

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7590955号
(P7590955)

(45)発行日 令和6年11月27日(2024.11.27)

(24)登録日 令和6年11月19日(2024.11.19)

(51)国際特許分類		F I			
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A	
C 1 2 Q	1/6881(2018.01)	C 1 2 Q	1/6881	Z	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	
C 0 7 K	1/13 (2006.01)	C 0 7 K	1/13		
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	1 0 0 Z	
					請求項の数 22 (全169頁)
(21)出願番号 特願2021-507836(P2021-507836)		(73)特許権者 595117091			
(86)(22)出願日 令和1年8月14日(2019.8.14)				ベクトン・ディキンソン・アンド・カン	
(65)公表番号 特表2021-533781(P2021-533781				パニー	
A)				B E C T O N , D I C K I N S O N A	
(43)公表日 令和3年12月9日(2021.12.9)				N D C O M P A N Y	
(86)国際出願番号 PCT/US2019/046549				アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 0	
(87)国際公開番号 WO2020/037065				7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レ	
(87)国際公開日 令和2年2月20日(2020.2.20)				イクス ベクトン・ドライブ 1	
審査請求日 令和4年8月10日(2022.8.10)		(74)代理人 100103610			
(31)優先権主張番号 62/719,406				弁理士 ▲吉▼田 和彦	
(32)優先日 平成30年8月17日(2018.8.17)		(74)代理人 100109070			
(33)優先権主張国・地域又は機関				弁理士 須田 洋之	
米国(US)		(74)代理人 100119013			
前置審査				弁理士 山崎 一夫	
		(74)代理人 100111796			
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アプタマーバーコーディング

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料を識別するための方法であって、
複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、
前記複数の試料の各々は、各々が1つまたは複数の細胞成分標的を含む1つまたは複数の細胞を含み、前記試料インデックス付与組成物は、アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、単一ポリヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび前記アプタマーを含み、前記アプタマーは、前記1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、
前記アプタマー組成物は、前記1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2のアプタマーと、第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドとを含み
前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、異なっており、前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、前記1つまたは複数の細胞成分標的のうちの異なる細胞成分標的に結合することが可能であり、
単一ポリヌクレオチドは、前記第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび前記第2のアプタマーを含み、
前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み

、前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含み、前記第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、第2の試料インデックス付与配列を含み、前記試料インデックス付与配列および前記第2の試料インデックス付与配列は同一である、接触させること；および

前記複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む方法。

【請求項2】

(a) 前記少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、

複数のバーコードを使用して前記複数の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；

前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および

前記配列決定データ中の前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記細胞の試料起源を識別することを含み、

(b) 前記少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、前記複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列の存在または非存在を識別することを含み、

任意に、前記試料インデックス付与配列の存在または非存在の識別は、

前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；

前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および

前記配列決定データ中の前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに対応する前記複数の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記細胞の試料起源を識別することを含んでいてもよく、

任意に、前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、

(i) 前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製用アダプターを前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートさせることであって、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートされた前記複製用アダプターを使用して、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、ライゲートさせること、又は

(ii) 前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを、前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを生成し、かつ前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記捕捉プローブを伸長して、前記捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することであって、前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、前記捕捉プローブが付随している前記試料

10

20

30

40

50

インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、生成すること、
を含んでいてもよい、
請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(a) 前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含む、

(b) 前記試料インデックス付与配列は、6 ～ 60 ヌクレオチド長または 50 ～ 500 ヌクレオチド長である、

(c) 前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも 10、100、または 1000 個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、

10

(d) 前記アプタマーは、

(i) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの 5' 側にある、又は

(ii) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの 3' 側にある、及び／又は

(e) 前記アプタマーは、

ヌクレオチドアプタマーを含み、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸 (DNA)、リボ核酸 (RNA)、ゼノ核酸 (XNA)、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含んでいてもよく、任意に、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい

20

請求項 1 ～ 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

(a) 前記試料インデックス付与組成物は、第 1 の担体に付随している、及び／又は

(b) 前記アプタマー組成物は、第 1 の担体に付随している、及び／又は

(c) (i) 前記アプタマーおよび前記第 2 のアプタマーは、第 1 の担体に付随している、又は

(ii) 前記アプタマーは、第 1 の担体に付随し、かつ前記第 2 のアプタマーは、第 2 の担体に付随している、

30

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

(a) 前記第 1 の担体は、

(i) 金属ナノ材料であって、任意に、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せを含んでいてもよい金属ナノ材料、および／または

(ii) 金ナノ材料であって、任意に、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってよい金ナノ材料、および／または

(iii) リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せを含む、

40

(b) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体に付着されており、任意に、前記アプタマーは、前記第 1 の担体に共有結合で付着されていてもよい、

(c) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体にコンジュゲートされており、任意に、前記アプタマーは、UV 光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第 1 の担体にコンジュゲートされていてもよい、

(d) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体に非共有結合で連結されている、

(e) 前記アプタマーは、リンカーを介して前記第 1 の担体に付随している、及び／又は

(f) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体上に固定化されているか、前記第 1 の担体上に部分的に固定化されているか、前記第 1 の担体内に固定化されているか、前記第 1 の担体

50

内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

(a) 前記アプタマーを前記第1の担体から解離させることを含み、任意に、前記解離は、

(i) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングした後に生じてもよく、又は

(ii) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングする前に生じてもよく、及び／又は

(b) 前記複数の試料の各々を前記試料インデックス付与組成物と接触させることは、前記試料の前記1つまたは複数の細胞のうちの細胞を前記試料インデックス付与組成物と接触させることを含み、任意に、前記第1の担体は、前記細胞へと内部移行されてもよく、任意に、前記内部移行は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せによるものであってもよい、

請求項4(c)又は5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

(a) 前記1つもしくは複数のタンパク質標的または前記1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの前記少なくとも1つは、細胞表面上にある、

(b) 前記方法が、前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去することを含む、

(c) 前記未結合試料インデックス付与組成物の除去は、(a) 前記複数の試料の各々に由来する前記1つもしくは複数の細胞を洗浄緩衝液で洗浄すること、(b) フローサイトメトリーを使用して、少なくとも1つのアプタマーに結合している細胞を選択すること、または(a)及び(b)の両方を含む、及び／又は

(d) 前記方法が、前記複数の試料の各々に由来する前記1つまたは複数の細胞を溶解することを含む、

請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

(a) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記1つもしくは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではないか、種のゲノム配列と相同性であるか、またはそれらの組合せであり、任意に、前記種は、非哺乳動物種であってもよい、

(b) 前記複数の試料のうちの試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む、

(c) 前記複数の試料は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む、

(d) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含み、任意に、

(i) 前記少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数のバーコードを使用して前記複数の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでいてもよく、前記バーコードは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよく、任意に、前記標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよく、又は

(ii) 前記捕捉配列に相補的な前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含んでいてもよく、任意に、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記ポリ(dA)領域に隣接するアラインメント配列を含んでいてもよく

10

20

30

40

50

、任意に、(a) 前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよく、(b) 前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、および／あるいは(c) 前記アラインメント配列は、ポリ(d T) 領域、ポリ(d G) 領域、ポリ(d C) 領域、ポリ(d U) 領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、及び／又は

(e) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含み、任意に、前記分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長または5～50ヌクレオチド長であってもよく、任意に、前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、

10

(f) 前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含み、前記タンパク質標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、

(g) 前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含み、前記タンパク質標的は、10～100個の異なるタンパク質標的を含む群から選択される、

(h) 前記細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、

20

(i) 前記細胞成分標的は、10～100個の異なる細胞成分標的を含む群から選択される、及び／又は

(j) 前記アプタマーには、

(A) 同一の配列、又は

(B) 異なる試料インデックス付与配列

を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、及び／又は

(k) 前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの前記試料インデックス付与組成物は、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない第2のアプタマーを含み、任意に、前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは同一であってもよい、及び／又は

30

(l) 前記複数の試料インデックス付与組成物の各々は、前記アプタマーを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

複数の試料インデックス付与組成物であって、

前記複数の試料インデックス付与組成物の各々は、第1の細胞成分結合性アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、

単一ポリヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび前記アプタマーを含み、

前記細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、

40

前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含み、

前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含み、

前記アプタマー組成物は、前記1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2のアプタマーと、第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドとを含み、

前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、異なっており、

前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、前記1つもしくは複数の細胞成分標的

50

のうちの異なる細胞成分標的に結合することが可能であり、

単一ポリヌクレオチドは、前記第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび前記第2のアプタマーを含み、

前記第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、第2の試料インデックス付与配列を含み、

前記試料インデックス付与配列および前記第2の試料インデックス付与配列は同一である、

複数の試料インデックス付与組成物。

【請求項10】

(a) 前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含む、

(b) 前記試料インデックス付与配列は、6～60ヌクレオチド長または50～500ヌクレオチド長である、

(c) 前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または1000個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、

(d) 前記アプタマーは、

(i) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にある、又は

(ii) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にある、及び／又は

(e) 前記アプタマーは、

ヌクレオチドアプタマーを含み、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでもよく、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含んでもよく、任意に、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでもよい

請求項9に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

【請求項11】

(a) 前記試料インデックス付与組成物は、第1の担体に付随している、

(b) 前記アプタマー組成物は、第1の担体に付随している、及び／又は

(c) (i) 前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、第1の担体に付随している、又は

(ii) 前記アプタマーは、第1の担体に付随し、かつ前記第2のアプタマーは、第2の担体に付随している、

請求項9又は10に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

【請求項12】

(a) 前記第1の担体は、

(i) 金属ナノ材料であって、任意に、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せを含んでもよい金属ナノ材料、および／または

(ii) 金ナノ材料であって、任意に、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってよい金ナノ材料、および／または

(iii) リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せを含む、

(b) 前記アプタマーは、前記第1の担体に付着されており、任意に、前記アプタマーは、前記第1の担体に共有結合で付着されていてもよい、

(c) 前記アプタマーは、前記第1の担体にコンジュゲートされており、任意に、前記アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第1の担体にコンジュゲートされていてもよい、

(d) 前記アプタマーは、前記第1の担体に非共有結合で連結されている、

(e) 前記アプタマーは、リンカーを介して前記第1の担体に付随している、及び／又は

(f) 前記アプタマーは、前記第1の担体上に固定化されているか、前記第1の担体上に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に固定化されているか、前記第1の担体内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、

請求項11に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

【請求項13】

(a) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記1つまたは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではないか、種のゲノム配列と相同性であるか、またはそれらの組合せであり、任意に、前記種は、非哺乳動物種であってもよい、

10

(b) 前記複数の試料のうちの試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む、

(c) 前記複数の試料は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む、

(d) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含み、任意に、

(i) 複数のバーコードのうちのバーコードは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよく、任意に、前記標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよい、又は

20

(ii) 前記捕捉配列に相補的な前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含んでいてもよく、任意に、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記ポリ(dA)領域に隣接するアラインメント配列を含んでいてもよく、任意に、(a) 前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよく、(b) 前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、および／あるいは(c) 前記アラインメント配列は、ポリ(dT)領域、ポリ(dG)領域、ポリ(dC)領域、ポリ(dU)領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、及び／又は

30

(e) 前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含み、任意に、前記分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長または5～50ヌクレオチド長であってもよく、任意に、前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、

(f) 前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含み、前記タンパク質標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、

40

(g) 前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含み、前記タンパク質標的は、10～100個の異なるタンパク質標的を含む群から選択される、

(h) 前記細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、

(i) 前記細胞成分標的は、10～100個の異なる細胞成分標的を含む群から選択される、及び／又は

(j) 前記アプタマーには、

(A) 同一の配列、又は

(B) 異なる試料インデックス付与配列

50

を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、及び／又は

(k) 前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの前記試料インデックス付与組成物は、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない第2のアプタマーを含み、任意に、前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは同一であってもよい、及び／又は

(l) 前記複数の試料インデックス付与組成物の各々は、前記アプタマーを含む、請求項9～12のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

【請求項14】

細胞における細胞成分発現を測定するための方法であって、

複数の細胞成分結合性アプタマーを、複数の細胞成分標的を含む複数の細胞と接触させる工程であって、前記複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、前記細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよび前記アプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成し、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、

前記複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含み、前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、同一であり、

前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーの前記細胞成分標的は同一であり、

前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドに付随していない、工程；

前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生する工程であって、前記標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、工程；ならびに

前記複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、前記複数の細胞の1つまたは複数における、前記複数の細胞成分標的の1つまたは複数の量を決定する工程を含む方法。

【請求項15】

前記オリゴヌクレオチドプローブを伸長する前に、

前記複数の細胞成分結合性アプタマーが付随している前記複数の細胞を複数の区画に分配する工程であって、前記複数の区画のうち区画は、前記細胞成分結合性アプタマーが付随している前記複数の細胞に由来する単一細胞を含む、工程；

前記単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させる工程であって、前記バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、工程を含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

(a) 前記複数の細胞成分標的は、複数のタンパク質標的を含み、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、及び／又は

(b) 前記アプタマーは、

(i) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にある、又は

(ii) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にある、及び／又は

(c) 前記アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含み、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、

10

20

30

40

50

フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含んでいてもよく、任意に、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい、

請求項 1 4～1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

(a) (i) 前記アプタマーおよび前記第 2 のアプタマーは、第 1 の担体に付随している、又は

(i i) 前記アプタマーは、第 1 の担体に付随し、かつ前記第 2 のアプタマーは、第 2 の担体に付随している、及び／又は

(b) 前記第 1 の担体は、

(i) 金属ナノ材料であって、任意に、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金属ナノ材料、および／または

(i i) 金ナノ材料であって、任意に、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金ナノ材料、および／または

(i i i) リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せ

を含む、及び／又は

(c) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体に付着されており、任意に、前記アプタマーは、前記第 1 の担体に共有結合で付着されていてもよい、

(d) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体にコンジュゲートされており、任意に、前記アプタマーは、UV 光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第 1 の担体にコンジュゲートされていてもよい、

(e) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体に非共有結合で連結されている、

(f) 前記アプタマーは、リンカーを介して前記第 1 の担体に付随している、及び／又は

(g) 前記アプタマーは、前記第 1 の担体上に固定化されているか、前記第 1 の担体上に部分的に固定化されているか、前記第 1 の担体内に固定化されているか、前記第 1 の担体内に部分的に固定化されているか、前記第 1 の担体内に封入されているか、前記第 1 の担体内に部分的に封入されているか、前記第 1 の担体内に埋め込まれているか、前記第 1 の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、

請求項 1 4～1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含み、任意に、

(a) 前記オリゴヌクレオチドプローブは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよく、任意に、前記標的結合性領域は、ポリ (d T) 領域を含んでいてもよい、及び／又は

(b) 前記捕捉配列に相補的な前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ (d A) 領域を含んでいてもよく、任意に、

(i) 前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーが、前記複数の細胞成分標的のうちの前記少なくとも 1 つと接触すると、前記ポリ (d A) 領域が接近不能である第 1 のコンフォメーションから、前記ポリ (d A) 領域が接近可能である第 2 のコンフォメーションへと変化してもよく、任意に、前記第 1 のコンフォメーションの前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ (d A) 領域は、ヘアピン構造を構成してもよく、任意に、前記ヘアピン構造を伴う前記ポリ (d A) 領域は、前記オリゴヌクレオチドプローブの前記標的結合性領域の前記ポリ (d T) 領域に接近可能であってもよい、

(i i) 前記オリゴヌクレオチドプローブは、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ (d A) 領域と前記オリゴヌクレオチドプローブの前記ポリ (d T) 領域とのハイブリダイゼーションにより前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされてもよく、及び／又は

10

20

30

40

50

(i i i) 前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記ポリ (d A) 領域に隣接するアラインメント配列を含んでいてもよく、任意に、(a) 前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよく、(b) 前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、および／あるいは (c) 前記アラインメント配列は、ポリ (d T) 領域、ポリ (d G) 領域、ポリ (d C) 領域、ポリ (d U) 領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、及び／又は

(c) 前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含んでいてもよく、任意に、前記分子標識配列は2～20ヌクレオチド長であってもよく、または前記ユニバーサルプライマーは5～50ヌクレオチド長であってもよく、または両方であってもよく、任意に、前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

複数の細胞成分結合性アプタマーを含む組成物であって、前記複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、前記細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよび前記アプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成し、前記細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、

前記複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含み、

前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、同一であり、

前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーの前記細胞成分標的は同一であり、

前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドに付随していない、

組成物。

【請求項20】

(a) 前記複数の細胞成分標的は、複数のタンパク質標的を含み、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、及び／又は

(b) 前記アプタマーは、

(i) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にある、又は

(i i) 前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にある、及び／又は

(c) 前記アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含み、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸 (D N A) 、リボ核酸 (R N A) 、ゼノ核酸 (X N A) 、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、任意に、前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含んでいてもよく、任意に、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい、

請求項19に記載の組成物。

【請求項21】

(a) (i) 前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、第1の担体に付随している、又は

(i i) 前記アプタマーは、第1の担体に付随し、かつ前記第2のアプタマーは、第2の担体に付随している、及び／又は

(b) 前記第1の担体は、

(i) 金属ナノ材料であって、任意に、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金属ナノ材料、および／または

10

20

30

40

50

(i i) 金ナノ材料であって、任意に、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金ナノ材料、および／または

(i i i) リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せを含む、及び／又は

(c) 前記アプタマーは、前記第1の担体に付着されており、任意に、前記アプタマーは、前記第1の担体に共有結合で付着されていてもよい、

(d) 前記アプタマーは、前記第1の担体にコンジュゲートされており、任意に、前記アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第1の担体にコンジュゲートされていてもよい、

(e) 前記アプタマーは、前記第1の担体に非共有結合で連結されている、

(f) 前記アプタマーは、リンカーを介して前記第1の担体に付随している、及び／又は

(g) 前記アプタマーは、前記第1の担体上に固定化されているか、前記第1の担体上に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に固定化されているか、前記第1の担体内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、

請求項19又は20に記載の組成物。

【請求項22】

前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含み、任意に、

(a) 複数のオリゴヌクレオチドプローブのうちのオリゴヌクレオチドプローブは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよく、任意に、前記標的結合性領域は、ポリ(d T)領域を含んでいてもよい、及び／又は

(b) 前記捕捉配列に相補的な前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(d A)領域を含んでいてもよく、任意に、

(i) 前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーが、前記複数のタンパク質標的または細胞成分標的のうちの前記少なくとも1つと接触すると、前記ポリ(d A)領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、前記ポリ(d A)領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化してもよく、任意に、前記第1のコンフォメーションの前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ(d A)領域は、ヘアピン構造を構成してもよく、任意に、前記ヘアピン構造を伴う前記ポリ(d A)領域は、複数のオリゴヌクレオチドプローブのうちのオリゴヌクレオチドプローブの前記標的結合性領域の前記ポリ(d T)領域に接近可能であってもよい、

(i i) 複数のオリゴヌクレオチドプローブのうちのオリゴヌクレオチドプローブは、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ(d A)領域と前記オリゴヌクレオチドプローブの前記ポリ(d T)領域とのハイブリダイゼーションにより前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされてもよく、及び／又は

(i i i) 前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記ポリ(d A)領域に隣接するアラインメント配列を含んでいてもよく、任意に、(a) 前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよく、(b) 前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよく、および／あるいは(c) 前記アラインメント配列は、ポリ(d T)領域、ポリ(d G)領域、ポリ(d C)領域、ポリ(d U)領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、及び／又は

(c) 前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含んでいてもよく、任意に、前記分子標識配列は2～20ヌクレオチド長であってもよく、または前記ユニバーサルプライマーは5～50ヌクレオチド長であってもよく、または両方であってもよく、任意に、前記ユニバーサルプライマ

10

20

30

40

50

ーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、請求項 21 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第 119 条 (e) に基づき、2018 年 8 月 17 日に提出された米国特許仮出願第 62/719,406 号の利益を主張するものである。この関連出願の内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

配列表の参照

本出願は、電子形式の配列表と共に提出されている。配列表は、2019 年 8 月 2 日に作成されたサイズが 4 キロバイトの Sequence Listing という名称のファイルとして提供されている。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、概して、分子生物学の分野に、例えば、分子バーコーディングを使用して、異なる試料の細胞を識別することおよび細胞におけるタンパク質発現プロファイルを決定することに関する。

【背景技術】

【0003】

現行技術では、細胞の各々をバーコード化試薬ビーズと共にコンパートメント内に共局在化させながら、個々の細胞に由来するポリ (A) mRNA 分子に細胞特異的オリゴヌクレオチドバーコードを付着させることにより、大規模並行様式 (例えば、>1000 個の細胞) で単一細胞の遺伝子発現を測定することが可能である。遺伝子発現は、タンパク質発現に影響を及ぼす可能性がある。タンパク質間相互作用は、遺伝子発現およびタンパク質発現に影響を及ぼす可能性がある。細胞におけるタンパク質発現を定量的に分析し、同時に細胞におけるタンパク質発現および遺伝子発現を測定することができる系および方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0004】

本明細書における開示は、試料を識別するための方法の実施形態を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、複数の試料の各々は、各々が 1 つまたは複数のタンパク質標的を含む 1 つまたは複数の細胞を含み、試料インデックス付与組成物は、アダプターおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアダプター組成物を含み、アダプターは、1 つまたは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも 1 つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも 2 つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1 つまたは複数の細胞のうちの少なくとも 1 つの細胞の試料起源を識別することを含む。

一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、複数の試料の各々は、各々が 1 つまたは複数の細胞成分標的を含む 1 つまたは複数の細胞を含み、試料インデックス付与組成物は、アダプターおよび試料インデックス付与オリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含むアプタマー組成物を含み、アプタマーは、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；および複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む。一部の実施形態では、細胞成分標的は、タンパク質標的を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数のバーコードを使用して複数の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および配列決定データ中の複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、細胞の試料起源を識別することを含む。

【0005】

一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列の存在または非存在を識別することを含む。試料インデックス付与配列の存在または非存在の識別は、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および配列決定データ中の少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに対応する複数の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、細胞の試料起源を識別することを含む。

【0006】

一部の実施形態では、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製用アダプターを少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートさせることを含み、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートされた複製用アダプターを使用して、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを生成すること；および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを伸長して、捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでいてもよい。

【0007】

一部の実施形態では、試料インデックス付与配列は、6～60ヌクレオチド長である。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、50～500ヌクレオチド長であってもよい。複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または100

0個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含んでいてもよい。

【0008】

一部の実施形態では、単一ポリヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよびアプタマーを含む。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にあってもよい。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にあってもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーに付随していてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーに付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介してアプタマーにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーに非共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してアプタマーに付随していてもよい。

10

【0009】

一部の実施形態では、アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでいてもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでいてもよい。アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでいてもよい。

20

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物は、第1の担体に付随していてもよい。複数の試料インデックス付与組成物のうちの異なる試料インデックス付与組成物は、異なる第1の担体に付随していてもよい。

【0010】

一部の実施形態では、アプタマー組成物は、第1の担体に付随していてもよい。アプタマー組成物は、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2のアプタマー、および第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体に付随していてもよく、第2のアプタマーは、第2の担体に付随している。アプタマーおよび第2のアプタマーは、配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、例えば、配列が同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは異なってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

30

40

【0011】

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、アプタマーは、第1の担体に付着されていてもよい。アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の

50

担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体上に固定化されてもよく、第1の担体上に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に固定化されていてもよく、第1の担体内に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に封入されていてもよく、第1の担体内に部分的に封入されていてもよく、第1の担体内に埋め込まれていてもよく、第1の担体内に部分的に埋め込まれていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

一部の実施形態では、本方法は、アプタマーを第1の担体から解離させることを含む。解離は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングした後で生じててもよい。解離は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングする前に生じててもよい。

【0012】

一部の実施形態では、複数の試料の各々を試料インデックス付与組成物と接触させることは、試料の1つまたは複数の細胞のうちの細胞を試料インデックス付与組成物と接触させることを含む。第1の担体は細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより、細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより、細胞へと内部移行されてもよい。

一部の実施形態では、本方法は、複数の試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去することを含む。未結合試料インデックス付与組成物の除去は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を洗浄緩衝液で洗浄することを含んでいてもよい。未結合試料インデックス付与組成物の除去は、フローサイトメトリーを使用して、少なくとも1つのアプタマーに結合している細胞を選択することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を溶解することを含む。

【0013】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーから脱離不能であるように構成されている（または脱離不能であってもよい）。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーから脱離可能であるように構成されていてもよい（または脱離可能であってもよい）。本方法は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをアプタマーから脱離させることを含んでいてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの脱離は、UV光切断、化学処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せにより試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをアプタマーから脱離させることを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、1つもしくは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではないか、種のゲノム配列と相同性であるか、またはそれらの組合せである。種は、非哺乳動物種であってもよい。

【0014】

一部の実施形態では、複数の試料のうちの試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む。複数の試料は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な）捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的な試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（dA）領域を含んでいてもよい。

【0015】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、ポリ（d A）領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、1またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでもよい。アラインメント配列は、ポリ（d T）領域、ポリ（d G）領域、ポリ（d C）領域、ポリ（d U）領域、またはそれらの組合せを含んでもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含んでもよい。分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5～50ヌクレオチド長

10

【0016】

一部の実施形態では、アダプターには、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している。アダプターには、異なる試料インデックス付与配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない第2のアダプターを含む。アダプターおよび第2のアダプターは同一であってもよい。一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、アダプターを含む。

20

【0017】

一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物は、第2のタンパク質結合性アダプターを含む第2のアダプター組成物を含み、第2のアダプターは、1つもしくは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに、または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。アダプターおよび第2のアダプターは、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的の同じタンパク質標的に結合することが可能であってもよく、第2のアダプターには、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない。第2のアダプターには、第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。アダプターおよび第2のアダプターは、配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一であってもよい。アダプターおよび第2のアダプターは、例えば、配列が同一であってもよい。アダプターおよび第2のアダプターは異なってもよい。アダプターおよび第2のアダプターは、同じタンパク質標的の異なる領域に、または同じ細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。アダプターおよび第2のアダプターは、1つもしくは複数のタンパク質標的の異なるタンパク質標的に、または1つもしくは複数の細胞成分標的の異なる細胞成分標的に結合することが可能であってもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は同一であってもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は異なってもよい。

30

40

【0018】

一部の実施形態では、本方法は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングする前に、複数の試料インデックス付与組成物と接触させた複数の試料をプールすることを含む。

一部の実施形態では、複数のバーコードのうちのバーコードは、標的結合性領域および分子標識配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。標的結合性領域は、ポリ（d T）領域を含んでもよい。

一部の実施形態では、複数のバーコードは、粒子に付随している。複数のバーコードの

50

うちの少なくとも1つのバーコードは、粒子上に固定化されていてもよく、粒子上に部分的に固定化されていてもよく、粒子内に封入されていてもよく、粒子内に部分的に封入されていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。粒子は、破壊可能であってもよい。粒子は、ビーズを含んでいてもよい。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA／Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ（dT）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、ヒドロゲルビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、もしくはそれらの任意の組合せを含んでいてもよく、または粒子は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む。粒子は、破壊可能なヒドロゲルビーズを含んでいてもよい。

10

【0019】

一部の実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも1000個、10000個、またはそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含んでいてもよい。粒子は、少なくとも10000個のバーコードを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングすることは、複数のバーコードを試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを生成すること；および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

20

【0020】

一部の実施形態では、本方法は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長する前に、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードをプールすることを含み、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長することは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプールされたバーコードを伸長して、複数のプールされたバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。バーコードの伸長は、DNAポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでいてもよい。バーコードの伸長は、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでいてもよい。

30

【0021】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを産生することを含む。複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、分子標識配列の少なくとも一部および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ることは、複数のアンプリコンの配列決定データを得ることを含んでいてもよい。配列決定データを得ることは、分子標識配列の少なくとも一部および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を配列決定することを含んでいてもよい。

40

【0022】

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、試料インデックス付与

50

オリゴヌクレオチドを確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

【0023】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的をバーコーディングして、複数のバーコード化標的を生成することであって、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；およびバーコード化標的の配列決定データを得ることを含む。複数のバーコードを使用して複数の標的をバーコーディングして複数のバーコード化標的を生成することは、標的のコピーを、バーコードの標的結合性領域と接触させること；および複数のバーコードを使用して複数の標的を逆転写して、複数の逆転写標的を生成することを含んでいてもよい。本方法は、複数のバーコード化標的の配列決定データを得る前に、バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成することを含んでいてもよい。バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成することは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりバーコード化標的を増幅することを含んでいてもよい。複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的をバーコーディングして複数のバーコード化標的を生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して細胞の複数の標的を確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化標的を生成することを含んでいてもよい。

10

【0024】

本明細書における開示は、複数の試料インデックス付与組成物の実施形態である。一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、第1の細胞成分結合性アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む。

20

【0025】

一部の実施形態では、試料インデックス付与配列は、6～60ヌクレオチド長である。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、50～500ヌクレオチド長であってもよい。複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または1000個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含んでいてもよい。

30

一部の実施形態では、単一ポリヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび細胞成分結合性アプタマーを含む。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にあってもよい。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にあってもよい。

【0026】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーに付随している。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに非共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して、タンパク質結合性アプタマーまたは細胞成分結合性アプタマーに付随していてもよい。

40

50

【0027】

一部の実施形態では、タンパク質結合性アプタマーまたは細胞成分結合性アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、またはそれらの組合せを含んでもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでもよい。細胞成分結合性アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでもよい。

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物は、第1の担体に付随している。複数の試料インデックス付与組成物のうちの異なる試料インデックス付与組成物は、異なる第1の担体に付随していてもよい。一部の実施形態では、アプタマー組成物は、第1の担体に付随している。

10

一部の実施形態では、アプタマー組成物は、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2の細胞成分結合性アプタマー、および第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含む。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは第1の担体に付随していてもよく、第2の細胞成分結合性アプタマーは、第2の担体に付随していてもよい。

【0028】

20

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%配列同一性を有する。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、例えば、配列が同一であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは異なってもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

30

【0029】

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付着されている。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。

40

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体上に固定化されているか、第1の担体上に部分的に固定化されているか、第1の担体内に固定化されているか、第1の担体内に部分的に固定化されているか、第1の担体内に封入されているか、第1の担体内に部分的に封入されているか、第1の担体内に埋め込まれているか、第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである。

【0030】

一部の実施形態では、第1の担体は、細胞へと内部移行される（または内部移行され得

50

る)ように構成されている。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより、細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されてもよい。

【0031】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではない。複数の試料のうちの少なくとも1つの試料は、1つもしくは複数の単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。試料は、哺乳動物試料、細菌試料、ウイルス試料、酵母試料、真菌試料、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

10

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された(または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な)捕捉配列に相補的な配列を含む。標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的な試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含んでいてもよい。

【0032】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、ポリ(dA)領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アラインメント配列は、ポリ(dT)領域、ポリ(dG)領域、ポリ(dC)領域、ポリ(dU)領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

20

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ(dA)領域、またはそれらの組合せを含む。分子標識配列は、2~20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5~50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【0033】

30

一部の実施形態では、細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せを含む。細胞成分標的は、10~100個の異なる細胞成分標的を含む群から選択することができる。一部の実施形態では、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つは、細胞表面上にある。一部の実施形態では、タンパク質標的または細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む。タンパク質標的または細胞成分標的は、10~100個の異なるタンパク質標的または細胞成分標的を含む群から選択することができる。

40

【0034】

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーには、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している。細胞成分結合性アプタマーには、異なる試料インデックス付与配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物は、第2の細胞成分結合性アプタマーを含み、第2の細胞成分結合性アプタマーは、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。

細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、1つまたは複数の細胞成分標的の同じ細胞成分標的に結合することが可能であってもよく、第2の細胞成

50

分結合性アプタマーには、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していなくてもよい。第2の細胞成分結合性アプタマーには、第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は同一であってもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は異なってもよい。

【0035】

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一である。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは同一であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、同じタンパク質標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、1つまたは複数のタンパク質標的の異なるタンパク質標的に結合することが可能であってもよい。

【0036】

本明細書における開示は、試料を識別するためのキットの実施形態である。一部の実施形態では、キットは、複数の試料インデックス付与組成物を含む。一部の実施形態では、キットは、複数のバーコードを含む。複数のバーコードのうちのバーコードは、標的結合性領域を含む。標的結合性領域は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な）捕捉配列を含んでいてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび第1の細胞成分結合性アプタマーを含んでいてもよい。

【0037】

本明細書における開示は、細胞におけるタンパク質発現を測定するための方法の実施形態である。一部の実施形態では、本方法は、複数のタンパク質結合性アプタマーを、複数のタンパク質標的を含む複数の細胞と接触させることであって、複数のタンパク質結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、タンパク質結合性アプタマーは、複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；複数のタンパク質結合性アプタマーが付随している複数の細胞を複数の区画に分配することであって、複数の区画のうちの区画は、タンパク質結合性アプタマーが付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、こと；アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、こと；ならびに複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、複数の細胞の1つまたは複数における、複数のタンパク質標的の1つまたは複数の量を決定することを含む。

【0038】

本明細書における開示は、細胞における細胞成分発現を測定するための方法の実施形態を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の細胞成分結合性アプタマーを、複数の細胞成分標的を含む複数の細胞と接触させることであって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、こと；ならびに複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、複数の細胞の1つまたは複数における、複数の細胞成分標的の1つまたは複数

の量を決定することを含む。本方法は、オリゴヌクレオチドプローブを伸長する前に、複数の細胞成分結合性アプタマーが付随している複数の細胞を複数の区画に分配することであって、複数の区画のうちの区画は、細胞成分結合性アプタマーが付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、ことを含んでいてもよい。複数の細胞成分標的は、複数のタンパク質標的を含み、細胞成分結合性アプタマーは、複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。

10

【0039】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成する。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいてアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にあってもよい。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいてアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にあってもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーに付随していてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーに付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーに非共有結合で付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介してアプタマーにコンジュゲートされていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。一部の実施形態では、本方法は、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドを、アプタマーから脱離させることを含む。

20

【0040】

一部の実施形態では、アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでいてもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでいてもよい。アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでいてもよい。

30

一部の実施形態では、複数のタンパク質結合性アプタマーは、第2のタンパク質結合性アプタマーを含むか、または複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含む。アプタマーおよび第2のアプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体に付随していてもよく、第2のアプタマーは、第2の担体に付随していてもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一であってもよい。アプタマーおよび第2のタンパク質結合性アプタマーは同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは異なってもよい。

40

一部の実施形態では、アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である。アプタマーおよび第2のアプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

【0041】

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

50

【0042】

一部の実施形態では、アプタマーは、第1の担体に付着されている。アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体上に固定化されていてもよく、第1の担体上に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に固定化されていてもよく、第1の担体内に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に封入されていてもよく、第1の担体内に部分的に封入されていてもよく、第1の担体内に埋め込まれていてもよく、第1の担体内に部分的に埋め込まれていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

10

【0043】

一部の実施形態では、本方法は、アプタマーを第1の担体から解離させることを含む。解離は、単一細胞を含む区画での接触後に生じてもよい。解離は、単一細胞を含む区画での接触前に生じてもよい。

一部の実施形態では、複数のアプタマーを複数の細胞と接触させることは、アプタマーを含む第1の担体を、複数のタンパク質標的を含む複数の細胞のうちの細胞と接触させることを含む。第1の担体は、細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されてもよい。

20

【0044】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な）捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的なアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（dA）領域を含んでいてもよい。

30

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーが、複数のタンパク質標的または細胞成分標的のうちの少なくとも1つと接触すると、ポリ（dA）領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、ポリ（dA）領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化する。第1のコンフォメーションのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域は、ヘアピン構造を構成してもよい。ヘアピン構造を伴うポリ（dA）領域は、バーコードの標的結合性領域のポリ（dT）領域に接近可能であってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域とオリゴヌクレオチドプローブのポリ（dT）領域とのハイブリダイゼーションによりアプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされることができる。

40

【0045】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、ポリ（dA）領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、1またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2ヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アラインメント配列は、ポリ（dT）領域、ポリ（dG）領域、ポリ（dC）領域、ポリ（dU）領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含む。分子標識配列は2～20ヌクレオチド

50

長であってもよい。ユニバーサルプライマーは5～50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでもよい。

【0046】

一部の実施形態では、本方法は、複数のアプタマーを複数の細胞と接触させた後、複数の細胞と接触していないアプタマーを除去することを含む。複数の細胞と接触していないアプタマーの除去は、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーを除去することを含んでもよい。複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーの除去は、アプタマースポンジ (aptamer sponge) を使用して、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触して

10

いないアプタマーを除去することを含んでもよい。アプタマースポンジは、アプタマーの配列に相補的な複数の配列を含んでもよい。複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーは、アプタマースポンジの複数の配列にハイブリダイズすることができる。

一部の実施形態では、アプタマーは相補配列を含む。複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーは、互いにハイブリダイズして凝集体を形成する場合がある。凝集体は、細胞での分解の標的とされてもよい。

【0047】

一部の実施形態では、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーの除去は、複数のアンチセンスアプタマーを使用して、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーを除去することを含み、複数のアンチセンスアプタマーの各アンチセンスアプタマーは、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーの1つのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの相補配列またはその一部を含むアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含む第2のアプタマーを含み、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、二本鎖のまたは部分的に二本鎖のデオキシリボ核酸 (DNA) 分子を形成する。

20

一部の実施形態では、複数の細胞の分配は、複数のアプタマーが付随している複数の細胞およびバーコーディング粒子を含む複数のバーコーディング粒子を複数の区画に分配することを含み、複数の区画のうちの区画は、オリゴヌクレオチドコンジュゲートアプタマーおよびバーコーディング粒子が付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む。一部の実施形態では、区画は、ウェルまたは液滴である。一部の実施形態では、複数の標識化核酸またはそれらの一部の配列決定情報を得ることは、標識化核酸を1つまたは複数の反応に供して、核酸配列決定のための1セットの核酸を生成することを含む。

30

一部の実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞内タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、複数の細胞は、T細胞、B細胞、腫瘍細胞、骨髄性細胞、血液細胞、正常細胞、胎児細胞、母体細胞、またはそれらの混合物を含む。

【0048】

40

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブの各々は、細胞標識、ユニバーサルプライマーの結合部位、増幅アダプター、配列決定アダプター、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、バーコーディング粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、ヒドロゲルビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはヒドロゲルビーズである。

【0049】

本明細書における開示は、複数の細胞成分結合性アプタマーを含む組成物であって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、

50

複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である組成物を含む。

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成する。細胞成分結合性アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいてアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にあってもよい。細胞成分結合性アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいてアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にあってもよい。

【0050】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに付随している。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに非共有結合で付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。

【0051】

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでいてもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでいてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含む。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは第1の担体に付随していてもよく、第2の細胞成分結合性アプタマーは、第2の担体に付随していてもよい。

【0052】

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%配列同一性を有していてもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2のタンパク質結合性アプタマーは同一であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは異なってもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

【0053】

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付着されている。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの

10

20

30

40

50

組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体上に固定化されていてもよく、第1の担体上に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に固定化されていてもよく、第1の担体内に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に封入されていてもよく、第1の担体内に部分的に封入されていてもよく、第1の担体内に埋め込まれていてもよく、第1の担体内に部分的に埋め込まれていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

【0054】

一部の実施形態では、第1の担体は、細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されている。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されていてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されていてもよい。

【0055】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、結合、もしくはハイブリダイズすることが可能な）捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的なアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（dA）領域を含んでいてもよい。

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーが、複数のタンパク質標的または細胞成分標的のうちの少なくとも1つと接触すると、ポリ（dA）領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、ポリ（dA）領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化する。第1のコンフォメーションのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域は、ヘアピン構造を構成してもよい。ヘアピン構造を伴うポリ（dA）領域は、バーコードの標的結合性領域のポリ（dT）領域に接近可能であってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域とオリゴヌクレオチドプローブのポリ（dT）領域とのハイブリダイゼーションによりアプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされることができる。

【0056】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、ポリ（dA）領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、1またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2ヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アラインメント配列は、ポリ（dT）領域、ポリ（dG）領域、ポリ（dC）領域、ポリ（dU）領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含んでいてもよい。分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5～50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【0057】

一部の実施形態では、組成物は、アプタマースポンジを含む。アプタマースポンジは、アプタマーの配列に相補的な複数の配列を含んでいてもよい。

一部の実施形態では、アプタマーは相補配列を含む。アプタマーは、互いにハイブリダイズして（またはハイブリダイズすることを可能にして）凝集体を形成するように構成さ

10

20

30

40

50

れてもよい。凝集体は、細胞での分解の標的とされてもよい。

【0058】

一部の実施形態では、組成物は、複数のアンチセンスアプタマーを含み、複数のアンチセンスアプタマーの各アンチセンスアプタマーは、アプタマーの1つのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの相補配列またはその一部を含むアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含む第2のアプタマーを含み、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、二本鎖のまたは部分的に二本鎖のデオキシリボ核酸（DNA）分子を形成する。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】非限定的な例示的確率論的バーコードを示す図である。

【図2】確率論的バーコーディングおよび電子計数の非限定的な例示的ワークフローを示す図である。

【図3】複数の標的からの確率論的バーコード化標的のインデックス化ライブラリーを作成するための非限定的な例示のプロセスを示す略図である。

【図4】タンパク質結合性試薬に対して固有識別子を含むオリゴヌクレオチドが付随している例示的なタンパク質結合性試薬（本図に示す抗体）の略図を示す。

【図5】同じ試料または異なる試料からの細胞を決定するために試料インデックス付与のために固有識別子を含むオリゴヌクレオチドが付随している例示的結合性試薬（本図に示す抗体）の略図を示す。

【図6】ハイスループット方式で、細胞成分の発現（例えば、タンパク質発現）および遺伝子発現を同時に決定するために、オリゴヌクレオチドが付随している抗体を使用する例示的ワークフローの略図を示す。

【図7】試料インデックス付与のためにオリゴヌクレオチドが付随している抗体を使用する例示的ワークフローの略図を示す。

【図8A-8E】細胞成分の発現（例えば、タンパク質発現）を決定するためにオリゴヌクレオチドが付随している（例えば、コンジュゲートした）アプタマーを使用する例示的ワークフローの略図を示す。

【図9】非限定的な例示のアプタマーおよび付随している配列を示す図である。

【図10A-10B】試料インデックス付与のためにオリゴヌクレオチドが付随しているアプタマーを使用する例示的ワークフローの略図を示す。

【図11A-11D】タンパク質発現と遺伝子発現を同時に決定するためのおよび試料インデックス付与のためのオリゴヌクレオチドの非限定的な例示的設計を示す図である。

【図12】タンパク質発現と遺伝子発現を同時に決定するためのおよび試料インデックス付与のための非限定的な例示的オリゴヌクレオチド配列の略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0060】

以下の発明を実施するための形態では、本明細書の一部を形成する添付の図面が参照される。図面では、状況が別様に指示しない限り、類似の記号は、典型的には類似の成分を示す。発明を実施するための形態、図面、および特許請求の範囲に記載されている例示的な実施形態は、限定を意味するものではない。本明細書に提供される主題の趣旨または範囲から逸脱することなく、他の実施形態を使用することができ、他の変更をなすことができる。本明細書に概して説明されており、図に例示されているような本開示の態様は、多種多様な異なる構成に配置されてもよく、置換されてもよく、組み合わせられてもよく、分離されてもよく、および設計されてもよく、それらはすべて本明細書において明示的に企図されており、本明細書の開示の一部をなすことが容易に理解されるだろう。

本明細書で参照されているすべての特許、公開特許出願、他の刊行物、ならびに Gen Bank および他のデータベースの配列は、関連技術に関してその全体が参照により組み込まれる。

【0061】

少数の核酸、例えば、メッセンジャーリボヌクレオチド酸（mRNA）分子の定量化は、例えば、異なる発生段階または異なる環境条件下で細胞において発現される遺伝子を決定するために、臨床的に重要である。しかしながら、特に分子の数が非常に少ない場合、核酸分子（例えば、mRNA分子）の絶対数を決定することは非常に困難なことでもあり得る。試料中の分子の絶対数を決定するための1つの方法は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。理想的には、PCRは、各サイクルにおいて同一コピーの分子を産生する。しかしながら、PCRには、各分子が確率論的な蓋然性で複製されるという欠点があり、この蓋然性は、PCRサイクルおよび遺伝子配列により様々であり、増幅バイアスおよび不正確な遺伝子発現測定がもたらされる。固有分子標識（分子インデックス（MI）とも呼ばれる）を有する確率論的バーコードを使用すると、分子の数を計数し、増幅バイアスを補正することができる。Precise（商標）アッセイ（Cellular Research, Inc. 社（パロアルト（Palo Alto）、カリフォルニア州））などの確率論的バーコーディングは、逆転写（RT）中に分子標識（ML）を使用してmRNAを標識化することにより、PCRステップおよびライブラリー調製ステップにより誘導されるバイアスを補正することができる。

10

【0062】

Precise（商標）アッセイでは、RTステップ中に試料中のすべてのポリ（A）mRNAにハイブリダイズさせるためのポリ（T）オリゴヌクレオチドに多数の、例えば6561～65536個の固有分子標識を有する確率論的バーコードの非枯渇プールを使用することができる。確率論的バーコードは、ユニバーサルPCRプライミング部位を含んでいてもよい。RT中、標的遺伝子分子は確率論的バーコードとランダムに反応する。各標的分子は、確率論的バーコードにハイブリダイズして、確率論的バーコード化相補的リボヌクレオチド酸（cDNA）分子を生成することができる。標識後、マイクロウェルプレートのマイクロウェルの確率論的バーコード化cDNA分子を、PCR増幅および配列決定のために単一チューブにプールすることができる。生配列データを分析して、リードの数、固有分子標識を有する確率論的バーコードの数、およびmRNA分子の数を得ることができる。

20

【0063】

単一細胞のmRNA発現プロファイルを決定するための方法は、大規模並行様式で実施することができる。例えば、Precise（商標）アッセイを使用すると、10000個よりも多くの細胞のmRNA発現プロファイルを同時に決定することができる。1試料当たりの分析する単一細胞の数（例えば、数百または数千個の単一物）は、現行の単一細胞技術の容量よりも少ない可能性がある。異なる試料に由来する細胞をプールすることにより、現行の単一技術の容量の使用を向上させることができるため、試薬の浪費および単一細胞分析のコストを削減することができる。本開示は、単一細胞分析などの細胞分析のためのcDNAライブラリーを調製するために異なる試料の細胞を区別するための試料インデックス付与法を提供する。異なる試料に由来する細胞をプールすることにより、異なる試料の細胞のcDNAライブラリー調製のばらつきを最小限に抑えることができるため、異なる試料のより正確な比較が可能になる。

30

【0064】

本明細書における開示は、試料を識別するための方法の実施形態を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、複数の試料の各々は、各々が1つまたは複数のタンパク質標的を含む1つまたは複数の細胞を含み、試料インデックス付与組成物は、アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、アプタマーは、1つまたは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチド

40

50

をバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む。

【0065】

本明細書における開示は、複数の試料インデックス付与組成物の実施形態である。一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、第1の細胞成分結合性アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む。

【0066】

本明細書における開示は、細胞におけるタンパク質発現を測定するための方法の実施形態である。一部の実施形態では、本方法は、複数のタンパク質結合性アプタマーを、複数のタンパク質標的を含む複数の細胞と接触させることであって、複数のタンパク質結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、タンパク質結合性アプタマーは、複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；複数のタンパク質結合性アプタマーが付随している複数の細胞を複数の区画に分配することであって、複数の区画のうちの区画は、タンパク質結合性アプタマーが付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、こと；アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、こと；ならびに複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、複数の細胞の1つまたは複数における、複数のタンパク質標的の1つまたは複数の量を決定することを含む。

【0067】

本明細書における開示は、細胞における細胞成分発現を測定するための方法の実施形態を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の細胞成分結合性アプタマーを、複数の細胞成分標的を含む複数の細胞と接触させることであって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、こと；ならびに複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、複数の細胞の1つまたは複数における、複数の細胞成分標的の1つまたは複数の量を決定することを含む。

【0068】

本明細書における開示は、複数の細胞成分結合性アプタマーを含む組成物であって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である組成物

を含む。

【0069】

定義

別様に定義されていない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本開示が属する当業者により一般的に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)を参照されたい。本開示の目的のため、以下の用語を下記にて定義する。

【0070】

本明細書で使用される場合、用語「アダプター」は、付随している核酸の増幅または配列決定を容易にするための配列を意味することができる。付随している核酸は、標的核酸を含んでいてもよい。付随している核酸は、空間標識、標的標識、試料標識、インデックス付与標識、またはバーコード配列（例えば、分子標識）の1つまたは複数を含んでいてもよい。アダプターは、線状であってもよい。アダプターは、ブレアデニル化アダプターであってもよい。アダプターは、二本鎖であってもよくまたは一本鎖であってもよい。1つまたは複数のアダプターが、核酸の5'末端'または3'末端に位置していてもよい。アダプターが5'末端および3'末端に既知配列を含む場合、既知配列は、同じ配列であってもよくまたは異なる配列であってもよい。ポリヌクレオチドの5'末端および/または3'末端に位置するアダプターを、表面上に固定化された1つまたは複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせることが可能であってもよい。アダプターは、一部の実施形態では、ユニバーサル配列を含んでいてもよい。ユニバーサル配列は、2つまたはそれよりも多くの核酸分子に共通するヌクレオチド配列の領域であってもよい。また、2つまたはそれよりも多くの核酸分子は、異なる配列の領域を有していてもよい。したがって、例えば、5'アダプターは、同一および/またはユニバーサル核酸配列を含んでいてもよく、3'アダプターは、同一および/またはユニバーサル配列を含んでいてもよい。複数の核酸分子の異なるメンバーに存在していてもよいユニバーサル配列は、ユニバーサル配列に相補的な単一のユニバーサルプライマーを使用して、複数の異なる配列の複製または増幅を可能にすることができる。同様に、核酸分子のコレクションの異なるメンバーに存在していてもよい少なくとも1つ、2つ（例えば、一対の）、またはそれよりも多くのユニバーサル配列は、ユニバーサル配列に相補的な少なくとも1つ、2つ（例えば、一対の）、またはそれよりも多くの単一ユニバーサルプライマーを使用して、複数の異なる配列の複製または増幅を可能にすることができる。したがって、ユニバーサルプライマーは、そのようなユニバーサル配列にハイブリダイズすることができる配列を含む。標的核酸配列保有分子を修飾して、ユニバーサルアダプター（例えば、非標的核酸配列）を、異なる標的核酸配列の一方のまたは両方の末端に付着させることができる。標的核酸に付着される1つまたは複数のユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマーのハイブリダイゼーション用の部位を提供することができる。標的核酸に付着される1つまたは複数のユニバーサルプライマーは、互いに同じであってもよくまたは異なってもよい。

【0071】

本明細書で使用される場合、抗体は、全長（例えば、天然に存在するかもしれない通常の免疫グロブリン遺伝子断片組換えプロセスにより形成される）免疫グロブリン分子（例えば、IgG抗体）または抗体断片のような免疫グロブリン分子の免疫学的活性（すなわち、特異的結合性）部分であってもよい。

【0072】

一部の実施形態では、抗体は、機能的抗体断片である。例えば、抗体断片は、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、およびscFvなどの、抗体の一部であってもよい。抗体断片は、全長抗体により認識されるものと同じ抗原に結合することができる。抗体断片は、重鎖および軽鎖の変換領域からなる「Fv」断片、ならびに軽鎖変換領域および重鎖変換領域がペプチドリンカーにより接続されている組換え単鎖ポリペプチド分子（「scFv

10

20

30

40

50

タンパク質」)などの、抗体の可変領域からなる単離断片を含むことができる。例示的な抗体としては、これらに限定されないが、がん細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面受容体(例えば、CD8、CD34、およびCD45)に結合する抗体、ならびに治療用抗体を挙げることができる。

【0073】

本明細書で使用される場合、「付随している」または「～に付随している」という用語は、2つまたはそれよりも多くの種が、ある時点で共局在化されていると識別可能であることを意味する場合がある。付随は、2つまたはそれよりも多くの種が同様の容器内に存在するかまたは存在していたことを意味する場合がある。付随は、インフォマティクスの付随であってもよい。例えば、2つまたはそれよりも多くの種に関するデジタル情報を保存することができ、その種の1つまたは複数がある時点で共局在化されていたことを決定するために使用することができる。また、付随は、物理的な付随であってもよい。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くの付随している種は、互いにまたは一般的な固体または半固体表面に「係留」、「付着」、または「固定化」されている。付随は、ビーズなどの固体または半固体支持体に標識を付着させるための共有結合手段または非共有結合手段を指す場合がある。付随は、標的と標識との共有結合であってもよい。付随は、2分子間(標的分子と標識との間など)のハイブリダイゼーションを含むことができる。

【0074】

本明細書で使用される場合、「相補的」という用語は、2つのヌクレオチド間の正確な対合能力を指す場合がある。例えば、核酸の所与の位置にあるヌクレオチドが、別の核酸のヌクレオチドと水素結合することが可能な場合、この2つの核酸は、その位置で互いに相補的であるとみなされる。2つの一本鎖核酸分子間の相補性は、ヌクレオチドの一部のみが結合する「部分的」であってもよく、または一本鎖分子間に完全な相補性が存在する場合は完全であってもよい。第1のヌクレオチド配列は、第1のヌクレオチド配列が第2のヌクレオチド配列に相補的である場合、第2の配列の「相補体」であると言えることができる。第1のヌクレオチド配列は、第1のヌクレオチド配列が、第2のヌクレオチド配列の逆向きである(すなわち、ヌクレオチドの順序が逆である)配列に相補的である場合、第2の配列の「逆相補体」であると言えることができる。本明細書で使用される場合、「相補体」、「相補的」、および「逆相補体」という用語は、同義的に使用することができる。本開示では、分子は、別の分子にハイブリダイズすることができる場合、ハイブリダイズしている分子の相補体であり得ることが理解される。

【0075】

本明細書で使用される場合、「デジタル計数」という用語は、試料中の標的分子の数を推定するための方法を指す場合がある。デジタル計数は、試料中の、標的に付随している固有標識の数を決定するステップを含んでもよい。この方法論は、性質が確率論的であってもよく、分子計数の問題を、同一の分子を捜し出して識別する問題から、1セットの事前に規定されている標識の検出に関する一連のはい／いいのデジタル的な質問へと変換する。

【0076】

本明細書で使用される場合、「標識(単数)」または「標識(複数)」という用語は、試料内の標的に付随している核酸コードを指す場合がある。標識は、例えば、核酸標識であってもよい。標識は、完全にまたは部分的に増幅可能な標識であってもよい。標識は、完全にまたは部分的に配列決定可能な標識であってもよい。標識は、別個のものとして識別可能な天然核酸の一部であってもよい。標識は、既知配列であってもよい。標識は、核酸配列の接合部、例えば、天然配列および非天然配列の接合部を含んでもよい。本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、「インデックス」、「タグ」、または「標識タグ」という用語と同義的に使用することができる。標識は、情報を伝達することができる。例えば、種々の実施形態では、標識を使用して、試料の同一性、試料の供給源、細胞の同一性、および／または標的を決定することができる。

【0077】

本明細書で使用される場合、「非枯渇リザーバ」という用語は、多数の異なる標識で構成されるバーコード（例えば、確率論的バーコード）のプールを指す場合がある。非枯渇リザーバは、非枯渇リザーバを標的のプールに付随させると、各標的が固有バーコードに付随する可能性が高くなるように、数多くの異なるバーコードを含んでいてもよい。各標識化標的分子の一意性は、ランダム選択の統計により決定することができ、標識の多様性と比較したコレクション内の同一標的分子のコピー数に依存する。得られる標識化標的分子のセットのサイズは、バーコーディングプロセスの確率論的性質により決定することができ、検出されるバーコードの数を分析することにより、元のコレクションまたは試料に存在する標的分子の数を算出することが可能になる。存在する標的分子のコピー数の固有バーコードの数に対する比が低い場合、標識化標的分子は高度に一意性である（すなわち、1つよりも多くの標的分子が、所与の標識で標識されていることになる可能性は非常に低い）。

【0078】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド配列またはその断片を指す。核酸はヌクレオチドを含むことができる。核酸は、細胞に対して外因性であってもよくまたは内因性であってもよい。核酸は無細胞環境に存在してもよい。核酸は、遺伝子またはその断片であってもよい。核酸はDNAであってもよい。核酸はRNAであってもよい。核酸は、1つまたは複数のアナログ（例えば、変更された骨格、糖、または核酸塩基）を含むことができる。アナログのいくつかの非限定的な例としては、5-ブromoウラシル、ペプチド核酸、ゼノ核酸、モルホリノ、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コーディセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に連結されているローダミンまたはフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン連結ヌクレオチド、蛍光性塩基アナログ、CpGアイランド、メチル-7-グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、キューオシン、およびワイオシンが挙げられる。「核酸」、「ポリヌクレオチド」、「標的ポリヌクレオチド」、および「標的核酸」は、同義的に使用することができる。

【0079】

核酸は、核酸に新しいまたは増強された特徴（例えば、安定性の向上）を提供するために、1つまたは複数の修飾（例えば、塩基修飾、骨格修飾）を含んでいてもよい。核酸は、核酸親和性タグを含むことができる。ヌクレオシドは、塩基-糖の組合せであってもよい。ヌクレオシドの塩基部分は、複素環式塩基であってもよい。そのような複素環式塩基の2つの最も一般的な種類は、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合で連結されているリン酸基をさらに含むヌクレオシドであってもよい。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部分に連結されていてもよい。核酸を形成する際、リン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合で連結して、線状ポリマー化合物を形成することができる。この線状ポリマー化合物のそれぞれの末端が次にさらに接合されて、環状化合物を形成する場合があるが、一般に線状化合物が好適である。加えて、線状化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有してもよく、したがって、完全にまたは部分的に二本鎖の化合物を産生するようにフォールディングする場合がある。核酸内では、リン酸基は、一般的に、核酸のヌクレオシド間骨格を形成するものと呼ばれる場合がある。連結または骨格は、3'-5'ホスホジエステル連結であってもよい。

【0080】

核酸は、修飾骨格および／または修飾ヌクレオシド間連結を含むことができる。修飾骨格としては、骨格にリン原子を保持するものおよび骨格にリン原子を有しないものを挙げることができる。その中にリン原子を含有する好適な修飾核酸骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネートなどのメチルおよび他のアルキルホスホネート、

ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオホスホルアミダートを含むホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、ならびに通常の3'-5'連結を有するボラノホスフェート、2'-5'連結アナログ、ならびに1つまたは複数のヌクレオチド間連結が3'-3'、5'-5'、または2'-2'連結である逆極性を有するものを挙げることができる。

【0081】

核酸は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または1つもしくは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間連結により形成されるポリヌクレオチド骨格を含むことができる。そのようなものとしては、モルホリノ連結を有するもの（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）；シロキサノ骨格；スルフィド、スルホキシド、およびスルホン骨格；ホルムアセチル（formacetyl）およびチオホルムアセチル（thioformacetyl）骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；リボアセチル（riboacetyl）骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合N、O、S、CH₂成分部分を有する他のものが挙げられる。

【0082】

核酸は、核酸模倣物を含むことができる。「模倣物」という用語は、フラノース環のみ、またはフラノース環およびヌクレオチド間連結の両方が、非フラノース基で置き換えられているポリヌクレオチドを含むことが意図されていてもよく、フラノース環のみの置き換えは、糖代用物と呼ばれる場合もある。複素環式塩基部分または修飾複素環式塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持されていてもよい。1つのそのような核酸は、ペプチド核酸（PNA）であってもよい。PNAでは、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、特にアミノエチルグリシン骨格で置き換えられていてもよい。ヌクレオチドは、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的にまたは間接的に、保持されていてもよく、結合している。PNA化合物の骨格は、PNAにアミド含有骨格を付与する、2つまたはそれよりも多くの連結されたアミノエチルグリシン単位を含んでもよい。複素環式塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的にまたは間接的に結合していてもよい。

【0083】

核酸は、モルホリノ骨格構造を含んでもよい。例えば、核酸は、リボース環の代わりに6員モルホリノ環を含んでもよい。こうした実施形態の一部では、ホスホロジアミダートまたは他の非ホスホジエステルヌクレオシド間連結が、ホスホジエステル連結を置き換えていてもよい。

【0084】

核酸は、モルホリノ環に付着されている複素環式塩基を有する連結モルホリノ単位（例えば、モルホリノ核酸）を含んでもよい。連結基は、モルホリノ核酸のモルホリノモノマー単位を連結することができる。非イオン性モルホリノベースオリゴマー化合物は、細胞タンパク質との望ましくない相互作用が少ない場合がある。モルホリノベースポリヌクレオチドは、核酸の非イオン性模倣物であってもよい。異なる連結基を使用して、モルホリノ種類内の様々な化合物を接合することができる。さらなる種類のポリヌクレオチド模倣物は、シクロヘキセニル核酸（CeNA）と呼ばれる場合がある。核酸分子に通常存在するフラノース環を、シクロヘキセニル環と置き換えることができる。CeNA DMT保護ホスホラミダイトモノマーを調製し、ホスホラミダイト化学反応を使用してオリゴマー化合物合成に使用することができる。核酸鎖へのCeNAモノマーの組み込みは、DNA/RNAハイブリッドの安定性を増加させることができる。CeNAオリゴアデニレートは、天然複合体と同様の安定性で、核酸相補体と複合体を形成することができる。さらなる修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子に連結され、それにより2'-C、4' 50

10

20

30

40

－Cオキシメチレン連結を形成し、それにより二環式糖部分を形成するロックド核酸（LNA）を含んでいてもよい。連結は、2' 酸素原子および4' 炭素原子を架橋するメチレン（－CH₂），基（式中nは1または2である）であってもよい。LNAおよびLNAアナログは、相補的核酸との非常に高い二重鎖熱安定性（T_m=+3～+10℃）、3'－エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、および良好な溶解度特性を示すことができる。

【0085】

また、核酸は、核酸塩基（単に「塩基」と呼ばれることが多い）修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、「未修飾」または「天然」核酸塩基としては、プリン塩基（例えば、アデニン（A）およびグアニン（G））ならびにピリミジン塩基（例えば、チミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U））を挙げることができる。修飾核酸塩基としては、5－メチルシトシン（5－me－C）、5－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2－プロピルおよび他のアルキル誘導体、2－チオウラシル、2－チオチミンおよび2－チオシトシン、5－ハロウラシルおよびシトシン、5－プロピニル（－C＝C－CH₃）ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5－ウラシル（ブソイドウラシル）、4－チオウラシル、8－ハロ、8－アミノ、8－チオール、8－チオアルキル、8－ヒドロキシル、および他の8－置換アデニンおよびグアニン、5－ハロ、特に5－プロモ、5－トリフルオロメチル、および他の5－置換ウラシルおよびシトシン、7－メチルグアニンおよび7－メチルアデニン、2－F－アデニン、2－アミノアデニン、8－アザグアニンおよび8－アザアデニン、7－デアザグアニンおよび7－デアザアデニン、ならびに3－デアザグアニンおよび3－デアザアデニンなどの他の合成および天然核酸塩基を挙げることができる。修飾核酸塩基としては、フェノキサジンシチジン（1H－ピリミド（5，4－b）（1，4）ベンゾキサジン－2（3H）－オン）、フェノチアジンシチジン（1H－ピリミド（5，4－b）（1，4）ベンゾチアジン－2（3H）－オン）などの三環式ピリミジン、置換フェノキサジンシチジン（例えば、9－（2－アミノエトキシ）－H－ピリミド（5，4－（b）（1，4）ベンゾキサジン－2（3H）－オン）、フェノチアジンシチジン（1H－ピリミド（5，4－b）（1，4）ベンゾチアジン－2（3H）－オン）などのG－クランプ、置換フェノキサジンシチジン（例えば、9－（2－アミノエトキシ）－H－ピリミド（5，4－（b）（1，4）ベンゾキサジン－2（3H）－オン）、カルバゾールシチジン（2H－ピリミド（4，5－b）インドール－2－オン）、ピリドインドールシチジン（H－ピリド（3'，2'：4，5）ピロロ[2，3－d]ピリミジン－2－オン）などのG－クランプを挙げることができる。

【0086】

本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、標的を含む組成物を指すことができる。本開示の方法、デバイス、および系による分析に好適な試料としては、細胞、組織、臓器、または生物が挙げられる。

【0087】

本明細書で使用される場合、「試料採取デバイス」または「デバイス」という用語は、試料の切片を採取し、および／または切片を基材に配置することができるデバイスを指すことができる。試料デバイスは、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）機械、細胞選別機械、生検針、生検デバイス、組織切片化デバイス、マイクロ流体デバイス、ブレードグリッド、および／またはマイクロトームを指すことができる。

【0088】

本明細書で使用される場合、「固体支持体」という用語は、複数のバーコード（例えば、確率論的バーコード）を付着させることができる、個別の固体または半固体表面を指すことができる。固体支持体は、核酸をそれに固定化することができる（例えば、共有結合でまたは非共有結合で）、プラスチック、セラミック、金属、またはポリマー材料（例えば、ヒドロゲル）で構成されている任意のタイプの中実性、多孔性、または中空の球体、

ボール、ベアリング、円柱、または他の類似構成を包含することができる。固体支持体は、球状であってもよく（例えば、マイクロスフェア）、または立方体、立方形、ピラミッド形、円柱状、円錐形、長方形、もしくは円盤形など、非球状もしくは不規則の形状を有してもよい個別の粒子を含んでいてもよい。ビーズは、形状が非球状であってもよい。アレイ状に離間されている複数の固体支持体は、基材を構成しないことがある。固体支持体は、「ビーズ」という用語と同義的に使用される場合がある。

【0089】

本明細書で使用される場合、「確率論的バーコード」という用語は、本開示の標識を含むポリヌクレオチド配列を指すことができる。確率論的バーコードは、確率論的バーコーディングのために使用することができるポリヌクレオチド配列であってもよい。確率論的バーコードを使用して、試料内の標的を定量化することができる。確率論的バーコードを使用して、標識が標的に付随した後で生じ得るエラーを制御することができる。例えば、確率論的バーコードを使用して、増幅エラーまたは配列決定エラーを評価することができる。標的に付随している確率論的バーコードは、確率論的バーコードー標的または確率論的バーコードータグー標的と呼ばれる場合がある。

本明細書で使用される場合、「遺伝子特異的確率論的バーコード」という用語は、標識および遺伝子特異的である標的結合性領域を含むポリヌクレオチド配列を指すことができる。確率論的バーコードは、確率論的バーコーディングのために使用することができるポリヌクレオチド配列であってもよい。確率論的バーコードは、試料内の標的を定量化するために使用することができる。確率論的バーコードは、標識が標的に付随した後で生じ得るエラーを制御するために使用することができる。例えば、確率論的バーコードは、増幅エラーまたは配列決定エラーを評価するために使用することができる。標的に付随している確率論的バーコードは、確率論的バーコードー標的または確率論的バーコードータグー標的と呼ばれる場合がある。

【0090】

本明細書で使用される場合、「確率的バーコーディング」という用語は、核酸のランダム標識付与（例えば、バーコーディング）を指すことができる。確率論的バーコーディングは、再帰的ポアソン戦略を使用して、標的に付随している標識を関連付け、定量化することできる。本明細書で使用される場合、「確率論的バーコーディング」という用語は、「確率論的標識付与」と同義的に使用することができる。

ここで使用される場合、「標的」という用語は、バーコード（例えば、確率論的バーコード）を付随させることができる組成物を指すことができる。本開示の方法、デバイス、および系による分析のための例示的で好適な標的としては、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、mRNA、マイクロRNA、およびtRNAなどが挙げられる。標的は、一本鎖であってもよくまたは二本鎖であってもよい。一部の実施形態では、標的は、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドであってもよい。一部の実施形態では、標的は脂質である。本明細書で使用される場合、「標的」は、「種」と同義的に使用することができる。

【0091】

本明細書で使用される場合、「逆転写酵素」という用語は、逆転写酵素活性を有する（すなわち、RNA鋳型からのDNAの合成を触媒する）酵素のグループを指すことができる。一般に、そのような酵素としては、これらに限定されないが、レトロウイルス逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、レトロプラスミド逆転写酵素、レトロ逆転写酵素、細菌逆転写酵素、グループIIイントロン由来逆転写酵素、およびそれらの突然変異体、変異体、または誘導体が挙げられる。非レトロウイルス逆転写酵素としては、非LTRレトロトランスポゾン逆転写酵素、レトロプラスミド逆転写酵素、レトロ逆転写酵素、およびグループIIイントロン逆転写酵素が挙げられる。グループIIイントロン逆転写酵素の例としては、ラクトコッカス・ラクチス（*Lactococcus lactis*）LI.LtrBイントロン逆転写酵素、サーモシネココッカス・エロンガ투스（*Thermosynechococcus elongatus*）TeI4cイントロン逆転写酵素、またはゲオバチルス・ステアロサーモフィラス（*Geobacillus*

steaerothermophilus) GsI-IIIイントロン逆転写酵素が挙げられる。他のクラスの逆転写酵素としては、多くのクラスの非レトロウイルス逆転写酵素（すなわち、中でも、レトロ、グループIIイントロン、および多様性を生じさせるレトロエレメント (diversity-generating retroelement)）を挙げることができる。

【0092】

「ユニバーサルアダプタープライマー」、「ユニバーサルプライマーアダプター」、または「ユニバーサルアダプター配列」という用語は、バーコード（例えば、確率論的バーコード）とハイブリダイズして遺伝子特異的バーコードを生成するために使用することができるヌクレオチド配列を指すために同義的に使用される。ユニバーサルアダプター配列は、例えば、本開示の方法で使用されるすべてのバーコードにわたってユニバーサルである既知配列であってもよい。例えば、本明細書で開示される方法を使用して複数の標的が標識されている場合、標的特異的配列の各々は、同じユニバーサルアダプター配列に連結されていてもよい。一部の実施形態では、1つよりも多くのユニバーサルアダプター配列を、本明細書で開示される方法に使用することができる。例えば、本明細書で開示される方法を使用して複数の標的が標識されている場合、標的特異的配列のうちの少なくとも2つは、異なるユニバーサルアダプター配列に連結されている。ユニバーサルアダプタープライマーおよびその相補体は、2つのオリゴヌクレオチドに含まれていてもよく、それらの一方は標的特異的配列を含み、他方はバーコードを含む。例えば、ユニバーサルアダプター配列は、標的核酸に相補的なヌクレオチド配列を生成するための標的特異的配列を含むオリゴヌクレオチドの一部であってもよい。バーコードおよびユニバーサルアダプター配列の相補配列を含む第2のオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列とハイブリダイズし、標的特異的バーコード（例えば、標的特異的確率論的バーコード）を生成することができる。一部の実施形態では、ユニバーサルアダプタープライマーは、本開示の方法で使用するユニバーサルPCRプライマーとは異なる配列を有する。

【0093】

バーコード

確率論的バーコーディングなどのバーコーディングは、例えば、米国特許出願公開第20150299784号明細書、国際公開第2015031691号パンフレット、およびFu et al, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2011 May 31; 108(22):9026-31に記載されており、こうした刊行物の内容はその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるバーコードは、標的を確率論的に標識（例えば、バーコード、タグ）するために使用することができるポリヌクレオチド配列であってもよい確率論的バーコードであってもよい。バーコードは、確率論的バーコードの異なるバーコード配列の数および標識されることになる標的のいずれかの出現数の比が、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、もしくは約1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であり得る場合、確率論的バーコードと呼ぶことができる。標的は、同一のまたはほぼ同一の配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であってもよい。バーコードは、確率論的バーコードの異なるバーコード配列の数および標識されることになる標的のいずれかの出現数の比が、少なくとも1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、もしくは100:1であるか、または最大で1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:

1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、もしくは100:1である場合、確率論的バーコードと呼ぶことができる。確率論的バーコードのバーコード配列は、分子標識と呼ばれる場合がある。

【0094】

バーコード、例えば、確率論的バーコードは、1つまたは複数の標識を含むことができる。例示的な標識としては、ユニバーサル標識、細胞標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、試料標識、プレート標識、空間標識、および／またはプレ空間標識（*pre-spatial label*）を挙げることができる。図1は、空間標識を有する例示的なバーコード104を示す。バーコード104は、バーコードを固体支持体105に連結することができる5'アミンを含んでいてもよい。バーコードは、ユニバーサル標識、ディメンション標識（*dimension label*）、空間標識、細胞標識、および／または分子標識を含んでいてもよい。バーコード内の様々な標識（これらに限定されないが、ユニバーサル標識、ディメンション標識、空間標識、細胞標識、および分子標識を含む）の順序は様々であってもよい。例えば、図1に示されているように、ユニバーサル標識が最も5'側の標識であってもよく、分子標識が最も3'側の標識であってもよい。空間標識、ディメンション標識、および細胞標識は、任意の順序であってもよい。一部の実施形態では、ユニバーサル標識、空間標識、ディメンション標識、細胞標識、および分子標識は、任意の順序である。バーコードは、標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、試料中の標的（例えば、標的核酸、RNA、mRNA、DNA）と相互作用することができる。例えば、標的結合性領域は、mRNAのポリ（A）テイルと相互作用することができるオリゴ（dT）配列を含んでいてもよい。一部の 경우에는、バーコードの標識（例えば、ユニバーサル標識、ディメンション標識、空間標識、細胞標識、およびバーコード配列）は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の、またはそれよりも多くのヌクレオチドにより隔てられていてもよい。

【0095】

標識、例えば、細胞標識は、規定の長さ、例えば各々が7ヌクレオチド（一部のハミングエラー訂正コードで使用されるビット数に等しい）の固有なセットの核酸部分配列を含んでいてもよく、それらは、エラー訂正能力を提供するように設計されていてもよい。エラー訂正部分配列のセットは、7ヌクレオチド配列を含み、セット内の配列の任意の対の組合せが、規定の「遺伝的距離」（またはミスマッチ塩基の数）を表すように設計することができる。例えば、エラー訂正部分配列のセットは、3ヌクレオチドの遺伝的距離を表すように設計することができる。この場合、標識化標的核酸分子の配列データのセットのエラー訂正配列を精査することにより（下記により完全に記載されている）、増幅エラーまたは配列決定エラーを検出または訂正することが可能になり得る。一部の実施形態では、エラー訂正コードを作出するために使用される核酸部分配列の長さは様々であってもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、31、40、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、31、40、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、他の長さの核酸部分配列を、エラー訂正コードの作出に使用することができる。

【0096】

バーコードは、標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、試料中の標的と相互作用することができる。標的は、リボ核酸（RNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、RNA分解産物、各々がポリ（A）テイルを含むRNA、またはそれらの任意の組合せであってもよくまたは含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の標的は、デオキシリボ核酸（DNA）を含んでいてもよい。

【0097】

一部の実施形態では、標的結合性領域は、mRNAのポリ(A)テイルと相互作用することができるオリゴ(dT)配列を含んでいてもよい。バーコードの標識(例えば、ユニバーサル標識、ディメンション標識、空間標識、細胞標識、およびバーコード配列(例えば、分子標識))の1つまたは複数は、スペーサーにより、バーコードの残りの標識の別の1つまたは2つから隔てられていてもよい。スペーサーは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個、またはそれよりも多くのヌクレオチドであってもよい。一部の実施形態では、バーコードの標識はいずれも、スペーサーにより隔てられていない。

【0098】

ユニバーサル標識

バーコードは、1つまたは複数のユニバーサル標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数のユニバーサル標識は、所与の固体支持体に付着されているバーコードのセット内のすべてのバーコードで同じであってもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数のユニバーサル標識は、複数のビーズに付着されているすべてのバーコードで同じであってもよい。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーにハイブリダイズすることが可能な核酸配列を含んでいてもよい。配列決定プライマーは、ユニバーサル標識を含むバーコードの配列決定に使用することができる。配列決定プライマー(例えば、ユニバーサル配列決定プライマー)は、ハイスループット配列決定プラットフォームに付随する配列決定プライマーを含んでいてもよい。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、PCRプライマーにハイブリダイズすることが可能な核酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーおよびPCRプライマーにハイブリダイズすることが可能な核酸配列を含んでいてもよい。配列決定プライマーまたはPCRプライマーにハイブリダイズすることが可能なユニバーサル標識の核酸配列は、プライマー結合部位と呼ばれる場合がある。ユニバーサル標識は、バーコードの転写を開始するために使用することができる配列を含んでいてもよい。ユニバーサル標識は、バーコードまたはバーコード内の領域の伸長に使用することができる配列を含んでいてもよい。ユニバーサル標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。例えば、ユニバーサル標識は、少なくとも約10個のヌクレオチドを含んでいてもよい。ユニバーサル標識は、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、切断可能なリンカーまたは修飾ヌクレオチドは、バーコードが支持体から切断されることが可能になるようにユニバーサル標識配列の一部であってもよい。

【0099】

ディメンション標識

バーコードは、1つまたは複数のディメンション標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ディメンション標識は、標識付与(例えば、確率論的標識付与)が生じたディメンションに関する情報を提供する核酸配列を含んでいてもよい。例えば、ディメンション標識は、標的がバーコード化された時点に関する情報を提供することができる。ディメンション標識は、試料内のバーコーディング(例えば、確率論的バーコーディング)の時点に関連付けられていてもよい。ディメンション標識は、標識付与の時点で活性化されることができる。異なるディメンション標識を異なる時点で活性化することができる。ディメンション標識は、標的、標的のグループ、および／または試料がバーコード化された順序に関する情報を提供する。例えば、細胞の集団を、細胞周期のG0期にてバーコード化することができる。細胞を、細胞周期のG1期にてバーコード(例えば、確率論的バーコード)で再度パルスすることができる。細胞を、細胞周期のS期などにてバーコードで再

10

20

30

40

50

度パルスすることができる。各パルス（例えば、細胞周期の各期）におけるバーコードは、異なるディメンション標識を含むことができる。このように、ディメンション標識は、細胞周期のどの期でどの標的が標識化されたかに関する情報を提供する。ディメンション標識により、多数の異なる生物学的時点を調査することができる。例示的な生物学的時点としては、これらに限定されないが、細胞周期、転写（例えば、転写開始）、および転写物分解を挙げることができる。別の例では、試料（例えば、細胞、細胞の集団）は、薬物および／または療法による治療前および／または治療後に標識することができる。別の標的のコピー数の変化は、薬物および／または療法に対する試料の応答を示すことができる。

【0100】

ディメンション標識は、活性化可能であってもよい。活性化可能なディメンション標識は、特定の時点で活性化することができる。活性化可能な標識は、例えば、構成的に活性化することができる（例えば、オフにならない）。活性化可能なディメンション標識は、例えば、可逆的に活性化することができる（例えば、活性化可能なディメンション標識は、オンおよびオフにすることができる）。例えば、ディメンション標識は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれよりも多くの回数、可逆的に活性化可能であってもよい。ディメンション標識は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回、またはそれよりも多くの回数、可逆的に活性化可能であってもよい。一部の実施形態では、ディメンション標識は、蛍光、光、化学的事象（例えば、切断、別の分子のライゲーシオン、修飾の付加（例えば、ペグ化、SUMO化、アセチル化、メチル化、脱アセチル化、脱メチル化）、光化学的事象（例えば、フォトケージ化）、および非天然ヌクレオチドの導入により活性化することができる。

【0101】

ディメンション標識は、一部の実施形態では、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されているすべてのバーコード（例えば、確率論的バーコード）で同一であってもよいが、異なる固体支持体（例えば、ビーズ）毎に異なってもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、または100%が、同じディメンション標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%が、同じディメンション標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも95%が、同じディメンション標識を含んでいてもよい。

【0102】

複数の固体支持体（例えば、ビーズ）には、 10^6 個ものまたはそれよりも多くの固有ディメンション標識配列が提供されていてもよい。ディメンション標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ディメンション標識は、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。ディメンション標識は、約5～約200個のヌクレオチドを含んでいてもよい。ディメンション標識は、約10～約150個のヌクレオチドを含んでいてもよい。ディメンション標識は、長さが約20～約125個のヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0103】

空間標識

バーコードは、1つまたは複数の空間標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、空間標識は、バーコードが付随している標的分子の空間的方向性に関する情報を提供する核酸配列を含んでいてもよい。空間標識は、試料の座標に関連付けられてもよい。座標は

10

20

30

40

50

、固定座標であってもよい。例えば、座標は、基材を基準にして固定されていてもよい。空間標識は、二次元または三次元グリッドを基準していてもよい。座標は、目印を基準にして固定されていてもよい。目印は、空間にて識別可能であってもよい。目印は、画像化することができる構造であってもよい。目印は、生物学的構造、例えば、解剖学的目印であってもよい。目印は、細胞性の目印、例えば細胞小器官であってもよい。目印は、カラーコード、バーコード、磁気特性、蛍光物質、放射能、または固有のサイズもしくは形状などの識別可能な識別子を有する構造などの非天然の目印であってもよい。空間標識は、物理的な区画（例えば、ウェル、容器、または液滴）に関連付けられていてもよい。一部の実施形態では、空間における1つまたは複数の位置をコード化するために、複数の空間標識が一緒に使用される。

10

【0104】

空間標識は、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されているすべてのバーコードで同一であってもよいが、異なる固体支持体（例えば、ビーズ）毎に異なってもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の、同じ空間標識を含むバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、もしくは約60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の、同じ空間標識を含むバーコードのパーセンテージは、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、もしくは100%であってもよく、または最大で60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、もしくは100%であってもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%が、同じ空間標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも95%が、同じ空間標識を含んでいてもよい。

20

【0105】

複数の固体支持体（例えば、ビーズ）には、 10^6 個ものまたはそれよりも多くの固有空間標識配列が提供されていてもよい。空間標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数または範囲のヌクレオチド長であってもよい。空間標識は、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。空間標識は、約5～約200個のヌクレオチドを含んでいてもよい。空間標識は、約10～約150個のヌクレオチドを含んでいてもよい。空間標識は、長さが約20～約125個のヌクレオチドを含んでいてもよい。

30

【0106】

細胞標識

バーコード（例えば、確率論的バーコード）は、1つまたは複数の細胞標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、細胞標識は、どの標的核酸がどの細胞を起源とするかを決定するための情報を提供する核酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、細胞標識は、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されているすべてのバーコードで同一であるが、異なる固体支持体（例えば、ビーズ）毎に異なる。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の、同じ細胞標識を含むバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、もしくは約60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の、同じ細胞標識を含むバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、もしくは100%であってもよく、または

40

50

約60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、もしくは100%であってもよい。例えば、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%が、同じ細胞標識を含んでいてもよい。別の例として、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも95%が、同じ細胞標識を含んでいてもよい。

【0107】

複数の固体支持体（例えば、ビーズ）には、 10^6 個ものまたはそれよりも多くの固有細胞標識配列が提供されていてもよい。細胞標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。細胞標識は、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。例えば、細胞標識は、約5～約200個のヌクレオチドを含んでいてもよい。別の例として、細胞標識は、約10～約150個のヌクレオチドを含んでいてもよい。さらに別の例として、細胞標識は、長さが約20～約125個のヌクレオチドを含んでいてもよい。

10

【0108】

バーコード配列

バーコードは、1つまたは複数のバーコード配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコード配列は、バーコードにハイブリダイズした特定のタイプの標的核酸種を識別するための情報を提供する核酸配列を含んでいてもよい。バーコード配列は、バーコード（例えば、標的結合性領域）にハイブリダイズした標的核酸種の具体的な出現の計数手段を提供する（例えば、大まかな近似値を提供する）核酸配列を含んでいてもよい。

20

【0109】

一部の実施形態では、多様なセットのバーコード配列が、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されている。一部の実施形態では、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 個の、もしくは約 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 個の、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の固有分子標識配列が存在してもよい。例えば、複数のバーコードは、別個の配列を有する約6561個のバーコード配列を含んでいてもよい。別の例として、複数のバーコードは、別個の配列を有する約65536個のバーコード配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 個の、または最大で 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 個の固有バーコード配列が存在してもよい。固有分子標識配列は、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されていてもよい。

30

【0110】

バーコードの長さは、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。例えば、バーコードは、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。別の例として、バーコードは、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。

40

【0111】

分子標識

バーコード（例えば、確率論的バーコード）は、1つまたは複数の分子標識を含んでいてもよい。分子標識は、バーコード配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、分子

50

標識は、バーコードにハイブリダイズした特定のタイプの標的核酸種を識別するための情報を提供する核酸配列を含んでいてもよい。分子標的は、バーコード（例えば、標的結合性領域）にハイブリダイズした標的核酸種の具体的な出現の計数手段を提供する核酸配列を含んでいてもよい。

【0112】

一部の実施形態では、多様なセットの分子標識が、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されている。一部の実施形態では、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 個の、もしくは約 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 個の、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の固有分子標識配列が存在してもよい。例えば、複数のバーコードは、別個の配列を有する約6561個の分子標識を含んでいてもよい。別の例として、複数のバーコードは、別個の配列を有する約65536個の分子標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、少なくとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 個の、または最大で 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 個の固有分子標識配列が存在してもよい。固有分子標識配列を有するバーコードは、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に付着されていてもよい。

【0113】

複数の確率論的バーコードを使用する確率論的バーコーディングの場合、異なる分子標識配列の数および標的のいずれかの出現数の比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、もしくは約1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。標的は、同一のまたはほぼ同一の配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であってもよい。一部の実施形態では、異なる分子標識配列の数および標的のいずれかの出現数の比は、少なくとも1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、もしくは100:1であるか、または最大で1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、もしくは100:1である。

【0114】

分子標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。分子標識は、少なくとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。

【0115】

標的結合性領域

バーコードは、捕捉プローブなど、1つまたは複数の標的結合性領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、目的の標的とハイブリダイズすることができる。一部の実施形態では、標的結合性領域は、標的（例えば、標的核酸、標的分子、例

例えば、分析しようとする細胞性核酸）に、例えば特定の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする核酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、特定の標的核酸の特定の位置に付着する（例えば、ハイブリダイズする）ことができる核酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、制限酵素部位突出（例えば、E c o R I 粘着末端突出）に対する特異的ハイブリダイゼーションが可能である核酸配列を含んでいてもよい。次いで、バーコードは、制限部位突出に相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートすることができる。

【0116】

一部の実施形態では、標的結合性領域は、非特異的標的核酸配列を含んでいてもよい。非特異的標的核酸配列は、標的核酸の特異的配列とは無関係の複数の標的核酸に結合することができる配列を指すことができる。例えば、標的結合性領域は、ランダム多量体配列、またはmRNA分子上のポリ（A）テイルにハイブリダイズするオリゴ（dT）配列を含んでいてもよい。ランダム多量体配列は、例えば、ランダム二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、または任意の長さのより高次の多量体配列であってもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、所与のビーズに付着されているすべてのバーコードで同じである。一部の実施形態では、所与のビーズに付着されている複数のバーコードの標的結合性領域は、2つまたはそれよりも多くの異なる標的結合性配列を含んでいてもよい。標的結合性領域は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、もしくは約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。標的結合性領域は、最大で約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。

【0117】

一部の実施形態では、標的結合性領域は、ポリアデニル化末端を含むmRNAとハイブリダイズすることができるオリゴ（dT）を含んでいてもよい。標的結合性領域は、遺伝子特異的であってもよい。例えば、標的結合性領域は、標的の特定の領域にハイブリダイズするように構成されていてもよい。標的結合性領域は、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、30ヌクレオチド長、もしくは約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、30ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。標的結合性領域は、少なくとも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、もしくは30ヌクレオチド長であってもよく、または最大で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、もしくは30ヌクレオチド長であってもよい。標的結合性領域は、約5～30ヌクレオチド長であってもよい。バーコードが遺伝子特異的標的結合性領域を含む場合、バーコードは、本明細書では遺伝子特異的バーコードと呼ばれる場合がある。

【0118】

方向付け特性

確率論的バーコード（例えば、確率論的バーコード）は、バーコードを方向付ける（例えば、アラインさせる）ために使用することができる1つまたは複数の方向付け特性を含んでいてもよい。バーコードは、等電点電気泳動のための部分を含んでいてもよい。異なるバーコードは、異なる等電点電気泳動点を構成することができる。こうしたバーコードが試料に導入されている場合、バーコードを既知の方向へと方向付けるために、試料を等電点電気泳動にかけることができる。このように、方向付け特性を使用すると、試料内のバーコードの既知マップを作成することができる。例示的な方向付け特性としては、電気

泳動移動度（例えば、バーコードのサイズに基づく）、等電点、スピン、導電率、および／または自己組織化を挙げることができる。例えば、自己組織化の方向付け特性を有するバーコードは、活性化されると特定の方向（例えば、核酸ナノ構造）へと自己組織化することができる。

【0119】

親和性特性

バーコード（例えば、確率論的バーコード）は、1つまたは複数の親和性特性を含んでもよい。例えば、空間標識は、親和性特性を含んでもよい。親和性特性は、バーコードと別の実体（例えば、細胞受容体）との結合を容易にすることができる化学的および／または生物学的部分を含んでもよい。例えば、親和性特性は、抗体、例えば、試料上の特定の部分（例えば、受容体）に対して特異的な抗体を含んでもよい。一部の実施形態では、抗体は、バーコードを、特定の細胞タイプまたは分子へと導くことができる。特定の細胞タイプにあるおよび／または付近にある標的を標識する（例えば、確率論的に標識する）ことができる。抗体はバーコードを特定の位置に導くことができるため、一部の実施形態では、親和性特性は、空間標識のヌクレオチド配列に加えて、空間情報を提供することができる。抗体は、治療用抗体、例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、ヒト化またはキメラ化されていてもよい。抗体は、ネイキッド抗体または融合抗体であってもよい。

10

【0120】

抗体は、全長（すなわち、天然に存在するか、もしくは通常の免疫グロブリン遺伝子断片組換えプロセスにより形成される）免疫グロブリン分子（例えば、IgG抗体）または抗体断片のような免疫グロブリン分子の免疫学的活性（すなわち、特異的に結合する）部分であってもよい。

20

抗体断片は、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、およびsFvなどの抗体の一部であってもよい。一部の実施形態では、抗体断片は、全長抗体により認識されるものと同じ抗原に結合することができる。抗体断片は、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、ならびに軽鎖可変領域および重鎖可変領域がペプチドリンカーにより接続されている組換え単鎖ポリペプチド分子（「scFvタンパク質」）などの、抗体の可変領域からなる単離断片を含むことができる。例示的な抗体としては、これらに限定されないが、がん細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面受容体（CD8、CD34、CD45）に結合する抗体、および治療用抗体を挙げることができる。

30

【0121】

ユニバーサルアダプタープライマー

バーコードは、1つまたは複数のユニバーサルアダプタープライマーを含んでもよい。例えば、遺伝子特異的確率論的バーコードなどの遺伝子特異的バーコードは、ユニバーサルアダプタープライマーを含んでもよい。ユニバーサルアダプタープライマーは、すべてのバーコードにわたってユニバーサルであるヌクレオチド配列を指すことができる。ユニバーサルアダプタープライマーは、遺伝子特異的バーコードを構築するために使用することができる。ユニバーサルアダプタープライマーは、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、30ヌクレオチド長、もしくは約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、30ヌクレオチド長、またはこれらのうちの任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルアダプタープライマーは、少なくとも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、もしくは30ヌクレオチド長で、または最大で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、もしくは30ヌクレオチド長であってもよい。ユニバ

40

50

ーサルアダプタープライマーは、5～50ヌクレオチド長であってもよい。

【0122】

リンカー

バーコードが、1つよりも多くのタイプの標識を含む場合（例えば、1つの分子標識などの、1つよりも多くの細胞標識または1つよりも多くのバーコード配列）、標識は、リンカー標識配列で分散されていてもよい。リンカー標識配列は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。リンカー標識配列は、最大で約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長、またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。一部の場合では、リンカー標識配列は、12ヌクレオチド長である。リンカー標識配列を使用して、バーコードの合成を容易にすることができる。リンカー標識は、エラー訂正（例えば、ハミング）コードを含んでいてもよい。

【0123】

固体支持体

本明細書で開示される確率論的バーコードなどのバーコードは、一部の実施形態では、固体支持体に付随していてもよい。固体支持体は、例えば、合成粒子であってもよい。一部の実施形態では、固体支持体上の複数のバーコード（例えば、第1の複数のバーコード）の確率論的バーコード（例えば、第1のバーコード配列）の分子標識などの、バーコード配列の一部またはすべては、少なくとも1つのヌクレオチドが異なる。同じ個体支持体上のバーコードの細胞標識は、同じであってもよい。異なる固体支持体上のバーコードの細胞標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なってもよい。例えば、第1の固体支持体上の第1の複数のバーコードの第1の細胞標識は同じ配列を有してもよく、第2の固体支持体上の第2の複数のバーコードの第2の細胞標識は同じ配列を有してもよい。第1の固体支持体上の第1の複数のバーコードの第1の細胞標識および第2の固体支持体上の第2の複数のバーコードの第2の細胞標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なってもよい。細胞標識は、例えば、約5～20ヌクレオチド長であってもよい。バーコード配列は、例えば、約5～20ヌクレオチド長であってもよい。合成粒子は、例えば、ビーズであってもよい。

【0124】

ビーズは、例えば、シリカゲルビーズ、細孔が制御されたガラスビーズ、磁気ビーズ、ダイナビーズ、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、またはそれらの任意の組合せであってもよい。ビーズは、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、またはそれらの任意の組合せなどの材料を含んでいてもよい。

【0125】

一部の実施形態では、ビーズは、バーコードまたは確率論的バーコードで官能化されたポリマービーズ、例えば、変形可能ビーズまたはゲルビーズであってもよい（10X Genomics（カリフォルニア州サンフランシスコ）のゲルビーズなど）。一部の実施形態では、ゲルビーズは、ポリマーベースゲルを含んでいてもよい。ゲルビーズは、例えば、1つまたは複数のポリマー前駆体を液滴内に被包することにより生成することができる。ポリマー前駆体を促進剤（例えば、テトラメチルエチレンジアミン（TEMED））に曝露すると、ゲルビーズを生成することができる。

【0126】

一部の実施形態では、粒子は分解可能であってもよい。例えば、ポリマービーズは、例えば、所望の条件下で、溶解、融解、または分解することができる。所望の条件は、環境条件を含むことができる。所望の条件は、制御された様式でのポリマービーズの溶解、融解、または分解をもたらすことができる。ゲルビーズは、化学的刺激、物理的刺激、生物学的刺激、熱的刺激、磁氣的刺激、電氣的刺激、光刺激、またはそれらの任意の組合せに

より、溶解、融解、または分解することができる。

【0127】

オリゴヌクレオチドバーコードなどの分析物および／または試薬は、例えば、ゲルビーズの内部表面（例えば、オリゴヌクレオチドバーコードおよび／もしくはオリゴヌクレオチドバーコードの生成に使用される材料の拡散により接近可能な内部）ならびに／またはゲルビーズもしくは本明細書に記載の他のマイクロカプセルの外部表面にカップリング／固定化されていてもよい。カップリング／固定化は、任意の形態の化学結合（例えば、共有結合、イオン結合）または物理的現象（例えば、ファンデルワールス力、双極子間相互作用など）によるものであってもよい。一部の実施形態では、ゲルビーズまたは本明細書に記載の任意の他のマイクロカプセルとの試薬のカップリング／固定化は、例えば、不安定部分を介する（例えば、本明細書に記載の化学架橋剤を含む化学架橋剤を介する）ものなど、可逆的であってもよい。刺激を適用すると、不安定部分が切断され、固定化されている試薬を解放することができる。一部の実施形態では、不安定部分はジスルフィド結合である。例えば、オリゴヌクレオチドバーコードがジスルフィド結合を介してゲルビーズに固定化されている場合、ジスルフィド結合を還元剤に曝露することにより、ジスルフィド結合を切断し、オリゴヌクレオチドバーコードをビーズから解放することができる。不安定部分は、ゲルビーズもしくはマイクロカプセルの一部として、試薬もしくは分析物をゲルビーズもしくはマイクロカプセルに連結する化学リンカーの一部として、および／または試薬もしくは分析物の一部として含まれていてもよい。一部の実施形態では、複数のバーコードのうちの少なくとも1つのバーコードは、粒子上に固定化されていてもよく、粒子上に部分的に固定化されていてもよく、粒子内に封入されていてもよく、粒子内に部分的に封入されていてもよく、またはそれらの任意の組合せであってもよい。

【0128】

一部の実施形態では、ゲルビーズは、これらに限定されないが、ポリマー、熱感受性ポリマー、光感受性ポリマー、磁気ポリマー、pH感受性ポリマー、塩感受性ポリマー、化学感受性ポリマー、高分子電解質、ポリサッカライド、ペプチド、タンパク質、および／またはプラスチックを含む、広範囲の様々なポリマーを含んでいてもよい。ポリマーとしては、これらに限定されないが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）、ポリ（スチレンスルホネート）（PSS）、ポリ（アリルアミン）（PAAm）、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリ（エチレンイミン）（PEI）、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）（PDADMAC）、ポリ（ピロール）（poly（pyrrole））（PPy）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVPON）、ポリ（ビニルピリジン）（PVP）、ポリ（メタクリル酸）（PMAA）、ポリ（メチルメタクリレート）（PMMA）、ポリスチレン（PS）、ポリ（テトラヒドロフラン）（PTHF）、ポリ（フタルアルデヒド）（poly（phthalaldehyde））（PTHF）、ポリ（ヘキシルビオロゲン）（PHV）、ポリ（L-リシン）（PLL）、ポリ（L-アルギニン）（PARG）、ポリ（乳酸-c o -グリコール酸）（PLGA）などの材料を挙げることができる。

【0129】

数多くの化学的刺激を使用して、ビーズの破壊、溶解、または分解を誘発することができる。こうした化学的变化の例としては、これらに限定されないが、ビーズ壁に対するpH媒介性変化、架橋結合の化学的切断によるビーズ壁の崩壊、ビーズ壁の解重合誘発、およびビーズ壁スイッチング反応を挙げることができる。また、バルク変化を使用して、ビーズの破壊を誘発することができる。

【0130】

また、種々の刺激によるマイクロカプセルに対するバルク変化または物理的变化は、試薬放出のためのカプセルの設計に多数の利点を提供する。バルク変化または物理的变化は、肉眼的規模で生じ、ビーズ破裂は、刺激により誘導される機械物理的力の結果である。こうしたプロセスとしては、これらに限定されないが、圧力誘導性破裂、ビーズ壁融解、またはビーズ壁の多孔性の変化を挙げることができる。

また、生物学的刺激を使用して、ビーズの破壊、溶解、または分解を誘発することができる。一般に、生物学的誘発因子は、化学的誘発因子に類似するが、多数の例では、生体分子、または酵素、ペプチド、サッカライド、脂肪酸、および核酸など、生体系に一般的に見出される分子が使用される。例えば、ビーズは、特定のプロテアーゼによる切断に感受性であるペプチド架橋連結を有するポリマーを含んでいてもよい。より具体的には、一例は、G F L G K ペプチド架橋連結を含むマイクロカプセルを含むことができる。プロテアーゼカテプシン B などの生物学的誘発因子を添加すると、シェル壁のペプチド架橋連結が切断され、ビーズの内容物が放出される。他の場合では、プロテアーゼは、熱活性化することができる。別の例では、ビーズは、セルロースを含むシェル壁を含む。加水分解酵素キトサンの添加は、セルロース結合の切断、シェル壁の解重合、およびその内部内容物の放出のための生物学的誘発因子としての役目を果たす。

10

また、ビーズは、熱刺激の適用時にそれらの内容物を放出するように誘導することができる。温度の変化は、ビーズに様々な変化を引き起こすことができる。熱の変化は、ビーズの融解を引き起こし、ビーズ壁を崩壊させることができる。他の場合では、熱は、ビーズの内部成分の内圧を上昇させ、ビーズを破裂または爆発させることができる。さらに他の場合では、熱は、ビーズを変形して収縮脱水状態にすることができる。また、熱は、ビーズの壁内の熱感受性ポリマーに作用して、ビーズの破壊を引き起こすことができる。

【0131】

マイクロカプセルのビーズ壁に磁気ナノ粒子を含めることにより、ビーズの破裂を誘発することならびにビーズをアレイにおいて誘導することが可能になり得る。本開示のデバイスは、いずれの目的のために磁気ビーズを含んでいてもよい。一例では、ビーズを含有する高分子電解質への Fe_3O_4 ナノ粒子の組込みは、振動磁場刺激の存在下での破裂を誘発する。

20

また、ビーズは、電気刺激の結果として、破壊、溶解、または分解することができる。前節で説明した磁気粒子と同様に、電气的感受性ビーズは、ビーズの破裂誘発、ならびに電場でのアラインメント、電気伝導性、または酸化還元反応などの他の機能を両方とも可能にすることができる。一例では、電气的感受性材料を含有するビーズは、電場にてアラインされ、内部試薬の放出を制御することができる。他の例では、電場は、ビーズ壁自体内での酸化還元反応を誘導することができ、それにより多孔性を増加させることができる。

また、光刺激を使用して、ビーズを破壊することができる。数多くの光誘発因子が考えられ、特定の波長範囲の光子を吸収可能なナノ粒子および発色団などの種々の分子を使用する系を挙げることができる。例えば、金属酸化物コーティングを、カプセル誘発因子として使用することができる。 SiO_2 でコーティングされた高分子電解質カプセルを UV 照射すると、ビーズ壁の崩壊を引き起こすことができる。さらに別の例では、アゾベンゼン基などの光スイッチング可能な物質をビーズ壁に組み込むことができる。UV 光または可視光を適用すると、これらのような化学物質は、光子の吸収時に可逆的なシストランス異性化を起こす。この態様では、光子スイッチの組込みは、光誘発因子を適用すると崩壊するかまたはより多孔性になり得るビーズ壁をもたらす。

30

【0132】

例えば、図 2 に例示されているバーコーディング（例えば、確率論的バーコーディング）の非限定的な例では、ブロック 208 にて、マイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに単一細胞などの細胞を導入した後、ブロック 212 にて、ビーズをマイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに導入することができる。各マイクロウェルは、1 つのビーズを含んでいてもよい。ビーズは、複数のバーコードを含んでいてもよい。バーコードは、ビーズに付着されている 5' アミン領域を含んでいてもよい。バーコードは、ユニバーサル標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的結合性領域、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

40

【0133】

本明細書で開示されるバーコードは、固体支持体（例えば、ビーズ）に付随（例えば、付着）していてもよい。固体支持体に付随しているバーコードは各々、固有配列を有する

50

少なくとも100個または1000個のバーコード配列を含む群から選択されるバーコード配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、固体支持体に付随している異なるバーコードは、異なる配列を有するバーコードを含んでいてもよい。一部の実施形態では、固体支持体に付随しているあるパーセンテージのバーコードは、同じ細胞標識を含む。例えば、パーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、もしくは約60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。別の例として、パーセンテージは、少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、もしくは100%であってもよく、または最大で60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、もしくは100%であってもよい。一部の実施形態では、固体支持体に付随しているバーコードは、同じ細胞標識を有してもよい。異なる固体支持体に付随しているバーコードは、固有配列を有する少なくとも100個または1000個の細胞標識を含む群から選択される異なる細胞標識を有してもよい。

【0134】

本明細書で開示されるバーコードは、固体支持体（例えば、ビーズ）に付随（例えば、付着）していてもよい。一部の実施形態では、試料内の複数の標的のバーコーディングは、複数のバーコードが付随している複数の合成粒子を含む固体支持体を用いて実施することができる。一部の実施形態では、固体支持体は、複数のバーコードが付随している複数の合成粒子を含んでいてもよい。異なる固体支持体上の複数のバーコードの空間標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なってもよい。固体支持体は、例えば、二次元または三次元の複数のバーコードを含んでいてもよい。合成粒子は、ビーズであってもよい。ビーズは、シリカゲルビーズ、細孔が制御されたガラスビーズ、磁気ビーズ、ダイナビーズ、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、またはそれらの任意の組合せであってもよい。固体支持体は、ポリマー、マトリックス、ヒドロゲル、ニードルアレイデバイス、抗体、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、固体支持体は、浮遊性であってもよい。一部の実施形態では、固体支持体は、半固体または固体アレイに埋め込まれていてもよい。バーコードは、固体支持体に付随していてもよい。バーコードは、個々のヌクレオチドであってもよい。バーコードは、基材に付随していてもよい。

【0135】

本明細書で使用される場合、「係留された」、「付着された」、および「固定化された」という用語は、同義的に使用され、バーコードを固体支持体に付着させるための共有結合手段または非共有結合手段を指すことができる。様々な異なる固体支持体のいずれかを、事前に合成されたバーコードを付着させるための、またはバーコードを *in situ* で固相合成するための固体支持体として使用することができる。

【0136】

一部の実施形態では、固体支持体はビーズである。ビーズは、1つまたは複数のタイプの中実性、多孔性、または中空の球体、ボール、ベアリング、円柱、または核酸を固定化することができる（例えば、共有結合でまたは非共有結合で）他の類似構成を含んでいてもよい。ビーズは、例えば、プラスチック、セラミック、金属、ポリマー材料、またはそれらの任意の組合せで構成されていてもよい。ビーズは、球状であるか（例えば、マイクロスフェア）、または立方体、立方形、ピラミッド形、円柱状、円錐形、長方形、もしくは円盤形など、非球状もしくは不規則の形状を有する個別の粒子であってもよくまたは含んでいてもよい。一部の実施形態では、ビーズは、形状が非球状であってもよい。

【0137】

ビーズは、これらに限定されないが、常磁性材料（例えば、マグネシウム、モリブデン、リチウム、およびタンタル）、超常磁性材料（例えば、フェライト（ Fe_3O_4 ；マグネタイト）ナノ粒子）、強磁性材料（例えば、鉄、ニッケル、コバルト、それらの一部の合金、および一部の希土類金属化合物）、セラミック、プラスチック、ガラス、ポリスチレ

ン、シリカ、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、アガロース、ヒドロゲル、ポリマー、セルロース、ナイロン、またはそれらの任意の組合せを含む様々な材料を含んでいてもよい。

一部の実施形態では、ビーズ（例えば、標識が付着されるビーズ）は、ヒドロゲルビーズである。一部の実施形態では、ビーズはヒドロゲルを含む。

【0138】

本明細書で開示される一部の実施形態は、1つまたは複数の粒子（例えば、ビーズ）を含む。粒子の各々は、複数のオリゴヌクレオチド（例えば、バーコード）を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドの各々は、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、細胞標識、および標的結合性領域（例えば、オリゴ（dT）配列、遺伝子特異的配列、ランダム多量体、またはそれらの組合せ）を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドの各々の細胞標識配列は同じであってもよい。異なる粒子上のオリゴヌクレオチドの細胞標識配列は、異なる粒子上のオリゴヌクレオチドを識別することができるように、異なっている。異なる細胞標識配列の数は、インプリメンテーションが異なれば異なっている。一部の実施形態では、細胞標識配列の数は、10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは約10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、細胞標識配列の数は、少なくとも10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 であってもよく、または最大で10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 であってもよい。一部の実施形態では、複数の粒子の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個以下、またはそれよりも多くが、同じ細胞配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、同じ細胞配列を有するオリゴヌクレオチドを含む複数の粒子は、最大で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%、またはそれよりも多くともよい。一部の実施形態では、複数の粒子はいずれも、同じ細胞標識配列を有していない。

【0139】

各粒子上の複数のオリゴヌクレオチドは、異なるバーコード配列（例えば、分子標識）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコード配列の数は、10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは約10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、1

0000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、バーコード配列の数は、少なくとも10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 であってもよく、または最大で10、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、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 であってもよい。例えば、複数のオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも100個は、異なるバーコード配列を含む。別の例として、単一粒子において、複数のオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも100、500、1000、5000、10000、15000、20000、50000個、こうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲、またはそれよりも多くが、異なるバーコード配列を含む。一部の実施形態は、バーコードを含む複数の粒子を提供する。一部の実施形態では、標識しようとする標的の出現（またはコピーもしくは数）および異なるバーコード配列の比は、少なくとも1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、またはそれよりも大きくともよい。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドの各々は、試料標識、ユニバーサル標識、または両方をさらに含む。粒子は、例えば、ナノ粒子またはマイクロ粒子であってもよい。

【0140】

ビーズのサイズは様々であってもよい。例えば、ビーズの直径は、0.1マイクロメートル～50マイクロメートルの範囲であってもよい。一部の実施形態では、ビーズの直径は、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50マイクロメートル、もしくは約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50マイクロメートル、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。

【0141】

ビーズの直径は、基材のウェルの直径に関連していてもよい。一部の実施形態では、ビーズの直径は、ウェルの直径よりも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、もしくは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲だけ長くともよくまたは短くともよい。ビーズの直径は、細胞（例えば、基材のウェルに閉じ込められる単一細胞）の直径に関連していてもよい。一部の実施形態では、ビーズの直径は、ウェルの直径よりも、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%または最大で10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、もしくは100%長くともよくまたは短くともよい。ビーズの直径は、細胞（例えば、基材のウェルに閉じ込められる単一細胞）の直径に関連していてもよい。一部の実施形態では、ビーズの直径は、細胞の直径よりも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、もしくは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲だけ長くともよくまたは短くともよい。一部の実施形態では、ビーズの直径は、細胞の直径よりも、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、もしくは300%ま

10

20

30

40

50

たは最大で10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、もしくは300%長くともよくまたは短くともよい。

【0142】

ビーズは、基材に付着および／または埋め込まれていてもよい。ビーズは、ゲル、ヒドロゲル、ポリマー、および／またはマトリックスに付着および／または埋め込まれていてもよい。基材（例えば、ゲル、マトリックス、スキャフォールド、またはポリマー）内のビーズの空間的位置は、位置アドレスとしての役目を果たすことができる、ビーズ上のバーコードに存在する空間標識を使用して識別することができる。

ビーズの例としては、これらに限定されないが、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、Dynabeads（登録商標）、MACS（登録商標）マイクロビーズ、抗体コンジュゲートビーズ（例えば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ）、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA／Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ（dT）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、およびBcMag（商標）カルボキシル末端化磁気ビーズを挙げることができる。

【0143】

ビーズには、ビーズが1つの蛍光光学チャネルまたは複数の光学チャネルにて蛍光発光するように、量子ドットまたは蛍光性色素が付随していてもよい（例えば、含浸されていてもよい）。ビーズに酸化鉄または酸化クロムを付随させて、ビーズを常磁性または強磁性にしてもよい。ビーズは、識別可能であってもよい。例えば、ビーズは、カメラを使用して画像化することできる。ビーズは、ビーズに付随している検出可能なコードを有してもよい。例えば、ビーズはバーコードを含んでいてもよい。ビーズは、例えば、有機溶液または無機溶液での膨潤により、サイズが変化する場合がある。ビーズは疎水性であってもよい。ビーズは親水性であってもよい。ビーズは生体適合性であってもよい。

【0144】

固体支持体（例えば、ビーズ）は、視覚化することができる。固体支持体は、視覚化タグ（例えば、蛍光性色素）を含んでいてもよい。固体支持体（例えば、ビーズ）は、識別子（例えば、数字）が刻印されていてもよい。識別子は、ビーズを画像化することにより視覚化することができる。

固体支持体は、不溶性、半可溶性、または不溶性の材料を含んでいてもよい。固体支持体は、それに付着されているリンカー、スキャフォールド、構造ブロック、または他の反応性部分を含む場合「官能化」されていると呼ぶことができ、固体支持体は、それに付着されているそのような反応性部分を欠如する場合、「非官能化」されていると呼ぶことができる。固体支持体は、マイクロタイターウェル形式、カラムなどのフロースルー形式、または浸漬スティックなどにおいて、溶液中に浮遊させて使用することができる。

固体支持体は、膜、紙、プラスチック、コーティング表面、平坦表面、ガラス、スライド、チップ、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。固体支持体は、樹脂、ゲル、マイクロスフェア、または他の幾何学的構成の形態をとっていてもよい。固体支持体は、シリカチップ、マイクロ粒子、ナノ粒子、プレート、アレイ、毛細管、ガラス繊維フィルター、ガラス表面、金属表面（鋼鉄、金銀、アルミニウム、ケイ素、および銅）などの平坦支持体、ガラス支持体、プラスチック支持体、ケイ素支持体、チップ、フィルター、膜、マイクロウェルプレート、スライド、マルチウェルプレートもしくは膜を含むプラスチック材料（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオリドで形成されている）、および／またはウェーハ、コーム、ピン、もしくは針（例えば、コンビナトリアル合成もしくは分析に好適なピンのアレイ）、またはウェーハ（例えば、シリコンウェーハ）、フィルター底部を有するもしくは有しないピットを有するウェーハなどの平坦表面のピットもしくはナノリットルウェルのアレイ中のビーズを含むことができる。

10

20

30

40

50

【0145】

固体支持体は、ポリマーマトリックス（例えば、ゲル、ヒドロゲル）を含んでいてもよい。ポリマーマトリックスは、細胞内空間（例えば、細胞小器官周囲）に浸透することができる場合がある。ポリマーマトリックスは、循環系全体にポンプ送出することができる場合がある。

【0146】

基材およびマイクロウェルアレイ

本明細書で使用される場合、基材は、あるタイプの固体支持体を指すことができる。基材は、本開示のバーコードまたは確率論的バーコードを含んでいてもよい固体支持体を指すことができる。基材は、例えば、複数のマイクロウェルを含んでいてもよい。例えば、基材は、2つまたはそれよりも多くのマイクロウェルを含むウェルアレイであってもよい。一部の実施形態では、マイクロウェルは、規定容積の小型反応チャンバーを含んでいてもよい。一部の実施形態では、マイクロウェルには、1つまたは複数の細胞を閉じ込めることができる。一部の実施形態では、マイクロウェルには、1つのみの細胞を閉じ込めることができる。一部の実施形態では、マイクロウェルには、1つまたは複数の固体支持体を閉じ込めることができる。一部の実施形態では、マイクロウェルには、1つのみの固体支持体を閉じ込めることができる。一部の実施形態では、マイクロウェルには、単一細胞および単一固体支持体（例えば、ビーズ）を閉じ込める。マイクロウェルは、本開示のバーコード試薬を含むことができる。

【0147】

バーコーディングの方法

本開示は、物理的試料（例えば、組織、臓器、腫瘍、細胞）中の別個の位置にある別個の標的の数を推定するための方法を提供する。本方法は、バーコード（例えば、確率論的バーコード）を試料の近傍に配置すること、試料を溶解すること、別個の標的にバーコードを付随させること、標的を増幅すること、および／または標的をデジタル的に計数することを含んでいてもよい。本方法は、バーコードにある空間標識から得られる情報を分析および／または視覚化することをさらに含んでいてもよい。一部の実施形態では、方法は、試料中の複数の標的を視覚化することを含む。複数の標的を試料のマッピングマップにマッピングすることは、試料の二次元マップまたは三次元マップを生成することを含んでいてもよい。二次元マップおよび三次元マップは、試料中の複数の標的をバーコーディングする（例えば、確率論的にバーコーディングする）前にまたは後で生成することができる。試料中の複数の標的の視覚化は、複数の標的を試料のマッピングマップにマッピングすることを含んでいてもよい。複数の標的を試料のマッピングマップにマッピングすることは、試料の二次元マップまたは三次元マップを生成することを含んでいてもよい。二次元マップおよび三次元マップは、試料中の複数の標的をバーコーディングする前にまたは後で生成することができる。一部の実施形態では、二次元マップおよび三次元マップは、試料を溶解する前にまたは後で生成することができる。二次元マップまたは三次元マップを生成する前にまたは後で試料を溶解することは、試料を加熱すること、試料を界面活性剤と接触させること、試料のpHを変化させること、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

【0148】

一部の実施形態では、複数の標的をバーコーディングすることは、複数のバーコードを複数の標的とハイブリダイズさせて、バーコード化標的（例えば、確率論的バーコード化標的）を作出することを含む。複数の標的のバーコーディングは、バーコード化標的のインデックス化ライブラリーを生成することを含んでいてもよい。バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、複数のバーコード（例えば、確率論的バーコード）を含む個体支持体を使用して実施することができる。

【0149】

試料とバーコードとの接触

本開示は、試料（例えば、細胞）を、本開示の基材と接触させるための方法を提供する。例えば、細胞、臓器、または組織の薄い切片を含む試料を、バーコード（例えば、確率

論的バーコード)と接触させることができる。例えば、重力流により細胞を接触させることができ、その場合、細胞は沈降して単層を作出することができる。試料は、組織の薄い切片であってもよい。薄い切片を、基材上に配置することができる。試料は1次元であってもよい(例えば、平面状表面を形成してもよい)。試料(例えば、細胞)は、例えば、細胞を基材上で増殖／培養することにより、基材全体に広げることができる。

バーコードが標的の近傍に存在すると、標的は、バーコードにハイブリダイズすることができる。別個の標的の各々に本開示の別個のバーコードが付随し得るように、バーコードを非枯渇比率で接触させることができる。標的とバーコードと効率的な付随を保証するため、標的をバーコードと架橋連結してもよい。

【0150】

細胞溶解

細胞およびバーコードを配分した後、細胞を溶解して標的分子を遊離させてもよい。細胞溶解は、様々な手段のいずれかにより、例えば、化学的もしくは生化学的手段により、浸透圧ショックにより、または熱溶解、機械的溶解、もしくは光学的溶解により達成することができる。細胞は、界面活性剤(例えば、SDS、ドデシル硫酸Li、Triton X-100、Tween-20、もしくはNP-40)、有機溶媒(例えば、メタノールもしくはアセトン)、または消化酵素(例えば、プロテイナーゼK、ペプシン、もしくはトリプシン)、またはそれらの任意の組合せを含む細胞溶解緩衝液の添加により溶解することができる。標的へのバーコードの付随を増加させるため、標的分子の拡散速度を、例えば、温度を低減させることおよび／または溶解物の粘度を増加させることにより変更してもよい。

【0151】

一部の実施形態では、試料は、濾過紙を使用して溶解してもよい。濾過紙は、濾過紙の上部に溶解緩衝液を含浸させることができる。試料の溶解および試料の標的と基材とのハイブリダイゼーションを容易にすることができる圧力で、濾過紙に試料を適用することができる。

一部の実施形態では、溶解は、機械的溶解、熱溶解、光学的溶解、および／または化学的溶解により実施することができる。化学的溶解は、プロテイナーゼK、ペプシン、およびトリプシンなどの消化酵素の使用を含んでもよい。溶解は、溶解緩衝液を基材に添加することにより実施することができる。溶解緩衝液は、Tris HClを含んでもよい。溶解緩衝液は、少なくとも約0.01、0.05、0.1、0.5、または1M、またはそれよりも高濃度のTris HClを含んでもよい。溶解緩衝液は、最大で約0.01、0.05、0.1、0.5、または1M、またはそれよりも高濃度のTris HClを含んでもよい。溶解緩衝液は、約0.1MのTris HClを含んでもよい。溶解緩衝液のpHは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも高くともよい。溶解緩衝液のpHは、最大で約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも高くともよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液のpHは約7.5である。溶解緩衝液は、塩(例えば、LiCl)を含んでもよい。溶解緩衝液中の塩濃度は、少なくとも約0.1、0.5、または1M、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中の塩濃度は、最大で約0.1、0.5、または1M、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の塩濃度は、約0.5Mである。溶解緩衝液は、界面活性剤(例えば、SDS、ドデシル硫酸Li、Triton X、Tween、NP-40)を含んでもよい。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、少なくとも約0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、または7%、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、最大で約0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、または7%、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、約1%ドデシル硫酸Liである。溶解法に使用される

10

20

30

40

50

時間は、使用される界面活性剤の量に依存する場合がある。一部の実施形態では、使用される界面活性剤が多いほど、溶解に必要な時間が短くなる。溶解緩衝液は、キレート剤（例えば、EDTA、EGTA）を含んでいてもよい。溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、少なくとも約1、5、10、15、20、25、または30mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、最大で約1、5、10、15、20、25、または30mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、約10mMである。溶解緩衝液は、還元剤（例えば、ベーターメルカプトエタノール、DTT）を含んでいてもよい。溶解緩衝液中の還元剤の濃度は、少なくとも約1、5、10、15、または20mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中の還元剤の濃度は、最大で約1、5、10、15、または20mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の還元剤の濃度は、約5mMである。一部の実施形態では、溶解緩衝液は、約0.1MのTris HCl、約pH7.5、約0.5MのLiCl、約1%のドデシル硫酸リチウム、約10mMのEDTA、および約5mMのDTTを含んでいてもよい。

【0152】

溶解は、約4、10、15、20、25、または30℃の温度で実施することができる。溶解は、約1、5、10、15、または20分間、またはそれよりも長時間、実施することができる。溶解された細胞は、少なくとも約100000、200000、300000、400000、500000、600000、または700000個、またはそれよりも多くの標的核酸分子を含んでいてもよい。溶解された細胞は、最大で約100000、200000、300000、400000、500000、600000、または700000個、またはそれよりも多くの標的核酸分子を含んでいてもよい。

【0153】

標的核酸分子に対するバーコードの付着

細胞を溶解し、それらから核酸分子を放出させた後、核酸分子に、共局在化されている固体支持体のバーコードをランダムに付随させることができる。付随は、バーコードの標的認識領域と標的核酸分子の相補的部分とのハイブリダイゼーションを含んでいてもよい（例えば、バーコードのオリゴ（dT）は、標的のポリ（A）テイルと相互作用することができる）。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（例えば、緩衝液pH、イオン強度、温度など）は、特異的で安定したハイブリッドの形成を促進するように選択することができる。一部の実施形態では、溶解された細胞から放出された核酸分子に、基材上の複数のプローブを付随させる（例えば、基材上のプローブとハイブリダイズする）ことができる。プローブがオリゴ（dT）を含む場合、mRNA分子は、プローブにハイブリダイズし、逆転写され得る。オリゴヌクレオチドのオリゴ（dT）部分は、cDNA分子の第一鎖合成のプライマーとして作用することができる。例えば、図2に例示されているバーコーディングの非限定的な例では、ブロック216において、mRNA分子を、ビーズ上のバーコードにハイブリダイズさせることができる。例えば、一本鎖ヌクレオチド断片は、バーコードの標的結合性領域にハイブリダイズすることができる。

【0154】

付着は、バーコードの標的認識領域と標的核酸分子の一部とのライゲーションをさらに含んでいてもよい。例えば、標的結合性領域は、制限部位突出（例えば、EcoRI粘着末端突出）に対する特異的ハイブリダイゼーションが可能であり得る核酸配列を含んでいてもよい。アッセイ手順は、標的核酸を制限酵素（例えば、EcoRI）で処理して、制限部位突出を作出することをさらに含んでいてもよい。次いで、バーコードは、制限部位突出に相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートすることができる。リガーゼ（例えば、T4 DNAリガーゼ）を使用して、2つの断片を接合することができる。

【0155】

例えば、図2に例示されているバーコーディングの非限定的な例では、その後、ブロック220において、複数の細胞（または複数の試料）に由来する標識化標的（例えば、標的バーコード分子）を、例えばチューブにプールしてもよい。標識化標的は、例えば、

標的バーコード分子が付着されているバーコードおよび／またはビーズを回収することによりプールのすることができる。

付着されている標的バーコード分子の固体支持体に基づくコレクションの回収は、磁気ビーズおよび外部から印加される磁場を使用することにより実施することができる。標的バーコード分子をプールしたら、すべてのさらなる処理は、単一反応容器で進めることができる。さらなる処理は、例えば、逆転写反応、増幅反応、切断反応、解離反応、および／または核酸伸長反応を含んでいてもよい。マイクロウェル内で、すなわち、複数の細胞に由来する標識化標的核酸分子を最初にプールすることなく、さらなる処理反応を実施してもよい。

【0156】

逆転写

本開示は、逆転写を使用して標的バーコードコンジュゲートを作成するための方法を提供する（例えば、図2のブロック224において）。標的バーコードコンジュゲートは、バーコードおよび標的核酸のすべてまたは一部の相補配列（すなわち、確率論的バーコード化cDNA分子などのバーコード化cDNA分子）を含んでいてもよい。付随しているRNA分子の逆転写は、逆転写酵素と共に逆転写プライマーを添加することにより生じ得る。逆転写プライマーは、オリゴ（dT）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、または標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーであってもよい。オリゴ（dT）プライマーは、12～18ヌクレオチド長であってもよく、または約12～18ヌクレオチド長であってもよく、哺乳動物mRNAの3'末端にある内因性ポリ（A）テイルに結合することができる。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、様々な相補的部位にてmRNAに結合することができる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、選択的に目的のmRNAからのプライミングを生じる。

【0157】

一部の実施形態では、標識化RNA分子の逆転写は、逆転写プライマーの添加により生じ得る。一部の実施形態では、逆転写プライマーは、オリゴ（dT）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、または標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーである。一般に、オリゴ（dT）プライマーは、12～18ヌクレオチド長であり、哺乳動物mRNAの3'末端にある内因性ポリ（A）テイルに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、様々な相補的部位にてmRNAに結合することができる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、選択的に目的のmRNAからのプライミングを生じる。

逆転写は、繰り返して生じて、複数の標識化cDNA分子を産生することができる。本明細書で開示される方法は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20回の逆転写反応を実施することを含んでいてもよい。本方法は、少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回の逆転写反応を実施することを含んでいてもよい。

【0158】

増幅

1つまたは複数の核酸増幅反応（例えば、図2のブロック228における）を実施して、標識化標的核酸分子の複数コピーを作成することができる。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅されるマルチプレックス様式で実施することができる。増幅反応を使用して、配列決定アダプターを核酸分子に付加することができる。増幅反応は、存在する場合、試料標識の少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。増幅反応は、細胞標識および／またはバーコード配列（例えば、分子標識）の少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。増幅反応は、試料タグ、細胞標識、空間標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的核酸、またはそれらの組合せの少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。増幅反応は、複数の核酸の0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、

45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の範囲もしくは数値を増幅することを含んでいてもよい。本方法は、1つまたは複数のcDNA合成反応を実施して、試料標識、細胞標識、空間標識、および／またはバーコード配列（例えば、分子標識）を含む標的バーコード分子の1つまたは複数のcDNAコピーを産生することをさらに含んでいてもよい。

【0159】

一部の実施形態では、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して実施することができる。本明細書で使用される場合、PCRは、DNAの相補鎖の同時プライマー伸長により特定のDNA配列を*in vitro*増幅するための反応を指すことができる。本明細書で使用される場合、PCRは、これらに限定されないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量的PCR、マルチプレックスPCR、デジタルPCR、およびアセンブリPCRを含む、この反応の派生形態を包含することができる。

【0160】

標識化核酸の増幅は、非PCRベース法を含んでいてもよい。非PCRベース法の例としては、これらに限定されないが、複数置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、鎖置換増幅（SDA）、リアルタイムSDA、ローリングサークル増幅、またはサークルツーサークル増幅（*circle-to-circle amplification*）が挙げられる。他の非PCRベース増幅法としては、DNAまたはRNA標的を増幅するためのDNA依存性RNAポリメラーゼ駆動性RNA転写増幅またはRNA指向性DNA合成および転写の複数サイクル、リガーゼ連鎖反応（LCR）、およびQβレプリカーゼ（Qβ）法、パリンドロームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを使用したオリゴヌクレオチド駆動性増幅、プライマーが核酸配列にハイブリダイズし、得られた二重鎖が伸長反応および増幅の前に切断される増幅法、5'エキソヌクレアーゼ活性を欠如する核酸ポリメラーゼを使用した鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、ならびに分岐伸長増幅（RAM、*ramification extension amplification*）が挙げられる。一部の実施形態では、増幅は、環状化転写物を産生しない。

【0161】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、標識化核酸（例えば、標識化RNA、標識化DNA、標識化cDNA）に対してポリメラーゼ連鎖反応を実施して、標識化アンプリコン（例えば、確率論的標識化アンプリコン）を産生することをさらに含む。標識化アンプリコンは、二本鎖分子であってもよい。二本鎖分子は、二本鎖RNA分子、二本鎖DNA分子、またはDNA分子にハイブリダイズしたRNA分子を含んでいてもよい。二本鎖分子の一方または両方の鎖は、試料標識、空間標識、細胞標識、および／またはバーコード配列（例えば、分子標識）を含んでいてもよい。標識化アンプリコンは、一本鎖分子であってもよい。一本鎖分子は、DNA、RNA、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。本開示の核酸は、合成のまたは改変された核酸を含んでいてもよい。

【0162】

増幅は、1つまたは複数の非天然ヌクレオチドの使用を含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドは、光不安定性または誘発性ヌクレオチドを含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドの例としては、これらに限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ、およびロックド核酸（LNA）、ならびにグリコール核酸（GNA）、およびトレオース核酸（TNA）を挙げることができる。非天然ヌクレオチドを、増幅反応の1つまたは複数のサイクルに添加してもよい。非天然ヌクレオチドの添加は、増幅反応の特定のサイクルまたは時点での産物を識別するために使用することができる。

【0163】

1つまたは複数の増幅反応の実施は、1つまたは複数のプライマーの使用を含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個、またはそれよりも多くのヌクレオチド

10

20

30

40

50

を含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個、またはそれよりも多くのヌクレオチドを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、12~15個未満のヌクレオチドを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、複数の標識化標的（例えば、確率論的標識化標的）の少なくとも一部にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、複数の標識化標的の3'末端または5'末端にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、複数の標識化標的の内部領域にアニーリングすることができる。内部領域は、複数の標識化標的の3'末端から少なくとも約50、100、150、200、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、または1000ヌクレオチドであってもよい。1つまたは複数のプライマーは、一定のパネルのプライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の特注プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の対照プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の遺伝子特異的プライマーを含んでいてもよい。

【0164】

1つまたは複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含んでいてもよい。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニーリングすることができる。1つまたは複数の特注プライマーは、第1の試料標識、第2の試料標識、空間標識、細胞標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的、またはそれらの任意の組合せにアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーおよび特注プライマーを含んでいてもよい。特注プライマーは、1つまたは複数の標的を増幅するように設計することができる。標的は、1つまたは複数の試料中の全核酸のサブセットを含んでいてもよい。標的は、1つまたは複数の試料中の全標識化標的のサブセットを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも96個またはそれよりも多くの特注プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも960個またはそれよりも多くの特注プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも9600個またはそれよりも多くの特注プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数の特注プライマーは、2つまたはそれよりも多くの異なる標識化核酸にアニーリングすることができる。2つまたはそれよりも多くの異なる標識化核酸は、1つまたは複数の遺伝子に対応していてもよい。

【0165】

任意の増幅スキームを、本開示の方法で使用することができる。例えば、1つのスキームにおいて、最初のラウンドのPCRでは、遺伝子特異的プライマーおよびユニバーサルIllumina配列決定プライマー1配列に対するプライマーを使用して、ビーズに付着されている分子を増幅することができる。2回目のラウンドのPCRでは、Illumina配列決定プライマー2配列にフランキングされているネステッド遺伝子特異的プライマー、およびユニバーサルIllumina配列決定プライマー1配列に対するプライマーを使用して、最初のPCR産物を増幅することができる。3回目のラウンドのPCRでは、P5およびP7および試料インデックスが付加され、PCR産物がIllumina配列決定ライブラリーへと変換される。150bp×2配列決定を使用した配列決定により、リード1では細胞標識およびバーコード配列（例えば、分子標識）を、リード2では遺伝子を、ならびにインデックス1リードでは試料インデックスを明らかにすることができる。

【0166】

一部の実施形態では、化学的切断を使用して核酸を基材から除去することができる。例えば、核酸に存在する化学基または修飾塩基を使用して、固体支持体からの核酸の除去を

容易にすることができる。例えば、酵素を使用して、核酸を基材から除去することができる。例えば、核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化により基材から除去することができる。例えば、 $dUTP$ または $ddUTP$ を含有する核酸をウラシル- d -グリコシラーゼ (UDG) で処理することにより、核酸を基材から除去することができる。例えば、核酸は、脱プリン/脱ピリミジン (AP) エンドヌクレアーゼなどの塩基切除修復酵素などの、ヌクレオチド切除を実施する酵素を使用して、基材から除去することができる。一部の実施形態では、核酸は、光切断可能基および光を使用して基材から除去することができる。一部の実施形態では、切断可能なリンカーを使用して、核酸を基材から除去することができる。例えば、切断可能なリンカーは、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、ビオチン/ニュートラアビジン、 Ig -プロテイン A、光不安定性リンカー、酸もしくは塩基不安定性リンカー基、またはアダプターのうちの少なくとも 1 つを含んでいてもよい。

10

【0167】

プローブが遺伝子特異的である場合、分子はプローブにハイブリダイズし、逆転写および/または増幅され得る。一部の実施形態では、核酸が合成された後 (例えば、逆転写された後)、それを増幅してもよい。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅されるマルチプレックス様式で実施することができる。増幅により、配列決定アダプターを核酸に付加することができる。

【0168】

一部の実施形態では、増幅は、例えばブリッジ増幅により基材上で実施することができる。基材上のオリゴ (dT) プローブを使用してブリッジ増幅するために適した末端を生成するために、 $cDNA$ にホモポリマーのテイルを加えてもよい。ブリッジ増幅では、鋳型核酸の 3' 末端に相補的なプライマーは、中実粒子に共有結合で付着されている各対の第 1 のプライマーであってもよい。鋳型核酸を含有する試料を粒子と接触させ、単一のサーマルサイクルを実施すると、鋳型分子が第 1 のプライマーにアニーリングし、ヌクレオチドを添加することにより第 1 のプライマーをフォワード方向に伸長させて、鋳型分子および鋳型に相補的な新たに形成された DNA 鎖からなる二重鎖分子を形成することができる。次のサイクルの加熱ステップにて、二重鎖分子を変性させて、鋳型分子を粒子から放出させ、第 1 のプライマーを介して粒子に付着されている相補的 DNA 鎖を残すことができる。それに続くアニーリングおよび伸長ステップのアニーリング段階では、相補鎖は、第 1 のプライマーから除去された位置の相補鎖のセグメントに相補的な第 2 のプライマーにハイブリダイズすることができる。このハイブリダイゼーションは、相補鎖が、共有結合により第 1 のプライマーにおよびハイブリダイゼーションにより第 2 のプライマーに保持されている第 1 および第 2 のプライマー間の架橋の形成を引き起こすことができる。伸長段階では、同じ反応混合物にヌクレオチドを添加することにより、第 2 のプライマーをリバース方向に伸長させ、それにより架橋を二本鎖架橋に変換することができる。次いで、次のサイクルが開始され、二本鎖架橋が変性して、各々の一方の末端がそれぞれ第 1 および第 2 のプライマーを介して粒子表面に付着されており、各々の他方の末端が付着されていない 2 つの一本鎖核酸分子を得ることができる。この第 2 のサイクルのアニーリングおよび伸長ステップでは、各鎖は、同じ粒子上にあり以前に使用されなかったさらなる相補的プライマーにハイブリダイズして、新しい一本鎖架橋を形成することができる。この時点でハイブリダイズしている 2 つの以前に使用されなかったプライマーが伸長されて、2 つの新しい架橋が二本鎖架橋に変換される。

20

30

40

【0169】

増幅反応は、複数の核酸の少なくとも 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または 100% を増幅することができる。

標識化核酸の増幅は、 PCR ベース法または非 PCR ベース法を含んでいてもよい。標識化核酸の増幅は、標識化核酸の指数関数的増幅を含んでいてもよい。標識化核酸の増幅

50

は、標識化核酸の線形増幅を含んでいてもよい。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により実施することができる。PCRは、DNAの相補鎖の同時プライマー伸長により特定のDNA配列を *in vitro* 増幅するための反応を指すことができる。PCRは、これらに限定されないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量的PCR、マルチプレックスPCR、デジタルPCR、サブプレッションPCR、半サブプレッシブPCR（*semi-suppressive PCR*）、およびアセンブリPCRを含む、この反応の派生形態を包含することができる。

【0170】

一部の実施形態では、標識化核酸の増幅は、非PCRベース法を含む。非PCRベース法の例としては、これらに限定されないが、複数置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベース増幅（NASBA）、鎖置換増幅（SDA）、リアルタイムSDA、ローリングサークル増幅、またはサークルツーサークル増幅が挙げられる。他の非PCRベース増幅法としては、DNAまたはRNA標的を増幅するためのDNA依存性RNAポリメラーゼ駆動性RNA転写増幅もしくはRNA指向性DNA合成および転写の複数サイクル、リガーゼ連鎖反応（LCR）、Q β レプリカーゼ（Q β ）法、パリンδροームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを使用したオリゴヌクレオチド駆動性増幅、プライマーが核酸配列にハイブリダイズし、得られた二重鎖が伸長反応および増幅の前に切断される増幅法、5'エキソヌクレアーゼ活性を欠如する核酸ポリメラーゼを使用した鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、ならびに／または分岐伸長増幅（RAM）が挙げられる。

【0171】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、増幅されたアンプリコン（例えば、標的）に対してネステッドポリメラーゼ連鎖反応を実施することをさらに含む。アンプリコンは、二本鎖分子であってもよい。二本鎖分子は、二本鎖RNA分子、二本鎖DNA分子、またはDNA分子にハイブリダイズしたRNA分子を含むことができる。二本鎖分子の一方または両方の鎖は、試料タグまたは分子識別子標識を含んでいてもよい。あるいは、アンプリコンは、一本鎖分子であってもよい。一本鎖分子は、DNA、RNA、またはそれらの組合せを含むことができる。本開示の核酸は、合成のまたは改変された核酸を含んでいてもよい。

【0172】

一部の実施形態では、本方法は、標識化核酸を繰り返して増幅し、複数のアンプリコンを産生することを含む。本明細書で開示される方法は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20回の増幅反応を実施することを含んでいてもよい。あるいは、本方法は、少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100回の増幅反応を実施することを含む。

増幅は、複数の核酸を含む1つまたは複数の試料に1つまたは複数の対照核酸を添加することをさらに含んでいてもよい。増幅は、複数の核酸に1つまたは複数の対照核酸を添加することをさらに含んでいてもよい。対照核酸は、対照標識を含んでいてもよい。

【0173】

増幅は、1つまたは複数の非天然ヌクレオチドの使用を含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドは、光不安定性および／または誘発性ヌクレオチドを含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドの例としては、これらに限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ、およびロックド核酸（LNA）、ならびにグリコール核酸（GNA）、およびトレオース核酸（TNA）が挙げられる。非天然ヌクレオチドを、増幅反応の1つまたは複数のサイクルに添加してもよい。非天然ヌクレオチドの添加は、増幅反応の特定のサイクルまたは時点での産物を識別するために使用することができる。

【0174】

1つまたは複数の増幅反応の実施は、1つまたは複数のプライマーの使用を含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドを含んで

10

20

30

40

50

いてもよい。1つまたは複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約7～9個のヌクレオチドを含んでいてもよい。1つまたは複数のオリゴヌクレオチドは、12～15個未満のヌクレオチドを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、複数の標識化核酸の少なくとも一部にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、複数の標識化核酸の3'末端および／または5'末端にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、複数の標識化核酸の内部領域にアニーリングすることができる。内部領域は、複数の標識化核酸の3'末端から少なくとも約50、100、150、200、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、または1000ヌクレオチドであってもよい。1つまたは複数のプライマーは、一定のパネルのプライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の特注プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数の対照プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、少なくとも1つまたは複数のハウスキーピング遺伝子プライマーを含んでいてもよい。1つまたは複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含んでいてもよい。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニーリングすることができる。1つまたは複数の特注プライマーは、第1の試料タグ、第2の試料タグ、分子識別子標識、核酸、またはそれらの産物にアニーリングすることができる。1つまたは複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーおよび特注プライマーを含んでいてもよい。特注プライマーは、1つまたは複数の標的核酸を増幅するように設計することができる。標的核酸は、1つまたは複数の試料中の全核酸のサブセットを含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーは、本開示のアレイに付着されているプローブである。

【0175】

一部の実施形態では、試料中の複数の標的のバーコーディング（例えば、確率論的バーコーディング）は、バーコード化標的（例えば、確率論的バーコード化標的）または標的のバーコード化断片のインデックス化ライブラリーを生成することをさらに含む。異なるバーコードのバーコード配列（例えば、異なる確率論的バーコードの分子標識）は、互いに異なってもよい。バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、試料中の複数の標的から複数のインデックス化ポリヌクレオチドを生成することを含む。例えば、第1のインデックス化標的および第2のインデックス化標的を含むバーコード化標的のインデックス化ライブラリーの場合、第1のインデックス化ポリヌクレオチドの標識領域は、第2のインデックス化ポリヌクレオチドの標識領域と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチドが異なってもよい。一部の実施形態では、バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、複数の標的、例えばmRNA分子を、ポリ（T）領域および標識領域を含む複数のオリゴヌクレオチドと接触させること；ならびに逆転写酵素を使用して第一鎖合成を実施して、各々がcDNA領域および標識領域を含む一本鎖標識化cDNA分子を産生することを含み、複数の標的は、異なる配列の少なくとも2つのmRNA分子を含み、複数のオリゴヌクレオチドは、異なる配列の少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、一本鎖標識化cDNA分子を増幅して、二本鎖標識化cDNA分子を産生すること；および二本鎖標識化cDNA分子に対してネステッドPCRを実施して、標識化アンプリコンを産生することをさらに含んでいてもよい。一部の実施形態では、本方法は、アダプター標識化アンプリコンを生成することを含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0176】

バーコーディング（例えば、確率論的バーコーディング）は、核酸バーコードまたはタグを使用して、個々の核酸（例えば、DNAまたはRNA）分子を標識することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコーディングは、cDNA分子がmRNAから生成される際に、DNAバーコードまたはタグをcDNA分子に付加することを含む。ネステッドPCRを実施して、PCR増幅バイアスを最小限に抑えることができる。例えば、次世代配列決定（NGS）を使用して配列決定するためのアダプターを付加することができる。配列決定の結果を使用して、細胞標識、分子標識、および標的の1つまたは複数のコピーのヌクレオチド断片の配列を、例えば、図2のブロック232にて決定することができる。

10

【0177】

図3は、バーコード化mRNAまたはそれらの断片などの、バーコード化標的（例えば、確率論的バーコード化標的）のインデックス化ライブラリーを生成するための非限定的で例示的なプロセスを示す概略図である。ステップ1に示されているように、逆転写プロセスでは、固有分子標識、細胞標識、およびユニバーサルPCR部位を有する各mRNA分子をコード化することができる。特に、1セットのバーコード（例えば、確率論的バーコード）310を、RNA分子302のポリ（A）テイル領域308にハイブリダイゼーション（例えば、確率論的ハイブリダイゼーション）させることによりRNA分子302を逆転写して、cDNA領域306を含む標識化cDNA分子304を産生することができる。バーコード310の各々は、標的結合性領域、例えばポリ（dT）領域312、標識領域314（例えば、バーコード配列または分子）、およびユニバーサルPCR領域316を含んでいてもよい。

20

【0178】

一部の実施形態では、細胞標識は、3～20個のヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、分子標識は、3～20個のヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の確率論的バーコードの各々は、ユニバーサル標識および細胞標識の1つまたは複数をさらに含み、ユニバーサル標識は、固体支持体上の複数の確率論的バーコードで同じであり、細胞標識は、固体支持体上の複数の確率論的バーコードで同じである。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、3～20個のヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、細胞標識は、3～20個のヌクレオチドを含む。

30

【0179】

一部の実施形態では、標識領域314は、バーコード配列または分子標識318および細胞標識320を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標識領域314は、ユニバーサル標識、ディメンション標識、および細胞標識の1つまたは複数を含んでいてもよい。バーコード配列または分子標識318は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。細胞標識320は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ユニバー

40

50

サル標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサル標識は、固体支持体上の複数の確率論的バーコードで同じであってもよく、細胞標識は、固体支持体上の複数の確率論的バーコードで同じである。ディメンション標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。

【0180】

一部の実施形態では、標識領域314は、バーコード配列または分子標識318および細胞標識320などの、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個の異なる標識を含んでいてもよく、約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個の異なる標識を含んでいてもよく、少なくとも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個の異なる標識を含んでいてもよく、もしくは最大で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個の異なる標識を含んでいてもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲の異なる標識を含んでいてもよい。各標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であってもよく、またはこうした値の任意のいずれかの数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。1セットのバーコードまたは確率論的バーコード310は、10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、約10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、少なくとも10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、または最大で10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、

10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、あるいはこうした値のいずれかの間の数または範囲のバーコードまたは確率論的バーコード310を含有していてもよい。また、1セットのバーコードまたは確率論的バーコード310は、例えば、各々が固有標識領域314を含有していてもよい。過剰なバーコードまたは確率論的バーコード310を除去するために、標識化cDNA分子304を精製してもよい。精製は、Ampureビーズ精製を含んでもよい。

【0181】

ステップ2に示されているように、ステップ1の逆転写プロセスの産物を1つのチューブにプールし、第1のPCRプライマープールおよび第1のユニバーサルPCRプライマーを用いてPCR増幅してもよい。固有標識領域314があるため、プールすることが可能である。特に、標識化cDNA分子304を増幅して、ネステッドPCR標識化アンプリコン322を産生してもよい。増幅は、マルチプレックスPCR増幅を含んでもよい。増幅は、96マルチプレックスプライマーを用いた単一反応容積でのマルチプレックスPCR増幅を含んでもよい。一部の実施形態では、マルチプレックスPCR増幅は、単一反応容積中にて、10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のマルチプレックスプライマーを使用してもよく、約10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のマルチプレックスプライマーを使用してもよく、少なくとも10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のマルチプレックスプライマーを使用してもよく、もしくは最大で10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のマルチプレックスプライマーを使用してもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲のマルチプレックスプライマーを使用してもよい。増幅は、特定の遺伝子を標的とする特注プライマー326A〜Cおよびユニバーサルプライマー328を含む第1のPCRプライマープール324を使用することを含んでもよい。特注プライマー326は、標識化cDNA分子304のcDNA部分306'内の領域にハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー328は、標識化cDNA分子304のユニバーサルPCR領域316にハイブリダイズすることができる。

【0182】

図3のステップ3に示されているように、ステップ2のPCR増幅の産物を、ネステッドPCRプライマープールおよび第2のユニバーサルPCRプライマーを用いて増幅してもよい。ネステッドPCRは、PCR増幅バイアスを最小限に抑えることができる。特に、ネステッドPCR標識アンプリコン322を、ネステッドPCRによりさらに増幅してもよい。ネステッドPCRは、ネステッドPCRプライマー332a〜cのネステッドPCRプライマープール330および第2ユニバーサルPCRプライマー328'を用いた単一反応容積でのマルチプレックスPCRを含んでもよい。ネステッドPCRプライマープール328は、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個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、約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個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、少なくとも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個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、もしくは最大で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個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよい。ネステッドPCRプライマー332は、アダプター334を含有し、標識化アンプリコン322のcDNA部分306' '内の領域にハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー328'は、アダプター336を含有し、標識化アンプリコン322のユニバーサルPCR領域316にハイブリダイズすることができる。したがって、ステップ3では、アダプター-標識化アンプリコン338が産生される。一部の実施形態では、ネステッドPCRプライマー332および第2のユニバーサルPCRプライマー328'は、アダプター334および336を含有していなくともよい。代わりに、アダプター334および336をネステッドPCRの産物にライゲートさせて、アダプター-標識化アンプリコン338を産生してもよい。

【0183】

ステップ4に示されているように、ライブラリー増幅プライマーを使用して、ステップ3のPCR産物を、配列決定のためにPCR増幅してもよい。特に、アダプター334および336を使用して、アダプター-標識化アンプリコン338に対して1つまたは複数の追加のアッセイを実施してもよい。アダプター334および336は、プライマー340および342にハイブリダイズすることができる。1つまたは複数のプライマー340および342は、PCR増幅プライマーであってもよい。1つまたは複数のプライマー340および342は、配列決定プライマーであってもよい。1つまたは複数のアダプター334および336は、アダプター-標識化アンプリコン338のさらなる増幅に使用してもよい。1つまたは複数のアダプター334および336は、アダプター-標識化アンプリコン338の配列決定に使用してもよい。プライマー342は、同じセットのバーコードまたは確率論的バーコード310を使用して生成されたアンプリコンを、次世代シーケンシング(NGS)を使用して1つの配列決定反応で配列決定することができるように、プレートインデックス344を含有していてもよい。

【0184】

オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含む組成物

本明細書で開示される一部の実施形態は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬(タンパク質結合性試薬など)を各々が含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドは、それがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬の固有識別子を含む組成物を提供する。細胞成分結合性試薬(バーコード化抗体など)およびそれらの使用(細胞の試料インデックス付与など)は、米国特許出願公開第2018/0088112号明細書および米国特許出願第15/937,713号明細書に記載されている。これらの各々の内容は、参照によりその全体が組み込まれる。

【0185】

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、細胞成分標的に特異的に結合することが可能である。例えば、細胞成分結合性試薬の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、インテグリン、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せであってもよくまたは含んでいてもよい。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬(例えば、タンパク質結合性試薬)は、抗原標的またはタンパク質標的に特異的に結合することが可能である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、確率論的バーコードなどのバーコードを含んでいてもよい。バーコードは、バーコード配列(例えば、分子標識)、細胞標識、試料標識、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含んでいてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、ポリ(A)テイルなど、オリゴヌクレオチドプローブに対する結合部位を含んでいてもよい。例えば、ポリ(A)テイルは、例えば、固体支持体に繫留されていなくともよく、または固体支持体に繫留されていてもよい。ポリ(A)テイルは、約10~50ヌクレオチド長であってもよい。

一部の実施形態では、ポリ（A）テイルは、18ヌクレオチド長であってもよい。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、または両方を含んでもよい。

【0186】

固有識別子は、例えば、任意の好適な長さ、例えば、約4ヌクレオチド～約200ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列であってもよい。一部の実施形態では、固有識別子は、25ヌクレオチド長～約45ヌクレオチド長のヌクレオチド配列である。一部の実施形態では、固有識別子は、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチドの長さ、約4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチドの長さ、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド未満の長さ、もしくは4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチドよりも大きな長さ、または上記の値の任意の2つの間である範囲である長さを有してもよい。

【0187】

一部の実施形態では、固有識別子は、多様なセットの固有識別子から選択される。多様なセットの固有識別子は、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個の異なる固有識別子を含んでもよく、もしくは約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個の異なる固有識別子を含んでもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の異なる固有識別子を含んでもよい。多様なセットの固有識別子は、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる固有識別子を含んでもよく、または最大で20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる固有識別子を含んでもよい。一部の実施形態では、1セットの固有識別子は、分析しようとする試料のDNAまたはRNA配列に対して最小限の配列相同性を有するように設計されている。一部の実施形態では、1セットの固有識別子の配列は、互いにまたはそれらの相補体と、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチドだけ異なるか、もしくは約1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチドだけ異なるか、

10

20

30

40

50

またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲だけ異なる。一部の実施形態では、1セットの固有識別子の配列は、互いにまたはそれらの相補体と、少なくとも1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチドだけ異なるか、または最大で1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチドだけ異なる。一部の実施形態では、1セットの固有識別子の配列は、互いにまたはそれらの相補体と、少なくとも3%、少なくとも5%、少なくとも8%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、またはそれよりも多くが異なる。

【0188】

一部の実施形態では、固有識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する結合部位を含んでいてもよい。一部の実施形態では、固有識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する少なくとも2つの結合部位を含んでいてもよい。一部の実施形態では、固有識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する少なくとも3つの結合部位を含んでいてもよい。プライマーは、例えば、PCR増幅による固有識別子の増幅に使用することができる。一部の実施形態では、プライマーは、ネステッドPCR反応に使用することができる。

【0189】

本開示では、タンパク質結合性試薬、抗体もしくはそれらの断片、アプタマー、小分子、リガンド、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど、またはそれらの任意の組合せなど、任意の好適な細胞成分結合性試薬が企図されている。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、単鎖抗体(s c - A b)、またはF a b、F vなどのそれらの断片であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性試薬は、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個の異なる細胞成分試薬を含んでいてもよく、もしくは約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個の細胞成分試薬を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分試薬を含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性試薬は、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる細胞成分試薬を含んでいてもよく、または最大で20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる細胞成分試薬を含んでいてもよい。

【0190】

オリゴヌクレオチドは、種々の機序により細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬に共有結合でコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬に非共有結合でコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされている。リンカーは、例えば、細胞成分結合性試薬および／またはオリゴヌクレオチドから切断可能または脱離可能であってもよい。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドを細胞成分結合性試薬に可逆的に付着させる化学基を含んでいてもよい。化学基は、例えば、アミン基を介してリンカーにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、リンカーは、細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされている別の化学基と安定的な結合を形成する化学基を含んでいてもよい。例えば、化学基は、UV光切断可能基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミンなどであってもよい。一部の実施形態では、化学基は、リシンなどのアミノ酸の一級アミンまたはN末端を介して細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされていてもよい。P r o t e i n - O l i g o コン

10

20

30

40

50

ジュゲーションキット (Solulink, Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア州)、Thunder-Link (登録商標) オリゴコンジュゲーション系 (Innova Biosciences、ケンブリッジ、英国) などの市販のコンジュゲーションキットを使用して、オリゴヌクレオチドを細胞成分結合性試薬にコンジュゲートすることができる。

【0191】

オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬とその細胞成分標的との間の特異的結合を妨害しない限り、細胞成分結合性試薬 (例えば、タンパク質結合性試薬) の任意の好適な部位にコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、抗体などのタンパク質である。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、抗体ではない。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、抗体の抗原結合部位以外の任意の場所に、例えば、Fc領域、CH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CLドメインなどにコンジュゲートすることができる。オリゴヌクレオチドを細胞成分結合性試薬 (例えば、抗体) にコンジュゲートするための方法は、以前に、例えば米国特許第6,531,283号明細書に開示されている。この内容は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。細胞成分結合性試薬に対するオリゴヌクレオチドの化学量論は様々であってもよい。配列決定において細胞成分結合性試薬特異的オリゴヌクレオチドを検出するための感度を増加させるために、コンジュゲーション中の、オリゴヌクレオチドの細胞成分結合性試薬に対する比を増加させることが有利であり得る。一部の実施形態では、各細胞成分結合性試薬には、単一オリゴヌクレオチド分子がコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、各細胞成分結合性試薬は、1つよりも多くのオリゴヌクレオチド分子に、例えば、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000個のオリゴヌクレオチド分子に、もしくは最大で2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000個のオリゴヌクレオチド分子に、またはそうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のオリゴヌクレオチド分子にコンジュゲートされていてもよく、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じまたは異なる固有識別子を含む。一部の実施形態では、各細胞成分結合性試薬は、1つよりも多くのオリゴヌクレオチド分子に、例えば、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000個のオリゴヌクレオチド分子に、または最大で2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000個のオリゴヌクレオチド分子にコンジュゲートされていてもよく、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じまたは異なる固有識別子を含む。

【0192】

一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性試薬は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍試料、または血液試料などの試料中の複数の細胞成分標的に特異的に結合することが可能である。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分は、細胞または生物中の全細胞成分 (例えば、タンパク質) の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、もしくは約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分は、細胞または生物中の全細胞成分 (例えば、タンパク質) の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%であってもよく、または最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%であってもよい。一部

の実施形態では、複数の細胞成分標的は、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよく、もしくは約2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分標的を含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよく、または最大で2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよい。

【0193】

図4は、抗体の固有識別子配列を含むオリゴヌクレオチドが付随している（例えば、コンジュゲートされている）例示的な細胞成分結合性試薬（例えば、抗体）の概略図を示す。細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチド、細胞成分結合性試薬にコンジュゲーションさせるためのオリゴヌクレオチド、または細胞成分結合性試薬に以前にコンジュゲートされていたオリゴヌクレオチドを、本明細書では、抗体オリゴヌクレオチドと呼ぶ（結合性試薬オリゴヌクレオチドと略記する）ことができる。抗体にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチド、抗体にコンジュゲーションさせるためのオリゴヌクレオチド、または抗体に以前にコンジュゲートされていたオリゴヌクレオチドを、本明細書では、抗体オリゴヌクレオチドと呼ぶ（「AbOligo」または「AbO」と略記する）ことができる。また、オリゴヌクレオチドは、これらに限定されないが、1つまたは複数のリンカー、抗体の1つまたは複数の固有識別子、任意に1つまたは複数のバーコード配列（例えば、分子標識）、およびポリ（dA）テイルを含む、追加の成分を含んでいてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、5'から3'へと、リンカー、固有識別子、バーコード配列（例えば、分子標識）、およびポリ（dA）テイルを含んでいてもよい。抗体オリゴヌクレオチドは、mRNA模倣物であってもよい。

【0194】

図5は、抗体の固有識別子配列を含むオリゴヌクレオチドが付随している（例えば、コンジュゲートされている）例示的な細胞成分結合性試薬（例えば、抗体）の概略図を示す。細胞成分結合性試薬は、抗原標的またはタンパク質標的などの少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であってもよい。結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、または抗体オリゴヌクレオチド）は、本開示の方法を実施するための配列（例えば、試料インデックス付与配列）を含んでいてもよい。例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含んでいてもよい。細胞成分結合性試薬を含む複数の組成物の2つの細胞成分結合性試薬を含む少なくとも2つの組成物（例えば、試料インデックス付与組成物）のインデックス付与配列（例えば、試料インデックス付与配列）は、異なる配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドは、種のゲノム配列と相同性ではない。結合性試薬オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬から脱離可能または脱離不能であるように構成されていてもよい（または脱離可能もしくは脱離不能であってもよい）。

【0195】

細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチドは、例えば、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、ポリ（dA）テイル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチドは、mRNA模倣物であってもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードのうちの少なくとも1つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードの標的結合性領域は、捕捉配列を含んでいてもよい。標的結合性領域は、例えば、ポリ（dT）領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコードの捕捉配列に相補的な試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（dA）テイルを含んでいてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標

10

20

30

40

50

識を含んでいてもよい。

【0196】

一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料オリゴヌクレオチド）は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列、もしくは約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドは、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000ヌクレオチド長の、または最大で6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970

10

20

30

40

50

0、980、990、もしくは1000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。

【0197】

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質スキャフォールド、またはそれらの組合せを含む。結合性試薬オリゴヌクレオチドは、例えば、リンカーを介して細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされていてもよい。結合性試薬オリゴヌクレオチドは、リンカーを含んでいてもよい。リンカーは、化学基を含んでいてもよい。化学基は、細胞成分結合性試薬の分子に可逆的にまたは不可逆的に付着されていてもよい。化学基は、UV光切断可能基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【0198】

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、ADAM10、CD156c、ANO6、ATP1B2、ATP1B3、BSG、CD147、CD109、CD230、CD29、CD298、ATP1B3、CD44、CD45、CD47、CD51、CD59、CD63、CD97、CD98、SLC3A2、CLDN1、HLA-ABC、ICAM1、ITFG3、MPZL1、NAKATPaseアルファ1、ATP1A1、NPTN、PMCAATPase、ATP2B1、SLC1A5、SLC29A1、SLC2A1、SLC44A2、またはそれらの任意の組合せに結合することができる。

【0199】

一部の実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せであるかまたは含む。一部の実施形態では、抗原またはタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、インテグリン、またはそれらの任意の組合せであるかまたは含む。抗原またはタンパク質標的は、脂質、炭水化物、またはそれらの任意の組合せであってもよくまたは含んでいてもよい。タンパク質標的は、少なからぬタンパク質標的を含む群から選択することができる。抗原標的またはタンパク質標的の数は、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、もしくは約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、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。タンパク質標的の数は、少なくとも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、もしくは10000であってもよく、または最大で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、もしくは10000であってもよい。

【0200】

細胞成分結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）には、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）が付随していてもよい。細胞成分結合性試薬には、異なる配列を有する2つまたはそれよりも多くの結合性試薬オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。細胞成分結合性試薬に付随している結合性試薬オリゴヌクレオチドの数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドの数は、同一配列を有するかまたは異なる配列を有するに関わらず、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90

10

20

30

40

50

、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、もしくは約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、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも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、もしくは1000であってもよく、または最大で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、もしくは1000であってもよい。

10

【0201】

細胞成分結合性試薬を含む複数の組成物（例えば、複数の試料インデックス付与組成物）は、結合性試薬オリゴヌクレオチド（試料インデックス付与オリゴヌクレオチドなど）にコンジュゲートされていない、本明細書では、結合性試薬オリゴヌクレオチドを含まない細胞成分結合性試薬（試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含まない細胞成分結合性試薬など）とも呼ばれる1つまたは複数の追加の細胞成分結合性試薬を含んでいてもよい。複数の組成物中の追加の細胞成分結合性試薬の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、追加の細胞成分結合性試薬の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、追加の細胞成分結合性試薬の数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100であってもよい。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬およびいずれかの追加の細胞成分結合性試薬は同一であってもよい。

20

【0202】

一部の実施形態では、1つまたは複数の結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬、および結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬を含む混合物が提供される。この混合物を、本明細書で開示される方法の一部の実施形態にて、例えば、試料および／または細胞との接触に使用することができる。（1）結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬の数および（2）結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）または混合物中の他の結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない別の細胞成分結合性試薬（例えば、同じ細胞成分結合性試薬）の数の比は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、この比は、1：1、1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.5、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：11、1：12、1：13、1：14、1：15、1：16、1：17、1：18、1：19、1：20、1：21、1：22、1：23、1：24、1：25、1：26、1：27、1：28、1：29、1：30、1：31、1：32、1：33、1：34、1：35、1：36、1：37、1：38、1：39、1：40、1：41、1：42、1：43、1：44、1：45、1：46、1：47、1：48、1：49、1：50、1：51、1：52、1：53、1：54、1：55、1：56、1：57、1：58、1：59、1：60、1：61、1：62、1：63、1：64、1：65、1：66、1：67、1：68、1：69、1：70、1：71、1：72、1：73、1：74、1：75、1：76、1：77、1：78、1：79、1：80、1：81、1：82、1：83、1：84、1：85、1：86、1：87、

30

40

50

1:88、1:89、1:90、1:91、1:92、1:93、1:94、1:95、
 1:96、1:97、1:98、1:99、1:100、1:200、1:300、1:
 400、1:500、1:600、1:700、1:800、1:900、1:1000
 、1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000、1:70
 00、1:8000、1:9000、1:10000、もしくは約1:1、1:1.1、
 1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.
 8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:
 8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16
 、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24
 、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32
 、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40
 、1:41、1:42、1:43、1:44、1:45、1:46、1:47、1:48
 、1:49、1:50、1:51、1:52、1:53、1:54、1:55、1:56
 、1:57、1:58、1:59、1:60、1:61、1:62、1:63、1:64
 、1:65、1:66、1:67、1:68、1:69、1:70、1:71、1:72
 、1:73、1:74、1:75、1:76、1:77、1:78、1:79、1:80
 、1:81、1:82、1:83、1:84、1:85、1:86、1:87、1:88
 、1:89、1:90、1:91、1:92、1:93、1:94、1:95、1:96
 、1:97、1:98、1:99、1:100、1:200、1:300、1:400、
 1:500、1:600、1:700、1:800、1:900、1:1000、1:2
 000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000、1:7000、1
 :8000、1:9000、1:10000、または上記の値の任意の2つの間の数値も
 しくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、この比は、少なくとも1:1、1:1
 .1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1
 :1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7
 、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1
 :16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1
 :24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1
 :32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1
 :40、1:41、1:42、1:43、1:44、1:45、1:46、1:47、1
 :48、1:49、1:50、1:51、1:52、1:53、1:54、1:55、1
 :56、1:57、1:58、1:59、1:60、1:61、1:62、1:63、1
 :64、1:65、1:66、1:67、1:68、1:69、1:70、1:71、1
 :72、1:73、1:74、1:75、1:76、1:77、1:78、1:79、1
 :80、1:81、1:82、1:83、1:84、1:85、1:86、1:87、1
 :88、1:89、1:90、1:91、1:92、1:93、1:94、1:95、1
 :96、1:97、1:98、1:99、1:100、1:200、1:300、1:4
 00、1:500、1:600、1:700、1:800、1:900、1:1000、
 1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000、1:700
 0、1:8000、1:9000、もしくは1:10000であってもよく、または最大
 で1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6
 、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:4、1:5
 、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:1
 4、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:2
 2、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:3
 0、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:3
 8、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44、1:45、1:4
 6、1:47、1:48、1:49、1:50、1:51、1:52、1:53、1:5
 4、1:55、1:56、1:57、1:58、1:59、1:60、1:61、1:6
 2、1:63、1:64、1:65、1:66、1:67、1:68、1:69、1:7

10

20

30

40

50

0、1：71、1：72、1：73、1：74、1：75、1：76、1：77、1：78、1：79、1：80、1：81、1：82、1：83、1：84、1：85、1：86、1：87、1：88、1：89、1：90、1：91、1：92、1：93、1：94、1：95、1：96、1：97、1：98、1：99、1：100、1：200、1：300、1：400、1：500、1：600、1：700、1：800、1：900、1：1000、1：2000、1：3000、1：4000、1：5000、1：6000、1：7000、1：8000、1：9000、もしくは1：10000であってもよい。

【0203】

一部の実施形態では、この比は、1：1、1.1：1、1.2：1、1.3：1、1.4：1、1.5：1、1.6：1、1.7：1、1.8：1、1.9：1、2：1、2.5：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、12：1、13：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18：1、19：1、20：1、21：1、22：1、23：1、24：1、25：1、26：1、27：1、28：1、29：1、30：1、31：1、32：1、33：1、34：1、35：1、36：1、37：1、38：1、39：1、40：1、41：1、42：1、43：1、44：1、45：1、46：1、47：1、48：1、49：1、50：1、51：1、52：1、53：1、54：1、55：1、56：1、57：1、58：1、59：1、60：1、61：1、62：1、63：1、64：1、65：1、66：1、67：1、68：1、69：1、70：1、71：1、72：1、73：1、74：1、75：1、76：1、77：1、78：1、79：1、80：1、81：1、82：1、83：1、84：1、85：1、86：1、87：1、88：1、89：1、90：1、91：1、92：1、93：1、94：1、95：1、96：1、97：1、98：1、99：1、100：1、200：1、300：1、400：1、500：1、600：1、700：1、800：1、900：1、1000：1、2000：1、3000：1、4000：1、5000：1、6000：1、7000：1、8000：1、9000：1、10000：1、もしくは約1：1、1.1：1、1.2：1、1.3：1、1.4：1、1.5：1、1.6：1、1.7：1、1.8：1、1.9：1、2：1、2.5：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、12：1、13：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18：1、19：1、20：1、21：1、22：1、23：1、24：1、25：1、26：1、27：1、28：1、29：1、30：1、31：1、32：1、33：1、34：1、35：1、36：1、37：1、38：1、39：1、40：1、41：1、42：1、43：1、44：1、45：1、46：1、47：1、48：1、49：1、50：1、51：1、52：1、53：1、54：1、55：1、56：1、57：1、58：1、59：1、60：1、61：1、62：1、63：1、64：1、65：1、66：1、67：1、68：1、69：1、70：1、71：1、72：1、73：1、74：1、75：1、76：1、77：1、78：1、79：1、80：1、81：1、82：1、83：1、84：1、85：1、86：1、87：1、88：1、89：1、90：1、91：1、92：1、93：1、94：1、95：1、96：1、97：1、98：1、99：1、100：1、200：1、300：1、400：1、500：1、600：1、700：1、800：1、900：1、1000：1、2000：1、3000：1、4000：1、5000：1、6000：1、7000：1、8000：1、9000：1、10000：1、または上記の値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、この比は、少なくとも1：1、1.1：1、1.2：1、1.3：1、1.4：1、1.5：1、1.6：1、1.7：1、1.8：1、1.9：1、2：1、2.5：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、12：1、13：1、14：1、15：1、16：1、17：1、18：1、19：1、20：1、21：1、22：1、23：1、24：1、25：1、26：1、27：1、28：1、29：1、30：1、31：1、32：1、33：1、34：1、35：1

10

20

30

40

50

20

30

50

0.1%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。

10

一部の実施形態では、混合物中の、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬のパーセンテージは、少なくとも0.000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよく、または最大で0.00000000001%、0.0000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよい。

20

30

【0205】

一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬を含む混合物中の、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬のパーセンテージは、0.00000000001%、0.0000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%

40

50

%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、もしくは約0.00000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.00001%、0.001%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、混合物中の、結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬のパーセンテージは、少なくとも0.0000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.000001%、0.0001%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよく、または最大で0.0000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.000001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよい。

【0206】

細胞成分カクテル

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬のカクテル（例えば、抗体カクテル）を使用して、本明細書で開示される方法での標識付与感度を増加させることができる。いかなる特定の理論にも束縛されないが、これは、細胞成分発現またはタンパク質発現が、細胞タ

10

20

30

40

50

イブ間および細胞状態間で様々であり得るため、すべての細胞タイプを標識するユニバーサルな細胞成分結合性試薬または抗体を見出すことが困難であるためであり得ると考えられる。例えば、細胞成分結合性試薬のカクテルを使用すると、より多くの試料タイプのより高感度で効率的な標識付与を可能にすることができる。細胞成分結合性試薬のカクテルは、2つまたはそれよりも多くの異なるタイプの細胞成分結合性試薬、例えば、より広範囲の細胞成分結合性試薬または抗体を含むことができる。異なる細胞成分標的を標識する細胞成分結合性試薬と一緒にプールして、目的のすべての細胞タイプまたは1つもしくは複数の細胞タイプを十分に標識するカクテルを作出することができる。

【0207】

一部の実施形態では、複数の組成物（例えば、試料インデックス付与組成物）の各々は、細胞成分結合性試薬を含む。一部の実施形態では、複数の組成物のうちの組成物は、2つまたはそれよりも多くの細胞成分結合性試薬を含み、2つまたはそれよりも多くの細胞成分結合性試薬の各々には、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）が付随しており、2つまたはそれよりも多くの細胞成分結合性試薬の少なくとも1つは、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。2つまたはそれよりも多くの細胞成分結合性試薬に付随している結合性試薬オリゴヌクレオチドの配列は、同一であってもよい。2つまたはそれよりも多くの細胞成分結合性試薬に付随している結合性試薬オリゴヌクレオチドの配列は、異なる配列を含んでいてもよい。複数の組成物の各々は、2つまたはそれよりも多くの細胞成分結合性試薬を含んでいてもよい。

【0208】

組成物中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬（例えば、CD147抗体およびCD47抗体）の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。2つまたはそれよりも多くの異なるタイプの細胞成分結合性試薬を有する組成物は、本明細書では、細胞成分結合性試薬カクテル（例えば、試料インデックス付与組成物カクテル）と呼ばれる場合がある。カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬の数は様々であってもよい。一部の実施形態では、カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬の数は、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、10000、100000、もしくは約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、10000、100000、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬の数は、少なくとも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、10000、100000、もしくは1000000であってもよく、または最大で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、10000、100000、もしくは1000000であってもよい。異なるタイプの細胞成分結合性試薬には、同じまたは異なる配列（例えば、試料インデックス付与配列）を有する結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていてもよい。

【0209】

細胞成分標的の定量分析の方法

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法はまた、本明細書に開示された組成物およびバーコード配列（例えば、分子標識配列）を細胞成分結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）のオリゴヌクレオチドに付随させ得るオリゴヌクレオチドプローブを使用して、試料中の複数の細胞成分標的（例えば、タンパク質標的）の定量分析に使用することができる。細胞成分結合性試薬のオリゴヌクレオチドは、抗体オリゴヌクレオチド、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、細胞識別オリゴヌクレオチド、制御粒子オリ

ゴヌクレオチド、制御オリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなどであるか、またはこれらを含んでもよい。一部の実施形態では、試料は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍試料、血液試料などであり得る。一部の実施形態では、試料は、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、B細胞、T細胞、母体細胞、胎児細胞など、または様々な対象からの細胞の混合物を含み得る。

一部の実施形態では、試料は、マイクロウェルアレイにおけるマイクロウェルなどの個々のコンパートメント中に分離した複数の単一細胞を含み得る。

【0210】

一部の実施形態では、複数の細胞成分標的（すなわち、細胞成分標的）の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、インテグリン、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せであるか、またはそれらを含んでもよい。一部の実施形態では、細胞成分標的は、タンパク質標的である。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含み得る。一部の実施形態では、複数の細胞成分は、生物においてコードされた細胞成分のすべてのうちの少なくとも1%、少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれより高い割合であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも1000、少なくとも10000、またはそれより多い異なる細胞成分標的を含み得る。

【0211】

一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性試薬を、複数の細胞成分標的との特異的結合のために、試料と接触させる。未結合の細胞成分結合性試薬は、例えば、洗浄することによって除去され得る。試料が細胞を含む実施形態では、細胞に特異的に結合していない任意の細胞成分結合性試薬が除去され得る。

【0212】

一部の例では、細胞集団に由来する細胞は、本開示の基材のウェル中に分離（例えば、単離）され得る。細胞集団は、分離前に希釈され得る。細胞集団は、基材のウェルの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%が単一細胞を受容するように希釈され得る。細胞集団は、基材のウェルの最大1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%が単一細胞を受容するように希釈され得る。細胞集団は、希釈された集団における細胞の数が、基材上のウェルの数の1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%であるか、または少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%であるように希釈され得る。一部の例では、細胞集団は、細胞の数が、基材におけるウェルの数の約10%であるように希釈される。

【0213】

単一細胞の基材のウェル中への分配は、ポアソン分布に従ってもよい。例えば、基材のウェルが2つ以上の細胞を有する、少なくとも0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、もしくは10%、またはそれより高い確率が存在し得る。基材のウェルが2つ以上の細胞を有する、少なくとも0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、もしくは10%、またはそれより高い確率が存在し得る。単一細胞の基材のウェル中への分配は、ランダムであってもよい。単一細胞の基材のウェル中への分配は、ランダムでなくてもよい。細胞は、基材のウェルが1つの細胞のみを受容するように分離されてもよい。

10

【0214】

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、個々のコンパートメントへの細胞のフローソーティングを可能にするために、蛍光分子とさらにコンジュゲートされてもよい。

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、複数の細胞成分標的との特異的結合のために、複数の組成物を試料と接触させることを提供する。使用される条件は、細胞成分結合性試薬、例えば、抗体の、細胞成分標的への特異的結合を可能にし得ることが認識されるであろう。接触させるステップの後に、未結合の組成物を除去してもよい。例えば、試料が細胞を含み、かつ組成物が、細胞表面タンパク質などの細胞表面細胞成分である細胞成分標的に特異的に結合する実施形態では、未結合の組成物は、細胞成分標的に特異的に結合する組成物のみが細胞と共に残るように、細胞を緩衝液で洗浄することによって除去され得る。

20

【0215】

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、バーコード配列（例えば、分子標識）、細胞標識、試料標識などを含むオリゴヌクレオチド（例えば、バーコード、または確率論的バーコード）、またはそれらの任意の組合せを、細胞成分結合性試薬に付随している複数のオリゴヌクレオチドに付随させることを含み得る。例えば、バーコードを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを使用して、組成物のうちの複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせることができる。

30

【0216】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体支持体上に固定化されていてもよい。固体支持体は、浮動性、例えば、溶液中のビーズであってもよい。固体支持体は、半固体または固体アレイ中に封入されていてもよい。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体支持体上に固定化されていなくてもよい。複数のオリゴヌクレオチドプローブが、細胞成分結合性試薬のオリゴヌクレオチドが付随している複数の近接して存在する場合、細胞成分結合性試薬の複数のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズし得る。細胞成分結合性試薬の別個のオリゴヌクレオチドの各々に、本開示の異なるバーコード配列（例えば、分子標識）を有するオリゴヌクレオチドプローブが付随し得るように、オリゴヌクレオチドプローブを非枯渇的比率で接触させてもよい。

40

【0217】

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、細胞成分標的に特異的に結合した細胞成分結合性試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させることを提供する。UV光切断、化学処理（例えば、ジチオトレイトール処理）、加熱、酵素処理、またはそれらの組合せなどの、細胞成分結合性試薬から化学基を分離する種々の方法で、脱離を実施することができる。細胞成分結合性試薬からのオリゴヌクレオチドの脱離は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを組成物のうちの複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップの前、後、またはその間に実施することができる。

【0218】

50

細胞成分と核酸標的の同時定量分析の方法

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法はまた、本明細書に開示された組成物および細胞成分結合性試薬のオリゴヌクレオチドと核酸標的分子との両方にバーコード配列（例えば、分子標識配列）に付随し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用して、試料中の複数の細胞成分標的（例えば、タンパク質標的）および複数の核酸標的分子の同時定量分析のために使用され得る。複数の細胞成分標的および複数の核酸標的分子の同時定量分析の他の方法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、2017年9月25日に出願された米国特許出願第15/715028号に記載されている。一部の実施形態では、試料は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍試料、血液試料などであり得る。一部の実施形態では、試料は、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、B細胞、T細胞、母体細胞、胎児細胞などの細胞型の混合物、または異なる対象からの細胞の混合物を含み得る。

【0219】

一部の実施形態では、試料は、マイクロウェルアレイ中のマイクロウェルなどの個々のコンパートメント中に分離された複数の単一細胞を含み得る。

【0220】

一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含み得る。一部の実施形態では、複数の細胞成分は、生物、または生物の1つもしくは複数の細胞中で発現したタンパク質などのすべての細胞成分のうちの1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲で存在してもよく、または約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲で存在してもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分は、生物、または生物の1つもしくは複数の細胞中で発現され得るタンパク質などのすべての細胞成分のうちの少なくとも、または最大1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%で存在してもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分標的を含んでもよく、または約2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分標的を含んでもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、もしくは10000個の異なる細胞成分標的を含むか、または最大2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、もしくは10000個の異なる細胞成分標的を含んでもよい。

一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性試薬を、複数の細胞成分標的と特異的に結合させるために、試料と接触させる。未結合の細胞成分結合性試薬は、例えば、洗浄することによって除去され得る。試料が細胞を含む実施形態では、細胞に特異的に結合していない任意の細胞成分結合性試薬が除去され得る。

【0221】

一部の例では、細胞集団に由来する細胞は、本開示の基材のウェル中に分離（例えば、単離）され得る。細胞集団は、分離前に希釈され得る。細胞集団は、基材のウェルのうちの少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%が単一細胞を受容するように希釈され得る。細胞集団は、基材の

ウェルの最大1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%が単一細胞を受容するように希釈され得る。細胞集団は、希釈された集団における細胞の数が、基材上のウェルの数の1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%であるか、または少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%であるように希釈され得る。細胞集団は、希釈された集団における細胞の数が、基材上のウェルの数の1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%であるか、または少なくとも1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、もしくは100%であるように希釈され得る。一部の例では、細胞集団は、細胞の数が、基材におけるウェルの数の約10%であるように希釈される。

10

【0222】

単一細胞の基材のウェル中への分配は、ポアソン分布に従ってもよい。例えば、基材のウェルが2つ以上の細胞を有する、少なくとも0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、もしくは10%、またはそれより高い確率が存在し得る。基材のウェルが2つ以上の細胞を有する、少なくとも0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、もしくは10%、またはそれより高い確率が存在し得る。単一細胞の基材のウェル中への分配は、ランダムであってもよい。単一細胞の基材のウェル中への分配は、ランダムでなくてもよい。細胞は、基材のウェルが1つの細胞のみを受容するように分離されてもよい。

20

【0223】

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、個々のコンパートメントへの細胞のフローソートリングを可能にするために、蛍光分子とさらにコンジュゲートされ得る。

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、複数の細胞成分標的との特異的結合のために、複数の組成物を試料と接触させることを提供する。使用される条件は、細胞成分結合性試薬、例えば、抗体の、細胞成分標的への特異的結合を可能にし得ることが認識されるであろう。接触させるステップの後に、未結合の組成物を除去してもよい。例えば、試料が細胞を含み、かつ組成物が、細胞表面タンパク質などの細胞表面上にある細胞成分標的に特異的に結合する実施形態では、未結合の組成物は、細胞成分標的に特異的に結合する組成物のみが細胞と共に残るように、細胞を緩衝液で洗浄することによって除去され得る。

30

【0224】

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、試料、例えば、細胞から複数の核酸標的分子を放出することを提供し得る。例えば、細胞を溶解させて、複数の核酸標的分子を放出させることができる。細胞溶解は、種々の手段のいずれかによって、例えば、化学処理、浸透圧ショック、熱処理、機械的処理、光学的処理、またはそれらの任意の組合せによって達成され得る。界面活性剤（例えば、SDS、Liドデシルスルフェート、Triton X-100、Tween-20、またはNP-40）、有機溶媒（例えば、メタノールまたはアセトン）、もしくは消化酵素（例えば、プロテイナーゼK、ペプシン、またはトリプシン）、またはそれらの任意の組合せを含む細胞溶解緩衝液を添加することによって、細胞を溶解することができる。

40

【0225】

複数の核酸分子が、様々な核酸分子を含み得ることが当業者によって認識されるであろう。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、DNA分子、RNA分子、ゲノムDNA分子、mRNA分子、rRNA分子、siRNA分子、またはそれらの組合せを含んでもよ

50

く、かつ二本鎖または一本鎖であってもよい。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の種を含むか、または約100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の種を含む。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、少なくとも100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、もしくは1000000種を含むか、または最大100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、もしくは1000000種を含む。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、試料、例えば、単一細胞、または複数の細胞に由来し得る。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、複数の試料、例えば、複数の単一細胞からプールされ得る。

10

【0226】

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、バーコード配列（例えば、分子標識）、細胞標識、試料標識など、またはそれらの任意の組合せを含み得るバーコード（例えば、確率論的バーコード）を複数の核酸標的分子および細胞成分結合性試薬の複数のオリゴヌクレオチドに付随させることを含み得る。例えば、確率論的バーコードを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを使用して、複数の核酸標的分子と組成物のうちの複数のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせることができる。

【0227】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブを固体支持体上に固定化させ得る。固体支持体は、浮動性、例えば、溶液中のビーズであってもよい。固体支持体は、半固体または固体アレイ中に封入されていてもよい。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体支持体上に固定化されていなくてもよい。複数のオリゴヌクレオチドプローブが、複数の核酸標的分子および細胞成分結合性試薬の複数のオリゴヌクレオチドに近接して存在する場合、複数の核酸標的分子および細胞成分結合性試薬の複数のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズし得る。別個の核酸標的分子および細胞成分結合性試薬のオリゴヌクレオチドの各々に、本開示の異なるバーコード配列を有するオリゴヌクレオチドプローブ（例えば、分子標識）が付随し得るように、オリゴヌクレオチドプローブを非枯渇的比率で接触させることができる。

20

30

【0228】

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、細胞成分標的に特異的に結合した細胞成分結合性試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させることを提供する。UV光切断、化学処理（例えば、ジチオトレイトール処理）、加熱、酵素処理、またはそれらの組合せなどの種々の方法で脱離を実施し、細胞成分結合性試薬から化学基を分離することができる。細胞成分結合性試薬からのオリゴヌクレオチドの脱離は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを複数の核酸標的分子および組成物のうちの複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップの前、後、またはその間に実施することができる。

【0229】

タンパク質および核酸標的の同時定量分析

40

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法はまた、複数種の標的分子、例えば、タンパク質および核酸標的の同時定量分析のために使用することができる。例えば、標的分子は、細胞成分であってもよく、または細胞成分を含んでもよい。図6は、単一細胞における核酸標的と他の細胞成分標的（例えば、タンパク質）との両方の同時定量分析の例示的方法の概略図を示す。一部の実施形態では、各々が抗体などの細胞成分結合性試薬を含む複数の組成物605、605b、605cなどが提供される。異なる細胞成分標的に結合する、抗体などの異なる細胞成分結合性試薬が、異なる固有識別子とコンジュゲートされる。次に、細胞成分結合性試薬は、複数の細胞610を含有する試料とインキュベートされ得る。異なる細胞成分結合性試薬は、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せな

50

どの細胞表面上の細胞成分に特異的に結合することができる。未結合の細胞成分結合性試薬は、例えば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去され得る。次いで、細胞成分結合性試薬を含む細胞は、単一のコンパートメント 615 が単一細胞および単一ビーズ 620 に適合するように所定のサイズにされているマイクロウェルアレイなどの複数のコンパートメント中に分離され得る。各ビーズは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、およびバーコード配列（例えば、分子標識配列）を含み得る複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。一部の実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合性領域、例えば、ポリ（dT）配列を含み得る。細胞成分結合性試薬にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド 625 は、化学的、光学的または他の手段を使用して、細胞成分結合性試薬から脱離され得る。細胞は溶解されて（635）、ゲノム DNA または細胞の mRNA 630 などの細胞内の核酸を放出し得る。細胞の mRNA 630、オリゴヌクレオチド 625 またはその両方は、ビーズ 620 上のオリゴヌクレオチドプローブによって、例えば、ポリ（dT）配列にハイブリダイズすることによって、捕捉され得る。逆転写酵素を使用して、細胞の mRNA 630 およびオリゴヌクレオチド 625 にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを細胞の mRNA 630 およびオリゴヌクレオチド 625 を鋳型として使用して伸長することができる。逆転写酵素によって生成された伸長産物は、増幅および配列決定に供され得る。配列決定リードは、試料中の各単一細胞の細胞成分および遺伝子発現のデジタルな表現をもたらすことができる、細胞標識、バーコード（例えば、分子標識）、遺伝子、細胞成分結合性試薬に特異的なオリゴヌクレオチド（例えば、抗体に特異的なオリゴヌクレオチド）などの配列または識別子のデマルチプレクシングに供され得る。

【0230】

バーコードの付随

細胞成分結合性試薬（例えば、抗原結合性試薬またはタンパク質結合性試薬）および／または核酸分子に付随しているオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブ（例えば、確率論的バーコードなどのバーコード）にランダムに付随し得る。本明細書において、結合性試薬オリゴヌクレオチドと称される細胞成分結合性試薬に付随しているオリゴヌクレオチドは、本開示のオリゴヌクレオチド、例えば、抗体オリゴヌクレオチド、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、細胞識別オリゴヌクレオチド、制御粒子オリゴヌクレオチド、制御オリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなどであってもよく、またはこれらを含んでもよい。付随は、例えば、標的核酸分子および／またはタンパク質結合性試薬のオリゴヌクレオチドの相補的部分へのオリゴヌクレオチドプローブの標的結合性領域のハイブリダイゼーションを含む。例えば、バーコード（例えば、確率論的バーコード）のオリゴ（dT）領域は、標的核酸分子のポリ（A）テイルおよび／またはタンパク質結合性試薬のオリゴヌクレオチドのポリ（dA）テイルと相互作用可能である。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（例えば、緩衝液の pH、イオン強度、温度など）は、特定の安定なハイブリッドの形成を促進するように選択することができる。

【0231】

本開示は、逆転写を使用して、分子標識を標的核酸および／または細胞成分結合性試薬に付随しているオリゴヌクレオチドに付随させる方法を提供する。逆転写は、鋳型として RNA と DNA との両方を使用し得る。例えば、細胞成分結合性試薬に元々コンジュゲートしたオリゴヌクレオチドは、RNA もしくは DNA 塩基のいずれか、またはその両方であってもよい。結合性試薬オリゴヌクレオチドは、コピーされ、結合性試薬配列の配列、またはその一部に加えて、細胞標識およびバーコード配列（例えば、分子標識）に連結（例えば、共有結合で連結）され得る。別の例として、mRNA 分子は、コピーされ、mRNA 分子の配列、またはその一部に加えて、細胞標識およびバーコード配列（例えば、分子標識）に連結（例えば、共有結合で連結）され得る。

一部の実施形態では、分子標識は、オリゴヌクレオチドプローブ標的結合性領域と標的核酸分子の一部および／または細胞成分結合性試薬に付随している（例えば、現在、また

は以前に付随した) オリゴヌクレオチドとのライゲーションにより追加され得る。例えば、標的結合性領域は、制限部位オーバーハング(例えば、E c o R I 付着末端オーバーハング) への特異的ハイブリダイゼーションが可能となり得る核酸配列を含み得る。本方法は、制限部位オーバーハングを生成するために制限酵素(例えば、E c o R I) で標的核酸および／または細胞成分結合性試薬に付随しているオリゴヌクレオチドを処置することをさらに含み得る。2つの断片を接続するために、リガーゼ(例えば、T 4 D N A リガーゼ)を使用することができる。

【0232】

固有分子標識配列の数または存在の決定

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、各固有識別子、各核酸標的分子、および／または各結合性試薬オリゴヌクレオチド(例えば、抗体オリゴヌクレオチド) のための固有分子標識配列の数または存在を決定することを含む。例えば、配列決定リードを使用して、各固有識別子、各核酸標的分子、および／または各結合性試薬オリゴヌクレオチドのための固有分子標識配列の数を決定することができる。別の例として、配列決定リードを使用して、分子標識配列(例えば、配列決定リードにおける標的に付随している分子標識配列、結合性試薬オリゴヌクレオチド、抗体オリゴヌクレオチド、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、細胞識別オリゴヌクレオチド、制御粒子オリゴヌクレオチド、制御オリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなど) の存在または非存在を決定することができる。

【0233】

一部の実施形態では、各固有識別子、各核酸標的分子、および／または各結合性試薬オリゴヌクレオチドのための固有分子標識配列の数は、試料中の各細胞成分標的(例えば、抗原標的またはタンパク質標的) および／または各核酸標的分子の量を示す。一部の実施形態では、細胞成分標的の量およびその対応する核酸標的分子、例えば、m R N A 分子の量を互いに比較することができる。一部の実施形態では、細胞成分標的の量およびその対応する核酸標的分子、例えば、m R N A 分子の量の比率を計算することができる。細胞成分標的は、例えば、細胞表面タンパク質マーカーであり得る。一部の実施形態では、細胞表面タンパク質マーカーのタンパク質レベルと細胞表面タンパク質マーカーのm R N A のレベルとの比率は低い。

【0234】

本明細書に開示された方法は、種々の用途のために使用され得る。例えば、本明細書に開示された方法は、試料のプロテオームおよび／またはトランスクリプトーム分析のために使用され得る。一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、試料中の細胞成分標的および／または核酸標的、すなわち、バイオマーカーを識別するために使用され得る。一部の実施形態では、細胞成分標的および核酸標的は互に対応する、すなわち、核酸標的は細胞成分標的をコード化する。一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、試料中の細胞成分標的の量とその対応する核酸標的分子、例えば、m R N A 分子の量との間で所望の比率を有する細胞成分標的を識別するために使用され得る。一部の実施形態では、その比率は、0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000、もしくは上記値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であるか、または約0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000、もしくは上記値のいずれか2つの間の数もしくは範囲である。一部の実施形態では、その比率は、少なくとも、または最大0.001、0.01、0.1、1、10、100、もしくは1000である。一部の実施形態では、本明細書に開示された方法を使用して、試料中の対応する核酸標的分子の量が、1000、100、10、5、2、1、0、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲、または約1000、100、10、5、2、1、0、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲である、試料中の細胞成分標的を識別することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示された方法を使用して、試料中の対応する核酸標的分子の量が、1000、100、10、5、2、1、もしくは0を超えるか、または1000、100、10、5、2、1、もしくは0未満である、試料中の細胞成分標的を識別

することができる。

【0235】

組成物およびキット

本明細書に開示された一部の実施形態は、試料中の複数の細胞成分（例えば、タンパク質）および／または複数の核酸標的分子の同時定量分析のためのキットおよび組成物を提供する。キットおよび組成物は、一部の実施形態では、各々がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした複数の細胞成分結合性試薬（例えば、複数のタンパク質結合性試薬）を含むことができ、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬に対する固有識別子、および複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々は、標的結合性領域、バーコード配列（例えば、分子標識配列）を含み、バーコード配列は、固有バーコード配列の多様なセットに由来する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、分子標識、細胞標識、試料標識、またはこれらの任意の組合せを含み得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含み得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、オリゴヌクレオチドプローブの結合部位、例えば、ポリ（A）テイルを含み得る。例えば、ポリ（A）テイルは、例えば、`oligo dA18`（固体支持体に係留していない）または`oligo A18 V`（固体支持体に係留している）であり得る。オリゴヌクレオチドは、DNA残基、RNA残基、またはその両方を含み得る。

10

【0236】

本明細書の開示には、複数の試料インデックス付与組成物が含まれる。複数の試料インデックス付与組成物の各々は、2つ以上の細胞成分結合性試薬を含み得る。2つ以上の細胞成分結合性試薬の各々に、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに付随させ得る。2つ以上の細胞成分結合性試薬のうちの少なくとも1つは、少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり得る。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含み得る。複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含み得る。

20

【0237】

本明細書の開示には、細胞を識別するための試料インデックス付与組成物を含むキットが含まれる。一部の実施形態では、2つの試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分標的（例えば、1つまたは複数のタンパク質標的）のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は異なる配列を含む。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含む。

30

【0238】

本明細書の開示は、細胞を識別するためのキットを含む。一部の実施形態では、キットは、2つ以上の試料インデックス付与組成物を含む。2つ以上の試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬（例えば、抗原結合性試薬）を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は異なる配列を含む。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含む。本明細書の開示は、多重識別するためのキットを含む。一部の実施形態では、キットは、2つの試料インデックス付与組成物を含む。2つの試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬（例えば、抗原結合性試薬）を含み、抗原結合性試

40

50

薬は、1つまたは複数の細胞成分標的（例えば、抗原標的）のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む。

【0239】

固有識別子（または結合性試薬オリゴヌクレオチド、抗体オリゴヌクレオチド、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、細胞識別オリゴヌクレオチド、制御粒子オリゴヌクレオチド、制御オリゴヌクレオチド、または相互作用決定オリゴヌクレオチドなどの細胞成分結合性試薬に付随しているオリゴヌクレオチド）は、任意の適切な長さ、例えば、約25ヌクレオチドから約45ヌクレオチド長を有し得る。一部の実施形態では、固有識別子は、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、または上記値のいずれか2つの間の範囲であり、約4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド、または上記値のいずれか2つの間の範囲であり、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチド未満、または上記値のいずれか2つの間の範囲であり、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、15ヌクレオチド、20ヌクレオチド、25ヌクレオチド、30ヌクレオチド、35ヌクレオチド、40ヌクレオチド、45ヌクレオチド、50ヌクレオチド、55ヌクレオチド、60ヌクレオチド、70ヌクレオチド、80ヌクレオチド、90ヌクレオチド、100ヌクレオチド、200ヌクレオチドを超えるか、または上記値のいずれか2つの間の範囲である長さを有し得る。

【0240】

一部の実施形態では、固有識別子は、固有識別子の多様なセットから選択される。固有識別子の多様なセットは、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なる固有識別子を含んでもよく、または約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なる固有識別子を含んでもよい。固有識別子の多様なセットは、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる固有識別子を含むか、または最大20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる固有識別子を含んでもよい。一部の実施形態では、固有識別子のセットは、分析される試料のDNAまたはRNA配列に対する最小限の配列相同性を有するよう設計される。一部の実施形態では、固有識別子のセットの配列は、1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレ

オチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲で、または約1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、10ヌクレオチド、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲で、互いに異なるか、またはその相補体である。一部の実施形態では、固有識別子のセットの配列は、少なくとも、または最大1ヌクレオチド、2ヌクレオチド、3ヌクレオチド、4ヌクレオチド、5ヌクレオチド、6ヌクレオチド、7ヌクレオチド、8ヌクレオチド、9ヌクレオチド、もしくは10ヌクレオチド互いに異なるか、またはその相補体である。

【0241】

一部の実施形態では、固有識別子は、プライマー、例えば、ユニバーサルプライマーに対する結合部位を含み得る。一部の実施形態では、固有識別子は、プライマー、例えば、ユニバーサルプライマーに対する少なくとも2つの結合部位を含み得る。一部の実施形態では、固有識別子は、プライマー、例えば、ユニバーサルプライマーに対する少なくとも3つの結合部位を含み得る。プライマーは、例えば、PCR増幅によって、固有識別子の増幅のために使用され得る。一部の実施形態では、プライマーは、ネステッドPCR反応のために使用され得る。

【0242】

任意のタンパク質結合性試薬（例えば、抗体もしくはその断片、アプタマー、小分子、リガンド、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど、またはそれらの任意の組合せ）などの任意の適切な細胞成分結合性試薬が、本開示において企図される。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、一本鎖抗体（scAb）、またはその断片、例えば、Fab、Fvなどであり得る。一部の実施形態では、複数のタンパク質結合性試薬は、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なるタンパク質結合性試薬を含んでもよく、または約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なるタンパク質結合性試薬を含んでもよい。一部の実施形態では、複数のタンパク質結合性試薬は、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000種の異なるタンパク質結合性試薬を含んでもよく、または最大20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000種の異なるタンパク質結合性試薬を含んでもよい。

【0243】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合性試薬とコンジュゲートされる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合性試薬と共有結合でコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合性試薬と非共有結合でコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドをタンパク質結合性試薬に可逆的または不可逆的に付着させる化学基を含み得る。化学基は、例えば、アミン基を介してリンカーにコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、リンカーは、タンパク質結合性試薬にコンジュゲートした別の化学基と安定した結合を形成する化学基を含み得る。例えば、化学基は、UV光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミンなどであり得る。一部の実施形態では、化学基は、リシンなどのアミノ酸上の第一級アミン、またはN末端を介してタンパク質結合性試薬にコンジュゲートされ得る。オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合性試薬とそのタンパク質標的との間の特異的結合に干渉しない限り、タンパク質結合性試薬の任意の適切な部位にコンジュゲートされ得る。タンパク質結合性試薬が抗

10

20

30

40

50

体である実施形態では、オリゴヌクレオチドは、抗原結合部位、例えば、 F_c 領域、 C_H1 ドメイン、 C_H2 ドメイン、 C_H3 ドメイン、 C_L ドメインなど以外の抗体のどの部位にでもコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、各タンパク質結合性試薬は、単一のオリゴヌクレオチド分子にコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、各タンパク質結合性試薬は、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲のオリゴヌクレオチド分子と、または約2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされ得、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じ固有識別子を含む。一部の実施形態では、各タンパク質結合性試薬は、2つ以上のオリゴヌクレオチド分子、例えば、少なくとも、または最大2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、もしくは1000個のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされ得、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じ固有識別子を含む。

【0244】

一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）は、試料中の複数の細胞成分標的（例えば、タンパク質標的）に特異的に結合することが可能である。試料は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍試料、血液試料などであってもよく、またはこれらを含んでもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内タンパク質を含み得る。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、生物中のすべての細胞成分標的（例えば、発現されたまたは発現され得るタンパク質）のうちの1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲で存在してもよく、または約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲で存在してもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、生物中のすべての細胞成分標的（例えば、発現されたまたは発現され得るタンパク質）のうちの少なくとも、または最大1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分標的を含んでもよく、または約2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分標的を含んでもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、もしくは10000個の異なる細胞成分標的を含むか、または最大2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、もしくは10000個の異なる細胞成分標的を含んでもよい。

【0245】

オリゴヌクレオチドとコンジュゲートした細胞成分結合性試薬を使用する試料インデックス付与

本明細書の開示は、試料を識別するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、1つまたは複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分標的を含み、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試

薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；複数のバーコード（例えば、確率論的バーコード）を使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディング（例えば、確率論的にバーコーディング）して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む。

10

【0246】

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングすることは、複数のバーコードを試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを生成すること、および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。バーコードを伸長することは、DNAポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む得る。バーコードを伸長することは、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む得る。

20

【0247】

抗体にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド、抗体とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、または抗体に以前にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドは、本明細書において、抗体オリゴヌクレオチド（「AbOligo」）と称される。試料インデックス付与の文脈における抗体オリゴヌクレオチドは、本明細書において、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと称される。抗体オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした抗体は、本明細書において、ホット抗体またはオリゴヌクレオチド抗体と称される。抗体オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされていない抗体は、本明細書において、コールド抗体またはオリゴヌクレオチドフリー抗体と称される。結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド、結合性試薬とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、または結合性試薬に以前にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチドは、本明細書において、試薬オリゴヌクレオチドと称される。試料インデックス付与の文脈における試薬オリゴヌクレオチドは、本明細書において、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと称される。抗体オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした結合性試薬は、本明細書において、ホット結合性試薬またはオリゴヌクレオチド結合性試薬と称される。抗体オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされていない結合性試薬は、本明細書において、コールド結合性試薬またはオリゴヌクレオチドフリー結合性試薬と称される。

30

40

【0248】

図7は、試料インデックス付与のためにオリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を使用する例示的ワークフローの略図を示す。一部の実施形態では、各々が結合性試薬を含む複数の組成物705a、705bなどが提供される。結合性試薬は、タンパク質結合性試薬、例えば、抗体であり得る。細胞成分結合性試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質足場、またはそれらの組合せを含む得る。複数の組成物705a、705bの結合性試薬は、同一の細胞成分標的に結合し得る。例えば、複数の組成物705、705bの結合性試薬は、同一であり得る（結合性試薬に付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを除いて）。

50

【0249】

様々な組成物は、様々な試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした結合性試薬を含み得る。様々な組成物の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、様々な組成物の数は、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種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、様々な組成物の数は、少なくとも、または最大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、もしくは10000種であってもよい。

【0250】

一部の実施形態では、1つの組成物中の結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、同一の試料インデックス付与配列を含み得る。1つの組成物中の結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、同一でなくてもよい。一部の実施形態では、同一の試料インデックス付与配列を有する1つの組成物中の結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのパーセンテージは、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、同一の試料インデックス付与配列を有する1つの組成物中の結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも、または最大50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、もしくは99.9%であってもよい。

【0251】

組成物705aおよび705bは、様々な試料のうちの試料を標識するために使用され得る。例えば、組成物705a中の細胞成分結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、1つの試料インデックス付与配列を有してもよく、患者の試料などの試料707aにおいて、黒丸として示される細胞710aを標識するために使用され得る。組成物705b中の細胞成分結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、別の試料インデックス付与配列を有してもよく、別の患者の試料または同じ患者の別の試料

などの試料 707b において、陰影を付けた丸として示される細胞 710b を標識するために使用され得る。細胞成分結合性試薬は、細胞表面、例えば、細胞マーカー、B 細胞受容体、T 細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せ上の細胞成分標的またはタンパク質に特異的に結合し得る。未結合の細胞成分結合性試薬は、例えば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去され得る。

【0252】

次いで、細胞成分結合性試薬を有する細胞は、単一のコンパートメント 715a、715b が単一細胞 710a および単一のビーズ 720a または単一細胞 710b および単一のビーズ 720b に適合するように所定のサイズにされているマイクロウェルアレイなどの複数のコンパートメント中に分離され得る。各ビーズ 720a、720b は、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通する細胞標識、および分子標識配列を含み得る複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。一部の実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合性領域、例えば、ポリ(dT) 配列を含み得る。組成物 705a の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725a は、細胞成分結合性試薬から脱離可能であるかまたは脱離不可能であるように（またはそうであり得るように）構成され得る。組成物 705a の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725a は、化学的、光学的または他の手段を使用して細胞成分結合性試薬から脱離され得る。組成物 705b の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725b は、細胞成分結合性試薬から脱離可能であるかまたは脱離不可能であるように（またはそうであり得るように）構成され得る。組成物 705b の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725b は、化学的、光学的または他の手段を使用して細胞成分結合性試薬から脱離され得る。

【0253】

細胞 710a は、溶解されて、ゲノム DNA または細胞の mRNA 730a などの細胞 710a 内の核酸を放出し得る。溶解された細胞 735a を破線の丸として示す。細胞の mRNA 730a、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725a、またはその両方は、ビーズ 720a 上のオリゴヌクレオチドプローブによって、例えば、ポリ(dT) 配列にハイブリダイズすることによって捕捉され得る。逆転写酵素を使用して、細胞の mRNA 730a およびオリゴヌクレオチド 725a にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを細胞の mRNA 730a およびオリゴヌクレオチド 725a を鋳型として使用して伸長することができる。逆転写酵素によって生成された伸長産物は、増幅および配列決定に供され得る。

【0254】

同様に、細胞 710b は、溶解されて、ゲノム DNA または細胞の mRNA 730b などの細胞 710b 内の核酸を放出し得る。溶解された細胞 735b を破線の丸として示す。細胞の mRNA 730b、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725b、またはその両方は、ビーズ 720b 上のオリゴヌクレオチドプローブによって、例えば、ポリ(dT) 配列にハイブリダイズすることによって捕捉され得る。逆転写酵素を使用して、細胞の mRNA 730b およびオリゴヌクレオチド 725b にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを細胞の mRNA 730b およびオリゴヌクレオチド 725b を鋳型として使用して伸長することができる。逆転写酵素によって生成された伸長産物は、増幅および配列決定に供され得る。

【0255】

配列決定リードは、細胞標識、分子標識、遺伝子同一性、および試料同一性（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 725a および 725b の試料インデックス付与配列に関する）のデマルチプレクシングに供され得る。細胞標識、分子標識、および遺伝子同一性のデマルチプレクシングによって、試料中の各単一細胞の遺伝子発現のデジタルな表現を得ることができる。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列を使用する、細胞標識、分子標識、および試料同一性のデマルチプレクシン

グを使用して、試料起源を決定することができる。

【0256】

一部の実施形態では、細胞表面上の細胞成分結合性試薬に対する細胞成分結合性試薬は、固有試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのライブラリーにコンジュゲートされ、細胞に試料の同一性を保持させることができる。例えば、細胞表面マーカーに対する抗体は、固有試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのライブラリーにコンジュゲートされ、細胞に試料の同一性を保持させることができる。このことにより、複数の試料を同じ Rhapsody (商標) カートリッジ上にロードすることが可能となり、これは、試料供給源に関する情報がライブラリーの調製および配列決定を通して保持されるためである。試料インデックス付与は、複数の試料を単一の実験で一緒にランすること、単純化および実験時間の短縮化、ならびにバッチ効果の排除を可能にすることができる。

10

【0257】

本明細書の開示は、試料を識別するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、1つまたは複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分標的を含み、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；複数の試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去することを含む。本方法は、複数のバーコード (例えば、確率論的バーコード) を使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディング (例えば、確率論的にバーコーディング) して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む得る。

20

30

【0258】

一部の実施形態では、試料を識別するための方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、1つまたは複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分標的を含み、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；複数の試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去すること；および複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞うちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む。

40

【0259】

一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数のバーコード (例えば、確率論的バーコード) を使用して複数の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディング (例えば、確率論的にバーコーディング) して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得

50

ること；および複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、細胞の試料起源を識別することを含む。一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

【0260】

一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列の存在または非存在を識別することを含み得る。試料インデックス付与配列の存在または非存在の識別は、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および配列決定データ中の少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに対応する複数の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、細胞の試料起源を識別することを含む。

【0261】

一部の実施形態では、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製用アダプターを少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートさせることを含む。少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製することは、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートされた複製用アダプターを使用して、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含み得る。

【0262】

一部の実施形態では、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを生成すること、および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを伸長して、捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製することは、捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含み得る。

【0263】

細胞のオーバーローディングおよびマルチプレットの識別

本明細書の開示は、細胞のオーバーローディングおよびマルチプレットを識別するための方法、キットおよびシステムも含む。このような方法、キットおよびシステムは、例えば、オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を用いて細胞成分の発現レベル（例えば、タンパク質発現レベル）を測定するための方法、キットおよびシステムなどの、本明細書に開示された任意の適切な方法、キットおよびシステムにおいて、またはそれらと組み合わせて使用され得る。

【0264】

現在の細胞ローディング技術を使用すると、約20000個の細胞が約60000個の

10

20

30

40

50

マイクロウェルを有するマイクロウェルカートリッジまたはアレイにロードされる場合に、2つ以上の細胞を有するマイクロウェルまたは液滴の数（ダブレットまたはマルチプレットと称される）が最小限になり得る。しかし、ロードされた細胞の数が増加すると、複数の細胞を有するマイクロウェルまたは液滴の数が著しく増加する場合がある。例えば、約50000個の細胞がマイクロウェルカートリッジまたはアレイの約60000個のマイクロウェルにロードされる場合、複数の細胞を有するマイクロウェルのパーセンテージはかなり高く、例えば、11～14%になり得る。このように多数の細胞をマイクロウェル中にロードすることは、細胞のオーバーローディングと称される場合がある。しかし、細胞をいくつかの群（例えば、5）に分割し、各群の細胞が別個の試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドで標識される場合、2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している細胞標識（例えば、確率論的バーコードなどのバーコードの細胞標識）は、配列決定データにおいて識別され、かつ次の処理から除去され得る。一部の実施形態では、細胞を多数の群（例えば、10000）に分割し、各群の細胞が別個の試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドで標識される場合、2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している試料標識は、配列決定データにおいて識別され、かつ次の処理から除去され得る。一部の実施形態では、様々な細胞が別個の細胞識別配列を有する細胞識別オリゴヌクレオチドで標識され、2つ以上の細胞識別オリゴヌクレオチドに付随している細胞識別配列は、配列決定データにおいて識別され、かつ次の処理から除去され得る。マイクロウェルカートリッジまたはアレイにおけるマイクロウェルの数に対して、このような多数の細胞をマイクロウェル中にロードすることができる。

10

20

【0265】

本明細書の開示は、試料を識別するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、第1の複数の細胞および第2の複数の細胞をそれぞれ2つの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、第1の複数の細胞の各々と第2の複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分を含み、2つの試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分のうちの少なくとも1つに特異的に結合可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、かつ2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列が異なる配列を含む、こと；複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することであって、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、および標的結合性領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードのバーコード配列は、異なる配列を含み、かつ複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；ならびに得られた配列決定データにおいて、各々が2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している1つまたは複数の細胞標識配列を識別すること；ならびに得られた配列決定データから、各々が2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している1つまたは複数の細胞標識配列に関連した配列決定データを除去し、かつ／または次の分析（例えば、単一細胞mRNAプロファイリング、または全トランスクリプトーム分析）から、各々が2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している1つまたは複数の細胞標識配列に関連した配列決定データを除くことを含む。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含む。

30

40

【0266】

例えば、本方法は、試料インデックス付与を使用して、50000個以上の細胞（10000～20000個の細胞と比較して）をロードするために使用され得る。試料インデックス付与により、細胞成分（例えば、ユニバーサルタンパク質マーカー）に対するオリ

50

ゴヌクレオチドとコンジュゲートした細胞成分結合性試薬（例えば、抗体）または細胞成分結合性試薬を使用して、異なる試料由来の細胞を固有試料インデックスで標識することができる。異なる試料由来の2つ以上の細胞、試料の異なる細胞集団由来の2つ以上の細胞、または試料の2つ以上の細胞が、同じマイクロウェルまたは液滴において捕捉される場合、合わせた「細胞」（または2つ以上の細胞の内容物）には、異なる試料インデックス付与配列（または異なる細胞識別配列を有する細胞識別オリゴヌクレオチド）を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに付随させ得る。異なる細胞集団の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、異なる集団の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、異なる集団の数は、少なくとも、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100であってもよい。各集団における細胞の数、または平均数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、各集団における細胞の数、または平均数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、各集団における細胞の数、または平均数は、少なくとも、または最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、もしくは100個であってもよい。各集団における細胞の数、または平均数が十分に少ない（例えば、集団当たり50、25、10、5、4、3、2、もしくは1個の細胞に等しいか、またはそれより少ない）場合、細胞のオーバーローディングおよびマルチプレットの識別のための試料インデックス付与組成物は、細胞識別組成物と称されてもよい。

【0267】

試料の細胞を複数の集団へと等分することによって、試料の細胞を複数の集団へと分割してもよい。配列決定データにおいて2つ以上の試料インデックス付与配列が付随している「細胞」は、配列決定データにおいて1つの細胞標識配列（例えば、バーコード、例えば、確率論的バーコードの細胞標識配列）が付随している2つ以上の試料インデックス付与配列に基づいて、「マルチプレット」として識別され得る。合わせた「細胞」の配列決定データもまた、本明細書において、マルチプレットと呼ばれる。マルチプレットは、ダブレット、トリプレット、カルテット、クインテット、セクステット、セプテット、オクテット、ノネット、またはそれらの任意の組合せであり得る。マルチプレットは、任意のn-プレットであってもよい。一部の実施形態では、nは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の範囲であるか、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の範囲である。一部の実施形態では、nは、少なくとも、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20である。

【0268】

単一細胞の発現プロファイルを決定する場合、2つの細胞は1つの細胞として識別することができる。2つの細胞の発現プロファイルは、1つの細胞の発現プロファイルとして識別し得る（ダブレット発現プロファイルと称される）。例えば、バーコーディング（例えば、確率論的バーコーディング）を使用して、2つの細胞の発現プロファイルを決定する場合、2つの細胞のmRNA分子には、同じ細胞標識を有するバーコードが付随し得る。別の例として、2つの細胞には、1つの粒子（例えば、ビーズ）が付随し得る。粒子は、

同じ細胞標識を有するバーコードを含み得る。細胞を溶解させた後、2つの細胞のmRNA分子には、粒子のバーコードが付随し、よって、同じ細胞標識が付随し得る。ダブレット発現プロファイルは、発現プロファイルの解釈を歪める場合がある。

【0269】

ダブレットは、異なる試料インデックス付与配列を有する2つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。ダブレットはまた、2つの試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。異なる配列の2つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している2つの細胞（または2つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している2つ以上の細胞）が、同じマイクロウェルまたは液滴中に捕捉される場合にダブレットが起こる可能性があり、合わせた「細胞」には、異なる試料インデックス付与配列を有する2つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随し得る。トリプレットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する3つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または3つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。カルテットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する4つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または4つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。クインテットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する5つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または5つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。セクステットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する6つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または6つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。セプテットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する7つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または7つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。オクテットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する8つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または8つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。ノネットは、すべてが異なる試料インデックス付与配列を有する9つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」、または9つの異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している合わせた「細胞」を指し得る。異なる配列の2つ以上の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している2つ以上の細胞（または2つ以上の異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している2つ以上の細胞）が、同じマイクロウェルまたは液滴中に捕捉される場合にマルチプレットが起こる可能性があり、合わせた「細胞」には、2つ以上の異なる試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随し得る。

【0270】

別の例として、試料をオーバーローディングする状況またはマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするもしくは細胞を含有する液滴を生成する状況であるかに関わらず、本方法は、マルチプレットの識別のために使用することができる。2つ以上の細胞が1つのマイクロウェル中にロードされる場合、合わせた「細胞」（または2つ以上の細胞の内容物）から得られるデータは、異常な遺伝子発現プロファイルを有するマルチプレットである。試料インデックス付与を使用することによって、異なる試料インデックス付与配列を有する2つ以上の試料インデックス付与オリゴヌクレオチド（または2つ

以上の試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチド)に各々が付随しているかまたは割り当てられている細胞標識を探すことにより、これらのマルチプレットの一部を認識することができる。試料インデックス付与配列と共に、本明細書に開示された方法を、マルチプレットの識別のために使用することができる(試料をオーバーローディングするかしないかの状況、またはマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするかもしれない細胞を含有する液滴を生成する状況であるかに関わらず)。一部の実施形態では、本方法は、第1の複数の細胞および第2の複数の細胞をそれぞれ2つの試料インデックス付与組成物と接触させることであり、第1の複数の細胞の各々と第2の複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分を含み、2つの試料インデックス付与組成物の各々は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分のうちの少なくとも1つに特異的に結合可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、かつ2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列が異なる配列を含む、こと；複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することであり、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列、バーコード配列(例えば、分子標識配列)、および標的結合性領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードのバーコード配列は、異なる配列を含み、かつ複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；ならびに得られた配列決定データにおいて、各々が2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している1つまたは複数のマルチプレット細胞標識配列を識別することを含む。

【0271】

マイクロウェルカートリッジのマイクロウェルにまたはマイクロフルイディクスデバイスを使用して生成された液滴中にロードされ得る細胞の数は、マルチプレット率によって制限され得る。より多くの細胞をロードすることによって、識別するのが困難で、単一細胞データにおいてノイズを生成し得る、より多くのマルチプレットを引き起こす可能性がある。試料インデックス付与と共に、本方法は、マルチプレットをより正確に標識するかまたは識別し、かつ配列決定データまたは次の分析からマルチプレットを除去するために使用することができる。より高い信頼度でマルチプレットを識別することによって、マルチプレット率に関するユーザ許容度を増大させることができ、かつ各マイクロウェルカートリッジまたは各々が少なくとも1つの細胞を有する生成中の液滴により多くの細胞をロードすることができる。

【0272】

一部の実施形態では、第1の複数の細胞および第2の複数の細胞をそれぞれ2つの試料インデックス付与組成物と接触させることは、第1の複数の細胞を2つの試料インデックス付与組成物のうちの第1の試料インデックス付与組成物と接触させること；および第1の複数の細胞を2つの試料インデックス付与組成物のうちの第2の試料インデックス付与組成物と接触させることを含む。複数の細胞の数および複数の試料インデックス付与組成物の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞および／または試料インデックス付与組成物の数は、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、10000、100000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、10000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞および／または試料インデックス付与組成物の数は、少なくとも

、または最大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、10000、100000、もしくは1000000種であってもよい。細胞の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、細胞の数、または平均数は、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、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、細胞の数、または平均数は、少なくとも、または最大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、10000、100000、1000000、もしくは10000000個であってもよい。

【0273】

一部の実施形態では、本方法は、2つの試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去することを含む。未結合試料インデックス付与組成物を除去することは、第1の複数の細胞および第2の複数の細胞のうちの細胞を洗浄緩衝液で洗浄することを含み得る。未結合試料インデックス付与組成物を除去することは、フローサイトメトリーを使用して2つの試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも1つの細胞成分結合性試薬に結合した細胞を選択することを含み得る。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を溶解することを含む。

【0274】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬から脱離可能であるかまたは脱離不可能であるように（またはそうであり得るように）構成される。本方法は、細胞成分結合性試薬から試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを脱離させることを含み得る。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを脱離させることは、UV光切断、化学処理（例えば、ジチオトレイトールなどの還元試薬を使用する）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、細胞成分結合性試薬から試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを脱離させることを含み得る。

【0275】

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングすることは、複数のバーコードを、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを生成すること；および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。バーコードを伸長することは、DNAポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含み得る。バーコードを伸長することは、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含み得る。

【0276】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成することを含む。複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを増幅することは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、バーコード配列（例えば、分子標識配列）の少なくとも一部および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅することを含み得る。一部の実施形態では、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決

定データを得ることは、複数のアンプリコンの配列決定データを得ることを含み得る。配列決定データを得ることは、バーコード配列の少なくとも一部および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を配列決定することを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、複数のバーコード化標的の試料起源を識別することを含む。

【0277】

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的をバーコーディングして、複数のバーコード化標的を生成することであって、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；およびバーコード化標的の配列決定データを得ることを含む。複数のバーコードを使用して複数の標的をバーコーディングして、複数のバーコード化標的を生成することは、標的のコピーをバーコードの標的結合性領域と接触させること；および複数のバーコードを使用して複数の標的を逆転写して、複数の逆転写標的を生成することを含み得る。

【0278】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化標的の配列決定データを得る前に、バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成することを含む。バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成することは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってバーコード化標的を増幅することを含み得る。複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的をバーコーディングして、複数のバーコード化標的を生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、細胞の複数の標的を確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化標的を生成することを含み得る。

【0279】

一部の実施形態では、細胞を識別するための方法は、第1の複数の1つまたは複数の細胞および第2の複数の1つまたは複数の細胞をそれぞれ2つの細胞識別組成物と接触させることであって、第1の複数の1つまたは複数の細胞の各々と第2の複数の1つまたは複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分を含み、2つの細胞識別組成物の各々は、細胞識別オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、細胞識別オリゴヌクレオチドは、細胞識別配列を含み、2つの細胞識別組成物の細胞識別配列は異なる配列を含む、こと；複数のバーコードを使用して細胞識別オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することであって、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、および標的結合性領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードのバーコード配列は、異なる配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；ならびに得られた配列決定データにおいて、各々に2つ以上の細胞識別配列が付随している1つまたは複数の細胞標識配列を識別すること；ならびに得られた配列決定データから、各々に2つ以上の細胞識別配列が付随している1つまたは複数の細胞標識配列に関連した配列決定データを除去し、および／または次の分析（例えば、単一細胞mRNAプロファイリング、または全トランスクリプトーム分析）から、各々に2つ以上の細胞識別配列が付随している1つまたは複数の細胞標識配列に関連した配列決定データを除くことを含む。一部の実施形態では

、細胞識別オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【0280】

異なる配列の2つ以上の細胞識別オリゴヌクレオチドが付随している2つ以上の細胞（または2つ以上の異なる細胞識別配列を有する細胞識別オリゴヌクレオチドが付随している2つ以上の細胞）が、同じマイクロウェルまたは液滴中で捕捉される場合にマルチプレット（例えば、ダブルレット、トリプレットなど）が起こる可能性があり、合わせた「細胞」には、2つ以上の異なる細胞識別配列を有する細胞識別オリゴヌクレオチドが付随し得る。

【0281】

細胞をオーバーローディングする状況またはマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をローディングするかもしれない細胞を含有する液滴を生成する状況であるかに関わらず、細胞識別組成物をマルチプレット識別のために使用することができる。2つ以上の細胞が1つのマイクロウェル中にロードされる場合、合わせた「細胞」（または2つ以上の細胞の内容物）から得られるデータは、異常な遺伝子発現プロファイルを有するマルチプレットである。細胞識別を使用することによって、異なる細胞識別配列を有する2つ以上の細胞識別オリゴヌクレオチド（または2つ以上の細胞識別配列を有する細胞識別オリゴヌクレオチド）が各々に付随しているか、または割り当てられている細胞標識（例えば、確率論的バーコードなどのバーコードの細胞標識）を探すことによって、これらのマルチプレットの一部を認識することができる。細胞識別配列と共に、本明細書に開示された方法を、マルチプレットの識別のために使用することができる（試料をオーバーローディングするかしないかの状況、またはマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするかもしれない細胞を含有する液滴を生成する状況であるかに関わらず）。一部の実施形態では、本方法は、第1の複数の1つまたは複数の細胞および第2の複数の1つまたは複数の細胞をそれぞれ2つの細胞識別組成物と接触させることであって、第1の複数の1つまたは複数の細胞の各々と第2の複数の1つまたは複数の細胞の各々は、1つまたは複数の細胞成分を含み、2つの細胞識別組成物の各々は、細胞識別オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含み、細胞成分結合性試薬は、1つまたは複数の細胞成分のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、細胞識別オリゴヌクレオチドは、細胞識別配列を含み、2つの細胞識別組成物の細胞識別配列は異なる配列を含む、こと；複数のバーコードを使用して細胞識別オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することであって、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、および標的結合性領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードのバーコード配列は、異なる配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；ならびに得られた配列決定データにおいて、各々に2つ以上の細胞識別配列が付随している1つまたは複数のマルチプレット細胞標識配列を識別することを含む。

【0282】

マイクロウェルカートリッジのマイクロウェルにまたはマイクロフルイディクスデバイスを使用して生成された液滴中にロードされ得る細胞の数は、マルチプレット率によって制限され得る。より多くの細胞をロードすることによって、識別するのが困難で、単一細胞データにおいてノイズを生成し得る、より多くのマルチプレットを引き起こす可能性がある。細胞識別と共に、本方法は、マルチプレットをより正確に標識するかまたは識別し、かつ配列決定データまたは次の分析からマルチプレットを除去するために使用することができる。より高い信頼度でマルチプレットを識別することによって、マルチプレット率に関するユーザ許容度を増大させることができ、かつ各マイクロウェルカートリッジまたは各々が少なくとも1つの細胞を有する生成中の液滴により多くの細胞をロードすることができる。

【0283】

一部の実施形態では、第1の複数の1つまたは複数の細胞および第2の複数の1つまたは複数の細胞をそれぞれ2つの細胞識別組成物と接触させることは、第1の複数の1つまたは複数の細胞を2つの細胞識別組成物のうちの第1の細胞識別組成物と接触させること；および第1の複数の1つまたは複数の細胞を2つの細胞識別組成物のうちの第2の細胞識別組成物と接触させることを含む。複数の細胞識別組成物の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、細胞識別組成物の数は、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、10000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、10000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、細胞識別組成物の数は、少なくとも、または最大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、10000、100000、1000000、もしくは10000000種であってもよい。複数の1つまたは複数の細胞の各々における細胞の数、または平均数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、複数の1つまたは複数の細胞の各々における細胞の数、または平均数は、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、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、複数の1つまたは複数の細胞の各々における細胞の数、または平均数は、少なくとも、または最大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、10000、100000、1000000、もしくは10000000個であってもよい。

【0284】

一部の実施形態では、本方法は、2つの細胞識別組成物のうちの未結合細胞識別組成物を除去することを含む。未結合細胞識別組成物を除去することは、第1の複数の1つまたは複数の細胞および第2の複数の1つまたは複数の細胞の細胞を洗浄緩衝液で洗浄することを含み得る。未結合細胞識別組成物を除去することは、フローサイトメトリーを使用して2つの細胞識別組成物のうちの少なくとも1つの細胞成分結合性試薬に結合した細胞を選択することを含み得る。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を溶解することを含む。

【0285】

一部の実施形態では、細胞識別オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬から脱離可能であるかまたは脱離不可能であるように（またはそうであり得るように）構成される。本方法は、細胞成分結合性試薬から細胞識別オリゴヌクレオチドを脱離させることを含み得る。細胞識別オリゴヌクレオチドを脱離させることは、UV光切断、化学処理（例えば、ジチオトレイトールなどの還元試薬を使用する）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、細胞成分結合性試薬から細胞識別オリゴヌクレオチドを脱離させることを含み得る。

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して細胞識別オリゴヌクレオチドをバーコーディングすることは、複数のバーコードを、細胞識別オリゴヌクレオチドと接触させ

て、細胞識別オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを生成すること；および細胞識別オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長して、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することを含む。バーコードを伸長することは、DNAポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することを含み得る。バーコードを伸長することは、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することを含み得る。

【0286】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成することを含む。複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを増幅することは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、バーコード配列（例えば、分子標識配列）の少なくとも一部および細胞識別オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅することを含み得る。一部の実施形態では、複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ることは、複数のアンプリコンの配列決定データを得ることを含み得る。配列決定データを得ることは、バーコード配列の少なくとも一部および細胞識別オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を配列決定することを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、少なくとも1つのバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドの細胞識別配列に基づいて、複数のバーコード化標的の試料起源を識別することを含む。

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して細胞識別オリゴヌクレオチドをバーコーディングして複数のバーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、細胞識別オリゴヌクレオチドを確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化細胞識別オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

【0287】

アプタマーによる細胞成分のプロファイリング方法

本明細書の開示は、アプタマーを使用して、細胞成分の発現（例えば、細胞内タンパク質発現を含む、細胞内での細胞成分の発現）をプロファイリングするための方法の実施形態を含む。図8A～8Eは、細胞成分の発現（例えば、タンパク質発現）を決定するためにオリゴヌクレオチドが付随している（例えば、コンジュゲートした）アプタマーを使用する例示的ワークフローの略図を示す。一部の実施形態では、本方法は、任意の単一細胞RNA配列決定方法（BD Rhapsody（商標）などの任意の単一細胞3'RNA配列決定方法、および単一細胞5'RNA配列決定方法を含む）と共に使用することができる。一部の実施形態では、本方法は、細胞を固定および透過処理する必要なく（例えば、細胞を部分的または完全に固定および／または透過処理する必要なく）、単一細胞RNA配列決定方法と共に使用することができる。

【0288】

一部の実施形態では、アプタマー804は、一本鎖ポリヌクレオチド804ss（例えば、リボ核酸（RNA）またはデオキシリボ核酸（DNA））であってもよい。一本鎖ポリヌクレオチドは、例えば、100ヌクレオチド長であってもよい。一本鎖ポリヌクレオチドの長さは、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、一本鎖ポリヌクレオチドは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、25

0、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、一本鎖ヌクレオチドは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530

10

20

30

40

50

、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。アプタマー804は、標的808、例えば、細胞成分標的808（例えば、タンパク質標的）を認識することができる3次元構造804へとフォールディングされ得る。

【0289】

一部の実施形態では、標的細胞内成分（例えば、細胞内タンパク質）に特異的なアプタマー804は、金ナノ粒子812に付随（例えば、結合またはコンジュゲート）していてもよい（図8Bを参照のこと）。このように付随させることによって、アプタマー804の細胞816への取り込みが可能となり得る。アプタマー804が細胞816へと取り込まれた後、アプタマー804は金ナノ粒子816から解離し、アプタマー804の標的に結合し得る。

【0290】

一部の実施形態では、アプタマー804は、アプタマー標的結合性領域804t（すなわち、アプタマーの細胞成分標的に結合することが可能である）、ユニバーサルプライマー結合部位804h（例えば、PCRハンドル、完全または部分的なIllumina R2および／またはP7配列）、識別子配列804i（本明細書において、アプタマーバーコードとも称される）、および単一細胞3'RNA配列決定プラットフォーム（例えば、BD Rhapsody（商標））を使用してアプタマーの捕捉および増幅を可能にするポリ（dA）テイル804a（図8Cおよび9を参照のこと）を含有する単一のポリヌクレオチドである。一部の実施形態では、アプタマーバーコードとポリ（dA）との間には、ポリ（dA）テイルをバーコードのオリゴ（dT）配列にアラインするための複数のヌクレオチド804bが存在する（本明細書において、アラインメント配列と称される）。複数のヌクレオチドの各々は、アデノシンでなくてもよい（例えば、グアニン、シトシン、チミン、およびウラシル）。一部の実施形態では、1つのポリヌクレオチドはアプタマー標的結合性領域を含み、第2のポリヌクレオチドは、ユニバーサルプライマー結合部位、識別子配列、アラインメント配列、およびポリ（dA）テイルを含む。

【0291】

一部の実施形態では、標的細胞成分（例えば、タンパク質分子）に結合していない過剰なアプタマーは、除去され得る。例えば、図8Dに示されるように、アプタマー804は、各々がヘアピン構造820を形成し得るように設計されてもよく、その結果、ポリ（dA）テイル804aは、標的細胞成分（この図で示すタンパク質標的824）に結合することによって誘導される立体構造の変化が生じた際のみアクセス可能となり得る。未結合のアプタマー820はいずれも、バーコードのオリゴ（dT）配列にハイブリダイズすることができない（例えば、3'RNA配列決定捕捉ビーズに付随している確率論的バーコードなどのバーコードのオリゴ（dT）配列）。別の例として、センスアプタマー送達の後、アンチセンスアプタマーを導入し（例えば、細胞中に）、未結合のアプタマーを吸い取り、RNA配列決定捕捉ビーズ上に捕捉することができない二本鎖ヌクレオチド（例えば、二本鎖DNA、二本鎖RNA、DNA/RNAハイブリッド）を生成することができる。

【0292】

別の例として、図8Eに示されるように、例えば、アプタマー804の配列またはその下位配列に相補的な（例えば、部分的にまたは完全に）タンデム配列828を有するベクターを使用して、アプタマー「スポンジ」828を細胞中に導入することができる。アプタマー配列（またはその下位配列）に相補的なタンデム配列828とアプタマー配列（またはその下位配列）との間の配列同一性は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。未結合のアプタマーは、アプタマー配列に相補的なタンデム配列828に結合し、凝集し、かつ細胞において分解の標的とされ得る。よって、アプタマーは、細

胞成分標的に結合していないアプタマーを吸収することができる。一部の実施形態では、アプタマー配列（またはその下位配列）に対する相補配列 8 2 8 とアプタマー配列（またはその下位配列）との間の配列同一性は、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % もしくはこれらの値のいずれか 2 つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約 5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % もしくはこれらの値のいずれか 2 つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、アプタマー配列（またはその下位配列）に対する相補配列 8 2 8 とアプタマー配列（またはその下位配列）との間の配列同一性は、少なくとも、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % であってもよく、または最大 5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % であってもよい。

【0 2 9 3】

本明細書の開示は、細胞中でタンパク質発現を測定するための方法の実施形態である。一部の実施形態では、本方法は、複数のタンパク質結合性アプタマー（例えば、図 8 C および 9 に関して記載されたアプタマー標的結合性領域 8 0 4 t）を複数のタンパク質標的を含む複数の細胞（例えば、図 8 B に関して記載された細胞 8 1 6）と接触させることであって、複数のタンパク質結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列（例えば、アプタマー識別子または図 8 C および 9 に関して記載されたバーコード 8 0 4 i）を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、タンパク質結合性アプタマーは、複数のタンパク質標的のうちの少なくとも 1 つに特異的に結合することが可能である、ことを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数のタンパク質結合性アプタマーが付随している複数の細胞（例えば、図 8 B に関して記載された細胞 8 1 6）を複数の区画に分配することであって、複数の区画のうちの区画は、タンパク質結合性アプタマーが付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブ（例えば、図 1 に関して記載されたバーコード 1 0 4）を含む、こと；アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、標識化核酸の各々は、固有識別子配列、またはその相補配列、およびバーコード配列を含む、こと；ならびに複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、複数の細胞の 1 つまたは複数における、複数のタンパク質標的の 1 つまたは複数の量を決定することを含む。

【0294】

本明細書の開示は、細胞において細胞成分の発現を測定する方法の実施形態を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の細胞成分結合性アプタマー（例えば、図8A～8Eおよび9に関して記載されたアプタマー804）を複数の細胞成分標的を含む複数の細胞（例えば、図8Bに関して記載された細胞816）と接触させることであって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列（例えば、図8Cおよび9に関して記載されたアプタマー識別子またはバーコード804i）を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブ（例えば、図1に関して記載されたバーコード104）を伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、標識化核酸の各々は、固有識別子配列、またはその相補配列、およびバーコード配列を含む、こと；ならびに複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、複数の細胞の1つまたは複数における、複数の細胞成分標的の1つまたは複数の量を決定することを含む。

【0295】

アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマー標的結合性領域804tを含まないポリヌクレオチド、例えば、PCRハンドル804h（例えば、完全または部分的なIllumina R2および／またはP7配列）、識別子配列804i（本明細書において、アプタマーバーコードとも称される）、アラインメント配列804a、および／またはポリ（dA）テイル804aを含むポリヌクレオチドを指し得る。一部の実施形態では、図9に関して示されるように、アプタマー標的結合性領域804tおよびアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、1つの単一のポリヌクレオチドを形成し得る。

【0296】

アプタマー（またはアプタマー標的結合性領域）の長さは、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、アプタマーの長さは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000、6100、6200、6300、6400、6500、6600、6700、6800、6900、7000、7100、7200、7300、7400、7500、7600、7700、7800、7900、8000、8100、8200、8300、8400、8500、8600、8700、8800、8900、9000、9100、9200、9300、9400、9500、9600、9700、9800、9900、10000、11000、12000、13000、14000、15000、16000、17000、18000、19000、20000、21000、22000、23000、24000、25000、26000、27000、28000、29000、30000、41000、42000、43000、44000、45000、46000、47000、48000、49000、50000、51000、52000、53000、54000、55000、56000、57000、58000、59000、60000、61000、62000、63000、64000、65000、66000、67000、68000、69000、70000、71000、72000、73000、74000、75000、76000、77000、78000、79000、80000、81000、82000、83000、84000、85000、86000、87000、88000、89000、90000、91000、92000、93000、94000、95000、96000、97000、98000、99000、100000、110000、120000、130000、140000、150000、160000、170000、180000、190000、200000、210000、220000、230000、240000、250000、260000、270000、280000、290000、300000、410000、420000、430000、440000、450000、460000、470000、480000、490000、500000、510000、520000、530000、540000、550000、560000、570000、580000、590000、600000、610000、620000、630000、640000、650000、660000、670000、680000、690000、700000、710000、720000、730000、740000、750000、760000、770000、780000、790000、800000、810000、820000、830000、840000、850000、860000、870000、880000、890000、900000、910000、920000、930000、940000、950000、960000、970000、980000、990000、1000000、1100000、1200000、1300000、1400000、1500000、1600000、1700000、1800000、1900000、2000000、2100000、2200000、2300000、2400000、2500000、2600000、2700000、2800000、2900000、3000000、4100000、4200000、4300000、4400000、4500000、4600000、4700000、4800000、4900000、5000000、5100000、5200000、5300000、5400000、5500000、5600000、5700000、5800000、5900000、6000000、6100000、6200000、6300000、6400000、6500000、6600000、6700000、6800000、6900000、7000000、7100000、7200000、7300000、7400000、7500000、7600000、7700000、7800000、7900000、8000000、8100000、8200000、8300000、8400000、8500000、8600000、8700000、8800000、8900000、9000000、9100000、9200000、9300000、9400000、9500000、9600000、9700000、9800000、9900000、10000000、11000000、12000000、13000000、14000000、15000000、16000000、17000000、18000000、19000000、20000000、21000000、22000000、23000000、24000000、25000000、26000000、27000000、28000000、29000000、30000000、41000000、42000000、43000000、44000000、45000000、46000000、47000000、48000000、49000000、50000000、51000000、52000000、53000000、54000000、55000000、56000000、57000000、58000000、59000000、60000000、61000000、62000000、63000000、64000000、65000000、66000000、67000000、68000000、69000000、70000000、71000000、72000000、73000000、74000000、75000000、76000000、77000000、78000000、79000000、80000000、81000000、82000000、83000000、84000000、85000000、86000000、87000000、88000000、89000000、90000000、91000000、92000000、93000000、94000000、95000000、96000000、97000000、98000000、99000000、100000000、110000000、120000000、130000000、140000000、150000000、160000000、170000000、180000000、190000000、200000000、210000000、220000000、230000000、240000000、250000000、260000000、270000000、280000000、290000000、300000000、410000000、420000000、430000000、440000000、450000000、460000000、470000000、480000000、490000000、500000000、510000000、520000000、530000000、540000000、550000000、560000000、570000000、580000000、590000000、600000000、610000000、620000000、630000000、640000000、650000000、660000000、670000000、680000000、690000000、700000000、710000000、720000000、730000000、740000000、750000000、760000000、770000000、780000000、790000000、800000000、810000000、820000000、830000000、840000000、850000000、860000000、870000000、880000000、890000000、900000000、910000000、920000000、930000000、940000000、950000000、960000000、970000000、980000000、990000000、1000000000、1100000000、1200000000、1300000000、1400000000、1500000000、1600000000、1700000000、1800000000、1900000000、2000000000、2100000000、2200000000、2300000000、2400000000、2500000000、2600000000、2700000000、2800000000、2900000000、3000000000、4100000000、4200000000、4300000000、4400000000、4500000000、4600000000、4700000000、4800000000、4900000000、5000000000、5100000000、5200000000、5300000000、5400000000、5500000000、5600000000、5700000000、5800000000、5900000000、6000000000、6100000000、6200000000、6300000000、6400000000、6500000000、6600000000、6700000000、6800000000、6900000000、7000000000、7100000000、7200000000、7300000000、7400000000、7500000000、7600000000、7700000000、7800000000、7900000000、8000000000、8100000000、8200000000、8300000000、8400000000、8500000000、8600000000、8700000000、8800000000、8900000000、9000000000、9100000000、9200000000、9300000000、9400000000、9500000000、9600000000、9700000000、9800000000、9900000000、10000000000、11000000000、12000000000、13000000000、14000000000、15000000000、16000000000、17000000000、18000000000、19000000000、20000000000、21000000000、22000000000、23000000000、24000000000、25000000000、26000000000、27000000000、28000000000、29000000000、30000000000、41000000000、42000000000、43000000000、44000000000、45000000000、46000000000、47000000000、48000000000、49000000000、50000000000、51000000000、52000000000、53000000000、54000000000、55000000000、56000000000、57000000000、58000000000、59000000000、60000000000、61000000000、62000000000、63000000000、64000000000、65000000000、66000000000、67000000000、68000000000、69000000000、70000000000、71000000000、72000000000、73000000000、74000000000、75000000000、76000000000、77000000000、78000000000、79000000000、80000000000、81000000000、82000000000、83000000000、84000000000、85000000000、86000000000、87000000000、88000000000、89000000000、90000000000、91000000000、92000000000、93000000000、94000000000、95000000000、96000000000、97000000000、98000000000、99000000000、100000000000、110000000000、120000000000、130000000000、140000000000、150000000000、160000000000、170000000000、180000000000、190000000000、200000000000、210000000000、220000000000、230000000000、240000000000、250000000000、260000000000、270000000000、280000000000、290000000000、300000000000、410000000000、420000000000、430000000000、440000000000、450000000000、460000000000、470000000000、480000000000、490000000000、500000000000、510000000000、520000000000、530000000000、540000000000、550000000000、560000000000、570000000000、580000000000、590000000000、600000000000、610000000000、620000000000、630000000000、640000000000、650000000000、660000000000、670000000000、680000000000、690000000000、700000000000、710000000000、720000000000、730000000000、740000000000、750000000000、760000000000、770000000000、780000000000、790000000000、800000000000、810000000000、820000000000、830000000000、840000000000、850000000000、860000000000、870000000000、880000000000、890000000000、900000000000、910000000000、920000000000、930000000000、940000000000、950000000000、960000000000、970000000000、980000000000、990000000000、1000000000000、1100000000000、1200000000000、1300000000000、1400000000000、1500000000000、1600000000000、1700000000000、1800000000000、1900000000000、2000000000000、2100000000000、2200000000000、2300000000000、2400000000000、2500000000000、2600000000000、2700000000000、2800000000000、2900000000000、3000000000000、4100000000000、4200000000000、4300000000000、4400000000000、4500000000000、4600000000000、4700000000000、4800000000000、4900000000000、5000000000000、5100000000000、5200000000000、5300000000000、5400000000000、5500000000000、5600000000000、5700000000000、5800000000000、5900000000000、6000000000000、6100000000000、6200000000000、6300000000000、6400000000000、6500000000000、6600000000000、6700000000000、6800000000000、6900000000000、7000000000000、7100000000000、7200000000000、7300000000000、7400000000000、7500000000000、7600000000000、7700000000000、7800000000000、7900000000000、8000000000000、8100000000000、8200000000000、8300000000000、8400000000000、8500000000000、8600000000000、8700000000000、8800000000000、8900000000000、9000000000000、9100000000000、9200000000000、9300000000000、9400000000000、9500000000000、9600000000000、9700000000000、9800000000000、9900000000000、10000000000000、11000000000000、12000000000000、13000000000000、14000000000000、15000000000000、16000000000000、17000000000000、18000000000000、19000000000000、20000000000000、21000000000000、22000000000000、23000000000000、24000000000000、25000000000000、26000000000000、27000000000000、28000000000000、29000000000000、30000000000000、41000000000000、42000000000000、43000000000000、44000000000000、45000000000000、46000000000000、47000000000000、48000000000000、49000000000000、50000000000000、51000000000000、52000000000000、53000000000000、54000000000000、55000000000000、56000000000000、57000000000000、58000000000000、59000000000000、60000000000000、61000000000000、62000000000000、63000000000000、64000000000000、65000000000000、66000000000000、67000000000000、68000000000000、69000000000000、70000000000000、71000000000000、72000000000000、73000000000000、74000000000000、75000000000000、76000000000000、77000000000000、78000000000000、79000000000000、80000000000000、81000000000000、82000000000000、83000000000000、84000000000000、85000000000000、86000000000000、87000000000000、88000000000000、89000000000000、90000000000000、91000000000000、92000000000000、93000000000000、94000000000000、95000000000000、96000000000000、97000000000000、98000000000000、99000000000000、100000000000000、110000000000000、120000000000000、130000000000000、140000000000000、150000000000000、160000000000000、170000000000000、180000000000000、190000000000000、200000000000000、210000000000000、220000000000000、230000000000000、240000000000000、250000000000000、260000000000000、270000000000000、280000000000000、290000000000000、300000000000000、410000000000000、420000000000000、430000000000000、440000000000000、450000000000000、460000000000000、470000000000000、480000000000000、490000000000000、500000000000000、510000000000000、520000000000000、530000000000000、540000000000000、550000000000000、560000000000000、570000000000000、580000000000000、590000000000000、600000000000000、610000000000000、620000000000000、630000000000000、640000000000000、650000000000000、660000000000000、670000000000000、680000000000000、690000000000000、700000000000000、710000000000000、720000000000000、730000000000000、740000000000000、750000000000000、760000000000000、770000000000000、780000000000000、790000000000000、800000000000000、810000000000000、820000000000000、830000000000000、840000000000000、850000000000000、860000000000000、870000000000000、880000000000000、890000000000000、900000000000000、910000000000000、920000000000000、930000000000000、940000000000000、950000000000000、960000000000000、970000000000000、980000000000000、990000000000000、1000000000000000、1100000000000000、1200000000000000、1300000000000000、1400000000000000、1500000000000000、1600000000000000、1700000000000000、1800000000000000、1900000000000000、2000000000000000、2100000000000000、2200000000000000、2300000000000000、24000000

00、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、アダマーの長さは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0297】

アダマー特異的オリゴヌクレオチドの長さは、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、アダマー特異的オリゴヌクレオチドの長さは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、9

10

20

30

40

50

6、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの長さは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、1

10

20

30

40

50

60、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0298】

アダプターの識別子配列の長さは、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、アダプターの識別子配列の長さは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000。もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、アダプターの識別子配列の長さは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、

10

20

30

40

50

84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0299】

本方法は、オリゴヌクレオチドプローブを伸長する前に、複数の細胞成分結合性アプタマーが付随している複数の細胞を複数の区画に分配することであって、複数の区画のうちの区画は、細胞成分結合性アプタマーが付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子（例えば、図1に関して記載されたビーズ105）を、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、ことを含む。複数の細胞成分標的は、複数のタンパク質標的を含んでもよく、細胞成分結合性アプタマーは、複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。

【0300】

一部の実施形態では、複数の細胞を分配することは、複数のアプタマーが付随している複数の細胞およびバーコーディング粒子を含む複数のバーコーディング粒子を複数の区画に分配することを含み（例えば、図2に関して記載されたブロック208および212を参照のこと）、複数の区画のうちの区画は、オリゴヌクレオチドコンジュゲートアプタマーおよびバーコーディング粒子が付随している複数の細胞に由来する単一細胞を含む。一部の実施形態では、区画は、ウェルまたは液滴である。

一部の実施形態では、複数の標識化核酸またはそれらの一部の配列決定情報を得ることは、標識化核酸を1つまたは複数の反応に供して、核酸配列決定のための1セットの核酸を生成することを含む（例えば、図3およびそれに伴う記載を参照のこと）。

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブの各々は、細胞標識、ユニバーサルプライマーの結合部位、増幅アダプター、配列決定アダプター、またはそれらの組合せを含む（例えば、図1に関して記載されたバーコード104）。一部の実施形態では、バー

10

20

30

40

50

コーディング粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、ヒドロゲルビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはヒドロゲルビーズである。

【0301】

アダマー特異的オリゴヌクレオチド

アダマー特異的オリゴヌクレオチドのアダマーへの付随は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアダマーは、例えば、単一ポリヌクレオチド（例えば、図8Aおよび図9に示されている単一ポリヌクレオチド804）中に存在（例えば、単一ポリヌクレオチドを形成）してもよい。アダマーは、単一ポリヌクレオチド中のアダマー特異的オリゴヌクレオチドに対して5'側にあってもよい。アダマーは、単一ポリヌクレオチド中のアダマー特異的オリゴヌクレオチドに対して3'側にあってもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマーに付随していてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマーに付着されていてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマーに共有結合で付着されていてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマーに非共有結合で付着されていてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマーにコンジュゲートされていてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介してアダマーにコンジュゲートされていてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマーに共有結合で付着されていてもよい。一部の実施形態では、本方法は、アダマー特異的オリゴヌクレオチドをアダマーから脱離させることを含む。

【0302】

一部の実施形態では、アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、アダマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な）捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的なアダマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含んでいてもよい。

【0303】

一部の実施形態では、アダマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位（例えば、図9を参照して記載されているユニバーサルプライマー結合部位804h）、または両方を含む。分子標識配列は、2〜20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5〜50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー（例えば、Illumina P7配列もしくはその部分配列）、配列決定プライマー（例えば、Illumina R2配列もしくはその部分配列）、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アダマー特異的オリゴヌクレオチドの分子標識またはユニバーサルプライマーの結合部位の長さは、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、アダマー特異的オリゴヌクレオチドの分子標識またはユニバーサルプライマーの結合部位の長さは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、もしくは約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、

39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100または、こうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの分子標識またはユニバーサルプライマーの結合部位の長さは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよく、または最大で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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよい。

【0304】

アラインメント配列

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アラインメント配列を含む（例えば、図9を参照して記載されている、ポリ（dA）領域に隣接するアラインメント配列804b）。アラインメント配列は、1またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2ヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アラインメント配列は、ポリ（dT）領域、ポリ（dG）領域、ポリ（dC）領域、ポリ（dU）領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【0305】

アラインメント配列の長さは、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、アラインメント配列の長さは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100であってもよく、もしくは約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100であってもよく、またはこうした値の任意の

2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、アラインメント配列の長さは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよく、または最大で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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよい。アラインメント配列中のグアニン、シトシン、チミン、またはウラシルの数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルの数は、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100であってもよく、もしくは約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。グアニン、シトシン、チミン、またはウラシルの数は、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよく、または最大で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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96

10

20

30

40

50

、 97、98、99、もしくは100であってもよい。

【0306】

アプタマー

一部の実施形態では、アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーであるかまたは含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでいてもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでいてもよい。アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでいてもよい。

【0307】

担体

一部の実施形態では、複数のタンパク質結合性アプタマーは、第2のタンパク質結合性アプタマーを含むか、または複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含む。アプタマーおよび第2のアプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体に付随していてもよく、第2のアプタマーは、第2の担体に付随していてもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一であってもよい。アプタマーと第2のアプタマーとの間の配列同一性は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、アプタマーおよび第2のアプタマーは、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列同一性、もしくは約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の配列同一性、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲の配列同一性を有していてもよい。一部の実施形態では、アプタマーおよび第2のアプタマーは、少なくとも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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

10

20

30

40

50

98%、99%、もしくは100%の配列同一性、または最大で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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有していてもよい。アダマーおよび第2のタンパク質結合性アダマーは同一であってもよい。アダマーおよび第2のアダマーは異なってもよい。

10

【0308】

異なる担体の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、1つのタイプの担体が存在する。一部の実施形態では、異なるタイプの担体の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、異なるタイプの担体の数は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大で2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、1

20

30

40

50

10、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。各タイプの担体の担体分子の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、各タイプの担体の担体分子の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、もしくは10000000000であってもよく、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、もしくは10000000000であってもよく、あるいはこうした値の任意の2つの間の数または範囲であってもよい。一部の実施形態では、各タイプの担体の担体分子の数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、もしくは10000000000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、1

10

20

30

40

50

4、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、100000、1000000、10000000、100000000、1000000000、もしくは100000000000であってもよい。

10

【0309】

一部の実施形態では、アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である。アプタマーおよび第2のアプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

【0310】

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでもよい。

20

【0311】

一部の実施形態では、アプタマーは、第1の担体に付着されている。アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体上に固定化されていてもよく、第1の担体上に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に固定化されていてもよく、第1の担体内に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に封入されていてもよく、第1の担体内に部分的に封入されていてもよく、第1の担体内に埋め込まれていてもよく、第1の担体内に部分的に埋め込まれていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

30

【0312】

一部の実施形態では、本方法は、アプタマーを第1の担体から解離させることを含む。解離は、単一細胞を含む区画での接触後に生じてもよい。解離は、単一細胞を含む区画での接触前に生じてもよい。

【0313】

一部の実施形態では、複数のアプタマーを複数の細胞と接触させることは、アプタマーを含む第1の担体を、複数のタンパク質標的を含む複数の細胞のうちの細胞と接触させることを含む。第1の担体は、細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されてもよい。

40

【0314】

アプタマーの除去

50

一部の実施形態では、本方法は、複数のアプタマーを複数の細胞と接触させた後、複数の細胞と接触していないアプタマーを除去することを含む。複数の細胞と接触していないアプタマーの除去は、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーを除去することを含んでいてもよい。

アプタマーの除去 - アプタマースポンジ

複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーの除去は、アプタマースポンジ（図8Eを参照して記載されているアプタマースポンジ828）を使用して、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーを除去することを含んでいてもよい。アプタマースポンジは、例えば、アプタマーの配列に相補的な複数の配列を含んでいてもよい。複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーは、アプタマースポンジの複数の配列にハイブリダイズすることができる。

【0315】

アプタマーの除去 - アプタマー特異的オリゴヌクレオチドのコンフォメーション

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーが、複数のタンパク質標的または細胞成分標的のうちの少なくとも1つと接触すると、ポリ（dA）領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、ポリ（dA）領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化する。例えば、図8Dに例示されているように、接近不能なポリ（dA）領域を有するアプタマー特異的オリゴヌクレオチドが付随しているアプタマー804inは、アプタマー804inがその細胞成分標的に結合すると、接近可能なポリ（dA）領域を有するアプタマー特異的オリゴヌクレオチドが付随しているアプタマー804acへと変化することができる。第1のコンフォメーションのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域は、ヘアピン構造（図8Dを参照して記載されているヘアピン構造820）を構成してもよい。ヘアピン構造を伴うポリ（dA）領域は、バーコードの標的結合性領域のポリ（dT）領域に接近可能であってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域とオリゴヌクレオチドプローブのポリ（dT）領域とのハイブリダイゼーションにより、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。細胞コンパートメント標的（cellular compartment target）と接触していないアプタマーに付随しているアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブのポリ（dT）領域にハイブリダイズすることができない接近不能なポリ（dA）領域を有してもよい。そのようなアプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびそれが付随しているアプタマーは、除去することができる。

【0316】

一部の実施形態では、アプタマーは相補配列を含む。複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーは、互いにハイブリダイズして凝集体を形成する場合がある。凝集体は、細胞での分解の標的とされてもよい。

【0317】

アプタマーの除去 - アンチセンス

一部の実施形態では、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーの除去は、複数のアンチセンスアプタマーを使用して、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーを除去することを含み、複数のアンチセンスアプタマーの各アンチセンスアプタマーは、複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアプタマーの1つのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの相補配列またはその一部を含むアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含む第2のアプタマーを含み、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、二本鎖のまたは部分的に二本鎖のデオキシリボ核酸（DNA）分子を形成する。

【0318】

標的および試料

一部の実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞内タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、複数の細胞は、T細胞、B細胞、腫瘍細胞、骨髄性細胞、血液細胞、正常細胞、胎児細胞、母体細胞、またはそれらの混合物を含む。

【0319】

アプタマー細胞成分プロファイリング組成物

本明細書における開示は、複数の細胞成分結合性アプタマーを含む組成物であって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、

10

【0320】

アプタマー特異的オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成する。細胞成分結合性アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいてアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にあってもよい。細胞成分結合性アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいてアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にあってもよい。

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに付随している。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに非共有結合で付着されていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。

20

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含んでもよい。分子標識配列は、2~20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5~50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでもよい。

30

【0321】

アラインメント配列

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、ポリ(dA)領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、1またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2ヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでもよい。アラインメント配列は、ポリ(dT)領域、ポリ(dG)領域、ポリ(dC)領域、ポリ(dU)領域、またはそれらの組合せを含んでもよい。

40

【0322】

アプタマー

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、またはそれらの組合せを含んでもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでもよい。細胞成分結合性アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでもよい。

50

【0323】

担体

一部の実施形態では、複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含む。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは第1の担体に付随していてもよく、第2の細胞成分結合性アプタマーは、第2の担体に付随していてもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一である。細胞成分結合性アプタマーおよび第2のタンパク質結合性アプタマーは同一であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは異なってもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでもよい。

【0324】

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付着されている。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体上に固定化されていてもよく、第1の担体上に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に固定化されていてもよく、第1の担体内に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に封入されていてもよく、第1の担体内に部分的に封入されていてもよく、第1の担体内に埋め込まれていてもよく、第1の担体内に部分的に埋め込まれていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

一部の実施形態では、第1の担体は、細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されている。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されていてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されていてもよい。

【0325】

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、結合、もしくはハイブリダイズすることが可能な）捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでもよい。標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでもよい。捕捉配列に相補的なアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含んでもよい。

【0326】

アプタマー除去 - アプタマースポンジ

一部の実施形態では、組成物は、アプタマースポンジを含む。アプタマースポンジは、

アプタマーの配列に相補的な複数の配列を含んでいてもよい。アプタマースポンジを使用して、標的に結合していないアプタマーを除去することができる。

アプタマーの除去 — アプタマー特異的オリゴヌクレオチドのコンフォメーション

一部の実施形態では、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、アプタマーが、複数のタンパク質標的または細胞成分標的のうちの少なくとも1つと接触すると、ポリ(dA)領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、ポリ(dA)領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化する。第1のコンフォメーションのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ(dA)領域は、ヘアピン構造を構成してもよい。ヘアピン構造を伴うポリ(dA)領域は、バーコードの標的結合性領域のポリ(dT)領域に接近可能であってもよい。オリゴヌクレオチドプローブは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドのポリ(dA)領域とオリゴヌクレオチドプローブのポリ(dT)領域とのハイブリダイゼーションによりアプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされることができる。

10

一部の実施形態では、アプタマーは相補配列を含む。アプタマーは、互いにハイブリダイズして（またはハイブリダイズすることを可能にして）、凝集体を形成するように構成されてもよい。凝集体は、細胞での分解の標的とされてもよい。

【0327】

アプタマーの除去 — アンチセンス

一部の実施形態では、組成物は、複数のアンチセンスアプタマーを含み、複数のアンチセンスアプタマーの各アンチセンスアプタマーは、アプタマーの1つのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの相補配列またはその一部を含むアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含む第2のアプタマーを含み、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよびアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、二本鎖のまたは部分的に二本鎖のデオキシリボ核酸(DNA)分子を形成する。

20

【0328】

アプタマー細胞成分プロファイリングキット

本明細書における開示は、細胞成分をプロファイリングするための（例えば、タンパク質発現をプロファイリングするための）キットを含む。キットは、複数の細胞成分結合性アプタマーを含む組成物であって、複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である組成物を含んでいてもよい。キットは、アプタマー特異的オリゴヌクレオチドをバーコーディング（例えば、確率論的にバーコーディング）するためのバーコーディング粒子を含んでいてもよい。キットは、アプタマースポンジを含んでいてもよい。アプタマーは、互いにハイブリダイズして（またはハイブリダイズすることを可能にして）、凝集体を形成するように構成されてもよい。組成物は、複数のアンチセンスアプタマーを含んでいてもよい。

30

【0329】

アプタマー試料インデックス付与方法

図10A～10Bは、試料インデックス付与または試料識別のためにオリゴヌクレオチド付随アプタマーを使用する例示的なワークフローの概略図を示す。本方法は、ステップ1000aにて、各試料の細胞を試料インデックス付与組成物と接触させること；ステップ1000bにて、試料インデックス付与組成物と接触させた異なる試料に由来する細胞をプールすること；ステップ1000cにて、プールされた細胞のうちの単一細胞を単一ビーズと共に区画に共分配すること；ステップ1000dにて、区画内の細胞を溶解し、試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングすること；およびステップ1000eにて、バーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ることを含んでいてもよい。

40

【0330】

一部の実施形態では、本方法は、複数の試料（例えば、図10Aの試料1004a～1

50

004e)の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることを含み(例えば、図10Aのステップ1000aにて)、複数の試料の各々は、各々が1つまたは複数のタンパク質標的を含む1つまたは複数の細胞(例えば、図10Aの細胞1008a~1008e)を含み、試料インデックス付与組成物は、アプタマー(例えば、アプタマー1016a~1016e)および試料インデックス付与オリゴヌクレオチド(例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド1020a~1020e)を含むアプタマー組成物(例えば、図10A~10Bを参照して記載されているアプタマー組成物1012a~1012e)を含み、アプタマーは、1つまたは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む。例えば、試料インデックス付与配列(本明細書では、アプタマー識別子またはバーコードとも呼ばれる)1020a~1020eは、図10Aに例示されているように、異なる配列を有する。本方法は、複数のバーコード(例えば、図10Bのビーズ1028に付随しているバーコード1024a~1024c)を使用して、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして(例えば、図10のステップ1000dにて)、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること;複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること;および複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含んでいてもよい。

10

20

【0331】

一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、複数の試料の各々は、各々が1つまたは複数の細胞成分標的を含む1つまたは複数の細胞を含み、試料インデックス付与組成物は、アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、アプタマーは、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと;および複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別することを含む。

30

【0332】

一部の実施形態では、細胞成分標的は、タンパク質標的を含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数のバーコードを使用して複数の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること;複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること;および配列決定データ中の複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、細胞の試料起源を識別することを含む。

40

【0333】

試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの長さは、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの長さは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、4

50

30

40

50

、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与配列の長さは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0335】

異なる配列を有する試料インデックス付与配列を含む、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、異なる配列を有する試料インデックス付与配列を含む試料インデックス付与組成物の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約2、3、4、5、6、7、8

10

20

30

40

50

、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 30、 40、 50、 60、 70、 80、 90、 100、 110、 120、 130、 140、 150、 160、 170、 180、 190、 200、 210、 220、 230、 240、 250、 260、 270、 280、 290、 300、 410、 420、 430、 440、 450、 460、 470、 480、 490、 500、 510、 520、 530、 540、 550、 560、 570、 580、 590、 600、 610、 620、 630、 640、 650、 660、 670、 680、 690、 700、 710、 720、 730、 740、 750、 760、 770、 780、 790、 800、 810、 820、 830、 840、 850、 860、 870、 880、 890、 900、 910、 920、 930、 940、 950、 960、 970、 980、 990、 1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、異なる配列を有する試料インデックス付与配列を含む試料インデックス付与組成物の数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0336】

試料起源識別

一部の実施形態では、少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列の存在または非存在を識別することを含む。試料インデックス付与配列の存在または非存在の識別は、少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および配列決定データ中の少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに対応する複数の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、細胞の試料起源を識別することを含む。

【0337】

試料インデックス付与組成物

一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない第2のアプタマーを含む。アプタマーおよび第2のアプタマーは同一であってもよい。試料インデックス

10

20

30

40

50

付与組成物中のアプタマーの数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、アプタマーを含む。

【0338】

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物中のアプタマーの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物中のアプタマーの数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0339】

試料インデックス付与オリゴヌクレオチド

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、単一ポリヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよびアダプターを含む。アダプターは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にあってもよい。アダプターは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にあってもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターに付随していてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターに付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターに共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターにコンジュゲートされていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介してアダプターにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターに非共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してアダプターに付随していてもよい。

【0340】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターから脱離不能であるように構成されている（または脱離不能であってもよい）。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アダプターから脱離可能であるように構成されていてもよい（または脱離可能であってもよい）。本方法は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをアダプターから脱離させることを含んでいてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの脱離は、UV光切断、化学処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せにより試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをアダプターから脱離させることを含んでいてもよい。

【0341】

一部の実施形態では、試料インデックス付与配列は、6～60ヌクレオチド長である。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、50～500ヌクレオチド長であってもよい。複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または1000個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含んでいてもよい。

【0342】

試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含んでいてもよい。分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5～50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー（例えば、Illumina P7配列もしくはその部分配列）、配列決定プライマー（例えば、Illumina R2配列もしくはその部分配列）、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの分子標識またはユニバーサルプライマーの結合部位の長さは、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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100であってもよく、もしくは約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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、

87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの分子標識またはユニバーサルプライマーの結合部位の長さは、少なくとも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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよく、または最大で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、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは100であってもよい。

【0343】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、1つもしくは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではないか、種のゲノム配列と相同性であるか、またはそれらの組合せである。種は、非哺乳動物種であってもよい。

【0344】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な）捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合性領域を含んでいてもよい。標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的な試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（dA）領域を含んでいてもよい。

【0345】

アラインメント配列

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、ポリ（dA）領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、1またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アラインメント配列は、ポリ（dT）領域、ポリ（dG）領域、ポリ（dC）領域、ポリ（dU）領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【0346】

アプタマー

一部の実施形態では、アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでいてもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでいてもよい。アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでいてもよい。

【0347】

一部の実施形態では、アプタマーには、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している。アプタマーには、異なる試

料インデックス付与配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。

【0348】

担体

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物は、第1の担体に付随していてもよい。複数の試料インデックス付与組成物のうちの異なる試料インデックス付与組成物は、異なる第1の担体に付随していてもよい。担体の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、担体の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、担体の数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

10

20

30

40

50

【0349】

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでもよい。

【0350】

一部の実施形態では、アプタマーは、第1の担体に付着されていてもよい。アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。アプタマーは、第1の担体上に固定化されてもよく、第1の担体上に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に固定化されていてもよく、第1の担体内に部分的に固定化されていてもよく、第1の担体内に封入されていてもよく、第1の担体内に部分的に封入されていてもよく、第1の担体内に埋め込まれていてもよく、第1の担体内に部分的に埋め込まれていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。

【0351】

一部の実施形態では、本方法は、アプタマーを第1の担体から解離させることを含む。解離は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングした後で生じてもよい。解離は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングする前に生じてもよい。

【0352】

一部の実施形態では、複数の試料の各々を試料インデックス付与組成物と接触させることは、試料の1つまたは複数の細胞のうちの細胞を試料インデックス付与組成物と接触させることを含む。第1の担体は細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより、細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより、細胞へと内部移行されてもよい。

【0353】

第2のタンパク質結合-結合性アプタマー

一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物は、第2のタンパク質結合性アプタマーを含む第2のアプタマー組成物を含み、第2のアプタマーは、1つもしくは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに、または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。アプタマーおよび第2のアプタマーは、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的の同じタンパク質標的に結合することが可能であってもよく、第2のアプタマーには、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない。第2のアプタマーには、第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは異なってもよい。

【0354】

異なるアプタマーの数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、アプタマーの数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60

、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、異なるアプタマーの数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000であってもよい。

【0355】

アプタマーおよび第2のアプタマーの配列同一性は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、アプタマーおよび第2のアプタマーは、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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%

10

20

30

40

50

%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の、もしくは約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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲の配列同一性を有してもよい。一部の実施形態では、アダプターおよび第2のアダプターは、少なくとも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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の、または最大で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%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の配列同一性を有してもよい。

【0356】

アダプターおよび第2のアダプターは、同じタンパク質標的の異なる領域に、または同じ細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。アダプターおよび第2のアダプターは、1つもしくは複数のタンパク質標的の異なるタンパク質標的に、または1つもしくは複数の細胞成分標的の異なる細胞成分標的に結合することが可能であってもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は同一であってもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は異なってもよい。

【0357】

一部の実施形態では、アダプター組成物は、第1の担体に付随していてもよい。アダプター組成物は、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2のアダプター、および第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含んでいてもよい。アダプターおよび第2のアダプターは、第1の担体に付随していても

よい。アプタマーは、第1の担体に付随していてもよく、第2のアプタマーは、第2の担体に付随している。アプタマーおよび第2のアプタマーは、配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、例えば、配列が同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは異なってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は、例えば、配列が同一であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。アプタマーおよび第2のアプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

【0358】

標的および試料

一部の実施形態では、複数の試料のうちの試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む。複数の試料は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つは、細胞表面上にある。一部の実施形態では、タンパク質標的または細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む。タンパク質標的または細胞成分標的は、10~100個の異なるタンパク質標的または細胞成分標的を含む群から選択することができる。

【0359】

タンパク質標的または細胞成分標的の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、標的の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000であってもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、標的の数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290

10

20

30

40

50

、 3 0 0、 4 1 0、 4 2 0、 4 3 0、 4 4 0、 4 5 0、 4 6 0、 4 7 0、 4 8 0、 4 9 0
、 5 0 0、 5 1 0、 5 2 0、 5 3 0、 5 4 0、 5 5 0、 5 6 0、 5 7 0、 5 8 0、 5 9 0
、 6 0 0、 6 1 0、 6 2 0、 6 3 0、 6 4 0、 6 5 0、 6 6 0、 6 7 0、 6 8 0、 6 9 0
、 7 0 0、 7 1 0、 7 2 0、 7 3 0、 7 4 0、 7 5 0、 7 6 0、 7 7 0、 7 8 0、 7 9 0
、 8 0 0、 8 1 0、 8 2 0、 8 3 0、 8 4 0、 8 5 0、 8 6 0、 8 7 0、 8 8 0、 8 9 0
、 9 0 0、 9 1 0、 9 2 0、 9 3 0、 9 4 0、 9 5 0、 9 6 0、 9 7 0、 9 8 0、 9 9 0
、 もしくは 1 0 0 0 であってもよく、または最大で 1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9
、 1 0、 1 1、 1 2、 1 3、 1 4、 1 5、 1 6、 1 7、 1 8、 1 9、 2 0、 3 0、 4 0、
5 0、 6 0、 7 0、 8 0、 9 0、 1 0 0、 1 1 0、 1 2 0、 1 3 0、 1 4 0、 1 5 0、 1
6 0、 1 7 0、 1 8 0、 1 9 0、 2 0 0、 2 1 0、 2 2 0、 2 3 0、 2 4 0、 2 5 0、 2
6 0、 2 7 0、 2 8 0、 2 9 0、 3 0 0、 4 1 0、 4 2 0、 4 3 0、 4 4 0、 4 5 0、 4
6 0、 4 7 0、 4 8 0、 4 9 0、 5 0 0、 5 1 0、 5 2 0、 5 3 0、 5 4 0、 5 5 0、 5
6 0、 5 7 0、 5 8 0、 5 9 0、 6 0 0、 6 1 0、 6 2 0、 6 3 0、 6 4 0、 6 5 0、 6
6 0、 6 7 0、 6 8 0、 6 9 0、 7 0 0、 7 1 0、 7 2 0、 7 3 0、 7 4 0、 7 5 0、 7
6 0、 7 7 0、 7 8 0、 7 9 0、 8 0 0、 8 1 0、 8 2 0、 8 3 0、 8 4 0、 8 5 0、 8
6 0、 8 7 0、 8 8 0、 8 9 0、 9 0 0、 9 1 0、 9 2 0、 9 3 0、 9 4 0、 9 5 0、 9
6 0、 9 7 0、 9 8 0、 9 9 0、 もしくは 1 0 0 0 であってもよい。

【 0 3 6 0 】

試料インデックス付与ワークフロー

一部の実施形態では、本方法は、複数の試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去することを含む。未結合試料インデックス付与組成物の除去は、複数の試料の各々に由来する 1 つまたは複数の細胞を洗浄緩衝液で洗浄することを含んでいてもよい。未結合試料インデックス付与組成物の除去は、フローサイトメトリーを使用して、少なくとも 1 つのアプタマーに結合した細胞を選択することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する 1 つまたは複数の細胞を溶解することを含む（例えば、図 1 0 B のステップ 1 0 0 0 d にて）。

【 0 3 6 1 】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製用アダプターを、少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートさせることを含み、少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートされた複製用アダプターを使用して、少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、少なくとも 1 つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを、少なくとも 1 つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを生成すること；および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを伸長して（例えば、図 1 0 B のステップ 1 0 0 0 e にて）、捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。少なくとも 1 つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでいてもよい。

【 0 3 6 2 】

バーコードおよびバーコーディング

一部の実施形態では、本方法は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコー

ディングする前に、複数の試料インデックス付与組成物と接触させた複数の試料をプールすることを含む（例えば、図10Aのステップ1000bにて）。

一部の実施形態では、複数のバーコードのうちのバーコードは、標的結合性領域および分子標識配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含んでもよい。

【0363】

一部の実施形態では、複数のバーコードは、粒子に付随している。複数のバーコードのうちの少なくとも1つのバーコードは、粒子上に固定化されていてもよく、粒子上に部分的に固定化されていてもよく、粒子内に封入されていてもよく、粒子内に部分的に封入されていてもよく、またはそれらの組合せであってもよい。粒子は、破壊可能であってもよい。粒子は、ビーズを含んでもよい。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA／Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ（dT）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、ヒドロゲルビーズ、抗バイオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、もしくはそれらの任意の組合せを含んでもよく、または粒子は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む。粒子は、破壊可能なヒドロゲルビーズを含んでもよい。

【0364】

一部の実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも1000個、10000個、またはそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含んでもよい。粒子は、少なくとも10000個のバーコードを含んでもよい。

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングすることは、複数のバーコードを試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを生成すること；および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

【0365】

一部の実施形態では、本方法は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長する前に、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードをプールすることを含み、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを伸長することは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプールされたバーコードを伸長して、複数のプールされたバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。バーコードの伸長は、DNAポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでもよい。バーコードの伸長は、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含んでもよい。

【0366】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを産生することを含む。複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、分子標識配列の少なくとも一部および試料インデックス付与オリゴヌクレオチド

の少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ることは、複数のアンプリコンの配列決定データを得ることを含んでいてもよい。配列決定データを得ることは、分子標識配列の少なくとも一部および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を配列決定することを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、複数のバーコードを使用して試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む。

10

【0367】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的をバーコーディングして、複数のバーコード化標的を生成することであって、複数のバーコードの各々は、細胞標識配列を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；およびバーコード化標的の配列決定データを得ることを含む。複数のバーコードを使用して複数の標的をバーコーディングして複数のバーコード化標的を生成することは、標的のコピーを、バーコードの標的結合性領域と接触させること；および複数のバーコードを使用して複数の標的を逆転写して、複数の逆転写標的を生成することを含んでいてもよい。本方法は、複数のバーコード化標的の配列決定データを得る前に、バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成することを含んでいてもよい。バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成することは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によりバーコード化標的を増幅することを含んでいてもよい。複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的をバーコーディングして複数のバーコード化標的を生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して細胞の複数の標的を確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化標的を生成することを含んでいてもよい。

20

【0368】

アダプター試料インデックス付与組成物

本明細書における開示は、複数の試料インデックス付与組成物の実施形態である。一部の実施形態では、複数の試料インデックス付与組成物の各々は、第1の細胞成分結合性アダプターおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアダプター組成物を含み、細胞成分結合性アダプターは、少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含み、複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む。

30

【0369】

第2の細胞成分結合性アダプター

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物は、第2の細胞成分結合性アダプターを含み、第2の細胞成分結合性アダプターは、1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である。

40

細胞成分結合性アダプターおよび第2の細胞成分結合性アダプターは、1つまたは複数の細胞成分標的の同じ細胞成分標的に結合することが可能であってもよく、第2の細胞成分結合性アダプターには、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。第2の細胞成分結合性アダプターには、第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は同一であってもよい。試料インデックス付与配列および第2の試料インデックス付与配列は異なってもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アダプターおよび第2の細胞成分結合性アダプターは、配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一である。細

50

細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは同一であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、同じタンパク質標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、1つまたは複数のタンパク質標的の異なるタンパク質標的に結合することが可能であってもよい。

【0370】

試料インデックス付与オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、単一ポリヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび細胞成分結合性アプタマーを含む。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にあってよい。アプタマーは、単一ポリヌクレオチドにおいて試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にあってよい。

10

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、アプタマーに付随している。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性アプタマーに非共有結合で付着されていてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して、タンパク質結合性アプタマーまたは細胞成分結合性アプタマーに付随していてもよい。

20

【0371】

一部の実施形態では、試料インデックス付与配列は、6~60ヌクレオチド長である。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、50~500ヌクレオチド長であってもよい。複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または1000個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含んでいてもよい。

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ(dA)領域、またはそれらの組合せを含む。分子標識配列は、2~20ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、5~50ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー(例えば、Illumina P7配列もしくはその部分配列)、配列決定プライマー(例えば、Illumina R2配列もしくはその部分配列)、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

30

【0372】

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、1つまたは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではない。複数の試料のうちの少なくとも1つの試料は、1つもしくは複数の単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。試料は、哺乳動物試料、細菌試料、ウイルス試料、酵母試料、真菌試料、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。

40

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された(または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な)捕捉配列に相補的な配列を含む。標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよい。捕捉配列に相補的な試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含んでいてもよい。

【0373】

アラインメント配列

一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、ポリ(dA)領域に隣接するアラインメント配列を含む。アラインメント配列は、またはそれよりも長いヌ

50

クレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、2またはそれよりも長いヌクレオチド長であってもよい。アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。アラインメント配列は、ポリ（d T）領域、ポリ（d G）領域、ポリ（d C）領域、ポリ（d U）領域、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

【0374】

アプタマー

一部の実施形態では、タンパク質結合性アプタマーまたは細胞成分結合性アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含む。ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、塩基アナログを含んでいてもよい。塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい。ヌクレオチドアプタマーは、フルオロフォアを含んでいてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、ペプチドアプタマーを含んでいてもよい。

10

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーには、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している。細胞成分結合性アプタマーには、異なる試料インデックス付与配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。

【0375】

担体

20

一部の実施形態では、試料インデックス付与組成物は、第1の担体に付随している。複数の試料インデックス付与組成物のうちの異なる試料インデックス付与組成物は、異なる第1の担体に付随していてもよい。一部の実施形態では、アプタマー組成物は、第1の担体に付随している。

一部の実施形態では、第1の担体は、金属ナノ材料を含む。第1の担体は、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ材料を含んでいてもよい。第1の担体は、金ナノ構造、金ナノ粒子、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付着されている。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に共有結合で付着されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して第1の担体にコンジュゲートされていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に非共有結合で連結されていてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、リンカーを介して第1の担体に付随していてもよい。

30

【0376】

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体上に固定化されているか、第1の担体上に部分的に固定化されているか、第1の担体内に固定化されているか、第1の担体内に部分的に固定化されているか、第1の担体内に封入されているか、第1の担体内に部分的に封入されているか、第1の担体内に埋め込まれているか、第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである。

40

一部の実施形態では、第1の担体は、細胞へと内部移行される（または内部移行され得る）ように構成されている。第1の担体は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、またはそれらの組合せにより、細胞へと内部移行されてもよい。第1の担体は、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されてもよい。

【0377】

第2の細胞成分結合性アプタマー—結合性アプタマー

50

一部の実施形態では、アプタマー組成物は、1つもしくは複数のタンパク質標的または1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2の細胞成分結合性アプタマー、および第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含む。

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%配列同一性を有してもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは同一であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは異なってもよい。一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随していてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随していてもよく、第2の細胞成分結合性アプタマーは、第2の担体に付随していてもよい。

10

一部の実施形態では、細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能であってもよい。細胞成分結合性アプタマーおよび第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は異なってもよい。

【0378】

アプタマー試料インデックス付与キット

本明細書における開示は、試料を識別するためのキットの実施形態である。一部の実施形態では、キットは、複数の試料インデックス付与組成物を含む。一部の実施形態では、キットは、複数のバーコードを含む。複数のバーコードのうちのバーコードは、標的結合性領域を含む。標的結合性領域は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された（または捕捉、ハイブリダイズ、もしくは結合することが可能な）捕捉配列を含んでいてもよい。細胞成分結合性アプタマーは、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび第1の細胞成分結合性アプタマーを含んでいてもよい。

20

【実施例】

【0379】

上記の実施形態のいくつかの態様を以下の実施例でさらに詳しく開示するが、これらの実施例は、本開示の範囲を制限することを何ら意図しない。

30

【0380】

（実施例1）

タンパク質結合性試薬に付随させるためのオリゴヌクレオチド

この実施例は、タンパク質結合性試薬がコンジュゲートし得るオリゴヌクレオチドの設計について実証する。オリゴヌクレオチドを使用して、タンパク質発現と遺伝子発現を同時に決定することができる。オリゴヌクレオチドを試料インデックス付与のために使用して、同一または異なる試料の細胞を決定することもできる。

【0381】

95マーのオリゴヌクレオチドの設計

以下の方法を使用して、タンパク質発現と遺伝子発現の同時決定または試料インデックス付与のための、候補オリゴヌクレオチド配列および対応するプライマー配列を生成した。

40

【0382】

1. 配列の生成および排除

以下のプロセスを使用して、タンパク質発現と遺伝子発現の同時決定または試料インデックス付与のための候補オリゴヌクレオチド配列を生成した。

ステップ1a. 所望の長さ（45bp）を有するいくつかの候補配列（50000配列）をランダムに生成する。

ステップ1b. 生成した配列の5'末端に転写調節LSRR配列および生成した配列の3'末端にポリ（dA）配列（25bp）を付加する。

ステップ1c. 生成および付加した配列で、40%～50%の範囲のGC含量を有さな

50

い配列を除去する。

ステップ 1 d. 残った配列で、各々 1 つまたは複数のヘアピン構造を有する配列を除去する。

残った候補オリゴヌクレオチド配列の数は、4 2 3 であった。

【0 3 8 3】

2. プライマー設計

残った 4 2 3 の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。

2. 1 N 1 プライマー：N 1 プライマーとして、ユニバーサル N 1 配列：5' - G T T G T C A A G A T G C T A C C G T T C A G A G - 3' (L S R R 配列；配列番号 5) を使用する。

10

2. 2 N 2 プライマー（特定試料インデックスオリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；例えば、図 1 1 B ~ 1 1 D の N 2 プライマー）：

2. 2 a. N 1 配列の下流で開始しない候補 N 2 プライマーを除去する。

2. 2 b. 候補オリゴヌクレオチド配列の最後の 3 5 b p において重複する候補 N 2 プライマーを除去する。

2. 2 c. オリゴヌクレオチドを使用して試験される細胞の種のトランスクリプトーム（例えば、ヒトトランスクリプトームまたはマウストランスクリプトーム）とアラインするプライマー候補を除去する。

2. 2 d. プライマー-プライマー相互作用を最小限にするかまたは回避するために、デフォルト対照として I L R 2 配列（A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T；配列番号 6）を使用する。

20

4 2 3 の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、3 9 0 候補に対する N 2 プライマーを設計した。

【0 3 8 4】

3. フィルタリング

残った 3 9 0 の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下のプロセスを使用した。

3 a. すべてのバーコードについてポリ (d A) テイルを同じ長さに維持するために、A で終わるランダム配列を有する（すなわち、ポリ (d A) 配列の有効長さが 2 5 b p を超える）あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。

30

3 b. G が連続するオリゴ合成では、コストが余分にかかり、しかも収率が低い可能性があるため、4 以上の連続する G (> 3 G) を含むあらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。

図 1 1 A は、上記の方法を使用して生成した非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。

【0 3 8 5】

2 0 0 マーのオリゴヌクレオチドの設計

以下の方法を使用して、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定ならびに試料インデックス付与のための候補オリゴヌクレオチド配列および対応するプライマー配列を生成した。

40

【0 3 8 6】

1. 配列の生成および排除

以下を使用して、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定ならびに試料インデックス付与のための候補オリゴヌクレオチド配列を生成した。

1 a. 所望の長さ (1 2 8 b p) を有するいくつかの候補配列 (1 0 0 0 0 0 配列) をランダムに生成する。

1 b. 生成した配列の 5' 末端に転写調節 L S R R 配列と、非ヒト、非マウスの追加アンカー配列を、および生成した配列の 3' 末端にポリ (d A) 配列 (2 5 b p) を付加する。

1 c. 生成および付加した配列で、4 0 % ~ 5 0 % の範囲の G C 含量を有さない配列を

50

除去する。

1 d. ヘアピン構造スコアに基づき、残った候補オリゴヌクレオチド配列を選別する。

1 e. 最も低いヘアピンスコアを有する 1 0 0 0 の残った候補オリゴヌクレオチド配列を選択する。

【0387】

2. プライマー設計

最も低いヘアピンスコアを有する 4 0 0 の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。

2. 1 N1 プライマー: N1 プライマーとして、ユニバーサル N1 配列: 5' - G T T G T C A A G A T G C T A C C G T T C A G A G - 3' (L S R R 配列; 配列番号 5) を使用する。

10

2. 2 N2 プライマー (特定の試料インデックスオリゴヌクレオチドの増幅を目的とする; 例えば、図 1 1 B および 1 1 C の N2 プライマー):

2. 2 a. N1 配列の 2 3 n t 下流で開始しない候補 N2 プライマーを除去する (アンカー配列は、すべての候補オリゴヌクレオチド配列についてユニバーサルであった)。

2. 2 b. 標的配列の最後の 1 0 0 b p において重複する候補 N2 プライマーを除去する。得られたプライマー候補は、標的配列の 4 8 番目のヌクレオチドと 1 0 0 番目のヌクレオチドとの間に存在し得る。

2. 2 c. オリゴヌクレオチドを使用して試験される細胞の種のトランスクリプトーム (例えば、ヒトトランスクリプトームまたはマウストランスクリプトーム) とアラインするプライマー候補を除去する。

20

2. 2 d. プライマー-プライマー相互作用を最小限にするかまたは回避するために、デフォルト対照として I L R 2 配列 5' - A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T - 3' (配列番号 6) を使用する。

2. 2 e. 標的配列の最後の 1 0 0 b p において重複する N2 プライマー候補を除去する。

4 0 0 の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、3 9 2 候補に対する N2 プライマーを設計した。

【0388】

3. フィルタリング

30

残った 3 9 2 の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下を使用した。

3 a. すべてのバーコードについてポリ (d A) テイルを同じ長さに維持するために、A で終わるランダム配列を有する (すなわち、ポリ (d A) 配列の有効長さが 2 5 b p を超える) あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。

3 b. G が連続するオリゴ合成では、コストが余分にかかり、しかも収率が低い可能性があるため、4 以上の連続する G (> 3 G) を含むあらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。

【0389】

図 1 1 B は、上記の方法を使用して生成した非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。図 1 1 B に示されるネステッド N2 プライマーは、標的化増幅のための抗体または試料特異的配列に結合し得る。図 1 1 C は、標的化増幅のためのアンカー配列に対応するネステッドユニバーサル N2 プライマーを有する同一の非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。図 1 1 D は、ワンステップ標的化増幅のための N2 プライマーを有する同一の非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。

40

まとめると、これらのデータは、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定または試料インデックス付与のために、異なる長さのオリゴヌクレオチド配列を設計することができることを示す。オリゴヌクレオチド配列は、ユニバーサルプライマー配列、抗体特異的オリゴヌクレオチド配列または試料インデックス付与配列、およびポリ (d A) 配列を含み得る。

【0390】

50

(実施例2)

オリゴヌクレオチドが付随している抗体のワークフロー

この実施例は、タンパク質標的の発現プロファイルを決定するためにオリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体を使用するワークフローを実証する。

対象の凍結細胞（例えば、凍結末梢血単核細胞（P B M C））を解凍する。解凍した細胞を一定温度で一定期間（例えば、室温で20分間）オリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体（例えば、 $0.06 \mu\text{g} / 100 \mu\text{l}$ の抗CD4抗体（オリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体ストックの1:333希釈液））で染色する。オリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体は、1、2、または3種のオリゴヌクレオチド（「抗体オリゴヌクレオチド」）にコンジュゲートされている。抗体オリゴヌクレオチドの配列を図12に示す。細胞を洗浄して、未結合のオリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体を除去する。目的の細胞（例えば、生細胞）を得るために、フローサイトメトリーによる選別を目的として、細胞をCa l c e i n A M（BD（Franklin Lake, New Jersey））およびD r a q 7（商標）（A b c a m（Cambridge, United Kingdom））で染色してもよい。細胞を洗浄して、過剰なCa l c e i n A MおよびD r a q 7（商標）を除去してもよい。フローサイトメトリーを使用して、Ca l c e i n A M（生細胞）で染色され、D r a q 7（商標）（死滅または透過処理していない細胞）で染色されていない単一細胞をB D R h a p s o d y（商標）カートリッジ中に選別する。

【0391】

単一細胞とビーズを含有するウェルのうち、ウェル中の単一細胞（例えば、3500個の生細胞）を溶解緩衝液（例えば、5 mM D T Tの溶解緩衝液）中で溶解する。標的（例えば、CD4）のmRNA発現プロファイルを、B D R h a p s o d y（商標）ビーズを使用して決定する。標的（例えば、CD4）のタンパク質発現プロファイルをB D R h a p s o d y（商標）ビーズと抗体オリゴヌクレオチドを使用して決定する。簡潔には、細胞溶解後にmRNA分子が放出される。B D R h a p s o d y（商標）ビーズに、各々が分子標識、細胞標識、およびオリゴ（dT）領域を含有するバーコード（例えば、確率論的バーコード）を付随させる。溶解した細胞から放出されたmRNA分子のポリ（A）領域を確率論的バーコードのポリ（T）領域にハイブリダイズさせる。抗体オリゴヌクレオチドのポリ（dA）領域をバーコードのオリゴ（dT）領域にハイブリダイズさせる。バーコードを使用して、mRNA分子を逆転写させた。バーコードを使用して、抗体オリゴヌクレオチドを複製する。逆転写と複製は、1つの試料アリコート中で同時に起こってもよい。

【0392】

N1プライマーを使用して目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルを決定する、および抗体オリゴヌクレオチドN1プライマーを使用して標的のタンパク質発現プロファイルを決定するために、プライマーを使用して、逆転写産物および複製産物をPCR増幅する。例えば、血液パネルN1プライマーを使用して488の血液パネル遺伝子のmRNA発現プロファイルを決定する、および抗体オリゴヌクレオチドN1プライマーを使用してCD4タンパク質の発現プロファイルを決定するために、プライマーを使用して、逆転写産物および複製産物を60度のアニーリング温度で15サイクルPCR増幅することができる（「PCR 1」）。過剰なバーコードは、Ampureクリーンアップで除去されてもよい。PCR 1からの産物を2つのアリコートに分割してもよく、1つのアリコートは、目的の遺伝子のためのN2プライマーを使用して目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルを決定するためのものであり、1つのアリコートは、抗体オリゴヌクレオチドN2プライマーを使用して目的の標的のタンパク質発現プロファイルを決定するためのものである（「PCR 2」）。両方のアリコートをPCR増幅する（例えば、60度のアニーリング温度で15サイクル）。細胞中の標的のタンパク質発現を図12に示される抗体オリゴヌクレオチドに基づいて決定する（「PCR 2」）。配列決定データを得て、配列決定アダプターの付加（「PCR 3」）、例えば、配列決定アダプターのライゲーション後に分析する。目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルに基づいて細胞型を決定する。

まとめると、この実施例は、目的の標的のタンパク質発現プロファイルを決定するためにオリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体を使用することを記載する。この実施例は、目的の標的のタンパク質発現プロファイルおよび目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルを同時に決定することができることをさらに記載する。

【0393】

用語

以前に記載された実施形態の少なくとも一部では、実施形態において使用される1つまたは複数のエレメントは、このような置き換えが技術的に実施不可能でなければ、別の実施形態において交換可能に使用され得る。特許請求された主題の範囲から逸脱することなく、以上に記載の方法および構造に種々の他の省略、追加および変更を行い得ることが当業者によって認識されるであろう。このような変更および変化はすべて、添付の特許請求の範囲に規定される主題の範囲内に含まれることが意図される。

【0394】

本明細書の実質的に任意の複数形および／または単数形の用語の使用に関連して、文脈上および／または適用上適切であれば、当業者は、複数形から単数形へおよび／または単数形から複数形への変換が可能である。明確にするために種々の単数形／複数形の入替えを本明細書に明示的に記述し得る。本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、別段に文脈上明確に規定されていなければ、単数形の「a」、「an」、および「the」には、複数の参照が含まれる。本明細書において、「または (or)」へのいずれの言及も、別段に記載されていなければ、「および／または (and/or)」を包含することを意図する。

【0395】

一般的には、本明細書において、特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）で使用される用語は、全般的に、「オープン」用語であることが意図されることが当業者によって理解されるであろう（例えば、「含む (including)」という用語は、「以下に限定されないが、～を含む (including but not limited to)」と解釈されるべきであり、「有する (having)」という用語は、「少なくとも～を有する (having at least)」と解釈されるべきであり、「含む (includes)」という用語は「以下に限定されないが、～を含む (includes but is not limited to)」と解釈されるべきであるなど）。さらに、導入された請求項の記載の特定数が意図される場合、このような意図は請求項で明示的に記載され、このような記載の非存在下では、このような意図は存在しないことが、当業者によって理解されるであろう。例えば、理解の一助として、以下の添付の特許請求の範囲は、請求項の記載を導入するために、導入語句「少なくとも1つの (at least one)」および「1つまたは複数の (one or more)」の使用を含み得る。しかし、このような語句の使用は、たとえ同一の請求項が、「1つまたは複数の (one or more)」または「少なくとも1つの (at least one)」という導入句および「a」または「an」のような不定冠詞を含む場合でも、「a」または「an」という不定冠詞による請求項の記載の導入がこのような導入された請求項の記載を含むいかなる特定の請求項もそのような記載を1つのみ含む実施形態に限定することを意味するものと解釈させるべきではなく（例えば、「a」および／または「an」は、「少なくとも1つの (at least one)」または「1つまたは複数の (one or more)」を意味すると解釈されるべきである）、請求項の記載を導入するために使用される定冠詞の使用についても同様である。さらに、たとえ特定数の導入された請求項の記載が明示的に記載されたとしても、このような記載は少なくとも記載された数を意味すると解釈されるべきであることを当業者は認識するであろう（例えば、「2つの記載」という他の修飾語を含まない無修飾の記載は、少なくとも2つの記載、または2つ以上の記載を意味する）。さらに、「A、B、およびCの少なくとも1つなど」に類似した慣習が使用される場合、一般的には、このような構成は当業者がその慣習を理解する意味であることが意図される（例えば、「A、B、およびCの少なくとも1つを有す

10

20

30

40

50

るシステム」は、以下に限定されないが、A単独、B単独、C単独、AとBの両方、AとCの両方、BとCの両方、および／またはAとBとCの全部などを有するシステムを含むことになる。「A、B、またはCの少なくとも1つなど」に類似した慣習が使用される場合、一般的には、このような構成は当業者がその慣習を理解する意味であることが意図される（例えば、「A、B、またはCの少なくとも1つを有するシステム」は、以下に限定されないが、A単独、B単独、C単独、AとBの両方、AとCの両方、BとCの両方、および／またはAとBとCの全部などを有するシステムを含むことになる）。さらに、2つ以上の代替用語を表す実質上任意の選言的な語および／または語句は、明細書、特許請求の範囲、または図面に関わらず、用語の1つ、用語のいずれか、または用語の両方を含む可能性が企図されると理解されるべきであることが当業者によって理解されるであろう。例えば、「AまたはB」という語句は、「A」または「B」または「AおよびB」の可能性を含むことが理解されるであろう。

10

【0396】

さらに、本開示の特徴または態様がマーカッシュ群により記述される場合、それにより、本開示はまた、マーカッシュ群の任意の個別のメンバーまたはメンバーの下位群により記述されることが、当業者に認識されるであろう。

【0397】

当業者に理解されるように、あらゆる目的で、例えば、記載される明細書の提供に関して、本明細書に開示された範囲はすべて、あらゆる可能な下位範囲およびその下位範囲の組合せも包含する。任意の列挙された範囲は、少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分などに分解された同じ範囲を十分に記述し可能にすると容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書で考察した各範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1などに容易に分解可能である。同様に、当業者に理解されるように、「最大」、「少なくとも」、「より多い」、「より少ない」などの表現はすべて、記載された数を含み、以上で考察したように後続的に下位範囲に分解可能な範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は、それぞれ個々のメンバーを含む。よって、例えば、1～3個の物品を有する群は、1、2、または3個の物品を有する群を指す。同様に、1～5個の物品を有する群は、1、2、3、4、または5個の物品を有する群を指し、他も同様である。

20

【0398】

様々な態様および実施形態が本明細書に開示されているが、他の態様および実施形態が当業者にとって明らかであろう。本明細書に開示される様々な態様および実施形態は、例示を目的とし、限定を意図するものではなく、以下の特許請求の範囲によって示されている真の範囲および精神を有する。

30

本発明の好ましい態様は、下記の通りである。

〔1〕 試料を識別するための方法であって、

複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、

前記複数の試料の各々は、各々が1つまたは複数のタンパク質標的を含む1つまたは複数の細胞を含み、前記試料インデックス付与組成物は、アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、前記アプタマーは、前記1つまたは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、

40

前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；

複数のバーコードを使用して前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；

前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを

50

得ること；および

前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別すること

を含む方法。

〔2〕試料を識別するための方法であって、

複数の試料の各々を、それぞれ、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、

前記複数の試料の各々は、各々が1つまたは複数の細胞成分標的を含む1つまたは複数の細胞を含み、前記試料インデックス付与組成物は、アダプターおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアダプター組成物を含み、前記アダプターは、前記1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能であり、

前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料インデックス付与配列を含み、前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、こと；および

前記複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記1つまたは複数の細胞のうちの少なくとも1つの細胞の試料起源を識別すること

を含む方法。

〔3〕前記細胞成分標的は、タンパク質標的を含む、前記〔2〕に記載の方法。

〔4〕前記少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、

複数のバーコードを使用して前記複数の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして、複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；

前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および

前記配列決定データ中の前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記細胞の試料起源を識別すること

を含む、前記〔2〕～〔3〕のいずれか1項に記載の方法。

〔5〕前記少なくとも1つの細胞の試料起源の識別は、前記複数の試料インデックス付与組成物の少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列の存在または非存在を識別することを含む、前記〔1〕～〔4〕のいずれか1項に記載の方法。

〔6〕前記試料インデックス付与配列の存在または非存在の識別は、

前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること；

前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ること；および

前記配列決定データ中の前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドに対応する前記複数の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデックス付与配列に基づいて、前記細胞の試料起源を識別すること

を含む、前記〔5〕に記載の方法。

〔7〕前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製用アダプターを前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートさせることを含み、

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにライゲートされた前記複製用アダプターを使用して、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、

前記〔6〕に記載の方法。

〔8〕前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、前記少なくとも1つのバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製する前に、

捕捉プローブを、前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした捕捉プローブを生成すること；および

前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記捕捉プローブを伸長して、前記捕捉プローブが付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含み、

前記少なくとも1つの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの複製は、前記捕捉プローブが付随している前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、

前記〔6〕に記載の方法。

〔9〕前記試料インデックス付与配列は、6～60ヌクレオチド長または50～500ヌクレオチド長である、前記〔1〕～〔8〕のいずれか1項に記載の方法。

〔10〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または1000個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、前記〔1〕～〔9〕のいずれか1項に記載の方法。

〔11〕単一ポリヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび前記アダプターを含む、前記〔1〕～〔10〕のいずれか1項に記載の方法。

〔12〕前記アダプターは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にある、前記〔11〕に記載の方法。

〔13〕前記アダプターは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にある、前記〔11〕に記載の方法。

〔14〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターに付随している、前記〔1〕～〔13〕のいずれか1項に記載の方法。

〔15〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターに付着されており、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターに共有結合で付着されていてもよい、前記〔1〕～〔14〕のいずれか1項に記載の方法。

〔16〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターにコンジュゲートされており、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記アダプターにコンジュゲートされていてもよい、前記〔1〕～〔14〕のいずれか1項に記載の方法。

〔17〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターに非共有結合で付着されている、前記〔1〕～〔15〕のいずれか1項に記載の方法。

〔18〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して前記アダプターに付随している、前記〔1〕～〔17〕のいずれか1項に記載の方法。

〔19〕前記アダプターは、ヌクレオチドアダプターを含み、前記ヌクレオチドアダプターは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔1〕～〔18〕のいずれか1項に記載の方法。

〔20〕前記ヌクレオチドアダプターは塩基アナログを含み、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい、前記〔19〕に記載の方法。

10

20

30

40

50

〔21〕前記アプタマーは、ペプチドアプタマーを含む、前記〔1〕～〔18〕のいずれか1項に記載の方法。

〔22〕前記試料インデックス付与組成物は、第1の担体に付随している、前記〔1〕～〔21〕のいずれか1項に記載の方法。

〔23〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの異なる試料インデックス付与組成物は、異なる第1の担体に付随している、前記〔1〕～〔22〕のいずれか1項に記載の方法。

〔24〕前記アプタマー組成物は、第1の担体に付随している、前記〔1〕～〔21〕のいずれか1項に記載の方法。

〔25〕前記アプタマー組成物は、

前記1つもしくは複数のタンパク質標的または前記1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能な第2のアプタマー、および

第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含む、前記〔1〕～〔21〕のいずれか1項に記載の方法。

〔26〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、第1の担体に付随している、前記〔25〕に記載の方法。

〔27〕前記アプタマーは、第1の担体に付随しており、前記第2のアプタマーは、第2の担体に付随している、前記〔25〕に記載の方法。

〔28〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%配列同一性を有する、前記〔26〕または〔27〕に記載の方法。

〔29〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは同一である、前記〔26〕～〔28〕のいずれか1項に記載の方法。

〔30〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは異なる、前記〔26〕～〔28〕のいずれか1項に記載の方法。

〔31〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は同一である、前記〔26〕～〔30〕のいずれか1項に記載の方法。

〔32〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔31〕に記載の方法。

〔33〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は異なる、前記〔26〕～〔30〕のいずれか1項に記載の方法。

〔34〕前記第1の担体は、

金属ナノ材料であって、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せを含んでいてもよい金属ナノ材料、および／または

金ナノ材料であって、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金ナノ材料、および／または

リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せを含む、前記〔22〕～〔33〕のいずれか1項に記載の方法。

〔35〕前記アプタマーは、前記第1の担体に付着されており、前記アプタマーは、前記第1の担体に共有結合で付着されていてもよい、前記〔25〕～〔34〕のいずれか1項に記載の方法。

〔36〕前記アプタマーは、前記第1の担体にコンジュゲートされており、前記アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第1の担体にコンジュゲートされていてもよい、前記〔25〕～〔35〕のいずれか1項に記載の方法。

〔37〕前記アプタマーは、前記第1の担体に非共有結合で連結されている、前記〔25〕～〔36〕のいずれか1項に記載の方法。

〔38〕前記アプタマーは、リンカーを介して前記第1の担体に付随している、前記〔25〕～〔37〕のいずれか1項に記載の方法。

〔39〕前記アプタマーは、前記第1の担体上に固定化されているか、前記第1の担体上

10

20

30

40

50

に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に固定化されているか、前記第1の担体内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、前記〔25〕～〔38〕のいずれか1項に記載の方法。

〔40〕前記アダプターを前記第1の担体から解離させることを含む、前記〔25〕～〔39〕のいずれか1項に記載の方法。

〔41〕前記解離は、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングした後に生じる、前記〔40〕に記載の方法。

〔42〕前記解離は、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングする前に生じる、前記〔40〕に記載の方法。

〔43〕前記複数の試料の各々を前記試料インデックス付与組成物と接触させることは、前記試料の前記1つまたは複数の細胞のうちの細胞を前記試料インデックス付与組成物と接触させることを含む、前記〔25〕～〔42〕のいずれか1項に記載の方法。

〔44〕前記第1の担体は、前記細胞へと内部移行され、前記内部移行は、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せによるものであってもよい、前記〔43〕に記載の方法。

〔45〕前記1つもしくは複数のタンパク質標的または前記1つもしくは複数の細胞成分標的のうちの前記少なくとも1つは、細胞表面上にある、前記〔1〕～〔44〕のいずれか1項に記載の方法。

〔46〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの未結合試料インデックス付与組成物を除去することを含む、前記〔1〕～〔45〕のいずれか1項に記載の方法。

〔47〕前記未結合試料インデックス付与組成物の除去は、(a)前記複数の試料の各々に由来する前記1つもしくは複数の細胞を洗浄緩衝液で洗浄すること、(b)フローサイトメトリーを使用して、少なくとも1つのアダプターに結合している細胞を選択すること、または両方を含む、前記〔46〕に記載の方法。

〔48〕前記複数の試料の各々に由来する前記1つまたは複数の細胞を溶解することを含む、前記〔1〕～〔47〕のいずれか1項に記載の方法。

〔49〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターから脱離不能であるように構成されている、前記〔1〕～〔48〕のいずれか1項に記載の方法。

〔50〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アダプターから脱離可能であるように構成されている、前記〔1〕～〔48〕のいずれか1項に記載の方法。

〔51〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを前記アダプターから脱離させることを含み、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの脱離は、UV光切断、化学処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せにより前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを前記アダプターから脱離させることを含んでいてもよい、前記〔1〕～〔50〕のいずれか1項に記載の方法。

〔52〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記1つもしくは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではないか、種のゲノム配列と相同性であるか、またはそれらの組合せであり、前記種は、非哺乳動物種であってもよい、前記〔1〕～〔51〕のいずれか1項に記載の方法。

〔53〕前記複数の試料のうちの試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔1〕～〔52〕のいずれか1項に記載の方法。

〔54〕前記複数の試料は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔1〕～〔53〕のいずれか1項に記載の方法。

〔55〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔１〕～〔５４〕のいずれか１項に記載の方法。

〔５６〕バーコードは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含み、前記標的結合性領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含んでいてもよい、前記〔５５〕に記載の方法。

〔５７〕前記捕捉配列に相補的な前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔５５〕または〔５６〕に記載の方法。

〔５８〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、ポリ（ｄＡ）領域に隣接するアラインメント配列を含み、任意に、（ａ）前記アラインメント配列は、１もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または２もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であり、（ｂ）前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含み、および／あるいは（ｃ）前記アラインメント配列は、ポリ（ｄＴ）領域、ポリ（ｄＧ）領域、ポリ（ｄＣ）領域、ポリ（ｄＵ）領域、またはそれらの組合せを含む、前記〔５７〕に記載の方法。

〔５９〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含み、前記分子標識配列は、２～２０ヌクレオチド長または５～５０ヌクレオチド長であってもよく、前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔１〕～〔５８〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６０〕前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔１〕～〔５９〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６１〕前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は、１０～１００個の異なるタンパク質標的または細胞成分標的を含む群から選択される、前記〔１〕～〔６０〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６２〕前記アプタマーには、同一の配列を有する２つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、前記〔１〕～〔６１〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６３〕前記アプタマーには、異なる試料インデックス付与配列を有する２つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、前記〔１〕～〔６１〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６４〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの前記試料インデックス付与組成物は、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない第２のアプタマーを含む、前記〔１〕～〔６３〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６５〕前記アプタマーおよび前記第２のアプタマーは同一である、前記〔６４〕に記載の方法。

〔６６〕前記複数の試料インデックス付与組成物の各々は、前記アプタマーを含む、前記〔１〕～〔６５〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６７〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの前記試料インデックス付与組成物は、第２のタンパク質結合性アプタマーを含む第２のアプタマー組成物を含み、前記第２のアプタマーは、前記１つもしくは複数のタンパク質標的のうちの少なくとも１つに、または前記１つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、前記〔１〕～〔６６〕のいずれか１項に記載の方法。

〔６８〕前記アプタマーおよび前記第２のアプタマーは、前記１つもしくは複数のタンパク質標的または前記１つもしくは複数の細胞成分標的の同じタンパク質標的に結合することが可能であり、前記第２のアプタマーには、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない、前記〔６７〕に記載の方法。

〔６９〕前記第２のアプタマーには、第２の試料インデックス付与配列を含む第２の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、前記〔６７〕に記載の方法。

〔７０〕前記アプタマーおよび前記第２のアプタマーは、配列が少なくとも６０％、７０

10

20

30

40

50

%、80%、90%、または95%同一である、前記〔67〕～〔69〕のいずれか1項に記載の方法。

〔71〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは同一である、前記〔67〕～〔70〕のいずれか1項に記載の方法。

〔72〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは異なる、前記〔67〕～〔70〕のいずれか1項に記載の方法。

〔73〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、同じタンパク質標的の異なる領域または同じ細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔67〕～〔71〕のいずれか1項に記載の方法。

〔74〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、前記1つもしくは複数のタンパク質標的の異なるタンパク質標的に、または前記1つもしくは複数の細胞成分標的の異なる細胞成分標的に結合することが可能である、前記〔67〕～〔71〕のいずれか1項に記載の方法。

〔75〕前記試料インデックス付与配列および前記第2の試料インデックス付与配列は同一である、前記〔69〕～〔74〕のいずれか1項に記載の方法。

〔76〕前記試料インデックス付与配列および前記第2の試料インデックス付与配列は異なる、前記〔69〕～〔74〕のいずれか1項に記載の方法。

〔77〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングする前に、前記複数の試料インデックス付与組成物と接触させた前記複数の試料をプールすることを含む、前記〔1〕～〔76〕のいずれか1項に記載の方法。

〔78〕前記複数のバーコードのうちのバーコードは、標的結合性領域および分子標識配列を含む、

前記複数のバーコードのうちの少なくとも2つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む、前記〔1〕～〔77〕のいずれか1項に記載の方法。

〔79〕前記バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔78〕に記載の方法。

〔80〕前記標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含む、前記〔78〕または〔79〕に記載の方法。

〔81〕前記複数のバーコードは、粒子に付随している、前記〔78〕～〔80〕のいずれか1項に記載の方法。

〔82〕前記複数のバーコードのうちの少なくとも1つのバーコードは、前記粒子上に固定化されているか、前記粒子上に部分的に固定化されているか、前記粒子内に封入されているか、前記粒子内に部分的に封入されているか、またはそれらの組合せである、前記〔81〕に記載の方法。

〔83〕前記粒子は、破壊可能であるか、または

前記粒子は、ビーズ、任意に、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA/Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ(dT)コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、ヒドロゲルビーズ、抗生物質マイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、もしくはそれらの任意の組合せを含むか、または

前記粒子は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、

前記〔81〕または〔82〕に記載の方法。

〔84〕前記粒子は、破壊可能なヒドロゲルビーズを含む、前記〔81〕～〔83〕のいずれか1項に記載の方法。

〔85〕前記粒子の前記バーコードは、少なくとも1000個、10000個、またはそ

10

20

30

40

50

これらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔８１〕～〔８４〕のいずれか１項に記載の方法。

〔８６〕前記バーコードの前記分子標識配列は、ランダム配列を含む、前記〔８５〕に記載の方法。

〔８７〕前記粒子は、少なくとも１０００個のバーコードを含む、前記〔８１〕～〔８６〕のいずれか１項に記載の方法。

〔８８〕前記複数のバーコードを使用して前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングすることは、

前記複数のバーコードを前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドと接触させて、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたバーコードを生成すること、および

前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成すること

を含む、前記〔８１〕～〔８７〕のいずれか１項に記載の方法。

〔８９〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記バーコードを伸長する前に、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記バーコードをプールすることを含み、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記バーコードを伸長することは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした前記プールされたバーコードを伸長して、複数のプールされたバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、前記〔８８〕に記載の方法。

〔９０〕前記バーコードの伸長は、ＤＮＡポリメラーゼまたは逆転写酵素を使用して前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、前記〔８８〕に記載の方法。

〔９１〕前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを産生することを含み、前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、前記分子標識配列の少なくとも一部および前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい、前記〔８８〕～〔９０〕のいずれか１項に記載の方法。

〔９２〕前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列決定データを得ることは、前記複数のアンプリコンの配列決定データを得ること、前記分子標識配列の少なくとも一部および前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を配列決定すること、または両方を含む、前記〔９１〕に記載の方法。

〔９３〕前記複数のバーコードを使用して前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドをバーコーディングして前記複数のバーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを生成することを含む、前記〔１〕～〔９２〕のいずれか１項に記載の方法。

〔９４〕前記複数のバーコードを使用して前記細胞の複数の標的をバーコーディングして、複数のバーコード化標的を生成することであって、前記複数のバーコードの各々は、細胞標識配列を含み、前記複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含む、こと；および

前記バーコード化標的の配列決定データを得ることを含む、前記〔１〕～〔９３〕のいずれか１項に記載の方法。

〔９５〕前記複数のバーコードを使用して前記複数の標的をバーコーディングして前記複数のバーコード化標的を生成することは、

前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合性領域と接触させること；および

10

20

30

40

50

前記複数のバーコードを使用して前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写標的を生成すること

を含む、前記〔94〕に記載の方法。

〔96〕前記複数のバーコード化標的の配列決定データを得る前に、前記バーコード化標的を増幅して複数の増幅されたバーコード化標的を生成し、前記バーコード化標的を増幅して前記複数の増幅されたバーコード化標的を生成することは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により前記バーコード化標的を増幅することを含んでいてもよい、前記〔94〕または〔95〕に記載の方法。

〔97〕前記複数のバーコードを使用して前記細胞の前記複数の標的をバーコーディングして前記複数のバーコード化標的を生成することは、複数の確率論的バーコードを使用して前記細胞の前記複数の標的を確率論的にバーコーディングして、複数の確率論的バーコード化標的を生成することを含む、前記〔94〕～〔96〕のいずれか1項に記載の方法。

〔98〕複数の試料インデックス付与組成物であって、

前記複数の試料インデックス付与組成物の各々は、第1の細胞成分結合性アプタマーおよび試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含むアプタマー組成物を含み、

前記細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも1つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、

前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含み、

前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも2つの試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、

複数の試料インデックス付与組成物。

〔99〕前記試料インデックス付与配列は、6～60ヌクレオチド長または50～500ヌクレオチド長である、前記〔98〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔100〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの少なくとも10、100、または1000個の試料インデックス付与組成物の試料インデックス付与配列は、異なる配列を含む、前記〔98〕または〔99〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔101〕単一ポリヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドおよび前記細胞成分結合性アプタマーを含む、前記〔98〕～〔100〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔102〕前記アプタマーは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの5'側にある、前記〔101〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔103〕前記アプタマーは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの3'側にある、前記〔101〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔104〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーに付随している、前記〔98〕～〔103〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔105〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに付着されており、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されていてもよい、前記〔98〕～〔104〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔106〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされており、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい、前記〔98〕～〔105〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔107〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタ

10

20

30

40

50

マーに非共有結合で付着されている、前記〔９８〕～〔１０５〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１０８〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して、タンパク質結合性アプタマーまたは前記細胞成分結合性アプタマーに付随している、前記〔９８〕～〔１０７〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１０９〕前記タンパク質結合性アプタマーまたは前記細胞成分結合性アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含み、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔９８〕～〔１０８〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

10

〔１１０〕前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含み、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい、前記〔１０９〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１１〕前記細胞成分結合性アプタマーは、ペプチドアプタマーを含む、前記〔９８〕～〔１１０〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１２〕前記試料インデックス付与組成物は、第１の担体に付随している、前記〔９８〕～〔１１１〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１３〕前記複数の試料インデックス付与組成物のうちの異なる試料インデックス付与組成物は、異なる第１の担体に付随している、前記〔９８〕～〔１１２〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

20

〔１１４〕前記アプタマー組成物は、第１の担体に付随している、前記〔９８〕～〔１１１〕のいずれか１項に記載の試料インデックス付与組成物のうちの複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１５〕前記アプタマー組成物は、

１つもしくは複数のタンパク質標的または１つもしくは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも１つに特異的に結合することが可能な第２の細胞成分結合性アプタマー、および第２の試料インデックス付与配列を含む第２の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを含む、前記〔９８〕～〔１１１〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１６〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第２の細胞成分結合性アプタマーは、第１の担体に付随している、前記〔１１５〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

30

〔１１７〕前記細胞成分結合性アプタマーは、第１の担体に付随しており、前記第２の細胞成分結合性アプタマーは、第２の担体に付随している、前記〔１１５〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１８〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第２の細胞成分結合性アプタマーは、配列が少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、または９５％同一である、前記〔１１５〕～〔１１７〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１１９〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第２の細胞成分結合性アプタマーは同一である、前記〔１１６〕～〔１１８〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

40

〔１２０〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第２の細胞成分結合性アプタマーは異なる、前記〔１１６〕～〔１１８〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１２１〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第２の細胞成分結合性アプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は同一である、前記〔１１６〕～〔１２０〕のいずれか１項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔１２２〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第２の細胞成分結合性アプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔１２１〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

50

〔123〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は異なる、前記〔116〕～〔120〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔124〕前記第1の担体は、

金属ナノ材料であって、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せを含んでいてもよい金属ナノ材料、および／または

金ナノ材料であって、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金ナノ材料、および／または

リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せを含む、前記〔112〕～〔123〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

10

〔125〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体に付着されており、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体に共有結合で付着されていてもよい、前記〔115〕～〔124〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔126〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体にコンジュゲートされており、前記細胞成分結合性アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第1の担体にコンジュゲートされていてもよい、前記〔115〕～〔125〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔127〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体に非共有結合で連結されている、前記〔115〕～〔126〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

20

〔128〕前記細胞成分結合性アプタマーは、リンカーを介して前記第1の担体に付随している、前記〔115〕～〔127〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔129〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体上に固定化されているか、前記第1の担体上に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に固定化されているか、前記第1の担体内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、前記〔115〕～〔128〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

30

〔130〕前記第1の担体は、前記細胞へと内部移行され、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより前記細胞へと内部移行されてもよい、前記〔112〕～〔129〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔131〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記1つまたは複数の細胞のいずれのゲノム配列とも相同性ではない、前記〔98〕～〔130〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

40

〔132〕前記複数の試料のうちの少なくとも1つの試料は、1つもしくは複数の単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔98〕～〔131〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔133〕前記試料は、哺乳動物試料、細菌試料、ウイルス試料、酵母試料、真菌試料、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔105〕～〔132〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔134〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔98〕～〔133〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

50

〔135〕バーコードは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含む、前記〔134〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔136〕前記標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含む、前記〔135〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔137〕前記捕捉配列に相補的な前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（dA）領域を含む、前記〔134〕～〔136〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔138〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、前記ポリ（dA）領域に隣接するアラインメント配列を含み、任意に、（a）前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であり、（b）前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含み、および／あるいは（c）前記アラインメント配列は、ポリ（dT）領域、ポリ（dG）領域、ポリ（dC）領域、ポリ（dU）領域、またはそれらの組合せを含む、前記〔137〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔139〕前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（dA）領域、またはそれらの組合せを含み、前記分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長であってもよく、前記ユニバーサルプライマーは、5～50ヌクレオチド長であってもよく、または両方であってもよく、前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔98〕～〔138〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔140〕前記細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せを含む、前記〔98〕～〔139〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔141〕前記細胞成分標的は、10～100個の異なる細胞成分標的を含む群から選択される、前記〔98〕～〔140〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔142〕前記細胞成分結合性アプタマーには、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、前記〔98〕～〔141〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔143〕前記細胞成分結合性アプタマーには、異なる試料インデックス付与配列を有する2つまたはそれよりも多くの試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、前記〔98〕～〔141〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔144〕前記試料インデックス付与組成物は、第2の細胞成分結合性アプタマーを含み、前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、前記1つまたは複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、前記〔98〕～〔143〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔145〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、前記1つまたは複数の細胞成分標的の同じ細胞成分標的に結合することが可能であり、前記第2の細胞成分結合性アプタマーには、前記試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随していない、前記〔144〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔146〕前記第2の細胞成分結合性アプタマーには、第2の試料インデックス付与配列を含む第2の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドが付随している、前記〔144〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔147〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%配列同一性を有する、前記〔145〕または〔146〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔148〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは同一である、前記〔145〕～〔147〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔149〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、同じタンパク質標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔144〕～〔148〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔150〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、前記1つまたは複数のタンパク質標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔149〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔151〕前記試料インデックス付与配列および前記第2の試料インデックス付与配列は同一である、前記〔146〕～〔150〕のいずれか1項に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

〔152〕前記試料インデックス付与配列および前記第2の試料インデックス付与配列は異なる、前記〔151〕に記載の複数の試料インデックス付与組成物。

10

〔153〕細胞におけるタンパク質発現を測定するための方法であって、

複数のタンパク質結合性アプタマーを、複数のタンパク質標的を含む複数の細胞と接触させることであって、前記複数のタンパク質結合性アプタマーの各々は、細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、前記タンパク質結合性アプタマーは、前記複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；

前記複数のタンパク質結合性アプタマーが付随している前記複数の細胞を複数の区画に分配することであって、前記複数の区画のうちの区画は、前記タンパク質結合性アプタマーが付随している前記複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；

20

前記単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、こと；

前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、前記標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、こと；および

前記複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、前記複数の細胞の1つまたは複数における、前記複数のタンパク質標的の1つまたは複数の量を決定することを含む方法。

30

〔154〕細胞における細胞成分発現を測定するための方法であって、

複数の細胞成分結合性アプタマーを、複数の細胞成分標的を含む複数の細胞と接触させることであって、前記複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、前記細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、こと；

前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識化核酸を産生することであって、前記標識化核酸の各々は、固有識別子配列またはその相補配列およびバーコード配列を含む、こと；ならびに

前記複数の標識化核酸またはその一部の配列情報を得て、前記複数の細胞の1つまたは複数における、前記複数の細胞成分標的の1つまたは複数の量を決定することを含む方法。

40

〔155〕前記オリゴヌクレオチドプローブを伸長する前に、

前記複数の細胞成分結合性アプタマーが付随している前記複数の細胞を複数の区画に分配することであって、前記複数の区画のうちの区画は、前記細胞成分結合性アプタマーが付随している前記複数の細胞に由来する単一細胞を含む、こと；

前記単一細胞を含む区画において、バーコーディング粒子を、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドと接触させることであって、前記バーコーディング粒子は、各々が、標的結合性領域、および多様なセットの固有バーコード配列から選択されるバーコード配列を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む、こと

50

を含む、前記〔154〕に記載の方法。

〔156〕前記複数の細胞成分標的は、複数のタンパク質標的を含み、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記複数のタンパク質標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である、前記〔154〕または〔155〕に記載の方法。

〔157〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよび前記アプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成する、前記〔153〕～〔156〕のいずれか1項に記載の方法。

〔158〕前記アプタマーは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にある、前記〔157〕に記載の方法。

〔159〕前記アプタマーは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にある、前記〔157〕に記載の方法。

〔160〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーに付随している、前記〔153〕～〔159〕のいずれか1項に記載の方法。

〔161〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーに付着されている、前記〔153〕～〔160〕のいずれか1項に記載の方法。

〔162〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーに共有結合で付着されている、前記〔153〕～〔161〕のいずれか1項に記載の方法。

〔163〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーに非共有結合で付着されている、前記〔153〕～〔161〕のいずれか1項に記載の方法。

〔164〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーにコンジュゲートされており、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記アプタマーにコンジュゲートされていてもよい、前記〔153〕～〔163〕のいずれか1項に記載の方法。

〔165〕前記アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含み、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、ゼノ核酸(XNA)、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔153〕～〔164〕のいずれか1項に記載の方法。

〔166〕前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含み、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい、前記〔165〕に記載の方法。

〔167〕前記アプタマーは、ペプチドアプタマーを含む、前記〔153〕～〔166〕のいずれか1項に記載の方法。

〔168〕前記複数のタンパク質結合性アプタマーは、第2のタンパク質結合性アプタマーを含むか、または前記複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含む、

前記〔153〕～〔156〕のいずれか1項に記載の方法。

〔169〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、第1の担体に付随している、前記〔168〕に記載の方法。

〔170〕前記アプタマーは、第1の担体に付随しており、

前記第2のアプタマーは、第2の担体に付随している、

前記〔168〕に記載の方法。

〔171〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、配列が少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%同一である、前記〔168〕～〔170〕のいずれか1項に記載の方法。

〔172〕前記アプタマーおよび前記第2のタンパク質結合性アプタマーは同一である、前記〔168〕～〔171〕のいずれか1項に記載の方法。

〔173〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは異なる、前記〔168〕～〔170〕のいずれか1項に記載の方法。

〔174〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は同一である、前記〔173〕に記載の方法。

〔175〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーは、タンパク質標的または細胞成

10

20

30

40

50

分標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔173〕に記載の方法。

〔176〕前記アプタマーおよび前記第2のアプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は異なる、前記〔173〕に記載の方法。

〔177〕前記第1の担体は、

金属ナノ材料であって、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであって
もよい金属ナノ材料、および／または

金ナノ材料であって、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであって
もよい金ナノ材料、および／または

リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せ
を含む、前記〔168〕～〔176〕のいずれか1項に記載の方法。

10

〔178〕前記アプタマーは、前記第1の担体に付着されており、前記アプタマーは、前
記第1の担体に共有結合で付着されていてもよい、前記〔168〕～〔177〕のいずれ
か1項に記載の方法。

〔179〕前記アプタマーは、前記第1の担体にコンジュゲートされており、前記アプ
タマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組
合せからなる群から選択される化学基を介して前記第1の担体にコンジュゲートされてい
てもよい、前記〔168〕～〔178〕のいずれか1項に記載の方法。

〔180〕前記アプタマーは、前記第1の担体に非共有結合で連結されている、前記〔1
68〕～〔179〕のいずれか1項に記載の方法。

〔181〕前記アプタマーは、リンカーを介して前記第1の担体に付随している、前記〔
168〕～〔180〕のいずれか1項に記載の方法。

20

〔182〕前記アプタマーは、前記第1の担体上に固定化されているか、前記第1の担体
上に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に固定化されているか、前記第1の
担体内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1
の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第
1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、前記〔168
〕～〔181〕のいずれか1項に記載の方法。

〔183〕前記アプタマーを前記第1の担体から解離させることを含む、前記〔168〕
～〔182〕のいずれか1項に記載の方法。

〔184〕前記解離は、前記単一細胞を含む前記区画での接触後に生じる、前記〔183
〕に記載の方法。

30

〔185〕前記解離は、前記単一細胞を含む前記区画での接触前に生じる、前記〔183
〕に記載の方法。

〔186〕前記複数のアプタマーを前記複数の細胞と接触させることは、前記アプタマ
ーを含む前記第1の担体を、前記複数のタンパク質標的を含む前記複数の細胞のうちの細胞
と接触させることを含む、前記〔168〕～〔185〕のいずれか1項に記載の方法。

〔187〕前記第1の担体は、前記細胞へと内部移行され、エンドサイトーシス、ピノサ
イトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、
膜融合、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行
、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより前記細胞へと内部移行されても
よい、前記〔186〕に記載の方法。

40

〔188〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマー特異的オリゴヌ
クレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔1
68〕～〔187〕のいずれか1項に記載の方法。

〔189〕バーコードは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含み、前記標的結合性領
域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよい、前記〔188〕に記載の方法。

〔190〕前記捕捉配列に相補的な前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、
ポリ(dA)領域を含む、前記〔188〕または〔189〕に記載の方法。

〔191〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーが、前記複数の
タンパク質標的または細胞成分標的のうちの前記少なくとも1つと接触すると、前記ポリ

50

〔d A〕領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、前記ポリ（d A）領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化する、前記〔190〕に記載の方法。

〔192〕前記第1のコンフォメーションの前記アダプター特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ（d A）領域は、ヘアピン構造を構成し、前記ヘアピン構造を伴う前記ポリ（d A）領域は、前記バーコードの前記標的結合性領域の前記ポリ（d T）領域に接近可能である、前記〔191〕に記載の方法。

〔193〕前記オリゴヌクレオチドプローブは、前記アダプター特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ（d A）領域と前記オリゴヌクレオチドプローブの前記ポリ（d T）領域とのハイブリダイゼーションにより前記アダプター特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる、前記〔190〕～〔192〕のいずれか1項に記載の方法。

10

〔194〕前記アダプター特異的オリゴヌクレオチドは、前記ポリ（d A）領域に隣接するアラインメント配列を含み、任意に、（a）前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2もしくはそれよりも長いヌクレオチド長であり、（b）前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含み、および／あるいは（c）前記アラインメント配列は、ポリ（d T）領域、ポリ（d G）領域、ポリ（d C）領域、ポリ（d U）領域、またはそれらの組合せを含む、前記〔190〕～〔193〕のいずれか1項に記載の方法。

〔195〕前記アダプター特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含み、前記分子標識配列は2～20ヌクレオチド長であってもよく、または前記ユニバーサルプライマーは5～50ヌクレオチド長であってもよく、または両方であってもよい、前記〔168〕～〔194〕のいずれか1項に記載の方法。

20

〔196〕前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含む、前記〔195〕に記載の方法。

〔197〕前記複数のアダプターを前記複数の細胞と接触させた後、前記複数の細胞と接触していないアダプターを除去することを含む、前記〔168〕～〔196〕のいずれか1項に記載の方法。

〔198〕前記複数の細胞と接触していないアダプターの除去は、前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターを除去することを含む、前記〔197〕に記載の方法。

30

〔199〕前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターの除去は、アダプタースポンジを使用して、前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターを除去することを含む、前記アダプタースポンジは、前記アダプターの配列に相補的な複数の配列を含んでいてもよい、前記〔198〕に記載の方法。

〔200〕前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターは、前記アダプタースポンジの複数の配列にハイブリダイズする、前記〔199〕に記載の方法。

〔201〕前記アダプターは相補配列を含む、前記〔198〕に記載の方法。

〔202〕前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターは、互いにハイブリダイズして凝集体を形成し、前記凝集体は、前記細胞での分解の標的とされてもよい、前記〔201〕に記載の方法。

40

〔203〕前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターの除去は、複数のアンチセンスアダプターを使用して、前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターを除去することを含む、

前記複数のアンチセンスアダプターの各アンチセンスアダプターは、前記複数のタンパク質標的の対応する少なくとも1つと接触していないアダプターの1つのアダプター特異的オリゴヌクレオチドの相補配列またはその一部を含むアンチセンスアダプター特異的オリゴヌクレオチドを含む第2のアダプターを含み、

前記アダプター特異的オリゴヌクレオチドおよび前記アンチセンスアダプター特異的オ

50

リゴヌクレオチドは、二本鎖のまたは部分的に二本鎖のデオキシリボ核酸（DNA）分子を形成する、

前記〔198〕に記載の方法。

〔204〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドを、前記アプタマーから脱離させることを含む、前記〔153〕～〔203〕のいずれか1項に記載の方法。

〔205〕前記複数の細胞の分配は、前記複数のアプタマーが付随している前記複数の細胞および前記バーコーディング粒子を含む複数のバーコーディング粒子を前記複数の区画に分配することを含み、前記複数の区画のうちの前記区画は、オリゴヌクレオチドコンジュゲートアプタマーおよび前記バーコーディング粒子が付随している前記複数の細胞に由来する前記単一細胞を含む、前記〔153〕～〔204〕のいずれか1項に記載の方法。

10

〔206〕前記複数の標識化核酸またはそれらの一部の配列決定情報を得ることは、前記標識化核酸を1つまたは複数の反応に供して、核酸配列決定のための1セットの核酸を生成することを含む、前記〔153〕～〔205〕のいずれか1項に記載の方法。

〔207〕前記複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞内タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの組合せを含む、前記〔153〕～〔206〕のいずれか1項に記載の方法。

〔208〕前記オリゴヌクレオチドプローブの各々は、細胞標識、ユニバーサルプライマーの結合部位、増幅アダプター、配列決定アダプター、またはそれらの組合せを含む、前記〔153〕～〔207〕のいずれか1項に記載の方法。

20

〔209〕前記バーコーディング粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、ヒドロゲルビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはヒドロゲルビーズである、前記〔153〕～〔208〕のいずれか1項に記載の方法。

〔210〕前記区画は、ウェルまたは液滴である、前記〔153〕～〔209〕のいずれか1項に記載の方法。

〔211〕前記複数の細胞は、T細胞、B細胞、腫瘍細胞、骨髄性細胞、血液細胞、正常細胞、胎児細胞、母体細胞、またはそれらの混合物を含む、前記〔153〕～〔210〕のいずれか1項に記載の方法。

〔212〕複数の細胞成分結合性アプタマーを含む組成物であって、前記複数の細胞成分結合性アプタマーの各々は、前記細胞成分結合性アプタマーのための固有識別子配列を含むアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含み、前記細胞成分結合性アプタマーは、複数の細胞成分標的のうちの少なくとも1つに特異的に結合することが可能である組成物。

30

〔213〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよび前記アプタマーは、単一ポリヌクレオチドを形成する、前記〔212〕に記載の組成物。

〔214〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの5'側にあるか、または前記細胞成分結合性アプタマーは、前記単一ポリヌクレオチドにおいて前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの3'側にある、前記〔213〕に記載の組成物。

〔215〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに付随している、前記〔212〕～〔214〕のいずれか1項に記載の組成物。

40

〔216〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに付着されている、前記〔212〕～〔215〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔217〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されている、前記〔216〕に記載の組成物。

〔218〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに非共有結合で付着されている、前記〔216〕に記載の組成物。

〔219〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされており、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から

50

選択される化学基を介して前記細胞成分結合性アプタマーにコンジュゲートされていてもよい、前記〔212〕～〔218〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔220〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記細胞成分結合性アプタマーに共有結合で付着されている、前記〔212〕～〔219〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔221〕前記細胞成分結合性アプタマーは、ヌクレオチドアプタマーを含み、前記ヌクレオチドアプタマーは、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、ゼノ核酸（XNA）、フルオロフォア、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔212〕～〔220〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔222〕前記ヌクレオチドアプタマーは塩基アナログを含み、前記塩基アナログは、蛍光性塩基アナログを含んでいてもよい、前記〔221〕に記載の組成物。

〔223〕前記細胞成分結合性アプタマーは、ペプチドアプタマーを含む、前記〔212〕または〔222〕に記載の組成物。

〔224〕前記複数の細胞成分結合性アプタマーは、第2の細胞成分結合性アプタマーを含む、

前記〔212〕～〔223〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔225〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随している、

前記〔224〕に記載の組成物。

〔226〕前記細胞成分結合性アプタマーは、第1の担体に付随しており、

前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、第2の担体に付随している、

前記〔224〕に記載の組成物。

〔227〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、少なくとも60%、70%、80%、90%、または95%配列同一性を有する、前記〔224〕～〔226〕に記載の組成物。

〔228〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび第2のタンパク質結合性アプタマーは同一である、前記〔224〕～〔227〕のいずれか1項に記載の方法。

〔229〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは異なる、前記〔224〕～〔226〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔230〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーのタンパク質標的または細胞成分標的は同一である、前記〔229〕に記載の組成物。

〔231〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーは、タンパク質標的または細胞成分標的の異なる領域に結合することが可能である、前記〔229〕に記載の組成物。

〔232〕前記細胞成分結合性アプタマーおよび前記第2の細胞成分結合性アプタマーの前記タンパク質標的または前記細胞成分標的は異なる、前記〔229〕に記載の組成物。

〔233〕前記第1の担体は、

金属ナノ材料であって、金属ナノ構造、金属ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金属ナノ材料、および／または

金ナノ材料であって、金ナノ構造、金ナノ粒子、もしくはそれらの組合せであってもよい金ナノ材料を含み、ならびに／または

前記第1の担体は、リソソーム、ミセル、小胞、脂質膜、脂質二重層、脂質単層、もしくはそれらの組合せを含む

前記〔225〕～〔232〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔234〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体に付着されており、前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体に共有結合で付着されていてもよい、前記〔225〕～〔233〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔235〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体にコンジュゲートされており、前記細胞成分結合性アプタマーは、UV光切断可能基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの組合せからなる群から選択される化学基を介して前記第1の

10

20

30

40

50

担体にコンジュゲートされていてもよい、前記〔225〕～〔233〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔236〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体に非共有結合で連結されている、前記〔225〕～〔235〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔237〕前記細胞成分結合性アプタマーは、リンカーを介して前記第1の担体に付随している、前記〔225〕～〔236〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔238〕前記細胞成分結合性アプタマーは、前記第1の担体上に固定化されているか、前記第1の担体上に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に固定化されているか、前記第1の担体内に部分的に固定化されているか、前記第1の担体内に封入されているか、前記第1の担体内に部分的に封入されているか、前記第1の担体内に埋め込まれているか、前記第1の担体内に部分的に埋め込まれているか、またはそれらの組合せである、前記〔225〕～〔237〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔239〕前記第1の担体は、細胞へと内部移行されるように構成されており、エンドサイトーシス、ピノサイトーシス、ナノピノサイトーシス、マイクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス、膜融合、クラスリン媒介性内部移行、カベオリン媒介性内部移行、受容体依存性内部移行、受容体非依存性内部移行、またはそれらの組合せにより細胞へと内部移行されるように構成されていてもよい、前記〔225〕～〔238〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔240〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔212〕～〔239〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔241〕バーコードは、前記捕捉配列を含む標的結合性領域を含み、前記標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含んでいてもよい、前記〔240〕に記載の方法。

〔242〕前記捕捉配列に相補的な前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ(dA)領域を含む、前記〔240〕または〔241〕に記載の組成物。

〔243〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記アプタマーが、複数のタンパク質標的または細胞成分標的のうちの少なくとも1つと接触すると、前記ポリ(dA)領域が接近不能である第1のコンフォメーションから、前記ポリ(dA)領域が接近可能である第2のコンフォメーションへと変化する、前記〔242〕に記載の組成物。

〔244〕前記第1のコンフォメーションの前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ(dA)領域は、ヘアピン構造を構成し、前記ヘアピン構造を伴う前記ポリ(dA)領域は、前記バーコードの前記標的結合性領域の前記ポリ(dT)領域に接近可能であってもよい、前記〔243〕に記載の組成物。

〔245〕オリゴヌクレオチドプローブは、前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドの前記ポリ(dA)領域と前記オリゴヌクレオチドプローブの前記ポリ(dT)領域とのハイブリダイゼーションにより前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる、前記〔243〕～〔244〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔246〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、前記ポリ(dA)領域に隣接するアラインメント配列を含み、任意に、(a)前記アラインメント配列は、1もしくはそれよりも長いヌクレオチド長または2ヌクレオチド長であり、(b)前記アラインメント配列は、グアニン、シトシン、チミン、ウラシル、またはそれらの組合せを含み、および/あるいは(c)前記アラインメント配列は、ポリ(dT)領域、ポリ(dG)領域、ポリ(dC)領域、ポリ(dU)領域、またはそれらの組合せを含む、前記〔242〕～〔245〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔247〕前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーの結合部位、または両方を含み、前記ユニバーサルプライマーは、増幅プライマー、配列決定プライマー、またはそれらの組合せを含んでいてもよい、前記〔212〕～〔246〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔248〕前記分子標識配列は、2～20ヌクレオチド長であるか、前記ユニバーサルプライマーは、5～50ヌクレオチド長であるか、または両方である、前記〔247〕に記

10

20

30

40

50

載の組成物。

〔249〕アプタマースポンジを含み、前記アプタマースポンジは、前記アプタマーの配列に相補的な複数の配列を含んでいてもよい、前記〔212〕～〔248〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔250〕前記アプタマーは相補配列を含む、前記〔212〕～〔248〕のいずれか1項に記載の組成物。

〔251〕前記アプタマーは、互いにハイブリダイズして凝集体を形成するように構成されており、前記凝集体は、前記細胞での分解の標的とされてもよい、前記〔250〕に記載の組成物。

〔252〕複数のアンチセンスアプタマーを含み、

前記複数のアンチセンスアプタマーの各アンチセンスアプタマーは、前記アプタマーの1つのアプタマー特異的オリゴヌクレオチドの相補配列またはその一部を含むアンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドを含む第2のアプタマーを含み、

前記アプタマー特異的オリゴヌクレオチドおよび前記アンチセンスアプタマー特異的オリゴヌクレオチドは、二本鎖のまたは部分的に二本鎖のデオキシリボ核酸（DNA）分子を形成する、

前記〔212〕～〔248〕のいずれか1項に記載の組成物。

【図面】

【図1】

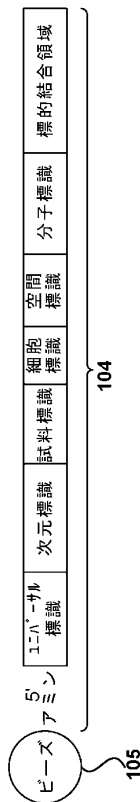


FIG. 1

【図2】

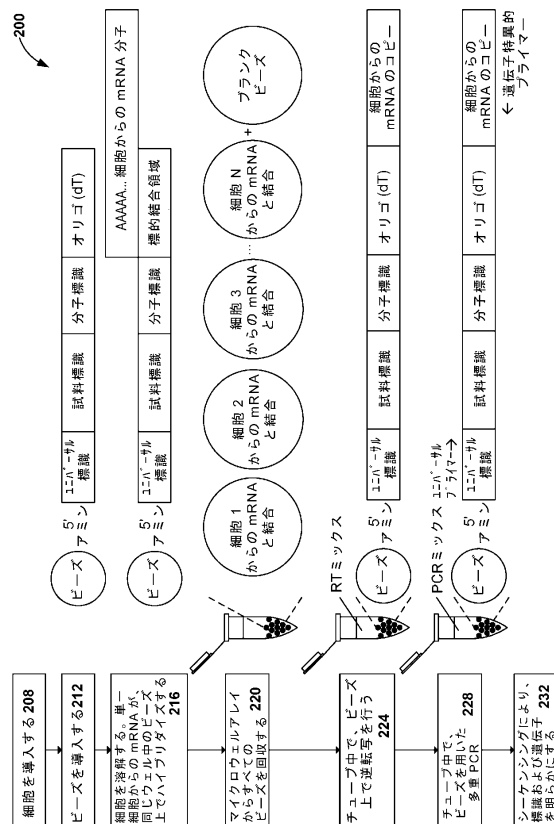


FIG. 2

10

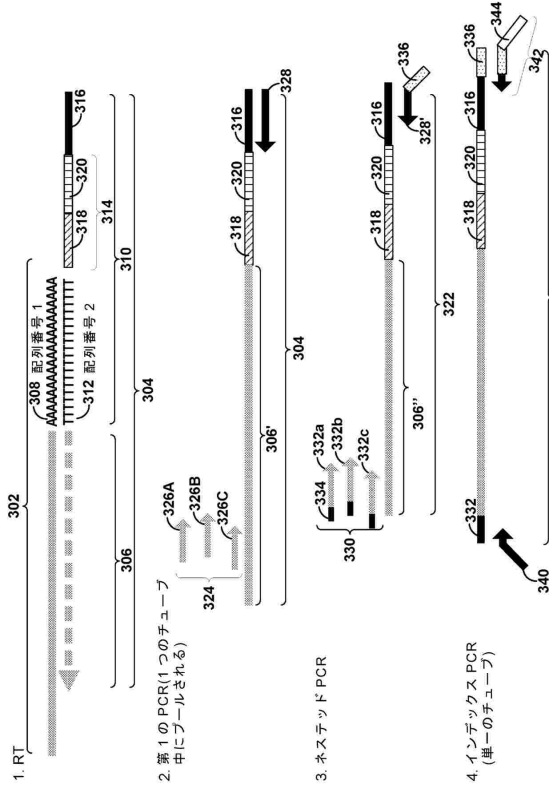
20

30

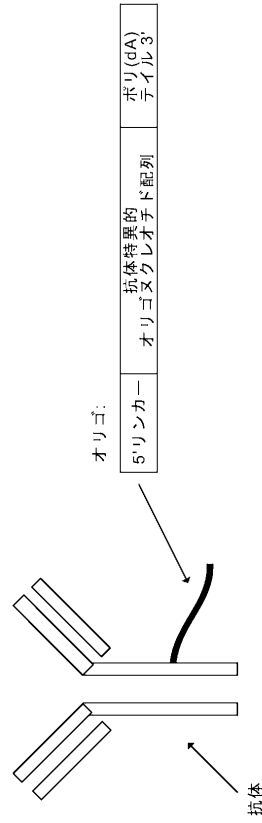
40

50

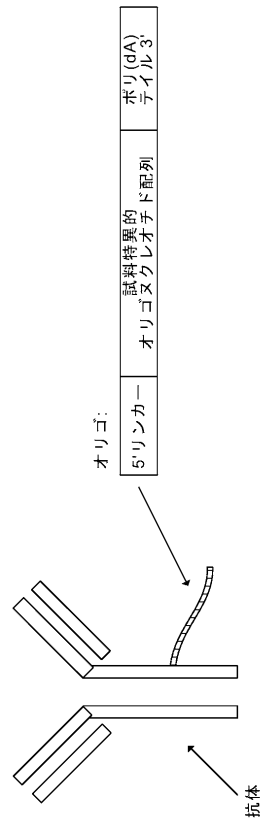
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図 6】

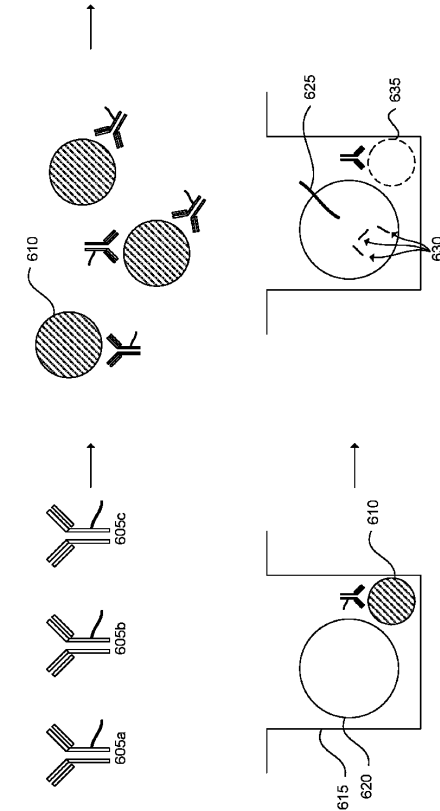


FIG. 4

FIG. 6

【図 7】

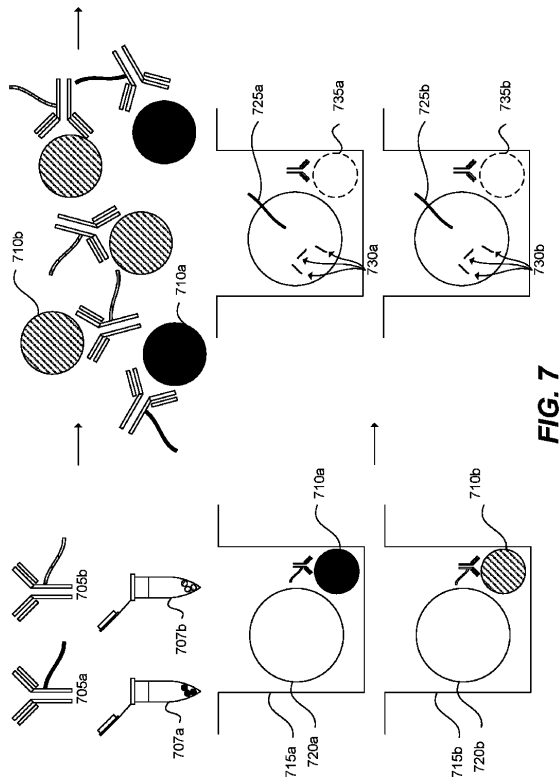
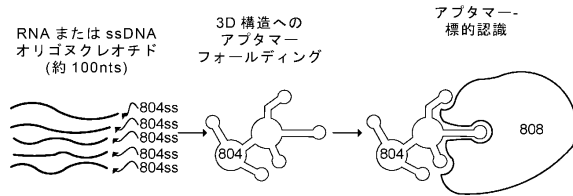


FIG. 7

【図 8 A】

FIG. 8A

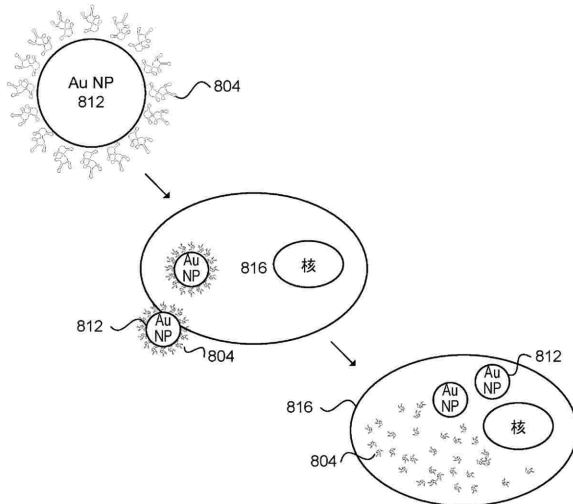


10

20

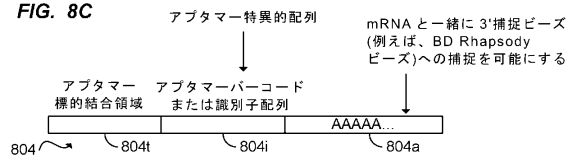
【図 8 B】

FIG. 8B



【図 8 C】

FIG. 8C



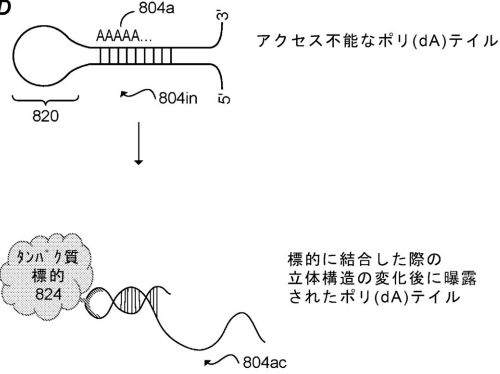
30

40

50

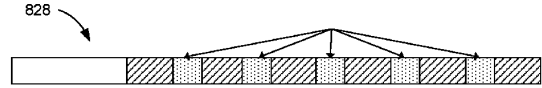
【図 8 D】

FIG. 8D

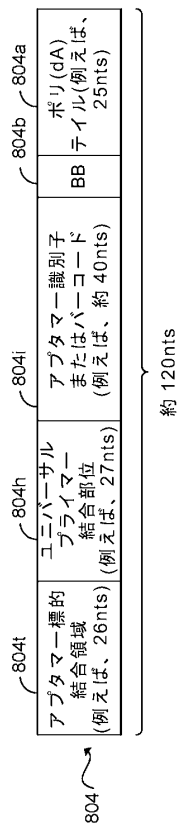


【図 8 E】

FIG. 8E



【図 9】



【図 10 A】

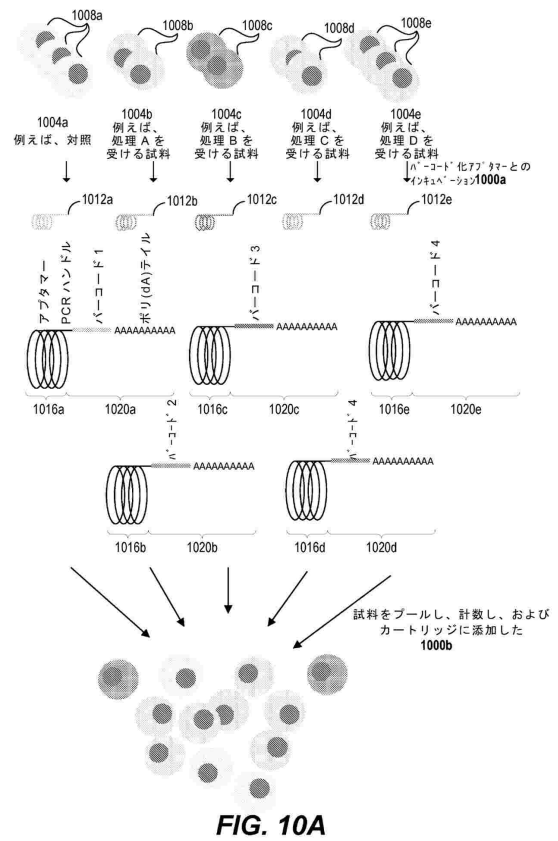
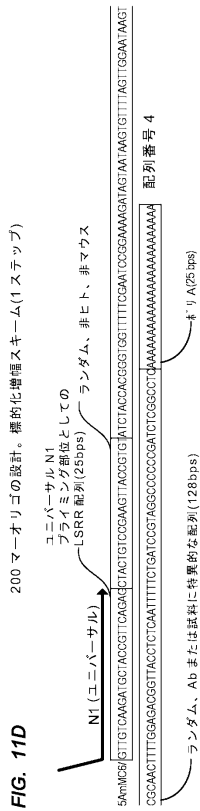


FIG. 9

FIG. 10A

【図 1 1 D】



【配列表】

0007590955000001.app

【図 1 2】

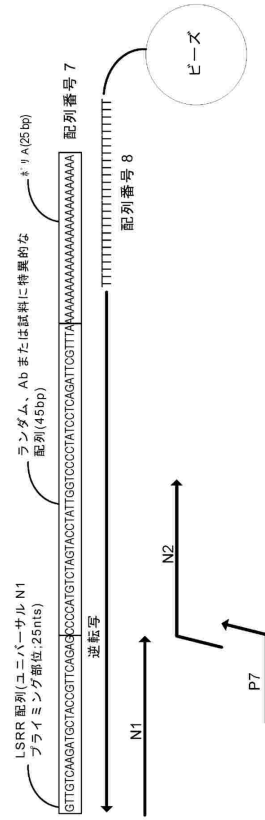


FIG. 12

10

20

30

40

50

フロントページの続き

弁理士 服部 博信
(74)代理人 100123766
弁理士 松田 七重
(74)代理人 100183379
弁理士 藤代 昌彦
(72)発明者 チャン クリスティーナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 1 サンノゼ クム ドライヴ 2 3 5 0
(72)発明者 シャム エリーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 1 サンノゼ クム ドライヴ 2 3 5 0
(72)発明者 リ シシン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 1 サンノゼ クム ドライヴ 2 3 5 0
(72)発明者 ナカモト マーガレット
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 1 サンノゼ クム ドライヴ 2 3 5 0
審査官 松田 芳子
(56)参考文献 国際公開第2018/058073 (WO, A2)
米国特許出願公開第2018/0208975 (US, A1)
SCIENTIFIC REPORTS, 2018年02月13日, 8:2919, p.1-8
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)