

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7280181号

(P7280181)

(45)発行日 令和5年5月23日(2023.5.23)

(24)登録日 令和5年5月15日(2023.5.15)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 1 1 0 Z

C 1 2 Q 1/6876(2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 Z

C 1 2 Q 1/6837(2018.01)

C 1 2 Q 1/6837 Z

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 4 0 B 40/06

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

請求項の数 31 (全155頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-517311(P2019-517311)

(86)(22)出願日 平成29年9月29日(2017.9.29)

(65)公表番号 特表2019-528762(P2019-528762
A)

(43)公表日 令和1年10月17日(2019.10.17)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/054628

(87)国際公開番号 WO2018/064640

(87)国際公開日 平成30年4月5日(2018.4.5)

審査請求日 令和2年9月29日(2020.9.29)

(31)優先権主張番号 62/403,116

(32)優先日 平成28年10月1日(2016.10.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/403,111

(32)優先日 平成28年10月1日(2016.10.1)

最終頁に続く

(73)特許権者 514304762

パークレー ライツ, インコーポレイテ
ッド

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9

4 6 0 8, エメリービル, ホールトン

ストリート 5 8 5 8, スイート 3 2 0

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 スミヨン, マガリ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNAバーコード組成物及びマイクロ流体デバイスによるインサイチュ同定法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の捕捉物体であって、当該複数の捕捉物体のそれぞれの捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

ブライミング配列と；

捕捉配列と；

3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列であって、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が当該バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列と、

を含み、

前記複数の捕捉物体の各捕捉物体について、当該各捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含み、

前記複数の捕捉物体の各捕捉物体の前記捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、前記複数の捕捉物体の他の全ての捕捉物体の前記捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列と異なり、

前記複数の捕捉物体の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記複数の捕捉物体の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、

複数の捕捉物体。

【請求項 2】

各捕捉オリゴヌクレオチドが最も 5' 側のヌクレオチドと最も 3' 側のヌクレオチドとを含み、

前記プライミング配列が前記最も 5' 側のヌクレオチドに隣接するか、又はそれを含み、
前記捕捉配列が前記最も 3' 側のヌクレオチドに隣接するか、又はそれを含み、

前記バーコード配列が前記プライミング配列の 3' 側且つ前記捕捉配列の 5' 側に位置する、

請求項 1 に記載の複数の捕捉物体。

【請求項 3】

前記 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が 8 ~ 12 ヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の複数の捕捉物体。

10

【請求項 4】

前記バーコード配列の前記 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、いかなる介在オリゴヌクレオチド配列もなしにタンデムで連結されている、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の複数の捕捉物体。

【請求項 5】

前記バーコード配列の前記 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が、配列番号 1 ~ 40 のいずれか 1 つの配列を含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の複数の捕捉物体。

【請求項 6】

前記バーコード配列が 4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含む、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の複数の捕捉物体。

20

【請求項 7】

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが unique molecule identifier (UMI) 配列を更に含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の複数の捕捉物体。

【請求項 8】

前記 UMI が前記プライミング配列の 3' 側且つ前記捕捉配列の 5' 側に位置する、請求項 7 に記載の複数の捕捉物体。

【請求項 9】

各捕捉オリゴヌクレオチドが、少なくとも 8 ヌクレオチド対の認識配列を含む制限部位を更に含む、請求項 1 に記載の複数の捕捉物体。

30

【請求項 10】

前記捕捉配列が、ポリ - d T 配列、ランダムヘキサマー配列、遺伝子特異的配列、又はモザイク末端配列を含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の複数の捕捉物体。

【請求項 11】

当該複数の捕捉物体の各捕捉物体の各バーコード配列の前記 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれが、12 から 100 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の規定されたセットから選択され、

前記規定されたセットにおける各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記規定されたセットの他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の複数の捕捉物体。

40

【請求項 12】

マイクロ流体デバイス内での 1 つ以上の捕捉物体のインサイチュ同定方法であって、

前記マイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する 1 つ以上の隔離ペンの各々の分離領域の中に前記 1 つ以上の捕捉物体のうちの単一の捕捉物体を配置することであって、

各捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

50

プライミング配列と；

捕捉配列と；

バーコード配列であって、当該バーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でなく、前記1つ以上の捕捉物体の各捕捉物体について、当該各捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含む、バーコード配列と、

を含み、

前記1つ以上の捕捉物体の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記1つ以上の捕捉物体の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、配置することと；

第1のハイブリダイゼーションプローブセットを含む第1の試薬溶液を前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャの中のフロー領域に流入させることであって、

前記フロー領域が前記1つ以上の隔離ペンの各々に流体接続し、及び前記第1のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブが、

前記1つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかに含まれるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と相補的なオリゴヌクレオチド配列であって、前記第1のハイブリダイゼーションプローブセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの前記相補的なオリゴヌクレオチド配列が前記第1のハイブリダイゼーションプローブセット中の前記ハイブリダイゼーションプローブの他のいずれの相補的なオリゴヌクレオチド配列とも同一でない、相補的なオリゴヌクレオチド配列と；

分光的に区別可能な蛍光標識のセットから選択される蛍光標識であって、前記第1のハイブリダイゼーションプローブセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの前記蛍光標識が前記第1のハイブリダイゼーションプローブセット中の他のいずれのハイブリダイゼーションプローブの前記蛍光標識とも異なる、蛍光標識と、

を含む、

流入させることと；

前記第1のハイブリダイゼーションプローブセットの前記ハイブリダイゼーションプローブを前記1つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかにおける対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズすることと；

前記第1のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブについて、前記1つ以上の捕捉物体のいずれかに関連する対応する蛍光シグナルを検出することと；

前記1つ以上の隔離ペンのうちの1つの中に配置された各捕捉物体について、(i)前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャの中での前記隔離ペンの位置と、(ii)前記第1のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブの前記対応する蛍光シグナルと前記捕捉物体との関連性又は非関連性と、を含むレコードを生成することであって、前記関連性及び非関連性のレコードが、前記捕捉物体を前記隔離ペンと関連付けるバーコードを構成することと、

を含む方法。

【請求項13】

ハイブリダイゼーションプローブの第nのセットを含む第nの試薬溶液を前記マイクロ流体デバイスの前記フロー領域に流入させることであって、

前記第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブが、

前記1つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかに含まれるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と相補的なオリゴヌクレオチド配列であって、前記第nのセット中の各ハイブリダイゼーションプロー

10

20

30

40

50

ブの前記相補的なオリゴヌクレオチド配列が前記第 n のセット中及び前記マイクロ流体デバイスの前記フロー領域に流入させる任意の他のハイブリダイゼーションプローブセット中の前記ハイブリダイゼーションプローブの他のいずれの相補的なオリゴヌクレオチド配列とも同一でない、相補的なオリゴヌクレオチド配列と；

分光的に区別可能な蛍光標識のセットから選択される蛍光標識であって、前記第 n のセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの前記蛍光標識が前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセット中の他のいずれのハイブリダイゼーションプローブの蛍光標識とも異なる、蛍光標識と、

を含む、

流入させることと；

前記第 n のセットの前記ハイブリダイゼーションプローブを前記 1 つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかにおける対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズすることと；

前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブについて、前記 1 つ以上の捕捉物体のいずれかに関連する対応する蛍光シグナルを検出することと；

前記 1 つ以上の隔離ペンのうちの 1 つの中に配置された各捕捉物体について、前記レコードに、前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブの前記対応する蛍光シグナルと前記捕捉物体との関連性又は非関連性を補足することと、

を更に含む、請求項 1 2 に記載の方法であって

n が、 $\{2, \dots, m\}$ の値を有する正の整数の集合であり、

m が 2 以上の値を有する正の整数であり、

前述の前記第 n の試薬を流入させるステップ、前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットをハイブリダイズするステップ、前記対応する蛍光シグナルを検出するステップ、及び前記レコードを補足するステップが、前記正の整数の集合 $\{2, \dots, m\}$ 中の n の各値について繰り返され、

m が 3 以上及び 20 以下の値を有する、

請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

各捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの各バーコード配列が 3 又は 4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含む、請求項 1 2 又は 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記第 1 のハイブリダイゼーションプローブセット及び前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各々が 3 又は 4 つのハイブリダイゼーションプローブを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記マイクロ流体デバイスの前記 1 つ以上の隔離ペンの中に 1 つ以上の生体細胞を配置することを更に含む、請求項 1 2 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、前記 1 つ以上の生体細胞の各 1 つずつが、前記 1 つ以上の隔離ペンのうちの異なる隔離ペンに配置される、請求項 1 2 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (DEP) 構成を更に含み、前記 1 つ以上の捕捉物体を 1 つ以上の隔離ペン内に配置することが誘電泳動 (DEP) 力を用いて実施される、請求項 1 2 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (DEP) 構成を更に含み、前記 1 つ以上の生体細胞を前記 1 つ以上の隔離ペンの中に前記配置することが誘電泳動 (DEP) 力を用いて実施される、請求項 1 6 又は 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

10

20

30

40

50

ゲノムデータをマイクロ流体デバイス内の生体細胞と関係付ける方法であって、
捕捉物体をマイクロ流体デバイスの隔離ペン内に配置することであって、
前記捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、
前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、
プライミング配列と；
捕捉配列と；

バーコード配列であって、当該バーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列と

を含み、

前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含み、

前記捕捉物体の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記捕捉物体の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、

配置することと；

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定すること、及び前記同定されたバーコード配列と前記隔離ペンとの間の関連性を記録することと；

前記生体細胞を前記隔離ペン内に配置することと；

前記生体細胞を溶解させること及び前記溶解した生体細胞から放出される核酸を、前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドによって捕捉させることと；

前記捕捉された核酸を逆転写し、それにより、各バーコード付きcDNAが前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの1つに共有結合的に結合した相補的な捕捉核酸配列を含む複数のバーコード付きcDNAを作製することと；

前記複数のバーコード付きcDNAをシーケンシングし、それにより前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの1つの前記バーコード配列に関連する前記相補的な捕捉核酸配列のリード配列を入手することと；

前記リード配列に基づき前記バーコード配列を同定することと；

前記リード配列によって同定されたバーコード配列及び前記インサイチュで同定されたバーコード配列を使用して、前記相補的な捕捉核酸配列の前記リード配列を前記隔離ペンと関連付けること、及びそれにより前記相補的な捕捉核酸配列の前記リード配列を前記隔離ペン内に置かれた前記生体細胞と関係付けることと、

を含む方法。

【請求項20】

前記生体細胞の表現型を観察することと；

前記相補的な捕捉核酸配列の前記リード配列を前記生体細胞の前記表現型と関係付けることと、

を更に含む、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定することが、請求項12に記載の方法を実施することを含む、請求項19又は20に記載の方法。

【請求項22】

複数の捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスの対応する複数の隔離ペン内に配置することと；

複数の生体細胞を前記対応する複数の隔離ペン内に配置することと、

前記複数の捕捉物体及び複数の生体細胞の各々を前記方法に従い処理することと、

を更に含む、請求項19から21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

核酸ライブラリを作製するためのキットであって、

マイクロ流体デバイスであって、

10

20

30

40

50

エンクロージャであって、前記エンクロージャがフロー領域と前記フロー領域に通じる複数の隔離ペンを含む、エンクロージャと；

誘電泳動（DEP）構成と、

を含むマイクロ流体デバイスと；

複数の捕捉物体であって、前記複数の捕捉物体のうちの各捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

捕捉配列と；

少なくとも3つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列であって、当該バーコード配列の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が当該バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列と；

10

を含み、

前記複数の捕捉物体の各捕捉物体について、当該各捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含み、

前記複数の捕捉物体が、請求項1から11のいずれか1項に記載の複数の捕捉物体である、

キット。

【請求項24】

複数のハイブリダイゼーションプローブであって、各ハイブリダイゼーションプローブが、

前記複数の捕捉物体のいずれか1つの前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のいずれか1つに相補的なオリゴヌクレオチド配列と；
標識と

20

を含む、複数のハイブリダイゼーションプローブを更に含む、請求項23に記載のキットであって

前記複数のうちの各ハイブリダイゼーションプローブの前記相補的な配列が異なるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的であり；

前記複数のうちの各ハイブリダイゼーションプローブの前記標識が分光的に区別可能な標識のセットから選択される、

請求項23に記載のキット。

【請求項25】

30

生体細胞からバーコード付きcDNAライブラリを提供する方法であって、

マイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する隔離ペンの中に前記生体細胞を配置することと；

前記隔離ペンの中に捕捉物体を配置することであって、

前記捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

プライマーに結合するプライミング配列と；

捕捉配列と；

バーコード配列であって、当該バーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が当該バーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、バーコード配列と、

40

を含み、

前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が同じであり、

前記捕捉物体の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記捕捉物体の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、

配置することと；

前記生体細胞を溶解させること及び前記溶解した生体細胞から放出される核酸を、前記

50

捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドによって捕捉させることと；

前記捕捉された核酸を逆転写することであって、それにより前記捕捉物体をデコレートする複数のバーコード付き cDNA を作製し、各バーコード付き cDNA が、(i) 前記捕捉された核酸のうちの対応する 1 つに相補的なオリゴヌクレオチド配列と、それが共有結合的に結合した (ii) 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの 1 つと、を含む、逆転写することと、

を含む方法。

【請求項 26】

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの 1 つ以上の前記捕捉配列が遺伝子特異的プライマー配列を含み、

前記遺伝子特異的プライマー配列が、T 細胞受容体 (TCR) 又は B 細胞受容体 (BCR) をコードする mRNA 配列を標的にする、

請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記捕捉物体が前記隔離ベンの中に位置する間に、前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定することを更に含み、

前記バーコード配列を前記同定することが、請求項 12 から 18 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて実施される、

請求項 25 又は 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (DEP) 構成を更に含み、前記生体細胞を配置すること及び/又は前記捕捉物体を配置することが、前記生体細胞及び/又は前記捕捉物体上に又はそれに近接して誘電泳動 (DEP) 力を印加することによって実施される、請求項 25 から 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

生物学的微小物体からバーコード付きゲノム DNA ライブラリを提供する方法であって、ゲノム DNA を含む生物学的微小物体をマイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する隔離ベンの中に配置することと；

前記生物学的微小物体の核膜を破壊する能力を有する溶解試薬を前記生物学的微小物体に接触させることであって、それにより前記生物学的微小物体のゲノム DNA を放出させ、放出されたゲノム DNA を供することと；

前記放出されたゲノム DNA をタグメンテーションすることであって、それにより第 1 のタグメンテーション挿入配列によって定義される第 1 の末端と第 2 のタグメンテーション挿入配列によって定義される第 2 の末端とを有する複数のタグメント化ゲノム DNA 断片を作製することと；

前記隔離ベンの中に捕捉物体を配置することであって、

前記捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

第 1 のプライミング配列と；

第 1 のタグメンテーション挿入捕捉配列と；

バーコード配列であって、当該バーコード配列が 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、バーコード配列と、

を含み、

前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が同じであり、

前記捕捉物体の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記捕捉物体の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、

10

20

30

40

50

配置することと；

前記複数のタグメント化ゲノムDNA断片のうちの1つを、(i)前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの1つの前記第1のタグメンテーション挿入捕捉配列、(ii)第2のタグメンテーション挿入捕捉配列、ランダム化プライマー配列、又は遺伝子特異的プライマー配列に結合した第2のプライミング配列を含む増幅オリゴヌクレオチド、及び(iii)鎖置換酵素とポリメラーゼとを含む酵素混合物と接触させることと；

前記接触させた複数のタグメント化ゲノムDNA断片をある期間インキュベートすることとあって、それにより同時に前記複数のタグメント化ゲノムDNA断片のうちの前記1つを増幅するとともに前記捕捉オリゴヌクレオチド及び前記増幅オリゴヌクレオチドを前記複数のタグメント化ゲノムDNA断片のうちの前記1つの末端に付加して前記バーコード付きゲノムDNAライブラリを作製することと；

前記バーコード付きゲノムDNAライブラリを前記マイクロ流体デバイスから搬出することと、
を含む方法。

【請求項30】

前記捕捉物体が前記隔離ペンの中に位置する間に、前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定することを更に含み、

前記バーコード配列を前記同定することが、請求項12から18のいずれか1項に記載の方法を用いて実施される、

請求項29に記載の方法。

【請求項31】

単一の生体細胞からバーコード付きcDNAライブラリ及びバーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する方法とあって、

マイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する隔離ペンの中に前記生体細胞を配置することと；

前記隔離ペンの中に第1の捕捉物体を配置することとあって、

前記第1の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、

前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

第1のプライミング配列と；

第1の捕捉配列と；

第1のバーコード配列とあって、当該第1のバーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記第1のバーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、第1のバーコード配列と、

を含み、

前記第1の捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が同じであり、

前記捕捉物体の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に対して前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記捕捉物体の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズしない、

配置することと；

請求項25から28のいずれか1項に記載の方法を実施することにより前記バーコード付きcDNAライブラリを入手することとあって、前記生体細胞を溶解させることが、前記生体細胞の細胞膜が分解されて前記生体細胞から細胞質RNAが放出される一方で、前記生体細胞の核膜はインタクトなまま残るように実施され、それにより前記生体細胞の前記RNAからの前記バーコード付きcDNAライブラリでデコレートされた前記第1の捕捉物体が提供されることと；

前記cDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスから搬出することと；

10

20

30

40

50

前記隔離ペンの中に第2の捕捉物体を配置することであって、
前記第2の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、各々が、
第2のプライミング配列と；
第1のタグメンテーション挿入捕捉配列と；
第2のバーコード配列であって、当該第2のバーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記第2のバーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、第2のバーコード配列と、
を含み、
前記第2の捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が同じである、
配置することと；

10

請求項29又は30に記載の方法を実施することにより前記バーコード付きゲノムDNAライブラリを入手することであって、前記生体細胞からの複数のタグメント化ゲノムDNA断片が前記第2の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの1つの前記第1のタグメンテーション挿入捕捉配列と接触し、それにより前記生体細胞の前記ゲノムDNAからの前記バーコード付きゲノムDNAライブラリが提供されることと；

前記バーコード付きゲノムDNAライブラリを前記マイクロ流体デバイスから搬出することと、

を含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

【0001】 本出願は、米国法典第35編第119条(e)の下、2016年10月1日出願の米国仮特許出願第62/403,116号、2016年10月1日出願の米国仮特許出願第62/403,111号、2017年2月10日出願の米国仮特許出願第62/457,399号、2017年2月10日出願の米国仮特許出願第62/457,582号、及び2017年3月13日出願の米国仮特許出願第62/470,669号(それらの開示はそれぞれその全体が参照により本明細書に援用される)に基づく利益を主張する非仮出願である。

30

【背景技術】

【0002】

開示の背景

【0002】 単一細胞ゲノム増幅技術及び次世代シーケンシング法の出現は、個別生体細胞のゲノム及びトランスクリプトームをシーケンスする我々の能力の飛躍的向上をもたらした。こうした進歩にもかかわらず、ゲノム及びトランスクリプトームの配列をシーケンスされた細胞の特異的表現型に関連付けることは、依然としてきわめて困難であり、不可能なことも多い。本明細書に更に記載されるように、マイクロ流体環境内でDNAバーコード等のバーコードを解読する能力は、ゲノム及びトランスクリプトームのデータと元の細胞及びその表現型との関連付けを可能にし得る。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

開示の概要

【0003】 単一細胞又は小クローン細胞集団からバーコード付きRNA-seqライブラリ及び/又はゲノムDNAライブラリを作製するために並びに逆にライブラリから得られる配列を個別の細胞/クローン集団に関連付けるために使用し得るバーコード付き捕捉物体に関する組成物、キット、及び方法が本明細書に記載されている。本方法は、1つ以上の隔離ペンを含むエンクロージャを有するマイクロ流体デバイスで実施される。本方法の利点の1つは、マイクロ流体デバイスの対応する隔離ペン内に細胞を選択的に配置し得る

50

と共にその表現型をゲノム及び／又はトランスクリプトームのシーケンシング処理前に観測し得ることである。バーコード付き捕捉物体及び関連方法の重要な特徴は、マイクロ流体デバイスとゲノム／トランスクリプトームライブラリから得られるシーケンスリードとの両方でバーコードをインサイチュで「読取り」可能であるため、ゲノム／トランスクリプトームデータと観測される原細胞表現型との関連付けが可能なことである。

【 0 0 0 4 】

[0004] 一態様では、捕捉物体が提供される。捕捉物体は、固体担体（例えばビーズ）に共有結合された少なくとも2つ（例えば複数）の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、各捕捉オリゴヌクレオチドは、バーコード配列とプライミング配列と捕捉配列とを有する。バーコード配列は、非同ーオリゴヌクレオチド配列（「サブバーコード」配列又は「ワード」とも称される）のセットを形成するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を用いて設計される。カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のユニークな組合せは、結合一体化されてユニークバーコード配列（又は「センテンス」）を形成する。標識（例えば蛍光標識）プローブを用いてカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を個別にデコードし得るので、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットに相補的なハイブリダイゼーションプローブのセットがあれば、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列の全ての可能な組合せ、したがって、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットから発生し得る全ての可能なバーコード配列をインサイチュで同定するのに十分である。

【 0 0 0 5 】

[0005] 他の態様では、マイクロ流体デバイス内の捕捉物体のインサイチュ同定更にはゲノム／トランスクリプトームデータと生物学的微小物体との相関付けを行う方法が提供される。本方法は、以上に又は本明細書の他の箇所に記載の通りであり得る捕捉物体をマイクロ流体デバイス内に配置することと、相補的なハイブリダイゼーションプローブのセットを用いて捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定／デコードすることと、を含む。インサイチュ同定が実施されるマイクロ流体デバイスは、フロー領域とフロー領域に流体接続された複数の隔離ペンとを含むエンクロージャを含み、捕捉物体は、隔離ペンの1つ内に配置される。複数の隔離ペンのそれぞれは、少なくとも1つの生物学的微小物体と少なくとも1つの捕捉物体とを保持可能である。

【 0 0 0 6 】

[0006] バーコードのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列を含有する1つ以上のハイブリダイゼーションプローブは、プローブを含む溶液をデバイスのフロー領域に流入させることにより隔離ペンに導入し得る。蛍光標識等の標識を含み得るこれらのハイブリダイゼーションプローブは、捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列内のそれらの標的相補的配列（すなわち、対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列）にアニールされ、その結果としてプローブ／カセット化可能オリゴヌクレオチド配列相補性に基づいて観測された標識（例えば蛍光）によりバーコード付きビーズの解読を可能にする。捕捉物体バーコードの同定は、生物学的微小物体から核酸を捕捉するプロセス及び核酸ライブラリを作製するプロセスの種々の時点で実施し得る。同定プロセスは、1つの生物学的微小物体から核酸を捕捉オリゴヌクレオチドに捕捉する前若しくは捕捉した後又は転写／逆転写後のいずれかで実施し得る。代替的に、捕捉物体の同定は、生物学的微小物体をマイクロ流体デバイスの隔離ペンに配置する前に行い得る。デコーディングプロセスは、画像取得ユニットを含むシステムを用いて行い得る。

【 0 0 0 7 】

[0007] 特定の実施形態では、幾つかの生物学的微小物体（例えば、単一細胞又はクローン集団）は、捕捉物体が隔離ペン内に配置される前又は配置された後のいずれかに隔離ペンに提示し得る。隔離ペンに導入される捕捉物体及び生物学的微小物体の数は、決定論的に設定可能である。例えば、単一捕捉物体及び単一生物学的微小物体を単一隔離ペンに配置可能であるか、単一捕捉物体及び生体細胞クローン集団を単一隔離ペンに配置可能であるか、又は複数の捕捉物体及び1つ以上の生物学的微小物体を単一隔離ペンに配置可能である。隔離ペンへの導入前に、生物学的微小物体の原集団を確認可能である。

【 0 0 0 8 】

[0008] 隔離ペンで生物学的微小物体を溶解したら、捕捉物体は、放出された核酸を捕捉可能である。バーコードは、任意選択的にPCR(RT-PCR)と組み合わせる逆転写等の様々な機序により、捕捉された核酸の転写物/ゲノムDNA断片に共有結合された/組み込まれた状態になる。バーコード付き転写物は、更に処理してからシーケンスし得る。ゲノムデータ及び関連バーコードは、解読して特定の原隔離ペンとのマッチングを可能にし得ると共に、その結果として生物学的原微小物体及びその表現型とのマッチングを可能にし得る。

【 0 0 0 9 】

[0009] 捕捉オリゴヌクレオチドひいては特定の位置の捕捉物体のバーコードの同定プロセスは、自動プロセスであり得る。本明細書に記載の画像取得ユニットは、マイクロ流体デバイスの複数の隔離ペン及びフロー領域の1つ以上の画像を捕捉するように構成された撮像素子を更に含み得る。システムは、画像取得ユニットに通信接続された画像処理ユニットを更に含み得る。画像処理ユニットは、各捕捉画像を受け取って画像に示された各隔離ペンの対象領域を規定するように構成された対象領域決定エンジンを含み得る。画像処理ユニットは、各隔離ペンの対象領域内の画像領域の少なくとも一部分を解析して各隔離ペンの特定の微小物体の存在及びそれに関連する標識ハイブリダイゼーションプローブから生じるいずれかの関連シグナルの指標となるスコアを決定するように構成されたスコアリングエンジンを更に含み得る。マイクロ流体デバイスは、少なくとも1つの被覆表面を更に含み得る。本方法の幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、親水性ポリマー及び/又はアニオン性ポリマー等の共有結合された分子を含み得る少なくとも1つの調整された表面を含み得る。

【 0 0 1 0 】

[0010] 他の態様では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン内に生体細胞を配置することと、隔離ペン内に捕捉物体を配置することとであって、捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、プライマーに結合するプライミング配列と捕捉配列とバーコード配列とを含み、バーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列がバーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、配置することと、生体細胞を溶解させて溶解させた生体細胞から放出された核酸を捕捉物体に含まれる複数の捕捉オリゴヌクレオチドにより捕捉できるようにすることと、捕捉された核酸を転写させて捕捉物体をデコレートする複数のバーコード付きcDNAを生成することとであって、各バーコード付きcDNAが、(i)複数の捕捉オリゴヌクレオチドの1つに共有結合された、(i)捕捉された核酸の対応する1つに相補的なオリゴヌクレオチド配列を含む、生成することと、を含む、生体細胞からバーコード付きcDNAライブラリを提供する方法が提供される。

【 0 0 1 1 】

[0011] 幾つかの実施形態では、遺伝子特異的プライマー配列は、T細胞受容体(TCR)をコードするmRNA配列を標的とし得る。他の実施形態では、遺伝子特異的プライマー配列は、B細胞受容体(BCR)をコードするmRNA配列を標的とし得る。

【 0 0 1 2 】

[0012] 幾つかの実施形態では、本方法は、捕捉物体が隔離ペン内に位置する間に捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定することを更に含み得る。幾つかの他の実施形態では、本方法は、前記捕捉物体又は前記複数の前記捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスから搬出することを更に含み得る。

【 0 0 1 3 】

[0013] 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動(DEP)構成体を更に含み得ると共に、生体細胞を配置すること及び/又は捕捉物体を配置することは、生体細胞及び/又は捕捉物体に又はそれに近接して誘電泳動(DEP)力を適用することにより実施される。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

【0014】 次いで、バーコード付き cDNA デコレート捕捉物体は、更なるライブラリ作製及びシーケンシングのために搬出し得る。バーコード及び cDNA は、シーケンスし得ると共に、ゲノムデータは、原隔離ペン番号及び個別細胞 / コロニーにマッチさせ得る。このプロセスはまた、本明細書に記載されるように自動プロセスによりマイクロ流体デバイス内で実施し得る。

【 0 0 1 5 】

【0015】 他の態様では、ゲノム DNA を含む生物学的微小物体をマイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン内に配置することと、生物学的微小物体と生物学的微小物体の核膜を破壊可能な溶解試薬とを接触させて生物学的微小物体のゲノム DNA を放出させることと、放出させたゲノム DNA をタグメント化して、第 1 のタグメンテーションインサート配列により規定される第 1 の末端と、第 2 のタグメンテーションインサート配列により規定される第 2 の末端と、を有する複数のタグメント化ゲノム DNA 断片を生成することと、隔離ペン内に捕捉物体を配置することであって、捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、第 1 のプライミング配列と第 1 のタグメンテーションインサート捕捉配列とバーコード配列とを含み、バーコード配列が 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、バーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同ーである、配置することと、複数のタグメント化ゲノム DNA 断片のそれぞれと、(i) 捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれの第 1 のタグメンテーションインサート捕捉配列、(i i) 第 2 のタグメンテーションインサート捕捉配列、ランダム化プライマー配列、又は遺伝子特異的プライマー配列に結合された第 2 のプライミング配列を含む増幅オリゴヌクレオチド、及び(i i i) 鎖置換酵素とポリメラーゼとを含む酵素混合物と、を接触させることと、接触させた複数のタグメント化ゲノム DNA 断片をある時間にわたりインキュベートして、複数のタグメント化ゲノム DNA 断片のそれぞれの増幅と、複数のタグメント化ゲノム DNA 断片のそれぞれの末端への捕捉オリゴヌクレオチド及び増幅オリゴヌクレオチドの付加と、を同時に行うことによりバーコード付きゲノム DNA ライブラリを生成することと、マイクロ流体デバイスからバーコード付きゲノム DNA ライブラリを搬出することと、を含む、生物学的微小物体からバーコード付きゲノム DNA ライブラリを提供する方法が提供される。

【 0 0 1 6 】

【0016】 幾つかの実施形態では、タグメント化することは、放出させたゲノム DNA と、(i) 第 1 のタグメンテーションインサート配列を含む第 1 の二本鎖 DNA 断片及び(i i) 第 2 のタグメンテーションインサート配列を含む第 2 の二本鎖 DNA 断片が装填されたトランスポザーゼと、を接触させることを含み得る。

【 0 0 1 7 】

【0017】 幾つかの実施形態では、第 1 の二本鎖 DNA 断片は、第 3 のプライミング配列に結合された第 1 のモザイク末端配列を含み得ると共に、第 2 の二本鎖 DNA 断片は、第 4 のプライミング配列に結合された第 2 のモザイク末端配列を含み得る。

【 0 0 1 8 】

【0018】 幾つかの実施形態では、本方法は、捕捉物体が隔離ペン内に位置する間に捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定することを更に含み得る。

【 0 0 1 9 】

【0019】 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動 (DEP) 構成を更に含むと共に、生物学的微小物体を配置すること及び / 又は捕捉物体を配置することは、生体細胞及び / 又は捕捉物体に又はそれに近接して誘電泳動 (DEP) 力を適用することにより実施される。

【 0 0 2 0 】

【0020】 他の態様では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン

内に生体細胞を配置することと、隔離ペン内に第1の捕捉物体を配置することであって、第1の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、第1のプライミング配列と第1の捕捉配列と第1のバーコード配列とを含み、第1のバーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、第1のバーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、配置することと、本明細書に記載されるようにcDNAライブラリを得る任意の方法を実施することによりバーコード付きcDNAライブラリを得ることであって、生体細胞を溶解させることが、生体細胞の形質膜を分解するように実施される、得ることと、生体細胞の核膜をインタクトな状態で残したまま生体細胞から細胞質RNAを放出させて、生体細胞のRNAからバーコード付きcDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を提供することと、マイクロ流体デバイスからcDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を搬出することと、隔離ペン内に第2の捕捉物体を配置することであって、第2の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、そのそれぞれが、第2のプライミング配列と第1のタグメンテーションインサート捕捉配列と第2のバーコード配列とを含み、第2のバーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、第2のバーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、配置することと、本明細書に記載されるようにバーコード付きゲノムDNAライブラリを得る任意の方法を実施することによりバーコード付きゲノムDNAライブラリを得ることであって、生体細胞からの複数のタグメント化ゲノムDNA断片が、第2の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれの第1のタグメンテーションインサート捕捉配列に接触されて、生体細胞のゲノムDNAからバーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する、得ることと、マイクロ流体デバイスからバーコード付きゲノムDNAライブラリを搬出することと、を含む、単一生体細胞からバーコード付きcDNAライブラリ及びバーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する方法が提供される。

【0021】

[0021] 幾つかの実施形態では、本方法は、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することは、隔離ペンに生体細胞を配置する前、生体細胞のRNAからバーコード付きcDNAライブラリを得る前、又はマイクロ流体デバイスからバーコード付きcDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を搬出する前に実施し得る。幾つかの実施形態では、本方法は、第2の捕捉物体の複数のオリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含み得る。

【0022】

[0022] 更に他の態様では、Bリンパ球からバーコード付きcDNAライブラリを作製することであって、作製することが、本明細書に記載されるようにバーコード付きcDNAを作製する任意の方法に従って実施され、バーコード付きcDNAライブラリが、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含む捕捉物体をデコレートし、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれがNotI制限部位配列を含む、作製することと、バーコード付きcDNAライブラリを増幅することと、バーコード付きcDNAライブラリからバーコード付きBCR配列を選択してバーコード付きBCR配列が富化されたライブラリを作製することと、バーコード付きBCR配列が富化されたライブラリからの配列を環化して環化バーコード付きBCR配列のライブラリを作製することと、環化バーコード付きBCR配列のライブラリを再線状化して再構成バーコード付きBCR配列のライブラリを提供することであって、そのそれぞれがそれぞれの可変(V)サブ領域及び/又はそれぞれの多様性(D)サブ領域の3'側にBCR配列の定常(C)領域を提示する、提供することと、シーケンシングアダプターの付加並びにVサブ領域及び/又はDサブ領域のサブ選択を行ってバーコード付きBCRシーケンシングライブラリを作製することと、を含む、バーコード付きBCR細胞受容体(BCR)シーケンシングライブラリを提供する方法が提供される。

【0023】

【0023】種々の実施形態では、本方法は、本明細書に記載されるようにバーコードをインサイチュで同定する任意の方法を用いて捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、同定することは、バーコード付きcDNAライブラリを増幅する前に実施し得る。他の実施形態では、同定することは、バーコード付きcDNAライブラリを作製する間に実施し得る。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1A】【0024】本開示の幾つかの実施形態によるマイクロ流体デバイス及び関連する制御機器で用いられるシステムの例を例示する。

【図1B】【0025】本開示の幾つかの実施形態によるマイクロ流体デバイスを例示する。

10

【図1C】【0025】本開示の幾つかの実施形態によるマイクロ流体デバイスを例示する。

【図2A】【0026】本開示の幾つかの実施形態による分離ペンを例示する。

【図2B】【0026】本開示の幾つかの実施形態による分離ペンを例示する。

【図2C】【0027】本開示の幾つかの実施形態による詳細な隔離ペンを例示する。

【図2D】【0028】本開示の幾つかの他の実施形態による隔離ペンを例示する。

【図2E】【0028】本開示の幾つかの他の実施形態による隔離ペンを例示する。

【図2F】【0028】本開示の幾つかの他の実施形態による隔離ペンを例示する。

【図2G】【0029】本開示の実施形態によるマイクロ流体デバイスを例示する。

【図2H】【0030】本開示の実施形態によるマイクロ流体デバイスのコーティング表面を例示する。

20

【図3A】【0031】本開示の幾つかの実施形態によるマイクロ流体デバイス及び関連する制御機器で用いられるシステムの例を例示する。

【図3B】【0032】本開示の幾つかの実施形態による撮像デバイスを例示する。

【図4A】【0033】捕捉物体のインサイチュ検出可能バーコード配列と、生体細胞からの核酸のシーケンシングデータと、の関係を例示する。この場合、核酸は、マイクロ流体環境内にある間に捕捉され、搬出後にシーケンスされる。

【図4B】【0034】本開示の実施形態に従って捕捉物体のインサイチュ検出可能バーコード配列を用いた可能な様々な核酸ワークフローの模式図である。

【図5】【0035】本開示の捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドの実施形態の模式図である。

【図6】【0036】カセット化可能配列の様々な組合せから生じる10,000のバーコード多様性を有してバーコード配列を形成する、本開示の捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドの実施形態の模式図である。

30

【図7A】【0037】本開示の一実施形態に従って捕捉物体のバーコードのインサイチュ検出を行うプロセスの模式図である。

【図7B】【0038】本開示の一実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列のインサイチュ検出を行う方法の写真図である。

【図7C】【0038】本開示の一実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列のインサイチュ検出を行う方法の写真図である。

【図8A】【0039】本開示の他の実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列のインサイチュ検出を行う方法の模式図である。

40

【図8B】【0039】本開示の他の実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列のインサイチュ検出を行う方法の模式図である。

【図8C】【0039】本開示の他の実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列のインサイチュ検出を行う方法の模式図である。

【図8D】【0040】本開示の他の実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列の2つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のインサイチュ検出を行う方法の写真図である。

【図8E】【0040】本開示の他の実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列の2つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のインサイチュ検出を行う方法の写真図である。

【図8F】【0040】本開示の他の実施形態に従って捕捉物体のバーコード配列の2つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のインサイチュ検出を行う方法の写真図である。

50

【図 9】[0041]本開示の一実施形態に従って単一細胞 R N A 捕捉、ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの模式図を例示する。

【図 10 A】[0042]本開示の一実施形態に従って外側細胞膜の溶解後に R N A 捕捉を行うプロセスの一実施形態の写真図である。

【図 10 B】[0042]本開示の一実施形態に従って外側細胞膜の溶解後に R N A 捕捉を行うプロセスの一実施形態の写真図である。

【図 10 C】[0042]本開示の一実施形態に従って外側細胞膜の溶解後に R N A 捕捉を行うプロセスの一実施形態の写真図である。

【図 10 D】[0042]本開示の一実施形態に従って外側細胞膜の溶解後に R N A 捕捉を行うプロセスの一実施形態の写真図である。

10

【図 11 A】[0043]本開示の実施形態に従って R N A ライブラリを提供するワークフローの一部分の模式図である。

【図 11 B】[0044]本開示の実施形態に従ってシーケンシングライブラリ品質を解析するグラフ図である。

【図 11 C】[0044]本開示の実施形態に従ってシーケンシングライブラリ品質を解析するグラフ図である。

【図 12 A】[0045]本開示の実施形態に従って単一細胞溶解、D N A ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの絵図である。

【図 12 B】[0045]本開示の実施形態に従って単一細胞溶解、D N A ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの絵図である。

20

【図 12 C】[0045]本開示の実施形態に従って単一細胞溶解、D N A ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの絵図である。

【図 12 D】[0045]本開示の実施形態に従って単一細胞溶解、D N A ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの絵図である。

【図 12 E】[0045]本開示の実施形態に従って単一細胞溶解、D N A ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの絵図である。

【図 12 F】[0045]本開示の実施形態に従って単一細胞溶解、D N A ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの絵図である。

【図 12 G】[0046]単一細胞 D N A ライブラリ作製の模式図である。

【図 13 A】[0047]単一細胞 B 細胞受容体 (B C R) 捕捉、ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの模式図である。

30

【図 13 B】[0047]単一細胞 B 細胞受容体 (B C R) 捕捉、ライブラリ作製、及びシーケンシングを行うワークフローの模式図である。

【図 14 A】[0048]本開示に従って捕捉物体のバーコード配列のインサイチュ検出を行う方法の実施形態の写真図である。

【図 14 B】[0049]本開示の実施形態に従って c D N A でデコレートされた捕捉物体の搬出を行う写真図である。

【図 14 C】[0050]本開示の実施形態に従ってシーケンシングライブラリ品質の分析を行うグラフ図である。

【図 14 D】[0050]本開示の実施形態に従ってシーケンシングライブラリ品質の分析を行うグラフ図である。

40

【図 15 A】[0051]本開示の実施形態により作製されたライブラリからのシーケンシングリードのグラフ図である。

【図 15 B】[0051]本開示の実施形態により作製されたライブラリからのシーケンシングリードのグラフ図である。

【図 16 A】[0052]本開示の実施形態に従って作製された c D N A シーケンシングライブラリから得られたシーケンシング結果のグラフ図である。

【図 16 B】[0052]本開示の実施形態に従って作製された c D N A シーケンシングライブラリから得られたシーケンシング結果のグラフ図である。

【図 16 C】[0052]本開示の実施形態に従って作製された c D N A シーケンシングライブ

50

ラリから得られたシーケンシング結果のグラフ図である。

【図 1 6 D】[0052]本開示の実施形態に従って作製された c D N A シーケンシングライブラリから得られたシーケンシング結果のグラフ図である。

【図 1 7】[0053]捕捉物体送達のランダム化を試験する実験全体を通じて検出されたバーコード配列のセットの変動のグラフ図である。

【図 1 8】[0054]本開示の方法の実施形態での 1 回の実験当たりのバーコード配列リードの回収のグラフ図である。

【図 1 9】[0055]本開示の実施形態でのマイクロ流体デバイス内の T 細胞の写真図である。

【図 2 0 A】[0056]本開示の実施形態に従って培養、抗原染色、及びインサイチュバーコード配列検出を行ったときの特異的細胞の写真図である。 10

【図 2 0 B】[0056]本開示の実施形態に従って培養、抗原染色、及びインサイチュバーコード配列検出を行ったときの特異的細胞の写真図である。

【図 2 1 A】[0057]本開示の実施形態に従って培養、抗原染色、及びインサイチュバーコード配列検出を行ったときの特異的細胞の写真図である。

【図 2 1 B】[0057]本開示の実施形態に従って培養、抗原染色、及びインサイチュバーコード配列検出を行ったときの特異的細胞の写真図である。

【図 2 2 A】[0058]本開示の実施形態に従って培養、抗原染色、及びインサイチュバーコード配列検出を行ったときの特異的細胞の写真図である。

【図 2 2 B】[0058]本開示の実施形態に従って培養、抗原染色、及びインサイチュバーコード配列検出を行ったときの特異的細胞の写真図である。 20

【図 2 3】[0059]本開示の実施形態に従って活性化細胞、活性化抗原陽性細胞、及び活性化抗原陰性細胞全体にわたりシーケンシングを行った結果のグラフ図である。

【図 2 4】[0060]本開示の実施形態に従って実質的に単一分布させた細胞の写真図である。

【図 2 5】[0061]本開示の実施形態に従って溶解及び核 D N A 放出を行うプロセスの写真図である。

【図 2 6 A】[0062]本開示の実施形態に従って溶解を行う前及び行った後の染色細胞の写真図である。

【図 2 6 B】[0062]本開示の実施形態に従って溶解を行う前及び行った後の染色細胞の写真図である。 30

【図 2 7】[0063]本開示の実施形態に従ってシーケンシングライブラリ中のゲノム D N A の分布を示すグラフ図である。

【図 2 8】[0064]サンプルゲノム D N A 中の染色体の予想長さのグラフ図であり、本開示の一実施形態に従って各染色体で観測された実験カバレッジを更に含む。

【図 2 9 A】[0065]本開示の実施形態に従ってゲノム D N A ライブラリ品質を示すグラフ図である。

【図 2 9 B】[0065]本開示の実施形態に従ってゲノム D N A ライブラリ品質を示すグラフ図である。

【図 2 9 C】[0065]本開示の実施形態に従ってゲノム D N A ライブラリ品質を示すグラフ図である。 40

【図 2 9 D】[0065]本開示の実施形態に従ってゲノム D N A ライブラリ品質を示すグラフ図である。

【図 3 0 A】[0066]本開示の実施形態に従って単一細胞から R N A 及びゲノム D N A の両方のシーケンシングライブラリを得る方法の写真図である。

【図 3 0 B】[0066]本開示の実施形態に従って単一細胞から R N A 及びゲノム D N A の両方のシーケンシングライブラリを得る方法の写真図である。

【図 3 0 C】[0066]本開示の実施形態に従って単一細胞から R N A 及びゲノム D N A の両方のシーケンシングライブラリを得る方法の写真図である。

【図 3 0 D】[0066]本開示の実施形態に従って単一細胞から R N A 及びゲノム D N A の両 50

方のシーケンシングライブラリを得る方法の写真図である。

【図 3 0 E】[0066]本開示の実施形態に従って単一細胞から RNA 及びゲノム DNA の両方のシーケンシングライブラリを得る方法の写真図である。

【図 3 0 F】[0066]本開示の実施形態に従って単一細胞から RNA 及びゲノム DNA の両方のシーケンシングライブラリを得る方法の写真図である。

【図 3 1 A】[0067]本開示の実施形態に従って捕捉物体上のバーコード配列を検出する方法の写真図である。

【図 3 1 B】[0067]本開示の実施形態に従って捕捉物体上のバーコード配列を検出する方法の写真図である。

【図 3 2】[0068]本開示の実施形態に従ってインサイチュで決定されたバーコード配列とバーコード及びゲノムデータを決定するシーケンシング結果との相関を示すグラフ図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

[0069] 本明細書には、本開示の例示的な実施形態及び適用が記載されている。しかし、本開示は、これらの例示的な実施形態及び適用、例示的な実施形態及び適用を行う方式、又はそれについて本明細書に記載される方式に限定されない。更に、図は、簡略図又は部分図を示し得、図中の要素の寸法は、誇張されるか又は他に比例していないことがあり得る。加えて、「上」、「付着される」、「接続される」、「結合される」という用語又は類似語が本明細書で使用される場合、一方の要素が直接他方の要素上にあるか、それに付着されるか、それに接続されるか、若しくはそれに結合されるか、又は一方の要素と他方の要素との間に 1 つ以上の介在要素があるかにかかわらず、一方の要素（例えば、材料、層、基板等）は、他方の要素「上」にあるか、それに「付着される」か、それに「接続される」か、又はそれに「結合される」。また、文脈上特に規定されない限り、方向（例えば、上、下、頂、底、側、上向き、下向き、下方、上方、上側、下側、水平、垂直、「x」、「y」、「z」等）は、提供された場合、相対的なものであり、単なる例として説明及び考察が容易になるように提供され、限定を目的としたものではない。加えて、要素のリスト（例えば、要素 a、b、c）が参照される場合、かかる参照は、列挙された要素のいずれか 1 つのみ、列挙された要素の全てに満たない任意の組合せ、及び / 又は列挙された要素の全ての組合せを含むことが意図される。本明細書でのセクション分割は、概説を容易にすることのみを目的とし、考察される要素のいずれの組合せにも限定されない。

20

30

【0026】

[0070] マイクロ流体フィーチャの寸法が幅又は面積を有するものとして記載されている場合、寸法は、典型的には、マイクロ流体デバイスの基板及び / 又はカバーに平行な平面内にいずれも位置する x 軸方向及び / 又は y 軸方向の寸法に対して記載されている。マイクロ流体フィーチャの高さは、マイクロ流体デバイスの基板及び / 又はカバーに平行な平面に垂直な z 軸方向に対して記載されている。幾つかの場合、チャネル又は通路等のマイクロ流体フィーチャの断面積は、x 軸方向 / z 軸方向、y 軸方向 / z 軸方向、又は x 軸方向 / y 軸方向の面積に対するものである。

40

【0027】

[0071] 本明細書で使用される場合、「実質的に」は、意図された目的で機能するのに十分であることを意味する。そのため、「実質的に」という用語は、当業者によって予想されるような、ただし全体性能にそれほど影響を及ぼさない、絶対的又は完全な状態、寸法、測定、結果等からのわずかな有意でない変動を許容する。数値又は数値として表現され得るパラメータ若しくは特性に対して用いられる場合、「実質的に」は、10 パーセント以内を意味する。

【0028】

[0072] 「1 つ」という用語は、2 つ以上を意味する。

【0029】

50

[0073] 本明細書で使用される場合、「複数」という用語は、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれを超え得る。

【0030】

[0074] 本明細書で使用される場合、 μm とはマイクロメートルを意味し、 μm^3 とは立方マイクロメートルを意味し、 pL とはピコリットルを意味し、 nL とはナノリットルを意味し、且つ μL （又は uL ）とはマイクロリットルを意味する。

【0031】

[0075] 本明細書で使用される場合、「配置される」という用語は、その意味内に「位置決めされる」を包含し、また、「配置する」という用語は、その意味内に「位置決めする」を包含する。

【0032】

[0076] 本明細書で使用される場合、「マイクロ流体デバイス」又は「マイクロ流体装置」は、流体を保持するように構成された1つ以上の離散マイクロ流体回路（各マイクロ流体回路は、限定されるものではないが、領域、流路、チャネル、チャンバ及び/又はポンプをはじめとする流体相互接続回路要素を含む）と、マイクロ流体デバイスに対して流体（及び任意選択的に流体中に懸濁された微小物体）の流入及び/又は流出を可能にするように構成された少なくとも1つのポートとを含むデバイスである。典型的には、マイクロ流体デバイスのマイクロ流体回路は、マイクロ流体チャネルを含むフロー領域と少なくとも1つチャンバとを含み、約1 mL未満、例えば約750 μL 未満、約500 μL 未満、約250 μL 未満、約200 μL 未満、約150 μL 未満、約100 μL 未満、約75 μL 未満、約50 μL 未満、約25 μL 未満、約20 μL 未満、約15 μL 未満、約10 μL 未満、約9 μL 未満、約8 μL 未満、約7 μL 未満、約6 μL 未満、約5 μL 未満、約4 μL 未満、約3 μL 未満又は約2 μL 未満の体積の流体を保持するであろう。特定の実施形態では、マイクロ流体回路は、約1～2 μL 、約1～3 μL 、約1～4 μL 、約1～5 μL 、約2～5 μL 、約2～8 μL 、約2～10 μL 、約2～12 μL 、約2～15 μL 、約2～20 μL 、約5～20 μL 、約5～30 μL 、約5～40 μL 、約5～50 μL 、約10～50 μL 、約10～75 μL 、約10～100 μL 、約20～100 μL 、約20～150 μL 、約20～200 μL 、約50～200 μL 、約50～250 μL 又は約50～300 μL を保持する。マイクロ流体回路は、マイクロ流体デバイスの第1のポート（例えば、流入口）に流体接続された第1の端と、マイクロ流体デバイスの第2のポート（例えば、流出口）に流体接続された第2の端とを有するように構成され得る。

【0033】

[0077] 本明細書で使用される場合、「ナノ流体デバイス」又は「ナノ流体装置」は、約1 μL 未満、例えば約750 nL未満、約500 nL未満、約250 nL未満、約200 nL未満、約150 nL未満、約100 nL未満、約75 nL未満、約50 nL未満、約25 nL未満、約20 nL未満、約15 nL未満、約10 nL未満、約9 nL未満、約8 nL未満、約7 nL未満、約6 nL未満、約5 nL未満、約4 nL未満、約3 nL未満、約2 nL未満、約1 nL以下の体積の流体を保持するように構成された少なくとも1つの回路要素を含有するマイクロ流体回路を有するタイプのマイクロ流体デバイスである。ナノ流体デバイスは、複数の回路要素（例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、75、100、150、200、250、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、6000、7000、8000、9000、10,000個又はそれを超える）を含み得る。特定の実施形態では、少なくとも1つの回路要素の1つ以上（例えば、全て）は、約100 pLから1 nL、約100 pLから2 nL、約100 pLから5 nL、約250 pLから2 nL、約250 pLから5 nL、約250 pLから10 nL、約500 pLから5 nL、約500 pLから10 nL、約500 pLから15 nL、約750 pLから10 nL、約750 pLから15 nL、約750 pLから20 nL、約1から10 nL、約1から15 nL、約1から20 nL、約1から25 nL又は約1から50 nLの体積の流体を保持するように構成

10

20

30

40

50

される。他の実施形態では、少なくとも1つの回路要素の1つ以上（例えば、全て）は、約20 nLから200 nL、約100から200 nL、約100から300 nL、約100から400 nL、約100から500 nL、約200から300 nL、約200から400 nL、約200から500 nL、約200から600 nL、約200から700 nL、約250から400 nL、約250から500 nL、約250から600 nL又は約250から750 nLの体積の流体を保持するように構成される。

【0034】

[0078] マイクロ流体デバイス又はナノ流体デバイスは、本明細書では、「マイクロ流体チップ」若しくは「チップ」又は「ナノ流体チップ」若しくは「チップ」として参照され得る。

【0035】

[0079] 本明細書で使用される「マイクロ流体チャネル」又は「フローチャネル」は、水平寸法及び垂直寸法の両寸法よりも有意に長い長さを有するマイクロ流体デバイスのフロー領域を意味する。例えば、フローチャネルは、水平寸法又は垂直寸法のいずれかの長さの少なくとも5倍、例えばその長さの少なくとも10倍、その長さの少なくとも25倍、その長さの少なくとも100倍、その長さの少なくとも200倍、その長さの少なくとも500倍、その長さの少なくとも1,000倍、その長さの少なくとも5,000倍であり得る。幾つかの実施形態では、フローチャネルの長さは、介在する任意の値を含めて約100,000 μm ～約500,000 μm である。幾つかの実施形態では、水平寸法は、約100 μm ～約1000 μm （例えば、約150～約500 μm ）であり、及び垂直寸法は、約25 μm ～約200 μm （例えば、約40～約150 μm ）である。フローチャネルは、マイクロ流体デバイス内で多様な空間構成を有し得るため、完全に線状の要素に制限されないことに留意されたい。例えば、フローチャネルは、以下の構成：カーブ、ベンド、スパイラル、傾斜、下降、フォーク（例えば、複数の異なる流路）及びそれらの任意の組合せを有する1つ以上のセクションであり得るか又はそれらを含み得る。加えて、フローチャネルは、その中に所望の流体フローを提供するように、その通路に沿って異なる断面積、拡幅及び狭窄を有し得る。フローチャネルは、バルブを含み得、バルブは、マイクロフルイディクス技術分野で公知の任意のタイプであり得る。バルブを含むマイクロ流体チャネルの例は、米国特許第6,408,878号及び同第9,227,200号（それぞれその全体が参照により本明細書に援用される）に開示されている。

【0036】

[0080] 本明細書で使用される場合、「障害物」という用語は、一般に、マイクロ流体デバイスの2つの異なる領域間又は回路要素間の標的微小物体の移動を部分的に（完全ではなく）妨げるのに十分な大きさのバンプ又は類似のタイプの構造物を意味する。2つの異なる領域/回路要素は、例えば、マイクロ流体隔離ペンの接続領域及び分離領域であり得る。

【0037】

[0081] 本明細書で使用される場合、「狭窄」という用語は、一般に、マイクロ流体デバイスの回路要素（又は2つの回路要素間のインタフェース）の幅の狭小化を意味する。狭窄は、例えば、本開示のマイクロ流体隔離ペンの分離領域と接続領域との間のインタフェースに位置し得る。

【0038】

[0082] 本明細書で使用される場合、「透明」という用語は、光が通過する際に光を実質的に変化させることなく可視光を透過させる材料を意味する。

【0039】

[0083] 本明細書で使用される場合、「微小物体」という用語は、一般に、本開示に従って分離及び/又は操作され得る任意の微視的物体を意味する。限定されるものではないが、微小物体の例としては、無生物微小物体、例えばマイクロ粒子、マイクロビーズ（例えば、ポリスチレンビーズ、Luminex（商標）ビーズ等）、磁気ビーズ、マイクロロッド、マイクロワイヤ、量子ドット等、生物学的微小物体、例えば細胞、生物オルガネラ、ベ

10

20

30

40

50

シクル又は複合体、合成ベシクル、リボソーム（例えば、合成又は膜調製物由来）、脂質ナノラフト等、又は無生物微小物体と生物学的微小物体との組合せ（例えば、細胞付着マイクロビーズ、リボソームコーティングマイクロビーズ、リボソームコーティング磁気ビーズ等）が挙げられる。ビーズは、共有結合又は非共有結合で結合された部分／分子、例えば検出可能な標識、タンパク質、炭水化物、抗原、低分子シグナリング部分又はアッセイで使用可能な他の化学的／生物学的種を含み得る。脂質ナノラフトは、例えば、Ritchie et al.(2009) “Reconstitution of Membrane Proteins in Phospholipid Bilayer Nanodiscs,” Methods Enzymol., 464:211-231に記載されている。

【0040】

[0084] 本明細書で使用される場合、「細胞」という用語は、「生体細胞」という用語と同義的に使用される。限定されるものではないが、生体細胞の例としては、真核細胞、植物細胞、動物細胞、例えば哺乳動物細胞、爬虫動物細胞、トリ細胞、サカナ細胞等、原核細胞、細菌細胞、真菌細胞、原生動物細胞等、組織、例えば筋肉、軟骨、脂肪、皮膚、肝臓、肺、神経の組織等から解離させた細胞、免疫細胞、例えばT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ等、胚（例えば、接合体）、卵母細胞、卵子、精子細胞、ハイブリドマ、培養細胞、細胞系細胞、癌細胞、感染細胞、トランスフェクト及び／又はトランスフォーム細胞、レポーター細胞等が挙げられる。哺乳動物細胞は、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、霊長動物等に由来し得る。

【0041】

[0085] コロニー中の複製可能な生細胞の全てが単一の親細胞に由来する娘細胞である場合、生体細胞のコロニーは、「クローン」である。特定の実施形態では、クローンコロニーの全ての娘細胞は、10回以下の分裂によって単一の親細胞から派生される。他の実施形態では、クローンコロニーの全ての娘細胞は、14回以下の分裂によって単一の親細胞から派生される。他の実施形態では、クローンコロニーの全ての娘細胞は、17回以下の分裂によって単一の親細胞から派生される。他の実施形態では、クローンコロニーの全ての娘細胞は、20回以下の分裂によって単一の親細胞から派生される。「クローン細胞」という用語は、同一のクローンコロニーの細胞を意味する。

【0042】

[0086] 本明細書で使用される場合、生体細胞の「コロニー」は、2個以上の細胞（例えば、約2～約20、約4～約40、約6～約60、約8～約80、約10～約100、約20～約200、約40～約400、約60～約600、約80～約800、約100～約1000個の細胞又は1000個超の細胞）を意味する。

【0043】

[0087] 本明細書で使用される場合、「細胞を維持する」という用語は、細胞の生存及び／又は増殖を続けるのに必要な条件を提供する、流体及び気体の両方の成分と任意選択的に表面とを含む環境を提供することを意味する。

【0044】

[0088] 本明細書で使用される場合、細胞を参照するときの「増殖させる」という用語は、細胞数が増加することを意味する。

【0045】

[0089] 流体培地の「成分」は、溶媒分子、イオン、低分子、抗生物質、ヌクレオチド及びヌクレオシド、核酸、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、糖、炭水化物、脂質、脂肪酸、コレステロール、代謝物等をはじめとする培地中に存在する任意の化学分子又は生化学分子である。

【0046】

[0090] 本明細書で使用される場合、「捕捉部分」は、微小物体に対する認識部位を提供する化学的若しくは生物学的種、官能基又はモチーフである。所定のクラスの微小物体は、インサイチュで生成された捕捉部分を認識し得、インサイチュで生成された捕捉部分に結合し得るか又はそれに対して親和性を有し得る。限定されるものではないが、例としては、抗原、抗体及び細胞表面結合モチーフが挙げられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

【0091】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「B」は、G（グアノシン）、C（シチジン）、及びT（チミジン）のヌクレオチドから選択されるヌクレオチドであるが、A（アデニン）を含まない。

【 0 0 4 8 】

【0092】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「H」は、A、C、及びTから選択されるヌクレオチドであるが、Gを含まない。

【 0 0 4 9 】

【0093】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「D」は、A、G、及びTから選択されるヌクレオチドであるが、Cを含まない。

10

【 0 0 5 0 】

【0094】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「V」は、A、G、及びCから選択されるヌクレオチドであるが、Tを含まない。

【 0 0 5 1 】

【0095】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「N」は、A、C、G、及びTから選択されるヌクレオチドである。

【 0 0 5 2 】

【0096】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「S」は、G及びCから選択されるヌクレオチドである。

【 0 0 5 3 】

20

【0097】 本明細書で使用される場合、単一ヌクレオチドを表すために用いられる「Y」は、C及びTから選択されるヌクレオチドである。

【 0 0 5 4 】

【0098】 本明細書で使用される場合、A、C、T、Gに続く「*」は、そのヌクレオチドのリン酸結合のホスホロチオエート（phosphorothioate）置換を意味する。

【 0 0 5 5 】

【0099】 本明細書で使用される場合、I s o Gはイソグアノシンであり、I s o Cはイソシチジンであり、I s o d Gはイソグアノシンデオキシリボヌクレオチドであり、且つI s o d Cはイソシチジンドデオキシリボヌクレオチドである。イソグアノシン及びイソシチジンのリボ - 又はデオキシリボ - ヌクレオチド（nucleotides）のそれぞれは、通常はRNA又はDNAにそれぞれ組み込まれたグアニンヌクレオ塩基又はシトシンヌクレオ塩基に対する異性体のヌクレオ塩基を含有する。

30

【 0 0 5 6 】

【00100】 本明細書で使用される場合、r Gとは、それ以外はデオキシリボヌクレオチドを含有する核酸に含まれるリボヌクレオチドを意味する。全リボヌクレオチドを含有する核酸は、各ヌクレオチドリボヌクレオチドであることを示す表示を含まないかもしれないが、文脈上明らかにされる。

【 0 0 5 7 】

【00101】 本明細書で使用される場合、「プライミング配列」とは、より大きなオリゴヌクレオチドの一部であると共にプライミング配列が遊離3'末端を含むようにより大きなオリゴヌクレオチドから分離されたときにDNA（又はRNA）重合反応でプライマーとして機能し得るオリゴヌクレオチド配列のことである。

40

【 0 0 5 8 】

【0102】 本明細書で使用される場合、「抗体」は、免疫グロブリン（Ig）を意味し、これは、霊長動物化（例えば、ヒト化）、ネズミ、マウス - ヒト、マウス - 霊長動物、並びにキメラのポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方を含み、且つインタクト分子、そのフラグメント（例えば、scFv、Fv、Fd、ファブ、Fab'及びF(ab)'₂フラグメント）、或いはインタクト分子及び/又はフラグメントのマルチマー若しくはアグリゲートであり得、天然に存在し得るか、又は免疫化、合成、遺伝子工学等によって生成され得る。「抗体フラグメント」は、本明細書で使用される場合、抗原に結合し、

50

且つ幾つかの実施形態ではガラクトース残基の導入等によってクリアランス及び取込みを促進する構造特徴部を呈するように誘導体化され得る、抗体に由来する又は関連するフラグメントを意味する。これは、例えば、 $F(a b)$ 、 $F(a b)'_2$ 、 $s c F v$ 、軽鎖可変領域(V_L)、重鎖可変領域(V_H)及びそれらの組合せを含む。

【0059】

[00103] 本明細書でいう抗原とは、 $A g$ 特異的受容体等の他の分子に特異的に結合可能な分子又はその一部分のことである。抗原は、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ等)等の生物内で免疫反応を誘導可能であり得るが、抗原は、かかる免疫反応を単独で誘導するには不十分なこともあり得る。抗原は、コンフォメーションルエピトープや線状分子断片等の分子の任意の一部分であり得ると共に、多くの場合、適応免疫系のきわめて多様な抗原受容体(B細胞受容体又はT細胞受容体)により認識可能である。抗原は、ペプチド、多糖、又は脂質を含み得る。抗原は、抗体の可変 $F a b$ 領域への結合能により特徴付けられ得る。異なる抗体は、抗原表面上に存在する異なるエピトープを区別する潜在能力を有し、その構造は、低分子であり得るハプテンの存在によりモジュレートされ得る。

10

【0060】

[00104] 幾つかの実施形態では、抗原は癌細胞関連抗原である。癌細胞関連抗原は単純型又は複合型であり得る。また、抗原は、タンパク質、炭水化物基若しくは炭水化物鎖、タンパク質や炭水化物以外の生物学剤若しくは化学剤、又はそれらの任意の組合せ上のエピトープであり得ると共に、エピトープは、リニア又はコンフォメーションルであり得る。

20

【0061】

[00105] 癌細胞関連抗原は、癌細胞(例えば、1つ以上の特定のタイプの癌細胞)を一義的に同定する又は正常細胞での発現と比較して癌細胞でアップレギュレートされる抗原であり得る。典型的には、癌細胞関連抗原は、癌細胞の表面上に存在するので、抗体により確実に認識可能である。抗原は、当技術分野で公知の又は本明細書に記載の腫瘍に見だし得る任意のタイプの癌細胞を含めて、任意のタイプの癌細胞に関連付け可能である。特に、抗原は、肺癌、乳癌、黒色腫等に関連付け可能である。本明細書で使用される場合、「癌細胞に関連付けられる」という用語は、抗原に関連して用いられるとき、抗原が癌細胞により直接産生されること又は癌細胞と正常細胞との間の相互作用により生じることがを意味する。

30

【0062】

[00106] 流体培地を参照して本明細書で使用される場合、「拡散する」又は「拡散」は、流体培地の成分が濃度勾配の下方に熱力学的に移動することを意味する。

【0063】

[00107] 「培地のフロー」という語句は、拡散以外の任意の機構に主に起因する流体培地のバルク移動を意味する。例えば、培地のフローは、点間の圧力差に起因する一方の点から他方の点への流体培地の移動を含み得る。かかるフローは、液体の連続フロー、パルスフロー、周期フロー、ランダムフロー、間欠フロー若しくは往復フロー又はそれらの任意の組合せを含み得る。一方の流体培地が他方の流体培地に流入する場合、培地の乱流及び混合を生じ得る。

40

【0064】

[00108] 「実質的にフローなし」という語句は、時間平均で流体培地中への又は流体培地中での材料の成分(例えば、対象のアナライト)の拡散速度未満の流体培地の流速を意味する。かかる材料の成分の拡散速度は、例えば、温度、成分のサイズ及び成分と流体培地との間の相互作用の強度に依存し得る。

【0065】

[00109] マイクロ流体デバイス内の異なる領域を参照して本明細書で使用される場合、「流体接続される」という語句は、異なる領域が流体培地等の流体で実質的に充填されたときに各領域内の流体が単一の流体を形成するように接続されることを意味する。こ

50

れは、異なる領域内の流体（又は流体培地）が必ずしも同一の組成であることを意味するものではない。より正確には、マイクロ流体デバイスの異なる流体接続領域内の流体は、溶質がそのそれぞれの濃度勾配の下方に移動するとき及び／又はマイクロ流体デバイスを貫流するときに流束内で異なる組成（例えば、タンパク質、炭水化物、イオン、他の分子等の溶質の濃度が異なる）を有し得る。

【 0 0 6 6 】

[00110] 本明細書で使用される場合、「流路」は、培地のフローのトラジェクトリーを規定し且つその対象となる１つ以上の流体接続回路要素（例えば、チャンネル、領域、チャンバ等）を意味する。そのため、流路は、マイクロ流体デバイスの掃引領域の例である。他の回路要素（例えば、非掃引領域）は、流路の培地のフローの対象とならない流路を含む回路要素に流体接続され得る。

10

【 0 0 6 7 】

[00111] 本明細書で使用される場合、「微小物体を分離する」は、マイクロ流体デバイス内の画定領域に微小物体を閉じ込めることである。

【 0 0 6 8 】

[00112] マイクロ流体（又はナノ流体）デバイスは、「掃引」領域と「非掃引」領域とを含み得る。本明細書で使用される場合、「掃引」領域は、流体がマイクロ流体回路を貫流するときに培地のフローにそれぞれ遭遇するマイクロ流体回路の１つ以上の流体相互接続回路要素を含む。掃引領域の回路要素は、例えば、領域、チャンネル及びチャンバの全部又は一部を含み得る。本明細書で使用される場合、「非掃引」領域は、流体がマイクロ流体回路を貫流するときに実質的に流体のフラックスなしにそれぞれ遭遇するマイクロ流体回路の１つ以上の流体相互接続回路要素を含む。拡散を可能とするが、掃引領域と非掃引領域との間で培地が実質的にフローなしとなるように流体接続が構造化される限り、非掃引領域は、掃引領域に流体接続され得る。そのため、マイクロ流体デバイスは、掃引領域と非掃引領域との間で実質的に拡散流体連通のみを可能にしつつ、掃引領域内の培地のフローから非掃引領域を実質的に分離するように構造化され得る。例えば、マイクロ流体デバイスのフローチャンネルは、掃引領域の例であり、一方、マイクロ流体デバイスの分離領域（以下に更に詳細に記載される）は、非掃引領域の例である。

20

【 0 0 6 9 】

[00113] マイクロ流体環境内における１つ以上の細胞からの gDNA シーケンシングライブラリの作製。マイクロ流体デバイス内で培養、観測、又は表現型決定が行われる細胞の物理的位置を相互参照して DNA シーケンシングデータを発生させることは、現在利用可能なシーケンシングストラテジーに対するきわめて望ましい改善である。gDNA をシーケンスする理由としては、細胞の DNA 内の変異又は突然変異の特徴付け、遺伝子編集イベントのアセスメント、及びクローン性のプロセス検証が挙げられる。シーケンシングデータを DNA が分離された特定の細胞に相関付ける能力は、これまで利用可能でなかった。

30

【 0 0 7 0 】

[00114] マイクロ流体デバイス内でインサイチュでも、得られたシーケンシングデータからも、読取り可能なバーコード配列を導入する、マイクロ流体デバイス内で細胞から DNA シーケンシングライブラリを作製するワークフローが本明細書に記載されている。マイクロ流体環境内でバーコードを解読できれば、ゲノムデータと細胞表現型との関連付けが可能になる。図 4 に示されるように、マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内の隔離ペン 405 内に生体細胞 410 を配置し、そこで維持してアッセイを行い得る。アッセイ時（限定されるものではないが細胞表面マーカー 415 を検出するアッセイであり得る）、試薬 420（例えば抗体であり得る）は、415 と記された細胞表面に結合してそうした結合時に検出可能シグナル 425 の検出を可能にし得る。この表現型は、３つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列 435 を含む捕捉物体 430 で細胞 410 から放出された核酸を捕捉する本明細書に記載の方法を用いて、その特定の生体細胞 410 からのゲノムデータに結び付けることが可能である。バーコード 435

40

50

は、本明細書に記載の検出法で蛍光プローブ 440 によりインサイチュで検出可能である。捕捉物体 430 に捕捉された放出された核酸は、シーケンシングライブラリを作製するために使用可能であり、このライブラリは、シーケン時に生体細胞 405 の放出された核酸からのゲノム情報と関連バーコード 435 の配列との両方を含むシーケンシングデータ 445 を提供する。こうして表現型とゲノムデータとの相関付けが提供される。この能力は、図 4B に示されるワークフロー全体へのエントリを提供する。例えば、遺伝子編集 450、機能/表現型アッセイ又は標識アッセイ 455 を含み得る経路を通り抜ける細胞は、細胞培養 460 の前、その後、又はその時のいずれかに、バーコード付き捕捉ビーズ 470 を用いて関連付けプロセス 465 に入ってから、RNA (475) 及び/又は DNA (480) を捕捉すると共に、元の方向に原細胞に関連付けられる RNA-seq 482、T 細胞受容体 (TCR) - seq 484、B 細胞受容体 (BCR) - seq 486、又は DNA seq (488) のデータを提供し得る。細胞がクローン集団の一部である場合、陽性クローン搬出 490 をもたらし得る。

【0071】

[00115] 更に、RNA 捕捉/ライブラリ作製及び DNA 捕捉/ライブラリ作製のために本明細書に記載のプロトコルを用いることにより、同一の単一細胞から RNA 及び DNA の両方のシーケンシング結果が得られ得ると共に、シーケンスされた RNA 及び DNA の特定の単一細胞源のマイクロ流体デバイス内の位置への関連付けを行い得る。

【0072】

[00116] 図 5 に模式的に示されるように、蛍光を用いて個別にデコードされるカセット化可能 (例えば、幾つかの実施形態では完全に互換性であり得る変更可能サブユニット 435a、435b、435c、435d) サブバーコード又は「ワード」を用いて設計される DNA バーコード 525 が本明細書に記載されている。バーコードの検出は、相補的蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブを用いて 4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれを検出することによりインサイチュで実施し得る。ここに示されるように、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列 435a は、フルオロフォア Fluor1 を含むハイブリダイゼーションプローブ 440a を用いたハイブリダイゼーションによりインサイチュで検出される。それぞれ、第 2 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列 435b は、ハイブリダイゼーションプローブ 440b (Fluor2 を含む) により同様に検出し得るし、第 3 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列 435c は、Fluor3 を有するハイブリダイゼーションプローブ 440c により検出し得るし、第 4 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列 435d は、Fluor4 を有するハイブリダイゼーションプローブ 440c により検出し得る。フルオロフォア Fluor1、Fluor2、Fluor3、及び Fluor4 のそれぞれはスペクトル識別可能であるので、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列ごとの明確な同定が可能である。

【0073】

[00117] 図 5 に例示される方法では、プライミング配列 520 と共にそれぞれ DNA バーコード 525 を含む複数の捕捉オリゴヌクレオチド (複数の単一捕捉オリゴヌクレオチド 550 が示される) を有するビーズ 510 を含む捕捉物体 430 は、1 つの細胞 410 / 1 つの細胞コロニー (図示せず) に対して 1 つの捕捉物体 430 / 1 つのバーコード 525 として各隔離ペン 405 に導入し得る。

幾つかの他の実施形態では、検査下の生体細胞からより大量の核酸を捕捉するために 2 つ以上の捕捉物体を隔離ペン内に配置し得る。

【0074】

[00118] プライミング配列 520、バーコード 525、任意選択的ユニーク分子識別子 (UMI) 525、及び捕捉配列 535 を含む捕捉オリゴヌクレオチド 550 にリンカー 515 を介して結合されたビーズ 510 を含む捕捉物体 430 により、溶解時に生体細胞 410 から放出された核酸 (放出された核酸は RNA 505 であり得る) を捕捉する模式図が図 5 に示される。この例では、バーコード 525 は、4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列 435a、435b、435c、及び 435d を含む。この例では、捕

捉オリゴヌクレオチドの捕捉配列 5 3 5 は、放出された核酸 5 0 5 のポリ A セグメントにハイブリダイズすることにより、放出された核酸 5 0 5 を捕捉する。

【 0 0 7 5 】

[00119] 溶解させる細胞は、ライブラリ作製及びシーケンシングのためにマイクロ流体デバイスに特定の搬入し得るか又は任意の望ましい時間にわたり維持した状態でマイクロ流体デバイス内に存在し得るかのいずれかであり得る。

【 0 0 7 6 】

[00120] 捕捉物体。捕捉物体は、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み得る。前記複数のそれぞれの、プライマー結合配列であるプライミング配列と、捕捉配列と、3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列であって、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、バーコード配列と、を含む。種々の実施形態では、捕捉物体は、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み得る。各捕捉オリゴヌクレオチドは、最も 5 ' 側のヌクレオチド及び最も 3 ' 側のヌクレオチドを含む。種々の実施形態では、プライミング配列は、前記最も 5 ' 側のヌクレオチドに隣接し得るか又はそれを含む。種々の実施形態では、捕捉配列は、前記最も 3 ' 側のヌクレオチドに隣接し得るか又はそれを含む。典型的には、バーコード配列は、プライミング配列の 3 ' 側且つ捕捉配列の 5 ' 側に位置し得る。

【 0 0 7 7 】

[00121] 捕捉物体組成。典型的には、捕捉物体は、負の DEP 力等の誘電泳動 (DEP) 力を用いた移動に適するような組成を有する。例えば、捕捉物体は、常磁性材料、高分子材料、及び / 又はガラスを含むコアを有するビーズ (又は類似の物体) であり得る。高分子材料は、捕捉オリゴヌクレオチドに結合するように機能し得るポリスチレン又は任意の他のプラスチック材料であり得る。捕捉物体のコア材料は、官能化ポリマーを含み得る捕捉オリゴヌクレオチドにリンカーを付着するのに好適な材料を提供するように被覆し得るが、他の構成も可能である。捕捉オリゴヌクレオチドを捕捉物体に結合するために使用されるリンカーは、当技術分野で公知の任意の好適なリンカーであり得る。リンカーは、アミド基、エーテル基、ケト基等の官能基で置換されていなくても置換されていてもそれらが介在していても介在していなくてもよい望ましい物理化学的性質を提供し得る炭化水素鎖を含み得る。リンカーは、リンカーに結合された捕捉オリゴヌクレオチドの末端近傍のプライミング部位に処理酵素がアクセスできるように十分な長さを有し得る。捕捉オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知のようにリンカーに共有結合又は非共有結合し得る。限定されるものではないがリンカーへの非共有結合の例としては、ビオチン / ストレプトアビジン対によるものが挙げられる。

【 0 0 7 8 】

[00122] 本明細書に記載の任意のマイクロ流体デバイスのフロー領域のフローチャネルを介する貫流及び隔離ベンに対する流出入に十分な程度に小さなものである限り、捕捉物体は任意の好適なサイズであり得る。更に、捕捉物体は、それに結合される捕捉オリゴヌクレオチドの数を十分に多くしてシーケンシングに有用な核酸ライブラリを作製するのに十分な量で核酸を捕捉し得るように選択し得る。幾つかの実施形態では、捕捉物体は、球状又は部分的に球状のビーズであり得ると共に約 5 μm 超且つ約 40 μm 未満の直径を有する。幾つかの実施形態では、球状又は部分的に球状のビーズは、約 5、約 7、約 8、約 10、約 12、約 14、約 16、約 18、約 20、約 22、約 24、又は約 26 μm の直径を有し得る。

【 0 0 7 9 】

[00123] 典型的には、捕捉物体に結合される各捕捉オリゴヌクレオチドは同一のバーコード配列を有し、多くの実施形態では、各捕捉物体はユニークバーコード配列を有する。各捕捉ビーズ上でユニークバーコードを有する捕捉ビーズを用いて、捕捉物体が配置される隔離ベンのユニークな同定を可能にする。複数の細胞が (多くの場合 1 つずつ) 隔離ベン内に配置される実験では、捕捉物体も複数送達され、占有隔離ベンに 1 隔離当たり 1 つの捕捉ビーズが配置される。複数の捕捉ビーズのそれぞれのユニークバーコードを有し

10

20

30

40

50

、且つバーコードは、マイクロ流体デバイス内に存在する他のいずれの捕捉の他のいずれのバーコードとも非同一である。結果として、隔離ペン内の1つの細胞（又は幾つかの実施形態では複数の細胞）は、そのシーケンシングライブラリに組み込まれたユニークバーコード識別子を有するであろう。

【0080】

[00124] バーコード配列。バーコード配列は、2つ以上（例えば、2、3、4、5、又はそれ以上）のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得ると共に、そのそれぞれは、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である。バーコード配列のセット内のいずれか1つのバーコード配列の n （例えば3つ以上）のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列がバーコード配列のセット内のいずれかの他のバーコード配列の n' （例えば3つ以上）のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に完全にオーバーラップしない限り、バーコード配列はセット内の他のバーコード配列と非同一であり、セット内の各バーコード配列がセット内の他の全てのバーコード配列と少なくとも1つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列だけ異なる限り、部分的なオーバーラップ（例えば $n-1$ まで）は許容し得る。特定の実施形態では、バーコード配列は、2つ以上（例えば、2、3、4、5、又はそれ以上）のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列からなる（又はそれらから本質的になる）。本明細書で使用される場合、「カセット化可能オリゴヌクレオチド配列」とは、オリゴヌクレオチド配列の規定のセット（例えば、12以上のオリゴヌクレオチド配列のセット）の1つであるオリゴヌクレオチド配列のことであり、規定のセット内の各オリゴヌクレオチド配列に対して、相補的オリゴヌクレオチド配列（本明細書の他の箇所に記載されるようにハイブリダイゼーションプローブの一部であり得る）は、オリゴヌクレオチド配列の規定のセット内の他のオリゴヌクレオチド配列のいずれにも実質的にハイブリダイズしない。特定の実施形態では、規定のセット内のオリゴヌクレオチド配列は全て（又は実質的に全て）、同一の長さ（又はヌクレオチド数）を有するであろう。例えば、規定のセット内のオリゴヌクレオチド配列は全て、10ヌクレオチドの長さを有し得る。しかし、約6ヌクレオチド～約15ヌクレオチドの範囲内の他の長さも、本発明で使用するのに好適である。そのため、例えば、規定のセット内の実質的に全てのオリゴヌクレオチド配列に対して、規定のセット内の各オリゴヌクレオチド配列は、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、11ヌクレオチド、12ヌクレオチド、13ヌクレオチド、14ヌクレオチド、又は15ヌクレオチドの長さを有し得る。代替的に、規定のセット内の各オリゴヌクレオチド配列又は実質的に全てのオリゴヌクレオチド配列は、6～8、7～9、8～10、9～11、10～12、11～12、12～14、又は13～16ヌクレオチドの長さを有し得る。

【0081】

[00125] 各オリゴヌクレオチド配列は、(i)バーコード配列のシーケンシング及び(ii)カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むプローブ（例えば、ハイブリダイゼーションプローブ）を用いたハイブリダイゼーション反応の実施の両方により検出可能なそのユニークヌクレオチド配列に基づいてバーコード配列中に存在するとして特定の同定可能であるので、オリゴヌクレオチド配列の規定のセットから選択される各オリゴヌクレオチド配列（ひいてはバーコード配列）は、規定のセット内の他のオリゴヌクレオチド配列（ひいてはバーコード配列）と「非同一」とであるといえる。

【0082】

[00126] 幾つかの実施形態では、バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、介在オリゴヌクレオチド配列を何ら含むことなくタンデムに結合される。他の実施形態では、3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、カセット化可能オリゴヌクレオチドの1つとその近接カセット化可能オリゴヌクレオチドとの間に直接結合でない1つ以上の結合を有し得る。3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のいずれかの間のかかる結合は、全合成ではなくライゲーションによる合成を容

易にするために存在し得る。しかし、種々の実施形態では、カセット化可能オリゴヌクレオチドのオリゴヌクレオチド配列には、1つ以上のプライミング配列、任意選択的インデックス配列、任意選択的ユニーク分子識別子配列、又は限定されるものではないがNot 1制限部位配列をはじめとする任意選択的制限部位を形成する他のオリゴヌクレオチド配列のいずれの他の配列も介在しない。

【0083】

[00127] カセット化可能オリゴヌクレオチド配列及びその相補的オリゴヌクレオチド配列（かかる相補的オリゴヌクレオチド配列の全部又は一部を含有するハイブリダイゼーションプローブを含めて）との関連で本明細書で使用される場合、「実質的にハイブリダイズする」という用語は、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列とその相補的オリゴヌクレオチド配列と間のハイブリダイゼーションのレベルが閾値レベルを超えることを意味する。ただし、閾値レベルは、相補的オリゴヌクレオチド配列とオリゴヌクレオチド配列の規定のセット内のいずれの他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列との間のクロスハイブリダイゼーションのレベルよりも大きく且つそれと実験的に識別可能である。当業者であれば容易に理解されるであろうが、相補的オリゴヌクレオチド配列が特定のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に実質的にハイブリダイズするかしないかを決定する閾値は、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列の長さ、ハイブリダイゼーション反応が行われる溶液の成分、ハイブリダイゼーション反応が行われる温度、及びハイブリダイゼーションを検出するために使用される標識（相補的オリゴヌクレオチド配列に結合し得る）の化学的性質をはじめとする幾つかの因子に依存する。出願人は、非同一のオリゴヌクレオチド配列の規定のセットに使用可能な例示的条件を提供したが、当業者であれば好適な追加条件を容易に同定可能である。

【0084】

[00128] 3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、少なくとも12のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットから選択し得る。例えば、セットは、少なくとも12、15、16、18、20、21、24、25、27、28、30、32、33、35、36、39、40、42、44、45、48、50、51、52、54、55、56、57、60、63、64、65、66、68、69、70、72、75、76、78、80、81、84、85、87、88、90、92、93、95、96、99、100の、又はそれ以上を含み得る（上記の任意の間の任意の数を含めて）。

【0085】

[00129] 表1に示される40のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットの配列番号1～40は、10マーのオリゴヌクレオチドを用いたインサイチュ検出法に使用するように設計されたものであり、検出時のフルオロフォアプローブハイブリダイゼーションを最適に行える。10マーの少なくとも6塩基は、検出法におけるミスアニーリングを防止するために差別化される。セットは、Comailab: (http://comailab.genomecenter.ucdavis.edu/index.php/Barcode_generator)製のバーコードジェネレーターpython scriptを用いて設計され、示された配列の更なる選択は、28以上のTm（融解温度）を有する配列の選択に基づくものであった。Tm計算は、IDT OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>)を用いて実施された。

【0086】

10

20

30

40

【表 1】

表 1. バーコードに組み込むためのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列及びそのインサイチュ検出のためのハイブリダイゼーションプローブ配列。

バーコード名	配列番号	バーコード配列	プローブ名	配列番号	プローブ配列	蛍光チャネル
BC1_C1	1	CAGCCTTCTG	プローブ_C1	41	CAGAAGGCTG/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C2	2	TGTGAGTTCC	プローブ_C2	42	GGAAC TCACA/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C3	3	GAATACGGGG	プローブ_C3	43	CCCCGTATTC/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C4	4	CTTTGGACCC	プローブ_C4	44	GGGTCCAAAG/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C5	5	GCCATACACG	プローブ_C5	45	CGTGTATGGC/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C6	6	AAGCTGAAGC	プローブ_C6	46	GCTTCAGCTT/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C7	7	TGTGGCCATT	プローブ_C7	47	AATGGCCACA/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C8	8	CGCAATCTCA	プローブ_C8	48	TGAGATTGCG/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C9	9	TGCGTTGTTG	プローブ_C9	49	CAACAACGCA/3AlexF647N/	Cy5
BC1_C10	10	TACAGTTGGC	プローブ_C10	50	GCCAACTGTA/3AlexF647N/	Cy5
BC2_D11	11	TTCCTCTCGT	プローブ_D11	51	/5AlexF405N/ACGAGAGGAA	Dapi
BC2_D12	12	GACGTTACGA	プローブ_D12	52	/5AlexF405N/TCGTAACGTC	Dapi
BC2_D13	13	ACTGACGCGT	プローブ_D13	53	/5AlexF405N/ACGCGTCAGT	Dapi
BC2_D14	14	AGGAGCAGCA	プローブ_D14	54	/5AlexF405N/TGCTGCTCCT	Dapi
BC2_D15	15	TGACGCGCAA	プローブ_D15	55	/5AlexF405N/TTGCGCGTCA	Dapi
BC2_D16	16	TCCTCGCCAT	プローブ_D16	56	/5AlexF405N/ATGGCGAGGA	Dapi
BC2_D17	17	TAGCAGCCCA	プローブ_D17	57	/5AlexF405N/TGGGCTGCTA	Dapi
BC2_D18	18	CAGACGCTGT	プローブ_D18	58	/5AlexF405N/ACAGCGTCTG	Dapi
BC2_D19	19	TGGAAAGCGG	プローブ_D19	59	/5AlexF405N/CCGCTTTCCA	Dapi
BC2_D20	20	GCGACAAGAC	プローブ_D20	60	/5AlexF405N/GTCTTGTCGC	Dapi
BC3_F21	21	TGTCCGAAAG	プローブ_F21	61	CTTTCGGACA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F22	22	AACATCCCTC	プローブ_F22	62	GAGGGATGTT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F23	23	AAATGTCCCG	プローブ_F23	63	CGGGACATTT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F24	24	TTAGCGCGTC	プローブ_F24	64	GACGCGCTAA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F25	25	AGTTCAGGCG	プローブ_F25	65	CGCCTGAAC/3AlexF488N/	FITC
BC3_F26	26	ACAGGGGAAC	プローブ_F26	66	GTTCCCCTGT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F27	27	ACCGGATTGG	プローブ_F27	67	CCAATCCGGT/3AlexF488N/	FITC
BC3_F28	28	TCGTGTGTGA	プローブ_F28	68	TCACACACGA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F29	29	TAGGTCTGCG	プローブ_F29	69	CGCAGACCTA/3AlexF488N/	FITC
BC3_F30	30	ACCCATACCC	プローブ_F30	70	GGGTATGGGT/3AlexF488N/	FITC
BC4_T31	31	CCGCACTTCT	プローブ_T31	71	AGAAGTGCGG/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T32	32	TTGGGTACAG	プローブ_T32	72	CTGTACCCAA/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T33	33	ATTCGTCGGA	プローブ_T33	73	TCCGACGAAT/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T34	34	GCCAGCGTAT	プローブ_T34	74	ATACGCTGGC/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T35	35	GTTGAGCAGG	プローブ_T35	75	CCTGCTCAAC/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T36	36	GGTACCTGGT	プローブ_T36	76	ACCAGGTACC/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T37	37	GCATGAACGT	プローブ_T37	77	ACGTTTCATGC/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T38	38	TGGCTACGAT	プローブ_T38	78	ATCGTAGCCA/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T39	39	CGAAGGTAGG	プローブ_T39	79	CCTACCTTCG/3AlexF594N/	テキサスレッド
BC4_T40	40	TTCAACCGAG	プローブ_T40	80	CTCGGTTGAA/3AlexF594N/	テキサスレッド

【0087】

[00131] 種々の実施形態では、バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、配列番号1～40のいずれか1つの配列を有し、3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチドには同一のものはない。カセット化可能配列は、捕捉オリゴヌクレオチド内に任意の順序で提示し得ると共に、その順序は、インサイチュ検出を変化させず、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれの配列は、シーケンシングリードからデコンボリューション可能である。幾つかの実施形態では、バーコード配列は4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を有し得る。

【0088】

10

20

30

40

50

【00132】 幾つかの実施形態では、バーコードの第1のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号1～40の第1のサブセットから選択される配列を有し、バーコードの第2のカセット化可能配列は、配列番号1～40の第2のサブセットから選択される配列を有し、バーコードの第3のカセット化可能配列は、配列番号1～40の第3のサブセットから選択される配列を有し、且つバーコードの第4のカセット化可能配列は、配列番号1～40の第4のサブセットから選択される配列を有する。

【0089】

【00133】 幾つかの実施形態では、バーコードの第1のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号1～10のいずれか1つの配列を有し、バーコードの第2のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号11～20のいずれか1つの配列を有し、バーコードの第3のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号21～30のいずれか1つの配列を有し、且つバーコードの第4のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号31～40のいずれか1つの配列を有する。幾つかの実施形態では、バーコードの第1のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号1～10のいずれか1つの配列を有し、バーコードの第2のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号11～20のいずれか1つの配列を有し、バーコードの第3のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号21～30のいずれか1つの配列を有し、且つバーコードの第4のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号31～40のいずれか1つの配列を有し、第1、第2、第3、及び第4のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、バーコード配列の5'→3'方向に順に捕捉オリゴヌクレオチドの長さに沿って位置する。すなわち、第1のカセット化可能オリゴヌクレオチドは、第2のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の5'側にあり、以下順に第2は第3のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の5'側に位置し、第3は第4のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の5'側に位置するであろう。これは図6に模式的に示される。この場合、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列G1～G10の1つは、第1のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列位置に位置し、Y1～Y10配列の1つは、第2のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列位置に配置し、R1～R10配列の1つは、第3のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列位置に配置し、且つB1～B10配列の1つは、バーコードの第4のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列位置に配置する。しかし、この順序は問題ではなく、存在又は不在を決定するインサイチュ検出及びシーケンシングリードは提示された順序に依拠しない。

【0090】

【00134】 キャプチャー配列。捕捉物体は、核酸を捕捉するように構成された捕捉配列を含む。捕捉配列は、約6～約50ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチド配列である。幾つかの実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチド配列は、対象細胞から放出された核酸にハイブリダイズすることにより核酸を捕捉する。限定されるものではないが一例としては、3'末端にポリAを有するRNA断片を捕捉可能且つそれにハイブリダイズ可能なポリT配列(約30～約40ヌクレオチドを有する)が挙げられる。ポリT配列は、その3'末端に2つのヌクレオチドVNを更に含有し得る。捕捉オリゴヌクレオチドの他の例としては、相補的核酸にハイブリダイズするようにひいてはそれを捕捉するように混合物で使用し得るランダムヘキサマー(「ランダマー」)が挙げられる。代替的に、B細胞受容体配列やT細胞受容体配列等の核酸の標的化捕捉のために遺伝子特異的配列の相補体を使用し得る。

【0091】

【00135】 他の実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチド配列は、リコンビナーゼ/ポリメラーゼ指向鎖伸長を介して認識可能末端配列をシェパードして適切にタグ付けされた放出核酸を効果的に「捕捉」することによりシーケンシングアダプター、バーコード、及びインデックスを付加するように、細胞から放出された核酸を捕捉するために使用し得る。このタイプの捕捉オリゴヌクレオチド配列の例としては、当技術分野で公知のようにモザイク末端(ME)配列又は他のタグメンテーションインサート配列が挙げられる。モザイ

ク末端インサート配列は、トランスポゾンにより容易に認識される短いオリゴヌクレオチドであり、核酸断片にプライミング／タギングを提供するために使用可能である。この目的に好適なオリゴヌクレオチド配列は、約 8 ヌクレオチド～約 50 ヌクレオチドを含有し得る。幾つかの実施形態では、ME + 追加インサート配列は、約 33 ヌクレオチド長であり得ると共に、Nextera DNA Library Prep Kit、Illumina、カタログ番号 15028212 等の市販のタグメンテーションキットの使用により挿入可能である。この実施形態では、捕捉配列により実施される捕捉は、ハイブリダイゼーションイベントではなく、タグメント化 DNA 断片を対象とした捕捉オリゴヌクレオチド、タグ付き DNA、並びにプライミング配列、バーコード配列及び任意の他のインデックス、アダプター、又は限定されるものではないが Not 1 制限部位配列等の機能部位に対するリコンビナーゼ／ポリメラーゼ機構の間のシェパード・ダイレクティング相互作用である（以下で考察される）。シェパード・ダイレクティング相互作用は、放出核酸を捕捉するためにハイブリダイゼーション相互作用を用いた以上に記載の cDNA 産物と等価な産物を提供する。いずれの場合も、この時点で少なくともシーケンシングアダプター及びバーコードを含む拡張核酸断片が放出核酸から提供され、増幅更にはシーケンシングライブラリ適合化が可能になると共に、シーケンスされたバーコード及びサンプル核酸のリードの取得が可能になる。

【0092】

[00136] プライミング配列。捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドはプライミング配列を有し、プライミング配列は捕捉オリゴヌクレオチドに隣接し得るか又はその最も 5' 側のヌクレオチドを含む。プライミング配列は、ジェネリック又は配列特異的プライミング配列であり得る。プライミング配列は、結合時に逆転写酵素又はポリメラーゼをプライミングするプライマーに結合し得る。幾つかの実施形態では、ジェネリックプライミング配列は、P7 (5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T 3' (配列番号 107)) プライマー又は P5 (5' - C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T 3' (配列番号 108)) プライマーに結合し得る。

【0093】

[00137] 他の実施形態では、ジェネリックプライミング配列は、以下：

5' - Me - i s o d C / / Me - i s o d G / / Me - i s o d C / A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C r G r G r G 3' - ' (配列番号 103)、

5' - A C A C T C T T T C C C T 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 104)、

5' - / 5 B i o s g / A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C - 3' (配列番号 105)、

5' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A G A T C T A C A C T C T T T C C C T 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 106)、

5' - / 5 B i o t i n T E G / C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T T C G C C T T A G T C T C G T G G - G C T C G * G - 3' (配列番号 109)、

5' / 5 B i o t i n T E G / C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T C T A G T A C G G T C T C G T G - G G C T C G * G - 3' (配列番号 110、及び

5' - / 5 B i o t i n T E G / C A A G C A G A A G A C G G C A T A C G A G A T C T A G T A C G G T C T C G T G - G G C T C G * G (配列番号 111)

の配列の 1 つを有するプライマーに結合し得る。

【0094】

[00138] 追加のプライミング配列及び／又はアダプター配列。捕捉オリゴヌクレオチドは、プライマー伸長用ランディング部位又は大規模並列シーケンシングアレイ若しくはフローセル内に相補的ハイブリダイジングアンカー部位を固定するための部位のいずれかを提供する 1 つ以上の追加のプライミング／アダプター配列を任意選択的に有し得る。

【0095】

[00139] 任意選択的オリゴヌクレオチド配列。捕捉オリゴヌクレオチドの複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、ユニーク分子識別子 (UMI) 配列を任意選択的に更

10

20

30

40

50

に含み得る。複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、捕捉物体の他の捕捉オリゴヌクレオチドとは異なるUMIを有し得ると共に、多くの増幅された配列とは対照的にユニーク捕捉の同定を可能にする。幾つかの実施形態では、UMIは、プライミング配列の3'側且つ捕捉配列の5'側に位置し得る。UMI配列は、約5～約20ヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドであり得る。幾つかの実施形態では、UMI配列のオリゴヌクレオチド配列は、約10ヌクレオチドを有し得る。

【0096】

[00140] 幾つかの実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドはまた、Not1制限部位配列(GCGGCCGC、配列番号160)を含み得る。Not1制限部位配列は、捕捉オリゴヌクレオチドの捕捉配列の5'側に位置し得る。幾つかの実施形態では、Not1制限部位配列は、捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列の3'側に位置し得る。

10

【0097】

[00141] 他の実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドはまた、プールインデックス配列等の追加の指標を含み得る。インデックス配列は、1つの実験に属する捕捉物体のセットをユニークに同定する4～10オリゴヌクレオチドの配列であり、幾つかの異なる実験からのシーケンシングライブラリを組み合わせたマルチプレックスシーケンシングを行って、シーケンシングデータのデコンボリューション並びに適正実験及びそれに関連する捕捉物体への元の方向の相関付けを可能にしつつ、シーケンシングランコスト及び時間の節約を可能にする。

20

【0098】

[00142] 限定されるものではないが、幾つかの例示的な捕捉物体が表2に例示される。ここでは、明確さを期して1つの捕捉オリゴヌクレオチドのみが示されている。プライミング配列と、バーコードと、UMIと、RNAを捕捉するための捕捉配列と、を含む捕捉物体は、配列番号97、配列番号98、配列番号99、又は配列番号100を有する捕捉物体であり得る。プライミング配列と、バーコードと、UMIと、Not1配列と、RNAを捕捉するための捕捉配列と、を含む捕捉物体は、配列番号101又は配列番号102を有する捕捉物体であり得る。

【0099】

30

40

50

【表 2】

表 2. 例示的な捕捉物体。

配列番号	配列
97	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
98	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGCAATCTCACAGACGCTGT TCGTGTGTGATGGCTACGATNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
99	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
100	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'
101	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTT GGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN
102	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCGTTGTTGTGGAAAGCGG TAGGTCTGCGCAAGGTAGGNNNNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCT TGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'

10

20

【0100】

[00144] 複数の捕捉物体。マルチプレックス核酸捕捉に使用される複数の捕捉物体が提供される。複数の捕捉物体のそれぞれは、本明細書に記載の任意の捕捉物体に係る捕捉物体であり、複数の捕捉物体のそれぞれに対して、その捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドは、同一のバーコード配列を有し、複数の捕捉物体のそれぞれの捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列は、複数の他の全ての捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列とは異なる。幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体は、少なくとも256の捕捉物体を含み得る。他の実施形態では、複数の捕捉物体は、少なくとも10,000の捕捉物体を含み得る。複数の捕捉物体の構築を示す模式図が図6に示される。捕捉物体630は、リンカー515を介して捕捉オリゴヌクレオチド550が付着されたビーズ510を有する。リンカー515は、捕捉オリゴヌクレオチド550の5'末端、特にプライミング配列520の5'末端に付着される。リンカー515及びプライミング配列520（ここでは33bp長として示される）は、この例では、全ての捕捉物体の全ての捕捉オリゴヌクレオチドに共通であるが、他の実施形態では、リンカー及び/又はプライミング配列は、捕捉物体上の異なる捕捉オリゴヌクレオチドに対して異なり得るか、又は代替的にリンカー及び/又はプライミング配列は、複数の異なる捕捉物体に対して異なり得る。捕捉オリゴヌクレオチド550の捕捉配列535は、捕捉オリゴヌクレオチド550の3'末端に位置するか又はそれに近接する。限定されるものではないがこの例では、捕捉配列535は、放出させたRNAをジェネリックに捕捉するポリT-VN配列として示される。幾つかの実施形態では、捕捉配列535は、複数の捕捉物体の全ての捕捉物体630の全ての捕捉オリゴヌクレオチド550に共通である。しかし、他の複数の捕捉物体では、捕捉物体630の複数の捕捉オリゴヌクレオチド550の各捕捉オリゴヌクレオチド上の捕捉配列535は、必ずしも同一であるとは限らない。この例では、任意選択的ユニーク分子識別子(UMI)530が存在し、且つ捕捉配列535の5'側、ただしプライミング配列520の3'側に位置する。この特定の例では、UMI530は、捕捉オリゴヌクレオチドに沿ってバーコード配列525の3'側に位置する。しかし、他の実施形態では、UMI530はバーコードの5'側に位置し得る。しかし、UMI530は、増幅核酸産物に組み込ま

30

40

50

れるようにプライミング配列 5 2 0 の 3' 側に位置する。この例では、UMI 5 3 0 は 1 0 b p 長である。ここでは、NNNNNNNNNN (配列番号 8 4) の配列を有する UMI 5 3 0 が示される。一般に、UMI 5 3 0 は、バーコード 5 2 5 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列 4 3 5 a、4 3 5 b、4 3 5 c、4 3 5 d のいずれとも同一でなくプライミング配列 5 2 0 ととも同一でないことを前提条件として、任意のヌクレオチドのランダムな組合せで構成し得る。多くの実施形態では、UMI は、この場合に示されるように、捕捉配列 5 3 5 にオーバーラップする 1 0 T の配列を含まないように設計される。UMI 5 3 0 は、各捕捉物体 6 3 0 の各捕捉オリゴヌクレオチド 5 5 0 に対してユニークである。幾つかの実施形態では、異なる捕捉物体 6 3 0 のバーコード 5 2 5 がシーケンシングリードのデコンボリューションを可能にするので、捕捉物体 6 3 0 の各捕捉オリゴヌクレオチド 5 5 0 のユニーク UMI 5 3 0 は、複数の異なる捕捉物体 6 3 0 の捕捉オリゴヌクレオチド 5 5 0 内で使用し得る。

10

【0101】

[00145] 捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード 5 2 5 は、プライミング配列の 3' 側にあり、それぞれ 1 0 b p 長の 4 つのカセット化可能配列 4 3 5 a、4 3 5 b、4 3 5 c、及び 4 3 5 d を含有する。単一捕捉物体 6 3 0 上の複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチド 5 5 0 は、同一のバーコード 5 2 5 を有し、複数の捕捉物体のバーコード 5 2 5 は、複数の捕捉物体 6 3 0 のそれぞれで異なる。捕捉物体のそれぞれのバーコード 5 2 5 の多様性は、以下に記載されるようにオリゴヌクレオチドの規定のセットからカセット化可能オリゴヌクレオチドの選択を行うことにより得られ得る。この例では、それぞれ 1 0 の異なる可能な選択肢を含有するオリゴヌクレオチドの 4 つの規定のセットから各 1 つずつ選択することにより 1 0、0 0 0 の異なるバーコードを作製可能である。

20

【0102】

[00146] カセット化可能オリゴヌクレオチド配列。カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、本明細書に記載されるようにバーコード内で使用するために提供され、配列番号 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つのオリゴヌクレオチド配列を有し得る。

【0103】

[00147] バーコード配列。バーコード配列は、捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチド及び本明細書に記載の方法で使用するために提供され、バーコード配列は、3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得ると共に、バーコード配列の 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、配列番号 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つの配列を有し、バーコード配列の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である。バーコード配列は、2 つ以上 (例えば、2、3、4、5、又はそれ以上) のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、そのそれぞれは、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である。特定の実施形態では、バーコード配列は、2 つ以上 (例えば、2、3、4、5、又はそれ以上) のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列からなる (又はそれらから本質的になる)。バーコード配列のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、本明細書の他の箇所に記載される通りであり得る。例えば、2 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、オリゴヌクレオチド配列の規定のセット (例えば、1 2 以上のオリゴヌクレオチド配列のセット) の 1 つであり得ると共に、規定のセット内の各オリゴヌクレオチド配列に対して、相補的オリゴヌクレオチド配列は、規定のセット内の他のオリゴヌクレオチド配列のいずれにも実質的にハイブリダイズしない。特定の実施形態では、バーコード配列の 2 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、6 ~ 1 5 ヌクレオチド (例えば、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、又は 1 5 ヌクレオチド長) を含み得る。他の実施形態では、2 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれは、6 ~ 1 5 ヌクレオチド (例えば、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4 又は 1 5 ヌクレオチド長) からなり得る (又は本質的になり得る)。更に他の実施形態では、バーコード配列の 2 つ以上のカセット化可能配列のそれぞれは、6 ~ 8、7 ~ 9、8 ~ 1 0、9 ~ 1 1、1 0 ~ 1 2、1 1 ~ 1 3、1 2 ~

30

40

50

14、又は13～15ヌクレオチドを含み得るか、それらからなり得るか、又はそれらから本質的になり得る。具体的な実施形態では、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、配列番号1～40により規定されるセットのいずれか1つであり得る。幾つかの実施形態では、バーコードは、3つ又は4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得る。種々の実施形態では、バーコードの3つ又は4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、介在オリゴヌクレオチド配列を何ら含むことなくタンデムに結合される。他の実施形態では、3つ又は4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の1つ以上は、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列間に介在する1つ、2つ、又は3つのヌクレオチドを用いて結合一体化し得る。これはライゲーション化学を用いてカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を結合するときには有用である。幾つかの実施形態では、捕捉オリゴヌクレオチド内の他の機能を有する他のヌクレオチド配列は、3つ又は4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の結合に介在しない。

【0104】

[00148] バーコード配列のセット。セットの各バーコード配列が本明細書に記載の任意のバーコードに係る構造を有する少なくとも64の非同ーバーコード配列を含むバーコード配列のセットが提供される。本明細書で使用される場合、バーコード配列のセット内のいずれか1つのバーコード配列の n （例えば3つ以上）のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列がバーコード配列のセット内のいずれかの他のバーコード配列の n' （例えば3つ以上）のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に完全にオーバーラップしない限り、バーコード配列はセット内の他のバーコード配列と非同ーであり、セット内の各バーコード配列がセット内の他の全てのバーコード配列と少なくとも1つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列だけ異なる限り、部分的なオーバーラップ（例えば $n-1$ まで）は許容し得る。幾つかの実施形態では、バーコード配列のセットは、64、81、100、125、216、256、343、512、625、729、1000、1296、2401、4096、6561、又は10,000のバーコード配列から本質的になり得る。

【0105】

[00149] ハイブリダイゼーションプローブ。カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列と検出可能標識とを有するハイブリダイゼーションプローブもまた開示される。検出可能標識は、例えば、限定されるものではないが、フルオレセイン色素、シアニン色素、ローダミン色素、フェニルインドール色素、クマリン色素、アクリジン色素等の蛍光標識であり得る。限定されるものではないが幾つかの例としては、Alexa Fluor（登録商標）647、Alexa Fluor（登録商標）405、Alexa Fluor（登録商標）488等のAlexa Fluor色素、Cy（登録商標）5やCy（登録商標）7等のシアニン色素、又は当技術分野で公知の任意の好適な蛍光標識が挙げられる。各色素の蛍光シグナルが検出可能識別可能である限り、バーコードを検出するためにマイクロ流体環境に流入されるハイブリダイゼーションプローブ上に存在する識別可能フルオロフォアの任意のセットを選択し得る。代替的に、検出可能標識は、発光剤、例えば、ルシフェラーゼレポーター、ランタニドタグ又は無機フォスファー、チューナブルであり得る且つ半導体材料を含み得る量子ドットであり得る。フルオロフォア分子と共にクエンチャー分子を含み得るFRET標識等の他のタイプの検出可能標識を組み込み得る。FRET標識としては、Black Hole Quencher（登録商標）（Biosearch）、Iowa Black（商標）、ダブシル等のダーククエンチャーが挙げられ得る。FRET標識は、TaqMan（登録商標）プローブ、ヘアピンプローブ、Scorpion（登録商標）プローブ、分子ビーコンプローブ等のいずれかであり得る。

【0106】

[00150] ハイブリダイゼーション条件の更なる詳細は以下に記載されており、一連のバーコード及びそれらのハイブリダイゼーションプローブ対の結合特異性を得るのに好適な条件の他の変形形態は当業者であれば決定し得る。

【0107】

[00151] ハイブリダイゼーションプローブ。配列番号41～80（表1参照）のい

10

20

30

40

50

れか1つの配列を有するオリゴヌクレオチド配列と検出可能標識とを含むハイブリダイゼーションプローブが提供される。検出可能標識は、ローダミン、シアニン、又はフルオレセインの蛍光色素標識であり得る。種々の実施形態では、ハイブリダイゼーションプローブのオリゴヌクレオチド配列は、配列番号41～80のいずれか1つの配列から本質的になり、ハイブリダイゼーションプローブの他の部分を形成するヌクレオチドを有していない。

【0108】

[00152] ハイブリダイゼーション試薬。複数のハイブリダイゼーションプローブを含むハイブリダイゼーション試薬が提供される。ただし、複数のハイブリダイゼーションプローブのそれぞれは、本明細書に記載のハイブリダイゼーションプローブであり、且つ複数のハイブリダイゼーションプローブのそれぞれは、(i)複数の他の全てのハイブリダイゼーションプローブのオリゴヌクレオチド配列と非同一のオリゴヌクレオチド配列を含むと共に、(ii)複数の他の全てのハイブリダイゼーションプローブの検出可能標識からスペクトル識別可能な検出可能標識を含む。複数(例えば、2、3、4、5、又はそれ以上)のハイブリダイゼーションプローブを含む試薬が更に開示される。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書に開示されるハイブリダイゼーションプローブのいずれかであり得る。試薬は溶液等の液体であり得る。代替的に、試薬は凍結乾燥粉末等の固体であり得る。固体として提供される場合、適切な量の水の添加物(又は好適な溶液)は、マイクロ流体デバイスへの導入に好適な液体試薬を発生させるように添加され得る。

【0109】

[00153] 幾つかの実施形態では、複数のハイブリダイゼーションプローブは、2つ～4つのハイブリダイゼーションプローブからなる。複数のハイブリダイゼーションプローブの幾つかの実施形態では、複数のハイブリダイゼーションプローブの第1は、配列番号41～80の第1のサブセットから選択される配列と第1の検出可能標識とを含み、且つ複数のハイブリダイゼーションプローブの第2は、配列番号41～80の第2のサブセットから選択される配列と、第1の検出可能標識からスペクトル識別可能な第2の検出可能標識と、を含み、配列番号41～80の第1及び第2のサブセットは、非オーバーラップサブセットである。

【0110】

[00154] 第1のハイブリダイゼーションプローブは、配列番号41～80に示される配列又はその配列のサブセットの1つの全部又は一部(例えば8～10ヌクレオチド)を含む配列を含み得る。特定の実施形態では、第1のハイブリダイゼーションプローブは、配列番号41～80に示される配列又はその配列のサブセットの1つの全部又は一部(例えば8～10ヌクレオチド)からなる(又はから本質的になる)配列を含み得る。第2のハイブリダイゼーションプローブは、配列番号41～80に示される配列又はその配列のサブセット(例えば、第1のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列を含まないサブセット又は第1のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列が選択されるサブセットにオーバーラップしないサブセット)の1つの全部又は一部(例えば8～10ヌクレオチド)を含む配列を含み得る。特定の実施形態では、第2のハイブリダイゼーションプローブは、配列番号41～80に示される配列又はその配列のサブセット(例えば、第1のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列を含まないサブセット又は第1のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列が選択されるサブセットにオーバーラップしないサブセット)の1つの全部又は一部(例えば8～10ヌクレオチド)からなる(又はから本質的になる)配列を含み得る。第3のハイブリダイゼーションプローブ(存在する場合)は、配列番号41～80に示される配列又はその配列のサブセット(例えば、第1及び第2のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列を含まないサブセット又は第1及び第2のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列が選択されるサブセットにオーバーラップしないサブセット)の1つの全部又は一部(例えば8～10ヌクレオチド)を含む配列を含み得る。特定の実施形態では、第3のハイブリダイゼーションプローブ(存在する場合)は、配列番号41～80に示される配列又はその配列のサブセット(例

例えば、第 1 及び第 2 のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列を含まないサブセット又は第 1 及び第 2 のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列が選択されるサブセットにオーバーラップしないサブセット) の 1 つの全部又は一部 (例えば 8 ~ 10ヌクレオチド) からなる (又はから本質的になる) 配列を含み得る。第 4 のハイブリダイゼーションプローブ (存在する場合) は、配列番号 41 ~ 80 に示される配列又はその配列のサブセット (例えば、第 1、第 2、及び第 3 のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列を含まないサブセット又は第 1、第 2、及び第 3 のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列が選択されるサブセットにオーバーラップしないサブセット) の 1 つの全部又は一部 (例えば 8 ~ 10ヌクレオチド) を含む配列を含み得る。特定の実施形態では、第 4 のハイブリダイゼーションプローブ (存在する場合) は、配列番号 41 ~ 80 に示される配列又はその配列のサブセット (例えば、第 1、第 2、及び第 3 のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列を含まないサブセット又は第 1、第 2、及び第 3 のハイブリダイゼーションプローブに存在する配列が選択されるサブセットにオーバーラップしないサブセット) の 1 つの全部又は一部 (例えば 8 ~ 10ヌクレオチド) からなる (又はから本質的になる) 配列を含み得る。当業者には明らかであろうが、試薬は、第 1、第 2、第 3、及び第 4 のハイブリダイゼーションプローブに類似した性質を有し得る第 5、第 6 等のハイブリダイゼーションプローブを含み得る。

10

【0111】

【00155】 幾つかの実施形態では、複数のハイブリダイゼーションプローブの第 3 は、配列番号 41 ~ 80 の第 3 のサブセットから選択される配列と、第 1 及び第 2 の検出可能標識のそれぞれからスペクトル識別可能な第 3 の検出可能標識と、を含み得ると共に、配列番号 41 ~ 80 の第 1、第 2、及び第 3 のサブセットは、非オーバーラップサブセットである。

20

【0112】

【00156】 更に他の実施形態では、試薬は、複数のハイブリダイゼーションプローブの第 4 (ただし、第 4 のハイブリダイゼーションプローブは配列番号 41 ~ 80 の第 4 のサブセットから選択される配列を含み得る) と、第 1、第 2、及び第 3 の検出可能標識のそれぞれからスペクトル識別可能な第 4 の検出可能標識と、を更に含み得ると共に、配列番号 41 ~ 80 の第 1、第 2、第 3、及び第 4 のサブセットは、非オーバーラップサブセットである。

30

【0113】

【00157】 ハイブリダイゼーション試薬の種々の実施形態では、配列番号 41 ~ 80 の各サブセットは、少なくとも 10 の配列を含み得る。ハイブリダイゼーション試薬の種々の実施形態では、第 1 のサブセットは配列番号 41 ~ 50 を含有し、第 2 のサブセットは配列番号 51 ~ 60 を含有し、第 3 のサブセットは配列番号 61 ~ 70 を含有し、且つ第 4 のサブセットは配列番号 71 ~ 80 を含有する。

【0114】

【00158】 キット。捕捉物体のバーコードのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を検出するためのキットが提供される。ただし、キットは、本明細書に記載の複数の試薬を含み、各試薬の複数のハイブリダイゼーションプローブは、複数の他の全ての試薬のハイブリダイゼーションプローブのセットにオーバーラップしないセットを形成する。幾つかの実施形態では、キットは、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 の試薬を含み得る。

40

【0115】

【00159】 捕捉物体のインサイチュ同定法。マイクロ流体デバイス内の 1 つ以上の捕捉物体のインサイチュ同定法もまた提供される。ただし、本方法は、以下のことを含む。

【00160】 1 つ以上の捕捉物体の単一捕捉物体をマイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する 1 つ以上の隔離ペンのそれぞれの中に配置すること。ただし、各捕捉物体は、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを有し、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、プライミング配列と捕捉配列とバーコード配列とを含み、バーコード配列は、3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド

50

配列は、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である。

【00161】 ハイブリダイゼーションプローブの第1のセットを含む第1の試薬溶液をマイクロ流体デバイスのエンクロージャ内のフロー領域に流入させること。ただし、フロー領域は、1つ以上の隔離ペンのそれぞれに流体接続され、第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブは、1つ以上の捕捉物体のいずれかの捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかのバーコード配列のいずれかに含まれるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列（ただし、第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブの相補的オリゴヌクレオチド配列は、第1のセットのハイブリダイゼーションプローブの他の全ての相補的オリゴヌクレオチド配列と非同一である）と、スペクトル識別可能検出可能標識のセットから選択される検出可能標識と、を有し、第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブの検出可能標識は、ハイブリダイゼーションプローブの第1のセットの他の全てのハイブリダイゼーションプローブの検出可能標識とは異なる。

10

【00162】 第1のセットのハイブリダイゼーションプローブを1つ以上の捕捉物体のいずれかの捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかのバーコード配列のいずれかの対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズさせること。

【00163】 ハイブリダイゼーションプローブの第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブに対して、1つ以上の捕捉物体のいずれかに関連付けられる対応する検出可能シグナルを検出すること。

【00164】 1つ以上の隔離ペンの1つ内に配置された各捕捉物体に対して、(i) マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内の隔離ペンの位置と、(ii) ハイブリダイゼーションプローブの第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブの対応する蛍光シグナルと捕捉物体との関連又は非関連と、を含む記録を作成すること。ただし、関連及び非関連の記録は、捕捉物体を隔離ペンに関連付けるバーコードを構成する。

20

【0116】

【00165】 本方法に使用される1つ以上の捕捉物体はそれぞれ、本明細書に記載の任意の捕捉物体であり得る。一般に、バーコード配列は全て、同数のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を有するであろう。また、特定の捕捉物体に含まれる複数の捕捉オリゴヌクレオチドの各捕捉オリゴヌクレオチドは、同一のバーコード配列を有するであろう。以上で考察されるように、各バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、非同一カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットから選択される。カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットは、例えば、12～100（又はそれ以上）の非同一オリゴヌクレオチド配列を含み得る。そのため、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットは、2つ以上（例えば2～5）のスペクトル識別可能標識を含み得るスペクトル識別可能標識のセットのスペクトル識別可能標識の数よりも多い数のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得る。

30

【0117】

【00166】 第1（又は後続）のセットのハイブリダイゼーションプローブの数は、各バーコード配列のカセット化可能オリゴヌクレオチドの数と同一であり得る。しかし、これら数は同一でなくてもよい。例えば、第1（又は任意の後続）のセットのハイブリダイゼーションプローブの数は、各バーコード配列のカセット化可能オリゴヌクレオチドの数よりも多くし得る。

40

【0118】

【00167】 各ハイブリダイゼーションプローブ（又は標識クラス）を検出することは、ハイブリダイゼーションプローブの第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブ（又は標識）の識別スペクトル特性を同定することを含む。更に、所与のハイブリダイゼーションプローブを検出することは、一般に、識別スペクトル特性を検出するために使用されるシステム（例えば光学縦列）に関連するバックグラウンド又は閾値レベルを超える識別スペクトル特性のレベルの検出を必要とする。かかる同定の後、検出された標識はいずれも、ハイブリダイゼーションプローブのオリゴヌクレオチド配列に相補的なカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の存在に関連付けることが可能である。検出可能標識は、例

50

えば、限定されるものではないが、フルオレセイン色素、シアニン色素、ローダミン色素、フェニルインドール色素、クマリン色素、アクリジン色素等の蛍光標識であり得る。限定されるものではないが幾つかの例としては、Alexa Fluor（登録商標）647、Alexa Fluor（登録商標）405、Alexa Fluor（登録商標）488等のAlexa Fluor色素、Cy（登録商標）5やCy（登録商標）7等のシアニン色素、又は当技術分野で公知の任意の好適な蛍光標識が挙げられる。各色素の蛍光シグナルが検出可能識別可能である限り、バーコードを検出するためにマイクロ流体環境に流入されるハイブリダイゼーションプローブ上に存在する識別可能フルオロフォアの任意のセットを選択し得る。代替的に、検出可能標識は、発光剤、例えば、ルシフェラーゼレポーター、ランタニドタグ又は無機フォスファール、チューナブルであり得る且つ半導体材料を含み得る量子ドットであり得る。フルオロフォア分子と共にクエンチャー分子を含み得るFRET標識等の他のタイプの検出可能標識を組み込み得る。FRET標識としては、Black Hole Quencher（登録商標）（Biosearch）、Iowa Black（商標）、ダブシル等のダーククエンチャーが挙げられ得る。FRET標識は、TaqMan（登録商標）プローブ、ヘアピンプローブ、Scorpion（登録商標）プローブ、分子ビーコンプローブ等のいずれかであり得る。

10

【0119】

[00168] 検出すること及び／又は記録を作成させることは、例えば、コントローラを利用して自動化可能である。

【0120】

[00169] インサイチュ同定法は、次のことを更に含み得る。ハイブリダイゼーションプローブの第nのセットを含む第nの試薬溶液をマイクロ流体デバイスのフロー領域に流入させること。ただし、第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブは、1つ以上の捕捉物体のいずれかの捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかのバーコード配列のいずれかに含まれるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的なオリゴヌクレオチド配列（ただし、第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブの相補的オリゴヌクレオチド配列は、マイクロ流体デバイスのフロー領域に流入するハイブリダイゼーションプローブの第nのセット及び任意の他のセットのハイブリダイゼーションプローブの他の全ての相補的オリゴヌクレオチド配列と非同一である）と、スペクトル識別可能検出可能標識のセットから選択される検出可能標識（ただし、第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブの検出可能標識は、ハイブリダイゼーションプローブの第nのセットの他の全てのハイブリダイゼーションプローブの検出可能標識とは異なる）と、を含み得る。

20

30

[00170] 第nのセットのハイブリダイゼーションプローブを1つ以上の捕捉物体のいずれかの捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかのバーコード配列のいずれかの対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズさせること。

[00171] ハイブリダイゼーションプローブの第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブに対して、1つ以上の捕捉物体のいずれかに関連付けられる対応する検出可能シグナルを検出すること。

[00172] 1つ以上の隔離ペンの1つ内に配置された各捕捉物体に対して、ハイブリダイゼーションプローブの第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブの対応する検出可能シグナルと捕捉物体との関連又は非関連を記録に補足すること。ただし、nは、{2、...、m}の値を有する正の整数のセットであり、mは、2以上の値を有する正の整数である。正の整数{2、...、m}のセット内のnの各値に対して、第nの試薬を流入させる上記のステップと、第nのセットのハイブリダイゼーションプローブをハイブリダイズさせることと、対応する検出可能シグナルを検出することと、記録に補足することと、を繰り返すこと。

40

【0121】

[00173] 種々の実施形態では、mは、3以上且つ20以下（例えば5以上且つ15以下）の値を有し得る。幾つかの実施形態では、mは、8以上且つ12以下（例えば10）の値を有し得る。

【0122】

50

【00174】種々の実施形態では、第1の試薬溶液及び/又は第nの試薬溶液をフロー領域に流入させることは、1つ以上の隔離ペンへの拡散により第1の試薬溶液及び/又は第nの試薬溶液の平衡化を可能にすることを更に含み得る。

【0123】

【00175】1つ以上の捕捉物体のいずれかに関連付けられる対応する蛍光シグナルを検出することは、ハイブリダイゼーションプローブを有していない濯ぎ溶液をマイクロ流体デバイスのフロー領域に通して流動させることと、濯ぎ溶液を1つ以上の隔離ペン内に拡散させて平衡化させることにより、第1のセット又は第nのセットのいずれかの非ハイブリダイズハイブリダイゼーションプローブを1つ以上の隔離ペンから拡散除去することと、を更に含み得る。幾つかの実施形態では、濯ぎ溶液を流動させることは、蛍光シグナルを検出する前に実施し得る。

10

【0124】

【00176】インサイチュ検出法の幾つかの実施形態では、各捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの各バーコード配列は、3つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得る。幾つかの実施形態では、第1のセットのハイブリダイゼーションプローブ及び第nのセットのハイブリダイゼーションプローブのそれぞれは、3つのハイブリダイゼーションプローブを含み得る。

【0125】

【00177】インサイチュ検出法の種々の実施形態では、各捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの各バーコード配列は、4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得る。幾つかの実施形態では、第1のセットのハイブリダイゼーションプローブ及び第nのセットのハイブリダイゼーションプローブのそれぞれは、4つのハイブリダイゼーションプローブを含む。

20

【0126】

【00178】1つ以上の捕捉物体のそれぞれを配置することは、1つ以上の捕捉物体のそれぞれをマイクロ流体デバイス内の1つ以上の隔離ペンの分離領域内に配置することを含み得る。

【0127】

【00179】幾つかの実施形態では、本方法は、1つ以上の生体細胞をマイクロ流体デバイスの1つ以上の隔離ペン内に配置することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、1つ以上の生体細胞のそれぞれは、1つ以上の隔離ペンの異なる1つ内に配置し得る。1つ以上の生体細胞は、マイクロ流体デバイスの1つ以上の隔離ペンの分離領域内に配置し得る。本方法の幾つかの実施形態では、1つ以上の生体細胞の少なくとも1つは、1つ以上の捕捉物体の1つが配置された隔離ペン内に配置し得る。幾つかの実施形態では、1つ以上の生体細胞は、クローン集団からの複数の生体細胞であり得る。本方法の種々の実施形態では、1つ以上の生体細胞を配置することは、1つ以上の捕捉物体を配置する前に実施し得る。

30

【0128】

【00180】インサイチュ検出法の種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動(DEP)構成を更に含み得ると共に、1つ以上の捕捉物体を1つ以上の隔離ペン内に配置することは、誘電泳動(DEP)力を用いて実施し得る。インサイチュ検出法の種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動(DEP)構成を更に含み得ると共に、1つ以上の生体細胞を1つ以上の隔離ペン内に配置することは、誘電泳動(DEP)力を用いて実施し得る。マイクロ流体デバイスは、本明細書に開示される任意のマイクロ流体デバイスであり得る。例えば、マイクロ流体デバイスは、少なくとも1つの被覆表面(例えば共有結合表面)を含み得る。少なくとも1つ被覆表面は、親水性又は負荷電の被覆表面を含み得る。

40

【0129】

【00181】インサイチュ同定法の種々の実施形態では、各捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、捕捉配列により捕捉された標的核酸を更に含み得る。

50

【 0 1 3 0 】

[00182] 次に、マイクロ流体デバイス内における捕捉物体のインサイチュ同定法をより良く理解できるように図 7 A に目を向けると、本明細書に記載の検出可能標識を含むハイブリダイゼーションプローブ 4 4 0 a のフローに暴露される本明細書に記載のバーコードを含む捕捉オリゴヌクレオチドを有する捕捉物体 4 3 0 の模式図が示される。プローブ 4 4 0 a とその標的である捕捉オリゴヌクレオチドのカセット化可能オリゴヌクレオチドとが関連付けられると、ハイブリダイズされたプローブ：カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が捕捉オリゴヌクレオチドの長さ部分に形成される 7 5 5。これにより、捕捉物体 7 3 0 の捕捉オリゴヌクレオチドの少なくとも一部分に沿って複数のハイブリダイズされたプローブ：カセット化可能オリゴヌクレオチド対を有する捕捉物体がもたらされる。図 7 B は、チャンネルに通じる隔離ペンを有するマイクロ流体デバイス内のマイクロ流体チャンネルの写真を示しており、捕捉物体（この写真には見られない）は隔離ペン内に配置される。そのほか、視認可能なチャンネル長さ部分の 3 つ全てに開口するペン内に捕捉物体が存在する間、最底側のチャンネル長さ部分の隔離ペン内に配置された捕捉物体のみが、プローブ 4 4 0 a の標的のカセット化可能オリゴヌクレオチドを含むバーコードを有していた。最上側チャンネル又は中間チャンネルに開口する隔離ペン内の捕捉物体は、プローブ 4 4 0 a のハイブリダイゼーション標的であるカセット化可能オリゴヌクレオチドをそれらのそれぞれの捕捉オリゴヌクレオチド上に有していなかった。写真は、ハイブリダイゼーションプローブ 4 4 0 a を含む試薬フローがフローチャンネルを貫流して隔離ペン内に拡散している時点を示す。プローブの検出可能標識の蛍光は、フローチャンネル全体にわたり隔離ペン内で視認可能であった。約 2 0 分間にわたり試薬を流動させた後、ハイブリダイゼーションプローブ 4 4 0 a を有していない濯ぎフローを本明細書に記載されるように実施した。図 7 B は、濯ぎフローの終了後におけるプローブ 4 4 0 a の検出可能標識を励起させるのに適した蛍光励起下の同一視野を示す。見えたものは、ハイブリダイズされたハイブリダイゼーションプローブ 4 4 0 a からの検出可能シグナルを提供する、最底側チャンネルに通じる隔離ペン内の捕捉物体 7 3 0 であった。そのほか見えたものは、蛍光照明下で視認可能でなかった、最上側及び中間のチャンネル長さ部分に通じる隔離ペン内の他のクラスの捕捉物体であった。このことから、ハイブリダイゼーションプローブを用いて同定を実施することにより、マイクロ流体デバイス内の標的のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のみの特異的且つ選択的な同定が例示された。

【 0 1 3 1 】

[00183] 図 8 A ~ 8 C は、マイクロ流体デバイスの隔離ペン内の各捕捉物体の各バーコードを同定するためにこの例では 4 つの異なるハイブリダイゼーションプローブを有する試薬の多重化された複数のフローをどのように使用し得るかを示す。図 8 A は、ペン番号 8 4、ペン番号 1 2、ペン番号 1 2 6、及びペン番号 2 6 0 の例示された 4 つの隔離ペンのそれぞれに対してバーコードの検出の模式図を示す。各ペンは、その内部に存在する捕捉物体を有する。各捕捉物体は、4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むユニークバーコードを有する。ペン番号 8 4 の捕捉物体は、配列：G G G G G C C C C C T T T T T T T T T T T C C G G C C G G C C A A A A A T T T T T（配列番号 8 9）を有するバーコードを有する。ペン番号 1 2 の捕捉物体は、A A A A A A A A A A T T T T T T T T T T G G G G G G G G G C C C C C C C C C C（配列番号 9 0）の配列を有するバーコードを有する。ペン番号 1 2 6 の捕捉物体は、G G G G G C C C C C T T A A T T A A T T C C G G C C G G C C A A A A A T T T T T（配列番号 9 1）の配列を有するバーコードを有する。ペン番号 2 6 0 の捕捉物体は、G G G G G C C C C C T T T T T T T T T T T G G G G G G G G G C C C C C C C C C C（配列番号 9 2）の配列を有するバーコードを有する。

【 0 1 3 2 】

[00184] 第 1 の試薬フロー 8 2 0 は、次のような配列及び検出可能標識を有する 4 つのハイブリダイゼーションプローブ、すなわち、4 つの識別可能標識のセットから選択される第 1 の検出可能標識（パターン 1 を有する円として表される）を有する T T T T T T

T T T T (配列番号 8 5) の配列 (この例示では、配列の選択は解説用にすぎず、ポリ T の捕捉配列と組み合わせて使用されるプローブ配列は示されていない) の第 1 のプローブ 4 4 0 a - 1、識別可能標識のセットから選択された第 2 の検出可能標識 (パターン 2 を有する円として表される) を有する配列 A A A A A A A A A (配列番号 8 6) の第 2 プローブ 4 4 0 b - 1、C C C C C C C C C C (配列番号 8 7) の配列と識別可能標識のセットから選択される第 3 の検出可能標識 (パターン 3 を有する円として表される) とを有する第 3 のプローブ 4 4 0 c - 1、及び G G G G G G G G G (配列番号 8 8) の配列と識別可能標識のセットから選択される第 4 の検出可能標識 (パターン 4 を有する円として表される) とを有する第 4 のプローブ 4 4 0 d - 1 を含む。

【 0 1 3 3 】

【 00185】 隔離ペン内への第 1 のフロー 8 1 0 の拡散が可能になってバーコードのいずれかに存在するいずれかの標的のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列にプローブがハイブリダイズした後、ハイブリダイズされたプローブを所定の位置に維持しながら非ハイブリダイズプローブを除去するために、プローブフリー培地を用いてフラッシングが実施される。これは、実験の部で以下に記載されるように、ハイブリダイズされたプローブ対をその標的から分離させない培地を使用することにより、例えば、D P B S 又は D u p l e x 緩衝液を使用することにより達成される。過剰の非ハイブリダイズプローブ含有培地をフラッシュした後、適切な励起波長で励起することにより、依然としてその標的にハイブリダイズされたプローブ上の検出可能標識の検出が可能になる。この例では、ペン番号 8 4 のシグナルは第 2 の識別可能検出波長で観測され、他の波長では観測されない。これは、パターン 2 がフロー 1 (8 1 0) で観測されたことを示唆するペン番号 8 4 の隣のパターン化された円で表記される。ペン番号 1 2 では、4 つ全ての識別可能検出波長でシグナルが観測され、対応するパターン 1 ~ 4 で表される。ペン番号 1 2 6 では、観測された検出可能シグナルはなく、図に沿った円はそうのように表される。最後に、ペン番号 2 6 0 では、プローブ 4 4 0 b - 1、4 4 0 c - 1、及び 4 4 0 d - 1 の 3 つが結合し、観測された検出可能シグナルの表記は、パターン 2、3、及び 4 を示すように行われる。

【 0 1 3 4 】

【 00186】 全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が検出されとは限らないので、図 8 B に示されるように第 2 のフロー 8 1 5 が実施されることが分かる。第 2 のフローは、4 つの非同ープローブ、すなわち、識別可能標識のセットの検出可能標識 1 (パターン 1 として表される) を有する C C C C C G G G G G (配列番号 9 3) の配列のプローブ 4 4 0 a - 2、セットの検出可能標識 2 (パターン 2 として表される) を有する A A T T A A T T A A (配列番号 9 4) の配列の第 2 プローブ 4 4 0 b - 2、セットの第 3 の検出可能標識 (パターン 3 として表される) を有する G G C C G G C C G G (配列番号 9 5) の配列の第 3 のプローブ 4 4 0 c - 2、及びセットの第 4 の検出可能標識 (パターン 4 として表される) を有する T T T T T A A A A A (配列番号 9 6) の配列の第 4 のプローブ 4 4 0 d - 2 を含有する。

【 0 1 3 5 】

【 00187】 試薬フロー 2 (8 1 5) を流入させることと、拡散させて結合させることと、非ハイブリダイズプローブをフラッシュすることと、次いで 4 つの識別可能波長のそれぞれで検出することと、からなる同一のプロセスを実施する。図 8 B に示されるように、ペン番号 1 2 は、第 2 のフローのプローブがカセット化可能配列のいずれにもハイブリダイズするように構成されていないので検出可能シグナルを有していない。更に、ペン番号 1 2 の捕捉物体のバーコードのカセット化可能配列は全て、すでに検出された。そのほか、これらの方法では、カセット化可能配列は各検出可能シグナルの 1 つのみを有するように選択され、且つリピートを有してないであろうから、検出可能標識波長チャネルの 1 つのシグナルが検出されているときは留意されたい。バーコードのそのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に結合するプローブはすでに検出されているので、より後のフローのそのチャネルの検出可能シグナルは無視し得る。幾つかの場合には、より後のフローでシグナルが見られることもあり得るが、それはバーコード配列にハイブリダイズされたまま

依然として残留するより前のフローからのプローブの結果であり、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列に結合する新たなフロー試薬のものではない。

【0136】

[00188] 第2のフロー815の検出に基づく分析に戻ると、ペン番号84の捕捉物体は、第1、第3、及び第4の検出可能シグナル波長チャネルのシグナルを有することが確認され、第1、第3、及び第4のパターンで表される。ペン番号126の捕捉物体は、4つ全てのプローブの結合を有するので、第1、第2、第3、及び第4のパターンで表される。ペン番号260の捕捉物体は、第1の検出可能標識シグナル波長チャネルのシグナルを有するものとして表され、第1のパターンで表される。これらの結果は、カセット化可能配列の全参照セットが対応するハイブリダイゼーションプローブで試験されるまで、第1のフロー810、第2のフロー815、第3のフロー820等、第xのフロー895まで、図8Cのようにまとめることが可能である。

10

【0137】

[00189] ハイブリダイゼーションプローブの配列は既知であるので、特定の隔離ペン内の捕捉物体上の各バーコードの配列は、示されるように検出シグナルパターンと各カセット化可能オリゴヌクレオチドの相補的配列とをマッチさせて導出可能である。次いで、捕捉物体の配列は、示されるように帰属可能である。すなわち、インサイチュ検出法により、ペン番号12の捕捉物体のバーコードは配列番号90の配列を有し、ペン番号84の捕捉物体のバーコードは配列番号89の配列を有し、ペン番号126の捕捉物体のバーコードは配列番号91の配列を有し、且つペン番号260の捕捉物体のバーコードは配列番号92の配列を有すると決定される。

20

【0138】

[00190] 図8D～Fは、バーコード配列に沿って同時に複数のプローブにハイブリダイズさせて検出する能力を示す他の実験を例示する。この実験では、使用したハイブリダイゼーションプローブ上で利用した色素は、Alexa Fluor（登録商標）647（Cy（登録商標）5チャンネルで検出可能（例えば、Cy（登録商標）5色素を検出するがAlexa Fluor（登録商標）647色素も検出可能な検出フィルタ）及びAlexa Fluor（登録商標）594（テキサスレッドチャンネルで検出可能（Alexa Fluor（登録商標）594も検出可能な検出フィルタ））であった。この実験では、全てバーコード配列内で互いに隣接して位置する同一の2つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を有する複数の捕捉物体をマイクロ流体デバイス800内のマイクロ流体チャンネル120に流入させ、それらを隔離ペン内に配置する試みは行わなかった。次いで、捕捉物体のバーコードの第1のカセット化可能オリゴヌクレオチドに結合する配列とAlexa Fluor（登録商標）594色素とを有する第1のハイブリダイゼーションプローブを含むフローを形成した。フローはまた、捕捉物体のバーコードの第2のカセット化可能オリゴヌクレオチドに結合する配列とAlexa Fluor647（登録商標）色素とを有する第2のハイブリダイゼーションプローブも含有していた。拡散させた後、ハイブリダイゼーション及び非ハイブリダイズプローブを除去するためのフラッシングを行う。

30

【0139】

[00191] 図8D、8E、及び8Fはそれぞれ、異なる波長領域の検出チャネル（フィルタ）を示した。図8Dは、200ms露光のテキサスレッド検出チャネルと、励起されて検出された捕捉物体830と、を示す。これにより、第1のハイブリダイゼーションプローブのAlexa Fluor（登録商標）594標識の存在が確認された（例えば、バーコードのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に結合されたもの）。図8Eは、マイクロ流体デバイスチャンネル120内の同一図を示しており、捕捉物体に結合されたAlexa Fluor647標識を検出した800ms露光のCy（登録商標）5検出チャネルである。捕捉物体830は、このチャンネルでも検出可能であったことから、第2のハイブリダイゼーションプローブは第1のハイブリダイゼーションプローブと同時に捕捉物体830に結合されたこと及び両方のシグナルが検出可能であることが確認される。図8Fは、2000ms露光のFITC検出（フィルタ）チャネルの同一図であり、チャンネル内の捕捉物体からのシグナル

40

50

は見られなかった。この実験は、検出特異性を損なうことなく並行して蛍光プローブにハイブリダイズする能力を実証した。

【0140】

[00192] 種々の実施形態では、使用した検出可能標識は、マイクロ流体デバイス内で励起、観測、及びイベントの記録に使用される光学システムのCy（登録商標）5蛍光チャネルで検出されるAlexa Fluor（登録商標）647、光学システムのDapi（登録商標）594で検出可能なAlexa Fluor（登録商標）405、光学システムのFITC（登録商標）488、及び光学システムのテキサスレッド（登録商標）594を含み得る。フルオロフォアは、合成に好適なハイブリダイゼーションプローブに付着し得ると共に、プローブの5'末端又は3'末端に存在し得る。1つが5'末端に標識され且つ1つが3'末端に標識された2つのプローブのハイブリダイゼーションは、隣接標識の存在に影響されないことが分かった（データは示されていない）。

10

【0141】

[00193] ゲノムデータとマイクロ流体デバイス内の細胞とを相関付ける方法。以下のことを含む、ゲノムデータとマイクロ流体デバイス内の生体細胞とを相関付ける方法が提供される。

[00194] 捕捉物体（単一捕捉物体であり得る）をマイクロ流体デバイスの隔離ペン内に配置すること。ただし、各捕捉物体は、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、プライミング配列と捕捉配列とバーコード配列とを含み、バーコード配列は、3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一であり、且つ複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、同一のバーコード配列を含む。

20

[00195] 複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定して、同定されたバーコード配列と隔離ペンとの間の関連を記録すること（すなわち、マイクロ流体デバイス内の捕捉物体の位置を同定すること）。

[00196] 生体細胞を隔離ペン内に配置すること。

[00197] 生体細胞を溶解させて溶解させた生体細胞から放出された核酸を捕捉物体に含まれる複数の捕捉オリゴヌクレオチドにより捕捉できるようにすること。

30

[00198] 捕捉された核酸を転写（例えば逆転写）して複数のバーコード付きcDNA（ライブラリであり得る）を作製すること。ただし、各バーコード付きcDNAは、捕捉オリゴヌクレオチドの1つに共有結合された相補的捕捉核酸配列を含む。

[00199] 転写された核酸及びバーコード配列をシーケンスして、バーコード配列のリード配列に関連付けられた複数の転写された核酸のリード配列を得ること。

[00200] リード配列に基づいてバーコード配列を同定すること。

[00201] リード配列で同定されたバーコード配列とインサイチュで同定されたバーコード配列とを用いて複数の転写された核酸のリード配列と隔離ペンとを関連付けすることにより、複数の転写された核酸のリード配列と隔離ペン内に配置された生体細胞とを相関付けること。

40

【0142】

[00202] 幾つかの実施形態では、単一生体細胞を隔離ペン内に配置して以上の方法に付し得る。代替的に、2つ以上の生体細胞（例えば、同一のクローン細胞集団からの2つ以上の生体細胞のグループ）を隔離ペン内に配置して以上の方法に付し得る。

【0143】

[00203] 捕捉物体を配置すること、捕捉物体のバーコードを同定すること、生体細胞を配置すること、溶解／転写／シーケンシングを行うこと、及び上記の方法のリード配列に基づいてバーコード配列を同定することは、これらの行為の順序の再構成が論理的順序に反すること（例えば、溶解前に転写を行うこと等）がないという限定条件で、記載の順序又は他の順序で実施可能である。例として、バーコード配列のインサイチュ同定は、生

50

体細胞を隔離ペン内に導入した後、生体細胞を溶解させた後、又は捕捉された核酸の転写後に実施可能である。同様に、捕捉物体を隔離ペン内に導入するステップは、少なくとも1つ生体細胞を隔離ペン内に導入した後に実施可能である。

【0144】

[00204] 種々の実施形態では、ゲノムデータと生体細胞とを相関付ける方法は、生体細胞の表現型を観測することと、複数の転写された核酸のリード配列と生体細胞の表現型とを相関付けることと、を更に含み得る。本方法は、追加的に、生体細胞がクローン集団の代表であるとして生体細胞の表現型を観測することと、複数の転写された核酸のリード配列と生体細胞及びクローン集団の表現型とを相関付けることと、を含み得る。幾つかの実施形態では、生体細胞の表現型を観測することは、少なくとも1つの生体細胞の少なくとも1つの物理的特性を観測することを含み得る。他の実施形態では、生体細胞の表現型を観測することは、生体細胞でアッセイを実施してアッセイ時に発生した検出可能シグナルを観測することを含み得る。幾つかの実施形態では、アッセイはタンパク質発現アッセイであり得る。

10

【0145】

[00205] 例えば、生体細胞の表現型を観測することは、生体細胞とアッセイ試薬との相互作用時に発生した検出可能シグナルを観測することを含み得る。検出可能シグナルは蛍光シグナルであり得る。代替的に、アッセイは検出可能シグナルの欠如に基づき得る。生体細胞の表現型に関する検出可能シグナルの同定観察を提供する実施し得るアッセイの更なる例は、国際公開第2015/061497号(Hobbsら)、米国特許出願公開第2015/0165436号(Chapmanら)、及び国際出願第PCT/US2017/027795号(Lionbergら)(それらの開示のそれぞれはその全体が本出願をもって参照により組み込まれる)の開示内に見いだし得る。

20

【0146】

[00206] 種々の実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定すること及び同定されたバーコード配列と隔離ペンとの間の関連を記録することは、生体細胞を隔離ペン内に配置する前に実施し得る。幾つかの他の実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定すること及び同定されたバーコード配列と隔離ペンとの間の関連を記録することは、生体細胞を隔離ペン内に導入した後に実施し得る。

30

【0147】

[00207] 更に他の実施形態では、捕捉物体を配置すること及び任意選択的に複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定すること及び同定されたバーコード配列と隔離ペンとの間の関連を記録することは、生体細胞の表現型を観測した後に実施し得る。幾つかの実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定すること及び同定されたバーコード配列と隔離ペンとの間の関連を記録することは、生体細胞を溶解させて溶解させた生体細胞から放出させた核酸を捕捉物体に含まれる複数の捕捉オリゴヌクレオチドにより捕捉できるようにした後に実施し得る。種々の実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定することは、本明細書に記載の方法の任意の変法を実施することを含み得る。ゲノムデータとマイクロ流体デバイス内の生体細胞とを相関付ける方法の種々の実施形態では、捕捉物体は本明細書に記載の任意の捕捉物体であり得る。

40

【0148】

[00208] 本方法の種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動(DEP)構成を含み得ると共に、捕捉物体を隔離ペン内に配置することは、誘電泳動(DEP)力を用いて捕捉物体を移動させることを含み得る。本方法の幾つかの他の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動(DEP)構成を更に含み得ると共に、生体細胞を隔離ペン内に配置することは、誘電泳動(DEP)力を用いて生体細胞を移動させることを含み得る。

【0149】

50

【00209】 ゲノムデータとマイクロ流体デバイス内の生体細胞とを相関付ける方法の種々の実施形態では、本方法は、複数の捕捉物体をマイクロ流体デバイスの対応する複数の隔離ペン内に配置することと（例えば、これは隔離ペン 1 つ当たり 1 つの捕捉物体を配置することを含み得る）、複数の生体細胞を対応する複数の隔離ペン内に配置することと、本方法の追加のステップに従って複数の捕捉物体及び複数の生物学的細胞のそれぞれを処理することと、を更に含み得る。

【0150】

【00210】 核酸ライブラリを作製するためのキット。エンクロージャを含むマイクロ流体デバイスであって、エンクロージャがフロー領域とフロー領域に通じる複数の隔離ペンとを含む、マイクロ流体デバイスと、複数の捕捉物体であって、複数の捕捉物体のそれぞれが複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、捕捉配列と、少なくとも 3 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列と、を含み、バーコード配列の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一であり、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが同一のバーコード配列を含む、複数の捕捉物体と、を含む、核酸ライブラリを作製するためのキットも提供される。

10

【0151】

【00211】 複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、少なくとも 2 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列（例えば、3、4、5、又はそれ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列）を含み得る。カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、本明細書の他の箇所に記載される通りであり得る。例えば、カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、非同一カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットから選択可能である。セットは、12 以上（例えば 12 ~ 100）の非同一カセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得る。

20

【0152】

【00212】 マイクロ流体デバイスは、本明細書に記載の任意のマイクロ流体デバイスであり得る。種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動（DEP）構成を更に含み得る。

【0153】

【00213】 核酸ライブラリを作製するためのキットの種々の実施形態では、複数の捕捉物体は、本明細書に記載の任意の複数の捕捉物体であり得る。幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体のそれぞれは、複数の対応する隔離ペン内に 1 つずつ配置し得る。

30

【0154】

【00214】 核酸ライブラリを作製するためのキットの種々の実施形態では、キットは同定表を更に含み得ると共に、この同定表は、複数の捕捉物体のそれぞれの複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列と、対応する複数の隔離ペンと、を相関付ける。

【0155】

【00215】 核酸ライブラリを作製するためのキットの種々の実施形態では、キットは、複数のハイブリダイゼーションプローブを更に含み得る。ただし、各ハイブリダイゼーションプローブは、複数の捕捉物体のいずれか 1 つの複数の捕捉オリゴヌクレオチドのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のいずれか 1 つに相補的なオリゴヌクレオチド配列と、標識と、を含み、複数の各ハイブリダイゼーションプローブの相補的配列は、異なるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的であり、複数の各ハイブリダイゼーションプローブの標識は、スペクトル識別可能標識のセットから選択される。種々の実施形態では、複数のハイブリダイゼーションプローブの各相補的配列は、配列番号 41 ~ 80 のいずれか 1 つの配列を含むオリゴヌクレオチド配列を含み得る。種々の実施形態では、標識は蛍光標識であり得る。

40

【0156】

【00216】 捕捉物体の作製方法。複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれを捕捉物体に化学結合させることを含む、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを有する捕捉物体の作製方

50

法も提供される。ただし、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、プライマーに結合するプライミング配列と、捕捉配列（例えば、標的核酸にハイブリダイズするように構成される）と、バーコード配列と、を含み、バーコード配列は、3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一であり、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、同一のバーコード配列を含む。

【0157】

[00217] 種々の実施形態では、捕捉物体はビーズであり得る。例えば、捕捉物体は、常磁性材料、高分子材料、及び/又はガラスを含むコアを有するビーズ（又は類似の物体）であり得る。高分子材料は、捕捉オリゴヌクレオチドに結合するように機能し得るポリスチレン又は任意の他のプラスチック材料であり得る。捕捉物体のコア材料は、官能化ポリマーを含み得る捕捉オリゴヌクレオチドにリンカーを付着するのに好適な材料を提供するように被覆し得るが、他の構成も可能である。

10

【0158】

[00218] 種々の実施形態では、関連付けることは、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれを捕捉物体に共有結合させることを含み得る。代替的に、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれをビーズに非共有結合させ得る。これはストレプトアビジン/ビオチン結合により行い得る。バーコード付きビーズは、当技術分野で公知の任意の好適な方法で合成し得る。プライミング配列/ユニーク分子識別子タグ/細胞バーコード/プライマー配列は、全オリゴヌクレオチド合成、スプリット・プール合成、任意の長さのオリゴヌクレオチドセグメントのライゲーション、又はそれらの任意の組合せにより合成し得る。

20

【0159】

[00219] 複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、最も5'側のヌクレオチドと最も3'側のヌクレオチドとを含み得る。この場合、プライミング配列は、最も5'側のヌクレオチドに隣接し得るか又はそれを含み得る。捕捉配列は、最も3'側のヌクレオチドに隣接し得るか又はそれを含み得る。そしてバーコード配列は、プライミング配列の3'側且つ捕捉配列の5'側に位置し得る。

【0160】

[00220] 種々の実施形態では、各バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、介在オリゴヌクレオチド配列を何ら含むことなくタンデムに結合し得る。幾つかの他の実施形態では、カセット化可能オリゴヌクレオチドの1つ以上は、ライゲーション化学による結合を可能にするために介在する1つ又は2つのヌクレオチドを介して他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に結合し得る。

30

【0161】

[00221] 種々の実施形態では、本方法は、スプリット・プール合成により3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれを複数の捕捉オリゴヌクレオチドに導入することを更に含み得る。

【0162】

[00222] 捕捉物体の作製方法の種々の実施形態では、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、約6~15ヌクレオチドを含んでいてもよいし約10ヌクレオチドを含んでいてもよい。

40

【0163】

[00223] 種々の実施形態では、本方法は、各バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれを12~100の非同一カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のセットから選択することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、本方法は、各バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列のそれぞれを配列番号1~40から選択することを含み得る。

【0164】

[00224] 幾つかの実施形態では、細胞関連バーコード配列は、4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み得る。種々の実施形態では、本方法は、第1のカセット化

50

可能オリゴヌクレオチド配列を配列番号 1 ~ 10 のいずれか 1 つから選択することと、第 2 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を配列番号 11 ~ 20 のいずれか 1 つから選択することと、第 3 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を配列番号 21 ~ 30 のいずれか 1 つから選択することと、第 4 のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を配列番号 31 ~ 40 のいずれか 1 つから選択することと、を含み得る。

【0165】

[00225] 捕捉物体の作製方法の種々の実施形態では、前記捕捉オリゴヌクレオチドから分離されたときに DNA ポリメラーゼをプライミングする。幾つかの実施形態では、DNA ポリメラーゼは逆転写酵素である。幾つかの実施形態では、プライミング配列は P7 又は P5 プライマーの配列を含む。

10

【0166】

[00226] 幾つかの実施形態では、本方法は、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが異なる UMI を含むようにユニーク分子識別子 (UMI) 配列を複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれに導入することを更に含み得る。UMI は、5 ~ 20 ヌクレオチド (例えば 8 ~ 15 ヌクレオチド) を含むオリゴヌクレオチド配列であり得る。

【0167】

[00227] 捕捉物体の作製方法の種々の実施形態では、捕捉配列は、ポリ dT 配列、ランダムヘキサマー、又はモザイク末端配列を含み得る。

【0168】

[00228] 捕捉物体の作製方法の種々の実施形態では、本方法は、プライマー配列を複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれに捕捉オリゴヌクレオチドの 5' 末端近傍で導入することと、捕捉配列を複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれに捕捉オリゴヌクレオチドの 3' 末端近傍で導入することと、を更に含み得る。幾つかの実施形態では、本方法は、プライミング配列の導入後且つ捕捉配列の導入前に複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれにバーコード配列を導入することを更に含み得る。

20

【0169】

[00229] 幾つかの実施形態では、本方法は、プライミング配列の導入後且つ捕捉配列の導入前に複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれに UMI を導入することを更に含み得る。更に他の実施形態では、本方法は、Not1 制限部位を含む配列を複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれに導入することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、本方法は、バーコード配列の導入後且つ捕捉配列の導入前に Not1 制限部位を含む配列を導入することを更に含み得る。

30

【0170】

[00230] 捕捉物体の作製方法の種々の実施形態では、本方法は、1 つ以上のアダプター配列を複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれに導入することを更に含み得る。

【0171】

[00231] シーケンシングライブラリの作製方法。本明細書に記載のワークフローに基づいて、ゲノムデータと、原細胞の位置更にはその細胞で観測された表現型情報と、の相関付けを可能にする様々なシーケンシングライブラリを作製し得る。ここに示される方法は、合成化学による Illumina (登録商標) シーケンシングを用いた最終的使用に適合化されるが、それに限定されるものではない。いずれの種類のシーケンシング化学も、これらの方法で使用するのに好適であり得る。また、その例としては、エマルジョン PCR、合成シーケンシング、パイロシーケンシング、及び半導体検出が挙げられ得る。当業者であれば、これらの方法を PacBio ロングリードシステム (SMRT, Pacific Biosystems)、Ion Torrent (ThermoFisher Scientific)、Roche 454、Oxford Nanopore 等の他の大規模並列シーケンシングプラットフォーム及び化学で使用するために、本方法並びに捕捉オリゴヌクレオチド及び関連するアダプター、プライマー等の構築を適合化させることが可能である。

40

【0172】

[00232] RNA 捕捉及びライブラリ作製。また、以下のことを含む、生体細胞からバ

50

ーコード付き cDNA ライブラリを提供する方法が提供される。マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン内に生体細胞を配置すること。隔離ペン内に捕捉物体を配置すること。ただし、捕捉物体は複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、プライミング配列と捕捉配列とバーコード配列とを含み、バーコード配列は、3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列は、バーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同義である。生体細胞を溶解させて溶解させた生体細胞から放出された核酸を捕捉物体に含まれる複数の捕捉オリゴヌクレオチドにより捕捉できるようにすること。

【00233】 捕捉された核酸を転写させて捕捉物体をデコレートする複数のバーコード付き cDNA を生成すること。ただし、各バーコード付き cDNA は、(i i) 複数の捕捉オリゴヌクレオチドの 1 つに共有結合された、(i) 捕捉された核酸の対応する 1 つに相補的なオリゴヌクレオチド配列を含む。捕捉物体は単一捕捉物体であり得る。溶解生体細胞から放出された核酸は、捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれの捕捉配列により捕捉し得る。幾つかの実施形態では、転写は逆転写を含み得る。捕捉物体及び / 又は生体細胞は、例えば、隔離ペンの分離領域内に配置可能である。

【0173】

【00234】 幾つかの実施形態では、生体細胞は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、マクロファージ等の免疫細胞であり得る。幾つかの実施形態では、生体細胞は、黒色腫瘍細胞、乳癌細胞、神経癌細胞等の癌細胞であり得る。他の実施形態では、生体細胞は、幹細胞（例えば、胚性幹細胞、誘導多能性 (i P S) 幹細胞等）又はプロジェニター細胞であり得る。更に他の実施形態では、生体細胞は、胚（例えば、接合体、2 ~ 200 細胞胚、胞胚等）であり得る。種々の実施形態では、生体細胞は単一生体細胞であり得る。代替的に、生体細胞はクローン集団等の複数の生体細胞であり得る。

【0174】

【00235】 種々の実施形態では、生体細胞を配置することは、生体細胞をマーキングすること更に含み得る（例えば、Dapi 染色やHoechst 染色等の核酸マーカーを用いて）。

【0175】

【00236】 捕捉物体は、本明細書に記載の任意の捕捉物体であり得る。

【0176】

【00237】 幾つかの実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドの 1 つ以上（個別であり得る）の捕捉配列は、オリゴ d T プライマー配列を含み得る。他の実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドの 1 つ以上（例えば個別）の捕捉配列は、遺伝子特異的プライマー配列を含み得る。幾つかの実施形態では、遺伝子特異的プライマー配列は、T 細胞受容体 (T C R) をコードする mRNA 配列（例えば、T C R 鎖又は T C R 鎖、特に可変領域をコードする mRNA の領域又は可変領域の 3' 側に位置するがそれに近接する mRNA の領域）を標的とし得る（又はそれに結合し得る）。他の実施形態では、遺伝子特異的プライマー配列は、B 細胞受容体 (B C R) をコードする mRNA 配列（例えば、B C R 軽鎖又は B C R 重鎖、特に可変領域をコードする mRNA の領域又は可変領域の 3' 側に位置するがそれに近接する mRNA の領域）を標的とし得る（又はそれに結合し得る）。

【0177】

【00238】 種々の実施形態では、複数の捕捉オリゴヌクレオチドの 1 つ以上（例えば、全て又は実質的に全て）の捕捉配列は、放出核酸の 1 つに結合し得ると共に放出核酸をプライミングして、捕捉された核酸をポリメラーゼ（例えば逆転写酵素）により転写できるようにする。

【0178】

【00239】 種々の実施形態では、捕捉物体は、磁気成分（例えば磁気ビーズ）を含み得る。代替的に、捕捉物体は非磁性であり得る。

【0179】

【00240】 幾つかの実施形態では、生体細胞を隔離ペン内に配置することは、捕捉物体

10

20

30

40

50

を隔離ペン内に配置する前に実施し得る。幾つかの実施形態では、捕捉物体を隔離ペン内に配置することは、生体細胞を隔離ペン内に配置する前に実施し得る。

【0180】

[00241] 種々の実施形態では、本方法は、捕捉物体が隔離ペン内に位置する間に捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定することを更に含み得る。バーコードを同定することは、本明細書に記載のバーコードを同定する任意の方法を用いて実施し得る。種々の実施形態では、バーコード配列を同定することは、生体細胞を溶解させる前に実施し得る。

【0181】

[00242] 幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、少なくとも1つ被覆表面を含み得る。被覆表面は、トリス及び/又はポリマー、例えば、PEG-PPGブロックコポリマーで被覆可能である。更に他の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、少なくとも1つの調整された表面を含み得る。

10

【0182】

[00243] 少なくとも1つの調整された表面は、共有結合された親水性部分又は負荷電部分を含み得る。共有結合された親水性部分又は負荷電部分は、親水性ポリマー又は負荷電ポリマーであり得る。

【0183】

[00244] 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動(DEP)構成を更に含み得る。生体細胞を配置すること及び/又は捕捉物体を配置することは、生体細胞及び/又は捕捉物体に又はそれに近接して誘電泳動(DEP)力を印加することにより実施し得る。

20

【0184】

[00245] マイクロ流体デバイスは、複数の隔離ペンを更に含み得る。種々の実施形態では、本方法は、複数の生体細胞を複数の隔離ペン内に配置することを更に含み得る。種々の実施形態では、複数の生体細胞はクローン集団であり得る。種々の実施形態では、複数の生体細胞を複数の隔離ペン内に配置することは、複数の生体細胞の実質的に1つのみに対応する複数の隔離ペン内に配置することを含み得る。そのため、配置された生体細胞を有する複数の隔離ペンのそれぞれは、一般に、単一生体細胞を含有するであろう。例えば、占有された隔離ペンの10%、7%、5%、3%、又は1%未満は、2つ以上の生体細胞を含有し得る。

30

【0185】

[00246] 種々の実施形態では、本方法は、複数の捕捉物体を複数の隔離ペン内に配置することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体を複数の隔離ペン内に配置することは、実質的に1つの捕捉物体のみ複数の隔離ペンの対応する隔離ペン内に配置することを含み得る。幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体を複数の隔離ペン内に配置することは、1つの生体細胞又は複数の生体細胞の溶解前に実施し得る。複数の捕捉物体は、本明細書に記載の任意の複数の捕捉物体であり得る。

【0186】

[00247] 種々の実施形態では、本方法は、1つの捕捉物体又は複数の捕捉物体をマイクロ流体デバイスから搬出することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、1つ以上の捕捉物体はcDNAデコレート捕捉物体である。幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体を搬出することは、複数の捕捉物体のそれぞれを個別に(すなわち1つずつ)搬出することを含み得る。種々の実施形態では、本方法は、複数の捕捉物体のそれぞれをマイクロ流体デバイス外の個別の目的容器に送達することを更に含み得る。

40

【0187】

[00248] 種々の実施形態では、1つの生体細胞又は複数の生体細胞を配置すること、1つの捕捉物体又は複数の捕捉物体を配置すること、1つの生体細胞又は複数の生体細胞を溶解させて溶解させた1つの生体細胞又は複数の生体細胞から放出させた核酸を捕捉できるようにすること、転写させること、及び1つの捕捉物体又は複数の捕捉物体のそれぞ

50

れのバーコード配列をインサイチュで（実施する場合）同定すること、の１つ以上は、自動で実施し得る。

【 0 1 8 8 】

【00249】 本明細書に記載の任意の方法により得られた１つの捕捉物体の c D N A ライブラリ又は複数の捕捉物体のそれぞれの c D N A ライブラリを増幅することと、増幅された１つの D N A ライブラリ又は複数の c D N A ライブラリをタグメント化して１つ以上のバーコード付きシーケンシングライブラリを作製することと、を含む、バーコード付きシーケンシングライブラリを提供する方法が提供される。種々の実施形態では、１つの c D N A ライブラリ又は複数の c D N A ライブラリを増幅することは、プールインデックス配列を導入することを含み得る。プールインデックス配列は 4 ~ 1 0 ヌクレオチドを含む。他の実施形態では、本方法は、複数のバーコード付きシーケンシングライブラリを組み合わせることを更に含み得る。ただし、複数のバーコード付きシーケンシングライブラリのそれぞれは、異なるバーコード配列及び／又は異なるプールインデックス配列を含む。

10

【 0 1 8 9 】

【00250】 R N A 等の放出させた核酸から c D N A を得る方法は、プロセスの模式図である図 9 に目を向ければ、より十分に理解し得る。細胞分離及び細胞溶解のボックス 9 0 2 では、生体細胞 4 1 0 は、マイクロ流体デバイス内の隔離ペン内に配置し得る。本明細書に記載の任意の捕捉物体として構成し得る捕捉物体 9 3 0 は、同一の隔離ペン内に配置し得る。これは隔離ペン内への細胞 4 1 0 の配置前又は配置後に実施し得る。細胞 4 1 0 は、以下の例に記載されるように細胞 4 1 0 の外側細胞膜を溶解させる（ただし核膜を溶解させない）溶解試薬を用いて溶解し得る。溶解させた細胞 4 1 0 ' は、このプロセスから生じて R N A 等の核酸 9 0 5 を放出する。捕捉物体 9 3 0 の捕捉オリゴヌクレオチドは、5 ' - A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T （配列番号 1 0 4 ）の配列を有するプライミング配列 5 2 0 と、本明細書に記載の任意のバーコードのように構成し得るバーコード配列 5 2 5 と、を含む。捕捉物体 9 3 0 の捕捉オリゴヌクレオチドは、任意選択的に U M I 5 3 0 を含み得る。捕捉物体 9 3 0 の捕捉オリゴヌクレオチドは、捕捉配列を含み、この場合には、3 ' 末端にポリ A 配列を有する放出させた核酸 9 0 5 を捕捉可能なポリ T 配列を含む。捕捉配列 5 3 5 は、放出させた核酸 9 0 5 を捕捉する。細胞及び分子バーコーディングボックス 9 0 4 並びに逆転写ボックス 9 0 6 では、捕捉オリゴヌクレオチドは、/ 5 M e - i s o d C / / i s o d G / / i M e - i s o d C / A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C r G r G r G （配列番号 1 0 3 ）の配列を有するテンプレートスイッチングオリゴヌクレオチド 9 1 5 の存在下で、放出させた核酸 9 0 5 から逆転写される。バーコードの同定 9 1 2 は、本明細書に記載の方法のいずれかを用いて、バーコード付きビーズへの R N A 捕捉前、ビーズに捕捉された R N A の逆転写前、又はビーズ上の R N A の逆転写後のいずれかで実施し得る。幾つかの実施形態では、細胞特異的バーコードの同定は、ビーズに捕捉された R N A の逆転写後に実施し得る。逆転写及び捕捉物体のバーコードのインサイチュ同定の両方を達成した後、c D N A デコレート捕捉物体はマイクロ流体デバイスから搬出される。複数の c D N A 捕捉物体は同時に搬出し得る。また、プーリング及び c D N A 増幅のボックス 9 1 2 （D N A アンプリコン 9 2 の生成）は、5 ' - / 5 B i o s g / A C A C T C T T T C C C T A C A C G A C G C 3 ' （配列番号 1 0 5 ）の配列を有する増幅プライマーを用いて実施される。次いで、適合化、サイジング、及びインデクシングのボックス 9 1 6 は、増幅された D N A 9 2 0 で実施される。これは、D N A を D N A 9 2 5 のサイズに断片化してタグメンテーションアダプター 9 4 2 を挿入する片側タグメンテーションボックス 9 1 4 を含む。本明細書にはタグメンテーションが示されるが、このプロセスは、フラグメンターゼ（N E B , K a p a ）等の酵素的断片化及び続いて末端修復により実施することも可能である。

20

30

40

【 0 1 9 0 】

また、ボックス 0 9 1 6 には、タグメント化 D N A 9 4 0 にプライマー 9 3 5 a 及び 9 3 5 b が作用するプールインデクシングボックス 9 1 8 も含まれる。タグメンテーションアダプター 9 4 2 に対する第 1 のプライマー 9 3 5 a は、5 ' - C A A G C A G A A G A C

50

G G C A T A C G A G A T - 3 (配列番号 1 0 7) の配列を有する P 7 シーケンシングアダプター 9 3 2 を導入すると共に、更に任意選択的プールインデックス 9 3 4 を導入する。(5 ' - A A T G A T A C G G C G A C C A C C G A G A T C T A C A C T C T T T C C C T 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 1 0 6) の配列を有する第 2 のプライマー 9 3 5 b は、プライミング配列 5 2 0 に対する部分を有し、P 5 シーケンシングアダプター配列 9 3 6 を導入する。サイジング、インデクシング、及び適合化が行われたシーケンシングライブラリ 9 5 0 は、シーケンシングボックス 9 2 2 でシーケンスし得る。この場合、第 1 のシーケンシングリード 9 5 5 (配列リード開始点はバーコード 5 2 5 及び任意選択的 U M I 5 3 9 を読み取る。第 2 のシーケンシングリード 9 6 0 はプールインデックス 9 3 4 を読み取る。第 3 のシーケンシングリード 9 6 5 は、DNA ライブラリ自体に含まれる所望の b p 数を読み取ってゲノムリードを発生させる。【 0 1 9 1 】

10

【 00252】 図 1 0 A ~ 1 0 D は、本開示の一実施形態に従って外側細胞膜の溶解後に RNA 捕捉を行うプロセスの一実施形態の写真図である。図 1 0 A は、マイクロ流体デバイス 1 0 0 0 内の隔離ペン内にそれぞれ配置された溶解前の捕捉物体 4 3 0 及び細胞 4 3 0 を示す明視野画像を示す。図 1 0 B は、溶解前の同じ時点のインタクト細胞 4 1 0 の D A P I 染色核からの蛍光を示す。図 1 0 C は、溶解終了後の捕捉物体 9 3 0 及び残留非溶解核 4 1 0 ' の明視野画像を示す。図 1 0 D は、溶解後の図 1 0 C と同じ時点の蛍光画像を示し、非破壊核 4 1 0 ' からの D A P I 蛍光を示すと共に、核がインタクトであることを示す。

20

【 0 1 9 2 】

【 00253】 図 1 1 A は、図 9 に示されるように RNA の捕捉から生じる c D N A の処理の模式図であり、この処理は、幾つかの品質分析と共に c D N A 増幅ボックス 9 1 2、片側タグメンテーションボックス 9 1 4、プールインデクシングボックス 9 1 8、及びシーケンシングボックス 9 2 2 を含めて、マイクロ流体環境外で実施される。c D N A 増幅ボックス 9 1 2 後の Q C は、増幅された DNA 9 2 0 に対して図 1 1 B に示されており、7 0 0 から 1 0 0 0 b p をはるかに超えるサイズの多量の産物を有するサイズ分布を示す。タグメンテーションステップの終了後、バーコード付きライブラリで得られた断片のサイズ分布は図 1 1 C に示されており、合成プロトコルによるシーケンシングに最適な 3 0 0 ~ 8 0 0 b p の範囲内にある。Q u b i t により測定された定量値から、約 1 . 1 6 0 n g / マイクロリットルのバーコード付き DNA サンプルが単一細胞から得られたことが示される。シーケンシングランでは、約 1 0 0 の単一細胞から個別にバーコード付き材料をプールしてシーケンシングランを実施することにより、約 1 0 0 の単一細胞のそれぞれに対してシーケンシングデータを提供した。

30

【 0 1 9 3 】

【 00254】 また、このワークフローは、以上で得られたバーコード付き c D N A を処理することにより PacBio ライブラリ作製 (S M R T system, Pacific Biosystems) に適合化し得ると共に、S M R T b e l l アダプターは、全長バーコード付き転写物に直接ライゲートし得る。

【 0 1 9 4 】

40

【 00255】 DNA 捕捉及びシーケンシングライブラリの作製。また、ゲノム DNA を含む生物学的微小物体をマイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン内に配置することと、生物学的微小物体と生物学的微小物体の核膜を破壊可能な溶解試薬とを接触させて生物学的微小物体のゲノム DNA を放出させることと、放出させたゲノム DNA をタグメント化して、第 1 のタグメンテーションインサート配列により規定される第 1 の末端と、第 2 のタグメンテーションインサート配列により規定される第 2 の末端と、を有する複数のタグメント化ゲノム DNA 断片を生成することと、隔離ペン内に捕捉物体を配置することであって、捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、第 1 のプライミング配列と第 1 のタグメンテーションインサート捕捉配列とバーコード配列とを含み、バーコード配列が 3 つ以上のカセット化可

50

能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、バーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、配置することと、複数のタグメント化ゲノムDNA断片のそれぞれと、(i) 捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれの第1のタグメンテーションインサート捕捉配列、(ii) 第2のタグメンテーションインサート捕捉配列、ランダム化プライマー配列、又は遺伝子特異的プライマー配列に結合された第2のプライミング配列を含む増幅オリゴヌクレオチド、及び(iii) 鎖置換酵素とポリメラーゼを含む酵素混合物と、を接触させることと、接触させた複数のタグメント化ゲノムDNA断片をある時間にわたりインキュベートして、複数のタグメント化ゲノムDNA断片のそれぞれの増幅と、複数のタグメント化ゲノムDNA断片のそれぞれの末端への捕捉オリゴヌクレオチド及び増幅オリゴヌクレオチドの付加と、を同時に行うことによりバーコード付きゲノムDNAライブラリを生成することと、マイクロ流体デバイスからバーコード付きゲノムDNAライブラリを搬出することと、を含む、生物学的微小物体からバーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する方法が提供される。

10

【0195】

[00256] 幾つかの実施形態では、ゲノムDNAはミトコンドリアDNAを含み得る。

【0196】

[00257] 種々の実施形態では、捕捉物体は、タグメント化するステップの前又は後に隔離ペンに配置可能である。種々の実施形態では、インキュベーションは、等温条件下(例えば、約30℃～約45℃、典型的には約37℃)で実施可能である。

20

【0197】

[00258] 搬出することは、増幅されたゲノムDNAを隔離ペンから隔離ペンに接続されたフロー領域(例えばチャンネル)内に拡散させることと、次いで、フロー領域を介してマイクロ流体デバイスから適切な容器(例えば、ウェルプレートのウェル、マイクロ遠心分離管等の管等)内に媒体(例えば、増幅緩衝液、搬出緩衝液等)を流動させることと、を含み得る。

【0198】

[00259] 幾つかの実施形態では、生物学的微小物体を隔離ペン内に配置することは、捕捉物体を隔離ペン内に配置する前に実施し得る。

【0199】

30

[00260] 幾つかの実施形態では、生物学的微小物体は生体細胞であり得る。他の実施形態では、生物学的微小物体は生体細胞(例えば真核細胞)の核であり得る。

【0200】

[00261] 幾つかの実施形態では、生体細胞は、免疫細胞(例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、マクロファージ等)である。幾つかの実施形態では、生体細胞は、癌細胞(例えば、黒色腫癌細胞、乳癌細胞、神経癌細胞等)であり得る。

【0201】

[00262] 幾つかの実施形態では、溶解試薬は少なくとも1つのリボヌクレアーゼ阻害剤を含み得る。

【0202】

40

[00263] 種々の実施形態では、タグメント化することは、放出させたゲノムDNAと、(i) 第1のタグメンテーションインサート配列を含む第1の二本鎖DNA断片及び(ii) 第2のタグメンテーションインサート配列を含む第2の二本鎖DNA断片が装填されたトランスポザーゼと、を接触させることを含み得る。幾つかの実施形態では、第1の二本鎖DNA断片は、第3のプライミング配列に結合された第1のモザイク末端配列を含み得ると共に、第2の二本鎖DNA断片は、第4のプライミング配列に結合された第2のモザイク末端配列を含み得る。

【0203】

[00264] 幾つかの実施形態では、捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの第1のタグメンテーションインサート捕捉配列は、第1のタグメンテーションインサート配列に少な

50

くとも部分的に（又はある実施形態では完全にであり得る）相補的な配列を含み得る。幾つかの実施形態では、増幅オリゴヌクレオチドの第2のタグメンテーションインサート捕捉配列は、第2のタグメンテーションインサート配列に少なくとも部分的に（又は幾つかの実施形態では完全にであり得る）相補的な配列を含む。例えば、各捕捉オリゴヌクレオチドの第1のタグメンテーションインサート捕捉配列は、第1のタグメンテーションインサート配列の第1のモザイク末端配列及び／又は第3のプライミング配列に少なくとも部分的に（例えば完全に）相補的であり得る。他の例では、増幅オリゴヌクレオチドの第2のタグメンテーションインサート捕捉配列は、第2のタグメンテーションインサート配列の第2のモザイク末端配列及び／又は第4のプライミング配列に少なくとも部分的に（例えば完全に）相補的であり得る。

10

【0204】

[00265] 種々の実施形態では、捕捉物体は、本明細書に記載の任意の捕捉物体であり得る。幾つかの実施形態では、捕捉物体は、磁気成分（例えば磁気ビーズ）を含み得る。代替的に、捕捉物体は非磁性であり得る。

【0205】

[00266] バーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する方法の種々の実施形態では、本方法は、捕捉物体が隔離ペン内に位置する間に捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列をインサイチュで同定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、バーコード配列を同定することは、本明細書に記載の任意の方法を用いて実施し得る。幾つかの他の実施形態では、バーコード配列を同定することは、生体細胞を溶解させる前に実施される。代替的に、バーコード配列を同定することは、放出させたゲノムDNAをタグメント化する前又はバーコード付きゲノムDNAライブラリを搬出した後に実施可能である。

20

【0206】

[00267] 幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、少なくとも1つの被覆表面を含み得る。被覆表面は、トリス及び／又はポリマー、例えば、PEG-PPGブロックコポリマーで被覆可能である。幾つかの他の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、少なくとも1つの調整された表面を含む。少なくとも1つの調整された表面が共有結合された親水性部分又は負荷電部分を含む、請求項141に記載の方法。幾つかの実施形態では、共有結合された親水性部分又は負荷電部分は、親水性ポリマー又は負荷電ポリマーであり得る。

30

【0207】

[00268] 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスのエンクロージャは、誘電泳動（DEP）構成を更に含み得ると共に、生物学的微小物体を配置すること及び／又は捕捉物体を配置することは、生体細胞及び／又は捕捉物体に又はそれに近接して誘電泳動（DEP）力を適用することにより実施し得る。

【0208】

[00269] 幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスは、複数の隔離ペンを更に含み得る。種々の実施形態では、本方法は、複数の生物学的微小物体を複数の隔離ペン内に配置することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、複数の生物学的微小物体を複数の隔離ペン内に配置することは、複数の生物学的微小物体の実質的に1つのみを対応する複数の隔離ペン内に配置することを含み得る。

40

【0209】

[00270] そのため、配置された生物学的微小物体を有する複数の隔離ペンのそれぞれは、一般に、単一の生物学的微小物体を含有するであろう。例えば、占有された隔離ペンの10%、7%、5%、3%、又は1%未満は、2つ以上の生物学的微小物体を含有し得る。幾つかの実施形態では、複数の生物学的微小物体は生体細胞のクローン集団であり得る。

【0210】

[00271] 種々の実施形態では、本方法は、複数の捕捉物体を複数の隔離ペン内に配置

50

することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体を複数の隔離ペン内に配置することは、実質的に1つの捕捉物体のみ複数の隔離ペンの対応する隔離ペン内に配置することを含み得る。他の実施形態では、複数の捕捉物体を複数の隔離ペン内に配置することは、1つの生物学的微小物体又は複数の生物学的微小物体の溶解前に実施し得る。

【0211】

[00272] 幾つかの実施形態では、複数の捕捉物体は、本明細書に記載の任意の複数の捕捉物体であり得る。

【0212】

[00273] 種々の実施形態では、タグメント化するステップ、接触させるステップ、及びインキュベートするステップは、複数の生物学的微小物体の1つを含有する隔離ペンのそれぞれに対して実質的に同時に実施し得る。

【0213】

[00274] 幾つかの実施形態では、1つの生物学的微小物体又は複数の生物学的微小物体を配置すること、1つの捕捉物体又は複数の捕捉物体を配置すること、1つの生物学的微小物体又は複数の生物学的微小物体を溶解させて溶解させた1つの生体細胞又は複数の生体細胞から放出させた核酸を捕捉できるようにすること、放出させたゲノムDNAをタグメント化すること、複数のタグメント化ゲノムDNA断片のそれぞれを接触させること、接触させた複数のタグメント化ゲノムDNA断片をインキュベートすること、1つのバーコード付きゲノムDNAライブラリ又は複数のDNAライブラリを搬出すること、及び1つの捕捉物体又は複数の捕捉物体のそれぞれのバーコード配列をインサイチュで同定すること、の1つ以上は、自動で実施し得る。

【0214】

[00275] 幾つかの実施形態では、本方法は、1つの捕捉物体又は複数の捕捉物体をマイクロ流体デバイスから搬出することを更に含み得る。複数の捕捉物体を搬出することは、複数の捕捉物体のそれぞれを個別に搬出することを含み得る。幾つかの実施形態では、本方法は、複数の捕捉物体のそれぞれをマイクロ流体デバイス外の個別の目的容器に送達することを更に含み得る。

【0215】

[00276] 本方法は、図12A～G及び以下の実施例3及び4に目を向ければ、よりよく理解し得る。図12A～12Fは、本明細書に記載のインサイチュ検出可能バーコードを有するシーケンシングライブラリを得るためのワークフローを例示する。生体細胞410は、マイクロ流体デバイス内のマイクロ流体チャネル(図示せず)に開口する隔離ペン405内に配置される(図12A)。細胞は、図12Bのように、細胞膜更には核膜の両方を破壊するために溶解されてゲノムDNA1220を放出する。図12Cは、その次のプロセス、すなわち、適正サイズの断片を形成するために、且つタグを挿入して捕捉及び増幅を可能にするタグメント化DNA1225を提供するために、利用されるタグメンテーションを例示する。図12Dでは、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを有する捕捉物体1230は、タグメント化DNA1225を含有するペン405に導入される。複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、インサイチュ検出可能バーコードとプライミング配列と捕捉配列とを含む。図12Eでは、タグメント化DNA1225は、リコンビナーゼ/ポリメラーゼ増幅を用いて等温増幅に付される。この場合、捕捉オリゴヌクレオチドの捕捉配列は、リコンビナーゼ/ポリメラーゼ機構の存在下で(捕捉物体1230')タグメント化DNAをシェパード及びダイレクトして、シーケンシングアダプターとバーコードとUMIやプールインデックス等の任意選択的インデックスとを含む増幅されたDNA1235を提供する。増幅及びその後全体を通じて、増幅された適格化バーコード付きDNA1235は、隔離ペン405から拡散して隔離ペンに開口するマイクロ流体チャネル122内に入り、流体媒体フロー242を用いてマイクロ流体デバイスから搬出される(図12F)。搬出後、増幅された適格化バーコード付きDNA1235は、シーケンシングライブラリとして使用するために定量され、シーケンシングラン用の他のライブラリと共にプールし得る。DNA1235の搬出終了後、捕捉物体1230の捕捉オリゴヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドのバーコードのインサイチュ決定は、本明細書に記載の方法のいずれかを用いて実施される（図12F）。

【0216】

【00277】 図12Gは、細胞のDNAからシーケンシングライブラリを作製する方法における捕捉オリゴヌクレオチド及びDNAの処理の模式図を示す。捕捉物体1230の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれは、リンカー1215を介して共有結合又は非共有結合されており、捕捉オリゴヌクレオチドの5'末端から、プライミング配列/アダプター1240と、バーコード1245と、任意選択的UMI1250と、タグメンテーションインサート捕捉配列を有すると共にモザイク末端インサート配列を捕捉（例えばシェパード及びダイレクト）し得る捕捉配列1255と、を含む。バーコード配列1245は、本明細書に記載されるように少なくとも3つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含有する任意のバーコード配列であり得る。タグメント化DNA1225は、モザイク末端配列インサートであり得るタグメンテーションインサート配列1255とDNA断片1260とを有する。それは等温リコンビナーゼポリメラーゼ駆動増幅時に、P5アダプター/プライミング配列1270と、任意選択的プールインデックス1265と、タグメンテーションインサート捕捉配列1255と、を有するいずれかのジェネリックプライマー1275によりプライミングされる。代替的に、遺伝子特異的プライマー1275'を使用し得る。この場合、プライマー1261の一部分は、遺伝子特異的配列等のDNAのサブセットを選択するようにダイレクトされる。

【0217】

【00278】 シーケンシングライブラリを形成する等温増幅産物は、増幅且つ適合化されたDNA1280又は1280'である。増幅且つ適合化されたDNA1280は、ジェネリックプライマー1275の産物であり、DNA断片1260のジェネリックライブラリを含み、一方、増幅されたDNA1280'は、遺伝子特異的増幅産物を含むDNA断片領域1262（遺伝子特異的プライミング配列によりプライミングされた遺伝子特異的DNAの残りの部分）+1261（遺伝子特異的プライミング配列）を有する。

【0218】

【00279】 同一細胞からのバーコード付きcDNAライブラリ及びバーコード付きゲノムDNAライブラリの作製。また、マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン内に生体細胞を配置することと、隔離ペン内に第1の捕捉物体を配置することとあって第1の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、第1のプライミング配列と第1の捕捉配列（例えば、放出させた核酸を捕捉するように構成される）と第1のバーコード配列とを含み、第1のバーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、第1のバーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、配置することと、本明細書に記載されるようにcDNAライブラリを得る任意の方法を実施することによりバーコード付きcDNAライブラリを得ることとあって、生体細胞を溶解させることが、生体細胞の形質膜を分解するように実施される、得ることと、生体細胞の核膜をインタクトな状態で残したまま生体細胞から細胞質RNAを放出させて、生体細胞のRNAからバーコード付きcDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を提供することと、マイクロ流体デバイスからcDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を搬出することと、隔離ペン内に第2の捕捉物体を配置することとあって、第2の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、そのそれぞれが、第2のプライミング配列と第1のタグメンテーションインサート捕捉配列と第2のバーコード配列とを含み、第2のバーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、第2のバーコード配列の他の全てのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と非同一である、配置することと、本明細書に記載されるようにバーコード付きゲノムDNAライブラリを得る任意の方法を実施することによりバーコード付きゲノムDNAライブラリを得ることとあって、生体細胞からの複数のタグメント化ゲノムDNA断片が、第2の捕捉物体の複数の捕捉オ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドのそれぞれの第1のタグメンテーションインサート捕捉配列に接触されて、生体細胞のゲノムDNAからバーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する、得ることと、マイクロ流体デバイスからバーコード付きゲノムDNAライブラリを搬出することと、を含む、単一生体細胞からバーコード付きcDNAライブラリ及びバーコード付きゲノムDNAライブラリを提供する方法が提供される。

【0219】

[00280] 幾つかの実施形態では、本方法は、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することは、隔離ペンに生体細胞を配置する前、生体細胞のRNAからバーコード付きcDNAライブラリを得る前、又はマイクロ流体デバイスからバーコード付きcDNAライブラリでデコレートされた第1の捕捉物体を搬出する前に実施し得る。幾つかの実施形態では、本方法は、第2の捕捉物体の複数のオリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含み得る。

10

【0220】

[00281] 種々の実施形態では、第2の捕捉の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することは、バーコード付きゲノムDNAライブラリを得る前又はマイクロ流体デバイスからバーコード付きゲノムDNAライブラリを搬出した後に実施し得る。

【0221】

[00282] 種々の実施形態では、第1又は第2の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することは、本明細書に記載されるようにインサイチュでバーコードを同定する任意の方法を用いて実施し得る。

20

【0222】

[00283] 種々の実施形態では、第1の捕捉物体及び第2の捕捉物体はそれぞれ、本明細書に記載の任意の捕捉物体であり得る。

【0223】

[00284] 幾つかの実施形態では、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドの第1のプライミング配列は、第2の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドの第2のプライミング配列とは異なり得る。他の実施形態では、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドの第1の捕捉配列は、第2の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドの第1のタグメンテーションインサート捕捉配列とは異なり得る。

30

【0224】

[00285] 種々の実施形態では、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列は、第2の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列と同一であり得る。他の実施形態では、第1の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列は、第2の捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列とは異なり得る。

【0225】

[00286] B細胞受容体シーケンシングライブラリの作製。

[00287] Bリンパ球からバーコード付きcDNAライブラリを作製することであって、作製することが、本明細書に記載されるようにバーコード付きcDNAライブラリを作製する任意の方法に従って実施され、バーコード付きcDNAライブラリが、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含む捕捉物体をデコレートし、複数の捕捉オリゴヌクレオチドのそれぞれが、Not1制限部位配列を含む、作製することと、バーコード付きcDNAライブラリを増幅することと、バーコード付きcDNAライブラリからバーコード付きBCR配列を選択してバーコード付きBCR配列が富化されたライブラリを作製することと、バーコード付きBCR配列が富化されたライブラリからの配列を環化して環化バーコード付きBCR配列のライブラリを作製することと、環化バーコード付きBCR配列のライブラリを再線状化して再構成バーコード付きBCR配列のライブラリを提供することであって、そのそれぞれがそれぞれの可変(V)サブ領域及び/又はそれぞれの多様性(D)サブ

40

50

領域の 3' 側に B C R 配列の定常 (C) 領域を提示する、提供することと、シーケンシングアダプターの付加並びに V サブ領域及び / 又は D サブ領域のサブ選択を行ってバーコード付き B C R シーケンシングライブラリを作製することと、を含む、バーコード付き B 細胞受容体 (B C R) シーケンシングライブラリを提供する方法が提供される。

【0226】

[00288] 種々の実施形態では、本方法は、B C R シーケンシングライブラリを増幅してバーコード付き B C R サブ領域配列の増幅されたライブラリを提供することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、バーコード付き c D N A ライブラリを増幅することは、ユニバーサルプライマーを用いて実施し得る。

【0227】

[00289] 幾つかの実施形態では、B C R 配列領域を選択することは、B C R 配列に対して選択性のあるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を実施してバーコード付き B C R 領域選択的増幅 D N A ライブラリを作製することを含み得る。幾つかの実施形態では、バーコード付き B C R 配列を選択することは、少なくとも 1 つのシーケンシングプライマー配列及び / 又は少なくとも 1 つのインデックス配列を付加することを更に含み得る。種々の実施形態では、バーコード付き B C R 配列が富化されたライブラリからの配列を環化することは、各バーコード付き B C R 配列の 5' 末端をそれぞれの 3' 末端にライゲートすることを含み得る。種々の実施形態では、環化バーコード付き B C R 配列のライブラリを再線状化することは、環化バーコード付き B C R 配列のライブラリのそれぞれを N o t 1 制限部位で消化することを含み得る。

【0228】

[00290] 他の実施形態では、シーケンシングアダプターを付加すること並びに V 及び / 又は D サブ領域をサブ選択することは、P C R を実施してシーケンシングアダプターの付加並びに V 及び / 又は D サブ領域のサブ選択を行うことを含み得る。

【0229】

[00291] 幾つかの他の実施形態では、捕捉物体は本明細書に記載の任意の捕捉物体である。

【0230】

[00292] 種々の実施形態では、本方法は、本明細書に記載されるようにバーコードをインサイチュで同定する任意の方法を用いて捕捉物体の複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含み得る。幾つかの実施形態では、同定することは、バーコード付き c D N A ライブラリを増幅する前に実施し得る。他の実施形態では、同定することは、バーコード付き c D N A ライブラリを作製する間に実施し得る。

【0231】

[00293] 種々の実施形態では、バーコード付き c D N A ライブラリを増幅すること、バーコード付き B C R 配列に対して選択性のあるポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を実施すること、配列を環化させること、環化バーコード付き B C R 配列のライブラリを N o t 1 制限部位で再線状化すること、及びシーケンシングアダプターの付加並びに V 及び / 又は D サブ領域のサブ選択を行うこと、のいずれかは、マイクロ流体デバイスのエンクロージャ内に位置する隔離ペン内で実施し得る。

【0232】

[00294] B 細胞受容体 (B C R) シーケンシングライブラリの作製方法は、図 13 A ~ B に目を向ければ、よりよく理解し得る。図 13 A ~ B は、本明細書及び実施例 7 に記載の B C R シーケンシングライブラリの作製プロセスの模式図である。捕捉物体 1330 は、明確さを期して複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうち 1 つの捕捉オリゴヌクレオチドのみが示されてビーズ 1310 を含む。捕捉物体 1330 の捕捉オリゴヌクレオチドは、リンカー 1315 を介してビーズ 1310 に結合される。この結合は共有結合であっても非共有結合であってもよい。リンカー 1315 は、プライミング配列 1 (1320) が捕捉オリゴヌクレオチドの長さに沿って位置する捕捉オリゴヌクレオチドの 5' 末端に結合される。捕捉オリゴヌクレオチドはまた、本明細書に記載の任意のインサイチュ検出可能バ

10

20

30

40

50

ーコードであり得るバーコード1325と、任意選択的UMI1335と、シーケンシングアダプター配列1340と、Not1制限部位配列と、この例ではRNAに対するジェネリック捕捉配列ポリT(3'末端に2つの追加のヌクレオチドVNを有し得る)である捕捉配列1350と、を含む。Not1配列1345は、捕捉配列1350の5'側且つバーコード1325、プライミング配列1320、シーケンシングアダプター1340、及び任意のUMI1335の3'側にある。捕捉オリゴヌクレオチドは、原細胞の細胞膜の溶解時に放出される対象RNA配列1301(ポリA配列1350'以外)を有するRNA505を捕捉するように構成される。RNAは、そのポリA配列1350'を捕捉物体のポリT捕捉配列1350にハイブリダイズして改変捕捉物体1330'を形成することにより、捕捉物体に捕捉される。逆転写ボックス1365は、テンプレートスイッチングオリゴヌクレオチド1306の存在下でcDNAデコレート捕捉物体を提供する。この時点で捕捉オリゴヌクレオチドは、逆転写された核酸1355の領域を含有する。プライミング配列1(1320)及びcDNAに取り込まれたテンプレートスイッチングオリゴヌクレオチドの部分1307に対するジェネリックプライマー1311、1312(表6、配列番号113参照)を用いたPCRを介するcDNAの増幅は、増幅されたDNAライブラリ1370を提供する。プライマー1302(DNA1370のプライミング配列1(1320))に対する配列1320と、任意選択的プールインデックス1305と、シーケンシングプライミング配列2(1304)と、を有する)と、BCR配列のみを選択する種依存のBCR選択的プライマー1303と、を用いた選択PCR1375。BCR選択的プライマー1303は、重鎖又は軽鎖の領域を標的とすることが可能なプライマー(1356)の混合物であり得る。表6参照(配列番号114~150)。産物選択DNA1380は、増幅産物1370に対して以上に列挙したプライミング配列とUMIとバーコード配列とを有するが、この時点ではDNA断片はBCR領域1357のみを含有し、BCR領域1357の最も5'側の領域はBCRの全長定常(C)サブ領域1351であり、連結(J)領域1352(研究下の種に存在する場合)、多様性(D)サブ領域1353、及び最後に3'末端可変(V)領域1354を伴う。

【0233】

[00295] よりシーケンシング解析に適合したより興味深いBCRサブ領域(V、D、J)を作製するために、再構成を実施する。選択されたDNA1380をライゲーションにより環化して図13Bの環化DNAライブラリ1385を生成する。次いで、環化DNAライブラリ1385をNot1制限部位1345(黒矢印)で消化して再線状化DNAライブラリ1390を生成する。環化及び再線状化の効果は、シーケンシングプライミング部位に対してより興味深いBCRサブ領域(V、D、J)の近接度をより良くしてより高品質のリードを達成できるようにすることである。再線状化DNAライブラリ1390では、BCRサブ領域配列の5'3'順序が逆転し、この時点では可変(V)領域1354は全てのBCRサブ領域の5'末端方向に配置され、そして3'方向に多様性(D)サブ領域1353、連結(J)領域1352(研究下の種に存在する場合)、最後にBCR領域配列1357の最も3'側部分にBCRの全長定常(C)サブ領域1351が続く。

【0234】

[00296] 次いで、サブ選択PCR1394が実施される。この場合、プライマー配列1360と選択領域1351' 'とを含むプライマー1308は、定常(C)サブ領域の配列1351'に向けてダイレクトされる。配列135'は、Cサブ領域の5'末端の近くにくるように選択されてCサブ領域の多くを切除する。これによりプライミング配列1360も追加されてサブ選択DNAライブラリ1395を生じる。この時点で、より良くシーケンシングプライミング部位に近接して配置することにより、且つ1)ポリT配列1350を完全に除去することにより、且つ2)BCRのCサブ領域の実質的な領域を除去することにより、サブ選択BCR領域は、V、D、及びJ領域に入り込んでより高品質のリード及びリード長を可能にする。シーケンシング1396は、サブ選択DNAライブラリ1395で実施され、バーコード1325及び任意選択的UMI1335の第1のリードを生成する。シーケンシング1392は、任意選択的プールインデックスを読み取る。シーケ

ンシング 1 3 9 3 及び 1 3 9 7 は、サブ選択 B C R 1 3 5 7 ' を読み取る。

【 0 2 3 5 】

[00297] シーケンシングライブラリの作製方法はいずれも、2つ以上の捕捉物体を隔離ペンに導入することにより実施し得る。2つ以上の捕捉物体のそれぞれは、以上に記載の1つ以上のカセット化可能サブユニットを含む細胞関連バーコードと、更にはプライミング配列と、を有する2つ以上の捕捉オリゴヌクレオチドを有し得る。幾つかの実施形態では、2つ以上の捕捉物体のそれぞれは同一のバーコードを有し得る。幾つかの他の実施形態では、2つ以上の捕捉物体が同一のペンに導入される場合、各捕捉物体は異なる細胞関連バーコードを有し得る。他の実施形態では、2つ以上の捕捉物体のそれぞれは同一の細胞関連バーコードを有し得る。2つ以上の捕捉物体の使用は、より大きな核酸捕捉能を可能にし得る。本明細書に記載のインサイチュ同定法は、1つの隔離ペン内で2つ以上の捕捉物体を同定するように容易に拡張し得る。

10

【 0 2 3 6 】

[00298] マイクロ流体デバイス並びにかかるデバイスの操作及び観測のためのシステム。図 1 A は、生物学的微小物体の保持、分離、アッセイ、又は培養に使用可能なマイクロ流体デバイス 1 0 0 及びシステム 1 5 0 の例を例示する。カバー 1 1 0 を一部切り欠き、マイクロ流体デバイス 1 0 0 内の部分図を提供するマイクロ流体デバイス 1 0 0 の斜視図を示す。マイクロ流体デバイス 1 0 0 は、一般に、流路 1 0 6 を含むマイクロ流体回路 1 2 0 を含み、流路 1 0 6 を通って流体培地 1 8 0 が流れることができ、任意選択的に1つ以上の微小物体（図示せず）をマイクロ流体回路 1 2 0 内及び／又はマイクロ流体回路 1 2 0 を通して搬送する。1つのマイクロ流体回路 1 2 0 が図 1 A に示されているが、適するマイクロ流体デバイスは、複数（例えば、2又は3個）のそのようなマイクロ流体回路を含むことができる。それに関係なく、マイクロ流体デバイス 1 0 0 はナノ流体デバイスであるように構成され得る。図 1 A に例示されるように、マイクロ流体回路 1 2 0 は、複数のマイクロ流体隔離ペン 1 2 4、1 2 6、1 2 8、及び 1 3 0 を含み得ると共に、各隔離ペンは、流路 1 0 6 に流体連通した状態で1つ以上の開口を有し得る。図 1 A のデバイスの幾つかの実施形態では、隔離ペンは、流路 1 0 6 に流体連通した状態で単一の開口部のみを有し得る。更に以下で考察するように、マイクロ流体隔離ペンは、培地 1 8 0 が流路 1 0 6 を通って流れているときであっても、マイクロ流体デバイス 1 0 0 等のマイクロ流体デバイスに微小物体を保持するように最適化された様々な特徴及び構造を含む。しかし、上記を参照する前に、マイクロ流体デバイス 1 0 0 及びシステム 1 5 0 の概説を提供する。

20

30

【 0 2 3 7 】

[00299] 図 1 A に概して示されるように、マイクロ流体回路 1 2 0 はエンクロージャ 1 0 2 により画定される。エンクロージャ 1 0 2 は異なる構成で物理的に構造化することができるが、図 1 A に示される例では、エンクロージャ 1 0 2 は、支持構造体 1 0 4（例えば、基部）、マイクロ流体回路構造 1 0 8、及びカバー 1 1 0 を含むものとして示されている。支持構造体 1 0 4、マイクロ流体回路構造 1 0 8、及びカバー 1 1 0 は、互いに取り付けることができる。例えば、マイクロ流体回路構造 1 0 8 は、支持構造体 1 0 4 の内面 1 0 9 に配置することができ、カバー 1 1 0 は、マイクロ流体回路構造 1 0 8 を覆って配置することができる。支持構造体 1 0 4 及びカバー 1 1 0 と一緒に、マイクロ流体回路構造 1 0 8 は、マイクロ流体回路 1 2 0 の要素を画定することができる。

40

【 0 2 3 8 】

[00300] 図 1 A に示されるように、支持構造体 1 0 4 は、マイクロ流体回路 1 2 0 の下部にあり得、カバー 1 1 0 はマイクロ流体回路 1 2 0 の上部にあり得る。代替的に、支持構造体 1 0 4 及びカバー 1 1 0 は、他の向きで構成され得る。例えば、支持構造体 1 0 4 は、マイクロ流体回路 1 2 0 の上部にあり得、カバー 1 1 0 はマイクロ流体回路 1 2 0 の下部にあり得る。それに関係なく、それぞれがエンクロージャ 1 0 2 内又は外への通路を含む1つ以上のポート 1 0 7 があり得る。通路の例としては、弁、ゲート、貫通孔等が挙げられる。示されるように、ポート 1 0 7 は、マイクロ流体回路構造 1 0 8 のギャップ

50

により作られる貫通孔である。しかし、ポート 107 は、カバー 110 等のエンクロージャ 102 の他の構成要素に配置することができる。1 つのみのポート 107 が図 1 A に示されているが、マイクロ流体回路 120 は 2 つ以上のポート 107 を有することができる。例えば、流体がマイクロ流体回路 120 に入るための流入口として機能する第 1 のポート 107 があり得、流体がマイクロ流体回路 120 を出るための流出口として機能する第 2 のポート 107 があり得る。ポート 107 が流入口として機能するか、それとも流出口として機能するかは、流体が流路 106 を通って流れる方向に依存し得る。

【0239】

[00301] 支持構造体 104 は、1 つ以上の電極（図示せず）と、基板又は複数の相互接続された基板を含むことができる。例えば、支持構造体 104 は、1 つ以上の半導体基板を含むことができ、各半導体基板は電極に電氣的に接続される（例えば、半導体基板の全て又はサブセットは、1 つの電極に電氣的に接続することができる）。支持構造体 104 は、プリント回路基板組立体（「PCBA」）を更に含むことができる。例えば、半導体基板は PCBA 上に搭載することができる。

【0240】

[00302] マイクロ流体回路構造 108 は、マイクロ流体回路 120 の回路要素を画定することができる。そのような回路要素は、マイクロ流体回路 120 に流体が充填される場合、流体的に相互接続することができる、（1 つ以上のフローチャネルを含んでもよい、又は 1 つ以上のフローチャネルである）フロー領域、チャンバ、ペン、トラップ等の空間又は領域を含むことができる。図 1 A に示されるマイクロ流体回路 120 では、マイクロ流体回路 108 は、枠 114 及びマイクロ流体回路材料 116 を含む。枠 114 は、マイクロ流体回路材料 116 を部分的又は完全に囲むことができる。枠 114 は、例えば、マイクロ流体回路材料 116 を実質的に囲む比較的剛性の構造であり得る。例えば、枠 114 は金属材料を含むことができる。

【0241】

[00303] マイクロ流体回路材料 116 には、キャビティ等をパターンニングして、マイクロ流体回路 120 の回路要素及び相互接続を画定することができる。マイクロ流体回路材料 116 は、ガス透過可能であり得る可撓性ポリマー（例えば、ゴム、プラスチック、エラストマー、シリコン、ポリジメチルシロキサン（「PDMS」）等）等の可撓性材料を含むことができる。マイクロ流体回路材料 116 を構成することができる材料の他の例としては、成形ガラス、シリコン（フォトパターンニング可能シリコン又は「PPS」）等のエッチング可能材料、フォトレジスト（例えば、SU8）等が挙げられる。幾つかの実施形態では、そのような材料 - したがって、マイクロ流体回路材料 116 - は、剛性及び / 又はガスを実質的に不透過であり得る。それに関係なく、マイクロ流体回路材料 116 は、支持構造体 104 上及び枠 114 内部に配置することができる。

【0242】

[00304] カバー 110 は、枠 114 及び / 又はマイクロ流体回路材料 116 の一体部分であり得る。代替的に、カバー 110 は、図 1 A に示されるように、構造的に別個の要素であり得る。カバー 110 は、枠 114 及び / 又はマイクロ流体回路材料 116 と同じ又は異なる材料を含むことができる。同様に、支持構造体 104 は、示されるように枠 114 若しくはマイクロ流体回路材料 116 とは別個の構造であってもよく、又は枠 114 若しくはマイクロ流体回路材料 116 の一体部分であってもよい。同様に、枠 114 及びマイクロ流体回路材料 116 は、図 1 A に示されるように別個の構造であってもよく、又は同じ構造の一体部分であってもよい。

【0243】

[00305] 幾つかの実施形態では、カバー 110 は剛性材料を含むことができる。剛性材料は、ガラス又は同様との特性を有する材料であり得る。幾つかの実施形態では、カバー 110 は変形可能材料を含むことができる。変形可能材料は、PDMS 等のポリマーであり得る。幾つかの実施形態では、カバー 110 は、剛性材料及び変形可能材料の両方を含むことができる。例えば、カバー 110 の 1 つ以上の部分（例えば、隔離ペン 124、

10

20

30

40

50

126、128、130上に位置する1つ以上の部分)は、カバー110の剛性材料と界面を接する変形可能材料を含むことができる。幾つかの実施形態では、カバー110は1つ以上の電極を更に含むことができる。1つ以上の電極は、ガラス又は同様の絶縁材料でコーティングし得る、インジウム - 錫 - 酸化物 (ITO) 等の導電性酸化物を含むことができる。代替的に、1つ以上の電極は、ポリマー (例えば、PDMS) 等の変形可能ポリマーに埋め込まれた単層ナノチューブ、多層ナノチューブ、ナノワイヤ、導電性ナノ粒子のクラスター、又はそれらの組合せ等の可撓性電極であり得る。マイクロ流体デバイスで使用する事ができる可撓性電極は、例えば、米国特許出願公開第2012/0325665号 (Chiouら) に記載されており、この内容は参照により本明細書に援用される。幾つかの実施形態では、カバー110は、細胞の接着、生存、及び/又は成長を支持するように変更することができる (例えば、マイクロ流体回路120に向かって内側に面する表面の全て又は部分を調整することにより)。変更は、合成ポリマー又は天然ポリマーのコーティングを含み得る。幾つかの実施形態では、カバー110及び/又は支持構造体104は、光を透過することができる。カバー110は、ガス透過可能な少なくとも1つの材料 (例えば、PDMS又はPPS) を含むこともできる。

【0244】

[00306] 図1Aは、マイクロ流体デバイス100等のマイクロ流体デバイスを動作させ制御するシステム150も示す。システム150は、電源192、撮像デバイス、及び傾斜デバイス190 (傾斜モジュール166の一部) を含む。

【0245】

[00307] 電源192は、電力をマイクロ流体デバイス100及び/又は傾斜デバイス190に提供し、バイアス電圧又は電流を必要に応じて提供することができる。電源192は、例えば、1つ以上の交流 (AC) 及び/又は直流 (DC) 電圧源又は電流源を含むことができる。撮像デバイス (撮像モジュール164の一部、以下に記載) は、マイクロ流体回路120内部の画像を捕捉する、デジタルカメラ等のデバイスを含むことができる。幾つかの場合、撮像デバイスは、高速フレームレート及び/又は高感度 (例えば、低光用途用) を有する検出器を更に含む。撮像デバイスは、刺激放射線及び/又は光線をマイクロ流体回路120内に向け、マイクロ流体回路120 (又はマイクロ流体回路120内に含まれる微小物体) から反射されるか、又は発せられる放射線及び/又は光線を収集する機構を含むこともできる。発せられる光線は可視スペクトル内であり得、例えば、蛍光放射を含み得る。反射光線は、LED又は水銀灯 (例えば、高圧水銀灯) 若しくはキセノンアーク灯等の広域スペクトル灯から発せられた反射放射を含み得る。図3Bに関して考察するように、撮像デバイスは顕微鏡 (又は光学縦列) を更に含み得、これは接眼レンズを含んでもよく、又は含まなくてもよい。

【0246】

[00308] システム150は、1つ以上の回転軸の周りでマイクロ流体デバイス100を回転させるように構成された傾斜デバイス190 (撮像モジュール164の一部、以下に記載) を更に含む。幾つかの実施形態では、傾斜デバイス190は、マイクロ流体デバイス100 (したがって、マイクロ流体回路120) を水平向き (すなわち、x軸及びy軸に相対して0°)、垂直向き (すなわち、x軸及び/又はy軸に相対して90°)、又はそれらの間の任意の向きで保持することができるように、少なくとも1つの軸の周りでマイクロ流体回路120を含むエンクロージャ102を支持及び/又は保持するように構成される。軸に相対するマイクロ流体デバイス100 (及びマイクロ流体回路120) の向きは、本明細書では、マイクロ流体デバイス100 (及びマイクロ流体回路120) の「傾斜」と呼ばれる。例えば、傾斜デバイス190は、x軸に相対して0.1°、0.2°、0.3°、0.4°、0.5°、0.6°、0.7°、0.8°、0.9°、1°、2°、3°、4°、5°、10°、15°、20°、25°、30°、35°、40°、45°、50°、55°、60°、65°、70°、75°、80°、90°、又はそれらの間の任意の度数でマイクロ流体デバイス100を傾斜させることができる。水平向き (したがって、x軸及びy軸) は、重力により定義される垂直軸に垂直なものとして定義

10

20

30

40

50

される。傾斜デバイスは、マイクロ流体デバイス 100（及びマイクロ流体回路 120）を x 軸及び / 又は y 軸に相対して 90°よりも大きい任意の角度に傾斜させるか、又はマイクロ流体デバイス 100（及びマイクロ流体回路 120）を x 軸若しくは y 軸に相対して 180°に傾斜させて、マイクロ流体デバイス 100（及びマイクロ流体回路 120）を真逆にすることもできる。同様に、幾つかの実施形態では、傾斜デバイス 190 は、流路 106 又はマイクロ流体回路 120 の何らかの他の部分により定義される回転軸の周りでマイクロ流体デバイス 100（及びマイクロ流体回路 120）を傾斜させる。

【0247】

【00309】 幾つかの場合、マイクロ流体デバイス 100 は、流路 106 が 1 つ以上の隔離ペンの上方又は下方に位置するように、垂直向きに傾斜する。「上方」という用語は、本明細書で使用される場合、流路 106 が、重力により定義される垂直軸上で 1 つ以上の隔離ペンよりも高く位置する（すなわち、流路 106 の上方の隔離ペン内の物体が流路内の物体よりも高い重力位置エネルギーを有する）ことを示す。「下方」という用語は、本明細書で使用される場合、流路 106 が、重力により定義される垂直軸上で 1 つ以上の隔離ペンよりも下に位置する（すなわち、流路 106 の下方の隔離ペン内の物体が流路内の物体よりも低い重力位置エネルギーを有する）ことを示す。

【0248】

【00310】 幾つかの場合、傾斜デバイス 190 は、流路 106 と平行な軸の周りでマイクロ流体デバイス 100 を傾斜させる。更に、マイクロ流体デバイス 100 は、流路 106 が、隔離ペンの真上又は真下に配置されずに、1 つ以上の隔離ペンの上方又は下方に配置されるように、90°未満の角度に傾斜することができる。他の場合、傾斜デバイス 190 は、流路 106 に直交する軸の周りでマイクロ流体デバイス 100 を傾斜させる。更に他の場合、傾斜デバイス 190 は、流路 106 に平行でもなく直交もしない軸の周りでマイクロ流体デバイス 100 を傾斜させる。

【0249】

【00311】 システム 150 は培地源 178 を更に含むことができる。培地源 178（例えば、容器、リザーバ等）は、それぞれが異なる流体培地 180 を保持する複数のセクション又は容器を含むことができる。したがって、培地源 178 は、図 1A に示されるように、マイクロ流体デバイス 100 の外部にある、マイクロ流体デバイス 100 とは別個のデバイスであり得る。代替的に、培地源 178 は、全体的又は部分的に、マイクロ流体デバイス 100 のエンクロージャ 102 内部に配置することができる。例えば、培地源 178 は、マイクロ流体デバイス 100 の部分であるリザーバを含むことができる。

【0250】

【00312】 図 1A は、システム 150 の一部を構成し、マイクロ流体デバイス 100 と併せて利用することができる制御及び監視機器 152 の例の簡易ブロック図表現も示す。示されるように、そのような制御及び監視機器 152 の例は、培地源 178 を制御する培地モジュール 160 と、マイクロ流体回路 120 での微小物体（図示せず）及び / 又は培地（例えば、培地の液滴）の移動及び / 又は選択を制御する原動モジュール 162 と、画像（例えば、デジタル画像）を捕捉する撮像デバイス（例えば、カメラ、顕微鏡、光源、又はそれらの任意の組合せ）を制御する撮像モジュール 164 と、傾斜デバイス 190 を制御する傾斜モジュール 166 とを含むマスタコントローラ 154 を含む。制御機器 152 は、マイクロ流体デバイス 100 に関する他の機能を制御、監視、又は実行する他のモジュール 168 を含むこともできる。示されるように、機器 152 は、表示デバイス 170 及び入 / 出力デバイス 172 を更に含むことができる。

【0251】

【00313】 マスタコントローラ 154 は、制御モジュール 156 及びデジタルメモリ 158 を含むことができる。制御モジュール 156 は、例えば、メモリ 158 内に非一時的データ又は信号として記憶される機械実行可能命令（例えば、ソフトウェア、ファームウェア、ソースコード等）に従って動作するように構成されたデジタルプロセッサを含むことができる。代替的に又は追加として、制御モジュール 156 は、ハードワイヤードデジ

タル回路及び／又はアナログ回路を含むことができる。培地モジュール１６０、原動モジュール１６２、撮像モジュール１６４、傾斜モジュール１６６、及び／又は他のモジュール１６８は、同様に構成され得る。したがって、マイクロ流体デバイス１００又は任意の他のマイクロ流体装置に関して実行されるものとして本明細書で考察される機能、プロセス、行動、動作、又はプロセスのステップは、上述したように構成されたマスタコントローラ１５４、培地モジュール１６０、原動モジュール１６２、撮像モジュール１６４、傾斜モジュール１６６、及び／又は他のモジュール１６８の任意の１つ以上により実行され得る。同様に、マスタコントローラ１５４、培地モジュール１６０、原動モジュール１６２、撮像モジュール１６４、傾斜モジュール１６６、及び／又は他のモジュール１６８は、通信可能に結合されて、本明細書において考察される任意の機能、プロセス、行動、動作、又はステップで使用されるデータを送受信し得る。

10

【０２５２】

【００３１４】 培地モジュール１６０は培地源１７８を制御する。例えば、培地モジュール１６０は、培地源１７８を制御して、選択された流体培地１８０をエンクロージャ１０２に入れる（例えば、流入口１０７を介して）ことができる。培地モジュール１６０は、エンクロージャ１０２からの培地の取り出し（例えば、流出口（図示せず）を通して）を制御することもできる。したがって、１つ以上の培地を選択的にマイクロ流体回路１２０に入れ、マイクロ流体回路１２０から搬出することができる。培地モジュール１６０は、マイクロ流体回路１２０内部の流路１０６での流体培地１８０のフローを制御することもできる。例えば、幾つかの実施形態では、培地モジュール１６０は、傾斜モジュール１６６が傾斜デバイス１９０に所望の傾斜角までマイクロ流体デバイス１００を傾斜させる前に、流路１０６内及びエンクロージャ１０２を通る培地１８０のフローを停止させる。

20

【０２５３】

【００３１５】 原動モジュール１６２は、マイクロ流体回路１２０での微小物体（図示せず）の選択、捕捉、及び移動を制御するように構成され得る。図１Ｂ及び図１Ｃに関して後述するように、エンクロージャ１０２は、誘電泳動（ＤＥＰ）構成、光電子ピンセット（ＯＥＴ）構成、及び／又は光電子ウェットティング（ＯＥＷ）構成（図１Ａに示されず）を含むことができ、原動モジュール１６２は、電極及び／又はトランジスタ（例えば、フォトトランジスタ）のアクティブ化を制御して、流路１０６及び／又は隔離ペン１２４、１２６、１２８、１３０で微小物体（図示せず）及び／又は培地の液滴（図示せず）を選択し移動させることができる。

30

【０２５４】

【００３１６】 撮像モジュール１６４は撮像デバイスを制御することができる。例えば、撮像モジュール１６４は、撮像デバイスから画像データを受信し、処理することができる。撮像デバイスからの画像データは、撮像デバイスにより捕捉された任意のタイプの情報を含むことができる（例えば、微小物体、培地の液滴、蛍光標識等の検出可能な標識の蓄積の有無等）。撮像デバイスにより捕捉された情報を使用して、撮像モジュール１６４は、物体（例えば、微小物体、培地の液滴）の位置及び／又はマイクロ流体デバイス１００内のそのような物体の移動速度を更に計算することができる。

【０２５５】

40

【００３１７】 傾斜モジュール１６６は、傾斜デバイス１９０の傾斜移動を制御することができる。代替的に又は追加として、傾斜モジュール１６６は、重力を介して１つ以上の隔離ペンへの微小物体の移送を最適化するように、傾斜率及びタイミングを制御することができる。傾斜モジュール１６６は、撮像モジュール１６４と通信可能に結合されて、マイクロ流体回路１２０での微小物体及び／又は培地の液滴の移動を記述するデータを受信する。このデータを使用して、傾斜モジュール１６６は、マイクロ流体回路１２０の傾斜を調整して、マイクロ流体回路１２０内で微小物体及び／又は培地の液滴が移動する率を調整し得る。傾斜モジュール１６６は、このデータを使用して、マイクロ流体回路１２０内の微小物体及び／又は培地の液滴の位置を繰り返し調整することもできる。

【０２５６】

50

【00318】 図1Aに示される例では、マイクロ流体回路120は、マイクロ流体チャンネル122及び隔離ペン124、126、128、130を含むものとして示されている。各ペンは、チャンネル122への開口部を含むが、ペンがペン内部の微小物体を流体培地180及び/又はチャンネル122の流路106又は他のペン内の微小物体から実質的に分離することができるように、その他では閉じられている。隔離ペンの壁は、ベースの内面109からカバー110の内面に延在してエンクロージャを提供する。マイクロ流体チャンネル122へのペンの開口は、フロー106がペン内にダイレクトされないように流体培地180のフロー106に対して角度をなして配置される。フローは、ペンの開口平面に接し得るか又は直交し得る。幾つかの場合、ペン124、126、128、130は、1つ以上の微小物体をマイクロ流体回路120内部に物理的に入れるように構成される。本開示による隔離ペンは、以下に詳細に考察され示されるように、DEP、OET、OEWS、流体フロー及び/又は重力との併用に最適化される様々な形状、表面、及び特徴を含むことができる。

10

【0257】

【00319】 マイクロ流体回路120は、任意の数のマイクロ流体隔離ペンを含み得る。5つの隔離ペンが示されているが、マイクロ流体回路120は、より少ない又はより多くの隔離ペンを有し得る。示されるように、マイクロ流体回路120のマイクロ流体隔離ペン124、126、128、及び130は、それぞれ、生物学的微小物体の保持、分離、アッセイ、又は培養に役立つ1つ以上の利益を提供し得る様々な特徴及び形状を含む。幾つかの実施形態では、マイクロ流体回路120は、複数の同一のマイクロ流体隔離ペンを含む。

20

【0258】

【00320】 図1Aに示される実施形態では、1つのチャンネル122及び流路106が示される。しかし、他の実施形態は、それぞれが流路106を含むように構成された複数のチャンネル122を含み得る。マイクロ流体回路120は、流路106及び流体培地180と流体連通する流入弁又はポート107を更に含み、それにより、流体培地180は、流入口107を介してチャンネル122にアクセスすることができる。幾つかの場合、流路106は1つの経路を含む。幾つかの場合、1つの経路はジグザグパターンで配置され、それにより、流路106は、交互になった方向で2回以上にわたってマイクロ流体デバイス100にわたり移動する。

30

【0259】

【00321】 幾つかの場合、マイクロ流体回路120は、複数の平行チャンネル122及び流路106を含み、各流路106内の流体培地180は同じ方向に流れる。幾つかの場合、各流路106内の流体培地は、順方向又は逆方向の少なくとも一方で流れる。幾つかの場合、複数の隔離ペンは、標的微小物体と並列に配置されるように構成される(例えば、チャンネル122に相対して)。

【0260】

【00322】 幾つかの実施形態では、マイクロ流体回路120は、1つ以上の微小物体トラップ132を更に含む。トラップ132は、一般に、チャンネル122の境界を形成する壁に形成され、マイクロ流体隔離ペン124、126、128、130の1つ以上の開口部の逆に位置し得る。幾つかの実施形態では、トラップ132は、流路106から1つの微小物体を受け取り、又は捕捉するように構成される。幾つかの実施形態では、トラップ132は、流路106から複数の微小物体を受け取り、又は捕捉するように構成される。幾つかの場合、トラップ132は、1つの標的微小物体の容積に概ね等しい容積を含む。

40

【0261】

【00323】 トラップ132は、標的微小物体のトラップ132へのフローを支援するように構成された開口部を更に含み得る。幾つかの場合、トラップ132は、1つの標的微小物体の寸法に概ね等しい高さ及び幅を有する開口部を含み、それにより、より大きい微小物体が微小物体トラップに入らないようにされる。トラップ132は、トラップ132内への標的微小物体の保持を支援するように構成された他の特徴を更に含み得る。幾つか

50

の場合、トラップ 1 3 2 は、微小流体隔離ペンの開口部と位置合わせされ、微小流体隔離ペンの開口部に関してマイクロ流体チャネル 1 2 2 の逆側に配置され、それにより、チャネル 1 2 2 に平行な軸の周りでマイクロ流体デバイス 1 0 0 を傾斜されると、捕捉された微小物体は、微小物体を隔離ペンの開口部に落とす軌道でトラップ 1 3 2 を出る。幾つかの場合、トラップ 1 3 2 は、標的微小物体よりも小さく、トラップ 1 3 2 を通るフローを促進し、それにより、トラップ 1 3 2 内への微小物体の捕捉確率を増大させるサイド通路 1 3 4 を含む。

【 0 2 6 2 】

【00324】 幾つかの実施形態では、誘電泳動（D E P）力は、1つ以上の電極（図示せず）を介して流体培地 1 8 0 にわたり適用されて（例えば、流路及び／又は隔離ペンにおいて）、内部に配置された微小物体の操作、輸送、分離、及びソートを行う。例えば、幾つかの実施形態では、D E P力は、マイクロ流体回路 1 2 0 の1つ以上の部分に適用されて、1つの微小物体を流路 1 0 6 から所望のマイクロ流体隔離ペンに輸送する。幾つかの実施形態では、D E P力を使用して、隔離ペン（例えば、隔離ペン 1 2 4、1 2 6、1 2 8、又は 1 3 0）内の微小物体が隔離ペンから変位しないようにする。更に、幾つかの実施形態では、D E P力を使用して、本開示の実施形態により前に収集された微小物体を隔離ペンから選択的に取り出す。幾つかの実施形態では、D E P力は、光電子ピンセット（O E T）力を含む。

【 0 2 6 3 】

【00325】 他の実施形態では、光電子ウェットティング（O E W）力が、1つ以上の電極（図示せず）を介してマイクロ流体デバイス 1 0 0 の支持構造体 1 0 4（及び／又はカバー 1 1 0）での1つ以上の位置（例えば、流路及び／又は隔離ペンの画定に役立つ位置）に適用されて、マイクロ流体回路 1 2 0 に配置された液滴の操作、輸送、分離、及びソートを行う。例えば、幾つかの実施形態では、O E W力は支持構造体 1 0 4（及び／又はカバー 1 1 0）の1つ以上の位置に適用されて、1つの液滴を流路 1 0 6 から所望のマイクロ流体隔離ペンに輸送する。幾つかの実施形態では、O E W力を使用して、隔離ペン（例えば、隔離ペン 1 2 4、1 2 6、1 2 8、又は 1 3 0）内の液滴が隔離ペンから変位しないようにする。更に、幾つかの実施形態では、O E W力を使用して、本開示の実施形態により前に収集された液滴を隔離ペンから選択的に取り出す。

【 0 2 6 4 】

【00326】 幾つかの実施形態では、D E P力及び／又はO E W力は、フロー及び／又は重力等の他の力と組み合わせられて、マイクロ流体回路 1 2 0 内の微小物体及び／又は液滴の操作、輸送、分離、及びソートを行う。例えば、エンクロージャ 1 0 2 は傾斜して（例えば、傾斜デバイス 1 9 0 により）、流路 1 0 6 及び流路 1 0 6 内に配置された微小物体をマイクロ流体隔離ペンの上に位置決めすることができ、重力は、微小物体及び／又は液滴をペン内に輸送することができる。幾つかの実施形態では、D E P力及び／又はO E W力は、他の力の前に適用することができる。他の実施形態では、D E P力及び／又はO E W力は、他の力の後に適用することができる。更に他の場合、D E P力及び／又はO E W力は、他の力と同時に又は他の力と交互に適用することができる。

【 0 2 6 5 】

【00327】 図 1 B、1 C、及び 2 A ~ 2 H は、本開示の実施形態の実施に使用することができるマイクロ流体デバイスの様々な実施形態を示す。図 1 B は、マイクロ流体デバイス 2 0 0 が光学作動動電学的デバイスとして構成された実施形態を示す。光電子ピンセット（O E T）構成を有するデバイス及び光電子ウェットティング（O E W）構成を有するデバイスを含め、様々な光学作動動電学的デバイスが当技術分野で既知である。適する O E T 構成の例は、以下の米国特許文献に示されており、各文献は全体的に参照により本明細書に援用される：米国特許第 R E 4 4 , 7 1 1 号（Wu ら）（元々は米国特許第 7 , 6 1 2 , 3 5 5 号として発行された）；及び米国特許第 7 , 9 5 6 , 3 3 9 号（Ohta ら）。O E W 構成の例は、米国特許第 6 , 9 5 8 , 1 3 2 号（Chiou ら）及び米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 2 4 7 0 8 号（Chiou ら）に示されており、これらは両方とも全体的に参

10

20

30

40

50

照により本明細書に援用される。光学作動動電的デバイスの更に別の例は、OET/OEW結合構成を含み、その例は、米国特許出願公開第20150306598号(Khandrosら)及び同第20150306599号(Khandrosら)並びにそれらの対応するPCT公報である国際公開第2015/164846号及び国際公開第2015/164847号に示されており、これらは全て全体的に参照により本明細書に援用される。

【0266】

[00328] 生物学的微小物体を配置可能、培養可能、及び/又は監視可能なペンを有するマイクロ流体デバイスの例は、例えば、米国特許出願公開第2014/0116881号(2013年10月22日出願の米国出願第14/060,117号)、米国特許出願公開第2015/0151298号(2014年10月22日出願の米国出願第14/520,568号)、及び米国特許出願公開第2015/0165436号(2014年10月22日出願の米国出願第14/521,447号)(それぞれその全体が参照により本明細書に援用される)に記載されている。また、米国特許出願第14/520,568号及び同第14/521,447号には、マイクロ流体デバイスで培養された細胞の分泌物を分析する例示的な方法が記載されている。上記の各出願には更に、光電子ピンセット(OET)等のように誘電泳動(DEP)力を生じるように構成された又はオプトエレクトロウェットティング(OEW)を提供するように構成されたマイクロ流体デバイスが記載されている。例えば、米国特許出願公開第2014/0116881号の図2に例示される光電子ピンセットデバイスは、個別の生物学的微小物体又は一群の生物学的微小物体を選択して移動させるために本開示の実施形態で利用し得るデバイスの例である。

【0267】

[00329] マイクロ流体デバイス原動構成。上述したように、システムの制御及び監視機器は、マイクロ流体デバイスのマイクロ流体回路において微小物体又は液滴等の物体を選択し移動させる原動モジュールを含むことができる。マイクロ流体デバイスは、移動される物体のタイプ及び他の考慮事項に応じて様々な原動構成を有することができる。例えば、誘電泳動(DEP)構成を利用して、マイクロ流体回路において微小物体を選択し移動させることができる。したがって、マイクロ流体デバイス100の支持構造体104及び/又はカバー110は、マイクロ流体回路120内の流体培地180内の微小物体に対してDEP力を選択的に誘導し、それにより、個々の微小物体又は微小物体群の選択、捕捉、及び/又は移動を行うDEP構成を含むことができる。代替的に、マイクロ流体デバイス100の支持構造体104及び/又はカバー110は、マイクロ流体回路120内の流体培地180内の液滴に対して電子ウェットティング(EW)力を選択的に誘導し、それにより、個々の液滴又は液滴群の選択、捕捉、及び/又は移動を行う電子ウェットティング(EW)構成を含むことができる。

【0268】

[00330] DEP構成を含むマイクロ流体デバイス200の一例を図1B及び図1Cに示す。簡潔にするために、図1B及び図1Cは、領域/チャンバ202を有するマイクロ流体デバイス200のエンクロージャ102の部分の側面断面図及び上面断面図をそれぞれ示すが、領域/チャンバ202が、成長チャンバ、隔離ペン、フロー領域、又はフローチャンネル等のより詳細な構造を有する流体回路要素の部分であり得ることを理解されたい。更に、マイクロ流体デバイス200は他の流体回路要素を含み得る。例えば、マイクロ流体デバイス200は、マイクロ流体デバイス100に関して本明細書に記載される等の複数の成長チャンバ、或いは隔離ペン及び/又は1つ若しくは複数のフロー領域又はフローチャンネルを含むことができる。DEP構成は、マイクロ流体デバイス200の任意のそのような流体回路要素に組み込み得るか、又はその部分を選択し得る。上記又は下記の任意のマイクロ流体デバイス構成要素及びシステム構成要素がマイクロ流体デバイス200内に組みこまれ得、及び/又はマイクロ流体デバイス200と組み合わせて使用し得ることを更に理解されたい。例えば、培地モジュール160、原動モジュール162、撮像モジュール164、傾斜モジュール166、及び他のモジュール168の1つ以上を含む上述した制御及び監視機器152を含むシステム150は、マイクロ流体デバイス200と

併用し得る。

【 0 2 6 9 】

[00331] 図 1 B において見られるように、マイクロ流体デバイス 2 0 0 は、下部電極 2 0 4 及び下部電極 2 0 4 に重なる電極活性化基板 2 0 6 を有する支持構造体 1 0 4 と、上部電極 2 1 0 を有するカバー 1 1 0 とを含み、上部電極 2 1 0 は下部電極 2 0 4 から離間される。上部電極 2 1 0 及び電極活性化基板 2 0 6 は、領域 / チャンバ 2 0 2 の両面を画定する。したがって、領域 / チャンバ 2 0 2 に含まれる培地 1 8 0 は、上部電極 2 1 0 と電極活性化基板 2 0 6 との間に抵抗接続を提供する。下部電極 2 0 4 と上部電極 2 1 0 との間に接続され、領域 / チャンバ 2 0 2 での D E P 力の生成のために必要に応じて電極間にバイアス電圧を生成するように構成された電源 2 1 2 も示されている。電源 2 1 2 は、例えば、交流 (A C) 電源であり得る。

10

【 0 2 7 0 】

[00332] 特定の実施形態では、図 1 B 及び図 1 C に示されるマイクロ流体デバイス 2 0 0 は、光学作動 D E P 構成を有することができる。したがって、原動モジュール 1 6 2 により制御し得る光源 2 1 6 からの光 2 1 8 の変更パターンは、電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 の領域 2 1 4 において D E P 電極の変更パターンを選択的に活性化又は非活性化することができる。(以下では D E P 構成を有するマイクロ流体デバイスの領域 2 1 4 を「 D E P 電極領域」と呼ぶ)。図 1 C に示されるように、電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 に向けられる光パターン 2 1 8 は、正方形等のパターンで、選択された D E P 電極領域 2 1 4 a (白色で示される)を照明することができる。照明されない D E P 電極領域 2 1 4 (斜線が付される)を以下では「暗」 D E P 電極領域 2 1 4 と呼ぶ。 D E P 電極活性化基板 2 0 6 を通る相対電気インピーダンス(すなわち、下部電極 2 0 4 から、フロー領域 1 0 6 において培地 1 8 0 と界面を接する電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 まで)は、各暗 D E P 電極領域 2 1 4 での領域 / チャンバ 2 0 2 において培地 1 8 0 を通る(すなわち、電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 からカバー 1 1 0 の上部電極 2 1 0 まで)相対電気インピーダンスよりも大きい。しかし、照明 D E P 電極領域 2 1 4 a は、各照明 D E P 電極領域 2 1 4 a での領域 / チャンバ 2 0 2 での培地 1 8 0 を通る相対インピーダンス未満である電極活性化基板 2 0 6 を通る相対インピーダンスの低減を示す。

20

【 0 2 7 1 】

[00333] 電源 2 1 2 が活性化されている場合、上記 D E P 構成は、照明 D E P 電極領域 2 1 4 a と隣接する暗 D E P 電極領域 2 1 4 との間に流体培地 1 8 0 内で電場勾配を生じさせ、次に、電場勾配は、流体培地 1 8 0 内の付近の微小物体(図示せず)を引き寄せるか、又は排斥する局所 D E P 力を生成する。したがって、流体培地 1 8 0 内の微小物体を引き寄せるか、又は排斥する D E P 電極は、光源 2 1 6 からマイクロ流体デバイス 2 0 0 に投射される光パターン 2 1 8 を変更することにより、領域 / チャンバ 2 0 2 の内面 2 0 8 での多くの異なるそのような D E P 電極領域 2 1 4 において選択的に活性化及び非活性化することができる。 D E P 力が付近の微小物体を引き寄せるか、それとも排斥するかは、電源 2 1 2 の周波数並びに培地 1 8 0 及び / 又は微小物体(図示せず)の誘電特性等のパラメータに依存し得る。

30

【 0 2 7 2 】

[00334] 図 1 C に示される照明 D E P 電極領域 2 1 4 a の正方形パターン 2 2 0 は単なる例である。マイクロ流体デバイス 2 0 0 に投射される光パターン 2 1 8 により、任意のパターンの D E P 電極領域 2 1 4 を照明する(それにより、活性化する)ことができ、照明 / 活性化される D E P 電極領域 2 1 4 のパターンは、光パターン 2 1 8 を変更又は移動させることにより繰り返し変更することができる。

40

【 0 2 7 3 】

[00335] 幾つかの実施形態では、電極活性化基板 2 0 6 は、光伝導性材料を含むか、又は光導電性材料からなることができる。そのような実施形態では、電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 は、特徴を有さないことができる。例えば、電極活性化基板 2 0 6 は、水素化非晶質シリコン (a - S i : H) の層を含むか、又は a - S i : H の層からなること

50

ができる。a - Si : Hは、例えば、約8%～40%の水素を含むことができる（水素原子の数 / 水素及びケイ素原子の総数に100を掛けたものとして計算）。a - Si : Hの層は厚さ約500nm～約2.0μmを有することができる。そのような実施形態では、DEP電極領域214は、光パターン218により、電極活性化基板206の内面208上の任意の場所に任意のパターンで作成することができる。したがって、DEP電極領域214の数及びパターンは、固定される必要がなく、光パターン218に対応することができる。上述したような光伝導層を含むDEP構成を有するマイクロ流体デバイスの例は、例えば、米国特許第RE44,711号（Wuら）（元々は米国特許第7,612,355号として発行された）に記載されており、その内容全体は参照により本明細書に援用される。

10

【0274】

[00336] 他の実施形態では、電極活性化基板206は、半導体分野で既知等の半導体集積回路を形成する複数のドーブ層、絶縁層（又は領域）、及び導電層を含む基板を含むことができる。例えば、電極活性化基板206は、例えば、横型バイポーラフォトトランジスタを含む複数のフォトトランジスタを含むことができ、各フォトトランジスタはDEP電極領域214に対応する。代替的に、電極活性化基板206は、フォトトランジスタスイッチにより制御される電極（例えば、導電性金属電極）を含むことができ、そのような各電極はDEP電極領域214に対応する。電極活性化基板206は、パターンになったそのようなフォトトランジスタ又はフォトトランジスタ制御される電極を含むことができる。パターンは、例えば、図2Bに示される等、行列に配置された実質的に正方形のフォトトランジスタ又はフォトトランジスタ制御される電極のアレイであり得る。代替的に、パターンは、六角形格子を形成する実質的に六角形のフォトトランジスタ又はフォトトランジスタ制御される電極のアレイであり得る。パターンに関係なく、電気回路素子は、電極活性化基板206の内面208におけるDEP電極領域214と下部電極210との間に電気接続を形成することができ、それらの電気接続（すなわち、フォトトランジスタ又は電極）は、光パターン218により選択的に活性化又は非活性化することができる。活性化されない場合、各電気接続は、電極活性化基板206を通る（すなわち、下部電極204から、領域 / チャンバ202内の培地180と界面を接する電極活性化電極206の内面208まで）相対インピーダンスが、対応するDEP電極領域214における培地180を通る（すなわち、電極活性化基板206の内面208からカバー110の上部電極210まで）相対インピーダンスよりも大きいような高いインピーダンスを有することができる。しかし、光パターン218内の光により活性化される場合、電極活性化基板206を通る相対インピーダンスは、各照明DEP電極領域214での培地180を通る相対インピーダンス未満であり、それにより、上述したように、対応するDEP電極領域214でのDEP電極を活性化する。したがって、培地180内の微小物体（図示せず）を引き寄せるか、又は排斥するDEP電極は、光パターン218により決まるように、領域 / チャンバ202での電極活性化基板206の内面208での多くの異なるDEP電極領域214において選択的に活性化及び非活性化することができる。

20

30

【0275】

[00337] フォトトランジスタを含む電極活性化基板を有するマイクロ流体デバイスの例は、例えば、米国特許第7,956,339号（Ohtaら）に記載されており（例えば、図21及び図22に示されるデバイス300並びにその説明を参照されたい）、この内容全体は参照により本明細書に援用される。フォトトランジスタスイッチにより制御される電極を含む電極活性化基板を有するマイクロ流体デバイスの例は、例えば、米国特許出願公開第2014/0124370号（Shortら）に記載されており（例えば、図面全体を通して示されるデバイス200、400、500、600、及び900並びにその説明を参照されたい）、これらの内容全体は参照により本明細書に援用される。

40

【0276】

[00338] DEP構成のマイクロ流体デバイスの幾つかの実施形態では、上部電極210はエンクロージャ102の第1の壁（又はカバー110）の一部であり、電極活性化基

50

板 2 0 6 及び下部電極 2 0 4 は、エンクロージャ 1 0 2 の第 2 の壁（又は支持構造体 1 0 4）の一部である。領域 / チャンバ 2 0 2 は、第 1 の壁と第 2 の壁との間にあり得る。他の実施形態では、電極 2 1 0 は第 2 の壁（又は支持構造体 1 0 4）の一部であり、電極活性化基板 2 0 6 及び / 又は電極 2 1 0 の一方又は両方は、第 1 の壁（又はカバー 1 1 0）の一部である。更に、光源 2 1 6 は代替的に、下からエンクロージャ 1 0 2 を照明するのに使用することができる。

【 0 2 7 7 】

[00339] D E P 構成を有する図 1 B 及び図 1 C のマイクロ流体デバイス 2 0 0 を用いて、原動モジュール 1 6 2 は、光パターン 2 1 8 をマイクロ流体デバイス 2 0 0 に投射して、微小物体を囲み捕捉するパターン（例えば、正方形パターン 2 2 0）で電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 の D E P 電極領域 2 1 4 a での第 1 の組の 1 つ以上の D E P 電極を活性化することにより、領域 / チャンバ 2 0 2 での培地 1 8 0 内の微小物体（図示せず）を選択することができる。次に、原動モジュール 1 6 2 は、光パターン 2 1 8 をマイクロ流体デバイス 2 0 0 に相対して移動させて、D E P 電極領域 2 1 4 での第 2 の組の 1 つ以上の D E P 電極を活性化することにより、インサイチュで生成された捕捉された微小物体を移動させることができる。代替的に、マイクロ流体デバイス 2 0 0 を光パターン 2 1 8 に相対して移動させることができる。

【 0 2 7 8 】

[00340] 他の実施形態では、マイクロ流体デバイス 2 0 0 は、電極活性化基板 2 0 6 の内面 2 0 8 での D E P 電極の光活性化に依存しない D E P 構成を有することができる。例えば、電極活性化基板 2 0 6 は、少なくとも 1 つの電極を含む表面（例えば、カバー 1 1 0）とは逆に位置する、選択的にアドレス指定可能且つエネルギー付与可能な電極を含むことができる。スイッチ（例えば、半導体基板のトランジスタスイッチ）を選択的に開閉して、D E P 電極領域 2 1 4 での D E P 電極を活性化又は非活性化し得、それにより、活性化された D E P 電極の近傍での領域 / チャンバ 2 0 2 内の微小物体（図示せず）に対する正味 D E P 力を生成する。電源 2 1 2 の周波数及び培地（図示せず）及び / 又は領域 / チャンバ 2 0 2 内の微小物体の誘電特性等の特徴に応じて、D E P 力は、付近の微小物体を引き寄せるか、又は排斥することができる。D E P 電極の組（例えば、正方形パターン 2 2 0 を形成する D E P 電極領域 2 1 4 の組における）を選択的に活性化又は非活性化することにより、領域 / チャンバ 2 0 2 における 1 つ以上の微小物体を捕捉し、領域 / チャンバ 2 0 2 内で移動させることができる。図 1 A の原動モジュール 1 6 2 は、そのようなスイッチを制御し、したがって、D E P 電極の個々の電極を活性化及び非活性化して、領域 / チャンバ 2 0 2 の周囲の特定の微小物体（図示せず）を選択、捕捉、及び移動させることができる。選択的にアドレス指定可能且つエネルギー付与可能な電極を含む D E P 構成を有するマイクロ流体デバイスは、当技術分野で既知であり、例えば、米国特許第 6, 2 9 4, 0 6 3 号（Becker ら）及び同第 6, 9 4 2, 7 7 6 号（Medoro）に記載されており、これらの内容全体は参照により本明細書に援用される。

【 0 2 7 9 】

[00341] 更なる別例として、マイクロ流体デバイス 2 0 0 は電子ウェットティング（E W）構成を有することができ、E W 構成は、D E P 構成の代わりであってもよく、又は D E P 構成を有する部分とは別個のマイクロ流体デバイス 2 0 0 の部分に配置されてもよい。E W 構成は、光電子ウェットティング構成又は誘電体上の電子ウェットティング（E W O D）構成であり得、これらは両方とも当技術分野で既知である。幾つかの E W 構成では、支持構造体 1 0 4 は、誘電層（図示せず）と下部電極 2 0 4 との間に挟まれた電極活性化基板 2 0 6 を有する。下記のように、誘電層は、疎水性材料を含むことができ、及び / 又は疎水性材料でコーティングすることができる。E W 構成を有するマイクロ流体デバイス 2 0 0 の場合、支持構造体 1 0 4 の内面 2 0 8 は、誘電層の内面又はその疎水性コーティングである。

【 0 2 8 0 】

[00342] 誘電層（図示せず）は、1 つ以上の酸化物層を含むことができ、厚さ約 5 0

10

20

30

40

50

nm ~ 約 250 nm (例えば、約 125 nm ~ 約 175 nm) を有することができる。特定の実施形態では、誘電層は、金属酸化物 (例えば、酸化アルミニウム又は酸化ハフニウム) 等の酸化物の層を含むことができる。特定の実施形態では、誘電層は、酸化ケイ素又は窒化物等の金属酸化物以外の誘電材料を含むことができる。厳密な組成及び厚さに関係なく、誘電層は約 10 k オーム ~ 約 50 k オームのインピーダンスを有することができる。
【0281】

【00343】 幾つかの実施形態では、領域 / チャンバ 202 に向かって内側に面した誘電層の表面は、疎水性材料でコーティングされる。疎水性材料は、例えば、フッ素化炭素分子を含むことができる。フッ素化炭素分子の例としては、ポリテトラフルオロエチレン (例えば、TEFLON (登録商標) 又はポリ (2, 3 - ジフルオロメチレニル - ペルフルオロテトラヒドロフラン) (例えば、CYTOP (商標)) などのパーフルオロポリマーが挙げられる。疎水性材料を構成する分子は、誘電層の表面に共有結合され得る。例えば、疎水性材料の分子は、シロキサン基、ホスホン酸基、又はチオール基等のリンカーにより、誘電層の表面に共有結合され得る。したがって、幾つかの実施形態では、疎水性材料は、アルキル末端シロキサン、アルキル末端ホスホン酸、又はアルキル末端チオールを含むことができる。アルキル基は長鎖炭化水素 (例えば、少なくとも 10 個の炭素又は少なくとも 16 個、18 個、20 個、22 個、若しくはそれを超える個数の炭素の鎖を有する) であり得る。代替的に、フッ素化 (又はパーフルオロ化) 炭素鎖をアルキル基の代わりに使用することができる。したがって、例えば、疎水性材料は、フルオロアルキル末端シロキサン、フルオロアルキル末端ホスホン酸、又はフルオロアルキル末端チオールを含むことができる。幾つかの実施形態では、疎水性コーティングは約 10 nm ~ 約 50 nm の厚さを有する。他の実施形態では、疎水性コーティングは厚さ 10 nm 未満 (例えば、5 nm 未満又は約 1.5 ~ 3.0 nm) を有する。

【0282】

【00344】 幾つかの実施形態では、電子ウェットティング構成を有するマイクロ流体デバイス 200 のカバー 110 も同様に疎水性材料 (図示せず) でコーティングされる。疎水性材料は、支持構造体 104 の誘電層のコーティングに使用されるものと同じ疎水性材料であり得、疎水性コーティングは、支持構造体 104 の誘電層の疎水性コーティングの厚さと略同じである厚さを有することができる。更に、カバー 110 は、支持構造体 104 の様式で、誘電層と上部電極 210 との間に挟まれた電極活性化基板 206 を含むことができる。電極活性化基板 206 及びカバー 110 の誘電層は、電極活性化基板 206 及び支持構造体 104 の誘電層と同じ組成及び / 又は寸法を有することができる。したがって、マイクロ流体デバイス 200 は 2 つの電子ウェットティング表面を有することができる。

【0283】

【00345】 幾つかの実施形態では、電子活性化基板 206 は、上述した光伝導性材料等の光伝導性材料を含むことができる。したがって、特定の実施形態では、電極活性化基板 206 は、水素化非晶質シリコン (a - Si : H) の層を含むか、又は a - Si : H の層からなることができる。a - Si : H は、例えば、約 8 % ~ 40 % の水素を含むことができる (水素原子の総数及びケイ素原子の総数 / 水素原子の総数に 100 を掛けたものとして計算)。a - Si : H の層は厚さ約 500 nm ~ 約 2.0 μ m を有することができる。代替的に、電子活性化基板 206 は、上述したように、フォトランジスタスイッチにより制御される電極 (例えば、導電性金属電極) を含むことができる。光電子ウェットティング構成を有するマイクロ流体デバイスは当技術分野で既知であり、及び / 又は当技術分野で既知の電極活性化基板を用いて構築することができる。例えば、内容全体が参照により本明細書に援用される米国特許第 6,958,132 号 (Chiou ら) には、a - Si : H 等の光伝導性材料を有する光電子ウェットティング構成が開示されており、一方、上記引用した米国特許出願公開第 2014/0124370 号 (Short ら) には、フォトランジスタスイッチにより制御される電極を有する電極活性化基板が開示されている。

【0284】

【00346】 したがって、マイクロ流体デバイス 200 は光電子ウェットティング構成を有

することができ、光パターン 218 を使用して、電極活性化基板 206 での光応答性 E W 領域又は光応答性 E W 電極を活性化することができる。電極活性化基板 206 のそのような活性化された E W 領域又は E W 電極は、支持構造体 104 の内面 208 (すなわち、重なった誘電層の内面又はその疎水性コーティング) において電子ウェットング力を生成することができる。電子活性化基板 206 に入射する光パターン 218 を変更する (又は光源 216 に相対してマイクロ流体デバイス 200 を移動させる) ことにより、支持構造体 104 の内面 208 に接触する液滴 (例えば、水性培地、水溶液又は水性溶媒を含む) は、領域 / チャンバ 202 内に存在する不混和流体 (例えば、油媒体) を通って移動することができる。

【0285】

[00347] 他の実施形態では、マイクロ流体デバイス 200 は、E W O D 構成を有することができる、電極活性化基板 206 は、活性化のために光に依存しない、選択的にアドレス指定可能且つエネルギー付与可能な電極を含むことができる。したがって、電極活性化基板 206 は、パターンになったそのような電子ウェットング (E W) 電極を含むことができる。パターンは、例えば、図 2 B に示される等の行列に配置された略正方形の E W 電極のアレイであり得る。代替的に、パターンは、六角形格子を形成する略六角形の E W 電極のアレイであり得る。パターンに関係なく、E W 電極は、電気スイッチ (例えば、半導体基板のトランジスタスイッチ) により選択的に活性化 (又は非活性化) することができる。電極活性化基板 206 での E W 電極を選択的に活性化及び非活性化することにより、重なった誘電層の内面 208 又はその疎水性コーティングに接触する液滴 (図示せず) は、領域 / チャンバ 202 内で移動することができる。図 1 A の原動モジュール 162 は、そのようなスイッチを制御することができ、したがって、個々の E W 電極を活性化及び非活性化して、領域 / チャンバ 202 の周囲で特定の液滴を選択し移動させることができる。選択的にアドレス指定可能且つエネルギー付与可能な電極を有する E W O D 構成を有するマイクロ流体デバイスは、当技術分野で既知であり、例えば、米国特許第 8,685,344 号 (Sundarsan ら) に記載されており、この内容全体は参照により本明細書に援用される。

【0286】

[00348] マイクロ流体デバイス 200 の構成に関係なく、電源 212 を使用して、マイクロ流体デバイス 200 の電気回路に給電する電位 (例えば、A C 電源電位) を提供することができる。電源 212 は、図 1 で参照される電源 192 と同じ又は電源 192 の構成要素であり得る。電源 212 は、上部電極 210 及び下部電極 204 に A C 電圧及び / 又は電流を提供するように構成され得る。A C 電圧の場合、電源 212 は、上述したように、領域 / チャンバ 202 内の個々の微小物体 (図示せず) を捕捉して移動させ、及び / 又はこれらも上述したように、領域 / チャンバ 202 内の支持構造体 104 の内面 208 (すなわち、誘電層及び / 又は誘電層上の疎水性コーティング) のウェットング特性を変更するのに十分に強い正味 D E P 力 (又は電子ウェットング力) を生成するのに十分な周波数範囲及び平均又はピーク電力 (例えば、電圧又は電流) を提供することができる。そのような周波数範囲及び平均又はピーク電力範囲は、当技術分野で既知である。例えば、米国特許第 6,958,132 号 (Chiou ら)、米国特許第 R E 44,711 号 (Wu ら) (元々は米国特許第 7,612,355 号として発行された)、並びに米国特許出願公開第 2014/0124370 号 (Short ら)、同第 2015/0306598 号 (Khandros ら)、及び同第 2015/0306599 号 (Khandros ら) を参照されたい。

【0287】

[00349] 隔離ペン。一般的な隔離ペン 224、226、及び 228 の非限定的な例は、図 2 A ~ 2 C に示されるマイクロ流体デバイス 230 内に示されている。各隔離ペン 224、226、及び 228 は、分離領域 240 と、分離領域 240 をチャンネル 122 に流体接続する接続領域 236 とを画定する分離構造体 232 を含むことができる。接続領域 236 は、マイクロ流体チャンネル 122 への基端開口部 234 及び分離領域 240 への先端開口部 238 を含むことができる。接続領域 236 は、マイクロ流体チャンネル 122 が

10

20

30

40

50

ら隔離ペン 224、226、228 内に流れる流体培地（図示せず）のフローの最大侵入深さが分離領域 240 内に及ばないように構成され得る。したがって、接続領域 236 に起因して、隔離ペン 224、226、228 の分離領域 240 内に配置された微小物体（図示せず）又は他の材料（図示せず）は、マイクロ流体チャネル 122 内の培地 180 のフローから分離され、マイクロ流体チャネル 122 内の培地 180 のフローにより実質的に影響されないことができる。

【0288】

【00350】 図 2A ~ 2C の隔離ペン 224、226、及び 228 は、それぞれ、マイクロ流体チャネル 122 に直接開口する単一開口を有する。隔離ペンの開口は、マイクロ流体チャネル 122 の横方向に開口する。電極活性化基板 206 は、マイクロ流体チャネル 122 並びに隔離ペン 224、226、及び 228 の両方の下側に配置される。隔離ペンのエンクロージャ内の電極活性化基板 206 の上表面（隔離ペンのフロアを形成する）は、マイクロ流体チャネル 122（又はチャネルが存在しないときはフロー領域）内の電極活性化基板 206 の上表面（マイクロ流体デバイスのフローチャネル（又はそれぞれフロー領域）のフロアを形成する）と同一レベル又は実質的に同一レベルに配置される。電極活性化基板 206 は、特徴部を有していなくてもよいし、その最高位からその最低位まで約 3 ミクロン未満、2.5 ミクロン、2 ミクロン、1.5 ミクロン、1 ミクロン、0.9 ミクロン、0.5 ミクロン、0.4 ミクロン、0.2 ミクロン、0.1 ミクロン、若しくはそれ以下で変動する不規則表面若しくはパターン化表面を有していてもよい。マイクロ流体チャネル 122（又はフロー領域）及び隔離ペンの両方を横切る基板の上表面の高位の変動は、隔離ペンの壁又はマイクロ流体デバイスの壁の高さの約 3 % 未満、2 % 未満、1 % 未満、0.9 % 未満、0.8 % 未満、0.5 % 未満、0.3 % 未満、又は 0.1 % 未満であり得る。マイクロ流体デバイス 200 について詳細に記載されているが、このことは本明細書に記載のマイクロ流体デバイス 100、230、250、280、290、300、700、800、1000 のいずれにも適用されている。

【0289】

【00351】 したがって、マイクロ流体チャネル 122 は掃引領域の例であり得、隔離ペン 224、226、228 の分離領域 240 は非掃引領域の例であり得る。述べたように、マイクロ流体チャネル 122 及び隔離ペン 224、226、228 は、1 つ以上の流体培地 180 を含むように構成され得る。図 2A ~ 2B に示される例では、ポート 222 はマイクロ流体チャネル 122 に接続され、流体培地 180 がマイクロ流体デバイス 230 内に導入又は外に取り出せるようにすることができる。流体培地 180 を導入する前に、マイクロ流体デバイスは、二酸化炭素ガス等のガスでプライミングし得る。マイクロ流体デバイス 230 が流体培地 180 を含むと、マイクロ流体チャネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 は選択的に生成及び停止させることができる。例えば、示されるように、ポート 222 はマイクロ流体チャネル 122 の異なる位置（例えば、両端部）に配置することができ、流入口として機能するあるポート 222 から流出口として機能する別のポート 222 への培地のフロー 242 を生成することができる。

【0290】

【00352】 図 2C は、本開示による隔離ペン 224 の例の詳細図を示す。微小物体 246 の例も示されている。

【0291】

【00353】 既知のように、隔離ペン 224 の基端開口部 234 を越えたマイクロ流体チャネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 は、隔離ペン 224 内及び / 又は外への培地 180 の 2 次フロー 244 を生じさせることができる。隔離ペン 224 の分離領域 240 内の微小物体 246 を 2 次フロー 244 から分離するために、隔離ペン 224 の接続領域 236 の長さ L_{con} （すなわち、基端開口部 234 から先端開口部 238 まで）は、接続領域 236 への 2 次フロー 244 の侵入深さ D_p よりも大きい値であるはずである。2 次フロー 244 の侵入深さ D_p は、マイクロ流体チャネル 122 内を流れる流体培地 180 の速度並びにマイクロ流体チャネル 122 及びマイクロ流体チャネル 122 への接続

領域 236 の基端開口部 234 の構成に関連する様々なパラメータに依存する。所与のマイクロ流体デバイスでは、マイクロ流体チャンネル 122 及び基端開口部 234 の構成は固定され、一方、マイクロ流体チャンネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 の速度は可変である。したがって、隔離ペン 224 毎に、2 次フロー 244 の侵入深さ D_p が接続領域 236 の長さ L_{con} を超えないことを保証するマイクロ流体チャンネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 の最高速度 V_{max} を識別することができる。マイクロ流体チャンネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 の流量が最大速度 V_{max} を超えない限り、結果として生成される、マイクロ流体チャンネル 122 及び接続領域 236 への 2 次フロー 244 を制限することができ、分離領域 240 に入らないようにすることができる。したがって、マイクロ流体チャンネル 122 内の培地 180 のフロー 242 は、微小物体 246 を分離領域 240 外に引き込まない。むしろ、分離領域 240 内に配置された微小物体 246 は、マイクロ流体チャンネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 に関係なく、分離領域 240 内に留まる。

【0292】

[00354] 更に、マイクロ流体チャンネル 122 内の培地 180 のフロー 242 の流量が V_{max} を超えない限り、マイクロ流体チャンネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 は、様々な粒子（例えば、微粒子及び／又はナノ粒子）をマイクロ流体チャンネル 122 から隔離ペン 224 の分離領域 240 内に移動させない。したがって、接続領域 236 の長さ L_{con} を 2 次フロー 244 の最大侵入深さ D_p よりも大きくすることで、ある隔離ペン 224 の、マイクロ流体チャンネル 122 又は別の隔離ペン（例えば、図 2D の隔離ペン 226、228）からの様々な粒子による汚染を回避することができる。

【0293】

[00355] マイクロ流体チャンネル 122 及び隔離ペン 224、226、228 の接続領域 236 は、マイクロ流体チャンネル 122 内の培地 180 のフロー 242 により影響を及ぼすことができるため、マイクロ流体チャンネル 122 及び接続領域 236 は、マイクロ流体デバイス 230 の掃引（又はフロー）領域と見なすことができる。他方、隔離ペン 224、226、228 の分離領域 240 は、非掃引（又は非フロー）領域と見なすことができる。例えば、マイクロ流体チャンネル 122 内の第 1 の流体培地 180 中の成分（図示せず）は、実質的に、マイクロ流体チャンネル 122 から接続領域 236 を通り分離領域 240 内の第 2 の流体培地 248 への第 1 の培地 180 の成分の拡散によってのみ、分離領域 240 内の第 2 の流体培地 248 と混合することができる。同様に、分離領域 240 内の第 2 の培地 248 の成分（図示せず）は、実質的に、分離領域 240 から接続領域 236 を通り、マイクロ流体チャンネル 122 内の第 1 の培地 180 への第 2 の培地 248 の成分の拡散によってのみ、マイクロ流体チャンネル 122 内の第 1 の培地 180 と混合することができる。幾つかの実施形態では、拡散による隔離ペンの分離領域とフロー領域との間の流体培地交換の程度は、流体交換の約 90% 超、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は約 99% 超である。第 1 の培地 180 は、第 2 の培地 248 と同じ培地であってもよく、又は異なる培地であってもよい。更に、第 1 の培地 180 及び第 2 の培地 248 は、同じ培地として開始され、異なるようになることができる（例えば、分離領域 240 内の 1 つ以上の細胞により又はマイクロ流体チャンネル 122 を通って流れる培地 180 を変更することにより、第 2 の培地 248 を調整することを通して）。

【0294】

[00356] マイクロ流体チャンネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 により生じる 2 次フロー 244 の最大侵入深さ D_p は、上述したように、幾つかのパラメータに依存し得る。そのようなパラメータの例としては、マイクロ流体チャンネル 122 の形状（例えば、マイクロ流体チャンネルは、培地を接続領域 236 に向けることができ、接続領域 236 から培地を逸らすことができ、又はマイクロ流体チャンネル 122 への接続領域 236 の基端開口部 234 に実質的に直交する方向に培地を向けることができる）、基端開口部 234 でのマイクロ流体チャンネル 122 の幅 W_{ch} （又は断面積）及び基端開口部 234 で

の接続領域 236 の幅 W_{con} (又は断面積)、マイクロ流体チャネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 の速度 V 、第 1 の培地 180 及び / 又は第 2 の培地 248 の粘度等が挙げられる。

【0295】

[00357] 幾つかの実施形態では、マイクロ流体チャネル 122 及び隔離ペン 224、226、228 の寸法は、マイクロ流体チャネル 122 内の流体培地 180 のフロー 242 のベクトルに対して以下のように向けることができる：マイクロ流体チャネル幅 W_{ch} (又はマイクロ流体チャネル 122 の断面積) は、培地 180 のフロー 242 に略直交することができ、開口部 234 での接続領域 236 の幅 W_{con} (又は断面積) は、マイクロ流体チャネル 122 内の培地 180 のフロー 242 に略平行であり得、及び / 又は接続領域の長さ L_{con} は、マイクロ流体チャネル 122 内の培地 180 のフロー 242 に略直交することができる。上記は単なる例であり、マイクロ流体チャネル 122 及び隔離ペン 224、226、228 の相対位置は、互いに対して他の向きであり得る。

10

【0296】

[00358] 図 2C に示されるように、接続領域 236 の幅 W_{con} は、基端開口部 234 から先端開口部 238 まで均一であり得る。したがって、先端開口部 238 での接続領域 236 の幅 W_{con} は、基端開口部 234 での接続領域 236 の幅 W_{con} について本明細書において識別された任意の範囲内にあり得る。代替的に、先端開口部 238 での接続領域 236 の幅 W_{con} は、基端開口部 234 での接続領域 236 の幅 W_{con} よりも大きい値であり得る。

20

【0297】

[00359] 図 2C に示されるように、先端開口部 238 での分離領域 240 の幅は、基端開口部 234 での基端領域 254 の幅 W_{con} と略同じであり得る。したがって、先端開口部 238 での分離領域 240 の幅は、基端開口部 234 での接続領域 236 の幅 W_{con} について本明細書において識別された任意の値であり得る。代替的に、先端開口部 238 での分離領域 240 の幅は、基端開口部 234 での接続領域 236 の幅 W_{con} よりも大きくてもよく、又は小さくてもよい。更に、先端開口部 238 は基端開口部 234 よりも小さくてもよく、接続領域 236 の幅 W_{con} は、基端開口部 234 と先端開口部 238 との間で狭め得る。例えば、接続領域 236 は、様々な異なるジオメトリ (例えば、接続領域を面取りする、接続領域に勾配を付ける) を使用して基端開口部と先端開口部との間で狭め得る。更に、接続領域 236 の任意の部分又はサブ部分を狭め得る (例えば、基端開口部 234 に隣接する接続領域の部分)。

30

【0298】

[00360] 図 2D ~ 2F は、図 1A の各マイクロ流体デバイス 100、回路 132、及びチャネル 134 の変形であるマイクロ流体回路 262 及びフローチャネル 264 を含むマイクロ流体デバイス 250 の別の例示的な実施形態を示す。マイクロ流体デバイス 250 は、上述した隔離ペン 124、126、128、130、224、226、又は 228 の追加の変形である複数の隔離ペン 266 も有する。特に、図 2D ~ 2F に示されるデバイス 400 の隔離ペン 266 をデバイス 100、200、230、280、290、300、700、800、1000 での上述した隔離ペン 124、126、128、130、224、226、又は 228 のいずれかで置換可能なことを理解されたい。同様に、マイクロ流体デバイス 250 は、マイクロ流体デバイス 100 の別の変形であり、上述したマイクロ流体デバイス 100、200、230、280、290、300、700、800、1000 と同じ又は異なる DEP 構成及び本明細書に記載される任意の他のマイクロ流体システム構成要素を有することもできる。

40

【0299】

[00361] 図 2D ~ 2F のマイクロ流体デバイス 250 は、支持構造体 (図 2D ~ 2F では見えないが、図 1A に示されるデバイス 100 の支持構造体 104 と同じ又は概して同様であり得る)、マイクロ流体回路構造 256、及びカバー (図 2D ~ 2F では見えないが、図 1A に示されるデバイス 100 のカバー 122 と同じ又は概して同様であり得る

50

）を含む。マイクロ流体回路構造 262 は枠 252 及びマイクロ流体回路材料 260 を含み、これらは図 1A に示されるデバイス 100 の枠 114 及びマイクロ流体回路材料 116 と同じ又は概して同様であり得る。図 2D に示されるように、マイクロ流体回路材料 260 により画定されるマイクロ流体回路 262 は複数のチャンネル 264（2 つが示されるが、より多くのチャンネルがあり得る）を含むことができ、チャンネル 264 に複数の隔離ペン 266 が流体接続される。

【0300】

[00362] 各隔離ペン 266 は、分離構造 272、分離構造 272 内の分離領域 270、及び接続領域 268 を含むことができる。マイクロ流体チャンネル 264 の基端開口部 274 から分離構造 272 での先端開口部 276 まで、接続領域 268 はマイクロ流体チャンネル 264 を分離領域 270 に流体接続する。一般に、図 2B 及び図 2C の上記考察によれば、チャンネル 264 内の第 1 の流体培地 254 のフロー 278 は、マイクロ流体チャンネル 264 から隔離ペン 266 の各接続領域 268 内及び / 又は外への第 1 の培地 254 の 2 次フロー 282 をもたらすことができる。

【0301】

[00363] 図 2E に示されるように、各隔離ペン 266 の接続領域 268 は、一般に、チャンネル 264 の基端開口部 274 と分離構造 272 の先端開口部 276 との間に延びるエリアを含む。接続領域 268 の長さ L_{con} は、2 次フロー 282 の最大侵入深さ D_p よりも大きい値であり得、その場合、2 次フロー 282 は、分離領域 270 に向かってリダイレクトされずに接続領域 268 内に延びる（図 2D に示されるように）。代替的に、図 2F に示されるように、接続領域 268 は、最大侵入深さ D_p よりも小さい長さ L_{con} を有することができ、その場合、2 次フロー 282 は、接続領域 268 を通って延び、分離領域 270 に向かってリダイレクトされる。この後者の状況では、接続領域 268 の長さ L_{c1} 及び L_{c2} との和は最大侵入深さ D_p よりも大きく、したがって、2 次フロー 282 は分離領域 270 内に延びない。接続領域 268 の長さ L_{con} が侵入深さ D_p よりも大きいとか否か又は接続領域 268 の長さ L_{c1} 及び L_{c2} の和が侵入深さ D_p よりも大きいとか否かに関係なく、最大速度 V_{max} を超えないチャンネル 264 内の第 1 の培地 254 のフロー 278 は、侵入深さ D_p を有する 2 次フローをもたらし、隔離ペン 266 の分離領域 270 内の微小物体（示されていないが、図 2C に示される微小物体 246 と同じ又は概して同様であり得る）は、チャンネル 264 内の第 1 の培地 254 のフロー 278 により分離領域 270 外に引き出されない。チャンネル 264 内のフロー 278 は、様々な材料（図示せず）もチャンネル 264 から隔離ペン 266 の分離領域 270 内に引き込まない。したがって、マイクロ流体チャンネル 264 内の第 1 の培地 254 内の成分をマイクロ流体チャンネル 264 から隔離ペン 266 の分離領域 270 内の第 2 の培地 258 内に移動させることができる唯一の機構は、拡散である。同様に、隔離ペン 266 の分離領域 270 内の第 2 の培地 258 内の成分を分離領域 270 からマイクロ流体チャンネル 264 内の第 1 の培地 254 内に移動させることができる唯一の機構も拡散である。第 1 の培地 254 は第 2 の培地 258 と同じ培地であり得、又は第 1 の培地 254 は第 2 の培地 258 と異なる培地であり得る。代替的に、第 1 の培地 254 及び第 2 の培地 258 は、同じ培地から始まり、例えば、分離領域 270 内の 1 つ以上の細胞により又はマイクロ流体チャンネル 264 を通って流れる培地を変更することにより、第 2 の培地を調整することを通して異なるようになることができる。

【0302】

[00364] 図 4B に示されるように、マイクロ流体チャンネル 264 内のマイクロ流体チャンネル 264 の幅 W_{ch} （すなわち、図 2D において矢印 278 で示されるマイクロ流体チャンネルを通る流体培地フローの方向を横断してとられる）は、基端開口部 274 の幅 W_{con1} に略直交することができ、したがって、先端開口部 276 の幅 W_{con2} に略平行であり得る。しかし、基端開口部 274 の幅 W_{con1} 及び先端開口部 276 の幅 W_{con2} は、互いと略直交する必要はない。例えば、基端開口部 274 の幅 W_{con1} が向けられる軸（図示せず）と、先端開口部 276 の幅 W_{con2} が向けられる別の軸との間の角度は、

直交以外であり得、したがって、 90° 以外であり得る。代替的に向けられる角度の例としては、角度：約 30° ～約 90° 、約 45° ～約 90° 、約 60° ～約 90° 等を含む。

【0303】

[00365] 隔離ペンの様々な実施形態（例えば、124、126、128、130、224、226、228、又は266）では、分離領域（例えば、240又は270）は、複数の微小物体を含むように構成される。他の実施形態では、分離領域は、1つのみ、2つ、3つ、4つ、5つ、又は同様の相対的に少数の微小物体を含むように構成され得る。したがって、分離領域の容積は、例えば、少なくとも 1×10^6 立方 μm 、少なくとも 2×10^6 立方 μm 、少なくとも 4×10^6 立方 μm 、少なくとも 6×10^6 立方 μm 、又はこれを超える大きさであり得る。

10

【0304】

[00366] 隔離ペンの様々な実施形態では、基端開口部（例えば、234）でのマイクロ流体チャネル（例えば、122）の幅 W_{ch} は、約 $50 \sim 1000 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 500 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 400 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 300 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 250 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 200 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 150 \mu\text{m}$ 、 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 500 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 400 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 300 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 250 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 200 \mu\text{m}$ 、 $70 \sim 150 \mu\text{m}$ 、 $90 \sim 400 \mu\text{m}$ 、 $90 \sim 300 \mu\text{m}$ 、 $90 \sim 250 \mu\text{m}$ 、 $90 \sim 200 \mu\text{m}$ 、 $90 \sim 150 \mu\text{m}$ 、 $100 \sim 300 \mu\text{m}$ 、 $100 \sim 250 \mu\text{m}$ 、 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 、 $100 \sim 150 \mu\text{m}$ 、又は $100 \sim 120 \mu\text{m}$ であり得る。幾つかの他の実施形態では、基端開口（例えば234）におけるマイクロ流体チャネル（例えば122）の幅 W_{ch} は、約 $200 \sim 800$ ミクロン、 $200 \sim 700$ ミクロン、又は $200 \sim 600$ ミクロンであり得る。上記は単なる例であり、マイクロ流体チャネル122の幅 W_{ch} は、上記列挙される任意の終点内の幅であることもできる。更に、マイクロ流体チャネル122の幅 W_{ch} は、隔離ペンの基端開口部以外のマイクロ流体チャネルの領域で、これらの任意の幅内であるように選択することができる。

20

【0305】

[00367] 幾つかの実施形態では、隔離ペンは、約 $30 \sim 200$ ミクロン又は約 $50 \sim 150$ ミクロンの高さを有する。幾つかの実施形態では、隔離ペンは、約 $1 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ 平方ミクロン、 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^6$ 平方ミクロン、 $4 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ 平方ミクロン、 $2 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 平方ミクロン、 $2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 平方ミクロン、又は約 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 平方ミクロンの断面積を有する。

30

【0306】

[00368] 隔離ペンの様々な実施形態では、基端開口部（例えば、234）でのマイクロ流体チャネル（例えば、122）の高さ H_{ch} は、以下の任意の高さ内の高さであり得る： $20 \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $20 \sim 90 \mu\text{m}$ 、 $20 \sim 80 \mu\text{m}$ 、 $20 \sim 70 \mu\text{m}$ 、 $20 \sim 60 \mu\text{m}$ 、 $20 \sim 50 \mu\text{m}$ 、 $30 \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $30 \sim 90 \mu\text{m}$ 、 $30 \sim 80 \mu\text{m}$ 、 $30 \sim 70 \mu\text{m}$ 、 $30 \sim 60 \mu\text{m}$ 、 $30 \sim 50 \mu\text{m}$ 、 $40 \sim 100 \mu\text{m}$ 、 $40 \sim 90 \mu\text{m}$ 、 $40 \sim 80 \mu\text{m}$ 、 $40 \sim 70 \mu\text{m}$ 、 $40 \sim 60 \mu\text{m}$ 、又は $40 \sim 50 \mu\text{m}$ 。上記は単なる例であり、マイクロ流体チャネル（例えば、122）の高さ H_{ch} は、上記列挙される任意の終点内の高さであることもできる。マイクロ流体チャネル122の高さ H_{ch} は、隔離ペンの基端開口部以外のマイクロ流体チャネルの領域で、これらの任意の高さ内であるように選択することができる。

40

【0307】

[00369] 隔離ペンの様々な実施形態では、基端開口部（例えば、234）でのマイクロ流体チャネル（例えば、122）の断面積は、約 $500 \sim 50,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 40,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 30,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 25,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 20,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 15,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 10,000$ 平方 μm 、 $500 \sim 7,500$ 平方 μm 、 $500 \sim 5,000$ 平方 μm 、 $1,000 \sim 25,000$ 平方 μm 、 $1,000 \sim 20,000$ 平方 μm 、 $1,000 \sim 15,000$ 平方 μm 、 $1,000 \sim 10,000$ 平方 μm 、 $1,000 \sim 7,500$ 平方 μm 、

50

1, 000 ~ 5, 000 平方 μm 、2, 000 ~ 20, 000 平方 μm 、2, 000 ~ 15, 000 平方 μm 、2, 000 ~ 10, 000 平方 μm 、2, 000 ~ 7, 500 平方 μm 、2, 000 ~ 6, 000 平方 μm 、3, 000 ~ 20, 000 平方 μm 、3, 000 ~ 15, 000 平方 μm 、3, 000 ~ 10, 000 平方 μm 、3, 000 ~ 7, 500 平方 μm 、又は 3, 000 ~ 6, 000 平方 μm であり得る。上記は単なる例であり、基端開口部（例えば、234）でのマイクロ流体チャネル（例えば、122）の断面積は、上記列挙される任意の終点内の任意の領域であることもできる。

【0308】

【00370】 隔離ペンの様々な実施形態では、接続領域（例えば、236）の長さ L_{con} は、約 1 ~ 600 μm 、5 ~ 550 μm 、10 ~ 500 μm 、15 ~ 400 μm 、20 ~ 300 μm 、20 ~ 500 μm 、40 ~ 400 μm 、60 ~ 300 μm 、80 ~ 200 μm 、又は約 100 ~ 150 μm であり得る。上記は単なる例であり、接続領域（例えば、236）の長さ L_{con} は、上記列挙される任意の終点内の任意の長さであることもできる。

10

【0309】

【00371】 隔離ペンの様々な実施形態では、基端開口部（例えば、234）での接続領域（例えば、236）の幅 W_{con} は、約 20 ~ 500 μm 、20 ~ 400 μm 、20 ~ 300 μm 、20 ~ 200 μm 、20 ~ 150 μm 、20 ~ 100 μm 、20 ~ 80 μm 、20 ~ 60 μm 、30 ~ 400 μm 、30 ~ 300 μm 、30 ~ 200 μm 、30 ~ 150 μm 、30 ~ 100 μm 、30 ~ 80 μm 、30 ~ 60 μm 、40 ~ 300 μm 、40 ~ 200 μm 、40 ~ 150 μm 、40 ~ 100 μm 、40 ~ 80 μm 、40 ~ 60 μm 、50 ~ 250 μm 、50 ~ 200 μm 、50 ~ 150 μm 、50 ~ 100 μm 、50 ~ 80 μm 、60 ~ 200 μm 、60 ~ 150 μm 、60 ~ 100 μm 、60 ~ 80 μm 、70 ~ 150 μm 、70 ~ 100 μm 、又は 80 ~ 100 μm であり得る。上記は単なる例であり、基端開口部（例えば、234）の接続領域（例えば、236）の幅 W_{con} は、上記例と異なることができる（例えば、上記列挙される任意の終点により定義される任意の値）。

20

【0310】

【00372】 隔離ペンの種々の実施形態では、基端開口（例えば 234）における接続領域（例えば 236）の幅 W_{con} は、隔離ペンで意図される微小物体（例えば、T 細胞、B 細胞、又は卵細胞若しくは胚であり得る生体細胞）の最大寸法と少なくとも同程度であり得る。上記は単なる例にすぎず、基端開口（例えば 234）における接続領域（例えば 236）の幅 W_{con} は上記の例と異なり得る（例えば、以上に列挙した端点のいずれかの範囲内の幅）。

30

【0311】

隔離ペンの種々の実施形態では、接続領域の基端開口の幅 W_{pr} は、隔離ペンで意図される微小物体（例えば、細胞等の生物学的微小物体）の最大寸法と少なくとも同程度であり得る。例えば、幅 W_{pr} は、約 50 μm 、約 60 μm 、約 100 μm 、約 200 μm 、約 300 μm であり得るか、又は約 50 ~ 300 μm 、約 50 ~ 200 μm 、約 50 ~ 100 μm 、約 75 ~ 150 μm 、約 75 ~ 100 μm 、若しくは約 200 ~ 300 μm であり得る。

40

【0312】

隔離ペンの種々の実施形態では、接続領域（例えば 236）の長さ L_{con} と基端開口 234 における接続領域（例えば 236）の幅 W_{con} との比は、次の比のいずれか以上、すなわち、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、又はそれ以上であり得る。上記は単なる例にすぎず、接続領域 236 の長さの L_{con} と基端開口 234 における接続領域 236 の幅 W_{con} との比は、上記の例と異なり得る。

【0313】

【00375】 マイクロ流体デバイス 100、200、23、250、280、290、3

50

00、700、800、1000の種々の実施形態では、 V_{max} は、0.2、0.5、0.7、1.0、1.3、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.7、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10、11、12、13、14、又は15マイクロリットル/secの近傍に設定可能である。

【0314】

【00376】 隔離ペンを有するマイクロ流体デバイスの種々の実施形態では、隔離ペンの分離領域（例えば240）の容積は、例えば、少なくとも 5×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 6×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 又は 8×10^8 立方 μm 、又はそれ以上であり得る。隔離ペンを有するマイクロ流体デバイスの種々の実施形態では、隔離ペンの容積は、約 5×10^5 、 6×10^5 、 8×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 8×10^6 、 1×10^7 、 3×10^7 、 5×10^7 、又は約 8×10^7 立方 μm 、又はそれ以上であり得る。幾つかの他の実施形態では、隔離ペンの容積は、約1ナノリットル～約50ナノリットル、2ナノリットル～約25ナノリットル、2ナノリットル～約20ナノリットル、約2ナノリットル～約15ナノリットル、又は約2ナノリットル～約10ナノリットルであり得る。

【0315】

【00377】 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスは、本明細書で考察される実施形態のいずれかで構成される隔離ペンを有する。この場合、マイクロ流体デバイスは、約5～約10の隔離ペン、約10～約50の隔離ペン、約100～約500の隔離ペン、約200の～約1000の隔離ペン、約500～約1500の隔離ペン、約1000～約2000の隔離ペン、約1000～約3500の隔離ペン、約3000～約7000の隔離ペン、約5000～約10,000の隔離ペン、約9,000～約15,000の隔離ペン、又は約12,000～約20,000の隔離ペンを有する。隔離ペンは全て同一のサイズである必要はなく、様々な構成（例えば、異なる幅、隔離ペン内の異なる特徴）を含み得る。

【0316】

【00378】 図2Gは、一実施形態によるマイクロ流体デバイス280を示す。マイクロ流体デバイス280は図2Gに示され、マイクロ流体デバイス100の定型化された図である。実際には、マイクロ流体デバイス280及びその構成回路要素（例えば、チャンネル122及び隔離ペン128）は本明細書で考察された寸法を有する。図2Gに示されるマイクロ流体回路120は、2つのポート、4つの別個のチャンネル122、及び4つの別個の流路106を有する。マイクロ流体デバイス280は、各チャンネル122に通じる複数の隔離ペンを更に含む。図2Gに示されるマイクロ流体デバイスでは、隔離ペンは、図2Cに示されるペンと同様のジオメトリを有し、したがって、接続領域及び分離領域の両方を有する。したがって、マイクロ流体回路120は、掃引領域（例えば、チャンネル122及び2次フロー244の最大侵入深さ D_p 内の接続領域236の部分）及び非掃引領域（例えば、分離領域240及び2次フロー244の最大侵入深さ D_p にない接続領域236の部分）の両方を含む。

【0317】

【00379】 図3A～3Bは、本発明によるマイクロ流体デバイス（例えば、100、200、230、250、280、290、300、700、800、1000）を動作させるため及び観測のために使用することができるシステム150の様々な実施形態を示す。図3Aに示されるように、システム150は、マイクロ流体デバイス100（図示せず）又は本明細書に記載される任意の他のマイクロ流体デバイスを保持するように構成された構造体（「ネスト」）300を含むことができる。ネスト300は、マイクロ流体デバイス320（例えば、光学的に作動される動電学的デバイス100）と界面を接することができ、電源192からマイクロ流体デバイス320への電気接続を提供することができるソケット302を含むことができる。ネスト300は、一体型電気信号生成サブシステム304を更に含むことができる。電気信号生成サブシステム304は、マイクロ流体デバイス320がソケット302により保持されているとき、バイアス電圧がマイクロ流体

デバイス 320 内の電極の対にわたり印加されるように、バイアス電圧をソケット 302 に供給するように構成され得る。したがって、電気信号生成サブシステム 304 は電源 192 の部分であり得る。バイアス電圧をマイクロ流体デバイス 320 に印加する能力は、マイクロ流体デバイス 320 がソケット 302 により保持されている場合には常にバイアス電圧が印加されることを意味しない。むしろ、大半の場合、バイアス電圧は、断続的に、例えば、マイクロ流体デバイス 320 内での電気泳動又は電子ウェットング等の動電力の生成を促進するために必要な場合にのみ印加される。

【0318】

[00380] 図 3A に示されるように、ネスト 300 は、プリント回路基板組立体 (PCBA) 322 を含むことができる。電気信号生成サブシステム 304 は、PCBA 322 に搭載され、PCBA 322 に電氣的に集積することができる。例示的な担体は、同様に PCBA 322 に搭載されるソケット 302 も含む。

10

【0319】

[00381] 通常、電気信号生成サブシステム 304 は波形生成器 (図示せず) を含む。電気信号生成サブシステム 304 は、波形生成器から受信される波形を増幅するように構成されたオシロスコープ (図示せず) 及び / 又は波形増幅回路 (図示せず) を更に含むことができる。オシロスコープは、存在する場合、ソケット 302 により保持されるマイクロ流体デバイス 320 に供給される波形を測定するように構成され得る。特定の実施形態では、オシロスコープは、マイクロ流体デバイス 320 の基端位置 (及び波形生成器の先端位置) において波形を測定し、それにより、デバイスに実際に印加されている波形を測定するに当たりより大きい精度を保証する。オシロスコープ測定から得られるデータは、例えば、フィードバックとして波形生成器に提供され得、波形生成器は、そのようなフィードバックに基づいて出力を調整するように構成され得る。適する結合された波形生成器及びオシロスコープの例は、Red Pitaya (商標) である。

20

【0320】

[00382] 特定の実施形態では、ネスト 300 は、電気信号生成サブシステム 304 の検知及び / 又は制御に使用される、マイクロプロセッサ等のコントローラ 308 を更に含む。適するマイクロプロセッサの例としては、Arduino Nano (商標) 等の Arduino (商標) マイクロプロセッサが挙げられる。コントローラ 308 を使用して機能及び分析を実行し、又は外部マスタコントローラ 154 (図 1A に示される) と通信して機能及び分析を実行し得る。図 3A に示される実施形態では、コントローラ 308 は、インタフェース 310 (例えば、プラグ又はコネクタ) を通してマスタコントローラ 154 と通信する。

30

【0321】

[00383] 幾つかの実施形態では、ネスト 300 は、Red Pitaya (商標) 波形生成器 / オシロスコープユニット (「Red Pitaya ユニット」) を含む電気信号生成サブシステム 304 と、Red Pitaya ユニットにより生成された波形を増幅し、増幅電圧をマイクロ流体デバイス 100 に渡す波形増幅回路とを含むことができる。幾つかの実施形態では、Red Pitaya ユニットは、マイクロ流体デバイス 320 での増幅電圧を測定し、次に、マイクロ流体デバイス 320 での測定電圧が所望の値であるように、必要に応じてそれ自体の出力電圧を調整するように構成される。幾つかの実施形態では、波形増幅回路は、PCBA 322 に搭載される DC - DC コンバータの対により生成される +6.5V ~ -6.5V 電源を有することができ、その結果、マイクロ流体デバイス 100 において 13Vpp までの信号が生成される。

40

【0322】

[00384] 図 3A に示されるように、支持構造体 300 (例えば、ネスト) は、熱制御サブシステム 306 を更に含むことができる。熱制御サブシステム 306 は、ネスト 300 により保持されるマイクロ流体デバイス 320 の温度を調整するように構成され得る。例えば、熱制御サブシステム 306 は、ペルチェ熱電デバイス (図示せず) 及び冷却ユニット (図示せず) を含むことができる。ペルチェ熱電デバイスは、マイクロ流体デバイス 320 の少なくとも 1 つの表面と界面を接するように構成された第 1 の表面を有すること

50

ができる。冷却ユニットは、例えば、液冷アルミニウムブロック等の冷却ブロック（図示せず）であり得る。ペルチェ熱電デバイスの第２の表面（例えば、第１の表面とは逆の表面）は、そのような冷却ブロックの表面と界面を接するように構成され得る。冷却ブロックは、冷却ブロックを通して冷却流体を循環させるように構成された流体路３１４に接続することができる。図３Ａに示される実施形態では、支持構造体３００は、流入口３１６及び流出口３１８を含む、外部リザーバ（図示せず）から冷却された流体を受け取り、冷却された流体を流体路３１４に導入し、冷却ブロックを通し、次に、冷却された流体を外部リザーバに戻す。幾つかの実施形態では、ペルチェ熱電デバイス、冷却ユニット、及び／又は流体路３１４は、支持構造体３００のケース３１２に搭載することができる。幾つかの実施形態では、熱制御サブシステム３０６は、ペルチェ熱電デバイスの温度を調整して、マイクロ流体デバイス３２０の標的温度を達成するように構成される。ペルチェ熱電デバイスの温度調整は、例えば、Pololu（商標）熱電電源（Pololu Robotics and Electronics Corp.）等の熱電電源により達成することができる。熱制御サブシステム３０６は、アナログ回路により提供される温度値等のフィードバック回路を含むことができる。代替的に、フィードバック回路はデジタル回路により提供され得る。

【０３２３】

[00385] 幾つかの実施形態では、ネスト３００は、抵抗（例えば、抵抗１ｋオーム＋／－０．１％、温度係数＋／－０．０２ppm／℃）及びNTCサーミスタ（例えば、公称抵抗１ｋオーム＋／－０．０１％を有する）を含むアナログ分圧回路（図示せず）であるフィードバック回路を有する熱制御サブシステム３０６を含むことができる。幾つかの場合、熱制御サブシステム３０６は、フィードバック回路からの電圧を測定し、次に、計算された温度値をオンボードPID制御ループアルゴリズムへの入力として使用する。PID制御ループアルゴリズムからの出力は、例えば、Pololu（商標）モーター駆動デバイス（図示せず）上の方向信号及びパルス幅変調信号ピンの両方を駆動して熱電電源を作動させることができ、それにより、ペルチェ熱電デバイスを制御する。

【０３２４】

[00386] ネスト３００はシリアルポート３２４を含むことができ、シリアルポート３２４により、コントローラ３０８のマイクロプロセッサは、インタフェース３１０（図示せず）を介して外部マスタコントローラ１５４と通信することができる。加えて、コントローラ３０８のマイクロプロセッサは、電気信号生成サブシステム３０４及び熱制御サブシステム３０６と通信することができる（例えば、Plinkツール（図示せず）を介して）。したがって、コントローラ３０８、インタフェース３１０、及びシリアルポート３２４の組合せを介して、電気信号生成サブシステム３０４及び熱制御サブシステム３０６は、外部マスタコントローラ１５４と通信することができる。このようにして、マスタコントローラ１５４は、特に、出力電圧調整のためにスケーリング計算を実行することにより電気信号生成サブシステム３０４を支援することができる。外部マスタコントローラ１５４に結合された表示デバイス１７０を介して提供されるグラフィカルユーザインタフェース（GUI）（図示せず）は、熱制御サブシステム３０６及び電気信号生成サブシステム３０４からそれぞれ得られる温度データ及び波形データをプロットするように構成され得る。代替的に又は追加として、GUIは、コントローラ３０８、熱制御サブシステム３０６、及び電気信号生成サブシステム３０４への更新を可能にすることができる。

【０３２５】

[00387] 上述したように、システム１５０は撮像デバイスを含むことができる。幾つかの実施形態では、撮像デバイスは光変調サブシステム３３０を含む。光変調サブシステム３３０は、デジタルミラーデバイス（DMD）又はマイクロシャッターアレイシステム（MSA）を含むことができ、これらのいずれかは、光源３３２から光を受け取り、受け取った光のサブセットを顕微鏡３５０の光学縦列に送るように構成され得る。代替的に、光変調サブシステム３３０は、有機発行ダイオードディスプレイ（OLED）、液晶オンシリコン（LCOS）デバイス、強誘電性液晶オンシリコンデバイス（FLCOS）、又は透過型液晶ディスプレイ（LCD）等のそれ自体の光を生成する（したがって、光源３３

10

20

30

40

50

2の必要性をなくす)デバイスを含むことができる(図3Bを参照)。光変調サブシステム330は、例えば、プロジェクタであり得る。したがって、光変調サブシステム330は、構造化光及び非構造化光の両方を発することが可能であり得る。特定の実施形態では、システム150の撮像モジュール164及び/又は原動モジュール162は、光変調サブシステム330を制御することができる。

【0326】

[00388] 特定の実施形態では、撮像デバイスは顕微鏡350を更に含む。そのような実施形態では、ネスト300及び光変調サブシステム330は、顕微鏡350に搭載されるように個々に構成され得る。顕微鏡350は、例えば、標準の研究等級の光学顕微鏡又は蛍光顕微鏡であるように構成され得る。したがって、ネスト300は、顕微鏡350のステージ344に搭載するように構成され得、及び/又は光変調サブシステム330は、顕微鏡350のポートに搭載されるように構成され得る。他の実施形態では、本明細書に記載されるネスト300及び光変調サブシステム330は、顕微鏡350の一体構成要素であり得る。

【0327】

[00389] 特定の実施形態では、顕微鏡350は1つ以上の検出器348を更に含むことができる。幾つかの実施形態では、検出器348は撮像モジュール164により制御される。検出器348は、接眼レンズ、電荷結合素子(CCD)、カメラ(例えば、デジタルカメラ)、又はそれらの任意の組合せを含むことができる。少なくとも2つの検出器348が存在する場合、1つの検出器は、例えば、高速フレームレートカメラであり得、一方、他の検出器は高感度カメラであり得る。更に、顕微鏡350は、マイクロ流体デバイス320から反射された光及び/又は発せられた光を受け取り、反射光及び/又は放射光の少なくとも部分を1つ以上の検出器348に結像するように構成された光学縦列を含むことができる。顕微鏡の光学縦列は、各検出器での最終倍率が異なることができるように、異なる検出器で異なるチューブレンズ(図示せず)を含むこともできる。

【0328】

[00390] 特定の実施形態では、撮像デバイスは、少なくとも2つの光源を使用するように構成される。例えば、第1の光源332は構造化光の生成(例えば、光変調サブシステム330を介した)に使用することができ、第2の光源334は非構造化光の提供に使用することができる。第1の光源332は、光学的に作動される動電学的及び/又は蛍光励起のために構造化光を生成することができ、第2の光源334は、明視野照明の提供に使用することができる。これらの実施形態では、原動モジュール164を使用して第1の光源332を制御することができ、撮像モジュール164を使用して第2の光源334を制御することができる。顕微鏡350の光学縦列は、(1)デバイスがネスト300により保持されているとき、構造化光を光変調サブシステム330から受け取り、構造化光を光学作動式動電学的デバイス等のマイクロ流体デバイス内の少なくとも第1の領域で結像し、(2)マイクロ流体デバイスから反射された光及び/又は発せられた光を受け取り、そのような反射光及び/又は放射光の少なくとも部分を検出器348上に結像するように構成され得る。光学縦列は、デバイスがネスト300により保持されているとき、非構造化光を第2の光源から受け取り、非構造化光をマイクロ流体デバイスの少なくとも第2の領域で結像するように更に構成され得る。特定の実施形態では、マイクロ流体デバイスの第1及び第2の領域は重複領域であり得る。例えば、第1の領域は第2の領域のサブセットであり得る。他の実施形態では、第2の光源334は、追加的又は代替的に、任意の好適な波長の光を有し得るレーザーを含み得る。図3Bに示される光学システムの図は模式図にすぎず、光学システムは、追加のフィルタ、ノッチフィルタ、レンズ等を含み得る。第2の光源334が明視野及び/又は蛍光励起更にはレーザー照明のための1つ以上の光源を含む場合、光源の物理的構成は、図3Bに示されるものと異なり得ると共に、レーザー照明は、光学システム内の任意の好適な物理的位置に導入し得る。光源334及び光源332/光変調サブシステム330の模式的な位置は、同様に交換し得る。

【0329】

[00391] 図3Bでは、光を光変調サブシステム330に供給している第1の光源332が示されており、光変調サブシステム330は構造化光をシステム355（図示せず）の顕微鏡350の光学縦列に提供する。ビームスプリッタ336を介して非構造化光を光学縦列に提供している第2の光源334が示される。光変調サブシステム330からの構造化光及びに示されるように、第2の光源334からの非構造化光は、ビームスプリッタ336から光学縦列を通過して一緒に移動して、第2のビームスプリッタ（又は光変調サブシステム330により提供される光に応じて、ダイクロイックフィルタ338）に到達し、ここで、光は反射し、対物レンズ336を通して試料面342まで下がる。次に、試料面342からの反射光及び／又は放射光は再び対物レンズ340を通過して移動し、ビームスプリッタ及び／又はダイクロイックフィルタ338を通り、ダイクロイックフィルタ346に到達する。ダイクロイックフィルタ346に達する光の一部のみが透過され、検出器348に到達する。

10

【0330】

[00392] 幾つかの実施形態では、第2の光源334は青色光を発する。適切なダイクロイックフィルタ346を用いて、試料面342から反射された青色光は、ダイクロイックフィルタ346を透過し、検出器348に到達することが可能である。これとは対照的に、光変調サブシステム330から来る構造化光は、試料面342で反射されるが、ダイクロイックフィルタ346を透過しない。この例では、ダイクロイックフィルタ346は、495nmよりも長い波長を有する可視光を濾波して除外する。光変調サブシステム330からの光のそのような濾波は、光変調サブシステムから発せられる光が495nmよりも短いかなる波長も含まない場合にのみ完了する（示されるように）。実際には、光変調サブシステム330から来る光が495nmよりも短い波長（例えば、青色波長）を含む場合、光変調サブシステムからの光の幾らかがフィルタ346を透過して検出器348に到達する。そのような実施形態では、フィルタ346は、第1の光源332から検出器348に到達する光の量と第2の光源334から検出器348に到達する光の量とのバランスを変更する役割を果たす。これは、第1の光源332が第2の光源334よりもはるかに強力な場合、有益であり得る。他の実施形態では、第2の光源334は、赤色光を発することができ、ダイクロイックフィルタ346は、赤色光以外の可視光（例えば、650nmよりも短い波長を有する可視光）を濾波して除外することができる。

20

【0331】

[00393] コーティング溶液及びコーティング剤。理論により限定することを意図するものではないが、マイクロ流体デバイスとその中に維持された生物学的微小物体との間に主要なインタフェースを提供する有機分子及び／又は親水性分子の層を呈するようにマイクロ流体デバイスの少なくとも1つ以上の内面が調整又はコーティングされている場合、マイクロ流体デバイス（例えば、DEP構成及び／又はEW構成のマイクロ流体デバイス）内の生物学的微小物体（例えば、生体細胞）の維持は容易であり得る（すなわち、生物学的微小物体は、マイクロ流体デバイス内で向上した生存能、より大量の増殖、及び／又はより向上した可搬性を呈する）。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの内面（例えば、DEP構成マイクロ流体デバイスの電極活性化基板の内面、マイクロ流体デバイスのカバーの内面、及び／又は回路材料の表面）の1つ以上は、有機分子及び／又は親水性分子の所望の層を生成するようにコーティング溶液及び／又はコーティング剤で処理又は改質し得る。

30

40

【0332】

[00394] コーティングは、生物学的微小物体の導入前又は導入後に施してもよいし、生物学的微小物体と同時に導入してもよい。幾つかの実施形態では、生物学的微小物体は、1つ以上のコーティング剤を含む流体培地に入れてマイクロ流体デバイスに搬入し得る。他の実施形態では、マイクロ流体デバイス（例えば、DEP構成マイクロ流体デバイス）の内面は、マイクロ流体デバイスへの生物学的微小物体の導入前にコーティング剤を含むコーティング溶液で処理又は「プライミング」される。

【0333】

50

【00395】 幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの少なくとも1つの表面は、生物学的微小物体の維持及び／又は増殖に好適な有機分子及び／又は親水性分子の層を提供する（例えば、以下に記載の調整された表面を提供する）コーティング材料を含む。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの内面は実質的に全て、コーティング材料を含む。コーティングされた内面は、フロー領域（例えばチャンネル）、チャンバ、若しくは隔離ペンの表面又はそれらの組合せを含み得る。幾つかの実施形態では、複数の隔離ペンのそれぞれは、コーティング材料でコーティングされた少なくとも1つの内面を有する。他の実施形態では、複数のフロー領域又はチャンネルのそれぞれは、コーティング材料でコーティングされた少なくとも1つの内面を有する。幾つかの実施形態では、複数の隔離ペンのそれぞれ及び複数のチャンネルのそれぞれの少なくとも1つの内面は、コーティング材

10

【0334】

【00396】 コーティング剤／溶液。限定されるものではないが、血清又は血清因子、ウシ血清アルブミン（BSA）、ポリマー、界面活性剤、酵素、及びそれらの任意の組合せをはじめとする任意の便利なコーティング剤／コーティング溶液を使用可能である。

【0335】

【00397】 ポリマー系コーティング材料。少なくとも1つの内面は、ポリマーを含むコーティング材料を含み得る。ポリマーは、少なくとも1つの表面に共有結合又は非共有結合し得る（又は非特異的に付着し得る）。ポリマーは、ブロックポリマー（及びコポリマー）、スターポリマー（スターコポリマー）、及びグラフトポリマー又はコムポリマー（グラフトコポリマー）に見られるような様々な構造モチーフを有し得ると共に、それらは全て、本明細書に開示される方法に好適であり得る。

20

【0336】

【00398】 ポリマーは、アルキレンエーテル部分を含むポリマーを含み得る。広範囲のアルキレンエーテル含有ポリマーが、本明細書に記載されるマイクロ流体デバイスでの使用に適し得る。アルキレンエーテル含有ポリマーの非限定的で例示的なクラスは、ポリマー鎖内で異なる比率及び異なる場所にあるポリエチレンオキシド（PEO）サブユニット及びポリプロピレンオキシド（PPO）サブユニットのブロックを含む両親媒性非イオンブロックコポリマーである。Pluronic（登録商標）ポリマー（BASF）は、このタイプのブロックコポリマーであり、生細胞と接触する場合の使用に適することが当技術分野で既知である。ポリマーは、平均分子質量 M_W で、約2000Da～約20KDaの範囲であり得る。幾つかの実施形態では、PEO-PPOブロックコポリマーは、約10よりも大きい（例えば、12～18）の親水性親油性バランス（HLB）を有することができる。コーティングされた表面をもたらしのに有用な特定のPluronic（登録商標）ポリマーは、Pluronic（登録商標）L44、L64、P85、及びF127（F127NFを含む）を含む。別のクラスのアルキレンエーテル含有ポリマーは、ポリエチレングリコール（PEG $M_W < 100,000$ Da）又は代替的にポリエチレンオキシド（PEO、 $M_W > 100,000$ Da）である。幾つかの実施形態では、PEGは約1000Da、5000Da、10,000Da、又は20,000Daの M_W を有し得る。

30

【0337】

【00399】 他の実施形態では、コーティング材料は、カルボン酸部分を含むポリマーを含み得る。カルボン酸サブユニットは、アルキル、アルケニル、又は芳香族部分含有サブユニットであり得る。非限定的な一例はポリ乳酸（PLA）である。他の実施形態では、コーティング材料は、ポリマー骨格の末端又はポリマー骨格からのペンダントのいずれかにリン酸部分を含有するポリマーを含み得る。更に他の実施形態では、コーティング材料は、スルホン酸部分を含有するポリマーを含み得る。スルホン酸サブユニットは、アルキル部分、アルケニル部分、又は芳香族部分を含有するサブユニットであり得る。限定されるものではないが一例は、ポリスチレンスルホン酸（PSSA）又はポリアネートールスルホン酸である。更なる実施形態では、コーティング材料は、アミン部分を含むポリマーを含み得る。ポリアミノポリマーは、天然ポリアミンポリマー又は合成ポリアミンポリマー

40

50

を含み得る。天然ポリアミンの例としては、スペルミン、スペルミジン、及びブトレシンが挙げられる。

【0338】

[00400] 他の実施形態では、コーティング材料は、糖部分を含有するポリマーを含み得る。限定されるものではないが例として、キサンタンガムやデキストラン等の多糖は、マイクロ流体デバイスにおいて細胞固着を低減又は防止し得る材料を形成するのに好適であり得る。例えば、約3 kDaのサイズを有するデキストランポリマーは、マイクロ流体デバイス内の表面のコーティング材料を提供するために使用し得る。

【0339】

[00401] 他の実施形態では、コーティング材料は、リボヌクレオチド部分又はデオキシリボヌクレオチド部分を有し得る、ヌクレオチド部分、すなわち、核酸を含むポリマーを含んでもよく、高分子電解質表面を提供する。核酸は、天然ヌクレオチド部分のみを含んでもよく、又は限定ではなく、7-デアザアデニン、ペントース、メチルホスホン酸、又はホスホロチオエート部分等の核酸塩基、リボース、リン酸塩部分類似物を含む非天然ヌクレオチド部分を含んでもよい。

【0340】

[00402] 更に他の実施形態では、コーティング材料は、アミノ酸部分を含有するポリマーを含み得る。アミノ酸部分を含有するポリマーは、天然アミノ酸含有ポリマー又は非天然アミノ酸含有ポリマーを含み得ると共に、それらはいずれもペプチド、ポリペプチド、又はタンパク質を含み得る。限定されるものではないが一例では、タンパク質は、ウシ血清アルブミン(BSA)及び/又はコーティング剤としてアルブミン及び/又は1つ以上の他の類似のタンパク質を含む血清(又は複数の異なる血清の組み合わせ)であり得る。血清は、限定されるものではないがウシ胎仔血清、ヒツジ血清、ヤギ血清、ウマ血清等をはじめとする任意の便利な供給源に由来し得る。特定の実施形態では、コーティング溶液中のBSAは、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、30 mg/mL、40 mg/mL、50 mg/mL、60 mg/mL、70 mg/mL、80 mg/mL、90 mg/mL、若しくはそれ以上、又はそれらの間の任意の位置を含めて、約1 mg/mL ~ 約100 mg/mLの濃度で存在する。特定の実施形態では、コーティング溶液中の血清は、25%、30%、35%、40%、45%、若しくはそれ以上、又はそれらの間の任意の位置を含めて、約20%(v/v) ~ 約50% v/vの濃度で存在し得る。幾つかの実施形態では、BSAは、5 mg/mLでコーティング溶液中にコーティング剤として存在し得る。これに対して、他の実施形態では、BSAは、70 mg/mLでコーティング溶液中にコーティング剤として存在し得る。特定の実施形態では、血清は、30%でコーティング溶液中にコーティング剤として存在する。幾つかの実施形態では、細胞接着を最適化して細胞成長を促進するために細胞外マトリックス(ECM)タンパク質をコーティング材料中に提供し得る。コーティング材料に含まれ得る細胞マトリックスタンパク質としては、限定されるものではないがコラーゲン、エラスチン、RGD含有ペプチド(例えばフィブロネクチン)、又はラミニンが挙げられ得る。更に他の実施形態では、成長因子、サイトカイン、ホルモン、又は他の細胞シグナリング種をマイクロ流体デバイスのコーティング材料中に提供し得る。

【0341】

[00403] 幾つかの実施形態では、コーティング材料は、アルキレンオキシド部分、カルボン酸部分、スルホン酸部分、リン酸塩部分、サッカリド部分、ヌクレオチド部分、又はアミノ酸部分の2つ以上を含むポリマーを含み得る。他の実施形態では、コーティング材料は、調整された表面に独立して又は同時に組み込み得る、アルキレンオキシド部分、カルボン酸部分、スルホン酸部分、リン酸塩部分、サッカリド部分、ヌクレオチド部分、及び/又はアミノ酸部分をそれぞれ有する2つ以上のポリマーの混合物を含み得る。

【0342】

[00404] 共有結合コーティング材料。幾つかの実施形態では、少なくとも1つの内面は、マイクロ流体デバイス内における生物学的微小物体の維持/増殖に好適な有機分子及

10

20

30

40

50

び／又は親水性分子の層を提供する共有結合分子を含み、かかる細胞に対して調整された表面を提供する。

【0343】

[00405] 以下に記載されるように、共有結合分子は結合基を含み、結合基はマイクロ流体デバイスの1つ以上の表面に共有結合される。結合基はまた、生物学的微小物体の維持／増殖に好適な有機分子及び／又は親水性分子の層を提供するように構成された部分に共有結合される。

【0344】

[00406] 幾つかの実施形態では、生物学的微小物体の維持／増殖に好適な有機分子及び／又は親水性分子の層を提供するように構成された共有結合部分は、アルキル部分若しくはフルオロアルキル（ペルフルオロアルキルを含む）部分、単糖若しくは多糖（限定されるものではないがデキストランを含み得る）、アルコール（限定されるものではないがプロパルギルアルコールを含む）、ポリアルコール、限定されるものではないがポリビニルアルコールを含む、アルキレンエーテル、限定されるものではないがポリエチレングリコールを含む、高分子電解質（限定されるものではないがポリアクリル酸若しくはポリビニルホスホン酸を含む）、アミノ基（その誘導体、例えば、限定されるものではないがアルキル化アミン、ヒドロキシアルキル化アミノ基、グアニジニウム、及び非芳香族窒素環原子含有ヘテロ環式基、例えば、限定されるものではないがモルホリニル若しくはピペラジニルを含む）、カルボン酸、限定されるものではないがプロピオン酸を含む（カルボキシレートアニオン性表面を供給し得る）、ホスホン酸、限定されるものではないがエチニルホスホン酸を含む（ホスホネートアニオン性表面を提供し得る）、スルホネートアニオン、カルボキシペタイン、スルホペタイン、スルファミン酸、又はアミノ酸を含み得る。

【0345】

[00407] 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスにおいて生物学的微小物体の維持／増殖に好適な有機分子及び／又は親水性分子の層を提供するように構成された共有結合部分は、非ポリマー部分、例えば、アルキル部分、置換アルキル部分、例えば、フルオロアルキル部分（限定されるものではないがペルフルオロアルキル部分を含む）、アミノ酸部分、アルコール部分、アミノ部分、カルボン酸部分、ホスホン酸部分、スルホン酸部分、スルファミン酸部分、又は糖部分を含み得る。代替的に、共有結合部分は、以上に記載の部分のいずれかであり得る高分子部分を含み得る。

【0346】

[00408] 幾つかの実施形態では、共有結合アルキル基部分は、直鎖（例えば、少なくとも10個の炭素又は少なくとも14、16、18、20、22個、若しくはそれ以上の炭素の直鎖）を形成する炭素原子を含み得、並びに非分岐鎖アルキル部分を含み得る。幾つかの実施形態では、アルキル基は、置換アルキル基を含み得る（例えば、アルキル基の炭素の幾つかは、フッ素化又は過フッ素化し得る）。幾つかの実施形態では、アルキル基は、非置換アルキル基を含み得る第2のセグメントに結合される、ペルフルオロアルキル基を含み得る第1のセグメントを含んでもよく、ここで、第1及び第2のセグメントは、直接又は間接的（例えば、エーテル結合により）に結合され得る。アルキル基の第1のセグメントは、結合基の先端部に配置し得、アルキル基の第2のセグメントは、結合基の基端部に配置し得る。

【0347】

[00409] 他の実施形態では、共有結合部分は、2つ以上のタイプのアミノ酸を含み得る少なくとも1つのアミノ酸を含み得る。したがって、共有結合部分は、ペプチド又はタンパク質を含み得る。幾つかの実施形態では、共有結合部分は、双性イオン性表面を提供して、細胞成長、生存、可搬性、又はそれらの任意の組合せを支持し得るアミノ酸を含み得る。

【0348】

[00410] 他の実施形態では、共有結合部分は、少なくとも1つのアルキレンオキシド部分を含み得ると共に、以上に記載の任意のアルキレンオキシドポリマーを含み得る。ア

10

20

30

40

50

ルキレンエーテル含有ポリマーの有用な一クラスは、ポリエチレングリコール (PEG $M_w < 100,000 Da$) 又は代替的にポリエチレンオキsid (PEO 、 $M_w > 100,000$) である。幾つかの実施形態では、 PEG は、約 $1000 Da$ 、 $5000 Da$ 、 $10,000 Da$ 、又は $20,000 Da$ の M_w を有し得る。

【0349】

[00411] 共有結合部分は1つ以上のサッカリドを含み得る。共有結合サッカリドはモノ、ジ、又はポリサッカリドであり得る。共有結合サッカリドは、表面に付着するような結合又は加工を可能にする反応ペア部分を導入するように修飾し得る。例示的な反応ペア部分は、アルデヒド、アルキン、又はハロ部分を含み得る。ポリサッカリドは、ランダムに修飾し得、各サッカリドモノマーが修飾されてもよく、又はポリサッカリド内のサッカリドモノマーの一部のみが、表面に直接若しくは間接的に結合され得る反応ペア部分を提供するように修飾される。一例は、非分岐鎖リンカーを介して表面に間接的に結合され得るデキストランポリサッカリドを含み得る。

10

【0350】

[00412] 共有結合部分は1つ以上のアミノ基を含み得る。アミノ基は、置換アミン部分、グアニジン部分、窒素含有ヘテロ環部分又はヘテロアリアル部分であり得る。アミノ含有部分は、マイクロ流体デバイス及び任意選択的に隔離ベン及び/又はフロー領域 (例えば、チャンネル) 内の環境の pH 変調を可能にする構造を有し得る。

【0351】

[00413] 調整された表面を提供するコーティング材料は、1種類のための共有結合部分を含み得るか又は2種類以上の異なる共有結合部分を含み得る。例えば、フルオロアルキルで調整された表面 (ペルフルオロアルキルを含む) は、全て同一の、例えば、同一の結合基及び表面への共有結合、同一の全長、並びにフルオロアルキル部分を含む同一の数のフルオロメチレンユニットを有する、複数の共有結合部分を有し得る。代替的に、コーティング材料は、表面に付着された2種類以上の共有結合部分を有し得る。例えば、コーティング材料は、特定数のメチレンユニット又はフルオロメチレンユニットを有する共有結合されたアルキル部分又はフルオロアルキル部分を有する分子を含み得ると共に、より高い部分をコーティング表面に呈する能力を提供し得るより多数のメチレンユニット又はフルオロメチレンユニットを有するアルキル鎖又はフルオロアルキル鎖に共有結合された荷電部分を有する分子の更なるセットを更に含み得る。この場合、異なるそれほど立体的に嵩高くない末端及びより少数の骨格原子を有する分子の第1のセットは、全基板表面の機能化を支援可能であり、それにより、基板自体を構成するシリコン/酸化ケイ素、酸化ハフニウム、又はアルミナへの望ましくない接着又は接触を防止する。他の例では、共有結合部分は、表面上にランダムに交互電荷を呈する双性イオン性表面を提供し得る。

20

30

【0352】

[00414] 調整された表面の性質。調整された表面の組成以外に、疎水性材料の物理的厚さ等の他の因子が DEP 力に影響を及ぼし得る。調整された表面を基板に形成する方法 (例えば、気相堆積、液相堆積、スピンコーティング、フラッディング、静電コーティング) 等の各種因子は、調整された表面の物理的厚さを変化させ得る。幾つかの実施形態では、調整された表面は、約 $1 nm$ ~ 約 $10 nm$ 、約 $1 nm$ ~ 約 $7 nm$ 、約 $1 nm$ ~ 約 $5 nm$ 、又はそれらの間の任意の個別値の厚さを有する。他の実施形態では、共有結合された部分により形成された調整された表面は、約 $10 nm$ ~ 約 $50 nm$ の厚さを有し得る。種々の実施形態では、本明細書に記載されるように作製された調整された表面は、 $10 nm$ 未満の厚さを有する。幾つかの実施形態では、調整された表面の共有結合された部分は、マイクロ流体デバイスの表面 (例えば、 DEP 構成の基板表面) に共有結合された場合、単層を形成し得ると共に、 $10 nm$ 未満 (例えば、 $5 nm$ 未満又は約 $1.5 \sim 3.0 nm$) の厚さを有し得る。これらの値は、例えば、典型的には約 $30 nm$ の厚さを有し得るスピンコーティングにより作製された表面のものと対照的である。幾つかの実施形態では、調整された表面は、 DEP 構成のマイクロ流体デバイス内の操作で好適に機能するように完全に形成された単層を必要とするものではない。

40

50

【0353】

[00415] 種々の実施形態では、マイクロ流体デバイスの調整された表面を提供するコーティング材料は、望ましい電気的性質を提供し得る。理論により限定することを意図するものではないが、特定のコーティング材料でコーティングされた表面のロバスト性に影響を及ぼす因子の1つは、固有電荷トラッピングである。様々なコーティング材料が電子をトラップし得るので、コーティング材料が破壊されるおそれがある。コーティング材料の欠陥は、電荷トラッピングを増加させてコーティング材料の更なる破壊をもたらし得る。同様に、様々なコーティング材料が様々な絶縁耐力（すなわち、絶縁破壊をもたらす最小印加電界）を有するので、電荷トラッピングが影響を受けるおそれがある。特定の実施形態では、コーティング材料は、電荷トラッピングの量を低減又は制限する全体構造（例えば、密充填単層構造）を有し得る。

10

【0354】

[00416] 調整された表面は、その電気特性に加えて、生体分子との併用に有利な特性を有することもできる。例えば、フッ化（又はパーフルオロ化）炭素鎖を含む調整された表面は、表面ファウリング量を低減するに当たり、アルキル末端鎖と比較して利点を提供し得る。表面ファウリングは、本明細書で使用される場合、タンパク質及びその老廃物、核酸及び各老廃物等のバイオ材料の永久的又は半永久的な堆積を含み得る、マイクロ流体デバイスの表面への無差別材料堆積量を指す。

【0355】

[00417] 単一部分又は複数部分で調整された表面。共有結合コーティング材料は、以下に記載されるように、マイクロ流体デバイスにおける生物学的微小物体の維持／増殖に好適な有機分子及び／又は親水性分子の層を提供するように構成された部分をすでに含有する分子の反応により形成し得る。代替的に、共有結合コーティング材料は、生物学的微小物体の維持／増殖に好適な有機分子及び／又は親水性分子の層を提供するように構成された部分と、それ自体が表面に共有結合された表面改質リガンドと、をカップリングさせることにより2部系列で形成し得る。

20

【0356】

[00418] 共有結合コーティング材料を調製する方法。幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイスの表面（例えば、隔離ペン及び／又はフロー領域の少なくとも1つの表面を含む）に共有結合されるコーティング材料は、式1又は式2の構造を有する。コーティング材料を一ステップで表面に導入する場合、それは式1の構造を有し、一方、コーティング材料を多ステッププロセスで導入する場合、それは式2の構造を有する。

30

40

50

10



【 0 3 5 8 】

30

40

【 0 3 6 0 】

50

部分 R_{px} (すなわち、反応性部分 R_x と反応するように構成された部分) との反応から得られる基を表す。例えば、典型的なカップリング基 CG の 1 つは、アミノ基と、カルボン酸の誘導体、例えば、活性化エステル、酸塩化物等と、の反応の結果であるカルボキサミジル基を含み得る。他の CG は、トリアゾリレン基、カルボキサミジル、チオアミジル、オキシム、メルカプチル、ジスルフィド、エーテル、若しくはアルケニル基、又は反応性部分とそのそれぞれの反応性対部分との反応により形成し得る任意の他の好適な基を含み得る。カップリング基 CG は、以上に記載の要素の任意の組合せを含み得るリンカー L の第 2 の末端 (すなわち、マイクロ流体デバイスにおいて生物学的微小物体の維持 / 増殖に好適な有機分子及び / 又は親水性分子の層を提供するように構成された部分に近接する末端) に位置し得る。幾つかの他の実施形態では、カップリング基 CG は、リンカー L の骨格に介在し得る。カップリング基 CG がトリアゾリレンである場合、それはクリックカップリング反応から生じる生成物であり得ると共に、更に置換されていてもよい (例えば、ジベンゾシクロオクテニル (dibenzocyclooctenyl) 縮合トリアゾリレン基)。

【0361】

[00423] 幾つかの実施形態では、コーティング材料 (又は表面改質リガンド) は、化学気相堆積を用いてマイクロ流体デバイスの内面上に堆積される。気相堆積プロセスは、任意選択的に、例えば、カバー 110、マイクロ流体回路材料 116、及び / 又は基板 (例えば、DEP 構成基板の電極活性化基板 206 の内面 208 又は EW 構成基板の支持構造体 104 の誘電体層) のプレクリーニングにより、溶媒浴、超音波処理、又はそれらの組み合わせへの暴露により改善可能である。代替的又は追加的に、かかるプレクリーニングは、各種不純物を除去可能であると同時に酸化表面 (例えば、本明細書に記載されるように共有結合修飾し得る表面の酸化物) を導入する酸素プラズマクリーナによるカバー 110、マイクロ流体回路材料 116、及び / 又は基板の処理を含み得る。代替的に、酸素プラズマクリーナの代わりに、塩酸と過酸化水素との混合物又は硫酸と過酸化水素との混合物 (例えば、約 3 : 1 ~ 約 7 : 1 の硫酸対過酸化水素比を有し得るピラニア溶液) を使用し得る。

【0362】

[00424] 幾つかの実施形態では、マイクロ流体デバイス 200 が組み立てられて、マイクロ流体回路 120 を画定するエンクロージャ 102 を形成した後、蒸着を使用してマイクロ流体デバイス 200 の内面をコーティングする。理論により限定することを意図するものではないが、完全にアセンブルされたマイクロ流体回路 120 上にかかるコーティング材料を堆積させることは、マイクロ流体回路材料 116 と電極活性化基板 206 誘電体層及び / 又はカバー 110 との間の結合の弱化により引き起こされるデラミネーションの防止に有益であり得る。2 ステッププロセスを利用する実施形態では、以上に記載されるように気相堆積により表面改質リガンドを導入してから、生物学的微小物体の維持 / 増殖に好適な有機分子及び / 又は親水性分子の層を提供するように構成された部分を導入し得る。後続反応は、表面改質マイクロ流体デバイスを溶液中で好適なカップリング試薬に暴露することにより実施し得る。

【0363】

[00425] 図 2H は、調整された表面を提供する例示的な共有結合コーティング材料を有するマイクロ流体デバイス 290 の断面図を示す。例示されるように、コーティング材料 298 (模式的に示される) は、DEP 基板であり得るベース 286 の内面 294 及びマイクロ流体デバイス 290 のカバー 288 の内面 292 の両方に共有結合された密充填分子の単層を含み得る。コーティング材料 298 は、幾つかの実施形態では以上で考察したように、マイクロ流体デバイス 290 内の回路要素及び / 又は構造体を規定するために使用されるマイクロ流体回路材料 (図示せず) の表面を含めて、マイクロ流体デバイス 290 のエンクロージャ 284 に近接する内向きの実質的に全て内面 294、292 上で配置可能である。代替的な実施形態では、コーティング材料 298 は、マイクロ流体デバイス 290 の内面の 1 つのみ又は幾つかの上に配置可能である。

【0364】

【00426】 図 2 H に示される実施形態では、コーティング材料 2 9 8 は、オルガノシロキサン分子の単層を含み得ると共に、各分子は、シロキシリンカー 2 9 6 を介してマイクロ流体デバイス 2 9 0 の内面 2 9 2、2 9 4 に共有結合される。以上で考察したコーティング材料 2 9 8 はいずれも使用可能であり（例えば、オルガノシロキシ部分に対するアルキル末端部分、フルオロアルキル末端部分、PEG 末端部分、デキストラン末端部分、又は正電荷若しくは負電荷を含有する末端部分）、末端部分は、そのエンクロージャ対向末端（すなわち、内面 2 9 2、2 9 4 に結合せずにエンクロージャ 2 8 4 に近接するコーティング材料 2 9 8 の単層部分）に配置される。

【0365】

【00427】 他の実施形態では、マイクロ流体デバイス 2 9 0 の内面 2 9 2、2 9 4 をコーティングするために使用されるコーティング材料 2 9 8 は、アニオン性、カチオン性、若しくは双性イオン性の部分又はそれらの任意の組合せを含み得る。理論により限定することを意図するものではないが、マイクロ流体回路 1 2 0 のエンクロージャ 2 8 4 の内面にカチオン性部分、アニオン性部分、及び／又は双性イオン性部分を呈することにより、コーティング材料 2 9 8 は、得られる水和水が生物学的微小物体と非生物学的分子（例えば、基板のシリコン及び／又は酸化ケイ素）との相互作用を回避する層（又は「シールド」）として作用するように水分子との強い水素結合を形成可能である。そのほか、コーティング材料 2 9 8 がコーティング剤と併用される実施形態では、コーティング材料 2 9 8 のアニオン、カチオン、及び／又は双性イオンは、エンクロージャ 2 8 4 内の培地 1 8 0（例えばコーティング溶液）に存在する非共有結合コーティング剤（例えば溶液中のタンパク質）の荷電部分とのイオン結合を形成可能である。

【0366】

【00428】 更に他の実施形態では、コーティング材料は、そのエンクロージャ対向末端に親水性コーティング剤を含み得るか又はそれを呈するように化学修飾し得る。幾つかの実施形態では、コーティング材料は、PEG 等のアルキレンエーテル含有ポリマーを含み得る。幾つかの実施形態では、コーティング材料は、デキストラン等の多糖を含み得る。以上で考察した荷電部分（例えば、アニオン性、カチオン性、及び双性イオン性の部分）のように、親水性コーティング剤は、得られる水和水が生物学的微小物体と非生物学的分子（例えば、基板のシリコン及び／又は酸化ケイ素）との相互作用を回避する層（又は「シールド」）として作用するように水分子との強い水素結合を形成可能である。

【0367】

【00429】 適切なコーティング処理及び改質の更なる詳細は、2016 年 4 月 22 日出願の米国特許出願第 15 / 135,707 号（その全体が参照により組み込まれる）に見いだし得る。

【0368】

【00430】 マイクロ流体デバイスの隔離ペン内の細胞の生存能を維持するための追加のシステムコンポーネント。細胞集団の成長及び／又は増殖を促進するために、システムの追加のコンポーネントにより機能細胞の維持の助けとなる環境条件を提供し得る。例えば、かかる追加のコンポーネントは、栄養素、細胞成長シグナリング種、pH 調節、ガス交換、温度制御、及び細胞からの老廃物の除去を提供可能である。

【0369】

【00431】 マイクロ流体デバイスの隔離ペン内の細胞の生存能を維持するための追加のシステムコンポーネント。細胞集団の成長及び／又は増殖を促進するために、システムの追加のコンポーネントにより機能細胞の維持の助けとなる環境条件を提供し得る。例えば、かかる追加のコンポーネントは、栄養素、細胞成長シグナリング種、pH 調節、ガス交換、温度制御、及び細胞からの老廃物の除去を提供可能である。

【0370】

【00432】 装填方法。生物学的微小物体又は微小物体、例えば、限定されるものではないがビーズ等の装填は、本明細書に記載されるように、流体フロー、重力、誘電泳動（DEP）力、エレクトロウェットティング、磁力、又はそれらの任意の組合せの使用を必要と

10

20

30

40

50

し得る。DEP力は、例えば、光電子ピンセット(OET)構成により光学的に、及び/又は時間/空間パターンで電極/電極領域の活性化により電氣的に、発生可能である。同様に、エレクトロウェットティング力は、例えば、オプト-エレクトロウェットティング(OEW)構成により光学的に、及び/又は時間空間パターンで電極/電極領域の活性化により電氣的に提供し得る。

【0371】

実験

[00433] システム及びマイクロ流体デバイス。システム及びマイクロ流体デバイス：Berkeley Lights, Inc.製。システムには、少なくともフローコントローラ、温度コントローラ、流体媒体調整・ポンプコンポーネント、光作動DEP構成用の光源、マイクロ流体デバイス用の取付けステージ、及びカメラが含まれていた。マイクロ流体デバイスは、OptoElectroPositioning(OEP(商標))技術を用いて構成されたOptoSelect(商標)デバイス(Berkeley Lights, Inc.)であった。マイクロ流体デバイスは、マイクロ流体チャネル及びそれに流体接続された複数のNanoPen(商標)チャンバを含み、チャンバは約 7×10^5 立方 μm の容積を有していた。

【0372】

[00434] プライミングレジーム。250マイクロリットルの100%二酸化炭素を12マイクロリットル/secのレートで流入させた。これに続いて、次のように構成された250マイクロリットルのプライミング媒体を流入させた：1000mLイスコフ改変ダルベッコ培地(ATCC(登録商標)カタログ番号30-2005)、200mLウシ胎児血清(ATCC(登録商標)カタログ番号30-2020)、10mLペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies(登録商標)カタログ番号15140-122)、及び10mL Pluronic F-127(Life Techカタログ番号50-310-494)。プライミングの最終ステップは、12マイクロリットル/secで流入させた250マイクロリットルのプライミング媒体を含んでいた。

続いて、培養媒体の導入を行う。

【0373】

[00435] かん流レジーム。かん流方法は以下の2つの方法のいずれかであった。

[00436] 1. 0.01マイクロリットル/秒で2時間かん流させ、2マイクロリットル/秒で64秒間かん流させ、そして繰り返す。

[00437] 2. 0.02マイクロリットル/秒で100秒間かん流させ、フローを500秒間停止し、2マイクロリットル/秒で64秒間かん流させ、そして繰り返す。

【0374】

[00438] バーコード付き核酸捕捉ビーズ：ビーズは、ポリスチレン($16\mu\text{m}$)又は磁性体($22\mu\text{m}$)(Spherotech #SVP-150-4又は#SVM-200-4)のいずれかであった。ビーズは、本明細書に記載されるようにバーコードを有するオリゴヌクレオチドを含むように改変した。バーコード付きビーズは、当技術分野で公知の任意の好適な方法で合成し得る。

【0375】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3. この実験で使用したプライマー。

配列番号	
103	/5Me-isodC//isodG//iMe-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG
104	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
105	5'-/5Biosg/ACACTCTTTCCCTACACGACGC-3'
106	(5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACG CTCTTC C*G*A*T*C*T-3'
107	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'
108	5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'

10

【0376】

[00440] RNAシーケンシング：ビーズは、オリゴ（dT）捕捉配列／ユニーク分子識別子配列／バーコード／プライミング配列を呈するように改変した。バーコードは、各ビーズに対してユニークになるように選択した。オリゴ（dT）プライマー／ユニーク分子識別子タグ／細胞バーコード／プライマー配列は、全オリゴヌクレオチド合成、スプリット・プール合成、任意の長さのオリゴヌクレオチドセグメントのライゲーション、又はそれらの任意の組合せにより合成し得る。オリゴ（dT）プライマー／ユニーク分子識別子タグ／細胞バーコード／プライマー配列は、直接的若しくは間接的にビーズに付着し得るか、又は例えばストレプトアビジン／ビオチンリンカー等を介して、非共有結合で付着し得る。この実験では、捕捉配列、UMI、バーコード、及びプライミング配列を含む完全合成オリゴヌクレオチドは、非共有結合ビオチン／ストレプトアビジン結合を介してビーズに付着した。

20

【0377】

[00441] 実施例1．OKT3細胞で実証されるRNA捕捉、シーケンシングライブラリ作製、及びシーケンシング結果。

30

[00442] 細胞：OKT3細胞（ネズミ骨髄腫ハイブリドーマ細胞系）は、ATCC（ATCC（登録商標）カタログ番号CRL-8001（商標））から得た。細胞はサスペンション細胞系として提供した。ガス環境として空気中5%二酸化炭素を用いて約 1×10^5 ～約 2×10^5 生細胞/mLで播種し、37℃でインキュベートすることにより、培養物を維持した。2～3日ごとに細胞を分割した。マイクロ流体デバイスに装填するために、OKT3細胞数及び生存能を計測し、細胞密度を 5×10^5 /mLに調整した。

【0378】

[00443] 培養培地：1000mLイスコフ改変ダルベッコ培地（ATCC（登録商標）カタログ番号30-2005）、200mLウシ胎児血清（ATCC（登録商標）カタログ番号30-2020）、及び10mLペニシリン・ストレプトマイシン（Life Technologies（登録商標）カタログ番号15140-122）を組み合わせることで培養培地を作製した。完全培地を0.22µmフィルタに通して濾過し、使用時まで明所を避けて4℃で貯蔵した。

40

【0379】

[00444] インキュベーション時のかん流の間、OptoSelectデバイスへの導入前に空気中5%二酸化炭素で培養培地を連続的に調整した。

【0380】

[00445] 実験：200マイクロリットル中 2×10^6 の密度でOKT3細胞のサンプルをOptoSelectデバイスに導入した。光学作動誘電泳動力により250細胞を移動させて各NanoPenチャンバにつき1個の細胞をロードした。マイクロ流体チャネルへの開口から最も離れたチャンバのセクション（例えば分離領域）内に各細胞を位置決めした。続いて、

50

単一ユニークバーコード付きビーズを占有されたチャンバのそれぞれに装填した。単一生体細胞を有するNanoPenチャンバに装填されたビーズの全数は223であり、各ビーズもまた、貫流する流体フローに晒されない各チャンバの部分内に位置決めした。この実験では、合計4つのカセット化可能配列をそれぞれ有する256のユニークバーコード付きビーズを形成した。バーコード内において、第1の位置で4つの可能な配列のうち1つ、第2の位置で4つの可能な配列の第2の異なるセットの4つのうち1つ、第3の位置で4つの可能な配列の第3の異なるセットの4つのうち1つ、及び第4の位置で4つの可能な配列の第4の異なるセットの4つのうち1つを選択することにより多様性を形成した。

【0381】

[00446] 溶解試薬（単一細胞溶解キット、Ambionカタログ番号4458235）をマイクロ流体チャンネルに流入させてNanoPenチャンバ内に拡散できるようにした。ペンに個別に隔離されたOKT3細胞を溶解緩衝液に10分間暴露した。溶解停止緩衝液（単一細胞溶解キット、Ambionカタログ番号4458235）を流入させてマイクロ流体チャンネルにフローがない状態で室温で2分間インキュベートすることにより溶解を停止させた。限定されるものではないが、溶解停止処理ステップを必要としないClontech溶解緩衝液（カタログ番号635013）をはじめとする他の溶解緩衝液を用いて、類似の結果を得ることが可能である。使用した条件下では、核膜は破壊されなかった。放出させたmRNAを同一のNanoPenチャンバ内に存在するバーコード付きビーズ上に捕捉した。

【0382】

[00447] 捕捉されたRNAをRT試薬混合物（Thermo Scientific（商標）Maxima（商標）H Minus RT（ThermoFisher、カタログ番号EP0751）：4マイクロリットルのRT緩衝液、2マイクロリットルの各10ミリモルdNTP（New England Biolabsカタログ番号NO447L）、2マイクロリットルの10マイクロモルE5V6プライマー（5Me-isodC//iisodG//iMe-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCGrGrGrG、配列番号103）、1マイクロリットルのH Minus RT酵素、11マイクロリットルの水）に流入させることにより、cDNAに逆転写させた。代替的に、酵素、緩衝液、及びDTTを含むClontech SMARTscribe™逆転写酵素キット（カタログ番号639536）を用いて、捕捉された核酸からcDNAを得ることが可能である。NanoPenチャンバ内への試薬混合物の拡散を16で20分間行い、続いて、42で90分間の反応時間を設けた。

【0383】

[00448] 逆転写後、陰性対照として3マイクロリットル/secで12マイクロリットルのブランク搬出を実施した。次いで、この対照を個別に処理したが、以下に記載のビーズの搬出グループと同様に取り扱った。

【0384】

[00449] 次いで、以上に記載の蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブの多重化フローにより各ビーズのユニーク細胞バーコードを同定した。識別可能蛍光標識を有する4つのプローブからなる各グループを用いた蛍光標識プローブ（4プローブ/試薬フローのセットで提供され、各プローブはフロー中の他のプローブのいずれとも異なるフルオロフォア及び非同一のオリゴヌクレオチド配列を含有する）を100mMストックから1×DPBSに1マイクロモルで希釈してマイクロ流体デバイスのマイクロ流体チャンネル内に流入させ、16でNanoPenチャンバ内を20分間拡散させ、次いで42℃で90分間ハイブリダイズさせた。（代替的に、異なる緩衝溶液（IDT Duplex緩衝液、カタログ番号11-05-01-12）を用いてもうまくいった。30mM Hepes及び100mM酢酸カリウムを含有するヌクレアーゼフリーのこのpH7.5緩衝液の使用はまた、これらの条件下で優れた二本鎖形成を促進した。）ハイブリダイゼーション時間の終了後、新鮮培地（DPBS又はDuplex緩衝液）をマイクロ流体デバイスに通して20分間貫流させ（0.25マイクロリットル/secで300マイクロリットル）、非関連ハイブリダイゼーションプローブをマイクロ流体デバイスのフロー領域からフラッシュした。フラッシュ時間は、ハイブリダイズされていないハイブリダイゼーションプローブが各NanoPenチャンバから拡

散するのに十分な程度に長い時間になるように選択した。続いて、各識別可能蛍光波長（C y 5、F I T C、D A P I、及びテキサスレッドのチャンネル）の励起を行って、NanoPenチャンバのいずれかが蛍光シグナルを示した場合にはその同定を行った。NanoPenチャンバに局在化された各プローブの蛍光標識の位置及び色に注目し、第1の試薬フローのハイブリダイゼーションプローブの既知の配列及び蛍光標識に相関付け、ビーズ上のバーコードの対応するカセット化可能配列のアイデンティティをアサイメントした。蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブの更なるセットの逐次追加試薬フロー（それぞれ互いに非同ーオリゴヌクレオチド配列を有し、第1及び先行する他のいずれの試薬フローの配列とも異なる）を以上のように流動させ、検出を継続させた。試薬フロー及び検出の各ラウンド間で、100マイクロリットルの1×DPBS（ダルベッコPBS）の第1のフラッシュ及び続いて同一培地の第2の50マイクロリットルのフラッシュを用いてフラッシングを実施した。両方とも0.5マイクロリットル/秒で実施した。第2以降の試薬フロー中のカセット化可能配列の誤同定を最小限に抑えるために、各識別可能フルオロフォアの最初に同定された蛍光シグナルのみを用いてバーコードのカセット化可能配列同一性をアサイメントした。試薬フローの終了時、マイクロ流体デバイス内の全てのビーズのバーコードで使用されたカセット化可能配列を全て合わせて、NanoPenチャンバ内の全てのビーズのバーコードを各単一NanoPenチャンバごとにアサイメントした。本方法によりアサイメントされた特定のバーコード配列のアサイメントされた位置を用いて、どの特定の細胞からRNAがビーズに捕捉されたか、例えば、マイクロ流体デバイスのNanoPenチャンバ内の原核酸の位置を同定した。図14Aは、1つのNanoPenチャンバ番号470のプロセス時の逐次点を示す。識別可能蛍光シグナル領域のそれぞれはA～Dの表示で各カラムの頂部に示される。各フローは、1～4の表示で垂直に示される。フロー1のプローブをハイブリダイズさせてからフラッシングを終了した後、NanoPenチャンバ470のビーズは、カラーチャンネルBにのみ蛍光シグナルを有していた。第2の試薬フローを導入し、ハイブリダイズさせ、そしてフラッシングを行った後、追加の標識は検出されなかった。NanoPenチャンバ番号470は第2のフロー時に「B」蛍光チャンネルのシグナルを示すが、各バーコード及び各プローブは、各バーコードが識別可能蛍光標識のそれぞれを有するカセット化可能配列を1つのみ有するように設計されたことに留意されたい。この第2のシグナリングは、第1のフロープローブがビーズに結合されたままであったことを示したので、記録されない。試薬フロー2のプローブでも試薬フロー3でも、追加のカセット化可能配列は同定されなかった。しかし、他の3つの蛍光チャンネルのそれぞれに対して第4のフローで蛍光シグナルが同定された。結果として、NanoPenチャンバ470のビーズのバーコードでは、バーコードはA4B1C4D4カセット化可能配列に相関付けられる配列を有するものとして同定された。検出後、更なる操作の前に、10mMトリス-HCl（0.5マイクロリットル/秒で200マイクロリットル）を用いてマイクロ流体デバイスのフロー領域を2回フラッシュすることにより、残留ハイブリダイゼーションプローブを除去した。

【0385】

次いで、図14Bに示されるように、光学作動誘電泳動力を用いて変位緩衝液（10マイクロモルトリス）中でバーコード付きビーズをNanoPenチャンバからフロー領域（例えばフローチャンネル）に搬出した。NanoPenチャンバから搬出されたビーズは、フローを用いてマイクロ流体デバイスから搬出しプールした。搬出グループに陽性対照ビーズが存在した。80～10分間のインキュベーションによる逆転写酵素の不活性化及びExo1緩衝液（17マイクロリットルの搬出ビーズ、1マイクロリットルのエキソヌクレアーゼ溶液、及び2マイクロリットルのExoI緩衝液）中のエキソヌクレアーゼI（NEB、カタログ番号M0293L）処理を行った後、ビーズの搬出グループ（20マイクロリットルの体積）を5マイクロリットルの10×Advantage2 PCR緩衝液、dNTP、10マイクロモルSNGV6プライマー（5'-/5Biosg/ACACTCTTTTCCCTACACGACGC3'、配列番号105）、1マイクロリットルのAdvantage2ポリメラーゼミックス、及び22マイクロリットルの水に添加した。この配列は、E5V6プライマー上に

10

20

30

40

50

存在すると共にビーズ上のオリゴ内にも存在し、単一プライマーPCRを介してcDNAを増幅してより短い断片で全長cDNAを富化するために使用した。cDNAは、18サイクルのDNA増幅(Advantage(登録商標)2PCRキット、Clontech、カタログ番号639206)に付した。

【0386】

[00451] 供給業者の説明書に従って0.6×SPRI(固相可逆的固定化)ビーズ(Agencourt AMPure XPビーズ(Beckman Coulter、カタログ番号A63881))を用いて搬出グループに対して粗増幅混合物の初期精製を実施した。電気泳動及び/又は蛍光(Qubit(商標)、ThermoFisher Scientific)により定量を実施し(Bioanalyzer2100、Agilent, Inc.)(図14C)、増幅されたDNAの許容可能な回収が示された。更なるライブラリ作製の前に、供給業者の説明書に従って片側タグメンテーション(Nextera XT DNAライブラリ作製キット、Illumina(登録商標), Inc.)の実施に使用する。第2の0.6×SPRI精製の後、サイズ選択を実施した(プレキャストアガロースゲル電気泳動システム。ラダー:50bpラダー(ThermoFisher、カタログ番号10488-099)。E-gel(登録商標):2%アガロース(Thermofisher、カタログ番号G501802)。ゲル抽出キット:QIAquickゲル抽出キット(Qiagen、#28704)。以上のように定量を実施し、シーケンシングに適した300~800bpサイズを有するライブラリを提供した。(図14D)

【0387】

[00452] Miseqシーケンサー(Illumina(登録商標), Inc.)を用いてシーケンシングを実施した。ブランク対照搬出から得られたデータは、DNA担持ビーズの搬出グループとは異なっているように見えると共に、シーケンシングリードは、陽性対照配列に関連付けられるように思われることが、シーケンシング結果の初期分析から示唆された。(データは示されていない)。ブランク対照搬出内のバーコードアイデンティティを分析したところ、最もよく代表されるバーコードは、陽性対照ビーズに由来することが分かった。(データは示されていない)。バーコードは特定のNanoPenチャンバに関連付け可能であるので、細胞バーコードの比較から、検出された且つ搬出されたビーズ(「ペン排出」)からの細胞バーコードは、検出されたがその特定のNanoPenチャンバ位置から搬出されなかった(「非ペン排出」)細胞バーコードよりもはるかによく代表されることが示された。図15Aに示されるように、ヒートマップ表現は、NanoPenチャンバから搬出されたことが分かっているビーズから検出されたバーコードの大きなグループを示した(「ペン排出」、「DU」で表される)。検出されたDUバーコードのほとんどは、より高頻度で同定された配列を表すヒートマップのより高いy軸位置に存在する。搬出されなかったビーズに関連付けられることが分かっている検出されたバーコードのより小さなセットは、「DN」で表されるカラムに示される(例えば、検出されたがペン排出でない)。更にまた、各DNバーコードの垂直位置は、バーコード配列同定の相対頻度を示した。Miseqシーケンサー(Illumina(登録商標), Inc.)を用いてシーケンシングを実施した。リード1を用いて55サイクルのシーケンシングを実施して、40bpのバーコード及び10bpのUMIをシーケンスした。特定の試験でバーコードのライゲーションに4bpを使用したため、全長バーコードの最初の2「ワード」と後続の2ワードとの間で4回の追加のサイクルが必要とされた。最後のサイクルはベースコーリング目的に使用した。Nexteraライブラリ作製時に追加されたプールインデックスを表す更に8bpをシーケンスし、同一のシーケンシングランで、幾つかのチップ/試験の多重化を可能にした。最後に、cDNA(転写物/遺伝子)の配列を提供するリード2(ペアエンドラン)を用いてシーケンシングの追加の46サイクルを実施した。追加のサイクルは、使用したシーケンシングキット及び所望の情報に依存して実施可能である。図15Bは、同一データのボックスプロット図を示した。理論により拘束されるものではないが、検出されたがペン排出でない位置のこうした細胞バーコードはプライマー及び/又はビーズ合成のアーチファクトとして生じたものであり得る。シーケンシングデータに見いだされるバーコードの表現の比較から、ビーズ搬出サンプルは、ブランク搬出から回収されたバーコードと有意差があることを示

10

20

30

40

50

される。

【0388】

[00453] 図16A及びBは、こうした方法を用いたシーケンシングデータ及びライブラリ作製の追加の品質評価を例示する。図16Aは、以上で実施された2つの異なる実験A及びBを列挙したものであり、逆転写ステップを実施した時間(60min、90min)が異なる。実験Aは、108ビーズの搬出から得られたDNAライブラリのデータを含んでいた(108細胞からRNAを捕捉した)。実験Bは、120ビーズの搬出から得られたDNAライブラリのデータを含んでいた(120細胞からRNAを捕捉した)。図16Bでは、全体のカラムには、各実験でシーケンシングデータから得られたリードの全数を示した。アサイメント数のカラムには、1)バーコードにマップされる且つ2)シーケンシング品質が所定の品質閾値を超えるリードの数を表した。アライメント数のカラムには、対象ゲノムにマッピングされるリードの数を示した。参照に存在しなかった偽遺伝子、ミスアノテート遺伝子、及び遺伝子間領域にマッピングされてアサイメントされたリードは、この全数を得る際に除外した。Mito Totalのカラムには、ミトコンドリア参照にマッピングされるリードの数が含まれる。これは、通常は増加した数のミトコンドリア遺伝子を発現する劣悪な生理学的条件の細胞に関係する。Mito UMIのカラムには、ミトコンドリア参照にマッピングされた識別可能ユニーク分子識別子を有するリードの数を示した。Refseq Totalのカラムには、mRNA Refseq参照にアライメントされたリードの数を示した。一方、Refseq UMIのカラムには、mRNA Refseq参照にアライメントされた識別可能UMIを有するリードの数を示し、また、細胞の溶解時に捕捉ビーズにより捕捉された元の分子数を示した。これらの数は全て、こうした方法により提供されたDNAライブラリが細胞のレパートリーを代表する良好な品質のシーケンシングデータを生成することを示唆する。

【0389】

[00454] 幾つかの他の解析を用いてシーケンシングサンプルライブラリの品質を評価した。同一細胞のプールからの1ngの全抽出RNAを用いてオフチップ実験を行った。全部で256通りのバーコードの組合せを含有するビーズミックスを用いてcDNAを作製した。以上に記載したように下流処理を実施して、バーコードの同定を必要としないバルク対照を提供した。これらの各投入から等量の投入DNAをシーケンスした。これらのサンプルから得られたシーケンシングデータの比較を図16C及びDに示す。シーケンシングデータ内で同定可能であったバーコードリードのパーセントは、全リード数の約78%~約87%の範囲内であり、シーケンシングリードによりカバーされた配列は、参照トランスクリプトームにアライメントしたとき、約49%~約61%の範囲内であった。(図16C)。最後に、上位5つまでの発現遺伝子には、RPL28(リボソームタンパク質)、EMB(B細胞特異的)、RPL24(B細胞特異的)、DCUN1D5(B細胞特異的)、RPS5A(リボソームタンパク質)、及びDDIT(B細胞特異的)が含まれており、それらは細胞型及び細胞起源が一致した。(図16D)。図17は、90分間の逆転写反応時間を用いた実験100、98、105、106全体を通じて様々な各実験の間で検出されたバーコードのセットを示しており、NanoPenチャンバへのビーズ送達が良いにランダム化されていることが示唆される。オフチップ実験(256で表される)、ブランク(XXX-b1)、及び4つの実験(実験100、98、105、106)のそれぞれで搬出されたビーズデータの比較が図18に示される。図18は、幾つかのNanoPenチャンバに対してシーケンスされたリードの回収を示したものである。各実験では、XXX-E1はcDNAデコレートビーズの第1の搬出であり、XXX-E2は同一ペンからの後続の第2の搬出であった。図18のバイオリンプロットのy軸は、各サンプルからのバーコードリードの量であった。オフマイクロ流体デバイス対照256は、全て等価に表されたバーコードを有していた。搬出されたビーズデータ(XXX-E1又はXXX-E2)は全てに満たないバーコードを示し、バーコードリードの量もまた、それほど等価に表されなかった。驚くべきことではないが、サンプルXXX-E2は、更に少ないリードを示したが、それらのリードの数はより変化に富んでいた。最後に、ブランクリードは、

10

20

30

40

50

前に考察したように、非常に少ない数のバーコードリードを示したが、リードの1つ又は2つは、理にかなった出現頻度を有する。

【0390】

[00455] 実施例2. T細胞の表現型決定、培養、アッセイ、及びRNAシーケンシング。表現型とゲノム情報との関連付け。

[00456] マイクロ流体システム、材料、及び方法は、以下の点を除けば実験1のときと同じであった。

[00457] 細胞：対照細胞はヒト末梢血T細胞であった。サンプル細胞はヒト腫瘍サンプルに由来するヒトT細胞であった。

[00458] 培養培地：RPMI 1640培地 (Gibco, #12633-012)、10%ウシ胎児血清 (FBS)、(Seradigm, #1500-500) 2%ヒトAB血清 (Zen-bio, #HSE-A BP100ml)、IL-2 (R&D Systems, 202-IL-010) 2 U/ml、IL-7 (PeproTech, #200-07) 10 ng/ml、IL-15 (PeproTech, #200-15) 10 ng/ml、1xPluronic F-127 (Life Techカタログ番号50-310-494)。

【0391】

[00459] ヒト腫瘍サンプルに由来するヒトT細胞をオフチップで抗原で染色し、次いで、 $5 \times E6$ 細胞/mlの密度でOptoSelectデバイスのマイクロ流体チャネルに導入した。抗原陽性T細胞 (P-Ag) 及び抗原陰性細胞 (N-Ag) の両方を光学作動誘電泳動力により移動させて単一T細胞に分離した状態で個別NanoPenチャンバに導入し、複数の格納NanoPenチャンバを形成した。

【0392】

[00460] 4日間の培養期間時にCD3/28ビーズ (Dynabeads (登録商標) ヒトTアクチベーターCD2/CD28、ThermoFisher No.Gibco (商標) #11131D) の存在下でヒト末梢血T細胞を活性化させ (図19)、活性化されたただし抗原特異的でない集団を形成した。標識抗原による処理は、標識対照活性化T細胞をもたらさなかった。これらの対照活性化T細胞集団を $5 \times E6$ 細胞/mlの密度でマイクロ流体チャネルに導入し、選択された複数の対照活性化T細胞を光学作動誘電泳動力により移動させ、腫瘍サンプルに由来するT細胞のセットを含有するNanoPenチャンバのセットとは異なる複数のNanoPenチャンバのそれぞれに単一对照活性化T細胞を配置した。

【0393】

[00461] 占有された各チャンバに、ライゲーション (この特定の試験では) により合成された単一バーコード付きビーズを添加した。各ビーズは、プライミング配列、バーコード配列、UMI配列、及び以上に記載の捕捉配列を含んでいた。続いて、以上に記載したように溶解及びRNAの捕捉を行った。使用した条件下では、核膜は破壊されない。放出させたmRNAを同一NanoPenチャンバ内に存在するバーコード付きビーズ上に捕捉した。

【0394】

[00462] 図20A、21A、及び22Aでは、4つの写真画像のセットは、代表的な占有されたNanoPenチャンバを例示する。写真の各セットは、左から右に、1) 光学作動誘電泳動力を用いてNanoPenチャンバ内に配置した後のT細胞の明視野照明、2) 抗原特異的染色のための蛍光検出 (テキサスレッドチャネル) プロービング、3) 光学作動誘電泳動力を用いて1つのバーコード付き捕捉ビーズを搬入した後のNanoPenチャンバの明視野照明、及び4) 溶解後の明視野照明を示した。以上のように、溶解条件は、細胞膜を破壊したが核膜を擾乱しなかった。

【0395】

[00463] 図20Aでは、1446の位置識別子を有するNanoPenチャンバは、1個の細胞により占有された状態で示された。この細胞は、図20Aのセットの第2の写真より示されるように、蛍光シグナル (NanoPenチャンバ内の白丸内に示される) を有する抗原陽性染色細胞 (P-Ag) であった。図20Aのセットの第3の写真は、単一ビーズがNanoPenチャンバ内に配置されたことを示し、図20Aのセットの第4の写真は、ビーズ及

び残留する核が依然としてNanoPenチャンバ内に位置することを示す。図2 1 Aでは、NanoPenチャンバ番号5 4 7内への細胞（第2のセットの第1の写真）及びビーズ（第2のセットの第3の写真）の類似の配置が示された。しかし、この細胞は抗原で染色されず、図2 1 Aの写真のセットの第2の写真で蛍光シグナルは検出されなかった。したがって、この細胞は抗原陰性T細胞（N - A g）として同定された。図2 2 Aでは、対照活性化T細胞を含有するNanoPenチャンバ3 4 3 1の等価なセットの写真が示された。予想通り、セットの第2の写真に蛍光シグナルは存在しなかったことから、この細胞は抗原陽性でないことが確証される。

【0396】

[00464] RNA放出、捕捉、ライブラリ作製、及びシーケンシング。マイクロ流体環境内における逆転写及びバーコード読取りに関して実施例1で説明したプロトコルを実施し、各NanoPenチャンバに対してバーコードの同定が記録された。図2 0 B、2 1 B、及び2 2 Bでは、それぞれのNanoPenチャンバのバーコード検出プロセスの画像が示される。NanoPenチャンバ1 4 4 6は、バーコードA 1 B 1 C 1 D 4を含有するビーズを有すると決定された。NanoPenチャンバ5 4 7は、バーコードA 1 B 3 C 3 D 4を有するビーズを有していた。また、NanoPenチャンバ3 4 3 1は、バーコードA 2 B 3 C 4 D 4を含有するビーズを有していた。ビーズ搬出、並びに搬出されたデコレートビーズからのc DNAのオフチップ増幅、タグメンテーション、精製、及びサイズ選択は、実施例1に記載されるように実施した。

【0397】

[00465] Miseqシーケンサー（Illumina（登録商標）、Inc.）を用いてシーケンシングを実施した。第1のシーケンシングリードでは、リード1を用いて5 5サイクルでシーケンシングを行って4 0 b pのバーコード及び1 0 b pのUMIをシーケンスした。この特定の実験ではバーコードライゲーションのために追加の4 b pを使用したので、全長バーコードの最初の2つのカセット化可能配列及び最後の2つのカセット化可能配列の間で4つの追加のサイクルが必要とされた。最後のサイクルはベースコーリング目的に使用した。第2のシーケンシングリードでは、Nexteraライブラリ作製時に追加されたプールのインデックスを表す8 b pをシーケンスして、同一のシーケンシングランで幾つかの実験の多重化を可能にした。最後に、c DNA（転写物/遺伝子）のシーケンシングを提供するリード2を用いて、追加の4 6サイクルでシーケンスした（ペアエンドラン）。この実験では使用しなかったが、所望により、より長いリードを取得し得る。

【0398】

[00466] 図2 3は、この実験のシーケンシング結果のヒートマップを示し、シーケンシングリードのカラムを有する。各カラム、NanoPenチャンバ内で1細胞から単一ビーズに捕捉されたRNAを表し、それは1）腫瘍抗原に暴露されて抗原陽性のもの、2）腫瘍抗原に暴露されて抗原陰性のもの、又は3）陰性対照活性化T細胞、ただし、抗原に暴露されないものである。カラムは、シーケンシングリードの類似性に従って配置されており、遺伝子発現情報に関連付けられる。カラー（暗色バンド対明色バンド）は発現レベルを表した。カラム1～1 4は、カラム1 5～3 6によりも互いにより近くに関連付けられた。各カラムで可読バーコードを同定可能であるので（1細胞からビーズごと）、ビーズが回収された位置を決定し、またRNAが得られた細胞の表現型を決定した。例えば、以上に規定された3つのビーズ、すなわち、NanoPenチャンバ1 4 4 6（グループA内のカラム番号6に見いだされる2 E B 1 p__1 4 6 6（P - A g）で表されるもの）、5 4 7（グループA内のカラム番号8に見いだされる2 E B 1 n__5 4 7（N - A g））、及び3 4 3 1（グループBのカラム番号3 3に見いだされるE A 1 N C__3 4 3 1（N C）で表されるもの）は、それぞれ強調表示されたカラムに示された遺伝子発現プロファイルを提供した。カラム1 5～3 6（ヒートマップのトップの関係ブラケットにグループBとしてクラスタ化）と、カラム1～1 4（グループA）と、の遺伝子発現の差は、腫瘍抗原への暴露に実質的に依存するようには見えなかった。抗原染色が陽性であるか陰性であるかにかかわらず、グループAのカラム1～1 4の実質的に全ての原細胞は、腫瘍抗原に暴露された。こ

れとは対照的に、カラム 1 5 ~ 3 6 の原細胞は全て、陰性対照細胞であり、腫瘍抗原に暴露されなかった。各カラムは、1つの実験のシーケンシングリードを表し、カラーは、発現レベルを表す。ビーズ活性化抗原非特異的対照T細胞（NC）のそれぞれのシーケンシングリードは、抗原陽性腫瘍由来T細胞（P - Ag）又は抗原陰性腫瘍由来（N - Ag）T細胞のシーケンシングリードのいずれとも明確に区別可能であった。特定の区別可能な単一細胞RNAシーケンシングが実証された。更に、表現型情報を単一細胞の遺伝子発現プロファイルに関連付け可能であることが示された。

【0399】

[00467] 実施例3．OKT3細胞で実証されるDNA捕捉、シーケンシングライブラリ作製、及びシーケンシング結果。この実施例で特に明記されていない限り、装置、プライミング及びかん流レジームは、細胞源、並びに作製は、以上の一般的方法のときと同様に使用／実施された。特に明記されていない限り、3培地及びOptoSelectデバイスは7に維持された。

【0400】

【表4】

表4. この実験で使用されるプライマー。

配列番号	配列
109	ビオチン TEG_N701/5 ビオチン TEG/CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCGCCTTAGTCTCGTGG GCTCG*G
110	ビオチン TEG_N702/5 ビオチン TEG/CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGG GCTCG*G
111	ビオチン TEG_S506/5 ビオチン TEG/AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACACACTGCATATCGT CGGCAGCGT*C

【0401】

[00469] この実験は、ビーズに付着された1つのビオチン化されたプライミング配列（バーコードを有する）と遊離の1つのプライマーとを溶液中で用いて等温PCRによりNexteraシーケンシングライブラリ（Illumina）を作製可能であることを実証した。OKT3細胞（150）をOptoSelectデバイスに搬入し、光学作動誘電泳動力を用いてNanoPenチャンバ内に装填した。図24は、NanoPenチャンバへの送達後の細胞を示した。光学作動誘電泳動力により、7つのNanoPenチャンバに、各NanoPenチャンバにつき1個の細胞を送達し、1つのNanoPenチャンバに細胞を送達し損ない、1つのNanoPenチャンバに2個の細胞を送達して、実質的に各NanoPenチャンバにつき1個の細胞のみを送達した。

【0402】

[00470] 溶解。順序を自動化して溶解手順を実施したが、各ステップの手動制御によって好適に実施し得る。溶解緩衝液をOptoSelectデバイス（Buffer TCL（Qiagen、カタログ番号1031576））に流入させ、次いで、フローを2分間で停止し、緩衝液をペン内に拡散させた。細胞膜及び核膜の両方の溶解を行った。次いで、各50マイクロリットルのフラッシュ後に30秒間の休止を含めて、OptoSelectデバイスを50マイクロリットルの培養培地で3回フラッシュした。800マイクログラム／ミリリットルの濃度でプロテイナーゼK（Ambionカタログ番号AM2546、20mg／ml）をOptoSelectデバイスに導入し、かん流を用いることなく20分間維持した。プロテイナーゼKをNanoPenチャンバに拡散させ、望ましくないタンパク質をタンパク質分解し、そしてクロマチンを破壊してgDNAの抽出を可能にした。終了後、各フロー後の10分間の保持時間を含めて

、50マイクロリットルのPBSの3サイクルでOptoSelectデバイスをフラッシュした。
【0403】

[00471] 1×PBS中1:1000でSYBR（登録商標）グリーンI染色（ThermoFisher Scientific、カタログ番号S7585）で染色を実施して、図25に示されるように、核の緻密化DNA2510の存在を実証した。そのほか、NanoPenチャンバを介して光学作動誘電泳動力を用いて両方向（上下、クロスオーバー）に垂直にスキャンして掃引を実施した。図25では、垂直「クロスオーバー」掃引を形成するために使用される2つの光パターン（「OEPバー」）が示される。この結果、放出させた核DNA2515からの蛍光シグナルのぼけた拡大した領域を生じたことから、緻密化形態から核膜溶解を示唆するより大きなより分散した領域に緻密化DNAをドラッグする能力が実証される。図26Aは、溶解前の染色OKT3細胞をそれぞれ含有する特定のNanoPenチャンバのセットの写真を示し、図26Bは、OEP掃引後の同一NanoPenチャンバの写真を示す。このことから、チャンバ内のより大きな領域に染色（例えばDNA）が分散されたことが実証する。

10

【0404】

[00472] タグメンテーション。トランスポザーゼによるDNAのタグメンテーション。3.3マイクロリットルのタグメントDNA緩衝液（TD）、16マイクロリットルのタグメントDNA酵素ミックス（TDE1緩衝液）、及び14マイクロリットルのヌクレアーゼフリーH₂O（Ambionカタログ番号AM9937）を含む15マイクロリットルの体積のトランスポソーム試薬（Nextera DNA Library Prep Kit, Illumina, カタログ番号15028212）をOptoSelectデバイス内に導入することにより、タグメンテーションのプロトコルに従った。15分間にわたりタグメンテーション試薬をNanoPenチャンバに拡散させた。次いで、100マイクロリットルのPBSで流入ライン及び流出ラインを清浄化したり、50マイクロリットルのPBSでデバイス自体をフラッシュしたりすることを含めて、OptoSelectデバイスを広範囲にフラッシュした。図27は、このプロトコルにより得られたタグメント化産物のサイズの分布グラフを示しており（Bioanalyzer, Agilent）、300bpの真下に分布の最大値を有し、約600bp超のサイズを有するタグメント化産物が少ないことから、大規模並列シーケンシング法に好適であることが実証される。

20

【0405】

[00473] ビーズへのDNA捕捉。ビオチン化16µmポリスチレン捕捉ビーズ（SpheroTech）をストレプトアビジン標識オリゴヌクレオチドにより改変した。オリゴヌクレオチドは、5' 3'の順に、プライミング配列、バーコード配列、及び捕捉配列（例えばモザイク配列）を含んでいた。バーコード配列は、少なくとも1つのサブバーコードモジュールを含有し、OptoSelectデバイスの特定のNanoPenチャンバ内の原細胞の同定を可能にした。オリゴヌクレオチド内に組み込まれたプライミング配列は、この実験ではP7（P7アダプター配列）であった。（しかし、他のプライミング配列、例えば、P5又はRPAプロセスのリコンビナーゼ及びポリメラーゼとの適合性が得られるように特に設計されたプライミング配列）を利用し得る。約300rpmまでのスピードで撹拌しながら（VWRアナログボルテックスミキサー）、1M NaCl、20mMトリスHCl、1mM EDTA、及び0.00002% Triton Xを含む結合緩衝液中で過剰のSA-オリゴヌクレオチドに15分間結合させた後、ビーズを新鮮な結合緩衝液の3つのアリコート及び続いて50マイクロリットルのPBSで洗浄した。P7プライミング配列（シーケンシングアダプター）/バーコード/捕捉配列のオリゴヌクレオチドを含有する新たに作製したビーズを溶解前の細胞を含有したNanoPenチャンバに送達した。このステップは、NanoPenチャンバへのOEP送達を含めて順序を自動化して実施したが、所望により手動で実施してもよい。この実験では、使用した特定の自動化プロセスは、終了までに1時間かかった。より迅速な送達が有利であり得る。そのほか、37 未満に低下させた温度は効果的なDNA捕捉に有利であり得る。

30

40

【0406】

50

【00474】 等温増幅。床上に捕捉されたDNAの等温増幅は、リコンビナーゼポリメラーゼ増幅（RPA）反応（TwistAMP TABA S03, TwistDX）を用いて実施した。プロセス時に形成された置換ループ（Dループ）を安定化させる一本鎖DNA（ss-DNA）結合タンパク質も含まれる。反応混合物中にはまた、P5モザイク配列、P7及びP5プライマー（IDT）も存在していた。次の混合物：TwistDXキットの乾燥酵素ペレット、27.1マイクロリットルの再懸濁緩衝液、2.4マイクロリットルの10マイクロモルP5プライマー、2.4マイクロリットルの10マイクロモルP7プライマー、及び2.4マイクロリットルの10マイクロモルP5末端インデックスプライマー（例えばS521）を2.5マイクロリットルの280ミリモルマグネシウムアセテート（MgOAc）に添加し、遠心分離管内でボルテックスした。15マイクロリットルのこの可溶化された且つスピンされた溶液を1マイクロリットル/秒のレートでOptoSelectデバイスのマイクロ流体チャネル内に搬入し、NanoPenチャンバ内に拡散させ、且つビーズ上に捕捉されたDNAに40～60分間触させた。

10

【0407】

【00475】 等温増幅時間の終了後、PBSを用いてOptoSelectデバイスから50マイクロリットルの流体媒体を搬出した。NanoPenチャンバから拡散させた増幅されたDNAを含有する搬出された溶液（「即時搬出」）を1×AMPure（登録商標）ビーズ（Agencourt Bioscience）を用いて清浄化し、100bp未満のサイズのプライマー及び他の核酸材料を除去した。

【0408】

20

【00476】 チャンネルに拡散しなかったビーズ及び増幅されたDNAを依然として含有するOptoSelectデバイスを4に一晚維持し、50マイクロリットルのPBSを用いて第2の搬出を行い、その時点でマイクロ流体チャネルに存在していた増幅産物を捕捉した（「第2の搬出」）。定量及びサイズ分析のためにPCRを介して2つのサンプルを個別に更に増幅した。それぞれ、KAPA HiFi Hotstart（KAPA Biosystems）、1マイクロリットルの10マイクロモルP5プライマー、及び1マイクロリットルの10マイクロモルP7プライマーを含む2.5マイクロリットルの反応で5サイクルPCTを使用した。1×AMPure（登録商標）ビーズによる処理を繰り返すことにより、即時搬出及び第2の搬出サンプルのそれぞれを清浄化してプライマーを除去した。即時搬出サンプルは、約312bpの平均サイズを有してシーケンシングに好適な断片サイズを有する合計40ngを生成した（データは示されていない）。第2の搬出サンプルは、NGS並列技術による更なるシーケンシングに好適でない約760bpの平均サイズを有して合計85ngを生成した（データは示されていない）。

30

【0409】

【00477】 共有Miseq大規模並列シーケンシング実験（Illumina）内で即時搬出サンプルをシーケンスした。図28に示されるように、カバレッジは低かったが（平均＝0.002731）、リードはマウスゲノム全体にわたりマッピングされた。図28では、各染色体はx軸に沿って表される。左側の明色バーは各染色体の予想長さを表し、一方、右側の暗色バーは、即時搬出サンプルからのデータに見られるマッピングされた全リードに対するパーセントを表す。幾つかの染色体はデータで多く見積もられた（chr2、chr16）、他の染色体は少なく見積もられた（chr8、chr12、chr15）。雌マウスに由来する細胞であるため、予想通り、Y染色体に対して得られたリードはなかったことに留意されたい。許容し得る程度に低レベルのアダプター汚染物質（0.000013%）が同定された。そのほか、特定の対象配列もまたデータに見いだされた（例えば、CXCRC4配列、データは示されていない）。

40

【0410】

【00478】 実施例4．DNA分離、ライブラリ作製、及びヒトBリンパ球に由来するOKT3細胞及びヒトLCL1細胞の混合物のシーケンシング。LCL1細胞の供給元：Coriell Institute。カタログ番号：GM128781C。培養に使用した培地は、RPMI-1640（Life Technologies、カタログ番号11875-127）、10%FBS、1%Pen /

50

S t r e p (1 0 0 0 U / m l)、2 m M G l u t a m a xである。

【 0 4 1 1 】

[00479] 実験では150のOKT3細胞：150のHuLCL1細胞又は75のOKT3細胞：75のHuLCL1細胞のいずれかを使用した。細胞は、各OKT3及び各HuLCL1細胞の位置が分かるようにOEP力を用いて個別NanoPenチャンバに1細胞を1チャンバに特定の送達した。

【 0 4 1 2 】

[00480] 溶解及びタグメンテーションのプロセスは、実験3のときと同様に実施したが、次の配列：

Tn5ME-A (Illumina FC-121-1030)、5' - T C G T C G G C A G C G T C A G A T G T G T A T A A G A G A C A G - 3' (配列番号161)、

Tn5ME-B (Illumina FC-121-1031)、5' G T C T C G T G G G C T C G G A G A T G T G T A T A A G A G A C A G - 3' (配列番号162)

の1つを有するトランスポザーゼにより、断片化DNAに追加されたモザイク末端+インサート配列を有していた。

【 0 4 1 3 】

[00481] OKT3細胞含有NanoPenに対してのみ第1のユニークバーコードを有するバーコード付きビーズの第1のセットの特定の送達を行い、続いて、HuLCL1細胞含有NanoPenに対してのみ第2のユニークバーコードを有するバーコード付きビーズの第2のセットの特定の送達を行った。これにより、ネズミDNAリードが元の方向にネズミ細胞にマッピングされるように且つHuLCL1細胞DNAリードが元の方向にヒト細胞にマッピングされるように、ビーズの各セットから増幅されたDNAに対して特定の識別子を提供した。タグメンテーションステップの後、ビーズをNanoPenチャンバに送達した。実験3のときと同様に等温増幅を実施し、5.67 ng (全300細胞から)又は2.62 ng (全150細胞から)を生成した。以上に記載したように各ライブラリに対して2サイクルのPCRランを実施し、NGSシーケンシング用のP5、P7の存在を保証し、清浄化を同様に実施した。図29A(150細胞から)及び29B(300細胞から)は、それぞれ、後続の2サイクルPCR増幅及び清浄化の後の2つの(OKT3/HuLCL1)DNAライブラリを示す。これらの結果は、標準的のウェルプレートフォーマットで個別に処理されたOKT3細胞更にはHuLCL1細胞から発生させた対照ライブラリのサイズ分布トレース(図29C(OKT3)及び図29D(HuLCL1))に示される)と比較可能である。マイクロ流体プロトコル内でより理想的な断片分布を得るために更なる最適化が望ましいであろうことが、比較から示唆される。混合OKT3/HuLCL1 DNAライブラリに基づくシーケンシング結果から、2つのバーコードのそれぞれを有するリードが得られることが示された(データは示されていない)。

【 0 4 1 4 】

[00482] インサイチュバーコード検出。増幅されたDNA産物の搬出後、以上に記載の蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブの逐次フローによりバーコード位置を同定した。

【 0 4 1 5 】

[00483] 実施例5. バーコード付きビーズの導入並びにDNA分離、ライブラリ調製及び増幅ワークフロー手順内におけるバーコード付きビーズのインサイチュ検出。理論によって拘束されることを望むものではないが、トランスポゾンの活性は一本鎖結合オリゴでなく、二本鎖核酸に向けられる。推論実験において、これらの条件に対する捕捉ビーズのロバスト性が示された。実験3について調製したとおりのビーズ、20マイクロリットルを、その同じ実験の条件下でタグメンテーション反応試薬に曝露した。トランスポゾンに曝露されたビーズ及び曝露されていない対照ビーズの両方を1.4 ngのヒト標準DNAに接触させた。RPA(S521)で2.4マイクロリットルのペアプライマー(S521、Illumina)を使用して、等温増幅において2.4マイクロリットルの各ビーズセットを使用し、実質的に同程度の量の増幅DNAが提供された。これらの結果は、DNA捕捉での

使用前にトランスポゾンに曝露した捕捉ビーズが妥当な同等量の増幅産物をもたらしたことを示しており、トランスポゾンによって捕捉ビーズ上の捕捉オリゴヌクレオチドが分解されなかったことが指摘される。

【 0 4 1 6 】

【表 5】

表 5. タグメンテーション反応条件に曝露したビーズと非曝露ビーズとの等温増幅後の収率比較

条件	等温収率 (ng/マイクロリットル)
トランスポゾン曝露	36.4
非曝露(対照)	33.4
トランスポゾン曝露	24.4
非曝露(対照)	31.8

10

【 0 4 1 7 】

[00485] 実施例 6 . R N A シーケンシングを実施した同じ細胞からの核 D N A のシーケンシング。図 3 0 A ~ 図 3 0 F は、各々、O K T 3 細胞及び捕捉ビーズが入った OptoSelect デバイスの 4 つの NanoPen チャンバの列を示す。一連の写真は、実験 1 にあるとおりの、R N A 捕捉、タグメンテーション及び搬出が実施されたプロトコルの経過中に撮影した。搬入前に細胞に NucBlue (登録商標) LiveReady Probes (登録商標) 試薬 (Molecular Probes、R37605) 染色剤を加えた (搬入直前に 2 0 0 マイクロリットルの細胞溶液に 2 滴を加える)。プロトコル全体を通じて追加の染色剤は加えなかった。各細胞の核 d s D N A を染色し、この染色は R N A 捕捉、タグメンテーション、及び逆転写のステップ全体を通じて維持された。図 3 0 A ~ 図 3 0 C は明視野条件下で撮影し、図 3 0 D ~ 図 3 0 F は紫外励起光下で撮影して (D N A への結合時 3 6 0 n m で励起、発光極大は 4 6 0 n m)、4 0 0 ~ 4 1 0 n m の D A P I フィルタによって可視化した。図 3 0 A 及び図 3 0 D は、それぞれ明視野下及び D A P I フィルタ露光下の、溶解前の時点における細胞が入った同じ NanoPen チャンバの対を成す画像である。3 0 0 2 はバーコード付きビーズであり、3 0 0 4 は同じ NanoPen チャンバの中にある生体細胞である。図中の 4 つの NanoPen チャンバのうち他のチャンバにも他のビーズ及び他の細胞をまた見ることができ、ただし符号は付していない。図 3 0 B 及び図 3 0 E は、それぞれ明視野下及び 4 0 0 n m 光下における、図 3 0 A 及び図 3 0 C に示されるものと同じ NanoPen チャンバの対を成す画像である。これらの写真は、実験 1 に記載されるとおりの外膜溶解の完了後に撮影した。4 0 0 n m 励起光下で核 D N A 3 0 0 4 をなおも見ることができるとともに (図 3 0 E)、明視野下でビーズ 3 0 0 2 と共に核 3 0 0 4 の形状がなおも残っている。図 3 0 C 及び図 3 0 F は、図 3 0 A ~ 図 3 0 D と同じ一群の 4 つの NanoPen チャンバの中にある同じ細胞についての対を成す画像、それぞれ、明視野、及び 4 0 0 n m 励起光である。図 3 6 0 C 及び図 3 0 F の写真は、逆転写を完了して、c D N A でデコレートされたバーコード付きビーズ 3 0 0 2 ' を各 NanoPen チャンバから搬出した後に撮影した (写真上部のマイクロ流体チャネルの中にある 3 0 0 2 を参照)。明視野下でコンパクトな核 3 0 0 6 をなおも見ることができ、図 3 0 F は、それらの核 3 0 0 6 がなおも核 D N A を含有したことを示している。追加の色素は加えなかったため、ビーズ上に c D N A の染色は生じなかった。

20

30

40

【 0 4 1 8 】

[00486] 図 3 0 A ~ 図 3 0 F から、R N A 捕捉 / ライブラリ調製、及び D N A 捕捉 / ライブラリ調製に関して本明細書に記載されるプロトコルを用いることにより、コンパクトな核がなおも D N A ライブラリ作製用の実現性のある核 d s D N A 源であったことが指摘される。したがって、同じ単一細胞から R N A 及び D N A の両方のシーケンシング結果を入手することができ、シーケンシングした R N A 及び D N A の特定の単一細胞源の Opto

50

Selectデバイス中における位置と相互に関係付けることができる。このようにRNA/DNAシーケンシング結果の単一細胞源の位置を相互に関係付け可能であることにより、特異的抗原に対する抗体を産生する細胞など、同じ単一細胞の表現型の所見と更に相互に関係付けることができる。

【0419】

[00487] バーコード付きプライミング配列を担持するビーズ (bead) を導入するステップは、タグメンテーションステップの前、又はタグメンテーションの後 (実験3のように) のいずれでも好適に実施されることが示された。

【0420】

[00488] 加えて、NanoPenチャンバの中に置かれたバーコード付きビーズ上の1つ以上のバーコードを読み取るステップは、タグメンテーション前、等温増幅前、増幅したDNAの搬出前、又は増幅したDNAの搬出後 (実施例4に示されるとおり) に実施されてもよい。或いは、ビーズは生体細胞の搬入前にNanoPenチャンバの中に置かれてもよい。この実施形態では、バーコードはまた、生体細胞がマイクロ流体環境に持ち込まれる前に検出されてもよい。

10

【0421】

[00489] 実施例7. OKT3細胞及びOKT8細胞について実証されるとおりのB細胞受容体 (BCR) 捕捉、シーケンシングライブラリ調製及びシーケンシング結果

[00490] 細胞: マウス骨髄腫ハイブリドーマ細胞株であるOKT3細胞はATCCから入手した (ATCC (登録商標) カタログ番号CRL-8001 (商標))。細胞は浮遊細胞株として提供された。培養物は、約 1×10^5 ~ 約 2×10^5 生細胞 / mL を播種し、気体環境として空気中5%二酸化炭素を用いて37 でインキュベートすることにより維持した。細胞は2~3日毎に分割した。OKT3細胞数及び生存率をカウントした。マイクロ流体デバイスへのローディングのため細胞密度は 5×10^5 / mL に調整する。

20

【0422】

[00491] マウス骨髄腫ハイブリドーマ細胞株であるOKT8細胞はATCCから入手した (ATCC (登録商標) カタログ番号CRL-8014 (商標))。細胞は浮遊細胞株として提供された。培養物は、約 1×10^5 ~ 約 2×10^5 生細胞 / mL を播種し、気体環境として空気中5%二酸化炭素を用いて37 でインキュベートすることにより維持した。細胞は2~3日毎に分割した。OKT8細胞数及び生存率をカウントした。マイクロ流体デバイスへのローディングのため細胞密度は 5×10^5 / mL に調整する。

30

【0423】

[00492] 培養培地: イスコフ改変ダルベッコ培地 (OKT3については; ATCC (登録商標) カタログ番号30-2005、OKT8については; ATCC (登録商標) カタログ番号30-2005)、10%ウシ胎児血清 (ATCC (登録商標) カタログ番号30-2020) 及び10mLペニシリン - ストレプトマイシン (Life Technologies (登録商標) カタログ番号15140-122) を合わせて培養培地を作製した。この完全培地は0.22 µm フィルタでろ過し、使用時まで暗所下に4 で保存した。

【0424】

[00493] インキュベーション期間中におけるかん流時、培養培地はOptoSelectデバイスへの導入前に空気中5%二酸化炭素で継続的に調整した。

40

【0425】

【表 6 - 1】

表 6. 実験で使用するオリゴヌクレオチド配列

配列 番号	配列	名称
112	5'-Me-isodC//Me-isodG//Me-isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG-3	
113	5'-ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'	
114	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC	YarivH-FOR 1
115	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	YarivH-FOR 2
116	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	YarivH-FOR 3
117	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC	YarivH-FOR 4
118	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC	YarivH-FOR 5
119	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC	YarivH-FOR 6
120	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC	YarivH-FOR 7
121	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC	YarivH-FOR 8
122	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC	YarivH-FOR 9
123	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC	YarivH-FOR 10
124	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC	YarivH-FOR 11
125	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC	YarivH-FOR 12
126	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC	YarivH-FOR 13
127	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC	YarivH-FOR 14
128	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC	YarivH-FOR 15
129	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG	YarivH-FOR 16
130	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC	YarivH-FOR 17
131	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC	YarivH-FOR 18
132	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC	YarivH-FOR 19
133	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C	YarivL-FOR1
134	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C	YarivL-FOR2
135	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C	YarivL-FOR3

【 0 4 2 6 】

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

136	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C	YarivL-FOR4
137	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C	YarivL-FOR5
138	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C	YarivL-FOR6
139	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C	YarivL-FOR7
140	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C	YarivL-FOR8
141	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C	YarivL-FOR9
142	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C	YarivL-FOR10
143	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART C	YarivL-FOR11
144	AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C	YarivL-FOR12
145	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C	YarivL-FOR13
146	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A	YarivL-FOR14
147	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T	YarivL-FOR15
148	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C	YarivL-FOR16
149	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C	YarivL-FOR17
150	AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C	YarivL-FOR 1 λ
151	R702_Opt3_R2R1_組み合わせ AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGA TGTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	
152	R709_Opt3_R2R1_組み合わせ AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGAT CAGACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	
153	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'	1390の5'末端に 対するプライマー 配列(図 13B)
154	P5 セクションは太字: P5_IG_GEN1-3_a_rv AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGATAG ACHGATGGGGSTGTYGTT	重鎖
155	P5 セクションは太字: P5_IG_κCon_rv AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGGATG GTGGGAAGATGGATACAG	軽鎖

【 0 4 2 7 】

[00495] 実験: OptoSelectデバイスにOKT3細胞のサンプルを200マイクロリットル中2E6の密度で導入した。約150個の細胞を光学作動の誘電泳動力によって移動させることにより、各NanoPenチャンバにつき1個の細胞をロードした。各細胞は、チャンバの中でマイクロ流体チャネルへの開口部から最も離れた区画内(例えば、分離領域)に位置した。次にOptoSelectデバイスを50マイクロリットルのプライミング培地で1回フラッシュした。閉じ込められたOKT3細胞の位置を同定するため、OptoSelectデバイスの明視野像を撮影した(図示せず)。OptoSelectデバイスにOKT8細胞のサンプルを200マイクロリットル中2E6の密度で導入した。約150個の細胞を光学作動の誘電

泳動力によって移動させることにより、O K T 3 細胞が閉じ込められていない視野内に各 NanoPen チャンバにつき 1 個の細胞をロードした。次に OptoSelect デバイスを 5 0 マイクロリットルのプライミング培地で 1 回フラッシュした。閉じ込められた O K T 8 細胞の位置を同定するため、OptoSelect デバイスの明視野像を撮影した（図示せず）。OptoSelect デバイスに、本明細書に記載されるとおりの捕捉オリゴ（2 つの例示的な、ただし限定はされない配列は、配列番号 1 0 1 及び 1 0 2 であり、表 2 を参照のこと）を有するバーコード付きビーズのサンプルを 2 0 0 マイクロリットル中 2 E 6 の密度で導入した。続いて占有されているチャンバの各々に、単一の一意にバーコード付きされたビーズをロードした。単一の生体細胞を有する NanoPen チャンバにロードされたビーズの総数は 1 2 6 個で、5 7 個のビーズが O K T 3 細胞に割り当てられ、6 9 個のビーズが O K T 8 細胞に割り当てられ、各ビーズはまた、各チャンバの中で侵入してくる流体のフローを受けない部分の範囲内に位置した。次に OptoSelect デバイスを 5 0 マイクロリットルの 1 × D P B S で 1 回フラッシュした。

【 0 4 2 8 】

【00496】 溶解試薬（単一細胞溶解キット、Ambion カタログ番号 4458235）をマイクロ流体チャンネルに流入させて、NanoPen チャンバ内に拡散させた。個々に閉じ込められた O K T 3 及び O K T 8 細胞を溶解緩衝液に 1 0 分間曝露した。次に OptoSelect デバイスを 3 0 マイクロリットルの 1 × D P B S で 1 回フラッシュした。溶解停止緩衝液（単一細胞溶解キット、Ambion カタログ番号 4458235）を流入させて、マイクロ流体チャンネルにフローがない間に室温で 2 分間インキュベートすることにより、溶解を停止させた。或いは、1 0 × 溶解緩衝液、カタログ番号 635013、Clontech/Takara などの溶解緩衝液を使用して同様の結果をもたらすことができ、これには溶解停止緩衝液を使用する必要がないという利点がある。次に OptoSelect デバイスを 3 0 マイクロリットルの 1 × D P B S で 1 回フラッシュした。使用した条件下では、核膜は破壊されなかった。同じ NanoPen チャンバ中に存在するバーコード付きビーズ上に遊離 m R N A が捕捉された。

【 0 4 2 9 】

【00497】 R T 試薬混合物（Thermo Scientific（商標）Maxima（商標）H Minus R T（ThermoFisher、カタログ番号 EP0751））及びテンプレートスイッチングオリゴヌクレオチド（配列番号 1 1 2）を流入させることにより、捕捉された R N A を c D N A に逆転写した。酵素を NanoPen チャンバ内に 1 6 で 2 0 分の時間にわたり拡散させた後、続いて 4 2 で 9 0 分の反応時間とした。逆転写後、次に OptoSelect デバイスを 3 0 マイクロリットルの 1 × D P B S で 1 回フラッシュした。

【 0 4 3 0 】

【00498】 次に、各捕捉ビーズについて、本明細書に記載されるとおりの蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブの多重フローにより、一意のバーコードを同定した。各蛍光標識プローブセットの連続試薬フローは、1 × D P B S（或いは、IDT Duplex 緩衝液が用いられてもよい）に希釈した 1 マイクロモル濃度でマイクロ流体デバイスのマイクロ流体チャンネルに流入させて、NanoPen チャンバ内に拡散させた。ハイブリダイゼーション後、OptoSelect デバイスを 1 5 0 マイクロリットルの 1 × D P B S でフラッシュすることによりバックグラウンドシグナルを取り除いた。このように同定された各 Cell Barcode の位置（例えば、当該の Cell Barcode で標識されたビーズの NanoPen 位置）を記録し、それを用いてどの特定のセルから B C R 配列がビーズに捕捉されたかを同定した。図 3 1 A 及び図 3 1 B に、2 つの個別の NanoPen チャンバ、3 4 4 1 及び 1 4 5 1 に関するバーコード検出の画像及び結果を示す。NanoPen チャンバ 3 4 4 1 のバーコードは C 3 D 1 1 F 2 2 T 3 1 と決定され、このバーコードは 4 つのカセット化可能配列 GAATACGGGG（配列番号 3）TTCCTCTCGT（配列番号 1 1）AACATCCCTC（配列番号 2 2）CCGCACTTCT（配列番号 3 1）で形成された。NanoPen チャンバ 1 4 5 1 のバーコードは C 1 D 1 1 F 2 4 T 3 1 と決定され、このバーコードは 4 つのカセット化可能配列 CAGCCTTCTG（配列番号 1）TTCCTCTCGT（配列番号 1 1）TTAGCGCGTC（配列番号 2 4）CCGCACTTCT（配列番号 3 1）で形成された。

10

20

30

40

50

【 0 4 3 1 】

[00499] 検出後、チップを10 mM トリス - HCl (0.5 マイクロリットル/秒で200 マイクロリットル) で2回洗浄し、その後、cDNA でデコレートされた捕捉ビーズを搬出した。

【 0 4 3 2 】

[00500] 選択のバーコード付き cDNA デコレートビーズは、移動緩衝液の10 mM トリス - HCl 中で光学作動の誘電泳動力を用いて NanoPen チャンバから搬出した。1回の搬出につき、OKT3 割り当てウェルからは47個のビーズ、OKT8 割り当てウェルからは69個のビーズが含まれた。NanoPen チャンバから搬出し終えたビーズは、続いてフローを用いてマイクロ流体デバイスから搬出し、プールした。

10

【 0 4 3 3 】

[00501] エキソヌクレアーゼ I (NEB、カタログ番号 M0293L) で処理した後、搬出群のビーズを5'-ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3' (配列番号 113) をプライマーとして使用した22 サイクルのDNA増幅 (Advantage (登録商標) 2 PCR キット、Clontech、カタログ番号 639206) に供した。1 × S P R I (固相可逆的固定化) ビーズ (Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter、カタログ番号 A63881)) を供給業者の指示に従い使用して、搬出群の粗増幅混合物の初期精製を実施した。

【 0 4 3 4 】

[00502] 次に粗増幅混合物を2つに分割し、ここでこれらの2つのうち第1の部分は重鎖用のBCR特異的フォワードプライマー (配列番号 114 ~ 132、表6) の混合物による18 サイクルのPCRに供し、第2の部分は軽鎖用のBCR特異的フォワードプライマー (配列番号 133 ~ 150、表6) の混合物による18 サイクルのPCRに供した (Q5 (登録商標) ハイ・フィデリティDNAポリメラーゼ、NEB、カタログ番号 M0491S)。リバースプライマー (配列番号 151 及び 152) が、搬出群のビーズ及び重鎖又は軽鎖に割り当てられたインデックスと共にプライミング配列を付加した。タッチダウンPCRプロトコル (連続サイクルにおいてアニール温度を低下させる) を使用して増幅特異性を増加させた。1 × S P R I (固相可逆的固定化) ビーズ (Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter、カタログ番号 A63881)) を供給業者の指示に従い使用してBCR配列含有アンプリコンの初期精製を実施し、続いて2%アガロースゲル上 (E-gel (商標) EXアガロースゲル2%、カタログ番号 G401002、ThermoFisher Scientific) でサイズにより選択した。供給業者の指示に従い (Zymoclean (商標) ゲルDNA回収キット、カタログ番号 D4001、Zymo Research)、ゲル抽出を実施した。

20

30

【 0 4 3 5 】

[00503] 精製及びサイズ選択したBCR配列含有アンプリコンをT4ポリヌクレオチドキナーゼ (T4ポリヌクレオチドキナーゼ、NEB、カタログ番号 M0201) で処理し、次に1 × S P R I (固相可逆的固定化) ビーズ (Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter、カタログ番号 A63881)) を供給業者の指示に従い使用して反応物を精製した。蛍光による定量化を実施した (Qubit (商標)、ThermoFisher Scientific)。

【 0 4 3 6 】

[00504] 次に、10 ng 以下のBCRアンプリコンを使用した精製後のT4ポリヌクレオチドキナーゼ処理BCR配列含有アンプリコンをセルフライゲートして環状化DNA分子を作成した (T4 DNAリガーゼ、カタログ番号 EL0011、ThermoFisher Scientific)。検出限界、大まかに約0.5 ng を超える任意の量のDNAが、環状化反応に十分であろう。別のアンプリコン分子とのクロスライゲーションよりむしろ自己環状化するようにドライブするには、約10 ng 以下が有用である。

40

【 0 4 3 7 】

[00505] 1 × S P R I (固相可逆的固定化) ビーズ (Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter、カタログ番号 A63881)) を供給業者の指示に従い使用してライゲーション反応物を精製し、続いて2%アガロースゲル上 (E-gel (商標) EXアガロースゲル2%、カタログ番号 G401002、ThermoFisher Scientific) の位置によって環状化D

50

NA分子を選択した。供給業者の指示に従い（Zymoclean（商標）ゲルDNA回収キット、カタログ番号D4001、Zymo Research）、ゲル抽出を実施した。

【0438】

[00506] 次に、Not1制限酵素消化（Not1-HF、NEB、カタログ番号R3189S）を製造者の指図に従い実施し、続いて反応を不活性化させることにより、精製した環状化DNA分子を再び線状化した。1×SPRI（固相可逆的固定化）ビーズ（Agencourt AMPure XPビーズ（Beckman Coulter、カタログ番号A63881））を供給業者の指示に従い使用して、再線状化DNAを精製した。

【0439】

[00507] 再線状化DNAをP7アダプター配列フォワードプライマー（配列番号153、表6）及びP5アダプター配列を含有するBCR定常領域プライマー（配列番号154、表6）による16サイクルのPCRに供した（KAPA HiFi HotStart ReadyMix、KK2601、KAPA Biosystems/Roche）。1×SPRI（固相可逆的固定化）ビーズ（Agencourt AMPure XPビーズ（Beckman Coulter、カタログ番号A63881））を供給業者の指示に従い使用して、増幅したDNA分子を精製した。次に増幅したDNA産物をP7及びP5アダプター配列プライマー（配列番号153及び155、表6）によるPCRに、重鎖について7サイクル及び軽鎖について6サイクル供した（KAPA HiFi HotStart ReadyMix、KK2601、KAPA Biosystems/Roche）。1×SPRI（固相可逆的固定化）ビーズ（Agencourt AMPure XPビーズ（Beckman Coulter、カタログ番号A63881））を供給業者の指示に従い使用して、得られたシーケンシングライブラリを精製し、続いて2%アガロースゲル上（E-gel（商標）EXアガロースゲル2%、カタログ番号G401002、ThermoFisher Scientific）でサイズ（550～750bp）により選択した。供給業者の指示に従い（Zymoclean（商標）ゲルDNA回収キット、カタログ番号D4001、Zymo Research）、ゲル抽出を行った。

【0440】

[00508] 精製したシーケンシングライブラリの定量化を蛍光的に実施した（Qubit（商標）、ThermoFisher Scientific）。シーケンシングはMiSeqシーケンサー（Illumina（登録商標）、Inc.）を用いて実施した。

【0441】

[00509] 配列結果を逆多重化することにより、リード1及びリード2プライマーに含まれるインデックスでプール（重鎖又は軽鎖を含む）毎及びユニークなバーコード配列によって同定されるとおりの細胞毎に分けて配列データのFASTQファイルを作成した。OKT3及びOKT8細胞株の可変領域の、抗原結合部位に対する、重要なサブ領域を含む既知のCDR3 BCR配列を各細胞のリードデータとアラインメントし、それを用いてリードをOKT3細胞又はOKT8細胞のいずれかに由来すると同定した。図32の中の右側の列は、細胞1～8からのリードが、TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGG（配列番号156）のCDR3配列を有する、OKT3配列アイデンティティ（配列番号157、表6）にマッチしたことを示している。

【0442】

[00510] 細胞9～12からのリードは、OKT8配列アイデンティティ（配列番号159、TGTGGTAGAGGTTATGGTTACTACGTATTTGACCACTGG（配列番号158）のCDR2配列を有する）にマッチした。

【0443】

[00511] 各細胞のバーコードはまた、シーケンシングによっても決定しており、細胞1～12の各々について示す。シーケンシングによって決定されたバーコードと上記に記載される試薬フロー方法によって決定されたバーコードとのマッチにより、細胞とゲノムとの間を明白に相互に関係付けることが可能であった。例えば、NanoPenチャンバ1451についてフロー試薬によって上記で決定されたバーコードは、OKT3細胞の表現型に

10

20

30

40

50

マッチする C D R 3 配列を有する細胞 1 にマッチした。NanoPen 3 4 4 1 についての、上記に記載される他のバーコードは、O K T 8 の表現型にマッチする C D R 3 配列を有する細胞 9 のバーコードにマッチした。これは原理証明実験であるため、特定の NanoPen チャンバの中にどのタイプの細胞が配置されているかは分かっており、シーケンシング結果は、バーコードフロー試薬検出が、シーケンシングによって決定された、予想 C D R 3 配列を含むバーコードに完全に結び付いたことを示した。これにより、B C R 配列データを供給源細胞の物理的位置と関連付けることが可能であると実証された。

【 0 4 4 4 】

[00512] 上記に示した任意の改良例に加えて、当業者は、本記載の趣旨及び範囲から逸脱することなく数多くの他の変形例及び代替構成を考案することができ、添付の特許請求の範囲は、かかる改良例及び構成を包含することが意図される。したがって、上記には、現在最も実際的で好ましい態様と見なされるものに関連する情報が特殊性をもって詳細に記載されているが、当業者には、限定はされないが、形態、機能、動作方法、及び使用を含め、数多くの改良が、本明細書に示される原理及び概念から逸脱することなく行われ得ることは明らかであろう。また、本明細書で使用されるとき、実施例及び実施形態は、あらゆる点で例示に過ぎないことも意図され、いかなる形であれ限定するものと解釈されてはならない。更に、本明細書において要素のリスト（例えば、要素 a、b、c）が参照される場合、かかる参照は、挙げられる要素それ自体のいずれか 1 つ、挙げられる要素の全部より少ない任意の組み合わせ、及び / 又は挙げられる要素の全ての組み合わせを包含することが意図される。また、本明細書で使用されるとき、ある（a）、ある（an）、及び 1 つ（one）という用語は、各々、少なくとも 1 つ及び 1 つ以上という用語と同義的であり得る。また、本明細書においてはステップという用語が使用されるが、この用語は単に、記載される方法の異なる部分に注意を向けさせるために用いられるのであってよく、方法の任意の部分の出発点又は停止点を表現すること、又は他の何らかの方法で限定されることを意味するものではないことにも留意しなければならない。

【 0 4 4 5 】

例示的实施形態

[00513]

本明細書に開示される主題において提供される例示的实施形態としては、限定はされないが、特許請求の範囲及び以下の実施形態が挙げられる：

【 0 4 4 6 】

[00514] 1 . 複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含む捕捉物体であって、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、
プライミング配列と；
捕捉配列と；

3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列であって、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列とを含む、捕捉物体。

【 0 4 4 7 】

[00515] 2 . 前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含む、実施形態 1 の捕捉物体。

【 0 4 4 8 】

[00516] 3 . 前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが最も 5 ' 側のヌクレオチドと最も 3 ' 側のヌクレオチドとを含み、
前記プライミング配列が前記最も 5 ' 側のヌクレオチドに隣接するか、又はそれを含み、
前記捕捉配列が前記最も 3 ' 側のヌクレオチドに隣接するか、又はそれを含み、及び
前記バーコード配列が前記プライミング配列の 3 ' 側且つ前記捕捉配列の 5 ' 側に位置する、実施形態 1 又は 2 の捕捉物体。

【 0 4 4 9 】

[00517] 4. 前記3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が6～15ヌクレオチドを含む、実施形態1～3のいずれか1つの捕捉物体。

【0450】

[00518] 5. 前記3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が10ヌクレオチドを含む、実施形態1～4のいずれか1つの捕捉物体。

【0451】

[00519] 6. 前記バーコード配列の3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、いかなる介在オリゴヌクレオチド配列もなしにタンデムで連結されている、実施形態1～5のいずれか1つの捕捉物体。

【0452】

[00520] 7. 前記バーコード配列の前記3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が、複数の12～100個のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列から選択される、実施形態1～6のいずれか1つの捕捉物体。

【0453】

[00521] 8. 前記バーコード配列の前記3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が、配列番号1～40のいずれか1つの配列を有する、実施形態1～7のいずれか1つの捕捉物体。

【0454】

[00522] 9. 前記バーコード配列が4つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含む、実施形態1～8のいずれか1つの捕捉物体。

【0455】

[00523] 10. 第1のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が配列番号1～10のいずれか1つの配列を有し；第2のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が配列番号11～20のいずれか1つの配列を有し；第3のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が配列番号21～30のいずれか1つの配列を有し；及び第4のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が配列番号31～40のいずれか1つの配列を有する、実施形態9の捕捉物体。

【0456】

[00524] 11. 前記プライミング配列が、前記捕捉オリゴヌクレオチドから分離されるとポリメラーゼをプライミングする、実施形態1～10のいずれか1つの捕捉物体。

【0457】

[00525] 12. 前記プライミング配列がP7又はP5プライマーの配列を含む、実施形態11の捕捉物体。

【0458】

[00526] 13. 前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドがunique molecule identifier (UMI) 配列を更に含む、実施形態1～12のいずれか1つの捕捉物体。

【0459】

[00527] 14. 前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが異なるUMI配列を含む、実施形態13の捕捉物体。

【0460】

[00528] 15. 前記UMIが前記プライミング配列の3'側且つ前記捕捉配列の5'側に位置する、実施形態13又は14の捕捉物体。

【0461】

[00529] 16. 前記UMI配列が、5～20ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチド配列である、実施形態13～15のいずれか1つの捕捉物体。

【0462】

[00530] 17. 前記UMIの前記オリゴヌクレオチド配列が10ヌクレオチドを含む、実施形態13～15のいずれか1つの捕捉物体。

【0463】

[00531] 18. 各捕捉オリゴヌクレオチドがNot1制限部位配列を更に含む、実施

10

20

30

40

50

形態 1 ~ 17 のいずれか 1 つの捕捉物体。

【 0 4 6 4 】

[00532] 19 . 前記 N o t 1 制限部位配列が前記捕捉配列の 5 ' 側に位置する、実施形態 18 の捕捉物体。

【 0 4 6 5 】

[00533] 20 . 前記 N o t 1 制限部位配列が前記バーコード配列の 3 ' 側に位置する、実施形態 18 又は 19 の捕捉物体。

【 0 4 6 6 】

[00534] 21 . 各捕捉オリゴヌクレオチドが 1 つ以上のアダプター配列を更に含む、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1 つの捕捉物体。

【 0 4 6 7 】

[00535] 22 . 前記捕捉配列が、ポリ - d T 配列、ランダムヘキサマー配列、又はモザイク末端配列を含む、実施形態 1 ~ 19 のいずれか 1 つの捕捉物体。

【 0 4 6 8 】

[00536] 23 . 複数の捕捉物体であって、前記複数のうちの各捕捉物体が、実施形態 1 ~ 22 のいずれか 1 つに係る捕捉物体であり、ここで、前記複数のうちの各捕捉物体について、前記捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含み、及び前記複数のうちの各捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列が前記複数のうちの他のいずれの捕捉物体の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列とも異なる、複数の捕捉物体。

【 0 4 6 9 】

[00537] 24 . 前記複数の少なくとも 2 5 6 個の捕捉物体を含む、実施形態 23 の複数の捕捉物体。

【 0 4 7 0 】

[00538] 25 . 前記複数の少なくとも 1 0 , 0 0 0 個の捕捉物体を含む、実施形態 23 の複数の捕捉物体。

【 0 4 7 1 】

[00539] 26 . 配列番号 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つの配列を含むオリゴヌクレオチド配列を含むカセット化可能オリゴヌクレオチド配列。

【 0 4 7 2 】

[00540] 27 . 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列であって、前記バーコード配列の前記 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列の各々が配列番号 1 ~ 4 0 のいずれか 1 つの配列を有し、及び前記バーコード配列の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列。

【 0 4 7 3 】

[00541] 28 . 3 つ又は 4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含む実施形態 27 のバーコード配列。

【 0 4 7 4 】

[00542] 29 . 前記 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列が、いかなる介在オリゴヌクレオチド配列もなしにタンデムで連結されている、実施形態 27 又は 28 のバーコード配列。

【 0 4 7 5 】

[00543] 30 . 少なくとも 6 4 個の同一でないバーコード配列を含むバーコード配列セットであって、前記セットの各バーコード配列が実施形態 27 ~ 29 のいずれか 1 つに係る構造を有する、バーコード配列セット。

【 0 4 7 6 】

[00544] 31 . セットが、6 4、8 1、1 0 0、1 2 5、2 1 6、2 5 6、3 4 3、5 1 2、6 2 5、7 2 9、1 0 0 0、1 2 9 6、2 4 0 1、4 0 9 6、6 5 6 1、又は 1 0 , 0 0 0 個のバーコード配列から本質的になる、実施形態 30 のバーコード配列セット。

10

20

30

40

50

【 0 4 7 7 】

[00545] 3 2 . 配列番号 4 1 ~ 8 0 のいずれか 1 つの配列を含むオリゴヌクレオチド配列と；蛍光標識とを含むハイブリダイゼーションプローブ。

【 0 4 7 8 】

[00546] 3 3 . 複数のハイブリダイゼーションプローブを含む試薬であって、前記複数のうちの各ハイブリダイゼーションプローブが実施形態 3 2 に係るハイブリダイゼーションプローブであり、及び前記複数のうちの各ハイブリダイゼーションプローブが、(i) 複数のうちの他のいずれのハイブリダイゼーションプローブのオリゴヌクレオチド配列とも異なるオリゴヌクレオチド配列を含み、及び(i i) 複数のうちの他のいずれのハイブリダイゼーションプローブの蛍光標識とも分光的に区別可能な蛍光標識を含む、試薬。

10

【 0 4 7 9 】

[00547] 3 4 . 複数のハイブリダイゼーションプローブが 2 ~ 4 個のハイブリダイゼーションプローブからなる、実施形態 3 3 の試薬。

【 0 4 8 0 】

[00548] 3 5 . 複数のうちの第 1 のハイブリダイゼーションプローブが、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 1 のサブセットから選択される配列と、第 1 の蛍光標識とを含み；複数のうちの第 2 のハイブリダイゼーションプローブが、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 2 のサブセットから選択される配列と、前記第 1 の蛍光標識と分光的に区別可能な第 2 の蛍光標識とを含み、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 1 及び第 2 のサブセットが重複のないサブセットである、実施形態 3 3 又は 3 4 の試薬。

20

【 0 4 8 1 】

[00549] 3 6 . 複数のうちの第 3 のハイブリダイゼーションプローブが、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 3 のサブセットから選択される配列と、前記第 1 及び第 2 の蛍光標識の各々と分光的に区別可能な第 3 の蛍光標識とを含み、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 1、第 2、及び第 3 のサブセットが重複のないサブセットである、実施形態 3 5 の試薬。

【 0 4 8 2 】

[00550] 3 7 . 複数のうちの第 4 のハイブリダイゼーションプローブが、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 4 のサブセットから選択される配列と、前記第 1、第 2、及び第 3 の蛍光標識の各々と分光的に区別可能な第 4 の蛍光標識とを含み、配列番号 4 1 ~ 8 0 の第 1、第 2、第 3、及び第 4 のサブセットが重複のないサブセットである、実施形態 3 6 の試薬。

30

【 0 4 8 3 】

[00551] 3 8 . 配列番号 4 1 ~ 8 0 の各サブセットが少なくとも 1 0 個の配列を含む、実施形態 3 5 ~ 3 7 のいずれか 1 つの試薬。

【 0 4 8 4 】

[00552] 3 9 . 前記第 1 のサブセットが配列番号 4 1 ~ 5 0 を含み、前記第 2 のサブセットが配列番号 5 1 ~ 6 0 を含み、前記第 3 のサブセットが配列番号 6 1 ~ 7 0 を含み、及び前記第 4 のサブセットが配列番号 7 1 ~ 8 0 を含む、実施形態 3 5 ~ 3 7 のいずれか 1 つの試薬。

【 0 4 8 5 】

[00553] 4 0 . 実施形態 3 3 ~ 3 9 のいずれか 1 つに係る複数の試薬を含むキットであって、各試薬の複数のハイブリダイゼーションプローブが、複数のうちの他のいずれの試薬のハイブリダイゼーションプローブセットとも重複のないセットを形成する、キット。

40

【 0 4 8 6 】

[00554] 4 1 . 3、4、5、6、7、8、9、又は 1 0 個の前記試薬を含む、実施形態 4 0 のキット。

【 0 4 8 7 】

[00555] 4 2 . マイクロ流体デバイス内での 1 つ以上の捕捉物体のインサイチュ同定方法であって、前記マイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する 1 つ以上の隔離ベンの各々に前記 1 つ以上の捕捉物体のうちの単一の捕捉物体を配置することであって、各捕捉物体が

50

複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、及び前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、

プライミング配列と；

捕捉配列と；

バーコード配列であって、前記バーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列と

を含むこと；

第1のハイブリダイゼーションプローブセットを含む第1の試薬溶液を前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャ内のフロー領域に流入させることであって、前記フロー領域が前記1つ以上の隔離ペンの各々に流体接続し、及び前記第1のセットの各ハイブリダイゼーションプローブが、

10

前記1つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかに含まれるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と相補的なオリゴヌクレオチド配列であって、第1のセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの前記相補的なオリゴヌクレオチド配列が前記第1のセット中の前記ハイブリダイゼーションプローブの他のいずれの相補的なオリゴヌクレオチド配列とも同一でない、相補的なオリゴヌクレオチド配列と；

分光的に区別可能な蛍光標識のセットから選択される蛍光標識であって、前記第1のセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの蛍光標識が前記第1のハイブリダイゼーションプローブセット中の他のいずれのハイブリダイゼーションプローブの蛍光標識とも異なる、蛍光標識と

20

を含むこと；

前記第1のセットの前記ハイブリダイゼーションプローブを前記1つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかにおける対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とハイブリダイズすること；

前記第1のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブについて、前記1つ以上の捕捉物体のいずれかに関連する対応する蛍光シグナルを検出すること；及び

前記1つ以上の隔離ペンのうちの1つの中に配置された各捕捉物体について、(i)前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャ内での隔離ペンの位置と、(ii)前記第1のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブの前記対応する蛍光シグナルと前記捕捉物体との関連性又は非関連性と、を含むレコードを生成することであって、前記関連性及び非関連性レコードが、前記捕捉物体を前記隔離ペンと関連付けるバーコードを構成すること

30

を含む方法。

【0488】

[00556] 43. 第nのハイブリダイゼーションプローブセットを含む第nの試薬溶液を前記マイクロ流体デバイスの前記フロー領域に流入させることであって、前記第nのセットの各ハイブリダイゼーションプローブが、

40

前記1つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかに含まれるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と相補的なオリゴヌクレオチド配列であって、第nのセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの前記相補的なオリゴヌクレオチド配列が、前記第nのセット中及び前記マイクロ流体デバイスの前記フロー領域に流入させる任意の他のハイブリダイゼーションプローブセット中の前記ハイブリダイゼーションプローブの他のいずれの相補的なオリゴヌクレオチド配列とも同一でない、相補的なオリゴヌクレオチド配列と；

分光的に区別可能な蛍光標識のセットから選択される蛍光標識であって、前記第nのセット中の各ハイブリダイゼーションプローブの蛍光標識が前記第nのハイブリダイゼーションプローブセット中の他のいずれのハイブリダイゼーションプローブの蛍光標識とも異なる

50

る、蛍光標識と
を含むこと；

前記第 n のセットの前記ハイブリダイゼーションプローブを前記 1 つ以上の捕捉物体のいずれかの前記捕捉オリゴヌクレオチドのいずれかの前記バーコード配列のいずれかにおける対応するカセット化可能オリゴヌクレオチド配列にハイブリダイズすること；

前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブについて、前記 1 つ以上の捕捉物体のいずれかに関連する対応する蛍光シグナルを検出すること；及び

前記 1 つ以上の隔離ペンのうちの 1 つの中に配置された各捕捉物体について、前記レコードに、前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各ハイブリダイゼーションプローブの前記対応する蛍光シグナルと前記捕捉物体との関連性又は非関連性を補足することを更に含む、実施形態 4 2 の方法であって、

n が、 $\{2, \dots, m\}$ の値を有する正の整数の集合であり、

m が、2 以上の値を有する正の整数であり、及び前述の、前記第 n の試薬を流入させるステップ、前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットをハイブリダイズするステップ、前記対応する蛍光シグナルを検出するステップ、及び前記レコードを補足するステップが、前記正の整数の集合中の n の各値について繰り返される、方法。

【0489】

[00557] 44 . m が 3 以上 20 以下（例えば 5 以上 15 以下）の値を有する、実施形態 4 3 の方法。

【0490】

[00558] 45 . m が 8 以上 12 以下（例えば 10）の値を有する、実施形態 4 3 の方法。

【0491】

[00559] 46 . 前記第 1 の試薬溶液及び / 又は前記第 n の試薬溶液を前記フロー領域に流入させることが、前記第 1 の試薬溶液及び / 又は前記第 n の試薬溶液を前記 1 つ以上の隔離ペン内への拡散によって平衡化させることを更に含む、実施形態 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 つの方法。

【0492】

[00560] 47 . 前記 1 つ以上の捕捉物体のいずれかに関連する前記対応する蛍光シグナルを検出することが、

ハイブリダイゼーションプローブを有しないリンス溶液を前記マイクロ流体デバイスの前記フロー領域に流すこと；

前記 1 つ以上の隔離ペン内に前記リンス溶液を拡散によって平衡化させることであって、それにより前記第 1 のセット又は前記第 n のセットのいずれかのうちのハイブリダイズしなかったハイブリダイゼーションプローブを拡散させて前記 1 つ以上の隔離ペンから出すことを更に含み；及び更に、前記リンス溶液を前記流すことが、前記蛍光シグナルの検出前に実施される、実施形態 4 3 ~ 4 5 のいずれか 1 つの方法。

【0493】

[00561] 48 . 各捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの各バーコード配列が 3 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含む、実施形態 4 3 ~ 4 7 のいずれか 1 つの方法。

【0494】

[00562] 49 . 前記第 1 のハイブリダイゼーションプローブセット及び前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各々が 3 つのハイブリダイゼーションプローブを含む、実施形態 4 8 の方法。

【0495】

[00563] 50 . 各捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの各バーコード配列が 4 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含む、実施形態 4 3 ~ 4 7 のいずれか 1 つの方法。

10

20

30

40

50

【 0 4 9 6 】

[00564] 5 1 . 前記第 1 のハイブリダイゼーションプローブセット及び前記第 n のハイブリダイゼーションプローブセットの各々が 4 つのハイブリダイゼーションプローブを含む、実施形態 5 0 の方法。

【 0 4 9 7 】

[00565] 5 2 . 前記 1 つ以上の捕捉物体の各々を配置することが、前記マイクロ流体デバイスの中の前記 1 つ以上の隔離ペンの分離領域の中に前記 1 つ以上の捕捉物体の各々を配置することを含む、実施形態 4 2 ~ 5 1 のいずれか 1 つの方法。

【 0 4 9 8 】

[00566] 5 3 . 前記マイクロ流体デバイスの前記 1 つ以上の隔離ペンの中に 1 つ以上の生体細胞を配置することを更に含む、実施形態 4 2 ~ 5 2 のいずれか 1 つの方法。 10

【 0 4 9 9 】

[00567] 5 4 . 前記 1 つ以上の生体細胞の各 1 つずつが、前記 1 つ以上の隔離ペンのうちの異なる隔離ペンに配置される、実施形態 5 3 の方法。

【 0 5 0 0 】

[00568] 5 5 . 前記 1 つ以上の生体細胞が前記マイクロ流体デバイスの前記 1 つ以上の隔離ペンの前記分離領域の中に配置される、実施形態 5 3 又は 5 4 の方法。

【 0 5 0 1 】

[00569] 5 6 . 1 つ以上の生体細胞のうちの少なくとも 1 つが、中に配置された前記 1 つ以上の捕捉物体のうちの 1 つを有する隔離ペンの中に配置される、実施形態 5 3 ~ 5 5 のいずれか 1 つの方法。 20

【 0 5 0 2 】

[00570] 5 7 . 1 つ以上の生体細胞が、クローン集団からの複数の生体細胞である、実施形態 5 3 ~ 5 6 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 0 3 】

[00571] 5 8 . 前記 1 つ以上の生体細胞を配置することが、前記 1 つ以上の捕捉物体を配置する前に実施される、実施形態 5 3 ~ 5 7 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 0 4 】

[00572] 5 9 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (D E P) 構成を更に含み、及び前記 1 つ以上の捕捉物体を 1 つ以上の隔離ペン内に配置することが誘電泳動 (D E P) 力を用いて実施される、実施形態 4 2 ~ 5 8 のいずれか 1 つの方法。 30

【 0 5 0 5 】

[00573] 6 0 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (D E P) 構成を更に含み、及び前記 1 つ以上の生体細胞を前記 1 つ以上の隔離ペン内に前記配置することが誘電泳動 (D E P) 力を用いて実施される、実施形態 5 3 ~ 5 9 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 0 6 】

[00574] 6 1 . 前記 1 つ以上の捕捉物体が、実施形態 1 ~ 2 5 のいずれか 1 つに係る捕捉物体である、実施形態 4 2 ~ 6 0 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 0 7 】

[00575] 6 2 . 各捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの少なくとも 1 つが、前記捕捉配列によってそこに捕捉された標的核酸を更に含む、実施形態 4 2 ~ 6 1 のいずれか 1 つの方法。 40

【 0 5 0 8 】

[00576] 6 3 . ゲノムデータをマイクロ流体デバイス内の生体細胞と相互に関係付ける方法であって、
捕捉物体をマイクロ流体デバイスの隔離ペン内に配置することであって、前記捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、プライミング配列と；
捕捉配列と； 50

バーコード配列であって、前記バーコード配列が3つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列とを含み；及び

前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含むこと；
 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定すること及び前記同定されたバーコード配列と前記隔離ペンとの間の関連性を記録すること；
 前記生体細胞を前記隔離ペン内に配置すること；
 前記生体細胞を溶解させること及び前記溶解した生体細胞から放出される核酸を、前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドによって捕捉させること；
 前記捕捉された核酸を転写することであって、それにより、前記捕捉オリゴヌクレオチドのうちの1つに共有結合的に結合した相補的な捕捉核酸配列を各々が含む複数の転写核酸を作製すること；
 前記転写核酸及び前記バーコード配列をシーケンシングすることであって、それにより前記バーコード配列のリード配列に関連する前記複数の転写核酸のリード配列を入手すること；
 前記リード配列に基づき前記バーコード配列を同定すること；及び
 前記リード配列によって同定されたバーコード配列及び前記インサイチュで同定されたバーコード配列を使用して前記複数の転写核酸の前記リード配列を前記隔離ペンと関連付けること、及びそれにより前記複数の転写核酸の前記リード配列を前記隔離ペン内に置かれた前記生体細胞と相互に関係付けることを含む方法。

【0509】

[00577] 64．前記生体細胞の表現型を観察すること；及び前記複数の転写核酸の前記リード配列を前記生体細胞の前記表現型と相互に関係付けることを更に含む、実施形態63の方法。

【0510】

[00578] 65．前記生体細胞の表現型を観察することであって、前記生体細胞がクローン集団を代表するものであること；及び前記複数の転写核酸の前記リード配列を前記生体細胞及び前記クローン集団の前記表現型と相互に関係付けることを更に含む、実施形態63の方法。

【0511】

[00579] 66．前記生体細胞の前記表現型を観察することが、前記少なくとも1つの生体細胞の少なくとも1つの物理的特性を観察することを含む、実施形態64又は65の方法。

【0512】

[00580] 67．前記生体細胞の前記表現型を観察することが、前記生体細胞に関してアッセイを実施すること、及び前記アッセイ中に生成される検出可能シグナルを観察することを含む、実施形態64又は65の方法。

【0513】

[00581] 68．前記アッセイがタンパク質発現アッセイである、実施形態67の方法。

【0514】

[00582] 69．前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定すること及び前記同定されたバーコード配列と前記隔離ペンとの間の関連性を記録することが、前記生体細胞を前記隔離ペン内に配置する前に実施される、実施形態63～68のいずれか1つの方法。

【0515】

[00583] 70．前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定すること及び前記同定されたバーコード配列と前記隔離ペンとの間の関連性を記録することが、前記生体細胞を前記隔離ペン内に導入した後に実施される、実施形態6

10

20

30

40

50

3 ~ 68 のいずれか 1 つの方法。

【0516】

[00584] 71 . 前記捕捉物体を配置すること、及び前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定すること及び前記同定されたバーコード配列と前記隔離ペンとの間の関連性を記録することが、前記生体細胞の表現型を観察した後実施される、実施形態 64 ~ 68 のいずれか 1 つの方法。

【0517】

[00585] 72 . 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定すること及び前記同定されたバーコード配列と前記隔離ペンとの間の関連性を記録することが、前記生体細胞を溶解させること及び前記溶解した生体細胞から放出される前記核酸を前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドによって捕捉させることの後に実施される、実施形態 63 ~ 68 のいずれか 1 つの方法。

10

【0518】

[00586] 73 . 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定することが、実施形態 42 ~ 60 のいずれか 1 つの方法を実施することを含む、実施形態 63 ~ 72 のいずれか 1 つの方法。

【0519】

[00587] 74 . 前記捕捉物体が、実施形態 1 ~ 23 のいずれか 1 つの捕捉物体である、実施形態 63 ~ 73 のいずれか 1 つの方法。

【0520】

[00588] 75 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (DEP) 構成を含み、及び前記捕捉物体を前記隔離ペン内に配置することが、誘電泳動 (DEP) 力を用いて前記捕捉物体を動かすことを含む、実施形態 63 ~ 74 のいずれか 1 つの方法。

20

【0521】

[00589] 76 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (DEP) 構成を更に含み、及び前記生体細胞を前記隔離ペンの中に配置することが、誘電泳動 (DEP) 力を用いて前記生体細胞を動かすことを含む、実施形態 63 ~ 75 のいずれか 1 つの方法。

【0522】

[00590] 77 . 複数の捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスの対応する複数の隔離ペン内に配置すること；
複数の生体細胞を前記対応する複数の隔離ペン内に配置すること、及び、
前記複数の捕捉物体及び複数の生体細胞の各々を前記方法の前記追加的なステップに従い処理すること
を更に含む、実施形態 63 ~ 76 のいずれか 1 つの方法。

30

【0523】

[00591] 78 . エンクロージャを含むマイクロ流体デバイスであって、前記エンクロージャがフロー領域と前記フロー領域に通じる複数の隔離ペンとを含む、マイクロ流体デバイスと；

40

複数の捕捉物体であって、前記複数のうちの各捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、
捕捉配列；及び

少なくとも 3 つのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含むバーコード配列であって、前記バーコード配列の各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列と同一でない、バーコード配列を含み、及び前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが同じバーコード配列を含む、複数の捕捉物体とを含む、核酸ライブラリを作製するためのキット。

【0524】

[00592] 79 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (DEP)

50

）構成を更に含む、実施形態 78 のキット。

【0525】

[00593] 80 . 前記複数の捕捉物体が、実施形態 23 ~ 25 のいずれか 1 つに係る複数の捕捉物体である、実施形態 78 又は 79 のキット。

【0526】

[00594] 81 . 前記複数の捕捉物体の各々が、複数のうちの対応する隔離ペン内に 1 つずつ配置される、実施形態 78 ~ 80 のいずれか 1 つのキット。

【0527】

[00595] 82 . 同定テーブルを更に含む、実施形態 81 のキットであって、前記同定テーブルが前記複数の捕捉物体の各々の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列を前記複数のうちの前記対応する隔離ペンと相互に関係付ける、キット。

10

【0528】

[00596] 83 . 複数のハイブリダイゼーションプローブであって、各ハイブリダイゼーションプローブが、前記複数の捕捉物体のいずれか 1 つの前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記カセット化可能オリゴヌクレオチド配列のいずれか 1 つに相補的なオリゴヌクレオチド配列を含む、複数のハイブリダイゼーションプローブと；
標識であって、前記複数のうちの各ハイブリダイゼーションプローブの前記相補的な配列が異なるカセット化可能オリゴヌクレオチド配列に相補的である、標識と
を更に含む、実施形態 78 ~ 82 のいずれか 1 つのキットであって；及び
前記複数のうちの各ハイブリダイゼーションプローブの前記標識が分光的に区別可能な標識のセットから選択される、キット。

20

【0529】

[00597] 84 . 前記複数のうちのハイブリダイゼーションプローブの各相補的な配列が、配列番号 41 ~ 80 のいずれか 1 つの配列を含むオリゴヌクレオチド配列を含む、実施形態 83 のキット。

【0530】

[00598] 85 . 前記標識が蛍光標識である、実施形態 83 又は 84 のキット。

【0531】

[00599] 86 . 生体細胞からバーコード付き cDNA ライブラリを提供する方法であって、
マイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する隔離ペンの中に前記生体細胞を配置すること；
前記隔離ペンの中に捕捉物体を配置することであって、前記捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、プライマーに結合するプライミング配列と；
捕捉配列と；
バーコード配列であって、前記バーコード配列が 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、バーコード配列と
を含むこと；
前記生体細胞を溶解させること及び前記溶解した生体細胞から放出される核酸を、前記捕捉物体に含まれる前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドによって捕捉させること；及び
前記捕捉された核酸を転写することであって、それにより前記捕捉物体をデコレートする複数のバーコード付き cDNA を作製し、各バーコード付き cDNA が、(i) 前記捕捉された核酸のうちの対応する 1 つに相補的なオリゴヌクレオチド配列、それが共有結合的に結合した (i i) 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの 1 つを含むこと
を含む方法。

30

40

【0532】

[00600] 87 . 前記生体細胞が免疫細胞である、実施形態 86 の方法。

50

【 0 5 3 3 】

[00601] 88 . 前記生体細胞が癌細胞である、実施形態 8 6 の方法。

【 0 5 3 4 】

[00602] 89 . 前記生体細胞が幹細胞又は前駆細胞である、実施形態 8 6 の方法。

【 0 5 3 5 】

[00603] 90 . 前記生体細胞が胚である、実施形態 8 6 の方法。

【 0 5 3 6 】

[00604] 91 . 前記生体細胞が単一の生体細胞である、実施形態 8 6 ~ 9 0 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 3 7 】

[00605] 92 . 前記生体細胞を前記配置することが、前記生体細胞をマーキングすることを更に含む、実施形態 8 6 ~ 9 1 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 3 8 】

[00606] 93 . 前記捕捉物体が、実施形態 1 ~ 2 2 のいずれか 1 つに係る捕捉物体である、実施形態 8 6 ~ 9 2 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 3 9 】

[00607] 94 . 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの 1 つ以上の前記捕捉配列がオリゴ d T プライマー配列を含む、実施形態 8 6 ~ 9 3 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 0 】

[00608] 95 . 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの 1 つ以上の前記捕捉配列が遺伝子特異的プライマー配列を含む、実施形態 8 6 ~ 9 3 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 1 】

[00609] 96 . 前記遺伝子特異的プライマー配列が、T 細胞受容体 (T C R) をコードする m R N A 配列を標的にする、実施形態 9 5 の方法。

【 0 5 4 2 】

[00610] 97 . 前記遺伝子特異的プライマー配列が、B 細胞受容体 (B C R) をコードする m R N A 配列を標的にする、実施形態 9 5 の方法。

【 0 5 4 3 】

[00611] 98 . 前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの 1 つ以上の前記捕捉配列が前記放出された核酸のうちの 1 つに結合して前記放出された核酸をプライミングし、それにより前記捕捉された核酸をポリメラーゼによって転写させる、実施形態 8 6 ~ 9 7 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 4 】

[00612] 99 . 前記捕捉物体が磁性成分を含む、実施形態 8 6 ~ 9 8 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 5 】

[00613] 100 . 前記隔離ペンの中に前記生体細胞を配置することが、前記隔離ペンの中に前記捕捉物体を配置する前に実施される、実施形態 8 6 ~ 9 9 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 6 】

[00614] 101 . 前記隔離ペンの中に前記捕捉物体を配置することが、前記隔離ペンの中に前記生体細胞を配置する前に実施される、実施形態 8 6 ~ 9 9 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 7 】

[00615] 102 . 前記捕捉物体が前記隔離ペンの中に位置する間に、前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定することを更に含む、実施形態 8 6 ~ 101 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 4 8 】

[00616] 103 . 前記バーコードを前記同定することが、実施形態 4 2 ~ 6 2 のいずれか 1 つの方法を用いて実施される、実施形態 102 の方法。

10

20

30

40

50

【 0 5 4 9 】

[00617] 1 0 4 . 前記バーコード配列を同定することが、前記生体細胞を溶解させる前に実施される、実施形態 1 0 2 又は 1 0 3 の方法。

【 0 5 5 0 】

[00618] 1 0 5 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが少なくとも 1 つのコーティングされた表面を含む、実施形態 8 6 ~ 1 0 4 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 5 1 】

[00619] 1 0 6 . 前記少なくとも 1 つのコーティングされた表面が、共有結合的に結合した表面を含む、実施形態 1 0 5 の方法。

【 0 5 5 2 】

[00620] 1 0 7 . 前記少なくとも 1 つのコーティングされた表面が親水性又は負電荷のコーティングされた表面を含む、実施形態 1 0 5 又は 1 0 6 の方法。

【 0 5 5 3 】

[00621] 1 0 8 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (D E P) 構成を更に含む、実施形態 8 6 ~ 1 0 7 のいずれか 1 つの方法であって、及び前記生体細胞を配置すること及び / 又は前記捕捉物体を配置することが、前記生体細胞及び / 又は前記捕捉物体上に又はそれに近接して誘電泳動 (D E P) 力を印加することによって実施される、方法。

【 0 5 5 4 】

[00622] 1 0 9 . 前記マイクロ流体デバイスが複数の隔離ペンを更に含む、実施形態 8 6 ~ 1 0 8 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 5 5 】

[00623] 1 1 0 . 前記複数の隔離ペンの中に複数の前記生体細胞を配置することを更に含む、実施形態 1 0 9 の方法。

【 0 5 5 6 】

[00624] 1 1 1 . 前記複数の前記生体細胞がクローン集団である、実施形態 1 1 0 の方法。

【 0 5 5 7 】

[00625] 1 1 2 . 前記複数の隔離ペンの中に前記複数の前記生体細胞を配置することが、前記複数のうちの対応する隔離ペンに前記複数のうちの実質的に 1 つのみの生体細胞を配置することを含む、実施形態 1 1 0 又は 1 1 1 の方法。

【 0 5 5 8 】

[00626] 1 1 3 . 前記複数の隔離ペンの中に複数の前記捕捉物体を配置することを更に含む、実施形態 1 0 9 ~ 1 1 2 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 5 9 】

[00627] 1 1 4 . 前記複数の隔離ペンの中に前記複数の前記捕捉物体を配置することが、前記複数の隔離ペンのうちの対応する 1 つの中に実質的に 1 つのみの捕捉物体を配置することを含む、実施形態 1 1 3 の方法。

【 0 5 6 0 】

[00628] 1 1 5 . 前記複数の隔離ペンの中に前記複数の捕捉物体を配置することが、前記生体細胞又は前記複数の前記生体細胞を前記溶解することの前に実施される、実施形態 1 1 3 又は 1 1 4 の方法。

【 0 5 6 1 】

[00629] 1 1 6 . 前記複数の前記捕捉物体が、実施形態 2 3 に係る複数の捕捉物体である、実施形態 1 1 3 ~ 1 1 5 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 6 2 】

[00630] 1 1 7 . 前記捕捉物体又は前記複数の前記捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスから搬出することを更に含む、実施形態 8 6 ~ 1 1 6 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 6 3 】

[00631] 1 1 8 . 前記複数の前記捕捉物体を搬出することが、前記複数の前記捕捉物

10

20

30

40

50

体の各々を個別に搬出することを含む、実施形態 1 1 7 の方法。

【 0 5 6 4 】

[00632] 1 1 9 . 前記複数のうちの各前記捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスの外部にある別個の収容先に送ることを更に含む、実施形態 1 1 8 の方法。

【 0 5 6 5 】

[00633] 1 2 0 . 前記生体細胞又は複数の前記生体細胞を前記配置すること；前記捕捉物体又は前記複数の前記捕捉物体を前記配置すること；前記生体細胞又は前記複数の前記生体細胞を前記溶解すること及び前記溶解した生体細胞又は前記複数の前記生体細胞から放出される核酸を前記捕捉させること；前記転写すること；及び前記捕捉物体又は前記複数のうちの各前記捕捉物体の前記バーコード配列をインサイチュで前記同定することのうちの 1 つ以上が自動化された方式で実施される、実施形態 8 6 ~ 1 1 9 のいずれか 1 つの方法。

10

【 0 5 6 6 】

[00634] 1 2 1 . バーコード付きシーケンシングライブラリを提供する方法であって、実施形態 8 6 ~ 1 2 0 のいずれか 1 つの方法によって得られた捕捉物体の c D N A ライブラリ又は複数の前記捕捉物体の各々の c D N A ライブラリを増幅すること；及び前記増幅した D N A ライブラリ又は前記複数の c D N A ライブラリをタグメンテーションすることであって、それにより 1 つ以上のバーコード付きシーケンシングライブラリを作製することを含む方法。

20

【 0 5 6 7 】

[00635] 1 2 2 . 前記 c D N A ライブラリ又は前記複数の c D N A ライブラリを増幅することが、プールインデックス配列を導入することを含み、前記プールインデックス配列が 4 ~ 1 0 ヌクレオチドを含む、実施形態 1 2 1 の方法。

【 0 5 6 8 】

[00636] 1 2 3 . 複数の前記バーコード付きシーケンシングライブラリを組み合わせることを更に含む、実施形態 1 2 2 の方法であって、前記複数のうちの各バーコード付きシーケンシングライブラリが異なるバーコード配列及び / 又は異なるプールインデックス配列を含む、方法。

【 0 5 6 9 】

[00637] 1 2 4 . 生物学的微小物体からバーコード付きゲノム D N A ライブラリを提供する方法であって、ゲノム D N A を含む生物学的微小物体をマイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する隔離ベンの中に配置すること；

30

前記生物学的微小物体の核膜を破壊する能力を有する溶解試薬を前記生物学的微小物体に接触させることであって、それにより前記生物学的微小物体のゲノム D N A を放出させること；

前記放出されたゲノム D N A をタグメンテーションすることであって、それにより第 1 のタグメンテーション挿入配列によって定義される第 1 の末端と第 2 のタグメンテーション挿入配列によって定義される第 2 の末端とを有する複数のタグメント化ゲノム D N A 断片を作製すること；

40

前記隔離ベンの中に捕捉物体を配置することであって、前記捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、第 1 のプライミング配列と；

第 1 のタグメンテーション挿入捕捉配列と；

バーコード配列であって、前記バーコード配列が 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記バーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、バーコード配列とを含むこと；

前記複数のタグメント化ゲノム D N A 断片のうちの 1 つを、(i) 前記捕捉物体の前記複

50

数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの1つの前記第1のタグメンテーション挿入捕捉配列、(i i) 第2のタグメンテーション挿入捕捉配列、ランダム化プライマー配列、又は遺伝子特異的プライマー配列に結合した第2のプライミング配列を含む増幅オリゴヌクレオチド、及び(i i i) 鎖置換酵素とポリメラーゼとを含む酵素混合物と接触させること；前記接触させた複数のタグメント化ゲノムDNA断片をある期間インキュベートすることであって、それにより同時に前記複数のタグメント化ゲノムDNA断片のうちの前記1つを増幅するとともに前記捕捉オリゴヌクレオチド及び前記増幅オリゴヌクレオチドを前記複数のタグメント化ゲノムDNA断片のうちの前記1つの末端に付加して前記バーコード付きゲノムDNAライブラリを作製すること；及び
前記バーコード付きゲノムDNAライブラリを前記マイクロ流体デバイスから搬出することを含む方法。

10

【0570】

[00638] 125. 前記隔離ペンの中に前記生物学的微小物体を配置することが、前記隔離ペンの中に前記捕捉物体を配置する前に実施される、実施形態124の方法。

【0571】

[00639] 126. 前記生物学的微小物体が生体細胞である、実施形態124又は125の方法。

【0572】

[00640] 127. 前記生物学的微小物体が生体細胞（例えば真核細胞）の核である、実施形態124又は125の方法。

20

【0573】

[00641] 128. 前記生体細胞が免疫細胞である、実施形態126又は127の方法。

【0574】

[00642] 129. 前記生体細胞が癌細胞である、実施形態126又は127の方法。

【0575】

[00643] 130. 前記溶解試薬が少なくとも1つのリボヌクレアーゼ阻害薬を含む、実施形態124～129のいずれか1つの方法。

【0576】

[00644] 131. 前記タグメンテーションすることが、前記放出されたゲノムDNAを、(i) 前記第1のタグメンテーション挿入配列を含む第1の二本鎖DNA断片、及び(i i) 前記第2のタグメンテーション挿入配列を含む第2の二本鎖DNA断片を负荷したトランスポザーゼと接触させることを含む、実施形態124～130のいずれか1つの方法。

30

【0577】

[00645] 132. 前記第1の二本鎖DNA断片が、第3のプライミング配列に結合した第1のモザイク末端配列を含み、及び前記第2の二本鎖DNA断片が、第4のプライミング配列に結合した第2のモザイク末端配列を含む、実施形態131の方法。

【0578】

[00646] 133. 前記捕捉物体の各捕捉オリゴヌクレオチドの前記第1のタグメンテーション挿入捕捉配列が、前記第1のタグメンテーション挿入配列に少なくとも部分的に相補的な配列を含む、実施形態131又は132の方法。

40

【0579】

[00647] 134. 前記増幅オリゴヌクレオチドの前記第2のタグメンテーション挿入捕捉配列が、前記第2のタグメンテーション挿入配列に少なくとも部分的に相補的な配列を含む、実施形態131～133のいずれか1つの方法。

【0580】

[00648] 135. 前記捕捉物体が、実施形態1～20のいずれか1つに係る捕捉物体である、実施形態124～134のいずれか1つの方法。

【0581】

[00649] 136. 前記捕捉物体が磁性成分を含む、実施形態124～135のいずれ

50

か 1 つの方法。

【 0 5 8 2 】

[00650] 1 3 7 . 前記捕捉物体が前記隔離ペンの中に位置する間に、前記捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列をインサイチュで同定することを更に含む、実施形態 1 2 4 ~ 1 3 6 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 8 3 】

[00651] 1 3 8 . 前記バーコード配列を前記同定することが、実施形態 4 2 ~ 6 2 のいずれか 1 つの方法を用いて実施される、実施形態 1 3 7 の方法。

【 0 5 8 4 】

[00652] 1 3 9 . 前記バーコード配列を同定することが、前記生体細胞を溶解させる前に実施される、実施形態 1 3 7 又は 1 3 8 の方法。

10

【 0 5 8 5 】

[00653] 1 4 0 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが少なくとも 1 つのコーティングされた表面を含む、実施形態 1 2 4 ~ 1 3 9 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 8 6 】

[00654] 1 4 1 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが少なくとも 1 つの調整された表面を含む、実施形態 1 2 4 ~ 1 4 0 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 8 7 】

[00655] 1 4 2 . 前記少なくとも 1 つの調整された表面が、共有結合的に結合した親水性部分又は負電荷部分を含む、実施形態 1 4 1 の方法。

20

【 0 5 8 8 】

[00656] 1 4 3 . 前記マイクロ流体デバイスの前記エンクロージャが誘電泳動 (D E P) 構成を更に含み、及び前記生物学的微小物体を配置すること及び / 又は前記捕捉物体を配置することが、前記生体細胞及び / 又は前記捕捉物体上に又はそれに近接して誘電泳動 (D E P) 力を印加することによって実施される、実施形態 1 2 4 ~ 1 4 2 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 8 9 】

[00657] 1 4 4 . 前記マイクロ流体デバイスが複数の隔離ペンを更に含む、実施形態 1 2 4 ~ 1 4 3 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 9 0 】

30

[00658] 1 4 5 . 前記複数の隔離ペンの中に複数の前記生物学的微小物体を配置することを更に含む、実施形態 1 4 4 の方法。

【 0 5 9 1 】

[00659] 1 4 6 . 前記複数の前記生物学的微小物体が生体細胞のクローン集団である、実施形態 1 4 5 の方法。

【 0 5 9 2 】

[00660] 1 4 7 . 前記複数の隔離ペンの中に前記複数の前記生物学的微小物体を配置することが、前記複数のうちの対応する隔離ペンに前記複数のうちの実質的に 1 つのみの生物学的微小物体を配置することを含む、実施形態 1 4 5 又は 1 4 6 の方法。

【 0 5 9 3 】

40

[00661] 1 4 8 . 前記複数の隔離ペンの中に複数の前記捕捉物体を配置することを更に含む、実施形態 1 4 4 ~ 1 4 7 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 9 4 】

[00662] 1 4 9 . 前記複数の隔離ペンの中に前記複数の前記捕捉物体を配置することが、前記複数の隔離ペンのうちの対応する 1 つの中に実質的に 1 つのみの捕捉物体を配置することを含む、実施形態 1 4 8 の方法。

【 0 5 9 5 】

[00663] 1 5 0 . 前記複数の隔離ペンの中に前記複数の捕捉物体を配置することが、前記生物学的微小物体又は前記複数の前記生物学的微小物体を前記溶解することの前に実施される、実施形態 1 4 8 又は 1 4 9 の方法。

50

【 0 5 9 6 】

【00664】 1 5 1 . 前記複数の前記捕捉物体が、実施形態 2 3 に係る複数の捕捉物体である、実施形態 1 4 8 ~ 1 5 0 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 9 7 】

【00665】 1 5 2 . 前記捕捉物体又は前記複数の前記捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスから搬出することを更に含む、実施形態 1 2 4 ~ 1 5 1 のいずれか 1 つの方法。

【 0 5 9 8 】

【00666】 1 5 3 . 前記複数の前記捕捉物体を搬出することが、前記複数の前記捕捉物体の各々を個別に搬出することを含む、実施形態 1 5 2 の方法。

【 0 5 9 9 】

【00667】 1 5 4 . 前記複数のうちの各前記捕捉物体を前記マイクロ流体デバイスの外部にある別個の収容先に送ることを更に含む、実施形態 1 5 3 の方法。

【 0 6 0 0 】

【00668】 1 5 5 . 前記タグメンテーションするステップ、接触させるステップ、及びインキュベートするステップが、前記複数の生物学的微小物体のうちの 1 つが入った前記隔離ペンの各々について実質的に同時に実施される、実施形態 1 4 5 ~ 1 5 4 のいずれか 1 つの方法。

【 0 6 0 1 】

【00669】 1 5 6 . 前記生物学的微小物体又は前記複数の前記生物学的微小物体を前記配置すること；前記捕捉物体又は前記複数の前記捕捉物体を前記配置すること；前記生物学的微小物体又は前記複数の前記生物学的微小物体を前記溶解させること及び前記溶解した生体細胞又は前記複数の前記生体細胞から放出される核酸を前記捕捉させること；前記放出されたゲノム DNA を前記タグメンテーションすること；前記複数のタグメント化ゲノム DNA 断片のうちの 1 つを前記接触させること；前記接触させた複数のタグメント化ゲノム DNA 断片を前記インキュベートすること；前記バーコード付きゲノム DNA ライブラリ又は前記複数の DNA ライブラリを前記搬出すること；及び前記捕捉物体又は前記複数のうちの各前記捕捉物体の前記バーコード配列をインサイチュで前記同定することのうちの 1 つ以上が自動化された方式で実施される、実施形態 1 2 4 ~ 1 5 5 のいずれか 1 つの方法。

【 0 6 0 2 】

【00670】 1 5 7 . 単一の生体細胞からバーコード付き c DNA ライブラリ及びバーコード付きゲノム DNA ライブラリを提供する方法であって、マイクロ流体デバイスのエンクロージャの中に位置する隔離ペンの中に前記生体細胞を配置すること；

前記隔離ペンの中に第 1 の捕捉物体を配置することであって、前記第 1 の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドが、第 1 のプライミング配列と；

第 1 の捕捉配列と；

第 1 のバーコード配列であって、前記第 1 のバーコード配列が 3 つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記第 1 のバーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、第 1 のバーコード配列と

を含むこと；

実施形態 8 6 ~ 1 2 3 のいずれか 1 つの方法を実施することにより前記バーコード付き c DNA ライブラリを入手することであって、前記生体細胞を溶解させることが、前記生体細胞の細胞膜が分解されて前記生体細胞から細胞質 RNA が放出される一方で、前記生体細胞の核膜は intact なまま残るように実施され、それにより前記生体細胞の前記 RNA からの前記バーコード付き c DNA ライブラリでデコレートされた前記第 1 の捕捉物体が提供されること；

前記 c DNA ライブラリでデコレートされた第 1 の捕捉物体を前記マイクロ流体デバイス

10

20

30

40

50

から搬出すること；

前記隔離ベンの中に第２の捕捉物体を配置することであって、前記第２の捕捉物体が複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含み、各々が

第２のプライミング配列と；

第１のタグメンテーション挿入捕捉配列と；

第２のバーコード配列であって、前記第２のバーコード配列が３つ以上のカセット化可能オリゴヌクレオチド配列を含み、各カセット化可能オリゴヌクレオチド配列が前記第２のバーコード配列の他のいずれのカセット化可能オリゴヌクレオチド配列とも同一でない、第２のバーコード配列と

を含むこと；

10

実施形態１２４～１５６のいずれか１つの方法を実施することにより前記バーコード付きゲノムＤＮＡライブラリを入手することであって、前記生体細胞からの複数のタグメント化ゲノムＤＮＡ断片が前記第２の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのうちの１つの前記第１のタグメンテーション挿入捕捉配列と接触し、それにより前記生体細胞の前記ゲノムＤＮＡからの前記バーコード付きゲノムＤＮＡライブラリが提供されること；及び

前記バーコード付きゲノムＤＮＡライブラリを前記マイクロ流体デバイスから搬出することを含む方法。

【０６０３】

【００６７１】 １５８．前記第１の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列を同定することを更に含む、実施形態１５７の方法。

20

【０６０４】

【００６７２】 １５９．前記第１の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列を同定することが、前記隔離ベンに前記生体細胞を配置する前；前記生体細胞の前記ＲＮＡから前記バーコード付きｃＤＮＡライブラリを入手する前；又は前記バーコード付きｃＤＮＡライブラリでデコレートされた第１の捕捉物体をマイクロ流体デバイスから搬出する前に実施される、実施形態１５８の方法。

【０６０５】

【００６７３】 １６０．前記第２の捕捉物体の前記複数のオリゴヌクレオチドの前記バーコード配列を同定することを更に含む、実施形態１５７～１５９のいずれか１つの方法。

30

【０６０６】

【００６７４】 １６１．前記第２の捕捉の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列を同定することが、前記バーコード付きゲノムＤＮＡライブラリを入手する前又は前記バーコード付きゲノムＤＮＡライブラリを前記マイクロ流体デバイスから搬出した後に実施される、実施形態１６０の方法。

【０６０７】

【００６７５】 １６２．前記第１又は前記第２の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列を同定することが、実施形態４２～６０のいずれか１つの方法を用いて実施される、実施形態１５７～１６１のいずれか１つの方法。

【０６０８】

40

【００６７６】 １６３．前記第１の捕捉物体及び前記第２の捕捉物体が、各々、実施形態１～２２のいずれか１つの捕捉物体である、実施形態１５７～１６２のいずれか１つの方法。

【０６０９】

【００６７７】 １６４．前記第１の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記第１のプライミング配列が前記第２の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記第２のプライミング配列と異なる、実施形態１５７～１６３のいずれか１つの方法。

【０６１０】

【００６７８】 １６５．前記第１の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記第１の捕捉配列が前記第２の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記第１のタグメンテーション挿入捕捉配列と異なる、実施形態１５７～１６４のいずれか１つの方法。

50

【0611】

[00679] 166. 前記第1の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が前記第2の捕捉物体の前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列と同じである、実施形態157~165のいずれか1つの方法。

【0612】

[00680] 167. バーコード付きB細胞受容体(BCR)シーケンシングライブラリを提供する方法であって、

Bリンパ球からバーコード付きcDNAライブラリを作成することであって、前記作成することが実施形態86~109のいずれか1つの方法により実施され、前記バーコード付きcDNAライブラリが、複数の捕捉オリゴヌクレオチドを含む捕捉物体をデコレートし、前記複数のうちの各捕捉オリゴヌクレオチドがNot1制限部位配列を含むこと；

前記バーコード付きcDNAライブラリを増幅すること；

前記バーコード付きcDNAライブラリからバーコード付きBCR配列を選択することであって、それによりバーコード付きBCR配列が富化されたライブラリを作製すること；

バーコード付きBCR配列が富化された前記ライブラリからの配列を環状化することであって、それにより環状化バーコード付きBCR配列のライブラリを作製すること；

前記環状化バーコード付きBCR配列ライブラリを再び線状化して、各々がそれぞれの可変(V)サブ領域及び/又はそれぞれの多様性(D)サブ領域の3'側に前記BCR配列の定常(C)領域を呈する再配列されたバーコード付きBCR配列のライブラリを提供すること；及び、

シーケンシングアダプターを付加して前記Vサブ領域及び/又は前記Dサブ領域をサブ選択することであって、それによりバーコード付きBCRシーケンシングライブラリを作製すること

を含む方法。

【0613】

[00681] 168. 前記BCRシーケンシングライブラリを増幅して、バーコード付きBCRサブ領域配列の増幅ライブラリを提供することを更に含む、実施形態167の方法。

【0614】

[00682] 169. 前記バーコード付きcDNAライブラリを増幅することが、ユニバーサルプライマーを使用して実施される、実施形態167又は168の方法。

【0615】

[00683] 170. 前記BCR配列領域を選択することが、BCR配列に選択的なポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を実施し、それにより前記バーコード付きBCR領域選択的増幅DNAのライブラリを作製することを含む、実施形態167~169のいずれか1つの方法。

【0616】

[00684] 171. 前記バーコード付きBCR配列を選択することが、少なくとも1つのシーケンシングプライマー配列及び/又は少なくとも1つのインデックス配列を付加することを更に含む、実施形態167~170のいずれか1つの方法。

【0617】

[00685] 172. バーコード付きBCR配列が富化された前記ライブラリからの配列を環状化することが、各バーコード付きBCR配列の5'末端をそのそれぞれの3'末端にライゲートすることを含む、実施形態167~171のいずれか1つの方法。

【0618】

[00686] 173. 前記環状化バーコード付きBCR配列のライブラリを再び線状化することが、前記環状化バーコード付きBCR配列のライブラリの各々を前記Not1制限部位で消化することを含む、実施形態167~172のいずれか1つの方法。

【0619】

[00687] 174. 前記シーケンシングアダプターを付加してVサブ領域及び/又はDサブ領域をサブ選択することが、PCRを実施することであって、それによってシーケン

10

20

30

40

50

シングアダプターを付加して前記Vサブ領域及び／又はDサブ領域をサブ選択することを
含む、実施形態167～173のいずれか1つの方法。

【0620】

[00688] 175．前記捕捉物体が、実施形態1～22のいずれか1つに係る捕捉物体
である、実施形態167～174のいずれか1つの方法。

【0621】

[00689] 176．実施形態42～60のいずれか1つの方法を用いて前記捕捉物体の
前記複数の捕捉オリゴヌクレオチドのバーコード配列を同定することを更に含む、実施形
態167～175のいずれか1つの方法。

【0622】

[00690] 177．前記同定することが、前記バーコード付きcDNAライブラリを増
幅する前に実施される、実施形態176の方法。

【0623】

[00691] 178．前記同定することが、前記バーコード付きcDNAライブラリを作
成する間に実施される、実施形態177の方法。

【0624】

[00692] 179．前記の前記バーコード付きcDNAライブラリを増幅すること；バ
ーコード付きBCR配列に選択的な前記ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施すること
；配列を環状化すること；前記環状化バーコード付きBCR配列のライブラリを前記No
t1制限部位で再び線状化すること；及び前記シーケンシングアダプターを付加してVサ
ブ領域及び／又はDサブ領域をサブ選択することのいずれかが、マイクロ流体デバイスの
エンクロージャの中に位置する隔離ペンの中で実施される、実施形態167～178のい
ずれか1つの方法。

【0625】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

非公式の配列番号表

配列 番号	配列	タイプ
1	CAGCCTTCTG	人工配列
2	TGTGAGTTCC	人工配列
3	GAATACGGGG	人工配列
4	CTTTGGACCC	人工配列
5	GCCATACACG	人工配列
6	AAGCTGAAGC	人工配列
7	TGTGGCCATT	人工配列
8	CGCAATCTCA	人工配列
9	TGCGTTGTTG	人工配列
10	TACAGTTGGC	人工配列
11	TTCCTCTCGT	人工配列
12	GACGTTACGA	人工配列
13	ACTGACGCGT	人工配列
14	AGGAGCAGCA	人工配列
15	TGACGCGCAA	人工配列
16	TCCTCGCCAT	人工配列
17	TAGCAGCCCA	人工配列
18	CAGACGCTGT	人工配列
19	TGGAAAGCGG	人工配列
20	GCGACAAGAC	人工配列
21	TGTCCGAAAG	人工配列
22	AACATCCCTC	人工配列
23	AAATGTCCCG	人工配列
24	TTAGCGCGTC	人工配列
25	AGTTCAGGCG	人工配列
26	ACAGGGGAAC	人工配列
27	ACCGGATTGG	人工配列
28	TCGTGTGTGA	人工配列
29	TAGGTCTGCG	人工配列
30	ACCCATACCC	人工配列
31	CCGCACTTCT	人工配列
32	TTGGGTACAG	人工配列
33	ATTCGTCGGA	人工配列
34	GCCAGCGTAT	人工配列
35	GTTGAGCAGG	人工配列
36	GGTACCTGGT	人工配列
37	GCATGAACGT	人工配列
38	TGGCTACGAT	人工配列
39	CGAAGGTAGG	人工配列
40	TTCAACCGAG	人工配列
41	CAGAAGGCTG/3AlexF647N/	人工配列
42	GGAAC TCACA/3AlexF647N/	人工配列
43	CCCCGTATTC/3AlexF647N/	人工配列
44	GGGTCCAAAG/3AlexF647N/	人工配列
45	CGTGTATGGC/3AlexF647N/	人工配列
46	GCTTCAGCTT/3AlexF647N/	人工配列
47	AATGGCCACA/3AlexF647N/	人工配列

【 0 6 2 6 】

10

20

30

40

【表 7 - 2】

48	TGAGATTGCG/3AlexF647N/	人工配列
49	CAACAACGCA/3AlexF647N/	人工配列
50	GCCAACTGTA/3AlexF647N/	人工配列
51	/5AlexF405N/ACGAGAGGAA	人工配列
52	/5AlexF405N/TCGTAACGTC	人工配列
53	/5AlexF405N/ACGCGTCAGT	人工配列
54	/5AlexF405N/TGCTGCTCCT	人工配列
55	/5AlexF405N/TTGCGCGTCA	人工配列
56	/5AlexF405N/ATGGCGAGGA	人工配列
57	/5AlexF405N/TGGGCTGCTA	人工配列
58	/5AlexF405N/ACAGCGTCTG	人工配列
59	/5AlexF405N/CCGCTTTCCA	人工配列
60	/5AlexF405N/GTCTTGTCGC	人工配列
61	CTTTCGGACA/3AlexF488N/	人工配列
62	GAGGGATGTT/3AlexF488N/	人工配列
63	CGGGACATTT/3AlexF488N/	人工配列
64	GACGCGCTAA/3AlexF488N/	人工配列
65	CGCCTGAACT/3AlexF488N/	人工配列
66	GTTCCCTGT/3AlexF488N/	人工配列
67	CCAATCCGGT/3AlexF488N/	人工配列
68	TCACACACGA/3AlexF488N/	人工配列
69	CGCAGACCTA/3AlexF488N/	人工配列
70	GGGTATGGGT/3AlexF488N/	人工配列
71	AGAAGTGCGG/3AlexF594N/	人工配列
72	CTGTACCCAA/3AlexF594N/	人工配列
73	TCCGACGAAT/3AlexF594N/	人工配列
74	ATACGCTGGC/3AlexF594N/	人工配列
75	CCTGCTCAAC/3AlexF594N/	人工配列
76	ACCAGGTACC/3AlexF594N/	人工配列
77	ACGTTCATGC/3AlexF594N/	人工配列
78	ATCGTAGCCA/3AlexF594N/	人工配列
79	CCTACCTTCG/3AlexF594N/	人工配列
80	CTCGGTTGAA/3AlexF594N/	人工配列
81	AGTCGACTGA	人工配列
82	TCAGCTGACT-FITC	人工配列
83	TCAGCTGACTXXXXXX	人工配列
84	NNNNNNNNNN	人工配列
85	TTTTTTTTTT	人工配列
86	AAAAAAAAAA	人工配列
87	CCCCCCCCC	人工配列
88	GGGGGGGGG	人工配列
89	GGGGGCCCCCTTTTTTTTTTCCGGCCGGCCAAAAATTTT	人工配列
90	AAAAAAAAAATTTTTTTTTTGGGGGGGGGGCCCCCCCCC	人工配列
91	GGGGGCCCCCTTAATTAATTCCGGCCGGCCAAAAATTTT	人工配列
92	GGGGGCCCCCTTTTTTTTTTGGGGGGGGGGCCCCCCCCC	人工配列
93	CCCCGGGGG	人工配列
94	AATTAATTAA	人工配列
95	GGCCGGCCGG	人工配列
96	TTTTTAAAAA	人工配列

【 0 6 2 7 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

配列 番号	配列	タイプ
97	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'	人工配列
98	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGCAATCTCACAGACGCTGTT CGTGTGTGATGGCTACGATNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'	人工配列
99	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'	人工配列
100	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'	人工配列
101	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCAGCCTTCTGTTCCCTCTCGTT GTCCGAAAGCCGCACTTCTNNNNNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN	人工配列
102	ビーズ-5'-リンカー- ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCGTTGTTGTGGAAAGCGG TAGGTCTGCGCGAAGGTAGGNNNNNNNNNNATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTT GGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN- 3'	人工配列

10

20

【 0 6 2 8 】

30

40

50

【表 7 - 4】

配列 番号	配列	タイプ
103	/5Me-isodC//isodG//iMe- isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG	人工配列
104	5'-ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	人工配列
105	5'-/5Biosg/ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'	人工配列
106	(5'- AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCT TC C*G*A*T*C*T-3'	人工配列
107	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'	人工配列
108	5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3'	人工配列
109	/5BiotinTEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGCCTTAG TCTCGTGGGCTCG*G	人工配列
110	/5BiotinTEG/CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACG GTCTCGTGGGCTCG*G	人工配列
111	/5BiotinTEG/AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACTG CATATCGTCGGCAGCGT*C	人工配列
112	5'-Me-isodC//Me-isodG//Me- isodC/ACACTCTTTCCCTACACGACGCrGrGrG-3	人工配列
113	5'-ACACTCTTTCCCT ACACGACGC-3'	人工配列
114	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT RMA GCT TCA GGA GTC	人工配列
115	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	人工配列
116	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT BCA GCT BCA GCA GTC	人工配列
117	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT CCA RCT GCA ACA RTC	人工配列
118	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA GCT BCA GCA RTC	人工配列
119	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT YCA RCT GCA GCA GTC	人工配列
120	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA CGT GAA GCA GTC	人工配列
121	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA SST GGT GGA ATC	人工配列
122	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA VGT GAW GYT GGT GGA GTC	人工配列
123	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA GSK GGT GGA GTC	人工配列
124	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA KGT GCA MCT GGT GGA GTC	人工配列
125	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GCT GAT GGA RTC	人工配列
126	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GCA RCT TGT TGA GTC	人工配列
127	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA RGT RAA GCT TCT CGA GTC	人工配列

10

20

30

40

【 0 6 2 9 】

【表 7 - 5】

128	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA AGT GAA RST TGA GGA GTC	人工配列
129	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT TAC TCT RAA AGW GTS TG	人工配列
130	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GCA GGT CCA ACT VCA GCA RCC	人工配列
131	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA TGT GAA CTT GGA AGT GTC	人工配列
132	GTT ATT GCT AGC GGC TCA GCC GGC AAT GGC GGA GGT GAA GGT CAT CGA GTC	人工配列
133	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TCC AGC TGA CTC AGC C	人工配列
134	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCW CCC AGT C	人工配列
135	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGM TMA CTC AGT C	人工配列
136	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGY TRA CAC AGT C	人工配列
137	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TRA TGA CMC AGT C	人工配列
138	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTM AGA TRA MCC AGT C	人工配列
139	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTC AGA TGA YDC AGT C	人工配列
140	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TYC AGA TGA CAC AGA C	人工配列
141	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TTC TCA WCC AGT C	人工配列
142	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG WGC TSA CCC AAT C	人工配列
143	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTS TRA TGA CCC ART C	人工配列
144	AGC CGG CCA TGG CGG AYR TTK TGA TGA CCC ARA C	人工配列
145	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CBC AGK C	人工配列
146	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TAA CYC AGG A	人工配列
147	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CCC AGW T	人工配列
148	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTG TGA TGA CAC AAC C	人工配列
149	AGC CGG CCA TGG CGG AYA TTT TGC TGA CTC AGT C	人工配列
150	AGC CGG CCA TGG CGG ARG CTG TTG TGA CTC AGG AAT C	人工配列
151	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACCGATGTACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	人工配列
152	AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACGATCAGACACTCTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	人工配列
153	5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-3'	人工配列
154	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGATAGACHGATGGGGSTG TYGTT	人工配列
155	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCTGGATGGTGGGAAGATGG ATACAG	人工配列
156	TGTGCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGG	人工配列
157	---GCAAGATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTAC---	天然 生物: ヒト OKT8,CDR3
158	TGTGGTAGAGGTTATGGTTACTACGTATTTGACCACTGG	人工配列
159	---GGTAGAGGTTATGGTTACTACGTATTTGACCAC---	天然 生物: マウス: OKT3,CDR3
160	GCGGCCGC	人工配列
161	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'	人工配列
162	5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'	人工配列

10

20

30

40

50

【図 2 B】

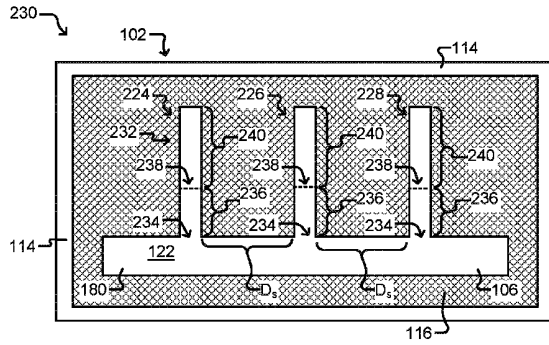


FIG. 2B

【図 2 C】

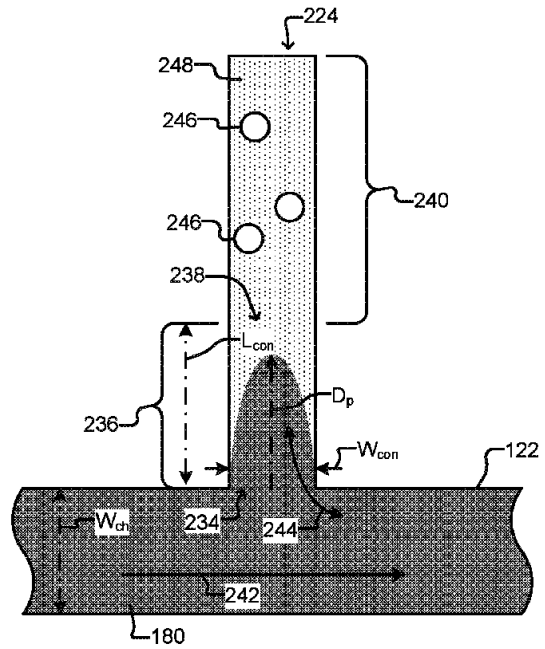


FIG. 2C

【図 2 D】

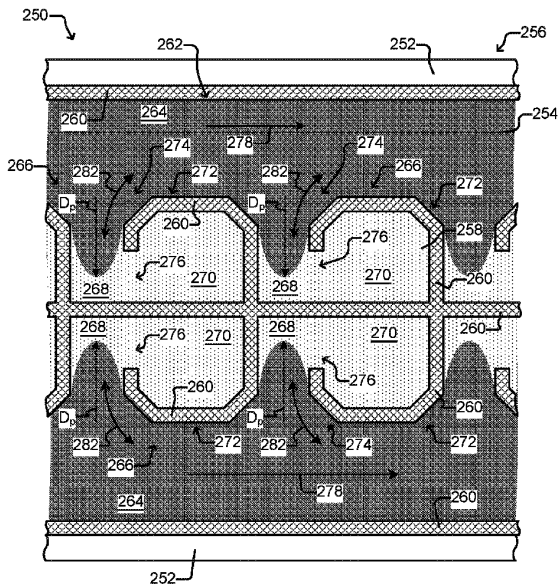


FIG. 2D

【図 2 E】

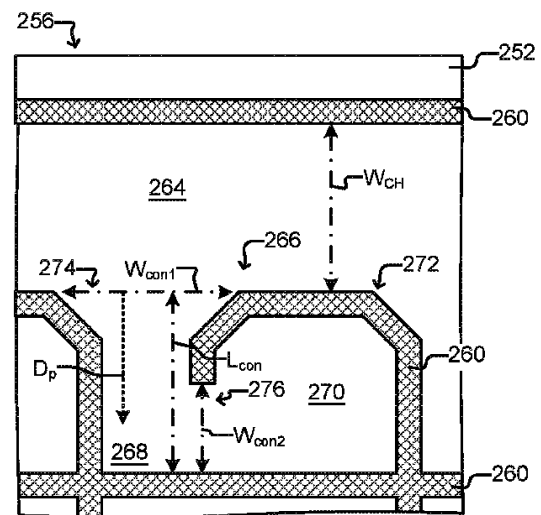


FIG. 2E

10

20

30

40

50

【 図 2 F 】

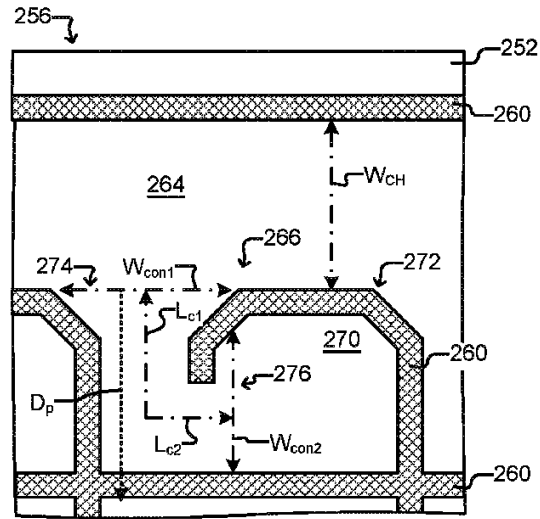


FIG. 2F

【 図 2 G 】

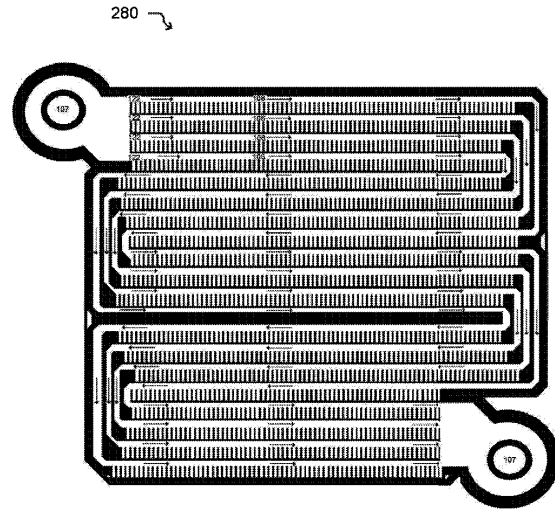


FIG. 2G

【 図 2 H 】

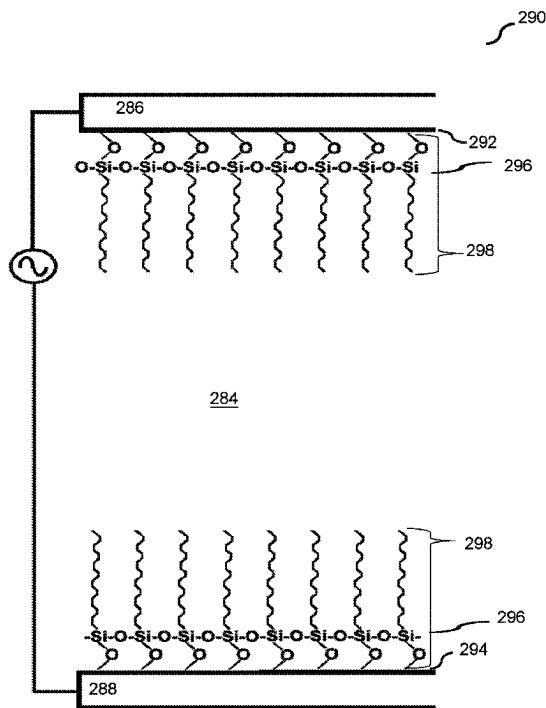
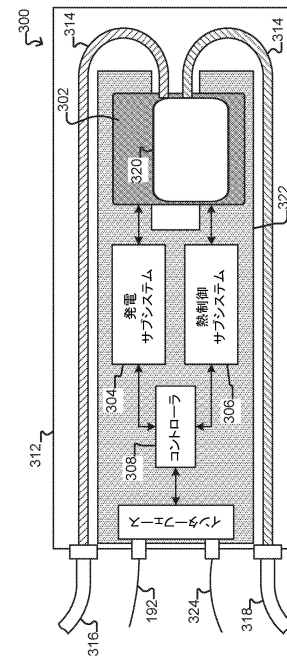


FIG. 2H

【 図 3 A 】



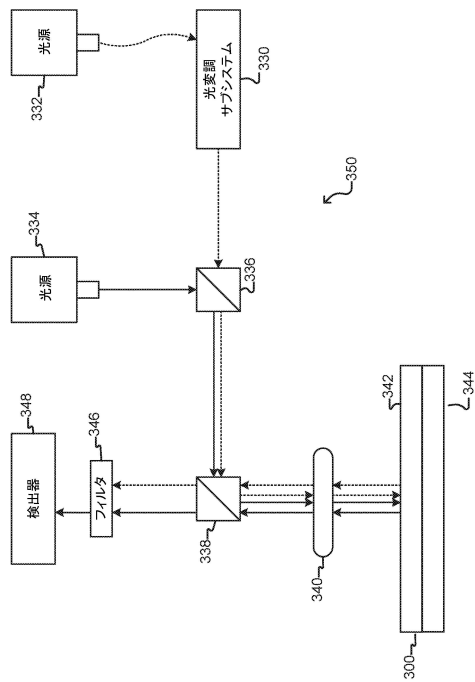
10

20

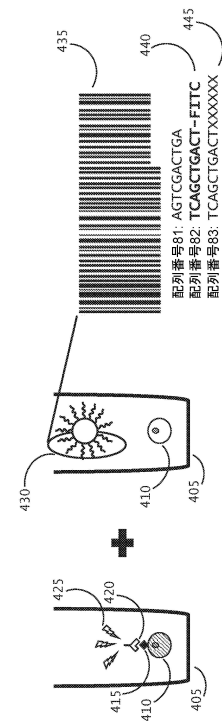
30

40

【図 3 B】



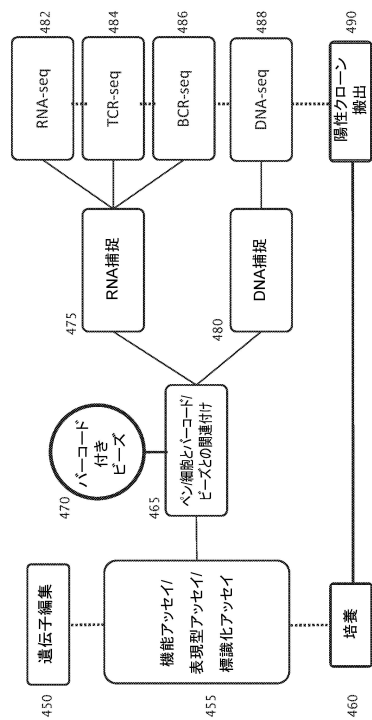
【図 4 A】



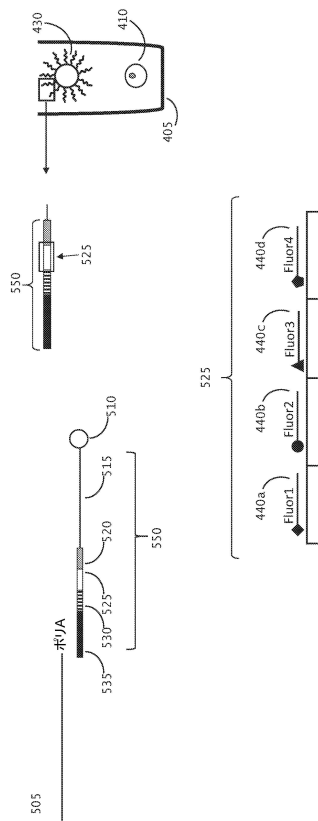
10

20

【図 4 B】



【図 5】

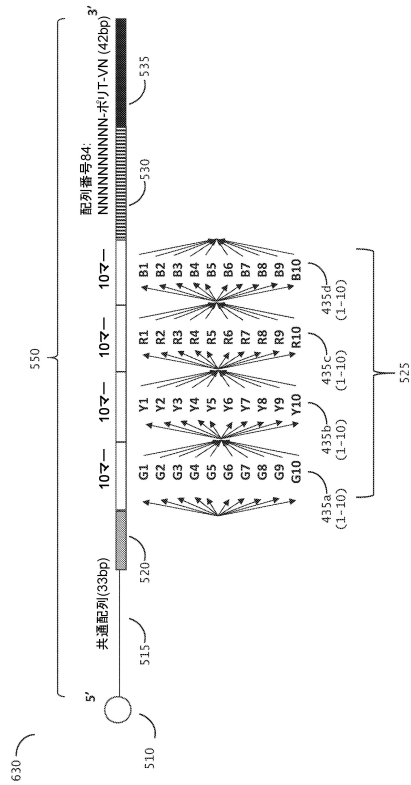


30

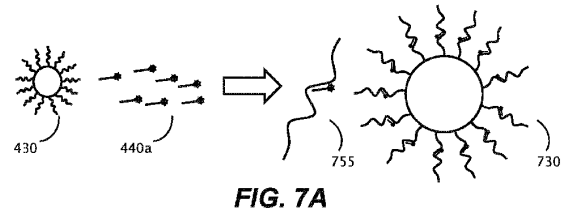
40

50

【図 6】



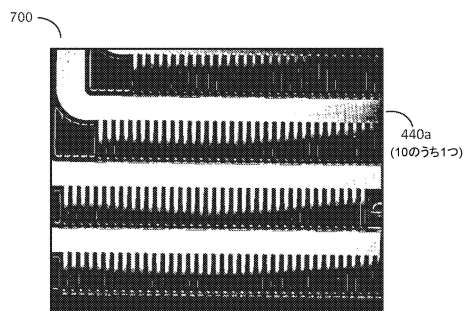
【図 7 A】



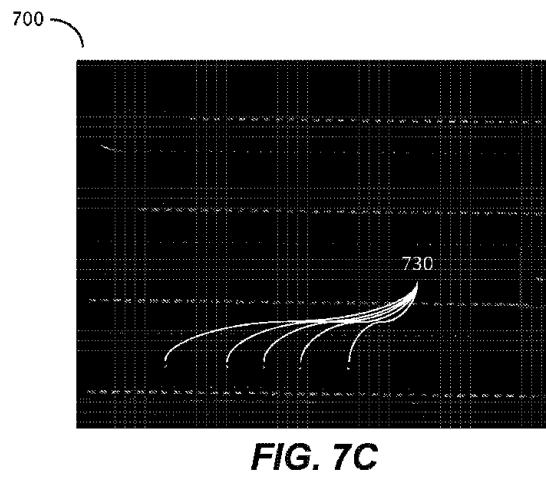
10

20

【図 7 B】



【図 7 C】

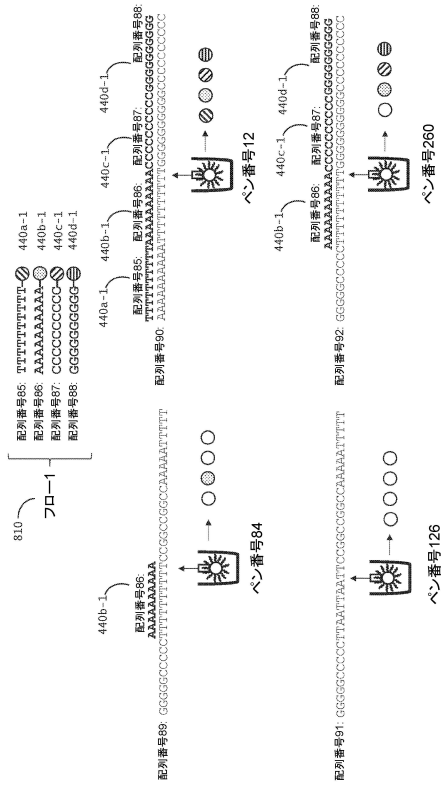


30

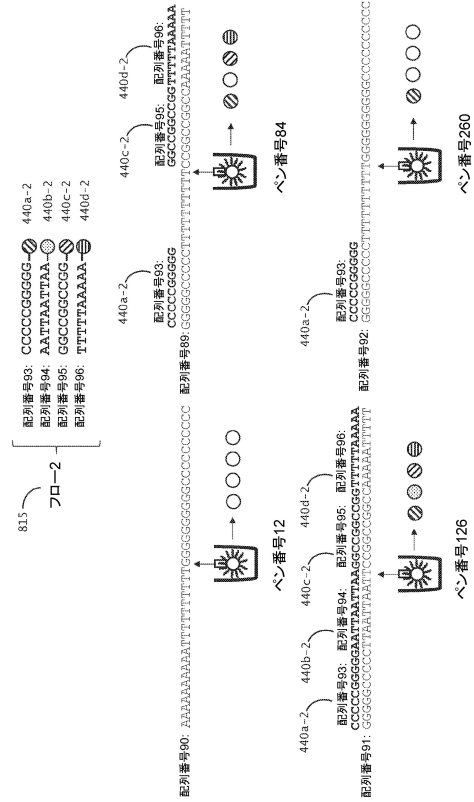
40

50

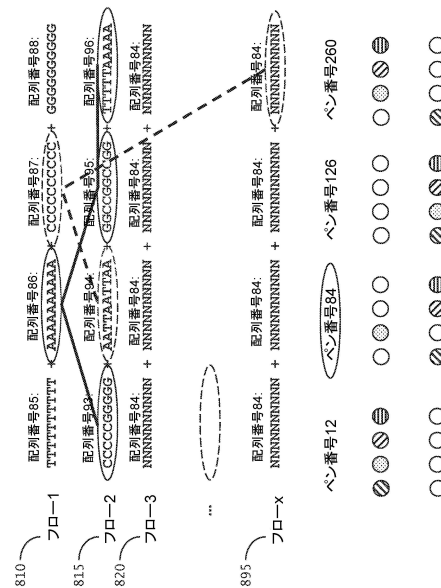
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



【図 8 D】

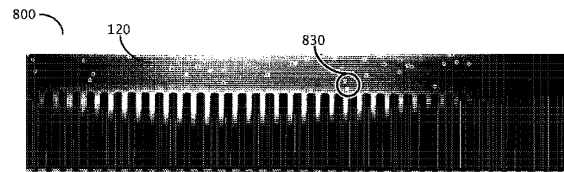


FIG. 8D

10

20

30

40

50

【図 8 E】

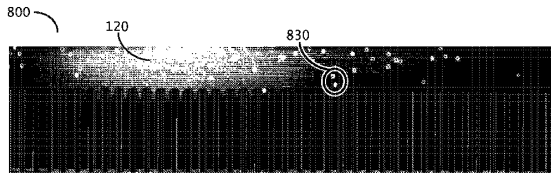


FIG. 8E

【図 8 F】

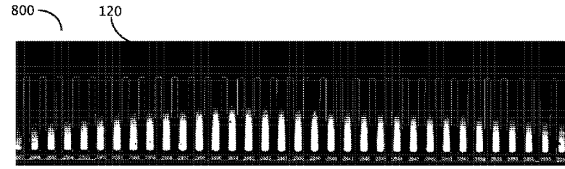
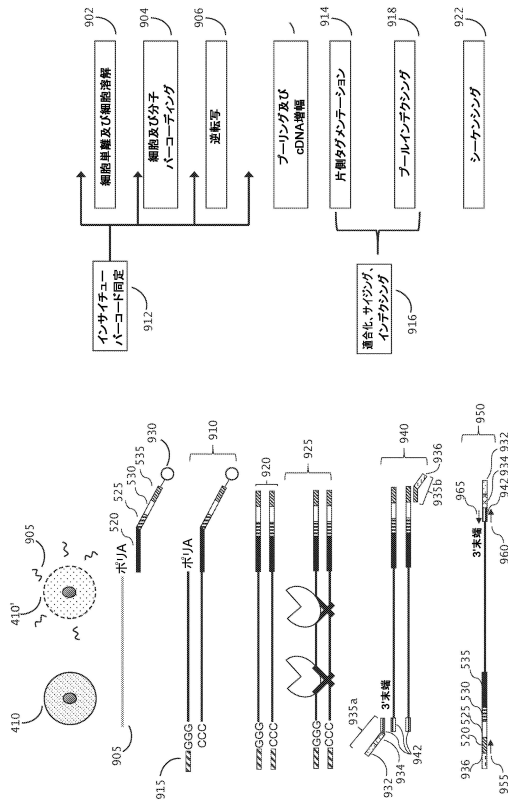
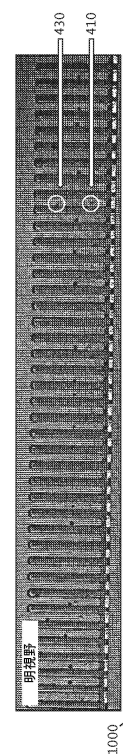


FIG. 8F

【図 9】



【図 10 A】



10

20

30

40

50

【図 10 B】

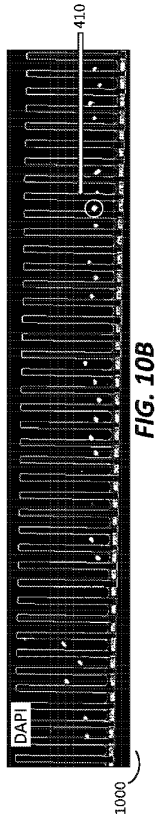
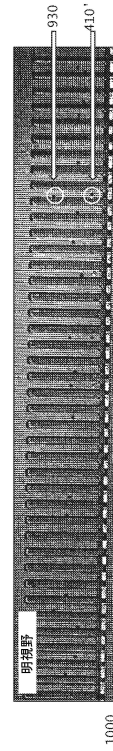


FIG. 10B

【図 10 C】



10

20

【図 10 D】

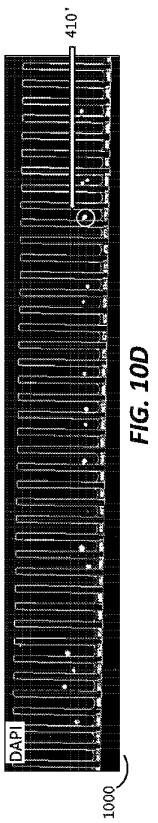
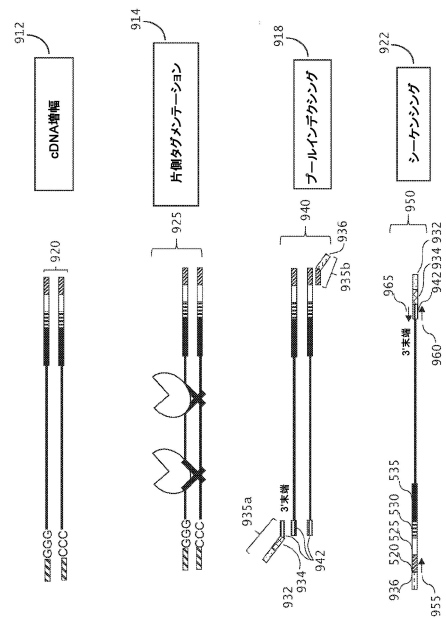


FIG. 10D

【図 11 A】

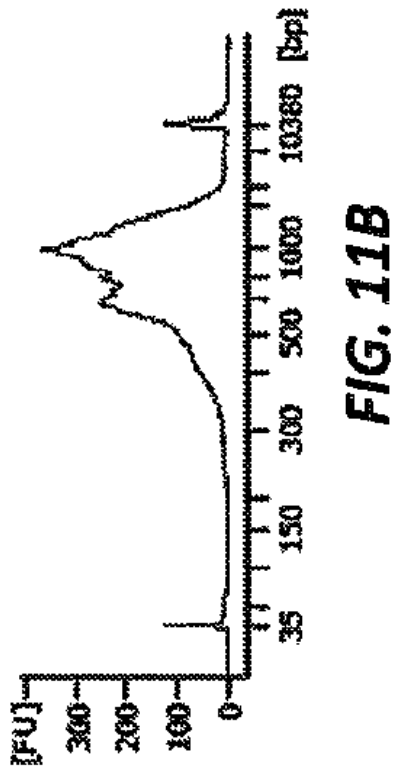


30

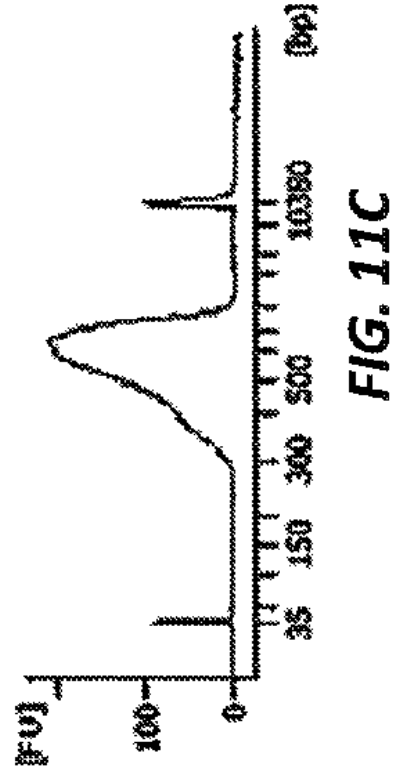
40

50

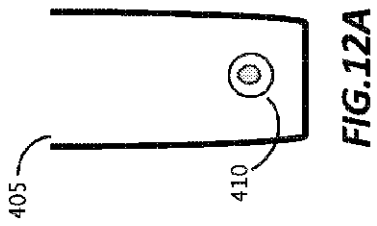
【図 1 1 B】



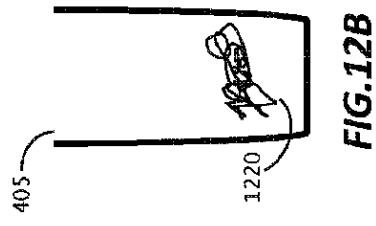
【図 1 1 C】



【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



10

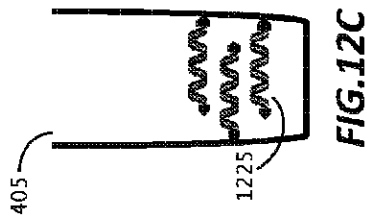
20

30

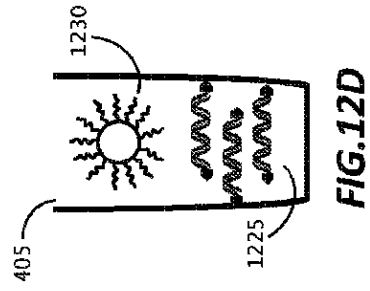
40

50

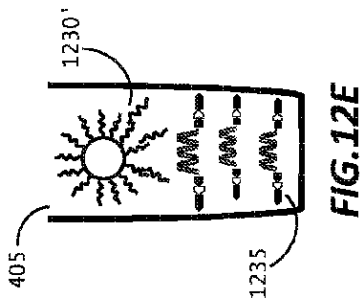
【図 1 2 C】



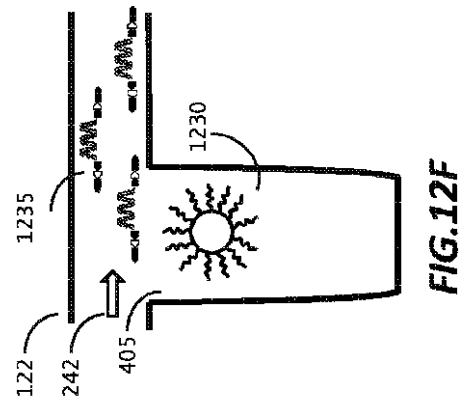
【図 1 2 D】



【図 1 2 E】



【図 1 2 F】



10

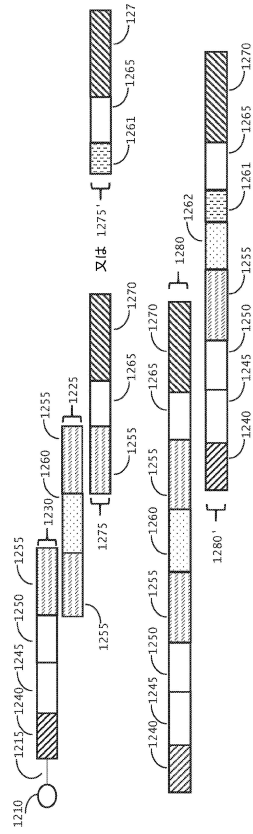
20

30

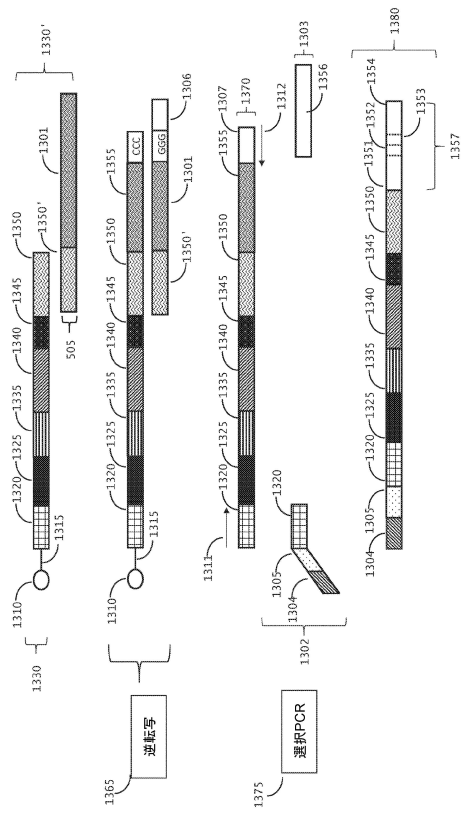
40

50

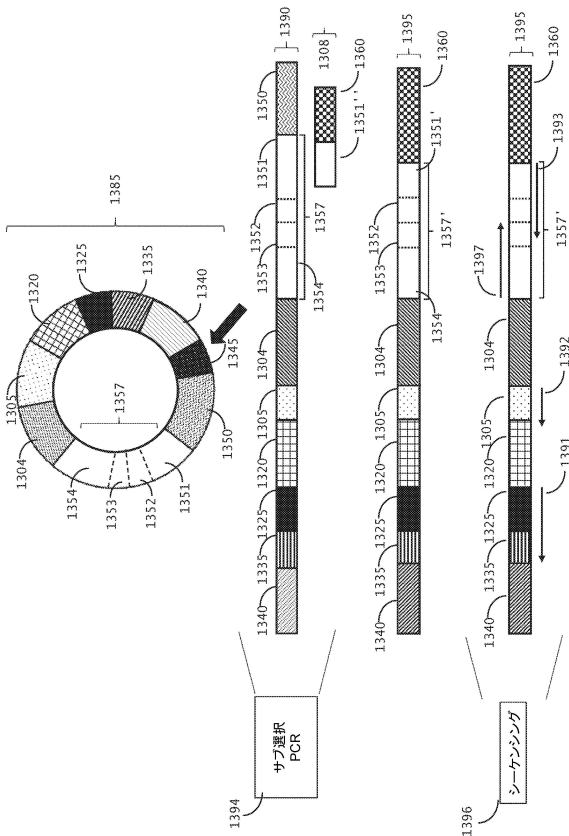
【図 1 2 G】



【図 1 3 A】



【図 1 3 B】



【図 1 4 A】

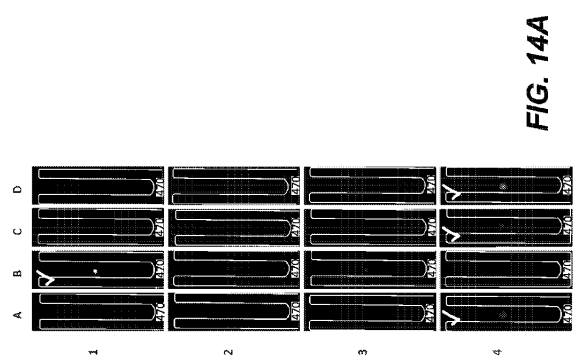


FIG. 14A

10

20

30

40

50

【図 14 B】

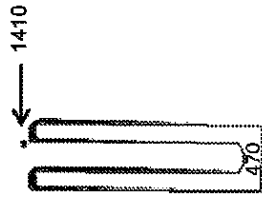


FIG. 14B

【図 14 C】

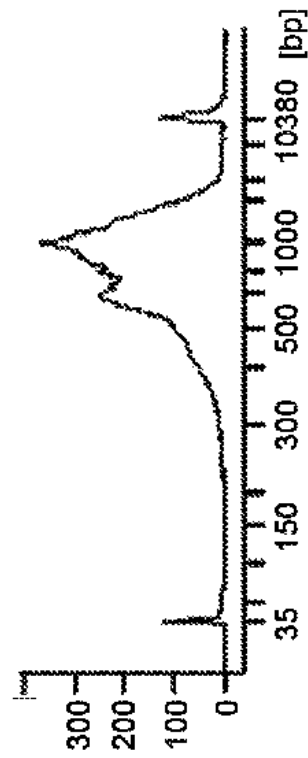


FIG. 14C

【図 14 D】

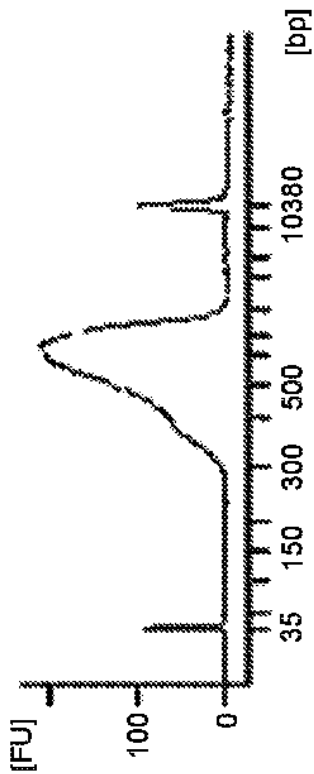
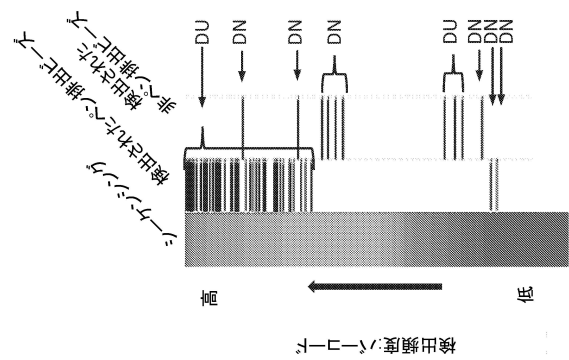


FIG. 14D

【図 15 A】



10

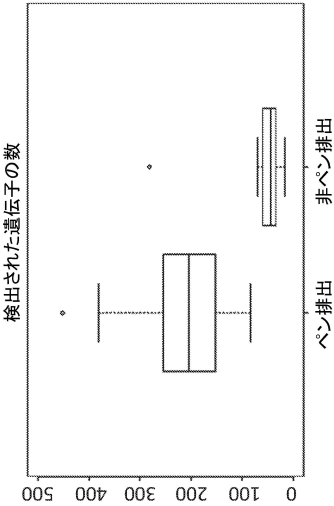
20

30

40

50

【図 1 5 B】



【図 1 6 A】

実験		ピーク数検出
A-60分RT B-90分RT		108
		120

10

20

【図 1 6 B】

サンプルID	全体	アライメント数	アライメント数	Mito_Total	Mito_UMI	Refseq_Total	Refseq_UMI
A	4383109	4139242	2538580	7810	711	2114803	281990
B	3313847	3154752	1813561	13489	1875	1540667	332634

【図 1 6 C】

サンプルID	バーコード付きリード トランスクリプトーム アライメント	Refseq アライメント	
		87%	61%
1		87%	61%
2		84%	49%
3		86%	53%
4		85%	62%
5		78%	55%
6		83%	57%

30

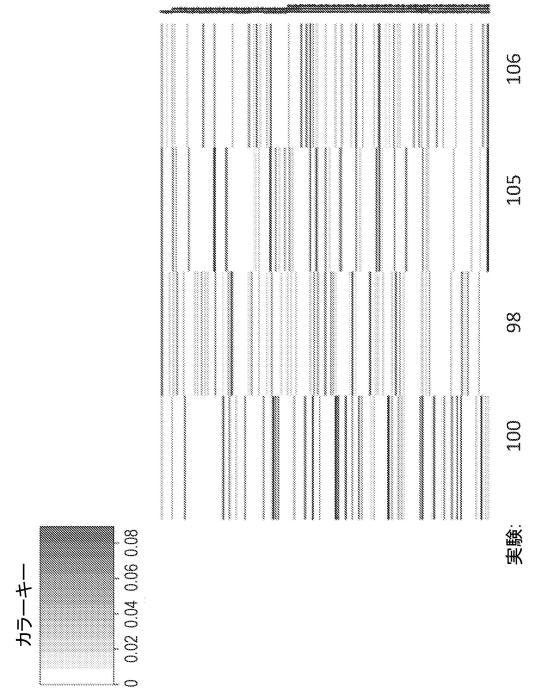
40

50

【図 16D】

上位5つの 発現遺伝子(OKT3)	内容
Rpl28	リボソームタンパク質
Emo	B細胞特異的
Rpl24	B細胞特異的
Doun1d5	B細胞特異的
Rpl35a	リボソームタンパク質
Ddt	B細胞特異的

【図 17】



10

20

【図 18】

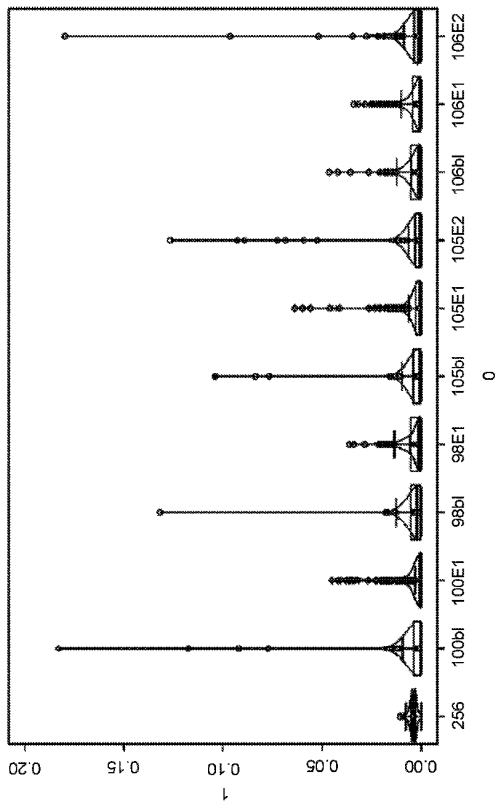
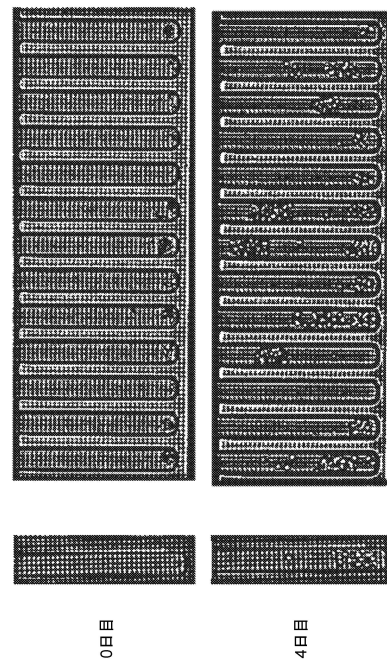


FIG. 18

【図 19】

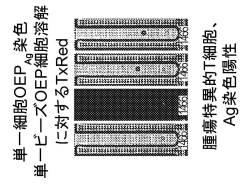


30

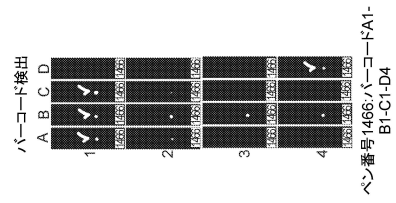
40

50

【図 20 A】

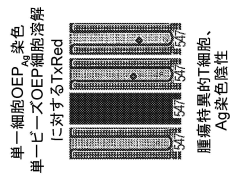


【図 20 B】

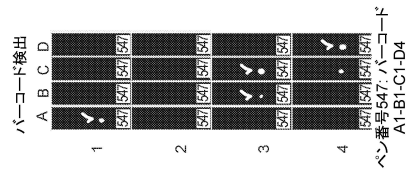


10

【図 21 A】



【図 21 B】



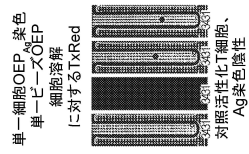
20

30

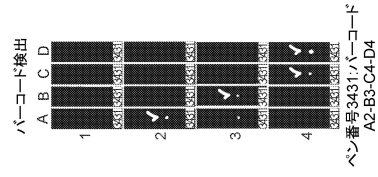
40

50

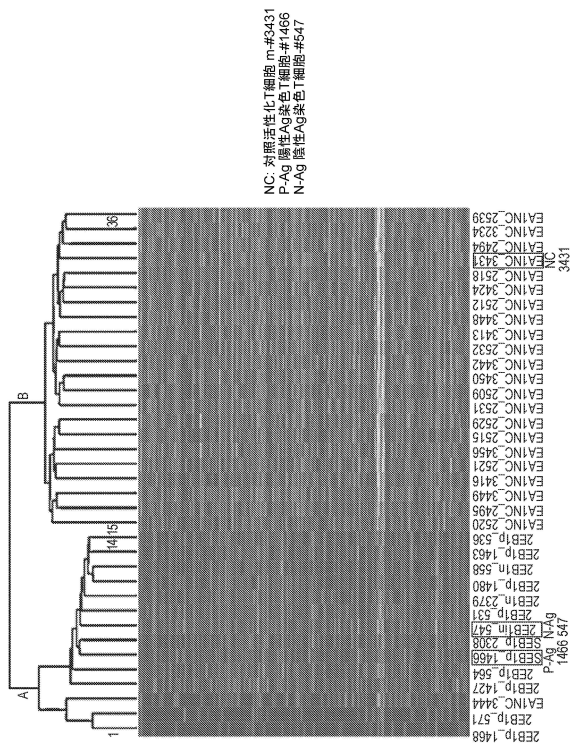
【図 2 2 A】



【図 2 2 B】



【図 2 3】



【図 2 4】

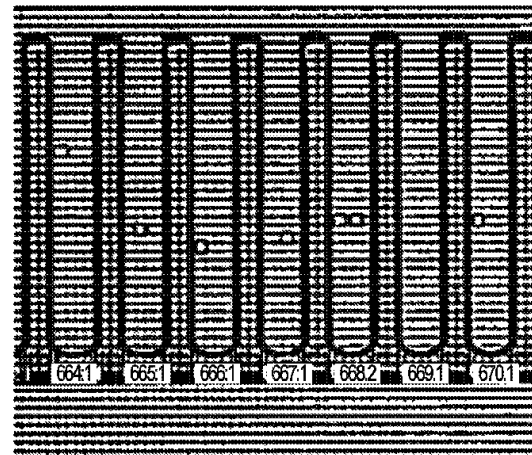
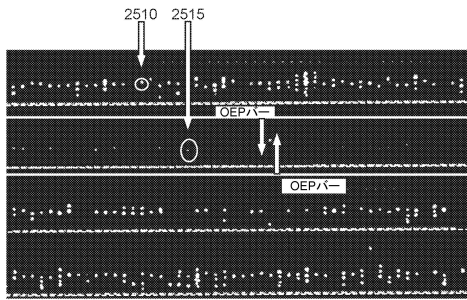
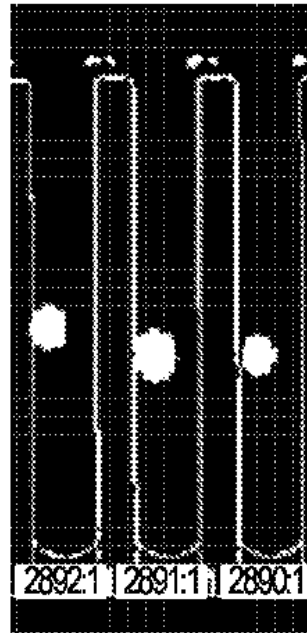


FIG. 24

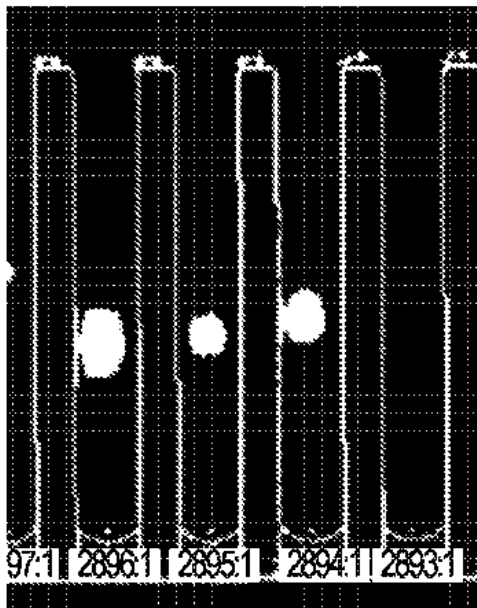
【図 25】



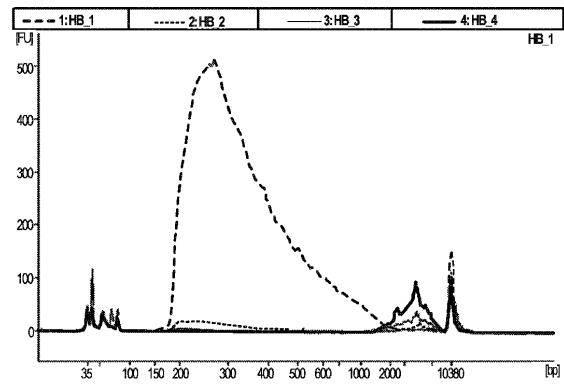
【図 26 A】

**FIG. 26A**

【図 26 B】

**FIG. 26B**

【図 27】

**FIG. 27**

10

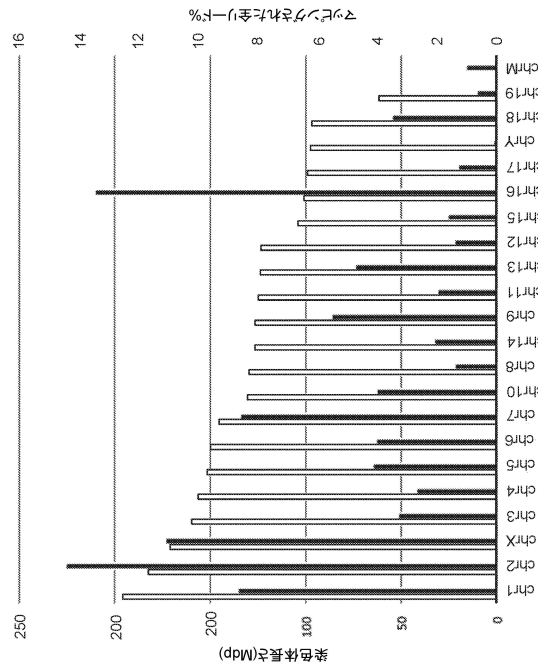
20

30

40

50

【図 28】



【図 29A】

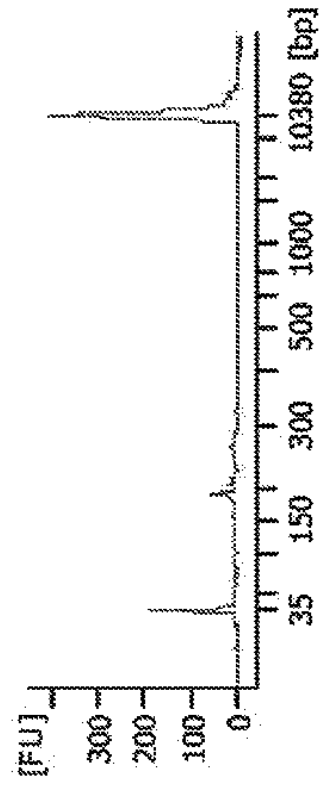


FIG. 29A

【図 29B】

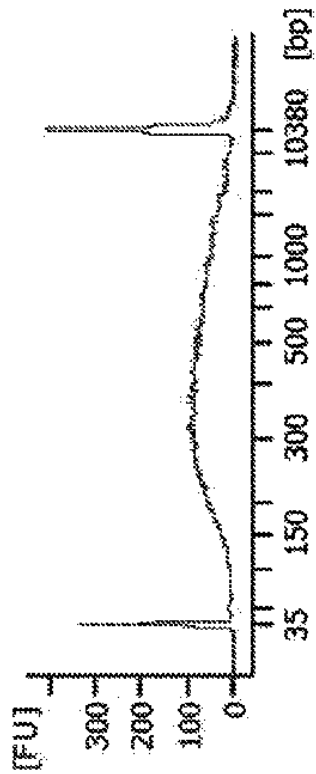


FIG. 29B

【図 29C】

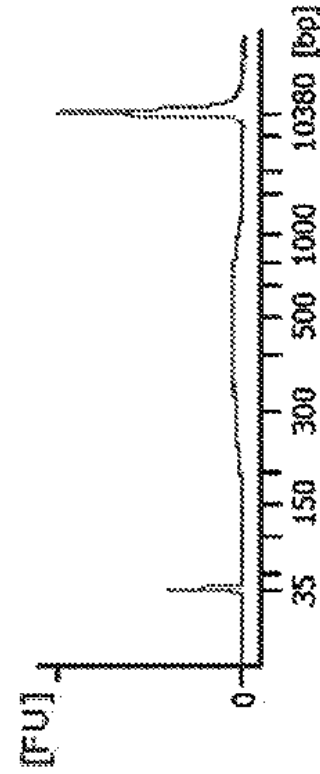


FIG. 29C

10

20

30

40

50

【図 29 D】

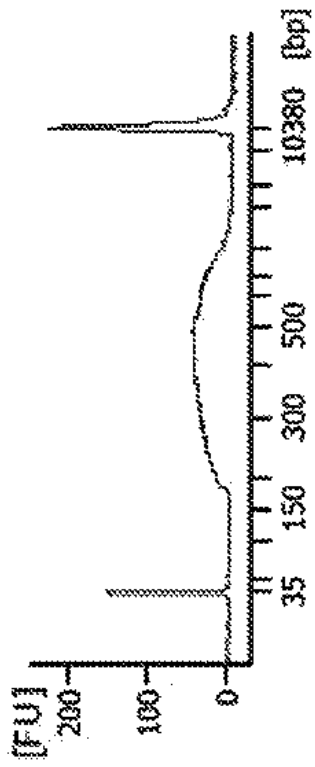


FIG. 29D

【図 30 A】

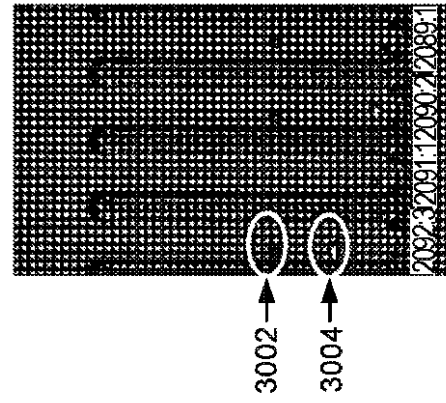


FIG. 30A

10

20

【図 30 B】

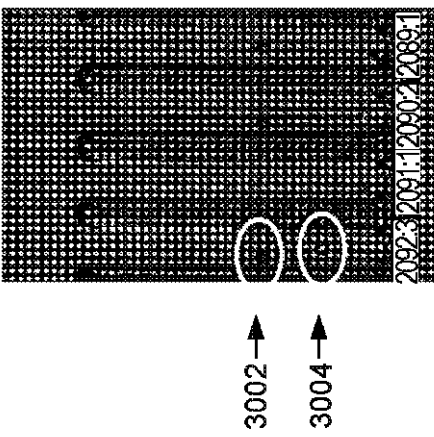


FIG. 30B

【図 30 C】

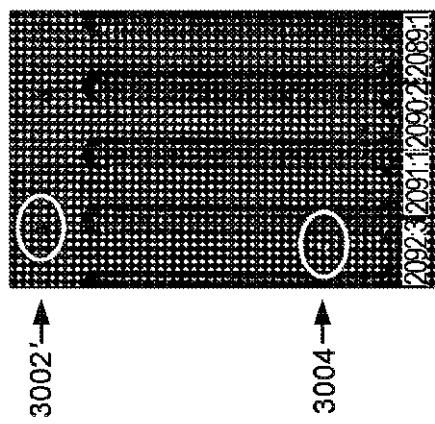


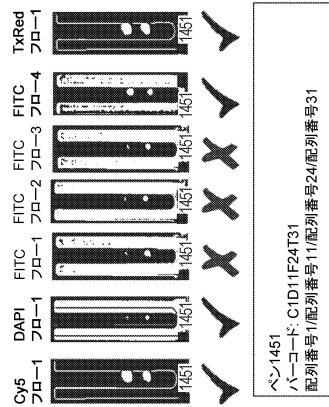
FIG. 30C

30

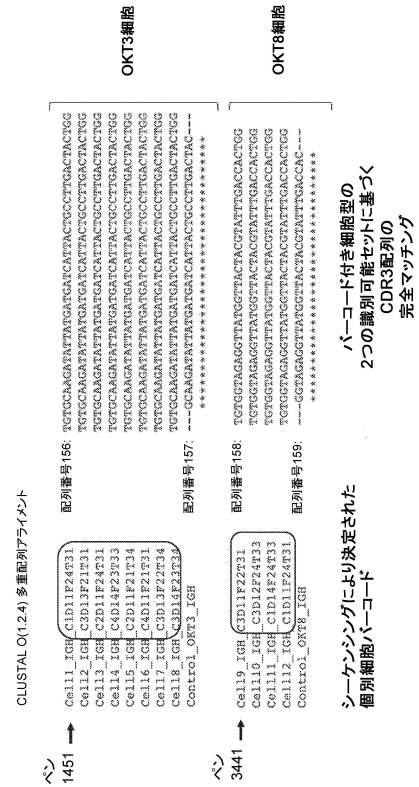
40

50

【図 3 1 B】



【図 3 2】



【配列表】

0007280181000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q

1/6869

Z

C 1 2 Q 1/6881(2018.01)

C 1 2 Q

1/6881

Z

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M

1/00

A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/457,399

(32)優先日 平成29年2月10日(2017.2.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/457,582

(32)優先日 平成29年2月10日(2017.2.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/470,669

(32)優先日 平成29年3月13日(2017.3.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 0 2 1 2 7，ボストン，ビー ストリート 1 2 5，ユニット 3 エー

(72)発明者 ベネット，ヘイリー エム．

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 4 1 1 7，サンフランシスコ，アルパイン テラス 1 4 4

(72)発明者 メヒア ゴンザレス，ヤラ エックス．

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 2 7 0 3 バークレー，グラント ストリート 2 3 1 5，
アパートメント ナンバー 5

(72)発明者 トー，マッケンジー エス．

アメリカ合衆国，カリフォルニア州 9 4 5 6 4，ピノール，ウォーターフォード プレイス 7 1 4

(72)発明者 ラメナニ，ラビ ケイ．

アメリカ合衆国，カリフォルニア州，9 4 5 5 1，リバモア，トランキリティ サークル 7 8 0
，ユニット 4

審査官 小田 浩代

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 1 5 1 2 9 8 (U S , A 1)

米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 2 9 8 0 9 1 (U S , A 1)

Fan, H. C. et al. , Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expres
sion cytometry , Science , 2015年 , Vol. 347(6222):1258367 , pp. 1-8

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d