

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7618548号
(P7618548)

(45)発行日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(24)登録日 令和7年1月10日(2025.1.10)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6874(2018.01)	C 1 2 Q	1/6874	Z
C 1 2 Q	1/6837(2018.01)	C 1 2 Q	1/6837	Z Z N A
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
請求項の数 15 (全148頁)				
(21)出願番号	特願2021-523956(P2021-523956)	(73)特許権者	595117091	
(86)(22)出願日	令和1年11月7日(2019.11.7)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カン	
(65)公表番号	特表2022-506546(P2022-506546		パニー	
	A)		BECTON, DICKINSON A	
(43)公表日	令和4年1月17日(2022.1.17)		ND COMPANY	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/060243		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 0	
(87)国際公開番号	WO2020/097315		7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レ	
(87)国際公開日	令和2年5月14日(2020.5.14)		イクス ベクトン・ドライブ 1	
審査請求日	令和4年11月4日(2022.11.4)	(74)代理人	100094569	
(31)優先権主張番号	62/757,757		弁理士 田中 伸一郎	
(32)優先日	平成30年11月8日(2018.11.8)	(74)代理人	100103610	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 ▲吉▼田 和彦	
		(74)代理人	100109070	
			弁理士 須田 洋之	
		(74)代理人	100119013	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ランダムプライミングを使用した単一細胞の全トランスクリプトーム解析

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の核酸標的を標識するための方法であって、
核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および前記核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；
前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；
ランダムプライマーを前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、前記ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；
前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成すること；
前記第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および前記第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して前記複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成すること；ならびに
前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを鋳型として使用して、第3の複数のバーコード化アンプリコンを合成することであって、前記第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、前記第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズするこ

とが可能なプライマー、および標的特異的プライマーを使用するPCR増幅を含む、ことを含む方法。

【請求項2】

前記複数の伸長産物の増幅は、配列決定プライマーならびに／もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を、前記複数の伸長産物に付加することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記第1の複数のバーコード化アンプリコンならびに／もしくは第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、前記試料中の前記核酸標的のコピー数を決定することを含む、請求項1～2のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項4】

試料中の核酸標的の数を決定するための方法であって、

核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および前記核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；

前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；

ランダムプライマーを前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、前記ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；

20

前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成すること；

前記第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および前記第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して前記複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成すること；

前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを鋳型として使用して、第3の複数のバーコード化アンプリコンを合成することであって、前記第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、前記第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および標的特異的プライマーを使用するPCR増幅を含む、こと；および

30

前記第1の複数のバーコード化アンプリコンならびに／もしくは第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、前記試料中の前記核酸標的のコピー数を決定することを含む方法。

【請求項5】

核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含み、

前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、前記複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含み、および

40

前記試料中の前記核酸標的のコピー数の決定は、前記複数の核酸標的の各々の配列を含む前記第1の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する前記分子標識の数に基づき、前記試料中の前記複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む、請求項3または請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記第1の複数のバーコード化アンプリコン中の前記核酸標的の配列は、前記核酸標的の部分配列を含む、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

50

前記第 1 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および前記第 2 のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンを増幅し、それにより第 2 の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

(a) 前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンの増幅は、配列決定プライマーならびに／もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を、前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンに付加することを含む；

(b) 前記方法が、前記第 2 の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、前記試料中の前記核酸標的のコピー数を決定することを含む；

(c) 核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含む；

(d) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、前記複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含む；および／または

(e) 前記試料中の前記核酸標的のコピー数の決定は、前記複数の核酸標的の各々の配列を含む前記第 2 の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する前記分子標識の数に基づき、前記試料中の前記複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む、および／または

(f) 前記第 2 の複数のバーコード化アンプリコン中の前記核酸標的の配列は、前記核酸標的の部分配列を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第 1 の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または前記第 2 の複数のバーコード化アンプリコンの各々は、前記第 1 のユニバーサル配列、前記第 2 のユニバーサル配列、または両方の少なくとも一部分を含む、請求項 7 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

(a) 前記第 1 のユニバーサル配列および前記第 2 のユニバーサル配列は

(i) 同じである；もしくは

(ii) 異なる；および／または

(b) 前記第 1 のユニバーサル配列および／または前記第 2 のユニバーサル配列は、配列決定プライマーならびに／もしくは配列決定アダプターの結合部位、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を含み；および／または

(c) 前記第 1 のユニバーサル配列および／または前記第 2 のユニバーサル配列は、配列決定プライマーならびに／もしくは配列決定アダプターの結合部位、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を含み、前記配列決定アダプターは、P 5 配列、P 7 配列、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を含み；および／または

(d) 前記第 1 のユニバーサル配列および／または前記第 2 のユニバーサル配列は、配列決定プライマーならびに／もしくは配列決定アダプターの結合部位、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を含み、前記配列決定プライマーは、リード 1 配列決定プライマー、リード 2 配列決定プライマー、それらの相補配列、ならびに／もしくはそれらの一部を含み；および／または

(e) 前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、逆転写酵素を使用して、前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含み；および／または

(f) 前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、逆転写酵素を使用して、前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含み、かつ前記逆転写酵素は、ウイルス逆転写酵素を含み；および／または

10

20

30

40

50

(g) (i) 前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含み；もしくは

(ii) 前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、前記核酸標的のコピーにハイブリダイズした前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含み、かつ前記DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含み；もしくは

(iii) 前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長することを含み、；もしくは

(iv) 前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長することを含み、かつ前記DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含む、

請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

(a) 前記第1の複数のバーコード化アンプリコンならびに／もしくは前記第2の複数のバーコード化アンプリコンは、全トランスクリプトーム増幅(WTA)産物を含む；

(b) 前記第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または前記第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも10%に相当する；および／または

(c) 前記第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または前記第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも50%または少なくとも90%に相当する、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

(a) 前記複数の核酸標的の1つまたは複数の、低発現遺伝子のmRNAを含む；

(b) 前記ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含む；

(c) 前記ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含み、かつ前記ヌクレオチドのランダム配列は、約4～約30ヌクレオチド長である；

(d) 前記ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含み、かつ前記ヌクレオチドのランダム配列は、6または9ヌクレオチド長である；

(e) 前記標的結合性領域は、オリゴdT配列、ランダム配列、標的的特異的配列、またはそれらの組合せを含む；

(f) 前記標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含み、前記核酸標的は、ポリ(dA)領域を含む；

(g) 前記方法は、ランダムプライマーを、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させるステップ、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズした前記ランダムプライマーを伸長するステップ、および前記複数の伸長産物を増幅するステップを繰り返すことを含む；

(h) 第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、前記複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を実施することを含む；

(i) 前記標的的特異的プライマーは、免疫受容体に特異的にハイブリダイズする；

(j) 前記標的的特異的プライマーは、免疫受容体に特異的にハイブリダイズし、かつ前記免

疫受容体は、T細胞受容体（TCR）および／またはB細胞受容体（BCR）受容体である；

(k)前記方法は前記第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物の配列情報を得ることを含む；

(l)前記方法は前記第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物の配列情報を得ることを含む、かつ前記配列情報の取得は、配列決定アダプターを、前記第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付着させることを含む；

(m)前記試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む；および／または

(n)前記試料は、末梢血単核細胞または免疫細胞を含む、および／または

(o)前記試料は、末梢血単核細胞または免疫細胞を含み、かつ前記免疫細胞は、B細胞、T細胞、またはそれらの組合せを含む、

請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記複数の伸長産物の増幅は、固体支持体の存在下では実施されない、請求項2～12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

(a)前記方法が、RNAseH誘導性プライミング、末端修復、および／またはアダプターライゲーションを含まない；

(b)前記方法が、断片化、タグ付け、または両方を含まない；

(c)前記第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、バーコード化デオキシリボ核酸（DNA）分子、バーコード化リボ核酸（RNA）分子、もしくは両方を含む；

(d)前記核酸標的は核酸分子を含む、

(e)前記核酸標的は核酸分子を含み、かつ

(i)前記核酸分子は、リボ核酸（RNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、RNA分解産物、ポリ（A）テイルを含むRNA、またはそれらの任意の組合せを含み；ならびに／もしくは

(ii)前記mRNAは免疫受容体をコードし；ならびに／もしくは

(iii)前記核酸標的は細胞成分結合性試薬を含む；

(iv)前記核酸標的は細胞成分結合性試薬を含み、かつ前記核酸分子は、前記細胞成分結合性試薬に付随し；ならびに／もしくは

(v)前記核酸標的は細胞成分結合性試薬を含み、前記核酸分子は、前記細胞成分結合性試薬に付随しており、かつ前記方法は、前記核酸分子および前記細胞成分結合性試薬を解離させることを含む；および／または

(f)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む；

(g)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む；

(h)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体に付随している；

(i)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体に付随しており、かつ

(i)前記固体支持体は、合成粒子、平面状表面、またはそれらの組合せを含む；ならびに／もしくは

(ii)同じ固体支持体に付随している前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、同一の試料標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む；および／または

(j)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、細胞標識を含む；

(k)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、細胞標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む；および／または

(l)前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、細胞標識を含み、前記複数の

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含み、かつ

(i) 同じ固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、同じ細胞標識を含む；ならびに／もしくは

(ii) 異なる固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、異なる細胞標識を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

前記試料は単一細胞を含み、前記方法は、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、前記試料中の前記単一細胞に付随させることを含み、以下の1以上が適用される；

(a) 前記方法は、前記合成粒子を前記単一細胞に付随させた後で前記単一細胞を溶解することを含む；

(b) 前記方法は、前記合成粒子を前記単一細胞に付随させた後で前記単一細胞を溶解することを含み、前記単一細胞の溶解は、前記試料を加熱すること、前記試料を界面活性剤と接触させること、前記試料のpHを変化させること、またはそれらの任意の組合せを含む；

(c) 前記合成粒子および前記単一細胞は同じ区画に存在する；

(d) 前記合成粒子および前記単一細胞は同じ区画に存在し、前記区画は、ウェルまたは液滴であり；

(e) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも1つは、前記合成粒子上に固定化されているかまたは部分的に固定化されている；

(f) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも1つは、前記合成粒子内に封入されているかまたは部分的に封入されている；

(g) 前記合成粒子は破壊可能である；

(h) 前記合成粒子は破壊可能であり、前記合成粒子は、破壊可能なヒドロゲル粒子である；

(i) 前記合成粒子はビーズを含む；

(j) 前記合成粒子はビーズを含み、前記ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA／Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ(dT)コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、ヒドロゲルビーズ、ゲルビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む；

(k) 前記合成粒子は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、および／または

(l) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各々は、リンカー官能基を含み、前記合成粒子は、固体支持体官能基を含み、ならびに／もしくは

前記支持体官能基および前記リンカー官能基は互いに付随しており；および／または

(m) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各々は、リンカー官能基を含み、前記合成粒子は、固体支持体官能基を含み、ならびに／もしくは

前記支持体官能基および前記リンカー官能基は互いに付随しており；かつ、前記リンカー官能基および前記支持体官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組合せからなる群から個々に選択されている

請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第119条(e)に基づき、2018年11月8日に出願された米国特許仮出願第62/757,757号の利益を主張するものである。この関連出願の内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

配列表の参照

本出願は、電子形式の配列表と共に提出されている。配列表は、2019年11月7日に作成されたサイズが4キロバイトの68EB_298705_WOという名称のファイルとして提供されている。配列表の電子形式の情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

本開示は、概して、分子生物学の分野に、例えば、分子バーコーディングを使用して細胞の遺伝子発現プロファイルを決定することに関する。

【背景技術】

【0002】

現行技術では、細胞の各々をバーコード化試薬ビーズと共にコンパートメント内に共局在化させながら、個々の細胞に由来するポリ(A)mRNA分子に細胞特異的オリゴヌクレオチドバーコードを付着させることにより、大規模並行様式(例えば、>1000個の細胞)で単一細胞の遺伝子発現を測定することが可能である。細胞の遺伝子発現を効率的に定量分析することができる系および方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0003】

本明細書における開示は、試料中の核酸標的を標識するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；ランダムプライマーを複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；ならびに複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成することを含む。

一部の実施形態では、本方法は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含む。一部の実施形態では、複数の伸長産物の増幅は、配列決定プライマーおよび／もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに／またはそれらの一部を、複数の伸長産物に付加することを含む。一部の実施形態では、本方法は、第1の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含む。

【0004】

本明細書における開示は、試料中の核酸標的の数を決定するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；ランダムプライマーを複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長

して、複数の伸長産物を生成すること；第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成すること；ならびに第1の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含む。

【0005】

一部の実施形態では、核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含み、試料中の核酸標的のコピー数の決定は、複数の核酸標的の各々の配列を含む第1の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む。一部の実施形態では、複数の核酸標的の各々の配列は、複数の核酸標的の各々の部分配列を含む。一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコン中の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含む。

【0006】

一部の実施形態では、本方法は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第1の複数のバーコード化アンプリコンを増幅し、それにより第2の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含む。一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコンの増幅は、配列決定プライマーおよび／もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに／またはそれらの一部を、第1の複数のバーコード化アンプリコンに付加することを含む。一部の実施形態では、本方法は、第2の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含む。一部の実施形態では、核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含み、および／または試料中の核酸標的のコピー数の決定は、複数の核酸標的の各々の配列を含む第2の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む。一部の実施形態では、複数の核酸標的の各々の配列は、複数の核酸標的の各々の部分配列を含む。一部の実施形態では、第2の複数のバーコード化アンプリコン中の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含む。

【0007】

一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または第2の複数のバーコード化アンプリコンの1つ1つは、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、または両方の少なくとも一部分を含む。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列および第2のユニバーサル配列は同じである。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列および第2のユニバーサル配列は異なる。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列および／または第2のユニバーサル配列は、配列決定プライマーおよび／もしくは配列決定アダプターの結合部位、それらの相補配列、ならびに／またはそれらの一部を含む。一部の実施形態では、配列決定アダプターは、P5配列、P7配列、それらの相補配列、および／またはそれらの一部を含む。一部の実施形態では、配列決定プライマーは、リード1配列決定プライマー、リード2配列決定プライマー、それらの相補配列、および／またはそれらの一部を含む。

【0008】

一部の実施形態では、核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、逆転写酵素を使用して、核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含む。一部の実施形態では、逆転写酵素は、ウイルス逆転写酵素を含む。一部の実施形態では、核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含む。一部の実施形態では、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長することを含む。一部の実施形態では、DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含む。

10

【0009】

一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または第2の複数のバーコード化アンプリコンは、全トランスクリプトーム増幅(WTA)産物を含む。一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも10%に相当する。一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも50%または少なくとも90%に相当する。一部の実施形態では、複数の核酸標的の1つまたは複数の、低発現遺伝子のmRNAを含む。一部の実施形態では、前記ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含み、ヌクレオチドのランダム配列は、約4〜約30ヌクレオチド長であってもよく、さらに前記ヌクレオチドのランダム配列は、6または9ヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、オリゴdT配列、ランダム配列、標的特異的配列、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、標的結合性領域は、ポリ(dT)領域を含み、核酸標的は、ポリ(dA)領域を含む。一部の実施形態では、本方法は、ランダムプライマーを、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させるステップ、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長するステップ、および複数の伸長産物を増幅するステップを繰り返すことを含む。

20

30

【0010】

一部の実施形態では、本方法は、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを第3の複数のバーコード化アンプリコンを生成するための鋳型として使用して、第3の複数のバーコード化アンプリコンを合成することを含む。一部の実施形態では、第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅を実施することを含む。一部の実施形態では、第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および標的特異的プライマーを使用するPCR増幅を含む。一部の実施形態では、本方法は、第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物の配列情報を得ることを含み、配列情報の取得は、配列決定アダプターを、第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付着させることを含んでもよい。一部の実施形態では、標的特異的プライマーは、免疫受容体と特異的にハイブリダイズし、免疫受容体は、T細胞受容体(TCR)および／またはB細胞受容体(BCR)受容体であってもよい。

40

【0011】

一部の実施形態では、複数の伸長産物の増幅は、固体支持体の存在下では実施されない。一部の実施形態では、本方法は、RNaseH誘導性プライミング、末端修復、および／またはアダプターライゲーションを含まない。一部の実施形態では、本方法は、断片化

50

、タグ付け、または両方を含まない。一部の実施形態では、第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、バーコード化デオキシリボ核酸（DNA）分子、バーコード化リボ核酸（RNA）分子、または両方を含む。

【0012】

一部の実施形態では、試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、試料は、末梢血単核細胞または免疫細胞を含み、免疫細胞は、B細胞、T細胞、またはそれらの組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、核酸標的は核酸分子を含み、核酸分子は、リボ核酸（RNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、RNA分解産物、ポリ（A）テイルを含むRNA、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、mRNAは、免疫受容体をコードする。

10

一部の実施形態では、核酸標的は、細胞成分結合性試薬を含む。一部の実施形態では、核酸分子は、細胞成分結合性試薬に付随している。一部の実施形態では、本方法は、核酸分子および細胞成分結合性試薬を解離させることを含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む。

【0013】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体に付随している。一部の実施形態では、同じ固体支持体に付随している複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、同一の試料標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、細胞標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含んでもよい。一部の実施形態では、同じ固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、同じ細胞標識を含む。一部の実施形態では、異なる固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、異なる細胞標識を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、合成粒子、平面状表面、またはそれらの組合せを含む。

20

【0014】

一部の実施形態では、試料は単一細胞を含み、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、試料中の単一細胞に付随させることを含む。一部の実施形態では、本方法は、合成粒子を単一細胞に付随させた後で単一細胞を溶解することを含み、単一細胞の溶解は、試料を加熱すること、試料を界面活性剤と接触させること、試料のpHを変化させること、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、合成粒子および単一細胞は同じ区画内に存在し、区画はウェルまたは液滴であってもよい。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも1つは、合成粒子上に固定化されているか、または部分的に固定化されている。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも1つは、合成粒子内に封入されているか、または部分的に封入されている。一部の実施形態では、合成粒子は破壊可能であり、合成粒子は、破壊可能なヒドロゲル粒子であってもよい。

30

40

【0015】

一部の実施形態では、合成粒子はビーズを含み、ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA／Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ（dT）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、ヒドロゲルビーズ、ゲルビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、合成粒子は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテッ

50

クス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各々は、リンカー官能基を含み、合成粒子は、固体支持体官能基を含み、および／または支持体官能基およびリンカー官能基は、互いに付随している。一部の実施形態では、リンカー官能基および支持体官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組合せからなる群から個々に選択される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】非限定的な例示的確率論的バーコードを示す図である。

10

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

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

【図4】タンパク質結合性試薬の固有識別子を含むオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされている例示的なタンパク質結合性試薬（ここでは抗体が示されている）の略図を示す。

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

【図6】ハイスループット方式で、タンパク質発現および遺伝子発現を同時に決定するために、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている抗体を使用する例示的ワークフローの略図を示す。

20

【図7】試料インデックス付与のためにオリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている抗体を使用する例示的ワークフローの略図を示す。

【図8】単一細胞の全トランスクリプトーム解析（WTA）を実施するための非限定的な例示的ワークフローの略図である。

【図9】単一細胞のライゲーションに基づく全トランスクリプトーム解析を実施するための非限定的な例示的ワークフローの略図である。

【図10】ランダムプライミングおよびプライマー伸長を使用して、単一細胞の全トランスクリプトーム解析を効率的に（例えば、他の全トランスクリプトーム解析方法と比較してより短い時間で）実施するための非限定的な例示的ワークフローの略図である。

30

【図11A】ランダムプライミングおよびプライマー伸長を使用して全トランスクリプトーム解析を実施するための非限定的な例示的ワークフローの略図である。

【図11B】ランダムプライミングおよびプライマー伸長を使用して全トランスクリプトーム解析を実施するための非限定的な例示のプロセスを示す図である。

【図12】標的化遺伝子発現プロファイリング、AbOを用いた試料多重化、AbOを用いたタンパク質発現プロファイリング、および全トランスクリプトーム解析を、1つのワークフローにおいて実施するための略図である。

【図13A-B】ライゲーションに基づく全トランスクリプトーム解析、ならびに6merランダムプライマーおよび9merランダムプライマーによるランダムプライミングおよび伸長を用いた全トランスクリプトーム解析の実施の非例示的な感度評価項目を示すプロットを示す図である。

40

【図14】ライゲーションに基づくWTA法と比較した、本開示のランダムプライミングおよび伸長に基づくWTA分析の例示的な性能を示す、t分布型確率的近傍埋め込み法（t-SNE、t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding）を示す図である。

【図15A-15B】ID010NK6（RPE WTAノナマー）がID010UG1（ライゲーションに基づくWTA法）よりも多くの細胞表面マーカーを捕捉するようであったことを示す非限定的な例示的円グラフを示す図である。

【図16A-16D】ジャーカット／ラモス細胞および健常ドナー末梢血単核細胞（PB

50

MC)におけるRPE WTA法の性能を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロットを示す図である。

【図17A-17D】ランダムプライミングおよび伸長(1つのランダムプライミングステップおよび1つのPCRステップを含むRPE法を使用した)によるWTA分析を実施する一部の実施形態では、鎖置換活性を有するKlenow Exo-が、T4 DNAポリメラーゼよりも好ましいことを示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(RPE PCR)を示す図である。

【図18A-18D】Klenow Exo-が、以前に考えられていたほどの鎖置換活性を示さない場合があることを示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(RPE PCR)を示す図である。

【図19A-19D】RPE WTA法の性能に対する、ランダムプライミングステップの数およびランダマーの長さの効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロットを示す図である。

【図20A-20F】RPEに基づくWTA法の性能に対するSPRIクリーンアップ比の効果を示す非限定的な例示的データを示す図である。

【図21A-21G】RPEに基づくWTA法の性能に対する、様々なランダムプライマー濃度およびRPE条件の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(RPE PCR、SPRIクリーンアップ後)を示す図である。

【図22A-22F】RPE WTAの性能に対する、コールドビーズの添加および様々なビーズ密度の効果を示す非限定的な例示的配列決定データを示す図である。

【図23A-23B】RPE WTAの性能に対する、ランダムプライマー濃度およびコールドビーズの効果を示す非限定的な例示的配列決定データを示す図である。

【図24A-24E】RPE WTA法に対する様々な細胞数の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(RPE PCR)を示す図である。

【図25A-25E】RPE WTA法の性能に対する様々な細胞数の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(インデックスPCR)を示す図である。

【図26A-26F】様々な細胞数を用いた本開示のランダムプライミングおよび伸長に基づくWTA分析の例示的な性能を示すt分布型確率的近傍埋め込み(t-SNE)投影図である。

【図27A-27D】RPE WTA法の性能に対する、連続RPE変性およびRPE反応容積の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロットを示す図である。

【図28A-28C】2PCRライブラリー生成プロトコル(図28A~28B)および1PCRライブラリー生成プロトコル(図28C)を用いた本開示のランダムプライミングおよび伸長に基づくWTA分析の例示的な性能を示す例示的なバイオアナライザープロットを示す図である。

【図29A-29D】タンパク質発現と遺伝子発現を同時に決定するためのおよび試料インデックス付与のためのオリゴヌクレオチドの非限定的な例示的設計を示す図である。

【図30】タンパク質発現と遺伝子発現を同時に決定するためのおよび試料インデックス付与のための非限定的な例示的オリゴヌクレオチド配列の略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

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

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

【0018】

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

【0019】

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

【0020】

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

【0021】

本明細書における開示は、試料中の核酸標的を標識するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第 1 のユニバーサル配列、分子標識、および核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；ランダムプライ

マーを複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；ならびに複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成することを含む。

【0022】

本明細書における開示は、試料中の核酸標的の数を決定するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；ランダムプライマーを複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成すること；第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成すること；ならびに第1の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含む。

【0023】

定義

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

【0024】

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

それよりも多くの単一ユニバーサルプライマーを使用して、複数の異なる配列の複製または増幅を可能にすることができる。したがって、ユニバーサルプライマーは、そのようなユニバーサル配列にハイブリダイズすることができる配列を含む。標的核酸配列保有分子を修飾して、ユニバーサルアダプター（例えば、非標的核酸配列）を、異なる標的核酸配列の一方のまたは両方の末端に付着させることができる。標的核酸に付着される1つまたは複数のユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマーのハイブリダイゼーション用の部位を提供することができる。標的核酸に付着される1つまたは複数のユニバーサルプライマーは、互いに同じであってもよくまたは異なってもよい。

【0025】

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

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

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

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

【0029】

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

【0030】

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

【0031】

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

【0032】

核酸は、核酸に新しいまたは増強された特徴（例えば、安定性の向上）を提供するために、1つまたは複数の修飾（例えば、塩基修飾、骨格修飾）を含んでいてもよい。核酸は、核酸親和性タグを含むことができる。ヌクレオシドは、塩基-糖の組合せであってもよい。ヌクレオシドの塩基部分は、複素環式塩基であってもよい。そのような複素環式塩基

10

20

30

40

50

の2つの最も一般的な種類は、プリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合で連結されているリン酸基をさらに含むヌクレオシドであってもよい。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドの場合、リン酸基は、糖の2'、3'、または5'ヒドロキシル部分に連結されていてもよい。核酸を形成する際、リン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合で連結して、線状ポリマー化合物を形成することができる。この線状ポリマー化合物のそれぞれの末端が次にさらに接合されて、環状化合物を形成する場合があるが、一般に線状化合物が好適である。加えて、線状化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有してもよく、したがって、完全にまたは部分的に二本鎖の化合物を産生するようにフォールディングする場合がある。核酸内では、リン酸基は、一般的に、核酸のヌクレオシド間骨格を形成するものと呼ばれる場合がある。連結または骨格は、3'-5'ホスホジエステル連結であってもよい。

10

【0033】

核酸は、修飾骨格および／または修飾ヌクレオシド間連結を含むことができる。修飾骨格としては、骨格にリン原子を保持するものおよび骨格にリン原子を有しないものを挙げることができる。その中にリン原子を含有する好適な修飾核酸骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネートなどのメチルおよび他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、3'-アミノホスホルアミダートおよびアミノアルキルホスホルアミダート、ホスホロジアミダート、チオノホスホルアミダートを含むホスホルアミダート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、ならびに通常の3'-5'連結を有するボラノホスフェート、2'-5'連結アナログ、ならびに1つまたは複数のヌクレオチド間連結が3'-3'、5'-5'、または2'-2'連結である逆極性を有するものを挙げることができる。

20

【0034】

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

30

【0035】

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

40

【0036】

50

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

【0037】

核酸は、モルホリノ環に付着されている複素環塩基を有する連結モルホリノ単位（例えば、モルホリノ核酸）を含んでいてもよい。連結基は、モルホリノ核酸のモルホリノモノマー単位を連結することができる。非イオン性モルホリノベースオリゴマー化合物は、細胞タンパク質との望ましくない相互作用が少ない場合がある。モルホリノベースポリヌクレオチドは、核酸の非イオン性模倣物であってもよい。異なる連結基を使用して、モルホリノ種類内の様々な化合物を接合することができる。さらなる種類のポリヌクレオチド模倣物は、シクロヘキセニル核酸（CeNA）と呼ばれる場合がある。核酸分子に通常存在するフラノース環を、シクロヘキセニル環と置き換えることができる。CeNA DMT保護ホスホラミダイトモノマーを調製し、ホスホラミダイト化学反応を使用してオリゴマー化合物合成に使用することができる。核酸鎖へのCeNAモノマーの組み込みは、DNA/RNAハイブリッドの安定性を増加させることができる。CeNAオリゴアデニレートは、天然複合体と同様の安定性で、核酸相補体と複合体を形成することができる。さらなる修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子に連結され、それにより2'-C、4'-Cオキシメチレン連結を形成し、それにより二環式糖部分を形成するロックド核酸（LNA）を含んでいてもよい。連結は、2'酸素原子および4'炭素原子を架橋するメチレン（-CH₂）、基（式中nは1または2である）であってもよい。LNAおよびLNAアナログは、相補的核酸との非常に高い二重鎖熱安定性（T_m=+3~+10℃）、3'-エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、および良好な溶解度特性を示すことができる。

【0038】

また、核酸は、核酸塩基（単に「塩基」と呼ばれることが多い）修飾または置換を含んでいてもよい。本明細書で使用される場合、「未修飾」または「天然」核酸塩基としては、プリン塩基（例えば、アデニン（A）およびグアニン（G））ならびにピリミジン塩基（例えば、チミン（T）、シトシン（C）、およびウラシル（U））を挙げることができる。修飾核酸塩基としては、5-メチルシトシン（5-me-C）、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサントシン、ヒポキサントシン、2-アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの6-メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの2-プロピルおよび他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミンおよび2-チオシトシン、5-ハロウラシルおよびシトシン、5-プロピニル（-C=C-CH₃）ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、6-アゾウラシル、シトシンおよびチミン、5-ウラシル（プソイドウラシル）、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、および他の8-置換アデニンおよびグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、および他の5-置換ウラシルおよびシトシン、7-メチルグアニンおよび7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニンおよび8-アザアデニン、7-デアザグアニンおよび7-デアザアデニン、ならびに3-デアザグアニンおよび3-デアザアデニンなどの他の合成および天然核酸塩基を挙げることができる。修飾核酸塩基としては、フェノキサジンシチジン（1H-ピリミド（5，4-b）（1，4）ベンゾキサジン-2（3H）-オン）、フェノチアジンシチジン（1H-ピリミド（5，4-b）（1，4）ベンゾチアジン-2（3H）-オン）などの三環式ピリミジン、置換フェノキサジンシチジン（例えば、9-（2-アミノエトキシ）-H-ピリミド（5，4-b）（1，4）ベンゾキサジン-2（3H）-オン）、フェノチアジンシチジン（1H-ピリミド（5，4-b）（1，4）ベンゾチアジン-2（3H）-オン）などのG-クランプ、置換フェノキサジンシチジン（例えば、9-（2-アミノエトキシ）-H-ピリミド（5，4-b）（1，4）ベンゾキサジン-2（3H）-オン）、カルバゾールシチジン（2H-ピリミド（4，5-b）インドール-2-オン）、ピリドインドールシチジン（H-ピ

リド（3'，2'：4，5）ピロロ〔2，3-d〕ピリミジン-2-オン）などのG-クラ
ンプを挙げることができる。

【0039】

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

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

【0040】

本明細書で使用される場合、「固体支持体」という用語は、複数のバーコード（例えば
、確率論的バーコード）を付着させることができる、個別の固体または半固体表面を指す
ことができる。固体支持体は、核酸をそれに固定化することができる（例えば、共有結合
でまたは非共有結合で）、プラスチック、セラミック、金属、またはポリマー材料（例
えば、ヒドロゲル）で構成されている任意のタイプの中実性、多孔性、または中空の球体
、ボール、ベアリング、円柱、または他の類似構成を包含することができる。固体支持体
は、球状であってもよく（例えば、マイクロスフェア）、または立方体、立方形、ピラミッ
ド形、円柱状、円錐形、長方形、もしくは円盤形など、非球状もしくは不規則の形状を有
してもよい個別の粒子を含んでいてもよい。ビーズは、形状が非球状であってもよい。ア
レイ状に離間されている複数の固体支持体は、基材を構成しないことがある。固体支持体
は、「ビーズ」という用語と同義的に使用される場合がある。

【0041】

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

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

【0042】

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

ここで使用される場合、「標的」という用語は、バーコード（例えば、確率論的バー
コード）を付随させることができる組成物を指すことができる。本開示の方法、デバイス、
および系による分析のための例示的で好適な標的としては、オリゴヌクレオチド、DNA

10

20

30

40

50

、RNA、mRNA、マイクロRNA、およびtRNAなどが挙げられる。標的は、一本鎖であってもよくまたは二本鎖であってもよい。一部の実施形態では、標的は、タンパク質、ペプチド、またはポリペプチドであってもよい。一部の実施形態では、標的は脂質である。本明細書で使用される場合、「標的」は、「種」と同義的に使用することができる。

【0043】

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

【0044】

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

【0045】

バーコード

確率論的バーコーディングなどのバーコーディングは、例えば、米国特許出願公開第20150299784号明細書、国際公開第2015031691号パンフレット、およびFu et al, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2011 May 31; 108(22):9026-31に記載されており、こうした刊行物の内容はその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書で開示されるバーコードは、標的を確率論的に標識（例えば、バーコード、タグ）するために使用することができるポリヌクレオチド配列であってもよい確率論的バ

ーコードであってもよい。バーコードは、確率論的バーコードの異なるバーコード配列の数および標識されることになる標的のいずれかの出現数の比が、1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1、90 : 1、100 : 1、もしくは約1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1、90 : 1、100 : 1、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であり得る場合、確率論的バーコードと呼ぶことができる。標的は、同一のまたはほぼ同一の配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であってもよい。バーコードは、確率論的バーコードの異なるバーコード配列の数および標識されることになる標的のいずれかの出現数の比が、少なくとも1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1、90 : 1、もしくは100 : 1であるか、または最大で1 : 1、2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、11 : 1、12 : 1、13 : 1、14 : 1、15 : 1、16 : 1、17 : 1、18 : 1、19 : 1、20 : 1、30 : 1、40 : 1、50 : 1、60 : 1、70 : 1、80 : 1、90 : 1、もしくは100 : 1である場合、確率論的バーコードと呼ぶことができる。確率論的バーコードのバーコード配列は、分子標識と呼ばれる場合がある。

【0046】

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

【0047】

標識、例えば、細胞標識は、規定の長さ、例えば各々が7ヌクレオチド（一部のハミングエラー訂正コードで使用されるビット数に等しい）の固有なセットの核酸部分配列を含んでもよく、それらは、エラー訂正能力を提供するように設計されていてもよい。エラー訂正部分配列のセットは、7ヌクレオチド配列を含み、セット内の配列の任意の対の組合せが、規定の「遺伝的距離」（またはミスマッチ塩基の数）を表すように設計することができ、例えば、エラー訂正部分配列のセットは、3ヌクレオチドの遺伝的距離を表す

ように設計することができる。この場合、標識化標的核酸分子の配列データのセットのエラー訂正配列を精査することにより（下記により完全に記載されている）、増幅エラーまたは配列決定エラーを検出または訂正することが可能になり得る。一部の実施形態では、エラー訂正コードを作出するために使用される核酸部分配列の長さは様々であってもよく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、31、40、50ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、31、40、50ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、他の長さの核酸部分配列を、エラー訂正コードの作出に使用することができる。

【0048】

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

【0049】

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

【0050】

ユニバーサル標識

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

10

20

30

40

50

1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、もしくは300ヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、切断可能なリンカーまたは修飾ヌクレオチドは、バーコードが支持体から切断されることが可能になるようにユニバーサル標識配列の一部であってもよい。

【0051】

ディメンション標識

バーコードは、1つまたは複数のディメンション標識を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ディメンション標識は、標識付与（例えば、確率論的標識付与）が生じたディメンションに関する情報を提供する核酸配列を含んでいてもよい。例えば、ディメンション標識は、標的がバーコード化された時点に関する情報を提供することができる。ディメンション標識は、試料内のバーコーディング（例えば、確率論的バーコーディング）の時点に関連付けられていてもよい。ディメンション標識は、標識付与の時点で活性化されることができる。異なるディメンション標識を異なる時点で活性化することができる。ディメンション標識は、標的、標的のグループ、および／または試料がバーコード化された順序に関する情報を提供する。例えば、細胞の集団を、細胞周期のG0期にてバーコード化することができる。細胞を、細胞周期のG1期にてバーコード（例えば、確率論的バーコード）で再度パルスすることができる。細胞を、細胞周期のS期などにてバーコードで再度パルスすることができる。各パルス（例えば、細胞周期の各期）におけるバーコードは、異なるディメンション標識を含むことができる。このように、ディメンション標識は、細胞周期のどの期でどの標的が標識化されたかに関する情報を提供する。ディメンション標識により、多数の異なる生物学的時点を調査することができる。例示的な生物学的時点としては、これらに限定されないが、細胞周期、転写（例えば、転写開始）、および転写物分解を挙げることができる。別の例では、試料（例えば、細胞、細胞の集団）は、薬物および／または療法による治療前および／または治療後に標識することができる。別個の標的のコピー数の変化は、薬物および／または療法に対する試料の応答を示すことができる。

【0052】

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

【0053】

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

【0054】

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

【0055】

空間標識

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

【0056】

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

【0057】

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

10

20

30

40

50

00個のヌクレオチド、約10～約150個のヌクレオチド、または約20～約125個のヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0058】

細胞標識

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

【0059】

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

【0060】

バーコード配列

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

【0061】

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

【0062】

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

10

【0063】

分子標識

バーコード（例えば、確率論的バーコード）は、1つまたは複数の分子標識を含んでもよい。分子標識は、バーコード配列を含んでもよい。一部の実施形態では、分子標識は、バーコードにハイブリダイズした特定のタイプの標的核酸種を識別するための情報を提供する核酸配列を含んでもよい。分子標的は、バーコード（例えば、標的結合性領域）にハイブリダイズした標的核酸種の具体的な出現の計数手段を提供する核酸配列を含んでもよい。

【0064】

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

20

30

【0065】

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

40

50

【0066】

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

【0067】

標的結合性領域

バーコードは、捕捉プローブなど、1つまたは複数の標的結合性領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、目的の標的とハイブリダイズすることができる。一部の実施形態では、標的結合性領域は、標的（例えば、標的核酸、標的分子、例えば、分析しようとする細胞性核酸）に、例えば特定の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする核酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、特定の標的核酸の特定の位置に付着する（例えば、ハイブリダイズする）ことができる核酸配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合性領域は、制限酵素部位突出（例えば、EcoRI粘着末端突出）に対する特異的ハイブリダイゼーションが可能である核酸配列を含んでいてもよい。次いで、バーコードは、制限部位突出に相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートすることができる。

【0068】

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

【0069】

一部の実施形態では、標的結合性領域は、ポリアデニル化末端を含むmRNAとハイブリダイズすることができるオリゴ（dT）を含んでいてもよい。標的結合性領域は、遺伝子特異的であってもよい。例えば、標的結合性領域は、標的の特定の領域にハイブリダイズするように構成されていてもよい。標的結合性領域は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチド長、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。標的結合性領域は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30ヌクレオチド長であってもよく、

または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30ヌクレオチド長であってもよい。標的結合性領域は、約5〜30ヌクレオチド長であってもよい。バーコードが遺伝子特異的標的結合性領域を含む場合、バーコードは、本明細書では遺伝子特異的バーコードと呼ばれる場合がある。

【0070】

方向付け特性

確率論的バーコード（例えば、確率論的バーコード）は、バーコードを方向付ける（例えば、アラインさせる）ために使用することができる1つまたは複数の方向付け特性を含んでいてもよい。バーコードは、等電点電気泳動のための部分を含んでいてもよい。異なるバーコードは、異なる等電点電気泳動点を構成することができる。こうしたバーコードが試料に導入されている場合、バーコードを既知の方向へと方向付けるために、試料を等電点電気泳動にかけることができる。このように、方向付け特性を使用すると、試料内のバーコードの既知マップを作成することができる。例示的な方向付け特性としては、電気泳動移動度（例えば、バーコードのサイズに基づく）、等電点、スピン、導電率、および／または自己組織化を挙げることができる。例えば、自己組織化の方向付け特性を有するバーコードは、活性化されると特定の方向（例えば、核酸ナノ構造）へと自己組織化することができる。

【0071】

親和性特性

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

【0072】

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

抗体断片は、例えば、 $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ 、および $s F v$ などの抗体の一部であってもよい。一部の実施形態では、抗体断片は、全長抗体により認識されるものと同じ抗原に結合することができる。抗体断片は、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「 $F v$ 」断片、ならびに軽鎖可変領域および重鎖可変領域がペプチドリンカーにより接続されている組換え単鎖ポリペプチド分子（「 $s c F v$ タンパク質」）などの、抗体の可変領域からなる単離断片を含むことができる。例示的な抗体としては、これらに限定されないが、がん細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面受容体（CD8、CD34、CD45）に結合する抗体、および治療用抗体を挙げることができる。

【0073】

ユニバーサルアダプタープライマー

バーコードは、1つまたは複数のユニバーサルアダプタープライマーを含んでいてもよい。例えば、遺伝子特異的確率論的バーコードなどの遺伝子特異的バーコードは、ユニバーサルアダプタープライマーを含んでいてもよい。ユニバーサルアダプタープライマーは

、すべてのバーコードにわたってユニバーサルであるヌクレオチド配列を指すことができる。ユニバーサルアダプタープライマーは、遺伝子特異的バーコードを構築するために使用することができる。ユニバーサルアダプタープライマーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチド長、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチド長、またはこれらのうちの任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルアダプタープライマーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30ヌクレオチド長であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30ヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサルアダプタープライマーは、5～50ヌクレオチド長であってもよい。

【0074】

リンカー

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

【0075】

固体支持体

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

【0076】

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

【0077】

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

【0078】

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

【0079】

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

【0080】

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

10

20

30

40

50

アルギニン) (PARG)、ポリ(乳酸- ϵ -グリコール酸) (PLGA)などの材料を挙げることができる。

【0081】

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

【0082】

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

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

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

【0083】

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

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

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

10

20

30

40

50

異性化を起こす。この態様では、光子スイッチの組込みは、光誘発因子を適用すると崩壊するかまたはより多孔性になり得るビーズ壁をもたらす。

【0084】

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

10

【0085】

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

20

【0086】

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

30

40

【0087】

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

50

【0088】

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

【0089】

ビーズは、これらに限定されないが、常磁性材料（例えば、マグネシウム、モリブデン、リチウム、およびタンタル）、超常磁性材料（例えば、フェライト（ Fe_3O_4 ；マグネタイト）ナノ粒子）、強磁性材料（例えば、鉄、ニッケル、コバルト、それらの一部の合金、および一部の希土類金属化合物）、セラミック、プラスチック、ガラス、ポリスチレン、シリカ、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、アガロース、ヒドロゲル、ポリマー、セルロース、ナイロン、またはそれらの任意の組合せを含む様々な材料を含んでいてもよい。

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

【0090】

本明細書で開示される一部の実施形態は、1つまたは複数の粒子（例えば、ビーズ）を含む。粒子の各々は、複数のオリゴヌクレオチド（例えば、バーコード）を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドの各々は、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、細胞標識、および標的結合性領域（例えば、オリゴ（dT）配列、遺伝子特異的配列、ランダムマルチマー、またはそれらの組合せ）を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドの各々の細胞標識配列は同じであってもよい。異なる粒子上のオリゴヌクレオチドの細胞標識配列は、異なる粒子上のオリゴヌクレオチドを識別することができるように、異なってもよい。異なる細胞標識配列の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、細胞標識配列の数は、10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは約10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、細胞標識配列の数は、少なくとも10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 であってもよく、または最大で10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、もしくは 10^9 であってもよい。一部の実施形態では、複数の粒子の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000個以下、またはそれよりも多くが、同じ細胞配列を有す

10

20

30

40

50

るオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、同じ細胞配列を有するオリゴヌクレオチドを含む複数の粒子は、最大で0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、またはそれよりも多くともよい。一部の実施形態では、複数の粒子はいずれも、同じ細胞標識配列を有していない。

【0091】

各粒子上の複数のオリゴヌクレオチドは、異なるバーコード配列（例えば、分子標識）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコード配列の数は、10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、もしくは約10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、バーコード配列の数は、少なくとも10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、20000、30000、40000、50000、60000、70000、80000、90000、100000、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲、またはそれよりも多くが、異なるバーコード配列を含む。一部の実施形態は、バーコードを含む複数の粒子を提供する。一部の実施形態では、標識しようとする標的の出現（またはコピーもしくは数）および異なるバーコード配列の比は、少なくとも1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:30、1:40、1:50、1:60、1:70、1:80、1:90、またはそれよりも大きくともよい。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドの各々は、試料標識、ユニバーサル標識、または両方をさらに含む。粒子は、例えば、ナノ粒子またはマイクロ粒子であってもよい。

【0092】

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

【0093】

ビーズの直径は、基材のウェルの直径に関連していてもよい。一部の実施形態では、ビーズの直径は、ウェルの直径よりも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、もしくは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはこうした値の任意の2つの間

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

10

【0094】

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

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

20

【0095】

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

30

【0096】

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

40

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

固体支持体は、膜、紙、プラスチック、コーティング表面、平坦表面、ガラス、スライド、チップ、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。固体支持体は、樹脂、ゲル、マイクロスフェア、または他の幾何学的構成の形態をとっていてもよい。固体支持体は、シリカチップ、マイクロ粒子、ナノ粒子、プレート、アレイ、毛細管、ガラス繊維フ

50

フィルター、ガラス表面、金属表面（鋼鉄、金銀、アルミニウム、ケイ素、および銅）などの平坦支持体、ガラス支持体、プラスチック支持体、ケイ素支持体、チップ、フィルター、膜、マイクロウェルプレート、スライド、マルチウェルプレートもしくは膜を含むプラスチック材料（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオリドで形成されている）、および／またはウェーハ、コーム、ピン、もしくは針（例えば、コンビナトリアル合成もしくは分析に好適なピンのアレイ）、またはウェーハ（例えば、シリコンウェーハ）、フィルター底部を有するもしくは有しないピットを有するウェーハなどの平坦表面のピットもしくはナノリットルウェルのアレイ中のビーズを含むことができる。

【0097】

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

【0098】

基材およびマイクロウェルアレイ

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

【0099】

バーコーディングの方法

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

【0100】

一部の実施形態では、複数の標的をバーコーディングすることは、複数のバーコードを

10

20

30

40

50

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

【0101】

試料とバーコードとの接触

本開示は、試料（例えば、細胞）を、本開示の基材と接触させるための方法を提供する。例えば、細胞、臓器、または組織の薄い切片を含む試料を、バーコード（例えば、確率論的バーコード）と接触させることができる。例えば、重力流により細胞を接触させることができ、その場合、細胞は沈降して単層を作出することができる。試料は、組織の薄い切片であってもよい。薄い切片を、基材上に配置することができる。試料は1次元であってもよい（例えば、平面状表面を形成してもよい）。試料（例えば、細胞）は、例えば、細胞を基材上で増殖／培養することにより、基材全体に広げることができる。

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

【0102】

細胞溶解

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

【0103】

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

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

塩濃度は、約 0.5 M である。溶解緩衝液は、界面活性剤（例えば、SDS、ドデシル硫酸 Li、triton X、tween、NP-40）を含んでいてもよい。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、少なくとも約 0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、または 7%、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、最大で約 0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、または 7%、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、約 1% ドデシル硫酸 Li である。溶解法に使用される時間は、使用される界面活性剤の量に依存する場合がある。一部の実施形態では、使用される界面活性剤が多いほど、溶解に必要な時間が短くなる。溶解緩衝液は、キレート剤（例えば、EDTA、EGTA）を含んでいてもよい。溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、少なくとも約 1、5、10、15、20、25、または 30 mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、最大で約 1、5、10、15、20、25、または 30 mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、約 10 mM である。溶解緩衝液は、還元剤（例えば、ベーターメルカプトエタノール、DTT）を含んでいてもよい。溶解緩衝液中の還元剤の濃度は、少なくとも約 1、5、10、15、または 20 mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。溶解緩衝液中の還元剤の濃度は、最大で約 1、5、10、15、または 20 mM、またはそれよりも高濃度であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の還元剤の濃度は、約 5 mM である。一部の実施形態では、溶解緩衝液は、約 0.1 M の Tris HCl、約 pH 7.5、約 0.5 M の LiCl、約 1% のドデシル硫酸リチウム、約 10 mM の EDTA、および約 5 mM の DTT を含んでいてもよい。

【0104】

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

【0105】

標的核酸分子に対するバーコードの付着

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

【0106】

付着は、バーコードの標的認識領域と標的核酸分子の一部とのライゲーションをさらに含んでいてもよい。例えば、標的結合性領域は、制限部位突出（例えば、EcoRI 粘着

末端突出) に対する特異的ハイブリダイゼーションが可能であり得る核酸配列を含んでいてもよい。アッセイ手順は、標的核酸を制限酵素(例えば、E c o R I)で処理して、制限部位突出を作出することをさらに含んでいてもよい。次いで、バーコードは、制限部位突出に相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートすることができる。リガーゼ(例えば、T 4 D N A リガーゼ)を使用して、2つの断片を接合することができる。

【0107】

例えば、図2に例示されているバーコーディングの非限定的な例では、その後、ブロック220において、複数の細胞(または複数の試料)に由来する標識化標的(例えば、標的バーコード分子)を、例えばチューブにプールしてもよい。標識化標的は、例えば、標的バーコード分子が付着されているバーコードおよび/またはビーズを回収することによりプールすることができる。

10

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

【0108】

逆転写

20

本開示は、逆転写を使用して標的バーコードコンジュゲートを作出するための方法を提供する(例えば、図2のブロック224において)。標的バーコードコンジュゲートは、バーコードおよび標的核酸のすべてまたは一部の相補配列(すなわち、確率論的バーコード化c D N A分子などのバーコード化c D N A分子)を含んでいてもよい。付随しているR N A分子の逆転写は、逆転写酵素と共に逆転写プライマーを添加することにより生じ得る。逆転写プライマーは、オリゴ(d T)プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、または標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーであってもよい。オリゴ(d T)プライマーは、12~18ヌクレオチド長であってもよく、または約12~18ヌクレオチド長であってもよく、哺乳動物m R N Aの3'末端にある内因性ポリ(A)テイルに結合することができる。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、様々な相補的部位にてm R N Aに結合することができる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、選択的に目的のm R N Aからのプライミングを生じる。

30

【0109】

一部の実施形態では、標識化R N A分子の逆転写は、逆転写プライマーの添加により生じ得る。一部の実施形態では、逆転写プライマーは、オリゴ(d T)プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、または標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーである。一般に、オリゴ(d T)プライマーは、12~18ヌクレオチド長であり、哺乳動物m R N Aの3'末端にある内因性ポリ(A)テイルに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、様々な相補的部位にてm R N Aに結合することができる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、選択的に目的のm R N Aからのプライミングを生じる。

40

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

【0110】

増幅

1つまたは複数の核酸増幅反応(例えば、図2のブロック228における)を実施して、標識化標的核酸分子の複数コピーを作出することができる。増幅は、複数の標的核酸配

50

列が同時に増幅されるマルチプレックス様式で実施することができる。増幅反応を使用して、配列決定アダプターを核酸分子に付加することができる。増幅反応は、存在する場合、試料標識の少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。増幅反応は、細胞標識および／またはバーコード配列（例えば、分子標識）の少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。増幅反応は、試料タグ、細胞標識、空間標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的核酸、またはそれらの組合せの少なくとも一部を増幅することを含んでいてもよい。増幅反応は、複数の核酸の0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の範囲もしくは数値を増幅することを含んでいてもよい。本方法は、1つまたは複数のcDNA合成反応を実施して、試料標識、細胞標識、空間標識、および／またはバーコード配列（例えば、分子標識）を含む標的バーコード分子の1つまたは複数のcDNAコピーを産生することをさらに含んでいてもよい。

10

【0111】

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

20

【0112】

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

30

【0113】

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

40

【0114】

増幅は、1つまたは複数の非天然ヌクレオチドの使用を含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドは、光不安定性または誘発性ヌクレオチドを含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドの例としては、これらに限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ、お

50

よびロックド核酸（LNA）、ならびにグリコール核酸（GNA）、およびトレオース核酸（TNA）を挙げることができる。非天然ヌクレオチドを、増幅反応の1つまたは複数のサイクルに添加してもよい。非天然ヌクレオチドの添加は、増幅反応の特定のサイクルまたは時点での産物を識別するために使用することができる。

【0115】

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

【0116】

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

【0117】

任意の増幅スキームを、本開示の方法で使用することができる。例えば、1つのスキームにおいて、最初のラウンドのPCRでは、遺伝子特異的プライマーおよびユニバーサルIllumina配列決定プライマー1配列に対するプライマーを使用して、ビーズに付着されている分子を増幅することができる。2回目のラウンドのPCRでは、Illumina配列決定プライマー2配列にフランキングされているネステッド遺伝子特異的プライマー、およびユニバーサルIllumina配列決定プライマー1配列に対するプライマーを使用して、最初のPCR産物を増幅することができる。3回目のラウンドのPCR

では、P5およびP7および試料インデックスが付加され、PCR産物がIllumina配列決定ライブラリーへと変換される。150bp×2配列決定を使用した配列決定により、リード1では細胞標識およびバーコード配列（例えば、分子標識）を、リード2では遺伝子を、ならびにインデックス1リードでは試料インデックスを明らかにすることができる。

【0118】

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

【0119】

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

【0120】

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

つの新しい架橋が二本鎖架橋に変換される。

【0121】

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

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

【0122】

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

【0123】

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

【0124】

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

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

【0125】

増幅は、1つまたは複数の非天然ヌクレオチドの使用を含んでいてもよい。非天然ヌクレオチドは、光不安定性および／または誘発性ヌクレオチドを含んでいてもよい。非天然

10

20

30

40

50

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

【0126】

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

【0127】

一部の実施形態では、試料中の複数の標的のバーコーディング（例えば、確率論的バーコーディング）は、バーコード化標的（例えば、確率論的バーコード化標的）または標的のバーコード化断片のインデックス化ライブラリーを生成することをさらに含む。異なるバーコードのバーコード配列（例えば、異なる確率論的バーコードの分子標識）は、互いに異なってもよい。バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、試料中の複数の標的から複数のインデックス化ポリヌクレオチドを生成することを含む。例えば、第1のインデックス化標的および第2のインデックス化標的を含むバーコード化標的のインデックス化ライブラリーの場合、第1のインデックス化ポリヌクレオチドの標識領域は、第2のインデックス化ポリヌクレオチドの標識領域と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50個の、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチドが異なってもよい。一部の実施形態では、バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、複数の標的、例えばmRNA分子を、ポリ（T）領域および標識領域を含む複数のオリゴヌクレオチドと接触させること；ならびに逆

10

20

30

40

50

転写酵素を使用して第一鎖合成を実施して、各々がcDNA領域および標識領域を含む一本鎖標識化cDNA分子を産生することを含み、複数の標的は、異なる配列の少なくとも2つのmRNA分子を含み、複数のオリゴヌクレオチドは、異なる配列の少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。バーコード化標的のインデックス化ライブラリーの生成は、一本鎖標識化cDNA分子を増幅して、二本鎖標識化cDNA分子を産生すること；および二本鎖標識化cDNA分子に対してネステッドPCRを実施して、標識化アンプリコンを産生することをさらに含んでいてもよい。一部の実施形態では、本方法は、アダプター標識化アンプリコンを生成することを含んでいてもよい。

【0128】

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

【0129】

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

【0130】

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

【0131】

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

10

20

30

40

50

20

30

50

15、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、約10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、少なくとも10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、または最大で10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} 個のバーコードもしくは確率論的バーコード310を含有していてもよく、あるいはこうした値のいずれかの間の数または範囲のバーコードまたは確率論的バーコード310を含有していてもよい。また、1セットのバーコードまたは確率論的バーコード310は、例えば、各々が固有標識領域314を含有していてもよい。過剰なバーコードまたは確率論的バーコード310を除去するために、標識化cDNA分子304を精製してもよい。精製は、Ampur eビーズ精製を含んでいてもよい。

【0133】

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

【0134】

図3のステップ3に示されているように、ステップ2のPCR増幅の産物を、ネステッドPCRプライマープールおよび第2のユニバーサルPCRプライマーを用いて増幅してもよい。ネステッドPCRは、PCR増幅バイアスを最小限に抑えることができる。特に、ネステッドPCR標識アンプリコン322を、ネステッドPCRによりさらに増幅してもよい。ネステッドPCRは、ネステッドPCRプライマー332a～cのネステッドPCRプライマープール330および第2ユニバーサルPCRプライマー328'を用いた単一反応容積でのマルチプレックスPCRを含んでいてもよい。ネステッドPCRプライマープール328は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、70

0、800、900、1000個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000個の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよく、またはこうした値のいずれかの間の数もしくは範囲の異なるネステッドPCRプライマー330を含有していてもよい。ネステッドPCRプライマー332は、アダプター334を含有し、標識化アンプリコン322のcDNA部分306' '内の領域にハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー328'は、アダプター336を含有し、標識化アンプリコン322のユニバーサルPCR領域316にハイブリダイズすることができる。したがって、ステップ3では、アダプター-標識化アンプリコン338が産生される。一部の実施形態では、ネステッドPCRプライマー332および第2のユニバーサルPCRプライマー328'は、アダプター334および336を含有していなくともよい。代わりに、アダプター334および336をネステッドPCRの産物にライゲートさせて、アダプター-標識化アンプリコン338を産生してもよい。

10

20

【0135】

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

30

【0136】

オリゴヌクレオチドが付随している細胞成分結合性試薬を含む組成物

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

40

【0137】

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬は、細胞成分標的に特異的に結合することが可能である。例えば、細胞成分結合性試薬の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、インテグリン、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せであってもよくまたは含んでいてもよい。一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬(例えば、タンパク質結合性試薬)は、抗原標的またはタンパク質標

50

的に特異的に結合することが可能である。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、確率論的バーコードなどのバーコードを含んでいてもよい。バーコードは、バーコード配列（例えば、分子標識）、細胞標識、試料標識、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含んでいてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、ポリ（A）テイルなど、オリゴヌクレオチドプローブに対する結合部位を含んでいてもよい。例えば、ポリ（A）テイルは、例えば、固体支持体に繫留されていなくともよく、または固体支持体に繫留されていてもよい。ポリ（A）テイルは、約10～50ヌクレオチド長、例えば、18ヌクレオチド長であってもよい。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、または両方を含んでいてもよい。

10

【0138】

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

20

30

【0139】

一部の実施形態では、固有識別子は、多様なセットの固有識別子から選択される。多様なセットの固有識別子は、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個の異なる固有識別子を含んでいてもよく、もしくは約20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、5000個の異なる固有識別子を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の異なる固有識別子を含んでいてもよい。多様なセットの固有識別子は、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる固有識別子を含んでいてもよく、または最大で20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、もしくは5000個の異なる固有識別子を含んでいてもよい。一部の実施形態では、1セットの固有識別子は、分析しようとする試料のDNAまたはRNA配列に対して最小限

40

50

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

【0140】

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

【0141】

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

【0142】

オリゴヌクレオチドは、種々の機序により細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬に共有結合でコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬に非共有結合でコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされている。リンカーは、例えば、細胞成分結合性試薬および／またはオリゴヌクレオチドから切断可能または脱離可能であってもよい。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドを細胞成分結合性試薬に可逆的に付着させる化学基を含んでいてもよい。化学基

は、例えば、アミン基を介してリンカーにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、リンカーは、細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされている別の化学基と安定的な結合を形成する化学基を含んでいてもよい。例えば、化学基は、UV光切断可能基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミンなどであってもよい。一部の実施形態では、化学基は、リシンなどのアミノ酸の一級アミンまたはN末端を介して細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされていてもよい。Protein-Oligoコンジュゲーションキット (Solulink, Inc.、サンディエゴ、カリフォルニア州)、Thunder-Link (登録商標) オリゴコンジュゲーション系 (Innova Biosciences、ケンブリッジ、英国) などの市販のコンジュゲーションキットを使用して、オリゴヌクレオチドを細胞成分結合性試薬にコンジュゲートすることができる。

10

【0143】

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

20

30

【0144】

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

40

50

範囲であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分は、細胞または生物中の全細胞成分（例えば、タンパク質）の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%であってもよく、または最大で1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、もしくは99%であってもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよく、もしくは約2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の異なる細胞成分標的を含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよく、または最大で2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、1000、10000個の異なる細胞成分標的を含んでいてもよい。

【0145】

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

【0146】

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

【0147】

細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチドは、例えば、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、ポリ（A）テイル、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされているオリゴヌクレオチドは、mRNA模倣物であってもよい。一部の実施形態では、試料インデックス付与オリゴヌク

レオチドは、複数のバーコードのうちの少なくとも1つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードの標的結合性領域は、捕捉配列を含んでいてもよい。標的結合性領域は、例えば、ポリ（dT）領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、バーコードの捕捉配列に相補的な試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（A）テイルを含んでいてもよい。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、分子標識を含んでいてもよい。

【0148】

一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料オリゴヌクレオチド）は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列、もしくは約6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドは、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000ヌクレオチド長の、または最大で6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、47

10

20

30

40

50

0、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、もしくは1000ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。

【0149】

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

10

【0150】

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

20

【0151】

一部の実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せであるかまたは含む。一部の実施形態では、抗原またはタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、インテグリン、またはそれらの任意の組合せであるかまたは含む。抗原またはタンパク質標的は、脂質、炭水化物、またはそれらの任意の組合せであってもよくまたは含んでいてもよい。タンパク質標的は、少なからぬタンパク質標的を含む群から選択することができる。抗原標的またはタンパク質標的の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。タンパク質標的の数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000であってもよい。

30

40

【0152】

細胞成分結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）には、同一の配列を有する2つまたはそれよりも多くの結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与

50

オリゴヌクレオチド) が付随していてもよい。細胞成分結合性試薬には、異なる配列を有する2つまたはそれよりも多くの結合性試薬オリゴヌクレオチドが付随していてもよい。細胞成分結合性試薬に付随している結合性試薬オリゴヌクレオチドの数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドの数は、同一配列を有するかまたは異なる配列を有するに関わらず、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000であってもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000であってもよい。

【0153】

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

【0154】

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

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

10

20

30

40

50

2、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40、1:41、1:42、1:43、1:44、1:45、1:46、1:47、1:48、1:49、1:50、1:51、1:52、1:53、1:54、1:55、1:56、1:57、1:58、1:59、1:60、1:61、1:62、1:63、1:64、1:65、1:66、1:67、1:68、1:69、1:70、1:71、1:72、1:73、1:74、1:75、1:76、1:77、1:78、1:79、1:80、1:81、1:82、1:83、1:84、1:85、1:86、1:87、1:88、1:89、1:90、1:91、1:92、1:93、1:94、1:95、1:96、1:97、1:98、1:99、1:100、1:200、1:300、1:400、1:500、1:600、1:700、1:800、1:900、1:1000、1:2000、1:3000、1:4000、1:5000、1:6000、1:7000、1:8000、1:9000、もしくは1:10000であってもよい。

【0155】

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

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

【0156】

細胞成分結合性試薬には、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされていてもよく、またはコンジュゲートされていなくともよい。一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬および結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬を含む混合物中の、結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬のパーセンテージは、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、

10

20

30

40

50

59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、もしくは約0.0000000001%、0.0000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、混合物中の、試料インデックス付与オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬のパーセンテージは、少なくとも0.0000000001%、0.0000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよく、または最大で0.0000000001%、0.0000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよい。

【0157】

一部の実施形態では、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬および試料インデックス付与オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬を含む混合物中の、結合性試薬オリゴヌクレオチド（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド）がコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬のパーセンテージは、0.

0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0
0 1 %、0 . 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 1 %、0 . 1 %、1
%、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3
%、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3
%、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3
%、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3
%、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3
%、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3
%、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3
%、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3
%、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3
%、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、もしくは約0 . 0 0
0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 1
%、0 . 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 1 %、0 . 1 %、1 %、
2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、
1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、
2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、
3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、
4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、
5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、
6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、
7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、
8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、
9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 %、またはこうした値の任意
の2つの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、混合物中の、結合
性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていない細胞成分結合性試薬のパーセン
テージは、少なくとも0 . 0 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0
0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 1 %、0 . 0 0 1 %、
0 . 0 1 %、0 . 1 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0
%、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、2 0
%、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、2 8 %、2 9 %、3 0
%、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、3 8 %、3 9 %、4 0
%、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、4 8 %、4 9 %、5 0
%、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、5 8 %、5 9 %、6 0
%、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、6 8 %、6 9 %、7 0
%、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、7 8 %、7 9 %、8 0
%、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0
%、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もし
くは1 0 0 %であってもよく、または最大で0 . 0 0 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0
0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0 0 1 %、0 . 0 0 0
1 %、0 . 0 0 1 %、0 . 0 1 %、0 . 1 %、1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7
%、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、
1 8 %、1 9 %、2 0 %、2 1 %、2 2 %、2 3 %、2 4 %、2 5 %、2 6 %、2 7 %、
2 8 %、2 9 %、3 0 %、3 1 %、3 2 %、3 3 %、3 4 %、3 5 %、3 6 %、3 7 %、
3 8 %、3 9 %、4 0 %、4 1 %、4 2 %、4 3 %、4 4 %、4 5 %、4 6 %、4 7 %、
4 8 %、4 9 %、5 0 %、5 1 %、5 2 %、5 3 %、5 4 %、5 5 %、5 6 %、5 7 %、
5 8 %、5 9 %、6 0 %、6 1 %、6 2 %、6 3 %、6 4 %、6 5 %、6 6 %、6 7 %、
6 8 %、6 9 %、7 0 %、7 1 %、7 2 %、7 3 %、7 4 %、7 5 %、7 6 %、7 7 %、
7 8 %、7 9 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、
8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、

10

20

30

40

50

98%、99%、もしくは100%であってもよい。

【0158】

細胞成分カクテル

一部の実施形態では、細胞成分結合性試薬のカクテル（例えば、抗体カクテル）を使用して、本明細書で開示される方法での標識付与感度を増加させることができる。いかなる特定の理論にも束縛されないが、これは、細胞成分発現またはタンパク質発現が、細胞タイプ間および細胞状態間で様々であり得るため、すべての細胞タイプを標識するユニバーサルな細胞成分結合性試薬または抗体を見出すことが困難であるためであり得ると考えられる。例えば、細胞成分結合性試薬のカクテルを使用すると、より多くの試料タイプのより高感度で効率的な標識付与を可能にすることができる。細胞成分結合性試薬のカクテルは、2つまたはそれよりも多くの異なるタイプの細胞成分結合性試薬、例えば、より広範囲の細胞成分結合性試薬または抗体を含むことができる。異なる細胞成分標的を標識する細胞成分結合性試薬と一緒にプールして、目的のすべての細胞タイプまたは1つもしくは複数の細胞タイプを十分に標識するカクテルを作出することができる。

【0159】

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

【0160】

組成物中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬（例えば、CD147抗体およびCD47抗体）の数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。2つまたはそれよりも多くの異なるタイプの細胞成分結合性試薬を有する組成物は、本明細書では、細胞成分結合性試薬カクテル（例えば、試料インデックス付与組成物カクテル）と呼ばれる場合がある。カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬の数は様々であってもよい。一部の実施形態では、カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、もしくは約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合性試薬の数は、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、もしくは1000000であってもよく、または最大で2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、もしくは1000000であってもよい。異なるタイプの細胞成分結合性試薬には、同じまたは異なる配列（例えば、試料インデックス付与配列）を有する結合性試薬オリゴヌクレオチドがコンジュゲートされていてもよい。

【0161】

細胞成分標的の定量分析の方法

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法はまた、本明細書に開示された組成物およびバーコード配列（例えば、分子標識配列）を細胞成分結合性試薬（例えば、タンパク質結合性試薬）のオリゴヌクレオチドに付随させ得るオリゴヌクレオチドプローブを使用して、試料中の複数の細胞成分標的（例えば、タンパク質標的）の定量分析に使用することができる。細胞成分結合性試薬のオリゴヌクレオチドは、抗体オリゴヌクレオチド、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、細胞識別オリゴヌクレオチド、制御粒子オリゴヌクレオチド、制御オリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなどであるか、またはこれらを含んでもよい。一部の実施形態では、試料は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍試料、血液試料などであり得る。一部の実施形態では、試料は、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、B細胞、T細胞、母体細胞、胎児細胞など、または様々な対象からの細胞の混合物を含み得る。

10

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

【0162】

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

20

30

【0163】

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

【0164】

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

40

50

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

【0165】

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

【0166】

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

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

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法は、細胞成分標的に特異的に結合した細胞成分結合性試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させることを提供する。UV光切断、

10

20

30

40

50

化学処理（例えば、ジチオトレイトール処理）、加熱、酵素処理、またはそれらの組合せなどの、細胞成分結合性試薬から化学基を分離する種々の方法で、脱離を実施することができる。細胞成分結合性試薬からのオリゴヌクレオチドの脱離は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを組成物のうちの複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップの前、後、またはその間に実施することができる。

【0170】

細胞成分と核酸標的の同時定量分析の方法

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法はまた、本明細書に開示された組成物および細胞成分結合性試薬のオリゴヌクレオチドと核酸標的分子との両方にバーコード配列（例えば、分子標識配列）に付随し得るオリゴヌクレオチドプローブを使用して、試料中の複数の細胞成分標的（例えば、タンパク質標的）および複数の核酸標的分子の同時定量分析のために使用され得る。複数の細胞成分標的および複数の核酸標的分子の同時定量分析の他の方法は、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20180088112号明細書に記載されている。一部の実施形態では、試料は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍試料、血液試料などであり得る。一部の実施形態では、試料は、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、B細胞、T細胞、母体細胞、胎児細胞などの細胞型の混合物、または同じ対象もしくは異なる対象からの細胞の混合物を含み得る。

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

【0171】

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

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

【0172】

一部の例では、細胞集団に由来する細胞は、本開示の基材のウェル中に分離（例えば、

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

【0173】

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

【0174】

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

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

【0175】

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

【0176】

複数の核酸分子が、様々な核酸分子を含み得ることが当業者によって認識されるであろう。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、DNA分子、RNA分子、ゲノムDNA分子、mRNA分子、rRNA分子、siRNA分子、またはそれらの組合せを含んでもよく、かつ二本鎖または一本鎖であってもよい。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の種を含むか、または約100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲の種を含む。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、少なくとも100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、もしくは1000000種を含むか、または最大100、1000、10000、20000、30000、40000、50000、100000、もしくは1000000種を含む。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、試料、例えば、単一細胞、または複数の細胞に由来し得る。一部の実施形態では、複数の核酸分子は、複数の試料、例えば、複数の単一細胞からプールされ得る。

10

【0177】

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

20

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

30

【0178】

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

40

【0179】

タンパク質および核酸標的の同時定量分析

一部の実施形態では、本明細書に開示された方法はまた、複数種の標的分子、例えば、タンパク質および核酸標的の同時定量分析のために使用することができる。例えば、標的分子は、細胞成分であってもよく、または細胞成分を含んでもよい。図6は、単一細胞における核酸標的と他の細胞成分標的（例えば、タンパク質）との両方の同時定量分析の例示的方法の概略図を示す。一部の実施形態では、各々が抗体などの細胞成分結合性試薬を含む複数の組成物605、605b、605cなどが提供される。異なる細胞成分標的に結合する、抗体などの異なる細胞成分結合性試薬が、異なる固有識別子とコンジュゲート

50

される。次に、細胞成分結合性試薬は、複数の細胞610を含有する試料とインキュベートされ得る。異なる細胞成分結合性試薬は、細胞マーカー、B細胞受容体、T細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せなどの細胞表面上の細胞成分に特異的に結合することができる。未結合の細胞成分結合性試薬は、例えば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去され得る。次いで、細胞成分結合性試薬を含む細胞は、単一のコンパートメント615が単一細胞および単一ビーズ620に適合するように所定のサイズにされているマイクロウェルアレイなどの複数のコンパートメント中に分離され得る。各ビーズは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、およびバーコード配列（例えば、分子標識配列）を含み得る複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。一部の実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合性領域、例えば、ポリ（dT）配列を含み得る。細胞成分結合性試薬にコンジュゲートしたオリゴヌクレオチド625は、化学的、光学的または他の手段を使用して、細胞成分結合性試薬から脱離され得る。細胞は溶解されて（635）、ゲノムDNAまたは細胞のmRNA630などの細胞内の核酸を放出し得る。細胞のmRNA630、オリゴヌクレオチド625またはその両方は、ビーズ620上のオリゴヌクレオチドプローブによって、例えば、ポリ（dT）配列にハイブリダイズすることによって、捕捉され得る。逆転写酵素を使用して、細胞のmRNA630およびオリゴヌクレオチド625にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のmRNA630およびオリゴヌクレオチド625を鋳型として使用して伸長することができる。逆転写酵素によって生成された伸長産物は、増幅および配列決定に供され得る。配列決定リードは、試料中の各単一細胞の細胞成分および遺伝子発現のデジタルな表現をもたらすことができる、細胞標識、バーコード（例えば、分子標識）、遺伝子、細胞成分結合性試薬に特異的なオリゴヌクレオチド（例えば、抗体に特異的なオリゴヌクレオチド）などの配列または識別子のデマルチプレクシングに供され得る。

【0180】

バーコードの付随

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

【0181】

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

一部の実施形態では、分子標識は、オリゴヌクレオチドプローブ標的結合性領域と標的核酸分子の一部および／または細胞成分結合性試薬に付随している（例えば、現在、または以前に付随した）オリゴヌクレオチドとのライゲーションにより追加され得る。例えば、標的結合性領域は、制限部位オーバーハング（例えば、E c o R I 付着末端オーバーハング）への特異的ハイブリダイゼーションが可能となり得る核酸配列を含み得る。本方法は、制限部位オーバーハングを生成するために制限酵素（例えば、E c o R I）で標的核酸および／または細胞成分結合性試薬に付随しているオリゴヌクレオチドを処置することをさらに含み得る。2つの断片を接続するために、リガーゼ（例えば、T 4 D N A リガーゼ）を使用することができる。

【0182】

固有分子標識配列の数または存在の決定

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

【0183】

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

【0184】

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

10

20

30

40

50

分子の量が、1000、100、10、5、2、1、もしくは0を超えるか、または1000、100、10、5、2、1、もしくは0未満である、試料中の細胞成分標的を識別することができる。

【0185】

組成物およびキット

本明細書に開示された一部の実施形態は、試料中の複数の細胞成分（例えば、タンパク質）および／または複数の核酸標的分子の同時定量分析のためのキットおよび組成物を提供する。キットおよび組成物は、一部の実施形態では、各々がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートした複数の細胞成分結合性試薬（例えば、複数のタンパク質結合性試薬）を含むことができ、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合性試薬に対する固有識別子、および複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々は、標的結合性領域、バーコード配列（例えば、分子標識配列）を含み、バーコード配列は、固有バーコード配列の多様なセットに由来する。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、分子標識、細胞標識、試料標識、またはこれらの任意の組合せを含み得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含み得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、オリゴヌクレオチドプローブの結合部位、例えば、ポリ（A）テイルを含み得る。例えば、ポリ（A）テイルは、例えば、oligo dA₁₈（固体支持体に係留していない）またはoligo A₁₈V（固体支持体に係留している）であり得る。オリゴヌクレオチドは、DNA残基、RNA残基、またはその両方を含み得る。

【0186】

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

【0187】

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

【0188】

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

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

【0189】

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

【0190】

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

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

10

【0191】

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

【0192】

20

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

30

【0193】

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

40

50

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

【0194】

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

【0195】

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

本明細書の開示は、試料を識別するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の試料の各々に由来する1つまたは複数の細胞を、複数の試料インデックス付与組成物のうちの試料インデックス付与組成物と接触させることであって、1つまたは複数の

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

【0196】

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

【0197】

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

【0198】

図7は、試料インデックス付与のためにオリゴヌクレオチドがコンジュゲートされている細胞成分結合性試薬を使用する例示的ワークフローの略図を示す。一部の実施形態では、各々が結合性試薬を含む複数の組成物705a、705bなどが提供される。結合性試薬は、タンパク質結合性試薬、例えば、抗体であり得る。細胞成分結合性試薬は、抗体、テトラマー、アプタマー、タンパク質足場、またはそれらの組合せを含み得る。複数の組成物705a、705bの結合性試薬は、同一の細胞成分標的に結合し得る。例えば、複

10

20

30

40

50

数の組成物 705、705b の結合性試薬は、同一であり得る（結合性試薬に付随している試料インデックス付与オリゴヌクレオチドを除いて）。

【0199】

様々な組成物は、様々な試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドにコンジュゲートした結合性試薬を含み得る。様々な組成物の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、様々な組成物の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、様々な組成物の数は、少なくとも、または最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、もしくは10000種であってもよい。

【0200】

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

【0201】

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

成物 7 0 5 b 中の細胞成分結合性試薬の試料インデックス付与オリゴヌクレオチドは、別の試料インデックス付与配列を有してもよく、別の患者の試料または同じ患者の別の試料などの試料 7 0 7 b において、陰影を付けた丸として示される細胞 7 1 0 b を標識するために使用され得る。細胞成分結合性試薬は、細胞表面、例えば、細胞マーカー、B 細胞受容体、T 細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはそれらの任意の組合せ上の細胞成分標的またはタンパク質に特異的に結合し得る。未結合の細胞成分結合性試薬は、例えば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去され得る。

【0202】

次いで、細胞成分結合性試薬を有する細胞は、単一のコンパートメント 7 1 5 a、7 1 5 b が単一細胞 7 1 0 a および単一のビーズ 7 2 0 a または単一細胞 7 1 0 b および単一のビーズ 7 2 0 b に適合するように所定のサイズにされているマイクロウェルアレイなどの複数のコンパートメント中に分離され得る。各ビーズ 7 2 0 a、7 2 0 b は、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通する細胞標識、および分子標識配列を含み得る複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。一部の実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合性領域、例えば、ポリ (d T) 配列を含み得る。組成物 7 0 5 a の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 a は、細胞成分結合性試薬から脱離可能であるかまたは脱離不可能であるように構成され得る。組成物 7 0 5 a の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 a は、化学的、光学的または他の手段を使用して細胞成分結合性試薬から脱離され得る。組成物 7 0 5 b の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 b は、細胞成分結合性試薬から脱離可能であるかまたは脱離不可能であるように構成され得る。組成物 7 0 5 b の細胞成分結合性試薬にコンジュゲートした試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 b は、化学的、光学的または他の手段を使用して細胞成分結合性試薬から脱離され得る。

【0203】

細胞 7 1 0 a は、溶解されて、ゲノム DNA または細胞の mRNA 7 3 0 a などの細胞 7 1 0 a 内の核酸を放出し得る。溶解された細胞 7 3 5 a を破線の丸として示す。細胞の mRNA 7 3 0 a、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 a、またはその両方は、ビーズ 7 2 0 a 上のオリゴヌクレオチドプローブによって、例えば、ポリ (d T) 配列にハイブリダイズすることによって捕捉され得る。逆転写酵素を使用して、細胞の mRNA 7 3 0 a およびオリゴヌクレオチド 7 2 5 a にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを細胞の mRNA 7 3 0 a およびオリゴヌクレオチド 7 2 5 a を鋳型として使用して伸長することができる。逆転写酵素によって生成された伸長産物は、増幅および配列決定に供され得る。

【0204】

同様に、細胞 7 1 0 b は、溶解されて、ゲノム DNA または細胞の mRNA 7 3 0 b などの細胞 7 1 0 b 内の核酸を放出し得る。溶解された細胞 7 3 5 b を破線の丸として示す。細胞の mRNA 7 3 0 b、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 b、またはその両方は、ビーズ 7 2 0 b 上のオリゴヌクレオチドプローブによって、例えば、ポリ (d T) 配列にハイブリダイズすることによって捕捉され得る。逆転写酵素を使用して、細胞の mRNA 7 3 0 b およびオリゴヌクレオチド 7 2 5 b にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを細胞の mRNA 7 3 0 b およびオリゴヌクレオチド 7 2 5 b を鋳型として使用して伸長することができる。逆転写酵素によって生成された伸長産物は、増幅および配列決定に供され得る。

【0205】

配列決定リードは、細胞標識、分子標識、遺伝子同一性、および試料同一性（例えば、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド 7 2 5 a および 7 2 5 b の試料インデックス付与配列に関する）のデマルチプレクシングに供され得る。細胞標識、分子標識、および遺伝子同一性のデマルチプレクシングによって、試料中の各単一細胞の遺伝子発現のデジタルな表現を得ることができる。試料インデックス付与オリゴヌクレオチドの試料インデッ

クス付与配列を使用する、細胞標識、分子標識、および試料同一性のデマルチプレクシングを使用して、試料起源を決定することができる。

【0206】

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

【0207】

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

【0208】

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

【0209】

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

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

【0210】

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

【0211】

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

【0212】

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

【0213】

細胞のオーバーローディングおよびマルチプレットの識別

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

【0214】

現在の細胞ローディング技術を使用すると、約20000個の細胞が約60000個のマイクロウェルを有するマイクロウェルカートリッジまたはアレイにロードされる場合に、2つ以上の細胞を有するマイクロウェルまたは液滴の数（ダブレットまたはマルチプレットと称される）が最小限になり得る。しかし、ロードされた細胞の数が増加すると、複数の細胞を有するマイクロウェルまたは液滴の数が著しく増加する場合がある。例えば、約50000個の細胞がマイクロウェルカートリッジまたはアレイの約60000個のマイクロウェルにロードされる場合、複数の細胞を有するマイクロウェルのパーセンテージはかなり高く、例えば、11～14%になり得る。このように多数の細胞をマイクロウェル中にロードすることは、細胞のオーバーローディングと称される場合がある。しかし、細胞をいくつかの群（例えば、5）に分割し、各群の細胞が別個の試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドで標識される場合、2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している細胞標識（例えば、確率論的バーコードなどのバーコードの細胞標識）は、配列決定データにおいて識別され、かつ次の処理から除去され得る。一部の実施形態では、細胞を多数の群（例えば、10000）に分割し、各群の細胞が別個の試料インデックス付与配列を有する試料インデックス付与オリゴヌクレオチドで標識される場合、2つ以上の試料インデックス付与配列に付随している試料標識は、配列決定データにおいて識別され、かつ次の処理から除去され得る。一部の実施形態では、様々な細胞が別個の細胞識別配列を有する細胞識別オリゴヌクレオチドで標識され、2つ以上の細胞識別オリゴヌクレオチドに付随している細胞識別配列は、配列決定データにおいて識別され、かつ次の処理から除去され得る。マイクロウェルカートリッジまたはアレイにおけるマイクロウェルの数に対して、このような多数の細胞をマイクロウェル中にロードすることができる。

【0215】

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

【0216】

例えば、本方法は、試料インデックス付与を使用して、50000個以上の細胞（10000～20000個の細胞と比較して）をロードするために使用され得る。試料インデ

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

【0217】

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

【0218】

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

別の例として、2つの細胞には、1つの粒子（例えば、ビーズ）が付随し得る。粒子は、同じ細胞標識を有するバーコードを含み得る。細胞を溶解させた後、2つの細胞のmRNA分子には、粒子のバーコードが付随し、よって、同じ細胞標識が付随し得る。ダブルット発現プロファイルは、発現プロファイルの解釈を歪める場合がある。

【0219】

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

【0220】

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

10

20

30

40

50

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

【0221】

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

【0222】

一部の実施形態では、第1の複数の細胞および第2の複数の細胞をそれぞれ2つの試料インデックス付与組成物と接触させることは、第1の複数の細胞を2つの試料インデックス付与組成物のうちの第1の試料インデックス付与組成物と接触させること；および第1の複数の細胞を2つの試料インデックス付与組成物のうちの第2の試料インデックス付与組成物と接触させることを含む。複数の細胞の数および複数の試料インデックス付与組成物の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なっていてもよい。一部の実施形態では、複数の細胞および／または試料インデックス付与組成物の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実

施形態では、複数の細胞および／または試料インデックス付与組成物の数は、少なくとも、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、もしくは1000000種であってもよい。細胞の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、細胞の数、または平均数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、細胞の数、または平均数は、少なくとも、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、もしくは10000000個であってもよい。

【0223】

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

【0224】

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

【0225】

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

【0226】

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

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

【0227】

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

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

【0228】

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

【0229】

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

は複数の細胞標識配列に関連した配列決定データを除くことを含む。一部の実施形態では、細胞識別オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【0230】

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

【0231】

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

【0232】

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

10

20

30

40

50

とができる。

【0233】

一部の実施形態では、第1の複数の1つまたは複数の細胞および第2の複数の1つまたは複数の細胞をそれぞれ2つの細胞識別組成物と接触させることは、第1の複数の1つまたは複数の細胞を2つの細胞識別組成物のうちの第1の細胞識別組成物と接触させること；および第1の複数の1つまたは複数の細胞を2つの細胞識別組成物のうちの第2の細胞識別組成物と接触させることを含む。複数の細胞識別組成物の数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、細胞識別組成物の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、10000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000種、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、細胞識別組成物の数は、少なくとも、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、もしくは10000000種であってもよい。複数の1つまたは複数の細胞の各々における細胞の数、または平均数は、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。一部の実施形態では、複数の1つまたは複数の細胞の各々における細胞の数、または平均数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよく、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、10000000個、もしくはこれらの値のいずれか2つの間の数もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、複数の1つまたは複数の細胞の各々における細胞の数、または平均数は、少なくとも、または最大2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、10000、100000、1000000、もしくは10000000個であってもよい。

【0234】

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

【0235】

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

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

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

【0236】

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

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

【0237】

ランダムプライミングおよび伸長による全トランスクリプトーム解析（WTA）

本明細書における開示は、適合する配列決定装置（例えば、Illumina（登録商標）配列決定装置）で配列決定するために、cDNA産物（例えば、BD Rhapsody単一細胞分析系のcDNA産物）から全トランスクリプトーム解析（WTA）ライブラリーを生成するための方法を含む。現在、標準的なBD Rhapsody RNAワークフローでは、まずBD Rhapsody細胞捕捉ビーズ（以降、「ビーズ」と呼ぶ）での3'捕捉およびcDNA合成によりRNAトランスクリプトームを捕捉し、続いて2回の多重化ネステッドPCR増幅を行って目的のRNA標的を富化する（標的化アッセイ）。この方法の一部の実施形態では、標的化RNA分析は、一般に、低発現標的に対してより高い感度をもたらすが、WTA RNA分析は、より広い範囲の遺伝子の調査を提供する。一部の実施形態では、所望の標的の増幅を成功させるには、目的のモデル系における各RNAの3'末端およびそのポリアデニル化部位の使用の十分な理解が必要となる場合がある。例えば、BD Rhapsodyを共に使用するWTA法は、いくつかのレベルの情報の取得を可能にし、1）モデル系において興味深いRNA標的を識別して、設計しようとする1パネルの遺伝子を識別すること；2）モデル系におけるトランスクリプトームの3'末端を、BD Rhapsodyの新世代PCRパネル設計への入力として特徴付けること；および3）標準的なBD Rhapsody標的化手法と比較してより幅広い遺伝子をアッセイすることにより、ユーザが発見生物学（discovery biology）を行うことを可能にすることを含む。

【0238】

図8は、単一細胞の全トランスクリプトーム解析（WTA）を実施するための非限定的な例示的ワークフロー800の略図である。ブロック804における単一細胞捕捉では、マイクロウェル（RhapsodyもしくはICELL8など）または液滴（droplets、ddseqなど）を使用することができる。ブロック808におけるcDNA合成は、逆転写および第二鎖合成を含んでいてもよく、その後、ブロック812における末端

修復およびアダプターのライゲーションによる無バイアス様式での5'アダプターの付加が続いてもよい。一部の実施形態では、ブロック808およびブロック812は、アダプターを付加するための鋳型スイッチの使用による逆転写を含んでいてもよい。ブロック814での全トランスクリプトームの増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含んでいてもよい。ブロック816における配列決定（例えば、Illumina配列決定）用の短いインサートの生成は、ランダムプライミングおよび伸長、それに続くPCRを含んでいてもよい。ブロック816は、一部の実施形態では、断片化、末端修復、およびライゲーション、それに続くPCRを含んでいてもよい。

【0239】

図9は、単一細胞のライゲーションに基づく全トランスクリプトーム解析を実施するための非限定的な例示的ワークフローの略図である。この方法は、バーコード（例えば、各々がユニバーサル配列（Univ）、固有分子インデックス（UMI）、細胞標識（CL）、およびオリゴ（dT）配列を有するバーコード）を使用した逆転写、第二鎖合成、末端調製、全長cDNA増幅、ランダムプライミング、および次いで配列決定ライブラリー増幅を実施することを含んでいてもよい。

【0240】

本明細書に記載のように、過去に開示されたWTA法の主な課題は、PCR収量が低いこと、ビーズを含んだままWTA PCR増幅を達成しなければならないことである。本明細書で開示される新しいRPEに基づくWTA手法では、例えば、一部の実施形態では、置換ランダムプライミングおよびDNAポリメラーゼ伸長により、ビーズ上でWTA PCRを行う必要性を回避することができる。

【0241】

図10および図11Aは、ランダムプライミングおよびプライマー伸長（RPE）を使用して、単一細胞の全トランスクリプトーム解析を効率的に（例えば、他の全トランスクリプトーム解析方法と比較してより短い時間で）実施するための非限定的な例示的ワークフローの略図である。この方法は、バーコード（例えば、各々がユニバーサル配列（「Univ」、例えば、リード1（R1））、固有分子インデックス（UMI）、細胞標識（CL）、およびオリゴ（dT）配列）を使用する逆転写、第一鎖cDNA合成、ランダムプライミング（例えば、Univ（例えば、リード2（R2））を含むランダムプライマーを使用して）、およびランダムプライマー伸長を実施することを含んでいてもよい。ランダムプライマーは、すべての転写物のコード配列に沿って異なる位置に結合し、伸長して伸長産物（例えば、線形増幅産物）を生成することができる。伸長産物は、ランダムプライマーの結合部位に応じて様々な長さのcDNAを含むことができる。伸長産物は、配列決定ライブラリー増幅プライマーで増幅することができる。ワークフローは、単一のPCR増幅（図10に示されているような）または2ラウンドもしくはそれよりも多くのラウンドのPCR増幅（図11Aに示されているように、PCR1、それに続くPCR2（「インデックスPCR」）など）を含んでいてもよい。配列決定ライブラリー増幅は、突出を介して配列決定アダプターおよび／またはライブラリーインデックスを付加するライブラリーフォワードおよびリバースプライマーの使用を含んでいてもよい。ライブラリー増幅は、ライブラリーフォワードプライマーおよびライブラリーリバースプライマーの突出を介して、配列決定アダプター（例えば、P5およびP7配列）および試料インデックス（例えば、i5、i7）を付加することができる。ライブラリーアンプリコンを配列決定し、本開示の下流の方法に供することができる。150bp×2個の配列決定リードを生成するために使用するペアエンド配列決定は、リード1の細胞標識、固有分子インデックス、ポリ（A）テイル、および／または遺伝子（もしくは遺伝子の部分配列）、リード2の遺伝子（もしくは遺伝子の部分配列）および／またはポリ（A）テイル、ならびにインデックス1リードの試料インデックスを明らかにすることができる。確率論的バーコードを使用して全トランスクリプトームを増幅するための方法、組成物、系、デバイス、およびキットは、例えば、米国特許出願公開第2016/0312276号明細書に以前に開示されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0242】

図11Bは、ランダムプライミングおよびプライマー伸長を使用して全トランスクリプトーム解析を実施するための非限定的な例示的プロセスである。ブロック1104における細胞捕捉、逆転写、および未使用のプライマーを除去するためのExoI処理では、プロセスのパラメータとしては、ビーズを再利用することができるか否か、またはビーズが他の分析方法と適合性であるか否かが挙げられる。このような分析方法としては、オリゴヌクレオチドが付随している（例えば、コンジュゲートされている）抗体（「AbO」）を用いて試料のインデックス付与、追跡、または多重化を行うこと、オリゴヌクレオチドが付随している抗体を用いて単一細胞タンパク質発現プロファイリングを行うこと（本明細書では「AbSeq」とも呼ばれる）、標的化単一細胞分析法（例えば、BD Rhapsody（商標）標的化アッセイ）、および5'転写物配列を決定するための方法（例えば、細胞のV(D)J領域の配列を決定するための方法）が挙げられる。AbOを使用して、単一細胞のタンパク質発現プロファイルを決定し、試料を追跡する（例えば、試料起源を追跡する）実施形態は、米国特許出願公開第2018/0088112号明細書として公開されている米国特許出願第15/715,028号明細書、および米国特許出願第15/937,713号明細書に記載されている。これら文献の各々の内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。5'転写物配列を決定する実施形態は、米国特許出願第62/739,795号明細書に記載されている。この文献の内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる。ブロック1108におけるランダムプライミング伸長では、プロセスのパラメータとしては、1μL当たりのビーズ数、使用するポリメラーゼ、反応の長さ、ウシ血清アルブミン（BSA）の濃度、およびAmpureクリーンアップ条件が挙げられる。ブロック1114におけるPCRおよびクリーンアップでは、プロセスのパラメータとしては、使用するポリメラーゼ、大型細胞または小型細胞のサイクル数、Ampureクリーンアップ条件、および品質管理（QC）方法が挙げられる。ブロック1116におけるインデックスPCRおよびクリーンアップでは、プロセスのパラメータとしては、使用するポリメラーゼ、PCR入力量、Ampureクリーンアップ条件、および品質管理方法が挙げられる。

【0243】

本明細書における開示は、試料中の核酸標的を標識するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；ランダムプライマーを複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；ならびに複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成することを含む。第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、バーコード化デオキシリボ核酸（DNA）分子、バーコード化リボ核酸（RNA）分子、または両方を含んでもよい。ランダムプライミングおよび伸長のサイクル数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、ランダムプライミングおよび伸長のサイクル数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100サイクルのランダムプライミングおよび伸長を含んでもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、

90、100サイクルのランダムプライミングおよび伸長を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のサイクルのランダムプライミングおよび伸長を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ランダムプライミングおよび伸長のサイクル数は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、もしくは100サイクルのランダムプライミングおよび伸長を含んでいてもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、もしくは100サイクルのランダムプライミングおよび伸長を含んでいてもよい。

【0244】

本方法は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含んでいてもよい。増幅（例えば、線形増幅、PCR増幅）のサイクル数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実施形態では、増幅は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100サイクルの増幅を含んでいてもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100サイクルの増幅を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のサイクルの増幅を含んでいてもよい。一部の実施形態では、線形増幅は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、もしくは100サイクルの増幅を含んでいてもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、もしくは100サイクルの増幅を含んでいてもよい。第1の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも10%に相当してもよい。第1の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも50%に相当してもよい。第1の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも90%に相当してもよい。一部の実施形態では、第1の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、

73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲に相当してもよい。第1の複数のバーコード化アンプリコンは、全トランスクリプトーム増幅(WTA)産物を含んでいてもよい。複数の伸長産物の増幅は、配列決定プライマーおよび／もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに／またはそれらの一部を、複数の伸長産物に付加することを含んでいてもよい。本方法は、第1の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含んでいてもよい。一部の実施形態では、複数の伸長産物の増幅は、固体支持体の存在下では実施されない。一部の実施形態では、本方法は、RNAseH誘導性プライミング、末端修復、および／またはアダプターライゲーションを含まない。一部の実施形態では、本方法は、断片化、タグ付け、または両方を含まない。

【0245】

本明細書における開示は、試料中の各核酸標的の数を決定するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることであって、各オリゴヌクレオチドバーコードは、第1のユニバーサル配列、分子標識、および核酸標的のコピーにハイブリダイズすることが可能な標的結合性領域を含む、こと；核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成すること；ランダムプライマーを複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させることであって、ランダムプライマーの各々は、第2のユニバーサル配列またはその相補体を含む、こと；複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長して、複数の伸長産物を生成すること；第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成すること；ならびに第1の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含む。

【0246】

一部の実施形態では、核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含み、試料中の核酸標的のコピー数の決定は、複数の核酸標的の各々の配列を含む第1の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む。複数の核酸標的の各々の配列は、複数の核酸標的の各々の部分配列を含んでいてもよい。第1の複数のバーコード化アンプリコン中の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含んでいてもよい。

【0247】

本方法は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第1の複数のバーコード化アンプリコンを増幅し、それにより第2の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含んでいてもよい。本方法は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および第2のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して複数の伸長産物を増幅し、それにより第1の複数のバーコード化アンプリコンを生成することを含んでいてもよい。増幅(例えば、線形増幅、PCR増幅)のサイクル数は、インプリメンテーションが異なれば異なってもよい。一部の実

施形態では、増幅は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100サイクルの増幅を含んでいてもよく、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100サイクルの増幅を含んでいてもよく、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲のサイクルの増幅を含んでいてもよい。10
一部の実施形態では、線形増幅は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、もしくは100サイクルの増幅を含んでいてもよく、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、もしくは100サイクルの増幅を含んでいてもよい。20
第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも10%、単一細胞のmRNAの少なくとも50%、または単一細胞のmRNAの少なくとも90%に相当してもよい。一部の実施形態では、第2の複数のバーコード化アンプリコンは、単一細胞のmRNAの少なくとも5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲に相当してもよい。30
第2の複数のバーコード化アンプリコンは、全トランスクリプトーム増幅(WTA)産物を含んでいてもよい。第1の複数のバーコード化アンプリコンの増幅は、配列決定プライマーおよび／もしくは配列決定アダプターの結合部位の配列、それらの相補配列、ならびに／またはそれらの一部を、第1の複数のバーコード化アンプリコンに付加することを含んでいてもよい。

【0248】

本方法は、第2の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の核酸標的のコピー数を決定することを含んでいてもよい。40
一部の実施形態では、核酸標的のコピーの接触は、複数の核酸標的のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させることを含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、複数の核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを生成することを含み、および／または試料中の核酸標的のコピー数の決定は、複数の核酸標的の各々の配列を含む第2の複数のバーコード化アンプリコンのうちのバーコード化アンプリコンに付随している別個の配列を有する分子標識の数に基づき、試料中の複数の核酸標的の各々の数を決定することを含む。50
複数の核酸標的の各々の配列は、複数の核酸標的の各々の部分配列を含んでいてもよい。第2の複数のバーコード化アンプリコン中の

核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含んでいてもよい。

【0249】

第1の複数のバーコード化アンプリコンおよび／または第2の複数のバーコード化アンプリコンの1つ1つは、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、または両方の少なくとも一部分を含んでいてもよい。第1のユニバーサル配列および第2のユニバーサル配列は同じであってもよく、または異なってもよい。第1のユニバーサル配列および／または第2のユニバーサル配列は、配列決定プライマーおよび／もしくは配列決定アダプターの結合部位、それらの相補配列、ならびに／またはそれらの一部を含んでいてもよい。配列決定アダプターは、P5配列、P7配列、それらの相補配列、および／またはそれらの一部を含んでいてもよい。配列決定プライマーは、リード1配列決定プライマー、リード2配列決定プライマー、それらの相補配列、および／またはそれらの一部を含んでいてもよい。

【0250】

ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含んでいてもよい。ヌクレオチドのランダム配列は、約4～約30ヌクレオチド長であってもよい。一部の実施形態では、前記ヌクレオチドのランダム配列は、6または9ヌクレオチド長である。ヌクレオチドのランダム配列は、インプリメンテーションが異なれば異なる長さを有してもよい。一部の実施形態では、ランダムプライマー内のヌクレオチドのランダム配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であるか、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であるか、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲のヌクレオチド長である。一部の実施形態では、ランダムプライマー内のヌクレオチドのランダム配列は、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であるか、または最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長である。ランダムプライマーは、インプリメンテーションが異なれば、ランダムプライミングステップ中の濃度が異なってもよい。一部の実施形態では、ランダムプライマーは、ランダムプライミング中の濃度が、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128 μ Mであるか、もしくは最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128 μ Mであるか、またはこうした値の任意の2つの間の数値もしくは範囲の μ M である。

【0251】

核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、逆転写酵素（例えば、ウイルス逆転写酵素）を使用して、核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含んでいてもよい。核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼを使用して、核酸標的のコピーにハイブリダイズした複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長することを含んでいてもよい。複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーの伸長は、5'から3'のエキソヌクレアーゼ活性および3'から5'のエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠如するDNAポリメラーゼ（例えば、Klenow断片）を使用

して、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長することを含む。一部の実施形態では、伸長酵素は、K l e n o wまたはK l e n o w e x oである。

【0252】

一部の実施形態では、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、追加の伸長および／または増幅反応のための鋳型として再利用することができる（ランダムプライミングおよび伸長の後で）。本方法は、ランダムプライマーを、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドと接触させるステップ、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドにハイブリダイズしたランダムプライマーを伸長するステップ、および複数の伸長産物を増幅するステップを繰り返すことを含んでいてもよい。本方法は、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを第3の複数のバーコード化アンプリコンを生成するための鋳型として使用して、第3の複数のバーコード化アンプリコンを合成することを含んでいてもよい。第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、複数の第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を実施することを含んでいてもよい。第3の複数のバーコード化アンプリコンの合成は、第1のユニバーサル配列またはその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、および標的的特異的プライマーを使用するPCR増幅を含んでいてもよい。本方法は、第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物の配列情報を得ることを含んでいてもよい。配列情報の取得は、配列決定アダプターを、第3の複数のバーコード化アンプリコンまたはそれらの産物に付着させることを含んでいてもよい。標的的特異的プライマーは、免疫受容体（例えば、T細胞受容体（TCR）および／またはB細胞受容体（BCR）受容体）と特異的にハイブリダイズすることができる。図12は、標的化遺伝子発現プロファイリング、AbOを用いた試料多重化、AbOを用いたタンパク質発現プロファイリング、および全トランスクリプトーム解析を、1つのワークフローにおいて実施するための略図である。一部の実施形態では、全トランスクリプトーム解析は、標的化遺伝子発現プロファイリング、AbOを用いた試料多重化、およびAbOを用いたタンパク質発現プロファイリングの1つまたは複数と1つのワークフローにおいて適合性であってもよく、1つのワークフローにおいて実施することができる。一部の実施形態では、第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドの一部（例えば、細胞捕捉およびバーコーディング後のビーズ）をRPE WTAのために部分サンプリングし、残りの第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを、標的化（例えば、遺伝子特異的）増幅および分析（例えば、標的化PCR2および標的化インデックスPCR）に使用する。一部の実施形態では、RPE WTAの後、第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、本明細書に開示のような多重化パネルのプライマーを使用した標的化（例えば、遺伝子特異的）増幅および分析のために再利用することができる。一部の実施形態では、本明細書で提供されるRPEに基づくWTA法から導出された配列決定情報を使用して、本明細書で開示されるような標的化（例えば、遺伝子特異的）増幅および分析のための1パネルのプライマーを生成する。

【0253】

試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。試料は、末梢血単核細胞または免疫細胞を含んでいてもよい。免疫細胞は、B細胞、T細胞、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。核酸標的は、核酸分子を含んでいてもよい。核酸分子は、リボ核酸（RNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、RNA分解産物、ポリ（A）テイルを含むRNA、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。mRNAは、免疫受容体をコードする。複数の核酸標的の1つまたは複数、低発現遺伝子のmRNAを含んでいてもよい。核酸標的は、細胞成分結合性試薬を含んでいてもよい。核酸分子は、細胞成分結合性試薬に付随していてもよい。本方法は、核酸分子および細胞成分結合性試薬を解離させることを含んでいてもよい。標的結合性領域は、オリゴdT配列、ランダム配列、標的的特異的配列、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。標的結合性領域は、ポリ（dT）領域を含んでいてもよく、核酸標的は、ポリ（dA）領域を含んでいて

10

20

30

40

50

もよい。

【0254】

本方法は、複数の伸長産物、第1の複数のバーコード化アンプリコン、および／または第2の複数のバーコード化アンプリコンのクリーンアップ（例えば、ampure クリーンアップ）を含んでいてもよい。SPRI クリーンアップ比は、インプリメンテーションが異なれば異なっているもよい。一部の実施形態では、SPRI クリーンアップ比は、約0.1×～約3.0×（例えば、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.5、2.7、3.0、およびその間の範囲）である。クリーンアップは、片側であってもよくまたは両側であってもよい。

10

【0255】

複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体に付随していてもよい。同じ固体支持体に付随している複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、同一の試料標識を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードは各々、細胞標識を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含んでいてもよい。同じ固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、同じ細胞標識を含んでいてもよい。異なる固体支持体に付随しているオリゴヌクレオチドバーコードは、異なる細胞標識を含んでいてもよい。固体支持体は、合成粒子、平面状表面、またはそれらの組合せを含んでいてもよい。固体支持体（例えば、ビーズ）は、本明細書で提供される反応のインプリメンテーションが異なれば異なる密度を有してもよい。一部の実施形態では、ランダムプライミングおよび伸長反応中の固体支持体の密度は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000個の固体支持体／ μ lであるか、もしくは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000個の固体支持体／ μ lであるか、またはこうした値の任意の2つの間の数もしくは範囲の固体支持体／ μ lである。一部の実施形態では、固体支持体はすべて、ランダムプライミングおよび伸長反応に使用さ

20

30

40

50

れる。一部の実施形態では、固体支持体の一部のみが、ランダムプライミングおよび伸長反応に使用される（例えば、部分サンプリング）。一部のそのような実施形態では、部分サンプリングは、第一鎖バーコード化ポリヌクレオチドを含まない固体支持体（例えば、「コールド」ビーズ）を、部分サンプリングされた固体支持体に添加することを含む。

【0256】

試料は単一細胞を含んでいてもよく、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、試料中の単一細胞に付随させることを含む。本方法は、合成粒子を単一細胞に付随させた後、単一細胞を溶解することを含んでいてもよい。単一細胞の溶解は、試料を加熱すること、試料を界面活性剤と接触させること、試料のpHを変化させること、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。合成粒子および単一細胞は、同じ区画（例えば、ウェルまたは液滴）に存在してもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも1つは、合成粒子上に固定化されていてもよく、または部分的に固定化されていてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも1つは、合成粒子内に封入されていてもよく、または部分的に封入されていてもよい。合成粒子は破壊可能であってもよい（例えば、破壊可能なヒドロゲル粒子）。合成粒子は、ビーズを含んでいてもよい。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA/Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ（dT）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、ヒドロゲルビーズ、ゲルビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含んでいてもよい。合成粒子は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含んでいてもよい。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各々は、リンカー官能基を含んでいてもよく、合成粒子は、固体支持体官能基を含んでいてもよく、および／または支持体官能基およびリンカー官能基は、互いに付随している。リンカー官能基および支持体官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、およびそれらの任意の組合せからなる群から個々に選択することができる。

【0257】

RPEに基づくWTA性能

本明細書で開示されるRPEに基づくWTA法は、低存在量の転写物の感度増加、新しい転写物の検出、新しい細胞タイプの検出、および／または配列決定コストの低減をもたらすことができる。本明細書で提供されるRPEに基づくWTA法の一部の実施形態は、代替的な、RPEに基づかないWTA法（例えば、ライゲーションに基づくWTA法または断片化に基づくWTA法）と比較して、低存在量の転写物の感度増加、新しい転写物の検出、新しい細胞タイプの検出、および／または配列決定コストの低減をもたらす。本明細書で使用される場合、「標的」は、「種」と同義的に使用することができる。

【0258】

本明細書で使用される場合、「種」は、互いに同じであるか、互いに相補体であるか、もしくは互いに逆相補体であるか、または互いにハイブリダイズすることが可能であるか、または同じ遺伝子座に由来する転写物であるか、または同じタンパク質もしくはその断片をコードするなどであるポリヌクレオチド（例えば、cDNA分子などの一本鎖ポリヌクレオチド、試料追跡のための試料インデックス付与オリゴヌクレオチド、およびタンパク質発現プロファイルを決定するためのタンパク質特異的オリゴヌクレオチド）を指す。本明細書で使用される場合、「標的」は、「種」と同義的に使用することができる。一部の実施形態では、種のメンバー（例えば、コピーまたは出現）は、互いにまたはそれらの相補体と、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%相同性である。一部の実施形態では、種のメンバー

は、同じ遺伝子座に由来する転写物であり、転写物は、同じ長さであってもよく、または異なる長さであってもよい。種は、一部の実施形態では、cDNAまたはmRNAである。

【0259】

本明細書で使用される場合、「高存在量種」は、大量に存在する種を指し、例えば、種は、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、もしくはそれよりも多くともよく、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、もしくはそれよりも多くともよく、少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、もしくはそれよりも多くともよく、または少なくとも約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、もしくはそれよりも多くともよい。一部の実施形態では、試料は、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも10種、少なくとも20種、少なくとも50種、少なくとも100種、少なくとも200種、少なくとも500種、少なくとも1000種、またはそれよりも多くの高存在量種を含んでいてもよい。一部の実施形態では、すべての高存在量種の合計は、試料中の核酸分子または種の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、またはそれよりも多くを占める。一部の実施形態では、高存在量種は、1つまたは複数のリボソームタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、1つまたは複数のミトコンドリアタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、1つまたは複数のハウスキーピングタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、試料インデックス付与オリゴヌクレオチド（本明細書では試料タグ配列または試料インデックス付与インデックスとも呼ばれる）の配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、試料追跡に使用されるオリゴヌクレオチドの配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、細胞成分結合性試薬（例えば、抗体）のための固有識別子配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされた（または以前にコンジュゲートされた）オリゴヌクレオチドの配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、高存在量種は、抗体にコンジュゲートされたかまたは以前にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの配列を含んでいてもよく、本明細書では、抗体オリゴヌクレオチドと呼ばれる場合がある（「Ab oligo」または「AbO」と略される）。

【0260】

本明細書で使用される場合、「中存在量種」は、少なくとも1つの種よりも低く、少なくとも1つの他の種よりも多い量で存在する種を指す。一部の実施形態では、中存在量種は、試料中の核酸分子または種の10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%であってもよく、少なくとも10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%であってもよく、約10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%であってもよく、もしくは少なくとも約10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.1%、0.01%であってもよく、または上記の値の任意の2つの間の範囲であってもよい。一部の実施形態では、試料は、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも10種、少なくとも20種、少なくとも50種、少なくとも100種、少なくとも200種、少なくとも500種、少なくとも1000種、またはそれよりも多くの中存在量種を含んでいてもよい。一部の実施形態では、すべての中存在量種の合計は、試料中の核酸分子の約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約20%、約30%、または上記の値の任意の2つの間の範囲を占める。一部の実施形態では、中存在量種は、1つまたは複数のハウスキーピングタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、中存在量

種は、試料追跡に使用されるオリゴヌクレオチドの配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、中存在量種は、試料の1つまたは複数の細胞の試料起源を識別するための試料インデックス付与配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、中存在量種は、細胞成分結合性試薬（例えば、抗体）のための固有識別子配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、中存在量種は、細胞成分結合性試薬にコンジュゲートされた（または以前にコンジュゲートされた）オリゴヌクレオチドの配列を含んでいてもよい。一部の実施形態では、中存在量種は、抗体にコンジュゲートされたかまたは以前にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの配列を含んでいてもよく、本明細書では、抗体オリゴヌクレオチドと呼ばれる場合がある（「AbOligo」または「AbO」と略される）。

【0261】

本明細書で使用される場合、「低存在量種」は、少量で存在する種を指し、例えば、種は、試料中の核酸分子または種の1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、もしくはそれ未満であってもよく、約1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%、もしくはそれ未満であってもよく、1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%未満であってもよく、または約1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.0001%未満であってもよい。一部の実施形態では、試料は、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも10種、少なくとも20種、少なくとも50種、少なくとも100種、少なくとも200種、少なくとも500種、少なくとも1,000種、またはそれよりも多くの低存在量種を含んでいてもよい。一部の実施形態では、すべての低存在量種の合計は、試料中の核酸分子の20%未満、10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、1%未満、1%未満、0.1%未満、またはそれ未満を占める。一部の実施形態では、低存在量種は、1つまたは複数の転写因子をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、低存在量種は、1つまたは複数のT細胞受容体をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。一部の実施形態では、低存在量種は、1つまたは複数の抗体をコードするポリヌクレオチドを含んでいてもよい。

【0262】

一部の実施形態では、複数の核酸標的のうちの2つまたはそれよりも多くは、低存在量種を含む。一部の実施形態では、複数の核酸標的のうちの2つまたはそれよりも多くは、低存在量種および／または中存在量種を含む。一部の実施形態では、複数の核酸標的の2つまたはそれよりも多くは、低発現遺伝子のmRNAを含む。一部の実施形態では、低存在量種である核酸標的のパーセンテージは、0.0000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.0001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%であってもよく、もしくは約0.0000000001%、0.000000001%、0.00000001%、0.0000001%、0.00001%、0.0001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%

、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%
、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%
、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%
、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%
、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%
、97%、98%、99%、100%であってもよく、またはこうした値の任意の2つの
間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、低存在量種である核酸標的
のパーセンテージは、少なくとも0.000000001%、0.00000001%、
0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.
001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、
9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、1
9%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、2
9%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、3
9%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、4
9%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、5
9%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、6
9%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、7
9%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、8
9%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、9
9%、もしくは100%であってもよく、または最大で0.000000001%、0.
00000001%、0.0000001%、0.000001%、0.00001%、0.0001%、0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%
、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%
、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%
、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%
、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%
、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%
、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%
、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%
、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%
、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%
、97%、98%、99%、もしくは100%であってもよい。

【0263】

一部の実施形態では、RPE WTAライブラリーは、本明細書に開示されるようなR
PE WTAライブラリー調製の産物を含む。一部の実施形態では、RPE WTAライ
ブラリーは、RPE WTAライブラリー調製の産物を鋳型として使用する、本開示の1つ
または複数の下流の方法の産物を含む。一部の実施形態では、本開示のRPE WTA法
により生成されるRPE WTAライブラリーの配列決定は、代替的な、RPEに基づか
ないWTA法（例えば、ライゲーションに基づくWTA法または断片化に基づくWTA法
）により生成されるライブラリーの配列決定と比較して、1つまたは複数の低存在量種（
例えば、核酸標的、低発現mRNA）のリード数の増加をもたらす。一部の実施形態では
、RPE WTAライブラリー中の1つまたは複数の低存在量種のリード数の増加は、R
PEに基づかないWTAライブラリーと比較して、少なくとも2%である（例えば、2%
、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14
%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50
%、75%、100%、またはそれよりも多く、およびこれら内の重複する範囲だけ）。
一部の実施形態では、本開示の方法により生成されるRPE WTAライブラリーの配列
決定は、RPEに基づかないWTAライブラリーの配列決定と比較して、総リード数に対
する1つまたは複数の低存在量種（例えば、核酸標的、低発現mRNA）のリード数の増
加をもたらす。一部の実施形態では、RPE WTAライブラリー中の総リード数に対す

10

20

30

40

50

る1つまたは複数の低存在量種のリード数の増加は、R P Eに基づかないW T Aライブラリーと比較して、少なくとも2%である（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、またはそれよりも多く、およびこれら内の重複する範囲だけ）。一部の実施形態では、本開示の方法により生成されるR P E W T Aライブラリーの配列決定は、R P Eに基づかないW T Aライブラリーの配列決定と比較して、1つまたは複数の低存在量種（例えば、核酸標的、低発現m R N A）の分子インデックス（M I）の数の増加をもたらす。一部の実施形態では、R P E W T Aライブラリー中の総リード数に対する1つまたは複数の低存在量種のM Iの数の増加は、R P Eに基づかないW T Aライブラリーと比較して、少なくとも2%である（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、またはそれよりも多く、およびこれら内の重複する範囲だけ）。

【0264】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、R P E W T Aライブラリー調製後の1つまたは複数の低存在量種の相対存在量を増加させることができる（非R P E W T Aライブラリー調製、例えば、ライゲーションに基づくW T A法または断片化に基づくW T A法と比較して）。例えば、本明細書で開示される方法は、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも10種、少なくとも20種、少なくとも50種、少なくとも100種、少なくとも200種、少なくとも500種、少なくとも1,000種、またはそれよりも多くの低存在量種のR P E W T Aライブラリーの調製後の相対存在量を増加させることができる（非R P E W T Aライブラリー調製と比較して）。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、1つまたは複数の低存在量種の各々のR P E W T Aライブラリー調製後の相対存在量を（非R P E W T Aライブラリー調製と比較して）、少なくとも約2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、またはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができる。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、R P E W T Aライブラリー調製後の1つまたは複数の低存在量種のうちの少なくとも1つの相対存在量を（非R P E W T Aライブラリー調製と比較して）、少なくとも約2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、またはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができる。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、R P E W T Aライブラリー調製後の総低存在量種の相対存在量を（非R P E W T Aライブラリー調製と比較して）、少なくとも約2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、またはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができる。

【0265】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、低存在量種の存在量がR P E W T Aライブラリー調製後に1つまたは複数の高存在量種と比べて増加するように、R P E W T Aライブラリー後の1つまたは複数の低存在量種の相対存在量を選択的に増加させることができる（非R P E W T Aライブラリー調製と比較して）。一部の実施形態では、本明細書で開示される方法および組成物は、低存在量種の存在量がR P E W T Aライブラリー調製後に1つまたは複数の高存在量種と比べて増加するように、R P E W T Aラ

イブラリー調製後の1つまたは複数の低存在量種の各々の相対存在量を（非RPE WTAライブラリーと比較して）、2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、もしくはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができるか、約2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、もしくはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができるか、少なくとも2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、もしくはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができるか、または少なくとも約2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、150%、200%、250%、500%、1000%、もしくはそれよりも多く、およびそれら内の重複する範囲だけ）増加させることができる。

【0266】

一部の実施形態では、本開示の方法により生成されるRPE WTAライブラリーの配列決定は、非RPE WTAライブラリーの配列決定と比較して、1つまたは複数の標的の同様の遺伝子発現プロファイルおよび／またはタンパク質発現プロファイル（例えば、遺伝子発現パネル結果）をもたらす。一部の実施形態では、RPE WTAライブラリーと非RPE WTAライブラリーとの間の、1つまたは複数の標的の遺伝子発現プロファイルおよび／またはタンパク質発現プロファイルの差は、最大で0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、またはこうした値のいずれかの間の数値もしくは範囲であってもよい。一部の実施形態では、RPE WTAライブラリーおよび非RPE WTAライブラリーの発現プロファイル間の R^2 相関性は、0.6、0.7、0.8、0.9、0.990、0.999、1.0、およびそれら内の重複する範囲であってもよい。ライブラリー結果の発現プロファイル間の相関性を試験するための方法は、当技術分野で十分に理解されている（例えば、tSNEプロットの重合せ）。

【0267】

RPE WTAライブラリーは、RPE WTAライブラリー中の中存在量種または低存在量種の配列決定リードを増加させることにより、および／または非RPE WTAライブラリー中の高存在量種の配列決定リードを減少させることにより、配列決定の効率を増加させることができる。本開示の方法により生成されるRPE WTAライブラリーでは、より低存在量の（例えば、より稀少な）核酸標的を、非RPE WTAライブラリーの場合よりも容易に識別することができる。RPE WTAライブラリー中のより低存在量の標的の配列決定リードは、非RPE WTAライブラリーの場合よりも総リードのより大きな部分を含むことができる。RPE WTAライブラリー中の1つまたは複数のより低存在量の標的の配列決定リードは、非RPE WTAライブラリー中の同じ標的のリードと比較して、少なくとも50、100、150、200、250、300、350、400、450、または500%、またはそれよりも多くのリードを含むことができる。正規化ライブラリー中の1つまたは複数のより低存在量の標的の配列決定リードは、非RPE WTAライブラリー中の同じ標的の配列決定リードよりも、少なくとも1、2、3、4、5、もしくは6倍であってもよく、またはそれよりも高い倍数であってもよい。

【0268】

R P E W T Aライブラリーを作成するための本明細書に記載の方法は、複数の核酸（例えば、核酸ライブラリー）中の中存在量核酸標的および／または低存在量核酸標的の配列決定リードを向上させることができる。例えば、複数の中存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、少なくとも5%であってもよい。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも50%、少なくとも40%、少なくとも30%、少なくとも20%、少なくとも10%、少なくとも5%、少なくとも4%、少なくとも3%、少なくとも2%、少なくとも1%であってもよい。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも5%である。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも10%である。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも20%である。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも30%である。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも40%である。一部の実施形態では、複数の低存在量核酸標的の配列決定リードは、R P E W T Aライブラリーの総配列決定リードの少なくとも50%である。

10

【0269】

20

本明細書で開示されるR P Eに基づくW T A法の一部の実施形態には、代替的な、R P Eに基づかないW T A法（例えば、ライゲーションに基づくW T A法または断片化に基づくW T A法）と比較して、より短いプロトコル時間を有するという利点がある。一部の実施形態では、単一細胞捕捉からc D N A合成までの時間、および／またはライブラリー調製からQ Cまでの時間は、R P Eに基づかないW T A法（例えば、ライゲーションに基づくW T A法または断片化に基づくW T A法）と比較して、少なくとも約2%（例えば、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、40%、50%、75%、100%、またはそれよりも大きく、およびそれら内の重複する範囲だけ）低減される。

30

【実施例】

【0270】

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

全トランスクリプトーム解析（W T A）のためのランダムプライミングおよび伸長（R P E）プロトコル。

以下に提供される本プロトコルは、ランダムプライミング手法を使用してR h a p s o d yビーズから全トランスクリプトームライブラリーを生成するための例示的な実施形態を概説するものである。以下に提供されるプロトコルと同様の手順を実施例1で使用した。

40

【0271】

試薬

B D R h a p s o d y 標的化m R N AおよびA b S e q増幅キット（B D B i o s c i e n c e s、633774）；S P R I s e l e c t試薬（B e c k m a n C o u l t e r L i f e S c i e n c e s、B23318）；100%エチルアルコール；無ヌクレアーゼ水；K l e n o w断片（3'→5'exo-）（N e w E n g l a n d B i o l a b s、M0212L）；10mM d N T P（N e w E n g l a n d B i o l a b s）；ならびに100uMの濃度に事前希釈したノナー2（5' T C A G A C G T G T G C T C T T C C G A T C T N N N N N N N N N 3'；配列番号1）（1ヌクレオチド内容物当たり25%の混合塩基を手作業による混合で達成した）。

50

【0272】

消耗品

ピペット（P10、P20、P200、P1000）；低保持濾過ピペットチップ；1.5mLマイクロ遠心分離チューブ（Eppendorf、022431021）；DNA LoBindチューブ、1.5mL（Eppendorf、0030108051）；および0.2mL PCRストリップチューブ。

機器

1. 5～2.0mLチューブ用のマイクロ遠心分離機；0.2mLチューブ用マイクロ遠心分離機；ボルテックス混合器；Pipet-Aid；1.5mLチューブ用の6チューブ磁気分離ラック（New England Biolabs、S1506S）；0.2mLの8ストリップチューブ用の薄型磁気分離スタンド（V&P Scientific、Clontech；VP772F4-1、635011）；デジタルタイマー；マルチチャンネルピペット（P20、P200）；ヒートブロック；およびThermomixer。

【0273】

手順

mRNAを有していないビーズの生成（「コールド」ビーズ）

1. Rhapsodyビーズの1つのチューブ（約600,000個のビーズ、3セットのカートリッジビーズに添加するのに十分なコールドビーズを含む）を磁石と共にインキュベートした。液体をすべて除去し、ペレットを750μLの試料緩衝液で再懸濁した。

2. チューブを磁石と共にインキュベートし、すべての液体を廃棄した。

3. ビーズを、42μLの1×溶解緩衝液（5mM DTTを含む）と共に2分間インキュベートした。5mM DTTを有する溶解緩衝液は、10μLの1M DTTおよび2mLの溶解緩衝液を組み合わせることで製作した。

4. 次に、各々を1mLの1×溶解緩衝液（5mM DTTを含む）で希釈し、磁石と共にインキュベートし、液体をすべて除去した。

5. 1.0mLのビーズ洗浄緩衝液を添加した。混合し、磁石と共にインキュベートした後、液体をすべて除去した。

6. 1.0mLのビーズ洗浄緩衝液を添加した。

7. RT緩衝液反応ミックスを、表1に示されているように調製した。

【0274】

【表1】

表1. RT緩衝液ミックス

成分	最終濃度	1x	1.05x	2.1x
5×RT緩衝液 (PN 650000067)	1 x	120.0	126	252
100mM DTT (PN 650000068)	5 mM	30.0	31.5	63
20mg/mL BSA (NEB B9000S)	1.2 mg/mL	36.0	37.8	75.6
無ヌクレアーゼ水		414.0	434.7	869.4
合計		600.0	630	1260

8. ビーズを磁石と共にインキュベートし、液体をすべて除去した。

9. 600μLのRT緩衝液ミックスをビーズに添加し、ピペティングで混合した。

10. ビーズを、ThermoMixerで1200RPMにて振とうしながら、37℃で20分間インキュベートした。

11. チューブを氷上に短時間配置した後、磁石と共にインキュベートし、液体をすべて除去した。

12. エクソヌクレアーゼIミックスを、表2に示されているように調製した。

【0275】

【表 2】

表2. エキソヌクレアーゼI反応ミックス

成分	最終濃度	1x	1.05x	2.05x
10×ExoI緩衝液(NEB)	1 x	60.0	63	123
20 U/μLエキソヌクレアーゼI(NEB)	1 U/μL	30.0	31.5	61.5
無ヌクレアーゼ水		510.0	535.5	1045.5
合計		600.0	630	1230

13. 600 μLのExoIミックスをビーズに添加し、ピペティングで混合した。

14. ビーズを、ThermoMixerで1200 RPMにて振とうしながら、37℃で30分間インキュベートした。

15. ビーズを振とうせずに20分間80℃へと移動させ、次いで氷上に1分間配置した。

【0276】

16. ビーズを磁石と共にインキュベートし、液体をすべて除去した。

17. 各ビーズペレットを、600 μLのビーズ再懸濁緩衝液で再懸濁した。得られた濃度は、およそ1000ビーズ/μLだった。一部の場合では、スキャナーのビーズ計数プログラムを使用して、最終ビーズ濃度を決定した。

cDNAを有するBD Rhapsodyビーズ上でのランダムプライミングおよび伸長(RPE)

1. 増幅前作業場所において、新しい1.5 mLのLoBindチューブに、表3に列挙されている成分を表示の順序でピペティングした。

【0277】

【表 3】

表3. ランダムプライマーミックス

成分	最終濃度	1x (200uL)	1.2x	4.4x
水		135	162	594
10x NEBuffer 2	1x	20	24	88
100 μMランダム2(ノナマー)	10 μM	20	24	88
合計		175	211.2	774.4

2. ランダムプライマーミックスを、穏やかなピペティングで混合した。

3. 一部の場合では、エキソヌクレアーゼIで処理したBD Rhapsody細胞捕捉ビーズの試料全体に対して、ランダムプライミングおよび伸長を実施し、手順を飛ばしてステップ7に進んだ。一部の場合では、エキソヌクレアーゼIで処理したBD Rhapsody細胞捕捉ビーズの部分試料に対して、ランダムプライミングおよび伸長を実施し、ユーザはステップ4へと進んだ。

【0278】

4. エキソヌクレアーゼIで処理したBD Rhapsody細胞捕捉ビーズを部分サンプリングするために、標的化配列決定のために部分サンプリングするビーズの容積を、最終ビーズ再懸濁容積中のビーズ上に捕捉された生細胞の予想数に基づいて決定した。一部の場合では、残りのビーズを4℃で最大3か月間保管した。ビーズをピペット混合で完全に再懸濁し、次いで算出された容積のビーズ懸濁物を、新しい1.5 mLのLoBindチューブにピペティングした。部分サンプリングしたビーズを使用する場合、総容積をビーズ再懸濁緩衝液で100 μLにした。

5. カートリッジ実験のビーズを、最終ビーズ容積が200 μLになるように「コールド」ビーズと組み合わせた(総ビーズ数は約200,000個だった)。例えば、20000個の細胞を有する40 uLのビーズの場合、160 uLのコールドビーズを添加した。あるいは、一部の場合では、以下のように計算を実施した：追加するコールドビーズの

数 = 200000 * (1 - (部分サンプリングする細胞 / ビーズ洗浄後の総細胞))。

【0279】

6. 組み合わせたビーズを有するチューブを、95℃のヒートブロックに2分間配置した。次いで、BD Rhapsody細胞捕捉ビーズを有するチューブを、直ちに1.5 mL磁石に配置し、上清を直ちに除去し廃棄した。BD Rhapsody細胞捕捉ビーズの乾燥を回避した。

7. チューブを磁石から取り外し、次いで低保持チップを使用して175 µLのランダムプライマーミックスをチューブへとピペッティングした。ピペット混合を10回実施し、ビーズを再懸濁した。

8. チューブを95℃のヒートブロックに2分間配置し、次いで試料を、37℃で5分間1,200 rpmで、25℃で5分間1,200 rpmで遠心分離沈降させた。

9. 25 µLのプライマー伸長反応ミックス（表4に示されている）を、ビーズを含む試料チューブへとピペッティングした（総容積は200 µL）。ピペット混合を10回実施した。

【0280】

【表4】

表4. プライマー伸長反応ミックス

成分	最終濃度	1x (200 µL)	1.2x	4.4x
10 mM dNTP	0.45 mM	9	10.8	39.6
20 mg/mL BSA (NEB B9000S)	1.0 mg/mL	10	12	44
5000 U/mL Klenow Exo- (NEB M0212S)	150 U/mL	6	7.2	26.4
合計		25	30	110

10. チューブを、37℃で30分間1,200 rpmにてthermomixerに配置した。

11. チューブを95℃のヒートブロックに2分間配置し、Thermomixerで約20秒間振とうし、1.5 mL磁石に配置し、上清（ランダムプライマー伸長産物、すなわちRPE産物）を直ちに新しい1.5 mLのLoBindチューブに移し、そのチューブを氷上で保管した。

【0281】

12. 一部の 경우에는、ビーズを、200 µLのビーズ再懸濁緩衝液（PN650000066）に再懸濁した。チューブを、95℃のヒートブロックに2分間配置し、1.5 mL磁石に配置し、上清を直ちに新しいチューブに移した。

13. 一部の 경우에는、200 µLのコールドビーズ再懸濁緩衝液（PN650000066）を、残りのビーズを有するチューブへとピペッティングした。ビーズを、ピペット混合のみで穏やかに再懸濁した（ボルテックスはしなかった）。ビーズを、増幅前作業場所で4℃にて保管した。残りのビーズは、BD Rhapsody標的化およびBD AbSeqライブラリー生成に使用することができる。

【0282】

RPE産物の精製

1. 新しい5.0 mLのLoBindチューブに、4.0 mLの無水エチルアルコールを1.0 mLの無ヌクレアーゼ水にピペッティングすることにより、5 mLの新鮮な80%（容積／容積）エチルアルコールを調製した。チューブを10秒間ボルテックスした。新鮮な80%エチルアルコールを作り、24時間以内に使用した。

2. SPRI Selectビーズを、使用前に1分間高速でボルテックスした。ビーズは、均質で均一な色を呈した。

3. 320 μ L (1.6 $\times$)のSPRI Selectビーズを、200 μ LのRPE産物上清を含むチューブにピペティングした。

4. ピペット混合を少なくとも10回実施し、次いで短時間遠心分離した。

5. 懸濁物を室温で10分間インキュベートし、次いでそれを1.5 mLチューブ磁石に5分間配置した。

【0283】

6. 上清を除去した。

7. ビーズを有する元のチューブを磁石上で維持し、このチューブに600 μ Lの新鮮な80%エチルアルコールを穏やかにピペティングした。

8. 試料を磁石上で30秒間インキュベートした。

9. 磁石上に置いたまま、SPRI Selectビーズを乱すことなく、上清を注意深く除去し、適切に廃棄した。

10. エタノール洗浄ステップを繰り返して、合計2回の80%エタノール洗浄を行った。

11. 磁石上に置いたまま、少容積ピペットを使用して、一切の残留上清をチューブから除去した。

【0284】

12. チューブを磁石上で開けたままにして、SPRI Selectビーズを、室温で10~15分間、またはビーズがもはや光沢を見せなくなるまで乾燥させた。

13. チューブを磁石から取り外し、31 μ Lの溶出緩衝液(PN650000075)をチューブへとピペティングした。溶液が懸濁し、均一な色を呈するまで、懸濁物を少なくとも10回ピペット混合した。

14. 試料を室温で2分間インキュベートした。

15. チューブを短時間遠心分離して、内容物を底部に収集した。

16. 溶液が透明になるまで(通常は $\leq$ 30秒)、チューブを磁石上に配置した。

17. 溶出液全体(約30 μ L)を新しいPCRチューブにピペティングした。これは、精製されたBD Rhapsody RPE産物だった。これをPCRするまで氷上または4℃で維持した。

RPE PCR

1. 増幅前作業場所において、新しい1.5 mLのLoBindチューブに、表5に示されている成分を表示の順序でピペティングした。

【0285】

【表5】

表5. RPE PCRミックス

成分	最終濃度	1x	1.2x	4.4x
ランダムプライミング1産物		30.0		
2 $\times$ PCRマスターミックス		50.0	60	220
ユニバーサルオリゴ(10 μ M)	1 μ M	10.0	12	44
AbSeq PCR1プライマー(10 μ M)	1 μ M	10.0	12	44
合計		100.0	84	308

2. 70 μ LのRPE PCRミックスを、30 μ Lの精製RPE産物と組み合わせた。

3. RPE PCR反応物を、1チューブ当たり50 μ Lの反応ミックスを有する2つのPCRチューブに分割した。

4. 表6に示されているPCRプログラムを実行し、PCRサイクルの数を表7に従って決定した。

【0286】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6. PCRプログラム

ステップ	サイクル	温度	時間
ホットスタート	1	95° C	3分間
変性	表7を参照	95° C	30秒間
アニーリング		60° C	1分間
伸長		72° C	1分間
最終伸長	1	72° C	2分間
保持	1	4° C	∞

10

【 0 2 8 7 】

【表 7】

表7. PCRサイクル数

増幅での細胞数	休止PBMCの推奨開始PCRサイクル
500細胞	17
1,000細胞	16
2,500細胞	15
5,000~10,000細胞	14
10,000細胞	13

20

5. RPE PCR反応が完了したら、チューブを短時間遠心分離して、内容物をチューブの底部に収集した。

6. 2つの反応物を、新しい0.2 mLのPCRチューブへと組み合わせられた。

RPE PCR増幅産物の精製（片側クリーンアップ）

1. 一部の 경우에는、2 µLのRPE PCR反応産物を、バイオアナライザー分析のために採取した（後に精製産物と比較するため）。

【 0 2 8 8 】

2. SPRI Selectビーズを室温に戻し、SPRI Selectビーズを高速で1分間ボルテックスした。ビーズは、均質で均一な色を呈した。

3. 最終増幅産物を有するチューブを短時間遠心分離した。

4. 100.0 µL (1.0×)のSPRI Selectビーズを最終増幅産物へとピペティングした。

5. 少なくとも10回のピペット混合を実施し、次いで試料を短時間遠心分離した。

6. 懸濁物を室温で5分間インキュベートし、次いでストリップチューブ磁石に3～5分間配置した。

【 0 2 8 9 】

7. 磁石上に置いたまま、ユーザは、SPRI Selectビーズを乱すことなく上清のみを注意深く除去し、適切に廃棄した。

8. チューブを磁石上に維持したまま、200 µLの新鮮な80%エチルアルコールを穏やかにピペティングした。

9. 試料を磁石上で30秒間インキュベートした。

10. 磁石上に置いたまま、ユーザは、SPRI Selectビーズを乱すことなく上清のみを注意深く除去し、適切に廃棄した。

11. 80%エタノール洗浄を繰り返して、合計で2回の洗浄を行った。

【 0 2 9 0 】

12. チューブを磁石上に維持したまま、少容積ピペットを使用して、一切の残留上清をチューブから除去した。

30

40

50

13. チューブを磁石上で開けたままにして、SPRI Selectビーズを、室温で少なくとも5分間、またはビーズがもはや光沢を見せなくなるまで乾燥させた。

14. 30 μ Lの溶出緩衝液(PN650000075)をチューブへとピペティングし、パルスボルテックスして、SPRI Selectビーズを完全に再懸濁した。

15. 試料を室温で2分間インキュベートした。

16. チューブを短時間遠心分離して、内容物を底部に収集した。

17. 溶液が透明になるまで(通常は ≤ 30 秒)、チューブを磁石上に配置した。

18. 溶出液全体(約30 μ L)を、新しい1.5mLのLoBindチューブへとピペティングした。これで、RPE PCR溶出液をインデックスPCRに使う準備ができた。一部の場合では、このステップは休止地点であり、RPE PCRライブラリーを -20°C で ≤ 6 か月間保管することができた。

【0291】

19. ユーザは、Qubit dsDNA HSアッセイを使用したQubit (商標) 蛍光光度計およびAgilent高感度DNAキットを使用したAgilent 2100 バイオアナライザーを用いて、RPE PCR産物を定量化し、品質管理を実施した。バイオアナライザートレースは、200~1000bpにブロードピークを適切に示した。200~1000bpの濃度を使用して、インデックスPCRに添加する鋳型の量を計算した。一部の場合では、70bp付近に小さなピークが観察される場合がある。一部の場合では、70bpのピークが顕著であった場合、インデックスPCR後の収量が影響を受けた。

WTAインデックスPCR

1. RPE PCR溶出液を、200~1000bpピークの濃度が約1~2nMになるように希釈した。例えば、200~1000bpピークのバイオアナライザー測定値が約6nMだった場合、試料を1:3希釈して2nMにした。

2. 表8に示されている成分を、表示の順序で新しい1.5mLチューブにピペティングした。

【0292】

【表8】

表8. WTAインデックスPCRミックス

成分	最終濃度	1X	1.2X	4.4X
RPE PCR溶出液(鋳型)	200~1000bpピークの約1~2nM (バイオアナライザーで測定)	3		
2 $\times$ PCRマスターミックス	1 x	25	30	110
ライブラリーフォワードプライマー(10 μ M)	1 μ M	5	6	22
ライブラリーリバースプライマー(10 μ M)	1 μ M	5	6	22
水		12	14.4	52.8
合計		50	56.4	184.8

3. WTAインデックスPCRミックスを、以下のようにPCR1鋳型と組み合わせた: (a) 1つの試料の場合、47 μ LのWTAインデックスPCRミックスを、3 μ Lの1~2nMのRPE PCR溶出液(鋳型)と組み合わせた; または (b) 異なるリバースライブラリーインデックスを有する複数の試料の場合、WTAインデックスPCRミックスを、5 μ Lのリバースインデックスおよび3 μ LのRPE PCR溶出液(鋳型)と組み合わせた。

4. 表9に示されているPCRプログラムを実行した。

【0293】

【表 9】

表9. インデックスPCRプログラム

ステップ	サイクル	温度	時間
ホットスタート	1	95° C	5分間
変性	6-8	95° C	30秒間
アニーリング		60° C	30秒間
伸長		72° C	30秒間
最終伸長	1	72° C	1分間
保持	1	4° C	∞

10

5. WTAインデックスPCRが完了したら、チューブを短時間遠心分離して、内容物をチューブの底部に収集した。

WTAインデックスPCR産物の精製（両側クリーンアップ）

1. 一部の 경우에는、2 µL の WTAインデックスPCR 反応産物を、バイオアナライザー分析のために採取した（後に精製産物と比較するため）。

【0294】

2. SPRI Select ビーズを室温に戻し、SPRI Select ビーズを高速で1分間ボルテックスした。ビーズは、均質で均一な色を呈した。

3. WTAインデックスPCR産物を有するチューブを短時間遠心分離した。

20

4. 50 µL の水を、100 µL の最終容積になるようにWTAインデックスPCR産物に添加した。

5. 55 µL (0.55×) の SPRI Select ビーズを、WTAインデックスPCR産物へとピPETTINGした。

6. 少なくとも10回のピPETT混合を実施し、次いで試料を短時間遠心分離した。

【0295】

7. 懸濁物を室温で5分間インキュベートし、次いで0.2 mL のストリップチューブ磁石に3分間配置した。

8. ステップ5のストリップチューブが依然として磁石上にある間に、ユーザは、磁石に引き付けられたビーズを乱すことなく155 µL の上清を注意深く取り出し、新しい0.2 mL ストリップチューブへと移し、ピPETTで10回混合した。

30

9. 15 µL (0.70×) の SPRI Select ビーズを、上清を含む新しいストリップチューブへとピPETTINGした。

10. 懸濁物を室温で5分間インキュベートし、次いで新しいチューブを0.2 mL チューブ磁石に5分間配置した。

11. 磁石上に置いたまま、ユーザは、SPRI Select ビーズを乱すことなく上清のみを注意深く除去し、適切に廃棄した。

12. チューブを磁石上に維持したまま、200 µL の新鮮な80%エチルアルコールを穏やかにピPETTINGした。

【0296】

40

13. 試料を磁石上で30秒間インキュベートした。

14. 磁石上に置いたまま、ユーザは、SPRI Select ビーズを乱すことなく上清のみを注意深く除去し、適切に廃棄した。

15. 80%エタノール洗浄を繰り返して、合計で2回の洗浄を行った。

16. チューブを磁石上に維持したまま、少容積ピPETTを使用して、一切の残留上清をチューブから除去した。

17. チューブを磁石上で開けたままにして、SPRI Select ビーズを、室温で5分間乾燥させた。

【0297】

18. 30 µL の溶出緩衝液 (PN 650000075) をチューブへとピPETティ

50

ングし、パルスボルテックスして、S P R I S e l e c t ビーズを完全に再懸濁した。

19. 試料を室温で2分間インキュベートした。

20. チューブを短時間遠心分離して、内容物を底部に収集した。

21. 溶液が透明になるまで（通常は ≤ 30 秒）、チューブを磁石上に配置した。

22. 溶出液全体（約 $30\mu\text{L}$ ）を、新しい 1.5mL のLoBindチューブへとピペティングした。WTAインデックスPCR溶出液は、最終配列決定ライブラリーだった。一部の場合では、このステップは休止地点だった。インデックスPCRライブラリーを、配列決定まで -20°C で ≤ 6 か月間保管することができた。

23. ユーザは、Qubit dsDNA HSアッセイを使用したQubit（商標）蛍光光度計およびAgilent高感度DNAキットを使用したAgilent 2100バイオアナライザーを用いて、インデックスPCRライブラリーを定量化し、品質管理を実施した。

10

配列決定

一部の場合では、1細胞当たり50,000リードで配列決定を実施し、20%PhiXを配列決定実行に負荷した。

【0298】

（実施例1）

全トランスクリプトーム解析（WTA）を実施するためのランダムプライミングおよび伸長（RPE）に基づく方法の開発および改良

本明細書で提供される全トランスクリプトーム解析（WTA）を実施するためのランダムプライミングおよび伸長（RPE）に基づく方法を、表10に提供されている非限定的な例示的WTA性能評価項目および現行の利用可能なWTA法との比較に、部分的に基づいて開発および最適化した。例えば、RPEに基づくWTA法は、以下を考慮して開発した：（1）一般的なWTA評価項目（例えば、1細胞当たりの遺伝子／UMI）、しかしながら、異なるWTA法は異なる遺伝子タイプに由来する固有のバイアスを有するため、これらはバイアスを受けている可能性がある；および（2）例えば、様々な発現レベルの遺伝子およびバイアス（リボソーム遺伝子、ミトコンドリア遺伝子、ハウスキーピング遺伝子など）にわたるWTAドロップアウト率などの追加の評価項目。一部の場合では、主要な免疫細胞タイプ（B細胞、NK、T細胞、および骨髄細胞）の識別は、BD Data ViewのtSNEおよび特徴選択初期設定を使用して行った。

20

30

【0299】

40

50

【表 10】

表10. WTA性能評価項目

性能評価項目	基準
バイアス	1試料当たりのリボソームリード%
	1試料当たりのミトコンドリアリード%
感度	作業工程終了後の1細胞当たり少なくとも8000リードの1細胞当たりの遺伝子中央値
	1細胞当たりの遺伝子中央値、非リボソーム、非ミトコンドリア、非偽遺伝子
WTAドロップアウト率	ハウスキーピング遺伝子陽性の総細胞%
	CD4陽性のT細胞%
	CD8A陽性のT細胞%
	TRBC2陽性のT細胞%
	TRAC陽性のT細胞%
	CD3D陽性のT細胞%
	TBX21陽性のT細胞%
	IGLC3陽性のB細胞%
ライブラリー収量およびIllumina配列決定装置との互換性	最終ライブラリーnM
	最終ライブラリーサイズ(bp)

10

20

【0300】

RPEに基づくWTA法とライゲーションに基づくWTA法との比較

ヘキサマー（ID010HK6）またはノナマー（ID010NK6）のいずれかを使用して、本明細書で提供されるWTAを実施するためのRPEに基づく方法を、ジャークット／ラモス細胞（表11）およびPMBC（表12）において、現行の利用可能なライゲーションに基づくWTA法（ID010UG1）と比較した。図13A～Bは、ライゲーションに基づく全トランスクリプトーム解析、ならびに6merランダムマーおよび9merランダムマーによるランダムプライミングおよび伸長を用いた全トランスクリプトーム解析を実施するための非例示的な感度評価項目を示すプロットである。ジャークット／ラモス細胞では、RPEに基づくWTA法を使用すると、ライゲーションに基づくWTA法と比較してより多くの遺伝子および分子が検出された。さらに、ノナマーに基づくRPE法を使用すると、ヘキサマーに基づく方法と比較してより多くの遺伝子および分子が検出された。一部のマーカーは、ジャークット細胞では発現しなかった。ライゲーションに基づく方法は、IGLC3のより良好な検出を示すことが認められた。

30

【0301】

40

50

【表 1 1】

表11. ジャーカット/ラモス細胞におけるWTA性能の比較

基準	RPEヘキサマー	RPEノナマー	ライゲーションに基づくWTAプロトコール
検出された総遺伝子	21576	21986	21149
1試料当たりのリボソームリード%	11.02%	11.13%	13.09%
1試料当たりのミトコンドリアリード%	15.14%	15.61%	11.60%
作業工程終了後の1細胞当たり少なくとも8000リードの1細胞当たりの遺伝子中央値	2495	2698	2154
1細胞当たりの遺伝子中央値、非リボソーム、非ミトコンドリア、非偽遺伝子	2362	2556	2003
ハウスキーピング遺伝子陽性の総細胞%	—	—	—
CD4陽性のT細胞%	10.1%	10.1%	7.2%
CD8A陽性のT細胞%	—	—	—
TRBC2陽性のT細胞%	76.6%	81.0%	74.1%
TRAC陽性のT細胞%	43.0%	45.8%	46.3%
CD3D陽性のT細胞%	91.3%	94.3%	93.5%
TBX21陽性のT細胞%	0.5%	0.3%	0.1%
IGLC3陽性のB細胞%	22.1%	65.8%	72.4%

【 0 3 0 2 】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表12. PBMCにおけるWTA性能の比較

基準	RPEヘキサマー	RPEノナマー	ライゲーションに基づくWTAプロトコール
検出された総遺伝子	18419	18999	18958
1試料当たりのリボソームリード%	11.91%	12.05%	27.01%
1試料当たりのミトコンドリアリード%	19.53%	20.27%	5.27%
作業工程終了後の1細胞当たり少なくとも8000リードの1細胞当たりの遺伝子中央値	569	651	391
1細胞当たりの遺伝子中央値、非リボソーム、非ミトコンドリア、非偽遺伝子	564	489	276
ハウスキーピング遺伝子陽性の総細胞%	—	—	—
CD4陽性のT細胞%	12.1%	17.0%	8.3%
CD8A陽性のT細胞%	18.7%	21.1%	9.7%
TRBC2陽性のT細胞%	65.6%	67.4%	36.5%
TRAC陽性のT細胞%	44.8%	51.6%	28.1%
CD3D陽性のT細胞%	16.1%	16.2%	22.1%
TBX21陽性のT細胞%	7.0%	11.2%	5.9%
IGLC3陽性のB細胞%	0.0%	0.7%	8.5%

【0303】

図14は、ライゲーションに基づくWTA法と比較した、本開示のランダムプライミングおよび伸長に基づくWTA分析の例示的な性能を示すt分布型確率的近傍埋め込み（t-SNE）である。t-SNE投影図では、所定の遺伝子セットに由来する664個の免疫関連遺伝子に焦点を当てた。ID010HK6（RPEヘキサマー）およびID010NK6（RPEノナマー）試料は、同様の遺伝子発現パターンを有し、ID010UG1（ライゲーションに基づくWTA法）よりも細胞クラスター間のばらつきが大きいように見えたが、すべてがより近い2D空間に集中しているようであった。

図15A～15Bは、ID010NK6（RPE WTAノナマー）が、ID010UG1（ライゲーションに基づくWTA法）よりも多くの細胞表面マーカーを捕捉するようであったことを示す非限定的な例示的円グラフである。図15Aは、特定の遺伝子を発現する細胞の数が、RPE WTAノナマー法またはライゲーションに基づくWTA法においてより多かったことを示す円グラフである。図15Bは、特定の遺伝子を発現する1細胞当たりのUMIが、RPEノナマー法またはライゲーションに基づくWTA法においてより多いことを示す円グラフである。さらに、表13および14に示されているように、ノナマーRPEに基づくWTA法は、ライゲーションに基づくWTA法よりも多くの細胞表面マーカーを捕捉した。

【0304】

したがって、こうしたデータは、複数の細胞タイプおよび多数の性能評価項目にわたって、現行の利用可能なライゲーションに基づくWTA法と比較して、本明細書で提供されるWTAを実施するためのRPEに基づく方法（ヘキサマーまたはノナマーのいずれかを使用した）の性能が增強されたことを実証する。

加えて、本明細書で開示される R P E に基づく W T A 法は、より短い W T A プロトコールを提供することができる。単一細胞捕捉から c D N A 合成完了までは、既存の液滴に基づく W T A 法、既存のライゲーシオンに基づく W T A 法、および R P E に基づく W T A 法では、それぞれ 8 5 分、1 3 0 分、および 1 3 0 分の時間がかかる。ライブラリー調製から Q C までは、既存の液滴に基づく W T A 法、既存のライゲーシオンに基づく W T A 法、および R P E に基づく W T A 法では、それぞれ 3 7 5 分、5 2 0 分、および 3 3 0 分の時間がかかる。したがって、本明細書で提供される W T A を実施するための新規方法には、プロトコール時間を短縮するという利点がある。

【 0 3 0 5 】

【表 1 3】

表13. 遺伝子オントロジー用語

GO用語	遺伝子
GO:0009897-原形質膜の外側	ENOX2, CD8A, ATP6AP2, CD88, CXCR3, TRDC1 IL7R, ADA, ALCAM, IFNG, CD4, IL2RG, CD24...
GO:0098552-膜の側面	ENOX2, CD8A, ATP6AP2, CD88, CXCR3, TRDC, IL7R, ADA, BTK, ALCAM, IFNG, IL2RG, CD4...
GO:0009986-細胞表面	ENOX2, CD8A, ATP6AP2, CDBB, CXCR3, TRDC IL7R, TGFB1, ADA, _ HMMR, ALCAM, CD44...
GO:0043231-細胞内膜結合小器官	HCCS, PNMA3, SLC9A7, SLC9A6, RP2, TRMT28, AURKA, HMGN5, USP51, SLC35A2, PRKX...
GO:0005622-細胞内	HCCS, PNMA3, SLC9A7, SLC9A6, RP2, . TRMT28, AURKA, HMGN5, SLC35A2, USP51, PRKX...
GO:0005768-エンドソーム	PRF1, SLC9A7, SLC9A6, RAB9A, MMT1, CD88, ATP6AP1, DIAPH2, TLR7, TLR8, RRAGB...
GO:0044459-原形質膜部分	PLXNA3, ENOX2, CD8A, CD88, ATP6AP2, RP2, TSPAN6, CASK, TSPAN7, CXCR3, TLR7, BTK...
GO:0044424-細胞内部分	HCCS, PNMA3, SLC9A7, SLC9A6, RP2, TRMT28, AURKA, HMGN5, SLC35A2, USP51, PRKX...
GO:0005634-核	PNMA3, AURKA, HMGN5, USP51, SLC35A2 PRKX, BTK, DNASE1L1, PRIM1, MAGED1, ZFP9...
GO:0043227-膜結合小器官	HCCS, PNMA3, SLC9A7, SLC9A6, RP2, TRMT28, AURKA, HMGN5, SLC35A2, USP51, PRKX...
GO:0005773-液胞	PRF1 SLC9A7, ARSD, SLC9A6, MMT1, RAB9A, CD88 ATP6AP1 DIAPH2, UBQLN2, TLR7...
GO:0044464-細胞部分	HCCS, SLC9A7, SLC9A6, RP2, USP51, BTK, MAGED1, SYP, CDCA7, CCR10, VMA21, PDHA1...

【 0 3 0 6 】

【表 1 4】

表14. 遺伝子オントロジー用語

GO用語	計数	%	P値	遺伝子
GO:0042571- 循環性免疫グロ ブリン複合体	7	7.142857143	8.75644E-10	IGHG1, IGHG3, IGHD, I GHA1, IGHA2, IGHM, IG LC3
GO:0019814- 免疫グロブリン 複合体	7	7.142857143	1.97463E-09	IGHG1, IGHG3, IGHD, I GHA1, IGHA2, IGHM, IG LC3
GO:0009897- 原形質膜の外側	11	11.2244898	2.41164E-07	IGHG1, SELP, IGHG3, I L2RA, IGHD, IGHA1, IG HA2, IGHM, ENG, LAG3, IGLC3
GO:0098552- 膜の側面	12	12.24489796	7.5028E-06	IGHG1, SELP, IGHG3, I L2RA, IGHD, IGHA1, IG HA2, CDH1, IGHM, ENG, LAG3, IGLC3
GO:0072562- 血液微粒子	8	8.163265306	8.2479E-06	IGHG 1. IGHG3. IGHD, IGHA 1. IGHA2, IGHM. ENG, IGLC3
GO:0005615- 細胞外空間	21	21.42857143	9.56996E-06	MUC1, IGHG1, SELP, IG HG3, VPRE83, LGALS1, PRDX4, IGHM, RPL39, T IMP1, AZU1, CFP...
GO:0032991- 巨大分子複合体	41	41.83673469	6.22817E-05	IGHG1, IGHG3, RPS26P1 1, ERBB2, TIMM178, CO X78, BEX1, CDH1, IGHM , RPL39, RPA4...
GO:0043234- タンパク質複合 体	36	36.73469388	0.000127154	IGHG1, IGHG3, ER882, TIMM17B, COX78, BEX1, CDH1, IGHM, RPA4I TI MP1, GATA1, NAA10...
GO:0009986- 細胞表面	12	12.24489796	0.000920806	IGHG1, SELP, IGHG3, I L2RA, LGALS1, IGHD, I GHA1, IGHA2, IGHM, EN G, LAG3, IGLC3
GO:0044421-細胞 外領域部分	31	31.63265306	0.002477963	IGHG1, IGHG3, VPRE83, PRDX4, CDH1, IGHM, O CRL, RPL39, TIMP1, AZ U1, CFP, SERPINE1...
GO:0005576-細胞 外領域	34	34.69387755	0.005252573	IGHG1, IGHG3, VPRE83, FAM3A, PRDX4, CDH1, IGHM, RPL39, OCRL1 TI MP1, AZU1, CFP...

【0 3 0 7】

モデル系

ヘキサマーまたはノナマーのいずれかを使用して、本明細書で提供されるWTAを実施するためのRPEに基づく方法を、PBMCおよびジャーカット／ラモス細胞で試験した。

図16A～16Dは、1つのランダムプライミングステップおよび1つのPCRステップを含むRPE法を使用すると、ジャーカット／ラモスは、健常ドナー末梢血単核細胞（PBMC）よりも高いRNA含有量を有し（1細胞当たりのUMI計数を比較すると約5×）、PBMCライブラリーは、165bpの夾雑物を生成したことを示す非限定的な例示的バイオアナライザープロットである。夾雑物は、これらのピークの配列決定が可能で

あったため、ランダムダイマーである可能性が高かった。図 1 6 A～1 6 B は、それぞれジャーカット／ラモスおよび P B M C におけるヘキサマー R P E バイオアナライザープロットを示し、図 1 6 C～1 6 D は、それぞれジャーカット／ラモスおよび P B M C におけるノナマー R P E バイオアナライザープロットを示す。

【 0 3 0 8 】

表 1 5 には、ジャーカットおよび P M B C におけるヘキサマーに基づくおよびノナマーに基づく R P E W T A 法の W T A 性能が示されている。一部のマーカーは、ジャーカット細胞では発現しなかった。P B M C は、R N A 含有量が少ないため、より難しいモデル系である。P B M C において本方法を開発すれば、感度分析がより向上する。

【 0 3 0 9 】

【表 1 5】

表15. ジャーカット細胞およびPBMCにおけるRPEに基づくWTA性能

基準	ジャーカット でのRPEヘキサ マー	ジャーカット でのRPEノナ マー	PBMCでのRPE ヘキサマー	PBMCでのRPE ノナマー
検出された総遺伝子	21576	21986	18419	18999
1試料当たりのリボ ソームリード%	11.02%	11.13%	11.91%	12.05%
1試料当たりのミト コンドリアリード%	15.14%	15.61%	19.53%	20.27%
作業工程終了後の1 細胞当たり少なくとも8000リードの1細 胞当たりの遺伝子中 央値	2495	2698	569	651
1細胞当たりの遺伝 子中央値、非リボソ ーム、非ミトコンド リア、非偽遺伝子	2362	2556	564	489
ハウスキーピング遺 伝子陽性の総細胞%	—	—	—	—
CD4陽性のT細胞%	10.1%	10.1%	12.1%	17.0%
CD8A陽性のT細胞%	—	—	18.7%	21.1%
TRBC2陽性のT細胞%	76.6%	81.0%	65.6%	67.4%
TRAC陽性のT細胞%	43.0%	45.8%	44.8%	51.6%
CD3D陽性のT細胞%	91.3%	94.3%	16.1%	16.2%
TBX21陽性のT細胞%	0.5%	0.3%	7.0%	11.2%
IGLC3陽性のB細胞%	22.1%	65.8%	0.0%	0.7%

【 0 3 1 0 】

伸長酵素

ヘキサマーまたはノナマーのいずれかを使用して本明細書で提供される W T A を実施するための R P E に基づく方法のための伸長酵素の使用を調査した。

図 1 7 A～1 7 D は、ランダムプライミングおよび伸長（1つのランダムプライミングステップおよび1つの P C R ステップを含む R P E 法を使用する）による W T A 分析を実施する一部の実施形態では、鎖置換活性を有する K l e n o w E x o ーが、T 4 D N A ポリメラーゼよりも好ましいことを示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット（

RPE PCR)である。様々なポリメラーゼを試験した。部分サンプリングしたジャーカット／ラモス細胞の数は1000個だった。図17A～17Bは、それぞれヘキサマーおよびノナマーを使用したKlenow Exo-のバイオアナライザープロットを示し、図17C～17Dは、それぞれヘキサマーおよびノナマーを使用したT4 DNAポリメラーゼのバイオアナライザープロットを示す。プロットは、Klenow Exo-が中程度の鎖置換活性を有し、T4 DNAポリメラーゼが鎖置換活性を有しなかったことを示す。2つの酵素の間にはエキソヌクレアーゼ活性にも違いがあった。Klenow Exo-は、複数のランダムプライミング伸長産物を生成することができるため、ヘキサマーおよびノナマーの両方でより高い収量をもたらした。一部の実施形態では、Klenowを伸長に使用する。一部の実施形態では、Klenow exo-を伸長に使用する。
【0311】

10

図18A～18Dは、Klenow Exo-が、以前に考えられていたほどの鎖置換活性を有しない場合があることを示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(RPE PCR)である。部分サンプリングしたPBMCの数は1000個だった。収量に変化したことを示すPCR1前のRPEの変性方法を試験した。以下の変数について試験した：(i)95℃で2分間変性させた後、直ちに上清を取り出す(図18A)；(ii)95℃で2分間変性させた後、1分間待って上清を取り出す(図18B)；(iii)0.1N NaOHで5分間処理した後、Tris Cl pH7で中和する(図18C)；および(iv)変性無し(図18D)。図18Dは、RPE PCR収率が低いことが、産物のほとんどがcDNAビーズに結合したままであることを示唆し、これは、酵素が鎖置換活性をほとんど有しない可能性があることを示す。一部の実施形態では、phi29酵素などの他の酵素を使用することができる。
【0312】

20

RPEプライマーの長さおよびランダムプライミングステップ

ヘキサマーまたはノナマーのいずれかを使用して本明細書で提供されるWTAを実施するためのRPEに基づく方法のランダムプライミングステップの数およびランダムプライマーの長さを調査した。

【0313】

図19A～19Dは、RPE WTA法に対する、ランダムプライミングステップの数およびランダムプライマーの長さの効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロットである。部分サンプリングしたジャーカット／ラモス細胞の数は1000個だった。二重ランダムプライミング(ランダムプライミングおよび伸長を2回ならびに2サイクルのPCRを実施すること)を含むRPEに基づくWTAプロトコルを、ヘキサマーおよびノナマーを使用して試験した(それぞれ、図19Aおよび19B)。加えて、単一ランダムプライミング(ランダムプライミングおよび伸長を1回ならびに1サイクルのPCRを実施すること)を含むRPEに基づくWTAプロトコルを、ヘキサマーおよびノナマーを使用して試験した(それぞれ、図19Cおよび19D)。単一ランダムプライミングを用いると、インデックスPCR後のプロットに示されているように、配列決定可能なライブラリーを生成することができる。165bpの夾雑物が観察された。表16は、ヘキサマーおよびノナマーを使用した上記の単一ランダムプライミングRPE変法および二重ランダムプライミングRPE変法のWTA性能を示す。単一ランダムプライミングステップは非常に迅速であるが、2つのランダムプライミングステップの方がより高い感度を有するようであった。ノナマーの方が、より多くの遺伝子に対してより良好な感度を有するようであった。本明細書で提供される残りの実験では、1つのランダムプライミングステップを使用した。

30

40

【0314】

50

【表 16】

表16. 1回または2回のランダムプライミングステップおよびヘキサマーまたはノナマーを使用したRPE WTA性能

基準	ヘキサマー、2回のランダムプライミングステップ	ヘキサマー、1回のランダムプライミングステップ	ノナマー、2回のランダムプライミングステップ	ノナマー、1回のランダムプライミングステップ
検出された総遺伝子	17327	17380	17984	17474
1試料当たりのリボソームリード%	10.26%	11.48%	10.16%	11.30%
1試料当たりのミトコンドリアリード%	14.15%	15.12	14.45%	16.53%
作業工程終了後の1細胞当たり少なくとも8000リードの1細胞当たりの遺伝子中央値	2579	2069	2637	1897
1細胞当たりの遺伝子中央値、非リボソーム、非ミトコンドリア、非偽遺伝子	2458	1951	2503	1779
ハウスキーピング遺伝子陽性の総細胞%	—	—	—	—
CD4陽性のT細胞%	5.4%	6.3%	3.0%	3.9%
CD8A陽性のT細胞%	—	—	—	—
TRBC2陽性のT細胞%	81.3%	75.3%	86.7%	78.3%
TRAC陽性のT細胞%	40.1%	28.9%	42.1%	28.1%
CD3D陽性のT細胞%	97.6%	83.7%	97.5%	78.3%
TBX21陽性のT細胞%	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%
IGLC3陽性のB細胞%	18.6%	16.3%	55.9%	41.9%

【0315】

RPEクリーンアップ

本明細書で提供されるWTAを実施するためのRPEに基づく方法のための最適なSPRIクリーンアップ比を調査した。

図20A～20Fは、RPEに基づくWTA法の性能に対するSPRIクリーンアップ比の効果を示す非限定的な例示的データである。図20A～20Bは、1.6×（図20A）および1.0×（図20B）SPRIクリーンアップ比を比較する非限定的な例示的バイオアナライザープロットである。加えて、リード／細胞（図20C）、遺伝子中央値／細胞（図20D）、分子中央値／細胞（図20E）、ならびにリボソーム分子%および

ミトコンドリア分子% (図20F) を、 $1.6\times$ および $1.0\times$ のSPRIクリーンアップ比で比較した。こうしたデータにより、 $1.6\times$ RPEクリーンアップ比は、 $1.0\times$ クリーンアップ比よりも高い収量をもたらし、 $1.6\times$ クリーンアップ比は、より少ないリード／細胞を有するにも関わらず、 $1.0\times$ クリーンアップ比よりも多くの分子および遺伝子／細胞の検出をもたらすことが実証される。

【0316】

ランダムプライマー濃度およびRPE条件

本明細書で提供されるWTAを実施するためのRPEに基づく方法のための様々なランダムプライマー濃度およびRPE条件を調査した。

図21A～21Gは、RPEに基づくWTA法に対する様々なランダムプライマー濃度およびRPE条件の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット (RPE PCR、SPRIクリーンアップ後) である。具体的には、実験では以下の条件を比較した: ID019-1 (図21A、 $10\mu\text{M}$ ランダムプライマー; コールドビーズの添加無し、 6.186 nM)、ID019-2 (図21B、 $10\mu\text{M}$ ランダムプライマー、コールドビーズを添加、 2.138 nM)、ID019-3 (図21C、 $5\mu\text{M}$ ランダムプライマー、コールドビーズを添加、 0.538 nM)、ID019-4 (図21D、 $1\mu\text{M}$ ランダムプライマー、コールドビーズを添加、 0.314 nM)、ID019-5 (図21E、 $0.5\mu\text{M}$ ランダムプライマー、コールドビーズを添加、 0.438 nM)、ID019-6 (図21F、 $1\mu\text{M}$ ランダムプライマー、コールドビーズを添加、 0.652 nM)、およびID019-7 (図21G、 $0.5\mu\text{M}$ ランダムプライマー、コールドビーズを添加、 0.242 nM)。図21Aおよび21Bを比較すると、コールドビーズの添加は、RPE PCRの所望の産物の収量を減少させることが観察される。ID017 (下記に記載) は、反対のPCR収量結果を有したが、これはPCR条件が異なるためであった可能性があり、ID019でのRPEクリーンアップ条件を片側クリーンアップに改変した。

【0317】

図22A～22Fは、RPE WTAに対する、コールドビーズの添加および様々なビーズ密度の効果を示す非限定的な例示的配列決定データである。図22A～22C (ID019) に示されているように、コールドビーズの添加は、RPE WTAアッセイの感度を減少させた。1細胞当たりの遺伝子数の中央値 (図22A、非リボソーム、非ミトコンドリア、非偽遺伝子)、平均リード／細胞 (図22B)、および平均分子／細胞 (図22C) をアッセイした。さらに、図22D～22F (ID017) に示されているように、RPEでのビーズ密度がより高いと、RPE WTAアッセイの感度が減少する。分子中央値／細胞 (図22D)、リード／細胞 (図22E)、および遺伝子中央値／細胞 (図22F) をアッセイした。

【0318】

図23A～23Bは、RPE WTAに対する、ランダムプライマー濃度およびコールドビーズの効果を示す非限定的な例示的配列決定データである。図23Aは、1細胞当たりの遺伝子中央値 (ID017、コールドビーズ無し) を示し、図23Bは、コールドビーズを用いた1細胞当たりの遺伝子数中央値 (非リボソーム、非ミトコンドリア、非偽遺伝子) を示す (ID019)。ID017単一細胞実験およびID019単一細胞実験では両方とも、 $10\mu\text{M}$ のランダムプライマー濃度が、一貫して最も高い感度をもたらした。表17は、既存のWTA法のWTA性能評価項目と、様々なランダムプライマー濃度およびビーズ密度を使用したRPE WTA法との比較を提供する。

【0319】

10

20

30

40

50

【表 17】

表17. 様々なランダムプライマー濃度およびビーズ密度を使用したRPE WTA性能

基準	既存のWTAプロトコール平均評価項目	WTA RPE評価項目(ランダムプライマーおよびビーズ濃度)				
		10uMプライマー(600ビーズ/u l)	10uMプライマー(150ビーズ/u l)	5uMプライマー(150ビーズ/u l)	1uMプライマー(150ビーズ/u l)	0.5uMプライマー(150ビーズ/u l)
検出された総遺伝子	14,757~19,919(平均16,485)	16,766	19,109	18,584	16,521	15,454
1試料当たりのリボソームリード%	27.38~44.79%(平均37%)	17.95	18.76	17.89	15.3	13.71
1試料当たりのミトコンドリアリード%	2.24~4.15%(平均3%)	22.26	19.62	20.93	23.49	24.76
ハウスキーパー遺伝子陽性の総細胞%	65.06~81.76%(平均75%)	57.84	66.88	59.76	36.83	30.61
CD4陽性のT細胞%	1.9~10%(平均6%)	23.1	27	20.5	12.6	7.7
CD8A陽性のT細胞%	7.5~19.7%(平均14%)	15.1	18.5	14.6	8.7	4.4
TRBC2陽性のT細胞%	44.5~75.4%(平均59%)	67.6	72.8	67.7	46.8	43.4
TRAC陽性のT細胞%	51.1~85.9%(平均71%)	63.5	67.9	65.9	51.9	36
CD3D陽性のT細胞%	65.7~84.5%(平均75%)	27.8	38.7	31.1	15.8	8.2
TBX21陽性のT細胞%	1.5~5.9%(平均4%)	3.8	5.8	3	2.9	2.5
IGLC3陽性のB細胞%	26.1~43.9%(平均35%)	5.5	11.9	8.8	3.9	5.3

【0320】

図24A~24Eは、RPE WTA法に対する様々な細胞数の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット(RPE PCR)である。具体的には、実験では以下の条件を比較した：ID018-1(図24A、7970細胞、14サイクル、2.62 ng/uL)、ID018-2(図24B、872細胞、18サイクル、1.14 ng/uL)、ID018-3(図24C、75細胞、18サイクル、0.774 ng/uL)、ID018-4(図24D、872細胞を部分サンプリングし、コールドビーズを添加、18サイクル、0.892 ng/uL)、およびID018-5(図24E、75細胞を部分サンプリングし、コールドビーズを添加、18サイクル、0.572 ng/uL)

）。矢印は、ブロードビーズ（beads）を示す。これらはおそらくは過剰増幅である。図25A～25Eは、RPE WTA法に対する様々な細胞数の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロット（インデックスPCR）である。具体的には、実験では以下の条件を比較した：ID018-1（図25A、7970細胞、6.36 ng/uL）、ID018-2（図25B、872細胞、1.14 ng/uL）、ID018-3（図25C、75細胞、0.774 ng/uL）、ID018-4（図25D、872細胞を部分サンプリングし、コールドビーズを添加、0.892 ng/uL）、およびID018-5（図25E、75細胞を部分サンプリングし、コールドビーズを添加、0.572 ng/uL）。一部の場合では、およそ100細胞の細胞ライブラリーは良好な品質を有しないことが見出された。表18は、上記で言及した条件のWTA性能評価項目を示す。細胞対ビーズ比が低いと、ライブラリー品質が低下する傾向があることが見出された。ビーズ濃度がより高いと、アッセイの感度が低減される場合があり、ユーザは、RPE容積を増加させることを望む場合がある。細胞：ビーズ比が低いと、ライブラリー品質が悪化する傾向がある。10 uMのランダムプライマー濃度が、最も高い感度を有することが見出された。一部の場合では、さらにより高い濃度が望ましい場合がある。

【0321】

【表18】

表18. 様々な細胞数を使用したRPE WTA性能

	カートリッジに捕捉された細胞数	推定細胞数	リード数/細胞	細胞標識に帰属された細胞リード%	トランスクリプトームに一義的にアラインされた細胞リード%	モル中央値/細胞	遺伝子中央値/細胞
ID018-1	7,970	6597	10657	74.22	39.74	965	531
ID018-2	872	789	5917	28.2	9.26	1114	572
ID018-3	75	72	2947.71	16.75	2	896	441.5
ID018-4	872	640	11820	42.55	18.74	819.5	450.5
ID018-5	75	57	4622.32	18.14	2.5	487	297

【0322】

図26A～26Fは、様々な細胞数を用いた本開示のランダムプライミングおよび伸長に基づくWTA分析の例示的な性能を示すt分布型確率的近傍埋め込み（t-SNE）投影図を示す。図26BはID018-1（10,000細胞）を示し、図26CはID018-2（1,000細胞）を示し、図26DはID018-3（100細胞）を示し、図26EはID018-4（部分サンプリングし、コールドビーズを添加した1,000細胞）を示し、図26Fは、ID018-5（部分サンプリングし、コールドビーズを添加した100細胞）を示し、図26Aは、上述の条件すべてを重ね合わせたものを示す。バッチ効果はほとんど観察されなかった。

【0323】

図27A～27Dは、RPE WTA法に対する連続RPE変性およびRPE反応容積の効果を示す非限定的な例示的バイオアナライザープロットである。図27Aおよび27Cに示されている単一変性プロトコール（RPE反応ミックス中で95℃の変性を行うことを含む）を、図27Bおよび27Dに示されている連続変性プロトコール（ビーズ再懸濁緩衝液中で95℃での2回目の変性を行うことをさらに含む）と比較した。さらに、200 uLのRPE容積の使用（図27A～27B）と1 mLのRPE容積の使用（図27C～27D）とを比較した。実験は以下の条件下で実施した：図27A（12971細胞；13サイクル；4.64 ng/uL）；図27B（12971細胞；17サイクル；68.07 ng/uL）、図27C（12522細胞；13サイクル；5.44 ng/uL

）；および図27D（12522細胞；17サイクル；49.30 ng/uL）。第2の変性では、1 mLのRPE容積および200 uLのRPE容積の両方で、およそ同量のPCR物質をもたらすことが見出された。

【0324】

PCR増幅の数

図28A～28Cは、2PCRライブラリー生成プロトコル（図28A～28B）および1PCRライブラリー生成プロトコル（図28C）を用いた本開示のランダムプライミングおよび伸長に基づくWTA分析の例示的な性能を示す例示的なバイオアナライザープロットである。図28Aは、2PCRライブラリー生成プロトコルのPCR1（例えば、RPE PCR）を示し、図28Bは、2PCRライブラリー生成プロトコルのPCR2（例えば、インデックスPCR）を示し、図28Cは、単一PCRステップの結果を示す。2PCRライブラリー生成プロトコル（RPE PCR）の第1のPCRには、リード1 & 2プライマーを使用した。1PCRライブラリー生成プロトコルの第1のPCRには、インデックスP5/P7プライマーを使用した。インデックスプライマーの使用は、16サイクル後に<1 ng/uLだった、強度が高い165 bpピーク（30 uLで溶出）をもたらした。PCR1におけるインデックスプライマーの使用（1PCRライブラリー生成プロトコル）は、量的に大きな165 bpピークに結び付いた（図28Cの矢印で示されている）。このピークは、リード1/リード2試料（図28A）ではそれほど顕著ではなかった（71 bpとして現れた）。したがって、PCR1にてR1/R2プライマーを使用すると、PCR1で生成される165 bpピークがより少なくなり、産物がわずかにより少なくなるが、ユーザは、第2のPCRにおいてより多くの収量を得ることができる。したがって、2PCRライブラリー生成プロトコルでは、165 bp夾雑物ピークがより少なく、総ライブラリー収量はより多くなった。したがって、2回のPCRに基づくRPE WTA法は、よりクリーンなライブラリー生成を可能にすることができる。

【0325】

（実施例2）

タンパク質結合性試薬に付随させるためのオリゴヌクレオチド

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

95merのオリゴヌクレオチドの設計

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

【0326】

1. 配列の生成および排除

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

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

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

ステップ1c. 生成および付加した配列で、40%～50%の範囲のGC含量を有さない配列を除去する。

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

残った候補オリゴヌクレオチド配列の数は、423であった。

【0327】

2. プライマー設計

残った 423 の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。

2.1 N1プライマー：N1プライマーとして、ユニバーサルN1配列：5' - G T T G T C A A G A T G C T A C C G T T C A G A G - 3' (L S R R配列；配列番号4) を使用する。

2.2 N2プライマー（特定試料インデックスオリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；例えば、図29B～29DのN2プライマー）：

2.2a. N1配列の下流で開始しない候補N2プライマーを除去する。

2.2b. 候補オリゴヌクレオチド配列の最後の35bpにおいて重複する候補N2プライマーを除去する。

2.2c. オリゴヌクレオチドを使用して試験される細胞の種のトランスクリプトーム（例えば、ヒトトランスクリプトームまたはマウストランスクリプトーム）とアラインするプライマー候補を除去する。

2.2d. プライマー-プライマー相互作用を最小限にするかまたは回避するために、デフォルト対照としてILR2配列（A C A C G A C G C T C T T C C G A T C T；配列番号5）を使用する。

423の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、390候補に対するN2プライマーを設計した。

【0328】

3. フィルタリング

残った390の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下のプロセスを使用した。

3a. すべてのバーコードについてポリ（A）テイルを同じ長さに維持するために、Aで終わるランダム配列を有する（すなわち、ポリ（A）配列の有効長さが25bpを超える）あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。

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

図29Aは、上記の方法を使用して生成した非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。

200merのオリゴヌクレオチドの設計

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

【0329】

1. 配列の生成および排除

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

1a. 所望の長さ（128bp）を有するいくつかの候補配列（100000配列）をランダムに生成する。

1b. 生成した配列の5'末端に転写調節L S R R配列と、非ヒト、非マウスの追加アンカー配列を、および生成した配列の3'末端にポリ（A）配列（25bp）を付加する。

1c. 生成および付加した配列で、40%～50%の範囲のGC含量を有さない配列を除去する。

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

1e. 最も低いヘアピンスコアを有する1000の残った候補オリゴヌクレオチド配列を選択する。

【0330】

2. プライマー設計

最も低いヘアピンスコアを有する400の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを

10

20

30

40

50

設計するために、以下の方法を使用した。

2. 1 N1プライマー：N1プライマーとして、ユニバーサルN1配列：5'-GT TGTCAAGATGCTACCGTTTCAGAG-3'（LSRR配列；配列番号4）を使用する。

2. 2 N2プライマー（特定の試料インデックスオリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；例えば、図29Bおよび29CのN2プライマー）：

2. 2 a. N1配列の23nt下流で開始しない候補N2プライマーを除去する（アンカー配列は、すべての候補オリゴヌクレオチド配列についてユニバーサルであった）。

2. 2 b. 標的配列の最後の100bpにおいて重複する候補N2プライマーを除去する。得られたプライマー候補は、標的配列の48番目のヌクレオチドと100番目のヌクレオチドとの間に存在し得る。

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

2. 2 d. プライマー-プライマー相互作用を最小限にするかまたは回避するために、デフォルト対照としてILR2配列 5'-ACACGACGCTCTTCCGATCT-3'（配列番号5）を使用する。

2. 2 e. 標的配列の最後の100bpにおいて重複するN2プライマー候補を除去する。

400の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、392候補に対するN2プライマーを設計した。

【0331】

3. フィルタリング

残った392の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下を使用した。

3 a. すべてのバーコードについてポリ（A）テイルを同じ長さに維持するために、Aで終わるランダム配列を有する（すなわち、ポリ（A）配列の有効長さが25bpを超える）あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。

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

【0332】

図29Bは、上記の方法を使用して生成した非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。図29Bに示されるネステッドN2プライマーは、標的化増幅のための抗体または試料特異的配列に結合し得る。図29Cは、標的化増幅のためのアンカー配列に対応するネステッドユニバーサルN2プライマーを有する同一の非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。図29Dは、ワンステップ標的化増幅のためのN2プライマーを有する同一の非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。

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

【0333】

（実施例3）

オリゴヌクレオチドが付随している抗体のワークフロー

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

対象の凍結細胞（例えば、凍結末梢血単核細胞（PBMC））を解凍する。解凍した細胞を一定温度で一定期間（例えば、室温で20分間）オリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体（例えば、0.06 μg/100 μlの抗CD4抗体（オリゴヌクレオチドコンジュ

10

20

30

40

50

ゲート抗体ストックの1:333希釈液))で染色する。オリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体は、1、2、または3種のオリゴヌクレオチド(「抗体オリゴヌクレオチド」)にコンジュゲートされている。抗体オリゴヌクレオチドの配列を図30に示す。細胞を洗浄して、未結合のオリゴヌクレオチドコンジュゲート抗体を除去する。目的の細胞(例えば、生細胞)を得るために、フローサイトメトリーによる選別を目的として、細胞をCalcein AM(BD(Franklin Lake, New Jersey))およびDra q 7(商標)(Abcam(Cambridge, United Kingdom))で染色してもよい。細胞を洗浄して、過剰なCalcein AMおよびDra q 7(商標)を除去してもよい。フローサイトメトリーを使用して、Calcein AM(生細胞)で染色され、Dra q 7(商標)(死滅または透過処理していない細胞)で染色されていない単一細胞をBD Rhapsody(商標)カートリッジ中に選別する。

10

【0334】

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

20

【0335】

N1プライマーを使用して目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルを決定する、および抗体オリゴヌクレオチドN1プライマーを使用して標的のタンパク質発現プロファイルを決定するために、プライマーを使用して、逆転写産物および複製産物をPCR増幅する。例えば、血液パネルN1プライマーを使用して488の血液パネル遺伝子のmRNA発現プロファイルを決定する、および抗体オリゴヌクレオチドN1プライマーを使用してCD4タンパク質の発現プロファイルを決定するために、プライマーを使用して、逆転写産物および複製産物を60度のアニーリング温度で15サイクルPCR増幅することができる(「PCR 1」)。過剰なバーコードは、Ampureクリーンアップで除去されてもよい。PCR 1からの産物を2つのアリコートに分割してもよく、1つのアリコートは、目的の遺伝子のためのN2プライマーを使用して目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルを決定するためのものであり、1つのアリコートは、抗体オリゴヌクレオチドN2プライマーを使用して目的の標的のタンパク質発現プロファイルを決定するためのものである(「PCR 2」)。両方のアリコートをPCR増幅する(例えば、60度のアニーリング温度で15サイクル)。細胞中の標的のタンパク質発現を図30に示される抗体オリゴヌクレオチドに基づいて決定する(「PCR 2」)。配列決定データを得て、配列決定アダプターの付加(「PCR 3」)、例えば、配列決定アダプターのライゲーション後に分析する。目的の遺伝子のmRNA発現プロファイルに基づいて細胞型を決定する。

30

40

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

【0336】

以前に記載された実施形態の少なくとも一部では、実施形態において使用される1つまたは複数のエレメントは、このような置き換えが技術的に実施不可能でなければ、別の実

50

施形態において交換可能に使用され得る。特許請求された主題の範囲から逸脱することなく、以上に記載の方法および構造に種々の他の省略、追加および変更を行い得ることが当業者によって認識されるであろう。このような変更および変化はすべて、添付の特許請求の範囲に規定される主題の範囲内に含まれることが意図される。

【0337】

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

【0338】

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

10

20

30

40

50

求の範囲、または図面に関わらず、用語の1つ、用語のいずれか、または用語の両方を含む可能性が企図されると理解されるべきであることが当業者によって理解されるであろう。例えば、「AまたはB」という語句は、「A」または「B」または「AおよびB」の可能性を含むことが理解されるであろう。

【0339】

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

【0340】

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

【0341】

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

10

20

30

40

50

【図面】
【図 1】

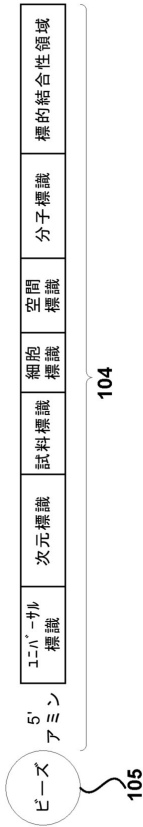


FIG. 1

【図 2】

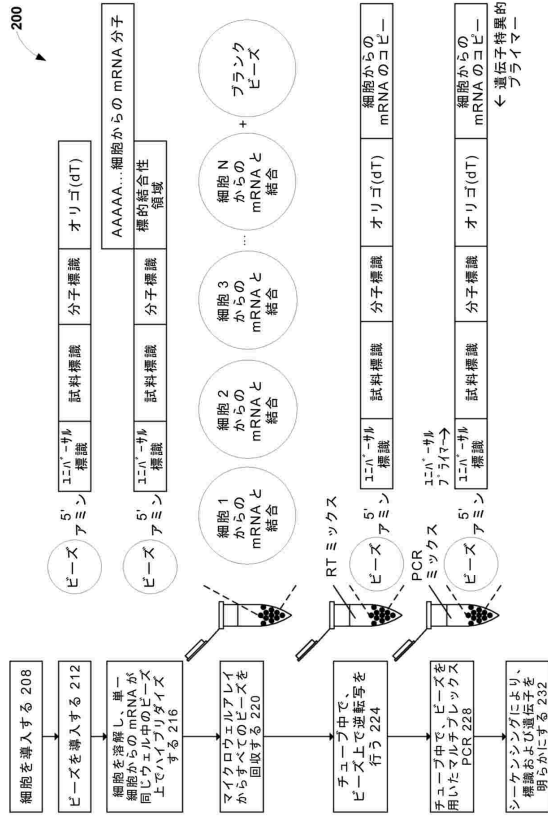


FIG. 2

【図 3】

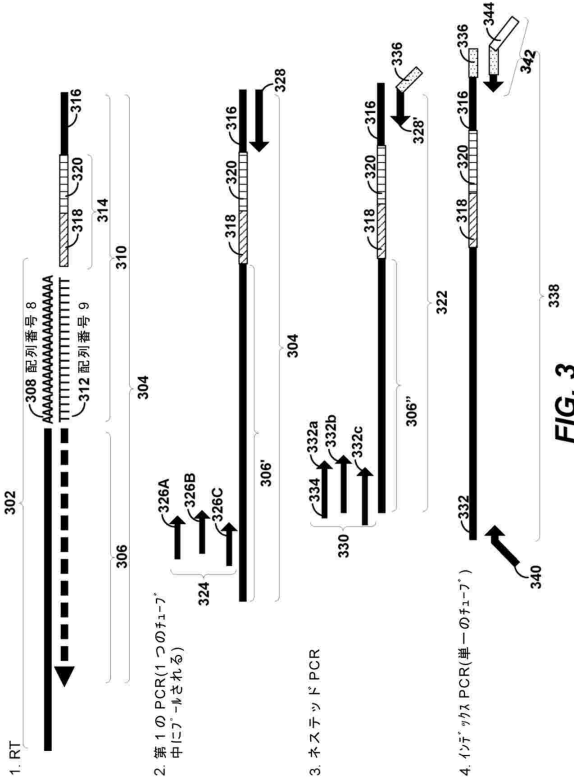


FIG. 3

【図 4】

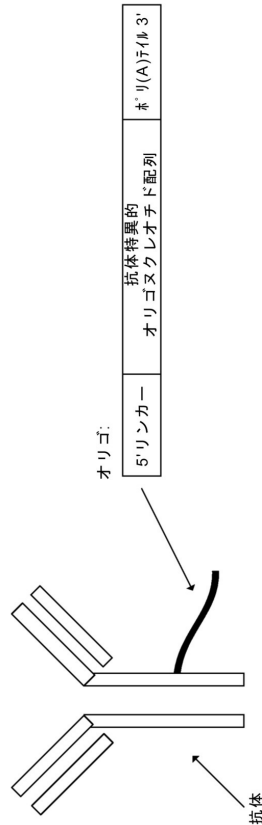


FIG. 4

【図 5】

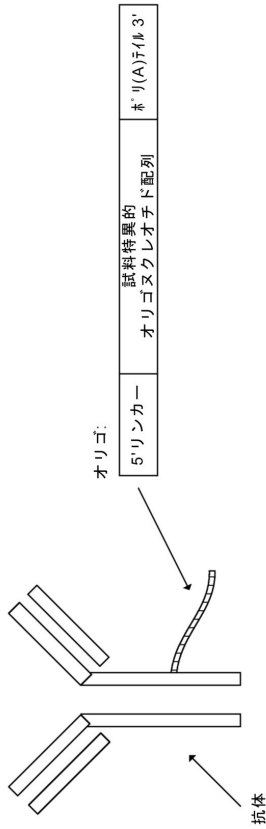


FIG. 5

【図 6】

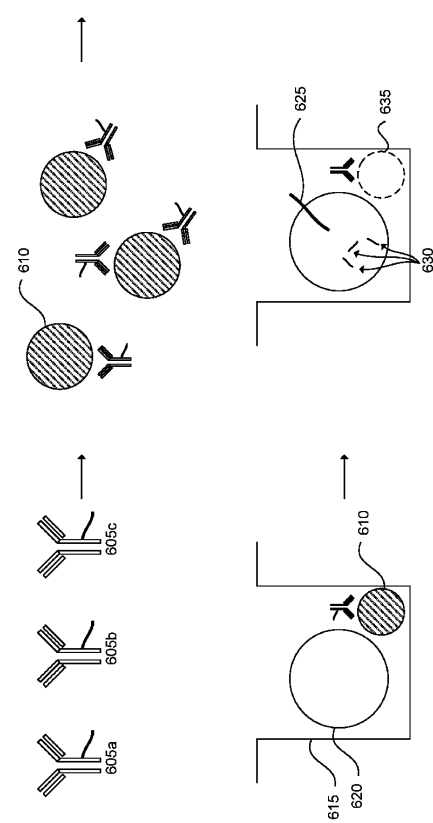


FIG. 6

【図 7】

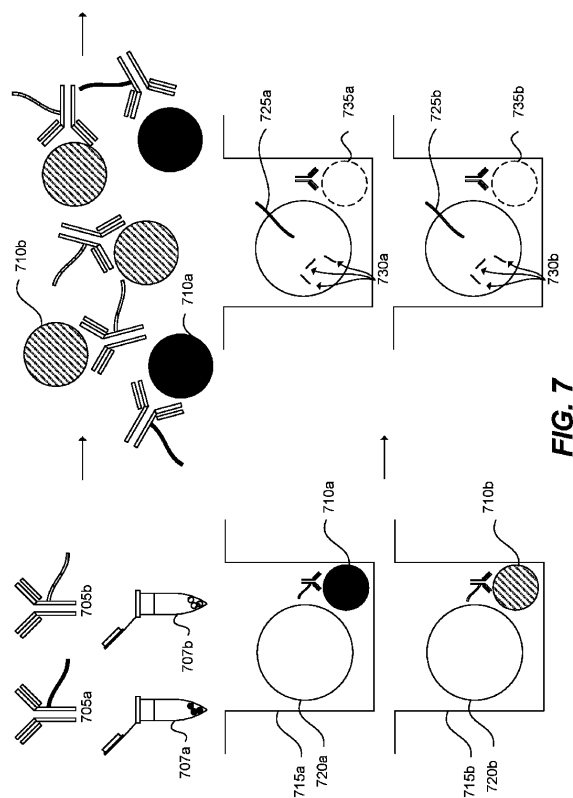


FIG. 7

【図 8】

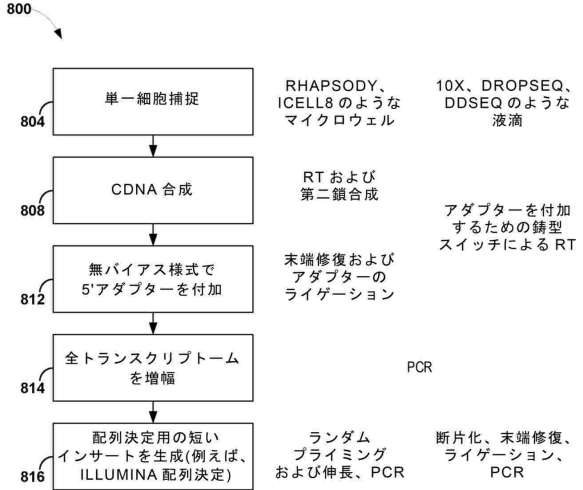


FIG. 8

10

20

30

40

50

【図 9】

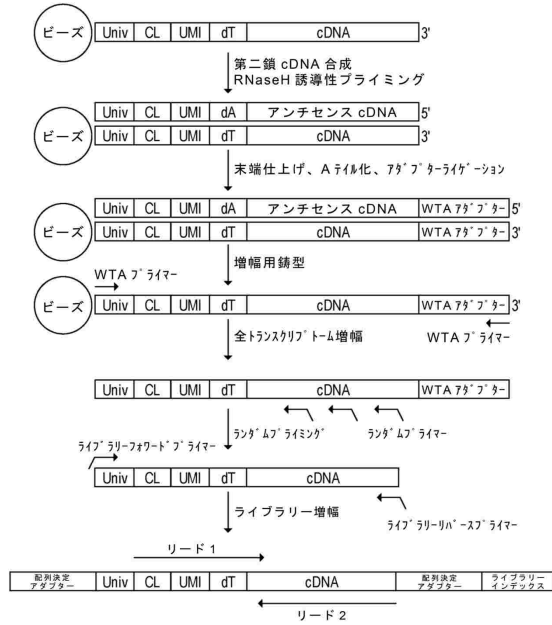


FIG. 9

【図 10】

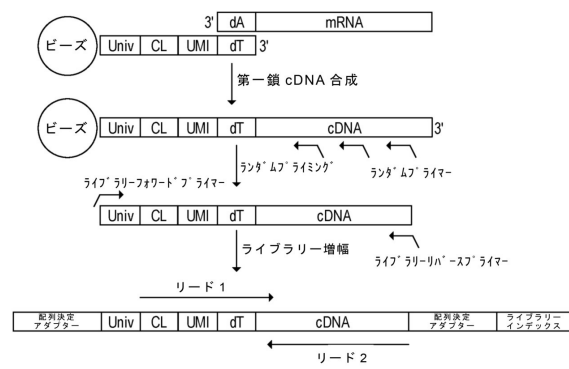


FIG. 10

【図 11 A】

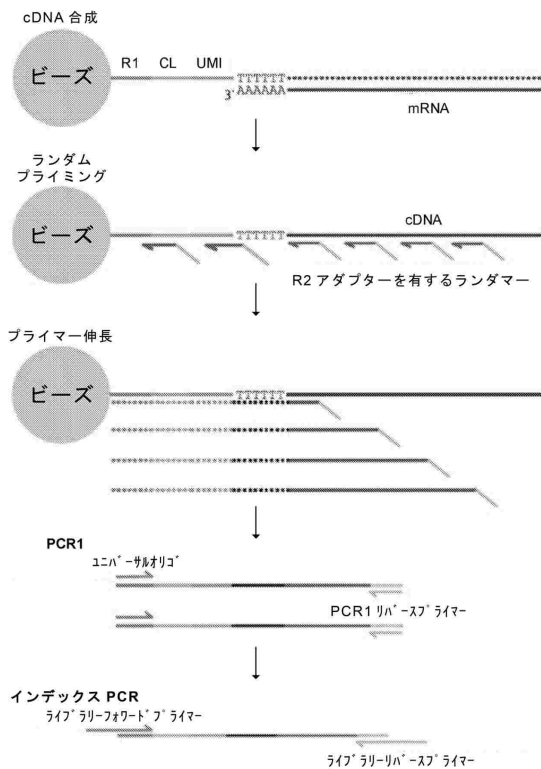


FIG. 11A

【図 11 B】

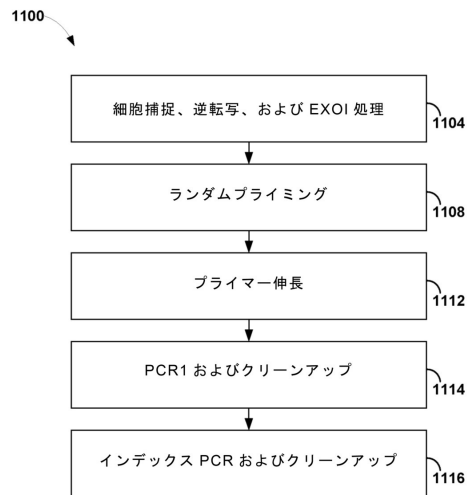


FIG. 11B

10

20

30

40

50

【図 1 2】

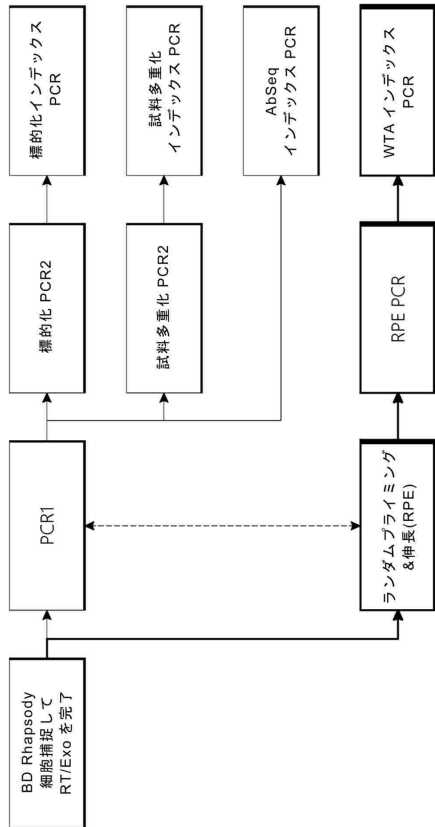


FIG. 12

【図 1 3 A】

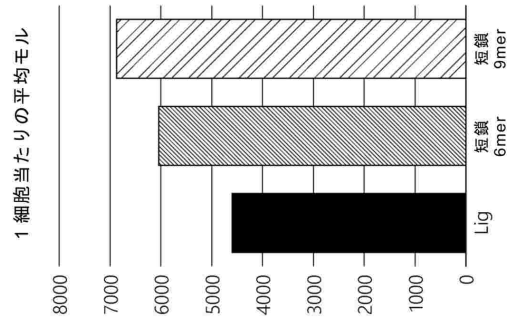


FIG. 13A

【図 1 3 B】

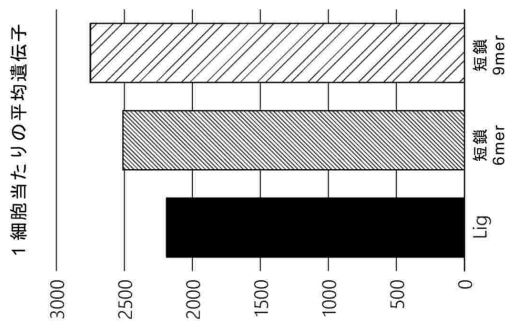


FIG. 13B

【図 1 4】

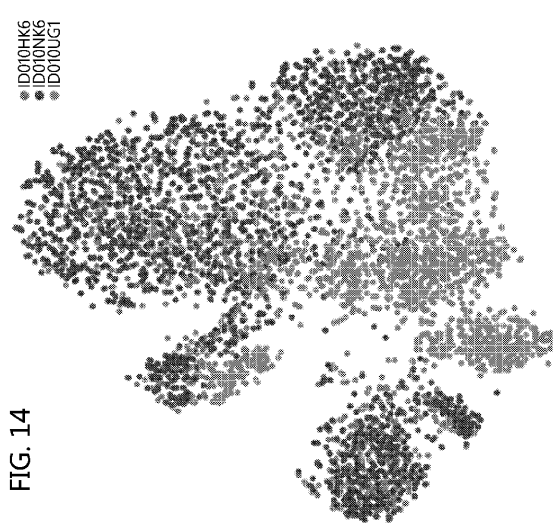


FIG. 14

10

20

30

40

50

【図 15 A】

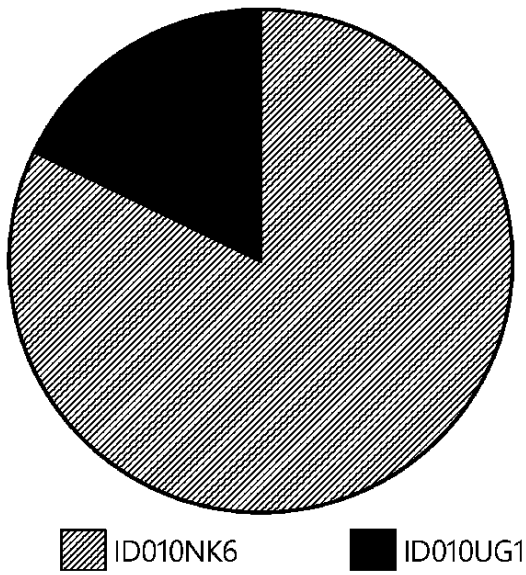


FIG. 15A

【図 15 B】

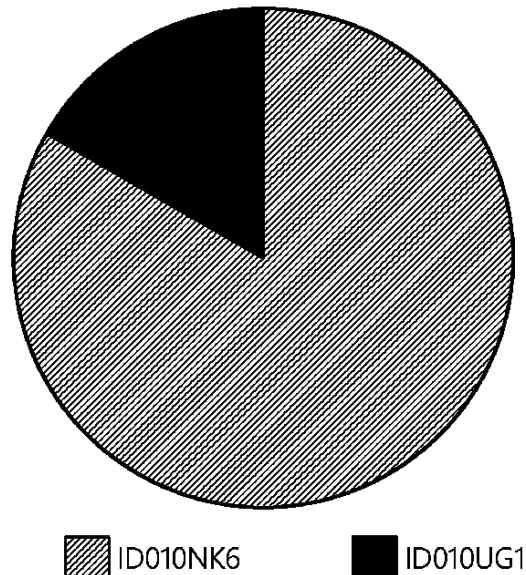


FIG. 15B

【図 16 A】

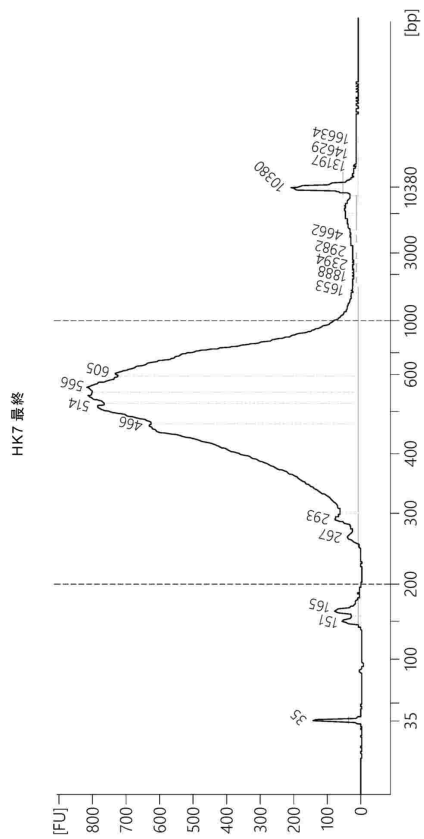


FIG. 16A

【図 16 B】

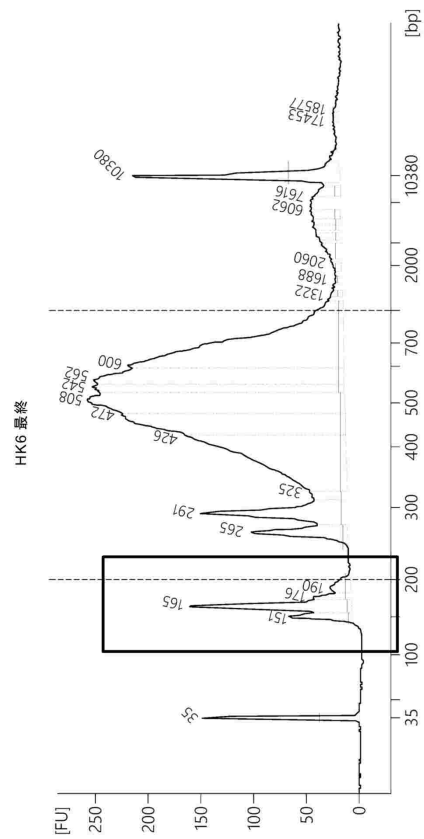


FIG. 16B

10

20

30

40

50

【図 16 C】

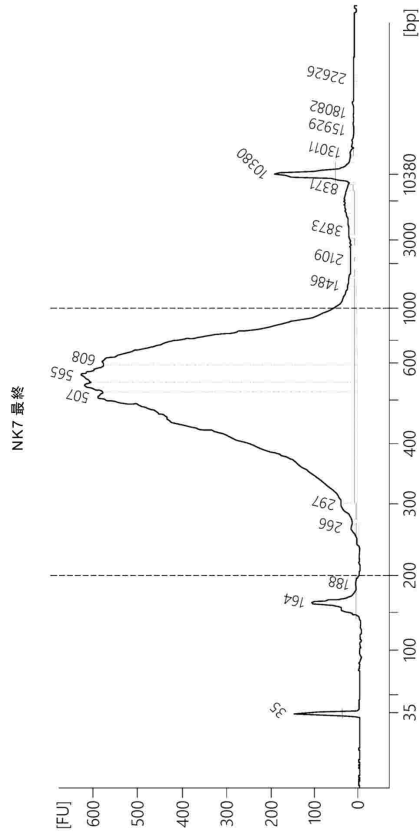


FIG. 16C

【図 16 D】

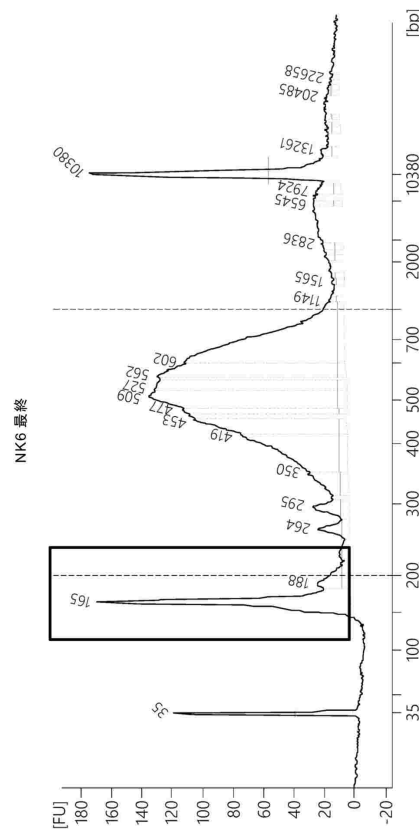


FIG. 16D

【図 17 A】

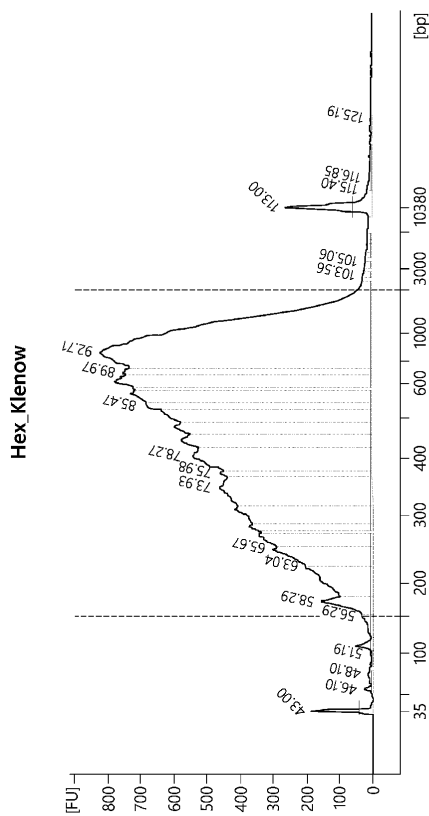


FIG. 17A

【図 17 B】

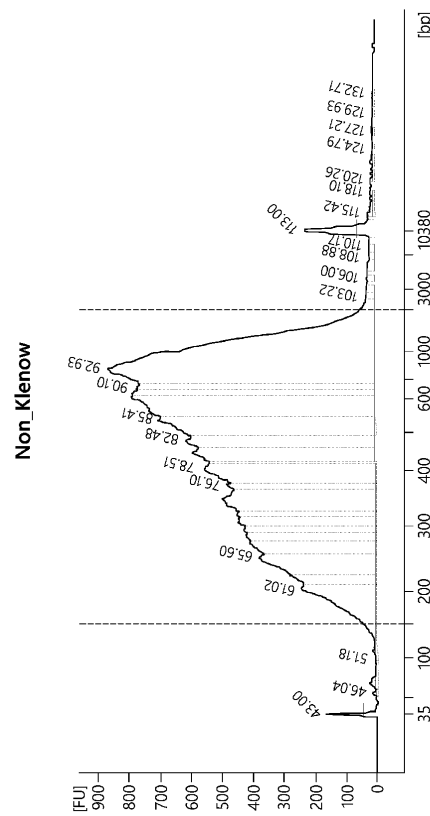


FIG. 17B

10

20

30

40

50

【図 17 C】

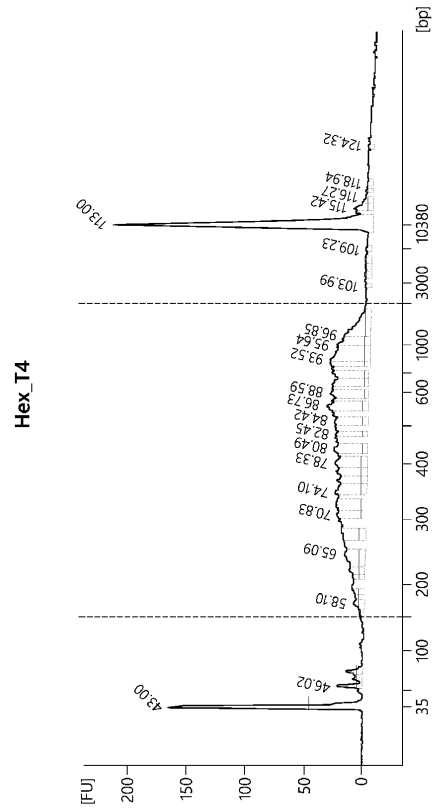


FIG. 17C

【図 17 D】

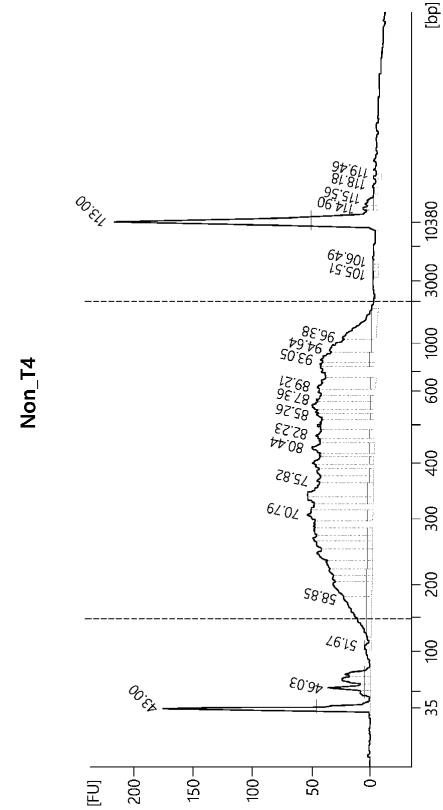


FIG. 17D

【図 18 A】

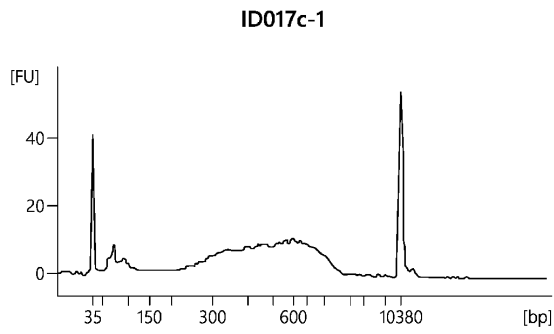


FIG. 18A

【図 18 B】

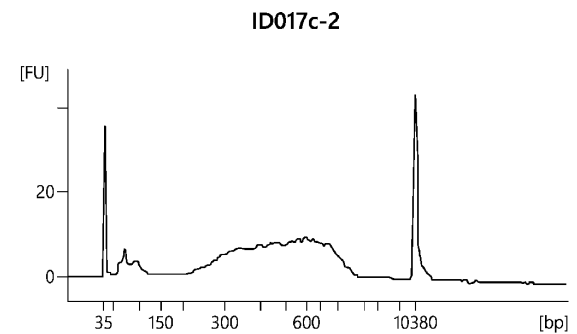


FIG. 18B

10

20

30

40

50

【図 18 C】

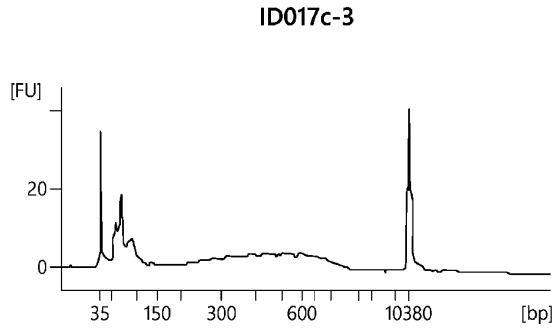


FIG. 18C

【図 18 D】

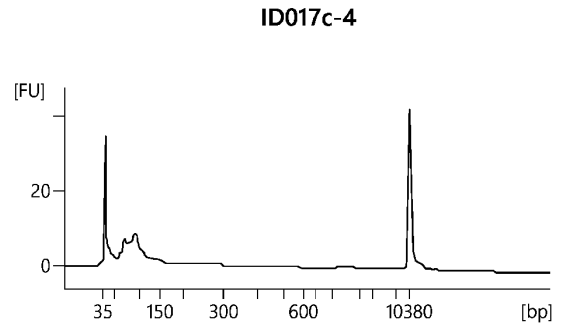


FIG. 18D

10

【図 19 A】

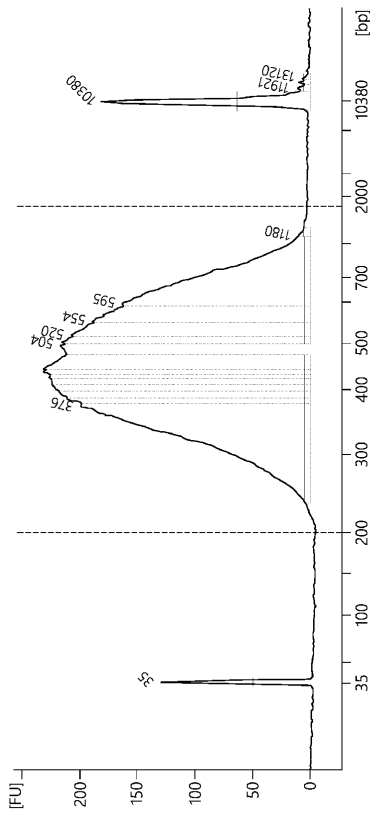


FIG. 19A

【図 19 B】

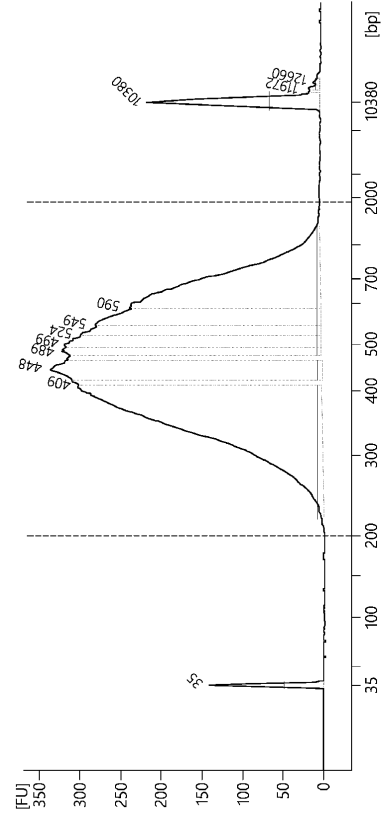


FIG. 19B

20

30

40

50

【図 19 C】

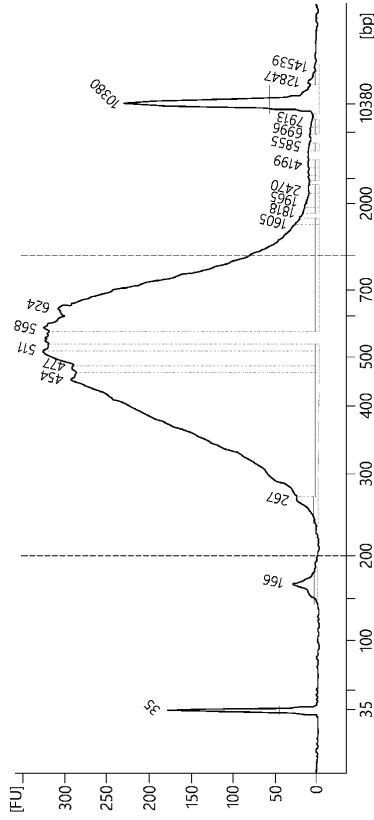


FIG. 19C

【図 19 D】

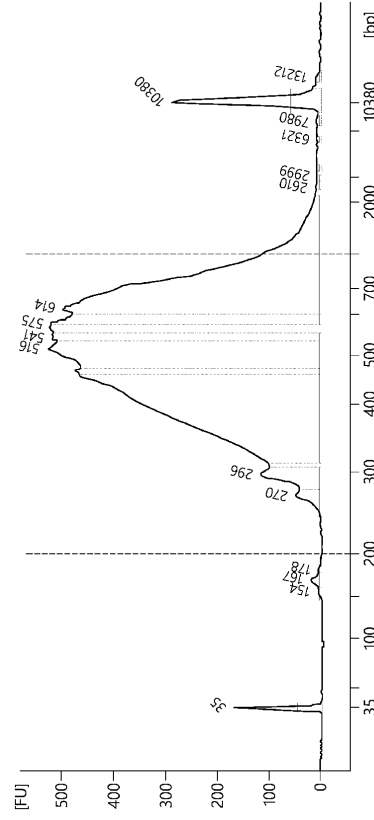


FIG. 19D

【図 20 A】

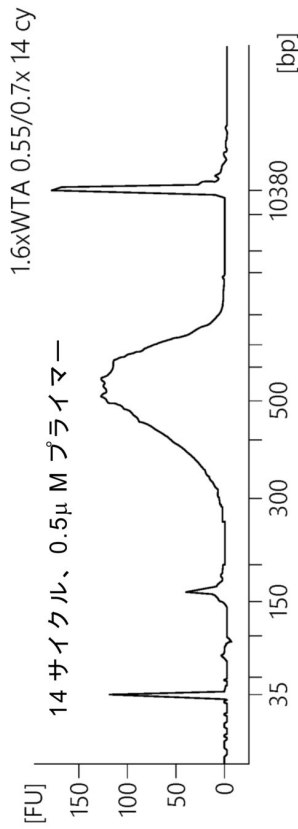


FIG. 20A

【図 20 B】

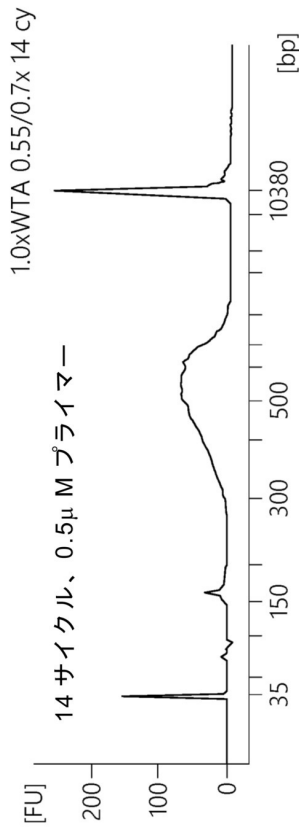


FIG. 20B

10

20

30

40

50

【図 20 C】

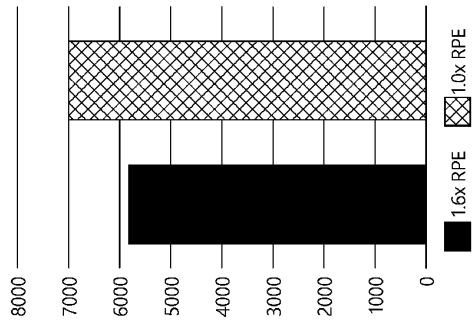


FIG. 20C

【図 20 D】

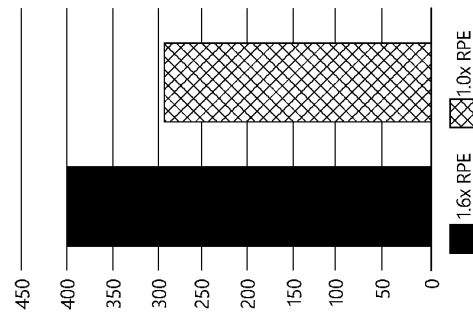


FIG. 20D

【図 20 E】

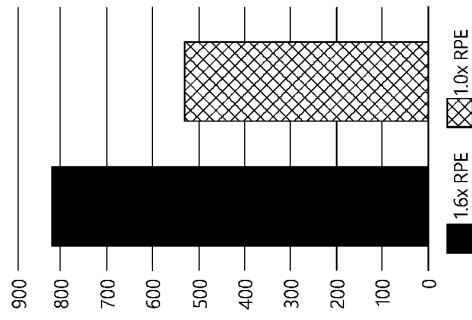


FIG. 20E

【図 20 F】

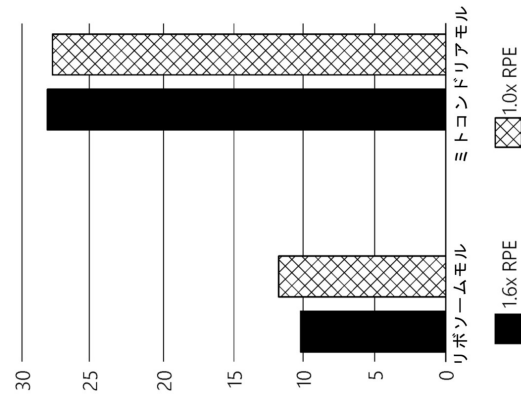


FIG. 20F

10

20

30

40

50

【図 2 1 A】

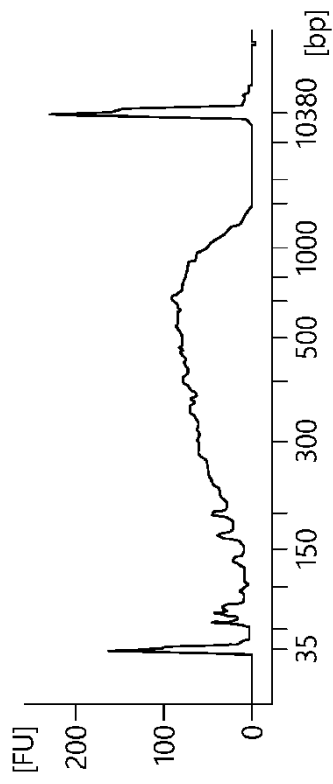


FIG. 21A

【図 2 1 B】

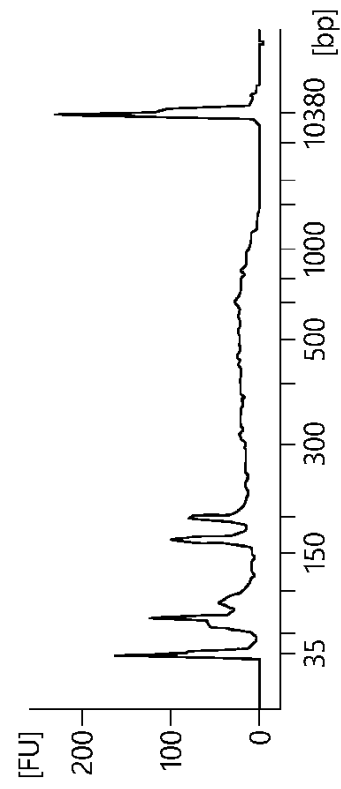


FIG. 21B

【図 2 1 C】

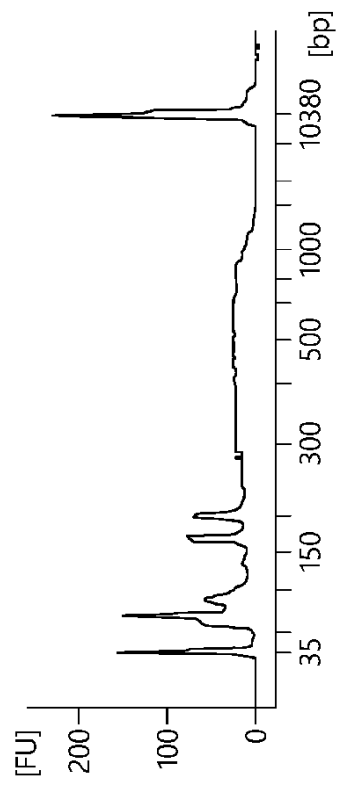


FIG. 21C

【図 2 1 D】

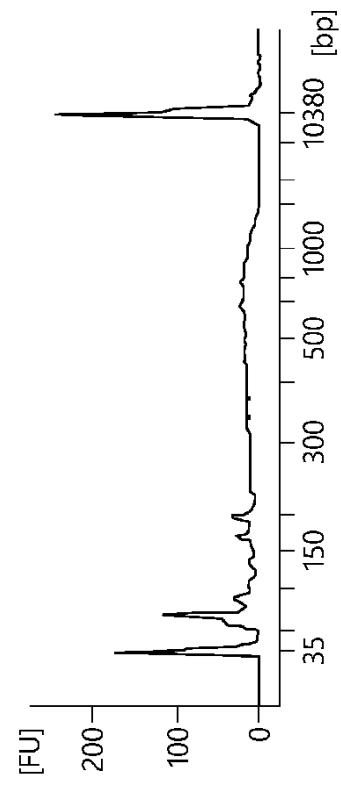


FIG. 21D

10

20

30

40

50

【図 2 1 E】

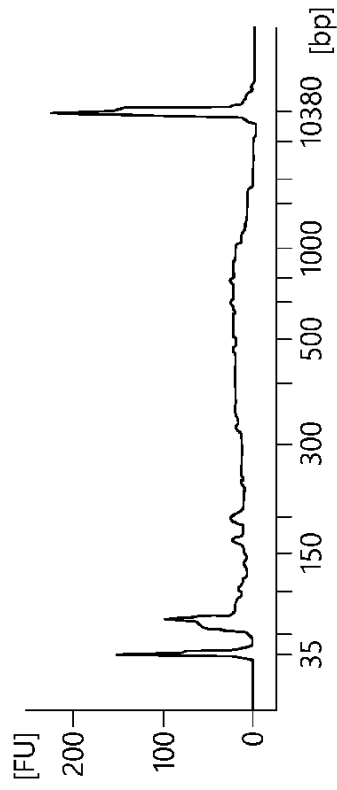


FIG. 21E

【図 2 1 F】

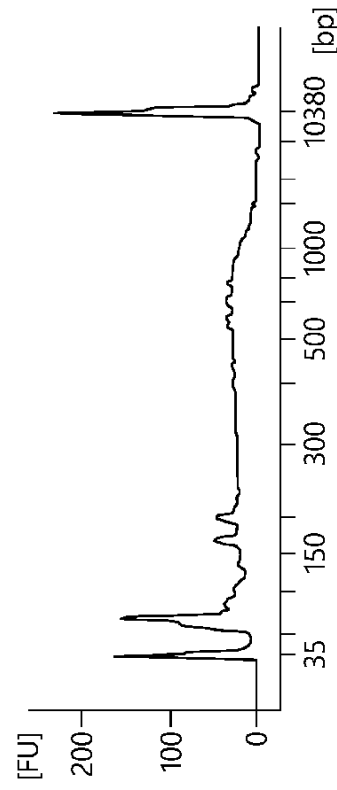


FIG. 21F

【図 2 1 G】

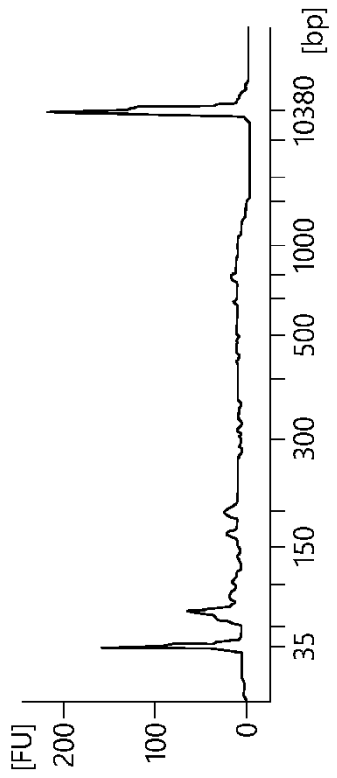


FIG. 21G

【図 2 2 A】

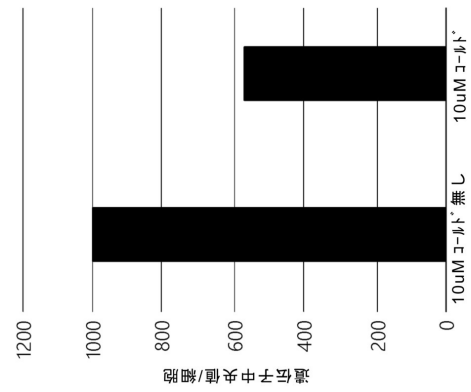


FIG. 22A

10

20

30

40

50

【図 2 2 B】

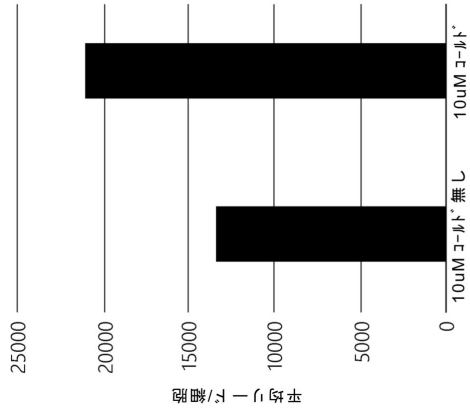


FIG. 22B

【図 2 2 C】

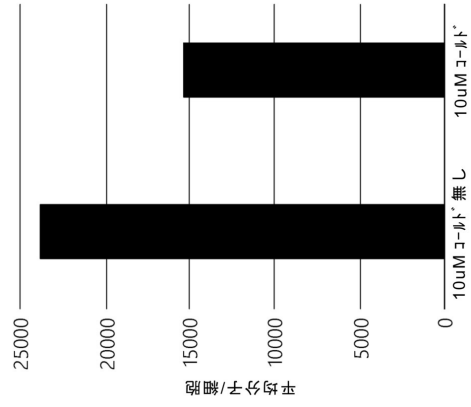


FIG. 22C

【図 2 2 D】

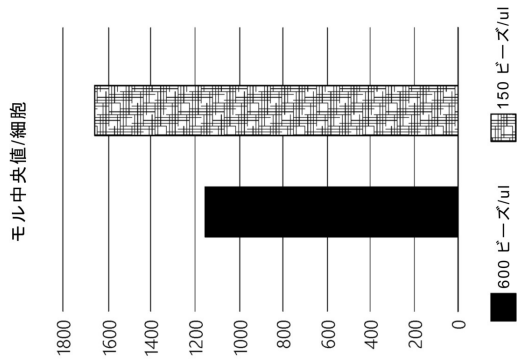


FIG. 22D

【図 2 2 E】

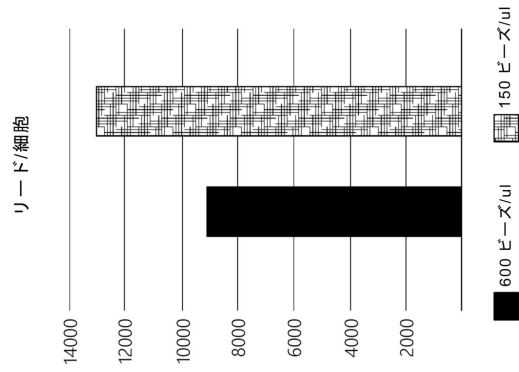


FIG. 22E

10

20

30

40

50

【図 2 2 F】

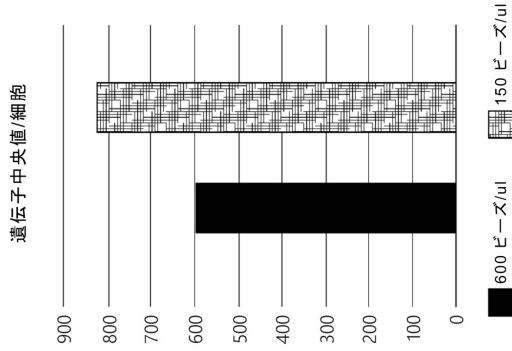


FIG. 22F

【図 2 3 A】

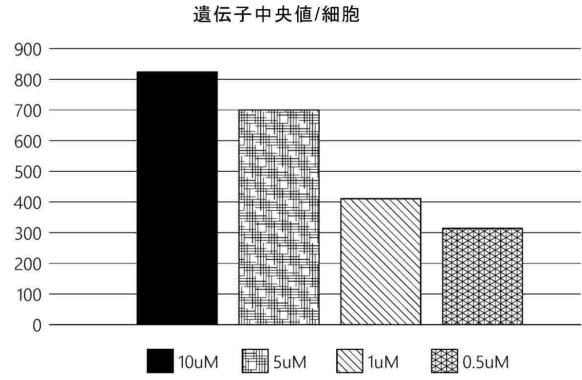


FIG. 23A

【図 2 3 B】

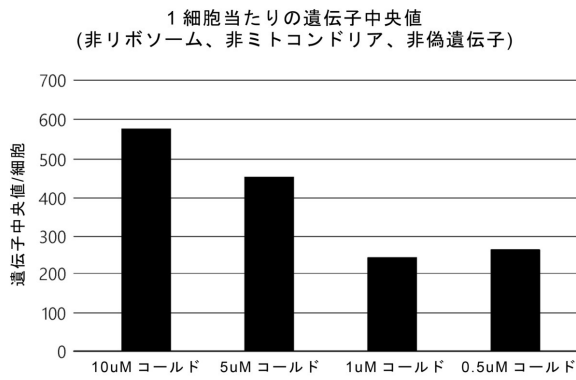


FIG. 23B

【図 2 4 A】

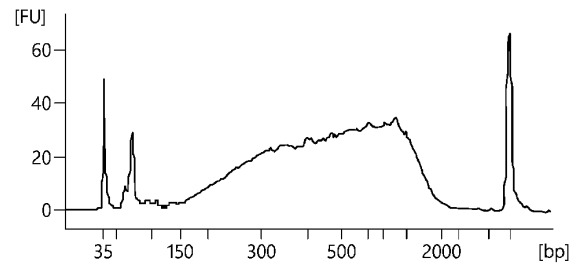


FIG. 24A

10

20

30

40

50

【図 2 4 B】

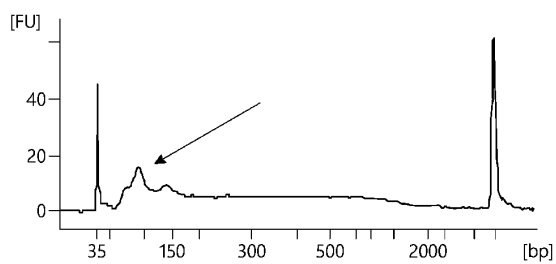


FIG. 24B

【図 2 4 C】

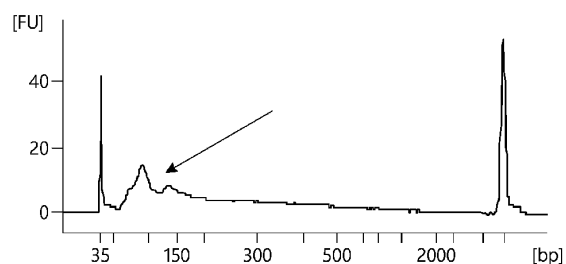


FIG. 24C

10

【図 2 4 D】

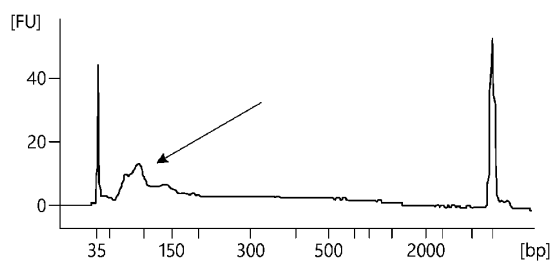


FIG. 24D

【図 2 4 E】

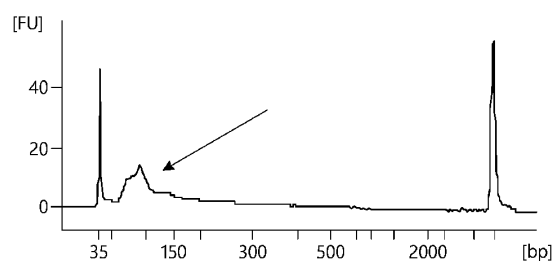


FIG. 24E

20

【図 2 5 A】

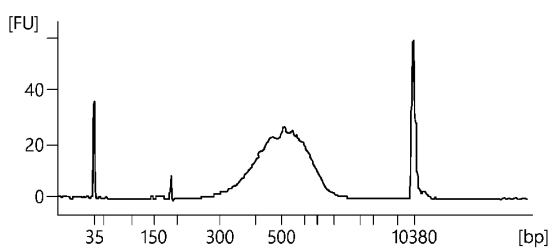


FIG. 25A

【図 2 5 B】

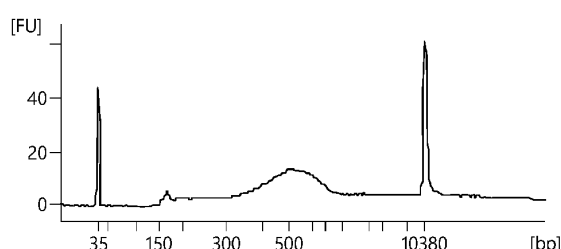


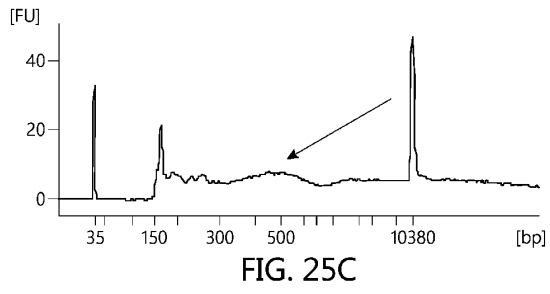
FIG. 25B

30

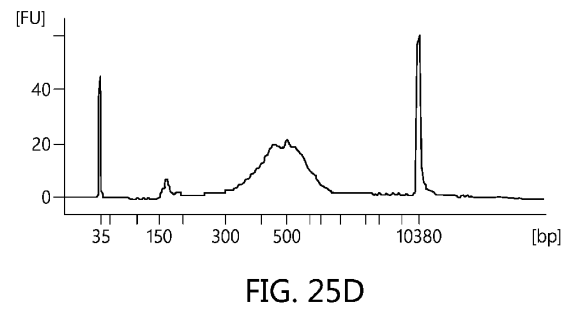
40

50

【図 25 C】

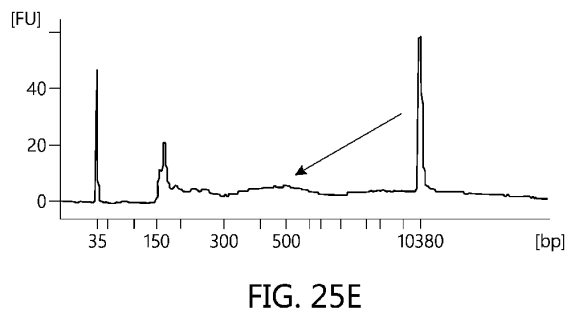


【図 25 D】



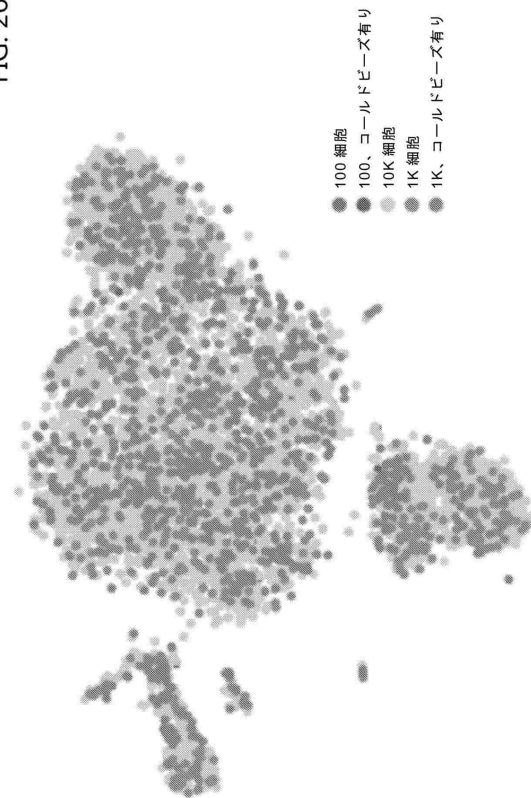
10

【図 25 E】



【図 26 A】

FIG. 26A



20

30

40

50

【図 2 6 B】

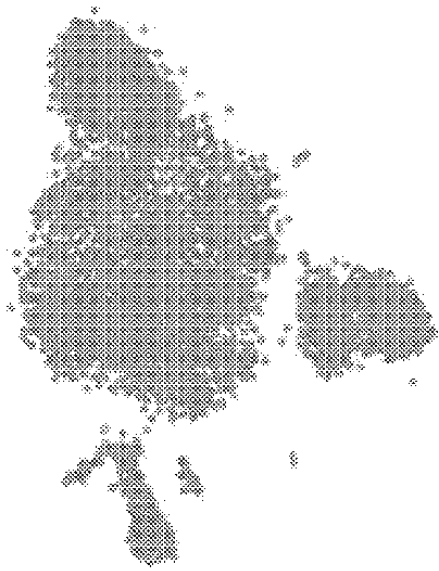


FIG. 26B

【図 2 6 C】

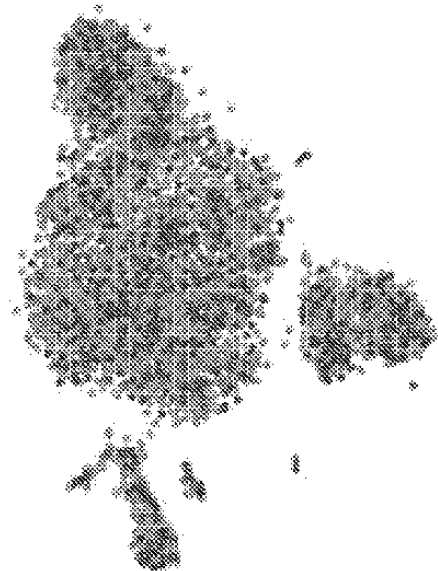


FIG. 26C

【図 2 6 D】

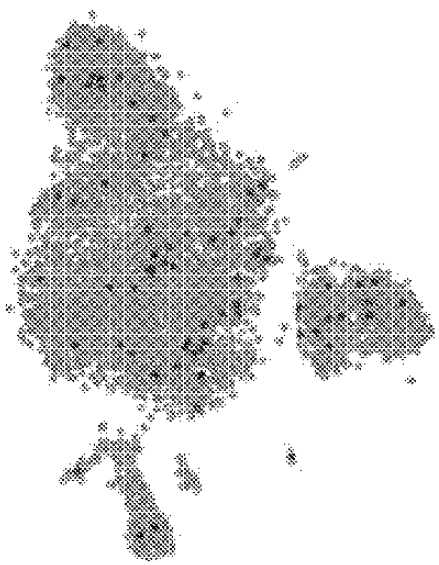


FIG. 26D

【図 2 6 E】

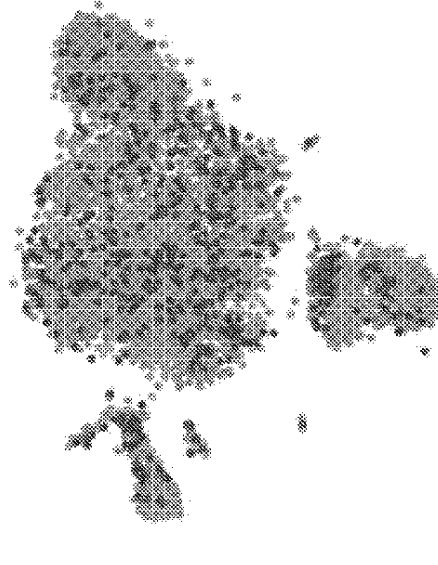


FIG. 26E

10

20

30

40

50

【図 26 F】



FIG. 26F

【図 27 A】

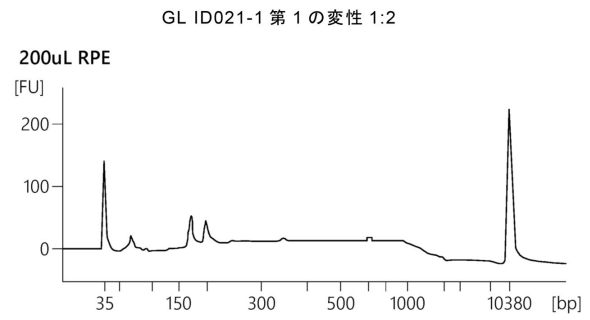


FIG. 27A

10

【図 27 B】

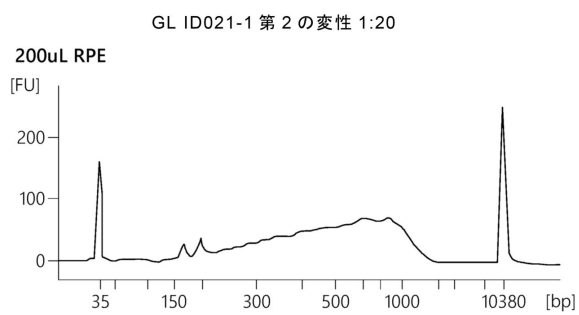


FIG. 27B

【図 27 C】

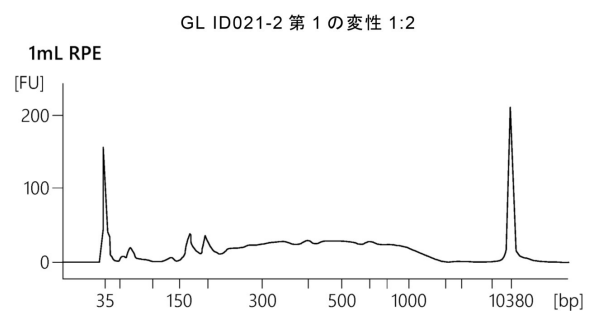


FIG. 27C

20

30

40

50

【図 27 D】

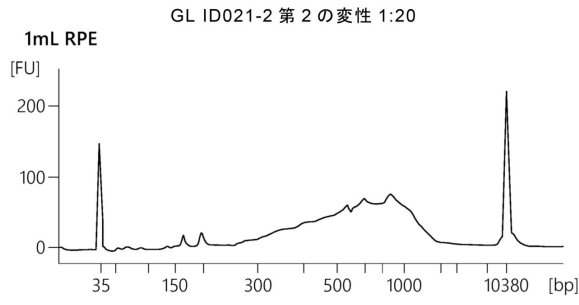


FIG. 27D

【図 28 A】

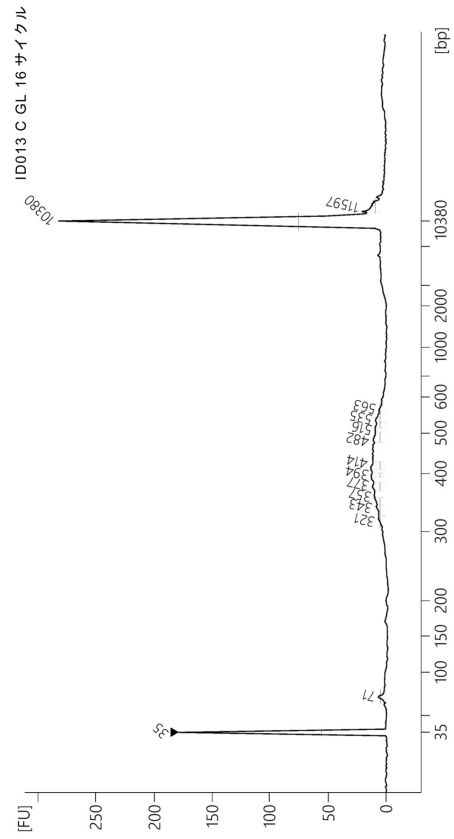


FIG. 28A

【図 28 B】

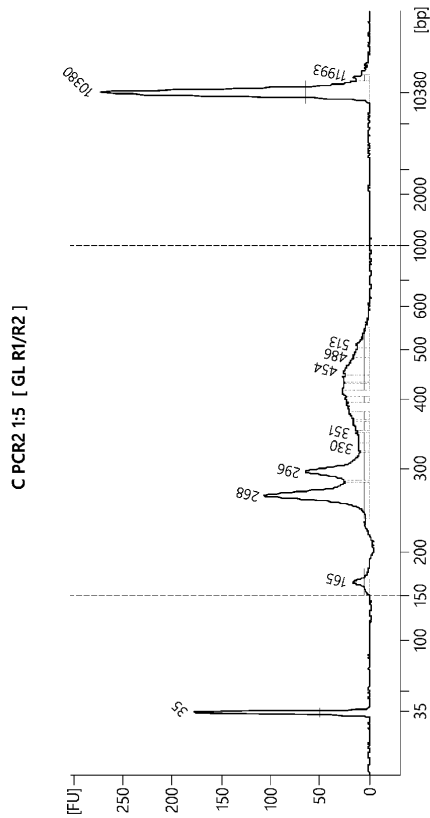


FIG. 28B

【図 28 C】

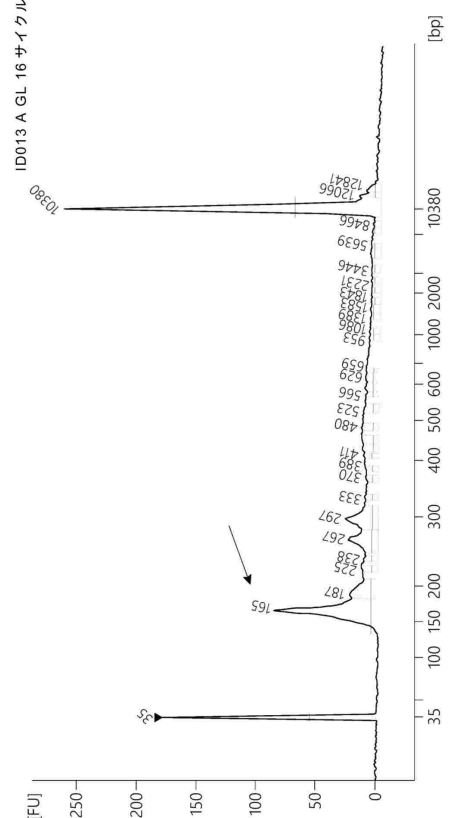


FIG. 28C

10

20

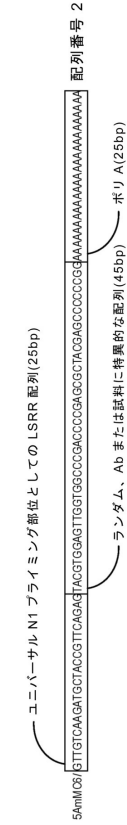
30

40

50

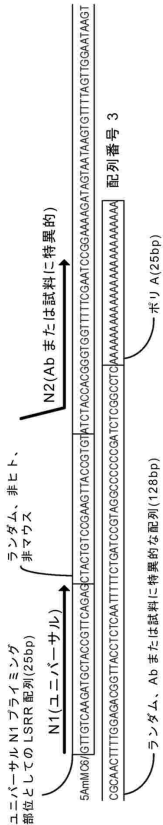
【図 2 9 A】

FIG. 29A 95 マーオリゴの設計



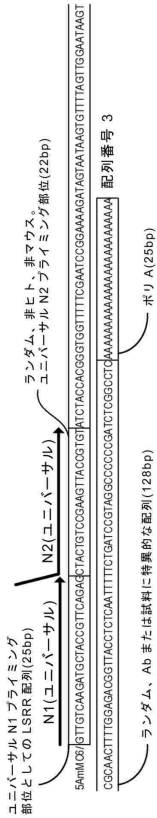
【図 2 9 B】

FIG. 29B 200 マーオリゴの設計。標的化増幅スキーム(ネステッド特異的)



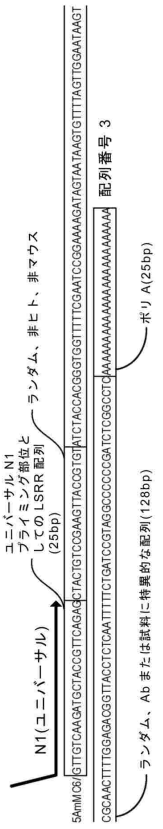
【図 2 9 C】

FIG. 29C 200 マーオリゴの設計。標的化増幅スキーム(ネステッドユニバーサル)



【図 2 9 D】

FIG. 29D 200 マーオリゴの設計。標的化増幅スキーム(1 ステップ)



10

20

30

40

50

【図 30】

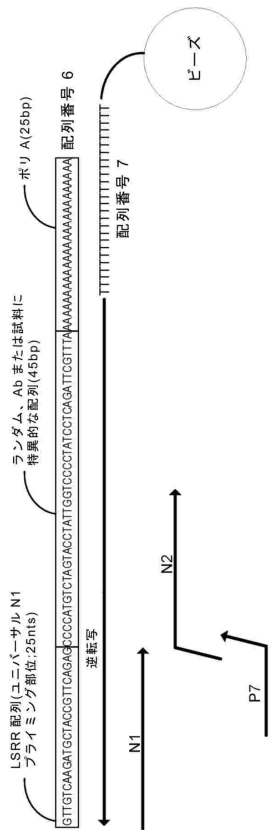


FIG. 30

【配列表】

0007618548000001.app

フロントページの続き

- 弁理士 山崎 一夫
(74)代理人 100123777
弁理士 市川 さつき
(74)代理人 100111796
弁理士 服部 博信
(74)代理人 100156982
弁理士 秋澤 慈
(72)発明者 シャム エリーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 95131 サンノゼ クム ドライヴ 2350
審査官 松井 一泰
(56)参考文献 特表2016-533187 (JP, A)
国際公開第2010/117620 (WO, A2)
FOX-WALSH, Kristi et al., "A multiplex RNA-seq strategy to profile poly(A+) RNA: Application to analysis of transcription response and 3' end formation", Genomics, 2011年10月, Vol. 98, No. 4, pp.266-271, DOI: 10.1016/j.ygeno.2011.04.003 Contents lists available at ScienceDirect Genomics journal homepage: www.elsevier.com/locate/
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12Q 1/00 - 3/00
C12N 15/00 - 15/90
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)