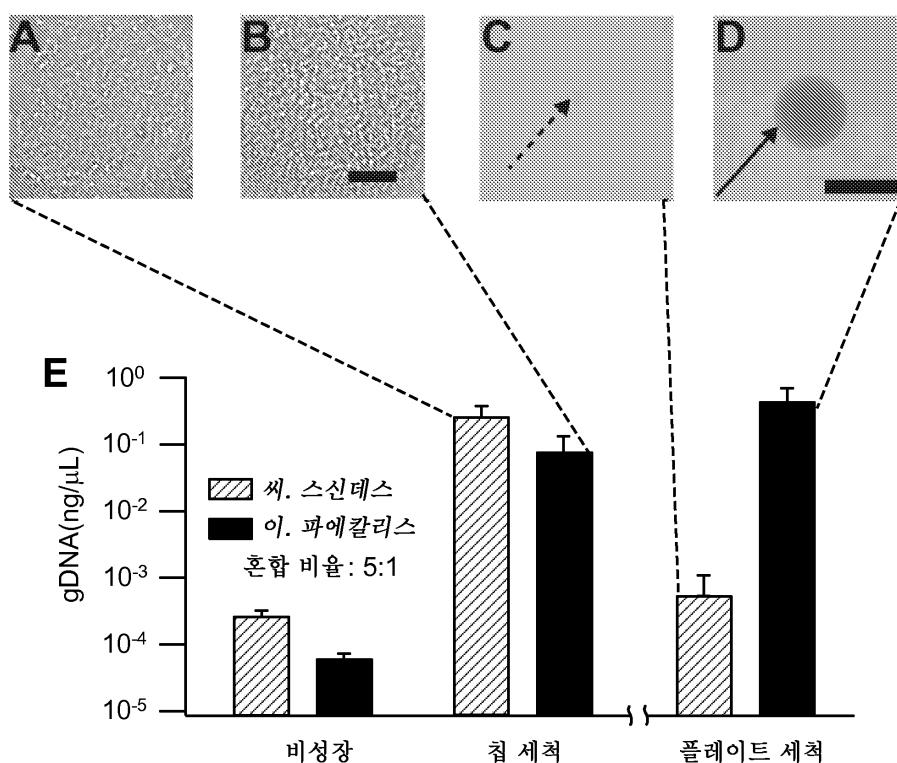
도면20



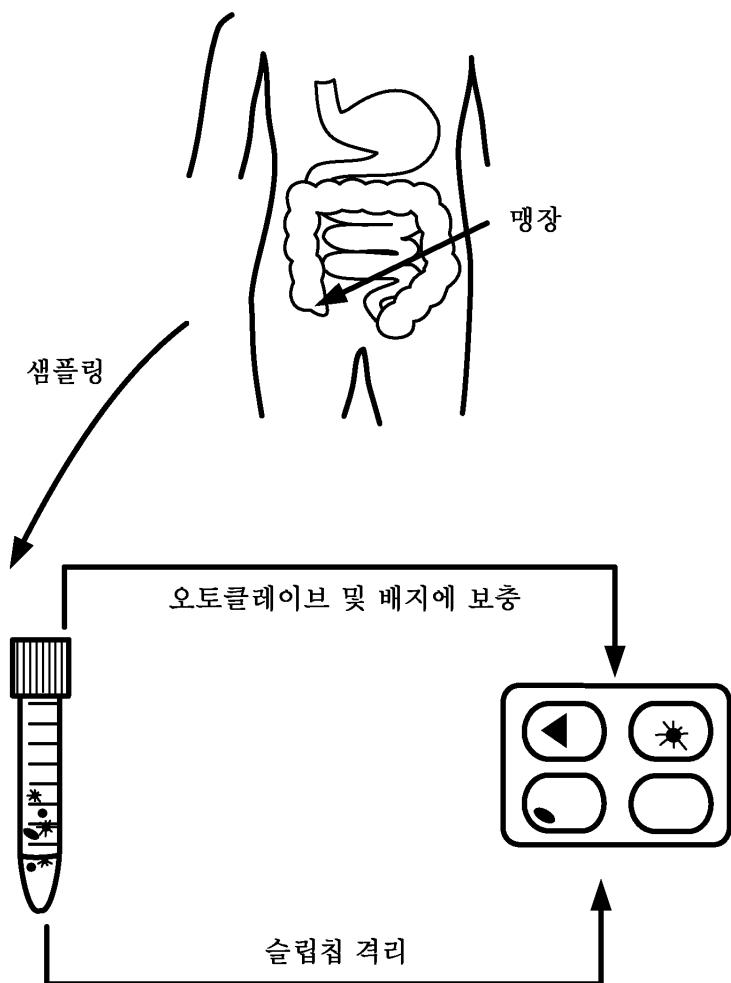
도면21



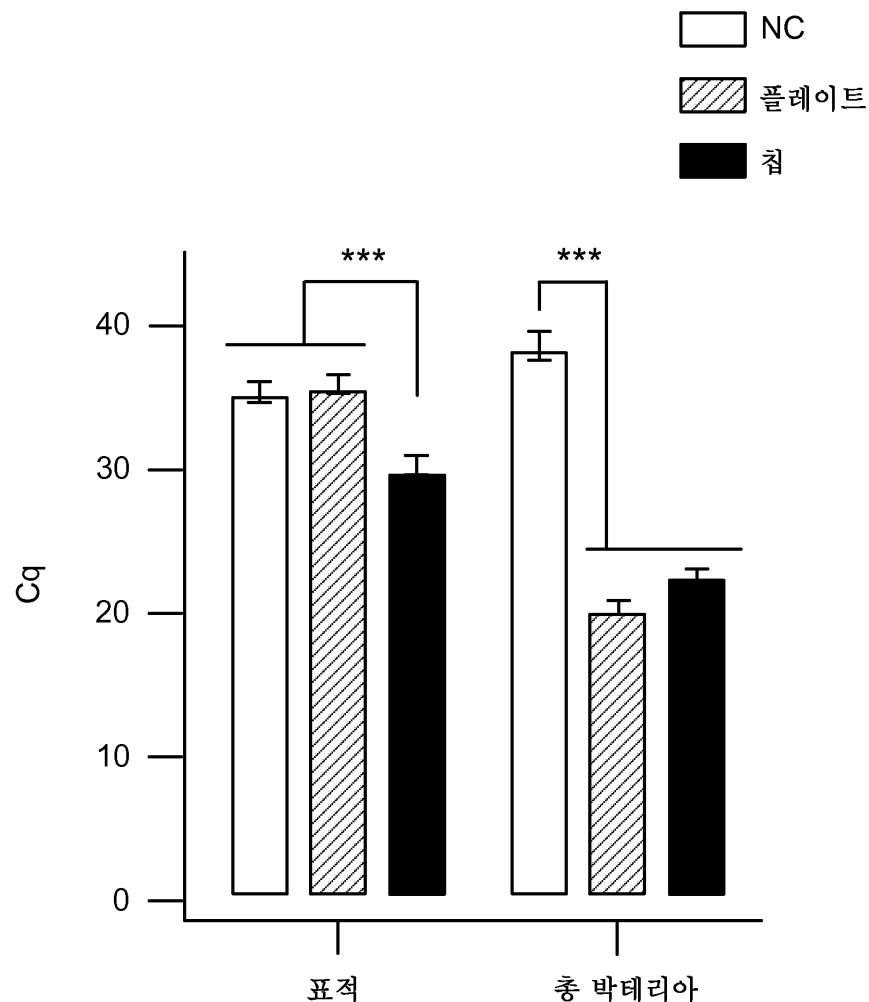
도면22



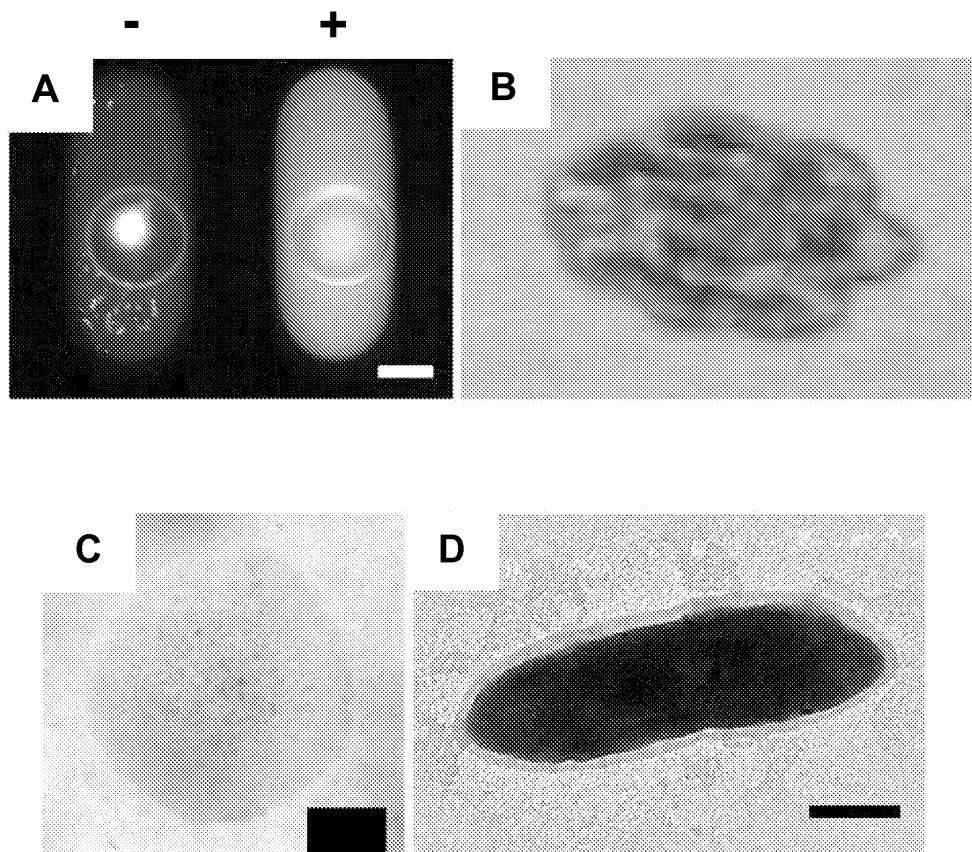
도면23



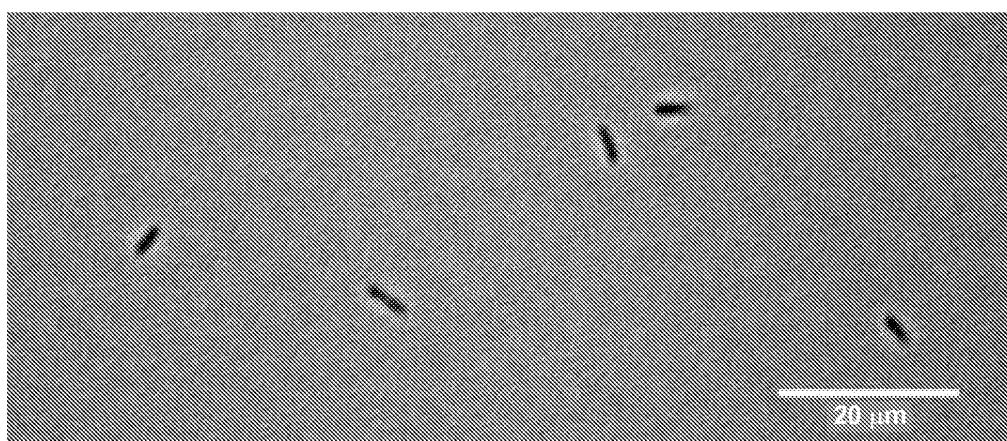
도면24



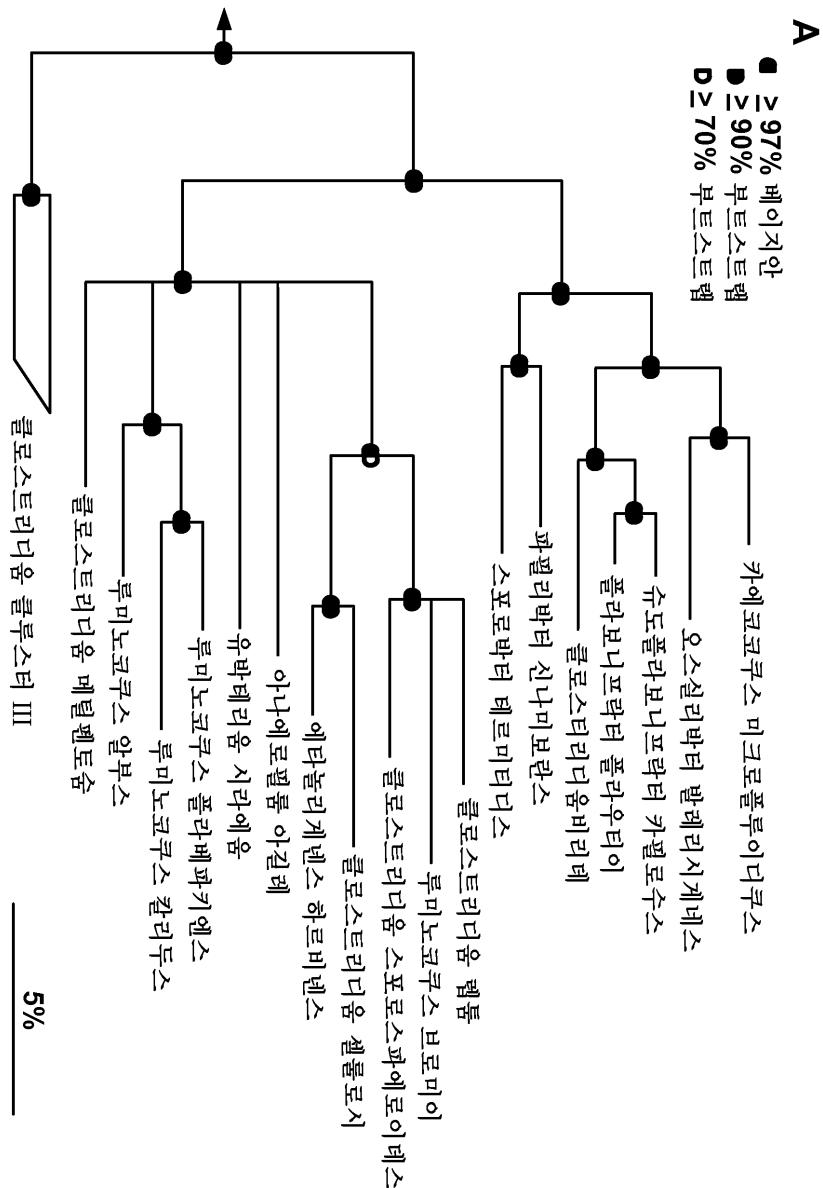
도면25



도면26

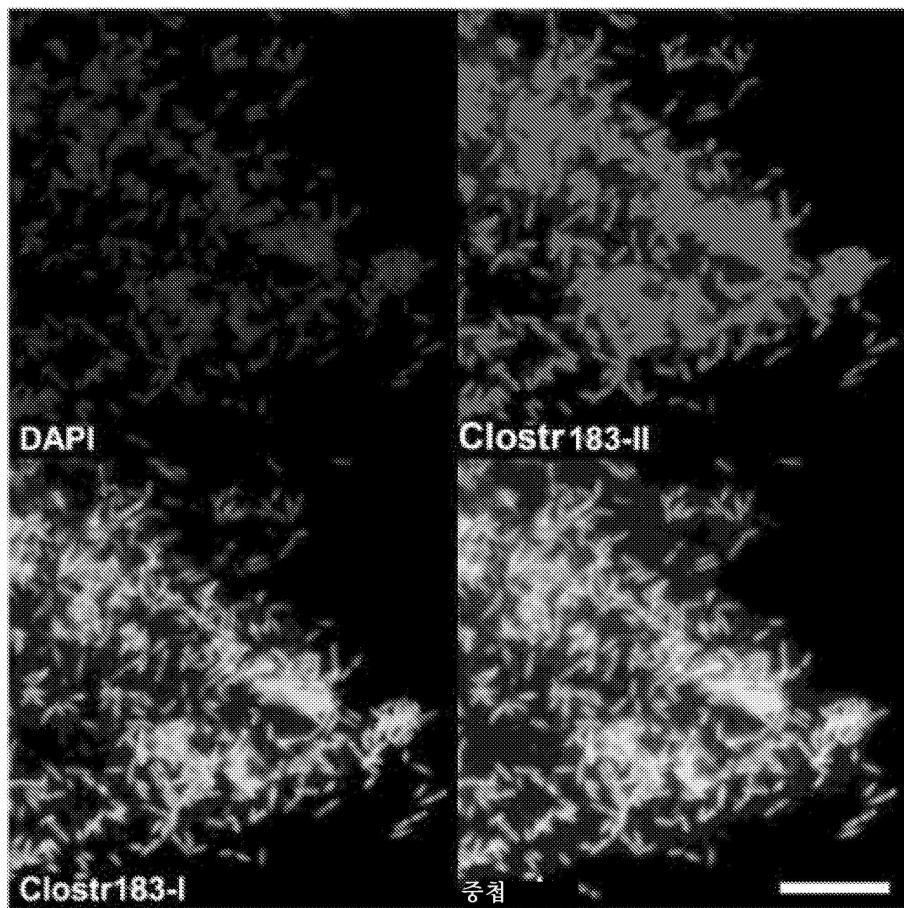


도면27i



도면27ii

B



도면28

