



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년08월24일  
(11) 등록번호 10-2436171  
(24) 등록일자 2022년08월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6869 (2018.01) C12Q 1/6806 (2018.01)  
C12Q 1/6813 (2018.01) C12Q 1/6876 (2018.01)  
G16B 30/00 (2019.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6869 (2018.05)  
C12Q 1/6806 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2022-7005065(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년06월26일  
심사청구일자 2022년02월15일
- (85) 번역문제출일자 2022년02월15일
- (65) 공개번호 10-2022-0025265
- (43) 공개일자 2022년03월03일
- (62) 원출원 특허 10-2021-7002986  
원출원일자(국제) 2014년06월26일  
심사청구일자 2021년02월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/044398
- (87) 국제공개번호 WO 2014/210353  
국제공개일자 2014년12월31일
- (30) 우선권주장  
61/840,403 2013년06월27일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
WO2012048341 A1  
JP2009513948 A  
JP2012522517 A

- (73) 특허권자  
10엑스 제노믹스, 인크.  
미국, 캘리포니아 94566, 플레젠튼, 스위트 401,  
7068 콜 센터 파크웨이
- (72) 발명자  
힌드슨 벤자민  
미국 94566 캘리포니아주 플레젠튼 테라 코트  
1789  
힌드슨 크리스토퍼  
미국 94566 캘리포니아주 플레젠튼 베르날 애비뉴  
4868 아파트먼트 비  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 29 항

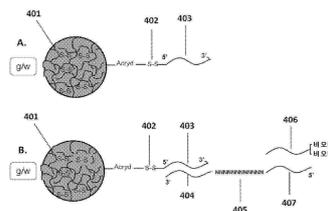
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 샘플 처리를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

방법 및 조성물은 특히 서열분석 적용을 위해 샘플을 가공 처리한다. 다수의 올리고뉴클레오타이드에 부착된 비드의 다양한 라이브러리에 대한 비드 조성물은 바코드를 함유한다. 본 방법은 바코딩된 비드의 라이브러리를 제조하는 방법, 예컨대, 미세유체 디바이스를 사용하여 비드를 샘플과 조합하는 방법을 포함한다. 제1 구획은 그와 결합된 복수 개의 핵산 바코드 분자를 포함하고, 핵산 바코드 분자는 동일한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다. 제1 구획은 샘플 재료의 성분과 함께 제2 구획으로 함께 공동 구획화될 수 있고, 이어서, 바코드 분자는 제1 구획으로부터 제2 구획으로 유리될 수 있다. 유리된 바코드 분자는 제2 구획 내에서 샘플 재료의 성분 또는 그의 단편에 부착된다. 제1 분획은 동일한 바코드 서열을 가지는, 그와 결합된 최대 1000000개 이상의 바코드 분자를 포함할 수 있다.

대표도 - 도4a



- (52) CPC특허분류  
*C12Q 1/6813* (2018.05)  
*C12Q 1/6876* (2018.05)  
*G16B 30/00* (2019.02)
- (72) 발명자  
**쉬날-레빈 마이클**  
 미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 립키즈 웨이  
 4238 유닛 티  
**네스 케빈**  
 미국 94566 캘리포니아주 플레젠튼 캠퍼니아 플레  
 이스 4306  
**자로스즈 미르나**  
 미국 94041 캘리포니아주 마운틴 뷰 팔로 알토 애  
 비뉴 272  
**마스쿠엘리어 도날드**  
 미국 95376 캘리포니아주 트래시 피에스타 코트  
 440  
**삭소노브 세르지**  
 미국 94619 캘리포니아주 오클랜드 발모탈 드라이  
 브 5799  
**메릴 란돈**  
 미국 94566 캘리포니아주 플레젠튼 콜 센터 파크웨  
 이 7068 스위트 401  
**프라이스 앤드류**  
 미국 94566 캘리포니아주 플레젠튼 콜 센터 파크웨  
 이 7068 스위트 401  
**하르텐블 폴**  
 미국 94110 캘리포니아주 샌 프란시스코 21번가  
 2709  
**리 유안**  
 미국 94568 캘리포니아주 더블린 더블린 불러바드  
 3465 유닛 429
- (30) 우선권주장  
 61/844,804 2013년07월10일 미국(US)  
 13/966,150 2013년08월13일 미국(US)  
 PCT/US2013/054797 2013년08월13일 미국(US)  
 61/896,060 2013년10월26일 미국(US)  
 61/909,974 2013년11월27일 미국(US)  
 61/937,344 2014년02월07일 미국(US)  
 61/940,318 2014년02월14일 미국(US)  
 61/991,018 2014년05월09일 미국(US)
-

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

(a) 제1 복수 개의 핵산 분자를 포함하는 복수 개의 비드를 제1 복수 개의 웰에 제공하는 단계로서, 제1 복수 개의 핵산 분자는 복수 개의 제1 부분 바코드 서열을 포함하고, 복수 개의 제1 부분 바코드 서열은 제1 복수 개의 웰마다 상이한 것인 단계;

(b) 제1 복수 개의 웰로부터 복수 개의 비드를 풀링시켜 풀링된 비드 집단을 생성하는 단계;

(c) 풀링된 비드 집단 및 제2 복수 개의 핵산 분자를 제2 복수 개의 웰에 구획화하는 단계로서, 제2 복수 개의 웰 중의 웰은 (i) 풀링된 비드 집단의 비드로서, 비드가 제1 복수 개의 핵산 분자 중의 제1 핵산 분자 및 (ii) 제2 복수 개의 핵산 분자 중의 제2 핵산 분자를 포함하는 것인 비드; 및 (ii) 제2 복수 개의 핵산 분자 중의 제2 핵산 분자를 포함하고, 제2 핵산 분자는 폴리-T 서열, 무작위 서열, 또는 표적화된 프라이머 서열을 포함하는 것인 단계; 및

(d) 제1 핵산 분자를 제2 핵산 분자에 커플링하여 바코드화된 비드를 생성하는 것을 허용하기 충분한 조건을 제공하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 제1 복수 개의 웰은 M 개의 웰을 포함하고, 제2 복수 개의 웰은 N 개의 웰을 포함하고,  $M \geq 96$  이고,  $N \geq 96$ 인 방법.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 복수 개의 비드는 복수 개의 결합 모이어티를 포함하고, 제1 복수 개의 핵산 분자는 복수 개의 결합 모이어티를 통해 비드에 부착되는 것인 방법.

**청구항 4**

제3항에 있어서 결합 모이어티는 복수 개의 핵산 고정 분자에 커플링되는 것인 방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서, (a) 단계 이전에, 복수 개의 상보적인 핵산 분자를 이용하여 제1 복수 개의 핵산 분자를 복수 개의 핵산 고정 분자에 커플링하는 단계로서, 복수 개의 핵산 분자의 상보적인 핵산 분자는 (i) 복수 개의 핵산 고정 분자 중 적어도 일부의 핵산 고정 분자에 상보적인 제1 서열 및 (ii) 제1 복수 개의 핵산 분자 중 적어도 일부의 제1 핵산 분자에 상보적인 제2 서열을 포함하는 것인 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 제1 핵산 분자는 커플링 이전에 제2 서열에 혼성화되는 것인 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 적어도 일부의 핵산 고정 분자를 제1 서열에 혼성화하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 제1 핵산 분자를 핵산 고정 분자에 결합시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 핵산 고정 분자로부터 제1 서열을 제거하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 제거는 변성을 통해 수행되는 것인 방법.

**청구항 11**

제4항에 있어서, 바코드화된 비드는 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

비드 - 핵산 고정 분자 - 제1 부분 바코드 서열 - 폴리-T 서열, 무작위 서열 또는 표적화된 프라이머 서열.

**청구항 12**

제4항에 있어서, 핵산 고정 분자는 프라이머 서열, 프라이머 결합 서열, 부분 프라이머 서열 또는 부분 프라이머 결합 서열을 포함하는 어댑터 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서, (i) 프라이머 서열은 서열분석 프라이머 서열이거나, (ii) 프라이머 결합 서열은 서열분석 프라이머 결합 서열이거나, (iii) 부분 프라이머 서열은 부분 서열분석 프라이머 서열이거나, 또는 (iv) 부분 프라이머 결합 서열은 부분 서열분석 프라이머 결합 서열인 방법.

**청구항 14**

제4항에 있어서, 복수 개의 핵산 고정 분자는 서열분석기의 유동 셀에 부착되도록 구성된 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 15**

제4항에 있어서, 복수 개의 결합 모이어티 중의 결합 모이어티는 불안정성 결합을 통해 복수 개의 비드 중의 비드에 커플링되는 것인 방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 불안정성 결합은 열적 불안정성 결합, 광불안정성 결합, 또는 화학적 불안정성 결합인 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 불안정성 결합은 에스테르 결합, 인접 디올 결합, 디일스-알더(Diels-Alder) 결합, 술폰 결합, 실릴 에테르 결합, 글리코시드 결합, 또는 펩티드 결합을 포함하는 것인 방법.

**청구항 18**

제1항에 있어서, (a) 단계 이전에, 제1 부분 바코드 서열을 추가의 부분 바코드 서열에 결합시키는 것을 허용하기 충분한 조건을 제공하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 19**

제1항에 있어서, 제1 핵산 분자는 복수 개의 부분 바코드 서열을 포함하는 것인 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, (a) 단계 이전에,

(i) 복수 개의 핵산 고정 분자를 포함하는 초기 복수 개의 비드 및 복수 개의 제1 부분 바코드 서열을 포함하는 초기 복수 개의 핵산 분자를 제1 초기 복수 개의 웰에 구획화시키는 단계;

(ii) 초기 복수 개의 핵산 분자를 복수 개의 핵산 고정 분자에 결합하여 복수 개의 비드-올리고뉴클레오티드 구성물을 생성하는 것을 허용하기 충분한 조건을 제공하는 단계;

(iii) 복수 개의 비드-올리고뉴클레오티드 구성물을 풀링시켜 초기 풀링된 비드 집단을 생성하는 단계;

(iv) 적어도 하나의 추가의 부분 바코드 서열을 포함하는 제2 초기 복수 개의 핵산 분자 및 초기 풀링된 비드 집단을 제2 초기 복수 개의 웰에 구획화시키는 단계; 및

(v) 제2 초기 복수 개의 핵산 분자를 (iv) 단계의 초기 풀링된 비드 집단의 비드-올리고뉴클레오티드 구성물에

결합시켜 (a) 단계에서의 제1 복수 개의 핵산 분자를 포함하는 복수 개의 비드를 생성하는 것을 허용하기 충분한 조건을 제공하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, (ii) 또는 (v) 단계는 핵산 스플린트(splint) 분자를 이용하여 완료되는 것인 방법.

**청구항 22**

제1항에 있어서, (d) 단계 이후에, 바코드화된 비드는 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 핵산 바코드 분자를 포함하는 것인 방법.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 제1 복수 개의 부분 바코드 서열 중의 바코드 서열은 길이가 4 내지 20개의 핵산 염기인 방법.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 복수 개의 비드는 복수 개의 겔 비드인 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 복수 개의 겔 비드 중의 겔 비드는 자극을 가하였을 때 분해될 수 있는 것인 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 자극은 열 자극, 화학적 자극, 생물학적 자극, 또는 광 자극을 포함하는 것인 방법.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 자극은 환원제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 28**

제1항에 있어서, 제2 복수 개의 핵산 분자는 복수 개의 제2 부분 바코드 서열을 포함하고, 복수 개의 제2 부분 바코드 서열은 제2 복수 개의 웰마다 상이한 것인 방법.

**청구항 29**

제1항에 있어서, 제1 핵산 분자는 1개의 부분 바코드 서열만을 포함하는 것인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

**[0001] 상호 참조**

**[0002]** 본 출원은 2013년 6월 27일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/840,403호; 2013년 7월 10일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/844,804호; 2013년 8월 13일 출원된 미국 특허 출원 번호 제13/966,150호; 2013년 8월 13일 출원된 PCT 국제 특허 출원 번호 PCT/US13/54797; 2013년 10월 26일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/896,060호; 2013년 11월 27일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/909,974호; 2014년 2월 27일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/937,344호; 2014년 2월 14일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/940,318호; 및 2014년 5월 9일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/991018호의 이점을 주장하며, 상기 출원들은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다. 또한, 본 출원은 2012년 8월 14일 출원된 미국 가특허 출원 번호 제61/683,192호에 관한 것이며, 상기 출원은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다.

**배경 기술**

**[0003] 배경**

[0004] 게놈 서열분석은 진단학, 예후, 생명공학, 및 법 의학적 생물학을 비롯한, 매우 다양한 생의학적 맥락에서 정보를 수득하는 데 사용될 수 있다. 서열분석은 맥삼-길버트(Maxam-Gilbert) 서열분석 및 연쇄 종결반응 방법, 또는 샷건(shotgun) 서열분석 및 브릿지 PCR을 비롯한 신생 서열분석 방법, 또는 폴로니 서열분석, 454 파이로시퀀싱, 일루미나(Illumina) 서열분석, 고체 서열분석, 이온 토렌트 (Ion Torrent) 반도체 서열분석, 헬리스코프(HeliScope) 단일 분자 서열분석, SMRT® 서열분석 등을 비롯한 차세대 방법을 포함하는 기본 방법을 포함할 수 있다. 대부분의 서열분석 적용을 위해, 서열분석 기계에 도입시키기 이전에 샘플, 예컨대, 핵산 샘플을 처리한다. 샘플은 예를 들어, 증폭에 의해, 또는 고유 식별자를 부착시킴으로써 처리될 수 있다. 고유 식별자는 대개 특정 샘플의 기원을 확인하는 데 사용된다.

**발명의 내용**

[0005] **요약**

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 폴리뉴클레오티드가 공유적으로 부착되어 있는 비드를 생성하기 위한 방법, 조성물, 장치, 및 키트를 제공한다. 상기 비드는 임의의 적합한 적용에 사용될 수 있다.

[0007] 본 개시내용의 한 측면은 샘플 재료를 바코딩하는 방법을 제공한다. 그와 회합된(결합된) 복수 개의 핵산 바코드 분자를 포함하는 제1 구획을 제공할 수 있고, 핵산 바코드 분자는 동일한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다. 제1 구획은 샘플 재료와 함께 제2 구획으로 공동 구획화될 수 있고, 이어서, 바코드 분자는 제1 구획으로부터 제2 구획으로 유리될 수 있다. 유리된 바코드 분자는 제2 구획 내의 샘플 재료의 성분 또는 그의 단편 중 하나 이상에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 구획은 동일한 바코드 서열을 가지는, 그와 회합된 1000개 이상의 바코드분자, 10000개 이상의 바코드 분자, 100000개 이상의 바코드 분자, 또는 1000000개 이상의 바코드 분자를 포함할 수 있다. 또한, 일부 예에서, 제1 구획은 비드, 마이크로캡슐, 또는 액적(droplet)일 수 있다. 일부 경우에서, 제1 구획은 비드(예컨대, 겔 비드)를 포함할 수 있고, 바코드 분자는 비드와 유리가능하게 커플링될 수 있다. 또한, 제2 구획은 액적을 포함할 수 있고/거나, 1개 이하의 제1 구획을 포함할 수 있다.

[0008] 일부 경우에서, 제1 구획 및 샘플 재료의 성분을 제2 구획으로 함께 공동 구획화하는 것은 비혼화성 유체 내의 액적 중에서 비드를 포함하는 제1 수성 유체를 샘플 성분을 포함하는 제2 수성 유체와 조합(배합)하는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 바코드 분자는 제1 구획을 분해함으로써 제1 구획으로부터 유리될 수 있다. 제1 구획이 비드인 경우, 바코드 분자는 비드를 분해함으로써 및/또는 바코드 분자와 비드 사이의 화학적 결합을 절단함으로써 제2 구획에서 유리될 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 가교결합, 및 비드와 바코드 분자 사이의 결합 중 적어도 하나는 이황화 결합을 포함할 수 있다. 상기 경우에, 바코드 분자는 비드를 환원제(예컨대, 디티오트레이톨(DTT) 또는 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP))에 노출시킴으로써 비드로부터 유리될 수 있다.

[0009] 샘플 재료는 하나 이상의 주형 핵산 분자를 포함할 수 있고, 바코드 분자는 주형 핵산 분자의 하나 이상의 단편에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 분자는 주형 핵산 분자의 적어도 일부에 상보적인 프라이머 서열을 포함할 수 있고, 바코드 분자는 바코드 분자를 연장시켜 주형 핵산 분자의 적어도 일부를 복제시킴으로써 주형 핵산 분자 또는 그의 단편에 부착시킬 수 있다. 또한, 샘플 재료는 단일 세포, 예를 들어, 암 세포 또는 박테리아 세포(예컨대, 인간 마이크로바이옴 샘플로부터 단리된 박테리아 세포)의 내용물을 포함할 수 있다.

[0010] 추가로, 복수 개의 상이한 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 제1 구획을 제공할 수 있다. 각각의 제1 구획은 그와 회합된, 동일한 핵산 바코드 서열을 가지는 복수 개의 1000개 이상의 핵산 바코드 분자를 포함할 수 있다. 제1 구획은 샘플 재료의 성분과 함께 복수 개의 제2 구획으로 공동 구획화될 수 있다. 이어서, 제1 구획으로부터의 핵산 바코드 분자는 제2 구획으로 유리될 수 있다. 이어서, 유리된 핵산 바코드 분자는 제2 구획 내의 샘플 재료의 성분 또는 그의 단편에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 복수 개의 상이한 핵산 바코드 서열은 약 1000개 이상의 상이한 바코드 서열, 약 10000개 이상의 바코드 서열, 약 100000개 이상의 바코드 서열, 또는 약 500000개 이상의 바코드 서열을 포함할 수 있다. 추가로, 일부 예에서, 제2 구획의 서브세트는 동일한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 약 1% 이상, 약 2% 이상, 또는 약 5% 이상의 제2 구획이 동일한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다. 추가로, 일부 경우에서, 50% 이상의 제2 구획, 70% 이상의 제2 구획, 또는 90% 이상의 제2 구획이 1개 이하의 제1 구획을 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 50% 이상의 제2 구획, 70% 이상의 제2 구획, 또는 90% 이상의 제2 구획이 정확하게 1개의 제1 구획을 함유할 수 있다.

[0011] 샘플 재료의 성분의 단편은 하나 이상의 주형 핵산 서열의 하나 이상의 단편을 포함할 수 있다. 주형 핵산 서열의 단편은 적어도 부분적으로는 그에 부착된 핵산 바코드 서열에 기초하여 서열분석될 수 있고, 특징 규명될 수 있다. 일부 경우에서, 주형 핵산 서열의 단편은 주형 핵산 서열의 개별 주형 핵산 서열의 단편을 주형 핵산 서

열의 개별 주형 핵산 서열, 또는 개별 주형 핵산 서열의 유래가 된 계놈에 대해 지도화함으로써 특징 규명될 수 있다. 일부 경우에서, 주형 핵산 서열의 단편은 적어도 상이한 핵산 바코드 서열의 개별 핵산 바코드 서열을 확인하고, 개별 핵산 바코드 서열에 부착된 주형 핵산 서열의 단편의 개별 단편의 서열을 확인함으로써 특징 규명될 수 있다.

[0012] 본 개시내용의 추가의 측면은 샘플 재료를 바코딩하는 방법을 제공한다. 복수 개의 상이한 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 제1 구획을 제공할 수 있다. 각각의 제1 구획은 그와 회합된 동일한 핵산 바코드 서열을 가지는 복수 개의 핵산 바코드 분자를 포함할 수 있다. 제1 구획은 샘플 재료의 성분과 함께 복수 개의 제2 구획으로 공동 구획화될 수 있다. 바코드 분자는 제1 구획으로부터 제2 구획으로 유리될 수 있다. 이어서, 유리된 바코드 분자는 제2 구획 내의 샘플 재료의 성분에 부착될 수 있다.

[0013] 본 개시내용의 추가의 측면은 샘플 재료를 바코딩하는 방법을 제공한다. 활성화가능한 핵산 바코드 서열을 제공할 수 있고, 이는 샘플 재료의 하나 이상의 성분과 함께 제1 구획으로 구획화될 수 있다. 활성화가능한 핵산 바코드 서열은 활성화되어 제1 구획에서 활성 핵산 바코드 서열을 생성할 수 있다. 활성 핵산 바코드 서열은 하나 이상의 샘플 재료의 성분에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 활성화가능한 핵산 바코드 서열은 활성화가능한 핵산 바코드 서열을 제1 구획 내의 제2 구획으로부터 유리시킴으로써 활성화될 수 있다. 일부 경우에서, 활성화가능한 핵산 바코드 서열은 활성화가능한 핵산 바코드 서열로부터 제거가능한 보호기를 제거함으로써 활성화될 수 있다.

[0014] 본 개시내용의 추가의 측면은 하나 이상의 샘플 성분을 포함하는 제1 구획, 및 제1 구획 내에 함유되어 있는 제2 구획을 포함하는 조성물을 제공한다. 제2 구획은 그와 유리가능하게 회합된 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 가질 수 있고, 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 구획은 에멀전 중 수성 액적을 포함할 수 있고/거나, 제2 구획은 마이크로캡슐 또는 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제2 구획은 광 분해성 비드, 화학 분해성 비드, 및/또는 열 분해성 비드일 수 있는 분해성 비드를 포함할 수 있다. 분해성 비드는 화학적으로 절단가능한 가교결합, 예를 들어, 이황화 가교결합을 포함할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 결합에 의해 제2 구획과 유리가능하게 결합될 수 있다. 절단가능한 결합은 예를 들어, 화학적으로 절단가능한 결합, 광 절단가능한 결합, 및/또는 열적으로 절단가능한 결합을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 절단가능한 결합은 이황화 결합이다. 추가로, 샘플 성분은 예를 들어, 핵산(예컨대, 계놈 핵산, 예컨대, 계놈 DNA) 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 핵산은 길이가 약 1 kb 내지 약 100 kb, 길이가 약 5 kb 내지 약 50 kb, 또는 길이가 약 10 kb 내지 약 30 kb일 수 있는 핵산 단편을 포함할 수 있다.

[0015] 일부 경우에서, 조성물은 복수 개의 제1 구획 및 복수 개의 상이한 제2 구획을 포함한다. 각각의 상이한 제2 구획은 별개의 제1 구획 내에 배치될 수 있고, 그와 유리가능하게 회합된 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 각 제2 구획과 회합된 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있고, 상이한 제2 구획과 회합된 올리고뉴클레오티드는 상이한 바코드 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 상이한 제2 구획은 1000 개 이상의 상이한 제2 구획, 10000개 이상의 상이한 제2 구획, 100000개 이상의 상이한 제2 구획, 또는 500000 개 이상의 상이한 제2 구획을 포함할 수 있다.

[0016] 본 개시내용의 추가의 측면은 핵산 샘플을 바코딩된 비드의 라이브러리와 조합하여 혼합물을 형성하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 혼합물은 적어도 구획의 서브세트가 1개 이하의 바코딩된 비드를 포함하도록 복수 개의 구획으로 구획화될 수 있다. 구획 내에서 바코드는 바코딩된 비드로부터 유리될 수 있다. 일부 경우에서, 바코드는 공지된 서열로 미리 합성될 수 있고/거나, 복수 개의 랜덤 N-mer을 포함할 수 있다. 랜덤 N-mer은 예를 들어, 구획 내에서 핵산 증폭 반응을 수행하기 위해 핵산의 샘플에 하이브리드화될 수 있다. 일부 경우에서, 바코딩된 비드는 환원제에 의해 용해될 수 있고, 이황화 결합을 포함할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 샘플 핵산은 바코딩된 비드와의 조합 이전에 단편화될 수 있거나, 또는 단편화될 수 없는 계놈 DNA일 수 있다. 일부 경우에서, 바코드는 환원제 작용에 의해 바코딩된 비드로부터 유리될 수 있다. 일부 경우에서, 바코딩된 비드는 이황화 결합으로 가교결합된 매트릭스를 포함할 수 있고, 바코드는 바코딩된 비드를 용해시키는 환원제 작용에 의해 바코딩된 비드로부터 유리될 수 있다. 일부 경우에서, 바코드는 구획 가열에 의해 바코딩된 비드로부터 유리될 수 있다.

[0017] 일부 경우에서, 핵산 샘플은 바코딩된 비드의 라이브러리와 조합될 수 있고/거나, 둘의 혼합물을 미세유체 디바이스(microfluidic device)를 사용하여 복수 개의 구획으로 구획될 수 있다. 일부 예에서, 구획은 유중수 에멀전 내의 수성 액적일 수 있다. 혼합물을 에멀전 내의 수성 액적으로 구획화하는 것을 미세유체 디바이스를 사용

하여 완성될 수 있다.

- [0018] 미세유체 디바이스는 액적 발생기(generator)일 수 있고, 일부 경우에서, 유출 채널에 유동적으로(fluidly) 연결된 접합부에서 만나는 제1 유입 채널 및 제2 유입 채널을 포함할 수 있다. 핵산 샘플은 제1 유입 채널 내로 도입될 수 있고, 바코딩된 비드의 라이브러리는 제2 유입 채널에 도입되어 유출 채널에서 핵산 샘플과 바코딩된 비드의 라이브러리의 혼합물을 생성할 수 있다. 일부 경우에서, 환원제 또한 제1 유입 채널 및 제2 유입 채널 중 하나 또는 그 둘 모두에 도입될 수 있다. 또한, 제1 유입 채널 및 제2 유입 채널은 서로 실질적으로 수직인 각도를 형성할 수 있다.
- [0019] 일부 경우에서, 유출 채널은 접합부에서 제3 유입 채널에 유동적으로 연결될 수 있다. 유중수 예멸전 내의, 및 바코딩된 비드를 포함하는 수성 액적이 형성되도록 오일이 제3 유입 채널 내로 도입될 수 있다. 액적은 평균적으로, 예를 들어, 10개 이하의 바코딩된 비드, 7개 이하의 바코딩된 비드, 5개 이하의 바코딩된 비드, 3개 이하의 바코딩된 비드, 2개 이하의 바코딩된 비드, 또는 1개 이하의 바코딩된 비드를 포함할 수 있다. 또한, 미세유체 디바이스는 접합부에서 제3 유입 채널 및 유출 채널과 교차하는 제4 유입 채널을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 오일은 또한 제4 유입 채널에 제공될 수 있다. 일부 경우에서, 미세유체 디바이스는 제1 유입 채널, 제2 유입 채널, 또는 제1 유입 채널과 제2 유입 채널의 접합부와 교차하는 추가의 유입 채널을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 환원제는 추가의 유입 채널 내로 도입될 수 있다.
- [0020] 본 개시내용의 추가의 측면은 동일한 바코드 서열 및 가변 도메인을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드에 공유적으로 연결된 비드를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 또한 프라이머 결합 부위 및/또는 범용 프라이머를 포함할 수 있다. 추가로, 동일한 바코드 서열의 길이는 약 6개의 뉴클레오티드 내지 약 20개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오티드는 이황화 결합에 의해 비드에 공유적으로 연결될 수 있고/거나, 비드는 시스타민 또는 변형된 시스타민을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 환원제에 의해 실질적으로 용해될 수 있다. 추가로, 일부 경우에서, 비드는 동일한 바코드 서열을 포함하는 약 1000000개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 약 30% 이상의 올리고뉴클레오티드는 상이한 서열을 가지는 가변 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 가변 도메인은 랜덤 N-mer일 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 절단가능한 결합, 예컨대, 화학적으로 절단가능한 결합, 광 절단가능한 결합, 및 열적으로 절단가능한 결합을 통해 올리고뉴클레오티드에 공유적으로 연결될 수 있다.
- [0021] 본 개시내용의 추가의 측면은 각각의 올리고뉴클레오티드가 불변 영역 및 가변 영역을 포함하는 것인, 복수 개의 1000000개 초과인 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있는 비드를 포함하는 조성물을 제공한다. 비드는 환원제에 의해 실질적으로 용해될 수 있다. 일부 경우에서, 각각의 올리고뉴클레오티드는 동일한 불변 영역을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 25% 이상의 올리고뉴클레오티드는 동일한 불변 영역을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 불변 영역은 바코드 서열일 수 있다. 일부 경우에서, 25% 이상의 올리고뉴클레오티드는 상이한 서열을 포함하는 가변 영역을 가질 수 있다. 본 개시내용의 추가의 측면은 각각이, 불변 영역 및 가변 영역을 포함하는 복수 개의 1000000개 초과인 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 약 1000000개 이상의 비드를 포함하는 라이브러리를 제공한다. 일부 경우에서, 약 25% 이상의 비드가 상이한 뉴클레오티드 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드를 포함한다.
- [0022] 본 개시내용의 추가의 측면은 각각의 비드가 그에 유리가능하게 커플링된 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인 복수 개의 비드를 포함하는 조성물을 제공한다. 개별 비드와 결합된 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 도메인 및 가변 도메인을 포함할 수 있다. 공통 바코드 도메인은 2개 이상의 비드 사이에 상이할 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 상이한 비드에 커플링된 약 10000개 이상의 상이한 바코드 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각각의 비드는 그에 유리가능하게 커플링된 약 1000000개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 개시내용의 추가의 측면은 작용화된 비드를 생성하는 방법을 제공한다. 복수 개의 중합체 또는 단량체를 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 혼합할 수 있다. 중합체 또는 단량체 사이에 이황화 결합이 형성되도록 중합체 또는 단량체를 가교결합하여 경화된 비드를 형성할 수 있다. 또한, 공유 결합은 올리고뉴클레오티드와 중합체 또는 단량체 사이에 형성되도록 일어날 수 있다. 일부 경우에서, 중합체 또는 단량체는 아크릴아미드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 중합체 및 단량체는 가교결합하여 경화된 비드를 형성할 수 있고, 공유 결합은 동시에 또는 순차적으로 올리고뉴클레오티드와 중합체 또는 단량체 사이에 형성되도록 일어날 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 아크리다이트(acrydite) 모이머에 연결될 수 있는 프라이머(예컨대, 범용 프라이머, 서열분석 프라이머)를 포함할 수 있다.

- [0024] 추가로, 하나 이상의 추가의 올리고뉴클레오타드가 올리고뉴클레오타드에 부착될 수 있다. 추가의 올리고뉴클레오타드는 바코드 서열일 수 있고, 따라서, 올리고뉴클레오타드에의 부착시, 바코딩된 비드가 형성될 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 서열의 길이는 약 6개의 뉴클레오타드 내지 약 20개의 뉴클레오타드 길이일 수 있다.
- [0025] 일부 경우에서, 작용화된 비드를 복수 개의 제1 추가의 올리고뉴클레오타드와 조합하여 혼합물을 생성할 수 있다. 혼합물은 평균적으로 각 구획이 1개 이하의 제1 추가의 올리고뉴클레오타드를 포함하도록 복수 개의 구획으로 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 유중수 에멀전 내의 수성 액적일 수 있고/거나, 미세유체 디바이스에 의해 생성될 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 벌크 유화 공정에 의해 생성된다. 또한, 제1 추가의 올리고뉴클레오타드를 구획 내에서 증폭시켜 증폭된 제1 올리고뉴클레오타드를 포함하는 비드를 제조할 수 있다. 일부 경우에서, 증폭 동안 포획 프라이머가 사용될 수 있고, 포획 프라이머는 포획 모이어티, 예컨대, 비오틴, 스트렙타아비딘 또는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST: glutathione-S-transferase)에 부착될 수 있다. 증폭 후, 구획의 내용물을 공통 베셀 내로 풀링시킬 수 있다. 일부 경우에서, 프로브를 증폭된 제1 올리고뉴클레오타드에 하이브리드화시킬 수 있다. 프로브는 포획 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0026] 추가로, 하나 이상의 제2 추가의 올리고뉴클레오타드는 증폭된 제1 올리고뉴클레오타드에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제2 추가의 올리고뉴클레오타드는 랜덤 N-mer 서열 및/또는 의사(pseudo) 랜덤 N-mer 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제2 추가의 올리고뉴클레오타드는 범용 서열 부분을 포함할 수 있는 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머 결합 부위는 우라실 함유 뉴클레오타드를 포함할 수 있다. 또한, 범용 서열 부분은 서열분석 장치와 양립가능하고/거나, 우라실 함유 뉴클레오타드의 서브섹션을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 개시내용의 추가의 측면은 바코드 라이브러리를 제조하는 방법을 제공한다. 복수 개의 별개의 제1 비드 집단을 제공할 수 있고, 제1 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타드를 별개의 제1 비드 집단에 부착시킬 수 있고, 이로써, 각각의 별개의 제1 비드 집단은 그에 부착된 상이한 제1 바코드 서열 세그먼트를 포함한다. 이어서, 별개의 비드 집단을 풀링시켜 제1 풀링된 비드 집단을 제공할 수 있다. 이어서, 제1 풀링된 비드 집단을 복수 개의 제2 비드 집단으로 분리할 수 있다. 제2 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타드를 제2 비드 집단에 부착된 제1 올리고뉴클레오타드에 부착시킬 수 있고, 이로써, 각각의 별개의 제2 비드 집단은 상이한 제2 바코드 서열 세그먼트를 포함한다. 이어서, 별개의 제2 비드 집단을 풀링시켜 바코드 라이브러리를 포함하는 제2 풀링된 비드 집단을 제공할 수 있다.
- [0028] 일부 경우에서, 제1 바코드 서열 세그먼트 및 제2 바코드 서열 세그먼트는 독립적으로 제1의 바코드 서열 세그먼트 세트로부터 선택될 수 있다. 추가로, 제1 바코드 서열 세그먼트 및 제2 바코드 서열 세그먼트는 독립적으로 4개 이상의 뉴클레오타드 길이, 6개 이상의 뉴클레오타드 길이, 또는 10개 이상의 뉴클레오타드 길이를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 바코드 서열 세그먼트 및 제2 바코드 서열 세그먼트는 독립적으로 약 4개의 뉴클레오타드 길이 내지 약 20개의 뉴클레오타드 길이를 포함할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 제1 비드 집단은 100개 이상의 상이한 제1 바코드 서열 세그먼트 또는 1000개 이상의 상이한 제1 바코드 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 추가로, 일부 경우에서, 1000000개 이상의 제1 올리고뉴클레오타드 분자는 각각의 별개의 제1 비드 집단 중 각 비드에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제2 비드 집단은 100개 이상의 상이한 제2 바코드 서열 세그먼트, 또는 1000개 이상의 상이한 제2 바코드 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 1000000개 이상의 제2 올리고뉴클레오타드 분자는 각각의 제2 비드 집단 중 각 비드에 부착될 수 있다.
- [0029] 추가로, 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타드 및 제2 올리고뉴클레오타드 중 적어도 하나는 기능성 서열, 예컨대, 프라이머 서열, 프라이머 어닐링 서열, 부착 서열, 및 서열분석 프라이머 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타드 및 제2 올리고뉴클레오타드 중 적어도 하나는 우라실 함유 뉴클레오타드 및 비천연 뉴클레오타드 중 하나 이상의 것을 포함하는 서열 세그먼트를 포함할 수 있다.
- [0030] 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타드를 제1 올리고뉴클레오타드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적이고, 별개의 제1 비드 집단에 부착된 올리고뉴클레오타드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적인 스플린트(splint) 서열을 제공함으로써 별개의 제1 비드 집단에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타드가 별개의 제1 비드 집단에 유리가능하게 부착되도록 별개의 제1 비드 집단에 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 제1 올리고뉴클레오타드를 절단가능한 결합을 통해 별개의 제1 비드 집단에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타드를 별개의 제1 비드 집단에 직접 또는 간접적으로 부착시킬 수 있다.
- [0031] 추가로, 일부 경우에서, 제2 올리고뉴클레오타드를 결합에 의해 제1 올리고뉴클레오타드에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적이고, 제2 올리고뉴클레오타드의 적

어도 일부에 부분적으로 상보적인 스플린트 서열을 제공함으로써 제2 올리고뉴클레오티드를 제1 올리고뉴클레오티드에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 스플린트 서열은 제1 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화되었을 때, 제1 오버행 서열을 제공할 수 있고, 제2 바코드 서열 세그먼트는 제1 오버행 서열에 상보적인 제2 오버행 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 오버행 서열 및 제2 오버행 서열의 길이는 약 2 뉴클레오티드 길이 내지 약 6 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 추가로, 일부 경우에서, 제1 오버행 서열은 복수 개의 상이한 오버행 서열을 포함할 수 있고, 제2 올리고뉴클레오티드는 복수 개의 상이한 제1 오버행 서열에 상보적인 복수 개의 상이한 제2 오버행 서열을 포함할 수 있다.

[0032] 또한, 별개의 제1 비드 집단은 분해성 비드, 예컨대, 화학 분해성 비드, 광 분해성 비드, 및/또는 열 분해성 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 별개의 제1 비드 집단은 화학적으로 환원가능한 가교제, 예를 들어, 이황화 결합을 포함하는 화학적으로 환원가능한 가교제를 포함하는 비드를 포함할 수 있다.

[0033] 일부 경우에서, 제3 올리고뉴클레오티드는 제1 올리고뉴클레오티드에 부착된 제2 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 제3 올리고뉴클레오티드는 프라이머 서열(예컨대, 범용 프라이머 서열, 표적화된 프라이머 서열, 또는 랜덤 서열)일 수 있고/거나, 랜덤 N-mer 서열일 수 있는 기능성 서열을 포함할 수 있다. 제3 올리고뉴클레오티드가 랜덤 N-mer 서열을 포함하는 경우, 랜덤 N-mer 서열의 길이는 약 5개의 뉴클레오티드 길이 내지 약 25개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0034] 본 개시내용의 추가의 측면은 바코드 라이브러리를 제조하는 방법을 제공한다. 각각의 상이한 제1 비드 집단이 그에 부착된 상이한 제1 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인, 복수 개의 상이한 제1 비드 집단을 포함하는 제1 풀링된 비드 집단을 제공할 수 있다. 각각의 상이한 제1 올리고뉴클레오티드는 상이한 제1 바코드 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 제1 풀링된 비드 집단은 복수 개의 제2 비드 집단으로 분리될 수 있다. 제2 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드는 이미 제2 비드 집단에 부착된 제1 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있고, 여기서, 각각의 제2 비드 집단은 상이한 제2 바코드 서열 세그먼트를 포함한다. 제2 비드 집단은 풀링되어 바코드 라이브러리를 포함하는 제2 풀링된 비드 집단을 제공할 수 있다.

[0035] 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오티드는 제1 풀링된 비드 집단 중 비드에 유리가능하게 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 결합을 통해 제1 풀링된 비드 집단 중 비드에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 풀링된 집단 중 비드는 각각 그에 부착된 1000000개 이상의 제1 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 풀링된 비드 집단은 10개 이상의 상이한 제1 비드 집단, 100개 이상의 상이한 제1 비드 집단, 또는 500개 이상의 상이한 제1 비드 집단을 포함할 수 있다.

[0036] 본 개시내용의 추가의 측면은 복수 개의 상이한 올리고뉴클레오티드를 포함하는 바코드 라이브러리를 제공한다. 각각의 상이한 올리고뉴클레오티드는 제1의 바코드 서열 세그먼트 세트로부터 선택된 제1 바코드 서열 세그먼트; 제2의 바코드 서열 세그먼트 세트로부터 선택된 제2 바코드 서열 세그먼트; 및 제1 바코드 서열 세그먼트 및 제2 바코드 서열 세그먼트를 연결하는 연결 서열을 포함할 수 있다. 연결 서열의 길이는 약 2개의 뉴클레오티드 길이 내지 약 6개의 뉴클레오티드 길이일 수 있고, 연결 서열 세트로부터 선택될 수 있다. 일부 경우에서, 연결 서열 세트는 약 2개의 상이한 연결 서열 내지 약 50개의 상이한 연결 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 제1의 바코드 서열 세그먼트 세트 및 제2의 바코드 서열 세그먼트 세트는 동일한 것이다.

[0037] 본 개시내용의 추가의 측면은 주형 핵산 서열을 증폭시키는 방법을 제공한다. 주형 핵산 서열 및 복수 개의 유리가능하게 부착된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비드는 구획으로 함께 공동 구획화될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 주형 핵산 서열의 하나 이상의 영역에 상보적인 프라이머 서열을 포함할 수 있고, 공통 서열을 포함할 수 있다. 프라이머 서열은 주형 핵산 서열에 어닐링될 수 있고, 프라이머 서열은 연장되어 하나 이상의 제1 카피가 프라이머 서열 및 공통 서열을 포함하는 것인, 주형 핵산 서열의 적어도 일부의 하나 이상의 제1 카피를 제조할 수 있다.

[0038] 일부 경우에서, 프라이머 서열은 가변 프라이머 서열(예컨대, 랜덤 N-mer)을 포함할 수 있고, 표적화된 프라이머 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 에멀전 중 액적을 포함할 수 있다. 프라이머 서열의 주형 핵산 서열로의 어닐링에 앞서, 올리고뉴클레오티드는 비드로부터 구획으로 유리될 수 있다. 일부 예에서, 폴리머라제 효소(예컨대, 엑소뉴클레아제 결핍 폴리머라제 효소)가 구획에 제공될 수 있다. 또한, 프라이머 서열의 연장은 가닥 치환 폴리머라제 효소(예컨대, 엑소뉴클레아제 활성이 없는 열 안정성 가닥 치환 폴리머라제 효소)를 사용하여 프라이머 서열을 연장시키는 것을 포함할 수 있다. 추가로, 올리고뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제 저항성일 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 포스포로티오에이트 결합은 올리고뉴클레오티드 중 말단 뉴클레오티드간 결합에서 포스포로티오에

이트 결합을 포함할 수 있다.

[0039] 추가로, 하나 이상의 가변 프라이머 서열은 제1 카피에 어닐링될 수 있고, 연장되어 제1 카피로부터 하나 이상의 제2 카피를 제조할 수 있으며, 이로써, 제2 카피는 하나 이상의 가변 프라이머 서열 및 공통 서열을 포함한다. 일부 경우에서, 제2 카피는 제1 카피들 중 개별 제1 카피의 적어도 일부에 상보적인 서열, 및 하나 이상의 가변 프라이머 서열의 개별 가변 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제2 카피는 우선적으로 어닐링 조건하에서 헤어핀 분자를 형성할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 가변 프라이머 서열의 연장 동안 복사되지 않는 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 복사되지 않는 서열 세그먼트는, 예를 들어, 하나 이상의 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 추가로, 상기 방법의 임의의 단계를 반복하여 증폭된 핵산을 제조할 수 있다.

[0040] 본 개시내용의 추가의 측면은 복수 개의 상이한 핵산을 증폭시키는 방법을 제공한다. 상이한 핵산은 별개의 제1 구획으로 구획될 수 있고, 여기서, 각 제1 구획은 그와 유리가능하게 회합된 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 가지는 제2 구획을 포함한다. 주어진 제2 구획과 회합된 복수 개의 올리고뉴클레오티드는 가변 프라이머 서열 및 바코드 서열을 포함할 수 있으며, 올리고뉴클레오티드는 상이한 바코드 서열을 포함하는 상이한 제2 구획과 결합되어 있다. 복수 개의 제2 구획과 회합된 올리고뉴클레오티드는 제1 구획 내로 유리될 수 있다. 제1 구획 중의 가변 프라이머 서열은 제1 구획 내의 핵산으로 유리되고, 연장되어 제1 구획 내의 핵산 중 적어도 일부의 하나 이상의 카피를 제조할 수 있으며, 이로써, 카피는 제1 구획 내로 유리되는 결합된 바코드 서열 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 경우에서, 제1 구획은 에멀전 중 액적을 포함할 수 있고, 제2 구획은 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 그와 회합된 100000개 초과와 올리고뉴클레오티드 또는 그와 회합된 1000000개 초과와 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제2 구획은 1000개 이상의 상이한 바코드 서열, 10000개 이상의 상이한 바코드 서열, 또는 100000개 이상의 상이한 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0041] 본 개시내용의 추가의 측면은 전체 게놈(whole genome) 증폭 방법을 제공한다. 랜덤 프라이머를 게놈 핵산에 하이브리드화시킬 수 있다. 랜덤 프라이머를 범용 핵산 서열 및 핵산 바코드 서열에 부착시킬 수 있고, 여기서, 범용 핵산 서열은 하나 이상의 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 랜덤 프라이머를 연장시켜 증폭된 생성물을 형성할 수 있고, 증폭된 생성물에서 부분 헤어핀 분자를 형성하는 분자내 하이브리드화 반응이 이루어지도록 하는데 적합한 조건에 증폭된 생성물을 노출시킬 수 있다. 일부 경우에서, 랜덤 프라이머는 랜덤 N-mer 서열일 수 있다. 일부 경우에서, 범용 핵산 서열은 우라실을 포함하지 않는 10개 이상의 뉴클레오티드로 이루어진 세그먼트를 포함할 수 있다. 또한, 본 방법은 올리고뉴클레오티드 차단제의 존재하에서 수행될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 차단제는 범용 핵산 서열의 적어도 일부에 하이브리드화할 수 있고/거나, C3 스페이스(/3SpC3/), 디데옥시-C(/3ddC/), 또는 3' 포스페이트를 포함할 수 있다.

[0042] 본 개시내용의 추가의 측면은 핵산을 증폭시키는 방법을 제공한다. 게놈 성분을 복수 개의 제1 단편으로 단편화시킬 수 있다. 제1 단편은 복수 개의 올리고뉴클레오티드와 함께 복수 개의 구획으로 공동 구획화될 수 있다. 각각의 구획 중 올리고뉴클레오티드는 프라이머 서열 및 공통 서열을 포함할 수 있다. 각각의 구획 중 프라이머 서열은 각각의 구획 내의 제1 단편의 복수 개의 상이한 영역에 어닐링될 수 있고, 프라이머 서열은 제1 단편을 따라 연장되어 구획 내의 증폭된 제1 단편을 제조할 수 있다. 일부 경우에서, 구획 내의 증폭된 제1 단편은 1X 이상의 커버리지, 게놈 성분의 2X 이상의 커버리지, 또는 게놈 성분의 10X 이상의 커버리지의 게놈 성분을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 게놈 성분은 염색체를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 게놈 성분은 유기체의 전체 게놈을 포함할 수 있다.

[0043] 본 개시내용의 추가의 측면은 핵산 세그먼트를 특징 규명하는 방법을 제공한다. 핵산 세그먼트는 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비드와 함께 구획으로 공동 구획화될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 핵산 세그먼트의 단편에 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착될 수 있고, 이로써, 공통 핵산 바코드 서열은 핵산 세그먼트의 단편에 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착된다. 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피 및 부착된 공통 핵산 바코드 서열은 서열분석될 수 있고, 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 카피는 적어도 부분적으로는 그의 공통 핵산 바코드 서열에의 부착에 기초하여 핵산 세그먼트 내에서 연결된 것으로 특징 규명될 수 있다. 핵산 세그먼트 및 비드는 예를 들어, 에멀전 중 액적으로 함께 공동 구획화될 수 있거나, 또는 마이크로캡슐로 함께 공동 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 세그먼트의 단편은 핵산 세그먼트의 중복 단편을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 세그먼트의 단편은 2X 초과와 커버리지 또는 핵산 세그먼트의 10X 초과와 커버리지의 핵산 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 비드에 유리가능하게 부착될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오

티드는 비드에 자극(예컨대, 열 자극, 광 자극, 화학적 자극 등)을 가하였을 때 비드로부터 유리될 수 있다. 일부 경우에서, 자극을 가하였을 때 올리고뉴클레오티드와 비드 사이의 결합을 절단될 수 있고/거나, 비드는 분해될 수 있으며, 이로써, 올리고뉴클레오티드가 비드로부터 유리된다. 추가로, 비드는 그에 회합된 약 10000개 이상의 올리고뉴클레오티드, 그에 회합된 약 100000개 이상의 올리고뉴클레오티드, 그에 회합된 약 1000000개 이상의 올리고뉴클레오티드, 그에 회합된 약 10000000개 이상의 올리고뉴클레오티드 또는 그에 회합된 약 100000000개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 추가로, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 기능성 서열, 예컨대, 프라이머 서열, 프라이머 어닐링 서열, 또는 고정화 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피 및 부착된 공통 핵산 바코드 서열은 합성 공정에서 서열분석을 통해서 서열분석될 수 있다.

[0045] 추가로, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 핵산 세그먼트의 일부 또는 그의 상보체와 어닐링할 수 있는 프라이머 서열을 포함할 수 있다. 프라이머 서열은 연장되어 핵산 세그먼트의 적어도 일부 또는 그의 상보체를 복제함으로써 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 핵산 세그먼트의 일부 또는 그의 상보체의 카피를 제조할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 제1 서열분석 프라이머 서열을 포함할 수 있다.

[0046] 일부 경우에서, 복수 개의 핵산 세그먼트는 복수 개의 상이한 비드와 함께 복수 개의 별개의 구획으로 공동 구획화될 수 있고, 이로써, 별개의 구획의 복수 개의 상이한 구획의 각각의 구획은 단일 비드를 함유한다. 각각의 비드는 그에 부착된 공통 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 여기서, 상이한 비드는 복수 개의 상이한 바코드 서열을 포함한다. 각각의 구획 중의 바코드 서열은 별개의 구획 내의 핵산 세그먼트의 단편에 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착될 수 있다. 이어서, 단편 또는 카피는 별개의 구획으로부터 풀링될 수 있고, 단편 또는 카피 및 임의의 부착된 바코드 서열을 서열분석함으로써 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피를 제공할 수 있다. 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피는 부분적으로, 공통 바코드 서열을 포함하는 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피에 기초하여 공통 핵산 세그먼트로부터 유래된 것으로서 특정 규명될 수 있다. 일부 경우에서, 핵산 세그먼트는 계놈의 적어도 일부의 단편을 포함할 수 있다. 상기 경우에, 서열은 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피로부터 조립될 수 있고, 이로써 계놈의 적어도 일부의 연속된 서열을 제공할 수 있다. 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피로부터의 서열의 조립은 부분적으로는 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피의 각각의 뉴클레오티드 서열 및 공통 바코드 서열을 포함하는 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피에 기초할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피는 부분적으로는 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피의 각각의 뉴클레오티드 서열 및 공통 바코드 서열을 포함하는 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피에 기초하여 특정 규명될 수 있다.

[0047] 일부 경우에서, 상이한 비드는 1000개 이상의 상이한 바코드 서열, 10000개 이상의 상이한 바코드 서열, 100000개 이상의 상이한 바코드 서열, 또는 1000000개 이상의 상이한 바코드 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 별개의 구획 중 2개 이상의 구획은 동일한 바코드 서열을 포함하는 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 1% 이상의 별개의 구획은 동일한 바코드 서열을 가지는 비드를 포함한다.

[0048] 본 개시내용의 추가의 측면은 표적 핵산을 특정 규명하는 방법을 제공한다. 표적 핵산의 제1 단편은 복수 개의 액적으로 구획화될 수 있으며, 여기서, 각 액적은 그에 복수 개의 올리고뉴클레오티드가 부착된 비드를 포함한다. 주어진 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있다. 공통 바코드 서열은 제1 단편의 제2 단편에 부착될 수 있고, 액적은 풀링될 수 있다. 제2 단편 및 부착된 바코드 서열은 서열분석될 수 있고, 제2 단편은 적어도 부분적으로는 공통 바코드 서열을 포함하는 제2 단편에 기초하여 제1 단편 중 하나 이상의 것에 대해 지도화될 수 있다.

[0049] 본 개시내용의 추가의 측면은 핵산 서열분석 방법을 제공한다. 복수 개의 표적 핵산 서열을 제공할 수 있고, 복수 개의 별개의 구획으로 분리할 수 있다. 별개의 구획의 각 구획은 하나 이상의 표적 핵산 서열 및 그에 부착된 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비드를 포함할 수 있다. 주어진 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 구획 내의 하나 이상의 표적 핵산 서열의 단편에, 또는 하나 이상의 표적 핵산 서열의 일부의 카피에 부착될 수 있으며, 이로써, 공통 바코드 서열은 하나 이상의 표적 핵산 서열의 단편, 또는 하나 이상의 표적 핵산 서열의 일부의 카피에 부착될 수 있다. 별개의 구획은 풀링될 수 있고, 하나 이상의 표적 핵산 서열의 단편, 또는 하나 이상의 표적 핵산 서열의 일부의 카피 및 부착된 바코드 서열은 서열분석될 수 있고, 이로써, 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열을 제공할 수 있다. 일부 경우에서, 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열은 부분적으로는 바코딩된 단편 서열 또는

바코딩된 카피 서열의 바코드 일부에 기초하여 하나 이상의 연속된 핵산 서열로 조립될 수 있다.

[0050] 본 개시내용의 추가의 측면은 핵산 세그먼트를 특징 규명하는 방법을 제공한다. 핵산 세그먼트는 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비드와 함께 제1 액적으로 공동 구획화될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 핵산 세그먼트의 단편에, 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착될 수 있고, 이로써, 공통 핵산 바코드 서열은 핵산 세그먼트의 단편에 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착될 수 있다. 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피 및 부착된 공통 핵산 바코드 서열은 서열분석될 수 있으며, 이로써, 복수 개의 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열을 제공할 수 있다. 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열은 적어도 부분적으로는 공통 핵산 바코드 서열에 기초하여 하나 이상의 연속된 핵산 서열로 조립될 수 있다. 일부 경우에서, 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열은 부분적으로는 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열의 바코드가 아닌 부분의 핵산 서열에 기초하여 조립될 수 있다.

[0051] 본 개시내용의 추가의 측면은 핵산 서열분석 방법을 제공한다. 복수 개의 표적 핵산 서열을 제공할 수 있고, 표적 핵산 서열을 복수 개의 별개의 구획으로 분리할 수 있다. 별개의 구획의 각 구획은 하나 이상의 표적 핵산 서열 및 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 주어진 구획 중의 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있고, 복수 개의 별개의 구획은 10000개 이상의 상이한 바코드 서열을 포함할 수 있다. 각 구획 중의 공통 바코드 서열은 구획 내의 하나 이상의 표적 핵산 서열의 단편에, 또는 하나 이상의 표적 핵산 서열의 일부의 카피에 부착될 수 있다. 별개의 구획은 풀링될 수 있고, 하나 이상의 표적 핵산 서열의 단편 또는 하나 이상의 표적 핵산 서열의 일부의 카피 및 부착된 바코드 서열은 서열분석될 수 있다. 일부 경우에서, 별개의 구획은 100000개 이상의 상이한 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0052] **참고 문헌 인용**

[0053] 본 명세서에서 언급된 모든 공개 문헌, 특허, 및 특허 출원은 그 전문이 본원에서 모든 목적을 위해 참조로 포함되며, 마치 각각의 개별 공개 문헌, 특허, 및 특허 출원이 참조로 포함된다고 구체적으로 및 개별적으로 명시된 바와 같은 정도로 포함된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0054] **도 1a**는 바코딩된 비드 제조에 관한 흐름도이다.
- 도 1b**는 서열분석을 위해 샘플을 처리하는 것에 관한 흐름도이다.
- 도 2**는 비드 제조에 관한 흐름도이다.
- 도 3a**는 제한 회석에 의해 바코드를 비드에 첨가하는 것에 관한 흐름도이다.
- 도 3b**는 추가의 서열을 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드에 첨가하는 것에 관한 흐름도이다.
- 도 4A-N**은 서열을 비드에 부착하는 것에 관한 다이어그램이다. "g/w"는 수중겔을 의미하고; "g/w/o"는 유중수중겔을 의미한다;
- 도 5**는 올리고뉴클레오티드에 부착된 겔 비드의 도해(5A), 에멀전 중 겔 비드 (GEM: Gel Beads in Emulsion)를 제조하는 데 사용된 미세유체 칩의 영상(5B) 뿐만 아니라, GEM의 영상(5C, D, E)을 제공하는 것이다.
- 도 6**은 올리고뉴클레오티드가 부착된 비드의 명시야(A, C, E) 및 형광(B, D, F) 영상을 제공하는 것이다.
- 도 7A-C**는 DNA에 부착된 비드의 형광 영상을 제공하는 것이다.
- 도 8A-F**는 바코드가 농축된 비드 집단의 영상을 제공하는 것이다.
- 도 9A-D**는 가열에 의한 비드 용해의 영상을 제공하는 것이다.
- 도 10A**는 작용화된 비드의 개략도를 제공하는 것이다. **도 10B-G**는 환원제로 용해된 비드의 영상을 제공하는 것이다.
- 도 11A**는 작용화된 비드의 개략도를 제공하는 것이다. **도 11B-D**는 비드가 상이한 조건하에서 제조되었을 때의 바코드 올리고뉴클레오티드 및 프라이머 이량체 쌍의 존재에 관하여 그래프로 도시한 것이다.
- 도 12**는 비드에 부착된 내용물에 관하여 그래프로 도시한 것이다.
- 도 13a**는 구획을 사용하여 바코드를 비드에 첨가하는 것을 예시한 흐름도이다.

- 도 13b는 추가의 서열을 비드에 첨가하는 것을 예시한 흐름도이다.
- 도 13c는 바코딩된 비드를 제조하기 위해 마이크로웰 플레이트에서 조합 접근법을 사용하는 것을 예시한 다이어그램이다.
- 도 14A-C는 범용 서열 (R1, P5) 및 우라실 함유 뉴클레오티드를 함유하는 올리고뉴클레오티드의 다이어그램이다.
- 도 15A-G는 서열분석을 위한 부분 헤어핀 증폭(PHASE: partial hairpin amplification for sequencing) 공정에서 사용된 단계의 다이어그램이다.
- 도 16A는 프라이머의 범용 부분 중 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 것에 관하여 그래프로 도시한 것이다.
- 도 16B는 반응 혼합물 중 아시NTP를 포함함으로써 증폭 생성물의 길이를 조절하는 것에 관하여 그래프로 도시한 것이다.
- 도 17은 차단제 올리고뉴클레오티드를 첨가함으로써 출발 부위 편향을 감소시키는 것에 관하여 그래프로 도시한 것이다.
- 도 18은 디지털 프로세서 및 그의 관련 컴포넌트의 흐름도이다.
- 도 19는 일루미나 서열분석기에 대한 일례의 서열을 제공하는 표이다.
- 도 20은 비드를 표지화하는 데 사용된 일례의 포획 모이어티 농도 목록을 제공하는 표이다.
- 도 21은 티민 함유 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머를 사용하여 수득된 서열분석 매트릭스 목록을 제공하는 표이다.
- 도 22는 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 프라이머를 사용하여 수득된 서열분석 매트릭스 목록을 제공하는 표이다.
- 도 23A-D는 바코딩된 비드를 제공하기 위하여 일례의 결찰 기반 조합 접근법을 사용하는 것을 도시한 개략도이다.
- 도 24A-B는 바코딩된 비드를 제공하기 위하여 결찰 기반 조합 접근법에서 스페이서 염기를 사용한 것에 관한 일례를 도시한 개략도이다.
- 도 25A-C는 바코딩된 비드를 제공하기 위하여 일례의 결찰 기반 조합 접근법을 사용하는 것을 도시한 개략도이다.
- 도 26은 바코딩된 비드를 제공하기 위하여 일례의 결찰 기반 조합 접근법에서 사용된 일례의 핵산을 도시한 개략도이다.
- 도 27은 바코딩된 비드를 제공하기 위한 일례의 결찰 기반 조합 접근법을 도시한 개략도이다.
- 도 28A-B는 가닥 특이 증폭에 적합한 일례의 표지화된 바코드 구성물을 개략적으로 나타낸 것이다.
- 도 29A-C는 중합되어 비드를 생성할 수 있는 일례의 단량체 및 가교제의 구조를 도시한 것이다.
- 도 30a-c는 비드를 생성하는 데 사용될 수 있는 일례의 방법을 구조로 도시한 것이다.
- 도 31은 중을 비드에 부착시키는 데 사용될 수 있는 작용기를 포함하는 일례의 비드를 도시한 개략도이다.
- 도 32는 중합 반응 동안 사용될 수 있는 일례의 개시제의 구조를 도시한 것이다.
- 도 33a는 바코드 프라이머를 도시한 개략도이다. 도 33b-e는 실시예 16에 기술된 일례의 증폭 반응 실험에 상응하는 데이터를 그래프로 도시한 것이다.
- 도 34A-C는 일례의 헤어핀 구성물의 개략도이다.
- 도 35a-b는 일례의 비드 작용화 방법에 관한 개략도이다.
- 도 36은 실시예 17에 기술된 겔 전기영동 실험 동안 수득된 겔 사진이다.
- 도 37a는 실시예 18에 기술된 올리고뉴클레오티드를 도시한 개략도이다. 도 37b는 실시예 18에 기술된 겔 전기영동 실험 동안 수득된 겔 사진이다. 도 37c는 실시예 18에 기술된 형광 현미경법 실험 동안 수득된 비드에 관

한 현미경 사진이다.

도 38은 예시적인 핵산 바코딩 및 증폭 공정을 도시한 개략도를 제공하는 것이다.

도 39는 본원에 기술된 방법을 핵산 서열분석 및 조립에 적용한 일례를 도시한 개략도를 제공하는 것이다.

도 40은 본원에 기술된 바와 같은, 핵산의 바코딩 및 증폭 후의 대안적 처리 단계의 일례를 제공하는 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

**상세한 설명**

**I. 일반적 개요**

본 개시내용은 시약을 샘플 성분의 서브세트에 조절된 방식으로 전달하여 샘플 재료를 처리한 후, 이어서, 부분적으로 전달된 시약을 이용하여 상기 샘플 성분을 분석하는 데 유용한 방법, 시스템, 및 조성물을 제공한다. 많은 경우에서, 방법 및 조성물은 샘플 처리에, 특히, 핵산 분석 적용, 일반적으로, 핵산 서열분석 적용에 특히 사용된다. 다양한 시약 세트, 예컨대, 바코드 서열을 함유하는 다수의 올리고뉴클레오티드에 부착된 다양한 비드 라이브러리를 포함하는 비드 조성물, 및 상기 비드 조성물의 제조 방법 및 사용 방법이 본 개시내용에 포함된다.

비드 제조 방법은 일반적으로 예컨대, 수용액 중 비드 전구체(예컨대, 단량체 또는 중합체), 프라이머, 및 가교제를 조합하는 단계, 때때로 미세유체 디바이스 또는 액적 발생기를 이용하여 상기 수용액을 오일상과 조합하는 단계, 및 유중수 액적을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 촉매, 예컨대, 촉진제 및/또는 개시제는 액적 형성 이전 또는 이후에 첨가될 수 있다. 일부 경우에서, 에너지 첨가에 의해, 예를 들어, 열 또는 광(예컨대, UV 광) 첨가를 통해 달성될 수 있다. 액적에서 중합 반응이 일어남으로써 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드(예컨대, 프라이머)의 하나 이상의 카피에 공유적으로 연결된 비드가 생성될 수 있다. 다양한 방법을 사용하여 추가의 서열을 작용화된 비드에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 작용화된 비드를 주형 올리고뉴클레오티드(예컨대, 바코드를 함유하는 것)와 조합하고, 평균적으로 1개 이하의 주형 올리고뉴클레오티드가 작용화된 비드와 동일한 구획을 점유하도록 구획화한다. 구획은 다양한 상이한 유형의 구획, 예컨대, 웰, 마이크로웰, 튜브, 바이알, 마이크로캡슐 등의 것 중 임의의 것일 수 있지만, 바람직한 측면에서, 구획은 에멀전 내의 액적(예컨대, 수성 액적)일 수 있다. 올리고뉴클레오티드(예컨대, 바코드) 서열은 반응, 예컨대, 프라이머 연장 반응, 결합 반응, 또는 다른 방법에 의해 구획 내의 비드에 부착될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 프라이머로 작용화된 비드를, 프라이머에 대한 결합 부위를 포함하는 주형 바코드 올리고뉴클레오티드와 조합하여 프라이머가 비드 상에서 연장될 수 있도록 한다. 다중 회차의 증폭 후, 단일 바코드 서열의 카피는 비드에 부착된 다중 프라이머에 부착된다. 바코드 서열의 비드에의 부착 후, 에멀전은 분해되고, 바코딩된 비드 (또는 또 다른 유형의 증폭된 생성물에 연결된 비드)는 증폭된 바코드가 없는 비드로부터 분리될 수 있다. 이어서, 예를 들어, 프라이머 연장 방법 또는 다른 증폭 반응을 사용하여 추가의 서열, 예컨대, 랜덤 서열(예컨대, 랜덤 N-mer) 또는 표적화된 서열을 비드에 결합된 바코드 서열에 첨가할 수 있다. 상기 공정을 통해 바코딩된 비드로 이루어진 크고 다양한 라이브러리가 생성될 수 있다.

도 1a는 바코딩된 비드를 생성하는 방법의 일례를 도시한 것이다. 먼저, 겔 전구체(예컨대, 선형 중합체 및/또는 단량체), 가교제, 및 프라이머를 수용액 중에서 조합할 수 있다(101). 이어서, 미세유체 디바이스에서 수용액을 오일상과 조합할 수 있다(102). 오일상과 수용액을 조합하면, 유중수 액적이 형성될 수 있다(103). 유중수 액적내에서 겔 전구체의 중합이 일어남으로써 프라이머의 다중의 카피를 포함하는 비드가 형성된다(104). 프라이머 함유 비드 생성 후, 에멀전을 파괴시키고(105), 비드를 회수할 수 있다. 회수된 비드를 예를 들어, 세척하여 비반응 성분으로부터 분리할 수 있고, 임의의 적합한 용매(예컨대, 수성 용매, 비수성 용매)로 도입할 수 있다. 일부 경우에서, 이어서, 또 다른 에멀전의 액적에서 프라이머 함유 비드를(예컨대, 제한 회석 방법을 통해) 주형 바코드 서열과 조합함으로써 각 액적은 평균적으로 1개 이상의 비드 및 평균적으로 1개 이하의 주형 바코드 서열 분자를 포함한다. 비드에 부착된 프라이머를 사용하여 주형 바코드 서열을 클론에 의해 증폭시킴으로써 주형에 상보적인 바코드 서열의 다중의 카피를 비드에 부착시킬 수 있다(106). 이어서, 바코딩된 비드를 바코드를 함유하는 비드 집단 또는 바코드를 함유하지 않는 비드 집단으로 풀링할 수 있다(107). 이어서, 바코딩된 비드를 예를 들어, 농축 단계에 의해 분리시킬 수 있다. 또한, 후속 처리에서 사용하기 위한 추가의 기능성 서열 성분을 바코드 분자에 제공할 수 있다. 예를 들어, 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 동일한 올리고뉴클레오티드 내로 프라이머 서열을 도입하여 바코드 함유 올리고뉴클레오티드를 샘플 핵산을 복제하기 위한 연장 프라이머로서, 또는 후속 서열분석 또는 증폭 반응을 위한 프라이밍 부위로서의 작용을 하는 용도로 사용할 수 있다.

일례에서, 이어서, 랜덤 N-mer 서열을 프라이머 연장 또는 다른 증폭 반응을 통해 바코딩된 비드에 첨가할 수 있고(108), 이로써, 바코딩된 비드의 다양한 라이브러리를 수득할 수 있으며(110), 여기서, 상기 랜덤 n-mer 서열이 범용 프라이머 서열을 제공할 수 있다. 유사하게, 기능성 서열로는 예컨대, 서열분석 적용을 위해 바코드 함유 서열을 표면 상에 고정화시키기 위한 고정화 서열을 포함할 수 있다. 쉽게 논의하기 위해, 예컨대, P5, P7, R1, R2, 샘플 인덱스, 랜덤 N-mer 등, 및 상기에 대한 부분 서열 뿐만 아니라, 상기 중 임의의 것의 상보체와 같은 다수의 구체적인 기능성 서열을 하기에 기술한다. 그러나, 이와 같이 기술하는 것은 논의 목적이고, 바코드 함유 올리고뉴클레오티드 내에 포함된 각종 기능성 서열들 중 임의의 것이 상기 구체적인 서열 대신으로 치환될 수 있으며, 그러한 것으로는 제한 없이, 상이한 부착 서열, 상이한 서열분석 프라이머 영역, 상이한 n-mer 영역(표적화된 것 및 무작위인 것) 뿐만 아니라, 예컨대, 2차 구조 형성과 같은 상이한 기능을 가지는 서열, 예컨대, 헤어핀 또는 다른 구조, 프로브 서열, 예컨대, 올리고뉴클레오티드의 존재 또는 부재를 질의할 수 있도록 허용하거나, 또는 생성된 애플리콘의 분해를 허용하는 것, 또는 각종의 다른 기능성 서열 중 임의의 것을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0060] 핵산 분석을 위한, 및 특히, 서열분석 적용을 위한 샘플 제조 방법 또한 본 개시내용에 포함된다. 샘플 제조는 일반적으로 예컨대, 공급원으로부터 샘플 핵산을 포함하는 샘플을 수득하는 단계, 임의적으로, 샘플을 추가로 처리하는 단계, 샘플 핵산을 바코딩된 비드와 조합하는 단계, 및 샘플 핵산 및 바코딩된 비드를 포함하는 유체 액적을 함유하는 에멀전을 형성하는 단계를 포함할 수 있다. 액적은 예를 들어, 미세유체 디바이스의 도움으로 및/또는 임의의 적합한 유화 방법을 통해 생성될 수 있다. 유체 액적은 또한 바코딩된 비드를 용해, 분해, 또는 다르게는 파괴시키고/거나, 부착된 서열에의 결합을 파괴시켜 부착된 바코드 서열을 비드로부터 유리시킬 수 있는 작용제를 포함할 수 있다. 비드를 분해함으로써, 예컨대, 절단 반응에 의해 올리고뉴클레오티드를 비드로부터 탈착시킴으로써, 또는 상기 둘의 조합에 의해 바코드 서열을 유리시킬 수 있다. 유체 액적 중에서 샘플 핵산을(예컨대, 본원에 기술된 증폭 방법을 통해) 증폭시킴으로써, 예를 들어, 유리 바코드 서열을 샘플 핵산에 부착시킬 수 있다. 이어서, 유체 액적을 포함하는 에멀전을 분해시킬 수 있고, 이어서, 원하는 경우, 추가의 서열(예컨대, 특히 서열분석 방법을 지원하는 서열, 추가의 바코드 서열 등)을 예를 들어, 추가의 증폭 방법을 사용하여 바코딩된 샘플 핵산에 첨가할 수 있다. 이어서, 바코딩된, 증폭된 샘플 핵산에 대해 서열분석하고, 하나 이상의 서열분석 알고리즘을 적용하여 서열분석 데이터를 해석한다. 본원에서 사용되는 바, 샘플 핵산은 예컨대, DNA 및 RNA를 비롯한, 및 구체적으로 예를 들어, 게놈 DNA, cDNA, mRNA 전체 RNA, 및 mRNA로부터 생성된 cDNA 또는 전체 RNA 전사체를 비롯한, 매우 다양한 핵산들 중 임의의 것을 포함할 수 있다.

[0061] 도 1b는 샘플 핵산을 바코딩하고, 이어서, 서열분석하는 방법에 관한 일례를 도시한 것이다. 먼저, 핵산을 포함하는 샘플을 공급원으로부터 수득할 수 있고(111), 예컨대, 본원에 기술된 바와 같이, 바코딩된 비드 세트를 수득할 수 있다(112). 비드는 바람직하게 하나 이상의 바코드 서열 뿐만 아니라, 프라이머, 예컨대, 랜덤 N-mer 또는 다른 프라이머를 함유하는 올리고뉴클레오티드에 연결된다. 바람직하게, 바코드 서열은 예컨대, 바코드와 비드 사이의 결합 절단을 통해, 또는 기초 비드의 분해를 통해 바코드를 유리시킴으로써, 또는 상기 둘의 조합을 통해 바코딩된 비드로부터 유리될 수 있다. 예를 들어, 특정 바람직한 측면에서, 바코딩된 비드를 바코드 서열을 유리시키는 작용제, 예컨대, 환원제에 의해 분해 또는 용해시킬 수 있다. 본 일례에서, 핵산을 포함하는 샘플(113), 바코딩된 비드(114), 및 예컨대, 환원제(116)를 조합하고, 구획화한다. 일례로, 상기 구획화는 액적 발생 시스템, 예컨대, 미세유체 디바이스로 성분을 도입하는 것을 포함할 수 있다(115). 미세유체 디바이스의 도움으로(115) 유중수 에멀전(117)이 형성될 수 있으며, 여기서, 에멀전은 샘플 핵산, 환원제, 및 바코딩된 비드를 함유하는 수성 액적을 함유한다(117). 환원제는 바코딩된 비드를 용해 또는 분해시킴으로써 액적 내에서 바코드 및 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 비드로부터 유리시킬 수 있다(118). 이어서, 랜덤 N-mer은 샘플 핵산의 상이한 영역을 프라이밍시켜 증폭 후 샘플의 증폭된 카피를 생성하는데, 여기서, 각 카피는 바코드 서열로 태깅된 것이다(119). 바람직하게, 각 액적은 동일한 바코드 서열 및 상이한 랜덤 N-mer 서열을 함유하는 올리고뉴클레오티드 세트를 함유한다. 이어서, 에멀전을 분해하고(120), 추가의 서열(예컨대, 특히 서열분석 방법을 지원하는 서열, 추가의 바코드 서열 등)을 예를 들어, 예를 들어, 증폭 방법(예컨대, PCR)을 통해 첨가할 수 있다(122). 이어서, 서열분석을 수행할 수 있고(123), 알고리즘을 적용하여 서열분석 데이터를 해석할 수 있다(124). 서열분석 알고리즘은 일반적으로 예를 들어, 바코드를 분석함으로써 서열분석 리드를 정렬하고/거나, 특정 서열 리드(read)가 속해 있는 샘플을 확인할 수 있다.

[0062] 본 개시내용의 방법 및 조성물은 임의의 적합한 디지털 프로세서와 함께 사용될 수 있다. 디지털 프로세서는 예를 들어, 장치의 임의의 컴포넌트를 작동시키도록 및/또는 본원에 기술된 방법을 실행하도록 프로그램화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비드 형성은 액적 발생기와 통신하는 디지털 프로세서의 지원으로 실행될 수 있다. 디지털 프로세서는 액적 형성 속도를 조절할 수 있거나, 또는 생성되는 액적의 총 개수를 조절할 수 있다. 일부

실시양태에서, 바코드 서열의 샘플 핵산에의 부착은 미세유체 디바이스 및 미세유체 디바이스와 통신하는 디지털 프로세서의 지원으로 완료될 수 있다. 일부 경우에서, 디지털 프로세서는 미세유체 디바이스의 채널에 제공되는 샘플 및/또는 비드의 양, 채널 내의 물질의 유속, 및 바코드 서열 및 샘플 핵산을 포함하는 액적 발생 속도를 조절할 수 있다.

[0063] 본 개시내용의 방법 및 조성물은 핵산 서열분석, 단백질 서열분석, 핵산 정량화, 서열분석 최적화, 유전자 발현 검출, 유전자 발현 정량화, 후성적 적용, 및 계능 또는 발현된 마커의 단일 세포 분석을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 각종의 상이한 분자 생물학 적용에 유용할 수 있다. 또한, 본 개시내용의 방법 및 조성물은 암을 비롯한 각종 유전병, 및 유전병이 아닌 질환의 확인, 검출, 진단, 치료, 병기 결정, 또는 그의 위험 예측을 비롯한 다수에 의학적으로 적용된다.

[0064] **II. 비드 또는 입자**

[0065] 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 겔 비드 및 다른 유형의 비드를 비롯한, 임의의 적합한 비드 또는 입자와 함께 사용될 수 있다. 비드는 본원에 기술된 방법에 따라 전달하고자 하는 시약에 대한 캐리어로서의 역할을 할 수 있다. 특히, 상기 비드는 시약이 유리가능하게 부착되는 표면, 또는 시약이 혼입되거나, 또는 다르게는 유리가능하게 구획화되는 부피를 제공할 수 있다. 이어서, 상기 시약은 바람직한 방법에 따라, 예를 들어, 조절 방식으로 시약을 개별 구획으로 전달하는 방법에 따라 전달할 수 있다. 매우 다양한 상이한 시약 또는 시약 유형이 비드에 결합될 수 있으며 여기서, 상기 시약을 구획으로 전달하고자 할 수 있다. 상기 시약의 비제한적인 예로는 예컨대, 효소, 폴리펩티드, 항체 또는 항체 단편, 표지화 시약, 예컨대, 염료, 형광단, 발색단 등, 핵산, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 및 상기 중 둘 이상의 것의 임의의 조합을 포함한다. 일부 경우에서, 비드는 그 위에서 올리고뉴클레오티드 서열을 합성하거나, 부착시킬 수 있는 표면을 제공할 수 있다. 올리고뉴클레오티드, 바코드 서열, 프라이머, 가교제 등을 비롯한 각종 엔티티가 비드의 외부 표면과 결합될 수 있다. 다공성 비드의 경우, 엔티티는 비드의 외부 표면 및 내부 표면, 둘 모두와 결합될 수 있다. 엔티티는 비드의 표면에 직접(예컨대, 공유 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 상호작용 등을 통해) 부착될 수 있고/거나, 비드의 표면에 부착된 다른 올리고뉴클레오티드 서열(예컨대, 어댑터 또는 프라이머)에 부착될 수 있고/거나, 비드의 내부 전역에 걸쳐 확산될 수 있고/거나, 구획(예컨대, 유체 액적)에서 비드와 조합될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 비드의 중합체 매트릭스 내의 부위에 공유적으로 부착되고, 이로써, 비드의 내부 및 외부 내에 존재하게 된다. 일부 경우에서, 엔티티, 예컨대, 세포 또는 핵산은 비드 내에 캡슐화된다. 증폭 시약(예컨대, PCR 시약, 프라이머)을 비롯한 다른 엔티티 또한 비드 전역에 걸쳐 확산될 수 있거나, 또는 비드의 내부에서(예컨대, 공극, 중합체 매트릭스에의 공유 부착을 통해) 화학적으로 연결될 수 있다.

[0066] 비드는 엔티티 또는 샘플을 국제화하는 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 엔티티(예컨대, 올리고뉴클레오티드, 바코드 서열, 프라이머, 가교제, 어댑터 등)는 비드의 외부 및/또는 내부 표면과 결합될 수 있다. 일부 경우에서, 엔티티는 비드 전역에 걸쳐 국제화될 수 있다. 일부 경우에서, 엔티티는 비드의 전체 표면과, 또는 비드 표면의 절반부 이상과 결합될 수 있다.

[0067] 비드는 그 위에서 올리고뉴클레오티드 서열을 합성할 수 있는 지지체로서의 역할을 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드의 합성은 결합 단계를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드의 합성은 2개의 더 작은 올리고뉴클레오티드를 함께 결합시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머 연장 또는 다른 증폭 반응은 비드에 부착된 프라이머를 통해 비드 상에서 올리고뉴클레오티드를 합성하는 데 사용될 수 있다. 상기 경우에서, 비드에 부착된 프라이머는, 주형 뉴클레오티드 서열 또한 함유하는 올리고뉴클레오티드의 프라이머 결합 부위에 하이브리드화될 수 있다. 이어서, 프라이머는 프라이머 연장 반응 또는 다른 증폭 반응에 의해 연장될 수 있고, 이로써, 주형 올리고뉴클레오티드에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 비드에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 비드에 결합된 동일한 올리고뉴클레오티드로 이루어진 세트가 다양한 올리고뉴클레오티드로 이루어진 세트에 결합될 수 있고, 이로써, 각각의 동일한 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 다양한 세트의 상이한 구성원에 부착된다. 다른 경우에, 비드에 결합된 다양한 올리고뉴클레오티드로 이루어진 세트는 동일한 올리고뉴클레오티드로 이루어진 세트에 결합될 수 있다.

[0068] **비드 특징**

[0069] 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 임의의 적합한 비드와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비드는 다공성, 비다공성, 고체, 반고체, 반유체성, 또는 유체성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 비드는 용해성, 파괴성, 또는 분해성일 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 분해성이 아닐 수 있다. 일부 실시양태에서,

비드는 겔 비드일 수 있다. 겔 비드는 하이드로겔 비드일 수 있다. 겔 비드는 분자 전구체, 예컨대, 중합체 또는 단량체 중으로부터 형성될 수 있다. 반고체 비드는 리소솜 비드일 수 있다. 고체 비드는 철 산화물, 금, 및 은을 비롯한 금속을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 실리카 비드이다. 일부 경우에서, 비드는 강성이다. 일부 경우에서, 비드는 가요성일 수 있다.

[0070] 일부 실시양태에서, 비드는 분자 전구체(예컨대, 단량체 또는 중합체)를 함유할 수 있으며, 이는 전구체의 중합을 통해 중합체 네트워크를 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 전구체는 예를 들어, 화학적 가교결합을 통해 추가로 중합될 수 있는, 이미 중합된 종일 수 있다. 일부 경우에서, 전구체는 아크릴아미드 또는 메타크릴아미드 단량체, 올리고머, 또는 중합체 중 하나 이상의 것을 포함한다. 일부 경우에서, 비드는 추가로 중합될 수 있는 올리고머인 예비중합체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리우레탄 비드는 예비중합체를 사용하여 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 함께 추가로 중합될 수 있는 개별 중합체를 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 상이한 전구체의 중합을 통해 생성될 수 있고, 이로써, 혼합된 중합체, 공중합체, 및/또는 블록 공중합체를 포함한다.

[0071] 비드는 천연 및 합성 중합체를 비롯한, 천연 및 합성 물질을 포함할 수 있다. 천연 중합체의 예로는 단백질 및 당, 예컨대, 데옥시리보핵산, 고무, 셀룰로스, 전분(예컨대, 아밀로스, 아밀로펙틴), 단백질, 효소, 다당류, 실크, 폴리하이드록시알카노에이트, 키토산, 텍스트란, 콜라겐, 카라기난, 이소과글라, 아카시아, 아가, 젤라틴, 셀락, 스테르쿨리아 검, 크산탄 검, 옥수수 당 검, 구아 검, 검 카라야, 아가로스, 알긴산, 알기네이트, 또는 그의 천연 중합체를 포함한다. 합성 중합체의 예로는 아크릴릭스, 나일론, 실리콘, 스팩텍스, 비스코스 레이온, 폴리카복실산, 폴리비닐 아세테이트, 폴리아크릴아미드, 폴리아크릴레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리우레탄, 폴리락트산, 실리카, 폴리스티렌, 폴리아크릴로니트릴, 폴리부타디엔, 폴리카르보네이트, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 폴리(클로로트리플루오로에틸렌), 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸렌 테레프탈레이트), 폴리에틸렌, 폴리이소부틸렌, 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(옥시메틸렌), 폴리포름알데히드, 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리(테트라플루오로에틸렌), 폴리(비닐 아세테이트), 폴리(비닐 알콜), 폴리(비닐 클로라이드), 폴리(비닐리덴 디클로라이드), 폴리(비닐리덴 디플루오라이드), 폴리(비닐 플루오라이드) 및 그의 조합(예컨대, 공중합체)을 포함한다. 비드는 또한 지질, 미셀, 세라믹, 유리 세라믹, 물질 합성물, 금속, 다른 무기 물질 등을 비롯한, 중합체 이외의 물질로부터 형성될 수 있다.

[0072] 일부 경우에서, 화학적 가교제는 단량체의 중합 동안 단량체를 가교결합시키는 데 사용되는 전구체일 수 있고/거나, 종으로 비드를 작용화시키는 데 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 중합체는 가교제 중 또는 다른 유형의 단량체로 추가로 중합됨으로써 추가의 중합체 네트워크를 생성할 수 있다. 화학적 가교제(이는 또한 본원에서 "가교제" 또는 "가교제 작용제"로도 지칭된다)의 비제한적인 예로는 시스타민, 글루타르알데히드, 디메틸 수베르이미데이트, N-하이드록시숙신이미드 가교제 BS3, 포름알데히드, 카르보디이미드 (EDC), SMCC, 술포-SMCC, 비닐실란, N,N'-디아릴타르타르디아미드(DATD), N,N'-비스(아크릴로일)시스타민(BAC), 또는 그의 동족체를 포함한다. 일부 경우에서, 본 개시내용에서 사용되는 가교제는 시스타민을 함유한다.

[0073] 가교결합은 사용되는 특정 가교제에 따라 영구적 또는 가역적일 수 있다. 가역적 가교결합은 중합체가 적절한 조건하에서 선형화 또는 해리될 수 있게 허용할 수 있다. 일부 경우에서, 가역적 가교결합은 비드 표면에 결합된 물질의 가역성 부착을 허용할 수 있다. 일부 경우에서, 가교제는 이황화 결합을 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 이황화 결합을 형성하는 화학적 가교제는 시스타민 또는 변형된 시스타민일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이황화 결합은 분자 전구체 단위(예컨대, 단량체, 올리고머, 또는 선형 중합체) 사이에 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이황화 결합은 이황화 결합은 분자 전구체 단위(예컨대, 단량체, 올리고머, 또는 선형 중합체) 또는 비드 및 올리고뉴클레오티드 내로 도입된 전구체 사이에 형성될 수 있다.

[0074] 시스타민(변형된 시스타민 포함)은 예를 들어, 비드의 개별 단량체 또는 중합체 전구체 사이의 가교제 작용제로서 사용될 수 있는 이황화 결합을 포함하는 유기 작용제이다. 폴리아크릴아미드는 시스타민 또는 시스타민을 포함하는 종(예컨대, 변형된 시스타민)의 존재하에서 중합되어 이황화 결합을 포함하는 폴리아크릴아미드 겔 비드(예컨대, 화학적으로 환원가능한 가교제를 포함하는 화학 분해성 비드)를 생성할 수 있다. 이황화 결합은 비드가 환원제에 노출되었을 때 비드가 분해(또는 용해)될 수 있도록 허용할 수 있다.

[0075] 1 이상이 대안적 일례에서, 선형 다당류 중합체인 키토산은 친수성 쇄를 통해 글루타르알데히드와 가교결합할 수 있다. 키토산 중합체의 가교결합은 열, 압력, pH 변화, 및/또는 방사선에 의해 개시되는 화학적 반응에 의해 달성될 수 있다.

[0076] 일부 실시양태에서, 비드는 중합체 전구체(예컨대, 단량체, 올리고머, 선형 중합체), 올리고뉴클레오티드, 프라

이며, 및 다른 엔티티 사이의 공유 또는 이온 결합을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 공유 결합은 탄소-탄소 결합 또는 티오에테르 결합을 포함한다.

- [0077] 일부 경우에서, 비드는 특정 측면에서 하나 이상의 종(예컨대, 바코드 서열, 프라이머, 다른 올리고뉴클레오티드)을 비드에 부착시키는 데 사용될 수 있는 아크리다이트 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 아크리다이트 모이어티는 아크리다이트와 하나 이상의 종의 반응, 예컨대, 중합 반응 동안 아크리다이트와 다른 단량체 및 가교제의 반응으로부터 생성되는 아크리다이트 유사체를 지칭할 수 있다. 아크리다이트 모이어티는 부착되는 종, 예컨대, 올리고뉴클레오티드(예컨대, 바코드 서열, 프라이머, 다른 올리고뉴클레오티드)와 화학 결합을 형성하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 아크리다이트 모이어티는 이황화 결합을 형성할 수 있는 티올 기로 변형될 수 있거나, 또는 이미 이황화 결합을 포함하는 기로 변형될 수 있다. 티올 또는 (이황화 교환을 통한) 이황화물은 부착되는 종에 대한 고정점으로서 사용될 수 있거나, 또는 아크리다이트 모이어티의 또 다른 부분은 부착을 위해 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 부착은 가역성이며, 이로써, 이황화 결합이 분해되었을 때(예컨대, 환원제의 존재하에서), 상기 작용제는 비드로부터 유래된다. 다른 경우에, 아크리다이트 모이어티는 부착에 사용될 수 있는 반응성 하이드록실 기를 포함한다.
- [0078] 다른 종, 예컨대, 핵산의 부착을 위한 비드의 작용화는 중합체 내의 화학 기의 활성화, 중합체 구조 내의 활성화 또는 활성화가능한 작용기의 도입, 또는 비드 제조시 예비중합체 또는 단량체 단계에서의 부착을 비롯한 매우 광범위한 상이한 접근법을 통해 달성될 수 있다.
- [0079] 예를 들어, 일부 예에서, 중합되어 비드를 형성하는 전구체(예컨대, 단량체, 가교제)는 아크리다이트 모이어티를 포함할 수 있으며, 이로써, 비드 생성시, 비드는 아크리다이트 모이어티 또한 포함한다. 대개, 아크리다이트 모이어티는 비드 내로 도입되는 것이 바람직한 올리고뉴클레오티드 서열, 예컨대, 프라이머(예컨대, 표적 핵산 증폭 및/또는 표적 핵산 바코드 서열의 서열 분석, 서열 결합 등 중 하나 이상의 것을 위함 프라이머)에 부착된다. 일부 경우에서, 프라이머는 P5 서열을 포함한다. 예를 들어, 아크릴아미드 전구체(예컨대, 가교제, 단량체)는 그가 중합되어 비드를 형성할 때, 비드가 아크리다이트 모이어티 또한 포함하도록, 아크리다이트 모이어티를 포함할 수 있다.
- [0080] 일부 경우에서, 전구체, 예컨대, 단량체 및 가교제는 예를 들어, 단일 올리고뉴클레오티드(예컨대, 프라이머 또는 다른 서열) 또는 다른 종을 포함할 수 있다. **도 29A**는 이황화 결합을 통해 아크리다이트 모이어티에 연결된 단일 P5 서열 및 아크리다이트 모이어티를 포함하는 단량체의 일례를 도시한 것이다. 일부 경우에서, 전구체, 예컨대, 단량체 및 가교제는 다중 올리고뉴클레오티드, 다른 서열, 또는 다른 종을 포함할 수 있다. **도 29B**는 각각이 이황화 결합을 통해 P5 프라이머에 연결된 다중 아크리다이트 모이어티를 포함하는 단량체의 일례를 도시한 것이다. 또한, **도 29C**는 각각이 이황화 결합을 통해 P5 종에 연결된 다중 아크리다이트 모이어티를 포함하는 가교제의 일례를 도시한 것이다. 각 전구체 내에 다중 아크리다이트 모이어티 또는 다른 링커 종을 포함하면 각 전구체는 로딩되는 종의 다중 카피를 포함할 수 있기 때문에 연결된 종(예컨대, 올리고뉴클레오티드)의 전구체로부터 생성된 비드 내로의 로딩은 개선될 수 있다.
- [0081] 일부 경우에서, 반응성이거나, 또는 반응성이 되도록 활성화될 수 있는 작용기를 포함하는 전구체는 다른 전구체와 중합되어 활성화된 활성화가능한 작용기를 포함하는 겔 비드를 생성할 수 있다. 이어서, 작용기는 추가의 종(예컨대, 이황화 링커, 프라이머, 다른 올리고뉴클레오티드 등)을 겔 비드에 부착시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, **도 31**에 제시된 바와 같이, 카르복실산(COOH) 기를 포함하는 일부 전구체는 다른 전구체와 공중합하여 COOH 작용기 또한 포함하는 겔 비드를 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 아크릴산(유리 COOH 기를 포함하는 종), 아크릴아미드, 및 비스(아크릴로일)시스타민은 함께 공중합하여 유리 COOH 기를 포함하는 겔 비드를 형성할 수 있다. 겔 비드의 COOH 기는 (예컨대, **도 31**에 제시된 바와 같이, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 (EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드(NHS) 또는 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메틸모르폴리늄 클로라이드(DMTMM)를 통해) 활성화될 수 있으며, 이로써, 반응성을 띠게 된다(예컨대, 활성화를 위해 DC/NHS 또는 DMTMM이 사용되었을 때에 아민 작용기에 대하여 반응성을 띠다). 이어서, 활성화된 COOH 기는 비드에 연결되는 모이어티를 포함하는 적절한 종(예컨대, 아민 작용기를 포함하는 종으로, 여기서, 카르복실산 기는 활성화되어 아민 작용기와 반응성을 띠게 된다)과 반응할 수 있다.
- [0082] 이황화 결합을 통해 P5 프라이머에 연결된 아민 기를 포함하는 종의 일례가 **도 31**에 제시되어 있다. 겔 비드의 COOH 작용기는 EDC/NHS 또는 DMTMM으로 활성화되어 COOH 부위 중 하나 이상의 부위에서 아민 반응성인 종을 생성할 수 있다. 이어서, **도 31**에 제시되어 있는 바와 같이, 종  $H_2N-C_6-S-S-C_6-P_5$  모이어티의 아민 기는 활성화된 카르복실산과 반응하여 모이어티 및 부착된 P5 올리고뉴클레오티드는 비드에 공유적으로 연결될 수 있다. 비반

응 COOH 종은 차단되도록 다른 종으로 전환될 수 있다.

[0083] 그의 중합체 네트워크에 이황화 결합을 포함하는 비드는 이황화 결합 중 일부의 유리 티올로의 환원을 통해 추가의 종으로 작용화될 수 있다. 이황화 결합은 예를 들어, 환원제(예컨대, DTT, TCEP 등)의 작용을 통해 환원됨으로써, 비드 용해 없이도 유리 티올기를 생성할 수 있다. 이어서, 비드의 유리 티올은 종이 (예컨대, 생성된 이황화 결합을 통해) 비드에 연결될 수 있도록 종 또는 또 다른 이황화 결합(예컨대, 티올-이황화물 교환을 통한)을 포함하는 종의 유리 티올과 반응할 수 있다. 일부 경우에서, 하지만 비드의 유리 티올이 임의의 다른 적합한 기와 반응할 수는 있다. 예를 들어, 비드의 유리 티올은 아크리다이트 모이어티를 포함하는 종과 반응할 수 있다. 비드의 유리 티올 기는 마이클 첨가 반응(Michael addition) 화학법을 통해 아크리다이트와 반응할 수 있으며, 이로써, 아크리다이트를 포함하는 종이 비드에 연결된다. 일부 경우에서, 티올 캡핑제, 예컨대, N-에틸 말레이미드 또는 요오도아세테이트를 포함함으로써 비조절 반응은 막을 수 있다.

[0084] 비드 내의 이황화 결합의 활성화는 단지 소수의 이황화 결합만이 활성화되도록 조절될 수 있다. 조절은 예를 들어, 유리 티올 기를 생성하는 데 사용되는 환원제의 농도 및/또는 비드 중합에서 이황화 결합을 형성하는 데 사용되는 시약의 농도를 조절함으로써 이루어질 수 있다. 일부 경우에서, 저농도(예컨대, 환원제 분자:겔 비드 비 = 약 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000, 1000000000, 10000000000, 또는 100000000000 미만)의 환원제가 환원을 위해 사용될 수 있다. 유리 티올로 환원되는 이황화 결합의 수를 조절하는 것이 작용화 동안 비드 구조적 완전성을 보장하는 데 유용할 수 있다. 일부 경우에서, 광학적으로 활성인 작용제, 예컨대, 형광성 염료가 비드의 유리 티올 기를 통해 비드에 커플링될 수 있고, 비드 중에 존재하는 유리 티올의 개수를 정량화 하고/거나, 비드를 추적하는 데 사용될 수 있다.

[0085] 이황화 결합을 포함하는 겔 비드를 작용화하는 것에 관한 개략의 일례가 도 35a에 제시되어 있다. 제시된 바와 같이, 이황화 결합을 포함하는 비드(3501)(예컨대, 겔 비드)는 예를 들어, 본원에 기술된 방법 중 임의의 것을 사용하여 생성될 수 있다. 비드 분해에 적합한 농도의 환원제(3502)(예컨대, DTT, TCEP, 또는 본원에 기술된 임의의 다른 환원제)의 작용시 겔 비드(3501) 이황화 결합 중 일부는 유리 티올로 환원되어 유리 티올 기를 포함하는 비드(3503)를 생성할 수 있다. (예컨대, 세척을 통한) 환원제 제거시(3504), 비드(3503)는 이황화 결합을 통해 아크리다이트에 연결된, 로딩되는 종(예컨대, 제시된 P5 올리고뉴클레오티드, 그러나, 상기 종은 P5, 바코드 서열, R1, 및 랜덤 N-mer을 포함하는 또 다른 유형의 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 올리고뉴클레오티드일 수 있다)을 포함하는 아크리다이트-S-S-종 모이어티(3505)와 반응할 수 있다. 모이어티(3505)는 마이클 첨가 반응 화학법을 통해 겔 비드(3503)와 커플링하여 모이어티(3505)를 포함하는 비드(3506)를 생성할 수 있다. 이어서, 원치 않는 (예컨대, 비부착된) 종을 제거함으로써 생성된 비드(3506)를 (예컨대, 세척을 통해) 정제할 수 있다.

[0086] 이황화 결합을 포함하는 겔 비드를 작용화하는 것에 관한 개략의 또 다른 일례가 도 35b에 제시되어 있다. 제시된 바와 같이, 이황화 결합을 포함하는 비드 (3501)(예컨대, 겔 비드)는 예를 들어, 본원에 기술된 방법 중 임의의 것을 사용하여 생성될 수 있다. 비드 분해에 적합하지 않은 농도의 환원제 (3502)(예컨대, DTT, TCEP, 또는 본원에 기술된 임의의 다른 환원제)의 작용시 겔 비드 (3501) 이황화 결합 중 일부는 유리 티올로 환원되어 유리 티올 기를 포함하는 비드 (3503)를 생성할 수 있다. (예컨대, 세척을 통한) 환원제 제거시(3504), 비드 (3503)는 2,2'-디티오피리딘(3507)과 반응하여 이황화 결합을 통해 피리딘 모이어티에 연결된 겔 비드 (3509)를 생성할 수 있다. 2,2'-디티오피리딘에 대한 대안으로서, 다른 유사 종, 예컨대, 4,4'-디티오피리딘 또는 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤조산)(예컨대, DTNB 또는 엘만 시약(Elman's Reagent))이 사용될 수 있다. 2,2'-디티오피리딘(3507)은 이황화물 교환을 통해 겔 비드(3503)와 커플링하여 이황화 결합을 통해 비드 (3509)에 연결된 피리딘 모이어티를 포함하는 비드(3509)를 생성할 수 있다. 이어서, 겔 비드(3509)를 (예컨대, 세척을 통해) 비 반응 종으로부터 분리할 수 있다.

[0087] 이어서, 정제된 겔 비드(3509)를, 겔 비드에 커플링되는 관심의 대상이 되는 종(예컨대, 제시된 바와 같은 P5 올리고뉴클레오티드) 및 유리 티올 기를 포함하는 모이어티(3508)와 반응시킬 수 있다. 일부 경우에서, 모이어티(3508)는 이황화 결합을 포함하는 또 다른 종으로부터 생성될 수 있으며, 이로써, 이황화 결합이 (예컨대, 환원제, 예컨대, DTT, TCEP 등의 작용을 통해) 환원되었을 때, 유리 티올 기를 포함하는 모이어티(3508)가 수득된다. 모이어티(3508)는 비드(3509)의 피리딘 기와의 티올-이황화물 교환에 참여하여 모이어티(3508)를 포함하는 겔 비드(3510)를 생성할 수 있다. 피리딘 기는 일반적으로 모이어티(3508)의 유리 티올과의 효과적인 티올-이황화물 교환을 허용할 수 있는, 우수한 이탈기이다. 이어서, 원치 않는 종을 제거함으로써 생성된 비드(3510)를 (예컨대, 세척을 통해) 정제할 수 있다.

[0088] 일부 경우에서, 겔 비드 형성 이후에 모이어티를 겔 비드에 첨가하는 것이 이로울 수 있다. 예를 들어, 겔 비드

형성 이후에 종을 첨가하는 것이 중합 동안 발생할 수 있는 연쇄 이동 종결 동안 종의 손실을 막을 수 있다. 또한, 더 작은 전구체(예컨대, 측쇄 기 및 연결된 모이어티를 포함하지 않는 단량체 또는 가교제)가 중합에 사용될 수 있고, 점성 효과에 기인하여 쇠 단부 성장에 대하여 최소한의 방해받을 수 있다. 일부 경우에서, 겔 비드 합성 후 작용화는 잠재적 손상 작용제(예컨대, 자유 라디칼) 및/또는 화학 환경으로 로딩되는 종(예컨대, 올리고뉴클레오티드)의 노출을 최소화시킬 수 있다. 일부 경우에서, 생성된 겔은 비드의 온도 구동 팽창 및 붕괴를 허용할 수 있는 상부 임계 용해 온도(UCST: upper critical solution temperature)를 가질 수 있다. 상기 작용기는 비드를 종으로 작용화시키는 후속 작용화 동안 비드 내로의 종(예컨대, 프라이머, P5 프라이머) 침투에 도움을 줄 수 있다. 제조 후 작용화 또한 비드 중 종의 로딩비를 조절하는 데 유용할 수 있으며, 이로써, 예를 들어, 로딩비의 변동성은 최소화된다. 또한, 종 로딩은 복수 개의 비드가 단일 회분식으로 종으로 작용화될 수 있도록 회분식 공정으로 수행될 수 있다.

[0089] 일부 경우에서, 전구체에 연결된 아크리다이트 모이어티, 전구체에 연결된 또 다른 종, 또는 전구체 그 자체는 불안정 결합, 예컨대, 화학 감응성, 감열성, 또는 감광성 결합, 예컨대, 이황화 결합, UV 감응성 결합 등을 포함한다. 일단 불안정 결합을 포함하는 아크리다이트 모이어티 또는 다른 모이어티가 비드 내로 도입되고 나면, 비드는 또한 불안정 결합도 포함할 수 있다. 불안정 결합은 예를 들어, 종(예컨대, 바코드, 프라이머 등)을 비드에 가역적으로 연결(예컨대, 공유적으로 연결)시키는 데 유용할 수 있다. 일부 경우에서, 열적으로 불안정한 결합으로는 예컨대, 올리고뉴클레오티드가, 비드에 부착되어 있는 상보적인 서열에 하이브리드화하는 핵산 하이브리드화 기반 부착을 포함할 수 있으며, 이로써, 하이브리드의 열적 용융을 통해 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 바코드 함유 서열이 비드 또는 마이크로캡슐로부터 유리된다. 또한, 다중 유형의 불안정 결합을 겔 비드에 첨가하면, 다양한 자극에 대하여 반응할 수 있는 비드가 생성될 수 있다. 각 유형의 불안정 결합은 관련 자극(예컨대, 화학적 자극, 광, 온도 등)에 대해 감응성일 수 있으며, 이로써, 각각의 불안정 결합을 통해 비드에 부착된 종의 유리는 적절한 자극을 가함으로써 조절될 수 있다. 상기 작용기는 겔 비드로부터 종을 조절 방식으로 유리시키는 데 유용할 수 있다. 일부 경우에서, 불안정 결합을 포함하는 또 다른 종은 겔 비드 형성 이후에 예를 들어, 상기 기술된 바와 같이 겔 비드의 활성화된 작용기를 통해 겔 비드에 연결될 수 있다. 이해할 수 있는 바와 같이, 본원에 기술된 유리가능하게, 절단가능하게, 또는 가역적으로 비드에 부착된 바코드로는 바코드 분자와 비드 사이의 결합의 절단을 통해 유리되거나, 또는 유리될 수 있는 바코드, 또는 기초 비드 그 자체의 분해를 통해 유리됨으로써 바코드가 다른 시약에 의해 접근될 수 있거나, 또는 접근 가능하도록 허용하는 것인 바코드, 또는 그 둘 모두인 것인 바코드를 포함한다. 일반적으로, 본원에 기술된 바와 같이 유리가능한 바코드가 일반적으로는, 일단 유리되고 나면 반응에 이용 가능하다는 점에서 활성화가능한 것으로 언급될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 활성화가능한 바코드는 바코드를 비드 (또는 본원에 기술된 다른 적합한 유형의 구획)로부터 유리시킴으로써 활성화될 수 있다. 이해할 수 있는 바와 같이, 다른 활성화가능한 배열 또한 기술된 방법 및 시스템과 관련하여 구상된다. 특히, 시약은 관련된 활성화가능한 기와 함께 비드에 유리가능하게 부착될 수 있거나, 또는 다르게는 구획에 배치될 수 있고, 이로써, 일단 예컨대, 공동 구획화를 통해 원하는 시약 세트로 전달되고 나면, 활성화가능한 기는 원하는 시약과 함께 반응할 수 있다. 상기 활성화가능한 기로는 케이징 기, 제거가능한 차단기 또는 보호기, 예컨대, 광불안정성 기, 열 불안정성 기, 또는 화학적으로 제거가능한 기를 포함한다.

[0090] 열적으로 절단가능한 결합, 이황화 결합 및 UV 감응성 결합 이외에도, 전구체 또는 비드에 커플링될 수 있는 불안정 결합의 다른 비제한적인 예로는 에스테르 결합(예컨대, 산, 염기, 또는 하이드록실아민으로 절단가능한 결합), 인접 디올 결합(예컨대, 과요오드산나트륨을 통해 절단가능한 결합), 디일스-알더(Diels-Alder) 결합(예컨대, 열을 통해 절단가능한 결합), 술폰 결합(예컨대, 염기를 통해 절단가능한 결합), 실릴 에테르 결합(예컨대, 산을 통해 절단가능한 결합), 글리코시드 결합(예컨대, 아밀라제를 통해 절단가능한 결합), 펩티드 결합(예컨대, 프로테아제를 통해 절단가능한 결합), 또는 포스포디에스테르 결합(예컨대, 뉴클레아제(예컨대, DNA아제)를 통해 절단가능한 결합)을 포함한다.

[0091] 비드는 다양한 개수의 아크리다이트 모이어티에 연결될 수 있다. 예를 들어, 비드는 비드에 연결된 약 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000, 1000000000, 또는 10000000000개의 아크리다이트 모이어티를 포함할 수 있다. 다른 일례에서, 비드는 비드에 연결된 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000, 1000000000, 또는 10000000000개 이상의 아크리다이트 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 예컨대, 아크리다이트 모이어티에 의해 비드에 공유적으로 연결된 약 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000, 1000000000, 또는 10000000000개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다른 일례에서, 비드는 예컨대, 아크리다이트 모이어티에 의해 비드에 공유적으로 연결된 1, 10, 100, 1000, 10000, 100000, 1000000, 10000000, 100000000, 1000000000, 또는 10000000000개 이상의

올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

- [0092] 중합에 참여하지 않는 종은 또한 비드 생성 동안(예컨대, 전구체의 중합 동안) 비드에 캡슐화될 수 있다. 상기 종은 비드 형성시 생성된 비드가 종을 포함하도록 중합 반응 혼합물 내로 유입될 수 있다. 일부 경우에서, 상기 종은 형성 후 겔 비드에 첨가될 수 있다. 상기 종은 예를 들어, 올리고뉴클레오티드, 본원에 기술된 것을 비롯한, 핵산 증폭 반응에 필요한 종(예컨대, 프라이머, 폴리머라제, dNTP, 보조 인자(예컨대, 이온성 보조 인자)), 효소 반응에 필요한 종(예컨대, 효소, 보조 인자, 기질), 또는 핵산 변형 반응, 예컨대, 중합, 절찰, 또는 분해에 필요한 종을 포함할 수 있다. 상기 종을 포획하는 것은 전구체 중합 동안 생성되는 중합체 네트워크 밀도에 의해, (예컨대, 중합된 종에 연결된 이온성 종을 통한) 겔 비드 내의 이온 전하의 조절에 의해, 또는 다른 종의 유리에 의해 조절될 수 있다. 캡슐화된 종은 비드 분해시에 및/또는 비드로부터 종을 유리시킬 수 있는 자극을 가함으로써 비드로부터 유리될 수 있다.
- [0093] 비드의 크기는 균일한 크기이거나, 또는 불균일한 크기일 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 직경은 약 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 또는 1 mm일 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 직경은 적어도 약 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 1 mm 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 직경은 약 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 또는 1 mm 미만일 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 직경은 약 40-75  $\mu\text{m}$ , 30-75  $\mu\text{m}$ , 20-75  $\mu\text{m}$ , 40-85  $\mu\text{m}$ , 40-95  $\mu\text{m}$ , 20-100  $\mu\text{m}$ , 10-100  $\mu\text{m}$ , 1-100  $\mu\text{m}$ , 20-250  $\mu\text{m}$ , 또는 20-500  $\mu\text{m}$  범위일 수 있다.
- [0094] 특정 바람직한 측면에서, 비드는 상대적으로 단분산인 크기 분포를 가지는 비드 집단으로서 제공된다. 이해하는 바와 같이, 구획내 비교적 일관된 양의 시약을 제공하는 것이 바람직한 일부 적용에서, 비교적 일관된 비드 특징, 예컨대, 크기를 유지하는 것이 상기 전반적인 컨시스턴시에 기여한다. 특히, 본원에 기술된 비드는 그의 단면 크기의 변동 계수가 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만 및 일부 경우에서, 15% 미만, 10% 미만, 또는 심지어 5% 미만인 크기 분포를 가질 수 있다.
- [0095] 비드의 형상은 규칙적인 형상 또는 불규칙적인 형상일 수 있다. 비드 형상의 예로는 구형, 비구형, 타원형, 장방형, 무정형, 원형, 원통형, 및 그에 상동하는 것을 포함한다.
- [0096] **분해성 비드**
- [0097] 비드 및 상기 기술된 결합된 분자, 예컨대, 바코드 함유 올리고뉴클레오티드 사이의 절단가능한 결합 이외에, 또는 그에 대한 대안으로서, 비드는 자발적으로, 또는 하나 이상의 자극(예컨대, 온도 변화, pH 변화, 특정 화학 종 또는 상에의 노출, 광에의 노출, 환원제 등)에의 노출시에 분해성, 파괴성, 또는 용해성일 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 용해성일 수 있고, 이로써, 비드의 물질 성분은 특정 화학 종 또는 환경 변화, 예컨대, 온도, 또는 pH에 노출되었을 때 가용화된다. 예를 들어, 겔 비드는 승온에서 및/또는 염기성 조건에서 분해되거나, 용해될 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 비드가 적절한 온도 변화(예컨대, 열)에 노출되었을 때, 비드가 분해되도록 열 분해성일 수 있다. 종(예컨대, 핵산 종)에 결합된 비드가 분해 또는 용해되면 종이 비드로부터 유리될 수 있다.
- [0098] 분해성 비드는 비드/종이 적절한 자극에 노출되었을 때, 결합이 분해되고, 비드가 분해되도록 불안정 결합을 가지는 하나 이상의 종을 포함할 수 있다. 불안정 결합은 화학 결합(예컨대, 공유 결합, 이온 결합)일 수 있거나, 또 다른 유형의 물리적 상호작용(예컨대, 반 데르 발스 상호작용, 이중극자-이중극자 상호작용 등)일 수 있다. 일부 경우에서, 비드를 생성하는 데 사용되는 가교제는 불안정 결합을 포함할 수 있다. 적절한 조건에의 노출시, 불안정 결합은 분해되고, 비드는 분해된다. 예를 들어, 폴리아크릴아미드 겔 비드는 시스타민 가교제를 포함할 수 있다. 비드가 환원제에 노출되었을 때, 시스타민의 이황화 결합은 분해되고, 비드는 분해된다.
- [0099] 분해성 비드는 적절한 자극을 비드에 가하였을 때 부착된 종(예컨대, 올리고뉴클레오티드, 바코드 서열)을 비드로부터 더욱 빠르게 유리시키는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 다공성 비드의 내부 표면에 결합된 종인 경우, 또는 캡슐화된 종인 경우, 비드 분해시 종은 용액 중 다른 종에의 더욱 큰 이동성 및 접근가능성을 가질 수 있다. 일부 경우에서, 종은 또한 분해성 링커(예컨대, 이황화 링커)를 통해 분해성 비드에 부착될 수 있다. 분해성 링커는 분해성 비드와 동일한 자극에 대하여 반응할 수 있거나, 또는 2개의 분해성 종은 상이한 자극에 대하여 반응할 수 있다. 예를 들어, 바코드 서열은 이황화 결합을 통해 시스타민을 포함하는 폴리아크릴아미드 비드에 부착될 수 있다. 바코드된 비드의 환원제에의 노출시, 비드는 분해되고, 바코드 서열과 비드 사이의 이황화

결합, 및 비드 중 시스타민의 이황화 결합, 둘 모두가 분해되었을 때 바코드 서열은 유리된다.

[0100] 분해성 비드는 구획, 예컨대, 구획, 예컨대, 에멀전의 액적 또는 웰 내로 도입됨으로써 적절한 자극이 가해졌을 때, 비드는 구획 내에서 분해되고, 임의의 결합 종은 액적 내에서 유리된다. 유리 종은 다른 종과 상호작용할 수 있다. 예를 들어, 시스타민을 포함하고, 이황화 결합을 통해 바코드 서열에 연결된 폴리아크릴아미드 비드는 유중수 에멀전의 액적 내에서 환원제와 조합될 수 있다. 액적 내에서, 환원제는 다양한 이황화 결합을 분해하여 비드 분해를 일으키고, 바코드 서열을 액적의 수성 내부 환경 내로 유리시킨다. 또 다른 일례에서, 염기성 용액 중 비드 결합된 바코드 서열을 포함하는 액적을 가열하는 경우에도 역시 비드 분해가 일어날 수 있고, 부착된 바코드 서열이 액적의 수성 내부 환경 내로 유리될 수 있다.

[0101] 상기 개시내용으로부터 이해할 수 있는 바와 같이, 상기 언급된 바와 같이 다수의 경우에는 비드 분해로 지칭되는, 상기 분해는 결합된 또는 혼입된 종의 비드로부터의 해리를 의미할 수 있으며, 이 둘 모두 물질적 비드 그 자체를 구조적으로 분해 및 비분해하는 것일 수 있다. 예를 들어, 혼입된 종은 예를 들어, 화학적 환경 변화에 기인하여 삼투압 차를 통해 비드로부터 유리될 수 있다. 일례로, 삼투압 차에 기인하여 일어나는 비드 공극 크기의 변경은 일반적으로 비드 그 자체의 구조적 분해 없이 일어날 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 삼투 팽창에 기인하여 일어나는 공극 크기 증가를 통해 혼입된 종이 비드 내에서 유리될 수 있다. 다른 경우에서, 비드의 삼투 수축을 통해 비드는 공극 크기 수축에 기인하여 혼입된 종을 더욱 잘 보유할 수 있게 된다.

[0102] 이해하는 바와 같이, 분해성 비드를 제공하는 경우, 미성숙 비드 분해, 및 불충분한 유동 특징, 응고 및 응집을 비롯한, 상기 분해로부터 발생하는 문제들을 피하기 위해 원하는 시점 이전에 상기 분해를 유발하는 자극 또는 자극들에 상기 비드를 노출시키지 않는 것이 바람직할 수 있다. 일례로, 비드가 환원성 가교결합 기, 예컨대, 이황화 기를 포함하는 경우, 상기 비드가 환원제, 예컨대, DTT 또는 다른 이황화 절단 시약과 접촉하는 것을 막는 것이 바람직할 것이다. 상기 경우에서, 본원에 기술된 비드 처리는 일부 경우에는 환원제, 예컨대, DTT 없이 제공될 것이다. 대개는 환원제가 시판용 효소 제제에 제공되어 있기 때문에, 대개는 본원에 기술된 비드를 처리할 때 환원제 무함유 (또는 DTT 무함유) 효소 제제를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 상기 효소의 예로는 예컨대, 폴리머라제 효소 제제, 리가제 효소 제제 뿐만 아니라, 본원에 기술된 비드를 처리하는 데 사용될 수 있는 다수의 다른 효소 제제를 포함한다. "환원제 무함유" 또는 "DTT 무함유" 제제란, 제제가 비드를 분해시키는 데 사용되는 상기 물질에 대한 하위 범위의 1/10 미만, 1/50 미만, 및 심지어는 1/100 미만으로 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, DTT의 경우, 환원제 무함유 제제는 전형적으로 0.01 mM, 0.005 mM, 0.001 mM DTT, 0.0005 mM DTT 미만, 또는 심지어는 0.0001 mM DTT 미만, 또는 그보다 적은 양으로 포함할 것이다. 다수의 경우에서, DTT의 양은 검출불가능한 양이 될 것이다.

[0103] **비드 분해 방법**

[0104] 일부 경우에서, 자극은 비드 분해를 일으켜 내용물을 비드로부터 유리시키는 데 사용될 수 있다. 일반적으로 자극은 비드 구조의 분해, 예컨대, 공유 결합 또는 다른 유형의 물리적 상호작용의 분해를 일으킬 수 있다. 이러한 자극은 비드 분해 및/또는 그의 내용물 유리를 유도하는 데 유용할 수 있다. 사용될 수 있는 자극의 예로는 하기에서 더욱 상세하게 기술되는 바와 같은, 화학적 자극, 열 자극, 광 자극 및 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0105] 다수의 화학적 유발인자가 비드 분해를 일으키는 데 사용될 수 있다. 이러한 화학적 변화의 예로는 비드내 성분의 완전성에 대한 pH 매개 변화, 가교결합된 결의 절단을 통한 비드 성분 분해, 및 비드 성분의 해중합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0106] 일부 실시양태에서, 비드는 분해성 화학 가교제, 예컨대, BAC 또는 시스타민을 포함하는 물질로부터 형성될 수 있다. 상기 분해성 가교제의 분해는 다수의 기전을 통해 달성될 수 있다. 일부 예에서, 산화, 환원, 또는 다른 화학 변화를 유도할 수 있는 화학 분해제와 비드를 접촉시킬 수 있다. 예를 들어, 화학 분해제는 환원제, 예컨대, 디티오프레이트(DTT)일 수 있다. 환원제의 추가의 예로는 β-머캅토에탄올, (2S)-2-아미노-1,4-디머캅토부탄(디티오프틸아민 또는 DTBA), 트리스(2-카복시에틸) 포스핀(TCEP), 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 환원제는 비드를 형성하는 겔 전구체 사이에 형성된 이황화 결합을 분해할 수 있고, 이로써, 비드를 분해할 수 있다. 다른 경우에서, 용액의 pH 변화, 예컨대, pH 증가는 비드 분해를 일으킬 수 있다. 다른 경우에서, 수용액, 예컨대, 물에의 노출은 가수분해성 분해를 일으킬 수 있고, 이로써, 비드를 분해할 수 있다.

[0107] 비드는 또한 열 자극이 가해졌을 때 그의 내용물을 유리시키도록 유도될 수 있다. 온도 변화는 비드에 다양한 변화를 일으킬 수 있다. 예를 들어, 열은 고체 비드를 액화시킬 수 있다. 열 변화는 비드의 일침가 분해될 수 있도록 비드를 용융시킬 수 있다. 다른 경우에서, 열은 비드가 파열 또는 폭발되도록 비드 성분의 내부 압력을

증가시킬 수 있다. 열은 또한 비드를 구성하는 물질로서 사용되는 감열성 중합체에 대해 작용할 수 있다.

[0108] 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 비드를 분해시키는 임의의 적합한 작용제와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 온도 또는 pH 변화는 비드 내에서 감열성 또는 pH 감응성 결합을 분해시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 산화, 환원 또는 다른 화학 변화에 의해 비드 내에서 화학 결합을 분해시키는 데 화학 분해제가 사용될 수 있다. 예를 들어, 화학 분해제는 환원제, 예컨대, DTT일 수 있으며, 여기서, DTT는 가교제와 겔 전구체 사이에 형성된 이황화 결합을 분해할 수 있고, 이로써 비드를 분해할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환원제를 첨가하여 비드를 분해할 수 있으며, 이는 비드가 그의 내용물을 유리시키도록 유발할 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수도 있다. 환원제의 예로는 디티오프레이톨(DTT), β-머캅토에탄올, (2S)-2-아미노-1,4-디머캅토부탄(디티오부틸아민 또는 DTBA), 트리스(2-카복시에틸) 포스핀(TCEP), 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 환원제는 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 또는 10 mM으로 존재할 수 있다. 환원제는 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM 초과, 또는 그보다 높은 농도로 존재할 수 있다. 환원제는 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 5 mM, 또는 10 mM 미만으로 존재할 수 있다.

[0109] **분해 단계 시기 선택**

[0110] 비드는 분해되어 비드 내에 부착되어 있고, 함유되어 있는 내용물을 유리시킬 수 있다. 이러한 분해 단계는 샘플이 비드와 조합될 때 그와 동시에 일어날 수 있다. 이러한 분해 단계는 샘플이 미세유체 디바이스에서 형성될 수 있는 유체 액적 내의 비드와 조합될 때 그와 동시에 일어날 수 있다. 이러한 분해 단계는 샘플이 미세유체 디바이스에서 형성될 수 있는 유체 액적 내의 비드와 조합된 이후에 일어날 수 있다. 이해할 수 있는 바와 같이, 다수의 적용에서, 분해 단계는 일어나지 않을 수도 있다.

[0111] 환원제는 샘플과 조합된 후, 이어서, 비드와 조합될 수 있다. 일부 경우에서, 환원제는 샘플과 동일 시점에 미세유체 디바이스로 도입될 수 있다. 일부 경우에서, 환원제는 샘플 도입 이후에 미세유체 디바이스로 도입될 수 있다. 일부 경우에서, 샘플은 미세유체 디바이스 중에서 환원제와 함께 혼합된 후, 이어서, 미세유체 디바이스 중에서 겔 비드와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 환원제와 함께 미리 혼합된 후, 이어서, 장치에 첨가되고, 겔 비드와 접촉될 수 있다.

[0112] 분해성 비드는 적절한 자극을 가할 때 그와 동시에 분해될 수 있다. 다른 경우에서, 비드 분해는 시간이 경과함에 따라 일어날 수 있다. 예를 들어, 비드는 적절한 자극을 가할 때 그와 동시에 또는 약 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11, 12, 13, 14, 15 또는 20분 이내에 분해될 수 있다. 다른 일례에서, 비드는 적절한 자극을 가할 때 그와 동시에 또는 최대 약 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 11, 12, 13, 14, 15 또는 20분 이내에 분해될 수 있다.

[0113] 비드는 또한 샘플과 조합하였을 때에 대해 상대적으로 상이한 시점에 분해될 수 있다. 예를 들어, 비드는 샘플과 조합된 후, 이어서, 후속 시점에 분해될 수 있다. 샘플과 비드의 조합 시점에서부터 이어지는 비드 분해 시점 사이의 시간은 약 0.0001, 0.001, 0.01, 1, 10, 30, 60, 300, 600, 1,800, 3,600, 18,000, 36,000, 86,400, 172,800, 432,000, 또는 864,000초일 수 있다. 샘플과 비드의 조합 시점에서부터 이어지는 비드 분해 시점 사이의 시간은 약 0.0001, 0.001, 0.01, 1, 10, 30, 60, 300, 600, 1,800, 3,600, 18,000, 36,000, 86,400, 172,800, 432,000, 864,000초 초과일 수 있다. 샘플과 비드의 조합 시점에서부터 이어지는 비드 분해 시점 사이의 시간은 약 0.0001, 0.001, 0.01, 1, 10, 30, 60, 300, 600, 1,800, 3,600, 18,000, 36,000, 86,400, 172,800, 432,000, 또는 864,000초 미만일 수 있다.

[0114] **올리고뉴클레오티드로 미리 작용화된 비드 제조**

[0115] 본원에 기술된 비드는 다양한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 비드는 분자 전구체(예컨대, 선형 중합체, 단량체, 가교제)를 함유하는 액체로부터 형성될 수 있다. 이어서, 액체에 대해 중합 반응이 이루어지고, 이로써, 비드 (또는 겔 비드)로 경화되거나, 겔화된다. 액체는 또한 중합 동안 비드 내로 도입될 수 있는 엔티티, 예컨대, 올리고뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 이러한 도입은 비드와의 공유 또는 비공유 결합을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 형성 동안 비드 내에 혼입될 수 있다. 별법으로, 올리고뉴클레오티드는 형성 동안 또는 형성 이후에 비드 또는 비드 골격에 커플링될 수 있다. 대개, 올리고뉴클레오티드는 중합 공정 동안 비드에 가교결합되는 아크리다이트 모이어티에 연결된다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 이황화 결합에 의해 아크리다이트 모이어티에 부착된다. 그 결과, 비드-아크리다이트-S-S-올리고뉴클레오티드 결합을 포함하는 조성물이 형성된다. 도 4A는 아크리다이트 연결된 프라이머로 작용화된

비드에 관한 예시적인 다이어그램이다.

- [0116] 한 예시적인 공정에서, 작용화된 비드는 복수 개의 중합체 및/또는 단량체를 하나 이상의 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 프라이머(예컨대, 범용 프라이머, 서열분석 프라이머)를 포함하는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 혼합함으로써 생성될 수 있다. 중합체 및/또는 단량체는 아크릴아미드를 포함할 수 있고, 중합체 및/또는 단량체 사이에 이황화 결합이 형성되도록 가교결합될 수 있고, 이로써, 경화된 비드가 형성될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 경화된 비드가 형성되는 동안(예컨대, 동시에) 복수 개의 중합체 및/또는 단량체에 공유적으로 연결될 수 있거나, 또는 경화된 비드 형성 이후에(예컨대, 순차적으로) 복수 개의 중합체 및/또는 단량체에 공유적으로 연결될 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 아크리다이트 모이어티를 통해 비드에 연결될 수 있다.
- [0117] 대부분의 경우, 비드 집단은 동일한 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 범용 프라이머 또는 프라이머 결합 부위로 미리 작용화된다. 일부 경우에서, 비드 집단 중의 비드는 다중의 상이한 올리고뉴클레오티드로 미리 작용화된다. 이들 올리고뉴클레오티드는 임의적으로 예컨대, 비드의 후속 가공 처리 또는 적용에서 사용하기 위한 각종의 상이한 기능성 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 기능성 서열로는 예컨대, 프라이머 서열, 예컨대, 표적화된 프라이머 서열, 범용 프라이머 서열, 예컨대, 샘플 핵산 상의 다수의 상이한 위치에 하이브리드화할 수 있고, 그로부터 연장을 프라이밍할 수 있을 정도로 충분히 짧은 프라이머 서열, 또는 랜덤 프라이머 서열, 부착 또는 고정화 서열, 결합 서열, 헤어핀 서열, 태깅 서열, 예컨대, 바코드 또는 샘플 인덱스 서열, 또는 다양한 다른 뉴클레오티드 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있다.
- [0118] 일례로, 일부 경우에서, 범용 프라이머(예컨대, P5 또는 다른 적합한 프라이머)는 추가의 내용물(예컨대, 바코드, 랜덤 N-mer, 다른 기능성 서열)을 비드에 부착시키는 각 비드 상의 프라이머로서 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 범용 프라이머(예컨대, P5)는 또한 서열분석 장치와 양립가능할 수 있고, 이어서, 서열분석 장치내 유동 셀에 원하는 가닥을 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 부착 또는 고정화 서열은 서열분석 장치에서 유동 셀의 표면에 연결되는 올리고뉴클레오티드에 상보적인 서열을 제공할 수 있으며, 이로써, 상기 서열은 서열분석을 위한 상기 표면에 서열을 고정화시킬 수 있다. 별법으로, 상기 부착 서열은 추가로 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드 서열 내에 제공되거나, 또는 그에 첨가될 수 있다. 일부 경우에서, 비드 및 그의 부착된 종은 후속되는 분석 공정, 예컨대, 서열분석 장치 또는 시스템과 양립가능하도록 제공될 수 있다. 일부 경우에서, 예컨대, 표적 서열의 증폭을 위한 제1 프라이머와, 증폭된 생성물을 서열분석하기 위한 제2 프라이머와 같이, 상이한 순차적 또는 동시 가공 처리 단계에서 올리고뉴클레오티드 뿐만 아니라, 사이 서열에 커플링되는 추가의 서열의 차별적인 가공 처리를 허용하기 위해 1개 초과와 프라이머가 비드에 부착될 수 있고, 1개 초과와 프라이머가 범용 서열을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드는 증폭된 바코드된 표적 서열 (들)을 생성하기 위하여 제1 증폭 또는 복제 과정을 수행하기 위한, 예컨대, 표적 핵산 서열을 따라 프라이머를 연장시키기 위한 제1 프라이머 서열을 포함할 것이다. 올리고뉴클레오티드 내에 서열분석 프라이머 또한 포함함으로써 생성된 증폭된 표적 서열은 상기 프라이머를 포함할 것이며, 이는 서열분석 시스템으로 쉽게 전달될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 예컨대, 일루미나 서열분석 시스템을 사용하여 증폭된 표적을 서열분석하고자 하는 경우, R1 프라이머 또는 프라이머 결합 부위 또한 비드에 부착시킬 수 있다.
- [0119] 비드 내로 도입되는 엔티티로는 상기 기술된 바와 같은 각종의 기능성 서열 중 임의의 것을 가지는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 올리고뉴클레오티드로는 P5, R1, 및 R2 서열, 비절단성 5' 아크리다이트-P5, 절단가능한 5' 아크리다이트-SS-P5, R1c, 서열분석 프라이머, 리드 프라이머, 범용 프라이머, P5\_U, 범용 리드 프라이머, 및/또는 상기 프라이머 중 임의의 것에 대한 결합 부위 중 어느 하나 이상의 것을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 뉴클레오티드 유사체, 또는 뉴클레오티드 모방체를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 펩티드 핵산(PNA: peptide nucleic acid), 잠금형 핵산(LNA: locked nucleic acid) 뉴클레오티드 등을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 이들 올리고뉴클레오티드는 추가로 또는 별법으로 그의 적용의 다른 단계에서의 차별적인 가공 처리를 허용하기 위하여 차별적으로 처리될 수 있는 뉴클레오티드 또는 유사체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 기능성 서열 중 하나 이상의 것은 특정 폴리머라제 효소에 의해 가공 처리되지 않고, 이로써 상기 효소를 사용하는 공정 단계에서 복사되지 않는 뉴클레오티드 또는 유사체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 예컨대, 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드의 기능성 서열 성분 중 하나 이상은 예컨대, 우라실 함유 뉴클레오티드, 비천연 염기를 함유하는 뉴클레오티드, 차단제 올리고뉴클레오티드, 차단된 3' 단부, 3' ddCTP를 포함할 것이다. **도 19**는 추가의 일례를 제공하는 것이다. 이해할 수 있는 바와 같이, 상기 엔티티 중 임의의 것의 서열은 특정 적용에 따라 프라이머 또는 프라이머 결합 부위로서 작용할 수 있다.

- [0120] 중합은 자발적으로 일어날 수 있다. 일부 경우에서, 중합은 개시제 및/또는 촉진제에 의해, 전자기 방사선에 의해, 온도 변화(예컨대, 가열 또는 열 제거)에 의해, pH 변화에 의해, 다른 방법에 의해, 및 그의 조합에 의해 개시될 수 있다. 개시제란 중합 반응에서 사용되는 하나 이상의 전구체를 (예컨대, 유리 라디칼의 생성을 통해) 활성화시킴으로써 중합 반응을 개시할 수 있는 종을 의미할 수 있다. 촉진제란 중합 반응 발생 속도를 가속화시킬 수 있는 종을 의미할 수 있다. 일부 경우에서, 촉진제는 후속하여 (예컨대, 유리 라디칼의 생성을 통해) 단량체를 활성화시켜 중합 반응을 개시시키는 데 사용되는 (예컨대, 유리 라디칼의 생성을 통해) 개시제의 활성화를 가속화시킬 수 있다. 일부 경우에서, 개시제의 활성화 속도가 빠를수록, 중합 속도는 더 빨라질 수 있다. 그러나, 일부 경우에서, 가속화는 또한 비화학적 수단, 예컨대, 열 (예컨대, 가열 및 열 제거) 수단, 다양한 유형의 방사성 수단(예컨대, 가시 광선 UV 광 등), 또는 임의의 다른 적합한 수단에 의해 달성될 수 있다. 이어서 중합되어 경화된 비드를 형성할 수 있는 분자 전구체를 함유하는 액적을 발생하기 위해, 에멀전 기법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 분자 전구체를 수용액에 첨가할 수 있다. 이어서, 수용액을 오일을 이용하여 (예컨대, 교반, 미세유체 액적 발생기, 또는 다른 방법에 의해) 유화시킬 수 있다. 이어서, 분자 전구체는 유화된 액적에서 중합되어 비드를 형성할 수 있다.
- [0121] 에멀전은 예를 들어, 예컨대, 벌크 진탕, 벌크 교반, 유동 포커싱, 및 마이크로시브와 같은, 당업계에 공지된 방법을 비롯한 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다(예컨대, 문헌 [Weizmann *et al*, Nature Methods, 2006, 3(7):545-550]; 미국 공개 번호 2012/0211084(Weitz 등) 참조). 일부 경우에서, 에멀전은 미세유체 디바이스를 사용하여 제조될 수 있다. 일부 경우에서, 유중수 에멀전이 사용될 수 있다. 상기 에멀전은 불소 계면활성제, 예컨대, PEG 함유 화합물을 포함하는 크라이톡스 FSH(Krytox FSH), 예컨대, 비스 크라이톡스 페그(BKP: bis krytox peg)를 도입할 수 있다. 일부 경우에서, 수중유 에멀전이 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 다분산 에멀전이 형성될 수 있다. 일부 경우에서, 단분산 에멀전이 형성될 수 있다. 일부 경우에서, 미세유체 유동 포커싱 장치에서 단분산 에멀전이 형성될 수 있다(문헌 [Gartecki *et al*, Applied Physics Letters, 2004, 85(13):2649-2651]).
- [0122] 1 이상의 일레에서, 비드 제조용 미세유체 디바이스는 2개 이상의 비혼화성 유체 스트림, 예컨대, 분자 전구체를 함유하는 수용액 및 오일을 조합하는 단일 십자형 교차 지점에서 교차하는 채널 세그먼트를 포함할 수 있다. 단일 십자형 교차 지점에서의 두 비혼화성 유체의 조합으로 유체 액적이 형성될 수 있다. 형성되는 유체 액적의 크기는 유체 교차점으로 유입되는 유체 스트림의 유속, 두 유체의 특성, 및 미세유체 채널의 크기에 따라 달라질 수 있다. 유체 교차점에서 배출되는 유체 액적 형성 이후의 중합 개시는 유체 액적으로부터 경화된 비드가 형성될 수 있도록 할 수 있다. 본원 어디에서나 논의되고 있는 바와 같이, 액적을 발생하기 위한, 비드를 형성하고, 비드를 개별 액적 내로 구획화하는 이 둘 모두를 위한 미세유체 디바이스, 채널 네트워크 및 시스템의 예는 2014년 4월 4일 출원된 예를 들어, 미국 특허 출원 번호 제61/977,804호(상기 출원은 그 전문이 본원에서 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.
- [0123] 개별 분자 전구체, 올리고머, 또는 중합체가 중합하여 경화된 비드를 형성하는 때를 조작하기 위하여, 개시제 및/또는 촉진제를 비드 형성 공정 중 상이한 시점에 첨가할 수 있다. 촉진제는 중합 공정을 (예컨대, 일부 경우에서, 중합 개시제의 활성화를 통해) 개시시킬 수 있고, 이로써, 비드 경화 시간을 단축시킬 수 있는 작용제일 수 있다. 일부 경우에서, 단일 촉진제 또는 복수 개의 촉진제가 중합에 사용될 수 있다. 적합한 중합 반응을 달성하는 데 있어 가속화의 주의 깊은 미세 조정이 중요할 수 있다. 예를 들어, 가속화가 너무 빠를 경우, 중량 및 과도한 연쇄 이동 이벤트를 통해 결 구조는 불량화될 수 있고, 임의의 원하는 종의 로딩은 감소될 수 있다. 가속화가 너무 느릴 경우, 고분자량 중합체는 중합체 얽힘 및 높은 점성에 기인하여 포획된 활성화 부위(예컨대, 자유 라디칼)를 생성할 수 있다. 높은 점성은 비드 로딩을 위한 종의 확산을 방해할 수 있고, 이로써 종의 로딩은 감소되거나, 또는 로딩되지 않을 수 있다. 예를 들어, 적절한 촉진제, 촉진제의 적절한 조합을 선택함으로써 또는 적절한 촉진제(들) 및 촉진제의 작용을 조절할 수 있는 임의의 자극(예컨대, 열, 전자기 방사선(예컨대, 광, UV 광), 또 다른 화학물질 중 등)을 선택함으로써 촉진제 작용의 세부 조절을 달성할 수 있다. 개시제 작용의 세부 조절은 또한 유사한 방식으로 달성될 수 있다.
- [0124] 촉진제는 수용성, 오일 가용성일 수 있거나, 수용성 및 오일 가능성, 둘 모두일 수 있다. 예를 들어, 촉진제는 테트라메틸에틸렌디아민(TMEDA 또는 TEMED), 디메틸에틸렌디아민, N,N,N',N'-테트라메틸메탄디아민, N,N'-디모르폴리노메탄, 또는 N,N,N',N'-테트라키스(2-하이드록시프로필)에틸렌디아민일 수 있다. 예를 들어, 개시제는 과황산암모늄(APS: ammonium persulfate), 칼슘 이온, 또는 도 32에 제시된 화합물 (I-IX) 중 임의의 것일 수 있다. 도 32에 제시된 화합물 (I-IX)은 수용성 아조계 개시제로서 작용할 수 있다. 아조계 개시제는 TEMED 및 APS의 부재하에서 사용될 수 있고, 열 기반 개시제로서 작용할 수 있다. 열 기반 개시제는 종을 (예컨대, 자유

라디칼의 생성을 통해) 열적으로 활성화시킬 수 있고, 이로써, 개시제 작용 속도는 개시제의 농도 및/또는 온도에 의해 세부 조정될 수 있다. 중합 촉진제 또는 개시제는 포스포네이트, 술포네이트, 카복실레이트, 하이드록실, 알부민 결합 모이어티, N-비닐 기, 및 인지질을 비롯한 작용기를 포함할 수 있다. 중합 촉진제 또는 개시제는 저분자량 단량체 화합물일 수 있다. 촉진제 또는 개시제를 a) 액적 발생 이전에 오일에 첨가할 수 있거나, b) 액적 발생 이후에 라인에 첨가할 수 있거나, c) 액적 발생 이후에 배출 저장소에 첨가할 수 있거나, 또는 d) 그의 조합으로 수행될 수 있다.

[0125] 중합은 또한 전자기 방사선에 의해 개시될 수 있다. 특정 유형의 단량체, 올리고머, 또는 중합체는 감광성 특성을 포함할 수 있다. 따라서, 중합은 상기 단량체, 올리고머, 또는 중합체를 UV 광, 가시 광선, 감광제와 조합된 UV 광, 감광제와 조합된 가시 광선, 또는 그의 조합에 노출시킴으로써 개시될 수 있다. 감광제의 예로는 리보플라빈이 있을 수 있다.

[0126] 비드가 완전하게 중합되거나, 경화되는데 소용되는 시간은 비드 크기, 촉진제가 첨가될 수 있는지 여부, 촉진제가 첨가될 수 있는 시점, 개시제의 유형, 전자기 방사선이 적용될 수 있는 시점, 용액 온도, 중합체 조성물, 중합체 농도, 및 다른 관련 파라미터에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 중합은 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20분 이후에 완료될 수 있다. 중합은 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20분 초과, 또는 그보다 더 긴 장기간의 시간 이후에 완료될 수 있다. 중합은 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20분 미만, 또는 그보다 더 짧은 단기간의 시간 이후에 완료될 수 있다.

[0127] 비드는 연속적인 상 교환에 의해 에멀전(예컨대, 젤-수-유)으로부터 회수될 수 있다. 과량의 수성 유체를 에멀전(예컨대, 젤-수-유)에 첨가할 수 있고, 경화된 비드는 침강될 수 있고, 여기서, 비드는 응집될 수 있고, 과량의 오일을 함유하는 상청액은 제거될 수 있다. 과량의 수성 유체를 첨가한 후, 침강 및 과량의 오일 제거를 수행하는 상기 공정은 비드가 연속상 오일에 대해 상대적인 수성 완충제의 주어진 순도로 현탁될 때까지 반복될 수 있다. 수성 완충제의 순도는 약 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%(v/v)일 수 있다. 수성 완충제의 순도는 약 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%(v/v) 초과 또는 그보다 클 수 있다. 수성 완충제의 순도는 약 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%(v/v) 미만일 수 있다. 침강 단계는 약 2, 3, 4, 또는 5회 반복될 수 있다. 침강 단계는 약 2, 3, 4, 또는 5회 초과, 또는 그보다 많이 반복될 수 있다. 침강 단계는 약 2, 3, 4, 또는 5회 미만으로 반복될 수 있다. 일부 경우에서, 침강 및 상청액의 제거는 또한 비반응 출발 물질을 제거할 수 있다.

[0128] 액적 발생기의 예로는 단일 유동 포커서(focuser), 병렬식 유동 포커서, 및 마이크로시브 막(microsieve membrane), 예컨대, 나노미 B.V.(Nanomi B.V.)에 의해 사용되는 것 등을 포함할 수 있다. 바람직하게, 미세유체 디바이스는 액적을 발생시키는 데 사용된다.

[0129] 이황화 결합을 통해 P5 프라이머에 연결된 아크리다이트 모이어티로 미리 작용화된 젤 비드를 생성하는 예시적인 에멀전 기반 개략이 도 30a에 도시되어 있다. 도 30a에 제시된 바와 같이, 아크릴아미드, 비스(아크릴로일)시스테인, 아크리다이트-S-S-P5 모이어티, 및 과황산암모늄을 에멀전의 액적 내로 조합한다. TEMED를 에멀전 오일상에 첨가하고, 액적으로 확산시켜 중합 반응을 개시할 수 있다. 도 30a에 제시된 바와 같이, TEMED가 과황산암모늄에 미치는 작용을 통해 SO<sub>4</sub><sup>-</sup> 유리 라디칼이 생성되고, 이는 이어서, 탄소-탄소 이중 결합의 탄소들 중 하나에서 유리 라디칼을 생성함으로써 아크릴아미드의 탄소-탄소 이중 결합을 활성화시킬 수 있다.

[0130] 도 30b에 제시된 바와 같이, 활성화된 아크릴아미드는 비활성화된 아크릴아미드와 (다시, 그의 탄소-탄소 이중 결합에서) 반응하여 중합을 시작할 수 있다. 생성된 각 생성물은 다시 유리 라디칼의 형성을 통해 활성화될 수 있고, 이로써 중합체는 확장될 수 있다. 또한, 비스(아크릴로일)시스테인 가교제 및 아크리다이트-S-S-P5 모이어티, 둘 모두는 활성화된 종과 반응할 수 있는 탄소-탄소 이중 결합을 포함하고, 이어서, 생성물 그 자체가 활성화될 수 있다. 도 30c에 제시된 바와 같이, 중합 반응에 비스(아크릴로일)시스테인 가교제를 포함시키면 중합체 쇄의 가교결합이 일어날 수 있다. 따라서, 도 30c에 도시된 바와 같이, 중합체 골격에 연결된 아크리다이트-S-S-P5 모이어티를 포함하는 하이드로겔 중합체 네트워크가 생성될 수 있다. 반응 종결시까지 중합 반응은 계속 수행될 수 있다. 반응 종결시, 연속 상 교환 또는 다른 적합한 방법을 사용하여 에멀전을 분해하고, 아크리다이트-S-S-P5 모이어티에 커플링된 가교결합된 하이드로겔(도 30a에 개략적으로 제시된 것)을 수득할 수 있다.

[0131] **바코드 및 랜덤 N-mer(도입)**

[0132] 특정 적용, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 서열분석은 서열을 확인하기 위해, 및 예를 들어, 서열분석된 단편으

로부터 더 큰 서열을 조립하기 위해 고유 식별자("바코드")에 의존할 수 있다. 그러므로, 서열분석 이전에 바코드를 폴리뉴클레오티드 단편에 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. 핵산을 적용하는 경우, 상기 바코드는 전형적으로 샘플 서열에 부착된, 비교적 짧은 뉴클레오티드 서열로 구성되며, 여기서, 바코드 서열은 그의 위치 또는 서열 요소에 의해 알려지거나, 또는 확인가능한 것이다. 일부 경우에서, 고유 식별자는 샘플을 인덱싱하는 데 유용할 수 있다. 그러나, 일부 경우에서, 바코드는 또한 다른 맥락에서도 유용할 수 있다. 예를 들어, 바코드는 가공 처리하는 동안 샘플을 추적하는 역할을 할 수 있고(예컨대, 실험실에서 샘플의 위치, 복수 개의 반응 베셀 중 샘플의 위치 등); 제조 정보를 제공하는 역할을 할 수 있고; 시간 경과에 따라(예컨대, 바코드 제조에서부터 사용 시점까지) 및 필드에서 바코드 성능을 추적하는 역할을 할 수 있고; 시간 경과에 따라 및 필드에서 바코드 로트 성능을 추적하는 역할을 할 수 있고; 서열분석 동안 생성물 정보를 제공하고, 가능할 경우, 서열분석 동안 생성물과 관련된 바코드가 판독될 때 자동 프로토콜(예컨대, 컴퓨터 지원으로 개시되고 실행되는 자동 프로토콜)을 일으키는 역할을 할 수 있고; 문제가 있는 바코드 서열 또는 생성물 로트를 추적하고 조정하는 역할을 할 수 있고; 바코드를 포함하는 반응에서 분자 유발인자로서 역할을 할 수 있고, 그의 조합을 수행할 수 있다. 특히 바람직한 측면에서, 및 앞서 언급한 바와 같이, 본원에 기술된 바와 같은 바코드 서열 세그먼트는 결정된 두 개별 핵산 서열 사이의 결합 정보를 제공하는 데 사용될 수 있다. 이러한 결합 정보로는 예를 들어, 공통 샘플, 공통 반응 베셀, 예컨대, 웰 또는 구획, 또는 심지어는 공통 출발 핵산 분자에의 결합을 포함할 수 있다. 특히, 주어진 반응 부피 내에서 공통 바코드를 특이 샘플 성분, 또는 샘플 성분의 서브세트에 부착시킴으로써 바코드를 보유하는 생성된 서열은 상기 반응 부피에 기인하는 것으로 간주할 수 있다. 결국, 샘플이 그의 근원 샘플, 후속하여 노출되는 가공 처리 단계에 기초하여 또는 개별 분자에 기초하여 상기 반응 부피로 할당되는 경우, 생성된 서열은 상기 반응 부피로부터 기원하는 것이라는 것을 더욱 잘 확인할 수 있다.

[0133] 바코드는 벌크 합성된 폴리뉴클레오티드 바코드, 무작위로 합성된 바코드 서열, 마이크로어레이 기반 바코드 합성, 천연 뉴클레오티드, N-mer 과의 부분적인 상보체, 랜덤 N-mer, 의사 랜덤 N-mer, 또는 그의 조합을 비롯한, 각종의 상이한 포맷으로부터 생성될 수 있다. 바코드 합성은 본원에 기술되어 있을 뿐만 아니라, 예를 들어, 2014년 2월 7일 출원된 미국 특허 출원 번호 제14/175,973호(그의 전체 기술내용은 그 전문이 본원에서 모든 목적을 위해 참조로 포함된다)에 기술되어 있다.

[0134] 상기 기술된 바와 같이, 고유 식별자로서의 기능을 하는 바코드 서열 세그먼트를 도입한 올리고뉴클레오티드는 또한 추가의 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 상기 추가의 서열 세그먼트로는 기능성 서열, 예컨대, 프라이머 서열, 프라이머 어닐링 부위 서열, 고정화 서열, 또는 후속되는 가공 처리에 유용한 다른 인식 또는 결합 서열, 예컨대, 바코드 함유 올리고뉴클레오티드가 부착되는 샘플의 서열분석에서 사용하기 위한 서열분석 프라이머 또는 프라이머 결합 부위를 포함할 수 있다. 추가로, 본원에서 사용되는 바, 바코드 함유 서열 내에 포함되는 것으로서 특이 기능성 서열을 언급하는 것 또한 임의의 상기 서열에 대한 상보체를 포함하는 것을 구상하였고, 이로써, 상보성 복제시 기술되는 특이 서열을 수득하게 될 것이다.

[0135] 일부 예에서, 바코드 또는 부분 바코드는 올리고뉴클레오티드 어레이, 예컨대, 마이크로어레이 또는 비드 어레이로부터 수득되거나, 또는 그에서 사용하는 데 적합한 올리고뉴클레오티드로부터 생성될 수 있다. 상기 경우에서, 마이크로어레이의 올리고뉴클레오티드는 유리 올리고뉴클레오티드가 바코드 또는 부분 바코드로서 작용할 수 있도록 (예컨대, 올리고뉴클레오티드를 어레이에 고정시키는 절단가능한 결합 또는 모이어티(예컨대, 광절단 가능한, 화학적으로 절단가능한, 또는 다르게는 절단가능한 결합)를 사용하여) 절단될 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 또는 부분 바코드는 공지된 서열로 이루어진 어레이로부터 수득된다. 예를 들어, 어레이로부터 수득된 것을 비롯한, 공지된 서열을 사용하는 것이 비공지된 서열로 이루어진 바코드와 관련된 서열분석 오류를 피하는 데 유익할 수 있다. 마이크로어레이는 약 10000000개 이상, 약 1000000개 이상, 약 900000개 이상, 약 800000개 이상, 약 700000개 이상, 약 600000개 이상, 약 500000개 이상, 약 400000개 이상, 약 300000개 이상, 약 200000개 이상, 약 100000개 이상, 약 50000개 이상, 약 10000개 이상, 약 1000개 이상, 약 100개 이상, 또는 약 10개 이상의, 바코드 또는 부분 바코드로서 사용될 수 있는 상이한 서열을 제공할 수 있다.

[0136] 본원에서 제공하는 비드는 고유 식별자(예컨대, 바코드)로서의 역할을 할 수 있는 올리고뉴클레오티드 서열에 부착될 수 있다. 대개, 본원에서 제공하는 비드의 집단은 각 비드가 단일 바코드 서열의 다중 카피에 부착되어 있는, 다양한 바코드 라이브러리를 함유한다. 일부 경우에서, 바코드 서열은 공지된 서열로 미리 합성되고/거나, 디자인된다. 일부 경우에서, 라이브러리 내의 각 비드는 독특한 고유 바코드 서열에 부착된다. 일부 경우에서, 복수 개의 비드는 그에 부착된 동일한 바코드 서열을 가질 것이다. 예를 들어, 일부 경우에서, 라이브러리 중 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%의 비드는 라이브러리 중 상이한 비드에 부착된 바코드 서열과 동일한 바코드 서열에 부착된다. 때때로, 약 1%, 2%, 3%, 4%,

5%, 10%, 20%, 25%, 또는 30%의 비드는 동일한 바코드 서열에 부착된다.

- [0137] 바코드 서열의 길이는 적용에 따라 임의의 적합한 길이일 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 서열의 길이는 약 2 내지 약 500개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 100개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 50개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 20개의 뉴클레오티드 길이, 약 6 내지 약 20개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 4 내지 16개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 서열의 길이는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 또는 500개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 경우에서, 바코드 서열의 길이는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 5000, 또는 10000개 초과 뉴클레오티드 길이이다. 일부 경우에서, 바코드 서열의 길이는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 또는 1000개 미만의 뉴클레오티드 길이이다.
- [0138] 바코드는 하나 이상의 바코드가 특정 비드 내로 도입되도록 비드 내로 로딩될 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 동일한 바코드 세트를 함유할 수 있다. 다른 경우에서, 각 비드는 바코드의 상이한 세트를 함유할 수 있다. 다른 경우에서, 각 비드는 동일한 바코드 세트를 포함할 수 있다. 다른 경우에서, 각 비드는 바코드의 상이한 세트를 포함할 수 있다.
- [0139] 본원에서 제공하는 비드는 하류 공정에서 샘플(예컨대, 게놈 샘플)을 프라이밍할 수 있는 랜더, 의사 랜덤, 또는 표적화된 N-mer인 올리고뉴클레오티드 서열에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 동일한 n-mer 서열이 단일 비드 또는 비드 집단에 부착된 올리고뉴클레오티드 상에 존재할 것이다. 이는 예컨대, 더욱 큰 표적 서열 내의 특정 서열 세그먼트를 표적화하기 위해 프라이머가 선택되는 것과 같은 표적화된 프라이밍 방법을 위한 경우일 수 있다. 다른 경우에서, 상기 랜덤 n-mer 서열은 샘플 핵산의 상이한 부분에 대해 무작위로 프라이밍하는 바, 본원의 비드 집단 내의 각 비드는 크고 다양한 개수의 N-mer 서열에 부착되어 그 중에서도 특히 주형 분자에 대한 상기 프라이머의 샘플링을 다양화할 수 있다.
- [0140] N-mer의 길이는 다양할 수 있다. 일부 경우에서, N-mer(예컨대, 랜덤 N-mer, 의사-랜덤 N-mer, 또는 표적화된 N-mer)의 길이는 약 2 내지 약 100개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 50개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 20개의 뉴클레오티드 길이, 약 5 내지 약 25개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 5 내지 약 15개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 경우에서, N-mer(예컨대, 랜덤 N-mer, 의사-랜덤 N-mer, 또는 표적화된 N-mer)의 길이는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 또는 500개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 경우에서, N-mer(예컨대, 랜덤 N-mer, 의사-랜덤 N-mer, 또는 표적화된 N-mer)의 길이는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 1000, 5000, 또는 10000개 초과 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 경우에서, N-mer(예컨대, 랜덤 N-mer, 의사-랜덤 N-mer, 또는 표적화된 N-mer)의 길이는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750, 또는 1000개 미만의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.
- [0141] N-mer(랜덤 N-mer 포함)은 특이 샘플 유형을 프라이밍하기 위해 조작될 수 있다. 예를 들어, 길이가 상이한 N-mer은 상이한 유형의 샘플 핵산, 또는 샘플 핵산의 상이한 영역에 대해 생성될 수 있고, 이로써, 각 N-mer 길이는 각각의 상이한 유형의 샘플 핵산 또는 샘플 핵산의 각각의 상이한 영역에 상응한다. 예를 들어, 한 길이의 N-mer은 한 종의 게놈(예컨대, 인간 게놈)으로부터 기원하는 샘플 핵산에 대해 생성될 수 있고, 또 다른 길이의 N-mer은 또 다른 종의 게놈(예컨대, 효모 게놈)으로부터 기원하는 샘플 핵산에 대해 생성될 수 있다. 또 다른 일례에서, 한 길이의 N-mer은 게놈의 특정 서열 영역을 포함하는 샘플 핵산에 대해 생성될 수 있고, 또 다른 길이의 N-mer은 게놈의 또 다른 서열 영역을 포함하는 샘플 핵산에 대해 생성될 수 있다. 또한, N-mer 길이에 대하여 추가로 또는 그에 대한 대안으로서, N-mer의 염기 조성(예컨대, N-mer의 GC 함량) 또한 샘플 핵산의 특정 유형 또는 그의 영역에 상응하도록 조작될 수 있다. 염기 함량은 특정 유형의 샘플 핵산에서 또는 샘플 핵산의 특정 영역에서 달라질 수 있고, 따라서, 예를 들어, 염기 함량이 상이한 N-mer은 상이한 샘플 유형의 핵산 또는 샘플 핵산의 상이한 영역을 프라이밍하는 데 유용할 수 있다.
- [0142] 본원 어디에나 기술되어 있는 비드 집단은 특정 샘플 유형 또는 특정 샘플 서열 영역에 대해 조작된 N-mer로 생성될 수 있다. 일부 경우에서, N-mer 길이 및 함량과 관련하여 혼합된 비드 집단(예컨대, 한 샘플 유형 또는 서

열 영역에 대하여 조작된 N-mer을 포함하는 비드 및 또 다른 샘플 유형 또는 서열 영역에 대하여 조작된 또 다른 N-mer을 포함하는 비드의 혼합물)이 생성될 수 있다. 일부 경우에서, 비드 중 하나 이상이 복수 개의 샘플 유형 또는 서열 영역에 대하여 조작된 N-mer의 혼합된 집단을 포함할 수 있는, 비드 집단이 생성될 수 있다.

[0143] 앞서 언급된 바와 같이, 일부 경우에서, 랜덤 N-mer인지 또는 표적화된 N-mer인지 상관없이, N-mer은 후속 가공 처리 단계에서의 성능이 개선된 프라이머를 제공하기 위해 뉴클레오티드 유사체, 모방체, 또는 비천연 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, n-mer 서열의 상대적인 프라이밍 효율을 증진시키기 위하여 써모사이클링을 수행할 때, 예컨대, 증폭 동안 상이한 용융/어닐링 프로파일을 가지는 N-mer 프라이머를 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 경우에서, 천연 뉴클레오티드를 포함하는 상응하는 프라이머와 비교하여 프라이머 서열의 용융 온도 프로파일을 변경시키기 위해 뉴클레오티드 유사체 또는 비천연 뉴클레오티드를 N-mer 프라이머 서열 내로 도입할 수 있다. 특정 경우에서, 프라이머 서열, 예컨대, 본원에 기술된 N-mer 서열은 주형 서열에 하이브리드화될 때, 프라이머에 대하여 상승된 온도 안정성을 제공하기 위해서, 그뿐만 아니라, 일반적으로 증진된 이중체 안정성을 제공하기 위해서 서열 중 하나 이상의 위치에 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체, 예컨대, LN염기를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 더 약한 결합을 더욱 밀착된 결합 LNA 유사체로 대체하기 위해 LNA 뉴클레오티드가 프라이머 합성에서 A 또는 T 염기 대신 사용된다. 증진된 하이브리드화 프라이머 서열을 제공함으로써 상기 프라이머를 사용하는 보다 고효율의 증폭 공정을 생성할 수 있을 뿐만 아니라, 상이한 온도상 내에서 작업할 수 있다.

[0144] 상기 기술된 올리고뉴클레오티드에 다른 변형 또한 제공될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 예컨대, 임의의 존재하는 엑소뉴클레아제 활성을 통한 올리고뉴클레오티드의 임의의 분해를 막거나, 또는 감소시키기 위하여 올리고뉴클레오티드는 보호된 말단 또는 다른 영역을 제공받을 수 있다. 일례에서, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 서열 내의 하나 이상의 위치에서, 예컨대, 3' 및/또는 5' 말단 위치에 인접한 또는 근접한 위치에서 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드 유사체를 제공받을 수 있다. 이러한 포스포로티오에이트 뉴클레오티드는 예컨대, 3'-5' 및/또는 5'-3' 엑소뉴클레아제를 비롯한, 올리고뉴클레오티드 상의 뉴클레아제 활성을 감소 또는 제거하기 위하여 올리고뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드간 결합 중 비결합 산소 대신 황 기를 제공한다. 일반적으로, 포스포로티오에이트 유사체는 예컨대, 올리고뉴클레오티드의 3'-5' 및/또는 5'-3' 엑소뉴클레아제 분해로부터 보호하는 것을 비롯한, 엑소뉴클레아제 및/또는 엔도뉴클레아제를 포함하는 올리고뉴클레오티드에 그에 대한 저항성을 부여하는 데 유용하다. 따라서, 일부 측면에서, 상기 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합은 올리고뉴클레오티드의 3' 또는 5' 말단 중 하나에 마지막 5 내지 10개의 뉴클레오티드간 결합 중 하나 이상의 것에 존재할 것이며, 바람직하게, 3'-5' 또는 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성으로부터 보호하기 위해 마지막 3' 또는 5' 말단 뉴클레오티드간 결합 및 두번째 내지 마지막 5' 말단 뉴클레오티드간 결합 중 하나 이상의 것을 포함한다. 올리고뉴클레오티드 내의 다른 위치도 또한 포스포로티오에이트 결합을 제공받을 수 있다. 바코드 서열 (및 임의의 결합된 기능성 서열)을 포함하는 올리고뉴클레오티드 상에서 상기와 같은 보호를 제공하는 것 이외에도, 상기 기술된 변형은 또한 본원에 기술된 차단제 서열과 관련하여, 차단제 서열 내의 포스포로티오에이트 유사체를 예컨대, 3' 및/또는 5' 말단 위치에 인접하거나, 근접한 위치 뿐만 아니라, 올리고뉴클레오티드 내의 잠재적으로 다른 위치에 도입하는 데 있어 유용하다.

[0145] **미리 작용화된 비드에의 내용물 부착**

[0146] 다양한 내용물(content)이 올리고뉴클레오티드로 작용화된 비드를 비롯한 본원에 기술된 비드에 부착될 수 있다. 대개, 올리고뉴클레오티드, 특히, 원하는 서열 ((예컨대, 바코드, 랜덤 N-mer)을 가지는 올리고뉴클레오티드가 부착된다. 본원에서 제공하는 다수의 방법에서, 올리고뉴클레오티드는 프라이머 연장 반응을 통해 비드에 부착된다. 프라이머로 미리 작용화된 비드를 올리고뉴클레오티드 주형과 접촉시킬 수 있다. 이어서, 증폭 반응을 수행하여 올리고뉴클레오티드 주형의 상보체의 카피가 프라이머에 부착되도록 프라이머를 연장시킬 수 있다. 부착의 다른 방법, 예컨대, 결합 반응 또한 가능하다.

[0147] 일부 경우에서, 상이한 서열 (또는 동일한 서열)을 가지는 올리고뉴클레오티드는 별개의 단계에서 비드에 부착된다. 예를 들어, 일부 경우에서, 고유 서열을 가지는 바코드는 각 비드가 그 위에 제1 바코드 서열의 다중 카피를 가지도록 비드에 부착된다. 제2 단계에서, 비드는 제2 서열로 추가로 작용화될 수 있다. 비드에 부착되는 제1 및 제2 서열의 조합이 고유 바코드, 또는 고유 식별자로서 작용할 수 있다. 본 공정을 계속 수행하여 바코드 서열로서 작용하는 추가 서열을 첨가할 수 있다(일부 경우에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 초과 의 바코드 서열이 각 비드에 순차적으로 첨가된다). 비드는 또한 예를 들어, 하류의 전체 계층 증폭 반응을 위해 랜덤 프라이머로서 작용할 수 있는 랜덤 N-mer로 추가로 작용화될 수 있다.

- [0148] 일부 경우에서, 특정 올리고뉴클레오타이드 서열(예컨대, 바코드 서열)로의 작용화 후, 비드를 풀링시키고, 이어서, 후속하여 비드에 부착되는 큰 랜덤 N-mer 집단과 접촉시킬 수 있다. 일부 경우에서, 특히 비드가 랜덤 N-mer 부착 이전에 풀링되는 경우, 각 비드는 그에 부착된 한 바코드 서열을 (대개는 다중 카피로서) 가지지만, 다수의 상이한 랜덤 N-mer 서열이 그에 부착된다. 도 4는 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 바코드 및 N-mer을 비드에 부착시키기 위한 한 예시적인 방법인, 제한 회석 방법의 일례를 단계식으로 도시하여 제공하는 것이다.
- [0149] 제한 회석은 올리고뉴클레오타이드를 비드에 부착시키기 위해 사용될 수 있으며, 이로써, 비드에는 평균적으로, 1개 이하의 고유 올리고뉴클레오타이드 서열, 예컨대, 바코드가 부착된다. 대개, 본 공정에서 비드는 이미 특정 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, 프라이머로 작용화되어 있는 것이다. 예를 들어, 프라이머(예컨대, 범용 프라이머)로 작용화된 비드 및 복수 개의 주형 올리고뉴클레오타이드는 대개 높은 비드:주형 올리고뉴클레오타이드의 비로 조합될 수 있고, 이로써, 비드 및 주형 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 수득할 수 있다. 이어서, 혼합물은 예컨대, 벌크 유화 공정, 플레이트 내의 에멀전에 의해 또는 미세유체 디바이스, 예컨대, 미세유체 액적 발생기에 의해 복수 개의 구획(예컨대, 유중수 에멀전 내의 수성 액적)으로 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 혼합물은 평균적으로, 각 구획이 1개 이하의 주형 올리고뉴클레오타이드를 포함하도록 복수 개의 구획으로 구획화될 수 있다.
- [0150] 또한, 주형 올리고뉴클레오타이드는 비드에 부착된 프라이머를 통해 구획 내에서 (예컨대, 프라이머 연장 반응을 통해) 증폭될 수 있다. 증폭으로 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 비드가 생성될 수 있다. 증폭 후, 구획의 내용물을 공통 베셀(예컨대, 튜브, 웰 등)로 풀링할 수 있다. 이어서, 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 비드를 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 포획 모이어티의 지원하에, 또는 그의 도움 없이, 예를 들어, 원심분리 및 자기 분리를 비롯한, 임의의 적합한 방법에 의해 구획의 다른 내용물(증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드를 포함하지 않는 비드를 포함)로부터 분리할 수 있다.
- [0151] 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 비드를 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드와 조합하여 비드 및 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 벌크 혼합물을 생성할 수 있다. 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드는 비드 상의 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드에 적어도 부분적으로 상보적인 서열을 포함할 수 있으며, 이로써, 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드는 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화한다. 이어서, 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드는 증폭 반응에서 하이브리드화된 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드를 통해 연장될 수 있고, 이로써, 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드의 상보체는 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드에 부착된다. 추가의 주형 올리고뉴클레오타이드를 증폭된 올리고뉴클레오타이드에 결합시키고, 증폭 반응에서 증폭된 올리고뉴클레오타이드를 연장시키는 것으로 이루어진 사이클은 비드에 첨가되는, 임의의 원하는 개수의 추가의 올리고뉴클레오타이드를 위해 반복될 수 있다.
- [0152] 증폭된 주형 올리고뉴클레오타이드에 부착되는 올리고뉴클레오타이드로는 예를 들어, 랜덤 N-mer 서열, 의사 랜덤 N-mer 서열, 또는 프라이머 결합 부위(예컨대, 범용 서열 일부, 예컨대, 서열분석 장치와 양립가능한 범용 서열 일부) 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다. 비드에 부착되는 상기 서열 또는 임의의 다른 서열 중 임의의 것은 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 적어도 우라실 함유 뉴클레오타이드의 서브섹션을 포함할 수 있다.
- [0153] 바코드 서열 및 랜덤 N-mer을 비드에 부착시키는 제한 회석 방법의 일례가 도 4에 제시되어 있다. 도 4A에 제시되어 있는 바와 같이, 비드(401)(예컨대, 이황화 가교결합된 폴리아크릴아미드 겔 비드)을 제1 프라이머(403)로 미리 작용화시킨다. 제1 프라이머(403)를 예를 들어, 비드(401)의 표면에 결합된 아크리다이트 모이어티와 함께 이황화 결합(402)을 통해 비드에 커플링시킬 수 있다. 그러나, 일부 경우에서, 제1 프라이머(403)는 이황화 결합(402) 없이, 아크리다이트 모이어티를 통해 비드에 커플링될 수 있다. 제1 프라이머(403)는 비드에 부착되는 올리고뉴클레오타이드의 주형 서열을 프라이밍시키기 위한 범용 프라이머일 수 있고/거나, 제1 프라이머(403)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드를 서열분석하는 데 사용하기 위한 프라이머 결합 부위(예컨대, P5)일 수 있다.
- [0154] 이어서, 도 4B에 제시된 바와 같이, 제1 프라이머(403)로 작용화된 비드(401)를 수용액 중에서 주형 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 제1 프라이머 결합 부위(404)(예컨대, P5c), 주형 바코드 서열(405), 및 주형 프라이머 결합 부위(407)(예컨대, R1c)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드) 및 핵산 증폭에 필요한 시약(예컨대, dNTP, 폴리머라제, 보조 인자 등)과 혼합할 수 있다. 수성 혼합물은 또한 주형 올리고뉴클레오타이드의 주형 프라이머 결합 부위(407)의 서열과 동일한, 포획 모이어티(예컨대, 비오틴)에 연결된 포획 프라이머(406)(예컨대, 이는 때때로 리드 프라이머로서 지칭된다)을 포함할 수 있다.
- [0155] 이어서, 수성 혼합물은 물/오일 에멀전으로 유화되어 연속 오일상인 수성 액적(예컨대, 하나 이상의 비드(401), 주형 올리고뉴클레오타이드, 핵산 증폭에 필요한 시약, 및 원하는 경우, 임의의 포획 프라이머(406)를 포함하는

액적)이 생성될 수 있다. 일반적으로, 액적은 액적당 평균적으로 1개 이하의 주형 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 도 4B 및 도 4C에 제시된 바와 같이, 액적에 대한 제1회차의 써모사이클링을 통해 제1 프라이머(403)에 의해 프라이머 결합 부위(404)에서 주형 올리고뉴클레오티드가 프라이밍되고, 제1 프라이머(403)의 연장이 이루어지고, 이로써, 주형 올리고뉴클레오티드 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 제1 프라이머(403)에서 겔 비드에 부착된다. 상보성 올리고뉴클레오티드는 제1 프라이머 (403), 바코드 서열(408)(예컨대, 주형 바코드 서열(405)에 상보적인 것), 및 주형 프라이머 결합 부위(407) 및 포획 프라이머(406), 둘 모두에 상보적인 포획 프라이머 결합 부위(415)를 포함한다. 포획 프라이머 결합 부위(415)는 또한 상보성 올리고뉴클레오티드의 서열분석 동안 리드 프라이머 결합 부위(예컨대, R1)로서 사용될 수 있다.

[0156] 도 4D에 제시된 바와 같이, 포획 프라이머(406)는 다음 회차의 써모사이클링 동안 포획 프라이머 결합 부위(415)에 결합할 수 있다. 이어서, 도 4E에 제시된 바와 같이, 그의 5' 단부에 포획 모이어티(예컨대, 비오틴)를 통합하는 포획 프라이머(406)는 연장되어 추가의 주형 올리고뉴클레오티드(예컨대, 서열(404), (405), 및 (406)을 포함하는 것)가 생성될 수 있다. 써모사이클링은 비드(401)의 모든 제1 프라이머(403) 부위가 바코드 서열(408) 및 포획 프라이머 결합 부위(415)에 연결될 때까지, 원하는 횟수의 사이클(예컨대, 적어도 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50회 이상의 사이클) 동안 계속 진행될 수 있다. 각 액적은 일반적으로 출발을 위해 1개 또는 0개의 주형 올리고뉴클레오티드를 포함하기 때문에, 각 액적은 일반적으로 주형 올리고뉴클레오티드에 상보적인 서열의 다중 카피에 부착된 비드를, 또는 주형 올리고뉴클레오티드에 상보적인 서열의 카피가 부착되지 않은 비드를 포함할 것이다. 도 4E에 제시된 바와 같이, 써모사이클링 종료시, 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드 생성물은 포획 모이어티(예컨대, 비오틴)도 또한 포함하는 주형 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화된다.

[0157] 이어서, 예멸전은 임의의 적합한 수단에 의해 분해될 수 있고, 유리된 비드는 공통 베슬로 풀링될 수 있다. 도 4F 및 도 4G에 제시된 바와 같이, 포획 프라이머 (406)의 포획 모이어티와 결합할 수 있는 모이어티(예컨대, 스트랩트아비딘)를 포함하는 포획 비드 (또는 본원에 기술된 포획 장치를 비롯한 다른 장치) (409)를 이용하여, 포획 비드와 포획 모이어티의 상호작용에 의해 양성 비드(예컨대, 서열 (403), (408), 및 (415)를 포함하는 비드)를 음성 비드(예컨대, 서열 (403), (408), 및 (415)를 포함하지 않는 비드)로부터 농축시킬 수 있다. 포획 비드가 사용되는 경우, 비드는 자성을 띌 수 있고, 이로써, 농축을 위해 자석이 사용될 수 있다. 대안으로서, 농축을 위해 원심분리가 사용될 수 있다. 도 4H에 제시된 바와 같이, 양성 비드를 농축할 때, 포획 모이어티를 포함하고, 포획 비드에 연결된 하이브리드화된 주형 올리고뉴클레오티드를 본원에 기술된 화학적 수단을 비롯한 화학적 수단 또는 가열을 통해 비드 결합된 올리고뉴클레오티드로부터 변성시킬 수 있다. 이어서, 변성된 올리고뉴클레오티드(예컨대, (404), (405), 및 (406)을 포함하는 올리고뉴클레오티드)를 변성된 올리고뉴클레오티드에 부착된 포획 비드를 통해 양성 비드로부터 분리할 수 있다. 도 4H에 제시된 바와 같이, 서열 (403), (408), 및 (415)를 포함하는 비드를 수득한다. 포획 비드에 대한 대안으로서, 양성 비드는 또한 예를 들어, 비드 또는 비드에 커플링된 중에 결합할 수 있는, 구획 중의 광학적으로 활성인 염료를 포함함으로써 유세포 분석법을 통해 양성 비드로부터 분류될 수 있다.

[0158] 이어서, 도 4I에 제시된 바와 같이, 벌크 수성 유체 중, 서열 (403), (408), 및 (415)를 포함하는 비드를 각각이 포획 프라이머 결합 부위(415)에 상보적인 서열(412)에 연결된 것인 주형 랜덤 서열(예컨대, 랜덤 N-mer)(413)과 조합할 수 있다. 도 4J에 제시된 바와 같이, 포획 프라이머 결합 부위(415)는 가열시 서열(412)에 주형 랜덤 서열(413)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 프라이밍시킬 수 있다. 프라이밍 후, 포획 프라이머 결합 부위(415)는 (예컨대, 폴리머라제를 통해) 연장될 수 있고, 이로써, 포획 프라이머 결합 부위(415)는 주형 랜덤 서열(413)과 상보적인 랜덤 서열(414)과 연결될 수 있다. 주형 랜덤 서열(413) 및 서열(412)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 본원에 기술된 화학적 수단을 비롯한 화학적 수단 또는 가열을 통해 비드 결합된 올리고뉴클레오티드로부터 변성시킬 수 있다. 변성된 올리고뉴클레오티드로부터 비드를 분리시키는 데 예를 들어, 비드의 원심분리 및 세척이 사용될 수 있다. 도 4K, 4L, 및 4M에 제시된 바와 같이, 변성된 올리고뉴클레오티드 제거 후, 바코드 서열(408) 및 랜덤 서열(414)을 포함하는 비드가 수득된다. 랜덤 서열(414)의 부착이 벌크로 수행되기 때문에, 고유 바코드 서열(408)의 다중 카피를 포함하는 각 비드는 또한 다양한 랜덤 서열(414)을 포함한다.

[0159] 비드로부터 비드 결합된 올리고뉴클레오티드를 유리시키기 위해, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 자극, 예컨대, 환원제가 사용될 수 있다. 도 4N에 제시된 바와 같이, 이황화 결합, 및 이황화 결합을 통한 올리고뉴클레오티드와의 결합을 포함하는 비드 환원제와 접촉시키면 비드 및 이황화 결합, 둘 모두 분해되고, 이로써, 올리고뉴클레오티드가 비드로부터 유리된다. 환원제와의 접촉은 예를 들어, 또 다른 구획(예컨대, 또 다른 예멸전

의 액적)에서도 완료될 수 있으며, 이로써, 올리고뉴클레오티드가 비드로부터 유리될 때, 각 액적은 일반적으로 모두가 동일한 바코드 서열 (408), 및 다양한 랜덤 서열 (414)를 포함하는 유리 올리고뉴클레오티드를 포함하게 된다. 랜덤 프라이머로서 작용하는 랜덤 서열 (414)를 통해, 유리 올리고뉴클레오티드는 구획에서도 또한 샘플 핵산의 상이한 영역을 바코딩하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기술된 것을 비롯한, 증폭 또는 걸찰 방식을 사용하여 바코드를 샘플 핵산에 부착하는 것을 완료할 수 있다.

[0160] 제한 회석시, 구획(예컨대, 액적)은 구획당 평균적으로 1개 이하의 올리고뉴클레오티드 서열을 함유할 수 있다. 주어진 서열-비드 회석시 이러한 분포 빈도는 푸아송 분포를 따른다. 따라서, 일부 경우에서, 약 6%, 10%, 18%, 20%, 30%, 36%, 40%, 또는 50%의 액적 또는 구획은 1개 이하의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 약 6%, 10%, 18%, 20%, 30%, 36%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 초과, 또는 그보다 많은 액적은 1개 이하의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 다른 경우에서, 약 6%, 10%, 18%, 20%, 30%, 36%, 40%, 또는 50% 미만의 액적은 1개 이하의 올리고뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0161] 일부 경우에서, 제한 회석 단계는 바코드 카피에 따라 양성 비드의 개수를 증가시키기 위해 랜덤 N-mer 서열 첨가 이전에 반복될 수 있다. 예를 들어, 제한 회석은 원하는 분율(예컨대, 1/10 내지 1/3)의 에멀전 액적이 증폭을 위한 주형을 포함하도록 준비될 수 있다. 양성 비드는, 양성인 것이 증폭용 프라이머 이상으로 포함하지 않도록(예컨대, 모든 P5 프라이머 부위는 연장된 것이다) (도 4에 도시된 바와 같이) 주형 증폭을 통해 생성될 수 있다. 이어서, 에멀전 액적은 분해될 수 있고, 이어서, 2회차 증폭을 위해 제한 회석시 새 주형으로 재유화될 수 있다. 1회차 증폭에서 생성된 양성 비드는 그의 프라이밍 부위가 이미 점유되어 있기 때문에, 추가 증폭에는 참여하지 않을 것이다. 증폭 후 재유화를 수행하는 공정은 원하는 분율의 양성 비드를 수득할 때까지 적합한 회차의 단계 동안 반복될 수 있다.

[0162] 일부 경우에서, 제한 회석 작용화 후 분류 동안 수득된 음성 비드를 회수하고, 추가로 가공 처리하여 추가의 양성 비드를 생성할 수 있다. 예를 들어, 음성 비드를 회수 후에 각 웰이 일반적으로 1개의 비드를 포함하도록 플레이트(예컨대, 384 웰 플레이트)의 웰 내로 분배할 수 있다. 일부 경우에서, 분배하는 것은 유세포 분석법의 지원으로(예컨대, 유세포 분석기는 분류하는 동안 각각의 음성 비드를 웰로 지정하며 - 유세포 분석기의 예로는 BD FACS 제즈(BD FACS Jazz)가 있다), 또는 분배 장치, 예컨대, 로봇 분배 장치를 통해 달성될 수 있다. 각 웰은 또한 주형 바코드 서열을 포함할 수 있고, 도 4에 도시된 공정은 반복되되, 단, 예외적으로 각 웰은 유체 액적보다는 각 비드를 구획화된다. 각 웰은 주형 및 비드를 포함하기 때문에, 각 웰은 양성 비드를 제조할 수 있다. 이어서, 본원 어디에나 기술되어 있는바와 같이, 비드는 각 웰로부터 풀링될 수 있고, 추가의 서열(예컨대, 랜덤 N-mer 서열)이 벌크로 첨가될 수 있다.

[0163] 바코드는 바코딩되는 비드 1개에 대한 바코드의 비를 예상 또는 예측되는 비로 하여 비드에 로딩될 수 있다. 일부 경우에서, 바코드는 비드 1개당 약 0.0001, 0.001, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 1000000000, 또는 10000000000개의 바코드인 비로 로딩되도록 로딩된다. 일부 경우에서, 바코드는 비드 1개당 0.0001, 0.001, 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000, 200000000, 300000000, 400000000, 500000000, 600000000, 700000000, 800000000, 900000000, 1000000000, 2000000000, 3000000000, 4000000000, 5000000000, 6000000000, 7000000000, 8000000000, 9000000000, 10000000000, 20000000000, 30000000000, 40000000000, 50000000000, 60000000000, 70000000000, 80000000000, 90000000000, 100000000000, 200000000000, 300000000000, 400000000000, 500000000000, 600000000000, 700000000000, 800000000000, 900000000000, 1000000000000개 초과 또는 그보다 많은 바코드인 비로 로딩되도록 로딩된다. 일부 경우에서, 바코드는 비드 1개당 약 0.0001, 0.0002, 0.0003, 0.0004, 0.0005, 0.0006, 0.0007, 0.0008, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 1000000000, 5000000000, 10000000000, 또는 100000000000개 미만의 바코드인 비로 로딩되도록 로딩된다.

[0164] 본원에 기술된 것(예컨대, 실질적으로 용해성인 비드, 일부 경우에서, 환원에 의해 실질적으로 용해성인 비드)을 비롯한 비드는 복수 개의 올리고뉴클레오티드에 공유적으로 또는 비공유적으로 연결될 수 있고, 여기서, 적어도 올리고뉴클레오티드 서브세트는 불변 영역 또는 도메인(예컨대, 바코드 서열, 바코드 도메인,

공통 바코드 도메인, 또는 서브세트의 올리고뉴클레오티드 사이에 일정한 다른 서열) 및 가변 영역 또는 도메인 (예컨대, 랜덤 서열, 랜덤 N-mer, 또는 서브세트의 올리고뉴클레오티드 사이에 가변적인 다른 서열)을 포함한다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 비드에 유리가능하게 커플링될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 공유 및 비공유 결합 유형을 비롯한 임의의 적합한 결합을 통해 비드에 공유적으로 또는 비공유적으로 연결될 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 결합, 예컨대, 화학적으로 절단가능한 결합(예컨대, 이황화 결합), 광 절단가능한 결합, 또는 열적으로 절단가능한 결합을 통해 비드에 공유적으로 연결될 수 있다. 비드는 불변 영역 또는 도메인 및 가변 영역 또는 도메인을 포함하는 약 약 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 1000000000, 또는 1000000000000개 초과, 또는 약 1, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 1000000000, 또는 1000000000000개 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0165] 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 각각 동일한 불변 영역 또는 도메인(예컨대, 동일한 바코드 서열, 동일한 바코드 도메인, 공통 도메인 등)을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 각각 상이한 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 동일한 불변 영역(또는 공통 도메인)을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 비율(%)은 약 0.01%, 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 상이한 서열을 포함하는 가변 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 비율(%)은 약 0.01%, 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 with 상이한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 (가변 및 불변 영역 또는 도메인을 포함하는 것 포함)을 포함하는 복수 개의 비드 중 비드의 비율(%)은 약 0.01%, 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상이다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 또한 하나 이상의 추가의 서열, 예컨대, 프라이머 결합 부위(예컨대, 서열분석 프라이머 결합 부위), 범용 프라이머 서열(예컨대, 하나 이상의 유전자좌가 특정 길이의 서열 내에 존재하게 될 확률에 기초하여 상기 길이의 임의의 핵산 단편 상에 상기의 하나 이상의 유전자좌에 하이브리드화하고, 그를 프라이밍하는 것으로 예상되는 프라이머 서열) 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 유형의 추가의 서열을 비롯한 임의의 다른 원하는 서열을 포함할 수 있다.

[0166] 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 복수 개의 비드가 생성됨으로써 예를 들어, 비드 라이브러리(예컨대, 바코딩된 비드 라이브러리)를 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 공통 도메인(예컨대, 공통 바코드 도메인) 또는 영역의 서열은 적어도 복수 개의 개별 비드의 서브세트 사이에 차이가 날 수 있다. 예를 들어, 복수 개의 비드의 개별 비드 사이의 공통 도메인 또는 영역의 서열은 2개 이상, 10개 이상, 50개 이상, 100개 이상, 500개 이상, 1000개 이상, 5000개 이상, 10000개 이상, 50000개 이상, 100000개 이상, 500000개 이상, 1000000개 이상, 5000000개 이상, 10000000개 이상, 50000000개 이상, 100000000개 이상, 500000000개 이상, 또는 10000000000개 이상의 복수 개의 비드 사이에서 차이가 날 수 있다. 일부 경우에서, 복수 개의 비드의 각 비드는 상이한 공통 도메인 또는 영역을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 상이한 공통 도메인 또는 영역을 포함하는 복수 개의 비드의 개별 비드의 비율(%)은 약 0.01%, 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 복수 개의 비드는 복수 개의 상이한 비드에 커플링된 상이한 공통 도메인을 적어도 약 2, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000개 이상 포함할 수 있다.

[0167] (예컨대, 에멀전의 액적을 통한) 제한 회석에 대한 대안으로서, 다른 구획화 방법을 사용하여 올리고뉴클레오티드를 비드에 부착시킬 수 있다. 도 13a에 제시된 바와 같이, 플레이트의 웰이 사용될 수 있다. 프라이머(예컨대, P5, 아크리다이트 및, 임의적으로, 이황화 결합을 통해 비드에 연결된 프라이머)를 포함하는 비드를 플레이트의 웰 중에서 주형 올리고뉴클레오티드(예컨대, 바코드 서열을 포함하는 주형 올리고뉴클레오티드) 및 증폭 시약과 조합할 수 있다. 각 웰은 고유 주형 바코드 서열의 하나 이상의 카피 및 하나 이상의 비드를 포함할 수 있다. 플레이트의 써모사이클링은 주형 올리고뉴클레오티드의 프라이머에 대한 하이브리드화를 통해 프라이머를 연장시키고, 이로써, 비드는 올리고뉴클레오티드 주형에 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드를 포함하게 된다. 써모사이클링은 최대로는 모든 프라이머가 연장될 때까지 원하는 횟수만큼의 사이클(예

컨대, 적어도 약 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50회 이상의 사이클) 동안 계속될 수 있다.

- [0168] 써모사이클링 완료시, 비드를 공통 베슬로 풀링시키고, (예컨대, 원심분리, 자기 분리 등을 통해) 변성된 상보성 가닥을 세척하고, 다시 세척한 후, 원하는 경우, 추가 회차의 별크 가공 처리를 수행할 수 있다. 예를 들어, 랜덤 N-mer 서열을 제한 회석에 대해 상기 기술된 방법을 사용하여 및 **도 13b** 및 **도 41-M**에 제시된 바와 같이 비드 결합 올리고뉴클레오티드에 첨가할 수 있다.
- [0169] 제한 회석에 대한 또 다른 대안 접근법으로서, **도 13c**에 제시된 바와 같이, 다중웰 플레이트를 구획화하는 것을 포함하는 조합 공정을 사용하여 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 비드를 생성할 수 있다. 상기 방법에서, 웰은 미리 합성된 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 올리고뉴클레오티드 주형을 함유할 수 있다. 비드(예컨대, 미리 도입된 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 프라이머를 포함하는 비드)는 다중웰 플레이트의 개별 웰 내로 분할할 수 있다. 예를 들어, P5 올리고뉴클레오티드를 함유하는 비드의 혼합물은 다중웰 플레이트 (예컨대, 384 웰)의 개별 웰 내로 분할될 수 있으며, 여기서, 각 웰은 고유 올리고뉴클레오티드 주형(예컨대, 제1 부분 바코드 주형 또는 바코드 주형을 포함하는 올리고뉴클레오티드)을 함유한다. 프라이머 연장 반응은 예를 들어, 주형으로서 올리고뉴클레오티드 주형 및 프라이머로서 비드에 부착된 프라이머를 사용하여 개별 웰 내에서 수행될 수 있다. 이어서, 모든 웰을 함께 풀링시키고, 비반응 생성물을 제거할 수 있다.
- [0170] 증폭된 생성물에 부착된 비드 혼합물을 제2 다중웰 플레이트 (예컨대, 384 웰)의 웰 내로 다시 재분할할 수 있으며, 여기서, 제2 다중웰 플레이트의 각 웰은 또 다른 올리고뉴클레오티드 서열(예컨대, 제2 부분 바코드 서열 및/또는 랜덤 N-mer을 포함하는 것)을 함유한다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단제 올리고뉴클레오티드에 (예컨대, 하이브리드화를 통해) 부착될 수 있다. 제2 다중웰 플레이트의 웰 내에서, 반응, 예컨대, 단일 가닥 결합 반응을 수행하여 추가의 서열을 (예컨대, 제2 단계의 웰에서 올리고뉴클레오티드를 이용하여 제1 단계에서와 같이 비드에 부착된 프라이머 연장 생성물의 결합을 통해) 각 비드에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 제1 단계에서 비드에 연결된 부분 바코드 서열을 제2 단계에서 제2 부분 바코드 서열에 결합시켜 전장의 바코드 서열을 포함하는 비드를 생성한다. 일부 경우에서, 전장의 바코드 서열을 포함하는 비드는 또한 랜덤 서열(예컨대, 랜덤 N-mer) 및/또는 차단 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 일부 경우에서, PCR 반응 또는 프라이머 연장 반응을 수행하여 추가의 서열을 비드에 부착시킨다. 웰로부터의 비드를 함께 풀링시키고, 비반응 생성물을 제거할 수 있다. 일부 경우에서, 추가의 다중 웰 플레이트를 이용하여 본 공정을 반복한다. 본 공정을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000, 또는 10000회에 걸쳐 반복할 수 있다.
- [0171] 일부 조합 접근법에서, 결합 방법을 사용하여 비드(예컨대, 본원 어디에나 기술되어 있는 분해성 비드) 상에서 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 조립할 수 있다. 예를 들어, 바코드 함유 올리고뉴클레오티드가 부착되는 별개의 비드 집단을 제공할 수 있다. 상기 집단은 뉴클레오티드를 부착시키기 위한 고정 성분(또는 결합), 예컨대, 활성화가능한 화학기 (포스포라미다이트, 아크리다이트 모이어티, 또는 다른 열적으로, 광학적으로 또는 화학적으로 활성화가능한 기), 절단가능한 결합, 바코드 함유 올리고뉴클레오티드가 그에 결합, 하이브리드화, 또는 다르게는 부착될 수 있는 앞서 부착된 올리고뉴클레오티드 분자, DNA 결합 단백질, 정전기적 부착을 위한 하전된 기, 또는 임의의 다양한 다른 부착 기전을 포함할 수 있다.
- [0172] 제1 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 세그먼트는 별개의 집단에 부착되고, 여기서, 상이한 집단은 그에 부착된 상이한 바코드 서열 세그먼트를 포함한다. 각각의 별개의 집단 중의 각 비드는 적어도 2, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000개 이상의 제1 올리고뉴클레오티드 분자 또는 올리고뉴클레오티드 세그먼트 분자에 부착될 수 있다. 제1 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 세그먼트는 별개의 집단에 유리가능하게 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 세그먼트는 별개의 집단 중의 각 비드에 직접적으로 부착될 수 있거나, 또는 별개의 집단 중의 각 비드에 간접적으로 (예컨대, 상기 기술된 바와 같이 비드에 커플링하는 고정 성분을 통해) 부착될 수 있다.
- [0173] 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오티드는 스플린트의 도움으로 별개의 집단에 부착될 수 있다(스플린트의 예는 **도 23A**의 (2306)으로 제시되어 있다). 본원에서 사용되는 바, 스플린트란 일반적으로, 핵산의 한 가닥은 하나 이상의 수용 올리고뉴클레오티드에 부착되는 올리고뉴클레오티드를 포함하고, 핵산의 다른 가닥은 부착되는 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적이고, 하나 이상의 수용 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인, 이중 가닥 핵산을 의미한다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 **도 23A**에 제시되어 있는 바와 같이 오버행을 통해 수용 올리고뉴클레오티드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적일 수 있다. 오버행 서열의 길이는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같

이, 임의의 적합한 길이일 수 있다.

[0174] 예를 들어, 스플린트는 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 세그먼트의 적어도 일부에 부분적으로 상보적인 서열, 및 별개의 집단에 부착된 올리고뉴클레오타이드의 적어도 일부에 부분적으로 상보적인 서열(예컨대, 오버행 서열)을 포함하는 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화된 올리고뉴클레오타이드 세그먼트를 포함하도록 구성될 수 있다. 스플린트는 별개의 집단에 부착된 올리고뉴클레오타이드에 그의 상보성 서열을 통해 하이브리드화될 수 있다. 일단 하이브리드화되고 나면, 스플린트의 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 세그먼트는 이어서, 별개의 집단에 부착된 올리고뉴클레오타이드에 임의의 적합한 부착 기전, 예컨대, 결합 반응을 통해 부착될 수 있다.

[0175] 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 세그먼트의 별개의 집단에의 부착 후, 이어서, 별개의 집단은 풀링되고, 이로써, 혼합된 풀링된 집단이 생성되고, 이어서, 혼합된 풀링된 집단의 복수 개의 별개의 집단으로 분리된다. 이어서, 제2 올리고뉴클레오타이드 또는 제2 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 세그먼트는 각각의 별개의 혼합된 풀링된 집단 중의 비드 상에 있는 제1 올리고뉴클레오타이드에 부착되고, 이로써, 상이한 혼합된 풀링된 비드 집단은 그에 부착된 상이한 제2 바코드 서열 세그먼트를 가지게 된다. 혼합된 풀링된 집단의 별개의 집단 중의 각 비드는 적어도 2, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000개 이상의 제2 올리고뉴클레오타이드 분자 또는 올리고뉴클레오타이드 세그먼트 분자에 부착될 수 있다.

[0176] 일부 경우에서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 스플린트의 도움으로 제1 올리고뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. 예를 들어, 혼합된 풀링된 비드 집단을 생성하기 이전에 제1 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 세그먼트를 별개의 집단에 부착시키는 데 사용되는 스플린트는 또한 제2 올리고뉴클레오타이드의 의 적어도 일부에 부분적으로 상보적인 서열(예컨대, 오버행 서열)을 포함한다. 스플린트는 상보성 서열을 통해 제2 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화할 수 있다. 일단 하이브리드화되고 나면, 이어서, 제2 올리고뉴클레오타이드는 임의의 적합한 부착 기전, 예컨대, 결합 반응을 통해 제1 올리고뉴클레오타이드에 부착될 수 있다. 이어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드, 둘 모두에 상보적인 스플린트 가닥을 추가의 가공 처리로 변성시킬 수 있다(또는 제거할 수 있다). 별법으로, 스플린트의 도움으로 제1 올리고뉴클레오타이드를 별개의 집단에 부착된 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 데 상기 기술된 바와 유사한 방식으로 제2 올리고뉴클레오타이드를 제1 올리고뉴클레오타이드에 부착시키는 제2 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 별개의 스플린트를 제공할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오타이드의 제1 바코드 세그먼트 및 제2 올리고뉴클레오타이드의 제2 바코드 세그먼트는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 연결 서열을 통해 연결될 수 있다.

[0177] 이어서, 혼합된 풀링된 집단의 별개의 집단을 풀링할 수 있고, 이어서, 생성된 풀링된 비드 집단은 상이한 제1 바코드 서열의 개수와 상이한 제2 바코드 서열의 개수의 곱으로 나타나는, 바코드 서열, 또는 바코드 라이브러리의 다양한 집단을 포함한다. 예를 들어, 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드가 모두 예컨대, 256개의 4-mer 바코드 서열 세그먼트를 포함하는 경우, 완전한 바코드 라이브러리는 65,536개의 다양한 8 염기 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0178] 바코드 서열 세그먼트는 독립적으로 바코드 서열 세그먼트의 세트로부터 선택될 수 있거나, 제1 및 제2 바코드 서열 세그먼트는 각각 별개의 바코드 서열 세그먼트 세트로부터 선택될 수 있다. 또한, 바코드 서열 세그먼트는 개별적으로 및 독립적으로 2 내지 20개의 뉴클레오타이드 길이, 바람직하게 약 4 내지 약 20개의 뉴클레오타이드 길이, 더욱 바람직하게, 약 4 내지 약 16개의 뉴클레오타이드 길이 또는 약 4 내지 약 10개의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 서열 세그먼트는 개별적으로 및 독립적으로 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 특히, 바코드 서열 세그먼트는 2-mers, 3-mers, 4-mers, 5-mers, 6-mers, 7-mers, 8-mers, 9-mers, 10-mers, 11-mers, 12-mers, 13-mers, 14-mers, 15-mers, 16-mers, 17-mers, 18-mers, 19-mers, 20-mers 이상의 서열 세그먼트를 포함할 수 있다.

[0179] 추가로, 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 서열 또는 서열 세그먼트 내에 포함되어 있는 바코드 서열 세그먼트는 전형적으로 50개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 100개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 500개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 1000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 약 2,000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 약 4,000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 약 5000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 약 10000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 50000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트, 100000개 이상의 바코드 서열 세그먼트, 500000 바코드 서열 세그먼트, 1000000개 이상의 바코드 서열 세그먼트

또는 그 초과인 바코드 서열 세그먼트를 나타낼 것이다. 상기 기술된 공정에 따라, 상기 상이한 올리고뉴클레오티드는 제1 또는 제2 올리고뉴클레오티드 첨가 단계에서 예컨대, 10, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000개 이상의 등의 유사한 또는 동일한 개수의 별개의 비드 집단 사이에 할당될 수 있고, 상이한 바코드 서열 세그먼트는 별개로 10, 100, 500, 1000, 2000, 4000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000개 이상의 등의 별개의 비드 집단에 첨가될 수 있다.

[0180] 그 결과, 생성된 바코드 라이브러리는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 라이브러리 내에서 나타나는 적어도 약 100개의 상이한 바코드 서열 세그먼트 내지 적어도 약 1000000, 2,000000, 5000000, 10000000 100000000개 이상의 상이한 바코드 서열 세그먼트 범위로 다양할 수 있다.

[0181] 앞서 언급된 바와 같이, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 서열 또는 서열 세그먼트 중 어느 하나 또는 그 둘 모두, 또는 이어서, 첨가되는 올리고뉴클레오티드(예컨대, 제3 올리고뉴클레오티드의 제2 올리고뉴클레오티드에의 첨가, 제4 올리고뉴클레오티드의 제3 올리고뉴클레오티드에의 첨가 등)는 후속 가공 처리에서 사용하기 위한 추가의 서열, 예컨대, 예컨대, 완전한 또는 부분 기능성 서열(예컨대, 프라이머 서열(예컨대, 범용 프라이머 서열, 표적화된 프라이머 서열, 랜덤 프라이머 서열), 프라이머 어닐링 서열, 부착 서열, 서열분석 프라이머 서열, 랜덤 N-mer 등)을 포함할 수 있다. 다수의 경우에서, 이들 서열은 별개의 집단, 집단의 서브에서 비드 중에서 공통적인 것일 수 있고/거나, 전체 집단에서 모든 비드 중에서 공통적인 것일 수 있다. 일부 경우에서, 기능성 서열은 상이한 비드 서브집단, 상이한 비드, 또는 단일 비드에 부착된 상이한 분자 중에서도 가변적일 수 있다. 또한, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 서열 또는 서열 세그먼트 중 어느 하나 또는 그 둘 모두는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 우라실 함유 뉴클레오티드 및 비천연 뉴클레오티드 중 하나 이상의 것을 포함하는 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 추가로, 비록 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드로서 기술되기는 하였지만, 상기와 같이 언급하는 대상은 올리고뉴클레오티드 내에서 하나 이상의 염기에 의해 이격되어 있는 2, 3개 이상의 개별 바코드 서열 세그먼트, 예컨대, 그가 포함되어 있는 올리고뉴클레오티드 중에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 10개 이상의 염기에 의해 제2 바코드 세그먼트로부터 이격되어 있는 제1 바코드 세그먼트로 구성된 올리고뉴클레오티드를 포함한다는 것을 이해할 것이다. 바람직하게, 바코드 서열 세그먼트는 서로 인접하게, 또는 그가 포함되어 있는 올리고뉴클레오티드 중에서 서로 6개의 염기, 4개의 염기, 3개의 염기 또는 2개의 염기 범위 이내에 위치할 것이다. 종합해 보면, 올리고뉴클레오티드 서열 내에 연속해 있든, 또는 하나 이상의 염기에 의해 이격되어 있든, 주어진 올리고뉴클레오티드 내의 상기 집단의 바코드 서열 세그먼트는 본원에서 바코드 서열, 바코드 서열 세그먼트, 또는 바코드 도메인으로서 지칭된다.

[0182] 바코드 서열 뿐만 아니라, 특이 유형의 기능성 서열을 포함하는 서열을 포함하는 비드를 생성하는 예시적인 조합 방법은 도 23에 제시되어 있다. 비록 설명 목적으로 특정의 구체적인 서열 세그먼트에 의해 기술되기는 하였지만, 각종의 상이한 기능성 서열 유형, 프라이머 유형, 예컨대, 상이한 서열분석 시스템에 특이적인 것 등을 비롯한, 각종의 상이한 배열이 본원에 기술된 비드에 부착된 바코드 함유 올리고뉴클레오티드 내로 도입될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 도 23A에 제시된 바와 같이, 비드 (2301)는 생성될 수 있고, 고정 성분으로서 사용되는 제1 올리고뉴클레오티드 성분 및/또는 기능성 서열 또는 부분 기능성 서열, 예컨대, 부분 P5 서열 (2302)에 (예컨대, 아크리다이트 모이어티 또는 다른 종을 통해) 공유적으로 연결될 수 있다. 플레이트 (예컨대, 384 웰 플레이트)의 각 웰에서, 나머지 P5 서열 및 고유 제1 부분 바코드 서열 (올리고뉴클레오티드(2303)에서 염기 "DDDDDD"로 표시)을 포함하는 올리고뉴클레오티드(2303)는 올리고뉴클레오티드(2303)의 상보체 및 올리고뉴클레오티드(2303)의 각 단부에 오버행되어 있는 추가의 염기를 포함하는 올리고뉴클레오티드(2304)에 하이브리드화될 수 있다. 이어서, 하이브리드화된 생성물("스플린트")(2306)이 생성될 수 있다. 스플린트의 각 오버행은 각 오버행은 부산물 형성을 막기 위해 차단 모이어티로 차단될 수 있다(도 23A에서 "X"로 표시). 차단 모이어티의 비제한적인 예로 3' 역전 dT, 디데옥시시티딘(ddC), 및 3'C3 스페이서를 포함한다. 따라서, 기술된 일례에서, 기술된 바와 같이, 각각이 고유 제1 부분 바코드 서열 또는 그의 상보체를 포함하는 상이한 스플린트, 예컨대, 384개의 상이한 스플린트가 생성될 수 있다.

[0183] 도 23B에 제시된 바와 같이, 비드(2301)를 플레이트의 각 웰에 첨가하고, 각 웰 중의 스플린트(2306)는 올리고뉴클레오티드(2304)의 오버행 중 하나를 통해 비드(2301)의 상응하는 고정 서열, 예컨대, 부분 P5 서열(2302)과 하이브리드화할 수 있다. 부분 P5 서열(2302)을 하이브리드화시킬 때 올리고뉴클레오티드(2304)의 오버행의 안정성이 제한되어 있기 때문에 스플린트(2306)는 역학적으로 샘플링될 수 있으며, 이는 후속되는 올리고뉴클레오티드(2303)의 부분 P5 서열(2302)에의 결합이 확실하게 효율적으로 이루어질 수 있도록 하는 데 도움을 줄 수 있다. 결합 효소(예컨대, 리가제)가 부분 P5 서열(2302)를 올리고뉴클레오티드(2303)에 결합시킬 수 있다. 리가제의 예는 T4 DNA 리가제가 될 것이다. 결합 후, 생성물을 풀링시키고, 비드를 세척하여 결합되지 않은 올리고

뉴클레오티드를 제거할 수 있다.

[0184] 도 23C에 제시된 바와 같이, 이어서, 세척된 생성물을 또 다른 플레이트 (예컨대, 384 웰 플레이트)의 웰 내로 재분포시킬 수 있고, 여기서, 플레이트의 각 웰은 고유 제2 부분 바코드 서열 (올리고뉴클레오티드(2305)에서 "DDDDDD"로 표시) 및 올리고뉴클레오티드(2304)의 나머지 오버행에 상보적인 인접한 짧은 서열(예컨대, 제2 부분 바코드 서열에 인접하고, 올리고뉴클레오티드(2305)의 말단 위치의 "CC")를 가지는 올리고뉴클레오티드(2305)를 포함한다. 올리고뉴클레오티드(2305)는 또한 추가의 서열, 예컨대, R1 서열 및 랜덤 N-mer(올리고뉴클레오티드(2305)에서 "NNNNNNNNNN"으로 표시)을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드(2305)는 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드(2305)의 티민 함유 뉴클레오티드 중 임의의 것은 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환될 수 있다. 일부 경우에서, 제2 부분 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 서열(2305)의 제1 부분 바코드 서열, 예컨대, 서열(2303)에의 결합 효율을 개선시키기 위하여, 스플린트(2304)에의 하이브리드화에 이용가능한 오버행은 그대로 남겨 두면서, 올리고뉴클레오티드(2305)의 일부분 또는 모두에 하이브리드화할 수 있는, 예컨대, 올리고뉴클레오티드(2305) 모두 또는 그의 일부에 상보적인 이중체 가닥을 제공할 수 있다. 앞서 언급된 바와 같이, 스플린트(2304) 및/또는 이중체 가닥은 스플린트 및 이중체 가닥 중 하나로부터 또는 그 둘 사이의 부산물 형성을 막기 위해 그의 3' 및 5' 중 하나 또는 그 둘 모두에서 차단될 수 있다. 바람직한 측면에서, 이중체 가닥은 올리고뉴클레오티드(2305) 모두 또는 그의 일부에 상보적일 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드(2305)가 랜덤 n-mer을 포함하는 경우, 올리고뉴클레오티드의 일부에 하이브리드되지 않는 이중체 가닥이 제공될 수 있다.

[0185] 도 23C에 제시된 바와 같이, 인접한 짧은 서열을 통해 올리고뉴클레오티드(2305)는 올리고뉴클레오티드(2304)에 하이브리드화될 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오티드(2305)의 짧은 상보성 서열을 하이브리드화시킬 때 오버행의 안정성이 제한되어 있기 때문에 올리고뉴클레오티드(2305)는 역학적으로 샘플링될 수 있으며, 이는 후속되는 올리고뉴클레오티드(2305)의 올리고뉴클레오티드(2303)에의 결합이 확실하게 효율적으로 이루어질 수 있도록 하는데 도움을 줄 수 있다. 이어서, 결합 효소(예컨대, 리가제)가 올리고뉴클레오티드(2305)를 올리고뉴클레오티드(2303)에 결합시킬 수 있다. 올리고뉴클레오티드(2305)가 올리고뉴클레오티드(2303)에 결합되면, 올리고뉴클레오티드(2305)의 제1 부분 바코드 서열과 올리고뉴클레오티드(2303)의 제2 부분 바코드 서열의 결합을 통해 전장의 바코드 서열이 생성될 수 있다. 도 23D에 제시된 바와 같이, 이어서, 생성물을 풀링시키고, 올리고뉴클레오티드(2304)를 생성물로부터 변성시키고, 이어서, 비결합 올리고뉴클레오티드를 세척하여 제거할 수 있다. 세척 후, 바코딩된 비드의 다양한 라이브러리를 수득할 수 있으며, 여기서, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드에 결합된 각 비드는 P5 서열, 전장의 바코드 서열, R1 서열, 및 랜덤 N-mer을 포함한다. 본 일례에서, 147,456개의 고유 바코드 서열이 수득될 수 있다(예컨대, 384개의 고유 제1 부분 바코드 서열 x 384개의 고유 제2 부분 바코드 서열).

[0186] 일부 경우에서, 상기 기술된 바와 같이 올리고뉴클레오티드의 결합에 도움을 주는 오버행 염기를 포함하게 되면, 모두가 도 24A에 제시된 바와 같이 바코드 서열의 일부의 사이에 포함되어 있는 주어진 위치에 동일한 염기를 가지는 생성물이 생성될 수 있다. 서열분석 리드 간의 주어진 서열 위치에서의 염기 다양성이 제한되어 있거나, 또는 존재하지 않을 경우, 서열분석 실행은 사용되는 특정 서열분석 방법에 따라 실패할 수 있다. 따라서, 다수의 측면에서, 올리고뉴클레오티드 중 전체 서열분석되는 일부분 내의 염기 아이덴티티 또는 위치 면에 있어서 상이한 스플린트 사이에 일부의 가변성을 가지는 오버행 염기를 제공할 수 있다. 예를 들어, 제1 일례에서, 하나 이상의 스페이서 염기(2401)(예컨대, 도 24B의 (2401)에서 "1" "2")을 비드 상에서 더욱 큰 올리고뉴클레오티드를 합성하는 데 사용되는 일부 올리고뉴클레오티드에 첨가할 수 있고, 이로써, 올리고뉴클레오티드 생성물은 서로 길이가 약간씩 상이할 수 있고, 이로써, 상이한 서열 중 상이한 위치의 오버행 염기가 위치하게 된다. 상보성 스페이서 염기 또한 서열 성분 결합에 필요한 스플린트에 첨가될 수 있다. 생성물 사이에 올리고뉴클레오티드 길이가 약간씩 상이할 경우, 도 24B에 제시된 바와 같이, 주어진 리드 위치에서 염기는 다양화될 수 있다.

[0187] 도 25에 제시된 또 다른 일례에서, 랜덤 염기 오버행을 포함하는 스플린트는 스플린트 오버행에 상보적인 리드 위치에 염기 다양성을 도입할 수 있다. 예를 들어, 이중 가닥 스플린트(2501)는 한 가닥 상의 랜덤 염기(예컨대, 도 25A에서 "NN") 오버행(2503) 및 결정된 염기(예컨대, 도 25A에서 "CTCT") 오버행(2506) 및 다른 가닥 상의 제1 부분 바코드 서열(예컨대, 도 25A에서 "DDDDDD")을 포함할 수 있다. 스플린트(2501)의 상부 가닥(도 25A에 제시)과의 후속되는 결합을 위해 도 23에 도시된 일례에 대하여 상기 기술된 바와 같은 유사한 결합 방식을 사용하여 결정된 오버행(2506)을 사용하여 하이브리드화를 통하여 (도 23에 제시된 바와 같이 비드에 부착될 수 있는) 서열(2502)을 포획할 수 있다. 비록 오버행(2506)은 4 염기 결정된 서열 오버행으로 예시되

었지만, 제1 결찰 단계에서 하이브리드화 및 결찰의 효율을 개선시키기 위해 상기 서열의 길이는 더 긴 것이 될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 결정된 염기 오버행(2506)은 부분 P5 서열(2502)에 상보적인, 4, 5, 8, 10개 이상의 염기 길이를 포함할 수 있다. 또한, 랜덤 염기 오버행(2503)은 최종의 원하는 서열의 나머지 성분(예컨대, 서열(2504))을 포획하는 데 사용될 수 있다. 서열(2504)은 한쪽 단부에는 제2 부분 바코드 서열(도 25C의 서열(2504) 중 "DDDDDD"), 랜덤 염기 오버행(2503)의 상보체(2505)(예컨대, 도 25C의 (2505)에서 "NN") 및 그의 다른 단부의 랜덤 N-mer(2507)(예컨대, 도 25C의 (2504)에서 "NNNNNNNNN")을 포함한다.

[0188] 랜덤 염기 오버행(2503) 중 염기의 랜덤성에 기인하여, 상보체(2505)에서 결찰 생성물 내로 도입되는 염기는 달라질 수 있고, 이로써, 생성물은 상보체(2505)의 리드 위치에 다양한 염기를 포함한다. 이해할 수 있는 바와 같이, 바람직한 측면에서, 제1 부분 바코드 서열에 결찰되는 제2 부분 바코드 서열 일부는 전형적으로 랜덤 오버행 서열에 대한 모든 상보체를 포함하는 상기 제2 부분 바코드 서열의 집단을 포함하고, 예컨대, 주어진 부분 바코드 서열은, 다중 오버행 서열이 나타나는 주어진 웰 중의 각 비드에 동일한 제2 부분 바코드 서열을 첨가하기 위하여 예컨대, 16개의 상이한 오버행 일부와 함께 존재할 것이다. 도 25에서 랜덤 오버행(2503) 및 상보체(2505)에 대해 단 2개의 염기만이 제시되어 있지만, 일례는 제한하고자 하는 것이 아니다. 오버행 중 임의의 적합한 개수의 랜덤 염기가 사용될 수 있다. 추가로, 랜덤 오버행 서열로서 기술되었지만, 일부 경우에서, 이들 오버행 서열은 오버행 서열의 서브세트로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 오버행은 오버행 길이의 모든 가능한 오버행 서열보다 적은 서열을 포함하는 오버행 서열의 집합으로부터 선택될 것이며, 이는 1개 초과, 2개 초과, 4개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 50개 초과, 또는 심지어 그보다 많은 오버행 서열일 수 있다.

[0189] 또 다른 일례에서, 각각이 주어진 길이의 오버행 서열의 세트로부터 선택되는 정의된 오버행을 포함하는 스플린트 세트, 예컨대, 적어도 2, 4, 10, 20개 이상의 오버행으로 이루어진 세트가 스플린트 오버행에 상보적인 리드 위치에 염기 다양성을 도입하는 데 사용될 수 있다. 또한, 상기 오버행은 제2 부분 바코드 서열을 제1 바코드 서열에 결찰시키는 데 사용되기 때문에, 제2 부분 바코드 서열 집단 중에 나타나는 모든 가능한 오버행 상보체를 가지는 것이 바람직할 것이다. 따라서, 다수의 경우에서, 상이한 오버행 서열의 개수를 낮게, 예컨대, 50개 미만, 20개 미만, 또는 일부 경우에서, 10개 미만, 또는 5개 미만의 상이한 오버행 서열로 유지시키는 것이 바람직할 것이다. 다수의 경우에서, 바코드 라이브러리 중 상이한 연결 서열의 개수는 2 내지 4096개의 상이한 연결 서열일 것이며, 바람직한 라이브러리는 약 2 내지 약 50개의 상이한 연결 서열을 가진다. 유사하게, 전형적으로는, 비관련 염기가 최종 서열 리드에 도입되는 것을 막기 위하여 상기 오버행 서열을 상대적으로 짧은 길이로 유지시키는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 상기 오버행 서열은 전형적으로 전체 올리고뉴클레오티드 구성물에 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 및 일부 경우에서, 3개 이하 또는 그보다 더 적은 뉴클레오티드를 도입하도록 디자인될 것이다. 일부 경우에서, 오버행 서열의 길이는 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 8개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 6개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 2 내지 약 4개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일반적으로, 세트 중의 각 스플린트는 세트 중의 다른 스플린트와 상이한 서열을 가지는 오버행을 포함할 수 있으며, 이로써, 오버행의 각 위치의 염기는 세트 중 다른 스플린트의 동일한 염기 위치의 염기와 다르게 된다. 스플린트 세트의 일례는 도 26에 도시되어 있다. 세트는 "AC"(2601)의 오버행을 포함하는 스플린트(2601), ("CT" (2604)의 오버행을 포함하는) 스플린트(2603), ("GA" (2606)의 오버행을 포함하는) 스플린트(2605), 및 ("TG" (2608)의 오버행을 포함하는) 스플린트(2607)를 포함한다. 각 스플린트는 또한 오버행(2609)(예컨대, 각 스플린트 중 "CTCT") 및 제1 부분 바코드 서열("DDDDDD")을 포함할 수 있다. 도 26에 제시된 바와 같이, 각 스플린트는, 스플린트 오버행 중 어느 것도 동일한 염기 위치에 동일한 염기를 포함하지 않도록, 그의 고유 오버행(예컨대, 스플린트(2601) 중 오버행(2602), 스플린트(2603) 중 오버행(2604), 스플린트(2605) 중 오버행(2606), 및 스플린트(2607) 중 오버행(2608))의 각 위치에 상이한 염기를 포함할 수 있다. 각 스플린트가 그의 고유 오버행의 각 위치에 상이한 염기를 포함하기 때문에, 각 스플린트로부터 생성된 생성물은 또한 다른 스플린트 중 하나로부터 생성된 생성물과 비교하였을 때, 각 상보성 위치에 상이한 염기를 가진다. 따라서, 상기 위치의 염기 다양성이 달성될 수 있다.

[0190] 상기 생성물은 원하는 서열의 제1 성분(예컨대, 제1 부분 바코드 서열을 포함하는 도 25의 서열(2502); 제1 성분은 또한 비드에 부착될 수 있다)과 각 스플린트에 공통적인 오버행(예컨대, 도 26의 서열(2609))을 하이브리드화시키고; 서열의 제1 성분을 스플린트에 결찰시키고; 원하는 서열(예컨대, 제2 부분 바코드 서열을 포함하는, 도 25의 서열(2504)과 유사한 서열, 단, 예외적으로, 상기 서열은 랜덤 염기 대신 위치(2505)의 고유 오버행 서열에 상보적인 염기를 포함한다)의 제2 부분을 스플린트의 고유 오버행에 하이브리드화시키고; 원하는 서열의 제2 성분을 스플린트에 결찰시킴으로써 생성될 수 있다. 이어서, 스플린트의 결찰되지 않은 부분(예컨대, 도 26에 제시된 바와 같이, 오버행을 포함하는 하단 서열)을 앞서 기술된 바와 같이, 변형시키고,

생성물을 세척하는 등 그러한 것을 수행함으로써 최종 생성물을 획득할 수 있다. 이해할 수 있는 바와 같이, 및 앞서 언급된 바와 같이, 상기 오버행 서열은 상이한 부분 바코드 서열(또는 바코드 서열 세그먼트) 사이에 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 염기를 제공할 수 있고, 이로써, 상기 기술된 특징과 함께 바코드 서열 세그먼트 사이의 연결 서열을 제공한다. 상기 연결 서열의 길이는 다양할 수 있고, 예컨대, 약 2 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 8개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 6개의 뉴클레오티드 길이, 약 2 내지 약 5개의 뉴클레오티드 길이, 또는 약 2 내지 약개의 4 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0191] 도 26에 도시된 스플린트 세트를 사용하는 예시적인 작업 흐름은 도 27에 제시되어 있다. 세트 중 각 스플린트의 경우, 고유 오버행 서열을 포함하는 스플린트 가닥(예컨대, 도 26에 제시된 스플린트의 하부 가닥)이 하나 이상의 플레이트의 각 웰에 제공될 수 있다. 도 27에서, 총 8개의 플레이트에 대하여 4개의 스플린트 유형 각각에 대해 고유 오버행 서열을 포함하는 스플린트 가닥으로 이루어진 2개의 96 웰 플레이트를 제공한다. 8개의 플레이트 중 두 플레이트((2601a), (2601b))는 도 26에서 고유 오버행 서열("AC")을 포함하는 스플린트(2601)의 하부 가닥에 상응하고, 두 플레이트((2603a), (2603b))는 도 26에서 고유 오버행 서열("CT")을 포함하는 스플린트(2603)의 하부 가닥에 상응하고, 두 플레이트((2605a), (2605b))는 도 26에서 고유 오버행 서열("GA")을 포함하는 스플린트(2605)의 하부 가닥에 상응하고, 두 플레이트((2607a), (2607b))는 도 26에서 고유 오버행 서열("TG")을 포함하는 스플린트(2607)의 하부 가닥에 상응한다. 각 96 웰 플레이트 중의 올리고뉴클레오티드((2601a), (2601b), (2603a), (2603b), (2605a), (2605b), (2607a), 및 (2607b))를 96 웰 플레이트(2702)의 또 다른 세트에 옮길 수 있고, 각 플레이트를 그 자신의 별개의 플레이트에 옮길 수 있고(이 역시, 총 8개의 플레이트에 대해), 각 플레이트의 각 웰을 다음 플레이트 중 그의 상응하는 웰로 옮길 수 있다.

[0192] 고유의 제1 부분 바코드 서열(예컨대, 도 26에 제시된 스플린트의 상부 가닥) 및 제1 부분 P5 서열을 포함하는 스플린트 가닥을 하나 이상의 플레이트에서 제공할 수 있다. 도 27에서, 상기 스플린트 가닥은 두 96 웰 플레이트(2708a) 및 (2708b)에 제공되고, 두 플레이트 간에 걸쳐 총 192개의 고유 제1 부분 바코드 서열에 대해 두 플레이트의 각 웰은 고유 제1 부분 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 플레이트(2708a)의 각 웰을 플레이트(2702)의 4개 중 그의 상응하는 웰에 첨가할 수 있고, 플레이트(2708b)의 각 웰을 플레이트(2702)의 다른 4개 중 그의 상응하는 웰에 첨가할 수 있다. 따라서, 각 웰 중의 두 스플린트 가닥은 하이브리드화하여 완전한 스플린트를 생성할 수 있다. 스플린트 생성 후, 도 27에서 두 96 웰 플레이트(2702)의 각 웰은 총 192개의 고유 제1 부분 바코드 서열에 대하여 도 26에서 스플린트(2601), 스플린트(2603), 스플린트(2605), 또는 스플린트(2607)로서 구성된 스플린트 및 고유 제1 부분 바코드 서열을 포함한다.

[0193] 이어서, 플레이트(2702)의 각 웰에 제2 부분 P5 서열을 포함하는 비드(2709)(예컨대, 도 25에서 서열(2502)과 유사하거나, 등가인 것)를 첨가할 수 있다. 각 웰 중의 스플린트는 각 스플린트의 공통 오버행 서열(2509)을 통해 제2 부분 P5 서열과 하이브리드화할 수 있다. 이어서, 결찰 효소(예컨대, 리가제)는 제2 부분 P5 서열을 나머지 제1 부분 P5 서열 및 제1 부분 바코드 서열을 포함하는 스플린트 가닥에 결찰시킬 수 있다. 따라서, 오버행 서열을 포함하는 스플린트 가닥에 여전히 하이브리드화되는, P5 서열 및 제1 부분 바코드 서열을 포함하는 서열에 연결된 비드를 포함하는 제1 생성물이 생성된다. 결찰 후, 각 플레이트의 웰로부터의 제1 생성물을 별개로 풀링시켜 플레이트 풀(2703)을 생성할 수 있다. 각각의 두 플레이트 세트에 상응하는(예컨대, 특정 스플린트 배열에 상응하는 각 세트) 플레이트 풀(2703) 또한 별개로 풀링시켜 제1 생성물 풀(2704)을 생성하고, 이로써, 각 제1 생성물 풀(2704)은 단 하나의 고유 오버행 서열만을 포함하는 스플린트로부터 생성된 생성물을 포함하게 된다. 도 27에서, 각각이 본 일례에서 사용된 4가지 스플린트 유형 중 하나에 상응하는 것인, 4개의 제1 생성물 풀(2704)이 생성된다. 각 플레이트 풀(2703) 중의 생성물을 세척하여 비결합 올리고뉴클레오티드를 제거하거나, 각 플레이트 풀(2704) 중의 생성물을 세척하여 비결합 올리고뉴클레오티드를 제거하거나, 또는 두 풀링 단계 모두에 대하여 세척을 수행할 수 있다. 일부 경우에서, 플레이트 풀링(2703)을 우회할 수 있고, 각각의 두 플레이트 세트의 내용물은 제1 생성물 풀(2704)로 직접 유입시킬 수 있다.

[0194] 이어서, 도 27에 도시되어 있는 바와 같이, 총 8개의 플레이트에 대하여(예컨대, 생성물 풀(2704)당 2개의 플레이트) 각 제1 생성물 풀(2704)을 2개의 96 웰 플레이트(2705)의 각 웰로 분취할 수 있다. 별개로, 고유 제2 부분 바코드 서열, 4개의 고유 오버행 서열 중 하나에 상보적인 말단 서열, 및 첨가되는 임의의 다른 서열(예컨대, 추가의 서열분석 프라이머 부위, 랜덤 N-mer 등)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 96 웰 플레이트(2706)에 제공할 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 도 25의 서열(2504)에 유사한 서열을 포함하되, 단, 예외적으로, 서열은 랜덤 염기 대신 위치 2505의 고유 오버행 서열에 상보적인 염기를 포함한다. 예를 들어, 도 26의 스플린트(2601)의 경우, 위치 2505의 염기는 스플린트(2601)의 고유 오버행(2602)("AC")에 상보적인 "TG"가 될 것이다. 도 27에 제시된 바와 같이, 총 8개의 플레이트 및 4개의 플레이트 세트에 대하여 플

레이트(2706) 중, 두 플레이트 세트는 각각 4가지 고유 오버행 서열 중 하나에 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 플레이트(2706)는 각 웰이 8개의 플레이트에 걸쳐 총 768개의 고유 제2 부분 바코드 서열에 대하여 고유 제2 부분 바코드 서열을 포함하도록 구성될 수 있다.

[0195] 도 27에 제시된 바와 같이, 플레이트(2705)의 플레이트 내로 유입되는 제1 생성물의 적절한 고유 오버행 서열에 기초하여 플레이트(2706)의 각 플레이트를 플레이트(2705)의 상응하는 플레이트와 쌍을 형성할 수 있다. 플레이트(2705)로부터의 플레이트의 각 웰 중의 올리고뉴클레오티드를 플레이트(2705)로부터의 그의 상응하는 플레이트 중의 그의 상응하는 웰에 첨가할 수 있고, 이로써, 각 웰은 적절한 제1 생성물 풀(2704)로부터의 분취량의 제1 생성물 및 플레이트(2706)로부터의 고유 제2 바코드 서열 및 임의의 다른 서열(예컨대, 랜덤 N-mer)을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 플레이트(2705)의 각 웰 중 각각의 제1 생성물의 고유 오버행 서열은 고유 오버행 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드의 염기를 통해 제2 부분 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화할 수 있다. 이어서, 결찰 효소(예컨대, 리가제)는 올리고뉴클레오티드를 제1 생성물에 결찰시킬 수 있다. 결찰시, 제1 생성물의 제1 부분 바코드 서열을 제2 생성물의 제2 부분 바코드 서열에 연결함으로써 완전한 바코드 서열을 포함하는 제2 생성물이 생성된다. 플레이트(2705)로부터 수득된 제2 생성물을 제거하고, 공통 제2 생성물 풀(2707)로 증착시킬 수 있다. 이어서, (도 26에 제시된 바와 같이) 오버행을 포함하는 스플린트 가닥을 생성물 풀(2707)에서 변형시킬 수 있고, 생성물을 세척하여 최종 생성물을 수득할 수 있다. 결찰 동안 사용된 고유 오버행 서열에 상보적인 염기 위치에서 염기 다양성을 가지는 총 147,456개의 고유 바코드 서열을 수득할 수 있다(예컨대, 192개의 제1 부분 바코드 서열 x 768개의 제2 부분 바코드 서열).

[0196] 스플린트 세트와 관련하여 상기 일례는 제한하고자 하는 것이 아니며, 조합 합성을 위해 사용되는 플레이트의 개수 및 유형(들)인 것이다. 스플린트 세트는 임의의 적합한 개수의 스플린트를 포함할 수 있다. 또한, 스플린트의 각 세트는 예를 들어, 원하는 고유 바코드 서열의 개수, 바코드 서열을 생성하는 데 사용되는 염기의 개수에 따라 적절한 제1 부분 바코드 서열 다양성으로 디자인될 수 있다.

[0197] 조합 플레이트 방법을 사용할 때, 다양성이 높은 바코딩된 비드의 라이브러리가 생성될 수 있다. 예를 들어, 각각의 것이 각 웰에 미리 증착된 부분 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포함하는 2개의 384 웰 플레이트가 사용될 경우, 384 x 384개 또는 147,456 고유 바코드 서열이 생성될 수 있다. 플레이트의 임의의 적합한 조합이 사용될 수 있는 바, 본원에 제시된 조합 예는 제한하고자 하는 것이 아니다. 예를 들어, 일부 경우에서, 각 조합 단계에 첨가되는 바코드 서열 세그먼트는 바코드 서열 세그먼트의 동일한 세트로부터 선택될 수 있다. 그러나, 다수의 경우에서, 각 조합 단계에 첨가되는 바코드 서열 세그먼트는 올리고뉴클레오티드 서열의 부분적으로 또는 완전하게 상이한 세트로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 제1 올리고뉴클레오티드 세그먼트는 바코드 서열의 제1 세트로부터의 바코드 서열, 예컨대, 4-mer 서열을 포함할 수 있지만, 제2 올리고뉴클레오티드 서열은 바코드 서열 세그먼트의 부분적으로 또는 완전하게 상이한 세트로부터의 바코드 서열, 예컨대, 4-mer 서열, 6-mer 서열, 8-mer 서열 등, 또는 심지어는 혼합된 길이의 서열을 포함할 수 있고, 예컨대, 제2 올리고뉴클레오티드 세그먼트가 다양한 길이 및 서열을 가지는 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드의 세트로부터 선택되는 경우, 생성된 바코드의 다중 파라미터, 예컨대, 서열 및 길이는 가변적일 수 있다.

[0198] 상기 일례를 참조하면, 예를 들어, 조합 방법 중 각 단계에 사용되는 플레이트 (및 바코드)의 개수 및 유형은 동일할 필요는 없다. 예를 들어, 총 36,864개의 고유 바코드 서열을 생성하기 위해, 384 웰 플레이트가 제1 단계에 사용될 수 있고, 96 웰 플레이트가 제2 단계에 사용될 수 있다. 추가로, 각 조합 단계에서 첨가되는 전장의 바코드 서열의 염기의 개수는 동일할 필요는 없다. 예를 들어, 제1 조합 단계에서, 12개의 염기 바코드 서열 중 4개의 염기가 첨가될 수 있고, 나머지 8개의 염기는 제2 조합 단계에서 첨가될 수 있다. 또한, 전장의 바코드 서열을 생성하는 데 사용되는 조합 단계의 수 또한 달라질 수 있다. 일부 경우에서, 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 조합 단계가 사용된다.

[0199] 프라이머 연장 반응 및 결찰 반응은 다중웰 플레이트에서 표적 기법 및 시약을 이용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 중합체인 폴리에틸렌 글리콜(PEG: polyethylene glycol)은 단일 가닥 결찰 반응 동안 약 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 또는 75%의 농도로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, PEG는 결찰 반응 동안 약 6%, 10%, 18%, 20%, 30%, 36%, 40%, 50% 초과 또는 그보다 높은 농도로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, PEG는 결찰 반응 동안 제2 플레이트에 약 6%, 10%, 18%, 20%, 30%, 36%, 40%, 또는 50% 미만인 농도로 존재할 수 있다.

[0200] 본원에서 제공하는 방법은 결찰 반응에서 뉴클레오티드 편향성을 감소시킬 수 있다. 제1 웰 플레이트에서 제1

연장이 수행되어 완료될 수 있을 때, 우수한 결과를 얻을 수 있다. 제2 웰 플레이트에서의 단일 가닥 결찰 단계의 경우, 오직 단 한 유형의 올리고뉴클레오티드가 사용될 때, 경쟁은 없을 수 있다. 내용물을 비드에 부착시키기 위한 웰내 구획화 방법은 특히 제1 웰 플레이트에서 제1 연장이 수행되어 완료될 때, 8N 단부를 가지는 어댑터가 잘못 제조되는 것을 막을 수 있다.

[0201] 웰내 구획화 공정에 대한 잠재적 변형은, 합성 비용을 절감할 수 있고, N-mer 서열 편향성을 감소시킬 수 있는 바, 제2 올리고뉴클레오티드 서열에 축퇴성 염기를 제공함으로써 단일 가닥 결찰 단계를 PCR로 대체하는 것, 제1 올리고뉴클레오티드 서열을 제2 올리고뉴클레오티드 서열보다 길게 변형시키는 것, 및/또는 단일 가닥 결찰 단계 후 별개의 벌크 반응에서 랜덤 N-mer 서열을 첨가하는 것을 포함할 수 있다.

[0202] 일부 경우에서, 하기 공정 순서를 사용하여 바코드 서열을 비드에 부착시킬 수 있다. 바코드 서열을 수성 유체 중에서 적합한 PCR 시약 및 복수 개의 비드와 혼합할 수 있다. 수성 유체를 비혼화성 유체, 예컨대, 오일 내에서 유화시켜 에멀전을 형성할 수 있다. 에멀전은 바코드 서열, 비드, 및 PCR 시약을 함유하는 개별 유체 액적을 생성할 수 있다. 다중 회차의 온도 사이클링을 통해 바코드 서열을 프라이밍시키고, 연장시킬 수 있는 써모사이클링 조건에 개별 유체 액적을 노출시킬 수 있다. 유체 액적을 함유하는 에멀전을 본 개시내용에 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 연속상 교환에 의해 분해할 수 있다. 수용액 중에 현탁된 생성된 바코딩된 비드를 자기 분리 또는 다른 분류 방법에 의해 분류하여 수성 유체 중 정제된 바코딩된 비드 집합을 획득할 수 있다.

[0203] 일부 경우에서, 하기 공정 순서를 사용하여 N-mer 서열을 비드에 부착시킬 수 있다. 수성 유체 중에서 N-mer 서열을 적합한 PCR 시약 및 복수 개의 풀링된 바코딩된 비드와 혼합할 수 있다. 수성 유체를 가열하여 N-mer 서열을 하이브리드화시키고, 연장시킬 수 있다. 추가 가열을 통해 상보체 가닥은 제거될 수 있다.

[0204] PCR 시약으로 임의의 적합한 PCR 시약을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머 연장 또는 다른 증폭 반응 동안 dTTP를 대신하여 dUTP로 치환될 수 있고, 이로써, 올리고뉴클레오티드 생성물은 티민 함유 뉴클레오티드보다는 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하게 된다. 범용 서열의 이러한 우라실 함유 부분은 우라실 함유 주형을 허용하거나, 가공 처리하지는 못하는 폴리머라제와 함께 사용되어 원치 않는 증폭 생성물을 완화시킬 수 있다.

[0205] 증폭 시약은 범용 프라이머, 범용 프라이머 결합 부위, 서열분석 프라이머, 서열분석 프라이머 결합 부위, 범용 리드 프라이머, 범용 리드 결합 부위, 또는 서열분석 장치, 예컨대, 일루미나 서열분석기, 이온 토렌트 서열분석기와 양립가능한 다른 프라이머 등을 포함할 수 있다. 증폭 시약은 P5, 비절단성 5' 아크리다이트-P5, a 절단 가능한 5' 아크리다이트-SS-P5, R1c, 비오틴 R1c, 서열분석 프라이머, 리드 프라이머, P5\_범용, P5\_U, 52-BioR1-rc, 랜덤 N-mer 서열, 범용 리드 프라이머 등을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머는 변형된 뉴클레오티드, 잠금형 핵산 (LNA), LNA 뉴클레오티드, 우라실 함유 뉴클레오티드, 비천연 염기를 함유하는 뉴클레오티드, 차단제 올리고뉴클레오티드, 차단된 3' 단부, 3'ddCTP를 함유할 수 있다. 도 19가 추가의 일례를 제공한다.

[0206] 본원에 기술된 바와 같이, 일부 경우에서, 바코드를 포함하는 올리고뉴클레오티드는 각 비드가 평균적으로, 1개 미만의 고유 올리고뉴클레오티드 서열, 2개 미만의 고유 올리고뉴클레오티드 서열, 3개 미만의 고유 올리고뉴클레오티드 서열, 4개 미만의 고유 올리고뉴클레오티드 서열, 5개 미만의 고유 올리고뉴클레오티드 서열, 또는 10개 미만의 고유 올리고뉴클레오티드 서열과 함께 구획화되도록 구획화된다. 그러므로, 일부 경우에서, 비드 분류는 올리고뉴클레오티드 주형을 함유하지 않고, 따라서, 증폭된 올리고뉴클레오티드를 함유할 수 없다. 따라서, 올리고뉴클레오티드를 포함하는 비드를 올리고뉴클레오티드를 포함하지 않는 비드로부터 분리시키는 것이 바람직할 수 있다. 일부 경우에서, 이는 포획 모이어티를 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 포획 모이어티는 단리 방법, 예컨대, 바코드를 함유하지 않을 수 있는 비드로부터 바코드를 함유하는 비드를 분리시키는 자기 분리법과 함께 사용될 수 있다. 따라서, 일부 경우에서, 증폭 시약은 프라이머 또는 프로브에 부착된 포획 모이어티를 포함할 수 있다. 포획 모이어티는 비표지화된 비드로부터 표지화된 비드를 분류함으로써 프라이머 및 하류 증폭 생성물이 비드에 확실히 부착될 수 있도록 할 수 있다. 예시적인 포획 모이어티로는 비오틴, 스트렙트아비딘, 글루타티온-S-트랜스피라제 (GST), cMyc, HA 등을 포함한다. 포획 모이어티는 형광 표지 또는 자기 표지일 수 있거나, 또는 그를 포함할 수 있다. 포획 모이어티는 포획 모이어티의 다중 분자, 예컨대, 비오틴, 스트렙트아비딘의 다중 분자 등을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 증폭 반응은 (본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이) 포획 모이어티에 부착될 포획 프라이머를 사용할 수 있고, 이로써, 프라이머는 증폭 생성물과 하이브리드화하고, 포획 모이어티는 증폭 반응의 추가의 사이클 동안 추가의 증폭된 올리고뉴클레오티드 내로 통합된다. 다른 경우에서, 포획 모이어티가 증폭된 올리고뉴클레오티드에 결합하도록 포획 모이어티를 포함하는 프로브는 증폭 반응 완료 후 증폭된 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화할 수 있다.



바코드 서열 및 N-mer(예컨대, 하기 기술되는 바와 같은 랜덤 N-mer 또는 표적화된 N-mer)을 포함하는 다중 유형의 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 각 유형의 올리고뉴클레오티드는 그의 바코드 서열, 그의 N-mer, 또는 올리고뉴클레오티드의 임의의 다른 서열에 있어 상이할 수 있다. 또한, 각 비드는 바코드 서열 및 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있고, 이는 또한 바코드 서열 및 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 차단할 수 있는 차단제 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 차단제 대 바코드 서열 및 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 원하는 화학량론으로 수득하기 위해 올리고뉴클레오티드 차단제 및 바코드 서열 및 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 로딩하는 것은 상이한 비율로 완성될 수 있다. 일반적으로, 비드 상의 종을 원하는 화학량론으로 수득하기 위해 복수 개의 종을 상이한 비율로 비드에 로딩할 수 있다.

[0215] 또한, 비드는 또한 하나 이상의 상이한 유형의 다기능성 올리고뉴클레오티드에 연결될 수 있다. 예를 들어, 다기능성 올리고뉴클레오티드는 하기 중 둘 이상의 것으로서의 기능을 할 수 있다: 프라이머, 결합용 도구, 올리고뉴클레오티드 차단제, 하이브리드화 검출이 가능한 올리고뉴클레오티드, 리포터 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 프로브, 기능성 올리고뉴클레오티드, 농축 프라이머, 표적화된 프라이머, 비특이 프라이머, 및 형광성 프로브. 비드 검출 또는 특징 규명을 위해(예컨대, 비드 개수 정량화, 비드에 부착된 종(예컨대, 프라이머, 링커 등)의 정량화, 비드 크기/토폴로지 측정, 비드 공극률 측정 등을 위해) 형광성 프로브로서 작용하는 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있다.

[0216] 또한 비드에 부착 또는 커플링될 수 있는 종의 다른 비제한적인 예로는 전체 세포, 염색체, 폴리뉴클레오티드, 유기 분자, 단백질, 폴리펩티드, 탄수화물, 당류, 당, 지질, 효소, 제한 효소, 리가제, 폴리머라제, 바코드, 어댑터, 소분자, 항체, 항체 단편, 형광단, 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이드(dNTP), 디데옥시뉴클레오티드 트리포스페이드(ddNTP), 완충제, 산성 용액, 염기성 용액, 감온성 효소, pH 감응성 효소, 감광성 효소, 금속, 금속 이온, 염화마그네슘, 염화나트륨, 망간, 수성 완충제, 순한 완충제, 이온성 완충제, 억제제, 당류, 오일, 염, 이온, 계면활성제, 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, DNA, RNA, 펩티드 폴리뉴클레오티드, 상보성 DNA(cDNA: complementary DAN), 이중 가닥 DNA(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 플라스미드 DNA, 코스미드 DNA, 염색체 DNA, 게놈 DNA, 바이러스 DNA, 박테리아 DNA, mtDNA(미토콘드리아 DNA: mitochondrial DNA), mRNA, rRNA, tRNA, nRNA, siRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, 마이크로RNA, dsRNA, 리보자임, 리보스위치 및 바이러스 RNA, 전체 또는 일부의 잠금형 핵산(LNA), 잠금형 핵산 뉴클레오티드, 임의의 다른 유형의 핵산 유사체, 프로테아제, 뉴클레아제, 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제, 킬레이팅제, 환원제, 산화제, 프로브, 발색단, 염료, 유기물, 유화제, 계면활성제, 안정제, 중합체, 물, 소분자, 제약, 방사성 분자, 보존제, 항생제, 압타머, 및 그의 조합을 포함한다. 추가의 올리고뉴클레오티드 종 및 다른 유형의 종, 둘 모두 공유 및 비공유 수단(예컨대, 이온성 결합, 반 데르 발스 상호작용, 소수성 상호작용, 캡슐화, 종의 비드 내로의 확산 등)을 비롯한, 임의의 적합한 방법에 의해 비드에 커플링될 수 있다. 일부 경우에서, 추가의 종은 비드 상에 또 다른 유형의 종을 포함하는 반응을 위한 반응 물질일 수 있다. 예를 들어, 비드에 커플링된 추가의 종은 비드에 또한 부착된 올리고뉴클레오티드 종을 포함하는 증폭 반응에 사용하는 데 적합한 반응 물질일 수 있다.

[0217] 일부 경우에서, 비드는 각각의 것이 핵산을 포함할 수 있는 성분을 비롯한, 특정 유형의 샘플 성분을 포획할 수 있는 하나 이상의 포획 리간드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 비드는 샘플로부터 세포를 포획할 수 있는 포획 리간드를 포함할 수 있다. 포획 리간드는 예를 들어, 항체, 항체 단편, 수용체, 단백질, 펩티드, 소분자 또는 특정 세포의 표면에 고유한, 및/또는 상기 표면상에서 과다발현되는 종으로 표적화되는 임의의 다른 종일 수 있다. 세포 표적과의 상호작용을 위해, 특정 세포 유형은 비드에 결합된 상태 그대로 유지될 수 있도록 샘플로부터 포획될 수 있다. 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 세포에 결합된 비드는 구획으로 유입될 수 있고, 이로써, 세포로부터 수득된 핵산을 바코딩할 수 있다. 일부 경우에서, 세포로부터의 세포를 포획하는 것은 구획에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, 핵산을 세포로부터 유리시키기 위해 용해제가 구획에 포함될 수 있다. 본원에 기술된 방법 중 임의의 것을 사용하여 유리된 핵산을 바코딩하고, 가공 처리할 수 있다.

[0218] **III. 바코드 라이브러리**

[0219] 비드는 하나 이상의 부착된 바코드 서열을 함유할 수 있다. 단일 비드에 부착된 바코드 서열은 동일하거나, 상이한 것일 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 약 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 1000000000, 5000000000, 또는 10000000000개의 동일한 바코드 서열에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 약 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000,

10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 1000000000, 5000000000, 10000000000, 50000000000, 또는 1000000000000개의 상이한 바코드 서열에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000, 200000000, 300000000, 400000000, 500000000, 600000000, 700000000, 800000000, 900000000, 1000000000, 2000000000, 3000000000, 4000000000, 5000000000, 6000000000, 7000000000, 8000000000, 9000000000, 10000000000, 20000000000, 30000000000, 40000000000, 50000000000, 60000000000, 70000000000, 80000000000, 90000000000, 100000000000, 200000000000, 300000000000, 400000000000, 500000000000, 600000000000, 700000000000, 800000000000, 900000000000, 1000000000000개 이상의 동일한 바코드 서열에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000, 200000000, 300000000, 400000000, 500000000, 600000000, 700000000, 800000000, 900000000, 1000000000, 2000000000, 3000000000, 4000000000, 5000000000, 6000000000, 7000000000, 8000000000, 9000000000, 10000000000, 20000000000, 30000000000, 40000000000, 50000000000, 60000000000, 70000000000, 80000000000, 90000000000, 100000000000개 이상의 상이한 바코드 서열에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 500000000, 10000000000, 또는 1000000000000개 미만의 동일한 바코드 서열에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 500000, 10000000, 500000000, 10000000000, 또는 1000000000000개 미만의 상이한 바코드 서열에 부착될 수 있다.

[0220] 개별 바코드 라이브러리는 하나 이상의 바코딩된 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 개별 바코드 라이브러리는 약 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 100000000, 500000000, 또는 1000000000000개의 개별 바코딩된 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각 라이브러리는 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 20000, 50000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000, 200000000, 300000000, 400000000, 500000000, 600000000, 700000000, 800000000, 900000000, 1000000000, 2000000000, 3000000000, 4000000000, 5000000000, 6000000000, 7000000000, 8000000000, 9000000000, 10000000000, 20000000000, 30000000000, 40000000000, 50000000000, 60000000000, 70000000000, 80000000000, 90000000000, 100000000000, 200000000000, 300000000000, 400000000000, 500000000000, 600000000000, 700000000000, 800000000000, 900000000000, 1000000000000개 이상의 개별 바코딩된 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각 라이브러리는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 500000000, 10000000000, 또는 1000000000000개 미만의 개별 바코딩된 비드를 포함할 수 있다. 라이브러리내 바코딩된 비드는 동일한 서열 또는 상이한 서열을 가질 수 있다.

[0221] 일부 실시양태에서, 각 비드는 고유 바코드 서열을 가질 수 있다. 그러나, 바코드 라이브러리 내의 고유 바코드 서열을 가지는 비드의 개수는 조합 제한에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 4개의 상이한 뉴클레오티드를 사용할 경우, 바코드 길이가 12개의 뉴클레오티드 길이라면, 이때 고유 구성물의 개수는  $4^{12} = 16777216$ 개의 고유 구성물로 제한될 수 있다. 바코드 라이브러리는 1677216개보다 많은 다수의 비드를 포함할 수 있기 때문에 동일한 바코드의 다중 카피를 포함하는 일부 라이브러리가 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 주어진 라이브러리 내의 동일한 바코드의 다중 카피의 비율(%)은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 또는 50%일 수 있다. 일부 경우에서, 주어진 라이브러리 내의 동일한 바코드의 다중 카피의 비율(%)은 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% 초과 또는 그보다 더 클 수 있다. 일부 경우에서, 주어진 라이브러리 내의 동일한 바코드의 다중 카피의 비율(%)은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%

,10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 또는 50% 미만일 수 있다.

[0222] 일부 실시양태에서, 각 비드는 하나의 고유 바코드 서열을 포함하지만, 다중의 상이한 랜덤 N-mer을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각 비드는 하나 이상의 상이한 랜덤 N-mer을 가질 수 있다. 또한, 바코드 라이브러리 내의 상이한 랜덤 N-mer을 가지는 비드의 개수는 조합 제한에 의해 제한될 수 있다. 예를 들어, 4개의 상이한 뉴클레오티드를 사용할 경우, N-mer 서열 길이가 12개의 뉴클레오티드 길이라면, 이때 상이한 구성물의 개수는  $4^{12} = 16777216$ 개의 상이한 구성물로 제한될 수 있다. 바코드 라이브러리는 1677216개보다 많은 다수의 비드를 포함할 수 있기 때문에 동일한 N-mer 서열의 다중 카피를 포함하는 일부 라이브러리가 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 주어진 라이브러리 내의 동일한 N-mer 서열의 다중 카피의 비율(%)은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 또는 50%일 수 있다. 일부 경우에서, 주어진 라이브러리 내의 동일한 N-mer 서열의 다중 카피의 비율(%)은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% 초과 또는 그보다 더 클 수 있다. 일부 경우에서, 주어진 라이브러리 내의 동일한 N-mer 서열의 다중 카피의 비율(%)은 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 40%, 또는 50% 미만일 수 있다.

[0223] 일부 실시양태에서, 바코드 내의 고유 식별자 서열은 각 비드 내의 각 프라이머에 대하여 상이할 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 서열 내의 고유 식별자 서열은 각 비드 내의 각 프라이머에 대하여 동일할 수 있다.

[0224] **IV. 바코딩된 비드와 샘플의 조합**

[0225] **샘플 유형**

[0226] 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 임의의 적합한 샘플 또는 종과 함께 사용될 수 있다. 샘플(예컨대, 샘플 재료, 샘플 재료의 성분, 샘플 재료의 단편 등) 또는 종은 예를 들어, 샘플 처리에서 사용되는 임의의 물질, 예컨대, 시약 또는 피분석물일 수 있다. 예시적인 샘플로는 전체 세포, 염색체, 폴리뉴클레오티드, 유기 분자, 단백질, 핵산, 폴리펩티드, 탄수화물, 당류, 당, 지질, 효소, 제한 효소, 리가제, 폴리머라제, 바코드(예컨대, 바코드 서열, 핵산 바코드 서열, 바코드 분자 포함), 어댑터, 소분자, 항체, 형광단, 테옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(dNTP), 디데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트(ddNTP), 완충제, 산성 용액, 염기성 용액, 감온성 효소, pH 감응성 효소, 감광성 효소, 금속, 금속 이온, 염화마그네슘, 염화나트륨, 망간, 수성 완충제, 순환 완충제, 이온성 완충제, 억제제, 오일, 염, 이온, 계면활성제, 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제, 올리고뉴클레오티드, 주형 핵산 분자(예컨대, 주형 올리고뉴클레오티드, 주형 핵산 서열), 핵산 단편, 주형 핵산 단편(예컨대, 단편화 동안 주형 핵산의 단편화로부터 생성된 주형 핵산의 단편, 핵산 증폭 반응으로부터 생성된 주형 핵산의 단편), 뉴클레오티드, DNA, RNA, 펩티드 폴리뉴클레오티드, 상보성 DNA(cDNA), 이중 가닥 DNA(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 플라스미드 DNA, 코스미드 DNA, 염색체 DNA, 게놈 DNA(gDNA: genomic DNA), 바이러스 DNA, 박테리아 DNA, mtDNA(미토콘드리아 DNA), mRNA, rRNA, tRNA, nRNA, siRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, 마이크로RNA, dsRNA, 리보자임, 리보스위치 및 바이러스 RNA, 프로테아제, 전체 또는 일부의 잠금형 핵산, 잠금형 핵산 뉴클레오티드, 뉴클레아제, 프로테아제 억제제, 뉴클레아제 억제제, 길레이팅제, 환원제, 산화제, 프로브, 발색단, 염료, 유기 물질, 유화제, 계면활성제, 안정제, 중합체, 물, 제약, 방사성 분자, 보존제, 항생제, 압타머 등의 것 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다. 요약컨대, 사용되는 샘플은 특정 가공 처리 요구에 따라 달라질 수 있다.

[0227] 샘플은 인간 및 비인간 공급원으로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에서, 샘플은 포유동물, 비인간 포유동물, 설치류, 양서류, 파충류, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 양, 닭, 조류, 마우스, 토끼, 곤충, 민달팽이, 미생물, 박테리아, 기생충 또는 어류로부터 유래된 것이다. 샘플은 진핵 세포, 원핵 세포, 진균 세포, 심장 세포, 폐 세포, 신장 세포, 간 세포, 췌장 세포, 생식 세포, 줄기 세포, 유도성 다능성 줄기 세포, 위장관 세포, 혈액 세포, 암 세포, 박테리아 세포, 인간 마이크로바이옴 샘플로부터 단리된 박테리아 세포 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 세포로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에서, 샘플은 세포의 내용물, 예컨대, 단일 세포의 내용물, 또는 다중 세포의 내용물을 포함할 수 있다. 본원에 기술된 방법 및 시스템의 단일 세포 적용에 관한 예는 본원과 함께 동일자에 출원되는 미국 가특허 출원 번호 \_\_\_\_\_(대리인 목록 번호 43487-728.101)에 기재되어 있다. 샘플은 또한 무세포, 예컨대, 순환 핵산(예컨대, DNA, RNA)일 수 있다.

[0228] 샘플은 천연적으로 발생된 것이거나, 또는 합성된 것일 수 있다. 샘플은 유기체, 전체 세포, 임의의 유기체, 조직, 세포, 또는 환경으로부터의 세포 시료 및 무세포 조성물로부터 수득된 것을 비롯한, 임의의 적합한 위치로부터 수득된 것일 수 있다. 샘플은 환경 생검, 흡입물, 포르말린 고정 포매된 조직, 대기, 농업용 샘플, 토양 샘플, 석유 샘플, 물 샘플 또는 먼지 샘플로부터 수득될 수 있다. 일부 경우에서, 샘플은 혈액, 소변, 대변, 혈

청, 림프, 타액, 점막 분비물, 땀, 중추 신경계내 체액, 질액, 또는 정액을 포함할 수 있는, 체액으로부터 수득될 수 있다. 샘플은 또한 제조된 제품, 예컨대, 화장품, 식품, 개인 케어 제품 등으로부터 수득될 수 있다. 샘플은 재조합 클로닝, 폴리뉴클레오티드 증폭, 중합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction) 증폭, 정제 방법(예컨대, 게놈 DNA 또는 RNA 정제), 및 합성 반응을 비롯한 실험 조작의 생성물일 수 있다.

**[0229] 바코드를 샘플에 부착시키는 방법**

**[0230]** 효소 작용을 통해서 두 핵산 세그먼트를 함께 연결시킴으로써 바코드 (또는 다른 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 랜덤 N-mer)를 샘플에 부착시킬 수 있다. 이는 프라이머 연장, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 폴리머라제를 사용하는 또 다른 유형의 반응에 의해, 또는 리가제를 사용하는 결합에 의해 달성될 수 있다. 결합 방법을 사용하여 샘플을 바코드에 부착시키는 경우, 샘플을 결합 단계 이전에 단편화 시키거나, 또는 단편화 시키지 않을 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드가 여전히 빈에 부착되어 있는 상태 그대로 올리고뉴클레오티드(예컨대, 바코드, 랜덤 N-mer)를 샘플에 부착시킨다. 일부 경우에서, 예컨대, 바코드를 포함하는 올리고뉴클레오티드를 비드로부터 절단하여, 및/또는 비드 분해를 통해 올리고뉴클레오티드를 비드로부터 유리시킨 이후에 올리고뉴클레오티드(예컨대, 바코드, 랜덤 N-mer)를 샘플에 부착시킨다.

**[0231]** 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 랜덤 N-mer 서열을 포함할 수 있다. 고유 랜덤 N-mer 서열 집합은 DNA 세그먼트의 랜덤 부분을 프라이밍하여 샘플(예컨대, 전체 게놈)을 증폭시킬 수 있다. 생성된 생성물은 전체 샘플(예컨대, 게놈)을 나타내는 바코딩된 단편 집합일 수 있다.

**[0232]** 샘플을 바코딩된 비드에의 결합 이전에 단편화 시키거나, 또는 단편화 시키지 않을 수 있다. DNA 단편화는 DNA 가닥을 작은 조각 또는 세그먼트로 분리 또는 파괴시키는 것을 포함할 수 있다. DNA를 단편화 시키는 데 다양한 방법이 사용될 수 있으며, 그러한 방법으로는 제한 분해 또는 전단력을 생성하는 다양한 방법을 포함한다. 제한 분해는 제한 효소를 사용함으로써 양 가닥에 대한 평활 절단에 의해, 또는 접착성 단부를 생성하는 요철형 절단에 의해 DNA 서열을 의도된 방식으로 절단할 수 있다. 전단력 매개 DNA 가닥 파괴의 예로는 초음파 처리, 음향 전단 가공, 니들 전단 가공, 피펫팅, 또는 분무포함할 수 있다. 초음파 처리는 DNA 서열을 단기간 동안 전단력에 노출시켜 약 700 bp 크기의 단편을 생성할 수 있는 유체 동력학적 전단 가공의 한 유형이다. 음향 전단 가공은 보울 형상의 변환기 내에서 DN샘플에 고주파수 음향 에너지를 가한다. 니들 전단 가공은 DNA를 직경이 작은 니들을 통과시켜 DNA를 물리적으로 더 작은 세그먼트로 인열시킴으로써 전단력을 생성한다. 분무력은, 에어로졸 장치에서 나가는 미세 미스트로부터 생성된 DNA 단편이 수집되는 에어로졸 장치의 작은 구멍을 통해 DNA를 이송시킴으로써 생성될 수 있다.

**[0233]** 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드를 샘플에 결합시키는 데 결합 반응이 사용된다. 결합은 포스포디에스테르 결합 형성을 촉매화함으로써 두 핵산 세그먼트, 예컨대, 바코드 서열 및 샘플을 함께 연결시키는 것을 포함할 수 있다. 결합 반응은 DNA 리가제, 예컨대, E. 콜라이(*E. coli*) DNA 리가제, T4 DNA 리가제, 포유동물 리가제, 예컨대, DNA 리가제 I, DNA 리가제 III, DNA 리가제 IV, 열 안정성 리가제 등을 포함할 수 있다. T4 DNA 리가제는 세그먼트 함유 DNA, 올리고뉴클레오티드, RNA, 및 RNA-DNA 하이브리드를 결합시킬 수 있다. 결합 반응은 DNA 리가제를 포함하지 않고, 대안인 예컨대, 토포이소머라제를 사용할 수 있다. 샘플을 바코드 서열에 결합시키기 위해 고농도의 DNA 리가제를 사용하여 PEG를 포함함으로써 신속하게 결합시킬 수 있다. 결합 반응에 바람직한 온도를 선택하는 데 DNA 리가제에 대해 최적인 온도(37°C일 수 있다), 및 달라질 수 있는, 결합시키고자 하는 DNA의 용융 온도가 고려될 수 있다. 결합에 영향을 줄 수 있는 이온 효과를 최소화하기 위해 샘플 및 바코딩된 비드를 완충제 중에 현탁시킬 수 있다.

**[0234]** 비록 상기에 바코드 서열의 샘플 핵산 성분에서의 결합 또는 직접적인 부착에 의해 기술되기는 하였지만, 본원 어디에서나 더욱 상세하게 기술되어 있는 바와 같이, 본원에서 사용되는 바, 바코드의 샘플 핵산에서의 부착은 또한 예컨대, 바코드가 샘플 핵산을 복제시키는 데 사용되는 프라이머 서열과 결합되어 있을 때에는 바코드 서열의 샘플의 상보체, 또는 상기 상보체의 카피 또는 상보체에서의 부착을 포함한다. 특히, 주형으로서 샘플 핵산(또는 샘플 핵산의 복제물)을 사용하는 프라이머 연장 반응에서 바코드 함유 프라이머 서열이 사용되는 경우에, 생성된 연장 생성물은 샘플 핵산의 상보체인지 또는 샘플 핵산의 복제물인지 여부와는 상관없이, 그에 부착된 바코드 서열을 가지는 것을 언급될 것이다.

**[0235]** 일부 경우에서, 샘플을 (수동으로 또는 미세유체 디바이스의 도움으로) 바코딩된 비드와 조합하고, 조합된 샘플 및 비드는 예컨대, 미세유체 디바이스에서 구획화된다. 구획은 유중수 에멀전 내의 수성 액적일 수 있다. 샘플을 바코딩된 비드와 조합할 때, 각 유체 액적에는 평균적으로 2개 미만의 표적 피분석물이 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 평균적으로, 1개의 유체 액적당 3개 미만의 표적 피분석물이 출현할 수 있다. 일부 경우에서,

평균적으로, 1개의 유체 액적당 2개 초과 표적 피분석물이 출현할 수 있다. 다른 경우에서, 평균적으로, 1개의 유체 액적당 3개 초과 표적 피분석물이 출현할 수 있다. 일부 경우에서, 동일한 표적 피분석물의 하나 이상의 가닥이 동일한 유체 액적에 출현할 수 있다. 일부 경우에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 1000, 5000, 10000, 또는 100000개 미만의 표적 피분석물이 유체 액적 내에 존재한다. 일부 경우에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 1000, 5000, 10000, 또는 100000개 초과 표적 피분석물이 유체 액적 내에 존재한다. 본원에 기술된 구획은 대개 극도로 작은 부피를 가지는 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 액적 기반 구획인 경우, 액적의 전체 부피는 1000 pL 미만, 900 pL 미만, 800 pL 미만, 700 pL 미만, 600 pL 미만, 500 pL 미만, 400 pL 미만, 300 pL 미만, 200 pL 미만, 100 pL 미만, 50 pL 미만, 20 pL 미만, 10 pL 미만, 또는 심지어는 1 pL 미만일 수 있다. 비드와 함께 공동 구획화되는 경우, 구획내 샘플 유체 부피는 상기 기술된 부피의 90% 미만, 상기 기술된 부피의 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 또는 심지어는 10% 미만일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0236] 샘플이 바코딩된 비드와 조합될 때, 평균적으로 1개 미만의 비드가 각 유체 액적에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 평균적으로, 2개 미만의 비드가 각 유체 액적에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 평균적으로, 1개의 유체 액적당 3개 미만의 비드가 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 평균적으로, 1개 초과 비드가 각 유체 액적에 존재할 수 있다. 다른 경우에서, 평균적으로, 2개 초과 비드가 각 유체 액적에 출현할 수 있다. 다른 경우에서, 평균적으로, 1개의 유체 액적당 3개 초과 비드가 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개의 유체 액적당 평균적으로 1개 미만의 바코딩된 비드인 비는 제한 회색 기법을 사용하여 달성될 수 있다. 여기서, 바코딩된 비드를 샘플과의 혼합 이전에 회색시키거나, 샘플과 혼합하는 동안 회색시키거나, 또는 샘플과의 혼합 이후에 회색시킬 수 있다.

[0237] 구획화되는 상이한 바코드, 또는 바코드의 상이한 세트 (예컨대, 바코드의 상이한 세트, 상이한 비드에 커플링된 각각의 상이한 세트)의 개수는 예를 들어, 구획화되는 특정 바코드 및/또는 적용에 따라 달라질 수 있다. 바코드의 상이한 세트는 예를 들어, 동일한 바코드가 각 세트간에 차이가 나는 동일한 바코드의 세트일 수 있다. 또는, 바코드의 상이한 세트는 예를 들어, 각 세트가 그의 포함된 바코드에서 차이가 나는 것인, 상이한 바코드의 세트일 수 있다. 일부 경우에서, 상이한 바코드는 상이한 바코드를 상이한 비드(예컨대, 겔 비드)에 부착시킴으로써 구획화된다. 일부 경우에서, 바코드의 상이한 세트는 각각의 상이한 세트를 상이한 구획에 배치함으로써 구획화된다. 그러나, 일부 경우에서, 구획은 하나 이상의 상이한 바코드 세트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 바코드의 각각의 상이한 세트는 상이한 비드(예컨대, 겔 비드)에 커플링될 수 있다. 각각의 상이한 비드는 유체 액적으로 구획화될 수 있고, 이로써, 바코드의 각각의 상이한 세트는 상이한 유체 액적으로 구획화된다. 예를 들어, 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000, 200000000, 300000000, 400000000, 500000000, 600000000, 700000000, 800000000, 900000000, 1000000000, 2000000000, 3000000000, 4000000000, 5000000000, 6000000000, 7000000000, 8000000000, 9000000000, 10000000000개 이상의 상이한 바코드 또는 바코드의 상이한 세트가 구획화될 수 있다. 일부 예에서, 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000, 200000000, 300000000, 400000000, 500000000, 600000000, 700000000, 800000000, 900000000, 1000000000, 2000000000, 3000000000, 4000000000, 5000000000, 또는 10000000000개 미만의 상이한 바코드 또는 바코드의 상이한 세트가 구획화될 수 있다. 일부 예에서, 약 1-5, 5-10, 10-50, 50-100, 100-1000, 1000-10000, 10000-100000, 100000-1000000, 1000000-10000000, 10000000-100000000, 또는 100000000-1000000000개의 상이한 바코드 또는 바코드의 상이한 세트가 구획화될 수 있다.

[0238] 바코드는 특정 밀도로 구획화될 수 있다. 예를 들어, 바코드는 각 구획이 구획당 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 또는 100000000개의 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 바코드는 각 구획이 구획당 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 또는 100000000개의 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 바코드는 각 구획이 구획당 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000,

300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 50000000, 또는 100000000개 미만의 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 바코드는 각 구획이 구획당 약 1-5, 5-10, 10-50, 50-100, 100-1000, 1000-10000, 10000-100000, 100000-1000000, 10000-1000000, 10000-10000000, 또는 10000-100000000개의 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 구획화된 바코드는 하나 이상의 비드, 예컨대, 겔 비드에 커플링될 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 유체 액적이다.

[0239] 바코드는 동일한 바코드가 특정 밀도로 구획화되도록 구획화될 수 있다. 예를 들어, 동일한 바코드는 각 구획이 구획당 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 50000000, 또는 100000000개의 동일한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 바코드는 각 구획이 구획당 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 50000000, 100000000개 이상의 동일한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 바코드는 각 구획이 구획당 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 50000000, 또는 100000000개 미만의 동일한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 바코드는 각 구획이 구획당 약 1-5, 5-10, 10-50, 50-100, 100-1000, 1000-10000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 또는 10000-100000000개의 동일한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 구획화된 동일한 바코드는 하나 이상의 비드, 예컨대, 겔 비드에 커플링될 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 유체 액적이다.

[0240] 바코드는 상이한 바코드가 특정 밀도로 구획화되도록 구획화될 수 있다. 예를 들어, 상이한 바코드는 각 구획이 구획당 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 50000000, 또는 100000000개의 상이한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 상이한 바코드는 각 구획이 구획당 적어도 약 1, 5, 10, 50, 100, 1000, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 50000000, 100000000개 이상의 상이한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 상이한 바코드는 각 구획이 구획당 약 1-5, 5-10, 10-50, 50-100, 100-1000, 1000-10000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 또는 10000-100000000개의 상이한 바코드를 함유하도록 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 구획화된 상이한 바코드는 하나 이상의 비드, 예컨대, 겔 비드에 커플링될 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 유체 액적이다.

[0241] 바코드 또는 바코드의 상이한 세트를 구획화하는 데 사용되는 구획의 개수는 예를 들어, 적용 및/또는 구획화하고자 하는 상이한 바코드 또는 바코드의 상이한 세트의 개수에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 바코드 또는 바코드의 상이한 세트를 구획화하는 데 사용되는 구획의 개수는 약 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500, 또는 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000 이상일 수 있다. 바코드 또는 바코드의 상이한 세트를 구획화하는 데 사용되는 구획의 개수는 적어도 약 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000 이상일 수 있다. 바코드 또는 바코드의 상이한 세트를 구획화하는 데 사용되는 구획의 개수는 약 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500, 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 200000, 300000, 400000, 500000, 600000, 700000, 800000, 900000, 1000000, 2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 6000000, 7000000, 8000000, 9000000, 10000000, 20000000, 30000000, 40000000, 50000000, 60000000, 70000000, 80000000, 90000000, 100000000 이상일 수 있다.

2000000, 3000000, 4000000, 5000000, 10000000, 또는 20000000개 미만일 수 있다. 바코드를 구획화하는 데 사용되는 구획의 개수는 약 5-10000000, 5-5000000, 5-1,000,000, 10-10,000, 10-5,000, 10-1,000, 1,000-6,000, 1,000-5,000, 1,000-4,000, 1,000-3,000, 또는 1000-2,000개 일 수 있다. 일부 경우에서, 구획은 유체 액적일 수 있다.

[0242] 상기 기술된 바와 같이, 상이한 바코드 또는 바코드의 상이한 세트 (예컨대, 각 세트는 복수 개의 동일한 바코드 또는 상이한 바코드를 포함)는 각 구획이 일반적으로 상이한 바코드 또는 상이한 바코드 세트를 포함하도록 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 각 구획은 동일한 바코드의 상이한 세트, 예컨대, 비드(예컨대, 겔 비드)에 커플링된 바코드의 동일한 세트를 포함할 수 있다. 동일한 바코드의 상이한 세트가 구획화되는 경우, 구획당 동일한 바코드의 개수는 달라질 수 있다. 예를 들어, 동일한 바코드의 약 100000개 이상의 상이한 세트 (예컨대, 비드에 부착된 동일한 바코드의 세트)는 약 100000개 이상의 상이한 구획 간에 걸쳐 구획화될 수 있고, 이로써, 각 구획은 동일한 바코드의 상이한 세트를 포함하게 된다(예컨대, 각 구획은 동일한 바코드의 상이한 세트에 커플링된 비드를 포함하게 된다). 각 구획에서, 바코드 세트당 동일한 바코드의 개수는 약 1000000개 이상의 동일한 바코드일 수 있다(예컨대, 각 구획은 하나 이상의 비드에 커플링된 1000000개 이상의 동일한 바코드를 포함한다). 일부 경우에서, 바코드의 상이한 세트의 개수는 구획 개수와 동일하거나, 또는 실질적으로 동일할 수 있거나, 또는 구획 개수보다 적을 수 있다. 상이한 바코드 또는 상이한 바코드 세트의 개수, 구획당 바코드의 개수, 및 구획의 개수를 임의로 적합한 개수로 조합할 수 있다. 따라서, 이해할 수 있는 바와 같이, 상기 기술된 상이한 바코드의 상이한 개수 중 임의의 것을 상기 기술된 구획당 바코드 밀도 중 임의의 것과 함께, 및 상기 기술된 구획의 개수 중 임의의 것으로 제공할 수 있다.

[0243] **미세유체 디바이스 및 액적**

[0244] 일부 경우에서, 본 개시내용은 예컨대, 비드를 제조하고, 비드 (또는 다른 유형의 구획)를 샘플과 조합하기 위한, 예컨대, 샘플 성분 및 비드를 함께 공동 구획화하기 위한 장치를 제공한다. 상기 장치는 미세유체 디바이스 (예컨대, 액적 발생기)일 수 있다. 장치는 임의의 적합한 물질로부터 형성될 수 있다. 일부 예에서, 장치는 용융 실리카, 소다 라임 유리, 보로실리케이트 유리, 폴리(메틸 메타크릴레이트) PMMA, PDMS, 사파이어, 실리콘, 게르마늄, 사이클릭 올레핀 공중합체, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리아크릴레이트, 폴리카르보네이트, 플라스틱, 열경화성 수지, 하이드로겔, 열가소성 물질, 종이, 탄성중합체, 및 그의 조합으로 이루어진 균으로부터 선택되는 물질로부터 형성될 수 있다.

[0245] 장치는 유체 유동을 위한 채널을 포함하는 방식으로 형성될 수 있다. 임의의 적합한 채널이 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 장치는 하나 이상의 유체 유입 채널(예컨대, 흡입 채널) 및 하나 이상의 유체 배출 채널을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유체 채널의 내경은 약 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 또는 150  $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 일부 경우에서, 유체 채널의 내경은 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  초과, 또는 그보다 클 수 있다. 일부 실시양태에서, 유체 채널의 내경은 약 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 85  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 125  $\mu\text{m}$ , 또는 150  $\mu\text{m}$  미만일 수 있다. 유체 채널 내의 체적 유량은 당업계에 공지된 임의의 유량일 수 있다.

[0246] 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 미세유체 디바이스는 하나 이상의 겔 전구체, 하나 이상의 가교제, 임의적으로, 개시제, 및 임의적으로, 수성 계면활성제르 포함하는 유체 액적을 형성함으로써 비드를 형성하는 데 사용될 수 있다. 유체 액적은 추가로 계면활성제 및/또는 촉진제를 포함할 수 있는 비혼화성 연속성 유체, 예컨대, 오일에 의해 둘러싸여 있을 수 있다.

[0247] 일부 실시양태에서, 미세유체 디바이스는 비드 및 샘플, 둘 모두를 포함하는 유체 액적(또는 다른 유형의 제2 구획(본원에 기술된 임의의 적합한 유형의 구획 포함))을 형성함으로써 비드(예컨대, 바코딩된 비드 또는 다른 유형의 제1 구획(본원에 기술된 임의의 적합한 유형의 구획 포함))를 샘플(예컨대, 핵산 샘플)과 조합하는 데 사용될 수 있다. 유체 액적은 유중수 에멀전 내에서 오일상, 예컨대, 수성 액적으로 둘러싸여 있는 수성 코어를 가질 수 있다. 유체 액적은 하나 이상의 바코딩된 비드, 샘플, 증폭 시약, 및 환원제를 함유할 수 있다. 일부 경우에서, 유체 액적은 물, 뉴클레아제 무함유 물, 아세트오니트릴, 비드, 겔 비드, 중합체 전구체, 중합체 단량체, 폴리아크릴아미드 단량체, 아크릴아미드 단량체, 분해성 가교제, 비분해성 가교제, 이황화 결합, 아크리다이트 모이어티, PCR 시약, 프라이머, 폴리머라제, 바코드, 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, 뉴클레오티드, DNA, RNA, 펩티드 폴리뉴클레오티드, 상보성 DNA(cDNA), 이중 가닥 DNA(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 플라스미드 DNA, 코스미드 DNA, 염색체 DNA, 계놈 DNA, 바이러스 DNA, 박테리아 DNA, mtDNA(미토콘드리아 DNA),

mRNA, rRNA, tRNA, nRNA, siRNA, snRNA, snoRNA, scaRNA, 마이크로RNA, dsRNA, 프로브, 염료, 유기 물질, 유화제, 계면활성제, 안정제, 중합체, 압타머, 환원제, 개시제, 비오틴 표지, 형광단, 완충제, 산성 용액, 염기성 용액, 감광성 효소, pH 감응성 효소, 수성 완충제, 오일, 염, 계면활성제, 이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 등 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다. 요약컨대, 유체 액적의 조성은 특정 가공 처리 요구에 따라 달라질 것이다.

[0248] 유체 액적의 크기는 균일한 크기이거나, 또는 불균일한 크기일 수 있다. 일부 경우에서, 유체 액적의 직경은 약 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 또는 1 mm일 수 있다. 일부 경우에서, 유체 액적의 직경은 적어도 약 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 1 mm 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 유체 액적의 직경은 약 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$ , 40  $\mu\text{m}$ , 45  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$ , 60  $\mu\text{m}$ , 65  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ , 80  $\mu\text{m}$ , 90  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 또는 1 mm 미만일 수 있다. 일부 경우에서, 유체 액적의 직경은 약 40-75  $\mu\text{m}$ , 30-75  $\mu\text{m}$ , 20-75  $\mu\text{m}$ , 40-85  $\mu\text{m}$ , 40-95  $\mu\text{m}$ , 20-100  $\mu\text{m}$ , 10-100  $\mu\text{m}$ , 1-100  $\mu\text{m}$ , 20-250  $\mu\text{m}$ , 또는 20-500  $\mu\text{m}$  범위일 수 있다.

[0249] 일부 실시양태에서, 장치는 2개 이상의 유체 유입 채널의 하나 이상의 교차 지점을 포함할 수 있다. 예를 들어, 교차 지점은 유체 교차점일 수 있다. 유체 교차점은 2개 이상의 유체 유입 채널 및 하나 이상의 유체 배출 채널을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 유체 교차점은 2개의 유체 유입 채널 및 2개의 유체 배출 채널을 포함할 수 있다. 다른 경우에서, 유체 교차점은 3개의 유체 유입 채널 및 1개의 유체 배출 채널을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 유체 교차점은 교차점을 형성하는 2개 이상의 유체 채널 사이에 실질적으로 수직인 각도를 형성할 수 있다.

[0250] 일부 경우에서, 미세유체 디바이스는 유출 채널에 유동적으로 연결된 접합부에서 서로 접하는 제1 및 제2 유입 채널을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 유출 채널은 예를 들어, 접합부에서 제3 유입 채널에 유동적으로 연결될 수 있다. 일부 경우에서, 제4 유입 채널이 포함될 수 있고, 이는 접합부에서 제3 유입 채널 및 배출 채널과 교차할 수 있다. 일부 경우에서, 미세유체 디바이스는 제1, 제2, 및 제3 유입 채널을 포함할 수 있으며, 여기서, 제3 유입 채널은 제1 유입 채널, 제2 유입 채널, 또는 제1 유입 채널과 제2 유입 채널의 접합부와 교차한다.

[0251] 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 미세유체 디바이스는 액체로부터 겔 비드를 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 유체 유입 채널 내의 나 이상의 겔 전구체, 하나 이상의 가교제 및 임의적으로, 개시제, 임의적으로, 수성 계면활성제, 및 임의적으로, 알콜을 포함하는 수성 유체는 유체 교차점으로 유입될 수 있다. 제2 유체 유입 채널 내에서, 임의적으로, 계면활성제 및 촉진제와 함께 오일은 동일한 유체 교차점으로 유입될 수 있다. 수성 성분 및 오일 성분, 둘 모두 유체 교차점에서 혼합될 수 있고, 이로써, 연속 오일 상 내에서 수성 유체 액적이 형성될 수 있다. 유체 교차점에서 배출되는 유체 액적 내의 겔 전구체는 중합되어 비드를 형성할 수 있다.

[0252] 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 미세유체 디바이스(예컨대, 액적 발생기)는 샘플을 비드(예컨대, 바코딩된 비드의 라이브러리)와, 그뿐만 아니라, 원하는 경우, 비드를 분해시킬 수 있는 작용제(예컨대, 비드가 이황화 결합으로 연결된 경우, 환원제)와 조합하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플(예컨대, 핵산 샘플)은 제1 유체 교차점(예컨대, 제1 유체 접합부)에 유동적으로 연결된 제1 유체 유입 채널에 제공될 수 있다. 미리 형성된 비드(예컨대, 바코딩된 비드, 분해성 바코딩된 비드)는, 제1 유체 유입 채널 및 제2 유체 유입 채널이 서로 접하는 제1 유체 교차점에도 또한 유동적으로 연결된 제2 유체 유입 채널에 제공될 수 있다. 샘플 및 비드는 제1 유체 교차점에서 혼합되어 혼합물(예컨대, 수성 혼합물)을 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 환원제는 제1 유체 교차점에도 또한 유동적으로 연결되고, 제1 유체 교차점에서 제1 및 제2 유체 유입 채널과 서로 접하는 제3 유체 유입 채널에 제공될 수 있다. 이어서, 환원제는 제1 유체 교차점에서 비드 및 샘플과 혼합될 수 있다. 다른 경우에서, 제1 유체 유입 채널을 통해 샘플과 함께 및/또는 제2 유체 유입 채널을 통해 비드와 함께 미세유체 디바이스에 제공하기 위하여 환원제를 미세유체 디바이스의 유입 이전에 샘플 및/또는 비드와 미리 혼합할 수 있다. 다른 경우에서, 환원제를 첨가하지 않을 수도 있다.

[0253] 일부 실시양태에서, 샘플 및 비드 혼합물은 제1 유체 교차점(및 따라서, 제1 유체 교차점을 형성하는 임의의 유체 채널)에 유동적으로 연결된 제1 배출 채널을 통해 제1 유체 교차점에서 배출될 수 있다. 혼합물은 제1 배출 채널에 유동적으로 연결된 제2 유체 교차점(예컨대, 제2 유체 접합부)에 제공될 수 있다. 일부 경우에서, 오일(또는 다른 적합한 비혼화성) 유체는 제2 유체 교차점(및 따라서, 상기 교차점을 형성하는 임의의 유체 채널)에

유동적으로 연결되고, 제2 유체 교차점에서 제1 배출 채널과 서로 접하는 하나 이상의 별개의 유체 유입 채널로부터 제2 유체 교차점으로 유입될 수 있다. 일부 경우에서, 오일(또는 다른 적합한 비혼화성 유체)은 제2 유체 교차점에서 제1 배출 채널 및 서로 접하는 제2 유체 교차점(및 따라서, 제1 배출 채널)에 유동적으로 연결된 1 또는 2개의 별개의 유체 유입 채널에 제공될 수 있다. 두 성분, 오일 및 샘플 및 비드 혼합물 모두 제2 유체 교차점에서 혼합될 수 있다. 상기 혼합을 통해 샘플 및 비드 혼합물이 복수 개의 유체 액적(예컨대, 유중수 에멀전 내의 수성 액적)으로 구획화되고, 여기서, 적어도 형성된 액적의 서브세트는 바코딩된 비드(예컨대, 겔 비드)를 캡슐화한다. 형성된 유체 액적은 제2 유체 교차점에서 배출되는 제2 유체 배출 채널을 통해 오일 내로 운반될 수 있다. 일부 경우에서, 제2 유체 교차점으로부터 제2 배출 채널에서 배출되는 유체 액적은 추가 가공 처리(예컨대, 써모사이클링)를 위해 웰 내로 구획될 수 있다.

[0254] 다수의 경우에서, 비드 (또는 제1 구획)와 관련하여 생성된 액적(또는 제2 구획)의 점유율을 조절하는 것이 바람직할 것이다. 상기 조절은 예를 들어, 2014년 4월 4일 출원된 미국 특허 출원 번호 제61/977,804호(그의 전체 개시내용은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다)에 기술되어 있다. 일반적으로, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 액적(또는 제2 구획)이 1개 이하의 비드 (또는 제1 구획)를 함유하도록 액적 (또는 제2 구획)이 형성될 것이다. 추가로, 또는 별법으로, 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 액적(또는 제2 구획)이 정확하게 1개의 비드 (또는 제1 구획)를 포함하도록 액적(또는 제2 구획)이 형성될 것이다. 일부 경우에서, 생성된 액적(또는 제2 구획)은 각각 평균적으로, 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 비드 (또는 제1 구획)를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 생성된 액적(또는 제2 구획)은 각각 평균적으로 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 비드 (또는 제1 구획)를 포함할 수 있다.

[0255] 일부 실시양태에서, 혼합물을 미세유체 디바이스 내로 유입하여 수성 반응 혼합물을 생성하기 이전에 샘플을 바코드를 포함하는 비드(예컨대, 분해성 비드) 및 임의의 다른 시약(예컨대, 샘플 증폭에 필요한 시약, 환원제 등)과 미리 혼합할 수 있다. 수성 혼합물을 유체 장치에 유입할 때, 혼합물을 제1 유체 유입 채널로부터 유체 교차점으로 유동할 수 있다. 일부 경우에서, 오일상은 유체 교차점에 또한 유동적으로 연결된 제2 유체 유입 채널(예컨대, 제1 유체 유입 채널에 수직이거나, 또는 그에 실질적으로 수직인 유체 채널)로부터 유체 교차점으로 유입될 수 있다. 수성 혼합물 및 오일은 유체 교차점에서 혼합될 수 있고, 이로써, 에멀전(예컨대, 겔-수-유 에멀전)이 형성된다. 에멀전은 연속 오일상 중 복수 개의 유체 액적(예컨대, 수성 반응 혼합물을 포함하는 액적)을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각 유체 액적은 단일 비드(예컨대, 동일한 바코드의 세트에 부착된 겔 비드), 분취량의 샘플, 및 분취량의 임의의 다른 시약(예컨대, 환원제, 샘플 증폭에 필요한 시약 등)을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 그러나, 유체 액적은 복수 개의 비드를 포함할 수 있다. 액적 형성시, 액적은 유체 교차점으로부터 배출되는 유체 배출 채널을 통해 오일 연속상을 통해 운반될 수 있다. 배출 채널에서 배출되는 유체 액적은 추가 가공 처리(예컨대, 써모사이클링)를 위해 웰 내로 구획될 수 있다.

[0256] 환원제가 미세유체 디바이스 내로의 유입 이전에 샘플에 첨가될 수 있거나, 또는 제1 유체 교차점에 첨가될 수 있는 경우에, 제2 유체 교차점에서 형성된 유체 액적은 환원제를 함유할 수 있다. 이 경우, 액적이 제2 유체 교차점에서 배출되어 배출 채널을 통해 운반됨에 따라 환원제는 유체 액적 내에 함유되어 있는 비드를 분해 또는 용해시킬 수 있다.

[0257] 일부 실시양태에서, 미세유체 디바이스는 병렬로 3개의 개별 유체 교차점을 함유할 수 있다. 유체 액적은 3개의 유체 교차점 중 어느 하나에서 형성될 수 있다. 샘플 및 비드는 3개의 유체 교차점 중 어느 하나 내에서 조합될 수 있다. 환원제는 3개의 유체 교차점 중 어느 하나에서 첨가될 수 있다. 오일은 3개의 유체 교차점 중 어느 하나에서 첨가될 수 있다.

[0258] 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 임의의 적합한 오일과 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 오일은 에멀전을 생성하는 데 사용될 수 있다. 오일은 불소화된 오일, 실리콘 오일, 미네랄 오일, 식물성 오일, 및 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, 미세유체 디바이스 내의 수성 유체는 또한 알코올을 함유할 수 있다. 예를 들어, 알코올은 글리세롤, 에탄올, 메탄올, 이소프로필 알코올, 펜타놀, 에탄, 프로판, 부탄, 펜탄, 헥산, 및 그의 조합일 수 있다. 알코올은 수성 유체 내에 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%(v/v)로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 알코올은 수성 유체 내에 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%(v/v) 이상으로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 알코올은 수성 유체 내에 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20%(v/v) 미만으

로 존재할 수 있다.

[0260] 일부 실시양태에서, 오일은 또한 에멀전을 안정화시키기 위해 계면활성제를 함유할 수 있다. 예를 들어, 계면활성제는 불소 계면활성제, 크라이톡스 윤활제, 크라이톡스 FSH, 조각된 유체, HFE-7500, 실리콘 화합물, PEG를 함유하는 실리콘 화합물, 예컨대, 비스 크라이톡스 페그(BKP)일 수 있다. 계면활성제는 약 0.1%, 0.5%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 5%, 또는 10%(w/w)로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 계면활성제는 적어도 약 0.1%, 0.5%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 5%, 10%(w/w) 이상으로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 계면활성제는 약 0.1%, 0.5%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 5%, 또는 10%(w/w) 미만으로 존재할 수 있다.

[0261] 일부 실시양태에서, 촉진제 및/또는 개시제가 오일에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 촉진제는 테트라메틸에틸렌디아민(TMEDA 또는 TEMED)일 수 있다. 일부 경우에서, 개시제는 과황산암모늄 또는 칼슘 이온일 수 있다. 촉진제는 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 또는 2%(v/v)로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 촉진제는 적어도 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 또는 2%(v/v) 이상으로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 촉진제는 약 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 또는 2%(v/v) 미만으로 존재할 수 있다.

[0262] **V. 증폭**

[0263] DNA 증폭은 DNA의 작은 또는 긴 세그먼트의 다중 카피를 생성하는 방법이다. 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 하나 이상의 원하는 올리고뉴클레오티드 서열을 개별 비드, 예컨대, 바코드 서열 또는 랜덤 N-mer 서열에 부착시키는 데 DNA 증폭을 사용할 수 있다. DNA 증폭은 또한 샘플 서열의 단편을 제조하고, 상기 단편에 프라이머와 결합된 바코드를 커플링시키기 위해 랜덤 N-mer 서열을 이용하여 관심 샘플, 예컨대, 게놈 DNA를 프라이밍하고, 그를 따라 연장시키는 데 사용될 수 있다.

[0264] 예를 들어, 핵산 서열은 주형 핵산 서열 및 복수 개의 부착된 올리고뉴클레오티드(예컨대, 유리가능하게 부착된 올리고뉴클레오티드)를 포함하는 비드를 함께 구획(예컨대, 에멀전의 액적, 마이크로캡슐, 또는 임의의 다른 적합한 유형의 구획(본원 어디에나 기술되어 있는 적합한 유형의 구획 포함))으로 공동 구획화함으로써 증폭될 수 있다. 부착된 올리고뉴클레오티드는 주형 핵산 서열의 하나 이상의 영역에 상보적인 프라이머 서열(예컨대, 가변 프라이머 서열, 예컨대, 랜덤 N-mer, 또는 표적화된 프라이머 서열, 예컨대, 표적화된 N-mer)를 포함할 수 있고, 추가로, 공통 서열(예컨대, 바코드 서열)도 또한 포함할 수 있다. 프라이머 서열은 주형 핵산 서열에 어닐링되고, (예컨대, 프라이머 연장 반응 또는 임의의 다른 적합한 핵산 증폭 반응에서) 연장되어 주형 핵산의 적어도 일부의 하나 이상의 제1 카피를 제조할 수 있고, 이로써, 하나 이상의 제1 카피는 프라이머 서열 및 공통 서열을 포함한다. 프라이머 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드가 비드에 유리가능하게 부착된 경우, 올리고뉴클레오티드는 프라이머 서열을 주형 핵산 서열에 어닐링하기 이전에 비드로부터 유리될 수 있다. 또한, 일반적으로, 프라이머 서열은 구획에 또한 제공되는 폴리머라제 효소(예컨대, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 가닥 치환 폴리머라제 효소, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 엑소뉴클레아제 결핍 폴리머라제 효소, 또는 임의의 다른 유형의 적합한 폴리머라제(본원 어디에나 기술되어 있는 폴리머라제 유형 포함))를 통해 연장될 수 있다. 추가로, 비드에 유리가능하게 부착된 올리고뉴클레오티드는 엑소뉴클레아제 저항성일 수 있고, 따라서, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 하나 이상의 포스포로티오에이트 결합은 올리고뉴클레오티드 중의 말단 뉴클레오티드간 결합의 포스포로티오에이트 결합을 포함할 수 있다.

[0265] 일부 경우에서, 하나 이상의 제1 카피 생성 후, 프라이머 서열은 하나 이상의 제1 카피에 어닐링되고, 프라이머 서열은 다시 연장되어 하나 이상의 제2 카피를 제조할 수 있다. 하나 이상의 제2 카피는 프라이머 서열, 공통 서열을 포함할 수 있고, 하나 이상의 제1 카피의 개별 카피의 적어도 일부에 상보적인 서열, 및/또는 가변 프라이머 서열에 상보적인 서열도 또한 포함할 수 있다. 상기 언급된 단계는 증폭된 핵산을 제조하는 데 원하는 만큼의 사이클 횟수 동안 반복될 수 있다.

[0266] 상기 기술된 올리고뉴클레오티드는 연장 반응(예컨대, 상기 기술된 하나 이상의 제1 또는 제2 카피를 제조하는 연장 반응) 동안 카피되지 않는 서열 세그먼트를 포함할 수 있다. 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 상기 서열 세그먼트는 하나 이상의 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 이는 또한 어닐링 조건하에서 헤어핀(또는 부분 헤어핀) 분자를 형성하는 앰프리콘을 생성할 수 있다.

[0267] 또 다른 일례에서, 복수 개의 상이한 핵산은 각각 제2 구획(예컨대, 비드 (본원 어디에나 기술되어 있는 비드 유형 포함))을 포함하는 별개의 제1 구획(예컨대, 에멀전 중 액적) 내로 상이한 핵산을 구획화함으로써 증폭될 수 있다. 제2 구획은 복수 개의 올리고뉴클레오타이드와 유리가능하게 결합될 수 있다. 제2 구획은 임의의 적합한 개수의 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 본원에 기술된 바와 같이 구획당 1000개 초과, 10000개 초과, 100000개 초과, 1000000개 초과, 10000000개 초과, 또는 임의의 다른 개수의 올리고뉴클레오타이드)를 포함할 수 있다. 또한, 제2 구획은 포함할 수 있다. 임의의 적합한 개수의 상이한 바코드 서열(예컨대, 1000개 이상의 상이한 바코드 서열, 10000개 이상의 상이한 바코드 서열, 100000개 이상의 상이한 바코드 서열, 1000000개 이상의 상이한 바코드 서열, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 임의의 다른 개수의 상이한 바코드 서열 포함)을 포함할 수 있다.

[0268] 추가로, 주어진 제2 구획과 회합된 복수 개의 올리고뉴클레오타이드는 프라이머 서열(예컨대, 가변 프라이머 서열, 표적화된 프라이머 서열) 및 공통 서열(예컨대, 바코드 서열)을 포함할 수 있다. 또한, 상이한 제2 구획에 회합된 복수 개의 올리고뉴클레오타이드는 상이한 바코드 서열을 포함할 수 있다. 복수 개의 제2 구획과 회합된 올리고뉴클레오타이드는 제1 구획으로 유리될 수 있다. 유리 후, 제1 구획 내의 프라이머 서열은 제1 구획 내의 핵산에 어닐링될 수 있고, 이어서, 프라이머 서열은 연장되어 제1 구획 내에서 핵산의 적어도 일부의 하나 이상의 카피를 제조할 수 있다. 일반적으로 하나 이상의 카피는 제1 구획으로 유리되는 바코드 서열을 포함할 수 있다.

[0269] **액적 내에서의 증폭 및 샘플 인덱싱**

[0270] 핵산(예컨대, DNA) 증폭은 유체 액적 내의 내용물에 대해 수행될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 유체 액적은 비드에 부착된 올리고뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 유체 액적은 샘플을 추가로 포함할 수 있다. 유체 액적은 또한 증폭에 적합한 시약도 포함할 수 있으며, 상기 시약으로는 카파(Kapa) HiFi 우라실 플러스(Plus), 변형된 뉴클레오타이드, 천연 뉴클레오타이드, 우라실 함유 뉴클레오타이드, dTTP, dUTP, dCTP, dGTP, dATP, DNA 폴리머라제, Taq 폴리머라제, 돌연변이체 프루프 리딩 폴리머라제, 9도 노스(North), 변형된 (NEB), exo(-), exo(-) Pfu, 딥 벤트 (Deep Vent) exo(-), 벤트(Vent) exo(-), 및 아시클로뉴클레오타이드(아시NTPS)를 포함할 수 있다.

[0271] 유체 액적 내에서 비드에 부착된 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드가 샘플 핵산에 부착되도록 샘플 핵산을 증폭시키는 데 사용될 수 있다. 샘플 핵산은 실제로 분석하고자 하는 임의의 핵산을 포함할 수 있고, 예를 들어, 전체 게놈, 엑솜, 애플리곤, 표적화된 게놈 세그먼트 예컨대, 유전자 또는 유전자 패밀리, 세포 핵산, 순환 핵산 등을 포함할 수 있고, 상기 언급된 바와 같이 DNA(gDNA, cDNA, mtDNA 등 포함), RNA(예컨대, mRNA, rRNA, 전체 RNA 등)를 포함할 수 있다. 바코딩을 위한 상기 핵산의 제조는 일반적으로 쉽게 이용가능한 방법, 예컨대, 농축 또는 풀 다운 방법, 단리 방법, 증폭 방법 등에 의해 달성될 수 있다. 원하는 샘플, 예컨대, gDNA를 증폭시키기 위해, 유체 액적 내의 올리고뉴클레오타이드의 랜덤 N-mer 서열은 원하는 표적 서열을 프라이밍하는 데 사용될 수 있고, 표적 서열의 상보체로서 연장될 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오타이드는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 프라이밍 이전에 액적에서 비드로부터 유리될 수 있다. 상기의 프라이밍 및 연장 공정을 위해, 중합효소 연쇄 반응 (PCR), 디지털 PCR, 역전사 PCR, 다중x PCR, nested PCR, 증폭 연장 PCR, 정량적 PCR, 다중 치환 증폭(MDA: displacement amplification), 또는 리가제 연쇄 반응(LCR: ligase chain reaction)을 비롯한, DNA 증폭의 임의의 적합한 방법이 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 유체 액적 내에서의 증폭은 특정량의, 바코드를 포함하는 샘플 핵산이 제조될 수 있을 때까지 수행될 수 있다. 일부 경우에서, 증폭은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 사이클 동안 수행될 수 있다. 일부 경우에서, 증폭은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 사이클 초과 또는 그보다 더 많이 수행될 수 있다. 일부 경우에서, 증폭은 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 사이클 미만으로 수행될 수 있다.

[0272] 본원에 기술된 바와 같은 예시적인 증폭 및 바코딩 공정은 도 38에 개략적으로 도시되어 있다. 제시된 바와 같이, 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드는 예컨대, 에멀전 중 액적(3802)에서 샘플 핵산(3804)과 함께 공동 구획화된다. 본원 어디에서나 언급된 바와 같이, 패널 A에 제시되어 있는 바와 같이, 샘플 핵산(3804)과 함께 공동 구획화된 올리고뉴클레오타이드(3808)는 비드(3806) 상에 제공될 수 있고, 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게 비드(3806)로부터 유리가능하다. 올리고뉴클레오타이드(3808)는 하나 이상의 기능성 서열, 예컨대, 서열(3810), (3814) 및 (3816) 이외에도, 바코드 서열(3812)을 포함한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드(3808)는 바코드 서열(3812) 뿐만 아니라, 주어진 서열분석 시스템에 대하여 부착 또는 고정화 서열로서 작용할 수 있는 서열(3810)은 예컨대, 일루미나 HiSeq 또는 Miseq 시스템의 유동 셀렉서 부착을 위해 사용되는 P5 서열을 포함

하는 것으로 제시되어 있다. 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드는, 샘플 핵산(3804)의 일부의 복제를 프라이밍하기 위해 랜덤 또는 표적화된 N-mer을 포함할 수 있는 프라이머 서열(3816) 또한 포함한다. 서열분석 시스템에서 합성 반응에 의한 폴리머라제 매개 주형 지정 서열분석을 프라이밍하는 데 사용되는, 서열분석 프라이밍 영역, 예컨대, "리드1" 또는 R1 프라이밍 영역을 제공할 수 있는 서열(3814) 또한 올리고뉴클레오티드(3808) 내에 포함된다. 다수의 경우에서, 바코드 서열(3812), 고정화 서열(3810) 및 R1 서열(3814)은 주어진 비드에 부착되는 모든 올리고뉴클레오티드에 공통적일 것이다. 프라이머 서열(3816)은 랜덤 N-mer 프라이머에 대해 달라질 수 있거나, 특정의 표적화된 적용을 위해 주어진 비드 상의 올리고뉴클레오티드에 공통적일 수 있다.

[0273] 프라이머 서열(3816)의 존재에 기초하여, 패널 B에 제시된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드는 샘플 핵산을 프라이밍할 수 있고, 이로써, 올리고뉴클레오티드(3808) 및 (3808a)는 폴리머라제 효소, 및 비드(3806) 및 샘플 핵산(3804)과 함께 함께 공동 구획화된 다른 연장 시약을 사용하여 연장될 수 있다. 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 상기 폴리머라제 효소로는 예컨대, 구획 내의 이중 가닥 샘플 핵산의 초기 변성이 요구되는, 열 안정성 폴리머라제를 포함할 수 있다. 별법으로, 바람직할 경우, 열 안정성이 아닌 폴리머라제 효소, 예컨대, 클레나우(Klenow), phi29, PoI 1의 사용을 허용하면서, 단일 가닥 표적 핵산이 구획 내에 증착될 수 있도록 샘플 핵산의 변성은 구획화 이전에 수행될 수 있다. 패널 C에 제시된 바와 같이, 랜덤 N-mer 프라이머가 샘플 핵산(3804)의 다중의 상이한 영역에 어닐링되는 올리고뉴클레오티드의 연장 후; 다중 중복 상보체 또는 핵산 단편 예컨대, 단편(3818) 및 (3820)이 생성된다. 비록 샘플 핵산, 예컨대, 서열(3822) 및 (3824)의 일부에 상보적인 서열 일부를 포함하기는 하지만, 이러한 구성물은 일반적으로 본원에서 부착된 바코드 서열을 가지는 샘플 핵산(3804)의 단편을 포함하는 것으로 지칭된다. 일부 경우에서, 제1 증폭 단계로부터 관리가능한 단편 크기를 유지시키기 위해 제조되는 복제 단편의 크기를 인공적으로 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 경우에서, 이는 상기 기술된 바와 같이, 기계적 수단에 의해, 예컨대, 코바리스(Covaris) 시스템과 같은 단편화 시스템을 사용하여 달성될 수 있거나, 또는 과도하게 긴 단편의 형성을 막기 위하여 랜덤 연장 종결인자를 예컨대, 저농도로 도입함으로써 달성될 수 있다.

[0274] 이어서, 상기 단편을 서열 분석할 수 있거나, 또는 패널 D에 제시된 바와 같이 본 공정에서 추가로 증폭시킬 수 있다. 예를 들어, 추가의 올리고뉴클레오티드, 예컨대, 이 또한 비드(3806)로부터 유래된 것인 올리고뉴클레오티드(3808b)는 단편(3818) 및 (3820)을 프라이밍시킬 수 있다. 이는 단편(3818)에 대하여 제시되어 있다. 특히, 또한 올리고뉴클레오티드(3808b) 중 랜덤 N-mer 프라이머(3816b)의 존재에 기초하여(다수의 경우에서, 이는 주어진 구획 중의 다른 랜덤 N-mer, 예컨대, 프라이머 서열(3816)과는 상이할 것이다), 올리고뉴클레오티드는 단편(3818)과 어닐링하고, 연장되어, 샘플 핵산 서열의 일부의 복제물을 포함하는, 서열(3828)을 포함하는 단편(3818)의 적어도 일부에 대한 상보체(3826)를 생성한다. 올리고뉴클레오티드(3808b) 연장은 그가 단편(3818)의 올리고뉴클레오티드 일부(3808)를 통해 복제될 때까지 계속된다. 본원 어디에서나 언급된 바와 같이, 및 패널 D에 도시되어 있는 바와 같이, 예컨대, 단편(3818) 내에 포함되어 있는 올리고뉴클레오티드(3808)의 서열(3816) 및 (3814)를 통한 복제 이후 올리고뉴클레오티드는 원하는 지점에서 폴리머라제에 의한 복제를 즉각 정지시킬 수 있도록 구성될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, 이는 예를 들어, 사용된 폴리머라제 효소에 의해 처리될 수 없는 상이한 뉴클레오티드 및/또는 뉴클레오티드 유사체의 도입을 비롯한, 상이한 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 비우라실 내성 폴리머라제가 상기 영역을 복제를 중단시킬 수 있도록 서열 영역(3812) 내에 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 것을 포함할 수 있다. 그 결과, 바코드 서열(3812), 부착 서열(3810), R1 프라이머 영역(3814), 및 랜덤 n-mer 서열(3816b)을 포함하는 전장의 올리고뉴클레오티드(3808b)를 한쪽 단부에 포함하는 단편(3826)이 생성된다. 서열의 다른 한쪽 단부에는 제1 올리고뉴클레오티드(3808)의 랜덤 n-mer에 대한 상보체 랜덤(3816') 뿐만 아니라, 서열(3814')로 제시된, R1 서열 모두 또는 그의 일부에 대한 상보체를 포함하게 될 것이다. 이어서, R1 서열(3814) 및 그의 상보체(3814')는 함께 하이브리드화되어 부분 헤어핀 구조(3828)를 형성하게 된다. 이해할 수 있는 바와 같이, 무작위-n-mer은 상이한 올리고뉴클레오티드 간에 상이하기 때문에, 상기 서열 및 그의 상보체는 헤어핀 형성에 참여할 것으로 예상되지 않으며, 예컨대, 랜덤 N-mer(3816)에 대한 상보체인 서열(3816')은 랜덤 n-mer 서열(3816b)에 상보적일 것이라고 예상되지 않는다. 예컨대, N-mer이 주어진 구획 내의 올리고뉴클레오티드 사이에서 공통적일 수 있는 표적화된 프라이머와 같은 다른 적용인 경우에는 그렇지 않을 것이다.

[0275] 이러한 부분 헤어핀 구조를 형성함으로써 예컨대, 반복적인 카피 복제를 방지하면서, 제1 수준의 샘플 서열의 복제물을 추가 복제로부터 제거할 수 있다. 부분 헤어핀 구조는 또한 형성된 단편, 예컨대, 단편(3826)에 대한 후속 가공 처리를 위해 유용한 구조를 제공한다.

[0276] 바코드를 샘플에 부착시킨 후, 추가의 증폭 단계(예컨대, PCR)를 수행하여 서열분석 이전에 바코딩된 단편을 증

폭시키고, 임의적으로 추가의 기능성 서열을 상기 바코딩된 단편, 예컨대, 서열분석 장치(예컨대, 일루미나 MiSeq)와 양립가능한 추가의 프라이머 결합 부위(예컨대, 리드2 서열 프라이머, 인덱스 프라이머) 및 임의적으로, 하나 이상의 추가의 바코드 서열(예컨대, 도 14C 참조) 뿐만 아니라, 다른 기능성 서열, 예컨대, 추가의 고정화 서열 또는 그의 상보체, 예컨대, P7 서열을 첨가할 수 있다. 일부 경우에서, 추가의 바코드 서열은 샘플 인덱스로서의 역할을 할 수 있고, 원래의 바코드 및 샘플 인덱스는 다중화된 서열분석(예컨대, 동시 수행되는 분자 태깅 및 샘플 확인)을 허용한다. 원래의 바코드는 서열분석 동안 바코드와 결합된(예컨대, 바코드를 통해 확인되는) 핵산에 상응하는 서열 디를 정렬하는 데 사용될 수 있다. 상이한 샘플 인덱스는 각각의 상이한 샘플로부터 생성된 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물에 포함될 수 있다. 따라서, 샘플 인덱스는 서열분석 동안 특정 서열 리드가 그에 속하는 샘플을 확인하는 데 사용될 수 있고, 다중화가 달성될 수 있다.

[0277] 일부 경우에서, 샘플 인덱스는 구획을 사용하거나, 또는 사용하지 않고, 또는 추가의 구획을 생성하거나, 또는 생성하지 않으면서, 원래의 바코드를 샘플 핵산에 첨가한 이후에 샘플 핵산에 첨가될 수 있다. 일부 경우에서, 샘플 인덱스는 별도로 첨가된다. 일부 경우에서, 샘플 인덱스의 샘플 핵산에의 첨가는 바코드를 샘플 핵산에 첨가하기 이전에 이루어질 수 있다. 일부 경우에서, 샘플 인덱스의 샘플 핵산에의 첨가는 샘플 인덱스의 샘플 핵산에의 첨가와 동시에 또는 그와 병행하여 이루어질 수 있다.

[0278] 일부 경우에서, 샘플 인덱스는 바코드 서열을 샘플 핵산에 첨가한 이후에 샘플 핵산에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 증폭 방법을 사용하여 바코드 서열 및 다른 서열(예컨대, P5, R1 등)을 샘플 핵산에 부착시킬 수 있다. 일부 경우에서, 랜덤 증폭 방식, 예컨대, 서열분석을 위한 부분 헤어핀 증폭(PHASE - 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 것)은 예를 들어, 바코드 서열 및 다른 서열을 샘플 핵산에 부착시키는 데 도움이 될 수 있다. 일례에서, 각각 상이한 랜덤 N-mer, 서열분석기 부착 또는 고정화 부위(예컨대, P5), 바코드 서열(예컨대, 동일한 바코드 서열), 및 서열분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R1)를 포함하는 복수 개의 프라이머가 샘플 핵산을 무작위로 프라이밍하고 증폭시키는 데 사용된다. 서열분석기 프라이머 결합 부위, 바코드 서열, 및/또는 서열분석 프라이머 결합 부위 중 임의의 것이 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 프라이머는 또한 확실하게 오직 랜덤 N-mer만을 통해서 샘플 핵산의 프라이밍이 일어날 수 있도록 프라이머의 하나 이상의 서열에서 프라이머에 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드 차단제를 포함할 수 있다. 예시적인 프라이머를 나타낸 개략도는 하기와 같다(올리고뉴클레오티드 차단제는 제시되지 않음):

[0279] P5-바코드-R1-랜덤Nmer

[0280] 샘플 핵산의 랜덤 프라이밍 및 다회차에 걸친 증폭을 통해 한쪽 단부에서 서열분석기 부착 또는 고정화 부위(예컨대, P5), 바코드, 서열분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R1), 랜덤 N-mer에 연결된 샘플 핵산의 일부를 포함하는 앰플리콘이 생성될 수 있다. 그의 다른 쪽 단부에서 샘플 핵산의 일부는 서열분석 프라이머 결합 부위에 상보적인 또는 부분적으로 상보적인 영역(예컨대, R1c, 또는 R1c 부분)에 연결될 수 있다. 예시적인 서열을 (선형 배열로) 나타낸 개략도는 하기와 같다:

[0281] P5-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R1c, 부분

[0282] 여기서, "인서트"는 증폭 동안 카피된 샘플 핵산의 일부에 상응하는 것이다. 카피된 샘플 핵산의 일부(인서트)의 반대쪽 단부의 서열분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R1) 및 그의 부분 상보체(예컨대, R1c, 부분)는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 분자내에서 하이브리드화하여 부분 헤어핀 구조를 형성할 수 있다.

[0283] 샘플 핵산의 바코딩된 단편 생성 후, 및 상기 언급된 바와 같이, 상기 단편을 추가로 증폭시킬 뿐만 아니라, 추가의 기능성 서열을 증폭된, 바코딩된 단편에 부착시키는 것인 바람직할 수 있다. 상기 증폭은 예컨대, PCR, LCR, 선형 증폭 등을 비롯한, 임의의 적합한 증폭 공정을 사용하여 수행될 수 있다. 전형적으로, 상기 증폭은 생성된 단편 중 공지된 말단 서열에 대해 프라이밍하는, 예컨대, 도 38에서 부착 서열(3810)의 한쪽 또는 양쪽 모두에 대해 프라이밍하는 표적화된 프라이머 및 서열(3814')을 사용하여 개시될 수 있다. 추가로, 상기 프라이머 내에 추가의 기능성 서열, 예컨대, 추가의 부착 서열, 예컨대, P7, 추가의 서열분석 프라이머, 예컨대, 리드 2 또는 R2 프라이밍 서열 뿐만 아니라, 임의적 샘플 인덱스 서열을 도입함으로써, 증폭된 바코딩된 단편을 추가로 구성할 수 있다.

[0284] 일례로, 부분 헤어핀 앰플리콘 생성 후, 헤어핀을 파괴시키고, 헤어핀 구조를 따른 연장을 프라이밍하기 위해 부분 헤어핀 앰플리콘을 헤어핀의 이중체 부분에 상보적인 프라이머와 접촉시킴으로써 부분 헤어핀 앰플리콘의 분자내 하이브리드화는 파괴시킬 수 있다. 다수의 경우에서, 상기 헤어핀을 차별적으로 파괴시키기 위해서는 헤어핀 구조보다 더 강력한 하이브리드화 친화도를 가지는 상기와 같은 프라이머를 제공하는 것이 바람직할 것이

다. 따라서, 1 이상의 일레에서, 프라이머는 잠금형 핵산(LNA) 또는 잠금형 핵산 뉴클레오티드를 포함한다. LNA는, 리보핵산 염기가 뉴클레오티드의 리보스 모이어티의 2'-산소와 4'-탄소를 연결하는 분자 브릿지를 포함하는 것인 뉴클레오티드를 포함한다. LNA는 일반적으로 더 높은 용융 온도 및 더 낮은 하이브리드화 에너지를 가진다. 따라서, LNA는 유리하게는 부분 헤어핀 앰플리콘의 하이브리드화된 서열 중 어느 것에 결합함으로써 부분 헤어핀 앰플리콘의 분자내 하이브리드화와 경쟁할 수 있다. 이어서, 파괴된 앰플리콘의 LNA를 포함하는 프라이머 및 다른 프라이머를 통한 증폭을 통해서 서열에 첨가하고자 하는 임의의 추가의 서열 (샘플 인덱스 포함)을 포함하는 선형 생성물이 생성될 수 있다.

[0285] 상기 기술된 예시적인 부분 헤어핀 P5-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R1c, 부분 배열의 경우, 부분 헤어핀은 LNA를 포함하는 프라이머 및 R1c, 부분에 상보적인 서열과 접촉할 수 있다(예컨대, 도 14C 참조). 프라이머는 또한 구성물에 첨가하고자 하는 임의의 추가의 서열의 상보체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 추가의 서열(예컨대, R2부분)은 R1c, 부분에 커플링되었을 때 추가의 서열분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R2)를 생성하는 서열일 수 있다. 프라이머와 부분 헤어핀의 하이브리드화는 부분 헤어핀의 분자내 하이브리드화를 파괴시킬 수 있고, 구성물을 선형화시킨다. 하이브리드화가 일어날 수 있고, 이로써, 예를 들어, 프라이머는 그의 상보성 서열을 통해 R1c, 부분과 하이브리드화한다(예컨대, 도 14C 참조). 프라이머의 연장을 통해 선형화된 부분 헤어핀 앰플리콘에 상보적인 서열에 연결된 프라이머를 포함하는 구성물이 생성될 수 있다. 예시적인 구성물의 개략도는 하기와 같다:

[0286] P5c-바코드, c-R1c-랜덤N-mer, c-인서트, c-R1, 부분-R2부분, c

[0287] 여기서, P5c는 P5의 상보체에 상응하고, 바코드, c는 바코드의 상보체에 상응하고, 랜덤N-mer, c는 랜덤 N-mer의 상보체에 상응하고, , 인서트, c는 인서트의 일부의 상보체에 상응하고, R1, 부분-R2부분, c는 R2의 상보체에 상응하는 것이다.

[0288] 제2 프라이머(예컨대, P5c에서 하이브리드화하는 P5)를 이용하여 추가 회차의 증폭을 실시하였을 때, 부분 헤어핀 앰플리콘 서열 및 프라이머에 상보적인 서열을 포함하는 선형 구성물이 생성될 수 있다. 예시적인 배열을 나타낸 개략도는 하기와 같다:

[0289] P5-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R1c, 부분-R2부분 또는

[0290] P5-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R2

[0291] 여기서, R1c, 부분 및 R2부분의 조합된 서열은 추가의 서열분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R2)에 상응하는 것일 수 있다.

[0292] 그러나, 다수의 추가 서열/다회에 걸친 추가 회차의 증폭이 요구되는 경우에는 상기 추가 회차의 증폭을 사용하여 추가의 서열을 구성물에 첨가할 수 있다. 상기 기술된 예시적인 P5-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R2 구성물의 경우, R2에 상보적인 서열(예컨대, R2c), 샘플 인덱스 서열의 상보체(예컨대, SIc, 샘플바코드), 및 추가의 서열분석기 프라이머 결합 부위 서열의 상보체(예컨대, P7c)를 포함하는 프라이머는 프라이머의 R2c를 통해 R2에서 구성물에 하이브리드화할 수 있다(예컨대, 도 14C 참조). 프라이머 연장을 통해 구성물에 상보적인 서열에 연결된 프라이머를 포함하는 구성물이 생성될 수 있다. 예시적인 배열을 나타낸 개략도는 하기와 같다:

[0293] P5c-바코드, c-R1c-랜덤N-mer, c-인서트, c-R2, c-SIc-P7c.

[0294] 제2 프라이머(예컨대, P5c에서 하이브리드화하는 P5)를 이용하여 추가 회차의 증폭을 실시하였을 때, 구성물 서열 및 프라이머에 상보적인 서열을 포함하는 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물이 생성될 수 있다. 상기 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물의 예시적인 배열을 나타낸 개략도는 하기와 같다:

[0295] P5-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R2-샘플인덱스-P7. 대안으로서 출발 프라이머는 바코드 서열, P7, 및 R2(P5 및 R1 대신)를 포함할 수 있다. 예시적인 프라이머를 나타낸 개략도는 하기와 같다:

[0296] P7-바코드-R2-랜덤N-mer

[0297] 상기 기술된 것(예컨대, LNA를 포함하는 프라이머를 이용하는 증폭, 추가 회차의 증폭 등)과 유사한 증폭 방식을 사용하여, 서열분석하고자 하는 샘플 핵산의 일부를 포함하는 인서트, P5, R1, 및 샘플 인덱스를 프라이머에 첨가하여 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물을 생성할 수 있다. 예시적인 생성물을 나타낸 개략도는 하기와 같다:

[0298] P7-바코드-R2-랜덤Nmer-인서트-R1-샘플인덱스-P5.

- [0299] 다른 경우에서, 샘플 인덱스는 바코드 서열을 샘플 핵산에 첨가할 때 그와 동시에 샘플 핵산에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 바코딩된 샘플 핵산을 생성하는 데 사용된 프라이머는 바코드 서열 및 샘플 인덱스, 둘 모두를 포함할 수 있으며, 이로써, 바코드가 샘플 핵산에 커플링되었을 때, 샘플 인덱스도 동시에 커플링된다. 샘플 인덱스는 프라이머 서열 중 어느 위치에나 배치될 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머는 랜덤 증폭, 예컨대, PHASE 증폭을 통해 바코딩된 샘플 핵산을 생성할 수 있는 프라이머일 수 있다. 개략적으로 하나타낸 상기 프라이머의 일례로는 하기를 포함한다:
- [0300] P5-바코드-R1-샘플인덱스-랜덤N-mer
- [0301] P5-바코드-샘플인덱스-R1-랜덤N-mer
- [0302] P5-샘플인덱스-바코드-R1-랜덤N-mer.
- [0303] 각 프라이머를 이용하는 샘플 핵산의 랜덤 프라이밍 및 구획에서의 샘플 핵산의 증폭이 실시될 때, 바코드 서열 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 부분 헤어핀 앰플리콘이 생성될 수 있다. (선형 형태로) 개략적으로 나타낸, 상기 프라이머로부터 생성된 상기 부분 헤어핀 앰플리콘은 그 예로 하기의 것을 각각 포함한다:
- [0304] P5-바코드-R1-샘플인덱스-랜덤Nmer-인서트-R1c, 부분
- [0305] P5-바코드-샘플인덱스-R1-랜덤Nmer-인서트-R1c, 부분
- [0306] P5-샘플인덱스-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R1c, 부분
- [0307] R1c, 부분은 R1에서 그의 상보성 서열과 분자내에서 하이브리드화하여 부분 헤어핀 앰플리콘을 형성할 수 있다.
- [0308] 일례로, 일부 경우에서, 부분 헤어핀 앰플리콘의 생성 후, 추가의 서열(예컨대, 기능성 서열, 예컨대, R2 및 P7 서열)을 예컨대, 벌크로 부분 헤어핀 앰플리콘에 첨가할 수 있다. 본원 어디에나 기술되어 있는 증폭 방법과 유사한 방식으로, 상기 추가의 기능성 서열을 포함하는 프라이머는 상기 기술된 바와 같이, 예컨대, 부분 헤어핀의 5' 단부, 예컨대, R1c 서열에 대해 프라이밍함으로써 부분 헤어핀 분자의 복제를 프라이밍하는 데 사용될 수 있다. 다수의 경우에서, 더욱 우수한 프라이밍 및 복제를 제공하기 위해 예컨대, 헤어핀 구조의 재하이브리드화보다 더 우수한 경쟁력을 가진, 친화도가 더 높은 프라이머 서열을 제공하는 것이 바람직할 것이다. 상기와 같은 경우에서, 예컨대, 그의 서열에 하나 이상의 친화도가 더 높은 뉴클레오티드 유사체, 예컨대, LNA 등을 포함하는 더욱 밀착된 결합 프라이머 서열이 부분 헤어핀 앰플리콘을 파괴시키고, 추가의 서열을 앰플리콘에 첨가하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 일례를 참조하면, 프라이머는 LNA, R1c, 부분에 상보적인 서열, 및 R2부분에 대한 상보체를 포함하는 서열을 포함할 수 있으며, 이로써, 프라이머가 연장되고, 생성된 생성물은 P5 프라이머를 통해 추가로 증폭되고, R1c, 부분 및 R2부분은 연결되어 R2를 생성하게 된다. 개략적으로 나타낸, 상기 프라이머로부터 생성된 상기 구성물은 그 예로 하기의 것을 각각 포함한다:
- [0309] P5-바코드-R1-샘플인덱스-랜덤Nmer-인서트-R2
- [0310] P5-바코드-샘플인덱스-R1-랜덤Nmer-인서트-R2
- [0311] P5-샘플인덱스-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R2
- [0312] 상기 언급한 바와 같이, 추가 회차의 증폭 사이클을 사용하여 추가의 서열을 구성물에 첨가할 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 R2에 상보적인 서열, 및 P7에 대한 상보체를 포함하는 서열을 포함할 수 있으며, 이로써, 프라이머가 연장되고, 생성된 생성물은 P5 프라이머를 통해 추가로 증폭되고, P7은 연결되어 R2에 연결되고, 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물이 생성된다. 개략적으로 나타낸, 상기 프라이머로부터 생성된 상기 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물은 그 예로 하기의 것을 각각 포함한다:
- [0313] P5-바코드-R1-샘플인덱스-랜덤Nmer-인서트-R2-P7
- [0314] P5-바코드-샘플인덱스-R1-랜덤Nmer-인서트-R2-P7
- [0315] P5-샘플인덱스-바코드-R1-랜덤Nmer-인서트-R2-P7.
- [0316] (예컨대, PHASE 증폭을 통해) 샘플 핵산의 영역을 증폭시킬 수 있는 프라이머로 바코드 및 샘플 인덱스에 조합하면, 샘플 인덱스는 병렬화될 수 있다. 프라이머 세트를 사용하여 상이한 샘플로부터 핵산을 인덱싱할 수 있다. 각 프라이머 세트는 특정 샘플로부터 수득된 핵산 분자에 결합될 수 있고, 다양한 바코드 서열 및 공통 샘플 인덱스 서열을 포함하는 프라이머를 포함한다.

- [0317] 일부 경우에서, 상기 기술된 바와 같은 샘플 핵산의 증폭된 단편에 추가의 작용기를 제공하기 위해서, 그뿐만 아니라, 상기 분자에 대한 후속 가공 처리, 예컨대, 증폭 및/또는 서열분석이 확실히 더욱 효율적으로 이루어질 수 있도록 하기 위해 추가의 서열 세그먼트를 본원에 기술된 부분 헤어핀 분자의 5' 단부에 부착시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 부분 헤어핀 분자를 연장 반응 조건에 가하는 경우, 5' 말단에서의 연장을 통해 그 자신의 "필링 인(filling in)" 반응을 프라이밍시킴으로써 부분 헤어핀 구조의 필링 인이 쉽게 이루어질 수 있게 할 것이다. 그 결과, 그의 이중체 부분의 안정성이 더 크기 때문에 증폭시키기가 더 어려운 완전한 헤어핀 구조가 생성될 수 있다. 상기 경우에는 완전한 헤어핀 구조가 형성되는 것을 막기 위해 반대쪽 단부 서열에 상보적인 아닌 추가의 서열 세그먼트 (들)를 우선적으로 부착시키는 것이 바람직할 수 있다. 한 예시적인 공정에서, 부분 헤어핀 구조의 증폭을 위한 것으로 상기 기술된 LNA 프라이머가 예컨대, 상기 기술된 R2 상보성 서열 뿐만 아니라, 다른 기능성 서열 성분예로 잠재적으로 상보적인 서열, 예컨대, 부착 서열, 예컨대, P7, 샘플 인덱스 서열 등을 비롯한, 추가의 오버행 서열과 함께 제공될 수 있다. 부분 헤어핀의 증폭을 위해 상기 기술된 바와 같은 연장 반응에 부분 헤어핀 및 프라이머를 가하면, 이를 통해서도 또한 LNA 프라이머 상의 오버행 서열을 따라 부분 헤어핀은 연장될 것이다. 연장된 서열은 단순히 비상보성 서열을 포함할 수 있거나, 또는 상기 언급된 바와 같이, 추가의 기능성 서열, 또는 그의 상보체를 포함할 수 있으며, 이로써, 연장 반응을 통해 상기 기능성 서열이 부분 헤어핀 구조의 5' 말단에 부착된다.
- [0318] 대안적인 측면에서, 추가의 서열 세그먼트가 부분 헤어핀 구조의 5' 단부에 결합될 수 있으며, 여기서, 상기 서열 세그먼트는 헤어핀 구조의 비중복된 부분에 대해 상보성이 아니다. 상기의 것도 도 40에 개략적으로 도시되어 있다. 경로 A에 제시된 바와 같이, 부분 헤어핀 구조는 프라이머 연장 조건에 가하였을 때, 그 자신의 프라이머로서의 역할을 할 수 있고, 점선 화살표로 표시된 바와 같이, 예컨대, 오버행 서열을 거의 포함하지 않거나, 전혀 포함하지 않는, 완전한 또는 거의 완전한 헤어핀 구조를 형성할 때까지, 그의 5' 서열에서 연장될 수 있다. 이러한 전장의 헤어핀 구조는 훨씬 더 큰 이중체 안정성을 가지게 될 것이며, 이로써, 심지어는 친화도가 더 큰 프라이머, 예컨대, LNA 함유 프라이머/프로브를 사용할 때에도 헤어핀 구조가 그의 복제를 프라이밍시킬 수 있는 능력에 대해 잠재적으로는 부정적인 영향을 미치게 될 것이다.
- [0319] 상기 가능성을 최소화하기 위해, 경로 B 및 C에 제시되어 있는 바와 같이, 완전한 또는 거의 완전한 헤어핀 구조의 생성을 막기 위하여 별개의 서열 세그먼트(4006)를 헤어핀 구조의 5' 단부에 첨가하여 비상보성 테일 서열을 포함하는 부분 헤어핀(4008)을 제공한다. 제시된 바와 같이, 이는 다수의 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 예를 들어, 경로 B에 제시된 제1 공정에서, 침투 프로브(4010)를 사용하여 부분 헤어핀 구조를 파괴시키고, 서열 세그먼트(4012)에 하이브리드화시킬 수 있다. 예컨대, 친화도가 더 높은 뉴클레오티드 유사체, 예컨대, LNA 등을 사용함으로써 상기 침투 프로브에 본래의 헤어핀 구조보다 더 높은 친화도 결합을 제공할 수 있다. 특히, 서열 세그먼트(4012)에 하이브리드화하는 인베이더(invader) 서열(4010)의 일부는 후속 증폭에서 사용되는 LNA 프라이머 서열과 함께 사용하기 위하여 본원에 기술된 방식과 동일한 방식으로 그의 서열 내에 LNA를 포함할 수 있다.
- [0320] 이어서, 경로 B에 점선 화살표로 표시된 바와 같이 부분 헤어핀(및 서열 세그먼트(4012))의 5' 부분의 연장은 서열(4006)을 부분 헤어핀 구조의 5' 말단에 첨부하여 구조(4008)를 제공한다. 별법으로, 서열(4006)은 부분 헤어핀 구조(4002)(또는 서열 세그먼트(4012))의 5' 말단에 결합될 수 있다. 경로 C에 제시된 바와 같이, 이는 결합을 위해 서열(4006)을 서열 세그먼트(4012)에 인접하게 유지시키기 위하여 서열(4006)에 부분적으로 상보적이고, 서열(4012)에 부분적으로 상보적인 스플린트 서열 (4014)를 사용함으로써 달성되었다. 이해할 수 있는 바와 같이, 부분 헤어핀 구조를 파괴시키고, 서열 세그먼트(4012)에 하이브리드화시키기 위하여 스플린트 서열(4014)은 다시 친화도가 더 높은 침투 프로브, 예컨대, 프로브(4010)를 이용할 수 있다. 특히, 부분 헤어핀 구조(4002)를 우선적으로 파괴시키고, 서열(4006)의 그의 5' 단부에의 결합이 이루어질 수 있도록 하기 위해, 서열 세그먼트(4012)에 하이브리드화시키기 위한 것인 스플린트 서열(4014)의 일부에 다시 그의 서열 내에 하나 이상의 LNA 뉴클레오티드 유사체를 제공할 수 있다.
- [0321] 일부 경우에서, 미세유체 디바이스(예컨대, 미세유체 칩)은 샘플 인덱싱을 병렬화하는 데 유용할 수 있다. 상기 장치는 각각의 것이 바코드 서열 및 샘플 인덱스, 둘 모두를 포함하는 프라이머를 통해 바코드 서열 및 샘플 인덱스를 샘플의 핵산 분자에 첨가할 수 있는 것인 병렬 모듈을 포함할 수 있다. 각각의 병렬 모듈은 상이한 샘플 인덱스를 포함하는 프라이머 세트를 포함할 수 있고, 이로써, 각 모듈에서 가공 처리되는 샘플을 상이한 샘플 인덱스 및 바코드 세트와 결합하게 된다. 예를 들어, 8개의 모듈을 가지는 미세유체 디바이스는 8개의 상이한 샘플을 샘플 인덱싱할 수 있다. 서열의 샘플 핵산에의 부착을 통한 바코딩 및 샘플 인덱싱 후, 예를 들어, 일련의 증폭을 통해 추가의 서열(예컨대, R2, P7, 다른 바코드 서열)을 벌크로 첨가하는 것을 사용함으로써 본원 어

디에나 기술되어 있는 바와 같은 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물을 생성할 수 있다.

[0322] 일부 경우에서, 샘플 인덱스는 바코드를 샘플 핵산에 부착시키는 데 사용되는 프라이머에 별개의 샘플 인덱스 서열을 포함시키지 않고, 바코딩 동안 달성될 수 있다. 상기 경우에서, 바코드 서열은 예를 들어, 또한 샘플 인덱스로서의 역할도 할 수 있다. 바코드 서열 및 샘플 인덱스, 둘 모두로서의 기능을 하는 서열을 포함하는 서열 분석기에서 바로 사용가능한 구성물의 예시적인 배열은 하기와 같다:

[0323] P5-BSI-R1- 랜덤Nmer-인서트-R2-P7

[0324] 여기서, "BSI"는 바코드 서열 및 샘플 인덱스, 둘 모두로서의 기능을 하는 서열이다.

[0325] 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 서열 리드를 정렬하고, 서열에 샘플 핵산을 제공하는 데 사용될 수 있는 바코드 서열을 포함할 수 있다. 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 예를 들어, PHASE 증폭 및 후속 벌크 증폭을 이용하여 생성될 수 있다. 또한, 바코드 서열은 공지된 바코드 서열의 특정 세트에 속하는 것일 수 있다. 바코드 서열의 세트는 특정 샘플과 관련될 수 있고, 이로써, 특정 서열분석 리드의 기원이 되는 샘플을 확인하는 것은 리드 바코드 서열을 통해 달성될 수 있다. 각 샘플은 공지된 바코드 서열의 세트에 관련될 수 있으며, 여기서, 각 바코드 서열 세트는 다른 샘플과 관련된 다른 바코드 세트 중의 바코드 서열과 중복되지 않는 바코드 서열을 포함한다. 따라서, 바코드 서열 고유성 및 그의 바코드 서열의 상이한 세트 사이의 고유성이 다중화를 위해 사용될 수 있다.

[0326] 예를 들어, 서열분석 리드는 바코드 서열 "GAGCCG"를 포함할 수 있다. 바코드 서열 "GAGCCG"는 샘플 A와 관련된 공지된 바코드 서열의 세트 중에 존재하는 바코드 서열일 수 있다. 상기 서열은 또 다른 샘플과 관련된 공지된 바코드 서열의 세트 중에서는 발견되지 않는다. 서열 "GAGCCG"를 관독하게 되면, 서열 "GAGCCG"는 샘플 A와 관련된 바코드 서열의 세트에 고유한 것이기 때문에, 서열 리드는 샘플 A와 관련되는 것으로 측정될 수 있다. 또한, 또 다른 서열분석 리드는 바코드 서열 "AGCAGA"를 포함할 수 있다. 바코드 서열 "AGCAGA"는 샘플 B와 관련된 공지된 바코드 서열의 세트 중에 존재하는 바코드 서열일 수 있다. 상기 서열은 또 다른 샘플과 관련된 공지된 바코드 서열의 세트 중에서는 발견되지 않는다. 서열 "AGCAGA"를 관독하게 되면, 서열 "AGCAGA"는 샘플 B와 관련된 바코드 서열의 세트에 고유한 것이기 때문에, 서열 리드는 샘플 B와 관련되는 것으로 측정될 수 있다.

[0327] 또 다른 일례에서, 샘플 인덱스 서열은 바코드를 샘플 핵산에 부착시키기 위해 하나 이상의 증폭 반응에서 사용되는 프라이머의 랜더 서열에 포매될 수 있다. 예를 들어, 프라이머는 무작위적으로 샘플 핵산을 프라이밍시키고, 바코드를 샘플 핵산에 부착시키는 데 사용될 수 있는 바코드 서열 및 랜덤 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 랜덤 서열은 랜덤 서열의 특정 염기가 모든 프라이머 사이에서 보존되는 의사 랜덤 서열일 수 있다. 보존되는 염기 패턴은 샘플 인덱스로서 사용될 수 있으며, 이로써, 특정 샘플로부터 수득된 모든 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 모두 랜덤 서열 영역 중에 보존되는 염기 패턴을 포함한다. 각 샘플은 상이한 보존되는 염기 패턴과 관련될 수 있으며, 따라서, 다중화를 달성할 수 있다. 일부 경우에서, 패턴은 의사 랜덤 서열의 연속된 서열 영역이거나(예컨대, "NNNATACNN"), 또는 다른 경우에서, 패턴은 의사 랜덤 서열의 비연속된 서열 영역(예컨대, "NCNGNNAANN")(여기서, "N"은 랜덤 염기에 상응한다)이다. 또한, 임의의 적합한 개수의 염기가 임의의 패턴으로 의사 랜덤 서열에서 보존될 수 있고, 본원에 기술된 예는 제한하고자 하는 것은 아니다. 바코드 서열 및 샘플 인덱스, 둘 모두로서의 기능을 하는 서열을 포함하는 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물의 예시적인 배열은 하기와 같다:

[0328] P5-바코드-R1- NQNQNNQQNN-인서트-R2-P7

[0329] 여기서, "Q"는 랜덤 영역 중의 보존 염기이다.

[0330] 예를 들어, 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 10-mer 의사 랜덤 서열 "NCNGNNAANN"(여기서, 의사 랜덤 서열의 2번째 염기("C"), 4번째 염기("G"), 7번째 염기("A"), 및 8번째 염기("A")는 샘플 A로부터 생성된 모든 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물에 대하여 보존된다)을 포함할 수 있다. 서열분석 리드는 랜덤 서열 영역 중 상기의 보존되는 염기 패턴을 포함할 수 있다. 상기 보존되는 염기 패턴을 관독하게 되면, "NCNGNNAANN"인 보존되는 염기 패턴은 샘플 A와 관련된 것이기 때문에, 서열 리드는 샘플 A와 관련되는 것으로 측정될 수 있다. 또한, 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 10-mer 의사 랜덤 서열 "NNGCNGNGNN"(여기서, 의사 랜덤 서열의 3번째 염기("G"), 4번째 염기("C"), 6번째 염기("G"), 및 8번째 염기("G")는 샘플 B로부터 생성된 모든 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물에 대하여 보존된다)을 포함할 수 있다. 서열분석 리드는 랜덤 서열 영역 중 상기의 보존되는 염기 패턴을 포함할 수 있다. 상기 보존되는 염기 패턴을 관독하게 되면, "NNGCNGNGNN"인 보존되는 염기 패턴은 샘플 B와 관련된 것이기 때문에, 서열 리드는 샘플 B와 관련되는 것으로 측정될 수 있다.

다.

- [0331] 다른 경우에서, 샘플 인덱스는 바코드 서열을 샘플 핵산에 첨가하기 이전에 샘플 핵산에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 샘플 핵산은 생성된 애플리콘이 바코딩 이전에 샘플 인덱스 서열에 부착되도록 벌크로 미리 증폭될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 샘플 인덱스 서열이 샘플 핵산에 부착될 수 있도록 샘플 인덱스 서열을 포함하는 프라이머로 증폭될 수 있다. 일부 경우에서, 프라이머는 (예컨대, 랜덤 N-mer 을 포함하는) 랜덤 프라이머일 수 있고, 증폭은 랜덤 증폭일 수 있다. 이어서, 본원에 기술된 바코딩 방법을 비롯한, 임의의 적합한 방법을 사용하여 샘플 인덱스를 포함하는 제조된 애플리콘을 바코딩할 수 있다.
- [0332] 샘플 핵산 분자를 상기 기술된 프라이머와 함께 구획(예컨대, 에멀전의 액적)으로 조합할 수 있다. 일부 경우에서, 각 구획은 복수 개의 샘플 핵산 분자(예컨대, 더 큰 핵산의 더 작은 조각)를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 구획당 고유 샘플 핵산 분자의 1개 이하의 카피가 존재한다. 일부 경우에서, 각 구획은 일반적으로 동일한 바코드 서열 및 샘플 프라이밍 서열(예컨대, 가변 랜덤 N-mer, 표적화된 N-mer)을 포함하는 프라이머를 포함할 수 있고, 여기서, 바코드 서열은 일반적으로 구획마다 다르다. 상기 경우에서, 각 구획(및 따라서, 구획 중의 샘플 핵산)은 고유 바코드 서열과 관련될 수 있고, 고유 바코드 서열을 사용하여 구획 중에서 생성된 바코딩된 샘플 핵산에 대한 서열을 측정할 수 있다.
- [0333] 일부 경우에서, 바코딩된 샘플 핵산 생성시, 바코딩된 샘플 핵산은 그의 개별 구획으로부터 유리되고, 풀링되고, 벌크 증폭 방식을 통해 모든 하류의 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물에 공동된 추가의 서열(예컨대, 추가의 서열분석 프라이머 결합 부위, 추가의 서열분석기 프라이머 결합 부위, 추가의 바코드 서열, 샘플 인덱스 서열)을 첨가할 수 있다. 구획이 에멀전의 액적인 경우, 에멀전을 분해할 수 있고, 바코딩된 샘플 핵산을 풀링할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 일련의 증폭 방법을 사용하여 유리된 바코딩된 샘플 핵산에 샘플 인덱스를 벌크로 첨가할 수 있다. 샘플 인덱스를 벌크로 첨가하는 경우, 동일한 샘플로부터 생성된 각각의 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물에 대한 리드의 생성 기점이 된 샘플을 확인하는 데 사용될 수 있는 동일한 샘플 인덱스를 포함한다. 샘플 인덱스가 바코딩 동안 첨가되는 경우, 바코딩을 위해 사용된 각 프라이머는 동일한 샘플 인덱스 서열을 포함할 수 있고, 이로써, 동일한 샘플로부터 생성된 각각의 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물은 동일한 샘플 인덱스 서열을 포함하게 될 것이다.
- [0334] 샘플 핵산을 구획화하여 바코딩된(또는 바코딩되고 샘플 인덱싱된) 샘플 핵산을 생성하고, 이어서, 추가의 서열(예컨대, 샘플 인덱스 포함)을 바코딩된 샘플 핵산에 첨가하는 것은 각 샘플에 대해 상이한 샘플 인덱스를 사용하여 각 샘플에 대하여 반복할 수 있다. 일부 경우에서, 미세유체 액적 발생기를 사용하여 샘플 핵산을 구획화할 수 있다. 일부 경우에서, 미세유체 칩은 다중 액적 발생기를 포함할 수 있고, 이로써, 상이한 샘플은 각 액적 발생기에서 가공 처리될 수 있으며, 이로써, 병렬 샘플 인덱싱을 수행할 수 있다. 각각의 상이한 샘플 인덱스를 통해 서열분석 동안 다중화를 달성할 수 있다.
- [0335] 서열분석기에서 바로 사용가능한 올리고뉴클레오티드 생성시, 이어서, 서열분석기에서 바로 사용가능한 올리고뉴클레오티드를 서열분석용 서열분석 장치에 제공할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 서열분석 장치에 제공되는 전체 서열은 서열분석 장치와 양립가능한 하나 이상의 어댑터(예컨대, P5, P7), 하나 이상의 바코드 서열, 하나 이상의 프라이머 결합 부위(예컨대, 리드1(R1) 서열 프라이머, 리드2(R2) 서열분석 프라이머, 인덱스 프라이머), N-mer 서열, 범용 서열, 관심 서열, 및 그의 조합을 포함할 수 있다. 바코드 서열은 서열 단부 중 한쪽에 위치할 수 있다. 일부 경우에서, 바코드 서열은 P5와 리드1 서열 프라이머 결합 부위 사이에 위치할 수 있다. 다른 경우에서, 바코드 서열은 P7과 리드2 서열 프라이머 결합 부위 사이에 위치할 수 있다. 일부 경우에서, 제 2 바코드 서열은 P7과 리드2 서열 프라이머 결합 부위 사이에 위치할 수 있다. 인덱스 서열 프라이머 결합 부위는 바코드 서열을 측정하기 위해 서열분석 장치에서 사용될 수 있다.
- [0336] 서열분석기 장치에 제공되는 서열의 다양한 성분(예컨대, 어댑터, 바코드 서열, 샘플 인덱스 서열, 샘플 서열, 프라이머 결합 부위 등)의 배열은 예를 들어, 원하는 특정 배열 및/또는 서열의 다양한 성분의 첨가 순서에 따라 달라질 수 있다. 서열분석에 적합한 임의의 배열이 사용될 수 있고, 임의의 서열이 임의의 적합한 순서로 올리고뉴클레오티드에 첨가될 수 있다. 추가의 서열은 샘플 핵산의 바코딩 이전, 그 동안, 및 그 이후에 샘플 핵산에 첨가될 수 있다. 예를 들어, P5 서열은 바코딩 동안에 샘플 핵산에 첨가될 수 있고, P7은 샘플 핵산의 바코딩 이후에 벌크 증폭으로 첨가될 수 있다. 별법으로, P7 서열은 바코딩 동안에 샘플 핵산에 첨가될 수 있고, P5 서열은 샘플 핵산의 바코딩 이후에 벌크 증폭으로 첨가될 수 있다. 본원에서 일례로서 제시된 예시적인 배열은 제한하고자 하는 것이 아니다. 또한, 증폭을 통해 서열 성분을 올리고뉴클레오티드에 첨가하는 것 또한 제한하고자 하는 것이 아니다. 다른 방법, 예컨대, 절찰 또한 사용될 수 있다. 추가로, 본원에 기술된 어댑터, 바코

드 서열, 샘플 인덱스 서열, 프라이머 결합 부위, 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물 등은 제한하고자 하는 것이 아니다. 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물을 비롯한, 본원에 기술된 임의 유형의 올리고뉴클레오티드는 본원에 기술된 방법을 사용하여 임의의 적합한 유형의 서열분석 플랫폼(예컨대, 일루미나 서열분석, 라이프 테크놀로지스 이온 토렌트, 파시픽 바이오사이언시즈(Pacific Biosciences) SMRT, 로슈(Roche) 454 서열분석, 라이프 테크놀로지스 고체 서열분석 등)을 위해 생성될 수 있다.

[0337] 서열분석기에서 바로 사용가능한 올리고뉴클레오티드는 본원에 기술된 방법을 사용하여 특정 서열분석 플랫폼에 적합한 임의의 어댑터 서열을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 라이프 테크놀로지스 이온 토렌트 서열분석에서 유용한 하나 이상의 바코드 서열 및 P1 및 A 어댑터 서열을 포함하는 서열분석기에서 바로 사용가능한 올리고뉴클레오티드는 본원에 기술된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 일례에서, 이황화 결합을 통해 P1 서열에 연결된 아크리다이트 모이어티를 포함하는 비드(예컨대, 겔 비드)가 생성될 수 있다. P1 서열, 바코드 서열, 및 랜덤 N-mer 서열을 포함하는 바코드 구성물이 생성될 수 있다. 바코드 구성물은 샘플 핵산을 바코딩하기 위해(예컨대, 구획, 예컨대, 유체 액적 중에서의) 증폭 반응에 유입될 수 있다. 이어서, 바코딩된 앰플리콘은 별도로 추가 증폭되어 A 서열 및 원하는 임의의 다른 서열, 예컨대, 샘플 인덱스를 첨가할 수 있다. 별법으로, A가 샘플 바코딩 동안 첨가되고, P1이 별도로 첨가되도록 P1 및 A 서열을 상호교환할 수 있다. 이어서, 완전한 서열을 이온 토렌트 서열분석기 내로 유입할 수 있다. 다른 서열분석 플랫폼을 위한 다른 어댑터 서열(예컨대, 라이프 테크놀로지스 고체 서열분석의 경우, P1 어댑터 서열, 로슈 454인 경우, A 및 B 어댑터 서열 등)이 유사한 방식으로 첨가될 수 있다.

[0338] 비록 본원에서는 부분 헤어핀 분자를 생성하는 것으로, 및 일부 경우에는 완전한 헤어핀의 형성을 막는 것으로 기술되기는 하였지만, 일부 경우에서, 본원에 기술된 바코드 서열을 포함하는 완전한 헤어핀 단편을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 특히, 종래 서열분석 작업 흐름에서 단일 헤어핀 분자의 3' 및 5' 단부를 이중 가닥 이중체 분자의 한쪽 단부로서 처리함으로써 상기의 완전한 헤어핀 분자에 대해 추가로 종래의 샘플 제조 단계를 수행할 수 있다. 특히, 종래 결합 단계를 사용할 때, 이중체 분자의 3' 및 5' 말단에 부착시키는 것과 동일한 방식으로 헤어핀 분의 3' 및 5' 단부, 둘 모두에 적절한 어댑터 서열을 쉽게 부착시킬 수 있다. 예를 들어, 일루미나 기반 서열분석 공정인 경우, 표준 일루미나 프로토콜을 이용하여 P5 및 P7 어댑터, 및 R1 및 R2 프라이머 서열을 포함하는 표준 Y 어댑터를, 헤어핀의 한쪽 단부가 이중체 분자의 한쪽 단부인 것처럼 그에 부착시킬 수 있다.

[0339] **원치 않는 증폭 생성물을 감소시키는 방법(서열분석을 위한 부분 헤어핀 증폭(PHASE))**

[0340] 랜덤 N-mer 서열은 샘플, 예컨대, 게놈 DNA(gDNA)를 무작위적으로 프라이밍하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 랜덤 N-mer은 프라이머를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 랜덤 N-mer은 샘플을 프라이밍할 수 있다. 일부 실시양태에서, 랜덤 N-mer은 게놈 DNA를 프라이밍할 수 있다. 일부 실시양태에서, 랜덤 N-mer은 DNA 단편을 프라이밍할 수 있다.

[0341] 추가로, 랜덤 N-mer 서열은 또한 또 다른 올리고뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 범용 서열일 수 있고/거나, 서열분석 장치와 양립가능할 수 있는 하나 이상의 프라이머 리드 서열(예컨대, 리드 1 프라이머 부위, 리드 2 프라이머 부위, 인덱스 프라이머 부위), 하나 이상의 바코드 서열, 및 서열분석 장치와 양립가능할 수 있는 하나 이상의 어댑터 세그먼트(예컨대, P5, P7)를 함유할 수 있다. 별법으로, 올리고뉴클레오티드는 상기의 것 중 어느 것도 포함하지 않을 수 있고, 또 다른 서열을 포함할 수 있다.

[0342] 후속 증폭 방법을 통해 랜덤 N-mer로 샘플 핵산을 프라이밍하는 것을 사용함으로써 랜덤 N-mer에 연결된 올리고뉴클레오티드 서열(예컨대, 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열)을 서열분석하고자 하는 샘플 핵산을 비롯한, 샘플 핵산에 부착시킬 수 있다. 랜덤 프라이머를 사용하여 샘플을 프라이밍시키면, 예를 들어, 원치 않는 증폭 생성물이 제조될 수 있기 때문에, 유의적인 서열 판독 오류가 도입될 수 있다.

[0343] 원치 않는 증폭 생성물을 완화시키기 위해, 적어도, 올리고뉴클레오티드 서열의 섹션은 dTTP 또는 티민 함유 뉴클레오티드 대신 각각 dUTP 또는 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환할 수 있다. 일부 경우에서, 치환은 완전한 치환일 수 있거나(예컨대, 티민 함유 뉴클레오티드 모두가 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환되거나), 또는 올리고뉴클레오티드의 티민 함유 뉴클레오티드의 일부가 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환되도록 부분적일 수 있다. 일부 경우에서, 랜덤 N-mer 서열에 인접한 올리고뉴클레오티드의 마지막 약 10 내지 약 20, 마지막 약 10 내지 30, 마지막 약 10 내지 40개, 또는 마지막 약 5 내지 40개의 뉴클레오티드를 제외한 모든 뉴클레오티드 중 티민 함유 뉴클레오티드가 dUTP 또는 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환된다. 추가로, 우라실 함유 주형을 수용하지 않거나, 가공 처리하지 않는 폴리머라제가 샘플 핵산 증폭을 위해 사용될 수 있다. 이러한 경우, 약 10 내지 약

20개의 뉴클레오티드로 이루어진 우라실 함유 부분이 증폭될 수 있고, dUTP 또는 우라실 함유 뉴클레오티드를 함유하는 나머지 부분은 증폭되지 않을 수 있다. 일부 경우에서, dUTP 또는 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열의 일부는 N-mer 서열에 인접하게 위치할 수 있다. 일부 경우에서, dUTP 또는 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열의 일부는 바코드 서열에 인접하게 위치할 수 있다. 어댑터 세그먼트, 바코드, 또는 리드 프라이머 서열을 비롯한, 올리고뉴클레오티드 서열의 임의의 일부는 올리고뉴클레오티드 서열의 배열에 의존하여, dUTP 또는 우라실 함유 뉴클레오티드(예컨대, 티민 함유 뉴클레오티드 대신으로 치환된 것)를 포함할 수 있다.

[0344] 또한, 예를 들어, 하기 기술되는 증폭 방법으로 획득되는 부분 헤어핀 생성물의 크기를 조정하기 위해 및/또는 우라실 함유 프라이머 서열과 폴리머라제 효소의 결합을 조정하기 위해 올리고뉴클레오티드 중 티민 함유 뉴클레오티드를 대신하는 우라실 함유 뉴클레오티드 치환의 개수 및 위치 결정이 사용될 수 있다. 추가로, 유리 우라실 함유 뉴클레오티드, 예컨대, UTP 또는 그의 유사체는 또한 폴리머라제/우라실-프라이머 결합 동역학적 성질을 조절하기 위해 원하는 농도로 반응 혼합물 내에, 예컨대, 구획 내에 제공될 수 있다. 일부 경우에서, 더 작은 부분 헤어핀 생성물이 더욱 정확한 서열분석 결과를 가져올 수 있다. 따라서, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드로부터 생성되는 부분 헤어핀 생성물의 원하는 길이에 따라 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개 이상의 티민 함유 뉴클레오티드를 대신하는 우라실 함유 뉴클레오티드 치환을 포함할 수 있다.

[0345] 올리고뉴클레오티드 서열(예컨대, 상기 기술된 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열)에 연결된 랜덤 N-mer을 이용하여 샘플 핵산을 랜덤 프라이밍할 때(도 15A), 1회차 증폭(예컨대, 주형으로서 우라실 함유 뉴클레오티드를 수용하지 않거나, 가공 처리하지 않는 폴리머라제를 사용하는 증폭)으로 올리고뉴클레오티드 서열이 샘플 핵산의 상보체에 부착될 수 있다(도 15B 및 도 15C). (랜덤 N-mer을 통해) 프라이밍시키고, 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열의 또 다른 카피로 증폭 생성물을 추가로 증폭시킬 때(도 15D), 올리고뉴클레오티드 서열 반대쪽 증폭 생성물 단부에 올리고뉴클레오티드 서열, 샘플 핵산 서열의 일부, 및 부분 상보성 올리고뉴클레오티드 서열(예컨대, 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드 서열의 일부에 상보적인 것)을 포함하는 증폭 생성물이 생성될 수 있다. 부분 상보성 올리고뉴클레오티드 서열 및 올리고뉴클레오티드 서열이 하이브리드화하여, 일부 경우에는, 더 이상 핵산 증폭에 참여하지 않을 수 있는 부분 헤어핀을 형성할 수 있다. 부분 헤어핀은 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 원래의 올리고뉴클레오티드 서열의 일부가 카피되지 않았기 때문에 생성될 수 있다. 증폭은 최대로는 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열 모두가 소비될 때까지 원하는 횟수만큼의 사이클 동안(예컨대, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50회 사이클) 계속 진행될 수 있다(도 15E-G).

[0346] 일부 실시양태에서, 부착된 올리고뉴클레오티드 서열의 일부가 아닌, 오직 랜덤 N-mer만을 이용하여 확실하게 샘플 핵산(예컨대, 게놈 DNA(gDNA))을 프라이밍시키고자 할 때, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단제 올리고뉴클레오티드(예컨대, 도 15에서 검은색 덤벨 표시)의 하이브리드화를 통해 차단될 수 있다. 차단제 올리고뉴클레오티드(이는 또한 본원 어디에서나 올리고뉴클레오티드 차단제로 지칭된다)는 바코드 서열, 리드 프라이머 부위 서열, 올리고뉴클레오티드의 우라실 함유 부분 모두 또는 그의 일부, 또는 올리고뉴클레오티드 모두 또는 그의 임의의 다른 일부, 또는 그 안의 다른 서열을 비롯한, 올리고뉴클레오티드 서열의 임의의 일부에 하이브리드화될 수 있다. 차단제 올리고뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 일부 경우에서, 차단제 올리고뉴클레오티드는 티민 함유 뉴클레오티드를 대신하는 우라실 함유 뉴클레오티드 치환을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 차단제 올리고뉴클레오티드의 티민 함유 뉴클레오티드 모두 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환될 수 있다. 일부 경우에서, 차단제 올리고뉴클레오티드의 티민 함유 뉴클레오티드의 일부는 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환될 수 있다. 일부 경우에서, 차단제 올리고뉴클레오티드는 잠금형 핵산(LNA), LNA 뉴클레오티드, 브릿지된 핵산(BNA: bridged nucleic acid), 및/또는 BNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 차단제 올리고뉴클레오티드의 길이는 차단제 작용기에 필요한 임의의 적합한 길이일 수 있다. 차단제 올리고뉴클레오티드의 길이는 올리고뉴클레오티드의 일부를 차단하는 데 적합한 길이일 수 있거나, 또는 차단하도록 디자인된 올리고뉴클레오티드가 길이와 동일하거나, 또는 실질적으로 동일한 길이일 수 있다. 차단제 올리고뉴클레오티드는 확실하게 오직 랜덤 N-mer이 올리고뉴클레오티드 서열의 다른 일부가 아닌, 샘플 핵산(예컨대, 게놈 DNA)에만 결합하도록 할 수 있다.

[0347] 차단제 올리고뉴클레오티드 대 올리고뉴클레오티드의 화학량론 비(예컨대, 차단제 올리고뉴클레오티드:올리고뉴클레오티드)는 달라질 수 있다. 예를 들어, 차단제 올리고뉴클레오티드:올리고뉴클레오티드의 화학량론 비는 약 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00, 1.05, 1.10, 1.15, 1.20, 1.25, 1.30, 1.35, 1.40, 1.45, 1.50, 1.55, 1.60, 1.65,

1.70, 1.75, 1.80, 1.85, 1.90, 1.95, 2.00, 2.10, 2.20, 2.30, 2.40, 2.50, 2.60, 2.70, 2.80, 2.90, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 20, 30, 40, 50, 100 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 차단제 올리고뉴클레오티드:올리고뉴클레오티드 화학량론 비는 적어도 약 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00, 1.05, 1.10, 1.15, 1.20, 1.25, 1.30, 1.35, 1.40, 1.45, 1.50, 1.55, 1.60, 1.65, 1.70, 1.75, 1.80, 1.85, 1.90, 1.95, 2.00, 2.10, 2.20, 2.30, 2.40, 2.50, 2.60, 2.70, 2.80, 2.90, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 20, 30, 40, 50, 100 이상일 수 있다. 일부 경우에서, 차단제 올리고뉴클레오티드:올리고뉴클레오티드 화학량론 비는 최대 약 0.01, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70, 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.95, 1.00, 1.05, 1.10, 1.15, 1.20, 1.25, 1.30, 1.35, 1.40, 1.45, 1.50, 1.55, 1.60, 1.65, 1.70, 1.75, 1.80, 1.85, 1.90, 1.95, 2.00, 2.10, 2.20, 2.30, 2.40, 2.50, 2.60, 2.70, 2.80, 2.90, 3.00, 3.50, 4.00, 4.50, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 20, 30, 40, 50, 또는 100일 수 있다.

[0348] 또한, (예컨대, 차단제 올리고뉴클레오티드 3' 또는 5' 단부의 디데옥시뉴클레오티드(ddNTP), ddCTP, ddATP, ddGTP, ddTTP 등을 통해) 차단제 모이어티를 차단제 올리고뉴클레오티드로 도입하고/거나, 차단제 올리고뉴클레오티드에 우라실 함유 뉴클레오티드(예컨대, 티민 함유 뉴클레오티드 모두 또는 그의 일부를 대신하여 치환된 것)를 포함하는 것은 차단된 올리고뉴클레오티드 서열의 차단된 일부의 샘플 핵산에의 우선적 결합을 막을 수 있다. 차단제 모이어티의 추가의 예로는 3' 포스페이트, 차단된 3' 단부, 3'ddCTP, C3 스페이서(/3SpC3/), 디데옥시-C(/3ddC/)를 포함한다. 차단제 올리고뉴클레오티드는 RN아제, RN아제H, 안티센스 DNA 올리고뉴클레오티드, 및/또는 알칼리성 포스파타제에 의해 올리고뉴클레오티드 서열로부터 절단될 수 있다.

[0349] 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 올리고뉴클레오티드 서열이 차단된 5' 단부를 포함하도록, 차단된 3' 단부를 포함하도록 차단제 올리고뉴클레오티드로 차단될 수 있거나, 또는 완전하게 차단될 수 있거나(예컨대, 그의 랜덤 N-mer 서열은 제외하고, 완전하게 차단될 수 있거나), 또는 또 다른 위치(예컨대, 올리고뉴클레오티드 서열의 랜덤 N-mer과 다른, 올리고뉴클레오티드의 부분 서열)에서 차단될 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 복수 개의 차단제를 포함할 수 있고, 이로써, 올리고뉴클레오티드의 다중 부위가 차단된다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단된 3' 단부 및 우라실 함유 뉴클레오티드, 둘 모두를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하고, 차단된 3' 단부는 N-mer 서열에 인접하게 위치할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단된 3' 단부를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단된 5' 단부 및 우라실 함유 뉴클레오티드, 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0350] 일부 경우에서, 우라실 함유 뉴클레오티드 및 차단된 3' 단부를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열은 N-mer 서열에 인접하게 위치할 수 있다. 일부 경우에서, 우라실 함유 뉴클레오티드 및 차단된 3' 단부를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열은 바코드 서열에 인접하게 위치할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단된 3' 단부를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드 서열은 차단된 3' 단부 및 우라실 함유 뉴클레오티드, 둘 모두를 포함할 수 있다. 차단제 올리고뉴클레오티드를 첨가하면, 증폭되는 것이 요망되지 않을 수 있는 범용 서열의 일부에의 우선적 결합을 막을 수 있다.

[0351] 일부 경우에서, 그의 랜덤 N-mer을 통해 샘플 핵산을 프라이밍시키는 데 적합한 올리고뉴클레오티드는 또한 차단제 올리고뉴클레오티드와 동일한 역할을 할 수 있는 차단 서열을 포함한다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 차단제 올리고뉴클레오티드와 동일한 역할을 할 수 있는 차단 서열과 헤어핀 배열로 배열될 수 있다. 랜덤 N-mer, R1c 서열, P5 서열, 바코드 서열, 및 R1 서열을 포함하는 예시적인 올리고뉴클레오티드는 하기와 같이 배열될 수 있다:

[0352] 5'-랜덤Nmer-R1c-P5-바코드-R1-3'

[0353] 올리고뉴클레오티드의 R1 서열 및 R1c 서열은 하이브리드화하여 P5 및 바코드 서열을 포함하는 헤어핀 루프를 가진 헤어핀을 생성할 수 있다. R1c 서열은 올리고뉴클레오티드를 이용한 샘플 핵산의 프라이밍이 오직 올리고뉴클레오티드의 랜덤 N-mer만을 통해 이루어지도록 차단제 올리고뉴클레오티드와 동일한 역할을 할 수 있다. 일부 경우에서, 원하는 경우, 올리고뉴클레오티드 하류의 서열 성분을 분리시키기 위해, 올리고뉴클레오티드의 헤어핀 루프를 비롯한 차단 서열을 포함하는 헤어핀으로서 배열된 올리고뉴클레오티드에 하나 이상의 절단 부위

(예컨대, 제한 부위, 절단 부위, 무염기성 부위 등)가 포함될 수 있다. 분리는 예를 들어, 효소 반응, 산화 환원, 방사선(예컨대, UV 광), 가열, 또는 다른 적합한 수단에 의해 이루어질 수 있다.

[0354] 랜덤 N-mer에 연결된 우라실 함유 뉴클레오티드 치환된 올리고뉴클레오티드 서열의 일례는 도 14B에 도시되어 있다. 구체적으로, 길이가 약 8 N-12 N인 랜덤 프라이머(예컨대, 랜덤 N-mer) (1404)는 올리고뉴클레오티드 서열과 연결될 수 있다. 랜덤 N-mer은 샘플 핵산, 예컨대, 게놈 DNA(gDNA)를 무작위로 프라이밍하고, 그로부터 연장시키는 데 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 서열은 (1) 서열분석 장치, 예컨대, 유동 셀과의 양립성을 위한 서열(예컨대, 일루미나의 P5(1401), 및 리드 1 프라이머 부위(1402)) 및 (2) 바코드 (BC)(1403)(예컨대, 6-12개의 염기 서열)을 포함한다. 추가로, 올리고뉴클레오티드 서열의 리드 1 프라이머 부위(1402)는 그의 3' 단부(예컨대, 3'ddCTP, "X"로 표시)에 우라실 함유 뉴클레오티드 및 차단제 모이어티를 포함하는 차단 올리고뉴클레오티드와 하이브리드화될 수 있다. 차단 올리고뉴클레오티드는 오직 랜덤 N-mer 서열만을 이용한 샘플 핵산의 프라이밍을 촉진시키고, 리드 1 프라이머 부위(1402)에 상보적인 샘플 핵산의 일부에의 올리고뉴클레오티드 서열의 우선적 결합을 막기 위해 사용될 수 있다. 임의적으로, 생성물 길이를 추가로 제한하기 위해 작은 비율(%)의 종결 뉴클레오티드(예컨대, 0.1-2% 아시클로뉴클레오티드(아시NTP))(도 16B)를 올리고뉴클레오티드 서열에 포함함으로써 원치 않는 증폭 생성물은 감소될 수 있다.

[0355] 랜덤 N-mer을 포함하는 우라실 함유 뉴클레오티드 치환된 올리고뉴클레오티드 서열을 샘플 핵산(예컨대, 게놈 DNA(gDNA))에 부착시키기 위한 부분 헤어핀 증폭의 예는 도 15에 도시되어 있다. 먼저, 변성 온도에서(예컨대, 98°C에서 2분 동안) 샘플 핵산의 초기 변성을 수행한 후, 프라이밍 온도에서(예컨대, 4°C에서 30초 동안) 랜덤 N-mer 서열로 샘플 핵산의 랜덤 부분을 프라이밍시킨다(도 15A). 올리고뉴클레오티드 서열은 차단 올리고뉴클레오티드(도 15에서 검은색 덤벨 표시)와 하이브리드화되고, 이로써, 올리고뉴클레오티드 서열의 또 다른 부분이 아닌, 오직 랜덤 N-mer만이 확실하게 샘플 핵산을 프라이밍시키게 된다. 이어서, 더 높은 온도로의 온도 램프(예컨대, 45°C까지 0.1°C/초(1초 동안 유지))를 따라 (예컨대, 주형으로서 우라실 함유 뉴클레오티드를 수용하지 않거나, 가공 처리하지 않는 폴리머라제를 통해) 서열 연장이 진행될 수 있다(도 15A). 이어서, 계속해서 상류 가닥을 치환하고, 제1 단계의 증폭부를 생성하면서, 승온다(예컨대, 70°C에서 20초)에서 연장을 계속 진행할 수 있다(도 15B). 이어서, 변성 온도(예컨대, 98°C에서 30초 동안)에서의 증폭 생성물의 변성을 통해 샘플 핵산 및 추가의 프라이밍을 위한 증폭 생성물이 유리될 수 있다.

[0356] 제1 사이클 후, 증폭 생성물은 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 단일 5' 태그를 가진다(도 15C). 상기 언급된 단계는 올리고뉴클레오티드 서열을 포함하는 증폭 생성물 및 샘플 핵산을 그의 랜덤 N-mer을 통해 프라이밍시키기 위하여 반복된다. 검은색 서열은 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하고, 이로써, 증폭 생성물의 프라이밍 및 증폭시에 카피되지 않는, 첨가된 5' 태그(사이클 1에서 첨가)의 일부를 나타낸다(도 15D). 2회차 증폭 후, 5' 태그된 생성물 및 3' & 5' 태그된 생성물, 둘 모두가 생성될 수 있다(도 15E). 3' & 5' 태그된 생성물은 한쪽 단부에 전장의 올리고뉴클레오티드 서열, 샘플 핵산 서열, 및 올리고뉴클레오티드의 나머지 다른 한쪽 단부에는 올리고뉴클레오티드 서열에 부분적으로 상보적인(예컨대, 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드 서열의 영역에 상보적인) 서열을 포함한다. 올리고뉴클레오티드 서열은 그의 부분적으로 상보적인 서열과 하이브리드화하여 부분 헤어핀 구조를 생성할 수 있다(도 15F). 증폭은 최대 올리고뉴클레오티드 서열 모두가 소비될 때까지 원하는 횟수만큼의 사이클 동안(예컨대, 최대 20회 사이클) 반복하여 계속될 수 있다(도 15G).

[0357] 부분 헤어핀 형성이 카피의 카피 생성을 막을 수 있고, 대신 오직 원래의 주형의 카피만 그가 제조되는 것은 촉진시킬 수 있고, 이로써, 잠재적인 증폭 편향성, 및 다른 아티팩트를 감소시킬 수 있다. 부분 헤어핀 형성은 원하는 생성물의 격리를 촉진시킬 수 있고, 카피 생산을 감소시킬 수 있다.

[0358] 우라실 비관독 폴리머라제가 부분 헤어핀을 형성하는 데 바람직한 특성으로는 엑소뉴클레아제 결핍 폴리머라제(예컨대, 낮은 엑소뉴클레아제 활성을 가지거나, 실질적으로 엑소뉴클레아제 활성을 가지지 않거나, 엑소뉴클레아제 활성을 가지지 않는 것), 가닥 치환 능력(예컨대, 열 안정성 가닥 치환 폴리머라제 효소), 온도 < 50 °C에서의 잔류 활성, 및 우라실 함유 뉴클레오티드 v 티민 함유 뉴클레오티드 식별을 포함할 수 있다. 상기 폴리머라제의 예로는 9도 노쓰, 변형된 (NEB), exo(-) Pfu, 딥 벤트 exo(-), 벤트 exo(-), 및 그의 동족체를 포함할 수 있다. 또한, 낮은 엑소뉴클레아제 활성을 가지는 폴리머라제는 정상적인 엑소뉴클레아제 활성을 가지는, 열적으로 안정한 폴리머라제(예컨대, Taq 폴리머라제)의 엑소뉴클레아제 활성의 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 0%인 엑소뉴클레아제 활성을 가지는 폴리머라제일 수 있다. 일부 경우에서, 부분 헤어핀 증폭에 사용되는 폴리머라제는 가닥 치환을 할 수 있다. 일부 경우에서, 증폭된 서열의 길이를 제한하면, 원치 않는 증폭 생성물이 감소될 수 있으며, 여기서, 길이

가 더 긴 생성물은 원치 않는 상류 일부, 예컨대, 바코드 서열을 포함할 수 있다. 증폭된 생성물 길이는 종결 뉴클레오티드를 포함함으로써 제한될 수 있다. 종결 뉴클레오티드의 예로는 아시클로뉴클레오티드(아시NTP)를 포함할 수 있다. 종결 뉴클레오티드는 증폭된 생성물 길이의 약 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 2.1%, 2.2%, 2.3%, 2.4%, 또는 2.5%로 존재할 수 있다. 일부 경우에서, 종결 뉴클레오티드는 증폭된 생성물 길이의 약 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 1.1%, 1.2%, 1.3%, 1.4%, 1.5%, 1.6%, 1.7%, 1.8%, 1.9%, 2%, 2.1%, 2.2%, 2.3%, 2.4%, 또는 2.5% 미만으로 존재할 수 있다.

[0359] 증폭 생성물 길이는 또한 PHASE 증폭의 개시 이전에 샘플 핵산의 사전 증폭에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, 랜덤 N-mer은 샘플 핵산의 사전 증폭에 사용될 수 있다. 랜덤 N-mer은 샘플 핵산을 프라이밍시킨 후, 적합한 써모사이클링 조건을 사용하여 프라이머를 연장시키는 데 사용될 수 있다. 생성물 길이는 샘플 핵산의 랜덤 프라이밍 이외에도 써모사이클링 조건(예컨대, 써모사이클 횟수, 사용 온도, 사이클 시간, 총 수행 횟수 등)에 의해 조절될 수 있다. 일부 경우에서, 원래의 샘플 핵산보다 더 작은 사전 증폭 생성물이 수득될 수 있다. 이어서, 사전 증폭 동안 생성된 증폭 생성물을 PHASE 증폭으로 유입하고, 상기 기술된 바와 같이 바코딩할 수 있다.

[0360] 도 17에 제시된 바와 같이, 차단 올리고뉴클레오티드를 첨가하면 출발 부위 편향성은 50%만큼 감소될 수 있다. 도 21 및 도 22에 제시된 바와 같이, 티민 함유 뉴클레오티드 대신 우라실 함유 뉴클레오티드를 범용 서열 내로 도입하고, 우라실 함유 주형을 수용하지 않거나, 가공 처리하지 않는 폴리머라제를 사용할 때, 서열분석 오류는 유의적으로 감소될 수 있다. 예를 들어, Q40 오류는 약 0.002 내지 약 0.001로 감소될 수 있고, 단부가 지도화되지 않은 것의 비율은 약 0.996 내지 약 0.03으로 감소될 수 있고, 중간 정도의 인서트 크기는 약 399 내지 약 310으로 감소될 수 있고, IQR 인서트 크기는 약 413 내지 약 209로 감소될 수 있고, 제로 커버리지 비율은 약 0.9242 내지 약 0.0093으로 감소될 수 있다.

[0361] 티민 함유 뉴클레오티드를 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환하는 것을 포함하지 않는 증폭 방식 또한 부분 헤어핀 종을 생성하는 데 구상된다. 일부 경우에서, 부분 헤어핀 앰플리콘을 생성하는 데 있어 우라실 함유 뉴클레오티드 대신으로 폴리머라제에 의해 인식될 수 없거나, 또는 카피될 수 없는 다른 종(예컨대, 메틸화된 염기, 무염기성 부위, 벌키한 측쇄에 연결된 염기성 기 등)이 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 전장의 헤어핀 앰플리콘이 생성될 수 있고, 합성 후 가공 처리를 거쳐 부분 헤어핀 종이 생성될 수 있다. 일부 경우에서, 전장의 헤어핀 앰플리콘이 생성될 수 있고, 이어서, 일부는 제거됨으로써 부분 헤어핀 종이 생성될 수 있다. 예를 들어, 도 34A에 제시된 바와 같이, 전장의 헤어핀 앰플리콘(3401)은, 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프라이머가 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하지 않고/거나, 우라실 함유 주형을 수용할 수 없거나, 가공 처리할 수 없는 폴리머라제가 증폭에 사용되는 경우, 도 15에 도시된 증폭 방식을 통해 생성될 수 있다. 전장의 헤어핀 앰플리콘(3401) 생성시, 전장의 헤어핀 앰플리콘은 하나 이상의 적절한 부위에서 효액적으로(예컨대, 제한 효소 또는 다른 부위 특이 효소, 예컨대, 니카제를 통해) 또는 화학적으로 니킹되어(3403) 부분 헤어핀 종(3402)이 생성될 수 있다.

[0362] 일부 경우에서, 전장의 헤어핀 앰플리콘이 생성될 수 있고, 이어서, 일부는 전장의 헤어핀 앰플리콘에 첨가되어 부분 헤어핀 종이 생성될 수 있다. 예를 들어, 도 15에 도시된 증폭 방식을 통해 랜덤 N-mer에 커플링하는 서열 분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R1)을 포함하고, 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하지 않는 프라이머를 사용하여 샘플 핵산을 증폭시키고, 전장의 헤어핀 앰플리콘(예컨대, 서열분석 프라이머 결합 부위(예컨대, R1), 카피된 샘플 핵산, 및 서열분석 프라이머 결합 부위와 하이브리드화된 서열분석 프라이머 결합 부위에 대한 상보체(예컨대, R1c)를 포함하는 전장의 헤어핀 - 도 34B에서 (3404))을 생성할 수 있다. 전장의 헤어핀 앰플리콘(3401) 생성시, 전장의 헤어핀 앰플리콘은 예를 들어, 결합(3406)을 통해 첨가된 추가의 서열(예컨대, P5 서열)을 포함하는 서열 및 바코드 서열) (3405)를 가질 수 있다.

[0363] 일부 경우에서, 전장의 헤어핀 앰플리콘을 생성하는 데 사용된 프라이머(예컨대, 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고 뉴클레오티드)는 예를 들어, 링커(예컨대, 핵산을 포함하지 않는 링커, 또는 증폭에 참여하지 않는 핵산을 포함하는 링커)를 통해 추가의 서열을 포함하도록 공유적으로 변형될 수 있다. 일부 경우에서, 링커는 폴리에틸렌 글리콜 또는 탄소계 링커일 수 있다. 따라서, (예컨대, 도 15에 도시된 증폭 방식을 통해) 프라이머로부터 생성된 전장의 헤어핀 앰플리콘은 또한 링커를 통해 추가의 서열에 공유적으로 연결될 수 있다. 이어서, 부착된 서열은 전장의 헤어핀 앰플리콘에 결합되어 부분 헤어핀 종이 생성될 수 있다. 링커(3407)을 통해 추가의 서열

(3408)을 포함하는 전장의 헤어핀 앰플리콘(3409)의 예는 도 34C에 제시되어 있다. 전장의 헤어핀 생성 후, 추가의 서열(3408)은, 추가의 서열(3408)을 포함하는 부분 헤어핀 중(3410)이 생성될 수 있도록 전장의 헤어핀 앰플리콘(3409)에 결합될 수 있다.

[0364] **표적화된 N-mer 및 표적화된 증폭**

[0365] 랜덤 증폭 방식 이외에도, 표적화된 프라이밍 서열(예컨대, 표적화된 N-mer)을 포함하는 바코드 구성물(예컨대, 바코드 서열 및 샘플 핵산을 프라이밍시키기 위한 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드) 및 표적화된 증폭 방식 또한 구상된다. 표적화된 증폭 방식은 예를 들어, 서열분석 방법을 통해 특정 유전자 또는 관심 서열을 검출하는 데 유용할 수 있고, 특정 유형의 핵산을 검출하는 데 유용할 수 있고, 핵산 포함 서열의 특정 가닥을 검출하는 데 유용할 수 있고, 그의 조합에도 유용할 수 있다. 일반적으로, 표적화된 증폭 방식은 특정 핵산 서열의 증폭의 완전한 증폭에 대해 표적화된 프라이머에 의존한다. 일부 예에서, PCR 방법은 특정 유전자 관심 서열, 또는 특정 유전자 관심 서열 상류의 특정 서열에 대하여 표적화된 프라이머 사용을 통한 표적화된 증폭을 위해 사용될 수 있고, 이로써, 특정 유전자 관심 서열이 PCR 동안 증폭된다.

[0366] 상기 기술된 PHASE 증폭 반응은 또한 샘플 핵산의 표적 증폭이 달성되도록 변형될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, PHASE 증폭 동안 특이 서열을 프라이밍시키는 데 랜덤 서열(예컨대, 랜덤 N-mer)보다는 표적화된 프라이밍 서열(예컨대, 표적화된 N-mer)을 포함하는 바코드 구성물이 사용될 수 있다. 예를 들어, 특이 서열은 앰플리콘 생성이 서열의 존재를 나타내도록 하는 것인 특정 유전자 관심 서열일 수 있다. 또는, 특이 서열은 특정 유전자 관심 서열로부터 상류에 있는 것으로 공지된 서열일 수 있다. 상기 구성물은 생성될 수 있고, 원하는 경우, 도 4에 도시된 제한 회색 방식, 및 본원 어디에나 기술되어 있는 조합 플레이트 방식을 비롯한, 본원에 기술된 방법 중 임의의 것을 사용하여 비드에 커플링될 수 있다.

[0367] 예를 들어, 도 4와 관련하여 앞서 기술된 바와 같이, 프라이머(403)(예컨대, P5), 바코드 서열(408), 및 리드 프라이머 결합 부위(예컨대, R1)(415)를 포함하는 구성물이 생성될 수 있다(도 4A-4H 참조). 도 4I에 제시된 바와 같이, 추가의 서열(413)을 리드 프라이머 결합 부위(415)에 상보적인 서열(412)를 포함하는 프라이머를 통해 구성물에 (임의적으로 별크로) 첨가할 수 있다. 서열(413)은 표적화된 서열이 특정 표적 관심 서열에 상응하도록 표적화된 서열(예컨대, 표적화된 N-mer)로서 작용할 수 있다. 구성물은 또한 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 구성물의 다른 서열 일부가 아닌, 오직 표적화된 서열만이 샘플 핵산을 프라이밍할 수 있도록 하기 위해 올리고뉴클레오티드 차단제를 포함할 수 있다. 완성된 구성물이 샘플 핵산과 함께 PHASE 반응으로 유입되면, 상기 기술된 바와 같이 표적화된 구성물은 (예컨대, 원하는 서열 부위에서) 샘플 핵산을 프라이밍시킬 수 있고, 증폭 반응을 개시시켜 샘플 핵산으로부터 부분 헤어핀을 생성할 수 있다. 일부 경우에서, 표적화된 N-mer 프라이머와 랜덤 N-mer 프라이머의 조합을 사용하여 부분 헤어핀 앰플리콘을 생성할 수 있다. 일부 경우에서, 표적화된 증폭은 특정 표적에 대하여 증폭 동안에 생성되는 부분 헤어핀 앰플리콘의 크기(예컨대, 서열 길이)를 조절하는 데 유용할 수 있다.

[0368] 일부 경우에서, 바코드 서열 및 표적화된 N-mer을 포함하는 복수 개의 구성물은 비드(예컨대, 겔 비드)에 커플링될 수 있다. 일부 경우에서, 복수 개의 구성물은 동일한 바코드 서열 및/또는 동일한 표적화된 N-mer 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 표적화된 N-mer 서열은, 샘플 핵산 상의 복수 개의 표적 서열이 다양한 표적화된 N-mer을 통해 프라이밍될 수 있도록 복수 개의 개별 구성물마다 다를 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 비드는 샘플 핵산과 함께 (예컨대 유세 액적으로) 구획화될 수 있고, 각 구획 중의 비드(들)는 분해되어 커플링 구성물을 구획 내로 유리시킬 수 있고, 샘플 핵산은 구성물의 표적화된 N-mer을 통해 증폭될 수 있다. 생성된 앰플리콘의 후처리(예컨대, 추가의 서열(예컨대, P7, R2) 첨가, 샘플 인덱스 첨가 등)는 별크 증폭 방법(예컨대, 별크 PCR) 및 별크 결합을 비롯한, 본원에 기술된 임의의 방법으로 달성될 수 있다.

[0369] 구획 중에서, 바코드 서열 및 표적화된 N-mer을 포함하는 구성물은 비드에 커플링될 수 있거나, 용액 중에서 유리 상태일 수 있거나(예컨대, 유체 액적의 수성 내부에서 유리 상태일 수 있거나), 또는 그 둘 모두일 수 있다. 또한, 구획은 표적화된 구성물(예컨대, 표적화된 N-mer 서열을 포함하는 구성물) 및 비표적화된 구성물(예컨대, 랜덤 N-mer 서열을 포함하는 구성물), 둘 모두를 포함할 수 있다. 표적화된 및 비표적화된 구성물은 각각 비드에 커플링될 수 있고, 둘 중 하나는 비드에 커플링될 수 있고, 그 중 하나의 구성물은 또한 구획 내의 용액 중에 존재할 수 있다.

[0370] 각 유형의 구성물이 구획 중에 존재할 경우, 샘플 핵산의 표적화된 및 비표적화된 증폭, 둘 모두가 일어날 수 있다. 예를 들어, PHASE 증폭 반응과 관련하여, 표적화된 바코드 구성물을 사용하여 먼저 샘플 핵산을 프라이밍하고 연장시킬 수 있다. 일반적으로, 상기 단계는 도 15A-C와 관련하여 상기 기술된 PHASE 증폭의 제1 사이클에

상응하는 것이되, 단, 예외적으로, 표적화된 구성물은 개시 프라이밍을 위해 사용된다. 이어서, 부분 헤어핀이 생성되도록 연장 생성물을 랜덤 N-mer을 포함하는 바코드 구성물로 프라이밍할 수 있으며, 상기 단계는 **도 15D-F**와 관련하여 상기 기술된 PHASE 증폭의 제2 사이클에 상응하는 것이다. 원하는 회차가 완료될 때까지 추가 회차 동안 증폭을 계속 진행할 수 있다(예컨대, **도 15G**). 생성된 부분 헤어핀 앰플리콘의 후처리(예컨대, 추가의 서열(예컨대, P7, R2) 첨가, 샘플 인덱스 첨가 등)는 벌크 증폭 방법(예컨대, 벌크 PCR) 및 벌크 걸찰을 비롯한, 본원에 기술된 임의의 방법으로 달성될 수 있다.

[0371] 또한, 표적화된 바코드 구성물은 구성물의 표적화된 N-mer이 DNA 이외의 다른 핵산 중, 예컨대, RNA 종으로 지정되도록 생성될 수 있다. 일부 경우에서, 표적화된 바코드 구성물의 표적화된 N-mer은 특정 RNA 서열, 예컨대, 전사된 유전자에 상응하는 서열 또는 메신저 RNA(mRNA: messenger RNA) 전사체 상의 다른 서열로 지정될 수 있다. 일부 경우에서, RNA(예컨대, mRNA)로부터 생성된 바코딩된 생성물의 서열분석은 RNA에 의해 전사된 유전자의 발현 수준을 측정하는 데 도움을 줄 수 있다. 일부 경우에서, 표적화된 N-mer은 예를 들어, mRNA 전사체의 3' 단부에서 발견될 수 있는 폴리아데닌(폴리서열)과 하이브리드화할 수 있는 폴리티민(예컨대, 폴리T 서열) 서열일 수 있다. 바코드 구성물의 폴리T 서열과 mRNA의 폴리서열의 하이브리드화를 통해 폴리T 서열을 포함하는 표적화된 바코드 구성물로 mRNA를 프라이밍할 때, 표적화된 바코드 구성물은 역전사 반응을 통해 연장될 수 있고, 이로써, 바코드 구성물을 포함하는 상보성 DNA(cDNA) 생성물이 생성될 수 있다. 일부 경우에서, 폴리T 표적화된 N-mer을 포함하는 표적화된 바코드 구성물 또한 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 올리고뉴클레오티드 차단제를 포함할 수 있고, 이로써, 오직 폴리T 서열만이 RNA와 하이브리드화한다.

[0372] RNA 종으로 표적화된 바코드 구성물은 또한 예를 들어, PHASE 증폭 반응을 통해 부분 헤어핀 앰플리콘을 생성하는 데 유용할 수 있다. 예를 들어, 폴리T 서열을 포함하는 표적화된 바코드 구성물은 그의 폴리서열을 통해 mRNA와 하이브리드화할 수 있다. 표적화된 바코드 구성물은 역전사 반응을 통해(예컨대, 역전사효소의 작용을 통해) 연장될 수 있고, 이로써, 바코드 구성물을 포함하는 cDNA가 생성된다. 상기 단계는 **도 15A-C**와 관련하여 상기 기술된 PHASE 증폭의 제1 사이클에 상응하는 것이되, 단, 예외적으로, 연장 생성물을 생성하기 위해 역전사가 사용된다. 역전사(예컨대, 제1 PHASE 사이클) 후, **도 15D-F**와 관련하여 상기 기술된 바와 같이 랜덤 N-mer을 포함하는 바코드 구성물은 연장 생성물을 프라이밍시킬 수 있고, 이로써, 부분 헤어핀이 생성된다. 원하는 회차가 완료될 때까지 추가 회차 동안 증폭을 계속 진행할 수 있다(예컨대, **도 15G**).

[0373] 일부 경우에서, 바코드 서열, 및 폴리T 서열을 포함하는 표적화된 N-mer을 포함하는 복수 개의 표적화된 구성물은 비드(예컨대, 젤 비드)에 커플링될 수 있다. 일부 경우에서, 복수 개의 구성물은 동일한 바코드 서열을 포함할 수 있다. 비드는 RNA를 포함하는 샘플 핵산과 함께 (예컨대 유세 액적으로) 구획화될 수 있고, 각 구획 중의 비드(들)는 분해되어 커플링 구성물을 구획 내로 유리시킬 수 있고, 샘플 RNA는 구성물의 표적화된 N-mer을 통해 포획될 수 있다. 구획은 또한 랜덤 N-mer을 포함하는 바코드 구성물(예컨대, 표적화된 구성물과 동일한 바코드 서열을 포함하는 것)을 포함할 수 있다. 제1 증폭 사이클에서, 각 구획 내에서 역전사를 통해 표적화된 구성물의 연장이 일어날 수 있고, 이로써, 표적화된 구성물을 포함하는 연장 생성물이 생성될 수 있다. 이어서, **도 15A-G**와 관련하여 상기 기술된 바와 같이, 각 구획 중의 연장 생성물은 랜덤 N-mer을 포함하는 바코드 구성물로 프라이밍될 수 있고, 이로써, 부분 헤어핀 앰플리콘이 생성될 수 있다. 생성된 앰플리콘의 후처리(예컨대, 추가의 서열(예컨대, P7, R2) 첨가, 샘플 인덱스 첨가 등)는 벌크 증폭 방법(예컨대, 벌크 PCR) 및 벌크 걸찰을 비롯한, 본원에 기술된 임의의 방법으로 달성될 수 있다.

[0374] 일부 경우에서, 샘플 중 RNA의 역전사는 또한 표적화된 바코드 구성물을 사용하지 않고 이용될 수 있다. 예를 들어, RNA를 포함하는 샘플 핵산을 먼저 다른 유형의 역전사 프라이머와 역전사 반응시켜 RNA로부터 cDNA를 생성한다. 이어서, 생성된 cDNA에 대하여 본원에 기술된 바와 같이 표적화된 또는 비표적화된 증폭을 수행할 수 있다. 예를 들어, RNA를 포함하는 샘플 핵산에 대해 역전사 반응시켜 RNA로부터 cDNA를 생성한다. 이어서, **도 15A-G**와 관련하여 상기 기술된 바와 같이, 랜덤 N-mer을 포함하는 바코드 구성물을 사용하여 cDNA를 PHASE 증폭 반응에 유입시켜 구성물의 바코드 서열을 포함하는 부분 헤어핀 앰플리콘을 생성할 수 있다. 생성된 부분 헤어핀 앰플리콘의 후처리(예컨대, 추가의 서열(예컨대, P7, R2) 첨가, 샘플 인덱스 첨가 등)는 벌크 증폭 방법(예컨대, 벌크 PCR) 및 벌크 걸찰을 비롯한, 본원에 기술된 임의의 방법으로 달성될 수 있다.

[0375] 각 가닥에 대하여 생성된 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물에 대해 가닥 정보가 유지될 수 있도록 표적화된 바코드 구성물은 또한 핵산의 특이 가닥 상의 특이 서열(예컨대, 유전자 서열)에 대해 생성될 수 있다. 예를 들어, 샘플 핵산은 이중 가닥 핵산(예컨대, 이중 가닥 DNA)을 포함할 수 있으며, 이로써, 핵산의 각 가닥은 하나 이상의 상이한 표적 유전자 서열을 포함하게 된다. 상보성 DNA 가닥은 각 가닥의 반대되는 5'→3' 방향성 및/또는 염기 조성에 기인하여 상이한 유전자 서열을 포함할 수 있다. 바코드 구성물의 배열 및 표적화된 N-mer에

기초하여 (가닥의 5'→3' 방향성에 기초하여) 각 가닥에 대해 표적화된 바코드 구성물이 생성될 수 있다. 이중 가닥 샘플 핵산의 정방향 및 역방향 가닥에 대한 표적화된 바코드 구성물 세트의 예가 도 28A에 제시되어 있다.

[0376] 각각 이중 가닥 샘플 핵산의 정방향(2801) 가닥 및 역방향(2802) 가닥에 대해 표적화된 표적화된 바코드 구성물의 일례의 세트(2801) 및 (2802)가 도 28A에 제시되어 있다. 세트(2801)는 P5 서열, 바코드 서열, 및 제1 표적 서열(2803) 또는 제2 표적 서열(2804) 중 어느 하나에 대한 표적화된 N-mer을 포함하는 표적화된 바코드 구성물(2803) 및 (2804)를 포함한다. 세트(2802)는 P5 서열, 바코드 서열, 및 제1 표적 서열(2805) 또는 제2 표적 서열(2806) 중 어느 하나에 대한 표적화된 N-mer을 포함하는 표적화된 바코드 구성물(2805) 및 (2806)을 포함한다. 각 구성물은 또한 바코드 및 표적화된 N-mer 사이에 임의의 추가의 서열(도 28A에 제시된 각 구성물 중 화살표로 표시)을 포함할 수 있다.

[0377] 세트(2801) 중의 바코드 구성물은 이중 가닥 샘플 핵산의 정방향 가닥 상의 그의 각 표적 서열을 프라이밍시키도록 구성된다. 세트(2802) 중의 바코드 구성물은 이중 가닥 샘플 핵산의 역방향 가닥 상의 그의 각 표적 서열을 프라이밍시키도록 구성된다. 제시된 바와 같이, 각 세트 중의 표적화된 바코드 구성물은 이중 가닥 샘플 핵산의 정방향 및 역방향 가닥의 반대되는 방향성에 상응하여 반대되는 방향으로 구성된다. 각 바코드 구성물은 샘플 핵산의 그의 각 가닥 상의 그의 각 표적 서열을 프라이밍시켜 증폭 반응, 예컨대, 본원에 기술된 임의의 증폭 반응을 통해 바코딩된 앰플리콘을 생성할 수 있다.

[0378] 벌크 증폭, 벌크 걸찰, 또는 그의 조합을 비롯한, 본원에 기술된 증폭 방법을 사용하여 추가의 서열을 바코딩된 앰플리콘에 첨가할 수 있다. 도 28A에서 표적화된 바코드 구성물로부터 생성된 앰플리콘에 샘플 인덱스 및 P7 서열을 첨가하는 데 사용될 수 있는 프라이머 세트의 예는 도 28B에 제시되어 있다. 프라이머 세트(2808)는 표적화된 바코드 구성물 세트(2801)에 상응하고(예컨대, 표적화된 바코드 구성물(2803)은 프라이머(2811)에 상응하고, 표적화된 바코드 구성물(2804)은 프라이머(2812)에 상응하고), 프라이머 세트(2808)는 표적화된 바코드 구성물 세트(2801)에 상응한다(예컨대, 표적화된 바코드 구성물(2805)은 프라이머(2809)에 상응하고, 표적화된 바코드 구성물(2806)은 프라이머(2810)에 상응한다). 각 프라이머는 그의 각 가닥 상의 그의 각 표적 서열을 프라이밍시킬 수 있고, 벌크 증폭(예컨대, 벌크 PCR)은 개시되어 본원 어디에나 기술되어 있는 벌크 증폭 방법과 유사한 방식으로 P7 및 샘플 인덱스 서열을 포함하는 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물이 생성될 수 있다. 각각의 서열분석기에서 바로 사용가능한 구성물(예컨대, P5, 바코드, 표적화된 N-mer, 샘플 인서트 등)의 다양한 성분의 배열 및 방향성에 기초하여 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물의 생성 기점이 되는 가닥을 측정할 수 있고/이는 유지된다.

[0379] 바코드 구성물(예컨대, 표적화된 바코드 구성물)의 라이브러리는 이중 가닥 핵산의 정방향 및 역방향 가닥, 둘 모두에 대하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법을 사용하여 표적화된 바코드 구성물을 포함하는 비드(예컨대, 겔 비드)의 두 라이브러리가 생성될 수 있으며, 이로써, 한 라이브러리는 샘플 핵산의 정방향 가닥에 대한 표적화된 바코드 구성물을 포함하게 되고, 나머지 다른 한 라이브러리는 샘플 핵산의 역방향 가닥에 대한 표적화된 바코드 구성물을 포함하게 된다. 일부 경우에서, 각 라이브러리는 각각이 동일한 표적화된 N-mer을 포함하는 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 각 라이브러리는 2개 이상의 비드 세트를 포함할 수 있으며, 여기서, 세트 중의 각 비드는 동일한 표적화된 N-mer(예컨대, 특정 유전자에 대하여 표적화된 N-mer)을 포함하고, 상이한 세트는 상이한 표적화된 N-mer을 포함한다. 일부 경우에서, 두 라이브러리는 조합될 수 있고, 이로써, 정방향 가닥 및 역방향 가닥의 비드로 이루어진 라이브러리가 생성될 수 있다.

[0380] 예를 들어, 라이브러리는 2개의 유형의 정방향 가닥 비드 및 2개의 유형의 역방향 가닥 비드, 총 4개 유형의 비드를 포함할 수 있다. 라이브러리 중의 각 비드는 고유 바코드 서열을 포함할 수 있다. 한 유형의 정방향 가닥 비드 및 한 유형의 역방향 가닥 비드는 표적 서열(예컨대, 표적 유전자 서열)에 상응하는 표적화된 N-mer을 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 유형의 정방향 가닥 비드는 도 28A에 (2803)으로 제시된 표적화된 바코드 구성물을 포함할 수 있고, 한 유형의 역방향 가닥 비드는 도 28A에 (2805)로 제시된 표적화된 바코드 구성물을 포함할 수 있다. 유사하게, 두번째 유형의 정방향 가닥 비드는 도 28A에 (2804)로 제시된 표적화된 바코드 구성물을 포함할 수 있고, 한 유형의 역방향 가닥 비드는 도 28A에 (2806)로 제시된 표적화된 바코드 구성물을 포함할 수 있다.

[0381] 각 비드는 고유 바코드 서열을 포함하는 것인, 정방향 가닥 및 역방향 가닥 비드(예컨대, 겔 비드)를 포함하는 바코드 라이브러리는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 구획화되어 샘플 핵산을 바코딩할 수 있다. 예를 들어, 상기 기술된 2개의 유형의 정방향 가닥 및 2개의 유형의 역방향 가닥 비드로 이루어진 혼합된 라이브러리는 샘플 핵산(예컨대, 게놈 DNA) 및 임의의 다른 원하는 시약(예컨대, 샘플 핵산 증폭에 필요한 시약, 환원제)

과 함께 구획화될 수 있다. 구획은 예를 들어, 유체 액적, 예컨대, 에멀전의 액적일 수 있다. 일반적으로 각 구획은 고유 바코드 서열 및 표적화된 N-mer을 포함하는 표적화된 바코드 구성물에 커플링된 비드(예컨대, 정방향 가닥 비드 또는 역방향 가닥 비드)를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 경우에서, 구획 중 하나 이상의 것은 동일한 유형 또는 상이한 유형의 다중 비드를 포함할 수 있다. 표적화된 바코드 구성물은 구획 중에서 비드로부터(예컨대, 비드 분해를 통해 - 예를 들어, 비드가 이화학 결합을 포함하는 겔 비드인 경우, 환원제를 통해) 유리될 수 있고, 샘플 핵산의 그의 각 가닥(예컨대, 정방향 가닥 또는 역방향 가닥) 상의 그의 표적 서열을 프라이밍시킬 수 있다.

[0382] 제1 생성물 가닥 합성은 각 구획 내에서, 하이브리드화된 표적화된 바코드 구성물의 연장을 통해, 예를 들어, 샘플 핵산의 선형 증폭을 통해 이루어질 수 있다. 표적화된 바코드 구성물을 이용한 샘플 핵산의 추가 회차의 선형 증폭은 예를 들어, 제1 생성물 가닥의 추가의 카피를 생성하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 제1 생성물 가닥을 구획으로부터 제거하고(예컨대, 구획이 에멀전의 액적인 경우, 에멀전은 분해되어 제1 생성물을 유리시킬 수 있고), 풀링시킬 수 있다. 제1 생성물을 세척하여 표적화된 바코드 구성물 및 임의의 다른 폐 생성물을 제거할 수 있다. 일부 경우에서, 임의적 이중 가닥 분해를 완료하여 샘플 핵산을 분해시키고, 그를 제1 생성물 가닥으로부터 제거할 수 있다.

[0383] 이어서, 제1 생성물 가닥을 벌크 증폭시켜 추가의 서열(예컨대, P7, 샘플 인덱스 등)을 제1 생성물 가닥에 첨가하여 제2 생성물 가닥을 생성할 수 있다. 벌크 증폭 반응 혼합물은 복수 개의 프라이머를 포함할 수 있으며, 복수 개의 각 프라이머는 제1 생성물 가닥을 생성하는 데 사용되는 비드 유형 중 하나에(및 표적화된 바코드 구성물 유형에) 상응한다. 상기 기술된 2개의 유형의 정방향 가닥 비드 및 2개의 유형의 역방향 가닥 비드를 포함하는 예시적인 라이브러리의 경우, 도 28B의 (2809), (2810), (2811), 및 (2812)로 제시된 프라이머를 사용하여 각각 벌크 증폭을 통해 표적화된 바코드 구성물(2803), (2804), (2805), 및 (2806)으로부터 생성된 제1 생성물 가닥에 추가의 샘플 인덱스 및 P7 서열을 첨가할 수 있다. 이어서, 제2 생성물 가닥을 세척하여 프라이머를 반응 혼합물로부터 제거할 수 있다. 이어서, 새 프라이머(예컨대, 상기 기술된 일례의 경우, P5 및 P7을 포함하는 프라이머)를(예컨대, PCR을 통해) 하나 이상의 추가 회차의 증폭을 첨가하여 최종의 서열분석기에서 바로 사용 가능한 생성물을 생성할 수 있다. 따라서, 최종의 생성물은 원래의 표적화된 바코드 구성물, 증폭된 샘플 핵산의 가닥, 및 제1 생성물 가닥에 첨가된 추가의 서열(예컨대, P7, 샘플 인덱스)을 포함할 수 있다.

[0384] 본원에 기술된 방법은 전체 게놈 증폭에 유용할 수 있다. 전체 게놈 증폭의 일부 실시양태에서, 랜덤 프라이머(예컨대, 랜덤 N-mer 서열)는 게놈 핵산에 하이브리드화될 수 있다. 랜덤 프라이머는 범용 핵산 서열(본원에 기술된 임의의 유형의 범용 핵산 서열 포함) 및 핵산 바코드 서열 또한 포함할 수 있는 더욱 큰 올리고뉴클레오티드의 성분일 수 있다. 일부 경우에서, 범용 핵산 서열은 하나 이상의 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 일부 경우에서, 범용 핵산 서열은 우라실을 포함하지 않는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 뉴클레오티드로 이루어진 세그먼트를 포함할 수 있다. 랜덤 프라이머는(예컨대, 프라이머 연장 반응 또는 임의의 다른 적합한 유형의 핵산 증폭 반응에서) 연장되어 증폭된 생성물을 형성할 수 있다.

[0385] 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 증폭된 생성물은 분자내 하이브리드화 반응을 거쳐 헤어핀 분자, 예컨대, 부분 헤어핀 분자를 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 전체 게놈 증폭은 차단제 모이어티(예컨대, C3 스페이서(/3SpC3/), 디데옥시-C (/3ddC/), 3' 포스페이트, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 임의의 다른 유형의 차단제 모이어티)를 포함하거나, 또는 포함하지 않을 수 있는 올리고뉴클레오티드 차단제(이는 또한 본원 어디에서든 차단제 올리고뉴클레오티드로서 지칭된다)의 존재하에서 이루어질 수 있다. 추가로, 올리고뉴클레오티드 차단제는 범용 핵산 서열의 적어도 일부 또는 랜덤 프라이머를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 임의의 다른 부분에 하이브리드화될 수 있다.

[0386] 전체 게놈 증폭의 일부 실시양태에서, 게놈 성분(예컨대, 염색체, 게놈 핵산, 예컨대, 게놈 DNA, 유기체의 전체 게놈, 또는 본원에 기술된 임의의 다른 유형의 게놈 성분)을 복수 개의 제1 단편으로 단편화할 수 있다. 제1 단편은 복수 개의 올리고뉴클레오티드와 함께 복수 개의 구획 내로 공동 구획화할 수 있다. 각 구획 내의 올리고뉴클레오티드는 프라이머 서열(본원 어디에나 기술되어 있는 유형의 프라이머 서열 포함) 및 공통 서열(예컨대, 바코드 서열)을 포함할 수 있다. 이어서, 각 구획 내의 프라이머 서열은 각 구획 내의 제1 단편의 복수 개의 상이한 영역에 어닐링될 수 있다. 이어서, 프라이머 서열은 제1 단편을 따라 연장되어 복수 개의 구획의 각 구획 내에서 증폭된 제1 단편을 수득할 수 있다. 구획 내의 증폭된 제1 단편은(본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은) 임의의 적합한 커버리지의 게놈 성분을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 구획 내의 증폭된 제1 단편은 1X 이상의 커버리지, 2X 이상의 커버리지, 5X 이상의 커버리지, 10X 이상의 커버리지, 20X 이상의

커버리지, 40X 이상의 커버리지, 또는 그 초과와 커버리지의 계층 성분을 포함할 수 있다.

[0387] **VII. 디지털 프로세서**

[0388] 본 개시내용의 방법, 조성물, 장치, 및 키트는 임의의 적합한 프로세서, 디지털 프로세서 또는 컴퓨터와 함께 사용될 수 있다. 디지털 프로세서는 예를 들어, 장치의 임의의 컴포넌트를 작동시키기 위해/또는 본원에 기술된 방법을 실행시키기 위해 프로그램화될 수 있다. 디지털 프로세서는 컴퓨터 네트워크, 예컨대, 인터넷을 통해 전자 신호를 송신 또는 수신할 수 있고/거나, 원격 컴퓨터와 통신할 수 있다. 하나 이상의 주변 장치, 예컨대, 스크린 디스플레이, 프린터, 메모리, 데이터 저장, 및/또는 전자 디스플레이 어댑터는 디지털 프로세서와 통신할 수 있다. 하나 이상의 입력 장치, 예컨대, 키보드, 마우스 또는 조이스틱은 디지털 프로세서와 통신할 수 있다. 디지털 프로세서는 또한 검출기가 원하는 시점에 또는 다르게는 미리 결정된 시점에 또는 전처리 장치 또는 다른 장치로부터 수신된 피드백으로부터 결정된 시점에 측정을 실행하도록 검출기와 통신할 수 있다.

[0389] 예시적인 제어 어셈블리에 대한 개념 도식이 도 18에 제시되어 있다. 컴퓨터는 제어 어셈블리에 대한 중앙 허브로서의 역할을 한다. 컴퓨터는 디스플레이, 하나 이상의 입력 장치(예컨대, 마우스, 키보드, 카메라 등), 및 임의적으로 프린터와 통신한다. 제어 어셈블리는 그의 컴퓨터를 통해 하나 이상의 장치: 임의적으로 샘플 전처리 유닛, 하나 이상의 샘플 처리 유닛(예컨대, 서열, 써모사이클러, 또는 미세유체 디바이스), 및 임의적으로, 검출기와 통신한다. 제어 어셈블리는 예를 들어, 이더넷(Ethernet) 연결을 통해 통신망을 구축할 수 있다. 사용자는 입력 장치를 사용하여 컴퓨터로 입력값(예컨대, 원하는 핵산 증폭 반응 세트에 필요한 파라미터 또는 미세유체 디바이스를 위한 유속)을 제공할 수 있다. 입력값은 컴퓨터에 의해 해석되고, 이로써 명령이 작성된다. 컴퓨터는 실행을 위해 상기 명령을 임의적인 샘플 전처리 유닛, 하나 이상의 샘플 처리 유닛, 및/또는 임의적인 검출기로 통신한다.

[0390] 또한, 임의적인 샘플 전처리 유닛, 하나 이상의 샘플 처리 유닛, 및/또는 임의적인가 작동하는 동안, 각 장치는 신호를 다시 컴퓨터로 역통신할 수 있다. 상기 신호는 컴퓨터에 의해 해석되고, 사용되어 장치 중 임의의 것이 추가의 명령을 필요로 하는지 여부를 결정할 수 있다. 컴퓨터는 또한 샘플 성분이 적절히 혼합되고, 원하는 또는 다르게는 미리 결정된 속도로 샘플 처리 유닛(예컨대, 미세유체 디바이스)로 공급되도록 샘플 전처리 유닛을 조절할 수 있다.

[0391] 컴퓨터는 또한 검출기가 원하는 또는 다르게는 미리 결정된 시점에 또는 샘플 전처리 유닛 또는 샘플 처리 유닛으로부터 받은 피드백으로부터 결정된 시점에 측정을 수행하도록 검출기와 통신할 수 있다. 검출기는 또한 측정 동안 수득된 원시 데이터를 추가 분석 및 해석을 위해 컴퓨터로 다시 역통신할 수 있다.

[0392] 분석은 디스플레이 및/또는 프린터에 의해 작성된 출력물을 통해 최종 사용자에게 유용한 포맷으로 요약될 수 있다. 샘플 전처리 유닛, 샘플 처리 유닛, 및/또는 검출기를 제어하는 데 사용되는 명령 또는 프로그램; 본원에 기술된 방법 중 임의의 것을 실행함으로써 획득된 데이터; 또는 분석되고/거나, 해석된 데이터는 예를 들어, 인터넷을 통해 하나 이상의 원격 컴퓨터로 송신 또는 수신될 수 있다.

[0393] 일부 실시양태에서, 비드 형성 방법은 액적 발생기와 통신하는 디지털 프로세서의 지원으로 실행될 수 있다. 디지털 프로세서는 액적 형성 속도를 조절할 수 있거나, 또는 생성되는 액적의 총 개수를 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플을 바코딩된 비드에 부착시키는 방법은 미세유체 디바이스와 통신하는 디지털 프로세서의 지원으로 실행될 수 있다. 구체적으로, 디지털 프로세서는 유입 채널 내로 주입되는 샘플 및/또는 비드의 부피량을 조절할 수 있고, 이는 또한 채널 내의 유속을 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드, 프라이머 등을 부착시키는 방법은 써모사이클러 또는 다른 프로그램가능한 가열 요소와 통신하는 디지털 프로세서의 지원으로 수행될 수 있다. 구체적으로, 디지털 프로세서는 결찰 또는 증폭 동안 사이클의 시간 및 온도를 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플을 서열분석하는 방법은 서열분석 장치와 통신하는 디지털 프로세서의 지원으로 수행될 수 있다.

[0394] **VIII. 키트**

[0395] 일부 경우에서, 본 개시내용은 미세유체 디바이스, 복수 개의 바코딩된 비드, 및 미세유체 디바이스 사용에 관한, 및 바코딩된 비드를 커스터머 샘플과 조합하여 상기 둘 모두를 함유하는 유체 액적을 생성하는 것에 관한 사용설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 본 개시내용 전역에 걸쳐 언급된 바와 같이, 임의의 적합한 샘플은 유체 액적 내로 도입될 수 있다. 본 개시내용 전역에 걸쳐 기술된 바와 같이, 비드는 분해성 또는 비분해성인 것으로 디자인될 수 있다. 이 경우, 키트는 비드 분해를 위한 환원제를 포함하거나, 포함하지 않을 수 있다.

[0396] 일부 경우에서, 본 개시내용은 복수 개의 바코딩된 비드, 적합한 증폭 시약을 포함하고, 예컨대, 임의적으로 폴

리머라제 효소, 뉴클레오시드 트리포스페이트 또는 그의 유사체, 프라이머 서열, 완충제 등의 것 중 하나 이상을 포함하고, 바코딩된 비드를 커스터머 샘플과 조합하는 것에 관한 사용설명서를 포함하는 키트를 제공한다. 본 개시내용 전역에 걸쳐 언급된 바와 같이, 임의의 적합한 샘플이 사용될 수 있다. 본 개시내용 전역에 걸쳐 언급된 바와 같이, 증폭 시약은 우라실 함유 주형을 허용하거나, 또는 가공 처리하지 않는 폴리머라제를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 키트는 또한 오일 및 계면활성제를 비롯한, 에멀전을 형성하기 위한 작용제를 제공할 수 있다.

[0397] IX. 적용

[0398] 샘플 재료 바코딩

[0399] 본원에 기술된 방법, 조성물 및 시스템은 특히 바코드, 및 특히 바코드 핵산 서열을 샘플 재료 및 상기 샘플 재료의 성분에 부착시키는 데 유용하다. 일반적으로, 이는 후속 단계에서 동일한 구획 내에서 샘플 성분에 부착되는 복수 개의 바코드가 함께 공동 구획화되어 있는 별개의 구획 또는 반응 부피로 샘플 재료 성분을 구획화함으로써 달성된다.

[0400] 예시적인 공정에서, 각각이 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드(예컨대, 핵산 바코드 분자)를 포함하는 제1 구획을 제공한다. 제1 구획은, 올리고뉴클레오티드가 유리가능하게 부착, 유리가능하게 커플링, 또는 유리가능하게 결합되는 임의의 다양한 이동식 구획, 예컨대, 비드(예컨대, 분해성 비드, 겔 비드), 액적(예컨대, 에멀전 중 수성 액적), 마이크로캡슐 등을 포함할 수 있다. 또한, 본원 어디에나 기술되어 있는 올리고뉴클레오티드의 개수를 비롯한, 구획당 임의의 적합한 개수의 올리고뉴클레오티드가 제1 구획에 포함될 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드는 절단가능한 결합, 예컨대, 화학적으로 절단가능한 결합(예컨대, 이황화 결합, 또는 본원에 기술된 임의의 다른 유형의 화학적으로 절단가능한 결합), 광 절단가능한 결합, 및/또는 열적으로 절단가능한 결합을 통해 제1 구획에 유리가능하게 부착, 유리가능하게 커플링, 또는 유리가능하게 결합될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 구획은 비드일 수 있고, 비드는 분해성 비드(예컨대, 광 분해성 비드, 화학 분해성 비드, 열 분해성 비드, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 임의의 다른 유형의 분해성 비드)일 수 있다. 또한, 비드는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 화학적으로 절단가능한 가교결합(예컨대, 이황화 가교결합)을 포함할 수 있다.

[0401] 이어서, 제1 구획은 샘플 재료, 샘플 재료 성분, 샘플 재료의 단편, 또는 샘플 재료 성분의 단편과 함께 제2 구획으로 공동 구획화된다. 샘플 재료 (또는 그의 성분 또는 단편)은 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 예시적인 샘플 유형을 비롯한, 임의의 적절한 샘플 유형일 수 있다. 샘플 재료 또는 샘플 재료의 성분이 하나 이상의 핵산 단편을 포함하는 경우, 하나 이상의 핵산 단편의 길이는 예를 들어, 본원 어디에나 기술되어 있는 핵산 단편 길이를 비롯한, 임의의 적합한 길이일 수 있다. 제2 구획은 예를 들어, 웰, 마이크로웰, 나노웰, 튜브 또는 용기를 비롯한, 임의의 다양한 구획을 포함할 수 있거나, 바람직한 경우에는, 제1 구획이 함께 공동 구획화될 수 있는 액적(예컨대, 수성 에멀전 중 액적) 또는 마이크로캡슐을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 구획은 제1 수성 유체 중에 제공될 수 있고, 샘플 재료, 샘플 재료 성분, 또는 샘플 재료 성분의 단편은 제2 수성 유체 중에 제공될 수 있다. 공동 구획화를 수행하는 동안, 제1 수성 유체 및 제2 수성 유체는 비혼화성 유체 내의 액적 내에서 조합될 수 있다. 일부 경우에서, 제2 구획은 1개 이하의 제1 구획을 포함할 수 있다. 다른 경우에서, 제2 구획은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 이하의 제1 구획을 포함할 수 있다. 다른 경우에서, 제2 구획은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 제1 구획을 포함할 수 있다.

[0402] 일단 함께 공동 구획화되고 나면, 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 (예컨대, 제1 구획의 분해, 올리고뉴클레오티드와 제1 구획 사이의 화학적 결합의 절단, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 유리 유형을 비롯한, 임의의 다른 적합한 유형의 유리를 통해) 제1 구획으로부터 제2 구획으로 유리되고, 그 안에서 함께 공동 구획화된 샘플 성분에 부착될 수 있다. 일부 경우에서, 제1 구획을 비드를 포함할 수 있고, 비드의 가교결합은 이황화 결합을 포함할 수 있다. 추가로, 또는 대안으로서, 올리고뉴클레오티드는 이황화 결합을 통해 비드에 연결될 수 있다. 어느 경우에서든, 올리고뉴클레오티드는 제1 구획을 환원제(예컨대, DTT, TCEP, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 임의의 다른 예시적인 환원제)에 노출시킴으로써 제1 구획으로부터 유리될 수 있다.

[0403] 본원 어디에서나 언급된 바와 같이, 바코드를 샘플 성분에 부착시키는 것은 예컨대, 결합, 하이브리드화, 또는 다른 결합을 통한 바코드 올리고뉴클레오티드의 샘플 재료에의 직접적인 부착을 포함한다. 추가로, 다수의 경우에서, 예를 들어, 핵산 샘플 재료(예컨대, 주형 핵산 서열, 주형 핵산 분자), 그의 성분 또는 단편을 바코딩할 때, 상기 부착은 프라이밍 서열로서 포함하는 바코드 함유 올리고뉴클레오티드를 사용하는 것도 추가로 포함할 수 있다. 프라이밍 서열은 핵산 샘플 재료의 적어도 일부에 상보적일 수 있고, 핵산 샘플 재료를 따라 연장되어

상기 샘플 재료 뿐만 아니라, 상기 서열의 증폭 생성물의 적어도 일부 또는 그의 상보체에 대한 상보체를 생성할 수 있다.

- [0404] 또 다른 예시적인 공정에서, 복수 개의 상이한 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 제1 구획을 제공할 수 있다. 각각의 제1 구획은 그와 함께 회합된 동일한 핵산 바코드 서열을 가지는 복수 개의 핵산 바코드 분자를 포함할 수 있다. 본원 어디에나 기술되어 있는 구획당 개수의 핵산 바코드 분자를 비롯한, 임의의 적합한 개수의 핵산 바코드 분자가 각각의 제1 구획과 결합될 수 있다. 제1 구획은 예를 들어, 적어도 약 2, 10, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 또는 1000000000개 이상의 상이한 핵산 바코드 서열을 비롯한, 임의의 적합한 개수의 상이한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다.
- [0405] 일부 경우에서, 복수 개의 제1 구획은, 각각의 상이한 제1 구획이 상이한 바코드 서열을 포함하는 각각의 상이한 제1 구획과 회합된 올리고뉴클레오티드와 함께 공통 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 유리가능하게 부착된, 유리가능하게 커플링된, 또는 유리가능하게 결합된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것인, 복수 개의 상이한 제1 구획을 포함할 수 있다. 상이한 제1 구획의 개수는 예를 들어, 적어도 약 2, 10, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000, 또는 1000000000개 이상의 상이한 제1 구획일 수 있다.
- [0406] 제1 구획은 샘플 재료, 샘플 재료의 단편, 샘플 재료의 성분, 또는 샘플 재료의 성분(들)의 단편과 함께 복수 개의 제2 구획으로 공동 구획화될 수 있다. 일부 경우에서, 제2 구획의 서브세트는 동일한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상의 제2 구획은 동일한 핵산 바코드 서열을 포함할 수 있다. 또한, 제2 구획당 제1 구획의 분포는 또한 예를 들어, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 점유율에 따라 달라질 수 있다. 복수 개의 제1 구획이 복수 개의 상이한 제1 구획을 포함하는 경우, 각각의 상이한 제1 구획은 별개의 제2 구획 내에 배치될 수 있다.
- [0407] 공동 구획화 후, 제1 구획에 회합된 핵산 바코드 분자는 복수 개의 제2 구획으로 유리될 수 있다. 이어서, 유리된 핵산 바코드 분자는 제2 구획 내에서 샘플 재료, 샘플 재료 성분, 샘플 재료의 단편, 또는 샘플 재료 성분의 단편에 부착될 수 있다. 바코딩된 핵산 중(예컨대, 바코딩된 샘플 핵산, 바코딩된 주형 핵산, 하나 이상의 주형 핵산 서열의 바코딩된 단편 등)인 경우, 바코딩된 핵산 중은 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 서열분석될 수 있다.
- [0408] 또 다른 예시적인 공정에서, 활성화가능한 핵산 바코드 서열이 제공될 수 있고, 이는 하나 이상의 샘플 재료, 샘플 재료의 성분, 샘플 재료의 단편, 또는 샘플 재료의 성분(들)의 단편과 함께 제1 구획으로 구획화될 수 있다. 제1 구획의 경우, 활성화가능한 핵산 바코드 서열은 활성화되어 활성 핵산 바코드 서열을 생성할 수 있다. 이어서, 활성 핵산 바코드 서열은 샘플 재료, 샘플 재료의 성분, 샘플 재료의 단편, 또는 샘플 재료의 성분(들)의 단편 중 하나 이상의 것에 부착될 수 있다.
- [0409] 일부 경우에서, 활성화가능한 핵산 바코드 서열은, 이 또한 활성화가능한 핵산 바코드 서열과 함께 제1 구획에서 구획화되는 제2 구획에 커플링될 수 있다. 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 활성화가능한 핵산 바코드 서열은 활성화가능한 핵산 바코드 서열을 결합된 구획(예컨대, 비드)로부터 유리시킴으로써 활성화될 수 있다. 따라서, 활성화가능한 핵산 바코드 서열이 제1 구획(예컨대, 유체 액적)에 구획화되어 있는 제2 구획(예컨대, 비드)과 결합되어 있는 경우, 활성화가능한 핵산 바코드 서열은 활성화가능한 핵산 바코드 서열을 그의 제2 구획으로부터 유리시킴으로써 활성화될 수 있다. 추가로, 또는 대안으로서, 활성화가능한 바코드는 또한 활성화가능한 핵산 바코드 서열로부터 제거가능한 차단기 또는 보호기를 제거함으로써 활성화될 수 있다.
- [0410] 또 다른 예시적인 공정에서, 핵산 샘플은 (본원 어디에나 기술되어 있는 유형의 비드를 비롯한) 바코딩된 비드의 라이브러리와 조합되어 혼합물을 형성할 수 있다. 일부 경우에서, 비드의 바코드는 바코드 서열 이외에도, 각각 하나 이상의 추가의 서열, 예컨대, 범용 서열 및/또는 기능성 서열(예컨대, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 랜덤 N-mer 또는 표적화된 N-mer)을 포함한다. 혼합물은 적어도, 1개 이하의 바코딩된 비드를 포함하는 구획의 서브세트와 함께 복수 개의 구획으로 구획화될 수 있다. 구획 내에서, 바코드는 본원에 기술된 유형의 유리를 비롯한, 임의의 적합한 경로를 사용하여 비드로부터 유리될 수 있다. 바코딩된 비드의 라이브러리는 본원 어디에나 기술되어 있는 방법 및 조성물을 사용하는 것을 비롯한, 임의의 적합한 경로를 통해 생성될 수 있다. 일부 경우에서, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 핵산 샘플은 바코딩된 비드의 라이브러리와 조합될 수 있고/거나, 생성된 혼합물은 미세유체 디바이스의 지원으로 구획화될 수 있다. 유리된 바코드가 또한 프라이머 서열(예컨대, 본원 어디에나 기술되어 있는 표적화된 N-mer 또는 랜덤 N-mer)을 포함하는 경우, 바코

드의 프라이머 서열은 샘플 핵산과 하이브리드화할 수 있고, 원하는 경우, 증폭 반응은 구획에서 완료될 수 있다.

[0411] **폴리뉴클레오티드 서열분석**

[0412] 일반적으로, 본원에서 제공하는 방법 및 조성물은 하류 적용, 예컨대, 서열분석을 위한 올리고뉴클레오티드 단편을 제조하는 데 유용하다. 특히, 본 방법, 조성물 및 시스템은 서열분석용 라이브러리를 제조하는 데 유용하다. 서열분석은 임의의 이용가능한 기법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 서열분석은 고전적인 생거(Sanger) 서열분석 방법에 의해 수행될 수 있다. 서열분석 방법은 또한 고처리 량 서열분석, 파이로시퀀싱, 결정에 의한 서열분석, 합성에 의한 서열분석, 하이브리드화에 의한 서열분석, RNA-Seq(일루미나), 디지털 진 익스프레션(Digital Gene Expression)(헬리코스(Helicos)), 차세대 서열분석, 합성에 의한 단일 분자 서열분석(SMSS: single molecule sequencing by synthesis)(헬리코스), 대량 병렬 서열분석, 클론 단일 분자 어레이(솔렉사(Solexa)), 샷건 서열분석, 맥심-길버트 서열분석, 프라이머 워킹, 및 당업계에 공지되어 있는 임의의 다른 서열분석 방법을 포함할 수 있다.

[0413] 예를 들어, 복수 개의 표적 핵산 서열은 복수 개의 표적 핵산 서열을 제공하고, 표적 핵산 서열을 복수 개의 별개의 구획으로 분리함으로써 서열분석될 수 있다. 각각의 별개의 구획은 하나 이상의 표적 핵산 서열 및 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 별개의 구획은 임의의 적합한 개수의 상이한 바코드 서열(예컨대, 1000개 이상의 상이한 바코드 서열, 10000개 이상의 상이한 바코드 서열, 100000개 이상의 상이한 바코드 서열, 1000000개 이상의 상이한 바코드 서열, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 임의의 다른 개수의 상이한 바코드 서열)을 포함할 수 있다. 또한, 주어진 구획 내의 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있다. 주어진 구획 내의 올리고뉴클레오티드 및 결합된 공통 바코드 서열은 주어진 구획 내의 하나 이상의 표적 핵산의 단편에, 또는 표적 핵산 서열의 일부의 카피에 부착될 수 있다. 부착 후, 이어서, 별개의 구획은 풀링될 수 있다. 이어서, 표적 핵산의 단편, 또는 표적 핵산의 일부의 카피 및 부착된 바코드 서열은 서열분석될 수 있다.

[0414] 또 다른 일례에서, 복수 개의 표적 핵산 서열은 표적 핵산 서열을 제공하고, 그를 복수 개의 별개의 구획으로 분리함으로써 서열분석될 수 있다. 복수 개의 별개의 구획의 각 구획은 표적 핵산 서열 및 복수 개의 부착된 올리고뉴클레오티드를 가지는 비드 중 하나 이상의 것을 포함할 수 있다. 주어진 비드에 부착된 올리고뉴클레오티드는 공통 바코드 서열을 포함할 수 있다. 비드와 결합된 올리고뉴클레오티드는 주어진 구획 내에서 표적 핵산 서열의 단편 또는 표적 핵산 서열의 일부의 카피에 부착될 수 있고, 이로써, 주어진 구획의 단편 또는 카피 또한 비드와 결합된 공통 바코드 서열에 부착된다. 올리고뉴클레오티드의 표적 핵산 서열의 단편 또는 표적 핵산 서열의 일부의 카피에의 부착 후, 이어서, 별개의 구획은 풀링될 수 있다. 이어서, 표적 핵산 서열의 단편, 또는 표적 핵산 서열의 일부의 카피 및 부착된 바코드 서열은 (예컨대, 본원 어디에나 기술되어 있는 것을 비롯한, 임의의 적합한 서열분석 방법을 사용하여) 서열분석될 수 있으며, 이로써, 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열을 제공할 수 있다. 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열은 부분적으로는 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열의 바코드 부분에 기초하여 하나 이상의 연속된 핵산 서열로 조립될 수 있다.

[0415] 일부 경우에서, 다양한 개수의 바코딩된 올리고뉴클레오티드가 서열분석된다. 예를 들어, 일부 경우에서, 약 30%-90%의 바코딩된 올리고뉴클레오티드가 서열분석된다. 일부 경우에서, 약 35%-85%, 40%-80%, 45%-75%, 55%-65%, 또는 50%-60%의 바코딩된 올리고뉴클레오티드가 서열분석된다. 일부 경우에서, 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 이상의 바코딩된 올리고뉴클레오티드가 서열분석된다. 일부 경우에서, 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 미만의 바코딩된 올리고뉴클레오티드가 서열분석된다.

[0416] 일부 경우에서, 단편으로부터의 서열은 조립되어 개별 서열 리드보다 더 장쇄일 수 있는 원래의 표적 폴리뉴클레오티드의 연속된 영역에 대한 서열 정보를 제공한다. 개별 서열 리드의 길이는 약 10-50, 50-100, 100-200, 200-300, 300-400개 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 서열 조립 방법의 예는 본원과 함께 동일자에 출원되는 미국 가특허 출원 번호 \_\_\_\_\_ (대리인 목록 번호 43487-729.101)에 기술되어 있는 것을 포함한다.

[0417] 바코드 아이덴티티가 개별 단편으로부터 서열 리드를 순서대로 정돈하는 역할을 할 뿐만 아니라, 일배체형을 서로 식별하는 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 유체 액적내 바코딩된 비드 및 개별 샘플 단편을 조합할 때, 부계 폴리뉴클레오티드 단편은 상이한 액적으로 분리될 수 있다. 유체 액적 및 액적내 비드 개수가 증가함에 따라, 동일한 비드와 결합된 동일한 유체 액적 내에 함유되어 있는 모계 및 부계 일배체형, 둘 모두로부터의 단편일 가능성은 무시할 수 있을 정도로 작을 수 있다. 따라서, 동일한 구획 내의 단편들로부터의 서열 리드를 조립하여 순서대로 정돈할 수 있다.

- [0418] 1 이상의 일례에서, 본 개시내용은 서열 조립 및 리드 길이 증가물, 둘 모두에서 수많은 이점을 제공하는 데 유용하고, 그를 수행하는 데 있어 매우 높은 고처리량으로 수행하고, 샘플 제조 시간 및 비용은 감축된 핵산 서열 분석 방법, 시스템 조성물, 및 그의 조합을 제공한다.
- [0419] 일반적으로, 본원에 기술된 서열분석 방법은 유전자 서열의 단편이 국제화된 태깅 또는 바코딩을 제공한다. 더 큰 유전자 서열 내의 동일 위치로부터 유래된 단편을 태깅함으로써 상기 언급된 바와 같이 태그 또는 바코딩의 존재를 이용하여 조립 공정을 알리는 데 사용될 수 있다. 추가로, 본원에 기술된 방법은 단일의 긴 핵산 분자로부터 더 짧은 단편을 생성하고 바코딩하는 데 사용될 수 있다. 상기의 더 짧은 단편의 서열분석 및 조립은 낮은 처리량의 더욱 긴 리드 길이 서열분석 기술을 필요로 하지 않으면서, 긴 리드 증가 서열을 제공한다.
- [0420] 도 39는 예시적인 서열분석 방법을 개략적으로 도시한 것이다. 제시된 바와 같이, 예를 들어, 염색체 또는 다른 큰 핵산 분자를 포함할 수 있는 제1 유전자 성분(3902)은 예컨대, 단편(3904) 및 (3906)을 비롯한, 큰 제1 핵산 단편의 세트로부터 단편으로 단편화된다. 큰 유전자 성분의 단편은 비중복성 또는 중복성일 수 있고, 일부 경우에서, 더욱 큰 성분의 서열을 고신뢰도로 조립하기 위하여 수배 중복 단편을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 더욱 큰 유전자 성분의 단편은 1X, 2X, 5X, 10X, 20X, 40X 이상의 커버리지의 더욱 큰 유전자 성분을 제공한다.
- [0421] 이어서, 제1 단편(3904) 중 하나 이상을 가공 처리하여 제1 단편(들)의 제2 단편의 중복 세트, 예컨대, 제2 단편 세트(3908) 및 (3910)를 별개로 제공한다. 상기 가공 처리는 또한 특정 제1 단편으로부터 유래된 각각의 제2 단편에 대하여 동일한 바코드 서열을 제2 단편에 제공한다. 제시된 바와 같이, 제2 단편 세트(3908)에 대한 바코드 서열은 "1"로 표시되는 반면, 단편 세트(3910)에 대한 바코드 서열은 "2"로 표시된다. 다양한 바코드 라이브러리를 사용하여 다수의 상이한 단편 세트를 차별적으로 바코딩할 수 있다. 그러나, 상이한 제1 단편으로부터 유래된 모든 제2 단편 세트를 상이한 바코드 서열로 바코딩해야 할 필요는 없다. 실제로, 다수의 경우에서, 동일한 바코드 서열을 포함하도록 다중의 상이한 제1 단편을 동시에 가공 처리할 수 있다. 다양한 바코드 라이브러리는 본원 어디에나 상세하게 기술되어 있다.
- [0422] 이어서, 예컨대, 단편 세트(3908) 및 (3910)으로부터의 바코딩된 단편을 서열분석을 위해 풀링할 수 있다. 일단 서열분석하고 나면, 서열 리드(3912)를 적어도 부분적으로는 포함된 바코드에 기초하여, 및 임의적으로, 및 바람직하게, 부분적으로는 단편 그 자체의 서열에 기초하여 예컨대, 집합화된 리드(3914) 및 (3916)에 제시된 바와 같이, 그의 각 단편 세트에 귀속시킬 수 있다. 이어서, 각 단편 세트에 대해 귀속된 서열 리드를 조립하여 제1 단편에 대해 조립된 서열, 예컨대, 단편 서열(3918) 및 (3920)을 수득하고, 최종적으로 이는 더욱 큰 유전자 성분의 서열(3922)로 조립될 수 있다.
- [0423] 상기 내용에 따라, 큰 유전자 성분, 예컨대, 긴 핵산 단편, 예컨대, 길이가 1, 10, 20, 40, 50, 75, 100, 1000 kb 이상인 것, 염색체 단편 또는 전체 염색체, 또는 전체 게놈(예컨대, 게놈 DNA)의 일부를 더 작은 제1 단편으로 단편화한다. 전형적으로, 상기 단편의 길이는 어디에서든 약 1000 내지 약 100000개의 염기 길이일 수 있다. 특정 바람직한 측면에서, 단편은 약 1 kb 내지 약 100 kb, 또는 약 5 kb 내지 약 50 kb, 또는 약 10kb 내지 약 30 kb일 것이고, 일부 경우에서는, 약 15 kb 내지 약 25 kb일 것이다. 상기의 더욱 큰 유전자 성분의 단편화는 상업적으로 이용가능한 전단 기반 단편화 시스템, 예컨대, 코바리스 단편화 시스템, 크기 표적화된 단편화 시스템, 예컨대, 블루 피핀(Blue Pippin)(세이지 사이언시즈(Sage Sciences)), 효액적 단편화 공정, 예컨대, 제한 엔도뉴클레아제를 이용하는 것 등을 비롯한, 임의의 다양한 편리한 이용가능한 공정에 의해 수행할 수 있다. 상기 언급된 바와 같이, 더욱 큰 유전자 성분의 제1 단편은 중복 또는 비중복 제1 단편을 포함할 수 있다. 비록 본원에는 구획화 이전에 단편화되는 것으로 기술되어 있지만, 단편화는 서열분석 적용을 위해 바람직한 크기의 단편을 수득하기 위하여 임의적으로 및/또는 추가로 본 공정에서 추후에, 예컨대, 하나 이상의 증폭 단편 이후에 수행할 수 있다.
- [0424] 바람직한 측면에서, 제1 단편은 더욱 큰 유전자 성분 또는 그의 일부의 다중 카피로부터 생성되며, 이로써, 중복 제1 단편이 제조된다. 바람직한 측면에서, 중복 단편은 1X 초과, 2X 초과, 5X 초과, 10X 초과, 20X 초과, 40X 초과 또는 그보다 더욱 큰 커버리지의 기초 더욱 큰 유전자 성분 또는 그의 일부를 구성할 것이다. 이어서, 제1 단편은 상이한 반응 부피로 분리된다. 일부 경우에서, 제1 단편은 반응 부피가 1개 이하의 제1 단편을 포함하는 분리될 수 있다. 이는 전형적으로는 용액 중에 제한 희석으로 단편을 제공함으로써 용액을 상이한 반응 부피에 할당함에 따라 극도로 낮은 확률로 1개 초과, 단편이 주어진 반응 부피에 증착될 수 있도록 함으로써 달성된다. 그러나, 다수의 경우에서, 주어진 반응 부피는 다중의 상이한 제1 단편을 포함할 수 있고, 주어진 반응 부피에 심지어는 2, 5, 10, 100, 100개 또

는 심지어는 최대 10000개 이상의 상이한 제1 단편을 가질 수 있다. 또한, 개별 반응 부피 내에 단편을 원하는 개수 범위로 달성하는 것은 전형적으로는 상기 출발 물질 중 핵산 농도에 대한 이해에 기초하여 제1 단편의 기원이 되는 용액의 적절한 희석을 통해 이루어질 수 있다.

[0425] 반응 부피는 각종의 상이한 유형의 베셀 또는 구획 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 반응 부피는 종래 반응 베셀, 예컨대, 시험관, 반응 웰, 마이크로웰, 나노웰을 포함할 수 있거나, 또는 덜 전통적인 반응 부피, 예컨대, 안정화된 에멀전 내의 액적, 예컨대, 오일 에멀전 시스템 중 물을 포함할 수 있다. 바람직한 측면에서, 액적은 예컨대, 단일 용기 내에서 수십, 수백, 수천만 개, 또는 심지어 그 초과와 개별 액적/반응 부피를 사용할 수 있도록 하는 것처럼, 그가 극도로 고도한 다중 능력을 가지고 있다는 점에서 반응 부피로서 바람직하다. 이어서, 각 반응 부피 내에서, 그 안에 함유되어 있는 단편은 각 제1 단편의 중복 제2 단편의 세트를 유도하고, 또한 제2 단편에 부착된 바코드 서열을 제공하는 가공 처리를 거치게 된다. 이해할 수 있는 바와 같이, 바람직한 측면에서, 제1 단편은 제2 단편을 생성하고, 바코딩하는 데 사용되는 바코드 라이브러리의 구성원을 포함하는 하나 이상의 마이크로캡슐 또는 비드 를 함유하는 액적으로 구획화된다.

[0426] 바람직한 측면에서, 상기 제2 단편을 생성하는 것은 바코드 서열을 포함하고, 제1 단편의 일부에 하이브리드화할 수 있고, 제1 단편을 따라 연장되는 프라이머 서열을 도입하여 바코드 서열을 포함하는 제2 단편을 제공하는 것을 통해 수행된다. 상기 프라이머는 표적화된 프라이머 서열, 예컨대, 제1 단편의 특정 일부분과 중복되는 단편을 유도할 수 있는 것을 포함할 수 있거나, 또는 제1 단편의 다중의 상이한 영역을 프라이밍하여 제1 단편에 걸쳐 있고, 수배 중복 커버리지를 제공하는 제2 단편의 크고 다양한 세트를 생성할 수 있는 범용 프라이밍 서열, 예컨대, 랜덤 프라이머를 포함할 수 있다. 이러한 연장된 프라이머 서열은 제2 단편으로 사용될 수 있거나, 또는 추가로 복제 또는 증폭될 수 있다. 예를 들어, 바코딩된 올리고뉴클레오티드를 함유하는 동일한 프라이머를 사용하여 연장된 서열에 대해 반복적으로 프라이밍할 수 있다. 특정 바람직한 측면에서, 예컨대, 단편의 제2 세트를 생성하면, 본원에 기술된 바와 같이, 각각이 본원에 기술된 바와 같은 PHASE 증폭을 위해 바코드를 포함한다 제1 단편의 일부의 부분 헤어핀 복제물이 생성된다. 본원 어디에나 언급되어 있는 바와 같이, 부분 헤어핀 형성은 일반적으로 복제된 가닥의 재프라이밍, 예컨대, 카피의 카피가 제조되는 것을 막기 위해 바람직하다. 따라서, 부분 헤어핀은 전형적으로 증폭 생성물에서의 프라이머 어닐링과 비교하여 어닐링 동안 증폭 생성물로부터 우선적으로 형성되고, 예컨대, 예컨대, 헤어핀은 프라이머 생성물 쌍보다 더 높은 Tm을 가지게 될 것이다.

[0427] 제2 단편은 일반적으로 후속되는 서열분석에 적합한 길이인 것으로 선택된다. 짧은 리드 서열분석 기술을 위해, 바코드 서열 세그먼트, 및 서열분석 공정을 거치는 기능성 서열을 포함하는, 상기 단편의 길이는 전형적으로 약 50개의 염기 내지 약 1000개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 900개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 800개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 700개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 600개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 500개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 400개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 300개의 염기의 서열분석가능한 길이, 약 50개의 염기 내지 약 250개의 염기의 서열분석가능한 길이, 또는 약 50개의 염기 내지 약 100개의 염기의 서열분석가능한 길이가 될 것이다.

[0428] 일단 중복화되고 나면, 바코딩된 제2 단편 세트가 생성되고, 이를 후속 가공 처리를 위해 풀링할 수 있고, 최종적으로는 서열분석할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에서, 이어서, 바코딩된 단편을 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 추가의 증폭, 예컨대, PCR 증폭시킬 수 있다. 유사하게, 서열분석 공정에서 사용하기 위한 추가의 기능성 서열을 제공하면서, 상기 단편에 추가로 또는 동시에, 바코딩된 단편의 집합의 유래 기점이 되는 샘플을 확인하기 위해 샘플 인덱스 서열을 제공할 수 있다.

[0429] 추가로, 예컨대, 다른 불순물로부터 핵산 성분을 정제하거나, 서열분석을 위해 단편 세트를 크기 선별하는 등의 정화 단계 또한 임의적으로 수행할 수 있다. 상기 정화 단계는 SPRI 비드(예컨대, 베크만 쿨터 인크.(Beckman Coulter, Inc.)로부터 이용가능한 앰퓨어(Ampure)® 비드) 상에서의 크기 선별 및/또는 정제를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 다중 공정 단계는 문헌 [ Fisher et al, Genome Biol. 2011;12(1):R1 (E-pub Jan 4, 2011)](상기 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에서 참고로 포함된다)에 기술되어 있는 바와 같이, 단편을 SPRI 비드에 결합시키면서, 통합 공정으로 수행될 수 있다.

[0430] 앞서 언급된 바와 같이, 다수의 경우에서, 제2 단편 세트에 대한 서열 정보를 제공하는 데 짧은 리드 서열분석 기술이 사용된다. 따라서, 바람직한 측면에서, 제2 단편 세트는 전형적으로, 바코드 서열을 포함할 경우, 사용

되는 서열분석 시스템의 리드 길이 범위 내에 포함되는 단편을 포함한다. 예를 들어, 일루미나 HiSeq® 서열분석을 위해, 상기 단편이 쌍을 이룬 단부의 서열분석을 수행할 경우, 그 길이는 일반적으로 약 100개의 염기 내지 약 200개의 염기 길이 범위가 될 것이다. 일부 경우에서, 서열분석 공정에 의해 단편의 말단부만을 이용할 때에는 더욱 긴 제2 단편이 서열분석될 수 있다.

[0431] 도 39를 참조로 하여 상기 언급된 바와 같이, 이어서, 다양한 제2 단편에 대한 서열 리드를 부분적으로는 특정 바코드 서열의 존재에 기초하여, 및 일부 경우에서, 부분적으로는 단편의 실제 서열에 기초하여, 즉, 바코드가 아닌, 단편 서열의 일부에 기초하여 그의 각 출발 핵산 세그먼트로 귀속된다. 이해할 수 있는 바와 같이, 짧은 서열 데이터에 기초함에도 불구하고, 동일한 바코드를 공유하는 두 서열은 동일한 더욱 긴 제1 단편 서열로부터 기원하는 것일 수 있으며, 특히, 상기 서열이 다르게는 예컨대, 공통 바코드를 포함하는 다른 중복 서열을 사용하여 연속된 서열 세그먼트로 조립가능할 경우에 그러할 가능성이 있다고 추론할 수 있다. 일단 제1 단편이 조립되고 나면, 이는 더욱 큰 서열 세그먼트, 예컨대, 전장의 유전자 성분으로 조립될 수 있다.

[0432] 한 예시적인 공정에서, 하나 이상의 주형 핵산 서열의 하나 이상의 단편은 본원에 기술된 방법을 사용하여 바코딩될 수 있다. 하나 이상의 단편의 단편은 적어도 부분적으로는 그에 부착된 핵산 바코드 서열에 기초하여 특징 규명될 수 있다. 단편의 특징 규명은 또한 단편을 그의 각 주형 핵산 서열 또는 주형 핵산 서열의 유래된 개념에 대해 지도화하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 특징 규명은 또한 개별 핵산 바코드 서열 및 그에 부착된 주형 핵산 서열의 단편의 서열을 확인하는 것을 포함할 수 있다.

[0433] 일부 경우에서, 본원에 기술된 서열분석 방법은 핵산 세그먼트 또는 표적 핵산을 특징 규명하는 데 유용할 수 있다. 일부 예시적인 방법에서, 핵산 세그먼트는 핵산 세그먼트 및 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 (예컨대, 본원에 기술된 임의의 적합한 유형의 비드를 비롯한) 비드를 (예컨대, 본원에 기술된 임의의 적합한 유형의 구획, 예컨대 액적을 비롯한) 구획으로 함께 공동 구획함으로써 특징 규명될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 비드에 유리가능하게 부착될 수 있고/거나(예컨대, 비드에 자극, 예컨대, 열 자극, 광 자극, 및 화학적 자극을 가하였을 때, 비드로부터 유리가능할 수 있고/거나), 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 하나 이상의 기능성 서열(예컨대, 프라이머 서열, 프라이머 어닐링 서열, 고정화 서열, 임의의 다른 적합한 기능성 서열 본원 어디에나 기술되어 있는 등) 및/또는 하나 이상의 서열분석 프라이머 서열을 포함할 수 있다. 또한, 임의의 적합한 개수의 올리고뉴클레오티드가 비드에 부착될 수 있고, 예를 들면, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 개수의 올리고뉴클레오티드가 비드에 부착될 수 있다.

[0434] 구획 내에서, 올리고뉴클레오티드는 핵산 세그먼트의 단편에, 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착될 수 있고, 이로써, 단편 또는 카피는 또한 공통 핵산 바코드 서열에 부착된다. 단편은 핵산 세그먼트의 중복 단편일 수 있고, 예를 들어, 2X 초과의 커버리지, 5X 초과의 커버리지, 10X 초과의 커버리지, 20X 초과의 커버리지, 40X 초과의 커버리지 또는 그보다 더욱 큰 커버리지의 핵산 세그먼트를 제공할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 핵산 세그먼트의 일부 또는 그의 상보체와 어닐링할 수 있는 프라이머 서열을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드의 프라이머 서열을 연장시켜 핵산 세그먼트의 적어도 일부 또는 그의 상보체를 연장시킴으로써 부착될 수 있고, 이로써, 올리고뉴클레오티드, 및 따라서, 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 핵산 세그먼트의 적어도 일부의 카피를 제조할 수 있다.

[0435] 올리고뉴클레오티드를 핵산 세그먼트의 단편에 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착시킨 후, 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피 및 부착된 올리고뉴클레오티드 (올리고뉴클레오티드의 바코드 서열 포함)를 본원에 기술된 임의의 유형의 서열분석 분석을 비롯한, 임의의 적합한 서열분석 방법을 통해 서열분석함으로써 복수 개의 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열을 제공할 수 있다. 서열분석 후, 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피는 적어도 부분적으로 공통 핵산 바코드 서열에 그의 부착에 기초하여 핵산 세그먼트 내에서 연결되어 있는 것으로 특징 규명될 수 있다. 이해할 수 있는 바와 같이, 특징 규명은 연결된 것으로 및 연속된 것으로 특징 규명된 서열 뿐만 아니라, 연속된 서열이 아닌, 동일한 단편 내에서 연결될 수 있는 서열을 포함할 수 있다. 또한, 서열분석 동안 생성된 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열은 적어도 부분적으로는 공통 핵산 바코드 서열 및/또는 바코드가 아닌, 바코딩된 단편 서열 또는 바코딩된 카피 서열의 일부에 기초하여 하나 이상의 연속된 핵산 서열로 조립될 수 있다.

[0436] 일부 경우에서, 복수 개의 핵산 세그먼트 (예컨대, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 개념의 적어도 일부의 단편)는 복수 개의 별개의 구획에서 복수 개의 상이한 비드와 함께 공동 구획화될 수 있고, 이로써, 별개의 구획의 복수 개의 상이한 구획의 각 구획은 단일 비드를 함유하게 된다. 복수 개의 상이한 비드는 복수 개의

상이한 바코드 서열(예컨대, 1000개 이상의 상이한 바코드 서열, 10000개 이상의 상이한 바코드 서열, 100000개 이상의 상이한 바코드 서열, 1000000개 이상의 상이한 바코드 서열, 또는 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같은 임의의 다른 개수의 상이한 바코드 서열)을 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 복수 개의 별개의 구획 중 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상의 복수 개의 별개의 구획은 동일한 바코드 서열을 포함하는 비드를 포함할 수 있다. 일부 경우에서, 0.01%, 0.1%, 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99% 이상의 별개의 구획은 동일한 바코드 서열을 가지는 비드를 포함할 수 있다. 또한, 각 비드는 공통 핵산 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 부착된 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0437] 공동 구획화 후, 바코드 서열을 각 구획에서 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피에 부착시킬 수 있다. 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피를 별개의 구획으로 풀링할 수 있다. 풀링 후, 핵산 세그먼트의 단편 또는 핵산 세그먼트의 일부의 카피 및 임의의 결합된 바코드 서열을 (예컨대, 본원에 기술된 것을 비롯한, 임의의 적합한 서열분석 방법을 사용하여) 서열분석하여 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피를 제공할 수 있다. 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피는 적어도 부분적으로는 공통 바코드 서열을 포함하는 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피에 기초하여 공통 핵산 세그먼트로부터 유래된 것으로 특징 규명될 수 있다. 또한, 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피로부터 수득된 서열은 조립되어 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피의 기원이 되는 서열(예컨대, 게놈의 적어도 일부)의 연속된 서열을 제공할 수 있다. 서열분석된 단편 또는 서열분석된 카피로부터의 서열 조립은 적어도 부분적으로는 서열분석된 단편의 뉴클레오티드 서열 및 서열분석된 단편의 공통 바코드 서열 각각의 것에 기초하여 완성될 수 있다.

[0438] 또 다른 예시적인 방법에서, 표적 핵산은 표적 핵산의 단편을 복수 개의 액적으로 구획화함으로써 특징 규명될 수 있다. 각 액적은 공통 바코드 서열을 포함하는 복수 개의 올리고뉴클레오티드에 부착된 비드를 포함할 수 있다. 공통 바코드 서열은 액적에서 표적 핵산의 단편의 단편에 부착될 수 있다. 이어서, 액적을 풀링시키고, 풀링된 액적의 단편 및 결합된 바코드 서열을 본원에 기술된 서열분석 방법을 비롯한 임의의 적합한 서열분석 방법을 사용하여 서열분석할 수 있다. 서열분석 후, 표적 핵산의 단편의 단편을 적어도 부분적으로 공통 바코드 서열을 포함하는 표적 핵산의 단편의 단편에 기초하여 표적 핵산의 단편에 대해 지도화할 수 있다.

[0439] 서열분석에서 본원에 기술된 방법, 조성물 및 시스템을 적용하는 것을 일반적으로 NGS 서열분석 기술을 비롯한, 임의의 다양한 상이한 서열분석 기술, 예컨대, 일루미나 MiSeq, HiSeq 및 X10 서열분석 시스템 뿐만 아니라, 라이프 테크놀로지즈 인크.(Life Technologies, Inc.)로부터 이용가능한 서열분석 시스템, 예컨대, 이온 토렌트 계열의 서열분석 시스템에 적용될 수 있다. 바코드 서열에 의해 논의하고는 있지만, 예컨대, 서열분석 오류의 원인이 될 수 있기 때문에, 서열분석된 바코드 서열은 포함되어 있는 전체 바코드 서열을 포함하지 않을 수 있다는 것을 이해할 것이다. 따라서, 두 바코드 서열이 동일한 바코드 서열인 것으로 특징 규명되었다라고 언급할 때, 이는 예컨대, 5, 4, 3, 2개 미만 또는 심지어는 1개의 염기에 따라 다른, 바코드 서열의 상당부를 인식하는 것에 기초하는 것일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0440] **소수의 세포로부터의 서열분석**

[0441] 본원에서 제공하는 방법은 또한 세포 특이 정보를 수득할 수 있는 방식으로 세포 내에 함유되어 있는 폴리뉴클레오티드를 제조하는 데 사용될 수 있다. 본 방법을 통해 극소수의 샘플로부터, 예컨대, 약 10-100개의 세포를 포함하는 샘플로부터 유전적 변이를 검출할 수 있다. 일부 경우에서, 약 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 세포가 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있다. 일부 경우에서, 적어도 약 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 세포가 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있다. 다른 경우에서, 최대 약 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100개의 세포가 본원에 기술된 방법에서 사용될 수 있다.

[0442] 일례에서, 방법은 1개 이하의 세포(또는 한 세포의 추출물)가 한 구획, 예컨대, 유체 액적 내에 존재하고, 예컨대, 상기 기술된 바와 같이, 바코드 올리고뉴클레오티드와 함께 공동 구획화되도록 세포성 샘플(또는 조 세포 추출물)을 구획화하는 것을 포함할 수 있다. 이어서, 가공 처리는 세포를 용해시키고, 세포 내에 함유되어 있는 폴리뉴클레오티드를 단편화하고, 단편화된 폴리뉴클레오티드를 바코딩된 비드에 부착시키고, 바코딩된 비드를 풀링시키고, 생성된 바코딩된 핵산 단편을 서열분석하는 것을 포함한다.

[0443] 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이, 바코드 및 다른 시약은 비드(예컨대, 겔 비드) 내에 캡슐화되거나, 그 위에 코팅되거나, 그와 결합되거나, 또는 그 안에 분산될 수 있다. 비드는 샘플(예컨대, 세포) 로딩과 동시에 유체 액적 내로 로딩될 수 있으며, 이로써, 각 세포는 상이한 비드와 접촉하게 된다. 이러한 기법은 고유 바코드를, 각 세포로부터 수득된 올리고뉴클레오티드에 부착시키는 데 사용될 수 있다. 이어서, 생성된 태깅된 올리

고뉴클레오티드를 풀링시키고, 서열분석하고, 바코드를 사용하여 올리고뉴클레오티드의 기원을 추적할 수 있다. 예를 들어, 동일한 바코드를 가지는 올리고뉴클레오티드는 동일한 세포로부터 기원한 것이라고 추정될 수 있는 반면, 상이한 바코드를 가지는 올리고뉴클레오티드는 상이한 세포로부터 기원한 것이라고 추정될 수 있다.

[0444] 본원에 기술된 방법을 사용하여 질환, 예컨대, 암의 존재를 시사할 수 있는 특이 유전자 돌연변이를 검출할 수 있다. 예를 들어, 결장 조직 샘플의 BRAF 유전자 중 V600 돌연변이가 존재하는 것으로 검출되었다면, 이는 결장암이 존재함을 시사하는 것일 수 있다. 다른 경우에서, 예후 적용은 특이 질환이 발생할 위험이 증가되어 있는 위험 인자로서의 역할을 할 수 있는 특이 유전자 또는 유전자들에서 돌연변이를 검출하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 유선 조직 샘플 중에 BRCA1 돌연변이가 존재하는 것으로 검출되었다면, 이는 유방암이 발생할 수 있는 위험 수준이 상기 돌연변이가 없는 인간에 비하여 더 높다는 것을 시사하는 것일 수 있다. 일부 예에서, 본 개시내용은 2개의 상이한 온코진(예컨대, KRAS 및 EGRF) 중의 돌연변이를 확인하는 방법을 제공한다. 동일한 세포가 두 돌연변이 모두를 가지는 유전자를 포함할 경우, 이는 더욱 진행성인 형태의 암임을 시사하는 것일 수 있다. 반대로, 돌연변이가 2개의 상이한 세포 위치한다면, 이는 암이 더욱 양성일 수 있거나, 또는 덜 진행성인 것일 수 있음을 시사하는 것일 수 있다.

[0445] **유전자 발현 분석**

[0446] 본 개시내용의 방법은 유전자 발현의 변화를 검출하기 위해 샘플을 가공 처리하는 데 적용될 수 있다. 샘플은 세포, mRNA, 또는 mRNA로부터 역전사된 cDNA를 포함할 수 있다. 샘플은 수개의 상이한 세포 또는 조직으로부터의 추출물을 포함하는 풀링된 샘플, 또는 단일 세포 또는 조직으로부터의 추출물을 포함하는 샘플일 수 있다.

[0447] 세포를 유체 액적에 직접 배치하고, 용해시킬 수 있다. 용해 후, 본 개시내용의 방법을 사용하여 세포의 올리고뉴클레오티드를 서열분석을 위해 단편화하고, 바코딩할 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 본 개시내용의 방법에서 사용되는 유체 액적 내로 도입시키기 이전에 세포로부터 추출될 수 있다. mRNA의 역전사는 본원에 기술된 유체 액적에서, 상기 유체 액적 밖에서 수행될 수 있다. cDNA의 서열분석은 시간 경과에 따라, 또는 특정 조건에의 노출 이후에 특정 세포 내의 특정 전사체의 존재를 나타낼 수 있다.

[0448] **세포 또는 단백질로부터의 폴리뉴클레오티드 구획화**

[0449] 일례에서, 본 개시내용에서 제공하는 조성물, 방법, 장치, 및 키트는 세포 또는 단백질을 유체 액적 내에 캡슐화하는 데 사용될 수 있다. 일례에서, 단일 세포 또는 복수 개의 세포(예컨대, 2, 10, 50, 100, 1000, 10000, 25000, 50000, 100000, 500000, 1000000개 이상 세포)를 유체 액적내 용해 완충제와 함께 비드 상에, 그 내부로 또는 그 안에서 로딩할 수 있고, 특정 기간 동안 인큐베이션시킬 수 있다. 비드는 다공성일 수 있고, 이로써, 유체 액적내 하나 이상의 세포의 폴리뉴클레오티드(예컨대, 염색체)를 유지시키면서, 비드 내용물을 세척할 수 있고, 시약을 비드 내로 도입할 수 있다. 이어서, 하나 이상의 세포의 캡슐화된 폴리뉴클레오티드(예컨대, 염색체)를 본 개시내용에서 제공하는 방법, 또는 당업계에 공지되어 있는 방법 중 임의의 것에 따라 가공 처리할 수 있다. 본 방법은 또한 임의의 다른 세포성 성분, 예컨대, 단백질에도 적용될 수 있다.

[0450] **후성적 적용**

[0451] 본 개시내용의 조성물, 방법, 장치, 및 키트는 후성적 적용에 유용할 수 있다. 예를 들어, DNA 메틸화는 단일 뉴클레오티드 다형성(SNP: single nucleotide polymorphism)을 비롯한, 후성적 유전의 지표에 존재할 수 있다. 따라서, 서열분석 동안 메틸화된 염기를 측정하기 위해 핵산을 포함하는 샘플을 처리할 수 있다. 일부 경우에서, 바코딩되는 핵산을 포함하는 샘플을 2개의 분취물로 분할할 수 있다. 메틸화되지 않은 시토신 함유 뉴클레오티드를 우라실 함유 뉴클레오티드로 전환시키기 위해, 한 샘플 분취물을 비술피이트로 처리할 수 있다. 일부 경우에서, 비술피이트 처리는 샘플 구획화 이전에 이루어질 수 있거나, 또는 샘플 구획화 이후에 이루어질 수 있다. 이어서, 본원에 기술된 바와 같이 각 분취물(이미 구획화되지 않았다면) 구획화할 수 있고, 구획에서 바코딩하고, 추가의 서열을 별크로 첨가하여 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물을 생성할 수 있다. 각 분취물(예컨대, 비술피이트 처리된 샘플 대 비처리 샘플)에 대해 수득된 서열분석 데이터 비교를 사용하여 샘플 핵산 중 어느 염기가 메틸화되었는지를 측정할 수 있다.

[0452] 일부 경우에서, 분할된 샘플 중 한 분취물을 메틸화 감응성 제한효소(MSRE: methylation-sensitive restriction enzyme)로 처리할 수 있다. 메틸화 특이 효소는 샘플 핵산이 메틸화 부위로서 절단되도록 샘플 핵산을 가공 처리할 수 있다. 샘플 분취물 처리는 샘플 구획화 이전에 이루어질 수 있거나, 또는 샘플 구획화 이후에 이루어질 수 있고, 각 분취물을 구획화할 수 있고, 이를 사용하여 바코딩된, 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물을 생성할 수 있다. 각 분취물(예컨대, MSRE 처리된 샘플 대 비처리 샘플)에 대해 수득된 서열분석

데이터 비교를 사용하여 샘플 핵산 중 어느 염기가 메틸화되었는지를 측정할 수 있다.

[0453] **저유입 DNA 적용**

[0454] 본원에 기술된 조성물 및 방법은 저유입 폴리뉴클레오티드 적용의 분석 및 서열분석에서 유용할 수 있다. 본원에 기술된 방법, 예컨대, PHASE는 저유입 폴리뉴클레오티드 적용에서 우수한 데이터 품질을 수득하는 것을 지원할 수 있고/거나, 증폭 오류를 필터링하는 것을 지원할 수 있다. 이러한 저유입 DNA 적용은 관심의 대상이 되는 서열이 단지 소수 성분인 것인, 관련이 없거나, 관련성이 거의 없는 핵산들로 이루어진 혼합물 중에서 관심의 대상이 되는 특정 핵산 서열을 서열분석하고, 확인함으로써 상이한 핵산의 응집물 중에 존재하는 다중의 상이한 핵산을 개별적으로 서열분석하고, 확인할 수 있는 서열 분석 뿐만 아니라, 유입 DNA의 진단량이 극도로 낮은 분석을 포함한다. 구체적인 예로는 조직 샘플로부터, 순환 세포로부터 체세포 돌연변이를 서열분석하고 확인하는 것을 포함하며, 여기서, 샘플 대다수에는 정상적인 건강한 세포가 기여하지만, 소수는 종양 또는 다른 암 세포로부터 유래될 수 있다. 다른 예로는 예컨대, 마이크로바이옴 분석 적용에서 다중 개별 집단 성분의 특징 규명을 포함하며, 여기서, 개별 집단 구성원의 기여는 다르게는 미생물 요소로 이루어진 크고 다양한 집단 중에서는 쉽게 확인될 수 없다. 추가의 예에서, 상이한 염색체, 예컨대, 모계 및 부계 염색체로부터의 동일한 영역의 상이한 가닥을 개별적으로 서열분석하고 확인할 수 있음으로써 이를 통해 각 염색체 상의 고유한 변이체를 확인할 수 있다. 본원에 기술된 조성물, 방법, 및 시스템의 저유입 폴리뉴클레오티드 적용에 관한 예는 본원과 함께 동일자에 출원되는 미국 가특허 출원 번호 \_\_\_\_\_(대리인 목록 번호 43487-727.101)에 기재되어 있다.

[0455] 본원에 기술된 방법 및 시스템의 이점은 당업계의 최신 기술에서 직면한 문제들을 논의할 때 더욱 명백해진다. 샘플 재료, 예컨대, 세포 또는 조직 샘플의 유전적 구성 성분을 분석할 때, 대부분의 서열분석 기술은 서열분석 공정을 위해 충분한 물질을 생성하기 위하여 샘플에서의 표적 핵산의 광범위한 증폭에 의존한다. 불행하게도, 상기 증폭 공정 동안 다수로 존재하는 물질들은 더 낮은 수준으로 존재하는 샘플의 일부를 우선적으로 압도하게 될 것이다. 예를 들어, 샘플로부터의 유전 물질이 95%의 정상 조직 DNA, 및 5%의 종양 세포로부터의 DNA로 구성되는 경우, 전형적인 증폭 공정, 예컨대, PCR 기반 증폭은 소수로 존재하는 물질은 배제하고, 다수로 존재하는 물질들을 빠르게 증폭시킬 것이다. 추가로, 이러한 증폭 반응은 전형적으로는 풀링된 환경에서 수행되는 바, 특정 염색체, 폴리뉴클레오티드 또는 유기체 면에서, 증폭된 서열의 기원은 전형적으로는 공정 동안 보존되지 않을 것이다.

[0456] 이에 반해, 본원에 기술된 방법 및 시스템은 핵산 성분이 초기에 증폭될 수 있는 예컨대, 액적 증의 별개의 반응 부피로 개별 또는 소수의 핵산을 구획화한다. 이러한 초기 증폭 동안, 고유 식별자는 별개의 반응 부피 중에 존재하는 성분별로 그에 커플링될 수 있다. 상이한 성분의 별개의, 구획화된 증폭 뿐만 아니라, 고유 식별자, 예컨대, 바코드 서열의 적용을 통해 후속 증폭 공정, 예컨대, PCR 증폭을 비롯한 서열분석 공정을 거쳐 각 샘플 성분 뿐만 아니라, 그의 기원의 특징의 기여를 보존시킬 수 있다.

[0457] 본원 및 본 개시내용 전역에서 사용되는 바, "약"이라는 용어는 일반적으로 구체적인 사용 문맥 내에서 언급된 수치 값보다 15% 더 크거나 더 작은 범위를 지칭한다. 예를 들어, "약 10"은 8.5 내지 11.5의 범위를 포함할 것이다.

[0458] 이해할 수 있는 바와 같이, 본 개시내용은 본원에 기술된 다양한 적용, 용도, 및 목적을 비롯한, 특종 용도 또는 목적을 위한 본원에 기술된 조성물, 라이브러리, 방법, 장치, 및 키트 중 임의의 것의 용도를 제공한다. 예를 들어, 본 개시내용은 종을 구획화하는 데, 올리고뉴클레오티드를 구획화하는 데, 종의 구획으로부터의 자극 선택적 유리에서, 구획에서 반응(예컨대, 결합 및 증폭 반응)을 수행하는 데, 핵산 합성 반응을 수행하는 데, 핵산을 바코딩하는 데, 서열분석을 위한 폴리뉴클레오티드를 제조하는 데, 폴리뉴클레오티드를 서열분석하는 데, 폴리뉴클레오티드 페이지에서(예컨대, 본원과 함께 동일자에 출원되는 미국 가특허 출원 번호 \_\_\_\_\_(대리인 목록 번호 43487-726.101) 참조), 소수의 세포로부터의 폴리뉴클레오티드의 서열분석에서, 유전자 발현을 분석하는 데, 세포로부터의 폴리뉴클레오티드를 구획화하는 데, 돌연변이 검출에서, 신경계 장애 진단에서, 당뇨병 진단에서, 태아의 이수성 진단에서, 암 돌연변이 검출 및 법의학에서, 질환 검출에서, 의학적 진단에서, 저유입 핵산 적용에서, 예컨대, 순환 종양 세포(CTC: circulating tumor cell) 서열분석에서, 그의 조합에서, 및 본원에 기술된 임의의 다른 적용, 방법, 공정 또는 용도에 있어서의 본원에 기술된 조성물, 방법, 라이브러리, 장치, 및 키트의 용도를 제공한다.

[0459] 본원에서 제공하는 임의의 농도 값은 임의의 계내 전환, 변형, 반응, 격리에 상관없이 혼합물 농도 값으로 제공된다. 또한, 적절한 경우, 본원에 기술된 방법(예컨대, 서열분석 방법, 바코딩 방법, 증폭 방법, 표적화된 증폭 방법, 바코딩된 샘플을 분석하는 방법 등)의 감도 및/또는 특이성은 달라질 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된

방법의 특이성은 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 초과일 수 있고/거나, 감도는 50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 99.5% 초과일 수 있다.

[0460] X. 실시예

[0461] 실시예 1: 아크리다이트 프라이머로 작용화된 겔 비드 생성

[0462] 도 2에 예시된 방법에 따라 겔 비드를 제조한다. 뉴클레아제 무함유 물 중에서 1 mL 스톱 용액을 하기 농도로 제조한다: 아크릴아미드 전구체(화합물 A) = 40%(v/v) 스톱 용액, 가교제(비스-아크릴로일 시스타민 - 화합물 B) = 50:50의 아세트니트릴:물 믹스 중 3.19 mg/mL, 개시제 (화합물 C) = 20 mg/mL, 및 이황화 아크리다이트 프라이머(화합물 D) = 1 mM. 하기 부피: 뉴클레아제 무함유 물 = 648  $\mu$ l, 화합물 A = 150  $\mu$ l, 화합물 B = 100  $\mu$ l, 화합물 C = 100  $\mu$ l, 및 화합물 D = 2  $\mu$ l를 혼합하여 상기 스톱 용액으로부터 1 mL의 수성 겔 비드(GB: Gel Bead) 작업용 용액을 제조한다. 화합물 A 및 B 및 GB 작업용 용액의 스톱 용액을 매일 제조한다.

[0463] 겔 비드 (GB) 작업용 용액(201)은 가교제인 BAC, 및 0.1 내지 약 100  $\mu$ m 농도의 이황화 변형된 아크리다이트 올리고뉴클레오티드를 포함하는 중합체 전구체 용액을 포함하는 수성 유체이다. 제2 유체(202)는 계면활성제인 크라이톡스 FSH 1.8% w/w HFE 7500을 함유하는 불소화된 오일이다. 촉진제인 테트라메틸에틸렌디아민(TEMED)을 a) 액적 생성 이전에 오일에 첨가하고/거나(203), b) 액적 생성 이후에 라인에 첨가하고/거나(205), c) 액적 생성 이후에 배출 저장소에 첨가하여(206) 1%(v/v)의 최종 농도를 수득한다. TEMED는 매일 새로 제조한다. 수성상 및 오일상 유체를 액적 발생기로 이송하여 겔 비드를 생성한다(204). 중합은 액적 생성 후 즉시 개시되고, 이는 계속해서 배출 웰로 이어진다. 15-20분 후 겔화는 완료된 것으로 간주된다. 겔화 후, 생성된 겔 비드를 HFE 7500 중에서 세척하여 과량이 오일을 제거하고, 비드를 수용액 중에 재현탁시켜 연속상 교환을 수행한다(207). 일부 경우에서, 생성된 비드는 응집체로 존재할 수 있다. 겔 비드의 응집체는 와동시 개별 겔 비드로 분리된다. 겔 비드를 현미경하에서 시각화된다.

[0464] 실시예 2: 제한 희석에 의한 바코딩된 겔 비드 생성

[0465] 도 3a 및 도 4에 예시된 방법에 따라 제한 희석에 의해 작용화된 겔 비드를 제조한다. (이황화 변형을 포함하거나, 포함하지 않는) 아크리다이트 올리고뉴클레오티드를 포함하는 겔 비드(301), (401)을 제한 희석으로 바코드 함유 주형 서열(302)와 혼합한다. 비오틴 표지화된 리드 프라이머(406)을 포함하는 PCR 시약(303)을 겔 비드 및 주형 서열(304)과 혼합한다. 비드, 바코드 주형, 및 PCR 시약을 진탕/교반, 유동 포커싱, 또는 마이크로시브에 의해 겔-수-유 에멀전으로 유화(305)시킴에 따라 바람직하게는 1개 이하의 바코드 주형이 에멀전 내의 구획(예컨대, 액적)에 존재하게 된다. 에멀전을 하나 이상의 써모사이클에 노출시킨다(306). 1차 써모사이클을 통해 상보체 바코드 서열(408)이 도입되고, 이는 겔 비드 상에 고정화된다.

[0466] 바코드 서열을 함유하는 비드를 그를 함유하지 않는 것으로부터 분류하는 하류 단계를 위해 계속 써모사이클링을 수행하여 겔 비드 전역에 걸쳐 바코드를 클론에 의해 증폭시키고, 5' 비오틴 표지화된 프라이머를 상보성 가닥으로 도입한다. 플루오로테카놀을 첨가하고, 오일을 제거하고, HFE-7500으로 세척하고, 수성 완충제를 첨가하고, 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 원치 않는 생성물(예컨대, 프라이머 이량체, 출발 물질, 데옥시뉴클레오티드 트리포스페이트 (dNTP), 효소 등)을 제거하고, 분해성 겔 비드를 수성 현탁액으로 회수함으로써 에멀전을 분해시킨다(307). 작용화된 겔 비드를 고염 완충제 중에 재현탁시킨다(308). 스트렙트아비딘 표지화된 자기 비드를 재현탁액에 첨가한 후, 인큐베이션시켜 비오틴닐화된 바코드에 부착된 겔 비드에 결합할 수 있도록 한다(308), (410). 이어서, 자기 장치를 이용하여 양성 바코딩된 겔 비드를 바코드에 부착되지 않은 비드로부터 분리한다(308). 바코딩된 비드로부터 비오틴닐화된 상보성 가닥을 분리시키기 위해 변성 조건(309)(예컨대, 열 또는 화학적 변성제)을 겔 비드에 가한다. 이어서, 자기 비드를 용액으로부터 제거하고; 생성된 부분적으로 작용화된 바코딩된 비드 용액을 추가의 가공 처리를 위해 폴링한다.

[0467] 실시예 3: 바코딩된 비드의 추가의 작용화

[0468] 도 3b에 제시된 바와 같이, 실시예 2로부터의 바코딩된 겔 비드(311)를 하기와 같이 추가로 작용화시킨다. 비드를 추가의 주형 올리고뉴클레오티드(310)(예컨대, 도 4에 제시된 바와 같이, 랜덤 N-mer 서열(413)을 함유하는 올리고뉴클레오티드), 및 PCR 시약(312), (313)과 조합하고, 주형 올리고뉴클레오티드가, 겔 비드에 부착된 리드 프라이머와 하이브리드화할 수 있도록 하는 조건에 가한다. 연장 반응을 수행함으로써 바코드 가닥을 연장시켜(314) 주형 올리고뉴클레오티드의 상보성 서열을 도입한다. 생성된 작용화된 겔 비드를 수성 완충제 중에 재현탁시키고(315), 가열 조건에 노출시켜 상보체 가닥을 제거하고(316), 수성 보관용 완충제에 놓는다(317).

[0469] **실시예 4: 비드 작용화에 대한 단계식 설명**

[0470] 도 4는 겔 비드를 바코드 및 랜덤 N-mer로 작용화하는 예시적인 공정을 기술하는 단계식 설명을 제공하는 것이다. 도 4A에 제시된 바와 같이, 공정은 범용 프라이머, 예컨대, P5 프라이머(또는 그의 상보체)(403)에 부착된 겔 비드(401)를 이용함으로써 시작된다. 비드는 이황화 결합(402)을 통해 프라이머에 연결될 수 있다. 겔 비드는 수용액 (g/w)에 제공된다. 제한 희석 및 구획화를 사용하여, 1개 이하의 고유 바코드 서열이 겔 비드와 동일한 구획을 점유하도록 고유 바코드 서열 주형(405)을 비드와 조합한다. 일반적으로, 구획은 겔/물/오일 (g/w/o) 에멀전 내의 수성 액적이다. 도 4B에 제시된 바와 같이, 바코드 서열 주형(405)은 범용 프라이머(403)에 상보적인 서열(404) 뿐만 아니라, 비오틴 표지화된 리드 프라이머(406)와 서열이 동일한 서열(407)을 함유하는 더옥 큰 뉴클레오티드 가닥내에 함유되어 있다.

[0471] 도 4C에 제시된 바와 같이, 이어서, 증폭 반응을 수행하여 바코드 주형(405)의 상보체(408)를 비드에 부착된 가닥 상에 도입한다. 증폭 반응을 통해서 또한 서열(407)에 상보적인 서열(415)이 도입된다. 추가의 증폭 사이클을 통해 비오틴 표지화된 리드 프라이머서열(406)이 서열(415)에 하이브리드화되고(도 4D), 이어서, 비오틴 표지화된 리드 프라이머가 연장된다(도 4E). 이어서, 에멀전을 분해할 수 있고, 이어서, 겔 비드를 겔/물 공통 용액 내로 풀링할 수 있다.

[0472] 이어서, 겔/수용액 중, 자기 포획 비드(409)를 사용하여 겔 비드에 부착된 비오틴화된 핵산을 포획하고, 이어서, 원래의 프라이머만을 함유하는 비드로부터 단리시킨다(도 4F 및 도 4G). 이어서, 비오틴화된 가닥을 겔 비드에 부착된 가닥으로부터 제거한다(도 4H). 이어서, 랜덤 N-mer 서열(414)을 겔 비드에 부착된 가닥에 부착시킬 수 있다. 각 겔 비드의 경우, 동일한 바코드 서열(408)은 겔 비드 전역에 걸쳐 각 프라이머에 부착되고; 이어서, 각 바코드 서열은 랜덤 N-mer 서열(414)로 작용화되고, 이로써, 다중의 상이한 랜덤 N-mer 서열은 각 비드에 부착된다. 상기 공정을 위해, 서열(415)에 상보적인 서열(412)에 연결된 랜덤 N-mer 주형 서열(413)을 풀링된 비드를 함유하는 용액에 도입한다(도 4I). 비드에 부착된 가닥에 대하여 주형이 하이브리드화할 수 있는 조건에 용액을 가하고, 서열(415)은 연장되어 랜덤 N-mer(414)를 포함하게 된다(도 4J). 이어서, 완전하게 작용화된 비드(도 4K)를 샘플 핵산 및 환원제(예컨대, 1 mM 농도의 디티오프레이톨(DTT))와 혼합하고, 이는 겔/물/오일 에멀전의 액적 내에 구획화된다(도 4L). 상기 조합 단계는 미세유체 디바이스에서 수행될 수 있다(도 5A). 이어서, 겔 비드는 예컨대, 환원제의 작용에 의해 각 구획(예컨대, 액적) 내에서 분해되고, 바코딩된 서열은 액적으로부터 유리된다(도 4M 및 도 4N). 바코딩된 서열 내의 랜덤 N-mer은 샘플 핵산의 증폭을 위한 프라이머로서의 역할을 할 수 있다.

[0473] **실시예 5: 에멀전 중 겔 비드 (GEM)와 샘플을 조합하기 위한 미세유체 칩의 용도**

[0474] 도 5에 도시된 이중 교차 미세유체 디바이스를 사용하여 작용화된 겔 비드를 샘플과 조합시킬 수 있다. 분해성 겔 비드는 약 7% 글리세롤을 함유하는 유체 스트림 중에서 유체 유입부(501)로 도입된다. 관심이 대상이 되는 실험 샘플을 수성상인 유체 스트림 중 유체 유입부(502)에 도입한다. 환원제인 디티오프레이톨(DTT)을 약 1 mM 농도로 약 7% 글리세롤을 함유하는 유체 스트림 중에서 유체 유입부(503)로 도입한다. 유체 유입부(501), (502), 및 (503)는 미세유체 교차 접합부(504)에서 혼합되고, 제2 미세유체 교차 접합부(506)로 유입된다. 제2 미세유체 교차 접합부는 e1 비드를 함유하는 유화된 (w/o) 액적을 제조하는 데 사용될 수 있다. 유체 유입부(505)는 2%(w/w) 비스 크라이투스 페그(BKP)와 함께 오일을 도입하는 데 사용된다. 제2 미세유체 교차 접합부(507)에서 배출되는 개별 액적은 추가의 하류 적용을 위해 마이크로플레이트 웰(도 5C)로 첨가된다. 도 5D는 DTT의 부재하에서 생성된(따라서, 겔 비드를 함유하는) 액적의 영상이다. 도 5E는 내부 겔 비드를 분해시키는 DTT로 분해된 액적의 영상이다.

[0475] **실시예 6: 양성 겔 비드의 형광 방식에 의한 확인**

[0476] 도 6에는 형광 표지로 표지화된 증폭된 핵산을 함유하는 겔 비드의 영상이 도시되어 있다. 겔 비드의 작용화는 먼저, 겔 비드 중 일부분만을 바코드로 작용화시키기 위해서 제한 희석을 사용하여 수행된다. PCR 써모사이클링 후, 세척 이전에 비스 크라이투스 페그(BKP) 에멀전 중에 현탁된 겔 비드를 4X 확대 비율로 영상화한다. 명시야 영상(도 6A)은 에멀전 생성된 액적 모두를 보여주는 것이고, 형광 영상(도 6B)은 오직 양성 작용화된 겔 비드만을 보여주는 것이다. 비형광성 액적이 다수가 생성되었는데, 이는 겔 비드 및/또는 올리고뉴클레오티드를 함유하지 않는, 속이 빈 액적을 나타내는 것이다. 다화에 걸친 재현탁화 및 HFE-7500 중에서의 세척에 의해 속이 빈 액적을 세척하여 제거한다. 도 6C 및 도 6D는 에멀전 파괴 및 추가의 세척 단계 이후의 양성 겔 비드 농축을 보여주는 것이다. 명시야 영상 (4X)(도 6C), 및 (10X)(도 6E))는 모든 겔 비드를 보여주는 것이다. 형광 영상 (4X)(도 6D) 및 (10X)(도 6F))은 SYBR 염색으로부터 30%의 양성 비드를 보여주는 것이다. 30%의 양성 비드는

gDNA 입력값으로부터 예측되는 값과 매칭된다.

[0477] **도 7**은 단일 가닥(ss: single stranded) DNA, 이중 가닥(ds: double-stranded) DNA, 및 변성된 ssDNA를 함유하는 겔 비드의 영상을 보여주는 것이다. 단계 1: 제조(ssDNA)(**도 7A**), 단계 2: 연장(dsDNA), (**도 7B**), 및 단계 3: 변성(ssDNA)(**도 7C**)에서 촬영된 형광 영상으로부터 명백하게 나타나는 바와 같이, 1X 에바그린으로 염색된 겔 비드는 dsDNA의 존재하에서 더 밝다. 형광 영상은 비드가 연장 이후에 더 밝아지고, 변성 이후에 더 흐릿해 진다는 것을 보여준다.

[0478] **실시예 7: 스트랩트아비딘 코팅된 자기 비드를 이용한 양성 겔 비드의 농축**

[0479] 스트랩트아비딘 코팅된 자기 비드를 사용하여 양성 겔 비드를 농축시키는 것이 **도 8**에 도시되어 있다. **도 8A**(명시야) 및 **도 8B**(형광)는 자기 비드 첨가 후 24시간 경과하였을 때 YBR 염색된 겔 비드의 영상을 제공한다. 자기 코팅된 양성 겔 비드는 SYBR 염색에 기인하여 더 밝다. 자기 비드 농도 40 mg/mL일 때, 분류 이전(**도 8C**) 및 그 이후(**도 8D**)의 명시야 영상은 코팅된 비드가 광학적으로 더 밝은, 양성 겔 비드 농축을 보여준다. 자기 비드 농도 60 mg/mL일 때, 분류 이전(**도 8E**) 및 그 이후(**도 8F**)의 명시야 영상은 코팅된 비드가 광학적으로 더 밝은, 양성 겔 비드 농축을 보여준다. 각 자기 비드 작업 농도에서, 단일 겔 비드는 약 100-1000개의 자기 비드에 의해 코팅된다.

[0480] **실시예 8: 겔 비드 용해**

[0481] **도 9**에서 명백하게 나타나는 바와 같이, 염기성 용액 중에서 겔 비드를 가열하여 겔 비드는 분해된다. 겔 비드를 염기성 용액 중 95°C에서 가열하고, 5분 가열 간격을 두고 모니터링한다: t = 0 min(**도 9A**), t = 5 min(**도 9B**), t = 10 min(**도 9C**), t = 15 min(**도 9D**). 15분 후, 겔 비드는 완전하게 분해된다. 겔 비드는 분해되는 동안 크기는 2배 초과로 배가된다. **도 10**에는 효과적이고, 비가역적인 이황화 결합 환원제인 트리스(2-카복시에틸)포스핀(TCEP)을 이용한 겔 비드의 용해가 도시되어 있다. 작용화된 겔 비드 (**도 10A**)를 염기성 용액(pH = 8)에 1 mM, TCEP와 함께 넣고, 2분 간격으로 모니터링한다: t = 0 min(**도 10B**), t = 2 min(**도 10C**), t = 4 min(**도 10D**), t = 6 min(**도 10E**), t = 8 min(**도 10F**), t = 10 min(**도 10G**). 약 6분 내지 약 10분 사이에 작용화된 겔 비드가 완전하게 분해된다.

[0482] **실시예 9: 겔 비드 (GB) 용해 이후의 내용물 분석**

[0483] 겔 비드에 부착된 내용물 분석은 **도 11**, 및 **도 12**에 제공되어 있다. 겔 비드를 바코드 또는 바코드 상보체(N12C) 및 길이가 8개의 뉴클레오타이드 길이인 랜덤 N-mer (8mer)(**1102**)로 작용화시킨다(**1101**). 랜덤 N-mer은 RIC 및 랜덤 N-mer(**1102**)를 함유하는 주형 구성물을 사용하는 프라이머 연장 반응을 수행함으로써 부착된다. (바코드 및 랜덤 N-mer을 포함하는) 전체 올리고뉴클레오타이드 가닥의 길이는 82 bp이다(**1101**). 랜덤 N-mer 및 RIC 가닥의 길이는 42 염기쌍(bp)(**1102**)이다. 연장 반응은 65°C에서 1시간 동안 고농도의 프라이머 농도(10 μm)하에서 KAPA HIFI RM 마스터 믹스(KAPA HIFI RM Master Mix)를 사용하여 수행된다. 겔 비드를 분해시키는 단계 이전에 세척 단계의 횟수를 증가시키면 샘플 내의 프라이머 이량체의 양은 감소하게 된다. 세척 단계를 수행하지 않을 때(**1103**), 42 bp 생성물(**1107**), 및 80 bp 생성물(**1107**)이 관찰될 수 있다. 3회의 세척 후, 프라이머 이량체(**1104**)의 수준은 세척을 수행하지 않은 실험에서의 것에 비하여 감소된다. 6회의 세척 후, 80 bp 생성물(**1107**)이 관찰되지만, 프라이머 이량체는 관찰되지 않는다.

[0484] 연장 단계를 위해 6개의 상이한 온도(65°C, 67°C, 69°C, 71°C, 73°C, 75°C, **도 11C**)를 이용하여 6 세척 실험 또한 수행할 수 있다. 본 구체적인 실시예에서, 고농도의 프라이머 농도(10 μm)가 사용되고, 연장 단계는 1시간 동안 지속된다. 80 bp 생성물의 수준을 최적화하고, 42 bp 생성물의 개수를 최소화시키는 데 67°C가 최적의 온도인 것으로 보인다(**1109**).

[0485] 후속 변성 연구를 위해 67°C 온도가 선택된다. 샘플을 6회에 걸쳐 95°C로 가열하고, 세척하여 상보성 가닥을 제거하는 상보성 가닥의 열 변성 결과, 변성 이전에는 84 bp 피크(**1202**)를 나타내고, 변성 이후에는 감소된 피크(**1201**)을 나타낸다. 단계 1로부터 측정된 대조군 값은 (**1203**)에 제시되어 있다.

[0486] **실시예 10: 웰에서의 구획화에 의한 바코딩된 겔 비드 생성**

[0487] **도 13a**에 및 **도 13b**에 예시된 방법에 따라 웰에서 구획화하여 작용화된 비드를 제조한다. 제1 작용화 단계는 **도 13a**에 개요되어 있고, 제2 작용화 단계는 **도 13b**에 개요되어 있다. 예시적인 다중 어댑터 생성 방식은 **도 13c**에 개요되어 있고, 실시예 11에 기술되어 있다. **도 13a**에 제시된 바와 같이, 작용화된 비드(**1301**)(예컨대, 아크리다이트 올리고 및 프라이머(예컨대, 5'-AAUGAUACGGCGACCACCGAGA-3'을 포함하는 비드), 바코드 서열(예컨대,

5'-XXXXXXTCTCGGTGGTCGCCGTATCATT-3')을 포함하는 주형(1302), 및 적절한 PCR 시약 (1303)을 함께 혼합하고 (1304/1305), 다중 웰 플레이트의 384 웰에 분할한다. 각 웰은 고유 바코드 서열 및 다중 비드의 다중 카피를 포함한다. 각 개별 웰 중에서 연장 반응과 함께 써모사이클링(1306)을 수행함으로써 바코드가 부착된 비드가 형성된다. 모든 웰을 함께 풀링시키고, 벌크로 세정한다(1307/1308).

[0488] 랜덤 N-mer을 첨가하기 위해 부분적으로 작용화된 비드(1310), 주형 랜덤 N-mer 올리고뉴클레오티드(1309), 및 적절한 PCR 시약(1311)을 함께 혼합하고(1312), 작용화된 비드(1310)에 대해 연장 반응(1313)을 수행하여 랜덤 N-mer 주형에 상보적인 랜덤 N-mer 서열을 비드에 첨가한다. 써모사이클링 후, 비드를 벌크로 세정한다(1314-1316).

[0489] **실시예 11: 조합 플레이트 기법**

[0490] 도 13c에 제시된 바와 같이, 프라이머(예컨대, P5 올리고머, 5'-AAUGAUACGGCGACCACCGAGA-3')(1318)에 부착된 비드(1317)을 고유 주형 부분 바코드 서열(예컨대, 5'-XXXXXXTCTCGGTGGTCGCCGTATCATT-3)을 포함하는 주형 (1321)의 다중 카피를 포함하는 다중 웰 플레이트 (예컨대, 5X-1 384-웰 플레이트(1319))의 웰로 구획화한다. 연장 반응(예컨대, 주형(1321)을 통한 프라이머(1318)의 연장)을 수행하여 각 웰에서 연장 생성물을 포함하는 비드-P5-[5X-1](1320)(예컨대, 프라이머(1318) 및 주형 부분 바코드 서열에 상보적인 부분 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드)을 생성한다. 비드를 웰로부터 제거하고, 함께 풀링시키고, 세정 단계를 벌크로 수행한다.

[0491] 이어서, 풀링된 혼합물을 제2 다중 웰 플레이트, 예컨대, 5X-2를 포함하는 384 웰 플레이트(1322)의 웰에 재분할하며, 여기서, 각 웰은 또한 제2 고유 부분 바코드 서열 및 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드(예컨대, 5'-P-YYYYYCGCACACUCUUCCUACACGACGUCUCUCCGAUCUNNNNNNNN-블록)를 포함한다. 올리고뉴클레오티드는 (예컨대, 하이브리드화를 통해) 부착된 차단제 올리고뉴클레오티드(예컨대, "블록")를 가질 수 있다. 비드에 결합된 연장 생성물과 제2 부분 바코드 서열 및 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드 사이에 단일 가닥 결합 반응(1324)을 수행한다. 결합 반응 후, 전장의 바코드 서열(예컨대, XXXXXYYYYYY) 및 랜덤 N-mer을 포함하는 비드(1323)(예컨대, 비드-P5-[5X-1][5X-2]R1[8N-차단제])이 생성된다. 비드는 또한 차단제 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 이어서, 모든 웰을 함께 풀링시키고, 차단기를 절단하고, 비드 생성물을 벌크로 세정하고, 매우 다양한 바코드 서열을 포함하는 비드가 수득된다.

[0492] **실시예 12: 서열분석을 위한 부분 헤어핀 증폭(PHASE) 반응**

[0493] 서열분석을 위한 부분 헤어핀 증폭(PHASE) 반응은 부분 헤어핀 구조를 형성함으로써 도 14 및 15에 개요된 방법에 따라 바람직하지 못한 증폭 생성물을 감소시키는 데 사용될 수 있는 기법이다. 구체적으로, 범용 서열 부분 (1401/1402/1403)으로 태깅된, 길이가 약 8 N-12 N인 랜덤 프라이머(1404)는 핵산, 예컨대, 게놈 DNA(gDNA)를 무작위로 프라이밍하고, 그로부터 연장시키는 데 사용될 수 있다. 범용 서열은 (1) 서열분석 장치, 예컨대, 유동 셀과의 양립성을 위한 서열(예컨대, 일루미나의 P5(1401), 및 리드 1 프라이머 부위(1402)) 및 (2) 바코드 (BC)(1403)(예컨대, 6개의 염기 서열)을 포함한다. 상기 긴 범용 서열 부분의 바람직하지 못한 결과를 감소시키기 위해, 범용 서열 부분의 마지막 10-20개의 뉴클레오티드를 제외한 모두를 티민 함유 뉴클레오티드를 대신하여 우라실 함유 뉴클레오티드로 치환하고, 우라실 함유 주형을 수용하지 않거나, 가공 처리하지 않는 폴리머라제가 핵산 증폭을 위해 사용되며, 그 결과, 주요 서열분석 매트릭스가 유의적으로 개선된다(도 16A, 도 21, 및 도 22). 추가로, 우라실 함유 뉴클레오티드 및 차단된 3' 단부(예컨대, 3'ddCTP)를 포함하는 차단 올리고뉴클레오티드는 랜덤 N-mer 서열에 의한 핵산의 프라이밍을 촉진시키고, 리드 1 프라이머 부위에 상보적인 핵산의 일부(1402)에의 우선적인 결합을 막는 데 사용된다. 추가로, 원치 않는 증폭 생성물을 감소시키기 위해 작은 비율(%)의 종결 뉴클레오티드(예컨대, 0.1-2% 아시클로뉴클레오티드(아시NTP))를 포함함으로써(도 16B) 생성물의 길이는 추가로 제한된다.

[0494] 여기서 원치 않는 생성물의 증폭을 막기 위한 부분 헤어핀 형성의 일례를 제공한다. 먼저, 98°C에서 2분 동안 초기 변성을 수행한 후, 4°C에서 30초 동안 프라이머로서 작용하는 랜덤 N-mer 서열에 의해 게놈 DNA 서열의 랜덤 부분을 프라이밍시킨다(도 15A). 이어서, 0.1°C/초의 온도 램프로 45°C까지(1초 동안 유지) 서열 연장이 진행된다(도 15A). 계속해서 상류 가닥을 치환하고, 제1 단계의 증폭부를 생성하면서, 승온에서 연장을 계속 진행한다(70°C에서 20초)(도 15B). 98°C에서 30초 동안의 변성을 통해 추가의 프라이밍을 위한 게놈 DNA가 유리된다. 제1 사이클 후, 증폭 생성물은 단일 5' 태그를 가진다(도 15C). 예를 들어, 4°C에서의 사이클 2를 시작으로 게놈 DNA를 다시 프라이밍시키기 위해 랜덤 N-mer 서열을 사용함으로써 상기 언급된 단계들을 최대 20회 까지 반복한다(여기서, 검은색 서열은 카피될 수 없는 첨가된 5' 태그(사이클 1에서 첨가된 것)의 일부를 나타

낸다)(도 15D). 98℃에서 진행되는 변성을 통해 게놈 DNA 및 추가의 프라이밍을 위한 제1 사이클로부터의 증폭 생성물이 다시 유리된다. 2회차 써모사이클링 후, 5' 태깅된 생성물 및 3' & 5' 태깅된 생성물, 둘 모두가 존재한다(도 15E). 원치 않는 생성물의 증폭을 막은 부분 헤어핀 구조가 3' & 5' 태깅된 생성물로부터 형성된다(도 15F). 게놈 DNA 서열의 새로운 랜덤 프라이밍은 다시 4℃에서 시작된다(도 15G).

[0495] 실시예 13: 증폭에 의한 추가 서열 첨가

[0496] 서열분석기에서 바로 사용가능한 라이브러리를 완성하기 위해, 추가의 증폭(예컨대, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 단계)을 완료하여 추가의 서열을 첨가한다(도 14C). 헤어핀 형성보다 더 우수한 경쟁력을 가지도록 하기 위해, 잠금형 핵산(LNA) 또는 잠금형 핵산 뉴클레오티드를 함유하는 프라이머가 사용된다. 추가로, 이전 단계에서 우라실 함유 뉴클레오티드를 포함하는 것을 사용하는 경우, 주형 우라실 함유 뉴클레오티드를 차별하지 않는 폴리머라제가 본 단계에서 사용된다. 도 17에 제시된 결과는 일루미나 MiSeq 서열분석기에서 서열분석에 의해 측정된 바, 차단 올리고뉴클레오티드가 출발 부위 편향을 감소시킨다는 것을 보여주는 것이다. 이 경우 핵산 주형은 효모 gDNA이다.

[0497] 실시예 14: 디지털 프로세서

[0498] 예시적인 제어 어셈블리(1801)에 대한 개념 도식이 도 18에 제시되어 있다. 컴퓨터(1802)는 제어 어셈블리(1801)에 대한 중앙 허브로서의 역할을 한다. 컴퓨터(1802)는 디스플레이(1803), 하나 이상의 입력 장치(예컨대, 마우스, 키보드, 카메라 등)(1804), 및 임의적으로 프린터(1805)와 통신한다. 제어 어셈블리(1801)는 그의 컴퓨터(1802)를 통해 하나 이상의 장치: 임의적으로, 샘플 전처리 유닛(1806), 하나 이상의 샘플 처리 유닛(예컨대, 서열, 써모사이클러, 또는 미세유체 디바이스)(1807), 및 임의적으로, 검출기(1808)와 통신한다. 제어 어셈블리는 예를 들어, 인터넷 연결을 통해 통신망을 구축할 수 있다. 사용자는 입력 장치(1804)를 사용하여 컴퓨터(1802)로 입력값(예컨대, 원하는 핵산 증폭 반응 세트에 필요한 파라미터 또는 미세유체 디바이스를 위한 유속)을 제공할 수 있다. 입력값은 컴퓨터(1802)에 의해 해석되고, 이로써 명령이 작성된다. 컴퓨터(1802)는 실행을 위해 상기 명령을 임의적인 샘플 전처리 유닛(1806), 하나 이상의 샘플 처리 유닛(1807), 및/또는 임의적인 검출기(1808)로 통신한다. 또한, 임의적인 샘플 전처리 유닛(1806), 하나 이상의 샘플 처리 유닛(1807) 및/또는 임의적인 검출기(1808)가 작동하는 동안, 각 장치는 신호를 다시 컴퓨터(1802)로 역통신한다. 상기 신호는 컴퓨터(1802)에 의해 해석되고, 사용되어 장치 중 임의의 것이 추가의 명령을 필요로 하는지 여부를 결정한다. 컴퓨터(1802)는 또한 샘플 성분이 적절히 혼합되고, 원하는 또는 다르게는 미리 결정된 속도로 샘플 처리 유닛(예컨대, 미세유체 디바이스)(1807)으로 공급되도록 샘플 전처리 유닛(1806)을 조절한다. 컴퓨터(1802)는 또한 검출기가 원하는 또는 다르게는 미리 결정된 시점에 또는 샘플 전처리 유닛(1806) 또는 샘플 처리 유닛(1807)으로부터 받은 피드백으로부터 결정된 시점에 측정을 수행하도록 검출기(1808)와 통신할 수 있다. 검출기(1808)는 또한 측정 동안 수득된 원시 데이터를 추가 분석 및 해석을 위해 컴퓨터(1802)로 다시 역통신할 수 있다. 분석은 디스플레이(1803) 및/또는 프린터(1805)에 의해 작성된 출력물을 통해 최종 사용자에게 유용한 포맷으로 요약될 수 있다. 샘플 전처리 유닛(1806), 샘플 처리 유닛(1807), 및/또는 검출기(1808)를 제어하는데 사용되는 명령 또는 프로그램; 본원에 기술된 방법 중 임의의 것을 실행함으로써 획득된 데이터; 또는 분석되고/거나, 해석된 데이터는 인터넷일 수 있는 네트워크(1810)를 통해 하나 이상의 원격 컴퓨터(1809)로 송신 또는 수신될 수 있다.

[0499] 실시예 15: 결찰을 통한 조합 기법

[0500] 도 23A에 제시된 바와 같이, 비드(2301)는 생성되고, (예컨대 아크리다이트 모이어티를 통해) 부분 P5 서열(2302)에 공유적으로 연결된다. 별개로, 50 μl의, 4개의 96웰 플레이트의 각 웰 중에서 남은 P5 서열 및 고유 부분 바코드 서열 (올리고뉴클레오티드(2303)에서 염기 "DDDDDD"로 표시)을 포함하는 올리고뉴클레오티드(2303)를 올리고뉴클레오티드(2303)에 대한 역 상보체, 및 올리고뉴클레오티드(2303)의 각 단부에 오버행되어 있는 추가의 염기를 포함하는 올리고뉴클레오티드(2304)에 하이브리드화된다. 스플린트(2306)가 생성된다. 각 오버행은 부산물 형성을 막기 위해 3' C3 스페이서, 3' 역전 dT, 또는 디데옥시-C(ddC)로 차단된다(도 23에서 "X"로 표시).

[0501] 도 23B에 제시된 바와 같이, 스플린트(2306)를 각각 4개의 96 웰 플레이트에 첨가하고, 여기서, 각 웰은 2 mL 비드(2301)를 포함하고, 스플린트는 고유 부분 바코드 서열을 포함한다. 각 웰에서, 스플린트(2306)는 올리고뉴클레오티드(2304)의 상응하는 오버행을 통해 비드(2301)의 부분 P5 서열(2302)과 하이브리드화한다. 하이브리드화 후, 부분 P5 서열(2302)을 16℃에서 1시간 동안 리가제, 예컨대, T4 리가제의 작용을 통해 (전형적으로는 5' 인산화되는) 올리고뉴클레오티드(2303)에 결찰시킨다. 결찰 후, 생성물을 풀링시키고, 비드를 세척하여

결찰되지 않은 올리고뉴클레오타이드를 제거한다.

[0502] **도 23C**에 제시된 바와 같이, 이어서, 세척된 생성물을 4개의 새로운 96 웰 플레이트의 웰 내로 재분포시키고, 여기서, 플레이트의 각 웰은 2 mL의 비드(2301) 및 고유 부분 바코드 서열 (올리고뉴클레오타이드(2305)에서 "DDDDDD"로 표시) 및 올리고뉴클레오타이드(2304)의 나머지 오버행에 상보적인 인접한 짧은 서열(예컨대, 부분 바코드 서열에 인접하고, 올리고뉴클레오타이드(2305)의 말단 위치의 "CC")를 가지는 올리고뉴클레오타이드(2305)를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드(2305)는 또한 랜덤 N-mer(올리고뉴클레오타이드(2305)에서 "NNNNNNNNNN"으로 표시)을 포함한다. 인접한 짧은 서열을 통해, 올리고뉴클레오타이드(2305)는 올리고뉴클레오타이드(2304)의 나머지 오버행을 통하여 올리고뉴클레오타이드(2304)와 하이브리드화한다. 이어서, 올리고뉴클레오타이드(2305)를 16°C에서 1 시간 동안 리가제의 작용을 통해 올리고뉴클레오타이드(2303)에 결찰시킨다. 올리고뉴클레오타이드(2305)의 올리고뉴클레오타이드(2303)에의 결찰을 통해 전장의 바코드 서열이 생성된다. **도 23D**에 제시된 바와 같이, 이어서, 생성물을 풀링시키고, 올리고뉴클레오타이드(2304)를 생성물로부터 변성시키고, 이어서, 비결합 올리고뉴클레오타이드를 세척하여 제거한다. 세척 후, 바코딩된 비드의 다양한 라이브러리를 획득할 수 있으며, 여기서, 올리고뉴클레오타이드에 결합된 각 비드는 P5 서열, 전장의 바코드 서열, 및 랜덤 N-mer을 포함한다. 생성된 라이브러리는 대략 147,000개의 상이한 바코드 서열을 포함한다.

[0503] **실시예 16: 바코드 프라이머에서 티민 함유 뉴클레오타이드의 우라실 함유 뉴클레오타이드로의 치환**

[0504] **도 33a**에 제시된 바와 같이, PHASE 증폭에 적합한 2개의 바코드 프라이머(3301) 및 (3302)를 사용하여 효모 게놈으로부터 획득된 샘플 핵산을 증폭시켰다. PHASE 증폭 후, 추가의 서열을 (예컨대, 벌크 PCR을 통해) 첨가하여 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물을 생성하였다. 바코드 프라이머(3301)(이는 또한 **도 33a**에서 U.2로 제시) 및 (3302)(이는 또한 **도 33a**에서 U.1로 제시)는 동일한 서열을 포함하였고, 단, 예외적으로, 프라이머(3301)는 3306번 위치에 티민 함유 뉴클레오타이드 대신에 추가의 우라실 함유 뉴클레오타이드 치환을 포함하였다. 각 바코드 프라이머에 대한 증폭 실험 세트를 수행하였고, 각 세트는 다양한 화학량론으로 각 바코드 프라이머와 혼합된 특정 차단제 올리고뉴클레오타이드에 상응하는 것이었다. 바코드 프라이머(3302)의 경우, 표준 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303), 브릿지된 핵산(BNA)을 포함하는 전장의 차단제 올리고뉴클레오타이드(3304) (이는 또한 **도 33a**에서 BNA 차단제로 제시), 또는 전장의 차단제 올리고뉴클레오타이드(3305)에 상응하는 증폭 실험 세트를 수행하였다. 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303) 및 (3305)는 모든 티민 함유 뉴클레오타이드 위치에 티민 함유 뉴클레오타이드를 대신하는 우라실 함유 뉴클레오타이드 치환 및 ddC 차단형 단부를 포함하였다. 각 세트에서, 차단제 올리고뉴클레오타이드:바코드 프라이머 화학량론은 0, 0.4, 0.8, 또는 1.2였다. 바코드 프라이머(3301)의 경우, 각 유형의 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303), (3304), 및 (3305)를 0.8의 차단제 올리고뉴클레오타이드:바코드 프라이머 화학량론으로 테스트하였다.

[0505] PHASE 증폭 생성물의 크기 결과는 **도 33b**에 도시되어 있다. 제시된 바와 같이, 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303)에 커플링된 바코드 프라이머(3302)(예컨대, 티민 함유 뉴클레오타이드 대신에 추가의 우라실 함유 뉴클레오타이드 치환을 포함하는 것)는 일반적으로 테스트된 화학량론 간에 걸쳐 가장 작은 증폭 생성물을 생성하였다. 차단제 올리고뉴클레오타이드(3304) 및 (3305)와 관련하여 바코드 프라이머(3302)의 결과는 다양하였는데, 크기는 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303)에 대한 결과보다는 더 컸다. 바코드 프라이머(3301)의 경우, 증폭 생성물 크기도 또한 일반적으로 테스트된 차단제 올리고뉴클레오타이드 간에 걸쳐 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303)에 커플링된 바코드 프라이머(3301)에 대한 획득된 것보다 더 컸다. 서열분석기에서 바로 사용가능한 생성물의 크기 결과는 **도 33c**에 도시되어 있다.

[0506] 증폭 생성물로부터 획득된 주요 서열분석 매트릭스는 **도 33d**에 도시되어 있다. 제시된 바와 같이, 지도화되지 않은 리드의 분율(**도 33d**에의 패널 I)은 일반적으로 바코드 프라이머(3302)로부터 생성된 증폭 생성물에 대한 서열분석 런에 대한 것보다 더 낮았다. 예를 들어, 0.8 차단제 올리고뉴클레오타이드:바코드 프라이머 화학량론의 바코드 프라이머(3302) 및 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303)로부터 생성된 증폭 생성물에 대한 지도화되지 않은 리드의 분율은 대략 7-8%인 반면, 동일한 조건하에서 바코드 프라이머(3301)를 사용하여 획득된 결과는 대략 17-18%였다. 또한, Q40 오류율(**도 33d**에의 패널 II) 또한 바코드 프라이머(3302)의 경우에 더 낮았다. 예를 들어, 0.8 차단제 올리고뉴클레오타이드:바코드 프라이머 화학량론의 바코드 프라이머(3302) 및 차단제 올리고뉴클레오타이드(3303)로부터 생성된 증폭 생성물에 대한 Q40 오류율은 대략 0.105%인 반면, 동일한 조건하에서 바코드 프라이머(3301)를 사용하여 획득된 결과는 대략 0.142%였다. 서열분석 동안 측정된 리드 1 출발 부위(패널 III) 및 리드 2 출발 부위(패널 IV) 상대 엔트로피는 **도 33e**에 제시되어 있다.

[0507] **실시예 17: 이황화물 교환을 통한 겔 비드의 합성 이후의 작용화**

- [0508] 본원에 기술된 하나 이상의 방법에 따라 이황화 결합을 포함하는 겔 비드를 생성하였다. 이어서, 겔 비드를 TCEP 대 겔 비드 (TCEP:GB)의 분자비로 TCEP와 반응시켰다. 테스트된 비는 0,  $2.5 \times 10^9$ , 및  $10.0 \times 10^9$ 였다. TCEP는 환원제로서 작용함으로써 겔 비드 내에 유리 티올을 생성한다. 환원 후, 겔 비드를 1회 세척하여 TCEP를 제거하였다. 이어서, 도 35a에 제시되어 있는 바와 같이 겔 비드의 생성된 유리 티올을 아크리다이트-S-S-P5 중 (예컨대, 도 35a에서 (3505))과 반응시켜 아크리다이트-S-S-P5를 마이클 첨가 반응 화학법을 통해 겔 비드에 연결시켰다. 상이한 비의 아크리다이트-S-S-P5 대 각 유형의 활성화된 겔 비드(예컨대, 겔 비드 상에 유리 티올을 생성하기 위해 사용된 TCEP:GB의 비)를 테스트하였다. 아크리다이트-S-S-P5 중 대 활성화된 겔 비드 (P5:GB)에 대해 테스트된 비는  $50 \times 10^6$ ,  $500 \times 10^6$ , 및  $5 \times 10^9$ 였다.
- [0509] 합성 후, 각 반응으로부터의 겔 비드를 세척하고, 반응 혼합물 중 DTT로 처리하여 겔 비드를 분해하고, 임의의 결합된 아크리다이트-S-S-P5 중을 유리시켰다. 분취량의 각 반응 혼합물을 겔 라인 내로 유입하고, 유리 올리고뉴클레오티드는 도 36에 제시된 바와 같이 겔 전기영동시켰다(도 36의 라인 3-11). 50 피코몰의 아크리다이트-S-S-P5 표준(예컨대, 레도 36의 라인인 1)이 25개의 염기쌍 래더(예컨대, 도 36의 라인 2)를 따라 전개되었다. 로딩된 아크리다이트-S-S-P5에 상응하는 밴드는 라인 5 및 8(도 36에 화살표로 표시)에서 생성되었다. 라인 5는  $2.5 \times 10^9$ 의 TCEP:GB 비로 처리된 겔 비드 및  $5 \times 10^9$ 의 P5:GB 비로 아크리다이트-S-S-P5와 반응시킨 TCEP 처리된 겔 비드에 상응하는 것이다. 라인 8은  $10.0 \times 10^9$ 의 TCEP:GB 비로 처리된 겔 비드 및  $5 \times 10^9$ 의 P5:GB 비로 아크리다이트-S-S-P5와 반응시킨 TCEP 처리된 겔 비드에 상응하는 것이다.
- [0510] **실시예 18: 이황화물 교환을 통한 겔 비드의 합성 이후의 작용화**
- [0511] 본원에 기술된 하나 이상의 방법에 따라 이황화 결합을 포함하는 겔 비드를 생성하였다. 이어서, 겔 비드를  $4 \mu\text{g}$  TCEP/100,000개의 겔 비드 농도로 0.1 M 포스페이트 완충제 중 TCEP와 반응시켰다. TCEP는 환원제로서 작용함으로써 유리 티올 기를 가지는 겔 비드를 생성할 수 있다. 환원 후, 겔 비드를 1회 세척하여 TCEP로부터 겔 비드를 분리하였다. 이어서, 도 35b에 제시되어 있는 바와 같이, 겔 비드의 유리 티올을 2,2'-디티오피리딘 포화 용액(~0.2 mM) 중 2,2'-디티오피리딘(예컨대, 도 35b 중 (3507))과 반응시켜 이황화물 교환 화학법을 통해 피리딘 기를 겔 비드에 연결시켰다. 합성 후, 겔 비드를 3회 세척하여 과량의 2,2'-디티오피리딘을 제거하였다.
- [0512] 이어서, 세척된 겔 비드를, 한쪽 단부에는 전장의 구성물 바코드 (FCBC(full construct barcode) - 예컨대, P5, 바코드 서열, R1, 및 랜덤 N-mer을 포함하는 올리고뉴클레오티드) 서열을, 및 그의 다른 쪽 단부에는 유리 티올기를 포함하는 올리고뉴클레오티드(3702)와 반응시켰다. 두 반응은 FCBC 대 겔 비드(예컨대, FCBC:GB)의 2개의 상이한 분자 비율에서 완료되었고, 반응을 밤새도록 진행시켰다. 테스트된 FCBC:GB 비는  $400 \times 10^6$  및  $1.6 \times 10^9$ 였다. 먼저, 올리고뉴클레오티드(3702)에 도 37a에 (3701)로 제시되어 있는, 이황화 결합으로 보호된 그의 유리 티올 기를 공급하였다. 올리고뉴클레오티드(3702)에서와 같이 유리 티올 기를 생성하기 위해, 올리고뉴클레오티드(3701)를 30분 동안 1X 트리스-EDTA 완충제(TE) 완충제 중 0.1 M DTT로 처리하였다. 세파덱스(Sephadex)(NAP-5) 칼럼 상에서의 염 교환을 사용하여 환원 후 DTT를 제거하고, 올리고뉴클레오티드(3702)를 정제하였다. 각 반응에 대해, 이어서, 정제된 올리고뉴클레오티드(3702)를 티올-이황화물 교환을 통해 겔 비드의 디티오-피리딘 종과 반응시켜(예컨대, 도 35b 참조) 올리고뉴클레오티드(3702)를 포함하는 겔 비드를 생성하였다. 반응 후, 비드를 3회에 걸쳐 세척하여 겔 비드를 정제하였다.
- [0513] 비교 목적으로, 본원 어디에나 기술되어 있는 바와 같이 단량체의 중합을 통해 이황화 결합 및 FCBC 서열을 포함하는 겔 비드 또한 생성하였다. FCBC를, 아크릴아미드 및 비스(아크릴로일)시스타민과의 중합항에 참여할 수 있는 아크리다이트 중을 포함하는 단량체에 연결하여 겔 비드를 생성하였다. FCBC 서열을 아크리다이트 모이티를 통해 겔 비드에 연결시켰다.
- [0514] 합성 후, 각 반응으로부터의 겔 비드를 세척하고, 반응 혼합물 중 DTT로 처리하여 겔 비드를 분해하고, 임의의 결합된 올리고뉴클레오티드(3702)를 유리시켰다. 중합을 통해 합성된 FCBC 서열을 포함하는 겔 비드 또한 반응 혼합물 중 DTT로 처리하였다. 분취량의 각 반응 혼합물을 겔 라인 내로 유입하고, 유리 올리고뉴클레오티드는 도 37b에 제시된 바와 같이 겔 전기영동시켰다. 도 37b에 도시된 겔 사진에 제시된 바와 같이, 라인 1은 50 염기쌍 래더에 상응하는 것이고; 라인 2는  $400 \times 10^6$ 인 FCBC:GB의 비로 이황화물 교환 화학법을 통해 작용화된 겔 비드에 상응하는 것이고; 라인 3은  $1.6 \times 10^9$ 인 FCBC:GB의 비로 이황화물 교환 화학법을 통해 작용화된 겔 비드에 상응하는 것이고; 라인 4는 아크리다이트 종의 중합을 통해 생성된 작용화된 겔 비드에 상응하는 것이다. 로딩

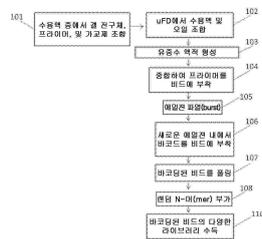
된 올리고뉴클레오티드에 상응하는 밴드는 두 FCBC:GB 비 모두에서 생성된 작용화된 겔 비드에 대해 생성되었고, 아크리다이트 중의 중합을 통해 생성된 작용화된 겔 비드에 대하여 생성된 밴드와 유사한 위치에 있었다.

[0515] 합성 후, 각 반응으로부터의 겔 비드 또한 세척하고, SYBR 골드 (SYBR Gold) 형광성 염료로 염색하였다. 중합을 통해 합성된 FCBC 서열을 포함하는 겔 비드 또한 SYBR 골드로 염색하였다. SYBR 골드는 임의의 결합된 올리고뉴클레오티드를 인터칼레이팅시켜 작용화된 비드를 염색시킬 수 있다. 염색 후, 비드를 플링시키고, 형광 현미경법을 사용하여 영상화하였고, 이는 도 37c에 도시된 현미경 사진에 제시되어 있는 바와 같았다. 도 37c에서 더 밝은 비드(3704)는 비드 중합 동안 작용화된 비드에 상응하는 것이고, (여전히 SYBR 골드 신호는 보내는) 흐릿한 비드 (3705)는 겔 비드 생성 이후에 이황화물 교환 화학법으로 작용화된 비드에 상응하는 것이다. 이황화물 교환을 통한 올리고뉴클레오티드의 로딩은 겔 비드 중합 동안 비드의 작용화를 통해 달성된 것의 대략 30% 정도였다.

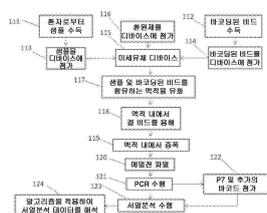
[0516] 특정 구현을 예시하고, 기술하였지만, 그에 대하여 다양하게 수정될 수 있고, 이는 본원에서 고려된다는 것을 상기로부터 이해하여야 한다. 또한, 본 발명을 본 명세서 내에서 제공된 구체적인 일례로 제한하고자 하지 않는다. 본 발명은 상기 언급된 명세서를 참조로 하여 기술되었지만, 본원의 바람직한 실시양태에 관한 설명 및 예시는 제한적인 의미로 해석되지 않아야 한다. 추가로, 본 발명의 모든 측면은 본원에 기재된 구체적인 묘사, 배열, 또는 상대적인 비율에 제한되지 않으며, 이는 다양한 조건 및 변수에 의존하여 달라질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명의 실시양태에 대한 형태 및 상세한 설명에 관한 다양한 수정은 당업자에게 자명할 것이다. 그러므로, 본 발명은 또한 임의의 상기 수정, 변형 및 등가물 또한 포함할 수 있다는 것도 고려된다. 하기 청구범위가 본 발명의 범주를 정의하고, 이러한 청구범위의 범주 내에 포함되어 있는 방법 및 구조 및 그의 등가물이 그에 의해 포함되는 것으로 한다.

도면

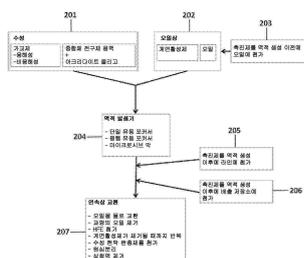
도면1a



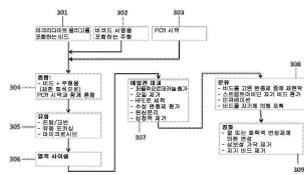
도면1b



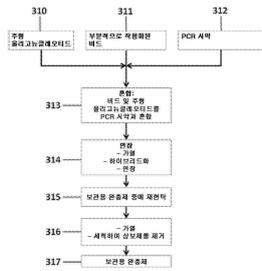
도면2



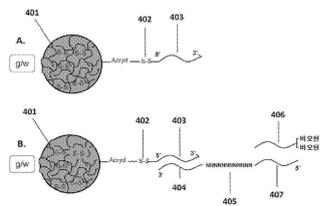
도면3a



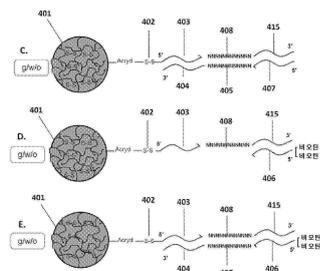
도면3b



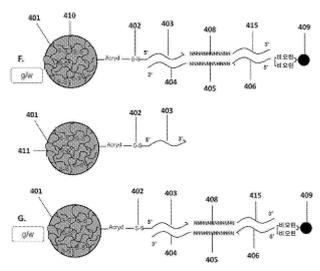
도면4a



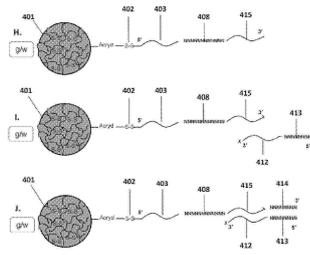
도면4b



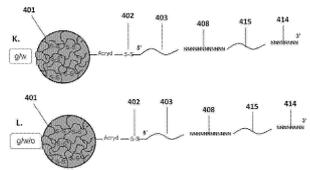
도면4c



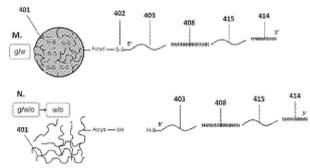
도면4d



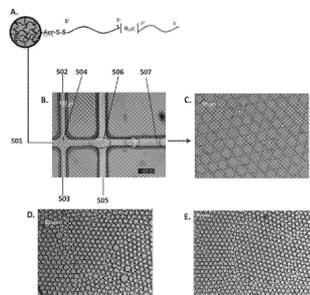
도면4e



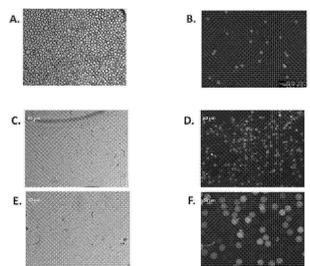
도면4f



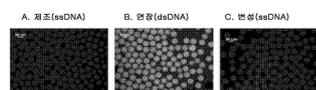
도면5



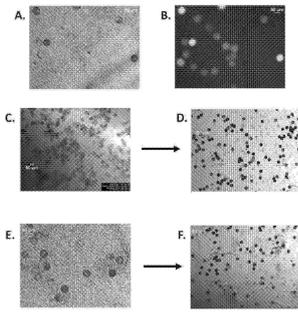
도면6



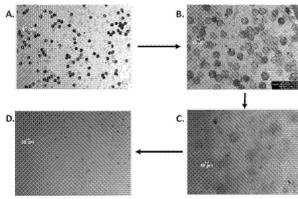
도면7



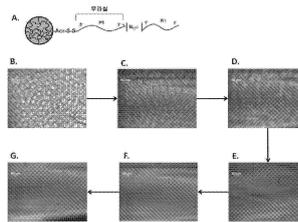
도면8



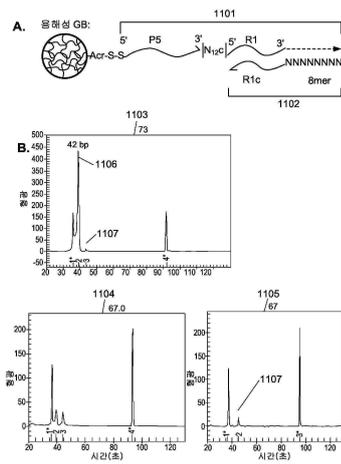
도면9



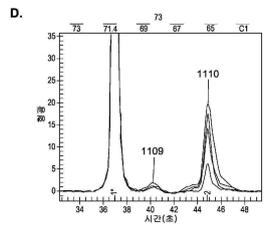
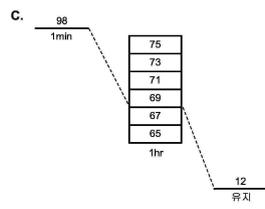
도면10



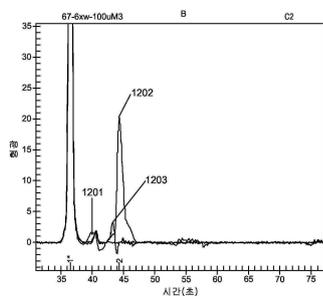
도면11a



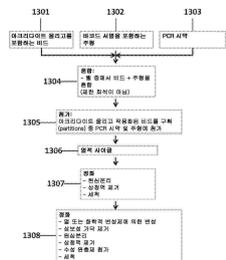
도면11b



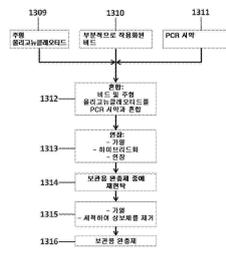
도면12



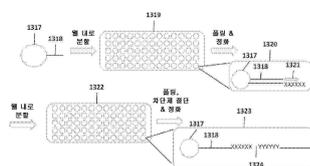
도면13a



도면13b



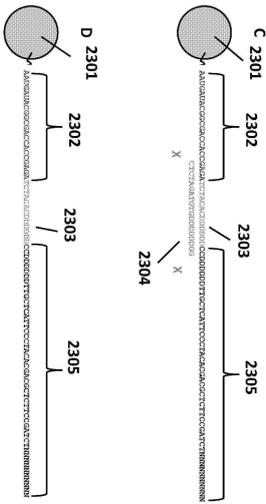
도면13c



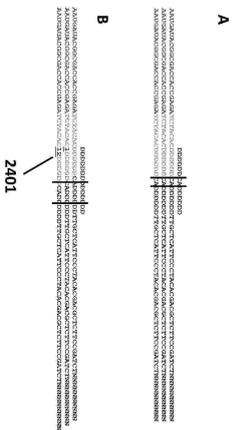




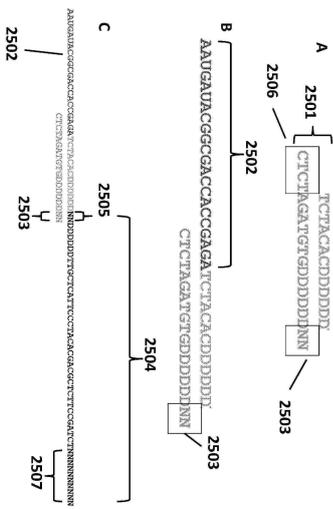
도면23b



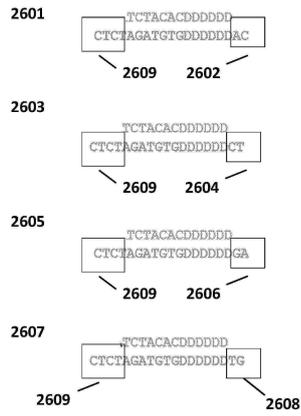
도면24



도면25



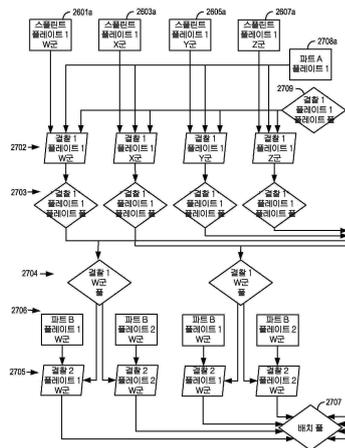
도면26



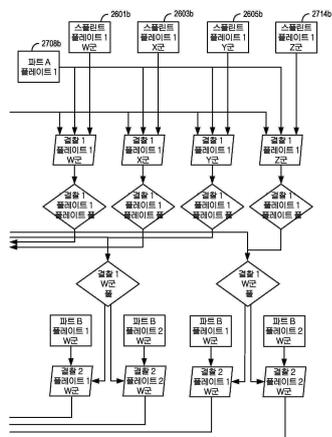
도면27

도 27a, 도 27b

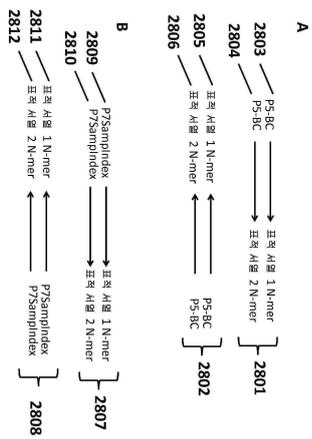
도면27a



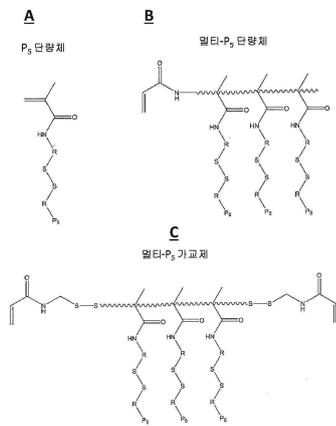
도면27b



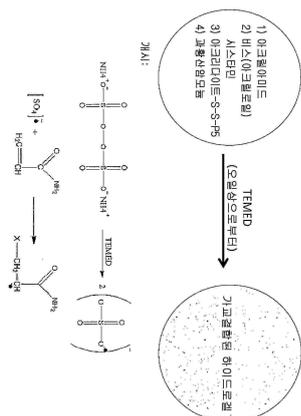
도면28



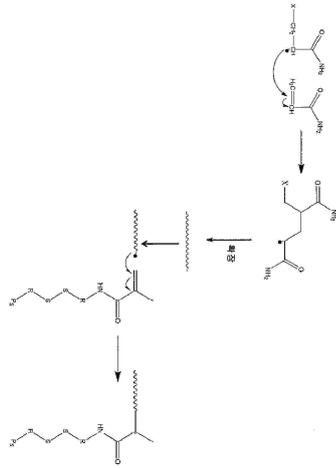
도면29



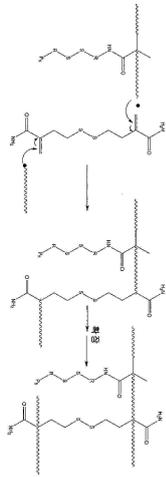
도면30a



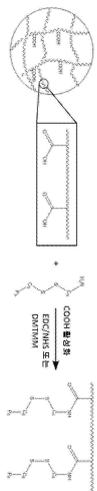
도면30b



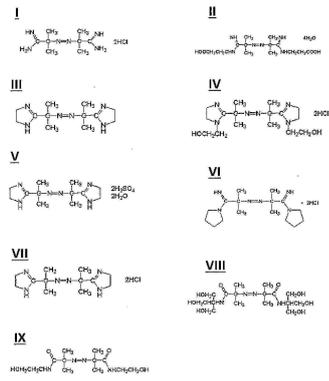
도면30c



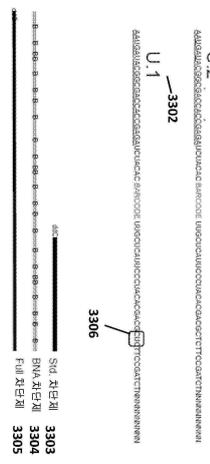
도면31



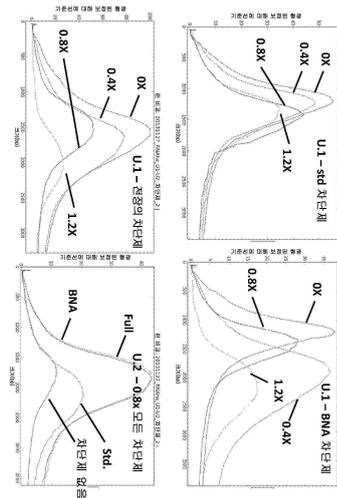
도면32



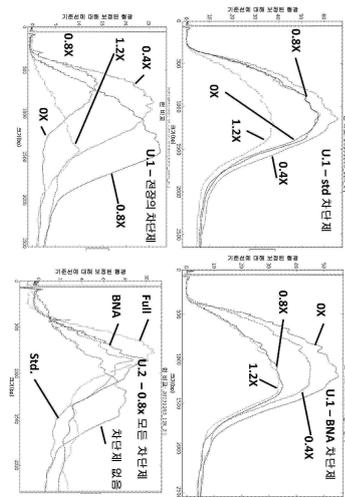
도면33a



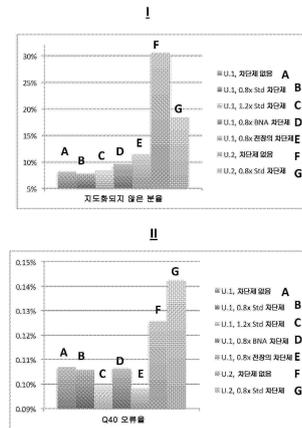
도면33b



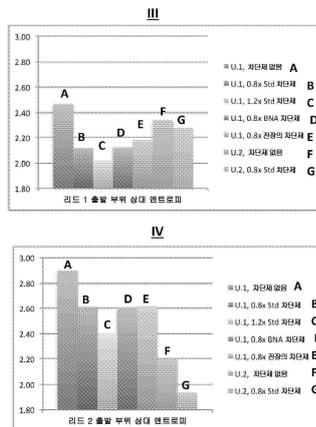
도면33c



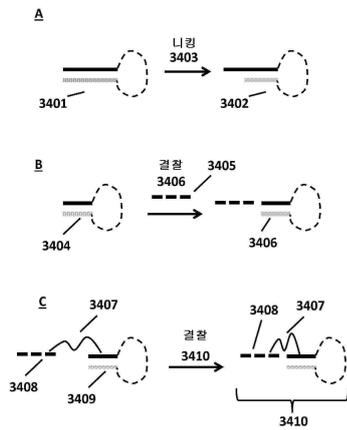
도면33d



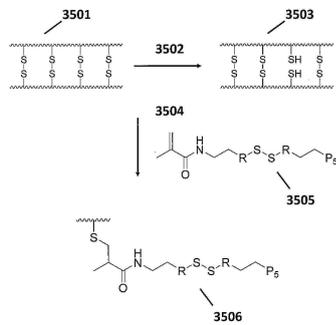
도면33e



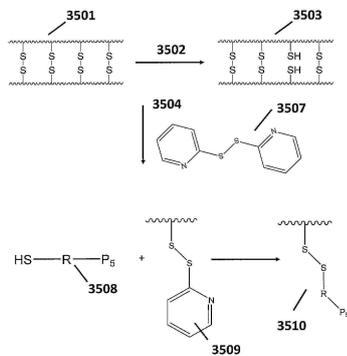
도면34



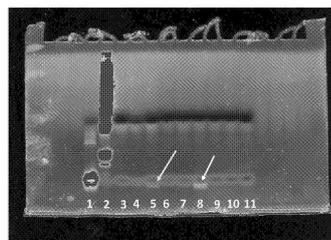
도면35a



도면35b

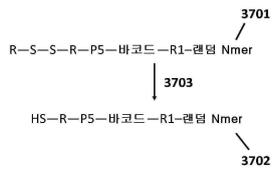


도면36

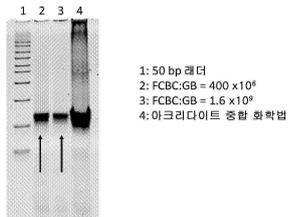


1: 50 pmoles P5-아크리다이트 9-11: TCEP:GB = 0  
 2: 25 bp 래더 3,6,9: P5:GB = 50 x10<sup>6</sup>  
 3-5: TCEP:GB = 2.5 x10<sup>6</sup> 4,7,10: P5:GB = 500 x10<sup>6</sup>  
 6-8: TCEP:GB = 10.0 x10<sup>6</sup> 5,8,11: P5:GB = 5 x10<sup>6</sup>

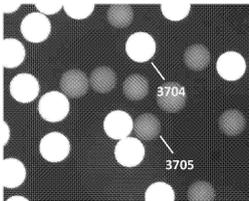
도면37a



도면37b



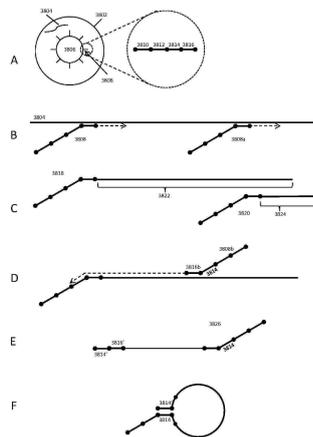
도면37c



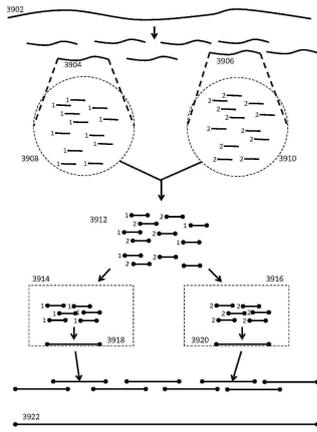
더 밝은 밴드: 마이크로어레이트 중합 화합법  
(덜 밝은 밴드: 높은 비율의 작용화)

어두운 밴드: 티올 이황화물 교환 화합법  
(덜 밝은 밴드: 높은 비율의 작용화)

도면38



도면39



도면40

