(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월23일
(11) 등록번호 10-2758333
(24) 등록일자 2025년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6874 (2018.01) *B01L 7/00* (2023.01)
C12Q 1/686 (2018.01) *C12Q 1/6876* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6874 (2018.05)
B01L 7/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7017312(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년08월28일
심사청구일자 2023년06월21일
(85) 번역문제출일자 2023년05월22일
(65) 공개번호 10-2023-0074639
(43) 공개일자 2023년05월30일
(62) 원출원 특허 10-2022-7017261
원출원일자(국제) 2014년08월28일
심사청구일자 2022년06월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/053301
(87) 국제공개번호 WO 2015/031691
국제공개일자 2015년03월05일
(30) 우선권주장
61/871,232 2013년08월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2012048341 A1*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 17 항

(73) 특허권자
벡톤 디킨슨 앤드 컴퍼니
미국, 뉴저지 07417-1880, 프랭클린 레이크스, 1 벡톤 드라이브
(72) 발명자
팬, 크리스티나
미국 94538 캘리포니아주 프리몬트 임페이션스 커몬 5664
포도어, 스티븐, 피.에이.
미국 94301 캘리포니아주 팔로 알토 파킨슨 애비뉴 1120
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김윤기

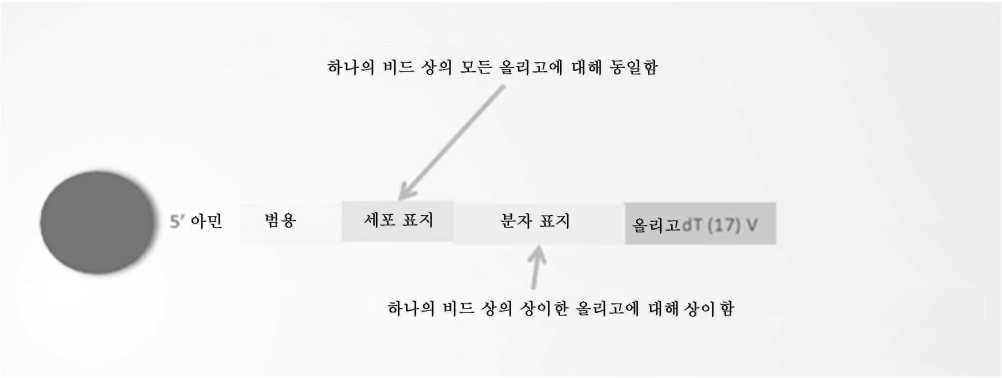
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 **대량의 동시 단일 세포 분석**

(57) 요 약

본 개시내용은 단일 세포의 다중 핵산 분석을 위한 방법, 조성물 및 키트를 제공한다. 방법, 조성물 및 시스템은 대량의 동시 단일 세포 서열분석을 위해 사용될 수 있다. 방법, 조성물 및 시스템은 수천 개의 세포를 동시에 분석하기 위해 사용될 수 있다. 수천 개의 세포는 세포의 혼합된 집단 (예를 들어, 상이한 유형 또는 아형, 상이한 크기의 세포)을 포함할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12Q 1/686 (2018.05)
C12Q 1/6876 (2018.05)
B01L 2300/023 (2013.01)
B01L 2300/0627 (2013.01)
B01L 2300/0829 (2013.01)
C12Q 2563/159 (2013.01)
C12Q 2563/185 (2013.01)

(72) 발명자
푸, 글렌, 케이.
미국 94568 캘리포니아주 더블린 이스트 코그 힐 테라스 2771
페이서, 제프리, 리처드
미국 94061 캘리포니아주 레드우드 시티 캔자스 애비뉴 1671
윌헬미, 줄리
미국 95060 캘리포니아주 산타크루즈 에스칼론 드라이브 1726

(56) 선행기술조사문헌
PNAS.,108(22):9026-9031(2011.5.31.)
PNAS.,108(50):20166-20171(2011.12.13.)
WO2010117620 A2
WO2012083225 A2
US20130116130 A1
US20130190206 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장
61/952,036 2014년03월12일 미국(US)
62/012,237 2014년06월13일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다중 단일 세포 분석을 수행하기 위한 기구 시스템으로서,

마이크로타이터 플레이트 또는 미세유동칩; 및

복수의 올리고뉴클레오티드와 각각 회합된 복수의 입자를 포함하며,

상기 복수의 올리고뉴클레오티드 각각은 세포 표지 서열, 분자 표지 서열, 및 표적-결합 영역을 포함하고, 상기 복수의 올리고뉴클레오티드 각각의 세포 표지 서열은 동일한 입자 상에서 동일하지만 상이한 입자 상에서는 상이하고, 상기 각각의 복수의 입자와 회합된 상기 복수의 올리고뉴클레오티드 중 적어도 100개는 상이한 분자 표지 서열을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 하나 이상의 증폭제를 포함하고, 상기 하나 이상의 증폭제는 폴리머라제, 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP), 프라이머, 완충제, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적-결합 영역이 올리고-dT 서열, 유전자-특이적 서열, 무작위 다량체 서열, 또는 이들의 조합을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 복수의 올리고뉴클레오티드 각각이 (a) 샘플 표지 서열 및 (b) 범용 표지 서열 중 적어도 하나를 더 포함하는, 기구 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 분자 표지 서열이 무작위 서열을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 각각의 복수의 입자와 회합된 상기 복수의 올리고뉴클레오티드 중 적어도 10,000개가 상이한 분자 표지 서열을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 복수의 올리고뉴클레오티드가 적어도 100,000개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 기구 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 마이크로타이터 플레이트 또는 상기 미세유동칩이 복수의 구획을 포함하고, 상기 복수의 구획의 적어도 10%의 각각은 상기 복수의 입자 중 하나를 함유하는, 기구 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 복수의 구획의 적어도 10%의 각각은 단일 세포 또는 단일 세포의 용해물을 함유하는, 기구 시스템.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 복수의 구획의 적어도 10%의 각각은 (1) 상기 복수의 입자 중 하나 및 (2) 단일 세포 또는 단일 세포의 용해물을 함유하는, 기구 시스템.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 단일 세포가 희귀 세포, 암 세포, 면역 세포, 조직으로부터의 세포, 인간 세포, 바이러스 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포, 또는 이들의 조합인, 기구 시스템.

청구항 12

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 구획이 마이크로웰, 소적, 또는 이들의 조합을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 복수의 입자의 상기 복수의 올리고뉴클레오티드가 상기 단일 세포 또는 상기 단일 세포의 용해물의 표적 분자의 개별적인 발생을 표지할 수 있고, 상기 표적 분자는 DNA 분자, RNA 분자, 또는 이들의 조합을 포함하는, 기구 시스템.

청구항 14

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 복수의 입자의 상기 복수의 올리고뉴클레오티드가 역전사를 통해 상기 단일 세포 또는 상기 단일 세포의 용해물의 mRNA 분자의 개별적인 발생을 표지할 수 있는, 기구 시스템.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복수의 입자가 적어도 384개의 입자를 포함하는, 기구 시스템.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각각의 복수의 입자가:

폴리디메틸실록산 (PDMS), 폴리스티렌, 유리, 폴리프로필렌, 아가로스, 젤라틴, 히드로겔, 상자성 물질, 세라믹, 플라스틱, 유리, 메틸스티렌, 아크릴계 중합체, 티타늄, 라텍스, 세파로스, 셀룰로스, 나일론, 실리콘, 실리카 겔, 제어된 세공 유리, 디나비드, 왕 (Wang) 수지, 메리필드 (Merrifield) 수지, 세파덱스/세파로스, 셀룰로스, 또는 이들의 조합을 포함하고;

미세입자 또는 나노입자이고/이거나;

비드이고, 여기서 비드는 스트렙타비딘 비드, 아가로스 비드, 자성 비드, 히드로겔 비드, 항체 접합된 비드, 단백질 A 접합된 비드, 단백질 G 접합된 비드, 단백질 NG 접합된 비드, 단백질 L 접합된 비드, 올리고dT 접합된 비드, 실리카 비드, 실리카-유사 비드, 항-비오틴 마이크로비드, 또는 항-형광 색소 마이크로비드인, 기구 시스템.

청구항 17

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화 시스템, 세포 또는 입자 분배 시스템, 유동 제어기, 세포 용해 시스템, 온도 제어 제어기, 자기장 제어기, 사용자 인터페이스 및 시스템 기능의 제어를 제공하기 위해 프로그램된 프로세서 또는 컴퓨터, 실시간 영상 분석을 제공하기 위한 프로그램 코드, 통합된 PCR 열 싸이클러, 통합된 시퀀서, 또는 이들의 조합을 더 포함하는, 기구 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 교차 참조

[0002] 본원은 그 전부가 본원에 참고로 포함된, 2014년 6월 13일 출원된 미국 특허 가출원 62/012,237, 2014년 3월 12일 출원된 미국 특허 가출원 61/952,036 및 2013년 8월 28일 출원된 미국 특허 가출원 61/871,232를 기초로 한

우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] 다세포 집합체, 예컨대 조직 및 종양은 불균일한 세포 환경 (cellular milieu)을 포함할 수 있다. 이러한 복잡한 세포 환경은 종종 다수의 표현형을 제시할 수 있고, 이들은 다수의 유전자형을 나타낼 수 있다. 다세포 복잡성을 단일 세포 가변성으로 추출하는 것은 다세포 불균일성 이해의 중요한 측면이다. 상기 이해는 다수의 내성 유전자형을 갖는 질환의 퇴치를 위한 치료 요법의 개발에서 중요할 수 있다.

발명의 내용

[0004] **발명의 개요**

[0005] 제공되는 한 측면은 다수의 세포를 포함하는 샘플을 얻고; 다수의 제1 세포 및 다수의 제2 세포로부터의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 그의 상보체, 또는 그의 반응 생성물의 적어도 일부를, 제1 세포에 특이적인 제1의 동일한 세포 표지 및 제2 세포에 특이적인 제2의 동일한 세포 표지, 및 각각의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 그의 상보체, 또는 그의 반응 생성물에 특이적인 분자 표지로 표지하는 것을 포함하는 방법이고, 여기서 제1 세포로부터의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 그의 상보체, 또는 그의 반응 생성물의 각각의 분자 표지는 서로에 대해 특유하고, 제2 세포로부터의 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 그의 상보체, 또는 그의 반응 생성물의 각각의 분자 표지는 서로에 대해 특유하다. 일부 실시양태에서, 방법은 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 그의 상보체, 또는 그의 반응 생성물의 적어도 일부를 서열분석하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포들 중 한 특정 세포에서 폴리뉴클레오티드의 다수의 개별 분자를 확인하기 위해 서열분석으로부터 서열 데이타를 분석하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 바이러스 폴리뉴클레오티드로 감염된 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 박테리아 또는 진균 세포이다. 일부 실시양태에서, 서열분석은 판독 길이가 적어도 100개 염기인 서열분석을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석은 판독 길이가 적어도 500개 염기인 서열분석을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 mRNA 또는 마이크로 RNA이고, 그의 상보체 및 그의 반응 생성물은 mRNA 또는 마이크로 RNA의 상보체 및 반응 생성물이다. 일부 실시양태에서, 분자 표지는 비드에 존재한다. 일부 실시양태에서, 개별 세포에 특이적인 표지는 비드에 존재한다. 일부 실시양태에서, 개별 세포에 특이적인 표지 및 분자 표지는 비드에 존재한다. 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 부분적으로 에멀젼에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 부분적으로 어레이의 웰 또는 마이크로웰에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태와 연관된 폴리뉴클레오티드의 존재가 검출된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암이다. 일부 실시양태에서, 마이크로RNA, 그의 상보체, 또는 그의 반응 생성물의 적어도 일부가 검출된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 바이러스 감염이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 감염은 외피 보유 바이러스 감염이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 감염은 비-외피 보유 바이러스 감염이다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 이중 가닥인 바이러스 DNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 단일 가닥인 바이러스 DNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 수두 바이러스, 포진 바이러스, 수두 대상포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스, 헤파드나바이러스, 파포바바이러스, 폴리오마바이러스, 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제1 세포는 질환 또는 병태가 존재하지 않는 사람의 세포이고, 제2 세포는 질환 또는 병태가 존재하는 사람의 세포이다. 일부 실시양태에서, 사람은 상이하다. 일부 실시양태에서, 사람은 동일하지만, 세포는 상이한 시점에서 채취된다. 일부 실시양태에서, 제1 세포는 질환 또는 병태가 존재하는 사람의 것이고, 제2 세포는 동일한 사람의 것이다. 일부 실시양태에서, 샘플 내의 세포는 조직 또는 장기로부터의 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 내의 세포는 흉선으로부터의 세포, 백혈구, 적혈구, 간 세포, 비장 세포, 폐 세포, 심장 세포, 뇌 세포, 피부 세포, 췌장 세포, 위 세포, 구강으로부터의 세포, 비강으로부터의 세포, 결장 세포, 소장 세포, 신장 세포, 분비선으로부터의 세포, 뇌 세포, 신경 세포, 신경교 세포, 눈 세포, 생식 기관 세포, 방광 세포, 생식 세포, 인간 세포, 태아 세포, 양막 세포, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함한다.

[0006] 제공되는 한 측면은 각각 세포 표지 및 분자 표지를 포함하는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 고체 지지체이고, 여기서 다수의 올리고뉴클레오티드의 각각의 세포 표지는 동일하고, 다수의 올리고뉴클레오티드의 각각의 분자 표지는 상이하고; 고체 지지체는 비드이거나, 세포 표지는 고체 지지체에 특이적이나, 고체 지지체는 3차원 직교 좌표계 (Cartesian coordinate system)의 중앙에 위치할 때 8분 공간 (octant) 중 적어도 7개로 연장되는 올리고뉴클레오티드를 갖거나, 또는 이들의 임의의 조합을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 적어도 하나의 샘플 표지; 범용 표지; 및 표적 핵산 결합 영역을 추가로 포함한다. 일부

실시양태에서, 고체 지지체는 표적 핵산 결합 영역을 포함하고, 표적 핵산 결합 영역은 유전자-특이적 서열, 올리고-dT 서열, 무작위 다량체, 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 표적 핵산 또는 그의 상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 유기체의 트랜스크립톰의 약 0.01% 내지 약 100%의 전사체 또는 그의 상보체, 또는 유기체의 게놈의 약 0.01% 내지 약 100%의 유전자 또는 그의 상보체를 차지하는 다수의 표적 핵산 또는 그의 상보체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 제1 표지 연결 서열에 의해 제2 무작위 서열에 연결된 제1 무작위 서열을 포함하고; 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 무작위 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리디메틸실록산 (PDMS) 고체 지지체, 폴리스티렌 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체, 아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 플루로닉 (pluronic) 고체 지지체, 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 링커 관능기를 포함하는 링커를 포함하고, 고체 지지체는 고체 지지체 관능기를 포함하고; 고체 지지체 관능기와 링커 관능기는 서로 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커 관능기 및 고체 지지체 관능기는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민(들), 알데히드(들), 케톤(들), 및 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 개별적으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 적어도 15개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0007] 제공되는 한 측면은 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체, 및 사용 설명서를 포함하는 키트이다. 일부 실시양태에서, 키트는 웰을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 웰은 어레이에 포함된다. 일부 실시양태에서, 웰은 마이크로웰이다. 일부 실시양태에서, 키트는 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 포장물 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 포장물은 상자이다. 일부 실시양태에서, 포장물 또는 상자의 부피는 2 입방 피트 이하이다. 일부 실시양태에서, 포장물 또는 상자의 부피는 1 입방 피트 이하이다.

[0008] 제공되는 한 측면은 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체를 포함하는 에멀젼이다.

[0009] 제공되는 한 측면은 웰 및 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체를 포함하는 조성물이다.

[0010] 제공되는 한 측면은 세포 및 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체를 포함하는 조성물이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 에멀젼 또는 조성물은 세포를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 단일 세포이다. 일부 실시양태에서, 웰은 마이크로웰이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 부피는 약 1,000 μm^3 내지 약 120,000 μm^3이다.

[0012] 제공되는 한 측면은 샘플을 본원에 개시된 임의의 고체 지지체와 접촉시키고, 샘플로부터의 표적 핵산을 다수의 올리고뉴클레오티드의 한 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산 또는 그의 상보체를 증폭시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산 또는 그의 상보체를 서열분석하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 서열분석은 표적 핵산 또는 그의 상보체가 결합하는 올리고뉴클레오티드의 분자 표지를 서열분석하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산 또는 그의 상보체의 양을 결정하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 결정은 표적 핵산 또는 그의 상보체의 수준을 정량하거나; 동일한 분자 표지를 포함하는 다수의 서열을 계수하거나; 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 임의의 동일한 분자 표지 또는 임의의 동일한 세포 표지를 정렬하는 것을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 증폭은 표적 핵산의 역전사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 PCR, 네스티드 (nested) PCR, 정량적 PCR, 실시간 PCR, 디지털 (digital) PCR, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 이용한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 고체 지지체에 대해; 고체 지지체로부터 전사되는 주형에 대해; 또는 이들의 조합에 대해 직접 수행된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 단일 세포이다. 일부 실시양태에서, 접촉은 웰에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 웰은 마이크로웰이고, 마이크로웰의 어레이에 포함된다.

[0013] 제공되는 한 측면은 다수의 마이크로웰을 포함하는 기기이고, 여기서 다수의 마이크로웰의 각각의 마이크로웰의 부피는 약 1,000 μm^3 내지 약 120,000 μm^3이다. 일부 실시양태에서, 다수의 마이크로웰의 각각의 마이크로웰의 부피는 약 20,000 μm^3이다. 일부 실시양태에서, 다수의 마이크로웰은 약 96 내지 약 200,000개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 물질의 층에 포함된다. 일부 실시양태에서, 적어도 약 10%의 마이크로웰은 세포를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기기는 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체를 추가로 포함한다.

[0014] 제공되는 한 측면은 본원에서 설명되는 임의의 기기, 및 액체 처리기를 포함하는 장치이다. 일부 실시양태에서, 액체 처리기는 액체를 약 1초 내에 다수의 마이크로웰에 전달한다. 일부 실시양태에서, 액체 처리기는 액체를 단일 유입 포트로부터 다수의 마이크로웰에 전달한다. 일부 실시양태에서, 장치는 자석을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 유입 포트, 유출 포트, 펌프, 밸브, 배기구, 저장소, 샘플 수집 챔버, 온도 제어 장치, 또는 이들의 임의의 조합물 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 샘플 수집 챔버를 포함하고, 샘플 수집 챔버는 장치로부터 제거가능하다. 일부 실시양태에서, 장치는 광학 영상화기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 광학 영상화기는 액체 처리기를 제어하기 위해 사용되는 출력 신호를 생성한다. 일부 실시양태에서, 장치는 올리고뉴클레오티드의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 증폭을 수행하도록 형성된 열 순환 메카니즘을 추가로 포함한다.

[0015] 제공되는 한 측면은 본원에서 설명되는 임의의 기기 또는 장치; 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체; 본원에서 설명되는 임의의 방법; 또는 이들의 임의의 조합으로 임상 진단 시험 결과를 생성하는 것을 포함하는, 임상 진단 시험 결과를 생성하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 임상 진단 시험 결과는 통신 매체를 통해 전송된다.

[0016] 제공되는 한 측면은 세포 표지의 제1 부분, 및 제1 링커를 포함하는 제1 폴리뉴클레오티드를 고체 지지체에 부착하고; 세포 표지의 제2 부분, 제1 링커에 상보성인 서열, 및 분자 표지를 포함하는 제2 폴리뉴클레오티드를 접촉시키는 것을 포함하는, 본원에서 설명되는 임의의 고체 지지체의 제조 방법이다. 일부 실시양태에서, 제3 폴리뉴클레오티드는 표적 핵산 결합 영역을 추가로 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 에멀젼, 마이크로웰, 또는 웰은 단지 하나의 세포만 함유한다. 일부 실시양태에서, 1 내지 2,000,000개의 에멀젼, 마이크로웰, 또는 웰은 각각 하나의 세포만 함유한다. 일부 실시양태에서, 방법은 최대 하나의 세포를 각각의 에멀젼, 마이크로웰, 또는 웰 내에 분배하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 고체 지지체 및 단일 세포가 에멀젼, 마이크로웰, 또는 웰에 분배된다. 일부 실시양태에서, 1 내지 2,000,000개의 에멀젼, 마이크로웰, 또는 웰에 각각 하나의 세포 및 하나의 고체 지지체가 분배된다. 일부 실시양태에서, 방법은 에멀젼, 마이크로웰, 또는 웰당 최대 하나의 고체 지지체를 분배하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 하나의 고체 지지체 및 하나의 세포를 각각의 1 내지 2,000,000개의 마이크로웰, 에멀젼, 또는 웰에 분배하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 분배는 무작위 또는 비-무작위이다. 일부 실시양태에서, 세포 분배는 확률적이다. 일부 실시양태에서, 세포는 세포 분류기에 의해 분배된다. 일부 실시양태에서, 세포는 하나 이상의 웰, 마이크로웰, 또는 에멀젼을, 최대 하나의 세포가 하나 이상의 웰, 마이크로웰, 또는 에멀젼에 분배되도록 희석된 세포의 희석 용액과 접촉시킴으로써 분배된다.

[0018] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 영역, 다수의 올리고뉴클레오티드의 표적 특이적 영역, 또는 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자의 표적 특이적 영역은 표적 패널의 2개 이상의 표적에 상보성인 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 패널의 2개 이상의 표적은 바이오마커이다. 일부 실시양태에서, 바이오마커는 질환 또는 병태에 대한 바이오마커이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 병태는 암, 감염, 바이러스 감염, 염증성 질환, 신경변성 질환, 진균 질환, 박테리아 감염, 또는 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 패널은 2-50,000, 2-40,000, 2-30,000, 2-20,000, 2-10,000, 2-9000, 2-8,000, 2-7,000, 2-6,000, 2-5,000, 2-1,000, 2-800, 2-700, 2-600, 2-500, 2-400, 2-300, 2-200, 2-100, 2-75, 2-50, 2-40, 2-30, 2-20, 2-10, 또는 2-5개의 바이오마커를 포함한다.

[0019] **참고문헌의 인용**

[0020] 본원 명세서에서 언급되는 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 마치 각각의 개별적인 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 본 발명의 신규한 특징은 특히 첨부된 청구의 범위에 기재되어 있다. 본 발명의 원리를 이용하는 예시적 실시양태를 제시하는 다음 상세한 설명 및 첨부하는 도면을 참고로 하여 본 발명의 특징 및 이점의 보다 나은 이해를 얻을 것이다:

도 1은 예시적인 올리고뉴클레오티드와 접합된 예시적인 고체 지지체를 보여준다.

도 2a-c는 분할-풀 합성을 사용하여 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 합성하기 위한 예시적인 작업 흐름을 보여준다.

도 3은 예시적인 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 보여준다.

도 4는 마이크로웰 어레이의 예시적인 실시양태를 제시한다.

도 5는 마이크로웰 어레이 내의 고체 지지체의 예시적인 분포를 보여준다.

도 6a-c는 마이크로웰 어레이 상의 예시적인 세포 분포를 보여준다. 도 6a는 K562 세포 (큰 세포 크기)의 분포를 보여준다. 도 6b는 라모스 (Ramos) 세포 (작은 세포 크기)의 분포를 보여준다. 도 6c는 마이크로웰 어레이 상의 라모스 세포 및 올리고뉴클레오티드 연결된 비드의 분포를 보여주고, 실선 화살표는 라모스 세포를 나타내고, 점선 화살표는 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 나타낸다.

도 7은 마이크로웰 부피, 고체 지지체 부피, 및 용해로부터 얻은 생물학적 물질의 양의 예시적인 통계를 보여준다.

도 8a-c는 비드 캡 밀봉의 예시적인 실시양태를 제시한다. 도 8a-b는 마이크로어레이 웰의 영상을 보여주고, 여기서 세포 및 올리고뉴클레오티드 비드는 마이크로어레이 웰의 웰 내로 분배되고, 더 큰 세파덱스 비드가 웰을 밀봉하기 위해 사용된다. 점선 화살표는 세포를, 점선 화살표는 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를, 실선 화살표는 세파덱스 비드를 나타낸다. 도 8c는 웰을 밀봉하기 위해 사용된 세파덱스 비드와 함께 웰 내에 침적된 올리고뉴클레오티드 비드 (예를 들어, 올리고비드) 및 세포의 개략도를 보여준다.

도 9는 마이크로웰 및 튜브로부터 증폭된 GAPDH 및 RPL19의 증폭 효능을 비교하는 막대 그래프를 보여준다. 회색 막대는 마이크로웰로부터의 데이타를 나타낸다. 백색 막대는 튜브로부터의 데이타를 나타낸다.

도 10은 고체 지지체 상에서 직접 3개의 상이한 유전자의 증폭 특이성을 비교하는 아가로스 겔을 보여준다.

도 11a-i는 서열분석 결과의 그래프 표시를 보여준다.

도 12a-c는 각각 K562-단독 샘플, 라모스-단독 샘플, 및 K562 + 라모스 혼합물 샘플에 대한 서열분석 결과의 막대 그래프를 보여준다.

도 12d-e는 각각 라모스-단독 세포 샘플 및 K562-단독 세포 샘플에 대한 표 3에 제시된 유전자의 카피수의 그래프를 보여준다.

도 12f-i는 개별 유전자에 대한 카피수를 보여준다.

도 12j-m은 100개의 특유한 바코드 (barcode) 조합을 갖는 비드에 대한 유전자당 특유한 분자의 수 (y-축)를 보여준다.

도 12n-o는 2가지 세포 유형에 대한 유전자 발현 프로파일의 일반적인 패턴을 보여주는 2개의 비드의 확대된 그래프를 보여준다.

도 12p는 K562+라모스 혼합물 샘플로부터 비드당 > 30개 분자로 768개 비드의 유전자 발현 프로파일의 주요 성분 분석을 기초로 한 결과의 산포도를 보여준다.

도 12q-r은 각각 K562-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 좌측 상의 비드) 및 라모스-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 우측 상의 비드)에 대한 비드당 앰플리콘당 카피수의 막대 그래프를 보여준다.

도 12s-t는 각각 K562-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 좌측 상의 비드) 및 라모스-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 우측 상의 비드)에 대한 개별 유전자의 비드 또는 단일 세포당 카피수를 보여준다.

도 13a는 마우스 및 라모스 세포에 대한 일반적인 유전자 발현 패턴을 보여준다.

도 13b-c는 각각 고밀도 샘플 및 저밀도 샘플의 유전자 발현 프로파일의 주요 성분 분석을 기초로 한 결과의 산포도를 보여준다.

도 13d-e는 각각 고밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 바코드 (bc) 조합당 판독물 (y-축) 대 bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다.

도 13f-g는 각각 고밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 바코드 (bc) 조합당 분자의 수 (y-축) 대 bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다.

도 13h-i는 각각 저밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 바코드 (bc) 조합당 판독물 (y-축) 대 바코드 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다.

도 13j-k는 각각 저밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 바코드 조합당 분자의 수 (y-축) 대 바코드 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다.

도 14는 X-축 상의 유전자 및 판독물의 수의 log10을 제시하는 그래프를 보여준다.

도 15a는 3-부분 세포 표지 (예를 들어, 세포 바코드)당 검출된 유전자의 분포의 그래프를 보여준다. 도 15b는 비드 (유전자 패널을 발현함)당 검출된 특유한 분자의 분포의 그래프를 보여준다.

도 16은 세포 바코드와 회합된 유전자를 기초로 한 세포 클러스터를 보여준다.

도 17a-d는 단핵구 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 17e는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 18a-b는 T 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 18c는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 19a-b는 CD8+ T 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 19c는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 20a는 CD4+ T 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 20b는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 21a-d는 자연 살해 (NK) 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 20e는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 22a-e는 B 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 22f는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 23a-f는 Toll-유사 수용체의 분석을 보여준다. Toll-유사 수용체는 주로 단핵구 및 몇몇의 B 세포에 의해 발현된다. 도 23g는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다.

도 24는 유전자 대 판독물의 수의 log10의 그래프를 보여준다.

도 25a-d는 2개의 유전자에 대한 분자 바코드 대 판독물의 수 또는 판독물의 수의 log10의 그래프를 보여준다.

도 26a는 세포 바코드당 발현된 패널 내의 유전자의 수 대 특유한 세포 바코드/단일 세포의 수의 그래프를 보여준다. 도 26b는 비드당 검출된 특유한 분자의 수 대 제시된 수의 분자를 보유하는 특유한 세포 바코드당 세포의 수의 빈도의 막대 그래프를 보여준다. 도 26c는 비드당 검출된 특유한 GAPDH 분자의 수 대 제시된 수의 분자를 보유하는 세포/특유한 세포 바코드당 세포의 수의 빈도의 막대 그래프를 보여준다.

도 27은 856개 세포의 산포도를 보여준다.

도 28은 상위 100개 (검출된 분자의 총수의 측면에서)의 발현의 히트 맵 (heat map)을 보여준다.

도 29는 실시예 12의 작업 흐름을 보여준다.

도 30은 실시예 13의 작업 흐름을 보여준다.

도 31a-c. 2개의 별개의 세포 유형을 포함하는 제어된 혼합물 내의 단일 세포의 군집화. a. 12개의 유전자의 발현에 대한 주요 성분 분석에 의한 K562 및 라모스 세포의 1:1 혼합물의 군집화. 행렬도는 2개의 별개의 클러스터를 보여주고, 하나의 클러스터는 라모스 특이적 유전자를 발현하고, 다른 하나는 K562 특이적 유전자를 발현한다. b. 111개 유전자의 패널을 사용하여 건강한 개체로부터의 일차 B 세포의 배경에서 작은 비율의 라모스 세포를 함유하는 혼합물의 주요 성분 분석. 각각의 데이타 점의 색은 전체 유전자 패널에 걸쳐 검출된 특유한 전사체 분자의 총수를 나타낸다. 1198개 세포 중 18개 세포 (원으로 둘러쌈)의 세트는 별개의 유전자 발현 프로파일을 보이고, 훨씬 더 높은 전사 수준을 제시한다. c. 유전자 패널에서 검출된 전사체 분자의 총수에 의해 분류된, 도 31b의 샘플에서 상위 100개의 세포 내의 각각의 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵. 유전자는 상관성의 측면에서 계층적 군집화를 통해 정렬된다. 수평 적색 막대로 표시된 상위 18개의 세포는 수직 적색 막대로 표시되는, 여포성 림프종과 연관된 것으로 알려진 유전자의 세트를 우선적으로 발현하였다.

도 31d. 라모스 세포로 스파이킹된 일차 B 세포의 PCA 분석. 각각의 데이타 점 (단일 세포)의 색은 각각의 세포가 특정 유전자에 대해 보유하는 전사체 분자의 수의 log를 나타낸다. 상위 7개의 행: 아마도 라모스 세포인 18개의 세포의 하위세트에 의해 우선적으로 발현되는 유전자. 제1 행 유전자 (좌측에서 우측으로)는 GAPDH, TCL1A, MKI67 및 BCL6을 포함한다. 제2 행 유전자 (좌측에서 우측으로)는 MYC, CCND3, CD81 및 GNAI2를 포함한다. 제3 행의 유전자 (좌측에서 우측으로)는 IGBP1, CD20, BLNK 및 DOCK8을 포함한다. 제4 행의 유전자 (좌

측에서 우측으로)는 IRF4, CD22, IGHM 및 AURKB를 포함한다. 제5 행의 유전자 (좌측에서 우측으로)는 CD38, CD10, LEF1 및 AICDA를 포함한다. 제6 행의 유전자 (좌측에서 우측으로)는 CD40, CD27, IL4R 및 PRKCD를 포함한다. 제7 행의 유전자 (좌측에서 우측으로)는 RGS1, MCL1, CD79a 및 HLA-DRA를 포함한다. 마지막 행: 일차 B 세포의 하위세트에 의해 우선적으로 발현되지만 그 18개의 세포에 의해 특별히 농축되지 않는 유전자. 마지막 행의 유전자 (좌측에서 우측으로)는 IL6, CD23a, CCR7 및 CXCR5를 포함한다.

도 32. GAPDH의 발현. 색은 세포당 관찰된 특유한 전사체 분자의 수의 자연 로그를 나타낸다.

도 33a-f는 단핵구 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 33a는 CD16에 대한 PCA를 보여준다. 도 33b는 CCRvarA에 대한 PCA를 보여준다. 도 33c는 CD14에 대한 PCA를 보여준다. 도 33d는 S100A12에 대한 PCA를 보여준다. 도 33e는 CD209에 대한 PCA를 보여준다. 도 33f는 IFNGR1에 대한 PCA를 보여준다.

도 34a-b는 pan-T 세포 마커 (CD3)에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 34a는 CD3D에 대한 PCA를 보여주고, 도 34b는 CD3E에 대한 PCA를 보여준다.

도 35a-e는 CD8 T 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 35a는 CD8A에 대한 PCA를 보여준다. 도 35b는 EOMES에 대한 PCA를 보여준다. 도 35c는 CD8B에 대한 PCA를 보여준다. 도 35d는 PRF1에 대한 PCA를 보여준다. 도 35e는 RUNX3에 대한 PCA를 보여준다.

도 36a-c는 CD4 T 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 36a는 CD4에 대한 PCA를 보여준다. 도 36b는 CCR7에 대한 PCA를 보여준다. 도 36c는 CD62L에 대한 PCA를 보여준다.

도 37A-f는 B 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 37a는 CD20에 대한 PCA를 보여준다. 도 37b는 IGHD에 대한 PCA를 보여준다. 도 37c는 PAX5에 대한 PCA를 보여준다. 도 37d는 TCL1A에 대한 PCA를 보여준다. 도 37e는 IGHM에 대한 PCA를 보여준다. 도 37f는 CD24에 대한 PCA를 보여준다.

도 38a-c는 자연 살해 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 38a는 KIR2DS5에 대한 PCA를 보여준다. 도 38b는 CD16에 대한 PCA를 보여준다. 도 38c는 CD62L에 대한 PCA를 보여준다.

도 39. 높은 상관성이 있는 발현 프로파일을 갖는 CytoSeq 세포에 의해 검정된 81개의 유전자의 PCA 분석에 의한 인간 PBMC 샘플 (632개의 세포)에서 주요 세포 유형의 동시 확인은 유사한 색으로 지정된다.

도 40a-b. PBMC 샘플의 단일 세포 유전자 발현 프로파일의 상관성 분석. 40a. 샘플에서 632개의 세포에 걸친 쌍별 상관 계수를 보여주는 매트릭스. 세포는 높은 상관성이 있는 유전자 발현 프로파일을 갖는 것이 함께 분류되도록 정렬된다. 40b. 각각의 세포에 의한 각각의 유전자의 발현을 보여주는 히트맵. 세포 (열)는 상기 상관성 매트릭스와 동일한 방식으로 정렬된다. 유전자 (행)는 세포에 걸쳐 고도로 유사한 발현 패턴을 공유하는 유전자가 함께 분류되도록 정렬된다. 세포의 각각의 클러스터의 세포 유형은 동시 발현되는 유전자 세포의 군에 의해 확인될 수 있다. 각각의 주요 세포 클러스터 내에, 유전자 발현의 측면에서 실질적인 정도의 불균일성이 존재한다.

도 41은 동일한 공여자로부터의 PBMC 샘플의 반복 실험에 의한 731개의 세포 데이타를 제시한다. 유사한 유전자 발현 프로파일 (상관 계수를 사용한 계층적 군집화를 기초로 한)을 갖는 세포는 유사한 색으로 표시된다.

도 42는 유전자 사이의 유전자 발현 프로파일의 상관성을 보여주는 히트 맵을 보여준다.

도 43. CytoSeq의 설명. A. CytoSeq를 위한 실험 절차. B. 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드의 구조.

도 44. CD3+ T 세포의 하위 집단의 분석. a. 공여자 1 비자극 샘플의 PCA는 세포의 2개의 주요 분지를 보여준다. 각각의 세포 내의 특정 유전자의 발현 수준 (특유한 전사체 분자의 log)은 색으로 표시된다. 헬퍼 T 세포 연관 시토카인 및 이펙터 (effector) 유전자는 하위 분지의 세포에서 풍부하고, 세포독성 T 세포 연관 유전자는 상위 분지에서 풍부하다. 여기서 대표적인 유전자가 제시된다. 제1 행은 헬퍼 T 세포 관련 유전자를 보여주고, (좌측에서 우측으로) CD4, SELL 및 CCR7을 포함한다. 제2 행은 세포독성 T 세포 관련 유전자를 보여주고, (좌측에서 우측으로) CD8A, NKG2D 및 EOMES를 포함한다. b. 나타낸 유전자의 발현이 헬퍼 및 세포독성 T 세포를 나타내는 2개의 주요 분지 중의 하나로 집중됨을 보여주는 공여자 1 항-CD3/항-CD28 자극 샘플의 PCA. 상기 유전자는 비자극 샘플에 소량으로 존재한다. 먼저, 2개의 행은 활성화된 T 세포와 연관된 것으로 알려진 유전자를 보여주고, (좌측에서 우측으로) 제1 행에 IRF4, CD69 및 MYC를, 제2 행에 GAPDH, TNF 및 IFNG를 포함한다. 제3 행은 활성화된 헬퍼 T 세포와 연관된 것으로 알려진 유전자를 보여주고, (좌측에서 우측으로) IL2, LTA 및 CD40LG를 포함한다. 제4 행은 활성화된 세포독성 T 세포와 연관된 것으로 알려진 유전자를 보여주고,

(좌측에서 우측으로) CCL4, CCL3 및 GZMB를 포함한다. c. 전체 데이타에서 비자극 샘플에 대해 자극 샘플을 비교할 때 더 큰 변화 배수를 보이는 유전자의 총 발현 수준에 기여하는 세포의 수. 몇몇의 시토카인 (적색 화살표)에 대해, 단지 소수의 세포로부터의 기여가 전체 집단의 큰 전체적인 유전자 발현 변화를 책임진다.

도 45. 비자극 샘플에서 헬퍼 또는 세포독성 하위세트의 우선적인 발현을 분명하게 보이는 유전자의 발현을 강조한, 2명의 공여자의 항-CD28/항-CD3 비드로 자극된 T 세포 샘플 및 대응하는 비자극 샘플의 PCA 도면. 각각의 데이타 점 (단일 세포)의 색은 나타낸 유전자에 대한 세포당 log(특유한 전사체 분자의 수)를 나타낸다. 각각의 공여자에서 자극 및 비자극 그래프의 각각의 쌍에서, 색 범위는 동일하게 조정된다. a. 헬퍼 및 세포독성 T 세포 둘 모두와 연관된 것으로 알려진 유전자. b. 세포독성 T 세포와 연관된 것으로 알려진 유전자. c. 헬퍼 T 세포와 연관된 것으로 알려진 유전자.

도 46a-d. 자극된 샘플에서 발현되지만 비자극 샘플에서 낮거나 비검출가능한 수준으로 발현되는 유전자의 발현을 강조한, 2명의 공여자의 항-CD28/항-CD3 비드로 자극된 T 세포 샘플 및 대응하는 비자극 샘플의 PCA 도면. 각각의 데이타 점 (단일 세포)의 색은 나타낸 유전자에 대한 세포당 log(특유한 전사체 분자의 수)를 나타낸다. 각각의 공여자에서 자극 및 비자극 그래프의 각각의 쌍에서, 색 범위는 동일하게 조정된다. 46a 및 46d. 활성화시에 세포의 두 분지에 의해 발현되는 유전자. 46b. 활성화시에 상위 분지 내의 세포에 의해 우선적으로 발현되는 유전자. 상기 유전자는 활성화된 세포독성 T 세포와 연관된 것으로 알려져 있다. 46c. 활성화시에 하위 분지 내의 세포에 의해 우선적으로 발현되는 유전자. 상기 유전자는 활성화된 헬퍼 T 세포와 연관된 것으로 알려져 있다.

도 47. 공여자 1의 비자극 CD3+ T 세포로부터의 데이타의 군집화는 CD4 및 CD8 세포, 및 그랜자임 (Granzyme) K 및 그랜자임 A를 발현하지만 CD8은 거의 발현하지 않는 군의 분리를 보여준다. 상부: 각각의 세포쌍 사이의 상관성을 보여주는 히트맵. 높은 상관성이 있는 세포는 함께 분류된다. 하부: 각각의 세포의 각각의 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵. 세포 및 유전자는 양방향성 계층적 군집화를 통해 정렬된다.

도 48. 도 47과 유사하지만, 공여자 1의 항-CD3/항-CD28 자극된 CD3+ T 세포 샘플로부터의 데이타를 보여준다. 상부: 각각의 세포쌍 사이의 상관성을 보여주는 히트맵. 높은 상관성이 있는 세포는 함께 분류된다. 하부: 각각의 세포의 각각의 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵. 세포 및 유전자는 양방향성 계층적 군집화를 통해 정렬된다.

도 49a-c. 공여자 1에서, 큰 전체적인 변화 배수는 비자극 샘플에 비해 항CD28/항CD3 자극 샘플에서 다양한 시토카인에 대해 관찰되었다. a-b: 상기 시토카인의 큰 변화 배수는 대부분 단지 몇 개의 단일 세포 (정사각형 또는 원으로 둘러싸인 점)에 의한 것이었다. 많은 상기 시토카인은 동일한 소수의 세포에 의한 것이었다. c: 이들 시토카인의 동시 발현 패턴은 헬퍼 T 세포의 Th2 및 Th17 하위세트에 대한 시그너쳐 (signature) 시토카인 조합물과 일치한다.

도 50a-b. CD8+ T 세포의 하위 집단의 분석. a. CytoSeq 데이타의 군집화는 CD8+ 세포의 2개의 주요 군을 규정한다 - 한 군은 중심 기억/나이브 세포에 의해 공유되는 유전자를 발현하고, 다른 군은 이펙터 기억/이펙터 세포에 의해 공유되는 유전자를 발현한다. 공여자 2의 비자극 샘플의 데이타가 본원에서 제시된다. 상부: 각각의 세포쌍 사이의 상관성을 보여주는 히트맵. 하부: 각각의 세포에서 각각의 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵. 세포 및 유전자는 양방향성 계층적 군집화를 통해 정렬된다. b. CMV 펩티드 풀로 자극한 후 2명의 공여자로부터의 CD8+ T 세포에서 감마 인터페론 (IFNG)의 발현에 의한 희귀 항원 특이적 T 세포의 확인. 각각의 세포는 2D 주요 성분 공간에 표시된다. IFNG를 발현하는 세포 (원으로 둘러쌈)는 대체로 패널 내의 대부분의 총 검출 전사체를 갖는 세포 중에 존재한다 (색으로 표시됨). 공여자 2에서, 상위 발현 세포 (정사각형)는 IFNG를 생산하지 않지만, 시토카인 IL6 및 IL1B를 발현한다. 각각의 원 다음의 숫자는 그 세포에 대해 검출된 특유한 전사체 분자 전체의 수를 내림차순으로 나타낸다.

도 51. 도 50a와 유사하되, 데이타는 공여자 2 CMV 자극된 샘플의 데이타를 나타낸다. a. CytoSeq 데이타의 군집화는 CD8+ 세포의 2개의 주요 군을 규정한다 - 한 군은 중심 기억/나이브 세포에 의해 공유되는 유전자를 발현하고, 다른 군은 이펙터 기억/이펙터 세포에 의해 공유되는 유전자를 발현한다. 공여자 2의 비자극 샘플의 데이타가 본원에서 제시된다. 상부: 각각의 세포쌍 사이의 상관성을 보여주는 히트맵. 하부: 각각의 세포에서 각각의 유전자의 발현 수준을 보여주는 히트맵. 세포 및 유전자는 양방향성 계층적 군집화를 통해 정렬된다.

도 52. 데이타는 주요 성분 공간에 표시된다. 색은 특정 유전자에 대한 log(검출된 특유한 전사체 분자의 수)를 나타낸다. a. CMV 펩티드 풀에 의한 자극시에 세포의 보다 큰 비율에 의해 발현되는 것으로 보이는 유전자.

b. 세포의 한 분지에서 풍부화된 유전자 분지. 상기 유전자는 또한 나이브 및 중심 기억 CD8+ T 세포와 연관된 것으로 알려져 있다. c. 세포의 다른 분지에서 풍부화된 유전자. 상기 유전자는 이펙터 및 이펙터 기억 CD8+ T 세포와 연관된 것으로 알려져 있다. d. 그랜자임 K 발현 세포는 PC 공간 상의 나이브/중심 기억 세포와 이펙터/이펙터 기억 세포 사이의 영역을 점유한다. e. HLA-DRA 발현 세포는 특수한 하위세트를 구성한다. f. 세포의 두 분지 모두에서 발현되는 유전자.

도 53. 도 50b와 동일하되, 데이타는 비자극 대조군의 데이타를 나타낸다. 공여자 1의 샘플 내의 세포는 IFNG를 발현하지 않은 반면, 공여자 2의 샘플 내의 하나의 세포는 IFNG를 발현하였지만, 전체 유전자 패널에 걸쳐 전체적으로 낮은 발현을 보였다 (순위 1069). 색 스케일은 자극된 샘플의 각각의 그래프의 것과 일치하도록 조정된다.

도 54. 공여자 1 및 2의 CMV 자극된 CD8+ T 세포에서 감마 인터페론 (IFNG)을 발현하는 세포에서 유전자 패널의 불균일한 발현을 보여주는 히트맵. 또한, 공여자 2에서 검출된 대부분의 총 전사체를 보유하는 세포가 제시된다. 상기 특정 세포는 IFNG를 발현하지 않지만, IL6, IL1B 및 CCL4를 강력하게 발현한다. 세포 및 유전자는 상관성을 기초로 하여 양방향성 계층적 군집화에 의해 정렬된다. 세포 ID는 유전자 패널의 검출된 전사체의 총 수에서의 순위를 나타내고, 도 50의 PCA 도면에서 표시된다.

도 55. 증폭 방식. 제1 PCR은 유전자 특이적 프라이머 및 범용 일루미나 (Illumina) 서열분석 프라이머 1 서열에 대한 프라이머를 사용하여 비드에 부착된 분자를 증폭한다. 제2 PCR은 일루미나 서열분석 프라이머 2 서열이 인접한 네스티드 유전자 특이적 프라이머, 및 범용 일루미나 서열분석 프라이머 1 서열에 대한 프라이머를 사용하여 제1 PCR 생성물을 증폭한다. 제3 PCR은 PCR 생성물을 일루미나 서열분석 라이브러리로 만들기 위해 P5 및 P7 및 샘플 인덱스를 첨가한다. 150 bp x 2 서열분석은 판독물 1 상의 세포 표지 및 분자 표지, 판독물 2 상의 유전자, 및 인덱스 1 판독물 상의 샘플 인덱스를 제시한다.

도 56은 샘플로부터의 분자를 분석하기 위한 작업 흐름의 개략도를 보여준다.

도 57은 샘플로부터의 분자를 분석하기 위한 작업 흐름의 개략도를 보여준다.

도 58a-b는 PCR 생성물의 아가로스 겔을 보여준다.

도 59는 다수의 유전자에 대한 서열분석 판독물의 도면을 보여준다.

도 60a-d는 각각 Lys, Phe, Thr, 및 Dap 스파이크-인 (spike-in) 대조군에 대해 검출된 표지당 관찰된 판독물 (RPLD)의 도면을 보여준다. 도 60e는 판독물 대 입력의 도면을 보여준다.

도 61은 다양한 유전자에 대해 검출된 표지당 관찰된 판독물 (RPLD)의 도면을 보여준다.

도 62는 다양한 유전자에 대해 검출된 표지당 관찰된 판독물 (RPLD)의 도면을 보여준다.

도 63은 다양한 유전자에 대한 총 판독물 (표지) 대 rpld의 도면을 보여준다.

도 64는 비검출된 유전자에 대한 RPKM의 도면을 보여준다.

도 65는 분자 바코드의 합성에 대한 개략도를 보여준다.

도 66a-c는 분자 바코드의 합성에 대한 개략도를 보여준다.

도 67은 핵산을 확률적으로 표지하기 위한 작업 흐름의 개략도를 보여준다.

도 68은 핵산을 확률적으로 표지하기 위한 작업 흐름의 개략도이다.

도 69는 마이크로웰 어레이 기판이 그 내부에서 꽉 죄여, 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 실험을 수행하기 위해 샘플 및 시약이 피펫팅에 의해 그 내로 도입될 수 있는 반응 챔버 또는 웰을 형성하는 기계적 고정기를 도시한 것이다. 상부: 고정기의 상부 및 하부 부품 및 마이크로웰 어레이 기판과 새지 않는 밀봉을 형성하기 위한 엘라스토머 가스켓을 보여주는 분해도. 하부: 고정기의 분해 측면도.

도 70은 마이크로웰 어레이 기판이 고정기 내에서 꽉 죄일 때 2개의 반응 챔버 또는 웰을 형성하는 기계적 고정기를 도시한 것이다.

도 71은 도 69 및 70에 도시된 기계적 고정기와 함께 사용하기 위한 엘라스토머 (예를 들어, 폴리디메틸실록산) 가스켓의 2개의 예를 보여준다. 엘라스토머 가스켓은 마이크로웰 어레이 주위에 시약 웰을 생성하기 위해 마이크로웰 어레이 기판과의 새지 않는 밀봉을 제공한다. 가스켓은 시약 웰을 생성하기 위한 하나 (상부), 둘 (하

부), 또는 그 초과의 개구부를 포함할 수 있다.

도 72은 그 내부에 마이크로웰 어레이가 포장된 카트리지의 하나의 실시양태를 도시한 것이다. 좌측: (아래에서 위로) 마이크로웰 어레이 기판, 유동 셀 또는 어레이 챔버를 규정하는 가스켓, 미리 로딩된 검정 시약을 보유하거나 또는 소비된 시약을 보관하기 위한 구획을 규정하기 위한 시약 및/또는 폐기물 저장소 부품, 및 시약 및 폐기물 저장소를 밀봉하고 샘플 유입 및 유출 포트를 규정하는 덮개를 보여주는 카트리지의 분해도. 우측: 외부 자석을 마이크로웰 어레이에 아주 가깝게 위치시키기 위한 안전판을 보여주는 카트리지 설계의 한 실시양태의 조립도.

도 73은 포장된 마이크로웰 어레이와 함께 내부의 검정 시약을 포함하도록 설계된 카트리지의 하나의 실시양태를 도시한 것이다.

도 74는 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 검정을 수행하기 위한 기구 시스템의 개략도를 제시한다. 기구 시스템은 다양한 제어 및 분석 능력을 제공할 수 있고, 개별적인 모듈로서 또는 완전히 통합된 시스템으로서 포장될 수 있다. 마이크로웰 어레이는 시스템의 고정된 부품이거나 제거가능한 유동 셀과 통합될 수 있거나, 또는 미리 로딩된 검정 시약 저장소 및 다른 기능을 추가로 포함하는 제거가능한 카트리지 내에 포장될 수 있다.

도 75는 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 검정을 수행하기 위한 자동화된 시스템에 의해 수행되는 공정 단계의 한 실시양태를 보여준다.

도 76은 기구 제어 및 데이타 분석 능력을 본원에 개시된 검정 시스템에 제공하기 위한 컴퓨터 시스템 또는 프로세서의 한 실시양태를 보여준다.

도 77은 본원의 검정 시스템의 예시적인 실시양태와 함께 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템 구조의 일례를 보여주는 블록도를 보여준다.

도 78은 본원의 검정 시스템의 예시적인 실시양태와 함께 사용될 수 있는 다수의 컴퓨터 시스템, 휴대전화, 개인 정보 단말기, 및 네트워크 결합 저장장치 (NAS)와 함께 네트워크를 보여주는 도면을 도시한 것이다.

도 79는 본원의 검정 시스템의 예시적인 실시양태와 함께 사용될 수 있는 다중프로세서 컴퓨터 시스템의 블록도를 도시한 것이다.

도 80은 시험 샘플의 분석 및 시험 샘플로부터 얻은 시험 결과의 통신 매체를 통한 전달의 도면을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 발명의 상세한 설명

[0023] 다수의 샘플에서 분자를 분석하기 위한 방법, 키트, 및 조성물이 본원에 개시된다. 일반적으로, 방법, 키트, 및 조성물은 (a) 표지된 분자를 생성하기 위해 2개 이상의 샘플 내의 분자를 분자 바코드로 확률적으로 표지하고; (b) 표지된 분자를 검출하는 것을 포함한다. 분자 바코드는 하나 이상의 표적 특이적 영역, 표지 영역, 샘플 인덱스 영역, 범용 PCR 영역, 어댑터 (adaptor), 링커, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 표지된 분자는 a) 분자 영역; b) 샘플 인덱스 영역; 및 c) 표지 영역을 포함할 수 있다. 분자 영역은 본래 그에 대해 부착된 분자 바코드로부터의 분자의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 분자 영역은 본래 그에 대해 부착된 분자 바코드로부터의 분자의 단편을 포함할 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 분자 영역의 공급원을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 분자 영역이 어느 샘플로부터 유래되는지 결정하기 위해 사용될 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 2개 이상의 상이한 샘플로부터의 분자 영역을 구분하기 위해 사용될 수 있다. 표지 영역은 동일한 공급원으로부터 유래하는 동일한 분자 영역에 특유한 정체성을 부여하기 위해 사용될 수 있다. 표지 영역은 동일한 샘플로부터 유래하는 동일한 분자 영역에 특유한 정체성를 부여하기 위해 사용될 수 있다.

[0024] 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법은 a) i) 다수의 핵산을 포함하는 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제1 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고; ii) 다수의 핵산을 포함하는 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제2 샘플-태그부착된 핵산을 생산함으로써 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고, 여기서 다수의 제2 샘플 태그는 제1 샘플 태그와 상이하고; b) 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하고; c) 표지된 핵산의 적어도 일부를 검출하여 다수의 샘플 내의 다수의 핵산의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 단일 세포를 포함할 수 있다.

[0025] 대안적으로, 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법은 a) i) 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시키고, 여기서 다수의 제1 샘플 태그는 동일한 핵산 서열을 포함하고; ii) 제1 샘플을 상이한 핵산 서열을 포함할 수 있는 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키고, 여기서 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그 또는 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 다수의 제1-표지된 핵산을 생산하기 위해 동시에 또는 순차적으로 수행하고; iii) 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시키고, 여기서 다수의 제2 샘플 태그는 동일한 핵산 서열을 포함할 수 있고; iv) 제2 샘플을 상이한 핵산 서열을 포함할 수 있는 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하고, 여기서 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그 또는 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 다수의 제2-표지된 핵산을 생산하기 위해 동시에 또는 순차적으로 수행하고, 여기서 다수의 표지된 핵산은 다수의 제1-표지된 핵산 및 제2-표지된 핵산을 포함할 수 있고; b) 많은 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하여 다수의 샘플 내의 다수의 핵산의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다.

[0026] 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법은 a) 2개 이상의 상이한 핵산을 포함할 수 있는 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하고, 여기서 i) 다수의 표지된 핵산은 2개 이상의 샘플 태그 및 2개 이상의 분자 식별 표지에 부착된 2개 이상의 핵산을 포함할 수 있고; ii) 다수의 샘플의 제1 샘플로부터의 핵산에 부착된 샘플 태그는 다수의 샘플의 제2 샘플로부터의 핵산 분자에 부착된 샘플 태그와 상이하고; iii) 동일한 샘플 내의 2개 이상의 동일한 핵산은 2개 이상의 상이한 분자 식별 표지에 부착되고; b) 표지된 핵산의 적어도 일부를 검출하여 다수의 샘플 내의 2개 이상의 상이한 핵산의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다.

[0027] 도 56은 샘플 내의 RNA 분자의 정량을 위한 예시적인 작업 흐름을 보여준다. 도 56의 단계 1에 제시된 바와 같이, RNA 분자 (110)는 분자 식별 표지의 세트 (115)의 RNA 분자의 폴리A 테일 (tail) 영역에 대한 확률적 혼성화에 의해 cDNA 분자 (105)를 생산하기 위해 역전사될 수 있다. 분자 식별 표지 (115)는 올리고dT 영역 (120), 표지 영역 (125), 및 범용 PCR 영역 (130)을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지의 세트는 960개의 상이한 유형의 표지 영역을 포함할 수 있다. 도 56의 단계 2에 제시된 바와 같이, 표지된 cDNA 분자 (170)는 과량의 분자 식별 표지 (115)를 제거하기 위해 정제될 수 있다. 정제는 앰퓨어 (Ampure) 비드 정제를 포함할 수 있다. 도 56의 단계 3에 제시된 바와 같이, 표지된 cDNA 분자 (170)는 표지된 앰플리콘 (180)을 생산하기 위해 증폭될 수 있다. 증폭은 다중 PCR 증폭을 포함할 수 있다. 증폭은 단일 반응 부피 내의 96개의 다중 프라이머를 사용한 다중 PCR 증폭을 포함할 수 있다. 증폭은 맞춤형 (custom) 프라이머 (135) 및 범용 프라이머 (140)를 포함할 수 있다. 맞춤형 프라이머 (135)는 표지된 cDNA 분자 (170)의 cDNA (105) 부분 내의 영역에 혼성화할 수 있다. 범용 프라이머 (140)은 표지된 cDNA 분자 (170)의 범용 PCR 영역 (130)에 혼성화할 수 있다. 단계 4에 제시된 바와 같이, 표지된 앰플리콘 (180)은 네스티드 PCR에 의해 추가로 증폭될 수 있다. 네스티드 PCR은 단일 반응 부피 내의 96개의 다중 프라이머를 사용하는 다중 PCR을 포함할 수 있다. 네스티드 PCR은 맞춤형 프라이머 (145) 및 범용 프라이머 (140)를 포함할 수 있다. 맞춤형 프라이머 (135)는 표지된 앰플리콘 (180)의 cDNA (105) 부분 내의 영역에 혼성화할 수 있다. 범용 프라이머 (140)는 표지된 앰플리콘 (180)의 범용 PCR 영역 (130)에 혼성화할 수 있다. 단계 5에 제시된 바와 같이, 하나 이상의 어댑터 (150, 155)는 표지된 앰플리콘 (180)에 부착되어 어댑터-표지된 앰플리콘 (190)을 생산할 수 있다. 하나 이상의 어댑터는 라이게이션을 통해 표지된 앰플리콘 (180)에 부착될 수 있다. 단계 6에 제시된 바와 같이, 하나 이상의 어댑터 (150, 155)는 어댑터-표지된 앰플리콘 (190)에 대한 하나 이상의 추가의 검정을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 하나 이상의 어댑터 (150, 155)는 하나 이상의 프라이머 (160, 165)에 혼성화될 수 있다. 하나 이상의 프라이머 (160, 165)는 PCR 증폭 프라이머일 수 있다. 하나 이상의 프라이머 (160, 165)는 서열분석 프라이머일 수 있다. 하나 이상의 어댑터 (150, 155)는 어댑터-표지된 앰플리콘의 추가의 증폭을 위해 사용될 수 있다. 하나 이상의 어댑터 (150, 155)는 어댑터-표지된 앰플리콘의 서열분석을 위해 사용될 수 있다.

[0028] 도 57은 2개 이상의 샘플로부터의 핵산을 분석하기 위한 작업 흐름의 예시적인 개략도를 보여준다. 도 57에 제시된 바와 같이, 2개 이상의 샘플로부터의 핵산을 분석하기 위한 방법은 분석을 위한 2개 이상의 유전자의 선택 및 선택된 유전자를 기초로 한 맞춤형 프라이머의 설계를 포함할 수 있다 (210). 이 방법은 핵산 (예를 들어, RNA)을 포함하는 하나 이상의 샘플을 하나 이상의 스파이크-인 대조군으로 보충하는 것을 추가로 포함할 수 있다 (220). 샘플 내의 핵산은 분자 바코드 (또는 샘플 태그 또는 분자 식별 표지) 및 맞춤형 프라이머를 사용하는 다중 RT-PCR (230)에 의해 증폭되어 표지된 앰플리콘을 생산할 수 있다. 표지된 앰플리콘은 하나 이상의 서열분석 어댑터로 추가로 처리되어 어댑터 표지된 앰플리콘을 생산할 수 있다 (240). 어댑터 표지된 앰플리콘은 분석될 수 있다 (250). 도 57에 제시된 바와 같이, 표지된 앰플리콘 (250)의 분석은 (1) 범용 PCR 프라이머 seq, 폴리A 및/또는 분자 바코드 (또는 샘플 태그, 분자 식별 표지)의 검출; (2) 어댑터 및/또는 바코드 (예를

들어, 분자 바코드, 샘플 태그, 분자 식별 표지)에 부착되지 않은 어댑터 표지된 앰플리콘 (예를 들어, 96개의 유전자 및 스파이크-인 대조군)의 말단에 대한 지도 판독; 및 (3) 상이한 어댑터 표지된 앰플리콘의 수 측정 및/또는 요약 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0029] 도 67은 핵산을 분자 바코드 (1220)로 확률적으로 표지하기 위한 작업 흐름의 예시적인 개략도를 보여준다. 도 67의 단계 1에 제시된 바와 같이, RNA 분자는 분자 바코드 (1220)의 세트로 확률적으로 표지될 수 있다. 분자 바코드 (1220)는 표적 결합 영역 (1221), 표지 영역 (1222), 샘플 인덱스 영역 (1223) 및 범용 PCR 영역 (1224)을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 표적 결합 영역은 RNA 분자 내의 폴리A 서열에 혼성화하는 올리고dT 서열을 포함한다. 표지 영역 (1222)은 2개 이상의 상이한 분자 바코드를 구분하기 위해 사용할 수 있는 특유한 서열을 포함할 수 있다. 분자 바코드가 RNA 분자에 혼성화할 때, 표지 영역은 특유한 정체성을 동일한 RNA 분자에 부여하기 위해 사용될 수 있다. 샘플 인덱스 영역 (1223)은 분자 바코드의 세트에 대해 동일할 수 있다. 샘플 인덱스 영역 (1223)은 상이한 샘플로부터의 표지된 핵산을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 범용 PCR 영역 (1224)은 표지된 분자의 증폭을 위한 프라이머 결합 부위로서 역할을 할 수 있다. RNA 분자가 분자 바코드로 표지되면, RNA 분자는 역전사되어, RNA 분자의 cDNA 카피 (1210) 및 분자 바코드 (1220)를 포함하는 표지된 cDNA 분자 (1230)를 생산할 수 있다.

[0030] 도 67의 단계 2에 제시된 바와 같이, 과량의 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 분자 바코드)는 앰퓨어 비드 정제에 의해 제거될 수 있다. 도 67의 단계 3에 제시된 바와 같이, 표지된 cDNA 분자는 다중 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 표지된 cDNA 분자의 다중 PCR은 표지된 앰플리콘 (1245)을 생산하기 위해 단일 반응 부피 내에서 제1 세트의 전방향 프라이머 (F1, 도 67의 (1235)) 및 범용 프라이머 (1240)를 사용하여 수행될 수 있다. 도 67의 단계 4에 제시된 바와 같이, 표지된 앰플리콘은 네스티드 프라이머를 사용하는 다중 PCR에 의해 추가로 증폭될 수 있다. 표지된 앰플리콘의 네스티드 프라이머 증폭은 표지된 네스티드 PCR 앰플리콘을 생산하기 위해 단일 반응 부피 내에서 제2 세트의 전방향 프라이머 (F2, 도 67의 (1250)) 및 범용 프라이머 (1240)를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 예에서, F2 프라이머 (1250)는 어댑터 (1251) 및 표적 결합 영역 (1252)을 포함한다. F2 프라이머의 표적 결합 영역 (1252)은 표지된 앰플리콘에 혼성화할 수 있고, 표지된 앰플리콘의 증폭을 프라이밍할 수 있다. 네스티드 PCR 앰플리콘의 어댑터 (1251) 및 범용 PCR 영역 (1224)은 표지된 네스티드 PCR 앰플리콘의 서열분석에 사용될 수 있다. 앰플리콘은 MiSeq에 의해 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 앰플리콘은 HiSeq에 의해 서열분석될 수 있다.

[0031] 도 68은 핵산을 확률적으로 표지하기 위한 작업 흐름의 개략도를 보여준다. 도 68의 단계 1에 제시된 바와 같이, RNA 분자 (1305)는 분자 바코드의 세트 (1320)로 확률적으로 표지될 수 있다. 분자 바코드는 표적 결합 영역 (1321), 표지 영역 (1322), 및 범용 PCR 영역 (1323)을 포함할 수 있다. 일단 분자 바코드가 RNA 분자에 부착되면, RNA 분자 (1305)는 역전사되어, RNA 분자의 cDNA 카피 (1310) 및 분자 바코드 (1320)를 포함하는 표지된 cDNA 분자 (1325)를 생산할 수 있다. 도 68의 단계 2에 제시된 바와 같이, 표지된 cDNA 분자는 과량의 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 분자 바코드)를 제거하기 위해 앰퓨어 비드 정제에 의해 정제될 수 있다. 도 68의 단계 3에 제시된 바와 같이, 표지된 앰플리콘은 다중 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 표지된 cDNA 분자의 다중 PCR은 표지된 앰플리콘 (1360)을 생산하기 위해 단일 반응 부피 내에서 제1 세트의 전방향 프라이머 (F1, 도 68의 (1330)) 및 범용 프라이머 (1335)를 사용함으로써 수행될 수 있다. 도 67의 단계 4에 제시된 바와 같이, 표지된 앰플리콘은 네스티드 프라이머를 사용하는 다중 PCR에 의해 추가로 증폭될 수 있다. 표지된 앰플리콘의 네스티드 프라이머 증폭은 표지된 네스티드 PCR 앰플리콘을 생산하기 위해 단일 반응 부피 내에서 제2 세트의 전방향 프라이머 (F2, 도 68의 (1340)) 및 샘플 인덱스 프라이머 (1350)를 사용함으로써 수행될 수 있다. 일부 예에서, F2 프라이머 (1340)는 어댑터 (1341) 및 표적 결합 영역 (1342)을 포함한다. F2 프라이머의 표적 결합 영역 (1342)은 표지된 앰플리콘에 혼성화할 수 있고, 표지된 앰플리콘의 증폭을 프라이밍할 수 있다. 샘플 인덱스 프라이머 (1350)는 범용 프라이머 영역 (1351), 샘플 인덱스 영역 (1352), 및 어댑터 영역 (1353)을 포함할 수 있다. 도 68의 단계 4에 제시된 바와 같이, 샘플 인덱스 프라이머의 범용 프라이머 영역 (1351)은 표지된 앰플리콘의 범용 PCR 영역에 혼성화할 수 있다. 샘플 인덱스 프라이머의 샘플 인덱스 영역 (1352)은 2개 이상의 샘플을 구별하기 위해 사용될 수 있다. 어댑터 영역 (1341, 1353)은 표지된 네스티드 PCR 앰플리콘을 서열분석하기 위해 사용될 수 있다. 앰플리콘은 MiSeq에 의해 서열분석될 수 있다. 대안적으로, 앰플리콘은 HiSeq에 의해 서열분석될 수 있다.

[0032] 추가로, 하나 이상의 라이브러리를 생산하는 방법이 본원에 개시된다. 하나 이상의 라이브러리는 다수의 표지된 분자를 포함할 수 있다. 하나 이상의 라이브러리는 다수의 표지된 앰플리콘을 포함할 수 있다. 하나 이상의 라이브러리는 다수의 풍부화된 분자 또는 그의 유도체 (예를 들어, 표지된 분자, 표지된 앰플리콘)를 포함할

수 있다. 일반적으로, 하나 이상의 라이브러리의 생산 방법은 (a) 2개 이상의 샘플로부터의 다수의 분자를 확률적으로 표지하여 다수의 표지된 분자를 생산하고, 여기서 표지된 분자는 분자 영역, 샘플 인덱스 영역, 및 표지 영역을 포함하고; (b) 다수의 표지된 분자로부터 하나 이상의 라이브러리를 생산하는 것을 포함하고, 여기서 (i) 하나 이상의 라이브러리는 2개 이상의 상이한 표지된 분자를 포함하고, (ii) 2개 이상의 상이한 표지된 분자는 분자 영역, 샘플 인덱스 영역, 표지 영역, 또는 이들의 조합에서 상이하다.

[0033] 하나 이상의 라이브러리의 생산 방법은 a) i) 다수의 핵산을 포함하는 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제1 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고; ii) 다수의 핵산을 포함하는 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제2 샘플-태그부착된 핵산을 생산함으로써 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고, 여기서 다수의 제1 샘플 태그는 제2 샘플 태그와 상이하고; b) 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산함으로써 표지된 핵산 라이브러리를 생산하는 것을 포함한다.

[0034] 샘플에 대한 접촉은 무작위 또는 비-무작위일 수 있다. 예를 들어, 샘플과 샘플 태그의 접촉은 무작위 또는 비-무작위 접촉일 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 샘플 태그와 무작위로 접촉된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 샘플 태그와 비-무작위로 접촉된다. 다수의 핵산에 대한 접촉은 무작위 또는 비-무작위일 수 있다. 예를 들어, 다수의 핵산과 샘플 태그의 접촉은 무작위 또는 비-무작위 접촉일 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 핵산은 샘플 태그와 무작위로 접촉된다. 일부 실시양태에서, 다수의 핵산은 샘플 태그와 비-무작위로 접촉된다.

[0035] 추가로, 하나 이상의 세트의 표지된 비드를 생산하는 방법이 본원에 개시된다. 하나 이상의 세트의 표지된 비드의 생산 방법은 하나 이상의 핵산을 하나 이상의 비드에 부착시켜 하나 이상의 세트의 표지된 비드를 생산하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 분자 바코드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 프라이머 영역; b) 샘플 인덱스 영역; 및 c) 링커 또는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 프라이머 영역; b) 표지 영역; 및 c) 링커 또는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 샘플 인덱스 영역; 및 b) 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 프라이머 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 표적 특이적 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 링커 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 어댑터 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 샘플 인덱스 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 표지 영역을 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 하나 이상의 맞춤형 프라이머를 선택하는 방법이 본원에 개시된다. 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 맞춤형 프라이머를 선택하는 방법은 a) 선택된 프라이머가 i) 3개 이하의 순차적인 구아닌, 3개 이하의 순차적인 시토신, 4개 이하의 순차적인 아데닌, 및 4개 이하의 순차적인 티민; ii) 구아닌 또는 시토신인 적어도 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오티드; 및 iii) 쉽게 머리핀 구조를 형성하지 않는 서열을 포함할 수 있는 제1 패스; b) i) 모든 전사체의 높은 적용 범위를 갖는 다수의 서열을 선택하는 제1 라운드; 및 ii) 나머지 전사체의 가장 높은 적용 범위 및 4 이하의 다른 선택된 서열과의 상보성 점수를 갖는 서열을 선택하는 1회 이상의 후속 라운드를 포함하는 제2 패스; 및 c) 적용 범위가 포화되거나 또는 맞춤형 프라이머의 총수가 약 96개 이하일 때까지 선택된 세트에 서열을 첨가하는 것를 포함할 수 있다.

[0037] 또한, 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자를 분석할 때 사용하기 위한 키트가 본원에 개시된다. 키트는 (a) 제1 세트의 분자 바코드를 포함하는 제1 용기 (여기서, (i) 제1 세트의 분자 바코드 중의 한 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역 및 표지 영역을 포함하고; (ii) 제1 세트의 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 샘플 인덱스 영역은 동일하고; (iii) 제1 세트의 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 표지 영역은 상이함); 및 (b) 제2 세트의 분자 바코드를 포함하는 제2 용기 (여기서, (i) 제2 세트의 분자 바코드 중의 한 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역 및 표지 영역을 포함하고; (ii) 제2 세트의 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 샘플 인덱스 영역은 동일하고; (iii) 제2 세트의 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 표지 영역은 상이하고; (iv) 제2 세트의 분자 바코드의 바코드의 샘플 인덱스 영역은 제1 세트의 분자 바코드의 바코드의 샘플 인덱스 영역과 상이하고; (v) 제2 세트의 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 표지 영역은 제1 세트의 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 표지 영역과 동일함)을 포함할 수 있다.

[0038] 대안적으로, 키트는 a) 다수의 비드 (여기서, 다수의 비드 중의 하나 이상의 비드는 다수의 핵산 중 적어도 하나를 포함할 수 있고, 다수의 핵산 중 적어도 하나는 i) 적어도 하나의 프라이머 서열 (여기서, 다수의 핵산 중 적어도 하나의 프라이머 서열은 다수의 비드에 대해 동일함); ii) 비드-특이적 서열 (여기서, 다수의 핵산의 임

의의 하나의 비드-특이적 서열은 동일하고, 비드-특이적 서열은 다수의 비드의 임의의 하나에 대해 상이함); 및 iii) 다수의 핵산의 임의의 하나에 대해 상이한 확률적 서열을 포함할 수 있음); b) 프라이머 서열에 상보성인 서열을 포함할 수 있는 프라이머; 및 c) 핵산 증폭에 적합한 하나 이상의 증폭제를 포함한다.

[0039] 대안적으로, 키트는 a) 제1 세트의 샘플 태그를 포함하는 제1 용기 (여기서, (i) 제1 세트의 샘플 태그 중의 하나의 샘플 태그는 샘플 인덱스 영역을 포함하고; (ii) 제1 세트의 샘플 태그의 샘플 태그들의 샘플 인덱스 영역은 적어도 약 80% 동일함); b) 제1 세트의 분자 식별 표지를 포함하는 제2 용기 (여기서, (i) 제1 세트의 분자 식별 표지 중의 하나의 분자 식별 표지는 표지 영역을 포함하고; (ii) 제1 세트의 분자 식별 표지 중의 총 분자 식별 표지들의 적어도 약 30%의 표지 영역이 상이함)를 포함한다.

[0040] 본 발명의 방법, 키트 및 조성물을 보다 상세하게 설명하기 전에, 본 발명은 설명되는 특정 방법, 키트 또는 조성물로 제한되지 않고 물론 변경될 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것이고, 본 발명의 범위는 오직 첨부되는 청구의 범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에 본 발명을 제한하고자 의도하지 않음을 이해하여야 한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 본 발명을 실시하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시내용 및 설명을 제공하기 위해 실시예가 제시되고, 이것은 본 발명자들이 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하고자 의도되지 않고, 또한 하기 실험이 수행되는 실험의 전부이거나 유일한 실험을 나타내고자 의도되지 않는다. 사용된 수치 (예를 들어, 양, 온도 등)에 대한 정확성을 보장하기 위해 노력하였지만, 일부 실험 오차 및 편차를 고려하여야 한다. 달리 나타내지 않으면, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 거의 대기압이다.

[0041] 다수의 샘플에서 또는 복합 핵산 제제에서 핵산의 확률적 표지를 위한 방법, 키트 및 조성물이 제공된다. 이들 방법, 키트 및 조성물은 세포 반응, 분화 또는 신호 전달의 메카니즘의 규명 및 매우 다양한 임상 측정을 수행하는데 유용한 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 이들 및 다른 목적, 이점, 및 특징은 아래에서 보다 잘 설명되는 방법, 키트 및 조성물의 상세한 내용을 통해 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0042] 본원에 개시된 방법은 하나 이상의 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지를 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착시키는 것을 포함한다. 분자 바코드, 샘플 태그 및/또는 분자 식별 표지는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 분자에 대한 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지의 부착은 분자의 확률적 표지를 포함한다. 분자를 확률적으로 표지하는 방법은 예를 들어 U.S. 특허 출원 12/969,581 및 13/327,526에서 볼 수 있다. 일반적으로, 확률적 표지 방법은 하나 이상의 분자에 대한 다수의 태그 및 표지 올리고뉴클레오티드의 무작위 부착을 포함한다. 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지는 표지되는 과량의 하나 이상의 분자에 제공된다. 확률적 표지시에, 표지되는 각각의 개별적인 분자는 다수의 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지에 대한 개별적인 부착 확률을 갖는다. 표지되는 각각의 개별적인 분자의 특정 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지에 대한 부착 확률은 표지되는 임의의 다른 개별적인 분자와 거의 동일할 수 있다. 따라서, 일부 예에서, 샘플 내의 임의의 분자에서 임의의 태그 및 표지를 발견할 확률은 동일한 것으로 가정되고, 이 가정은 샘플 내의 분자의 수를 추정하기 위해 수학 계산에서 사용할 수 있는 것이다. 몇몇 상황에서, 부착 확률은 예를 들어 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지의 개별적인 분자와의 결합 효율을 증가 또는 감소시키는 상이한 특성을 갖는 태그 및 표지를 선발함으로써 조작될 수 있다. 태그 및 표지는 또한 특정 분자 바코드, 샘플 태그, 및/또는 분자 식별 표지가 확률적 표지 동안 결합 파트너를 발견할 확률을 변경하기 위해 그 수가 상이할 수 있다. 예를 들어, 하나의 표지가 표지의 풀에 과다제시되어 과다제시된 표지가 적어도 하나의 결합 파트너를 발견할 가능성을 증가시킨다.

[0043] 본원에 개시된 방법은 2개 이상의 샘플을 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법은 2개 이상의 샘플로부터의 하나 이상의 분자를 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 방법은 제1 샘플 및 제2 샘플을 조합하는 것을 포함한다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 확률적 표지 절차 후에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 세트의 분자 바코드가 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착된 후에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 세트의 샘플 태그가 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착된 후에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 세트의 분자 식별 표지가 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착된 후에 조합될 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 샘플은 다수의 분자 식별 표지와 접촉하기 전에 조합된다.

[0044] 대안적으로, 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 확률적 표지 절차 수행 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 세트의 분자 바코드를 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착시키기 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 세트의 샘플 태그를 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착시키

기 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 세트의 분자 식별 표지를 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 부착시키기 전에 조합될 수 있다.

[0045] 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자 또는 그의 유도체 (예를 들어, 표지된 분자, 앰플리콘)에 대한 하나 이상의 검정의 수행 후에 조합될 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 증폭 반응을 포함할 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 농축 검정을 포함할 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 검출 검정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 샘플은 표지된 핵산의 검출 후에 조합된다.

[0046] 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자 또는 그의 유도체 (예를 들어, 표지된 분자, 앰플리콘)에 대한 하나 이상의 검정의 수행 전에 조합될 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 증폭 반응을 포함할 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 농축 검정을 포함할 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 검출 검정을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 샘플은 표지된 핵산의 검출 전에 조합된다.

[0047] **지지체**

[0048] 본원은 단일 세포로부터 다중 서열 분석을 위한 조성물 및 방법을 포함한다. 본원의 방법 및 조성물은 고체 지지체의 사용을 제공한다. 일부 예에서, 본원에 개시된 방법, 키트 및 조성물은 지지체를 포함한다.

[0049] 용어 "지지체", "고체 지지체", "반-고체 지지체", 및 "기판"은 교환가능하게 사용될 수 있고, 경질 또는 반-경질 표면(들)을 갖는 물질 또는 물질의 군을 나타낸다. 지지체는 용액으로부터 용액으로 이동가능한 또는 올리고뉴클레오티드-기반 검정을 수행하기 위한 구조를 형성하는 임의의 표면을 나타낼 수 있다. 지지체 또는 기판은 고체 지지체일 수 있다. 대안적으로, 지지체는 비-고체 지지체이다. 지지체는 불용성, 반-가용성, 또는 불용성 물질을 나타낼 수 있다. 지지체는 지지체에 부착된 링커, 스캐폴드, 빌딩 블록, 또는 다른 반응성 모어이티를 포함할 때 "관능화된" 것으로 언급될 수 있는 반면, 고체 지지체는 지지체에 부착된 상기 반응성 모어이티가 결여될 때 "비관능화된" 것으로 언급될 수 있다. 지지체는 용액 내에서, 예컨대 마이크로타이터 웰 포맷으로; 관류 포맷으로, 예컨대 컬럼에서; 또는 유량계 내에서 자유롭게 사용될 수 있다.

[0050] 지지체 또는 기판은 막, 종이, 플라스틱, 코팅된 표면, 편평한 표면, 유리, 슬라이드, 칩, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 많은 실시양태에서, 지지체의 적어도 하나의 표면은 실질적으로 편평할 수 있지만, 일부 실시양태에서 상이한 화합물의 합성 영역을, 예를 들어, 웰, 솟은 영역, 핀, 식각된 트렌치 등으로 물리적으로 분리하는 것이 바람직할 수 있다. 다른 실시양태에 따르면, 고체 지지체(들)은 수지, 겔, 미세구, 또는 다른 기하학적 형상일 수 있다. 대안적으로, 고체 지지체(들)은 실리카 칩, 미세입자, 나노입자, 플레이트, 및 어레이를 포함한다. 고체 지지체는 비드 (예를 들어, 실리카 겔, 제어된 세공 유리, 자성 비드, 다이나비드 (Dynabead), 왕 (Wang) 수지; 메리필드 (Merrifield) 수지, 세파덱스/세파로스 비드, 셀룰로스 비드, 폴리스티렌 비드 등), 모세관, 편평한 지지체, 예컨대 유리 섬유 필터, 유리 표면, 금속 표면 (강철, 금, 은, 알루미늄, 규소 및 구리), 유리 지지체, 플라스틱 지지체, 규소 지지체, 칩, 필터, 막, 마이크로웰 플레이트, 슬라이드 등, 멀티웰 플레이트 또는 막 (예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아미드, 폴리비닐리덴디플루오라이드로 형성된)을 포함하는 플라스틱 물질, 웨이퍼, 빗 핀 또는 바늘 (예를 들어, 조합 합성 또는 분석에 적합한 핀의 어레이) 또는 편평한 표면의 피트 (pit) 또는 나노리터 웰의 어레이, 예컨대 웨이퍼 (예를 들어, 실리콘 웨이퍼), 필터 저변부가 존재하거나 존재하지 않는 피트를 갖는 웨이퍼 내의 비드를 포함할 수 있다.

[0051] 중합체 (단백질 포함) 어레이 합성에 적용가능한 방법 및 기술은 모든 목적을 위해 그 전부가 본원에 참고로 포함된 미국 특허 공개 20050074787, WO 00/58516, 미국 특허 5,143,854, 5,242,974, 5,252,743, 5,324,633, 5,384,261, 5,405,783, 5,424,186, 5,451,683, 5,482,867, 5,491,074, 5,527,681, 5,550,215, 5,571,639, 5,578,832, 5,593,839, 5,599,695, 5,624,711, 5,631,734, 5,795,716, 5,831,070, 5,837,832, 5,856,101, 5,858,659, 5,936,324, 5,968,740, 5,974,164, 5,981,185, 5,981,956, 6,025,601, 6,033,860, 6,040,193, 6,090,555, 6,136,269, 6,269,846 및 6,428,752, PCT 공개 WO 99/36760 및 WO 01/58593에 기재되어 있다. 구체적 실시양태에서 합성 기술을 설명하고 있는 특허는 미국 특허 5,412,087, 6,147,205, 6,262,216, 6,310,189, 5,889,165, 및 5,959,098을 포함한다. 핵산 어레이는 상기 특허 중 많은 특허에서 설명되어 있지만, 많은 동일한 기술이 폴리펩티드 어레이에 적용될 수 있다. 추가의 예시적인 기판은 미국 특허 5,744,305 및 미국 특허 공개 20090149340 및 20080038559에 개시되어 있다.

[0052] 지지체에 대한 표지된 핵산의 부착은 아민-티올 가교결합, 말레이미드 가교결합, N-히드록시숙신이미드 또는 N-히드록시술포숙신이미드, 제논 (Zenon) 또는 사이트클릭 (SiteClick)을 포함할 수 있다. 표지된 핵산을 지지체에 부착하는 것은 비오틴을 다수의 표지된 핵산에 부착시키고, 하나 이상의 비드를 스트렙타비딘으로 코팅하는

것을 포함할 수 있다.

[0053] 일부 예에서, 고체 지지체는 분자 스캐폴드를 포함할 수 있다. 예시적인 분자 스캐폴드는 항체, 항원, 친화도 시약, 폴리펩티드, 핵산, 세포 소기관 등을 포함할 수 있다. 분자 스캐폴드는 함께 연결될 수 있다 (예를 들어, 고체 지지체는 다수의 연결된 분자 스캐폴드를 포함할 수 있다). 분자 스캐폴드는 아미노산 링커, 핵산 링커, 소분자 연결 (예를 들어, 비오틴 및 아비딘), 및/또는 매트릭스 연결 (예를 들어, PEG 또는 글리세롤)에 의해 함께 연결될 수 있다. 연결은 비-공유 연결일 수 있다. 연결은 공유 연결일 수 있다. 일부 예에서, 분자 스캐폴드는 연결되지 않을 수 있다. 다수의 개별적인 분자 스캐폴드가 본 개시내용의 방법에 사용될 수 있다.

[0054] 일부 예에서, 지지체는 나노입자를 포함할 수 있다. 나노입자는 니켈, 금, 은, 탄소, 구리, 실리케이트, 백금 코발트, 산화아연, 이산화규소 결정, 및/또는 은 나노입자일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 나노입자는 다공성 산화망간에 포매된 금 나노입자일 수 있다. 나노입자는 철 나노입자일 수 있다. 나노입자는 탄소의 나노입자가 산재된 나노테트라포드일 수 있다.

[0055] 지지체는 중합체를 포함할 수 있다. 중합체는 매트릭스를 포함할 수 있다. 매트릭스는 하나 이상의 비드를 추가로 포함할 수 있다. 중합체는 PEG, 글리세롤, 다당류, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 중합체는 플라스틱, 고무, 나일론, 실리콘, 네오프렌, 및/또는 폴리스티렌일 수 있다. 중합체는 천연 중합체일 수 있다. 천연 중합체의 예는 셸락, 호박, 양모, 비단, 셀룰로스, 및 천연 고무를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 중합체는 합성 중합체일 수 있다. 합성 중합체의 예는 합성 고무, 페놀 포름알데히드 수지 (또는 베이클라이트 (Bakelite)), 네오프렌, 나일론, 폴리비닐 클로라이드 (PVC 또는 비닐), 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴로니트릴, PVB, 및 실리콘을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0056] 지지체는 반-고체 지지체일 수 있다. 지지체는 겔 (예를 들어, 히드로겔)을 포함할 수 있다. 용어 "히드로겔", "겔" 등은 본원에서 교환가능하게 사용되고, 쉽게 유동가능한 액체가 아니고 고체도 아니지만, 0.5 중량% 이상, 바람직하게는 40 중량% 미만의 겔 형성 용질 물질 및 95 중량% 이하, 바람직하게는 55 중량% 초과의 물을 포함하는 물질을 의미할 수 있다. 본 발명의 겔은 물에 결합하고/하거나, 포획하고/하거나, 흡수하고/하거나 달리 보유하여, 물과 조합되어 겔을 생성하는 서로 연결된 세포를 형성하는 용질, 바람직하게는 합성 용질 (그러나, 예를 들어 젤라틴을 형성하기 위한 천연 용질일 수 있음)의 사용에 의해 형성될 수 있고, 여기서 물은 결합된 및 비결합된 물을 포함한다. 겔은 본 발명의 히드로겔 패치의 기본적인 구조일 수 있고, 겔 형성 용질 물질 및 물 이외의 추가의 성분, 예컨대 효소 및 염을 포함할 것이고, 상기 성분은 본원에서 추가로 설명된다. 겔은 중합체 겔일 수 있다.

[0057] 고체 지지체는 구조화된 나노구조를 포함할 수 있다. 예를 들어, 구조화된 나노구조는 세포 및/또는 세포의 내용물을 포획하기 위해 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있는 포획 용기 (예를 들어, 소형 벌집 구조)를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 구조화된 나노구조는 외부 시약의 첨가를 필요로 하지 않을 수 있다.

[0058] 일부 예에서, 지지체는 비드를 포함한다. 비드는 핵산이 그 위에 고정될 수 있는 (예를 들어, 공유 또는 비-공유 방식으로) 플라스틱, 세라믹, 금속, 또는 중합성 물질로 이루어진 임의의 유형의 고체 또는 속이 빈 구체, 공, 베어링, 원통형, 또는 다른 유사한 입체형태를 포함할 수 있다. 비드는 나일론 스트링 또는 스트링들을 포함할 수 있다. 비드는 구체 형상일 수 있다. 비드는 비-구체 형상일 수 있다. 비드는 비연마될 수 있거나, 또는 연마된 경우 연마된 비드는 처리 (예를 들어 알킬화제를 사용한) 전에 거칠게 될 수 있다. 비드는 구체 (예를 들어, 미세구)이거나 불규칙한 형상을 가질 수 있는 별개의 입자를 포함할 수 있다. 비드는 상자성 물질, 세라믹, 플라스틱, 유리, 폴리스티렌, 메틸스티렌, 아크릴계 중합체, 티탄, 라텍스, 세파로스, 셀룰로스, 나일론 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 물질을 포함할 수 있다. 비드는 하나 이상의 지지체에 부착되거나 포매될 수 있다. 비드는 겔 또는 히드로겔에 부착될 수 있다. 비드는 겔 또는 히드로겔 내에 포매될 수 있다. 비드는 매트릭스에 부착될 수 있다. 비드는 매트릭스 내에 포매될 수 있다. 비드는 중합체에 부착될 수 있다. 비드는 중합체 내에 포매될 수 있다. 지지체 (예를 들어, 겔, 매트릭스, 스캐폴드, 또는 중합체) 내의 비드의 공간적 위치는 위치 주소로서 기능하는, 비드에 존재하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 확인될 수 있다. 비드의 예는 스트렙타비딘 비드, 아가로스 비드, 자성 비드, 다이나비즈(Dynabeads)®, MACS® 마이크로비드, 항체 접합된 비드 (예를 들어, 항-이뮤노글로불린 마이크로비드), 단백질 A 접합된 비드, 단백질 G 접합된 비드, 단백질 A/G 접합된 비드, 단백질 L 접합된 비드, 올리고dT 접합된 비드, 실리카 비드, 실리카-유사 비드, 항-비오틴 마이크로비드, 항-형광 색소 마이크로비드, 및 BcMag™ 카르복시-말단 자성 비드를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 비드의 직경은 약 5 ㎛, 10 ㎛, 20 ㎛, 25 ㎛, 30 ㎛, 35 ㎛, 40 ㎛, 45 ㎛ 또는

50 ㎛일 수 있다. 비드는 생물학적 입자 및 거대분자, 예컨대 DNA 및 RNA의 고정을 위한 증가된 표면적을 제공할 수 있는 임의의 3차원 구조를 나타낼 수 있다.

[0059] 지지체는 다공성일 수 있다. 지지체는 투과성 또는 반-투과성일 수 있다. 지지체는 고체일 수 있다. 지지체는 반-고체일 수 있다. 지지체는 전성일 수 있다. 지지체는 가요성일 수 있다. 일부 예에서, 지지체는 형상으로 몰딩될 수 있다. 예를 들어, 지지체는 물체 위에 놓일 수 있고, 지지체는 물체의 형상을 가질 수 있다. 일부 예에서, 지지체는 장기 위에 놓이고 장기의 형상을 취한다. 일부 예에서, 지지체는 3D-인쇄에 의해 생산된다.

[0060] 지지체 (예를 들어, 비드, 나노입자)의 직경은 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 100, 500, 1000, 또는 2000 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 고체 지지체 (예를 들어, 비드)의 직경은 최대 약 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 100, 500, 1000, 또는 2000 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 비드의 직경은 약 20 마이크로미터일 수 있다.

[0061] 일부 예에서, 고체 지지체는 덴드리머를 포함한다. 덴드리머는 비드보다 작을 수 있다. 덴드리머는 세포보다 작을 수 있다. 덴드리머의 직경은 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 또는 0.1 마이크로미터 미만일 수 있다. 덴드리머의 직경은 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 또는 0.01 마이크로미터 미만일 수 있다. 덴드리머는 3개의 주요 부분, 즉 코어, 내부 쉘, 및 외부 쉘을 포함할 수 있다. 덴드리머는 각각의 상기 부분에서 상이한 기능성을 갖도록 합성할 수 있다. 덴드리머의 부분들의 상이한 기능성은 특성, 예컨대 용해도, 열 안정성, 및 특정 용도를 위한 화합물의 부착을 제어할 수 있다. 덴드리머는 합성 방식으로 처리될 수 있다. 덴드리머는 발산형 합성에 의해 합성할 수 있다. 발산형 합성은 일련의 반응에 의해 밖으로 연장되는 다기능성 코어로부터 덴드리머를 조립하는 것을 포함할 수 있다. 발산형 합성은 일련의 마이클 (Michael) 반응을 포함할 수 있다. 대안적으로, 덴드리머는 수렴형 합성에 의해 합성할 수 있다. 수렴형 합성은 구체의 표면에 머무르는 소분자로부터 덴드리머를 쌓아올리는 것을 포함할 수 있고, 반응물은 안쪽으로 진행되고, 궁극적으로 코어에 부착된다. 덴드리머는 또한 클릭 화학에 의해 제조될 수 있다. 클릭 화학은 딜스-알더 (Diels-Alder) 반응, 티올-인 반응, 아지드-알킨 반응, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 덴드리머의 예는 폴리(아미도아민) (PAMAM) 덴드리머, PEG-코어 덴드리머, 인 덴드리머, 폴리프로필렌이민 덴드리머, 및 폴리리신 덴드리머를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 덴드리머는 키랄 덴드리머일 수 있다. 대안적으로, 덴드리머는 비키랄 덴드리머일 수 있다.

[0062] 고체 지지체는 덴드리머의 일부를 포함할 수 있다. 덴드리머의 일부는 수상 돌기를 포함할 수 있다. 수상 돌기는 다수의 말단기 및 중심의 단일 반응 관능기를 갖는 단분산 쐐기형 덴드리머 섹션을 포함할 수 있다. 고체 지지체는 폴리에스테르 수지상 돌기을 포함할 수 있다. 수상 돌기의 예는 폴리에스테르-8-히드록실-1-아세틸렌 비스-MPA 수상 돌기, 폴리에스테르-16-히드록실-1-아세틸렌 비스-MPA 수상 돌기, 폴리에스테르-32-히드록실-1-아세틸렌 비스-MPA 수상 돌기, 폴리에스테르-8-히드록실-1-카르복실 비스-MPA 수상 돌기, 폴리에스테르-16-히드록실-1-카르복실 비스-MPA 수상 돌기, 및 폴리에스테르-32-히드록실-1-카르복실 비스-MPA 수상 돌기를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0063] 고체 지지체는 과분지형 중합체를 포함할 수 있다. 과분지형 중합체는 덴드리머-유사 특성을 갖는 다분산 수지상 거대분자를 포함할 수 있다. 종종, 과분지형 중합체는 단일 합성 중합 단계로 제조된다. 과분지형 중합체는 2,2-비스(히드록시메틸)프로판산 (비스-MPA) 단량체를 기초로 할 수 있다. 과분지형 중합체의 예는 과분지형 비스-MPA 폴리에스테르-16-히드록실, 과분지형 비스-MPA 폴리에스테르-32-히드록실, 및 과분지형 비스-MPA 폴리에스테르-64-히드록실을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0064] 고체 지지체는 어레이 또는 마이크로어레이일 수 있다. 고체 지지체는 별개의 영역을 포함할 수 있다. 고체 지지체는 주소 지정 가능 어레이일 수 있다. 일부 예에서, 어레이는 고체 표면 상에 고정된 다수의 프로브를 포함한다. 다수의 프로브는 고체 표면에 대한 표지된-분자 및/또는 표지된-앰플리콘의 혼성화를 가능하게 한다. 다수의 프로브는 표지된-분자 및/또는 표지된-앰플리콘의 적어도 일부에 상보성인 서열을 포함한다. 일부 예에서, 다수의 프로브는 샘플 태그, 분자 식별 표지, 핵산, 또는 이들의 조합의 적어도 일부에 상보성인 서열을 포함한다. 다른 예에서, 다수의 프로브는 핵산에 대한 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 부착에 의해 형성된 연결부에 상보성인 서열을 포함한다.

[0065] 어레이는 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 프로브는 다양한 형식으로 존재할 수 있다. 어레이는 표적 핵산의 적어도 일부에 상보성인 서열 및 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 특유한 식별 영역에 상보성인 서열을 포함하는 프로브를 포함할 수 있고, 여기서 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

표적 핵산의 적어도 일부에 상보성인 서열은 어레이에 부착될 수 있다. 특유한 식별 영역에 상보성인 서열은 어레이에 부착될 수 있다. 어레이는 표적 핵산의 적어도 일부에 상보성인 서열을 포함하는 제1 프로브 및 특유한 식별 영역에 상보성인 제2 프로브를 포함할 수 있다. 확률적으로 표지된 핵산이 어레이에 혼성화할 수 있는 다양한 방법이 존재한다. 예를 들어, 확률적으로 표지된 핵산의 특유한 식별 영역 및 표적 핵산의 연결부는 어레이 상의 프로브에 혼성화할 수 있다. 어레이 상의 프로브에 혼성화할 수 있는 확률적으로 표지된 핵산의 영역에 갭이 존재할 수 있다. 확률적으로 표지된 핵산의 상이한 영역은 어레이 상의 2개 이상의 프로브에 혼성화할 수 있다. 따라서, 어레이 프로브는 많은 상이한 형식으로 존재할 수 있다. 어레이 프로브는 특유한 식별 영역에 상보성인 서열, 표적 핵산에 상보성인 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 어레이에 대한 확률적으로 표지된 핵산의 혼성화는 다양한 방식으로 발생할 수 있다. 예를 들어, 확률적으로 표지된 핵산의 2개 이상의 뉴클레오티드는 어레이 상의 하나 이상의 프로브에 혼성화할 수 있다. 프로브에 혼성화하는 확률적으로 표지된 핵산의 2개 이상의 뉴클레오티드는 연속적인 뉴클레오티드, 비-연속적인 뉴클레오티드, 또는 이들의 조합일 수 있다. 프로브에 혼성화된 확률적으로 표지된 핵산은 관련 기술 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 확률적으로 표지된 핵산은 직접 검출될 수 있다. 확률적으로 표지된 핵산을 직접 검출하는 것은 형광단, 합텐, 또는 검출가능 표지의 검출을 포함할 수 있다. 확률적으로 표지된 분자는 간접적으로 검출될 수 있다. 확률적으로 표지된 핵산의 간접 검출은 라이게이션 또는 다른 효소적 또는 비-효소적 방법을 포함할 수 있다.

[0066] 어레이는 다양한 형식으로 존재할 수 있다. 예를 들어, 어레이는 16-, 32-, 48-, 64-, 80-, 96-, 112-, 128-, 144-, 160-, 176-, 192-, 208-, 224-, 240-, 256-, 272-, 288-, 304-, 320-, 336-, 352-, 368-, 384-, 또는 400-형식으로 존재할 수 있다. 대안적으로, 어레이는 8x60K, 4x180K, 2x400K, 1x1M 형식으로 존재한다. 다른 예에서, 어레이는 8x15K, 4x44K, 2x105K, 1x244K 형식으로 존재한다.

[0067] 어레이는 단일 어레이를 포함할 수 있다. 단일 어레이는 단일 기판 상에 존재할 수 있다. 대안적으로, 어레이는 다수의 기판 상에 존재한다. 어레이는 다수의 형식을 포함할 수 있다. 어레이는 다수의 어레이를 포함할 수 있다. 다수의 어레이는 2개 이상의 어레이를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 어레이는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100개의 어레이를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 다수의 어레이 중 적어도 2개의 어레이는 동일하다. 대안적으로, 다수의 어레이 중 적어도 2개의 어레이는 상이하다.

[0068] 일부 예에서, 어레이는 대칭의 챔버가 있는 영역을 포함한다. 예를 들어, 어레이는 0.5 x 0.5 밀리미터 (mm), 1 x 1 mm, 1.5 x 1.5 mm, 2 x 2 mm, 2.5 x 2.5 mm, 3 x 3 mm, 3.5 x 3.5 mm, 4 x 4 mm, 4.5 x 4.5 mm, 5 x 5 mm, 5.5 x 5.5 mm, 6 x 6 mm, 6.5 x 6.5 mm, 7 x 7 mm, 7.5 x 7.5 mm, 8 x 8 mm, 8.5 x 8.5 mm, 9 x 9 mm, 9.5 x 9.5 mm, 10 x 10 mm, 10.5 x 10.5 mm, 11 x 11 mm, 11.5 x 11.5 mm, 12 x 12 mm, 12.5 x 12.5 mm, 13 x 13 mm, 13.5 x 13.5 mm, 14 x 14 mm, 14.5 x 14.5 mm, 15 x 15 mm, 15.5 x 15.5 mm, 16 x 16 mm, 16.5 x 16.5 mm, 17 x 17 mm, 17.5 x 17.5 mm, 18 x 18 mm, 18.5 x 18.5 mm, 19 x 19 mm, 19.5 x 19.5 mm, 또는 20 x 20 mm의 챔버가 있는 영역을 포함한다. 일부 예에서, 어레이는 6.5 x 6.5 mm의 챔버가 있는 영역을 포함한다. 대안적으로, 어레이는 비대칭의 챔버가 있는 영역을 포함한다. 예를 들어, 어레이는 6.5 x 0.5 mm, 6.5 x 1 mm, 6.5 x 1.5 mm, 6.5 x 2 mm, 6.5 x 2.5 mm, 6.5 x 3 mm, 6.5 x 3.5 mm, 6.5 x 4 mm, 6.5 x 4.5 mm, 6.5 x 5 mm, 6.5 x 5.5 mm, 6.5 x 6 mm, 6.5 x 6.5 mm, 6.5 x 7 mm, 6.5 x 7.5 mm, 6.5 x 8 mm, 6.5 x 8.5 mm, 6.5 x 9 mm, 6.5 x 9.5 mm, 6.5 x 10 mm, 6.5 x 10.5 mm, 6.5 x 11 mm, 6.5 x 11.5 mm, 6.5 x 12 mm, 6.5 x 12.5 mm, 6.5 x 13 mm, 6.5 x 13.5 mm, 6.5 x 14 mm, 6.5 x 14.5 mm, 6.5 x 15 mm, 6.5 x 15.5 mm, 6.5 x 16 mm, 6.5 x 16.5 mm, 6.5 x 17 mm, 6.5 x 17.5 mm, 6.5 x 18 mm, 6.5 x 18.5 mm, 6.5 x 19 mm, 6.5 x 19.5 mm, 또는 6.5 x 20 mm의 챔버가 있는 영역을 포함한다.

[0069] 어레이는 적어도 약 1 마이크로미터 (㎛), 2 ㎛, 3 ㎛, 4 ㎛, 5 ㎛, 6 ㎛, 7 ㎛, 8 ㎛, 9 ㎛, 10 ㎛, 15 ㎛, 20 ㎛, 25 ㎛, 30 ㎛, 35 ㎛, 40 ㎛, 45 ㎛, 50 ㎛, 55 ㎛, 60 ㎛, 65 ㎛, 70 ㎛, 75 ㎛, 80 ㎛, 85 ㎛, 90 ㎛, 95 ㎛, 100 ㎛, 125 ㎛, 150 ㎛, 175 ㎛, 200 ㎛, 225 ㎛, 250 ㎛, 275 ㎛, 300 ㎛, 325 ㎛, 350 ㎛, 375 ㎛, 400 ㎛, 425 ㎛, 450 ㎛, 475 ㎛, 또는 500 ㎛ 스폿을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 어레이는 70 ㎛ 스폿을 포함한다.

[0070] 어레이는 적어도 약 1 ㎛, 2 ㎛, 3 ㎛, 4 ㎛, 5 ㎛, 6 ㎛, 7 ㎛, 8 ㎛, 9 ㎛, 10 ㎛, 15 ㎛, 20 ㎛, 25 ㎛, 30 ㎛, 35 ㎛, 40 ㎛, 45 ㎛, 50 ㎛, 55 ㎛, 60 ㎛, 65 ㎛, 70 ㎛, 75 ㎛, 80 ㎛, 85 ㎛, 90 ㎛, 95 ㎛, 100 ㎛, 125 ㎛, 150 ㎛, 175 ㎛, 200 ㎛, 225 ㎛, 250 ㎛, 275 ㎛, 300 ㎛, 325 ㎛, 350 ㎛, 375 ㎛, 400 ㎛, 425 ㎛, 450 ㎛, 475 ㎛, 500 ㎛, 525 ㎛, 550 ㎛, 575 ㎛, 600 ㎛, 625 ㎛, 650 ㎛, 675 ㎛, 700 ㎛, 725 ㎛, 750 ㎛,

775 ㎛, 800 ㎛, 825 ㎛, 850 ㎛, 875 ㎛, 900 ㎛, 925 ㎛, 950 ㎛, 975 ㎛, 1000 ㎛의 형상 피치를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 어레이는 161 ㎛의 형상 피치를 포함한다.

[0071] 어레이는 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 어레이는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개의 프로브를 포함한다. 대안적으로, 어레이는 적어도 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 또는 3000개의 프로브를 포함한다. 어레이는 적어도 약 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 또는 10000개의 프로브를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 어레이는 적어도 약 960개의 프로브를 포함한다. 대안적으로, 어레이는 적어도 약 2780개의 프로브를 포함한다. 프로브는 다수의 올리고뉴클레오티드 태그에 특이적일 수 있다. 프로브는 다수의 올리고뉴클레오티드 태그의 적어도 일부에 특이적일 수 있다. 프로브는 다수의 올리고뉴클레오티드 태그의 총수의 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% 또는 100%에 특이적일 수 있다. 대안적으로, 프로브는 다수의 올리고뉴클레오티드 태그의 상이한 올리고뉴클레오티드 태그의 총수의 적어도 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97% 또는 100%에 특이적이다. 프로브는 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 다른 예에서, 프로브는 비-특이적 프로브이다. 예를 들어, 프로브는 표지된-분자에 부착된 검출가능 표지에 특이적일 수 있다. 프로브는 스트렙타비딘일 수 있다.

[0072] 어레이는 인쇄된 어레이일 수 있다. 일부 예에서, 인쇄된 어레이는 기판에 부착된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 인쇄된 어레이는 에폭시 실란 기판에 부착된 5' 아민 변형된 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0073] 대안적으로, 어레이는 하나 이상의 웰을 갖는 슬라이드를 포함한다. 슬라이드는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100개의 웰을 포함할 수 있다. 대안적으로, 슬라이드는 적어도 약 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 또는 1000개의 웰을 포함한다. 일부 예에서, 슬라이드는 16개의 웰을 포함한다. 대안적으로, 슬라이드는 96개의 웰을 포함한다. 다른 예에서, 슬라이드는 적어도 약 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560, 640, 720, 800, 880, 또는 960개의 웰을 포함한다.

[0074] 일부 예에서, 고체 지지체는 애피메트릭스 (Affymetrix) 3K 태그 어레이, 어레이제트 (Arrayjet) 비-접촉 인쇄된 어레이, 또는 어플라이드 마이크로어레이 인크 (Applied Microarrays Inc: AMI) 어레이이다. 대안적으로, 지지체는 접촉 프린터, 충격식 프린터, 도트 프린터, 또는 핀 프린터를 포함한다.

[0075] 고체 지지체는 마이크로웰 내에서 자가-조립하는 비드의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, 고체 지지체는 일루미나의 비드어레이 기술을 포함한다. 대안적으로, 고체 지지체는 애보트 몰레큘라 (Abbott Molecular)의 비드 어레이 기술, 및 어플라이드 마이크로어레이의 플렉시플렉스 (FlexiPlex)TM 시스템을 포함한다.

[0076] 다른 경우에, 고체 지지체는 플레이트이다. 플레이트의 예는 MSD 멀티-어레이 플레이트, MSD 멀티-스폿 (Multi-Spot)® 플레이트, 마이크로플레이트, 프로테온(ProteOn) 마이크로플레이트, 알파플레이트 (AlphaPlate), 델피아 (DELFIA) 플레이트, 이소플레이트 (IsoPlate), 및 루마플레이트 (LumaPlate)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0077] 방법은 다수의 표지된 핵산 중 적어도 하나를 지지체에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 지지체는 다수의 비드를 포함할 수 있다. 지지체는 어레이를 포함할 수 있다. 지지체는 유리 슬라이드를 포함할 수 있다.

[0078] 유리 슬라이드는 하나 이상의 웰을 포함할 수 있다. 하나 이상의 웰은 유리 슬라이드에 식각될 수 있다. 하나 이상의 웰은 적어도 960개의 웰을 포함할 수 있다. 유리 슬라이드는 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프로브는 유리 슬라이드 상에 인쇄될 수 있다. 하나 이상의 웰은 하나 이상의 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 프로브는 하나 이상의 웰 내에 인쇄될 수 있다. 하나 이상의 프로브는 960개의 핵산을 포함할 수 있다.

[0079] 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 제1 샘플 태그, 다수의 제2 샘플 태그, 다수의 분자 식별 표지, 또는 이들의 임의의 조합물을 마이크로웰 플레이트 내에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 비드를 마이크로웰 플레이트 내에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 샘플을 마이크로웰 플레이트의 다수의 웰 내에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 샘플은 다수의 세포를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 샘플은 다수의 핵산을

포함할 수 있다. 방법은 하나 또는 그보다 더 적은 세포를 다수의 웰에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 다수의 세포는 마이크로웰 플레이트 내에서 용해될 수 있다. 방법은 마이크로웰 플레이트 내에서 cDNA를 합성하는 것을 추가로 포함할 수 있다. cDNA의 합성은 mRNA의 역전사를 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 소프트 리소그래피에 의해 PDMS 상에 제작되거나 실리콘 웨이퍼 상에 식각되거나, 유리 슬라이드 상에 식각된 마이크로웰 플레이트, 유리 슬라이드 상의 패터닝된 포토레지스트, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 마이크로웰은 미세모세관 플레이트 상의 홀을 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 유중수형 에멀젼을 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 적어도 1개 또는 그 초과의 웰을 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 적어도 약 6 웰, 12 웰, 48 웰, 96 웰, 384 웰, 960 웰 또는 1000 웰을 포함할 수 있다.

[0080] 방법 및 키트는 칩을 추가로 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 칩에 부착될 수 있다. 칩은 적어도 약 6 웰, 12 웰, 48 웰, 96 웰, 384 웰, 960 웰, 1000 웰, 2000 웰, 3000 웰, 4000 웰, 5000 웰, 6000 웰, 7000 웰, 8000 웰, 9000 웰, 10,000 웰, 20,000 웰, 30,000 웰, 40,000 웰, 50,000 웰, 60,000 웰, 70,000 웰, 80,000 웰, 90,000 웰, 100,000 웰, 200,000 웰, 500,000 웰, 또는 백만 웰을 포함할 수 있다. 웰은 적어도 약 300 제곱마이크로미터, 400 제곱마이크로미터, 500 제곱마이크로미터, 600 제곱마이크로미터, 700 제곱마이크로미터, 800 제곱마이크로미터, 900 제곱마이크로미터, 1000 제곱마이크로미터, 1100 제곱마이크로미터, 1200 제곱마이크로미터, 1300 제곱마이크로미터, 1400 제곱마이크로미터, 1500 제곱마이크로미터의 면적을 포함할 수 있다. 방법은 약 10,000 내지 30,000개의 샘플을 칩 상에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0081] ***관능화된 표면 및 올리고뉴클레오티드***

[0082] 비드는 관능화된 표면을 포함할 수 있다. 관능화된 표면은 관능기를 포함하는 고체 지지체의 표면을 나타낼 수 있다. 관능기는 또 다른 관능기와의 부착을 형성할 수 있는 기일 수 있다. 예를 들어, 관능기는 비오틴일 수 있고, 이것은 또 다른 관능기인 스트렙타비딘과의 부착을 형성할 수 있다. 예시적인 관능기는 알데히드, 케톤, 카르복시기, 아미노기, 비오틴, 스트렙타비딘, 핵산, 소분자 (예를 들어, 클릭 화학을 위한), 호모- 및 헤테로-2관능성 시약 (예를 들어, N-숙신이미딜(4-아이오도아세틸) 아미노벤조에이트 (SIAB), 디말레이미드, 디티오-비스-니트로벤조산 (DTNB), N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC) 및 6-히드라지노니코티미드 (HYNIC), 및 항체를 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 관능기는 카르복시기 (예를 들어, COOH)이다.

[0083] 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 핵산)는 관능화된 고체 지지체에 부착될 수 있다. 고체 지지체 또는 유사한 구조체 상의 고정된 올리고뉴클레오티드는 핵산 프로브로서 역할을 할 수 있고, 복잡한 생물학적 샘플 내에서 특이적 표적 핵산이 검출될 수 있는 혼성화 검정을 수행할 수 있다.

[0084] 고체 지지체 (예를 들어, 비드)는 올리고뉴클레오티드의 고정화를 위해 관능화될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 고체 지지체 및 올리고뉴클레오티드 사이에 형성된 공유 아미드 결합을 통해 고체 지지체에 접합될 수 있다.

[0085] 지지체는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 약 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000 또는 10000000, 100000000, 500000000, 1000000000개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 약 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000 또는 10000000, 100000000, 500000000, 1000000000개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 1백만 개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 1천만 개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 2천5백만개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 5천만개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 1억개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 2억5천만개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 5억개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 7억5천만개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150억개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 10억개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다. 지지체는 적어도 50억개의 올리고뉴클레오티드에 접합될 수 있다.

[0086] 올리고뉴클레오티드는 링커를 통해 지지체 (예를 들어, 비드, 중합체, 겔)에 부착될 수 있다. 접합은 공유 또는 비-공유 부착을 포함할 수 있다. 접합은 비드 및 핵산 사이에 가변 스페이서 (spacer)를 도입할 수 있다.

지지체 및 올리고뉴클레오티드 사이의 링커 (예를 들어, 광절단가능한 연결기, 산 불안정성 링커, 열 감수성 링커, 및 효소에 의해 절단가능한 링커)는 절단가능할 수 있다.

[0087] 분자를 지지체에 접합시키기 위해 사용하기 위한 가교결합제는 고체 지지체의 표면 상에 존재하는 관능기 및 분자 내에 존재하는 관능기와 반응할 수 있는 활성제를 포함할 수 있다. 그러한 반응을 할 수 있는 시약은 알데히드, 케톤, 카르복시기, 아미노기, 비오틴, 스트렙타비딘, 핵산, 소분자 (예를 들어, 클릭 화학을 위한), 호모- 및 헤테로-2관능성 시약 (예를 들어, N-숙신이미딜(4-아이오도아세틸) 아미노벤조에이트 (SIAB), 디말레이미드, 디티오-비스-니트로벤조산 (DTNB), N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트 (SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC) 및 6-히드라지노니코티미드 (HYNIC)를 포함할 수 있다.

[0088] 비드는 카르복시 관능기를 사용하여 관능화될 수 있고, 올리고뉴클레오티드는 아미노 관능기를 사용하여 관능화될 수 있다.

[0089] 지지체는 평탄할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 지지체는 디벳 (divet), 융기 (ridge), 또는 웰을 포함할 수 있다. 지지체는 마이크로웰 어레이를 포함할 수 있다. 마이크로웰 어레이는 올리고뉴클레오티드의 부착을 용이하게 하는 관능기를 사용하여 관능화될 수 있다. 마이크로웰 어레이 상의 관능기는 마이크로웰 어레이 상의 상이한 위치에 대해 상이할 수 있다. 마이크로웰 어레이 상의 관능기는 마이크로웰 어레이의 모든 영역에 대해 동일할 수 있다.

[0090] **검정 시스템 성분**

[0091] ***마이크로웰 어레이***

[0092] 상기 설명된 바와 같이, 마이크로웰 어레이는 한정된 부피의 작은 반응 챔버 내에 단일 세포 및 비드 (세포당 하나의 비드)를 포획하기 위해 사용된다. 각각의 비드는 세포의 용해 시에 방출되는 세포 mRNA 분자의 전체 상보체의 확률적 표지 및 디지털 계수에서 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드 프로브의 라이브러리를 포함한다. 본원의 하나의 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 검정 시스템의 소모성 성분이다. 다른 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 재사용가능할 수 있다. 두 경우에 모두, 이들은 검정을 수동으로 수행하는데 사용하기 위한 독립형 (stand-alone) 기기로서 사용되도록 구성될 수 있거나, 검정 절차의 완전 또는 부분적 자동화를 제공하는 기구의 제거가능한 또는 고정된 성분을 포함하도록 구성될 수 있다.

[0093] 어레이의 마이크로웰은 각각의 웰 내에 단일 세포 및 비드를 포획하는 효율을 최적화하도록 선택되는 다양한 형상 및 크기로 제작될 수 있다. 적절한 웰 기하학은 원통형, 원추형, 반구형, 직사각형, 또는 다면체 (예를 들어, 몇 개의 평면을 포함한 3차원 기하학, 예를 들어, 육각 기둥, 팔각 기둥, 역전된 삼각 피라미드, 역전된 정사각 피라미드, 역전된 오각 피라미드, 역전된 육각 피라미드, 또는 역전된 끝이 잘린 피라미드)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 마이크로웰은 2가지 이상의 이들 기하학을 조합한 형상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 마이크로웰은 부분적으로 원통형일 수 있고, 나머지는 역전된 원추형 형상을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰은 하나의 직경이 다른 것보다 더 큰 2개의 나란한 원통을 포함할 수 있고, 이들은 원통의 전체 길이 (깊이)로 연장하는 수직 채널 (즉, 원통 축에 평행한)에 의해 연결된다. 일반적으로, 각각의 마이크로웰의 열린 단부 (또는 입구)는 마이크로웰 어레이의 상부 표면에 위치할 것이지만, 일부 실시양태에서, 개구부는 어레이의 하부 표면에 위치할 수 있다. 일반적으로, 마이크로웰의 닫힌 단부 (또는 저변부)는 편평할 것이지만, 곡선 표면 (예를 들어, 볼록 또는 오목한)이 또한 가능하다. 일반적으로, 마이크로웰의 형상 (및 크기)은 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 유형을 기초로 하여 결정될 것이다.

[0094] 마이크로웰 치수는 웰의 직경과 웰의 깊이의 면에서 특성화될 수 있다. 본원에서 사용될 때, 마이크로웰의 직경은 마이크로웰 기하학의 평면 단면 내에 새겨질 수 있는 최대원을 나타낸다. 본원의 한 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 약 0.1배 내지 약 5배 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 마이크로웰 직경은 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 적어도 0.1배, 적어도 0.5배, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 또는 적어도 5배이다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰 직경은 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 최대 5배, 최대 4배, 최대 3배, 최대 2배, 최대 1배, 최대 0.5배, 또는 최대 0.1배이다. 한 실시양태에서, 마이크로웰 직경은 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 약 2.5배이다. 통상의 기술자는 마이크로웰 직경이 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 약 0.2배 내지 약 3.5배) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다. 대안적으로, 마이크로웰의 직경은 절대 치수의 면에서 명시될 수 있

다. 본원의 한 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 약 5 내지 약 50 마이크로미터 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 마이크로웰 직경은 적어도 5 마이크로미터, 적어도 10 마이크로미터, 적어도 15 마이크로미터, 적어도 20 마이크로미터, 적어도 25 마이크로미터, 적어도 30 마이크로미터, 적어도 35 마이크로미터, 적어도 40 마이크로미터, 적어도 45 마이크로미터, 또는 적어도 50 마이크로미터이다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰 직경은 최대 50 마이크로미터, 최대 45 마이크로미터, 최대 40 마이크로미터, 최대 35 마이크로미터, 최대 30 마이크로미터, 최대 25 마이크로미터, 최대 20 마이크로미터, 최대 15 마이크로미터, 최대 10 마이크로미터, 또는 최대 5 마이크로미터이다. 한 실시양태에서, 마이크로웰 직경은 약 30 마이크로미터이다. 통상의 기술자는 마이크로웰 직경이 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 28 마이크로미터 내지 약 34 마이크로미터) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0095] 마이크로웰 깊이는 또한 웰 내에 담긴 검정 완충제 및 다른 시약의 효율적인 교환을 제공하면서 세포 및 비드 포획 효율을 최적화하도록 선택된다. 본원의 한 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 약 0.1 내지 약 5배 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 마이크로웰 깊이는 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 적어도 0.1배, 적어도 0.5배, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 또는 적어도 5배이다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰 깊이는 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 최대 5배, 최대 4배, 최대 3배, 최대 2배, 최대 1배, 최대 0.5배, 또는 최대 0.1배이다. 한 실시양태에서, 마이크로웰 깊이는 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 약 2.5배이다. 통상의 기술자는 마이크로웰 깊이가 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 마이크로웰 내에 포획할 세포 및/또는 비드의 직경의 약 0.2배 내지 약 3.5배) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다. 대안적으로, 마이크로웰의 직경은 절대 치수의 면에서 명시될 수 있다. 본원의 한 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 약 10 내지 약 60 마이크로미터 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 마이크로웰 깊이는 적어도 10 마이크로미터, 적어도 20 마이크로미터, 적어도 25 마이크로미터, 적어도 30 마이크로미터, 적어도 35 마이크로미터, 적어도 40 마이크로미터, 적어도 50 마이크로미터, 또는 적어도 60 마이크로미터이다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰 깊이는 최대 60 마이크로미터, 최대 50 마이크로미터, 최대 40 마이크로미터, 최대 35 마이크로미터, 최대 30 마이크로미터, 최대 25 마이크로미터, 최대 20 마이크로미터, 또는 최대 10 마이크로미터이다. 한 실시양태에서, 마이크로웰 깊이는 약 30 마이크로미터이다. 통상의 기술자는 마이크로웰 깊이가 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 24 마이크로미터 내지 약 36 마이크로미터) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0096] 마이크로웰 어레이의 웰은 1차원, 2차원, 또는 3차원 어레이로 배열되고, 여기서 3차원 어레이는 예를 들어, 일련의 2개 이상의 2차원 어레이를 쌓음으로써 (즉, 마이크로웰 어레이를 포함하는 2개 이상의 기판을 쌓음으로써) 달성할 수 있다. 패턴 및 웰들 사이의 간격은 각각의 웰 내에 단일 세포 및 비드를 포획하는 효율을 최적화하도록, 및 어레이의 단위 면적당 웰의 수를 최대화하도록 선택된다. 웰은 다양한 무작위 또는 비-무작위 패턴에 따라 분포될 수 있고, 예를 들어, 이들은 어레이 기판의 표면을 가로질러 전적으로 무작위로 분포될 수 있거나, 이들은 정사각형 그리드, 직사각형 그리드, 또는 육각형 그리드로 배열될 수 있다. 본원의 한 실시양태에서, 웰들 사이의 중심-대-중심 거리 (또는 간격)은 약 15 마이크로미터 내지 약 75 마이크로미터 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 웰들 사이의 간격은 적어도 15 마이크로미터, 적어도 20 마이크로미터, 적어도 25 마이크로미터, 적어도 30 마이크로미터, 적어도 35 마이크로미터, 적어도 40 마이크로미터, 적어도 45 마이크로미터, 적어도 50 마이크로미터, 적어도 55 마이크로미터, 적어도 60 마이크로미터, 적어도 65 마이크로미터, 적어도 70 마이크로미터, 또는 적어도 75 마이크로미터이다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰 간격은 최대 75 마이크로미터, 최대 70 마이크로미터, 최대 65 마이크로미터, 최대 60 마이크로미터, 최대 55 마이크로미터, 최대 50 마이크로미터, 최대 45 마이크로미터, 최대 40 마이크로미터, 최대 35 마이크로미터, 최대 30 마이크로미터, 최대 25 마이크로미터, 최대 20 마이크로미터, 또는 최대 15 마이크로미터이다. 한 실시양태에서, 마이크로웰 간격은 약 55 마이크로미터이다. 통상의 기술자는 마이크로웰 깊이가 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 18 마이크로미터 내지 약 72 마이크로미터) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0097] 마이크로웰 어레이는 세포 및 비드를 웰 내로 인도하는 것을 돕고/돕거나 웰들 사이의 표면 상에 침강하는 것을 방지하도록 설계된 마이크로웰들 사이에 표면 특징부를 포함할 수 있다. 적합한 표면 특징부의 예는 웰을 둘러싸고/싸거나 웰들 사이의 표면에 걸쳐있는 반구형, 융기형, 또는 피크형 표면 특징부를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0098] 마이크로웰 어레이 내의 웰의 총수는 웰의 패턴 및 간격과 어레이의 전체 치수에 의해 결정된다. 본원의 한 실

시양태에서, 어레이 내의 마이크로웰의 수는 약 96 내지 약 5,000,000개 또는 그 초과의 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 어레이 내의 마이크로웰의 수는 적어도 96, 적어도 384, 적어도 1,536, 적어도 5,000, 적어도 10,000, 적어도 25,000, 적어도 50,000, 적어도 75,000, 적어도 100,000, 적어도 500,000, 적어도 1,000,000, 또는 적어도 5,000,000개이다. 또 다른 실시양태에서, 어레이 내의 마이크로웰의 수는 최대 5,000,000, 최대 1,000,000, 최대 75,000, 최대 50,000, 최대 25,000, 최대 10,000, 최대 5,000, 최대 1,536, 최대 384, 또는 최대 96 웰이다. 한 실시양태에서, 어레이 내의 마이크로웰의 수는 약 96개이다. 또 다른 실시양태에서, 마이크로웰의 수는 약 150,000개이다. 통상의 기술자는 어레이 내의 마이크로웰의 수가 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 100 내지 325,000개) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0099] 마이크로웰 어레이는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 많은 제작 기술을 이용하여 제작할 수 있다. 사용할 수 있는 제작 방법의 예는 벌크 미세기계가공 기술, 예컨대 포토리소그래피 및 습식 화학적 식각, 플라즈마 식각, 또는 깊은 반응성 이온 식각; 마이크로-몰딩 및 마이크로-엠보싱; 레이저 미세기계가공; 경화성 물질을 사용하는 3D 인쇄 또는 다른 직접 쓰기 제작 공정; 및 유사한 기술을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0100] 마이크로웰 어레이는 통상의 기술자에게 공지된 임의의 많은 기판 물질로부터 제작될 수 있고, 여기서 물질의 선택은 대개 제작 기술의 선택에 의존하고, 그 반대일 수도 있다. 적합한 물질의 예는 규소, 용융-실리카, 유리, 중합체 (예를 들어, 아가로스, 젤라틴, 히드로겔, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET) 및 에폭시 수지), 금속 또는 금속 필름 (예를 들어, 알루미늄, 스테인레스 강철, 구리, 니켈, 크롬 및 티탄) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 대개, (세포 및 다른 생물학적 물질의 습윤성을 향상시키고 비-특이적 결합을 최소화하기 위해) 마이크로웰 어레이의 제작을 위해 친수성 물질이 바람직하지만, (예를 들어, 산호 플라즈마 처리, 또는 폴리에틸렌 옥사이드 표면층의 그래프팅에 의해) 처리하거나 코팅할 수 있는 소수성 물질을 또한 사용할 수 있다. 마이크로웰 어레이의 제작을 위한 다공성 친수성 물질의 사용은 기기 내에 포획된 기포의 모세관 흡수/배출을 용이하게 하기 위해 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 광학 접착제를 사용하여 제작된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 플라즈마 또는 코로나 처리 물질을 사용하여 제작된다. 플라즈마 또는 코로나 처리 물질의 사용은 물질을 친수성으로 만들 수 있다. 몇몇의 실시양태에서, 플라즈마 또는 코로나 처리 물질, 예컨대 친수성 물질은 비-처리 물질보다 더 안정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 단일 물질로부터 제작된다. 다른 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 함께 결합되거나 기계적으로 연결된 2가지 이상의 상이한 물질을 포함할 수 있다.

[0101] 마이크로웰 어레이 표면의 특성을 변경시키기 위해 다양한 표면 처리 및 표면 변형 기술이 사용될 수 있다. 그 예는 소수성 물질 표면을 보다 친수성으로 만들기 위한 산소 플라즈마 처리, 유리 및 규소 표면을 평탄화하기 위한 (또는 거칠게 하기 위한) 습식 또는 건식 식각 기술의 사용, 이들을 보다 친수성으로 만들고 생물분자 및 세포의 비-특이적 흡착을 덜 받도록 만드는 기판 표면에의 폴리에틸렌 옥사이드 또는 다른 중합체 층의 흡착 및/또는 그래프팅, 화학적 반응성 관능기를 달리 비활성 규소 및 유리 표면에 그래프팅하기 위한 실란 반응의 이용 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 어레이 구조 내의 특이적 위치에서 화학적 반응성 관능기를 선택적으로 활성화시키기 위해 광탈보호 기술을 이용할 수 있고, 예를 들어, 마이크로웰의 내벽 상에 화학적 반응성 관능기, 예컨대 1급 아민 또는 카르복실기의 선택적 첨가 또는 활성화가 올리고뉴클레오티드 프로브, 펩티드, 단백질, 또는 다른 생물분자를 마이크로웰의 벽에 공유 연결하기 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이용되는 표면 처리 또는 표면 변형의 선택은 목적하는 표면 특성의 유형 및 마이크로웰 어레이가 제조되는 물질의 유형 둘 모두에 따라 결정될 것이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 인접한 마이크로웰 사이에서 표적 핵산의 교차 혼성화를 방지하기 위해 예를 들어, 세포 용해 단계 동안 마이크로웰의 개구부를 밀봉하는 것이 유리할 수 있다. 마이크로웰은 캡, 예컨대 고체 지지체 또는 비드를 사용하여 밀봉할 수 있고, 여기서 비드의 직경은 마이크로웰의 직경보다 더 크다. 예를 들어, 캡으로서 사용된 비드는 마이크로웰의 직경보다 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 더 크다. 대안적으로, 캡은 마이크로웰의 직경보다 최대 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 더 크다.

[0103] 캡으로서 사용된 비드는 가교결합된 덱스트란 비드 (예를 들어, 세파덱스)를 포함할 수 있다. 가교결합된 덱스트란은 약 10 마이크로미터 내지 약 80 마이크로미터 범위일 수 있다. 비드 캡의 가교결합된 덱스트란은 20 마이크로미터 내지 약 50 마이크로미터일 수 있다. 캡은 예를 들어, 무기 나노포어 막 (예를 들어, 산화알루미늄), 투석 막, 유리 슬라이드, 커버슬립, 및/또는 친수성 플라스틱 필름 (예를 들어, 용해 완충제로

수화된 아가로스의 박막으로 코팅된 필름)을 포함할 수 있다.

[0104] 일부 실시양태에서, 캡은 거대분자 (예를 들어, 핵산)가 웰 외부로 이동하는 것을 방지하면서 완충제가 마이크로웰의 내부로 및 외부로 통과하도록 허용할 수 있다. 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 이상의 뉴클레오티드의 거대분자는 캡에 의해 마이크로웰의 내부로 또는 외부로 이동하는 것이 차단될 수 있다. 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 이상의 뉴클레오티드의 거대분자는 캡에 의해 마이크로웰의 내부로 또는 외부로 이동하는 것이 차단될 수 있다.

[0105] 일부 실시양태에서, 밀봉된 마이크로웰 어레이는 마이크로웰의 상단에 단일층의 비드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 밀봉된 마이크로웰 어레이는 마이크로웰의 상단에 다수층의 비드를 포함할 수 있다. 밀봉된 마이크로웰 어레이는 약 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개 또는 그 초과의 층의 비드를 포함할 수 있다.

[0106] *기계적 고정기*

[0107] 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 검정을 수동으로 수행할 때, 반응 챔버를 생성하고 어레이 상으로 세포 현탁액 및 검정 시약의 피펫팅 또는 분배를 용이하게 하기 위해 마이크로웰 어레이를 기계적 고정기 내에 탑재하는 것이 편리하다 (도 69 및 70). 도 69에 예시된 예에서, 고정기는 1 ㎜ 두께 기판 상에 제작된 마이크로웰 어레이를 수용하고, 검정 시약을 16 ㎜ 폭 x 35 ㎜ 길이 x 약 4 ㎜ 깊이의 반응 챔버에 한정시켜 검정을 수행하기 위해 800 마이크로리터 내지 1 밀리리터의 세포 현탁액 및 비드 현탁액 (비드-기반 올리고뉴클레오티드 표지를 포함하는)의 사용을 가능하게 하기 위해 실리콘 가스켓의 형태로 기계적 지지체를 제공한다.

[0108] 고정기는 경질의 가공된 상단부 및 저변부 플레이트 (예를 들어, 알루미늄), 및 챔버 또는 웰의 벽을 형성하기 위한 압축성 (예를 들어, 실리콘, 폴리디메틸실록산) 가스켓으로 이루어진다. 설계 특징부는 (i) (마이크로웰 어레이를 상이한 배율로 관찰하기 위해) 현미경 대물렌즈를 필요한 대로 위치의 안팎으로 회전시키기 위한 모따기된 구멍 모서리 및 클리어런스, (ii) 마이크로웰 어레이 기판과 새지 않는 밀봉의 균일한, 반복가능한 형성을 보장하기 위한 실리콘 가스켓의 제어된 압축, (iii) 편리한 작업을 위한 포획 패스너, (iv) 어레이의 고정 및 반복가능한 배치를 위한 자립잡기 클램프 메카니즘, (v) 세정 단계 동안 어레이의 제거를 위한 편리한 분해를 포함한다.

[0109] 상단부 및 저변부 플레이트는 다양한 물질 (예를 들어, 알루미늄, 양극 알루미늄, 스테인레스 강철, 테플론, 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 또는 유사한 경질 중합체 물질)을 사용하여 임의의 다양한 기술 (예를 들어, 통상의 기계가공, CNC 기계가공, 주입 몰딩, 3D 인쇄 등)을 이용하여 제작할 수 있다.

[0110] 실리콘 (폴리디메틸실록산; PDMS) 가스켓은 대조군 및 실험 (또는 반복 실험, 또는 다수의 독립 실험)을 병행으로 실행하기 위해 다수의 챔버 (도 71 참조)를 생성하도록 구성될 수 있다. 가스켓은 수직 가스켓 벽이 우수한 방출 특징을 제공하도록 빼기 각을 포함하는 테플론 주형을 사용하여 PDMS 또는 유사한 엘라스토머 물질로부터 몰딩된다. 대안적으로, 주형은 알루미늄 또는 다른 물질 (예를 들어, 블랙 델린 (black delrin), 폴리에테르이미드 (울템 (ultem)) 등)로부터 가공되고, 우수한 방출 특징을 제공하기 위해 필요한 경우에 테플론으로 코팅될 수 있다. 가스켓 주형 설계는 역전되고, 즉, 따라서 몰딩된 부품의 상단 표면 (즉, 주조하는 동안 주형을 덮도록 사용된 유리 슬라이드 또는 실리콘 웨이퍼와의 계면에서의 표면)이 사용하는 동안 마이크로웰 어레이 기판과 밀봉을 생성하기 위한 표면이 되어, (어레이 기판과 새지 않는 밀봉을 보장하기 위해) 평탄한 가스켓 표면을 생성하는데 있어서 주형 표면 거칠기 및 표면 오염의 잠재적인 문제를 피하고, 또한 주조하는 동안 기부로서 마이크로웰 어레이 기판을 사용함으로써 기판 물질의 유연한 선택 및 사전-조립의 선택권을 제공한다. 가스켓 주형 설계는 또한 웰 영역의 경계에서 포스 집속 융기를 포함할 수 있고, 즉, 주형 내의 중심 메사(들) (웰(들)을 형성하는)은 웰(들)의 둘레가 되는 위치에서 솟은 융기를 갖고, 따라서, 주형의 상단에 배치된 덮개는 충진 후에 정확한 위치에서 작은 접촉 면적 상에 놓이고, 여기서, 우수한 모서리 프로파일은 사용하는 동안 가스켓 및 기판 사이에 새지 않는 밀봉을 형성하기 위해 중요하다.

[0111] **기구 시스템**

[0112] 본원은 또한 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 검정의 자동화를 지지하기 위한 기구 시스템 및 소모재를 포함한다. 그러한 시스템은 유동 셀과 통합된 마이크로웰 어레이뿐만 아니라, 제어 및 분석 기능성, 예컨대 (i) 유체역학 제어, (ii) 온도 제어, (iii) 세포 및/또는 비드 분포 및 수집 메카니즘, (iv) 세포 용해 메카니즘, (v) 영상화 능력, 및 (vi) 영상 처리을 제공하기 위한 필요한 계기를 포함하는 소모성 카트리지를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템에 대한 입력은 세포 샘플을 포함하고, 출력은 샘플 태그, 세포 태그, 및

분자 인덱싱 태그를 포함하는 부착된 올리고뉴클레오티드를 갖는 비드를 포함하는 비드 현탁액을 포함한다. 다른 실시양태에서, 시스템은 추가의 기능성, 예컨대 PCR 증폭을 수행하기 위한 열 순환 능력을 포함할 수 있고, 이러한 경우에 시스템에 대한 입력은 세포 샘플을 포함하고, 출력은 원래 비드에 부착된 샘플 태그, 세포 태그, 및 분자 인덱싱 태그를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 증폭으로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 라이브러리를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 시스템은 또한 올리고뉴클레오티드 증폭을 필요로 하거나 필요로 하지 않으면서 서열분석 능력을 포함할 수 있고, 이러한 경우에 시스템에 대한 입력은 세포 샘플이고, 출력은 관심있는 표적 서열와 회합된 모든 샘플 태그, 세포 태그, 및 분자 인덱싱 태그의 서열을 추가로 포함하는 데이타세트를 포함한다.

[0113] ***마이크로웰 어레이 유동 셀***

[0114] 자동화 검정 시스템의 많은 실시양태에서, 마이크로웰 어레이 기판은 나머지 유체 취급 시스템과 편리한 접속을 제공하고, 마이크로웰 어레이에 전달되는 유체, 예를 들어, 세포 및 비드 현탁액, 용해 완충제, 세정 완충제 등의 교화를 용이하게 하는 유동 셀 내에 포장될 것이다. 설계 특징부는 (i) 세포 샘플, 비드 현탁액, 및/또는 다른 검정 시약을 도입하기 위한 하나 이상의 유입 포트, (ii) 역소용돌이 또는 데드 존을 최소화하면서 균일한 충진 및 효율적인 유체-교환을 제공하도록 설계된 하나 이상의 마이크로웰 어레이 챔버, 및 (iii) 샘플 수집 지점 및/또는 폐기물 저장소로 유체의 전달을 위한 하나 이상의 유출 포트를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유동 셀의 설계는 하나 이상의 세포 샘플이 병행으로 처리될 수 있도록 다수의 마이크로웰 어레이와 접속하는 다수의 마이크로어레이 챔버를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유동 셀의 설계는, 예를 들어, "유동 확산기"로서 챔버 유입구 가까이 및 마이크로웰 어레이의 상류에 위치한 다공성 장벽을 사용함으로써, 또는 각각의 어레이 챔버를 집합적으로 동일한 전체 어레이 영역을 덮지만 나누어진 유입구 유체 흐름은 그를 통해 병행으로 유동하는 몇몇 하위구역들로 나눔으로써, 마이크로웰에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하기 위해 어레이 챔버의 폭을 가로질러 균일한 유속 프로파일, 즉, "플러그 유동"을 생성하기 위한 특징부를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 하나 초과의 마이크로웰 어레이 기판을 에워싸거나 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 통합된 마이크로웰 어레이/유동 셀 어셈블리는 시스템의 고정된 성분을 구성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이/유동 셀 어셈블리는 기구로부터 제거가능할 수 있다.

[0115] 일반적으로, 유동 셀 설계에서 유체 채널 및 어레이 챔버(들)의 치수는 (i) 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 균일한 전달을 제공하고, (ii) 샘플 및 시약 소비를 최소화하도록 최적화될 것이다. 일부 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 50 마이크로미터 내지 20 ㎜일 것이다. 다른 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 적어도 50 마이크로미터, 적어도 100 마이크로미터, 적어도 200 마이크로미터, 적어도 300 마이크로미터, 적어도 400 마이크로미터, 적어도 500 마이크로미터, 적어도 750 마이크로미터, 적어도 1 ㎜, 적어도 2.5 ㎜, 적어도 5 ㎜, 적어도 10 ㎜, 또는 적어도 20 ㎜일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 최대 20 ㎜, 최대 10 ㎜, 최대 5 ㎜, 최대 2.5 ㎜, 최대 1 ㎜, 최대 750 마이크로미터, 최대 500 마이크로미터, 최대 400 마이크로미터, 최대 300 마이크로미터, 최대 200 마이크로미터, 최대 100 마이크로미터, 또는 최대 50 마이크로미터일 수 있다. 한 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 약 2 ㎜이다. 통상의 기술자는 유체 채널의 폭이 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 250 마이크로미터 내지 약 3 ㎜) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0116] 일부 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 50 마이크로미터 내지 10 ㎜일 것이다. 다른 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 적어도 50 마이크로미터, 적어도 100 마이크로미터, 적어도 200 마이크로미터, 적어도 300 마이크로미터, 적어도 400 마이크로미터, 적어도 500 마이크로미터, 적어도 750 마이크로미터, 적어도 1 ㎜, 적어도 1.25 ㎜, 적어도 1.5 ㎜, 적어도 1.75 ㎜, 적어도 2 ㎜, 적어도 2.5 ㎜, 적어도 3 ㎜, 적어도 3.5 ㎜, 적어도 4 ㎜, 적어도 4.5 ㎜, 적어도 5 ㎜, 적어도 5.5 ㎜, 적어도 6 ㎜, 적어도 6.5 ㎜, 적어도 7 ㎜, 적어도 7.5 ㎜, 적어도 8 ㎜, 적어도 8.5 ㎜, 적어도 9 ㎜, 또는 적어도 9.5 ㎜일 수 있다. 다른 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 최대 10 ㎜, 최대 9.5 ㎜, 최대 9 ㎜, 최대 8.5 ㎜, 최대 8 ㎜, 최대 7.5 ㎜, 최대 7 ㎜, 최대 6.5 ㎜, 최대 6 ㎜, 최대 5.5 ㎜, 최대 5 ㎜, 최대 4.5 ㎜, 최대 4 ㎜, 최대 3.5 ㎜, 최대 3 ㎜, 최대 2 ㎜, 최대 1.75 ㎜, 최대 1.5 ㎜, 최대 1.25 ㎜, 최대 1 ㎜, 최대 750 마이크로미터, 최대 500 마이크로미터, 최대 400 마이크로미터, 최대 300 마이크로미터, 최대 200 마이크로미터, 최대 100 마이크로미터, 또는 최대 50 마이크로미터일 수 있다. 한 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 약 1 ㎜이다. 통상의 기술자는 유체 채널의 깊이가 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 800 마이크로미터 내지 약 1 ㎜) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0117] 유동 셀은 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술 및 물질을 사용하여 제작될 수 있다. 일반적으로, 유동 셀은

별개의 부품으로서 제작되고, 후속적으로 마이크로웰 어레이 기판에 기계적으로 꽉 죄이거나 영구적으로 접착될 것이다. 적합한 제작 기술의 예는 통상의 기계가공, CNC 기계가공, 주입 몰딩, 3D 인쇄, 하나 이상의 층의 레이저 또는 다이-컷 (die-cut) 중합체 필름의 정렬 및 라미네이션, 또는 임의의 많은 미세제작 기술, 예컨대 포토리소그래피 및 습식 화학적 식각, 건식 식각, 깊은 반응성 이온 식각, 또는 레이저 미세기계가공을 포함한다. 일단 유동 셀 부품이 제작된 후, 예를 들어, 이를 마이크로웰 어레이 기판에 대해 꽉 죄임으로써 (가스켓을 사용하거나 사용하지 않고) 마이크로웰 어레이 기판에 기계적으로 부착할 수 있거나, 통상의 기술자에게 공지된 임의의 다양한 기술 (사용된 물질의 선택에 따라)을 이용하여, 예를 들어, 양극 접착, 열 접착, 초음파 용접, 또는 임의의 다양한 접착제 또는 접착 필름, 예컨대 에폭시계, 아크릴계, 실리콘계, UV 경화성, 폴리우레탄계, 또는 시아노아크릴레이트계 접착제의 사용을 통해 마이크로웰 어레이 기판에 직접 접착시킬 수 있다.

[0118] 유동 셀은 통상의 기술자에게 공지된 다양한 물질을 사용하여 제작될 수 있다. 적합한 물질의 예는 규소, 용융-실리카, 유리, 임의의 다양한 중합체, 예를 들어, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET), 에폭시 수지, 금속 (예를 들어, 알루미늄, 스테인레스 강철, 구리, 니켈, 크롬, 및 티탄), 또는 상기 물질의 조합을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0119] ***카트리지***

[0120] 자동화 검정 시스템의 많은 실시양태에서, 마이크로웰 어레이 (부착된 유동 셀을 갖거나 갖지 않는)는 기구 시스템과 접속하고, 추가의 기능성을 포함할 수 있는 소모성 카트리지 내에 포장될 것이다. 카트리지의 설계 특징부는 다음을 포함할 수 있다: (i) 기구와 유체 연결을 생성하고/하거나 세포 샘플, 비드 현탁액, 및/또는 다른 검정 시약을 카트리지 내로 수동으로 도입하기 위한 하나 이상의 유입 포트, (ii) 과도충전 및/또는 역류를 피하기 위해 세포 샘플 및 비드 현탁액의 자가-계량을 위한 하나 이상의 우회 채널, (iii) 하나 이상의 통합된 마이크로웰 어레이/유동 셀 어셈블리, 또는 그 내부에 마이크로어레이 기판(들)이 배치되는 하나 이상의 챔버, (iv) 기기를 통해 유체 유동을 제어하기 위한 통합된 축소형 펌프 또는 다른 유체 작동 메카니즘, (v) 미리 로딩된 시약을 구획화하고/하거나 기기를 통한 유체 유동을 제어하기 위한 통합된 축소형 밸브, (vi) 포획된 공기를 위한 탈출 경로를 제공하는 배기구, (vii) 하나 이상의 샘플 및 시약 폐기물 저장소, (viii) 기구와 유체 연결을 생성하고/하거나 처리된 샘플 수집 지점을 제공하기 위한 하나 이상의 유출 포트, (ix) 기구 시스템에 관하여 제거가능한 소모성 카트리지를 재현가능하게 배치하고, 외부 자석이 마이크로웰 어레이와 근접하게 놓일 수 있도록 접근부를 제공하기 위한 기계적 인터페이스 특징부, (x) 기구 시스템과 우수한 열 접촉을 제공하기 위한 통합된 온도 제어 성분 및/또는 열 인터페이스, 및 (xi) 마이크로웰 어레이의 광학 질의에 사용하기 위한 광학 인터페이스 특징부, 예를 들어, 투명한 창. 일부 실시양태에서, 카트리지는 하나 초과의 샘플을 병행으로 처리하기 위해 설계된다. 기기의 일부 실시양태에서, 카트리지는 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 접속하기 위해 적합한 하나 이상의 제거가능한 샘플 수집 챔버(들)을 추가로 포함할 수 있다. 기기의 일부 실시양태에서, 카트리지 자체는 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 접속하기 위해 적합하다.

[0121] 기기의 일부 실시양태에서, 카트리지는 마이크로웰 사이에 교차-오염을 최소화하기 위해 큰 분자의 확산을 방지하는 (또는 경로 길이 및 확산 시간을 증가시키는), 물리적 및/또는 화학적 장벽을 생성하도록 설계된 성분을 추가로 포함할 수 있다. 그러한 장벽의 예는 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 전달을 위해 사용된 사형 채널의 패턴, 용해 또는 인큐베이션 단계 동안 마이크로웰 어레이 기판의 표면과 접촉하도록 눌리는 철회가능한 압반 또는 변형가능한 막, 마이크로웰의 개구부를 차단하기 위해 보다 큰 비드, 예를 들어, 앞서 설명된 바와 같은 세파덱스 비드의 사용, 또는 어레이 내의 각각의 마이크로웰을 효과적으로 분리하고 구획화하기 위해, 용해 또는 인큐베이션 단계 동안 카트리지 내에서 저장소로부터 비혼화성의 소수성 유체의 방출을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 임의의 또는 모든 이들 장벽, 또는 그러한 장벽이 없는 실시양태는 예를 들어, 글리세롤 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 용액 성분의 첨가를 통해, 마이크로웰 내 및 마이크로웰에 인접한 용액의 점도를 상승시키는 것과 조합될 수 있다.

[0122] 일반적으로, 카트리지 설계에서 유체 채널 및 어레이 챔버(들)의 치수는 (i) 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 균일한 전달을 제공하고, (ii) 샘플 및 시약 소비를 최소화하기 위해 최적화될 것이다. 일부 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 50 마이크로미터 내지 20 ㎜일 것이다. 다른 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 적어도 50 마이크로미터, 적어도 100 마이크로미터, 적어도 200 마이크로미터, 적어도 300 마이크로미터, 적어도 400 마이크로미터, 적어도 500 마이크로미터, 적어도 750 마이크로미터, 적어도 1 ㎜, 적어도 2.5 ㎜, 적어도 5 ㎜, 적어도 10 ㎜, 또는 적어도 20 ㎜일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 최대 20 ㎜, 최대 10 ㎜,

최대 5 ㎜, 최대 2.5 ㎜, 최대 1 ㎜, 최대 750 마이크로미터, 최대 500 마이크로미터, 최대 400 마이크로미터, 최대 300 마이크로미터, 최대 200 마이크로미터, 최대 100 마이크로미터, 또는 최대 50 마이크로미터일 수 있다. 한 실시양태에서, 유체 채널의 폭은 약 2 ㎜이다. 통상의 기술자는 유체 채널의 폭이 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 250 마이크로미터 내지 약 3 ㎜) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0123] 일부 실시양태에서, 카트리지 설계에서 유체 채널의 깊이는 50 마이크로미터 내지 10 ㎜일 것이다. 다른 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 적어도 50 마이크로미터, 적어도 100 마이크로미터, 적어도 200 마이크로미터, 적어도 300 마이크로미터, 적어도 400 마이크로미터, 적어도 500 마이크로미터, 적어도 750 마이크로미터, 적어도 1 ㎜, 적어도 1.25 ㎜, 적어도 1.5 ㎜, 적어도 1.75 ㎜, 적어도 2 ㎜, 적어도 2.5 ㎜, 적어도 3 ㎜, 적어도 3.5 ㎜, 적어도 4 ㎜, 적어도 4.5 ㎜, 적어도 5 ㎜, 적어도 5.5 ㎜, 적어도 6 ㎜, 적어도 6.5 ㎜, 적어도 7 ㎜, 적어도 7.5 ㎜, 적어도 8 ㎜, 적어도 8.5 ㎜, 적어도 9 ㎜, 또는 적어도 9.5 ㎜일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 최대 10 ㎜, 최대 9.5 ㎜, 최대 9 ㎜, 최대 8.5 ㎜, 최대 8 ㎜, 최대 7.5 ㎜, 최대 7 ㎜, 최대 6.5 ㎜, 최대 6 ㎜, 최대 5.5 ㎜, 최대 5 ㎜, 최대 4.5 ㎜, 최대 4 ㎜, 최대 3.5 ㎜, 최대 3 ㎜, 최대 2 ㎜, 최대 1.75 ㎜, 최대 1.5 ㎜, 최대 1.25 ㎜, 최대 1 ㎜, 최대 750 마이크로미터, 최대 500 마이크로미터, 최대 400 마이크로미터, 최대 300 마이크로미터, 최대 200 마이크로미터, 최대 100 마이크로미터, 또는 최대 50 마이크로미터일 수 있다. 한 실시양태에서, 유체 채널의 깊이는 약 1 ㎜이다. 통상의 기술자는 유체 채널의 깊이가 임의의 이들 값에 의해 경계지워진 임의의 범위 (예를 들어, 약 800 마이크로미터 내지 약 1 ㎜) 내에 있을 수 있음을 이해할 것이다.

[0124] 카트리지는 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술 및 물질을 사용하여 제작될 수 있다. 일반적으로, 카트리지는 일련의 별개의 성분 부품 (도 72)으로서 제작되고, 후속적으로 임의의 많은 기계적 조립 또는 접착 기술을 이용하여 조립될 것이다 (도 72 및 73). 적합한 제작 기술의 예는 통상의 기계가공, CNC 기계가공, 주입 몰딩, 열성형, 및 3D 인쇄를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일단 카트리지 성분이 제작된 후, 이들을 나사, 클립 등을 사용하여 기계적으로 조립하거나, 임의의 다양한 기술 (사용된 물질의 선택에 따라)을 이용하여, 예를 들어, 열 또는 초음파 접착/용접 또는 임의의 다양한 접착제 또는 접착 필름, 예컨대 에폭시계, 아크릴계, 실리콘계, UV 경화성, 폴리우레탄계, 또는 시아노아크릴레이트계 접착제의 사용을 통해 영구적으로 접착시킬 수 있다.

[0125] 카트리지 성분은 규소, 용융-실리카, 유리, 임의의 다양한 중합체, 예를 들어, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET), 에폭시 수지, 또는 금속 (예를 들어, 알루미늄, 스테인레스 강철, 구리, 니켈, 크롬, 및 티탄)을 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 많은 적합한 물질을 사용하여 제작될 수 있다.

[0126] 상기 설명된 바와 같이, 카트리지의 유입 및 유출 특징부는 기구와 편리하고 새지 않는 유체 연결을 제공하는 설계될 수 있거나, 카트리지의 내부로 또는 외부로 샘플 및 시약의 수동 피펫팅을 위한 열린 저장소로서 역할을 할 수 있다. 유입 및 유출 포트 연결장치를 위한 편리한 기계적 설계의 예는 나사산 연결장치, 압착 연결장치, 루어 락 (Luer lock) 연결장치, 루어 슬립 (Luer slip) 또는 "슬립 팁" 연결장치, 프레스핏 연결장치 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 카트리지의 유입 및 유출 포트는 카트리지가 기구 내에 배치될 때 열리거나 천공될 수 있고, 저장 동안 내부 카트리지 표면의 오염을 방지하는 역할을 하는 및/또는 유체가 카트리지가 기구로부터 제거될 때 쏟아지는 것을 방지하는 캡, 스프링 탑재 덮개 또는 클로져, 상변화 물질, 또는 중합체 막을 추가로 포함할 수 있다. 상기 지시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 카트리지의 하나 이상의 유출 포트는 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 접속하기 위해 적합한 제거가능한 샘플 수집 챔버를 추가로 포함할 수 있다.

[0127] 상기 지시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 카트리지는 기기를 통한 유체 유동의 제어를 위한 통합된 축소형 펌프 또는 다른 유체 작동 메카니즘을 포함할 수 있다. 적합한 축소형 펌프 또는 유체 작동 메카니즘의 예는 전기기계적으로 또는 공기압에 의해 작동되는 축소형 시린지 또는 플런저 메카니즘, 화학 추진제, 공기압에 의해 또는 외부 피스톤에 의해 작동되는 막 다이아프램 펌프, 공기압에 의해 작동되는 시약 파우치 또는 주머니, 또는 전기-삼투 펌프를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0128] 상기 설명된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 카트리지는 미리 로딩된 시약을 구획화하고/하거나 기기를 통한 유체 유동을 제어하기 위한 축소형 밸브를 포함할 수 있다. 적합한 축소형 밸브의 예는 용융 또는 용해될 수 있는 왁스 또는 중합체 플러그를 사용하여 제작된 원샷 "밸브", 또는 천공될 수 있는 중합체 막; 변형가능한 막

및 공기압, 수력압, 자기, 전자기, 또는 전기기계적 (솔레노이드) 작동을 사용하여 제작된 핀치 밸브, 변형가능한 막 플랩을 사용하여 제작된 1방 밸브, 및 축소형 게이트 밸브를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0129] 상기 지시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 카트리지는 포획된 공기를 위한 탈출 경로를 제공하기 위한 배기구를 포함할 수 있다. 배기구는 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술에 따라, 예를 들어, 폴리디메틸실록산 (PDMS) 또는 공기의 모세관 흡수를 허용하지만 물의 관통을 차단하는 다른 소수성 물질의 다공성 플러그를 사용하여 제작될 수 있다. 배기구는 또한 구멍 벽에 대한 습윤이 작동 동안 사용된 압력에서 일어나지 않도록 소수성 장벽 물질을 통한 구멍으로서 제작될 수 있다.

[0130] 일반적으로, 카트리지의 기계적 인터페이스 특징부는 기구 시스템에 관하여 카트리지의 쉽게 제거가능하지만 고도로 정확하고 반복가능한 배치를 제공한다. 적합한 기계적 인터페이스 특징부는 정렬 핀, 정렬 가이드, 기계식 스톱 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 기계적 설계 특징부는 외부 장치, 예를 들어 자석 또는 광학 부품을 마이크로웰 어레이 챔버에 아주 가깝게 위치시키기 위한 안전판 특징부를 포함할 것이다 (도 72).

[0131] 일부 실시양태에서, 카트리지는 또한 외부 온도 제어 모듈에 맞물리는 온도 제어 성분 또는 열 인터페이스 특징부를 포함할 것이다. 적합한 온도 제어 부재의 예는 저항 가열 부재, 축소형 적외선-발광 광원, 펠티에 (Peltier) 가열 또는 냉각 기기, 열 싱크, 써미스터, 열전쌍 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 열 인터페이스 특징부는 대개 우수한 열 전도체인 물질 (예를 들어, 구리, 금, 은, 알루미늄 등)로부터 제작될 것이고, 대개 외부 가열 블록 또는 냉각 블록과 우수한 열 접촉을 만들 수 있는 하나 이상의 편평한 표면을 포함할 것이다.

[0132] 많은 실시양태에서, 카트리지는 마이크로웰 어레이의 광학 영상화 또는 분광학 질의에 사용하기 위한 광학 인터페이스 특징부를 포함할 것이다. 대개, 카트리지는 마이크로웰 어레이를 프로빙하기 위해 사용된 영상화 또는 분광학 기술에 대한 스펙트럼 요건을 만족하는 물질로부터 제작된, 광학상 투명한 창, 예를 들어, 마이크로웰 기판 자체, 또는 마이크로웰 어레이의 반대편의 유동 셀 또는 마이크로어레이 챔버의 측면을 포함할 것이다. 적합한 광학 창 물질의 예는 유리, 용융-실리카, 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 또는 시클릭 올레핀 공중합체 (COC)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 대개, 카트리지는 횡단, 반사된, 또는 사선 조명 배향으로 마이크로웰 어레이를 조명하기 위해 사용될 수 있는 제2의 광학상 투명한 또는 반투명한 창 또는 영역을 포함할 것이다.

[0133] *기구*

[0134] 본원은 또한 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 검정의 자동화에서 사용하기 위한 기구를 포함한다. 상기 지시한 바와 같이, 이들 기구는 제어 및 분석 기능성, 예컨대 (i) 유체역학 제어, (ii) 온도 제어, (iii) 세포 및/또는 비드 분포 및 수집 메카니즘, (iv) 세포 용해 메카니즘, (v) 자기장 제어, (vi) 영상화 능력, 및 (vii) 영상 처리를 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 하나 이상의 모듈 (그의 하나의 가능한 실시양태를 도 74에 개략적으로 예시한다)을 포함할 수 있고, 여기서, 각각의 모듈은 하나 이상의 특이적 기능적 특징부 세트를 시스템에 제공한다. 다른 실시양태에서, 기구 시스템은 모든 시스템 기능성이 동일한 포장물 내에 존재하도록 포장될 수 있다. 도 75는 자동화된 시스템의 한 실시양태에 포함된 공정 단계의 개략도를 제시한다. 상기 지시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 시스템은 시스템의 기능적 능력을 PCR 증폭 (또는 다른 유형의 올리고뉴클레오티드 증폭 기술) 및 올리고뉴클레오티드 서열분석을 포함하도록 확장시키는 추가의 기능적 단위를, 시스템의 통합된 성분으로서 또는 모듈 성분으로서 포함할 수 있다.

[0135] 일반적으로, 기구 시스템은 샘플 및/또는 시약을 시스템에 연결된 하나 이상의 검정 카트리지(들) 내에서 하나 이상의 마이크로어레이 챔버(들) 또는 유동 셀(들)에 전달하기 위한 유체역학 능력을 제공할 것이다. 검정 시약 및 완충제는 카트리지 유입구에 연결된 병, 시약 및 완충제 카트리지, 또는 다른 적합한 용기 내에 저장될 수 있다. 시스템은 또한 검정 카트리지(들)의 하류에서 유체를 수집하기 위한 병, 폐기물 카트리지, 또는 다른 적합한 폐기물 용기의 형태로 폐기물 저장소를 포함할 수 있다. 시스템을 통한 유체 유동의 제어는 대개 펌프 (또는 다른 유체 작동 메카니즘) 및 밸브의 사용을 통해 수행될 것이다. 적합한 펌프의 예는 시린지 펌프, 프로그램가능한 시린지 펌프, 연동 펌프, 다이아프램 펌프 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 시스템을 통한 유체 유동은 시약 및 완충제 용기의 하나 이상의 유입구에서, 또는 검정 카트리지(들)의 유입구에서 양성 공기 압력을 인가하는 수단에 의해 제어될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템을 통한 유체 유동은 폐기물 저장소의 하나 이상의 유출구에서, 또는 검정 카트리지(들)의 유출구에서 진공을 가하는 수단에 의해 제어될 수 있다. 적합한 밸브의 예는 체크 밸브, 전기기계적 2방 또는 3방 밸브, 공기압 2방 및 3방 밸브

등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 마이크로웰 어레이 유동 셀(들) 또는 챔버(들) 내에서 유체의 완전하고 효율적인 교환을 용이하게 하기 위해 검정 세척/세정 단계 동안 박동 유동이 적용될 수 있다.

[0136] 상기 지시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 마이크로웰 어레이 상에서 세포 및 비드의 균일한 분포를 추가로 용이하게 하는 메카니즘을 포함할 수 있다. 그러한 메카니즘의 예는 요동, 진탕, 소용돌이, 재순환류, 저빈도 교반 (예를 들어, 로커 (rocker) 플레이트를 사용하여, 또는 챔버 또는 인근 유체 채널의 벽을 형성하는 가요성 (예를 들어, 실리콘) 막의 펄싱을 통해), 또는 고빈도 교반 (예를 들어, 압전 변환기의 사용을 통해)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 이들 메카니즘이 어레이 챔버 내에서 세포 또는 비드의 혼합을 용이하게 하고/하거나 세포 또는 비드의 모임을 방지하는 것을 돕기 위해, 유동 셀 또는 어레이 챔버의 내벽 물리적 구조 또는 특징부, 예를 들어, 메자닌/톱 해트 구조, 세브론, 또는 융기 어레이와 조합으로 사용된다. 유동 셀 또는 어레이 챔버의 상부 또는 하부 표면 상의 유동 향상 립은 유속 프로파일을 제어하고 마이크로웰 개구부를 가로질러 전단을 감소시키기 위해 (즉, 세포 또는 비드가 시약 교환 및 세정 단계 동안 마이크로웰에서 빠져나오는 것을 방지하기 위해) 사용될 수 있다.

[0137] 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 세제 또는 다른 시약의 사용에 대한 대안으로서 기계적 세포 용해 능력을 포함할 수 있다. 고빈도 압전 변환기를 사용하는 초음파 분해가 적합한 기술의 한 예이다.

[0138] 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 검정 결과의 정확성 및 재현성을 용이하게 하는 목적을 위한 온도 제어 기능성을 포함할 것이고, 예를 들어, 마이크로웰 사이에서 분자 확산을 최소화하기 위해 마이크로웰 어레이 유동 셀 또는 챔버의 냉각이 유리할 수 있다. 기구 시스템 설계 내로 포함될 수 있는 온도 제어 성분의 예는 저항 가열 부재, 적외선 광원, 펠티에 가열 또는 냉각 기기, 열 싱크, 써미스터, 열전쌍 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 시스템의 일부 실시양태에서, 온도 제어기는 명시된 시간 간격에 걸쳐 온도의 프로그램가능한 변화를 제공할 수 있다.

[0139] 본원의 다른 곳에서 지시된 바와 같이, 개시된 방법의 많은 실시양태에서는 검정의 완료 시에 마이크로웰로부터 비드를 제거하기 위해 자기장을 이용한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 비드를 마이크로웰 어레이 유동 셀 또는 챔버 내부로 또는 외부로 수송하기 위한 자기장의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 자기장의 제어를 제공하는 적합한 수단의 예는 카트리지에 비해 고정 위치(들)에 전자석의 사용, 또는 필요시에 기계적으로 재배치되는 영구 자석의 사용을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 기구 시스템의 일부 실시양태에서, 인가된 자기장(들)의 강도는 하나 이상의 전자석에 적용된 전류의 양을 변화시킴으로써 변화될 것이다. 기구 시스템의 일부 실시양태에서, 인가된 자기장의 강도는 예를 들어, 스테퍼 모터-구동 선형 작동기, 서보 모터-구동 선형 작동기, 또는 캠축 메카니즘을 사용하여 마이크로어레이 챔버(들)의 위치에 비해 하나 이상의 영구 자석의 배치를 변화시킴으로써 변화될 것이다. 기구 시스템의 일부 실시양태에서, 예를 들어, 자성 비드의 군집화를 방지하기 위해 펄스 자기장의 사용이 유리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 어레이 또는 챔버에 근접한 자석은 마이크로웰 어레이에 비해 적어도 2개의 위치 사이에서 1회 또는 수회 이동될 수 있다. 마이크로웰로부터 비드의 제거를 용이하게 하기 위해, 또는 목적하는 위치에서 자성 비드를 수집하기 위해 자석의 움직임은 마이크로웰 내에서 비드를 교반하는 역할을 할 수 있다.

[0140] 상기 지시된 바와 같이, 많은 실시양태에서, 기구 시스템은 광학 영상화 및/또는 다른 분광학 능력을 포함할 것이다. 그러한 기능성은 예를 들어, 어레이가 세포 및/또는 비드로 균일하게 및 최적으로 집단화되는지 그렇지 않은지 결정하기 위한 마이크로웰 어레이(들)의 검사를 위해 유용할 수 있다. 명시야, 암시야, 및 형광/발광 영상화를 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 다양한 영상화 방식을 이용할 수 있다. 영상화 방식의 선택은 마이크로웰 어레이, 유동 셀, 및 카트리지 챔버의 설계에 영향을 미칠 것이고, 따라서 어레이 기판, 및/또는 유동 셀 또는 어레이 챔버의 대향하는 벽은 반드시 관심있는 스펙트럼 범위에 걸쳐 투명하거나 반투명할 필요가 있을 것이다. 일부 실시양태에서, 각각의 마이크로웰 어레이는 단일 영상 내에 그 전체가 영상화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 일련의 영상이 "타일링"되어 전체 어레이의 고해상 영상을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 어레이에 대한 특성, 예를 들어, 세포 또는 비드 분포를 전체로서 평가하기 위해 어레이의 하위구역을 나타내는 단일 영상을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중 파장 여기 및 방출 (또는 멀티-파장 여기 및/또는 방출) 영상화를 수행할 수 있다. 영상화 및/또는 여기광을 제공하기 위해, 텅스텐 램프, 텅스텐-할로겐 램프, 아크 (arc) 램프, 레이저, 발광 다이오드 (LED), 또는 레이저 다이오드를 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 다양한 광원을 사용할 수 있다. 영상화 목적을 위해, 포토다이오드 어레이, 전하 결합 소자 (CCD) 카메라, 또는 CMOS 영상 센서를 포함하고 이로 제한되지 않는 임의의 다양한 영상 센서를 사용할 수 있다. 광학 시스템은 대개 시스템을 통해 광선을 조종, 형상화, 여과, 및/또는 집중시키기 위한 다양한 광학 부품을 포

함할 것이다. 적합한 광학 부품의 예는 렌즈, 거울, 프리즘, 회절 격자, 착색 유리 필터, 협대역 간섭 필터, 광대역 간섭 필터, 이색성 반사경, 광섬유, 광학 도파관 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 마이크로웰 어레이에 여기광을 전달하기 위한 도파관으로서 광학상 투명한 마이크로어레이 기판을 사용할 수 있다. 영상화 방식의 선택은 또한 확률적 표지/분자 인덱싱 검정과 병행으로 실행되도록 다른 유형의 검정의 사용, 예를 들어, 명시야 영상화와 병행으로 트립판 청색 생존 세포/죽은 세포 검정의 사용, 형광 영상화와 병행으로 형광-기반 생존 세포/죽은 세포 검정의 사용 등을 가능하게 할 수 있다. 개별 세포에 대한 생활력 데이타와 연관된 마이크로웰에서 각각의 비드와 연관된 세포 태그와의 상관성은 다중, 단일 세포 검정으로부터 데이타를 분석하는데 있어서 추가의 식별 수준을 제공할 수 있다. 대안적으로, 다수의 세포에 대한 통계 형태의 생활력 데이타는 검정의 분석 능력 및 품질 보증을 향상시키기 위해 사용될 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 시스템은 마이크로웰 어레이를 프로빙하기 위한 비-영상화 및/또는 비-광학 능력을 포함할 수 있다. 포획된 기포를 검출하고, 어레이 상의 세포 및/또는 비드 분포를 결정하기 위한 등의 비-영상화 및/또는 비-광학 기술의 예는 광 산란의 측정, 자외선/가시광선/적외선 흡수 측정 (예를 들어, 염료를 포함하는 염색된 세포 및/또는 비드를 사용하는), 간섭성 라만 (coherent raman) 산란, 및 전도도 측정 (예를 들어, 마이크로웰 어레이와 함께 전극의 미세제작된 어레이를 사용하는)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0142] ***시스템 프로세서 및 소프트웨어***

[0143] 일반적으로, 다중, 단일 세포 확률적 표지/분자 인덱싱 검정의 자동화를 지지하기 위해 설계된 기구 시스템은 프로세서 또는 컴퓨터를, (i) 기구 제어 기능성, (ii) 영상 처리 및 분석 능력, 및 (iii) 데이타 저장, 분석, 및 디스플레이 기능성을 제공하기 위해 소프트웨어와 함께 포함할 것이다.

[0144] 많은 실시양태에서, 기구 시스템은 사용자 인터페이스 및 모든 시스템 기능의 수동, 반-자동화, 또는 완전-자동화 제어, 즉, 유체역학 시스템, 온도 제어 시스템, 세포 및/또는 비드 분포 기능, 자성 비드 조작 기능, 및 영상화 시스템의 제어를 제공하기 위한 코드를 포함하는 컴퓨터-판독 매체 및 컴퓨터 (또는 프로세서)를 포함할 것이다. 기구 제어 소프트웨어에 의해 제공된 유체 제어 기능의 예는 부피 유체 유동률, 유체 유동 속도, 샘플 및 비드 첨가, 시약 첨가, 및 세정 단계를 위한 시기 및 지속시간을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 기구 제어 소프트웨어에 의해 제공된 온도 제어 기능의 예는 온도 설정점(들)의 지정 및 온도 변화를 위한 시기, 지속시간, 및 증감률의 제어를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 기구 제어 소프트웨어에 의해 제공된 세포 및/또는 비드 분포 기능의 예는 진폭, 빈도, 및 지속시간과 같은 교반 파라미터의 제어를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 기구 제어 소프트웨어에 의해 제공된 자기장 기능의 예는 인가된 자기장(들)의 시기 및 지속시간, 및 전자석의 경우에, 자기장의 강도를 또한 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 기구 제어 소프트웨어에 의해 제공된 영상화 시스템 제어 기능의 예는 자동초점 능력, 조명 및/또는 여기광 노출 시간 및 강도의 제어, 영상 획득 속도, 노출 시간, 및 데이타 저장 선택사항의 제어를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0145] 기구 시스템의 일부 실시양태에서, 시스템은 영상 처리 및 분석 능력을 제공하기 위한 코드를 포함하는 컴퓨터-판독 매체를 추가로 포함할 것이다. 소프트웨어에 의해 제공된 영상 처리 및 분석 능력의 예는 수동, 반-자동화, 또는 완전-자동화 영상 노출 조정 (예를 들어, 화이트 밸런스 (white balance), 콘트라스트 조정, 신호-평균화 및 다른 노이즈 감소 능력 등), 자동화된 물체 식별 (즉, 영상 내의 세포 및 비드를 확인하기 위한), 자동화된 통계 분석 (즉, 마이크로웰 어레이의 단위 면적당 확인된 세포 및/또는 비드의 수를 결정하기 위한, 또는 하나 초과의 세포 또는 하나 초과의 비드를 함유하는 웰을 확인하기 위한), 및 수동 측정 능력 (예를 들어, 물체들 사이의 거리를 측정하기 위한 등)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 기구 제어 및 영상 처리/분석 소프트웨어는 별개의 소프트웨어 모듈로서 기록될 것이다. 일부 실시양태에서, 기구 제어 및 영상 처리/분석 소프트웨어는 통합된 포장물 내에 포함될 것이다. 일부 실시양태에서, 시스템 소프트웨어는 통합된 실시간 영상 분석 및 기구 제어를 제공할 수 있어서, 최적 세포/비드 분포가 달성될 때까지 최적 세포/비드 분포가 달성될 때까지 세포 및 비드 샘플 로딩 단계가 연장되거나 반복될 수 있다.

[0146] 기구 시스템의 일부 실시양태에서, 시스템은 서열 데이타 분석을 제공하기 위한 코드를 포함하는 컴퓨터-판독 매체를 포함할 것이다. 데이타 분석 소프트웨어에 의해 제공될 수 있는 서열 데이타 분석 기능성의 예는 (i) 검정을 실행함으로써 생성된 올리고뉴클레오티드 라이브러리를 서열분석함으로써 제공된 데이타에 기반하여, 세포당 유전자당 판독물의 수, 및 세포당 유전자당 특유한 전사체 분자의 수를 결정하기 위한 알고리즘, (ii) 세포당 유전자당 전사체 분자의 수 등의 결정을 위한 신뢰 구간을 예측하기 위해 서열분석 데이타, 예를 들어, 주요 성분 분석의 통계 분석, (iii) 공지의 참조 서열과의 유전자 서열 데이타의 정렬을 위한 서열 정렬 능력, (iv) 샘플 바코드, 세포 바코드, 및 분자 바코드의 해독/역다중화, 및 (v) 증폭 또는 서열분석 오류를 보상하기

위한 분자 표지의 자동화된 군집화를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0147] 일반적으로, 도 76에 예시된 바와 같이 본원에 개시된 기구 시스템 내에 포함된 컴퓨터 또는 프로세서는 매체 (511) 및/또는 네트워크 포트 (505)로부터 명령을 읽을 수 있는 논리 장치로서 추가로 이해될 수 있고, 이것은 임의로 고정된 매체 (512)를 갖는 서버 (509)에 연결될 수 있다. 도 76에 도시된 것과 같은 시스템 (500)은 CPU (501), 디스크 드라이브 (503), 선택적 입력 기기, 예컨대 키보드 (515) 및/또는 마우스 (516) 및 선택적 모니터 (507)을 포함할 수 있다. 데이타 통신은 로컬 (local) 또는 리모트 (remote) 위치에서 지시된 통신 매체를 통해 서버로 달성될 수 있다. 통신 매체는 데이타를 전송하고/받는 임의의 수단을 포함할 수 있다. 예를 들어, 통신 매체는 네트워크 연결, 무선 연결 또는 인터넷 연결일 수 있다. 그러한 연결은 월드와이드웹 (World Wide Web) 상의 통신을 제공할 수 있다. 본원에 관련된 데이타는 도 76에 예시된 바와 같이 관계자 (522)에 의한 수신 및/또는 검토를 위해 그러한 네트워크 또는 연결 위로 전송될 수 있는 것으로 고안된다.

[0148] 도 77은 본원의 예시적인 실시양태와 함께 사용할 수 있는 컴퓨터 시스템 (100)의 구조의 제1 예를 예시하는 블록도이다. 도 77에 도시된 바와 같이, 예시하는 컴퓨터 시스템은 명령을 처리하기 위한 프로세서 (102)를 포함할 수 있다. 프로세서의 비제한적인 예는 인텔(Intel) 제온(Xeon)TM 프로세서, AMD 옵테론(Opteron)TM 프로세서, 삼성(Samsung) 32-비트 RISC ARM 1176JZ(F)-S v1.0TM 프로세서, ARM 코텍스(Cortex)-A8 삼성 S5PC100TM 프로세서, ARM 코텍스-A8 애플(Apple) A4TM 프로세서, 마벨(Marvell) PXA 930TM 프로세서, 또는 기능상 동등한 프로세서를 포함한다. 멀티 쓰레드 실행이 병행 처리를 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 컴퓨터 시스템 내에서, 클러스터 내에서, 또는 다수의 컴퓨터, 휴대전화, 및/또는 개인 정보 단말기 기기를 포함한 네트워크 위에서 시스템을 가로질러 분포된 상태이든, 다수의 프로세서 또는 다수의 코어를 갖는 프로세서가 또한 사용될 수 있다.

[0149] 도 77에 예시된 바와 같이, 프로세서 (102)에 의해 최근에 또는 빈번하게 사용된 명령 또는 데이타에 대한 고속 메모리를 제공하기 위해 고속 캐시 (104)가 프로세서 (102)에 연결되거나 내부에 포함될 수 있다. 프로세서 (102)는 프로세서 버스 (bus) (108)에 의해 노스 브리지 (106)에 연결된다. 노스 브리지 (106)은 메모리 버스 (112)에 의해 랜덤 액세스 메모리 (RAM) (110)에 연결되고, 프로세서 (102)에 의한 RAM (110)에의 접근을 관리한다. 노스 브리지 (106)은 또한 칩세트 버스 (116)에 의해 사우스 브리지 (114)에 연결된다. 사우스 브리지 (114)는 다시 주변기기 버스 (118)에 연결된다. 주변기기 버스는 예를 들어, PCI, PCI-X, PCI 익스프레스, 또는 다른 주변기기 버스일 수 있다. 노스 브리지 및 사우스 브리지는 종종 프로세서 칩세트로 언급되고, 프로세서, RAM, 및 주변기기 버스 (118) 상의 주변기기 성분 사이에 데이타 이송을 관리한다. 몇몇 별도의 구조에서, 별개의 노스 브리지 칩을 사용하는 대신 노스 브리지의 기능성이 프로세서 내에 포함될 수 있다.

[0150] 일부 실시양태에서, 시스템 (100)은 주변기기 버스 (118)에 부착된 가속 카드 (122)를 포함할 수 있다. 가속기는 현장 프로그램가능한 게이트 어레이 (FPGA) 또는 특정 처리를 가속시키기 위한 다른 하드웨어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 가속기는 적응 데이타 재구성을 위해, 또는 확장된 세트 처리에 사용된 대수 표현을 평가하기 위해 사용될 수 있다.

[0151] 소프트웨어 및 데이타는 외부 저장장치 (124)에 저장되고, 프로세서에 의한 사용을 위해 RAM (110) 및/또는 캐시 (104) 내로 로딩될 수 있다. 시스템 (100)은 시스템 자원을 관리하기 위한 운영 시스템을 포함하고; 운영 시스템의 비제한적인 예는 리눅스 (Linux), 윈도우즈(Windows)™, 마코스(MACOS)™, 블랙베리(BlackBerry) OS™, iOS™, 및 다른 기능상 동등한 운영 시스템뿐만 아니라, 본 발명의 예시적인 실시양태에 따라 데이타 저장 및 최적화를 관리하기 위한 운영 시스템의 상위에서 실행하는 응용 소프트웨어를 포함한다.

[0152] 본 예에서, 시스템 (100)은 또한 외부 저장장치, 예컨대 네트워크 결합 저장장치 (NAS) 및 분산 병렬 처리를 위해 사용될 수 있는 다른 컴퓨터 시스템에 네트워크 인터페이스를 제공하기 위한 주변기기 버스에 연결된 네트워크 인터페이스 카드 (NIC) (120 및 121)을 포함한다.

[0153] 도 78은 다수의 컴퓨터 시스템 (202a 및 202b), 다수의 휴대전화 및 개인 정보 단말기 (202c), 및 네트워크 결합 저장장치 (NAS) (204a 및 204b)를 갖는 네트워크 (200)을 보여주는 도면이다. 예시적인 실시양태에서, 시스템 (212a, 212b, 및 212c)는 데이타 저장을 관리하고, 네트워크 결합 저장장치 (NAS) (214a 및 214b) 내에 저장된 데이타에 대한 데이타 접근을 최적화할 수 있다. 데이타를 위해 수학 모델을 사용할 수 있고, 컴퓨터 시스템 (212a 및 212b), 및 휴대전화 및 개인 정보 단말기 시스템 (212c)를 가로질러 분산 병렬 처리를 이용하여 평가할 수 있다. 컴퓨터 시스템 (212a 및 212b), 및 휴대전화 및 개인 정보 단말기 시스템 (212c)는 또한 네트워크 결합 저장장치 (NAS) (214a 및 214b) 내에 저장된 데이타의 적응 데이타 재구성을 위한 병렬 처리를 제공할 수 있다. 도 78은 단지 한 예를 예시한 것이고, 본 발명의 다양한 실시양태와 함께 매우 다양한 다른 컴퓨

터 구조 및 시스템을 사용할 수 있다. 예를 들어, 병렬 처리를 제공하기 위해 블레이드 서버를 사용할 수 있다. 병렬 처리를 제공하기 위해 프로세서 블레이드는 뒤판을 통해 연결될 수 있다. 저장장치가 또한 뒤판에 또는 네트워크 결합 저장장치 (NAS)로서 별개의 네트워크 인터페이스를 통해 연결될 수 있다.

[0154] 일부 예시적인 실시양태에서, 프로세서는 별개의 메모리 공간을 유지하고, 다른 프로세서에 의한 병렬 처리를 위해 네트워크 인터페이스, 뒤판 또는 다른 연결장치를 통해 데이타를 전송할 수 있다. 다른 실시양태에서, 몇몇 또는 모든 프로세서는 공유 가상 어드레스 메모리 공간을 사용할 수 있다.

[0155] 도 79는 예시적인 실시양태에 따라 공유 가상 어드레스 메모리 공간을 사용하는 다중프로세서 컴퓨터 시스템 (300)의 블록도이다. 시스템은 공유 메모리 서브시스템 (304)에 접근할 수 있는 다수의 프로세서 (302a-f)를 포함한다. 시스템은 메모리 서브시스템 (304) 내에 다수의 프로그램가능한 하드웨어 메모리 알고리즘 프로세서 (MAP) (306a-f)를 포함한다. 각각의 MAP (306a-f)는 메모리 (308a-f) 및 하나 이상의 현장 프로그램가능한 게이트 어레이 (FPGA) (310a-f)를 포함할 수 있다. MAP는 설정가능한 기능 단위를 제공하고, 특정 알고리즘 또는 알고리즘의 일부가 각각의 프로세서와 밀접하게 협조하여 처리하기 위해 FPGA (310a-f)에 제공될 수 있다. 예를 들어, MAP는 데이타 모델에 관한 대수 표현을 평가하기 위해 및 예시적인 실시양태에서 적응 데이타 재구성을 수행하기 위해 사용될 수 있다. 본 예에서, 각각의 MAP는 이들 목적을 위한 모든 프로세서에 의해 포괄적으로 접근가능하다. 하나의 형태에서, 각각의 MAP는 각각의 마이크로프로세서 (302a-f)와 독립적으로 및 그로부터 비동기적으로 과제를 실행하는 것을 허용하도록, 연합된 메모리 (308a-f)에 접근하기 위해 직접 메모리 액세스 (DMA)를 사용할 수 있다. 상기 형태에서, MAP는 알고리즘의 파이프라이닝 및 병렬 실행을 위해 또 다른 MAP에 직접 결과를 제공할 수 있다.

[0156] 상기 컴퓨터 구조 및 시스템은 단지 예시적인 것이고, 일반적인 프로세서, 공동-프로세서, FPGA 및 다른 프로그램가능한 논리 기기, 시스템 온 칩 (SOC), 주문형 집적 회로 (ASIC), 및 다른 처리 및 논리 부재의 임의의 조합을 사용하여 시스템을 포함하는, 매우 다양한 다른 컴퓨터, 휴대전화, 및 개인 정보 단말기 구조 및 시스템을 예시적인 실시양태와 함께 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 모든 또는 일부 컴퓨터 시스템은 소프트웨어 또는 하드웨어에서 실행될 수 있다. 랜덤 액세스 메모리, 하드 드라이브, 플래시 메모리, 테이프 드라이브, 디스크 어레이, 네트워크 결합 저장장치 (NAS) 및 다른 국소 또는 분산 데이타 저장 기기 및 시스템을 포함하는, 임의의 다양한 데이타 저장 매체가 예시적인 실시양태와 함께 사용될 수 있다.

[0157] 예시적인 실시양태에서, 본원의 컴퓨터 서브시스템은 임의의 상기 또는 다른 컴퓨터 구조 및 시스템 상에서 실행하는 소프트웨어 모듈을 사용하여 시행될 수 있다. 다른 실시양태에서, 시스템의 기능은 펌웨어 (firmware), 프로그램가능한 논리 기기, 예컨대 도 79에 참조된 현장 프로그램가능한 게이트 어레이 (FPGA), 시스템 온 칩 (SOC), 주문형 집적 회로 (ASIC), 또는 다른 처리 및 논리 부재에서 부분적으로 또는 완전히 시행될 수 있다. 예를 들어, 세트 프로세서 (Set Processor) 및 옵티마이저 (Optimizer)는 하드웨어 가속 카드, 예컨대 도 77에 예시된 가속 카드 (122)의 사용을 통해 하드웨어 가속과 함께 시행될 수 있다.

[0158] **올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 분자 바코드)**

[0159] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 그의 사용을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 본원에 개시된 고체 지지체에 부착될 수 있다. 고체 지지체에 대한 올리고뉴클레오티드의 부착은 고체 지지체 및 올리고뉴클레오티드 상의 관능기 쌍을 통해 발생할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 분자 바코드로 언급될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 표지 (예를 들어, 분자 표지, 세포 표지) 또는 태그 (예를 들어, 샘플 태그)로 언급될 수 있다.

[0160] 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함할 수 있다. 범용 표지는 샘플 내의 모든 올리고뉴클레오티드에 대해 동일할 수 있다. 범용 표지는 한 세트의 올리고뉴클레오티드 내의 올리고뉴클레오티드에 대해 동일할 수 있다. 범용 표지는 2개 이상의 세트의 올리고뉴클레오티드에 대해 동일할 수 있다. 범용 표지는 서열분석 프라이머에 혼성화할 수 있는 핵산의 서열을 포함할 수 있다. 서열분석 프라이머는 범용 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 서열분석을 위해 사용될 수 있다. 서열분석 프라이머 (예를 들어, 범용 서열분석 프라이머)는 고처리량 서열분석 플랫폼과 연관된 서열분석 프라이머를 포함할 수 있다. 범용 표지는 PCR 프라이머에 혼성화할 수 있는 핵산의 서열을 포함할 수 있다. 범용 표지는 서열분석 프라이머 및 PCR 프라이머에 혼성화할 수 있는 핵산의 서열을 포함할 수 있다. 서열분석 및/또는 PCR 프라이머에 혼성화할 수 있는 범용 표지의 핵산의 서열은 프라이머 결합 부위로 언급될 수 있다. 범용 표지는 올리고뉴클레오티드의 전사를 개시하기 위해 사용할 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 범용 표지는 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 내의 영역의 연장을 위해 사용할 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 범용 표지의 길이는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30,

35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 범용 표지는 적어도 약 10개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 범용 표지의 길이는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0161] 올리고뉴클레오티드는 세포 표지를 포함할 수 있다. 세포 표지는 올리고뉴클레오티드가 접촉되는 세포에 대한 정보를 제공할 수 있는 핵산 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 어떤 핵산이 어떤 세포로부터 유래하는지 결정). 동일한 고체 지지체 상의 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%의 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지를 포함할 수 있다. 동일한 고체 지지체 상의 적어도 60%의 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지를 포함할 수 있다. 동일한 고체 지지체 상의 적어도 95%의 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지를 보여준다. 동일한 고체 지지체 상의 모든 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지를 포함할 수 있다. 제1 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 제2 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지와 상이할 수 있다.

[0162] 세포 표지의 길이는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 세포 표지의 길이는 최대 약 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4개 또는 그 미만 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 세포 표지는 약 5 내지 약 200개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 세포 표지는 약 10 내지 약 150개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 세포 표지는 약 20 내지 약 125개 뉴클레오티드 길이를 포함할 수 있다.

[0163] 올리고뉴클레오티드는 분자 표지를 포함할 수 있다. 분자 표지는 올리고뉴클레오티드에 혼성화된 특이적 핵산 종에 대한 정보의 확인을 제공할 수 있는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 동일한 고체 지지체에 접합된 올리고뉴클레오티드는 상이한 분자 표지를 포함할 수 있다. 상기 방식에서, 분자 표지는 상이한 올리고뉴클레오티드에 혼성화하는 표적 핵산 (예를 들어, 유전자)의 유형을 구별할 수 있다. 분자 표지의 길이는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 분자 표지의 길이는 최대 약 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4개 또는 그 미만의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0164] 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지 (예를 들어, 샘플 인덱스)를 포함할 수 있다. 샘플 표지는 표적 핵산이 어디로부터 유래되었는지에 대한 정보를 제공할 수 있는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 샘플 표지는 상이한 실험에 사용되는 상이한 고체 지지체에 대해 상이할 수 있다. 샘플 표지의 길이는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 샘플 표지의 길이는 최대 약 300, 200, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4개 또는 그 미만의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0165] 올리고뉴클레오티드는 범용 표지, 세포 표지, 분자 표지 및 샘플 표지, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 조합시에, 샘플 표지는 샘플 사이의 표적 핵산을 구별하기 위해 사용될 수 있고, 세포 표지는 샘플 내의 상이한 세포로부터의 표적 핵산을 구별하기 위해 사용될 수 있고, 분자 표지는 세포 내의 상이한 표적 핵산 (예를 들어, 동일한 표적 핵산의 상이한 카피)을 구별하기 위해 사용될 수 있고, 범용 표지는 표적 핵산의 증폭 및 서열분석을 위해 사용될 수 있다.

[0166] 범용 표지, 분자 표지, 세포 표지, 링커 표지 및/또는 샘플 표지는 뉴클레오티드의 무작위 서열을 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 무작위 서열은 컴퓨터에 의해 생성될 수 있다. 뉴클레오티드의 무작위 서열은 그와 연관된 패턴을 갖지 않을 수 있다. 범용 표지, 분자 표지, 세포 표지, 링커 표지 및/또는 샘플 표지는 뉴클레오티드의 비-무작위 (예를 들어, 뉴클레오티드는 패턴을 포함한다) 서열을 포함할 수 있다. 범용 표지, 분자 표지, 세포 표지, 링커 표지 및/또는 샘플 표지의 서열은 상업적으로 이용가능한 서열일 수 있다. 범용 표지, 분자 표지, 세포 표지, 링커 표지 및/또는 샘플 표지의 서열은 랜도머 (randomer) 서열을 포함할 수 있다. 랜도머 서열은 제시된 길이의 랜도머에 대해 모든 가능한 서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낼 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 범용 표지, 분자 표지, 세포 표지, 링커 표지 및/또는 샘플 표지는 뉴클레오티드의 미리 결정된 서열을 포함할 수 있다.

[0167] 도 1은 범용 표지, 세포 표지 및 분자 표지를 포함하는 본 개시내용의 예시적인 올리고뉴클레오티드를 보여준다.

[0168] 도 3은 올리고뉴클레오티드 (312)에 연결된 고체 지지체 (301)를 포함하는 예시적인 올리고뉴클레오티드 연결된 고체 지지체를 보여준다. 올리고뉴클레오티드 (312)는 화학기 (5' 아민, 302), 범용 표지 (303), 세포 표지

(311), 분자 표지 (분자 BC, 311), 및 표적 결합 영역 (올리고dT, 310)을 포함한다. 상기 개략도에서, 세포 표지 (311)는 제1 세포 표지 (CL 파트 1, 304), 제1 링커 (링커1, 305), 제2 세포 표지 (CL 파트 2, 306), 제2 링커 (링커2, 307), 제3 세포 표지 (CL 파트 3, 308)를 포함한다. 세포 표지 (311)은 고체 지지체 상의 각각의 올리고뉴클레오티드에 대해 공통적이다. 2가지 이상의 비드에 대한 세포 표지 (311)는 상이할 수 있다. 2가지 이상의 비드에 대한 세포 표지 (311)는 세포 표지 (예를 들어, CL 파트 1 (304), CL 파트 2 (306), CL 파트 3 (308))가 상이할 수 있다. 2가지 이상의 비드에 대한 세포 표지 (311)는 제1 세포 표지 (304), 제2 세포 표지 (306), 제3 세포 표지 (308), 또는 이들의 조합이 상이할 수 있다. 세포 표지 (311)의 제1 및 제2 링커 (303, 305)는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드 연결된 고체 지지체에 대해 동일할 수 있다. 범용 표지 (303)는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드 연결된 고체 지지체에 대해 동일할 수 있다. 범용 표지 (303)는 동일한 고체 지지체 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드에 대해 동일할 수 있다. 분자 표지 (311)는 고체 지지체 상의 적어도 2개 이상의 올리고뉴클레오티드에 대해 상이할 수 있다. 고체 지지체는 100개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 고체 지지체는 1000개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 고체 지지체는 10000개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 고체 지지체는 100000개 또는 그 초과의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0169] 범용 표지, 세포 표지, 및 분자 표지 이외에, 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 포함할 수 있다. 표적 결합 영역은 표적 핵산 (예를 들어, 분석되는 세포 핵산)에 결합할 수 있는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 표적 결합 영역은 유전자 특이적 서열일 수 있다. 예를 들어, 표적 결합 영역은 특이적 표적 핵산의 특이적 위치에 부착 (예를 들어, 혼성화)할 수 있는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 표적 결합 영역은 비-특이적 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 비-특이적 표적 핵산 서열은 표적 핵산의 특이적 서열과 무관하게 다수의 표적 핵산에 결합할 수 있는 서열을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 표적 결합 영역은 무작위 다량체 서열 또는 올리고dT 서열 (예를 들어, mRNA 상의 폴리-아데닐화 테일에 혼성화할 수 있는 티미딘 뉴클레오티드의 스트레치 (stretch))을 포함할 수 있다. 무작위 다량체 서열은 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 그 초과의 임의의 길이의 다량체 서열일 수 있다. 표적 결합 영역의 길이는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 표적 결합 영역의 길이는 최대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0170] 올리고뉴클레오티드는 다수의 표지를 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 범용 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 범용 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 세포 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 세포 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 분자 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 분자 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 샘플 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 샘플 표지를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 표적 결합 영역을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 또는 그 초과의 표적 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0171] 올리고뉴클레오티드가 하나 초과의 유형의 표지 (예를 들어, 하나 초과의 세포 표지 또는 하나 초과의 분자 표지)를 포함할 때, 표지는 링커 표지 서열 사이에 배치될 수 있다. 링커 표지 서열의 길이는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 링커 표지 서열의 길이는 최대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 예에서, 링커 표지 서열의 길이는 12개 뉴클레오티드이다. 링커 표지 서열은 도 2a에 도시된 바와 같은 올리고뉴클레오티드의 합성을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다.

[0172] 고체 지지체에 접합된 올리고뉴클레오티드의 수는 세포 내의 표적 핵산의 수보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 많을 수 있다. 일부 예에서, 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%의 올리고뉴클레오티드가 표적 핵산에 의해 결합된다. 일부 예에서, 최대 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%의 올리고뉴클레오티드가 표적 핵산에 의해 결합된다. 일부 예에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개 또는 그 초과의 상이한 표적 핵산이 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 의해 포획된다. 일부 예에서, 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개 또는 그 초과의 상이한 표적 핵산이 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 의해 포획된다.

[0173] 중합체는 추가의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중합체에는 비드가 점재할 수 있다. 비드는 중합체의 상이한 영역에 공간적으로 위치할 수 있다. 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비드 또는 지지체는 공간적으로 주소지정될 수 있다. 비드 또는 지지체는 중합체 상의 공간 주소에 대응하는 바코드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 비드 또는 지지체의 각각의 비드 또는 지지체는 중합체 상의 위치, 예컨대 어레이 또는 다수의 마이크로웰의 특정 마이크로웰의 위치에 대응하는 바코드를 포함할 수 있다. 공간 주소는 비드 또는 지지체가 존재한 위치를 결정하기 위해 해독될 수 있다. 예를 들어, 공간 주소, 예컨대 바코드는 바코드에 대한 올리고뉴클레오티드의 혼성화에 의해 또는 바코드의 서열분석에 의해 해독될 수 있다. 대안적으로, 비드 또는 지지체는 공간 주소 해독을 위해 다른 유형의 바코드, 예컨대 그래픽 특징부, 화학기, 색, 형광, 또는 이들의 임의의 조합을 보유할 수 있다.

[0174] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 세트의 분자 바코드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역 및 표지 영역을 포함할 수 있다. 분자 바코드의 세트의 2개 이상의 분자 바코드는 동일한 샘플 인덱스 영역 및 2개 이상의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드의 2개 이상의 분자 바코드는 2개 이상의 상이한 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 분자 바코드의 세트로부터의 2개 이상의 분자 바코드는 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드의 2개 이상의 분자 바코드는 동일한 표지 영역을 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드로부터의 분자 바코드는 그의 샘플 인덱스 영역이 상이할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드로부터의 분자 바코드는 그의 표지 영역을 기초로 하여 유사할 수 있다.

[0175] 분자 바코드는 표적 특이적 영역, 어댑터 영역, 범용 PCR 영역, 표적 특이적 영역 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 분자 바코드는 범용 PCR 영역 및 표적 특이적 영역을 포함할 수 있다. 분자 바코드는 하나 이상의 2차 구조를 포함할 수 있다. 분자 바코드는 머리핀 구조를 포함할 수 있다. 분자 바코드는 표적 특이적 영역 및 절단가능한 줄기를 포함할 수 있다.

[0176] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 세트의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플 태그는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플 태그는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 샘플 태그의 세트의 2개 이상의 샘플 태그는 동일한 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 샘플 태그의 2개 이상의 샘플 태그는 2개 이상의 상이한 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다.

[0177] 샘플 태그는 표적 특이적 영역, 어댑터 영역, 범용 PCR 영역, 표적 특이적 영역 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 샘플 태그는 범용 PCR 영역 및 표적 특이적 영역을 포함할 수 있다. 샘플 태그는 하나 이상의 2차 구조를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 머리핀 구조를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 표적 특이적 영역 및 절단가능한 줄기를 포함할 수 있다.

[0178] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 세트의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 분자 식별 표지는 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 분자 식별 표지는 표지 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지는 2개 이상의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 식별 표지의 2개 이상의 분자 식별 표지는 2개 이상의 동일한 표지 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 표적 특이적 영역, 어댑터 영역, 범용 PCR 영역, 표적 특이적 영역 또는 이들의 임의의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 범용 PCR 영역 및 표적 특이적 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 하나 이상의 2차 구조를 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 머리핀 구조를 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 표적 특이적 영역 및 절단가능한 줄기를 포함할 수 있다.

[0179] 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 적어도 약 1500, 2,000, 2500, 3,000, 3500, 4,000, 4500, 5,000, 5500, 6,000, 6500, 7,000, 7500, 8,000, 8500, 9,000, 9500, 또는 10,000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다.

[0180] 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 다량체, 예를 들어, 무작위 다량체일 수 있다. 다량체 서열은 예를 들어, 비-무작위 또는 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 임의의 길이의 그 초과의 다량체 서열일 수 있다. 태그는 모노뉴클레오티드의 세트로부터 무작위로 생성될 수 있다. 태그는 모노뉴클레오티드를 무작위로 도입함으로써 조립될 수 있다.

[0181] 또한, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는, 무작위로 생성되지 않지만 방법을 실행하기에 충분한 수

의 상이한 태그를 포함하는 상이한 태그의 라이브러리를 생성하기 위해 비무작위 방식으로 조립될 수 있다.

[0182] 일부 실시양태에서, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 표적 핵산 내의 삭감 (cutback)을 포함할 수 있다. 삭감은 예를 들어 표적 핵산의 하나 또는 두 말단의 효소에 의한 소화일 수 있다. 삭감은 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 첨가와 함께 사용될 수 있다. 삭감 및 첨가된 태그의 조합은 특정 출발 분자에 대한 정보를 포함할 수 있다. 무작위 삭감을 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지에 적용함으로써, 검출이 무작위 삭감 및 첨가된 올리고뉴클레오티드 둘 모두의 결정을 허용할 때 표적 핵산의 수를 계수하기 위해 다양성이 보다 작은 첨가된 태그를 필요로 할 수 있다.

[0183] 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 표적 특이적 영역을 포함할 수 있다. 표적 특이적 영역은 분자에 상보성인 서열을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 분자는 mRNA 분자이고, 표적 특이적 영역은 mRNA 분자의 폴리A 테일에 상보성인 올리고dT 서열을 포함할 수 있다. 표적 특이적 영역은 또한 DNA 및/또는 RNA 합성을 위한 프라이머로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 표적 특이적 영역의 올리고dT 서열은 mRNA 분자의 cDNA 카피의 제1 가닥 합성을 위한 프라이머로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 표적 특이적 영역은 분자의 임의의 부분에 상보성인 서열을 포함한다. 다른 예에서, 표적 특이적 영역은 분자에 혼성화되거나 라이게이션될 수 있는 무작위 서열을 포함한다. 표적 특이적 영역은 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 분자에 대한 부착을 가능하게 한다. 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 부착은 본원에 개시된 임의의 방법 (예를 들어, 혼성화, 라이게이션)에 의해 이루어질 수 있다. 일부 예에서, 표적 특이적 영역은 하나 이상의 제한 효소에 의해 인식되는 서열을 포함한다. 표적 특이적 영역은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다. 또 다른 예에서, 표적 특이적 영역은 적어도 약 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 또는 10000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 표적 특이적 영역은 적어도 약 5-10, 10-15, 10-20, 10-30, 15-30, 또는 20-30 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다.

[0184] 일부 예에서, 표적 특이적 영역은 특정 유전자 또는 유전자 생성물에 특이적이다. 예를 들어, 표적 특이적 영역은 p53 유전자 또는 유전자 생성물의 영역에 상보성인 서열을 포함한다. 따라서, 샘플 태그 및 분자 식별 표지는 p53-특이적 서열을 포함하는 분자에만 부착할 수 있다. 대안적으로, 표적 특이적 영역은 다수의 상이한 유전자 또는 유전자 생성물에 특이적이다. 예를 들어, 표적 특이적 영역은 올리고dT 서열을 포함한다. 따라서, 샘플 태그 및 분자 식별 표지는 폴리A 서열을 포함하는 임의의 분자에 부착할 수 있다. 또 다른 예에서, 표적 특이적 영역은 다수의 상이한 유전자 또는 유전자 생성물에 상보성인 무작위 서열을 포함한다. 따라서, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 표적 특이적 영역에 상보성인 서열을 갖는 임의의 분자에 부착할 수 있다. 다른 예에서, 표적 특이적 영역은 제한 부위 오버행 (overhang) (예를 들어, EcoRI 점착성-말단 오버행)을 포함한다. 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 제한 부위 오버행에 상보성인 서열을 포함하는 임의의 분자에 라이게이션될 수 있다.

[0185] 일부 예에서, 표적 특이적 영역은 특정 마이크로RNA 또는 마이크로RNA 생성물에 특이적이다. 예를 들어, 표적 특이적 영역은 특이적 마이크로RNA 또는 마이크로RNA 생성물의 영역에 상보성인 서열을 포함한다. 예를 들어, 표적 특이적 영역은 마이크로RNA의 특이적 패널 또는 마이크로RNA 생성물의 패널의 영역에 상보성인 서열을 포함한다. 따라서, 샘플 태그 및 분자 식별 표지는 마이크로RNA-특이적 서열을 포함하는 분자에만 부착할 수 있다. 대안적으로, 표적 특이적 영역은 다수의 상이한 마이크로RNA 또는 마이크로RNA 생성물에 특이적이다. 예를 들어, 표적 특이적 영역은 2개 이상의 마이크로RNA, 예컨대 공통 서열을 포함하는 마이크로RNA의 패널에 포함된 영역에 상보성인 서열을 포함한다. 따라서, 샘플 태그 및 분자 식별 표지는 공통적인 마이크로RNA 서열을 포함하는 임의의 분자에 부착할 수 있다. 또 다른 예에서, 표적 특이적 영역은 다수의 상이한 마이크로RNA 또는 마이크로RNA 생성물에 상보성인 무작위 서열을 포함한다. 따라서, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 표적 특이적 영역에 상보성인 서열을 갖는 임의의 마이크로RNA 분자에 부착할 수 있다. 다른 예에서, 표적 특이적 영역은 제한 부위 오버행 (예를 들어, EcoRI 점착성-말단 오버행)을 포함한다. 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 제한 부위 오버행에 상보성인 서열을 포함하는 임의의 마이크로RNA 분자에 라이게이션될 수 있다.

[0186] 본원에 개시된 분자 바코드 또는 분자 식별 표지는 종종 표지 영역을 포함한다. 표지 영역은 표적 종의 발생을 특유하게 확인하여, 그렇지 않으면 동일하거나 거의 동일한 2개의 표적을 구분하기 위해 사용할 수 있는 식별자로 각각의 종을 표시하기 위해 사용될 수 있다. 다수의 샘플 태그 및 분자 식별 표지의 표지 영역은 그와 결합되거나 또는 그 내에 포매된 상이한 형상, 색, 바코드 또는 회절 패턴을 갖는 상이한 반도체 나노결정, 금속 화

합물, 퀩티드, 올리고뉴클레오티드, 항체, 소분자, 동위원소, 입자 또는 구조, 일련의 숫자, 단백질 또는 핵산의 무작위 단편, 상이한 동위원소, 또는 이들의 임의의 조합물의 집합체를 포함할 수 있다. 표지 영역은 축중성 서열을 포함할 수 있다. 표지 영역은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 표지 영역은 적어도 약 1500, 2,000, 2500, 3,000, 3500, 4,000, 4500, 5,000, 5500, 6,000, 6500, 7,000, 7500, 8,000, 8500, 9,000, 9500, 또는 10,000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다. 바람직하게는, 표지 영역은 적어도 약 10-30, 15-40, 또는 20-50개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다.

[0187] 일부 예에서, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 범용 프라이머 결합 부위를 포함한다. 범용 프라이머 결합 부위는 표지된-분자 및/또는 표지된-앰플리콘에 대한 범용 프라이머의 부착을 허용한다. 범용 프라이머는 관련 기술 분야에 잘 알려져 있고, -47F (M13F), alfaMF, AOX3', AOX5', BGH_r, CMV_-30, CMV_-50, CVM_f, LACrmt, 담다 gt10F, 람다 gt10R, 람다 gt11F, 람다 gt11R, M13 rev, M13Forward(-20), M13Reverse, male, p10SEQP_pQE, pA_-120, pet_4, pGAP Forward, pGL_RVpr3, pGLpr2_R, pKLAC1_4, pQE_FS, pQE_RS, puc_U1, puc_U2, revers_A, seq_IRES_tam, seq_IRES_zpet, seq_ori, seq_PCR, seq_pIRES-, seq_pIRES+, seq_pSecTag, seq_pSecTag+, seq_retro+PSI, SP6, T3-prom, T7-prom, 및 T7-term_Inv를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 범용 프라이머 결합 부위에 대한 범용 프라이머의 부착은 표지된-분자 및/또는 표지된-앰플리콘의 증폭, 검출, 및/또는 서열분석을 위해 사용될 수 있다. 범용 프라이머 결합 부위는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 범용 프라이머 결합 부위는 적어도 약 1500, 2,000, 2500, 3,000, 3500, 4,000, 4500, 5,000, 5500, 6,000, 6500, 7,000, 7500, 8,000, 8500, 9,000, 9500, 또는 10,000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다. 바람직하게는, 범용 프라이머 결합 부위는 10-30개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다.

[0188] 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 어댑터 영역은 하나 이상의 프로브의 혼성화를 가능하게 할 수 있다. 어댑터 영역은 하나 이상의 HCR 프로브의 혼성화를 가능하게 할 수 있다.

[0189] 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 하나 이상의 검출가능 표지를 포함할 수 있다.

[0190] 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 혼성화 연쇄 반응 (HCR)의 개시제로서 작용할 수 있다. 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 어댑터 영역은 HCR의 개시제로서 작용할 수 있다. 범용 프라이머 결합 부위는 HCR의 개시제로서 작용할 수 있다.

[0191] 일부 예에서, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 단일 가닥이다. 다른 예에서, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 이중 가닥이다. 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 선형일 수 있다. 대안적으로, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 2차 구조를 포함한다. 본원에서 사용할 때, "2차 구조"는 3차, 4차 등의 구조를 포함한다. 일부 예에서, 2차 구조는 머리핀, 줄기-루프 (stem-loop) 구조, 내부 루프, 튀어나온 루프, 분지 구조 또는 유사매듭 (pseudoknot), 다수의 줄기 루프 구조, 클로버잎 유형의 구조 또는 임의의 3차원 구조이다. 일부 예에서, 2차 구조는 머리핀이다. 머리핀은 오버행 서열을 포함할 수 있다. 머리핀의 오버행 서열은 폴리머라제 연쇄 반응 및/또는 역전사 반응을 위한 프라이머로서 작용할 수 있다. 오버행 서열은 샘플 태그 또는 분자 식별 표지가 부착되는 분자에 상보성인 서열을 포함하고, 오버행 서열은 분자에 혼성화한다. 오버행 서열은 분자에 라이게이션되고, 폴리머라제 연쇄 반응 및/또는 역전사 반응의 주형으로 작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자 바코드, 샘플 태그, 또는 분자 식별 표지는 핵산 및/또는 합성 핵산 및/또는 변형된 핵산을 포함한다.

[0192] 일부 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 포함한다. 다른 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 적어도 약 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1,000; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000; 6,000; 7,000; 8,000; 9,000; 또는 10000개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 포함한다. 대안적으로; 다수의 분자 바

코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 적어도 약 20,000; 30,000; 40,000; 50,000; 60,000; 70,000; 80,000; 90,000; 또는 100,000개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 포함한다.

[0193] 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 수는 종종 표지할 분자의 수를 초과한다. 일부 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 수는 표지할 분자의 수보다 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 더 많다.

[0194] 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 수는 종종 표지할 상이한 분자의 수를 초과한다. 일부 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 수는 표지할 상이한 분자의 수보다 적어도 약 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 더 많다.

[0195] 일부 예에서, 분자의 확률적 표지는 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 포함하고, 여기서 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 동일하다. 상기 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 동일한 수의 각각의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지를 포함한다.

[0196] 일부 예에서, 분자의 확률적 표지는 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 포함하고, 여기서 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 상이하다. 상기 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 상이한 수의 각각의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지를 포함한다.

[0197] 일부 예에서, 몇몇의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 다른 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)보다 더 높은 농도로 존재한다. 일부 예에서, 상이한 농도의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 사용한 확률적 표지는 사용되는 상이한 표지의 수를 증가시키지 않으면서 샘플 측정 가능 범위를 확장한다. 예를 들어, 3개의 핵산 샘플 분자를 모두 동일한 농도의 10개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)로 확률적 표지하는 것을 고려한다. 본 발명자들은 3개의 상이한 표지를 관찰할 것으로 예상한다. 이제, 3개의 핵산 분자 대신에, 30개의 핵산 분자를 고려하고, 본 발명자들은 10개의 모든 표지를 관찰할 것으로 예상한다. 이와 대조적으로, 본 발명자들이 10개의 상이한 확률적 표지를 계속 사용하고, 표지의 상대적인 비율을 1:2:3:4,...10으로 변경하면, 3개의 핵산 분자를 사용하여 본 발명자들은 1-3개의 표지를 관찰할 것으로 예상하지만, 30개의 분자를 사용할 경우에는 본 발명자들은 약 5개의 표지만을 관찰하고, 따라서 동일한 수의 확률적 표지를 사용하여 측정 범위를 확장할 것으로 예상한다.

[0198] 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표

지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 상대적인 비율은 1:X일 수 있고, 여기서 X는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100이다. 대안적으로, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 "n"개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 상대적인 비율은 1:A:B:C:,...Zn이고, 여기서 A, B, C,...Zn은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100이다.

[0199] 일부 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 2개 이상의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 동일하다. "n"개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)에 대해, 적어도 2, 3, 4,...n개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 동일하다. 대안적으로, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 2개 이상의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 상이하다. "n"개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)에 대해, 적어도 2, 3, 4,...n개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 상이하다. 일부 예에서, "n"개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)에 대해, 적어도 2, 3, 4,...n개의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)에 대한 농도의 차이는 적어도 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000배이다.

[0200] 일부 예에서, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 100%의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 동일한 농도를 갖는다. 대안적으로, 다수의 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지) 내의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%), 97%, 또는 100%의 상이한 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 상이한 농도를 갖는다.

[0201] 도 65에 제시된 바와 같이, 분자 바코드 (1004)는 별개로 합성될 수 있다. 분자 바코드 (1004)는 범용 PCR 영역 (1001), 하나 이상의 식별 영역 (1002), 및 표적 특이적 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 식별 영역은 샘플 인덱스 영역, 표지 영역, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 하나 이상의 식별 영역는 인접할 수 있다. 하나 이상의 식별 영역은 비-인접할 수 있다. 개별적인 분자 바코드는 다수의 상이한 식별 영역을 포함하는 다수의 분자 바코드 (1005)를 생산하기 위해 함께 모아질 수 있다. 샘플 태그는 도 65에 도시된 바와 유사한 방식으로 합성될 수 있고, 여기서 하나 이상의 식별 영역은 샘플 인덱스 영역을 포함한다. 분자 식별 표지는 도 65에 도시된 바와 유사한 방식으로 합성될 수 있고, 여기서 하나 이상의 식별 영역은 표지 영역을 포함한다.

[0202] 표적 특이적 영역은 식별 영역에 라이게이션되어 표적 특이적 영역을 포함하는 분자 바코드를 생산할 수 있다. 5' 및 3' 엑소뉴클레아제는 비-라이게이션된 생성물을 제거하기 위해 반응물에 첨가될 수 있다. 분자 바코드는 범용 프라이머 결합 부위, 표지 영역 및 표적 특이적 영역을 포함할 수 있고, 5' 및 3' 엑소뉴클레아제에 대해 내성일 수 있다. 본원에서 사용할 때, 용어 "범용 프라이머 결합 부위" 및 "범용 PCR 영역"은 교환가능하게 사용될 수 있고, 증폭 반응을 프라이밍하기 위해 사용될 수 있는 서열을 나타낸다. 라이게이션된 식별 영역으로부터의 3' 포스페이트 기는 3' 포스페이트 기가 없는 분자 바코드를 생성하기 위해 제거될 수 있다. 3' 포스페이트 기는 효소에 의해 제거될 수 있다. 예를 들어, T4 폴리뉴클레오티드 키나제가 3' 포스페이트 기를 제거하기 위해 사용될 수 있다.

[0203] 분자 바코드의 또 다른 합성 방법이 도 66a에 제시되어 있다. 도 66a에 제시된 바와 같이, 분자 바코드 (112

8)는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드 단편 (1121 및 1127)을 라이게이션함으로써 합성될 수 있다. 한 올리고뉴클레오티드 단편 (1121)은 범용 프라이머 결합 부위 (1122), 식별 영역 (1123) 및 제1 부목 (splint) (1124)을 포함할 수 있다. 다른 올리고뉴클레오티드 단편 (1128)은 제2 부목 (1125) 및 표적 특이적 영역 (1126)을 포함할 수 있다. 리가제 (예를 들어, T4 DNA 리가제)는 2개의 올리고뉴클레오티드 단편 (1121 및 1127)을 연결하여 분자 바코드 (1128)를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 제1 부목 (1124) 및 제2 부목 (1125)의 이중 가닥 라이게이션은 가교 (bridge) 부목 (1129)을 갖는 분자 바코드 (1128)를 생산할 수 있다.

[0204] 2개의 올리고뉴클레오티드 단편의 라이게이션에 의해 분자 바코드를 합성하기 위한 별도의 방법은 도 66b에 도시되어 있다. 도 66b에 제시된 바와 같이, 분자 바코드 (1158)는 2개의 올리고뉴클레오티드 단편 (1150 및 1158)을 라이게이션함으로써 합성된다. 하나의 올리고뉴클레오티드 단편 (1150)은 범용 프라이머 결합 부위 (1151), 하나 이상의 식별 영역 (1152), 및 라이게이션 서열 (1153)을 포함할 수 있다. 다른 올리고뉴클레오티드 단편 (1158)은 제1 올리고뉴클레오티드 단편 (1150)의 라이게이션 서열 (1153)에 상보성인 라이게이션 서열 (1154), 표적 특이적 영역 (1155)의 상보체, 및 표지 (1156)을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 단편 (1159)은 또한 올리고뉴클레오티드 단편의 연장을 억제하는 3' 포스페이트를 포함할 수 있다. 도 66b의 단계 1에 제시된 바와 같이, 2개의 올리고뉴클레오티드 단편의 라이게이션 서열 (1153 및 1154)은 어닐링될 수 있고, 폴리머라제를 사용하여 제1 올리고뉴클레오티드 단편 (1150)의 3' 말단을 연장함으로써 분자 바코드 (1158)를 생산할 수 있다. 분자 바코드 (1158)는 범용 프라이머 결합 부위 (1151), 하나 이상의 식별 영역 (1152), 라이게이션 서열 (1153), 및 표적 특이적 서열 (1157)을 포함할 수 있다. 분자 바코드 (1158)의 표적 특이적 서열 (1157)은 제2 올리고뉴클레오티드 단편 (1159)의 표적 특이적 영역 (1155)의 상보체의 상보체일 수 있다. 표지 (1156)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 단편은 분자 바코드 (1158)로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 표지 (1156)은 비오틴을 포함할 수 있고, 비오틴 표지 (1156)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 단편 (1159)은 스트렙타비딘 포획을 통해 제거될 수 있다. 또 다른 예에서, 표지 (1156)는 5' 포스페이트를 포함할 수 있고, 5' 포스페이트 (1156)를 포함하는 올리고뉴클레오티드 단편 (1159)은 엑소뉴클레아제 (예를 들어, 람다 엑소뉴클레아제)를 통해 제거될 수 있다.

[0205] 도 66c에 도시된 바와 같이, 범용 프라이머 결합 부위 (1171), 하나 이상의 식별 영역 (1172), 제1 라이게이션 서열 (1173)을 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 단편 (1170)은 제2 라이게이션 서열 (1174) 및 표적 서열의 RNA 상보체 (1175)를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드 단편 (1176)에 어닐링된다. 단계 1은 제1 및 제2 라이게이션 서열 (1173 및 1174)의 어닐링, 이어서 표적 서열의 RNA 상보체 (1175)의 역전사를 통해 범용 프라이머 결합 부위 (1171), 하나 이상의 식별 영역 (1172), 제1 라이게이션 서열 (1173), 및 표적 특이적 영역 (1178)을 포함하는 분자 바코드 (1177)를 생산하는 것을 포함할 수 있다. 표적 서열의 RNA 상보체를 포함하는 올리고뉴클레오티드 단편은 RNAse 처리에 의해 선택적으로 분해될 수 있다.

[0206] 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 서열은 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 이량체화를 최소화하기 위해 최적화될 수 있다. 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 이량체는 증폭되고, 앰플리콘의 각각의 말단 상의 2개의 범용 프라이머 결합 부위 및 표적 특이적 영역 및 특유한 식별 영역을 포함하는 앰플리콘의 형성을 유발할 수 있다. 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)의 농도는 DNA 주형의 수보다 훨씬 더 크기 때문에, 이들 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 이량체는 증폭 반응에서 표지된 DNA 분자와의 경쟁에서 이길 수 있다. 비증폭된 DNA는 위음성 (false negative)을 유도하고, 증폭된 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 이량체는 높은 위양성 (false positive)을 유도한다. 따라서, 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 이량체 형성을 최소화하기 위해 최적화될 수 있다. 대안적으로, 이량체화하는 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 버려지고, 이에 의해 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 이량체 형성은 최소화된다.

[0207] 대안적으로, 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 이량체 형성은 하나 이상의 변형을 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지 서열 내로 도입함으로써 제거 또는 감소될 수 있다. 범용 프라이머 결합 부위, 특유한 식별 영역, 및 우라실 및 3' 포스페이트 기를 포함하는 표적 특이적 영역을 포함하는 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 표적 핵산에 어닐링된다. 표적 핵산은 제한 엔도뉴클레아제 소화된 단편일 수 있다. 제한 엔도뉴클레아제는 인식 부위를 인식할 수 있다. PCR 증폭은 하나 이상의 전방향 프라이머 및 하나

이상의 역방향 프라이머를 포함할 수 있다. PCR 증폭은 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 범용 프라이머 결합 부위에 특이적인 전방향 프라이머 및 분자 바코드, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 표적 특이적 영역에 특이적인 전방향 프라이머 및 표적 핵산에 특이적인 역방향 프라이머를 사용하는 네스티드 PCR을 포함할 수 있다. 표적 핵산은 하나 이상의 우라실을 포함하는 주형을 증폭할 수 없는 Pfu DNA 폴리머라제를 사용하여 증폭될 수 있다. 따라서, 임의의 이량체화된 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스 영역, 샘플 표지), 세포 표지, 및 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 Pfu DNA 폴리머라제에 의해 증폭될 수 없다.

[0208] **올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 분자 바코드)의 합성 방법**

[0209] 올리고뉴클레오티드를 합성할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어 관능화된 고체 지지체의 카르복실기에 대한 올리고뉴클레오티드 상의 5' 아미노기의 연결 (예를 들어, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드)에 의해 합성될 수 있다.

[0210] 연결되지 않은 올리고뉴클레오티드는 다수의 세척에 의해 반응 혼합물로부터 제거될 수 있다. 고체 지지체는 웰 (예를 들어, 96 웰) 내로 분할될 수 있다. 각각의 고체 지지체는 상이한 웰 내로 분할될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 합성은 분할/풀 (split/pool) 합성법을 이용하여 수행할 수 있다. 분할/풀 방법은 반응성 모이어티 (예를 들어, 합성되는 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 고체 지지체의 풀을 이용할 수 있다. 상기 풀은 고체 지지체의 많은 개별 풀 내로 분할될 수 있다. 각각의 풀은 각각의 풀 내의 고체 지지체에 상이한 변형을 유발할 수 있는 제1 반응에 적용될 수 있다 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드에 대한 상이한 핵산 서열의 첨가). 반응 후, 고체 지지체의 풀은 다시 조합, 혼합, 및 분할될 수 있다. 각각의 분할 풀은 다시 각각의 풀에 대해 상이한 제2 반응 또는 무작위화에 적용될 수 있다. 과정은 표적의 라이브러리가 형성될 때까지 계속될 수 있다.

[0211] 분할/풀 합성을 이용하여, 올리고뉴클레오티드에 첨가되는 핵산 서열은 프라이머 연장 (예를 들어, 클레나우 (Klenow) 연장)에 의해 도입될 수 있다. 올리고뉴클레오티드에 첨가되는 핵산 서열은 프라이머 단편으로 언급될 수 있다. 각각의 개별 풀에 대한 각각의 프라이머 단편은 상이한 서열을 (예를 들어, 세포 표지, 분자 표지, 샘플 표지, 또는 이들의 임의의 조합 내에) 포함할 수 있다. 프라이머 단편은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 고체 지지체에 연결된 올리고뉴클레오티드)의 링커 표지 서열에 혼성화할 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 프라이머 단편은 제2 세포 표지 및 제2 링커 표지 서열을 추가로 포함할 수 있다. 프라이머 연장은 제2 세포 표지 서열 및 제2 링커 표지 서열을 고체 지지체에 연결된 올리고뉴클레오티드 상에 도입하기 위해 사용될 수 있다 (도 2b 참조). 프라이머 연장이 새로운 서열을 도입한 후, 고체 지지체가 조합될 수 있다. 조합된 고체 지지체는 효소를 변성시키기 위해 가열될 수 있다. 조합된 고체 지지체는 혼성화를 붕괴시키기 위해 가열될 수 있다. 조합된 고체 지지체는 다시 웰 내에 분할될 수 있다. 과정은 추가의 서열을 고체 지지체-접합된 올리고뉴클레오티드에 첨가하기 위해 반복될 수 있다.

[0212] 분할/풀 공정은 적어도 약 1000, 10000, 100000, 500000, 또는 1000000개 또는 그 초과의 상이한 올리고뉴클레오티드의 생성을 유도할 수 있다. 과정은 최대 약 1000, 10000, 100000, 500000, 또는 1000000개 또는 그 초과의 상이한 올리고뉴클레오티드의 생성을 유도할 수 있다.

[0213] 분할 풀 합성은 화학적 합성을 포함할 수 있다. 상이한 올리고뉴클레오티드는 개별 반응에서 고체 지지체 상에서 DMT 화학을 사용하여 합성된 후, 합성을 위해 반응물 내로 모여질 수 있다. 분할/풀 공정은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 또는 그 초과로 반복될 수 있다. 분할/풀 공정은 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100회 또는 그 초과로 반복될 수 있다. 분할/풀 공정은 2회 또는 그 초과로 반복될 수 있다. 분할/풀 공정은 3회 또는 그 초과로 반복될 수 있다. 분할/풀 공정은 5회 또는 그 초과로 반복될 수 있다. 분할/풀 공정은 10회 또는 그 초과로 반복될 수 있다.

[0214] 또한, 하나 이상의 세트의 표지된 비드 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드 접합된 비드)의 생산 방법이 본원에 개시된다. 하나 이상의 세트의 표지된 비드의 생산 방법은 하나 이상의 핵산을 하나 이상의 비드에 부착시켜 하나 이상의 세트의 표지된 비드를 생산하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 분자 바코드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 표지, 샘플 인덱스 영역)를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 세포 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 프라이머 영역; b) 샘플 인덱스 영역; 및 c) 링커 또는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 프라이머 영역; b) 표지 영역 (예를 들어, 분자 표지); 및 c) 링커 또는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a)

샘플 인덱스 영역 (예를 들어, 샘플 태그); 및 b) 표지 영역 (예를 들어, 분자 표지)을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 샘플 인덱스 영역; 및 b) 세포 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 세포 표지; 및 b) 분자 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 샘플 인덱스 영역; b) 세포 표지; 및 c) 분자 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 프라이머 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 표적 특이적 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 링커 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 어댑터 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 샘플 인덱스 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 표지 영역을 추가로 포함할 수 있다.

[0215] 대안적으로, 방법은 a) 다수의 제1 핵산을 다수의 웰 내에 침적하고, 여기서 다수의 웰 중의 2개 이상의 상이한 웰은 다수의 핵산 중의 2개 이상의 상이한 핵산을 포함할 수 있고; b) 다수의 웰 중의 하나 이상의 웰을 하나 또는 그보다 더 적은 비드와 접촉시켜 다수의 단일 표지 비드를 생산하고, 여기서 다수의 제1 표지된 비드 중의 단일 표지 비드는 다수의 제1 핵산 중의 한 핵산에 부착된 비드를 포함하고; c) 다수의 제1 표지된 비드를 다수의 웰로부터 모아서 제1 표지된 비드의 풀을 생산하고; d) 제1 표지된 비드의 풀을 후속적인 다수의 웰에 분배하고, 여기서 후속적인 다수의 웰 중의 2개 이상의 웰은 다수의 후속적인 핵산 중의 2개 이상의 상이한 핵산을 포함하고; e) 다수의 후속적인 핵산 중의 하나 이상의 핵산을 하나 이상의 제1 표지된 비드에 부착시켜 다수의 특유하게 표지된 비드를 생산하는 것을 포함한다.

[0216] **라이브러리**

[0217] 분자 라이브러리의 생산 방법이 본원에 개시된다. 이 방법은 (a) 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자를 확률적으로 표지하여 표지된 분자를 생산하는 것을 포함할 수 있고, 여기서 표지된 분자는 (i) 2개 이상의 분자를 기초로 하거나 이로부터 유래된 분자 영역, (ii) 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자를 구별할 때 사용하기 위한 샘플 인덱스 영역; 및 (iii) 단일 샘플로부터의 2개 이상의 분자를 구별할 때 사용하기 위한 표지 영역을 포함한다. 확률적 표지는 하나 이상의 세트의 분자 바코드의 사용을 포함할 수 있다. 확률적 표지는 하나 이상의 세트의 샘플 태그의 사용을 포함할 수 있다. 확률적 표지는 하나 이상의 세트의 분자 식별 표지의 사용을 포함할 수 있다.

[0218] 2개 이상의 분자의 확률적 표지는 2개 이상의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 특이적 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하는 것을 포함할 수 있다. 접촉은 무작위일 수 있다. 방법은 하나 이상의 표지된 분자를 증폭시켜 라이브러리의 표지된 분자의 풍부화된 집단을 생산하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 방법은 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자에 대한 하나 이상의 검정을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 방법은 하나 이상의 풀-다운 (pull-down) 검정을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0219] 표지된 핵산 라이브러리의 생산 방법은 하나 이상의 대조군을 2개 이상의 샘플에 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 대조군은 확률적으로 표지되어 표지된 대조군을 생산할 수 있다. 하나 이상의 대조군은 표지된 분자의 생산 효율을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0220] 본원에 개시된 라이브러리는 다양한 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, 라이브러리는 서열분석 용도로 사용될 수 있다. 라이브러리는 보관되고, 분석용 샘플 생성을 위해 다수 회 사용될 수 있다. 몇몇 용도는 예를 들어, 다형성의 유전형 분석 (genotyping), RNA 처리의 연구, 및 서열분석을 수행할 클론 대표자의 선택을 포함한다.

[0221] **샘플 제조 및 적용**

[0222] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 분자 바코드, 샘플 태그, 분자 표지, 세포 표지)는 다양한 방법으로 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 핵산 분석을 위한 방법에서 사용될 수 있다. 핵산 분석은 유전형 분석, 유전자 발현, 카피수 변화, 및 분자 계수를 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0223] 본원은 다중 핵산 분석 방법을 제공한다. 이 방법은 (a) 세포로부터의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 지지체에 부착된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키고, 여기서 지지체에 부착된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 (i) 비-무작위 서열에 의해 연결된 2개 이상의 랜도머 서열을 포함하는 세포 표지 영역; 및 (ii) 분자 표지 영역을 포함하고; (b) 세포로부터의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드에 대해 하나 이상의 검정을 수행하는 것을 포함할 수 있다.

[0224] 또한, 단일 세포 핵산 라이브러리의 생산 방법이 본원에 개시된다. 이 방법은 (a) 세포로부터의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 지지체에 부착된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 접촉시키고, 여기서 지지체에 부착된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 (i) 비-무작위 서열에 의해 연결된 2개 이상의 랜도머 서열을 포함하는 세포 표지 영역; 및 (ii) 분자 표지 영역을 포함하고; 및 (b) 세포로부터의 하나 이상의 올리고뉴클레오티드에 대해

하나 이상의 검정을 수행하는 것을 포함할 수 있다.

[0225] 일부 예에서, 방법은 하나 이상의 세포를 마이크로웰 어레이 상에 부가하는 것을 포함한다. 부가되는 세포의 수는 계수를 통해 결정될 수 있다. 과량의 또는 미결합된 세포는 완충제 (예를 들어, 인산염 완충된 염수 완충제, HEPES, 트리스 (Tris))를 사용하여 세척 제거할 수 있다. 마이크로웰 어레이의 웰에 의해 포획될 수 있는 세포의 수는 세포의 크기에 관련될 수 있다. 예를 들어, 마이크로웰의 설계에 따라, 보다 큰 세포는 도 6에 도시된 바와 같이 더 작은 세포보다 더 쉽게 포획될 수 있다. 상이한 마이크로웰 (예를 들어, 상이한 치수)은 상이한 세포 유형을 포획하기 위해 사용될 수 있다.

[0226] 본원에서 설명되는 방법은 서열분석 또는 다른 분자 분석을 위한 핵산일 수 있는 서열의 첨가를 허용한다. 상기 방법은 RNA 또는 DNA 분자의 집단에서 발견되는 핵산 변이체, 돌연변이체, 다형성, 전위, 결실, 복귀 및 다른 정성적 사건의 검출을 허용할 수 있다. 예를 들어, 방법은 표적 빈도 (예를 들어, 유전자 발현 또는 대립유전자 분포)의 확인을 허용할 수 있다. 예를 들어, 방법은 또한 질병에 걸린 또는 비-질병에 걸린 대상체로부터 게놈 또는 트랜스크립톰 내의 돌연변이 또는 SNP의 확인을 허용한다. 방법은 또한 대상체로부터의 생물학적 샘플, 예컨대 외래 유기체 또는 바이러스, 예컨대 박테리아 또는 진균의 오염 또는 감염의 존재 또는 부재의 결정을 허용한다.

[0227] 세포는 임의의 방법에 의해 마이크로웰 내에 첨가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 희석된 세포 샘플로서 마이크로웰에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 세포는 마이크로웰에 첨가되고, 중력에 의해 마이크로웰 내에 침강하게 된다. 일부 실시양태에서, 세포는 마이크로웰에 첨가되고, 원심분리가 세포를 마이크로웰 내에 침강시키기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포는 하나 이상의 세포를 하나 이상의 마이크로웰 내로 주사함으로써 마이크로웰에 첨가된다. 예를 들어, 단일 세포는 단일 세포를 마이크로웰에 주사함으로써 마이크로웰에 첨가될 수 있다. 세포의 주사는 임의의 기기 또는 방법의 사용을 통해, 예컨대 현미 조작장치의 사용을 통해 실시될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 자석을 사용하여 마이크로웰에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 세포는 그 표면이 자성 입자, 예컨대 자성 미세입자 또는 자성 나노입자로 코팅되고, 자석 또는 자기장을 사용하여 마이크로웰에 첨가될 수 있다.

[0228] 세포를 포함하는 마이크로웰 어레이는 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체 (예를 들어, 비드)와 접촉될 수 있다. 비포획된 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체는 제거될 수 있다 (예를 들어, 완충제로 세척 제거될 수 있다). 도 5는 포획된 고체 지지체가 존재하는 마이크로웰 어레이를 보여준다. 마이크로웰은 적어도 하나 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 적어도 2개의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 최대 하나의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 최대 2개의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 초과의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 초과의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰 어레이의 몇몇 마이크로웰은 도 5에 제시된 바와 같이 하나의 고체 지지체를 포함할 수 있고, 마이크로웰 어레이의 몇몇 마이크로웰은 2개 이상의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 임의의 본 개시내용의 방법에서 덮을 필요가 없을 수 있다. 즉, 마이크로웰은 방법 동안 밀봉될 필요가 없을 수 있다. 마이크로웰이 덮이지 않을 때 (예를 들어, 밀봉되지 않을 때), 웰들은 하나의 마이크로웰의 내용물이 또 다른 마이크로웰 내로 확산할 수 없도록 이격될 수 있다.

[0229] 대안적으로 또는 추가로, 세포는 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체와 접촉하기 전에 포획 및/또는 정제될 수 있다. 세포의 포획 및/또는 정제 방법은 항체, 분자 스캐폴드, 및/또는 비드의 사용을 포함할 수 있다. 세포는 유동 세포측정법에 의해 정제할 수 있다. 상업적으로 이용가능한 키트를 사용하여 세포를 포획 또는 정제할 수 있다. 예를 들어, 다이나비즈(R)를 사용하여 세포를 단리할 수 있다. 자성 단리를 사용하여 세포를 정제할 수 있다. 세포는 원심분리에 의해 정제될 수 있다.

[0230] 세포는 세포 및 지지체를 포함하는 현탁액을 생성함으로써 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체와 접촉될 수 있다. 현탁액은 겔을 포함할 수 있다. 세포는 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체와 접촉하기 전에 지지체 상에 또는 용액 내에 고정될 수 있다. 대안적으로, 세포는 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체를 포함하는 현탁액에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 세포는 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체로 포매된 히드로겔에 첨가될 수 있다.

[0231] 단일 세포는 단일 올리고뉴클레오티드 연결된 고체 지지체와 접촉될 수 있다. 단일 세포는 다수의 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체와 접촉될 수 있다. 다수의 세포는 단일 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체와 상호작용할 수 있다. 다수의 세포는 다수의 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체와 상호작용할 수 있다.

올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체는 세포-유형 특이적일 수 있다. 대안적으로, 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체는 2개 이상의 상이한 세포 유형과 상호작용할 수 있다.

[0232] *용해*

[0233] 마이크로웰 내의 세포는 용해시킬 수 있다. 용해는 기계적 용해, 열 용해, 광학 용해, 및/또는 화학적 용해에 의해 수행할 수 있다. 화학적 용해는 소화 효소, 예컨대 프로테이나제 K, 펩신, 및 트립신의 사용을 포함할 수 있다. 용해는 마이크로웰에 대한 용해 완충제의 첨가에 의해 수행할 수 있다. 용해 완충제는 트리스 HCl을 포함할 수 있다. 용해 완충제는 적어도 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 또는 1 M 또는 그 초과의 트리스 HCl을 포함할 수 있다. 용해 완충제는 최대 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 또는 1M 또는 그 초과의 트리스 HCl을 포함할 수 있다. 용해 완충제는 약 0.1 M 트리스 HCl을 포함할 수 있다. 용해 완충제의 pH는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 또는 그 초과일 수 있다. 용해 완충제의 pH는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 또는 그 초과일 수 있다. 일부 예에서, 용해 완충제의 pH는 약 7.5이다. 용해 완충제는 염 (예를 들어, LiCl)을 포함할 수 있다. 용해 완충제 내의 염의 농도는 적어도 약 0.1, 0.5, 또는 1 M 또는 그 초과일 수 있다. 용해 완충제 내의 염의 농도는 최대 약 0.1, 0.5, 또는 1 M 또는 그 초과일 수 있다. 일부 예에서, 용해 완충제 내의 염의 농도는 약 0.5 M이다. 용해 완충제는 세제 (예를 들어, SDS, Li 도데실 술페이트, 트리톤 (triton) X, 트윈 (tween), NP-40)를 포함할 수 있다. 용해 완충제 내의 세제의 농도는 적어도 약 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7% 또는 그 초과일 수 있다. 용해 완충제 내의 세제의 농도는 최대 약 0.0001, 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7% 또는 그 초과일 수 있다. 일부 예에서, 용해 완충제 내의 세제의 농도는 약 1% Li 도데실 술페이트이다. 용해를 위해 방법에서 사용되는 시간은 사용되는 세제의 양에 따라 결정될 수 있다. 일부 예에서, 보다 많은 세제가 사용될수록, 용해에 필요한 시간이 단축된다. 용해 완충제는 킬레이팅제 (예를 들어, EDTA, EGTA)를 포함할 수 있다. 용해 완충제 내의 킬레이팅제의 농도는 적어도 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30 mM 또는 그 초과일 수 있다. 용해 완충제 내의 킬레이팅제의 농도는 최대 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 또는 30 mM 또는 그 초과일 수 있다. 일부 예에서, 용해 완충제 내의 킬레이팅제의 농도는 약 10 mM이다. 용해 완충제는 환원 시약 (예를 들어, 베타-머캅토에탄올, DTT)을 포함할 수 있다. 용해 완충제 내의 환원 시약의 농도는 적어도 약 1, 5, 10, 15, 또는 20 mM 또는 그 초과일 수 있다. 용해 완충제 내의 환원 시약의 농도는 최대 약 1, 5, 10, 15, 또는 20 mM 또는 그 초과일 수 있다. 일부 예에서, 용해 완충제 내의 환원 시약의 농도는 약 5 mM이다. 일부 예에서, 용해 완충제는 약 0.1 M 트리스HCl, 약 pH 7.5, 약 0.5 M LiCl, 약 1% 리튬 도데실 술페이트, 약 10 mM EDTA, 및 약 5 mM DTT를 포함할 수 있다.

[0234] 용해는 약 4, 10, 15, 20, 25, 또는 30℃의 온도에서 수행될 수 있다. 용해는 약 1, 5, 10, 15, 또는 20분 또는 그 초과 동안 수행할 수 있다. 용해된 세포는 적어도 약 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 또는 700000개 또는 그 초과의 표적 핵산 분자를 포함할 수 있다. 용해된 세포는 최대 약 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 또는 700000개 또는 그 초과의 표적 핵산 분자를 포함할 수 있다. 도 7은 용해를 통해 얻을 수 있는 표적 핵산 (즉, mRNA)의 농도에 대한 예시적인 통계를 보여준다.

[0235] *밀봉*

[0236] 마이크로웰 어레이의 마이크로웰은 용해 동안 밀봉될 수 있다. 밀봉은 인접한 마이크로웰들 사이에 표적 핵산의 교차 혼성화를 방지하기 위해 유용하다. 마이크로웰은 도 8a 및 b에 제시된 바와 같이 캡을 사용하여 밀봉될 수 있다. 캡은 고체 지지체일 수 있다. 캡은 비드를 포함할 수 있다. 비드의 직경은 마이크로웰의 직경보다 클 수 있다. 예를 들어, 캡은 마이크로웰의 직경보다 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 더 클 수 있다. 예를 들어, 캡은 마이크로웰의 직경보다 최대 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90% 더 클 수 있다.

[0237] 캡은 가교결합된 덱스트란 비드 (예를 들어, 세파덱스)를 포함할 수 있다. 가교결합된 덱스트란은 약 10 마이크로미터 내지 약 80 마이크로미터일 수 있다. 캡의 가교결합된 덱스트란은 20 마이크로미터 내지 약 50 마이크로미터일 수 있다. 캡은 예를 들어, 나노포어 무기 막 (예를 들어, 알루미늄 산화물), 투석 막, 유리 슬라이드, 커버슬립, 및/또는 친수성 플라스틱 필름 (예를 들어, 용해 완충제로 수화된 아가로스의 박막으로 코팅된 필름)을 포함할 수 있다.

[0238] 캡은 완충제가 마이크로웰의 내부로 및 외부로 통과하도록 허용할 수 있지만, 거대분자 (예를 들어, 핵산)가 웰 외부로 이동하는 것을 방지할 수 있다. 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 또는 그 초과의 뉴클레오티드의 거대분자는 캡에 의해 마이크로웰의 내부로 또는 외부로 이

동하는 것이 차단될 수 있다. 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개 또는 그 초과의 뉴클레오티드의 거대분자는 캡에 의해 마이크로웰의 내부로 또는 외부로 이동하는 것이 차단될 수 있다.

[0239] 밀봉된 마이크로웰 어레이는 마이크로웰의 상단에 단일층의 비드를 포함할 수 있다. 밀봉된 마이크로웰 어레이는 마이크로웰의 상단에 다수층의 비드를 포함할 수 있다. 밀봉된 마이크로웰 어레이는 약 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개 또는 그 초과의 층의 비드를 포함할 수 있다.

[0240] 비드, 또는 다수의 비드의 고체 지지체 (예를 들어, 마이크로웰 어레이) 상에 대한 침적은 무작위 또는 비-무작위일 수 있다. 예를 들어, 비드를 마이크로웰 어레이와 접촉시키는 것은 무작위 또는 비-무작위 접촉일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비드는 마이크로웰 어레이와 무작위로 접촉된다. 일부 실시양태에서, 비드는 마이크로웰 어레이와 비-무작위로 접촉된다. 다수의 비드의 마이크로웰 어레이에 대한 침적은 무작위 또는 비-무작위일 수 있다. 예를 들어, 다수의 비드의 마이크로웰 어레이에 대한 접촉은 무작위 또는 비-무작위 접촉일 수 있다. 일부 실시양태에서, 다수의 비드는 마이크로웰 어레이에 무작위로 접촉된다. 일부 실시양태에서, 다수의 비드는 마이크로웰 어레이에 비-무작위로 접촉된다.

[0241] **분자의 확률적 표지**

[0242] 샘플 태그 또는 분자 식별 표지가 올리고뉴클레오티드인 경우, 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 부착은 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 혼성화를 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 방법에 의해 수행될 수 있다. 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드는 표적 특이적 영역을 포함한다. 표적 특이적 영역은 적어도 일부의 표지된 분자에 상보성인 서열을 포함할 수 있다. 표적 특이적 영역은 분자에 혼성화하여 표지된 핵산을 생산할 수 있다. 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 혼성화 후에, 핵산 연장 반응이 발생할 수 있다. 핵산 연장 반응은 역전사일 수 있다.

[0243] 다수의 핵산을 샘플 태그에 부착 (다르게는, 접촉으로 언급됨)하는 것은 샘플 태그를 다수의 핵산 중의 하나 이상에 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 샘플 태그와 접촉시키는 것은 핵산 연장 반응의 수행을 포함할 수 있다. 핵산 연장 반응은 역전사 반응일 수 있다.

[0244] 다수의 핵산을 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 분자 식별 표지를 다수의 핵산 중의 하나 이상과 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 핵산 연장 반응의 수행을 포함할 수 있다. 핵산 연장 반응은 역전사를 포함할 수 있다.

[0245] 다수의 핵산을 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 샘플 태그를 다수의 핵산 중의 하나 이상과 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 분자 식별 표지를 샘플 태그와 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다.

[0246] 다수의 핵산을 샘플 태그와 접촉시키는 것은 분자 식별 표지를 다수의 핵산 중의 하나 이상과 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 샘플 태그와 접촉시키는 것은 샘플 태그를 분자 식별 표지와 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다.

[0247] 샘플 태그 및/또는 분자 식별 표지의 핵산에 대한 부착은 라이게이션에 의해 이루어질 수 있다. 다수의 핵산을 샘플 태그와 접촉시키는 것은 샘플 태그를 다수의 핵산 중의 임의의 하나에 라이게이션시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 분자 식별 표지를 다수의 핵산 중의 하나 이상에 라이게이션시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 샘플 태그와 접촉시키는 것은 분자 식별 표지를 하나 이상의 핵산에 라이게이션시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 샘플 태그를 하나 이상의 핵산에 라이게이션시키는 것을 포함할 수 있다. 라이게이션 기술은 평활 (blunt)-말단 라이게이션 및 점착성-말단 라이게이션을 포함한다. 라이게이션 반응물은 DNA 리가제, 예컨대 DNA 리가제 I, DNA 리가제 III, DNA 리가제 IV, 및 T4 DNA 리가제를 포함할 수 있다. 라이게이션 반응물은 RNA 리가제, 예컨대 T4 RNA 리가제 I 및 T4 RNA 리가제 II를 포함할 수 있다.

[0248] 라이게이션 방법은 예를 들어 문헌 [Sambrook et al. (2001)] 및 [New England BioLabs] 카탈로그에 기재되어 있고, 이들 문헌은 모든 목적을 위해 본원에 참고로 포함된다. 방법은 평활 및 점착성 말단이 존재하는 이중체 DNA 또는 RNA 내의 병치된 5' 포스페이트와 3' 히드록실 말단 사이에 포스포디에스테르 결합의 형성을 촉매하는 T4 DNA 리가제; 상보성 표적 DNA에 혼성화되는 2개의 인접한 올리고뉴클레오티드의 병치된 5' 포스페이트와 3' 히드록실 말단 사이에 포스포디에스테르 결합의 형성을 촉매하는 Taq DNA 리가제; 응집성 (cohesive) 말단을 포함하는 이중체 DNA 내의 병치된 5' 포스페이트와 3' 히드록실 말단 사이에 포스포디에스테르 결합의 형성을 촉

매하는 이. 콜라이(*E. coli*) DNA 리가제; 및 3'→5' 포스포디에스테르 결합의 형성을 통해 5' 포스포릴-말단 핵산 공여자의 3' 히드록실-말단 핵산 수용자 (acceptor)에 대한 라이게이션을 촉매하는 T4 RNA 리가제 (여기서, 기질은 단일 가닥 RNA 및 DNA 및 디뉴클레오시드 피로포스페이트를 포함함); 또는 관련 기술 분야에서 설명된 임의의 다른 방법의 사용을 포함한다. 단편화된 DNA는 라이게이션에 적합한 말단을 생성함으로써 라이게이션을 용이하게 하기 위해 말단의 하나 또는 둘 모두에 대한 어댑터의 라이게이션 전에 하나 이상의 효소, 예를 들어, 엔도뉴클레아제로 처리될 수 있다.

[0249] 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드의 두 말단 모두가 분자에 부착된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 두 말단은 분자의 하나 이상의 말단에 혼성화 및/또는 라이게이션될 수 있다. 일부 예에서, 분자의 두 말단에 대한 올리고뉴클레오티드의 두 말단의 부착은 고리화된 표지된 핵산의 형성을 유발한다. 올리고뉴클레오티드의 두 말단은 또한 분자의 동일한 말단에 부착될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드의 5' 말단은 분자의 3' 말단에 라이게이션되고, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단은 분자의 3' 말단에 혼성화되어, 한 말단에 머리핀 구조를 갖는 표지된 핵산을 생성한다. 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드는 분자의 중앙에 부착된다.

[0250] 일부 예에서, 핵산에 대한 올리고뉴클레오티드의 부착은 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 다수의 핵산에 부착시키는 것을 포함한다. 방법은 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 샘플-태그부착된 핵산에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 방법은 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 표지된 핵산에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 핵산, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지에 부착하는 것은 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 핵산, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지에 라이게이션하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 링커는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 링커는 적어도 약 1000개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0251] 일부 예에서, 분자에 대한 분자 바코드의 부착은 하나 이상의 어댑터의 사용을 포함한다. 본원에서 사용할 때, 용어 "어댑터" 및 "어댑터 영역"은 교환가능하게 사용될 수 있다. 어댑터는 분자에 대한 어댑터의 부착을 허용하는 표적 특이적 영역, 및 어댑터에 대한 분자 바코드의 부착을 허용하는 올리고뉴클레오티드 특이적 영역을 포함할 수 있다. 어댑터는 범용 프라이머를 추가로 포함할 수 있다. 어댑터는 범용 PCR 영역을 추가로 포함할 수 있다. 어댑터는 혼성화 및/또는 라이게이션을 포함하고 이로 제한되지 않는 방법에 의해 분자 및/또는 분자 바코드에 부착될 수 있다.

[0252] 어댑터를 핵산의 단편에 라이게이션하는 방법은 잘 알려져 있다. 어댑터는 이중 가닥, 단일 가닥 또는 부분적으로 단일 가닥일 수 있다. 몇몇 측면에서, 어댑터는 상보성의 영역, 예를 들어, 완전한 상보성의 약 10 내지 30, 또는 약 15 내지 40개의 염기를 갖는 2개의 올리고뉴클레오티드로부터 형성되고; 이에 의해 2개의 올리고뉴클레오티드가 함께 혼성화될 때 이들은 이중 가닥 영역을 형성한다. 임의로, 올리고뉴클레오티드의 하나 또는 둘 모두는 다른 올리고뉴클레오티드에 상보성이 아니고 어댑터의 하나 또는 둘 모두의 말단에 단일 가닥 오버행을 형성하는 영역을 가질 수 있다. 단일 가닥 오버행은 약 1 내지 약 8개 염기, 또는 약 2 내지 약 4개 염기일 수 있다. 오버행은 "점착성-말단" 라이게이션을 용이하게 하기 위해 제한 효소를 사용한 절단에 의해 생성된 오버행에 상보성일 수 있다. 어댑터는 다른 특징부, 예컨대 프라이머 결합 부위 및 제한 부위를 포함할 수 있다. 몇몇 측면에서, 제한 부위는 타입 IIS 제한 효소 또는 그의 인식 서열의 외부에서 절단하는 또 다른 효소, 예컨대 EcoP15I에 대한 것일 수 있다 (그 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌 [Mucke et al. J Mol Biol 2001, 312(4):687-698] 및 US 5,710,000 참조).

[0253] 일부 예에서, 다수의 샘플 내의 핵산의 카피수를 확률적으로 계수하는 것은 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하기 위해 어댑터, 어댑터의 상보체, 어댑터의 역상보체 또는 그의 일부를 검출하는 것을 포함한다. 어댑터, 어댑터의 상보체, 어댑터의 역상보체 또는 그의 일부의 검출은 어댑터, 어댑터의 상보체, 어댑터의 역상보체 또는 그의 일부의 서열분석을 포함할 수 있다.

[0254] 분자 바코드는 분자의 임의의 영역에 부착될 수 있다. 예를 들어, 분자 바코드는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA, RNA)의 5' 또는 3' 말단에 부착될 수 있다. 예를 들어, 분자 바코드의 표적-특이적 영역은 분자의 5' 영역 내의 서열에 상보성인 서열을 포함한다. 분자 바코드의 표적-특이적 영역은 또한 분자의 3' 영역 내의 서열에 상보성인 서열을 포함한다. 일부 예에서, 분자 바코드는 유전자 또는 유전자 생성물 내의 영역에 부착된다. 예를 들어, 게놈 DNA는 단편화되고, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 단편화된 DNA에 부착된다. 다른 예에서, RNA 분자는 선택적으로 스플라이싱되고, 분자 바코드는 선택적으로 스플라이싱된 변이체에 부착된다. 또 다른 예에서, 폴리뉴클레오티드는 소화되고, 분자 바코드 는 소화된 폴리뉴클레오티드에 부착된다. 또 다른

예에서, 분자 바코드의 표적-특이적 영역은 분자 내의 서열에 상보성인 서열을 포함한다.

[0255] 머리핀을 포함하는 분자 바코드, 샘플 태그 (예를 들어, 샘플 인덱스), 세포 표지, 또는 분자 식별 표지 (예를 들어, 분자 표지)는 혼성화 연쇄 반응 (HCR)을 위한 프로브로서 작용할 수 있고, 따라서 HCR 프로브로 언급될 수 있다. HCR 프로브는 머리핀 구조를 포함하는 분자 바코드를 포함할 수 있다. HCR 프로브는 머리핀 구조를 포함하는 샘플 태그를 포함할 수 있다. HCR 프로브는 머리핀 구조를 포함하는 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 또한, 하나 이상의 핵산 분자를 HCR 프로브로 확률적으로 표지하는 것을 포함하는 확률적 표지-기반 혼성화 연쇄 반응 (HCR) 방법이 본원에 개시되고, 여기서 HCR 프로브는 머리핀을 포함하는 분자 바코드를 포함하고, 하나 이상의 핵산 분자는 혼성화 연쇄 반응을 위한 개시제로서 작용한다. 또한, 하나 이상의 핵산 분자를 HCR 프로브로 확률적으로 표지하는 것을 포함하는 확률적 표지-기반 혼성화 연쇄 반응 (HCR) 방법이 본원에 개시되고, 여기서 HCR 프로브는 머리핀을 포함하는 샘플 태그를 포함하고, 하나 이상의 핵산 분자는 혼성화 연쇄 반응을 위한 개시제로서 작용한다. 또한, 하나 이상의 핵산 분자를 HCR 프로브로 확률적으로 표지하는 것을 포함하는 확률적 표지-기반 혼성화 연쇄 반응 (HCR) 방법이 본원에 개시되고, 여기서 HCR 프로브는 머리핀을 포함하는 분자 식별 표지를 포함하고, 하나 이상의 핵산 분자는 혼성화 연쇄 반응을 위한 개시제로서 작용한다.

[0256] HCR 프로브는 오버행 영역이 존재하는 머리핀을 포함할 수 있다. 머리핀의 오버행 영역은 표적 특이적 영역을 포함할 수 있다. 오버행 영역은 올리고dT 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 샘플은 확률적 표지 전에 하나 이상의 제한 뉴클레아제로 처리될 수 있다. 오버행 영역은 제한 효소 인식 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산 분자를 포함하는 샘플은 어댑터-핵산 분자 혼성체 (hybrid)를 생산하기 위해 확률적 표지 전에 하나 이상의 어댑터와 접촉될 수 있다. 오버행 영역 및 줄기는 하나 이상의 어댑터에 상보성일 수 있다. HCR 프로브는 루프가 존재하는 머리핀을 포함할 수 있다. HCR 프로브의 루프는 표지 영역 및/또는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다.

[0257] 핵산 분자에 대한 제1 HCR 프로브의 혼성화는 표지된 핵산의 형성을 유발할 수 있고, 여기서 제1 HCR 프로브는 선형화되어 제1 선형화된 HCR 프로브를 생산한다. 표지된 핵산의 제1 선형화된 HCR 프로브는 2개의 선형화된 HCR 프로브를 갖는 표지된 핵산을 생산하기 위해 표지된 핵산에 대한 제2 HCR 프로브의 혼성화를 위한 개시제로서 작용할 수 있다. 제2 선형화된 HCR 프로브는 또 다른 혼성화 반응을 위한 개시제로서 작용할 수 있다. 이 과정은 다수의 선형화된 HCR 프로브를 갖는 표지된 핵산을 생산하기 위해 다수회 반복될 수 있다. HCR 프로브 상의 검출가능 표지는 표지된 핵산의 검출을 가능하게 할 수 있다. 검출가능 표지는 임의의 유형의 표지 (예를 들어, 형광단, 발색단, 소분자, 나노입자, 합텐, 효소, 항체, 자석)일 수 있다. 검출가능 표지는 단일 표지의 단편을 포함할 수 있다. 검출가능 표지들은 근접하여 존재할 때 검출가능한 신호를 생성할 수 있다. HCR 프로브가 머리핀일 때, 검출가능 표지는 검출가능한 신호를 생성하기에는 너무 멀리 떨어져 존재할 수 있다. HCR 프로브가 선형화되고 다수의 선형화된 HCR 프로브가 함께 혼성화될 때, 검출가능 표지는 검출가능 신호를 생성하기에 충분히 매우 근접하여 존재할 수 있다. 예를 들어, HCR 프로브는 2개의 피렌 모이어티를 검출가능 표지로서 포함할 수 있다. 대안적으로, 검출가능 표지는 나노입자일 수 있다. 확률적 표지-기반 HCR 방법은 표지된 핵산에 대한 다수의 머리핀 HCR 프로브의 부착을 허용하여, 신호 증폭을 유발할 수 있다. 확률적 표지-기반 HCR은 핵산 분자의 검출, 분석 및/또는 정량의 감도를 증가시킬 수 있다. 확률적 표지-기반 HCR은 하나 이상의 핵산 분자의 검출, 분석 및/또는 정량의 정확도를 증가시킬 수 있다. 용해 후에, 세포의 표적 핵산은 고체 지지체에 접합된 올리고뉴클레오티드에 혼성화할 수 있다. 표적 핵산은 올리고뉴클레오티드의 표적 결합 영역에 혼성화할 수 있다. 핵산은 올리고뉴클레오티드의 임의의 영역에 혼성화할 수 있다.

[0258] 일부 예에서, 모든 올리고뉴클레오티드가 표적 핵산에 결합할 수 있는 것은 아니다. 이것은 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드의 수가 표적 핵산의 수보다 더 크기 때문이다. 고체 지지체에 접합된 올리고뉴클레오티드의 수는 세포 내의 표적 핵산의 수보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10배 더 많을 수 있다. 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%의 올리고뉴클레오티드가 표적 핵산에 의해 결합될 수 있다. 최대 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100%의 올리고뉴클레오티드가 표적 핵산에 의해 결합될 수 있다. 일부 예에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개 또는 그 초과의 상이한 표적 핵산이 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 의해 포획될 수 있다. 일부 예에서, 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개 또는 그 초과의 상이한 표적 핵산이 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 의해 포획될 수 있다.

[0259] 일부 예에서, 표적 핵산의 카피수의 적어도 약 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%가 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 결합된다. 일부 예에서, 표적 핵산의 카피수의 최대 약 40, 50, 60, 70,

80, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100%가 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 결합된다.

[0260] ***회수***

[0261] 용해 후에, 고체 지지체는 회수될 수 있다. 고체 지지체의 회수는 자석을 사용하여 수행할 수 있다. 고체 지지체의 회수는 마이크로웰 어레이의 용융 및/또는 초음파 처리에 의해 수행할 수 있다. 고체 지지체의 회수는 원심분리를 포함할 수 있다. 고체 지지체의 회수는 크기 배제를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 적어도 약 50, 60, 70, 80, 90, 95, 또는 100%의 고체 지지체가 마이크로웰로부터 회수된다. 일부 예에서, 최대 약 50, 60, 70, 80, 90, 95, 또는 100%의 고체 지지체가 마이크로웰로부터 회수된다.

[0262] **역전사**

[0263] 본원에 개시된 방법은 표지된-cDNA 분자를 생산하기 위해 표지된-RNA 분자의 역전사를 추가로 포함할 수 있다. 일부 예에서, 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부는 역전사 반응을 위한 프라이머로서 작용한다. 올리고뉴클레오티드의 올리고dT 부분은 cDNA 분자의 제1 가닥 합성을 위한 프라이머로서 작용할 수 있다.

[0264] 일부 예에서, 표지된 cDNA 분자는 새로운 확률적 표지 반응을 위한 분자로서 사용될 수 있다. 표지된 cDNA는 역전사 전의 RNA에 부착된 제1 태그 또는 태그의 세트 및 cDNA 분자에 부착된 제2 태그 또는 태그의 세트를 포함할 수 있다. 상기 다수의 표지 반응은 예를 들어 제1 태그와 제2 태그의 부착 사이에 발생하는 사건, 예를 들어, 선택적인 증폭 반응 또는 역전사 반응의 효율을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0265] 또 다른 예에서, 올리고뉴클레오티드는 RNA 분자의 5' 말단에 부착되어 표지된-RNA 분자를 생성한다. 표지된-RNA 분자의 역전사는 역전사 프라이머의 첨가에 의해 발생할 수 있다. 일부 예에서, 역전사 프라이머는 올리고dT 프라이머, 무작위 헥사뉴클레오티드 프라이머, 또는 표적-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머이다. 일반적으로, 올리고dT 프라이머는 12-18개 뉴클레오티드 길이이고, 포유동물 mRNA의 3' 말단의 내인성 폴리(A)+ 테일에 결합한다. 무작위 헥사뉴클레오티드 프라이머는 다양한 상보성 부위에서 mRNA에 결합할 수 있다. 표적-특이적 올리고뉴클레오티드 프라이머는 일반적으로 관심있는 mRNA를 선택적으로 프라이밍할 수 있다.

[0266] 일부 예에서, 방법은 표지된-RNA 분자를 반복적으로 역전사시켜 다수의 표지된-cDNA 분자를 생산하는 것을 포함한다. 본원에 개시된 방법은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20회의 역전사 반응의 수행을 포함할 수 있다. 방법은 적어도 약 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100회의 역전사 반응의 수행을 포함할 수 있다.

[0267] 핵산 합성 (예를 들어, cDNA 합성)은 회수된 고체 지지체 상에서 수행할 수 있다. 핵산 합성은 고체 지지체를 현탁된 상태로 유지하기 위해서 튜브에서 및/또는 회전자 (rotor)에서 수행할 수 있다. 생성되는 합성 핵산은 후속적인 핵산 증폭 및/또는 서열분석 기술에서 사용될 수 있다. 핵산 합성은 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 부착된 RNA에 대한 cDNA 카피의 생성을 포함할 수 있다. cDNA 카피의 생성은 역전사효소 (RT) 또는 RT 활성을 갖는 DNA 폴리머라제를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 이것은 단일 가닥 cDNA 분자의 생성을 유도할 수 있다. 핵산 합성 후에, 미사용 올리고뉴클레오티드는 고체 지지체로부터 제거될 수 있다. 올리고뉴클레오티드의 제거는 엑소뉴클레아제 처리에 의해 (예를 들어, ExoI에 의해) 실시될 수 있다.

[0268] 일부 실시양태에서, 핵산은 화학적 절단을 이용하여 고체 지지체로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 핵산에 존재하는 화학기 또는 변형된 염기는 고체 지지체로부터 그의 제거를 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 효소가 고체 지지체로부터 핵산을 제거하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 제한 엔도뉴클레아제 소화를 통해 고체 지지체로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, dUTP 또는 ddUTP 함유 핵산의 우라실-d-글리코실라제 (UDG) 처리는 핵산을 고체 지지체로부터 제거하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 뉴클레오티드 절제를 수행하는 효소, 예컨대 염기 절제 수복 효소, 예컨대 퓨린 결여/피리미딘 결여 (apurinic/apyrimidinic) (AP) 엔도뉴클레아제를 사용하여 고체 지지체로부터 제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 광절단가능한 기 및 광을 사용하여 고체 지지체로부터 제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 고체 지지체로부터 핵산을 제거하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 절단가능한 링커는 비오틴/아비딘, 비오틴/스트렙타비딘, 비오틴/뉴트라비딘, Ig-단백질 A, 광-불안정성 링커, 산 또는 염기 불안정성 링커기, 또는 앱타머 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0269] 일부 실시양태에서, 핵산은 증폭되지 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 핵산을 서열분석하기 전에 증폭되지 않는다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체에 부착되지 않은 핵산은 사전 증폭을 수행하지 않으면서 직접 서열분석될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 고체 지지체에 부착될 때 증폭을 수행하지 않으면서 직접 서열분석될 수 있고, 예를 들어, 고체 지지체에 부착된 핵산은 고체 지지체에 부착된 상태에서 직접 서열분석될 수

있다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체로부터 제거된 핵산은 직접 서열분석될 수 있다. 예를 들어, 고체 지지체로부터 제거된 핵산은 증폭을 수행하지 않으면서 직접 서열분석될 수 있다. 증폭을 수행하지 않으면서 서열분석에 도움을 주는 임의의 서열분석 플랫폼이 서열분석을 수행하기 위해 사용될 수 있다.

[0270] **증폭**

[0271] 핵산은 합성된 (예를 들어, 역전사된) 후, 증폭될 수 있다. 증폭은 다수의 표적 핵산 서열이 동시에 증폭되는 다중 방식으로 수행할 수 있다. 증폭은 서열분석 어댑터를 핵산에 첨가할 수 있다. 증폭은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 수행할 수 있다. PCR은 DNA의 상보성 가닥의 동시 프라이머 연장에 의해 특이적 DNA 서열의 시험관내 증폭을 위한 반응을 나타낼 수 있다. PCR은 RT-PCR, 실시간 PCR, 네스티드 PCR, 정량적 PCR, 다중 PCR, 디지털 PCR, 및 어셈블리 PCR을 포함하고 이로 제한되지 않는 파생된 반응 형태를 포함할 수 있다.

[0272] 방법은 하나 이상의 증폭 반응을 수행하여 표지된 핵산 앰플리콘을 생산하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 핵산은 표지된 핵산을 검출하기 전에 증폭될 수 있다. 방법은 하나 이상의 증폭 반응 수행 전에 제1 및 제2 샘플을 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0273] 증폭 반응은 샘플 태그의 적어도 일부를 증폭시키는 것을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 표지의 적어도 일부를 증폭시키는 것을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 샘플 태그, 표지, 핵산, 또는 이들의 조합의 적어도 일부를 증폭시키는 것을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 100%를 증폭시키는 것을 포함할 수 있다. 방법은 샘플-태그부착된 핵산 또는 분자 식별 표지된 핵산의 하나 이상의 cDNA 카피를 생산하기 위해 하나 이상의 cDNA 합성 반응을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0274] 표지된 핵산의 증폭은 PCR-기반 방법 또는 비-PCR 기반 방법을 포함할 수 있다. 표지된 핵산의 증폭은 표지된 핵산의 기하급수적 증폭을 포함할 수 있다. 표지된 핵산의 증폭은 표지된 핵산의 선형 증폭을 포함할 수 있다.

[0275] 일부 예에서, 표지된 핵산의 증폭은 비-PCR 기반 방법을 포함한다. 비-PCR 기반 방법의 예는 다수의 변위 (displacement) 증폭 (MDA), 전사-매개 증폭 (TMA), 핵산 서열-기반 증폭 (NASBA), 가닥 변위 증폭 (SDA), 실시간 SDA, 롤링 서클 (rolling circle) 증폭, 또는 서클-투-서클 (circle-to-circle) 증폭을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 비-PCR-기반 증폭 방법은 DNA 또는 RNA 표적을 증폭시키기 위한 DNA-의존 RNA 폴리머라제-유도 RNA 전사 증폭 또는 RNA-유도 DNA 합성 및 전사의 다수의 사이클 (WO 89/01050; WO 88/10315; 및 미국 특허 5,130,238; 5,409,818; 5,466,586; 5,514,545; 5,554,517; 5,888,779; 6,063,603; 및 6,197,554), 리가제 연쇄 반응 (LCR), 미국 특허 4,786,600에 기재되어 있는 Qβ 레플리카제 (Qβ) 방법, 회문식 (palindromic) 프로브의 사용, 가닥 변위 증폭, 제한 엔도뉴클레아제를 사용한 올리고뉴클레오티드-유도 증폭, 프라이머가 핵산 서열에 혼성화되고 생성되는 이중체가 연장 반응 및 증폭 전에 절단되는 증폭 방법, 5' 엑소뉴클레아제 활성이 결여된 핵산 폴리머라제를 사용한 가닥 변위 증폭 (미국 특허 6,214,587), 롤링 서클 증폭, 및 분지 (ramification) 연장 증폭 (RAM) (미국 특허 5,942,391)을 포함한다.

[0276] 표지된 핵산의 증폭은 혼성화 연쇄 반응 (HCR) 기반 방법을 포함할 수 있다 ([Dirks and Pierce, PNAS, 2004]; [Zhang et al., Anal Chem, 2012]). HCR 기반 방법은 DNA-기반 HCR을 포함할 수 있다. HCR 기반 방법은 하나 이상의 표지된 프로브를 포함할 수 있다. 하나 이상의 표지된 프로브는 본원에 개시된 하나 이상의 샘플 태그 또는 분자 식별 표지, 또는 그의 상보체를 포함할 수 있다.

[0277] 일부 예에서, 본원에 개시된 방법은 표지된 핵산 (예를 들어, 표지된-RNA, 표지된-DNA, 표지된-cDNA)에 대해 폴리머라제 연쇄 반응을 수행하여 표지된-앰플리콘을 생산하는 것을 추가로 포함한다. 표지된-앰플리콘은 이중 가닥 분자일 수 있다. 이중 가닥 분자는 이중 가닥 RNA 분자, 이중 가닥 DNA 분자, 또는 DNA 분자에 혼성화된 RNA 분자를 포함할 수 있다. 이중 가닥 분자의 하나의 가닥 또는 두 가닥 모두가 샘플 태그 또는 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 대안적으로, 표지된-앰플리콘은 단일-가닥 분자이다. 단일 가닥 분자는 DNA, RNA, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명의 핵산은 합성 또는 변경된 핵산을 포함할 수 있다.

[0278] 폴리머라제 연쇄 반응은 PCR, HD-PCR, Next Gen PCR, 디지털 RTA, 또는 이들의 임의의 조합과 같은 방법에 의해 수행할 수 있다. 추가의 PCR 방법은 대립유전자-특이적 PCR, Alu PCR, 어셈블리 PCR, 비대칭 PCR, 소적 (droplet) PCR, 에멀젼 PCR, 헬리카제 의존 증폭 HDA, 고온 출발 (hot start) PCR, 역 (inverse) PCR, 기하급수후 선형 (linear-after-the-exponential) (LATE)-PCR, 긴 (long) PCR, 다중 PCR, 네스티드 PCR, 헤미-네스티드 PCR, 정량적 PCR, RT-PCR, 실시간 PCR, 단일 세포 PCR, 터치다운 (touchdown) PCR 또는 이들의 조합을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0279] 다중 PCR 반응은 네스티드 PCR 반응을 포함할 수 있다. 방법은 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있고, 여기서 제1 프라이머는 다수의 핵산의 임의의 하나에, 다수의 핵산의 임의의 하나의 3' 말단으로부터의 적어도 300 내지 400개의 뉴클레오티드에서 어닐링하고, 제2 프라이머는 다수의 핵산의 임의의 하나에, 다수의 핵산의 임의의 하나의 3' 말단으로부터의 적어도 200 내지 300개의 뉴클레오티드에서 어닐링하고, 제1 프라이머 및 제2 프라이머는 다수의 핵산의 임의의 하나의 3' 말단을 향한 상보성 DNA 합성물을 생성한다.

[0280] 일부 예에서, 폴리머라제 연쇄 반응의 수행은 제1 표적 특이적 프라이머를 표지된 핵산에 어닐링하는 것을 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 폴리머라제 연쇄 반응의 수행은 범용 프라이머를 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 범용 프라이머 결합 부위 영역에 어닐링하는 것을 포함하고, 여기서 샘플 태그 또는 분자 식별 표지는 표지된 핵산 또는 표지된-앰플리콘 상에 존재한다. 본원에 개시된 방법은 제2 표적 특이적 프라이머를 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘에 어닐링하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0281] 일부 예에서, 방법은 표지된 핵산을 반복적으로 증폭시켜 다수의 표지된-앰플리콘을 생산하는 것을 포함한다. 본원에 개시된 방법은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20회의 증폭 반응의 수행을 포함할 수 있다. 대안적으로, 방법은 적어도 약 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100회의 증폭 반응의 수행을 포함한다.

[0282] 다른 적합한 증폭 방법은 리가제 연쇄 반응 (LCR) (예를 들어, [Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989)], [Landegren et al., Science 241, 1077 (1988)] 및 [Barringer et al. Gene 89:117 (1990)]), 전사 증폭 ([Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989)] 및 WO88/10315), 자가 유지 (self-sustained) 서열 복제 ([Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990)] 및 WO90/06995), 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 선택적 증폭 (미국 특허 6,410,276), 컨센서스 서열 프라이밍된 폴리머라제 연쇄 반응 (CP-PCR) (미국 특허 4,437,975), 임의로 프라이밍된 폴리머라제 연쇄 반응 (AP-PCR) (미국 특허 5,413,909, 5,861,245), 롤링 서클 증폭 (RCA) (예를 들어, 문헌 [Fire and Xu, PNAS 92:4641 (1995)] 및 [Liu et al., J. Am. Chem. Soc. 118:1587 (1996)] 및 미국 특허 5,648,245), 가닥 변위 증폭 ([Lasken and Egholm, Trends Biotechnol. 2003 21(12):531-5]; [Barker et al. Genome Res. 2004 May;14(5):901-7]; [Dean et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(8):5261-6]; [Walker et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6, 1992] 및 [Paez, et al. Nucleic Acids Res. 2004; 32(9):e71] 참조), PCT 특허 출원 PCT/US87/00880에 기재되어 있는 Q베타 레플리카제 및 핵산 기반 서열 증폭 (NABSA) (각각 본원에 참고로 포함된 미국 특허 5,409,818, 5,554,517, 및 6,063,603 참조)를 포함한다. 사용할 수 있는 다른 증폭 방법은 각각 본원에 참고로 포함된 미국 특허 6,582,938, 5,242,794, 5,494,810, 4,988,617, 및 US 특허 공개 20030143599에 기재되어 있다. DNA는 또한 다중 유전자좌-특이적 PCR에 의해 또는 어댑터-라이게이션 및 단일 프라이머 PCR (문헌 [Kinzler and Vogelstein, NAR (1989) 17:3645-53] 참조)을 사용하여 증폭될 수 있다. 다른 이용가능한 증폭 방법, 예컨대 균형을 이룬 (balanced) PCR (Makrigiorgos, et al. (2002), Nat Biotechnol, Vol. 20, pp.936-9)이 또한 사용될 수 있다.

[0283] 분자 전위 프로브 ("MIP")는 또한 선택된 표적의 증폭을 위해 사용될 수 있다. MIP는 고리화전 (pre-circle) 프로브의 말단이, 증폭되는 영역에 인접하는 영역에 상보성이도록 생성될 수 있다. 갭 (gap)은 표적의 상보체가 라이게이션 전에 MIP 내로 도입되어 닫힌 원을 형성하도록 프로브의 말단의 연장에 의해 닫힐 수 있다. 닫힌 원은 문헌 [Hardenbol et al., Genome Res. 15:269-275 (2005)] 및 미국 특허 6,858,412에 이전에 개시된 바와 같이 증폭되고 서열분석 또는 혼성화에 의해 검출될 수 있다.

[0284] 증폭은 하나 이상의 대조군 핵산을 다수의 핵산을 포함하는 하나 이상의 샘플에 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 증폭은 하나 이상의 대조군 핵산을 다수의 핵산에 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 대조군 핵산은 대조군 표지를 포함할 수 있다.

[0285] 증폭은 하나 이상의 비-천연 뉴클레오티드의 사용을 포함할 수 있다. 비-천연 뉴클레오티드는 광불안정성 및/또는 촉발가능 (triggerable) 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비-천연 뉴클레오티드의 예는 펩티드 핵산 (PNA), 모르폴리노 및 잠금 핵산 (LNA), 및 글리콜 핵산 (GNA) 및 트레오스 핵산 (TNA)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 비-천연 뉴클레오티드는 증폭 반응의 하나 이상의 사이클에 첨가될 수 있다. 비-천연 뉴클레오티드의 첨가는 생성물을 증폭 반응에서 특정 사이클 또는 시점으로서 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0286] 하나 이상의 증폭 반응의 수행은 하나 이상의 프라이머의 사용을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 7-9개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 12-15개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있

다. 하나 이상의 프라이머는 다수의 표지된 핵산의 적어도 일부에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 다수의 표지된 핵산의 3' 말단 및/또는 5' 말단에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 다수의 표지된 핵산의 내부 영역에 어닐링될 수 있다. 내부 영역은 다수의 표지된 핵산의 3' 말단으로부터의 적어도 약 50, 100, 150, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 1000개의 뉴클레오티드일 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 프라이머의 고정된 패널을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 하나 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 하나 또는 그 초과의 제어 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 하나 또는 그 초과의 하우스키핑 (housekeeping) 유전자 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 표 23 내의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 프라이머를 포함한다. 범용 프라이머는 범용 프라이머 결합 부위에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 제1 샘플 태그, 제2 샘플 태그, 분자 식별 표지, 핵산 또는 그의 생성물에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 프라이머 및 맞춤형 프라이머를 포함한다. 맞춤형 프라이머는 하나 이상의 표적 핵산을 증폭시키도록 설계될 수 있다. 표적 핵산은 하나 이상의 샘플 내의 전체 핵산의 하위세트를 포함할 수 있다. 표적 핵산은 하나 이상의 샘플 내의 전체 표지된 핵산의 하위세트를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 96개 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 960개 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 9600개 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 2개 이상의 상이한 표지된 핵산에 어닐링될 수 있다. 2개 이상의 상이한 표지된 핵산은 하나 이상의 유전자에 대응할 수 있다.

[0287] a) 선택된 프라이머가 i) 3개 이하의 순차적인 구아닌, 3개 이하의 순차적인 시토신, 4개 이하의 순차적인 아데닌, 및 4개 이하의 순차적인 티민; ii) 구아닌 또는 시토신인 적어도 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오티드; 및 iii) 쉽게 머리핀 구조를 형성하지 않는 서열을 포함할 수 있는 제1 패스; b) i) 모든 전사체의 높은 적용 범위를 갖는 다수의 서열을 선택하는 제1 라운드; 및 ii) 나머지 전사체의 가장 높은 적용 범위 및 4 이하의 다른 선택된 서열과의 상보성 점수를 갖는 서열을 선택하는 1회 이상의 후속 라운드를 포함하는 제2 패스; 및 c) 적용 범위가 포화되거나 또는 맞춤형 프라이머의 총수가 약 96개 이하일 때까지 선택된 세트에 서열을 첨가하는 것을 포함하는, 맞춤형 프라이머를 선택하는 방법이 본원에 개시된다.

[0288] 하나 이상의 mRNA 전사체, 구조 RNA를 포함하는 비-코딩 전사체, 전사된 위유전자 (pseudogene), 게놈 주해 (annotation) 과정에 의해 제시되는 모델 mRNA, 게놈 콘티그 (게놈 contig에 대응하는 서열)에 대응하는 서열, 또는 이들의 임의의 조합물을 기초로 하여 적어도 하나의 공통적인 프라이머를 선택하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0289] 맞춤형 프라이머의 선택 방법은 하나 이상의 하위세트의 핵산을 농축하는 프라이머 선택 방법을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 하위세트는 저풍부도의 mRNA를 포함할 수 있다.

[0290] 맞춤형 프라이머의 선택 방법은 컴퓨터 알고리즘을 추가로 포함할 수 있다. 방법에 사용되는 프라이머는 사용자 규정 입력 서열을 기초로 하여 프라이머 서열을 제시하는 컴퓨터 프로그램인 Primer3을 사용하여 설계될 수 있다. 다른 프라이머 설계도 또한 사용될 수 있거나, 또는 프라이머는 컴퓨터 프로그램의 도움 없이 눈으로 선택될 수 있다. 프라이머 설계를 대부분의 용도에 맞도록 하기 위한 프로그램에 이용가능한 많은 많은 선택사항이 존재한다. Primer3은 올리고뉴클레오티드 용융 온도, 길이, GC 함량, 3' 안정성, 추정된 2차 구조, 비바람직한 서열 (예를 들어 산재된 반복체)의 어닐링 또는 증폭 가능성 및 동일한 프라이머의 2개의 카피의 프라이머-이량체 형성을 포함하고 이로 제한되지 않는 많은 인자를 고려할 수 있다. 프라이머쌍의 설계시에, Primer3은 생성물 크기 및 용융 온도, 쌍 내의 2개의 프라이머 사이의 프라이머-이량체 형성 가능성, 프라이머 용융 온도의 차이, 및 회피되는 관심있는 특정 영역에 대한 프라이머 위치를 고려할 수 있다.

[0291] 본원에 개시된 방법, 조성물 및 키트는 표 23-24에 개시된 하나 이상의 프라이머를 포함할 수 있다.

[0292] **서열분석**

[0293] 몇몇 측면에서, 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물 (예를 들어, 표지된-앰플리콘, 표지된-cDNA 분자)의 서열을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 증폭된 표적 핵산은 서열분석에 적용될 수 있다. 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열의 결정은 적어도 일부의 샘플 태그, 분자 식별 표지, 적어도 일부의 표지된 핵산, 그의 상보체, 그의 역상보체, 또는 이들의 임의의 조합물을

서열분석하기 위해 서열분석 반응을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 단지 샘플 태그 또는 샘플 태그의 일부만이 서열분석된다. 일부 예에서, 단지 분자 식별 표지 또는 분자 식별 표지의 일부만이 서열분석된다.

[0294] 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열 결정은 서열분석 방법, 예컨대 헬리오스코프(Helioscope)™ 단일 분자 서열분석, 나노포어 DNA 서열분석, 링크스 테라퓨틱스 (Lynx Therapeutics)의 대량의 동시 시그너쳐 서열분석 (MPSS), 454 파이로서열분석 (pyrosequencing), 단일 분자 실시간 (RNAP) 서열분석, 일루미나 (솔렉사 (Solexa)) 서열분석, SOLiD 서열분석, 이온 토렌트(Ion Torrent)™, 이온 반도체 서열분석, 단일 분자 SMRT™ 서열분석, 폴로니 (Polony) 서열분석, DNA 나노볼 (nanoball) 서열분석, 및 비시겐 바이오테크놀로지 (VisiGen Biotechnologies) 방법에 의해 수행할 수 있다. 대안적으로, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열분석은 게놈 분석기 IIx, HiSeq, 및 MiSeq (일루미나 제품), 단일 분자 실시간 (SMRT™) 기술, 예컨대 PacBio RS 시스템 (퍼시픽 바이오사이언시스 (Pacific Biosciences, 미국 캘리포니아) 제품) 및 솔렉사 시퀀서 (sequencer), 트루 (True) 단일 분자 서열분석 (tSMS™) 기술, 예컨대 헬리스코프(HeliScope)™ 시퀀서 (헬리코스 인크. (Helicos Inc., 미국 매사추세츠주 캠브리지) 제품)을 포함하고 이로 제한되지 않는 서열분석 플랫폼을 사용할 수 있다.

[0295] 일부 실시양태에서, 표지된 핵산은 유기체의 게놈의 약 0.01%의 유전자 내지 유기체의 게놈의 약 100%의 유전자를 나타내는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 유기체의 게놈의 약 0.01%의 유전자 내지 유기체의 게놈의 약 100%의 유전자는 샘플로부터의 상보성 서열을 함유하는 유전자를 포획함으로써 다수의 다량체를 포함하는 표적 상보성 영역을 사용하여 서열분석될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지된 핵산은 유기체의 트랜스크립톰의 약 0.01%의 전사체 내지 유기체의 트랜스크립톰의 약 100%의 전사체를 나타내는 핵산을 포함한다. 예를 들어, 유기체의 트랜스크립톰의 약 0.501%의 전사체 내지 유기체의 트랜스크립톰의 약 100%의 전사체는 샘플로부터의 mRNA를 포획함으로써 폴리-T 테일을 포함하는 표적 상보성 영역을 사용하여 서열분석될 수 있다.

[0296] 일부 예에서, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열분석은 쌍을 이룬-말단 서열분석, 나노포어 서열분석, 고처리량 서열분석, 샷건 서열분석, 염료-종결 서열분석, 다수의-프라이머 DNA 서열분석, 프라이머 워킹 (walking), 생거 (Sanger) 디데옥시 서열분석, 맥심-길버트 (Maxim-Gilbert) 서열분석, 파이로서열분석, 트루 단일 분자 서열분석, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 대안적으로, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열은 전자 현미경 또는 화학적으로 민감함 전계 효과 트랜지스터 (chemFET) 어레이에 의해 결정될 수 있다.

[0297] 핵산 (예를 들어, 증폭된 핵산, 표지된 핵산, 표지된 핵산의 cDNA 카피 등)의 서열분석은 혼성화에 의해 서열분석 (SBH), 라이게이션에 의해 서열분석 (SBL), 정량적 증분 형광 뉴클레오티드 부가 서열분석 (QIFNAS), 단계적 라이게이션 및 절단, 형광 공명 에너지 전달 (FRET), 분자 비콘 (beacon), TaqMan 리포터 프로브 소화, 파이로서열분석, 형광 계내 (in situ) 서열분석 (FISSEQ), FISSEQ 비드, 워블 (wobble) 서열분석, 다중 서열분석, 중합된 콜로니 (POLONY) 서열분석; 나노그리드 롤링 서클 서열분석 (ROLONY), 대립유전자-특이적 올리고 라이게이션 검정 (예를 들어, 올리고 라이게이션 검정 (OLA), 라이게이션된 선형 프로브 및 롤링 서클 증폭 (RCA) 판독, 라이게이션된 패드록 (padlock) 프로브를 사용하는 단일 주형 분자 OLA, 및/또는 라이게이션된 환상 패드록 프로브 및 롤링 서클 증폭 (RCA) 판독을 사용하는 단일 주형 분자 OLA) 등을 포함하고 이로 제한되지 않는 다양한 서열분석 방법을 사용하여 수행할 수 있다. 고처리량 서열분석 방법, 예컨대 플랫폼, 예컨대 로슈 (Roche) 454, 일루미나 솔렉사, ABI-SOLiD, 이온 토렌트, 컴플리트 게노믹스 (Complete Genomics), 퍼시픽 바이오사이언스, 헬리코스, 폴로네이터 (Polonator) 플랫폼을 사용하는 시클릭 어레이 서열분석이 또한 이용될 수 있다. 서열분석은 MiSeq 서열분석을 포함할 수 있다. 서열분석은 HiSeq 서열분석을 포함할 수 있다. 서열분석은 세포 표지, 분자 표지 및/또는 원래의 올리고뉴클레오티드 상에 존재한 유전자를 판독할 수 있다.

[0298] 또 다른 예에서, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열분석은 RNA-Seq 또는 마이크로RNA 서열분석을 포함한다. 대안적으로, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 서열분석은 단백질 서열분석 기술, 예컨대 에드만 (Edman) 분해, 펩티드 질량 지문법, 질량 분광법, 또는 프로테아제 소화를 포함한다.

[0299] 서열분석 반응은 특정 실시양태에서 고체 또는 반-고체 지지체 상에서, 겔 내에서, 에멀젼 내에서, 표면 상에서, 비드 상에서, 적하액에서, 연속 유동액에서, 희석액에서, 또는 하나 이상의 물리적으로 분리된 부피 내에서 일어날 수 있다.

[0300] 서열분석은 표지된 핵산의 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 또는 염기쌍의 서열분석을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 서열분석은 표지된 핵산의 적어도 약 200, 300,

400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 또는 염기쌍의 서열분석을 포함한다. 다른 예에서, 서열분석은 표지된 핵산의 적어도 약 1500; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000; 6,000; 7,000; 8,000; 9,000; 또는 10,000개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 또는 염기쌍의 서열분석을 포함한다.

[0301] 서열분석은 실행당 적어도 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000회 또는 그 초과의 서열분석 판독을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 서열분석은 실행당 적어도 약 1500; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000; 6,000; 7,000; 8,000; 9,000; 또는 10,000회 또는 그 초과의 서열분석 판독을 포함할 수 있다. 서열분석은 실행당 약 1,600,000,000회 이하의 서열분석 판독을 포함할 수 있다. 서열분석은 실행당 약 200,000,000회 이하의 판독을 포함할 수 있다.

[0302] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 하나 이상의 어레이를 포함할 수 있다.

[0303] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 하나 이상의 프로브와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

[0304] 본원에서 설명되는 바와 같이 프로브는 적어도 일부의 표지된 핵산 또는 표지된-앰플리콘에 상보성인 서열을 포함할 수 있다. 다수의 프로브는 별개의 영역에서 고체 지지체 상에 배열될 수 있고, 여기서 고체 지지체 상의 별개의 영역은 동일한 또는 거의 동일한 서열의 프로브를 포함한다. 일부 예에서, 고체 지지체 상의 2개 이상의 별개의 영역은 올리고뉴클레오티드 태그의 2개의 상이한 특유한 식별 영역의 서열에 상보성인 서열을 포함하는 2개의 상이한 프로브를 포함한다.

[0305] 일부 예에서, 다수의 프로브는 어레이에 혼성화된다. 다수의 프로브는 어레이에 대한 표지된 분자의 혼성화를 허용할 수 있다. 다수의 프로브는 확률적 표지 올리고dT에 상보성인 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 다수의 프로브는 분자에 상보성인 서열을 포함한다.

[0306] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 다수의 프로브의 어레이와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 다수의 프로브의 유리 슬라이드와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

[0307] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 프로브 혼성화, 표적-특이적 증폭, 표적-특이적 서열분석, 표적 작은 뉴클레오티드 다형성에 특이적인 표지된 뉴클레오티드를 사용한 서열분석, 제한 효소 소화 패턴에 특이적인 표지된 뉴클레오티드를 사용한 서열분석, 돌연변이에 특이적인 표지된 뉴클레오티드를 사용한 서열분석, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0308] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 서열-특이적 표지의 유동 세포측정법 분류를 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 비드에 부착된 표지된 핵산의 검출을 포함할 수 있다. 비드에 부착된 표지된 핵산의 검출은 형광 검출을 포함할 수 있다.

[0309] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표적-특이적 프로브와 표지된 핵산 또는 표적-특이적 표지된 프로브 사이의 형광 공명 에너지 전달 (FRET)에 의해 다수의 표지된 핵산을 계수하는 것을 포함할 수 있다.

[0310] **표지된 핵산의 검출**

[0311] 본원에 개시된 방법은 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출은 표면, 예를 들어, 고체 지지체에 대한 표지된 핵산의 혼성화를 포함할 수 있다. 방법은 핵산 결합 단백질로 표적 서열을 면역침전시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 핵산 및/또는 표지된 앰플리콘의 검출은 상이한 표지된 핵산의 수 결정을 가능하게 하거나 도울 수 있다.

[0312] 일부 예에서, 방법은 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘을 검출가능 표지와 접촉시켜 검출가능한 표지 접합된 표지된 핵산을 생산하는 것을 추가로 포함한다. 본원에 개시된 방법은 검출가능한 표지 접합된 표지된 핵산을 검출하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물 (예를 들어, 표지된-앰플리콘, 검출가능 표지 접합된 표지된 핵산)의 검출은 적어도 일부의 샘플 태그 또는 분자 식별 표지, 분자, 검출가능 표지, 샘플 태그 또는 분자 식별 표지의 상보체, 분자의 상보체, 또는 이들의 임의의 조합물의 검출을 포함할 수 있다.

[0313] 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 검출은 에멀젼 또는 소적을 포함할 수 있다. 예를 들어, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물은 에멀젼 또는 소적에 존재할 수 있다. 소적은 비혼화성 제2 액체, 예컨대 에멀젼의 연속적인 상에 의해 (및/또는 보다 큰 소적에 의해) 캡슐화되는 작은 부피의 제1 액체일 수 있다. 에멀젼 내의

소적의 부피, 및/또는 소적의 평균 부피는 예를 들어 약 1 마이크로리터 미만 (또는 약 1 마이크로리터 내지 1 나노리터 또는 약 1 마이크로리터 내지 1 피코리터), 약 1 나노리터 미만 (또는 약 1 나노리터 내지 1 피코리터), 또는 특히 약 1 피코리터 미만 (또는 약 1 피코리터 내지 1 펨토리터)일 수 있다. 소적 (또는 에멀젼의 소적)의 직경 (또는 평균 직경)은 약 1000, 100, 또는 10 마이크로미터 미만, 또는 약 1000 내지 10 마이크로미터일 수 있다. 소적은 구체 또는 나노구체일 수 있다. 평균 직경이 약 0.001, 0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 180, 200, 300, 400, 또는 500 마이크로미터이거나, 대략 이보다 작거나 또는 대략 이보다 큰 소적이 생성될 수 있다. 소적의 평균 직경은 약 0.001 내지 약 500, 약 0.01 내지 약 500, 약 0.1 내지 약 500, 약 0.1 내지 약 100, 약 0.01 내지 약 100, 또는 약 1 내지 약 100 마이크로미터일 수 있다. 소적은 간단한 소적 또는 복합 소적일 수 있다. 본원에서 사용할 때, 용어 에멀젼은 비혼화성 액체의 혼합물 (예컨대 오일 및 물)을 나타낼 수 있다. 오일상 및/또는 유중수형 에멀젼은 수성 소적 내의 반응 혼합물의 구획화를 허용한다. 에멀젼은 연속적인 오일상 내의 수성 소적을 포함할 수 있다. 본원에 제공되는 에멀젼은 수중유형 에멀젼일 수 있고, 여기서 소적은 연속적인 수성상 내의 오일 소적이다. 에멀젼 또는 소적이 단일 세포를 단리, 예를 들어, 공간적으로 단리하기 위해 사용될 때, 고체 지지체는 사용되지 않을 수 있다. 따라서, 태그부착되고 분석되는 핵산은 고체 지지체에 결합되지 않을 수 있고, 상기 예에서 세포 표지는 태그부착될 때 에멀젼 또는 소적에 존재하는 단일 세포 또는 세포의 집단에 대응할 수 있다. 에멀젼 또는 소적은 따라서 단일 세포 또는 다수의 세포로 태깅 또는 표지 단계를 효과적으로 분리할 수 있고, 세포 표지는 단일 세포 또는 다수의 세포로부터 유래한 핵산을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 소적은 예를 들어 마이크로웰 어레이에 대한 비드의 적용과 유사하게 마이크로웰에 적용될 수 있다.

[0314] 대안적으로, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 검출은 하나 이상의 용액을 포함한다. 다른 예에서, 표지된 핵산의 검출은 하나 이상의 용기를 포함한다.

[0315] 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물 (예를 들어, 표지된-앰플리콘, 검출가능 표지 접합된 표지된 핵산)의 검출은 각각의 표지된 핵산 또는 그의 생성물을 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 개시된 방법은 각각의 표지된 핵산의 적어도 일부를 서열분석하여 각각의 표지된 핵산을 검출하는 것을 포함한다.

[0316] 일부 예에서, 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출은 전기영동, 분광학, 현미경, 화학발광, 발광, 형광, 면역형광, 비색법, 또는 전기화학발광 방법을 포함한다. 예를 들어, 방법은 형광 염료의 검출을 포함한다. 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 검출은 비색 방법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비색 방법은 비색계 또는 비색 판독기의 사용을 포함한다. 비색계 및 비색 판독기의 비-제한적인 목록은 센소베이션 (Sensovation)의 비색 어레이 영상화 판독기 (CLAIR), ESEQuant 측류 면역검정 판독기, 스펙트라맥스 (SpectraMax) 340PC 38, 스펙트라맥스 플러스 384, 스펙트라맥스 190, 베르사맥스 (VersaMax), VMax, 및 EMax를 포함한다.

[0317] 표지된 핵산 및/또는 앰플리콘을 검출하기 위해 단독으로 또는 다른 방법과 조합으로 사용되는 추가의 방법은 어레이 검출기, 형광 판독기, 비-형광 검출기, CR 판독기, 광도계, 또는 스캐너 (scanner)의 사용을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출은 어레이 검출기의 사용을 포함한다. 어레이 검출기의 예는 다이오드-어레이 검출기, 포토다이오드 어레이 검출기, HLPC 포토다이오드 어레이 검출기, 어레이 검출기, 게르마늄 어레이 검출기, CMOS 및 CCD 어레이 검출기, 게이팅된 (Gated) 선형 CCD 어레이 검출기, InGaAs 포토다이오드 어레이 시스템, 및 TE 냉각 CCD 시스템을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 어레이 검출기는 마이크로어레이 검출기일 수 있다. 마이크로어레이 검출기의 비제한적인 예는 미세전극 어레이 검출기, 광학 DNA 마이크로어레이 검출 플랫폼, DNA 마이크로어레이 검출기, RNA 마이크로어레이 검출기, 및 단백질 마이크로어레이 검출기를 포함한다.

[0318] 일부 예에서, 형광 판독기는 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘을 검출하기 위해 사용된다. 형광 판독기는 바이오칩 (biochip) 상에서, 슬라이드 상에서, 또는 마이크로플레이트 내에서 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 컬러 형광 마이크로어레이 또는 다른 구조를 판독할 수 있다. 일부 예에서, 형광 판독기는 센소베이션 형광 어레이 영상화 판독기 (FLAIR)이다. 대안적으로, 형광 판독기는 형광 마이크로플레이트 판독기, 예컨대 제미니 (Gemini) XPS 형광 마이크로플레이트 판독기, 제미니 EM 형광 마이크로플레이트 판독기, 핀스트루먼츠 (Finstruments)® 플루오로스칸 (Fluoroskan) 필터 기반 형광 마이크로플레이트 판독기, 페라스타 (PHERAstar) 마이크로플레이트 판독기, 플루오스타 (FLUOstar) 마이크로플레이트 판독기, 폴라스타 오메가 (Omega) 마이크로플레이트 판독기, 플루오스타 옵티마 (OPTIMA) 멀티-방식 마이크로플레이트 판독기 및 폴라스타 옵티마 멀티-방식 마이크로플레이트 판독기이다. 형광 판독기의 추가의 예는 PharosFXTM 및 PharosFX Plus 시스템을

포함한다.

[0319] 일부 예에서, 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출은 마이크로플레이트 판독기의 사용을 포함한다. 일부 예에서, 마이크로플레이트 판독기는 xMarkTM 마이크로플레이트 흡수 분광광도계, iMark 마이크로플레이트 흡수 판독기, 엔스파이어(EnSpire)® 멀티방식 플레이트 판독기, 엔비젼 (EnVision) 멀티표지 플레이트 판독기, 빅터 (VICTOR) X 멀티표지 플레이트 판독기, 플렉스스테이션 (FlexStation), 스펙트라맥스 패러다임 (Paradigm), 스펙트라맥스 M5e, 스펙트라맥스 M5, 스펙트라맥스 M4, 스펙트라맥스 M3, 스펙트라맥스 M2-M2e, 필터맥스 F 시리즈, 플루오로스칸 아센트 FL 마이크로플레이트 형광계 및 광도계, 플루오로스칸 아센트 마이크로플레이트 형광계, 루미노스칸 (Luminoskan) 아센트 마이크로플레이트 광도계, 멀티스칸 (Multiskan) EX 마이크로플레이트 광도계, 멀리스칸 (Muliskan) FC 마이크로플레이트 광도계, 및 멀리스칸 GO 마이크로플레이트 광도계이다. 일부 예에서, 마이크로플레이트 판독기는 흡수, 형광, 발광, 시분해 (time-resolved) 형광, 광 산란, 또는 이들의 임의의 조합을 검출한다. 몇몇의 실시양태에서, 마이크로플레이트 판독기는 동적 광 산란을 검출한다. 마이크로플레이트 판독기는 일부 예에서, 정적 광 산란을 검출할 수 있다. 일부 예에서, 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출은 마이크로플레이트 영상화기의 사용을 포함한다. 일부 예에서, 마이크로플레이트 영상화기는 ViewLux uHTS 마이크로플레이트 영상화기 및 버이오라드 (BioRad) 마이크로플레이트 영상화 시스템을 포함한다.

[0320] 표지된 핵산 및/또는 그의 생성물의 검출은 광도계의 사용을 포함할 수 있다. 광도계의 예는 스펙트라맥스 L, 글로맥스(GloMax)®-96 마이크로플레이트 광도계, 글로맥스®-20/20 단일-튜브 광도계, InstinctTM 소프트웨어가 구비된 글로맥스®-Multi+, 글로맥스®-Multi Jr 단일 튜브 멀티방식 판독기, 루미스타 옵티마 (LUMIstar OPTIMA), 리더 (LEADER) HC+ 광도계, LEADER 450i 광도계, 및 LEADER 50i 광도계를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0321] 일부 예에서, 표지된 핵산 및/또는 표지된-앰플리콘의 검출은 스캐너의 사용을 포함한다. 스캐너는 평판 스캐너, 예컨대 캐논 (Cannon), 엡손 (Epson), HP, 후지쯔 (Fujitsu), 및 제록스 (Xerox)에서 공급되는 것을 포함한다. 추가의 평판 스캐너의 예는 FMBIO® 형광 영상화 스캐너 (예를 들어, FMBIO® II, III, 및 III 플러스 시스템)를 포함한다. 스캐너는 마이크로플레이트 스캐너, 예컨대 어레이이트 (Arrayit) 어레이픽스 (ArrayPix)TM 마이크로어레이 마이크로플레이트 스캐너를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 스캐너는 바이오-라드에서 공급되는 개인용 몰레큘라 이미저(Personal Molecular Imager)TM (PMI) 시스템이다.

[0322] 표지된 핵산의 검출은 대전 입자의 질량 대 전하비를 측정하는 분석 기술, 예를 들어, 질량 분광법의 사용을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대전 입자의 질량 대 전하비는 크로마토그래피 분리 기술과 조합으로 측정된다. 일부 실시양태에서, 서열분석 반응이 대전 입자의 질량 대 전하비 측정와 조합으로 사용된다. 일부 실시양태에서, 태그는 동위원소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동위원소 유형 또는 비는 태그 라이브러리에서 제어 또는 조작된다.

[0323] 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 검출은 작은 입자 및/또는 광 산란의 사용을 포함한다. 예를 들어, 증폭된 분자 (예를 들어, 표지된-앰플리콘)는 합텐에 또는 작은 입자에 직접 부착되고 어레이에 혼성화된다. 작은 입자는 크기가 나노미터 내지 마이크로미터 범위일 수 있다. 입자는 광이 그의 표면에서 산란될 때 검출될 수 있다.

[0324] 비색 검정은 작은 입자가 착색되는 경우에 사용될 수 있거나, 합텐이 비색 검출 시스템으로 염색될 수 있다. 일부 예에서, 평판 스캐너가 입자로부터 산란된 광, 또는 착색 물질의 발생을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 개시된 방법은 흡광 물질의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 흡광 물질은 바람직하지 않은 광 산란 또는 반사를 차단하기 위해 사용될 수 있다. 흡광 물질은 식품 착색제 또는 다른 물질일 수 있다. 일부 예에서, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물의 검출은 표지된 핵산을 탈축 (off-axis) 백색광과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0325] 일부 실시양태에서, 샘플로부터의 2개 이상의 상이한 유형의 생물학적 물질이 동시에 검출될 수 있다. 예를 들어, 샘플로부터의 DNA, RNA (예를 들어, 마이크로RNA, mRNA 등), 뉴클레오티드, 단백질, 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 2개 이상의 상이한 유형의 생물학적 물질이 동시에 검출할 수 있다. 예를 들어, 샘플로부터의 DNA 및 RNA를 본원에서 설명되는 방법을 사용하여 동시에 검출할 수 있다.

[0326] **데이타 분석**

[0327] 세포 내의 표적 핵산 분자의 수를 계수하기 위해 서열분석 데이타를 사용할 수 있다. 예를 들어, 세포 내의 표

적 핵산의 다수의 카피는 상이한 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있다. 다수의 표적 핵산을 증폭시키고 서열 결정할 때, 이들은 상이한 분자 표지를 포함할 수 있다. 동일한 표적 핵산에 대한 분자 표지의 수는 세포 내의 표적 핵산의 카피수를 나타낼 수 있다. 표적 핵산의 카피수를 결정하는 것은 세포 내의 표적 핵산의 농도를 결정할 때 증폭 편차 (bias)를 제거하기 위해 유용할 수 있다.

[0328] 서열분석 데이타는 대상체의 유전자형 결정을 위해 사용될 수 있다. 표적 핵산을 상이한 세포 표지와 비교함으로써, 표적 핵산의 카피수 변화 및/또는 농도를 결정할 수 있다. 표적 핵산의 농도를 상이한 세포 표지와 비교함으로써, 서열분석 데이타는 세포 유전자형 불균일성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 샘플의 제1 세포는 표적 핵산을 고농도로 포함할 수 있는 반면, 샘플의 제2 세포는 표적 핵산을 포함할 수 없거나, 또는 표적 핵산을 저농도로 포함하여, 세포 샘플의 불균일성을 나타낼 수 있다.

[0329] 세포 유전자형 불균일성의 결정은 질환의 진단, 예측 및 치료 과정의 결정을 위해 유용할 수 있다. 예를 들어, 샘플의 제1 세포가 표적 핵산을 포함하지만, 샘플의 제2 세포는 표적 핵산을 포함하지 않고 제2 표적 핵산을 포함할 경우, 치료 과정은 제1 유전자형을 표적화하는 작용제 (예를 들어, 약물) 및 제2 유전자형을 표적화하는 작용제 (예를 들어, 약물)을 포함할 수 있다.

[0330] 일부 실시양태에서, 특정 서열 유형은 DNA 또는 RNA 프로파일에 연결될 수 있다. 예를 들어, T-세포 수용체 및/또는 B-세포 수용체 서열은 샘플, 예컨대 단일 세포의 전사 프로파일, 마이크로RNA 프로파일, 또는 게놈 돌연변이 프로파일에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 서열 유형은 항원성 또는 단백질 발현 프로파일에 연결될 수 있다. 예를 들어, T-세포 수용체 및/또는 B-세포 수용체 서열은 표면, 예컨대 단백질을 포함하는 표면, 예컨대 T-세포 수용체 및/또는 B-세포 수용체 서열을 포함하는 항체의 단백질 표적에 대한 항체의 결합을 통해 항원성 또는 단백질 발현 프로파일에 연결될 수 있다.

[0331] 일부 실시양태에서, 서열, 예컨대 바이러스 서열의 존재 또는 부재는 DNA 또는 RNA 프로파일에 연결될 수 있다. 예를 들어, 서열, 예컨대 바이러스 서열의 존재 또는 부재는 샘플, 예컨대 단일 세포의 전사 프로파일, 마이크로RNA 프로파일, 또는 게놈 돌연변이 프로파일에 연결될 수 있다.

[0332] **키트**

[0333] 본원은 본 개시내용의 방법의 수행을 위한 키트를 제공한다. 키트는 마이크로웰 어레이, 올리고뉴클레오티드, 및 고체 지지체 중의 하나 이상을 포함할 수 있다. 키트는 올리고뉴클레오티드 및/또는 고체 지지체의 재구성 및/또는 희석을 위한 시약을 포함할 수 있다. 키트는 올리고뉴클레오티드를 고체 지지체에 접합시키기 위한 시약을 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 추가의 시약을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 상기 추가의 시약은 세척 완충제; 대조군 시약, 표적 핵산의 증폭 (예를 들어, cDNA 합성 및 PCR의 수행)을 위한 증폭제, 및 올리고뉴클레오티드를 고체 지지체에 접합시키기 위한 접합제로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 키트의 성분은 별개의 용기에 존재할 수 있거나, 또는 단일 용기 내에서 조합될 수 있다.

[0334] 키트는 본 발명의 방법을 실시하기 위해 키트의 성분을 사용하기 위한 사용설명서를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법을 실시하기 위한 사용설명서는 적합한 기록 매체 상에 기록될 수 있다. 예를 들어, 사용설명서는 기판, 예컨대 종이 또는 플라스틱에 인쇄될 수 있다. 따라서, 사용설명서는 포장 삽입물로서, 키트 또는 그의 성분의 용기의 라벨 (즉, 포장재 또는 세부 포장 (subpackaging)에 부착된) 등으로 키트에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 사용설명서는 적합한 컴퓨터 판독 저장 매체, 예를 들어, CD-ROM, 디스켓, 플래시 드라이브 등에 존재하는 전자식 저장 데이타 파일로 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 실제 사용설명서는 키트에 존재하지 않을 수 있지만, 먼 공급처로부터, 예를 들어 인터넷을 통해 사용설명서를 얻는 수단이 제공된다. 예를 들어, 키트는 사용설명서가 제시되고/되거나 그로부터 사용설명서를 내려받을 수 있는 웹 주소를 포함할 수 있다. 사용설명서처럼, 사용설명서를 얻기 위한 상기 수단은 적합한 기판 상에 기록된다.

[0335] 또한, 2개 이상의 샘플로부터 2개 이상의 분자를 분석할 때 사용하기 위한 키트가 본원에 개시된다. 본원에 개시된 키트는 적어도 약 384개의 샘플을 처리하기에 충분한 다수의 비드, 프라이머 및 증폭제를 포함할 수 있다. 임의의 하나의 샘플은 단일 세포를 포함할 수 있다. 핵산 증폭은 샘플 내의 약 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개의 표적화된 핵산의 측정을 유도할 수 있다. 핵산 증폭은 샘플 내의 약 1000개의 표적화된 핵산의 측정을 유도할 수 있다. 핵산 증폭은 샘플 내의 약 100개의 표적화된 핵산의 측정을 유도할 수 있다. 핵산 증폭은 단일 세포 내의 총 핵산의 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%의 측정을 유도할 수 있다. 핵산 증폭은 단일 세포 내의 모든 핵산 서열의 포괄적 측

정을 유도할 수 있다. 핵산 증폭은 서열분석에 의해 단일 세포 내의 표적화된 핵산 서열의 측정을 유도할 수 있다. 핵산 증폭은 어레이에 의해 단일 세포 내의 표적화된 핵산 서열의 측정을 유도할 수 있다.

[0336] 증폭제는 프라이머의 고정된 패널을 포함할 수 있다. 증폭제는 적어도 하나의 쌍의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭제는 적어도 하나의 쌍의 제어 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭제는 적어도 하나의 쌍의 하우스키핑 유전자 프라이머를 포함할 수 있다. 적합한 증폭제는 PCR 매스터 믹스 (master mix)를 포함할 수 있다. 키트는 프라이머 설계 및 최적화를 위한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 마이크로웰 플레이트를 추가로 포함할 수 있고, 여기서 마이크로웰 플레이트는 하나 이하의 비드가 분배되는 적어도 하나의 웰을 포함할 수 있다. 키트는 하나 이상의 추가의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기는 하나 이상의 추가의 다수의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기 내의 다수의 하나 이상의 추가의 샘플 태그는 제1 용기 내의 다수의 제1 샘플 태그와 상이하다. 하나 이상의 추가의 용기는 하나 이상의 추가의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기의 하나 이상의 추가의 분자 식별 표지는 제2 용기의 하나 이상의 추가의 분자 식별 표지와 동일하다.

[0337] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 피펫 팁 (tip) 및/또는 용기 (예를 들어, 튜브, 바이알, 멀티웰 플레이트, 마이크로웰 플레이트, 에펜도르프 (eppendorf) 튜브, 유리 슬라이드, 비드)의 사용을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 피펫 팁은 저결합 피펫 팁이다. 대안적으로 또는 추가로, 용기는 저결합 용기일 수 있다. 저결합 피펫 팁 및 저결합 용기는 실리콘계 팁 및 비-저결합 용기와 연관된 감소된 침출 및/또는 후속적인 샘플 분해를 보일 수 있다. 저결합 피펫 팁 및 저결합 용기는 비-저결합 피펫 팁 및 용기에 비해 감소된 샘플 결합을 보일 수 있다. 저결합 팁의 예는 코닝(Corning)® 데크웍스(DeckWorks)TM 저결합 팁 및 아반트 프리미엄 (Avant Premium) 눈금이 새겨진 저결합 팁을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 저-결합 용기의 비-제한적인 목록은 코닝® 코스타® 저결합 미세원심분리 튜브 및 코스모브랜드 (Cosmobrand) 저결합 PCR 튜브 및 미세원심분리 튜브를 포함한다.

[0338] 본원에 개시된 임의의 키트는 소프트웨어를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 서열, 예컨대 바코드 또는 표적 서열을 분석하기 위한 소프트웨어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 특유한 표적 분자, 예컨대 단일 세포로부터 특유한 표적 분자를 계수하기 위한 서열, 예컨대 바코드 또는 표적 서열을 분석하기 위한 소프트웨어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 특유한 표적 분자, 예컨대 유전자, 예컨대 단일 세포로부터의 유전자로부터 특유한 표적 분자를 계수하기 위한 서열, 예컨대 바코드 또는 표적 서열을 분석하기 위한 소프트웨어를 포함할 수 있다.

[0339] 마이크로웰 **및 마이크로웰 어레이**

[0340] 일부 예에서, 본 개시내용의 방법은 접합된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 고체 지지체를 세포와 접촉시키는 것을 제공한다. 접촉 단계는 표면 상에서 수행할 수 있다. 예시적인 표면은 마이크로웰, 튜브, 플라스크, 및 칩을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 표면은 마이크로웰을 포함한다. 일부 예에서, 마이크로웰은 마이크로웰 어레이의 일부이다.

[0341] 마이크로웰 어레이의 마이크로웰은 마이크로웰당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 초과의 세포를 포함할 수 있는 크기 및 형상일 수 있다. 마이크로웰은 마이크로웰당 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 초과의 세포를 포함할 수 있는 크기 및 형상일 수 있다. 마이크로웰 어레이의 마이크로웰은 마이크로웰당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 초과의 고체 지지체를 포함할 수 있는 크기 및 형상일 수 있다. 마이크로웰은 마이크로웰당 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 또는 그 초과의 고체 지지체를 포함할 수 있는 크기 및 형상일 수 있다. 마이크로웰은 최대 하나의 세포 및 하나의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 최대 하나의 세포 및 2개의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 적어도 하나의 세포 및 최대 하나의 고체 지지체를 포함할 수 있다. 마이크로웰은 적어도 하나의 세포 및 최대 2개의 고체 지지체를 포함할 수 있다.

[0342] 마이크로웰 어레이 상의 마이크로웰은 수평으로 배열될 수 있다. 마이크로웰은 수직으로 배열될 수 있다. 마이크로웰은 동일하거나 거의 동일한 간격으로 배열될 수 있다. 마이크로웰 어레이는 하나 이상의 마이크로웰과 연관된 마커를 가질 수 있다. 예를 들어, 마이크로웰 어레이의 마이크로웰은 각각 미리 정해진 수의 마이크로웰을 포함하는 군으로 분할될 수 있다. 이들 군은 기판의 주요 표면 상에 제시될 수 있다. 마커는 각각의 군의 위치가 결정될 수 있도록 제공될 수 있다. 마커는 육안으로 검출가능할 수 있다. 마커는 보기 위해 광학기기를 필요로 하는 마커 (예를 들어, 형광 마커, 방출 마커, UV 마커)일 수 있다.

[0343] 마이크로웰 어레이는 적어도 약 96, 384, 1000, 5000, 10000, 15000, 100000, 150000, 500000, 1000000, 또는 5000000개 또는 그 초과의 마이크로웰을 포함할 수 있다. 마이크로웰 어레이는 최대 약 96, 384, 1000, 5000, 10000, 15000, 100000, 150000 500000, 1000000, 또는 5000000개 또는 그 초과의 마이크로웰을 포함할 수 있다.

[0344] 마이크로웰의 형상은 원통형일 수 있다. 마이크로웰의 형상은 비원통형, 예컨대 다수의 면을 포함하는 다면체 (예를 들어, 평행육면체, 육각 기둥, 또는 팔각 기둥), 역전된 원추형, 역전된 피라미드 (역전된 삼각 피라미드, 역전된 정사각 피라미드, 역전된 오각 피라미드, 역전된 육각 피라미드, 또는 7개 이상의 각을 갖는 역전된 다각 피라미드). 마이크로웰은 2가지 이상의 이들 형상을 조합한 형상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 마이크로웰은 부분적으로 원통형일 수 있고, 나머지는 역전된 원추형 형상을 갖는다. 마이크로웰의 형상은 역전된 원추형 또는 역전된 피라미드의 상단의 일부를 잘라낸 형상일 수 있다. 마이크로웰의 입구는 마이크로웰의 상단부 또는 마이크로웰의 저변부에 존재할 수 있다. 마이크로웰의 저변부는 편평할 수 있지만, 곡선 표면 (예를 들어, 볼록 또는 오목한)이 또한 가능하다. 마이크로웰의 형상 및 크기는 마이크로웰 내에 보관되는 세포의 유형 및/또는 고체 기판 (예를 들어, 형상, 크기)을 고려하여 결정될 수 있다.

[0345] 마이크로웰의 직경은 마이크로웰의 평면 형상 내에 새겨질 수 있는 최대원을 나타낼 수 있다. 마이크로웰의 직경은 마이크로웰 내에 함유시킬 세포 및/또는 고체 지지체의 직경의 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 2, 또는 3배 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 직경은 마이크로웰 내에 함유시킬 세포 및/또는 고체 지지체의 직경의 최대 약 0.1, 0.5, 1, 2, 또는 3배 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 직경은 고체 지지체의 직경의 적어도 약 10, 20, 30, 40, 또는 50% 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 직경은 고체 지지체의 직경의 최대 약 10, 20, 30, 40, 또는 50% 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 직경은 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 직경은 최대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 직경은 약 25 마이크로미터이다. 일부 예에서, 마이크로웰의 직경은 약 30 마이크로미터이다. 일부 예에서, 마이크로웰의 직경은 약 28 마이크로미터이다.

[0346] 마이크로웰 부피와 고체 지지체 부피 사이의 차이는 적어도 약 $1x10^{(-14)}$ m^3, $1.5x10^{(-14)}$ m^3, $1.7x10^{(-14)}$ m^3, $2.0x10^{(-14)}$ m^3, $2.5x10^{(-14)}$ m^3, 또는 $3.0x10^{(-14)}$ m^3 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰 부피와 고체 지지체 부피 사이의 차이는 최대 약 $1x10^{(-14)}$ m^3, $1.5x10^{(-14)}$ m^3, $1.7x10^{(-14)}$ m^3, $2.0x10^{(-14)}$ m^3, $2.5x10^{(-14)}$ m^3, 또는 $3.0x10^{(-14)}$ m^3 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰 부피와 고체 지지체 부피 사이의 차이는 적어도 약 $1x10^{(-11)}$ L, $1.5x10^{(-11)}$ L, $1.7x10^{(-11)}$ L, $2.0x10^{(-11)}$ L, $2.5x10^{(-11)}$ L, 또는 $3.0x10^{(-11)}$ L 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰 부피와 고체 지지체 부피 사이의 차이는 최대 약 $1x10^{(-11)}$ L, $1.5x10^{(-11)}$ L, $1.7x10^{(-11)}$ L, $2.0x10^{(-11)}$ L, $2.5x10^{(-11)}$ L, 또는 $3.0x10^{(-11)}$ L 또는 그 초과일 수 있다. 도 7은 마이크로웰의 부피, 고체 지지체, 및 마이크로웰과 고체 지지체 부피 사이의 차이에 대한 예시적인 통계를 보여준다.

[0347] 마이크로웰의 깊이는 마이크로웰 내에 함유시킬 세포 및/또는 고체 지지체의 직경의 적어도 약 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 또는 5배 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 마이크로웰 내에 함유시킬 세포 및/또는 고체 지지체의 직경의 최대 약 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 또는 5배 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 고체 지지체의 깊이의 적어도 약 10, 20, 30, 40, 또는 50% 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 고체 지지체의 깊이의 최대 약 10, 20, 30, 40, 또는 50% 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 최대 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 약 30 마이크로미터일 수 있다. 마이크로웰의 깊이는 약 28 마이크로미터일 수 있다. 마이크로웰은 편평, 또는 실질적으로 편평할 수 있다.

[0348] 마이크로웰 어레이는 웰들 사이에 간격을 포함할 수 있다. 웰들 사이의 간격은 적어도 약 5, 10, 25, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 웰들 사이의 간격은 최대 약 5, 10, 25, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 마이크로미터 또는 그 초과일 수 있다. 웰들 사이의 간격은 약 15 마이크로미터일 수 있다. 웰들 사이의 간격은 약 25 마이크로미터일 수 있다.

[0349] 마이크로웰의 내벽 상의 임의의 위치에서 패인 부분과 언덕 부분의 높이 차이가 존재할 수 있다. 평활도를 위해 처리된 웰의 내벽의 일부에 패인 부분과 언덕 부분을 생성함으로써, 기능성이 웰에 부여될 수 있다. 마이크

로웰의 내벽은 식각에 의해 평탄화될 수 있다. 식각 기기 내의 진공 정도, 식각 가스의 유형, 식각 단계 등은 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 마이크로웰의 내벽의 평탄화는 습식 식각에 의해 또는 고온 산화 단계를 옥사이드 필름 식각과 조합함으로써 수행할 수 있다. 마이크로웰의 내벽은 관능화될 (예를 들어, 올리고뉴클레오티드, 반응성 기, 관능기를 사용하여 관능화될) 수 있다.

[0350] 마이크로웰 어레이는 규소, 금속 (예를 들어, 알루미늄, 스테인레스 강철, 구리, 니켈, 크롬, 및 티탄), PDMS (엘라스토머), 유리, 폴리프로필렌, 아가로스, 젤라틴, 플루로닉 (예를 들어, 플루로닉 F127), 플라스틱 (예를 들어, 천연적으로 친수성인 플라스틱, 예컨대 PMMA), 소수성이지만 친수성으로 처리될 수 있는 플라스틱 (예를 들어, PP, COP, COC) 및 엘라스토머 (예를 들어, PDMS), 히드로겔 (예를 들어, 폴리아크릴아미드, 알기네이트), 또는 수지 (예를 들어, 폴리이미드, 폴리에틸렌, 비닐 클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리카르보네이트, 아크릴계, 및 폴리에틸렌 테레프탈레이트)로 제조될 수 있다. 마이크로웰 어레이는 소수성인 물질로 제조될 수 있다. 마이크로웰 어레이는 소수성이지만 코팅되어 친수성으로 되는 물질 (예를 들어, 산소 플라즈마 처리에 의해)로 제조될 수 있다. 마이크로웰 어레이는 친수성이지만 코팅되어 소수성으로 되는 물질로 제조될 수 있다.

[0351] 마이크로웰 어레이는 조립될 수 있다. 마이크로웰 어레이 어셈블리는 패터닝 (patterning) (예를 들어, SU8 포토레지스트로 제조된 패터닝된 포스트 (post))이 존재하는 규소 웨이퍼를 얻고, 이를 PDMS 물질과 함께 인큐베이팅하여 소프트 리소그래피 (예를 들어, 수 시간 동안 80℃에서)를 통해 웰의 어레이를 생성하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비경화된 PDMS는 액체일 수 있다. 비경화된 PDMS는 포스트 사이의 갭을 충전할 수 있다. PDMS는 열에 의해 경화될 때, 고체로 될 수 있고, 이에 의해 웰의 어레이가 생성된다. 광학 접착제 (예를 들어, NOA81/NOA63)가 PDMS 물질에 적용되어 (예를 들어, UV 광을 사용하여) 포스트의 어레이 (예를 들어, 다수의 어레이)를 생성할 수 있다. 적용은 적어도 약 1초, 2초, 3초, 4초, 5초, 6초, 7초, 8초, 9초, 10초 또는 1분, 2분, 3분, 4분, 또는 5분 또는 그 초과의 시간 동안 수행할 수 있다. 아가로스를 포함하는 층은 광학 접착제에 적용될 수 있다. 아가로스 층은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% 또는 그 초과의 아가로스일 수 있다. 아가로스 층은 최대 약 1, 2, 3, 4 5, 6, 7, 8, 9, 10% 또는 그 초과의 아가로스일 수 있다. 아가로스 층은 약 5% 아가로스일 수 있다. 아가로스 층은 겔본드 (Gelbond) 필름, 또는 아가로스가 부착될 수 있는 임의의 친수성 기판 상에 제시될 수 있다. 광학 표면 상의 아가로스 층의 인큐베이션은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10분 또는 그 초과의 시간 동안 이루어질 수 있다. 광학 표면 상의 아가로스 층의 인큐베이션은 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10분 또는 그 초과의 시간 동안 이루어질 수 있다.

[0352] 일부 예에서, 본 개시내용의 방법에서는 마이크로웰을 포함하지 않을 수 있는 표면을 사용할 수 있다. 표면은 유리, 플라스틱, 금속일 수 있다. 표면은 고체 지지체, 세포외 매트릭스, 중합체로 코팅될 수 있다. 표면은 웰을 포함하지 않을 수 있다. 표면은 분자 확산을 제한하기 위해 공간적으로 배열된 고체 지지체를 포함할 수 있다. 세포 및/또는 세포 내용물을 포획하는 본 개시내용의 방법은 편평한 표면에 대해 수행될 수 있다. 세포 및/또는 세포 내용물을 포획하는 본 개시내용의 방법은 현탁액에서 시행될 수 있다.

[0353] **세포 및 샘플**

[0354] 본 개시내용의 세포는 동물 (예를 들어, 인간, 래트, 돼지, 말, 소, 개, 마우스)의 세포일 수 있다. 일부 예에서, 세포는 인간 세포이다. 세포는 태아 인간 세포일 수 있다. 태아 인간 세포는 태아를 임신한 모체로부터 얻을 수 있다. 세포는 임신한 모체로부터의 세포일 수 있다. 세포는 척추동물, 무척추동물, 진균, 원시세균 (archae), 또는 박테리아로부터의 세포일 수 있다. 세포는 다세포 조직 (예를 들어, 장기 (예를 들어, 뇌, 간, 폐, 신장, 전립선, 난소, 비장, 림프절, 갑상선, 췌장, 심장, 골격근, 장, 후두, 식도, 및 위), 배반포)으로부터의 세포일 수 있다. 세포는 세포 배양액으로부터의 세포일 수 있다. 세포는 HeLa 세포, K562 세포, 라모스 세포, 하이브리도마, 줄기 세포, 미분화 세포, 분화 세포, 순환 세포, CHO 세포, 3T3 세포 등일 수 있다.

[0355] 일부 예에서, 세포는 암성 세포이다. 암 세포의 비-제한적인 예는 전립선암 세포, 유방암 세포, 결장암 세포, 폐암 세포, 뇌암 세포, 및 난소암 세포를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 세포는 암으로부터의 세포 (예를 들어, 순환 종양 세포)이다. 암의 비제한적인 예는 선종, 선암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 소세포 암종, 큰 세포 미분화 암종, 연골육종, 및 섬유육종을 포함할 수 있다.

[0356] 일부 예에서, 세포는 희귀 세포이다. 희귀 세포는 순환 종양 세포 (CTC), 순환 상피 세포 (CEC), 순환 줄기 세포 (CSC), 줄기 세포, 미분화 줄기 세포, 암 줄기 세포, 골수 세포, 전구 세포, 거품 세포, 태아 세포, 간엽 세포, 순환 내피 세포, 순환 자궁내막 세포, 영양모세포, 면역계 세포 (숙주 또는 이식편), 연결 조직 세포, 박테리아, 진균, 또는 병원체 (예를 들어, 박테리아 또는 원생동물), 미세입자, 세포 단편, 단백질 및 핵산, 세포 소기관, 다른 세포 성분 (예를 들어, 미토콘드리아 및 핵), 및 바이러스일 수 있다.

[0357] 일부 예에서, 세포는 종양으로부터의 세포이다. 일부 예에서, 종양은 양성 또는 악성이다. 종양 세포는 전이성 세포를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 세포는 다수의 상이한 세포 유형 (예를 들어, 상이한 유전자형)을 포함하는 고체 조직으로부터의 세포이다.

[0358] 세포는 바이러스, 박테리아, 진균, 및 기생충을 포함할 수 있다. 바이러스는 DNA 또는 RNA 동물 바이러스 (예를 들어, 피코르나비리대 (예를 들어, 폴리오바이러스), 레오비리대 (예를 들어, 로타바이러스), 토가비리대 (예를 들어, 뇌염 바이러스, 황열병 바이러스, 풍진 바이러스), 오르토믹소비리대 (예를 들어, 인플루엔자 바이러스), 파라믹소비리대 (예를 들어, 호흡기 세포 융합 바이러스, 홍역 바이러스, 이하선염 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스), 랍도비리대 (예를 들어, 광견병 바이러스), 코로나코로나비리대, 분야비리대, 플라비비리대, 필로비리대, 아레나비리대, 분야비리대 및 레트로비리대 (예를 들어, 인간 T 세포 림프친화성 바이러스 (HTLV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 파포바비리대 (예를 들어, 유두종 바이러스), 아데노비리대 (예를 들어, 아데노바이러스), 헤르페스비리대 (예를 들어, 단순 포진 바이러스), 및 폭스비리대 (예를 들어, 천연두 바이러스))를 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0359] 본 개시내용의 방법에서 사용할 수 있는 예시적인 박테리아는 악티노메두래(*Actinomedurae*), 악티노마이세스 이스라엘리이(*Actinomyces israelii*), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*), 클로스트리듐 페르프링겐스(*Clostridium perfringens*), 클로스트리듐 테타니(*Clostridium tetani*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 노카르디아(*Nocardia*), 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 에피덤(*Staphylococcus epiderm*), 스트렙토코커스 무탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*) 등을 포함할 수 있다. 그람 음성 박테리아는 아피피아 펠리스(*Afipia felis*), 박테리오데스(*Bacteriodes*), 바르토넬라 바실리포르미스(*Bartonella bacilliformis*), 보르타델라 페르투시스(*Bortadella pertussis*), 보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*), 보렐리아 레쿠렌티스(*Borrelia recurrentis*), 브루셀라(*Brucella*), 칼림마토박테리움 그라눌로마티스(*Calymmatobacterium granulomatis*), 캄필로박터(*Campylobacter*), 에셔리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 가르드네렐라 바기날리스(*Gardnerella vaginalis*), 해모필리우스 애깁티우스(*Haemophilius aegyptius*), 해모필리우스 두크레이이(*Haemophilius ducreyi*), 해모필리우스 인플루엔지애(*Haemophilius influenziae*), 헬리코박터 필로리(*Helicobacter pylori*), 레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*), 렙토스피라 인테로간스(*Leptospira interrogans*), 네이세리아 메닝기티디아(*Neisseria meningitidia*), 포르피로모나스 깅기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 프로비덴시아 스투르티(*Providencia sturti*), 슈도모나스 애루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리디스(*Salmonella enteridis*), 살모넬라 티피(*Salmonella typhi*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*), 시겔라 보이디이(*Shigella boydii*), 스트렙토바실루스 모닐리포르미스(*Streptobacillus moniliformis*), 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 트레포네마 팔리둠(*Treponema pallidum*), 비브리오 콜레래(*Vibrio cholerae*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 예르시니아 페스티스(*Yersinia pestis*) 등을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 박테리아는 미오박테리움 아비움(*Myobacterium avium*), 미오박테리움 레프래(*Myobacterium leprae*), 미오박테리움 투베르쿨로시스(*Myobacterium tuberculosis*), 바르토넬라 헨셀래(*Bartonella henselae*), 클라미디아 시타시(*Chlamydia psittaci*), 클라미디아 트라코마티스(*Chlamydia trachomatis*), 콕시엘라 부르네티이(*Coxiella burnetii*), 미코플라즈마 뉴모니애(*Mycoplasma pneumoniae*), 리케챠 아카리(*Rickettsia akari*), 리케챠 프로와제키이(*Rickettsia prowazekii*), 리케챠 리케치이(*Rickettsia rickettsii*), 리케챠 쯔쯔가무시(*Rickettsia tsutsugamushi*), 리케챠 티피(*Rickettsia typhi*), 우레아플라스마 우레알리티쿰(*Ureaplasma urealyticum*), 디플로코커스 뉴모니애(*Diplococcus pneumoniae*), 에르리키아 카펜시스(*Ehrlichia chafensis*), 엔테로코커스 패시움(*Enterococcus faecium*), 메닝고코시(*Meningococci*) 등을 포함할 수 있다.

[0360] 본 개시내용의 방법에서 사용되는 예시적인 진균은 아스페르길리(*Aspergilli*), 칸디대(*Candidae*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*), 코시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 크립토코시(*Cryptococci*), 및 이들의 조합을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0361] 본 개시내용의 방법에서 사용되는 예시적인 기생충은 발란티듐 콜라이(*Balantidium coli*), 크립토스포리듐 파르붐(*Cryptosporidium parvum*), 시클로스포라 카야타넨시스(*Cyclospora cayatanensis*), 엔세팔리토조아(*Encephalitozoa*), 엔타모에바히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*), 엔테로시토준 비에네우시(*Enterocytozoon*

bieneusi), 기아르디아 람블리아(*Giardia lamblia*), 레슈마니애 플라스모디이(*Leishmaniae, Plasmodii*), 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*), 트리파노소매(*Trypanosomae*), 사다리꼴 아메바 (trapezoidal amoeba), 벌레 (예를 들어, 연충), 특히 기생성 벌레 선충 (회충, 예를 들어, 편충, 십이지장충, 요충, 회충류 (ascarid), 사상충류 (filarid) 등), 촌충류 (예를 들어, 촌충)를 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0362] 본 개시내용의 샘플은 동물 (예를 들어, 인간, 래트, 돼지, 말, 소, 개, 마우스)로부터의 샘플일 수 있다. 일부 예에서, 샘플은 인간 샘플이다. 샘플은 태아 인간 샘플일 수 있다. 태아 인간 샘플은 태아를 임신한 모체로부터 얻을 수 있다. 샘플은 임신한 모체로부터의 샘플일 수 있다. 샘플은 척추동물, 무척추동물, 진균, 고세균, 또는 박테리아로부터의 샘플일 수 있다. 샘플은 다세포 조직 (예를 들어, 장기 (예를 들어, 뇌, 간, 폐, 신장, 전립선, 난소, 비장, 림프절, 갑상선, 췌장, 심장, 골격근, 장, 후두, 식도, 및 위), 배반포)으로부터의 샘플일 수 있다. 샘플은 세포 배양액으로부터의 세포일 수 있다.

[0363] 샘플은 다수의 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 다수의 동일한 유형의 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 다수의 상이한 유형의 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 세포 주기 및/또는 분화 경로의 동일한 지점에서의 다수의 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 세포 주기 및/또는 분화 경로의 상이한 지점에서의 다수의 세포를 포함할 수 있다. 샘플은 다수의 샘플을 포함할 수 있다.

[0364] 다수의 샘플은 적어도 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개 또는 그 초과의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개 또는 그 초과의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 또는 10,000, 또는 100,000, 또는 1,000,000개 또는 그 초과의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 10,000개의 샘플을 포함할 수 있다.

[0365] 제1 샘플 내의 하나 이상의 핵산은 제2 샘플 내의 하나 이상의 핵산과 상이할 수 있다. 제1 샘플 내의 하나 이상의 핵산은 다수의 샘플 내의 하나 이상의 핵산과 상이할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 적어도 약 1개 뉴클레오티드, 2개 뉴클레오티드, 5개 뉴클레오티드, 10개 뉴클레오티드, 20개 뉴클레오티드, 50개 뉴클레오티드, 100개 뉴클레오티드, 200개 뉴클레오티드, 300개 뉴클레오티드, 500개 뉴클레오티드, 1000개 뉴클레오티드, 2000개 뉴클레오티드, 3000개 뉴클레오티드, 4000개 뉴클레오티드, 5000개 뉴클레오티드, 10,000개 뉴클레오티드, 100,000개 뉴클레오티드, 1,000,000개 뉴클레오티드의 길이를 포함할 수 있다.

[0366] 제1 샘플은 하나 이상의 세포를 포함할 수 있고, 제2 샘플은 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다. 제1 샘플의 하나 이상의 세포는 제2 샘플의 하나 이상의 세포와 동일한 세포 유형일 수 있다. 제1 샘플의 하나 이상의 세포는 다수의 샘플의 하나 이상의 상이한 세포와 상이한 세포 유형일 수 있다. 세포 유형은 연골세포, 파골세포, 지방세포, 근모세포, 줄기 세포, 내피 세포 또는 평활근 세포일 수 있다. 세포 유형은 면역 세포 유형일 수 있다. 면역 세포 유형은 T 세포, B 세포, 혈소판, 수지상 세포, 호중구, 대식구 또는 단핵구일 수 있다.

[0367] 다수의 샘플은 하나 이상의 악성 세포를 포함할 수 있다. 하나 이상의 악성 세포는 종양, 육종 또는 백혈병으로부터 유래될 수 있다.

[0368] 다수의 샘플은 적어도 하나 체액을 포함할 수 있다. 체액은 혈액, 소변, 림프액, 타액을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 하나의 혈액 샘플을 포함할 수 있다.

[0369] 다수의 샘플은 하나 이상의 생물학적 조직으로부터의 적어도 하나의 세포를 포함할 수 있다. 하나 이상의 생물학적 조직은 뇌, 심장, 흉선, 동맥, 혈관, 폐, 근육, 위, 장, 간, 췌장, 비장, 신장, 담낭, 갑상선, 부신, 유선, 난소, 전립선, 정소, 피부, 지방질, 눈 또는 뇌일 수 있다.

[0370] 생물학적 조직은 감염된 조직, 질병에 걸린 조직, 악성 조직, 석회화 조직 또는 건강한 조직을 포함할 수 있다.

[0371] 다수의 샘플은 하나 이상의 공급원으로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 2개 이상의 공급원으로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 하나 이상의 대상체로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 2명 이상의 대상체로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 동일한 대상체로부터 기원할 수 있다. 하나 이상의 대상체는 동일한 종으로부터 기원할 수 있다. 하나 이상의 대상체는 상이한 종으로부터 기원할 수 있다. 하나 이상의 대상체는 건강할 수 있다. 하나 이상의 대상체는 질환, 장애 또는 병태가 발생한 대상체일 수 있다. 다수의 샘플은 포유동물, 박테리아, 바이러스, 진균 또는 식물로부터 선택되는 기원의 세포를 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플은 인간, 말, 소, 닭, 돼지, 래트, 마우스, 원숭이, 토끼, 기니 피그, 양, 염소, 개, 고양이, 새, 물고기, 개구리

및 과일파리로부터 기원할 수 있다.

[0372] 다수의 샘플은 동시에 얻을 수 있다. 다수의 샘플은 공동으로 얻을 수 있다. 다수의 샘플은 순차적으로 얻을 수 있다. 다수의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 100년, 10년, 5년, 4년, 3년, 2년 또는 1년의 과정에 걸쳐 얻을 수 있다. 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 약 1년 내에 얻을 수 있다. 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 12개월, 11개월, 10개월, 9개월, 8개월, 7개월, 6개월, 4개월, 3개월, 2개월 또는 1개월 내에 얻을 수 있다. 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 30일, 28일, 26일, 24일, 21일, 20일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일 또는 1일 내에 얻을 수 있다. 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 약 24시간, 22시간, 20시간, 18시간, 16시간, 14시간, 12시간, 10시간, 8시간, 6시간, 4시간, 2시간 또는 1 hour 내에 얻을 수 있다. 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 약 60초, 45초, 30초, 20초, 10초, 5초, 2초 또는 1초 내에 얻을 수 있다. 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 상이한 샘플을 얻는 1초 미만 내에 얻을 수 있다.

[0373] **표적 분자**

[0374] 본원에 개시된 방법 및 키트는 분자의 확률적 표지에 사용될 수 있다. 상기 분자는 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 본원에서 사용할 때, 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"는 퓨린 및 피리미딘 염기, 또는 다른 천연, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 잠금 핵산 (LNA) 또는 펩티드 핵산 (PNA)의 중합체 형태를 의미한다. "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"는 단일 뉴클레오티드 또는 염기쌍으로 이루어질 수 있다. 대안적으로, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"는 2개 이상의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다. 예를 들어, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산 분자"는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다. 또 다른 예에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 약 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 또는 10000개의 뉴클레오티드 또는 염기쌍을 포함한다. 폴리뉴클레오티드의 백본 (backbone)은 일반적으로 RNA 또는 DNA에서 볼 수 있는 당 및 포스페이트 기, 또는 변형된 또는 치환된 당 또는 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 그 내에 비-뉴클레오티드 성분이 개재할 수 있다. 따라서, 용어 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 데옥시뉴클레오시드 및 데옥시뉴클레오티드는 일반적으로 유사체, 예컨대 본원에서 설명되는 것을 포함한다. 이들 유사체는 핵산 또는 올리고뉴클레오시드 서열 내에 포함될 때 용액 내에서 천연 발생 핵산 서열과의 혼성화를 허용하도록 천연 발생 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드와 공통적인 몇몇 구조적 특징부를 갖는 분자이다. 일반적으로, 이들 유사체는 염기, 리보스 또는 포스포디에스테르 모어이티의 교체 및/또는 변형에 의해 천연 발생 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드로부터 유래된다. 변화는 혼성체 형성을 안정화 또는 불안정화하거나 요구되는 상보성 핵산 서열과의 혼성화 특이성을 향상시키도록 조정될 수 있다. 일부 예에서, 분자는 DNA, RNA, 또는 DNA-RNA 혼성체이다. 분자는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 예에서, 분자는 RNA 분자, 예컨대 mRNA, rRNA, tRNA, ncRNA, lncRNA, siRNA, 마이크로RNA 또는 miRNA이다. RNA 분자는 폴리아데닐화될 수 있다. 대안적으로, mRNA 분자는 폴리아데닐화되지 않는다. 대안적으로, 분자는 DNA 분자이다. DNA 분자는 게놈 DNA일 수 있다. DNA 분자는 엑손, 인트론, 비번역 영역, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 분자는 분자들의 패널이다.

[0375] 본원에 개시된 방법 및 키트는 동일한 또는 거의 동일한 분자 및/또는 상이한 분자의 개별적인 발생을 확률적으로 표지하기 위해 사용될 수 있다. 일부 예에서, 본원에 개시된 방법 및 키트는 동일한 또는 거의 동일한 분자 (예를 들어, 분자는 동일한 또는 거의 동일한 서열을 포함한다)를 확률적으로 표지하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 표지할 분자는 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성을 포함한다. 거의 동일한 분자는 약 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 뉴클레오티드 또는 염기쌍이 상이할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상의 샘플 내의 다수의 핵산은 2개 이상의 동일한 서열을 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상 내의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 또는 100%의 총 핵산은 동일한 서열을 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상의 샘플 내의 다수의 핵산은 적어도 2개의 상이한 서열을 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상 내의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%,

86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 총 핵산은 적어도 2개의 상이한 서열을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 표지할 분자는 서로에 대해 변이체이다. 예를 들어, 표지할 분자는 단일 뉴클레오티드 다형성 또는 다른 유형의 돌연변이를 함유할 수 있다. 또 다른 예에서, 표지할 분자는 스플라이스 변이체이다. 일부 예에서, 적어도 하나의 분자는 확률적으로 표지된다. 다른 예에서, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 동일한 또는 거의 동일한 분자가 확률적으로 표지된다. 대안적으로, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 동일한 또는 거의 동일한 분자가 확률적으로 표지된다. 다른 예에서, 적어도 1500; 2,000; 2500; 3,000; 3500; 4,000; 4500; 5,000; 6,000; 7,000; 8,000; 9,000; 또는 10000개의 동일한 또는 거의 동일한 분자가 확률적으로 표지된다. 다른 예에서; 적어도 15,000; 20,000; 25,000; 30,000; 35,000; 40,000; 45,000; 50,000; 60,000; 70,000; 80,000; 90,000; 또는 100,000개의 동일한 또는 거의 동일한 분자가 확률적으로 표지된다.

[0376] 다른 예에서, 본원에 개시된 방법 및 키트는 상이한 분자를 확률적으로 표지하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 표지할 분자는 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만의 서열 동일성을 포함한다. 상이한 분자는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 또는 염기쌍이 상이할 수 있다. 일부 예에서, 적어도 하나의 분자는 확률적으로 표지된다. 다른 예에서, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 분자가 확률적으로 표지된다. 대안적으로, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 상이한 분자가 확률적으로 표지된다. 다른 예에서, 적어도 1500; 2,000; 2500; 3,000; 3500; 4,000; 4500; 5,000; 6,000; 7,000; 8,000; 9,000; 또는 10000개의 상이한 분자가 확률적으로 표지된다. 다른 예에서; 적어도 15,000; 20,000; 25,000; 30,000; 35,000; 40,000; 45,000; 50,000; 60,000; 70,000; 80,000; 90,000; 또는 100,000개의 상이한 분자가 확률적으로 표지된다.

[0377] 표지할 상이한 분자는 상이한 농도 또는 양으로 샘플 내에 존재할 수 있다. 예를 들어, 하나의 분자의 농도 또는 양은 샘플 내의 또 다른 분자의 농도 또는 양보다 더 크다. 일부 예에서, 샘플 내의 적어도 하나의 분자의 농도 또는 양은 샘플 내의 적어도 하나의 다른 분자의 농도 또는 양보다 적어도 약 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 또는 그 초과로 더 크다. 일부 예에서, 샘플 내의 적어도 하나의 분자의 농도 또는 양은 샘플 내의 적어도 하나의 다른 분자의 농도 또는 양보다 적어도 약 1000배 또는 그 초과로 더 크다. 또 다른 예에서, 하나의 분자의 농도 또는 양은 샘플 내의 또 다른 분자의 농도 또는 양보다 더 적다. 샘플 내의 적어도 하나의 분자의 농도 또는 양은 샘플 내의 적어도 하나의 다른 분자의 농도 또는 양보다 적어도 약 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 또는 그 초과로 더 적을 수 있다. 샘플 내의 적어도 하나의 분자의 농도 또는 양은 샘플 내의 적어도 하나의 다른 분자의 농도 또는 양보다 적어도 약 1000배 또는 그 초과로 더 적을 수 있다.

[0378] 일부 예에서, 표지할 분자는 하나 이상의 샘플 내에 존재한다. 표지할 분자는 2개 이상의 샘플 내에 존재한다. 2개 이상의 샘플은 상이한 양 또는 농도의 표지할 분자를 함유할 수 있다. 일부 예에서, 하나의 샘플 내의 하나의 분자의 농도 또는 양은 상이한 샘플 내의 동일한 분자의 농도 또는 양보다 더 클 수 있다. 예를 들어, 혈액 샘플은 소변 샘플보다 더 많은 양의 특정 분자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 단일 샘플을 2개 이상의 하위샘플로 나눈다. 하위샘플은 상이한 양 또는 농도의 동일한 분자를 포함할 수 있다. 하나의 샘플 내의 적어도 하나의 분자의 농도 또는 양은 또 다른 샘플 내의 동일한 분자의 농도 또는 양보다 적어도 약 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 또는 그 초과로 더 클 수 있다. 대안적으로, 하나의 샘플 내의 하나의 분자의 농도 또는 양은 상이한 샘플 내의 동일한 분자의 농도 또는 양보다 더 적을 수 있다. 예를 들어, 심장 조직 샘플은 폐 조직 샘플보다 더 많은 특정 분자를 포함할 수 있다. 하나의 샘플 내의 적어도 하나의 분자의 농도 또는 양은 또 다른 샘플 내의 동일한 분자의 농도 또는 양보다 적어도 약 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100배 또는 그 초과로 더 적을 수 있다. 일부 예에서, 2개 이상의 상이한 샘플 내의 분자의 상이한 농도 또는 양은 샘플 편차로 언급된다.

[0379] 본원에 개시된 방법 및 키트는 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자의 분석을 위해 사용될 수 있다. 2개 이상의 분자는 2개 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 방법은 2개 이상의 표지된 폴리펩티드의 정체성을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 2개 이상의 표지된 폴리펩티드의 정체성의 결정은 질량 분광법을 포함할 수 있다. 방법은 제1 샘플의 표지된 폴리펩티드를 제2 샘플의 표지된 폴리펩티드와 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 폴리펩티드는 상이한 표지된 폴리펩티드의 수를 결정하기에 앞서 조합될 수 있다. 방법은 제

1 샘플-태그부착된 폴리펩티드 및 제2 샘플-태그부착된 폴리펩티드의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 제1 샘플-태그부착된 폴리펩티드 및 제2 샘플-태그부착된 폴리펩티드는 다수의 분자 식별 표지와 접촉하기 전에 조합될 수 있다. 상이한 표지된 폴리펩티드의 수의 결정은 표지된 폴리펩티드의 적어도 일부를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 표지된 폴리펩티드의 적어도 일부의 검출은 샘플 태그, 분자 식별 표지, 폴리펩티드, 또는 이들의 조합의 적어도 일부를 검출하는 것을 포함할 수 있다.

[0380] 본원에서 사용할 때, 용어 "폴리펩티드"는 적어도 하나의 펩티드를 포함하는 분자를 의미한다. 일부 예에서, 폴리펩티드는 단일 펩티드로 이루어진다. 대안적으로, 폴리펩티드는 2개 이상의 펩티드를 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드는 적어도 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000개의 펩티드를 포함한다. 폴리펩티드의 예는 아미노산, 단백질, 펩티드, 호르몬, 올리고당, 지질, 당지질, 인지질, 항체, 효소, 키나제, 수용체, 전사 인자, 및 리간드를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0381] **대상체**

[0382] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 대상체로부터의 세포 또는 샘플의 사용을 포함할 수 있다. 대상체는 인간 또는 비-인간 대상체일 수 있다. 대상체는 살아있을 수 있다. 대상체는 죽은 대상체일 수 있다. 대상체는 간병인 (예를 들어, 의료 전문가)의 보살핌 하에 있는 인간일 수 있다. 대상체는 질환이 존재하는 것으로 의심될 수 있다. 대상체는 질환이 존재할 수 있다. 대상체는 질환의 증상을 보일 수 있다. 대상체는 하나 이상의 샘플을 제공하는 대상체일 수 있다. 대상체는 포유동물, 파충류, 양서류, 및/또는 새일 수 있다. 대상체는 비-인간 영장류일 수 있다.

[0383] **효소**

[0384] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 효소를 포함할 수 있다. 효소의 예는 리가제, 역전사효소, 폴리머라제, 및 제한 뉴클레아제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 분자에 대한 올리고뉴클레오티드 태그의 부착은 하나 이상의 리가제의 사용을 포함한다. 리가제의 예는 DNA 리가제, 예컨대 DNA 리가제 I, DNA 리가제 III, DNA 리가제 IV, 및 T4 DNA 리가제, 및 RNA 리가제, 예컨대 T4 RNA 리가제 I 및 T4 RNA 리가제 II를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0385] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 역전사효소의 사용을 추가로 포함한다. 일부 예에서, 역전사효소는 HIV-1 역전사효소, M-MLV 역전사효소, AMV 역전사효소, 및 텔로머라제 역전사효소이다. 일부 예에서, 역전사효소는 M-MLV 역전사효소이다.

[0386] 일부 예에서, 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 폴리머라제의 사용을 포함한다. 폴리머라제의 예는 DNA 폴리머라제 및 RNA 폴리머라제를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, DNA 폴리머라제는 DNA 폴리머라제 I, DNA 폴리머라제 II, DNA 폴리머라제 III 전효소 (holoenzyme), 및 DNA 폴리머라제 IV이다. 상업적으로 이용가능한 DNA 폴리머라제는 Bst 2.0 DNA 폴리머라제, Bst 2.0 웜스타트(WarmStart)™ DNA 폴리머라제, Bst DNA 폴리머라제, 술포로부스 (Sulfolobus) DNA 폴리머라제 IV, Taq DNA 폴리머라제, 9° N™m DNA 폴리머라제, 딥 벤트알(Deep VentR)™ (엑소-) DNA 폴리머라제, 딥 벤트알R™ DNA 폴리머라제, 헤모 클렌타크(Hemo KlenTaq)™, LongAmp® Taq DNA 폴리머라제, OneTaq® DNA 폴리머라제, 퓨전(Phusion)® DNA 폴리머라제, Q5™ 고성능 (High-Fidelity) DNA 폴리머라제, 써미네이터(Therminator)™ γ DNA 폴리머라제, 써미네이터™ DNA 폴리머라제, 써미네이터™ II DNA 폴리머라제, 써미네이터™ III DNA 폴리머라제, 벤트알® DNA 폴리머라제, 벤트알® (엑소-) DNA 폴리머라제, Bsu DNA 폴리머라제, phi29 DNA 폴리머라제, T4 DNA 폴리머라제, T7 DNA 폴리머라제, 말단 트랜스퍼라제, 티타늄® Taq 폴리머라제, KAPA Taq DNA 폴리머라제 및 KAPA Taq 고온 출발 DNA 폴리머라제를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0387] 대안적으로, 폴리머라제는 RNA 폴리머라제, 예컨대 RNA 폴리머라제 I, RNA 폴리머라제 II, RNA 폴리머라제 III, 이. 콜라이 폴리(A) 폴리머라제, phi6 RNA 폴리머라제 (RdRP), 폴리(U) 폴리머라제, SP6 RNA 폴리머라제, 및 T7 RNA 폴리머라제이다.

[0388] 일부 예에서, 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 제한 효소를 포함한다. 제한 효소는 타입 I, 타입 II, 타입 III, 및 타입 IV 제한 효소를 포함한다. 일부 예에서, 타입 I 효소는 그의 인식 서열로부터 먼 부위에서 무작위로 DNA를 절단하는 복합, 멀티-서브유닛, 조합 제한-및-변형 효소이다. 일반적으로, 타입 II 효소는 그의 인식 서열에 근접하거나 인식 서열 내의 규정된 위치에서 DNA를 절단한다. 이들은 별개의 제한 단편 및 별개의 겔 밴드 형성 패턴을 생산할 수 있다. 타입 III 효소는 또한 큰 조합 제한-및-변형 효소이다. 이들

은 종종 그의 인식 서열 외부에서 절단하고, 절단을 수행하기 위해 2개의 상기 서열이 동일한 DNA 분자 내에 반대 배향으로 존재할 것을 필요로 할 수 있고; 좀처럼 완전한 소화를 유도하지 않는다. 일부 예에서, 타입 IV 효소는 변형된, 일반적으로 메틸화된 DNA를 인식하고, 이. 콜라이의 McrBC 및 Mrr 시스템에 의해 예시될 수 있다.

[0389] **추가의 시약**

[0390] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 시약의 사용을 포함할 수 있다. 시약의 예는 PCR 시약, 라이게이션 시약, 역전사 시약, 효소 시약, 혼성화 시약, 샘플 제조 시약, 및 핵산 정제 및/또는 단리를 위한 시약을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0391] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 완충제의 사용을 포함할 수 있다. 완충제의 예는 세척 완충제, 라이게이션 완충제, 혼성화 완충제, 증폭 완충제, 및 역전사 완충제를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 혼성화 완충제는 상업적으로 이용가능한 완충제, 예컨대 TMAC Hyb 용액, SSPE 혼성화 용액, 및 ECONOTM 혼성화 완충제이다. 본원에 개시된 완충제는 하나 이상의 세제를 포함할 수 있다.

[0392] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 담체의 사용을 포함할 수 있다. 담체는 본원에 개시된 하나 이상의 반응 (예를 들어, 라이게이션 반응, 역전사, 증폭, 혼성화)의 효율을 향상시키거나 개선할 수 있다. 담체는 분자 또는 그의 임의의 생성물 (예를 들어, 표지된-분자, 표지된-cDNA 분자, 표지된-앰플리콘)의 비-특이적 손실을 감소시키거나 억제할 수 있다. 예를 들어, 담체는 표면에 대한 흡수를 통해 표지된-분자의 비-특이적 손실을 감소시킬 수 있다. 담체는 표면 또는 기판 (예를 들어, 용기, 에펜도르프 튜브, 피펫 팁)에 대한 분자, 표지된-분자, 또는 그의 임의의 생성물의 친화도를 감소시킬 수 있다. 대안적으로, 담체는 표면 또는 기판 (예를 들어, 비드, 어레이, 유리, 슬라이드, 칩)에 대한 분자 또는 그의 임의의 생성물의 친화도를 증가시킬 수 있다. 담체는 분자 또는 그의 임의의 생성물을 분해로부터 보호할 수 있다. 예를 들어, 담체는 RNA 분자 또는 그의 임의의 생성물을 리보뉴클레아제로부터 보호할 수 있다. 대안적으로, 담체는 DNA 분자 또는 그의 임의의 생성물을 DNase로부터 보호할 수 있다. 담체의 예는 핵산 분자, 예컨대 DNA 및/또는 RNA, 또는 폴리펩티드를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. DNA 담체의 예는 플라스미드, 벡터, 폴리아데닐화된 DNA, 및 DNA 올리고뉴클레오티드를 포함한다. RNA 담체의 예는 폴리아데닐화된 RNA, 파지 RNA, 파지 MS2 RNA, 이. 콜라이 RNA, 효모 RNA, 효모 tRNA, 포유동물 RNA, 포유동물 tRNA, 짧은 폴리아데닐화된 합성 리보뉴클레오티드 및 RNA 올리고뉴클레오티드를 포함한다. RNA 담체는 폴리아데닐화된 RNA일 수 있다. 대안적으로, RNA 담체는 비-폴리아데닐화된 RNA일 수 있다. 일부 예에서, 담체는 박테리아, 효모, 또는 바이러스로부터 유래된다. 예를 들어, 담체는 박테리아, 효모 또는 바이러스로부터 유래된 핵산 분자 또는 폴리펩티드일 수 있다. 예를 들어, 담체는 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로부터의 단백질이다. 또 다른 예에서, 담체는 에셔리키아 콜라이로부터의 핵산 분자이다. 대안적으로, 담체는 포유동물 (예를 들어, 인간, 마우스, 염소, 래트, 소, 양, 돼지, 개, 또는 토끼), 조류, 양서류, 또는 파충류로부터의 핵산 분자 또는 펩티드이다.

[0393] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 대조군 물질의 사용을 포함할 수 있다. 대조군 물질은 대조군 올리고뉴클레오티드, 불활성 효소, 비-특이적 경쟁자를 포함할 수 있다. 대안적으로, 대조군 물질은 브라이트 혼성화, 브라이트 프로브 대조군, 핵산 주형, 스파이크-인 대조군, PCR 증폭 대조군을 포함한다. PCR 증폭 대조군은 양성 대조군일 수 있다. 다른 예에서, PCR 증폭 대조군은 음성 대조군이다. 핵산 주형 대조군은 공지의 농도일 수 있다. 대조군 물질은 하나 이상의 표지를 포함할 수 있다.

[0394] 스파이크-인 대조군은 반응물 또는 샘플에 첨가되는 주형일 수 있다. 예를 들어, 스파이크-인 주형은 증폭 반응에 첨가될 수 있다. 스파이크-인 주형은 제1 증폭 사이클 후에 임의의 시간에 증폭 반응에 첨가될 수 있다. 일부 예에서, 스파이크-인 주형은 제2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50회 증폭 사이클 후에 증폭 반응에 첨가된다. 스파이크-인 주형은 마지막 증폭 사이클 전에 임의의 시간에 증폭 반응에 첨가될 수 있다. 스파이크-인 주형은 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 핵산 염기쌍을 포함할 수 있다. 스파이크-인 주형은 DNA, RNA, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 스파이크-인 주형은 하나 이상의 표지를 포함할 수 있다.

[0395] **검출가능 표지**

[0396] 본원에 개시된 방법, 키트, 및 조성물은 검출가능 표지를 추가로 포함할 수 있다. 용어 "검출가능 표지", "태그" 또는 "표지"는 교환가능하게 사용되고, 분자 (예를 들어, 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 중합체, 또는 핵산 결합 인자, 분자 바코드)에 부착된 임의의 화학적 모어이티를 의미할 수 있다. 화학적 모어이티는 분자에 공유

부착된다. 화학적 모어이티는 분자에 비-공유 부착될 수 있다. 분자 바코드, 샘플 태그 및 분자 식별 표지는 검출가능 표지, 태그 또는 표지를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 표지는 검출가능하고, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 중합체를 본 발명의 실시자에게 검출가능하도록 만든다. 본원에 개시된 방법에서 사용할 수 있는 검출가능 표지는 예를 들어, 형광 표지, 화학발광 표지, 켄쳐 (quencher), 방사성 표지, 비오틴, 피렌 모어이티, 금, 또는 이들의 조합물을 포함한다. 검출가능 표지의 비-제한적인 예는 발광 분자, 형광 색소, 형광 켄칭제, 착색 분자, 방사성동위원소 또는 섬광제 (scintillant)를 포함한다.

[0397] 일부 예에서, 본원에 개시된 방법은 하나 이상의 검출가능 표지를 분자 바코드, 분자 식별 표지, 샘플 태그, 표지된 핵산 또는 그의 임의의 생성물 (예를 들어, 표지된-앰플리콘)에 부착하는 것을 추가로 포함한다. 방법은 2개 이상의 검출가능 표지를 분자 바코드, 분자 식별 표지, 샘플 태그 또는 표지된 핵산에 부착하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 방법은 적어도 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 검출가능 표지를 분자 바코드, 분자 식별 표지, 샘플 태그 또는 표지된 핵산에 부착시키는 것을 포함한다. 일부 예에서, 검출가능 표지는 CyTM 표지이다. CyTM 표지는 Cy3 표지이다. 대안적으로 또는 추가로, 검출가능 표지는 비오틴이다. 일부 실시양태에서, 검출가능 표지는 분자 바코드, 분자 식별 표지, 샘플 태그 또는 표지된 핵산에 결합하는 프로브에 부착된다. 이것은 예를 들어, 핵산 또는 표지된 핵산이 어레이에 혼성화된 후 일어날 수 있다. 한 예에서, 핵산 또는 표지된 핵산은 어레이 상의 파트너에 결합된다. 결합 후에, 표지된 핵산에 결합할 수 있는 프로브는 어레이 상의 분자에 결합된다. 상기 과정은 신호가 표지의 비특이적 결합 또는 어레이에 대한 분자의 비특이적 결합의 결과일 가능성을 감소시키기 위해 다수의 프로브 및 표지를 사용하여 반복될 수 있다.

[0398] 공여자 수용자 쌍을 검출가능 표지로서 사용할 수 있다. 공여자 또는 수용자는 핵산에 결합하는 프로브에 부착될 수 있다. 프로브는 예를 들어 핵산 또는 표지된 핵산에 결합할 수 있는 핵산 프로브일 수 있다. 대응하는 공여자 또는 수용자는 신호를 유도하기 위해 첨가될 수 있다.

[0399] 일부 예에서, 검출가능 표지는 프리덤 (Freedom) 염료, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 염료, CyTM 염료, 플루오레세인 염료, 또는 LI-COR IRDyes®이다. 일부 예에서, 프리덤 염료는 플루오레세인 (6-FAMTM, 6-카르복시플루오레세인), MAX (NHS 에스테르), TYETM 563, TEX 615, TYETM 665, TYE 705이다. 검출가능 표지는 알렉사 플루오르 염료일 수 있다. 알렉사 플루오르® 염료의 예는 알렉사 플루오르® 488 (NHS 에스테르), 알렉사 플루오르® 532 (NHS 에스테르), 알렉사 플루오르® 546 (NHS 에스테르), 알렉사 플루오르® 594 (NHS 에스테르), 알렉사 플루오르® 647 (NHS 에스테르), 알렉사 플루오르® 660 (NHS 에스테르), 또는 알렉사 플루오르® 750 (NHS 에스테르)일 수 있다. 대안적으로, 검출가능 표지는 CyTM 염료이다. CyTM 염료의 예는 Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, 및 Cy7을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 검출가능 표지는 플루오레세인 염료이다. 비-제한적인 플루오레세인 염료의 예는 6-FAMTM (아지드), 6-FAMTM (NHS 에스테르), 플루오레세인 dT, JOE (NHS 에스테르), TETTM, 및 HEXTM이다. 일부 예에서, 검출가능 표지는 LI-COR IRDyes®, 예컨대 5' IRDye® 700, 5' IRDye® 800, 또는 IRDye® 800CW (NHS 에스테르)를 포함한다. 일부 예에서, 검출가능 표지는 TYETM 563이다. 대안적으로, 검출가능 표지는 Cy3이다.

[0400] 검출가능 표지는 로다민 염료일 수 있다. 로다민 염료의 예는 로다민 그린TM-X (NHS 에스테르), TAMRATM, TAMRATM (NHS 에스테르), 로다민 레드TM-X(NHS 에스테르), ROXTM (NHS 에스테르), 및 5' TAMRATM (아지드)를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 다른 예에서, 검출가능 표지는 WellRED 염료이다. WellRED 염료는 WellRED D4 염료, WellRED D3 염료, 및 WellRED D2 염료를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 검출가능 표지는 텍사스 레드(Texas Red)®-X (NHS 에스테르), 라이트사이클러(Lightcycler)® 640 (NHS 에스테르), 또는 Dy 750 (NHS 에스테르)이다.

[0401] 일부 예에서, 검출가능 표지는 링커 분자를 포함한다. 링커 분자의 예는 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘, HRP, 단백질 A, 단백질 G, 항체 또는 그의 단편, Grb2, 폴리히스티딘, Ni2+, FLAG 태그, myc 태그를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 대안적으로, 검출가능 표지는 중금속, 전자 공여자/수용자, 아크리디늄 에스테르, 염료 및 열량측정 기질을 포함한다. 다른 예에서, 검출가능 표지는 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, 퍼옥시다제 및 루시페라제를 포함한다.

[0402] 질량의 변화는 표면 플라즈몬 공명 검출의 경우에서처럼 검출가능 표지로 간주될 수 있다. 통상의 기술자는 본원에서 언급되지 않지만 본 발명의 실행시에 이용될 수 있는 유용한 검출가능 표지를 쉽게 알 것이다.

[0403] 일부 예에서, 검출가능 표지는 프라이머와 함께 사용된다. 예를 들어, 범용 프라이머는 검출가능 표지로 표지된다 (예를 들어, Cy3 표지된 범용 프라이머, 형광단 표지된 범용 프라이머). 대안적으로, 표적 특이적 프라이머는 검출가능 표지로 표지된다 (예를 들어, TYE 563-표지된 표적 특이적 프라이머). 다른 예에서, 검출가능

표지는 샘플 태그 또는 분자 식별 표지와 함께 사용된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 태그는 검출가능 표지로 표지된다 (예를 들어, 비오틴-표지된 올리고뉴클레오티드 태그). 다른 예에서, 검출가능 표지는 핵산 주형 분자와 함께 사용된다. 검출가능 표지는 표지된-분자 또는 표지된-앰플리콘을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 검출가능 표지는 핵산 주형 분자를 검출하기 위해 사용된다.

[0404] 일부 예에서, 검출가능 표지는 프라이머, 분자 바코드, 샘플 태그, 분자 식별 표지, 표지된-분자, 표지된-앰플리콘, 프로브, HCR 프로브, 및/또는 비-표지된 핵산에 부착된다. 검출가능 표지를 프라이머, 올리고뉴클레오티드 태그, 표지된-분자, 표지된-앰플리콘, 및/또는 비-표지된 핵산에 부착시키는 방법은 화학적 표지화 및 효소 표지화를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 검출가능 표지는 화학적 표지화에 의해 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 표지화 기술은 화학적 반응성 기를 포함한다. 비-제한적인 반응성 기의 예는 아민-반응성 숙신이미딜 에스테르, 예컨대 NHS-플루오레세인 또는 NHS-로다민, FITC를 포함하는 아민-반응성 이소티오시아네이트 유도체, 및 술프히드릴-반응성 말레이미드-활성화된 플루오르, 예컨대 플루오레세인-5-말레이미드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 임의의 이들 반응성 염료와 또 다른 분자의 반응은 형광단 및 링커 및/또는 작용제 사이에 안정한 공유 결합의 형성을 유도한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 이소티오시아네이트이다. 일부 실시양태에서, 표지는 리신 측쇄의 1급 아민을 통해 작용제에 부착된다. 일부 실시양태에서, 화학적 표지화는 NHS-에스테르 화학 방법을 포함한다.

[0405] 대안적으로, 검출가능 표지는 효소 표지화에 의해 부착된다. 효소 표지화 방법은 비오틴 수용자 펩티드/비오틴 리가제 (AP/Bir A), 아실 담체 단백질/포스포판테테인 트랜스퍼라제 (ACP/PPTase), 인간 O6-알킬구아닌 트랜스퍼라제 (hAGT), Q-태그/트랜스글루타미나제 (TGase), 알데히드 태그/포르밀글라이신-생성 효소, 돌연변이된 원핵 데할로게나제 (HaloTagTM), 및 파르네실화 모티프/단백질 파르네실트랜스퍼라제 (PFTase) 방법을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 친화도 표지화는 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 및 FK506-결합 단백질 12의 Phe36Val 돌연변이체 (FKBP12(F36V))를 이용하는 비공유 방법, 및 금속-킬레이션 방법을 포함할 수 있고 이로 제한되지 않는다.

[0406] 가교결합 시약은 검출가능 표지를 프라이머, 올리고뉴클레오티드 태그, 표지된-분자, 표지된-앰플리콘, 및/또는 비-표지된 핵산에 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 예에서, 가교결합 시약은 글루타르알데히드이다. 글루타르알데히드는 몇몇 경로에 의해 아민기와 반응하여 가교결합을 생성할 수 있다. 예를 들어, 환원 조건 하에서, 글루타르알데히드의 양 말단 상의 알데히드는 아민과 연결되어 2차 아민 연결기를 형성한다.

[0407] 일부 예에서, 프라이머, 올리고뉴클레오티드 태그, 표지된-분자, 표지된-앰플리콘, 및/또는 비-표지된 핵산에 대한 검출가능 표지의 부착은 퍼아이오데이트-활성화, 이어서 환원성 아민화를 포함한다. 일부 예에서, 술포-SMCC 또는 다른 헤테로2관능성 가교링커는 검출가능 표지를 프라이머, 올리고뉴클레오티드 태그, 표지된-분자, 표지된-앰플리콘, 및/또는 비-표지된 핵산에 접합하기 위해 사용된다. 예를 들어, 술포-SMCC는 효소를 약물에 접합하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 효소는 1단계에서 활성화 및 정제된 후, 제2 단계에서 약물에 접합된다. 일부 실시양태에서, 가교결합의 방향성은 하나의 특이적 배향으로 제한된다 (예를 들어, 효소 상의 아민에서 항체 상의 술프히드릴기로).

[0408] **질환/병태**

[0409] 대상체에서 질환 또는 병태의 상태 또는 결과의 진단, 모니터링, 및/또는 예측을 위한 방법, 키트 및 조성물이 본원에 개시된다. 일반적으로, 방법은 (a) 2개 이상의 샘플로부터의 2개 이상의 분자를 확률적으로 표지하여 2개 이상의 표지된 핵산을 생산하고; (b) 2개 이상의 표지된 핵산을 검출 및/또는 정량하고; (c) 2개 이상의 표지된 핵산의 검출 및/또는 정량을 기초로 하여 대상체에서 질환 또는 병태의 상태 또는 결과의 진단, 모니터링, 및/또는 예측을 포함한다. 방법은 치료 요법의 결정을 추가로 포함할 수 있다. 2개 이상의 샘플은 질환 또는 병태를 앓고 있는 대상체로부터의 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 2개 이상의 샘플은 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 2개 이상의 샘플은 대조군으로부터 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다.

[0410] 질환 또는 병태의 모니터링은 치료 요법의 모니터링을 추가로 포함할 수 있다. 치료 요법의 모니터링은 치료 요법의 효능을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 치료 요법의 모니터링은 치료 요법의 투여, 종료, 추가 또는 변경을 포함한다. 치료 요법의 변경은 치료 요법의 투여량, 투여 빈도, 또는 투여 방식을 증가시키거나 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 치료 요법은 하나 이상의 치료 약물을 포함할 수 있다. 치료 약물은 항암 약물, 항바이러스 약물, 항박테리아 약물, 항병원체 약물, 또는 이들의 임의의 조합물일 수 있다.

[0411] *암*

[0412] 일부 예에서, 질환 또는 병태는 암이다. 확률적으로 표지할 분자는 암성 세포 또는 조직으로부터 기원할 수 있다. 일부 예에서, 암은 육종, 암종, 림프종 또는 백혈병이다. 육종은 뼈, 연골, 지방, 근육, 혈관, 또는 다른 연결 또는 지지 조직의 암이다. 육종은 뼈암, 섬유육종, 연골육종, 유잉 (Ewing) 육종, 악성 혈관내피종, 악성 신경초종, 양측 전정 신경초종, 골육종, 연조직 육종 (예를 들어, 포상 연부 육종, 혈관육종, 엽상 낭상 육종, 피부섬유육종, 인대양 종양, 유상피 육종, 골외 골육종, 섬유육종, 혈관 주위 세포종, 혈관육종, 카포시 (Kaposi) 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 림프육종, 악성 섬유 조직구종, 신경섬유육종, 횡문근육종, 및 활막 육종)을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0413] 암종은 인체의 표면을 덮고 호르몬을 생산하고 선을 형성하는 세포인 상피 세포에서 시작하는 암이다. 비-제한적인 예를 들어, 암종은 유방암, 췌장암, 폐암, 결장암, 결직장암, 직장암, 신장암, 방광암, 위암, 전립선암, 간암, 난소암, 뇌암, 질암, 외음부암, 자궁암, 구강암, 음경암, 정소암, 식도암, 피부암, 난관암, 두경부암, 위장관 기질암, 선암종, 피부 또는 안내 흑색종, 항문 영역의 암, 소장의 암, 내분비계의 암, 갑상선의 암, 부갑상선의 암, 부신의 암, 요도의 암, 신우의 암, 요관의 암, 자궁내막의 암, 자궁경관의 암, 뇌하수체의 암, 중추신경계 (CNS)의 신생물, 원발성 CNS 림프종, 뇌간 신경교종, 및 척추 종양을 포함한다. 일부 예에서, 암은 피부 암, 예컨대 기저 세포 암종, 편평 세포 암종, 흑색종, 비흑색종, 또는 광선 (일광) 각화증이다.

[0414] 일부 예에서, 암은 폐암이다. 폐암은 폐 (기관지) 또는 폐의 작은 기낭 (폐포)를 공급하기 위해 기관으로부터 분지하는 기도에서 시작할 수 있다. 폐암은 비-소세포 폐 암종 (NSCLC), 소세포 폐 암종, 및 중피종을 포함한다. NSCLC의 예는 편평 세포 암종, 선암종, 및 큰 세포 암종을 포함한다. 중피종은 폐 및 흉강의 내벽 (흉막) 또는 복부의 내벽 (복막)의 암성 종양일 수 있다. 중피종은 석면 노출 때문일 수 있다. 암은 뇌암, 예컨대 아교모세포종일 수 있다.

[0415] 대안적으로, 암은 중추신경계 (CNS) 종양일 수 있다. CNS 종양은 신경교종 또는 비신경교종으로 분류될 수 있다. 신경교종은 악성 신경교종, 고등급 신경교종, 광범위 내재성 뇌교 신경교종일 수 있다. 신경교종의 예는 별아교세포종, 희돌기신경교종 (또는 희돌기신경교종 및 별아교세포종 성분의 혼합물), 및 뇌실막세포종을 포함한다. 별아교세포종은 저-등급 별아교세포종, 역형성 별아교세포종, 다형성 아교모세포종, 모양세포성 별아교세포종, 다형 황색별아교세포종, 및 뇌실막하 거대 세포 별아교세포종을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 희돌기신경교종은 저-등급 희돌기신경교종 (또는 희돌기별아교세포종) 및 역형성 희소돌기신경교종을 포함한다. 비신경교종은 수막종, 뇌하수체 선종, 원발성 CNS 림프종, 및 수모세포종을 포함한다. 일부 예에서, 암은 수막종이다.

[0416] 백혈병은 급성 림프성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 또는 만성 골수구성 백혈병일 수 있다. 백혈병의 추가의 유형은 털세포 백혈병, 만성 골수단구성 백혈병, 및 연소성 골수단구성 백혈병을 포함한다.

[0417] 림프종은 림프구의 암이고, B 또는 T 림프구로부터 발생할 수 있다. 2개의 주요 림프종 유형은 이전에 호지킨 질환으로 알려진 호지킨 (Hodgkin) 림프종, 및 비-호지킨 림프종이다. 호지킨 림프종은 리드-스턴버그 (Reed-Sternberg) 세포의 존재를 특징으로 한다. 비-호지킨 림프종은 호지킨 림프종이 아닌 모든 림프종이다. 비-호지킨 림프종은 무통성 림프종 및 침습성 림프종일 수 있다. 비-호지킨 림프종은 미만성 큰 B 세포 림프종, 여포성 림프종, 점막 연관 림프 조직 림프종 (MALT), 소세포 림프성 림프종, 외투세포 림프종, 버킷 림프종, 종격 큰 B 세포 림프종, 발덴스트롬 (Waldenstroem) 거대글로불린혈증, 림프절 변연대 B 세포 림프종 (NMZL), 비장 변연대 림프종 (SMZL), 림프절외 변연대 B 세포 림프종, 혈관내 큰 B 세포 림프종, 원발성 삼출 림프종, 및 림프종양 육아종증을 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0418] *병원체 감염*

[0419] 일부 예에서, 질환 또는 병태는 병원체 감염이다. 확률적으로 표지할 분자는 병원체로부터 기원할 수 있다. 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균, 또는 원생동물일 수 있다. 일부 예에서, 병원체는 원생동물, 예컨대 아칸트아메바(*Acanthamoeba*) (예를 들어, 에이. 아스트로닉시스(*A. astronyxis*), 에이. 카스텔라니이(*A. castellanii*), 에이. 쿨베르트소니(*A. culbertsoni*), 에이. 하체티(*A. hatchetti*), 에이. 폴리파가(*A. polyphaga*), 에이. 리소데스(*A. rhysodes*), 에이. 헤알리이(*A. healyi*), 에이. 디비오넨시스(*A. divionensis*)), 브라키올라(*Brachiola*) (예를 들어, 비. 콘노리(*B. connori*), 비. 베시쿨라룸(*B. vesicularum*)), 크립토스포리듐(*Cryptosporidium*) (예를 들어, 씨. 파르붐(*C. parvum*)), 시클로스포라

(*Cyclospora*) (예를 들어, 씨. 카예타넨시스(*C. cayetanensis*)), 엔세팔리토준(*Encephalitozoon*) (예를 들어, 이. 쿠니쿨리(*E. cuniculi*), 이. 헬렘(*E. hellem*), 이. 인테스티날리스(*E. intestinalis*)), 엔트아메바(*Entamoeba*) (예를 들어, 이. 히스톨리티카(*E. histolytica*)), 엔테로시토준(*Enterocytozoon*) (예를 들어, 이. 비에네우시(*E. bieneusi*)), 기아르디아(*Giardia*) (예를 들어, 지. 람블리아(*G. lamblia*)), 이소스포라(*Isospora*) (예를 들어, 아이. 벨리(*I. belli*)), 미크로스포리듐(*Microsporidium*) (예를 들어, 엠. 아프리카눔(*M. africanum*), 엠. 세일로넨시스(*M. ceylonensis*)), 나에글레리아(*Naegleria*) (예를 들어, 엔. 포울레리(*N. fowleri*)), 노세마(*Nosema*) (예를 들어, 엔. 알게래(*N. algerae*), 엔. 오쿨라룸(*N. ocularum*)), 플레이스토포라(*Pleistophora*), 트라키플레이스토포라(*Trachipleistophora*) (예를 들어, 티. 안트로포프테라(*T. anthropophthera*), 티. 호미니스(*T. hominis*)), 및 비타포르마(*Vittaforma*) (예를 들어, 브이. 코르네애(*V. corneae*))일 수 있다. 병원체는 진균, 예컨대, 칸디다, 아스페르길루스(*Aspergillus*), 크립토코커스(*Cryptococcus*), 히스토플라스마(*Histoplasma*), 뉴모시스티스(*Pneumocystis*), 및 스타키보트리스(*Stachybotrys*)일 수 있다.

[0420] 병원체는 박테리아일 수 있다. 예시적인 박테리아는 보르데텔라(*Bordetella*), 보렐리아, 브루셀라, 캄필로박터, 클라미디아, 클라미도필라(*Chlamydophila*), 클로스트리듐, 코리네박테리움, 엔테로코커스, 에셔리키아, 프란시셀라, 해모필루스(*Haemophilus*), 헬리코박터, 레지오넬라, 렙토스피라, 리스테리아, 미코박테리움(*Mycobacterium*), 미코플라즈마, 네이세리아, 슈도모나스, 리케챠, 살모넬라, 시겔라, 스타필로로커스, 스트렙토코커스, 트레포네마, 비브리오, 또는 예르시니아를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0421] 바이러스는 역전사 바이러스일 수 있다. 역전사 바이러스의 예는 단일 가닥 RNA-RT (ssRNA-RT) 바이러스 및 이중 가닥 DNA-RT (dsDNA-RT) 바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. ssRNA-RT 바이러스의 비-제한적인 예는 레트로바이러스, 알파레트로바이러스, 베타레트로바이러스, 감마레트로바이러스, 델타레트로바이러스, 엡실론레트로바이러스, 렌티바이러스, 스푸마 바이러스, 메타비리우스, 및 유사 바이러스 (pseudovirus)를 포함한다. dsDNA-RT 바이러스의 비-제한적인 예는 헤파데노바이러스 및 콜리모바이러스를 포함한다. 바이러스는 DNA 바이러스일 수 있다. 바이러스는 RNA 바이러스일 수 있다. DNA 바이러스는 이중 가닥 DNA (dsDNA) 바이러스일 수 있다. 일부 예에서, dsDNA 바이러스는 아데노바이러스, 포진 바이러스, 또는 수두 바이러스이다. 아데노바이러스의 예는 아데노바이러스 및 감염성 개 간염 바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 포진 바이러스의 예는 단순 포진 바이러스, 바리셀라-조스터 (varicella-zoster) 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 및 엡스타인-바 바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 수두 바이러스의 비-제한적인 목록은 천연두 바이러스, 소 수두 바이러스, 양 수두 바이러스, 원숭이 수두 바이러스, 및 우두 바이러스를 포함한다. DNA 바이러스는 단일 가닥 DNA (ssDNA) 바이러스일 수 있다. ssDNA 바이러스는 파르보바이러스일 수 있다. 파르보바이러스의 예는 파르보바이러스 B19, 개 파르보바이러스, 마우스 파르보바이러스, 돼지 파르보바이러스, 고양이 백혈구감소증, 및 밍크 장염 바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0422] 바이러스는 RNA 바이러스일 수 있다. RNA 바이러스는 이중 가닥 RNA (dsRNA) 바이러스, (+) 센스 단일 가닥 RNA 바이러스 ((+)ssRNA) 바이러스, 또는 (-) 센스 단일 가닥 ((-) ssRNA) 바이러스일 수 있다. dsRNA 바이러스의 비-제한적인 목록은 레오바이러스, 오르토레오바이러스, 시포바이러스, 로타바이러스, 청설 (bluetongue) 바이러스, 및 피토레오 바이러스를 포함한다. (+) ssRNA 바이러스의 예는 피코르나바이러스 및 토가바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 피코르나바이러스의 예는 엔테로바이러스, 리노바이러스, 헤파토바이러스, 카르디오바이러스, 아프토바이러스, 폴리오바이러스, 파레코바이러스, 에르보바이러스, 코부바이러스, 테스코바이러스, 및 콕사키를 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 일부 예에서, 토가바이러스는 풍진 바이러스, 신드비스 바이러스, 동부형 말 뇌염 바이러스, 서부형 말 뇌염 바이러스, 베네주엘라 말 뇌염 바이러스, 로스강 (Ross River) 바이러스, 오뇽뇽 (O'nyong'nyong) 바이러스, 치쿤군야 (Chikungunya), 또는 셈리키 삼림열 (Semliki Forest) 바이러스이다. (-) ssRNA 바이러스의 비-제한적인 목록은 오르토믹소바이러스 및 랍도 바이러스를 포함한다. 오르토믹소바이러스의 예는 인플루엔자바이러스 A, 인플루엔자바이러스 B, 인플루엔자바이러스 C, 이사바이러스, 및 토고토바이러스를 포함한다. 랍도바이러스의 예는 시토랍도바이러스, 디코랍도바이러스, 에페메로바이러스, 리싸바이러스, 노비랍도바이러스, 및 베지쿨로바이러스를 포함하고, 이로 제한되지 않는다.

[0423] *태아 장애*

[0424] 일부 예에서, 질환 또는 병태는 임신이다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 임신한 대상체에서 태아 병태를 진단하는 것을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 태아 돌연변이 또는 유전 이상을 확인하는 것을 포함할 수 있다. 확률적으로 표지할 분자는 태아 세포 또는 조직으로부터 기원할 수 있다. 대안적으로 또는 추

가로, 표지할 분자는 임신한 대상체로부터 기원할 수 있다.

[0425] 본원에 개시된 방법 및 키트는 상염색체 삼염색체 (예를 들어, 삼염색체 13, 15, 16, 18, 21, 또는 22)의 진단, 예측 또는 모니터링에 사용될 수 있다. 몇몇 경우에, 삼염색체는 증가된 유산 가능성과 연관될 수 있다 (예를 들어, 삼염색체 15, 16, 또는 22). 다른 경우에, 검출되는 삼염색체는 유아가 선천적 장애를 갖기 때어날 것임을 가르킬 수 있는 생존출생 삼염색체이다 (예를 들어, 삼염색체 13 (파타우 (Patau) 증후군), 삼염색체 18 (에드워즈 (Edwards) 증후군), 및 삼염색체 21 (다운 (Down) 증후군)). 이상은 또한 성염색체 이상일 수 있다 (예를 들어, XXY (클라인펠터 (Klinefelter) 증후군), XYY (야콥 (Jacobs) 증후군), 또는 XXX (삼염색체 X). 표지할 분자(들)은 하나 이상의 다음 염색체 상에 존재할 수 있다: 13, 18, 21, X, 또는 Y. 예를 들어, 분자는 염색체 21 및/또는 염색체 18, 및/또는 염색체 13 상에 존재한다.

[0426] 본원에 개시된 방법 및 키트에 기초하여 결정할 수 있는 추가의 태아 병태는 하나 이상의 염색체의 일염색체 (X 염색체 일염색체, 터너 (Turner) 증후군으로도 공지됨), 하나 이상의 염색체의 삼염색체 (13, 18, 21, 및 X), 하나 이상의 염색체의 사염색체 및 오염색체 (인간에서는 성염색체에서 가장 흔하게 관찰됨, 예를 들어, XXXX, XXYY, XXXY, XYYY, XXXXX, XXXXY, XXXYY, XYYYY 및 XXYYY), 일배성 (monoploidy), 삼배성 (모든 염색체, 예를 들어, 인간에서 69 염색체 중 3개), 사배성 (모든 염색체, 예를 들어, 인간에서 92 염색체 중 4개), 오배성 및 다배성을 포함한다.

[0427] 또한, 임의의 상기 설명된 방법을 포함하는 법의학 분석 방법을 본원에 개시한다. 법의학 과학자는 현장에서 개체, 예컨대 가해자의 존재를 확인하기 위해 범죄 현장에서 발견된 다양한 샘플 (예를 들어, 혈액, 정액, 피부, 타액, 모발) 내의 핵산을 이용할 수 있다. 상기 과정은 공식적으로 DNA 프로파일링으로 칭하지만, 또한 "유전자 지문법"으로 부를 수 있다. 예를 들어, DNA 프로파일링은 다양한 샘플 및 사람 내의 반복 DNA의 가변 구역, 예컨대 짧은 탠덤 반복체 (tandem repeat) 및 미소부수체 (minisatellite)의 길이를 측정하고 비교하는 것을 포함한다. 상기 방법은 사람으로부터 DNA 샘플을 범죄 현장에서 발견된 샘플 내의 DNA와 일치시키기 위해 대체로 매우 믿을만한 기술이다. 그러나, 현장이 몇몇의 사람의 DNA로 오염되면 확인이 복잡해질 수 있다. 상기 경우에 및 다른 법의학 용도에서, 단일 세포 또는 소수의 세포로부터 핵산의 절대적 정량화를 얻는 것이 유리할 수 있다.

[0428] 일부 예에서, 질환 또는 병태는 면역 장애이다. 면역 장애는 염증성 장애, 자가면역 장애, 과민성 대장 증후군 또는 궤양성 결장염일 수 있다. 자가면역 질환의 예는 크론 (Chrohn) 질환, 루푸스, 및 그레이브스 (Graves) 질환을 포함한다.

[0429] 몇몇 경우에, 질환 또는 장애는 신경계 병태 또는 장애이다. 신경계 병태 또는 장애는 다음의 것일 수 있다: 후천적 간질양 언어상실증, 급성 파종 뇌척수염, 부신백질형성장애, 뇌량 무발생, 인지불능, 애카르디 (Aicardi) 증후군, 알렉산더 (Alexander) 질환, 알퍼 (Alper) 질환, 교대 편마비, 알츠하이머 (Alzheimer) 질환, 근위축 측삭 경화증 (운동 신경 질환 참조), 무뇌증, 앙겔만 (Angelman) 증후군, 혈관종증, 무산소증, 언어상실증, 행위상실증, 거미막낭증, 거미막염, 아놀드-키아리 (Arnold-Chiari) 기형, 동정맥 기형, 아스퍼거 (Asperger) 증후군, 모세관확장 실조, 주의력 결핍 과활동 장애, 자폐증, 청각 처리 장애, 자율신경 기능장애, 등통증, 배튼 (Batten) 질환, 베체트 (Behcet) 질환, 벨 (Bell) 마비, 양성 본태성 안검연축, 양성 국소 근위축증, 양성 두개내 고혈압, 양측 전두두정 다소뇌회증 (polymicrogyria), 빈스방거 (Binswanger) 질환, 안검연축, 블로크-슐츠버거 (Bloch-Sulzberger) 증후군, 팔신경얼기 손상, 뇌 농양, 뇌 상해, 뇌 손상, 뇌 종양, 브라운-세카르 (Brown-Sequard) 증후군, 카나반 (Canavan) 질환, 손목 터널 증후군 (CTS), 작열통, 중추 통증 증후군, 뇌교 수초용해증, 중심핵 근병증, 머리 장애, 뇌 동맥류, 뇌 동맥경화증, 뇌위축증, 대뇌성 거인증, 뇌성 마비, 샤르코-마리-투스 (Charcot-Marie-Tooth) 질환, 키아리 기형, 무도병, 만성 염증성 탈수초 다발신경병증 (CIDP), 만성 통증, 만성 부위 통증 증후군, 코핀 로리 (Coffin Lowry) 증후군, 지속적 식물인간 상태를 포함한 혼수 (Coma), 복합체 I 결핍 증후군, 복합체 I 결핍 증후군, 복합체 II 결핍 증후군, 복합체 III 결핍 증후군, 복합체 IV/COX 결핍 증후군, 복합체 V 결핍 증후군, 선천 얼굴 양측마비, 피질기저 퇴행, 두개 동맥염, 두개골유합증, 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeldt-Jakob) 질환, 누적 외상 장애, 쿠싱 (Cushing) 증후군, 거대세포 봉입체 질환 (CIBD), 사이토메갈로바이러스 감염, 댄디-워커 (Dandy-Walker) 증후군, 도슨 (Dawson) 질환, 복합체 I의 미토콘드리아 NADH 탈수소효소 성분의 결핍, 드모지에 (De Morsier) 증후군, 데제린-클룸프케 (Dejerine-Klumpke) 마비, 데제린-소타 (Dejerine-Sottas) 질환, 수면 위상 지연 증후군, 치매, 피부근염, 신경학적 행동 곤란증, 당뇨 신경병증, 파종 경화증, 자율신경기능장애, 계산곤란증, 쓰기장애, 읽기장애, 근긴장이상, 초기 영아 간질성 뇌병증, 빈 안장 증후군, 뇌염, 뇌류, 뇌삼차신경 혈관종증, 유분증, 간질, 에르브 (Erb) 마비, 홍색사지통증, 본태성 진전, 파브리 (Fabry) 질환, 파르 (Fahr) 증후군, 기절, 가족성 강직 마비, 열성 발작, 피

셔 (Fisher) 증후군, 프리드리히 (Friedreich) 운동실조, FART 증후군, 고셔 (Gaucher) 질환, 게르스트만 (Gerstmann) 증후군, 거대 세포 동맥염, 거대 세포 포함 질환, 구형 세포 백색질형성장애, 회색질 이소증, 길랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, HTLV-1 연관 골수병증, 할러보르덴-슈파츠 (Hallervorden-Spatz) 질환, 머리 손상, 두통, 편측얼굴 연축, 유전성 강직 대마비, 유전성 다발신경염성 실조, 귀 대상포진, 대상포진, 히라야마 (Hirayama) 증후군, 완전전뇌증, 헌팅턴 (Huntington) 질환, 무뇌수두증, 수두증, 고코티솔혈증, 저산소증, 면역-매개 뇌척수염, 봉입체 근염, 색소실조증, 영아 피탄산 축적 질환, 영아 레프섬 (Refsum) 질환, 영아 연축, 염증성 근병증, 두개내 낭, 두개내 고혈압, 쥬버트 (Joubert) 증후군, 컨스-세이어 (Kearns-Sayre) 증후군, 케네디 (Kennedy) 질환, 킨스본 (Kinsbourne) 증후군, 클리펠 파일 (Klippel Feil) 증후군, 크라베 (Krabbe) 질환, 쿠퍼-레이켑 (Kufor-Rakeb) 증후군, 쿠겔베르크-벨란더 (Kugelberg-Welander) 질환, 쿠루 (Kuru), 라포라 (Lafora) 질환, 램버트-이튼 (Lambert-Eaton) 근무력 증후군, 랜다우-클레프너 (Landau-Kleffner) 증후군, 외측 연수 (발렌베르크 (Wallenberg)) 증후군, 학습 무능력, 리 (Leigh) 질환, 레녹스-가스토 (Lennox-Gastaut) 증후군, 레슈-니한 (Lesch-Nyhan) 증후군, 백색질형성장애, 루이체 (Lewy body) 치매, 평평뇌증, 감금 (Locked-In) 증후군, 루게릭 (Lou Gehrig) 질환, 요추 추간판 질환, 라임 (Lyme) 질환 - 신경학적 후유증, 마카도-조셉 (Machado-Joseph) 질환 (척수소뇌 실조 타입 3), 대뇌증, 단풍시럽 뇨 질환, 거뇌증, 멜커슨-로젠탈 (Melkersson-Rosenthal) 증후군, 메니에르 (Meniere) 질환, 수막염, 멘케스 (Menkes) 질환, 이염색 백색질형성장애, 소두증, 편두통, 밀러 피셔 (Miller Fisher) 증후군, 미니-뇌졸중 (Mini-Stroke), 미토콘드리아 질환, 미토콘드리아 기능장애, 미토콘드리아 근병증, 미토콘드리아 호흡 사슬 복합체 I 결핍, 뫼비우스 (Mobius) 증후군, 단일사지성 근위축증, 운동 신경 질환, 운동 기술 장애, 모야모야 (Moyamoya) 질환, 무코다당체축적병, 다발경색 치매, 다초점성 운동 신경병증, 다발 경화증, 체위 저혈압이 있는 다발 전신 위축증, 근육 형성장애, 근육통 뇌척수염, 중증 근무력증, 수초탈락 광범위 경화증, 영아의 간대성 뇌병증, 간대성경련, 근병증, 근세관성 근병증, 선천성 근긴장증, NADH-보조효소 Q 환원효소 결핍, NADH:Q(1) 산화환원효소 결핍, 기면증, 신경섬유종증, 신경이완제 악성 증후군, AIDS의 신경학적 소견, 루푸스의 신경학적 후유증, 신경근긴장증, 신경 세로이드 지방갈색소증, 신경 이동 장애, 니만-픽 (Niemann-Pick) 질환, 비-24시간 수면-각성 증후군, 비언어 학습 장애, 오설리반-맥레오 (O'Sullivan-McLeod) 증후군, 후두 신경통, 잠재 척추후궁미봉증 결과, 오타하라 (Ohtahara) 증후군, 올리브뇌교소뇌 위축증, 눈 간대성경련 증후군, 시각 신경염, 기립성 저혈압, 과사용 증후군, 산화적 인산화 장애, 반복시, 감각이상, 파킨슨 (Parkinson) 질환, 선천성 이상근긴장증, 부신생물 질환, 발작 공격, 패리-롬베르크 (Parry-Romberg) 증후군 (롬버그 증후군으로도 알려짐), 펠리제우스-메르즈바허 (Pelizaeus-Merzbacher) 질환, 주기적 마비, 말초 신경병증, 지속적 식물인간 상태, 전반 신경계 장애, 광 반사 재채기, 피탄산 축적 질환, 픽 (Pick) 질환, 신경 압박, 뇌하수체 종양, PMG, 소아마비, 다소뇌회증, 다발근염, 공뇌증, 소아마비후 증후군, 포진후 신경통 (PHN), 감염후 뇌척수염, 체위 저혈압, 프라더-윌리 (Prader-Willi) 증후군, 원발성 측삭 경화증, 프리온 (Prion) 질환, 진행성 편측얼굴 위축증 (또한 롬베르크 (Romberg) 증후군으로 알려짐), 진행성 다초점성 백질뇌병증, 진행성 경화성 폴리오디스트로피 (Poliodystrophy), 진행성 핵상 마비, 가성뇌종양, 램지-헌트 (Ramsay-Hunt) 증후군 (타입 I 및 타입 II), 라스문센 (Rasmussen) 뇌염, 반사 교감신경 이상 증후군, 레프섬 질환, 반복 운동 장애, 반복 스트레스 손상, 하지 불안 증후군, 레트로바이러스-연관 골수병증, 레트 (Rett) 증후군, 라이에 (Reye) 증후군, 롬베르크 증후군, 광견병, 무도병 (Saint Vitus dance), 핸드호프 (Sandhoff) 질환, 정신분열증, 실더 (Schilder) 질환, 뇌갈림증, 감각 통합 기능장애, 격막-안 이형성증, 흔들리 아이 증후군, 대상포진, 사이-드래거 (Shy-Drager) 증후군, 쇼그렌 (Sjogren) 증후군, 수면 무호흡, 수면병, 위 재채기 (Snatiation), 소토스 (Sotos) 증후군, 경직, 척추갈림증, 척수 손상, 척수 종양, 척추 근 위축증, 척추관 협착증, 스틸-리차드슨-올스제브스키 (Steele-Richardson-Olszewski) 증후군 (진행성 핵상 마비 참조), 척수소뇌 실조, 강직 (Stiff-person) 증후군, 뇌졸중, 스터지-베버 (Sturge-Weber) 증후군, 아급성 경화 범뇌염, 피질화 동맥경화 뇌병증, 표재성 철침착증, 시덴함 (Sydenham) 무도병, 실신, 공감각, 척수고동증, 지연성 운동이상증, 테이-삭스 (Tay-Sachs) 질환, 측두 동맥염, 결박 척수 증후군, 톰센 (Thomsen) 질환, 흉곽출구 증후군, 발작성 삼차신경통, 토드 (Todd) 마비, 투렛 (Tourette) 증후군, 일과성 허혈 발작, 전염성 해면양 뇌병증, 횡단 골수염, 외상성 뇌 손상, 진전, 삼차 신경통, 열대성 강직성 하반신마비, 트리파소미아증, 결정 경화증, 측두 동맥염을 포함한 혈관염, 폰히펠-린다우 (Von Hippel-Lindau) 질환 (VHL), 빌류이스크 (Viliuisk) 뇌척수염 (VE), 발렌베르크 증후군, 베르드니크-호프만 (Werdnig-Hoffman) 질환, 웨스트 (West) 증후군, 편타손상 (Whiplash), 윌리암스 (Williams) 증후군, 윌슨 (Wilson) 질환, X-연관 척수 및 구 근 위축증, 또는 젤베거 (Zellweger) 증후군.

[0430] **정의**

[0431] 값의 범위가 제시될 경우, 문맥상 달리 명백하게 나타내지 않으면, 해당 범위의 상한과 하한 사이에 각각 존재

하는 값은 또한 하한의 단위의 1/10까지 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 임의의 언급된 값 사이의 보다 작은 범위 또는 언급된 범위 사이에 존재하는 값 및 상기 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 사이에 존재하는 값은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이들 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 범위 내에 포함되거나 제외될 수 있고, 한계들 중의 하나 또는 둘 모두가 보다 작은 범위 내에 포함되거나 어느 것도 포함되지 않을 경우 각각의 범위는 또한 본 발명의 범위 내에 포함되고, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제외된 한계에 적용된다. 언급된 범위가 한계의 하나 또는 둘 모두를 포함할 경우, 포함된 한계 중의 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 본 발명에 포함된다.

[0432] 달리 규정하지 않으면, 본원에 사용된 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 기술의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 설명되는 바와 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 일부의 잠재적인 및 바람직한 방법 및 물질을 이제 설명한다. 본원에서 언급되는 모든 간행물은 간행물이 그와 관련하여 언급되는 방법 및/또는 물질을 개시하고 설명하기 위해 본원에 참고로 포함된다. 본 개시내용은 모순이 존재하는 정도로, 포함된 간행물의 임의의 개시내용을 대체하는 것으로 이해된다.

[0433] 본원의 개시내용을 통해 통상의 기술자에게 자명할 바와 같이, 본원에서 설명되는 각각의 개별적인 실시양태는 본 발명의 범위 또는 취지로부터 벗어나지 않으면서 임의의 다른 몇몇의 실시양태의 특징부로부터 쉽게 분리되거나 함께 조합될 수 있는 별개의 성분 및 특징부를 갖는다. 임의의 언급된 방법은 언급된 사건의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0434] 본원에서 및 첨부되는 청구의 범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an", 및 "the")는 문맥상 분명히 그렇지 않다고 나타내지 않는 한 복수 대상을 포함함을 유의하여야 한다. 따라서, 예를 들어, "세포"라는 표현은 다수의 상기 세포를 포함하고, "펩티드"라는 표현은 통상의 기술자에게 공지된 하나 이상의 펩티드 및 그의 동등물, 예를 들어, 폴리펩티드 등을 포함한다.

[0435] 본원에서 사용할 때, 용어 "표지"는 상응하는 핵산 염기 및/또는 핵산 서열의 확인을 허용할 수 있는 특유한 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 염기 및/또는 핵산 서열은 보다 큰 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 비드에 부착된 폴리뉴클레오티드)의 특이적 위치에 존재할 수 있다.

[0436] 본원에서 사용할 때, 용어 "혼성화"는 2개의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드가 비-공유 결합하여 안정한 이중 가닥 폴리뉴클레오티드를 형성하는 과정을 의미할 수 있다. 용어 "혼성화"는 또한 삼중-가닥 혼성화를 나타낼 수 있다. 생성되는 (대체로) 이중 가닥 폴리뉴클레오티드는 "혼성체" 또는 "이중체"이다.

[0437] 본원에서 사용할 때, "뉴클레오시드"는 천연 뉴클레오시드, 예컨대 2'-데옥시 및 2'-히드록실 형태를 포함할 수 있다. 뉴클레오시드와 관련하여 "유사체"는 변형된 염기 모이어티 및/또는 변형된 당 모이어티 등을 포함하는 합성 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 유사체는 혼성화할 수 있다. 유사체는 결합 특성 향상, 복잡성 감소, 특이성 증가 등을 위해 설계된 합성 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 유사체의 예시적인 유형은 올리고뉴클레오티드 포스포르아미데이트 (본원에서 "아미데이트"로 언급됨), 펩티드 핵산 (본원에서 "PNA"로 언급됨), 올리고-2'-O-알킬리보뉴클레오티드, C-5 프로피닐피리미딘 함유 폴리뉴클레오티드, 및 잠금 핵산 (LNA)을 포함할 수 있다.

[0438] 본원에서 사용할 때, 용어 "핵산 분자", "핵산 서열", "핵산 단편", "올리고뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드 단편" 및 "폴리뉴클레오티드"는 교환가능하게 사용될 수 있고, 다양한 길이 및 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 가질 수 있는 뉴클레오티드의 중합체 형태, 또는 그의 유사체를 포함하고 이로 제한되지 않음이 의도될 수 있다. 핵산 분자는 단일 가닥 DNA (ssDNA), 이중 가닥 DNA (dsDNA), 단일 가닥 RNA (ssRNA) 및 이중 가닥 RNA (dsRNA)를 포함할 수 있다. 상이한 핵산 분자는 상이한 3차원 구조를 가질 수 있고, 다양한 기능을 수행할 수 있다. 비-제한적인 핵산 분자의 예는 유전자, 유전자 단편, 게놈 갭, 엑손, 인트론, 유전자간 DNA (이질염색질 DNA를 포함하고 이로 제한되지 않음), 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, 작은 간섭 RNA (siRNA), miRNA, 작은 인 RNA (snoRNA), cDNA, 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 서열의 단리된 DNA, 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브, 및 프라이머를 포함할 수 있다.

[0439] 올리고뉴클레오티드는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 천연 또는 변형된 뉴클레오시드 단량체의 선형 중합체 또는 그의 유사체를 나타낼 수 있다. "올리고뉴클레오티드 단편"은 2개 이상의 보다 작은 올리고뉴클레오티드 서열로 절단된 올리고뉴클레오티드 서열을 의미한다. 올리고뉴클레오티드는 천연 또는 합성일 수 있다.

올리고뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오시드, 및 그의 비-천연 유사체, 예컨대 그의 아노머 형태, 펩티드 핵산 (PNA) 등을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 단량체-대-단량체 상호작용의 규칙적인 패턴, 예컨대 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 유형의 염기 페어링, 염기 적층, 훅스틴 (Hoogsteen) 또는 역 훅스틴 (reverse Hoogsteen) 유형의 염기 페어링 등에 의해 표적 게놈에 특이적으로 결합할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 및 용어 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다.

[0440] 올리고뉴클레오티드가 문자의 서열, 예컨대 "ATGCCTG"로 표시될 때마다, 달리 나타내지 않으면 뉴클레오티드는 5'에서 3'의 순서로 좌측에서 우측으로 존재하고, "A"는 데옥시아데노신이고, "C"는 데옥시시티딘이고, "G"는 데옥시구아노신이고, "T"는 데옥시티미딘이고, "U"는 리보뉴클레오시드인 우리딘임이 이해될 수 있다.

[0441] 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 비-표준 뉴클레오티드(들), 뉴클레오티드 유사체(들) 및/또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오티드의 예는 디아미노퓨린, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-아이오도우라실, 히포잔틴, 잔틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실퀘오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸 시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸 구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실퀘오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-D46-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 퀘오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)w, 올리고뉴클레오티드 포스포르아미데이트 (본원에서 "아미데이트"로 언급됨), 펩티드 핵산 (본원에서 "PNA"로 언급됨), 올리고-2'-O-알킬리보뉴클레오티드, C-5 프로피닐피리미딘 함유 폴리뉴클레오티드, 잠금 핵산 (LNA), 2,6-디아미노퓨린 등을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 핵산 분자는 또한 염기 모어이티에서 (예를 들어, 일반적으로 상보성 뉴클레오티드와 수소 결합을 형성하기 위해 이용가능한 하나 이상의 원자에서 및/또는 일반적으로 상보성 뉴클레오티드와 수소 결합을 형성할 수 없는 하나 이상의 원자에서), 당 모어이티 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다.

[0442] 본원에서 사용할 때, "샘플"은 단일 세포 또는 많은 세포를 의미할 수 있다. 핵산 분자는 하나 이상의 샘플로부터 얻을 수 있다. 샘플은 단일 세포 유형 또는 2종 이상의 세포 유형의 조합물을 포함할 수 있다. 샘플은 유사한 기능을 수행하는 세포의 집단, 예컨대 조직에서 발견되는 것을 포함할 수 있다. 샘플은 하나 이상의 조직을 포함할 수 있다. 조직의 예는 상피 조직 (예를 들어, 피부, 분비선의 내벽, 장, 피부 및 장기, 예컨대 간, 폐, 신장), 내피 (예를 들어, 혈관 및 림프관의 내벽), 중피 (예를 들어, 흉막, 복막 및 심막 공간의 내벽), 중간엽 (예를 들어, 지방, 근육, 뼈, 연골 및 힘줄 세포를 포함하는 장기 사이의 공간을 채우는 세포), 혈액 세포 (예를 들어, 백혈구, 과립구, 호중구, 호산구, 호염기구, 단핵구, T-림프구 (T-세포로도 알려짐), B-림프구 (B-세포로도 알려짐), 형질 세포, 거핵구 등), 뉴런, 생식 세포 (예를 들어, 정자, 난모세포), 양수 세포, 태반, 줄기 세포 등을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 샘플은 배양액 내의 하나 이상의 단일 세포, 메타게놈 (metagenomic) 샘플, 배아 줄기 세포, 유도 다능성 줄기 세포, 암 샘플, 조직 절편, 및 생검, 또는 이들의 임의의 조합물로부터 얻을 수 있다.

[0443] 본원에서 사용할 때, 용어 "유기체"는 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 양, 염소, 돼지, 개, 고양이, 토끼, 마우스, 래트, 게르빌루스쥐 (gerbil), 개구리, 두꺼비, 어류 (예를 들어, 다니오 레리오 (Danio rerio)), 회충 (예를 들어, 씨. 엘레간스(*C. elegans*)) 및 이들의 임의의 트랜스제닉 (transgenic) 종을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다. 용어 "유기체"는 또한 효모 (예를 들어, 에스. 세레비재애(*S. cerevisiae*)) 세포, 효모 사분체 (tetrad), 효모 콜로니, 박테리아, 박테리아 콜로니, 비리온, 비리좀, 바이러스-유사 입자 및/또는 그의 배양액 등을 포함할 수 있고, 이로 제한되지 않는다.

[0444] 본원에서 사용할 때, 용어 "부착하다", "접합하다", 및 "연결하다"는 교환가능하게 사용될 수 있고, 공유 상호작용 및 비공유 상호작용을 모두 나타낼 수 있다.

[0445] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에서 제시되고 설명되었지만, 상기 실시양태는 단지 예로서 제시되는 것임이 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 이제, 통상의 기술자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 많은 변이, 변화, 및 치환을 알 수 있을 것이다. 본원에서 설명되는 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실행시에 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 다음 청구의 범위가 본 발명의 범위를 규정하고, 이들 청구의 범위 내의 방법 및 구조 및 그의 균등물이 청구의 범위에 포함되는 것이 의도된다.

[0446] **실시예**

[0447] 실시예 1: 효소적 분할-풀 합성

[0448] 본 실시예에서, 효소적 분할-풀 합성법을 이용하여 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 생산하였다. 도 2a에 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드의 세트를 제1 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드의 세트 내의 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 및 링커를 포함한다. 5' 아민, 범용 서열 및 링커는 각각의 세트의 올리고뉴클레오티드에 대해 동일하다. 범용 서열 및 링커는 서로 상이하다. 그러나, 세포 표지는 각각의 세트의 올리고뉴클레오티드에 대해 상이하다. 따라서, 각각의 웰은 상이한 세포 표지를 갖는다. 효소적 분할-풀 합성의 단계 1에서, 단일 비드를 각각의 웰에 첨가하고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC) 연결 반응을 수행함으로써, 올리고뉴클레오티드-연결된 비드를 합성하였다. 단계 1로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 비드는 다수의 올리고뉴클레오티드에 연결된 비드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 5'-아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 및 링커 1을 포함한다 (도 2a 참조). 동일한 비드 상의 올리고뉴클레오티드는 동일하다. 그러나, 제1 비드 상의 올리고뉴클레오티드는 제2 비드 상의 올리고뉴클레오티드와 상이하다.

[0449] 효소적 분할-풀 합성의 단계 2에서, 연결되지 않은 올리고뉴클레오티드를 제거하기 위해 다수의 세척을 수행하였다. 일단 연결되지 않은 올리고뉴클레오티드가 제거된 후, 올리고뉴클레오티드-연결된 비드를 모았다 (도 2a 참조). 단계 2로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 연결된 비드는 다수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드에 연결된 비드를 포함한다. 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1 및 링커 1을 포함한다. 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드는 동일하다. 그러나, 각각의 비드는 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 상이한 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 1 서열이 상이하다.

[0450] 도 2b에 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드의 세트를 제2 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드의 세트 내의 올리고뉴클레오티드는 제1 링커, 세포 표지, 및 제2 링커를 포함한다. 제1 및 제2 링커는 각각의 세트의 올리고뉴클레오티드에 대해 동일하다. 제1 및 제2 링커는 서로 상이하다. 그러나, 세포 표지는 각각의 세트의 올리고뉴클레오티드에 대해 상이하다. 따라서, 각각의 웰은 상이한 세포 표지를 갖는다.

[0451] 효소적 분할-풀 합성의 단계 3에서, 단계 2에서 모은 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 제2 플레이트의 웰 내로 분할하였다. 제2 플레이트의 웰 내의 올리고뉴클레오티드의 제1 링커는 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드의 링커에 상보성이기 때문에, 클레나우 큰 단편을 사용하는 프라이머 연장을 수행하여, 제2 플레이트로부터 올리고뉴클레오티드를 단계 2로부터의 올리고뉴클레오티드 연결된 비드에 연결시켰다. 단계 3으로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 연결 비드는 다수의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드에 연결된 비드를 포함한다. 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 링커 1, 세포 표지 2, 및 링커 2를 포함한다 (도 2b 참조).

[0452] 효소적 분할-풀 합성의 단계 4에서, 연결되지 않은 올리고뉴클레오티드 및 클레나우 큰 단편 효소를 제거하기 위해 다수의 세척을 수행하였다. 제2 플레이트를 가열하여 이중 가닥 올리고뉴클레오티드를 변성시키고, 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 모았다 (도 2b 참조). 단계 4로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 연결된 비드는 다수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드에 연결된 비드를 포함한다. 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 링커 1, 세포 표지 2, 및 링커 2를 포함한다. 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드는 동일하다. 그러나, 각각의 비드는 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 상이한 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드는 조합된 세포 표지 서열이 상이하다. 예를 들어, 제1 비드는 세포 표지 A의 제1 세포 표지 및 세포 표지 C의 제2 세포 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 비드는 세포 표지 C의 제1 세포 표지 및 세포 표지 D의 제2 세포 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 따라서, 제1 비드 및 제2 비드는 동일한 세포 표지 (이 경우에, 세포 표지 C)를 포함할 수 있지만, 제1 비드 및 제2 비드의 조합된 세포 표지 서열은 상이하다 (예를 들어, 제1 비드에 대해, 조합된 세포 표지 서열은 세포 표지 A + 세포 표지 C이고; 제2 비드에 대해, 조합된 세포 표지 서열은 세포 표지 C + 세포 표지 A이다). 다른 예에서, 2개의 비드는 상이한 세포 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 제1 비드는 세포 표지 A 및 세포 표지 B를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 비드는 세포 표지 C 및 세포 표지 D를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 예에서, 제1 비드의 두 세포 표지는 제2 비드의 두 세포 표지와 상이하다.

[0453] 도 2c에 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드의 세트를 제3 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드의 세트 내의 올리고뉴클레오티드는 링커, 세포 표지, 분자 표지, 및 올리고dT를 포함한다. 링커 및 올리고dT 서열은 각각의 세트의 올리고뉴클레오티드에 대해 동일하다. 그러나, 세포 표지는 각각의 세트의 올

리고뉴클레오티드에 대해 상이하다. 따라서, 각각의 웰은 상이한 세포 표지를 갖는다. 또한, 분자 표지는 세트 내의 올리고뉴클레오티드에 대해 상이하다. 따라서, 단일 웰은 동일한 세포 표지를 갖지만 상이한 분자 표지를 갖는 다수의 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 상이한 웰로부터의 올리고뉴클레오티드는 동일한 분자 표지를 함유할 수 있다.

[0454] 효소적 분할-풀 합성의 단계 5에서, 단계 4에서 모은 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 제3 플레이트의 웰 내로 분할하였다. 제2 플레이트의 웰 내의 올리고뉴클레오티드의 링커는 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드의 제2 링커에 상보성이기 때문에, 클레나우 큰 단편을 사용하는 프라이머 연장을 수행하여, 제3 플레이트로부터 올리고뉴클레오티드를 단계 4로부터의 올리고뉴클레오티드 연결된 비드에 연결시켰다. 단계 5로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 연결된 비드는 다수의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드에 연결된 비드를 포함한다. 이중 가닥 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 링커 1, 세포 표지 2, 링커 2, 세포 표지 3, 분자 표지 및 올리고dT를 포함한다 (도 2c 참조).

[0455] 효소적 분할-풀 합성의 단계 6에서, 연결되지 않은 올리고뉴클레오티드 및 클레나우 큰 단편 효소를 제거하기 위해 다수의 세척을 수행하였다. 제3 플레이트를 가열하여 이중 가닥 올리고뉴클레오티드를 변성시키고, 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 모았다 (도 2c 참조). 단계 4로부터 생성되는 올리고뉴클레오티드 연결된 비드는 다수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드에 연결된 비드를 포함한다. 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 링커 1, 세포 표지 2, 링커 2, 세포 표지 3, 분자 표지 및 올리고dT를 포함한다. 단일 비드 상의 다수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드는 분자 표지에서 차이가 있을 수 있다. 단일 비드 상의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지 부분은 동일하다. 각각의 비드는 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 상이한 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 서열이 상이하다. 상이한 비드로부터의 올리고뉴클레오티드 상의 분자 표지는 동일할 수 있다. 상이한 비드로부터의 올리고뉴클레오티드 상의 분자 표지는 상이할 수 있다. 2개 이상의 비드는 조합된 세포 표지 서열이 상이할 수 있다. 예를 들어, 제1 비드는 세포 표지 A, 세포 표지 B 및 세포 표지 C를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 제2 비드는 세포 표지 B, 세포 표지 D 및 세포 표지 A를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 예에서, 제1 및 제2 비드는 둘 모두 세포 표지 B를 함유하지만, 2개의 다른 세포 표지는 상이하다. 따라서, 2가지 이상의 비드는 적어도 하나의 세포 표지가 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 2가지 이상의 비드는 적어도 2개의 세포 표지가 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 2가지 이상의 비드는 적어도 3개의 세포 표지가 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 그러나, 비드는 2개 이상의 동일한 세포 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 세포 표지 A, 세포 표지 A 및 세포 표지 D를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비드는 적어도 3개의 동일한 세포 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 세포 표지 A, 세포 표지 A 및 세포 표지 A를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비드는 3개의 비-동일한 세포 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 세포 표지 A, 세포 표지 D 및 세포 표지 E를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비드는 적어도 2개의 상이한 분자 표지를 포함하는 적어도 2개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 분자 표지 A를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드, 및 분자 표지 D를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 그러나, 비드는 제1 분자 표지를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 다수의 카피를 포함할 수 있다. 따라서, 비드는 동일한 분자 표지를 포함하는 적어도 2개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 분자 표지 A를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드, 및 분자 표지 A를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 비드 상의 적어도 30%의 올리고뉴클레오티드는 상이한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 적어도 40%의 올리고뉴클레오티드는 상이한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 적어도 50%의 올리고뉴클레오티드는 상이한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 적어도 60%의 올리고뉴클레오티드는 상이한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 30% 미만의 올리고뉴클레오티드는 동일한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 20% 미만의 올리고뉴클레오티드는 동일한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 15% 미만의 올리고뉴클레오티드는 동일한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 10% 미만의 올리고뉴클레오티드는 동일한 분자 표지를 포함할 수 있다. 비드 상의 5% 미만의 올리고뉴클레오티드는 동일한 분자 표지를 포함할 수 있다.

[0456] 효소적 분할-풀 합성 기술은 보다 많은 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 생산하기 위해 보다 많은 수의 웰을 갖는 다수의 플레이트(들)상에서 수행할 수 있다. 3가지 별개의 세포 표지 부분의 사용은 비드 상의 총 세포 표지 부분의 다양성을 증가시킬 수 있다. 각각의 세포 표지 부분에 대한 96가지 상이한 서열 선택사항을 사용하여, 884,736개의 상이한 세포 표지 조합을 생성할 수 있다.

[0457] 실시예 2: 튜브 및 마이크로웰 내에서 증폭의 비교

[0458] 본원은 세포를 포획하는 방법을 제공한다. 약 5,000개의 라모스 세포를 약 30 마이크로미터 직경의 마이크로웰을 포함하는 마이크로웰 어레이 상에 포획하였다. 몇몇 세포는 포획되지 않았다. 실험에 대한 대조군은 튜브 내에 포획된 동등한 수의 세포였다. 튜브 내의 세포 및 마이크로웰 어레이 내의 세포를 모두 용해시켰다. 핵산을 접합된 비드에 혼성화하도록 허용하였다. GAPDH 및 RPL19 유전자의 실시간 PCR을 수행하였다.

[0459] 도 9는 실시간 PCR 증폭의 결과를 보여준다. 마이크로웰로부터 수율이 튜브 내의 핵산으로부터 수율보다 더 크고, 이것은 올리고뉴클레오티드에 대한 핵산의 혼성화가 튜브보다 마이크로웰에서 더 효과적이었음 (각각 회색 막대 및 백색 막대를 비교함)을 나타낸다.

[0460] 실시예 3: 제2 합성된 가닥의 증폭 및 비드 상의 합성의 비교

[0461] 실시예 1에 설명된 바와 같이 세포를 얻고 용해시켰다. RPL19, TUBB, 및 GAPDH를, 범용 프라이머를 사용하여 고체 지지체에서 합성된 제2 가닥, 또는 고체 지지체 상에서 직접 증폭시켰다. 도 10은 고체 지지체 상의 직접 증폭 (도 10)이 고체 지지체에서 직접이 아닌 증폭보다 더 적은 표적을 벗어난 (off-target) 증폭을 일으켰다. GAPDH 및 TUBB 증폭은 방법에 무관하게 정확한 크기의 생성물을 생산하였다 (도 10의 각각의 삼중물의 좌측 레인은 튜브 형식 내의 고체 지지체 + 용해물에 상응하고, 각각의 삼중물의 중간 레인은 마이크로웰로부터 고체 지지체에 상응하고, 각각의 삼중물의 우측 레인은 고체 지지체 + 정제된 핵산에 상응한다). RPL19 생성물은 최소의 표적을 벗어난 증폭 생성물을 가졌지만, 단지 정제된 핵산을 고체 지지체와 함께 사용할 때에만 강한 생성물을 합성하였다. 이들 실험은 비드 상의 직접 증폭이 고체 지지체에서 합성된 제2 가닥을 사용하는 증폭보다 더 적은 표적을 벗어난 증폭 생성물을 생산함을 나타낸다.

[0462] 실시예 4: 표적 핵산의 복합 분석

[0463] 실시예 1에 설명된 바와 같이 세포를 얻고 용해시켰다. 표적 핵산을 올리고뉴클레오티드를 포함하는 고체 지지체에 혼성화시켰다. 표적 핵산의 다수의 카피를 올리고dT 서열을 포함하는 표적 결합 영역에 혼성화시켰다. 표적 핵산의 다수의 카피를 역전사효소를 이용하여 역전사시켰다. 역전사는 표적 핵산의 카피가 혼성화된 올리고뉴클레오티드의 특징 (예를 들어, 분자 표지, 세포 표지, 및 범용 표지)을 포함한다. 표적 핵산의 다수의 카피를 PCR을 이용하여 증폭시켰다. 표적 핵산의 증폭된 카피를 서열 결정하였다. 서열 결정한 표적 핵산을 계수하여 세포 내의 표적 핵산의 카피수를 결정하였다. 계수는 표적 핵산의 각각의 동일한 서열 판독물에 대한 상이한 분자 표지의 수를 계수함으로써 수행하였다. 상기 방식으로, 증폭 편차가 감소될 수 있다.

[0464] 실시예 5: 하나의 세포 표지 조합의 클로날 (clonal) 카피를 갖는 비드를 생산하기 위한 분할-풀 합성의 효능 평가

[0465] 본 실시예에서, 하나의 세포 표지 조합의 클로날 카피를 갖는 비드를 생산하기 위한 분할-풀 합성의 효능을 평가하였다. 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 실시예 1에 설명된 바와 같은 효소적 분할-풀 합성법에 의해 합성하였다. 250 ng의 총 RNA를 라모스 세포로부터 정제하였고, 이것은 25,000개의 세포로부터의 RNA와 동등하였다. 총 RNA를 35,000개의 올리고뉴클레오티드 연결된 비드와 접촉시켜, 올리고뉴클레오티드 연결된 비드에 대한 mRNA의 혼성화를 일으켰다. cDNA 합성은 올리고뉴클레오티드 연결된 비드에 혼성화된 mRNA 상에서 수행하였다. 18, 175, 및 1750 비드를 포함하는 샘플을 추가의 분석을 위해 사용하였다. GAPDH-특이적 프라이머 및 IGJ-특이적 프라이머를 사용하는 PCR 증폭 반응을 18-, 175- 및 1750-비드 샘플로부터의 비드에 결합된 cDNA 상에서 수행하였다. 비드에 부착된 cDNA 분자를 서열분석하였다. 도 11a-i는 서열분석 결과의 그래프 표시를 보여준다. 도 11a-c에 대해, 비드당 판독물의 수를 y-축에 그리고, 특유한 바코드 (예를 들어, 세포 표지 조합)를 각각 18-비드, 175-비드 및 1750-비드 샘플에 대해 x-축에 그렸다. 도 11d-f에 대해, 비드당 특유한 분자의 수를 y-축에 그리고, 특유한 바코드 (예를 들어, 세포 표지 조합)를 각각 18-비드, 175-비드 및 1750-비드 샘플에 대해 x-축에 그렸다. 도 11g-i에 대해, 비드당 특유한 분자의 수를 y-축에 그리고, 특유한 바코드를 각각 18-비드, 175-비드 및 1750-비드 샘플에 대해 x-축에 그렸다. 도 11g-i에 대한 결과는 분자의 총수에 의해 분류된다. 다양한 샘플에 대한 비드당 특유한 분자의 중간수를 표 1에 제시한다. 서열분석 결과에 대한 수치를 표 2에 제시한다. 도 11j-l에 대해, 인덱스를 사용하는 특유한 바코드 (bc) 조합의 수를 y-축에 그리고, 바코드 (bc) 절편 인덱스를 1750-비드 샘플에 대해 각각 세포 표지 1, 세포 표지 2, 및 세포 표지 3에 대해 x-축에 그렸다. 바코드 (bc)는 세포 표지를 나타낸다 (예를 들어, bc 절편1 = 세포 표지 부분 1). 도 11j-l에 제시된 바와 같이, 각각의 절편 내에서 거의 모든 96개의 바코드의 존재가 서열분석에 의해 검출되었다. 이들 결과는 하나의 세포 표지 조합의 클로날 카피를 갖는 비드를 생산하기 위한 효소적 분할-풀 합성법의 성공을 입증한다.

[0466] <표 1>

	특유한 분자의 중간 수		
	18 비드	175 비드	1750 비드
IGJ	78	85	40
GAPDH	22	45	25

[0467]

[0468] <표 2>

비드의 예상된 수	17.5	175	1750
판독물의 총 수	58321	60308	133043
불변영역 1 내의 >=8 매치	56385	57615	123349
불변영역 2 내의 >=8 매치	54117	55187	115126
불변영역 1 & 2 내의 >=8 매치	54114	55185	115107
3개의 모든 서브-바코드 내의 완벽한 매치	38585	46066	95217
유전자 (40bp) 내의 완벽한 매치	29968	33775	72260
특유한 바코드 조합의 총 수	239	407	1654
% 유용한 판독물	51.388%	56.00%	54.31%
특유한 바코드 조합의 수 > 20 판독물	5	26	288

[0469]

[0470] 실시예 6. 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 사용하는 단일 세포 RNA 표지

[0471] 본 실시예에서, 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 사용하여 단일 세포 RNA 표지의 효능을 평가하였다. 3가지 세포 샘플을 다음과 같이 제조하였다:

	샘플 1: K562 단독	샘플 2: 라모스 단독	샘플 3:라모스 + K562 혼합물
마이크로웰의 수	~10000	~10000	~10000
라모스 세포의 수	0	5000	3750
K562 세포의 수	1000	0	2500

[0472]

[0473] 샘플의 세포 현탁액을 마이크로웰의 상단에 첨가하고, 세포를 마이크로웰 어레이의 웰 내로 침강시켰다. 마이크로웰 어레이에 의해 포획되지 않은 세포를 포스페이트 완충 염수 (PBS) 조 내에서 세척 제거하였다. 실시예 1에 기재된 효소적 분할-풀 합성법에 의해 제조된 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 마이크로웰 어레이에 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드 연결된 비드는 다수의 올리고뉴클레오티드를 갖는 자성 비드를 포함한다. 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 링커 1, 세포 표지 2, 링커 2, 세포 표지 3, 분자 표지, 및 올리고dT를 포함한다. 동일한 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드에 대해, 올리고뉴클레오티드의 서열은 분자 표지에 대한 것을 제외하고는 동일하다. 상이한 비드 상의 올리고뉴클레오티드에 대해, 세포 표지 1, 2, 및 3 조합은 상이하다. 약 5-6개의 비드를 마이크로웰 어레이의 웰당 첨가하였다. 일부 예에서, 10개의 웰마다, 50개의 비드가 어레이 상에 침적될 수 있고, 여기서 0-2개의 비드가 각각의 웰 내로 떨어진다. 비드를 웰 내로 침강시키고, 포획되지 않은 비드를 PBS 조 내에서 세척 제거하였다. 자석을 마이크로웰 어레이 아래에 배치하였다. 세포를 냉각 용해 완충제의 첨가에 의해 용해시켰다. 어레이 및 자석을 냉각 알루미늄 블록 상에 5분 동안 놓았다. 용해된 세포로부터 mRNA를 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드에 혼성화시켰다. 어레이를 과잉의 용해 완충제로 세척하여 미결합된 mRNA를 제거하였다. 자석을 마이크로웰 어레이의 상단부에 놓음으로써 웰로부터 비드를 회수하였다. 회수된 비드를 세척하였다. cDNA 합성은 비드 상에서 수퍼스크립트(Superscript) III을 사용하여 50℃에서 50분 동안 회전자 상에서 수행하였다. 비드 상의 올리고뉴클레오티드로부터 비-연장된 올리고dT는 37℃에서 30분 동안 회전자 상에서 수행한 ExoI 처리에 의해 제거하였다. 유전자-특이적 PCR 증폭을 cDNA 상에서 수행하였다. 유전자-특이적 PCR을 위해 선택된 유전자는 세포 유형 특이적이었고, 표 3에 제시한다. PCR 증폭된 생성물을 서열분석하였다. 서열분석 통계학을 표 4에 제시한다. 도 12a-c는 각각 K562-단독 샘플, 라모스-단독 샘플, 및 K562 + 라모스 혼합물 샘플에 대한 서열분석 결과의 막대 그래프를 보여준다. 도 12a-c에 대해, 바코드당 특유한 분자를 y-축 상에 그리고, bc당 판독물에 의해 분류된 특유한 bc 조합 인덱스를 x-축에 그렸다.

[0474] <표 3>

번호	유전자	세포-유형
1	CD74	라모스-특이적
2	CD79a	라모스-특이적
3	IGJ	라모스-특이적
4	TCL1A	라모스-특이적
5	SEPT9	라모스-특이적
6	CD27	라모스-특이적
7	CD41	K562-특이적
8	GYPA	K562-특이적
9	GATA1	K562-특이적
10	GATA2	K562-특이적
11	HBG1	K562-특이적
12	GAPDH	공통적

[0475]

[0476] <표 4>

	샘플 1: K562 단독	샘플 2: 라모스 단독	샘플 3: 라모스 + K562 혼합물
라모스 세포의 수	0	5000	3750
K562 세포의 수	1000	0	2500
판독물의 총 수	717718	1329189	2399025
불변영역 1 내의 >=8 매치	657911	1201081	2026726
불변영역 2 내의 >=8 매치	581581	1071364	1513466
불변영역 1 & 2 내의 >=8 매치	581508	1071153	1513102
3개의 모든 서브-바코드 내의 완벽한 매치	481564	862348	1248073
유전자 (40bp) 내의 완벽한 매치	283463	575713	1004338
% 유용한 판독물	39.50%	43.31%	41.86%
특유한 바코드 조합의 총 수	8501	29647	28783
특유한 바코드 조합의 수 > 30개 분자	145	1072	768
포획 효율	0.145	0.2144	0.12288

[0477]

[0478] 단일 세포 표지를 이용하여 단일-세포 유형 샘플 (예를 들어, K562-단독 샘플, 라모스-단독 샘플)에 대한 카피수를 결정하였다. 도 12d-e는 각각 라모스-단독 세포 샘플 및 K562-단독 세포 샘플에 대한 표 3에 열거된 유전자의 카피수의 그래프를 보여준다. 도 12d-e에 대해, 바코드 (bc) 조합당 분자의 수를 y-축 상에 그리고, 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합을 x-축 상에 그린다. 도 12d-e에 제시된 결과는 > 30 특유한 분자의 총수를 갖는 비드로부터의 서열분석 데이타에 기반한 것이다. 이들 결과는 비드당 앰플리콘당 분자의 비율이 세포 유형에 대한 예상치와 일치함을 입증한다. K562-단독 세포 샘플에 대해, 분자의 수의 왜곡은 보다 심하고, 상기 세포 유형 내에 고도로 풍부한 HBG1는 가변 카피수를 갖는 것으로 나타난다. 그러나, GAPDH 카피수는 비드당 분자의 총수가 왜곡되더라도 불변인 것으로 나타난다. 개별 유전자에 대한 카피수를 도 12f-i에 제시한다. 도 12f-g에 대해, 카피수를 각각 라모스-단독 세포 및 K562-단독 세포에 대한 비드 또는 단일 세포당 카피로서 나타낸다. 도 12h-i에 대해, 카피수를 각각 라모스-단독 세포 및 K562-단독 세포에 대한 비드 또는 단일 세포당 상대적 풍부도로서 나타낸다.

[0479] 단일 세포 표지를 사용하여, K562+라모스 혼합물 샘플 내의 단일 세포의 세포 유형을 결정하였다. 가장 풍부한 분자를 갖는 100개의 특유한 바코드 조합으로부터 서열분석 결과를 분석하여, K562+라모스 혼합물 샘플 내의 단일 세포의 세포 유형을 결정하기 위한 단일 세포 표지의 효능을 평가하였다. 도 12j-m은 100개의 특유한 바코드 조합을 갖는 비드에 대한 유전자당 특유한 분자의 수 (y-축)를 보여준다. x-축 상의 숫자는 유전자를 나타낸다 (표 3 참조). 도 12j-m는 K562 및 라모스 세포에 대한 일반적인 유전자 발현 패턴을 명백하게 보여준다. 도 12n-o는 2가지 세포 유형에 대한 유전자 발현 프로파일의 일반적인 패턴을 보여주는 2개의 비드의 확대된 그래프를 보여준다. 도 12n은 K562-유사 세포에 대한 유전자 발현 프로파일의 일반적인 패턴을 보여주고, 도 12o는 라모스-유사 세포에 대한 유전자 발현 프로파일의 일반적인 패턴을 보여준다. 도 12p는 K562+라모스 혼합물

샘플로부터 비드당 > 30개 분자를 갖는 768개 비드의 유전자 발현 프로파일의 주요 성분 분석을 기초로 한 결과의 산포도를 보여준다. x-축 상에 그려진 성분 1은 2가지 세포 유형을 분리한다. y-축 상에 그려진 성분 2는 높은 및 낮은 HBG1 카피수를 갖는 K562 세포를 분리한다. 산포도 상의 각각의 점은 하나의 특유한 바코드 조합을 나타내고, 이것은 하나의 비드 또는 하나의 세포에 동등하다. 주요 성분 분석을 기초로 하여, 409개의 비드는 K562 세포에 대응하고, 347개의 비드는 라모스 세포에 대응하였다. 표 3으로부터 유전자의 카피수를 K562-유사 및 라모스-유사 세포 유형에 대해 결정하였다. 도 12q-r은 각각 K562-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 좌측 상의 비드) 및 라모스-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 우측 상의 비드)에 대한 비드당 앰플리콘당 카피수의 막대 그래프를 보여준다. 도 12q-r에 대해, bc 조합당 분자의 수를 y-축에 그리고, bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합을 x-축 상에 그린다. 도 12s-t는 각각 K562-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 좌측 상의 비드) 및 라모스-유사 세포 (도 12p를 기초로 한 제1 주요 성분의 우측 상의 비드)에 대한 개별 유전자의 비드 또는 단일 세포당 카피수를 보여준다. 표 5는 단일 세포 및 혼합물 샘플에 대한 비드당 평균 카피수를 보여준다.

[0480] <표 5>

	단일 세포 유형 샘플		K562+라모스 혼합물 샘플	
유전자	K562-단독	라모스-단독	K562- 유사	라모스-유사
CD74	0.00	39.95	0.10	7.50
CD79a	0.02	30.97	0.84	18.88
IGJ	0.03	42.43	0.81	27.76
TCL1A	0.01	31.78	0.71	19.44
SEPT9	0.88	3.89	1.35	1.52
CD27	0.00	5.31	0.03	1.30
CD41	0.61	0.00	0.47	0.01
GYPA	1.92	0.00	0.73	0.02
GATA2	1.38	0.00	0.60	0.04
GATA1	0.94	0.00	1.04	0.04
HBG1	201.09	0.00	72.27	1.37
GAPDH	51.77	39.13	44.94	13.53
GAPDH판독물 과잉성	2.04	1.47	7.67	7.22

[0481]

[0482] 실시예 7. 비드 사이의 혼선 (cross-talk) 평가

[0483] 본 실시예에서, 비드 사이의 혼선을 평가하였다. 마우스 EL4 세포 및 라모스 세포의 혼합물을 포함하는 샘플을 다음과 같이 제조하였다:

	고밀도	저밀도
마이크로웰의 수	~10000	~10000
마우스 EL4 세포의 수	2500	1500
라모스 세포의 수	3750	1500

[0484]

[0485] 샘플의 세포 현탁액을 마이크로웰의 상단에 첨가하고, 세포를 마이크로웰 어레이의 웰 내로 침강시켰다. 마이크로웰 어레이에 의해 포획되지 않은 세포를 포스페이트 완충 염수 (PBS) 조 내에서 세척 제거하였다. 실시예 1에 기재된 효소적 분할-풀 합성법에 의해 제조된 올리고뉴클레오티드 연결된 비드를 마이크로웰 어레이에 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드 연결된 비드는 다수의 올리고뉴클레오티드를 갖는 자성 비드를 포함한다. 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 세포 표지 1, 링커 1, 세포 표지 2, 링커 2, 세포 표지 3, 분자 표지, 및 올리고dT를 포함한다. 동일한 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드에 대해, 올리고뉴클레오티드의 서열은 분자 표지에 대한 것을 제외하고는 동일하다. 상이한 비드 상의 올리고뉴클레오티드에 대해, 세포 표지 1, 2, 및 3 조합은 상이하다. 약 5-6개의 비드를 마이크로웰 어레이의 웰당 첨가하였다. 비드를 웰 내로 침강시키고, 포획되지 않은 비드를 PBS 조 내에서 세척 제거하였다. 자석을 마이크로웰 어레이 아래에 배치하였다. 세포를 냉각 용해 완충제의 첨가에 의해 용해시켰다. 어레이 및 자석을 냉각 알루미늄 블록 상에 5분 동안 놓았다. 용해된 세포로부터 mRNA를 비드에 연결된 올리고뉴클레오티드에 혼성화시켰다. 어레이를 과잉의 용해 완충제로 세척하여 미결합된 mRNA를 제거하였다. 자석을 마이크로웰 어레이의 상단부에 놓음으로써 웰로부터 비드를 회수하였다. 회수된 비드를 세척하였다. cDNA 합성은 비드 상에서 수퍼스크립트 III을 사용하여 50℃에서 50분 동안 회전자 상에서 수행하였다. 비드 상의 올리고뉴클레오티드로부터 비-연장된 올리고dT

는 37℃에서 30분 동안 회전자 상에서 수행한 ExoI 처리에 의해 제거하였다. 유전자-특이적 PCR 증폭을 cDNA 상에서 수행하였다. 유전자-특이적 PCR을 위해 선택된 유전자는 세포 유형 특이적이었고, 표 6에 제시한다.

[0486] <표 6>

번호	유전자	세포-유형
1	HS_CD74	인간
2	HS_CD79a	인간
3	HS_IGJ	인간
4	HS_TCL1A	인간
5	HS_SEPT9	인간
6	HS_CD27	인간
7	HS_GAPDH	인간
8	MM_B2M	마우스
9	MM_ACTM	마우스
10	MM_HPRT	마우스
11	MM_SHDA	마우스

[0487]

[0488] PCR 증폭된 생성물을 서열분석하였다. 서열분석 통계학을 표 7에 제시한다.

[0489] <표 6>

	저밀도	고밀도
라모스 세포의 수	15000	3750
마우스 세포의 수	1500	2500
판독물의 총 수	2391780	4038217
불변영역 1 내의 >=8 매치	2162945	3651643
불변영역 2 내의 >=8 매치	1981835	3356493
불변영역 1 & 2 내의 >=8 매치	1981626	3355787
3개의 모든 서브-바코드 내의 완벽한 매치	1645994	2790879
유전자 (40bp) 내의 완벽한 매치	1083013	2171930
% 유용한 판독물	45%	54%
특유한 바코드 조합의 총 수	16695	36595
특유한 바코드 조합의 수 > 30개 분자	80	281
포획 효율	0.03	0.04

[0490]

[0491] 가장 풍부한 분자를 갖는 100개의 특유한 바코드 조합에 대한 유전자 발현 프로파일을 고밀도 및 저밀도 샘플에 대해 결정하였다. 서열분석 결과에 기반하여 유전자 발현 프로파일을 생성하였다. 도 13a는 고밀도 샘플로부터 100개의 특유한 바코드 조합 중 35에 대한 유전자 발현 프로파일의 그래프를 보여준다. 도 13a에 대해, 특유한 분자의 수를 y-축 상에 그리고, 유전자 참조 번호를 x-축 상에 그린다 (유전자 참조 번호에 대응하는 유전자에 대해서는 표 6을 참조한다). 도 13a는 마우스 및 라모스 세포에 대한 일반적인 유전자 발현 패턴을 분명히 보여준다. 도 13b-c는 각각 고밀도 샘플 및 저밀도 샘플의 유전자 발현 프로파일의 주요 성분 분석을 기초로 한 결과의 산포도를 보여준다. x-축 상에 그려진 성분 1은 2가지 세포 유형을 분리한다. y-축 상에 그려진 성분 2는 라모스 세포 집단 내에서 유전자 발현의 가변성을 나타낸다. 산포도 상의 각각의 점은 하나의 특유한 바코드 조합을 나타내고, 이것은 하나의 비드 또는 하나의 세포에 동등하다. 고밀도 샘플의 주요 성분 분석을 기초로 하여, 144개의 비드는 마우스 세포에 대응하고, 132개의 비드는 라모스 세포에 대응하였다. 저밀도 샘플의 주요 성분 분석을 기초로 하여, 52개의 비드는 마우스 세포에 대응하고, 27개의 비드는 라모스 세포에 대응하였다.

[0492] 일단 세포 유형이 결정되면, 상이한 세포 유형 내에서 표 6의 유전자를 검출함으로써 비드 사이의 혼선을 평가하였다. 도 13d-e는 각각 고밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 바코드 (bc) 조합당 판독물 (y-축) 대 bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다. 도 13f-g는 각각 고밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 bc 조합당 분자의 수 (y-축) 대 bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다. 도 13h-i는 각각 저밀도 샘플로부터 라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 bc 조합당 판독물 (y-축) 대 bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다. 도 13j-k는 각각 저밀도 샘플로부터

라모스-유사 세포 및 마우스-유사 세포에 대한 bc 조합당 분자의 수 (y-축) 대 bc 조합당 분자의 총수에 의해 분류된 특유한 바코드 조합 (x-축)의 그래프를 보여준다. 표 8은 저밀도 및 고밀도 샘플에 대한 특유한 분자당 평균 적용 범위 배수 또는 판독물 과잉성을 보여준다.

[0493] <표 8>

	저밀도		고밀도	
유전자	라모스-유사 세포	마우스-유사 세포	라모스-유사 세포	마우스-유사 세포
HS_CD74	29.75	3.17	23.75	2.15
HS_CD79a	47.2	4.09	42.30	2.67
HS_IGJ	29.65	1.39	30.23	2.4
HS_TCL1A	45.74	2.26	39.00	4.13
HS_SEPT9	11.85	1.00	12.75	1.18
HS_CD27	37.99	1.00	32.12	1.10
HS_GAPDH	19.97	1.55	17.37	2.57
MM_B2M	1.21	31.98	3.05	31.48
MM_ACTM	1.05	29.08	1.90	28.38
MM_HPRT	1.02	39.96	1.03	43.65
MM_SHDA	1.00	39.60	1.02	29.60

[0494]

[0495] 표 8의 결과는 특유한 분자당 평균 적용 범위 배수가 라모스 세포 내에서 마우스 유전자보다 인간 유전자에 대해 훨씬 더 높고, 그 반대도 같음을 보여준다.

[0496] 대조군으로서, 마우스 및 인간 세포의 혼합물을 튜브 내에서 용해시키고, 비드를 사용한 cDNA 합성으로 전환시키고, cDNA를 서열 결정하였다. 도 4x1은 서열분석 결과의 그래프 표시를 보여준다. 예상된 바와 같이, 매우 많은 특유한 바코드 (bc) 조합이 관찰되었고, 대부분의 비드는 단지 총 1 내지 2개의 카피만을 가졌다.

[0497] 이들 결과는 비드 사이에 최소의 혼선이 존재하고, 혼선은 생물정보학에 의해 확인될 수 있음을 입증한다.

[0498] 실시예 8. 단일 세포 핵산 라이브러리 생산

[0499] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체는 단일 세포 핵산 라이브러리를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 본 실시예에서, 세포 샘플을 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체를 갖는 표면 (예를 들어, 그리드)에 첨가함으로써, 단일 세포 핵산 라이브러리를 생산하였다. 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체는 비드에 접합된 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 (a) 링커에 의해 연결된 적어도 2개의 별개의 영역을 포함하는 세포 표지 영역; 및 (b) 분자 표지 영역을 포함한다. 비드 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지 영역을 포함한다. 비드 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 상이한 분자 표지 영역을 포함한다. 2개 이상의 상이한 비드 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 상이한 세포 표지 영역을 포함한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체와 회합된 각각의 세포는 상이한 세포 표지 영역을 갖는다. 세포 샘플 내의 세포의 농도는 표면 상의 1개의 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체에 하나 또는 그보다 더 적은 세포의 회합을 가능하게 하기 위해 충분히 묽다. 용해 완충제를 사용하여 세포를 용해시켰다. 세포로부터 mRNA를 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시켰다. 따라서, 세포로부터의 모든 mRNA는 동일한 세포 표지 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드로 표지된다. 세포로부터의 2개 이상의 mRNA는 2개 이상의 상이한 분자 표지 영역을 포함하는 2개 이상의 올리고뉴클레오티드로 표지된다. 자석을 표면에 적용하여, 표면으로부터 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체를 정제하였다. 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체를 표면으로부터 개별적으로 정제할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오티드에 혼성화된 mRNA를 역전사시켜 표지된 cDNA를 생산하였다. 표지된 cDNA는 mRNA의 역보체, 및 mRNA가 혼성화된 올리고뉴클레오티드의 카피를 포함한다. 표지된 cDNA를 PCR에 의해 증폭시켜 표지된 앰플리콘을 생산하였다. 표지된 cDNA 및/또는 표지된 앰플리콘은 제한 효소 소화에 의해 비드로부터 제거할 수 있다. 표지된 앰플리콘으로부터 단일 세포로부터 핵산의 라이브러리를 생산하였다.

[0500] 대안적으로, 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체를 함께 정제하였다. mRNA의 역전사는 조합된 올리고뉴클레오티드 접합된 고체 지지체 상에서 수행할 수 있다. 상이한 세포로부터 mRNA는 상이한 세포 표지 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드로 표지되기 때문에, 세포 표지 영역을 사용하여 표지된 cDNA 또는 표지된 앰플리콘이 어떠한 세포로부터 기인하는지 결정할 수 있다. 따라서, 다수의 세포로부터의 핵산의 라이브러리를 생산할

수 있고, 여기서 표지된 앰플리콘이 기원하는 세포의 정체성은 세포 표지 영역에 의해 결정할 수 있다.

[0501] 단일 세포 핵산 라이브러리는, 세포를 용해시키기 전에 세포를 작용제와 접촉시킴으로써 또한 생산할 수 있다. 작용제는 항원, 약물, 세포, 독소 등일 수 있다. 따라서, 특수화된 단일 세포 핵산 라이브러리를 생산할 수 있다. 핵산 라이브러리의 분석을 이용하여, 단일 세포 약물 발현 프로파일을 생성할 수 있다. 단일 세포 수준 상의 신호 전달 경로는 이들 핵산 라이브러리로부터 또한 결정될 수 있다. 핵산 라이브러리는 특이적 세포 유형에 대한 항원의 효과를 결정하기 위해 또한 사용할 수 있다.

[0502] 실시예 9. 단일 세포 발현 프로파일링

[0503] 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체를 사용하여, 단일 세포의 발현 프로파일을 결정할 수 있다. 본 실시예에서, 세포의 혼합물을 포함하는 세포 샘플을 다수의 항체와 접촉시켰다. 하위세트의 세포를 유동 세포측정법을 이용하여 정제하였다. 하위세트의 세포를 마이크로웰 어레이에 첨가하였다. 다수의 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체를 마이크로웰 어레이에 첨가하였다. 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체는 나노입자에 연결된 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 (a) 2개의 미리 결정된 서열에 의해 연결된 3개의 별개의 서열을 포함하는 세포 표지 영역; 및 (b) 분자 표지 영역을 포함한다. 나노입자 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지 영역을 포함한다. 나노입자 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 상이한 분자 표지 영역을 포함한다. 2개 이상의 상이한 나노입자 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 상이한 세포 표지 영역을 포함한다. 따라서, 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체와 회합된 각각의 세포는 상이한 세포 표지 영역을 갖는다.

[0504] 자석을 마이크로웰 어레이에 적용하고, 올리고뉴클레오티드 접합된 지지체와 회합되지 않은 세포를 세척 제거하였다. 용해 완충제를 포함하는 스폰지를 마이크로웰 어레이의 상단부 상에 놓아, 세포를 용해시켰다.

[0505] 용해된 세포로부터 mRNA를 비드 상의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시켰다. mRNA를 역전사시켜 표지된 cDNA를 생산하였다. 표지된 cDNA는 mRNA의 역보체, 및 mRNA가 혼성화된 올리고뉴클레오티드의 카피를 포함한다. 표지된 cDNA를 PCR에 의해 증폭시켜 표지된 앰플리콘을 생산하였다. 표지된 앰플리콘을 서열 결정하였다. 세포로부터 각각의 mRNA는 동일한 세포 표지로 표지되고, 상이한 세포로부터의 mRNA는 상이한 세포 표지로 표지되기 때문에, 표지된 앰플리콘의 서열 정보를 이용하여 단일 세포 발현 프로파일을 생성하였다.

[0506] 실시예 10: 단일 세포 서열분석에 의한 면역표현형 결정

[0507] 혈액 샘플을 대상체로부터 수집하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PMBC)를 혈액 샘플로부터 단리하였다. PMBC를 RPMI1640 배지 내에서 배양하고, 밤새 인큐베이터 내에 넣었다. PMBC를 PBS 내에서 수회 세척하여 혈청을 제거하였다. 약 7000개의 PMBC를 32,400개의 웰을 갖는 마이크로웰 어레이 상에 침적시켰다. 따라서, 마이크로웰 어레이 상의 대부분의 웰은 세포를 함유하지 않고, 어레이 상의 몇몇 웰은 단지 1개의 세포를 하유하였다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드를 마이크로웰 어레이에 적용하였다. 각각의 올리고뉴클레오티드-접합된 비드는 약 10억개의 비드-부착된 올리고뉴클레오티드를 함유하였다. 각각의 비드-부착된 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 3-부분 세포 표지 (예를 들어, 2개의 링커에 의해 연결된 3개의 세포 표지 구역), 분자 표지, 및 올리고dT를 함유하였다. 각각의 비드는 특유한 3-부분 세포 표지를 함유하였고, 이것은 3개의 세포 표지 구역의 특유한 조합의 결과이다. 단일 비드 상의 모든 올리고뉴클레오티드는 동일한 3-부분 세포 표지를 함유하였다. 상이한 비드로부터의 올리고뉴클레오티드는 상이한 3-부분 세포 표지를 함유하였다. 각각의 웰은 1 또는 더 적은 올리고뉴클레오티드-접합된 비드를 함유하였다. 세포 용해 시약을 마이크로웰 어레이에 적용하여, 세포의 용해를 일으켰다. 세포로부터의 폴리아데닐화된 분자 (예를 들어, mRNA)는 올리고뉴클레오티드-접합된 비드로부터 올리고뉴클레오티드의 올리고dT 서열에 혼성화하였다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드로부터 올리고뉴클레오티드에 혼성화된 폴리아데닐화된 분자를, 수퍼스크립트 II를 사용하여 42℃에서 90분 동안 회전자 상에서 역전사시켰다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드로부터의 올리고뉴클레오티드는 제1 가닥 cDNA 합성을 위한 프라이머로서 역할을 하였다. SMART 올리고뉴클레오티드를 cDNA 합성에 포함시켜, 수퍼스크립트 II가 단부에 도달할 때 SMART 올리고뉴클레오티드 서열의 상보체를 cDNA의 3' 말단에 첨가할 수 있도록 하였다. cDNA 합성 반응은 연장되지 않은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 세포로부터 폴리아데닐화된 분자에 부착되지 않은 올리고뉴클레오티드) 및 연장된 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 폴리아데닐화된 분자에 부착되고 폴리아데닐화된 분자/cDNA 혼성체를 포함하는 올리고뉴클레오티드)에 접합된 비드를 생산하였다.

[0508] 비드를 합하고, 폴리아데닐화된 분자/cDNA 혼성체를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 증폭시켰다. 다중 PCR을 수행하여, 비드 상에서 cDNA로부터 98개 유전자 (표 9 참조)의 패널을 증폭시켰다. 다중 PCR을 위한 프라이머

는 mRNA의 3' 말단으로부터 약 500개 염기쌍에 놓이도록 설계된 제1 유전자 특이적 프라이머, 및 mRNA의 3' 말단으로부터 약 300개 염기쌍에 놓이도록 설계된 네스티드 유전자-특이적 프라이머를 포함하였다. 다중 PCR을 위한 프라이머는 패널 내의 프라이머의 마지막 6개의 염기에서 유의한 상보성을 요구하지 않도록 설계되었다. 다중 PCR 프라이머 내에서 상보성이 검출되면, 프라이머를 수동으로 교체하였다. 다중 PCR 반응은 다음 단계를 포함하였다: 1) 15 사이클의 제1 유전자 특이적 PCR (KAPA 다중 믹스, 50 nM의 각각의 프라이머 (제1 유전자 특이적 프라이머, 및 올리고뉴클레오티드-접합된 비드의 범용 서열에 상보성인 범용 프라이머), 앰퓨어 청소 (clean up) (0.7x 비드 대 주형 비), 15 사이클의 네스티드 유전자 특이적 PCR (KAPA 다중 믹스, 50 nM의 각각의 프라이머 (네스티드 유전자-특이적 프라이머, 및 올리고뉴클레오티드-접합된 비드의 범용 서열에 상보성인 범용 프라이머), 앰퓨어 청소 (0.7x 비드 대 주형 비), 전장 일루미나 어댑터 (KAPA HiFi 레디믹스(ReadyMix)) 를 첨가하기 위한 8 사이클의 최종 PCR, 및 앰퓨어 청소 (1x 비드 대 주형 비).

[0509] <표 9>

유전자 패널							
세포 유형	유전자	세포 유형	유전자	세포 유형	유전자	세포 유형	유전자
B 세포	PAX5	단핵구	CD14	나이브	CD62L (SELL)	Th17	IL17A
	CD19	종래의 단핵구	S100A12		CD45RA		IL17F
	CD20		CCR2	나이브Th	THPOK/ZBTB7B		IL21
	BCMA/ TNFRSF17		SELL/CD62L (L-셀렉틴)	나이브Tc	RUNX3		IL22
	BAFF	비-종래의 단핵구	CD16/FCGR3B	기억	CD45RO/PTPRC		CCL20
	TCL1A		CX3CR1		CD44		IL23R
	TACI		ITGAL	중심 기억 CD8+/CD4+	CCR7		RORa/RORA
B 나이브	IGHD	통상적인 골수성 DC	CD1b		TXK		RORgamat/RORC
	IGHM		FOXQ1		MBD2	여포 T 헬퍼	OX40L/TNFSF4/ CD252
B 기억	CD27		CD209/ DC-SIGN		BCL6		CXCR5
	CD38		CD1e	이펙터 기억 CD8+/CD4+	BLIMP1		SLAM/SLAMF1
	CD24		CCL17	Th1	CXCR3		ICOS
	AICDA		DTNA		IFNGR1		SAP/SH2D1A
	CD95	형질세포양 수지상 세포 (희귀)	CLEC4C/ CD303		IL12RB2	활성화된 T	CD69
B 이행	CD10	희귀 골수성 수지상 세포 (0.02%)	CD141/TM		IFN 감마	활성화된 T 및 B	CD30
B reg	IL10	NKT		Th2	IL33R/IL1RL1	Toll- 유사 수용체 (선천)	TLR1
형질	RASD1		PLZF/ZBTB16		IL4R		TLR2
	AMPD1		SLAMF1		CCR4		TLR3
	SDC1 (CD138)	T 세포	CD3 (CD3D)		CRTH2/PTGDR2		TLR4
NK	OSBPL5		CD3 (CD3E)		IL4		TLR5
	CD56/NCAM 1	세포독성 T	CD8 (CD8A)		IL5		TLR6
	IGFBP7		CD8 (CD8B)	Treg	CD25		TLR7
	KIR2DS5		PRF1 (퍼포린)		FOXP1		TLR8
	KIR2DS2		EOMES		TGF베타		TLR9
	RAB4B	헬퍼 T	CD4		IL10		TLR10

[0510]

[0511] 증폭된 생성물을 서열분석하였다. 150 bp를 갖는 서열 판독물을, Bowtie2를 이용하여 표 9에 열거된 98개의 유전자의 전체 mRNA 서열에 정렬시켰다. 서열 정렬의 결과 (표 10 참조)는 다중 PCR 반응이 고도로 특이적인 생성물을 생성하였음을 입증한다. 도 14는 X-축 상의 유전자 및 판독물의 수의 log10을 제시하는 그래프를 보여준다. 98개의 유전자 중 16개의 유전자는 존재하지 않았다. 이들 유전자의 부재는 몇몇 유전자가 상기 혈액 샘플 내에 존재할 수 없는 희귀 세포를 표적으로 한다는 사실 때문일 수 있다. 종합하면, 98개의 유전자 패널로부터 대략 84%의 유전자가 검출되었다.

[0512] <표 10>

총	6357075
0회 정렬된	703616
정확하게 1회 정렬된	5584201
> 1회 정렬된	69258
정확하게 1회 정렬된 %	88%

[0513]

[0514] 표 11은 전체 서열분석 통계학의 결과를 보여준다. 판독물1에 대해, 총 판독물1 매치 기준은 3-부분 세포 표지

(예를 들어, 세포 바코드)에 완벽한 매치, 및 링커에 최대 1 미스매치 (mismatch)를 요구하였다.

[0515] <표 11>

판독물 총 수	6357075
총 판독물1 매치 기준	4384245
판독물2 또한 정렬함	3943667
판독물2 정렬%	89.95%
특유한 세포 bc의 수	31129
특유한 bc 당 판독물 계수 > 100	3228
특유한 bc 당 판독물 계수 > 50	3721
% 유용한 판독물	62.04%

[0516]

[0517] 도 15a는 3-부분 세포 표지 (예를 들어, 세포 바코드)당 검출된 유전자의 분포의 그래프를 보여준다. 도 15b는 (유전자 패널을 발현하는) 비드당 검출된 특유한 분자의 분포의 그래프를 보여준다.

[0518] 서열분석 결과가 세포 바코드에 기반한 세포 집단을 분석하기 위해 사용될 수 있는지 결정하기 위해, 세포 군집화 분석을 수행하였다. SPADE (CyTOF 데이타를 위해 놀란 랩 (Nolan lab)에서 개발한 최소 신장 트리 (spanning tree) 알고리즘)을 사용하여, 17개의 유전자의 존재/부재에 기반하여 세포를 군집화할 수 있다. 존재하는 것으로 고려되는 유전자에 대해, gen에 대한 평균 서열분석 과잉도는 5배 초과이어야 한다. 서열 필터링 후에, 20개 초과의 특유한 분자와 회합된 약 500개의 특유한 세포 바코드 (예를 들어, 세포 표지)가 존재하였다. 각각의 특유한 세포 바코드는 단일 세포에 상응한다. 특유한 세포 바코드와 회합된 유전자에 기반하여, 세포를 세포 유형으로 군집화하였다. 표 12는 세포 유형을 확정적으로 확인하기 위해 사용할 수 있는 유전자의 목록을 보여준다. 따라서, CD20, IGHM, TCL1A 및 CD24와 회합되는 세포 바코드를 B-세포로서 지정한 한편, CD8A, CD3D, CD3E, CD4 및 CD62L과 회합되는 세포 바코드를 T-세포로서 지정하였다. 표 9의 나머지 유전자를 세포 클러스터에 매핑하였다. 도 16은 세포 바코드와 회합된 유전자를 기초로 한 세포 클러스터를 보여준다. 클러스터의 크기는 클러스터에 배정된 세포의 수에 비례한다. 도 16에 제시된 결과는 단일 세포로부터 분자의 카피를 특유하게 표지하기 위해 세포 및 분자 바코딩의 조합이 이용될 수 있음을 입증하고, 이것은 단일 세포 서열분석에 의한 면역표현형 결정을 가능하게 할 수 있다. PMBC를 표 12에 열거된 유전자에 기초하여 주요 세포 유형으로 군집화하는 것에 추가로, 주요 세포 유형의 하위형의 클러스터를 확인하기 위해 98개의 유전자 패널을 또한 사용할 수 있다. 표 13은 단일 세포 서열분석에 의해 검출된 각각의 주요 세포 유형의 빈도를 보여준다. 표 13에 제시된 바와 같이, CD8+ T 세포를 제외하고는, 각각의 세포 유형의 백분율은 정상 세포 백분율 범위에 상응하였다. 근소하게 더 높은 백분율의 CD8+ T 세포가 PMBC 샘플 내에서 관찰되었다. 도 16에 기반한 세포 클러스터를 이용하여, 세포 클러스터를 추가로 분석하기 위해 98개의 유전자 패널로부터 추가의 유전자의 발현 프로파일을 사용하였다.

[0519] <표 12>

주요 세포 유형	유전자
B 세포	CD20, IGHM, TCL1A, CD24
T 세포	CD8A, CD3D, CD3E, CD4, CD62L
NKT 세포	ZBTB16
수지상 세포	CD209
자연 살해 세포	KIR2DS5, KIR2DS2, CD16
단핵구	CD16, CD14, CCR2, S100A12, CD62L

[0520]

[0521] <표 13>

세포 유형	세포 #	백분율	정상 범위
단핵구	67	13.3%	10-30%
NK	85	16.9%	15% 까지
B	47	9.3%	15% 까지
CD8	210	41.7%	5-30%
CD4	94	18.7%	25-60%
총 배정된 클러스터	503	100.0%	

[0522]

[0523] 도 17a-d는 단핵구 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 17e는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 17a는 단핵구 특이적 마커인 CD14에 대한 세포 발현 프로파일을 보여준다. "따뜻한 색" (예를 들어, 적색)은 높은 유전자 발현을 나타내고, "차가운 색" (예를 들어, 청색)은 낮은 유전자 발현을 나타낸다. 도 17a에 제시된 바와 같이, CD14는 단핵구 집단에서 고도로 발현되고, 다른 세포 유형에서 발현이 적거나 없었다. 단핵구 및 NK 모두에 존재하는 것으로 알려져 있는 CD16에 대한 세포 발현 프로파일을 도 17b에 제시한다. 도 17b에 제시된 바와 같이, 단핵구 및 NK 세포 클러스터는 높은 CD16 발현을 갖는 반면, 다른 세포 유형에서는 발현이 적거나 없었다. CCR2 및 S100A12는 단핵구에서 고도로 발현되는 것으로 알려져 있다. CCR2 및 S100A12 단핵구-특이적 발현은 각각 도 17c 및 17d에 도시된 세포 발현 프로파일에서 또한 입증되었다. 그러나, CCR2 및 S100A12의 발현은 단핵구 세포의 2개의 분지로 분리되었다. 다른 세포 유형에서는 CCR2 및 S100A12의 발현이 적거나 없었다.

[0524] 도 18a-b는 T 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 18c는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 18a는 CD3 분자의 사슬인 CD3D에 대한 세포 발현 프로파일을 보여준다. CD3은 범 T 세포 마커이다. 도 18a는 CD3D가 CD8+ T 세포의 2개의 분지에서 고도로 발현되고 CD8+ T 세포의 제3 분지에서 중등도로 발현됨을 보여준다. 그러나, CD3D는 CD4+ T 세포에서 고도로 발현되지 않는다. 또한, 다른 세포 유형에서는 CD3D의 발현이 적거나 없다. 도 18b는 CD3 분자의 사슬인 CD3E에 대한 세포 발현 프로파일을 보여준다. 도 18b는 CD3D이 CD4+ T 세포에서 고도로 발현됨을 보여준다. CD8+ T 세포의 상이한 분지는 CD3D의 고도 내지 중등도 발현을 보여준다. 다른 세포 유형에서 CD3D의 발현은 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다.

[0525] 도 19a-b는 CD8+ T 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 19c는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 19a는 CD8 분자의 사슬인 CD8A에 대한 세포 발현 프로파일을 보여준다. 도 19a에 제시된 바와 같이, CD8+ T 세포의 상이한 분지는 다양한 수준의 CD8A 발현을 갖고, 여기서 몇몇 분지는 고도 발현을 갖고, 다른 분지는 중등도 발현을 갖고, 하나의 분지에서는 CD8A의 발현이 적거나 없다. 높은 CD8A 발현이 CD16+ NK 세포의 분지에서 관찰되었다. 문헌에는 80%까지의 NK 세포가 CD8을 발현하는 것으로 보고되어 있다. 다른 세포 유형에서는 CD8A 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 19b는 CD8 모델의 사슬인 CD8B에 대한 세포 발현 프로파일을 보여준다. 도 19b에 제시된 바와 같이, CD8+ T 세포의 상이한 분는 다양한 수준의 CD8B 발현을 갖고, 여기서 하나의 분지는 고도 발현을 갖고, 몇몇 분지는 중등도 발현을 갖고, 2개의 분지는 CD8B의 발현이 적거나 없다. 높은 CD8B 발현은 CD16+ NK 세포의 분지에서 또한 관찰되었다. 다른 세포 유형에서는 CD8B 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다.

[0526] 도 20a는 CD4+ T 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 20b는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 20a는 CD4에 대한 발현 프로파일을 보여준다. CD4의 중등도 발현이 CD4+ T 세포 클러스터에서 하위세트의 세포에서 관찰되고, CD4의 고도 발현이 단핵구 클러스터의 분지에서 관찰되었다. 단핵구가 또한 CD4를 발현하는 것은 이전에 문헌에 기록되었다. CD4의 중등도 내지 적은 발현이 CD8+ T-세포의 분지에서 및 NK 세포에서 관찰되었다. 다른 세포 유형에서 CD4의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다.

[0527] 도 21a-d는 자연 살해 (NK) 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 20e는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 20a는 KIR2DS2에 대한 발현 프로파일을 보여준다. 모든 세포 유형은 KIR2DS2 발현을 거의 또는 전혀 보이지 않았다. 도 20b는 KIR2DS5에 대한 발현 프로파일을 보여준다. 살해 이뮤노글로불린 수용체 (KIR)는 NK 세포, 및 T 세포의 하위세트에서 발현되는 것으로 알려져 있다. KIR2DS5의 고도 발현이 NK 세포의 2개의 분지에서 관찰되고, KIR2DS5의 중등도 내지 적은 발현이 NK 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. KIR2DS5의 중등도 내지 고도 발현이 CD8+ T 세포의 2개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 KIR2DS5의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. OSBPL5 및 IGFBP7은 NK 세포에서 고도로 발현되는 것으로 알려져 있다.

도 20c는 OSBPL5에 대한 발현 프로파일을 보여준다. OSBPL5는 NK 세포의 1개의 분지에서 고도로 발현되었다. OSBPL5의 중등도 내지 적은 발현이 B 세포의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 OSBPL5의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 20d는 IGFPBP7에 대한 발현 프로파일을 보여준다. IGFPBP7의 고도 발현이 NK 세포의 2개의 분지 및 단핵구의 1개의 분지에서 관찰되었다. IGFPBP7의 중등도 발현이 B 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 IGFPBP7의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다.

[0528] 도 22a-e는 B 세포 특이적 마커의 분석을 보여준다. 도 22f는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 22a는 IGHM CH4에 대한 발현 프로파일을 보여준다. IGHM CH4는 B 세포의 1개의 분지에서 고도로 발현되고, B 세포의 제2 분지에서 중등도 발현되었다. 다른 모든 세포 유형에서 IGHM CH4의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 22b는 PAX5에 대한 발현 프로파일을 보여준다. PAX5는 B 세포의 1개의 분지에서 고도로 발현되었다. 다른 모든 세포 유형에서 PAX5의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 22c는 CD20에 대한 발현 프로파일을 보여준다. CD20은 B 세포의 1개의 분지에서 고도로 발현되었다. 다른 모든 세포 유형에서 CD20의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 22d는 TCL1A에 대한 발현 프로파일을 보여준다. 다른 모든 세포 유형에서 TCL1A의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 22e는 IGHD CH2에 대한 발현 프로파일을 보여준다. IGHD CH2는 B 세포의 1개의 분지에서 고도로 발현되었다. 다른 모든 세포 유형에서 IGHD CH2의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다.

[0529] 도 23a-f는 Toll-유사 수용체의 분석을 보여준다. Toll-유사 수용체는 주로 단핵구 및 일부 B 세포에 의해 발현된다. 도 23g는 도 16에 도시된 세포 클러스터를 보여준다. 도 23a는 TLR1에 대한 발현 프로파일을 보여준다. 단핵구의 1개의 분지는 TLR1의 고도 발현을 보이고, 단핵구의 2개의 분지는 TLR1의 중등도 발현을 보였다. 다른 모든 세포 유형에서 TLR1의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 23b는 TLR4에 대한 발현 프로파일을 보여준다. 단핵구의 1개의 분지는 TLR4의 고도 발현을 보였다. 중등도 TLR4 발현이 단핵구의 2개의 분지 및 NK 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 TLR4의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 23c는 TLR7에 대한 발현 프로파일을 보여준다. TLR7의 고도 발현이 단핵구의 1개의 분지에서 관찰되고, TLR7의 중등도 발현이 NK 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 TLR7의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 23d는 TLR2에 대한 발현 프로파일을 보여준다. TLR2의 고도 발현이 B 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 TLR2의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 23e는 TLR3에 대한 발현 프로파일을 보여준다. TLR3의 고도 발현이 B 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 TLR3의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다. 도 23f는 TLR8에 대한 발현 프로파일을 보여준다. TLR8의 고도 발현이 단핵구의 3개의 분지에서 관찰되었다. TLR8의 중등도 내지 낮은 발현이 단핵구의 2개의 분지 및 NK 세포의 1개의 분지에서 관찰되었다. 다른 모든 세포 유형에서 TLR8의 발현이 적게 내지 전혀 관찰되지 않았다.

[0530] 이들 결과는 대량의 동시 단일 세포 서열분석이 PMBC 내에서 주요 세포 유형을 성공적으로 확인할 수 있음을 입증한다. 서열분석 결과는 또한 세포 유형을 확인하기 위해 FAC에서 사용되는 몇몇 세포 마커가 높은 mRNA 발현을 갖지 않음을 결정하였다 (예를 들어, NK 세포에 대한 CD56, B 세포에 대한 CD19). 또한, 유전자 패널 내의 많은 유전자가 다수의 세포 유형을 가로질러 발현되었다. 이들 발현 프로파일은 주요 세포 유형 내에서 세포의 아형 결정을 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 활성화된 세포 대 휴지기 세포 등).

[0531] 실시예 11: 집단 내의 희귀 세포의 확인

[0532] 본 실험에서, 대량의 동시 단일 세포 서열분석은 암 및 비-암 세포의 혼합물로부터 암 세포를 확인하기 위해 사용된다. 라모스 (버킷 림프종) 세포를 건강한 개체로부터 단리된 CD19+ B 세포의 집단 내로 스파이킹하였다. 혼합된 집단 내의 라모스 세포의 농도는 약 4-5%이었다. 약 7000개의 정상 B 세포 및 300개의 라모스 세포를 25,200개의 웰을 갖는 마이크로웰 어레이 상에 침적시켰다. 따라서, 마이크로웰 어레이 상의 대부분의 웰은 세포를 함유하지 않고, 어레이 상의 몇몇 웰은 단지 1개의 세포를 함유하였다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드를 마이크로웰 어레이에 적용하였다. 각각의 올리고뉴클레오티드-접합된 비드는 약 10억개의 비드-부착 올리고뉴클레오티드를 함유하였다. 각각의 비드-부착 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 서열, 3-부분 세포 표지 (예를 들어, 2개의 링커에 의해 연결된 3개의 세포 표지 구역), 분자 표지, 및 올리고dT를 함유하였다. 각각의 비드는 3개의 세포 표지 구역의 특유한 조합의 결과인 특유한 3-부분 세포 표지를 함유하였다. 단일 비드 상의 모든 올리고뉴클레오티드는 동일한 3-부분 세포 표지를 함유하였다. 상이한 비드로부터의 올리고뉴클레오티드는 상이한 3-부분 세포 표지를 함유하였다. 각각의 웰은 1 또는 그보다 적은 올리고뉴클레오티드-접합된 비드를 함유하였다. 세포 용해 시약을 마이크로웰 어레이에 적용하여, 세포를 용해시켰다. 세포로부터의 폴리아데닐화된 분자 (예를 들어, mRNA)는 올리고뉴클레오티드-접합된 비드로부터의 올리고뉴클레오티드의 올리고dT 서

열에 혼성화하였다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드로부터의 올리고뉴클레오티드에 혼성화된 폴리아데닐화된 분자를, 수퍼스크립트 II를 사용하여 42℃에서 90분 동안 회전자 상에서 역전사시켰다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드로부터의 올리고뉴클레오티드는 제1 가닥 cDNA 합성을 위한 프라이머로서 역할을 하였다. SMART 올리고뉴클레오티드를 cDNA 합성에 포함시켜, 수퍼스크립트 II가 단부에 도달할 때 SMART 올리고뉴클레오티드 서열의 상보체를 cDNA의 3' 말단에 첨가할 수 있도록 하였다. cDNA 합성 반응은 연장되지 않은 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 세포로부터의 폴리아데닐화된 분자에 부착되지 않은 올리고뉴클레오티드) 및 연장된 올리고뉴클레오티드 (예를 들어, 폴리아데닐화된 분자에 부착되고 폴리아데닐화된 분자/cDNA 혼성체를 포함하는 올리고뉴클레오티드)에 접합된 비드를 생산하였다.

[0533] 비드를 합하고, 폴리아데닐화된 분자/cDNA 혼성체를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 증폭시켰다. 다중 PCR을 수행하여, 비드 상에서 cDNA로부터 111개의 유전자의 패널을 증폭시켰다. 111개의 유전자는 상이한 하위세트의 B 세포에 대한 마커를 나타낸다. 다중 PCR을 위한 프라이머는 mRNA의 3' 말단으로부터 약 500개 염기쌍에 놓이도록 설계된 제1 유전자 특이적 프라이머, 및 mRNA의 3' 말단으로부터 약 300개 염기쌍에 놓이도록 설계된 네스티드 유전자-특이적 프라이머를 포함하였다. 다중 PCR을 위한 프라이머는 패널 내의 프라이머의 마지막 6개의 염기에서 유의한 상보성을 요구하지 않도록 설계되었다. 다중 PCR 프라이머 내에서 상보성이 검출되면, 프라이머를 수동으로 교체하였다. 다중 PCR 반응은 다음 단계를 포함하였다: 1) 15 사이클의 제1 유전자 특이적 PCR (KAPA 다중 믹스, 50 nM의 각각의 프라이머 (제1 유전자 특이적 프라이머, 및 올리고뉴클레오티드-접합된 비드의 범용 서열에 상보성인 범용 프라이머), 앰퓨어 청소 (0.7x 비드 대 주형 비), 15 사이클의 네스티드 유전자 특이적 PCR (KAPA 다중 믹스, 50 nM의 각각의 프라이머 (네스티드 유전자-특이적 프라이머, 및 올리고뉴클레오티드-접합된 비드의 범용 서열에 상보성인 범용 프라이머), 앰퓨어 청소 (0.7x 비드 대 주형 비), 전장 일루미나 어댑터 (KAPA HiFi 레디믹스)를 첨가하기 위한 8 사이클의 최종 PCR, 및 앰퓨어 청소 (1x 비드 대 주형 비).

[0534] 증폭된 생성물을 서열분석하였다. 150 bp를 포함하는 서열 판독물을, Bowtie2를 이용하여 111개의 유전자 (표 17)의 전체 mRNA 서열에 정렬시켰다. 서열 정렬의 결과 (표 14 참조)는 다중 PCR 반응이 고도로 특이적인 생성물을 생성하였음을 입증한다. 도 24는 유전자 대 판독물의 수의 log10의 그래프를 보여준다. 111개의 유전자 중 24개는 존재하지 않았다. 적어도 2개의 유전자, 즉, VDJ 재조합에 관여하고 프리-B 세포에서만 존재할 것인 RAG1 및 RAG2는 존재하지 않아야 한다. 부재하는 유전자의 몇몇은 형질 세포에 대해 특이적이고, 이것은 동결된 세포에서 매우 희귀하게 보존된다.

[0535] <표 17>

CD19	AURKB	FOXP1	CCND3	TLR1	FOXP3	CXCL12	GNAI2
CD27	CD81	MCL1	IL12A	TLR2	LAG3	CCL3	RGS1
CD138	CD80	IFNB1	IFNG	TLR3	CD73	CCL14	CD5
CD38	CD23a	BLNK	TNFA	TLR4	CD70	CCL20	CD22
CD24	CD44	CD40LG	IL2	TLR5	CCR7	CCL18	PIK3CD
CD10	LEF1	IGBP1	IL4	TLR6	CD45RA	TCL1A	DOCK8
CD95	CXCR5	IRF4	IL6	TLR7	PDCD1	TACI	CD11b
CD21	PRKCB	CD79a	BAFF	TLR8	MYC	AICDA	FCGR2B
CXCR3	PRKCD	LTA	IGHE	TLR9	CD25	FCRL4	CD72
CD40	CD20	HDAC5	IGHD	TLR10	FCAMR	BCL2	BCL11B
CD69	CD30	RAG1	IGHM	GAPDH	CCND2	FASLG	CD86
CD1c	CD30L	RAG2	IGHA	CD9	MKI67	BCL6	TBX21
IL10	BAFFR	CD1d	IGHG1	CD11c	IL21R	IGHG2	PRDM1
IL4R	CMRF-35H	TGFB1	IGHG4	IL6R	HLA-DRA	IGHG3	

[0536]

[0537] <표 14>

총	5711013
0회 정렬된	504775
정확하게 1회 정렬된	5203308
> 1회 정렬된	2930
정확하게 1회 정렬된 %	91.6%

[0538]

[0539] 표 15는 전체 서열분석 통계학의 결과를 보여준다. 판독물1에 대해, 총 판독물1 매치 기준은 3-부분 세포 표지(예를 들어, 세포 바코드)에 대해 완벽한 매치 및 링커에 대해 최대 1 미스매치를 요구하였다.

[0540] <표 15>

판독물 총 수	5711013
총 판독물1 매치 기준	3795915
판독물2 또한 정렬함	3495392
판독물2 정렬%	92%
특유한 세포 bc의 수	40764
특유한 bc 당 판독물 계수 > 100	3313
특유한 bc 당 판독물 계수 > 50	4154
% 유용한 판독물	61%

[0541]

[0542] 도 25a-d는 2개의 유전자에 대한 분자 바코드 대 판독물의 수 또는 판독물의 수의 log10의 그래프를 보여준다. 도 25a는 CD79에 대한 분자 바코드 (풍부도에 의해 분류된) 대 판독물의 수의 그래프를 보여준다. 도 25b는 CD79에 대한 분자 바코드 (풍부도에 의해 분류된) 대 판독물의 수의 log10의 그래프를 보여준다. 도 25c는 GAPDH에 대한 분자 바코드 (풍부도에 의해 분류된) 대 판독물의 수의 그래프를 보여준다. 도 25d는 GAPDH에 대한 분자 바코드 (풍부도에 의해 분류된) 대 판독물의 수의 log10의 그래프를 보여준다.

[0543] 856개의 세포를 분석을 위해 보유하였다. 도 26a는 세포 바코드당 발현된 패널 내의 유전자의 수 대 특유한 세포 바코드/단일 세포의 수의 그래프를 보여준다. 도 26b는 비드당 검출된 특유한 분자의 수 대 제시된 수의 분자를 보유하는 특유한 세포 바코드당 세포의 수의 빈도의 막대 그래프를 보여준다. 세포의 작은 하위세트는 명백하게 더 많은 수의 mRNA 분자 및 111개의 유전자 패널로부터 발현된 유전자 (도 26a-b에서 원으로 둘러싼 구역 참조)를 보여준다. 도 26c는 비드당 검출된 특유한 GAPDH 분자의 수 대 제시된 수의 분자를 보유하는 세포/특유한 세포 바코드의 수의 빈도의 막대 그래프를 보여준다.

[0544] 주요 성분 분석 (PCA)을 이용하여 세포의 산포도를 생성하였다. 도 27은 856개의 세포의 산포도를 보여준다. PCA는 대부분의 세포와 상이한 유전자 발현 패턴을 갖는 세포의 작은 하위세트를 확인하였다. 세포의 하위세트는 18개의 세포를 함유하였고, 이것은 분석된 모든 세포의 약 2%이다. 상기 백분율은 집단 내로 스파이킹된 라모스 세포의 백분율과 유사하다.

[0545] 라모스 세포는 여포 B 세포로부터 유래되고, B 세포 분화 마커인 CD20, CD22, CD19, CD10 및 BCL6을 강하게 발현한다. 라모스 세포는 또한 IgM을 발현하고, c-myc를 과다발현한다. 도 28은 상위 100개 (검출된 분자의 총 수의 측면에서)의 발현의 히트 맵을 보여준다. 훨씬 더 높은 수준의 mRNA를 발현하는 세포의 하위세트 (18개 세포)는 또한 라모스 세포에 대한 공지의 마커인 유전자 (예를 들어, CD10, Bcl-6, CD22, C-my, 및 IgM)를 강하게 발현한다.

[0546] 이들 결과는 대량의 동시 단일 세포 서열분석이 세포 현탁액 내에서 비정상 세포 유형의 작은 하위세트 (2% 정도로 낮은)를 성공적으로 확인할 수 있음을 입증한다. 대량의 동시 단일 세포 서열분석은 암 진단 (예를 들어, 생검/순환 종양 세포)에서 사용될 수 있다. 암 세포는 크기가 보다 크고 보다 많은 mRNA를 보유하므로, 정상 세포로부터 쉽게 구별될 수 있다.

[0547] 실시예 12: RESOLVE를 사용하여 gDNA 표적의 대량의 동시 단일 세포 전체 게놈 및 다중 증폭

[0548] 도 29는 본 실시예에 대한 작업 흐름을 보여준다. 도 29에 제시된 바와 같이, 세포 현탁액을 마이크로웰 어레이 (2901)에 적용한다. 세포 현탁액 내의 세포의 수는 마이크로웰 어레이 내의 웰의 수보다 더 적어서, 마이크

로웰 어레이에 세포 현탁액을 적용하면 마이크로웰 어레이의 웰 내에 1개 또는 그 미만의 세포가 함유된다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드 (2905)를 마이크로웰 어레이에 적용한다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드 (2905)는 5' 아민 (2915), 범용 프라이머 서열 (2920), 세포 표지 (2925), 분자 표지 (2930) 및 랜도머 (2935)를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 부착된 비드 (2910)를 함유한다. 올리고뉴클레오티드-접합된 비드는 약 10억 개의 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 프라이머 서열, 세포 표지, 분자 표지, 및 랜도머를 함유한다. 단일 비드 상의 각각의 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지를 함유한다. 그러나, 단일 비드 상의 2개 이상의 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 상이한 분자 표지를 함유할 수 있다. 비드는 동일한 분자 표지를 함유하는 올리고뉴클레오티드의 다수의 카피를 함유할 수 있다.

[0549] 올리고뉴클레오티드-접합된 비드를 마이크로웰 어레이에 첨가한 후, 세포 용해 완충제를 어레이 표면에 적용한다. 도 29에 제시된 바와 같이, 세포로부터 게놈 DNA (2945)는 올리고뉴클레오티드-접합된 비드 (2940)의 랜도머 서열 (2935)에 혼성화한다. 중화 완충제를 어레이 표면에 첨가한다. DNA 폴리머라제 (예를 들어, Phi29) 및 dNTP를 어레이 표면에 첨가한다. 랜도머 서열 (2935)은 게놈 DNA의 증폭을 위한 프라이머로서 작용하여, gDNA-접합된 비드 (2555)를 생성한다. gDNA-접합된 비드 (2955)는 5' 아민 (2915), 범용 프라이머 서열 (2920), 세포 표지 (2925), 분자 표지 (2925), 랜도머 (2935) 및 게놈 DNA의 카피 (2955)를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 원래의 게놈 DNA (2945)는 랜도머 (2935) 및 게놈 DNA의 카피 (2955)에 혼성화한다. 단일 비드에 대해, 올리고뉴클레오티드에 부착된 다수의 상이한 게놈 DNA 분자가 존재한다.

[0550] 도 29에 제시된 바와 같이, 웰로부터 gDNA-접합된 비드 (2950)를 에펜도르프 튜브 (2960) 내로 조합한다. 랜도머, dNTP 및 DNA 폴리머라제 (예를 들어, Phi29)를 함유하는 gDNA MDA 믹스 상의 게놈 DNA 믹스를 조합된 gDNA-접합된 비드를 함유하는 에펜도르프 튜브에 첨가한다. 표지된 게놈 DNA를 추가로 증폭시켜, 용액 내에 표지된 앰플리콘 (2965)을 생성한다. 표지된 앰플리콘 (2965)은 범용 프라이머 서열 (2920), 세포 표지 (2925), 분자 표지 (2930), 랜도머 (2935), 및 게놈 DNA의 카피 (2955)를 포함한다. 표지된 앰플리콘은 약 1 kb 이하의 보다 작은 조각으로 절단된다. 대안적으로, 표지된 앰플리콘을 태그멘테이션 (Tagmentation) (넥스테라 (Nextera))에 의해 단편화시킬 수 있다. 표지된 앰플리콘의 절단 또는 단편화로 표지된 단편 (2980) 및 비표지된 단편 (2985)을 생성한다. 표지된 단편 (2980)은 범용 프라이머 서열 (2920), 세포 표지 (2925), 분자 표지 (2930), 랜도머 (2935), 및 게놈 DNA의 카피의 단편 (2955)을 함유한다. 어댑터 (2970, 7975)를 단편에 첨가한다. 범용 프라이머 서열, 및 어댑터 (2970, 2975) 중 하나에 대한 프라이머를 사용하는 PCR 또는 혼성화 풀다운을 통해 표지된 단편 (2980)을 선택하기 위해, 범용 프라이머 서열을 사용할 수 있다.

[0551] 표지된 단편을 서열분석할 수 있다. 세포 표지, 분자 표지 및 게놈 단편의 서열을 포함하는 서열 판독물을 사용하여, 세포 현탁액으로부터 세포 집단을 확인할 수 있다. 주요 성분 분석을 이용하여, 공지의 세포 마커에 기초한 세포의 산포도를 생성할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, SPADE를 사용하여 세포 클러스터 plots을 생성할 수 있다. 컴퓨터 소프트웨어 프로그램을 이용하여 세포 표지 및 세포 표지와 회합된 분자 표지 및 게놈 단편을 포함하는 목록을 생성할 수 있다.

[0552] 실시예 13: 불균일한 집단 내에서 세포를 확인하기 위한 대량의 동시 서열분석

[0553] 본 실시예에 대한 실험 작업 흐름을 도 30에 제시한다. 도 30에 제시된 바와 같이, 세포의 혼합된 집단을 마이크로웰 어레이 상으로 확률적으로 분산시켰다. 본 실시예에서, 세포의 혼합된 집단은 라모스 세포 및 K562 세포의 혼합물을 포함하였다. 세포 현탁액은 낮은 농도의 세포를 포함하여, 어레이 내의 각각의 마이크로웰을 1 또는 더 적은 세포를 함유하였다. 세포가 마이크로웰 어레이에 적용된 후에, 다수의 올리고뉴클레오티드 접합된 비드를 마이크로웰 어레이 상으로 확률적으로 분산시켰다. 올리고뉴클레오티드 비드는 5' 아민, 범용 프라이머 서열, 세포 표지, 분자 표지, 및 올리고dT를 포함하는 다수의 올리고뉴클레오티드를 함유한다. 단일 비드로부터 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하다. 단일 비드는 동일한 분자 표지를 포함하는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 단일 비드는 상이한 분자 표지를 포함하는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 제1 비드에 접합된 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 제2 비드에 접합된 올리고뉴클레오티드의 세포 표지와 상이하다. 따라서, 세포 표지를 사용하여, 2가지 이상의 올리고뉴클레오티드 접합된 비드를 구별할 수 있다. 세포를 용해시키고, 단일 세포로부터 RNA 분자를 동일한 웰 내에서 올리고뉴클레오티드 접합된 비드에 부착시켰다. 도 30은 올리고뉴클레오티드의 올리고dT 서열에 대한 RNA의 폴리A 서열의 부착을 보여준다. 동일한 웰 내에서 올리고뉴클레오티드 접합된 비드에 대한 개별 세포로부터 RNA 분자의 부착 후에, 비드를 단일 샘플 내로 조합시켰다. cDNA 합성 반응을 단일 샘플 내의 비드 상에서 수행하였다. 도 30은 cDNA 합성의 생성물이 올리고뉴클레오티드에 부착된 비드를 포함함을 보여주고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 5' 아민, 범용 프라이머 서열, 세포 표지, 분자 표지, 올리고dT 및 RNA 분자의 카피를 포함한다. 단순함을 위

해, 단지 1개의 올리고뉴클레오티드를 도 30에 도시하지만, 본 실시예에서, 각각의 올리고뉴클레오티드 접합된 비드는 약 10억개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 도 30에 제시된 바와 같이, 범용 프라이머 서열에 혼성화된 범용 프라이머, 및 RNA 분자의 카피에 혼성화된 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 단일 샘플 내에서 비드를 사용하여 다중 PCR을 수행하였다. 유전자-특이적 프라이머는 표 16에 제시된 유전자 패널로부터 라모스-특이적 유전자 또는 K562-특이적 유전자에 결합하도록 설계되었다. 대조군으로서, GAPDH 유전자-특이적 프라이머를 또한 다중 PCR 반응에서 사용하였다. 마지막으로, 차세대 서열분석을 이용하여, 증폭된 생성물의 서열을 결정하였다. 서열분석 판독물은 세포 표지, 분자 표지 및 유전자에 관한 정보를 포함하였다. 주요 성분 분석을 이용하여, 세포 표지, 분자 표지 및 유전자에 관한 서열분석 정보에 기초하여 세포의 산포도를 작성하였다. FAC가 세포를 분류하기 위해 사용되는 방식 및 표면 마커에 기초한 산포도가 세포를 분류하기 위해 사용되는 방식과 유사하게, 세포 표지는 단일 세포로부터 유전자를 확인하기 위해 사용되고, 분자 표지는 유전자의 양을 결정하기 위해 사용된다. 이어서, 상기 조합된 정보를 사용하여, 유전자 발현 프로파일을 개별 세포에 관련시켰다. 도 31a에 제시된 바와 같이, 세포 및 분자 표지를 사용하는 대량의 동시 단일 세포 서열분석은 혼합된 세포 집단 내에서 2가지 세포 집단 (K562 및 라모스 세포)을 성공적으로 확인할 수 있었다.

[0554] <표 16>

유전자	세포	유전자	세포
CD74	라모스-특이적	CD41	K562 특이적
CD79a	라모스-특이적	GYPA	K562 특이적
IGJ	라모스-특이적	GATA2	K562 특이적
TCL1A	라모스-특이적	GATA1	K562 특이적
SEPT9	라모스-특이적	HBG1	K562 특이적
CD27	라모스-특이적	GAPDH	공통적인

[0555]

[0556] 실시예 14: 주요 성분 분석을 이용하는 대량의 동시 단일 세포 서열분석

[0557] 본 실시예에서, 개별 세포로부터 mRNA 분자를 동시에 올리고뉴클레오티드 접합된 비드로 확률적으로 표하였다. PBMC를 혈액으로부터 단리하고, 80℃에서 RPMI1640 + FBS 및 DMSO 내에서 동결시켰다. PMBC를 해동시키고, PBS로 3회 세척하였다. 세포 유형들의 혼합물 (4000개의 총 세포)를 포함하는 PBMC 샘플을 아가로스 마이크로웰 어레이에 확률적으로 적용하였다. 아가로스 마이크로웰 어레이는 37,500개의 세포를 함유하였다. 150,000개의 올리고뉴클레오티드 접합된 비드의 혼합물을 마이크로웰 어레이를 둘러싸는 PDMS 가스켓을 통해 마이크로웰 어레이에 확률적으로 적용하였다. 올리고뉴클레오티드 접합된 비드는 도 1에 도시되어 있다. 단순함을 위해, 단지 1개의 올리고뉴클레오티드가 비드에 부착된 것으로 도시하지만, 올리고뉴클레오티드 접합된 비드는 약 10억개의 올리고뉴클레오티드를 함유하였다.

[0558] 마이크로웰 어레이를 냉각 블록 상에 10분 동안 놓고, 용해 완충제를 어레이 표면에 적용함으로써 세포를 용해시켰다. 일단 웰 내의 세포가 용해된 후에, 단일 세포로부터 mRNA 분자를 올리고dT 서열을 통해 올리고뉴클레오티드 접합된 비드에 부착시켰다. 자석을 어레이에 적용하고, 어레이를 세척 완충제로 2회 세척하였다.

[0559] 부착된 mRNA 분자를 갖는 비드를 에펜도르프 튜브 내로 조합시켰다. 비드에 부착된 mRNA 분자를 역전사시켜 cDNA를 생산하였다. 다음 cDNA 합성 혼합물을 다음과 같이 제조하였다:

성분	부피 (uL)
물	8
dNTP (10mM)	2
5x 제1 가닥 완충제	4
MgCl2	2.4
수퍼라제(SuperRase) 억제제	1
SMART올리고(50uM)	0.4
0.1M DTT	1
100x BSA	0.2
SSII	1
총	20

[0560]

[0561] cDNA 합성 혼합물을, 부착된 mRNA 분자를 갖는 비드를 함유하는 에펜도르프 튜브에 첨가하였다. 에펜도르프 튜브를 40℃에서 90분 동안 회전자 상에서 인큐베이팅하였다. cDNA 합성 반응은 비드 상에서 발생하였다. 90분 후에, 자석을 튜브에 적용하고, cDNA 혼합물을 제거하고, 다음 ExoI 반응 혼합물을 교체하였다:

성분	부피 (uL)
ExoI 완충제	2
물	17
ExoI	1

[0562]

[0563] 튜브를 37℃에서 30분 동안 회전자 상에서 인큐베이팅하였다. 이어서, 튜브를 열 싸이클러에 15분 동안 80℃에서 옮겼다. 튜브를 80℃에서 15분 인큐베이팅한 후, 70 마이크로리터의 TE+Tween20을 튜브에 첨가하였다. 자석을 튜브에 적용하고, 완충제를 제거하였다. 이어서, 비드를 50 마이크로리터 TE+Tween20 내에 재현탁시켰다.

[0564] 비드에 부착된 cDNA를 다음 증폭 혼합물을 사용하여 실시간 PCR에 의해 증폭시켰다:

성분	부피(uL)
2x iTaq 믹스	10
GAPDH ILMN (10uM)	0.6
ILR2 (10uM)	0.6
비드	2
물	6.8
총	20

[0565]

[0566] 세포 표지, 분자 인덱스, 및 유전자를 검출하기 위해, 표지된 cDNA 앰플리콘을 서열분석하였다. 서열분석 판독물을 세포 표지, 이어서 유전자, 및 마지막으로 분자 표지에 정렬시켰다. 4개 이상의 유전자와 회합된 또는 10개 이상의 특유한 전사체 분자 (각각의 특유한 전사체 분자는 1회 초과 서열 결정되었다)와 회합된 세포 표지를 세포에 지정하였다. 검출된 표 9의 모든 유전자를 사용한 주요 성분 분석을 이용하여, 데이타에서 변이에 가장 큰 기여를 하는 유전자의 세트를 확인하였다. 632개의 단일 세포를 주요 성분 분석에서 사용하였다. 서열분석 결과에 기초하여, 98개의 유전자 중 81개가 검출되었다.

[0567] 도 32는 GAPDH 발현에 대한 주요 성분 분석 도면을 보여준다. 도 32에 제시된 바와 같이, 주요 성분 공간의 위치에 기초하여 2개의 세포 클러스터가 관찰되었다.

[0568] 도 33a-f는 단핵구 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 33a는 CD16에 대한 PCA를 보여준다. 도 33b는 CCRvarA에 대한 PCA를 보여준다. 도 33c는 CD14에 대한 PCA를 보여준다. 도 33d는 S100A12에 대한 PCA를 보여준다. 도 33e는 CD209에 대한 PCA를 보여준다. 도 33f는 IFNGR1에 대한 PCA를 보여준다.

[0569] 도 34a-b는 pan-T 세포 마커 (CD3)에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 34a는 CD3D에 대한 PCA를 보여주고, 도 34b는 CD3E에 대한 PCA를 보여준다.

[0570] 도 35a-e는 CD8 T 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 35a는 CD8A에 대한 PCA를 보여준다. 도 35b는 EOMES에 대한 PCA를 보여준다. 도 35c는 CD8B에 대한 PCA를 보여준다. 도 35d는 PRF1에

대한 PCA를 보여준다. 도 35e는 RUNX3에 대한 PCA를 보여준다.

[0571] 도 36a-c는 CD4 T 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 36a는 CD4에 대한 PCA를 보여준다. 도 36b는 CCR7에 대한 PCA를 보여준다. 도 36c는 CD62L에 대한 PCA를 보여준다.

[0572] 도 37a-f는 B 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 37a는 CD20에 대한 PCA를 보여준다. 도 37b는 IGHD에 대한 PCA를 보여준다. 도 37c는 PAX5에 대한 PCA를 보여준다. 도 37d는 TCL1A에 대한 PCA를 보여준다. 도 37e는 IGHM에 대한 PCA를 보여준다. 도 37f는 CD24에 대한 PCA를 보여준다.

[0573] 도 38a-c는 자연 살해 세포 연관 유전자에 대한 주요 성분 분석 (PCA)을 보여준다. 도 38a는 KIR2DS5에 대한 PCA를 보여준다. 도 38b는 CD16에 대한 PCA를 보여준다. 도 38c는 CD62L에 대한 PCA를 보여준다.

[0574] 주요 성분 분석을 기초로 하여, 단핵구 및 림프구는 PC1 상에 2개의 별개의 클러스터를 형성하였다. B, T, 및 NK 세포는 PC2를 따라 클러스터 내에 연속체 (continuum)로서 놓이는 또 다른 클러스터를 형성하였다. 도 39는 세포 유형 및 세포 아형에 대한 주해를 갖는, GAPDH 발현의 PCA 분석을 보여준다. 도 40은 세포들 사이에 유전자 발현 프로파일의 상관성을 보여주는 히트 맵을 도시한다. 좌측 상부 모서리에서 시작하는 대각선을 따라, 세포는 단핵구, 나이브 CD4 T 세포, 나이브 CD8 T 세포, 세포독성 CD8 T 세포, NK 세포, 및 B 세포이다. 도 41은 유전자 발현과 세포 유형 사이의 상관성을 보여주는 히트 맵의 또 다른 버전을 보여준다. 도 42는 유전자 사이의 유전자 발현 프로파일의 상관성을 보여주는 히트 맵을 보여준다.

[0575] 실시예 15: 디지털 유전자 발현 세포측정법에 의한 세포 불균일성의 확인

[0576] 차세대 서열분석을 단일 세포의 확률적 바코딩과 조합하는 유전자 발현 세포측정법을 위한 방안을 제시한다. 수천 개의 세포를 약 150,000개의 마이크로웰의 어레이 상에 무작위로 침적시켰다. 세포- 및 전사체-바코딩 포획 프로브를 보유하는 비드의 라이브러리를 첨가하여, 각각의 세포가 특유한 세포 바코드를 갖는 비드와 함께 분배되도록 하였다. 세포 용해 이후, mRNA를 비드에 혼성화시키고, 역전사, 증폭, 및 서열분석을 위해 모았다. 바코딩된 전사체를 계수하고 기원 세포에 배정할 때, 각각의 세포에 대한 디지털 유전자 발현 프로파일을 재구성하였다. 본 발명자들은 인간 조혈계를 세포 하위 집단들로 나누고, 시험관내 자극에 대한 면역 세포의 불균일한 반응을 특성화하기 위해 기술을 적용하였다. 추가로, 방법의 높은 감수성은 희귀 세포, 예컨대 항원-특이적 T 세포, 및 정상 세포의 높은 배경 내에서 종양 세포의 검출에 의해 입증되었다.

[0577] *도입*

[0578] 큰 세포 집합체에서 세포 다양성 및 기능의 이해에는 개별 세포에 의해 발현된 특이적 유전자 또는 단백질의 측정이 필요하다. 유동 세포측정법은 단일 세포의 단백질 발현에 대해 잘 확립되었지만, mRNA 발현 측정은 대개 벌크 샘플에서 수행되고, 따라서 개별 세포 기여도에 대한 이해를 어렵게 한다. 마이크로타이터 플레이트 또는 시판되는 미세유동칩을 이용한 단일 세포 mRNA 발현 측정이 최근에 보고되었지만 (1-5), 이들 방안은 처리 속도가 극히 느리고, 규모 확대가 곤란하다. 이들 제한 때문에, 지금까지의 대부분의 연구는 조사되는 세포의 수와 탐구되는 조건의 수 모두에서 제한된다.

[0579] 본원에서, 본 발명자들은 임의의 수의 유전자를 가로질러 수천 개의 단일 세포의 일상적 디지털 유전자 발현 프로파일링을 가능하게 하는 고도로 규모 확대가능한 방안을 개발하였다. 미세규모 공학 및 조합적 화학을 이용하여, 대량의 동시 방식으로 특유한 세포 바코드를 사용하여 세포 내의 모든 mRNA 분자를 표지할 수 있다. 또한, 세포 내에서 각각의 전사체 카피를 분자 바코드로 태그부착하였고, 이것은 절대적 디지털 유전자 발현 측정을 허용한다 (6). 모든 세포로부터 태그부착된 mRNA 분자를 모으고, 증폭시키고, 서열 결정하였다. 각각의 서열 상의 세포 및 분자 바코드를 사용하여, 각각의 세포의 디지털 유전자 발현 프로파일을 재구성하였다. 상기 고도로 규모 확대가능한 기술은 유전자 발현 세포측정법을 가능하게 하고, 본 발명자들은 이를 CytoSeq로 명명하였다. 본 발명자들은 상기 기술을 조혈계의 멀티파라미터 유전자 분류에 적용하였고, 세포 불균일성을 연구하고 집단 내의 희귀 세포를 검출하기 위한 그의 용도를 입증하였다.

[0580] *결과*

[0581] *CytoSeq*

[0582] 절차를 도 43A에 개략하였다. 세포 현탁액을 150,000개까지의 마이크로웰을 갖는 미세제작된 표면 상에 먼저 로딩하였다. 각각의 30 마이크로미터의 직경 마이크로웰은 ~20 피코리터의 부피를 갖는다. 세포의 수는 10개 이상의 웰 중 단지 ~1개만이 세포를 갖도록 조정하였다. 세포는 중력에 의해 웰 내에 침강하였다.

[0583] 자성 비드를 마이크로웰 어레이 상으로 포화까지 로딩하여, 비드가 부분적으로 웰 내에서 각각의 세포의 상단부위에 또는 그에 인접하게 놓이도록 하였다. 비드의 치수는 각각의 마이크로웰이 단지 1개의 비드를 보유할 수 있도록 선택하였다. 각각의 자성 비드는 도 43B에 개략한 구조를 갖는 약 10억 개의 올리고뉴클레오티드 주형을 보유하였다. 각각의 올리고뉴클레오티드는 범용 프라이밍 부위에 이어, 세포 표지, 분자 표지, 및 올리고(dT)의 포획 서열을 보여주었다. 각각의 비드 상의 모든 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포 표지를 갖지만, 분자 표지의 다양성을 함유한다. 본 발명자들은 1백만에 근접한 다양성을 갖는 비드를 합성하기 위해 조합적 분할-풀 방법을 고안하였다. 동일한 세포 표지로 태그부착된 2개의 단일 세포를 가질 확률은 낮고 (약 10^{-4}), 이것은 웰의 단지 ~10%만이 단일 세포에 의해 점유되기 때문이었다. 이와 유사하게, 단일 비드 상의 분자 표지의 다양성은 약 10^{4}이었고, 동일한 세포 내의 동일한 유전자의 2개의 전사체 분자가 동일한 분자 표지로 태그부착될 가능성도 또한 낮았다.

[0584] 용해 완충제를 마이크로웰 어레이의 표면에 적용하였고, 마이크로웰 내로 확산하였다. 세포로부터 방출된 폴리(dA) 테일이 있는 mRNA 분자는 비드 상의 올리고뉴클레오티드의 3' 말단의 올리고(dT)에 혼성화하였다. 세포는 용해 완충제의 고염 조건 및 mRNA의 높은 국소 농도 (수십 나노몰) 하에 비드에 인접하기 때문에, mRNA 분자가 비드 상에 포획되었다.

[0585] 용해 및 혼성화 후에, 자석을 사용하여 마이크로웰 어레이로부터 모든 비드를 튜브 내로 수집하였다. 앞으로, 모든 반응은 단일 튜브 내에서 수행하였다. cDNA 합성은 비드 상에서 통상의 프로토콜 (방법)을 이용하여 수행하였다. 각각의 세포로부터 유래하는 cDNA 분자는 각각 5' 말단 상에 세포 표지 및 분자 표지로 태그부착된 그의 상응하는 비드에 공유 부착되었다. 네스티드 다중 PCR을 수행하여 관심있는 유전자를 증폭시켰다 (도 55). 각각의 세포로부터 mRNA는 cDNA로서 비드 상으로 카피되었기 때문에, 비드는 반복적으로 증폭되고, 예를 들어 상이한 세트의 유전자에 대해 분석될 수 있다.

[0586] 앰플리콘의 서열분석으로 세포 표지, 분자 표지, 및 유전자 정체성을 밝혔다 (도 55). 컴퓨터 분석은 세포 표지에 기초하여 판독물을 분류하였고, 임의의 증폭 편차를 억제하기 위해 동일한 분자 표지 및 유전자 서열을 갖는 판독물을 단일 입력값으로 감소시켰다. 분자 표지의 사용으로 본 발명자들은 세포당 유전자당 분자의 절대수를 측정할 수 있고, 따라서 상이한 깊이의 서열분석을 할 수 있는 생물학적 샘플을 가로질러 세포 발현 수준의 직접 비교가 가능해졌다.

[0587] *제어된 세포 혼합물에서 별개의 세포 유형의 확인*

[0588] 2개의 세포 유형을 구별하는 상기 방법의 능력을 측정하기 위해, K562 및 라모스 세포의 ~1:1 혼합물을 10,000개 웰을 갖는 마이크로웰 어레이 상으로 로딩하였다. 약 6000개의 세포를 사용하여, ~1000개의 세포를 포획하였다. 12개 유전자의 패널을 선택하고, 비드로부터 증폭시켰다. 패널은 K562 (골수성 백혈병) 세포에 특이적인 5개의 유전자, 라모스 (여포성 림프종) 세포에 특이적인 6개의 유전자, 및 하우스키핑 유전자 GAPDH로 이루어졌다 (표 18). 각각 단일 비드를 갖는 10,000-웰 어레이 상에 포획된 대략 1000개의 세포 중에서, 비드의 단지 10%만이 mRNA를 보유하고, 이론적으로 서열분석 데이타에서 단지 최대 1000개의 특유한 세포 표지를 발견할 것이다. 실제로, 본 발명자들은 데이타 필터링 후에 유의한 수의 판독물과 연관된 768개의 세포 표지를 발견하였다 (필터링 방법 기준 참조). 비교를 위해, 본 발명자들은 유사한 수의 세포 및 비드를 갖는 미세원심분리 튜브 내에서 벌크 세포 용해 및 mRNA 포획을 수행하였고, 각각의 세포 표지와 연관된 대개 단지 1개의 판독물을 갖는 매우 많은 세포 표지를 관찰하였다. 이것은 마이크로웰 어레이가 단일 세포로부터의 mRNA의 혼성화를 동일한 웰 내의 비드로 한정하는데 효과적이었음을 입증한다.

[0589] 각각의 768개 단일 세포의 유전자 발현 프로파일을 주요 성분 분석 (PCA)을 이용하여 군집화하였다 (도 31a). 제1 주요 성분 (PC)은 단일 세포를 세포 유형에 기반한 2개의 주요 클러스터로 명백하게 분리하였다. 제1 주요 성분의 양의 측면에 기여한 유전자는 라모스에 특이적인 것인 한편, 동일한 주요 성분의 음의 측면에 기여한 유전자는 K562에 특이적인 것이었다. 특이적 발현에 기반하여 집단으로 세포를 성공적으로 군집화하는 것은 웰내 오염이 존재하더라도 무시가능함을 보여주었다. 제2 주요 성분은 K562 세포 내의 태아 헤모글로빈 (HBG1)의 고도의 가변성을 강조하였고, 이것은 이전에 관찰되었다 (7).

[0590] <표 18>

유전자	외부 프라이머	공통적인 5' 플랭킹 서열을 갖는 네스티드 프라이머
CD41	CCCCTGGAAGAAGATGATGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTCCAACAAGTTGCCTCC
GYPD	GAGGAAATGAAGCCAAACACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAATCGTGACCTTAAAGGCCC
GATA1	TTAGCCACCTCATGCCTTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTACTGTGGTGGCTCCGCT
GATA2	GGAGGAGGATTGTGCTGATG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTCCGCATAAGAAAAAGAATC
HBG1	GCAAGAAGGTGCTGACTTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGCATGTGGATCCTGAGAA
CD27	CTGCAGTCCCATCCTCTTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATGAGGTGGAGAGTGGGAA
IGJ	GGACATAACAGACTTGGAAGCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAATCCATTTTGTAACTGAACCTT
TCL1A	AAGCCTCTGGGTCAGTGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAAAAGGGATAGAGGTTGG
CD74	TAGACAGATCCCCGTTCCTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAGGGAGAAGGGATAACCC
SEPT9	CAGCATCCCAGCCTTGAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTCAATGGCCTTTTGCTAC
CD79a	CCTCTAAACTGCCCCACCTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTAATCGCTGCCTCTAGG
GAPDH	CACATGGCCUCCAAGGAGUAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAAGAGCACAAGAGGAA

[0591]

[0592] 또 다른 실험에서, 본 발명자들은 라모스 (버킷 림프종) 세포를 수 백분율로 건강한 개체로부터의 일차 B 세포내로 스파이킹하였다. 111개 유전자의 패널 (표 22)을 B 세포의 상이한 상태를 나타내도록 설계하였다. 1198개의 단일 세포를 분석하였다. 18개의 단일 세포로 이루어진 작은 군의 집단 (집단의 ~1.5%)은 나머지에 비해 별개의 유전자 발현 패턴을 갖는 것으로 밝혀졌다 (도 31b). 상기 군에 의해 우세하게 발현된 유전자는 버킷 림프종, 예컨대 MYC 및 IgM, 및 버킷 림프종이 기원하는 B 세포의 하위세트인 여포 B 세포에 의해 특이적으로 발현된 B 세포 분화 마커 (CD10, CD20, CD22, BCL6)와 연관된 것으로 알려져 있다 (도 31c 및 도 31d). 또한, 상기 군의 세포는 보다 높은 수준의 CCND3 및 GAPDH뿐만 아니라, 분자 인덱스를 분석하는 것에 기반하여 검출된 특유한 mRNA 분자의 총수에 의해 결정할 때 전체 보다 높은 mRNA 함량을 보유하였다 (도 31b). 상기 발견은 림프종 세포가 정상 개체의 일차 B 세포보다 물리적으로 더 크고, 빠르게 증식하고 보다 다량의 전사체를 생산한다는 사실과 일치하였다.

[0593] *인간 PBMC에서 다수의 세포 유형의 동시 확인*

[0594] 제어된 실험은 2가지 별개의 세포 유형의 인공 혼합물을 포함하지만, 대부분의 천연 발생하는 생물학적 샘플은 유전자 발현 프로파일에서 보다 미세한 차이를 갖는 수많은 세포 유형 및 상태를 갖는 다양한 집단을 함유한다. 유명한 예는 혈액이다. 본 발명자들은 각각의 주요 세포 유형에 특이적인 98개 유전자의 패널 (표 19)의 발현 프로파일을 측정함으로써, 단핵구, NK 세포, 및 상이한 T 및 B 세포 하위세트를 포함한 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 내의 모든 주요 세포 유형을 동시에 확인하는 것을 목표로 하는 실험을 수행하였다. 대부분 표면 단백질 마커에 제한되는 전통적인 면역표현형 결정과는 달리, 본 발명자들은 표면 단백질에 추가로, 다양한 세포 기능의 시토카인, 전사 인자, 및 세포내 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하였다. 본 발명자들은 PCA를 이용하여, 존재하는 81개 유전자를 사용하여 632개의 단일 PBMC의 디지털 유전자 발현 프로파일을 분석하였다 (도 32-39). 제1 주요 성분은 1개의 클러스터 내에서 CD16a, CD14, S100A12, 및 CCR2의 발현, 및 다른 클러스터 내에서 림프구 연관 유전자의 발현에 의해 증명된 바와 같이, 단핵구 및 림프구를 2개의 직교 (orthogonal) 클러스터로 명백하게 분리하였다. 림프구의 상이한 아형은 제2 주요 성분을 따라 연속체로 놓이고, 여기서 B 세포 (IgM, IgD, TCL1A, CD20, CD24, PAX5를 발현하는)는 하나의 단부에, 나이브 T 세포 (CD4, CCR7, CD62L을 발현하는)는 중간에, 세포독성 T 세포 (CD8A, CD8B, EOMES, PRF1을 발현하는)는 다른 단부에 놓인다. 살해-유사 이뮤노글로불린 수용체, CD16a, 및 퍼포린 (PRF1)를 발현하는 자연 살해 세포는 단핵구 및 세포독성 T 세포 사이의 공간에 놓인다. 본 발명자들은 또한 세포 대사의 표시자인 GAPDH가 단핵구 내에서 최고 수준으로, 및 아마도 대부분 휴지기인 B 세포에서 최저로 발현됨을 관찰하였다. 세포를 가로질러 유전자 발현 프로파일의 상관성 분석은 PCA를 사용한 관찰을 반복하였고, 각각의 주요 세포 유형 내에 추가의 더 작은 하위세트의 세포를 밝혀냈다 (도 40a-b). 731개의 세포를 사용한 동일한 PBMC 샘플의 반복 실험으로 대체로 유사한 분리 및 세포 유형 빈도를 얻었다 (도 41).

[0595] <표 22>

유전자	외부 프라이머	공통적인 5' 플랭킹 서열을 갖는 네스티드 프라이머
CD19	GCAGGGTCCCAGTCCTATG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAATCATGAGGAAGATGCA
CD27	TCCAGGAGGATTACCGAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATCCAAGGGAGAGTGAGA
CD138	AATGGCAAAGGAAGGTGGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGACACCTTGGACATCCT
CD38	AGATCTGAGCCAGTCGCTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGCAGAGCTGAAGATTTT
CD24	AAAAGTGGGCTTGATTCTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGTTCGCATGGTCACAC
CD10	ATATTCCTTTGGGCCTCTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGTTTGGGTCTGTGCTG
CD95	CCCCCGAAAATGTTCAATAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTCTTGTCATACCCCCA
CD21	TAGCTTCCTCCTCTGGTGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGCCTTTCCATAATCACTCA
CXCR3	CTGGCTCTCCCCAATATCCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCTGAGGACTGCACCATT
CD40	GTGGTGTTGGGGTATGGTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATACACAGATGCCCATTGCA
CD69	AGACAGGTCCTTTTCGATGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCAATATGTGATGTGGC
CD1c	TTGAGACAGGCACATACAGCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCTTCCTCAATCTGTCCA
IL10	CCCCAACCACTTCATTCTTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAATTCCTCTGGGAATGTT

[0596]

IL4R	TGCCTAGAGGTGCTCATTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTGATGCTGGAGGCAGAAT
IL21R	AGCCTGGGTCACAGATCAAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTAGGAGGGTGGATGGAG
IL6R	CCAGCACCAGGGAGTTTCTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAAAGGATTGGAACAGCA
CXCL12	GGGTTTCAGGTTCCAATCAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTAACTTTTTGCAAGGCA
CCL3	GTGAGGAGTGGGTCCAGAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTGGGGAGGAGCAGGAG
CCL14	CCATTCCCTTCTTCCTCCTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCTACAAGATCCCGCGTC
CCL20	TTGGACATAGCCCAAGAACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCCTCACTGGACTTGTC
CCL18	ACCTGAAGCTGAATGCCTGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGAGGCCACCTCTTCTAA
TCL1A	GGTAAACACGCCTGCAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGACTCAGAAGCCTCTGG
TACI	CAACAAAGCACAGTGTTAAATGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTCAGCTACTGCGGAAA
AICDA	TGAGCAGATCCACAGGAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAATGGAGTCTCAAAGCTTCA
FCRL4	TCCCAACTACGCTGATTTGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACCAAAAGGAATGTGTGGG
BCL2	TGCAAGAGTGACAGTGGATTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAACCAAGGTTTGCTTTTGT
FASLG	AGAGGCTGAAAGAGGCCAAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAATATGGGTTGCATTTGGTCA
BCL6	AAATCTGCAGAAGGAAAAATGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTTTTCAATGATGGGCGAG
AURKB	GCTCAAGGGAGAGCTGAAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACCTGCCCCCAGAGAT
CD81	GTGGCGTGTATGAGTGGAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTCGCCCAGAGACTCAG
CD80	GCACATCTCATGGCAGCTAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTTCACAAACCTTGCTCCT
CD23a	ACATTTTCTGCCACCCAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACAGCACCCTCTCCAGATG
CD44	GCCTGGTAGAATTGGCTTTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGTAGCCAACATTCATTCAA
LEF1	CAATTGGCAGCCCTATTTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTCAGCAGACTGGTTTGCA
CXCR5	CCGTGAGGATGTCACTCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGAGGAAGCCCTAAGACGT
PRKCB	TTGAGCCTGGGGTGTAAGAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCTTCCAGGATTCACGGTG
PRKCD	GAGCACCTCCTGGAAGATTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAAGCACCAGTGGGACTGTG
CD20	TAGGAGCAGGCCTGAGAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTCCTCTCCAAACCCATG
CD30	TGTTTTGGGGAAAGTTGGAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTTTGCCCAGTGTTTGTG
CD30L	TGCAACCCAACTGTGTGTTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTCACCAACTGTTCTCTGAGC
BAFFR	GCCCTGAGCAACAATAGCAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAGCTCTTCACTCCAGCA
CMRF-35H	AGGAAAAGATGTGGCTCACG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAGTTGGGGAGAACTGTCA
PRDM1	TCGAATAATCCAGGGAAACC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAAAGCATCACGTTGACA
HLA-DRA	GGCTTTACAAAGCTGGCAAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATGCCTCTTCGATTGCTCC
GNAI2	CCTTGAGTGTGTCTGCGTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACAGAATTGGGTTCCAAG
RGS1	AACTGGGAAGGCCAGGTAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTTTTCAAATTGCCATTGC
CD5	CTTTCTCCACGCCATTTGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTAGGATATGGGGTGGGCT
CD22	GGGATCTGCTCGTCATCATT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTCTGCCTCTGAGGGAAA
PIK3CD	GCGTGCGCGTTATTTATTTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTCTGGGGAAGGCAAGTTA
DOCK8	GCAGTCAGCCAGAAATCACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTCTCCTCTCTGGGACCA
CD11b	TGAAAAGTCTCCCTTTCCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTCAGACAGATTCCAGGC
FCGR2B	GGAGAGGAGAGATGGGGATT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTGAGTGCCCCTTTTCTT
CD72	CTCATGCCAACAAGAACCTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGACCCACACCTGACACTTC
BCL11B	TCGTGGAACACAGGCAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCATTTGTACTGGCAAGG
CD86	TCAAGGCAACCAGAGGAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTAAGGGATGGGGCAGTCT
TBX21	ACCTTTTCGTTGGCATGTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAGGGAAAGGACTCACCTG
FOXP1	ATGCTGAAGGCATTTCTTGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTGAGCATGGTGCTTCAT
MCL1	GAGGGGAGTGGTGGGTTTAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAAAGGGAAAGGGAGGATT
IFNB1	AGGGGAAAACTCATGAGCAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACTGTGCCTGGACCATAG
BLNK	TTGGGCAGAAAGAAAAATGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAAAGATTCCACCAGACTGAA

[0597]

CD40LG	CCTCCCCCAGTCTCTCTTCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTCAGGCCGTTGCTAGTC
IGBP1	GGCTGATCTTCCCACAACAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGAGGGCAAAGATGCTAAA
IRF4	ATTCCCGTGTTGCTTCAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAACTGCCAGCAGGTAGGA
CD79a	CACTTCCCTGGGACATTCTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACTCTTCTCCAGGCCAG
LTA	TGATGTCTGTCTGGCTGAGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACACACAGAGGAAGAGCA
HDAC5	CCAGCCTGTAGGAAACCAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCCTTCTATCTCCAGGGCC
RAG1	GGATGCAGGTGGTTTTTGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATTGTACCCATTTTACATTTTCTT
RAG2	CAAACCTTAAACACCCAGAAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATAACAATTCGGCAGTTGGC
CD1d	GAACCAGTTTCCTCCTGTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGATGTGGAGGCTGTTGCT
TGFB1	GACTGCGGATCTCTGTGTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCACTATTCCTTTGCCC
CD9	TCAGTATGATCTTGTGCTGTGCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCCATGAAGATTGGTGGG
CD11c	CACAGCATGAGAGGCTCTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCAGTTCCGATTTCCCAG
FOXP3	TCAGGATCTGAGGTCCCAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACCTGTGTATCTCACGCA
LAG3	AGAGCTGTCTAGCCCAGGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGTCCTTTCTCTGCTCC
CD73	CTTAACGTGGGAGTGGAACC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTGCAAATGGCAGCTAGA
CD70	TCTCAGCTTCCACCAAGGTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACTGGGACACTTTTGCCT
CCR7	CAGGGGAGAGTGTGGTGTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACATGCACTCAGCTCTTGG
CD45RA	TGCATAGTTCCCATGTTAAATCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGAATGGATGTCGCT
PDCD1	ACATCCTACGGTCCCAAGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGAAGTGCAGGCACCTA
MYC	TGCATGATCAAATGCAACCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGGACTTTGGGCATAAAAGA
CD25	AAATCACGGCAGTTTTCAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCATCTGTGCACTCTCCCC
FCAMR	GTGGGAAGAGAAGCTGATGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGCATTATCCACGTCCA
CCND2	TGTGATGCCATATCAAGTCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAGTGTATGCGAAAAGGTTTTT
MKI67	AGCCTCTCTTGGGCTTTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTTCCCTGCCTGGAACTT
CCND3	CTTTGCTGCTGAAGGCTCAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAAGTGGTGGTAACCCTGG
IL12A	TGCTTCCTAAAAAGCGAGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAACTAGGGAGGGGGAAAGA
IFNG	GCAGCCAACCTAAGCAAGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCAGTTACTGCCGGTTTG
TNFA	GAATGCTGCAGGACTTGAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTCCTTGAGACACGGAGC
IL2	ACCCAGGGACTTAATCAGCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGATGAGACAGCAACCATT
IL4	GACATCTTTGCTGCCTCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAGAAGGACACTCGCTGC
IL6	TTAAGGAGTTCCTGCAGTCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCACTGGGCACAGAACTTA
BAFF	TCCTTCGCTTTGCTTGTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTGGAAAAATAGATGCCAGTC
IGHE	CCCGGAAGTCTATGCGTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGACATCTCGGTGCAGTG
IGHD	TGTGTGAGGTGTCTGGCTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAGCACCACGTTCTGG
IGHM	CCCGGAGAAGTATGTGACCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTACTTCGCCCACAGCATC
IGHA	CTGAACGAGCTGGTGACG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTACCTGACTTGGGCATCC
IGHG1	CAAGGGCCCATCGGTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTGACAAAACTCACACATGC
IGHG4	CAAGGGCCCATCGGTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAATATGGTCCCCCATGC
IGHG2	CAAGGGCCCATCGGTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAAATGTTGTGTCGAGTGC
IGHG3	CAAGGGCCCATCGGTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCCCACTTGGTGACACAAC
TLR1	CCATTCCGCAGTACTCCATT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGAAAAGAGCAAACGTGG
TLR2	TTGGTTGACTTCATGGATGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAACAGCACAAATGAACTTAA
TLR3	CATCATGCAGTTCAACAAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGCACTCTGTTTGCGAAGA
TLR4	GGGTGTGTTTCCATGTCTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGAAAGTGTGTGTGTCCGC
TLR5	TCAGGCTGTTGCATGAAGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTATGCCCTTGCTGGACCTA
TLR6	ATGCGCAGTAAAAACTCGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACAGTTCCACGCTGAGCTG
TLR7	GCCTGTACTTTCAGCTGGGTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGTGTTTGTGCCATTTGG
TLR8	GGTGAGCTCTGATTGCTTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATCAGGAGGCAGGGATCAC

[0598]

TLR9	GACCGGGTCAGTGGTCTCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATCCTGAGCCCTGAC
TLR10	TGCAGTGAGCTGAGATCGAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGAAAACATCCTCATGGC
GAPDH	CACATGGCCUCCAAGGAGUAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAAGAGCACAAGAGGAA

[0599]

[0600] <표 19>

유전자	외부 프라이머	공통적인 5' 플랭킹 서열을 갖는 네스티드 프라이머
CD19	GCAGGGTCCCAGTCCTATG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAATCATGAGGAAGATGCA
CD20	TAGGAGCAGGCCTGAGAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTCCTCTCCAAACCCATG
BAFF	TCCTTCGCTTTGCTTGTCTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTGGAAAAATAGATGCCAGTC
TCL1A	GGTAAACACGCCTGCAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGACTCAGAAGCCTCTGG
TACI	CAACAAAGCACAGTGTTAAATGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTCAGCTACTGCGGAAA
IGHD	TGTGTGAGGTGTCTGGCTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAGCACCACGTTCTGG
IGHM	CCCGGAGAAGTATGTGACCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTACTTCGCCCACAGCATC
CD27	TCCAGGAGGATTACCGAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATCCAAGGGAGAGTGAGA
CD38	AGATCTGAGCCAGTCGCTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGCAGAGCTGAAGATTTT
CD24	AAAAGTGGGCTTGATTCTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGTTCGCATGGTCACAC
AICDA	TGAGCAGATCCACAGGAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAATGGAGTCTCAAAGCTTCA
CD95	CCCCCGAAAATGTTCAATAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTCTTGTCATACCCCCA
CD10	ATATTCCTTTGGGCCTCTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGTTTGGGTCTGTGCTG
IL10	CCCCAACCACTTCATTCTTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAATTCCTCTGGGAATGTT
CD138	AATGGCAAAGGAAGGTGGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGACACCTTGGACATCCT
CD45RA	TGCATAGTTCCCATGTTAAATCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGAATGGATGTCGCT
BCL6	AAATCTGCAGAAGGAAAAATGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTTTTCAATGATGGGCGAG
PRDM1	TCGAATAATCCAGGGAAACC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAAAGCATCACGTTGACA
CXCR3	CTGGCTCTCCCCAATATCCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCTGAGGACTGCACCATT
IFNG	GCAGCCAACCTAAGCAAGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCAGTTACTGCCGGTTTG
IL4R	TGCCTAGAGGTGCTCATTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTGATGCTGGAGGCAGAAT
IL4	GACATCTTTGCTGCCTCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAGAAGGACACTCGCTGC
CCL20	TTGGACATAGCCCAAGAACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCCTCACTGGACTTGTC
CD25	AAATCACGGCAGTTTTCAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCATCTGTGCACTCTCCCC
FOXP1	ATGCTGAAGGCATTTCTTGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTGAGCATGGTGCTTCAT
TGFB1	GACTGCGGATCTCTGTGTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCACTATTCCTTTGCCC
CXCR5	CCGTGAGGATGTCACTCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGAGGAAGCCCTAAGACGT
CD69	AGACAGGTCCTTTTCGATGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCAATATGTGATGTGGC
CD30	TGTTTTGGGGAAAGTTGGAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTTTGCCCAGTGTTTGTG
PDCD1	ACATCCTACGGTCCCAAGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGAAGTGCAGGCACCTA
LAG3	AGAGCTGTCTAGCCCAGGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGTCCTTTCTCTGCTCC
PAX5	TGACGTGTGTTGCTTTTGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGGGAGAAAACAGGGGT
TNFRSF17	GCTTTCCACTCCCAGCTATG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTTTGAGTGCTACGGAGA
RASD1	GGGGGAGGGATGTGAAGTTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCTTGTCTGTGATTCCGGG
AMPD1	ACAGATGACCCAATGCAATTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGCACCTGTGATATGTGCG
OSBPL5	AGACCGATGCACAGTCTTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTCACGTCTGGCCTCAGTC
CD56	GGAGCACTCAAGTGTGACGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTCTATGGAGCCTTCCGA
IGFBP7	CATCCAATTCCCAAGGACAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGAAGGTGCCGAGCTATA
KIR2DS5	GCTCTTCCTCAAACCACGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACACTCCTTTGCTTAGCCC
KIR2DS2	TCCTCACACCACGAATCTGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTCCTTTGCTTAGCCCAC
RAB4B	CCAGCTCACCTGTTCTCCAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAATCCCGTACCTGCTGCT
CD14	CTAAAGGACTGCCAGCCAAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATAACCTGACACTGGACGGG

[0601]

S100A12	CACATTCCTGTGCATTGAGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATACTCAGTTCGGAAGGGGC
CCR2variantB	GAAGGAGGGAGACATGAGCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTGGTCCTTAGCCCCATCT
CD62L	TCAGTTGGCTGACTTCCACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTAGTTTGGGGGTTTTGCTG
CD16	TCTTGGCCAGGGTAGTAAGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCAGTTCCAATGAGGTGGG
CX3CR1	CGTCCAGACCTTGTTCACAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACAAATAGTGCTCGCTTTC
CD1b	TAGAGGGCCAGGACATCATC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCTCCTTTTGCTATGCCT
FOXQ1	TGCTATTGACCGATGCTTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAACGGGCTACAGCTTTAT
CD209	GCTCTTGTTCTTGCCGTTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTCCCTCAGTGGAGCAAG
CD1e	CACAAGCACATTCATCTCTTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATTCAGGGCCAGCTTCATAA
CCL17	TACTTCAAGGGAGCCATTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTAACTGTGCAGGGCAG
DTNA	AGCAACGTGGAGTCAGTCTGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACCTTCTCTTGCCTTGG
CLEC4C	TTATTTTCTGGGGCTGTCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATTCTGGCACTCAGGTGAA
ZBTB16	TGATCAAGCACCTGAGAACG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGTGCACCATCTGCAC
SLAMF1	TGCAAAACCCAGAAGCTAAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTCTGTGCAAATGGCATTC
CD3D	AGAGCTGTGTGGAGCTGGAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAGTCTTCTGCTTTGCTGG
CD3E	GCCCTCTTGCCAGGATATTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATGTAAGTTGTCCCCCAT
CD8A	CTGGCCTCTGCTCAACTAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGTACAAGCAATGCCTGC
CD8B	CAGCCTCAAGGGGAAGGTAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTTAACCCATGGATCCTG
PRF1	CCCTGCAGTCACAGCTACAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAGGGCTGGTCTTTTAGGA
EOMES	TGGGATAATGTAAAACTGGTGCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATCCCCATGATATTTGGGA
CD4	AGCTAGCCTGAGAGGGAACC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTCCAGACCATTCAGGAC
THPOK	GGCTCTGCCTTGCACTATTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCTTCCTCCCTTCCATGC
RUNX3	TAAGGCCCAAAGTGGGTACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGGAAGCACGAGGAAAGGA
CD45RO	ACCCTCTCTCCCTCCCTTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGTTGGCTATGCTGGCATG
CD44	GCCTGGTAGAATTGGCTTTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGTAGCCAACATTCATTCAA
CCR7	CAGGGGAGAGTGTGGTGTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTCAGCTCTTGGCTCCACT
TXK	ACATCAAGCTCCATTGTTTCG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGCCTGCACTCTTTGTAGG
MBD2	GCCTGGCACGTAATAGCTTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAAAGAAATGCCCTTGGT
IFNGR1	GAGGATGTGTGGCATTTTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTTCCTAGGTGAGCAGGTG
IL12RB2	AGCAGGCTGTACACAGCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACACTAGGCACATTGGCTG
IL33R	ACTGTGCCCTCATCCAGAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACGACGCCAAGGTGATACT
CCR4	TGGTGAAATGCAGAGTCAATG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAGGAGGAAGGCTTACACC
CRTH2	TGAATTTTGCTTGGTGGATG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTCAGTGGAAGAAGCAGATG
IL5	CAGTGAGAATGAGGGCCAAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAATGAGGGCCAAGAAAGAG
IL17A	AAAATGAAACCCTCCCCAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTTTGGAGATTAAGGCCC
IL17F	CTGCATCAATGCTCAAGGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAAGGCTGCTCTGTTTCTT
IL21	AAATCAAGCTCCCAAGGTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGAATGACTTGGTCCCTG
IL22	ATGCCCCAAAGCGATTTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAAGGAAACCAATGCCACT
IL23R	TCCCTCATTGAAAGATGCAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGAATCATTAGGCCAGGCG
RORA	TGCAAGCCATTTATGGGAAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTGGGTTTTCTTTTCAATTC
RORC	ATTTCCATGGTGCTCCAGTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAGAAGCAGAAGTCGCTCG
OX40L	CTGCTGGCCCTGTACCTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCCACCCTGGCCAAGAT
ICOS	TTCAGCTGACTTGGACAACCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACAACCTGACTGGCTTTG
SH2D1A	GGGTGTTGGTGAACTTGGTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTAATATGGATGCCGTGGG
CCR2variantA	GTTGCCCAGTGTGTTTCTGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACCAGGCAACTTGGGAACT
TLR1	CCATTCCGCAGTACTCCATT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGAAAAGAGCAAACGTGG
TLR2	TTGGTTGACTTCATGGATGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAACAGCACAAATGAACTTAA
TLR3	CATCATGCAGTTCAACAAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGCACTCTGTTTGCGAAGA

[0602]

TLR4	GGGTGTGTTTCCATGTCTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGAAAGTGTGTGTGTCCGC
TLR5	TCAGGCTGTTGCATGAAGAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTATGCCCTTGCTGGACCTA
TLR6	ATGCGCAGTAAAAACTCGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACAGTTCCACGCTGAGCTG
TLR7	GCCTGTACTTTCAGCTGGGTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGTGTTTGTGCCATTTGG
TLR8	GGTGAGCTCTGATTGCTTCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATCAGGAGGCAGGGATCAC
TLR9	GACCGGGTCAGTGGTCTCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATCCTGAGCCCTGAC
TLR10	TGCAGTGAGCTGAGATCGAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGAAAACATCCTCATGGC
GAPDH	CACATGGCCUCCAAGGAGUAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAAGAGCACAAGAGGAA

[0603]

[0604] *시험관내 자극에 대한 인간 T 세포의 반응의 다양성 연구*

[0605] 벌크 샘플의 유전자 발현 패턴을 조사할 때, 샘플의 세포 조성, 및 각각의 세포 유형 또는 아형 내의 각각의 유전자의 발현 수준 둘 모두가 관찰된 패턴에 기여하였다. 이들 2개의 효과는 벌크 분석에 의해 데컨벌루션(deconvolution)될 수 없지만, 단지 대규모 단일 세포 분석를 사용하여 가능하다. 이를 설명하기 위해, 본 발명자들은 시험관내 자극에 대한 인간 T 세포의 반응의 가변성을 연구하기 위해 본 발명자들의 플랫폼을 이용하였다.

[0606] 본 발명자들은 혈액 공여자로부터 음성 선택에 의해 CD3+ T 세포를 정제하고, 이를 항-CD28/항-CD3 비드로 6시간 동안 자극하고, 자극된 세포 및 비자극 세포의 별개의 분취액을 사용하는 실험을 수행하였다. 본 발명자들은 상이한 T 세포 하위세트에 의해 발현된 표면 단백질, 시토카인, 케모카인, 및 이펙터 분자를 포함하는 93개 유전자의 패널 (표 20)을 설계하였다. 총 3517 및 1478개의 단일 세포를 각각 자극된 샘플 및 비자극 샘플에 대해 분석하였다.

[0607] <표 20>

[0608]

유전자	외부 프라이머	공통적인 5' 플랭킹 서열을 갖는 네스티드 프라이머
GAPDH	GACTTCAACAGCGACACCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCTCAACGACCACTTTGT
CD3D	GAAAACGCATCCTGGACCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGATGTCATTGCCACTCTGCT
CD3E	AAGTTGTCCCCCATCCCAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGGGATGGACTGGGTAAAT
CD8A	ACTGCTGTCCCAAACATGCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGCCTGCCCATTGGAGAGAA
CD8B	CCACCATCTTTGCAGGTTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGTCCAGTTCCCAGAAGG
CD4	CTGGGAGAGGGGGTAGCTAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCACTTCCCTCAGTCCCAA
FOXP3	ACAGAAGCAGCGTCAGTACC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGTCTCTTGAGTCCCGTG
CCR7	GGGGAGAGTGTGGTGTTTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCTTGGCTCCACTGGGATG
CD5	ATCAATGGTCCAAGCCGCAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTCACAGATCTTCCCCCG
IL32	CTTTCCAGTCCTACGGAGCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTCTGAACCCCAATCCTC
CD28	ACCATCACAGGCATGTTCCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTAGATGACCTGGCTTGCC
SELL	GCATCTCATGAGTGCCAAGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCCCCCAGACCTTTTATC
CD27	TGCAGAGCCTTGTCGTTACA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGTGACAGAGTGCCTTTTCG
GZMB	AGGTGAAGATGACAGTGCAGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGCCCTCTTGTGTGTAACA
GZMA	GGAACCATGTGCCAAGTTGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTTGTTGTGCGAGGGTGT
GZMH	AGTGTTGCTGACAGTGCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAAAGAAGACACAGACCGGT
GZMK	TTGCCACAAAGCCTGGAATC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAAGCAACCTTGTCCCGCCT
PRF1	GGAGTCCAGCGAATGACGTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATGGCCACGTTGTCATTGT
NKG2D	CAACACCCAGGGGATCAGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACCCTCCACAGGAAATTG

LAG3	AGCTGTACCAGGGGGAGAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTGGAGAAGACAGTGGCGA
CD160	GGAAGACAGCCAGATCCAGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTGCAGACCAAGAGCACC
CD244	GGGCTGAGAATGAGGCAGTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAAGCGACAAGGGTGAAC
EOMES	ACTTAACAGCTGCAGGGGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTAACTTGAACCGTGTTTAAGG
TBX21	TTATAACCATCAGCCCGCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAAAAGGGGCTGGAAAGGG
PRDM1	ACCAAAGCATCACGTTGACAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACATGTGAATGTTGAGCCCA
IRF4	CTCTTCAGCATCCCCCGTAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCCCAAATGAAAGCTTGA
ZNF683	GGAGAGCGTCCATTCCAGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCACCTGAAGCTGCACC
ZBED2	AATGTACCAGCCAGTCAGCG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTTTTGGTGGAGCTGACGA
CD30	TTTACTCATCGGGCAGCCAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTTTGCCCAGTGTTTGTGC
CD69	GCTGTAGACAGGTCCTTTTCG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTGTTGGAAAATGTGCAATATGTG
HLA-DRA	GGGTCTGGTGGGCATCATTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCTCTTCGATTGCTCCGTA
CD38	AGGTCAATGCCAGAGACGGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCAGCATACCTTTATTGTGATCTATC
TNFRSF9	TGGCATGTGAGTCATTGCTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGATGTGAGGGGCGGAT
MKI67	TACTTTTTCGCCTCCCAGGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTGCCCCACCAAGATCAT
BIRC5	TGCCACGGCCTTTCCTTAAA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTCTAAGTGCAACCGCCT
FOSL1	CTCCTGACAGAAGGTGCCAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATTGGACCAGGCCATT
MCL1	GACTGGCTACGTAGTTCGGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGCTTAGAAGGATGGCGC
MYC	AGCTACGGAACTCTTGTGCG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAACCTTGGCTGAGTCTTGA
TYMS	TCAGTCTTTAGGGGTTGGGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGTGCATTTCAATCCCACGTAC
CDCA7	CCAGTCTAGTTTCTGGGCAGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGTAAACCATTGCTGTGCCATT
UHRF1	CCAGTTCTTCCTGACACCGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAAAGTTTGCAGCCTATACC
SAP30	ACCAACCAGACCAGGACTTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACTAGGAGACGTGGAATTG
CX3CR1	CACCCGTCCAGACCTTGTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTTTTCCTCTTAACGTTAGACCAC
BCL2	TGCAAGAGTGACAGTGGATTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGATATTCTGCAACACTGTACA
BCL6	TGTCCTCACGGTGCCTTTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTAGGCAGACACAGGGACTT
FASLG	CCTCAAGGGGGACTGTCTTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATATCCTGAGCCATCGGT
FAS	ATTGCTGGTAGAGACCCCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCCATTTCCCCGATGT
CCL4	CCCAGCCAGCTGTGGTATTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAACTGAACTGAGCTGCT
IFNG	CTAGGCAGCCAACCTAAGCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCAATCTGAGCCAGTGC
TNF	AGTGGACCTTAGGCCTTCCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTCAGACATGTTTTCCGTG
IL2	TCACTTAAGACCCAGGGACTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGCATCATCTCAACACTGACTT
IL4	ACCATGAGAAGGACACTCGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGGGCTTGAATTCCTGTCCT
IL6	CGGCAAATGTAGCATGGGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAAGTGGCTATGCAGTTTG
IL1A	GGCATCCTCCACAATAGCAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATTTTGGTCCAAGTTGTGC
IL1B	CTTAAAGCCCGCCTGACAGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACATTCTGATGAGCAACCGC
IL3	ACAGACGACTTTGAGCCTCG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATTTCACCTTTTCCTGCGGC
IL13	GGAGCCAAGGGTTCAGAGAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTACCTCACTGGGGTCCT
IL31	GGCCATCTCTTCCTTTCGGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTGGGAACTCTGCCGTG
IL24	CTCACCCCATCATCCCTTTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCAGTGAGACTGTGTTGT
IL26	TACTGACGGCATGTTAGGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTGTGGAGTGGGATGTG
LTA	AGGCAGGGAGGGGACTATTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAGAAACAGAGACAGGCCC
IL5	GCAGTGAGAATGAGGGCCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGCATACTGACACTTTGCC
CSF2	AGCCAGTCCAGGAGTGAGAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCCACACTGACCCTGATAC
IL21	CCCAAGGTCAAGATCGCCAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGCCAGCTCCAGAAGATGT
IL22	TGGGAAGCCAAACTCCATCAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAACCAATGCCACTTTTGT
IL17A	GCCTTCAAGACTGAACACCGA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCCTCAGAGATCAACAGAC
IL17F	TTGGAGAAGGTGCTGGTGAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTACCCAGTGCTCTGCAAC

[0609]

TGFB1	TATTCCTTTGCCCGGCATCA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCTTGGGCACTGTTGAAGT
CCL20	ACTTGCACATCATGGAGGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCATAAGCTATTTTGGTTTAGTGC
IL12A	GGTCCCTCCAAACCGTTGTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAACTAGGGAGGGGGAAAGAAG
CXCL12	TGGGAGTTGATCGCCTTTCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCATTCTGAAGGAGCCCCAT
CCL3	TGGACTGGTTGTTGCCAAAC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCTGAGAGTTCCCCTGTCC
CCL14	TTCCTCCTCATCACCATCGC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTACCACCCCTCAGAGTGC
CCL18	GAAGCTGAATGCCTGAGGGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCCCATCTGCTATGCCCA
CCL17	GAGTGCTGCCTGGAGTACTT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACCCCAGACTCCTGACT
IL12B	GCTATGGTGAGCCGTGATTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTCACCCCCACCTCTCTA
CXCR3	GACCTCAGAGGCCTCCTACT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAATATCCTCGCTCCCGG
IL33R	TTCAGGACTCCCTCCAGCAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTACCAAATGCCTGTGCC
IL4R	TGAACTTCAGGGAGGGTGGT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTCGTATGCATGGAACCC
CCR4	CCAAAGGGAAGAGTGCAGGG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATTCTGTATAACACTCATATCTTTGCC
IL23R	AGAATCATTAGGCCAGGCGTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGCCAATATGCTGAAACCC
IL21R	ATTTGAGGCTGCAGTGAGCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACAAGAGCTGGCTCACCT
CXCR5	CCTCCCCAGCCTTTGATCAG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCTCGCAAGCTGGGTAATC
IL6R	CCAGCACCAGGGAGTTTCTA	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAGCATGTCACAAGGCTGT
CXCL13	AGGCAGATGGAACTTGAGCC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATTCGAAGATCCCCAGACTT
LIF	TCCCCATCGTCCTCCTTGTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCCGGCTCTCCAGAGTA
PTPRCv1 (CD45RA)	GTTCCCATGTTAAATCCCATTCAT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGAATGGATGTCGCTAATCA
PTPRCv2 (CD45RO)	ACCCTCTCTCCCTCCCTTTC	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGTTGGCTATGCTGGCATG
IL10	CCCCAACCACTTCATTCTTG	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAATTCCTCTGGGAATGTT
CD40LG	CCTCCCCCAGTCTCTCTTCT	CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTCAGGCCGTTGCTAGTC

[0610]

[0611] 비자극 샘플에서, PCA 분석으로 세포의 2가지 주요 하위세트를 밝혔다. 각각의 하위세트 내에 풍부화된 유전자에 대한 보다 밀접한 관찰은 하나의 하위세트가 CD8A, CD8B, NKG2D, GZMA, GZMH, GZMK, 및 EOMES을 발현하는 CD8+ 세포를 나타내고, 다른 하위세트는 CD4, CCR7 및 SELL을 발현하는 CD4+ 세포를 나타냄을 보여주었다 (도 44a 및 도 45).

[0612] 자극된 샘플에서, 세포의 2개의 분지는 PCA 도면에서 바로 명백하였다 (도 44b 및 도 46a-d). 제1 주요 성분은 IFNG, TNF, CD69, 및 GAPDH의 다양한 발현 수준의 측면에서 자극체에 대한 개별 세포의 반응의 정도를 나타냈다. 세포독성 T 세포와 연관된 시토카인 및 이펙터 분자인 CCL3, CCL4, 및 GZMB, 및 소모된 세포와 연관된 마커인 LAG3의 발현이 상부 분지 내의 세포에 편재하였다. 헬퍼 T 세포와 연관된 시토카인인 IL2, LTA, CD40LG, 및 CCL20의 발현은 하부 분지에 편재하였다. ZBED2, IL4R, PRDM1, TBX21, MYC, FOSL1, CSF2, TNFRSF9, BCL2 및 FASLG를 비롯한 활성화된 T 세포에서 상향조절되는 것으로 알려진 다른 유전자는 보다 적은 수의 세포에서 다양한 정도로 발현되었다 (도 46a-d). 대부분의 이들 시토카인, 이펙터 분자, 및 전사 인자는 비자극 샘플 내의 세포에 의해 발현되지 않거나 매우 낮은 수준으로 발현되었다. 상기 짧은 자극 기간 내에 반응한 대부분의 세포는 기억 세포로 추정되지만, 본 발명자들은 세포의 작은 집단이 보다 낮은 수준의 IL2를 생산하지만 다른 시토카인이나 이펙터 분자는 생산하지 않고, 나이브 세포를 나타낼 수 있음을 관찰하였다 (도 44b, 화살표).

[0613] 반응의 불균일성을 충분히 이해하기 위해, 본 발명자들은 쌍별 상관 계수에 기초하여 세포를 군집화하였다. CD4 및 CD8 세포의 2개의 주요 군은 명백한 반면, 활성화된 발현된 유전자의 조합 및 수준의 측면에서 각각의 세트 내에 상당한 다양성이 존재하였다 (도 47 및 도 48).

[0614] 본 발명자들은 비자극 샘플에 비해, 전체로서 자극된 샘플에서 수백 배 이상 상향조절된 몇 개의 시토카인, 즉, IL4, IL5, IL13, IL17F, IL22, L1F, IL3, 및 IL21이 존재하지만, 이것은 단지 샘플 내의 소수의 세포에 의해서만 이루어진 것임을 관찰하였다 (도 44c). 이들 시토카인의 하위세트는 동일한 세포에 의해 발현되었다 (도 49a-c). 예를 들어, 동일한 단일 세포가 Th17 세포에 대한 시그너쳐인 IL17F 및 IL22의 계수의 대부분에 기여하였다. 또 다른 7개의 세포는 Th2 세포의 시그너쳐인 IL4, IL5, IL13의 다양한 조합을 발현하였고, 이들의 다양한 조합을 발현하였다. 상기 관찰은 특히 전체 발현 변화에 대한 기여가 희귀 하위집단으로부터 유래될 때, 대규모 단일 세포 분석의 중요성을 강조한다.

[0615] 본 발명자들은 제2 혈액 공여자로부터 T 세포를 사용하여 동일한 자극 실험을 반복하였고, 자극된 샘플 및 비자극 샘플 내에서 각각 669개 및 595개의 단일 세포의 프로파일을 분석하였다. 총 활성화 수준은 상기 개체에서

더 낮지만 (발현의 변화 측면에서 더 작은 규모) (가능하게는 자극에 대한 개체간 가변성을 나타냄), 본 발명자들은 PCA 분석에서와 동일한 경향, 및 자극에 대한 개별 세포 반응의 불균일성을 관찰하였다 (도 48).

[0616] *희귀 항원 특이적 T 세포의 확인*

[0617] 본 발명자들은 CD8+ T 세포 집단에서 항원 특이적 세포의 모델을 사용하여 희귀 세포를 확인하기 위한 본 발명자들의 플랫폼의 유용성을 입증하였다. 본 발명자들은 사이토메갈로바이러스 (CMV)에 대해 혈청 반응 양성인 동일한 2명의 혈액 공여자의 신선한 혈액을 CMV pp65 펩티드 풀에 노출시켰다. 각각의 공여자의 별개의 비처리된 혈액 분취액을 음성 대조군으로서 사용하였다. 본 발명자들은 후속적으로 CD8+ T 세포를 단리하고, 본 발명의 플랫폼 상에서 자극된 세포 및 비자극 세포의 반응을 분석하였다. 본 발명자들은 공여자 2의 CMV 자극된 샘플 및 비자극 샘플, 및 공여자 1의 CMV 자극된 샘플 및 비자극 샘플 내의 각각 2274, 2337, 581, 및 253개 세포로부터 데이타를 얻었다.

[0618] 비교적 소수의 세포를 생성하여 군집화 분석에서 명백한 클러스터를 형성하는 공여자 1의 음성 대조군을 제외하고, 나머지 모든 샘플은 2개의 주요 세포군을 보여주었다 (도 50a, 51 및 52). 하나의 군의 세포는 나이브 세포 및 중심 기억 연관 마커 SELL, CCR7 및 CD27를 발현하는 한편, 다른 군의 세포는 이펙터 기억 세포 (CCL4, CX3CR1, CXCR3) 및 이펙터 세포 연관 유전자 (EOMES, GZMA, GZMB, GZMH, TBX21, ZNF683)를 발현하였다. 2개의 분지 사이의 공간을 점유하고 그랜자임 K (GZMK)를 발현하는 세포의 별개의 작은 하위세트, 및 HLA-DRA 발현 세포의 또 다른 하위세트가 존재하였다. 상이한 유형의 그랜자임의 차별적인 발현은 이전에 보고되었다 (8). 본 발명자들의 결과는 CD8+ T 세포를 사용하는 이전의 CyTOF 실험에서 관찰된 것을 개괄하였다 (9).

[0619] 상당한 비율의 세포가 CD69 및 MYC 발현을 통해 항원에의 노출에 반응하는 것으로 보였지만 (도 52), 본 발명자들은 활성화된 항원 특이적 세포에 대한 시그너쳐 시토카인인 IFNG를 발현한 단지 몇 개의 세포만을 발견하였다. IFNG를 발현하는 대부분의 세포는 또한 활성 세포 상태의 표시인, 유전자 패널 내의 대부분의 총 검출된 전사체 분자를 보유한 세포들 사이에 존재하고, 이펙터 기억/이펙터 세포 클러스터에 속한다 (도 50b 및 53). 본 발명자들은 공여자 1 및 2에서 각각, 581개의 세포 중 5개 (0.86%) 및 2274개의 세포 중 2개 (0.09%)의 세포가 IFNG 발현 및 총 전사 수준에 기초하여 CMV 특이적인 것으로 보이는 것을 확인하였다. 이들 세포 중에서, 발현된 이펙터 분자 (예를 들어, 그랜자임) 및 시토카인 (예를 들어, IFNG, IL2, CCL3, CCL4, TNF, CSF2, IL4)의 수준 및 조합의 측면에서 상당한 불균일성이 존재하였다 (도 54). 흥미롭게도, 공여자 2에서 대부분의 전사체를 발현한 단일 세포는 IL6 및 IL1B를 모두 발현하지만, IFNG를 발현하지 않았다.

[0620] *논의*

[0621] 본 실시예에서, 본 발명자들은 단일 세포를 단리하고, 세포 내용물을 특유하게 바코딩하고, 정량 분석을 위해 개별 분자를 바코딩하기 위해 재귀 포아송 (recursive Poisson) 전략을 사용하는, 고도로 규모 확대가능한 mRNA 세포측정법을 제시하였다. 본 발명자들은 수천 개의 세포를 함유하는 샘플 내에서 각각의 세포에 속하는 전사체 분자를 동시에 확인하고 계수할 수 있음을 밝혀냈다. 또한, 본 발명자들은 천연 발생하는 불균일한 시스템 내에서 발현 프로파일, 및 큰 배경 집단 내에서 희귀 세포의 검출에 기초하여 개별 세포를 특성화하기 위한 상기 기술의 용도를 입증하였다.

[0622] CytoSeq의 처리량 및 단순함은 단일 세포의 유전자 발현의 측정에 기반한 서열분석을 위해 마이크로타이터 플레이트 또는 미세유동 칩을 포함하는 기존의 방안에 비해 주요 이점을 제공한다. 실험 절차가 단순하고 세포당 시약 소비가 적기 때문에 (나노리터 범위), 다수 조건을 가로질러 많은 수의 세포에 대한 단일 세포 분석을 쉽게 수행할 수 있도록 한다. 상기 연구 단독에서, 본 발명자들은 기존의 방안에 의해 수행되는 경우에 비용이 많이 들고 시간 소모적인, 12개의 실험에 걸여 총 ~14,600개의 단일 세포의 유전자 발현 프로파일링을 수행하였다. CytoSeq에 의해 측정된 세포의 수는 간단히 마이크로웰 어레이의 크기 및 바코딩된 비드의 라이브러리 크기를 증가시킴으로써 추가로 규모 확대될 수 있고,이것은 조합적 합성에 의해 쉽게 달성된다. 또한, 세포 크기의 균일성에 대한 제한이 없고, 따라서 임의의 사전-분류 없이, 본 실시예에 제시된 PBMC와 같은 다양한 세포 크기 및 형상을 갖는 세포를 함유하는 복잡한 샘플의 직접 분석을 허용한다.

[0623] CytoSeq 데이타는 유동 세포측정법 (FC)의 데이타와 유사하지만 중요한 차이가 있다. 먼저, CytoSeq는 연구된 유전자 생성물의 수 및 유형의 면에서 보다 많은 다능성을 제공한다. 대부분 소수의 표면 단백질에 한정되고 최적 결합 항체를 필요로 하는 유동 세포측정법과는 달리, CytoSeq는 핵산 증폭 기술을 통해 임의의 전사된 mRNA의 측정을 허용하였다. 최적 프라이머 설계 및 검정 조건은 본 발명자들이 100개 또는 그 초과의 유전자의 임의로 선택된 패널에 대해 다중 PCR을 통해 ~88% 매핑 비율을 일상적으로 달성할 수 있도록 한다 (표 21). 추

가로, 샘플 내의 각각의 단일 세포의 트랜스크립톰은 또한 비드 결합 cDNA의 범용 증폭을 통해 측정할 수 있지만, 통상 사용되는 범용 증폭 기술의 비교적 낮은 효율 (7) 및 수천 개의 세포에 걸쳐 트랜스크립톰을 측정하기 위해 요구되는 높은 서열분석 깊이를 유의해야 한다.

[0624] 두 번째로, 항체 결합의 운동학에 의존하는 유동 세포측정법과는 대조적으로, CytoSeq는 분자 인덱싱을 통한 유전자 발현 수준의 디지털 방식의 절대적 판독을 제공한다. 희귀 세포에 특이적인 많은 수의 유전자의 동시-발현에 의해 검출이 달성되기 때문에, 이것은 단일 희귀 세포 사건에 대한 보다 큰 감수성 및 특이성을 갖는다. 따라서, 이것은 게이팅을 위한 신뢰가능한 클러스터를 형성하기 위해 특정 수의 사건을 필요로 하는 유동 세포측정법에 비해 훨씬 더 적은 양의 샘플을 소비한다.

[0625] 본 발명의 데이타는 단일 세포 대 벌크 분석의 중요성을 설명한다. 예를 들어, 본 발명자들은 전체로서 수천 개의 세포의 샘플 내에서 가장 고도로 발현된 유전자에는 단지 하나의 또는 몇 개의 세포가 기여한다는 시나리오를 보여주었다. 가장 중요하게는, 본 발명의 실험은 선행 방안에서 극도로 제한되는 능력인, 단일 세포 유전자 발현 연구에서 많은 수의 세포 및 많은 수의 유전자를 모두 검사하는 중요성을 설명한다. 생물학적 샘플 내의 수천 개의 단일 세포에 걸친 일상적인 발현 측정을 위한 상기 도구의 이용가능성은 복잡한 생물학적 시스템의 이해를 가속화하고 임상 진단에서 신규한 용도, 예컨대 순환 종양 세포 분석 및 면역 반응 모니터링의 수행을 도울 수 있다. 본 발명자들은 본 발명의 대량 동시 단일 세포 바코딩 계획이 암 생물학 및 신경과학과 같은 영역에서 단일 세포 게놈 불안정성을 연구하기 위해, 게놈, 및 게놈 및 트랜스크립톰을 동시에 측정하기 위해 또한 채택될 수 있음을 구상한다.

[0626] <표 21>

실험	판독물의 총 수	패널 내의 유전자에 정확하게 1 매치를 갖는 판독물의 수	패널 내의 하나의 유전자에 정렬된 판독물 %	세포 바코드에 정확한 매치 및 하나의 유전자에 정렬을 갖는 판독물 의 수	유전자 및 바코드 정렬 후의 판독물%	필터링 기준을 만족하는 특유한 세포 바코드의 수	세포 바코드와 연관된 판독물 의 수
K562 + 라모스	2399025	2154454	90%	1175715	49%	768	859470
1차 B+ 라모스	5711013	5203308	91%	3495392	61%	1198	2868577
PBMC	1270214	1105687	87%	803151	63%	632	670576
PBMC 복제물	3927672	3468538	88%	2459367	63%	731	1920956
공여자 1 항CD3/항CD28 자극된	3529898	3249998	92%	2122416	60%	3517	1466000
공여자 1 항CD3/항CD28 음성 대조군	1557996	1292211	83%	939094	60%	1478	719351
공여자 2 항CD3/항CD28 자극된	606865	552877	91%	403943	67%	669	246234
공여자 2 항CD3/항CD28 음성 대조군	332951	283723	85%	205762	62%	595	86866
공여자 1 CMV 자극된	1064648	958410	90%	697057	65%	581	401629
공여자 1 CMV 음성 대조군	619957	547259	88%	406801	66%	253	192605
공여자 2 CMV 자극된	1902977	1692734	89%	1229667	65%	2274	688296
공여자 2 CMV 음성 대조군	1671419	1346637	81%	977344	58%	2337	715453

[0627]

[0628] 비드 라이브러리의 합성

[0629] 비드는 분할-풀 조합적 방안을 이용하여 셀룰라 리서치, 인크. (Cellular Research, Inc.)에서 제조하였다. 간단히 설명하면, 카르복실기로 관능화시킨 20-마이크로미터 자성 비드를 5' 아민에 이어, 범용 서열, 상이한 튜브에 대해 상이한 제1 부분의 세포 표지, 및 링커 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 96개의 튜브 내로 분포시켰다. 올리고뉴클레오티드는 카르보디이미드 화학에 의해 비드 상에 공유 연결되었다. 비드를 모으고, 5' 말단에 제2 링커 서열에 이어, 상이한 튜브에 대해 상이한 제2 부분의 세포 표지, 및 제1 링커에 상보성

서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 제2 세트의 96개의 튜브로 분할시켰다. 비드 상의 올리고뉴클레오티드는 제1 링커를 통해 용액 내의 올리고뉴클레오티드에 혼성화할 때 DNA 폴리머라제에 의해 연장되었다. 비드를 모으고, 5' 말단 상에 올리고(dA)에 이어, 분자 표지로서 역할을 하는 랜도머 서열, 제3 부분의 세포 표지, 및 제2 링커에 상보성 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 함유하는 제3 세트의 96개 튜브로 분할시켰다. 비드 상의 올리고뉴클레오티드는 제2 링커를 통해 용액 내의 올리고뉴클레오티드에 혼성화할 때 DNA 폴리머라제에 의해 연장되었다. 최종 비드 라이브러리의 크기는 96x96x96 (884,736)개 세포 표지이었다.

[0630] 마이크로웰 어레이의 제작

[0631] 마이크로웰 어레이는 표준 포토리소그래피를 이용하여 제작하였다. 기둥 (pillar)의 어레이를 실리콘 웨이퍼 상의 포토레지스트 상에 패터닝하였다. PDMS를 웨이퍼 상에 부어 마이크로웰의 어레이를 생성하였다. 웨이퍼의 복제물은 주형으로서 PDMS 마이크로웰 어레이를 이용하여 NOA63 광학 접착제를 사용하여 제조하였다. 아가로스 (5%, 타입 IX-A, 시그마 (Sigma)) 마이크로웰 어레이를 각각의 실험 전에 NOA63 복제물로부터 주조하였다.

[0632] 샘플 제조

[0633] K562 및 라모스 세포를 10% FBS 및 1x 항생제-항진균제를 갖는 RPMI-1640 내에서 배양하였다. 건강한 공여자로부터 일차 B 세포는 생귄 바이오사이언시즈 (Sanguine Biosciences)로부터 구입하였다. 건강한 공여자로부터 PBMC는 림포프렙 (Lymphoprep) 용액 (스템셀 (StemCell))을 사용하여 스탠포드 블러드 센터 (Stanford Blood Center)로부터 획득한 나트륨 헤파린 튜브 내의 신선한 전혈로부터 단리하였다.

[0634] T 세포 자극

[0635] CMV 혈청 반응 양성인 2명의 혈액 공여자의 헤파린처리 전혈을 스탠포드 블러드 센터로부터 얻었다. CMV 자극을 위해, 1 ml의 전혈을 PBS 내에 희석시킨 CMV pp65 펩티드 풀 (밀테나이이 바이오텍 (Miltenyi Biotec))로 1.8 ㎍/ml의 최종 농도로 6시간 동안 37℃에서 자극하였다. 각각의 공여자의 전혈의 별개의 분취액을 음성 대조군으로서 PBS와 함께 인큐베이팅하였다. CD8+ T 세포를 로제테셉 (RosetteSep) 칵테일 (스템셀)를 이용하여 단리하고, 후속적으로 마이크로웰 어레이 상에 침적시켰다. 항-CD3/항-CD28 자극을 위해, 동일한 2명의 공여자로부터 T 세포를 로제테셉 T 세포 농축 칵테일을 사용하여 전혈로부터 단리하고, 10% FBS 및 1x 항생제-항진균제를 갖는 RPMI-1640 내에 제현탁하였다. 각각의 공여자로부터 하나의 세포 분취액을 다이나비즈 인간 T-액티베이터 (Activator) CD3/CD28 (라이프 테크놀로지스 (Life Technologies))와 함께 ~1:1 비드 대 세포 비에서 37℃에서 6시간 동안 인큐베이팅하였다. 각각의 공여자로부터 별개의 세포 분취액을 자극 없이 인큐베이터에 넣었고, 음성 대조군으로서 역할을 하였다.

[0636] 단일 세포 포획

[0637] 단일 세포 현탁액을 마이크로웰 어레이 상에 10개 마이크로웰당 ~1개 세포의 밀도로 피페팅하였다. 포획되지 않은 세포를 제거하기 위해 세척한 후에, 자성 비드를 웰당 ~5개 비드의 밀도로 로딩하여 마이크로웰 어레이를 포화시켰다. 과잉의 비드를 제거하기 위한 세척한 후에, 냉각 용해 완충제 (0.1 M 트리스-HCl pH 7.5, 0.5 M LiCl, 1% LiSDS, 10 mM EDTA, 5 mM DTT)를 마이크로웰 어레이의 표면 위로 피페팅하였다. 슬라이드 자석 상에서 10분 인큐베이션 후에, 비드를 마이크로웰 어레이로부터 회수하였다. 비드를 미세원심분리 튜브 내로 수집하고, 세척 A 완충제 (0.1 M 트리스-HCl, 0.5 M LiCl, 1 mM EDTA)로 2회, 및 세척 B 완충제 (20 mM 트리스-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 3mM MgCl2)로 1회 세척하였다. 앞으로, 모든 반응을 단일 튜브 내에서 수행하였다.

[0638] cDNA 합성

[0639] 세척한 비드를 혼성화 오븐 내에서 회전자 상에 놓인 미세원심분리 튜브 내에서 40 ㎕ RT 믹스 (1x 제1 가닥 완충제, 1 ㎕ 수퍼라제 억제제, 1 ㎕ 수퍼스크립트 II 또는 수퍼스크립트 III, 3 mM 추가의 MgCl2, 1 mM dNTP, 0.2 ug/㎕ BSA) 내에 온도 50℃에서 50분 동안 (K562 및 라모스 세포를 사용하는 초기 실험을 위해 수퍼스크립트 III를 사용할 때) 또는 42℃에서 90분 동안 (나머지 실험을 위해 수퍼스크립트 II를 사용할 때) 재현탁하였다. 비드를 20 ㎕의 1x ExoI 완충제 내에서 1 ㎕의 ExoI (NEB)로 37℃에서 30분 동안, 및 80℃에서 15분 동안 처리하였다.

[0640] 다중 PCR 및 서열분석

[0641] 각각의 유전자 패널은 프라이머3에 의해 설계된 2개 세트의 유전자 특이적 프라이머를 함유하였다. 세트 내에서 프라이머를 가로질러 최소의 3' 말단 상보성이 존재하도록 PCR 프라이머를 선택하기 위해 맞춤형 MATLAB 스크립트를 기록하였다. 각각의 패널 내의 프라이머를 표 21에 나열한다. 증폭 흐름도를 도 55에 도시한다. 다

음 순환 프로토콜을 이용하여 100 ㎕ 또는 200 ㎕의 부피 내에서 제1 프라이머 세트 내에 50 nM의 각각의 유전자 특이적 프라이머 및 400 nM 범용 프라이머를 사용하여 KAPA 패스트 (Fast) 멀티플렉스 키트를 사용하여 비드 상에서 PCR을 수행하였다: 95℃에서 3 min; 95℃에서 15 s, 60℃에서 60 s, 72℃에서 90s의 15 사이클; 72℃에서 5 min. 자성 비드를 회수하고, 0.7x 앰퓨어 XP를 사용하여 PCR 생성물을 정제하였다. 정제된 생성물의 절반을, 동일한 KAPA 키트 및 순환 프로토콜을 이용하는 제2 프라이머 세트를 사용하는 다음 라운드의 네스티드 PCR을 위해 사용하였다. 0.7x 앰퓨어 XP를 사용한 정제 후에, 생성물의 1/10을 최종 PCR 반응으로 입력하여, 전장 일루미나 어댑터를 부가하였다 (1x KAPA HiFi 레디믹스, 200 nM의 P5, 200 nM의 P7. 95℃ 5 min; 98℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s의 8 사이클; 72℃ 5 min).

[0642] 데이타 분석

[0643] 라이브러리의 서열분석을 샘플당 백육십만개 판독물의 중앙 깊이에서 150x2 bp 화학을 갖는 일루미나 MiSeq 기구 상에서 수행하였다. 서열분석에 의해 세포 표지, 분자 표지, 및 각각의 판독물의 유전자를 밝혔다 (도 55). 각각의 판독물의 유전자의 정렬은 정렬 소프트웨어 'bowtie' (ref)를 이용하여 이루어졌다. 각각의 판독물의 세포 표지 및 분자 표지를 맞춤형 MATLAB 스크립트 사용하여 분석하였다. 판독물을 먼저 세포 표지에 의해, 이어서 유전자 및 분자 표지에 의해 분류하였다. 세포당 유전자당 특유한 분자의 수를 계산하기 위해, 동일한 세포 표지 및 유전자 배정을 갖는 판독물의 분자 표지를 군집화화였다. 1 염기를 초과하는 에디트 (Edit) 거리를 특유한 클러스터로서, 및 따라서 특유한 전사체 분자로서 간주하였다. 각각의 세포의 디지털 유전자 발현 정보를 포함하는 표를 각각의 샘플에 대해 작성하였다 - 표 내의 각각의 행은 특유한 세포 표지를 나타내고, 각각의 열은 유전자를 나타내고, 표 내의 각각의 입력값은 세포 표지당 유전자 내의 특유한 분자의 계수를 나타낸다. 표를 필터링하여, 단지 1회 서열분석된 (즉, 과잉도 = 1) 특유한 분자를 제거하였다. 후속적으로, 10미만의 특유한 분자의 합을 갖는 세포, 또는 패널 내의 4개 또는 그 미만의 유전자의 동시-발현을 갖는 세포를 제거하였다. 이어서, 군집화 분석을 위해 필터링된 표를 사용하였다. 주요 성분 분석 및 계층적 군집화를 MATLAB에서 빌트인 (built-in) 함수를 이용하여 (1의 위계수를 첨가하여) log-전환된 전사체 계수에 대해 수행하였다.

[0644] 실시예 15에 인용된 참조문 (모두 그 전문을 참조로 포함시킨다):

[0645] 1. A. K. Shalek et al., Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. Nature 498, 236 (Jun 13, 2013).

[0646] 2. S. C. Bendall et al., Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. Science 332, 687 (May 6, 2011).

[0647] 3. A. R. Wu et al., Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. Nature methods 11, 41 (Jan, 2014).

[0648] 4. B. Treutlein et al., Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. Nature 509, 371 (May 15, 2014).

[0649] 5. S. Islam et al., Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. Genome research 21, 1160 (Jul, 2011).

[0650] 6. G. K. Fu, J. Hu, P. H. Wang, S. P. Fodor, Counting individual DNA molecules by the stochastic attachment of diverse labels. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 9026 (May 31, 2011).

[0651] 7. G. K. Fu, J. Wilhelmy, D. Stern, H. C. Fan, S. P. Fodor, Digital encoding of cellular mRNAs enabling precise and absolute gene expression measurement by single-molecule counting. Analytical chemistry 86, 2867 (Mar 18, 2014).

[0652] 8. K. Bratke, M. Kuepper, B. Bade, J. C. Virchow, Jr., W. Luttmann, Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. European journal of immunology 35, 2608 (Sep, 2005).

[0653] 9. E. W. Newell, N. Sigal, S. C. Bendall, G. P. Nolan, M. M. Davis, Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8+ T cell phenotypes. Immunity 36, 142 (Jan 27, 2012).

[0654] 실시예 16: 단일 세포 정량 프로토콜의 개발

[0655] 도 56은 샘플 내의 RNA 분자의 정량을 위한 일반적인 작업 흐름을 보여준다. 본 실시예에서, 샘플 내의 RNA 분자의 총수는 단일 세포 내의 RNA 분자의 총수와 동등하였다. 도 56의 단계 1에 제시된 바와 같이, RNA 분자 (110)을 역전사시켜 분자 식별 표지의 세트 (115)를 RNA 분자의 폴리A 테일 영역에 확률적 혼성화시킴으로써 cDNA 분자 (105)를 생성하였다. 분자 식별 표지 (115)는 올리고dT 영역 (120), 표지 영역 (125), 및 범용 PCR 영역 (130)을 포함하였다. 분자 식별 표지의 세트는 960개의 상이한 유형의 표지 영역을 포함하였다.

[0656] *파트 I. RNA 분자의 역전사 및 표지화*

[0657] RNA 샘플은 다음 성분을 혼합함으로써 제조하였다:

[0658]

유전자	RNA 분자의 수
Lys (스파이크-인 대조군)	456
Phe (스파이크-인 대조군)	912
Thr (스파이크-인 대조군)	1824
Dap (스파이크-인 대조군)	6840
Kan (스파이크-인 대조군)	7352
림프구 세포주RNA	10 pg (1세포 당량)
MS2 캐리어 (폴리A 없음)	$6x10^{11}$

[0659] 에펜도르프 튜브 내에 다음과 같은 표지화 믹스를 제조함으로써 RNA 분자를 표지하였다:

[0660]

	양(μL)
RNA샘플	2
ms2 RNA 1μg/μL	1
10mM dNTP	1
960 dT 올리고 풀 (세트#4) 10μM	0.4
물	9.1

[0661] 주: dT 올리고뉴클레오티드 풀 (세트#4)는 분자 식별 표지의 세트를 나타낸다.

[0662] 분자 식별 표지를 65℃에서 5분 동안 인큐베이션에 의해 RNA 분자에 혼성화시켰다. 표지화 믹스를 얼음 상에서 적어도 1분 동안 저장하였다.

[0663] 표지된 RNA 분자를 아래 설명된 바와 같이 역전사 믹스를 첨가하여 역전사시켰다:

[0664]

	양 (μL)
5X 제1 가닥 완충제	4
0.1M DTT	1
수퍼라제 억제제 20u/μL	0.5
수퍼스크립트 III RT	1

[0665] 일단 역전사 믹스를 표지화 믹스 반응액을 함유하는 에펜도르프 튜브에 첨가한 후에, 샘플을 37℃에서 5분 동안 인큐베이팅한 후, 50℃에서 30분 동안 인큐베이팅하고 마지막으로 75℃에서 15분 동안 인큐베이팅함으로써 역전사 반응을 수행하였다. 표지된 RNA 분자의 역전사에 의해 표지된 cDNA 분자 (170)를 생성하였다.

[0666] 일단 RNA 분자를 역전사시키고 표지한 후에, 과잉의 올리고뉴클레오티드를 앰퓨어 비드 정제에 의해 샘플로부터 제거하였다 (도 1의 단계 2). 앰퓨어 비드 정제는 20 ㎕의 앰퓨어 비드를, 역전사되고 표지된 RNA 분자를 함유하는 에펜도르프 튜브에 첨가하고 튜브를 실온에서 5분 동안 인큐베이팅함으로써 수행하였다. 비드를 70% 에탄올로 2회 세척하여 과잉의 올리고뉴클레오티드를 제거하였다. 일단 과잉의 올리고뉴클레오티드를 에탄올 세척에 의해 제거한 후, 20 ㎕의 10 mM 트리스를 비드-결합된 표지된 cDNA 분자를 함유하는 튜브에 첨가하였다.

[0667] 도 56의 단계 3에 제시된 바와 같이, 표지된 cDNA 분자 (170)를 다중 PCR에 의해 증폭시켰다. 표지된 cDNA 분자의 맞춤형 증폭은 맞춤형 전방향 프라이머 (F1, 도 1에서 135) 및 범용 PCR 프라이머 (140)를 사용하여 수행하였다. 표 23은 96개의 상이한 유전자를 증폭시켜 단일 반응 부피 내에서 표지된 앰플리콘 (180)을 생성하기

위해 사용된 96개의 상이한 맞춤형 전방향 프라이머를 나열한다.

[0668] 다중 PCR 반응을 최적화하기 위해, 3가지 다중 PCR 반응 혼합물을 제조하였다. 다중 PCR 반응액 1은 다음과 같이 제조하였다:

	반응액1
	양 (μL)
10X 티타늄	5
10mM dNTP	1.5
물	35.5
1μM 각각의 F1 프라이머 풀	5
PCR004 10μM	1
정제된 cDNA	1
티타늄 폴리머라제	1

[0669]

[0670] 다중 PCR 반응을 위한 반응 조건은 94℃에서 2 min의 1 사이클, 이어서 94℃에서 30 sec, 57℃에서 60 sec, 및 68℃에서 1 min의 25 사이클, 이어서 68℃에서 7 min의 1 사이클 및 4℃에서 1 유지 사이클이었다.

[0671] 다중 PCR 반응액 2 및 3은 다음과 같이 제조하였다:

	반응액 2	반응액 3
	양 (μL)	양 (μL)
2X 퀴아젠 다중 믹스	25	25
1μM 각각의 F1 프라이머 풀	5	5
PCR004 10μM	1	1
Q 용액		5
물	18	13
정제된 cDNA	1	1

[0672]

[0673] 반응액 2 및 3에 대한 다중 PCR 반응 조건은 95℃에서 15 min의 1 사이클, 이어서 94℃에서 30 sec, 57℃에서 90 sec, 및 72℃에서 1 min의 25 사이클, 이어서 68℃에서 7 min의 1 사이클 및 4℃에서 1 유지 사이클이었다.

[0674] F1 프라이머 풀은 다음 프라이머를 함유하였다:

F1 PCR 프라이머	서열
100611KanF2	CTGCCTCGGTGAGTTTTCTC
Lys_L_269	CTTCCCGTTACGGTTTTGAC
phe_L_177	AAAACCGGATTAGGCCATTA
thr_L_332	TCTCGTCATGACCGAAAAAG
dap_L_276	CAACGCCTACAAAAGCCAGT

[0675]

[0676] Kan, Phe 및 Dap 대조군 유전자는 네스티드 PCR에 의해 선택적으로 증폭시켰다. 네스티드 PCR 증폭 반응액을 다음과 같이 제조하였다:

다중 PCR Rxn # →	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PCR Rxn # →	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL	μL
10x Taq	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10mM dNTP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
물	22.25	22.25	22.25	22.25	22.25	22.25	22.25	22.25	22.25
Cy3 PCR004 10μM	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
KanF3_5P 5μM	1	1	1						
Phe_L_215 5μM				1	1	1			
Dap_L_290 5μM							1	1	1
다중 PCR Rxn	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
USB taq	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

[0677]

[0678] 주: PCR 반응 1, 4, 및 7을 위한 다중 PCR 반응액은 다중 PCR 반응액 #1이었다. PCR 반응 2, 5 및 8을 위해 사용된 다중 PCR 반응액은 다중 PCR 반응액 #2이었다. PCR 반응 3, 6 및 9를 위해 사용된 다중 PCR 반응액은 다중 PCR 반응액 #3이었다.

[0679] 네스티드 PCR을 위해 사용된 프라이머는 다음과 같이 개시된다:

네스티드PCR프라이머	서열
KanF4_5P	/5Phos/GTGGCAAAGCAAAAGTTCAA
Phe_L_215	TGAGAAAGCGTTTGATGATGTA
Dap_L_290	GCCAGTTTATCCCGTCAAAG

[0680]

[0681] 반응 1-9를 위한 PCR 증폭 반응 조건은 94℃에서 2 min의 1 사이클, 94℃에서 20 sec, 55℃에서 20 sec, 및 72℃에서 20 sec의 30 사이클, 이어서 72℃에서 4 min의 1 사이클 및 4℃에서 1 유지 사이클이었다.

[0682] PCR 증폭 반응 1-9의 PCR 생성물 4 ㎕을 아가로스 겔 상에서 진행시켰다. 도 58a에 제시된 바와 같이, 반응 1-3은 Kan 대조군 유전자의 존재를 보여주고, 반응 4-6은 Phe 대조군 유전자의 존재를 보여주고, 반응 7-9는 Dap 대조군 유전자의 존재를 보여주었다.

[0683] PCR 반응 1-9로부터의 PCR 생성물을 어플라이드 마이크로어레이 인크 (AMI) 어레이에 혼성화를 위해 제조하였다. 혼성화 혼합물은 다음과 같이 제조하였다:

	μL
PCR생성물	20
세척액 A (6X SSPE+0.01% 트리톤 X-100)	55
Cy3 올리고(760pM)	1

[0684]

[0685] 혼성화 혼합물 1-9 (각각 PCR 반응 1-9로부터의 PCR 생성물을 함유하는 혼합물에 상응하는)을 95℃에서 5분 동안 변성시킨 후 4℃에 놓았다. 혼성화 혼합물을 AMI 어레이 슬라이드에 옮기고 37℃에서 철야 인큐베이팅하였다.

[0686] 철야 혼성화 후에, AMI 어레이 슬라이드를 세척한 후 스캐닝하였다. 이론적 및 실제 측정치 및 정확도 %를 아래 제시한다:

혼성화 혼합물 # →	1	2	3	4	5	6	7	8	9
다중 PCR 조건 (Rxn #)	티타늄 (1)	퀴아젠 (2)	퀴아젠 +Q (3)	티타늄 (1)	퀴아젠 (2)	퀴아젠 +Q (3)	티타늄 (1)	퀴아젠 (2)	퀴아젠 +Q (3)
이론적 측정치	3676 (바이오애널라이저)			912			6840		
실제 측정치	1826	1740	2116	299	235	251	1165	1077	172
% 검출	49.7	47.3	57.6	32.8	25.8	27.5	17	15.7	2.5

[0687]

[0688] 주: 이론적 측정치는 100%의 Kan, Phe 및 Dap 대조군 유전자의 검출에 기초한다.

[0689] 반응 2으로부터 PCR 생성물을 앰퓨어 정제에 의해 정제하였다. 앰퓨어 정제는 다음과 같이 수행하였다:

	μL
X01 샘플 2로부터 F1 PCR 생성물	30
앰퓨어 비드	30

[0690]

[0691] 앰퓨어 정제 반응액을 실온에서 5 min 동안 인큐베이팅한 후 70% 에탄올 내에서 세척하였다. 정제된 PCR 생성물을 30 ㎕의 물 내에서 비드로부터 용리하였다. PCR 생성물의 농도는 나노드롭 (Nanodrop) 분광기에 의해 결정할 때 6 ng/㎕이었다.

[0692] *파트 II: 라이브러리 제조 프로토콜*

[0693] X01 샘플 2로부터 정제된 PCR 생성물 (실시예 1 참조)을 사용하여 DNA 라이브러리를 제조하였다. F2 프라이머 풀은 다음 프라이머를 혼합하여 생성하였다:

F2 PCR 프라이머	서열
Lys_L_269	CTTCCCGTTACGGTTTTGAC
phe_L_177	AAAACCGGATTAGGCCATTA
thr_L_332	TCTCGTCATGACCGAAAAAG
dap_L_276	CAACGCCTACAAAAGCCAGT

[0694]

[0695] F2 프라이머 믹스는 다음을 혼합함으로써 제조하였다:

F2 프라이머 믹스	μL
물	750
F2 프라이머 풀 1uM 각각/100uM 총	100

[0696]

[0697] F2 프라이머 믹스를 95℃에서 3 min 동안 인큐베이팅한 후, 얼음 상에 저장하였다. 다음 라이게이션 믹스를 F2 프라이머 믹스에 첨가하여 F2 프라이머 라이게이션 믹스를 생산하였다:

라이게이션 믹스	μL
10X DNA 리가제 완충제 NEB	100
T4 PNK USB	50

[0698]

[0699] F2 프라이머 라이게이션 믹스를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이팅한 후, 65℃에서 20 min 동안 인큐베이팅하였다. F2 PCR 프라이머를 에탄올 침전시키고, 프라이머 풀의 농도를 나노드롭 분광광도계에 의해

결정하였다. F2 프라이머 풀을 재현탁시켜 1 uM 각각/100 uM 총의 최종 농도를 생산하였다.

[0700] 도 56의 단계 4에 제시된 바와 같이, 표지된 앰플리콘 (180)을 다중 PCR에 의해 증폭시켰다. 96개의 상이한 맞춤형 전방향 프라이머 (F2, 도 1에서 145) 및 범용 PCR 프라이머 (140)를 사용하여, 단일 반응 부피 내에서 표지된 앰플리콘 (실시예 1로부터 X01 샘플 2)을 증폭시켰다. 표 24는 96개의 상이한 맞춤형 전방향 프라이머를 나열한다.

[0701] 다중 PCR 반응액을 다음과 같이 제조하였다:

[0702]

다중 PCR 믹스	µL
2X 퀴아젠 다중 믹스	25
1 µM 각각의 F2 프라이머 풀 키나제	5
PCR004 5'P 10µM	1
물	18
정제된 제1 PCR X01 샘플 2	1

[0703] 다중 PCR 조건은 95℃에서 15 min의 1 사이클, 이어서 94℃에서 30 sec, 57℃에서 90 sec, 및 72℃에서 1 min의 18 사이클, 이어서 68℃에서 7 min의 1 사이클 및 4℃에서 1 유지 사이클이었다. 다중 앰플리콘을 앰퓨어 정제에 의해 정제하고 50 ㎕의 물 내에서 용리하였다. 앰플리콘의 농도는 나노드롭 분광광도계에 의해 30 ng/㎕인 것으로 결정되었다. 5 ㎕의 앰플리콘을 아가로스 겔 상에서 진행시켰다 (도 58b).

[0704] 도 56의 단계 5에 제시된 바와 같이, 어댑터 (150, 155)를 표지된 앰플리콘 (180)에 라이게이션하여 어댑터 표지된 앰플리콘 (190)을 생성하였다. 어댑터 표지된 앰플리콘은 다음과 같이 생산하였다:

[0705]

어댑터 믹스	µL
10X T4 리가제USB	10
물	60
정제된 네스티드 PCR 생성물	10
어닐링된, 모아진 96 ABC 어댑터 50µM	10
T4 DNA 리가제 (3µl neb hc, 7 µl usb)	10

[0706] 어댑터 믹스를 16℃에서 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 어댑터 표지된 앰플리콘을 앰퓨어 정제에 의해 정제하고 20 ㎕의 10 mM 트리스 내에 용리시켰다.

[0707] 정제된 어댑터 표지된 앰플리콘을 갭-수복하고, 다음과 같이 PCR 증폭시켰다:

[0708]

필-인 (Fill-in) 및 PCR 믹스	µL
10x 써모Pol 완충제	5
10mM dNTP	1.5
물	32
CR P1 10µM	3
CR IDX D1 10µM	3
정제된 어댑터 표지된 앰플리콘	5
Vent exo- 2u/µL	0.5

[0709] PCR 조건은 72℃에서 2 min, 이어서 94℃에서 1 min의 1 사이클, 94℃에서 15초, 60℃에서 15초 및 72℃에서 30 sec의 12 사이클, 72℃에서 4 min의 1 사이클 및 4℃에서 1 유지 사이클이었다. PCR 생성물을 앰퓨어 정제

에 의해 정제하고 30 ㎕의 TE 내에서 용리하였다. 정제된 PCR 생성물의 농도는 나노드롭 분광기에 의해 결정할 때 22 ng/㎕ (83 nM)이었다. 5 ㎕의 PCR 정제된 생성물을 1% 아가로스 겔 상에서 진행시켰다 (도 58b)

[0710] *파트 III. 어댑터 표지된 앰플리콘 라이브러리의 서열분석*

[0711] 어댑터 표지된 앰플리콘 라이브러리를 MiSeq 시퀀서를 이용하여 서열분석하였다.

[0712] 서열 매핑 요약을 아래에 제시한다:

[0713]

	완벽한 매치를 요구함	1bp 미스매치를 허용함
총 판독물 쌍	7,724,955	
범용 프라이머 및 폴리A 매치를 갖는 RNA의 #	2,499,444 (32%)	4,716,378 (61%)
표적 (96 유전자)에 맵핑된 RNA의 #	2,373,700	4,489,485

[0714] 상기 서열 매핑 요약에 제시된 바와 같이, 엄격한 폴리A 매치 기준 때문에 많은 판독물이 손실되었다. 도 59는 모든 검출된 유전자에 걸쳐 판독물 및 계수를 보여준다.

[0715] 서열분석 판독물을 또한 사용하여 특이적 유전자를 정량하였다. 도 61-62는 다양한 유전자에 대한 검출된 표지당 관찰된 판독물 (RPLD)의 도면을 보여준다. 통상의 rpkm 값을 또한 도 61-62에 도시된 도면에 제시한다. 도 59는 다양한 유전자에 대한 RPLD 및 RPKM의 비교를 요약한다.

[0716] 도 63은 다양한 유전자에 대한 총 판독물 (표지) 대 rpld의 도면이다.

[0717] 도 4, 7 및 8에 제시된 데이타를 또한 표 25에 숫자 형태로 제시한다.

[0718] 도 64는 비검출된 유전자에 대한 RPKM의 도면을 보여준다.

[0719] 어댑터 표지된 앰플리콘 라이브러리 내의 스파이크-인 대조군의 양을 MiSeq 서열분석에 의해 결정하였다. 스파이크-인 대조군의 MiSeq 서열분석으로부터 결과를 아래 표에 제시한다.

[0720]

스파이크-인 대조군	입력 N (mfg)	판독물	표지 (K)
Dap	6840	1,920,503	893
Phe	912	470,738	859
Thr	1824	410,664	847
Lys	456	282,174	847
Kan	7352	24	23

[0721] 상기 표에서, 입력 N은 스파이크-인 대조군의 원래 수를 나타내고; 판독물은 판독물 쌍의 총 수를 나타내고; 표지 (K)는 서열분석에 의해 검출된 상이한 표지의 수를 나타낸다. 도 60a-d는 각각 Lys, Phe, Thr, 및 Dap 스파이크-인 대조군에 대한 검출된 표지당 관찰된 판독물 (RPLD)의 도면을 보여준다. 도 60e는 판독물 대 입력의 도면을 보여준다.

[0722] <표 23>

명칭	서열
NM_144646.3F1	TTGACTTTGCCTTGGAGAGC
NR_015342.1F1	TTTTTCTTACAGTGTCTTGGCATA
NM_000193.2F1	CGTGACCCTAAGCGAGGAG
NM_001777.3F1	TTTGCAGTGATTTGAAGACCA
NM_000600.3F1	GGCATTCCTTCTTCTGGTCA
NM_021127.2F1	CTGGGCTATATACAGTCCTCAAA
NM_004318.3F1	GGGGTGATTATGACCAGTTGA
NM_002467.4F1	TGCATGATCAAATGCAACCT
NM_001773.2F1	TCTTCCGAAAAATCCTCTTCC
NM_001770.5F1	CTGGGGTCCCAGTCCTATG
NM_001718.4F1	TGTACTGGGAAGGCAATTTCA
NR_023920.1F1	GAGCCGCTGGGGTTACTC
NM_000267.3F1	CAGTTAGTTGCTGCACATGGA
NM_000633.2F1	TTGCATTTCTTTTGGGGAAG
NM_000314.4F1	GTCATGCATGCAGATGGAAG
NM_021151.3F1	GCTGCAGTGAGCTGTGATGT
NM_002415.1F1	GTTCCTCTCCGAGCTCACC
NM_004985.3F1	TCCGAAAGTTTCCAATTCCA
NM_005375.2F1	TTGTTTGGGAGACTCTGCATT
NM_000555.3F1	GACCCCACTTGGACTGGTAG
NM_001668.3F1	GTGATCTTGATTGCGGCTTT
NM_025237.2F1	GGGGGAAAAACTACAAGTGC
NM_021117.3F1	TGATTCCTTTTCCTGCCTGT
NM_016316.2F1	AAAAACCTCCAGGCCAGACT
NM_021975.3F1	AATCAAAATAACGCCCCAGA
NM_004333.4F1	TTGCTAAAAATTGGCAGAGC
NM_001621.4F1	TTGTTAAGTGCCAAACAAAGGA
NM_005239.5F1	AAGCTGGGAAGAGCAAAGC
NM_000485.2F1	AGGACAGAGGGTGGTCGTC
NM_004048.2F1	TGAGTGCTGTCTCCATGTTTG

[0723]

NM_001657.2F1	CCTCACAGCTGTTGCTGTTATT
NM_012238.4F1	AAAACACCCAGCTAGGACCA
NM_002055.4F1	AACTGAGGCACGAGCAAAGT
NM_002392.4F1	GCTTTATGGGTGGATGCTGA
NM_001625.3F1	ATAATATCGCCAGCCTCAGC
NM_002110.3F1	TCCAGAGTGTGCTGGATGAC
NM_002943.3F1	TGCAAGCCATTTATGGGAAT
NM_000059.3F1	TGGAATGAGGTCTCTTAGTACAGTT
NM_018136.4F1	TCCCAGAAACACCTGTAAGGA
NM_003467.2F1	TGTCTAGGCAGGACCTGTGG
NM_004958.3F1	AGTGATGCTGCGACTCACAC
NM_006139.3F1	GGCTCAGAAAGTCTCTCTTTCC
NM_002693.2F1	CTCCCAAACTCAGGCTTTCA
NM_001080432.2F1	AAAGCGCTGGGATTACAGG
NM_005954.2F1	CGTCCAGTTGCTTGGAGAAG
NM_024865.2F1	AATAACCTTGGCTGCCGTCT
NM_001905.2F1	GGGAATTCTCAGTGCCAACT
NM_002046.4F1	GCATCCTGGGCTACACTGAG
NM_002253.2F1	TGCTGGGAACAATGACTATAAGA
NM_002356.5F1	GCCTAAAACACTTTGGGTGGT
NM_000189.4F1	GGGTGCCCACAAAATAGAGA
NM_000546.5F1	GAGACTGGGTCTCGCTTTGT
NM_152860.1F1	TGGGGAAGGCTTTCTCTAGG
NM_016231.4F1	TTCAACTTGAGTGATCTGAGCTG
NM_000518.4F1	TATGGGCAACCCTAAGGTGA
NM_000905.3F1	CGCTGCGACACTACATCAAC
NM_005038.2F1	TGGAGTCTTGCTCTGTCACC
NM_000041.2F1	ACGAGGTGAAGGAGCAGGT
NM_005957.4F1	CGATGCCTTTGGGTAGAGAG
NR_002785.2F1	ACTGATCGTCCAAGGACTGG
NM_000321.2F1	AAAAAGAAATCTGGTCTTGTTAGAAAA
NM_152756.3F1	TTGAAAAGTGGTAAGGAATTGTGA

[0724]

NM_000610.3F1	CACCAAGAATTGATTTTGTAGCC
NR_033314.1F1	AAAAATGGGGGAAAATGGTG
NM_017460.5F1	CATGGTTGAAACCCCATCTC
NR_002196.1F1	TTCAAAGCCTCCACGACTCT
NM_000591.3F1	GCTGGAACAGGTGCCTAAAG
NM_000106.5F1	CCCTAAGGGAACGACACTCA
NM_138712.3F1	ACCTGCTACAAGCCCTGGA
NM_004304.4F1	GGATCCCTAAGACCGTGGAG
NM_000754.3F1	CCACCTCAGAGGCTCCAA
NM_000492.3F1	TGCTGTATTTTAAAAGAATGATTATGA
NM_000444.4F1	GTAGCTGGGACGCTGGTTTA
NM_002463.1F1	ATTCCCTTCCCCCTACAAGA
NM_000552.3F1	CCTGAGTGCAACGACATCAC
NM_005430.3F1	GGGGGAACCAGCAGAAAT
NM_003150.3F1	GACCTAGGGCGAGGGTTC
NM_000388.3F1	AATTCCTGAAGCCAGATCCA
NM_007294.3F1	AAAATGTTTATTGTTGTAGCTCTGG
NM_005933.3F1	TTTCAAGAGCTCAACAGATGACA
NM_002343.3F1	GACTGCCCGGACAAGTTTT
NM_000376.2F1	GAGAAGGTGCCCCAAAATG
NM_002462.3F1	AGCCACTGGACTGACGACTT
NM_021005.3F1	GGAGGACTAGTGAGGGAGGTG
NM_012343.3F1	GGCAAGTGATGTGGCAATTA
NM_001741.2F1	GTTGGAGCACCTGGAAAGAA
NM_014417.4F1	ATGCCTGCCTCACCTTCAT
NM_014009.3F1	ACAGGGGCACTGTCAACAC
NM_006908.4F1	AAAAATCATGTGTTGCAGCTTT
NM_005228.3F1	TGCTTTCACAACATTTGCAG
NM_013994.2F1	AATGTTTCCTTGTGCCTGCT
NM_000639.1F1	ATATCCTGAGCCATCGGTGA
NM_002701.4F1	TTTTGGTACCCCAGGCTATG
NM_000268.3F1	ACCCCGTGGCATTACATAAC

[0725]

NM_003140.1F1	CTTCCAGGAGGCACAGAAAT
NM_000551.3F1	CTAACCTGGGCGACAGAGTG

[0726]

[0727] <표 24>

명칭	서열
NM_144646.3F2	ATATTTGGACATAACAGACTTGGAA
NR_015342.1F2	TGCTGACTTTTAAAATAAGTGATTCG
NM_000193.2F2	GCGGCAGAGTAGCCCTAAC
NM_001777.3F2	TGGGCTATTTCTATTGCTGCT
NM_000600.3F2	AATGGAAAGTGGCTATGCAG
NM_021127.2F2	GGTTGTAGTCACTTTAGATGGAAAA
NM_004318.3F2	TTTGTTTGACTTTGAGCACCA
NM_002467.4F2	AATGTTTCTCTGTAAATATTGCCATT
NM_001773.2F2	CACCCCCATATGGTCATAGC
NM_001770.5F2	AGCACCAGGTGATCCTCAG
NM_001718.4F2	TGTTTTGCTGTAACATTGAAGGA
NR_023920.1F2	TAATGCCACAGTGGGGATG
NM_000267.3F2	GGGCCTAAACTTTGGCAGTT
NM_000633.2F2	TTTTACCTTCCATGGCTCTTTT
NM_000314.4F2	GCCTTACTCTGATTCAGCCTCTT
NM_021151.3F2	CGTAACAAAATTCATTGTGGTGT
NM_002415.1F2	AGAACCGCTCCTACAGCAAG
NM_004985.3F2	GTGCTTTCTTTTGTGGGACA
NM_005375.2F2	GGGAGTTCTGCATTTGATCC
NM_000555.3F2	TGGGTCAGAGGACTTCAAGG
NM_001668.3F2	AGGGTTCTGATCACATTGCAC
NM_025237.2F2	CTGCAGGACTGGTCGTTTTT
NM_021117.3F2	AGGGCAGGGTAGAGAGGGTA
NM_016316.2F2	TTCTTCCATGCGGAGAAATC
NM_021975.3F2	CATGGCTGAAGGAAACCAGT
NM_004333.4F2	TTGCCAGCTATCACATGTCC
NM_001621.4F2	TCTTTTCCTGTACCAGGTTTTTC

[0728]

NM_005239.5F2	TGACTGGGAACATCTTGCTG
NM_000485.2F2	TGGCACCTGTACCCTTCTTC
NM_004048.2F2	TTCAATCTCTTGCACTCAAAGC
NM_001657.2F2	TGGAGTCACTGCCAAGTCAT
NM_012238.4F2	TTTGCATGATGTTTGTGTGC
NM_002055.4F2	GCACCCACTCTGCTTTGACT
NM_002392.4F2	ACCATGTAGCCAGCTTTCAA
NM_001625.3F2	GCAACTGGGCATGAGTACCT
NM_002110.3F2	CCACACCCCCTTCCTACTC
NM_002943.3F2	AGTCTGCTTATTTCCAGCTGTTT
NM_000059.3F2	TCCTGTTCAAAAGTCAGGATGA
NM_018136.4F2	AAATCACAAATCCCCTGCAA
NM_003467.2F2	CTGAACATTCCAGAGCGTGT
NM_004958.3F2	CAGTGGGACCACCCTCACT
NM_006139.3F2	TCTGTAGATGACCTGGCTTGC
NM_002693.2F2	TCAGAACCAAGATGCCAACA
NM_001080432.2F2	CATGACCCAGCCTATGGTTT
NM_005954.2F2	ACCTCCTGCAAGAAGAGCTG
NM_024865.2F2	TTGGGAGGCTTTGCTTATTTT
NM_001905.2F2	CTGGGAAACACTCCTTGCAT
NM_002046.4F2	CAACGAATTTGGCTACAGCA
NM_002253.2F2	CAAAGGTCATAATGCTTTCAGC
NM_002356.5F2	TTTGACGTATCTTTTCATCCAA
NM_000189.4F2	TGTTGTTGGTTTCCAAAAAGG
NM_000546.5F2	GCCAACTTTTGCATGTTTTG
NM_152860.1F2	CCCAAGCTGATCTGGTGGT
NM_016231.4F2	TGCTGTGAAAGAAACAAACATTG
NM_000518.4F2	GCACGTGGATCCTGAGAACT
NM_000905.3F2	CCAGCCCAGAGACACTGATT
NM_005038.2F2	CACGCCCAGCTAATTTTTGT
NM_000041.2F2	CCTGGTGGAAGACATGCAG
NM_005957.4F2	TCACACCTGTAATCCCAGCA

[0729]

NR_002785.2F2	CAGAGCTCCGCCTCATTAGT
NM_000321.2F2	TCCATTTCATCATTGTTTCTGC
NM_152756.3F2	TGGTGTTTGTAGGTCACTGAACA
NM_000610.3F2	AACATGGTCCATTCACCTTTATG
NR_033314.1F2	AGAGCGAGACTCCGTCTCAA
NM_017460.5F2	AGTGAGCTGAGATTGCACCA
NR_002196.1F2	AGACGGCCTTGAGTCTCAGT
NM_000591.3F2	GGGAATCCCTTCCTGGTC
NM_000106.5F2	CTTCCTGCCTTTCTCAGCAG
NM_138712.3F2	TGCAGGTGATCAAGAAGACG
NM_004304.4F2	GGTTTTGAGCATGGGTTCAT
NM_000754.3F2	CCAGCCCACTCCTATGGAT
NM_000492.3F2	AAACTGGGACAGGGGAGAAC
NM_000444.4F2	TTTGGGTAGGTGACCTGCTT
NM_002463.1F2	TCACTGAACGAATGAGTGCTG
NM_000552.3F2	ACGATGTGCAGGACCAGTG
NM_005430.3F2	AATTTGCACTGAAACGTGGA
NM_003150.3F2	CTGTTGTGGCCCATTAAAGAA
NM_000388.3F2	TTCCCTCCAGCAGTGGTATT
NM_007294.3F2	CACCAGGAAGGAAGCTGTTG
NM_005933.3F2	TTTCCTTGTGTTCTTCCAAGC
NM_002343.3F2	TCGCAGGCATTACTAATCTGAA
NM_000376.2F2	CTCTGGCTGGCTAACTGGAA
NM_002462.3F2	AGAGCCCCACCCTCAGAT
NM_021005.3F2	TGTGCAGAGTTCTCCATCTGA
NM_012343.3F2	TGCCTGTTACAAATATCAAGGAA
NM_001741.2F2	TTTCCCTTCTTGCATCCTTC
NM_014417.4F2	TGTGACCACTGGCATTCATT
NM_014009.3F2	CTCACACACACGGCCTGTTA
NM_006908.4F2	CACTTGACCAATACTGACCCTCT
NM_005228.3F2	GTGTGTGCCCTGTAACCTGA
NM_013994.2F2	CCACTTCCCACTTGCAGTCT

[0730]

NM_000639.1F2	TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
NM_002701.4F2	TCTCCCATGCATTCAAACTG
NM_000268.3F2	TCTAAGTGTTCCTCACTGACAGG
NM_003140.1F2	TACTCTGCAGCGAAGTGCAA
NM_000551.3F2	CCAAGATCACACCATTGCAC
NM_144646.3F2	ATATTTGGACATAACAGACTTGGAA

[0731]

[0732] <표 25>

유전자	판독물의 수	표지의 수	판독물/kb/백만 (RPKM)
APOE	1585	408	0.2
APRT	11280	56	103.4
AREG	147	102	0.0
ASPM	4683	53	4.4
B2M	209362	698	3891.7
BBC3	8	1	0.0
BCL2	3627	27	33.2
BDNF	12778	116	0.3
CD19	38	5	43.1
CD44	6789	47	8.1
COMT	2828	16	10.7
CTPS1	3998	15	25.4
CXCR4	10547	54	19.2
CYP3A4	80982	267	0.1
DCX	28	24	0.0
ETS2	6	5	0.0
FASLG	3182	565	0.2
FTO	8877	58	11.3
GAPDH	227129	661	3870.8
HCK	294	2	2.4
HK2	593	2	12.7
IGJ	119449	454	438.9
KDR	2	2	0.0
KRAS	64	31	6.8
LTF	126	90	0.0
MARCKS	1563	12	36.9
MIF	17775	89	760.4
MLL	72	9	2.6
MTHFR	4854	282	3.9
MX1	100701	285	119.0
MX2	2145	13	45.2
MYB	18361	100	2.8
MYC	6859	27	130.5
NF1	4	1	3.7
NNT	15673	78	14.1

[0733]

PMAIP1	50604	244	126.9
POLG	5163	46	7.4
POU5F1	1924	12	1.0
PPID	27354	303	39.0
PTEN	20884	109	51.6
RAC1	12454	67	44.8
RB1	1420	14	46.1
RELA	3893	26	17.9
RICTOR	898	5	5.2
RORA	954	7	0.1
SOST	1	1	0.0
SP7	1	1	0.0
STAT3	706	28	16.9
TP53	900	34	14.6
VHL	11576	106	0.0

[0734]

[0735] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에서 제시되고 설명되었지만, 상기 실시양태는 단지 예로서 제시되는 것임이 통상의 기술자에게 자명할 것이다. 이제, 통상의 기술자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않는 많은 변이, 변

화, 및 치환을 알 수 있을 것이다. 본원에서 설명되는 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명의 실행시에 사용될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0736] 본원에서 논의되는 간행물은 단지 본원의 출원일 이전의 그의 개시내용에 대해서만 제시된다. 본원에서 그 어느 것도 본 발명이 선행 발명보다 앞서는 권리가 없다고 인정하는 것으로 고려되지 않아야 한다. 추가로, 제시되는 간행물의 날짜는 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 간행일과 상이할 수 있다.

[0737] **실시양태**

[0738] 2개 이상의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법이 본원에 개시된다. 이 방법은 a) i) 다수의 핵산을 포함하는 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제1 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고; ii) 다수의 핵산을 포함하는 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제2 샘플-태그부착된 핵산을 생산함으로써 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고, 여기서 다수의 제2 샘플 태그는 제1 샘플 태그와 상이하고; b) 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하고; c) 적어도 하나의 표지된 핵산을 검출하여 다수의 샘플 내의 다수의 핵산의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 단일 세포 또는 세포 용해물을 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 단일 세포로 이루어질 수 있다. 샘플 태그는 표지된 핵산이 그로부터 유래하는 세포를 확인하는 세포 표지를 포함할 수 있다. 단일 세포로 이루어진 다수의 샘플은 하나 이상의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 샘플 태그는 단일 세포의 공급원을 확인하는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 분자 표지로 언급될 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 1,000,000개 미만의 세포를 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 100,000개 미만의 세포를 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 10,000개 미만의 세포를 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 1,000개 미만의 세포를 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 100개 미만의 세포를 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중 하나 이상은 세포 용해물을 포함할 수 있다.

[0739] 대안적으로, 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법은 a) i) 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시키고, 여기서 다수의 제1 샘플 태그는 동일한 핵산 서열을 포함하고; ii) 제1 샘플을 상이한 핵산 서열을 포함하는 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 제1-표지된 핵산을 생산하고; iii) 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시키고, 여기서 다수의 제2 샘플 태그는 동일한 핵산 서열을 포함하고; iv) 제2 샘플을 상이한 핵산 서열을 포함하는 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 제2-표지된 핵산을 생산함으로써 다수의 표지된 핵산을 생산하고, 여기서 다수의 표지된 핵산은 다수의 제1-표지된 핵산 및 제2-표지된 핵산을 포함하고; b) 많은 상이한 표지된 핵산을 결정하여 다수의 샘플 내의 다수의 핵산의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 샘플 태그는 표지된 핵산이 그로부터 유래하는 세포를 확인하는 세포 표지를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 단일 세포의 공급원을 확인하는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 분자 표지로 언급될 수 있다.

[0740] 대안적으로, 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법은 a) 2개 이상의 상이한 핵산을 포함하는 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하고, 여기서 i) 다수의 표지된 핵산은 2개 이상의 샘플 태그 및 2개 이상의 분자 식별 표지에 부착된 2개 이상의 핵산을 포함하고; ii) 다수의 샘플의 제1 샘플로부터의 핵산에 부착된 샘플 태그는 다수의 샘플의 제2 샘플로부터의 핵산 분자에 부착된 샘플 태그와 상이하고; iii) 동일한 샘플 내의 2개 이상의 동일한 핵산은 2개 이상의 상이한 분자 식별 표지에 부착되고; b) 표지된 핵산의 적어도 일부를 검출하여 다수의 샘플 내의 2개 이상의 상이한 핵산의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 샘플 태그는 표지된 핵산이 그로부터 유래하는 세포를 확인하는 세포 표지를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 단일 세포의 공급원을 확인하는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 분자 표지로 언급될 수 있다.

[0741] 또한, a) 다수의 샘플의 제1 샘플로부터의 다수의 제1 분자를 제1 세트의 분자 바코드와 접촉시켜 다수의 제1 표지된 분자를 생산하고, 여기서 다수의 제1 분자 바코드 중의 한 분자 바코드는 표지 영역 및 샘플 인덱스 영역을 포함하고; b) 다수의 샘플의 제2 샘플로부터의 다수의 제2 분자를 제2 세트의 분자 바코드와 접촉시켜 다수의 제2 표지된 분자를 생산하고, 여기서 다수의 제2 분자 바코드 중의 한 분자 바코드는 표지 영역 및 샘플 인덱스 영역을 포함하고, 다수의 제1 분자 바코드 및 다수의 제2 분자 바코드는 적어도 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역이 상이하고; c) 다수의 제1 표지된 분자의 2개 이상의 분자의 적어도 일부 및 다수의 제2 표지된 분자의 2개 이상의 분자의 적어도 일부를 검출하여 다수의 샘플 내의 2개 이상의 분자의 총수를 결정하는 것을 포함하는, 다수의 샘플 내의 분자를 분석하기 위한 방법이 본원에 개시된다. 다수의 제1 분자는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 다수의 제2 분자는 핵산 분자를 포함할 수 있다. 표지 영역은 분자 표지로 언급될 수 있다.

분자 바코드는 세포 표지를 추가로 포함할 수 있다. 다수의 샘플의 샘플이 단일 세포로 이루어진 경우에, 샘플 인덱스 영역은 세포 표지로 언급될 수 있다.

[0742] a) 선택된 프라이머가 i) 3개 이하의 순차적인 구아닌, 3개 이하의 순차적인 시토신, 4개 이하의 순차적인 아데닌, 및 4개 이하의 순차적인 티민; ii) 구아닌 또는 시토신인 적어도 3, 4, 5, 또는 6개의 뉴클레오티드; 및 iii) 쉽게 머리핀 구조를 형성하지 않는 서열을 포함하는 제1 패스; b) i) 모든 전사체의 높은 적용 범위를 갖는 다수의 서열을 선택하는 제1 라운드; 및 ii) 나머지 전사체의 가장 높은 적용 범위 및 4 이하의 다른 선택된 서열과의 상보성 점수를 갖는 서열을 선택하는 1회 이상의 후속 라운드를 포함하는 제2 패스; 및 c) 적용 범위가 포화되거나 또는 맞춤형 프라이머의 총수가 약 96개 이하일 때까지 선택된 세트에 서열을 첨가하는 것을 포함하는, 맞춤형 프라이머를 선택하는 방법이 본원에 개시된다.

[0743] 또한, a) i) 다수의 핵산을 포함하는 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제1 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고; ii) 다수의 핵산을 포함하는 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제2 샘플-태그부착된 핵산을 생산함으로써 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 생산하고, 여기서 다수의 제1 샘플 태그는 제2 샘플 태그와 상이하고; b) 다수의 샘플-태그부착된 핵산을 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산함으로써 표지된 핵산 라이브러리를 생산하는 것을 포함하는, 표지된 분자 라이브러리의 생산 방법이 본원에 개시된다.

[0744] 다수의 샘플에서 분자를 분석할 때 사용하기 위한 키트가 본원에 개시된다. 키트는 a) 2개 이상의 세트의 분자 바코드 (하나 이상의 분자 바코드의 세트의 한 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역 및 표지 영역을 포함하고, 여기서 (i) 분자 바코드의 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역은 동일하고; (ii) 제1 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역은 제2 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역과 상이함); 및 b) 다수의 비드를 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드는 다수의 비드에 부착될 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드는 비드에 접합될 수 있다. 표지 영역은 분자 표지로 언급될 수 있다. 분자 바코드는 세포 표지를 추가로 포함할 수 있다. 다수의 샘플의 샘플이 단일 세포로 이루어진 경우에, 샘플 인덱스 영역은 세포 표지로 언급될 수 있다.

[0745] 다수의 샘플에서 분자를 분석하기 위한 키트는 (a) 다수의 제1 분자 바코드를 포함하는 제1 용기 (여기서, (i) 한 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역 및 표지 영역을 포함하고; (ii) 다수의 제1 분자 바코드의 분자 바코드의 총수의 적어도 약 80%의 샘플 인덱스 영역은 동일하고; (iii) 다수의 제1 분자 바코드의 2개 이상의 바코드의 표지 영역은 상이함); 및 (b) 다수의 제2 분자 바코드를 포함하는 제2 용기 (여기서, (i) 한 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역 및 표지 영역을 포함하고; (ii) 다수의 제1 분자 바코드의 분자 바코드의 총수의 적어도 약 80%의 샘플 인덱스 영역은 동일하고; (iii) 다수의 제1 분자 바코드 중의 2개 이상의 바코드의 표지 영역은 상이하고; 다수의 제1 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역은 다수의 제2 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역과 상이함)를 포함할 수 있다. 표지 영역은 분자 표지로 언급될 수 있다. 분자 바코드는 세포 표지를 추가로 포함할 수 있다. 다수의 샘플의 샘플이 단일 세포로 이루어진 경우에, 샘플 인덱스 영역은 세포 표지로 언급될 수 있다.

[0746] 대안적으로, 다수의 샘플에서 분자를 분석하기 위한 키트는 a) 동일한 핵산 서열을 포함하는 다수의 제1 샘플 태그를 포함하는 제1 용기; 및 b) 2개 이상의 상이한 핵산 서열을 포함하는 다수의 제1 분자 식별 표지를 포함하는 제2 용기를 포함한다. 표지 영역은 분자 표지로 언급될 수 있다. 다수의 샘플 중의 한 샘플이 단일 세포로 이루어진 예에서, 샘플 태그는 세포 표지를 나타낼 수 있다. 키트는 2개 이상의 상이한 핵산 서열을 포함하는 다수의 제1 세포 표지를 포함하는 제3 용기를 추가로 포함할 수 있다.

[0747] 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 세트의 분자 바코드를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 분자 바코드를 포함할 수 있다. 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역, 분자 표지 영역, 세포 표지 영역, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 한 세트의 분자 바코드의 적어도 2개의 분자 바코드는 2개 이상의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드의 2개 이상의 분자 바코드의 표지 영역은 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 분자 바코드는 동일한 표지 영역을 포함하는 분자 바코드를 포함할 수 있다. 다수의 샘플 중의 한 샘플이 단일 세포로 이루어진 예에서, 샘플 태그는 세포 표지를 나타낼 수 있다.

[0748] 본원에 개시된 분자 바코드는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 분자 바코드의 2개 이상의 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역은 상이할 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개

이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 80% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 60% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 40% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 20% 미만의 상동성을 가질 수 있다.

[0749] 본원에 개시된 분자 바코드는 세포 표지를 포함할 수 있다. 분자 바코드의 2개 이상의 세트의 분자 바코드의 세포 표지는 상이할 수 있다. 세포 표지는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 세포 표지의 2개 이상의 서열은 약 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 세포 표지의 2개 이상의 서열은 약 80% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 세포 표지의 2개 이상의 서열은 약 60% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 세포 표지의 2개 이상의 서열은 약 40% 미만의 상동성을 가질 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 분자 바코드의 세포 표지의 2개 이상의 서열은 약 20% 미만의 상동성을 가질 수 있다.

[0750] 본원에 개시된 분자 바코드는 범용 PCR 영역을 추가로 포함할 수 있다. 분자 바코드는 표적-특이적 영역을 추가로 포함할 수 있다. 분자 바코드는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 표지 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 범용 PCR 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 표적-특이적 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0751] 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 세트의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 제1 세트의 샘플 태그 중 하나의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역은 제2 세트의 샘플 태그의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역과 상이할 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 80% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 60% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 40% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 2개 이상의 상이한 세트의 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역의 2개 이상의 서열은 약 20% 미만의 상동성을 보일 수 있다.

[0752] 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 세트의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 표지 영역을 포함할 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역은 상이할 수 있다. 표지 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역의 서열은 약 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역의 서열은 약 80% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역의 서열은 약 60% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역의 서열은 약 40% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 분자 식별 표지의 세트의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역의 서열은 약 20% 미만의 상동성을 보일 수 있다. 표지 영역은 세포 표지 영역으로 언급될 수 있다.

[0753] 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 프라이머를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 PCR 영역에 적어도 부분적으로 상보성인 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 PCR 영역에 적어도 약 50% 상보성인 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 PCR 영역에 적어도 약 80% 상보성인 서열을 포함할 수 있다.

[0754] 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 증폭제를 추가로 포함할 수 있다. 증폭제는 프라이머의 고정된 패널을 포함할 수 있다. 증폭제는 하나 이상의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭제는 하나 이상의 제어 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭제는 하나 이상의 하우스키핑 유전자 프라이머를 포함할 수 있다. 증폭제는 하나 이상의 PCR 시약을 포함할 수 있다. 하나 이상의 PCR 시약은 폴리머라제, 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트 (dNTP), 완충제, 또는 이들의 조합물을 포함할 수 있다.

[0755] 본원에 개시된 키트 및 방법은 하나 이상의 비드를 추가로 포함할 수 있다. 분자 바코드는 하나 이상의 비드에 부착될 수 있다. 샘플 태그는 하나 이상의 비드에 부착될 수 있다. 분자 식별 표지는 하나 이상의 비드에 부착될 수 있다.

[0756] 또한, 하나 이상의 세트의 비드의 생성 방법이 본원에 개시된다. 이 방법은 a) 다수의 제1 핵산을 다수의 웰 내에 침적하고, 여기서 다수의 웰 중의 2개 이상의 상이한 웰은 다수의 핵산 중의 2개 이상의 상이한 핵산을 포함할 수 있고; b) 다수의 웰 중의 하나 이상의 웰을 하나 또는 그보다 더 적은 비드와 접촉시켜 다수의 단일 표지 비드를 생산하고, 여기서 다수의 제1 표지된 비드 중의 단일 표지 비드는 다수의 제1 핵산 중의 한 핵산에 부착된 비드를 포함하고; c) 다수의 제1 표지된 비드를 다수의 웰로부터 모아서 제1 표지된 비드의 풀을 생산하고; d) 제1 표지된 비드의 풀을 후속적인 다수의 웰에 분배하고, 여기서 후속적인 다수의 웰 중의 2개 이상의 웰은 다수의 후속적인 핵산 중의 2개 이상의 상이한 핵산을 포함하고; e) 다수의 후속적인 핵산 중의 하나 이상의 핵산을 하나 이상의 제1 표지된 비드에 부착시켜 다수의 특유하게 표지된 비드를 생산하는 것을 포함할 수 있다.

[0757] 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 핵산을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 약 100,000,000개 미만의 핵산을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 약 10,000,000개 미만의 핵산을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 약 1,000,000개 미만의 핵산을 분석하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 다수의 단백질을 분석하는 방법이 본원에 개시된다. 이 방법은 a) i) 다수의 폴리펩티드를 포함하는 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제1 샘플-태그부착된 폴리펩티드를 생산하고; ii) 다수의 폴리펩티드를 포함하는 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시켜 다수의 제2 샘플-태그부착된 폴리펩티드를 생산함으로써 다수의 샘플-태그부착된 폴리펩티드를 생산하고, 여기서 다수의 제1 샘플 태그는 다수의 제2 샘플 태그와 상이하고; b) 다수의 샘플-태그부착된 폴리펩티드를 다수의 분자 식별 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 폴리펩티드를 생산하고; c) 표지된 폴리펩티드의 적어도 일부를 검출하여, 다수의 샘플 내의 다수의 폴리펩티드의 총수를 결정하는 것을 포함할 수 있다.

[0758] 다수의 샘플 내의 폴리펩티드를 분석하는 방법은 하나 이상의 표지된 폴리펩티드의 정체성을 결정하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 표지된 폴리펩티드의 정체성의 결정은 질량 분광법을 포함할 수 있다. 방법은 제1 샘플의 표지된 폴리펩티드를 제2 샘플의 표지된 폴리펩티드와 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 폴리펩티드는 상이한 표지된 폴리펩티드의 수를 결정하기에 앞서 조합될 수 있다. 방법은 제1 샘플-태그부착된 폴리펩티드 및 제2 샘플-태그부착된 폴리펩티드의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 제1 샘플-태그부착된 폴리펩티드 및 제2 샘플-태그부착된 폴리펩티드는 다수의 분자 식별 표지와 접촉하기 전에 조합될 수 있다. 상이한 표지된 폴리펩티드의 수의 결정은 태그부착된 표지된 폴리펩티드의 적어도 일부를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 태그부착된 표지된 폴리펩티드의 적어도 일부의 검출은 샘플 태그, 분자-특이적 태그, 폴리펩티드, 또는 이들의 조합의 적어도 일부를 검출하는 것을 포함할 수 있다.

[0759] 본원에 개시된 방법은 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 식별 표지와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 동시에 일어날 수 있다. 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 공동으로 일어날 수 있다. 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 순차적으로 일어날 수 있다. 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그와 접촉시키는 것은 다수의 샘플을 다수의 분자 식별 표지와 접촉시키기 전에 일어날 수 있다. 다수의 샘플을 다수의 샘플 태그와 접촉시키는 것은 다수의 샘플을 다수의 분자 식별 표지와 접촉시킨 후 일어날 수 있다.

[0760] 본원에 개시된 방법은 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그 및 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그 및 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 동시에 일어날 수 있다. 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그 및 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 공동으로 일어날 수 있다. 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그 및 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 순차적으로 일어날 수 있다. 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시키는 것은 제1 샘플을 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시키기 전에 일어날 수 있다. 제1 샘플을 다수의 제1 샘플 태그와 접촉시키는 것은 제1 샘플을 다수의 제1 분자 식별 표지와 접촉시킨 후 일어날 수 있다.

[0761] 본원에 개시된 방법은 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그 및 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그 및 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 동시에 일어날 수 있다. 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그 및 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 공동으로 일

어날 수 있다. 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그 및 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시키는 것은 순차적으로 일어날 수 있다. 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시키는 것은 제2 샘플을 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시키기 전에 일어날 수 있다. 제2 샘플을 다수의 제2 샘플 태그와 접촉시키는 것은 제2 샘플을 다수의 제2 분자 식별 표지와 접촉시킨 후 일어날 수 있다.

[0762] 본원에 개시된 방법 및 키트는 2개 이상의 샘플을 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 제1 샘플 및 제2 샘플을 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 제1 및 제2 샘플은 다수의 분자 식별 표지와 접촉하기 전에 조합될 수 있다. 제1 및 제2 샘플은 표지된 핵산의 검출 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 확률적으로 표지하기 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 확률적으로 표지한 후에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 검출하기 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 검출한 후에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 분석하기 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 분석한 후에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자에 대한 하나 이상의 검정의 수행 전에 조합될 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자에 대한 하나 이상의 검정의 수행 후에 조합될 수 있다.

[0763] 본원에 개시된 방법 및 키트는 샘플 내의 2개 이상의 분자에 대해 하나 이상의 검정을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 검정은 하나 이상의 증폭 반응을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 증폭 반응을 수행하여 표지된 핵산 앰플리콘을 생산하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 표지된 핵산은 표지된 핵산의 검출 전에 증폭될 수 있다. 방법은 하나 이상의 증폭 반응을 수행하기 전에 제1 및 제2 샘플을 조합하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0764] 증폭 반응은 샘플 태그의 적어도 일부의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 표지의 적어도 일부의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 샘플 태그, 표지, 핵산, 또는 이들의 조합물의 적어도 일부의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 적어도 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 적어도 약 1%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 적어도 약 5%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 적어도 약 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 적어도 약 1%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 적어도 약 5%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 적어도 약 10%의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 약 95%, 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 약 50% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 약 20% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 핵산의 핵산의 총수의 약 10% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 약 95%, 90%, 80%, 70%, 60% 또는 50% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 약 40% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 약 25% 미만의 증폭을 포함할 수 있다. 증폭 반응은 다수의 표지된 핵산의 표지된 핵산의 총수의 약 10% 미만의 증폭을 포함할 수 있다.

[0765] 하나 이상의 증폭 반응은 샘플 내에서 약 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개의 표적화된 핵산의 증폭을 일으킬 수 있다. 하나 이상의 증폭 반응은 샘플 내에서 약 2000개의 표적화된 핵산의 증폭을 일으킬 수 있다. 하나 이상의 증폭 반응은 샘플 내에서 약 1000개의 표적화된 핵산의 증폭을 일으킬 수 있다. 하나 이상의 증폭 반응은 약 2000개의 표적화된 분자의 증폭을 일으킬 수 있다. 하나 이상의 증폭 반응은 샘플 내에서 약 100개의 표적화된 핵산의 증폭을 일으킬 수 있다.

[0766] 증폭 반응은 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 포함할 수 있다. 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응은 다중 PCR, 네스티드 PCR, 절대적 PCR, HD-PCR, Next Gen PCR, 디지털 RTA, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응은 다중 PCR을 포함할 수 있다. 하나 이상의 폴리머라제 연쇄 반응은 네스티드 PCR을 포함할 수 있다.

[0767] 하나 이상의 증폭 반응의 수행은 하나 이상의 프라이머의 사용을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 적어도 약 7-9개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 12-15개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 다수의 표지된 핵산의 적어도 일부에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 다수의 표지된 핵산의 3' 말단 및/또는 5' 말단에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 다수의 표지된 핵산의 내부 영역에 어닐링될 수 있다. 내부 영역은 다수의 표지된 핵산의 3' 말단으로부터의 적어도 약 50, 100, 150, 200, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900 또는 1000개의 뉴클레오티드일 수 있다. 내부 영역은 다수의 표지된 핵산의 3' 말단으로부터의 적어도 약 2000개의 뉴클레오티드일 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 프라이머의 고정된 패널을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 하나 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 하나 또는 그 초과의 제어 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 하나 또는 그 초과의 하우스키핑 유전자 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 올리고뉴클레오티드는 표 1 내의 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 프라이머를 포함한다. 범용 프라이머는 범용 프라이머 결합 부위에 어닐링될 수 있다. 범용 프라이머는 범용 PCR 영역에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 샘플 태그의 적어도 일부에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 적어도 일부의 분자 식별 표지에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 적어도 일부의 분자 바코드에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 제1 샘플 태그, 제2 샘플 태그, 분자 식별 표지, 핵산 또는 그의 생성물에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 범용 프라이머 및 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 약 96개 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 약 960개 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프라이머는 적어도 약 9600개 또는 그 초과의 맞춤형 프라이머를 포함할 수 있다. 하나 이상의 맞춤형 프라이머는 2개 이상의 상이한 표지된 핵산에 어닐링될 수 있다. 2개 이상의 상이한 표지된 핵산은 하나 이상의 유전자에 대응할 수 있다.

[0768] 다중 PCR 반응은 네스티드 PCR 반응을 포함할 수 있다. 네스티드 PCR 반응은 제1 프라이머 및 제2 프라이머를 포함하는 한 쌍의 프라이머를 포함할 수 있다. 제1 프라이머는 다수의 핵산의 하나 이상의 핵산의 영역에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 핵산의 영역은 하나 이상의 핵산의 3' 말단으로부터의 적어도 약 300 내지 400개의 뉴클레오티드일 수 있다. 제2 프라이머는 다수의 핵산의 하나 이상의 핵산의 영역에 어닐링될 수 있다. 하나 이상의 핵산의 영역은 하나 이상의 핵산의 3' 말단으로부터의 적어도 200 내지 300개의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0769] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 cDNA 합성 반응을 수행하여 분자 또는 그의 유도체 (예를 들어, 표지된 분자)의 하나 이상의 cDNA 카피를 생산하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 cDNA 합성 반응은 하나 이상의 역전사 반응을 포함할 수 있다.

[0770] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개 또는 그 초과의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000개 또는 그 초과의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 또는 10,000, 또는 100,000, 또는 1,000,000개 또는 그 초과의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 10,000개의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 2개의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 5개의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 10개의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 50개의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 적어도 약 100개의 샘플을 포함할 수 있다.

[0771] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 세포를 포함하는 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 세포를 포함하는 2개 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 제1 샘플은 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다. 제2 샘플은 하나 이상의 세포를 포함할 수 있다. 제1 샘플의 하나 이상의 세포는 제2 샘플의 하나 이상의 세포와 동일한 세포 유형일 수 있다.

[0772] 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 하나 이상의 대상체로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 2명 이상의 대상체로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 동일한 대상체로부터 기원할 수 있다. 2명 이상의 대상체는 동일한 종으로부터 기원할 수 있다. 2명 이상의 대상체는 상이한 종으로

부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 하나 이상의 공급원으로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 2개 이상의 공급원으로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 동일한 대상체로부터 기원할 수 있다. 2개 이상의 공급원은 동일한 종으로부터 기원할 수 있다. 2개 이상의 공급원은 상이한 종으로부터 기원할 수 있다.

[0773] 다수의 샘플은 공동으로 얻을 수 있다. 다수의 샘플은 순차적으로 얻을 수 있다. 다수의 샘플은 둘 이상의 시기에 걸쳐 얻을 수 있다. 둘 이상의 시기는 1시간 이상 차이가 날 수 있다. 둘 이상의 시기는 1일 이상 차이가 날 수 있다. 둘 이상의 시기는 1주 이상 차이가 날 수 있다. 둘 이상의 시기는 1개월 이상 차이가 날 수 있다. 둘 이상의 시기는 1년 이상 차이가 날 수 있다.

[0774] 다수의 샘플은 하나 이상의 체액, 조직, 세포, 장기, 또는 근육으로부터 기원할 수 있다. 다수의 샘플은 하나 이상의 혈액 샘플을 포함할 수 있다.

[0775] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 2개 이상의 샘플은 하나 이상의 핵산을 포함할 수 있다. 2개 이상의 샘플은 2개 이상의 핵산을 포함할 수 있다. 제1 샘플의 하나 이상의 핵산은 제2 샘플의 하나 이상의 핵산과 상이할 수 있다. 제1 샘플 내의 핵산은 제2 샘플 내의 핵산에 적어도 약 50% 동일할 수 있다. 제1 샘플 내의 핵산은 제2 샘플 내의 핵산에 적어도 약 70% 동일할 수 있다. 제1 샘플 내의 핵산은 제2 샘플 내의 핵산에 적어도 약 80% 동일할 수 있다.

[0776] 하나 이상의 샘플 내의 다수의 핵산은 2개 이상의 동일한 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플 내의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%의 전체 핵산은 동일한 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플 내의 다수의 핵산은 적어도 2개의 상이한 서열을 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플 내의 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%의 전체 핵산은 상이한 서열을 포함할 수 있다.

[0777] 다수의 핵산은 RNA, DNA, cDNA, mRNA, 게놈 DNA, 작은 RNA, 비-코딩 RNA, 또는 세포의 다른 핵산 내용물을 포함할 수 있다. 다수의 핵산은 mRNA를 포함할 수 있다. 다수의 핵산은 RNA를 포함할 수 있다. 다수의 핵산은 mRNA를 포함할 수 있다. 다수의 핵산은 DNA를 포함할 수 있다.

[0778] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 다수의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 샘플 인덱스 영역을 포함할 수 있다. 다수의 제1 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역은 다수의 제2 샘플 태그의 샘플 인덱스 영역과 상이할 수 있다. 샘플 태그는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0779] 샘플 태그는 적어도 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 적어도 약 5개 또는 그 초과의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 적어도 약 10개 또는 그 초과의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 약 200개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 약 100개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 샘플 태그는 약 60개 미만의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0780] 샘플 태그는 범용 프라이머 결합 부위를 추가로 포함할 수 있다. 샘플 태그는 범용 PCR 영역을 추가로 포함할 수 있다. 샘플 태그는 하나 이상의 어댑터 영역을 추가로 포함할 수 있다. 샘플 태그는 하나 이상의 표적-특이적 영역을 추가로 포함할 수 있다.

[0781] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 2개 이상의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 50개 또는 그 초과의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 90개 또는 그 초과의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 100개 또는 그 초과의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 300개 또는 그 초과의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 500개 또는 그 초과의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 960개 또는 그 초과의 상이한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 다수의 카피의 하나 이상의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 2개 이상의 다수의 분자 식별 표지는 하나 이상의 동일한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 2개 이상의 다수의 분자 식별 표지는 10개 또는 그 초과의 동일한 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 다수의 제1 분자 식별 표지의 분자 식별 표지는 다수의 제2 분자 식별 표지의 분자 식별 표지에 적어도 약 30% 동일할 수 있다. 다수의 제1 분자 식별 표지의 분자 식별 표지는 다수의 제2 분자 식별 표지의 분자 식별 표지에 적어도 약 50% 동일할 수 있

다. 다수의 제1 분자 식별 표지의 분자 식별 표지는 다수의 제2 분자 식별 표지의 분자 식별 표지에 적어도 약 80% 동일할 수 있다.

[0782] 분자 식별 표지는 표지 영역 (예를 들어, 분자 표지 영역, 분자 인덱스 영역)을 포함할 수 있다. 다수의 제1 분자 식별 표지의 2개 이상의 분자 식별 표지의 표지 영역은 상이할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 적어도 약 20개의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 적어도 약 50개의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 적어도 약 96개의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 적어도 약 200개의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 적어도 약 500개의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 분자 식별 표지는 적어도 약 960개의 상이한 표지 영역을 포함할 수 있다.

[0783] 분자 식별 표지는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 적어도 약 20, 30, 40, 50개 또는 그 초과의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 적어도 약 21개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0784] 분자 식별 표지는 표적-특이적 영역을 추가로 포함할 수 있다. 표적-특이적 영역은 올리고dT 서열을 포함할 수 있다.

[0785] 분자 식별 표지는 하나 이상의 염료 표지를 추가로 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 Cy3 염료를 추가로 포함할 수 있다. 분자 식별 표지는 Tye563 염료를 추가로 포함할 수 있다.

[0786] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 표지된 분자를 포함할 수 있다. 하나 이상의 표지된 분자는 다수의 분자를 다수의 샘플 태그와 접촉시켜 생산될 수 있다. 하나 이상의 표지된 분자는 다수의 핵산을 다수의 샘플 태그와 접촉시켜 생산될 수 있다. 다수의 핵산을 다수의 샘플 태그와 접촉시키는 것은 하나 이상의 샘플 태그를 하나 이상의 핵산에 라이게이션하는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 다수의 샘플 태그와 접촉시키는 것은 하나 이상의 샘플 태그를 하나 이상의 핵산에 혼성화시키는 것을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 다수의 샘플 태그와 접촉시키는 것은 하나 이상의 핵산 연장 반응을 수행하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산 연장 반응은 역전사를 포함할 수 있다.

[0787] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 다수의 핵산에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 방법 및 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 샘플 태그부착된 핵산에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 방법 및 키트는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 링커를 표지된 핵산에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 링커는 적어도 약 10개의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0788] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 표지된 핵산을 지지체에 부착하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 지지체는 고체 지지체를 포함할 수 있다. 지지체는 비드를 포함할 수 있다. 지지체는 어레이를 포함할 수 있다. 지지체는 유리 슬라이드를 포함할 수 있다.

[0789] 지지체에 대한 표지된 핵산의 부착은 아민-티올 가교결합, 말레이미드 가교결합, N-히드록시숙신이미드 또는 N-히드록시술포숙신이미드, 제논, 사이트클릭, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 표지된 핵산을 지지체에 부착하는 것은 비오틴을 하나 이상의 표지된 핵산에 부착하는 것을 포함할 수 있다.

[0790] 지지체는 하나 이상의 비드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 비드는 코팅된 비드일 수 있다. 코팅된 비드는 스트렙타비딘으로 코팅될 수 있다.

[0791] 지지체는 어레이를 포함할 수 있다. 어레이는 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 표지된 핵산은 하나 이상의 프로브에 부착될 수 있다. 하나 이상의 프로브는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프로브는 표지된 핵산의 적어도 일부에 부착될 수 있다. 하나 이상의 프로브에 부착된 표지된 핵산의 일부는 적어도 일부의 샘플 태그, 분자 식별 표지, 분자 바코드, 핵산, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0792] 지지체는 유리 슬라이드를 포함할 수 있다. 유리 슬라이드는 하나 이상의 웰을 포함할 수 있다. 하나 이상의 웰은 유리 슬라이드 상에 식각될 수 있다. 하나 이상의 웰은 적어도 960개의 웰을 포함할 수 있다. 유리 슬라이드는 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 하나 이상의 프로브는 유리 슬라이드 상에 인쇄될 수 있다. 하나 이상의 웰은 하나 이상의 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 프로브는 하나 이상의 웰 내에 인쇄될 수 있다. 하나 이상의 프로브는 960개의 핵산을 포함할 수 있다. 핵산은 상이할 수 있다. 핵산은 동일할 수 있다.

[0793] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 샘플 내의 하나 이상의 분자의 총수를 결정하기 위해 사용될 수 있

다. 하나 이상의 분자의 총수의 결정은 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것을 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산의 적어도 일부의 검출을 포함할 수 있다. 적어도 일부의 표지된 핵산의 검출은 적어도 일부의 샘플 태그, 분자 식별 표지, 분자 바코드, 핵산, 또는 이들의 조합의 검출을 포함할 수 있다.

[0794] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 서열분석을 포함할 수 있다. 서열분석은 MiSeq 서열분석을 포함할 수 있다. 서열분석은 HiSeq 서열분석을 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 어레이를 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 하나 이상의 프로브와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

[0795] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 어레이와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 어레이는 다수의 프로브를 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 다수의 프로브의 유리 슬라이드와 접촉시키는 것을 포함할 수 있다.

[0796] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 프로브 혼성화, 표적-특이적 증폭, 표적-특이적 서열분석, 표적 작은 뉴클레오티드 다형성에 특이적인 표지된 뉴클레오티드를 사용한 서열분석, 제한 효소 소화 패턴에 특이적인 표지된 뉴클레오티드를 사용한 서열분석, 돌연변이에 특이적인 표지된 뉴클레오티드를 사용한 서열분석, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0797] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 서열-특이적 표지의 유동 세포측정법 분류를 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 비드에 부착된 표지된 핵산의 검출을 포함할 수 있다. 비드에 부착된 표지된 핵산의 검출은 형광 검출을 포함할 수 있다.

[0798] 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표적-특이적 프로브와 표지된 핵산 또는 표적-특이적 표지된 프로브 사이의 형광 공명 에너지 전달 (FRET)에 의해 다수의 표지된 핵산을 계수하는 것을 포함할 수 있다. 상이한 표지된 핵산의 수를 결정하는 것은 표지된 핵산을 지지체에 부착하는 것을 포함할 수 있다.

[0799] 본원에 개시된 방법 및 키트는 핵산 결합 단백질로 표적 서열을 면역침전시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0800] 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 샘플을 마이크로웰 플레이트의 다수의 웰 내로 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 샘플은 다수의 세포를 포함할 수 있다. 하나 이상의 다수의 샘플은 다수의 핵산을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 또는 그보다 더 적은 세포를 다수의 웰에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 다수의 세포는 마이크로웰 플레이트 내에서 용해될 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 마이크로웰 플레이트 내에서 cDNA를 합성하는 것을 추가로 포함할 수 있다. cDNA의 합성은 mRNA의 역전사를 포함할 수 있다.

[0801] 본원에 개시된 방법 및 키트는 다수의 제1 샘플 태그, 다수의 제2 샘플 태그, 다수의 분자 식별 표지, 또는 이들의 임의의 조합물을 마이크로웰 플레이트 내로 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0802] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 비드를 마이크로웰 플레이트 내에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 소프트 리소그래피에 의해 PDMS 상에 제작되거나 실리콘 웨이퍼 상에 식각되거나 유리 슬라이드 상에 식각된 마이크로웰 플레이트, 유리 슬라이드 상의 패터닝된 포토레지스트, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 마이크로웰은 미세모세관 플레이트 상의 홀을 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 유중수형 에멀젼을 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 적어도 하나 또는 그 초과의 웰을 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 적어도 약 6 웰, 12 웰, 48 웰, 96 웰, 384 웰, 960 웰 또는 1000 웰을 포함할 수 있다.

[0803] 본원에 개시된 방법 및 키트는 칩을 추가로 포함할 수 있다. 마이크로웰 플레이트는 칩에 부착될 수 있다. 칩은 적어도 약 6 웰, 12 웰, 48 웰, 96 웰, 384 웰, 960 웰, 1000 웰, 2000 웰, 3000 웰, 4000 웰, 5000 웰, 6000 웰, 7000 웰, 8000 웰, 9000 웰, 10,000 웰, 20,000 웰, 30,000 웰, 40,000 웰, 50,000 웰, 60,000 웰, 70,000 웰, 80,000 웰, 90,000 웰, 100,000 웰, 200,000 웰, 500,000 웰, 또는 1백만 웰을 포함할 수 있다. 웰은 적어도 약 300 제곱마이크로미터, 400 제곱마이크로미터, 500 제곱마이크로미터, 600 제곱마이크로미터, 700 제곱마이크로미터, 800 제곱마이크로미터, 900 제곱마이크로미터, 1000 제곱마이크로미터, 1100 제곱마이크로미터, 1200 제곱마이크로미터, 1300 제곱마이크로미터, 1400 제곱마이크로미터, 1500 제곱마이크로미터의 면적을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 약 10,000 내지 30,000개의 샘플을 칩 상에 분포시키는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0804] 본원에 개시된 방법 및 키트는 병태, 질환, 또는 장애의 진단이 필요한 대상체에서 진단을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0805] 본원에 개시된 방법 및 키트는 병태, 질환, 또는 장애의 예측이 필요한 대상체에서 예측을 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 키트는 병태, 질환, 또는 장애의 치료가 필요한 대상체에서 치료를 수행하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0806] 다수의 샘플은 질환 또는 병태를 앓고 있는 대상체로부터의 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다. 다수의 샘플은 건강한 대상체로부터의 하나 이상의 샘플을 포함할 수 있다.

[0807] 또한, a) 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 분자를 확률적으로 표지하여 2개 이상의 표지된 분자를 생산하고; b) 2개 이상의 표지된 분자를 검출하는 것을 포함하는, 법의학 분석 방법이 본원에 개시된다.

[0808] 맞춤형 프라이머의 선택 방법은 하나 이상의 핵산을 기초로 하여 맞춤형 프라이머를 선택하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 mRNA 전사체, 구조 RNA를 포함하는 비-코딩 전사체, 전사된 위유전자, 게놈 주해 과정에 의해 제시되는 모델 mRNA, 게놈 콘티그에 대응하는 서열, 또는 이들의 임의의 조합물을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 RNA일 수 있다. 하나 이상의 핵산은 mRNA일 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 엑손을 포함할 수 있다. 맞춤형 프라이머의 선택 방법은 하나 이상의 하위세트의 핵산의 농축을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 하위세트는 저풍부도의 mRNA를 포함한다. 맞춤형 프라이머의 선택 방법은 컴퓨터 알고리즘을 추가로 포함할 수 있다.

[0809] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 대조군의 사용을 포함할 수 있다. 하나 이상의 대조군은 대조군에서 스파이킹될 수 있다. 하나 이상의 대조군은 핵산을 포함할 수 있다. 다수의 핵산을 포함하는 하나 이상의 샘플은 하나 이상의 대조군 핵산으로 스파이킹될 수 있다. 하나 이상의 대조군 핵산은 표지된 핵산 라이브러리의 생산 효율을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0810] 본원에 개시된 방법 및 키트는 하나 이상의 핵산 라이브러리의 생산에 사용될 수 있다. 하나 이상의 핵산 라이브러리는 다수의 표지된 핵산 또는 그의 유도체 (예를 들어, 표지된 앰플리콘)를 포함할 수 있다. 표지된 핵산 라이브러리의 생산 방법은 2개 이상의 샘플 내의 2개 이상의 핵산을 2개 이상의 세트의 분자 바코드로 확률적 표지하여 다수의 표지된 핵산을 생산하는 것을 포함할 수 있다. 표지된 핵산 라이브러리의 생산 방법은 2개 이상의 샘플을 다수의 샘플 태그 및 다수의 분자 특이적 표지와 접촉시켜 다수의 표지된 핵산을 생산하는 것을 포함할 수 있다. 표지된 핵산은 샘플 인덱스 영역, 표지 영역 및 핵산 영역을 포함할 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 샘플 또는 하위-샘플 정체성을 핵산에 부여하기 위해 사용될 수 있다. 샘플 인덱스 영역은 핵산의 공급원을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 표지 영역은 특유한 정체성을 핵산에 부여하여, 동일한 샘플 또는 하위-샘플 내의 2개 이상의 동일한 핵산의 구별을 가능하게 하기 위해 사용될 수 있다.

[0811] 핵산 라이브러리의 생산 방법은 하나 이상의 표지된 핵산을 증폭시켜 하나 이상의 풍부화된 표지된 핵산을 생산하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 방법은 하나 이상의 풍부화된 표지된 핵산의 하나 이상의 풀다운 검정을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 방법은 하나 이상의 풍부화된 표지된 핵산을 정제하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0812] 본원에 개시된 키트는 다수의 비드, 프라이머 및/또는 증폭제를 포함할 수 있다. 하나 이상의 키트는 적어도 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개 또는 그 초과의 샘플 또는 하위-샘플의 분석에 사용될 수 있다. 하나 이상의 키트는 적어도 약 96개의 샘플의 분석에 사용될 수 있다. 하나 이상의 키트는 적어도 약 384개의 샘플의 분석에 사용될 수 있다. 키트는 프라이머 설계 및 최적화를 위한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다.

[0813] 키트는 하나 이상의 마이크로웰 플레이트를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 비드의 분포를 위해 하나 이상의 마이크로웰 플레이트가 사용될 수 있다. 하나 이상의 샘플로부터의 하나 이상의 분자 또는 그의 유도체 (예를 들어, 표지된 분자, 표지된 앰플리콘)의 분포를 위해 하나 이상의 마이크로웰 플레이트가 사용될 수 있다.

[0814] 키트는 하나 이상의 추가의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기는 하나 이상의 추가의 다수의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기 내의 하나 이상의 추가의 다수의 샘플 태그는 제1 용기 내의 다수의 제1 샘플 태그와 상이할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기는 하나 이상의 추가의 다수의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기의 하나 이상의 추가의 다수의 분자 식별 표지는 제2

용기의 하나 이상의 추가의 분자 식별 표지에 적어도 약 50% 동일할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기의 하나 이상의 추가의 다수의 분자 식별 표지는 제2 용기의 하나 이상의 추가의 분자 식별 표지에 적어도 약 80% 동일할 수 있다. 하나 이상의 추가의 용기의 하나 이상의 추가의 다수의 분자 식별 표지는 제2 용기의 하나 이상의 추가의 분자 식별 표지에 적어도 약 90% 동일할 수 있다.

[0815] 또한, 하나 이상의 세트의 표지된 비드의 생산 방법이 본원에 개시된다. 하나 이상의 세트의 표지된 비드의 생산 방법은 하나 이상의 핵산을 하나 이상의 비드에 부착하여 하나 이상의 세트의 표지된 비드를 생산하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 분자 바코드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 샘플 태그를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 분자 식별 표지를 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 프라이머 영역; b) 샘플 인덱스 영역; 및 c) 링커 또는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 프라이머 영역; b) 표지 영역; 및 c) 링커 또는 어댑터 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 a) 샘플 인덱스 영역; 및 b) 표지 영역을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 프라이머 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 표적 특이적 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 링커 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 어댑터 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 샘플 인덱스 영역을 추가로 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산은 표지 영역을 추가로 포함할 수 있다.

[0816] 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 프라이머 영역은 적어도 약 70% 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 프라이머 영역은 적어도 약 90% 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 프라이머 영역은 동일할 수 있다.

[0817] 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 적어도 약 70% 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 적어도 약 90% 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 샘플 인덱스된 (indexed) 비드에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 약 40% 미만이 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 샘플 인덱스된 비드에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 약 50% 미만이 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 샘플 인덱스된 비드에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 약 60% 미만이 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 샘플 인덱스된 비드에 대한 핵산의 샘플 인덱스 영역은 상이할 수 있다.

[0818] 2개 이상의 세트의 표지된 비드에 대한 핵산의 표지 영역은 적어도 약 70% 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 표지된 비드에 대한 핵산의 표지 영역은 적어도 약 90% 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 표지된 비드에 대한 핵산의 표지 영역은 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 표지 영역은 약 40% 미만이 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 표지 영역은 약 50% 미만이 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 표지 영역은 약 60% 미만이 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 2개 이상의 핵산의 표지 영역은 상이할 수 있다.

[0819] 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 링커 또는 어댑터 영역은 적어도 약 70% 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 링커 또는 어댑터 영역은 적어도 약 90% 동일할 수 있다. 표지된 비드의 세트에 대한 핵산의 링커 또는 어댑터 영역은 동일할 수 있다.

[0820] 2개 이상의 세트의 표적 특정된 비드에 대한 핵산의 표적 특이적 영역은 적어도 약 70% 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 표적 특정된 비드에 대한 핵산의 표적 특이적 영역은 적어도 약 90% 동일할 수 있다. 2개 이상의 세트의 표적 특정된 비드에 대한 핵산의 표적 특이적 영역은 동일할 수 있다. 표적 특정된 비드의 세트에 대한 핵산의 표적 특이적 영역은 약 40% 미만이 동일할 수 있다. 표적 특정된 비드의 세트에 대한 핵산의 표적 특이적 영역은 약 50% 미만이 동일할 수 있다. 표적 특정된 비드의 세트에 대한 핵산의 표적 특이적 영역은 약 60% 미만이 동일할 수 있다. 표적 특정된 비드의 세트에 대한 2개 이상의 핵산의 표적 특이적 영역은 상이할 수 있다.

[0821] 하나 이상의 세트의 표지된 비드는 1백만 개 또는 그 초과의 표지된 비드를 포함할 수 있다. 하나 이상의 세트의 표지된 비드는 1천만 개 또는 그 초과의 표지된 비드를 포함할 수 있다.

[0822] 하나 이상의 핵산을 비드에 부착하는 것은 공유 부착을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산을 비드에 부착하는 것은 접합을 포함할 수 있다. 하나 이상의 핵산을 비드에 부착하는 것은 이온 상호작용을 포함할 수 있다.

[0823] 비드는 코팅된 비드일 수 있다. 핵산은 하나 이상의 태그에 부착될 수 있다. 비드는 스트렙타비딘으로 코팅될 수 있다. 핵산은 비오틴에 부착될 수 있다. 비드는 또한 항체 또는 핵산으로 코팅될 수 있고, 핵산은 상기 표면 코팅된 물질을 통해 비드에 간접적으로 부착될 수 있다.

[0824] 한 측면에서, 본 개시내용은 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 상기 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 세포 표지는 동일하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 표적 핵산에 혼성화하도록 조정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 무작위 다량체, 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 임의의 길이의 그 초과의 다량체 서열; 유전자-특이적 프라이머; 및 올리고dT; 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 표지는 서열분석 프라이머를 위한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 상기 올리고뉴클레오티드의 5'에 위치한다. 일부 실시양태에서, 링커는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리스티렌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자성이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 PDMS 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체, 아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 및 플루로닉 고체 지지체, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 20 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 5 마이크로미터 내지 약 40 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 다수의 세포 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 표지는 다수의 링커 표지 서열 사이에 배치된다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다.

[0825] 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 무작위 서열, 제2 무작위 서열, 및 상기 제1 무작위 서열 및 상기 제2 무작위 서열을 연결하는 제1 링커 표지 서열을 포함하는 제1 세포 표지 및 무작위 서열을 포함하는 제1 분자 표지를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드; 및 제3 무작위 서열, 제4 무작위 서열, 및 상기 제3 무작위 서열 및 상기 제4 무작위 서열을 연결하는 제2 링커 표지 서열을 포함하는 제2 세포 표지 및 무작위 서열을 포함하는 제2 분자 표지를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드 (여기서, 상기 제1 세포 표지 및 상기 제2 세포 표지는 동일하고, 상기 제1 분자 표지 및 상기 제2 분자 표지는 상이하다)를 포함하는 고체 지지체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드는 동일한 샘플 인덱스 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 인덱스 영역은 무작위 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 인덱스 영역의 길이는 4-12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 상기 분자 표지에 직접 부착된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지 및 상기 분자 표지는 링커 표지 서열을 통해 부착된다. 일부 실시양태에서, 상기 세포 표지의 무작위 서열의 길이는 4-12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 상기 세포 표지의 불변 서열의 길이는 적어도 4개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지의 총 길이는 적어도 12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 하나 이상의 추가의 무작위 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 하나 이상의 추가의 링커 표지 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가의 링커 표지 서열은 하나 이상의 추가의 무작위 서열에 연결된다. 일부 실시양태에서, 분자 표지의 무작위 서열의 길이는 4-12개 뉴클레오티드이다.

[0826] 한 측면에서, 본 개시내용은 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지, 분자 표지; 및 표적 결합 영역; 및 다수의 표적 핵산을 포함하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 세포 표지는 동일하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 적어도 하나의 상기 다수의 표적 핵산에 혼성화하도록 조정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 무작위 무작위 다량체 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 임의의 길이의 그 초과의 다량체 서열; 유전자-특이적 프라이머; 및 올리고dT; 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 상기 다수의 표적 핵산의 표적 핵산의 수보다 많은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 표적 핵산은 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 포함한다. 일부 실

시양태에서, 다수의 표적 핵산은 상이한 표적 핵산의 다수의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 표적 핵산은 상기 다수의 올리고뉴클레오티드에 결합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 표지는 서열분석 프라이머에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 상기 올리고뉴클레오티드의 5'에 위치한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 아미노기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리스티렌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자성이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 PDMS 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체, 아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 및 플루로닉 고체 지지체, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 20 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 5 마이크로미터 내지 약 40 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 카르복시기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 다수의 세포 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 표지는 다수의 링커 표지 서열 사이에 배치된다.

[0827] 한 측면에서, 본 개시내용은 동일한 제1 세포 표지를 포함하는 다수의 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 고체 지지체, 동일한 제2 세포 표지를 포함하는 다수의 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제2 고체 지지체, 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공하고, 상기 제1 세포 표지 및 상기 제2 세포 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 상기 다수의 제1 올리고뉴클레오티드를 형성하고, 상기 다수의 제2 올리고뉴클레오티드는 분자 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 상기 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 동일하다. 일부 실시양태에서, 일부의 상기 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하고, 일부는 동일하다. 일부 실시양태에서, 상기 다수의 제1 올리고뉴클레오티드 및 상기 다수의 제2 올리고뉴클레오티드로부터의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 마이크로웰 어레이를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 재구성 완충제, 희석 완충제, 및 안정화 완충제, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0828] 한 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 고체 지지체와 접촉시키고, 여기서 상기 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 세포 표지는 동일하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지는 상이하고; 상기 샘플로부터의 상기 표적 핵산을 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함하는, 표적 핵산의 양을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 상기 혼성화 전에 용해된다. 일부 실시양태에서, 혼성화는 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 상기 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 표적 핵산의 증폭을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 표적 핵산의 역전사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 PCR, 정량적 PCR, 실시간 PCR, 및 디지털 PCR, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체에 대해 직접 수행된다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체로부터 전사되는 주형에 대해 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 표적 핵산의 서열분석을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석은 상기 표적 핵산 및 상기 분자 표지의 서열분석을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 표적 핵산의 양을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 결정은 상기 표적 핵산의 수준을 정량하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결정은 상기 표적 핵산에 대해 서열 결정된 분자 표지의 수를 계수하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 마이크로웰에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 친수성 플라스틱, 플라스틱, 엘라스토머, 및 히드로겔, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 아가로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 마이크로웰 어레이의 하나의 마이크로웰이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 적어도 90개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 적어도 150,000개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 적어도 하나 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 최대 2개의 고체 지지체를 포함한다. 일부

실시양태에서, 마이크로웰은 최대 2개의 상기 고체 지지체를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 최대 하나의 고체 지지체를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 적어도 25 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 적어도 25 마이크로미터이다.

[0829] 한 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 고체 지지체에 접촉시키고, 상기 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 세포 표지는 동일하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지는 상이하고; 상기 샘플로부터의 표적 핵산을 상기 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키고; 상기 표적 핵산을 증폭시키고; 상기 표적 핵산을 서열분석하고, 상기 서열분석은 상기 표적 핵산 및 상기 표적 핵산이 결합되는 상기 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지를 서열분석하고; 상기 표적 핵산의 양을 결정하는 것을 포함하는, 표적 핵산의 증폭 편차를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 혼성화는 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 상기 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결정은 동일한 표적 핵산에 대한 다수의 서열분석된 분자 표지를 계수하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 계수는 상기 동일한 표적 핵산의 카피수를 계수한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 표적 핵산의 역전사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 PCR, 정량적 PCR, 실시간 PCR, 및 디지털 PCR, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체에 대해 직접 수행된다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체로부터 전사되는 주형에 대해 수행된다.

[0830] 한 측면에서, 본 개시내용은 마이크로웰; 세포; 및 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 상기 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 세포 표지는 동일하고, 상기 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 상기 다수의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 무작위 다량체, 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 임의의 길이의 그 초과의 다량체 서열; 유전자-특이적 프라이머; 및 올리고dT; 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 표지는 서열분석 프라이머에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리스티렌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자성이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 PDMS 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체, 아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 및 플루로닉 고체 지지체, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 20 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 5 마이크로미터 내지 약 40 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 다수의 세포 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 표지는 다수의 링커 서열 사이에 배치된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 친수성 플라스틱, 플라스틱, 엘라스토머, 및 히드로겔, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 아가로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 마이크로웰 어레이의 마이크로웰이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 적어도 하나 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 최대 2개의 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 적어도 하나의 상기 고체 지지체 및 적어도 하나의 상기 세포를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 최대 하나의 상기 고체 지지체 및 적어도 하나의 상기 세포를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 적어도 25 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 적어도 25 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 편평하다.

[0831] 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 마이크로웰 어레이를 포함하는 제1 기판을 포함하는 기기를 제공하고; 상기 제1 마이크로웰 어레이는 다수의 제1 마이크로웰을 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된 미리 결정된 제1 공간 배열로 포함한다.

[0832] 일부 실시양태에서, 기기는 적어도 제2 마이크로웰 어레이를 포함하는 제1 기판을 포함하고, 상기 적어도 제2 마이크로웰 어레이는 다수의 적어도 제2 마이크로웰을 적어도 미리 결정된 제2 공간 배열로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 마이크로웰 및 적어도 제2 마이크로웰은 동일하다. 일부 실시양태에서, 제1 마이크로웰 및 적어도 제2 마이크로웰은 상이하다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 제1 공간 배열 및 적어도 미리 결정된 제2

공간 배열은 동일하다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 제1 공간 배열 및 적어도 미리 결정된 제2 공간 배열은 상이하다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 공간 배열은 1차원 또는 2차원 어레이 패턴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차원 어레이 패턴은 정사각형 그리드, 직사각형 그리드, 또는 육각형 그리드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 원통형 기하학, 원추형 기하학, 반구형 기하학, 직사각형 기하학, 다면체 기하학, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 약 5 마이크로미터 내지 약 50 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 약 10 마이크로미터 내지 약 60 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 2개의 인접한 마이크로웰 사이의 중심-대-중심 간격은 약 15 마이크로미터 내지 약 75 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 적어도 제2 마이크로웰 어레이 내의 마이크로웰의 총수는 약 96 내지 약 5,000,000개이다. 일부 실시양태에서, 제1 기판은 규소, 용융-실리카, 유리, 중합체, 금속, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 기판은 아가로스 또는 히드로겔을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 적어도 하나 표면 특징부를 추가로 포함하고, 상기 표면 특징부는 하나 이상의 개별 마이크로웰을 둘러싸거나, 개별 마이크로웰들 사이에 표면에 걸쳐있고, 상기 표면 특징부는 반구형이거나, 융기형이거나, 피크형이다.

[0833] 한 측면에서, 본 개시내용은 적어도 제1 마이크로웰 어레이를 포함하는 제1 기판; 및 상단부 플레이트, 저변부 플레이트, 및 가스켓을 포함하는 기계적 고정기를 포함하는 기기를 제공하고; 여기서, 제1 기판 및 기계적 고정기는 조립된 형태로 존재하고, 제1 기판은 가스켓과 저변부 플레이트 사이에 배치되고, 가스켓은 제1 기판과 새지 않는 밀봉을 형성하고, 상단부 플레이트 및 가스켓은 상기 적어도 제1 마이크로웰 어레이를 포함하는 적어도 제1 챔버를 형성하여, 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 세포 샘플 및 비드-기반 올리고뉴클레오티드 표지는 상기 적어도 제1 챔버 내로 분배될 수 있다.

[0834] 일부 실시양태에서, 적어도 제1 마이크로웰 어레이는 임의의 본원에서 설명되는 것이다. 일부 실시양태에서, 가스켓은 폴리디메틸실록산 (PDMS) 또는 유사한 엘라스토머 물질로 제작된다. 일부 실시양태에서, 상단부 및 저변부 플레이트는 알루미늄, 양극 알루미늄, 스테인레스 강철, 테플론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리카르보네이트, 또는 유사한 경질 중합체 물질로 제작된다.

[0835] 한 측면에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 적어도 하나의 기판; 및 유동 셀을 포함하는 기기를 제공하고; 여기서 유동 셀은 상기 적어도 하나 기판을 에워싸거나 기판에 부착되고, 상기 마이크로웰 어레이에 유체를 전달하기 위해 적어도 하나 유입 포트 및 적어도 하나 유출 포트를 포함하고; 기기는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된다.

[0836] 일부 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 기판은 본원에서 설명되는 적어도 하나의 마이크로웰 어레이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 하나 이상의 샘플이 병행으로 처리될 수 있도록 다수의 마이크로웰 어레이와 접속하는 다수의 마이크로어레이 챔버를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 적어도 하나의 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하도록 다공성 장벽 또는 유동 확산기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 마이크로웰 어레이를 포함하는 각각의 챔버를 집합적으로 동일한 전체 어레이 영역을 덮는 하위구역으로 나누고 적어도 하나의 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하는 분할기 (divider)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기기 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 50 마이크로미터 내지 20 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 기기 내에 포함되는 유체 채널의 깊이는 약 50 마이크로미터 내지 약 2 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 규소, 용융-실리카, 유리, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET), 에폭시 수지, 금속, 또는 이들 물질의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 기기는 자동화된 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된 기구 시스템의 고정된 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기기는 자동화된 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된 기구 시스템의 제거가능한 성분을 포함한다.

[0837] 한 측면에서, 본 개시내용은 적어도 제1 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 적어도 제1 기판; 적어도 제1 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버; 하나 이상의 샘플 또는 시약 저장소를 포함하는 카트리지를 제공하고, 여기서 카트리지는 유체를 상기 적어도 제1 마이크로웰 어레이에 전달하기 위한 적어도 하나의 유입 포트 및 적어도 하나의 유출 포트를 추가로 포함하고; 카트리지는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된다.

[0838] 일부 실시양태에서, 상기 적어도 제1 기판은 본원에서 설명되는 적어도 제1 마이크로웰 어레이를 포함한다. 일

부 실시양태에서, 카트리지는 다수의 마이크로웰 어레이를 포함하고, 하나 이상의 샘플이 병행으로 처리되도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 적어도 제1 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 적어도 제1 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하도록 다공성 장벽 또는 유동 확산기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 제1 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 적어도 제1 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버를 집합적으로 동일한 전체 어레이 영역을 덮는 하위구역으로 나누고 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하는 분할기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 50 마이크로미터 내지 200 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 200 마이크로미터 내지 2 mm이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 2 mm 내지 10 mm이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 10 mm 내지 20 mm이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내로 도입되는 유체 채널의 깊이는 약 50 마이크로미터 내지 약 2 mm이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 깊이는 약 500 마이크로미터 내지 1 mm이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 깊이는 약 1 mm 내지 약 2 mm이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 규소, 용융-실리카, 유리, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET), 에폭시 수지, 금속, 또는 이들 물질의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 기기는 자동화된 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된 기구 시스템의 제거가능한 소모성 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 카트리지 내로 분배되거나 주입된 세포 샘플 또는 비드 현탁액의 자가-계량을 제공하기 위한 우회 채널 또는 다른 설계 특징부를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 기기를 통한 유체 유동을 제어하기 위한 통합된 축소형 펌프를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 미리 로딩된 시약을 구획화하고 기기를 통한 유체 유동을 제어하기 위한 통합된 축소형 밸브를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 포획된 공기를 위한 탈출 경로를 제공하는 배기구를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 통로 길이를 효과적으로 증가시키고 마이크로웰 사이에 분자의 확산을 방지하거나 최소화하는 물리적 또는 화학적 장벽을 생성하기 위한 설계 부재를 추가로 포함하고, 여기서 설계 부재는 적어도 제1 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 전달을 위한 사형 채널의 패턴, 적어도 제1 마이크로웰 어레이의 표면과 접촉하도록 눌리는 철회가능한 압반 또는 변형가능한 막, 또는 카트리지 내에서 저장소로부터 비혼화성의 소수성 유체의 방출로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 외부 기구 시스템과 우수한 열 우수한 열 접촉을 제공하는 통합된 온도 제어 성분 또는 통합된 열 인터페이스를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 적어도 제1 마이크로웰 어레이의 광학적 영상화를 위한 광학 인터페이스 또는 창을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 접속하도록 구성된 하나 이상의 제거가능한 샘플 수집 챔버를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지 자체가 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 직접 접속하도록 구성된다.

[0839] 한 측면에서, 본 개시내용은 적어도 제1 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 적어도 제1 유동 셀 또는 카트리지; 및 유동 제어기를 포함하는 기구 시스템을 제공하고; 여기서 유동 제어기는 적어도 제1 마이크로웰 어레이에 세포 샘플, 비드-기반 올리고뉴클레오티드 표지화 시약, 및 다른 검정 시약의 전달을 제어하고, 기구 시스템은 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된다.

[0840] 일부 실시양태에서, 적어도 제1 마이크로웰 어레이는 임의의 본원에서 설명되는 것이다. 일부 실시양태에서, 적어도 제1 유동 셀은 시스템의 고정된 성분이다. 일부 실시양태에서, 적어도 제1 유동 셀은 시스템의 제거가능한 소모성 성분이다. 일부 실시양태에서, 적어도 제1 카트리지는 시스템의 제거가능한 소모성 성분이다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 및 비드-기반 올리고뉴클레오티드 시약은 카트리지 내로 분배되거나 사용자에 의해 직접 주입된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 이외의 검정 시약을 카트리지에 미리 로딩한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 적어도 제1 마이크로웰 어레이를 영상화하기 위한 영상화 시스템을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 적어도 제1 마이크로웰 어레이에 걸쳐 세포 및 비드의 균일한 분포를 용이하게 하기 위한 세포 또는 비드 분포 시스템을 추가로 포함하고, 여기서 상기 분포 시스템의 기초를 이루는 메카니즘은 요동, 진탕, 소용돌이, 재순환류, 저빈도 교반, 또는 고빈도 교반으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 세포 용해 시스템을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 시스템은 세포를 초음파 처리하기 위해 고빈도 압전 변환기를 사용한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 사용자-특정된 온도를 유지하거나, 또는 둘 이상의 특정된 시간 간격에 걸쳐 둘 이상의 특정된 온도 사이에서 온도를 변경하기 위한 온도 제어기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 마이크로웰로부터 비드를 용리할 때 사용하기 위한

자기장 제어기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 사용자 인터페이스 및 시스템 기능의 제어를 제공하도록 프로그램가능한 컴퓨터 또는 프로세서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 실시간 영상 분석 능력을 제공하기 위한 프로그램 코드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 실시간 영상 분석 및 기구 제어 기능이 연결되어, 최적 세포/비드 분포가 달성될 때까지 세포 및 비드 샘플 로딩 단계가 연장되거나 반복될 수 있다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 올리고뉴클레오티드 표지의 증폭을 위한 통합된 PCR 열 싸이클러를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 올리고뉴클레오티드 라이브러리의 서열분석을 위한 통합된 시퀀서를 추가로 포함하고, 이에 의해 샘플 응답능 (sample-to-answer capability)이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 환자 샘플을 포함하고, 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정의 결과는 임상 진단 용도를 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 환자 샘플을 포함하고, 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정의 결과는 충분한 설명에 기초한 의료적 치료 결정을 위해 의료 제공자에 의해 사용된다.

[0841] 한 측면에서 본 개시내용은 하나 이상의 다음 서열 데이타 분석 기능을 수행하기 위해 프로그램가능한 컴퓨터 판독가능 매체에 존재하는 소프트웨어를 제공한다: 세포당 유전자당 판독물의 수, 및 세포당 유전자당 특유한 전사체 분자의 수의 결정; 세포당 유전자당 전사체 분자의 수의 결정을 위한 신뢰 구간을 예측하기 위한 주요 성분 분석 또는 다른 통계 분석; 공지의 참조 서열과 유전자 서열 데이타의 정렬; 샘플 바코드, 세포 바코드, 및 분자 바코드의 해독/역다중화; 및 증폭 또는 서열분석 오류를 보상하기 위한 분자 표지의 자동화된 군집화 (여기서, 서열 데이타는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행함으로써 생성된다).

[0842] 한 측면에서, 본 개시내용은 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다.

[0843] 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 표적 핵산에 혼성화하도록 조정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 유기체의 트랜스크립톰의 적어도 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 전사체를 포함하는 다수의 표적 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 DNA이다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 RNA이다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 mRNA이다. 일부 실시양태에서, DNA는 게놈 DNA이다. 일부 실시양태에서, 게놈 DNA는 전단된다. 일부 실시양태에서, 전단된 게놈 DNA는 유기체의 게놈의 적어도 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 무작위 다량체, 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 임의의 길이의 그 초과의 다량체 서열; 유전자-특이적 프라이머; 및 올리고dT; 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 표지는 서열분석 프라이머에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 올리고뉴클레오티드의 5'에 위치한다. 일부 실시양태에서, 링커는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리스티렌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자성이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 PDMS 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체, 아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 플루로닉 고체 지지체, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 20 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 5 마이크로미터 내지 약 40 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 다수의 세포 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 표지는 다수의 링커 표지 서열 사이에 배치된다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 표적 결합 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 상이한 표적 결합 영역을 포함한

다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 동일한 표적 결합 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상이한 표적 결합 영역은 유기체의 트랜스크립톰의 적어도 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 전사체에 혼성화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상이한 표적 결합 영역은 유기체의 트랜스크립톰의 적어도 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 전사체에 혼성화할 수 있다.

[0844] 한 측면에서 본 개시내용은 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다.

[0845] 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 표적 핵산에 혼성화하도록 조정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 유기체의 트랜스크립톰의 적어도 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 전사체를 포함하는 다수의 표적 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 전단된 게놈 DNA를 포함하고, 여기서 전단된 게놈 DNA는 유기체의 게놈의 적어도 0.01%, 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%의 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 올리고dT를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 제1 올리고뉴클레오티드 및 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드는 제1 세포 표지 및 제1 분자 표지를 포함하고, 제1 세포 표지는 제1 무작위 서열, 제2 무작위 서열, 및 제1 무작위 서열 및 제2 무작위 서열을 연결하는 제1 링커 표지 서열을 포함하고, 제1 분자 표지는 무작위 서열을 포함하고; 제2 올리고뉴클레오티드는 제2 세포 표지 및 제2 분자 표지를 포함하고, 제2 세포 표지는 제3 무작위 서열, 제4 무작위 서열, 및 제3 무작위 서열 및 제4 무작위 서열을 연결하는 제2 링커 표지 서열을 포함하고, 제2 분자 표지는 무작위 서열을 포함하고, 제1 세포 표지 및 제2 세포 표지는 동일하고, 제1 분자 표지 및 제2 분자 표지는 상이하다.

[0846] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 임의의 조성물 및 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공한다.

[0847] 한 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 고체 지지체와 접촉시키고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하고; 샘플로부터의 표적 핵산을 다수의 올리고뉴클레오티드 중의 한 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0848] 일부 실시양태에서, 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 혼성화 전에 용해된다. 일부 실시양태에서, 혼성화는 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산을 역전사시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 올리고뉴클레오티드 증폭을 수행하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 PCR, 정량적 PCR, 실시간 PCR, 및 디지털 PCR, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 증폭을 포함한다.

[0849] 한 측면에서 본 개시내용은 제1 무작위 서열, 제2 무작위 서열, 및 제1 무작위 서열 및 제2 무작위 서열을 연결하는 제1 링커 표지 서열을 포함하는 제1 세포 표지, 및 무작위 서열을 포함하는 제1 분자 표지를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드; 및 제3 무작위 서열, 제4 무작위 서열, 및 제3 무작위 서열 및 제4 무작위 서열을 연결하는 제2 링커 표지 서열을 포함하는 제2 세포 표지, 및 무작위 서열을 포함하는 제2 분자 표지를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하는 고체 지지체를 제공하고, 여기서 제1 세포 표지 및 제2 세포 표지는 동일하고, 제1 분자 표지 및 제2 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드는 동일한 샘플 인덱스 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 인덱스 영역은 무작위 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플 인덱스 영역의 길이는 4-12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 분자 표

지에 직접 부착된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지 및 분자 표지는 링커 표지 서열을 통해 부착된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지의 무작위 서열의 길이는 4-12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지의 불변 서열의 길이는 적어도 4개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지의 총 길이는 적어도 12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 하나 이상의 추가의 무작위 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 하나 이상의 추가의 링커 표지 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가의 링커 표지 서열은 하나 이상의 추가의 무작위 서열에 연결된다. 일부 실시양태에서, 분자 표지의 무작위 서열의 길이는 4-12개 뉴클레오티드이다.

[0850] 한 측면에서, 본 개시내용은 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지, 분자 표지; 및 표적 결합 영역; 및 다수의 표적 핵산을 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다.

[0851] 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 다수의 표적 핵산 중 적어도 하나에 혼성화하도록 조정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 무작위 다량체 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 그 초과의 임의의 길이의 다량체 서열; 유전자-특이적 프라이머; 및 올리고dT; 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 1만 내지 1십억 개의 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 다수의 표적 핵산의 표적 핵산의 수보다 많은 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 표적 핵산은 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 표적 핵산은 상이한 표적 핵산의 다수의 카피를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 표적 핵산은 다수의 올리고뉴클레오티드에 결합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 표지는 서열분석 프라이머에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 올리고뉴클레오티드의 5'에 위치한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 아미노기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리스티렌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자성이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 PDMS 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체, 아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 및 플루로닉 고체 지지체, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 20 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 5 마이크로미터 내지 약 40 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 관능기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 카르복시기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관능기는 C6, 비오틴, 스트렙타비딘, 1급 아민, 알데히드, 및 케톤, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 다수의 세포 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 표지는 다수의 링커 표지 서열 사이에 배치된다.

[0852] 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 고체 지지체 (여기서, 제1 고체 지지체는 다수의 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 다수의 제1 올리고뉴클레오티드는 동일한 제1 세포 표지를 포함한다), 제2 고체 지지체 (여기서, 제2 고체 지지체는 다수의 제2 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 다수의 제2 올리고뉴클레오티드는 동일한 제2 세포 표지를 포함한다), 및 사용 설명서를 포함하는 키트를 제공하고, 여기서 제1 세포 표지 및 제2 세포 표지는 상이하다.

[0853] 일부 실시양태에서, 다수의 제1 올리고뉴클레오티드 및 다수의 제2 올리고뉴클레오티드로부터의 올리고뉴클레오티드는 분자 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 동일하다. 일부 실시양태에서, 몇몇의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하고, 몇몇은 동일하다. 일부 실시양태에서, 다수의 제1 올리고뉴클레오티드 및 다수의 제2 올리고뉴클레오티드로부터의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 마이크로웰 어레이를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 완충제는 재구성 완충제, 희석 완충제, 및 안정화 완충제, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0854] 한 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 고체 지지체와 접촉시키고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티

드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하고; 샘플로부터의 표적 핵산을 다수의 올리고뉴클레오티드의 한 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함하는, 표적 핵산의 양을 결정하는 방법을 제공한다.

[0855] 일부 실시양태에서, 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 혼성화 전에 용해된다. 일부 실시양태에서, 혼성화는 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산의 증폭을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 표적 핵산의 역전사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 PCR, 정량적 PCR, 실시간 PCR, 및 디지털 PCR, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체에 대해 직접 수행된다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체로부터 전사되는 주형에 대해 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산의 서열분석을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열분석은 표적 핵산 및 분자 표지의 서열분석을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 핵산의 양을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 결정은 표적 핵산의 수준을 정량하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결정은 표적 핵산에 대해 서열분석된 분자 표지의 수를 계수하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접촉은 마이크로웰에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 친수성 플라스틱, 플라스틱, 엘라스토머, 및 히드로겔, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 아가로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 마이크로웰 어레이의 하나의 마이크로웰이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 적어도 90개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 적어도 150,000개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 적어도 하나 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 최대 2개의 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 최대 2개의 상기 고체 지지체를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 최대 하나의 고체 지지체를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 적어도 25 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 적어도 25 마이크로미터이다.

[0856] 한 측면에서, 본 개시내용은 샘플을 고체 지지체에 접촉시키고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 상기 분자 표지는 상이하고; 샘플로부터의 표적 핵산을 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키고; 표적 핵산 또는 그의 상보체를 증폭시키고; 표적 핵산 또는 그의 상보체를 서열분석하고, 여기서 서열분석은 표적 핵산 또는 그의 상보체 및 상기 표적 핵산 또는 그의 상보체가 결합되는 올리고뉴클레오티드의 분자 표지를 서열분석하고; 표적 핵산의 양을 결정하는 것을 포함하는, 표적 핵산의 증폭 편차를 감소시키는 방법을 제공한다.

[0857] 일부 실시양태에서, 혼성화는 동일한 표적 핵산의 다수의 카피를 다수의 올리고뉴클레오티드에 혼성화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결정은 동일한 표적 핵산에 대한 다수의 서열분석된 분자 표지를 계수하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 계수는 동일한 표적 핵산의 카피수를 계수한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 표적 핵산의 역전사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 PCR, 정량적 PCR, 실시간 PCR, 및 디지털 PCR, 또는 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 사용하는 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체에 대해 직접 수행된다. 일부 실시양태에서, 증폭은 상기 고체 지지체로부터 전사되는 주형에 대해 수행된다.

[0858] 한 측면에서, 본 개시내용은 마이크로웰; 세포; 및 고체 지지체를 포함하는 조성물을 제공하고, 여기서 고체 지지체는 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다.

[0859] 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 샘플 표지를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 표적 결합 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 결합 영역은 무작위 다량체 예를 들어, 무작위 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체, 칠량체, 팔량체, 구량체, 십량체, 또는 임의의 길이의 그 초과의 다량체 서열; 유전자-특이적 프라이머; 및 올리고dT; 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 올리고뉴클레오티드는 범용 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 표지는 서열분석 프라이머에 대한 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 폴리스티렌으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자성이다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 PDMS 고체 지지체, 유리 고체 지지체, 폴리프로필렌 고체 지지체,

아가로스 고체 지지체, 젤라틴 고체 지지체, 자성 고체 지지체, 및 플루로닉 고체 지지체, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 20 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 약 5 마이크로미터 내지 약 40 마이크로미터의 직경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 표지는 다수의 세포 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 표지는 다수의 링커 서열 사이에 배치된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 친수성 플라스틱, 플라스틱, 엘라스토머, 및 히드로겔, 또는 이들의 임의의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 아가로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 마이크로웰 어레이의 마이크로웰이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 적어도 하나 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 웰당 최대 2개의 고체 지지체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 적어도 하나의 고체 지지체 및 적어도 하나의 세포를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 최대 하나의 고체 지지체 및 적어도 하나의 세포를 수용하는 크기이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 깊이는 적어도 25 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 직경은 적어도 25 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 편평하다.

[0860] 한 측면에서, 본 개시내용은 다수의 마이크로웰을 포함하는 기기를 제공하고, 다수의 마이크로웰은 적어도 2개의 마이크로웰을 포함하고; 다수의 마이크로웰의 각각의 마이크로웰의 부피는 약 1,000 μm^3 내지 약 120,000 μm^3이다. 일부 실시양태에서, 다수의 마이크로웰의 각각의 마이크로웰의 부피는 약 20,000 μm^3이다. 일부 실시양태에서, 다수의 마이크로웰은 약 1,000 내지 약 5,000,000개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 마이크로웰은 약 100,000 내지 약 200,000개의 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰은 단일 물질의 층 내에 포함된다. 일부 실시양태에서, 적어도 약 10%의 마이크로웰은 세포를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 약 10%의 마이크로웰은 다수의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 고체 지지체를 추가로 포함하고, 여기서 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드는 세포 표지 및 분자 표지를 포함하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 세포 표지는 동일하고, 적어도 2개의 다수의 올리고뉴클레오티드의 분자 표지는 상이하다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 자화된다.

[0861] 한 측면에서 본 개시내용은 본원에서 설명되는 임의의 기기, 및 액체 처리기를 포함하는 장치를 제공한다.

[0862] 일부 실시양태에서, 액체 처리기는 액체를 약 1초 내에 다수의 마이크로웰에 전달한다. 일부 실시양태에서, 장치는 액체를 단일 유입 포트로부터 다수의 마이크로웰에 전달한다. 일부 실시양태에서, 장치는 자석을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 유입 포트, 유출 포트, 펌프, 밸브, 배기구, 저장소, 샘플 수집 챔버, 온도 제어 장치, 또는 이들의 임의의 조합물 중 적어도 하나를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 장치는 샘플 수집 챔버를 포함하고, 샘플 수집 챔버는 장치로부터 제거가능하다. 일부 실시양태에서, 장치는 광학 영상화기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 광학 영상화기는 액체 처리기를 제어하기 위해 사용되는 출력 신호를 생성한다. 일부 실시양태에서, 장치는 올리고뉴클레오티드의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 증폭을 수행하도록 형성된 열 순환 메카니즘을 추가로 포함한다.

[0863] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에서 설명되는 임의의 기기 또는 장치로 임상 진단 시험 결과를 생성하는 것을 포함하는, 임상 진단 시험 결과를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 임상 진단 시험 결과는 통신 매체를 통해 전송된다.

[0864] 한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 하나 이상의 기판을 포함하는 기기를 제공하고; 여기서 마이크로웰 어레이는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하기 위해 사용된다.

[0865] 일부 실시양태에서, 기판의 마이크로웰 어레이는 1차원 또는 2차원 어레이 패턴으로 배열된 마이크로웰을 포함한다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰의 2차원 어레이 패턴은 정사각형 그리드, 직사각형 그리드, 또는 육각형 그리드를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0866] 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이의 마이크로웰은 원통형, 원추형, 반구형, 직사각형, 또는 다면체를 포함하는 군으로부터 선택되는 웰 기하학을 사용하여 제작된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이의 마이크로웰은 원통형, 원추형, 반구형, 직사각형, 또는 다면체를 포함하는 군으로부터 선택되는 둘 이상의 성분 기하학을 포함하는 전체적인 기하학을 사용하여 제작된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이 내의 마이크로웰의 직경은 약 5 마이크로미터 내지 약 50 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이 내의 마이크로웰의 깊이는 약 10 마이크로미터 내지 약 60 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이 내의

마이크로웰 사이의 중심-대-중심 간격은 약 15 마이크로미터 내지 약 75 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 각각의 마이크로웰 어레이 내의 마이크로웰의 총수는 약 96 내지 약 5,000,000개이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 기판은 규소, 용융-실리카, 유리, 중합체, 또는 금속을 포함하는 군으로부터 선택되는 물질로 제작된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 기판은 아가로스 또는 히드로겔로부터 제작된다. 일부 실시양태에서, 마이크로웰 어레이는 마이크로웰을 둘러싸거나 마이크로웰들 사이의 표면에 걸쳐있고 반구형, 융기형, 또는 피크형 표면 특징부를 포함하는 군으로부터 선택되는 마이크로웰들 사이의 표면 특징부를 추가로 포함한다.

[0867] 한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 기판; 및 상단부 플레이트, 저변부 플레이트, 및 가스켓을 포함하는 기계적 고정기를 포함하는 기기를 제공하고; 조립된 기판이 가스켓과 저변부 플레이트 사이에 배치될 때, 가스켓은 기판과 새지 않는 밀봉을 형성하고, 상단부 플레이트 및 가스켓은 마이크로웰 어레이를 포함하는 하나 이상의 챔버를 형성하여, 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 하나 이상의 세포 샘플 및 비드-기반 올리고뉴클레오티드 표지는 챔버 내로 분배될 수 있다.

[0868] 일부 실시양태에서, 기판은 본원에서 설명되는 임의의 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가스켓은 폴리디메틸실록산 (PDMS) 또는 유사한 엘라스토머 물질로부터 제작된다. 일부 실시양태에서, 상단부 및 저변부 플레이트는 알루미늄, 양극 알루미늄, 스테인레스 강철, 테플론, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리카르보네이트, 또는 유사한 경질 중합체 물질로부터 제작된다.

[0869] 한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 하나 이상의 기판; 및 하나 이상의 유동 셀을 포함하는 기기를 제공하고; 여기서, 하나 이상의 유동 셀은 하나 이상의 기판을 에워싸거나 기판에 부착되고, 유체를 마이크로웰 어레이에 전달하기 위한 적어도 하나의 유입 포트 및 적어도 하나의 유출 포트를 포함하고; 기기는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하기 위해 사용된다.

[0870] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 기판은 본원에서 설명되는 임의의 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 하나 이상의 유동 셀은 하나 이상의 샘플이 병행으로 처리될 수 있도록 다수의 마이크로웰 어레이와 접속하는 다수의 마이크로어레이 챔버를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀은 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하도록 다공성 장벽 또는 유동 확산기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀은 마이크로웰 어레이를 담은 챔버를 집합적으로 동일한 전체 어레이 영역을 덮는 하위구역으로 나누고 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하는 분할기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기기 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 50 마이크로미터 내지 20 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 내에 포함되는 유체 채널의 깊이는 약 50 마이크로미터 내지 약 2 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀은 규소, 용융-실리카, 유리, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET), 에폭시 수지, 금속, 또는 이들 물질의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 기기는 자동화된 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하기 위한 기구 시스템의 고정된 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기기는 자동화된 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하기 위한 기구 시스템의 제거가능한 성분을 포함한다.

[0871] 한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 하나 이상의 기판; 하나 이상의 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버; 하나 이상의 샘플 또는 시약 저장소를 포함하는 카트리지를 제공하고; 카트리지는 유체를 마이크로웰 어레이에 전달하기 위한 적어도 하나의 유입 포트 및 적어도 하나의 유출 포트를 추가로 포함하고; 카트리지는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하기 위해 사용된다.

[0872] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 기판은 본원에서 설명되는 임의의 적어도 하나의 마이크로웰 어레이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 하나 이상의 샘플이 병행으로 처리될 수 있도록 다수의 마이크로웰 어레이와 접속한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하도록 다공성 장벽 또는 유동 확산기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 유동 셀 또는 챔버를 집합적으로 동일한 전체 어레이 영역을 덮는 하위구역으로 나누고 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 보다 균일한 전달을 제공하는 분할기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 50 마이크로미터 내지 200 마이크로미터이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 200 마이크로미터 내지 2 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체

채널의 폭은 약 2 ㎜ 내지 10 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 10 ㎜ 내지 20 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 깊이는 약 50 마이크로미터 내지 약 10 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 깊이는 약 500 마이크로미터 내지 1 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 카트리지 내에 포함되는 유체 채널의 폭은 약 1 ㎜ 내지 약 2 ㎜이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀 또는 마이크로웰 어레이 챔버는 규소, 용융-실리카, 유리, 폴리디메틸실록산 (PDMS; 엘라스토머), 폴리메틸메타크릴레이트 (PMMA), 폴리카르보네이트 (PC), 폴리프로필렌 (PP), 폴리에틸렌 (PE), 고밀도 폴리에틸렌 (HDPE), 폴리이미드, 시클릭 올레핀 중합체 (COP), 시클릭 올레핀 공중합체 (COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET), 에폭시 수지, 금속, 또는 이들 물질의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질로 제조된다. 일부 실시양태에서, 기기는 자동화된 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하기 위한 기구 시스템의 제거가능한 소모성 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 카트리지 내로 분배되거나 주입된 세포 샘플 또는 비드 현탁액의 자가-계량을 제공하기 위한 우회 채널 또는 다른 설계 특징부를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 기기를 통한 유체 유동을 제어하기 위한 통합된 축소형 펌프를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 미리 로딩된 시약을 구획화하고 기기를 통한 유체 유동을 제어하기 위한 통합된 축소형 밸브를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 포획된 공기를 위한 탈출 경로를 제공하는 배기구를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 통로 길이를 효과적으로 증가시키고 마이크로웰 사이에 분자의 확산을 방지하거나 최소화하는 물리적 또는 화학적 장벽을 생성하기 위한 설계 부재를 추가로 포함하고, 여기서 설계 부재는 마이크로웰 어레이에 세포 및 비드의 전달을 위한 사형 채널의 패턴, 마이크로웰 어레이의 표면과 접촉하도록 눌리는 철회가능한 압반 또는 변형가능한 막, 또는 카트리지 내에서 저장소로부터 비혼화성의 소수성 유체의 방출로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 외부 기구 시스템과 우수한 열 우수한 열 접촉을 제공하는 통합된 온도 제어 성분 또는 통합된 열 인터페이스를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 하나 이상의 마이크로웰 어레이의 광학적 영상화를 위한 광학 인터페이스 또는 창을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지는 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 접속하도록 구성된 하나 이상의 제거가능한 샘플 수집 챔버를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 카트리지 자체가 독립형 PCR 열 싸이클러 및/또는 서열분석 기구와 직접 접속하도록 구성된다.

[0873] 한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 마이크로웰 어레이를 추가로 포함하는 하나 이상의 유동 셀 또는 카트리지; 및 유동 제어기를 포함하는 기구 시스템을 제공하고; 여기서 유동 제어기는 마이크로웰 어레이에 세포 샘플, 비드-기반 올리고뉴클레오티드 표지화 시약, 및 다른 검정 시약의 전달을 제어하고, 기구 시스템은 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행하도록 구성된다.

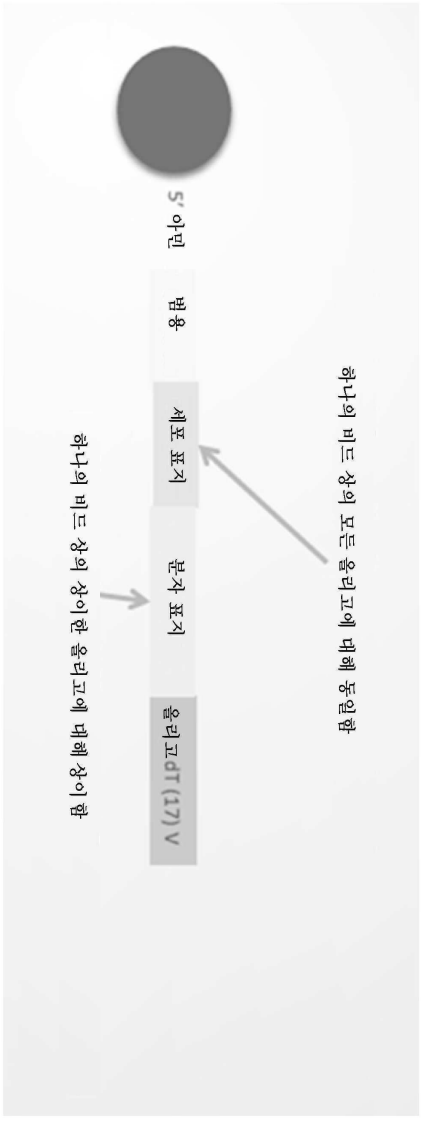
[0874] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 마이크로웰 어레이는 임의의 본원에서 설명되는 것이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀은 시스템의 고정된 성분이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 유동 셀은 시스템의 제거가능한 소모성 성분이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 카트리지는 시스템의 제거가능한 소모성 성분이다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 및 비드-기반 올리고뉴클레오티드 시약은 카트리지 내로 분배되거나 사용자에 의해 직접 주입된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 이외의 검정 시약을 카트리지에 미리 로딩한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 적어도 마이크로웰 어레이를 영상화하기 위한 영상화 시스템을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 마이크로웰 어레이에 걸쳐 세포 및 비드의 균일한 분포를 용이하게 하기 위한 세포 또는 비드 분포 시스템을 추가로 포함하고, 여기서 상기 분포 시스템의 기초를 이루는 메카니즘은 요동, 진탕, 소용돌이, 재순환류, 저빈도 교반, 또는 고빈도 교반으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 세포 용해 시스템을 추가로 포함할 수 있고, 여기서 시스템은 세포를 초음파 처리하기 위해 고빈도 압전 변환기를 사용한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 사용자-특정된 온도를 유지하거나, 또는 둘 이상의 특정된 시간 간격에 걸쳐 둘 이상의 특정된 온도 사이에서 온도를 변경하기 위한 온도 제어기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 마이크로웰로부터 비드를 용리할 때 사용하기 위한 자기장 제어기를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 사용자 인터페이스 및 시스템 기능의 제어를 제공하도록 프로그램가능한 컴퓨터 또는 프로세서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 실시간 영상 분석 능력을 제공하기 위한 프로그램 코드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 실시간 영상 분석 및 기구 제어 기능이 연결되어, 최적 세포/비드 분포가 달성될 때까지 세포 및 비드 샘플 로딩 단계가 연장되거나 반복될 수 있다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 올리고뉴클레오티드 표지의 증폭을 위한 통합된 PCR 열 싸이클러를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 기구 시스템은 올리고뉴클레오티드 라이브러리의 서열분석을 위한 통합된 시퀀서를 추가로 포함하고, 이에 의해 샘플 응답능이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 환자 샘플을 포함하고, 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정의 결과는 임상 진단 용도를 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 환자 샘플을 포함하고, 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱

검정의 결과는 충분한 설명에 기초한 의료적 치료 결정을 위해 의료 제공자에 의해 사용된다.

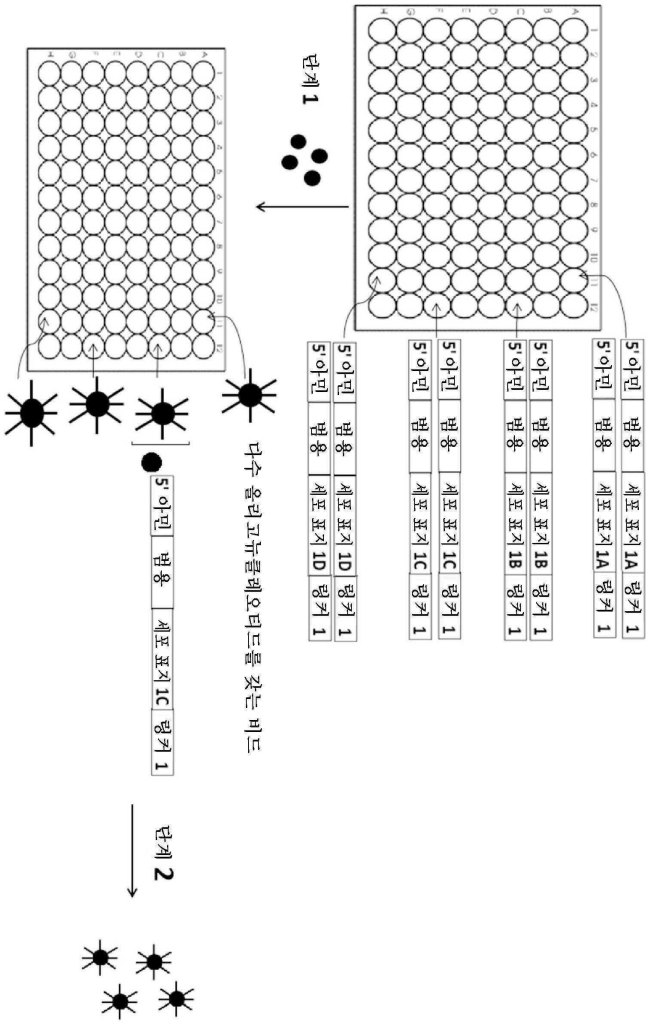
[0875] 한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 다음 서열 데이타 분석을 수행하도록 프로그래밍된 컴퓨터 판독가능 매체에 존재하는 소프트웨어를 제공한다: 세포당 유전자당 판독물의 수, 및 세포당 유전자당 특유한 전사체 분자의 수의 결정; 세포당 유전자당 전사체 분자의 수의 결정을 위한 신뢰 구간을 예측하기 위한 주요 성분 분석 또는 다른 통계 분석; 공지의 참조 서열과 유전자 서열 데이타의 정렬; 샘플 바코드, 세포 바코드, 및 분자 바코드의 해독/역다중화; 및 증폭 또는 서열분석 오류를 보상하기 위한 분자 표지의 자동화된 군집화 (여기서, 서열 데이타는 다중, 단일 세포 확률적 표지 및 분자 인덱싱 검정을 수행함으로써 생성된다).

도면

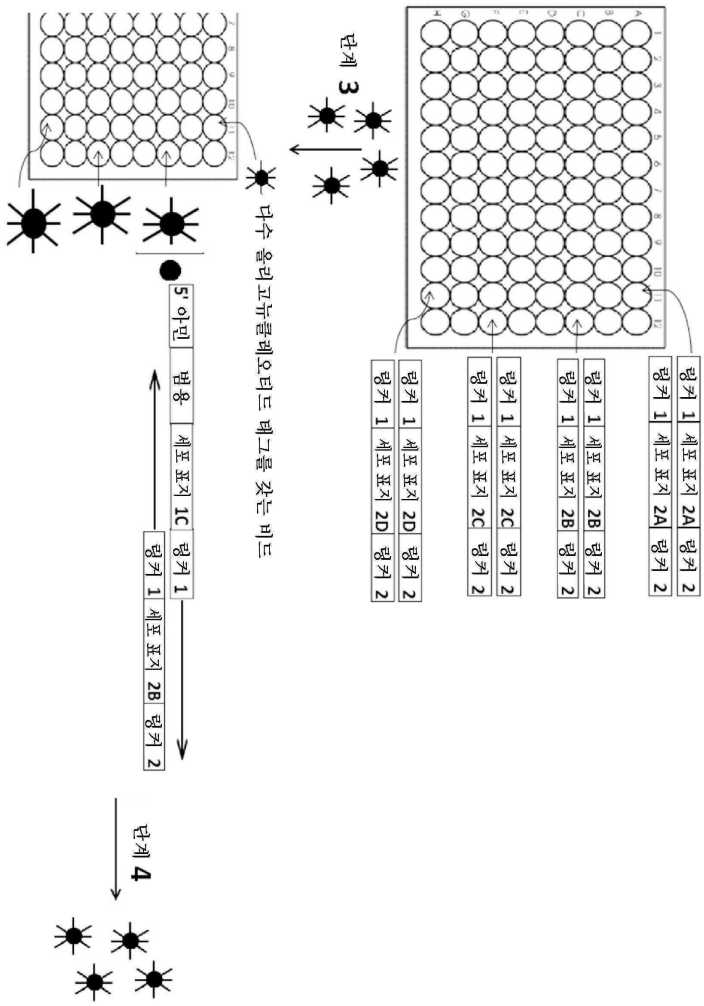
도면1



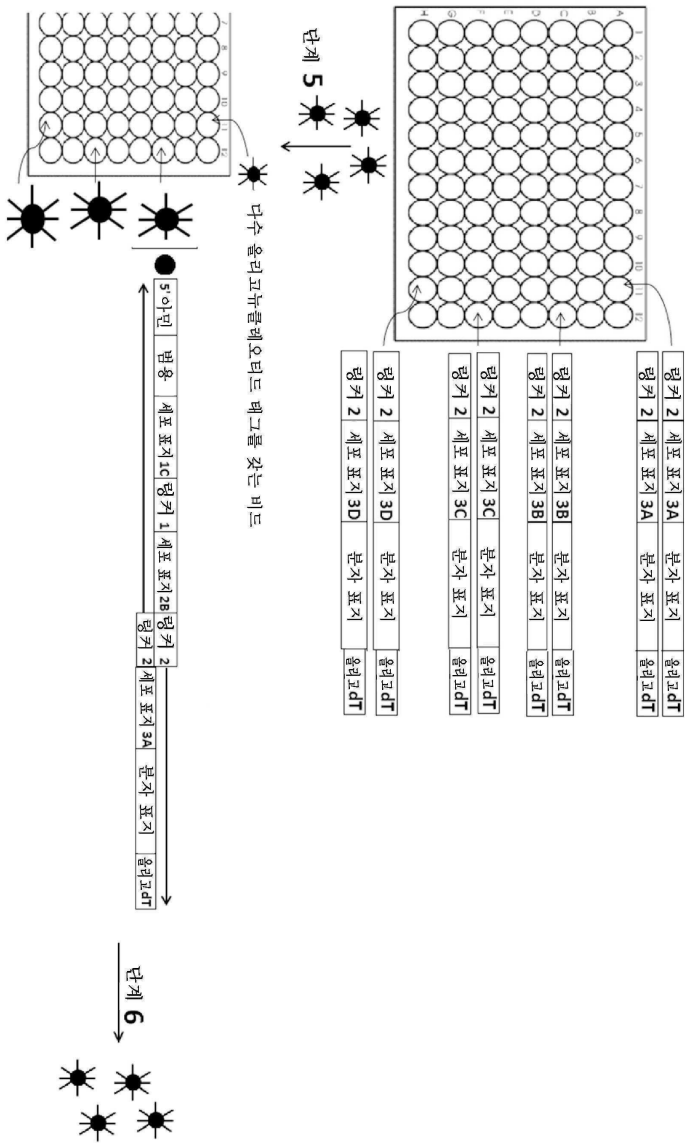
도면2a


단계 1
5' 아민 | 범용 | 세포 표지 1A | 링커 1
5' 아민 | 범용 | 세포 표지 1B | 링커 1
5' 아민 | 범용 | 세포 표지 1C | 링커 1
5' 아민 | 범용 | 세포 표지 1D | 링커 1
다수 올리고뉴클레오티드를 갖는 비드
5' 아민 | 범용 | 세포 표지 1C | 링커 1
단계 2

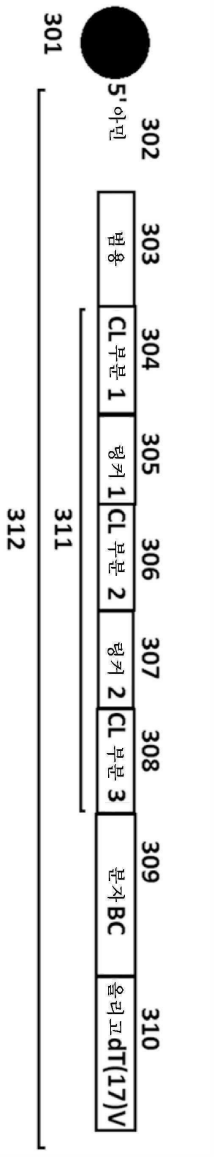
도면2b


단계 3
다수 올리고뉴클레오티드 태그를 갖는 비드
5' 아민
범용
세포 표지 1C
링커 1
링커 1
세포 표지 2B
링커 2
단계 4
링커 1 세포 표지 2A 링커 2
링커 1 세포 표지 2A 링커 2
링커 1 세포 표지 2B 링커 2
링커 1 세포 표지 2B 링커 2
링커 1 세포 표지 2C 링커 2
링커 1 세포 표지 2C 링커 2
링커 1 세포 표지 2D 링커 2
링커 1 세포 표지 2D 링커 2

도면2c


단계 5
다수 올리고뉴클레오티드 태그를 갖는 비드
5'아민
범용
세포 표지 1C
링커 1
세포 표지 2B
링커 2
세포 표지 3A
분자 표지
울러고dT
단계 6
링커 2
세포 표지 3A
분자 표지
울러고dT
링커 2
세포 표지 3B
분자 표지
울러고dT
링커 2
세포 표지 3C
분자 표지
울러고dT
링커 2
세포 표지 3D
분자 표지
울러고dT

도면3

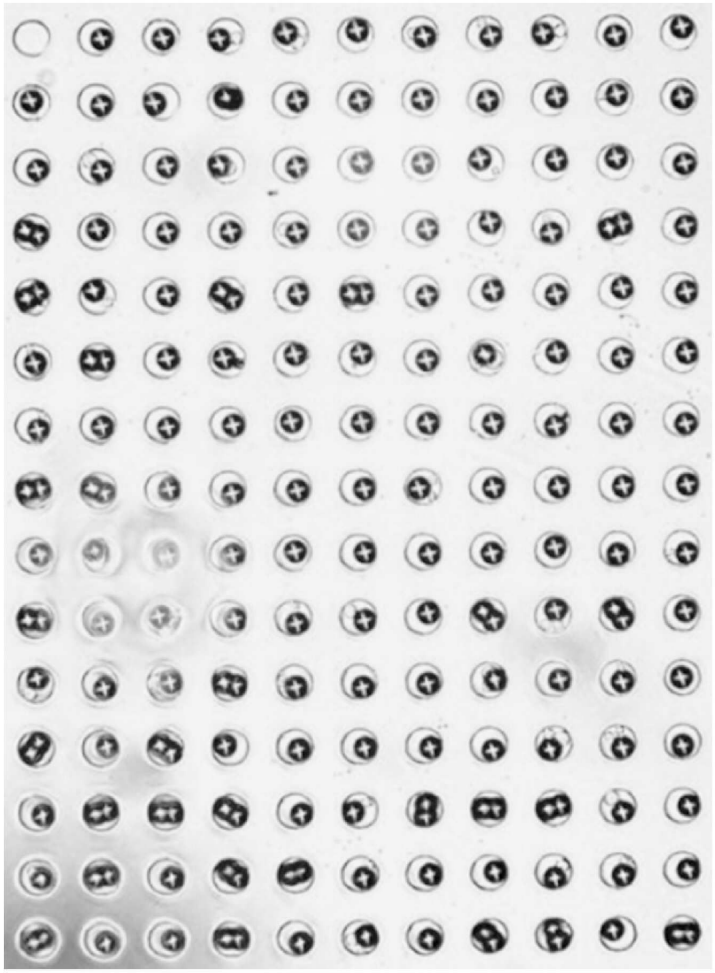

301
5' 아민
302
범용
303
CL 뉴뮬 1
304
링커 1
305
CL 뉴뮬 2
306
링커 2
307
CL 뉴뮬 3
308
분자BC
309
올리고dT(17)V
310
311
312

도면4

광학 접착제 (소수성 장벽)

광학 접착제에 의해 유리 상에 붙여진 아가로스 마이크로웰 어레이를 갖는 겔 접착 필름

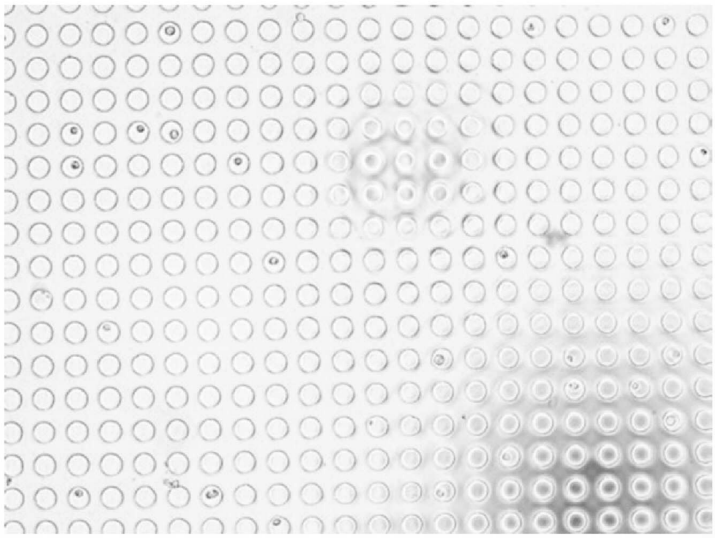
도면5



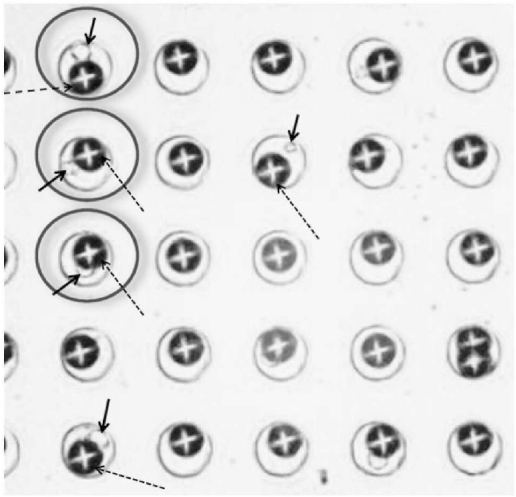
도면6a



도면6b



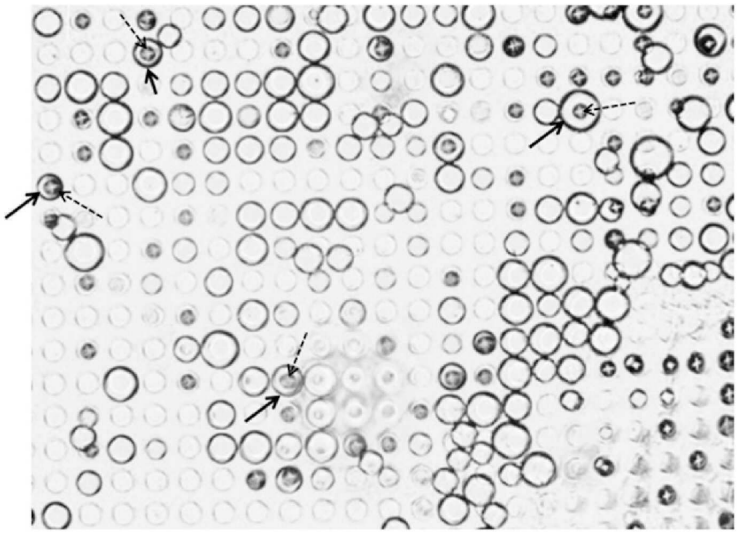
도면6c



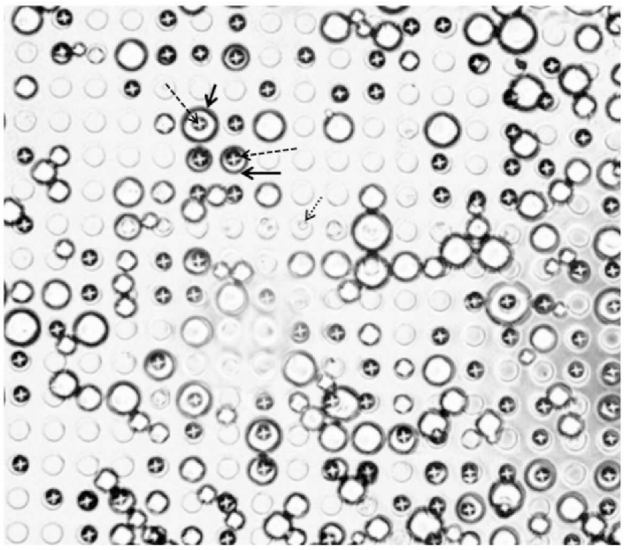
도면7

웰 부피	2.12E-14	m3
비드 부피	4.19E-15	m3
웰 부피 – 비드 부피	1.70E-14	m3
웰 부피 – 비드 부피	1.70E-11	L
세포당 #mRNA	2.50E+05	분자
mRNA의 농도	1.47E+16	분자/L
mRNA의 농도	2.44E-08	몰/L
mRNA의 농도	24.40	nM

도면8a



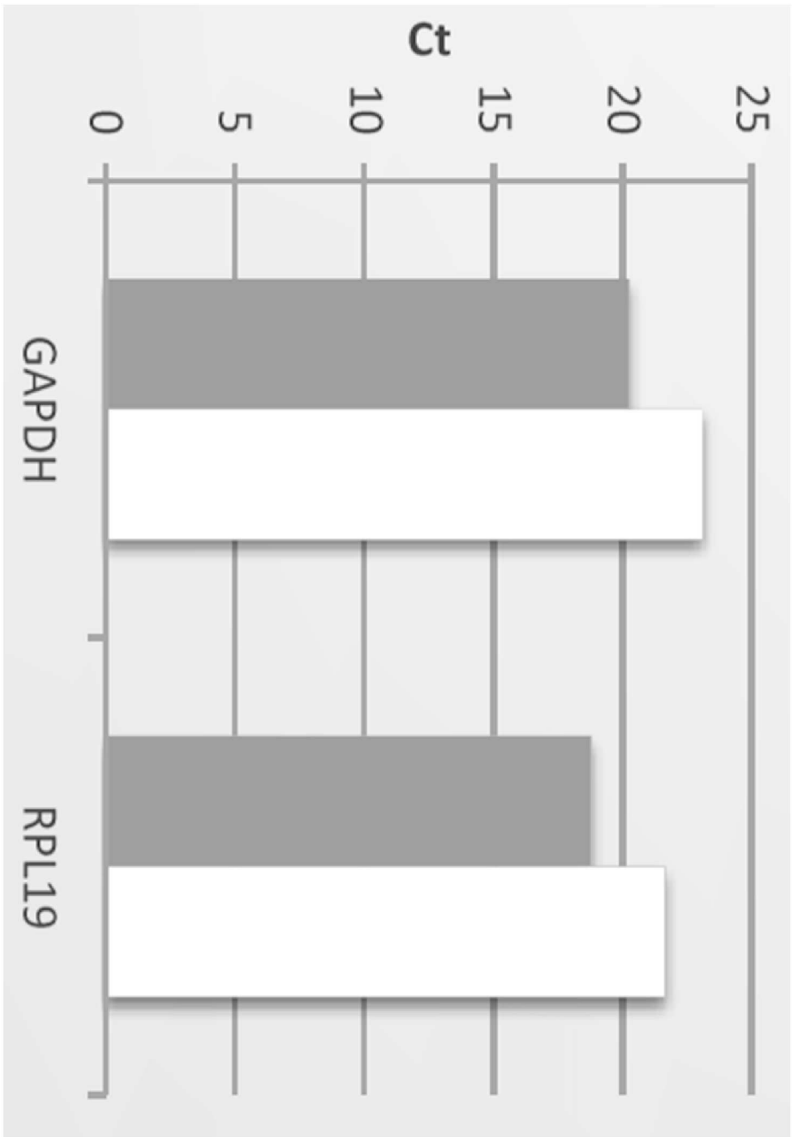
도면8b



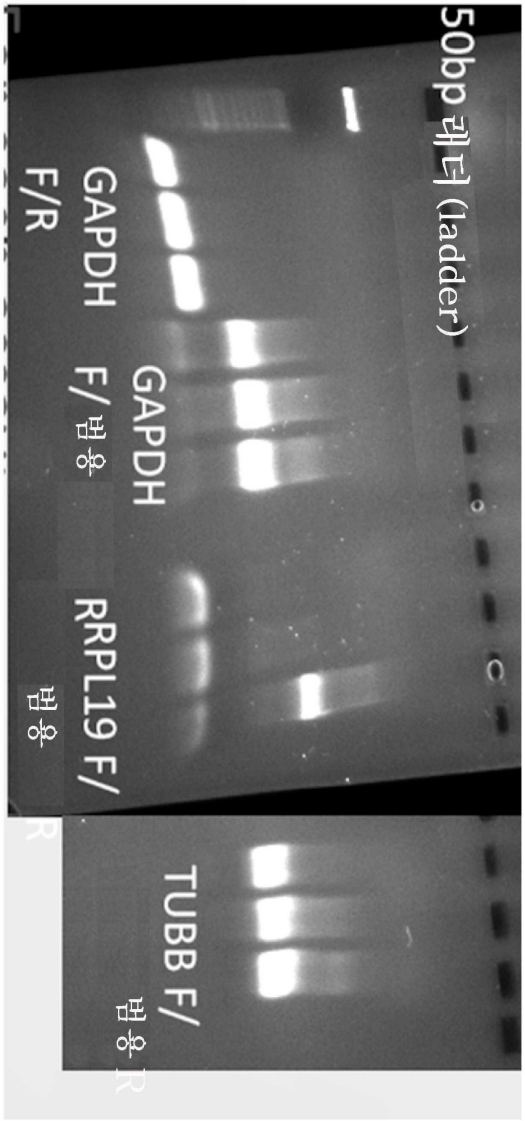
도면8c



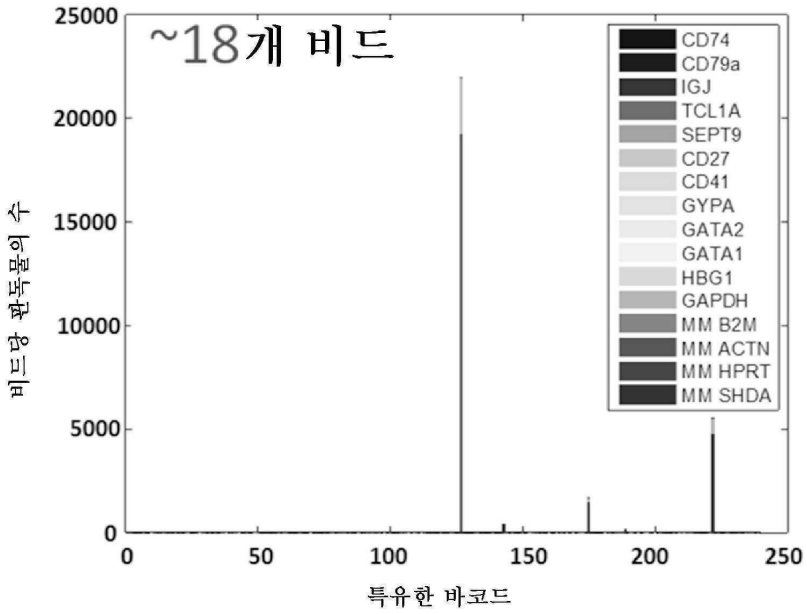
도면9



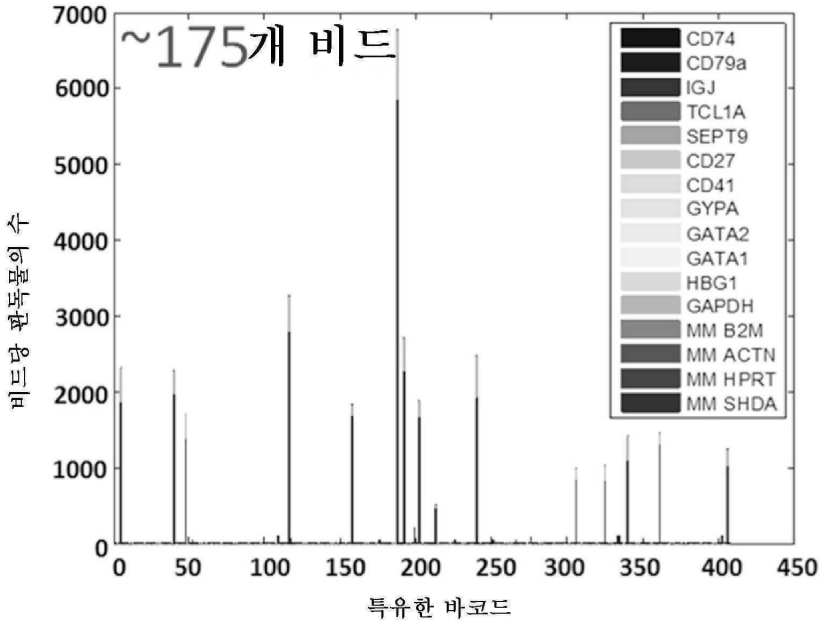
도면10



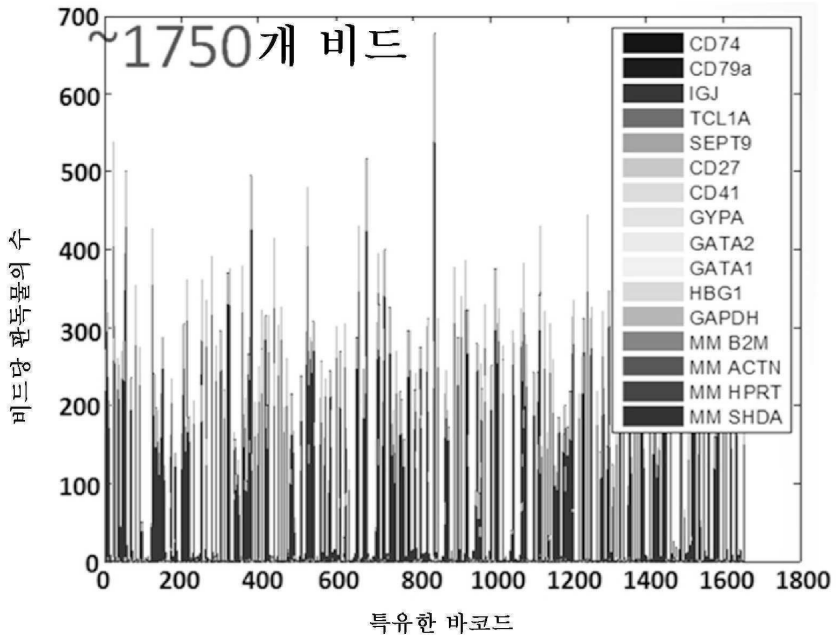
도면11a


~18개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 판독물의 수
특유한 바코드
0
5000
10000
15000
20000
25000
0
50
100
150
200
250

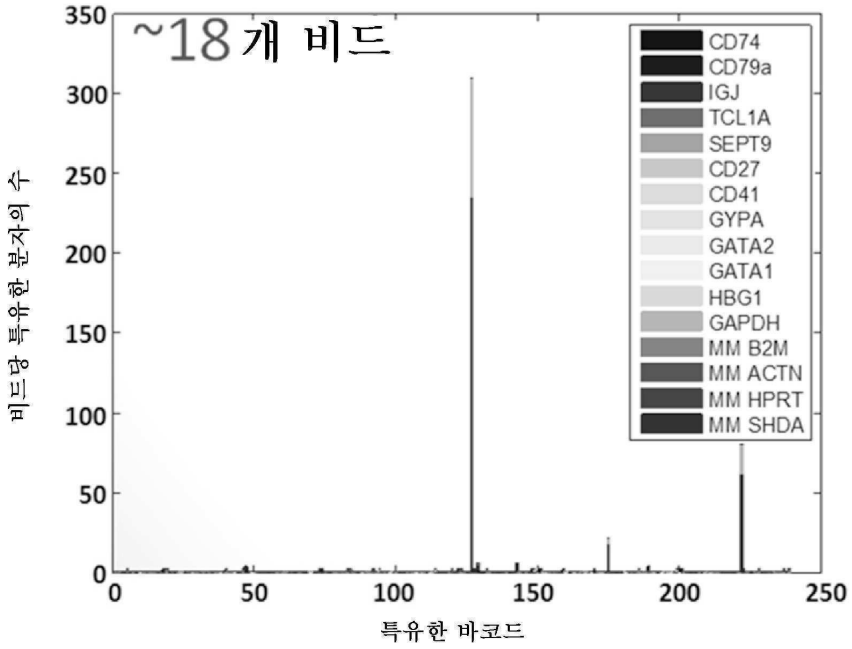
도면11b


~175개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 판독물의 수
특유한 바코드
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450

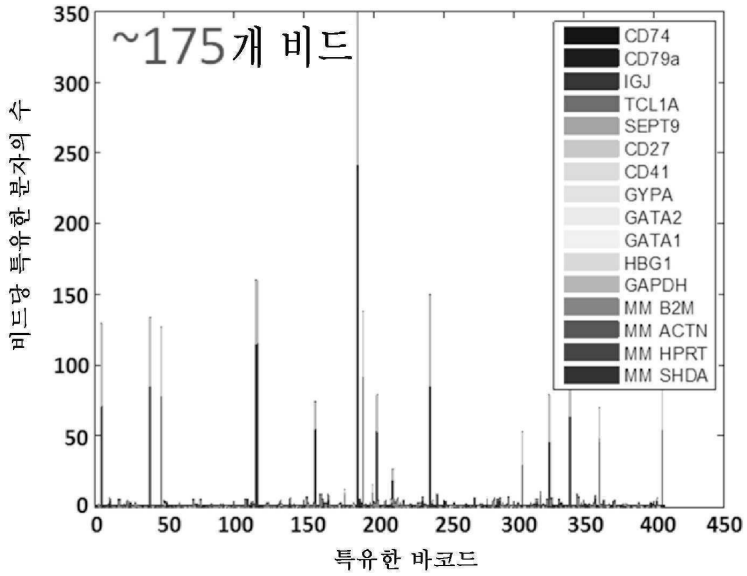
도면11c


~1750개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 판독물의 수
특유한 바코드

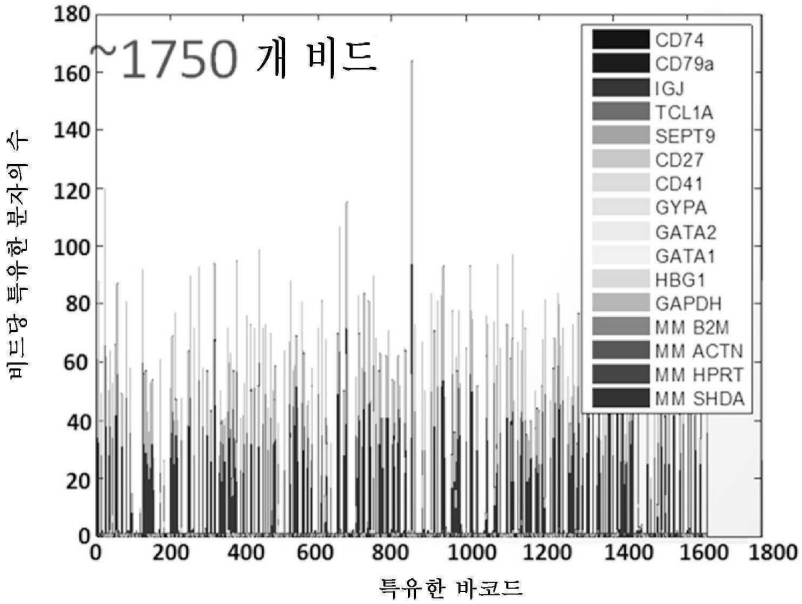
도면11d


~18개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 특유한 분자의 수
특유한 바코드

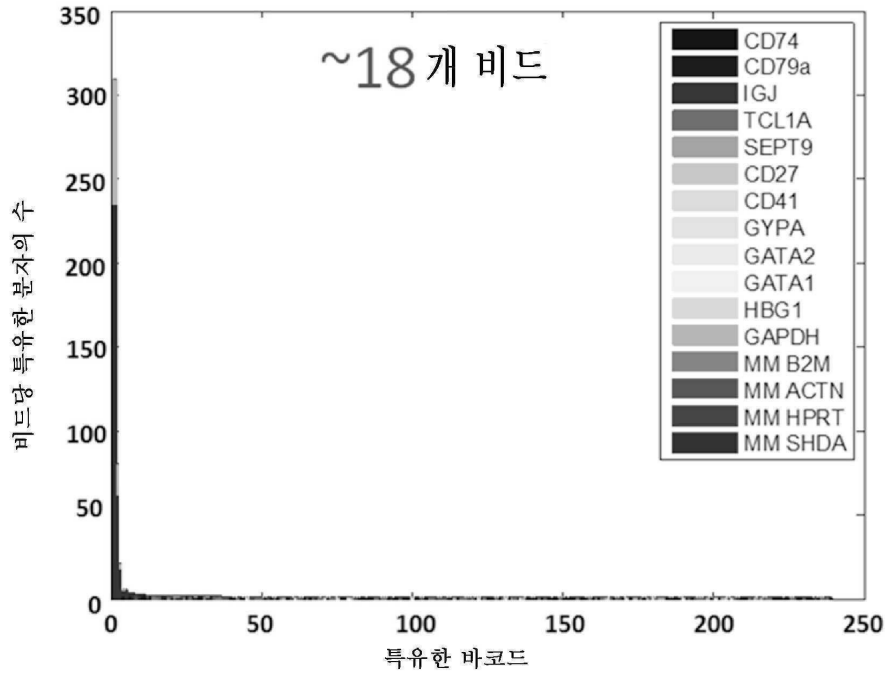
도면11e


~175개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 특유한 분자의 수
특유한 바코드
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450

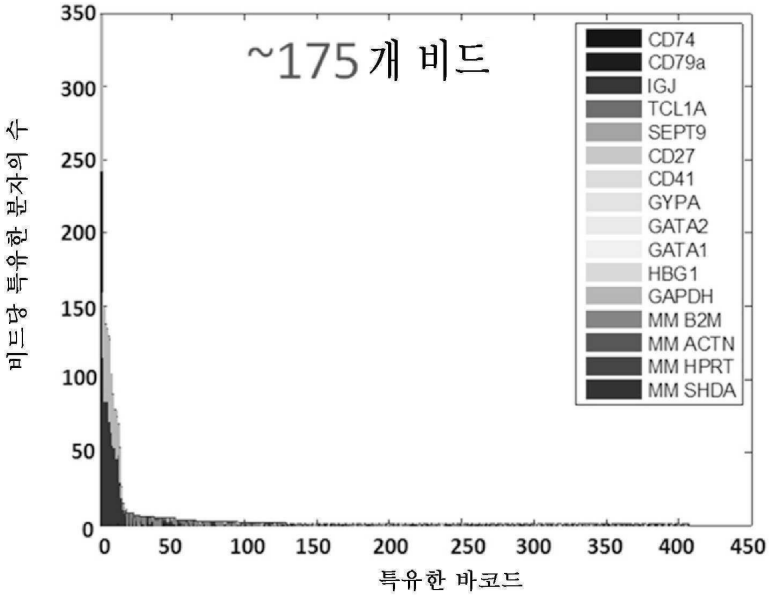
도면11f


~1750 개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 특유한 분자의 수
특유한 바코드
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800

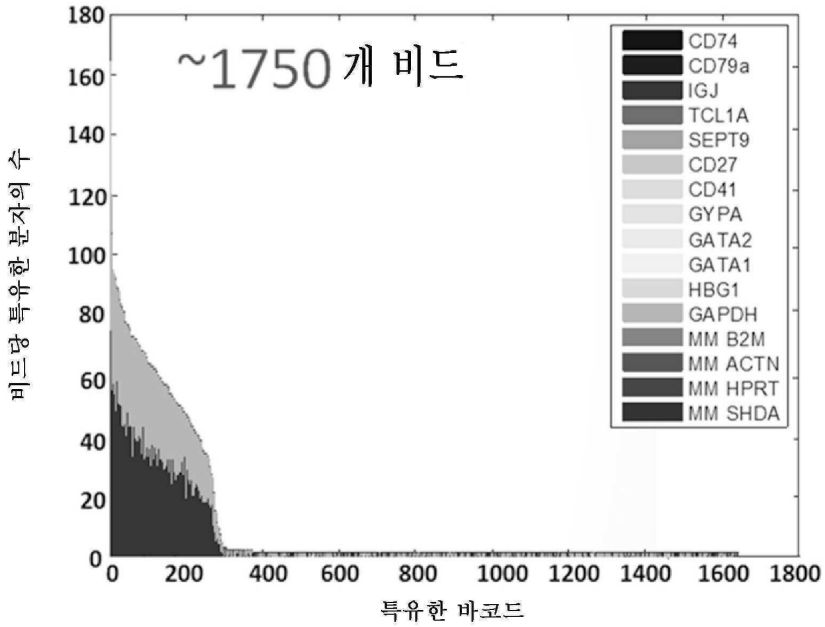
도면11g


~18 개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 특유한 분자의 수
특유한 바코드
0
50
100
150
200
250
300
350

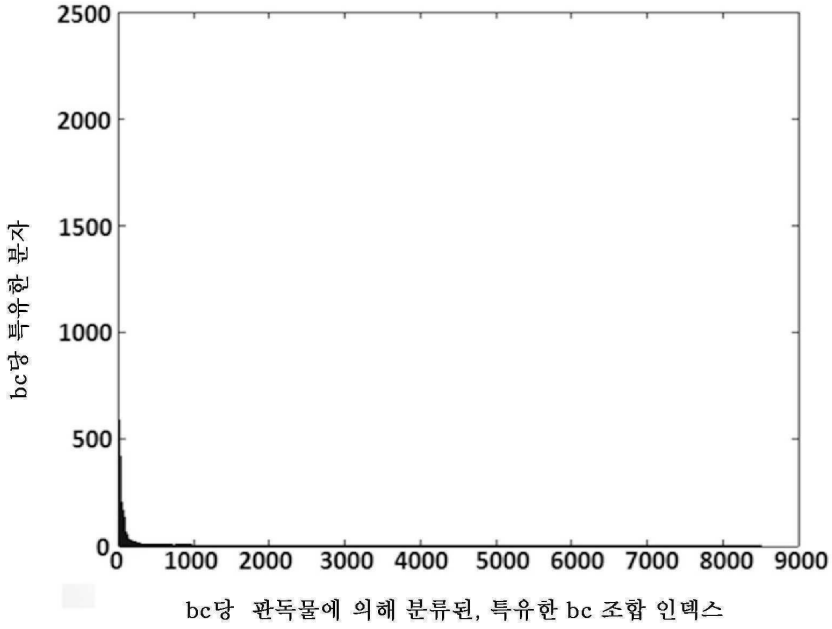
도면11h


~175 개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 특유한 분자의 수
특유한 바코드
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450

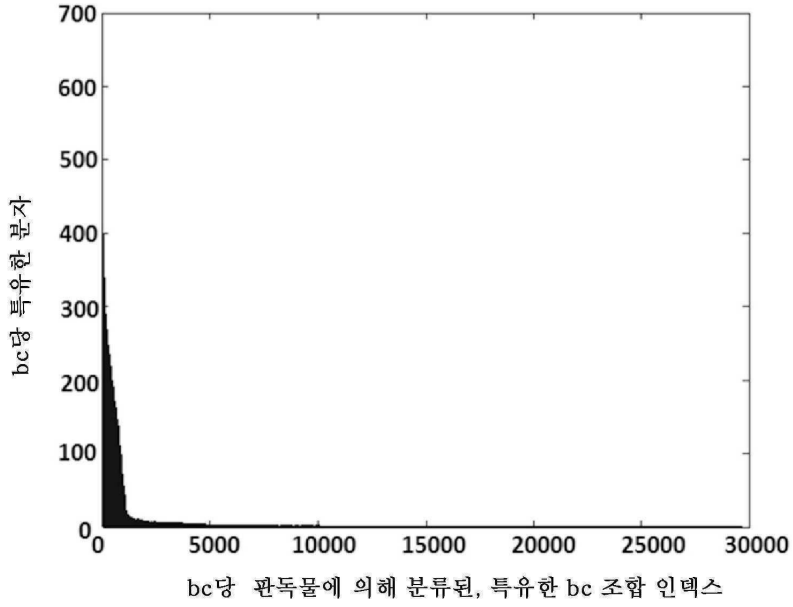
도면11i


~1750 개 비드
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
비드당 특유한 분자의 수
특유한 바코드

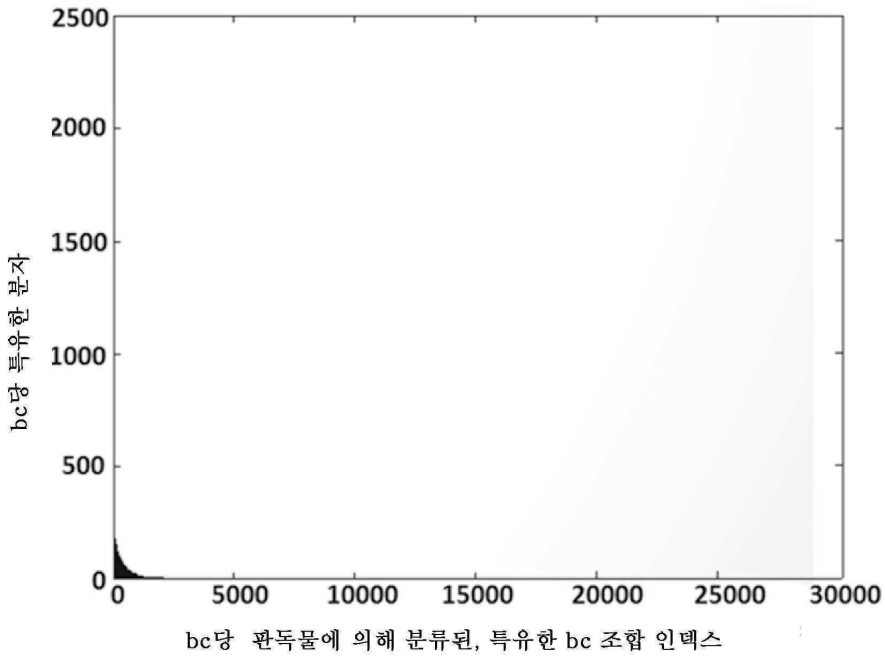
도면12a


bc당 특유한 분자
bc당 판독물에 의해 분류된, 특유한 bc 조합 인덱스

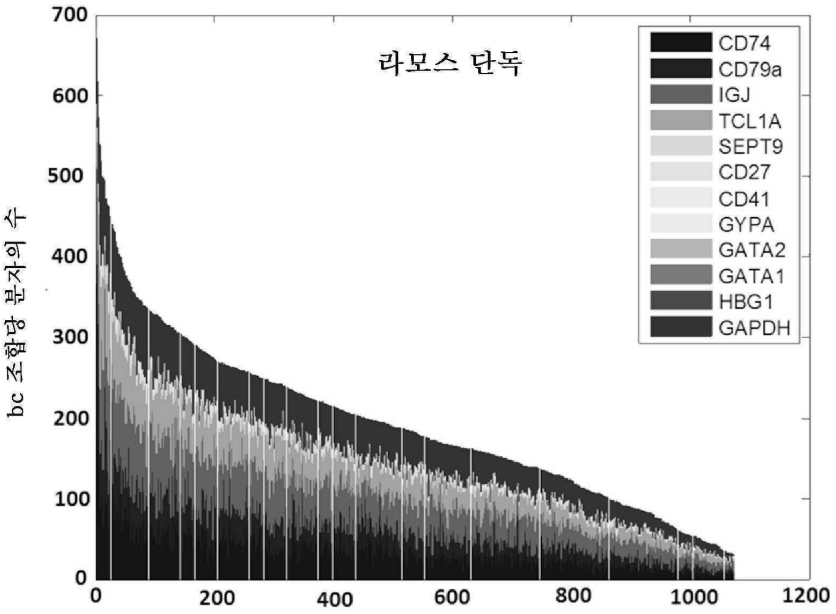
도면12b


700
600
500
400
300
200
100
0
bc당 특유한 분자
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
bc당 판독물에 의해 분류된, 특유한 bc 조합 인덱스

도면12c

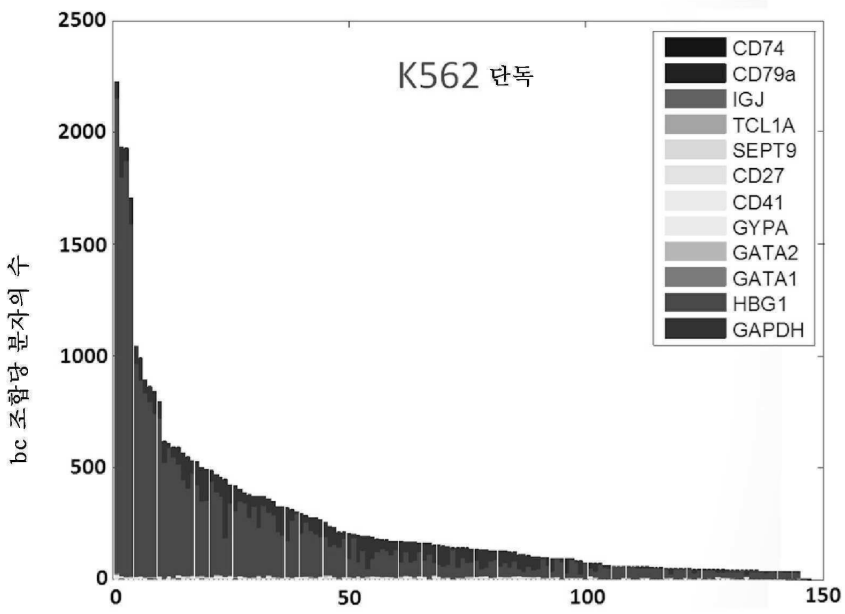

2500
2000
1500
1000
500
0
bc당 특유한 분자
0
5000
10000
15000
20000
25000
30000
bc당 판독물에 의해 분류된, 특유한 bc 조합 인덱스

도면12d



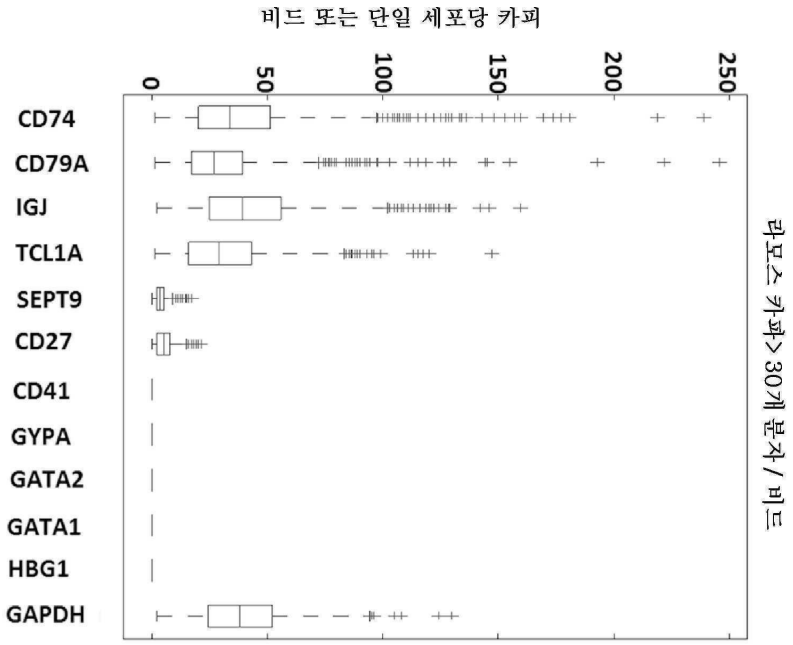
bc 조합당 분자의 총 수에 의해 분류된, 특유한 바코드 조합

도면12e

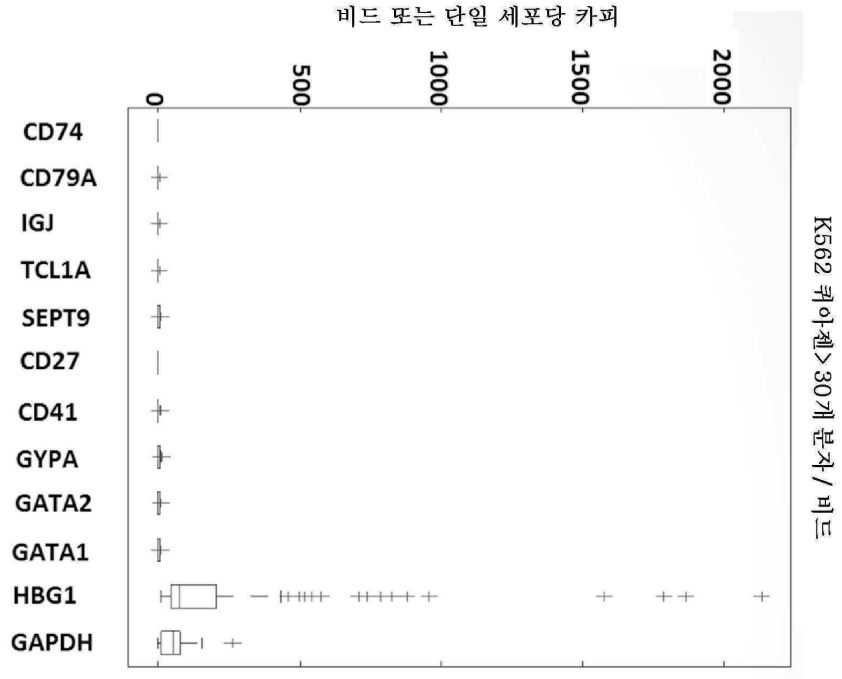


bc 조합당 분자의 총 수에 의해 분류된, 특유한 바코드 조합

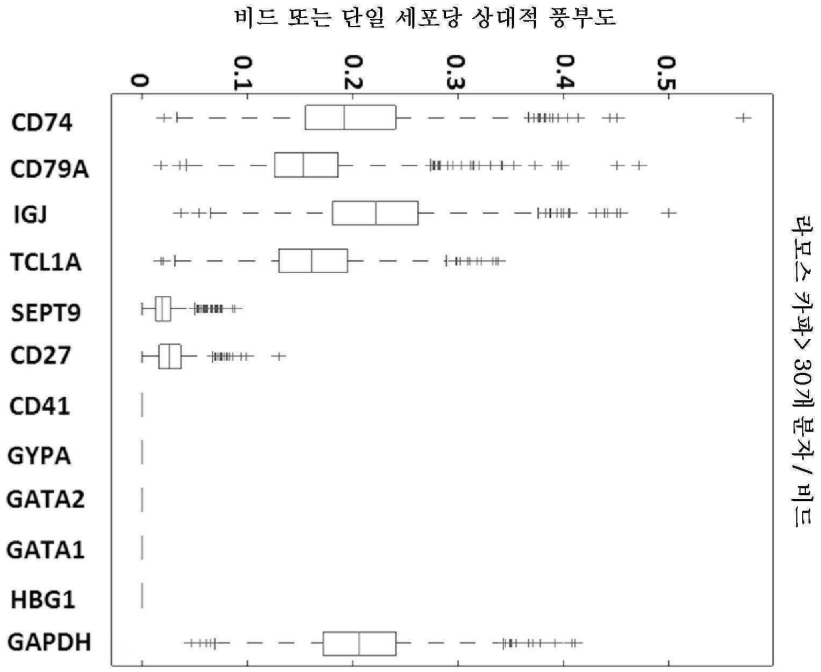
도면12f


비드 또는 단일 세포당 카피
0
50
100
150
200
250
CD74
CD79A
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
라모스 카파> 30개 분자 / 비드

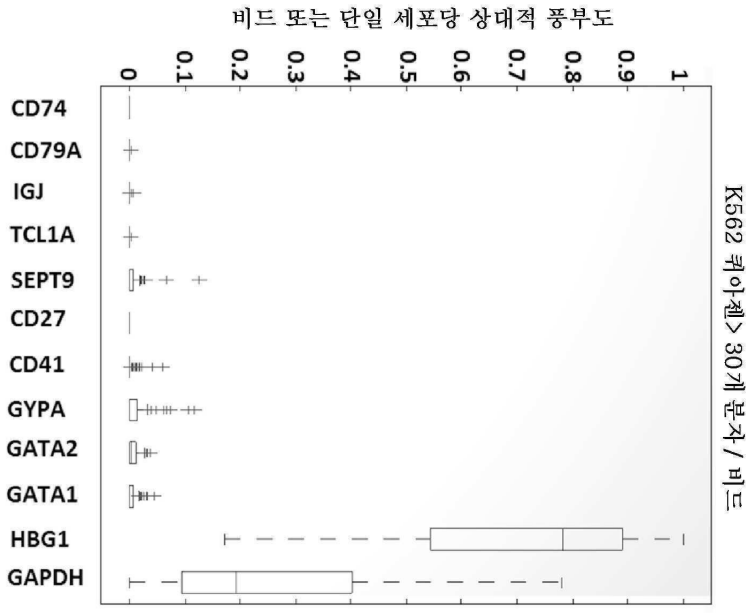
도면12g


비드 또는 단일 세포당 카피
0
500
1000
1500
2000
CD74
CD79A
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
K562 카아젠> 30개 분자 / 비드

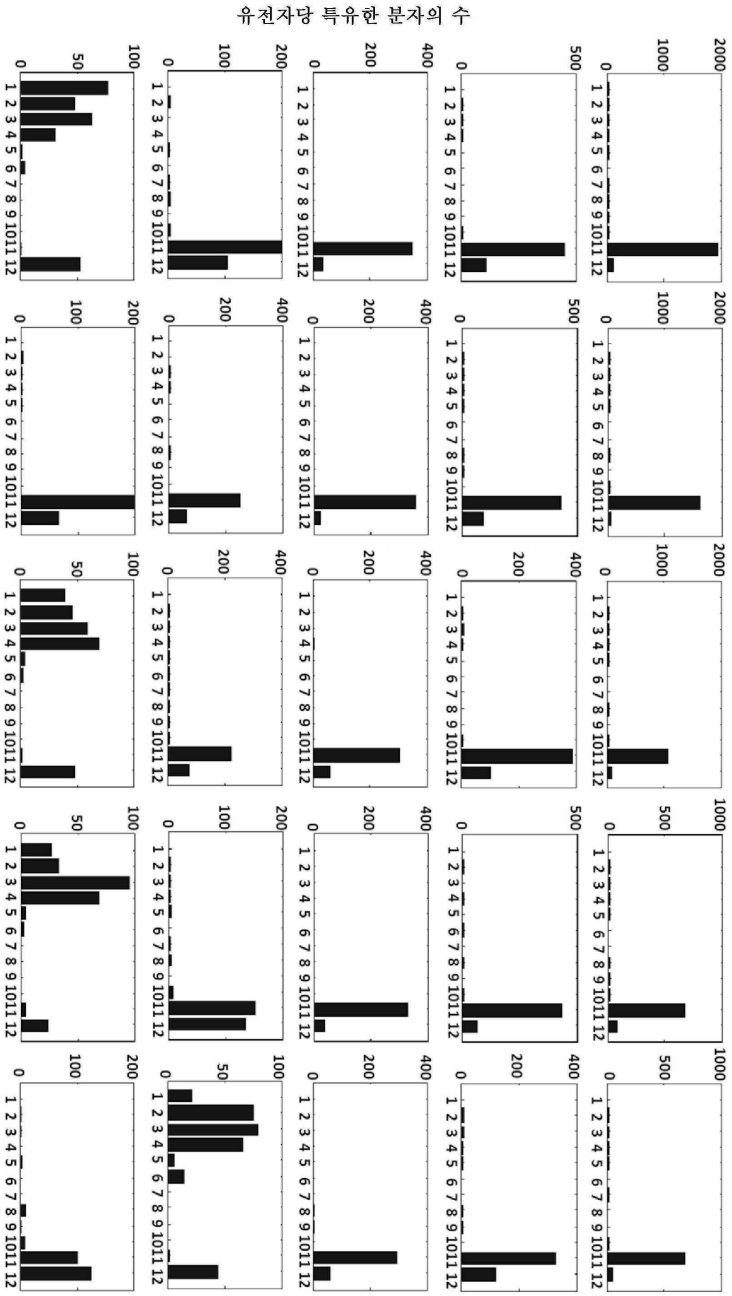
도면12h


비드 또는 단일 세포당 상대적 풍부도
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
CD74
CD79A
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
라모스 카파> 30개 분자 / 비드

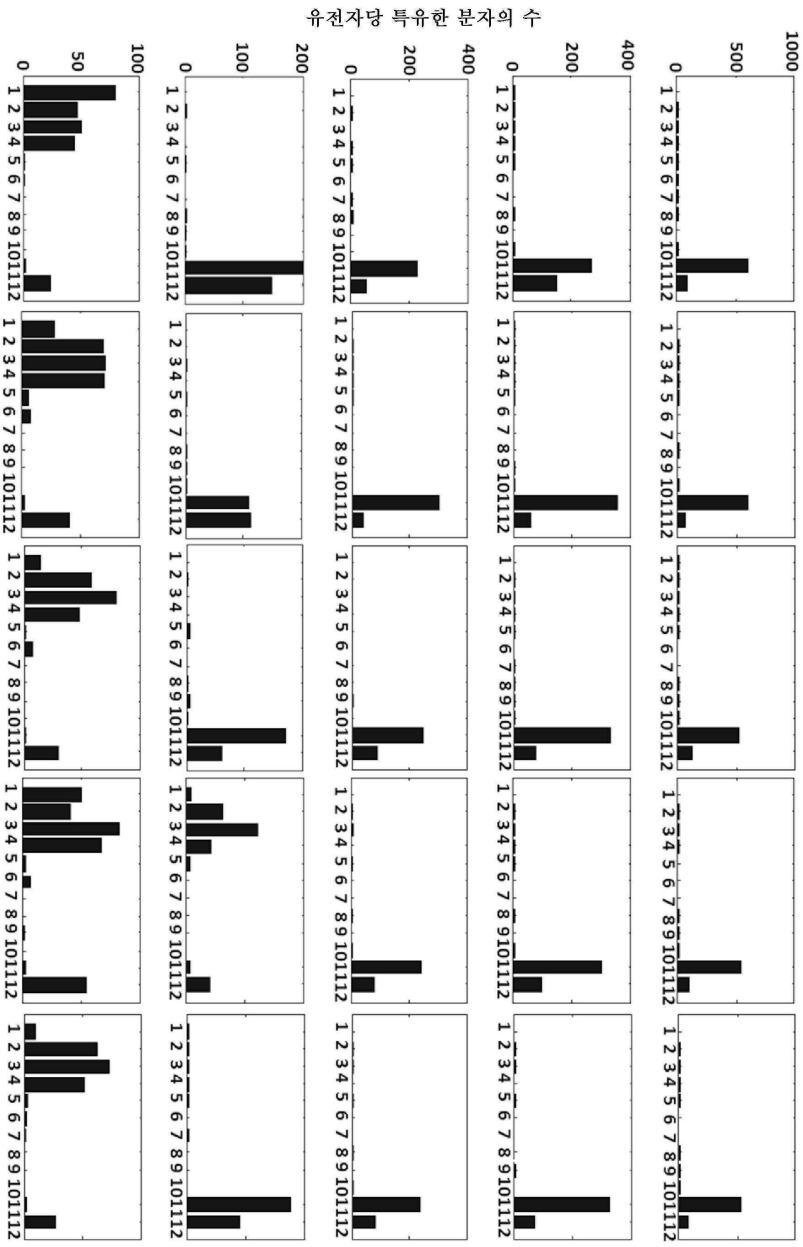
도면12i


비드 또는 단일 세포당 상대적 풍부도
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
CD74
CD79A
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
K562 퀴아젠> 30개 분자 / 비드

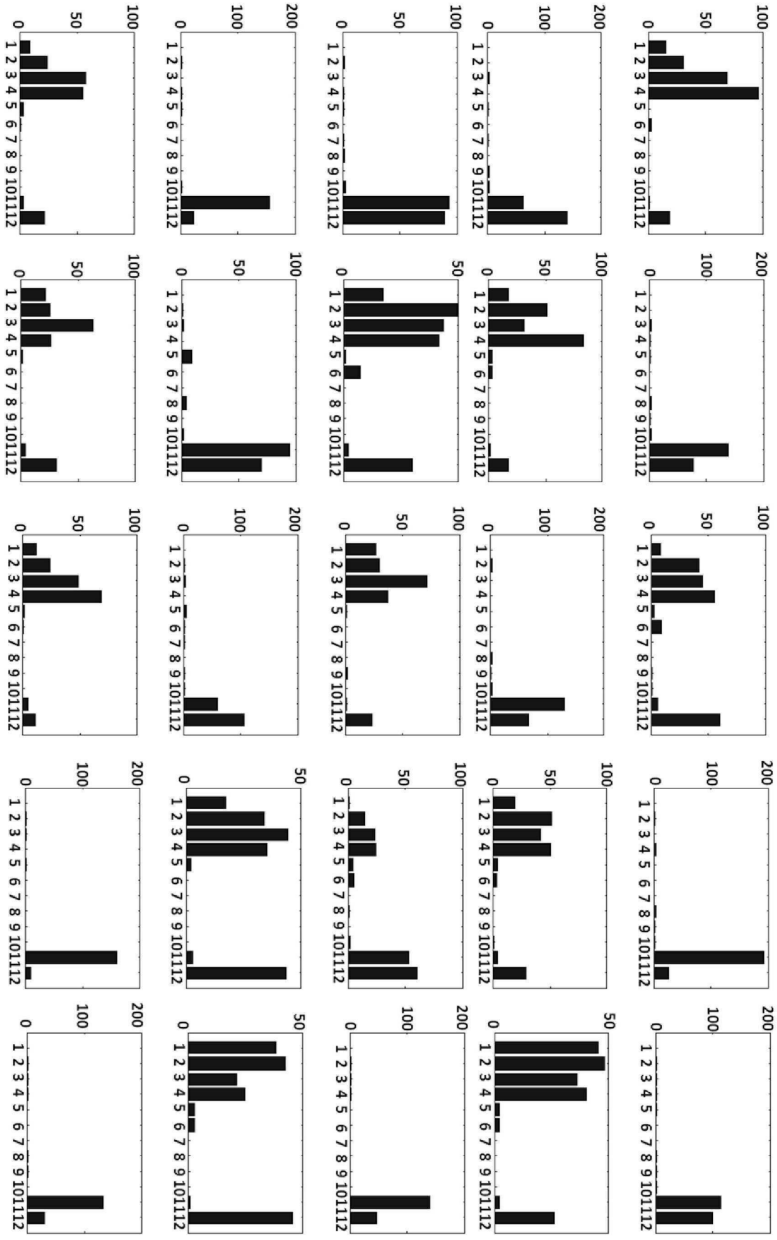
도면12j



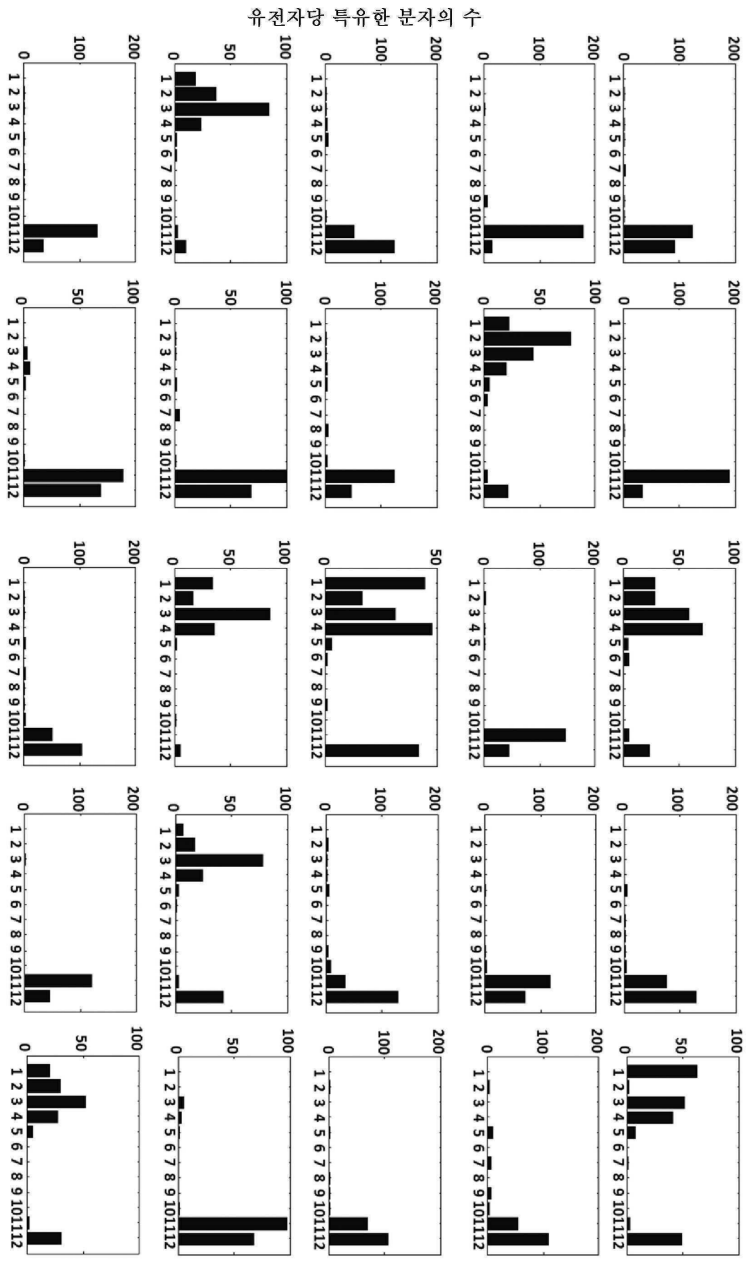
도면12k



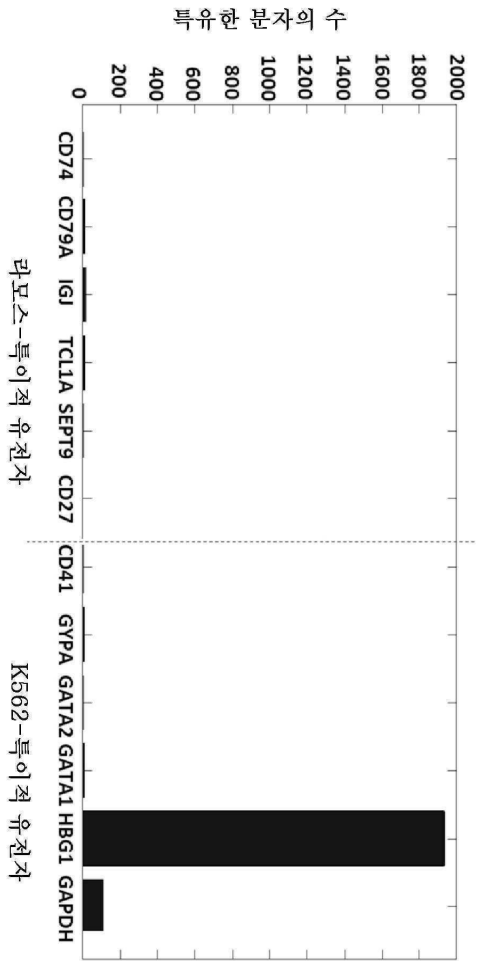
도면121



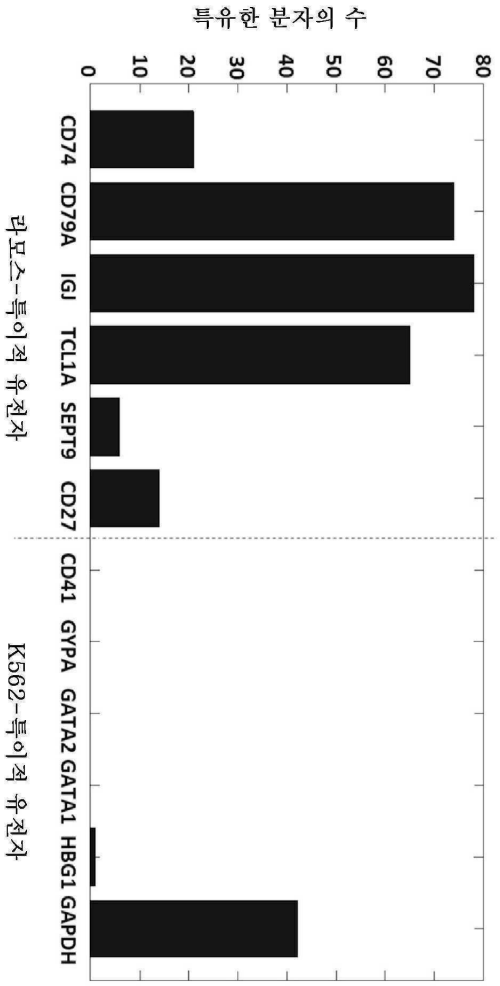
도면12m



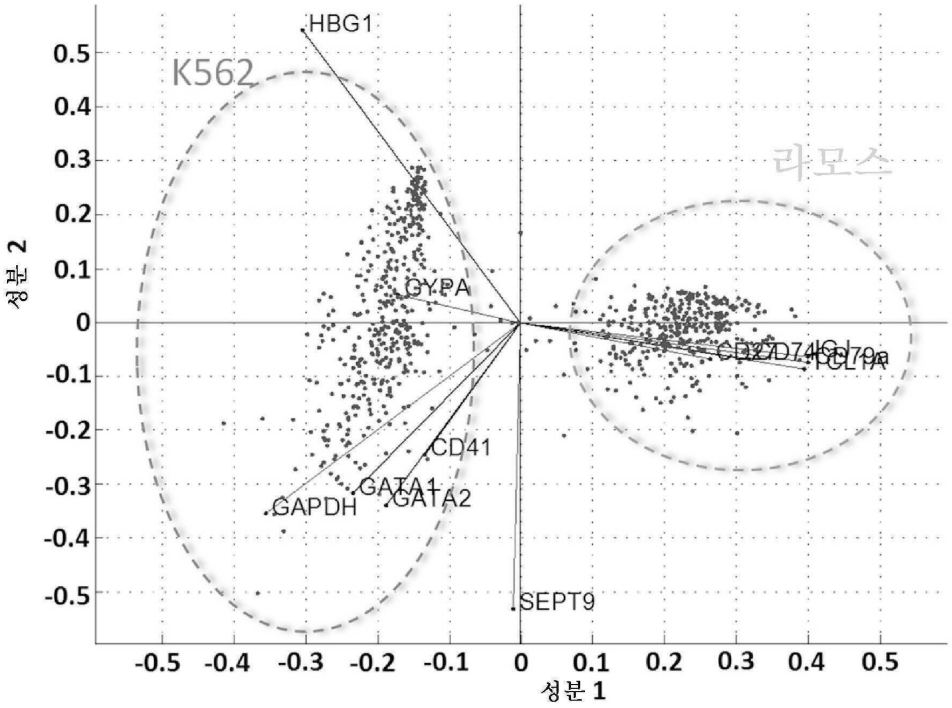
도면12n


특유한 분자의 수
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
CD74
CD79A
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
라모스-특이적 유전자
K562-특이적 유전자

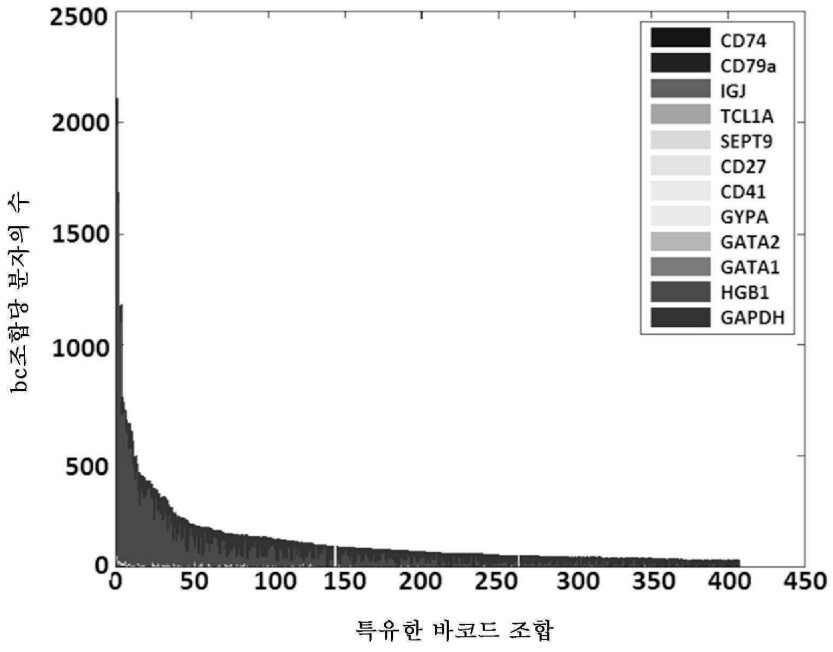
도면12o


특유한 분자의 수
0
10
20
30
40
50
60
70
80
CD74
CD79A
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
라모스-특이적 유전자
K562-특이적 유전자

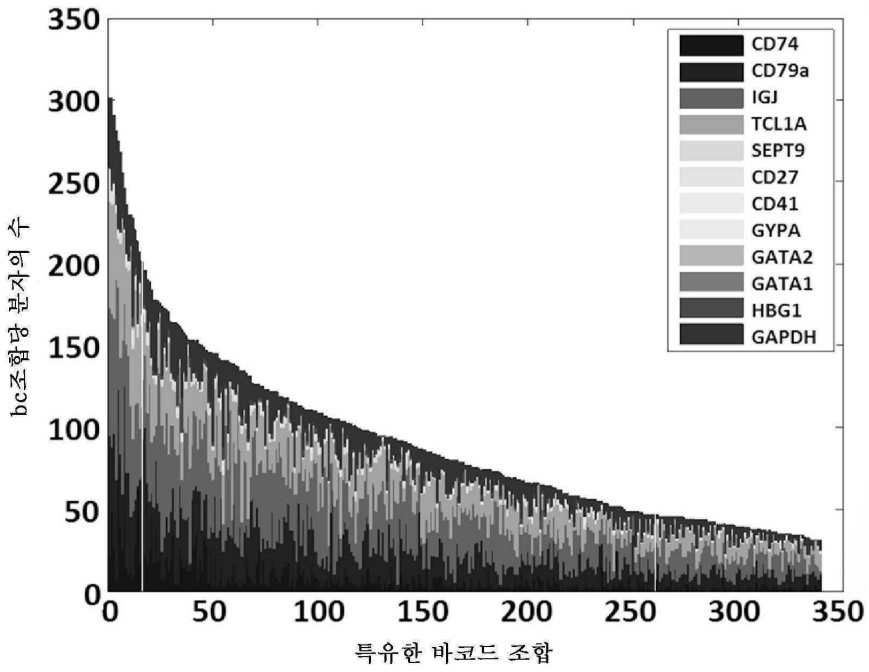
도면12p


HBG1
K562
라모스
GYPA
CD41
GATA1
GATA2
GAPDH
SEPT9
TCL1A
성분 2
성분 1

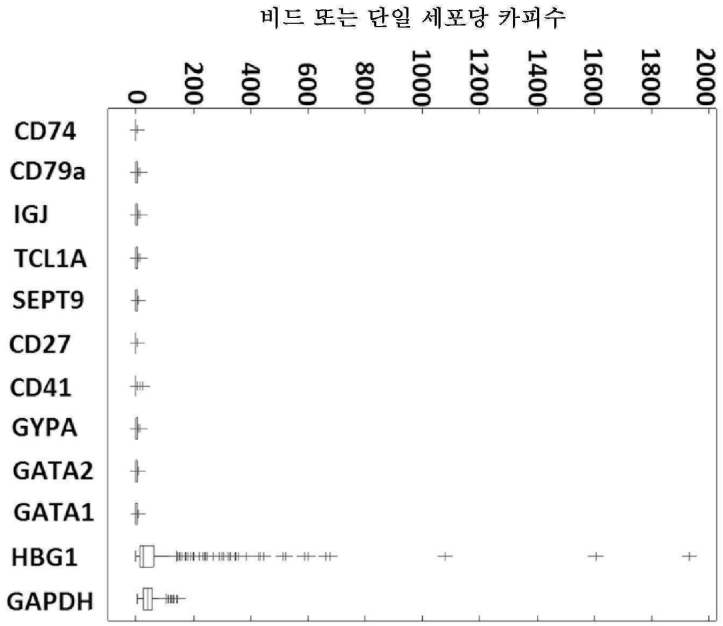
도면12q


CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HGB1
GAPDH
bc조합당 분자의 수
특유한 바코드 조합

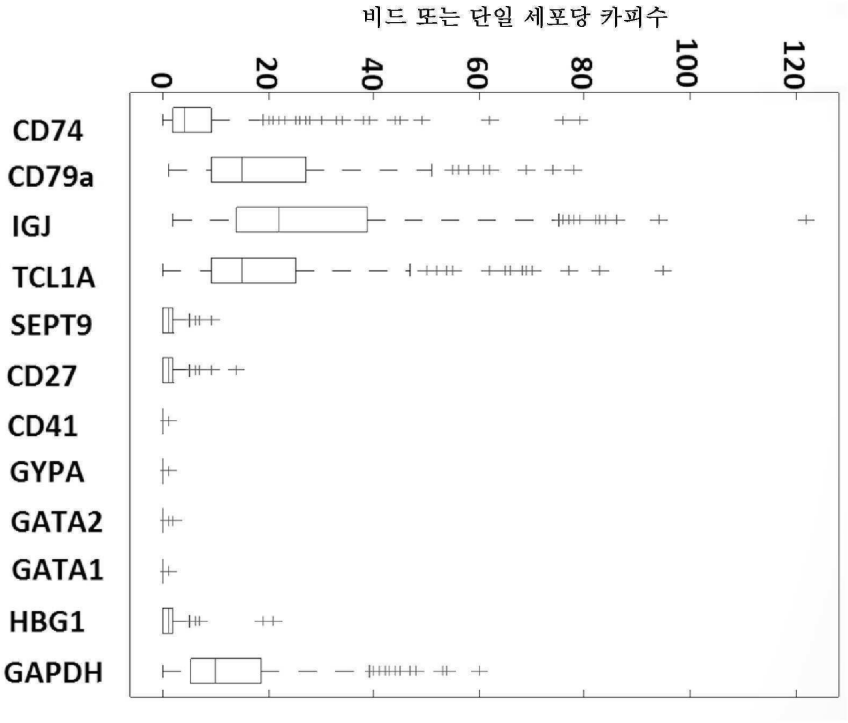
도면12r


CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH
bc조합당 분자의 수
특유한 바코드 조합
0
50
100
150
200
250
300
350

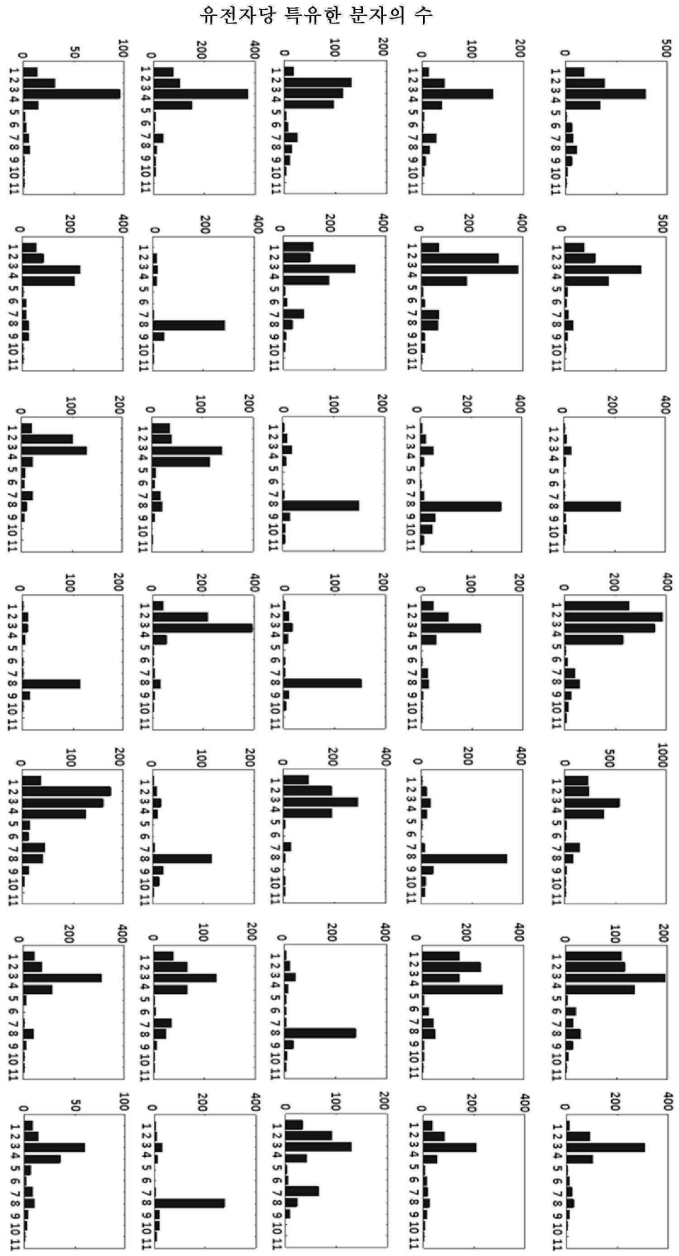
도면12s


비드 또는 단일 세포당 카피수
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH

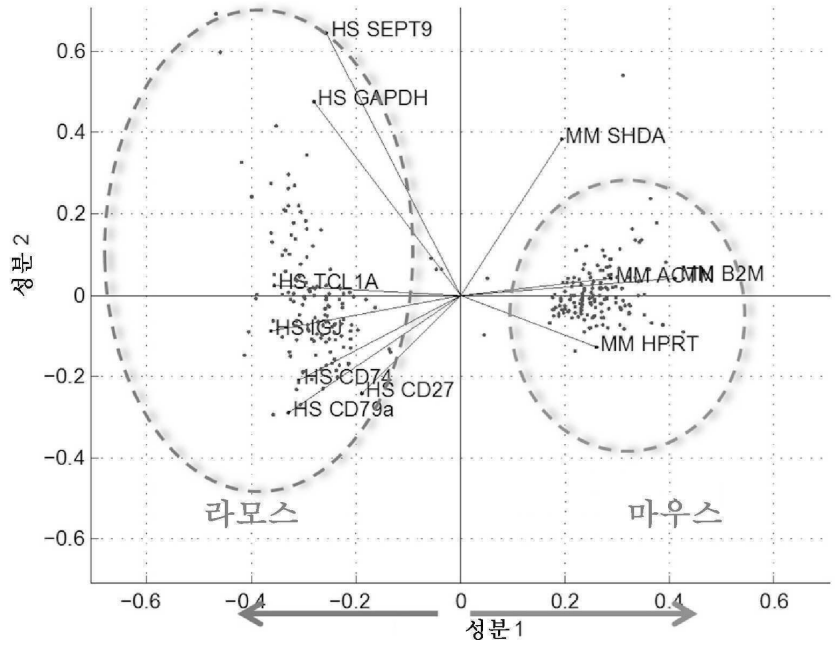
도면12t


비드 또는 단일 세포당 카피수
0
20
40
60
80
100
120
CD74
CD79a
IGJ
TCL1A
SEPT9
CD27
CD41
GYPA
GATA2
GATA1
HBG1
GAPDH

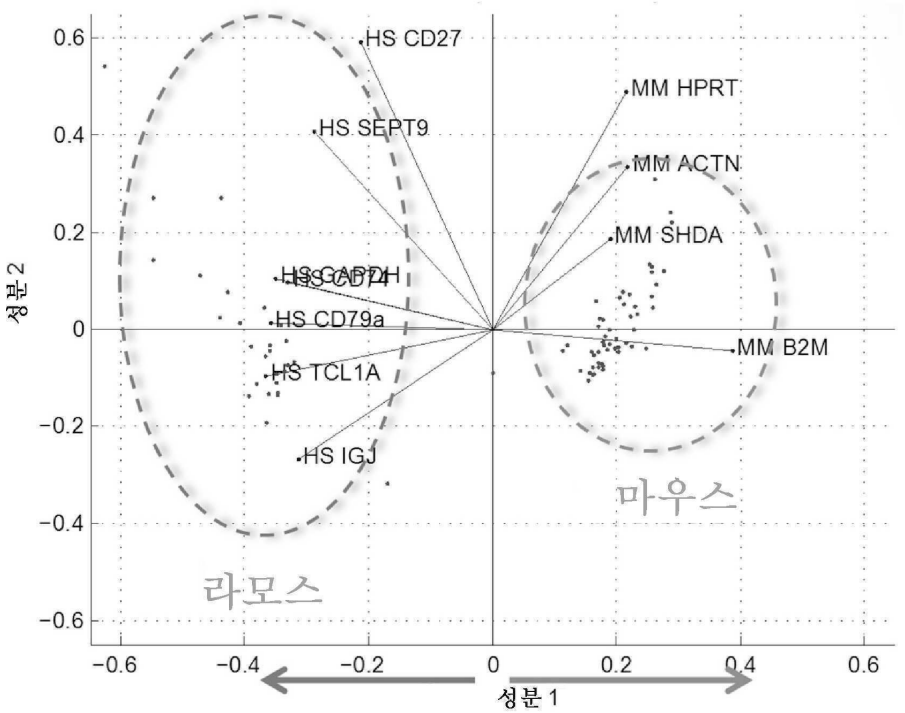
도면13a



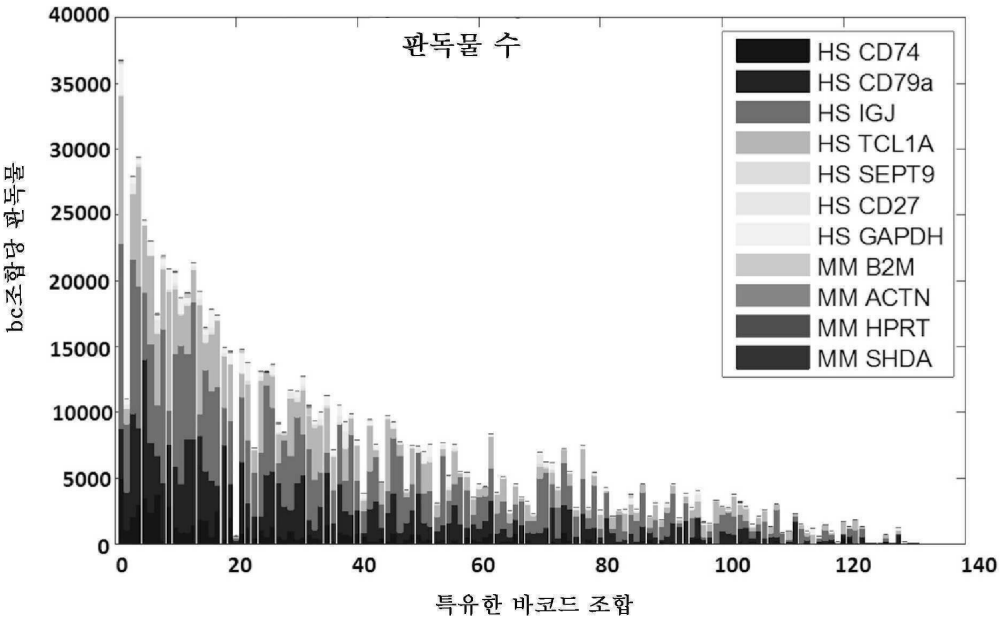
도면13b


HS SEPT9
HS GAPDH
MM SHDA
MM ACTN
MM B2M
HS TCL1A
HS IGJ
MM HPRT
HS CD74
HS CD27
HS CD79a
라모스
마우스
성분 2
성분 1
0.6
0.4
0.2
0
−0.2
−0.4
−0.6

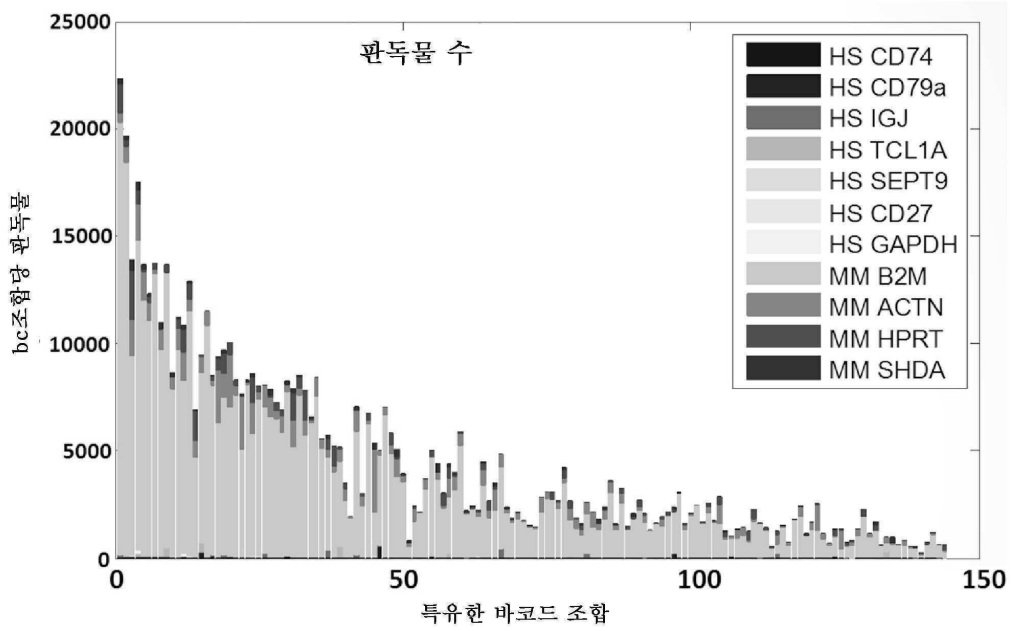
도면13c


HS CD27
MM HPRT
HS SEPT9
MM ACTN
MM SHDA
HS GAPDH
HS CD74
HS CD79a
MM B2M
HS TCL1A
HS IGJ
마우스
라모스
성분 2
성분 1
0.6
0.4
0.2
0
−0.2
−0.4
−0.6

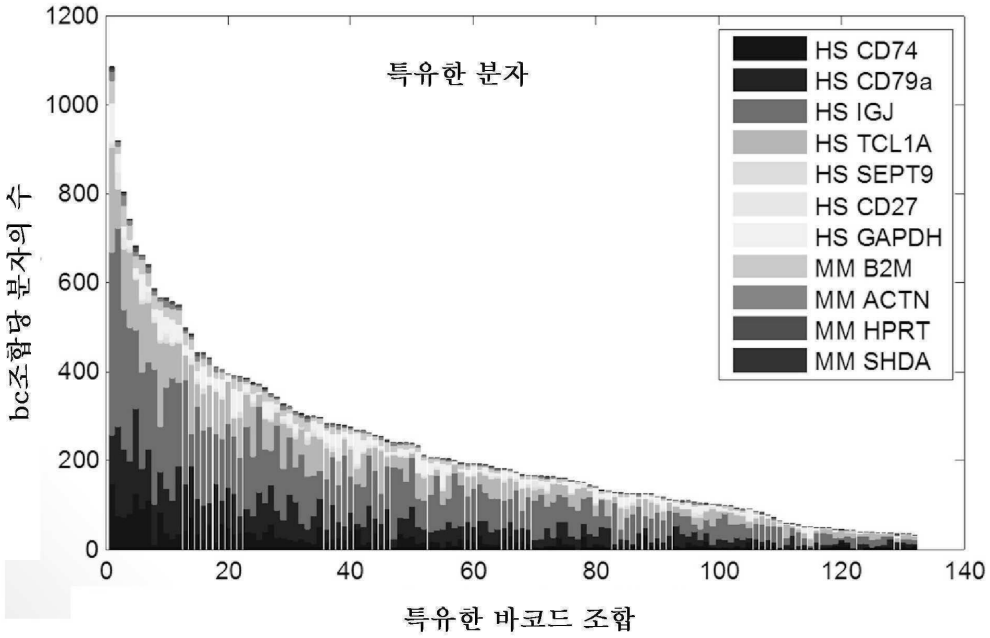
도면13d


판독물 수
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 판독물
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
20
40
60
80
100
120
140
특유한 바코드 조합

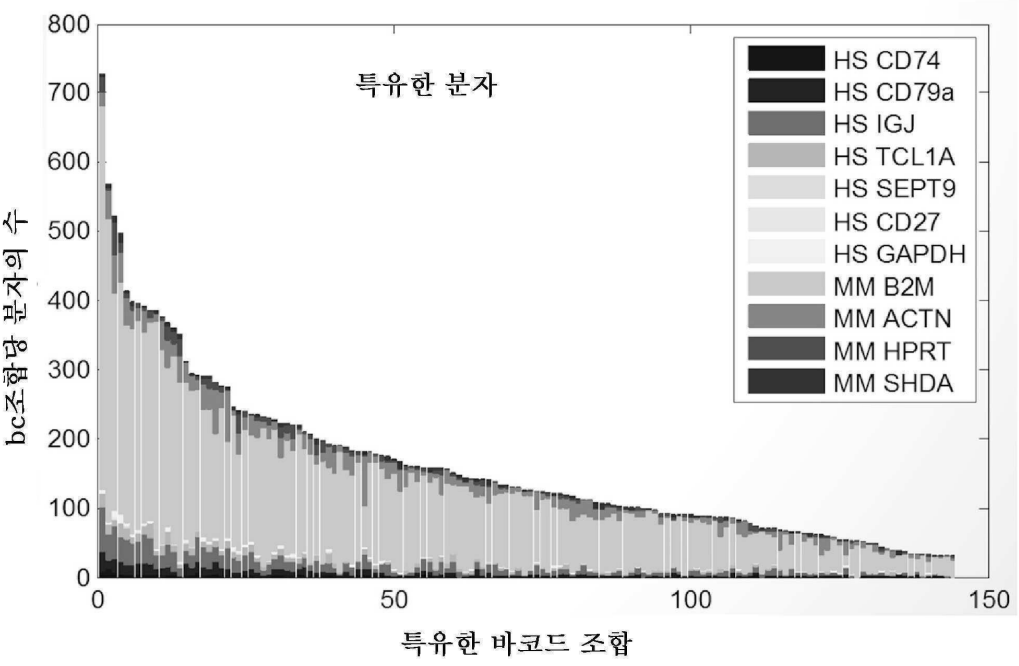
도면13e


판독물 수
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 판독물
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
50
100
150
특유한 바코드 조합

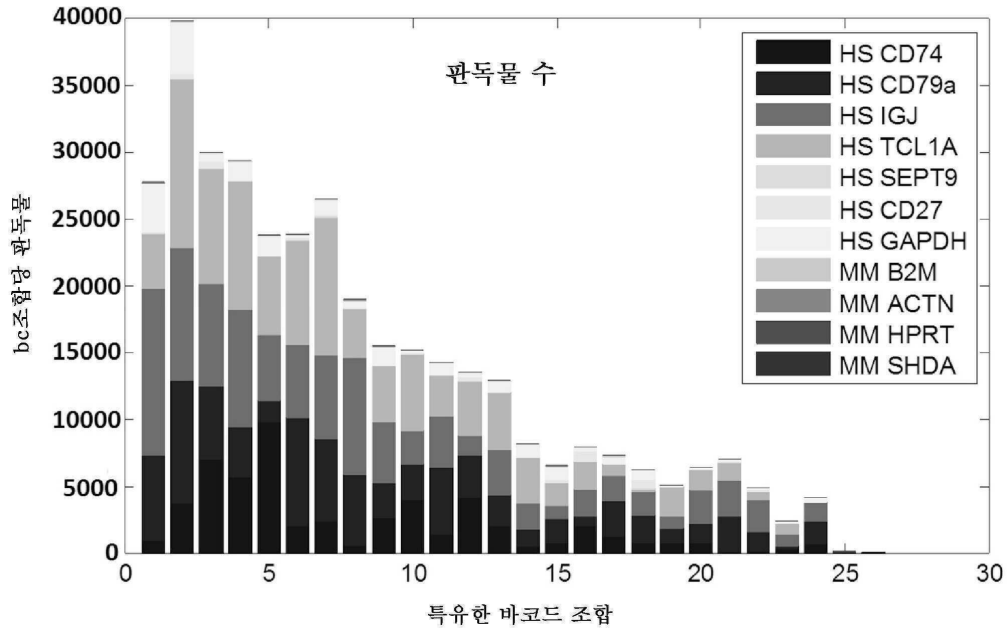
도면13f


특유한 분자
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 분자의 수
특유한 바코드 조합
0
200
400
600
800
1000
1200
0
20
40
60
80
100
120
140

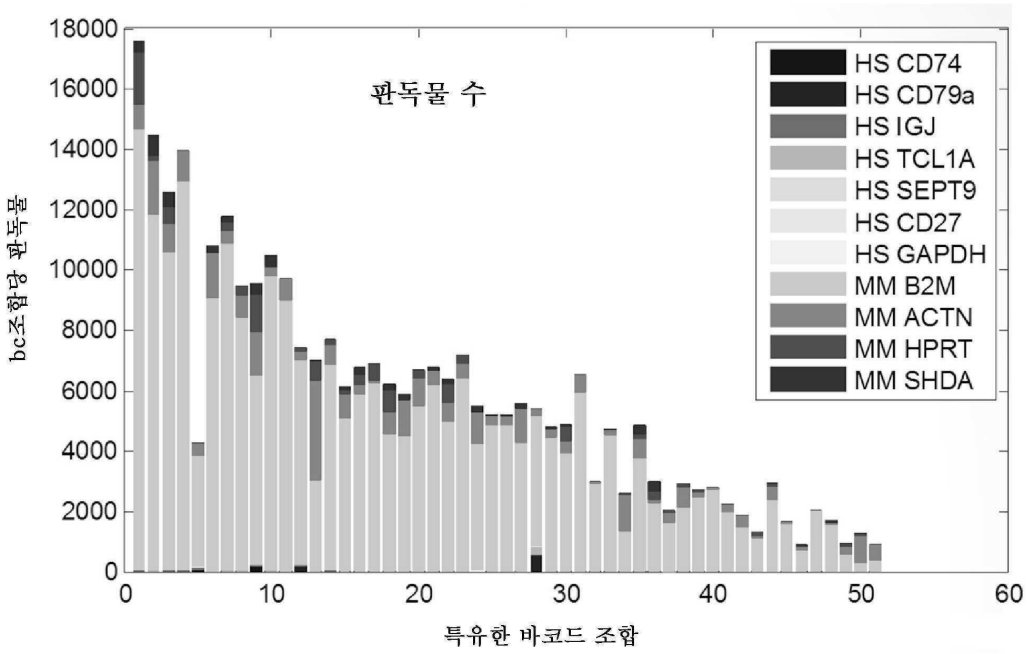
도면13g


특유한 분자
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 분자의 수
특유한 바코드 조합
0
100
200
300
400
500
600
700
800
0
50
100
150

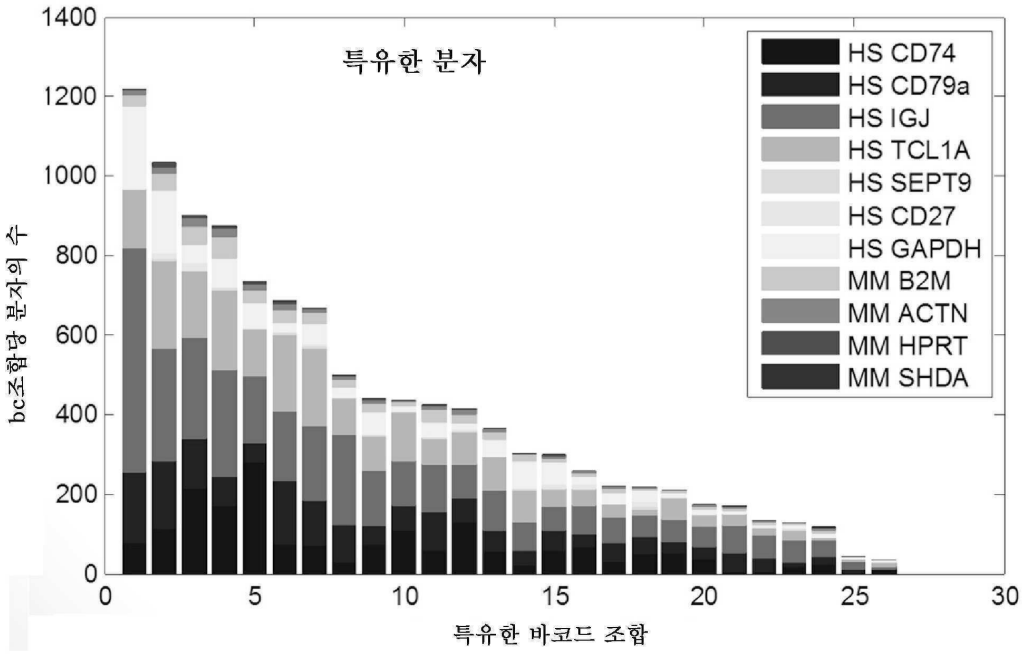
도면13h


판독물 수
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 판독물
특유한 바코드 조합
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
5
10
15
20
25
30

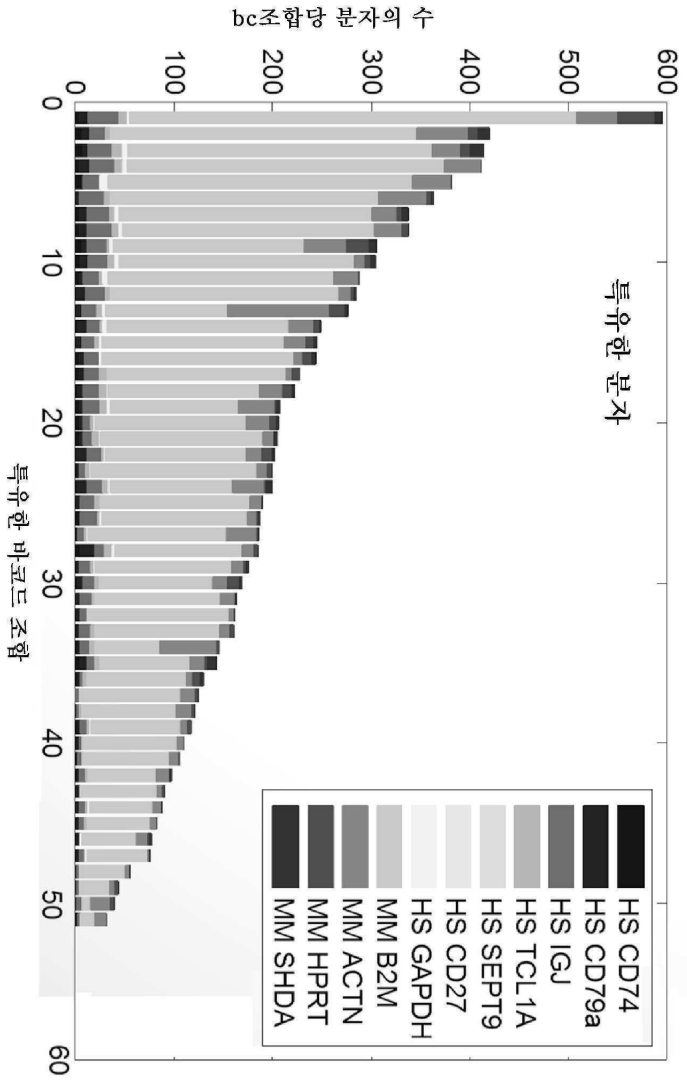
도면13i


판독물 수
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 판독물
특유한 바코드 조합
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
60

도면13j


특유한 분자
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA
bc조합당 분자의 수
특유한 바코드 조합
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
0
5
10
15
20
25
30

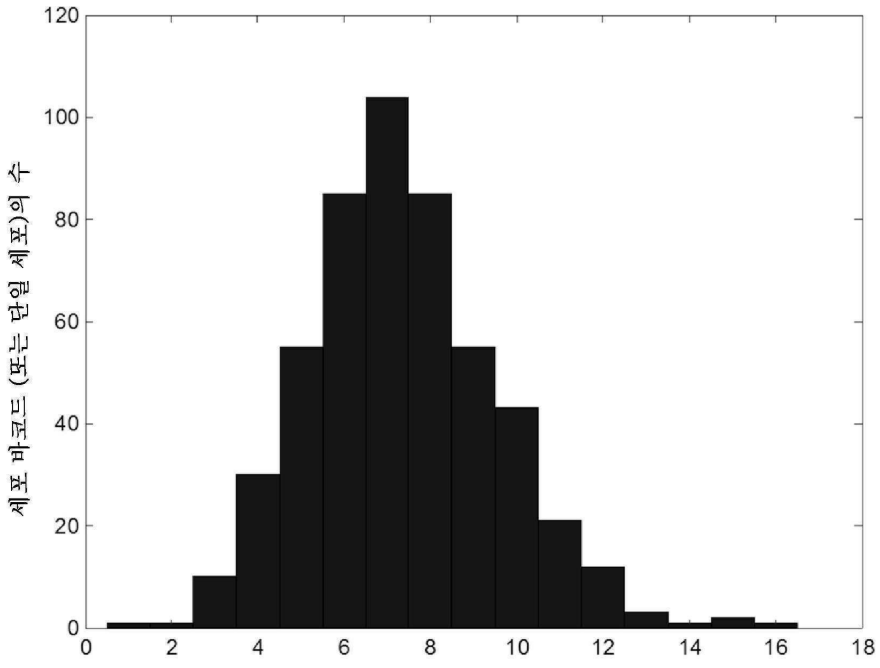
도면13k


bc조합당 분자의 수
0
100
200
300
400
500
600
특유한 분자
특유한 바코드 조합
0
10
20
30
40
50
60
HS CD74
HS CD79a
HS IGJ
HS TCL1A
HS SEPT9
HS CD27
HS GAPDH
MM B2M
MM ACTN
MM HPRT
MM SHDA

도면14

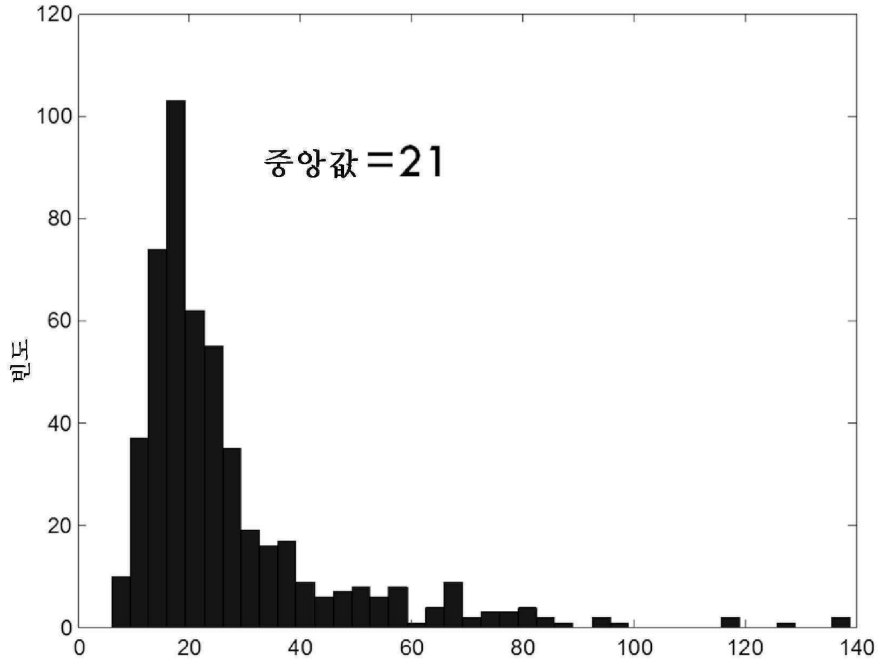

log10 (판독물의 수)
0
1
2
3
4
5
6
CD30
CD69
CD19
CD20
BAFF
TCL1A
TACI
PAX5
TNFRSF17
CD27
CD38
CD24
AICDA
CD95
IGHD_CH3
IGHM_CH4
IL10
CD10
BCL6
PRDM1
TXK
MBD2
CCR7
S100A12
CCR2varA
CCR2varB
CD62L
CD1b
FOXQ1
CD209
CD1e
CCL17
DTNA
CD8A
CD8B
PRF1
EOMES
PDCD1
LAG3
CXCR5
OX40L
ICOS
SH2D1A
CD4
GAPDH
CD44
CD45RO
CD14
CD45RA
RUNX3
THPOK
OSBPL5
CD56
IGFBP7
KIR2DS5
KIR2DS2
RAB4B
ZBTB16
SLAMF1
CD16a
CX3CR1
CD138
RASD1
AMPD1
CLEC4C
CD3D
CD3E
CXCR3
IFNG
IFNGR1
IL12RB2
CCL20
IL17A
IL17F
IL21
IL22
IL23R
RORA
RORC
IL4R
IL4
IL33R
CCR4
CRTH2
IL5
TLR1
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6
TLR7
TLR8
TLR9
TLR10
CD25
FOXP3
TGFB1

도면15a



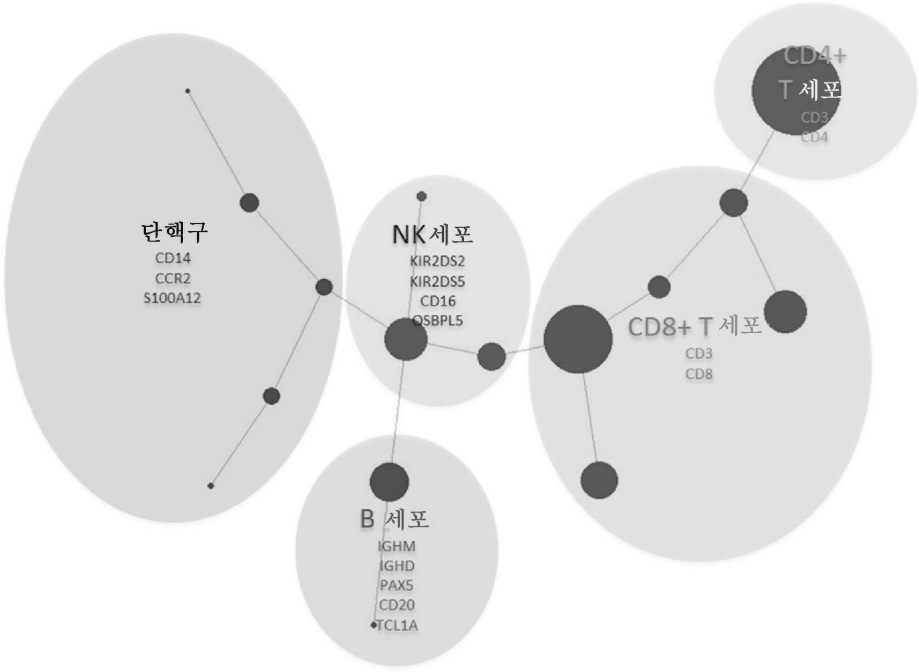
세포 바코드당 존재하는 유전자의 수 (평균>5배 서열 과잉성)

도면15b

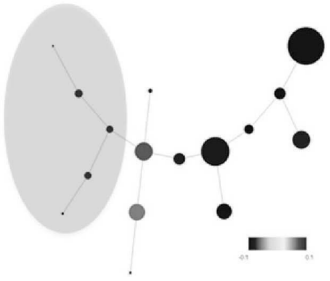


(유전자 패널을 발현하는) 비드 상의 특유한 분자의 총 수

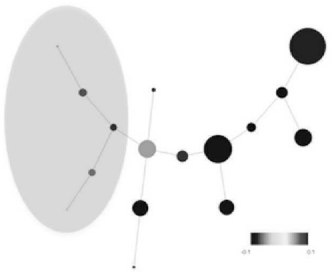
도면16



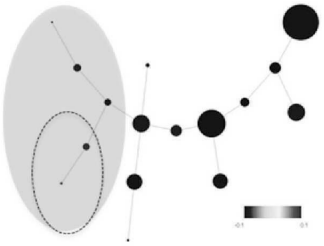
도면17a



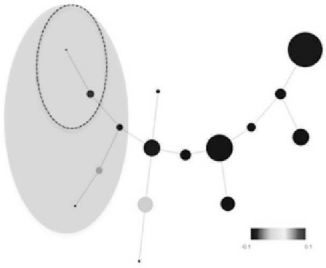
도면17b



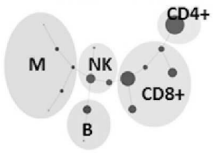
도면17c



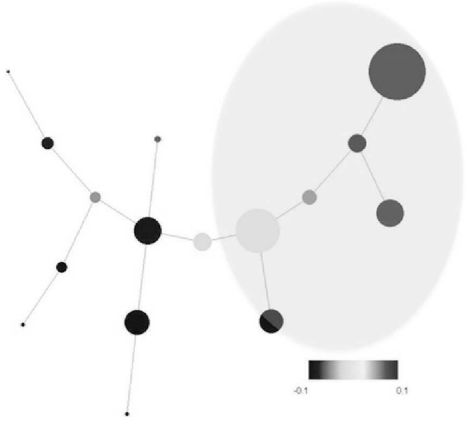
도면17d



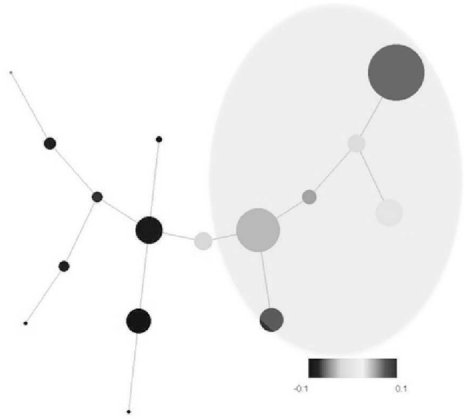
도면17e



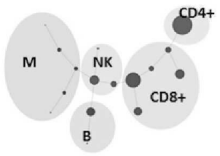
도면18a



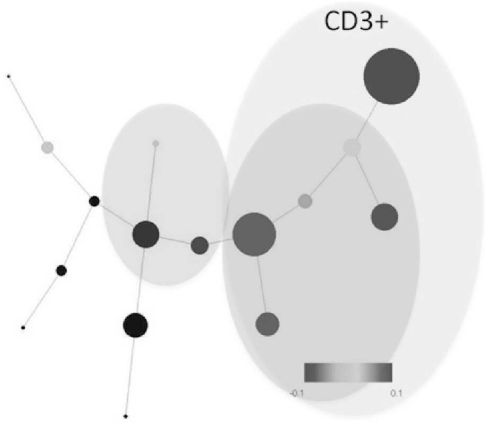
도면18b



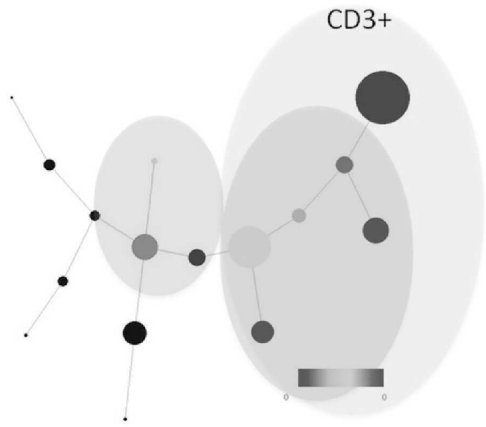
도면18c



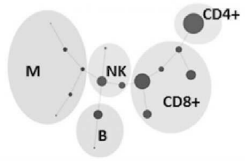
도면19a



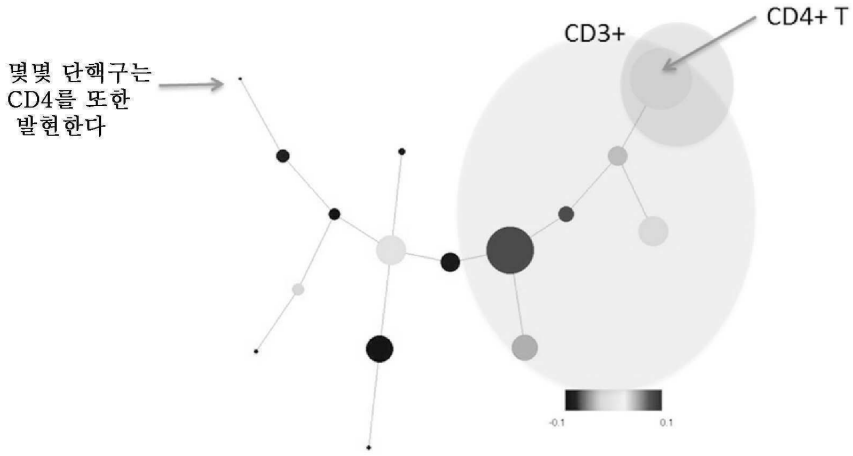
도면19b



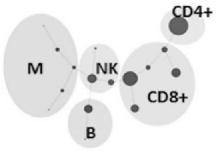
도면19c



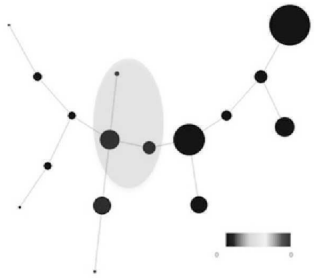
도면20a



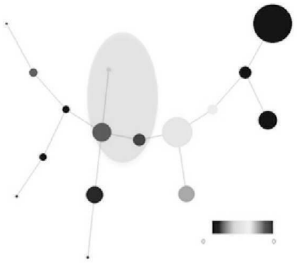
도면20b



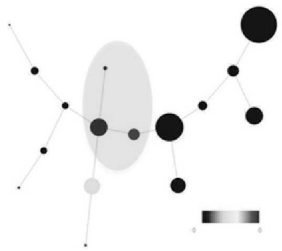
도면21a



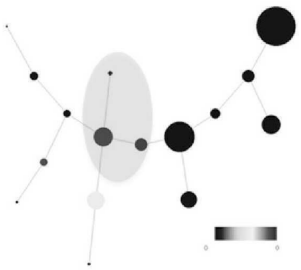
도면21b



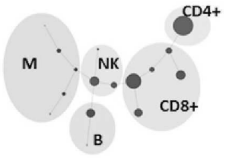
도면21c



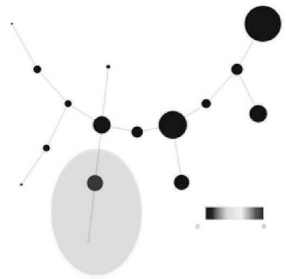
도면21d



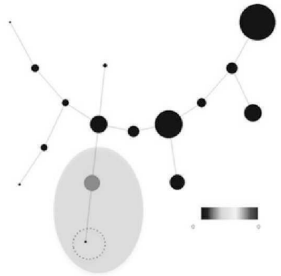
도면21e



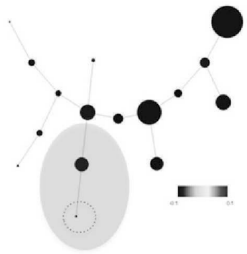
도면22a



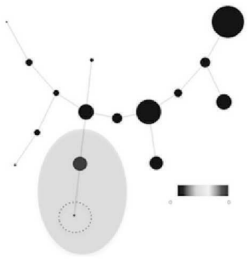
도면22b



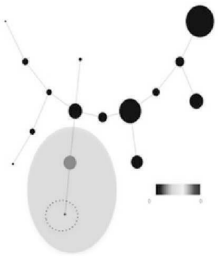
도면22c



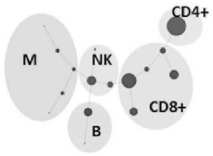
도면22d



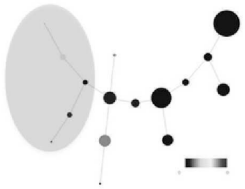
도면22e



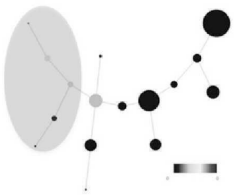
도면22f



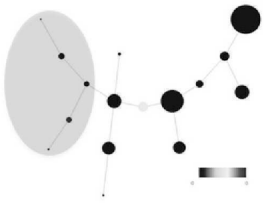
도면23a



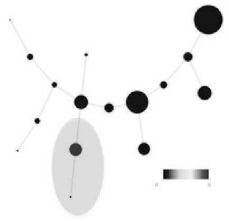
도면23b



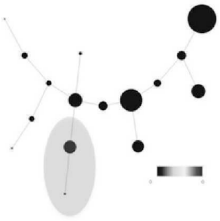
도면23c



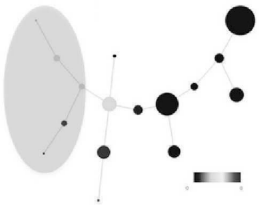
도면23d



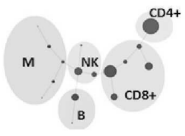
도면23e



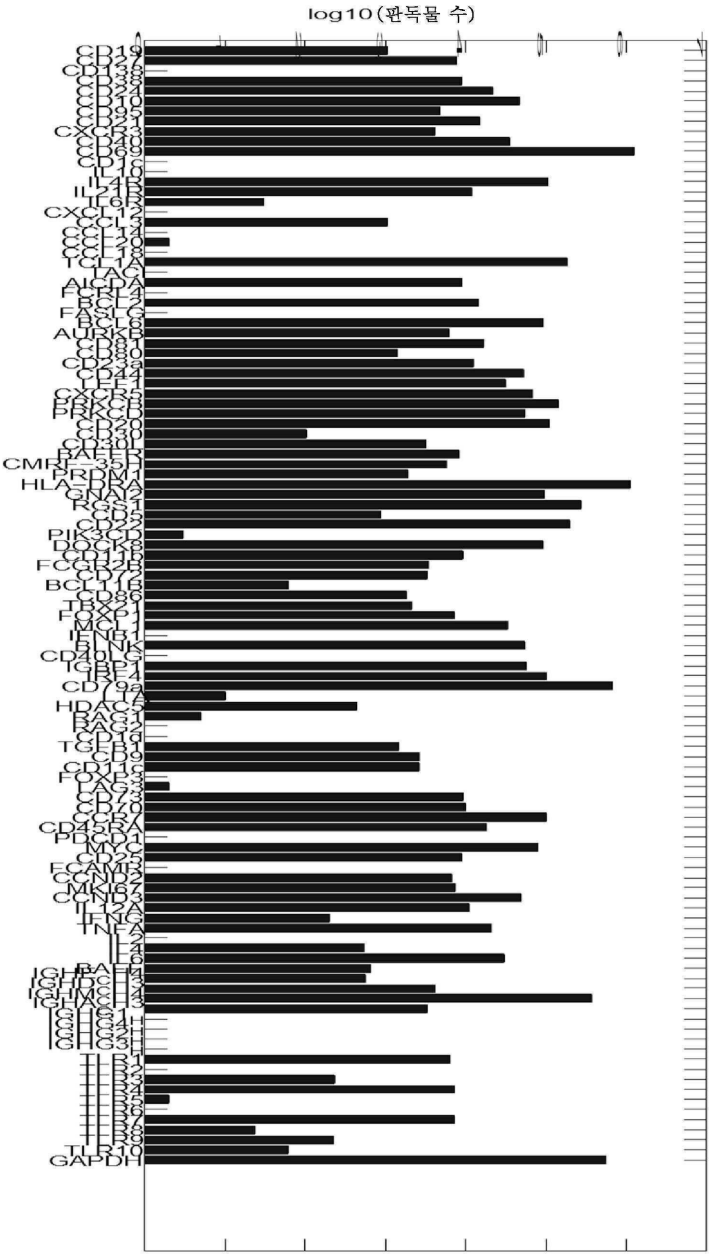
도면23f



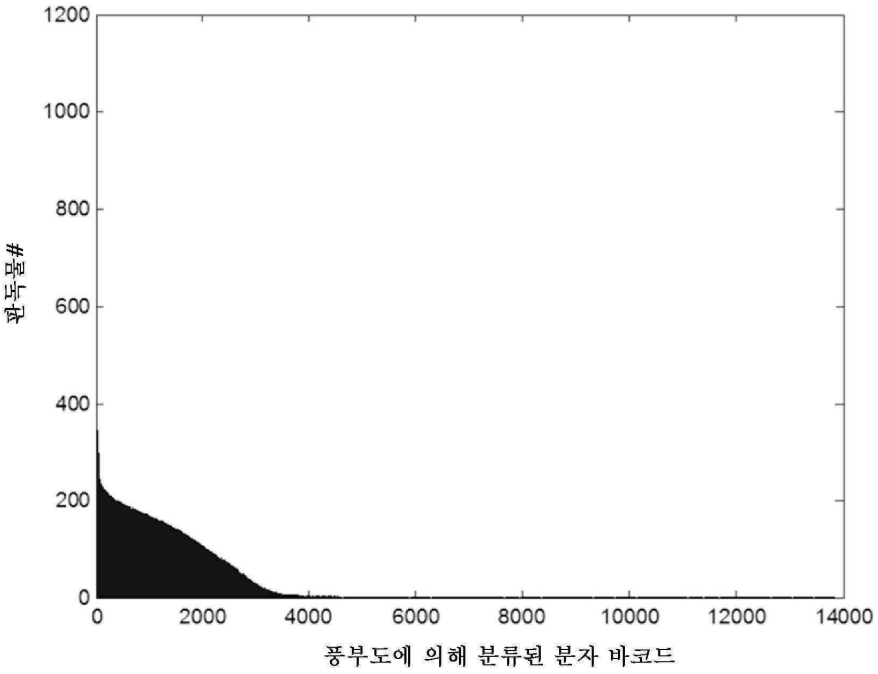
도면23g



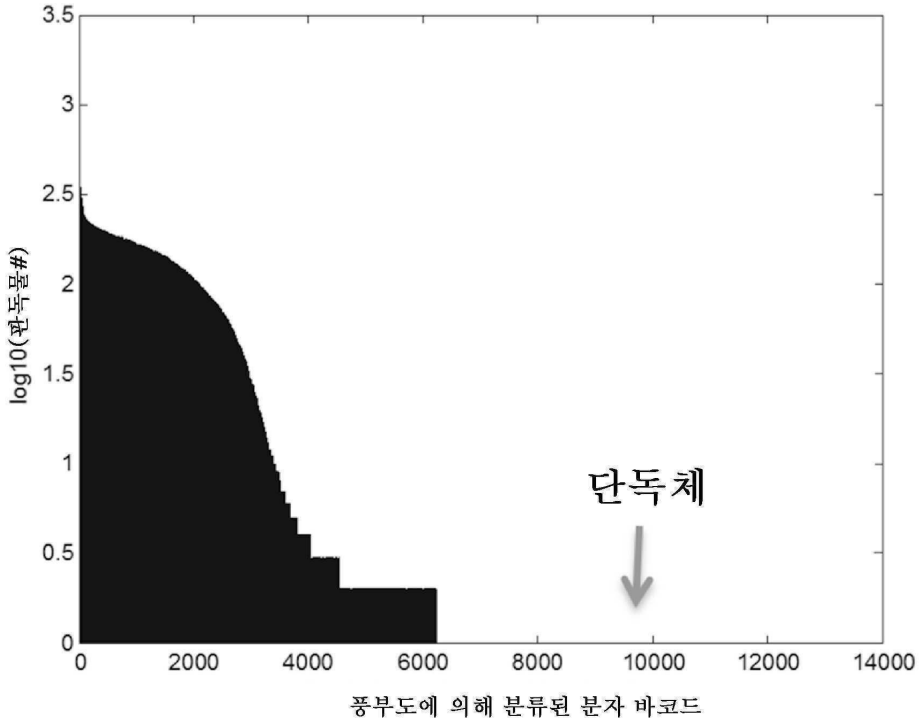
도면24


log10(판독물 수)
CD19
CD138
CD38
CD24
CD10
CD95
CD21
CXCR4
CD40
CD69
CD16
IL10
IL4R
IL21R
IL6R
CXCL12
CCL3
CCL4
CCL19
CCL18
TGFA
TAC1
AICDA
FCRL4
BCL2
FASLG
BCL6
AURKB
CD81
CD80
CD23a
CD44
ITGB7
CXCR5
PRKCB
PRKCD
CD20
CD40
CD30L
BATF3
CMRF-35H
PRDM1
HLA-DRA
GNA2
RGS1
CD5
CD22
PIK3CD
DOCK8
CD11b
FCGR2B
CD72
BCL11B
CD86
TBX21
FOXP1
MCL1
IFNB1
BLNK
CD40LG
TGBP1
IRF4
CD79a
IL7A
HDAC5
BAG1
MAL
CD10
TGFB1
CD19
CD11c
FOXE3
TAG7
CD73
CD70
CD45
CD45RA
PDCD1
MYC
CD25
ECAM3
CCND2
MKI67
CD83
IL12A
IFNG
TNFA
IL4
IL6
BAFF
IGHD
IGHG
IGHM
IGHA
IGHG1
IGHG4
IGHG2
IGHG3
TLR1
TLR2
TLR3
TLR4
TLR5
TLR6
TLR7
TLR8
TLR9
TLR10
GAPDH

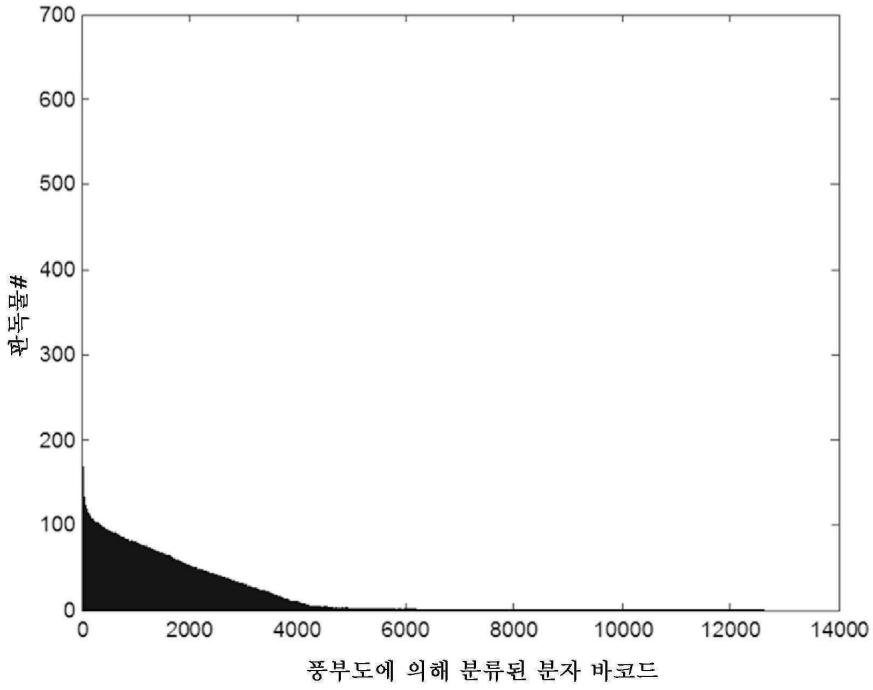
도면25a


1200
1000
800
600
400
200
0
판독물#
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
풍부도에 의해 분류된 분자 바코드

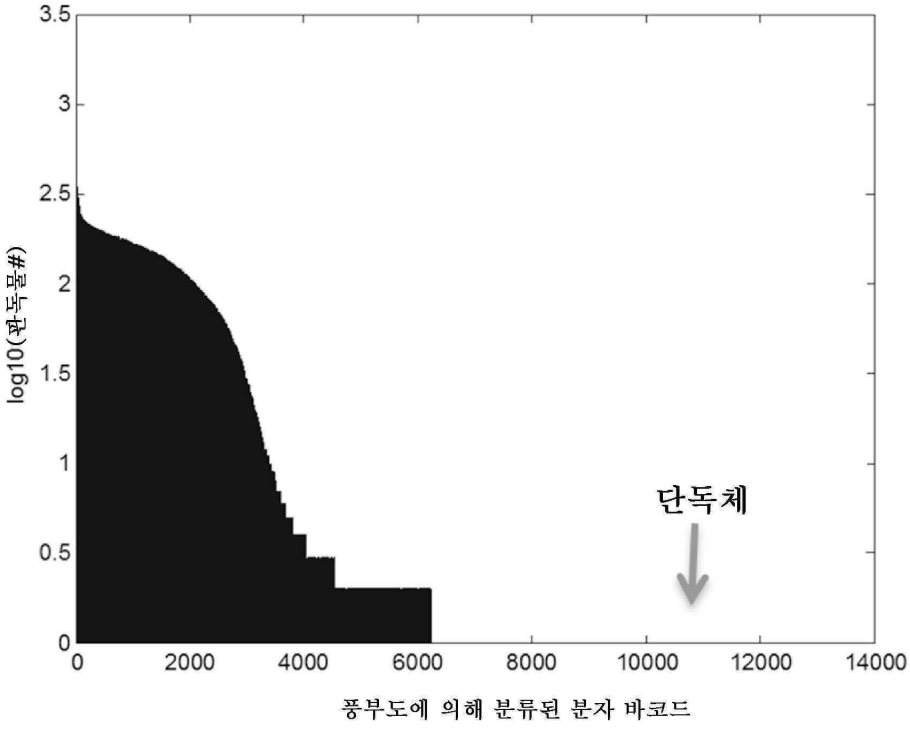
도면25b


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
log10(판독물#)
단독체
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
풍부도에 의해 분류된 분자 바코드

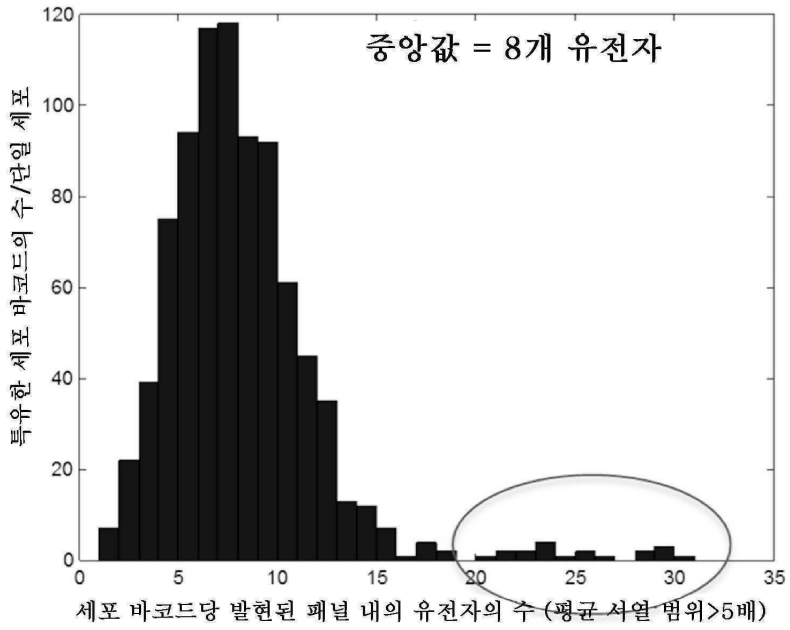
도면25c


700
600
500
400
300
200
100
0
판독물#
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
풍부도에 의해 분류된 분자 바코드

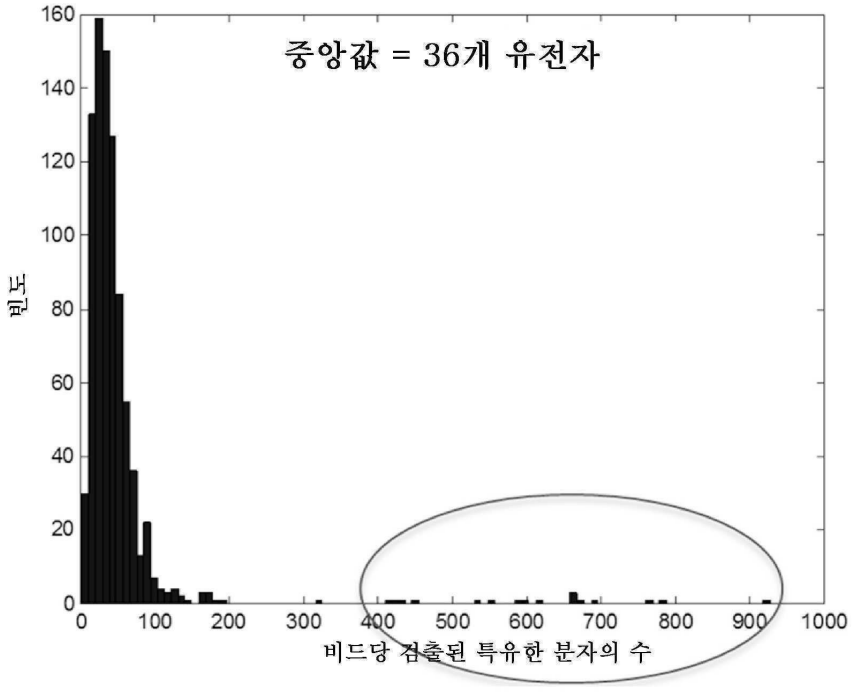
도면25d


3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
log10(판독물#)
단독체
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
풍부도에 의해 분류된 분자 바코드

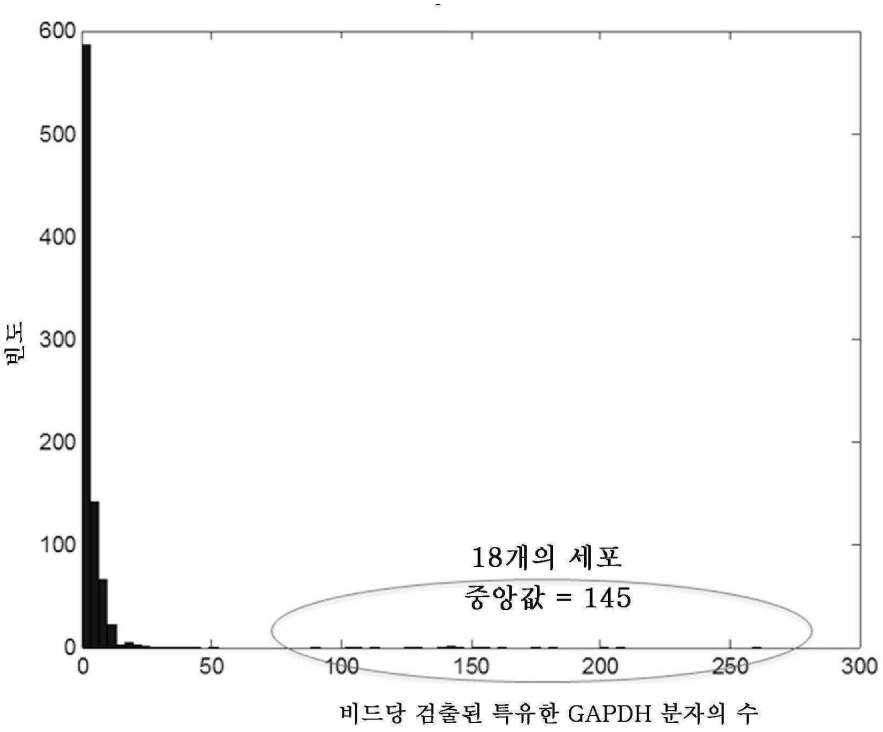
도면26a


중앙값 = 8개 유전자
특유한 세포 바코드의 수/단일 세포
세포 바코드당 발현된 패널 내의 유전자의 수 (평균 서열 범위>5배)

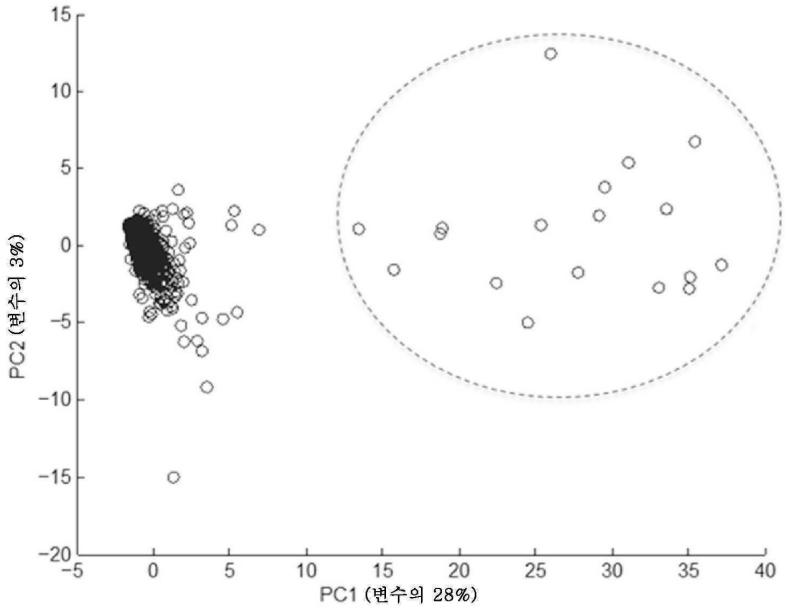
도면26b


중앙값 = 36개 유전자
빈도
비드당 검출된 특유한 분자의 수

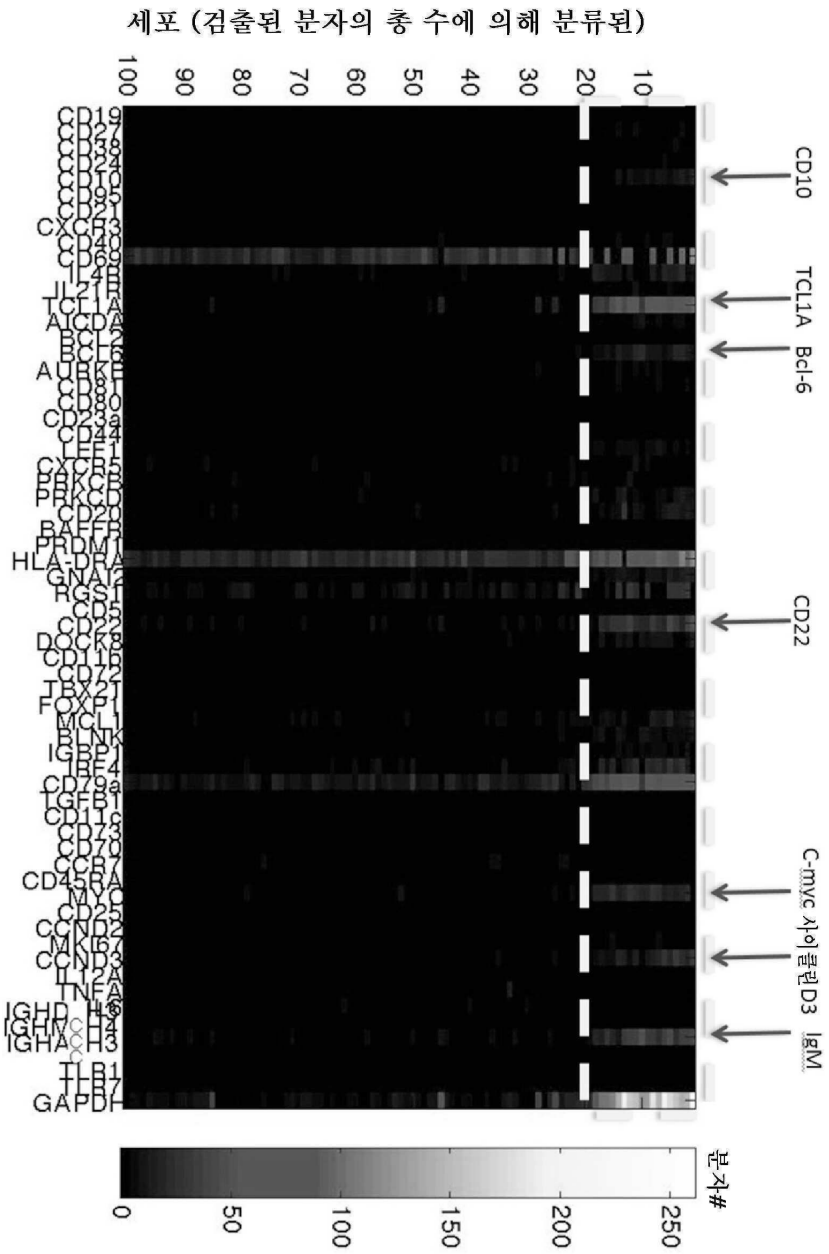
도면26c


600
500
400
300
200
100
0
빈도
18개의 세포
중앙값 = 145
0
50
100
150
200
250
300
비드당 검출된 특유한 GAPDH 분자의 수

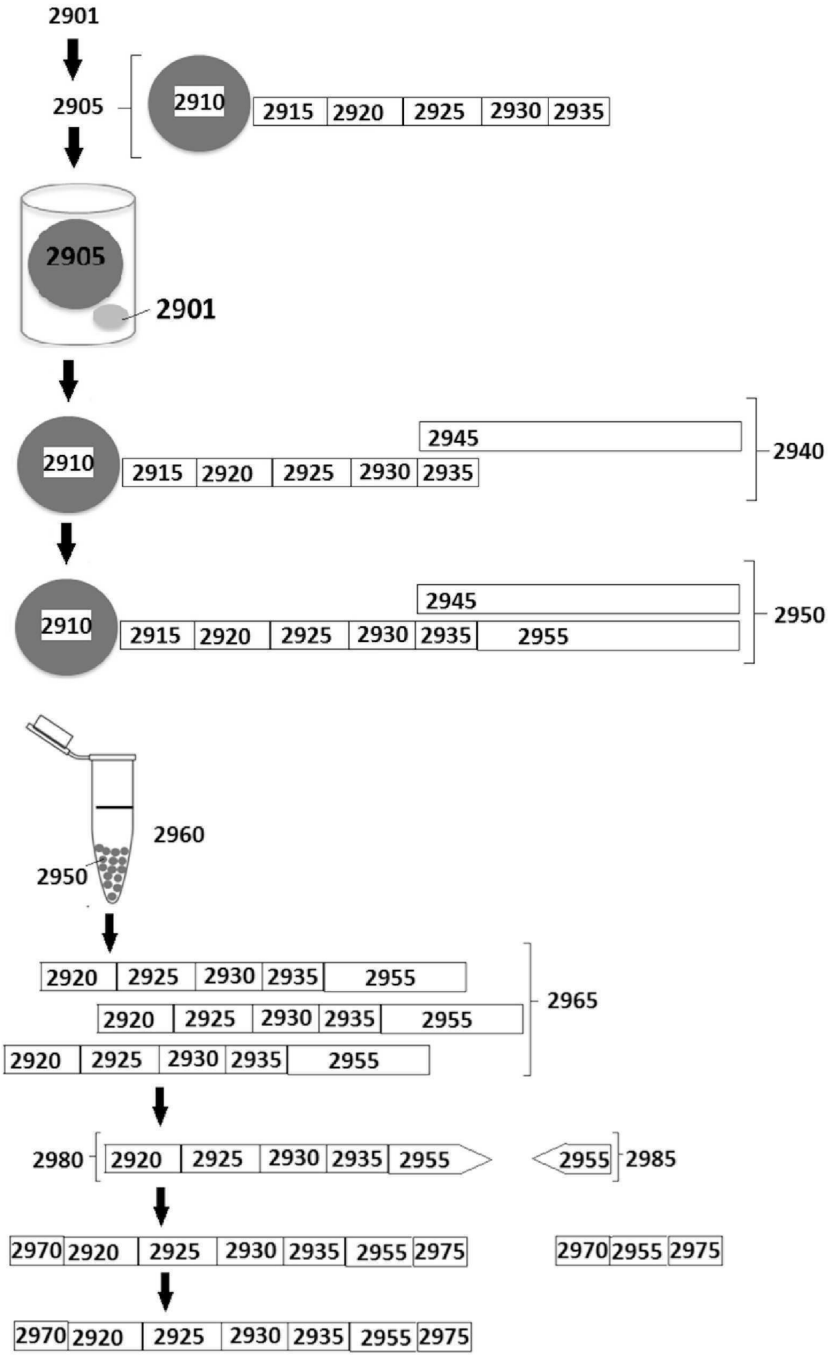
도면27


15
10
5
0
−5
−10
−15
−20
PC2 (변수의 3%)
−5
0
5
10
15
20
25
30
35
40
PC1 (변수의 28%)

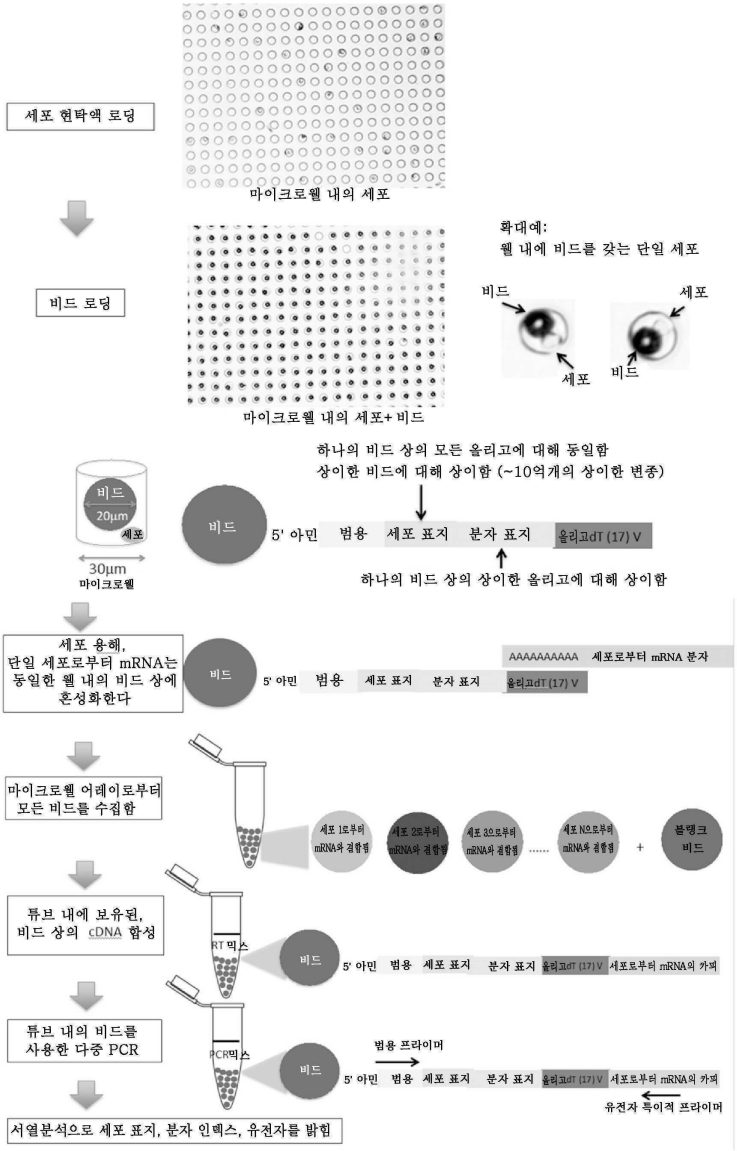
도면28


세포 (검출된 분자의 총 수에 의해 분류된)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
CD10
TCL1A
Bcl-6
CD22
C-myc
사이클린D3
IgM
분자#
0
50
100
150
200
250

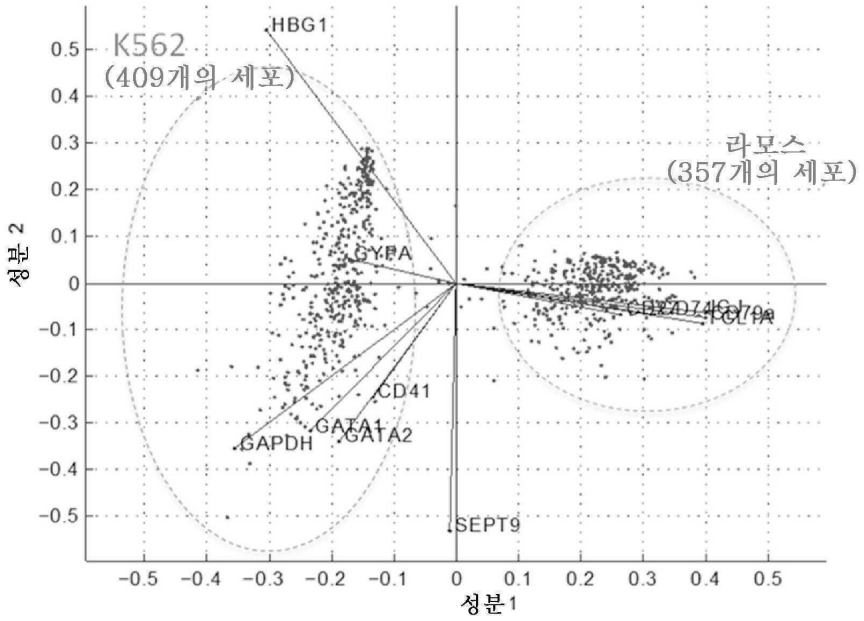
도면29


2901
2905
2910
2915 2920 2925 2930 2935
2905
2901
2910
2945
2915 2920 2925 2930 2935
2940
2910
2945
2915 2920 2925 2930 2935 2955
2950
2960
2950
2920 2925 2930 2935 2955
2920 2925 2930 2935 2955
2920 2925 2930 2935 2955
2965
2980
2920 2925 2930 2935 2955
2955
2985
2970 2920 2925 2930 2935 2955 2975
2970 2955 2975
2970 2920 2925 2930 2935 2955 2975

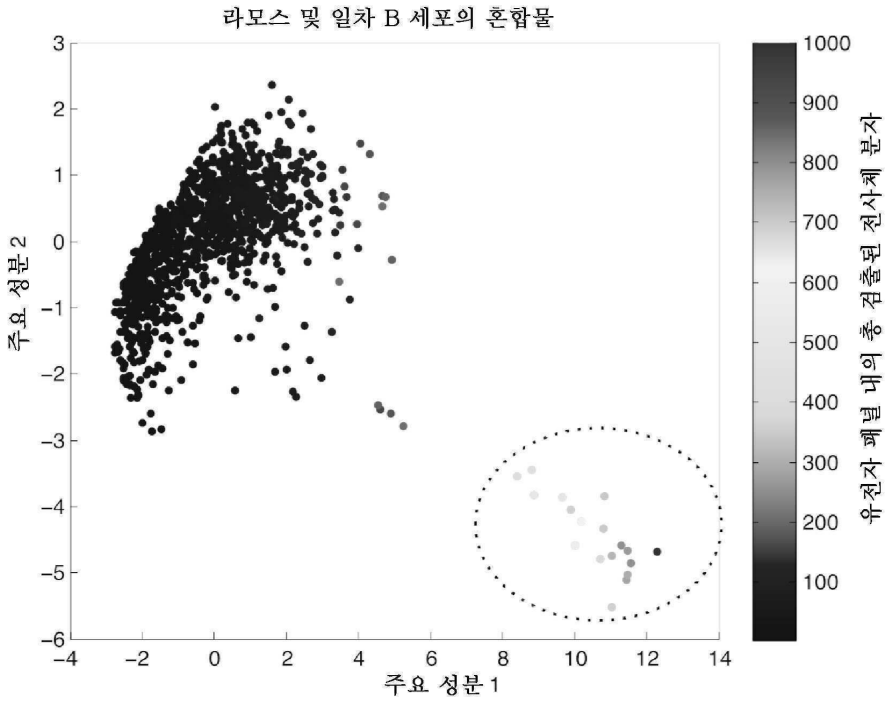
도면30


세포 현탁액 로딩
마이크로웰 내의 세포
비드 로딩
확대예:
웰 내에 비드를 갖는 단일 세포
비드
세포
세포
비드
마이크로웰 내의 세포+ 비드
하나의 비드 상의 모든 올리고에 대해 동일함
상이한 비드에 대해 상이함 (~10억개의 상이한 변종)
비드
20μm
세포
30μm
마이크로웰
비드
5' 아민
범용
세포 표지
분자 표지
올리고dT (17) V
하나의 비드 상의 상이한 올리고에 대해 상이함
세포 용해,
단일 세포로부터 mRNA는
동일한 웰 내의 비드 상에
혼성화한다
AAAAAAAAA
세포로부터 mRNA 분자
마이크로웰 어레이로부터
모든 비드를 수집함
세포 1로부터 mRNA와 결합됨
세포 2로부터 mRNA와 결합됨
세포 3으로부터 mRNA와 결합됨
세포 N으로부터 mRNA와 결합됨
+
블랭크 비드
튜브 내에 보유된,
비드 상의 cDNA 합성
RT 믹스
비드
5' 아민
범용
세포 표지
분자 표지
올리고dT (17) V
세포로부터 mRNA의 카피
튜브 내의 비드를
사용한 다중 PCR
PCR믹스
범용 프라이머
유전자 특이적 프라이머
서열분석으로 세포 표지, 분자 인덱스, 유전자를 밝힘

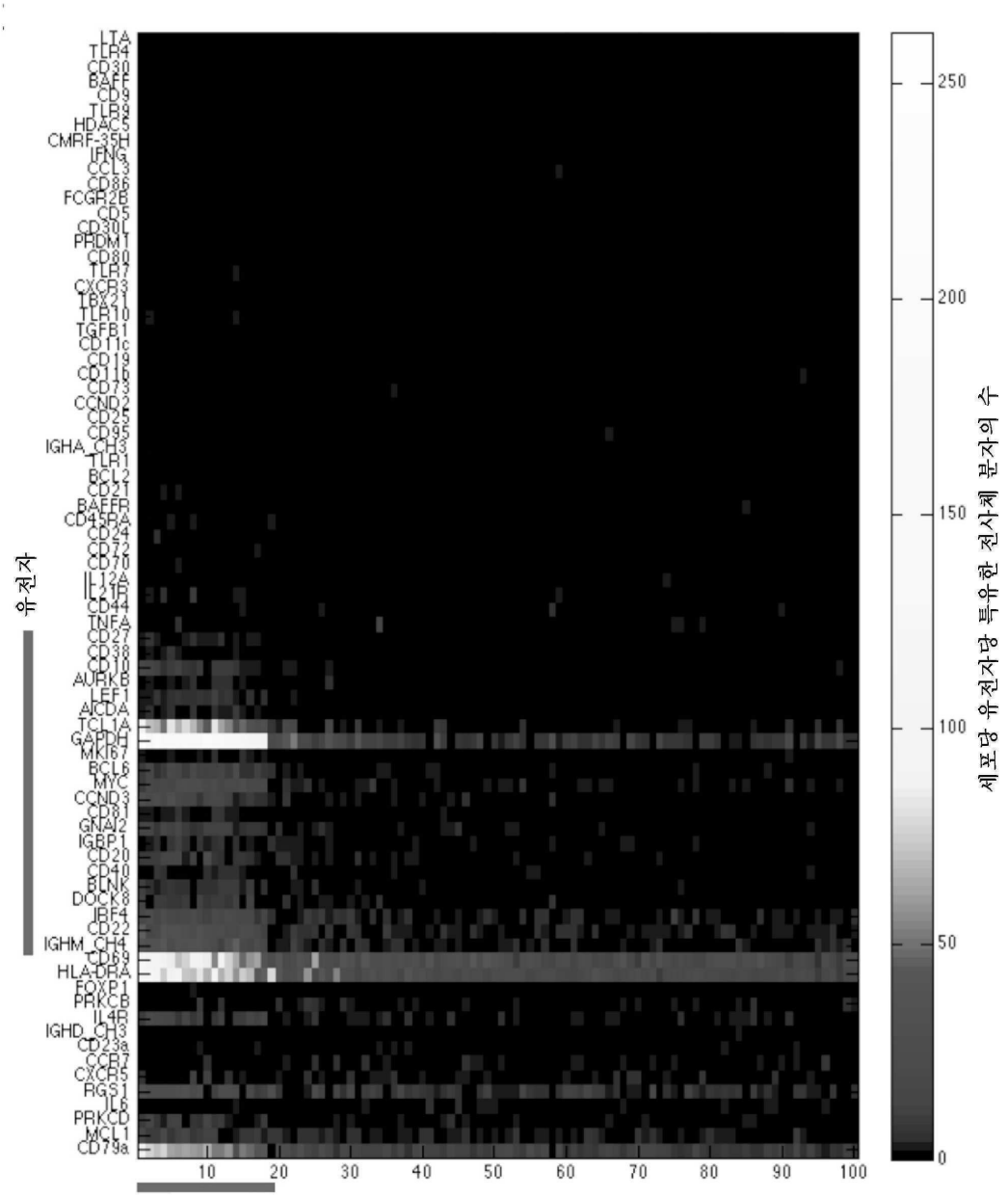
도면31a


K562
(409개의 세포)
라모스
(357개의 세포)
HBG1
GYPA
CD41
GATA1
GATA2
GAPDH
SEPT9
성분 2
성분 1

도면31b


라모스 및 일차 B 세포의 혼합물
주요 성분 2
주요 성분 1
유전자 패널 내의 총 검출된 전사체 분자

도면31c

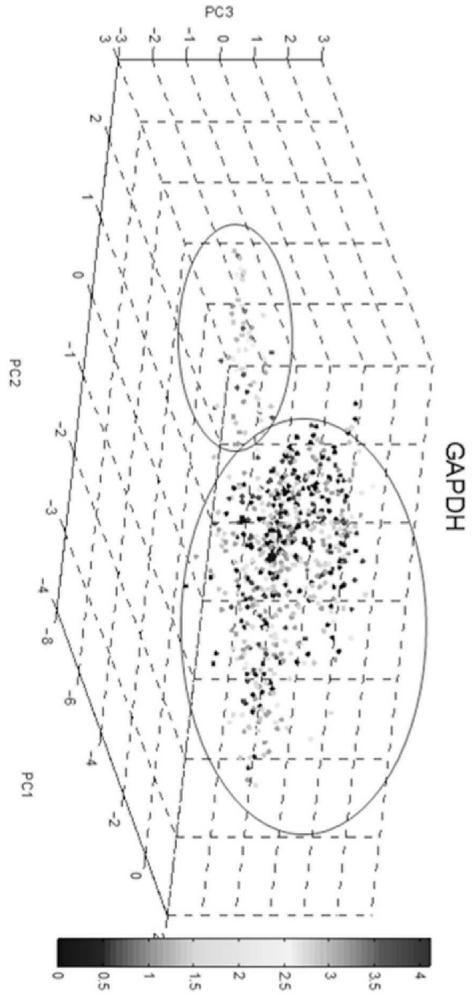


검출된 전사체 분자의 총 수에 의해 분류된, 제1 내지 제100 세포

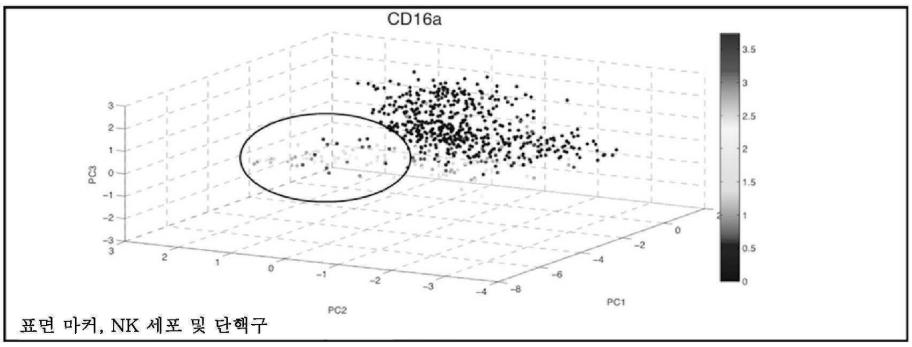
도면31d


GAPDH
TCL1A
MKI67
BCL6
MYC
CCND3
CD81
GNAI2
IGBP1
CD20
BLNK
DOCK8
IRF4
CD22
IGHM
AURKB
CD38
CD10
LEF1
AICDA
CD40
CD27
IL4R
PRKCD
RGS1
MCL1
CD79a
HLA-DRA
IL6
CD23a
CCR7
CXCR5

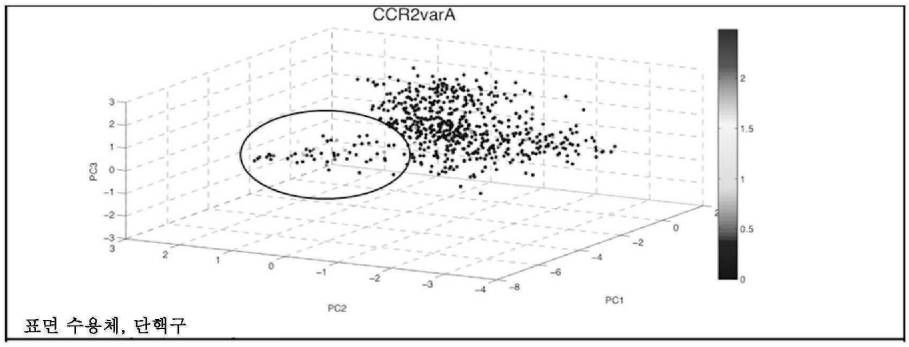
도면32



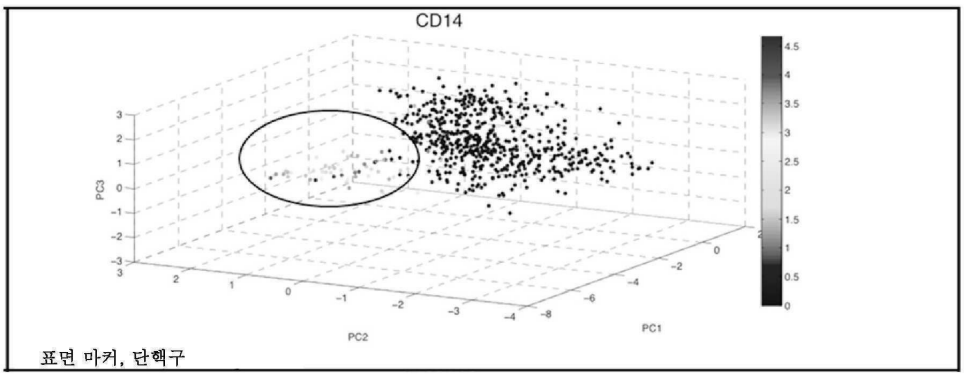
도면33a



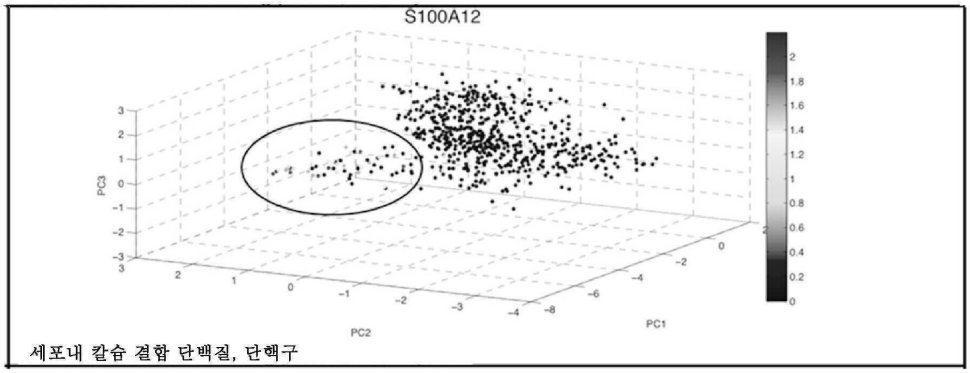
도면33b



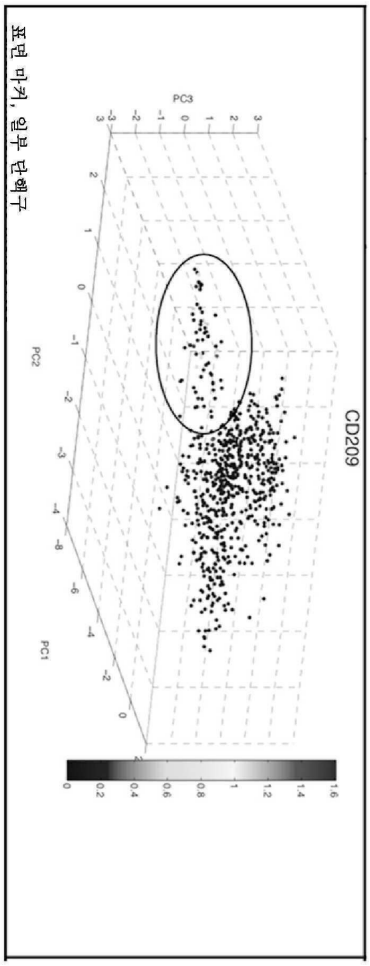
도면33c



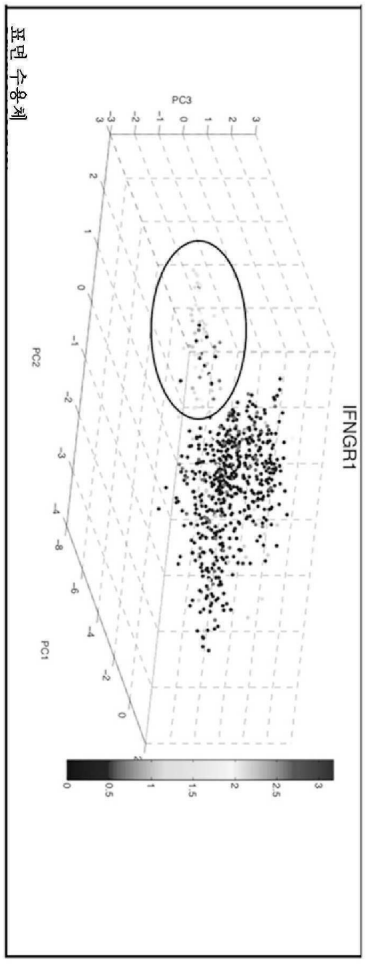
도면33d



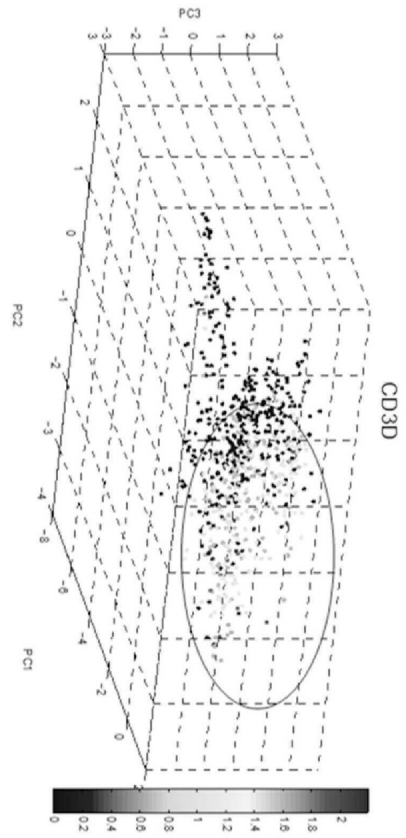
도면33e



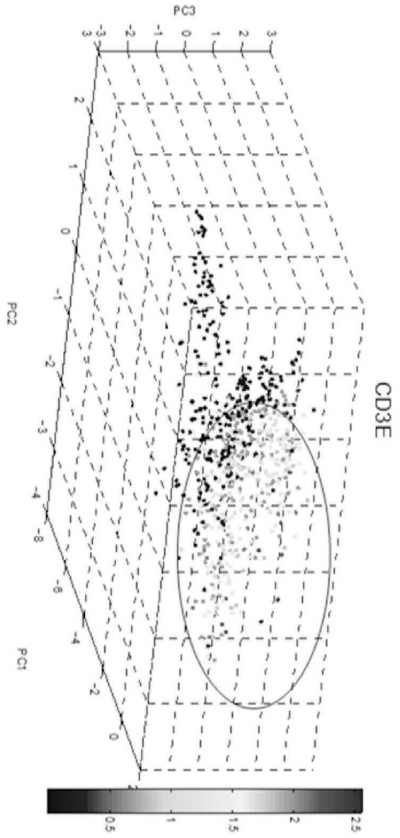
도면33f



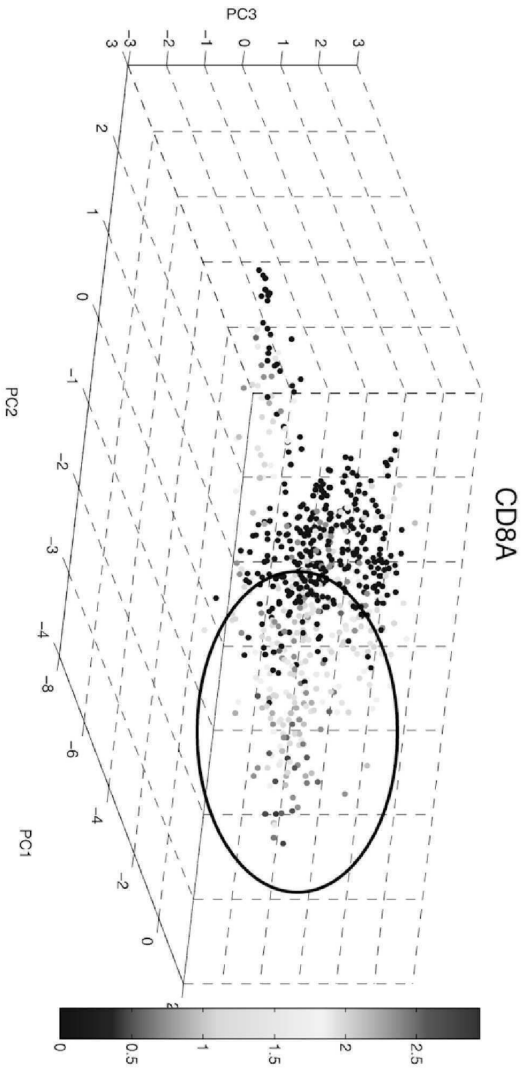
도면34a



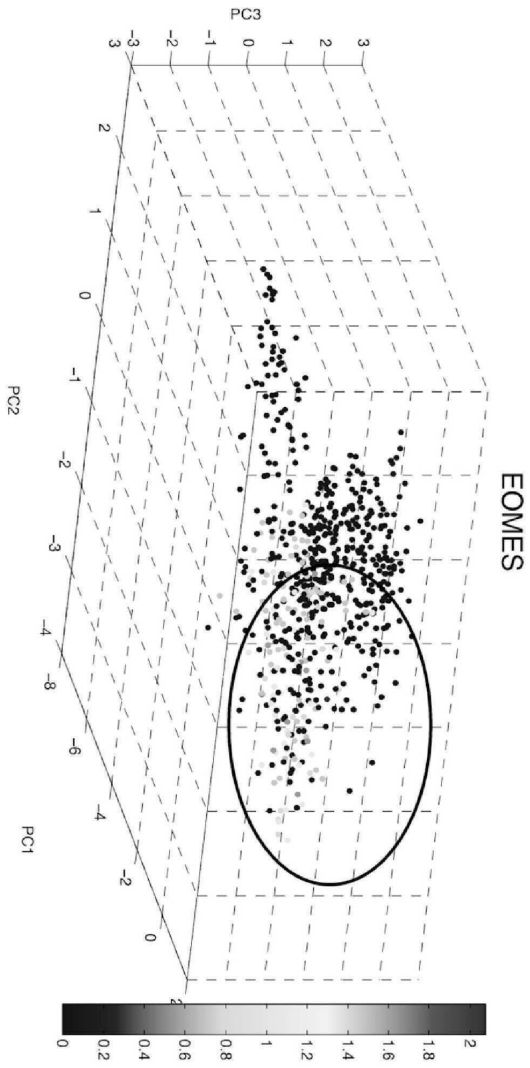
도면34b



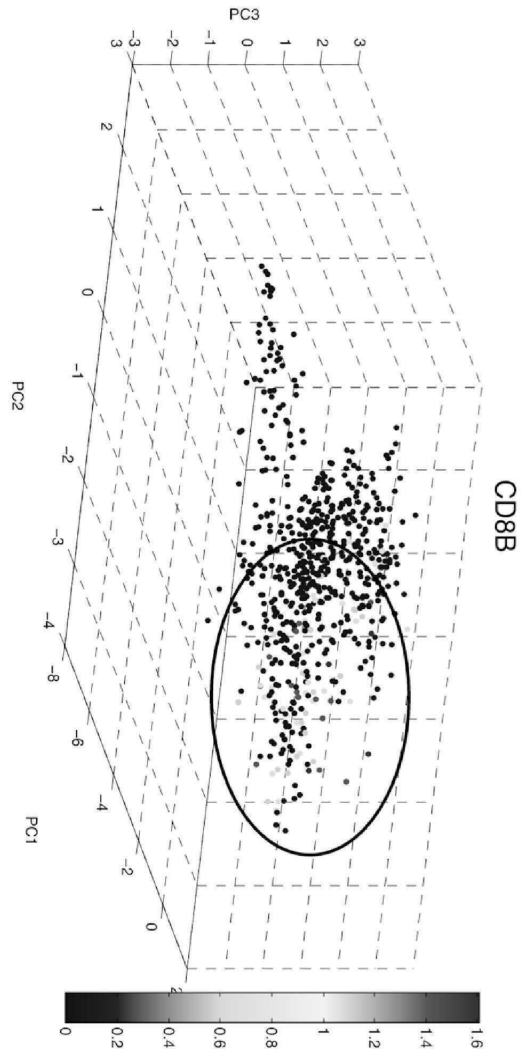
도면35a



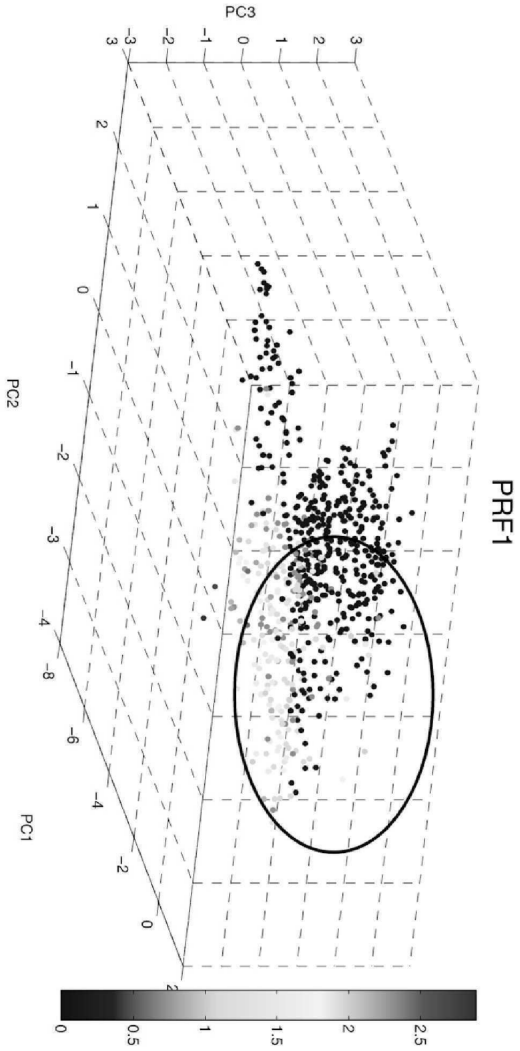
도면35b



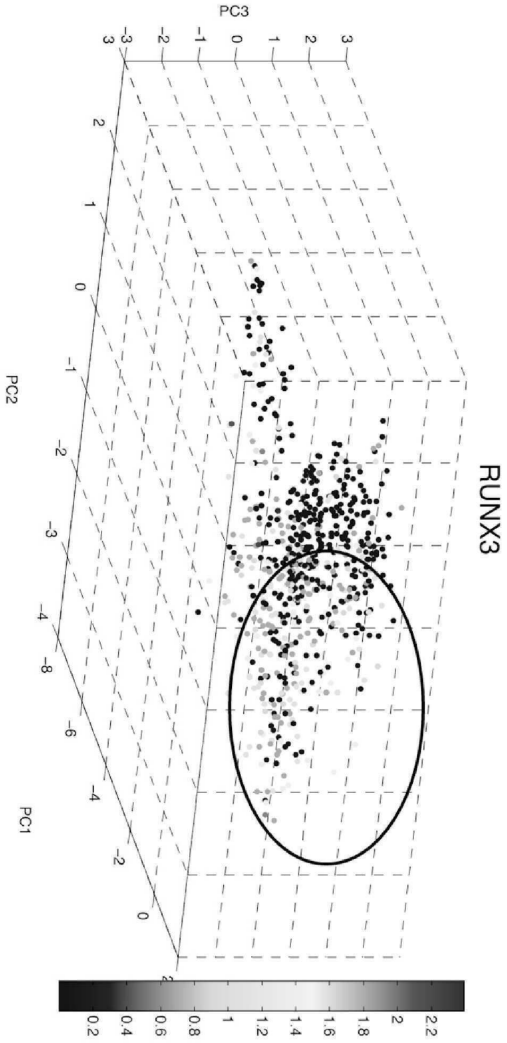
도면35c



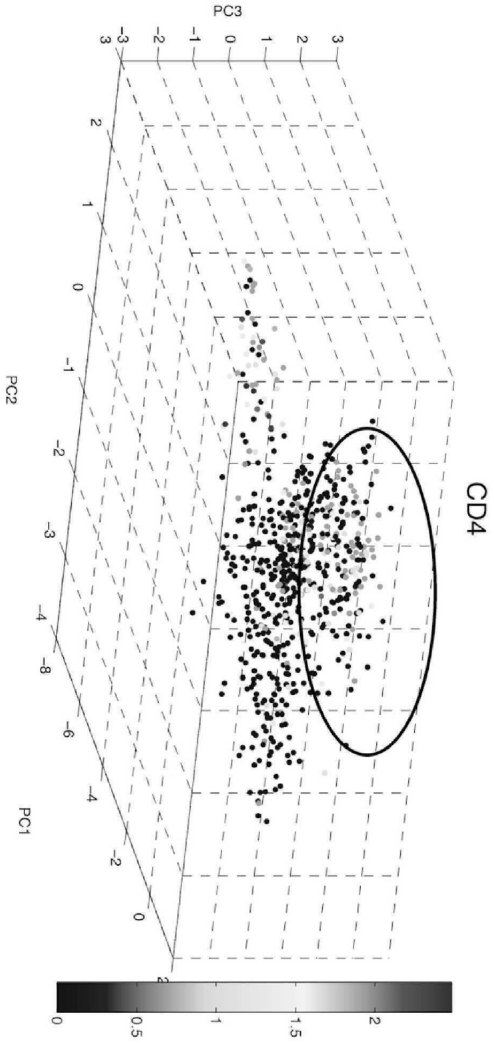
도면35d



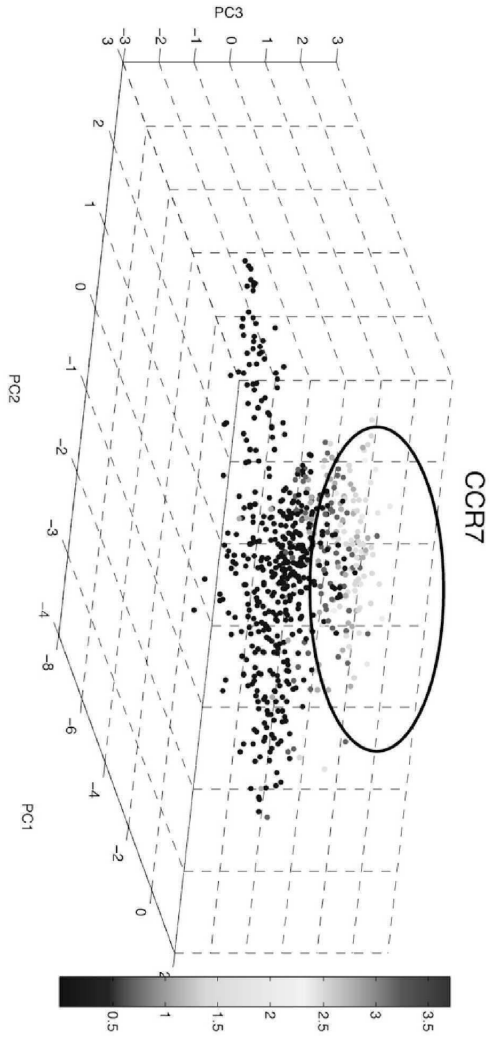
도면35e



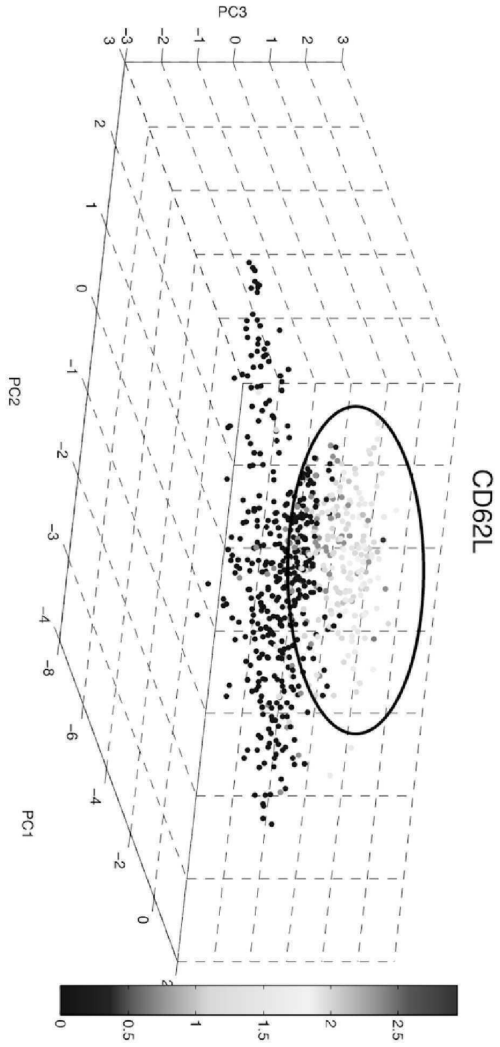
도면36a



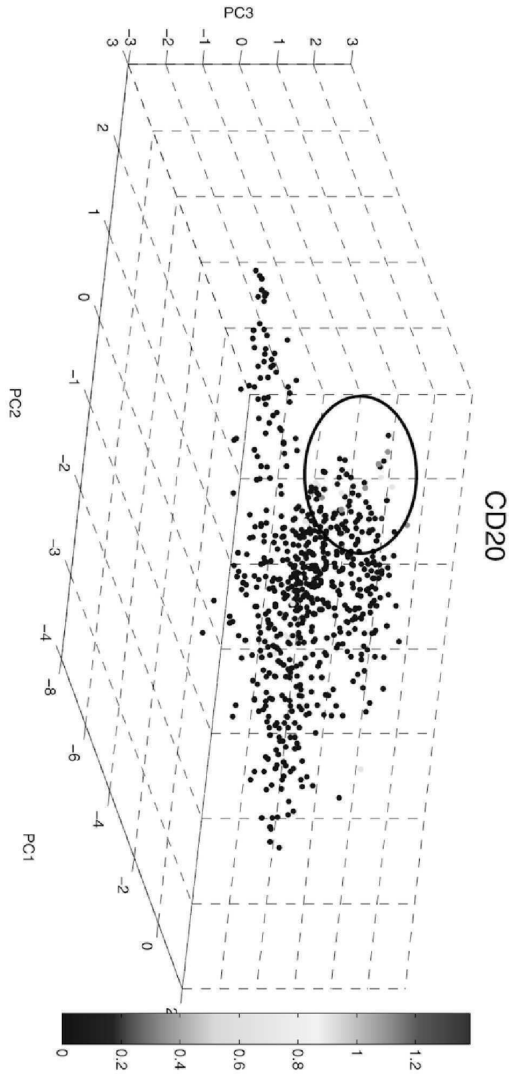
도면36b



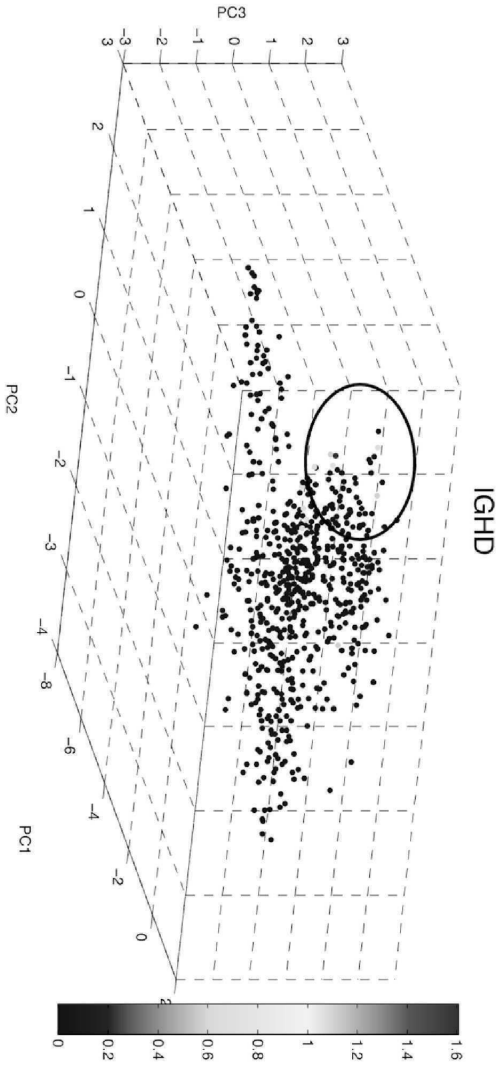
도면36c



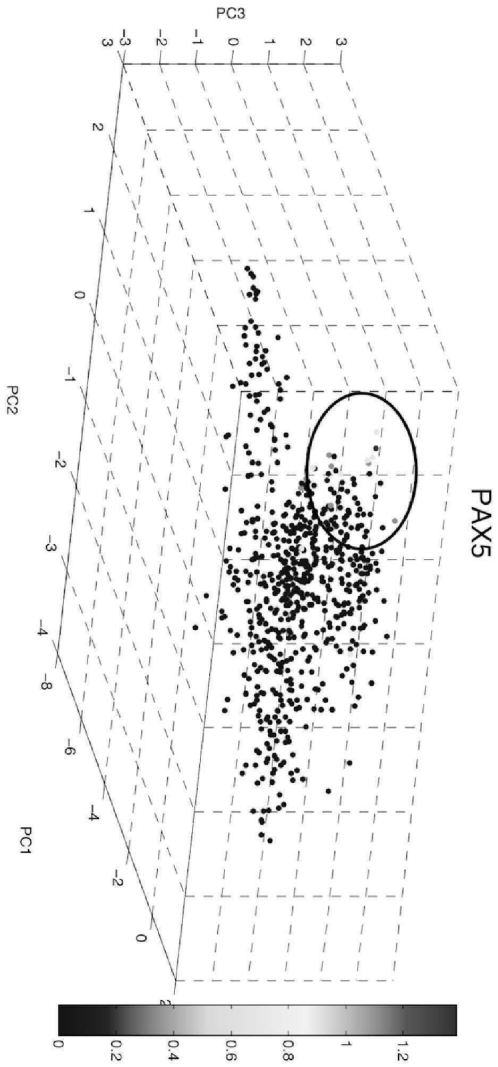
도면37a



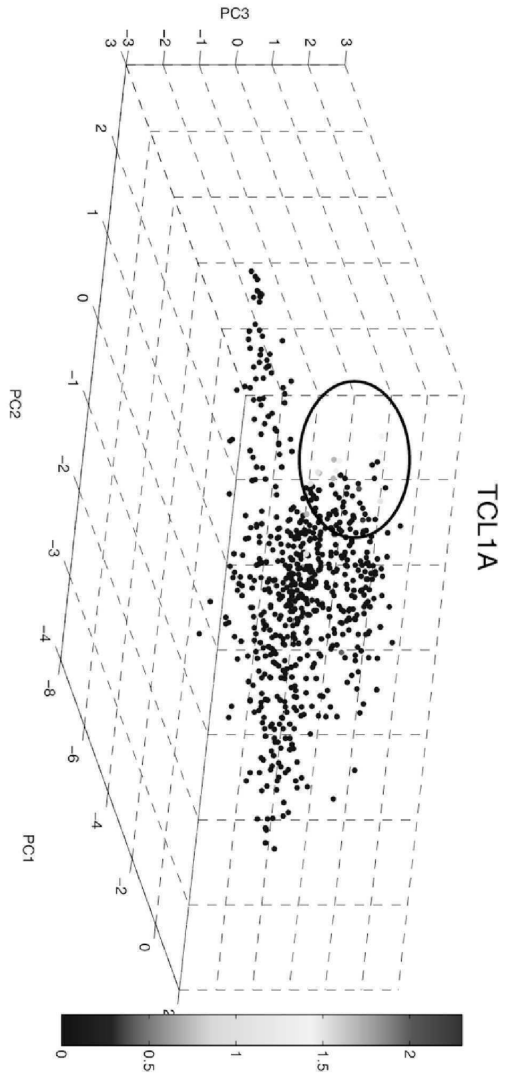
도면37b



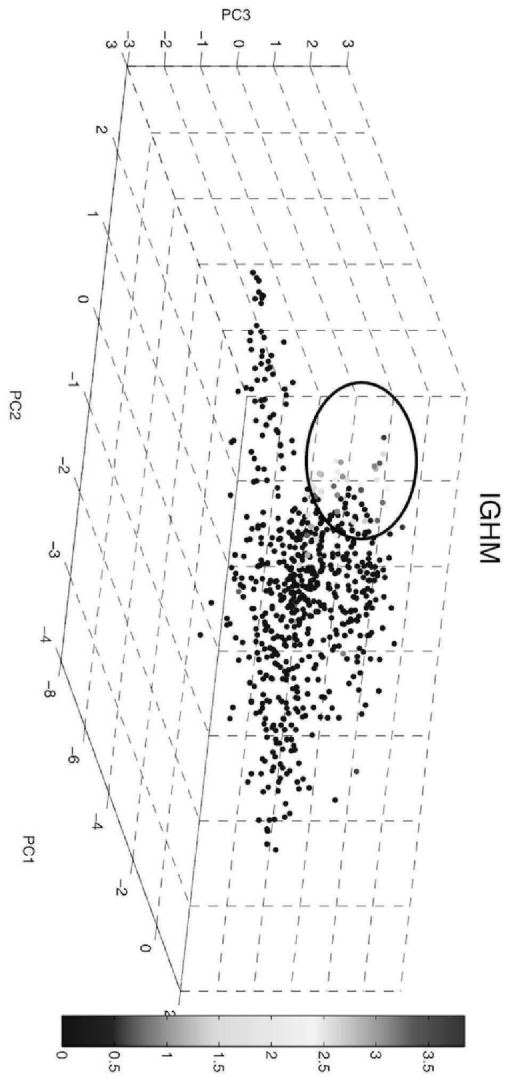
도면37c



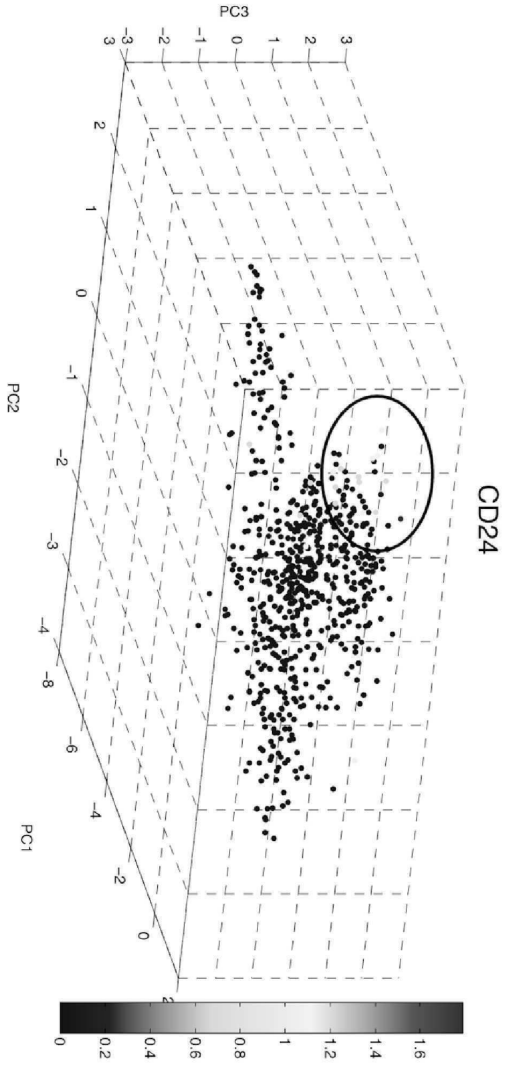
도면37d



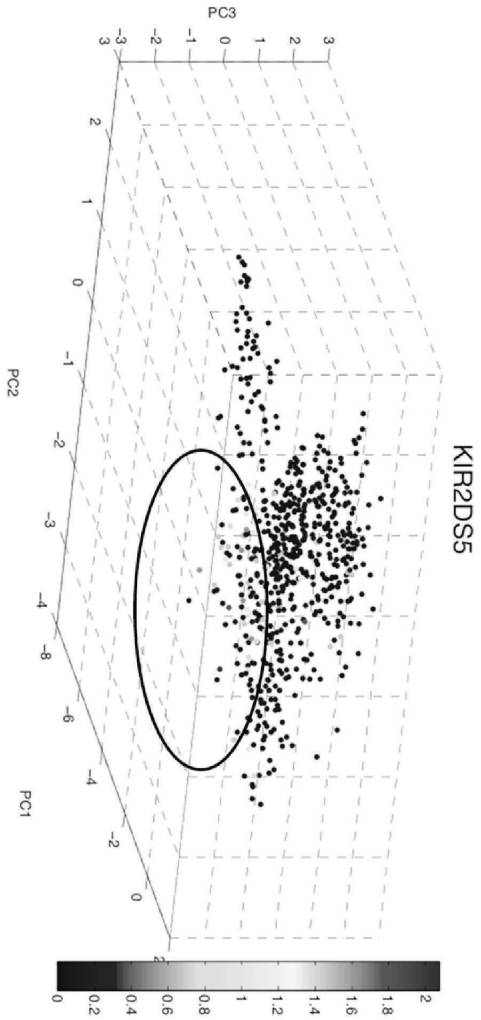
도면37e



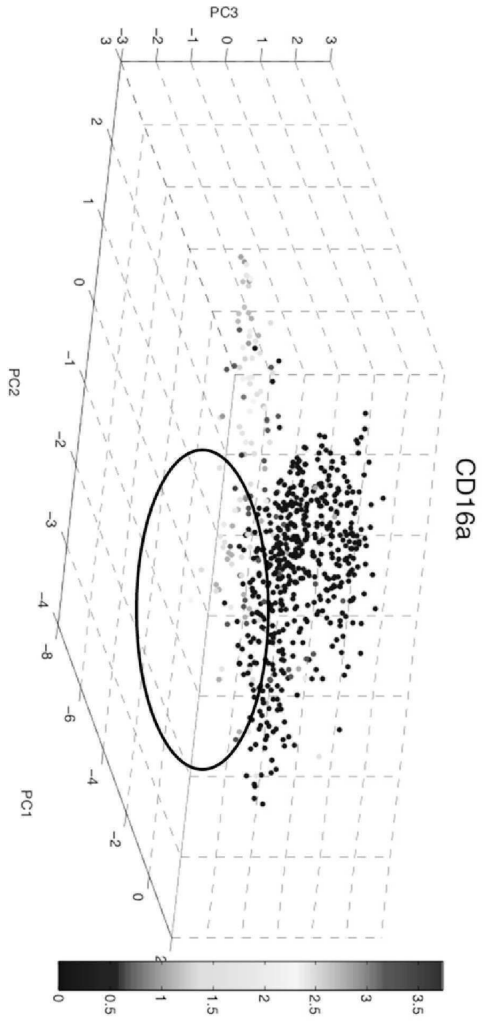
도면37f



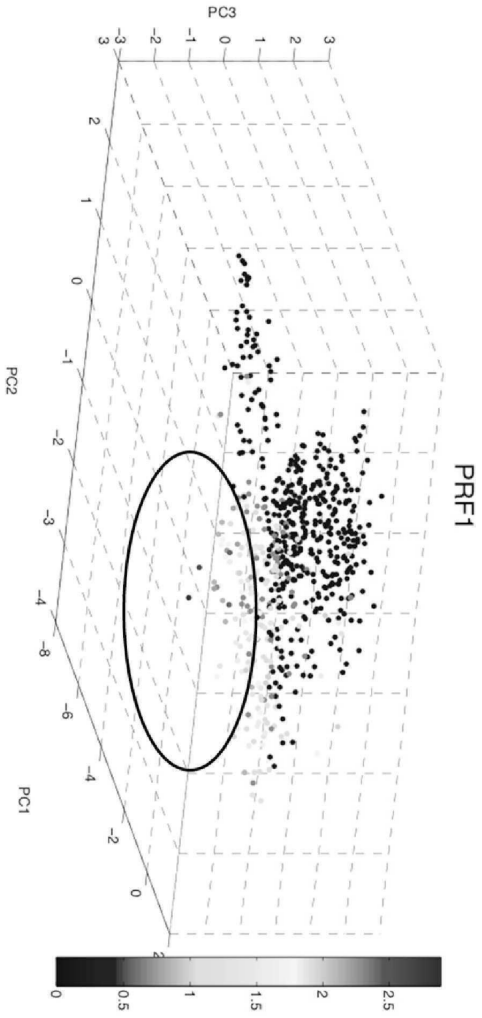
도면38a



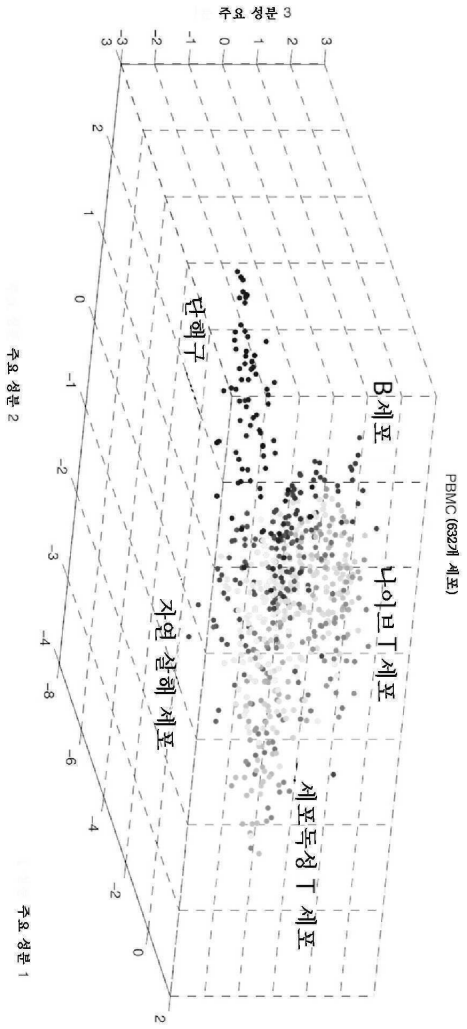
도면38b



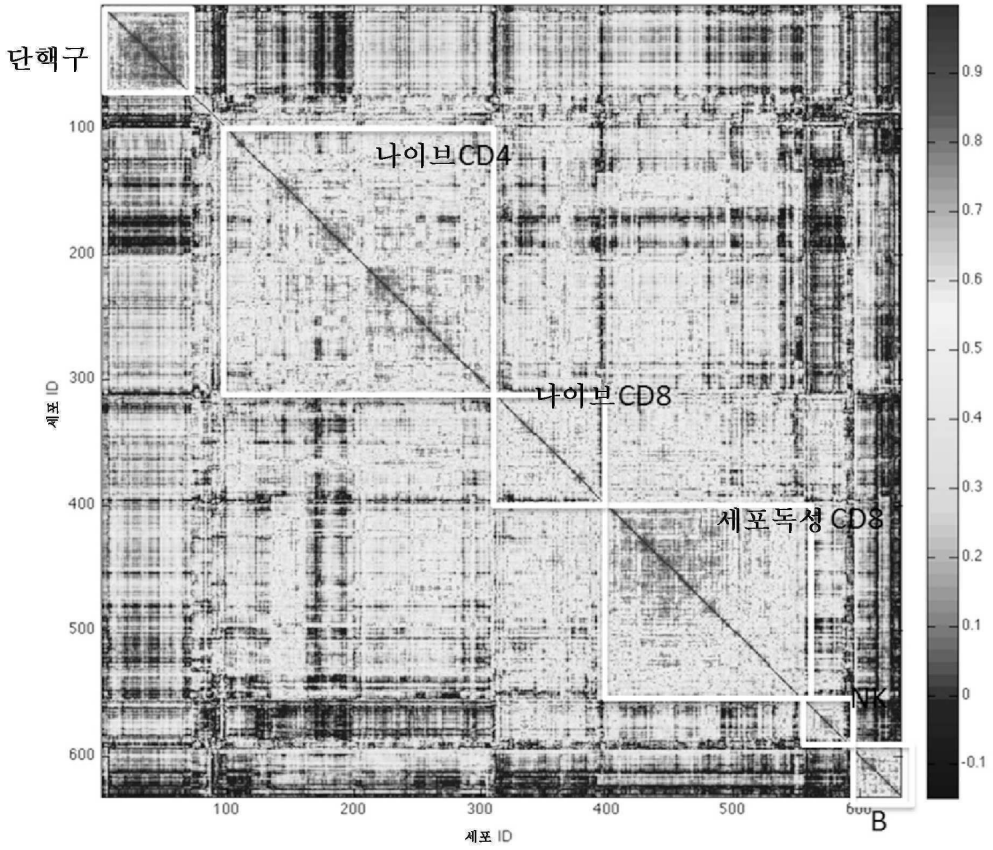
도면38c



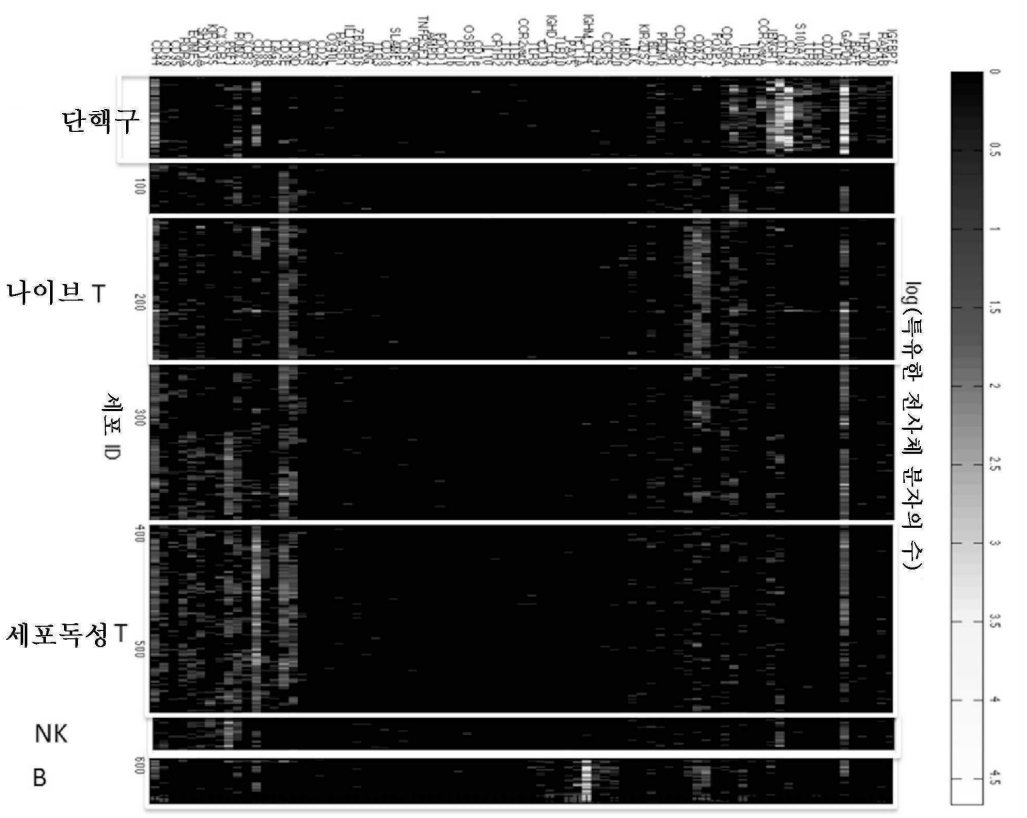
도면39


주요 성분 3
주요 성분 2
주요 성분 1
PBMC (6327개 세포)
단핵구
B 세포
나이브 T 세포
세포독성 T 세포
자연 살해 세포

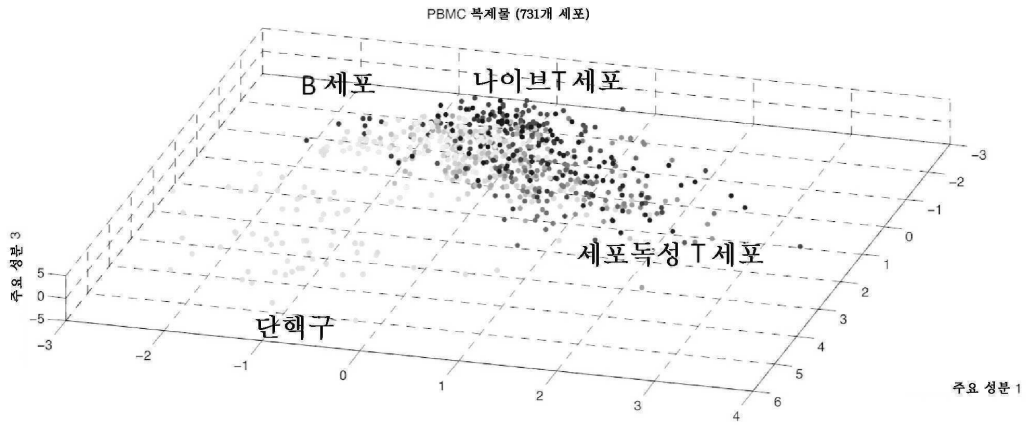
도면40a


단핵구
나이브CD4
나이브CD8
세포독성 CD8
NK
B
세포 ID
세포 ID
100
200
300
400
500
600
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1

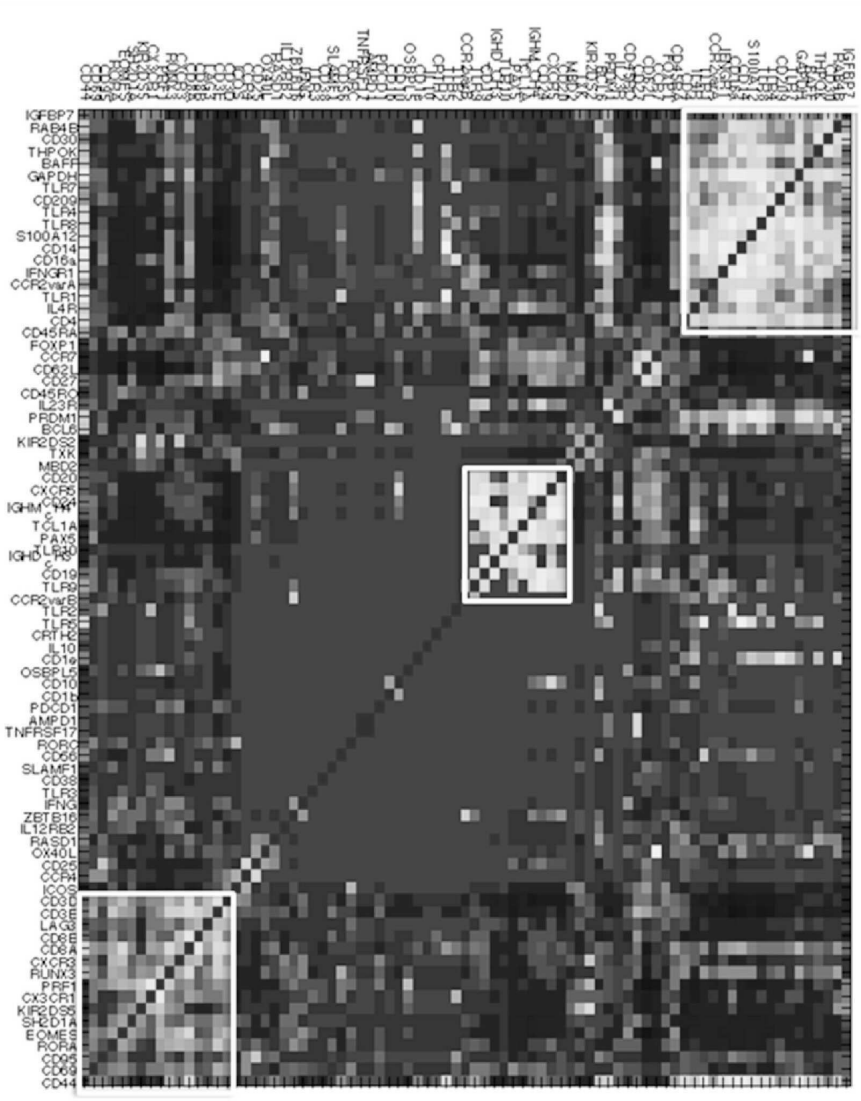
도면40b


단핵구
나이브 T
세포독성 T
NK
B
세포 ID
log(특유한 전사체 분자의 수)

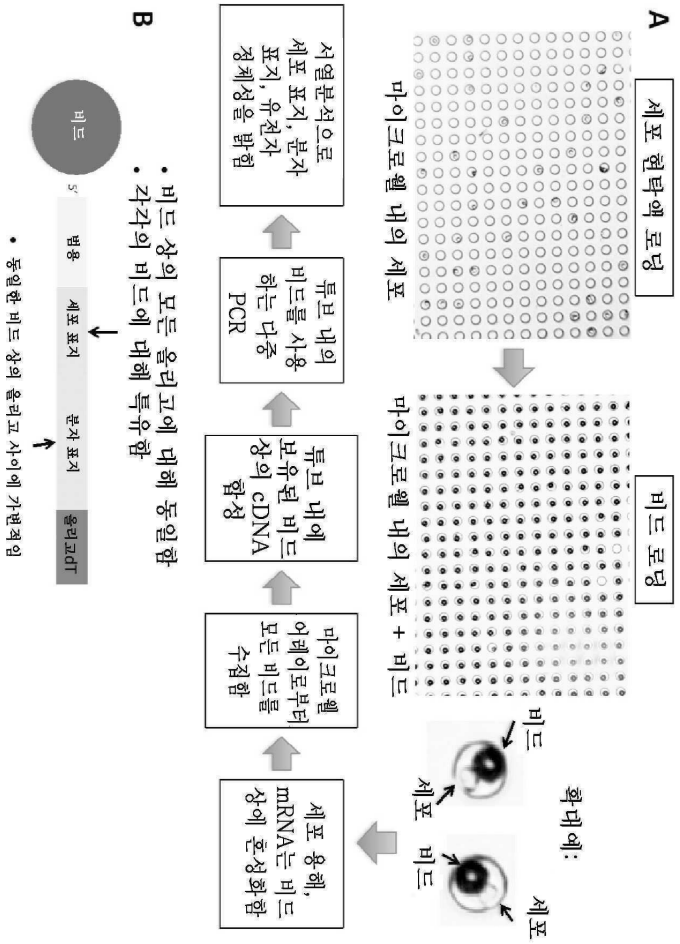
도면41


PBMC 특제물 (731개 세포)
B 세포
나이브 T 세포
세포독성 T 세포
단핵구
주요 성분 3
주요 성분 1

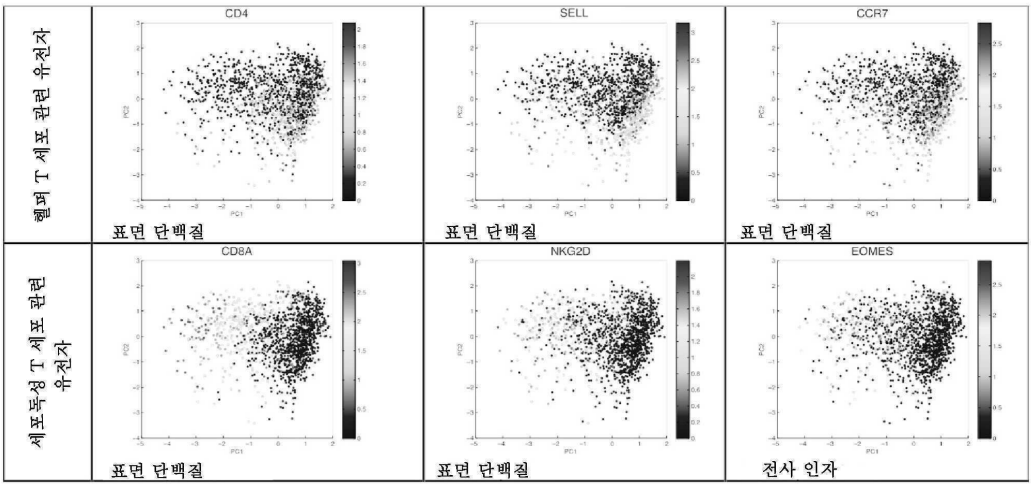
도면42



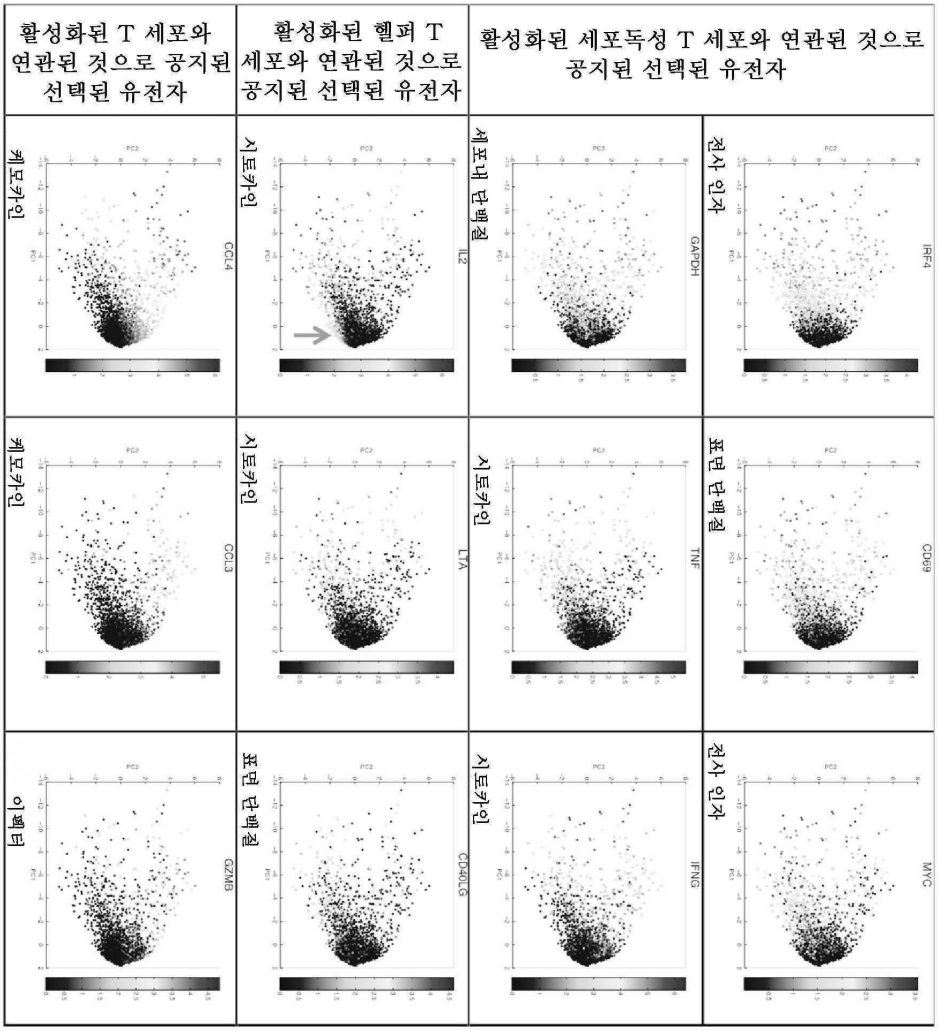
도면43


A
세포 현탁액 로딩
마이크로웰 내의 세포
비드 로딩
마이크로웰 내의 세포 + 비드
확대에:
비드
세포
비드
세포
세포 용해, mRNA는 비드 상에 혼성화함
마이크로웰 어레이로부터 모든 비드를 수집함
튜브 내에 보유된 비드 상의 cDNA 합성
튜브 내의 비드를 사용하는 다중 PCR
서열분석으로 세포 표지, 유전자 정체성을 밝힘
B
• 비드 상의 모든 올리고에 대해 동일함
• 각각의 비드에 대해 특유함
비드
범용
세포 표지
분자 표지
올리고dT
• 동일한 비드 상의 올리고 사이에 가변적임

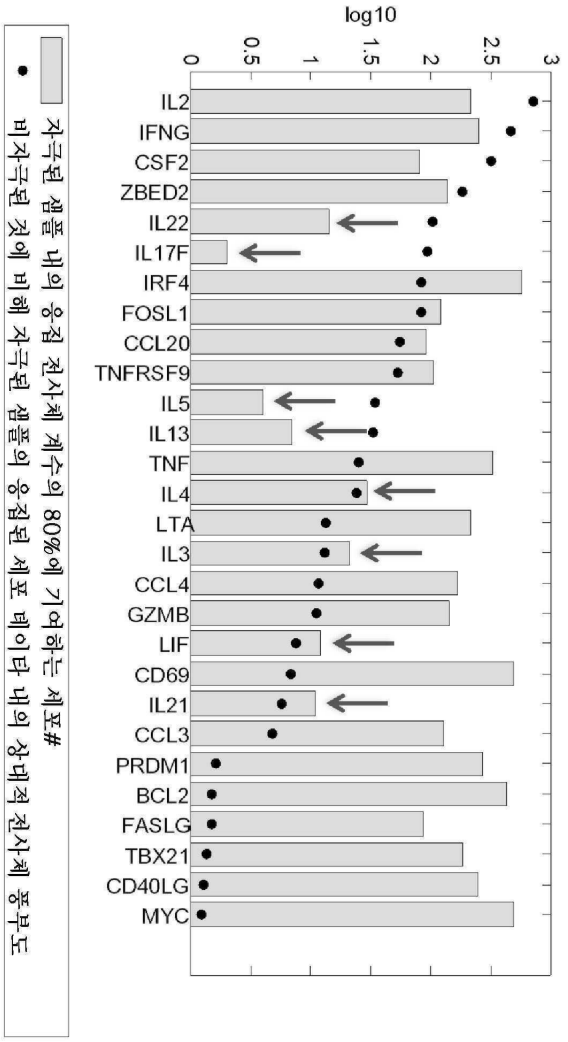
도면44a


헬퍼 T 세포 관련 유전자
세포독성 T 세포 관련 유전자
CD4
SELL
CCR7
CD8A
NKG2D
EOMES
표면 단백질
표면 단백질
표면 단백질
표면 단백질
표면 단백질
전사 인자

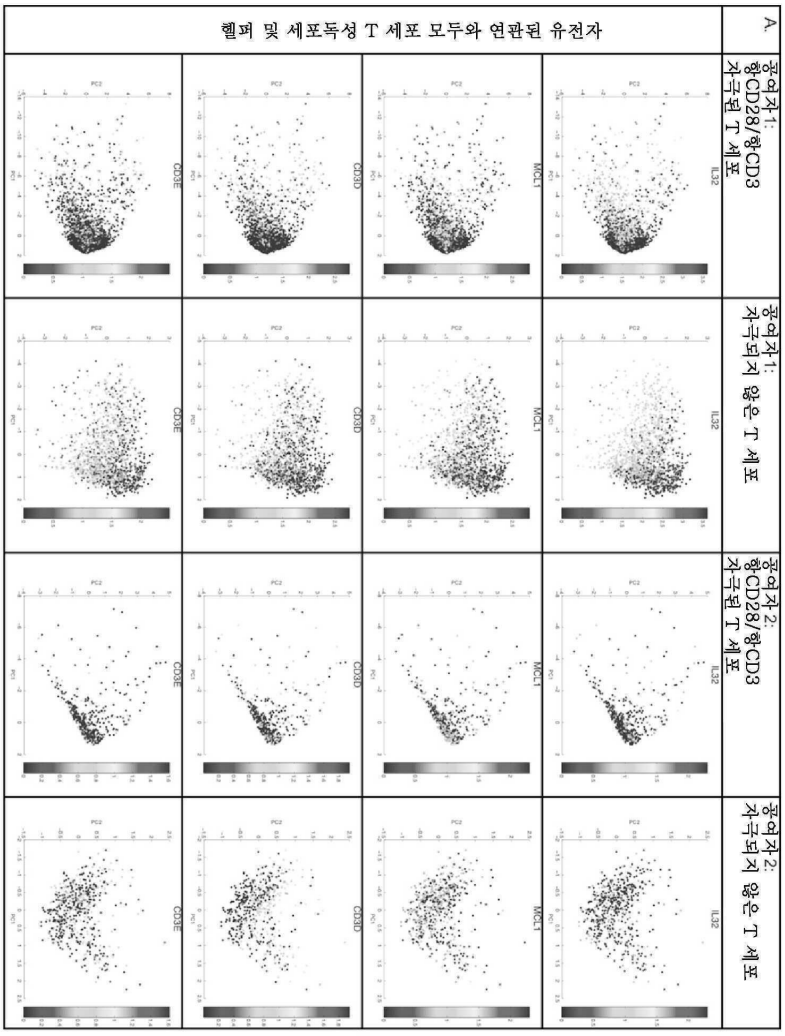
도면44b


활성화된 세포독성 T 세포와 연관된 것으로 공지된 선택된 유전자
활성화된 헬퍼 T 세포와 연관된 것으로 공지된 선택된 유전자
활성화된 T 세포와 연관된 것으로 공지된 선택된 유전자
전사 인자
IRF4
세포내 단백질
GAPDH
시토카인
IL2
케모카인
CCL4
표면 단백질
CD69
시토카인
TNF
시토카인
LTA
케모카인
CCL3
전사 인자
MYC
시토카인
IFNG
표면 단백질
CD40LG
이펙터
GZMB

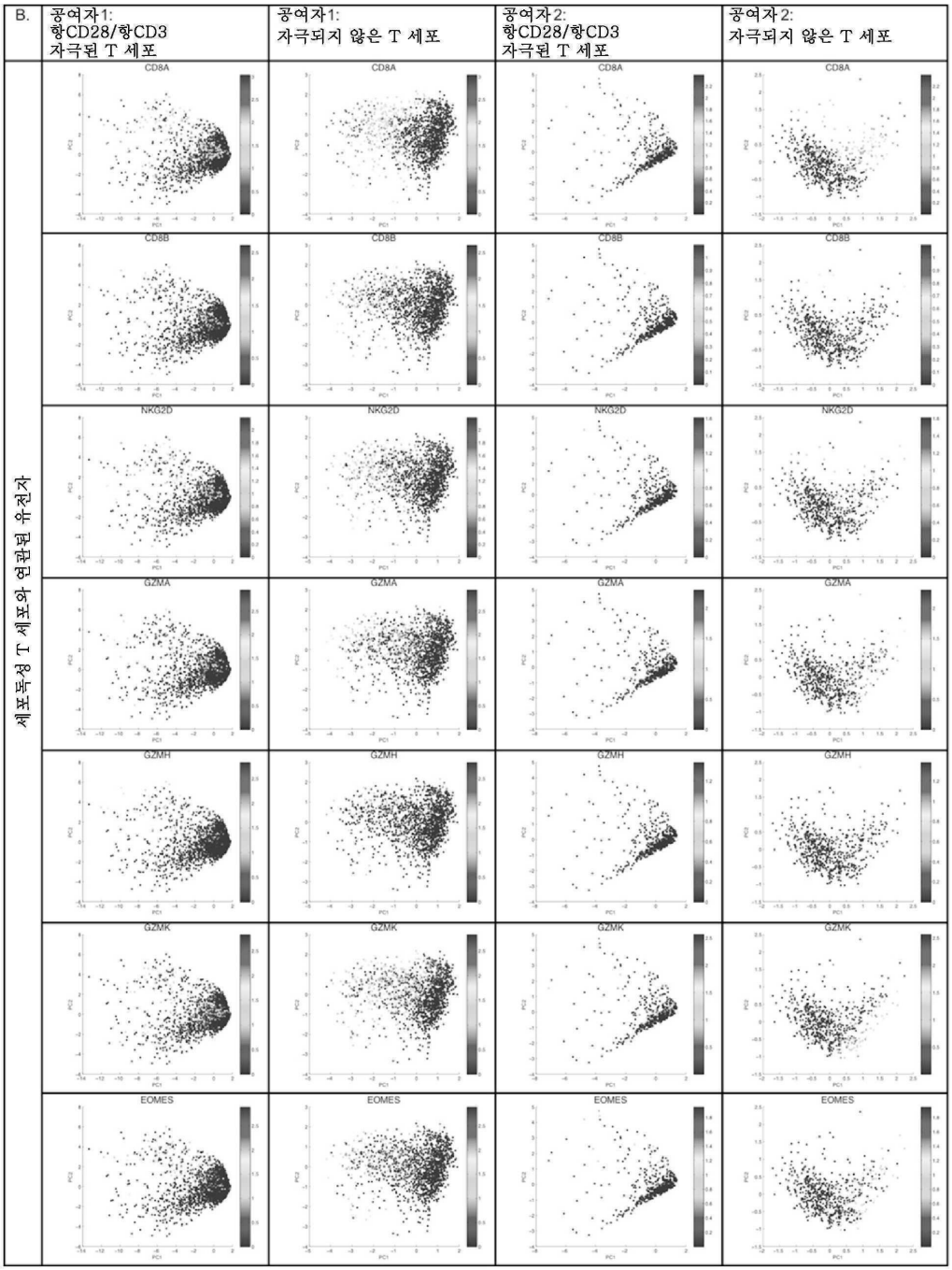
도면44c


log10
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
IL2
IFNG
CSF2
ZBED2
IL22
IL17F
IRF4
FOSL1
CCL20
TNFRSF9
IL5
IL13
TNF
IL4
LTA
IL3
CCL4
GZMB
LIF
CD69
IL21
CCL3
PRDM1
BCL2
FASLG
TBX21
CD40LG
MYC
자극된 샘플 내의 응집 전사체 계수의 80%에 기여하는 세포#
비자극된 것에 비해 자극된 샘플의 응집된 세포 데이타 내의 상대적 전사체 풍부도

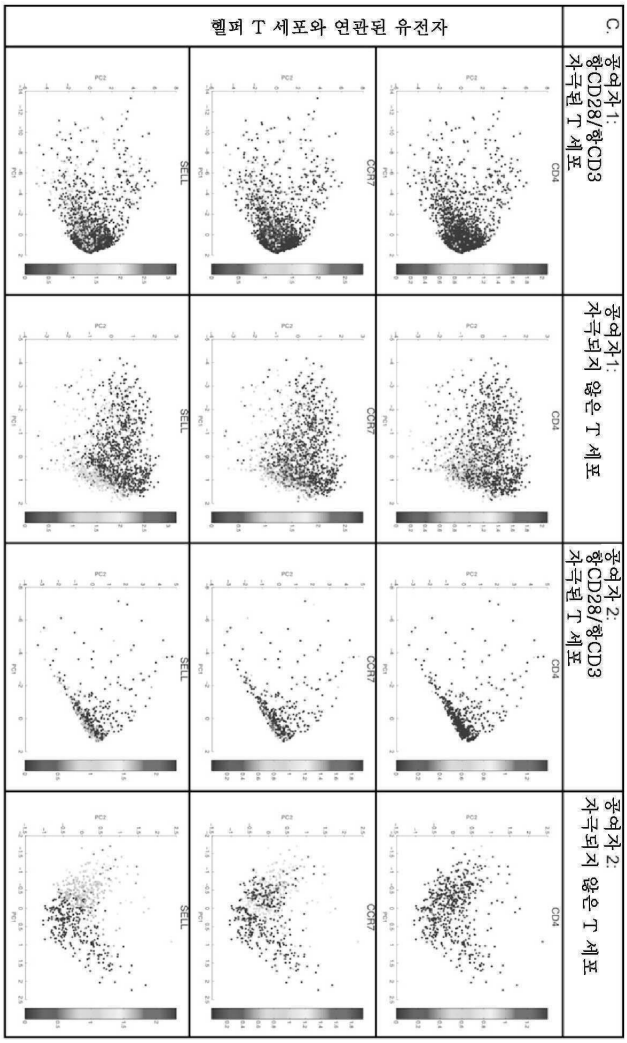
도면45a


A.
헬퍼 및 세포독성 T 세포 모두와 연관된 유전자
공여자1: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자1: 자극되지 않은 T 세포
공여자2: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자2: 자극되지 않은 T 세포
IL32
MCL1
CD3D
CD3E

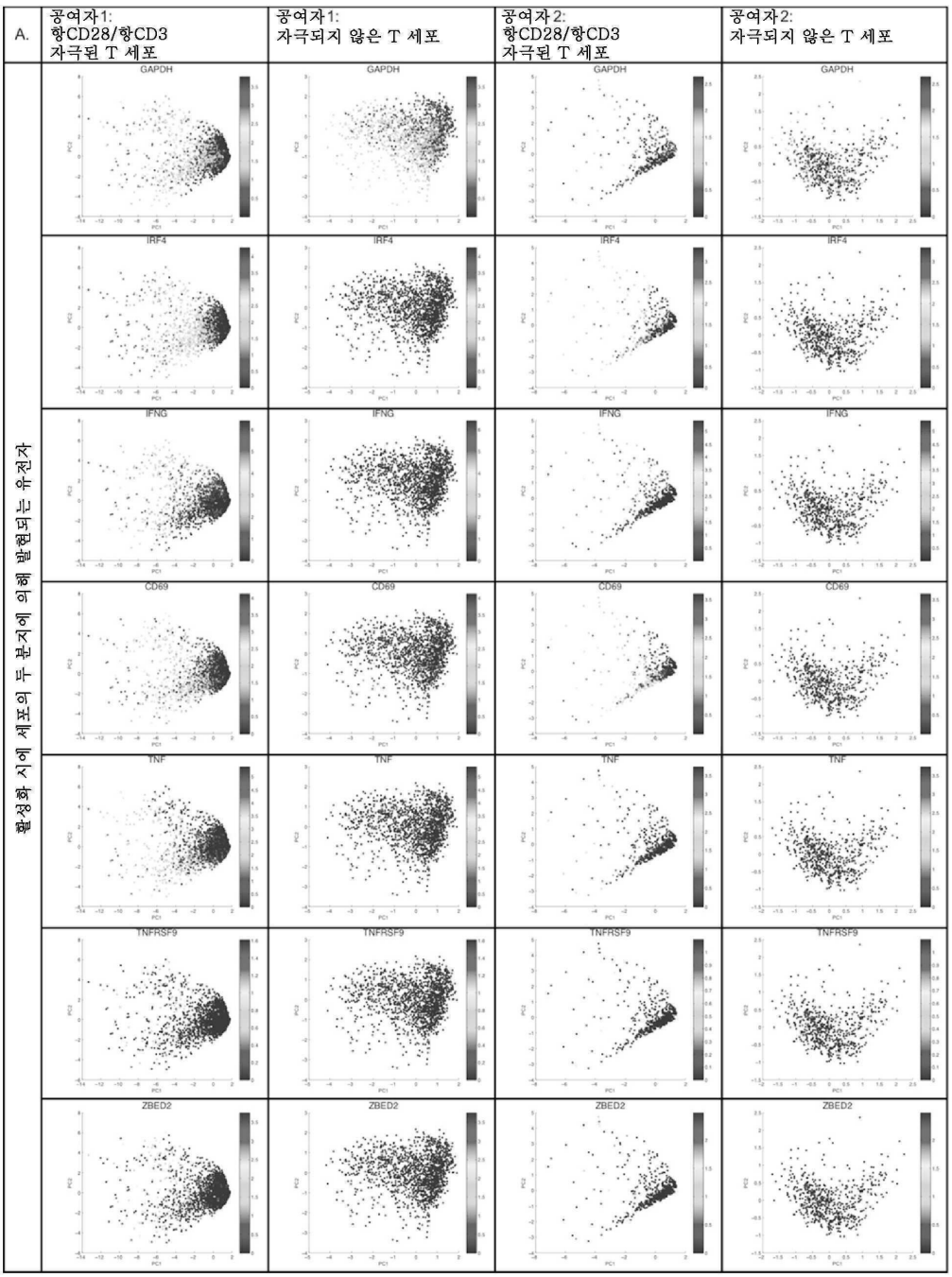
도면45b


B.
공여자1:
항CD28/항CD3
자극된 T 세포
공여자1:
자극되지 않은 T 세포
공여자2:
항CD28/항CD3
자극된 T 세포
공여자2:
자극되지 않은 T 세포
세포독성 T 세포와 연관된 유전자
CD8A
CD8B
NKG2D
GZMA
GZMH
GZMK
EOMES

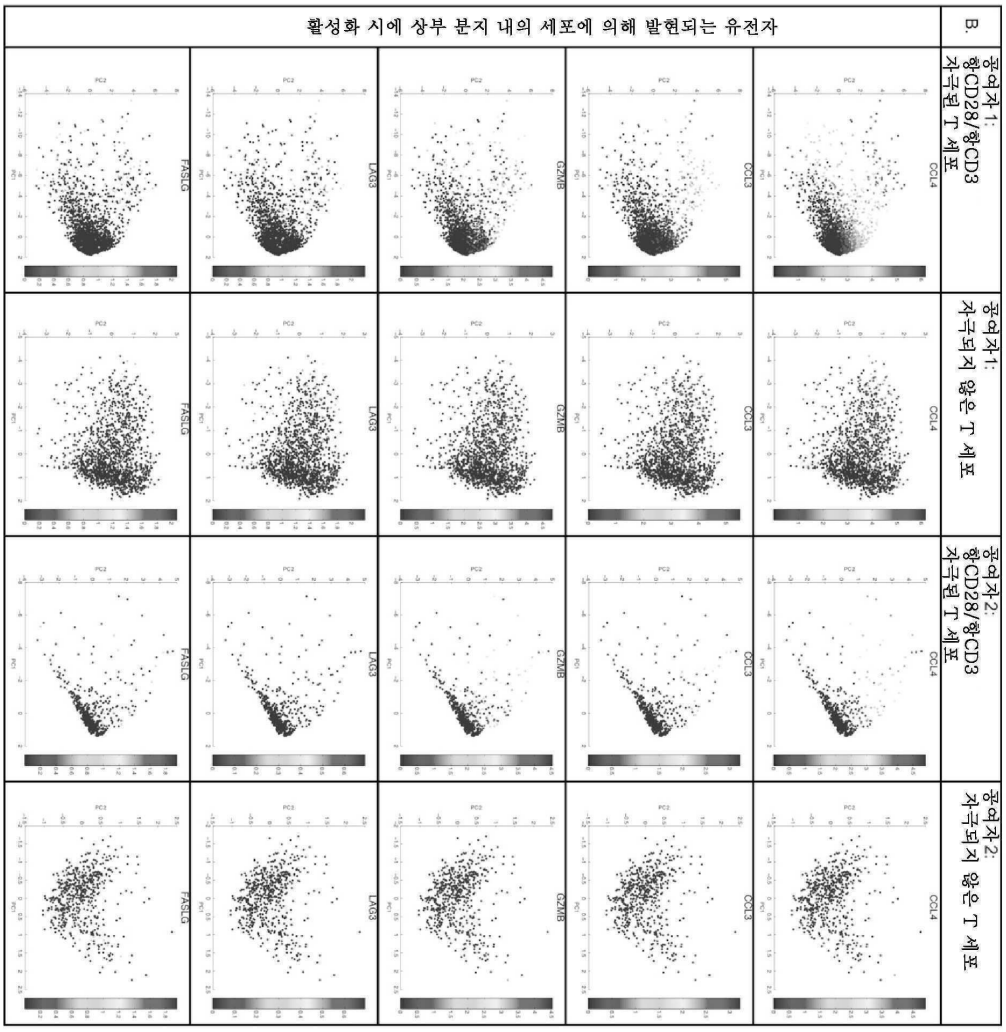
도면45c


C.
헬퍼 T 세포와 연관된 유전자
공여자 1: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자 1: 자극되지 않은 T 세포
공여자 2: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자 2: 자극되지 않은 T 세포
CD4
CCR7
SELL

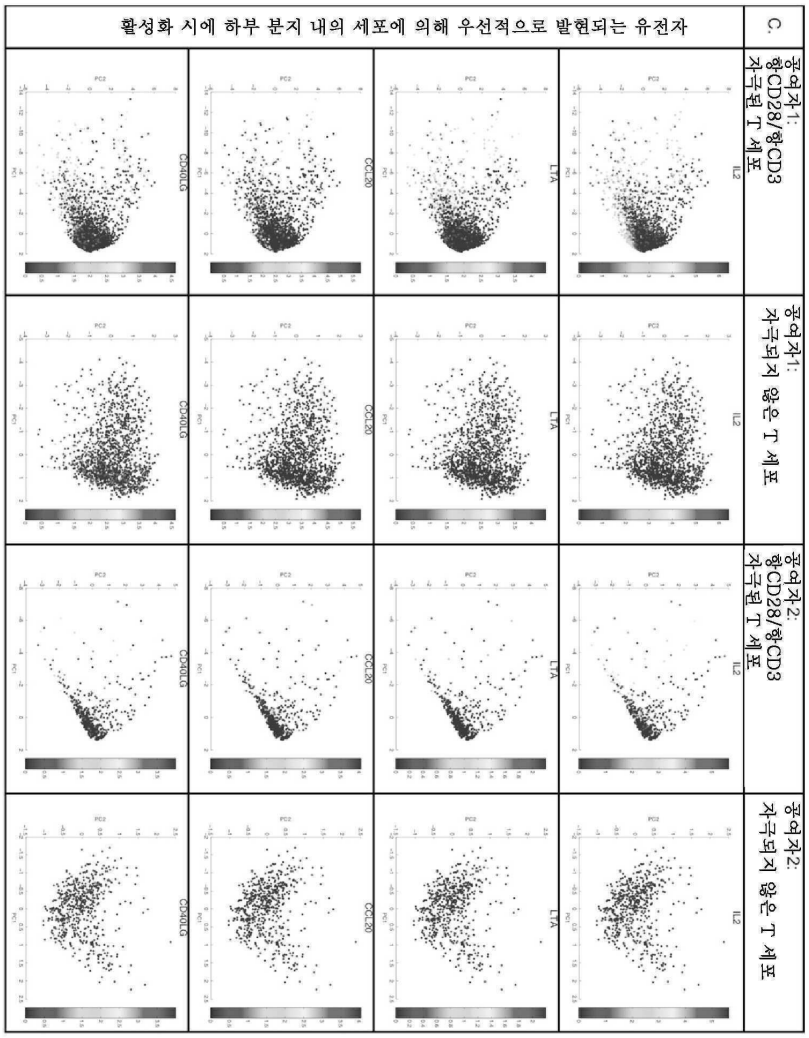
도면46a


A.
공여자1:
항CD28/항CD3
자극된 T 세포
공여자1:
자극되지 않은 T 세포
공여자2:
항CD28/항CD3
자극된 T 세포
공여자2:
자극되지 않은 T 세포
활성화 시에 세포의 두 분지에 의해 발현되는 유전자
GAPDH
IRF4
IFNG
CD69
TNF
TNFRSF9
ZBED2

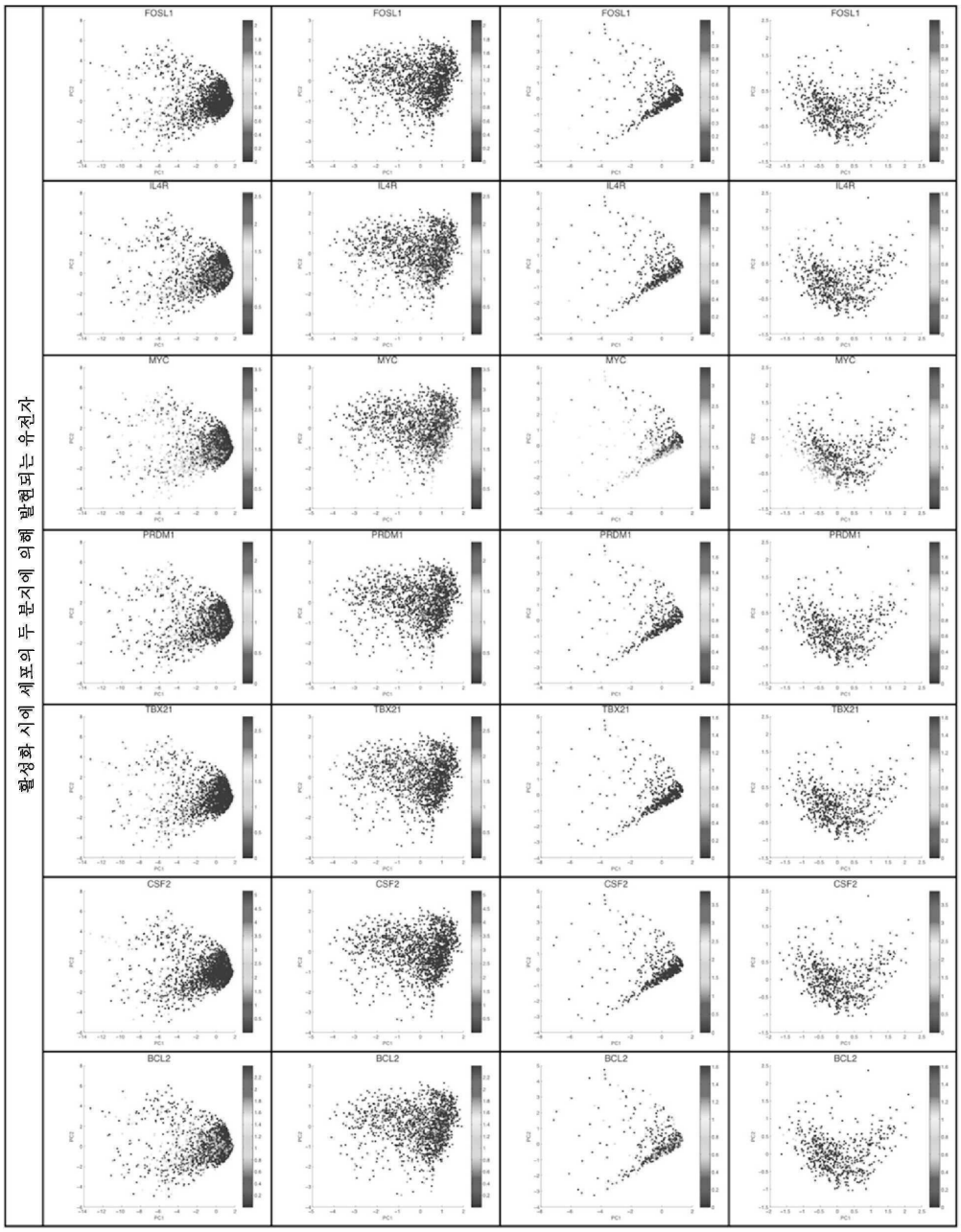
도면46b


B.
활성화 시에 상부 분지 내의 세포에 의해 발현되는 유전자
공여자 1: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자 1: 자극되지 않은 T 세포
공여자 2: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자 2: 자극되지 않은 T 세포
CCL4
CCL3
GZMB
LAG3
FASLG
PC2
PC3

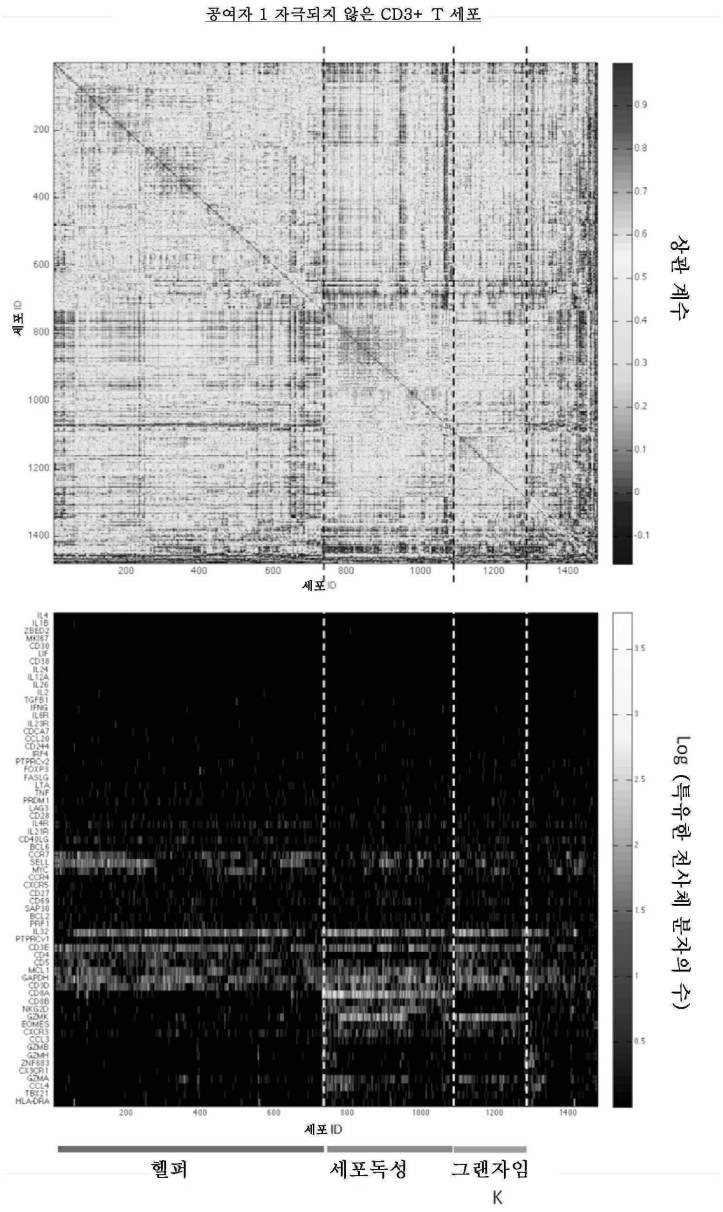
도면46c


C.
활성화 시에 하부 분지 내의 세포에 의해 우선적으로 발현되는 유전자
공여자1: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자1: 자극되지 않은 T 세포
공여자2: 항CD28/항CD3 자극된 T 세포
공여자2: 자극되지 않은 T 세포
IL2
LTA
CCL20
CD40LG

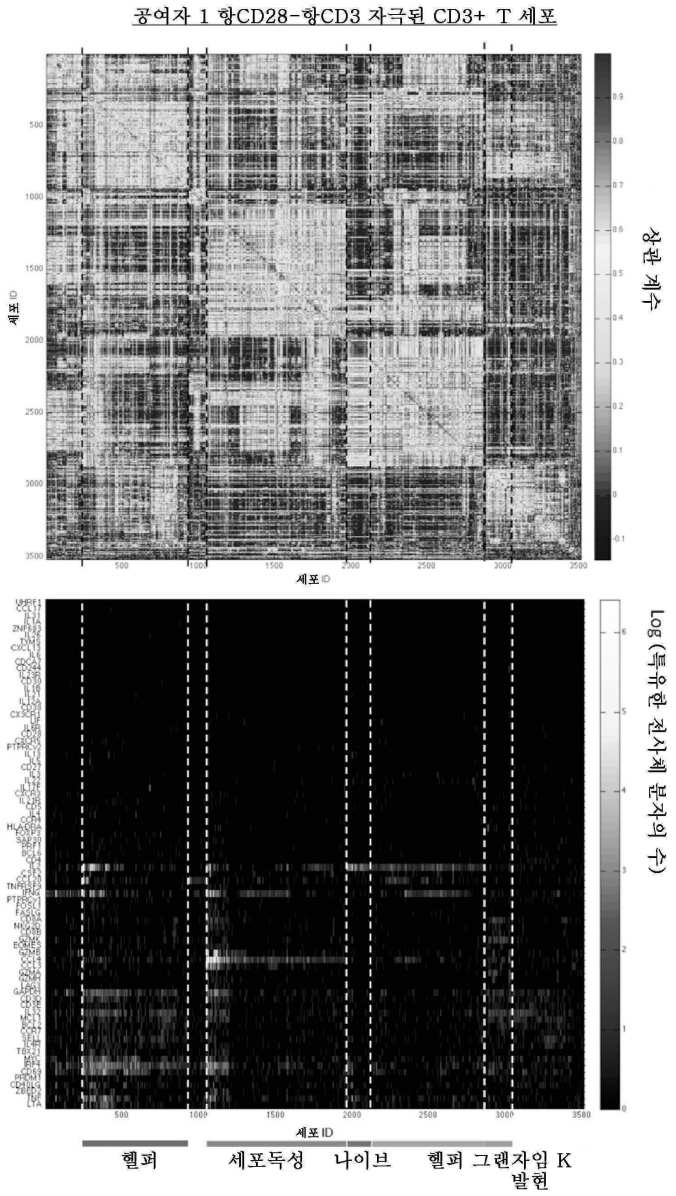
도면46d


활성화 시에 세포의 두 분지에 의해 발현되는 유전자
FOSL1
IL4R
MYC
PRDM1
TBX21
CSF2
BCL2

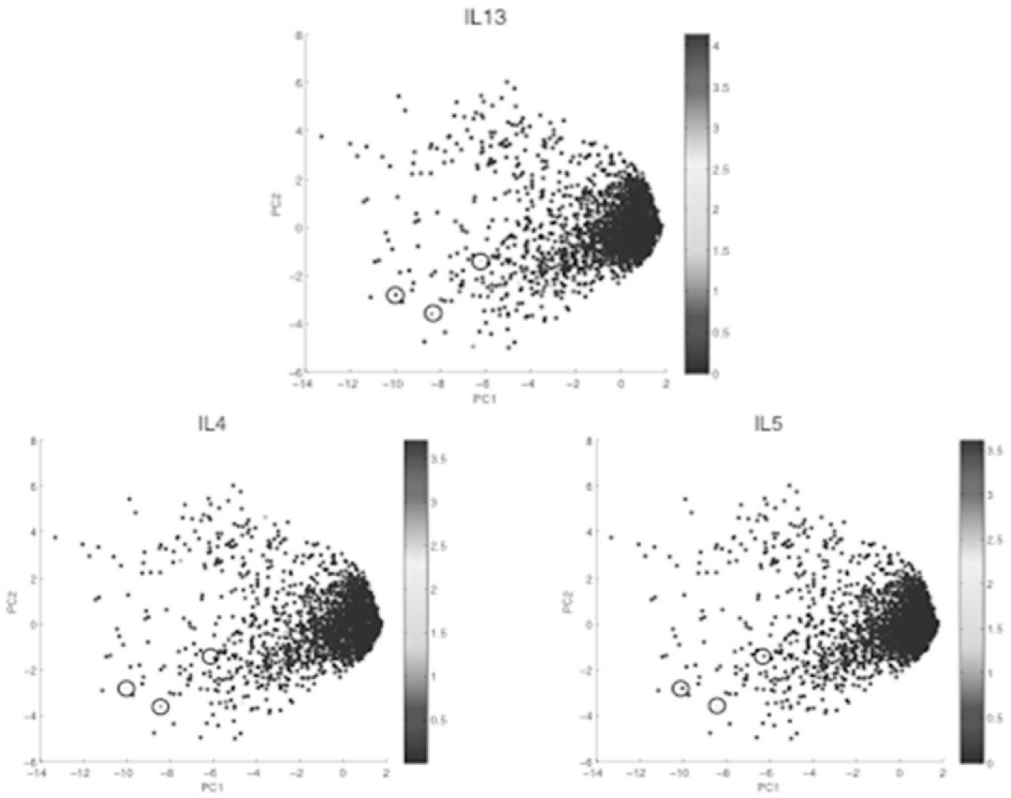
도면47



도면48

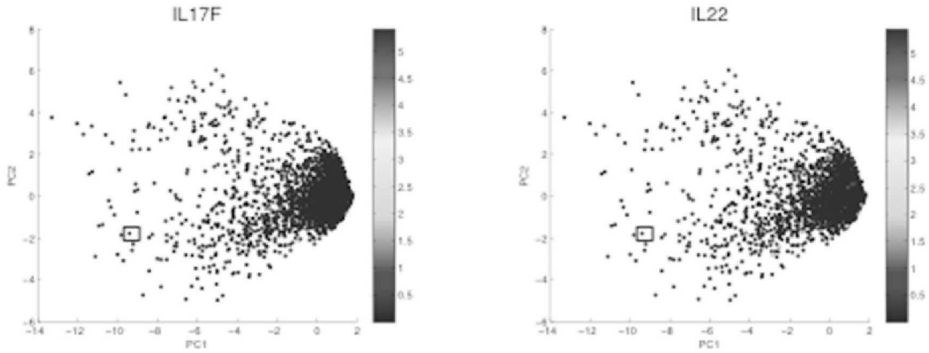

공여자 1 항CD28-항CD3 자극된 CD3+ T 세포
상관 계수
세포 ID
Log (특유한 전사체 분자의 수)
세포 ID
헬퍼
세포독성
나이브
헬퍼 그랜자임 K 발현

도면49a



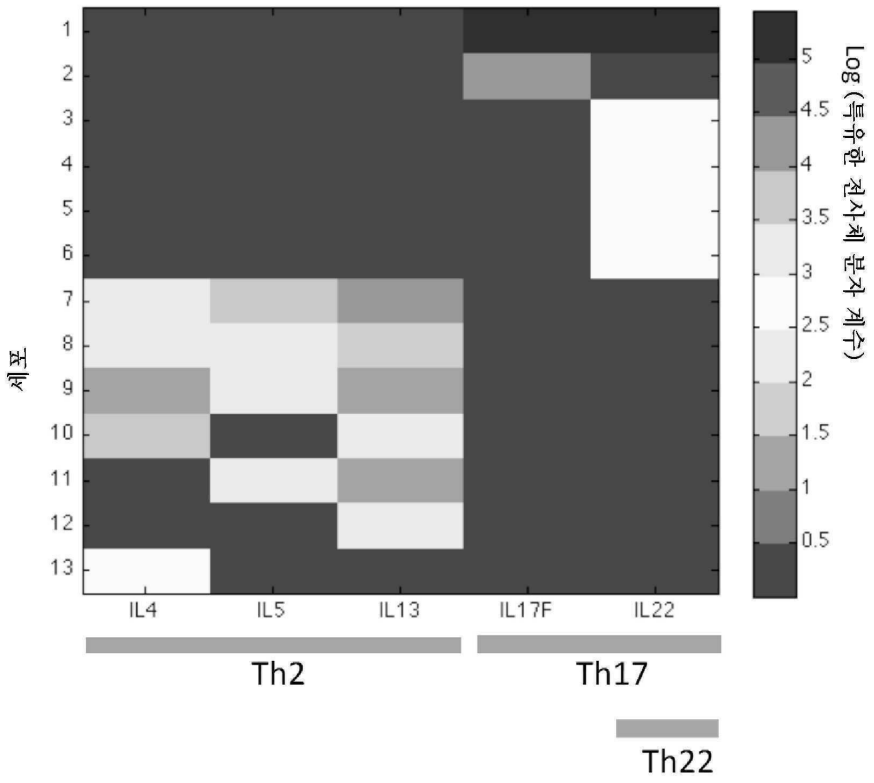
○ IL4, IL5, IL13을 동시-발현하는 세포

도면49b

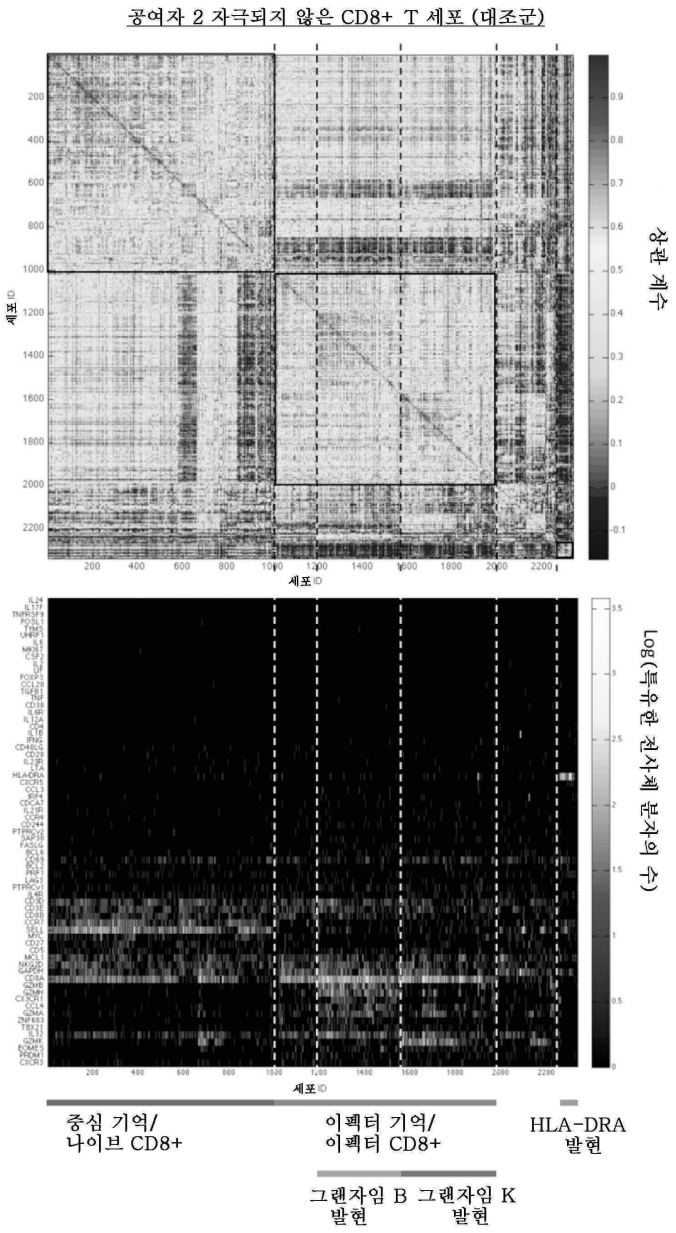


□ IL17F 및 IL22를 동시-발현하는 단일 세포

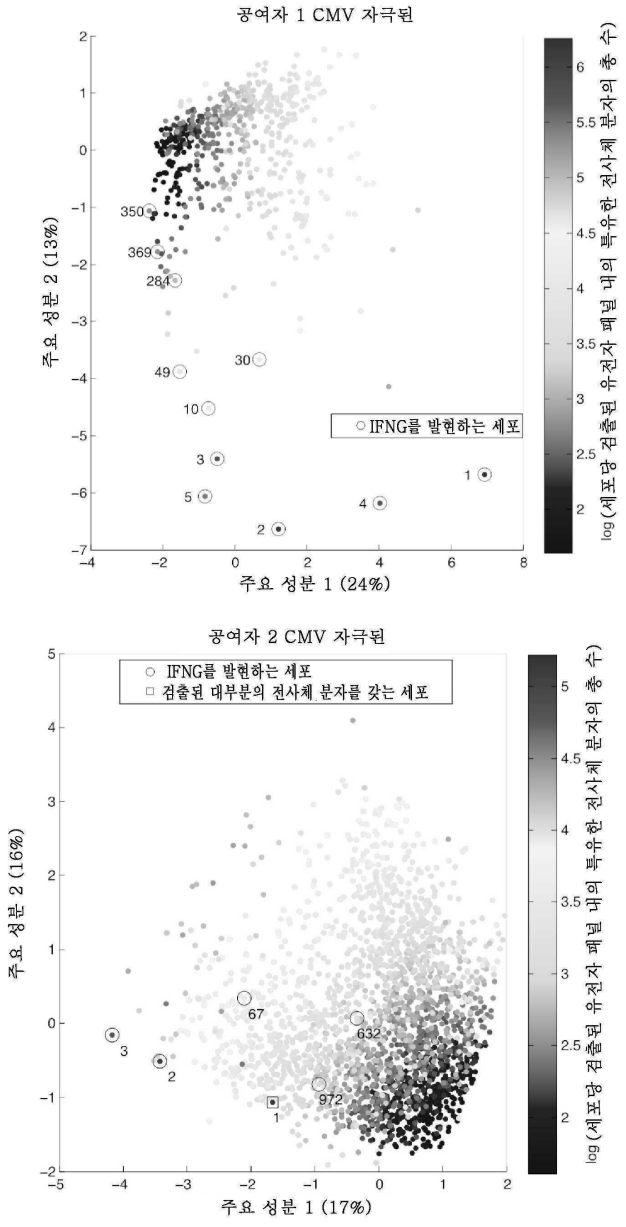
도면49c


세포
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
IL4
IL5
IL13
IL17F
IL22
Th2
Th17
Th22
Log (특유한 전사체 분자 계수)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5

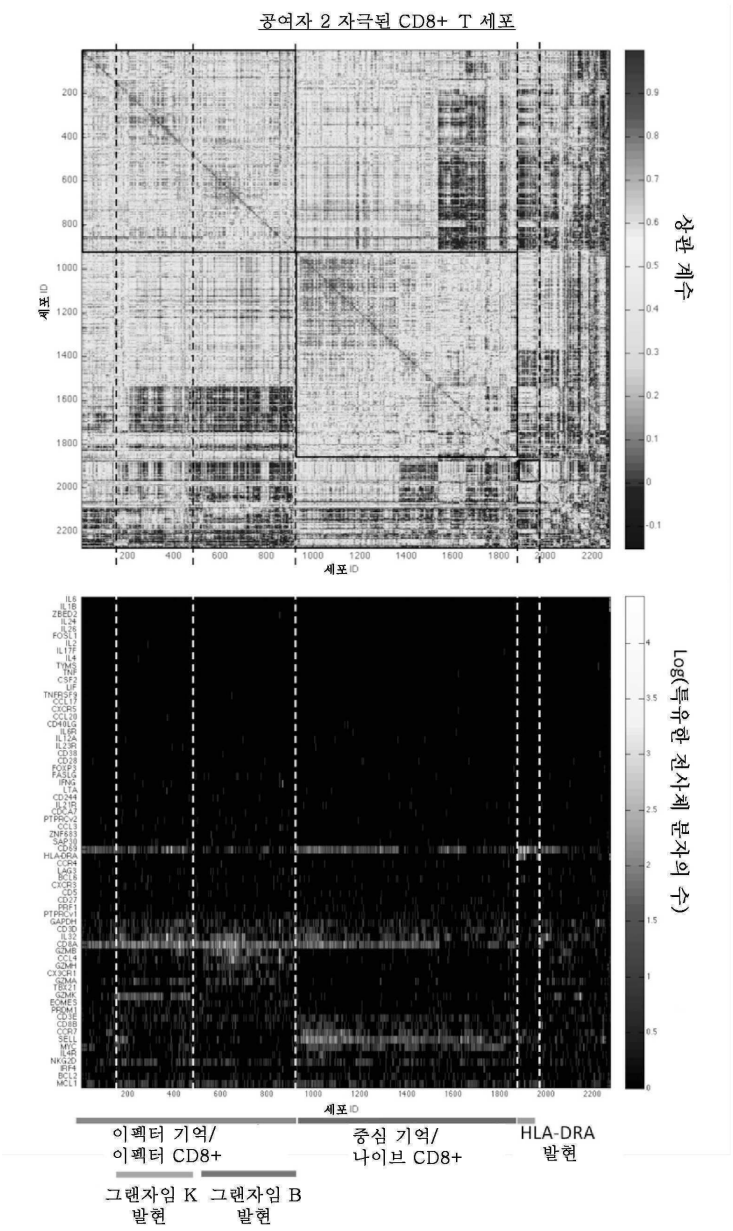
도면50a


공여자 2 자극되지 않은 CD8+ T 세포 (대조군)
세포 ID
상관 계수
Log (특유한 전사체 분자의 수)
중심 기억/
나이브 CD8+
이펙터 기억/
이펙터 CD8+
HLA-DRA
발현
그랜자임 B
발현
그랜자임 K
발현

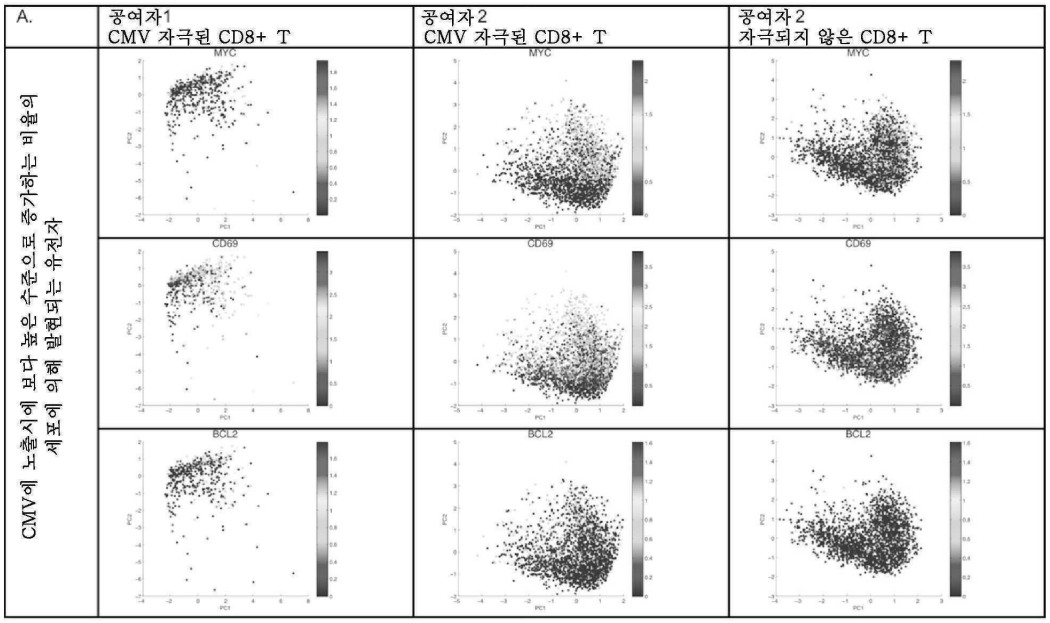
도면50b


공여자 1 CMV 자극된
주요 성분 2 (13%)
주요 성분 1 (24%)
IFNG를 발현하는 세포
log (세포당 검출된 유전자 패널 내의 특유한 전사체 분자의 총 수)
350
369
284
49
30
10
3
5
4
2
1
공여자 2 CMV 자극된
IFNG를 발현하는 세포
검출된 대부분의 전사체 분자를 갖는 세포
주요 성분 2 (16%)
주요 성분 1 (17%)
log (세포당 검출된 유전자 패널 내의 특유한 전사체 분자의 총 수)
67
632
3
2
972
1

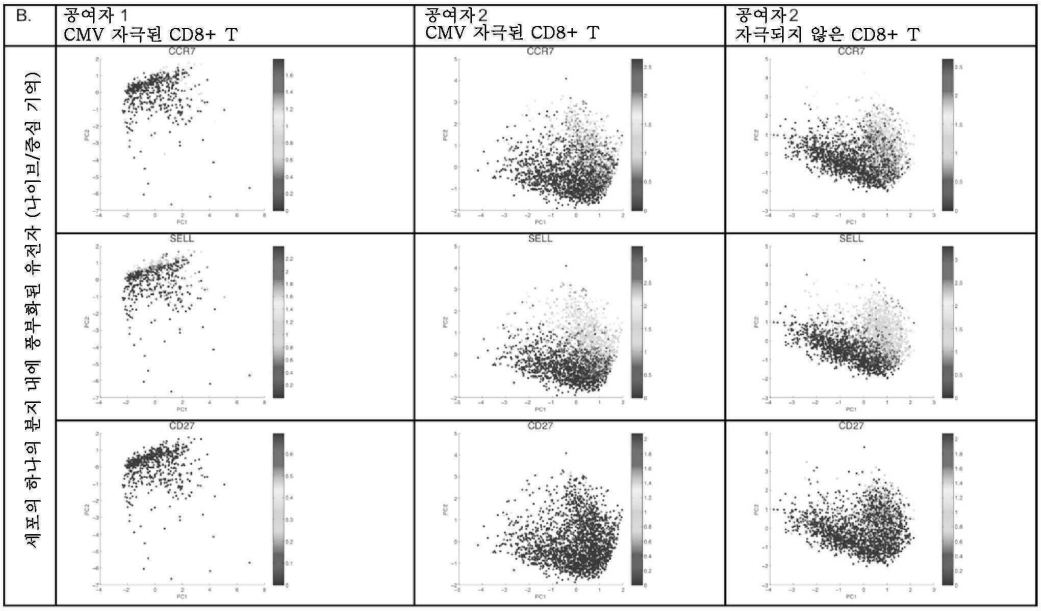
도면51


공여자 2 자극된 CD8+ T 세포
상관 계수
세포 ID
Log(특유한 전사체 분자의 수)
이펙터 기억/
이펙터 CD8+
중심 기억/
나이브 CD8+
HLA-DRA
발현
그랜자임 K
발현
그랜자임 B
발현

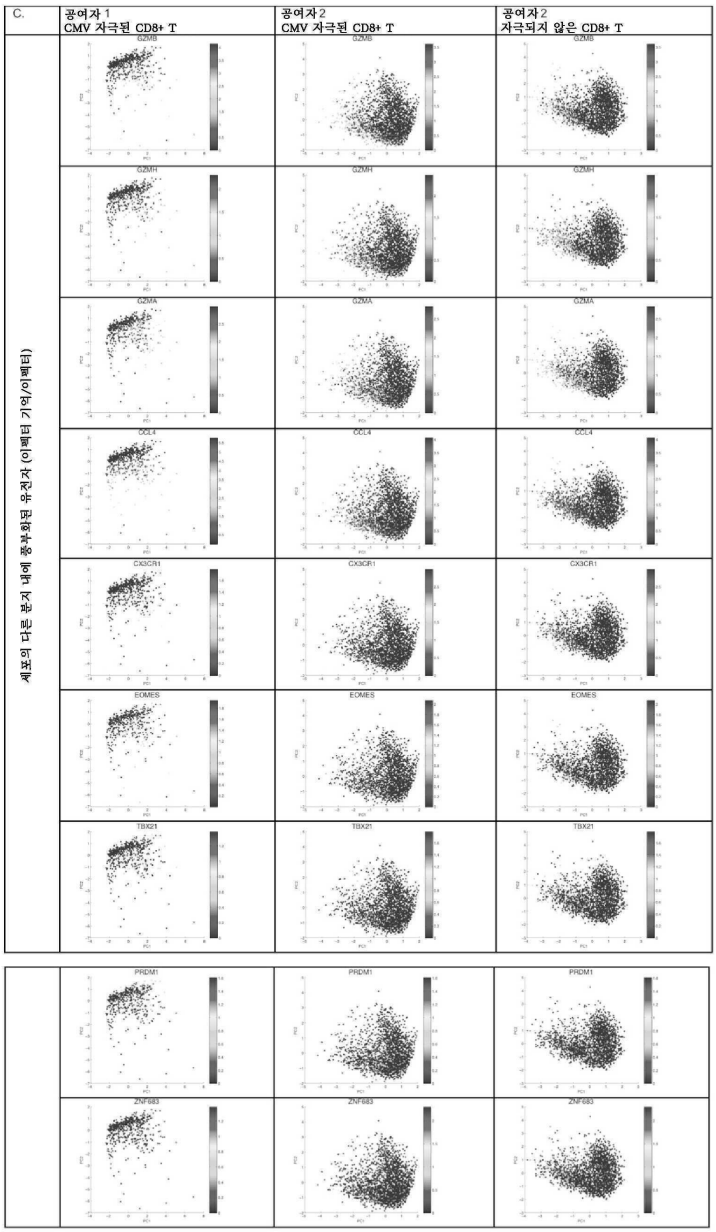
도면52a


A.
공여자1
CMV 자극된 CD8+ T
공여자2
CMV 자극된 CD8+ T
공여자2
자극되지 않은 CD8+ T
CMV에 노출시에 보다 높은 수준으로 증가하는 비율의 세포에 의해 발현되는 유전자
MYC
CD69
BCL2

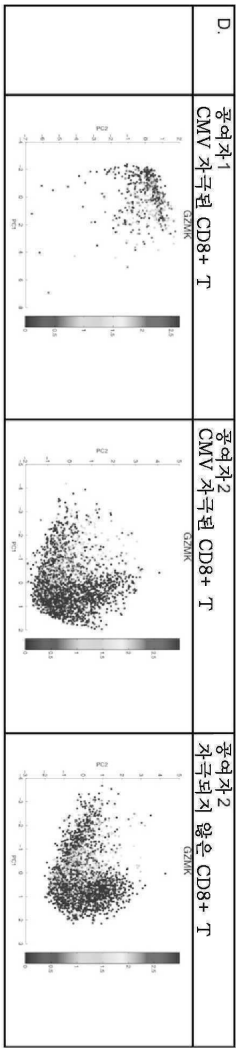
도면52b


B.
공여자 1
CMV 자극된 CD8+ T
공여자2
CMV 자극된 CD8+ T
공여자2
자극되지 않은 CD8+ T
세포의 하나의 분지 내에 풍부화된 유전자 (나이브/중심 기억)
CCR7
SELL
CD27

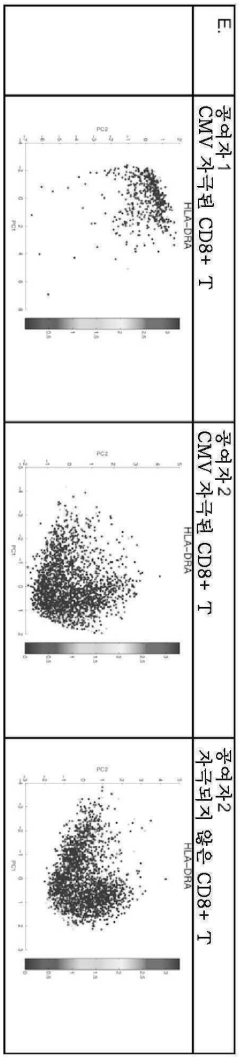
도면52c


C.
공여자 1
CMV 자극된 CD8+ T
공여자 2
CMV 자극된 CD8+ T
공여자 2
자극되지 않은 CD8+ T
세포의 다른 분자 내에 풍부화된 유전자 이펙터 기억(이펙터)
GZMB
GZMH
GZMA
CCL4
CX3CR1
EOMES
TBX21
PRDM1
ZNF683

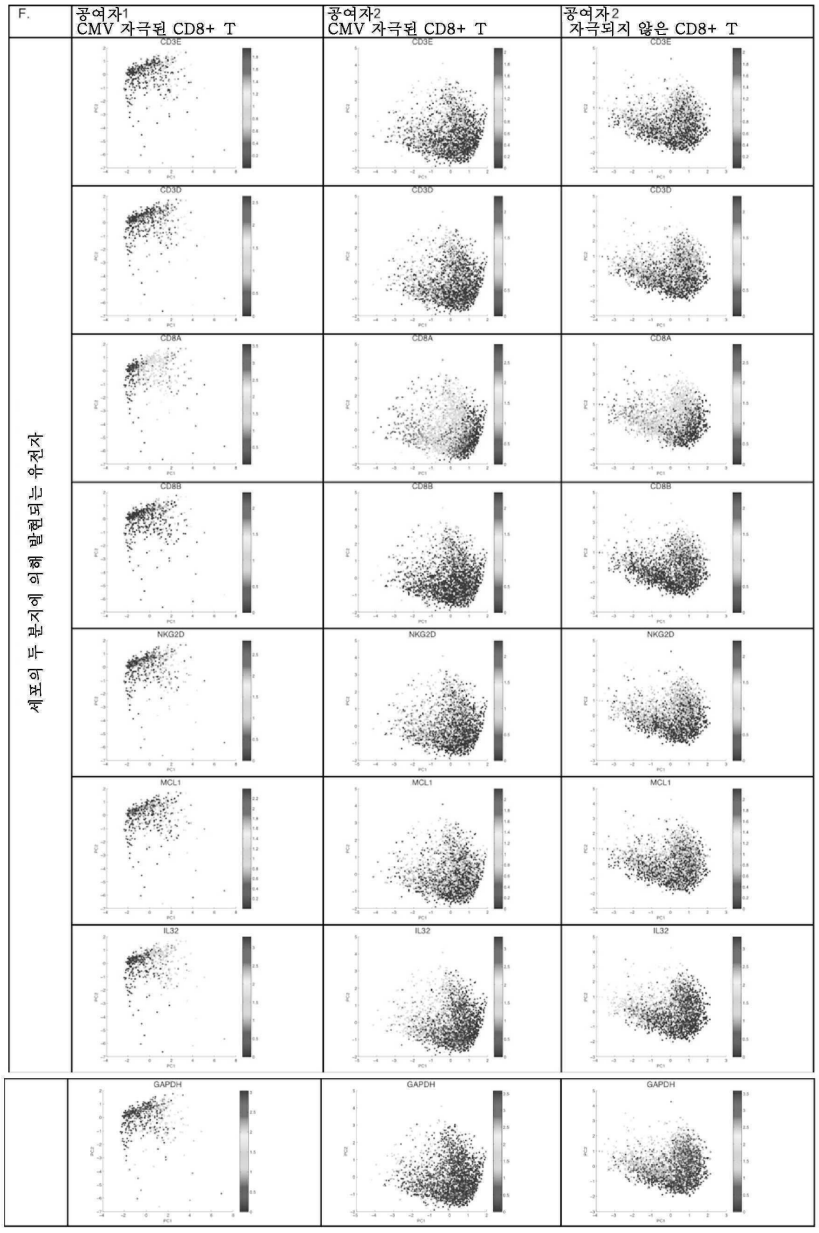
도면52d


D.
공여자1 CMV 자극된 CD8+ T
공여자2 CMV 자극된 CD8+ T
공여자2 자극되지 않은 CD8+ T
PC2
PC3
GZMK
CD4

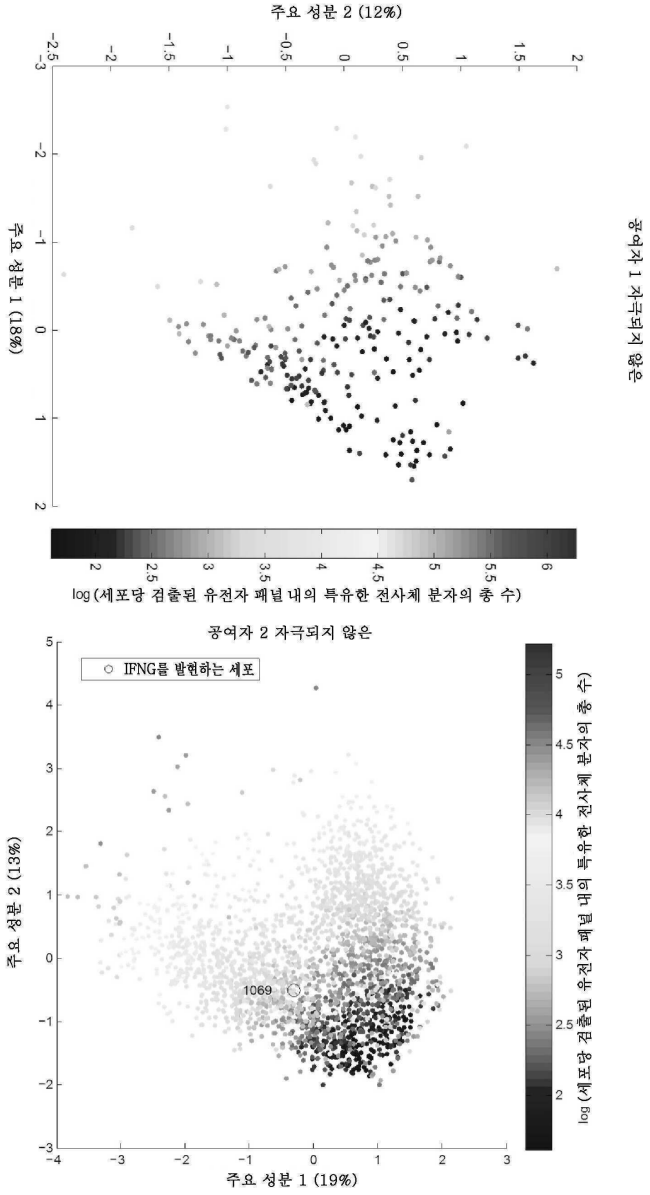
도면52e


E.
공여자1 CMV 자극된 CD8+ T
공여자2 CMV 자극된 CD8+ T
공여자2 자극되지 않은 CD8+ T
PC2
HLA-DRA

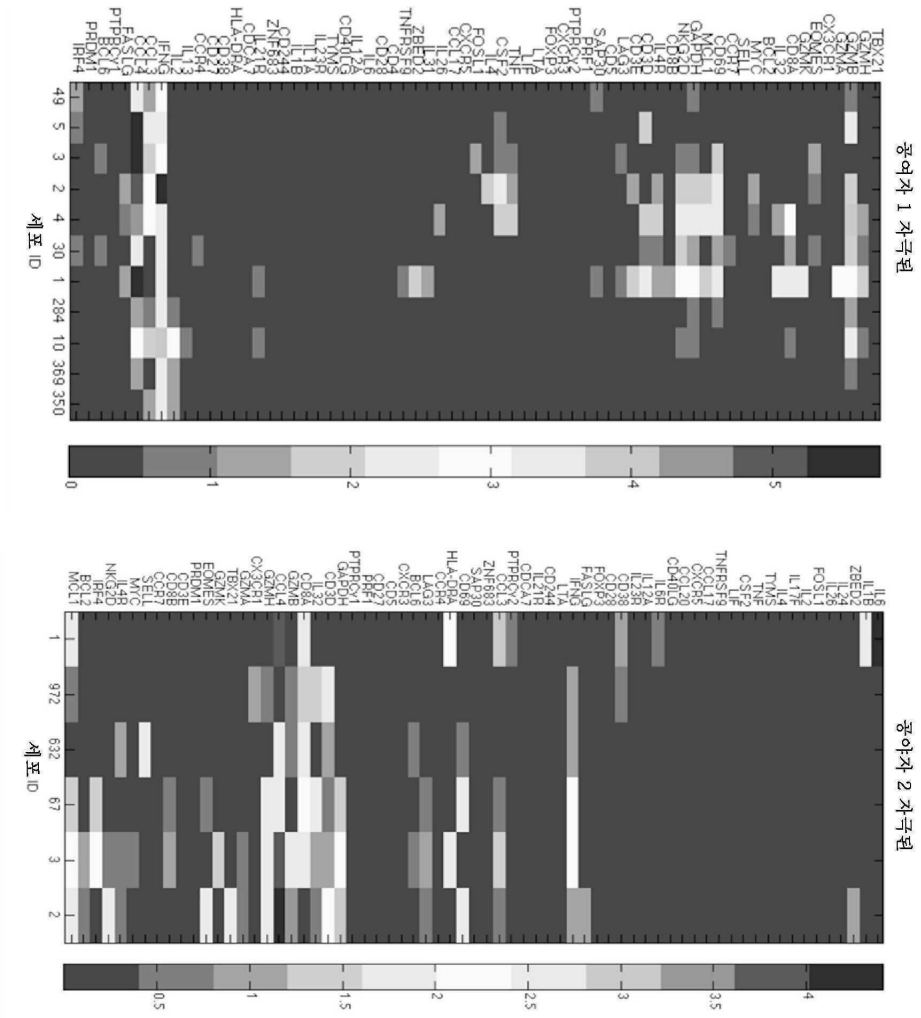
도면52f


F.
공여자1
CMV 자극된 CD8+ T
공여자2
CMV 자극된 CD8+ T
공여자2
자극되지 않은 CD8+ T
세포의 두 분지에 의해 발현되는 유전자
CD3E
CD3D
CD8A
CD8B
NKG2D
MCL1
IL32
GAPDH

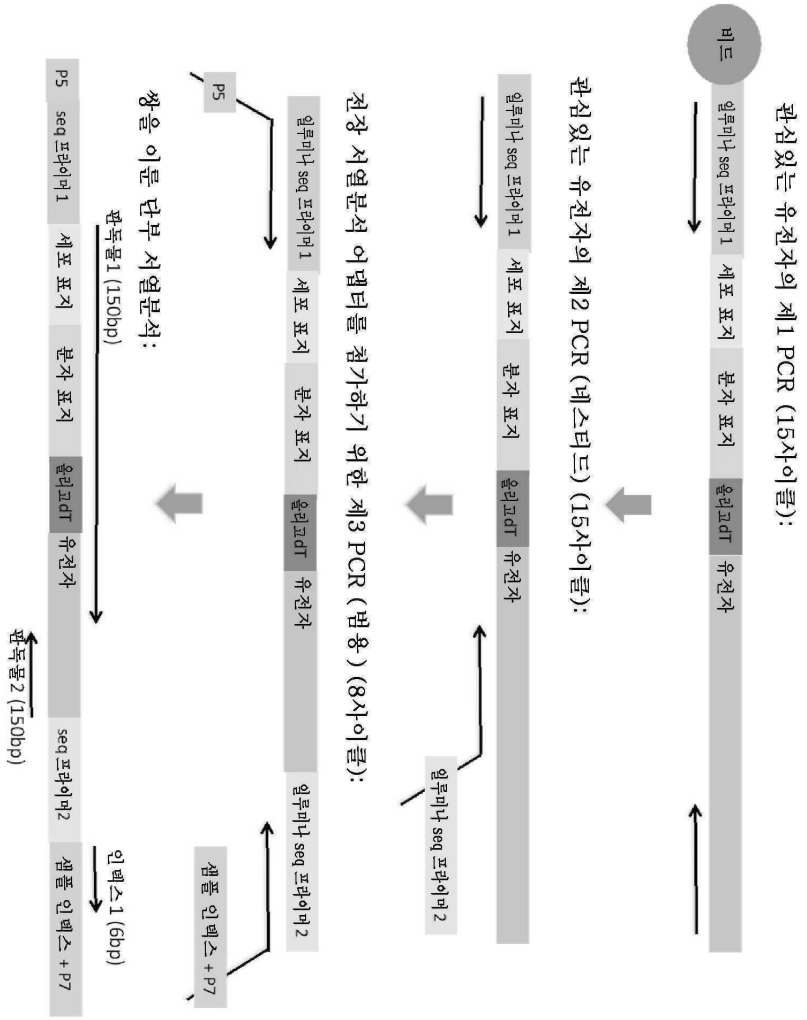
도면53


주요 성분 2 (12%)
주요 성분 1 (18%)
공여자 1 자극되지 않음
log (세포당 검출된 유전자 패널 내의 특유한 전사체 분자의 총 수)
공여자 2 자극되지 않은
IFNG를 발현하는 세포
1069
주요 성분 2 (13%)
주요 성분 1 (19%)
log (세포당 검출된 유전자 패널 내의 특유한 전사체 분자의 총 수)

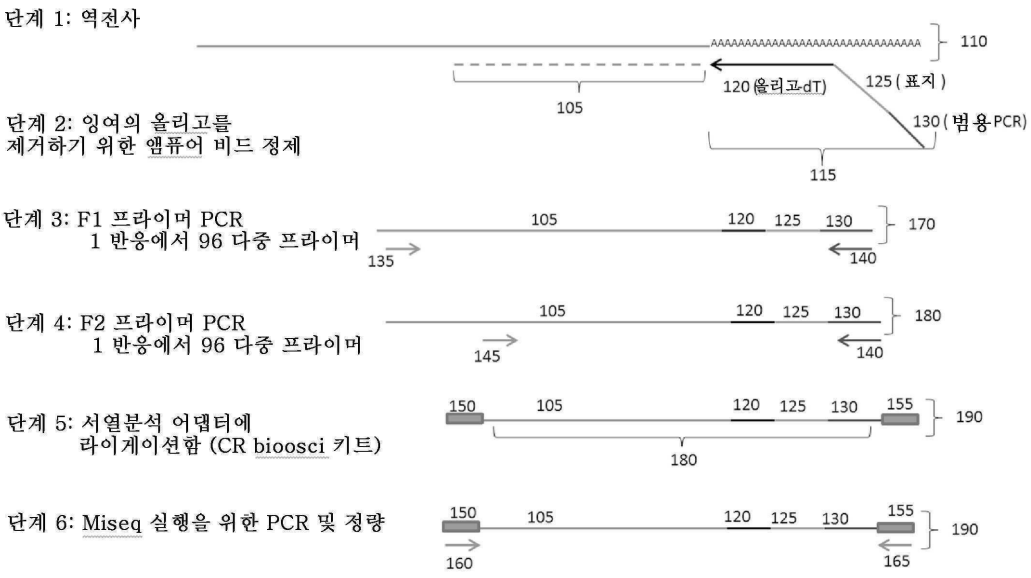
도면54



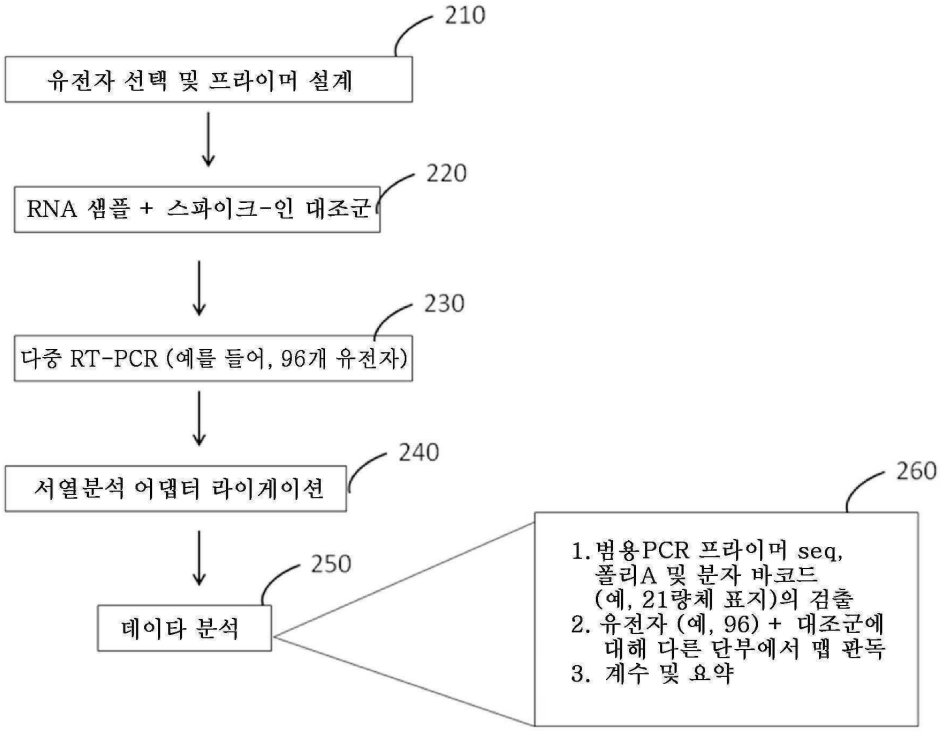
도면55


관심있는 유전자의 제1 PCR (15사이클):
비드
일루미나 seq 프라이머 1
세포 표지
분자 표지
올리고dT
유전자
관심있는 유전자의 제2 PCR (네스티드) (15사이클):
일루미나 seq 프라이머 1
세포 표지
분자 표지
올리고dT
유전자
일루미나 seq 프라이머 2
전장 서열분석 어댑터를 첨가하기 위한 제3 PCR (범용) (8사이클):
P5
일루미나 seq 프라이머 1
세포 표지
분자 표지
올리고dT
유전자
일루미나 seq 프라이머 2
샘플 인덱스 + P7
쌍을 이룬 단부 서열분석:
P5
seq 프라이머 1
세포 표지
분자 표지
올리고dT
유전자
seq 프라이머 2
샘플 인덱스 + P7
판독물 1 (150bp)
인덱스 1 (6bp)
판독물 2 (150bp)

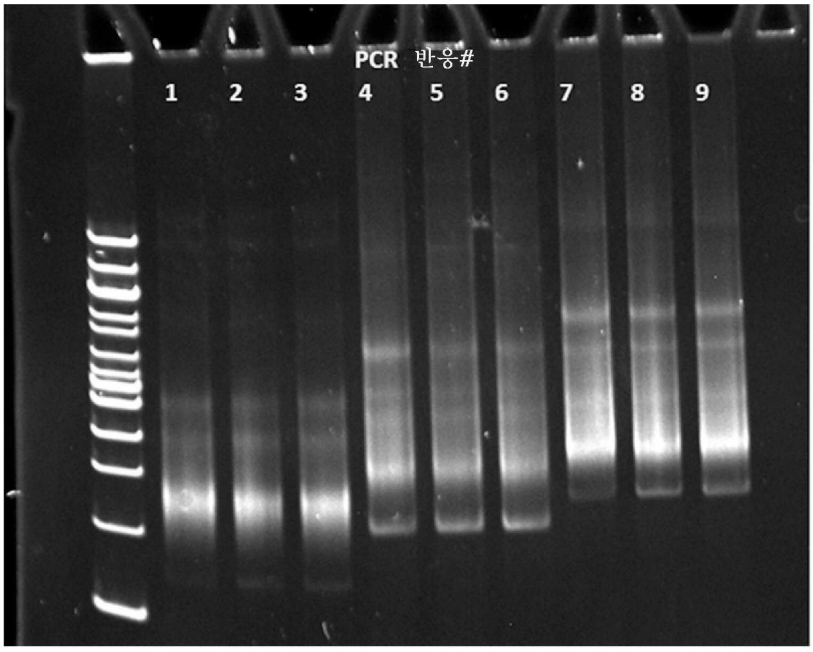
도면56


단계 1: 역전사
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
110
105
120 (올리고-dT)
125 (표지)
130 (범용-PCR)
115
단계 2: 잉여의 올리고를
제거하기 위한 앰퓨어 비드 정제
단계 3: F1 프라이머 PCR
1 반응에서 96 다중 프라이머
105
120
125
130
170
135
140
단계 4: F2 프라이머 PCR
1 반응에서 96 다중 프라이머
105
120
125
130
180
145
140
단계 5: 서열분석 어댑터에
라이게이션함 (CR bioosci 키트)
150
105
120
125
130
155
190
180
단계 6: Miseq 실행을 위한 PCR 및 정량
150
105
120
125
130
155
190
160
165

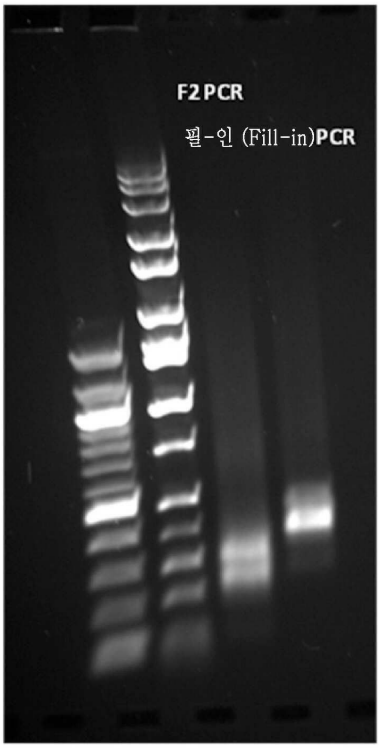
도면57


210
유전자 선택 및 프라이머 설계
220
RNA 샘플 + 스파이크-인 대조군
230
다중 RT-PCR (예를 들어, 96개 유전자)
240
서열분석 어댑터 라이게이션
250
데이타 분석
260
1. 범용PCR 프라이머 seq, 폴리A 및 분자 바코드 (예, 21량체 표지)의 검출
2. 유전자 (예, 96) + 대조군에 대해 다른 단부에서 맵 판독
3. 계수 및 요약

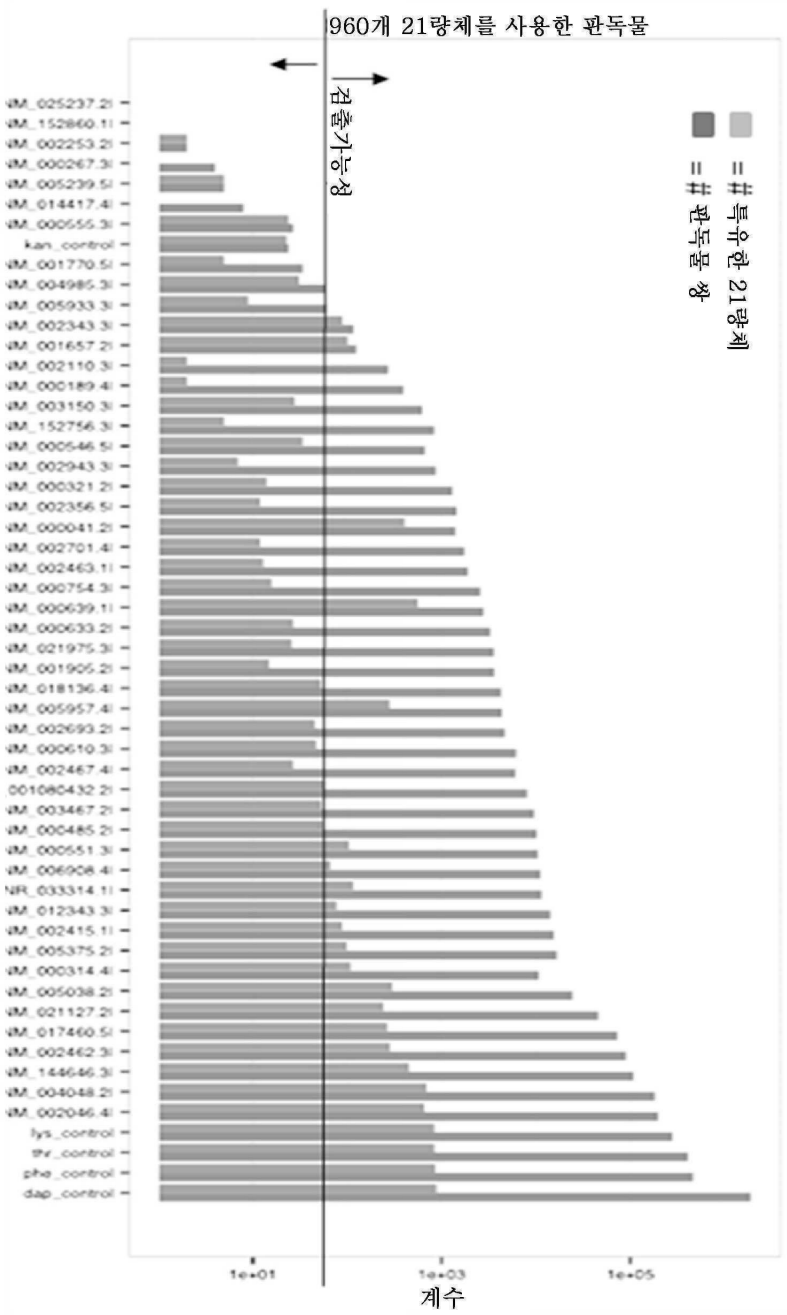
도면58a


PCR 반응#
1
2
3
4
5
6
7
8
9

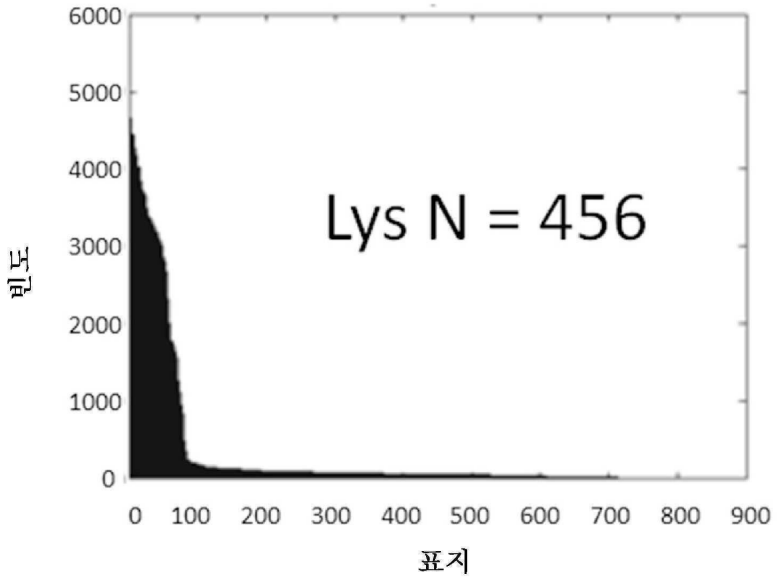
도면58b



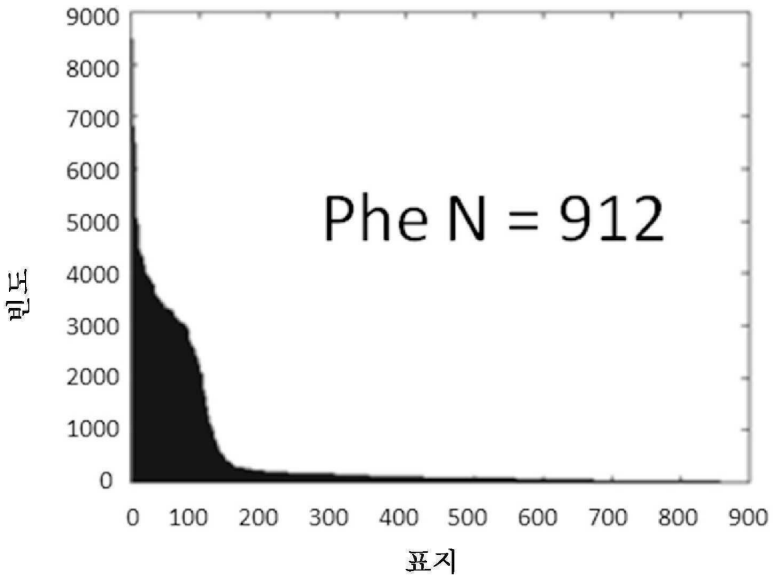
도면59


960개 21량체를 사용한 판독물
검출가능성
= ## 특유한 21량체
= ## 판독물 쌍
kan_control
lys_control
thr_control
phe_control
dap_control
1e+01
1e+03
1e+05
계수

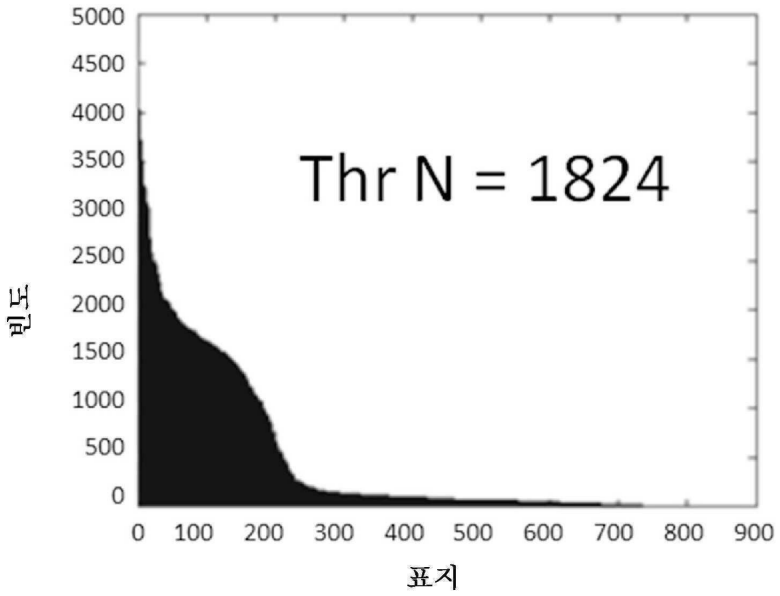
도면60a


Lys N = 456
빈도
표지
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900

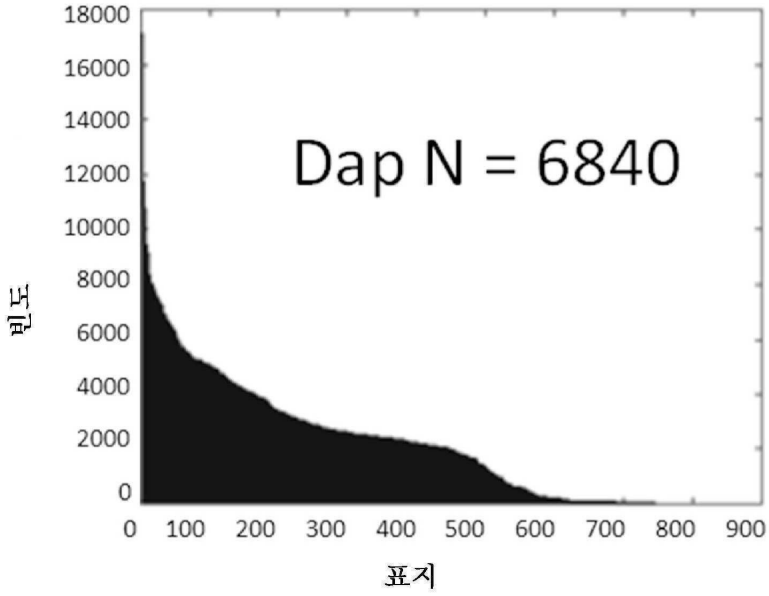
도면60b


Phe N = 912
빈도
표지
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900

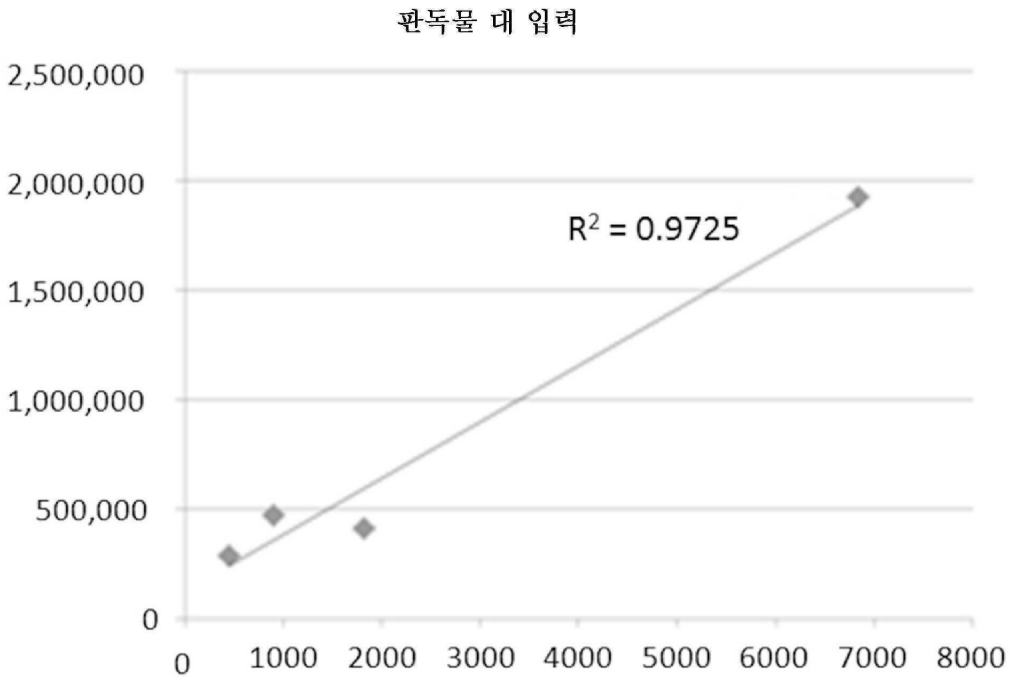
도면60c


Thr N = 1824
빈도
표지
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900

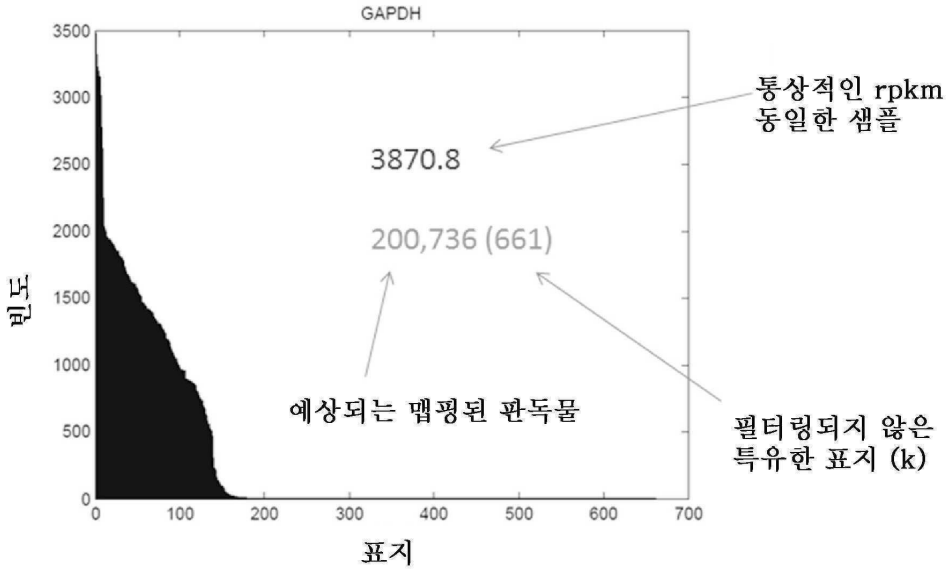
도면60d


Dap N = 6840
빈도
표지
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0 100 200 300 400 500 600 700 800 900

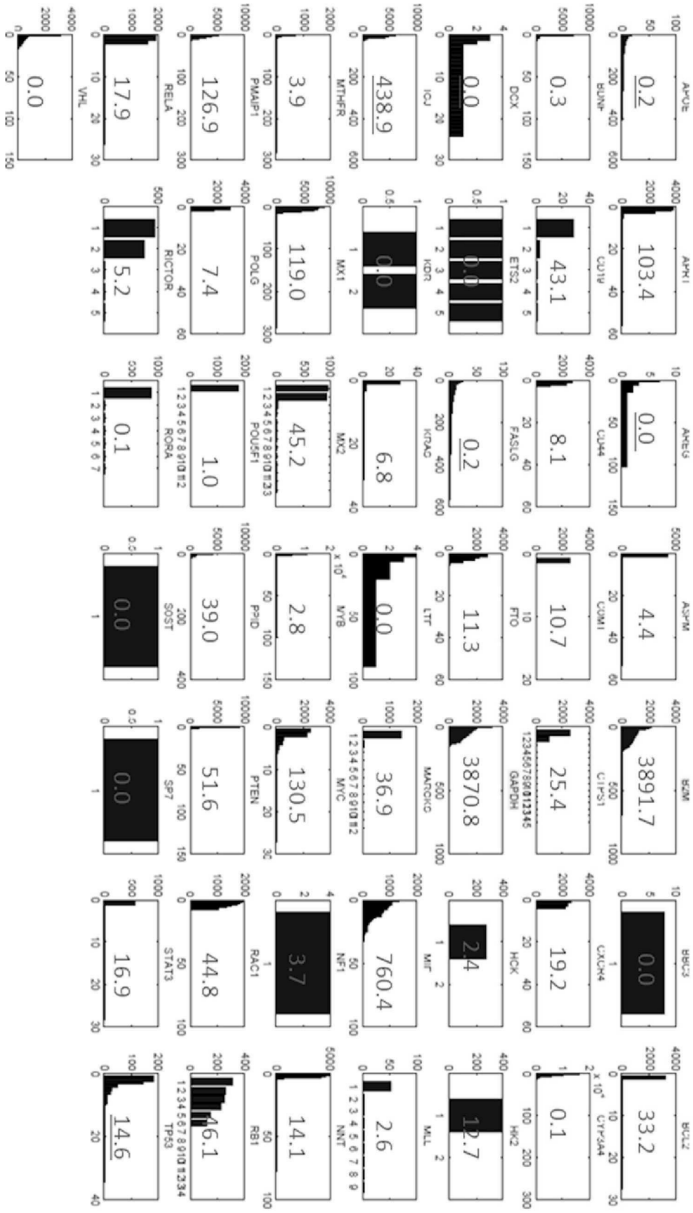
도면60e


판독물 대 입력
2,500,000
2,000,000
1,500,000
1,000,000
500,000
0
R² = 0.9725
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000

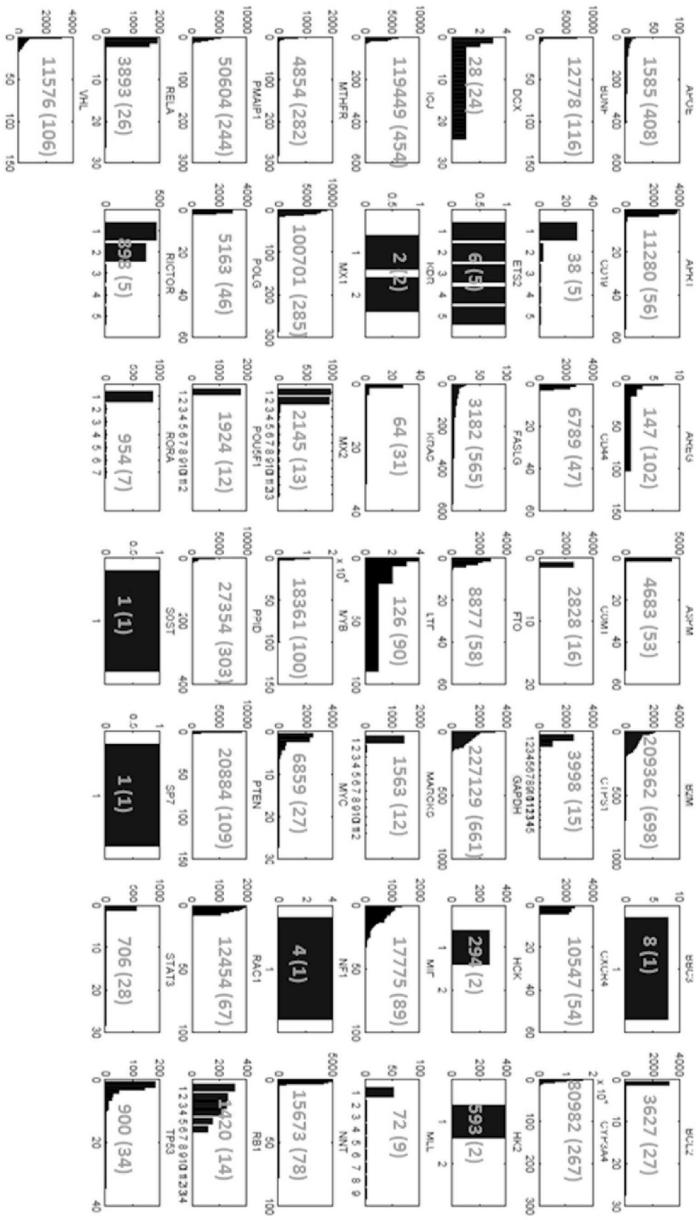
도면61


GAPDH
빈도
표지
3870.8
200,736 (661)
통상적인 rpkm
동일한 샘플
예상되는 맵핑된 판독물
필터링되지 않은
특유한 표지 (k)

도면62



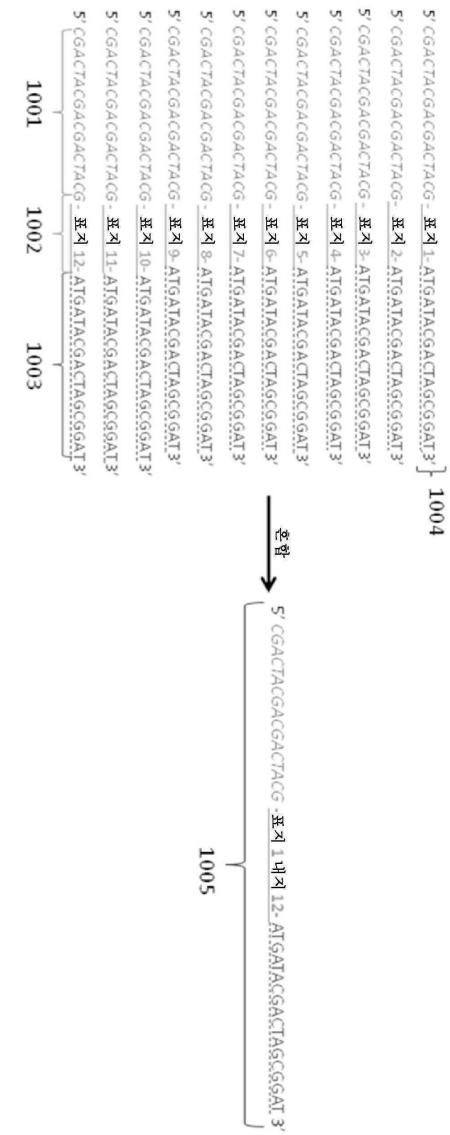
도면63


APOE
1585 (408)
APK1
11280 (56)
ANGS
147 (102)
AURM
4683 (53)
BGLM
209362 (698)
BRCA3
8 (1)
BRCA2
3627 (27)
BUN
12778 (116)
CDTV
38 (5)
CUM1
2828 (16)
CUM3
3998 (15)
CUM4
10547 (54)
DCX
28 (24)
ETS2
6 (5)
FASLG
6789 (47)
FTO
8877 (58)
GAPDH
227129 (661)
HCK
294 (2)
HK2
593 (2)
HCJ
119449 (454)
KDR
2 (2)
KDAC
3182 (565)
LTF
126 (90)
MARCHG
1563 (12)
MF
17775 (89)
MLL
72 (9)
MTHFR
4854 (282)
MX1
100701 (285)
MX2
64 (31)
MYB
18361 (100)
MYC
6859 (27)
NF1
4 (1)
NNT
15673 (78)
PMAIP1
50604 (244)
POLG
5163 (46)
POU5F1
2145 (13)
PPID
27354 (303)
PTEN
20884 (109)
RAC1
12454 (67)
RB1
1420 (14)
RELA
3893 (26)
RICTOR
893 (5)
RORA
1924 (12)
SOST
1 (1)
SP7
1 (1)
STAT3
706 (28)
TP53
900 (34)
VHL
11576 (106)

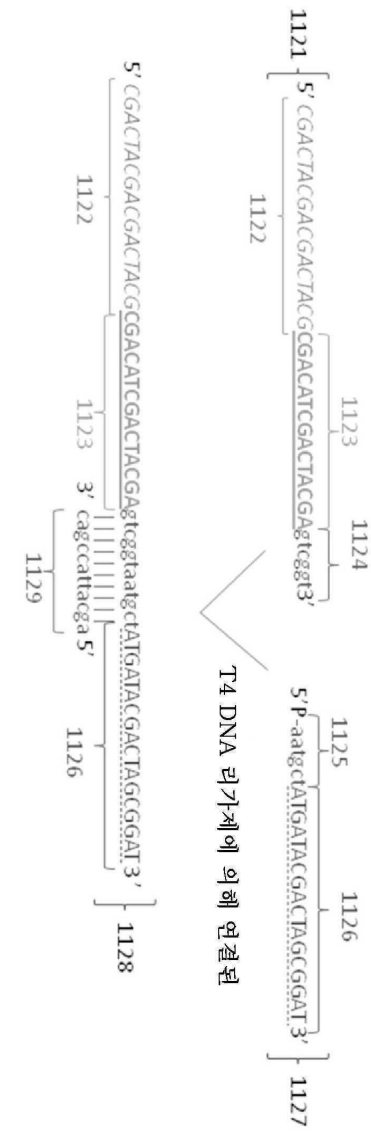
도면64


0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
아릴 탄화수소 수용체 (AHR), mRNA
라파마이신의 기계론적 표적
네모-유사 키나제 (NLK), mRNA
CD47 분자 (CD47), 전사체 변이체 1
v-raf 뮤린 육종 바이러스 발암유전자 상동체
핵 수용체 서브패밀리 2, 군 F
유방암 2, 조기 발병 (BRCA2), mRNA
시르투인 1 (SIRT1), 전사체 변이체 1, mRNA
REV1, 폴리머라제 (DNA 유도) (REV1)
아릴 탄화수소 수용체 핵
크립토크롬 2 (포토리아제-유사) (CRY2)
뉴로피브로민 2 (메를린) (NF2), 전사체
카르니틴 O-옥타노일트랜스퍼라제 (CROT)
아스파르테이트 베타-히드록실라제 (ASPH), 전사체
유방암 1, 조기 발병 (BRCA1)
비타민 D (1,25-디히드록시비타민 D3)
디스코이딘 도메인 수용체 티로신 키나제 1
포스페이트 조절 엔도펩티다제 상동체
GNAS 안티센스 RNA 1 (GNAS-AS1), 안티센스
인터류킨 6 (인터페론, 베타 2) (IL6), mRNA
칼슘-감지 수용체 (CASR), 전사체
파옥시좀 증식제-활성화된 수용체
나노그 호메오박스 (NANOG), mRNA
윔리스-타입 MMTV 통합 부위 패밀리
낭포성 섬유증 막횡단 전도
시토크롬 P450, 패밀리 2, 하위패밀리 D
소닉 헤지호그 (SHH), mRNA
헤모글로빈, 베타 (HBB), mRNA
폰 빌레브란트 인자 (VWF), mRNA
CD14 분자 (CD14) , 전사체 변이체 1
신경펩티드 Y (NPY), mRNA
아데닐레이트 키나제 2 (AK2), 핵 유전자
골 형성 단백질 6 (BMP6), mRNA
칼시토닌-관련 폴리펩티드 알파 (CALCA)
CD34 분자 (CD34), 전사체 변이체 2
신경교 섬유 산성 단백질 (GFAP), 전사체
MDM2 발암유전자, E3 유비퀴틴 단백질 리가제
성 결정 영역 Y (SRY), mRNA
역형성 림프종 수용체 티로신 키나제
표피 성장 인자 수용체 (EGFR)
메탈로티오네인 3 (MT3), mRNA
CD28 분자 (CD28), 전사체 변이체 1
포크헤드 박스 P3 (FOXP3), 전사체 변이체 1
텔로머라제 역전사효소 (TERT)
전립선암 항원 3 (비-단백질 코딩)
WT1 안티센스 RNA (WT1-AS), 비-코딩 RNA

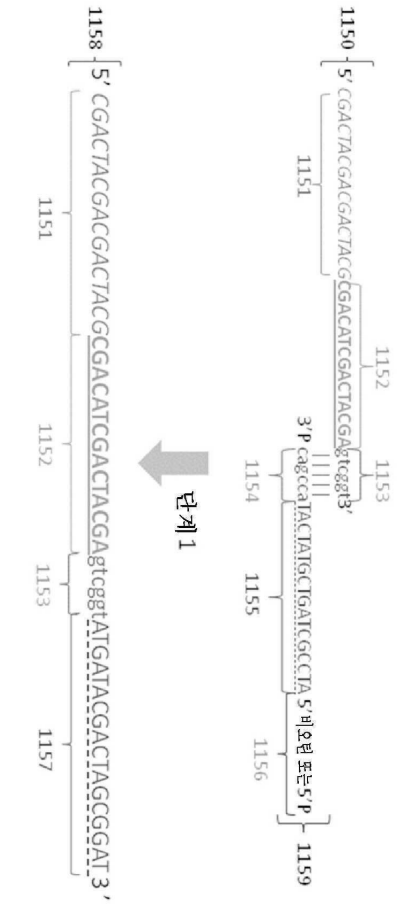
도면65


5' CGACTACGACGACTACG-표지1-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지2-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지3-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지4-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지5-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지6-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지7-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지8-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지9-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지10-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지11-ATGATACGACTAGCGGAT3'
5' CGACTACGACGACTACG-표지12-ATGATACGACTAGCGGAT3'
1001
1002
1003
1004
혼합
5' CGACTACGACGACTACG-표지1내지12-ATGATACGACTAGCGGAT 3'
1005

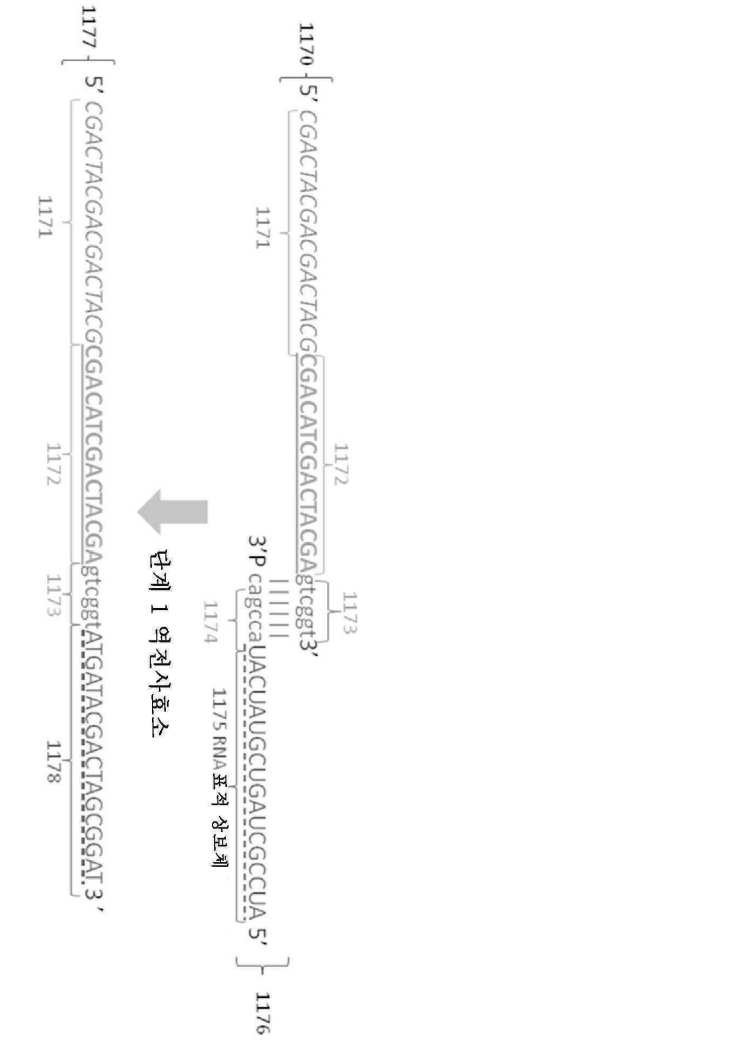
도면66a


1121
5' CGACTACGACGACTACGGCGACATCGACTACGAgtcggtaatgctATGATACGACTAGCGGAT 3'
1122
1123
1124
3' cagccattacga 5'
1129
1122
1123
1126
1128
5'P-aatgctATGATACGACTAGCGGAT3'
1125
1126
1127
T4 DNA 리가제에 의해 연결된

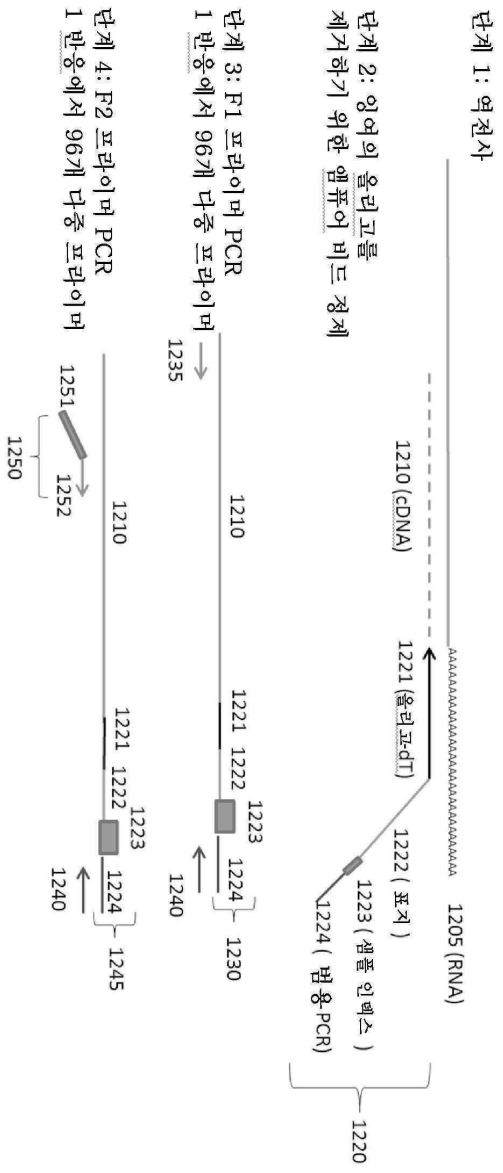
도면66b


1150
5' CGACTACGACGACTACGCGACATCGACTACGAgtcggt3'
1151
1152
1153
3'P cagccaTACTATGCTGATCGCCTA 5'비오틴 또는 5'P
1154
1155
1156
1159
단계 1
1158
5' CGACTACGACGACTACGCGACATCGACTACGAgtcggtATGATACGACTAGCGGAT 3'
1151
1152
1153
1157

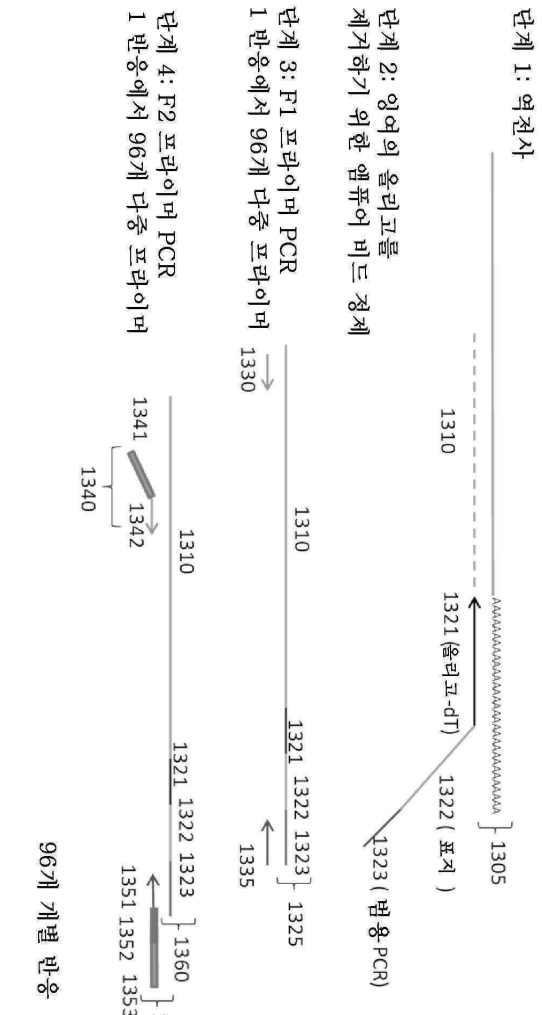
도면66c


1177
5' CGACTACGACGACTACGCGACATCGACTACGAgtcggtATGATACGACTAGCGGAT 3'
1171
1172
1173
1178
단계 1 역전사효소
1170
5' CGACTACGACGACTACGCGACATCGACTACGAgtcggt3'
1171
1172
1173
3'P cagccaUACUAUGCUGAUCGCCUA 5'
1174
1175 RNA표적 상보체
1176

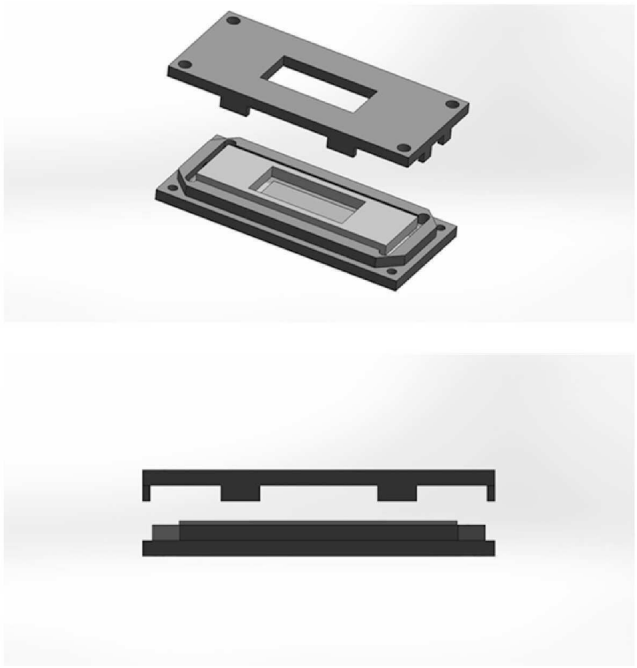
도면67


단계 1: 역전사
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1205 (RNA)
1210 (cDNA)
1221 (올리고-dT)
1222 (표지)
1223 (샘플 인덱스)
1224 (범용 PCR)
1220
단계 2: 잉여의 올리고를 제거하기 위한 앰퓨어 비드 정제
단계 3: F1 프라이머 PCR 1 반응에서 96개 다중 프라이머
1235
1210
1221 1222
1223
1224
1230
1240
단계 4: F2 프라이머 PCR 1 반응에서 96개 다중 프라이머
1251
1250
1252
1210
1221 1222
1223
1224
1245
1240

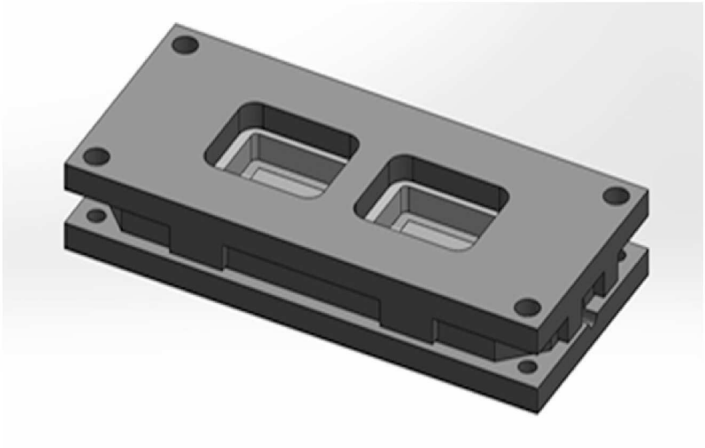
도면68


단계 1: 역전사
1310
1321 (올리고-dT)
1322 (표지)
1323 (범용 PCR)
1305
1320
단계 2: 잉여의 올리고를
제거하기 위한 앰퓨어 비드 정제
단계 3: F1 프라이머 PCR
1 반응에서 96개 다중 프라이머
1330
1310
1321 1322 1323
1325
1335
단계 4: F2 프라이머 PCR
1 반응에서 96개 다중 프라이머
1341
1342
1340
1310
1321 1322 1323
1360
1351 1352 1353
1350
96개 개별 반응

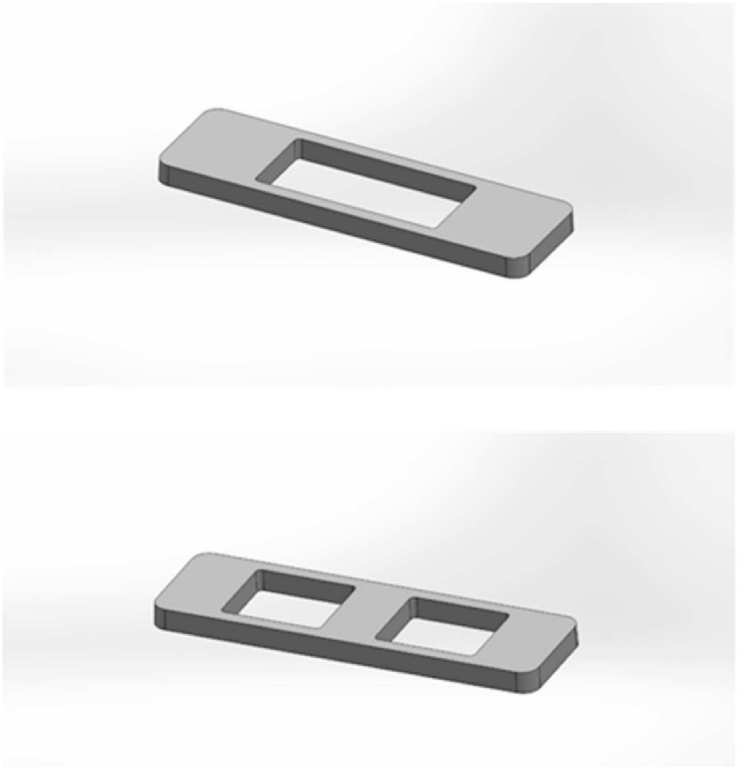
도면69



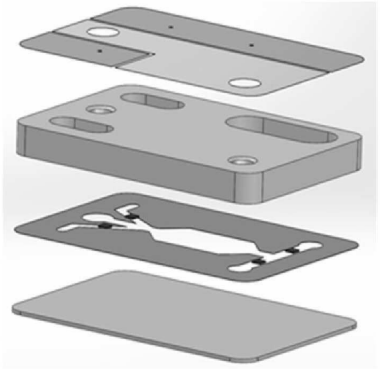
도면70

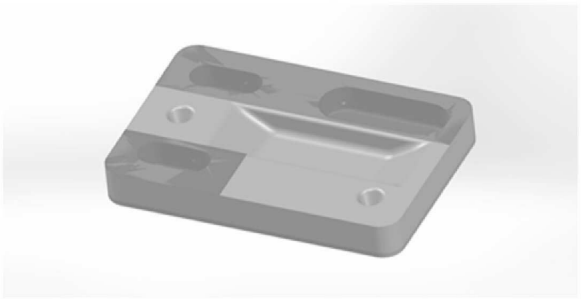


도면71

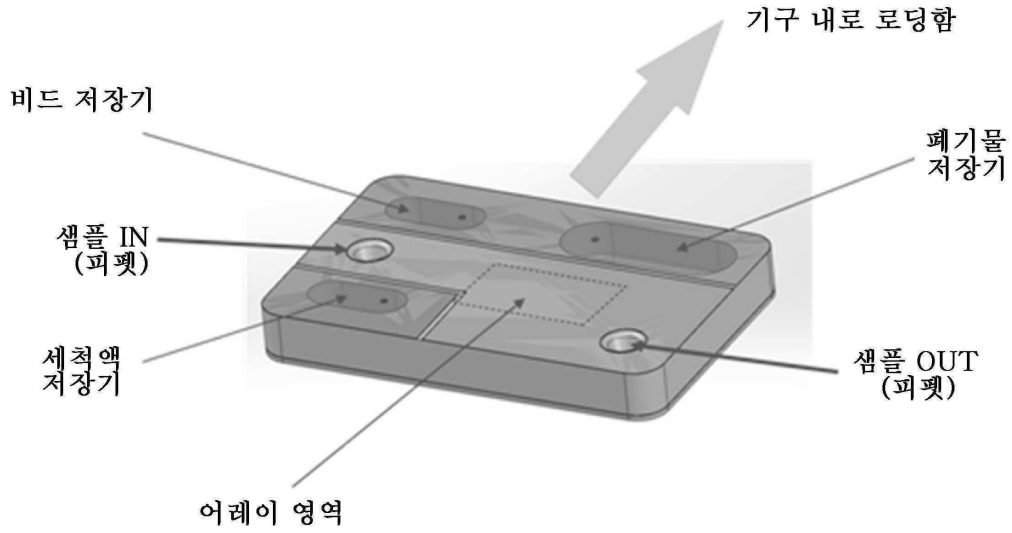


도면72

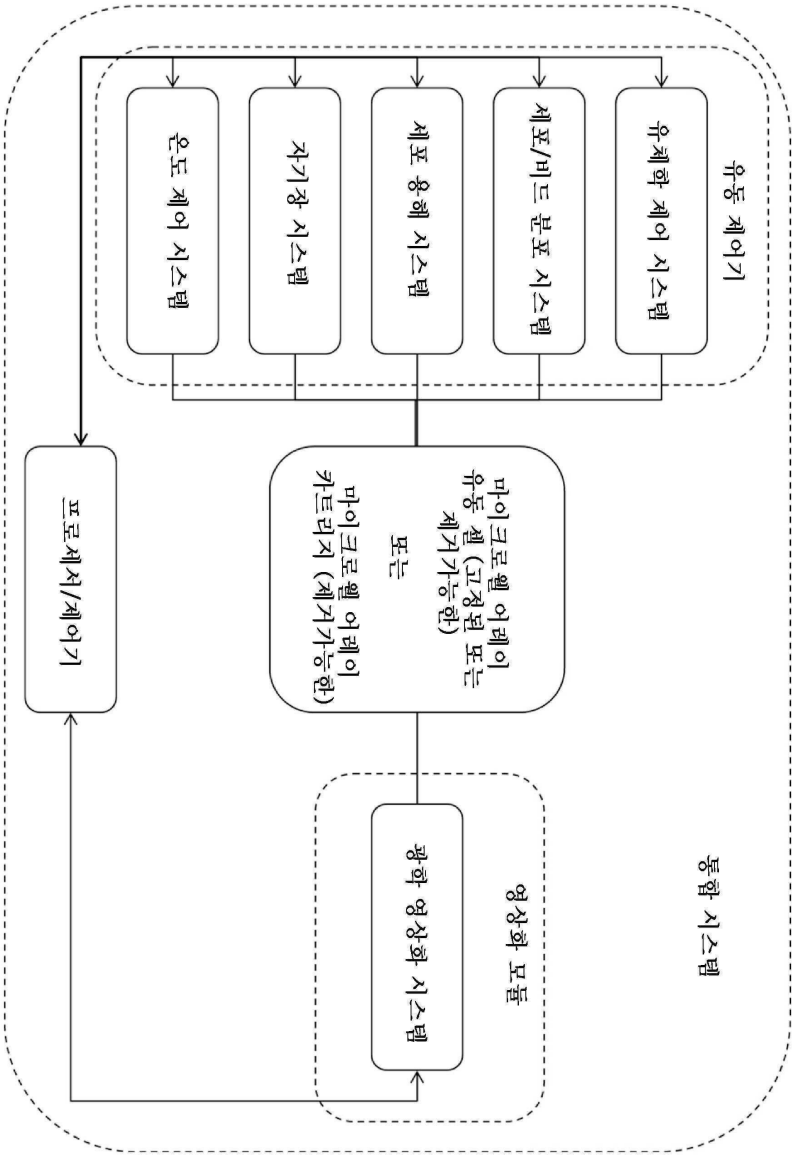




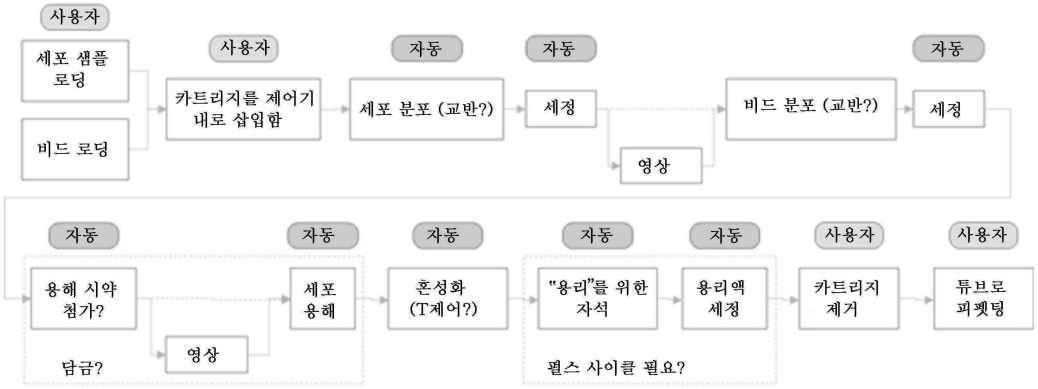
도면73



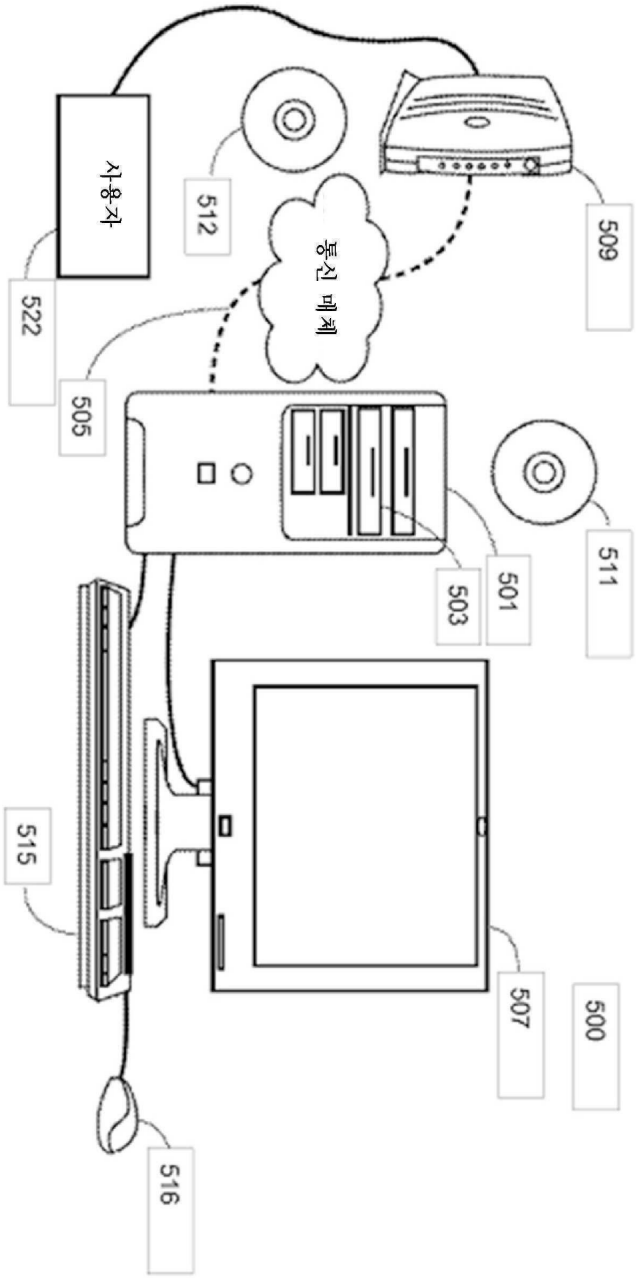
도면74


유동 제어기
온도 제어 시스템
자기장 시스템
세포 용해 시스템
세포/비드 분포 시스템
유체학 제어 시스템
프로세서/제어기
마이크로웰 어레이
유동 셀 (고정된 또는
제거가능한)
또는
마이크로웰 어레이
카트리지 (제거가능한)
영상화 모듈
광학 영상화 시스템
통합 시스템

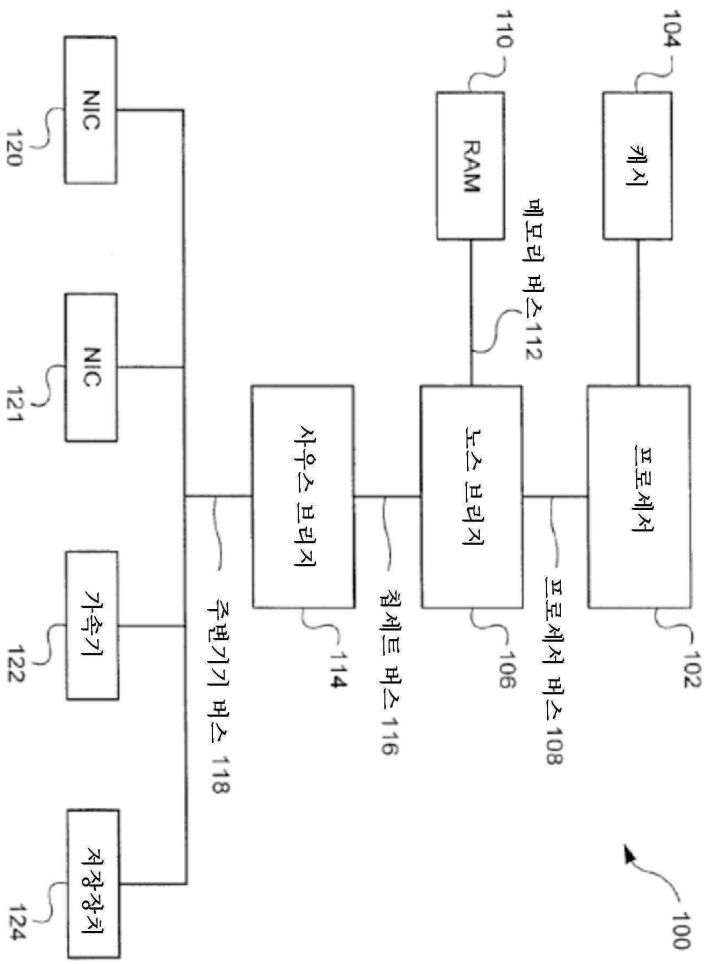
도면75


사용자
세포 샘플 로딩
비드 로딩
사용자
카트리지를 제어기 내로 삽입함
자동
세포 분포 (교반?)
자동
세정
영상
자동
비드 분포 (교반?)
자동
세정
자동
용해 시약 첨가?
담금?
영상
자동
세포 용해
자동
혼성화 (T제어?)
자동
"용리"를 위한 자석
펄스 사이클 필요?
자동
용리액 세정
사용자
카트리지 제거
사용자
튜브로 피펫팅

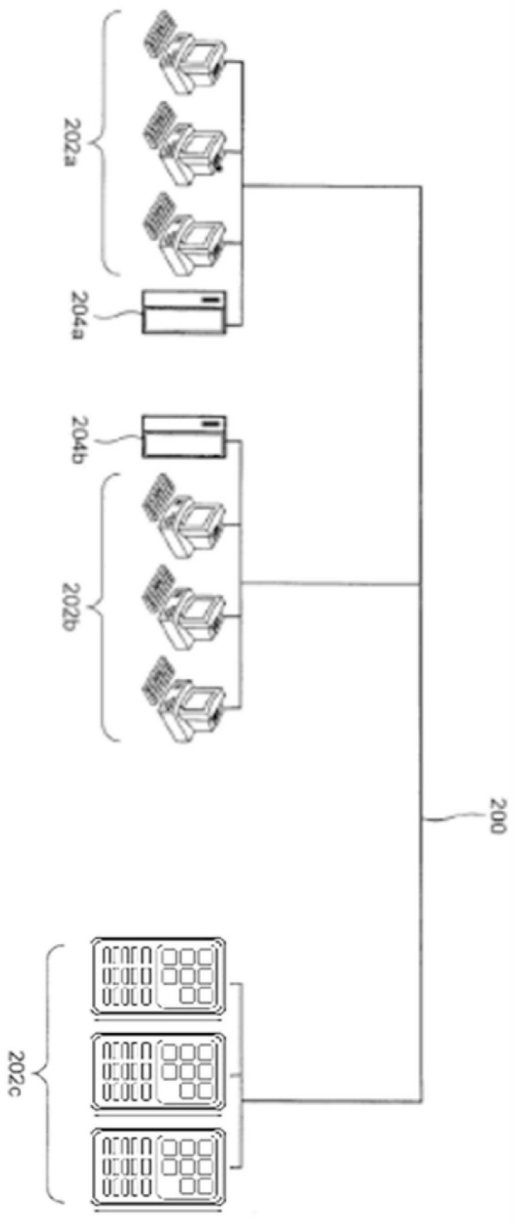
도면76



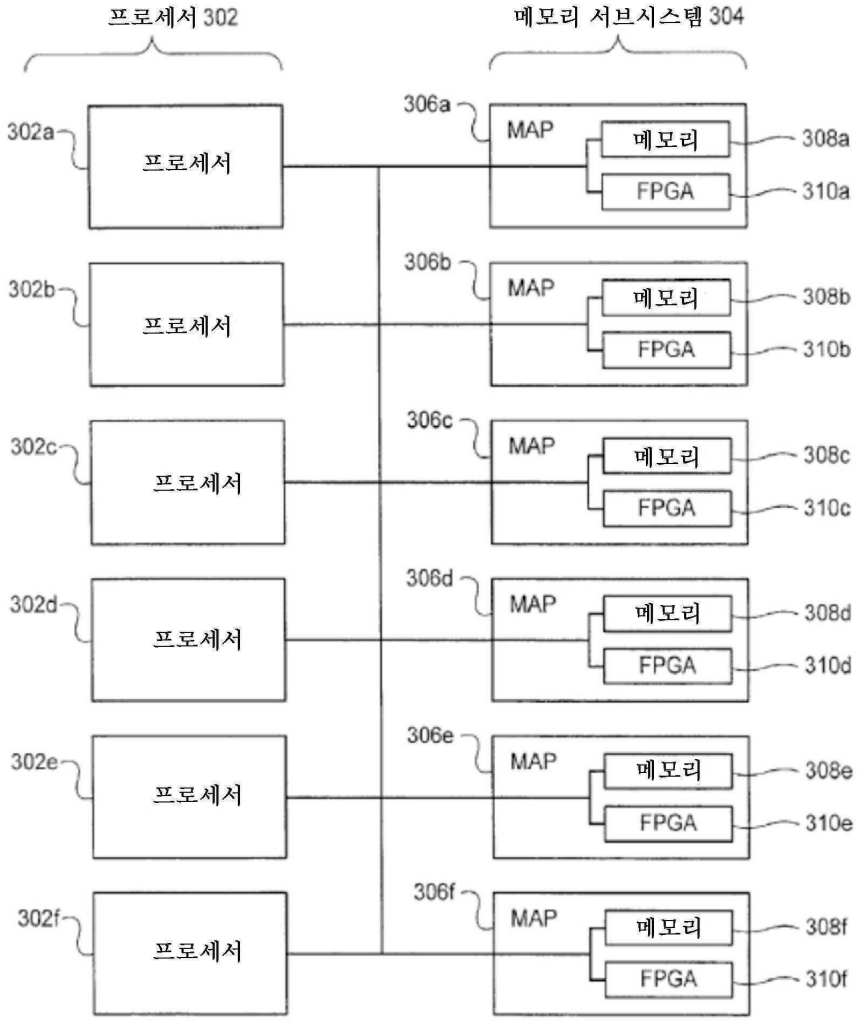
도면77


104
캐시
110
RAM
메모리 버스112
NIC
120
NIC
121
가속기
122
저장장치
124
사우스 브리지
114
노스 브리지
106
프로세서
102
주변기기 버스 118
칩세트 버스 116
프로세서 버스 108
100

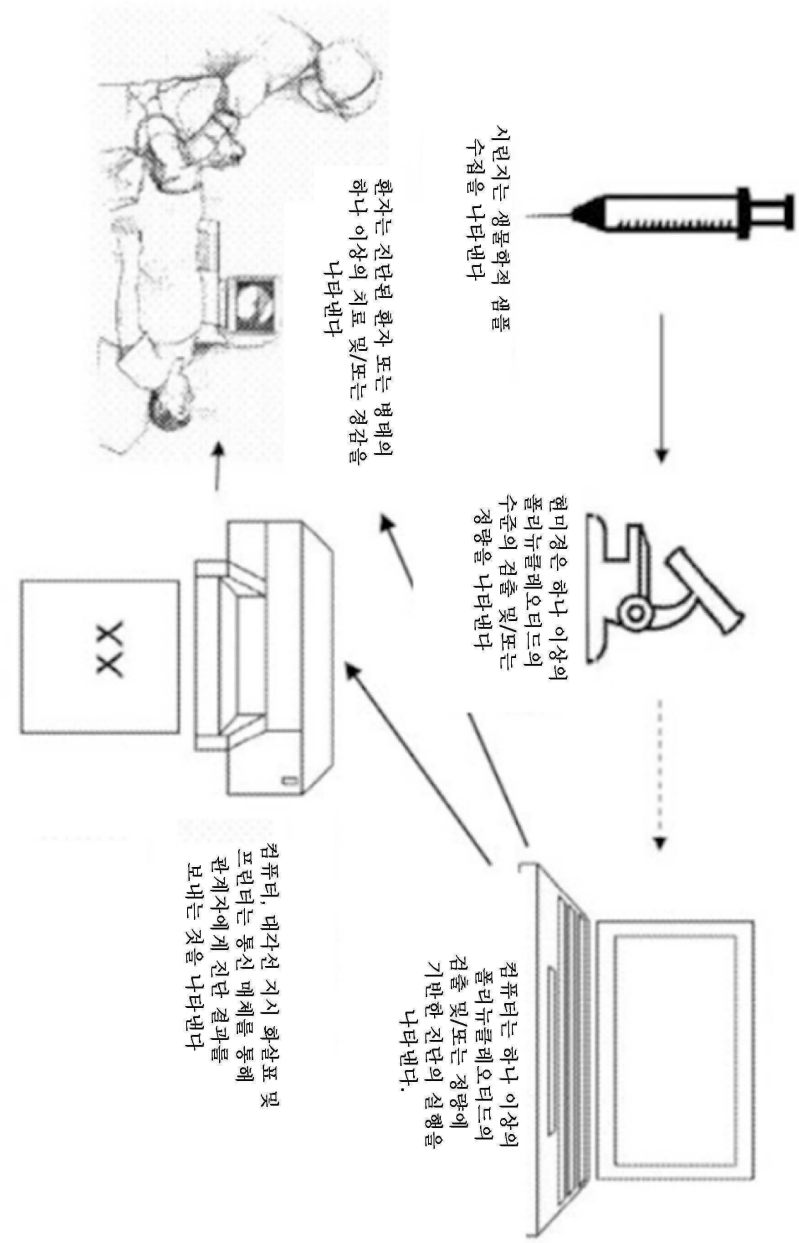
도면78



도면79


프로세서 302
메모리 서브시스템 304
302a
프로세서
306a
MAP
메모리
308a
FPGA
310a
302b
프로세서
306b
MAP
메모리
308b
FPGA
310b
302c
프로세서
306c
MAP
메모리
308c
FPGA
310c
302d
프로세서
306d
MAP
메모리
308d
FPGA
310d
302e
프로세서
306e
MAP
메모리
308e
FPGA
310e
302f
프로세서
306f
MAP
메모리
308f
FPGA
310f

도면80



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CELLULAR RESEARCH, INC.

<120> MASSIVELY PARALLEL SINGLE CELL ANALYSIS

<130> 41977-710.601

<140> PCT/US2014/053301

<141> 2014-08-28

<150> 62/012,237

<151> 2014-06-13

<150> 61/952,036

<151> 2014-03-12

<150> 61/871,232

<151> 2013-08-28

<160> 843

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<220><221> misc_feature

<
222> (1)..(18)

<223> /note="This sequence may encompass 12-18 nucleotides"

<400> 1

ttttttttt tttttttt 18

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 2

cccctggaag aagatgatga 20

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 3

cagacgtgtg ctcttccgat ctttctccaa caagttgcct cc 42

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 4

gaggaaatga agccaaacac a 21

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 5

cagacgtgtg ctcttccgat ctaatcgtga ccttaaaggc cc 42

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 6

ttagccacct catgcctttc 20

<210> 7

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 7

cagacgtgtg ctcttccgat ctctactgtg gtggctccgc t 41

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 8

ggaggaggat tgtgctgatg 20

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 9

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtgtccgc ataagaaaaa gaatc 45

<210> 10

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 10

gcaagaaggt gctgacttcc 20

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 11

cagacgtgtg ctcttccgat ctctgcatgt ggatcctgag aa 42

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 12

ctgcagtccc atcctcttgt 20

<210> 13

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 13

cagacgtgtg ctcttccgat ctgatgaggt ggagagtggg aa 42

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 14

ggacataaca gacttggaag ca 22

<210> 15

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 15

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaatccat tttgtaactg aaccttt 46

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 16

aagcctctgg gtcagtggt 19

<210> 17

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 17

cagacgtgtg ctcttccgat cttggaaaag ggatagaggt tgg 43

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400

> 18

tagacagatc cccgttcctg 20

<210> 19

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 19

cagacgtgtg ctcttccgat ctacagggag aagggataac cc 42

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 20

cagcatccca gccttgag 18

<210> 21

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 21

cagacgtgtg ctcttccgat ctcctcaatg gccttttgct ac 42

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 22

cctctaaact gccccacctc 20

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 23

cagacgtgtg ctcttccgat ctccttaatc gctgcctcta gg 42

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic primer"

<400> 24

cacatggccu ccaaggagua a 21

<210> 25

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 25

cagacgtgtg ctcttccgat ctcagcaaga gcacaagagg aa 42

<210> 26

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 26

gcagggtccc agtcctatg 19

<210> 27

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 27

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaatcat gaggaagatg ca 42

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 28

tccaggagga ttaccgaaaa 20

<210> 29

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 29

cagacgtgtg ctcttccgat ctccatccaa gggagagtga ga 42

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 30

aatggcaaag gaaggtggat 20

<210> 31

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 31

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcagacac cttggacatc ct 42

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 32

agatctgagc cagtcgctgt 20

<210> 33

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 33

cagacgtgtg ctcttccgat cttggtgcag agctgaagat ttt 43

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 34

aaaagtgggc ttgattctgc 20

<210> 35

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400

> 35

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttgttc gcatggtcac ac 42

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 36

atattccttt gggcctctgc 20

<210> 37

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 37

cagacgtgtg ctcttccgat cttcaagttt gggtctgtgc tg 42

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 38

cccccgaaaa tgttcaataa 20

<210> 39

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 39

cagacgtgtg ctcttccgat cttgctcttg tcataccccc a 41

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 40

tagcttcctc ctctggtggt 20

<210> 41

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 41

cagacgtgtg ctcttccgat cttttgcctt tccataatca ctca 44

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 42

ctggctctcc ccaatatcct 20

<210> 43

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 43

cagacgtgtg ctcttccgat ctgctctgag gactgcacca tt 42

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 44

gtggtgttgg ggtatggttt 20

<210> 45

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 45

cagacgtgtg ctcttccgat ctatacacag atgcccattg ca 42

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 46

agacaggtcc ttttcgatgg 20

<210> 47

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 47

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgcaat atgtgatgtg gc 42

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400

> 48

ttgagacagg cacatacagc tt 22

<210> 49

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 49

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgcttcc tcaatctgtc ca 42

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 50

ccccaaccac ttcattcttg 20

<210> 51

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 51

cagacgtgtg ctcttccgat ctttcaattc ctctgggaat gtt 43

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 52

tgcctagagg tgctcattca 20

<210> 53

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 53

cagacgtgtg ctcttccgat ctgttgatgc tggaggcaga at 42

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 54

agcctgggtc acagatcaag 20

<210> 55

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 55

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggtagga gggtggatgg ag 42

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 56

ccagcaccag ggagtttcta 20

<210> 57

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 57

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggaaagg attggaacag ca 42

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 58

gggtttcagg ttccaatcag 20

<210> 59

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 59

cagacgtgtg ctcttccgat cttttgtaac tttttgcaag gca 43

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 60

gtgaggagtg ggtccagaaa 20

<210> 61

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400

> 61

cagacgtgtg ctcttccgat ctagtgggga ggagcaggag 40

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 62

ccattccctt cttcctcctc 20

<210> 63

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 63

cagacgtgtg ctcttccgat cttacctaca agatcccgcg tc 42

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 64

ttggacatag cccaagaaca 20

<210> 65

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 65

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgcctc actggacttg tc 42

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 66

acctgaagct gaatgcctga 20

<210> 67

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 67

cagacgtgtg ctcttccgat ctctggaggc cacctcttct aa 42

<210> 68

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 68

ggtaaacacg cctgcaaac 19

<210> 69

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 69

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaggactc agaagcctct gg 42

<210> 70

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 70

caacaaagca cagtgttaaa tgaa 24

<210> 71

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 71

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgtcag ctactgcgga aa 42

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 72

tgagcagatc cacaggaaaa 20

<210> 73

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 73

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaaatgga gtctcaaagc ttca 44

<210> 74

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400

> 74

tcccaactac gctgatttga 20

<210> 75

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 75

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaccaaaa ggaatgtgtg gg 42

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 76

tgcaagagtg acagtggatt g 21

<210> 77

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 77

cagacgtgtg ctcttccgat cttcaaccaa ggtttgcttt tgt 43

<210> 78

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 78

agaggctgaa agaggccaat 20

<210> 79

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 79

cagacgtgtg ctcttccgat ctaatatggg ttgcatttgg tca 43

<210> 80

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 80

aaatctgcag aaggaaaaat gtg 23

<210> 81

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 81

cagacgtgtg ctcttccgat ctagttttca atgatgggcg ag 42

<210> 82

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 82

gctcaaggga gagctgaaga 20

<210> 83

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 83

cagacgtgtg ctcttccgat ctgactacct gcccccagag at 42

<210> 84

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 84

gtggcgtgta tgagtggaga 20

<210> 85

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 85

cagacgtgtg ctcttccgat ctcactcgcc cagagactca g 41

<210> 86

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 86

gcacatctca tggcagctaa 20

<210> 87

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400

> 87

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcttcaca aaccttgctc ct 42

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 88

acattttctg ccacccaaac 20

<210> 89

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 89

cagacgtgtg ctcttccgat ctaacagcac cctctccaga tg 42

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 90

gcctggtaga attggctttt c 21

<210> 91

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 91

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttgtag ccaacattca ttcaa 45

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 92

caattggcag ccctatttca 20

<210> 93

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 93

cagacgtgtg ctcttccgat ctgttcagca gactggtttg ca 42

<210> 94

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 94

ccgtgaggat gtcactcaga 20

<210> 95

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 95

cagacgtgtg ctcttccgat ctacgaggaa gccctaagac gt 42

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 96

ttgagcctgg ggtgtaagac 20

<210> 97

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 97

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtcttcca ggattcacgg tg 42

<210> 98

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 98

gagcacctcc tggaagattg 20

<210> 99

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 99

cagacgtgtg ctcttccgat cttaagcacc agtgggactg tg 42

<210> 100

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400

> 100

taggagcagg cctgagaaaa 20

<210> 101

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 101

cagacgtgtg ctcttccgat ctgattcctc tccaaaccca tg 42

<210> 102

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 102

tgttttgggg aaagttggag 20

<210> 103

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 103

cagacgtgtg ctcttccgat ctctgtttgc ccagtgtttg tg 42

<210> 104

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 104

tgcaacccaa ctgtgtgtta 20

<210> 105

<211

> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 105

cagacgtgtg ctcttccgat cttttcacca actgttctct gagc 44

<210> 106

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 106

gccctgagca acaatagcag 20

<210> 107

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 107

cagacgtgtg ctcttccgat ctttcagctc ttcactccag ca 42

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 108

aggaaaagat gtggctcacg 20

<210> 109

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 109

cagacgtgtg ctcttccgat ctggagttgg ggagaactgt ca 42

<210> 110

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 110

tcgaataatc cagggaaacc 20

<210> 111

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 111

cagacgtgtg ctcttccgat ctaccaaagc atcacgttga ca 42

<210> 112

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 112

ggctttacaa agctggcaat 20

<210> 113

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 113

cagacgtgtg ctcttccgat cttatgcctc ttcgattgct cc 42

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 114

ccttgagtgt gtctgcgtgt 20

<210> 115

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 115

cagacgtgtg ctcttccgat ctccacagaa ttgggttcca ag 42

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 116

aactgggaag gccaggtaac 20

<210> 117

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 117

cagacgtgtg ctcttccgat cttgttttca aattgccatt gc 42

<210> 118

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 118

ctttctccac gccatttgat 20

<210> 119

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 119

cagacgtgtg ctcttccgat ctactaggat atggggtggg ct 42

<210> 120

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 120

gggatctgct cgtcatcatt 20

<210> 121

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 121

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtttctgc ctctgaggga aa 42

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 122

gcgtgcgcgt tatttattta 20

<210> 123

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 123

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtctggg gaaggcaagt ta 42

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 124

gcagtcagcc agaaatcaca 20

<210> 125

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 125

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttctcc tctctgggac ca 42

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 126

tgaaaagtct ccctttccag a 21

<210> 127

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 127

cagacgtgtg ctcttccgat ctccttcaga cagattccag gc 42

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 128

ggagaggaga gatggggatt 20

<210> 129

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 129

cagacgtgtg ctcttccgat ctgagtgagt gccccttttc tt 42

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 130

ctcatgccaa caagaacctg 20

<210> 131

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 131

cagacgtgtg ctcttccgat cttgacccac acctgacact tc 42

<210> 132

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 132

tcgtggaaca caggcaaac 19

<210> 133

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 133

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgcattt gtactggcaa gg 42

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 134

tcaaggcaac cagaggaaac 20

<210> 135

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 135

cagacgtgtg ctcttccgat ctactaaggg atggggcagt ct 42

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 136

acctttcgt tggcatgtgt 20

<210> 137

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 137

cagacgtgtg ctcttccgat cttcagggaa aggactcacc tg 42

<210> 138

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 138

atgctgaagg catttcttgg 20

<210> 139

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 139

cagacgtgtg ctcttccgat ctctgtgagc atggtgcttc at 42

<210> 140

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 140

gaggggagtg gtgggtttat 20

<210> 141

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 141

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaaaaggg aaagggagga tt 42

<210> 142

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 142

aggggaaaac tcatgagcag 20

<210> 143

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 143

cagacgtgtg ctcttccgat cttcactgtg cctggaccat ag 42

<210> 144

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 144

ttgggcagaa agaaaaatgg 20

<210> 145

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 145

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaaaagat tccaccagac tgaa 44

<210> 146

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 146

cctcccccag tctctcttct 20

<210> 147

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 147

cagacgtgtg ctcttccgat ctgagtcagg ccgttgctag tc 42

<210> 148

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 148

ggctgatctt cccacaacac 20

<210> 149

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 149

cagacgtgtg ctcttccgat ctacgagggc aaagatgcta aa 42

<210> 150

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 150

attcccgtgt tgcttcaaac 20

<210> 151

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 151

cagacgtgtg ctcttccgat ctagaactgc cagcaggtag ga 42

<210> 152

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 152

cacttccctg ggacattctc 20

<210> 153

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 153

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcactct tctccaggcc ag 42

<210> 154

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 154

tgatgtctgt ctggctgagg 20

<210> 155

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 155

cagacgtgtg ctcttccgat ctccacacac agaggaagag ca 42

<210> 156

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 156

ccagcctgta ggaaaccaaa 20

<210> 157

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 157

cagacgtgtg ctcttccgat ctctccttct atctccaggg cc 42

<210> 158

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 158

ggatgcaggt ggtttttgat 20

<210> 159

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 159

cagacgtgtg ctcttccgat ctcattgtac ccattttaca ttttctt 47

<210> 160

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 160

caaaccttaa acacccagaa gc 22

<210> 161

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 161

cagacgtgtg ctcttccgat ctataacaat tcggcagttg gc 42

<210> 162

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 162

gaaccagttt cctcctgtgc 20

<210> 163

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 163

cagacgtgtg ctcttccgat ctaagatgtg gaggctgttg ct 42

<210> 164

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 164

gactgcggat ctctgtgtca 20

<210> 165

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 165

cagacgtgtg ctcttccgat cttctgcact attcctttgc cc 42

<210> 166

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 166

tcagtatgat cttgtgctgt gct 23

<210> 167

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 167

cagacgtgtg ctcttccgat cttacccatg aagattggtg gg 42

<210> 168

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 168

cacagcatga gaggctctgt 20

<210> 169

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 169
cagacgtgtg ctcttccgat cttctcagtt ccgatttccc ag 42
<210> 170
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 170
tcaggatctg aggtcccaac 20
<210> 171
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 171
cagacgtgtg ctcttccgat cttcacctgt gtatctcacg ca 42
<210> 172
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 172
agagctgtct agcccaggtg 20

<210> 173

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 173

cagacgtgtg ctcttccgat cttggtgtcc tttctctgct cc 42

<210> 174

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 174

cttaacgtgg gagtggaacc 20

<210> 175

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 175

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtgtgcaa atggcagcta ga 42

<210> 176

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 176

tctcagcttc caccaaggtt 20

<210> 177

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 177

cagacgtgtg ctcttccgat cttcactggg acacttttgc ct 42

<210> 178

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 178

caggggagag tgtggtgttt 20

<210> 179

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 179

cagacgtgtg ctcttccgat ctgacatgca ctcagctctt gg 42

<210> 180

<211

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 180

tgcatagttc ccatgttaaa tcc 23

<210> 181

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 181

cagacgtgtg ctcttccgat cttaccagga atggatgtcg ct 42

<210> 182

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 182

acatcctacg gtcccaaggt 20

<210> 183

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 183

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcagaagt gcaggcacct a 41

<210> 184

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 184

tgcatgatca aatgcaacct 20

<210> 185

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 185

cagacgtgtg ctcttccgat ctttggactt tgggcataaa aga 43

<210> 186

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 186

aaatcacggc agttttcagc 20

<210> 187

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 187

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcatctg tgcactctcc cc 42

<210> 188

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 188

gtgggaagag aagctgatgc 20

<210> 189

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 189

cagacgtgtg ctcttccgat cttcaagcat tatccacgtc ca 42

<210> 190

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 190

tgtgatgcca tatcaagtcc a 21

<210> 191

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 191

cagacgtgtg ctcttccgat cttcagtgta tgcgaaaagg ttttt 45

<210> 192

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 192

agcctctctt gggctttctt 20

<210> 193

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 193

cagacgtgtg ctcttccgat ctgttttccc tgcctggaac tt 42

<210> 194

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 194

ctttgctgct gaaggctcat 20

<210> 195

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 195

cagacgtgtg ctcttccgat ctacaagtgg tggtaaccct gg 42

<210> 196

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 196

tgcttcctaa aaagcgaggt 20

<210> 197

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 197

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaactagg gaggggggaaa ga 42

<210> 198

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 198

gcagccaacc taagcaagat 20

<210> 199

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 199

cagacgtgtg ctcttccgat ctatccagtt actgccggtt tg 42

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 200

gaatgctgca ggacttgaga 20

<210> 201

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 201

cagacgtgtg ctcttccgat ctacttcctt gagacacgga gc 42

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 202

acccagggac ttaatcagca 20

<210> 203

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 203

cagacgtgtg ctcttccgat ctgctgatga gacagcaacc att 43

<210> 204

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 204

gacatctttg ctgcctcca 19

<210> 205

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 205

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgagaag gacactcgct gc 42

<210> 206

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 206

ttaaggagtt cctgcagtcc a 21

<210> 207

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 207

cagacgtgtg ctcttccgat cttccactgg gcacagaact ta 42

<210> 208

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 208

tccttcgctt tgcttgtctt 20

<210> 209

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 209

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggtggaa aaatagatgc cagtc 45

<210> 210

<211

> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 210

cccggaagtc tatgcgttt 19

<210> 211

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 211

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggacatc tcggtgcagt g 41

<210> 212

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 212

tgtgtgaggt gtctggcttc 20

<210> 213

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 213

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggagcac cacgttctgg 40

<210> 214

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 214

cccggagaag tatgtgacca 20

<210> 215

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 215

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtacttcg cccacagcat c 41

<210> 216

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 216

ctgaacgagc tggtgacg 18

<210> 217

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 217

cagacgtgtg ctcttccgat ctagtacctg acttgggcat cc 42

<210> 218

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 218

caagggccca tcggtctt 18

<210> 219

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 219

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgtgaca aaactcacac atgc 44

<210> 220

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 220

caagggccca tcggtctt 18

<210> 221

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 221

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaaatatg gtcccccatg c 41

<210> 222

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 222

caagggccca tcggtctt 18

<210> 223

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 223

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcaaatgt tgtgtcgagt gc 42

<210> 224

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 224

caagggccca tcggtctt 18

<210> 225

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 225

cagacgtgtg ctcttccgat ctaccccact tggtgacaca ac 42

<210> 226

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 226

ccattccgca gtactccatt 20

<210> 227

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 227

cagacgtgtg ctcttccgat ctaaggaaaa gagcaaacgt gg 42

<210> 228

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 228

ttggttgact tcatggatgc 20

<210> 229

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 229

cagacgtgtg ctcttccgat ctggaaacag cacaaatgaa cttaa 45

<210> 230

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 230

catcatgcag ttcaacaagc 20

<210> 231

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 231

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgcactc tgtttgcgaa ga 42

<210> 232

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 232

gggtgtgttt ccatgtctca 20

<210> 233

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 233

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgaaagt gtgtgtgtcc gc 42

<210> 234

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 234

tcaggctgtt gcatgaagaa 20

<210> 235

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 235

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtatgccc ttgctggacc ta 42

<210> 236

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 236

atgcgcagta aaaactcgtg 20

<210> 237

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 237

cagacgtgtg ctcttccgat cttacagttc cacgctgagc tg 42

<210> 238

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 238

gcctgtactt tcagctgggt a 21

<210> 239

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 239

cagacgtgtg ctcttccgat ctaaggtgtt tgtgccattt gg 42

<210> 240

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 240

ggtgagctct gattgcttca 20

<210> 241

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 241

cagacgtgtg ctcttccgat cttatcagga ggcagggatc ac 42

<210> 242

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 242

gaccgggtca gtggtctct 19

<210> 243

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 243

cagacgtgtg ctcttccgat ctggtgatcc tgagccctga c 41

<210> 244

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 244

tgcagtgagc tgagatcgag 20

<210> 245

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 245

cagacgtgtg ctcttccgat ctatggaaaa catcctcatg gc 42

<210> 246

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic primer"

<400> 246

cacatggccu ccaaggagua a 21

<210> 247

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 247

cagacgtgtg ctcttccgat ctcagcaaga gcacaagagg aa 42

<210> 248

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 248

gcagggtccc agtcctatg 19

<210> 249

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 249

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaatcat gaggaagatg ca 42

<210> 250

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 250

taggagcagg cctgagaaaa 20

<210> 251

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 251

cagacgtgtg ctcttccgat ctgattcctc tccaaaccca tg 42

<210> 252

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 252

tccttcgctt tgcttgtctt 20

<210> 253

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 253

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggtggaa aaatagatgc cagtc 45

<210> 254

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 254

ggtaaacacg cctgcaaac 19

<210> 255

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 255

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaggactc agaagcctct gg 42

<210> 256

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 256

caacaaagca cagtgttaaa tgaa 24

<210> 257

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 257

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgtcag ctactgcgga aa 42

<210> 258

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 258

tgtgtgaggt gtctggcttc 20

<210> 259

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 259

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggagcac cacgttctgg 40

<210> 260

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 260

cccggagaag tatgtgacca 20

<210> 261

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 261

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtacttcg cccacagcat c 41

<210> 262

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 262

tccaggagga ttaccgaaaa 20

<210> 263

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 263

cagacgtgtg ctcttccgat ctccatccaa gggagagtga ga 42

<210> 264

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 264

agatctgagc cagtcgctgt 20

<210> 265

<211

> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 265

cagacgtgtg ctcttccgat cttggtgcag agctgaagat ttt 43

<210> 266

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 266

aaaagtgggc ttgattctgc 20

<210> 267

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 267

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttgttc gcatggtcac ac 42

<210> 268

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 268

tgagcagatc cacaggaaaa 20

<210> 269

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 269

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaaatgga gtctcaaagc ttca 44

<210> 270

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 270

cccccgaaaa tgttcaataa 20

<210> 271

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 271

cagacgtgtg ctcttccgat cttgctcttg tcataccccc a 41

<210> 272

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 272

atattccttt gggcctctgc 20

<210> 273

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 273

cagacgtgtg ctcttccgat cttcaagttt gggtctgtgc tg 42

<210> 274

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 274

ccccaaccac ttcattcttg 20

<210> 275

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 275

cagacgtgtg ctcttccgat ctttcaattc ctctgggaat gtt 43

<210> 276

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 276

aatggcaaag gaaggtggat 20

<210> 277

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 277

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcagacac cttggacatc ct 42

<210> 278

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 278

tgcatagttc ccatgttaaa tcc 23

<210> 279

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 279

cagacgtgtg ctcttccgat cttaccagga atggatgtcg ct 42

<210> 280

<211

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 280

aaatctgcag aaggaaaaat gtg 23

<210> 281

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 281

cagacgtgtg ctcttccgat ctagttttca atgatgggcg ag 42

<210> 282

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 282

tcgaataatc cagggaaacc 20

<210> 283

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 283
cagacgtgtg ctcttccgat ctaccaaagc atcacgttga ca 42
<210> 284
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 284
ctggctctcc ccaatatcct 20
<210> 285
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 285
cagacgtgtg ctcttccgat ctgctctgag gactgcacca tt 42
<210> 286
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 286
gcagccaacc taagcaagat 20
<210> 287
<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 287

cagacgtgtg ctcttccgat ctatccagtt actgccggtt tg 42

<210> 288

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 288

tgcctagagg tgctcattca 20

<210> 289

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 289

cagacgtgtg ctcttccgat ctgttgatgc tggaggcaga at 42

<210> 290

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 290

gacatctttg ctgcctcca 19

<210> 291

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 291

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgagaag gacactcgct gc 42

<210> 292

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 292

ttggacatag cccaagaaca 20

<210> 293

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 293

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgcctc actggacttg tc 42

<210> 294

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 294

aaatcacggc agttttcagc 20

<210> 295

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 295

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcatctg tgcactctcc cc 42

<210> 296

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 296

atgctgaagg catttcttgg 20

<210> 297

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 297

cagacgtgtg ctcttccgat ctctgtgagc atggtgcttc at 42

<210> 298

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 298

gactgcggat ctctgtgtca 20

<210> 299

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 299

cagacgtgtg ctcttccgat cttctgcact attcctttgc cc 42

<210> 300

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 300

ccgtgaggat gtcactcaga 20

<210> 301

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 301

cagacgtgtg ctcttccgat ctacgaggaa gccctaagac gt 42

<210> 302

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 302

agacaggtcc ttttcgatgg 20

<210> 303

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 303

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgcaat atgtgatgtg gc 42

<210> 304

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 304

tgttttgggg aaagttggag 20

<210> 305

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 305

cagacgtgtg ctcttccgat ctctgtttgc ccagtgtttg tg 42

<210> 306

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 306

acatcctacg gtcccaaggt 20

<210> 307

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 307

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcagaagt gcaggcacct a 41

<210> 308

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 308

agagctgtct agcccaggtg 20

<210> 309

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 309

cagacgtgtg ctcttccgat cttggtgtcc tttctctgct cc 42

<210> 310

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 310

tgacgtgtgt tgcttttgtg 20

<210> 311

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 311

cagacgtgtg ctcttccgat ctacttggga gaaaacaggg gt 42

<210> 312

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 312

gctttccact cccagctatg 20

<210> 313

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 313

cagacgtgtg ctcttccgat cttgctttga gtgctacgga ga 42

<210> 314

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 314

gggggaggga tgtgaagtta 20

<210> 315

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 315

cagacgtgtg ctcttccgat ctatcttgtc tgtgattccg gg 42

<210> 316

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 316

acagatgacc caatgcaatt c 21

<210> 317

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 317

cagacgtgtg ctcttccgat ctgagcacct gtgatatgtg cg 42

<210> 318

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 318

agaccgatgc acagtcttcc 20

<210> 319

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 319

cagacgtgtg ctcttccgat ctcttcacgt ctggcctcag tc 42

<210> 320

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 320

ggagcactca agtgtgacga 20

<210> 321

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 321

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttctat ggagccttcc ga 42

<210> 322

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 322

catccaattc ccaaggacag 20

<210> 323

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 323

cagacgtgtg ctcttccgat ctggtgaagg tgccgagcta ta 42

<210> 324

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 324

gctcttcctc aaaccacgaa 20

<210> 325

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 325

cagacgtgtg ctcttccgat ctcacactcc tttgcttagc cc 42

<210> 326

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 326

tcctcacacc acgaatctga 20

<210> 327

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 327

cagacgtgtg ctcttccgat ctcactcctt tgcttagccc ac 42

<210> 328

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 328

ccagctcacc tgttctccag 20

<210> 329

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 329

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaatcccg tacctgctgc t 41

<210> 330

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 330

ctaaaggact gccagccaag 20

<210> 331

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 331

cagacgtgtg ctcttccgat ctataacctg acactggacg gg 42

<210> 332

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 332

cacattcctg tgcattgagg 20

<210> 333

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 333

cagacgtgtg ctcttccgat ctatactcag ttcggaaggg gc 42

<210> 334

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 334

gaaggaggga gacatgagca 20

<210> 335

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 335

cagacgtgtg ctcttccgat ctactggtcc ttagccccat ct 42

<210> 336

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 336

tcagttggct gacttccaca 20

<210> 337

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 337

cagacgtgtg ctcttccgat ctttagtttg ggggttttgc tg 42

<210> 338

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 338

tcttggccag ggtagtaaga a 21

<210> 339

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 339

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtcagttc caatgaggtg gg 42

<210> 340

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 340

cgtccagacc ttgttcacac 20

<210> 341

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 341

cagacgtgtg ctcttccgat ctccacaaat agtgctcgct ttc 43

<210> 342

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 342

tagagggcca ggacatcatc 20

<210> 343

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 343

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgctcct tttgctatgc ct 42

<210> 344

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 344

tgctattgac cgatgcttca 20

<210> 345

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 345

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcaacggg ctacagcttt at 42

<210> 346

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 346

gctcttgttc ttgccgtttt 20

<210> 347

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 347

cagacgtgtg ctcttccgat ctgagtccct cagtggagca ag 42

<210> 348

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 348

cacaagcaca ttcatctctt cc 22

<210> 349

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 349

cagacgtgtg ctcttccgat ctattcaggg ccagcttcat aa 42

<210> 350

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 350

tacttcaagg gagccattcc 20

<210> 351

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 351

cagacgtgtg ctcttccgat cttttgtaac tgtgcagggc ag 42

<210> 352

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 352

agcaacgtgg agtcagtctg t 21

<210> 353

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 353

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcacctt ctcttgcctt gg 42

<210> 354

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 354

ttattttctg gggctgtcag a 21

<210> 355

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 355

cagacgtgtg ctcttccgat ctcattctgg cactcaggtg aa 42

<210> 356

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 356

tgatcaagca cctgagaacg 20

<210> 357

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 357

cagacgtgtg ctcttccgat cttaccagtg caccatctgc ac 42

<210> 358

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 358

tgcaaaaccc agaagctaaa a 21

<210> 359

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 359

cagacgtgtg ctcttccgat ctgttctgtg caaatggcat tc 42

<210> 360

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 360

agagctgtgt ggagctggat 20

<210> 361

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 361

cagacgtgtg ctcttccgat ctggagtctt ctgctttgct gg 42

<210> 362

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 362

gccctcttgc caggatattt 20

<210> 363

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 363

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcatgtaa gttgtccccc at 42

<210> 364

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 364

ctggcctctg ctcaactagc 20

<210> 365

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 365

cagacgtgtg ctcttccgat ctatggtaca agcaatgcct gc 42

<210> 366

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 366

cagcctcaag gggaaggtat 20

<210> 367

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 367

cagacgtgtg ctcttccgat cttgcttaac ccatggatcc tg 42

<210> 368

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 368

ccctgcagtc acagctacac 20

<210> 369

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 369

cagacgtgtg ctcttccgat cttcagggct ggtcttttag ga 42

<210> 370

<211

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 370

tgggataatg taaaactggt gct 23

<210> 371

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 371

cagacgtgtg ctcttccgat ctcatcccca tgatatttgg ga 42

<210> 372

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 372

agctagcctg agagggaacc 20

<210> 373

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 373

cagacgtgtg ctcttccgat cttcctccag accattcagg ac 42

<210> 374

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 374

ggctctgcct tgcactattt 20

<210> 375

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 375

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcttcct cccttccatg c 41

<210> 376

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 376

taaggcccaa agtgggtaca 20

<210> 377

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 377

cagacgtgtg ctcttccgat cttaggaagc acgaggaaag ga 42

<210> 378

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 378

accctctctc cctcccttc 20

<210> 379

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 379

cagacgtgtg ctcttccgat cttagttggc tatgctggca tg 42

<210> 380

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 380

gcctggtaga attggctttt c 21

<210> 381

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 381

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttgtag ccaacattca ttcaa 45

<210> 382

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 382

caggggagag tgtggtgttt 20

<210> 383

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 383

cagacgtgtg ctcttccgat ctactcagct cttggctcca ct 42

<210> 384

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 384

acatcaagct ccattgtttc g 21

<210> 385

<211

> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 385

cagacgtgtg ctcttccgat cttttgcctg cactctttgt agg 43

<210> 386

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 386

gcctggcacg taatagcttg 20

<210> 387

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 387

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggaaaga aatgcccttg gt 42

<210> 388

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 388

gaggatgtgt ggcattttca 20

<210> 389

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 389

cagacgtgtg ctcttccgat ctggttccta ggtgagcagg tg 42

<210> 390

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 390

agcaggctgt acacagcaga 20

<210> 391

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 391

cagacgtgtg ctcttccgat ctgacactag gcacattggc tg 42

<210> 392

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 392

actgtgccct catccagaac 20

<210> 393

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 393

cagacgtgtg ctcttccgat ctaacgacgc caaggtgata ct 42

<210> 394

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 394

tggtgaaatg cagagtcaat g 21

<210> 395

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 395

cagacgtgtg ctcttccgat cttcaggagg aaggcttaca cc 42

<210> 396

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 396

tgaattttgc ttggtggatg 20

<210> 397

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 397

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtcagtg gaagaagcag atg 43

<210> 398

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 398

cagtgagaat gagggccaag 20

<210> 399

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 399

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaatgagg gccaagaaag ag 42

<210> 400

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 400

aaaatgaaac cctccccaaa 20

<210> 401

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 401

cagacgtgtg ctcttccgat cttcctttgg agattaaggc cc 42

<210> 402

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 402

ctgcatcaat gctcaaggaa 20

<210> 403

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 403

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaaggct gctctgtttc tt 42

<210> 404

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 404

aaatcaagct cccaaggtca 20

<210> 405

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 405

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgaatg acttggtccc tg 42

<210> 406

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 406

atgccccaaa gcgattttt 19

<210> 407

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 407

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaaaggaa accaatgcca ct 42

<210> 408

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 408

tccctcattg aaagatgcaa 20

<210> 409

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 409

cagacgtgtg ctcttccgat cttagaatca ttaggccagg cg 42

<210> 410

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 410

tgcaagccat ttatgggaat 20

<210> 411

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 411

cagacgtgtg ctcttccgat ctccttgggt tttcttttca attc 44

<210> 412

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 412

atttccatgg tgctccagtc 20

<210> 413

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 413

cagacgtgtg ctcttccgat ctagagaagc agaagtcgct cg 42

<210> 414

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 414

ctgctggccc tgtacctg 18

<210> 415

<211

> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 415

cagacgtgtg ctcttccgat ctctccaccc tggccaagat 40

<210> 416

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 416

ttcagctgac ttggacaacc t 21

<210> 417

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 417

cagacgtgtg ctcttccgat ctggacaacc tgactggctt tg 42

<210> 418

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 418

gggtgttggt gaacttggtt 20

<210> 419

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 419

cagacgtgtg ctcttccgat cttttaatat ggatgccgtg gg 42

<210> 420

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 420

gttgcccagt gtgtttctga 20

<210> 421

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 421

cagacgtgtg ctcttccgat ctaaccaggc aacttgggaa ct 42

<210> 422

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 422

ccattccgca gtactccatt 20

<210> 423

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 423

cagacgtgtg ctcttccgat ctaaggaaaa gagcaaacgt gg 42

<210> 424

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 424

ttggttgact tcatggatgc 20

<210> 425

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 425

cagacgtgtg ctcttccgat ctggaaacag cacaaatgaa cttaa 45

<210> 426

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 426

catcatgcag ttcaacaagc 20

<210> 427

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 427

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgcactc tgtttgcgaa ga 42

<210> 428

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 428

gggtgtgttt ccatgtctca 20

<210> 429

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 429

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgaaagt gtgtgtgtcc gc 42

<210> 430

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 430

tcaggctgtt gcatgaagaa 20

<210> 431

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 431

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtatgccc ttgctggacc ta 42

<210> 432

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 432

atgcgcagta aaaactcgtg 20

<210> 433

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 433

cagacgtgtg ctcttccgat cttacagttc cacgctgagc tg 42

<210> 434

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 434

gcctgtactt tcagctgggt a 21

<210> 435

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 435

cagacgtgtg ctcttccgat ctaaggtgtt tgtgccattt gg 42

<210> 436

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 436

ggtgagctct gattgcttca 20

<210> 437

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 437

cagacgtgtg ctcttccgat cttatcagga ggcagggatc ac 42

<210> 438

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 438

gaccgggtca gtggtctct 19

<210> 439

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 439

cagacgtgtg ctcttccgat ctggtgatcc tgagccctga c 41

<210> 440

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 440

tgcagtgagc tgagatcgag 20

<210> 441

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 441

cagacgtgtg ctcttccgat ctatggaaaa catcctcatg gc 42

<210> 442

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<220><221> source

<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

primer"

<400> 442

cacatggccu ccaaggagua a 21

<210> 443

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 443

cagacgtgtg ctcttccgat ctcagcaaga gcacaagagg aa 42

<210> 444

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 444

gacttcaaca gcgacaccca 20

<210> 445

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 445

cagacgtgtg ctcttccgat ctgccctcaa cgaccacttt gt 42

<210> 446

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 446

gaaaacgcat cctggaccca 20

<210> 447

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 447

cagacgtgtg ctcttccgat cttgatgtca ttgccactct gct 43

<210> 448

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 448

aagttgtccc ccatcccaaa 20

<210> 449

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 449

cagacgtgtg ctcttccgat ctctggggat ggactgggta aat 43

<210> 450

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 450

actgctgtcc caaacatgca 20

<210> 451

<211

> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 451

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgcctgc ccattggaga gaa 43

<210> 452

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 452

ccaccatctt tgcaggttgc 20

<210> 453

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 453

cagacgtgtg ctcttccgat ctgctgtcca gttcccagaa gg 42

<210> 454

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 454

ctgggagagg gggtagctag 20

<210> 455

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 455

cagacgtgtg ctcttccgat ctaccacttc cctcagtccc aa 42

<210> 456

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 456

acagaagcag cgtcagtacc 20

<210> 457

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 457

cagacgtgtg ctcttccgat ctgggtctct tgagtcccgt g 41

<210> 458

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 458

ggggagagtg tggtgtttcc 20

<210> 459

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 459

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcttggc tccactggga tg 42

<210> 460

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 460

atcaatggtc caagccgcat 20

<210> 461

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 461

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggtcaca gatcttcccc cg 42

<210> 462

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 462

ctttccagtc ctacggagcc 20

<210> 463

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 463

cagacgtgtg ctcttccgat cttgctctga accccaatcc tc 42

<210> 464

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 464

accatcacag gcatgttcct 20

<210> 465

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 465

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtagatg acctggcttg cc 42

<210> 466

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 466

gcatctcatg agtgccaagc 20

<210> 467

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 467

cagacgtgtg ctcttccgat ctcctgcccc cagacctttt atc 43

<210> 468

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 468

tgcagagcct tgtcgttaca 20

<210> 469

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 469

cagacgtgtg ctcttccgat ctcgtgacag agtgcctttt cg 42

<210> 470

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 470

aggtgaagat gacagtgcag g 21

<210> 471

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 471

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggccctc ttgtgtgtaa ca 42

<210> 472

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 472

ggaaccatgt gccaagttgc 20

<210> 473

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 473

cagacgtgtg ctcttccgat ctcctttgtt gtgcgagggt gt 42

<210> 474

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 474

agtgttgctg acagtgcaga 20

<210> 475

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 475

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaaagaa gacacagacc ggt 43

<210> 476

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 476

ttgccacaaa gcctggaatc 20

<210> 477

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 477

cagacgtgtg ctcttccgat ctaaagcaac cttgtcccgc ct 42

<210> 478

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 478

ggagtccagc gaatgacgtc 20

<210> 479

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 479

cagacgtgtg ctcttccgat ctcatggcca cgttgtcatt gt 42

<210> 480

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 480

caacacccag gggatcagtg 20

<210> 481

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 481

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaccctc cacaggaaat tg 42

<210> 482

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 482

agctgtacca gggggagag 19

<210> 483

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 483

cagacgtgtg ctcttccgat ctctttggag aagacagtgg cga 43

<210> 484

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 484

ggaagacagc cagatccagt g 21

<210> 485

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 485

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgtgcag accaagagca cc 42

<210> 486

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 486

gggctgagaa tgaggcagtt 20

<210> 487

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 487

cagacgtgtg ctcttccgat ctggaaagcg acaagggtga ac 42

<210> 488

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 488

acttaacagc tgcaggggc 19

<210> 489

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 489

cagacgtgtg ctcttccgat ctactaactt gaaccgtgtt taagg 45

<210> 490

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 490

ttataaccat cagcccgcca 20

<210> 491

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 491

cagacgtgtg ctcttccgat ctagaaaagg ggctggaaag gg 42

<210> 492

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 492

accaaagcat cacgttgaca t 21

<210> 493

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 493

cagacgtgtg ctcttccgat ctacatgtga atgttgagcc ca 42

<210> 494

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 494

ctcttcagca tcccccgtac 20

<210> 495

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 495

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcccccaa atgaaagctt ga 42

<210> 496

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 496

ggagagcgtc cattccagtg 20

<210> 497

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 497

cagacgtgtg ctcttccgat ctatccacct gaagctgcac c 41

<210> 498

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 498

aatgtaccag ccagtcagcg 20

<210> 499

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 499

cagacgtgtg ctcttccgat ctggttttgg tggagctgac ga 42

<210> 500

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 500

tttactcatc gggcagccac 20

<210> 501

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 501

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtttgcc cagtgtttgt gc 42

<210> 502

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 502

gctgtagaca ggtccttttc g 21

<210> 503

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 503

cagacgtgtg ctcttccgat ctagtgttgg aaaatgtgca atatgtg 47

<210> 504

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 504

gggtctggtg ggcatcatta 20

<210> 505

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 505

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcctcttc gattgctccg ta 42

<210> 506

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 506

aggtcaatgc cagagacgga 20

<210> 507

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 507

cagacgtgtg ctcttccgat ctatcagcat acctttattg tgatctatc 49

<210> 508

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 508

tggcatgtga gtcattgctc 20

<210> 509

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 509

cagacgtgtg ctcttccgat ctttttgatg tgaggggcgg at 42

<210> 510

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 510

tacttttcg cctcccaggg 20

<210> 511

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 511

cagacgtgtg ctcttccgat cttcctgccc caccaagatc at 42

<210> 512

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 512

tgccacggcc tttccttaaa 20

<210> 513

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 513

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgtctaa gtgcaaccgc ct 42

<210> 514

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 514

ctcctgacag aaggtgccac 20

<210> 515

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 515

cagacgtgtg ctcttccgat ctggtgattg gaccaggcca tt 42

<210> 516

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 516

gactggctac gtagttcggg 20

<210> 517

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 517

cagacgtgtg ctcttccgat cttttgctta gaaggatggc gc 42

<210> 518

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 518

agctacggaa ctcttgtgcg 20

<210> 519

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 519

cagacgtgtg ctcttccgat ctcaaccttg gctgagtctt ga 42

<210> 520

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 520

tcagtcttta ggggttgggc 20

<210> 521

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 521

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgtgcat ttcaatccca cgtac 45

<210> 522

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 522

ccagtctagt ttctgggcag g 21

<210> 523

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 523

cagacgtgtg ctcttccgat ctatgtaaac cattgctgtg ccatt 45

<210> 524

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 524

ccagttcttc ctgacaccgg 20

<210> 525

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 525

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaaagtt tgcagcctat acc 43

<210> 526

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 526

accaaccaga ccaggactta 20

<210> 527

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 527

cagacgtgtg ctcttccgat cttcactagg agacgtggaa ttg 43

<210> 528

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 528

cacccgtcca gaccttgtt 19

<210> 529

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 529

cagacgtgtg ctcttccgat cttgttttcc tcttaacgtt agaccac 47

<210> 530

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 530
tgcaagagtg acagtggatt g 21
<210> 531
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 531
cagacgtgtg ctcttccgat ctgctgatat tctgcaacac tgtaca 46
<210> 532
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 532
tgtcctcacg gtgcctttt 19
<210> 533
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 533
cagacgtgtg ctcttccgat ctgtaggcag acacagggac tt 42
<210> 534
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 534

cctcaagggg gactgtcttt c 21

<210> 535

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 535

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcatatcc tgagccatcg gt 42

<210> 536

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 536

attgctggta gagaccccca 20

<210> 537

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 537

cagacgtgtg ctcttccgat ctcccccatt tccccgatgt 40

<210> 538

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 538

cccagccagc tgtggtattc 20

<210> 539

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 539

cagacgtgtg ctcttccgat cttggaactg aactgagctg ct 42

<210> 540

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 540

ctaggcagcc aacctaagca 20

<210> 541

<211
> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 541

cagacgtgtg ctcttccgat ctcctgcaat ctgagccagt gc 42

<210> 542

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 542

agtggacctt aggccttcct 20

<210> 543

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 543

cagacgtgtg ctcttccgat ctggctcaga catgttttcc gtg 43

<210> 544

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 544

tcacttaaga cccagggact t 21

<210> 545

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 545
cagacgtgtg ctcttccgat ctaagcatca tctcaacact gactt 45
<210> 546
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 546
accatgagaa ggacactcgc 20
<210> 547
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 547
cagacgtgtg ctcttccgat ctcgggcttg aattcctgtc ct 42
<210> 548
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 548
cggcaaatgt agcatgggc 19

<210> 549

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 549

cagacgtgtg ctcttccgat ctggaaagtg gctatgcagt ttg 43

<210> 550

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 550

ggcatcctcc acaatagcag a 21

<210> 551

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 551

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcattttg gtccaagttg tgc 43

<210> 552

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 552

cttaaagccc gcctgacaga 20

<210> 553

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 553

cagacgtgtg ctcttccgat ctacattctg atgagcaacc gc 42

<210> 554

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 554

acagacgact ttgagcctcg 20

<210> 555

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 555

cagacgtgtg ctcttccgat ctatttcacc ttttcctgcg gc 42

<210> 556

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 556

ggagccaagg gttcagagac 20

<210> 557

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 557

cagacgtgtg ctcttccgat cttgctacct cactggggtc ct 42

<210> 558

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 558

ggccatctct tcctttcgga 20

<210> 559

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 559

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtgtggga actctgccgt g 41

<210> 560

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 560

ctcaccccat catccctttc c 21

<210> 561

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 561

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcccagtg agactgtgtt gt 42

<210> 562

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 562

tactgacggc atgttaggtg 20

<210> 563

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 563

cagacgtgtg ctcttccgat cttgtgtgtg gagtgggatg tg 42

<210> 564

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 564

aggcagggag gggactattt 20

<210> 565

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 565

cagacgtgtg ctcttccgat ctggagaaac agagacaggc cc 42

<210> 566

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 566

gcagtgagaa tgagggcca 19

<210> 567

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 567

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggcatac tgacactttg cc 42

<210> 568

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 568

agccagtcca ggagtgagac 20

<210> 569

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 569

cagacgtgtg ctcttccgat ctggccacac tgaccctgat ac 42

<210> 570

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 570

cccaaggtca agatcgccac 20

<210> 571

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 571

cagacgtgtg ctcttccgat ctctgccagc tccagaagat gt 42

<210> 572

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 572

tgggaagcca aactccatca t 21

<210> 573

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 573

cagacgtgtg ctcttccgat ctggaaacca atgccacttt tgt 43

<210> 574

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 574

gccttcaaga ctgaacaccg a 21

<210> 575

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 575

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcccctca gagatcaaca gac 43

<210> 576

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 576

ttggagaagg tgctggtgac 20

<210> 577

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 577

cagacgtgtg ctcttccgat ctcttaccca gtgctctgca ac 42

<210> 578

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 578

tattcctttg cccggcatca 20

<210> 579

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 579

cagacgtgtg ctcttccgat ctaccttggg cactgttgaa gt 42

<210> 580

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 580

acttgcacat catggagggt 20

<210> 581

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 581

cagacgtgtg ctcttccgat cttccataag ctattttggt ttagtgc 47

<210> 582

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 582

ggtccctcca aaccgttgtc 20

<210> 583

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 583

cagacgtgtg ctcttccgat ctgaactagg gaggggggaaa gaag 44

<210> 584

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 584

tgggagttga tcgcctttcc 20

<210> 585

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 585

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcattct gaaggagccc cat 43

<210> 586

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 586

tggactggtt gttgccaaac 20

<210> 587

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 587

cagacgtgtg ctcttccgat ctctctgaga gttcccctgt cc 42

<210> 588

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 588

ttcctcctca tcaccatcgc 20

<210> 589

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 589

cagacgtgtg ctcttccgat ctcttaccac ccctcagagt gc 42

<210> 590

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 590

gaagctgaat gcctgagggg 20

<210> 591

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 591

cagacgtgtg ctcttccgat ctgtcccatc tgctatgccc a 41

<210> 592

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 592

gagtgctgcc tggagtactt 20

<210> 593

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 593

cagacgtgtg ctcttccgat ctctcacccc agactcctga ct 42

<210> 594

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 594

gctatggtga gccgtgattg 20

<210> 595

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 595

cagacgtgtg ctcttccgat cttcctcacc cccacctctc ta 42

<210> 596

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 596

gacctcagag gcctcctact 20

<210> 597

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 597

cagacgtgtg ctcttccgat ctccaatatc ctcgctcccg g 41

<210> 598

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 598

ttcaggactc cctccagcat 20

<210> 599

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 599

cagacgtgtg ctcttccgat ctaggtacca aatgcctgtg cc 42

<210> 600

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 600

tgaacttcag ggagggtggt 20

<210> 601

<211

> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 601

cagacgtgtg ctcttccgat cttcctcgta tgcatggaac cc 42

<210> 602

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 602

ccaaagggaa gagtgcaggg 20

<210> 603

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 603

cagacgtgtg ctcttccgat ctattctgta taacactcat atctttgcc 49

<210> 604

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 604

agaatcatta ggccaggcgt g 21

<210> 605

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 605

cagacgtgtg ctcttccgat ctctggccaa tatgctgaaa ccc 43

<210> 606

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 606

atttgaggct gcagtgagct 20

<210> 607

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 607

cagacgtgtg ctcttccgat ctagacaaga gctggctcac ct 42

<210> 608

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 608

cctccccagc ctttgatcag 20

<210> 609

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 609

cagacgtgtg ctcttccgat cttcctcgca agctgggtaa tc 42

<210> 610

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 610

ccagcaccag ggagtttcta 20

<210> 611

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 611

cagacgtgtg ctcttccgat ctacagcatg tcacaaggct gt 42

<210> 612

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 612

aggcagatgg aacttgagcc 20

<210> 613

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 613

cagacgtgtg ctcttccgat ctgcattcga agatccccag actt 44

<210> 614

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 614

tccccatcgt cctccttgtc 20

<210> 615

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 615

cagacgtgtg ctcttccgat ctttgccggc tctccagagt a 41

<210> 616

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 616

gttcccatgt taaatcccat tcat 24

<210> 617

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 617

cagacgtgtg ctcttccgat cttaccagga atggatgtcg ctaatca 47

<210> 618

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 618

accctctctc cctcccttc 20

<210> 619

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 619

cagacgtgtg ctcttccgat cttagttggc tatgctggca tg 42

<210> 620

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 620

ccccaaccac ttcattcttg 20

<210> 621

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 621

cagacgtgtg ctcttccgat ctttcaattc ctctgggaat gtt 43

<210> 622

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 622

cctcccccag tctctcttct 20

<210> 623

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 623

cagacgtgtg ctcttccgat ctgagtcagg ccgttgctag tc 42

<210> 624

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 624

ctgcctcggt gagttttctc 20

<210> 625

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 625

cttcccgtta cggttttgac 20

<210> 626

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 626

aaaaccggat taggccatta 20

<210> 627

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 627

tctcgtcatg accgaaaaag 20

<210> 628

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 628

caacgcctac aaaagccagt 20

<210> 629

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 629

gtggcaaagc aaaagttcaa 20

<210> 630

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 630

tgagaaagcg tttgatgatg ta 22

<210> 631

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 631

gccagtttat cccgtcaaag 20

<210> 632

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 632

cttcccgtta cggttttgac 20

<210> 633

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 633

aaaaccggat taggccatta 20

<210> 634

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 634

tctcgtcatg accgaaaaag 20

<210> 635

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 635

caacgcctac aaaagccagt 20

<210> 636

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 636

ttgactttgc cttggagagc 20

<210> 637

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 637

tttttcttac agtgtcttgg cata 24

<210> 638

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 638

cgtgacccta agcgaggag 19

<210> 639

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 639

tttgcagtga tttgaagacc a 21

<210> 640

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 640

ggcattcctt cttctggtca 20

<210> 641

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 641
ctgggctata tacagtcctc aaa 23
<210> 642
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 642
ggggtgatta tgaccagttg a 21
<210> 643
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 643
tgcatgatca aatgcaacct 20

<210> 644
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 644
tcttccgaaa aatcctcttc c 21
<210> 645

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 645

ctggggtccc agtcctatg 19

<210> 646

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 646

tgtactggga aggcaatttc a 21

<210> 647

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 647

gagccgctgg ggttactc 18

<210> 648

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 648

cagttagttg ctgcacatgg a 21

<210> 649

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 649

ttgcatttct tttggggaag 20

<210> 650

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 650

gtcatgcatg cagatggaag 20

<210> 651

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 651

gctgcagtga gctgtgatgt 20

<210> 652

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 652

gttcctctcc gagctcacc 19

<210> 653

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 653

tccgaaagtt tccaattcca 20

<210> 654

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 654

ttgtttggga gactctgcat t 21

<210> 655

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 655

gaccccactt ggactggtag 20

<210> 656

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 656

gtgatcttga ttgcggcttt 20

<210> 657

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 657

gggggaaaaa ctacaagtgc 20

<210> 658

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 658

tgattccttt tcctgcctgt 20

<210> 659

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 659

aaaaacctcc aggccagact 20

<210> 660

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 660

aatcaaaata acgccccaga 20

<210> 661

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 661

ttgctaaaaa ttggcagagc 20

<210> 662

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 662

ttgttaagtg ccaaacaaag ga 22

<210> 663

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 663

aagctgggaa gagcaaagc 19

<210> 664

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 664

aggacagagg gtggtcgtc 19

<210> 665

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 665

tgagtgctgt ctccatgttt g 21

<210> 666

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 666

cctcacagct gttgctgtta tt 22

<210> 667

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 667

aaaacaccca gctaggacca 20

<210> 668

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 668

aactgaggca cgagcaaagt 20

<210> 669

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 669

gctttatggg tggatgctga 20

<210> 670

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 670

ataatatcgc cagcctcagc 20

<210> 671

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 671

tccagagtgt gctggatgac 20

<210> 672

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 672

tgcaagccat ttatgggaat 20

<210> 673

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 673

tggaatgagg tctcttagta cagtt 25

<210> 674

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 674

tcccagaaac acctgtaagg a 21

<210> 675

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 675

tgtctaggca ggacctgtgg 20

<210> 676

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 676

agtgatgctg cgactcacac 20

<210> 677

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 677

ggctcagaaa gtctctcttt cc 22

<210> 678

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 678

ctcccaaact caggctttca 20

<210> 679

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 679

aaagcgctgg gattacagg 19

<210> 680

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 680

cgtccagttg cttggagaag 20

<210> 681

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 681

aataaccttg gctgccgtct 20

<210> 682

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 682

gggaattctc agtgccaact 20

<210> 683

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 683

gcatcctggg ctacactgag 20

<210> 684

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 684

tgctgggaac aatgactata aga 23

<210> 685

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 685

gcctaaaaca ctttgggtgg t 21

<210> 686

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 686

gggtgcccac aaaatagaga 20

<210> 687

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 687

gagactgggt ctcgctttgt 20

<210> 688

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 688

tggggaaggc tttctctagg 20

<210> 689

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 689

ttcaacttga gtgatctgag ctg 23

<210> 690

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 690

tatgggcaac cctaaggtga 20

<210> 691

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 691

cgctgcgaca ctacatcaac 20

<210> 692

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 692

tggagtcttg ctctgtcacc 20

<210> 693

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 693

acgaggtgaa ggagcaggt 19

<210> 694

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 694

cgatgccttt gggtagagag 20

<210> 695

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 695

actgatcgtc caaggactgg 20

<210> 696

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 696

aaaaagaaat ctggtcttgt tagaaaa 27

<210> 697

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 697

ttgaaaagtg gtaaggaatt gtga 24

<210> 698

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 698

caccaagaat tgattttgta gcc 23

<210> 699

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 699

aaaaatgggg gaaaatggtg 20

<210> 700

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 700

catggttgaa accccatctc 20

<210> 701

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 701

ttcaaagcct ccacgactct 20

<210> 702

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 702

gctggaacag gtgcctaaag 20

<210> 703

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 703

ccctaaggga acgacactca 20

<210> 704

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 704

acctgctaca agccctgga 19

<210> 705

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 705

ggatccctaa gaccgtggag 20

<210> 706

<211

> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 706

ccacctcaga ggctccaa 18

<210> 707

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 707

tgctgtattt taaaagaatg attatga 27

<210> 708

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 708

gtagctggga cgctggttta 20

<210> 709

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 709

attcccttcc ccctacaaga 20

<210> 710

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 710

cctgagtgca acgacatcac 20

<210> 711

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 711

gggggaacca gcagaaat 18

<210> 712

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 712

gacctagggc gagggttc 18

<210> 713

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 713

aattcctgaa gccagatcca 20

<210> 714

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 714

aaaatgttta ttgttgtagc tctgg 25

<210> 715

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 715

tttcaagagc tcaacagatg aca 23

<210> 716

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 716

gactgcccgg acaagtttt 19

<210> 717

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 717

gagaaggtgc cccaaaatg 19

<210> 718

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 718

agccactgga ctgacgactt 20

<210> 719

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 719

ggaggactag tgagggaggt g 21

<210> 720

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 720

ggcaagtgat gtggcaatta 20

<210> 721

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 721

gttggagcac ctggaaagaa 20

<210> 722

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 722

atgcctgcct caccttcat 19

<210> 723

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 723

acaggggcac tgtcaacac 19

<210> 724

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 724

aaaaatcatg tgttgcagct tt 22

<210> 725

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 725

tgctttcaca acatttgcag 20

<210> 726

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 726

aatgtttcct tgtgcctgct 20

<210> 727

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 727

atatcctgag ccatcggtga 20

<210> 728

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 728

ttttggtacc ccaggctatg 20

<210> 729

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 729

accccgtggc attacataac 20

<210> 730

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 730

cttccaggag gcacagaaat 20

<210> 731

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 731

ctaacctggg cgacagagtg 20

<210> 732

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 732

atatttggac ataacagact tggaa 25

<210> 733

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 733

tgctgacttt taaaataagt gattcg 26

<210> 734

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 734

gcggcagagt agccctaac 19

<210> 735

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 735

tgggctattt ctattgctgc t 21

<210> 736

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 736

aatggaaagt ggctatgcag 20

<210> 737

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 737

ggttgtagtc actttagatg gaaaa 25

<210> 738

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 738

tttgtttgac tttgagcacc a 21

<210> 739

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 739

aatgtttctc tgtaaatatt gccatt 26

<210> 740

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 740

caccccata tggtcatagc 20

<210> 741

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 741

agcaccaggt gatcctcag 19

<210> 742

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 742

tgttttgctg taacattgaa gga 23

<210> 743

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 743

taatgccaca gtggggatg 19

<210> 744

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 744

gggcctaaac tttggcagtt 20

<210> 745

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 745

ttttaccttc catggctctt tt 22

<210> 746

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 746

gccttactct gattcagcct ctt 23

<210> 747

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 747

cgtaacaaaa ttcattgtgg tgt 23

<210> 748

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 748

agaaccgctc ctacagcaag 20

<210> 749

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 749

gtgctttctt ttgtgggaca 20

<210> 750

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 750

gggagttctg catttgatcc 20

<210> 751

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 751

tgggtcagag gacttcaagg 20

<210> 752

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 752

agggttctga tcacattgca c 21

<210> 753

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 753

ctgcaggact ggtcgttttt 20

<210> 754

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 754

agggcagggt agagagggta 20

<210> 755

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 755

ttcttccatg cggagaaatc 20

<210> 756

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 756

catggctgaa ggaaaccagt 20

<210> 757

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 757

ttgccagcta tcacatgtcc 20

<210> 758

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 758

tcttttcctg taccaggttt ttc 23

<210> 759

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 759

tgactgggaa catcttgctg 20

<210> 760

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 760

tggcacctgt acccttcttc 20

<210> 761

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 761

ttcaatctct tgcactcaaa gc 22

<210> 762

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 762

tggagtcact gccaagtcat 20

<210> 763

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 763

tttgcatgat gtttgtgtgc 20

<210> 764

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 764

gcacccactc tgctttgact 20

<210> 765

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 765

accatgtagc cagctttcaa 20

<210> 766

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 766

gcaactgggc atgagtacct 20

<210> 767

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 767

ccacaccccc ttcctactc 19

<210> 768

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 768

agtctgctta tttccagctg ttt 23

<210> 769

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 769

tcctgttcaa aagtcaggat ga 22

<210> 770

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 770

aaatcacaaa tcccctgcaa 20

<210> 771

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 771

ctgaacattc cagagcgtgt 20

<210> 772

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 772

cagtgggacc accctcact 19

<210> 773

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 773

tctgtagatg acctggcttg c 21

<210> 774

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 774

tcagaaccaa gatgccaaca 20

<210> 775

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 775

catgacccag cctatggttt 20

<210> 776

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 776

acctcctgca agaagagctg 20

<210> 777

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 777

ttgggaggct ttgcttattt t 21

<210> 778

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 778

ctgggaaaca ctccttgcat 20

<210> 779

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 779

caacgaattt ggctacagca 20

<210> 780

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 780

caaaggtcat aatgctttca gc 22

<210> 781

<211

> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 781

tttgacgtat cttttcatcc aa 22

<210> 782

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 782

tgttgttggt ttccaaaaag g 21

<210> 783

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 783

gccaactttt gcatgttttg 20

<210> 784

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 784

cccaagctga tctggtggt 19

<210> 785

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 785
tgctgtgaaa gaaacaaaca ttg 23
<210> 786
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 786
gcacgtggat cctgagaact 20
<210> 787
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 787
ccagcccaga gacactgatt 20
<210> 788
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 788
cacgcccagc taatttttgt 20

<210> 789

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 789

cctggtggaa gacatgcag 19

<210> 790

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 790

tcacacctgt aatcccagca 20

<210> 791

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 791

cagagctccg cctcattagt 20

<210> 792

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 792

tccatttcat cattgtttct gc 22

<210> 793

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 793

tggtgtttgt aggtcactga aca 23

<210> 794

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 794

aacatggtcc attcaccttt atg 23

<210> 795

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 795

agagcgagac tccgtctcaa 20

<210> 796

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 796

agtgagctga gattgcacca 20

<210> 797

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 797

agacggcctt gagtctcagt 20

<210> 798

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 798

gggaatccct tcctggtc 18

<210> 799

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 799

cttcctgcct ttctcagcag 20

<210> 800

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 800

tgcaggtgat caagaagacg 20

<210> 801

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 801

ggttttgagc atgggttcat 20

<210> 802

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 802

ccagcccact cctatggat 19

<210> 803

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 803

aaactgggac aggggagaac 20

<210> 804

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 804

tttgggtagg tgacctgctt 20

<210> 805

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 805

tcactgaacg aatgagtgct g 21

<210> 806

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 806

acgatgtgca ggaccagtg 19

<210> 807

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 807

aatttgcact gaaacgtgga 20

<210> 808

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 808

ctgttgtggc ccattaaaga a 21

<210> 809

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 809

ttccctccag cagtggtatt 20

<210> 810

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 810

caccaggaag gaagctgttg 20

<210> 811

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 811

tttccttgtg ttcttccaag c 21

<210> 812

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 812

tcgcaggcat tactaatctg aa 22

<210> 813

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 813

ctctggctgg ctaactggaa 20

<210> 814

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 814

agagccccac cctcagat 18

<210> 815

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 815

tgtgcagagt tctccatctg a 21

<210> 816

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 816

tgcctgttac aaatatcaag gaa 23

<210> 817

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 817

tttcccttct tgcatccttc 20

<210> 818

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 818
tgtgaccact ggcattcatt 20
<210> 819
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 819
ctcacacaca cggcctgtta 20
<210> 820
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 820
cacttgacca atactgaccc tct 23
<210> 821
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"
<400> 821
gtgtgtgccc tgtaacctga 20
<210> 822
<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 822

ccacttccca cttgcagtct 20

<210> 823

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 823

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg t 21

<210> 824

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 824

tctcccatgc attcaaactg 20

<210> 825

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 825

tctaagtgtt cctcactgac agg 23

<210> 826

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 826

tactctgcag cgaagtgcaa 20

<210> 827

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 827

ccaagatcac accattgcac 20

<210> 828

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer"

<400> 828

atatttggac ataacagact tggaa 25

<210> 829

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 829

ttttttttt tttttttv 18

<210> 830

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 830

aaaaaaaaaa 10

<210> 831

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 831

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 31

<210> 832

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 832

cgactacgac gactacg 17

<210> 833

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 833

atgatacgac tagcggat 18

<210> 834

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 834

cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggt 38

<210> 835

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 835

aatgctatga tacgactagc ggat 24

<210> 836

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 836

cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggtaa tgctatgata cgactagcgg 60

at 62

<210> 837

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 837

agcattaccg ac 12

<210> 838

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 838

cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggt 38

<210> 839

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 839

atccgctagt cgtatcatac cgac 24

<210> 840

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 840

cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggtat gatacgacta gcggat 56

<210> 841

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 841

cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggt 38

<210> 842

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 842

auccgcuagu cguaucauac cgac 24

<210> 843

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 843

cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggtat gatacgacta gcggat 56