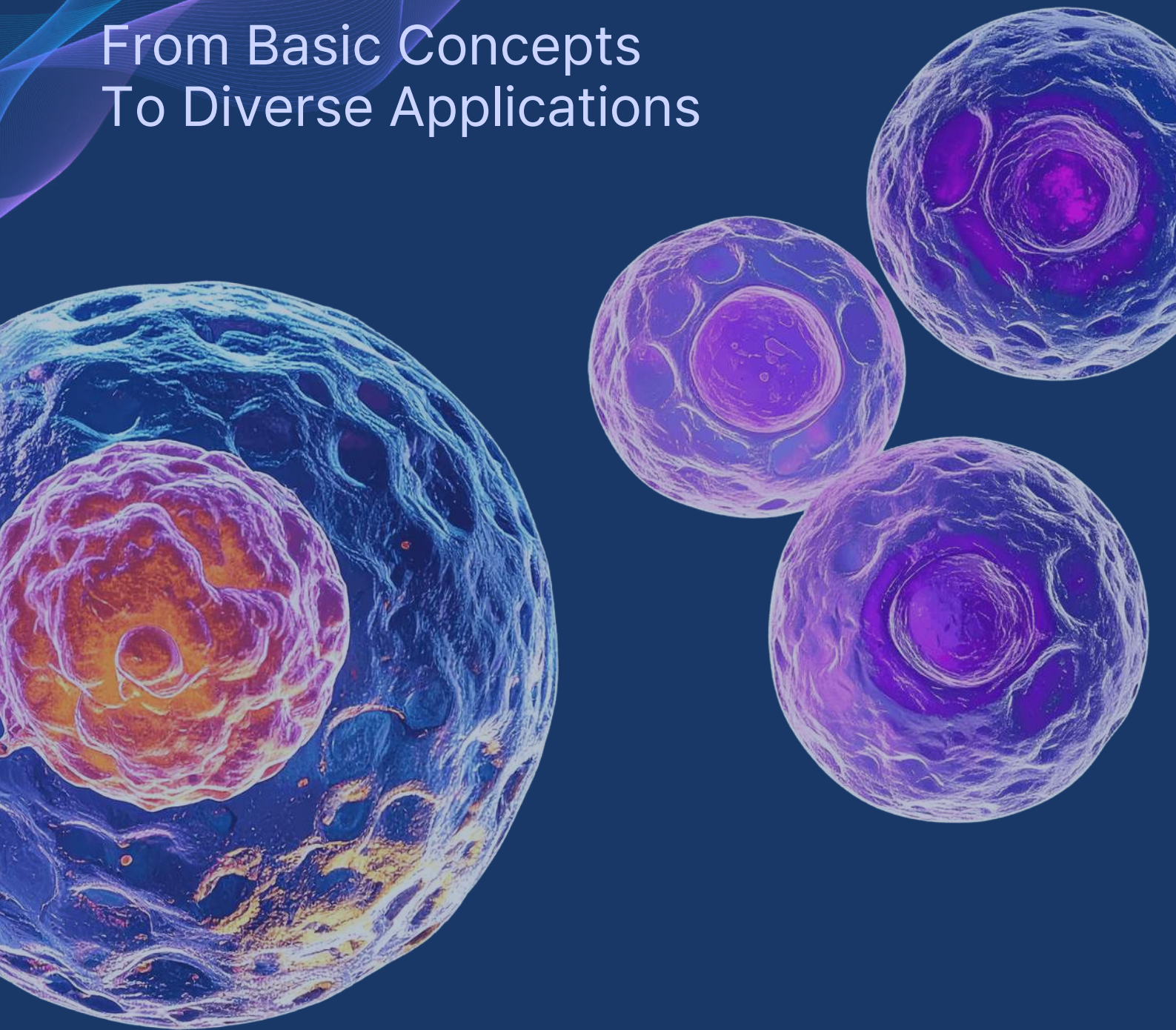


SINGLE CELL RNA-SEQ

From Basic Concepts
To Diverse Applications



EBIOGEN

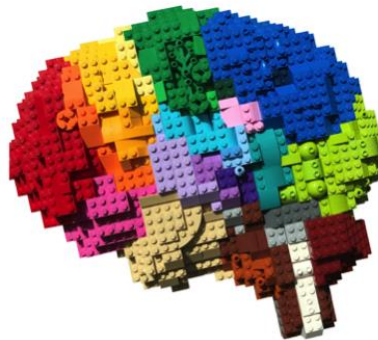
TECHNICAL NOTE | NOV.2025

Single cell RNA-seq : 기본 개념부터 다양한 활용 사례까지

1. scRNA-seq (단일 세포 전사체 분석, single cell RNA sequencing)이란?

단일 세포 전사체 분석 (Single-cell RNA sequencing, 이하 scRNA-seq)으로 단일 세포 수준에서 유전 정보를 분석함으로써 복잡한 생물학적 시스템에 대한 이해가 혁신적으로 발전했다 [1]. 기존의 RNA-seq (이하 bulk RNA-seq)은 세포 집단 전체의 평균 발현량을 제공하여 전사체 연구의 기반을 마련했으나, 세포 간 이질성 (heterogeneity)이나 희귀 세포 (rarer cell types)의 고유한 특성을 구분하기 어렵다는 한계가 있었다 [2,3]. scRNA-seq은 이러한 제약을 극복하여, 단일 세포 단위의 발현 패턴을 분석함으로써 조직 내 다양한 세포 타입의 구성, 세포 상태 변화, 분화 경로의 연속성 (lineage trajectory), 자극·질환 조건에서의 세포 특이적 반응 등을 보다 정밀하게 규명할 수 있다 [4]. 본 기술노트에서는 scRNA-seq의 분석 원리와 대표적인 진행 방식, 최신 활용 사례를 정리하고 이바이오젠에서 제공하는 단일 세포 전사체 분석 서비스에 대해 소개하고자 한다.

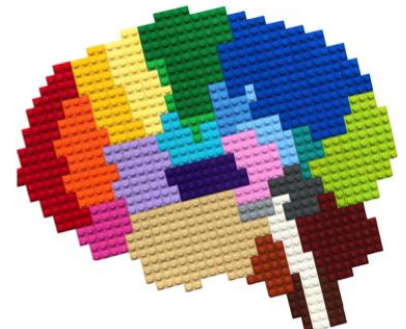
organ



Bulk RNA-seq



scRNA-seq



spatial RNA-seq

Image credit: @BoXia7

2. scRNA-seq 진행 과정과 방법

scRNA-seq 은 다음과 같은 과정을 통해 진행된다 (그림 1)[5]. 조직에서 단일 세포로 분리한 후 각 세포에서 RNA 로 라이브러리를 제작한다. 시퀀싱 후, 데이터는 복잡한 세포 집단 내 발현 차이를 규명하고 세포 타입 및 세포 상태를 분류하는데 활용한다.

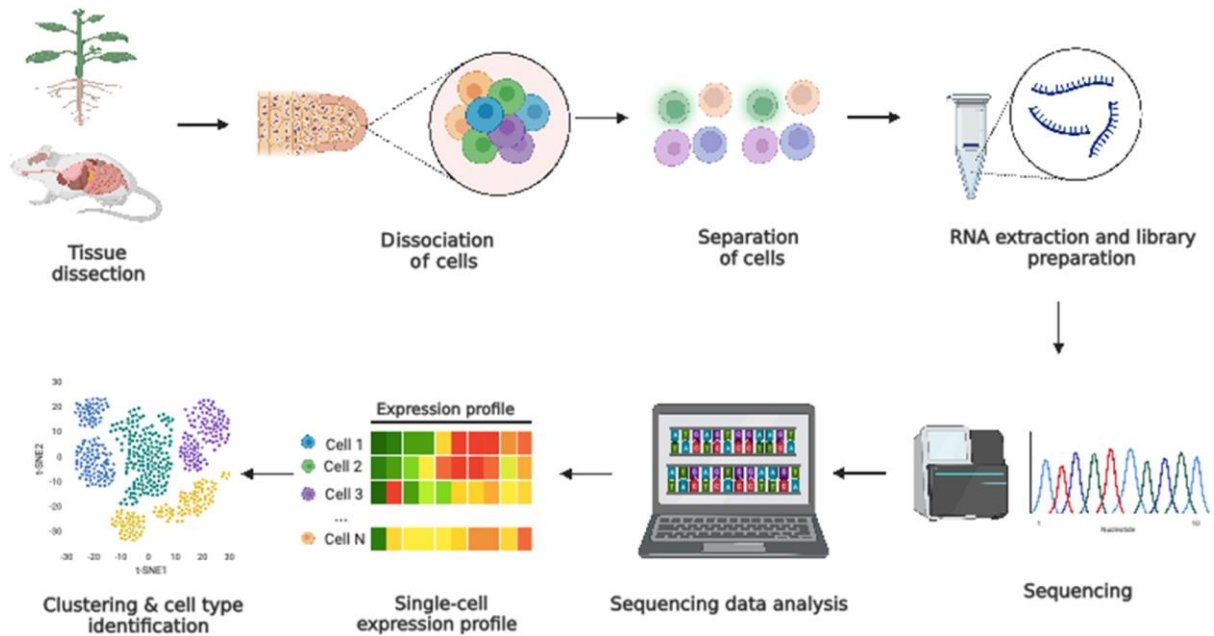


그림 1. scRNA-seq workflow

단일 세포 수준의 전사체 분석을 위해서는 세포를 효율적으로 분리하고 고유한 바코드를 부여하는 과정이 필수적이며, 플랫폼마다 서로 다른 방식으로 single-cell partitioning 을 구현한다 [6]. 대표적인 방식은 아래와 같다.

- **Emulsion 기반 방식**

Microfluidic 또는 vortexing 방식을 이용해 세포와 바코딩 비드를 개별적인 droplet 안에 캡슐화한다.

- 10x Genomics, Illumina (구 Fluent BioSciences)

- **Microwell 기반 방식**

중력·원심력 등을 이용하여 세포를 well 단위로 분리하고, 각 well 에서 바코딩 및 라이브러리 제작을 진행한다.

- BD Biosciences, Honeycomb Biotechnologies

- **Combinatorial Indexing 방식**

세포를 여러 라운드에 걸쳐 서로 다른 바코드가 부여된 well 에 분주·풀링하여 단계적으로 바코딩을 완성하는 방식이다.

- Scale Biosciences, Parse Biosciences

가장 널리 활용되는 **10x Genomics 플랫폼**은 microfluidic 기반의 emulsion 방식을 적용한다. 세포와 바코딩 비드는 microfluidic 채널에서 1:1로 결합되며, 이 결합체는 유화액을 통해 개별 oil droplet으로 캡슐화된다. 이후 droplet 안에서 cDNA 합성이 이루어지고, 이어 라이브러리를 제작한다 (그림 2) [7].

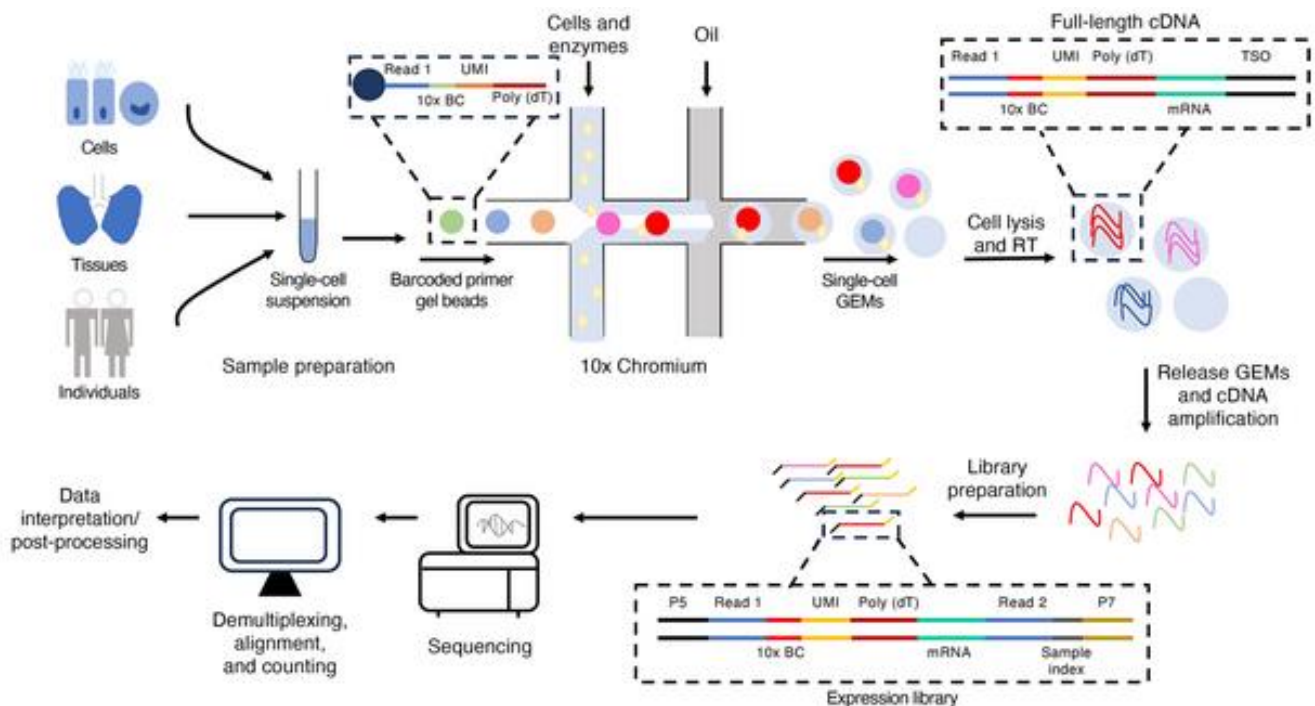


그림 2. microfluidic workflow

Illumina 플랫폼(PIP-seq) 또한 emulsion 방식을 사용하지만, microfluidic 시스템 대신 전용 볼렉서를 이용해 용액 안에서 세포와 비드를 결합시킨다는 점이 다르다. 세포와 비드가 안정적으로 페어링되면 droplet 환경에서 cDNA 합성이 진행되며, 이후 표준 라이브러리 제작 과정을 거친다 (그림 3) [8].

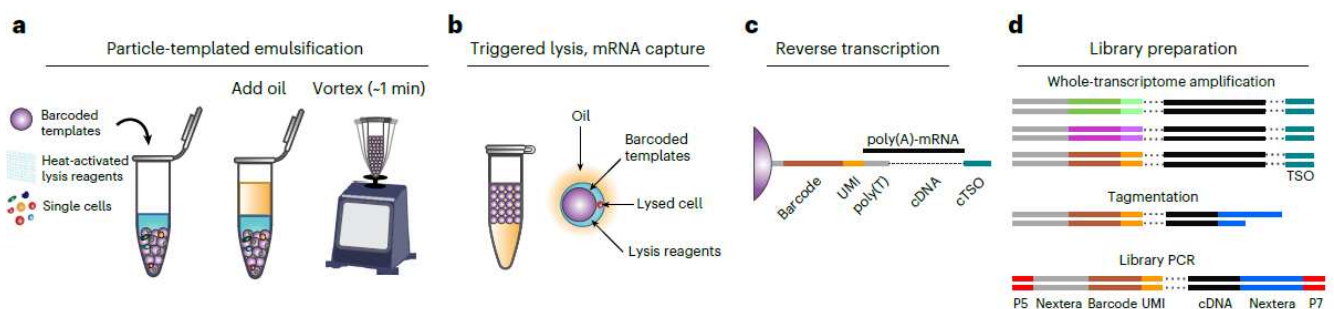


그림 3. PIP-seq workflow

3. 활용

scRNA-seq은 다양한 생물학·의학 분야에서 그 활용도가 빠르게 확장되고 있으며, 단일 세포 수준의 정보를 기반으로 기존 bulk RNA-seq 분석에서 확인하기 어려웠던 세포 간 이질성, 세포 상태 변화, 미세환경 상호작용을 정밀하게 해석할 수 있게 한다. 최근에는 단일 세포 유전체·전사체·후성유전체·단백체 분석을 통합하는

멀티오믹스 연구, 그리고 공간 정보를 통합하는 공간 전사체 분석 (spatial transcriptomics)과 결합하여 임상 연구에 폭넓게 적용되고 있다.

종양미세환경 (Tumor microenvironment, 이하 TME)은 종양 초기 단계에 중요한 역할을 하며 종양 내 이질성 형성에도 크게 기여한다. TME는 다양한 세포 집단으로 구성되어 있으며, 종양과 지속적으로 상호작용하기 때문에 종양 치료나 환자의 생존 예후에 깊은 영향을 미친다 [9]. 단일 세포 수준의 다양한 오믹스(omics) 분석은 종양과 TME를 연구하는 데에 활용한다. TME 내의 복잡한 세포 구성과 동적 상태를 고해상도로 분석할 수 있게 하여 암세포뿐 만 아니라 다양한 면역세포 하위집단 (T 세포, B 세포, NK 세포, 수지상세포, MDSC 등)과 암 연관 섬유아세포(CAFs)와 같은 기질세포에 대한 연구가 가능하게 한다.

단일 세포 수준에서 이루어지는 다양한 분석 (유전체학, 전사체학, 후성유전체학, 단백체학, TCR/BCR 시퀀싱, 공간 분석, 다중오믹스 통합 분석 등)은 종양이 어떻게 발생하고 진행하는지 그 핵심 과정을 이해하는 데에 직접적으로 활용된다. 이러한 접근법을 통해 연구자들은 암 발생 초기의 분자 변화를 포착하고, 전이가 진행되면서 나타나는 세포 상태 변화와 이동 경로를 추적하며, 세포 간 신호전달을 리간드-수용체 네트워크 관점에서 해석할 수 있다. 또한 종양 내부에서 세포 집단이 어떻게 분화하고 확장하는지, 즉 클론이 성장하고 변하는 흐름까지도 보다 선명하게 그려낼 수 있다 (그림 4)[9].

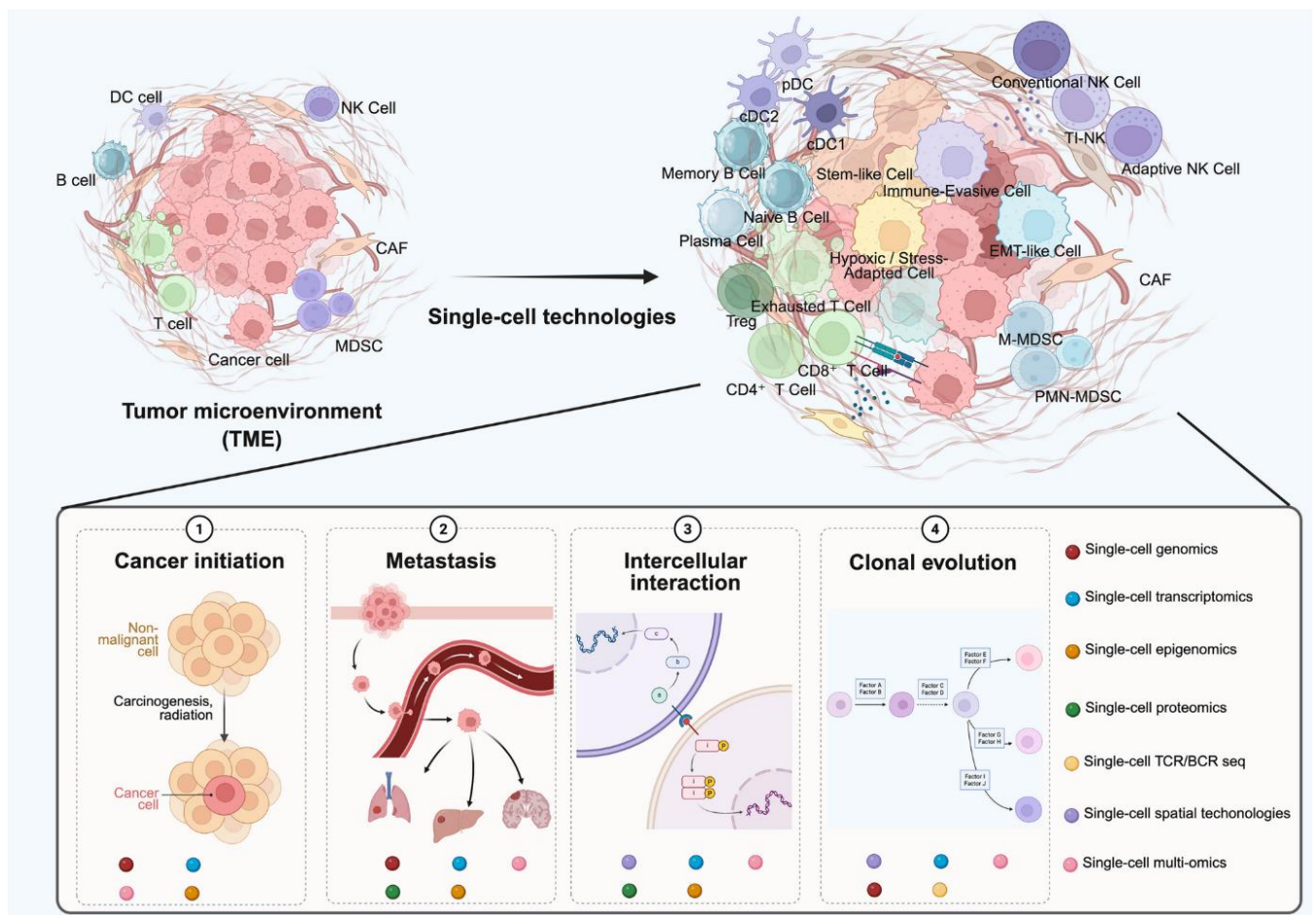


그림 4. 종양미세환경 전반에 걸친 종양 이질성 연구에 활용되는 단일 세포 분석

특히 이 중에서도 scRNA-seq은 세포 내 전사 과정의 변화와 조절에 대해 개별 종양 세포 수준에서 고해상도로 탐색할 수 있게 함으로써 종양 생물학에 대한 이해를 크게 향상시켰다. 단일세포 수준에서의 분자적 변화를 포착함으로써, scRNA-seq은 종양의 개시와 진행의 유전적 기반을 밝히는 것뿐 만 아니라, 전이

기전(metastasis mechanisms), 종양 내 이질성(intratatumoral heterogeneity), 면역 환경(immune landscapes), 그리고 TME 내의 복잡한 세포 간 상호작용에 대한 중요한 통찰을 제공한다.

scRNA-seq 는 종양의 진행 과정 중 다양한 단계에서 악성으로 전환되는 것과 관련한 전사체적 변화를 정밀하게 매핑할 수 있도록 한다 [10, 11]. 예를 들어, 대장암의 경우 APC 유전자의 돌연변이가 대부분의 대장 폴립과 대장암에서의 종양 발생의 시작으로 작용한다. 연구자들은 이 돌연변이를 보유한 가족성 선종성 용종증(familial adenomatous polyposis) 환자의 대장 폴립과, 건강한 사람의 정상 대장 조직을 대상으로 scRNA-seq 을 수행하였다. 그 결과, 장 상피세포의 악성 종양으로의 전환 과정에서 LGR5, SMOC2, RGMB 와 같은 줄기세포 표지 유전자의 발현이 유의하게 증가함을 발견하였다. 또한, 연구진은 ASCL2 발현이 높게 나타나는 '슈퍼 줄기세포(super stem cell)' 유형을 규명하였는데, 이 세포는 줄기세포성을 유지하며 암세포의 증식과 침윤을 촉진하는 것으로 나타났다 [12]. 이와 유사한 접근법은 위암 [13], 두경부 편평세포암 [14], 그리고 폐선암 [15] 연구에도 적용되었으며, 이를 통해 scRNA-seq 이 조기 암 진단과 종양 세포 이질성에 기반한 신규 치료 표적 발굴에 활용될 수 있음을 입증하였다.

종양 세포 자체의 이질성뿐만 아니라, TME 내의 면역 세포 역시 높은 복잡성을 보인다. scRNA-seq 을 활용하여 종양 면역 이질성 (tumor immune heterogeneity)을 연구함으로써, 질병의 진행 과정과 치료 반응 과정에서의 면역세포의 구성이 어떻게 변화하는지를 알 수 있다. Alcazar et al. [16] 에서는 제자리 관상암 (ductal carcinoma in situ)이 침윤성 유방암 (invasive breast cancer)으로 진행되는 과정에서 CD8⁺ T 세포의 수, 조절 T 세포 (regulatory T cells)의 비율, 그리고 TCR (T cell Receptor)의 클론 다양성 (clonal diversity)이 유의하게 변화함을 발견하였다. 이러한 변화는 면역 억제 (immunosuppression)가 점진적으로 증가함을 반영하며, PD-L1 및 CTLA4 발현 증가, 그리고 TCR 클론형 다양성 감소로 확인되었다.

scRNA-seq 은 희귀 면역세포 집단 (rare immune cell populations)을 식별하고, 이들이 종양 면역반응 (tumor immune responses)에 미치는 영향을 분석하는 데에도 활용될 수 있다. 이를 통해 암 환자 맞춤형 정밀 치료 (precision therapy)의 기반을 마련할 수 있다. Cui et al. [17] 에서는 scRNA-seq 분석을 통해 폐암에서 SELENOP (Selenoprotein P)을 발현하는 희귀 대식세포 아형 (SELENOP-expressing macrophage subset)을 발견하였으며, 이 세포들이 항암 기능을 가진다는 사실을 규명하였다. 이 발견은 해당 세포 집단이 면역치료의 새로운 잠재적 표적이 될 수 있음을 시사하며, 정밀종양학 (precision oncology)에서 scRNA-seq 의 임상적 중요성을 부각시킨다.

또한 Li et al. [18] 에서는 복막 전이를 동반한 위암 환자 중에서 항-PD-1 항체인 신틸리맵 (sintilimab)으로 치료받은 환자로부터 채취한 샘플에 대해 scRNA-seq 분석을 수행함으로써, 연구자들은 SPP1⁺ 종양 연관 대식세포 (tumor-associated macrophages)와 Thrombospondin 2⁺ 기질성 암연관 섬유아세포 (matrix cancer-associated fibroblasts)로 구성된 기질-골수(stroma-myeloid) 니치가 지배적인 면역억제성 생태계 (immunosuppressive ecosystem)를 형성하고 있음을 밝혀냈다. 이러한 기질세포와 면역세포 간의 상호작용 (crosstalk)을 차단하자, 면역 관문 억제제 (immune checkpoint blockade)의 치료 효능이 현저히 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

종합적으로, scRNA-seq 는 종양 발생과 진행에서부터 전이, 면역 회피, 그리고 치료 저항에 이르기까지, 종양 생물학 전반에 걸쳐 포괄적이고 고해상도의 통찰을 제공함으로써 더 깊이 있는 종양 연구가 가능하게 하였다.

뿐만 아니라 scRNA-seq 은 공간 전사체학 (Spatial transcriptomics)과도 함께 연구에 활용되기도 한다. Xu et al. [19], Ji et al. [20] 에서는 scRNA-seq 과 spatial transcriptomics 을 결합하여 췌장암과 편평세포암 연구에 활용했다. 이를 통해 종양 세포와 면역세포 간의 새로운 상호작용이 밝혀졌으며 두 연구 모두 섬유혈관성 니치 (fibrovascular niches) 내에서의 암세포 집적 (cancer cell aggregation)을 확인한 반면, 면역세포는 주로 특정

구획에 공간적으로 제한되어 있음이 관찰되었다. 이는 면역 배제 (immune exclusion)의 잠재적 기전으로서 세포 군집 별로 분석하는 것에서 더 나아가 공간적으로 나누어 분석하는 것의 중요성을 알 수 있다.

또한 scRNA-seq 과 spatial transcriptome 를 함께 분석함으로써 특정 세포 타입이 종양의 진행을 조절하고 치료 저항에도 영향을 줄 수 있다는 것을 밝혀내는 연구도 활발히 이루어지고 있다. Zhang et al. [21]에서는 scRNA-seq 와 spatial transcriptomics 분석을 통해 고등급 장액성 난소암 (high-grade serous ovarian carcinoma)에서 섬유아세포 (fibroblasts), 근섬유아세포 (myofibroblasts), 암연관 중간엽 줄기세포 (cancer-associated mesenchymal stem cells) 등 서로 구별되는 기질세포 아형들을 규명했다. 높은 기질 비율 (high-stroma)을 가진 종양에서는 CXCL12-CXCR4 수용체 상호작용을 매개로 침윤 NK 세포와 CD8⁺ T 세포와 복잡한 파라크린 신호 네트워크 (paracrine signaling networks)를 형성하여, 면역 배제를 촉진하고 항종양 면역반응 (anti-tumor immune responses)을 억제하는 것으로 나타났다.

이처럼 scRNA-seq 을 기반으로 spatial transcriptome 분석까지 확장된 연구는 종양 이질성 (tumor heterogeneity)과 면역 역동성 (immune dynamics)에 대한 이해를 확장하고, 치료 저항 (therapeutic resistance)의 기전에 관한 새로운 통찰을 제공하여 더 효과적인 개인 맞춤형 면역치료 전략 (personalized immunotherapy strategies) 개발로까지 이어지는 길을 열고 있다.

4. E-biogen's Service

이바이오젠에서는 조직이나 세포 집단의 전사체 분석 한계점을 극복하기 위해 단일 세포의 전사체를 분석할 수 있는 다양한 single cell RNA-seq 서비스를 제공함으로써 세포 간 유전자 발현의 다양성을 확인할 수 있도록 한다. 전문 인력과 맞춤형 상담을 통해 연구자의 상황과 목적에 맞게 최적의 실험 서비스를 제공하고자 한다.

scRNA-seq GEM-X

10x genomics 사의 Next GEM-X 3' technology 기술을 사용한 scRNA-seq 방식이다. 가장 널리 사용되는 방식 중 하나로, 샘플 당 3,000 cells 부터 20,000 cells 까지 target cells 수를 결정할 수 있다. 자체 분석 파이프라인인 Cell Ranger 파이프라인과 visualization tool 인 Loupe browser 를 활용하여 분석이 가능하며, 이바이오젠에서 제공하는 자체 응용프로그램인 WinSeurat 프로그램과 ExSCEA report 로 더욱 연구자 편의에 맞춘 분석이 가능하다.

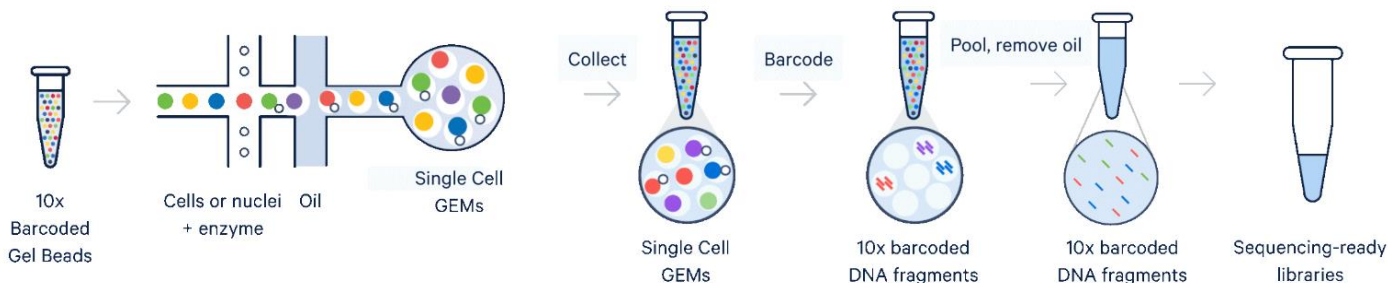


그림 5. scRNA-seq GEM-X 의 실험 과정 모식도 [22]

Sample requirement	Cell line, Primary cell, FACS sorted cell : 250,000 cells (Viability > 70%) Tissue ⁺ : Fresh Tissue 200 mg 이상 (in MACS buffer)
Library method	10X Genomics Next GEM-X 3' technology
Number of Target cell	3,000 ~ 20,000 cells
Turnaround Time	~ 4 weeks after Cell counting & QC
Data analysis	ExSCEA Report, UMAP, t-SNE, PCA, Clustering heatmap (Seurat/Loupe 기반 분석 제공 등)

+ Tissue dissociation 과정은 별도 상담이 필요할 수 있습니다.

scRNA-seq OCM

10x genomics 사의 Next GEM-X 3' technology 기술을 사용한 On Chip Multiplexing (OCM) scRNA-seq 방식이다. 4개 샘플을 한 번에 진행하며, 각 샘플 당 5,000 cells까지 target cells 수를 결정할 수 있다. GEM-X 서비스와 마찬가지로 자체 분석 파이프라인인 Cell Ranger 파이프라인과 visualization tool인 Loupe browser를 활용하여 분석이 가능하며, 이바이오젠에서 제공하는 자체 응용프로그램인 WinSeurat 프로그램과 ExSCEA report로 더욱 연구자 편의에 맞춘 분석이 가능하다.

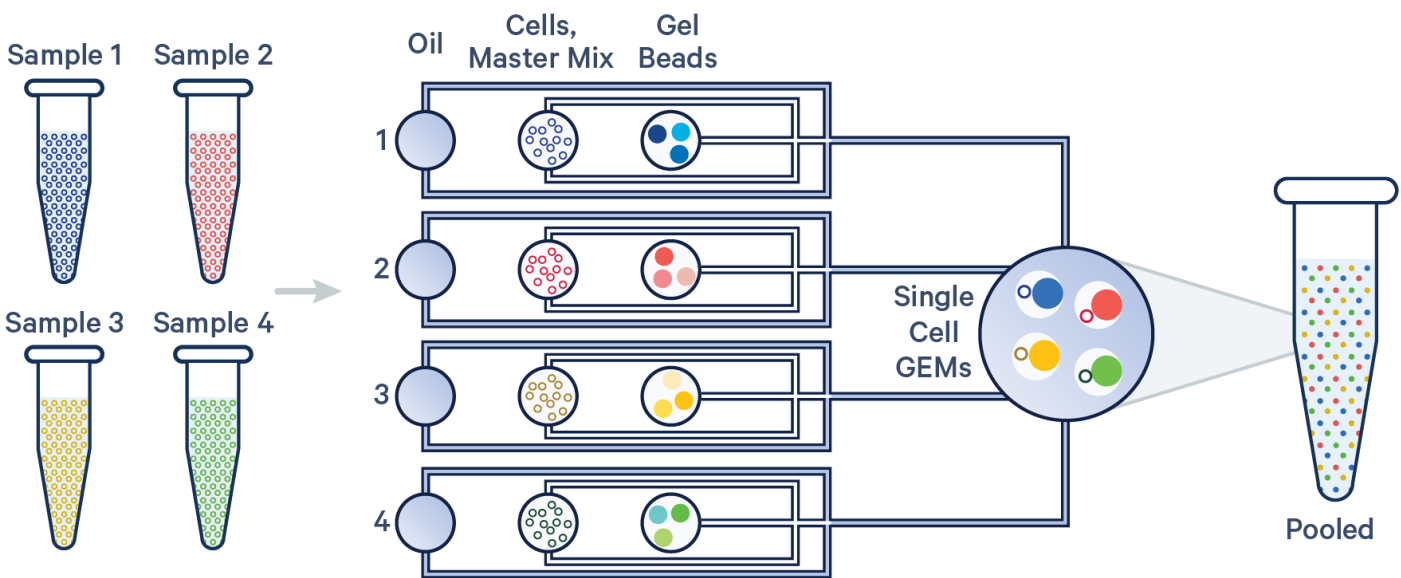


그림 6. scRNA-seq OCM의 실험 과정 모식도 [22]

Sample requirement	Cell line, Primary cell, FACS sorted cell : 250,000 cells (Viability > 70%) Tissue ⁺ : Fresh Tissue 200 mg 이상 (in MACS buffer)
Library method	10X Genomics Next GEM-X 3' technology
Number of Target cell	5,000 cells
Turnaround Time	~ 4 weeks after Cell counting & QC
Data analysis	ExSCEA Report, UMAP, t-SNE, PCA, Clustering heatmap (Seurat/Loupe 기반 분석 제공 등)

+ Tissue dissociation 과정은 별도 상담이 필요할 수 있습니다.

Illumina scRNA-seq

Illumina 사의 scRNA-seq 방식으로, 각 샘플 당 10,000 cells 혹은 20,000 cells target cells 수를 결정할 수 있다. Illumina의 자체 분석 파이프라인인 DRAGEN 분석 파이프라인을 사용하여 분석하며, 이바이오젠에서 제공하는 자체 응용프로그램인 WinSeurat 프로그램과 ExSCEA report로 더욱 연구자 편의에 맞춘 분석이 가능하다.

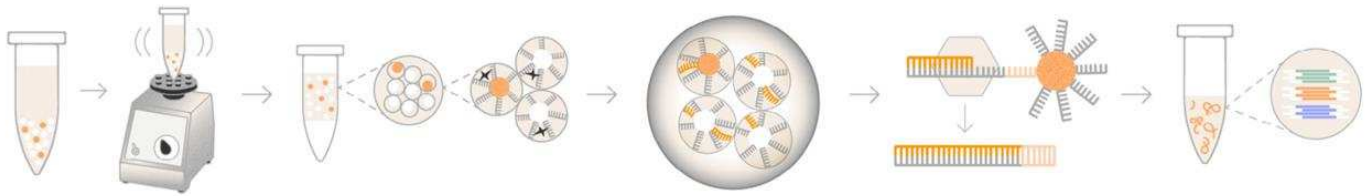


그림 7. Illumina scRNA-seq 의 실험 과정 모식도 [22]

Sample requirement	Cell line, Primary cell, FACS sorted cell : 500,000 cells (Viability > 70%) Tissue ⁺ : Fresh Tissue 200 mg 이상 (in MACS buffer)
Library method	Illumina single cell 3' RNA-Seq preparation
Number of Target cell	10,000 cells / 20,000 cells
Turnaround Time	~ 4 weeks after Cell counting & QC
Data analysis	QC Report, Gene expression data, UMAP, t-SNE, Feature selection PCA, Clustering heatmap 등 (Dragen 기반 분석 제공)

+ Tissue dissociation 과정은 별도 상담이 필요할 수 있습니다.

이바이오젠은 다양한 실험, 분석 서비스를 제공함으로써 연구자의 연구가 최적의 프로세스로 최선의 결과를 도출하도록 지원하고자 한다. 이 글에서 소개한 scRNA-seq 서비스뿐 아니라 bulk RNA-seq, spatial genomics, proteomics 등 다양한 분야의 실험 분석 서비스로 연구자들의 다양한 요구를 충족시켜왔다. 이바이오젠은 오랜 시간 쌓아온 다양한 연구 분야에서의 노하우로 연구자 맞춤으로 상담을 진행하여 가장 적합한 방식으로 실험 서비스를 제공하고, 전문 분석 인력을 배치하여 연구자가 원하는 분석까지 구현하고 그 결과를 제공하고 있다. 또한 연구자가 직접 분석할 수 있도록 이론부터 분석까지 교육하는 무료 분석 세미나도 시행 중이다. 이바이오젠 홈페이지 (www.e-biogen.com)에서 다양한 서비스 및 분석 세미나에 대한 내용 확인이 가능하며, 자세한 상담 혹은 문의가 필요하면 전화 (02-3141-0791)나 메일 (service@e-biogen.com)로도 문의가 가능하다.

5. 참고문헌

1. Hedlund E, Deng Q. Single-cell RNA sequencing: Technical advancements and biological applications. *Mol Aspects Med* 2018;**59**:36–46. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.07.003>
2. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009;**10**:57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
3. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med* 2018;**50**:1–14. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
4. WOO, Hyunmin; EYUN, Seong-il. Applications and techniques of single-cell RNA sequencing across diverse species. *Briefings in bioinformatics*, 2025, 26.4: bbaf354. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaf354>
5. NETLA, Vamsidhar Reddy, et al. A comparative analysis of single-cell transcriptomic technologies in plants and animals. *Current Plant Biology*, 2023, 35: 100289. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2023.100289>
6. DE SIMONE, Marco, et al. Comparative analysis of commercial single-cell RNA sequencing technologies. *BioRxiv*, 2024, 2024.06.18.599579. <https://doi.org/10.1101/2024.06.18.599579>
7. SWAMINATH, Sharmada; RUSSELL, Alistair B. The use of single-cell RNA-seq to study heterogeneity at varying levels of virus–host interactions. *PLoS Pathogens*, 2024, 20.1: e1011898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011898>
8. CLARK, Iain C., et al. Microfluidics-free single-cell genomics with templated emulsification. *Nature Biotechnology*, 2023, 41.11: 1557–1566. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01685-z>
9. LE, Jiayuan, et al. Single-cell multi-omics in cancer immunotherapy: from tumor heterogeneity to personalized precision treatment. *Molecular Cancer*, 2025, 24.1: 221. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02426-3>
10. Ma L, et al. Tumor cell biodiversity drives microenvironmental reprogramming in liver cancer. *Cancer Cell*, 2019, 36:418–e430416. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.007>.
11. Liu Y, et al. Immune phenotypic linkage between colorectal cancer and liver metastasis. *Cancer Cell*, 2022, 40:424–e437425. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.02.013>.
12. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*, 2015, 348:69–74. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4971>.
13. Gubin MM, Artyomov MN, Mardis ER, Schreiber RD. Tumor neoantigens: Building a framework for personalized cancer immunotherapy. *J Clin Invest*, 2015, 125:3413–21. <https://doi.org/10.1172/jci80008>.
14. Koşaloğlu-Yalçın Z, et al. Predicting T cell recognition of MHC class I restricted neoepitopes. *Oncoimmunology*, 2018, 7:e1492508. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2018.1492508>.
15. Cracking cancer: Using long-read RNA sequencing for cancer neoantigen discovery. 2023, <https://www.pacb.com/blog/cracking-cancer-using-long-read-rna-sequencing-for-cancer-neoantigen-discovery/>.
www.e-biogen.com

16. GIL DEL ALCAZAR, Carlos R., et al. Immune escape in breast cancer during in situ to invasive carcinoma transition. *Cancer discovery*, 2017, 7.10: 1098-1115. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0222>
17. CUI, Xiaolu, et al. Single-cell and spatial transcriptomic analyses revealing tumor microenvironment remodeling after neoadjuvant chemoimmunotherapy in non-small cell lung cancer. *Molecular cancer*, 2025, 24.1: 111. <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02287-w>
18. LI, Yuanfang, et al. CAF-macrophage crosstalk in tumour microenvironments governs the response to immune checkpoint blockade in gastric cancer peritoneal metastases. *Gut*, 2025, 74.3: 350-363. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2024-333617>
19. XU, Yanfen, et al. Multimodal single cell-resolved spatial proteomics reveal pancreatic tumor heterogeneity. *Nature Communications*, 2024, 15.1: 10100. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-54438-0>
20. JI, Andrew L., et al. Multimodal analysis of composition and spatial architecture in human squamous cell carcinoma. *cell*, 2020, 182.2: 497-514. e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.039>
21. ZHANG, Linan, et al. Single-cell analysis reveals the stromal dynamics and tumor-specific characteristics in the microenvironment of ovarian cancer. *Communications Biology*, 2024, 7.1: 20. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05733-x>
22. 이바이오젠 홈페이지, <https://www.e-biogen.com/service/single-cell-rna-seq>