(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0011725
(43) 공개일자 2025년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6841 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6841 (2018.05)
C12Q 2531/125 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7038517
(22) 출원일자(국제) 2023년04월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/065972
(87) 국제공개번호 WO 2023/205707
국제공개일자 2023년10월26일
(30) 우선권주장
63/332,690 2022년04월20일 미국(US)
63/334,023 2022년04월22일 미국(US)

(71) 출원인
엘리먼트 바이오사이언스, 인크.
미국 92121 캘리포니아주 샌디에이고 반스 캐년 로드 10055
(72) 발명자
리우 쭝리
미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100
아르슬란 시난
미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 181 항

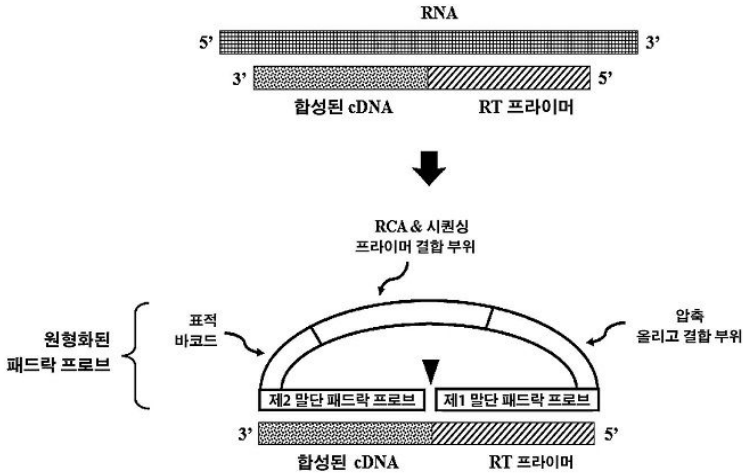
(54) 발명의 명칭 **세포 샘플 내부에서의 반복적 짧은 리드 시퀀싱**

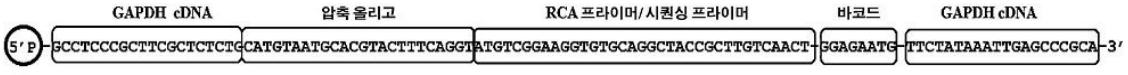
(57) 요 약

본 개시내용은 코딩된 패드락 프로브를 사용하여 다중체 및 다중-오믹스 검출 및 식별을 제자리에서(in situ) 수행하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 세포 샘플에서 RNA 및 폴리퍼티드 둘 다를 검출하기 위해 RNA 특이적 패드락 프로브 및 폴리퍼티드 특이적 패드락 프로브를 동시에 사용하는 단계를 포함한다. 두 유형의 프로브는 패드락

(뒷면에 계속)

대 표 도





프로브가 검출하는 RNA 또는 폴리펩티드를 고유하게 식별하는 바코드를 포함한다. 두 유형의 프로브는 원하는 콘카티머 주형 분자 서브세트를 시퀀싱할 수 있도록 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위도 포함한다. 배치 특이적 시퀀싱 프라이머의 사용은 과밀 신호와 이미지를 감소시켜, 강렬하고 해상될 수 있는 광학 이미지를 생성한다. 상이한 배치 특이적 시퀀싱 프라이머들을 사용하여 동일한 세포 샘플에 대해 다회 라운드의 시퀀싱을 수행함으로써, 다중체 및 다중-오믹스 시퀀싱이 수많은 표적 RNA들과 이들의 인코딩된 폴리펩티드를 드러낼 수 있게 한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

(72) 발명자

프리비테 마이클

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

벤예헤즈켈 투발

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

톰슨 코너

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

켈링거 매튜

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

마 후이 젠

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

헤 몰리

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

프라이스 앤드류

미국 92121 캘리포니아 샌 디에고 반스 캐니언 로드 10055 스위트 100

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계들을 포함하는, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서(in situ) 검출하는 방법으로서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하는 것인 방법:

(a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자; 및

(ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자

를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계;

(b) (i) 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고;

(ii) 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진 것인 단계;

(c) 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 및 제2 핵산 분자가 제거 후 생물학적 샘플 내부에 위치하는 것인 단계; 및

(d) 단계 (b) 및 (c)를 반복하여 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 생물학적 샘플은 고정되고 투과 가능해진 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

a. 생물학적 샘플 내부에서 제1 메신저 RNA(mRNA) 분자의 역전사를 통해 제1 상보적 DNA(cDNA) 분자를 제자리에서 생성하는 단계로서, 여기서 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자는 제1 표적 핵산 서열, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함하는 것인 단계; 및 또는

b. 생물학적 샘플 내부에서 제2 mRNA 분자의 역전사를 통해 제2 cDNA 분자를 제자리에서 생성하는 단계로서, 여기서 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자는 제2 표적 핵산 서열, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

a. 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체를, 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제자리에서 접촉시키는 단계로서, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계; 및/또는

b. 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체를, 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드와 제자리에서 접촉시키는 단계로서, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

a. 제1 표적 핵산 서열은 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자를 포함하고/하거나;

b. 제2 표적 핵산 서열은 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 1개 뉴클레오타이드의 크기를 가진 것인 방법.

청구항 7

제4항 또는 제5항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 적어도 2개 뉴클레오타이드의 크기를 가진 것인 방법.

청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열을 추가로 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제4항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 시퀀싱 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제4항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 핵산 증폭용 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 핵산 증폭용 프라이머는 콘카티머(concatemer)를 생성하는 롤링 서클 증폭(RCA)용 프라이머이고, 여기서 콘카티머는 적어도 2개의 표적 핵산 서열 중 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체의 적어도 2개의 반복부(repeat)를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 역상보체를 추가로 포함하고, 여기서

a. 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

b. 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여,

콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 방법.

청구항 13

제4항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 생물학적 샘플 내부에서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 제자리에서 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계; 및

(b) 생물학적 샘플 내부에서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 제자리에서 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

(a) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계가 제1 핵산 효소를 통해 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함하고;

(b) 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계가 제2 핵산 효소를 통해 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소가 동일한 유형의 효소인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 제1 핵산 효소 및 제2 핵산 효소는 핵산 리가제(ligase), 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소(polymerase), 핵산 중합 효소(polymerization enzyme), 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 제자리에서 증폭하여 제1 핵산 분자를 생성하는 단계; 및/또는

(b) 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 제자리에서 증폭하여 제2 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 증폭이 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함하고, 여기서 제1 핵산 분자가 제1 콘카티머를 포함하고 제2 핵산 분자가 제2 콘카티머를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

a. 제1 콘카티머가 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나;

b. 제2 콘카티머가 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하는 것인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 제1 콘카티머가 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제2 콘카티머가 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 제1 콘카티머가 제1 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

a. 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

b. 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여,

제1 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 제2 콘카티머가 제2 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

a. 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

b. 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여,

제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 확인은

a. 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 확인하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및/또는

b. 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 확인하는 단계로서, 여기서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드가 제1 식별 서열을 포함하고 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드가 제2 식별 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드가 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자의 서열의 적어도 일부를 추가로 포함하고, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드가 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자의 서열의 적어도 일부를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 확인은

(a) 중합효소, 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제1 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계; 및

(c) 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 확인은

(a) 중합효소, 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제2 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계; 및

(c) 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 31

제22항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계;

(c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제22항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제2 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제2 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계;

(c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제하는 것인 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티가 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 것인 방법.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제31항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 제1 콘카티머로부터 2개의 중합효소 및 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계;

(b) 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및

(c) 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하며, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제32항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 제2 콘카티머로부터 2개의 중합효소 및 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계;

(b) 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제2 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제22항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머의 제1 부분 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제1 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계;

(c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제1 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제22항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머의 제1 부분 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제2 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제2 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계;

(c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제2 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제39항 또는 제40항에 있어서, 상기 조건이 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제하는 것인 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 접합체가 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티가 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 것인 방법.

청구항 43

제39항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 가능한 표지가 형광 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 검출이 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제39항 또는 제40항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 46

제39항 또는 제40항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 47

제39항 또는 제40항에 있어서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제39항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트

기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 방법.

청구항 49

제1항에 있어서, 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열이 동일한 mRNA 또는 cDNA 분자의 2개의 별개 부분에 상응하는 것인 방법.

청구항 50

제1항에 있어서, 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열이 2개의 상이한 mRNA 또는 cDNA 분자에 상응하는 것인 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 반복이 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 확인은 이미지화를 통해 생물학적 샘플 내부에서 제1 또는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제자리에서 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제22항에 있어서, 확인은 이미지화를 통해 생물학적 샘플 내부에서 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 동시에 제자리에서 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 이미지화가 형광 이미지화를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 생물학적 샘플이 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 표적 DNA 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 59

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 표적 RNA 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 제1 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 제1 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 마이크로RNA(miRNA), 가이드 RNA(gRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제60항에 있어서, 제2 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제58항에 있어서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 제1 표적 DNA 서열 및 제2 표적 DNA 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제58항에 있어서, 제1 표적 DNA 서열이 상보적 DNA(cDNA), 게놈 DNA(gDNA), 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제58항에 있어서, 제2 표적 DNA 서열이 cDNA, gDNA, 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제58항 또는 제59항에 있어서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 표적 RNA 서열 및 표적 DNA 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제66항에 있어서, 표적 DNA 서열이 cDNA, gDNA, 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제1항에 있어서, 생물학적 샘플이 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 생물학적 샘플이 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함하는 것인 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 표면에 고착되는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 표면이 유동 셀의 내부 표면을 포함하는 것인 방법.

청구항 73

하기 단계들을 포함하는, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 분자 및 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를

제자리에서 검출하는 방법으로서, 여기서 상기 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 상기 적어도 2개의 표적 폴리펩티드가 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드 및 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법:

(a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자;

(ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자;

(iii) 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제3 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자; 및

(iv) 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자

를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하고, 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하는 것인 단계;

(b) (i) 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고;

(ii) 생물학적 샘플에서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계; 및

(c) (i) 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고;

(ii) 생물학적 샘플에서 제4 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계,

여기서 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가지며, 단계 (b)는 단계 (c)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다.

청구항 74

하기 단계들을 포함하는, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열 및 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법으로서, 여기서 상기 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 상기 적어도 2개의 표적 폴리펩티드가 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드 및 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법:

(a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자;

(ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자;

(iii) 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제3 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자; 및

(iv) 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자

를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하고, 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하는 것인 단계;

(b) (i) 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고;

(ii) 생물학적 샘플에서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 제1 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 제3 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및

(c) 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제3 핵산 분자로부터 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 및 제3 핵산 분자가 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치하는 것인 단계;

(d) 단계 (b) 및 (c)를 반복하는 단계;

(e) (i) 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고;

(ii) 생물학적 샘플에서 제4 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 제2 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 상기 제4 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계;

(f) 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제4 핵산 분자로부터 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제2 핵산 분자 및 제4 핵산 분자가 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치하는 것인 단계; 및

(g) 단계 (e) 및 (f)를 반복하는 단계,

여기서 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가지며, 단계 (b)는 단계 (e)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다.

청구항 75

하기 단계들을 포함하는, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법:

(a) 표면에 고착되어 있고 투과 가능해져 있으며 고정되어 있는 생물학적 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 생물학적 샘플이

(i) 적어도 2개의 표적 RNA 서열 중 제1 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 폴리펩티드 중 제1 표적 폴리펩티드; 및

(ii) 적어도 2개의 표적 RNA 서열 중 제2 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 폴리펩티드 중 제2 표적 폴리펩티드

를 포함하고, 여기서 제1 표적 폴리펩티드가 제1 표적 RNA 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고, 제2 표적 폴리펩티드가 제2 표적 RNA 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되는 것인 단계;

(b) 제1 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 제1 표적 cDNA 서열을 생성하고 제2 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 제2 표적 cDNA 서열을 생성하는 단계;

(c) (iii) 제1 표적 cDNA 서열을, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분이 제1 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 제1 시퀀싱 프라이머 및 핵산 증폭 프라이머를 포함하는 것인 단계;

(iv) 제2 표적 cDNA 서열을, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분이 제2 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을

가진 원형 구조를 형성하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드가 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 제2 시퀀싱 프라이머 및 핵산 증폭 프라이머를 포함하고, 여기서 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머가 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진 것인 단계;

(v) 제1 표적 폴리펩티드를, 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제1 짧은 핵산이 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열이 제1 결합 모이어티를 식별하는 것인 단계; 및

(vi) 제2 표적 폴리펩티드를, 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제2 짧은 핵산이 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열이 제2 결합 모이어티를 식별하는 것인 단계;

(d) (vii) 제1 결합 복합체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분이 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계; 및

(viii) 제2 결합 복합체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분이 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계;

(e) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계로서, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드가 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 여기서 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진 것인 단계;

(f) (ix) 롤링 서클 증폭을 통해 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제1 콘카티머를 생성하는 단계;

(x) 롤링 서클 증폭을 통해 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제2 콘카티머를 생성하는 단계;

(xi) 롤링 서클 증폭을 통해 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제3 콘카티머를 생성하는 단계; 및

(xii) 롤링 서클 증폭을 통해 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제4 콘카티머를 생성하는 단계;

(g) (i) 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및

(ii) 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고,

단계 (g)가 단계 (j)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행되는 것인 단계;

(h) 제1 콘카티머로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제3 콘카티머로부터 제3 시퀀싱 생성물 핵산

분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제1 콘카티머 및 제3 콘카티머가 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치하는 것인 단계;

(i) 단계 (g) 및 (h)를 적어도 한 번 반복하는 단계;

(j) (xiii) 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제2 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및

(xiv) 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제4 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고,

단계 (j)가 단계 (g)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행되며, 여기서 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열이 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진 것인 단계;

(k) 제2 콘카티머로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제4 콘카티머로부터 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제2 콘카티머 및 제4 콘카티머가 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치하는 것인 단계;

(xv) 단계 (j) 및 (k)를 적어도 한 번 반복하는 단계.

청구항 76

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 확인은 제1 또는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 이미지화하는 단계를 포함하고, 식별이 제2 또는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 이미지화하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 동시에 이미지화하여, 생물학적 샘플 내부에서 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자의 공간적 분포를 분석하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 78

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함하는 것인 방법.

청구항 79

제73항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제73항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적 핵산 서열이 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제73항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적 핵산 서열이 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제73항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 83

제75항에 있어서, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머가 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

(a) 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

(b) 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 방법.

청구항 84

제75항에 있어서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자가 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자가 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제75항에 있어서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자가 제1 표적 RNA 서열 및 제1 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자가 제2 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제2 식별 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 86

제75항에 있어서, 확인은

(a) 중합효소, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계; 및

(c) 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 방법.

청구항 89

제86항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된 한 유형의 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 방법.

청구항 90

제86항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물을 포함하는 것인 방법.

청구항 91

제75항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계;

(c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머로부터 2개의 중합효소 및 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계;

(b) 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 93

제72항에 있어서, 확인은

(a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계;

(b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계;

(c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 상기 조건이 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머에 혼입되는 것을 억제하는 것인 방법.

청구항 95

제93항 또는 제94항에 있어서, 뉴클레오타이드 접합체가 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티가 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 것인 방법.

청구항 96

제93항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 검출 가능한 표지가 형광 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 97

제93항에 있어서, 검출이 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제93항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 99

제93항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 100

제93항에 있어서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 방법.

청구항 102

제86항 또는 제87항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 103

제86항 또는 제87항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 방법.

청구항 104

제75항에 있어서, 제1 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 마이크로RNA(miRNA), 가이드 RNA(gRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 105

제75항에 있어서, 제2 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 106

제73항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 생물학적 샘플이 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함하는 것인 방법.

청구항 108

제73항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 표면에 고착되는 것인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 표면이 유동 셀의 내부 표면을 포함하는 것인 방법.

청구항 110

하기 구성요소들을 포함하는, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 시스템으로서, 여기서 상기 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하는 것인 시스템:

(a) 제1 핵산 분자 및 제2 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플로서, 여기서 제1 핵산 분자가 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분을 포함하고, 제2 핵산 분자가 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분을 포함하는 것인 생물학적 샘플;

(b) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드로서, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 생물학적 샘플 내에서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함하는 것인 제1 올리고뉴클레오타이드; 및

(c) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드로서, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드가 생물학적 샘플 내에서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함하는 것인 제2 올리고뉴클레오타이드.

청구항 111

제110항에 있어서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하도록 구성된 제1 핵산 효소를 추가로 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드가 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하도록 구성된 제2 핵산 효소를 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 112

제111항에 있어서, 제1 핵산 효소 및 제2 핵산 효소가 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 시스템.

청구항 113

제111항 또는 제112항에 있어서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드의 제1 앰플리콘 및 제2 원형 올리고뉴클레오타이드의 제2 앰플리콘을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 114

제113항에 있어서, 제1 앰플리콘이 제1 콘카티머를 포함하고/하거나, 제2 앰플리콘이 제2 콘카티머를 포함하는 것인 시스템.

청구항 115

제114항에 있어서,

(a) 제1 콘카티머가 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나;

(b) 제2 콘카티머가 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하는 것인 시스템.

청구항 116

제115항에 있어서, 제1 콘카티머가 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제2 콘카티머가 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 117

제116항에 있어서, 제1 콘카티머가 제1 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

(d) 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

(e) 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제1 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 시스템.

청구항 118

제116항에 또는 제117항에 있어서, 제2 콘카티머가 제2 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

(f) 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

(g) 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 시스템.

청구항 119

제114항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머의 적어도 일부에 상보적인 프라이머 서열을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 120

제119항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 뉴클레오타이드의 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하도록 구성된 작용제를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 121

제120항에 있어서, 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드

기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 시스템.

청구항 122

제119항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 형광 표지를 포함하는 것인 시스템.

청구항 123

제119항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 시스템.

청구항 124

제119항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 시스템.

청구항 125

제110항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체가 2개 이상의 중합효소, 뉴클레오타이드 접합체 및 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성되고, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 이 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 적어도 2개의 표적 핵산 서열 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 시스템.

청구항 126

제110항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 제1 짧은 핵산이 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제1 결합 모이어티를 통해 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열이 핵산 서열 반응에서 제1 결합 모이어티를 식별하는 것인 시스템.

청구항 127

제110항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 제2 짧은 핵산이 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제2 결합 모이어티를 통해 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열이 핵산 서열 반응에서 제2 결합 모이어티를 식별하는 것인 시스템.

청구항 128

제127항에 있어서, 제1 또는 제2 결합 모이어티가 항체 또는 이의 항원 결합 단편인 시스템.

청구항 129

제126항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 시스템.

청구항 130

제126항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레

오타이드를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 시스템.

청구항 131

제126항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 생성된 제3 원형 올리고뉴클레오타이드, 및 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 생성된 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드가 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 상기 연결이 제1 또는 제2 핵산 효소에 의해 수행되는 것인 시스템.

청구항 132

제126항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 원형 올리고뉴클레오타이드의 제3 앰플리콘 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드의 제4 앰플리콘을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 133

제132항에 있어서, 제3 앰플리콘이 제3 콘카티머를 포함하고/하거나, 제4 앰플리콘이 제4 콘카티머를 포함하는 것인 시스템.

청구항 134

제133항에 있어서,

(h) 제3 콘카티머가 제3 원형 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나;

(i) 제4 콘카티머가 제4 원형 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하는 것인 시스템.

청구항 135

제134항에 있어서, 제3 콘카티머가 제1 결합 모이어티를 식별하는 제1 또는 제2 태그 서열 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제4 콘카티머가 제2 결합 모이어티를 식별하는 제3 또는 제4 태그 서열 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 136

제135항에 있어서, 제3 콘카티머가 제3 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

(j) 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제3 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

(k) 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제3 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제3 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 시스템.

청구항 137

제136항에 있어서, 제4 콘카티머가 제4 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서

(l) 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절이 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며;

(m) 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절이 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제4 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발하는 것인 시스템.

청구항 138

제126항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제3 또는 제4 콘카티머,

제2 중합효소, 및 제3 또는 제4 콘카티머의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하는 제2 복수의 뉴클레오타이드 중 제2 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제2 중합효소, 제2 복수의 뉴클레오타이드, 및 제3 콘카티머 또는 제4 콘카티머의 적어도 일부에 상보적인 제2 프라이머 서열을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 139

제138항에 있어서, 제2 복수의 뉴클레오타이드 중 제2 뉴클레오타이드로부터 제2 차단기를 제거하고 제2 뉴클레오타이드의 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하도록 구성된 제2 작용제를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 140

제139항에 있어서, 제2 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 시스템.

청구항 141

제138항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 복수의 뉴클레오타이드가 제2 형광 표지를 포함하는 것인 시스템.

청구항 142

제141항에 있어서, 제2 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 시스템.

청구항 143

제141항 또는 제142항에 있어서, 제2 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 시스템.

청구항 144

제126항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하는 시스템으로서, 여기서 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 제2 뉴클레오타이드 접합체가 2개 이상의 제2 중합효소, 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 제2 뉴클레오타이드 접합체, 및 적어도 2개의 제1 짧은 핵산 또는 짧은 핵산 또는 이의 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성되고, 여기서 제2 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 이 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 적어도 2개의 제1 짧은 핵산 또는 짧은 핵산 또는 이의 부분 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 시스템.

청구항 145

제110항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 고체 표면에 고착된 생물학적 샘플을 포함하는 고체 표면을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 146

제145항에 있어서, 생물학적 샘플이 투과 가능해진 것인 시스템.

청구항 147

제145항 또는 제146항에 있어서, 고체 표면이 그에 커플링된 친수성 중합체 코팅 층을 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 148

제147항에 있어서, 친수성 중합체 코팅 층이 50도 미만의 물 접촉각을 가진 것인 시스템.

청구항 149

제110항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 고체 표면에 커플링된 생물학적 샘플을 이미지화하여 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열 및/또는 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하도록 구성된 광학 이미지화 모듈을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 150

제126항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적 폴리펩티드가 제1 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고 제2 표적 폴리펩티드가 제2 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 것인 시스템.

청구항 151

적어도 하나의 프로세서를 포함하는 컴퓨팅 장치, 실행 가능한 명령어를 수행하도록 구성된 운영 시스템, 메모리, 및 상기 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 수 있는 명령어를 포함하는 컴퓨터 프로그램을 포함하는 컴퓨터 구현 시스템으로서, 여기서 상기 명령어가 제1항 내지 제109항 중 어느 한 항의 방법을 포함하는 것인 컴퓨터 구현 시스템.

청구항 152

하나 이상의 프로세서에 의해 실행될 수 있는 명령어를 포함하는 컴퓨터 프로그램으로 인코딩된 비일시적 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체로서, 여기서 상기 명령어가 제1항 내지 제109항 중 어느 한 항의 방법을 포함하는 것인 비일시적 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체.

청구항 153

하기 구성요소들을 포함하는, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 키트로서, 여기서 상기 적어도 2개의 표적 핵산 서열이 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하는 것인 키트:

(a) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드로서, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 생물학적 샘플 내에서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 상기 제1 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함하고, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체, 압축 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 역상보체, 또는 핵산 증폭용 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하는 것인 제1 올리고뉴클레오타이드;

(b) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드로서, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드가 생물학적 샘플 내에서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 상기 제2 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함하고, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드가 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체, 압축 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 역상보체, 또는 핵산 증폭용 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하는 것인 제2 올리고뉴클레오타이드;

(c) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하거나, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하도록 구성된 제1 핵산 효소;

(d) 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 제1 콘카티머를 생성하거나 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 제2 콘카티머를 생성하도록 구성된 제2 핵산 효소;

(e) 제3 핵산 효소, 제1 콘카티머의 부분 또는 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 시퀀싱 프라이머, 복수의 뉴클레오타이드, 또는 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 여기서 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체는 코어, 및 코어에 부착된 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고,

(i) 여기서 제3 핵산 효소, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 시퀀싱 프라이머는 제3 핵산 효소, 제1 또는 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하도록 구성되거나;

(ii) 여기서 적어도 2개의 제3 핵산 효소, 뉴클레오타이드 접합체, 시퀀싱 프라이머, 및 제1 또는 제2 콘카티머는 제3 핵산 효소, 뉴클레오타이드 접합체, 및 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 제1 또는 제2 콘카티머를 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성되고, 여기서 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 제1 또는 제2 콘카티머의 2개의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하며, 2개의 제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머 각각은 2개의 시퀀싱 프라이머 각각에 하이브리드화됨;

(f) (i) 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드를 제1 콘카티머에 하이브리드화된 시퀀싱 프라이머의 말단에 추가하고 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하도록 구성된 제4 핵산 효소로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 표지부착되지 않고 차단기를 포함하는 것인 제4 핵산 효소; 또는

(ii) 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드를 제2 콘카티머에 하이브리드화된 시퀀싱 프라이머의 말단에 추가하고 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하도록 구성된 제4 핵산 효소로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 표지부착되지 않고 차단기를 포함하는 것인 제4 핵산 효소; 및

(g) 제1 콘카티머로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제2 콘카티머로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하도록 구성된 해리 시약.

청구항 154

제153항에 있어서, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열 및 제1 표적 폴리펩티드와 제2 표적 폴리펩티드를 포함하는 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하도록 추가로 구성되고 제1 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드를 포함하는 키트로서, 여기서 제2 표적 폴리펩티드가 제2 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고, 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열이 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진 것인 키트.

청구항 155

제153항 또는 제154항에 있어서, 제1, 제2, 제3 또는 제4 핵산 효소가 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 키트.

청구항 156

제153항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드가 형광 표지를 포함하는 것인 키트.

청구항 157

제153항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 키트.

청구항 158

제153항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 형광 표지를 포함하는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 키트.

청구항 159

제153항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 복수의 뉴클레오타이드가 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 상기 적어도 두 유형 중 한 유형의 뉴클레오타이드가 형광 표지를 포함하고, 상기 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드가 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지가 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출하는 것인 키트.

청구항 160

제153항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 접합체가 검출 가능한 표지를 포함하는 것인 키트.

청구항 161

제153항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오타이드 접합체가 형광 표지를 포함하는 것인 키트.

청구항 162

제153항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함하는 것인 키트.

청구항 163

제153항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함하는 것인 키트.

청구항 164

제153항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함하는 것인 키트.

청구항 165

제153항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함하는 것인 키트.

청구항 166

제153항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적 핵산 서열이 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 키트.

청구항 167

제153항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 표적 핵산 서열이 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열이 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하는 것인 키트.

청구항 168

제157항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 차단기가 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 것인 키트.

청구항 169

제153항 내지 제168항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체로서, 여기서 제1 짧은 핵산이 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열이 제1 결합 모이어티를 식별하는 것인 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체; 또는

(b) 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체로서, 여기서 제2 짧은 핵산이 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열이 제2 결합 모이어티를 식별하는 것인 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체

를 추가로 포함하는 키트.

청구항 170

제169항에 있어서,

(a) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드로서, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 제3 올리고뉴클레오타이드; 또는

(b) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드로서, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 제4 올리고뉴클레오타이드

를 추가로 포함하는 키트.

청구항 171

제170항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오타이드가 제1 결합 모이어티를 식별하는 제3 식별 서열을 포함하고, 제4 올리고뉴클레오타이드가 제2 결합 모이어티를 식별하는 제4 식별 서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 172

제171항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오타이드와 제3 올리고뉴클레오타이드가 동일한 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드와 제4 올리고뉴클레오타이드가 동일한 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하는 것인 키트.

청구항 173

제171항에 있어서, 뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드 모이어티의 당 모이어티의 3' 탄소에서 반응성 기와 반응하는 작용제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 174

제173항에 있어서, 뉴클레오타이드 결합 반응에 사용하기 위한 시약을 추가로 포함하는 키트.

청구항 175

제174항에 있어서, 시약이 양이온을 포함하는 것인 키트.

청구항 176

제153항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 역전사효소, 역전사용 프라이머, 시퀀싱 프라이머, 생물학적 샘

플을 투과 가능하게 만들도록 구성된 시약, 생물학적 샘플을 고정하도록 구성된 시약, 차단되지 않은 뉴클레오타이드, 차단된 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 혼입 반응에 사용하기 위한 시약, 양이온을 포함하는 용액, 하나 이상의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드, 하나 이상의 역전사용 완충제, 하나 이상의 핵산 결합용 완충제, 하나 이상의 핵산 증폭용 완충제, 또는 하나 이상의 핵산 해리용 완충제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 177

제153항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 178

제153항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열 및 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 179

제177항 또는 제178항에 있어서, 상기 설명서가 합성에 의한 시퀀싱 반응을 수행하는 것을 포함하는 것인 키트.

청구항 180

제177항 또는 제178항에 있어서, 상기 설명서가 결합에 의한 시퀀싱 반응을 수행하는 것을 포함하며, 여기서 제자리에서의 검출이 뉴클레오타이드 혼입 단계와 동시에 이루어지지 않는 것인 키트.

청구항 181

제153항 내지 제180항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제109항 중 어느 한 항에 제공된 방법을 이용하여 키트를 사용하기 위한 설명서를 추가로 포함하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **상호참조**

[0002] 본 출원은 그 전문이 본원에 참고로 각각 포함되는, 2022년 4월 20일에 출원된 미국 가출원 제63/332,690호 및 2022년 4월 22일에 출원된 미국 가출원 제63/334,023호의 이익을 주장한다.

[0003] **서열목록**

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열목록과 함께 출원된다. 서열목록은 2023년 4월 17일에 생성된 파일명 52933-752_601_SL.xml로서 제공되며, 이 파일의 크기는 12,924 바이트이다. 전자 포맷의 서열목록 내의 정보는 그 전문이 참고로 포함된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 개시내용은 세포 샘플 내부에서 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 수행하는 조성물, 장치 및 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 반복적 짧은 리드 시퀀싱은 세포 샘플의 RNA 함량을 발견하는 데 사용될 수 있다.

발명의 내용

[0007] 한 측면에서, 본원은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서(in situ) 검출하는 방법을 제공하는 것으로, 여기서 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 이 방법은 (a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자; 및 (ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계; (b) 생물학적 샘플에서 (i) 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고; (ii) 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여 제2

핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진 것인 단계; (c) 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 및 제2 핵산 분자가 상기 제거 후 생물학적 샘플 내부에 위치하는 것인 단계; 및 (d) 생물학적 샘플에서 단계 (b) 및 (c)를 반복하여 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 고정되고 투과 가능해진다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 생물학적 샘플 내부에서 제1 메신저 RNA(mRNA) 분자의 역전사를 통해 제1 상보적 DNA(cDNA) 분자를 제자리에서 생성하는 단계로서, 여기서 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자가 제1 표적 핵산 서열, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함하는 것인 단계; 및/또는 (b) 생물학적 샘플 내부에서 제2 mRNA 분자의 역전사를 통해 제2 cDNA 분자를 제자리에서 생성하는 단계로서, 여기서 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자가 제2 표적 핵산 서열, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제자리에서 접촉시키는 단계로서, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계; 및/또는 (b) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드와 제자리에서 접촉시키는 단계로서, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, (a) 제1 표적 핵산 서열은 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자를 포함하고/하거나; (b) 제2 표적 핵산 서열은 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 1개 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 적어도 2개 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열을 추가로 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 시퀀싱 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 핵산 증폭용 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭용 프라이머는 콘카티머(concatemer)를 생성하는 롤링 서클 증폭(RCA)용 프라이머이고, 여기서 콘카티머는 적어도 2개의 표적 핵산 서열 중 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체의 적어도 2개의 반복부(repeat)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 역상보체를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 상기 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하고; (b) 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 상기 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 상기 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다.

[0008] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 제자리에서 연결하여 생물학적 샘플 내부에서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계; 및 (b) 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 제자리에서 연결하여 생물학적 샘플 내부에서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, (a) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계는 제1 핵산 효소를 통해 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함하고; (b) 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계는 제2 핵산 효소를 통해 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소는 동일한 유형의 효소이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 제자리에서 증폭하여 제1 핵산 분자를 생성하고/하거나; (b) 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 제자리에서 증폭하여 제2 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함하고, 여기서 제1 핵산 분자는 제1 콘카티머를 포함하고 제2 핵산 분자는 제2 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, (a) 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나; (b) 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열 또는

이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하고; (b) 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제1 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머는 제2 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하고; (b) 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 확인하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된 것인 단계; 및/또는 (b) 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 확인하는 단계로서, 여기서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된 것인 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제1 식별 서열을 포함하고 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자의 서열의 적어도 일부를 추가로 포함하고, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자의 서열의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 중합효소, 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제1 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계; 및 (c) 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 중합효소, 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제2 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계; 및 (c) 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다.

[0009] 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각

각 상보적이고 결합하는, 2개의 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제2 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제2 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암(arm)에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 제1 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; (b) 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 (c) 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 제2 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; (b) 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제2 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하며, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머의 제1 부분, 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제1 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제1 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머의 제1 부분, 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제2 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제2 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드에

각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제2 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다.

[0011] 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열은 동일한 mRNA 또는 cDNA 분자의 2개의 별개 부분에 상응한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열은 2개의 상이한 mRNA 또는 cDNA 분자에 상응한다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 이미지화를 통해 생물학적 샘플 내부에서 제1 또는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제자리에서 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 이미지화를 통해 생물학적 샘플 내부에서 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자와 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 동시에 제자리에서 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이미지화는 형광 이미지화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 표적 RNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 마이크로RNA(miRNA), 가이드 RNA(gRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 DNA 서열 및 제2 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 DNA 서열은 상보적 DNA(cDNA), 게놈 DNA(gDNA), 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 DNA 서열은 cDNA, gDNA, 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 표적 RNA 서열 및 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 DNA 서열은 cDNA, gDNA, 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 표면에 고착된다. 일부 실시양태에서, 표면은 유동 셀의 내부 표면을 포함한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본원은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 분자와 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드, 및 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함하고, 상기 방법은 (a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자; (ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자; (iii) 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제3 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자; 및 (iv) 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 상기 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하고, 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 상기 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하는 것인 단계; (b) (i) 상기 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고; (ii) 상기 생물학적 샘플에서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계; 및 (c) (i) 상기 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고; (ii) 상기 생물학적 샘플에서 제4 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가지며, 단계 (b)는 단계 (c)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본원은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열과 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하고, 여기서 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드, 및 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함하고, 상기 방법은 (a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자; (ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자; (iii) 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제3 표적 핵산 서열 의 역상보체또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자; 및 (iv) 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 상기 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하고, 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재가 상기 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 식별하는 것인 단계; (b) (i) 상기 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고, (ii) 상기 생물학적 샘플에서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및 (c) 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제3 핵산 분자로부터 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제1 핵산 분자 및 제3 핵산 분자가 상기 제거 후 생물학적 샘플 내에 위치하는 것인 단계; (d) 단계 (b) 및 (c)를 반복하는 단계; (e) (i) 상기 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하고, (ii) 상기 생물학적 샘플에서 제4 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; (f) 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제4 핵산 분자로부터 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제2 핵산 분자 및 제4 핵산 분자가 상기 제거 후 생물학적 샘플 내에 위치하는 것인 단계; 및 (g) 단계 (e) 및 (f)를 반복하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖

고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가지며, 단계 (b)는 단계 (e)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본원은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열과 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하고, 이 방법은 다음 단계를 포함한다: (a) 표면에 고착되고 투과 가능해지고 고정되어 있는 생물학적 샘플을 제공하는 단계로서, 여기서 이 생물학적 샘플이 (i) 적어도 2개의 표적 RNA 서열 중 제1 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 폴리펩티드 중 제1 표적 폴리펩티드; 및 (ii) 적어도 2개의 표적 RNA 서열 중 제2 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 폴리펩티드 중 제2 표적 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 표적 폴리펩티드가 제1 표적 RNA 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고, 제2 표적 폴리펩티드가 제2 표적 RNA 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되는 것인 단계; (b) 제1 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 제1 표적 cDNA 서열을 생성하고 제2 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 제2 표적 cDNA 서열을 생성하는 단계; (c) (i) 제1 표적 cDNA 서열을, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분이 제1 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하고, 제1 올리고뉴클레오타이드가 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 제1 시퀀싱 프라이머 및 핵산 증폭 프라이머를 포함하는 것인 단계; (ii) 제2 표적 cDNA 서열을, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분이 제2 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하고, 제2 올리고뉴클레오타이드가 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 제2 시퀀싱 프라이머 및 핵산 증폭 프라이머를 포함하고, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머가 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진 것인 단계; (iii) 제1 표적 폴리펩티드를, 제1 짧은 핵산을 포함하고 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제1 짧은 핵산이 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함하고, 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 제1 태그 서열과 제2 태그 서열이 제1 결합 모이어티를 식별하는 것인 단계; 및 (iv) 제2 표적 폴리펩티드를, 제2 짧은 핵산을 포함하고 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제2 짧은 핵산이 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체가 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 제3 태그 서열과 제4 태그 서열이 제2 결합 모이어티를 식별하는 것인 단계; (d) (i) 제1 결합 복합체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계; 및 (ii) 제2 결합 복합체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계로서, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분이 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드가 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하는 것인 단계; (e) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계로서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드가 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드가 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진 것인 단계; (f) (i) 롤링 서클 증폭을 통해 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제1 콘카티머를 생성하고; (ii) 롤링 서클 증폭을 통해 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제2 콘카티머를 생성하고; (iii) 롤링 서클 증폭을 통해 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제3 콘카티머를 생성하고; (iv) 롤링 서클 증폭을 통해 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여, 복수의 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제4 콘카티머를 생성하는 단계; (g) (i) 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로

서, 여기서 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및 (ii) 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 단계 (g)가 단계 (j)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행되는 것인 단계; (h) 제1 콘카티머로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제3 콘카티머로부터 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여깃 제1 콘카티머와 제3 콘카티머가 상기 제거 후 생물학적 샘플 내에 위치하는 것인 단계; (i) 단계 (g) 및 (h)를 적어도 한 번 반복하는 단계; (j) (i) 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제2 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되는 것인 단계; 및 (ii) 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 식별하여, 제4 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열이 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성되고, 단계 (j)가 단계 (g)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행되고, 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열이 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열이 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진 것인 단계; (k) 제2 콘카티머로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제4 콘카티머로부터 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계로서, 여기서 제2 콘카티머와 제4 콘카티머가 상기 제거 후 생물학적 샘플 내에 위치하는 것인 단계; (l) 단계 (j) 및 (k)를 적어도 한 번 반복하는 단계.

[0015] 일부 실시양태에서, 확인은 제1 또는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 이미지화하는 단계를 포함하고, 여기서 확인은 제2 또는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자와 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 동시에 이미지화하여 생물학적 샘플 내부에서 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자와 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자의 공간적 분포를 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머는 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하고; (b) 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제1 표적 RNA 서열 및 제1 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제2 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 중합효소, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계; 및 (c) 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드

로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된 한 유형의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; (b) 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하며, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 확인은 (a) 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분, 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; (b) 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; (c) 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어

티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 마이크로RNA(miRNA), 가이드 RNA(gRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 표면에 고착된다. 일부 실시양태에서, 표면은 유동 셀의 내부 표면을 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본원은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 시스템을 제공하고, 여기서 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 이 시스템은 (a) 내지 (c)를 포함한다: (a) 제1 핵산 분자 및 제2 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플, 여기서 제1 핵산 분자는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분을 포함하고, 제2 핵산 분자는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분을 포함함; (b) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내에서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함함; 및 (c) 제1 말단 부분 및 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로,제2 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내에서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함함. 일부 실시양태에서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하도록 구성된 제1 핵산 효소를 추가로 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드는 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하도록 구성된 제2 핵산 효소를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 제1 원형 올리고뉴클레오타이드의 제1 앰플리콘 및 제2 원형 올리고뉴클레오타이드의 제2 앰플리콘을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 앰플리콘은 제1 콘카티머를 포함하고/하거나, 제2 앰플리콘은 제2 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, (a) 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나; (b) 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며; (b) 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제1 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머는 제2 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제2

콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며; (b) 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머의 적어도 일부에 상보적인 프라이머 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 뉴클레오타이드의 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하도록 구성된 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 복수의 뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하며, 여기서 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체는 2개 이상의 중합효소, 뉴클레오타이드 접합체 및 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성되고, 여기서 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 이 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 적어도 2개의 표적 핵산 서열 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하고, 여기서 제1 짧은 핵산은 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 결합 모이어티를 통해 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열은 핵산 서열 반응에서 제1 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하고, 여기서 제2 짧은 핵산은 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 결합 모이어티를 통해 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열은 핵산 서열 반응에서 제2 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 결합 모이어티는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 생성된 제3 원형 올리고뉴클레오타이드, 및 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 생성된 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드는 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 상기 연결은 제1 또는 제2 핵산 효소에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제3 원형 올리고뉴클레오타이드의 제3 앰플리콘 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드의 제4 앰플리콘을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 앰플리콘은 제3 콘카티머를 포함하고/하거나, 제4 앰플리콘은 제4 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, (a) 제3 콘카티머는 제3 원형 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나; (b) 제4 콘카티머는 제4 원형 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머는 제1 결합 모이어티를 식별하는 제1 또는 제2 태그 서열 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제4 콘카티머는 제2 결합 모이어티를 식별하는 제3 또는 제4 태그 서열

또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머는 제3 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제3 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며; (b) 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제3 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제3 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다.

[0020] 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머는 제4 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 (a) 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합하며; (b) 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제4 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 중합효소, 제2 복수의 뉴클레오타이드, 및 제2 프라이머 서열을 추가로 포함하고, 이 프라이머 서열은 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제3 또는 제4 콘카티머, 제2 중합효소, 및 제3 또는 제4 콘카티머의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하는 제2 복수의 뉴클레오타이드 중 제2 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제3 콘카티머 또는 제4 콘카티머의 적어도 일부에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 복수의 뉴클레오타이드 중 제2 뉴클레오타이드로부터 제2 차단기를 제거하고 제2 뉴클레오타이드의 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하도록 구성된 제2 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드는 제2 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하며, 여기서 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 제2 뉴클레오타이드 접합체는 2개 이상의 제2 중합효소, 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 제2 뉴클레오타이드 접합체, 및 적어도 2개의 제1 짧은 핵산 또는 짧은 핵산 또는 이의 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성되고, 여기서 제2 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 이 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 적어도 2개의 제1 짧은 핵산 또는 짧은 핵산 또는 이의 부분 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 고체 표면에 고착된 생물학적 샘플을 포함하는 고체 표면도 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 투과 가능해진다. 일부 실시양태에서, 고체 표면은 그에 커플링된 친수성 중합체 코팅 층을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체 코팅 층은 50도 미만의 물 접촉각을 가진다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 고체 표면에 커플링된 생물학적 샘플을 이미지화하여 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열 및/또는 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하도록 구성된 광학 이미지화 모듈을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고 제2 표적 폴리펩티드는 제2 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본원은 적어도 하나의 프로세서를 포함하는 컴퓨팅 장치, 실행 가능한 명령어를 수행하도록 구성된 운영 시스템, 메모리, 및 컴퓨팅 장치에 의해 실행될 수 있는 명령어를 포함하는 컴퓨터 프로그램을 포함하는 컴퓨터 구현 시스템을 제공하며, 여기서 상기 명령어는 본원에 개시된 방법을 포함한다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본원은 하나 이상의 프로세서에 의해 실행될 수 있는 명령어를 포함하는 컴퓨터 프로그램으로 인코딩된 비일시적 컴퓨터 판독 가능한 저장 매체이고, 여기서 상기 명령어는 본원에 개시된 방법을 포함한다.

[0023] 또 다른 측면에서 본원은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 키트를 제공하고, 여기서 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 상기 키트는 하기 (a) 내지 (g)를 포함한다: (a) 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내에서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분

사이에 갭을 포함하고, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체, 압축 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 역상보체, 또는 핵산 증폭용 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함함; (b) 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 일부의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내에서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체, 압축 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 역상보체, 또는 핵산 증폭용 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함함; (c) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하거나, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하도록 구성된 제1 핵산 효소; (d) 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 제1 콘카티머를 생성하거나 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 제2 콘카티머를 생성하도록 구성된 제2 핵산 효소; (e) 제3 핵산 효소, 제1 콘카티머의 부분 또는 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 시퀀싱 프라이머, 복수의 뉴클레오타이드 또는 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 여기서 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체는 코어와 코어에 부착된 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, (i) 여기서 제3 핵산 효소, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 및 시퀀싱 프라이머는 제3 핵산 효소, 제1 또는 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하도록 구성되거나; (ii) 여기서 적어도 2개의 제3 핵산 효소, 뉴클레오타이드 접합체, 시퀀싱 프라이머, 및 제1 또는 제2 콘카티머는 제3 핵산 효소, 뉴클레오타이드 접합체, 및 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 제1 또는 제2 콘카티머를 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성되고, 여기서 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 제1 또는 제2 콘카티머의 2개의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하며, 2개의 제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머 각각은 2개의 시퀀싱 프라이머 각각에 하이브리드화됨; (f) 단계 (i) 또는 (ii)를 수행하도록 구성된 제4 핵산 효소: (i) 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드를 제1 콘카티머에 하이브리드화된 시퀀싱 프라이머의 말단에 추가하고 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 표지부착되어 있지 않고 차단기를 포함하는 것인 단계; 또는 (ii) 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드를 제2 콘카티머에 하이브리드화된 시퀀싱 프라이머의 말단에 추가하고 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드가 표지부착되어 있지 않고 차단기를 포함하는 것인 단계; 및 (g) 제1 콘카티머로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하거나 제2 콘카티머로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하도록 구성된 해리 시약. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열 및 제1 표적 폴리펩티드와 제2 표적 폴리펩티드를 포함하는 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하도록 추가로 구성되며, 이 키트는 제1 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제2 표적 폴리펩티드는 제2 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고, 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1, 제2, 제3 또는 제4 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 제거 가능한 차단기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함하는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 상기 적어도 두 유형 중 한 유형의 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함하고, 상기 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의

군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 (a) 제1 짧은 핵산을 포함하고 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체; 또는 (b) 제2 짧은 핵산을 포함하고 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하고, 여기서 제1 짧은 핵산은 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함하고, 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 제1 태그 서열과 제2 태그 서열은 제1 결합 모이어티를 식별하고, 제2 짧은 핵산은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 제3 태그 서열과 제4 태그 서열은 제2 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 키트는 (a) 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드; 또는 (b) 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하고, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 결합 모이어티를 식별하는 제3 식별 서열을 포함하고, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제2 결합 모이어티를 식별하는 제4 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드와 제3 올리고뉴클레오타이드는 동일한 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드와 제4 올리고뉴클레오타이드는 동일한 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드 모이어티의 당 모이어티의 3' 탄소에서 반응성 기와 반응하는 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 뉴클레오타이드 결합 반응에 사용하기 위한 시약도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시약은 양이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 역전사효소, 역전사용 프라이머, 시퀀싱 프라이머, 생물학적 샘플을 투과 가능하게 만들도록 구성된 시약, 생물학적 샘플을 고착하도록 구성된 시약, 차단되지 않은 뉴클레오타이드, 차단된 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 혼입 반응에 사용하기 위한 시약, 양이온을 포함하는 용액, 하나 이상의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드, 하나 이상의 역전사용 완충제, 하나 이상의 핵산 결합용 완충제, 하나 이상의 핵산 증폭용 완충제, 또는 하나 이상의 핵산 해리용 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열과 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 설명서는 합성에 의한 시퀀싱 반응을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 설명서는 결합에 의한 시퀀싱 반응을 수행하는 것을 포함하며, 여기서 제자리에서의 검출은 뉴클레오타이드 혼입 단계와 동시에 이루어지지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 본원에 개시된 방법을 이용한 키트의 사용에 대한 설명서를 추가로 포함한다.

[0024] **참고에 의한 포함**

[0025] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참고로 포함되는 것으로 구체적 및 개별적으로 표시된 것처럼 동일한 정도로 본원에 참고로 포함된다. 참고로 포함되는 간행물 및 특허 또는 특허 출원이 본 명세서에 함유된 개시내용과 모순되는 경우, 본 명세서는 임의의 이러한

모순되는 자료를 대체하고/하거나 이러한 자료보다 우선한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 본 발명적 개념의 신규 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 제시되어 있다. 본 발명적 개념의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 하기 상세한 설명 및 첨부된 도면을 참조함으로써 본 발명적 개념의 특징 및 장점을 더 잘 이해할 것이다.

도 1은 세포 샘플 내부에서 콘카티머를 생성하기 위한 비제한적 예시 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 세포 샘플에 의해 보유된 표적 RNA는 역전사 프라이머(RT 프라이머)에 하이브리드화되고 역전사가 수행되어 제1 가닥 cDNA를 합성한다. 제1 가닥 cDNA는 표적 특이적 패드락 프로브에 하이브리드화되어, 하이브리드화된 패드락 프로브의 제1 말단과 제2 말단 사이에 닉(nick)(실선 하향 삼각형)을 가진 원형화된 패드락 프로브를 생성한다. 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위에 대한 어댑터, 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 대한 어댑터, 및 주어진 표적 cDNA에 상응하는 표적 바코드 서열을 가진다. 원형화된 패드락 프로브의 닉은 라이게이션되어, 표적 RNA에 상응하는 cDNA 서열을 가진 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 형성한다. GAPDH cDNA에 선택적으로 결합하는 비제한적 예시 패드락 프로브의 서열은 도 1의 하단에 표시되어 있다. 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브는 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭을 거쳐, 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 콘카티머 분자는 세포 샘플 내부에서 반복적으로 시퀀싱될 수 있다.

도 2는 도 1에 표시된 바와 같이 세포 내부에서 생성된 콘카티머를 시퀀싱하기 위한 비제한적 예시 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 도 2에 도시된 콘카티머는 탠덤 반복부 유닛을 포함하고, 여기서 각각의 유닛은 (i) 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(Seq), (ii) 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(CO), (iii) 주어진 표적 cDNA에 상응하는 삽입체 서열, 및 (iv) 주어진 표적 cDNA에 상응하는 표적 바코드 서열(BC)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 시퀀싱 프라이머(실선 화살표)는 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하고 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 표적 바코드 서열만을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 표적 바코드 서열만을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 다시 한 번 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 표적 바코드 서열만을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복적 시퀀싱은 50회까지 수행될 수 있다. 모든 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열이 확인될 수 있고 제1 기준 서열(예를 들어, 기준 바코드 서열)과 정렬되어, 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜 줄 수 있다.

도 3은 도 1에 표시된 바와 같이 세포 내부에서 생성된 콘카티머를 시퀀싱하기 위한 비제한적 예시 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 도 3에 도시된 콘카티머는 탠덤 반복부 유닛을 포함하며, 여기서 각각의 유닛은 (i) 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(Seq), (ii) 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(CO), (iii) 주어진 표적 cDNA에 상응하는 삽입체 서열, 및 (iv) 주어진 표적 cDNA에 상응하는 표적 바코드 서열(BC)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 시퀀싱 프라이머(실선 화살표)는 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하고 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 표적 바코드 서열 및 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 표적 바코드 서열 및 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 다시 한 번 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 표적 바코드 서열 및 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복적 시퀀싱은 50회까지 수행될 수 있다. 모든 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열이 확인될 수 있고 제1 기준 서열(예를 들어, 기준 바코드 서열, 및 표적 RNA에 상응하는 삽입체 서열)과 정렬되어, 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜 줄 수 있다.

도 4는 도 1에 표시된 바와 같이 세포 내부에서 생성된 콘카티머를 시퀀싱하기 위한 비제한적 예시 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 도 4에 도시된 콘카티머는 탠덤 반복부 유닛을 포함하며, 여기서 각각의 유닛은 (i) 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(Seq), (ii) 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(CO), 및 (iii) 주어진 표적 cDNA에 상응하는 삽입체 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 시퀀싱 프라이머(실선 화살표)는 범용

시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하고 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 다시 한 번 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복적 시퀀싱은 50회까지 수행될 수 있다. 모든 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열이 확인될 수 있고 제1 기준 서열(예를 들어, 표적 RNA에 상응하는 삽입체 서열)과 정렬되어, 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜 줄 수 있다.

도 5는 도 1에 표시된 바와 같이 세포 내부에서 생성된 콘카티머를 시퀀싱하기 위한 비제한적 예시 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 도 5에 도시된 콘카티머는 탠덤 반복부 유닛을 포함하며, 여기서 각각의 유닛은 (i) 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(Seq), 및 (ii) 주어진 표적 cDNA에 상응하는 삽입체 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 범용 시퀀싱 프라이머(실선 화살표)는 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하고 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 콘카티머로부터 제거되고, 30회 이하의 시퀀싱 주기가 수행되어 또 다른 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물(쇄선 화살표)을 생성하는 시퀀싱이 다시 한 번 반복되는데, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물은 삽입체 서열의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복적 시퀀싱은 50회까지 수행될 수 있다. 모든 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열이 확인될 수 있고 제1 기준 서열(예를 들어, 표적 RNA에 상응하는 삽입체 서열)과 정렬되어, 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜 줄 수 있다.

도 6은 폴리라이신으로 코팅된 유동 셀에서 배양된 HEK 293 세포로부터 방출된 형광 시퀀싱 신호의 이미지를 보여준다. 배양된 세포를 고착하고 투과 가능하게 만들고, 이 세포에 대해 역전사 반응을 수행하고 유동 셀에서 롤링 서클 증폭을 수행하였는데, 이 모든 과정을 세포 내부에서 세포 핵산을 유지하기에 적합한 조건 하에서 수행하였다. 코팅된 유동 셀은 표면 포획 프라이머를 결여하였다. 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자와 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체를 사용하는 2-단계 시퀀싱 방법을 이용하여 세포 내에 유지된 핵산을 시퀀싱하였다. 4개의 형광단 중 하나로 표지부착된 다가 분자 및 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 30회 주기의 2-단계 시퀀싱 반응을 수행하였다. 도 6은 제2 제자리 시퀀싱 실험의 결과를 보여준다(실시예 1 참조). 도 6은 주기 20 내지 25의 형광 신호를 보여주는데, 여기서 서열은 CCTCCT로 판독된다. 모든 주기에서 총 4620개의 형광 스팟이 유의미한 신호와 함께 검출되었다. 형광 스팟의 90% 이상이 샘플 인덱스 서열을 검출하였다.

도 7은 다가 분자의 다양한 비제한적 예시 구성의 개략도이다. 왼쪽(클래스 I): "스타버스트(starburst)" 또는 "헬터-스켈터(helter-skelter)" 구성을 가진 다가 분자의 개략도. 중앙(클래스 II): 덴드리머 구성을 가진 다가 분자의 개략도. 오른쪽(클래스 III): 4-아암 또는 8-아암 PEG-NHS를 가진 스트렙타비딘을 바이오틴 및 dNTP와 반응시킴으로써 형성된 다수의 다가 분자의 개략도. 뉴클레오타이드 유닛은 'N'으로 표기되고, 바이오틴은 13'으로 표기되고, 스트렙타비딘은 'SA'로 표기된다.

도 8은 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 일반 코어를 포함하는 비제한적 예시 다가 분자의 개략도이다.

도 9는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 덴드리머 코어를 포함하는 비제한적 예시 다가 분자의 개략도이다.

도 10은 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하는 비제한적 예시 다가 분자의 개략도를 보여주는데, 여기서 뉴클레오타이드 아암은 바이오틴, 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다.

도 11은 코어 부착 모이어티, 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 유닛을 포함하는 비제한적 예시 뉴클레오타이드 아암의 개략도이다.

도 12는 비제한적 예시 스페이서의 화학 구조(상단), 및 11-원자 링커, 16-원자 링커, 23-원자 링커 및 N3 링커를 포함하는 다양한 비제한적 예시 링커의 화학 구조(하단)를 보여준다.

도 13은 링커 1 내지 9를 포함하는 다양한 비제한적 예시 링커의 화학 구조를 보여준다.

도 14는 뉴클레오타이드 유닛에 연결/부착된 다양한 비제한적 예시 링커의 화학 구조를 보여준다.

도 15는 뉴클레오타이드 유닛에 연결/부착된 다양한 비제한적 예시 링커의 화학 구조를 보여준다.

도 16은 뉴클레오타이드 유닛에 연결/부착된 다양한 비제한적 예시 링커의 화학 구조를 보여준다.

도 17은 비제한적 예시 바이오틴화된 뉴클레오타이드 아암의 화학 구조를 보여준다. 이 예에서, 뉴클레오타이드 유닛은 피리미딘 염기의 5 위치 또는 푸린 염기의 7 위치에서 프로파길 아민 부착을 통해 링커에 연결된다.

도 18은 구아닌 테트라드(예를 들어, G-테트라드)의 개략도이다.

도 19는 비제한적 예시 분자내 G-사중체 구조의 개략도이다.

도 20은 제1 표적 RNA 분자 및 제2 표적 RNA 분자로부터 (각각) 제1 cDNA 및 제2 cDNA를 생성하는 단계, 제1 패드락 프로브 및 제2 패드락 프로브를 (각각) 제1 cDNA 분자 및 제2 cDNA 분자에 하이브리드화하여 (각각) 제1 원형화된 패드락 프로브 및 제2 원형화된 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함하는, 원형화된 패드락 프로브를 생성하는 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 제1 패드락 프로브는 (i) 제1 표적 RNA를 고유하게 식별하는 제1 표적 바코드 서열(표적 BC-1), (ii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1)(또는 이의 상보적 서열), (iii) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), 및 (iv) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 제2 패드락 프로브는 (i) 제2 표적 RNA를 고유하게 식별하는 제2 표적 바코드 서열(표적 BC-2), (ii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2)(또는 이의 상보적 서열), (iii) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), 및 (iv) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

도 21은 제1 공유 폐쇄된 원형 분자 및 제2 공유 폐쇄된 원형 분자를 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행함으로써 (각각) 제1 콘카티머 및 제2 콘카티머를 생성하는 롤링 서클 및 시퀀싱 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 제1 시퀀싱 워크플로우를 제1 콘카티머와 제2 콘카티머에 대해 수행한다. 제1 콘카티머는 반복적 시퀀싱을 거치지만 제2 콘카티머는 반복적 시퀀싱을 거치지 않는다. 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 제2 시퀀싱 워크플로우를 제1 콘카티머와 제2 콘카티머에 대해 수행한다. 제2 콘카티머는 반복적 시퀀싱을 거치지만 제1 콘카티머는 반복적 시퀀싱을 거치지 않는다.

도 22는 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 보여주는 개략도이다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 포함한다. 제1 항체는 제1 올리고뉴클레오타이드에 연결되어 있으며, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열을 가진다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 포함한다. 제2 항체는 제2 올리고뉴클레오타이드에 연결되어 있으며, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드는 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열을 가진다. 제1 태그 서열, 제2 태그 서열, 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열은 서로 상이하다.

도 23은 각각의 표적 폴리펩티드 및 각각의 패드락 프로브에 각각 결합된 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 보여주는 개략도이다.

제1 패드락 프로브는 (i) 제1 태그 서열에 하이브리드화할 수 있는 서열, (ii) 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 고유하게 식별하는 제3 표적 바코드 서열(표적 BC-3), (iii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1)(또는 이의 상보적 서열), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), (v) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위(또는 이의 상보적 서열), 및 (vi) 제2 태그 서열에 하이브리드화할 수 있는 서열을 포함한다. 제2 패드락 프로브는 (i) 제3 태그 서열에 하이브리드화할 수 있는 서열, (ii) 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 고유하게 식별하는 제4 표적 바코드 서열(표적 BC-4), (iii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2)(또는 이의 상보적 서열), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), (v) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위(또는 이의 상보적 서열), 및 (vi) 제4 태그 서열에 하이브리드화할 수 있는 서열을 포함한다.

도 24는 제1 표적 RNA와 제1 표적 폴리펩티드에 대한 롤링 서클 증폭 및 시퀀싱 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 제1 표적 cDNA 분자(왼쪽 상단 개략도)는 (i) 제1 표적 cDNA에 하이브리드화하는 제1 결합 아암과 제2 결

합 아암, (ii) 제1 표적 cDNA를 고유하게 식별하는 제1 바코드 서열(BC-1), (iii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위, 및 (v) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위를 가진 제1 cDNA에 대한 표적 특이적 패드락 프로브와 하이브리드화한다. 하이브리드화된 제1 패드락 프로브는 닉 또는 갭을 포함하고, 상기 닉 또는 갭은 효소에 의해 폐쇄되어, 제1 cDNA 서열을 가진 제1 공유 폐쇄된 원형 분자를 생성한다. 공유 폐쇄된 원형 분자는 롤링 서클 증폭을 거쳐 제1 cDNA 콘카티머 분자(상단 콘카티머 분자)를 생성한다. 제1 cDNA 콘카티머 분자는 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 사용하는 시퀀싱을 거친다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체(오른쪽 상단 개략도)는 제1 표적 폴리펩티드와 결합한다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 올리고뉴클레오타이드는 (i) 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열에 하이브리드화하는 제1 결합 아암 및 제2 결합 아암, (ii) 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 고유하게 식별하는 제3 바코드 서열(BC-3), (iii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위, 및 (v) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위를 가진 제1 표적 폴리펩티드-올리고뉴클레오타이드 접합체에 대한 표적 특이적 패드락 프로브에 결합한다. 하이브리드화된 제1 패드락 프로브는 닉 또는 갭을 포함하고, 상기 닉 또는 갭은 효소에 의해 폐쇄되어, 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 가진 제3 공유 폐쇄된 원형 분자를 생성한다. 공유 폐쇄된 원형 분자는 롤링 서클 증폭을 거쳐 제3 올리고뉴클레오타이드-태그부착된 콘카티머 분자(하단 콘카티머 분자)를 생성한다. 제3 올리고뉴클레오타이드-태그부착된 콘카티머 분자는 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 사용하는 시퀀싱을 거친다.

도 25는 제2 표적 RNA 및 제2 표적 폴리펩티드에 대한 롤링 서클 증폭 및 시퀀싱 워크플로우를 보여주는 개략도이다. 제2 표적 cDNA 분자(왼쪽 상단 개략도)는 (i) 제2 표적 cDNA에 하이브리드화하는 제1 결합 아암과 제2 결합 아암, (ii) 제2 표적 cDNA를 고유하게 식별하는 제2 바코드 서열(BC-2), (iii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위, 및 (v) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위를 가진 제2 cDNA에 대한 표적 특이적 패드락 프로브와 하이브리드화한다. 하이브리드화된 제2 패드락 프로브는 닉 또는 갭을 포함하고, 상기 닉 또는 갭은 효소에 의해 폐쇄되어, 제2 cDNA 서열을 가진 제2 공유 폐쇄된 원형 분자를 생성한다. 공유 폐쇄된 원형 분자는 롤링 서클 증폭을 거쳐 제2 cDNA 콘카티머 분자(상단 콘카티머 분자)를 생성한다. 제2 cDNA 콘카티머 분자는 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 사용하는 시퀀싱을 거친다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체(오른쪽 상단 개략도)는 제2 표적 폴리펩티드와 결합한다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 올리고뉴클레오타이드는 (i) 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열에 하이브리드화하는 제1 결합 아암 및 제2 결합 아암, (ii) 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 고유하게 식별하는 제4 바코드 서열(BC-4), (iii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위, 및 (v) 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위를 가진 제2 표적 폴리펩티드-올리고뉴클레오타이드 접합체에 대한 표적 특이적 패드락 프로브에 결합한다. 하이브리드화된 제4 패드락 프로브는 닉 또는 갭을 포함하고, 상기 닉 또는 갭은 효소에 의해 폐쇄되어, 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 가진 제4 공유 폐쇄된 원형 분자를 생성한다. 공유 폐쇄된 원형 분자는 롤링 서클 증폭을 거쳐 제4 올리고뉴클레오타이드-태그부착된 콘카티머 분자(하단 콘카티머 분자)를 생성한다. 제4 올리고뉴클레오타이드-태그부착된 콘카티머 분자는 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 사용하는 시퀀싱을 거친다.

도 26은 본원에 제공된 방법을 실행하도록 프로그래밍되어 있거나 달리 구성되어 있는 컴퓨터 시스템을 보여준다.

도 27은 다수의 링커를 통해 다수의 올리고뉴클레오타이드에 접합된 항체의 비제한적 예시 방법을 도시한다. 검출 효율은 본원에 설명된 바와 같이 링커 모이어티를 직접 또는 다가 구조를 통해 추가함으로써 증가될 수 있다. 이것은 롤링 서클 증폭으로 인한 비-검출을 감소시킬 수 있다.

도 28은 본원에 개시된 비제한적 예시 방법을 도시한다. 제1 항체와 제1 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 및 제2 항체와 제2 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 표적 RNA에 상응하는 동일한 표적 단백질에 대해 사용될 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드 태그와 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 본원에 개시된 바와 같이 패드락 프로브를 원형화하는 데 사용될 수 있다. 이 방법은 결합 특이성을 증가시킬 수 있다.

도 29는 본원에 개시된 비제한적 예시 방법을 도시한다. 제1 항체와 제1 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 및 제2 항체와 제2 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하는 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 표적 RNA에 상응하는 동일한 표적 단백질에 대해 사용될 수 있다. 제1 올리고뉴클

레오타이드 태그와 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 본원에 개시된 바와 같이 패드락 프로브를 원형화하는 데 사용될 수 있다. 이 방법은 결합 특이성을 증가시킬 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] **정의**

[0028] 본원에서 제공된 제목은 본 개시내용의 다양한 측면의 제한이 아니며, 이러한 측면은 본 명세서를 전체적으로 참조함으로써 이해될 수 있다.

[0029] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 기술 및 과학 용어는 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가진다. 일반적으로, 본원에 설명된 분자 생물학, 핵산 화학, 단백질 화학, 유전학, 미생물학, 형질전환 세포 제조 및 하이브리드화의 기법에 관한 전문용어는 당분야에 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 용어이다. 본원에 설명된 기법 및 절차는 당분야에 잘 알려진 통상적인 방법에 따라 일반적으로 수행되며, 본 명세서 전체에서 인용되고 논의되는 다양한 일반 참고문헌 및 보다 구체적인 참고문헌에 설명된 바와 같다. 예를 들어, 전문이 참고로 포함되는 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2000)]을 참조한다. 전문이 참고로 포함되는 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)]도 참조한다. 본원에 설명된 실험실 절차 및 기법과 관련하여 사용된 명명법, 및 이러한 절차와 기법은 당분야에 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 명명법 및 절차와 기법이다.

[0030] 본원에서 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함한다. 임의의 단어의 단수형 및 단수 사용은, 하나의 지시대상으로 명확하고 명료하게 제한되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다.

[0031] 택일적 용어(예를 들어, "또는")의 사용은 대안 중 하나 또는 둘 다, 또는 이들의 임의의 조합을 의미하는 것으로 간주된다는 것을 이해한다.

[0032] 본원에서 사용된 용어 "및/또는"은 다른 것과 함께 또는 다른 것 없이 특정된 기능 또는 구성요소 각각의 구체적인 개시를 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 문구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 "A 및 B"; "A 또는 B"; "A"(A 단독); 또는 "B"(B 단독)을 포함하기 위한 것이다. 마찬가지로, "A, B 및/또는 C"와 같은 문구에서 사용되는 용어 "및/또는"은 다음 측면 각각을 포괄하기 위한 것이다: "A, B 및 C"; "A, B 또는 C"; "A 또는 C"; "A 또는 B"; "B 또는 C"; "A 및 B"; "B 및 C"; "A 및 C"; "A"(A 단독); "B"(B 단독); 또는 "C"(C 단독).

[0033] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 본원에서 사용된 용어 "포함하는", "비롯한", "가진" 및 "함유하는"과 이들의 문법적 변형어는 목록에 있는 한 항목 또는 여러 항목이 나열된 항목으로 대체될 수 있거나 나열된 항목에 추가될 수 있는 다른 항목을 배제하지 않도록 제한하지 않기 위한 것이다. 본원에서 측면이 "포함하는"이라는 용어로 설명되는 경우, "로 이루어진" 및/또는 "로 본질적으로 이루어진"의 관점에서 설명된 다른 유사한 측면도 제공된다는 것을 이해한다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약" 및 "대략"은 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에 의해 확인될 때 특정 값 또는 조성에 대한 허용 가능한 오차 범위 내에 있는 값 또는 조성을 의미하며, 이러한 값 또는 조성은 값 또는 조성이 어떻게 측정되거나 결정되는지, 즉, 측정 시스템의 한계에 부분적으로 의존할 것이다. 예를 들어, "약" 또는 "대략"은 당분야의 관행에 따라 1 이상의 표준 편차 내에 있음을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약" 또는 "대략"은 측정 시스템의 한계에 따라 최대 10%(즉, ±10%) 또는 그 이상의 범위를 의미할 수 있다. 예를 들어, 약 5 mg은 4.5 mg과 5.5 mg 사이의 임의의 숫자를 포함할 수 있다. 더욱이, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 상기 용어들은 최대 한 자릿수 또는 최대 5배의 값을 의미할 수 있다. 본 개시내용에서 특정 값 또는 조성이 제공될 때, 달리 언급되지 않는 한, "약" 또는 "대략"의 의미는 그 특정 값 또는 조성에 대한 허용 가능한 오차 범위 내에 있는 것으로 가정되어야 한다. 또한, 값의 범위 및/또는 하위범위가 제공되는 경우, 범위 및/또는 하위범위는 범위 및/또는 하위범위의 종점을 포함할 수 있다.

[0035] 본원에서 사용된 용어 "중합효소" 및 이의 변형어는 중합효소가 주형 핵산 및 상보적 뉴클레오타이드를 가진 복합체를 형성할 수 있는 경우 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)에 결합하는 도메인을 포함하는 효소를 포함한다. 중합효소는 염기 유사체 검출 활성, DNA 중합 활성, 역전사효소 활성, DNA 결합, 가닥 치환 활성, 및 뉴클레오타이드 결합과 인식을 포함하나 이들로 제한되지 않는 하나 이상의 활성을 가질 수 있다. 중합효소는 뉴

클레오타이드(이의 유사체 포함)를 핵산 가닥으로 중합하는 것을 촉매작용할 수 있는 임의의 효소일 수 있다. 전형적으로, 이러한 뉴클레오타이드 중합은 주형 이존적 방식으로 일어날 수 있으나, 반드시 그러한 것은 아니다. 전형적으로, 중합효소는 뉴클레오타이드 결합 및/또는 뉴클레오타이드 중합의 촉매작용이 일어날 수 있는 하나 이상의 활성 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합효소는 예를 들어, 3'-5' 엑소뉴클레아제 활성 또는 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성과 같은 다른 효소 활성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합효소는 가닥 치환 활성을 가진다. 중합효소는 천연 생성 중합효소 및 이의 임의의 서브유닛과 절두체, 돌연변이체 중합효소, 변이체 중합효소, 재조합, 융합 또는 기타 방식으로 조작된 중합효소, 화학적으로 변형된 중합효소, 합성 분자 또는 조립체, 및 뉴클레오타이드 중합을 촉매작용하는 능력을 보유하는 이들의 임의의 유사체, 유도체 또는 단편(예를 들어, 촉매 활성 단편)을 제한 없이 포함할 수 있다. 중합효소는 촉매적 불활성 중합효소, 촉매적 활성 중합효소, 역전사효소, 및 뉴클레오타이드 결합 도메인을 포함하는 다른 효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합효소는 세포로부터 단리될 수 있거나, 재조합 DNA 기술 또는 화학적 합성 방법의 이용을 통해 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합효소는 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 파지 유기체에서 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합효소는 번역 후 변형된 단백질 또는 이의 단편일 수 있다. 중합효소는 원핵생물, 진핵생물, 바이러스 또는 파지로부터 유래할 수 있다. 중합효소는 DNA 지향 DNA 중합효소 및 RNA 지향 DNA 중합효소를 포함한다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "가닥 치환"은 중합효소가 이중 가닥 핵산의 가닥을 국소적으로 분리하고 주형 기반 방식으로 새로운 가닥을 합성하는 능력을 의미한다. 가닥 치환 중합효소는 주형 가닥으로부터 상보적인 가닥을 치환하고 새로운 가닥 합성을 촉매작용한다. 가닥 치환 중합효소는 중온성 중합효소 및 호열성 중합효소를 포함한다. 가닥 치환 중합효소는 야생형 효소, 및 엑소뉴클레아제 결여 돌연변이체, 돌연변이체 버전, 키메라 효소 및 절두된 효소를 비롯한 변이체를 포함한다. 가닥 치환 중합효소의 예는 phi29 DNA 중합효소, Bst DNA 중합효소의 큰 단편, Bsu DNA 중합효소의 큰 단편(엑소-), Bca DNA 중합효소(엑소-), 이. 콜라이(*E. coli*) DNA 중합효소의 클레나우(Klenow) 단편, T5 중합효소, M-MuLV 역전사효소, HIV 바이러스 역전사효소, 딥 벤트(Deep Vent) DNA 중합효소 및 KOD DNA 중합효소를 포함한다. phi29 DNA 중합효소는 야생형 phi29 DNA 중합효소(예를 들어, 엑스페데온(Expedeon)의 MagniPhi), 또는 변이체 EquiPhi29 DNA 중합효소(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)의 제품) 또는 키메라 QualiPhi DNA 중합효소(예를 들어, 4베이스바이오(4basebio)의 제품)일 수 있다.

[0037] 본원에서 사용된 용어 "핵산", "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드", 및 다른 관련 용어는 교환 가능하게 사용되며 뉴클레오타이드의 중합체를 지칭하고 임의의 특정 길이로 제한되지 않는다. 핵산은 재조합 형태 및 화학적으로 합성된 형태를 포함한다. 핵산은 단리될 수 있다. 핵산은 DNA 분자(예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자(예를 들어, mRNA), 뉴클레오타이드 유사체(예를 들어, 펩티드 핵산(PNA) 및 비천연 생성 뉴클레오타이드 유사체)를 사용함으로써 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체, 및 DNA 와 RNA를 함유하는 키메라 형태를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 핵산은 뉴클레오타이드의 중합체를 포함하고, 여기서 뉴클레오타이드는 천연 또는 비천연 염기 및/또는 당을 포함한다. 핵산은 천연 생성 뉴클레오사이드간 결합, 예를 들어, 포스포디에스테르 결합을 포함한다. 핵산은 포스페이트 기를 결여할 수 있다. 핵산은 포스포로티오에이트, 포스포로티올레이트 또는 펩티드 핵산(PNA) 결합을 포함하는 비천연 뉴클레오사이드간 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 한 유형의 폴리뉴클레오타이드, 또는 2가지 이상의 상이한 유형의 폴리뉴클레오타이드의 혼합물을 포함한다.

[0038] 본원에서 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된" 및 "작동 가능하게 회합된" 또는 관련 용어는 구성요소의 병치를 의미한다. 병치된 구성요소는 공유 결합에 의해 함께 연결될 수 있다. 예를 들어, 두 핵산 구성요소들은 효소에 의해 함께 라이게이션될 수 있으며, 여기서 두 구성요소들을 함께 연결하는 결합은 포스포디에스테르 결합을 포함한다. 제1 핵산 구성요소와 제2 핵산 구성요소는 함께 연결될 수 있으며, 여기서 제1 핵산 구성요소는 제2 핵산 구성요소에 기능을 부여할 수 있다. 예를 들어, 프라이머 결합 서열과 관심 있는 서열 사이의 결합은 프라이머에 결합할 수 있는 부분을 가진 핵산 라이브러리 분자를 형성한다. 또 다른 예에서, 형질전환유전자(예를 들어, 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 또는 관심 있는 핵산 서열)은 벡터에 라이게이션될 수 있으며, 여기서 결합은 벡터에 함유된 형질전환유전자 서열의 발현 또는 기능을 허용한다. 일부 실시양태에서, 형질전환유전자는 형질전환유전자의 발현에 영향을 미치는 숙주 세포 조절 서열(예를 들어, 프로모터 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 프로모터 서열, 인핸서, 전사 및/또는 번역 개시 서열, 전사 및/또는 번역 종결 서열, 폴리펩티드 분비 신호 서열 등을 비롯한 적어도 하나의 숙주 세포 조절 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포 조절 서열은 형질전환유전자의 발현 수준, 타이밍 및/또는 위치를 조절한다.

[0039] 용어 "연결된", "회합된", "부착된", "부가된" 및 이들의 변형어는 특정 절차에서의 사용을 견딜 수 있을 만큼 충분한 안정성을 가진 화합물 또는 분자의 임의의 조합 사이의 임의의 유형의 융합, 결합, 접착 또는 회합을 포함한다. 상기 절차는 뉴클레오타이드 결합; 뉴클레오타이드 혼입; 차단해제(예를 들어, 쇄 종결 모이어티의 제거); 세척; 제거; 유동; 검출; 이미지화 및/또는 식별; 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 결합은 예를 들어, 공유 결합, 이온 결합, 수소 결합, 쌍극자-쌍극자 결합, 친수성 결합, 소수성 결합 또는 친화성 결합, 반데르발스 힘을 수반하는 결합 또는 회합, 기계적 결합 등, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 결합은 분자내에서 발생하여, 예를 들어, 단일 가닥 또는 이중 가닥 선형 핵산 분자의 말단을 함께 연결함으로써 원형 분자를 형성한다. 일부 실시양태에서, 이러한 결합은 핵산 분자와 고체 표면 사이의 결합, 단백질과 검출 가능한 리포터 모이어티 사이의 결합, 뉴클레오타이드와 검출 가능한 리포터 모이어티 사이의 결합 등을 포함하나 이들로 제한되지 않는, 다양한 분자들의 조합 사이, 또는 분자와 비-분자 사이에서 발생할 수 있다. 결합의 일부 예는 예를 들어, 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Hermanson, G., "Bioconjugate Techniques", Second Edition (2008); Aslam, M., Dent, A., "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", London: Macmillan (1998); Aslam, M., Dent, A., "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", London: Macmillan (1998)]에서 찾을 수 있다.

[0040] 본원에서 사용된 용어 "프라이머" 및 관련 용어는 DNA 및/또는 RNA 폴리뉴클레오타이드 주형과 하이브리드화하여 이중체 분자를 형성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 프라이머는 천연 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 프라이머는 재조합 핵산 분자일 수 있다. 프라이머는 임의의 길이를 가질 수 있으나, 전형적으로 길이가 4개 내지 50개 뉴클레오타이드일 수 있다. 전형적인 프라이머는 5' 말단과 3' 말단을 포함한다. 프라이머의 3' 말단은 중합효소 촉진 프라이머 연장 반응에서 뉴클레오타이드 중합 개시 부위로서 역할을 하는 3' OH 모이어티를 포함할 수 있다. 대안적으로, 프라이머의 3' 말단은 3' OH 모이어티를 결여할 수 있거나, 중합효소 촉진 반응에서 뉴클레오타이드 중합을 억제하는 말단 3' 차단기를 포함할 수 있다. 프라이머의 길이를 따라 어느 한 뉴클레오타이드 또는 하나 초과의 뉴클레오타이드를 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착할 수 있다. 프라이머는 용액에 있을 수 있거나(예를 들어, 가용성 프라이머), 지지체에 고착될 수 있다(예를 들어, 포획 프라이머).

[0041] 용어 "주형 핵산", "주형 폴리뉴클레오타이드", "표적 핵산", "표적 폴리뉴클레오타이드", "주형 가닥" 및 기타 변형어는 본원에 설명된 반복적 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법을 위한 기본 핵산 분자로서 역할을 하는 핵산 가닥을 지칭한다. 주형 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있으며, 주형 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥 부분을 가질 수 있다. 주형 핵산은 천연 생성 공급원으로부터 얻을 수 있거나, 재조합 형태로 얻을 수 있거나, 임의의 유형의 핵산 유사체를 포함하도록 화학적으로 합성될 수 있다. 주형 핵산은 선형, 원형 또는 기타 형태일 수 있다. 주형 핵산은 삽입체 서열을 가진 삽입체 부분을 포함할 수 있다. 주형 핵산은 적어도 하나의 어댑터 서열도 포함할 수 있다. 삽입체 부분은 염색체, 게놈, 세포소기관(예를 들어, 미토콘드리아, 엽록체 또는 리보좀), 재조합 분자, 클로닝된 형태, 증폭된 형태, cDNA, 전구체 mRNA 또는 mRNA와 같은 RNA, 올리고뉴클레오타이드, 신선한 냉동 파라핀 포매 조직으로부터 얻은 전체 게놈 DNA, 바늘 생검, 순환 종양 세포, 무세포 순환 DNA, 또는 임의의 유형의 핵산 라이브러리를 포함하는 임의의 형태로 단리될 수 있다. 삽입체 부분은 유기체, 예컨대, 원핵생물, 진핵생물(예를 들어, 인간, 식물 및 동물), 진균, 바이러스 세포, 조직, 정상 또는 병든 세포 또는 조직, 혈액, 소변, 혈청, 림프, 종양, 타액, 항문 및 질 분비물, 양수 샘플, 땀, 정액을 포함하는 체액, 환경 샘플, 배양 샘플, 또는 재조합 분자 생물학 또는 화학 합성 방법을 이용하여 제조한 합성된 핵산 분자를 포함하는 임의의 공급원으로부터 단리될 수 있다. 삽입체 부분은 머리, 목, 뇌, 유방, 난소, 자궁경부, 결장, 직장, 자궁내막, 담낭, 장, 방광, 전립선, 고환, 간, 폐, 신장, 식도, 췌장, 갑상선, 뇌하수체; 흉선, 피부, 심장, 후두 또는 기타 장기를 포함하는 임의의 장기로부터 단리될 수 있다. 주형 핵산에 대해 시퀀싱 및 조성 분석을 포함하는 핵산 분석을 수행할 수 있다.

[0042] 용어 "어댑터" 및 관련 용어는 표적 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결될 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭하고, 여기서 어댑터는 공-연결된 어댑터-표적 분자에 기능을 부여한다. 어댑터는 DNA, RNA, 키메라 DNA/RNA 또는 이의 유사체를 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 하나의 리보뉴클레오사이드 잔기를 포함할 수 있다. 어댑터는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있거나, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥 부분을 가질 수 있다. 어댑터는 선형, 스템-루프, 헤어핀 또는 Y-모양 형태이도록 구성될 수 있다. 어댑터는 4개 내지 100개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 길이일 수 있다. 어댑터는 블런트 말단, 오버행 말단, 또는 이들 둘의 조합을 가질 수 있다. 오버행 말단은 5' 오버행 말단 및 3' 오버행 말단을 포함한다. 단일 가닥 어댑터의 5' 말단 또는

이중 가닥 어댑터의 한 가닥은 5' 포스페이트 기를 가질 수 있거나 5' 포스페이트 기를 결여할 수 있다. 어댑터는 표적 폴리뉴클레오타이드에 하이브리드화하지 않는 5' 테일(예를 들어, 테일을 가진 어댑터)를 포함할 수 있거나, 어댑터는 테일을 갖지 않을 수 있다. 어댑터는 증폭 프라이머, 시퀀싱 프라이머 또는 포획 프라이머(예를 들어, 가용성 또는 고착화된 포획 프라이머)와 같은 프라이머의 적어도 일부에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 무작위 서열 또는 축퇴 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 하나의 이노신 잔기를 포함할 수 있다. 어댑터는 적어도 하나의 포스포로티오에이트, 포스포로티올레이트 및/또는 포스포라미데이트 결합을 포함할 수 있다. 어댑터는 다중체 어세이에서 다양한 샘플 공급원의 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 삽입체 서열)를 구별하는 데 사용될 수 있는 바코드 서열을 포함할 수 있다. 어댑터는 어댑터가 부착된 핵산 분자를 고유하게 식별하는 데 사용될 수 있는 고유 식별 서열(예를 들어, 고유 분자 색인, UMI; 또는 고유 분자 태그)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 고유 식별 서열을 사용하여 오류 수정 및 정확도를 증가시킬 수 있고/있거나, 거짓 양성 변이체 판정률을 감소시킬 수 있고/있거나, 변이체 검출의 민감도를 증가시킬 수 있다. 어댑터는 I형, II형, III형, IV형, Hs형 또는 IIB형으로 이루어진 군으로부터 선택된 2개 이상 중 어느 하나 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 적어도 하나의 제한 효소 인식 서열을 포함할 수 있다.

[0043] 일부 실시양태에서, 임의의 증폭 프라이머 서열, 시퀀싱 프라이머 서열, 포획 프라이머 서열, 표적 포획 서열, 원형화 앵커 서열, 샘플 바코드 서열, 공간 바코드 서열 또는 앵커 영역 서열은 길이가 약 3개 내지 50개 뉴클레오타이드일 수 있거나, 길이가 약 5개 내지 40개 뉴클레오타이드일 수 있거나, 길이가 약 5개 내지 25개 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0044] 용어 "범용 서열" 및 관련 용어는 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 분자들 사이에 공통된 핵산 분자의 서열을 지칭한다. 예를 들어, 범용 서열을 가진 어댑터는 공-연결된 분자들의 집단이 동일한 범용 어댑터 서열을 보유하도록 복수의 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 범용 어댑터 서열의 예는 증폭 프라이머 서열, 시퀀싱 프라이머 서열 또는 포획 프라이머 서열(예를 들어, 가용성 또는 고정화된 포획 프라이머)을 포함한다.

[0045] 핵산 분자와 관련하여 사용될 때, 용어 "하이브리드화한다" 또는 "하이브리드화하는" 또는 "하이브리드화" 또는 기타 관련 용어는 이중체 핵산을 형성하기 위한 2개의 상이한 핵산 사이의 수소 결합을 의미한다. 하이브리드화는 이중체 영역을 가진 자체-하이브리드화 분자를 형성하기 위한 단일 핵산 분자의 2개의 상이한 영역 사이의 수소 결합도 포함한다. 하이브리드화는 이중체 이중 가닥 핵산, 또는 핵산 분자 내의 이중 가닥 영역을 형성하기 위한 왓슨-크릭 또는 후그스틴 결합을 포함할 수 있다. 이중 가닥 핵산, 또는 단일 핵산의 2개의 상이한 영역은 완전히 상보적일 수 있거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 상보적 핵산 가닥들은 그들의 전체 길이에 걸쳐 서로 하이브리드화할 필요가 없다. 상보적 염기 페어링은 표준 A-T 또는 C-G 염기 페어링일 수 있거나, 다른 형태의 염기 페어링 상호작용일 수 있다. 이중체 핵산은 잘못 매칭된 염기-페어링된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0046] 핵산과 관련하여 사용될 때, 용어 "연장한다", "연장하는", "연장" 및 기타 변형어는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 핵산 분자에 혼입하는 것을 의미한다. 뉴클레오타이드 혼입은 하나 이상의 뉴클레오타이드를 핵산 가닥의 말단 3' OH 말단에 중합하여, 핵산 가닥을 연장하는 것을 포함한다. 뉴클레오타이드 혼입은 천연 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체를 사용함으로써 수행될 수 있다. 전형적으로, 뉴클레오타이드 혼입은 주형 의존적 방식으로 일어나지만, 반드시 그러한 것은 아니다. DNA 중합효소 또는 RNA 중합효소에 의해 촉진되는 프라이머 연장을 비롯한, 핵산 분자를 연장하는 임의의 적합한 방법이 이용될 수 있다.

[0047] 용어 "뉴클레오타이드" 및 관련 용어는 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스) 및 적어도 하나의 포스페이트 기를 포함하는 분자를 지칭한다. 정규 또는 비-정규 뉴클레오타이드는 상기 용어의 사용과 일치한다. 일부 실시양태에서, 포스페이트는 모노포스페이트, 디포스페이트 또는 트리포스페이트, 또는 상응하는 포스페이트 유사체를 포함한다. 용어 "뉴클레오사이드"는 방향족 염기와 당을 포함하는 분자를 지칭한다. 뉴클레오타이드 및 뉴클레오사이드는 표지부착되지 않을 수 있거나 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착될 수 있다.

[0048] 뉴클레오타이드(및 뉴클레오사이드)는 전형적으로 천연 생성 핵산, 치환된 핵산, 변형된 핵산, 또는 이의 조작된 변이체 또는 유사체를 비롯한 핵산에서 일반적으로 발견되는 치환된 또는 비치환 질소 함유 모 헤테로방향족 고리를 포함하는 헤테로환형 염기를 포함한다. 뉴클레오타이드(또는 뉴클레오사이드)의 염기는 적절한 상보적 염기와 왓슨-크릭 및/또는 후그스틴 수소 결합을 형성할 수 있다. 비제한적 예시 염기는 푸린 및 피리미딘, 예컨대, 2-아미노푸린, 2,6-디아미노푸린, 아데닌(A), 에테노아데닌, N6-2-이소펜테닐아데닌(6iA), N6-2-이소펜테

닐-2-메틸티오아데닌(2ms6iA), N6-메틸아데닌, 구아닌(G), 이소구아닌, N2-디메틸구아닌(dmG), 7-메틸구아닌(7mG), 2-티오피리미딘, 6-티오구아닌(6sG), 하이포잔틴 및 O6-메틸구아닌; 7-데아자-푸린, 예컨대, 7-데아자아데닌(7-데아자-A) 및 7-데아자구아닌(7-데아자-G); 피리미딘, 예컨대, 사이토신(C), 5-프로피닐사이토신, 이소사이토신, 타이민(T), 4-티오타이민(4sT), 5,6-디하이드로타이민, O4-메틸타이민, 우라실(U), 4-티오우라실(4sU) 및 5,6-디하이드로우라실(디하이드로우라실; D); 인돌, 예컨대, 니트로인돌 및 4-메틸인돌; 피롤, 예컨대, 니트로피롤; 네불라린; 이노신; 하이드록시메틸사이토신; 5-메틸사이토신; 염기(Y)뿐만 아니라; 메틸화된 염기 모이어티, 글리코실화된 염기 모이어티 및 아실화된 염기 모이어티 등도 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 추가 비제한적 예시 염기는 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Fasman, 1989, in "Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", pp. 385-394, CRC Press, Boca Raton, Fla]에서 발견될 수 있다.

[0049] 뉴클레오타이드(및 뉴클레오사이드)는 전형적으로 당 모이어티, 예컨대, 탄소환형 모이어티(전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Ferraro and Gotor 2000 Chem. Rev. 100: 4319-48]), 비고리형 모이어티(둘 다 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Martinez, et al., 1999 Nucleic Acids Research 27: 1271-1274]; 및 문헌[Martinez, et al., 1997 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters vol. 7: 3013-3016]), 및 기타 당 모이어티(모두 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Joeng, et al., 1993 J. Med. Chem. 36: 2627-2638]; 문헌[Kim, et al., 1993 J. Med. Chem. 36: 30-7; Eschenmosser 1999 Science 284:2118-2124]; 및 미국 특허 제5,558,991호)를 포함한다. 당 모이어티는 리보실; 2'-데옥시리보실; 3'-데옥시리보실; 2',3'-디데옥시리보실; 2',3'-디데하이드로디데옥시리보실; 2'-알콕시리보실; 2'-아지도리보실; 2'-아미노리보실; 2'-플루오로리보실; 2'-머캅토리복실; 2'-알킬티오리보실; 3'-알콕시리보실; 3'-아지도리보실; 3'-아미노리보실; 3'-플루오로리보실; 3'-머캅토리복실; 3'-알킬티오리보실 탄소환형; 비고리형 또는 기타 변형된 당을 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드는 1개, 2개 또는 3개의 인 원자로 구성된 쇄를 포함하고, 여기서 상기 쇄는 전형적으로 에스테르 또는 포스포라미드 결합을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되어 있는 인 쇄를 가진 유사체이다. 일부 실시양태에서, 쇄의 인 원자는 O, S 또는 BH3을 비롯한 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄는 포스포라미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 O-메틸포스포라미다이트 기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트 기를 포함한다.

[0051] 용어 "리포터 모이어티", "리포터 모이어티들" 또는 관련 용어는 검출 가능한 신호를 생성하거나 생성하게 하는 화합물을 지칭한다. 리포터 모이어티는 종종 "표지"로 불린다. 발광, 광발광, 전기발광, 생물발광, 화학발광, 형광, 인광, 발색단, 방사성동위원소, 전기화학, 질량 분광측정, 라만, 햅텐, 친화성 태그, 원자 또는 효소를 포함하는 임의의 적합한 리포터 모이어티가 사용될 수 있다. 리포터 모이어티는 화학적 또는 물리적 변화(예를 들어, 열, 빛, 전기, pH, 염 농도, 효소 활성 또는 근접 이벤트)로 인해 발생하는 검출 가능한 신호를 생성한다. 근접 이벤트는 2개의 리포터 모이어티가 서로 접근하거나, 서로 회합하거나 서로 결합하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포터 모이어티는 각각이 여기 방사선을 흡수하고/하거나 다른 리포터 모이어티와 구별될 수 있는 파장에서 형광을 방출하여, 동일한 반응 또는 상이한 반응에서 상이한 리포터 모이어티들의 존재를 모니터링할 수 있게 하도록 선택될 수 있다. 스펙트럼으로 구별되는 방출 프로파일을 갖거나 최소한의 중첩 스펙트럼 방출 프로파일을 가진 2개 이상의 상이한 리포터 모이어티가 선택될 수 있다. 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드, 핵산, 효소(예를 들어, 중합효소 또는 역전사효소) 또는 지지체(예를 들어, 표면)에 연결(예를 들어, 작동 가능하게 연결)될 수 있다.

[0052] 리포터 모이어티(또는 표지)는 형광 표지 또는 형광단을 포함할 수 있다. 형광 표지 또는 형광단으로서 작용할 수 있는 비제한적 예시 형광 모이어티는 플루오레세인 및 플루오레세인 유도체, 예컨대, 카복시플루오레세인, 테트라클로로플루오레세인, 헥사클로로플루오레세인, 카복시나프토플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, NHS-플루오레세인, 요오도아세트아미도플루오레세인, 플루오레세인 말레이미드, SAMSA-플루오레세인, 플루오레세인 티오세미카바자이드, 카보하이드라지노메틸티오아세틸-아미노 플루오레세인, 로다민 및 로다민 유도체, 예컨대, TRITC, TMR, 리사민 로다민, 텍사스 레드, 로다민 B, 로다민 6G, 로다민 10, NHS-로다민, TMR-요오도아세트아미드, 리사민 로다민 B 설포닐 클로라이드, 리사민 로다민 B 설포닐 하이드라진, 텍사스 레드 설포닐 클로라이드, 텍사스 레드 하이드라자이드, 쿠마린 및 쿠마린 유도체, 예컨대, AMCA, AMCA-NHS, AMCA-설포-NHS, AMCA-HPDP, DCIA, AMCE-하이드라자이드, BODIPY 및 유도체, 예컨대, BODIPY FL C3-SE, BODIPY 530/550 C3, BODIPY 530/550 C3-SE, BODIPY 530/550 C3 하이드라자이드, BODIPY 493/503 C3 하이드라자이드, BODIPY FL C3 하이드라자이드, BODIPY FL IA, BODIPY 530/551 IA, Br-BODIPY 493/503, 캐스케이드 블루 및 유도체, 예컨대, 캐스케이드 블루 아세틸 아지드,캐스케이드 블루 카다베린, 캐스케이드 블루 에틸렌디아민, 캐스

케이드 블루 하이드라자이드,루시퍼 옐로우 및 유도체, 예컨대, 루시퍼 옐로우 요오도아세트아미드, 루시퍼 옐로우 CH, 시아닌 및 유도체, 예컨대, 인돌륨 기반 시아닌 염료, 벤조-인돌륨 기반 시아닌 염료, 피리듐 기반 시아닌 염료, 티오졸륨 기반 시아닌 염료, 퀴놀리늄 기반 시아닌 염료, 이미다졸륨 기반 시아닌 염료, Cy 3, Cy5, 란타나이드 킬레이트 및 유도체, 예컨대, BCPDA, TBP, TMT, BHHCT, BCOT, 유로퓸 킬레이트, 테르븀 킬레이트, 알렉사 플루오르 염료, 다이라이트 염료, 아토 염료, 라이트사이클러 레드 염료, CAL 플루오르 염료, JOE 및 이의 유도체, 오레곤 그린 염료, WellRED 염료, IRD 염료, 파이코에리트린 및 파이코빌린 염료, 말라카이트 그린, 스틸벤, DEG 염료, NR 염료, 근적외선 염료 및 당분야에 알려진 다른 염료, 예컨대, 모두 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Haugland, Molecular Probes Handbook, (Eugene, Oreg.) 6th Edition; Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Ed., Plenum Press New York (1999)] 또는 문헌[Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2nd Edition]에 기재된 염료; 또는 이들의 유도체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 시아닌 염료는 설폰화된 형태 또는 비설폰화 형태로 존재할 수 있으며, 2개의 질소 원자 사이의 폴리메틴 가교에 의해 분리된 2개의 인돌레닌, 벤조-인돌륨, 피리듐, 티오졸륨 및/또는 퀴놀리늄 기로 구성된다. 상업적으로 입수 가능한 시아닌 형광단은 예를 들어, Cy3(1-[6-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-2-(3-{1-[6-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-3,3-디메틸-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-일리덴}프로프-1-엔-1-일)-3,3-디메틸-3H-인돌륨 또는 1-[6-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-2-(3-{1-[6-(2,5-디옥소피롤리딘-1-일옥시)-6-옥소헥실]-3,3-디메틸-5-설포-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-일리덴}프로프-1-엔-1-일)-3,3-디메틸-3H-인돌륨-5-설포네이트를 포함할 수 있음), Cy5(1-(6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-3,3-디메틸-5-인돌린-2-일리덴)펜타-1,3-디엔-1-일)-3,3-디메틸-3H-인돌-1-윰 또는 1-(6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-2-((1E,3E)-5-((E)-1-(6-((2,5-디옥소피롤리딘-1-일)옥시)-6-옥소헥실)-3,3-디메틸-5-설포인돌린-2-일리덴)펜타-1,3-디엔-1-일)-3,3-디메틸-3H-인돌-1-윰-5-설포네이트를 포함할 수 있음), 및 Cy7(1-(5-카복시펜틸)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-에틸-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-일리덴)헵타-1,3,5-트리엔-1-일]-3H-인돌륨 또는 1-(5-카복시펜틸)-2-[(1E,3E,5E,7Z)-7-(1-에틸-5-설포-1,3-디하이드로-2H-인돌-2-일리덴)헵타-1,3,5-트리엔-1-일]-3H-인돌륨-5-설포네이트를 포함할 수 있음)를 포함하고, 이때 "Cy"는 '시아닌'을 나타내고 첫 번째 숫자는 2개의 인돌레닌 기 사이의 탄소 원자 수를 식별한다. 인돌레닌 이외의 옥사졸 유도체인 Cy2, 및 벤조 유도체화된 Cy3.5, Cy5.5 및 Cy7.5는 이 규칙에 대한 예외의 비제한적 예이다.

[0053] 일부 실시양태에서, 리포터 모이어티는 FRET 쌍일 수 있으므로, 단일 여기 및 이미지화 단계 하에서 여러 분류를 수행할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, FRET는 여기 교환(Forster) 전달 또는 전자 교환(Dexter) 전달을 포함할 수 있다.

[0054] 핵산과 관련하여 사용될 때, 용어 "증폭한다", "증폭하는", "증폭" 및 기타 관련 용어는 원래 폴리뉴클레오타이드 주형 분자의 여러 카피를 생성하는 것을 포함하고, 여기서 상기 카피는 주형 서열에 상보적인 서열을 포함하거나, 상기 카피는 주형 서열과 동일한 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 카피는 주형 서열과 실질적으로 동일한 서열을 포함하거나, 서열 서열에 상보적인 서열과 실질적으로 동일하다.

[0055] 본원에서 사용된 용어 "지지체"는 어세이 및/또는 분석을 위해 생물학적 분자 또는 생물학적 샘플을 침착하도록 설계된 기판을 지칭한다. 지지체에 침착될 생물학적 분자의 예는 핵산(예를 들어, DNA, RNA), 폴리펩티드, 당류, 지질, 단일 세포 또는 다수의 세포를 포함한다. 생물학적 샘플의 예는 타액, 가래, 점액, 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 대변, 땀, 눈물, 및 조직 또는 장기의 체액을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0056] 일부 실시양태에서, 지지체는 고체, 반고체, 또는 이들 둘의 조합이다. 일부 실시양태에서, 지지체는 다공성, 반다공성, 비다공성, 또는 다공성의 임의의 조합이다. 일부 실시양태에서, 지지체는 실질적으로 평면, 오목, 볼록 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 예를 들어, 모세관 또는 모세관의 내부 표면을 포함하는 원통형일 수 있다.

[0057] 일부 실시양태에서, 지지체의 표면은 실질적으로 매끄러울 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 범프, 에칭, 공극, 3차원 스캐폴드 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 규칙적 또는 불규칙적 질감을 가질 수 있다.

[0058] 일부 실시양태에서, 지지체는 구형, 반구형, 원통형, 배럴형, 원환형, 원반형, 막대 유사 모양, 원뿔형, 삼각형, 입방형, 다각형, 관형 또는 와이어 유사 모양을 포함하는 임의의 모양을 가진 비드를 포함한다.

[0059] 지지체는 유리, 용융 실리카, 규소, 중합체(예를 들어, 폴리스티렌(PS), 거대다공성 폴리스티렌(1VIPPS), 폴리메틸메타크릴레이트(PMMA), 폴리카보네이트(PC), 폴리프로필렌(PP), 폴리에틸렌(PE), 고밀도 폴리에틸렌(HDPE), 환형 올레핀 중합체(COP), 환형 올레핀 공중합체(COC), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)), 또는 이들의 임의의

조합을 포함하나 이들로 제한되지 않는 임의의 재료로부터 제작될 수 있다. 유리 및 플라스틱 기판 둘 다의 다양한 조성물이 고려된다.

[0060] 지지체는 그 위에 고착된 복수(예를 들어, 2개 이상)의 핵산 주형을 가질 수 있다. 복수의 고착된 핵산 주형은 동일한 서열을 가질 수 있거나 상이한 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 핵산 주형 중 개별 핵산 주형 분자는 지지체 상의 상이한 부위에 고착된다. 일부 실시양태에서, 복수의 핵산 주형 중 2개 이상의 개별 핵산 주형 분자는 지지체 상의 부위에 고착된다.

[0061] 용어 "어레이"는 지지체 상의 사전결정된 위치에 위치하여 부위의 어레이를 형성하는 복수의 부위를 포함하는 지지체를 지칭한다. 부위는 구별될 수 있고 층간 영역에 의해 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체 상의 사전결정된 부위는 행 또는 열로 1차원으로 배열될 수 있거나, 행과 열로 2차원으로 배열될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 사전결정된 부위는 조직화된 방식으로 지지체 상에 배열된다. 일부 실시양태에서, 복수의 사전결정된 부위는 직선형, 육각형 패턴, 격자 패턴, 반사 대칭을 가진 패턴, 회전 대칭을 가진 패턴 등을 포함하는 임의의 조직화된 패턴으로 배열된다. 상이한 부위 쌍 사이의 피치는 동일할 수 있거나 다를 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 적어도 10^2개의 부위, 적어도 10^3개의 부위, 적어도 10^4개의 부위, 적어도 10^5개의 부위, 적어도 10^6개의 부위, 적어도 10^7개의 부위, 적어도 10^8개의 부위, 적어도 10^9개의 부위, 적어도 10^{10}개의 부위, 적어도 10^{11}개의 부위, 적어도 10^{12}개의 부위, 적어도 10^{13}개의 부위, 적어도 10^{14}개의 부위, 적어도 10^{15}개의 부위 또는 더 많은 부위를 포함하며, 여기서 부위는 지지체 상의 사전결정된 위치에 위치한다. 일부 실시양태에서, 핵산 주형을 지지체 상의 복수의 사전결정된 부위(예를 들어, 10^2개 내지 10^{15}개의 부위 또는 더 많은 부위)에 고착시켜 핵산 주형 어레이를 형성한다. 일부 실시양태에서, 핵산 주형은 고착된 표면 포획 프라이머에 하이브리드화함으로써 복수의 사전결정된 부위에 고착되거나, 핵산 주형은 표면 포획 프라이머에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 핵산 주형은 복수의 사전결정된 부위에 고착되며, 예를 들어, 10^2개 내지 10^{15}개의 부위 또는 더 많은 부위에 고착된다. 일부 실시양태에서, 고착된 핵산 주형을 클론 증폭하여, 복수의 사전결정된 부위에서 고착된 핵산 클러스터를 생성한다. 일부 실시양태에서, 개별 고착된 핵산 클러스터는 선형 클러스터를 포함하거나, 단일 가닥 또는 이중 가닥 콘카티머를 포함한다.

[0062] 일부 실시양태에서, 지지체 상의 무작위 위치에 위치한 복수의 부위를 포함하는 지지체는 본원에서 그 위에 무작위로 위치한 부위를 가진 지지체로서 지칭된다. 지지체 상에 무작위로 위치한 부위의 위치는 사전결정되지 않는다. 복수의 무작위로 위치한 부위는 무질서한 방식 및/또는 예측 불가능한 방식으로 지지체 상에 배열된다. 일부 실시양태에서, 지지체는 적어도 10^2개의 부위, 적어도 10^3개의 부위, 적어도 10^4개의 부위, 적어도 10^5개의 부위, 적어도 10^6개의 부위, 적어도 10^7개의 부위, 적어도 10^8개의 부위, 적어도 10^9개의 부위, 적어도 10^{10}개의 부위, 적어도 10^{11}개의 부위, 적어도 10^{12}개의 부위, 적어도 10^{13}개의 부위, 적어도 10^{14}개의 부위, 적어도 10^{15}개의 부위 또는 더 많은 부위를 포함하며, 여기서 부위는 지지체 상에 무작위로 위치한다. 일부 실시양태에서, 핵산 주형을 지지체 상의 복수의 무작위로 위치한 부위(예를 들어, 10^2개 내지 10^{15}개의 부위 또는 더 많은 부위)에 고착시켜, 핵산 주형이 고착된 지지체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 핵산 주형은 고착된 표면 포획 프라이머에 하이브리드화함으로써 복수의 무작위로 위치한 부위에 고착되거나, 핵산 주형은 표면 포획 프라이머에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 핵산 주형은 복수의 무작위로 위치한 부위에 고착될 수 있으며, 예를 들어, 10^2개 내지 10^{15}개의 부위 또는 더 많은 부위에 고착된다. 일부 실시양태에서, 고착된 핵산 주형을 클론 증폭하여, 복수의 무작위로 위치한 부위에서 고착된 핵산 클러스터를 생성한다. 일부 실시양태에서, 개별 고착된 핵산 클러스터는 선형 클러스터를 포함하거나, 단일 가닥 또는 이중 가닥 콘카티머를 포함한다.

[0063] 일부 실시양태에서, 지지체 상의 복수의 고착된 표면 포획 프라이머는 서로 유체 연통하여, 시약 용액(예를 들어, 핵산 주형 분자, 가용성 프라이머, 효소, 뉴클레오타이드, 2가 양이온, 완충제 등)을 지지체 상으로 유동할 수 있게 하므로, 지지체 상의 복수의 고착된 표면 포획 프라이머는 대량 병렬 방식으로 시약과 본질적으로 동시에 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 고착된 표면 포획 프라이머의 유체 연통은 복수의 고착된 표면 포획 프라이머에서 본질적으로 동시에 핵산 증폭 반응(예를 들어, RCA, MDA, PCR 및 브릿지 증폭)을 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에서, 지지체 상의 복수의 고착된 핵산 클러스터는 서로 유체 연통하여, 시약 용액(예를 들어, 효소, 뉴클레오타이드, 2가 양이온 등)을 지지체 상으로 유동할 수 있게 하므로, 지지체 상의 복수의 고착된 핵산

클러스터는 대량 병렬 방식으로 시약과 본질적으로 동시에 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 고착된 핵산 클러스터의 유체 연통은 복수의 고착된 핵산 클러스터에 대해 본질적으로 동시에 뉴클레오타이드 결합 어세이를 수행하고/하거나 뉴클레오타이드 중합 반응(예를 들어, 프라이머 연장 또는 시퀀싱)을 수행하고, 임의로 대량 병렬 시퀀싱을 위한 검출 및 이미지화를 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0065] 고착된 효소와 관련하여 사용될 때, 용어 "고착된" 및 관련 용어는 공유 결합 또는 비-공유 상호작용을 통해 지지체에 부착되어 있거나, 지지체 상의 코팅물에 부착되어 있거나, 지지체 상의 코팅물에 의해 형성된 매트릭스 내에 묻혀 있는 효소(예를 들어, 중합효소)를 지칭한다.

[0066] 고착된 핵산과 관련하여 사용될 때, 용어 "고착된" 및 관련 용어는 공유 결합 또는 비-공유 상호작용을 통해 지지체에 부착되어 있거나, 지지체 상의 코팅물에 부착되어 있거나, 지지체 상의 코팅물에 의해 형성된 매트릭스 내에 묻혀 있는 핵산 분자를 지칭하고, 여기서 상기 핵산 분자는 표면 포획 프라이머, 핵산 주형 분자, 및 포획 프라이머의 연장 생성물을 포함한다. 포획 프라이머의 연장 생성물은 핵산 콘카티머(예를 들어, 핵산 클러스터)를 포함한다.

[0067] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 핵산 주형은 지지체에 고착되며, 예를 들어, 지지체 상의 부위에 고착된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 핵산 주형은 클론 증폭된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 핵산 주형은 지지체로부터 떨어져(예를 들어, 용액에서) 클론 증폭된 후 지지체에 침착되고 지지체에 고착된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 핵산 주형의 클론 증폭 반응은 지지체 상에서 수행되어, 지지체에의 고착을 유발한다. 일부 실시양태에서, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 다중 치환 증폭(MDA), 전사 매개 증폭(TMA), 핵산 서열 기반 증폭(NASBA), 가닥 치환 증폭(SDA), 실시간 SDA, 브릿지 증폭, 등온 브릿지 증폭, 롤링 서클 증폭(RCA), 서클-대-서클 증폭, 헬리카제 의존적 증폭, 재조합효소 의존적 증폭, 및/또는 단일 가닥 결합(SSB) 단백질 의존적 증폭 중 어느 하나 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 핵산 증폭 반응을 이용하여 하나 이상의 핵산 주형을 (예를 들어, 용액에서 또는 지지체 상에서) 클론 증폭한다.

[0068] 용어 "지속 시간" 및 관련 용어는 표적 핵산, 중합효소, 접합되거나 접합되지 않은 뉴클레오타이드 사이에 형성된 결합 복합체가 결합 복합체로부터의 임의의 결합 구성요소 해리 없이 안정적으로 유지되는 시간의 길이를 지칭한다. 지속 시간은 결합 복합체의 안정성과 결합 상호작용의 강도를 표시한다. 지속 시간은 결합 복합체의 시작 및/또는 지속을 관찰함으로써, 예컨대, 결합 복합체의 표지부착된 구성요소로부터의 신호를 관찰함으로써 측정될 수 있다. 예를 들어, 표지부착된 뉴클레오타이드, 또는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 표지부착된 시약은 결합 복합체에 존재함으로써, 결합 복합체의 지속 시간 동안 표지로부터의 신호가 검출될 수 있게 한다. 표지의 비제한적 일례는 형광 표지이다.

[0069] **도입**

[0070] 본 개시내용은 생체분자를 처리하거나 분석하는 데 사용하는 방법, 조성물, 시스템 및 키트를 제공한다. 생체분자는 예를 들어, 핵산, 폴리펩티드 또는 단백질, 지질 또는 탄수화물을 포함할 수 있다. 본원에 설명된 방법, 조성물, 시스템 및 키트는 RNA 또는 DNA와 같은 핵산 서열의 위치, 및 핵산 서열에 의해 인코딩된 단백질에 대한 정보를 얻는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 핵산 서열은 본원에 개시된 바와 같이 식별되고 시퀀싱될 수 있다. 예를 들어, 표적 단백질 또는 폴리펩티드와 관련된 표적 RNA 또는 DNA 분자는 본원에 설명된 바와 같이 패드락 프로브에 의해 식별될 수 있고, 증폭될 수도 있고/있거나 시퀀싱될 수도 있다. 이 방식으로, 표적 단백질, RNA 서열 및 DNA 서열의 위치 및/또는 서열에 대한 정보를 모을 수 있다.

[0071] 일부 실시양태에서, 본원은 핵산 서열을 처리하고/하거나 분석하는 데 사용하는 방법, 조성물, 시스템 및 키트를 개시한다. 본원에 설명된 방법, 시스템, 키트 및 조성물은 제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱에 사용될 수 있다. 시퀀싱은 하나 이상의 세포, 조직 또는 종양에서 수행될 수 있다. 핵산 서열은 예를 들어, DNA 서열 또는 RNA 서열일 수 있다. 본원에 설명된 방법, 시스템, 키트 및 조성물은 대량 병렬 시퀀싱 기술을 활용하는 데 유용할 수 있다. 이러한 방법, 조성물, 키트 및 시스템은 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 공개 제US20210139884호에서도 찾을 수 있다.

[0072] **방법**

[0073] 본 개시내용은 핵산 서열을 분석하는 방법을 제공한다. 본원에 개시된 방법은 단일 핵산 시퀀싱에서 RNA를 인코딩하는 DNA, 단백질을 인코딩하는 RNA, 또는 단백질을 식별하기에 충분한 조건 하에서 하나 이상의 시약을 생물학적 샘플에 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 식별은 본원에 개시된 방법들 중 임의의 방법을 실행하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 바코딩된 핵산의 사용을 요구하지 않으며, 그 대신

공간적으로 인코딩된 시약을 사용할 수 있다. 예를 들어, 고체 표면에 공간적으로 인코딩된 프라이머는 고체 표면 상에서의 그의 상대적 위치에 의해 식별될 수 있다. 본원에 설명된 방법은 단일 세포, 다수의 세포, 조직 또는 종양을 비롯한 세포 샘플 내부에서 제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 이용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 주형 분자의 동일한 영역의 짧은 수의 시퀀싱 주기를 반복적으로 수행하는 단계를 포함한다. 반복적 짧은 시퀀싱 주기를 수행함으로써, 세포 샘플의 RNA 함량을 발견할 수 있다. 본원에 설명된 방법은 대량 병렬 시퀀싱 기술을 활용하는 전사체학 워크플로우를 수행하는 데 사용될 수 있다. 본원에 설명된 반복적 짧은 시퀀싱 주기는 긴 리드 시퀀싱 워크플로우에 비해 감소된 양의 시퀀싱 시약을 사용하여 비용을 절감하고 시간을 절약한다. 반복적 짧은 시퀀싱 주기를 수행하는 방법은 관심 있는 특정 RNA, 돌연변이체 RNA 서열, 스플라이스 변이체 및 이들의 존재도를 검출하는 것을 포함하나 이들로 제한되지 않는 많은 용도를 가진다.

[0074] 본원에 설명된 방법의 목적의 비제한적 일례는 대량 병렬 시퀀싱을 이용하여 세포 샘플 내에서의 공간적 RNA 국소화를 검출하고 이미지화하는 것이다. 워크플로우는 다음과 같은 일반적인 단계를 포함할 수 있다: 세포 샘플은 형광 신호를 검출하도록 구성된 형광 현미경에 위치할 수 있는 고체 지지체 상에 배치될 수 있다. 세포는 세포 내부에서 표적 RNA를 유지하도록 화학적 고정 시약으로 처리될 수 있다. 세포 샘플은 세포 내부에서 표적 RNA를 조작할 수 있게 하도록 투과 가능해질 수도 있다. 표적 RNA는 특정 cDNA에 상응하는 원형화된 패드락 프로브를 생성하기 위해 표적 특이적 패드락 프로브에 선택적으로 하이브리드화될 수 있는 제1 가닥 cDNA로 전환될 수 있다. 패드락 프로브는 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 대한 적어도 하나의 범용 어댑터를 가질 수 있다. 패드락 프로브는 주어진 표적 cDNA에 각각 상응하는 표적 바코드 서열도 가질 수 있다. 원형화된 패드락 프로브에 대해 라이게이션 및/또는 채우기 반응을 수행하여, 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 형성할 수 있고, 이 원형 패드락 프로브는 롤링 서클 증폭을 통해 세포 샘플 내부에서 증폭되어 단일 가닥 콘카티머를 생성할 수 있다. 롤링 서클 증폭은 하나 이상의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에서 수행될 수 있다. 콘카티머는 관심 있는 cDNA의 탠덤 반복부 유닛, 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위 및 표적 바코드 서열을 가질 수 있다. 콘카티머는 샘플 내부에서 시퀀싱될 수 있고, 여기서 각각의 라운드에 대해 짧은 수의 시퀀싱 주기가 수행되고 다회 라운드의 짧은 리드 시퀀싱이 수행된다. 표적 바코드와 cDNA 영역의 전체 길이가 시퀀싱되지 않을 수 있다. 그 대신, 표적 바코드 영역의 적어도 일부가 반복적으로 시퀀싱될 수 있다. 일부 실시양태에서, cDNA 영역을 시퀀싱하는 것은 필요하지 않다. 일부 실시양태에서, 표적 바코드 및 cDNA 영역의 부분이 반복적으로 시퀀싱된다. cDNA 영역의 전체 길이를 시퀀싱하는 것은 필요하지 않을 수 있다. 시퀀싱 리드를 조립하거나 관심 있는 cDNA의 전체 길이 서열을 얻는 것은 필요하지 않을 수 있다. 짧은 시퀀싱 리드로부터 얻은 중복 시퀀싱 정보는 콘카티머의 상보적 가닥을 시퀀싱할 필요성을 없앨 수 있다. 따라서, 쌍별 시퀀싱은 필요하지 않을 수 있다.

[0075] 본원에 설명된 방법은 다른 제자리 전사체학 워크플로우에 비해 여러 장점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 세포 샘플은 고체 지지체, 예를 들어, 임의의 모양과 크기로 제작될 수 있는, 유리 또는 플라스틱을 포함하는 평면 지지체 상에 배치될 수 있다. 지지체 상에서 하이브리드화 챔버를 조립하는 것은 필요하지 않을 수 있다. 세포 부착을 위한 화학적으로 세척된 유리 비드의 준비도 필요하지 않을 수 있다. 지지체에의 세포 부착을 촉진하는 코팅물로 지지체를 부동태화할 수 있다. 코팅물은 고착된 포획 프라이머를 포함하도록 제제화될 필요가 없을 수 있다. 세포 샘플이 부착되어 있는 지지체는 자동화된 유체 분배 시스템에 유체적으로 연결되고 형광 현미경 상에서 구성되어 있는 기존 유동 셀 홀더/크래들에 맞도록 쉽게 조정될 수 있다. 세포 시딩, 세포 고정, 세포 투과 가능화, 역전사 반응, 패드락 프로브 하이브리드화, 패드락 프로브 라이게이션 반응, 롤링 서클 증폭 및 시퀀싱을 포함하는, 제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 수행하기 위한 단계들의 임의의 조합을, 유체 분배 시스템을 사용하여 자동화된 모드로 수행할 수 있다.

[0076] 본원에 설명된 방법의 또 다른 장점은 세포 샘플 내부에서 콘카티머를 형성한다는 것이다. 단일 가닥 콘카티머는 압축 DNA 나노볼로 붕괴될 수 있으며, 여기서 각각의 나노볼은 그의 길이를 따라 폴리뉴클레오타이드 유닛의 수많은 탠덤 카피를 가지며, 여기서 상기 폴리뉴클레오타이드 유닛은 관심 있는 cDNA 서열 및 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다. 각각의 폴리뉴클레오타이드 유닛은 시퀀싱 프라이머, 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지부착된 뉴클레오타이드 시약(예를 들어, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자)에 결합하여, 검출 가능한 시퀀싱 복합체(예를 들어, 검출 가능한 삼원 복합체)를 형성할 수 있다. 각각의 나노볼은 수많은 검출 가능한 시퀀싱 복합체를 가진다. 따라서, 나노볼의 압축성은 시퀀싱 워크플로우 동안 사용되는 검출 가능하게 표지부착된 뉴클레오타이드 시약의 국소 농도를 증가시킴으로써, 나노볼로부터 방출된 신호 강도를 증가시킬 수 있다. 이것은 세포 샘플 내부에서 형광 스팟으로서 이미지화될 수 있는 개별 검출 가능한 신호를 제공할 수 있다. 각각의 스팟은 콘카티머에 상응하고 각각의 콘카티머는 세포 샘플의 표적 RNA 분자에 상응한다. 세포 샘플에서 다수의 스팟을 동시에 검출하고 이미지화할 수 있다.

[0077] 추가로, 콘카티머에서 cDNA 영역의 짧은 부분을 동일한 시작 위치로부터 적어도 한 번 재시퀀싱하여(예를 들어, 반복적 시퀀싱) 기준 서열에 정렬될 수 있는 중첩 시퀀싱 리드를 생성할 수 있다. 예를 들어, 콘카티머 분자의 동일한 부분을 적어도 2회, 3회, 4회, 5회 또는 최대 50회 시퀀싱할 수 있다. 시작 시퀀싱 부위는 콘카티머의 임의의 위치에 있을 수 있으며 콘카티머 내의 선택된 위치에 어닐링하도록 설계된 시퀀싱 프라이머에 의해 좌우될 수 있다. 반복적 짧은 시퀀싱 리드는 cDNA 영역의 개별 염기에 대한 시퀀싱 정보의 중복성을 증가시킬 수 있다. 콘카티머 주형 분자의 한 가닥을 반복적으로 시퀀싱하는 것은 세포 샘플에서 표적 RNA의 존재를 드러내기에 충분한 염기 커버범위를 제공할 수 있으므로, 상보적 가닥의 쌍별 시퀀싱은 필요하지 않다.

[0078] 콘카티머 주형 분자는 동일한 콘카티머 분자를 따라 다수의 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있으며, 이러한 결합 부위는 시퀀싱 깊이를 증가시키기 위해 다수의 사용 가능한 시퀀싱 리드를 생성하는 데 사용될 수 있다. 아울러, 콘카티머 주형의 한 가닥을 반복적으로 시퀀싱하는 것은 한 카피 주형 분자를 시퀀싱하는 것에 비해 시퀀싱 염기 커버범위와 시퀀싱 깊이를 증가시킬 수 있다.

[0079] 본원에 설명된 방법은 단일체 또는 다중체 모드로 수행될 수 있다. 상이한 역전사 프라이머, 상이한 표적 특이적 패드락 프로브 및 범용 시퀀싱 프라이머를 사용하여 세포 샘플 내부에서 2개 이상의 상이한 표적 RNA를 동시에 검출하고 이미지화할 수 있다. 예를 들어, 본원에 설명된 반복적 짧은 리드 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법을 이용하여 세포 샘플에서 하우스킵핑 RNA 및 적어도 하나의 표적 RNA의 존재를 동시에 검출하고 이미지화할 수 있다.

[0080] 본원에 설명된 방법에서, RNA는 세포 샘플로부터 추출되지 않을 수 있으며, 시퀀싱 정보를 추적하여 세포 샘플의 이미지로 다시 맵핑할 필요가 없을 수 있다. 오히려, RNA는 세포 샘플 내부에 유지되어, 세포 내에서 표적 RNA의 공간적 위치를 직접 이미지화할 수 있게 한다. 또한, 세포 샘플 내의 RNA는 단편화되지 않을 수 있고, 표적 RNA의 농후화는 필요하지 않을 수 있다. 표적 특이적 역전사 프라이머 및/또는 무작위 서열 역전사 프라이머의 사용은 단일체 또는 다중체 모드에서 폴리-A RNA 및 비-폴리-A RNA 둘 다를 검출할 수 있게 한다.

[0081] 본원에 설명된 방법은 다른 제자리 전사체학 워크플로우에 비해, 더 간단한 워크플로우, 더 적은 시약, 더 낮은 비용, 더 짧은 시간, 세포 샘플에 대한 더 온화한 조건, 및 특수 장비를 필요로 하지 않음을 비롯한 여러 장점을 제공한다.

[0082] **제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 수행하는 방법**

[0083] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 제자리 시퀀싱을 수행하는 방법을 제공한다. 하나 이상의 핵산을 생물학적 샘플, 예를 들어, 세포에서 분석할 수 있다. 핵산은 예를 들어, 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)을 포함할 수 있다. 시퀀싱은 반복적으로 수행될 수 있으므로, 핵산의 여러 시퀀싱 주기가 수행된다.

[0084] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법을 제공한다. 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 생물학적 샘플은 세포 샘플일 수 있다. 상기 방법은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 cDNA 앰플리콘은 콘카티머 분자일 수 있다. 생물학적 샘플은 제1 핵산 분자, 제2 핵산 분자 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 제1 핵산 분자는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함할 수 있다. 제2 핵산 분자는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함할 수 있다. 상기 방법은 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가질 수 있다. 상기 방법은 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 제1 핵산 분자와 제2 핵산 분자는 상기 제거 후 생물학적 샘플 내부에 위치할 수 있다. 상기 방법은 제1 핵산과 제2 핵산의 서열을 제자리에서 확인하는 것을 반복하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다. 상기 방법은 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 것을 반복하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회,

30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다.

[0085] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 핵산 분자를 제자리에서 검출하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 단계 (a): 고체 지지체에 침착된 세포 샘플을 제공하는 단계를 포함하는, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하고, 여기서 세포 샘플은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 보유하고 세포 샘플은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제1 표적 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 적어도 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제2 표적 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제2 표적 RNA에 상응할 수 있는 적어도 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고체 지지체에 침착될 수 있다.

[0086] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 2개 내지 25개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 25개 내지 50개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 50개 내지 75개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 75개 내지 100개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 100개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 250개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 500개 이상의 상이한 표적 분자, 또는 1000개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 더 많은 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 10,000개 이상의 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 전체 세포, 복수의 전체 세포, 온전한 조직 또는 온전한 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고체 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 세포 부착을 촉진하는 코팅물에 의해 부동태화된 고체 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고착된 포획 올리고뉴클레오타이드를 결여하는 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 단순 또는 복합 세포 배양 배지에서 배양된 확장된 세포 샘플을 포함한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 제1 복수의 DNA 앰플리콘은 제1 복수의 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 DNA 앰플리콘은 제2 복수의 콘카티머를 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 제1 복수의 DNA 앰플리콘은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 DNA 앰플리콘은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 표적 DNA 서열, 및 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 DNA 앰플리콘은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 표적 DNA 서열, 및 적어도 하나의 범용 어댑터 서열, 예를 들어, 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 DNA 앰플리콘은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 표적 DNA 서열, 및 롤링 서클 증폭 프라이머에 대한 범용 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 DNA 앰플리콘은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 표적 DNA 서열, 및 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 제2 복수의 DNA 앰플리콘은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 DNA 앰플리콘은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 DNA 서열, 및 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 DNA 앰플리콘은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 DNA 서열, 및 적어도 하나의 범용 어댑터 서열, 예를 들어, 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 DNA 앰플리콘은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 DNA 서열, 및 롤링 서클 증폭 프라이머에 대한 범용 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 DNA 앰플리콘은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 DNA 서열, 및 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법은 단계 (b): 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계, 및 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 것을 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하는 것을 포함할 수 있는, 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2회 내지 30회의 시퀀싱 주기는 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하는 것을 포함할 수 있는, 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2

회 내지 30회의 시퀀싱 주기는 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 제1 표적 기준 서열과 정렬하여, 세포 생성물에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 제2 표적 기준 서열과 정렬하여, 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 제1 표적 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인하고, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 제2 표적 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 제1 표적 기준 서열은 제1 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 기준 서열은 제1 표적 바코드 서열 및 제1 표적 RNA 서열의 적어도 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 기준 서열은 제1 표적 RNA 서열의 적어도 일부를 포함한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 제2 표적 기준 서열은 제2 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 기준 서열은 제2 표적 바코드 서열 및 제2 표적 RNA 서열의 적어도 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 기준 서열은 제2 표적 RNA 서열의 적어도 일부를 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법은 단계 (c): 제1 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제1 DNA 앰플리콘을 유지하고, 제2 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제2 DNA 앰플리콘을 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 제1 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 제거하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 세포 샘플 내부에서 제1 DNA 앰플리콘을 유지하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 제2 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제2 서열 리드 생성물을 제거하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 세포 샘플 내부에서 제2 DNA 앰플리콘을 유지하는 것을 포함할 수 있다.

[0094] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법은 단계 (c): 제1 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제1 DNA 앰플리콘을 유지하고, 제1 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제2 DNA 앰플리콘을 유지하는 단계를 추가로 포함한다.

[0095] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법은 단계 (d): 단계 (b) 및 (c)를 적어도 한 번 반복하여 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 단계 (b) 및 (c)를 적어도 한 번 반복하여 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 반복적으로 시퀀싱하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 단계 (b) 및 (c)를 적어도 한 번 반복하여 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 반복적으로 시퀀싱하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b) 및 (c)는 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회 또는 적어도 10회 반복될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b) 및 (c)는 최대 10회, 최대 20회, 최대 30회, 최대 40회 또는 최대 50회 반복될 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법은 단계 (d): 단계 (b) 및 (c)를 적어도 한 번 반복하여 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b) 및 (c)는 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회 또는 적어도 10회 반복될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b) 및 (c)는 최대 10회, 최대 20회, 최대 30회, 최대 40회 또는 최대 50회 반복될 수 있다.

[0097] 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열과 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 길이가 30개 이하의 염기인 제1 시퀀싱 리드 생성물과 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후(예를 들어, 단계 (b) 후), 또는 길이가 30개 이하의 염기인 제1 시퀀싱 리드 생성물과 제2 시퀀싱 리드 생성물로 이루어진 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후(예를 들어, 단계 (d) 후)에 정렬될 수 있다.

[0098] 본 개시내용은 단계 (a): 적어도 제1 표적 RNA 분자와 제2 표적 RNA 분자를 포함하는 복수의 RNA를 보유하는 세포 샘플을 제공하는 단계를 포함하는, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 세포 샘플은 고정되고 투과 가능해진다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 2개

내지 25개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 25개 내지 50개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 50개 내지 75개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 75개 내지 100개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 100개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 250개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 500개 이상의 상이한 표적 분자, 또는 1000개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 더 많은 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 10,000개 이상의 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 전체 세포, 복수의 전체 세포, 온전한 조직 또는 온전한 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고체 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 세포 부착을 촉진하는 코팅물에 의해 부동태화된 고체 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고착된 포획 올리고뉴클레오타이드를 결여하는 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 복수의 RNA는 적어도 제1 표적 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 RNA는 적어도 제2 표적 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 아래에 설명된 단계 (b)를 수행하기 전에 배양된다.

[0099] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (b): 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제1 표적 cDNA 분자를 포함하는 복수의 cDNA 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 복수의 cDNA 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 표적 cDNA 분자를 포함한다. 복수의 cDNA 분자 중 cDNA 분자는 생물학적 샘플 내부에서 메신저 RNA(mRNA) 분자의 역전사를 통해 생성될 수 있으며, 여기서 cDNA 분자 또는 mRNA 분자는 표적 핵산 서열, 또는 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함한다. 복수의 cDNA 분자는 생물학적 샘플 내부에서 하나 이상의 메신저 RNA(mRNA) 분자(들)의 역전사를 통해 생성될 수 있고, 여기서 복수의 cDNA 분자 또는 하나 이상의 mRNA 분자는 표적 핵산 서열, 또는 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함한다. 제1 표적 cDNA 분자 또는 제2 표적 cDNA 분자는 생물학적 샘플 내부에서 하나 이상의 메신저 RNA(mRNA) 분자(들)의 역전사를 통해 생성될 수 있고, 여기서 복수의 cDNA 분자 또는 하나 이상의 mRNA 분자는 표적 핵산 서열, 또는 표적 핵산 서열의 역상보체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 cDNA 분자를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 역전사 반응을 수행하여 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자(예를 들어, 복수의 제1 가닥 cDNA 분자)를 생성하기에 적합한 조건 하에서 세포 샘플 내부의 복수의 RNA를 (i) 복수의 역전사 프라이머, (ii) 복수의 역전사효소 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다(예를 들어, 도 1). 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함하고, 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함하고, 제2 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (b): 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 적어도 제1 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있는 복수의 cDNA 분자를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 복수의 cDNA 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 제2 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 적어도 제1 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 cDNA 분자는 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 적어도 제2 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 cDNA 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 cDNA 분자를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 (i) 복수의 역전사 프라이머, (ii) 복수의 역전사효소, 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 역전사 반응을 수행하여 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자(예를 들어, 복수의 제1 가닥 cDNA 분자)를 생성하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다(예를 들어, 도 1). 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 역전사 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 역전사효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 표적 특이적 역전사 프라이머의

제1 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단은 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단은 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있고, 제2 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단은 제1 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단은 제2 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있다.

[0101] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (c): 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자를, 적어도 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브와 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함하는 복수의 표적 특이적 패드락 프로브와 접촉키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 적어도 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 적어도 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자를 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 특이적 패드락 프로브와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 복수의 제1 표적 특이적 패드락 프로브의 개별 패드락 프로브는 제1 말단과 제2 말단(예를 들어, 제1 패드락 결합 아암 및 제2 패드락 결합 아암)을 포함하고, 여기서 제1 말단은 제1 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화하고 제2 말단은 제1 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)의 접촉은 제1 표적 특이적 패드락 프로브의 제1 말단 및 제2 말단을 제1 표적 cDNA 분자의 근위 위치에 하이브리드화하여, 하이브리드화된 제1 말단과 제2 말단 사이에 닉 또는 갭을 가진 원형화된 제1 표적 특이적 패드락 프로브를 형성하는 단계를 포함한다(예를 들어, 도 1). 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 제1 표적 cDNA 서열에 상응하는 제1 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 제1 표적 cDNA 분자에 선택적으로 하이브리드화하는 제1 표적 특이적 패드락 프로브의 영역 중 하나에 인접하여 위치한 제1 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 예를 들어, 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)와 같은 적어도 하나의 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 롤링 서클 증폭 프라이머(또는 이의 상보적 서열)에 대한 범용 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 제자리에서 접촉시키는 단계를 포함한다. 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 상보적일 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 두 인접 분절에 결합할 수 있으므로, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드와 제자리에서 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 두 인접 분절에 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열은 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 핵산 서열은 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 1개 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 1개 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드의 갭은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 이상의 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 이상의 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 올리고뉴클레오타이드의 갭은 적어도 2개 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 및 제2 올리고뉴클레오타이드

의 갭은 적어도 2개 뉴클레오타이드의 크기를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열도 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열도 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 시퀀싱 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 시퀀싱 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 핵산 증폭용 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 핵산 증폭용 프라이머의 핵산 서열에 상보적인 서열인 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭용 프라이머는 롤링 서클 증폭(RCA)용 프라이머이다. 일부 실시양태에서, RCA용 프라이머는 콘카티머를 생성한다. 일부 실시양태에서, 콘카티머는 적어도 2개의 표적 핵산 서열 중 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 콘카티머의 제1 부분 및/또는 제2 부분에의 결합은 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 생물학적 샘플 내부에서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 제자리에서 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 생물학적 샘플 내부에서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 제자리에서 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계는 제1 핵산 효소를 통해 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계는 제2 핵산 효소를 통해 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소는 동일한 유형의 효소이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계는 제2 핵산 효소를 통해 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소는 상이한 유형의 효소이다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 제자리에서 증폭하여 제1 핵산 분자를 생성하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 제자리에서 증폭하여 제2 핵산 분자를 생성하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 롤링 서클 증폭(RCA)을 포함하고, 여기서 제1 핵산 분자는 제1 콘카티머를 포함하고 제2 핵산 분자는 제2 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제1 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머는 제2 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다.

[0104] 일부 실시양태에서, 복수의 제2 표적 특이적 패드락 프로브 중 개별 패드락 프로브는 제1 말단과 제2 말단을 포함하고, 여기서 제1 말단은 제2 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화하고 제2 말단은 제2 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)의 접촉은 제2 표적 특이적 패드락 프로브의 제1 말단 및 제2 말단을 제2 표적 cDNA 분자의 근위 위치에 하이브리드화하여, 하이브리

드화된 제1 말단과 제2 말단 사이에 닉 또는 갭을 가진 원형화된 제2 표적 특이적 패드락 프로브를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 제2 표적 cDNA 서열에 상응하는 제2 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 제2 표적 cDNA 분자에 선택적으로 하이브리드화하는 제2 표적 특이적 패드락 프로브의 영역 중 하나에 인접하여 위치한 제2 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브, 예를 들어, 적어도 하나의 범용 어댑터 서열은 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 롤링 서클 증폭 프라이머(또는 이의 상보적 서열)에 대한 범용 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 패드락 프로브는 콘카티머의 표적 바코드 영역이 먼저 시퀀싱되도록 서로 인접한 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위와 표적 바코드 서열을 포함한다. 표적 바코드 서열은 임의의 길이, 예를 들어, 3개 내지 15개 염기, 또는 15개 내지 25개 염기, 또는 25개 내지 40개 염기 또는 더 긴 길이일 수 있다.

[0106] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (d): 효소 반응을 수행하여 적어도 제1 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브 및 제2 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브와 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 효소 반응을 수행하여 적어도 제1 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 적어도 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 효소 반응을 수행하여 적어도 제2 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 적어도 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 닉을 폐쇄하는 단계는 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제1 또는 제2 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계, 및 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제1 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제2 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 효소 반응을 수행하여 적어도 2개 내지 10,000개의 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0107] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (e): 주형 분자로서 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브 및 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행함으로써, 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제1 콘카티머 분자를 포함하는 복수의 콘카티머 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 복수의 콘카티머 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제2 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 주형 분자로서 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 롤링 서클 증폭은 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 콘카티머 분자는 제1 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자는 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 주형 분자로서 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 롤링 서클 증폭은 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 콘카티머 분자는 제2 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자는 탠덤 반복부 유닛을 포함할 수 있으며, 여기서 유닛은 제1 표적 cDNA의 서열 및 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자는 탠덤 반복부 유닛을 포함할 수 있으며, 여기서 유닛은 제2 표적 cDNA의 서열 및 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 주형 분자로서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행함으로써, 적어도 2개 내지 10,000개의 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 2개 내지 10,000개의 콘카티머 분자를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 압축 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드는 한 말단에서 제1 영역을 가질

수 있고 다른 말단에서 제2 영역을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 콘카티머 분자의 부분에 하이브리드화할 수 있고, 제2 영역은 콘카티머 분자의 또 다른 부분에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 영역과 제2 영역의 하이브리드화는 콘카티머 분자를 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 크기를 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 모양을 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 크기와 모양을 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자를 압축하여 압축 나노볼을 형성할 수 있다.

[0108] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (f): 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제1 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 하는 단계 및 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제2 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있는, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제1 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제2 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 제1 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있고, 제2 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 제1 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 제2 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있고, 이 단계는 2개 내지 10,000개의 콘카티머 분자에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자의 제1 표적 바코드 영역만이 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자의 제1 표적 바코드의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제1 표적 바코드가 시퀀싱되고 제1 콘카티머 분자의 제1 cDNA 영역의 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 3). 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자의 제1 cDNA 영역의 적어도 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 4 또는 5). 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자의 제2 표적 바코드 영역만이 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자의 제2 표적 바코드의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제2 표적 바코드가 시퀀싱되고 제2 콘카티머 분자의 제2 cDNA 영역의 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 3). 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자의 제2 cDNA 영역의 적어도 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 4 또는 5).

[0109] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 1.0 mm^2보다 더 큰 시야(FOV)를 포함하는 광학 이미지화 시스템을 사용하여 제1 핵산 콘카티머 및 제2 핵산 콘카티머의 적어도 일부를 시퀀싱하는 단계를 포함한다.

[0110] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있으며, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있으며, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있으며, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함할 수 있다.

[0111] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있으며, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복

수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있으며, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱에서, 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있으며, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함할 수 있다.

[0112] 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 제1 표적 기준 서열과 정렬하여, 세포 생성물에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 제2 표적 기준 서열과 정렬하여, 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인할 수 있다.

[0113] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 (1) 복수의 범용 시퀀싱 프라이머를 콘카티머에 있는 이들 각각의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하기에 적합한 조건 하에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 (i) 복수의 범용 시퀀싱 프라이머, (ii) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드 시약과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 (1) 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 복수의 범용 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 (1) 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 복수의 시퀀싱 중합효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 (1) 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 복수의 뉴클레오타이드 시약과 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (2) 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 적어도 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (2) 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 적어도 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (3) 콘카티머로부터 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (3) 제1 콘카티머 분자로부터 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, (3)의 시퀀싱은 세포 샘플 내부에서 제1 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (3) 콘카티머로부터 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제1 콘카티머 분자를 유지하고, 제2 콘카티머 분자로부터 제2 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제2 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (3) 제2 콘카티머 분자로부터 제2 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, (3)의 시퀀싱은 세포 샘플 내부에서 제2 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (4) (1) 내지 (3)을 적어도 한 번 반복하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, (4)는 (1) 내지 (3)을 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회 또는 적어도 10회 반복하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, (4)는 (1) 내지 (3)을 최대 10회, 최대 20회, 최대 30회, 최대 40회 또는 최대 50회 반복하는 단계를 포함할 수 있다.

[0114] 일부 실시양태에서, 반복적 시퀀싱은 결합에 의한 시퀀싱 절차, 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드 및/또는 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드, 또는 다가 분자를 사용함으로써 수행될 수 있다. 이들 세 가지 시퀀싱 방법의 설명은 아래에 기재되어 있다.

[0115] 일부 실시양태에서, 포름아미드(예를 들어, 10% 내지 20% 포름아미드)와 함께 SSC 완충제(예를 들어, 2X 식염수-구연산나트륨 완충제)를 포함하는 하이브리드화 시약을 사용하여 복수의 범용 시퀀싱 프라이머를 콘카티머 주형 분자에 하이브리드화할 수 있다. 하이브리드화 조건은 약 10분 내지 60분 동안 약 20℃ 내지 30℃의 온도를 포함한다.

[0116] 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 콘카티머로부터 제거할 수 있고, 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예를 들어, 30℃ 내지 90℃에서 포름아미드와 함께 또는 포름아미드 없이 SSC 완충제(예를 들어, 식염수-구연산나트륨 완충제)를 포함하는 탈하이브리드화 시약을 사용하여 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머를 유지할 수 있다.

[0117] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 복수의 뉴클레오타이드 시약은 검출 가능하게 표지부착되어 있거나 표지부착되어 지 않은 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터

모이어티에 연결된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 검출 가능하게 표지부착된 뉴클레오타이드 유사체는 복수의 쇄 종결 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 쇄 종결 모이어티는 3' 뉴클레오타이드 당 위치에 연결되어 3' 차단된 뉴클레오타이드 유사체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티를 제거하여 3' 차단된 뉴클레오타이드 유사체를, 당에서 3' OH 기를 가진 확장 가능한 뉴클레오타이드로 전환할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지부착된 뉴클레오타이드 유사체는 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 타이민 또는 우라실에 상응하는 상이한 형광단에 연결되며, 여기서 상이한 형광단은 단계 (f)의 시퀀싱 동안 형광 신호를 방출한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 (1) 중합효소 촉매를 사용하여 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를, 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, (2) 혼입된 쇄 종결 뉴클레오타이드에 의해 방출된 형광 신호와 색상을 검출하고 이미지화하는 단계, 및 (3) 쇄 종결 모이어티를 제거하고(예를 들어, 차단해제) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물과 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 제1 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 제2 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 반응은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응으로부터 형광 신호를 포착하는 검출기를 가진 시퀀싱 장치에서 수행될 수 있다. 시퀀싱 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 신호 데이터를, 세포 샘플에서 함께 위치하는 상이한 형광 스팟의 이미지를 표시하도록 프로그래밍된 컴퓨터 시스템으로 보내도록 구성될 수 있고, 여기서 개별 형광 스팟은 상이한 표적 RNA 분자 또는 상이한 표적 폴리펩티드에 상응한다. 일부 실시양태에서, 상이한 핵염기(예를 들어, A, G, C, T/U)에 상응하는 상이한 형광 표지부착된 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 시퀀싱을 수행하는 경우, 이미지는 상이한 시퀀싱 주기에서 동일한 세포 샘플에 함께 위치하는 상이한 색상 형광 스팟을 가질 수 있다.

[0118] 일부 실시양태에서, 클론 증폭된 주형 앰플리콘에서 동기화된 시퀀싱 반응 동안 동기화되지 않은 페이징(phasing) 및/또는 프리-페이징(pre-phasing) 이벤트가 발생할 수 있으며, 여기서 시퀀싱 반응은 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드를 사용하는 중합효소 촉진 시퀀싱 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 클론 증폭된 주형 분자 중 한 주형 분자에 대한 시퀀싱 반응은 클론 증폭된 주형 분자 내의 다른 주형 분자의 시퀀싱보다 앞서거나(예를 들어, 프리-페이징) 뒤처진다(예를 들어, 페이징). 시퀀싱 동안, 전형적으로 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드의 혼입에 상응하는 형광 신호가 검출된다. 따라서, 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드의 혼입을 이용하여 페이징 및 프리-페이징 이벤트를 검출하고 모니터링할 수 있다.

[0119] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 복수의 뉴클레오타이드 시약은 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 각각 포함하는 복수의 다가 분자를 포함하고, 여기서 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛에 부착된다. 일부 실시양태에서, 개별 다가 분자는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 형광단으로 표지부착되며, 여기서 다가 분자의 주어진 코어에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아

데닌, 구아닌, 사이토신, 타이민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 뉴클레오타이드 아암 중 적어도 하나는 링커, 및/또는 형광단에 부착된 뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 여기서 주어진 뉴클레오타이드 염기에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 타이민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 (1) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제1 시퀀싱 중합효소와 접촉시켜 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계, (2) 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛을 복합체화된 중합효소에 결합시킴으로써 다가 결합 복합체를 형성하기에 적합하고 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입되는 것을 억제하기에 적합한 조건 하에서 복합체화된 중합효소를 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자와 접촉시키는 단계, (3) 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자에 의해 방출된 형광 신호와 색상을 검출하고 이미지화하는 단계, (4) 제1 시퀀싱 중합효소 및 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자를 제거하고, 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계, (5) 중합효소 촉매를 사용하여 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 상기 유지된 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제2 시퀀싱 중합효소 및 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, 및 (6) 쇄 종결 모이어티를 제거하고(예를 들어, 차단해제) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제1 시퀀싱 중합효소와 접촉시켜 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛을 복합체화된 중합효소에 결합시킴으로써 다가 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 복합체화된 중합효소를 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고, 이 조건은 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입되는 것을 억제하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자에 의해 방출된 형광 신호와 색상을 검출하고 이미징하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 제1 시퀀싱 중합효소 및 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자를 제거하는 단계, 및 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 중합효소 촉매를 사용하여 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 상기 유지된 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제2 시퀀싱 중합효소 및 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 쇄 종결 모이어티를 제거하는 단계(예를 들어, 차단해제) 및 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 주기 시간은 30분 미만에 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시야(FOV)는 1 ㎟를 초과할 수 있고, 큰 면적(>10 ㎟)을 스캐닝하기 위한 주기 시간은 5분 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 제1 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 제2 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 제2 표적 RNA 분자의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물과 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 길이가 30개 이하의 염기인 제1 시퀀싱 리드 생성물과 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후, 또는 길이가 30개 이하의 염기인 제1 시퀀싱 리드 생성물과 제2 시퀀싱 리드 생성물로 이루어진 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 반복적 시퀀싱 리드 생성물

세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 리드 생성물은 길이가 30개 이하의 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 반응은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응으로부터 형광 신호를 포착할 수 있는 검출기를 가진 시퀀싱 장치에서 수행될 수 있다. 시퀀싱 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 신호 데이터를, 세포 샘플에서 함께 위치할 수 있는 상이한 형광 스팟의 이미지를 표시하도록 프로그래밍될 수 있는 컴퓨터 시스템으로 보내도록 구성될 수 있고, 여기서 개별 형광 스팟은 상이한 표적 RNA 분자(예를 들어, 제1 표적 RNA 분자, 제2 표적 RNA 분자, 또는 제1 RNA 분자와 제2 RNA 분자의 조합)에 상응할 수 있다.

[0120] 일부 실시양태에서, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자로 시퀀싱할 때, 다가 결합 복합체가 형성되는 단계 (2) 및 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자가 이미지화되고 검출되는 단계 (3)의 조건은 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드를 사용하는 시퀀싱 워크플로우에 비해 온화하다. 예를 들어, 단계 (2) 및 (3)은 약 35℃ 내지 45℃ 또는 약 39℃ 내지 42℃의 온화한 온도에서 수행될 수 있다. 단계 (2) 및 (3)은 다회 시퀀싱 주기(예를 들어, 최대 30회 주기) 동안 DNA 나노볼의 압축 크기와 모양을 유지하는 데 도움이 될 수 있는 온화한 온도에서 수행될 수 있으며, 이것은 세포 샘플 내부에서 DNA 나노볼의 스팟 이미지의 FWHM(전폭 절반 최대치)을 개선할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼은 다회 시퀀싱 주기 동안 풀리지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 확대되지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 개별 스팟으로 남아있다. 스팟 이미지는 가우시안 스팟으로서 표시될 수 있으며 크기는 FWHM으로서 측정될 수 있다. 더 작은 FWHM으로 표시되는 더 작은 스팟 크기는 전형적으로 스팟의 개선된 이미지와 상관관계를 가진다. 일부 실시양태에서, 나노볼 스팟의 FWHM은 약 10 ㎛ 이하일 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자를 사용하는 동기화된 중합효소 촉진 시퀀싱 반응 동안 동기화되지 않은 페이징 및/또는 프리-페이징 이벤트가 발생할 수 있다. 시퀀싱 동안, 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 복합체화된 중합효소에 결합하여 다가 결합 복합체를 형성하는 것에 상응하는 형광 신호가 검출될 수 있다. 따라서, 표지부착된 다가 분자의 결합을 이용하여 페이징 및 프리-페이징 이벤트를 검출하고 모니터링할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자로 최대 30회 시퀀싱 주기를 수행할 때, 페이징 및/또는 프리-페이징 비율은 약 5% 미만, 또는 약 1% 미만, 또는 약 0.01% 미만, 또는 약 0.001% 미만일 수 있다. 대조적으로, 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드를 사용하여 최대 30회 시퀀싱 주기를 수행하는 경우 페이징 및/또는 프리-페이징 비율은 약 5%일 수 있다.

[0122] 일부 실시양태에서, (f)의 시퀀싱은 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, (f)의 서열은 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제1 식별 서열을 포함하고 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제1 cDNA 분자 또는 제1 mRNA 분자의 서열의 적어도 일부를 추가로 포함하고, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드는 제2 cDNA 분자 또는 제2 mRNA 분자의 서열의 적어도 일부를 추가로 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 확인은 중합효소, 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제1 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계도 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 확인은 중합효소, 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제2 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태

에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기, 실릴 기, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다.

[0125] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 여기서 상기 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; 및 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제1 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0126] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제2 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제2 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제2 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; 및 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제2 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제1 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의

제1 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0127] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제2 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제2 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제2 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제1 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0128] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머의 제1 부분, 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제1 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; 및 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제1 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제1 콘카티머로부터 2개의 중합효소와 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계; 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머

서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계; 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계로서, 여기서 상기 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각이 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하고, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드가 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함하는 것인 단계를 추가로 포함한다.

[0129] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머의 제1 부분, 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제2 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제2 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이머 서열, 및 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계로서, 여기서 뉴클레오타이드 접합체가 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 제2 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 것인 단계; 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계; 및 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제2 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1 또는 제2 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다.

[0130] 본원에 개시된 방법에서, 제1 표적 핵산 서열 또는 제2 표적 핵산 서열은 메신저 RNA(mRNA) 분자의 적어도 일부에 상응할 수 있다. 본원에 개시된 방법에서, 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열은 메신저 RNA(mRNA) 분자의 적어도 일부에 상응할 수 있다. 본원에 개시된 방법에서, 제1 표적 핵산 서열 또는 제2 표적 핵산 서열은 상보적 DNA(cDNA) 분자의 적어도 일부에 상응할 수 있다. 본원에 개시된 방법에서, 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열은 상보적 DNA(cDNA) 분자의 적어도 일부에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열 및/또는 제2 표적 핵산 서열은 동일한 mRNA 또는 cDNA 분자의 2개의 별개 부분에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열은 2개의 상이한 mRNA 또는 cDNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 확인은 이미지화를 통해 생물학적 샘플 내부에서 제1 또는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제자리에서 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 이미지화를 통해 생물학적 샘플 내부에서 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 동시에 제자리에서 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이미지화는 형광 이미지화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 표적 RNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적

RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 마이크로 RNA(miRNA), 가이드 RNA(gRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 DNA 서열 및 제2 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 DNA 서열은 상보적 DNA(cDNA), 게놈 DNA(gDNA), 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 DNA 서열은 cDNA, gDNA, 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 표적 RNA 서열 및 표적 DNA 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 DNA 서열은 cDNA, gDNA, 비-코딩 DNA 또는 코딩 DNA를 포함한다.

[0131] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (g): 제1 콘카티머 분자로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플에서 제1 콘카티머 분자를 유지하고, 제2 콘카티머 분자로부터 제2 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플에서 제2 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 제1 콘카티머 분자로부터 복수의 제1 서열 리드 생성물을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 세포 샘플에서 제1 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 제2 콘카티머 분자로부터 복수의 제2 서열 리드 생성물을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 세포 샘플에서 제2 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0132] 일부 실시양태에서, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 검출하는 방법은 단계 (h): 단계 (f) 및 (g)를 적어도 한 번 반복하여 복수의 콘카티머를 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 세포 샘플에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜주고, 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 세포 샘플에서 제2 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (h)는 단계 (f) 및 (g)를 적어도 한 번 반복하여 복수의 콘카티머를 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 세포 샘플에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜줄 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 세포 샘플에서 제2 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜줄 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 세포 샘플에서 제1 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜줄 수 있고 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 상기 샘플에서 제2 표적 RNA 분자의 존재를 확인시켜줄 수 있다.

[0133] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 분자 및 적어도 2개의 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하며, 여기서 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열 및 제2 표적 핵산 서열을 포함하고, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드, 및 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 생물학적 샘플을 제공하는 단계 (a)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 제3 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자를 포함하고, 여기서 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재는 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 식별한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자를 포함하고, 여기서 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재는 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 식별한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (b) 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 생물학적 샘플에서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (c) 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자

리에서 확인하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 생물학적 샘플에서 제4 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 단계 (c)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다.

[0134] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열과 적어도 2개의 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (a) (i) 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (ii) 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (iii) 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제3 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재는 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 식별한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (iv) 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자를 추가로 포함하고, 여기서 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체의 존재는 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 식별한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (b) (i) 생물학적 샘플에서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제1 핵산 분자 또는 이의 부분은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 (ii) 생물학적 샘플에서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제3 핵산 분자 또는 이의 부분은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (c) 제1 핵산 분자로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제3 핵산 분자로부터 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산 분자 및 제3 핵산 분자는 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (d): 단계 (b) 및 (c)를 반복하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (e): (i) 생물학적 샘플에서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제2 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제2 핵산 분자 또는 이의 부분은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 (ii) 생물학적 샘플에서 제4 핵산 분자 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 핵산 분자 또는 이의 부분은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (f): 제2 핵산 분자로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제4 핵산 분자로부터 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제2 핵산 분자 및 제4 핵산 분자는 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (g): 단계 (e) 및 (f)를 반복하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열의 전체 서열과 제2 표적 핵산 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 단계 (e)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다.

[0135] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열과 적어도 2개의 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 표면에 고착되어 있고 투과 가능해졌으며 고정되어 있는 생물학적 샘플을 제공하는 단계 (a)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (i) 적어도 2개의 표적 RNA 서열 중 제1 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 폴리펩티드 중 제1 표적 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제1 표적 폴리펩티드는 제1 표적 RNA 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 (ii) 적어도 2개의 표적 RNA 서열 중 제2 표적 RNA 서열 및 적어도 2개의 폴리펩티드 중 제2 표적 폴리펩티드를 포함하고, 여기서 제2 표적 폴리펩티드는 제2 표적 RNA 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된다. 일

부 실시양태에서, 상기 방법은 (b) 제1 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 제1 표적 cDNA 서열을 생성하고 제2 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 제2 표적 cDNA 서열을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (c) 제1 표적 cDNA 서열을, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계도 포함하며, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 제1 시퀀싱 프라이머 및 핵산 증폭 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 제2 표적 cDNA 서열을, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제2 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 제2 시퀀싱 프라이머, 및 핵산 증폭 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머는 적어도 하나 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 제1 표적 폴리펩티드를, 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 제1 짧은 핵산은 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열은 제1 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 제2 표적 폴리펩티드를, 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체와 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 제2 짧은 핵산은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열은 제2 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (d) 제1 결합 복합체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 제2 결합 복합체를, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함하고, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (e) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하고, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하여 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드는 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 여기서 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (f) 롤링 서클 증폭을 통해 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 복수의 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제1 콘카티머를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 롤링 서클 증폭을 통해 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 복수의 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제2 콘카티머를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 롤링 서클 증폭을 통해 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 복수의 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제3 콘카티머를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)는 롤링 서클 증폭을 통해 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭하여 복수의 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제4 콘카티머를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (g) 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제1 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제3 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 단계 (j)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다. 일부 실시양

태에서, 상기 방법은 (h) 제1 콘카티머로부터 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제3 콘카티머로부터 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제1 콘카티머 및 제3 콘카티머는 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (i) 단계 (g) 및 (h)를 적어도 한 번 반복하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (j) 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제2 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 단계 (j)는 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열을 제자리에서 확인하여, 제4 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 단계 (j)는 단계 (g)의 수행을 방해하는 조건 하에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (k) 제2 콘카티머로부터 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하고 제4 콘카티머로부터 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 및 제4 콘카티머는 상기 제거 후 생물학적 샘플에 위치한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 (i) 단계 (j) 및 (k)를 적어도 한 번 반복하는 단계를 추가로 포함한다.

[0136] 일부 실시양태에서, 확인은 제1 또는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 이미지화하는 단계를 포함하고, 여기서 확인은 제2 또는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자 및 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 동시에 이미지화하여 생물학적 샘플 내부에서 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자와 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자의 공간적 분포를 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머는 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제1 표적 RNA 서열 및 제1 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제2 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 중합효소, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 뉴클레오타이드 유닛에 상보적이고 결합하는 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드, 및 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 프라이머 서열과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당

모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된 한 유형의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물을 포함한다.

[0137] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 2개의 제1 콘카티머의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 추가로 포함한다.

[0138] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머로부터 2개의 중합효소 및 뉴클레오타이드 접합체를 제거하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 2개의 제2 중합효소 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 2개의 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각은 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함한다.

[0139] 일부 실시양태에서, 확인은 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 제1 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분, 및 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적인 제1 프라이미 서열, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적인 제2 프라이머 서열과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분과 제2 부분의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드 접합체의 표지를 통해 다가 결합 복합체를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 각각에 각각 상보적이고 결합하는, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분 및 제2 부분의 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 조건은 뉴클레오타이드 접합체의 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티가 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머에 혼입되는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 커플링된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 뉴클레오타이드 모이어티는 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 하나의 뉴클레오타이드 아암에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출은 형광 표지를 이미지화하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군

으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, 메신저 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보좀 RNA(rRNA), 마이크로RNA(miRNA), 가이드 RNA(gRNA), 작은 핵 RNA(snRNA), 작은 간섭 RNA(siRNA), 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 표면 상에 고착된다. 일부 실시양태에서, 표면은 유동 셀의 내부 표면을 포함한다.

[0141] **제자리 배치 시퀀싱 RNA 및 폴리펩티드**

[0142] 본 개시내용은 코딩된 패드락 프로브를 사용하여 제자리에서 다중체 및 다중-오믹스 검출 및 식별을 수행하는 방법을 제공한다. 패드락 프로브는 표적 RNA 또는 폴리펩티드를 선택적으로 검출하도록 설계된다. 패드락 프로브는 프라이머에 특이적인 하나 이상의 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 프라이머는 공간적으로 국소화될 수 있으므로, 패드락 프로브는 바코드 서열을 필요로 하지 않을 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0143] RNA 특이적 패드락 프로브는 표적 RNA에 상응하는 cDNA에 선택적으로 하이브리드화한다. RNA 특이적 프로브는 cDNA를 고유하게 식별하는 바코드를 가진다. RNA 특이적 패드락 프로브는 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위도 가진다. 패드락 프로브는 프라이머에 특이적인 하나 이상의 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 프라이머는 공간적으로 국소화될 수 있으므로, 패드락 프로브는 바코드 서열을 필요로 하지 않을 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0144] 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 및 항체에 접합된 올리고뉴클레오타이드에 선택적으로 하이브리드화하는 폴리펩티드 특이적 패드락 프로브를 사용하여 표적 폴리펩티드를 검출한다. 폴리펩티드 특이적 패드락 프로브는 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 항체를 고유하게 식별하는 바코드를 가진다. 폴리펩티드 특이적 패드락 프로브는 표적 RNA, 및 그 표적 RNA에 의해 인코딩된 폴리펩티드를 동시에 시퀀싱하고 검출할 수 있도록, 상응하는 RNA 특이적 패드락 프로브가 가진 배치 특이적 시퀀싱 프라이머와 동일한 배치 특이적 시퀀싱 프라이머도 가진다. 따라서, 패드락 프로브는 RNA 및 이의 인코딩된 폴리펩티드를 동시에 검출하고 식별할 수 있게 한다.

[0145] 두 유형의 패드락 프로브를 사용하여 배치 특이적 시퀀싱 결합 부위 및 바코드의 여러 카피를 가진 콘카티머를 생성한다. 콘카티머는 시퀀싱 동안 증가된 신호 강도 및 색상 차별화를 생성하는 압축 모양 및 크기를 가진 DNA 나노볼로 붕괴될 수 있다.

[0146] 제자리 시퀀싱의 경우, 광학적 해상능의 한계는 고도의 다중체 시퀀싱을 수행하는 능력을 방해한다. 패드락 프로브의 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위는 선택된 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 사용하여 콘카티머의 원하는 서브세트(예를 들어, 배치)을 시퀀싱하여 과밀 신호와 이미지를 줄일 수 있게 한다. 배치 특이적 시퀀싱 프라이머의 사용은 강렬하고 해상 가능한 광학 이미지를 생성한다. 상이한 배치 특이적 시퀀싱 프라이머들을 사용하여 동일한 세포 샘플에서 여러 라운드의 시퀀싱을 수행함으로써, 다중체 및 다중-오믹스 시퀀싱이 수많은

표적 RNA들과 이들의 인코딩된 폴리펩티드를 드러낼 수 있게 한다.

[0147] 본원에 설명된 배치 특이적 시퀀싱 방법은 많은 용도를 가진다. 예를 들어, 이미지화되고 시퀀싱과 관련된 스팟의 수를 카운팅할 수 있다. 카운팅된 스팟을 세포 샘플 내의 RNA 및 폴리펩티드 수준의 척도로서 사용할 수 있다.

[0148] 예를 들어, 150회 정방향 시퀀싱 주기 및 150회 역방향 시퀀싱 주기(예를 들어, 키트당 총 300회 시퀀싱 주기)를 수행하는 데 사용될 수 있는 쌍별 시퀀싱 키트를 사용하여 300,000개 이상의 분자를 드러낼 수 있다. 비제한적 예시 세포는 대략 총 150,000개의 전사체에 대한 5,000개의 상이한 전사체들의 대략 30개 카피를 갖고, 이 세포는 총 300,000개의 총 RNA 및 폴리펩티드 분자에 대한 전사체에 의해 인코딩된 대략 15,000개의 폴리펩티드를 가진다. 쌍별 키트를 사용하여 300회 시퀀싱 주기(쌍별 모드 아님)를 수행하여, 세포 샘플에서 300,000개의 상이한 RNA 및 폴리펩티드 분자를 드러낼 수 있다. 표 1을 참조한다. 표 1은 세포 샘플에서 RNA 및 폴리펩티드를 해독하기 위한 추정된 총 시퀀싱 주기 및 총 시간을 나열한다.

표 1

세포 샘플에서 RNA 및 폴리펩티드를 해독하기 위한 추정된 총 시퀀싱 주기 및 총 시간

A: 해상도 (um)	B: 세포 부피 (um^2)	C: 세포당 폴로니 (4 색상)	D: 전사체	E: 전사체당 카피 #	F: 단백질	G: 카피 # /단백질	H: 총 분자	I: 해독 주기	J: 총 주기	K: 총 시간 (시)
0.4	1000	10000	100	30	100	30	6000	10	0.13	0.01516
0.4	1000	10000	200	30	200	30	12000	10	12	1.4
0.4	1000	10000	500	30	500	30	30000	10	30	3.5
0.4	1000	10000	1000	30	1000	30	60000	10	60	7
0.4	1000	10000	2000	30	2000	30	120000	10	120	14
0.4	1000	10000	5000	30	5000	30	300000	10	300	35
0.4	1000	10000	10000	30	10000	30	600000	10	600	70

컬럼 A: 해상도(um)
컬럼 B: 세포 부피(um^2)
컬럼 C: 해상된 폴로니/세포(4 색상)
컬럼 D: 전사체
컬럼 E: 카피 수/전사체
컬럼 F: 단백질
컬럼 G: 카피 #/단백질
컬럼 H: 총 분자
컬럼 I: 해독 주기
컬럼 J: 모든 분자들을 해독하기 위한 총 주기
컬럼 K: 해독하기 위한 총 시간(시)

[0149]

[0150] 본 개시내용은 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자, 및 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 2개의 상이한 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법으로서, 단계 (a): 고체 지지체에 침착된 세포 샘플을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 세포 샘플은 (i) 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 복수의 DNA 앰플리콘, (ii) 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 복수의 DNA 앰플리콘, (iii) 제1 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 제1 폴리펩티드에 상응하는 제3 복수의 DNA 앰플리콘, 및 (iv) 제2 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 제2 폴리펩티드에 상응하는 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 보유한다.

[0151] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (b): 제2 복수의 DNA 앰플리콘 및 제4 복수의 DNA 앰플리콘의 시퀀싱을 억제하는 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제3 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계는 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하고, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인시켜주고, 세포 샘플 내부에서 제3 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계는 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하고, 여기서 제2 시퀀싱 리드 생

성물의 서열은 제2 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다.

[0152] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (c): 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제3 복수의 DNA 앰플리콘의 시퀀싱을 억제하는 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘 및 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 세포 샘플 내에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계는 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하고, 여기서 제3 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제3 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인시켜주고, 세포 샘플 내부에서 복수의 제4 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계는 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하고, 여기서 제4 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제4 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다.

[0153] 본 개시내용은 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자, 및 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 2개의 상이한 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법으로서, 단계 (a): 고체 지지체에 침착된 세포 샘플을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 세포 샘플은 (i) 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 복수의 DNA 앰플리콘, (ii) 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 복수의 DNA 앰플리콘, (iii) 제1 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 제1 폴리펩티드에 상응하는 제3 복수의 DNA 앰플리콘, 및 (iv) 제2 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 제2 폴리펩티드에 상응하는 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 보유한다.

[0154] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (b): 제2 복수의 DNA 앰플리콘 및 제4 복수의 DNA 앰플리콘의 시퀀싱을 억제하는 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제3 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제3 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제2 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제3 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제2 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다.

[0155] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (c): 제1 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제1 DNA 앰플리콘을 유지하고, 제3 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제3 DNA 앰플리콘을 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 차단 모이어티는 추가 시퀀싱 반응을 억제하기 위해 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물에 추가될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체는 뉴클레오타이드 유사체가 후속 뉴클레오타이드의 혼입을 억제하는 경우 혼입될 수 있다. 비제한적 예시 차단 뉴클레오타이드 유사체는 디데옥시뉴클레오타이드, 또는 2' 또는 3' 쇄 종결 모이어티를 가진 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (d): 단계 (b) 및 (c)를 적어도 한 번 반복하여 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제3 복수의 DNA 앰플리콘을 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다.

[0157] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (e): 제1 복수의 DNA 앰플리콘 및 제3 복수의 DNA 앰플리콘의 시퀀싱을 억제하는 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘 및 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제3 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제3 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제3 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제3 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주

기를 수행하여 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제4 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제4 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제4 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제4 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다.

[0158] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (f): 제2 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제2 DNA 앰플리콘을 유지하고, 제4 DNA 앰플리콘으로부터 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제4 DNA 앰플리콘을 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 차단 모이어티는 추가 시퀀싱 반응을 억제하기 위해 제3 시퀀싱 리드 생성물 및 제4 시퀀싱 리드 생성물에 추가될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체는 뉴클레오타이드 유사체가 후속 뉴클레오타이드의 혼입을 억제하는 경우 혼입될 수 있다. 비제한적 예시 차단 뉴클레오타이드 유사체는 디데옥시뉴클레오타이드, 또는 2' 또는 3' 쇄 종결 모이어티를 가진 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0159] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (g): 단계 (e) 및 (f)를 적어도 한 번 반복하여 제2 복수의 DNA 앰플리콘 및 제4 복수의 DNA 앰플리콘을 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다.

[0160] 본 개시내용은 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자, 및 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된 2개의 상이한 폴리펩티드를 제자리에서 검출하는 방법으로서, 단계 (a): 고체 지지체에 침착된 세포 샘플을 제공하는 단계를 포함하는 방법을 제공하고, 여기서 세포 샘플은 고정되고 투과 가능해지고, 여기서 세포 샘플은 제1 복수의 표적 RNA, 및 제1 복수의 표적 RNA에 의해 인코딩된 제1 복수의 표적 폴리펩티드를 보유하고, 세포 샘플은 제2 복수의 표적 RNA, 및 제2 복수의 표적 RNA에 의해 인코딩된 제2 복수의 표적 폴리펩티드를 보유한다.

[0161] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 2개 내지 25개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 25개 내지 50개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 50개 내지 75개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유하거나, 75개 내지 100개의 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 100개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 250개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 500개 이상의 상이한 표적 분자, 또는 1000개 이상의 상이한 표적 RNA 분자, 또는 더 많은 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 10,000개 이상의 상이한 표적 RNA 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 전체 세포, 복수의 전체 세포, 온전한 조직 또는 온전한 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고체 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 세포 부착을 촉진하는 코팅물에 의해 부동태화된 고체 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 고착된 포획 올리고뉴클레오타이드를 결여하는 지지체에 침착된다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 아래에 설명된 단계 (b)를 수행하기 전에 배양된다.

[0162] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 2개 내지 25개의 상이한 표적 폴리펩티드 분자를 보유하거나, 25개 내지 50개의 상이한 표적 폴리펩티드 분자를 보유하거나, 50개 내지 75개의 상이한 표적 폴리펩티드 분자를 보유하거나, 75개 내지 100개의 상이한 표적 폴리펩티드 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 100개 이상의 상이한 표적 폴리펩티드 분자, 또는 250개 이상의 상이한 표적 폴리펩티드 분자, 또는 500개 이상의 상이한 표적 분자, 또는 1000개 이상의 상이한 표적 폴리펩티드 분자, 또는 더 많은 상이한 표적 폴리펩티드 분자를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 10,000개 이상의 상이한 표적 폴리펩티드 분자를 보유한다. 표적 폴리펩티드 분자는 표적 RNA 분자에 의해 인코딩된다.

[0163] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (b): 세포 샘플 내부에서 (i) 제1 복수의 표적 RNA로부터 적어도 제1 복수의 표적 cDNA를 생성하고, (ii) 제2 복수의 표적 RNA로부터 적어도 제2 복수의 표적 cDNA를 생성함으로써 복수의 cDNA를 생성하는 단계를 포함한다(예를 들어, 도 20). 일부 실시양태에서, 제1 표적 cDNA는 제1 표적 RNA 분자에 상응한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 cDNA는 제2 표적 RNA 분자에 상응한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 cDNA 분자를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 역전사 반응을 수행하여 세포 샘플 내에서 복수의 cDNA 분자(예를 들어, 복수의 제1 가닥 cDNA 분자)를 생성하기에 적합한 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 (i) 복수의 역전사 프라이머, (ii) 복수의 역전사효소, 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으

로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함하고, 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함하고, 제2 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함한다.

[0164] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (c): 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 표적 RNA 분자 및 제2 복수의 표적 RNA 분자에 상응하는 복수의 DNA 콘카티머를 생성하는 단계를 포함하고, 이 단계는 (1) 제1 복수의 표적 cDNA를 제1 복수의 패드락 프로브와 접촉시켜 제1 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 접촉이 제1 패드락 프로브의 제1 결합 아암과 제2 결합 아암을 이들 각각의 제1 표적 cDNA 분자의 근위 위치에 하이브리드화하여, 하이브리드화된 제1 결합 아암과 제2 결합 아암 사이에 닉 또는 갭을 각각 가진 제1 복수의 원형화된 패드락 프로브를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행되고, 여기서 제1 패드락 프로브가 (i) 제1 표적 RNA를 고유하게 식별하는 제1 표적 바코드 서열(표적 BC-1), (ii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1)(또는 이의 상보적 서열), 및 (iii) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열)을 포함하는 것인 단계(예를 들어, 도 20, 왼쪽); (2) 제1 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 효소로 폐쇄하여 제1 복수의 공유 폐쇄된 패드락 프로브를 형성하는 단계; 및 (3) 주형 분자로서 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭을 수행함으로써, 제1 복수의 표적 RNA 분자에 상응하는 제1 복수의 콘카티머 분자를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자를 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 특이적 패드락 프로브와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 원형화된 패드락 프로브의 닉을 폐쇄하는 단계는 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 원형화된 패드락 프로브의 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제1 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계, 및 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 효소 반응을 수행하여 적어도 2개 내지 10,000개의 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 콘카티머 분자들 중 각각의 콘카티머 분자는 탠덤 반복부 유닛을 포함하고, 여기서 상기 유닛은 제1 표적 cDNA의 서열 및 (i) 제1 표적 RNA를 고유하게 식별하는 제1 표적 바코드 서열(표적 BC-1), (ii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1)(또는 이의 상보적 서열), 및 (iii) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 유닛은 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 단계 (c)는 (1) 제2 복수의 표적 cDNA를 제2 복수의 패드락 프로브와 접촉시켜 제2 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계로서, 여기서 상기 접촉이 제2 패드락 프로브의 제1 결합 아암과 제2 결합 아암을 이들 각각의 제2 표적 cDNA 분자의 근위 위치에 하이브리드화하여, 하이브리드화된 제1 결합 아암과 제2 결합 아암 사이에 닉 또는 갭을 각각 가진 제2 복수의 원형화된 패드락 프로브를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행되고, 여기서 제2 패드락 프로브가 (i) 제2 표적 RNA를 고유하게 식별하는 제2 표적 바코드 서열(표적 BC-2), (ii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위의 서열과 상이한 서열을 가진 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2)(또는 이의 상보적 서열), 및 (iii) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열)을 포함하는 것인 단계(예를 들어, 도 20, 오른쪽); (2) 제2 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 효소로 폐쇄하여 제2 복수의 공유 폐쇄된 패드락 프로브를 형성하는 단계; 및 (3) 주형 분자로서 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭을 수행함으로써, 제2 복수의 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 복수의 콘카티머 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자를 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 특이적 패드락 프로브와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 원형화된 패드락 프로브의 닉을 폐쇄하는 단계는 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 원형화된 패드락 프로브의 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제2 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계, 및 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 효소 반응을 수행하여 적어도 2개 내지 10,000개의 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유

폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 콘카티머 분자들 중 각각의 콘카티머 분자는 탠덤 반복부 유닛을 포함하고, 여기서 유닛은 제2 표적 cDNA의 서열 및 (i) 제2 표적 RNA를 고유하게 식별하는 제2 표적 바코드 서열(표적 BC-2), (ii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2)(또는 이의 상보적 서열), 및 (iii) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 유닛은 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다.

[0166] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (d): 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 폴리펩티드 분자 및 제2 복수의 표적 폴리펩티드 분자에 상응하는 복수의 DNA 콘카티머를 생성하는 단계를 추가로 포함하고, 이 단계는 (1) 제1 복수의 표적 폴리펩티드를, 제1 태그 서열(태그-1) 및 제2 태그 서열(태그-2)을 가진 제1 올리고뉴클레오타이드에 연결된 제1 항체를 각각 포함하는 제1 복수의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 분자와 접촉시켜 제3 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계로서, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열이 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 고유하게 식별하고(예를 들어, 도 22, 왼쪽), 여기서 이 접촉이 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 분자를 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합시키기에 적합한 조건 하에서 수행되는 것인 단계; (2) (제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 분자의) 제1 올리고뉴클레오타이드를 제3 복수의 패드락 프로브와 접촉시키는 단계로서, 여기서 이 접촉이 제3 패드락 프로브의 제1 결합 아암 및 제2 결합 아암을 이들 각각의 제1 올리고뉴클레오타이드의 근위 위치에 하이브리드화하여 하이브리드화된 제1 결합 아암과 제2 결합 아암 사이에 닉 또는 갭을 각각 가진 제3 복수의 원형화된 패드락 프로브를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행되고, 여기서 제3 패드락 프로브가 (i) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 태그 서열에 결합하는 서열, (ii) 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 고유하게 식별하는 제3 표적 바코드 서열(표적 BC-3), (iii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1)(또는 이의 상보적 서열), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), 및 (v) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제2 태그 서열에 결합하는 서열을 포함하는 것인 단계(예를 들어, 도 23, 왼쪽); (3) 제3 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 효소로 폐쇄하여 제3 복수의 공유 폐쇄된 패드락 프로브를 형성하는 단계; 및 (4) 주형 분자로서 제3 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭을 수행함으로써, 제1 복수의 표적 폴리펩티드에 상응하는 제3 복수의 콘카티머 분자를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제3 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 원형화된 패드락 프로브의 닉을 폐쇄하는 단계는 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 원형화된 패드락 프로브의 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제1 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계, 및 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 효소 반응을 수행하여 적어도 2개 내지 10,000개의 원형화된 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 복수의 콘카티머 분자들 중 각각의 콘카티머 분자는 탠덤 반복 유닛을 포함하고, 여기서 유닛은 (i) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 태그 서열에 결합하는 서열, (ii) 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 고유하게 식별하는 제3 표적 바코드 서열(표적 BC-3), (iii) 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-1)(또는 이의 상보적 서열), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), 및 (v) 제1 올리고뉴클레오타이드의 제2 태그 서열에 결합하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 유닛은 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다.

[0167] 일부 실시양태에서, 단계 (d)는 (1) 제2 복수의 표적 폴리펩티드를, 제3 태그 서열(태그-3) 및 제4 태그 서열(태그-4)을 가진 제2 올리고뉴클레오타이드에 연결된 제2 항체를 각각 포함하는 제2 복수의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 분자와 접촉시켜 제4 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계로서, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열이 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 고유하게 식별하고(예를 들어, 도 22, 오른쪽), 여기서 상기 접촉이 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 분자를 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합시키기에 적합한 조건 하에서 수행되는 것인 단계; (2) (제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 분자의) 제2 올리고뉴클레오타이드를 제4 복수의 패드락 프로브와 접촉시키는 단계로서, 여기서 이 접촉이 제4 패드락 프로브의 제1 결합 아암 및 제2 결합 아암을 이들 각각의 제2 올리고뉴클레오타이드의 근위 위치에 하이브리드화하여 하이브리드화된 제1 결합 아암과 제2 결합 아암 사이에 닉 또는 갭을 각각 가진 제4 복수의 원형화된 패드락 프로브를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행되고, 여기서 제4 패드락 프로브가 (i) 제2

올리고뉴클레오타이드의 제3 태그 서열에 결합하는 서열, (ii) 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 고유하게 식별하는 제4 표적 바코드 서열(표적 BC-4), (iii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2)(또는 이의 상보적 서열), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), 및 (v) 제2 올리고뉴클레오타이드의 제4 태그 서열에 결합하는 서열을 포함하는 것인 단계(예를 들어, 도 23, 오른쪽); (3) 제4 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 효소로 폐쇄하여 제4 복수의 공유 폐쇄된 패드락 프로브를 형성하는 단계; 및 (4) 주형 분자로서 제4 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭을 수행함으로써, 제2 복수의 표적 폴리펩티드에 상응하는 제4 복수의 콘카티머 분자를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제4 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 원형화된 패드락 프로브의 닉을 폐쇄하는 단계는 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 원형화된 패드락 프로브의 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제2 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계, 및 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 효소 반응을 수행하여 적어도 2개 내지 10,000개의 원형화된 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 복수의 콘카티머 분자들 중 각각의 콘카티머 분자는 탠덤 반복 유닛을 포함하고, 여기서 유닛은 (i) 제2 올리고뉴클레오타이드의 제3 태그 서열에 결합하는 서열, (ii) 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 고유하게 식별하는 제4 표적 바코드 서열(표적 BC-4), (iii) 제2 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위(배치 Seq-2)(또는 이의 상보적 서열), (iv) 증폭 프라이머에 대한 범용 결합 부위(범용 RCA)(또는 이의 상보적 서열), 및 (v) 제2 올리고뉴클레오타이드의 제4 태그 서열에 결합하는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 유닛은 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 추가로 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (e): 제2 복수의 콘카티머 및 제4 복수의 콘카티머의 시퀀싱을 억제하는 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 콘카티머 분자 및 제3 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다(예를 들어, 도 24). 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제1 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제1 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제3 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제2 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (e)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제3 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제2 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제2 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다.

[0169] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서, 제1 콘카티머 분자에서, 제1 표적 바코드 영역(표적 BC-1)만이 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자에서, 제1 표적 바코드(표적 BC-1)의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자에서, 제1 표적 바코드(표적 BC-1)가 시퀀싱되고 제1 cDNA 영역의 일부가 시퀀싱된다.

[0170] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서, 제3 콘카티머 분자에서, 제3 표적 바코드 영역(표적 BC-3)만이 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머 분자에서, 제3 표적 바코드(표적 BC-3)의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머 분자에서, 제3 표적 바코드(표적 BC-3)가 시퀀싱되고 제1 올리고뉴클레오타이드의 일부가 시퀀싱된다.

[0171] 일부 실시양태에서, 단계 (e)의 시퀀싱은 1.0 mm^2보다 더 큰 시야(FOV)를 포함하는 광학 이미지화 시스템을 사용하여 제1 핵산 콘카티머 및 제3 핵산 콘카티머의 적어도 일부를 시퀀싱하는 단계를 포함한다.

[0172] 일부 실시양태에서, 단계 (e)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물

은 이미지화에 의해 검출될 수 있고, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지, 또는 1회 내지 250회 서열 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함한다.

[0173] 일부 실시양태에서, 단계 (e)의 시퀀싱에서, 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있고, 여기서 시퀀싱은 세포 샘플에서 복수의 제1 검출 가능한 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 검출 가능한 시퀀싱 리드 생성물을 동시에 이미지화하는 단계를 포함한다(제1 시퀀싱 리드 생성물과 제2 시퀀싱 리드 생성물이 함께 국소화됨).

[0174] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (f): 제1 콘카티머 분자로부터 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제1 콘카티머 분자를 유지하고, 제3 콘카티머 분자로부터 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제3 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 차단 모이어티는 추가 시퀀싱 반응을 억제하기 위해 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 제2 시퀀싱 리드 생성물에 추가될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체는 뉴클레오타이드 유사체가 후속 뉴클레오타이드의 혼입을 억제하는 경우 혼입될 수 있다. 비제한적 예시 차단 뉴클레오타이드 유사체는 디데옥시뉴클레오타이드, 또는 2' 또는 3' 쇄 종결 모이어티를 가진 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0175] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (g): 단계 (e) 및 (f)를 적어도 한 번 반복하여 복수의 제1 콘카티머 및 제3 콘카티머를 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 단계 (g)의 제1 콘카티머의 시퀀싱은 (1) (i) 복수의 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 제1 콘카티머에 있는 이들 각각의 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하기에 적합한 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제1 복수의 콘카티머 분자를 (i) 복수의 제1 배치 특이적 시퀀싱 프라이머, (ii) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (2) 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (3) 콘카티머로부터 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머를 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (4) 단계 (1) 내지 (3)을 적어도 한 번 반복하는 단계를 추가로 포함한다(예를 들어, 도 21). 일부 실시양태에서, 단계 (4)는 단계 (1) 내지 (3)을 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회 또는 적어도 10회 반복하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (4)는 단계 (1) 내지 (3)을 최대 10회, 최대 20회, 최대 30회, 최대 40회 또는 최대 50회 반복하는 단계를 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 단계 (g)의 제1 콘카티머의 반복적 시퀀싱은 결합에 의한 시퀀싱 절차, 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드 및/또는 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드, 또는 다가 분자를 사용함으로써 수행될 수 있다. 이들 세 가지 시퀀싱 방법의 설명은 아래에 기재되어 있다.

[0178] 일부 실시양태에서, 단계 (g)의 제3 콘카티머의 시퀀싱은 (1) 복수의 제3 배치 특이적 시퀀싱 프라이머를 제3 콘카티머에 있는 이들 각각의 제3 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 하이브리드화하기에 적합한 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제3 복수의 콘카티머 분자를 (i) 복수의 제3 배치 특이적 시퀀싱 프라이머, (ii) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드 시약과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (2) 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 제2 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (3) 콘카티머로부터 제2 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머를 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 (4) 단계 (1) 내지 (3)을 적어도 한 번 반복하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (4)는 단계 (1) 내지 (3)을 적어도 2회, 적어도 3회, 적어도 4회, 적어도 5회, 적어도 6회, 적어도 7회, 적어도 8회, 적어도 9회 또는 적어도 10회 반복하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (4)는 단계 (1) 내지 (3)을 최대 10회, 최대 20회, 최대 30회, 최대 40회 또는 최대 50회 반복하는 단계를 포함한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 단계 (g)의 제3 콘카티머의 반복적 시퀀싱은 결합에 의한 시퀀싱 절차, 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드 및/또는 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드, 또는 다가 분자를 사용함으로써 수행될 수 있다. 이들 세 가지 시퀀싱 방법의 설명은 아래에 기재되어 있다.

[0180] 일부 실시양태에서, 포름아미드(예를 들어, 10% 내지 20% 포름아미드)와 함께 SSC 완충제(예를 들어, 2X 식염수-구연산나트륨 완충제)를 포함하는 하이브리드화 시약을 사용하여 복수의 범용 시퀀싱 프라이머를 콘카티머 주

형 분자에 하이브리드화할 수 있다. 하이브리드화 조건은 약 10분 내지 60분 동안 약 20℃ 내지 30℃의 온도를 포함한다.

[0181] 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 콘카티머로부터 제거할 수 있고, 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예를 들어, 30℃ 내지 90℃에서 포름아미드와 함께 또는 포름아미드 없이 SSC 완충제(예를 들어, 식염수-구연산 나트륨 완충제)를 포함하는 탈하이브리드화 시약을 사용하여 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머를 유지할 수 있다.

[0182] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (h): 제1 복수의 콘카티머 및 제3 복수의 콘카티머의 시퀀싱을 억제하는 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 콘카티머 분자 및 제4 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다(예를 들어, 도 25). 일부 실시양태에서, 단계 (h)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제3 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제3 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (h)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제2 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제3 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제3 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 RNA의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (h)는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제4 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제4 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제4 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다. 일부 실시양태에서, 단계 (h)는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 샘플 내부에서 제4 복수의 콘카티머를 시퀀싱하는 단계를 포함하며, 여기서 제4 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 제4 표적 기준 서열과 정렬되어 세포 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드의 존재를 확인시켜준다.

[0183] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서, 제2 콘카티머 분자에서, 제2 표적 바코드 영역(표적 BC-2)만이 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자에서, 제2 표적 바코드(표적 BC-2)의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자에서, 제2 표적 바코드(표적 BC-2)가 시퀀싱되고 제2 cDNA 영역의 일부가 시퀀싱된다.

[0184] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서, 제4 콘카티머 분자에서, 제4 표적 바코드 영역(표적 BC-4)만이 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머 분자에서, 제4 표적 바코드(표적 BC-4)의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다. 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머 분자에서, 제4 표적 바코드(표적 BC-4)가 시퀀싱되고 제2 올리고뉴클레오타이드의 일부가 시퀀싱된다.

[0185] 일부 실시양태에서, 단계 (h)의 시퀀싱은 1.0 mm^2보다 더 큰 시야(FOV)를 포함하는 광학 이미지화 시스템을 사용하여 제2 핵산 콘카티머 및 제4 핵산 콘카티머의 적어도 일부를 시퀀싱하는 단계를 포함한다.

[0186] 일부 실시양태에서, 단계 (h)의 시퀀싱에서, 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물 및 제4 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있고, 여기서 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지, 또는 1회 내지 250회 시퀀싱 주기 동안 얻은 이미지로부터 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물 및 제4 시퀀싱 리드 생성물을 해독하는 단계를 포함한다.

[0187] 일부 실시양태에서, 단계 (h)의 시퀀싱에서, 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물 및 제4 시퀀싱 리드 생성물은 이미지화에 의해 검출될 수 있고, 여기서 시퀀싱은 세포 샘플에서 복수의 제3 검출 가능한 시퀀싱 리드 생성물 및 제4 검출 가능한 시퀀싱 리드 생성물을 동시에 이미지화하는 단계를 포함한다(제3 시퀀싱 리드 생성물과 제4 시퀀싱 리드 생성물이 함께 국소화됨).

[0188] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (i): 제2 콘카티머 분자로부터 복수의 제3 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제2 콘카티머 분자를 유지하고, 제4 콘카티머 분자로부터 복수의 제4 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 세포 샘플 내부에서 제4 콘카티머 분자를 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 차단 모이어티는 추가 시퀀싱 반응을 억제하기 위해 제3 시퀀싱 리드 생성물 및 제4 시퀀싱 리드 생성물에 추가될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 유사체는 뉴클레오타이드 유사체가 후속 뉴클레오타이드의 혼입을 억제하는 경우 혼입될 수 있다. 비제한적 예시 차단 뉴클레오타이드 유사체는 디데옥시뉴클레오타이드, 또는 2' 또는 3' 쇄 종결 모이어티를 가진 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0189] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (j): 단계 (h) 및 (i)를 적어도 한 번 반복하여 복수의 제2 콘카티머 및

제4 콘카티머를 반복적으로 시퀀싱하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다.

[0190] 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 시약은 검출 가능하게 표지부착되거나 표지부착되지 않은 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티에 연결된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 검출 가능하게 표지부착된 뉴클레오타이드 유사체는 복수의 쇄 종결 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 쇄 종결 모이어티는 3' 뉴클레오타이드 당 위치에 연결되어 3' 차단된 뉴클레오타이드 유사체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티를 제거하여 3' 차단된 뉴클레오타이드 유사체를, 당에서 3' OH 기를 가진 확장 가능한 뉴클레오타이드로 전환할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지부착된 뉴클레오타이드 유사체는 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 타이민 또는 우라실에 상응하는 상이한 형광단에 연결되며, 여기서 상이한 형광단은 시퀀싱 동안 형광 신호를 방출한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 (1) 중합효소 촉매를 사용하여 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를, 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, (2) 혼입된 쇄 종결 뉴클레오타이드에 의해 방출된 형광 신호와 색상을 검출하고 이미지화하는 단계, 및 (3) 쇄 종결 모이어티를 제거하고(예를 들어, 차단해제) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 표적 RNA 분자의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 표적 폴리펩티드의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 리드 생성물의 서열은 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후, 또는 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 반응은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응으로부터 형광 신호를 포착하는 검출기를 가진 시퀀싱 장치에서 수행된다. 시퀀싱 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 신호 데이터를, 세포 샘플에서 함께 위치하는 상이한 형광 스팟의 이미지를 표시하도록 프로그래밍된 컴퓨터 시스템으로 보내도록 구성될 수 있고, 여기서 개별 형광 스팟은 상이한 표적 RNA 분자 또는 상이한 표적 폴리펩티드에 상응한다. 일부 실시양태에서, 상이한 핵염기(예를 들어, A, G, C, T/U)에 상응하는 상이한 형광 표지부착된 뉴클레오타이드 시약을 사용하여 시퀀싱을 수행하는 경우, 이미지는 상이한 시퀀싱 주기에서 동일한 세포 샘플에 함께 위치하는 상이한 색상 형광 스팟을 가질 수 있다.

[0191] 일부 실시양태에서, 클론 증폭된 주형 앰플리콘에서 동기화된 시퀀싱 반응 동안 동기화되지 않은 페이징 및/또는 프리-페이징 이벤트가 발생할 수 있으며, 여기서 시퀀싱 반응은 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드를 사용하는 중합효소 촉진 시퀀싱 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 클론 증폭된 주형 분자 중 한 주형 분자에 대한 시퀀싱 반응은 클론 증폭된 주형 분자 내의 다른 주형 분자의 시퀀싱보다 앞서거나(예를 들어, 프리-페이징) 뒤처진다(예를 들어, 페이징). 시퀀싱 동안, 전형적으로 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드의 혼입에 상응하는 형광 신호가 검출된다. 따라서, 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드의 혼입을 이용하여 페이징 및 프리-페이징 이벤트를 검출하고 모니터링할 수 있다.

[0192] 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 시약은 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 각각 포함하는 복수의 다가 분자를 포함하고, 여기서 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛에 부착된다. 일부 실시양태에서, 개별 다가 분자는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 형광단으로 표지부착되며, 여기서 다가 분자의 주어진 코어에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 타이민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 뉴클레오타이드 아암 중 적어도 하나는 링커, 및/또는 형광단에 부착된 뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 여기서 주어진 뉴클레오타이드 염기에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 타이민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 (1) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제1 시퀀싱 중합효소와 접촉시켜 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계, (2) 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛을 복합체화된 중합효소에 결합시킴으로써 다가 결합 복합체를 형성하기에 적합하고 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입되는 것을 억제하기에 적합한 조건 하에서 복합체화된 중합효소를 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자와 접촉시키는 단계, (3) 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자에 의해 방출된 형광 신호와 색상을 검출하고 이미지화하는 단계, (4) 제1 시퀀싱 중합효소 및 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자를 제거하고, 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계, (5) 중합효소 촉매를 사용하여 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 상

기 유지된 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제2 시퀀싱 중합효소 및 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, 및 (6) 쇄 종결 모이어티를 제거하고(예를 들어, 차단해제) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 주기 시간은 30분 미만에 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시야(FOV)는 1 mm^2를 초과할 수 있고, 큰 면적(>10 mm^2)을 스캐닝하기 위한 주기 시간은 5분 미만일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기 또는 1회 내지 250회의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 표적 RNA 분자의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 기준 서열과 정렬하여 세포 샘플 내부에서 표적 폴리펩티드의 존재를 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 리드 생성물의 서열을 확인하고 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 각각의 라운드 후, 또는 반복적 시퀀싱 리드 생성물 세트를 생성한 후에 정렬될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 반응은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응으로부터 형광 신호를 포착하는 검출기를 가진 시퀀싱 장치에서 수행된다. 시퀀싱 장치는 검출기에 의해 포착된 형광 신호 데이터를, 세포 샘플에서 함께 위치하는 상이한 형광 스팟의 이미지를 표시하도록 프로그래밍된 컴퓨터 시스템으로 보내도록 구성될 수 있고, 여기서 개별 형광 스팟은 상이한 표적 RNA 분자 또는 상이한 표적 폴리펩티드에 상응한다.

[0193] 일부 실시양태에서, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자로 시퀀싱할 때, 다가 결합 복합체가 형성되는 단계 (2) 및 결합된 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자가 이미지화되고 검출되는 단계 (3)의 조건은 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드를 사용하는 시퀀싱 워크플로우에 비해 온화하다. 예를 들어, 단계 (2) 및 (3)은 약 35℃ 내지 45℃ 또는 약 39℃ 내지 42℃의 온화한 온도에서 수행될 수 있다. 단계 (2) 및 (3)은 다회 시퀀싱 주기(예를 들어, 최대 30회 주기) 동안 DNA 나노볼의 압축 크기와 모양을 유지하는 데 도움이 될 수 있는 온화한 온도에서 수행될 수 있으며, 이것은 세포 샘플 내부에서 DNA 나노볼의 스팟 이미지의 FWHM(전폭 절반 최대치)을 개선할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼은 다회 시퀀싱 주기 동안 풀리지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 확대되지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 개별 스팟으로 남아있다. 스팟 이미지는 가우시안 스팟으로서 표시될 수 있으며 크기는 FWHM으로서 측정될 수 있다. 더 작은 FWHM으로 표시되는 더 작은 스팟 크기는 전형적으로 스팟의 개선된 이미지와 상관관계를 가진다. 일부 실시양태에서, 나노볼 스팟의 FWHM은 약 10 ㎛ 이하일 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자를 사용하는 동기화된 중합효소 촉진 시퀀싱 반응 동안 동기화되지 않은 페이징 및/또는 프리-페이징 이벤트가 발생할 수 있다. 시퀀싱 동안, 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 복합체화된 중합효소에 결합하여 다가 결합 복합체를 형성하는 것에 상응하는 형광 신호가 검출될 수 있다. 따라서, 표지부착된 다가 분자의 결합을 이용하여 페이징 및 프리-페이징 이벤트를 검출하고 모니터링할 수 있다. 일부 실시양태에서, 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자로 최대 30회 시퀀싱 주기를 수행할 때, 페이징 및/또는 프리-페이징 비율은 약 5% 미만, 또는 약 1% 미만, 또는 약 0.01% 미만, 또는 약 0.001% 미만일 수 있다. 대조적으로, 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드를 사용하여 최대 30회 시퀀싱 주기를 수행하는 경우 페이징 및/또는 프리-페이징 비율은 약 5%일 수 있다.

[0195] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 생물학적 샘플은 표면 상에 고착될 수 있다.

[0196] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 샘플은 전체 세포, 복수의 전체 세포, 온전한 조직 또는 온전한 종양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 신선한 세포 샘플, 신선하게 냉동된 세포 샘플, 박편화된 세포 샘플 또는 FFPE 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 하나 이상의 살아있는 세포 또는 살아 있지 않은 세포를 포함한다.

[0197] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 바이러스, 진균, 원핵생물 또는 진핵생물로부터 얻을 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 동물, 곤충 또는 식물로부터 얻을 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 하나 이상의 바이러스 감염 세포를 포함한다.

[0198] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 인간, 원숭이, 유인원, 갯과, 고양잇과, 솟과, 말과, 뮤린, 돼지과, 염소과, 늑대, 두꺼비, 어류, 식물, 곤충 세균, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 또는 진균을 비롯한 임의의 유기체로부터 얻을 수 있다.

[0199] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 머리, 목, 뇌, 유방, 난소, 자궁경부, 결장, 직장, 자궁내막, 담낭, 장, 방광,

전립선, 고환, 간, 폐, 신장, 식도, 췌장, 갑상선, 뇌하수체, 흉선, 피부, 심장, 후두 또는 기타 장기를 포함하는 임의의 장기로부터 얻을 수 있다.

[0200] 본원에 설명된 방법들 임의의 방법에서, 세포 샘플은 표적 RNA 및 비-표적 RNA를 포함하는 복수의 RNA를 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포는 전형적으로 DNA(예를 들어, 게놈 DNA)를 RNA 분자로 전사하는 것을 포함하는 유전자 발현으로 RNA를 생성한다. 전사된 RNA는 스플라이싱을 겪을 수 있거나 스플라이싱되지 않을 수 있다. 전사된 RNA는 폴리펩티드로 번역될 수 있거나(예를 들어, 코딩 RNA), 번역을 거치지 않지만 tRNA 또는 rRNA로 프로세싱될 수 있다(예를 들어, 비-코딩 RNA).

[0201] 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 표적 RNA 및 비-표적 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 야생형 RNA, 돌연변이체 RNA 또는 스플라이스 변이체 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 사전스플라이싱된 RNA, 부분적으로 스플라이싱된 RNA 또는 완전히 스플라이싱된 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, 마이크로RNA(miRNA), 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 하우스킵핑 RNA, 세포 특이적 RNA, 조직 특이적 RNA 또는 질환 특이적 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 열, 빛, 화학물질 또는 약물과 같은 자극에 반응하여 하나 이상의 세포에 의해 발현된 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 건강한 세포 또는 병든 세포에서 발견되는 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 재조합 DNA 절차를 이용하여 세포 샘플에 도입한 형질전환 DNA 서열로부터 전사된 RNA를 포함한다. 예를 들어, RNA는 유도성 또는 항시성 프로모터 서열에 의해 조절되는 형질전환 DNA 서열로부터 전사될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플이 보유한 복수의 RNA는 형질전환되지 않은 DNA 서열로부터 전사된 RNA를 포함한다.

[0202] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 샘플은 지지체 상에서 배양될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플을 2세대 내지 10세대 이상 확장하기에 적합한 조건 하에서 지지체 상에서 세포 샘플을 배양하는 단계를 포함한다. 배양된 세포 샘플은 세포의 콜로니를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플을 밀집도(confluence) 또는 비-밀집도까지 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 지지체 상의 세포 샘플을 단순 또는 복합 세포 배양 배지에서 배양하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 세포 배양 배지는 D-MEM 높은 글루코스(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 11965118), 태아 소 혈청(예를 들어, 10% FBS; 예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 A3160402), MEM 비-필수 아미노산(예를 들어, 0.1 mM MEM, 예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 11140050), L-글루타민(예를 들어, 6 mM L-글루타민, 예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 A2916801), MEM 피루브산나트륨(예를 들어, 1 mM 피루브산나트륨, 예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 11360070), 및 항생제(예를 들어, 1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 예를 들어, 써모 피셔 제품, 카탈로그 번호 10378016)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 지지체 상에서 세포(들)를 배양하기에 적합한 습도와 온도에서 세포 샘플을 배양하는 단계를 포함한다. 비제한적 예시 적합한 조건은 공기 중 대략 5% 내지 10% 이산화탄소의 가습된 대기와 함께 대략 37℃를 포함한다. 세포 샘플을 산소 및/또는 질소로 적절히 통기하면서 배양할 수 있다.

[0203] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 용어 "단순 세포 배지" 또는 관련 용어는 전형적으로 배양물에서의 세포 성장 및/또는 증식을 뒷받침하는 성분을 결여하는 세포 배지를 지칭한다. 단순 세포 배지는 예를 들어, 세포 샘플을 세척하거나, 현탁하거나 희석하는 데 사용될 수 있다. 단순 세포 배지를 특정 성분과 혼합하여, 배양물에서의 세포 성장 및/또는 증식을 뒷받침할 수 있는 세포 배지를 제조할 수 있다. 단순 세포 배지는 완충제, 인산염 화합물, 나트륨 화합물, 칼륨 화합물, 칼슘 화합물, 마그네슘 화합물 및/또는 글루코스 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단순 세포 배지는 PBS(인산염 완충 식염수), DPBS(둘베코 인산염 완충 식염수), HBSS(행크 균형 염 용액), DMEM(둘베코 변형 이글 배지), EMEM(이글 최소 필수 배지) 및/또는 EBSS를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 본원에 설명된 핵산 방법들 중 임의의 핵산 방법을 수행하는 단계 전 또는 동안에 단순 세포 배지에 놓일 수 있다.

[0204] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 용어 "복합 세포 배지" 또는 관련 용어는 보충제 또는 첨가제 없이 배양물에서의 세포 성장 및/또는 증식을 뒷받침하는 데 사용될 수 있는 세포 배지를 지칭한다. 복합 세포 배지는 완충 시스템(예를 들어, HEPES), 무기 염(들), 아미노산(들), 단백질(들), 폴리펩티드(들), 탄수화물(들), 지방산(들), 지질(들), 퓨린(들) 및 이들의 유도체(예를 들어, 하이포잔틴), 피리미딘(들) 및 이들의 유도체, 및/또는 미량 원소(들) 중 둘 이상의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 복합 세포 배지는 유체 또는 조직 추출물

로부터 얻은 유체를 포함한다. 복합 세포 배지는 인공 세포 배지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복합 세포 배지는 혈청 함유 배지일 수 있으며, 예를 들어, 복합 세포 배지는 태아 소 혈청, 혈액 혈장, 혈액 혈청, 림프액, 인간 태반 탯줄 혈청 및 양수와 같은 유체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복합 세포 배지는 전형적으로(반드시 그런 것은 아님) 규정된 세포 배양 배지인 무혈청 배지일 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합 세포 배지는 전형적으로(반드시 그런 것은 아님) 재조합 폴리펩티드, 및 초순수 무기 및/또는 유기 화합물을 포함하는 화학적으로 규정된 배지일 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합 세포 배지는 예를 들어, MEM(최소 필수 배지) 및 RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute)을 포함하는 무단백질 배지일 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합 세포 배지는 IMDM(이스코브 변형 둘베코 배지)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복합 세포 배지는 DMEM(둘베코 변형 이글 배지)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 본원에 설명된 핵산 방법들 중 임의의 핵산 방법을 수행하는 단계 전 또는 동안에 복합 세포 배지에 놓일 수 있다.

[0205] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 샘플은 고정된 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 세포와 이의 내용물을 보존하여 분해를 억제하고 세포 용해를 억제할 수 있는 고정 시약(예를 들어, 고정하는 시약)으로 처리될 수 있다. 예를 들어, 고정 시약은 세포 샘플에 의해 보유된 RNA를 보존할 수 있다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 세포 샘플로부터의 핵산의 손실을 억제한다.

[0206] 일부 실시양태에서, 고정 시약은 RNA를 가교결합시켜, RNA가 세포 샘플로부터 빠져나가는 것을 방지할 수 있다. 일부 실시양태에서, 가교결합 고정 시약은 알데하이드, 포름알데하이드, 파라포름알데하이드, 포르말린, 글루타르알데하이드, 이미도에스테르, N-하이드록시석신이미드 에스테르(NHS) 및/또는 글리옥살(이작용성 알데하이드)의 임의의 조합을 포함한다.

[0207] 일부 실시양태에서, 고정 시약은 메탄올 또는 에탄올을 비롯한 적어도 하나의 알코올을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 아세톤을 비롯한 적어도 하나의 케톤을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 아세트산, 빙초산 및/또는 피크르산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 염화수은을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 황산아연 또는 염화아연을 포함하는 아연 염을 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 폴리펩티드를 변성시킬 수 있다.

[0208] 일부 실시양태에서, 고정 시약은 물/PBS를 기준으로 4% w/v의 파라포름알데하이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 중성 pH에서 10%의 35% 포름알데하이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 물/PBS를 기준으로 2% v/v의 글루타르알데하이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고정 시약은 25%의 37% 포름알데하이드 용액, 70% 피크르산 및 5% 아세트산을 포함한다.

[0209] 일부 실시양태에서, 약 30분 내지 60분 동안 4% 파라포름알데하이드를 사용하여 세포 샘플을 지지체 상에 고정하고 PBS로 세척할 수 있다.

[0210] 일부 실시양태에서, 세포 샘플을 염색할 수 있거나, 탈색할 수 있거나, 염색하지 않을 수 있다.

[0211] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 샘플은 투과 가능해진 세포 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포막을 변경하여 실험 시약이 세포 내로 침투할 수 있게 하는 투과 가능화 시약으로 세포 샘플을 처리하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 투과 가능화 시약은 세포막으로부터 막 지질을 제거한다. 일부 실시양태에서, 유기 용매, 세제, 화학적 화합물, 가교결합제 및/또는 효소의 임의의 조합을 포함하는 투과 가능화 시약으로 세포 샘플을 처리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유기 용매는 아세톤, 에탄올 및 메탄올을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세제는 사포닌, 트리톤 X-100, 트윈-20, 도데실황산나트륨(SDS), N-라우로일사르코신 나트륨 염 용액 또는 비이온성 폴리옥시에틸렌 계면활성제(예를 들어, NP40)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가교결합제는 파라포름알데하이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 효소는 트립신, 펩신 또는 프로테아제(예를 들어, 프로테이나제 K)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제 효소와 함께 알칼리성 조건 또는 산성 조건을 사용하여 세포를 투과 가능하게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 투과 가능화 시약은 물 및/또는 PBS를 포함한다.

[0212] 예를 들어, 약 30분 내지 60분 동안 70% 에탄올을 사용하여 고정된 세포를 투과 가능하게 만들 수 있으며, 투과 가능화 시약을 PBS-T(예를 들어, 0.05% Tween-20이 함유된 PBS)로 교체할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 30분 내지 60분 동안 3% 파라포름알데하이드 및 0.1% 글루타르알데하이드로 세포를 후-고정할 수 있으며, PBS-T로 여러 번 세척할 수 있다.

[0213] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 팽윤성 폴리전해질 하이드로겔(미국 특허 제10,309,879호 및 문헌 [Chen 2015 Science 347:543], 이 문헌들의 내용은 그 전문이 참고로 포함됨)을 세포 샘플에 주입한다. 일부 실

시양태에서, 아크릴산나트륨, 아크릴아미드 및 가교결합제 N-N'-메틸렌비스아크릴아미드를 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플에 주입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합을 달성하기 위해 과황산암모늄(APS) 개시제와 테트라메틸에틸렌디아민(TEMED) 가속제를 주입하였다. 일부 실시양태에서, 단백질분해를 위해 프로테이나제 K를 세포 샘플에 주입할 수 있고 세포 샘플을 분해 완충제에서 인큐베이션할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부의 겔은 물의 첨가에 의해 팽윤될 수 있다.

[0214] 본 개시내용은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 cDNA로 전환하는 단계를 포함할 수 있는, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 역전사 반응을 수행하여 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자(예를 들어, 복수의 제1 가닥 cDNA 분자)를 생성하기에 적합한 조건 하에서, 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 (i) 복수의 역전사 프라이머, (ii) 복수의 역전사효소, 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 역전사 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 역전사효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플 내부에서복수의 RNA를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 가닥 cDNA 분자의 합성은 생략될 수 있다.

[0215] **역전사효소**

[0216] 본 개시내용은 제자리 핵산 분석을 수행하는 방법을 제공한다. 상기 분석은 핵산의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 RNA일 수 있다. RNA의 분석은 RNA를 상보적 DNA(cDNA)로 역전사하는 단계를 포함할 수 있다. 역전사효소를 사용하여 RNA를 cDNA로 전사할 수 있다.

[0217] 본원에 설명된 방법은 역전사효소의 사용을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 RNA 의존적 DNA 중합효소 활성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 AMV(조류 골수모세포증 바이러스), M-MMLV(몰로니 뮤린 백혈병 바이러스) 또는 HIV(인간 면역결핍 바이러스)의 역전사효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 감소된 RNase H 활성을 나타내는 재조합 효소, 예를 들어, REVERTAID(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 EP0441)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 MULTISCRIBE(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 # 4311235), THERMOSCRIPT(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 # 12236-014) 또는 ARRAYSCRIPT(예를 들어, 암비온 제품, 카탈로그 번호 AM2048)를 포함하는 상업적으로 입수 가능한 효소일 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 SUPERSCRIPT II(예를 들어, 카탈로그 번호 18064014), SUPERSCRIPT III(예를 들어, 카탈로그 번호 18080044) 또는 SUPERSCRIPT IV 효소(예를 들어, 카탈로그 번호 18090010)(인비트로겐(Invitrogen)으로부터의 모든 SUPERSCRIPT 효소)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사 반응은 RNase 억제제를 포함할 수 있다. 역전사효소의 추가 예는 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 공개 제US20210139884호에서도 찾을 수 있다.

[0218] 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 DNA, RNA 또는 키메라 DNA/RNA를 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 아데닌(A), 타이민(T), 구아닌(G), 사이토신(C), 우라실(U) 및/또는 이노신(I)의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 임의의 길이, 예를 들어, 5개 내지 25개 염기, 또는 25개 내지 50개 염기, 또는 50개 내지 75개 염기, 또는 75개 내지 100개 염기 길이, 또는 더 긴 길이일 수 있다. 역전사 프라이머는 5' 말단 및 3' 말단을 각각 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 3' 말단은 중합효소 촉진 프라이머 연장 반응에서 뉴클레오타이드 중합 개시 부위로서 역할을 하는 3' OH 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 3' 말단은 중합효소 촉진 프라이머 연장 반응을 차단하는 쇄 종결 모이어티를 가진다. 쇄 종결 모이어티를 제거하여 3' 당 위치를 연장 가능한 3' OH로 전환할 수 있다.

[0219] 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 뉴클레아제 분해(예를 들어, 리보뉴클레아제 분해)에 대한 저항성을 부여하도록 변형된다. 예를 들어, 역전사 프라이머는 그의 5' 말단에서 적어도 하나의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함하며, 이 결합은 역전사 프라이머가 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 갖게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 그의 5' 말단에서 2개 내지 5개 이상의 연속 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(MOE), 2' 플루오로-염기 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 인산화된 3' 말단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 잠금 핵산(LNA) 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 인산화된 5' 말단을 포함한다(예를 들어, 폴리뉴클레

오타이드 키나제를 사용함).

[0220] 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 전체 길이는 RNA 분자의 부분에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 역전사 프라이머는 RNA 분자의 부분에 하이브리드화하는 서열을 가진 3' 영역, 및 RNA 분자에 하이브리드화하지 않는 테일을 가진 5' 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 테일은 샘플 바코드 서열, 증폭 프라이머 결합 부위, 시퀀싱 프라이머 결합 부위, 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위 및/또는 표면 포획 프라이머 결합 부위 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 비롯한 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 테일은 고유 식별 서열(예를 들어, 고유 분자 인덱스(UMI))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 테일은 제한 효소 인식 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 역전사 프라이머는 단독중합체 서열, 예를 들어, 폴리-A, 폴리-T, 폴리-C, 폴리-G 또는 폴리-U를 가진 3' 영역의 적어도 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 RNA 분자의 5' 또는 3' 말단, 또는 RNA 분자의 내부 부분을 포함하는, RNA 분자의 임의의 부분에 하이브리드화할 수 있다.

[0221] 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함한다(예를 들어, 표적화 전사체학). 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머는 표적 RNA 분자에 하이브리드화하는, 3' 영역에 있는 사전결정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 사전결정된 서열 부분은 길이가 4개 내지 20개 염기, 또는 20개 내지 40개 염기, 또는 40개 내지 50개 염기일 수 있다.

[0222] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단은 하우스킵핑 유전자에 의해 세포 샘플에서 전사된 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하우스킵핑 유전자의 선택은 본원에 설명된 제자리 방법에 사용될 세포 샘플의 유형에 의해 좌우될 수 있다. 비제한적 예시 하우스킵핑 유전자는 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH), 베타-액틴(ACTB), 튜불린, PPIA(펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제), NME4(NME/NM23 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나제 4), SMARCAL1(염색질의 SWI/SNF 관련 매트릭스 관련 액틴 의존적 조절제, 서브패밀리 A 유사 1), 및 POMK(단백질-O-만노스 키나제)를 포함한다. 숙련된 당업자는 수많은 하우스킵핑 유전자들 중 임의의 하우스킵핑 유전자로부터 얻은 RNA 전사체에 하이브리드화하도록 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 설계할 수 있다.

[0223] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단은 검사되는 세포 샘플에서 발현되는 유전자로부터 전사된 RNA(예를 들어, 세포 특이적 또는 조직 특이적 RNA)에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다.

[0224] 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함한다(예를 들어, 전체 전사체학). 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제2 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 RNA 분자에 하이브리드화하는, 3' 영역에 있는 무작위 및/또는 축퇴 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 무작위 서열 또는 축퇴 서열 부분은 길이가 4개 내지 20개 염기, 또는 20개 내지 40개 염기, 또는 40개 내지 50개 염기일 수 있다.

[0225] **패드락 프로브**

[0226] 본 개시내용은 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에 사용하기 위한 패드락 프로브를 제공한다. 패드락 프로브는 표적 분자를 선택적으로 검출하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 패드락 프로브는 표적 핵산 또는 폴리펩티드를 선택적으로 검출하도록 설계될 수 있다. 표적 핵산은 표적 DNA 또는 표적 RNA일 수 있다. 패드락 프로브를 표적 핵산 또는 단백질/폴리펩티드에 결합시킴으로써, 표적 핵산 또는 단백질/폴리펩티드의 하나 이상의 특성에 대한 정보를 알 수 있다. 예를 들어, 표적 핵산 또는 단백질/폴리펩티드의 위치를 확인할 수 있다. 패드락 프로브는 프라이머에 특이적인 하나 이상의 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 프라이머는 공간적으로 국소화될 수 있으므로, 패드락 프로브는 바코드 서열을 필요로 하지 않을 수 있다. 표적의 위치는 샘플에 대한 정보, 예를 들어, 세포 기원을 제공할 수 있다. 이러한 경우, 패드락 프로브는 바코드를 가질 필요가 없을 수 있다. 그러나, 다른 비제한적 경우, 패드락 프로브는 바코드를 가질 수 있다.

[0227] 본 개시내용은 표적 RNA에 특이적인 패드락 프로브를 제공한다. RNA 특이적 패드락 프로브는 표적 RNA에 상응하는 cDNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. RNA 특이적 프로브는 cDNA를 고유하게 식별하는 바코드를 결여할 수 있다. 이러한 경우, RNA 특이적 프로브에 대한 공간적 정보를 얻을 수 있다. RNA 특이적 프로브는 cDNA를 고유하게 식별하는 바코드를 가질 수 있다. RNA 특이적 패드락 프로브는 시퀀싱 프라이머 결합 부위도 가질 수

있다. 시퀀싱 프라이머 결합 부위는 배치 특이적 프라이머 결합 부위일 수 있다 - 즉, 프라이머는 프로브에 고유한 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 하나 이상의 패드락 프로브를 사용할 수 있다. 각각의 프로브는 고유 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 가질 수 있다. 배치 특이적 프라이머 결합 부위의 사용은 패드락 프로브의 공간적 국소화를 가능하게 함으로써, 패드락 프로브에서 바코드 서열에 대한 필요성을 없앨 수 있다.

[0228] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 샘플 내부에 있는 복수의 cDNA를 증폭하여 cDNA 앰플리콘(예를 들어, 콘카티머)을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 패드락 프로브 원형화 및 롤링 서클 증폭 워크플로우를 수행함으로써 증폭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 cDNA 분자를, 제1 표적 cDNA 분자와 하이브리드화하는 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브 및 제2 표적 cDNA 분자와 하이브리드화하는 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함하는 복수의 패드락 프로브와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0229] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 DNA, RNA, DNA 및 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 표준 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 뉴클레아제 분해(예를 들어, 리보뉴클레아제 분해)에 대한 저항성을 부여하도록 변형된다. 예를 들어, 패드락 프로브는 그의 5' 말단에서 적어도 하나의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함하며, 이 결합은 패드락 프로브가 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 갖게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 그의 5' 말단에서 2개 내지 5개 이상의 연속 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(MOE), 2' 플루오로-염기 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 인산화된 3' 말단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 잠금 핵산(LNA) 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 인산화된 5' 말단을 포함한다(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용함).

[0230] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 cDNA 분자를 복수의 패드락 프로브와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 패드락 프로브는 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 제1 표적 cDNA 분자와 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 패드락 프로브는 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 제2 표적 cDNA 분자와 하이브리드화할 수 있다.

[0231] 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브는 cDNA 분자의 부분에 하이브리드화하여 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역과 제2 말단 영역을 포함하고, 여기서 개별 복합체는 cDNA 분자의 근위 영역에 하이브리드화하여 제1 말단 프로브 말단과 제2 말단 프로브 말단 사이에 닉 또는 갭을 형성하는 제1 말단 프로브 영역과 제2 말단 프로브 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브의 제1 말단 영역은 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화하는 제1 표적 특이적 서열을 갖고, 개별 패드락 프로브의 제2 말단 영역은 동일한 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화하는 제2 표적 특이적 서열을 갖고, 여기서 하이브리드화된 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이에 닉 또는 갭이 형성됨으로써, 패드락 프로브를 원형화한다. 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브의 제1 말단 영역은 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 제1 표적 특이적 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브의 제2 말단 영역은 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 제2 표적 특이적 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 하이브리드화된 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이에 닉 또는 갭이 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 말단 영역과 제2 말단 영역의 하이브리드화는 패드락 프로브를 원형화할 수 있다.

[0232] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트(예를 들어, 복수의 패드락 프로브)의 개별 패드락 프로브는 표적 cDNA 분자의 동일한 표적 영역에 하이브리드화하여 동일한 cDNA 서열을 가진 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역을 포함한다.

[0233] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트(예를 들어, 복수의 패드락 프로브)는 적어도 2개의 패드락 프로브 서브세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브 서브세트의 개별 패드락 프로브는 표적 cDNA 분자의 동일한 표적 영역(예를 들어, 제1 표적 영역)에 하이브리드화하여 동일한 cDNA 서열을 가진 제1 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 패드락 프로브 서브세트의 개별 패드락 프로브는 표적 cDNA 분자의 동일한 표적 영역(예를 들어, 제2 표적 영역)에 하이브리드화하여 동일한 cDNA 서열을 가진 제2 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역 및

제2 말단 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브 서브세트 및 제2 패드락 프로브 서브세트는 동일한 표적 cDNA 분자의 상이한 표적 영역에 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브 서브세트 및 제2 패드락 프로브 서브세트는 상이한 표적 cDNA 분자의 상이한 표적 영역에 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트는 2개 내지 10개의 패드락 프로브 서브세트, 또는 10개 내지 25개의 패드락 프로브 서브세트, 또는 25개 내지 50개의 패드락 프로브 서브세트, 또는 최대 100개의 패드락 프로브 서브세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트는 적어도 100개의 패드락 프로브 서브세트, 적어도 500개의 패드락 프로브 서브세트, 적어도 1000개의 패드락 프로브 서브세트, 적어도 10,000개의 패드락 프로브 서브세트 또는 더 많은 패드락 프로브 서브세트를 포함한다.

[0234] 일부 실시양태에서, 닉은 효소에 의해 라이게이션되어, 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 리가제 효소는 매칭되고 하이브리드화된 말단과 잘못 매칭되고 하이브리드화된 말단을 구별하여 표적 특이적 하이브리드화를 보장할 수 있다. 일부 실시양태에서, 라이게이션 반응은 T3, T4, T7 또는 Taq DNA 리가제 효소를 포함하는 리가제 효소의 사용을 포함한다.

[0235] 일부 실시양태에서, 하이브리드화된 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이의 갭의 크기는 1개 내지 25개 염기이다. 하이브리드화된 패드락 프로브의 3' OH 말단은 주형으로서 표적 cDNA 분자를 사용하는 중합효소 촉진 채우기 반응(예를 들어, 갭 채우기 반응)을 위한 개시 부위 역할을 할 수 있다. 채우기 반응 후, 남아있는 닉은 효소에 의해 라이게이션되어 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성할 수 있다.

[0236] 일부 실시양태에서, 갭 채우기 반응은 원형화된 패드락 프로브를 DNA 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 중합효소는 이. 콜라이 DNA 중합효소 I, 이. 콜라이 DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, T7 DNA 중합효소 또는 T4 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제 효소는 매칭되고 하이브리드화된 말단과 잘못 매칭되고 하이브리드화된 말단을 구별하여 표적 특이적 하이브리드화를 보장할 수 있다. 일부 실시양태에서, 라이게이션 반응은 T3, T4, T7 또는 Taq DNA 리가제 효소를 포함하는 리가제 효소의 사용을 포함한다.

[0237] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 샘플 바코드 서열, 증폭 프라이머 결합 부위, 시퀀싱 프라이머 결합 부위, 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위 및/또는 표면 포획 프라이머 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 고유 식별 서열(예를 들어, 고유 분자 인덱스(UMI))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 제한 효소 인식 서열을 포함한다.

[0238] **롤링 서클 증폭(RCA)**

[0239] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브는 롤링 서클 증폭 반응을 거쳐 유닛의 2개 이상의 탠덤 카피를 각각 가진 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있으며, 여기서 상기 유닛은 표적 RNA 분자에 상응하는 표적 서열, 및 범용 어댑터 서열(들), 고유 분자 인덱스 서열(들) 및/또는 제한 효소 인식 서열(들)을 비롯한, 패드락 프로브에 의해 보유된 임의의 추가 서열(들)을 포함한다.

[0240] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 콘카티머 분자 중 각각의 콘카티머 분자는 유닛의 2개 이상의 탠덤 카피를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 유닛은 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유닛은 패드락 프로브에 의해 보유된 추가 서열(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 서열은 범용 어댑터 서열(들), 고유 분자 인덱스 서열(들), 제한 효소 인식 서열(들) 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0241] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 개별 증폭 프라이머를 공유 폐쇄된 패드락 프로브에 하이브리드화하기에 적합한 조건, 및 주형 분자로서 공유 폐쇄된 패드락 프로브를 사용하여 프라이머 연장을 수행하여 핵산 콘카티머를 생성하기에 적합한 조건 하에서 공유 폐쇄된 원형화된 패드락 프로브를, 증폭 프라이머(예를 들어, 범용 롤링 서클 증폭 프라이머), 가닥 치환 DNA 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 공유 폐쇄된 원형화된 패드락 프로브를 증폭 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 공유 폐쇄된 원형화된 패드락 프로브를 가닥 치환 DNA 중합효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 공유 폐쇄된 원형화된 패드락 프로브를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭은 개별 증폭 프라이머를 공유 폐쇄된 패드락 프로브에 하이브리드화하기에 적합한 조

건 하에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭은 프라이머 연장을 수행하기에 적합한 조건 하에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머 연장은 주형 분자로서 공유 폐쇄된 패드락 프로브를 사용함으로써 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이머 연장은 핵산 콘카티머를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응에서 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP 중 둘 이상의 임의의 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 롤링 서클 증폭 반응들 중 임의의 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 또는 부재 하에서 수행될 수 있다.

[0242] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응이 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 생성된 콘카티머는 세포 샘플을 석신이누이드 에스테르(NHS), 말레이미드(설포-SMCC), 이미도에스테르(DMP), 카보디이미드(DCC, EDC) 또는 페닐 아자이드로 처리함으로써 가교결합 반응성 기에 가교결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가교결합 반응성 기의 중합은 빛 또는 UV 빛에 의해 개시될 수 있다. 일부 실시양태에서, 생성된 콘카티머는 세포 샘플을 가교결합된 아가로스, 가교결합된 덱스트란 또는 가교결합된 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리아크릴아미드, 셀룰로스 알기네이트 또는 폴리아미드로 처리함으로써 매트릭스에 가교결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG는 한쪽 또는 양쪽 말단에서 설포-NHS 에스테르 모이어티를 포함한다(예를 들어, PEG화된 비스(설포석신이미딜)수베레이트)(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽의 BS(PEG)9, 카탈로그 번호 21582).

[0243] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 일정한 온도(예를 들어, 등온)에서 수행될 수 있으며, 여기서 일정한 온도는 실온 내지 약 30℃, 또는 약 30℃ 내지 40℃, 또는 약 40℃ 내지 50℃, 또는 약 50℃ 내지 65℃이다.

[0244] 일부 실시양태에서, 가닥 치환 활성을 가진 DNA 중합효소는 phi29 DNA 중합효소, Bst DNA 중합효소의 큰 단편, Bsu DNA 중합효소의 큰 단편, 및 Bca(엑소-) DNA 중합효소, 이. 콜라이 DNA 중합효소의 클레나우 단편, T5 중합효소, M-MuLV 역전사효소, HIV 바이러스 역전사효소, 또는 딥 벤트 DNA 중합효소로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, phi29 DNA 중합효소는 야생형 phi29 DNA 중합효소(예를 들어, 엑스페데온의 MagniPhi), 또는 변이체 EquiPhi29 DNA 중합효소(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품) 및 키메라 QualiPhi DNA 중합효소(예를 들어, 4베이스바이오 제품)일 수 있다.

[0245] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키도록 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 그의 5' 말단에서 적어도 하나의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함하고, 이 결합은 증폭 프라이머가 엑소뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 갖게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 그의 5' 말단에서 2개 내지 5개 이상의 연속 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 2'-O-메틸 또는 2'-O-메톡시에틸(MOE) 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0246] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 콘카티머 분자에 하이브리드화될 때 콘카티머의 크기, 모양, 또는 크기와 모양의 조합을 압축하여 압축 나노볼을 형성할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 콘카티머 분자에 하이브리드화된 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 크기, 모양, 또는 크기와 모양의 조합을 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축된 콘카티머 분자는 압축 나노볼을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 부분에 하이브리드화할 수 있는 한 말단에서 제1 영역을 갖고 동일한 콘카티머 분자의 또 다른 부분에 하이브리드화할 수 있는 다른 말단에서 제2 영역을 가진 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 여기서 압축 올리고뉴클레오타이드와 주어진 콘카티머의 하이브리드화는 콘카티머의 크기, 모양, 또는 크기 또는 모양의 조합을 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 부분에 하이브리드화할 수 있는 한 말단에서 제1 영역을 갖고 동일한 콘카티머 분자의 또 다른 부분에 하이브리드화할 수 있는 다른 말단에서 제2 영역을 가진 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드와 콘카티머 분자의 하이브리드화는 콘카티머 분자의 크기, 모양, 또는 크기와 모양의 조합을 압축할 수 있다.

[0247] 압축 올리고뉴클레오타이드는 5' 영역, 임의적 내부 영역(개재 영역), 3' 영역 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역 및 3' 영역은 콘카티머의 상이한 부분에 하이브리드화하여 콘카티머의 원위 부분을 함께 당겨, 콘카티머의 압축을 유발하여 DNA 나노볼을 형성할 수 있다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카티머 분자의 제1 부분(예를 들어, 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위)에 하이브리드화하도록 설계되고, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카티머 분자의 제2 부분(예를 들어, 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위)에 하이브리드화하도록 설계된다. RCA 동안 압축 올리고뉴클

레오타이드의 포함은 압축 올리고뉴클레오타이드의 부재 하에서 생성된 콘카티머에 비해 더 조밀한 크기와 모양을 가진 DNA 나노볼의 형성을 촉진할 수 있다. DNA 나노볼의 압축 및 안정한 특성은 신호 강도를 증가시켜 제자리 시퀀싱 정확도를 개선하고 나노볼은 다회 시퀀싱 주기 동안 그의 모양과 크기를 유지한다.

[0248] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 또는 DNA와 RNA의 조합을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 압축 올리고뉴클레오타이드는 20개 내지 150개의 뉴클레오타이드, 또는 30개 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 40개 내지 80개의 뉴클레오타이드를 포함하는 임의의 길이일 수 있다.

[0249] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 5' 영역과 3' 영역, 및 임의로 5' 영역과 3' 영역 사이의 개재 영역을 포함한다. 개재 영역은 임의의 길이, 예를 들어, 약 2개 내지 20개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 개재 영역은 연속 동일한 염기(예를 들어, AAA, GGG, CCC, TTT 또는 UUU)를 가진 단독중합체를 포함한다. 개재 영역은 비-단독중합체 서열을 포함한다.

[0250] 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제1 부분에 전체적으로 상보적일 수 있거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제1 부분에 전체적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제1 부분에 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제2 부분에 전체적으로 상보적일 수 있거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제2 부분에 전체적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제2 부분에 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카티머 분자의 제1 범용 서열 부분에 하이브리드화할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카티머 분자의 제2 범용 서열 부분에 하이브리드화할 수 있다.

[0251] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 동일한 서열을 가질 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 상이한 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 5' 영역의 역서열인 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역의 역서열인 서열을 가질 수 있다.

[0252] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드들 중 임의의 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 말단 3' 말단에서 2'-O-메틸 RNA 염기(예를 들어, mUmUmU로 표기됨)를 포함하는 추가 3개의 염기를 포함할 수 있거나, 말단 3' 말단은 추가 2'-O-메틸 RNA 염기를 결여한다.

[0253] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 그의 5' 또는 3' 말단에서 특정 기능을 부여하는 하나 이상의 변형된 염기 또는 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 그의 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 엑소뉴클레아제 저항성을 부여하는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 말단에서 또는 그 근처에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 엑소뉴클레아제 저항성을 부여하는 2' 플루오로 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단은 중합효소 촉진 연장을 차단하는 적어도 하나의 2'-O-메틸 RNA 염기를 포함한다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단은 2'-O-메틸 RNA 염기(예를 들어, mUmUmU로 표기됨)를 포함하는 3개의 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 그의 3' 말단에서 중합효소 촉진 연장을 차단하는 3' 도립 dT를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 중합효소 촉진 연장을 차단하는 3' 인산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 내부 영역은 압축 올리고뉴클레오타이드를 콘카티머 분자에 하이브리드화함으로써 형성된 이중체의 열 안정성을 증가시키는 적어도 하나의 잠금 핵산(LNA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 인산화된 5' 말단을 포함한다(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용함).

[0254] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 서열 5'-CATGTAATGCACGTACTTTCAGGGTAAACATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT-3'(서열번호 14)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 말단 3' 말단에서 2'-O-메틸 RNA 염기(예를 들어, mUmUmU로 표기됨)를 포함하는 추가 3개의 염기를 포함하거나, 말단 3' 말단은 추가 2'-O-메틸 RNA 염기를 결여한다.

[0255] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 연속 구아닌을 가진 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 이상의 연속 구아닌을 가진 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 테트라드 구조를 형성할 수 있는 4개의 연속 구아닌을 포함한다(도 18 참조). 구아닌 테트라드 구조는 후그스틴 수소 결합을 통해 안정화될 수 있다. 구아닌 테트라드 구조는 칼륨, 나트륨, 리튬, 루비듐 또는 세슘을 포함하는 중심 양이온에 의해 안정

화될 수 있다.

[0256] 적어도 하나의 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 테트라드를 형성할 수 있고(도 18) 콘카티머의 범용 결합 서열에 하이브리드화함으로써, 콘카티머가 접혀 분자내 G-사중체 구조를 형성할 수 있게 한다(도 19). 콘카티머는 자체 붕괴되어 압축 나노볼을 형성할 수 있다. 나노볼에서 구아닌 테트라드와 G-사중체의 형성은 나노볼의 안정성을 증가시켜, 세포 샘플 내부에서 시퀀싱하는 동안 pH, 온도 및/또는 반복된 시약 유동의 변화를 견딜 수 있는 그의 압축 크기와 모양을 유지할 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응에서 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드는 동일한 서열을 가진다. 대안적으로, 롤링 서클 증폭 반응에서 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드는 상이한 서열을 가진 2개 이상의 상이한 압축 올리고뉴클레오타이드 집단의 혼합물을 포함한다.

[0258] 일부 실시양태에서, 고착된 콘카티머 주형 분자는 압축 핵산 나노볼로 자체 붕괴될 수 있다. 나노볼을 이미지화할 수 있고 FWHM 측정치를 얻어 나노볼의 모양/크기를 제공할 수 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응에서 압축 올리고뉴클레오타이드의 포함은 콘카티머가 DNA 나노볼로 붕괴되는 것을 촉진할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드로 RCA를 수행하는 것은 다회 시퀀싱 주기 동안 DNA 나노볼의 압축 크기와 모양을 유지하는 데 도움이 되며, 이는 세포 샘플 내부에서 DNA 나노볼의 스팟 이미지의 FWHM(전폭 절반 최대치)을 개선할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼은 다회 시퀀싱 주기 동안 풀리지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 확대되지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 개별 스팟으로 남아있다. 스팟 이미지는 가우시안 스팟으로서 표시될 수 있으며 크기는 FWHM으로서 측정될 수 있다. 더 작은 FWHM으로 표시되는 더 작은 스팟 크기는 전형적으로 스팟의 개선된 이미지와 상관관계를 가진다. 일부 실시양태에서, 나노볼 스팟의 FWHM은 약 10 ㎛ 이하일 수 있다.

[0260] **단백질 결합 조성물**

[0261] 본 개시내용은 단백질 결합 조성물을 제공한다. 단백질 결합 조성물은 표적 RNA에 상응하는 표적 폴리펩티드 또는 단백질에 특이적일 수 있다. 그 다음, 표적 RNA는 시퀀싱될 수 있다. 이 방식으로, 단백질 결합 조성물은 본원에 개시된 시퀀싱 방법의 특이성을 높일 수 있다.

[0262] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 단백질 결합 조성물은 표적 폴리펩티드 또는 단백질에 선택적으로 결합하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질 결합 조성물은 단백질 결합 조성물이 선택적으로 결합하는 표적 폴리펩티드 또는 단백질을 고유하게 식별하는 적어도 하나의 태그 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 단백질 결합 조성물은 항체를 포함한다.

[0263] 일부 실시양태에서, 단백질 결합 조성물은 단백질 결합 모이어티를 포함한다. 단백질 결합 모이어티는 하나 이상의 항원 인식 도메인을 포함할 수 있다. 단백질 결합 모이어티의 하나 이상의 항원 인식 도메인은 표적 폴리펩티드 또는 단백질을 인식할 수 있다. 다가 분자는 항체 또는 이의 부분, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 이의 부분, 또는 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 부분일 수 있거나 이를 포함할 수 있다.

[0264] **CAR/TCR**

[0265] 일반적으로, 키메라 항원 수용체(CAR)는 T 세포에서 발현되어 T 세포를 재프로그래밍하여 종양 세포를 특이적으로 표적화할 수 있는 항원 인식, 신호전달 및 보조자극 도메인으로부터 구축된 조작된 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, CAR은 적어도 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 자극 분자로부터 유래한 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인을 포함하는 재조합 폴리펩티드 구축물이다. 외인성 T 세포 수용체(TCR)는 항원(예를 들어, 종양 항원)을 인식하도록 조작될 수 있다는 점에서 CAR과 유사하다. 일부 실시양태에서, TCR은 재조합 폴리펩티드이다.

[0266] 본원에 개시된 단백질 결합 조성물은 CAR 또는 TCR을 포함할 수 있다. CAR 또는 TCR의 항원 인식 도메인은 표적 RNA에 의해 인코딩된 표적 단백질을 인식하거나 이 표적 단백질에 결합하도록 구성될 수 있다. 단백질 결합 조성물은 CAR 또는 TCR에 연결된 올리고뉴클레오타이드 태그를 추가로 포함할 수 있다. CAR 또는 TCR이 표적 단백질에 결합할 때, 올리고뉴클레오타이드 태그는 고유 패드락 프로브에 하이브리드화할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 태그와 패드락 프로브의 결합은 패드락 프로브를 위상적으로 고정할 수 있다. 그 후, 올리고뉴클레오타이드 태그가 증폭될 수 있다. 예를 들어, 이 태그는 롤링 서클 증폭(RCA), 브릿지 증폭, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 이들의 임의의 조합을 통해 증폭될 수 있다.

[0267] 일부 실시양태에서, 세포외 항원 결합 도메인은 항체의 항원 결합 단편 또는 이의 기능적 유도체(예를 들어, scFv)이다. 항원 결합 도메인의 특이성은 다양한 상이한 장애를 치료하도록 변형될 수 있으며, 1가 또는 다가(예를 들어, 2가, 3가)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 도메인은 scFv를 포함하고, 다가 결합은 상이한 항원 특이성을 가진 여러 scFv의 탠덤 추가에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, 항원 결합의 특이성 및 의도된 표시는 현대 임상 시험에서 CAR-T 구축물들 중 임의의 CAR-T 구축물의 특이성 및 의도된 표시와 일치한다. 예를 들어, 특이성은 항-CD19(예를 들어, R/R 미만성 대세포 림프종의 경우 액시카브타겐 실로류셀; 또는 R/R B 세포 ALL 및 비호지킨 림프종의 경우 티사겐레클레우셀), 항-CD22(예를 들어, R/RB-ALL의 경우), 항-CD19/CD22 이중 표적화(예를 들어, R/R ALL의 경우), 항-CAIX(탄산 안하이드라제 9), 항-PSMA(일명 FOLH1, 예를 들어, 신세포 암종의 경우), 항-MUC1(예를 들어, 정낭 암종의 경우), 항-CD33(예를 들어, 급성 골수성 백혈병의 경우), 항-메소텔린 mRNA(예를 들어, 선암종 및 흉막 중피종의 경우), 항-FOLR1(예를 들어, 전이성 난소암의 경우), 항-암배아 항원(일명 CEA, 예를 들어, CEA 발현 선암종 간 전이의 경우), 항-IL13RA2(예를 들어, 교모세포종의 경우), 항-HER2(예를 들어, 육종의 경우) 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다음 항원들 중 하나 이상이 CAR-T 구축물에 의해 결합될 수 있다: 1-40-β-아밀로이드, 4-1BB, 5AC, 5T4, 707-AP, 키나제 앵커 단백질 4(AKAP-4), 액티빈 수용체 2B형(ACVR2B), 액티빈 수용체 유사 키나제 1(ALK1), 선암종 항원, 아디포필린, 아드레날린 수용체 β 3(ADRB3), AGS-22M6, α 폴레이트 수용체, α-태아단백질(AFP), AIM-2, 역형성 림프종 키나제(ALK), 안드로겐 수용체, 안지오포이에틴 2, 안지오포이에틴 3, 안지오포이에틴 결합 세포 표면 수용체 2(Tie 2), 탄저균 독소, AOC3(VAP-1), B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3(CD276), 바실러스 안쓰라시스 탄저균, B 세포 활성화 인자(BAFF), B 림프종 세포, 골수 간질 세포 항원 2(BST2), 각인 부위 조절제의 형제(BORIS), C242 항원, C5, CA-125, 암 항원 125(CA-125 또는 MUC16), 암/고환 항원 1(NY-ESO-1), 암/고환 항원 2(LAGE-1a), 탄산 안하이드라제 9(CA-IX), 암배아 항원(CEA), 심장 미오신, CCCTC 결합 인자(CTCF), CCL11(에오탁신-1), CCR4, CCR5, CD11, CD123, CD125, CD140a, CD147(베이시긴), CD15, CD152, CD154(CD40L), CD171, CD179a, CD18, CD19, CD2, CD20, CD200, CD22, CD221, CD23(IgE 수용체), CD24, CD25(IL-2 수용체의 α 쇄), CD27, CD274, CD28, CD3, CD3 ε, CD30, CD300 분자 유사 패밀리 구성원 f(CD300LF), CD319(SLAMF7), CD33, CD37, CD38, CD4, CD40, CD40 리간드, CD41, CD44 v7, CD44 v8, CD44 v6, CD5, CD51, CD52, CD56, CD6, CD70, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD80, CD97, CEA 관련 항원, CFD, ch4D5, 염색체 X 오픈 리딩 프레임 61(CXORF61), 클라우딘 18. 2(CLDN18. 2), 클라우딘 6(CLDN6), 클로스트리듐 디피실, 응집 인자 A, CLCA2, 콜로니 자극 인자 1 수용체(CSF1R), CSF2, CTLA-4, C형 렉틴 도메인 패밀리 12 구성원 A(CLEC12A), C형 렉틴 유사 분자-1(CLL-1 또는 CLECL1), C-X-C 케모카인 수용체 4형, 사이클린 B1, 사이토크롬 P4501B1(CYP1B1), cyp-B, 사이토메갈로바이러스, 사이토메갈로바이러스 당단백질 B, 다비가트란, DLL4, DPP4, DR5, 이. 콜라이 시가 독소 1형, 이. 콜라이 시가 독소 2형, 엑토-ADP- 리보실 트랜스퍼라제 4(ART4), EGF 유사 모듈 함유 뮤신 유사 호르몬 수용체 유사 2(EMR2), EGF 유사 도메인 다중 7(EGFL7), 연장 인자 2 돌연변이(ELF2M), 내독소, 에프린 A2, 에프린 B2, 에프린 A형 수용체 2, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 표피 성장 인자 수용체 변이체 III(EGFRvIII), 에피시알린, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 상피 당단백질 2(EGP-2), 상피 당단백질 40(EGP-40), ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERG(막관통 프로테아제, 세린 2(TMPRSS2) ETS 융합 유전자), 에스케리키아 콜라이, 염색체 12p에 위치한 ETS 전위 변이체 유전자 6(ETV6-AML), 호흡기 세포융합 바이러스의 F 단백질, FAP, IgA 수용체(FCAR 또는 CD89)의 Fc 단편, Fc 수용체 유사 5(FCRL5), 태아 아세틸콜린 수용체, 피브린 II β 쇄, 섬유모세포 활성화 단백질 α(FAP), 피브로넥틴 엑스트라 도메인-B, FGF-5, Fms 유사 티로신 키나제 3(FLT3), 폴레이트 결합 단백질(FBP), 폴레이트 하이드롤라제, 폴레이트 수용체 1, 폴레이트 수용체 α, 폴레이트 수용체 β, Fos 관련 항원 1, 프리즐드(Frizzled) 수용체, 푸코실 GM1, G250, G 단백질-커플링된 수용체 20(GPR20), G 단백질-커플링된 수용체 클래스 C 군 5, 구성원 D(GPRC5D), 강글리오사이드 G2(GD2), GD3 강글리오사이드, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), GMCSF 수용체 α-쇄, GPNMB, GnT-V, 성장 분화 인자 8, GUCY2C, 열충격 단백질 70-2 돌연변이(mut hsp70-2), 헤마글루티닌, A형 간염 바이러스 세포 수용체 1(HAVCR1), B형 간염 표면 항원, B형 간염 바이러스, HER1, HER2/neu, HER3, 글로보H 글리코세라마이드의 육당류 부분(글로보H), HGF, HHGFR, 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), 히스톤 복합체, HIV-1, HLA-DR, HNGF, Hsp90, HST-2(FGF6), 인간 유두종 바이러스 E6(HPV E6), 인간 유두종 바이러스 E7(HPV E7), 인간 산란 인자 수용체 키나제, 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT), 인간 TNF, ICAM-1(CD54), iCE, IFN-α, IFN-β, IFN-ɣ, IgE, IgE Fc 영역, IGF-1, IGF-1 수용체, IGHE, IL-12, IL-13, IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-1β, IL-20, IL-22, IL-23, IL-31, IL-31RA, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6 수용체, IL-9, 면역글로불린 람다 유사 폴리펩티드 1(IGLL1), 인플루엔자 A 헤마글루티닌, 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-I 수용체), 인슐린 유사 성장 인자 2(ILGF2), 인테그린 α4β7, 인테그린 β2, 인테그린 α2, 인테그린 α4, 인테그린 α5β1, 인테그린 α7β7, 인테그린 αIIbβ3, 인테그린 αvβ3, 인터페론 α/β 수용체, 인터페론 ɣ 유도 단백질, 인터류킨 11 수용체 α(IL-11Rα), 인터류킨-13 수용

체 서브유닛 α-2(IL-13Ra2 또는 CD213A2), 장 카복실 에스테라제, 키나제 도메인 영역(KDR), KIR2D, KIT(CD117), L1 세포 부착 분자(L1-CAM), 레구마인, 백혈구 면역글로불린 유사 수용체 서브 패밀리 A 구성원 2(LILRA2), 백혈구 관련 면역글로불린 유사 수용체 1(LAIR1), 루이스-Y 항원, LFA-1(CD11a), LINGO-1, 리포테이코산, LOXL2, L-셀렉틴(CD62L), 림프구 항원 6 복합체, 유전자좌 K 9(LY6K), 림프구 항원 75(LY75), 림프구 특이적 단백질 티로신 키나제(LCK), 림포톡신-α(LT-α) 또는 종양 괴사 인자-β(TNF-β), 대식세포 이동 억제 인자(MIF 또는 MMIF), M-CSF, 유선 분화 항원(NY-BR-1), MCP-1, 흑색종 암 고환 항원-1(MAD-CT-1), 흑색종 암 고환 항원-2(MAD-CT-2), 흑색종 아폽토시스 억제제(ML-IAP), 흑색종 관련 항원 1(MAGE-A1), 메소텔린, 뮤신 1, 세포 표면 관련(MUC1), MUC-2, 뮤신 CanAg, 미엘린 관련 당단백질, 미오스타틴, N-아세틸 글루코사미닐-트랜스퍼라제 V(NA17), NCA-90(과립구 항원), 신경 성장 인자(NGF), 신경 아폽토시스 조절 프로테이나제 1, 신경 세포 부착 분자(NCAM), 신경돌기 과다성장 억제제(예를 들어, NOGO-A, NOGO-B, NOGO-C), 뉴로필린-1(NRP1), N-글리콜릴뉴라민산, NKG2D, 노치(Notch) 수용체, o-아세틸-GD2 강글리오사이드(OAcGD2), 후각 수용체 51E2(OR51E2), 태아종양 항원(h5T4), 중단점 클러스터 영역(BCR)과 아벨슨 뮤린 백혈병 바이러스 종양유전자 상동체 1(Abl)로 구성된 종양유전자 융합 단백질(bcr-abl), 오릭토라구스 쿠니쿨루스(Oryctolagus cuniculus), OX-40, oxLDL, p53 돌연변이체, 페어링 박스 단백질 Pax-3(PAX3), 페어링 박스 단백질 Pax-5(PAX5), 파넥신 3(PANX3), 인산염-나트륨 공-수송제, 포스파티딜세린, 태반 특이적 1(PLAC1), 혈소판 유래 성장 인자 수용체 α(PDGF-R α), 혈소판 유래 성장 인자 수용체 β(PDGFR-β), 폴리시알산, 프로아크로신 결합 단백질 sp32(OY-TES1), 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1(PD-1), 전구단백질 전환효소 서브틸리신/켁신 9형(PCSK9), 프로스타제, 전립선 암종 종양 항원-1(PCTA-1 또는 갈렉틴 8), T 세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 1(MelanA 또는 MART1), P15, P53, PRAME, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선 산 포스파타제(PAP), 전립선 암종 세포, 프로스테인, 프로테아제 세린 21(테스티신 또는 PRSS21), 프로테아좀(프로좀, 마크로파인) 서브유닛, β형, 9(LMP2), 슈도모나스 에루기노사, 광견병 바이러스 당단백질, RAGE, Ras 상동체 패밀리 구성원 C(RhoC), 핵인자 카파-B 리간드의 수용체 활성화제(RANKL), 고급 당화 최종 생성물에 대한 수용체(RAGE-1), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 신장 편재 1(RU1), 신장 편재 2(RU2), 호흡기 세포융합 바이러스, Rh 혈액군 D 항원, 레서스 인자, 육종 전위 중단점, 스클레로스틴(SOST), 셀렉틴 P, 시알릴 루이스 부착 분자(sLe), 정자 단백질 17(SPA17), 스핑고신-1-인산염, T 세포 1, 2, 3에 의해 인식되는 편평 세포 암종 항원(SART1, SART2 및 SART3), 단계 특이적 배아 항원 -4(SSEA-4), 스타필로코커스 아우레우스, STEAP1, 서바이빙(surviving), 신데칸 1 (SDC1)+ A314, SOX10, 서비빈, 서바이빙-2B, 활액 육종, X 중단점 2(SSX2), T 세포 수용체, TCR Γ 대안적 리딩 프레임 단백질(TARP), 텔로머라제, TEM1, 테나신 C, TGF-β(예를 들어, TGF-β 1, TGF-β 2, TGF-β 3), 갑상선 자극 호르몬 수용체(TSHR), 조직 인자 경로 억제제(TFPI), Tn 항원((Tn Ag) 또는 (GalNAcα-Ser/Thr)), TNF 수용체 패밀리 구성원 B 세포 성숙(BCMA), TNF-α, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRG, 트랜스글루타미나제 5(TGS5), 종양 항원 CTAA16. 88, 종양 내피 마커 1(TEM1/CD248), 종양 내피 마커 7 관련(TEM7R), 종양 단백질 p53(p53), MUC1의 종양 특이적 당화, 종양 관련 칼슘 신호 전달도입제 2, 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 종양 관련 당단백질 72(TAG-72)+A327, TWEAK 수용체, 티로시나제, 티로시나제 관련 단백질 1(TYRP1 또는 당단백질 75), 티로시나제 관련 단백질 2(TYRP2), 유로플라킨 2(UPK2), 혈관 내피 성장 인자(예를 들어, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PIGF), 혈관 내피 성장 인자 수용체 1(VEGFR1), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 비멘틴, v-myc 조류 골수종증 바이러스 종양유전자 신경모세포종 유래 상동체(MYCN), 폰 빌레브란트 인자(VWF), 윌름스 종양 단백질(WT1), X 항원 패밀리, 구성원 1A(XAGE1), β-아밀로이드 및 κ-경쇄.

[0268] 일부 실시양태에서, CAR의 막관통 도메인은 CAR을 올바른 막 위치에 위치시키고 그의 구조를 안정화하는 도메인이다. 일부 실시양태에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 자극 분자로부터 유래한 기능적 신호전달 도메인을 포함하는 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 분자는 자극 수용체 분자이다. 일부 실시양태에서, 자극 수용체 분자는 적응 면역 세포의 자극 수용체 분자이다. 일부 실시양태에서, 자극 분자는 T 세포 수용체 복합체와 회합된 제타 쇄이다. 일부 실시양태에서, 자극 분자는 예를 들어, FCER1G, Fc 감마 RIIa, FcR 베타(Fc 엡실론 Rib), CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD79a, CD79b, DAP10 또는 DAP1이다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 적어도 하나의 보조자극 분자로부터 유래한 하나 이상의 기능적 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 보조자극 분자는 4-1BB(즉, CD137), CD27, CD28 CD30, CD40, PD-1, CD2, CD7, CD258, NKG2C, B7-H3, CD83에 결합하는 리간드, ICAM-1, LFA-1(CD1 Ia/CD18), ICOS 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 CAR 융합 단백질의 아미노-말단(N-말단)에서 리더 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포외 항원 인식 도메인의 N-말단에서 신호 펩티드 서열을 포함하며, 여기서 신호 펩티드 서열은 세포 프로세싱 및 세포막으로의 CAR의 국소화 동안 항원 인식 도메인(예를 들어, scFv)으로부터 임의로 절단된다.

[0269] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 CAR은 1세대, 2세대, 3세대 또는 4세대 CAR 시스템, 이의 기능적 변이체 또는 이들의 조합이다. 일부 실시양태에서, 1세대 CAR은 특정 항원에 대한 특이성을 가진 항원 결합 도메인(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 예컨대, scFv, Fab 단편, VHH 도메인, 또는 중쇄 단독 항체의 VH 도메인), 적응 면역 수용체로부터 유래한 막관통 도메인(예를 들어, CD28 수용체의 막관통 도메인), 및 적응 면역 수용체로부터 유래한 신호전달 도메인(예를 들어, CD3 ζ 수용체 또는 FcεRIγ의 세포내 영역으로부터 유래한 3개의 ITAM 도메인)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2세대 CAR 구축물은 1세대 CAR의 요소, 및 이 CAR의 세포내 신호전달 도메인 부분에 추가된 보조자극 도메인(예를 들어, CD28, CD137/4-1BB 및 CD134/OX40과 같은 T 세포 수용체와 함께 작용하는 보조자극 수용체로부터 유래함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 보조자극 도메인은 1세대 CAR과 함께 IL-2를 투여할 필요성을 없앤다. 일부 실시양태에서, 3세대 CAR은 여러 보조자극 도메인이 CAR의 세포내 신호전달 도메인 부분(예를 들어, CD3ζ-CD28-OX40 또는 CD3ζ-CD28-41BB)에 추가된 1세대 CAR의 요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 4세대 CAR은 활성화 사이토카인(예를 들어, IL-12, IL-23 또는 IL-27)이 CAR의 세포내 신호전달 부분(전형적으로 하나 이상의 보조자극 도메인과 CD3ζ ITAM 도메인 사이)에 추가되어 있거나 CAR 유도 프로모터(예를 들어, NFAT/IL-2 최소 프로모터)의 조절 하에 있는 2세대 또는 3세대 CAR의 요소를 포함한다.

[0270] **항체**

[0271] 본원에 개시된 단백질 결합 조성물은 항체 또는 이의 단편을 포함할 수 있다. "이의 단편"은 (1) 항체의 부분을 포함하고 (2) 상응하는 항원(예를 들어, 표적 단백질)에 결합하는, 전체 길이 온전한 항체 이외의 모이어티를 지칭한다. 이것은 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, 디아바디, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 단일 도메인 낙타과 항체 및 단일 쇄 항체(scFv) 분자를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 항체의 Fab 영역은 표적 RNA에 의해 인코딩된 표적 단백질을 인식하거나 이 표적 단백질에 결합하도록 구성될 수 있다. 단백질 결합 조성물은 항체 또는 이의 단편에 연결된 올리고뉴클레오타이드 태그를 추가로 포함할 수 있다. 항체 또는 이의 단편이 표적 단백질에 결합할 때, 올리고뉴클레오타이드 태그는 고유 패드락 프로브에 하이브리드화할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 태그와 패드락 프로브의 결합은 패드락 프로브를 위상적으로 고정할 수 있다. 그 후, 올리고뉴클레오타이드 태그가 증폭될 수 있다. 예를 들어, 이 태그는 롤링 서클 증폭(RCA), 브릿지 증폭, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 이들의 임의의 조합을 통해 증폭될 수 있다.

[0272] 일부 실시양태에서, 항체와 올리고뉴클레오타이드 태그는 링커 모이어티를 통해 연결될 수 있다. 항체는 복수의 링커 모이어티를 통해 연결된 복수의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 항체는 표적 RNA에 상응하는 표적 단백질 또는 폴리펩티드에 특이적일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 태그는 본원에 개시된 패드락 프로브의 서열에 상응할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 태그와 본원에 개시된 패드락 프로브의 성공적인 결합은 패드락 프로브의 위상적 구성을 고정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 표적 폴리펩티드 사이의 결합과 관련된 시퀀싱 판독정보를 제공하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그의 서열은 세포 샘플에서 RNA(예를 들어, 표적 RNA)에 최소한으로 하이브리드화하는 특성을 나타내도록 설계된다.

[0273] 본 개시내용은 적어도 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 하나 이상의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트를 제공한다. 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트는 본원에 설명된 검출 및/또는 시퀀싱 방법들 중 임의의 방법을 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0274] 일부 실시양태에서, 상기 세트는 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 포함하는 적어도 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 제1 항체는 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 고유하게 식별하는 올리고뉴클레오타이드 태그 서열을 가진 제1 올리고뉴클레오타이드에 연결된다.

[0275] 일부 실시양태에서, 상기 세트는 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 포함하는 적어도 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 제2 항체는 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 고유하게 식별하는 올리고뉴클레오타이드 태그 서열을 가진 제2 올리고뉴클레오타이드에 연결된다.

[0276] 일부 실시양태에서, 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 동일하다(예를 들어, 도 28). 일부 실시양태에서, 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 상이하다(예를 들어, 도 29).

[0277] 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 서열 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 패드락 프로브의 왼쪽 결합 아암 및 오른쪽 결합 아암에 선택적으로 결합하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리

고뉴클레오타이드 태그 서열과 제2 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 서로 상이하다.

[0278] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트는 2개 내지 20개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함하며, 여기서 각각의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 그의 각각의 표적 폴리펩티드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 상기 세트는 20개 내지 100개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 또는 100개 내지 500개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 또는 500개 내지 1000개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 또는 더 많은 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다.

[0279] 본 개시내용은 올리고뉴클레오타이드에 연결된 항체를 각각 포함하는 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 온전한 면역글로불린, 항체 단편, 항체의 항원 결합 부분 또는 단일 쇄 항체를 포함한다. 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체일 수 있다. 항체는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 표적 분석물은 폴리펩티드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 당류 및 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분석물은 온전한 폴리펩티드 또는 펩티드 단편을 포함한다. 항체는 표적 분석물에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역(예를 들어, 파라토프)을 포함한다.

[0280] 면역글로불린은 전형적으로 두 쌍의 동일한 폴리펩티드 쇄를 포함하는 사량체 분자이고, 여기서 각각의 쌍은 경쇄와 중쇄를 포함한다. 중쇄와 경쇄의 아미노 부분은 서로 연결되어여 항원 결합 영역(예를 들어, 파라토프)을 형성하는 가변 영역을 각각 포함한다. 따라서, 전형적인 면역글로불린은 2개의 항원에 결합할 수 있거나 2개의 표적 분석물에 결합할 수 있다. 중쇄의 카복실 부분은 서로 연결되어 이펙터 기능을 위한 Fc 영역을 형성하는 불변 영역을 포함한다. 중쇄의 Fc 부분은 IgG, IgM, IgD, IgA 또는 IgE 동형을 포함하는 항체의 클래스를 정의할 수 있다. 중쇄 및/또는 경쇄는 재조합 기법을 이용함으로써, 또는 관심 있는 항원으로 동물을 예방접종함으로써 제조될 수 있다.

[0281] 항체 단편은 일반적으로 항원에 결합할 수 있는 온전한 면역글로불린의 부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ 및 Fd를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0282] 일부 실시양태에서, Fv 단편은 가변 경쇄 영역(VL) 및 가변 중쇄 영역(VH)을 포함한다.

[0283] 일부 실시양태에서, Fab 단편은 가변 경쇄 영역(VL), 불변 경쇄 영역(CL), 가변 중쇄 영역(VH) 및 제1 불변 영역(CH1)을 가진 1가 항체 단편을 포함한다.

[0284] 일부 실시양태에서, Fab' 단편은 가변 경쇄 영역(VL), 불변 경쇄 영역(CL), 가변 중쇄 영역(VH), 제1 불변 영역(CH1), 힌지 영역, 및 제2 불변 영역(CH2)의 적어도 일부를 가진 1가 항체 단편을 포함한다.

[0285] 일부 실시양태에서, F(ab')2 단편은 힌지 영역에서 디설파이드가교를 통해 연결된 2개의 Fab 단편을 가진 2가 항체 단편을 포함한다.

[0286] 단일 쇄 항체(scFv)는 전형적으로 폴리펩티드 링커에 의해 연결된 가변 경쇄 영역(VL)과 가변 중쇄 영역(VH)을 가진 단일 폴리펩티드 쇄(예를 들어, 1가 항체 분자)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Bird et al., 1988, Science 242:423-26] 및 문헌[Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83] 참조). 단일 쇄 항체의 아미노-말단은 가변 경쇄 영역(VL) 또는 가변 중쇄 영역(VH)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 쇄 항체는 항체 힌지 영역, 및 CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하는 Fc 영역의 적어도 일부를 추가로 포함하는 scFv-Fc 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 쇄 항체는 항체 힌지 영역, 및 CH3 영역의 적어도 일부를 추가로 포함하는 scFv-CH 항체를 포함한다.

[0287] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 링커 모이어티에 의해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 모이어티는 스트렙타비딘(또는 아비딘 유사 모이어티), 바이오틴, 아민 기 또는 디설파이드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 모이어티는 절단될 수 없거나 제거될 수 없다. 일부 실시양태에서, 링커 모이어티는 절단될 수 있거나 제거될 수 있다. 예를 들어, 링커 모이어티는 빛(예를 들어, 자외선)에 의해 절단될 수 있거나, 화학적으로 절단될 수 있거나(예를 들어, 디티오트레이톨), 열에 의해 절단될 수 있거나, 효소에 의해 절단될 수 있다.

[0288] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 글루타르알데하이드를 사용하여 항체와 올리고뉴클레오타이드의 아미노 기를 가교결합시킴으로써 제조될 수 있다. 라이신 측쇄 엡실론-아미드는 통상적으로 올리고뉴클레오타이드에 접합되도록 표적화된다. 일부 실시양태에서, 말레이미드 변형된 항체는 설프하이드릴 변형된 올리고뉴클레오타이드와 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종이작용성 가교결합제는 항체와 올리고뉴클레오타이드를 함께 연결하는 가교로서 도입된다.

[0289] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 올리고뉴클레오타이드에 연결된 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 또는 키메라 DNA 및 RNA를 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 표준 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대, 잠금 핵산(LNA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 길이는 10개 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 50개 내지 100개 뉴클레오타이드 길이, 또는 100개 내지 200개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0290] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 태그 서열을 갖도록 설계되며, 여기서 상기 태그 서열은 패드락 프로브의 왼쪽 결합 아암과 오른쪽 결합 아암에 선택적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 또한 그에 접합된 항체를 고유하게 식별하고, 여기서 상기 항체는 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 표적 폴리펩티드 사이의 결합과 관련된 시퀀싱 판독정보를 제공하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그의 서열은 세포 샘플에서 RNA(예를 들어, 표적 RNA)에 최소한으로 하이브리드화하는 특성을 나타내도록 설계된다.

[0291] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트는 적어도 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 세트는 적어도 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 세트는 2개 내지 20개의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하고, 여기서 상기 세트의 올리고뉴클레오타이드 태그 각각은 그의 각각의 접합된 항체를 고유하게 식별하고, 여기서 이 항체는 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합한다. 올리고뉴클레오타이드 태그 세트는 20개 내지 100개의 올리고뉴클레오타이드 태그, 또는 100개 내지 500개의 올리고뉴클레오타이드 태그, 또는 500개 내지 1000개의 올리고뉴클레오타이드 태그, 또는 더 많은 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다.

[0292] 도 28의 비제한적 실시양태에 묘사된 바와 같이, 제1 항체-뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-뉴클레오타이드 접합체는 단백질(도 28에서, "RNA-1에 의해 인코딩된 단백질-1")에 대해 사용될 수 있다. 제1 항체-뉴클레오타이드 접합체, 제2 항체-뉴클레오타이드 접합체, 또는 두 항체-뉴클레오타이드 접합체는 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 제1 링커 모이어티를 통해 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체에 연결될 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 패드락 프로브에 접합될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 예를 들어, 패드락 프로브에 라이게이션될 수 있거나, 화학적으로 접합될 수 있거나, 근접 가교결합을 가질 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 링커 모이어티를 통해 제2 항체에 연결될 수 있다. 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 패드락 프로브에 접합될 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 예를 들어, 패드락 프로브에 라이게이션될 수 있거나, 화학적으로 접합될 수 있거나, 근접 가교결합을 가질 수 있다. 탈하이브리드화 단계를 완료하여, 올리고뉴클레오타이드 태그에 라이게이션되어 있지 않거나 가교결합되어 있지 않은 패드락 프로브 영역으로부터 순환 프로브를 제거할 수 있다. 결과적으로, 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 태그와 패드락 프로브의 성공적인 라이게이션 또는 화학적 가교결합은 패드락 프로브를 제자리에 위상적으로 고정할 수 있다. 도 28의 예에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그 둘 다와 패드락 프로브의 하이브리드화는 패드락 프로브를 위상적으로 고정하는 데 필요하다. 다음으로, 롤링 서클 증폭(RCA) 단계를 완료할 수 있다. RCA 단계는 RCA 프라이머를 패드락 프로브의 서열에 하이브리드화한 다음, 하나 이상의 RCA 주기를 완료하는 것을 포함할 수 있다. RCA 단계는 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 태그의 포스페이트 기를 절단하여 3' 말단을 생성한 다음(도 28에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 기를 절단하는 것은 별표로 표시됨), 하나 이상의 RCA 주기를 완료하는 것을 포함할 수 있다.

[0293] 도 29의 비제한적 실시양태에 묘사된 바와 같이, 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 표적 단백질(도 29에서, "RNA-1에 의해 인코딩된 단백질-1")에 대해 사용될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 항체 및 제1 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 제1 링커 모이어티를 통해 제1 항체에 연결될 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 항체 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 링커 모이어티를 통해 제2 항체에 연결될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 동일한 표적 단백질에 특이적일 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그(도 29에서 쇄선으로 표시됨)는 패드락 프로브에 접합될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 예를 들어, 패드락 프로브에 라이게이션될 수 있

거나, 화학적으로 접합될 수 있거나, 근접 가교결합을 가질 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제2 올리고뉴클레오타이드 태그(도 29에서 점선으로 표시됨)는 패드락 프로브에 접합될 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 예를 들어, 패드락 프로브에 라이게이션될 수 있거나, 화학적으로 접합될 수 있거나, 근접 가교결합을 가질 수 있다. 탈하이브리드화 단계를 완료하여 제1 올리고뉴클레오타이드 태그(쇄선) 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 태그(점선)를 제거할 수 있다. 결과적으로, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 태그와 패드락 프로브의 성공적인 라이게이션 또는 화학적 가교결합은 패드락 프로브를 제자리에 위상적으로 고정할 수 있다. 도 29의 예에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그와 제2 올리고뉴클레오타이드 태그의 하이브리드화는 패드락 프로브에 성공적으로 라이게이션하는 데 필요하다. 이 단계는 거짓 양성을 방지하기 위한 것이고, 여기서 거짓 양성은 패드락 프로브의 위상적 고정을 결여할 것이다. 다음으로, 롤링 서클 증폭(RCA) 단계를 완료할 수 있다. RCA 단계는 RCA 프라이머를 패드락 프로브의 서열에 하이브리드화한 다음, 하나 이상의 RCA 주기를 완료하는 것을 포함할 수 있다. RCA 단계는 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 또는 제2 올리고뉴클레오타이드 태그의 포스페이트 기를 절단하여 3' 말단을 생성한 다음(도 29에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 기를 절단하는 것은 별표로 표시됨), 하나 이상의 RCA 주기를 완료하는 것을 포함할 수 있다. RCA 단계는 제1(쇄선) 올리고뉴클레오타이드 태그의 라이게이션을 포함할 수 있고, 제2(점선) 올리고뉴클레오타이드 태그의 라이게이션을 포함하지 않는데, 이는 제2 올리고뉴클레오타이드 태그가 5' 포스페이트 기를 갖지 않기 때문이다. 따라서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그의 3' 말단은 RCA 프라이머로서 사용되기 때문에 패드락 프로브에 하이브리드화된다. 그 다음, 하나 이상의 RCA 주기를 수행할 수 있다.

[0294] 일부 실시양태에서, 표적 분석물은 폴리펩티드 또는 펩티드 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서 표적 폴리펩티드는 세포 샘플에서 표적 RNA에 의해 인코딩된다. 표적 폴리펩티드는 메틸화, 인산화, 글리코실화, 하이드록실화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 아세틸화, 지질화, ADP-리보실화, 카보닐화, SUMO일화 및/또는 디설파이드 결합 형성을 포함하는 번역 후 변형된 형태를 가진 폴리펩티드를 포함한다. 표적 폴리펩티드는 예를 들어, 프로테아제에 의해 단백질분해될 수 있거나 리보좀 건너뛰기로 인해 절단될 수 있다. 표적 폴리펩티드는 아직 번역 후 변형을 거치지 않은 전구체 분자도 포함한다. 표적 폴리펩티드는 뮤테인, 변이체, 키메라 단백질 및 융합 단백질을 포함한다. 표적 폴리펩티드는 친화성 모이어티, 예를 들어, 바이오틴(또는 이의 유도체), 디곡시게닌, 플루오레세인, 콜레스테롤, 말토스, 또는 아래에 설명된 친화성 분자들 중 임의의 친화성 분자를 가진 결합 파트너 분자로 표지부착될 수 있다.

[0295] 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부의 다당류는 세포 샘플을, 패드락 프로브의 왼쪽 아암과 오른쪽 아암에 결합하도록 설계된 태그 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드에 접합된 렉틴과 접촉시킴으로써 검출될 수 있다. 렉틴-올리고뉴클레오타이드 접합체는 시퀀싱 판독정보를 사용하여 다당류를 검출할 수 있게 한다.

[0296] 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부의 지질은 세포 샘플을, 패드락 프로브의 왼쪽 아암과 오른쪽 아암에 결합하도록 설계된 태그 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드에 접합된 지질 특이적 결합 단백질 또는 양친매성 폴리펩티드와 접촉시킴으로써 검출될 수 있다. 태그부착된 올리고뉴클레오타이드에 접합된 지질 특이적 결합 단백질 및 양친매성 폴리펩티드는 시퀀싱 판독정보를 사용하여 지질을 검출할 수 있게 한다.

[0297] **시퀀싱 중합효소**

[0298] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 시퀀싱 중합효소는 시퀀싱 반응을 수행하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 중합효소(들)는 콘카티머 주형 분자의 뉴클레오타이드와 마주보는 상보적 뉴클레오타이드에 결합하고 이를 혼입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 중합효소(들)는 콘카티머 주형 분자의 뉴클레오타이드와 마주보는 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 재조합 돌연변이체 중합효소를 포함한다.

[0299] 뉴클레오타이드 및/또는 다가 분자를 사용한 시퀀싱에 사용하기에 적합한 중합효소의 예는 다음을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다: 클레나우 DNA 중합효소; 써머스 아쿠아티커스 DNA 중합효소 I(Taq 중합효소); KlenTaq 중합효소; 칸디다투스 알티아르케알레스 고세균; 칸디다투스 하다르케움 옐로스톤센스; 하데아르케아 고세균; 유리아케오타 고세균; 써모플라스마타 고세균; 써모코커스 리토랄리스와 같은 써모코커스 중합효소, 박테리오파지 T7 DNA 중합효소; 인간 알파, 델타 및 엡실론 DNA 중합효소; T4, RB69 및 phi29 박테리오파지 DNA 중합효소와 같은 박테리오파지 중합효소; 파이로코커스 퓨리오서스 DNA 중합효소(Pfu 중합효소); 바실러스 서브틸리스 DNA 중합효소 III; 이. 콜라이 DNA 중합효소 III 알파 및 엡실론; 9도 N 중합효소; HIV 타입 M 또는 O 역전사효소와 같은 역전사효소; 조류 골수모세포증 바이러스 역전사효소; 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효

소; 또는 텔로머라제. DNA 중합효소의 추가 비제한적 예는 당분야에 알려진 중합효소, 예컨대, 9도 N, VENT, DEEP VENT, THERMINATOR, Pfu, KOD, Pfx, Tgo 및 RB69 중합효소를 포함하는, 다양한 고세균 속, 예컨대, 에어로파이룸, 아케에글로버스, 데설푸로코커스, 파이로바큘룸, 파이로코커스, 파이로글로버스, 파이로딕튬, 스타필로써무스, 스테테리아, 설폴로버스, 써모코커스 및 불카니세타 등 또는 이들의 변종으로부터 유래한 중합효소를 포함한다.

[0300] **시퀀싱 cDNA 앰플리콘**

[0301] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 시퀀싱은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응을 수행하는 단계를 포함하며, 여기서 cDNA 앰플리콘은 콘카티머 분자이다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드를 사용한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 (a) 프라이밍된 콘카티머(예를 들어, 복수의 시퀀싱 프라이머에 어닐링된 콘카티머)를 삼원 복합체 안정화 조건 하에서 적어도 2개의 별도 혼합물과 순차적으로 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 적어도 2개의 별도 혼합물이 중합효소 및 뉴클레오타이드를 각각 포함하고, 상기 순차적 접촉으로 인해 상기 프라이밍된 콘카티머가 삼원 복합체 안정화 조건 하에서 상기 주형의 제1 염기 유형, 제2 염기 유형 및 제3 염기 유형에 대한 뉴클레오타이드 동족체와 접촉되는 것인 단계; (b) 적어도 2개의 별도 혼합물을 조사하여, 삼원 복합체가 형성되었는지를 확인하는 단계; 및 (c) 프라이밍된 콘카티머에 대한 다음 정확한 뉴클레오타이드를 식별하는 단계로서, 여기서 상기 다음 정확한 뉴클레오타이드가 단계 (b)에서 삼원 복합체가 검출되는 경우 제1, 제2 또는 제3 염기 유형의 동족체로서 식별되고, 단계 (b)에서의 삼원 복합체의 부재를 근거로 상기 다음 정확한 뉴클레오타이드가 제4 염기 유형의 뉴클레오타이드 동족체인 것으로 추정되는 것인 단계; (d) 단계 (b) 후에 다음 정확한 뉴클레오타이드를 프라이밍된 콘카티머의 프라이머에 추가함으로써, 연장된 프라이머를 생성하는 단계; 및 (e) 연장된 프라이머를 포함하는 프라이밍된 콘카티머에 대해 단계 (a) 내지 (d)를 적어도 한 번 반복하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반복은 적어도 2회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 35회, 40회, 45회 또는 적어도 50회 반복하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 결합에 의한 시퀀싱(SBB)이다. 일부 실시양태에서, 결합에 의한 시퀀싱(SBB)의 주기는 프라이밍된 콘카티머(예를 들어, 복수의 시퀀싱 프라이머에 어닐링된 콘카티머)를 삼원 복합체 안정화 조건 하에서 적어도 2개의 별도 혼합물과 순차적으로 접촉시키는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 상기 적어도 2개의 별도 혼합물은 중합효소 및 뉴클레오타이드를 각각 포함할 수 있고, 순차적 접촉으로 인해 상기 프라이밍된 콘카티머가 삼원 복합체 안정화 조건 하에서 상기 주형의 제1 염기 유형, 제2 염기 유형 및 제3 염기 유형에 대한 뉴클레오타이드 동족체와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합에 의한 시퀀싱(SBB)의 주기는 적어도 2개의 별도 혼합물을 조사하여, 삼원 복합체가 형성되었는지를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합에 의한 시퀀싱(SBB)의 주기는 프라이밍된 콘카티머에 대한 다음 정확한 뉴클레오타이드를 식별하는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 상기 다음 정확한 뉴클레오타이드는 삼원 복합체가 검출되는 경우 제1, 제2 또는 제3 염기 유형의 동족체로서 식별될 수 있고, 상기 다음 정확한 뉴클레오타이드는 삼원 복합체의 부재를 근거로 제4 염기 유형의 뉴클레오타이드 동족체인 것으로 추정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합에 의한 시퀀싱(SBB)의 주기는 다음 정확한 뉴클레오타이드를 프라이밍된 콘카티머의 프라이머에 추가함으로써, 연장된 프라이머를 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 결합에 의한 시퀀싱 방법은 미국 특허 제10,246,744호 및 제10,731,141호(두 특허의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 설명되어 있다. 일부 실시양태에서, 2회 내지 30회 이하의 결합에 의한 시퀀싱(SBB) 주기를 수행할 수 있다.

[0302] **뉴클레오타이드 및 쇄 종결 뉴클레오타이드**

[0303] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 핵산의 서열을 검출하는 방법을 제공한다. 핵산은 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있다. 생물학적 샘플은 세포 샘플일 수 있다.

[0304] 본 개시내용은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있는, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 방법을 제공하고, 여기서 cDNA 앰플리콘은 콘카티머 분자일 수 있다.

[0305] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 사용할 수 있다. 뉴클레오타이드는 염기, 당 및 적어도 하나의 포스페이트 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스) 및 하나 이상의 포스페이트 기(예를 들어, 1개 내지 10개의 포스페이트 기)를 포함한다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이

루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체가 아니다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

[0306] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 1개, 2개 또는 3개의 인 원자로 구성된 쇄를 포함하고, 여기서 상기 쇄는 전형적으로 에스테르 또는 포스포라미드 결합을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되어 있는 인 쇄를 가진 유사체이다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄의 인 원자는 O, S 또는 BH3을 비롯한 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄는 포스포라미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 O-메틸포스포라미다이트 기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트 기를 포함한다.

[0307] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 가진 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 신생 가닥 내로의 후속 뉴클레오타이드 유닛 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소 촉진 혼입을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 당이 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함하는 경우 3' 당 하이드록실 위치에 부착된다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3' 당 하이드록실 위치로부터 제거/절단되어, 중합효소 촉진 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장될 수 있는 3' OH 당 기를 가진 뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 예를 들어, 쇄 종결 모이어티를 화학 작용제, pH 변화, 빛 또는 열과 반응시킴으로써 뉴클레오타이드로부터 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 알킬, 알케닐, 알키닐 및 알릴은 피페리딘과 함께 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh3)4)을 사용하거나, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C를 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아민, 아미드, 케토, 이소시아네이트, 포스페이트, 티올, 디설파이드는 포스핀, 또는 티올 기 포함 베타-머캅토에탄올 또는 디티오트리톨(DTT)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중의 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중의 트리에틸아민, 또는 아세트산(AcOH) 중의 Zn을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 우레아 및 실릴은 불화테트라부틸암모늄, 피리딘-HF, 불화암모늄 또는 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드를 사용함으로써 절단될 수 있다.

[0308] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 가진 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3’-O-아지도 또는 3’-O-아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기는 포스핀 화합물을 사용함으로써 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트리-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트리-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트리페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트리(하이드록시프로일)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단제는 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0309] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 뉴클레오타이드는 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-디데옥시 뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에티닐, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-디플루오로메틸, 3'-트리플루오로메틸, 3'-설포닐, 3'-말로닐, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-설프하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'부틸, 3'-*tert* 부틸, 3'-플루오레닐메틸옥시카보닐, 3' *tert*-부틸옥시카보닐, 3'-O-알킬 하이드록실아미노 기, 3'-포스포로티오에이트 및 3-O-벤질, 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 쇄 종결 모이어티를 포함한다.

[0310] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광

단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 형광단은 염기로부터 절단/제거될 수 있는 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착되지 않는다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기를 검출하고 식별할 수 있게 하도록 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응할 수 있다.

[0311] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 핵산 분자 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능한 링커는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티오 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염기 상의 절단 가능한 링커는 절단 가능한 모이어티를 화학 작용제, pH 변화, 빛 또는 열과 반응시킴으로써 염기로부터 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 알킬, 알케닐, 알키닐 및 알릴은 피페리딘과 함께 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh3)4)을 사용하거나, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C를 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 아민, 아미드, 케토, 이소시아네이트, 포스페이트, 티올, 디설파이드는 포스핀, 또는 티올 기 포함 베타-머캅토에탄올 또는 디티오트리톨(DTT)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 카보네이트는 MeOH 중의 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중의 트리에틸아민, 또는 아세트산(AcOH) 중의 Zn을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 우레아 및 실릴은 불화테트라부틸암모늄, 피리딘-HF, 불화암모늄 또는 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드를 사용함으로써 절단될 수 있다.

[0312] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능한 링커는 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기를 비롯한 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기는 포스핀 화합물에 의해 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트리-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트리-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포트리페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트리(하이드록시프로필)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단제는 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0313] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, (예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에 있는) 쇄 종결 모이어티 및 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능한 링커는 동일하거나 상이한 절단 가능한 모이어티를 가진다. 일부 실시양태에서, (예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에 있는) 쇄 종결 모이어티, 및 염기에 연결된 검출 가능한 리포터 모이어티는 동일한 화학 작용제에 의해 화학적으로 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, (예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에 있는) 쇄 종결 모이어티, 및 염기에 연결된 검출 가능한 리포터 모이어티는 상이한 화학 작용제에 의해 화학적으로 절단/제거될 수 있다.

[0314] **다가 분자**

[0315] 본원에 설명된 방법은 적어도 하나의 다가 분자를 사용할 수 있다. 다가 결합 복합체는 하나 이상의 중합체-뉴클레오타이드 접합체, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 복수의 프라이밍된 표적 핵산 분자, 또는 이들의 임의의 조합 사이에 형성될 수 있다. 다가 결합 복합체는 안정적일 수 있으며, 본원에 설명된 임의의 시퀀싱 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 다가 결합 복합체는 시퀀싱 주기에서 검출 또는 염기 판정 단계가 뉴클레오타이드 혼입 단계로부터 분리될 수 있게 한다.

[0316] 본원에 개시된 다가 분자는, 코어에 부착되어 있고 스타버스트, 헬터 스켈터 또는 병 브러시 구성을 비롯한 임의의 구성을 가진 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다(예를 들어, 도 7). 다가 분자는 (1) 코어; 및 (2) (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링커 및 (iv) 뉴클레오타이드 유닛을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함하고, 여기서 상기 코어는 상기 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 상기 스페이서는 상기 링커에 부착되고, 상기 링커는 상기 뉴클레오타이드 유닛에 부착된다. 일부 실시양태에서, 다가 분자는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자는 하나 이상의 링커 모이어티를 포함할 수 있다(예를 들어, 도 26). 일부 실시양태에서, 다가 분자는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 뉴클레오타이드 아암은 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 아암은 스페이서를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서는

PEG 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 아암은 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 링커에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 뉴클레오타이드 유닛에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 염기, 당 및 적어도 하나의 포스페이트 기를 포함할 수 있고, 링커는 염기를 통해 뉴클레오타이드 유닛에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 지방족 쇄 또는 올리고 에틸렌 글리콜 쇄를 포함할 수 있고, 여기서 상기 두 링커 쇄는 2개 내지 6개의 서브유닛을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 방향족 모이어티도 포함할 수 있다. 비제한적 예시 뉴클레오타이드 아암은 도 11에 제시되어 있다. 비제한적 예시 다가 분자는 도 7 내지 10에 제시되어 있다. 비제한적 예시 스페이서는 도 12(상단)에 제시되어 있고, 비제한적 예시 링커는 도 12(하단) 및 도 13에 제시되어 있다. 링커에 부착된 비제한적 예시 뉴클레오타이드는 도 14 내지 16에 제시되어 있다. 비제한적 예시 바이오틴화된 뉴클레오타이드 아암은 도 17에 제시되어 있다.

[0317] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하며, 여기서 다수의 뉴클레오타이드 아암은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 유형의 뉴클레오타이드 유닛을 가진다.

[0318] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 아암은 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 뉴클레오타이드 유닛은 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스) 및 하나 이상의 포스페이트 기(예를 들어, 1개 내지 10개의 포스페이트 기)를 포함한다. 복수의 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 한 유형의 뉴클레오타이드 유닛을 가진 한 유형의 다가 분자를 포함할 수 있다. 복수의 다가 분자는 둘 이상의 유형의 다가 분자의 임의의 조합의 혼합물을 포함할 수 있고, 여기서 혼합물의 개별 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다.

[0319] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 1개, 2개 또는 3개의 인 원자로 구성된 쇄를 포함하고, 여기서 상기 쇄는 전형적으로 에스테르 또는 포스포라미드 결합을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유닛은 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되어 있는 인 쇄를 가진 뉴클레오타이드 유사체이다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄의 인 원자는 O, S 또는 BH3을 비롯한 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄는 포스포라미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 O-메틸포스포라미다이트 기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트 기를 포함한다.

[0320] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 여기서 개별 뉴클레오타이드 아암은 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 가진 뉴클레오타이드 유사체인 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 신생 가닥 내로의 후속 뉴클레오타이드 유닛 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소 촉진 혼입을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 당이 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함하는 경우 3' 당 하이드록실 위치에 부착된다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3' 당 하이드록실 위치로부터 제거/절단되어, 중합효소 촉진 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장될 수 있는 3' OH 당 기를 가진 뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 예를 들어, 쇄 종결 모이어티를 화학 작용제, pH 변화, 빛 또는 열과 반응시킴으로써 뉴클레오타이드 유닛으로부터 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 알킬, 알케닐, 알키닐 및 알릴은 피페리딘과 함께 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)($Pd(PPh_3)_4$)을 사용하거나, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C를 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아민, 아미드, 케토, 이소시아네이트, 포스페이트, 티올, 디설파이드는 포스핀, 또는 티올 기 포함 베타-머캅토에탄올 또는 디티오트리톨(DTT)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중의 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중의 트리에틸아민, 또는 아세트산(AcOH) 중의 Zn을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 우레아 및 실릴은 불화테트라부틸암모늄, 피리딘-HF, 불화암모늄 또는 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드를 사용함으로써 절단될

수 있다.

[0321] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3' -O-아지도 또는 3' -O-아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기는 포스핀 화합물을 사용함으로써 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트리-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트리-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트리페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트리(하이드록시프로일)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단제는 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0322] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-디데옥시 뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에티닐, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-디플루오로메틸, 3'-트리플루오로메틸, 3'-설포닐, 3'-말로닐, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-설프하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'부틸, 3'-*tert* 부틸, 3'-플루오레닐메틸옥시카보닐, 3' *tert*-부틸옥시카보닐, 3'-O-알킬 하이드록실아미노 기, 3'-포스포로티오에이트 및 3-O-벤질, 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 쇄 종결 모이어티를 포함한다.

[0323] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 여기서 상기 뉴클레오타이드 아암은 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 유닛을 포함하며, 여기서 상기 코어, 링커 및/또는 뉴클레오타이드 유닛은 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기를 검출하고 식별할 수 있게 하도록 상기 뉴클레오타이드 유닛의 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응할 수 있다.

[0324] 일부 실시양태에서, 다가 분자의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 아암은 검출 가능한 리포터 모이어티에 부착된 뉴클레오타이드 유닛을 가진다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기를 검출하고 식별할 수 있게 하도록 상기 뉴클레오타이드 유닛의 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응할 수 있다.

[0325] 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 아비딘 유사 또는 스트렙타비딘 유사 모이어티를 포함하고 코어 부착 모이어티는 바이오틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 아비딘 유사 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 스트렙타비딘 유사 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 바이오틴을 포함할 수 있는 코어 부착 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어는 아비딘 단백질뿐만 아니라, 적어도 하나의 바이오틴 모이어티에 결합할 수 있는 아비딘의 임의의 유도체, 유사체 및 다른 비천연 형태도 포함하는 스트렙타비딘 유형 또는 아비딘 유형 모이어티를 포함한다. 아비딘 모이어티의 다른 형태는 천연 아비딘과 스트렙타비딘 및 재조합 아비딘과 스트렙타비딘뿐만 아니라, 유도체화된 분자, 예를 들어, 글리코실화되지 않은 아비딘 및 절두된 스트렙타비딘도 포함한다. 예를 들어, 아비딘 모이어티는 아비딘의 탈글리코실화된 형태, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)(예를 들어, 스트렙토마이세스 아비디니(*Streptomyces avidinii*))에 의해 생성된 세균 스트렙타비딘뿐만 아니라, 유도체화된 형태, 예를 들어, N-아실 아비딘, 예를 들어, N-아세틸, N-프탈릴 및 N-석시닐 아비딘, 및 상업적으로 입수 가능한 제품 EXTRAVIDIN, CAPTAVIDIN, NEUTRAVIDIN 및 NEUTRALITE AVIDIN도 포함한다.

[0326] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 핵산 분자 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법은 결합 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 결합 복합체는 (i) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 뉴클레오타이드를 포함하거나, 결합 복합체는 (ii) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 다가 분자의 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 (i) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 (ii) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 다가 분자의 뉴클레오타이드 유닛을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 약 0.1초, 0.2초, 0.3초, 0.4초, 0.5초, 0.6초, 0.7초, 0.8초, 0.9초 또는 1초보다 더 긴 지속 시간을 가진다. 결합 복합체는 약 0.1초 내지 0.25초 초과, 또는 약 0.25초 내지 0.5초, 또는 약 0.5초 내지 0.75초, 또는 약 0.75초 내지 1초, 또는 약 1초

내지 2초, 또는 약 2초 내지 3초, 또는 약 3초 내지 4초, 또는 약 4초 내지 5초의 지속 시간을 갖고/갖거나, 상기 방법은 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 35℃ 이상, 37℃ 이상, 42℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 또는 72℃ 이상, 또는 80℃ 이상의 온도, 또는 상기 온도들 중 임의의 온도에 의해 정의된 범위 내의 온도에서 수행되거나 수행될 수 있거나, 결합 복합체의 조합은 약 0.1초 내지 0.25초, 또는 0.25초 내지 0.5초, 또는 약 0.5초 내지 0.75초, 또는 약 0.75초 내지 1초, 또는 약 1초 내지 2초, 또는 약 2초 내지 3초, 또는 약 3초 내지 4초, 또는 약 4초 내지 5초보다 더 긴 지속시간을 가질 수 있고 상기 방법은 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 35℃ 이상, 37℃ 이상, 42℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 또는 72℃ 이상, 또는 80℃ 이상, 또는 상기 온도들 중 임의의 온도에 의해 정의된 범위 내의 온도에서 수행될 수 있다. 결합 복합체(예를 들어, 삼원 복합체)는 임의의 중합효소, 주형 분자, 프라이머 및/또는 뉴클레오타이드 유닛 또는 뉴클레오타이드 사이의 상호작용의 해리를 야기하는 조건에 노출될 때까지 안정적으로 유지된다. 예를 들어, 해리 조건은 결합 복합체를 세제, EDTA 및/또는 물 중 어느 하나 또는 이들의 임의의 조합과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 결합 복합체가 검출 단계에서 20보다 더 큰 명암대비 대 노이즈 비를 보여주는 표면에 침착되거나, 부착되거나 하이브리드화되는 상기 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유닛이 주형 핵산의 다음 염기에 상보적일 때 결합 복합체를 안정화시키고, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유닛이 주형 핵산의 다음 염기에 상보적이지 않을 때 결합 복합체를 불안정화시키는 조건 하에서 접촉을 수행하는 상기 방법을 제공한다.

[0327] **결합력 복합체**

[0328] 본원에 개시된 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 다가 분자를 사용할 수 있다. 본원에 개시된 다가 결합 조성물은 입자에 부착된 뉴클레오타이드의 복수의 카피를 가진 입자-뉴클레오타이드 접합체를 포함할 수 있다. 다가 결합 조성물은 검출 가능한 신호를 국소화할 수 있게 하며, 중합효소 반응 동안 연장하는 핵산 쇄에서 염기 혼입의 부위를 식별하는 데 사용될 수 있다. 다가 결합 조성물은 시퀀싱 및 어레이 기반 응용분야를 위한 개선된 염기 구별을 제공하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자를 사용하는 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 복수의 제1 복합체화된 중합효소와 복수의 다가 분자의 결합은 적어도 하나의 결합력 복합체를 형성한다.

[0329] 상기 방법은 (a) 제1 핵산 프라이머, 제1 시퀀싱 중합효소 및 제1 다가 분자를 콘카티머 주형 분자의 제1 부분에 결합시켜 제1 결합 복합체를 형성하는 단계로서, 여기서 제1 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 유닛이 제1 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있는 것인 단계; 및 (b) 제2 핵산 프라이머, 제2 시퀀싱 중합효소 및 제1 다가 분자를 동일한 콘카티머 주형 분자의 제2 부분에 결합시켜 제2 결합 복합체를 형성하는 단계로서, 여기서 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 유닛이 제2 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있고, 동일한 다가 분자를 포함할 수 있는 제1 결합 복합체와 제2 결합 복합체가 결합력 복합체를 형성하는 것인 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 핵산 프라이머, 제1 시퀀싱 중합효소 및 제1 다가 분자를 콘카티머 주형 분자의 제1 부분에 결합시켜, 제1 결합 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0330] 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자는 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 유닛은 제1 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 핵산 프라이머, 제2 시퀀싱 중합효소 및 제1 다가 분자를 동일한 콘카티머 주형 분자의 제2 부분에 결합시켜, 제2 결합 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 유닛은 제2 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있으며, 여기서 동일한 다가 분자를 포함할 수 있는 제1 결합 복합체와 제2 결합 복합체는 결합력 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합은 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 유닛 및 제2 뉴클레오타이드 유닛의 중합효소 촉진 혼입을 억제하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 콘카티머 분자에서 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 콘카티머 분자에서 제1 결합 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 콘카티머 분자에서 제2 결합 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 결합 복합체에서 적어도 제1 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 분자의 제1 부분의 서열을 확인하는 단계, 및 제2 결합 복합체에서 적어도 제2 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 분자의 제2 부분의 서열을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 분자의 제1 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 결합 복합체에서 제2 뉴

클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 분자의 제2 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 중합효소는 본원에 기재된 임의의 야생형 또는 돌연변이체 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 중합효소는 본원에 기재된 임의의 야생형 또는 돌연변이체 중합효소를 포함할 수 있다. 콘카티머 주형 분자는 관심 있는 서열의 탠덤 반복부 서열 및 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 제1 핵산 프라이머 및 제2 핵산 프라이머는 콘카티머 주형 분자를 따라 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 예시 다가 분자는 도 7 내지 10에 제시되어 있다.

[0331] 일부 실시양태에서, 다가 분자를 사용하는 시퀀싱 방법들 중 임의의 시퀀싱 방법에서, 상기 방법은 복수의 제1 복합체화된 중합효소를 복수의 다가 분자에 결합시켜 적어도 하나의 결합력 복합체를 형성하는 단계를 포함할 수 있고, 상기 방법은 다음 단계를 포함할 수 있다: (a) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 복수의 핵산 프라이머를 콘카티머 핵산 콘카티머 분자의 상이한 부분과 접촉시켜, 동일한 콘카티머 주형 분자에서 적어도 제1 복합체화된 중합효소와 제2 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계; (b) 복수의 다가 분자 중 단일 다가 분자를 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합시키기에 적합한 조건 하에서 복수의 다가 분자를 동일한 콘카티머 주형 분자에서 적어도 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계로서, 여기서 상기 단일 다가 분자의 적어도 제1 뉴클레오타이드 유닛이 콘카티머 주형 분자의 제1 부분에 하이브리드화된 제1 프라이머를 포함할 수 있는 제1 복합체화된 중합효소에 결합됨으로써 제1 결합 복합체(예를 들어, 제1 삼원 복합체)를 형성할 수 있고, 단일 다가 분자의 적어도 제2 뉴클레오타이드 유닛이 콘카티머 주형 분자의 제2 부분에 하이브리드화된 제2 프라이머를 포함할 수 있는 제2 복합체화된 중합효소에 결합됨으로써 제2 결합 복합체(예를 들어, 제2 삼원 복합체)를 형성할 수 있고, 상기 접촉이 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체 내로의 결합된 제1 뉴클레오타이드 유닛 및 제2 뉴클레오타이드 유닛의 중합효소 촉진 혼입을 억제하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있고, 동일한 다가 분자에 결합될 수 있는 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체가 결합력 복합체를 형성하는 것인 단계; (c) 동일한 콘카티머 주형 분자에서 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계, (d) 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 확인하고, 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 확인하는 단계.

[0332] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 시퀀싱 중합효소 및 복수의 핵산 프라이머를 콘카티머 핵산 콘카티머 분자의 상이한 부분과 접촉시켜 동일한 콘카티머 주형 분자에서 적어도 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 다가 분자를 동일한 콘카티머 주형 분자에서 적어도 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 다가 분자를 적어도 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소와 접촉시키는 단계는 복수의 다가 분자 중 단일 다가 분자를 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소에 결합시키기에 적합한 조건 하에서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 다가 분자의 적어도 제1 뉴클레오타이드 유닛은 제1 복합체화된 중합효소에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 복합체화된 중합효소는 콘카티머 주형 분자의 제1 부분에 하이브리드화된 제1 프라이머를 포함함으로써, 제1 결합 복합체(예를 들어, 제1 삼원 복합체)를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 다가 분자의 적어도 제2 뉴클레오타이드 유닛은 제2 복합체화된 중합효소에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 복합체화된 중합효소는 콘카티머 주형 분자의 제2 부분에 하이브리드화된 제2 프라이머를 포함함으로써, 제2 결합 복합체(예를 들어, 제2 삼원 복합체)를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접촉은 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체 내로의 결합된 제1 뉴클레오타이드 유닛 및 제2 뉴클레오타이드 유닛의 중합효소 촉진 혼입을 억제하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 동일한 다가 분자에 결합될 수 있는 제1 결합 복합체와 제2 결합 복합체는 결합력 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 동일한 콘카티머 주형 분자에서 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 결합 복합체에서 적어도 제1 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 확인하는 단계, 및 제2 결합 복합체에서 적어도 제2 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제1 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 주형 분자의 제1 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 결합 복합체에서 제2 뉴클레오타이드 유닛을 식별함으로써 콘카티머 주형 분자의 제2 부분의 서열을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 콘카티머 분자를 (i) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 (ii) 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 콘카티머 분자를 복수의 시퀀싱 중합효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제1 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부

실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 콘카티머 분자를 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 복수의 복합체화된 시퀀싱 중합효소를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 복합체화된 시퀀싱 중합효소는 핵산 이중체에 결합된 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 이중체는 가용성 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 복합체화된 시퀀싱 중합효소를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접촉은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 복합체화된 시퀀싱 중합효소에 결합시키기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체는 형광단으로 표지부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체는 당 3' 위치에서 제거 가능한 쇄 종결 모이어티를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체는 형광단으로 표지부착될 수 있고 당 3' 위치에서 제거 가능한 쇄 종결 모이어티를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 적어도 뉴클레오타이드 유사체를 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머의 3' 말단에 혼입하여, 복수의 신생 연장된 시퀀싱 프라이머를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혼입된 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 검출하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혼입된 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체의 핵염기를 식별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0333] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 콘카티머 분자를 (i) 복수의 시퀀싱 중합효소 및 (ii) 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 콘카티머 분자를 복수의 시퀀싱 중합효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 제1 복수의 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 콘카티머 분자를 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 복수의 복합체화된 시퀀싱 중합효소를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 복합체화된 시퀀싱 중합효소는 핵산 이중체에 결합된 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 이중체는 가용성 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 제1 복합체화된 시퀀싱 중합효소를 복수의 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자와 접촉시켜 복수의 다가 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 복수의 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛을 복수의 제1 복합체화된 중합효소 중 적어도 2개의 제1 복합체화된 중합효소에 결합시켜, 복수의 다가 복합체화된 중합효소를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 복수의 다가 복합체화된 중합효소의 복수의 가용성 범용 시퀀싱 프라이머에 혼입되는 것을 억제할 수 있는 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자 중 개별 다가 분자는 뉴클레오타이드 유닛에 부착된 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 다가 복합체화된 중합효소를 검출하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 다가 복합체화된 중합효소 중 복수의 제1 복합체화된 시퀀싱 중합효소에 결합된 상보적 뉴클레오타이드 유닛의 핵염기를 식별함으로써, 핵산 주형의 서열을 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 다가 복합체화된 중합효소를 해리하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 제1 시퀀싱 중합효소 및 복수의 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자를 제거하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 핵산 이중체는 유지될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 핵산 이중체를 복수의 제2 시퀀싱 중합효소와 접촉시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 복수의 제2 시퀀싱 중합효소를 복수의 핵산 이중체에 결합시켜, 복수의 제2 복합체화된 시퀀싱 중합효소를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 제2 복합체화된 시퀀싱 중합효소는 핵산 이중체에 결합된 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 복수의 제2 복합체화된 시퀀싱 중합효소를 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드는 당 3' 위치에서 제거 가능한 쇄 종결 모이어티를 가질 수 있는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타드 중 상보적 뉴클레오타이드를 복수의 제2 복합체화된 서열 중합효소 중 적어도 2개의 제2 복합체화된 서열 중합효소에 결합시켜, 복수의 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소를 형성하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 접촉은 상보적 뉴클레오타이드가 복수의 뉴클레오타이드-복합체화된 중합효소의 복수

의 가용성 범용 시퀀싱 프라이머에 혼입되는 것을 촉진하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 본원에 기재된 임의의 야생형 또는 돌연변이체 시퀀싱 중합효소를 포함한다. 콘카티머 주형 분자는 관심 있는 서열의 탠덤 반복부 서열 및 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다. 복수의 핵산 프라이머는 콘카티머 주형 분자를 따라 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 비제한적 예시 다가 분자는 도 7 내지 10에 제시되어 있다.

[0334] **샘플 분석**

[0335] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 생물학적 샘플은 프로세싱될 수 있다. 예를 들어, 세포 샘플은 생물학적 샘플로부터 추출될 수 있다. 세포 샘플은 예를 들어, 혈액 또는 조직으로부터 추출될 수 있다. 세포 샘플은 면역자기 세포 분리, 형광 활성화 세포 분류(FACS), 밀도 구배 원심분리, 면역밀도 세포 단리, 미세유체학 또는 이들의 임의의 조합을 통해 생물학적 샘플의 다른 성분들로부터 분리될 수 있다. 세포 단리 기법의 추가 예는 전문이 본원에 참고로 포함되는 문헌[Hu, Ping, et al. "Single cell isolation and analysis." *Frontiers in cell and developmental biology* 4 (2016): 116]에서 찾을 수 있다. 세포 샘플에 대해 임의의 어세이, 예를 들어, 생존율 어세이, 세포 증식 어세이, 리포터 유전자 어세이, 세포 신호전달 어세이, 기능 어세이, 생존 세포 분석, 단백질 어세이, 반응성 산소 종 어세이, 또는 이들의 임의의 조합을 수행할 수 있다.

[0336] **유동 셀**

[0337] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 샘플은 고체 지지체(예를 들어, 유동 셀)에 침착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 벽(예를 들어, 상부 또는 제1 벽, 및 하부 또는 제2 벽) 및 그 사이의 갭을 가진 유동 셀에 침착되고, 여기서 상기 갭은 유체로 채워질 수 있으며, 상기 유동 셀은 형광 광학 이미지화 시스템에 위치된다. 세포 샘플은 전통적 이미지화 시스템을 이용할 때 유동 셀의 제1 표면과 제2 표면에 따로 초점을 맞추기 위해 이미지화 시스템을 사용할 것을 요구할 수 있는 두께를 가진다. 세포 샘플에서 콘카티머의 시퀀싱 반응의 개선된 이미지화를 위해, 유동 셀을 고성능 형광 이미지화 시스템에 위치시킬 수 있으며, 이 시스템은 2개 이상의 형광 파장에서 유동 셀의 제1 표면 및 제2 표면에 대한 최적 이미지화 성능을 제공하도록 설계된 2개 이상의 튜브 렌즈를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고성능 이미지화 시스템은 유동 셀의 제1 표면 및 제2 표면의 이미지를 획득하는 사이에 광학 시스템의 초점을 다시 맞추도록 구성된 초점맞춤 기작을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 고성능 이미지화 시스템은 제1 유동 셀 표면 또는 제2 유동 셀 표면 중 적어도 하나에서 2개 이상의 시야를 이미지화하도록 구성된다.

[0338] **지지체 및 코팅**

[0339] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 고체 지지체는 세포 부착을 촉진하는 코팅을 가진 유동 셀을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 평면 또는 비평면 지지체일 수 있는 지지체를 포함한다. 지지체는 고체 또는 반고체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 다공성, 반다공성 또는 비다공성일 수 있다. 지지체는 유리, 플라스틱 또는 중합체 재료와 같은 임의의 재료로 만들어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체의 표면은 지지체 상에서 부동태화된 층을 생성하기 위해 하나 이상의 화합물로 코팅될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부동태화된 층은 다공성 또는 반다공성 층을 형성한다. 일부 실시양태에서, 지지체는 라이신 화합물, 폴리-라이신 화합물, 아르기닌 화합물 또는 아미노-종결 화합물로 코팅된다. 지지체는 비분지형 화합물, 분지형 화합물, 또는 비분지형 화합물과 분지형 화합물의 혼합물로 코팅될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 세포 샘플로부터 핵산을 포획하기 위해 표면 프라이머로 코팅된다. 대안적으로, 지지체는 표면 프라이머를 결여한다.

[0340] **자동화된 모드**

[0341] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 세포 시딩, 세포 고정, 세포 투과 가능화, 역전사 반응, 패드락 프로브 하이브리드화, 패드락 프로브 라이게이션 반응, 롤링 서클 증폭 및 시퀀싱을 포함하는, 제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 수행하기 위한 단계들의 임의의 조합을, 유체 분배 시스템을 사용하여 자동화된 모드로 수행할 수 있다.

[0342] 본 개시내용은 유동 셀에서 세포 샘플을 성장/배양하고 유동 셀에서 배양된 세포 샘플의 핵산 워크플로우를 수행하는 장치 및 방법을 제공한다.

[0343] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 유동 셀에 침착된다. 유동 셀은 유동 셀에의 세포 부착을 촉진하는 시약으로 코팅될 수 있다. 세포 샘플이 부착되어 있는 유동 셀은 자동화된 유체 분배 시스템에 유체적으로 연결되고 형광 현미경 상에서 구성되어 있는 유동 셀 홀더/크래들을 가진 시퀀싱 장치에 배치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 장치는 적어도 하나의 유체 전달 장치, 적어도 하나의 유체 장치(예를 들어, 마이크로유체 장치), 적어

도 하나의 이미지화 장치 및/또는 적어도 하나의 센서로 구성되어, 시퀀싱 반응으로부터 신호를 검출할 수 있다.

[0344] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 단순 또는 복합 세포 배양 배지를 유동 셀 상의 세포 샘플에게 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 유동 셀 상에서 2세대 내지 10세대 또는 그 이상 동안 배양/확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 밀집도 또는 비-밀집도까지 확장될 수 있다.

[0345] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 고정 시약을 유동 셀 상의 확장된 세포 샘플에게 전달하는 데 사용될 수 있으며, 세포 샘플은 세포 고정에 적합한 조건 하에서 인큐베이션될 수 있다.

[0346] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 투과 가능화 시약을 유동 셀 상의 고정된 세포 샘플에게 전달하는 데 사용될 수 있으며, 세포 샘플은 세포 투과 가능화에 적합한 조건 하에서 인큐베이션될 수 있다.

[0347] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 cDNA를 생성하기에 적합한 조건 하에서, 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플 내부에서 RNA의 역전사를 수행하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0348] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하기에 적합한 조건 하에서 패드락 프로브 하이브리드화, 원형화 및 라이게이션을 수행하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0349] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 생성하기에 적합한 조건 하에서 롤링 서클 증폭을 수행하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0350] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머 분자의 시퀀싱 주기를 수행하기 위한 시퀀싱 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 주기 시간은 30분 미만에 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시야(FOV)는 1 mm^2를 초과할 수 있고, 큰 면적(>10 mm^2)을 스캐닝하기 위한 주기 시간은 5분 미만일 수 있다.

[0351] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 콘카티머 분자로부터 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 콘카티머 분자를 유지하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0352] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 또 다른 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머 분자의 시퀀싱 주기를 수행하기 위한 시퀀싱 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 주기 시간은 30분 미만에 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시야(FOV)는 1 mm^2를 초과할 수 있고, 큰 면적(>10 mm^2)을 스캐닝하기 위한 주기 시간은 5분 미만일 수 있다.

[0353] **키트**

[0354] 본 개시내용은 본원에 개시된 시스템 및 조성물을 사용하여 본원에 개시된 방법을 수행하는 키트를 제공한다. 키트는 검출 가능한 중합체-뉴클레오타이드 접합체를 포함할 수 있다. 중합체-뉴클레오타이드 접합체는 중합체 코어를 포함할 수 있다. 중합체-뉴클레오타이드 접합체는 중합체 코어에 부착된 2개 이상의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함할 수 있다. 본원에 설명된 키트는 적어도 하나, 둘, 셋 또는 네 가지 상이한 유형의 검출 가능한 중합체-뉴클레오타이드 접합체를 가질 수 있고, 예를 들어, 여기서 각각의 유형의 검출 가능한 중합체-뉴클레오타이드 접합체는 상이한 뉴클레오타이드 모이어티를 가진다. 키트는 생물학적 샘플 또는 이의 유도체를 상기 표면에 고착하기에 적합한 중합체 층이 커플링되어 있는 표면을 포함하는 기판을 가질 수 있다. 일부 키트에서, 생물학적 샘플(예를 들어, 세포 또는 조직)은 키트에 포함된다. 일부 키트에서, 생물학적 샘플은 키트에 포함되지 않는다. 키트는 예를 들어, (i) 40 이하의 유전 상수를 갖고 4 내지 9의 극성 지수를 가진 제1 극성 비양성자성 용매; 및/또는 (ii) 115 이하의 유전 상수를 가진 제2 극성 비양성자성 용매를 포함하는, 본원에 개시된 하이브리드화 완충제를 포함할 수 있다. 임의로, 포획 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 구성요소, 제자리 증폭 시약(예를 들어, 완충제, 프라이머, 검출 가능한 표지) 또는 이들의 조합은 키트에 포함된다.

[0355] 상기 표적 핵산 서열의 적어도 일부를 상기 표면에 커플링된 포획 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부에 하이브리드화하기 위한 설명서를 포함하는 설명서는 본원에 설명된 키트에 제공될 수 있다. 키트는 상기 2개 이상의 뉴클레오타이드 모이어티와 표적 핵산 서열 사이에 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 상기 검출 가능한 중합체-뉴클레오타이드 접합체를 생물학적 샘플 또는 이의 유도체(예를 들어, 표적 핵산 분자를 함유함)와 접촉시킴으로써 상기 생물학적 샘플 또는 이의 유도체 내에서 상기 표적 핵산 서열의 적어도 일부를 식별

하기 위한 설명서도 포함할 수 있다.

[0356] 키트는 상기 2개 이상의 뉴클레오타이드 모이어티와 하위세포 구성요소 사이에 다가 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 상기 검출 가능한 중합체-뉴클레오타이드 접합체를 상기 하위세포 구성요소와 접촉시킴으로써, 세포 또는 조직 내의 제자리에서 상기 하위세포 구성요소의 적어도 일부를 식별하기 위한 설명서도 포함할 수 있다.

[0357] 임의로, 키트는 희석제, 완충제, 약학적으로 허용되는 담체, 주사기, 카테터, 도포기, 피펫팅 또는 측정 도구, 붕대 재료 또는 기타 유용한 용품과 같은 다른 유용한 구성요소도 함유한다. 키트에서 조립된 재료 또는 구성요소는 그들의 작동성과 유용성을 보존하는 임의의 편리하고 적합한 방식으로 보관된 상태로 실무자에게 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 구성요소들은 용해된, 탈수된 또는 동결건조된 형태로 존재할 수 있으며, 이들은 실온, 냉장 또는 냉동 온도에서 제공될 수 있다. 상기 구성요소들은 전형적으로 적합한 포장재(들)에 함유된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "포장재"는 키트의 내용물, 예컨대, 조성물 등을 수용하는 데 사용되는 하나 이상의 물리적 구조물을 지칭한다. 포장재는 잘 알려진 방법에 의해 구축되어, 바람직하게는 멸균된 오염물질 무함유 환경을 제공한다. 키트에 사용된 포장재는 유전자 발현 어세이 및 치료제의 투여에 통상적으로 사용되는 포장재이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "팩키지"는 개별 키트 구성요소를 담을 수 있는 유리, 플라스틱, 종이, 호일 등과 같은 적합한 고체 매트릭스 또는 재료를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 팩키지는 적절한 양의 약학 조성물을 함유하는 데 사용되는 유리 바이알 또는 사전충전된 주사기일 수 있다. 포장재는 키트 및 이의 구성요소의 내용물 및/또는 용도를 표시하는 외부 표지를 가진다.

[0358] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 합성 폴리펩티드를 포함하는 하나 이상의 용기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 합성 폴리펩티드 및 뉴클레오타이드 유닛을 프라이밍된 핵산 서열에 도입하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프라이밍된 핵산 서열은 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 뉴클레오타이드 유닛에 상보적인 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 합성 폴리펩티드, 뉴클레오타이드 유닛 및 프라이밍된 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 접합체 또는 본원에 개시된 뉴클레오타이드 접합체와 같은 조성물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 코어와 적어도 2개의 뉴클레오타이드 아암을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 아암 중 뉴클레오타이드 아암은 코어에 커플링된 코어 부착 모이어티; 코어 부착 모이어티에 커플링된 스페이서; 스페이서에 커플링된 링커; 및 링커에 커플링된 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다.

[0359] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 바와 같은 배치 특이적 시퀀싱을 위한 하나 이상의 패드락 프로브를 포함한다. 본원에 개시된 키트는 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에 사용하기 위한 하나 이상의 항체를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트는 본원에 설명된 방법들 또는 조성물들 중 임의의 방법 또는 조성물에 사용하기 위한 하나 이상의 항체-뉴클레오타이드 접합체를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트는 하나 이상의 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트는 하나 이상의 역전사효소를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 키트는 롤링 서클 증폭(RCA)을 수행하기 위한 하나 이상의 시약을 포함할 수 있다.

[0360] 일부 실시양태에서, 본원은 핵산 분자 프로세싱을 위한 키트를 개시한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 조성물 또는 본원에 개시된 제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 식별 반응에서 조성물을 사용하기 위한 설명서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물 또는 제제의 사용에 대한 설명서는 핵산 서열의 뉴클레오타이드와, 뉴클레오타이드 접합체 또는 합성 폴리펩티드 또는 이들의 조합의 뉴클레오타이드 유닛 사이에 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 뉴클레오타이드 접합체 및/또는 합성 폴리펩티드를 핵산 서열(예를 들어, 프라이밍된 핵산 서열)에 도입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 설명서는 조성물을 사용하여 뉴클레오타이드 결합, 뉴클레오타이드 혼입 또는 뉴클레오타이드 식별 반응을 수행하기 위한 조성물의 용도를 추가로 포함한다.

[0361] 일부 실시양태에서, 키트는 조성물의 링커의 반응성 기와 반응하는 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 조성물의 뉴클레오타이드 유닛의 당 모이어티의 3' 탄소에서 반응성 기와 반응하는 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 결합 반응에 사용하기 위한 시약도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시약은 양이온을 포함한다.

[0362] 일부 실시양태에서, 키트는 (i) 양이온을 포함하는 용액; (ii) 하나 이상의 중합효소; (iii) 하나 이상의 프라이머 서열; (iv) 하나 이상의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드; 또는 (i) 내지 (iv)의 임의의 조합을 추가로 포함한다.

[0363] 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 뉴클레오타이드 접합체들 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 예를 들어, 복수의 한 유형의 뉴클레오타이드 접합체, 상이한 유형(하위집단)의 뉴클레오타이드 접합체의 혼합물, 또는 복수의 한 유형의 뉴클레오타이드 접합체와 상이한 유형의 뉴클레오타이드 접합체의 혼합물의 조합을 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 표지부착될 수 있거나(예를 들어, 형광 표지부착될 수 있거나), 표지부착되지 않을 수 있거나, 표지부착된 형태와 표지부착되지 않은 형태의 혼합물일 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 야생형 또는 돌연변이체 형태의 스트렙타비딘 또는 아비딘 코어를 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 동일한 유형의 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단) 또는 상이한 유형의 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 상이한 형광단)로 표지부착된 코어 모이어티를 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 동일한 유형의 스페이서 또는 상이한 유형의 스페이서를 가진 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 동일한 유형의 링커 또는 상이한 유형의 링커를 가진 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 동일한 유형의 반응성 기 또는 상이한 유형의 반응성 기를 가진 링커를 포함하는 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 동일한 유형의 뉴클레오타이드 유닛 또는 상이한 유형의 뉴클레오타이드 유닛을 가진 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다. 키트 내의 뉴클레오타이드 접합체는 당 3' 위치에서 동일한 유형의 반응성 기 또는 상이한 유형의 반응성 기를 가진 뉴클레오타이드 유닛을 가진 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다.

[0364] 키트는 뉴클레오타이드 접합체의 링커의 반응성 기와 반응하는 하나 이상의 화학 작용제를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드 유닛의 당 3' 기에서 반응성 기와 반응하는 하나 이상의 화학 작용제를 추가로 포함할 수 있다.

[0365] 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 유닛 결합 반응, 뉴클레오타이드 유닛 혼입 반응, 또는 뉴클레오타이드 유닛 결합 반응과 뉴클레오타이드 유닛 혼입 반응의 조합을 수행하는 데 사용하기에 적합한 적어도 하나의 시약을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시약은 나트륨, 마그네슘, 스트론튬, 바륨, 칼륨, 망간, 칼슘, 리튬, 니켈, 코발트 또는 이들의 임의의 조합 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 포함하는 양이온, 또는 뉴클레오타이드 유닛 결합 반응, 뉴클레오타이드 혼입 반응, 또는 뉴클레오타이드 유닛 결합 반응과 뉴클레오타이드 유닛 혼입 반응의 조합을 수행하기에 적합한 다른 양이온을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 스트론튬, 바륨, 칼슘 또는 이들의 조합을 포함하는 비-촉매 2가 양이온을 포함하는 시약을 포함할 수 있다. 키트는 마그네슘, 망간, 또는 마그네슘과 망간의 조합을 포함하는 촉매 2가 양이온을 포함하는 시약을 포함한다.

[0366] 키트는 본원에 기재된 임의의 뉴클레오타이드 접합체 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 함유하는 하나 이상의 용기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 적어도 하나의 양이온, 적어도 하나의 중합효소, 프라이머, 복수의 뉴클레오타이드 또는 이들의 조합을 함유하는 하나 이상의 용기를 추가로 포함할 수 있다. 양이온, 중합효소 및/또는 뉴클레오타이드는 임의의 조합으로 조합될 수 있으며 단일 용기에 함유될 수 있거나, 별도의 용기에 함유될 수 있거나, 이들의 임의의 조합으로 함유될 수 있다.

[0367] 키트는 뉴클레오타이드 접합체를 사용하여 뉴클레오타이드 결합 반응, 뉴클레오타이드 혼입 반응, 핵산 시퀀싱 반응 또는 이들의 조합을 수행하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서를 포함할 수 있다.

[0368] 일부 실시양태에서, 키트는 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열과 적어도 2개의 폴리펩티드를 제자리에서 검출하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 키트는 제1 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 폴리펩티드는 제2 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1, 제2 또는 제3 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합 효소 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 제거 가능한 차단기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함하는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 상기 적어도 두 유형 중 한 유형의 뉴클

레오타이드는 형광 표지를 포함하고, 상기 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 검출 가능한 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기 또는 유기체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리뉍티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 짧은 핵산은 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리뉍티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열은 제1 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 키트는 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리뉍티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 짧은 핵산은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리뉍티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열은 제2 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 키트는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 키트는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 결합 모이어티를 식별하는 제3 식별 서열을 포함하고, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제2 결합 모이어티를 식별하는 제4 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드와 제3 올리고뉴클레오타이드는 동일한 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 올리고뉴클레오타이드와 제4 올리고뉴클레오타이드는 동일한 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 접합체의 뉴클레오타이드 모이어티의 당 모이어티의 3' 탄소에서 반응성 기와 반응하는 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 뉴클레오타이드 결합 반응에 사용하기 위한 시약도 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시약은 양이온을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 역전사효소, 역전사용 프라이머, 시퀀싱 프라이머, 생물학적 샘플을 투과 가능하게 만들도록 구성된 시약, 생물학적 샘플을 고정하도록 구성된 시약, 차단되지 않은 뉴클레오타이드, 차단된 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 혼입 반응에 사용하기 위한 시약, 양이온을 포함하는 용액, 하나 이상의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드, 하나 이상의 역전사용 완충제, 하나 이상의 핵산 결합용 완충제, 하나 이상의 핵산 증폭용 완충제, 또는 하나 이상의 핵산 해리용 완충제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서도 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 RNA 서열과 적어도 2개의 폴리뉍티드를 제자리에서

검출하기 위한 키트의 사용에 대한 설명서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 설명서는 합성에 의한 시퀀싱 반응을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 설명서는 결합에 의한 시퀀싱 반응을 수행하는 것을 포함하며, 여기서 제자리에서의 검출은 뉴클레오타이드 혼입 단계와 동시에 이루어지지 않는다. 일부 실시양태에서, 키트는 본 개시내용에 제공된 방법들 중 임의의 방법을 이용한 키트의 사용에 대한 설명서를 추가로 포함한다.

[0369] **조성물**

[0370] 본 개시내용은 핵산 서열을 분석하거나 프로세싱하는 조성물을 제공한다. 본원에 설명된 조성물은 단일 세포, 다수의 세포, 조직 또는 종양을 비롯한 세포 샘플 내부에서 제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 이용하는 데 사용될 수 있다. 반복적 짧은 시퀀싱 주기를 수행함으로써, 세포 샘플의 RNA 함량을 발견할 수 있다. 본원에 설명된 조성물은 대량 병렬 시퀀싱 기술을 활용하는 전사체학 워크플로우를 수행하는 데 사용될 수 있다. 본원에 설명된 반복적 짧은 시퀀싱 주기는 긴 리드 시퀀싱 워크플로우에 비해 감소된 양의 시퀀싱 시약을 사용하여 비용을 절감하고 시간을 절약한다. 반복적 짧은 시퀀싱 주기를 수행하는 조성물은 관심 있는 특정 RNA, 돌연변이체 RNA 서열, 스플라이스 변이체 및 이들의 존재도를 검출하는 것을 포함하나 이들로 제한되지 않는 많은 용도를 가진다.

[0371] 본원에 설명된 조성물의 한 비제한적 예시 목적은 대량 병렬 시퀀싱을 이용하여 세포 샘플 내부에서 RNA의 공간적 국소화를 검출하고 이미지화하는 것이다. 본원에 개시된 임의의 방법이 이러한 목적에 사용될 수 있다.

[0372] 본원에 설명된 조성물은 다른 제자리 전사체학 워크플로우에 비해, 더 간단한 워크플로우, 더 적은 시약, 더 낮은 비용, 더 짧은 시간, 세포 샘플에 대한 더 온화한 조건, 및 특수 장비에 대한 요구 없음을 비롯한 여러 장점을 제공한다.

[0373] **제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 수행하는 조성물**

[0374] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 제자리 시퀀싱을 수행하는 조성물을 제공한다. 하나 이상의 핵산을 생물학적 샘플, 예를 들어, 세포에서 분석할 수 있다. 핵산은 예를 들어, 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA)을 포함할 수 있다.

[0375] 본 개시내용은 적어도 2개의 표적 핵산 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제1 표적 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 표적 폴리펩티드는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된 제2 표적 폴리펩티드를 포함한다.

[0376] 일부 실시양태에서, 조성물은 생물학적 샘플을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제1 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제2 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제3 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제3 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 제4 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 제4 표적 핵산 서열의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제4 핵산 분자를 포함한다.

[0377] 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 표적 상보적 DNA(cDNA) 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 cDNA 서열은 제1 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 생성된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제2 표적 cDNA 서열도 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 cDNA 서열은 제2 표적 RNA 서열의 역전사를 통해 생성된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제2 표적 cDNA 서열의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 제2 시퀀싱 프라이머, 및 핵산 증폭 프라이머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머는 적어도 하나 뉴클레오타이드 차이를 가진다.

[0378] 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 짧은 핵산 및 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 결합 모이어티는 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하고, 여기서 제1 짧은 핵산은 제1 태그 서열과 제2 태그 서열을 포함하고, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 결합 모이어티를 통해 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열은 제1 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 짧은 핵산은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 결합 모이어티를 통해 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열은 제2 결합 모이어티를 식별한다.

[0379] 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열에 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 형성된다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 연결되어 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 연결되어 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 연결되어 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드는 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열은 적어도 하나 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 롤링 서클 증폭을 통해 증폭되어, 복수의 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제1 콘카티머를 생성한다. 일부 실시양태에서, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드는 롤링 서클 증폭을 통해 증폭되어, 복수의 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제2 콘카티머를 생성한다. 일부 실시양태에서, 제3 원형 올리고뉴클레오타이드는 롤링 서클 증폭을 통해 증폭되어, 복수의 제3 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제3 콘카티머를 생성한다. 일부 실시양태에서, 제4 원형 올리고뉴클레오타이드는 롤링 서클 증폭을 통해 증폭되어, 복수의 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제4 콘카티머를 생성한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제1 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제3 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제3 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제2 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제4 콘카티머에 상보적이고 결합하는 제4 시퀀싱 생성물 핵산 분자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머 또는 이의 부분의 서열은 2개 내지 30개의 뉴클레오타이드로 구성된다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 RNA 서열의 전체 서열과 제2 표적 RNA 서열의 전체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 가진다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드의 전체 서열과 제2 표적 폴리펩티드의 전체 서열은 적어도 하나의 아미노산 차이를 가진다.

[0380] 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 세포 소기관, 세포, 전체 세포, 전체 세포의 군, 조직, 온전한 조직, 종양, 온전한 종양, 장기, 유기체, 원생동물, 조류, 세균, 바이러스, 식물, 진균, 곤충 또는 동물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 신선한 샘플, 처리된 샘플, 신선하게 냉동된 샘플, 박편화된 샘플, 또는 포르말린 고정 및 파라핀 포매(FFPE) 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제1 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시

양태에서, 제2 표적 핵산 서열은 DNA, cDNA, RNA, 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함하고/하거나, 제2 표적 RNA 서열은 코딩 RNA, 비-코딩 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, gRNA, snRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 성숙 마이크로RNA 또는 미성숙 마이크로RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 인간 샘플, 원숭이 샘플, 유인원 샘플, 갯과 샘플, 고양잇과 샘플, 솟과 샘플, 말과 샘플, 뮤린 샘플, 돼지과 샘플, 염소과 샘플, 늑대과 샘플, 두꺼비 샘플, 어류 샘플, 식물 샘플, 곤충 샘플, 세균 샘플, 조류 샘플, 바이러스 샘플, 원생동물 샘플 또는 진균 샘플을 포함한다.

[0381] 일부 실시양태에서, 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머는 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합하여, 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제1 표적 RNA 서열을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제2 표적 RNA 서열을 식별하는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제1 표적 RNA 서열 및 제1 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제1 식별 서열을 포함하고, 제2 시퀀싱 생성물 핵산 분자는 제2 표적 RNA 서열 및 제2 표적 RNA 서열의 부분을 식별하는 제2 식별 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소 위치에서 형광 표지 및 제거 가능한 차단기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 프라이머 서열의 3' 말단에 혼입하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 혼입된 뉴클레오타이드의 형광 표지를 이미지화하여 혼입된 뉴클레오타이드의 핵염기를 식별하는 단계도 포함한다. 일부 실시양태에서, 확인은 뉴클레오타이드를 작용제와 접촉시켜 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된 한 유형의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물을 포함한다.

[0382] 본원에 개시된 조성물은 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머; 및 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머를 2개의 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드 접합체, 및 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머의 부분에 상보적인 2개의 프라이머 서열과 접촉시켜, 2개의 중합효소 각각, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체, 및 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티 중 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 2개의 제1 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 하나 이상의 제2 중합효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 2개의 제2 중합효소 각각, 2개의 프라이머 서열 각각에 하이브리드화된 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각, 및 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하고 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각을 2개의 프라이머 서열 각각에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 2개의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 각각은 2개의 제1, 제2, 제3 또는 제4 콘카티머 각각의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 복수의 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 중 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드는 당 모이어티의 3' 탄소에서 제거 가능한 차단기를 포함한다.

[0383] 본 개시내용은 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 고체 지지체에 침착된 세포 샘플과 상호작용하도록 구성될 수 있고, 여기서 세포 샘플은 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 보유하고 세포 샘플은 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 보유한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제1 표적 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 적어도 제1 복수의 DNA 앰플리콘을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제2 표적 RNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 제2 표적 RNA에 상응할 수 있는 적어도 제2 복수의 DNA 앰플리콘을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에

서, 세포 샘플은 고체 지지체에 침착될 수 있다.

[0384] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 세포 샘플 내부에서 역전사 반응을 수행하여 복수의 cDNA 분자(예를 들어, 복수의 제1 가닥 cDNA 분자)를 생성하기에 적합한 조건 하에서 (i) 복수의 역전사 프라이머, (ii) 복수의 역전사효소 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함할 수 있다(예를 들어, 도 1). 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함하고, 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함하고, 제2 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함한다.

[0385] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 복수의 cDNA 분자를 포함할 수 있다. cDNA 분자는 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 적어도 제1 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있으며, 복수의 cDNA 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 제2 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 적어도 제1 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 cDNA 분자는 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 적어도 제2 표적 cDNA 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 cDNA 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 세포 샘플에서 역전사 반응을 수행하여 복수의 cDNA 분자(예를 들어, 복수의 제1 가닥 cDNA 분자)를 생성하기에 적합한 조건 하에서 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 (i) 복수의 역전사 프라이머, (ii) 복수의 역전사효소 및 (iii) 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시킴으로써 만들어질 수 있다(예를 들어, 도 1). 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 역전사 프라이머와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 역전사효소와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)의 생성은 세포 샘플 내부에서 복수의 RNA를 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있고, 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단은 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단은 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있고, 제2 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단은 제1 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단은 제2 표적 RNA에 하이브리드화할 수 있다.

[0386] 본원에 개시된 조성물은 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 적어도 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브 및 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 적어도 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 적어도 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플에서 복수의 cDNA 분자를 적어도 2개 내지 10,000개의 상이한 표적 특이적 패드락 프로브와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0387] 일부 실시양태에서, 복수의 제1 표적 특이적 패드락 프로브 중 개별 패드락 프로브는 제1 말단과 제2 말단(예를 들어, 제1 패드락 결합 아암과 제2 패드락 결합 아암)을 포함하고, 여기서 제1 말단은 제1 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화하고 제2 말단은 제1 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브의 제1 말단과 제2 말단은 제1 표적 cDNA 분자의 근위 위치에 하이브리드화하여, 하이브리드화된 제1 말단과 제2 말단 사이에 닉 또는 갭을 가진 원형화된 제1 표적 특이적 패드락 프로브를 형성할 수 있다(예를 들어, 도 1). 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 제1 표적 cDNA 서열에 상응하는 제1 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 제1 표적 cDNA 분자에 선택적으로 하이브리드화하는 제1 표적 특이적 패드락 프로브의 영역 중

하나에 인접하여 위치한 제1 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 예를 들어, 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)와 같은 적어도 하나의 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 롤링 서클 증폭 프라이머(또는 이의 상보적 서열)에 대한 범용 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 특이적 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

[0388] 일부 실시양태에서, 복수의 제2 표적 특이적 패드락 프로브 중 개별 패드락 프로브는 제1 말단과 제2 말단을 포함하고, 여기서 제1 말단은 제2 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화하고 제2 말단은 제2 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브의 제1 말단과 제2 말단은 제2 표적 cDNA 분자의 근위 위치에 하이브리드화하여, 하이브리드화된 제1 말단과 제2 말단 사이에 닉 또는 갭을 가진 원형화된 제2 표적 특이적 패드락 프로브를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 제2 표적 cDNA 서열에 상응하는 제2 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 제2 표적 cDNA 분자에 선택적으로 하이브리드화하는 제2 표적 특이적 패드락 프로브의 영역 중 하나에 인접하여 위치한 제2 표적 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브, 예를 들어, 적어도 하나의 범용 어댑터 서열은 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 롤링 서클 증폭 프라이머(또는 이의 상보적 서열)에 대한 범용 프라이머 결합 부위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 표적 특이적 패드락 프로브는 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함한다.

[0389] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 패드락 프로브는 콘카티머의 표적 바코드 영역이 먼저 시퀀싱되도록 서로 인접한 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위와 표적 바코드 서열을 포함한다. 표적 바코드 서열은 임의의 길이, 예를 들어, 3개 내지 15개 염기, 또는 15개 내지 25개 염기, 또는 25개 내지 40개 염기 또는 더 긴 길이일 수 있다.

[0390] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브에서 닉 또는 갭을 폐쇄하도록 구성된 하나 이상의 성분 또는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분 또는 시약은 효소 반응을 수행함으로써, 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하도록 구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 닉을 폐쇄하는 단계는 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제1 또는 제2 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계, 및 효소 라이게이션 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제1 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭을 폐쇄하는 단계는 주형으로서 제2 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 효소 반응을 수행하여 적어도 2개 내지 10,000개의 원형화된 표적 특이적 패드락 프로브의 닉 또는 갭을 폐쇄함으로써, 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0391] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행하기 위한 하나 이상의 성분 또는 시약을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브 및 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 주형 분자로서 사용함으로써, 제1 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제1 콘카티머 분자를 포함하는 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있으며, 복수의 콘카티머 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 제2 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 주형 분자로서 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 롤링 서클 증폭은 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 콘카티머 분자는 제1 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자는 제1 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 주형 분자로서 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플 내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브의 롤링 서클 증폭은 복수의 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 콘카티머 분자는 제2 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자는 제2 표적 RNA 분자에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자는 탠덤 반복부 유닛을 포함할 수 있으며, 여기서 유닛은 제1 표적 cDNA의 서열 및 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자는 탠덤 반복부 유닛을 포함할 수 있으며, 여기서 유닛은 제2 표적 cDNA의 서열 및 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위(또는 이의 상보적 서열)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 주형 분자로서 적어도 2개 내지 10,000개의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 사용하여 세포 샘플

내부에서 롤링 서클 증폭 반응을 수행함으로써, 적어도 2개 내지 10,000개의 표적 RNA 분자에 상응하는 적어도 2개 내지 10,000개의 콘카티머 분자를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭은 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 압축 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드는 한 말단에서 제1 영역을 가질 수 있고 다른 말단에서 제2 영역을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 콘카티머 분자의 부분에 하이브리드화할 수 있고, 제2 영역은 콘카티머 분자의 또 다른 부분에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 영역과 제2 영역의 하이브리드화는 콘카티머 분자를 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 크기를 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 모양을 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자의 크기와 모양을 압축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 콘카티머 분자를 압축하여 압축 나노볼을 형성할 수 있다.

[0392] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물은 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하기 위한 하나 이상의 시약 또는 성분을 추가로 포함할 수 있다. 시퀀싱은 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제1 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계, 및 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제2 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 것은 세포 샘플 내부에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제1 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계는 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성함으로써 제2 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱은 제1 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있으며, 제2 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 제1 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 시퀀싱은 제2 콘카티머 분자의 2개 내지 30개 이하의 염기를 시퀀싱하여 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 샘플 내부에서 적어도 2개 내지 10,000개의 콘카티머 분자를 시퀀싱하는 단계를 포함할 수 있고, 이 단계는 2개 내지 10,000개의 콘카티머 분자에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하는 단계를 포함할 수 있다.

[0393] 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자의 제1 표적 바코드 영역만이 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자의 제1 표적 바코드의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제1 표적 바코드가 시퀀싱되고 제1 콘카티머 분자의 제1 cDNA 영역의 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 3). 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머 분자의 제1 cDNA 영역의 적어도 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 4 또는 5).

[0394] 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자의 제2 표적 바코드 영역만이 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자의 제2 표적 바코드의 적어도 일부 또는 전체 길이가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 2). 일부 실시양태에서, 제2 표적 바코드가 시퀀싱되고 제2 콘카티머 분자의 제2 cDNA 영역의 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 3). 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머 분자의 제2 cDNA 영역의 적어도 일부가 시퀀싱된다(예를 들어, 도 4 또는 5).

[0395] 일부 실시양태에서, 반복적 시퀀싱은 결합에 의한 시퀀싱 절차, 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드 및/또는 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드, 또는 다가 분자를 사용함으로써 수행될 수 있다. 이 세 가지 시퀀싱 조성물의 설명은 아래에 기재되어 있다.

[0396] 일부 실시양태에서, 포름아미드(예를 들어, 10% 내지 20% 포름아미드)와 함께 SSC 완충제(예를 들어, 2X 식염수-구연산나트륨 완충제)를 포함하는 하이브리드화 시약을 사용하여 복수의 범용 시퀀싱 프라이머를 콘카티머 주형 분자에 하이브리드화할 수 있다. 하이브리드화 조건은 약 10분 내지 60분 동안 약 20℃ 내지 30℃의 온도를 포함한다.

[0397] 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 콘카티머로부터 제거할 수 있고, 핵산 변성을 촉진하는 온도,

예를 들어, 30℃ 내지 90℃에서 포름아미드와 함께 또는 포름아미드 없이 SSC 완충제(예를 들어, 식염수-구연산 나트륨 완충제)를 포함하는 탈하이브리드화 시약을 사용하여 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머를 유지할 수 있다.

[0398] 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 시약은 검출 가능하게 표지부착되거나 표지부착되지 않은 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티에 연결된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 검출 가능하게 표지부착된 뉴클레오타이드 유사체는 복수의 쇄 종결 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 쇄 종결 모이어티는 3' 뉴클레오타이드 당 위치에 연결되어 3' 차단된 뉴클레오타이드 유사체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티를 제거하여 3' 차단된 뉴클레오타이드 유사체를, 당에서 3' OH 기를 가진 확장 가능한 뉴클레오타이드로 전환할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표지부착된 뉴클레오타이드 유사체는 핵염기 아데닌, 사이토신, 구아닌, 타이민 또는 우라실에 상응하는 상이한 형광단에 연결되며, 여기서 상이한 형광단은 단계 (f)의 시퀀싱 동안 형광 신호를 방출한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 (1) 중합효소 촉매를 사용하여 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드를 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를, 시퀀싱 중합효소 및 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계, (2) 혼입된 쇄 종결 뉴클레오타이드에 의해 방출된 형광 신호와 색상을 검출하고 이미지화하는 단계, 및 (3) 쇄 종결 모이어티를 제거하고(예를 들어, 차단해제) 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머에 대해 2회 내지 30회 이하의 시퀀싱 주기를 수행하여 복수의 제1 시퀀싱 리드 생성물 및 복수의 제2 시퀀싱 리드 생성물을 생성할 수 있다.

[0399] 일부 실시양태에서, 클론 증폭된 주형 앰플리콘에서 동기화된 시퀀싱 반응 동안 동기화되지 않은 페이징 및/또는 프리-페이징 이벤트가 발생할 수 있으며, 여기서 시퀀싱 반응은 검출 가능하게 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드를 사용하는 중합효소 촉진 시퀀싱 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 클론 증폭된 주형 분자 중 한 주형 분자에 대한 시퀀싱 반응은 클론 증폭된 주형 분자 내의 다른 주형 분자의 시퀀싱보다 앞서거나(예를 들어, 프리-페이징) 뒤처진다(예를 들어, 페이징). 시퀀싱 동안, 전형적으로 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드의 혼입에 상응하는 형광 신호가 검출된다. 따라서, 표지부착된 쇄 종결자 뉴클레오타이드의 혼입을 이용하여 페이징 및 프리-페이징 이벤트를 검출하고 모니터링할 수 있다.

[0400] 일부 실시양태에서, 단계 (f)의 복수의 뉴클레오타이드 시약은 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 각각 포함하는 복수의 다가 분자를 포함하고, 여기서 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛에 부착된다. 일부 실시양태에서, 개별 다가 분자는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 형광단으로 표지부착되며, 여기서 다가 분자의 주어진 코어에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 타이민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 뉴클레오타이드 아암 중 적어도 하나는 링커, 및/또는 형광단에 부착된 뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 여기서 주어진 뉴클레오타이드 염기에 부착된 형광단은 뉴클레오타이드 아암의 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, 아데닌, 구아닌, 사이토신, 타이민 또는 우라실)에 상응한다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 콘카티머/시퀀싱 프라이머 이중체를 제1 시퀀싱 중합효소와 접촉시켜 복합체화된 중합효소를 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 주기는 다가 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛을 복합체화된 중합효소에 결합시킴으로써 다가 결합 복합체를 형성하기에 적합한 조건 하에서 복합체화된 중합효소를 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고, 이 조건은 상보적 뉴클레오타이드 유닛이 시퀀싱 프라이머의 말단에 혼입되는 것을 억제하기에 적합하다.

[0401] **제자리 배치 시퀀싱 RNA 및 폴리퀩티드**

[0402] 본 개시내용은 코딩된 패드락 프로브를 사용하여 제자리에서 다중체 및 다중-오믹스 검출 및 식별을 수행하는 조성물을 제공한다. 패드락 프로브는 표적 RNA 또는 폴리퀩티드를 선택적으로 검출하도록 설계된다. 패드락 프로브는 프라이머에 특이적인 하나 이상의 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 프라이머는 공간적으로 국소화될 수 있으므로, 패드락 프로브는 바코드 서열을 필요로 하지 않을 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0403] RNA 특이적 패드락 프로브는 표적 RNA에 상응하는 cDNA에 선택적으로 하이브리드화한다. RNA 특이적 프로브는 cDNA를 고유하게 식별하는 바코드를 가진다. RNA 특이적 패드락 프로브는 배치 특이적 시퀀싱 프라이머 결합 부위도 가진다. 패드락 프로브는 프라이머에 특이적인 하나 이상의 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 포함할 수

있다. 프라이머는 공간적으로 국소화될 수 있으므로, 패드락 프로브는 바코드 서열을 필요로 하지 않을 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0404] 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 및 항체에 접합된 올리고뉴클레오타이드에 선택적으로 하이브리드화하는 폴리펩티드 특이적 패드락 프로브를 사용하여 표적 폴리펩티드를 검출한다. 폴리펩티드 특이적 패드락 프로브는 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 항체를 고유하게 식별하는 바코드를 가진다. 폴리펩티드 특이적 패드락 프로브는 표적 RNA, 및 그 표적 RNA에 의해 인코딩된 폴리펩티드를 동시에 시퀀싱하고 검출할 수 있도록, 상응하는 RNA 특이적 패드락 프로브가 가진 배치 특이적 시퀀싱 프라이머와 동일한 배치 특이적 시퀀싱 프라이머도 가진다. 따라서, 패드락 프로브는 RNA 및 이의 인코딩된 폴리펩티드를 동시에 검출하고 식별할 수 있게 한다.

[0405] **역전사효소**

[0406] 본 개시내용은 제자리 핵산 분석을 수행하는 조성물을 제공한다. 분석은 핵산의 시퀀싱을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 RNA일 수 있다. RNA의 분석은 RNA를 상보적 DNA(cDNA)로 역전사하는 것을 포함할 수 있다. 역전사효소를 사용하여 RNA를 cDNA로 전사할 수 있다.

[0407] 본원에 설명된 조성물은 역전사효소도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 RNA 의존적 DNA 중합효소 활성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 AMV(조류 골수모세포증 바이러스), M-MuLV(몰로니 뮤린 백혈병 바이러스) 또는 HIV(인간 면역결핍 바이러스)의 역전사효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 감소된 RNase H 활성을 나타내는 재조합 효소, 예를 들어, REVERTAID(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 번호 EP0441)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 MULTISCRIBE(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 # 4311235), THERMOSCRIPT(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽 제품, 카탈로그 # 12236-014) 또는 ARRAYSCRIPT(예를 들어, 암비온 제품, 카탈로그 번호 AM2048)를 포함하는 상업적으로 입수 가능한 효소일 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사효소는 SUPERSCRIPT II(예를 들어, 카탈로그 번호 18064014), SUPERSCRIPT III(예를 들어, 카탈로그 번호 18080044) 또는 SUPERSCRIPT IV 효소(예를 들어, 카탈로그 번호 18090010)(인비트로겐으로부터의 모든 SUPERSCRIPT 효소)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사 반응은 RNase 억제제를 포함할 수 있다.

[0408] 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 DNA, RNA 또는 키메라 DNA/RNA를 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 아데닌(A), 타이민(T), 구아닌(G), 사이토신(C), 우라실(L..1) 및/또는 이노신(I)의 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 임의의 길이, 예를 들어, 5개 내지 25개 염기, 또는 25개 내지 50개 염기, 또는 50개 내지 75개 염기, 또는 75개 내지 100개 염기 길이, 또는 더 긴 길이일 수 있다. 역전사 프라이머는 5' 말단 및 3' 말단을 각각 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 3' 말단은 중합효소 촉진 프라이머 연장 반응에서 뉴클레오타이드 중합 개시 부위로서 역할을 하는 3' OH 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 3' 말단은 중합효소 촉진 프라이머 연장 반응을 차단하는 쇄 종결 모이어티를 가진다. 쇄 종결 모이어티를 제거하여 3' 당 위치를 연장 가능한 3' OH로 전환할 수 있다.

[0409] 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 뉴클레아제 분해(예를 들어, 리보뉴클레아제 분해)에 대한 저항성을 부여하도록 변형된다. 예를 들어, 역전사 프라이머는 그의 5' 말단에서 적어도 하나의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함하며, 이 결합은 역전사 프라이머가 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 갖게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 그의 5' 말단에서 2개 내지 5개 이상의 연속 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(MOE), 2' 플루오로-염기 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 인산화된 3' 말단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 잠금 핵산(LNA) 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 인산화된 5' 말단을 포함한다(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용함).

[0410] 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 전체 길이는 RNA 분자의 부분에 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 역전사 프라이머는 RNA 분자의 부분에 하이브리드화하는 서열을 가진 3' 영역, 및 RNA 분자에 하이브리드화하지 않는 테일을 가진 5' 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 테일은 샘플 바코드 서열, 증폭 프라이머 결합 부위, 시퀀싱 프라이머 결합 부위, 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위 및/또는 표면 포획 프라이머 결합 부위 중 어느 하나 또는 둘 이상의 임의의 조합을 비롯한 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 테일은 고유 식별 서열(예를 들어, 고유 분자 인덱스(UMI))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 테일은 제한 효소 인식 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 개별 역전사 프라이머는 단독중합체 서열, 예를 들

어, 폴리-A, 폴리-T, 폴리-C, 폴리-G 또는 폴리-U를 가진 3' 영역의 적어도 일부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 RNA 분자의 5' 또는 3' 말단, 또는 RNA 분자의 내부 부분을 포함하는, RNA 분자의 임의의 부분에 하이브리드화할 수 있다.

[0411] 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함한다(예를 들어, 표적화된 전사체학). 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제2 표적 RNA에 선택적으로 하이브리드화하는 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머는 표적 RNA 분자에 하이브리드화하는, 3' 영역에 있는 사전결정된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 사전결정된 서열 부분은 길이가 4개 내지 20개 염기, 또는 20개 내지 40개 염기, 또는 40개 내지 50개 염기일 수 있다.

[0412] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단은 하우스킵핑 유전자에 의해 세포 샘플에서 전사된 RNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하우스킵핑 유전자의 선택은 본원에 설명된 제자리 조성물에 사용될 세포 샘플의 유형에 의해 좌우될 수 있다. 비제한적 예시 하우스킵핑 유전자는 글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH), 베타-액틴(ACTB), 튜불린, PPIA(펩티딜-프롤릴 시스-트랜스 이소머라제), NME4(NME/NM23 뉴클레오사이드 디포스페이트 키나제 4), SMARCAL1(염색질의 SWI/SNF 관련 매트릭스 관련 액틴 의존적 조절제, 서브패밀리 A 유사 1), 및 POMK(단백질-O-만노스 키나제)를 포함한다. 숙련된 당업자는 수많은 하우스킵핑 유전자들 중 임의의 하우스킵핑 유전자로부터 얻은 RNA 전사체에 하이브리드화하도록 표적 특이적 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 설계할 수 있다.

[0413] 일부 실시양태에서, 표적 특이적 역전사 프라이머의 제2 하위집단은 검사되는 세포 샘플에서 발현되는 유전자로부터 전사된 RNA(예를 들어, 세포 특이적 또는 조직 특이적 RNA)에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다.

[0414] 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제1 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제1 하위집단을 포함한다(예를 들어, 전체 전사체학). 일부 실시양태에서, 복수의 역전사 프라이머는 제2 표적 RNA에 하이브리드화하는 무작위 서열 역전사 프라이머의 제2 하위집단을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머는 RNA 분자에 하이브리드화하는, 3' 영역에 있는 무작위 및/또는 축퇴 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 역전사 프라이머의 무작위 서열 또는 축퇴 서열 부분은 길이가 4개 내지 20개 염기, 또는 20개 내지 40개 염기, 또는 40개 내지 50개 염기일 수 있다.

[0415] **롤링 서클 증폭(RCA)**

[0416] 본원에 개시된 조성물은 복수의 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 복수의 콘카티머 분자는 RCA를 통해 생성될 수 있다. 복수의 콘카티머 분자는 유닛의 2개 이상의 탠덤 카피를 각각 가지며, 여기서 상기 유닛은 표적 RNA 분자에 상응하는 표적 서열, 및 범용 어댑터 서열(들), 고유 분자 인덱스 서열(들) 및/또는 제한 효소 인식 서열(들)을 비롯한, 패드락 프로브에 의해 보유된 임의의 추가 서열(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유닛은 표적 RNA 분자에 상응할 수 있는 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유닛은 패드락 프로브에 의해 보유된 추가 서열(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가 서열은 범용 어댑터 서열(들), 고유 분자 인덱스 서열(들), 제한 효소 인식 서열(들) 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0417] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응이 dUTP를 포함하는 복수의 뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 생성된 콘카티머는 세포 샘플을 석신이누이드 에스테르(NHS), 말레이미드(설포-SMCC), 이미도에스테르(DMP), 카보디이미드(DCC, EDC) 또는 페닐 아자이드로 처리함으로써 가교결합 반응성 기에 가교결합될 수 있다. 일부 실시양태에에서, 가교결합 반응성 기의 중합은 빛 또는 자외선에 의해 시작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 생성된 콘카티머는 세포 샘플을 가교결합된 아가로스, 가교결합된 덱스트란 또는 가교결합된 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리아크릴아미드, 셀룰로스 알기네이트 또는 폴리아미드로 처리함으로써 매트릭스에 가교결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG는 한 말단 또는 양 말단에서 설포-NHS 에스테르 모이어티를 포함한다(예를 들어, PEG화된 비스(설포석신이미딜)수베레이트(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽의 BS(PEG)9, 카탈로그 번호 21582)).

[0418] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 일정한 온도(예를 들어, 등온)에서 수행될 수 있으며, 여기서 일정한 온도는 실온 내지 약 30℃, 또는 약 30℃ 내지 40℃, 또는 약 40℃ 내지 50℃, 또는 약 50℃ 내지 65℃이다.

[0419] 일부 실시양태에서, 가닥 치환 활성을 가진 DNA 중합효소는 phi29 DNA 중합효소, Bst DNA 중합효소의 큰 단편, Bsu DNA 중합효소의 큰 단편, 및 Bca(엑소-) DNA 중합효소, 이. 콜라이 DNA 중합효소의 클레나우 단편, T5 중합효소, M-MuLV 역전사효소, HIV 바이러스 역전사효소, 또는 딥 벤트 DNA 중합효소로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, phi29 DNA 중합효소는 야생형 phi29 DNA 중합효소(예를 들어, 엑스페데온의

MagniPhi), 또는 변이체 EquiPhi29 DNA 중합효소(예를 들어, 써모 피셔 사이언티픽의 제품) 및 키메라 QualiPhi DNA 중합효소(예를 들어, 4베이스바이오의 제품)일 수 있다.

[0420] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 그의 5' 말단에서 적어도 하나의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함하고, 이 결합은 증폭 프라이머가 엑소뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 갖게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 그의 5' 말단에서 2개 내지 5개 이상의 연속 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 프라이머는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 2'-O-메틸 또는 2'-O-메톡시에틸(MOE) 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0421] 일부 실시양태에서, 조성물은 콘카티머 분자에 하이브리드화될 때 콘카티머의 크기, 모양, 또는 크기와 모양의 조합을 압축하여 압축 나노볼을 형성할 수 있는 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응은 하나 이상의 압축 올리고뉴클레오타이드의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0422] 압축 올리고뉴클레오타이드는 5' 영역, 임의적 내부 영역(개재 영역), 3' 영역 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역 및 3' 영역은 콘카티머의 상이한 부분에 하이브리드화하여 콘카티머의 원위 부분을 함께 당겨, 콘카티머의 압축을 유발하여 DNA 나노볼을 형성할 수 있다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카티머 분자의 제1 부분(예를 들어, 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위)에 하이브리드화하도록 설계될 수 있고, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카티머 분자의 제2 부분(예를 들어, 범용 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위)에 하이브리드화하도록 설계된다. RCA 동안 압축 올리고뉴클레오타이드의 포함은 압축 올리고뉴클레오타이드의 부재 하에서 생성된 콘카티머에 비해 더 조밀한 크기와 모양을 가진 DNA 나노볼의 형성을 촉진할 수 있다. DNA 나노볼의 압축 및 안정한 특성은 신호 강도를 증가시켜 제자리 시퀀싱 정확도를 개선하고 나노볼은 다회 시퀀싱 주기 동안 그의 모양과 크기를 유지한다.

[0423] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 또는 DNA와 RNA의 조합을 포함하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 압축 올리고뉴클레오타이드는 20개 내지 150개 뉴클레오타이드, 또는 30개 내지 100개 뉴클레오타이드, 또는 40개 내지 80개 뉴클레오타이드 길이를 포함하는 임의의 길이일 수 있다.

[0424] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 5' 영역과 3' 영역, 및 임의로 5' 영역과 3' 영역 사이의 개재 영역을 포함한다. 개재 영역은 임의의 길이, 예를 들어, 약 2개 내지 20개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 개재 영역은 연속 동일한 염기(예를 들어, AAA, GGG, CCC, TTT 또는 UUU)를 가진 단독중합체를 포함한다. 개재 영역은 비-단독중합체 서열을 포함한다.

[0425] 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제1 부분에 전체적으로 상보적일 수 있거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제1 부분에 전체적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제1 부분에 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제2 부분에 전체적으로 상보적일 수 있거나 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제2 부분에 전체적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 그의 길이를 따라 콘카티머 분자의 제2 부분에 부분적으로 상보적일 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 콘카티머 분자의 제1 범용 서열 부분에 하이브리드화될 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 콘카티머 분자의 제2 범용 서열 부분에 하이브리드화될 수 있다.

[0426] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 동일한 서열을 가질 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역과 상이한 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 5' 영역의 역서열인 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 5' 영역은 3' 영역의 역서열인 서열을 가질 수 있다.

[0427] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드들 중 임의의 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 영역은 3' 말단에서 2'-O-메틸 RNA 염기(예를 들어, mUmUmU로 표기됨)를 포함하는 추가 3개의 염기를 포함할 수 있거나, 3' 말단은 추가 2'-O-메틸 RNA 염기를 결여한다.

[0428] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 그의 5' 또는 3' 말단에서 특정 기능을 부여하는 하나 이상의 변형된 염기 또는 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 그의 5' 말단 및/또는 3' 말단에서 엑소뉴클레아제 저항성을 부여하는 적어도 하나의 포스포로티오에이트 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 3' 말단에서 또는 그 근처에서 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 엑소뉴클레아제 저항성을 부여하는 2' 플루오로 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단은 중합효소 촉진 연장을

차단하는 적어도 하나의 2'-O-메틸 RNA 염기를 포함한다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단은 2'-O-메틸 RNA 염기(예를 들어, mUmUmU로 표기됨)를 포함하는 3개의 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 그의 3' 말단에서 중합효소 촉진 연장을 차단하는 3' 도립 dT를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 중합효소 촉진 연장을 차단하는 3' 인산화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드의 내부 영역은 압축 올리고뉴클레오타이드를 콘카티머 분자에 하이브리드화함으로써 형성된 이중체의 열 안정성을 증가시키는 적어도 하나의 잠금 핵산(LNA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 인산화된 5' 말단을 포함한다(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용함).

[0429] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 서열 5'-CATGTAATGCACGTACTTTCAGGGTAAACATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT-3'(서열번호 14)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 말단 3' 말단에서 2'-O-메틸 RNA 염기(예를 들어, mUmUmU로 표기됨)를 포함하는 추가 3개의 염기를 포함하거나, 말단 3' 말단은 추가 2'-O-메틸 RNA 염기를 결여한다.

[0430] 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 연속 구아닌을 가진 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다. 예를 들어, 압축 올리고뉴클레오타이드는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개 이상의 연속 구아닌을 가진 적어도 하나의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 테트라드 구조를 형성할 수 있는 4개의 연속 구아닌을 포함한다(도 18 참조). 구아닌 테트라드 구조는 후그스틴 수소 결합을 통해 안정화될 수 있다. 구아닌 테트라드 구조는 칼륨, 나트륨, 리튬, 루비듐 또는 세슘을 포함하는 중심 양이온에 의해 안정화될 수 있다.

[0431] 적어도 하나의 압축 올리고뉴클레오타이드는 구아닌 테트라드를 형성할 수 있고(도 18) 콘카티머의 보편적 결합 서열에 하이브리드화함으로써, 콘카티머가 접혀 분자내 G-사중체 구조를 형성할 수 있게 한다(도 19). 콘카티머는 자체 붕괴되어 압축 나노볼을 형성할 수 있다. 나노볼에서 구아닌 테트라드와 G-사중체의 형성은 나노볼의 안정성을 증가시켜, 세포 샘플 내부에서 시퀀싱하는 동안 pH, 온도 및/또는 반복된 시약 유동의 변화를 견딜 수 있는 그의 압축 크기와 모양을 유지할 수 있다.

[0432] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응에서 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드는 동일한 서열을 가진다. 대안적으로, 롤링 서클 증폭 반응에서 복수의 압축 올리고뉴클레오타이드는 상이한 서열을 가진 2개 이상의 상이한 압축 올리고뉴클레오타이드 집단의 혼합물을 포함한다.

[0433] 일부 실시양태에서, 고착된 콘카티머 주형 분자는 압축 핵산 나노볼로 자체 붕괴될 수 있다. 나노볼을 이미지화할 수 있고 FWHM 측정치를 얻어 나노볼의 모양/크기를 제공할 수 있다.

[0434] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭 반응에서 압축 올리고뉴클레오타이드의 포함은 콘카티머가 DNA 나노볼로 붕괴되는 것을 촉진할 수 있다. 압축 올리고뉴클레오타이드로 RCA를 수행하는 것은 다회 시퀀싱 주기 동안 DNA 나노볼의 압축 크기와 모양을 유지하는 데 도움이 되며, 이것은 세포 샘플 내부에서 DNA 나노볼의 스팟 이미지의 FWHM(전폭 절반 최대치)을 개선할 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼은 다회 시퀀싱 주기 동안 풀리지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 확대되지 않는다. 일부 실시양태에서, DNA 나노볼의 스팟 이미지는 다회 시퀀싱 주기 동안 개별 스팟으로 남아있다. 스팟 이미지는 가우시안 스팟으로서 표시될 수 있으며 크기는 FWHM으로서 측정될 수 있다. 더 작은 FWHM으로 표시되는 더 작은 스팟 크기는 전형적으로 스팟의 개선된 이미지와 상관관계를 가진다. 일부 실시양태에서, 나노볼 스팟의 FWHM은 약 10 ㎛ 이하일 수 있다.

[0435] **항체-올리고뉴클레오타이드 접합체**

[0436] 본 개시내용은 단백질 결합 조성물을 제공한다. 단백질 결합 조성물은 표적 RNA에 상응하는 표적 폴리펩티드 또는 단백질에 특이적일 수 있다. 그 다음, 표적 RNA는 시퀀싱될 수 있다. 이 방식으로, 단백질 결합 조성물은 본원에 개시된 시퀀싱 방법의 특이성을 높일 수 있다.

[0437] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 단백질 결합 조성물은 항체 및 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 항체와 올리고뉴클레오타이드 태그는 링커 모이어티를 통해 연결될 수 있다. 항체는 복수의 링커 모이어티를 통해 연결된 복수의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 항체는 표적 RNA에 상응하는 표적 단백질 또는 폴리펩티드에 특이적일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 태그는 본원에 개시된 패드락 프로브의 서열에 상응할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 태그와 본원에 개시된 패드락 프로브의 성공적인 결합은 패드락 프로브의 위상적 구성을 고정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 표적 폴리펩티드 사이의 결합과 관련된 시퀀싱 판독정보를 제공하도록 설계된다. 일부 실시양

태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그의 서열은 세포 샘플에서 RNA(예를 들어, 표적 RNA)에 최소한으로 하이브리드화하는 특성을 나타내도록 설계된다.

[0438] 본 개시내용은 적어도 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함하는 하나 이상의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트를 제공한다. 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트는 본원에 설명된 검출 및/또는 시퀀싱 방법들 중 임의의 방법을 수행하는 데 사용될 수 있다.

[0439] 일부 실시양태에서, 세트는 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 포함하는 적어도 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 제1 항체는 제1 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제1 항체를 고유하게 식별하는 올리고뉴클레오타이드 태그 서열을 가진 제1 올리고뉴클레오타이드에 연결된다.

[0440] 일부 실시양태에서, 세트는 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 포함하는 적어도 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 제2 항체는 제2 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 제2 항체를 고유하게 식별하는 올리고뉴클레오타이드 태그 서열을 가진 제2 올리고뉴클레오타이드에 연결된다.

[0441] 일부 실시양태에서, 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 동일하다(예를 들어, 도 28). 일부 실시양태에서, 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 상이하다(예를 들어, 도 29).

[0442] 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 서열 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 패드락 프로브의 왼쪽 결합 아암 및 오른쪽 결합 아암에 선택적으로 결합하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 서열과 제2 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 서로 상이하다.

[0443] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트는 2개 내지 20개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함하며, 여기서 각각의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 그의 각각의 표적 폴리펩티드에 결합한다. 일부 실시양태에서, 상기 세트는 20개 내지 100개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 또는 100개 내지 500개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 또는 500개 내지 1000개의 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체, 또는 더 많은 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다.

[0444] 본 개시내용은 올리고뉴클레오타이드에 연결된 항체를 각각 포함하는 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항체는 온전한 면역글로불린, 항체 단편, 항체의 항원 결합 부분 또는 단일 쇄 항체를 포함한다. 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체일 수 있다. 항체는 표적 분석물에 특이적으로 결합할 수 있다. 표적 분석물은 폴리펩티드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 당류 및 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 분석물은 온전한 폴리펩티드 또는 펩티드 단편을 포함한다. 항체는 표적 분석물에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역(예를 들어, 파라토프)을 포함한다.

[0445] 면역글로불린은 전형적으로 두 쌍의 동일한 폴리펩티드 쇄를 포함하는 사량체 분자이고, 여기서 각각의 쌍은 경쇄와 중쇄를 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 아미노 부분은 서로 회합하여 항원 결합 영역(예를 들어, 파라토프)을 형성하는 가변 영역을 각각 포함한다. 따라서, 전형적인 면역글로불린은 2개의 항원에 결합할 수 있거나 2개의 표적 분석물에 결합할 수 있다. 중쇄의 카복실 부분은 서로 회합하여 이펙터 기능을 위한 Fc 영역을 형성하는 불변 영역을 포함한다. 중쇄의 Fc 부분은 IgG, IgM, IgD, IgA 또는 IgE 동형을 포함하는 항체의 클래스를 정의할 수 있다. 중쇄 및/또는 경쇄는 재조합 기법을 이용함으로써, 또는 관심 있는 항원으로 동물을 예방접종함으로써 제조될 수 있다.

[0446] 항체 단편은 일반적으로 항원에 결합할 수 있는 온전한 면역글로불린의 부분을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ 및 Fd를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다.

[0447] 일부 실시양태에서, Fv 단편은 가변 경쇄 영역(VL) 및 가변 중쇄 영역(VH)을 포함한다.

[0448] 일부 실시양태에서, Fab 단편은 가변 경쇄 영역(VL), 불변 경쇄 영역(CL), 가변 중쇄 영역(VH) 및 제1 불변 영역(CH1)을 가진 1가 항체 단편을 포함한다.

[0449] 일부 실시양태에서, Fab' 단편은 가변 경쇄 영역(VL), 불변 경쇄 영역(CL), 가변 중쇄 영역(VH), 제1 불변 영역(CH1), 힌지 영역, 및 제2 불변 영역(CH2)의 적어도 일부를 가진 1가 항체 단편을 포함한다.

[0450] 일부 실시양태에서, F(ab')2 단편은 힌지 영역에서 디설파이드가교를 통해 연결된 2개의 Fab 단편을 가진 2가 항체 단편을 포함한다.

[0451] 단일 쇄 항체(scFv)는 전형적으로 폴리펩티드 링커에 의해 연결된 가변 경쇄 영역(VL)과 가변 중쇄 영역(VH)을

가진 단일 폴리펩티드 쇄(예를 들어, 1가 항체 분자)를 포함한다(예를 들어, 문헌[Bird et al., 1988, Science 242:423-26] 및 문헌[Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83] 참조). 단일 쇄 항체의 아미노-말단은 가변 경쇄 영역(VL) 또는 가변 중쇄 영역(VH)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 쇄 항체는 항체 힌지 영역, 및 CH2 및/또는 CH3 영역을 포함하는 Fc 영역의 적어도 일부를 추가로 포함하는 scFv-Fc 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 쇄 항체는 항체 힌지 영역, 및 CH3 영역의 적어도 일부를 추가로 포함하는 scFv-CH 항체를 포함한다.

[0452] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 링커 모이어티에 의해 올리고뉴클레오타이드에 연결된 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 모이어티는 스트렙타비딘(또는 아비딘 유사 모이어티), 바이오틴, 아민 기 또는 디설파이드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 모이어티는 절단될 수 없거나 제거될 수 없다. 일부 실시양태에서, 링커 모이어티는 절단될 수 있거나 제거될 수 있다. 예를 들어, 링커 모이어티는 빛(예를 들어, 자외선)에 의해 절단될 수 있거나, 화학적으로 절단될 수 있거나(예를 들어, 디티오트레이톨), 열에 의해 절단될 수 있거나, 효소에 의해 절단될 수 있다.

[0453] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 글루타르알데하이드를 사용하여 항체와 올리고뉴클레오타이드의 아미노 기를 가교결합시킴으로써 제조될 수 있다. 라이신 측쇄 엡실론-아미드는 통상적으로 올리고뉴클레오타이드에 접합되도록 표적화된다. 일부 실시양태에서, 말레이미드 변형된 항체는 설프하이드릴 변형된 올리고뉴클레오타이드와 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종이작용성 가교결합제는 항체와 올리고뉴클레오타이드를 함께 연결하는 가교로서 도입된다.

[0454] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 올리고뉴클레오타이드에 연결된 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 DNA, RNA, 또는 키메라 DNA 및 RNA를 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 표준 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대, 잠금 핵산(LNA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 길이는 10개 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 또는 50개 내지 100개 뉴클레오타이드 길이, 또는 100개 내지 200개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0455] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 하나의 태그 서열을 갖도록 설계되며, 여기서 상기 태그 서열은 패드락 프로브의 왼쪽 결합 아암과 오른쪽 결합 아암에 선택적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 그에 접합된 항체를 고유하게 식별하고, 여기서 상기 항체는 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 서열은 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 표적 폴리펩티드 사이의 결합과 관련된 시퀀싱 판독정보를 제공하도록 설계된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그의 서열은 세포 샘플에서 RNA(예를 들어, 표적 RNA)에 최소한으로 하이브리드화하는 특성을 나타내도록 설계된다.

[0456] 일부 실시양태에서, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 세트는 적어도 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 세트는 적어도 제1 올리고뉴클레오타이드 태그 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 태그 세트는 2개 내지 20개의 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하고, 여기서 상기 세트의 올리고뉴클레오타이드 태그 각각은 그의 각각의 접합된 항체를 고유하게 식별하고, 여기서 이 항체는 표적 폴리펩티드에 선택적으로 결합한다. 올리고뉴클레오타이드 태그 세트는 20개 내지 100개의 올리고뉴클레오타이드 태그, 또는 100개 내지 500개의 올리고뉴클레오타이드 태그, 또는 500개 내지 1000개의 올리고뉴클레오타이드 태그, 또는 더 많은 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함한다.

[0457] 도 28의 비제한적 실시양태에 묘사된 바와 같이, 제1 항체-뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-뉴클레오타이드 접합체는 표적 RNA에 의해 인코딩된 표적 단백질(도 28에서, "RNA-1에 의해 인코딩된 단백질-1")에 대해 사용될 수 있다. 제1 항체-뉴클레오타이드 접합체, 제2 항체-뉴클레오타이드 접합체, 또는 두 항체-뉴클레오타이드 접합체는 링커 모이어티를 포함할 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 제1 링커 모이어티를 통해 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체에 연결될 수 있다. 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 패드락 프로브에 접합될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 올리고뉴클레오타이드 태그는 예를 들어, 패드락 프로브에 라이게이션될 수 있거나, 화학적으로 접합될 수 있거나, 근접 가교결합을 가질 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체의 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 링커 모이어티를 통해 제2 항체에 연결될 수 있다.

[0458] 도 29의 비제한적 실시양태에 묘사된 바와 같이, 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체와 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 표적 단백질(도 29에서, "RNA-1에 의해 인코딩된 단백질-1")에 대해 사용될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 항체 및 제1 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 제1 올리

고뉴클레오타이드 태그는 제1 링커 모이어티를 통해 제1 항체에 연결될 수 있다. 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 항체 및 제2 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함할 수 있다. 제2 올리고뉴클레오타이드 태그는 제2 링커 모이어티를 통해 제2 항체에 연결될 수 있다. 제1 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체 및 제2 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체는 동일한 표적 RNA에 의해 인코딩된 동일한 표적 단백질에 특이적일 수 있다.

[0459] 일부 실시양태에서, 표적 분석물은 폴리펩티드 또는 펩티드 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서 표적 폴리펩티드는 세포 샘플의 표적 RNA에 의해 인코딩된다. 표적 폴리펩티드는 메틸화, 인산화, 글리코실화, 하이드록실화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 아세틸화, 지질화, ADP-리보실화, 카보닐화, SUMO일화 및/또는 디설파이드 결합 형성을 포함하는 번역 후 변형된 형태를 가진 폴리펩티드를 포함한다. 표적 폴리펩티드는 예를 들어, 프로테아제에 의해 단백질분해될 수 있거나 리보좀 건너뛰기로 인해 절단될 수 있다. 표적 폴리펩티드는 아직 번역 후 변형을 거치지 않은 전구체 분자도 포함한다. 표적 폴리펩티드는 뮤테인, 변이체, 키메라 단백질 및 융합 단백질을 포함한다. 표적 폴리펩티드는 예를 들어, 바이오틴(또는 이의 유도체), 디곡시게닌, 플루오레세인, 콜레스테롤, 말토스 또는 아래에 설명된 친화성 분자들 중 임의의 친화성 분자와 같은 친화성 모이어티를 가진 결합 파트너 분자로 표지부착될 수 있다.

[0460] 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부의 다당류는 세포 샘플을, 패드락 프로브의 왼쪽 아암과 오른쪽 아암에 결합하도록 설계된 태그 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드에 접합된 렉틴과 접촉시킴으로써 검출될 수 있다. 렉틴-올리고뉴클레오타이드 접합체는 시퀀싱 판독정보를 사용하여 다당류를 검출할 수 있게 한다.

[0461] 일부 실시양태에서, 세포 샘플 내부의 지질은 세포 샘플을, 패드락 프로브의 왼쪽 아암과 오른쪽 아암에 결합하도록 설계된 태그 서열을 가진 올리고뉴클레오타이드에 접합된 지질 특이적 결합 단백질 또는 양친매성 폴리펩티드와 접촉시킴으로써 검출될 수 있다. 태그부착된 올리고뉴클레오타이드에 접합된 지질 특이적 결합 단백질 및 양친매성 폴리펩티드는 시퀀싱 판독정보를 사용하여 지질을 검출할 수 있게 한다.

[0462] **시퀀싱 중합효소**

[0463] 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 시퀀싱 중합효소는 시퀀싱 반응을 수행하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 중합효소(들)는 콘카티머 주형 분자의 뉴클레오타이드와 마주보는 상보적 뉴클레오타이드에 결합하고 이를 혼입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 중합효소(들)는 콘카티머 주형 분자의 뉴클레오타이드와 마주보는 다가 결합 분자의 상보적 뉴클레오타이드 유닛에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 재조합 돌연변이체 중합효소를 포함한다.

[0464] 뉴클레오타이드 및/또는 다가 분자를 사용한 시퀀싱에 사용하기에 적합한 중합효소의 예는 다음을 포함하나, 이들로 제한되지 않는다: 클레나우 DNA 중합효소; 써머스 아쿠아티커스 DNA 중합효소 I(Taq 중합효소); KlenTaq 중합효소; 칸디다투스 알티아르케알레스 고세균; 칸디다투스 하다르케움 옐로스톤센스; 하데아르케아 고세균; 유리아케오타 고세균; 써모플라스마타 고세균; 써모코커스 리토랄리스와 같은 써모코커스 중합효소, 박테리오파지 T7 DNA 중합효소; 인간 알파, 델타 및 엡실론 DNA 중합효소; T4, RB69 및 phi29 박테리오파지 DNA 중합효소와 같은 박테리오파지 중합효소; 파이로코커스 퓨리오서스 DNA 중합효소(Pfu 중합효소); 바실러스 서브틸리스 DNA 중합효소 III; 이. 콜라이 DNA 중합효소 III 알파 및 엡실론; 9도 N 중합효소; HIV 타입 M 또는 O 역전사효소와 같은 역전사효소; 조류 골수모세포증 바이러스 역전사효소; 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효소; 또는 텔로머라제. DNA 중합효소의 추가 비제한적 예는 당분야에 알려진 중합효소, 예컨대, 9도 N, VENT, DEEP VENT, THERMINATOR, Pfu, KOD, Pfx, Tgo 및 RB69 중합효소를 포함하는, 다양한 고세균 속, 예컨대, 에어로파이룸, 아케에글로버스, 데설플루로코커스, 파이로바큘럼, 파이로코커스, 파이로글로버스, 파이로딕튬, 스타필로써무스, 스테테리아, 설폴로버스, 써모코커스 및 불카니세타 등 또는 이들의 변이체로부터 유래한 중합효소들을 포함한다.

[0465] **시퀀싱 cDNA 앰플리콘**

[0466] 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에서, 시퀀싱은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응을 수행하는 단계를 포함하며, 여기서 cDNA 앰플리콘은 콘카티머 분자이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 표지부착되지 않은 쇄 종결 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 프라이밍된 콘카티머(예를 들어, 복수의 시퀀싱 프라이머에 어닐링된 콘카티머)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 삼원 복합체 안정화 조건 하에서 적어도 2개의 별도 혼합물과 접촉된 프라이밍된 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 2개의 별도 혼합물은 각각 중합효소와 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프라이밍된 콘카티머는 주형의 제1 염기 유형, 제2 염기 유형 및 제3 염기 유형에 대한 뉴클레오타이드 동족체와 접촉된다. 본원에 개시된 조성물은

미국 특허 제10,246,744호 및 제10,731,141호(두 특허의 내용은 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 설명되어 있다.

[0467] **패드락 프로브**

[0468] 본 개시내용은 본원에 설명된 방법들 중 임의의 방법에 사용하기 위한 패드락 프로브를 제공한다. 패드락 프로브는 표적 분자를 선택적으로 검출하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 패드락 프로브는 표적 핵산 또는 폴리펩티드를 선택적으로 검출하도록 설계될 수 있다. 표적 핵산은 표적 DNA 또는 표적 RNA일 수 있다. 패드락 프로브를 표적 핵산 또는 단백질/폴리펩티드에 결합시킴으로써, 표적 핵산 또는 단백질/폴리펩티드의 하나 이상의 특성에 대한 정보를 알 수 있다. 예를 들어, 표적 핵산 또는 단백질/폴리펩티드의 위치를 확인할 수 있다. 패드락 프로브는 프라이머에 특이적인 하나 이상의 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 프라이머는 공간적으로 국소화될 수 있으므로, 패드락 프로브는 바코드 서열을 필요로 하지 않을 수 있다. 표적의 위치는 샘플에 대한 정보, 예를 들어, 세포 기원을 제공할 수 있다. 이러한 경우, 패드락 프로브가 바코드를 가질 필요는 없을 수 있다. 그러나, 다른 비제한적 경우, 패드락 프로브는 바코드를 가질 수 있다.

[0469] 본 개시내용은 표적 RNA에 특이적인 패드락 프로브를 제공한다. RNA 특이적 패드락 프로브는 표적 RNA에 상응하는 cDNA에 선택적으로 하이브리드화할 수 있다. RNA 특이적 프로브는 cDNA를 고유하게 식별하는 바코드를 결여할 수 있다. 이러한 경우, RNA 특이적 프로브에 대한 공간적 정보를 얻을 수 있다. RNA 특이적 프로브는 cDNA를 고유하게 식별하는 바코드를 가질 수 있다. RNA 특이적 패드락 프로브는 시퀀싱 프라이머 결합 부위도 가질 수 있다. 시퀀싱 프라이머 결합 부위는 배치 특이적 프라이머 결합 부위일 수 있다 - 즉, 프라이머는 프로브에 고유한 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 하나 이상의 패드락 프로브를 사용할 수 있다. 각각의 프로브는 고유 배치 특이적 프라이머 결합 부위를 가질 수 있다. 배치 특이적 프라이머 결합 부위의 사용은 패드락 프로브의 공간적 국소화를 가능하게 함으로써, 패드락 프로브에서 바코드 서열의 필요성을 없앨 수 있다.

[0470] 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 세포 샘플 내부의 복수의 cDNA를 증폭하여 cDNA 앰플리콘(예를 들어, 콘카티머)을 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 cDNA 분자는 패드락 프로브 원형화 및 롤링 서클 증폭 워크플로우를 수행함으로써 증폭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 복수의 cDNA 분자를, 제1 표적 cDNA 분자와 하이브리드화하는 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브 및 제2 표적 cDNA 분자와 하이브리드화하는 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함하는 복수의 패드락 프로브와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0471] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 DNA, RNA, DNA 및 RNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 표준 뉴클레오타이드 및/또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 뉴클레아제 분해(예를 들어, 리보뉴클레아제 분해)에 대한 저항성을 부여하도록 변형된다. 예를 들어, 패드락 프로브는 그의 5' 말단에서 적어도 하나의 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함하며, 이 결합은 패드락 프로브가 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 갖게 만들 수 있다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 그의 5' 말단에서 2개 내지 5개 이상의 연속 포스포로티오에이트 디에스테르 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 리보뉴클레오타이드 및/또는 적어도 하나의 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸(MOE), 2' 플루오로-염기 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 인산화된 3' 말단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 잠금 핵산(LNA) 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 인산화된 5' 말단을 포함한다(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 키나제를 사용함).

[0472] 일부 실시양태에서, 복수의 패드락 프로브는 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 제1 표적 cDNA 분자와 하이브리드화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 패드락 프로브는 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 표적 특이적 패드락 프로브는 제2 표적 cDNA 분자와 하이브리드화할 수 있다.

[0473] 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브는 cDNA 분자의 부분에 하이브리드화하여 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역과 제2 말단 영역을 포함하고, 여기서 개별 복합체는 cDNA 분자의 근위 영역에 하이브리드화하여 제1 말단 프로브 말단과 제2 말단 프로브 말단 사이에 닉 또는 갭을 형성하는 제1 말단 프로브 영역과 제2 말단 프로브 영역을 가진다. 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브의 제1 말단 영역은 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화하는 제1 표적 특이적 서열을 갖고, 개별 패드락 프로브의 제2 말단 영역은 동일한 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화하는 제2 표적 특이적 서열을 갖고, 여기서 하이브리드화된 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이에 닉 또는 갭이 형성됨으로써, 패드락 프로브를 원

형화한다. 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브의 제1 말단 영역은 표적 cDNA 분자의 제1 영역에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 제1 표적 특이적 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 패드락 프로브의 제2 말단 영역은 표적 cDNA 분자의 제2 영역에 선택적으로 하이브리드화할 수 있는 제2 표적 특이적 서열을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 하이브리드화된 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이에 닉 또는 갭이 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 말단 영역과 제2 말단 영역의 하이브리드화는 패드락 프로브를 원형화할 수 있다.

[0474] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트(예를 들어, 복수의 패드락 프로브)의 개별 패드락 프로브는 표적 cDNA 분자의 동일한 표적 영역에 하이브리드화하여 동일한 cDNA 서열을 가진 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역을 포함한다.

[0475] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트(예를 들어, 복수의 패드락 프로브)는 적어도 2개의 패드락 프로브 서브세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브 서브세트의 개별 패드락 프로브는 표적 cDNA 분자의 동일한 표적 영역(예를 들어, 제1 표적 영역)에 하이브리드화하여 동일한 cDNA 서열을 가진 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 패드락 프로브 서브세트의 개별 패드락 프로브는 표적 cDNA 분자의 동일한 표적 영역(예를 들어, 제2 표적 영역)에 하이브리드화하여 동일한 cDNA 서열을 가진 복수의 cDNA-패드락 프로브 복합체를 형성하는 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브 서브세트 및 제2 패드락 프로브 서브세트는 동일한 표적 cDNA 분자의 상이한 표적 영역에 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 제1 패드락 프로브 서브세트 및 제2 패드락 프로브 서브세트는 상이한 표적 cDNA 분자의 상이한 표적 영역에 하이브리드화한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트는 2개 내지 10개의 패드락 프로브 서브세트, 또는 10개 내지 25개의 패드락 프로브 서브세트, 또는 25개 내지 50개의 패드락 프로브 서브세트, 또는 최대 100개의 패드락 프로브 서브세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브 세트는 적어도 100개의 패드락 프로브 서브세트, 적어도 500개의 패드락 프로브 서브세트, 적어도 1000개의 패드락 프로브 서브세트, 적어도 10,000개의 패드락 프로브 서브세트 또는 더 많은 패드락 프로브 서브세트를 포함한다.

[0476] 일부 실시양태에서, 닉은 효소에 의해 라이게이션되어, 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 리가제 효소는 매칭되고 하이브리드화된 말단과 잘못 매칭되고 하이브리드화된 말단을 구별하여 표적 특이적 하이브리드화를 보장할 수 있다. 일부 실시양태에서, 라이게이션 반응은 T3, T4, T7 또는 Taq DNA 리가제 효소를 포함하는 리가제 효소의 사용을 포함한다.

[0477] 일부 실시양태에서, 하이브리드화된 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이의 갭의 크기는 1개 내지 25개 염기이다. 하이브리드화된 패드락 프로브의 3' OH 말단은 주형으로서 표적 cDNA 분자를 사용하여 중합효소 촉진 채우기 반응(예를 들어, 갭 채우기 반응)을 위한 개시 부위로서 역할을 할 수 있다. 채우기 반응 후, 남아있는 닉은 효소에 의해 라이게이션되어 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성할 수 있다.

[0478] 일부 실시양태에서, 갭 채우기 반응은 원형화된 패드락 프로브를 DNA 중합효소 및 복수의 뉴클레오타이드와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 중합효소는 이. 콜라이 DNA 중합효소 I, 이. 콜라이 DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, T7 DNA 중합효소 또는 T4 DNA 중합효소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리가제 효소는 매칭되고 하이브리드화된 말단과 잘못 매칭되고 하이브리드화된 말단을 구별하여 표적 특이적 하이브리드화를 보장할 수 있다. 일부 실시양태에서, 라이게이션 반응은 T3, T4, T7 또는 Taq DNA 리가제 효소를 포함하는 리가제 효소의 사용을 포함한다.

[0479] 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 샘플 바코드 서열, 증폭 프라이머 결합 부위, 시퀀싱 프라이머 결합 부위, 압축 올리고뉴클레오타이드 결합 부위 및/또는 표면 포획 프라이머 결합 부위를 포함하는 적어도 하나의 범용 어댑터 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 고유 식별 서열(예를 들어, 고유 분자 인덱스(UMI))을 포함한다. 일부 실시양태에서, 패드락 프로브는 적어도 하나의 제한 효소 인식 서열을 포함한다.

[0480] **뉴클레오타이드 및 쇄 종결 뉴클레오타이드**

[0481] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 핵산의 서열을 검출하는 방법을 제공한다. 핵산은 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있다. 생물학적 샘플은 세포 샘플일 수 있다.

[0482] 본 개시내용은 세포 샘플 내부에서 시퀀싱 반응을 수행하는 단계를 포함할 수 있는, 세포 샘플에서 적어도 2개의 상이한 표적 RNA 분자를 제자리에서 검출하는 조성물을 제공하고, 여기서 cDNA 앰플리콘은 콘카티머 분자일

수 있다.

[0483] 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물은 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 뉴클레오타이드는 염기, 당 및 적어도 하나의 포스페이트 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스) 및 하나 이상의 포스페이트 기(예를 들어, 1개 내지 10개의 포스페이트 기)를 포함한다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한 유형의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 복수의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 둘 이상의 유형의 뉴클레오타이드의 임의의 조합의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체가 아니다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다.

[0484] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 1개, 2개 또는 3개의 인 원자로 구성된 쇄를 포함하고, 여기서 상기 쇄는 전형적으로 에스테르 또는 포스포라미드 결합을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되어 있는 인 쇄를 가진 유사체이다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄의 인 원자는 O, S 또는 BH3을 비롯한 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄는 포스포라미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 O-메틸포스포라미다이트 기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트 기를 포함한다.

[0485] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 가진 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 신생 가닥 내로의 후속 뉴클레오타이드 유닛 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소 촉진 혼입을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 당이 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함하는 경우 3' 당 하이드록실 위치에 부착된다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3' 당 하이드록실 위치로부터 제거/절단되어, 중합효소 촉진 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장될 수 있는 3' OH 당 기를 가진 뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 예를 들어, 쇄 종결 모이어티를 화학 작용제, pH 변화, 빛 또는 열과 반응시킴으로써 뉴클레오타이드로부터 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 알킬, 알케닐, 알키닐 및 알릴은 피페리딘과 함께 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh3)4)을 사용하거나, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C를 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아민, 아미드, 케토, 이소시아네이트, 포스페이트, 티올, 디설파이드는 포스핀, 또는 티올 기 포함 베타-머캅토에탄올 또는 디티오트리톨(DTT)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중의 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중의 트리에틸아민, 또는 아세트산(AcOH) 중의 Zn을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 우레아 및 실릴은 불화테트라부틸암모늄, 피리딘-HF, 불화암모늄 또는 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드를 사용함으로써 절단될 수 있다.

[0486] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 가진 종결자 뉴클레오타이드 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3’-O-아지도 또는 3’-O-아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기는 포스핀 화합물을 사용함으로써 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트리-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트리-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트리페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트리(하이드록시프로일)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단제는 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0487] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 뉴클레오타이드는 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-디데옥시 뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에티닐, 3'-

O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-디플루오로메틸, 3'-트리플루오로메틸, 3'-설포닐, 3'-말로닐, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-설프하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'부틸, 3'-*tert* 부틸, 3'-플루오레닐메틸옥시카보닐, 3' *tert*-부틸옥시카보닐, 3'-O-알킬 하이드록실아미노 기, 3'-포스포로티오에이트 및 3-O-벤질, 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 쇄 종결 모이어티를 포함한다.

[0488] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 복수의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된 복수의 뉴클레오타이드를 포함한다. 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형광단은 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 형광단은 염기로부터 절단/제거될 수 있는 링커에 의해 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 중 적어도 하나의 뉴클레오타이드는 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착되지 않는다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기를 검출하고 식별할 수 있게 하도록 뉴클레오타이드 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응할 수 있다.

[0489] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능한 링커는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함하는 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 염기 상의 절단 가능한 링커는 절단 가능한 모이어티를 화학 작용제, pH 변화, 빛 또는 열과 반응시킴으로써 염기로부터 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 알킬, 알케닐, 알키닐 및 알릴은 피페리딘과 함께 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(Pd(PPh3)4)을 사용하거나, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논(DDQ)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C를 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 아민, 아미드, 케토, 이소시아네이트, 포스페이트, 티올, 디설파이드는 포스핀, 또는 티올 기 포함 베타-머캅토에탄올 또는 디티오트리톨(DTT)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 카보네이트는 MeOH 중의 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중의 트리에틸아민, 또는 아세트산(AcOH) 중의 Zn을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 우레아 및 실릴은 불화테트라부틸암모늄, 피리딘-HF, 불화암모늄 또는 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드를 사용함으로써 절단될 수 있다.

[0490] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능한 링커는 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기를 비롯한 절단 가능한 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단 가능한 모이어티 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기는 포스핀 화합물에 의해 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트리-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트리-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트리페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트리(하이드록시프로일)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단제는 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0491] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 조성물들 중 임의의 조성물에서, (예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에 있는) 쇄 종결 모이어티 및 뉴클레오타이드 염기 상의 절단 가능한 링커는 동일하거나 상이한 절단 가능한 모이어티를 가진다. 일부 실시양태에서, (예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에 있는) 쇄 종결 모이어티, 및 염기에 연결된 검출 가능한 리포터 모이어티는 동일한 화학 작용제에 의해 화학적으로 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, (예를 들어, 당 2' 및/또는 당 3' 위치에 있는) 쇄 종결 모이어티, 및 염기에 연결된 검출 가능한 리포터 모이어티는 상이한 화학 작용제에 의해 화학적으로 절단/제거될 수 있다.

[0492] **다가 분자**

[0493] 본원에 설명된 조성물은 적어도 하나의 다가 분자를 사용할 수 있다. 다가 결합 복합체는 하나 이상의 중합체-뉴클레오타이드 접합체, 하나 이상의 중합효소, 하나 이상의 복수의 프라이밍된 표적 핵산 분자, 또는 이들의 임의의 조합 사이에 형성될 수 있다. 다가 결합 복합체는 안정적일 수 있으며, 본원에 설명된 임의의 시퀀싱 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 다가 결합 복합체는 시퀀싱 주기에서 검출 또는 염기 판정 단계가 뉴클레오타이드 혼입 단계로부터 분리될 수 있게 한다.

[0494] 본원에 설명된 조성물은, 코어에 부착되어 있고 스타버스트, 헬터 스켈터 또는 병 브러시 구성을 비롯한 임의의 구성을 가진 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함하는 적어도 하나의 다가 분자를 포함할 수 있다(예를 들어, 도 7). 다가 분자는 (1) 코어; 및 (2) (i) 코어 부착 모이어티, (ii) PEG 모이어티를 포함하는 스페이서, (iii) 링

커 및 (iv) 뉴클레오타이드 유닛을 포함하는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함하고, 여기서 상기 코어는 상기 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착되고, 스페이서는 링커에 부착되고, 링커는 뉴클레오타이드 유닛에 부착된다. 일부 실시양태에서, 다가 분자는 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자는 하나 이상의 링커 모이어티를 포함할 수 있다(예를 들어, 도 26). 일부 실시양태에서, 다가 분자는 복수의 뉴클레오타이드 아암을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 아암 중 뉴클레오타이드 아암은 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 아암은 스페이서를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 PEG 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 아암은 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 링커에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 뉴클레오타이드 유닛에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 염기, 당 및 적어도 하나의 포스페이트 기를 포함할 수 있고, 링커는 염기를 통해 뉴클레오타이드 유닛에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 지방족 쇄 또는 올리고 에틸렌 글리콜 쇄를 포함할 수 있고, 여기서 상기 두 링커 쇄는 2개 내지 6개의 서브유닛을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 방향족 모이어티도 포함할 수 있다. 비제한적 예시 뉴클레오타이드 아암은 도 11에 제시되어 있다. 비제한적 예시 다가 분자는 도 7 내지 10에 제시되어 있다. 비제한적 예시 스페이서는 도 12(상단)에 제시되어 있고, 비제한적 예시 링커는 도 12(하단) 및 도 13에 제시되어 있다. 링커에 부착된 비제한적 예시 뉴클레오타이드는 도 14 내지 16에 제시되어 있다. 비제한적 예시 바이오틴화된 뉴클레오타이드 아암은 도 17에 제시되어 있다.

[0495] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하며, 여기서 다수의 뉴클레오타이드 아암은 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 동일한 유형의 뉴클레오타이드 유닛을 가진다.

[0496] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 여기서 각각의 아암은 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 뉴클레오타이드 유닛은 방향족 염기, 오탄당(예를 들어, 리보스 또는 데옥시리보스) 및 하나 이상의 포스페이트 기(예를 들어, 1개 내지 10개의 포스페이트 기)를 포함한다. 복수의 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 한 유형의 뉴클레오타이드 유닛을 가진 한 유형의 다가 분자를 포함할 수 있다. 복수의 다가 분자는 둘 이상의 유형의 다가 분자의 임의의 조합의 혼합물을 포함할 수 있고, 여기서 혼합물의 개별 다가 분자는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및/또는 dUTP로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다.

[0497] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 1개, 2개 또는 3개의 인 원자로 구성된 쇄를 포함하고, 여기서 상기 쇄는 전형적으로 에스테르 또는 포스포라미드 결합을 통해 당 모이어티의 5' 탄소에 부착된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유닛은 인 원자가 개재 O, S, NH, 메틸렌 또는 에틸렌과 함께 연결되어 있는 인 쇄를 가진 뉴클레오타이드 유사체이다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄의 인 원자는 O, S 또는 BH3을 비롯한 치환된 측기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 쇄는 포스포라미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 및 O-메틸포스포라미다이트 기를 포함하는 유사체로 치환된 포스페이트 기를 포함한다.

[0498] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 여기서 개별 뉴클레오타이드 아암은 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 가진 뉴클레오타이드 유사체인 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 프라이머 연장 반응 동안 신생 가닥 내로의 후속 뉴클레오타이드 유닛 또는 유리 뉴클레오타이드의 중합효소 촉진 혼입을 억제할 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 당이 리보스 또는 데옥시리보스 당 모이어티를 포함하는 경우 3' 당 하이드록실 위치에 부착된다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3' 당 하이드록실 위치로부터 제거/절단되어, 중합효소 촉진 뉴클레오타이드 혼입 반응에서 후속 뉴클레오타이드에 의해 연장될 수 있는 3' OH 당 기를 가진 뉴클레오타이드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 예를 들어, 쇄 종결 모이어티를 화학 작용제, pH 변화, 빛 또는 열과 반응시킴으로써 뉴클레오타이드 유닛으로부터 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 알킬, 알케닐, 알키닐 및 알릴은 피페리딘과 함께 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)($Pd(PPh_3)_4$)을 사용하거나, 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조-퀴논(DDQ)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아릴 및 벤질은 H2 Pd/C를 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시

양태에서, 쇄 종결 모이어티 아민, 아미드, 케토, 이소시아네이트, 포스페이트, 티올, 디설파이드는 포스핀, 또는 티올 기 포함 베타-머캅토에탄올 또는 디티오트리톨(DTT)을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 카보네이트는 MeOH 중의 탄산칼륨(K_2CO_3), 피리딘 중의 트리에틸아민, 또는 아세트산(AcOH) 중의 Zn을 사용함으로써 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 우레아 및 실릴은 불화테트라부틸암모늄, 피리딘-HF, 불화암모늄 또는 트리에틸아민 트리하이드로플루오라이드를 사용함으로써 절단될 수 있다.

[0499] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 당 2' 위치, 당 3' 위치, 또는 당 2' 및 3' 위치에서 쇄 종결 모이어티(예를 들어, 차단 모이어티)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티는 3'-O-아지도 또는 3'-O-아지도메틸 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 쇄 종결 모이어티 아지드, 아지도 또는 아지도메틸 기는 포스핀 화합물을 사용함으로써 절단/제거될 수 있다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 유도체화된 트리-알킬 포스핀 모이어티 또는 유도체화된 트리-아릴 포스핀 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀 화합물은 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP) 또는 비스-설포 트리페닐 포스핀(BS-TPP) 또는 트리(하이드록시프로일)포스핀(THPP)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 절단제는 4-디메틸아미노피리딘(4-DMAP)을 포함한다.

[0500] 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 유닛은 3'-데옥시 뉴클레오타이드, 2',3'-디데옥시 뉴클레오타이드, 3'-메틸, 3'-아지도, 3'-아지도메틸, 3'-O-아지도알킬, 3'-O-에티닐, 3'-O-아미노알킬, 3'-O-플루오로알킬, 3'-플루오로메틸, 3'-디플루오로메틸, 3'-트리플루오로메틸, 3'-설포닐, 3'-말로닐, 3'-아미노, 3'-O-아미노, 3'-설프하이드랄, 3'-아미노메틸, 3'-에틸, 3'부틸, 3'-*tert* 부틸, 3'-플루오레닐메틸옥시카보닐, 3' *tert*-부틸옥시카보닐, 3'-O-알킬 하이드록실아미노 기, 3'-포스포로티오에이트 및 3-O-벤질, 또는 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 쇄 종결 모이어티를 포함한다.

[0501] 일부 실시양태에서, 다가 분자는 다수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함하고, 여기서 상기 뉴클레오타이드 아암은 스페이서, 링커 및 뉴클레오타이드 유닛을 포함하며, 여기서 상기 코어, 링커 및/또는 뉴클레오타이드 유닛은 검출 가능한 리포터 모이어티로 표지부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기를 검출하고 식별할 수 있게 하도록 상기 뉴클레오타이드 유닛의 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응할 수 있다.

[0502] 일부 실시양태에서, 다가 분자의 적어도 하나의 뉴클레오타이드 아암은 검출 가능한 리포터 모이어티에 부착된 뉴클레오타이드 유닛을 가진다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 뉴클레오타이드 염기에 부착된다. 일부 실시양태에서, 검출 가능한 리포터 모이어티는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자에 부착된 특정 검출 가능한 리포터 모이어티(예를 들어, 형광단)는 뉴클레오타이드 염기를 검출하고 식별할 수 있게 하도록 상기 뉴클레오타이드 유닛의 염기(예를 들어, dATP, dGTP, dCTP, dTTP 또는 dUTP)에 상응할 수 있다.

[0503] 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 아비딘 유사 또는 스트렙타비딘 유사 모이어티를 포함하고 코어 부착 모이어티는 바이오틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 아비딘 유사 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 스트렙타비딘 유사 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다가 분자의 코어는 바이오틴을 포함할 수 있는 코어 부착 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코어는 아비딘 단백질뿐만 아니라, 적어도 하나의 바이오틴 모이어티에 결합할 수 있는 아비딘의 임의의 유도체, 유사체 및 다른 비천연 형태도 포함하는 스트렙타비딘 유형 또는 아비딘 유형 모이어티를 포함한다. 아비딘 모이어티의 다른 형태는 천연 아비딘과 스트렙타비딘 및 재조합 아비딘과 스트렙타비딘뿐만 아니라, 유도체화된 분자, 예를 들어, 글리코실화되지 않은 아비딘 및 절두된 스트렙타비딘도 포함한다. 예를 들어, 아비딘 모이어티는 아비딘의 탈글리코실화된 형태, 스트렙토마이세스(예를 들어, 스트렙토마이세스 아비디니)에 의해 생성된 세균 스트렙타비딘뿐만 아니라, 유도체화된 형태, 예를 들어, N-아실 아비딘, 예를 들어, N-아세틸, N-프탈릴 및 N-석시닐 아비딘, 및 상업적으로 입수 가능한 제품 EXTRAVIDIN, CAPTAVIDIN, NEUTRAVIDIN 및 NEUTRALITE AVIDIN도 포함한다.

[0504] 일부 실시양태에서, 본원에 설명된 핵산 분자 시퀀싱 조성물들 중 임의의 조성물은 결합 복합체를 포함할 수 있으며, 여기서 결합 복합체는 (i) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 뉴클레오타이드를 포함하거나, 결합 복합체는 (ii) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 다가 분자의 뉴클레오타이드 유닛을 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 (i) 중합효소, 프라이머와 함

께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 (ii) 중합효소, 프라이머와 함께 이중체를 형성한 핵산 콘카티머 분자, 및 다가 분자의 뉴클레오타이드 유닛을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합 복합체는 약 0.1초, 0.2초, 0.3초, 0.4초, 0.5초, 0.6초, 0.7초, 0.8초, 0.9초 또는 1초보다 더 긴 지속 시간을 가진다. 결합 복합체는 약 0.1초 내지 0.25초 이상, 또는 약 0.25초 내지 0.5초, 또는 약 0.5초 내지 0.75초, 또는 약 0.75초 내지 1초, 또는 약 1초 내지 2초, 또는 약 2초 내지 3초, 또는 약 3초 내지 4초, 또는 약 4초 내지 5초의 지속 시간을 갖고/갖거나, 상기 방법은 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 35℃ 이상, 37℃ 이상, 42℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 또는 72℃ 이상, 또는 80℃ 이상의 온도, 또는 상기 온도들 중 임의의 온도에 의해 정의된 범위 내의 온도에서 수행되거나 수행될 수 있거나, 결합 복합체의 조합은 약 0.1초 내지 0.25초, 또는 0.25초 내지 0.5초, 또는 약 0.5초 내지 0.75초, 또는 약 0.75초 내지 1초, 또는 약 1초 내지 2초, 또는 약 2초 내지 3초, 또는 약 3초 내지 4초, 또는 약 4초 내지 5초보다 더 긴 지속시간을 가질 수 있고 상기 방법은 15℃ 이상, 20℃ 이상, 25℃ 이상, 35℃ 이상, 37℃ 이상, 42℃ 이상, 55℃ 이상, 60℃ 이상, 또는 72℃ 이상, 또는 80℃ 이상, 또는 상기 온도들 중 임의의 온도에 의해 정의된 범위 내의 온도에서 수행될 수 있다. 결합 복합체(예를 들어, 삼원 복합체)는 임의의 중합효소, 주형 분자, 프라이머 및/또는 뉴클레오타이드 유닛 또는 뉴클레오타이드 사이의 상호작용의 해리를 야기하는 조건에 노출될 때까지 안정적으로 유지된다. 예를 들어, 해리 조건은 결합 복합체를 세제, EDTA 및/또는 물 중 어느 하나 또는 이들의 임의의 조합과 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 결합 복합체가 검출 단계에서 20보다 더 큰 명암대비 대 노이즈 비를 보여주는 표면에 침착되거나, 부착되거나 하이브리드화되는 상기 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유닛이 주형 핵산의 다음 염기에 상보적일 때 결합 복합체를 안정화시키고, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유닛이 주형 핵산의 다음 염기에 상보적이지 않을 때 결합 복합체를 불안정화시키는 조건 하에서 접촉을 수행하는 상기 방법을 제공한다.

[0505] **결합력 복합체**

[0506] 본원에 개시된 조성물은 하나 이상의 결합력 복합체를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 조성물은 제1 핵산 프라이머, 제1 감지 중합효소 및 제1 다가 분자 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 제1 핵산 프라이머, 제1 시퀀싱 중합효소, 제1 다가 분자는 콘카티머 주형 분자의 제1 부분에 결합됨으로써, 제1 결합 복합체를 형성할 수 있으며, 여기서 제1 다가 분자의 제1뉴클레오타이드 유닛은 제1 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있다. 본원에 개시된 조성물은 제2 핵산 프라이머 및 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 제2 핵산 프라이머, 제2 중합효소 및 제1 다가 분자는 동일한 콘카티머 주형 분자의 제2 부분에 결합됨으로써, 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 유닛은 제2 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있고, 동일한 다가 분자를 포함할 수 있는 제1 결합 복합체와 제2 결합 복합체는 결합력 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자는 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자의 제1 뉴클레오타이드 유닛은 제1 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자의 제2 뉴클레오타이드 유닛은 제2 시퀀싱 중합효소에 결합할 수 있으며, 여기서 동일한 다가 분자를 포함할 수 있는 제1 결합 복합체와 제2 결합 복합체는 결합력 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 다가 분자는 복수의 뉴클레오타이드 아암에 부착된 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 뉴클레오타이드 아암은 뉴클레오타이드 유닛에 부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합은 제1 결합 복합체 및 제2 결합 복합체에서 제1 뉴클레오타이드 유닛 및 제2 뉴클레오타이드 유닛의 중합효소 촉진 혼입을 억제하기에 적합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 시퀀싱 중합효소는 본원에 기재된 임의의 야생형 또는 돌연변이체 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 시퀀싱 중합효소는 본원에 기재된 임의의 야생형 또는 돌연변이체 중합효소를 포함할 수 있다. 콘카티머 주형 분자는 관심 있는 서열의 탠덤 반복부 서열 및 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 제1 핵산 프라이머 및 제2 핵산 프라이머는 콘카티머 주형 분자를 따라 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 다가 분자는 도 7 내지 10에 제시되어 있다. 조성물은 콘카티머 핵산 콘카티머 분자의 상이한 부분과 함께 복수의 시퀀싱 중합효소 및 복수의 핵산 프라이머를 포함하여 동일한 콘카티머 주형 분자에서 적어도 제1 복합체화된 중합효소 및 제2 복합체화된 중합효소를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 다가 분자의 적어도 제1 뉴클레오타이드 유닛은 제1 복합체화된 중합효소에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 복합체화된 중합효소는 콘카티머 주형 분자의 제1 부분에 하이브리드화된 제1 프라이머를 포함함으로써, 제1 결합 복합체(예를 들어, 제1 삼원 복합체)를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일 다가 분자의 적어도 제2 뉴클레오타이드 유닛은 제2 복합체화된 중합효소에 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 복합체화된 중합효소는 콘카티머 주형 분자의 제2 부분에 하이브리드화된 제2 프라이머를 포함함으로써, 제2 결합 복합체(예를 들어, 제2 삼원 복합체)를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 동일한 다가 분자에 결합될 수

있는 제1 결합 복합체와 제2 결합 복합체는 결합력 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 조성물은 복수의 콘카티머 분자, 복수의 시퀀싱 중합효소 및 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제1 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 복합체화된 시퀀싱 중합효소는 핵산 이중체에 결합된 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 이중체는 가용성 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체는 형광단으로 표지부착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체는 당 3' 위치에서 제거 가능한 쇄 종결 모이어티를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체는 형광단으로 표지부착될 수 있고 당 3' 위치에서 제거 가능한 쇄 종결 모이어티를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 적어도 뉴클레오타이드 유사체를 복수의 가용성 시퀀싱 프라이머의 3' 말단에 혼입하여, 복수의 신생 연장된 시퀀싱 프라이머를 생성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혼입된 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체를 검출하는 단계도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 혼입된 적어도 하나의 뉴클레오타이드 유사체의 핵염기를 식별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0507] 본원에 개시된 조성물은 복수의 콘카티머 분자 및 복수의 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제1 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 시퀀싱 중합효소는 복수의 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 복합체화된 시퀀싱 중합효소는 핵산 이중체에 결합된 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 이중체는 가용성 시퀀싱 프라이머에 하이브리드화된 콘카티머 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 복수의 검출 가능하게 표지부착된 다가 분자 중 개별 다가 분자는 뉴클레오타이드 유닛에 부착된 코어를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 복합체화된 시퀀싱 중합효소는 핵산 이중체에 결합된 제2 시퀀싱 중합효소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 콘카티머 주형 분자는 관심 있는 서열의 탠덤 반복부 서열 및 적어도 하나의 범용 시퀀싱 프라이머 결합 부위를 포함한다. 복수의 핵산 프라이머는 콘카티머 주형 분자를 따라 시퀀싱 프라이머 결합 부위에 결합할 수 있다. 비제한적 예시 다가 분자는 도 7 내지 10에 제시되어 있다.

[0508] **시스템**

[0509] **컴퓨터 시스템**

[0510] 본 개시내용은 본 개시내용의 방법을 실행하도록 프로그래밍된 컴퓨터 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원은 본원에 개시된 컴퓨터 시스템을 이용하여 핵산 처리 및/또는 분석을 수행하는 컴퓨터 구현 방법을 개시한다. 도 26은 본원에 개시된 방법과 시스템을 실행하도록 프로그래밍되어 있거나 달리 구성되어 있는 컴퓨터 시스템(2601)을 보여준다. 컴퓨터 시스템(2601)은 본 개시내용의 다양한 측면을 조절할 수 있다. 컴퓨터 시스템(2601)은 사용자의 전자 장치, 또는 이 전자 장치에 대해 원격으로 위치된 컴퓨터 시스템일 수 있다. 전자 장치는 모바일 전자 장치일 수 있다.

[0511] 컴퓨터 시스템(2601)은 단일 코어 또는 다중 코어 프로세서, 또는 병렬식 처리를 위한 복수의 프로세서일 수 있는 중앙 처리 유닛(CPU, 본원에서 "프로세서" 및 "컴퓨터 프로세서"로서도 지칭됨)(2605)을 포함한다. 컴퓨터 시스템(2601)은 메모리 또는 메모리 위치(2610)(예를 들어, 랜덤 액세스 메모리, 읽기 전용 메모리, 플래쉬 메모리), 전자 저장 유닛(2615)(예를 들어, 하드 디스크), 하나 이상의 다른 시스템과 통신하기 위한 통신 인터페이스(2620)(예를 들어, 네트워크 어댑터), 및 주변 장치(2625), 예컨대, 캐시, 다른 메모리, 데이터 저장 및/또는 전자 디스플레이 어댑터도 포함한다. 메모리(2610), 저장 유닛(2615), 인터페이스(2620) 및 주변 장치(2625)는 통신 버스(실선), 예컨대, 마더보드를 통해 CPU(2605)와 통신한다. 저장 유닛(2615)은 데이터를 저장하기 위한 데이터 저장 유닛(또는 데이터 저장소)일 수 있다. 컴퓨터 시스템(2601)은 통신 인터페이스(2620)의 도움을 받아 컴퓨터 네트워크("네트워크")(2630)에 작동 가능하게 커플링될 수 있다. 네트워크(2630)는 인터넷, 인터넷 및/또는 엑스트라넷, 또는 인터넷과 통신하는 인트라넷 및/또는 엑스트라넷일 수 있다. 일부 실시양태에서, 네트워크(2630)는 전기통신 및/또는 데이터 네트워크이다. 네트워크(2630)는 분산된 컴퓨팅, 예컨대, 클라우드 컴퓨팅을 가능하게 할 수 있는 하나 이상의 컴퓨터 서버를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 네트워크(2630)는 컴퓨터 시스템(2601)의 도움을 받아 컴퓨터 시스템(2601)에 커플링된 장치가 고객 또는 서버로서 행동할 수 있게 하는 피어-투-피어(peer-to-peer) 네트워크를 실행할 수 있다.

[0512] CPU(2605)는 프로그램 또는 소프트웨어로 구현될 수 있는 기계 판독 가능한 명령어 시퀀스를 실행할 수 있다.

상기 명령어는 메모리 위치, 예컨대, 메모리(2610)에 저장될 수 있다. 상기 명령어는 CPU(2605)로 향할 수 있고, 그 후 본 개시내용의 방법을 실행하도록 CPU(2605)를 프로그래밍할 수 있거나 달리 구성할 수 있다. CPU(2605)에 의해 수행되는 작업의 예는 페치, 해독, 실행 및 다시 쓰기를 포함할 수 있다.

[0513] CPU(2605)는 회로, 예컨대, 집적 회로의 일부일 수 있다. 시스템(2601)의 하나 이상의 다른 구성요소가 회로에 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 회로는 애플리케이션 특정 집적 회로(ASIC)이다.

[0514] 저장 유닛(2615)은 파일, 예컨대, 드라이버, 라이브러리 및 저장된 프로그램을 저장할 수 있다. 저장 유닛(2615)은 사용자 데이터, 예를 들어, 사용자 환경설정 및 사용자 프로그램을 저장할 수 있다. 일부 실시양태에서, 컴퓨터 시스템(2601)은 컴퓨터 시스템(2601)의 외부에 있는, 예컨대, 인트라넷 또는 인터넷을 통해 컴퓨터 시스템(2601)과 통신하는 원격 서버 상에 위치하는 하나 이상의 추가 데이터 저장 유닛을 포함할 수 있다.

[0515] 컴퓨터 시스템(2601)은 네트워크(2630)를 통해 하나 이상의 원격 컴퓨터 시스템과 통신할 수 있다. 예를 들어, 컴퓨터 시스템(2601)은 사용자의 원격 컴퓨터 시스템과 통신할 수 있다. 원격 컴퓨터 시스템의 예는 개인용 컴퓨터(예를 들어, 휴대용 PC), 슬레이트 또는 태블릿 PC(예를 들어, Apple® iPad, Samsung® Galaxy Tab), 전화기, 스마트폰(예를 들어, Apple® iPhone, 안드로이드(Android) 이용 가능한 장치, Blackberry®), 또는 개인용 디지털 단말기를 포함한다. 사용자는 네트워크(2630)를 통해 컴퓨터 시스템(2601)에 접속할 수 있다.

[0516] 본원에 기재된 방법은 컴퓨터 시스템(2601)의 전자 저장 위치, 예를 들어, 메모리(2610) 또는 전자 저장 유닛(2615)에 저장된 기계(예를 들어, 컴퓨터 프로세서) 실행 가능한 코드에 의해 구현될 수 있다. 기계 실행 가능한 또는 기계 판독 가능한 코드는 소프트웨어의 형태로 제공될 수 있다. 사용 동안, 코드는 프로세서(2605)에 의해 실행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 코드는 저장 유닛(2615)으로부터 검색될 수 있고 프로세서(2605)에 의한 용이한 접속을 위해 메모리(2610)에 저장될 수 있다. 일부 경우, 전자 저장 유닛(2615)은 배제될 수 있고, 기계 실행 가능한 명령어는 메모리(2610)에 저장된다.

[0517] 코드는 프리-컴파일링될 수 있고 이 코드를 실행하기에 알맞은 프로세서를 가진 기계와 함께 사용되도록 구성될 수 있거나, 실행시간 동안 컴파일링될 수 있다. 코드는 코드가 프리-컴파일링된 또는 에즈-컴파일링된 방식으로 실행될 수 있게 하도록 선택될 수 있는 프로그래밍 언어로 공급될 수 있다.

[0518] 본원에 제공된 시스템 및 방법의 측면, 예컨대, 컴퓨터 시스템(2601)은 프로그래밍으로 구현될 수 있다. 기술의 다양한 측면은 전형적으로 일종의 기계 판독 가능한 매체에 담지되거나 구현되는 기계(또는 프로세서) 실행 가능한 코드 및/또는 관련 데이터 형태의 "제품" 또는 "물품"으로서 간주될 수 있다. 기계 실행 가능한 코드는 전자 저장 유닛, 예컨대, 메모리(예를 들어, 읽기 전용 메모리, 랜덤 액세스 메모리, 플래시 메모리) 또는 하드 디스크에 저장될 수 있다. "저장" 유형의 매체는 소프트웨어 프로그래밍을 위해 임의의 시간에 비일시적 저장을 제공할 수 있는, 컴퓨터, 프로세서 등 또는 이의 관련 모듈의 임의의 또는 모든 유형 메모리, 예컨대, 다양한 반도체 메모리, 테이프 드라이브, 디스크 드라이브 등을 포함할 수 있다. 소프트웨어의 전부 또는 일부는 종종 인터넷 또는 다양한 다른 전기통신 네트워크를 통해 통신될 수 있다. 이러한 통신은, 예를 들어, 소프트웨어가 한 컴퓨터 또는 프로세서로부터 또 다른 컴퓨터 또는 프로세서로, 예를 들어, 관리 서버 또는 호스트 컴퓨터로부터 애플리케이션 서버의 컴퓨터 플랫폼으로 로딩될 수 있게 한다. 따라서, 소프트웨어 요소를 가질 수 있는 또 다른 유형의 매체는 광학파, 전기파 및 전자기파, 예컨대, 근거리 장치들 사이의 물리적 인터페이스 전체에 걸쳐, 유선 및 광학 일반전화 네트워크를 통해, 그리고 다양한 에어-링크들 상에서 사용되는 광학파, 전기파 및 전자기파를 포함한다. 이러한 파를 전달하는 물리적 요소, 예컨대, 유선 또는 무선 링크, 광학 링크 등도 소프트웨어를 보유하는 매체로서 간주될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 비일시적 유형 "저장" 매체로 제한되지 않는 한, 컴퓨터 또는 기계 "판독 가능한 매체"와 같은 용어는 실행을 위해 명령어를 프로세서에게 제공하는 데 참여하는 임의의 매체를 지칭한다.

[0519] 따라서, 기계 판독 가능한 매체, 예컨대, 컴퓨터 실행 가능한 코드는 유형 저장 매체, 반송파 매체 또는 물리적 전송 매체를 포함하나 이들로 제한되지 않는 많은 형태를 취할 수 있다. 비소멸성 저장 매체는 예를 들어, 광학 또는 자기 디스크, 예컨대, 임의의 컴퓨터(들) 내의 임의의 저장 장치 등, 예컨대, 도면에 표시된 데이터베이스 등을 실행하는 데 이용될 수 있는 저장 장치를 포함한다. 소멸성 저장 매체는 동적 메모리, 예컨대, 이러한 컴퓨터 플랫폼의 주 메모리를 포함한다. 유형 전송 매체는 동축 케이블; 컴퓨터 시스템 내의 버스를 포함하는 와이어를 비롯한 구리 와이어 및 광섬유를 포함한다. 반송파 전송 매체는 전기 또는 전자기 신호, 또는 음향파 또는 광파, 예컨대, 라디오 주파수(RF) 및 적외선(IR) 데이터 통신 동안 생성된 음향파 또는 광파의 형태를 취할 수 있다. 따라서, 컴퓨터 판독 가능한 매체의 일반 형태는 예를 들어, 플로피 디스크, 플렉서블(flexible) 디스크, 하드 디스크, 자기 테이프, 임의의 다른 자기 매체, CD-ROM, DVD 또는 DVD-ROM, 임의의 다른 광학 매체, 펀

치 카드 페이퍼 테이프, 홀의 패턴을 가진 임의의 다른 물리적 저장 매체, RAM, ROM, PROM 및 EPROM, FLASH-EPROM, 임의의 다른 메모리 칩 또는 카트리지, 반송파 수송 데이터 또는 명령어, 이러한 반송파를 수송하는 케이블 또는 링크, 또는 컴퓨터가 프로그래밍 코드 및/또는 데이터를 판독할 수 있는 임의의 다른 매체를 포함한다. 이러한 형태의 컴퓨터 판독 가능한 매체들 중 대다수의 매체들은 실행을 위해 하나 이상의 명령어의 하나 이상의 시퀀스를 프로세서에게 전달하는 데 관여할 수 있다.

[0520] 컴퓨터 시스템(2601)은 예를 들어, 핵산, 예를 들어, 서열의 특성에 대한 정보를 제공하기 위해 사용자 인터페이스(UI)(2640)를 포함하는 전자 디스플레이(2635)를 포함할 수 있거나 이러한 디스플레이와 통신할 수 있다. UI의 예는 그래픽 사용자 인터페이스(GUI) 및 웹 기반 사용자 인터페이스를 포함하나 이들로 제한되지 않는다.

[0521] 본 개시내용의 방법 및 시스템은 하나 이상의 알고리즘에 의해 구현될 수 있다. 알고리즘은 중앙 처리 유닛(2605)에 의한 실행 시 소프트웨어에 의해 구현될 수 있다. 예를 들어, 알고리즘은 본원에 개시된 바와 같은 핵산 처리 방법을 수행할 수 있거나 분석할 수 있다.

[0522] **광학 시스템**

[0523] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 핵산의 서열을 검출하는 광학 시스템을 제공한다. 본원에 개시된 시스템은 핵산의 제자리 시퀀싱을 수행하는 데 사용될 수 있다. 생물학적 샘플은 예를 들어, 세포 샘플일 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 본원에 개시된 광학 시스템은 핵산의 이미지화, 예를 들어, 고성능 형광 이미지화에 사용될 수 있다. 본원에 개시된 광학 시스템은 조명 및 이미지화 모듈을 포함할 수 있다. 조명 및 이미지화 모듈은 다중채널 형광 이미지화에 사용될 수 있다. 조명 및 이미지화 모듈은 대물 렌즈, 조명원, 복수의 검출 채널, 및 이색성 반사기 또는 빔 분할기를 포함하는 이색성 필터, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 광학 시스템은 자동초점 레이저를 포함할 수 있는 자동초점 시스템을 포함할 수 있고, 예를 들어, 스팟을 투사하는 자동초점 레이저가 일부 설계에 포함될 수 있고, 이 스팟의 크기는 이미지화 시스템이 초점에 맞는 때를 확인하기 위해 모니터링된다. 본원에 개시된 조명 및 이미지화 모듈의 하나 이상의 구성요소는 기저판에 커플링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 광학 시스템은 전문이 본원에 참고로 포함되는 미국 공개 제US2022-0136047호 및 PCT 공개 제PCT/US2022/37831호에 제공된다.

[0524] **핵산 처리 시스템**

[0525] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 핵산의 서열을 검출하는 시스템을 제공한다. 본원에 개시된 시스템은 핵산의 제자리 시퀀싱을 수행하는 데 사용될 수 있다. 생물학적 샘플은 예를 들어, 세포 샘플일 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다.

[0526] 시스템은 본원에 개시된 조성물을 포함할 수 있다. 조성물은 역전사효소를 포함할 수 있다. 조성물은 패드락 프로브를 포함할 수 있다. 조성물은 단백질 결합 조성물, 예를 들어, 항체-올리고뉴클레오타이드 접합체를 포함할 수 있다. 조성물은 서열 중합효소를 포함할 수 있다. 조성물은 뉴클레오타이드, 예를 들어, 쇄 종결 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 조성물은 다가 분자를 포함할 수 있다. 조성물은 결합력 복합체를 포함할 수 있다.

[0527] 본 개시내용은 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 제자리에서 검출하는 시스템을 제공하며, 여기서 상기 적어도 2개의 표적 핵산 서열은 제1 표적 핵산 서열과 제2 표적 핵산 서열을 포함한다. 상기 시스템은 제1 핵산 분자와 제2 핵산 분자를 포함하는 생물학적 샘플을 포함할 수 있고, 여기서 제1 핵산 분자는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분을 포함하고, 제2 핵산 분자는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분을 포함한다. 시스템은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 여기서 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제1 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내에서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함한다. 시스템은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 역상보체, 또는 이의 부분의 두 인접 분절에 상보적이고 결합하므로, 제2 올리고뉴클레오타이드는 생물학적 샘플 내에서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드를 형성하고, 여기서 제2 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 포함한다.

[0528] 일부 실시양태에서, 제1 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하도록 구성된 제1 핵산 효소를 추가로 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드는 제2 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결하도록 구성된 제2 핵산 효소를 추가로 포함한다. 일부 실

시양태에서, 제1 핵산 효소와 제2 핵산 효소는 핵산 리가제, 핵산 라이게이션 효소, 핵산 중합효소, 핵산 중합효소 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 제1 원형 올리고뉴클레오타이드의 제1 앰플리콘 및 제2 원형 올리고뉴클레오타이드의 제2 앰플리콘을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 앰플리콘은 제1 콘카티머를 포함하고/하거나, 제2 앰플리콘은 제2 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제1 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함하고/하거나; 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 표적 핵산 서열을 식별하는 제1 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함하고, 제2 콘카티머는 제2 표적 핵산 서열을 식별하는 제2 식별 서열, 또는 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 콘카티머는 제1 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제1 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제1 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절과 제1 콘카티머의 제1 부분의 결합, 및/또는제1 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절과 제1 콘카티머의 제2 부분의 결합은 제1 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제2 콘카티머는 제2 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제2 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제2 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절과 제2 콘카티머의 제1 부분의 결합, 및/또는 제2 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절과 제2 콘카티머의 제2 부분의 결합은 제2 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 중합효소, 복수의 뉴클레오타이드, 및 제1 콘카티머 또는 제2 콘카티머의 적어도 일부에 상보적인 프라이머 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 복수의 뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드로부터 차단기를 제거하고 뉴클레오타이드의 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하도록 구성된 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 복수의 뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 뉴클레오타이드 접합체는 2개 이상의 중합효소, 뉴클레오타이드 접합체 및 적어도 2개의 표적 핵산 서열을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오타이드 접합체는 표지 및 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함하고, 이 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티는 적어도 2개의 표적 핵산 서열 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 제1 짧은 핵산, 및 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제1 결합 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 짧은 핵산은 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제1 결합 모이어티를 통해 생물학적 샘플에서 제1 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제1 결합 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 제1 태그 서열 및 제2 태그 서열은 핵산 서열 반응에서 제1 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 짧은 핵산, 및 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 제2 결합 모이어티를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함하고, 여기서 제2 짧은 핵산은 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오타이드 접합체는 제2 결합 모이어티를 통해 생물학적 샘플에서 제2 표적 폴리펩티드에 특이적으로 결합하여 제2 결합 복합체를 형성하고, 여기서 제3 태그 서열 및 제4 태그 서열은 핵산 서열 반응에서 제2 결합 모이어티를 식별한다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 결합 모이어티는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제1 올리고뉴클레오타이드 접합체의 제1 태그 서열과 제2 태그 서열

에 상보적이고 결합하므로, 제3 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 포함하는 제4 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분은 제3 태그 서열과 제4 태그 서열에 상보적이고 결합하므로, 제4 올리고뉴클레오타이드는 제1 말단 부분과 제2 말단 부분 사이에 갭을 가진 원형 구조를 형성한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제3 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 생성된 제3 원형 올리고뉴클레오타이드, 및 제4 올리고뉴클레오타이드의 제1 말단 부분과 제2 말단 부분을 연결함으로써 생성된 제4 원형 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하고, 여기서 제1 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제3 원형 올리고뉴클레오타이드는 제1 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제2 원형 올리고뉴클레오타이드 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드는 제2 시퀀싱 프라이머 또는 이의 역상보체를 포함하고, 제1 시퀀싱 프라이머와 제2 시퀀싱 프라이머의 서열은 적어도 하나의 뉴클레오타이드 차이를 갖고, 상기 연결은 제1 또는 제2 핵산 효소에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제3 원형 올리고뉴클레오타이드의 제3 앰플리콘 및 제4 원형 올리고뉴클레오타이드의 제4 앰플리콘을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 앰플리콘은 제3 콘카티머를 포함하고/하거나, 제4 앰플리콘은 제4 콘카티머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머는 제3 원형 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제3 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머는 제4 원형 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 부분, 또는 이의 역상보체 또는 이의 부분을 포함하는 제2 유닛 핵산 서열의 적어도 2개의 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머는 제1 결합 모이어티를 식별하는 제1 또는 제2 태그 서열 또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머는 제2 결합 모이어티를 식별하는 제3 또는 제4 태그 서열 또는 이의 역상보체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 콘카티머는 제3 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제3 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제3 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절과 제3 콘카티머의 제1 부분의 결합, 및/또는 제3 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절과 제3 콘카티머의 제2 부분의 결합은 제3 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 제4 콘카티머는 제4 압축 올리고뉴클레오타이드를 추가로 포함하며, 여기서 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절은 제4 콘카티머의 제1 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절은 제4 콘카티머의 제2 부분에 상보적이고 결합한다. 일부 실시양태에서, 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제1 분절과 제4 콘카티머의 제1 부분의 결합, 및/또는 제4 압축 올리고뉴클레오타이드의 제2 분절과 제4 콘카티머의 제2 부분의 결합은 제4 콘카티머의 크기 감소 또는 모양 변화를 유발한다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 중합효소, 제2 복수의 뉴클레오타이드, 및 제2 프라이머 서열을 추가로 포함하고, 이 프라이머 서열은 제2 프라이머 서열에 하이브리드화된 제3 콘카티머, 제2 중합효소, 및 제3 또는 제4 콘카티머의 뉴클레오타이드에 상보적이고 결합하는 제2 복수의 뉴클레오타이드 중 제2 뉴클레오타이드를 포함하는 결합 복합체를 형성하기에 충분한 조건 하에서 제3 콘카티머 또는 제4 콘카티머의 적어도 일부에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 제2 복수의 뉴클레오타이드 중 제2 뉴클레오타이드로부터 제2 차단기를 제거하고 제2 뉴클레오타이드의 당 모이어티에서 3' OH 기를 생성하도록 구성된 제2 작용제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 차단기는 알킬 기, 알케닐 기, 알키닐 기, 알릴 기, 아릴 기, 벤질 기, 아지드 기, 아지도 기, O-아지도메틸 기, 아민 기, 아미드 기, 케토 기, 이소시아네이트 기, 포스페이트 기, 티올 기, 디설파이드 기, 카보네이트 기, 우레아 기 또는 실릴 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드는 제2 형광 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 2개의 동일한 유형의 뉴클레오타이드로 구성되고, 여기서 동일한 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드는 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 적어도 두 유형의 뉴클레오타이드는 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 및 dUTP를 포함하는 군으로부터 선택되고, 여기서 상기 군의 한 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지는 상기 군의 또 다른 유형의 뉴클레오타이드의 제2 형광 표지로부터 방출된 빛의 파장과 상이한 파장에서 빛을 방출한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 제2 뉴클레오타이드 접합체는 2개 이상의 제2 중합효소, 제2 복수의 뉴클레오타이드 접합체 중 제2 뉴클레오타이드 접합체, 및 적어도 2개의 제1 짧은 핵산 또는 짧은 핵산 또는 이의 부분을 포함하는 다가 결합 복합체를 형성하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 제2 뉴클레오타이드 접합체는 표지, 및 적어도 2개의 제1 짧은 핵산 또는 짧은 핵산 또는 이의 부분 각각의 뉴클레오타이드에 각각 상보적이고 결합하는 적어도 2개의 뉴클레오타이드 모이어티를 포함한다. 일부

실시양태에서, 시스템은 고체 표면에 고착된 생물학적 샘플을 포함하는 고체 표면도 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 투과 가능해진다. 일부 실시양태에서, 고체 표면은 그에 커플링된 친수성 중합체 코팅 층을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 친수성 중합체 코팅 층은 50도 미만의 물 접촉각을 가진다. 일부 실시양태에서, 상기 시스템은 고체 표면에 커플링된 생물학적 샘플을 이미지화하여 생물학적 샘플에서 적어도 2개의 표적 핵산 서열 및/또는 적어도 2개의 표적 폴리펩티드를 제자리에서 검출하도록 구성된 광학 이미지화 모듈을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 표적 폴리펩티드는 제1 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩되고 제2 표적 폴리펩티드는 제2 표적 핵산 분자 또는 이의 역상보체에 의해 인코딩된다.

[0529] **유동 셀**

[0530] 본원에 설명된 시스템들 중 임의의 시스템에서, 세포 샘플은 고체 지지체(유동 셀)에 침착될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 벽(예를 들어, 상부 또는 제1 벽, 및 하부 또는 제2 벽) 및 그 사이의 갭을 가진 유동 셀에 침착되고, 여기서 상기 갭은 유체로 채워질 수 있으며, 상기 유동 셀은 형광 광학 이미지화 시스템에 위치된다. 세포 샘플은 전통적 이미지화 시스템을 이용할 때 유동 셀의 제1 표면과 제2 표면에서 따로 초점을 맞추기 위해 이미지화 시스템을 사용할 것을 요구할 수 있는 두께를 가진다. 세포 샘플에서 콘카티머의 시퀀싱 반응의 개선된 이미지화를 위해, 유동 셀을 고성능 형광 이미지화 시스템에 위치시킬 수 있으며, 이 시스템은 2개 이상의 형광 파장에서 유동 셀의 제1 표면 및 제2 표면에 대한 최적 이미지화 성능을 제공하도록 설계된 2개 이상의 튜브 렌즈를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고성능 이미지화 시스템은 유동 셀의 제1 표면 및 제2 표면의 이미지를 획득하는 사이에 광학 시스템의 초점을 다시 맞추도록 구성된 초점맞춤 기작을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 고성능 이미지화 시스템은 제1 유동 셀 표면 또는 제2 유동 셀 표면 중 적어도 하나에서 2개 이상의 시야를 이미지화하도록 구성된다.

[0531] **지지체 및 코팅**

[0532] 본원에 설명된 시스템들 중 임의의 시스템에서, 고체 지지체는 세포 부착을 촉진하는 코팅을 가진 유동 셀을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유동 셀은 평면 또는 비평면 지지체일 수 있는 지지체를 포함한다. 지지체는 고체 또는 반고체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 다공성, 반다공성 또는 비다공성일 수 있다. 지지체는 유리, 플라스틱 또는 중합체 재료와 같은 임의의 재료로 만들어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체의 표면은 지지체 상에서 부동태화된 층을 생성하기 위해 하나 이상의 화합물로 코팅될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부동태화된 층은 다공성 또는 반다공성 층을 형성한다. 일부 실시양태에서, 지지체는 라이신 화합물, 폴리-라이신 화합물, 아르기닌 화합물 또는 아미노-종결 화합물로 코팅된다. 지지체는 비분지형 화합물, 분지형 화합물, 또는 비분지형 화합물과 분지형 화합물의 혼합물로 코팅될 수 있다. 일부 실시양태에서, 지지체는 세포 샘플로부터 핵산을 포획하기 위해 표면 프라이머로 코팅된다. 대안적으로, 지지체는 표면 프라이머를 결여한다.

[0533] **자동화된 모드**

[0534] 본원에 설명된 시스템들 중 임의의 시스템에서, 세포 시딩, 세포 고정, 세포 투과 가능화, 역전사 반응, 패드락 프로브 하이브리드화, 패드락 프로브 라이게이션 반응, 롤링 서클 증폭 및 시퀀싱을 포함하는, 제자리 반복적 짧은 리드 시퀀싱을 수행하기 위한 단계들의 임의의 조합을, 유체 분배 시스템을 사용하여 자동화된 모드로 수행할 수 있다.

[0535] 본 개시내용은 유동 셀에서 세포 샘플을 성장/배양하고 유동 셀에서 배양된 세포 샘플의 핵산 워크플로우를 수행하는 시스템을 제공한다.

[0536] 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 유동 셀에 침착된다. 유동 셀은 유동 셀에의 세포 부착을 촉진하는 시약으로 코팅될 수 있다. 세포 샘플이 부착되어 있는 유동 셀은, 자동화된 유체 분배 시스템에 유체적으로 연결되고 형광 현미경 상에서 구성되어 있는 유동 셀 홀더/크래들을 가진 시퀀싱 장치에 배치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시퀀싱 장치는 적어도 하나의 유체 전달 장치, 적어도 하나의 유체 장치(예를 들어, 마이크로유체 장치), 적어도 하나의 이미지화 장치 및/또는 적어도 하나의 센서로 구성되어, 시퀀싱 반응으로부터 신호를 검출할 수 있다.

[0537] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 단순 또는 복합 세포 배양 배지를 유동 셀 상의 세포 샘플에게 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 유동 셀에서 2세대 내지 10세대 이상 동안 배양/확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 샘플은 밀집도 또는 비-밀집도까지 확장될 수 있다.

[0538] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 고정 시약을 유동 셀 상의 확장된 세포 샘플에게 전달하는 데

사용될 수 있으며, 세포 샘플은 세포 고정에 적합한 조건 하에서 인큐베이션될 수 있다.

[0539] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 투과 가능화 시약을 유동 셀 상의 고정된 세포 샘플에게 전달하는 데 사용될 수 있으며, 세포 샘플은 세포 투과 가능화에 적합한 조건 하에서 인큐베이션될 수 있다.

[0540] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 cDNA를 생성하기에 적합한 조건 하에서, 고정되고 투과 가능해진 세포 샘플 내부에서 RNA의 역전사를 수행하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0541] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 공유 폐쇄된 원형 패드락 프로브를 생성하기에 적합한 조건 하에서 패드락 프로브 하이브리드화, 원형화 및 라이게이션을 수행하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0542] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 콘카티머 분자를 생성하기에 적합한 조건 하에서 롤링 서클 증폭을 수행하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0543] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머 분자의 시퀀싱 주기를 수행하기 위한 시퀀싱 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 주기 시간은 30분 미만에 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시야(FOV)는 1 mm^2를 초과할 수 있고, 큰 면적(>10 mm^2)을 스캐닝하기 위한 주기 시간은 5분 미만일 수 있다.

[0544] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 콘카티머 분자로부터 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거하고 콘카티머 분자를 유지하기 위한 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0545] 일부 실시양태에서, 자동화된 유체 분배 시스템은 세포 샘플 내부에서 또 다른 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하기에 적합한 조건 하에서 콘카티머 분자의 시퀀싱 주기를 수행하기 위한 시퀀싱 시약을 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 개별 주기 시간은 30분 미만에 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시야(FOV)는 1 mm^2를 초과할 수 있고, 큰 면적(>10 mm^2)을 스캐닝하기 위한 주기 시간은 5분 미만일 수 있다.

[0546] **실시예**

[0547] 다음 실시예는 예시하기 위한 것이고 본 개시내용의 실시양태를 더 잘 이해하는 데 사용될 수 있으며 어떤 방식으로든 본 교시의 범위를 제한하는 것으로서 해석되어서는 안 된다.

[0548] **실시예 1: 반복적 제자리 시퀀싱**

[0549] **코팅된 유동 셀의 준비**

[0550] 유리 2-레인 유동 셀을 폴리-L-라이신(예를 들어, 물에서 0.01% w/v)으로 약 2분 내지 30분 동안 세척하여 유동 셀을 코팅하였다. 코팅된 유동 셀을 세포 시딩 전에 세포 배양 배지로 헹구었다. 폴리-라이신 코팅은 범용 포획 프라이머 서열을 가진 핵산에 하이브리드화할 수 있는 포획 프라이머를 결여하였다.

[0551] **코팅된 유동 셀에서의 세포 시딩 및 배양**

[0552] 신선한 세포 배양 배지 중의 인간 배아 신장 293 세포(HEK 293 세포)를 코팅된 유동 셀에 시딩하였다. 세포 배양 배지는 D-MEM 높은 글루코스(써모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 11965118), 태아 소 혈청(10% FBS; 써모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 A3160402), MEM 비-필수 아미노산(0.1 mM MEM, 써모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 11140050), L-글루타민(6 mM L-글루타민, 써모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 A2916801), MEM 피루브산나트륨(1 mM 피루브산나트륨, 써모 피셔 사이언티픽, 카탈로그 번호 11360070), 및 항생제(1% 페니실린-스트렙토마이신-글루타민, 써모 피셔, 카탈로그 번호 10378016)를 포함하였다. 시딩된 세포를 공기 중의 대략 5% 내지 10% 이산화탄소의 가습된 대기와 함께 37℃에서 2일 동안 배양하였다. 세포를 유동 셀에서 전체 세포로서 유지하였고 파라핀에 포매하지 않았거나 슬라이싱하지 않았다.

[0553] **세포 고정 및 투과 가능화**

[0554] 세포를 DPBS로 세척한 다음, 실온에서 약 30분 동안 PBS와 물에서 4% 파라포름알데하이드로 고정하였다. 세포를 PBS로 두 번 세척하였다.

[0555] 고정된 세포를 실온에서 약 30분 동안 70% 에탄올로 투과 가능하게 만든 후, PBS로 세척하였다. 고정되고 투과

가능해진 세포를 전체로서 유지하였고 슬라이스로 박편화하지 않았다. HEK 293은 형질전환 세포가 아니었다.

[0556] **역전사**

[0557] 20 ㎕의 역전사 시약을 유동 셀의 각 레인에 유동시켰다. 역전사 시약은 84 ㎕ RevertAid 역전사 완충제(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 EP0441), 1.0.5 ㎕ dNTP, 4.2 ㎕ BSA, 4.2 ㎕ 역전사 프라이머, 16.8 ㎕ RiboLock RNase 억제제(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 EO0381), 10.08 ㎕ RevertAid H-마이너스(Thermo Fisher Scientific, 카탈로그 번호 EP0451) 및 290.22 ㎕ 물을 포함하였다. 상기 유동 셀을 파라필름으로 밀봉한 보습 접시에 넣고, 이 접시를 약 16시간 동안 37℃ 인큐베이터에 넣어두었다. 세포를 PBS-T(Tween-20을 함유하는 PBS)로 5번 세척하여 세포를 다시 고정한 다음, 실온에서 약 30분 동안 후-고정 시약으로 처리하였다. 후-고정 시약은 PBS에 3% 파라포름알데하이드와 0.1% 글루타르알데하이드를 포함하였다. 세포를 PBS-T로 5회 세척하였다.

[0558] 역전사 프라이머는 하우스킵핑 유전자인 인간 GAPDH(글리세르알데하이드-3-포스페이트 데하이드로게나제)로부터 전사된 RNA에 선택적으로 하이브리드화하도록 설계되었다. 인간 GAPDH에 대한 cDNA 프라이머의 서열은 5'-CAGAGAGCGAAGCGGGAGGCTGCGGGCTCAATTTATAGAA-3'(서열번호 1)이다.

[0559] **패드락 프로브 원형화**

[0560] PBS-T를, 28 ㎕ AmpLigase 완충제(예를 들어, Lucigen, 카탈로그 번호 A1905B), 22.4 ㎕ RNase H(예를 들어, New England Biolabs, 카탈로그 번호 M0297S), 2.8 ㎕ BSA, 0.7 ㎕ 패드락 프로브, 28 ㎕ AmpLigase(예를 들어, Lucigen, 카탈로그 번호 A0110K) 및 198.1 ㎕ 물을 포함하는 100 ㎕의 패드락 프로브 시약으로 교체하였다. 유동 셀을 약 10분 동안 37℃에서 인큐베이션한 후, 약 90분 동안 45℃에서 인큐베이션하였다. 유동 셀을 PBS-T로 두 번 세척하였다.

[0561] 첫 번째 실험의 경우, GAPDH 패드락 프로브의 서열은 5' [P]-GCCTCCCGCTTCGCTCTCTGCATGTAATGCACGTACTTTCAGGTATGTCGG AAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACTGGAGAATGTTCTATAAATTGAGCCC GCA-3'(서열번호 2)이었다(도 1도 참조). 이 패드락 프로브는 5'-CATGTAATGCACGTACTTTCAGGT-3'(서열번호 3)인 압축 올리고뉴클레오타이드에 대한 범용 결합 부위를 가졌다. 이 패드락 프로브는 RCA 프라이머 및 5'-ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT-3'(서열번호 4)인 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 부위도 가졌다. 이 패드락 프로브는 5'-GGAGAATG-3'(서열번호 5)인 표적 바코드 서열도 가졌다.

[0562] 두 번째 실험의 경우, 또 다른 GAPDH 패드락 프로브의 서열은 5' [P]-CAGCCGCATCTTCTTTTGCGTCCTCTATGATTACTGACTGCGTCTATTTAGT GGAGCCXXXXXXXXXXXXCTTTTGCTCCTCCTGTTCGACAGT(서열번호 6)이었고, 여기서 11-머 'X' 서열(밑줄로 표시된 서열)은 GAPDH 전사체에 상응하는 표적 바코드 서열을 나타낸다. 이 패드락 프로브는 RCA 프라이머 및 5'-TCCTCTATGATTACTGACTGCGTCTA TTTAGTGGAGCC-3'(서열번호 7)인 시퀀싱 프라이머에 대한 범용 결합 부위를 가졌다. 이 패드락 프로브 세트는 표적 바코드 1: GCTACTATCTT(서열번호 8); 표적 바코드 2: TTAGTAGATAA(서열번호 9); 표적 바코드 3: CACCAGCGAGG(서열번호 10); 및 표적 바코드 4: AGGTGCTCGCC(서열번호 11)를 포함하는 4개의 상이한 표적 바코드 서열들 중 하나를 포함하도록 설계되었다. 두 패드락 프로브는 범용 포획 프라이머 서열을 결여하였다.

[0563] 첫 번째 실험의 경우, cDNA는 GAPDH cDNA의 길이를 따라 상이한 영역에 하이브리드화할 수 있는 상이한 GAPDH 특이적 패드락 프로브 세트에 어닐링되기보다는 오히려, (앞에서 설명된 바와 같이) GAPDH에 특이적인 한 유형의 패드락 프로브에 어닐링되었다. 두 번째 실험의 경우, cDNA는 4개의 상이한 패드락 프로브 세트에 어닐링되었으며, 여기서 각각의 프로브는 상이한 표적 바코드 서열을 갖지만, 왼쪽 패드락 아암과 오른쪽 패드락 아암은 상기 cDNA의 동일한 표적 서열에 하이브리드화하도록 설계되었다. 따라서, 두 번째 실험의 경우, 패드락 프로브는 cDNA의 한 표적 영역에 하이브리드화하도록 설계되었다.

[0564] **롤링 서클 증폭**

[0565] 2X SSC, 20% 포름아미드 및 1 μM RCA 프라이머를 포함하는 100 ㎕의 프라이머 하이브리드화 시약을 유동 셀에 유동시킴으로써 롤링 서클 증폭을 수행하였다. 상기 유동 셀을 실온에서 약 30분 동안 인큐베이션하였다. 상기 유동 셀을 PBS-T 완충제로 두 번 세척하였다. 1x Phi29 완충제, 250 μM dNTP, 0.2 mg/㎖ BSA, 5% 글리세롤 및 1 유닛/㎕ Phi29 DNA 중합효소를 포함하는 100 ㎕의 RCA 시약을 유동시킴으로써 롤링 서클 증폭 반응을 수행하였다. 상기 유동 셀은 30℃에서 약 16시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 유동 셀을 PBS-T로 두 번 세척하였다.

[0566] **2-단계 시퀀싱 방법을 이용한 제자리 시퀀싱**

[0567] 상기 유동 셀을, 2X SSC, 20% 포름아미드 및 1 μM 범용 시퀀싱 프라이머를 포함하는 시퀀싱 프라이머 시약으로 세척하였다. 제1 실험을 위한 시퀀싱 프라이머의 서열은 5'-ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT-3'(서열번호 12)이었다. 제2 실험을 위한 시퀀싱 프라이머의 서열은 5'-TTACTGACTGCGTCTATTTAGTGGAGCC-3'(서열번호 13)이었다.

[0568] 상기 유동 셀을, 10 mM Tris(pH 8), 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA 및 0.3% Tween-20을 포함하는 세척 완충제로 두 번 세척하였다.

[0569] 2-단계 시퀀싱 방법을 이용하여 세포 내부에서 프라이머-콘카타머를 시퀀싱하였다. 각각의 시퀀싱 주기는 제1 단계 및 제2 단계를 포함하였다. 제1 단계는 제1 시퀀싱 중합효소 및 형광 표지부착된 다가 분자를 사용하였다. 제2 단계는 제2 시퀀싱 중합효소 및 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체를 사용하였다.

[0570] 형광 표지부착된 다가 분자를 사용하여 제1 단계 시퀀싱을 수행하였다. 시퀀싱을 시작하기 전에 유동 셀에서 세포의 이미지를 얻었다. 제1 시퀀싱 중합효소 용액을 유동 셀 상에 유동시키고 42℃에서 약 10분 동안 인큐베이션하여 세포 내부의 콘카티머에서 복합체화된 중합효소를 형성하였다. 트랩 시약을 유동 셀 상에 유동시켰다. 트랩 시약은 형광 표지부착된 다가 분자의 혼합물(예를 들어, 약 40 내지 100 nM)(도 7 내지 10 참조) 및 비-촉매 양이온(예를 들어, 스트론튬, 바륨 또는 칼슘)을 포함하였다. 형광 표지부착된 다가 분자의 혼합물은 dATP, dGTP, dCTP 및 dUTP를포함하였다. 유동 셀을 약 10분 동안 42℃에서 인큐베이션하여, 다가 분자가 뉴클레오타이드 유닛의 혼입 없이 상기 복합체화된 중합효소에 결합하고 세포 내부의 콘카티머에서 결합력 복합체를 형성할 수 있게 하였다. 형광 표지부착된 다가 분자를 결여하는 트랩 시약으로 실온에서 상기 유동 셀을 세척하였다. 상기 유동 셀을 이미지화 완충제로 세척하였다. 형광 현미경을 이용하여 이미지를 얻었다: 1분/FOV, 4개 채널, 200 ms/프레임, Z-스택 이미지화 이용. 제거 시약으로 42℃에서 유동 셀을 두 번 세척하여 다가 분자 및 제1 시퀀싱 중합효소를 제거하였다. 유동 셀을 세척 완충제로 52℃에서 네 번 세척하였다(상기 제제화 참조).

[0571] 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 제2 단계 시퀀싱을 수행하였다. 제2 시퀀싱 중합효소 용액, 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체의 혼합물 및 촉매 2가 양이온(예를 들어, 마그네슘)을 유동 셀 상에 유동시키고 약 2분 내지 5분 동안 52℃에서 인큐베이션하여 뉴클레오타이드 유사체의 혼입을 허용하였다. 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체의 혼합물은 dATP, dGTP, dCTP 및 dTTP와 함께 3'O-메틸아지도 뉴클레오타이드를 포함하였다. 유동 셀을 약 20초 동안 51℃에서 제거 시약으로 두 번 세척하였다. 유동 셀을 약 40초 동안 51℃에서 절단 시약으로 두 번 세척하여 3' 차단 모이어티를 혼입된 뉴클레오타이드로부터 제거하였다. 유동 셀을 세척 완충제로 두 번 세척하였다(상기 제제화 참조). 앞에서 설명된 2-단계 시퀀싱 방법을 이용하여 다음 시퀀싱 주기를 수행하였다. 유동 셀의 세포에 대해 30회 시퀀싱 주기를 수행하여 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 생성하였다.

[0572] 별도의 실험에서, 자동화된 유체 전달 시스템을 갖도록 구성된 장치에 유동 셀을 배치함으로써, 자동화된 모드 하에서 워크플로우를 수행하였다. 앞에서 설명된 수동 워크플로우와 유사하게, 자동화된 워크플로우는 폴리-L-라이신으로 코팅된 유리 2-레인 유동 셀을 사용하였고, 범용 포획 프라이머 서열을 가진 핵산에 하이브리드화할 수 있는 포획 프라이머를 결여하였다. 자동화된 워크플로우는 세포 고정, 세포 투과 가능화, 역전사, 후-고정, 패드락 프로브 하이브리드화 및 롤링 서클 증폭을 수행하였다. 수동 워크플로우에 대해 앞에서 설명된 2-단계 시퀀싱 방법을 이용하여 자동화된 모드 하에서 세포 내부의 콘카티머를 시퀀싱하였다. 자동화된 워크플로우의 다양한 단계에 대한 공식은 수동 워크플로우에 대해 앞에서 설명된 바와 동일하였다.

[0573] 별도의 실험에서, 자동화된 유체 전달 시스템을 갖도록 구성된 장치에 유동 셀을 배치함으로써, 자동화된 모드 하에서 워크플로우를 수행하였다. 앞에서 설명된 수동 워크플로우와 유사하게, 자동화된 워크플로우는 폴리-L-라이신으로 코팅된 유리 2-레인 유동 셀을 사용하였고, 범용 포획 프라이머 서열을 가진 핵산에 하이브리드화할 수 있는 포획 프라이머를 결여하였다. 자동화된 워크플로우는 세포 고정, 세포 투과 가능화, 역전사, 후-고정, 패드락 프로브 하이브리드화 및 롤링 서클 증폭을 수행하였다. 수동 워크플로우에 대해 앞에서 설명된 2-단계 시퀀싱 방법을 이용하여 자동화된 모드 하에서 세포 내부의 콘카티머를 시퀀싱하였다. 자동화된 워크플로우의 다양한 단계에 대한 공식은 수동 워크플로우에 대해 앞에서 설명된 바와 동일하였다.

[0574] 도 6은 자동화된 워크플로우 모드를 사용하여 폴리-라이신 코팅된 유동 셀에 고정되고 투과 가능해진 HEK 293 세포로부터 방출된 형광 시퀀싱 신호의 이미지를 보여준다. 4개의 형광단 중 하나로 표지부착된 다가 분자 및 표지부착되지 않은 뉴클레오타이드 유사체를 사용하여 30회 주기의 2-단계 시퀀싱 반응을 수행하였다. 도 6은

주기 20 내지 25의 형광 신호를 보여주는데, 여기서 서열은 CCTCCT로 판독된다. 모든 주기에서 총 4620개의 형광 스팟이 유의미한 신호와 함께 검출되었다. 형광 스팟의 90% 이상이 표적 바코드 서열을 검출하였다.

[0575] 올림푸스(Olympus) UPlanFL N, 20X 0.7NA 대물렌즈 및 안도르 자일라(Andor Zyla) 4.2 SCMOS 카메라를 갖도록 구성된 올림푸스 IX83 도립 현미경을 이용하여 도 6의 이미지를 모았다. 사용된 필터는 셈락(Semrock) LPD02-532RU-25, 셈락 LP03-532RU-25, 크로마(Chroma) T6471pxr, 셈락 LP02-647RU-25, 셈락 FF01-562/40-25, 셈락 FF01-600/37-25, 셈락 FF01-719/60-25 및 셈락 FF01-660/30-25를 포함하였다.

[0576] 일부 실시양태에서, 반복적 제자리 시퀀싱을 수행할 수 있다. 예를 들어, 앞에서 설명된 바와 같이 2-단계 시퀀싱 방법을 이용하여 최대 30회의 시퀀싱 주기를 수행한 후, 유동 셀을 탈하이브리드화 시약으로 세척함으로써, 세포 내부에서 콘카티머를 유지하면서 콘카티머로부터 제1 복수의 시퀀싱 리드 생성물을 제거할 수 있다. 일부 실시양태에서, 탈하이브리드화 시약은 핵산 변성을 촉진하는 온도, 예를 들어, 30℃ 내지 90℃에서 약 2분 내지 10분 동안 포름아미드와 함께 또는 포름아미드 없이 SSC 완충제(예를 들어, 식염수-구연산나트륨) 완충제를 포함한다.

[0577] 비로소 제1 시퀀싱 리드 생성물로부터 변성된 콘카티머는 범용 시퀀싱 프라이머와 재하이브리드화하여, 2-단계 시퀀싱 방법의 최대 30회 주기의 또 다른 라운드를 시작할 수 있다. 예를 들어, 2X SSC, 20% 포름아미드 및 1 μM 범용 시퀀싱 프라이머를 포함할 수 있는 시퀀싱 프라이머 시약으로 유동 셀을 세척할 수 있다. 시퀀싱 프라이머의 서열은 5'-ATGTCGGAAGGTGTGCA GGCTACCGCTTGTCAACT-3'(서열번호 12)일 수 있다. 10 mM Tris(pH 8), 100 mM NaCl, 0.4 mM EDTA 및 0.3% Tween-20을 포함할 수 있는 세척 완충제로 유동 셀을 두 번 세척할 수 있다. 2-단계 시퀀싱 방법의 30회 주기를 앞에서 설명된 바와 같이 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2-단계 시퀀싱 방법의 최대 30회 주기의 하나 이상의 라운드를 유동 셀에 부착된 세포에 대해 수행할 수 있다.

[0578] 상기 실시예에서 사용된 모든 서열은 표 2에 표시되어 있다.

표 2

실시예에 사용된 서열

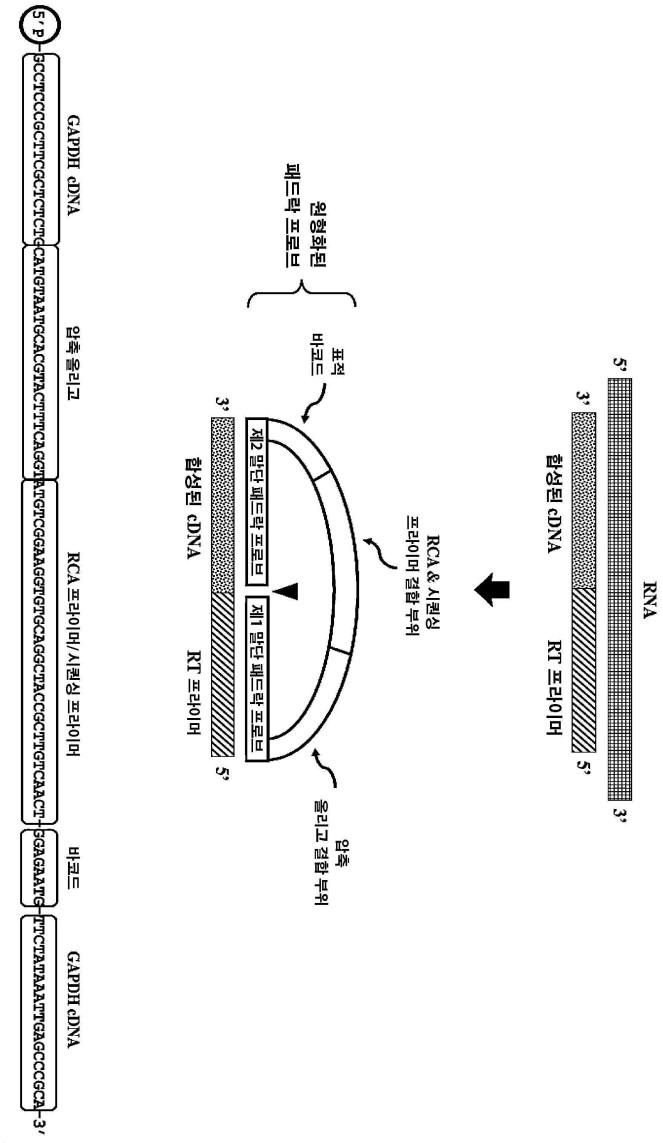
서열번호	서열
1	CAGAGAGCGAAGCGGGAGGCTGCGGGCTCAATTTATAGAA
2	GCCTCCCGCTTCGCTCTCTGCATGTAATGCACGTACTTTCAGGTATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACTGGAGAATGTTCTATAAATTGAGCCCGCA
3	CATGTAATGCACGTACTTTCAGGT
4	ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT
5	GGAGAATG
6	CAGCCGCATCTTCTTTTGCGTCCTCTATGATTACTGACTGCGTCTATTTAGTGGAGCCXXXXXXXXXXXXCTTTTGCTCCTCCTGTTCGACAGT
7	TCCTCTATGATTACTGACTGCGTCTATTTAGTGGAGCC
8	GCTACTATCTT
9	TTAGTAGATAA
10	CACCAGCGAGG
11	AGGTGCTCGCC
12	ATGTCGGAAGGTGTGCAGGCTACCGCTTGTCAACT
13	TTACTGACTGCGTCTATTTAGTGGAGCC
14	CATGTAATGCACGTACTTTCAGGGTAAACATGTAATGCACGTACTTTCAGGGT

[0579]

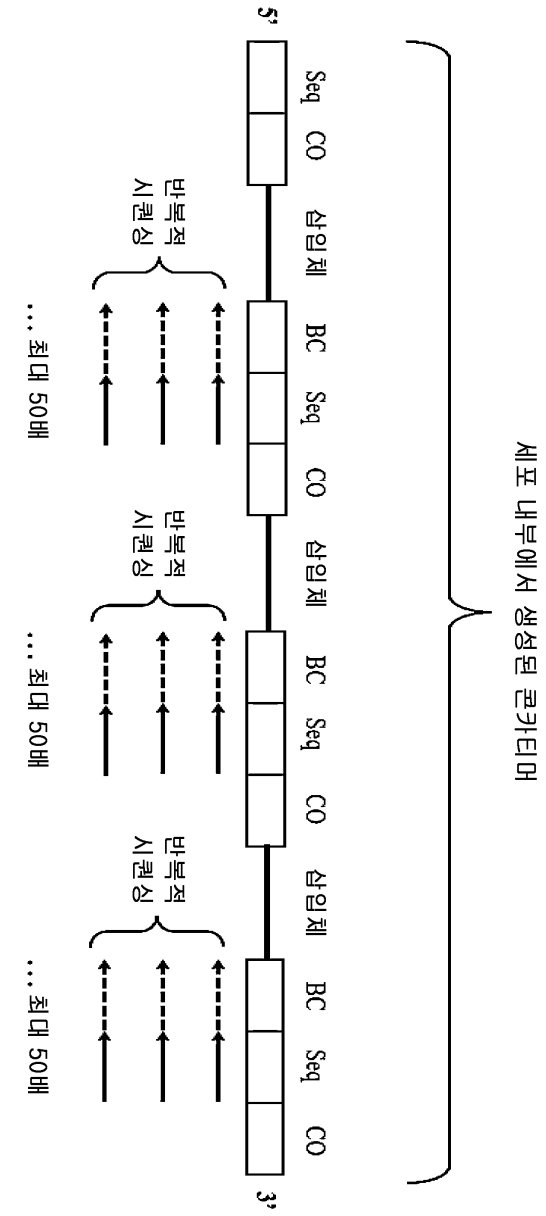
[0580] 본 조성물, 장치 및 방법의 바람직한 실시양태가 본원에 제시되고 설명되어 있지만, 이러한 실시양태가 단지 예시로써 제공된다는 것은 당업자에게 자명할 것이다. 당분야에서 숙련된 자는 비로서 상기 조성물, 장치 및 방법으로부터 벗어나지 않고도 수많은 변경, 변화 및 치환을 인식할 것이다. 본원에 설명된 조성물, 장치 및 방법의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명적 개념을 실시하는 데 사용될 수 있음을 이해해야 한다. 하기 청구범위는 상기 조성물, 장치 및 방법의 범위를 정의하고 이러한 청구범위 내에 있는 방법, 조성물 및 장치와 이들의 균등물은 이에 의해 커버된다.

도면

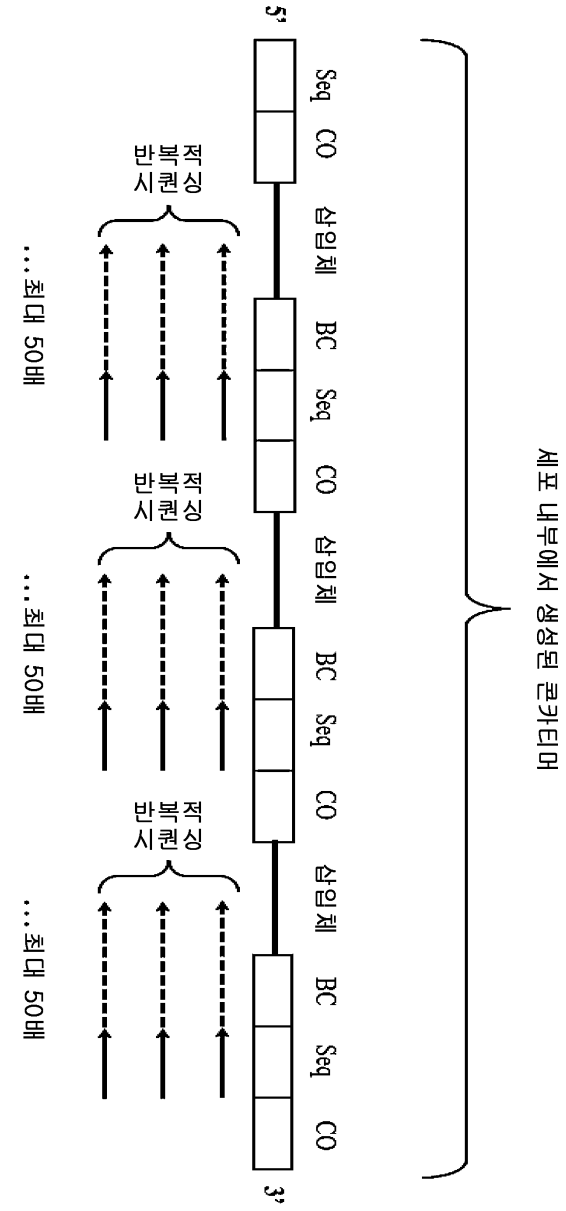
도면1


5'
RNA
3'
3'
합성된 cDNA
RT 프라이머
5'
원형화된
패드락 프로브
표적
바코드
3'
제2 말단 패드락 프로브
제1 말단 패드락 프로브
합성된 cDNA
RT 프라이머
5'
RCA & 시퀀싱
프라이머 결합 부위
암호
올리고 결합 부위
5'-P
GAPDH cDNA
암호 올리고
RCA 프라이머/시퀀싱 프라이머
바코드
GAPDH cDNA
3'

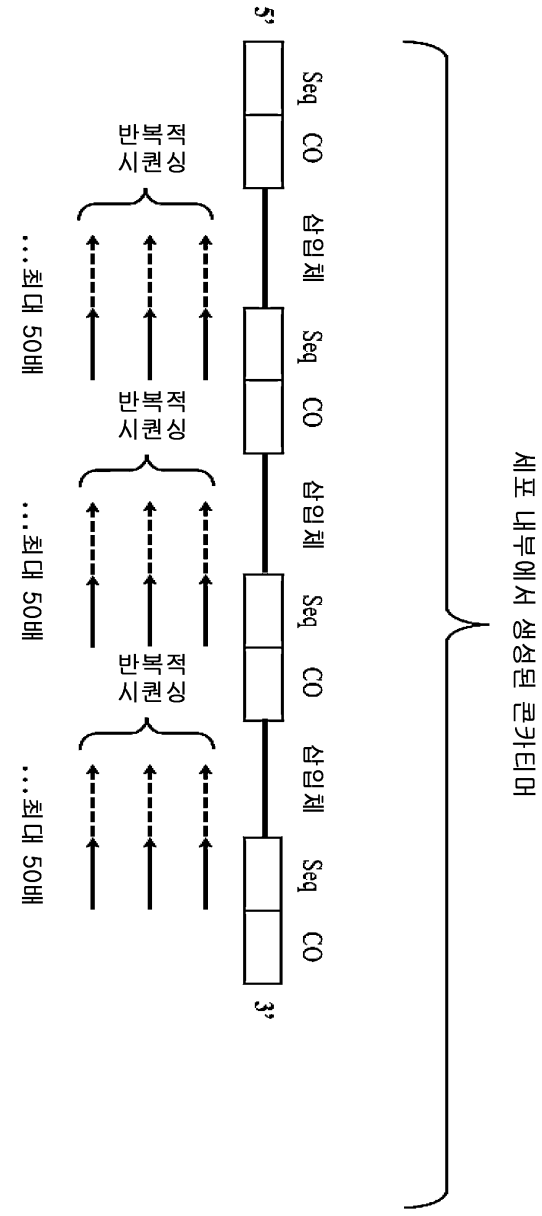
도면2


5'
Seq
CO
삽입체
BC
Seq
CO
삽입체
BC
Seq
CO
삽입체
BC
Seq
CO
3'
세포 내부에서 생성된 콘카티머
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
... 최대 50배
... 최대 50배
... 최대 50배

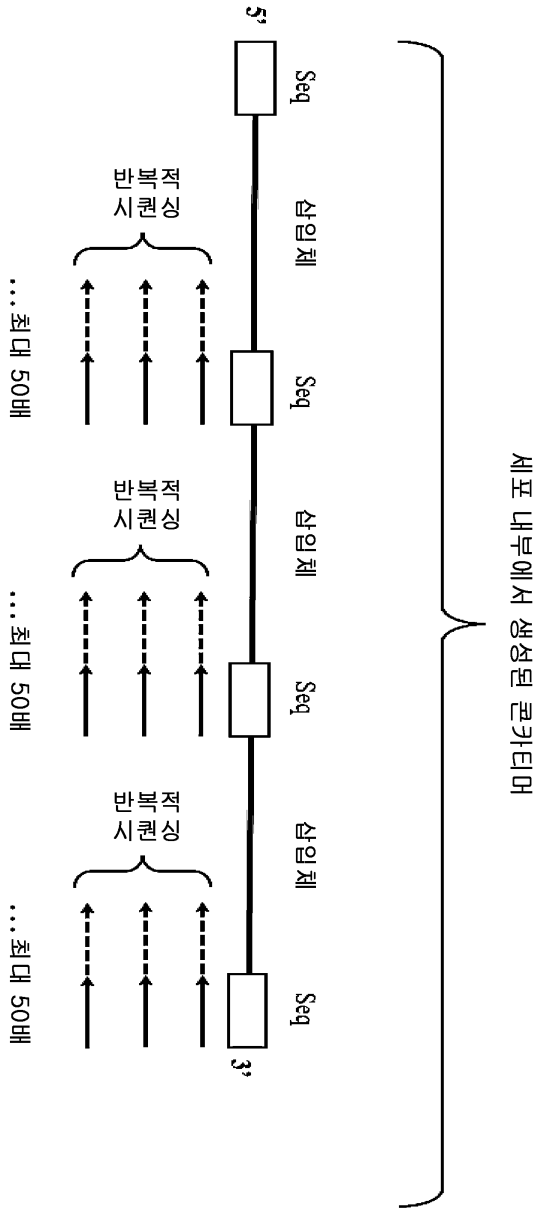
도면3


5'
Seq
CO
삽입체
BC
Seq
CO
삽입체
BC
Seq
CO
삽입체
BC
Seq
CO
3'
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
…최대 50배
…최대 50배
…최대 50배
세포 내부에서 생성된 콘카티머

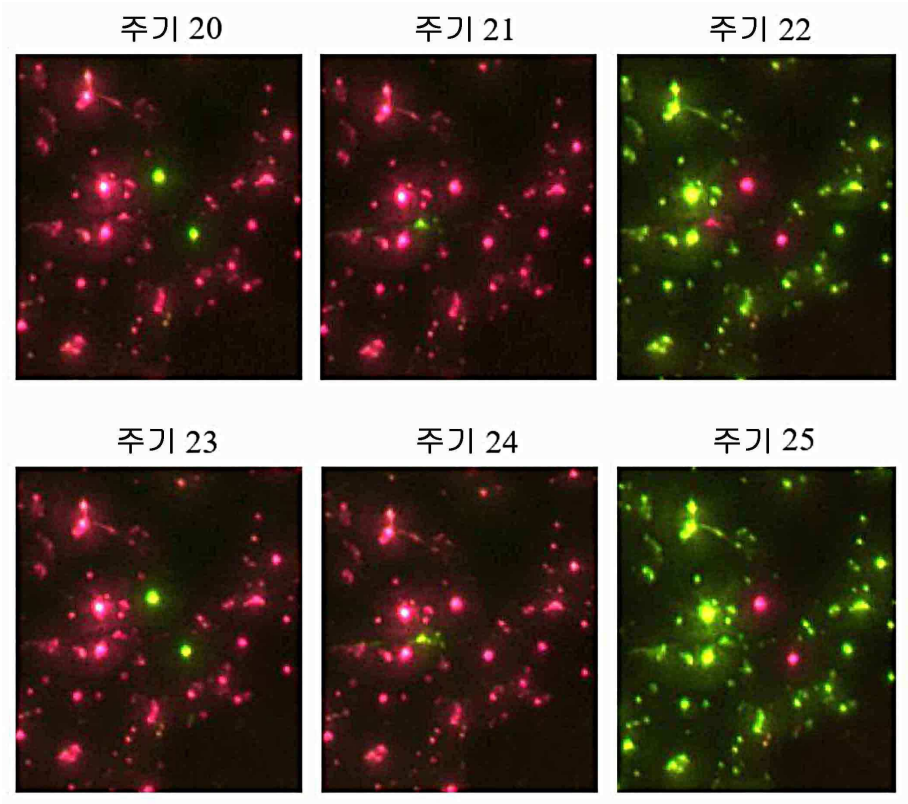
도면4


5'
Seq
CO
삽입체
Seq
CO
삽입체
Seq
CO
삽입체
Seq
CO
3'
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
...최대 50배
...최대 50배
...최대 50배
세포 내부에서 생성된 콘카티머

도면5


5'
Seq
삽입체
Seq
삽입체
Seq
삽입체
Seq
3'
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
반복적 시퀀싱
...최대 50배
...최대 50배
...최대 50배
세포 내부에서 생성된 콘카티머

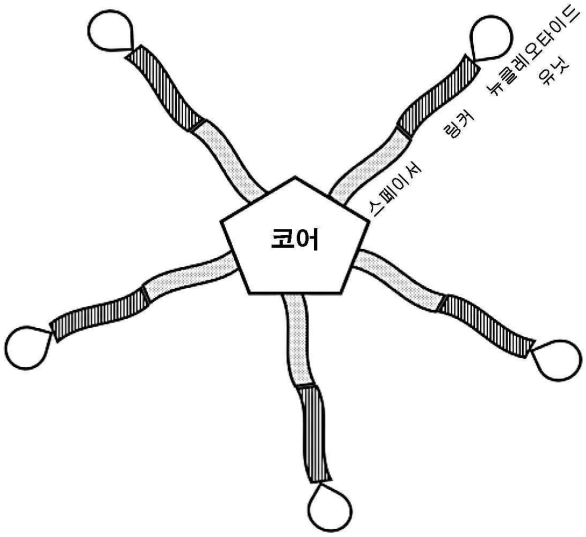
도면6



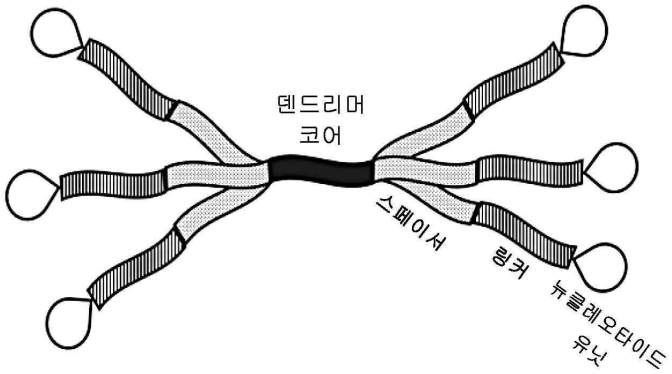
도면7

클래스 I
결합가 = 0-4
표화를 가진 균질한 집단
"Starburst"
PEG 길이 = 1K-10K
"Helter-Skelter"
PEG 길이 = 1.25K-5K
클래스 II
결합가 >4
표화를 가진 균질한 집단
덴드리머 코어 12,24,48,96 아암
PEG 길이 = 1K-10K
다른 코어 = 덱스트란, 다른 중합체
클래스 III
결합가 >4
구축을 기반으로 한 크기의 분포
바이오틴-NH2 및 dNTP-NH2와
혼합된 후 표지부착된
스트렙타비딘과 혼합된 8 아암
PEG-NHS

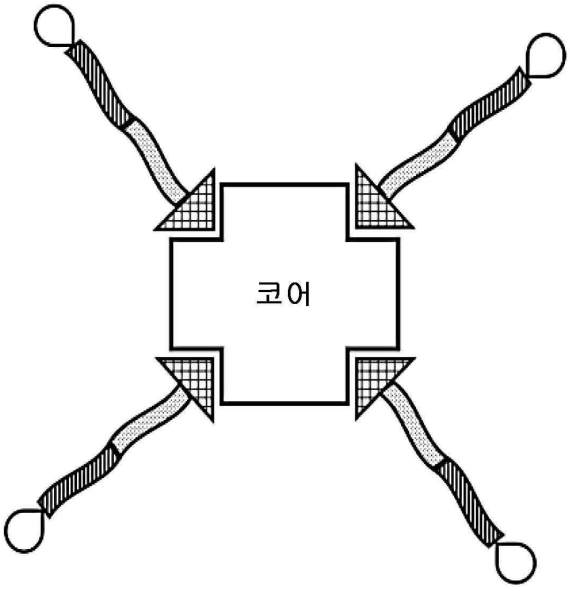
도면8



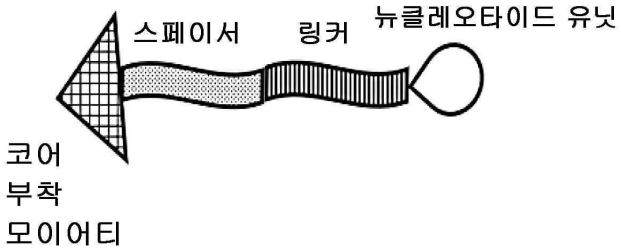
도면9



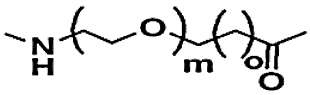
도면10



도면11

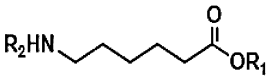


도면12

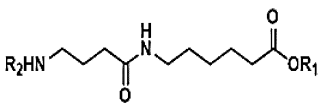
스페이서: 

링커:

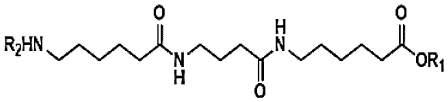
11 원자 링커:



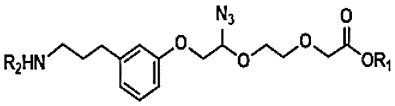
16 원자 링커:



23 원자 링커:



N3 링커:



도면13

링커 1:

링커 2:

링커 3:

링커 4:

링커 5:

링커 6:

분자량: 352.35

링커 7:

분자량: 449.42

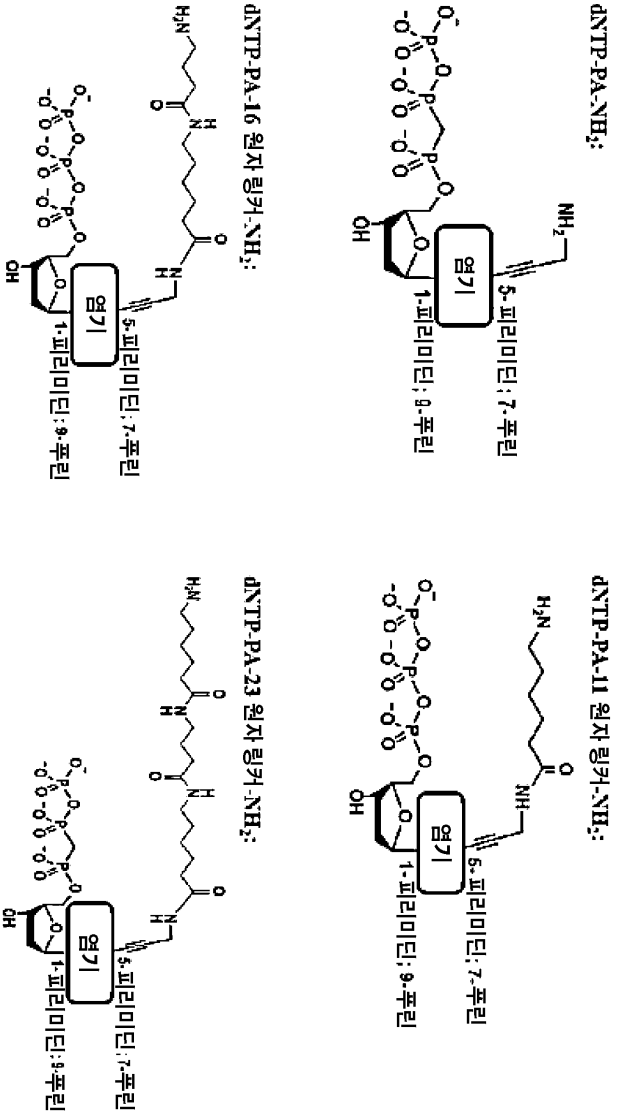
링커 8:

분자량: 518.57

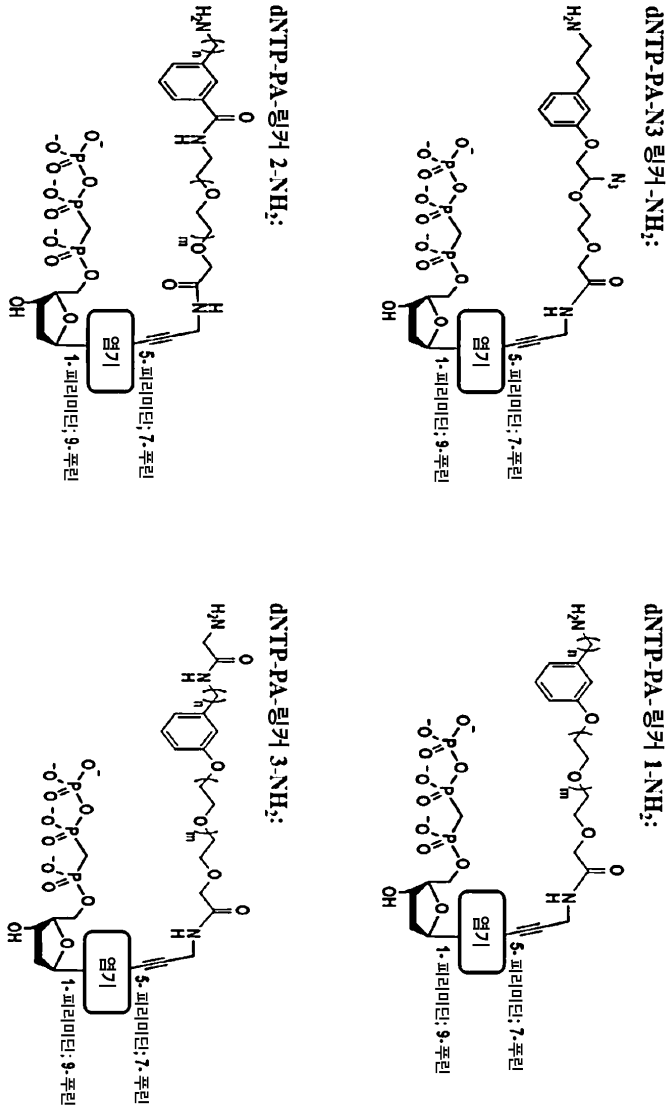
링커 9:

분자량: 615.64

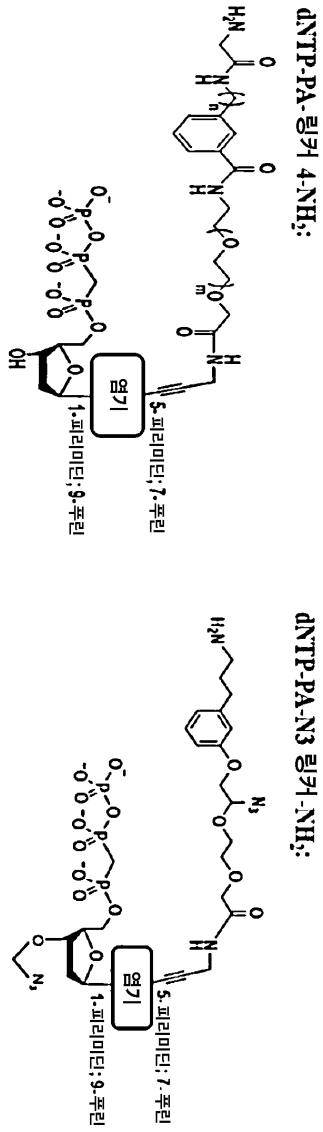
도면14


dNTP-PA-NH2:
염기
1-피리미딘; 9-푸린
5-피리미딘; 7-푸린
dNTP-PA-16 원자 링커-NH2:
염기
1-피리미딘; 9-푸린
5-피리미딘; 7-푸린
dNTP-PA-11 원자 링커-NH2:
염기
1-피리미딘; 9-푸린
5-피리미딘; 7-푸린
dNTP-PA-23 원자 링커-NH2:
염기
1-피리미딘; 9-푸린
5-피리미딘; 7-푸린

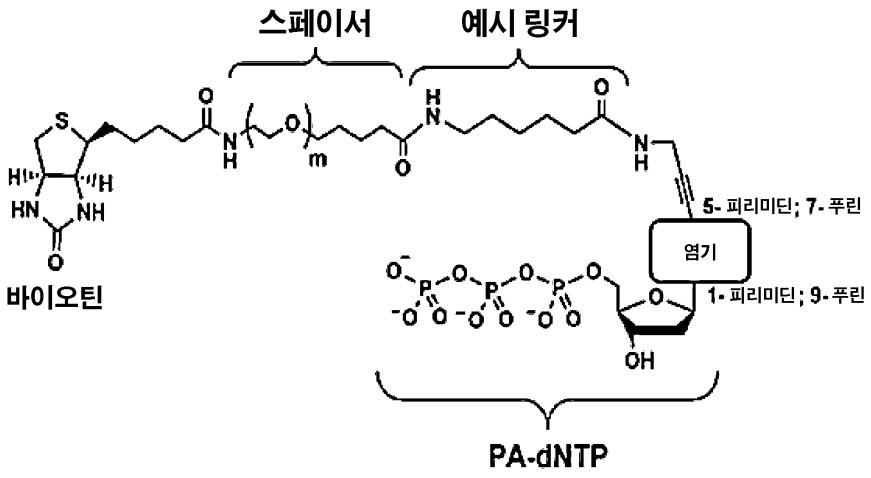
도면15


dNTP-PA-N3 링커-NH2:
dNTP-PA-링커 1-NH2:
dNTP-PA-링커 2-NH2:
dNTP-PA-링커 3-NH2:
염기
1-피리미딘; 9-푸린
5-피리미딘; 7-푸린

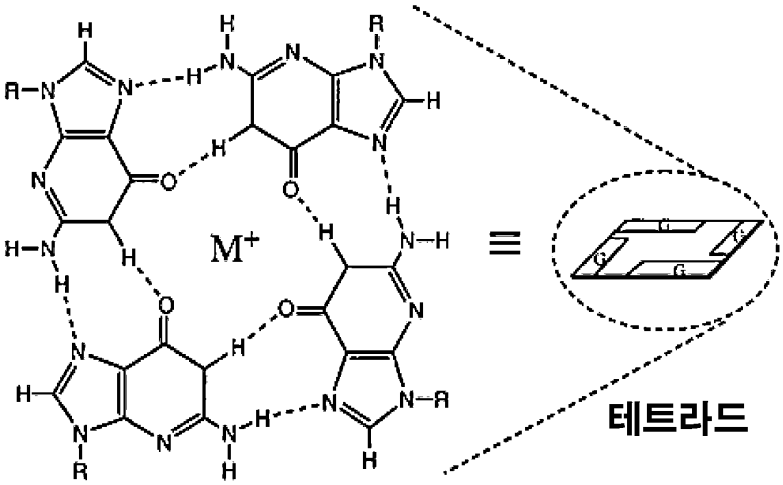
도면16


dNTP-PA-링커 4-NH2;
염기
5-피리미딘;7-푸린
1-피리미딘;9-푸린
dNTP-PA-N3 링커-NH2;
염기
5-피리미딘;7-푸린
1-피리미딘;9-푸린

도면17

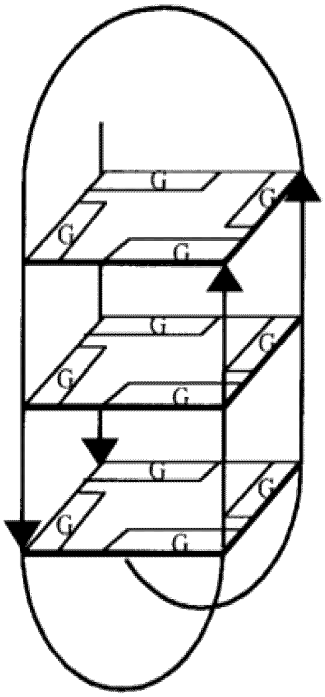

스페이서
예시 링커
바이오틴
5- 피리미딘; 7- 푸린
염기
1- 피리미딘; 9- 푸린
PA-dNTP

도면18

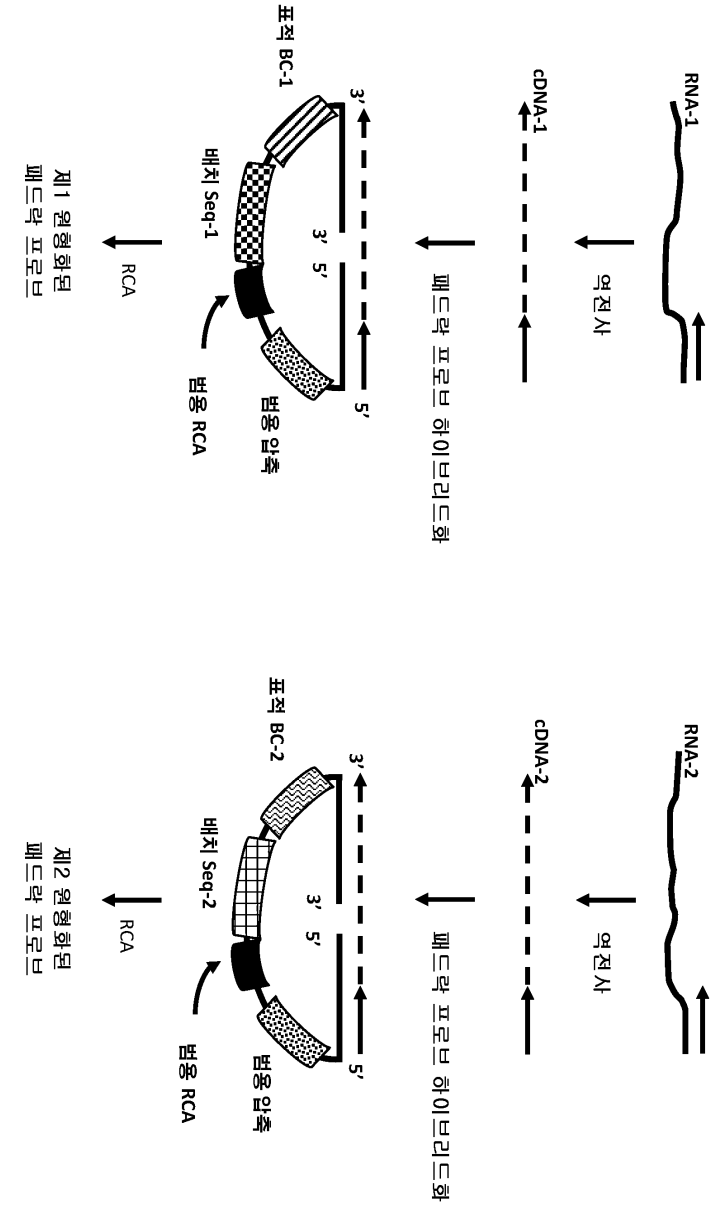


G-테트라드

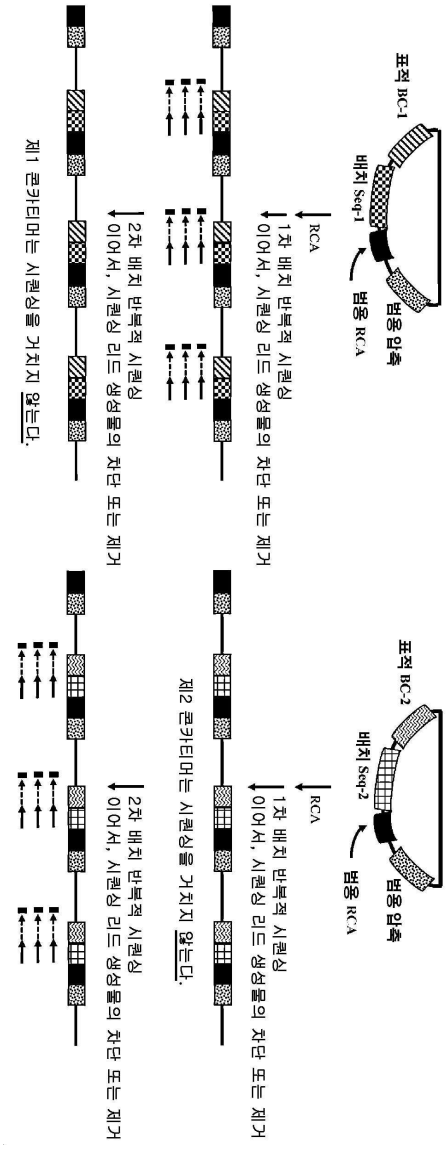
도면19



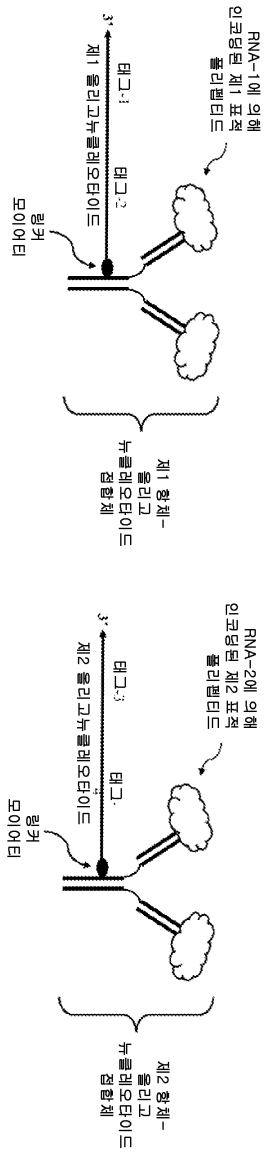
도면20


RNA-1
역전사
cDNA-1
패드락 프로브 하이브리드화
표적 BC-1
3′
5′
배치 Seq-1
범용 입축
범용 RCA
RCA
제1 원형화된
패드락 프로브
RNA-2
역전사
cDNA-2
패드락 프로브 하이브리드화
표적 BC-2
3′
5′
배치 Seq-2
범용 입축
범용 RCA
RCA
제2 원형화된
패드락 프로브

도면21

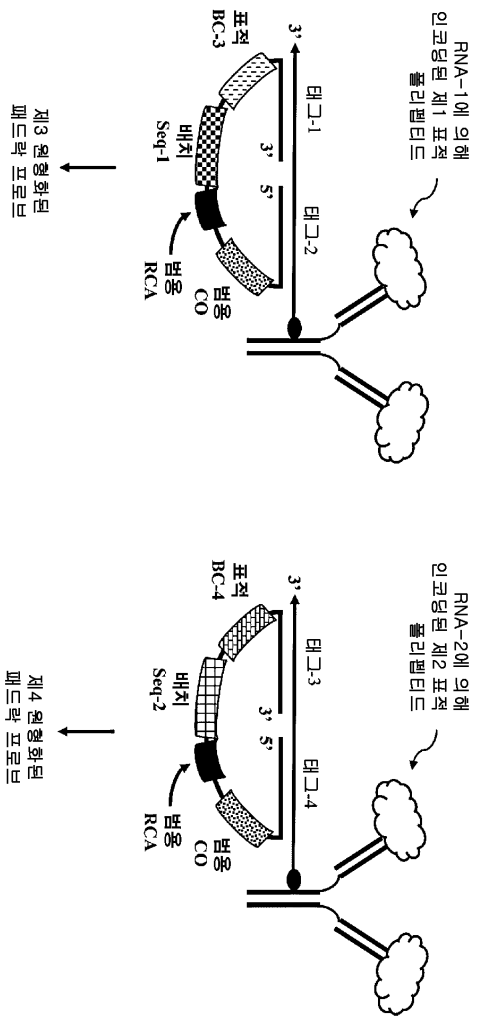

표적 RC-1
배치 Seq-1
범용 RCA
범용 입축
RCA
1차 배치 반복적 시퀀싱
이어서, 시퀀싱 리드 생성물의 차단 또는 제거
2차 배치 반복적 시퀀싱
이어서, 시퀀싱 리드 생성물의 차단 또는 제거
제1 콘카티머는 시퀀싱을 거치지 않는다.
표적 RC-2
배치 Seq-2
범용 RCA
범용 입축
RCA
1차 배치 반복적 시퀀싱
이어서, 시퀀싱 리드 생성물의 차단 또는 제거
제2 콘카티머는 시퀀싱을 거치지 않는다.
2차 배치 반복적 시퀀싱
이어서, 시퀀싱 리드 생성물의 차단 또는 제거

도면22

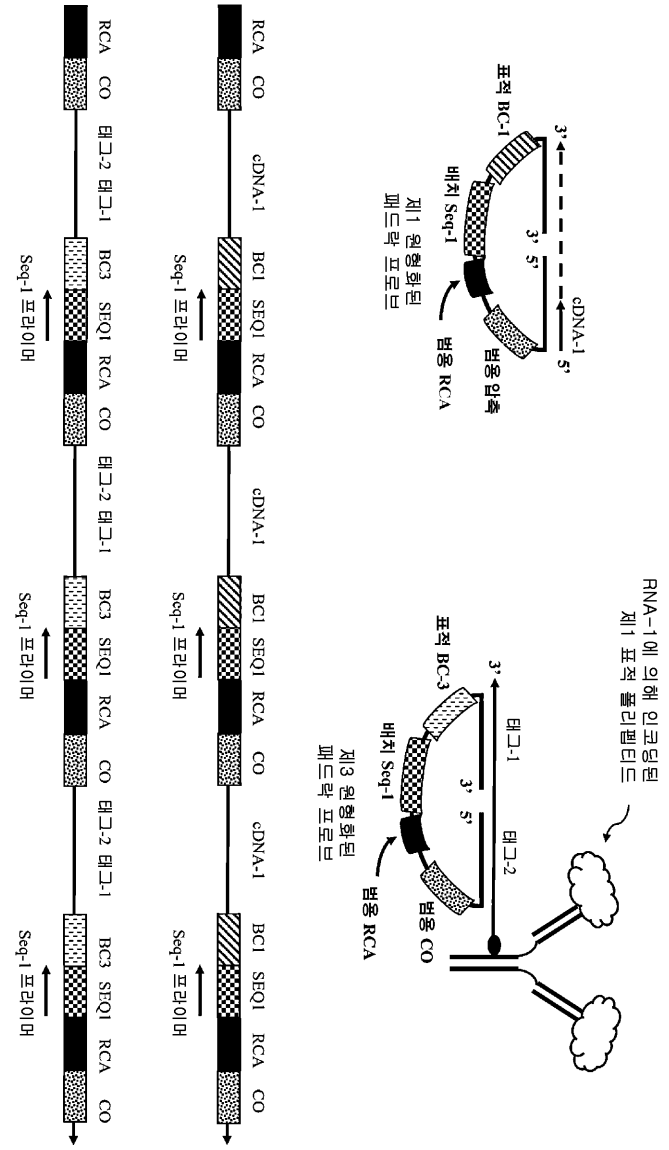

RNA-1에 의해
인코딩된 제1 표적
폴리펩티드
제1 올리고뉴클레오타이드
태그-1
태그-2
3'
캡처
모이어티
제1 형제-
올리고
뉴클레오타이드
결합체

RNA-2에 의해
인코딩된 제2 표적
폴리펩티드
제2 올리고뉴클레오타이드
태그-3
태그-4
3'
캡처
모이어티
제2 형제-
올리고
뉴클레오타이드
결합체

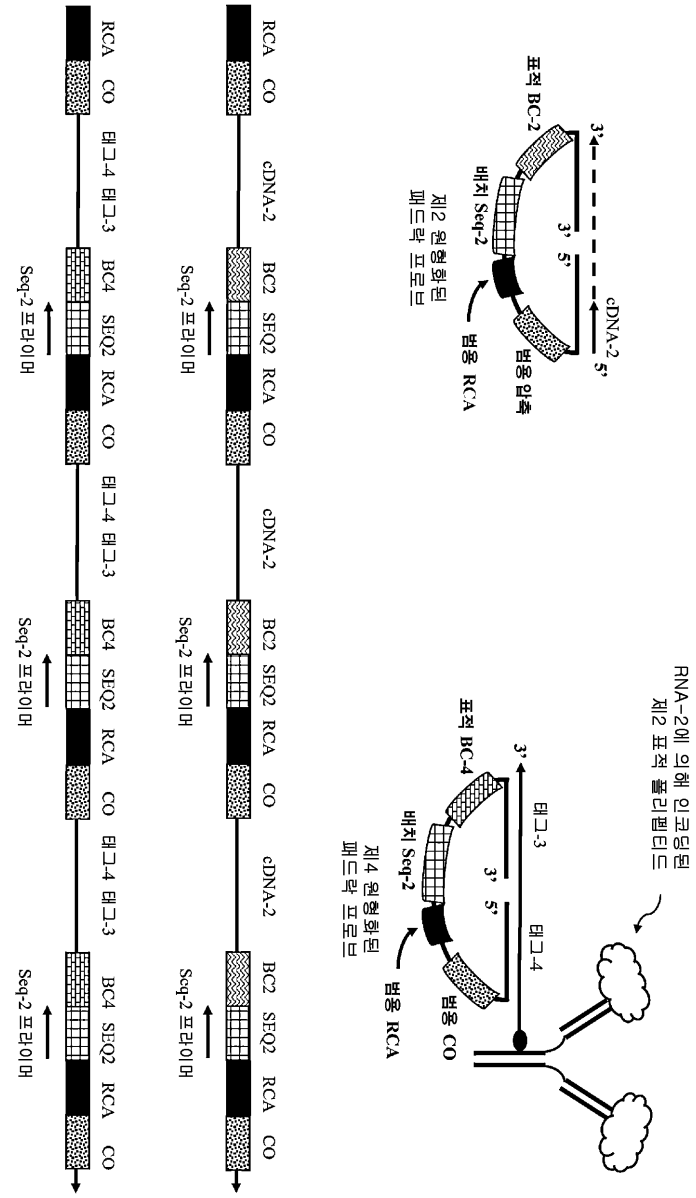
도면23


RNA-1에 의해
인코딩된 제1 표적
폴리펩티드
3'
태그-1
태그-2
표적
BC-3
배치
Seq-1
범용
RCA
범용
CO
제3 원형화된
패드락 프로브
RNA-2에 의해
인코딩된 제2 표적
폴리펩티드
3'
태그-3
태그-4
표적
BC-4
배치
Seq-2
범용
RCA
범용
CO
제4 원형화된
패드락 프로브

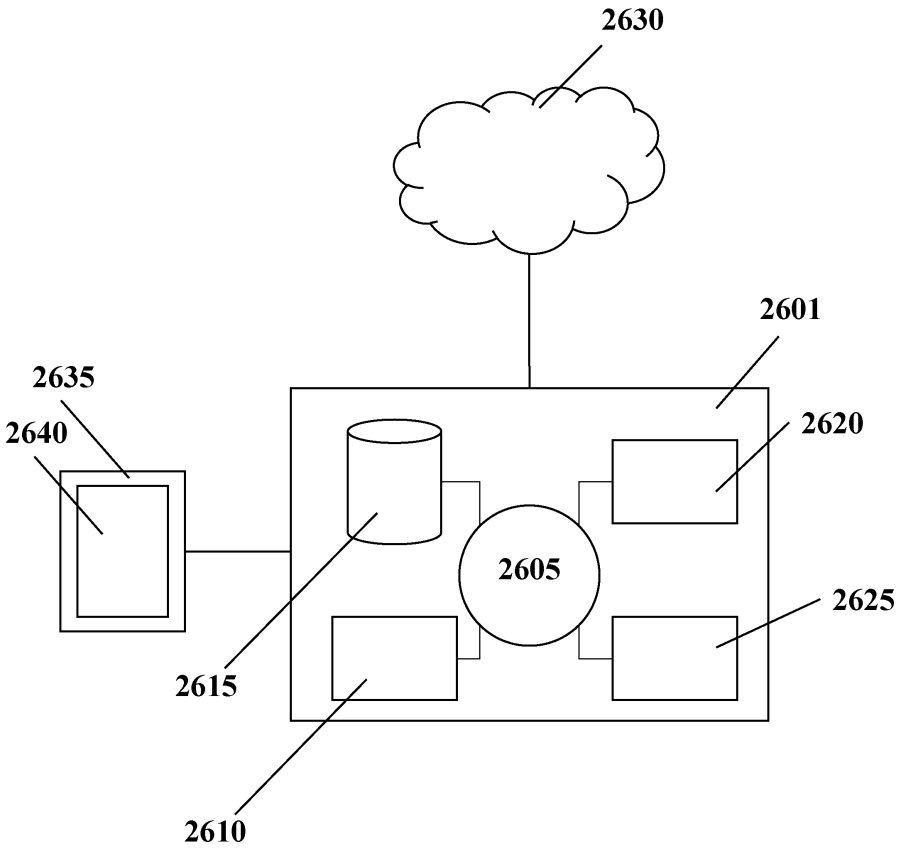
도면24


RNA-1에 의해 인코딩된
제1 표적 폴리펩티드
표적 BC-3
3'
5'
테그-1
테그-2
배치 Seq-1
제3 원형화된
패드락 프로브
벌옹 RCA
벌옹 CO
표적 BC-1
3'
5'
cDNA-1
배치 Seq-1
제1 원형화된
패드락 프로브
벌옹 RCA
벌옹 압축
RCA CO cDNA-1 BC1 SEQ1 RCA CO cDNA-1 BC1 SEQ1 RCA CO cDNA-1 BC1 SEQ1 RCA CO
Seq-1 프라이머
Seq-1 프라이머
Seq-1 프라이머
RCA CO 테그-2 테그-1 BC3 SEQ1 RCA CO 테그-2 테그-1 BC3 SEQ1 RCA CO 테그-2 테그-1 BC3 SEQ1 RCA CO
Seq-1 프라이머
Seq-1 프라이머
Seq-1 프라이머

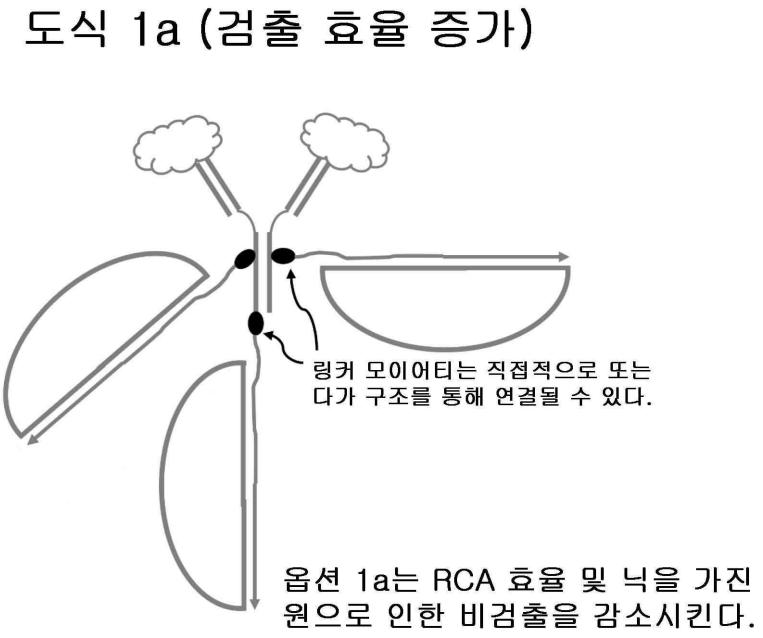
도면25


RNA-2에 의해 인코딩된
제2 표적 폴리펩티드
표적 BC-4
3'
5'
태그-3
태그-4
배치 Seq-2
제4 원형화된
패드락 프로브
범용 RCA
범용 CO
표적 BC-2
3'
5'
cDNA-2
5'
배치 Seq-2
제2 원형화된
패드락 프로브
범용 RCA
범용 앰축
RCA CO cDNA-2 BC2 SEQ2 RCA CO cDNA-2 BC2 SEQ2 RCA CO cDNA-2 BC2 SEQ2 RCA CO
Seq-2 프라이머
Seq-2 프라이머
RCA CO 태그-4 태그-3 BC4 SEQ2 RCA CO 태그-4 태그-3 BC4 SEQ2 RCA CO 태그-4 태그-3 BC4 SEQ2 RCA CO
Seq-2 프라이머
Seq-2 프라이머
Seq-2 프라이머

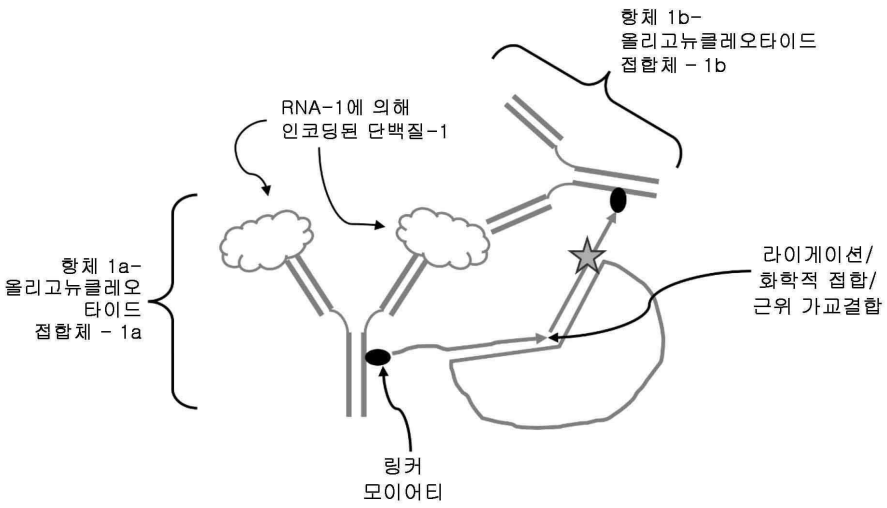
도면26


2630
2601
2635
2640
2620
2605
2625
2615
2610

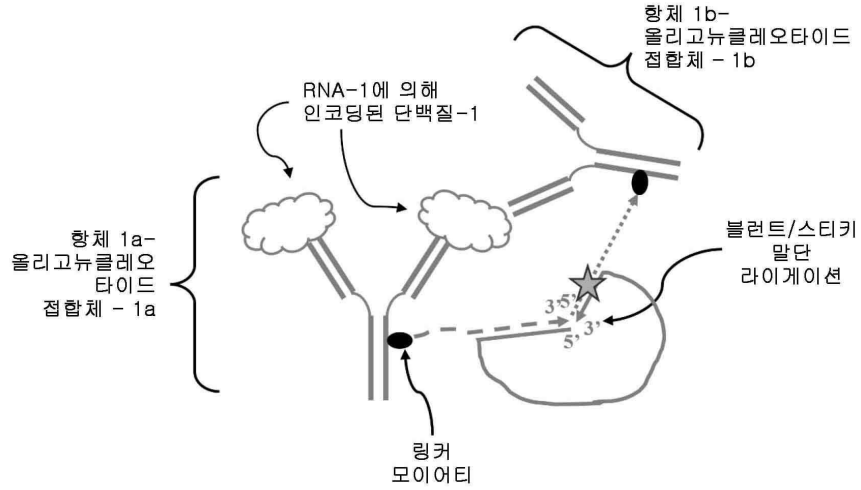
도면27


도식 1a (검출 효율 증가)
링커 모이어티는 직접적으로 또는
다가 구조를 통해 연결될 수 있다.
옵션 1a는 RCA 효율 및 닉을 가진
원으로 인한 비검출을 감소시킨다.

도면28


항체 1b-
올리고뉴클레오타이드
접합체 - 1b
RNA-1에 의해
인코딩된 단백질-1
항체 1a-
올리고뉴클레오
타이드
접합체 - 1a
라이게이션/
화학적 접합/
근위 가교결합
링커
모이어티

도면29


항체 1b-
올리고뉴클레오타이드
접합체 - 1b
RNA-1에 의해
인코딩된 단백질-1
항체 1a-
올리고뉴클레오
타이드
접합체 - 1a
블런트/스티키
말단
라이게이션
3'
5'
5'
3'
링커
모이어티

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.