

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-511341

(P2018-511341A)

(43) 公表日 平成30年4月26日 (2018. 4. 26)

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01) C 1 2 N 15/00 Z N A A 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2018. 01) C 1 2 Q 1/68 Z

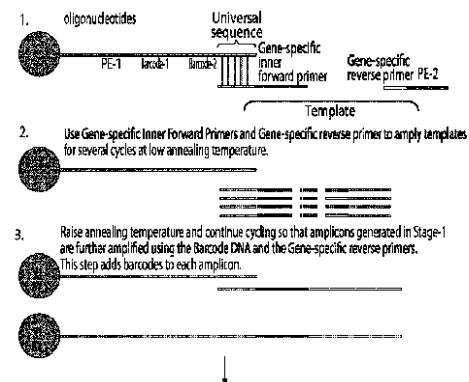
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2017-554339 (P2017-554339)	(71) 出願人	507044516
(86) (22) 出願日	平成28年4月15日 (2016. 4. 15)		プレジデント アンド フェローズ オブ
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月7日 (2017. 12. 7)		ハーバード カレッジ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/027734		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(87) 国際公開番号	W02016/168584		1 3 8, ケンブリッジ, クインシー
(87) 国際公開日	平成28年10月20日 (2016. 10. 20)		ストリート 1 7
(31) 優先権主張番号	62/149, 361	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成27年4月17日 (2015. 4. 17)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100138911
			弁理士 櫻井 陽子
		(74) 代理人	100165892
			弁理士 坂田 啓司
		(72) 発明者	デイビッド・エイ・ウェイツ
			アメリカ合衆国 O 1 7 4 O マサチューセツ
			州ボルトン、グリーン・ロード 2 1 3 番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子配列決定および他の適用のためのバーコード化システムおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、一般的に、微小流体および標識された核酸に関する。一態様において、本発明は、一般的に、オリゴヌクレオチドを含む粒子を含む複数の液滴を提供し、オリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させることを含む方法に関する。特定の態様は、一般的に、液滴を2以上の液滴に分割するシステムおよび方法に関する。特定の態様は、一般的に、液体中の流体液滴を選別するためのシステムおよび方法に関する。



PE-1	AGACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	SEQ ID NO: 1
PE-2	GTCGTGGGCACTCTGCTGAAC	SEQ ID NO: 2
Universal primer	GCCTCTGTTCGTCCTGG	SEQ ID NO: 3
Gene-specific primer-F (example)	GCCTCTGTTCGTCCTGG TAGAGGCAGTCATCGCAGTG	SEQ ID NO: 4
Gene-specific primer-R (example)	GTCGTGGGCACTCTGCTGACGACCTACCAATCCATCTCT	SEQ ID NO: 5
Barcode-1 (example)	AAACAAAC	
Barcode-2 (example)	TCGGTCATTC	SEQ ID NO: 6

Figure 1A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

液滴の少なくとも約 90% が 1 つの粒子を含むか、または粒子を含まず、該粒子がオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドが、実質的に各粒子が識別可能なバーコード配列を含むように、第 1 のバーコードの所定のプールから選択される第 1 のバーコードおよび第 2 のバーコードの所定のプールから選択される第 2 のバーコードであるバーコード配列を含むように、複数の粒子を含む複数の液滴を提供すること；および該オリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させることを含む、方法。

【請求項 2】

粒子がヒドロゲル粒子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

複数の液滴が微小流体液滴を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第 1 のバーコードの所定のプールが、少なくとも約 300 の識別可能なバーコードを含む、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

第 1 のバーコードの所定のプールが、少なくとも約 1,000 の識別可能なバーコードを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

第 1 のバーコードの所定のプールが、少なくとも約 3,000 の識別可能なバーコードを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

第 2 のバーコードの所定のプールが、少なくとも約 300 の識別可能なバーコードを含む、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

第 2 のバーコードの所定のプールが、少なくとも約 1,000 の識別可能なバーコードを含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

第 2 のバーコードの所定のプールが、少なくとも約 3,000 の識別可能なバーコードを含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

識別可能なバーコード配列が、少なくとも 10,000 の識別可能なバーコード配列を含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

識別可能なバーコード配列が、少なくとも 100,000 の識別可能なバーコード配列を含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

核酸配列が、ゲノム DNA に結合して構成されている、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

ゲノム DNA がヒトゲノム DNA を含む、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

核酸配列が遺伝子に結合して構成されている、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、粒子の表面に結合される、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、前記粒子に共有結合する、請求項 1 から

10

20

30

40

50

15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項17】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、アクリルホスホロアミダイト結合により前記粒子に共有結合する、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、アミノ結合により前記粒子に共有結合する、請求項16または17に記載の方法。

【請求項19】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、ビオチン-ストレプトアビジン結合により前記粒子に共有結合する、請求項1から18のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項20】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつかが開裂可能なリンカーを含む、請求項1から19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

開裂可能なリンカーが、光開裂可能なリンカーである、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

開裂可能なリンカーが、化学的に開裂可能なリンカーである、請求項20に記載の方法。

【請求項23】

開裂可能なリンカーが、酵素的に開裂可能なリンカーである、請求項20に記載の方法。

20

【請求項24】

前記粒子からオリゴヌクレオチドの少なくともいくつかを遊離することをさらに含む、請求項1から23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記液滴の少なくとも約95%が、1つのヒドロゲル粒子を含むか、またはヒドロゲル粒子を含まない、請求項1から24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記粒子が、最大約1粒子/液滴で液滴内に含まれる、請求項1から25のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項27】

前記粒子が、最大約0.1粒子/液滴で液滴内に含まれる、請求項1から26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記粒子が、最大約0.01粒子/液滴で液滴内に含まれる、請求項1から27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項29】

複数の粒子が、最大約500マイクロメートルの平均直径を有する、請求項1から28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

複数の粒子が、少なくとも約1マイクロメートルの平均直径を有する、請求項1から29のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項31】

前記オリゴヌクレオチドに結合した核酸配列を、複数の細胞から得られる核酸に暴露することをさらに含む、請求項1から30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項32】

複数の細胞が、複数の液滴の少なくともいくつかに存在する、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

複数の細胞が、最大1細胞/液滴で複数の液滴中に存在する、請求項31または32に

50

記載の方法。

【請求項 3 4】

複数の細胞が、最大 0 . 1 細胞 / 液滴で複数の液滴中に存在する、請求項 3 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

複数の細胞が、最大 0 . 0 1 細胞 / 液滴で複数の液滴中に存在する、請求項 3 1 から 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記液滴の少なくとも約 9 0 % が、1 つの細胞を含むか、または細胞を含まない、請求項 3 1 から 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 7】

前記液滴内の少なくとも一部の細胞を溶解することをさらに含む、請求項 3 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記液滴内の少なくとも一部の細胞を細胞溶解試薬を用いて溶解することを含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

少なくともいくつかの細胞がヒト細胞である、請求項 3 1 から 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記核酸配列が、前記細胞から得られる少なくともいくつかの核酸を認識すると予期される、請求項 3 1 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 4 1】

前記核酸配列が、前記細胞から得られる少なくともいくつかの核酸中に存在する遺伝子を認識すると予期される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに結合させる工程が、アダプター配列を、相補的アダプター配列およびプライマーを含む配列に曝露すること；プライマーを該プライマーの標的を含む核酸配列に暴露すること；および増幅させて、第 1 のバーコード、第 2 のバーコードおよび核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを作製すること、を含む、請求項 1 から 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 4 3】

核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに結合させる工程が、核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに直接結合させることを含む、請求項 1 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに結合させる工程が、核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに酵素的に結合させることを含む、請求項 1 から 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに結合させる工程が、核酸配列を前記オリゴヌクレオチドに連結させることを含む、請求項 1 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 4 6】

液滴の少なくとも約 9 0 % が 1 つの粒子を含むか、または粒子を含まず、該粒子がオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドが、実質的に各粒子が識別可能なバーコード配列を含むように、第 1 のバーコードの所定のプールから選択される第 1 のバーコード、第 2 のバーコードの所定のプールから選択される第 2 のバーコードであるバーコード配列およびアダプター配列を含むように、複数の粒子を含む複数の液滴を提供すること；該アダプター配列を、相補的アダプター配列およびプライマーを含む配列に曝露すること；

50

プライマーを該プライマーの標的を含む核酸配列に暴露すること；および増幅させて、第１のバーコード、第２のバーコードおよび核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを作製することを含む、方法。

【請求項４７】

液滴内で該核酸配列を増幅させることをさらに含む、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

増幅させて、第１のバーコード、第２のバーコードおよび核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを作製する前に、液滴内で核酸配列を増幅させることを含む、請求項４７に記載の方法。

10

【請求項４９】

アダプター配列が最大１０個のヌクレオチドを含む、請求項４６から４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】

アダプター配列が少なくとも５個のヌクレオチドを含む、請求項４６から４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１】

プライマーが遺伝子特異的プライマーを含む、請求項４６から５０のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項５２】

核酸配列が、ゲノムＤＮＡに結合して構成されている、請求項４６から５１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５３】

ゲノムＤＮＡがヒトゲノムＤＮＡを含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項５４】

核酸配列が遺伝子に結合して構成されている、請求項４６から５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５５】

粒子がヒドロゲル粒子を含む、請求項４６から５４のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項５６】

複数の液滴が微小流体液滴を含む、請求項４６から５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５７】

第１のバーコードの所定のプールが、少なくとも約３００の識別可能なバーコードを含む、請求項４６から５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５８】

第１のバーコードの所定のプールが、少なくとも約１，０００の識別可能なバーコードを含む、請求項４６から５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５９】

第１のバーコードの所定のプールが、少なくとも約３，０００の識別可能なバーコードを含む、請求項４６から５８のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項６０】

第２のバーコードの所定のプールが、少なくとも約３００の識別可能なバーコードを含む、請求項４６から５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６１】

第２のバーコードの所定のプールが、少なくとも約１，０００の識別可能なバーコードを含む、請求項４６から６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６２】

第２のバーコードの所定のプールが、少なくとも約３，０００の識別可能なバーコードを含む、請求項４６から６１のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項６３】

識別可能なバーコード配列が、少なくとも 1 0 , 0 0 0 の識別可能なバーコード配列を含む、請求項 4 6 から 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

識別可能なバーコード配列が、少なくとも 1 0 0 , 0 0 0 の識別可能なバーコード配列を含む、請求項 4 6 から 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、粒子の表面に結合される、請求項 4 6 から 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 6】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、前記粒子に共有結合されている、請求項 4 6 から 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 7】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、アクリルホスホロアミダイト結合により前記粒子に共有結合されている、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、アミノ結合により前記粒子に共有結合されている、請求項 6 6 または 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、ビオチン - ストレプトアビジン結合を介して、前記粒子に共有結合されている、請求項 4 6 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつか、開裂可能なリンカーを含む、請求項 4 6 から 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 1】

開裂可能なリンカーが光開裂可能なリンカーである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

開裂可能なリンカーが、化学的に開裂可能なリンカーである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 3】

開裂可能なリンカーが、酵素的に開裂可能なリンカーである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 4】

オリゴヌクレオチドの少なくともいくつかを、前記粒子から遊離させることをさらに含む、4 6 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

少なくとも約 9 5 % の液滴が、1 つのヒドロゲル粒子を含むか、またはヒドロゲル粒子を含まない、請求項 4 6 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記粒子が、最大約 1 粒子 / 液滴で液滴内に含まれる、請求項 4 6 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記粒子が、最大約 0 . 1 粒子 / 液滴で液滴内に含まれる、請求項 4 6 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記粒子が、最大約 0 . 0 1 粒子 / 液滴で液滴内に含まれる、請求項 4 6 から 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

複数の粒子が、最大約 5 0 0 マイクロメートルの平均直径を有する、請求項 4 6 から 7 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 80】

複数の粒子が、少なくとも約 1 マイクロメートルの平均直径を有する、請求項 46 から 79 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

オリゴヌクレオチドに結合した核酸配列を、複数の細胞から得られる核酸に暴露することをさらに含む、請求項 46 から 80 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

複数の細胞が、複数の液滴のうち少なくともいくつかの中に存在する、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

複数の細胞が、最大 1 細胞 / 液滴で複数の液滴中に存在する、請求項 81 または 82 に記載の方法。

【請求項 84】

複数の細胞が、最大 0.1 細胞 / 液滴で複数の液滴中に存在する、請求項 81 から 83 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 85】

複数の細胞が、最大 0.01 細胞 / 液滴で複数の液滴中に存在する、請求項 81 から 84 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 86】

液滴の少なくとも約 90 % が、1 つの細胞を含むか、または細胞を含まない、請求項 81 から 85 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 87】

前記液滴中で少なくとも一部の細胞を溶解させることをさらに含む、請求項 81 から 86 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 88】

前記液滴内の少なくとも一部の細胞を細胞溶解試薬を用いて溶解することを含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

少なくとも一部の細胞がヒト細胞である、請求項 81 から 88 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

前記核酸配列が、前記細胞から得られる少なくともいくつかの核酸を認識すると予期される、請求項 81 から 89 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 91】

前記核酸配列が、前記細胞から得られる少なくともいくつかの核酸中に存在する遺伝子を認識すると予期される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

第 1 のバーコードの所定のプールから選択される第 1 のバーコード、第 2 のバーコードの所定のプールから選択される第 2 のバーコード、およびアダプター配列を含む、オリゴヌクレオチドを付着させた複数の粒子を提供すること；および該アダプター配列を介してオリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させることを含む、方法。

【請求項 93】

複数の微小流体液滴内に複数の細胞および複数の粒子を封入し、少なくとも 10,000 の液滴のそれぞれが、複数の液滴の他の液滴に含まれるオリゴヌクレオチドと識別可能な 1 以上のオリゴヌクレオチドを含むように、各粒子がオリゴヌクレオチドおよびそれに共有結合した核酸配列を実質的に含み；液滴内で少なくともいくつかの細胞を溶解させて、該細胞から核酸を遊離させ、ここで、該核酸配列が、少なくともいくつかの遊離される核酸と相互作用することができる部分を含み；そして

10

20

30

40

50

遊離された核酸の部分を液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分およびオリゴヌクレオチドを含む配列を作製することを含む、方法。

【請求項 9 4】

細胞を含む少なくとも 10,000 の微小流体液滴を提供し、該複数の液滴の少なくとも約 90% が細胞を含むか、または細胞を含まず；
複数の微小流体液滴内で細胞を溶解させて、該細胞から核酸を遊離させ；そして
オリゴヌクレオチドに結合した該液滴内の選択的に増幅された核酸を産生すること、ここで、液滴の少なくとも約 90% について、液滴内のオリゴヌクレオチドは、複数の液滴の他の液滴内のオリゴヌクレオチドと識別可能である
を含む、方法。

10

【請求項 9 5】

液滴の 10% 以下が 2 以上の細胞を含むように、複数の細胞を含む少なくとも約 10,000 の微小流体液滴を提供すること、
複数の液滴内の細胞を溶解して該細胞から核酸を遊離させること；および
遊離された核酸の部分を液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分および液滴特異的バーコードを含む配列を作製すること
を含む、方法。

【請求項 9 6】

液滴の 10% 以下が 2 以上の細胞を含むように、複数の細胞を含む液滴を提供し；
複数の液滴内の細胞を溶解して該細胞から核酸を遊離させ；そして
遊離された核酸の部分を該液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分および少なくとも 10,000 の識別可能なバーコードのプールから選択されたバーコードを含む配列を作製すること
を含む、方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、引用によりその内容を本願明細書に包含させる Weitzらの、2015年4月17日出願の、発明の名称“Barcoding Systems and Methods for Gene Sequencing and Other Applications”と題する米国仮特許出願第62/149,361号に基づく優先権の利益を主張する。

30

【0002】

政府助成

本発明は、米国国立科学財団による助成金番号DMR-1310266およびDMR-1420570、ならびに米国国立衛生研究所による助成金番号P01HL120839の政府助成を受けてなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

分野

40

本発明は、全体として、微小流体および標識された核酸に関する。

【背景技術】

【0004】

背景

ハイスループット配列決定技術の開発により、研究者は、大量のゲノムデータおよびエピジェネティックデータを作製してきた。疾患関連遺伝子が患者から抽出され、配列情報が臨床診断および処置に使用されている。

【0005】

ハイスループット配列決定は、一般的に、数百塩基の核酸配列を与える、膨大な数の個々の反応の実施に依存する。例えば、Illumina HiSeqシーケンサー(HiSeq 2500 Rapid Ru

50

n Mode)の1回の“実行”には27時間かかり、約12億に達する対末端リード (paired end read) (反応物)を生成し、約150塩基の配列を与える。多くの実験に関して、この大量の配列情報は、1個の試料に対して要求される量を超える。

【0006】

従って、少なくともこの問題に関して望まれるのは、配列決定の前にサンプルにタグを付ける (“バーコード”する)能力であって、多くの試料を1回の配列決定操作で分析できることである。一例としては、単一細胞転写分析である。研究者は、数百個の細胞について数百の遺伝子の発現レベルの分析を必要とすることがある。これは、配列決定前に、個々の細胞からのRNAが遺伝子的にタグ付け (バーコード化)されていれば、1回のHiSeq操作で実行可能である。

10

【発明の概要】

【0007】

概要

本発明は、全体として、微小流体および標識された核酸に関する。本発明の方法は、ある場合において、相互に関連する複数の生産物、特定の問題に対する代替解決策、ならびに/または1以上のシステムおよび/もしくは物品 (article) の複数の異なる用途を包含する。

【0008】

一面において、本発明は、全体として、方法に関する。ある複数の態様において、本方法は、液滴の少なくとも約90%が1つの粒子を含むか、または粒子を含まず、該粒子がオリゴヌクレオチドを含むように、複数の粒子を含む複数の液滴を提供すること、および該オリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させること、を含む。ある場合において、該オリゴヌクレオチドは、例えば、実質的に各粒子が識別可能なバーコード配列を含むように、第1のバーコードの所定のプールから選択される第1のバーコードおよび第2のバーコードの所定のプールから選択される第2のバーコードであるバーコード配列を含む。

20

【0009】

別の複数の態様による方法は、液滴の少なくとも約90%が1つの粒子を含むか、または粒子を含まず、該粒子がオリゴヌクレオチドを含み、該オリゴヌクレオチドが、実質的に各粒子が識別可能なバーコード配列を含むように、第1のバーコードの所定のプールから選択される第1のバーコード、第2のバーコードの所定のプールから選択される第2のバーコードであるバーコード配列、およびアダプター配列を含むように、複数の粒子を含む複数の液滴を提供すること；該アダプター配列を、相補的アダプター配列およびプライマーを含む配列に暴露すること；該プライマーを、プライマーの標的を含む核酸配列に暴露すること；および、増幅させて、第1のバーコード、第2のバーコードおよび核酸配列を含むオリゴヌクレオチドを作製すること、を含む。

30

【0010】

さらに別の複数の態様において、本方法は、第1のバーコードの所定のプールから選択される第1のバーコード、第2のバーコードの所定のプールから選択される第2のバーコードおよびアダプター配列を含むオリゴヌクレオチドを付着させた複数の粒子を提供すること；および、該アダプター配列を介してオリゴヌクレオチドに核酸配列を結合させることを含む。

40

【0011】

さらに別の複数の態様によれば、本方法は、複数の微小流体液滴内に複数の細胞および複数の粒子を封入すること (ここで、少なくとも10,000の複数の液滴のそれぞれが、複数の液滴の他の液滴に含まれるオリゴヌクレオチドと識別可能な1以上のオリゴヌクレオチドを含むように、各粒子がオリゴヌクレオチドおよびそれに共有結合した核酸配列を実質的に含む)；液滴内で少なくともいくつかの細胞を溶解させて、該細胞から核酸を遊離させること (ここで、該核酸配列は、少なくともいくつかの遊離される核酸と相互作用することができる部分を含む)；および、遊離された核酸の部分を液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分およびオリゴヌクレオチドを含む配列を作製すること、を含む。

50

【 0 0 1 2 】

さらに別の複数の態様において、本方法は、細胞を含む少なくとも 10, 000 の複数の微小流体液滴を提供すること（ここで、該複数の液滴の少なくとも約 90% が細胞を含むか、または細胞を含まない）；複数の微小流体液滴内で細胞を溶解させて、該細胞から核酸を遊離させること；および、オリゴヌクレオチドに結合した該液滴内で選択的に増幅された核酸を産生すること、を含む。ある場合において、液滴の少なくとも約 90% について、液滴内のオリゴヌクレオチドは、複数の液滴の他の液滴内のオリゴヌクレオチドと識別可能である。

【 0 0 1 3 】

別の複数の態様において、本方法は、液滴の 10% 以下が 2 以上の細胞を含むように、複数の細胞を含む少なくとも約 10, 000 の複数の微小流体液滴を提供すること、複数の液滴内で細胞を溶解して該細胞から核酸を遊離させること、および遊離された核酸の部分を該液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分および液滴特異的バーコードを含む配列を作製すること、を含む。

10

【 0 0 1 4 】

さらに別の複数の態様において、本方法は、液滴の 10% 以下が 2 以上の細胞を含むように、複数の細胞を含む液滴を提供すること、複数の液滴内で細胞を溶解して該細胞から核酸を遊離させること、および遊離された核酸の部分を該液滴内で選択的に増幅させて、増幅部分および少なくとも 10, 000 の複数の識別可能なバーコードのプールから選択されたバーコードを含む配列を作製すること、を含む。

20

【 0 0 1 5 】

別の側面において、本発明は、本明細書に記載の 1 以上の態様を作製する方法を包含する。さらに別の側面において、本発明は、本明細書に記載の 1 以上の態様を使用する方法を包含する。

【 0 0 1 6 】

本発明の他の利点および新規な特徴は、添付の図面と併せて考慮するとき、本発明の様々な非限定的な態様についての以下の詳細な説明から明らかになる。本明細書および引用により包含される文献が、矛盾するおよび/または不一致の開示を含む場合には、本明細書の記載が優先されるものとする。引用により包含される 2 以上の文献が、互いに矛盾するおよび/または不一致の開示を含む場合には、後の発行日 (effective date) を有する文献が優先されるものとする。

30

【 0 0 1 7 】

図面の簡単な説明

本発明の非限定的な態様は、概略図であり、正確な縮尺率で描かれることを意図しない、添付の図面を参照して、例示により説明される。図面中、図示される各々同一のまたはほぼ同一の構成要素は、一般的に、1つの数字で表す。明確化のために、全ての図において全ての構成要素にラベルを付すわけではなく、当業者が本発明を理解するのに可能にするために説明する必要がないとき、本発明の各態様の全ての構成要素が示されるわけではない。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 1 8 】

【 図 1 】 図 1 A - 1 B は、ある複数の態様における、標識された核酸の作製の例を示す。

【 図 2 】 図 2 は、特定の態様における、標識された核酸の作製の別の例を示す。

【 図 3 】 図 3 は、特定の態様における、標識された核酸の作製のさらに別の例を示す。

【 図 4 】 図 4 は、本発明のいくつかの態様における、光開裂可能なスパーサーまたはリンカーを含む部分を例示する。

【 図 5 】 図 5 は、本発明の一態様による、細胞からの遺伝子型の決定を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 9 】

詳細な説明

50

本発明は、全体として、微小流体および標識された核酸に関する。例えば、特定の側面は、一般的に、微小流体液滴内または他の区画内で、例えば細胞から得られる核酸を標識するためのシステムおよび方法に関する。ある複数の態様において、粒子は、例えば、該粒子の表面に結合する標的核酸を決定するために使用できるオリゴヌクレオチドを含んで調製され得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、核酸が共にプールされるか、または液滴から除去された後でさえ、液滴中の核酸を別の液滴中の核酸と区別するために使用できる、“バーコード”または特異的配列を含み得る。本発明の特定の態様は、一般的に、微小流体液滴内または他の区画内で、核酸に、付加配列または任意の配列、例えば、液滴内に存在することが予期される所望の配列を選択的に決定または増幅するために使用できる認識配列、を結合させるためのシステムおよび方法に関する。かかるシステムは、例えば、

10

20

30

40

50

【0020】

本発明のある側面は、一般的に、微小流体液滴内または他の好適な区画内に、例えば、マイクロウェルプレートのマイクロウェル、スライドまたは他の表面上の個々のスポットなどに、オリゴヌクレオチドと共に核酸を包含または封入するためのシステムおよび方法に関する。ある場合において、該核酸およびオリゴヌクレオチドを、互いに連結または結合させてよい。該核酸は、液滴内で溶解した細胞または他の物質から得られ得る。該液滴内のオリゴヌクレオチドは、他の液滴中、例えば複数の液滴内または液滴の集団内のオリゴヌクレオチドと区別することができる。例えば、該オリゴヌクレオチドは、種々の液滴間で異なる1以上の特異的配列または“バーコード”を含み得る。従って、各液滴内の核酸は、核酸に関連するバーコードを決定することによって特異的に（uniquely）同定することができる。これは、例えば、液滴が“壊れている”か、または破壊され、次いで、異なる液滴からの核酸が、例えば配列決定または他の分析のために一緒にされまたはプールされる場合に、重要であり得る。

【0021】

ある態様において、オリゴヌクレオチドは、最初に、該オリゴヌクレオチドを粒子（例えば、ヒドロゲルまたはポリマー粒子）に結合させて、次いで、粒子を液滴に組み込んだ後に該粒子からオリゴヌクレオチドを遊離することによって、液滴中に導入される。例えば、それぞれ引用により本明細書中に包含される、2014年10月30日出願の米国特許出願番号第62/072,944号または2015年4月17日出願のPCT出願番号第PCT/US2015/026443、発明の名称“Systems and Methods for Barcoding Nucleic Acids”を参照のこと。例えば、特定の態様において、オリゴヌクレオチドはまた、開裂可能な配列またはリンカー（例えば、図4に示すように）を含んでいてもよい、さもなければ、粒子から遊離可能であってもよい。

【0022】

ある場合において、粒子は、粒子の大部分または全てが、他の識別可能なオリゴヌクレオチドを有する他の粒子と比較して、特異的に識別可能なオリゴヌクレオチドを有するように調整され得る。粒子が、1粒子/液滴（またはそれ以下）の密度で液滴内に存在するとき、一旦、オリゴヌクレオチドが粒子から遊離されると、液滴の大部分または全ては、1つの特異的なオリゴヌクレオチドを含み（または、特異的なオリゴヌクレオチドを含まない）、各液滴（および、そこに含まれる核酸）を特異的に同定することができる。

【0023】

本発明の態様の一例は、図1に記載されている。以下でより詳細に説明する通り、他の態様において、他の構成（configuration）も同様に使用可能である。図1Aは、粒子（例えば、ヒドロゲル粒子）、1以上のバーコード、および“ユニバーサル配列”またはさらなる所望の配列（例えば、別の物質（entity）を認識するのに使用できる認識配列、例えば相補的配列）をオリゴヌクレオチドに結合させるか、または含ませるのに使用することができるアダプター配列を示す。これらは、バルク相中または微小流体液滴のような液滴内に存在するかまたは調製されてもよい。加えて、例えば、図1に示されるように、プ

ロモーターまたはエンハンサーのような他の要素も、オリゴヌクレオチド内に存在してよい。ある態様において、例えば、オリゴヌクレオチド配列内で使用される可能性のあるバーコードは、以下で説明するように、例えば、スプリットプール合成法 (split-and-pool approach) を用いて、最終的なバーコード配列を作製するために共に連結される、バーコード要素の 2 つ (またはそれ以上) の別個の “プール” から形成される。ある場合において、これにより、非常に多数の可能性のあるバーコード、例えば 10^4 または 10^5 以上の可能性のあるバーコードをオリゴヌクレオチドに使用することが可能になる。

【0024】

ある態様において、アダプター配列は、アダプターに相補的な配列を含む相補的配列に曝されてもよい。他の配列、例えばプライマー、プロモーターなども、存在し得る。プライマー、プロモーターなどの例は、本明細書に記載される。相補的配列は、図 1 A に示すように、アダプター配列の少なくとも一部に結合するか、あるいは会合することができる。相補的配列は、アダプター配列に対して、完全に相補的であるか、または 1 つ、2 つ、3 つ、またはそれ以上のミスマッチを含み得る。アダプター配列 (およびその相補体) は、好適な長さ、例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 または 15 以上のヌクレオチド長であり得る。

【0025】

例えば、図 1 A に示す通り、相補的配列は、遺伝子特異的インナーフォワードプライマーまたは遺伝子特異的リバースプライマー配列などのプライマー、または本明細書に記載の他の配列を含み得る。これらは、例えば、その後の増幅または例えば粒子に結合したオリゴヌクレオチドへの所望のもしくは任意の配列の取り込みを促進するために有用であり得る。図 1 A において、これは、“テンプレート” 鎖である。プライマーは、テンプレートと、例えば特異的に (例えば、遺伝子特異的インナーフォワードプライマーを用いて) または非特異的に、相互作用することができるものであり得る。後の増幅または取り込みを、図 1 A に示す通り、テンプレート (または少なくともその一部) の配列を粒子に結合したオリゴヌクレオチドに組み込むのに使用し、それによって、1 以上のバーコード配列およびテンプレートの少なくとも一部に対応する配列を含むオリゴヌクレオチドを含む粒子を作製することができる。

【0026】

ある態様において、粒子は、微小流体液滴のような液滴中に封入され得る。当業者は、微小流体液滴内に粒子を封入するための技術を認識し得る。例えば、米国特許第 7,708,949 号、同第 8,337,778 号、同第 8,765,485 号、または国際特許出願公開番号 WO 2004/091763 および WO 2006/096571 を参照のこと (各々、引用により本明細書中に包含させる)。ある場合において、粒子は、1 粒子 / 液滴未満の (場合によっては、1 粒子 / 液滴より大幅に低い) 密度で封入されて、液滴の大部分または全てが、その中に粒子を含まないかまたはたった 1 個の粒子を有するのを確実にし得る。

【0027】

ある態様において、オリゴヌクレオチド (粒子の表面に結合されていてよい、あるいは粒子内に包含 (contained or incorporated) されていてよいものなど) を含む粒子を、細胞 (または他のサンプル) から得られる核酸を決定または配列決定するために、または他の適用のために、使用することができる。例えば、図 1 B の非限定的例において、細胞集団 10 を、例えば、それらの DNA を配列決定すること、少なくともいくつかの細胞中に存在することが予期され得る特定のタンパク質もしくは遺伝子を同定すること、それらの mRNA もしくはトランスクリプトームを決定することなどにより、分析することが望ましい。細胞は、この例において核酸材料の供給源として使用されるが、これは単なる例示であり、他の態様において、核酸を他の供給源からまたは他の技術を用いて液滴に導入し得る。

【0028】

細胞は、最初に、例えば、当業者に公知の技術を用いて、微小流体液滴 40 に封入され

10

20

30

40

50

得る。ある場合において、細胞は、1細胞/液滴未満の(そしてある場合において、1細胞/液滴より大幅に低い)密度で封入されて、液滴の大部分または全てが、その中に細胞を含まないか、またはたった1個の細胞を含むことを確実にし得る。従って、図1Bに示すように、液滴41、42、43...の各々は、その中に細胞を有しないか、1個のみの細胞を有する。

【0029】

粒子30上に存在するオリゴヌクレオチド20も液滴に封入される。上記の通り、粒子30は、例えば、微粒子であってよく、ヒドロゲルもしくはポリマー粒子または本明細書に記載するような他のタイプの粒子であってよい。粒子および細胞は、同時にまたは連続して、適当な順番で液滴内に封入され得る。ある複数の態様において、各粒子は特異的なオリゴヌクレオチドを含むが、粒子上に存在するオリゴヌクレオチドの複数コピーが存在してよい。例えば、オリゴヌクレオチドの各々は、1以上のバーコードを有し得る。従って、例えば、粒子31はオリゴヌクレオチド21のコピーのみを含み、粒子32はオリゴヌクレオチド22のコピーのみを含み、粒子33はオリゴヌクレオチド33のコピーのみを含むなどとなる。

10

【0030】

本発明の特定の態様によって、オリゴヌクレオチドは、図1Bに示すように、まず粒子に結合されて、各液滴へのたった1つの特異的なオリゴヌクレオチドの導入を促進することが特記されるべきである。(しかしながら、他の態様において、例えば、同じ特異的なバーコードを含む複数のオリゴヌクレオチドおよび/または粒子が液滴中に存在し得る)。例えば、粒子が液滴に1粒子/液滴未満の密度で存在するとき、液滴の大部分または全ては、各々単一粒子のみを有し、そして、存在する単一タイプのオリゴヌクレオチドのみを有する。したがって、図1Bに示すように、オリゴヌクレオチドは、例えば、各液滴41、42、43...が、他の液滴中に存在し得る他のオリゴヌクレオチドと異なる、特異的なオリゴヌクレオチド21、22、23...を含むように、粒子から切断されるかまたは他の方法で遊離され得る。従って、液滴内に存在する各オリゴヌクレオチドは、他の液滴に存在するオリゴヌクレオチドと識別可能である。粒子からオリゴヌクレオチドを開裂させるために図1Bでは光(hv)を使用しているが、これは単なる例示であり、例えば、本明細書に記載の通り、開裂または遊離の他の方法も使用できることが理解されるべきである。例えば、ある複数の態様において、オリゴヌクレオチドを含む(例えば、物理的に)アガロース粒子を使用してよく、該オリゴヌクレオチドは、例えば、アガロースが少なくとも一部液化するかまたは軟化するまでアガロースを加熱することにより遊離され得る。

20

30

【0031】

ある場合において、細胞を、該細胞から核酸または他の物質51、52、53...を遊離するために溶解する。例えば、細胞を、化学物質または超音波を用いて溶解させることができる。細胞は、例えば、DNA、RNA、mRNA、タンパク質、酵素などを遊離し得る。ある場合において、遊離された核酸は、例えば、増幅法に特異的な適当な試薬を包含させることにより、所望により増幅させてよい。当業者に知られる増幅法の例には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素(RT)PCR増幅、インビトロ転写増幅(IVT)、多置換増幅(MDA)または定量的リアルタイムPCR(qPCR)が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0032】

核酸または他の物質51、52、53...のいくつかまたは全ては、例えば共有結合によって、液滴に存在するオリゴヌクレオチドと結合させ得る。例えば、核酸または他の物質51、52、53を、液滴に存在するオリゴヌクレオチドにライゲートまたは酵素結合し得る。従って、図1Bに示すように、液滴41は、オリゴヌクレオチドタグ21に結合した核酸51を示し、液滴42はオリゴヌクレオチドタグ22に結合した核酸52を示し、液滴43はオリゴヌクレオチドタグ23に結合した核酸53を示すなどである。従って、各液滴内の核酸は、この例において各液滴に特異的であるオリゴヌクレオチドを手段として、複数の液滴50の他の液滴内の核酸と識別可能である。

50

【 0 0 3 3 】

図 1 B は、細胞の溶解後の粒子からのオリゴヌクレオチドの開裂を記載しているが、他の態様において、これらは必ずしもこの順番で起こる必要はないことが理解されるべきである。例えば、細胞溶解は開裂後に起きてよく、または両者は同時に起きてよい。

【 0 0 3 4 】

液滴 4 1、4 2、4 3...は、その後“破裂(burst)”または“破壊(broken)”してその内容物を遊離し、ある場合に、図 1 B に示す通り、各液滴に存在する核酸は、組み合わせられまたは共にプールされ得る。しかしながら、核酸が異なるオリゴヌクレオチドにより標識されているため、1つの液滴からの(すなわち、1つの細胞からの)核酸は、オリゴヌクレオチドを使用してもなお(例えば、オリゴヌクレオチド上のバーコードを決定することにより)、他の液滴(または他の細胞)と区別できる。従って、その後に核酸の組合せプールの分析(例えば、配列決定)を実施でき、各核酸(例えば、個々の細胞)の起源を、異なるオリゴヌクレオチドの決定により決定することができる。

10

【 0 0 3 5 】

従って、例えば、正常細胞と癌細胞の集団(例えば、組織サンプルまたは生検由来)をこのような形式で分析でき、癌細胞を、正常細胞が豊富に存在してもなお、異常 DNA を有するとして特定できる。例えば、オリゴヌクレオチドを用いて細胞レベルで DNA を追跡する能力により、大量の正常 DNA が数で勝ってさえなお、異常 DNA を同定できる。他の非限定的例として、幹細胞を正常細胞から単離でき、または目的の集団における稀な細胞型の単離を実施できる。

20

【 0 0 3 6 】

図 2 は、例えば、粒子の表面に結合されるか、または粒子内に組み込まれる、オリゴヌクレオチドを含む粒子の製造方法の別の例を示す。図 1 A と同様に、図 2 は、1 以上のバーコードがそれに結合された粒子を示す。必要に応じて、オリゴヌクレオチドは、光開裂可能なリンカーのような開裂可能なリンカーを含んでもよい。同様に、例えば P E 1 のようなプライマーなどの他の配列も存在し得る。図 2 において、オーバーハング領域(例えば、この例ではチミンを含む)は、相補的オーバーハング領域(例えば、アデニンを含む)を含む配列に適合させ得る。オーバーハング領域は、適当な数の、例えば、1、2、3、4、5 個などのヌクレオチドを含み得る。

【 0 0 3 7 】

好適な配列は、例えばオーバーハング領域を用いてオリゴヌクレオチドに結合させることができる複数の“アンプリコン”配列を作製するために、例えば液滴内またはバルク溶液中で別々に増幅され得る。そのようなシステムは、例えば、アンプリコン配列が、主としてオリゴヌクレオチドに結合し(オーバーハング領域の存在のために)、互いにまたはアンプリコン配列を既を含むオリゴヌクレオチド(すなわち、オーバーハング領域はすでにアンプリコン配列によって占有されている)に結合しないようにするのに、有用であり得る。好適な配列は、例えば、一本鎖または二本鎖であってよく、P C R または本明細書に記載のものを含む他の適当な技術を用いて増幅され得る。例えば、ある場合において、配列は、種々の技術を用いて増幅され得て、例えば、図 2 に示されるように微小流体液滴内で増幅され得る。例えば、米国特許出願番号第 6 1 / 9 8 1 , 1 0 8 号、同第 6 2 / 0 7 2 , 9 4 4 号、または同第 6 2 / 1 3 3 , 1 4 0 号を参照のこと(各々、引用により本明細書中に包含させる)。

30

40

【 0 0 3 8 】

このようにして、粒子は、1 以上のオリゴヌクレオチドを含んで(例えば、バーコード、プロモーター、プライマーなどのような標識を含んで)製造され得て、該オリゴヌクレオチドは、例えば後の使用のために、所望のまたは任意の配列(例えば、テンプレートから生じる)に結合され得る。図 1 A と同様に、これは、1 以上のバーコード配列およびテンプレートの少なくとも一部に対応する配列を含むオリゴヌクレオチドを含む粒子に使用することができる。

【 0 0 3 9 】

50

ある態様において、図2の例に示されるように、粒子は、第1の複数の液滴内に含まれ得て（例えば、1粒子/液滴未満の密度で含まれて、液滴の大部分または全てがその中に粒子を含まないか、またはたった1つの粒子を有することを確実にし得るが、このことはすべての態様における要件ではない）、アンプリコンは、第2の複数の液滴内に含まれてもよい。液滴が使用されるとき、該液滴は、例えば、公知の技術（例えば、米国特許出願公開番号第2006/0163385号、同第2007/0003442号、または同第2010/0172803号（各々、引用により本明細書中に包含される）を参照のこと）を用いて、合併されてもよい。同様に、バルク溶液（アンプリコンを含む）は、例えば、ピコインジェクションなどの既知の技術または国際特許出願公開番号WO 2010/151776、発明の名称“Fluid Injection”（引用により本明細書中に包含させる）に記載の他の方法を用いて、液滴に直接注入され得る。

10

【0040】

合併された後、核酸は、例えば、共有結合、プライマー伸長、ライゲーションなどにより、オリゴヌクレオチドに結合され得る。種々の異なる技術のいずれかを用いることができ、当業者は多くのそのような技術を知っている。用いられる正確な結合技術は、必ずしも決定的ではなく、態様間で変わり得る。非限定的な例には、米国特許出願番号第61/981,123（引用により本明細書中に包含させる）に記載の技術のようなりガーゼ技術または他の好適な技術が含まれる。

【0041】

図2と同様に、図3は、オリゴヌクレオチドを含む粒子の製造のためのさらに別のシステムを説明する。上記のように、適当な配列を、例えば、PCRまたは他の好適な技術を用いて別個に増幅させて、オリゴヌクレオチドに結合させることができる複数の“アンプリコン”配列を作製することができる。この例において、オーバーハング領域は、核酸およびオリゴヌクレオチドの末端を切断または開裂して、共に結合して最終的なオリゴヌクレオチドを製造し得る相補的オーバーハング領域を作製するために使用され得る制限酵素を用いて調製され得る。従って、核酸およびオリゴヌクレオチドのそれぞれは、制限エンドヌクレアーゼによって認識および切断され得る適切な制限部位を含むように設計され得る。制限エンドヌクレアーゼの非限定的な例には、EcoRI、EcoRII、BamHI、HindIII、TaqI、EcoPI5およびSmaIが含まれる。多くの制限エンドヌクレアーゼが市販されている。さらに、ある態様において、断片を共に切断および連結することができる酵素、例えば、GENEART（登録商標）II型（LifeTechnologies）を使用することができる。

20

30

【0042】

従って、本発明の特定の側面は、一般的に、粒子に結合しているか、または他の方法で粒子に連結しているオリゴヌクレオチドに核酸を結合させるためのシステムおよび方法に関する。核酸は、好適な核酸配列であってよく、ある場合において、任意の配列であり得る。例えば、ある態様において、例えば本明細書に記載されるような技術を用いて、オリゴヌクレオチドを含む粒子を調製して、粒子に結合したオリゴヌクレオチドに所望の核酸を添加する使用者（user）に送られる。

【0043】

ある複数の態様において、例えば、オリゴヌクレオチドに結合される核酸は、標的配列もしくはテンプレートを含み得て、および/または所望の核酸配列を認識することができる認識配列を含み得る。特定の場において、認識配列は、ヒトゲノムDNAなどのゲノムDNA、または遺伝子などの特定の部分を認識することができる。認識配列は、RNA配列（例えば、mRNA配列）と結合することもできる。認識配列は、標的配列に相補的であってもよいが、または多数のミスマッチ、例えば、1、2、3または4以上のミスマッチを含んでいてもよい。ある場合において、認識配列は、標的配列に対して少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約97%相補的であり得る。

40

【0044】

50

核酸はまた、ある態様において、プライマー、プロモーターなどの他の配列を含んでいてよい。例えば、プライマーは、本明細書に記載の通り、核酸の増幅、配列決定などを可能にするために存在し得る。非限定的な例としては、遺伝子特異的インナーフォワードプライマーまたは遺伝子特異的リバースプライマー配列、または本明細書に記載の他の配列が挙げられる。

【0045】

上記の通り、ある態様において、核酸を、オリゴヌクレオチドとの結合前に増幅することができる。好適な増幅技術、例えば、PCR、アセンブリPCR、ポリメラーゼサイクルアセンブリ、逆転写酵素(RT)PCR増幅、インビトロ転写増幅(IVT)、多重置換増幅(MDA)、または定量的リアルタイムPCR(qPCR)などを用いることができる。標的配列またはテンプレートは、液滴内(例えば、米国特許出願公開番号第2010/013654号、同第2014/019973号、または同第2014/0199731号を参照のこと)、またはバルク溶液中で増幅され得る。

【0046】

ある複数の態様において、核酸をオリゴヌクレオチドに結合させることができる。下記の通り、オリゴヌクレオチドを、粒子に結合させるか、または他の方法で取り込ませるかもしくは含有させることができる。ある複数の態様において、オリゴヌクレオチドに、例えば、オリゴヌクレオチドの遊離末端に、核酸を直接結合させることができるリガーゼまたは他の好適な酵素を用いて、該核酸をオリゴヌクレオチドに付加させることができる。例えば、それぞれ引用により本明細書中に包含される、2014年10月30日出願の米国特許出願番号第62/072,944号または2015年4月17日出願のPCT出願番号第PCT/US2015/026443、発明の名称“Systems and Methods for Barcoding Nucleic Acids”を参照のこと。

【0047】

リガーゼの非限定的例としては、DNAリガーゼI、DNAリガーゼII、DNAリガーゼIII、DNAリガーゼIV、T4 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、T3 DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼなどのようなDNAリガーゼが挙げられる。多くのこのようなりガーゼは、商業的に購入できる。さらに、ある態様において、2以上の核酸を、アニーリングまたはプライマー伸長法を用いて、共にライゲートし得る。さらに、ある場合において、核酸を、例えばトランスポゾンなどを用いて、オリゴヌクレオチドの内部に付加し得る。例えば、引用によりその内容全体を本明細書中に包含させる、米国特許出願番号第62/072,950号を参照のこと。

【0048】

ある態様において、核酸およびオリゴヌクレオチドは、例えば、相補性であり得る不對ヌクレオチドのオーバーハングを含む、平滑末端または“突出(sticky)”末端を有し得る。非限定的例としては、図2および3に記載されるものが挙げられる。ある場合において、例えば、図3に示す通り、制限酵素を、連結前に核酸の末端を調製するのに使用し得る。

【0049】

従って、例えば、核酸は不對ヌクレオチドの一部を含んでいてよく、オリゴヌクレオチドは不對ヌクレオチドの相補的部分を含み得る。非限定的な例として、オーバーハングはAであってよく、相補鎖はTであり得る。オーバーハング領域は、任意の好適な数の、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個などのヌクレオチドを含み得る。オーバーハング領域は、単一のヌクレオチド(例えば、A、AA、AAAなど)または好適なヌクレオチドのランダム配列もしくは任意の他の配列のみを含み得る。ある場合において、オーバーハングは、適当な酵素、例えば制限エンドヌクレアーゼまたは逆転写酵素を用いて作製され得る。

【0050】

例えば、1つの非限定的態様において、バーコードされたプライマーの3'末端は、全トランスクリプトームプロファイリングのために細胞mRNAを捕捉するために使用され

10

20

30

40

50

得るポリ T 配列で終結される。全ての細胞を組み合わせて得られたライブラリーは、P C R ベースの方法を用いて、またはハイブリダイゼーション捕捉ベースの方法 (Agilent SureSelect など) を用いて、例えば目的の遺伝子のサブセットのみの配列決定を可能にするように、富化されてもよい。別の態様において、バーコードされたプライマーの 3' 末端は、細胞内で RNA を捕捉するために使用され得るランダム DNA 配列で終結され得る。別の態様において、バーコードされたプライマーの 3' 末端は、目的の DNA または RNA 種 (“ 遺伝子 ”) を捕捉するために、または粒子もしくは微小球体に加えて、例えば酵素試薬と共に、液滴中に送達される DNA プローブにハイブリダイズするために、使用され得る特定の DNA 配列で終結され得る。別の態様において、粒子または微小球体は、目的の幾つかの遺伝子を標的とするために多数の異なるプライマーを担持し得る。さらに別の態様は、液滴のサイズおよび液滴のバーコード化に必要な反応成分の濃度の最適化に関する。

10

【 0 0 5 1 】

別の一連の態様において、核酸は、オリゴヌクレオチド上のアダプター配列に相補的な配列を用いてオリゴヌクレオチドに結合され得て、ここで、該相補的配列は、例えば図 1 A に説明した通り、所望のまたは任意の配列 (例えば、テンプレート) を増幅するか、またはオリゴヌクレオチドへ組み込むために使用され得るプライマーを含む。

【 0 0 5 2 】

例えば、ある態様において、テンプレートを液滴に導入し、液滴内で増幅することができる。液滴がオリゴヌクレオチドを含むとき、増幅プロセスを、例えば、テンプレートの少なくとも一部を認識することができるプライマーを含む相補的配列により、オリゴヌクレオチドにテンプレートを結合させるために使用することができる。例えば、オリゴヌクレオチドは、アダプター配列に相補的な部分およびテンプレートの少なくとも一部を認識することができるプライマーを含む相補的配列に相補的な、 “ ユニバーサル ” 配列またはアダプター配列を含んでよい。従って、液滴内での増幅の際に、オリゴヌクレオチドは、例えばテンプレートを含むように伸長され得る。従って、増幅により、テンプレート配列は、例えば図 1 に示すように、オリゴヌクレオチドに組み込まれ得て、プライマーは、増幅を促進するか、またはオリゴヌクレオチドへのテンプレート鎖または他の配列の連結を促進するために使用され得る。例えば、このプロセスは、相補的配列内の遺伝子特異的プライマー (フォワードまたはリバース) のようなプライマーを用いて促進され得る。

20

30

【 0 0 5 3 】

核酸が結合するオリゴヌクレオチドは、例えば、バーコード配列、認識配列、開裂可能な結合、ランダム配列、または本明細書に記載のような他の配列を含み得る。例えば、一連の態様において、核酸は、1つの供給源由来 (例えば、液滴内に含まれる細胞由来) の核酸を他の供給源由来 (例えば、他の細胞由来) のものから区別するために使用することができる特定のオリゴヌクレオチド (例えば、 “ バーコード ”) に結合され得る。1または2以上のバーコードが、オリゴヌクレオチド上に存在してもよい。

【 0 0 5 4 】

ある態様において、オリゴヌクレオチドは、 “ バーコード ” 配列または特異的配列を含み得る。該配列は、 (例えば、粒子上および / または液滴中に存在する) オリゴヌクレオチドのいくつかまたはほとんどが、特異的配列 (または、特異的な配列の組合せ) を有するが、 (例えば、他の粒子または液滴上の) 他のオリゴヌクレオチドは、特異的配列または配列の組合せを有さないように選択され得る。従って、例えば、該配列を、液滴または液滴から得られて包含される (例えば、溶解細胞由来の) 核酸を特異的に同定するか、または他の液滴もしくは他の液滴から得られて包含される (例えば、他の細胞から遊離された) 他の核酸と区別するために使用することができる。

40

【 0 0 5 5 】

配列は、何れかの好適な長さであり得る。バーコード配列の長さは重要ではなく、それは、該バーコード配列を他のバーコード配列と区別するのに十分な長さであればよい。1つ、2つ、またはそれ以上の “ バーコード ” 配列は、上記の通り、オリゴヌクレオチド中

50

に存在してよい。バーコード配列は、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24または25ヌクレオチドの長さを有し得る。ある場合には、25を超えるヌクレオチドも存在し得る。

【0056】

ある場合において、特異的配列またはバーコード配列は、可能性のあるバーコード配列の“プール”から選択され得る。2以上のバーコード配列がオリゴヌクレオチド中に存在するとき、バーコード配列は、可能性のあるバーコード配列の同じか、または異なるプールから選択され得る。配列のプールは、何らかの好適な技術を用いて、例えばランダムに、または例えば、バーコード配列の読み取りにおけるエラーを検出可能であり、場合によっては修復することができるように、ある距離（例えば、ハミング距離）だけ離れて、該配列がエラー検出および/または修復を可能にするように、選択され得る。プールは、任意の数の可能性のあるバーコード配列、例えば、少なくとも100、少なくとも300、少なくとも500、少なくとも1,000、少なくとも3,000、少なくとも5,000、少なくとも10,000、少なくとも30,000、少なくとも50,000、少なくとも100,000、少なくとも300,000、少なくとも500,000、または少なくとも1,000,000のバーコード配列を有し得る。

【0057】

従って、本発明のある態様は、一般的に、粒子または微小球体に結合されたバーコード化核酸に関する。例えば、一連の態様は、一般的に、核酸断片（それぞれが、核酸の捕捉、増幅および/または配列決定に使用される可能性のあるバーコード配列、プライマー配列、および/または他の配列をコードする）を担持する粒子または微小球体に関する。微小球体は、1~500マイクロメートルの大きさの、または本明細書に記載のような他の大きさのヒドロゲル粒子（ポリアクリルアミド、アガロースなど）、あるいはコロイド状粒子（ポリスチレン、磁性またはポリマー粒子など）を意味し得る。微小球体は、ある態様において多孔性であり得る。使用できる他の適当な粒子または微小球体は、本明細書にさらに詳細に記載する。

【0058】

粒子または微小球体の調製は、ある場合において、最初のDNAオリゴヌクレオチドの粒子または微小球体への共有結合または取り込みの他の技術と、それに続く所定のプールから、例えば、無作為に、選択された1以上のバーコードによる各オリゴヌクレオチドの酵素的伸長に依存し得る。可能な特異的なバーコードの最終的な数は、ある場合に、所定のバーコードプールのサイズおよび/または伸長工程の数に依存し得る。例えば、384の所定のバーコードのプールおよび2伸長工程を用いて、各粒子または微小球体は、 $384^2 = 147,456$ の可能なバーコードの一つを担持し、3伸長工程を用いて、各粒子または微小球体は $384^3 = 56,833,728$ の可能なバーコードの一つを担持するなどである。他の多数の工程もある場合に使用可能であり、さらに、各プールは、多様な数の所定のバーコード（384のみではない）を有し得て、これらプールは、同一およびまたは異なる数の所定のバーコードを有し得る。プールは同一および/または異なる配列を含み得る。

【0059】

従って、ある態様において、使用される可能なバーコードは、バーコード要素の1以上の別々の“プール”から形成され、これを、その後、例えば、スプリットプール合成法を用いて共に連結して最終的なバーコード配列を作製する。プールは、例えば、少なくとも約300、少なくとも約500、少なくとも約1,000、少なくとも約3,000、少なくとも約5,000または少なくとも約10,000の識別可能なバーコードを含み得る。例えば、第一プールは x_1 要素を含んでよく、第二プールは x_2 要素を含んでよく、第一プールからの要素および第二プールからの要素を含むバーコードを形成することにより、例えば、使用可能な $x_1 \times x_2$ の可能なバーコードを産生し得る。 x_1 および x_2 は等しくても等しくなくてもよいことは注意すべきである。この工程を任意の数繰り返してよく、例えば、バーコードは、第一プール、第二プールおよび第三プールからの要素（例え

ば、 $x_1 \times x_2 \times x_3$ の可能なバーコードを産生する) または第一プール、第二プール、第三プールおよび第四プールからの要素 (例えば、 $x_1 \times x_2 \times x_3 \times x_4$ の可能なバーコードを産生する) を含んでよいなどである。5、6、7、8 または任意の他の適当な数のプールが存在し得る。従って、可能性のある組み合わせの数のために、比較的少数のバーコード要素を使用してはなお、はるかに多い数の識別可能なバーコードを作製することができる。

【0060】

ある場合において、複数のプールのかかる使用は、組み合わせて、多数のバーコードを個々に別個に製造および合成することなく、実質的に多数の使用可能なバーコードの製造に使用し得る。例えば、多くの先行技術システムにおいて、100 または 1,000 バーコードに対する要求は、100 または 1,000 バーコードの個々の合成を必要とし得る。しかしながら、多数のバーコードが、例えば、多数の細胞の試験に必要であるならば、対応する多数のバーコードを合成する必要がある。このようなシステムは、10,000、100,000 または 1,000,000 のバーコードのような多数では非実用的および実行不可能となる。しかしながら、バーコードの別々の“プール”の使用により、多数のバーコードが、各バーコードの個々の合成を必ずしも必要とせずに達成できる。非限定的例として、1,000 (または任意の他の適当な数) の識別可能なバーコードの第一プールおよび 1,000 の識別可能なバーコードの第二プールを、2,000 バーコード (または該バーコードを各プールで再使用する場合、1,000 のみ) の合成を必要とし、さらにそれらを組み合わせて $1,000 \times 1,000 = 1,000,000$ の識別可能なバーコードを産生でき、例えば、ここで、各識別可能なバーコードは、第一プールから選

10

20

【0061】

オリゴヌクレオチドは、適当な長さであり得るか、または適当な数のヌクレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドは、DNA、RNA、および/または PNA などの他の核酸、および/またはこれらの組合せ、および/または他の核酸を含み得る。ある場合において、オリゴヌクレオチドは一本鎖であるが、他の場合二本鎖であり得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも約 10 nt、少なくとも約 30 nt、少なくとも約 50 nt、少なくとも約 100 nt、少なくとも約 300 nt、少なくとも約 500 nt、少なくとも約 1000 nt、少なくとも約 3000 nt、少なくとも約 5000 nt、少なくとも約 10,000 nt などの長さを有し得る。ある場合において、オリゴヌクレオチドは、約 10,000 nt 以下、約 5000 nt 以下、約 3000 nt 以下、約 1000 nt 以下、約 500 nt 以下、約 300 nt 以下、約 100 nt 以下、約 50 nt 以下などの長さを有し得る。これらの何れかの組み合わせも可能であり、例えば、オリゴヌクレオチドは約 10 nt ~ 約 100 nt であり得る。オリゴヌクレオチドの長さは重要ではなく、種々の長さを種々の態様において使用し得る。

30

【0062】

オリゴヌクレオチドはまた、種々の配列を含み得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、1 以上のプライマー配列、本明細書に記載の 1 以上の特異的配列または“バーコード”配列、1 以上のプロモーター配列、1 以上のスペーサー配列などを含み得る。オリゴヌクレオチドはまた、ある態様において 1 以上の開裂可能なスペーサー、例えば、光開裂可能なリンカーを含み得る。オリゴヌクレオチドは、例えば、該オリゴヌクレオチドが開裂により粒子から除去され得るように、化学的に (例えば、リンカーにより) または物理的に (例えば、リンカーを必ずしも必要としないで) 粒子に結合され得る。他の例としては、オリゴヌクレオチドの量 (バルク) (または長さ) を増加させる (例えば、特異的配列またはナンセンス配列を使用して)、取り扱いを容易にする (例えば、オリゴヌクレオチドはポリ A テイルを含み得る)、結合選択性を高める (例えば、下記のとおり)、酵素による認識を促進する (例えば、適当なリガーゼ)、同定を容易にするなどのために使用可能な

40

50

部分である。これらのおよび / または他の配列の例は、本明細書にさらに詳細に記載する。

【 0 0 6 3 】

ある場合において、オリゴヌクレオチドは、例えば、オリゴヌクレオチドの作製を可能にする、酵素増幅を可能にするなどのために、1 以上のプロモーター配列を含み得る。当業者は、プライマー配列、例えば、P 5 または P 7 を知っている。多くのこのようなプライマー配列が市販されている。プロモーターの例としては、T 7 プロモーター、T 3 プロモーターまたは S P 6 プロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 6 4 】

ある場合において、オリゴヌクレオチドは、1 以上のプライマー配列を含み得る。一般に、プライマーは、一本鎖または部分的に二本鎖核酸（例えば、DNA）であり、これは核酸合成の出発点として働き、核酸ポリメラーゼのようなポリメラーゼ酵素がプライマーを伸長させ、相補鎖を複製することを可能とする。プライマーは、標的核酸に相補的であり、かつハイブリダイズする。ある態様において、プライマーは合成プライマーである。ある態様において、プライマーは天然に存在しないプライマーである。プライマーは、一般に 10 ~ 50 ヌクレオチド長を有する。例えば、プライマーは、10 ~ 40、10 ~ 30、10 ~ 20、25 ~ 50、15 ~ 40、15 ~ 30、20 ~ 50、20 ~ 40 または 20 ~ 30 ヌクレオチド長を有し得る。ある態様において、プライマーは、18 ~ 24 ヌクレオチド長を有する。プライマーの例には、P 5 プライマー、P 7 プライマー、P E 1 プライマー、P E 2 プライマー、A 1 9 プライマーまたは本明細書に記載の他のプライマーが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【 0 0 6 5 】

ある場合において、オリゴヌクレオチドは、例えば、オリゴヌクレオチドの質量またはサイズを増加させるために、ナンセンス配列またはランダム配列を含み得る。ランダム配列は、適当な長さであってよく、1 または 2 以上存在し得る。非限定的例として、ランダム配列は、10 ~ 40、10 ~ 30、10 ~ 20、25 ~ 50、15 ~ 40、15 ~ 30、20 ~ 50、20 ~ 40 または 20 ~ 30 ヌクレオチド長を有し得る。

【 0 0 6 6 】

ある場合において、オリゴヌクレオチドは、遺伝子または他の化学物質（entity）に特異的に結合できる 1 以上の配列を含み得る。例えば、ある態様において、オリゴヌクレオチドは mRNA を認識できる配列、例えば、ポリ T 配列（例えば、一列に数個の T、例えば、4、5、6、7、8 個またはそれ以上の T）を含むものを含み得る。

30

【 0 0 6 7 】

ある一連の態様において、オリゴヌクレオチドは、例えば、適当な刺激の適用により開裂可能な、1 以上の開裂可能リンカーを含み得る。例えば、開裂可能な配列は、光または適当な化学物質もしくは酵素の適用により開裂され得る、光開裂可能なリンカーであり得る。光開裂可能なリンカーの非限定的例は、図 4 に見ることができる。ある場合において、例えば、複数の粒子（表面上にオリゴヌクレオチドを含む）を製造し、例えば、ある場合において、平均的に、各液滴が 1 粒子またはそれ未満（またはそれ以上）を含むように、液滴に添加することができる。液滴に添加された後、オリゴヌクレオチドは、該オリゴヌクレオチドを溶液中に、すなわち、液滴内部に存在させるために、例えば、光または他の適当な開裂技術を用いて、粒子から切断され得る。かかる方法において、オリゴヌクレオチドは、粒子の液滴への充填により液滴に容易に充填され、次いで開裂されて、例えば、ヌクレオチドまたは本明細書に記載の他の種と相互作用するように、該オリゴヌクレオチドを溶液中に存在させ得る。

40

【 0 0 6 8 】

本明細書に記載のようなオリゴヌクレオチドを作製するために、種々の技術を用いることができる。これらは、バルク中および / または微小流体液滴などの 1 もしくはそれ以上の液滴中で調製され得る。ある場合において、オリゴヌクレオチドは、例えば、各液滴内のバーコードおよび / またはオリゴヌクレオチドが特異的であることを確実にするために、

50

液滴中で調製され得る。さらに、ある態様において、粒子は、別個の液滴中に種々のバーコードを有するオリゴヌクレオチドを含有するように調製され得て、その後、粒子は、例えば上記のように核酸をオリゴヌクレオチドに添加する使用者に与えられるか、または販売され得る。

【0069】

ある場合において、DNAおよび/または他の核酸を含むオリゴヌクレオチドを粒子に結合し、液滴に送達し得る。ある場合において、オリゴヌクレオチドを、例えば、液滴が一般にその中に最大1粒子を有するように、液滴への送達を制御するために粒子に結合する。ある場合において、液滴への送達により、オリゴヌクレオチドは、例えば、開裂、粒子分解などにより、粒子から除去され得る。しかしながら、他の態様において、液滴は、同一または異なるオリゴヌクレオチドを有し得る、2、3または任意の他の数の粒子を含んでよいことは理解されるべきである。

10

【0070】

他の側面において、本発明は、多数の細胞からのDNAまたはRNA、例えばゲノムDNA、特定の遺伝子、特定のmRNA配列などの決定または同定のためのシステムおよび方法を提供する。ある態様において、本発明は、例えば、細胞集団のプロファイリングの目的または本明細書の記載のような他の目的のための、多数の単一細胞からのDNAまたはRNAの並行捕捉およびバーコーディングのためのシステムおよび方法を提供する。ある態様において、これは、例えば、細胞ならびに/またはRNAおよび/もしくはDNA捕捉および/もしくは増幅に使用し得る他の試薬と共に、粒子または微小球体（例えば、ヒドロゲルまたはポリマー微小球体）に結合した、バーコード化核酸または他の適当なオリゴヌクレオチドの封入に依存する。

20

【0071】

ある一連の態様において、実質的に各個々の細胞から生じる内容物を、例えば、集団の細胞間の不均一性を決定もしくは規定するため、または細胞集団をスクリーニングするなどのために、例えば、ある場合に、数百、数千、数万または数十万またはそれ以上の異なる細胞を単一実験においてバーコード化または他に標識することを可能にする特異的なバーコード（これは無作為に決定してよく、または本明細書に記載するように決定する）で標識し得る。他の目的は本明細書に記載されている。

【0072】

ある一連の態様において、微小流体システムを、例えば、一反応容器中、個々の液滴（例えば、50 pL ~ 10 nL 体積）内に単一細胞を捕捉するために使用する。各細胞を溶解し、そのRNAおよび/またはDNAを、例えば、酵素反応を介して、ライゲーションを介してなど、液滴特異的バーコードで特異的にバーコード化または標識し得る。これら以外の寸法を有するものを含む、微小流体システムの例も本明細書に記載する。ある態様も、例えば、最初に細胞をDNAタグ付抗体で処理することにより、RNAまたはDNAと並行して単一細胞におけるタンパク質存在量を定量するために、ある態様において使用されるはずであり、この場合、DNAタグは、液滴特異的バーコードで同様にバーコード化され得る。一旦、液滴中の細胞成分がバーコード化されると、液滴を破壊または破裂してよく、サンプルを、ハイスループット配列決定または他の適用のために、例えば、大量に、処理できる。配列決定後、DNAバーコードによってデータを分けるかまたは他の方法で分析できる。

30

40

【0073】

単一細胞におけるDNA、RNAおよび/またはDNA抗体タグの並行バーコーディングを実施するために、単一ヒドロゲルまたはポリマー粒子または微小球体を、ある一連の態様によって、生物学的または化学的試薬および細胞と共に各液滴に封入し得る。高濃度（例えば1 ~ 100 μ M）のDNAフラグメント（以後“プライマー”）を担持する粒子または微小球体は、(a) 同じバーコードが粒子または微小球体上の全核酸フラグメントに見られるとの条件で、例えば、少なくとも10,000のバーコード（または少なくとも30,000バーコード、少なくとも100,000バーコード、少なくとも300,000

50

バーコードまたは少なくとも1, 000, 000バーコードなど)のプールからランダムに選択されたバーコード配列をコードする; および/または(b)DNAまたはRNAのハイブリダイゼーションおよび捕捉に使用される1以上のプライマー配列をコードする。異なるバーコードの数は、2以上の細胞が、同じバーコードを担持する粒子または微小球体を有する異なる液滴で占拠される可能性を減らすために、捕捉すべき細胞の数より、少なくとも10倍、ある場合に少なくとも100倍多くてよい。例えば、150, 000バーコードおよび1, 000細胞で、平均3細胞のみが重複するバーコードを獲得する(997の検出バーコードをもたらす)。

【0074】

ある態様において、液滴が1粒子(または微小球体)および1細胞を含むような封入条件を選択する。空の液滴および/または単一粒子を有するが細胞がない液滴および/または細胞を有するが粒子がない液滴の存在は、実質的に性能に影響し得ない。しかしながら、1液滴中の2以上の粒子または2以上の細胞存在は、制御が困難な誤差をもたらし得て、したがって、このような事象の発生率は、ある場合において最小に、例えば、約10%未満または約5%未満に維持される。細胞および粒子を除けば、他の生物学および化学的試薬は、液滴に等しく分布される。共封入された細胞および粒子を、特定の適用の目的により、収集し、処理し得る。例えば、ある特定の態様において、単一細胞のDNAまたはRNAを、粒子と共に導入したプライマーにより捕捉し、次いで、逆転写または他のDNA重合反応によりバーコード化相補的DNAに変換し得る。

【0075】

精製および任意のDNA増幅後、細胞核酸の塩基組成およびバーコード同一性を、例えば、配列決定または他の技術により決定し得る。あるいは、ある態様において、粒子または微小球体と共に導入したプライマーを、ゲノムからの特異的核酸配列の増幅に使用できる。

【0076】

ある態様において、例えば、液滴中の酵素反応開始の効率を改善するために、粒子または微小球体を用いて導入したバーコード化プライマーを、例えば、光、化学物質、酵素または他の技術によりそれから開裂し得る。しかしながら、プライマーの開裂は任意の工程または時点で実施してよく、ある場合に使用者により決定され得る。このような開裂は、特定の状況および/または条件において特に重要であり得て、例えば、単一細胞におけるRNAおよびDNA分子のあるフラクションは、極めて大きく、または複雑に結合しており、それゆえに、粒子または微小球体の表面または内部に効率的に拡散しない。しかしながら、他の態様において、開裂は必須ではない。

【0077】

これらのような技術を用いて、例えば、ゲノム、一塩基多型、特異的遺伝子発現レベル、非コードRNA、全トランスクリプトーム(またはその一部)、遺伝子全体またはそれらのセクションなどを分析できる。しかしながら、本発明は、これらの適用にのみ限定されない。

【0078】

ある非限定的態様において、バーコード化プライマーの3'末端を、全トランスクリプトームプロファイリングのために細胞mRNAを捕捉するのに使用し得るポリT配列で終結させる。全ての細胞を合わせた得られたライブラリーを、所望によりPCRベースの方法を用いてまたはハイブリダイゼーション捕捉ベースの方法(例えばAgilent SureSelect)を用いて富化し、例えば、目的の遺伝子のサブセットのみの配列決定を可能とし得る。別の態様において、バーコード化プライマーの3'末端を、細胞内のRNAを捕捉するために使用できるランダムDNA配列で終結させ得る。別の態様において、バーコード化プライマーの3'末端を、例えば、目的のDNAまたはRNA種(“遺伝子”)の捕捉または例えば、酵素試薬と共に、粒子または微小球体に加えて液滴に送達されるDNAプローブとハイブリダイズするために、特異的DNA配列で終結させ得る。別の態様において、粒子または微小球体は、目的のいくつかの遺伝子を標的とするために、多数の異なるプライマ

ーを担持し得る。さらに他の態様は、液滴サイズおよび液滴バーコーディングに必要な反応成分の濃度の最適化に関する。

【0079】

オリゴヌクレオチドは、例えば本明細書に記載のように、粒子に結合され得る。ある態様において、オリゴヌクレオチドの複数のコピーが粒子上に存在し得るが、粒子は1つのオリゴヌクレオチドのみを含み得る。他の粒子は、例えば本明細書に記載のバーコード配列を用いて、識別可能な異なるオリゴヌクレオチドを含み得る。

【0080】

好適な方法のいずれかを使用して、オリゴヌクレオチドを粒子に結合し得る。正確な結合は重要ではなく、例えば、化学的でも物理的でもよい。例えば、オリゴヌクレオチドは、ピオチン-ストレプトアビジン結合、アミノ結合またはアクリルホスホロアミダイト結合により粒子に共有結合し得る。例えば、アクリルホスホロアミダイト結合の例として図4を参照のこと。他の一連の態様において、オリゴヌクレオチドは、例えば、物理的に、粒子に取り込まれ得て、そこで、オリゴヌクレオチドは、粒子を改変することにより遊離され得る。従って、ある場合において、オリゴヌクレオチドは開裂可能結合を有する必要はない。例えば、ある態様において、オリゴヌクレオチドは、粒子の形成により、アガロース粒子のような粒子に取り込まれ得る。粒子の分解により(例えば、粒子を軟化、分解または液化するまで加熱することにより)、オリゴヌクレオチドは粒子から遊離され得る。

【0081】

粒子は、本発明の特定の側面において微小粒子である。粒子は、多種多様なタイプのいずれであってもよく、本明細書に記載のように、粒子を、液滴中に特定のオリゴヌクレオチドを導入するのに使用でき、オリゴヌクレオチドが(例えば、物理的または化学的に)結合できる適当な粒子を使用し得る。粒子の正確な形態は重大ではない。粒子は、球形でも非球形でもよく、適当な材料で形成されていてよい。ある場合において、実質的に同じ組成および/または実質的に同じ平均直径を有する複数の粒子を使用する。複数のまたは一連の粒子の“平均直径”は、粒子の各々の平均直径の算術平均である。当業者は、例えば、レーザー光散乱、顕微鏡検査または他の既知技術を用いて、複数のまたは一連の粒子の平均直径(または他の特徴的数値)を決定できる。非球形粒子の、単一粒子の平均直径は、非球形粒子と同じ体積を有する完全な球形の直径である。粒子(および/または複数のもしくはは一連の粒子)の平均直径は、ある場合において、例えば、約1mm未満、約500μm未満、約200μm未満、約100μm未満、約75μm未満、約50μm未満、約25μm未満、約10μm未満または約5μm未満であり得る。平均直径はまた、特定の場合に、少なくとも約1μm、少なくとも約2μm、少なくとも約3μm、少なくとも約5μm、少なくとも約10μm、少なくとも約15μmまたは少なくとも約20μmであり得る。

【0082】

粒子は、ある一連の態様において、ヒドロゲル粒子であり得る。例えば、DNA含有ヒドロゲル粒子を含む、ヒドロゲル粒子の例について、国際特許出願公開WO2008/109176号、発明の名称“Assay and other reactions involving droplets”(引用により本明細書に包含させる)を参照のこと。ヒドロゲルの例は、ポリアクリルアミド、ポリN-イソプロピルアクリルアミドまたはポリN-イソプロピルポリアクリルアミドのようなアガロースまたはアクリルアミドベースのゲルを含むが、これらに限定されない。例えば、単量体水溶液を液滴に分散させ、次いで、例えば、ゲルを形成するために、重合化し得る。他の例は、カルシウムイオンの添加によりゲル化できる、アルギン酸のようなヒドロゲルである。ある場合において、例えば、各々、引用によりその内容全体を本明細書に包含させる、米国特許公開2007/000342号として2007年1月4日公開の、Linkらの、発明の名称“Electronic Control of Fluidic Species”である、2006年2月23日出願の米国特許出願番号第11/360,845号、またはAhnらの“Fluidic Droplet Coalescence”なる発明の名称の2007年1月24日出願の米国特許出願1

10

20

30

40

50

1 / 6 9 8 , 2 9 8 号に記載のように、ゲル化イニシエーター(アクリルアミドについて過硫酸アンモニウムおよび T E M E D、またはアルギン酸について Ca^{2+})を、例えば、水相との共流動により、油相を通す共流動により、または 2 個の異なる液滴の合体により、液滴に添加できる。

【 0 0 8 3 】

他の一連の態様において、粒子は 1 以上のポリマーを含み得る。ポリマーの例としては、ポリスチレン(P S)、ポリカプロラクトン(P C L)、ポリイソブレン(P I P)、ポリ(乳酸)、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリロニトリル、ポリイミド、ポリアミド、ならびに / またはこれらの混合物および / またはコポリマー、および / または他のポリマーが含まれるが、これらに限定されない。さらに、ある場合において、粒子は、粒子の磁性操作を可能にする、磁性であり得る。例えば、粒子は、鉄または他の磁性物質を含み得る。粒子はまた、タンパク質、核酸または小分子のような他の分子が結合されるように、官能化もできる。従って、本発明のある態様は、例えば、核酸、タンパク質、小分子または本明細書に記載のもののような他の種の、ライブラリーを規定する、一連の粒子に関する。ある態様において、粒子は蛍光であり得る。

10

【 0 0 8 4 】

ある側面において、オリゴヌクレオチドを含む本明細書の記載のもののような粒子は、液滴内に含まれていてよく、オリゴヌクレオチドは、該粒子から液滴内部に放出され得る。液滴はまた、オリゴヌクレオチドに結合するか、またはオリゴヌクレオチドによって認識され得る核酸(例えば、細胞を溶解することによって産生される)を含み得る。粒子および細胞は、液滴の形成中および / または形成後に液滴内に導入されてもよく、同時または逐次に(任意の好適な順序で)添加されてよい。上述の通り、ある態様において、粒子および細胞は、液滴が一般的には、平均して 1 個以下の粒子および 1 個以下の細胞を含むように、該液滴内に配置され得る。

20

【 0 0 8 5 】

ある一連の態様において、液滴は、細胞または他の核酸源、および例えば上記のようなオリゴヌクレオチドを含む粒子を含んで形成される。液滴を作製するために適当な方法を選択することができ、液滴を形成するための多様な技術が当業者に知られている。例えば、チャンネルの接合部を用いて液滴を作製することができる。接合部は、例えば、T 接合部、Y 接合部、チャンネル内チャンネル接合部(例えば、同軸配置であるか、または内部チャンネルおよび該内部チャンネルの少なくとも一部を取り囲む外部チャンネルを含む)、交差(または“X”)接合部、流動収束接合部(flow-focusing junction)、または液滴を作製するための他の好適な接合部であり得る。例えば、2 0 0 4 年 1 0 月 2 8 日に国際公開 W O 2 0 0 4 / 0 9 1 7 6 3 として公開された、Linkらによる発明の名称“Formation and Control of Fluidic Species”と題する 2 0 0 4 年 4 月 9 日出願の国際特許出願第 P C T / U S 2 0 0 4 / 0 1 0 9 0 3、または 2 0 0 4 年 1 月 8 日に国際公開 W O 2 0 0 4 / 0 0 2 6 2 7 として公開された、Stoneらの発明の名称“Method and Apparatus for Fluid Dispersion”と題する 2 0 0 3 年 6 月 3 0 日に出版された国際特許出願第 P C T / U S 2 0 0 3 / 0 2 0 5 4 2 号(各々、引用によりその全体を本明細書中に包含させる)を参照のこと。ある態様において、接合部は、実質的に単分散の液滴を作製するように構成および配置されていてよい。液滴はまた、流体デバイス上に作製されてもよく、および / または液滴は、別々に作成された後にデバイスに提供されてもよい。

30

40

【 0 0 8 6 】

細胞が使用される場合、該細胞は、いずれか好適な供給源から得られる得る。例えば、細胞は、該細胞由来の核酸が試験または配列決定されることが望まれる任意の細胞であってもよく、1 または 2 以上の細胞タイプを含み得る。細胞は、例えば、特定の臓器または組織由来の細胞(例えば、心細胞、免疫細胞、筋細胞、癌細胞など)、特定の個体または種由来の細胞(例えば、ヒト細胞、マウス細胞、細菌など)、異なる生物由来の細胞、天然サンプル(例えば、池水、土壌など)由来の細胞などであり得る。ある場合において、細胞は組織から分離されてもよい。

50

【0087】

さらに、本発明の特定の態様は、液滴または他の別個の区画、例えば、マイクロウェルプレートのマイクロウェル、スライドまたは他の表面上の個々のスポットなどの使用を伴う。ある場合において、各区画は、他の区画と誤って混ざらない特定の位置にあり得る。区画は、比較的小さくてもよく、ある場合において、例えば、各区画は、約1ml未満、約300 μ l未満、約100 μ l未満、約30 μ l未満、約10 μ l未満、約3 μ l未満、約1 μ l未満、約500nl未満、約300nl未満、約100nl未満、約50nl未満、約30nl未満、または約10nl未満の容積を有し得る。

【0088】

ある一連の態様において、液滴（または、他の区画）は、平均して、各液滴がその中に1個未満の粒子を有するように充填される。例えば、平均充填率は、約1粒子/液滴未満、約0.9粒子/液滴未満、約0.8粒子/液滴未満、約0.7粒子/液滴未満、約0.6粒子/液滴未満、約0.5粒子/液滴未満、約0.4粒子/液滴未満、約0.3粒子/液滴未満、約0.2粒子/液滴未満、約0.1粒子/液滴未満、約0.05粒子/液滴未満、約0.03粒子/液滴未満、約0.02粒子/液滴未満または約0.01粒子/液滴未満であり得る。ある場合において、2またはそれ以上の粒子をその中に有する液滴が作製される確立を最小化するために、低い粒子充填率が選択され得る。従って、液滴の、例えば、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%が粒子を含まないかまたは1個のみの粒子を含み得る。

【0089】

同様に、ある態様において、液滴（または他の区画）は、平均して、各液滴がその中に1細胞未満を有するように充填される。例えば、平均充填率は、約1細胞/液滴未満、約0.9細胞/液滴未満、約0.8細胞/液滴未満、約0.7細胞/液滴未満、約0.6細胞/液滴未満、約0.5細胞/液滴未満、約0.4細胞/液滴未満、約0.3細胞/液滴未満、約0.2細胞/液滴未満、約0.1細胞/液滴未満、約0.05細胞/液滴未満、約0.03細胞/液滴未満、約0.02細胞/液滴未満または約0.01細胞/液滴未満であり得る。ある場合において、2またはそれ以上の細胞をその中に有する液滴が作製される可能性を最小化するために、低い細胞充填率が選択され得る。従って、液滴の、例えば、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%が粒子を含まないかまたは1個のみの粒子を含み得る。さらに、液滴内の平均粒子充填率および平均細胞充填率は同一でも異なってもよいことに留意すべきである。

【0090】

ある場合において、比較的多数の液滴、例えば、少なくとも約10、少なくとも約30、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約300、少なくとも約500、少なくとも約1,000、少なくとも約3,000、少なくとも約5,000、少なくとも約10,000、少なくとも約30,000、少なくとも約50,000、少なくとも約100,000液滴などを作製し得る。ある場合において、前記のとおり、液滴のいくつかまたは全ては、例えば、少なくともいくつかの液滴に存在するオリゴヌクレオチド（例えば、これは1以上の特異的配列またはバーコードを含み得る）に基づき、識別可能である。ある場合において、液滴の少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%は識別可能であり得る。

【0091】

粒子および細胞を液滴内に充填した後、オリゴヌクレオチドは、本発明の特定の側面によって、粒子から遊離または開裂され得る。上記のとおり、光（例えば、オリゴヌクレオチドが光開裂可能リンカーを含む場合）、化学物質または酵素などのような、任意の適当な技術を使用して、液滴からオリゴヌクレオチドを遊離し得る。化学物質または酵素を使

用する場合、化学物質または酵素を、液滴形成後、例えば、ピコインジェクションまたは発明の名称“Fluid Injection”と題する国際特許出願公開WO 2010/151776号（引用により本明細書中に包含させる）に記載のような他の方法、液滴と化学物質もしくは酵素を含む液滴との融合、あるいは当業者に知られる他の技術により、液滴に導入し得る。

【0092】

記載のように、特定の側面において、オリゴヌクレオチドを含む粒子は、例えば細胞由来、または好適な他の供給源由来の核酸を分析するのに使用できる。ある一連の態様において、細胞が存在するならば、該細胞は、例えば、細胞からDNAおよび/またはRNAを遊離させるため、および/または液滴内に細胞溶解物を産生するため、液滴内で溶解され得る。例えば、細胞は、溶解性化学物質または細胞溶解剤（例えば、Triton-XまたはSDSのような界面活性剤、リゾチーム、リゾスタフィン、ザイモラーゼ、セルラーゼ、ムタノリシン、グリカナーゼ、プロテアーゼ、マンナーゼ、プロテイナーゼKのような酵素など）または物理的条件（例えば、超音波、紫外線、機械的攪拌など）への暴露により、溶解され得る。溶解性化学物質を使用するとき、該溶解性化学物質を、液滴形成後、例えば、ピコインジェクションまたは2012年5月31日に米国特許出願公開第2012/0132288号として公開された、発明の名称“Fluid Injection”と題する2011年12月21日出願の米国特許出願第13/379,782号（引用によりその全体を本明細書に包含させる）に記載のもののような他の方法、液滴と化学物質もしくは酵素を含む液滴の融合、あるいは当業者に知られる他の技術により、液滴に導入し得る。細胞の溶解は、粒子からのオリゴヌクレオチドの遊離前、遊離中または遊離後のいずれでもよい。ある場合において、細胞溶解は、細胞がその内容物、例えば、細胞核酸、タンパク質、酵素、糖などを遊離させる原因となる。ある態様において、細胞核酸のいくつかはまた、例えば、本明細書に記載するような、液滴内に含まれる1以上のオリゴヌクレオチドと連結されてもよい。例えば、ある一連の態様において、一般に細胞内で産生されるRNA転写物は遊離され、その後オリゴヌクレオチドに連結され得る。

10

20

【0093】

ある態様において、一旦遊離されると、細胞から遊離した核酸（例えば、DNAおよび/またはRNA）を、オリゴヌクレオチドに、例えば、プライマー伸長、ライゲーションなどにより、共有結合することができる。多種多様な異なる技術を使用することができ、当業者は多くのこのような技術を知っている。使用する正確な連結技術は必ずしも重大ではなく、態様毎に変わり得る。

30

【0094】

例えば、特定の態様において、核酸を、リガーゼを用いてオリゴヌクレオチドと結合させることができる。リガーゼの非限定的な例としては、DNAリガーゼI、DNAリガーゼII、DNAリガーゼIII、DNAリガーゼIV、T4 DNAリガーゼ、T7 DNAリガーゼ、T3 DNAリガーゼ、大腸菌DNAリガーゼ、Taq DNAリガーゼなどのDNAリガーゼが挙げられる。多くのこのようなりガーゼは、商業的に購入することができる。さらなる例としては、ある態様において、2またはそれ以上の核酸を、アニーリング法またはプライマー伸長法を用いて共にライゲーションすることができる。

40

【0095】

さらに別の一連の態様において、核酸を、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）または本明細書に引用する技術を含む他の好適な増幅技術を用いて、オリゴヌクレオチドと連結および/または増幅することができる。一般的に、PCR反応において、核酸を加熱してそれを一本鎖に解離させ、そして熱安定性DNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）を用いて該核酸を増幅する。このプロセスをしばしば複数回反復して、核酸を増幅させる。

【0096】

ある一連の態様において、PCRまたは核酸増幅を液滴内で実施し得る。例えば、液滴はポリメラーゼ（例えばTaqポリメラーゼ）およびDNAヌクレオチドを含んでよく

50

、液滴を、液滴内の核酸を増幅するために(例えば、加熱および冷却の反復により)処理し得る。ポリメラーゼおよびヌクレオチドを任意の適当な時点で、例えば、種々の条件をコードする種々の核酸の液滴への添加前、添加中または添加後に添加してよい。例えば、液滴はポリメラーゼおよびDNAヌクレオチドを含み得て、これを液滴に融合して、増幅を生じさせる。当業者は、ある態様において、増幅核酸の産生に使用し得る、アセンブリーPCRまたはポリメラーゼサイクリングアセンブリーのような適当なPCR技術および変形法を認識し得る。このような方法の非限定的例を以下にも記載する。さらに、ある場合において、適当なプライマー、例えば、P5およびP7、または当業者に知られる他のプライマーを使用して、重合化を開始し得る。ある態様において、プライマーを液滴に添加してよく、またはプライマーは、液滴内の核酸の1以上に存在し得る。当業者は適当なプライマーを知っており、その多くは、商業的に容易に入手できる。

10

【0097】

ある場合において、液滴を破裂、破壊または他の方法で崩壊させ得る。液滴を“破壊”または“破裂”させる多種多様な方法が当業者に利用可能であり、選択される正確な方法は重大ではない。例えば、運搬流体に含まれる液滴を、機械的破砕または超音波のような技術を使用して崩壊させ得る。液滴はまた、化学薬剤または界面活性剤、例えば、1H, 1H, 2H, 2H-ペルフルオロオクタノールを使用して崩壊させ得る。

【0098】

次いで、異なる液滴からの核酸(オリゴヌクレオチドで標識)を、共にプールされ、または結合され、または分析され、例えば配列決定され、増幅などされる。異なる液滴からの核酸は、しかしながら、崩壊前に各液滴に存在していた異なるオリゴヌクレオチド(例えば、異なるバーコードを含む)により、識別可能なままである。

20

【0099】

例えば、核酸を、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)または他の増幅技術を用いて増幅し得る。一般的に、PCR反応において、核酸を加熱してそれを一本鎖に解離させ、そして熱安定性DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)を用いて該核酸を増幅する。このプロセスをしばしば複数回反復して、核酸を増幅させる。

【0100】

ある一連の態様において、PCRを核酸の増幅に使用し得る。当業者は、ある態様において、増幅核酸を製造するのに使用され得る、アセンブリーPCRまたはポリメラーゼサイクリングアセンブリーのような適当なPCR技術および変形を知っている。このような方法の非限定的例を以下にも記載する。さらに、ある場合において、適当なプライマー、例えば、P5およびP7、または当業者に知られる他のプライマーを使用して、重合化を開始し得る。当業者は適当なプライマーを知っており、その多くは、商業的に容易に入手できる。

30

【0101】

使用し得る当業者に知られる増幅法の他の非限定的例は、逆転写酵素(RT)PCR増幅、インビトロ転写増幅(IVT)、多置換増幅(MDA)または定量的リアルタイムPCR(qPCR)を含むが、これらに限定されない。

【0102】

ある態様において、核酸を、多様な技術および装置を用いて配列決定することができ、その多くは、商業的に容易に利用可能である。このような技術の例は、連鎖停止配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、マクサム・ギルバート配列決定、ダイターミネーター配列決定、連鎖停止方法、大規模並列処理特徴配列決定(Lynx Therapeutics)、ポロニー配列決定、パイロシーケンシング、ライゲーションによる配列決定、イオン半導体配列決定、DNAナノボール配列決定、単分子リアルタイム配列決定、ナノポア配列決定、微小流体サンガー配列決定、デジタルRNA配列決定(“デジタルRNA-seq”)などを含むが、これらに限定されない。選択した正確な配列決定法は重大ではない。

40

【0103】

さらに、ある場合において、液滴は、例えば、DNAでの適当なタグ付けにより、例え

50

ば、細胞内のタンパク質を決定するために 1 以上の DNA タグ付抗体も含み得る。従って、例えば、タンパク質を、該タンパク質に特異的な DNA タグ付抗体を用いて、本明細書に記載のような複数の細胞において検出し得る。

【0104】

例えば、液滴（または液滴内の種）の決定、液滴の選別などのための、本発明の様々な側面による微小流体システムにおける液滴を操作するためのシステムおよび方法に関するさらなる詳細を次に示す。例えば、液滴のスクリーニングおよび/または選別のための種々のシステムおよび方法は、引用により本明細書に包含させる、2007年1月4日に米国特許公開第2007/000342号として公開された、Linkらの発明の名称“Electronic Control of Fluidic Species”と題する2006年2月23日出願の米国特許出願第11/360,845号に記載される。非限定的例として、第一電場（またはその一部）の適用（または除去）により、液滴を第一領域またはチャンネルに指向させることができ、デバイス（またはその一部）への第二電場の適用（または除去）により、液滴を第二領域またはチャンネルに指向させることができ、第三電場をデバイス（またはその一部）に適用することにより、液滴を第三領域またはチャンネルに指向させることができるなどであり、ここで、電場はある程度、例えば、強度、方向、周波数、持続時間などが異なり得る。

10

【0105】

本発明の特定の態様において、流動性液滴の 1 以上の特徴を決定することを可能とするような方法で、流動性液滴の 1 以上の特徴および/または流動性液滴を含む流動性システム（例えば、流動性液滴を囲む液体）の部分の特徴を感知および/または検出できるセンサーが提供される。液滴に関して決定可能なおよび本発明において使用可能な特徴は、当業者により特定され得る。このような特徴の非限定的例としては、生物学的物質（例えば、タンパク質、核酸など）のような物質の蛍光、スペクトロスコピー（例えば、光学、赤外、紫外など）、放射活性、質量、体積、密度、温度、粘度、pH、濃度などを含む。

20

【0106】

ある場合において、センサーをプロセッサに連結してよく、これは、次に、例えば、先に記載のように、例えば、液滴の選別、液滴からの電荷の付加または除去、液滴と他の液滴との融合、液滴の分割、液滴内での混合誘発などにより、流動性液滴上で実施すべき操作を実行し得る。例えば、流動性液滴のセンサー測定に応答して、プロセッサは流動性液滴を分裂させ、第2の流動性液滴と融合させるなどする。

30

【0107】

1 以上のセンサーおよび/またはプロセッサは、流動性液滴とセンシング・コミュニケーションできるように配置され得る。本明細書で用いる“センシング・コミュニケーション”とは、センサーが、流動性システム内（例えば、チャンネル内）の流動性液滴および/または流動性液滴を含む流動性システムの部分が何らかの方法で感知および/または決定され得るようにどこかに位置し得ることを意味する。例えば、センサーは、流動性液滴および/または流動性液滴を含む流動性システムの部分と、流動的に、光学的にまたは視覚的に、熱的に、空気圧に、電子工学的になどでセンシング・コミュニケーションであり得る。センサーは、流動性システムと近接して配置することができ、例えば、チャンネルの壁内に埋め込まれるまたはそれに一体的に接続されるか、あるいは流動性液滴および/または流動性液滴を含む流動性システムの部分（例えば、チャンネルまたは微小チャンネル、流動性液滴含有液体など）の感知および/または決定が可能であるように、流動性システムと物理的、電気的および/または光学的にコミュニケーションするならば、流動性システムと離れて位置し得る。例えば、センサーは、液滴を含むチャンネルと物理的結合はしていないが、赤外、紫外または可視光のような、液滴または流動性システムに起因する電磁放射が検出可能であるように配置し得る。電磁放射は液滴により産生されてよく、および/または流動性システムの他の位置（または流動性システムの外部）に起因してよく、流動性液滴および/または流動性液滴を含む流動性システムの部分と、例えば、吸収、反射、回折、屈折、蛍光、リン光、極性変化、相変化、時間に関する変化などにより、流動性液滴の 1 以上の特徴を示すような方法で相互作用する。一例として、レーザーを流動性液滴

40

50

および／または流動性液滴を取り囲む液体に向け、流動性液滴および／または周囲の液体の蛍光を決定し得る。本明細書で用いる“センシング・コミュニケーション”はまた、直接的でも間接的でもよい。一例として、流動性液滴からの光をセンサーに向けまたはセンサーに向ける前にまず光ファイバースystem、導波管などに向けてよい。

【0108】

本発明において有用なセンサーの非限定的な例としては、光学または電磁ベースのシステムが挙げられる。例えば、センサーは、蛍光センサー（例えば、レーザーにより刺激される）、顕微鏡システム（これはカメラまたは他の記録デバイスを含み得る）などであり得る。他の例として、センサーは、電子工学的センサー、例えば、電場または他の電気的特徴を決定できるセンサーであり得る。例えば、センサーは、流動性液滴および／または流動性液滴を含む流動性システムの部分のキャパシタンス、インダクタンスなどを検出し得る。

10

【0109】

本明細書で用いる“プロセッサ”または“マイクロプロセッサ”は、例えば、数式または電子回路もしくは計算回路の使用により、1以上のセンサーからシグナルを受け、シグナルを格納し、および／または1以上の応答を指示する（例えば、上記のような）ことができる、あらゆる成分またはデバイスである。シグナルは、センサーにより決定される環境因子の指標である何らかの適当なシグナル、例えば空気圧シグナル、電子工学的シグナル、光学シグナル、機械的シグナルなどであり得る。

【0110】

ある一連の態様において、流動性液滴は、液滴上に電荷および／または電気双極子を作り、AC場、DC場などであり得る適用した電場を使用して液滴を操縦することにより指向させ得る。一例として、流動性液滴を特定の領域に指向させる必要性に応じて、電場を選択的に適用および除去し得る（または異なる電場、例えば、逆電場を適用し得る）。電場は、ある態様において、流動性液滴を含む液体の流れを実質的に変えることなく、必要に応じて選択的に適用および除去できる。例えば、液体は、実質的に定常状態原則（すなわち、流動性液滴を含む液体の平均流速は、定常流もしくは時間に対する液体の流れの期待値の20%未満または15%未満の逸脱であり、ある場合において、平均流速は10%未満または5%未満逸脱し得る）、または本発明の流動性システムを介する（例えば、チャンネルまたはマイクロチャンネルを介する）所定の原則で流れることができ、液体内に含まれる流動性液滴は、流動性システムを通る液体の流れを実質的に変えることなく、例えば、電場を用いて、種々の領域に指向させ得る。

20

30

【0111】

ある態様において、流動性液滴を、液滴を含む液体の流れを変えることにより、本発明の流動性システムでスクリーニングまたは選別し得る。例えば、ある一連の態様において、流動性液滴を、流動性液滴を囲む液体を第一チャンネル、第二チャンネルなどに向けることにより、操縦または選別し得る。

【0112】

他の一連の態様において、流動性システム内、例えば、異なるチャンネル内またはチャンネルの異なる部分内の圧力を、流動性液滴の流れを指向させるために制御できる。例えば、液滴を、流れのさらなる方向付けのための複数の選択肢を含む、チャンネル接合部に指向させる（例えば、任意の下流流路を規定するチャンネルにおける、分枝または分岐に向ける）ことができる。1以上の任意の下流流路チャンネル内の圧力を制御して、液滴を、選択的にチャンネルの一つに向け、圧力の変化を、各連続的液滴の下流流路が独立して制御され得るように、連続的液滴が接合部に到達するのに必要な時間順で適用できる。一つの配置において、液体リザーバーの膨張および／または収縮を使用して、例えば、流動性液滴を含む液体の有向移動を引き起こすことにより、流動性液滴をチャンネル内に操作または選別できる。液体リザーバーは、活性化されたとき、活性化リザーバーによりもたらされる液体の移動が、液体を好ましい方向に流し、その中の流動性液滴を好ましい方向に運搬するように配置することができる。例えば、液体リザーバーの膨張は、液体のリザーバー方向への

40

50

流れを起こし、液体リザーバーの収縮は、液体のリザーバーから離れる流れを起こし得る。ある場合において、液体リザーバーの膨張および／または収縮を、例えば、本明細書に記載のような、他の流動制御デバイスおよび方法と組み合わせることができる。液体リザーバーの膨張および／または収縮を起こすことができるデバイスの非限定的例には、ピストンおよび圧電構成要素が含まれる。ある場合において、圧電構成要素は、例えば、電気信号に応答するような比較的速い応答時間のために、特に有用であり得る。ある態様において、流動性液滴を、3以上のチャンネルに選別し得る。

【0113】

ある態様は、一般的に、液体中の流動性液滴を選別するシステムおよび方法に関し、ある場合において、比較的高速である。例えば、液滴の特性を何らかの方法で感知および／または決定でき（例えば、本明細書にさらに記載するように）、次いで液滴を、例えば、選別目的で、微小流体チャンネルのようなデバイスの特定の領域に向け得る。ある場合において、本発明の特定のシステムおよび方法を用いて高選別速度を達成することができる。例えば、ある場合において、少なくとも約10液滴／秒が決定および／または選別され得て、他の場合において、少なくとも約20液滴／秒、少なくとも約30液滴／秒、少なくとも約100液滴／秒、少なくとも約200液滴／秒、少なくとも約300液滴／秒、少なくとも約500液滴／秒、少なくとも約750液滴／秒、少なくとも約1,000液滴／秒、少なくとも約1,500液滴／秒、少なくとも約2,000液滴／秒、少なくとも約3,000液滴／秒、少なくとも約5,000液滴／秒、少なくとも約7,500液滴／秒、少なくとも約10,000液滴／秒、少なくとも約15,000液滴／秒、少なくとも約20,000液滴／秒、少なくとも約30,000液滴／秒、少なくとも約50,000液滴／秒、少なくとも約75,000液滴／秒、少なくとも約100,000液滴／秒、少なくとも約150,000液滴／秒、少なくとも約200,000液滴／秒、少なくとも約300,000液滴／秒、少なくとも約500,000液滴／秒、少なくとも約750,000液滴／秒、少なくとも約1,000,000液滴／秒、少なくとも約1,500,000液滴／秒、少なくとも約2,000,000以上の液滴／秒または少なくとも約3,000,000以上の液滴／秒が決定および／または選別され得る。

【0114】

ある側面において、比較的小さい液滴の集団を使用し得る。特定の態様において、非限定的例として、液滴の平均直径は、約1mm未満、約500μm未満、約300μm未満、約200μm未満、約100μm未満、約75μm未満、約50μm未満、約30μm未満、約25μm未満、約20μm未満、約15μm未満、約10μm未満、約5μm未満、約3μm未満、約2μm未満、約1μm未満、約500nm未満、約300nm未満、約100nm未満または約50nm未満であり得る。液滴の平均直径はまた少なくとも約30nm、少なくとも約50nm、少なくとも約100nm、少なくとも約300nm、少なくとも約500nm、少なくとも約1μm、少なくとも約2μm、少なくとも約3μm、少なくとも約5μm、少なくとも約10μm、少なくとも約15μmまたは特定の態様において少なくとも約20μmであり得る。液滴の集団の“平均直径”は、液滴の直径の算術平均である。

【0115】

ある態様において、液滴は、特定の適用によって、実質的に同じ形および／またはサイズ(すなわち、“単分散”)でも、異なる形および／またはサイズでもよい。ある場合において、液滴は、断面直径の均質な分布を有し得て、すなわち、液滴は、液滴の最大約5%、最大約2%または最大約1%が、複数の液滴の全体的な平均直径の約90%未満(または約95%未満または約99%未満)および／または約110%超(または約105%超または約101%超)の直径を有するような、直径の分布を有し得る。液滴の断面直径の均質な分布を産生するためのいくつかの技術は、引用により本明細書に包含させる、2004年10月28日にWO2004/091763号として公開された、Linkらの発明の名称“Formation and Control of Fluidic Species”と題する2004年4月9日出願の国際特許出願PCT/US2004/010903号に記載されている。

【0116】

当業者は、例えば、レーザー光散乱または他の既知技術を用いて、液滴の集団の平均直径を決定できる。このように形成された液滴は、特定の場合に、球形でも非球形でもよい。非球形液滴中の液滴の直径は、非球形液滴と同じ体積を有する完全な数学的球形の直径とみなされ得る。

【0117】

ある態様において、1以上の液滴を、液体により囲まれる流体上に電荷を作ることにより、流体を液体内の個々の液滴に分離させて、チャンネル内に生成することができる。ある態様において、液滴を形成させるために、電場を流体に適用することができる。流体は、液体内の一連の個々の帯電したおよび/または電氣的に誘導可能な液滴として存在し得る。任意の適当な技術を用いて、例えば、流体を電場(これはAC、DCなどであり得る)内に置くことにより、および/または流体に電荷を持たせる反応を引き起こすことにより、液体内の流体に電荷を作り得る。

【0118】

電場は、ある態様において、電場発生装置、すなわち、流体に適用できる電場を作ることができるデバイスまたはシステムから産生される。電場発生装置は、AC場(すなわち、時間に関して周期的に変わる、例えば、正弦波、のこぎり波、方形波など)、DC場(すなわち、時間に関して一定の磁場)、パルス場などを発生させ得る。適当な電場(AC、DCなどであり得る)を生成するための技術は、当業者に知られている。例えば、ある態様において、電場は、少なくとも電場の一部がチャンネルと相互作用するように、チャンネルに近接に配置され得る、電極対に電圧を印加することによって生成される。電極は、銀、金、銅、炭素、白金、銅、タングステン、錫、カドミウム、ニッケル、酸化インジウム錫(“ITO”)など、ならびにこれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない、適当な電極材料または当業者に知られる材料から形成できる。

【0119】

他の一連の態様において、流体の液滴は、流体が個々の液滴を形成するのを誘発できる方法で、チャンネル寸法を変えることにより、チャンネル内で液体に取り囲まれる流体から作製することができる。例えば、チャンネルは、例えば流体がチャンネル壁に接着せず、その替わり個々の液滴を形成するように、流れの方向に対して拡張するチャンネルであるか、または、例えば、流体が個々の液滴に合体するように流れの方向に対して狭まるチャンネルであり得る。ある場合において、チャンネルのサイズを、個々の液滴の形成を生じるような方法で、時間に対して変え得る(例えば、機械的または電気機械的、空気圧など)。例えば、チャンネルを、機械的に収縮(“圧搾”)して液滴を形成させるかまたは、例えば、移動調節板、回転ブレードなどの使用により、流体流を機械的に崩壊させて、液滴形成させ得る。液滴を作製する他の技術は、例えば流体の混合またはボルテックス処理を含む。

【0120】

特定の態様は、一般に、液滴を2以上の液滴に分割するシステムおよび方法に関する。例えば、液滴を、適用電場を使用して分割できる。液滴は周囲液体より高い導電率を有する可能性があり、ある場合において、液滴は、中性に荷電していてもよい。特定の態様において、適用電場において、電荷は、液滴の内部から分散すべき表面への移動を強いられて、それにより、液滴の内部で生じている電場を打ち消し得る。ある態様において、液滴表面の電荷はまた適用電場により力を受け得て、これは、逆極性を有する電荷を逆方向に移動させる。電荷移動は、ある場合において、液滴を2個の分離した液滴に分裂させ得る。

【0121】

本発明のある態様は、一般に、2以上の液滴を1液滴に融合または凝集するためのシステムおよび方法に関し、例えば、2以上の液滴は、例えば、組成、表面張力、液滴サイズ、界面活性剤の存在または不在などにより、通常融合または凝集不可能である。特定の場合において、液滴サイズに対する液滴の表面張力も、液滴の融合または合体が起こるのを阻止し得る。

【0122】

非限定的例として、2液滴は、液滴の融合または合体が逆電荷により生じるように、2液滴の電氣的相互作用を増強できる、逆電荷(すなわち、必ずしも同じ強度ではない、正電荷と負電荷)を与えられ得る。例えば、電場を液滴に適用し得る、液滴をコンデンサーに通過させ得る、化学反応が液滴を帯電させ得るなどである。ある場合において、液滴は、界面活性剤を液滴の表面張力を低下させるために適用しても、融合不可能であり得る。しかしながら、液滴を逆電荷で電氣的に帯電させたら(これは、同じ強度であってもよいが、必ずしもそうである必要はない)、液滴は融合または合体可能となり得る。他の例として、液滴は必ずしも逆電荷を与えられず(そして、ある場合において、電荷を与えられ得ない)、液滴の凝集を起こす液滴に誘発された双極子の使用により融合させる。また、凝集できる2以上の液滴は、必ずしも“面と向かう(head-on)”必要はない。少なくとも液滴の幾つかの融合が最初に起こる限り、あらゆる接触角が十分である。また、例えば、引用によりその全体を本明細書に包含させる、2007年8月23日に米国特許公開第2007/0195127号として公開された、Ahnらの発明の名称“Fluidic Droplet Coalescence”と題する2007年1月24日出願の米国特許出願第11/698,298号を参照のこと。

【0123】

ある一連の態様において、流体を液滴に注入し得る。流体を、ある場合において、例えば、マイクロニードルまたは他のそのようなデバイスを使用して、液滴にマイクロインジェクションすることができる。他の場合において、流体を、液滴が流動性チャネルと接触するようになる流動性チャネルを用いて、液滴に直接注入することができる。流体注入の他の技術は、例えば、各々引用によりその全体を本明細書に包含させる、2010年12月29日にWO2010/151776号として公開されたWeitzらの発明の名称“Fluid Injection”と題する2010年6月25日出願の国際特許出願PCT/US2010/040006号；または2010年7月15日にWO2010/080134号として公開されたWeitzらの発明の名称“Particle-Assisted Nucleic Acid Sequencing”と題する2009年12月18日出願の国際特許出願PCT/US2009/006649号に記載されている。

【0124】

本発明の特定の側面によって、多様な材料および方法を用いて、本明細書に記載の物品または部品、例えば微小流体チャネルのようなチャネル、チャンバーなどを形成することができる。例えば、種々の物品または部品は、チャネルが微細加工、スピンコーティングおよび化学蒸着のようなフィルム沈着、レーザー加工(laser fabrication)、フォトリソグラフィ技術、湿式化学またはプラズマプロセスを含むエッチング法などにより形成できる、固形物であり得る。例えば、Scientific American, 248:44-55, 1983 (Angell, et al)参照のこと。

【0125】

ある一連の態様において、本明細書に記載の物品の種々の構造または部品は、ポリマー、例えば、ポリジメチルシロキサン(“PDMS”)、ポリテトラフルオロエチレン(“PTFE”)またはテフロン(登録商標)などのようなエラストマーポリマー製であり得る。例えば、ある態様によって、微小流体チャネルを、PDMSまたは他のソフトリソグラフィ技術(この態様に適するソフトリソグラフィ技術の詳細は、Annual Review of Material Science, 1998, Vol. 28, pages 153-184に発表されたYounan XiaおよびGeorge M. Whitesidesの“Soft Lithography”およびAnnual Review of Biomedical Engineering, 2001, Vol. 3, pages 335-373に発表されたGeorge M. Whitesides, Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu JiangおよびDonald E. Ingberの“Soft Lithography in Biology and Biochemistry”と題する文献に記載されている；これらの引用文献の各々は、引用により本明細書に包含される)を用いて別々に流動性システムを製作することにより実施し得る。

【0126】

適する可能性のあるポリマーの他の例は、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリ

アクリル酸、ポリメタクリレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、環状オレフィンコポリマー(COC)、ポリテトラフルオロエチレン、フッ化ポリマー、ポリジメチルシロキサンのようなシリコン、ポリ塩化ビニリデン、ビス-ベンゾシクロブテン(“BCB”)、ポリイミド、ポリイミドのフッ化誘導体などを含むが、これらに限定されない。上記のものを含むポリマーが関与する組み合わせ、コポリマーまたは混合(ブレンド)も考慮される。デバイスはまた、複合体物質、例えば、ポリマーと半導体物質との複合体からも形成され得る。

【0127】

ある態様において、物品の種々の構造または部品は、高分子および/または可撓性および/または弾性(elastomeric)物質から加工され、好都合には硬化可能流体の形であってよく、成型(例えばレプリカ成型、射出成型、注加成型など)による加工を容易にする。硬化可能流体は、本質的に固化を誘導できるか、または自発的に固化して、流動性ネットワーク内でのおよび該ネットワークと共に使用が意図される流体を含みおよび/または輸送できる固体となり得る如何なる流体であってもよい。ある態様において、硬化可能流体は、高分子液体または液体高分子前駆体(すなわち“プレポリマー”)を含む。適当な高分子液体は、例えば、融点より高く加熱された、熱可塑性ポリマー、熱硬化性ポリマー、蠟、金属またはこれらの混合物もしくは複合体を含み得る。他の例として、適当な高分子液体は、適当な溶媒中の1以上のポリマーの溶液を含んでよく、この溶液は、例えば、蒸発による溶媒除去により固体高分子物質を形成する。例えば、融解状態からまたは溶媒蒸発により固化できる、かかる高分子物質は当業者に周知である。大部分がエラストマーである種々の高分子物質が適当であり、また型(モールド)マスターの一方または両方がエラストマー物質からなる態様について、複数の型または型マスターの形成に適する。かかるポリマーの例の非限定的リストは、一般的クラスのシリコンポリマー、エポキシポリマーおよびアクリル酸ポリマーのポリマーを含む。エポキシポリマーは、エポキシ基、1, 2-エポキシドまたはオキシランと一般に称される3員環エーテル基の存在により特徴付けられる。例えば、芳香族アミン、トリアジンおよびシクロ脂肪族骨格に基づく化合物に加えて、ビスフェノールAのジグリシジルエーテルを使用できる。他の例は、周知のNovolacポリマーを含む。本発明による使用に適するシリコンエラストマーの非限定的例は、メチルクロロシラン、エチルクロロシラン、フェニルクロロシラン、ドデシルトリクロロシランなどのようなクロロシランを含む前駆体から形成されたものを含む。

【0128】

シリコンポリマー、例えば、シリコンエラストマーポリジメチルシロキサンを、特定の態様において使用する。PDMSポリマーの非限定的例は、Dow Chemical Co., Midland, MIから商品名Sylgardで販売されているもの、特にSylgard 182、Sylgard 184およびSylgard 186を含む。PDMSを含むシリコンポリマーは、本発明の種々の構造の作製を単純化するいくつかの有益な特性を有する。例えば、このような物質は安価であり、容易に入手可能であり、熱硬化によりプレポリマー液体から固化できる。例えば、PDMSは、一般的に、例えば約65 ~ 約75 の温度に、例えば約1時間の間、プレポリマー液体を暴露することにより硬化可能である。また、PDMSのようなシリコンポリマーはエラストマーであり得て、それゆえに、本発明の特定の態様において必要な比較的高い縦横比を有する極めて小さい形の形成に有用であり得る。可撓性(例えば、エラストマー)の型またはマスターは、この点で有益であり得る。

【0129】

PDMSのようなシリコンポリマーから微小流体構造またはチャネルのような構造を形成する一つの利点は、このようなポリマーが、例えば空気プラズマのような酸素含有プラズマへの暴露により酸化される能力であり、したがって、酸化構造は、その表面に、他の酸化シリコンポリマー表面または多様な他の高分子および非高分子物質の酸化表面と架橋できる化学基を含む。従って、構造が作製でき、その後酸化され、別の接着剤または他の封印手段を必要とすることなく、他のシリコンポリマー表面または酸化シリコンポリマー表面と反応性の他の基質の表面に、本質的に不可逆的に密封される。ほとんどの

場合、封印（シーリング）は、単に酸化シリコン表面を他の表面に接触させることにより、シールを形成するのに補助圧を適用する必要なく、完了できる。すなわち、予め酸化されたシリコン表面は、適当な接合表面に対してコンタクト接着剤として作用する。具体的には、それ自体に不可逆的に接着されるだけでなく、酸化PDMSのような酸化シリコンはまた、PDMS表面と同様の方法で（例えば、酸素含有プラズマへの暴露により）酸化されている、例えば、ガラス、シリコン、酸化シリコン、石英、窒化シリコン、ポリエチレン、ポリスチレン、ガラス状炭素およびエポキシポリマーを含む、それ以外の一定範囲の酸化物質にも不可逆的に密着され得る。本発明において有用な酸化および密着方法ならびに成型技術全体は、文献、例えば、引用により本明細書に包含される、表題“Rapid Prototyping of Microfluidic Systems and Polydimethylsiloxane,” Anal. Chem., 70:474-480, 1998 (Duffyら)に記載されている。 10

【0130】

従って、特定の態様において、物品の設計および／または作製は、例えば、比較的良好に知られたソフトリソグラフィおよび本明細書に記載の他の技術の使用により比較的単純であり得る。さらに、ある態様において、物品の迅速および／またはカスタマイズ設計が、例えば、幾何学的条件（terms of geometry）によっては可能である。ある一連の態様において、物品は、例えば、物品を放射性、毒性、有毒、反応性、バイオハザード等の物質と使用する、および／または物質のプロファイル（例えば、毒性プロファイル、放射性プロファイルなど）が未知である態様では、使い捨て可能に製造できる。酸化シリコンポリマーからチャンネルまたは他の構造（または内部、流体接触表面）を形成する他の利点は、これらの表面が、一般的エラストマーポリマーの表面よりはるかに親水性となり得ることである（親水性内部表面が望まれる場合）。従って、このような親水性チャンネル表面は、一般に、非酸化エラストマーポリマーまたは他の疎水性物質を含む構造で可能であるよりも、はるかに容易に水溶液で充填および湿潤され得る。 20

【0131】

次の文献は、その全体を全ての目的のために引用により本明細書に包含される：Weitzらの発明の名称“Methods and Systems for Droplet Tagging and Amplification”と題する米国特許出願61/980,541号；Bernsteinらの発明の名称“Systems and Methods for Droplet Tagging”と題する米国特許出願61/981,123号；Linkらの発明の名称“Formation and Control of Fluidic Species”と題する国際特許出願公開WO 2004/091763号；Stoneらの“Method and Apparatus for Fluid Dispersion”と題する国際特許出願公開WO 2004/002627号；Weitzらの発明の名称“Method and Apparatus for Forming Multiple Emulsions”と題する国際特許出願公開WO 2006/096571号；Linkらの発明の名称“Electronic Control of Fluidic Species”と題する国際特許出願公開WO 2005/021151号；Weitzらの発明の名称“Droplet Creation Techniques”と題する国際特許出願公開WO 2011/056546号；Weitzらの発明の名称“Creation of Libraries of Droplet and Related Species”と題する国際特許出願公開WO 2010/033200号；Weitzらの発明の名称“Fluid Injection”と題する米国特許出願公開2012-0132288号；Agrestiらの発明の名称“Assay And Other Reactions Involving Droplets”と題する国際特許出願公開WO 2008/109176号；Weitzらの発明の名称“Fluid Injection”と題する国際特許出願公開WO 2010/151776号；および、Weitzらの発明の名称“Systems and Methods for Barcoding Nucleic Acids”と題する米国特許出願62/072,944号。 30 40

【0132】

さらに、次の文献は、引用によりその全体を本明細書に包含させる：2014年4月17日出願の米国特許出願61/981,123号；“Systems and Methods for Droplet Tagging”と題する2015年4月17日出願のPCT特許出願公開PCT/US2015/026338；2014年4月17日出願の米国特許出願61/981,108号；“Methods and Systems for Droplet Tagging and Amplification”と題する2015年4月17日出願のPCT出願；2014年10月30日出願の米国特許出願62/072 50

， 9 4 4 号；および、“Systems and Methods for Barcoding Nucleic Acids”と題する 2 0 1 5 年 4 月 1 7 日出願の P C T 特許出願公開 P C T / U S 2 0 1 5 / 0 2 6 4 4 3。

【 0 1 3 3 】

以下の実施例は本発明の特定の態様を説明することを意図するが、本発明の完全な範囲を例示していない。

【 0 1 3 4 】

実施例 1

次の実施例は、ユニバーサルバーコードを用いて液滴内でハイスループット配列決定を行うための種々のシステムおよび方法を記載する。

【 0 1 3 5 】

引用によりその内容全体を本明細書中に包含させる、Weitzらの発明の名称“Systems and Methods for Barcoding Nucleic Acids”と題する P C T 特許出願公開 P C T / U S 2 0 1 5 / 0 2 6 4 4 3 は、一般的に、微小流体液滴およびバーコード化ヒドロゲルを記載する。バーコードおよびポリ d T 配列を含む D N A の多くのコピーを含むポリアクリルアミドヒドロゲルは、特定の態様において、ナノリットル液滴と共に、1つのバーコードビーズ、単一細胞、細胞溶解および逆転写のための緩衝液、ならびに逆転写酵素を含有して製造され得る。m R N A 転写物がバーコード化 c D N A に変換可能であるように、単一細胞逆転写を液滴中で行うことができる。この c D N A は、ハイスループット配列決定のために調製され得る。c D N A は、その供給源細胞を同定するためのバーコードを含み得るため、例えば単回の H i S e q 泳動で配列分析を行うことができる。これにより、精度、コストおよび時間の点でこれまでにない効率レベルで、1回の実験において数千の個々の細胞の転写プロファイリングが可能になる。

【 0 1 3 6 】

本実施例は、ユニバーサルバーコードビーズの作製および使用について説明する。これらは、標的特異的 D N A オリゴヌクレオチドまたは特異的 P C R 産物を許容できるユニバーサルアダプターを含む。このようにして、一組のユニバーサルバーコードを、目的の核酸配列を特異的に認識するように適合させることができる。これは、方法の一般的な有用性に大きな影響を与え、バーコード技術の商業化を合理化し得る。例えば、この改変により、バーコードビーズ製造の技術的に困難な部分であるバーコードが付いたビーズの合成を、高品質の制御で行うことができる。実施者 (customer) は、次に、標的特異的試薬を産生するための簡単な工程を実行することができる。

【 0 1 3 7 】

以下の実施例は、D N A バーコードを担持するビーズのライブラリーを、個々のテンプレート (細胞、分子オルガネラ、または核、または他の別個のテンプレート) と共に、また遺伝子特異的プライマーと共に、液滴中に封入する一般的な方法を説明する。バーコード化ビーズは、一般的に、米国特許出願 6 2 / 0 7 2 , 9 4 4 に記載の通りに合成される。遺伝子特異的プライマーは、目的の遺伝子座の増幅を可能にする一方、ビーズ送達バーコード化プライマーは、アンプリコンのテンプレート源を同定する。

【 0 1 3 8 】

実施例 2

アンプリコンバーコードを含む一例の方法は以下の通りである。図 1 も参照のこと。

【 0 1 3 9 】

本実施例において、単一のバーコードを有するプライマーの多数のコピーを担持するが、ビーズプール全体に亘って少なくとも 1 0 0 , 0 0 0 の異なるバーコードを有するビーズのプールが調製される。ビーズは、一般的に、米国特許出願 6 2 / 0 7 2 , 9 4 4 に記載の通りに合成される。しかしながら、ビーズ上のバーコード化プライマーの 3 ' 末端は、ユニバーサル増幅配列で置換することができる。ビーズは、遺伝子特異的リバースプライマーおよび遺伝子特異的内部フォワードプライマーを用いて、個々のテンプレート (例えば、細胞、分子オルガネラ、または核、または他の別個のテンプレート) をピコリットルサイズの液滴中に封入される。遺伝子特異的内部フォワードプライマーは、その 5 '

末端に、DNAバーコード上のユニバーサル増幅配列に相補的であり得る配列を含み得る。

【0140】

2段階PCRを液滴に行う。遺伝子特異的アンプリコンは、遺伝子特異的インナーフォワードプライマーおよび遺伝子特異的リバースプライマーからなる遺伝子特異的対を用いて作製される。遺伝子特異的インナーフォワードプライマーの濃度は、増幅中に実質的に消費されることを確実にするために、遺伝子特異的リバースプライマーの濃度よりも低くてよい。PCR中に産生されるアンプリコンのフォワード末端の5'末端には、ユニバーサル増幅配列が含まれ得る。次いで、PCRの第2段階において、バーコードDNAは、ユニバーサルアウターフォワードプライマーとして働き、アンプリコンは、ビーズに付着したDNAおよび遺伝子特異的リバースプライマーからなるプライマー対を用いてさらに増幅され得る。このプロセスにより、バーコード配列をアンプリコンに組み込む。

10

【0141】

PCRの第2段階のアニーリング温度は、第1段階のPCRに使用される温度よりも高くてもよい。これは、PCRの第2段階において、フォワードプライマーとして、より長いビーズ付着DNAの使用を増加させることができる。

【0142】

次いで、液滴を破壊してバーコード化アンプリコンを回収し、Illumina配列決定に必要な塩基を付加するためにPCRを行ってもよい。次いで、シーケンシング、例えばディープシーケンシングを実施することができる。

20

【0143】

実施例3

本実施例は、アンプリコンバーコードの他の方法を説明する。図2および3も参照のこと。先の実施例では、DNAバーコードをPCRにより目的のアンプリコンに加えた。本実施例において、PCRアンプリコンの一端を、例えばライゲーションなどによりバーコードビーズに連結することができる。本実施例において、液滴融合(drop merging)スキームにより、ライゲーション可能なアンプリコンが液滴中で産生され、次いで、これらの液滴が合して、ユニバーサル配列を有するDNAバーコードを担持するビーズのライブラリーを形成することもできる。

30

【0144】

バーコードビーズを最初に調製する。単一のバーコードを有するプライマーの多数のコピーを担持するが、ビーズプール全体に亘って少なくとも100,000の異なるバーコードを有するビーズのプールが調製される。ビーズは、実質的に、米国特許出願62/072,944に記載の通りに合成される。しかしながら、バーコードDNA分子は、目的のPCRアンプリコンに効率的に結合できるように構築され得る。

【0145】

ビーズに付着したバーコードDNAの遊離末端は、少なくとも部分的に二本鎖であってもよく、一本鎖の3'末端にオーバーハングチミン(T)を含んでいてもよい。この修飾は、単一のオーバーハングアデニン(A)を有するPCRアンプリコンに効率的に連結され得る末端を産生する。

40

【0146】

ビーズに付着したバーコードDNAの遊離末端は、少なくとも部分的に二本鎖であってもよく、特定の“突出末端”を産生するオーバーハング配列を含んでいてもよい。この突出末端は、対応する“相補的”突出末端を含むDNAフラグメントに効率よく連結され得る。例えば、標的特異的アンプリコンを作製するために使用されるPCRプライマーは、特定の制限酵素部位をコードする配列を含み得る。これらのプライマーで作製されたアンプリコンは、制限酵素で切断されて、バー固定化された(bar-immobilized)バーコード上の突出末端と適合し得る末端を残すことができる。

【0147】

ビーズに付着したバーコードDNAの遊離末端は、少なくとも部分的に一本鎖であって

50

もよく、特異的“突出末端”を有するPCR産物または単一のオーバーハング塩基を有するPCR産物に効率よく連結する配列を含む。

【0148】

リガーゼ、トポイソメラーゼおよびリコンビナーゼを含むが、これに限定されない、種々の酵素を、PCRアンプリコンを核酸バーコードに連結させるために使用できる。キナーゼ、制限酵素、IIS型制限酵素および一本鎖ニッカーゼを含むが、これに限定されない、種々の酵素を、効率の良い連結のために、バーコードDNAおよびPCRアンプリコンの末端を作製するのに使用してよい。いくつかの戦略は、バーコードがアンプリコンに優先的に連結し、アンプリコンがアンプリコンに連結せず、そしてバーコードがバーコードに連結しないように、突出末端を作製し得る。種々の分子生物学的酵素および方法を組み合わせ、これらの好ましい組み合わせを確実にし得る。

10

【0149】

テンプレート（例えば、単一分子または細胞）を、テンプレート特異的プライマーおよびPCR試薬を用いて、液滴（例えば、ピコリットルサイズの液滴）中に封入することができる。次いで、PCRを液滴内で行うことができる。リバースプライマーは、その5'末端に追加の配列を含んでいてよく、それは、配列決定に使用するためのアダプター、例えばIllumina配列決定プライマーをコードする。さらに、PCRプライマーおよびPCR条件を、作製されたアンプリコンが核酸バーコードに効率よく連結され得るのを確実にするように選択され得る。

20

【0150】

例えば、ビーズに付着したDNAバーコードの遊離末端が、1つの鎖の3'末端にオーバーハングチミン（T）を含むとき、1つのアンプリコン特異的プライマーは、リン酸化された5'末端を含み得る。さらに、PCR酵素および条件は、アンプリコンの3'末端に単一のテンプレートのない（オーバーハング）Aを付加することができる。このようにして、アンプリコンおよびテンプレートは、例えば、T4 DNAリガーゼを用いて共有結合され得る。この連結された“トップ鎖（top strand）”は、PCRのためのテンプレートとして働き得る。ビーズに付着したDNAの遊離末端の5'鎖を脱リン酸化して、アンプリコンの特定の末端がバーコードDNAに連結されるようにするのを確実にする。

【0151】

別の例として、ビーズに付着したバーコードDNAの遊離末端が、特定の“突出末端”を作製するオーバーハング配列を含むとき、相補的な突出末端を作製するために修飾され得るDNAを付加するプライマーを用いてPCRを行うことができる。例えば、PCRプライマーは、認識され、特定の制限酵素で切断されて、バーコードDNAの末端に相補的であり得るDNA末端を残す配列を付加することができる。

30

【0152】

液滴中での増幅反応後、バーコード化ヒドロゲルビーズを、例えばピコインジェクション（引用によりその内容全体を本明細書中に包含させる、Weitzらの発明の名称“Fluid Injection”と題する2010年12月29日公開の国際特許出願WO 2010/151776を参照のこと）または他の好適な技術により、PCRアンプリコンを含む液滴に加えることができる。このInjectionではまた、アンプリコンをDNAバーコードに結合させるための試薬を添加してもよい。例えば、リガーゼ（または、トポイソメラーゼまたは同様の酵素）は、AテールのPCRアンプリコンをTテールのバーコードDNAに結合させることができる；アンプリコンの末端を修飾する必要がある場合は、リガーゼおよび好適な制限酵素（またはニッカーゼ）を添加してもよい；および/または、キナーゼまたは脱リン酸化酵素を、分子生物学操作のために用い得る。

40

【0153】

合した液滴をインキュベートして、アンプリコンをバーコードDNAに結合させることができる。次いで、液滴が破壊され、全長アダプターを産生するためにPCRの別のラウンドが実行され得る。

【0154】

50

ある場合において、低コピーテンプレートの検出をさらに増加させるために、多様な線形（低バイアス）増幅法を用いることができる。例えば、バーコードDNAは、T7 RNAポリメラーゼを用いる線形増幅法を容易にするためにT7プロモーター配列を含み得る。

【0155】

実施例 4

本実施例において、図1Aに示す方法を用いて、単一細胞標的遺伝子バーコード配列決定を示す。2個の細胞株を選択した。一方の細胞株は、EGFRエクソン21 L858R変異を有し、他方は、EGFRエクソン19を欠失していた。細胞混合物シリーズを、1:1、1:10、1:50および0:100の比で2個の細胞株を混合することにより調製した。微小流体液滴作製装置を用いて、単一細胞および溶解緩衝液を50 μmの液滴に共封入した。次いで、微小流体液体注入器を用いて、両エクソン領域のプライマーを含むPCR混合物を添加し、続いて熱サイクルを行った。

【0156】

個々の細胞からのアンプリコンをバーコードするために、4つの注入口を有する微小流体ビーズ注入器を使用した：上流の2つは、PCRアンプリコンおよびスピンニングオイルを含む液滴用であり、下流の他の2つはビーズおよびPCR混合物の注入用である。アンプリコンを含む液滴を装置に流し、1% w/wの界面活性剤を含むHFE 7500オイルを用いて単一のファイルに収めた。装置の下流部分において、バーコード化ビーズおよびPCR混合物を、電気合体（electrocoalescence）により液滴中に注入した。滴を注入するために用いる流速は、1つのバーコードゲルがgDNAを含む液滴と融合するのを確実にするように選択された。PCRカクテルの流速を、緩衝液を合体時に~1:1の比で添加するのを確実にするために選択した。液滴を集め、2回目のインドロップPCRを行った後、該液滴を破壊し、個々のサンプルに、サンプルと一緒に配列決定することを可能にする特異的インデックスをインバルクPCRにより付加した。

【0157】

配列決定後、データ分析を行い、各個々の細胞からの遺伝子型を決定した。結果を図5に示す。エクソン19を欠失した細胞株において、増加した比が示された。しかし、エクソン21に変異を有さない細胞株において、エクソン21に変異を有する細胞株と混合したとき、変異エクソン21の割合が減少した。

【0158】

本発明のいくつかの態様が本明細書に記載され、説明されているが、当業者は、本明細書に記載する機能を実施するならびに／あるいは結果および／または利点の1以上を得るための、多様な他の手段および／または構造を容易に想起し、このようなバリエーションおよび／または修飾の各々は、本発明の範囲内であると考えられる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載する全てのパラメータ、サイズ、材料および配置が例示を意味するものであり、実際のパラメータ、寸法、材料および／または配置は、本発明の教示が使用される特定の1または複数の適用により変わることを容易に認識し得る。当業者は、本明細書に記載する本発明の特定の態様の多くの均等態様を認識できるか、または通常行う実験を超えない実験を用いて確認できる。従って、上記態様は、単なる例示であり、添付の特許請求の範囲およびその均等の範囲内で、本発明は、具体的に記載され、特許請求する発明以外でも実施され得ることが理解されるべきである。本発明は、本明細書に記載する各個々の特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法に関する。さらに、2以上のこのような特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法のあらゆる組み合わせは、そのような特徴、システム、物品、材料、キットおよび／または方法が互いに矛盾しない限り、本発明の範囲内に包含される。

【0159】

本明細書に定義し、使用する全ての定義は、辞書の定義、引用により包含される文献における定義、および／または定義された用語の通常の意味を超えて優先すると理解されるべきである。

10

20

30

40

50

【0160】

本明細書および特許請求の範囲で用いる単数表現は、明らかに矛盾しない限り、“少なくとも1”を意味すると理解されるべきである。

【0161】

本明細書および特許請求の範囲で用いる用語“および/または”は、結合された要素の“いずれかまたは両方”、すなわち、ある場合には結合して存在し、他の場合には分離して存在する要素を意味すると理解されるべきである。“および/または”を用いて列記された複数の要素は同じように解釈されるべきであり、すなわち、そのように結合された要素の“1以上”と解釈されるべきである。他の要素は、具体的に特定された要素と関連するかどうかにかかわらず、“および/または”文節により具体的に特定される以外の要素が存在してよい。従って、非限定的例として、“Aおよび/またはB”なる記載は、“含む”のようなオープンエンド型(open-ended)の用語と併せて使用するとき、ある態様において、Aのみ(所望によりB以外の要素を含み得る)；別の態様において、Bのみ(所望によりA以外の要素を含み得る)；さらに別の態様において、AおよびBの両方(所望により他の要素を含み得る)などを意味し得る。

【0162】

本明細書および特許請求の範囲で用いる“または”は、上記の“および/または”と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、リスト中の項目を分けるとき、“または”または“および/または”は包括的であると解釈されるべきであり、すなわち、数または要素のリストの少なくとも1つを包含するが、2以上も含み、所望により、さらなるリストにない項目も含む。“~の1つのみ”または“厳密に1つ”、または、特許請求の範囲で用いるとき、“~からなる”のような、これに明らかに反する用語のみが、数または要素のリストの厳密に1個の要素の包含を意味する。一般に、本明細書で用いる用語“または”は、“いずれか”、“一方”、“一方のみ”または“厳密に1つの”のような排他的用語を伴うときのみ、排他的代替(すなわち“一方または他方であるが、両者ではない”)を示すとして解釈されるべきである。“~本質的になる”は、特許請求の範囲で用いるとき、特許法の分野で使用されるその通常の意味を有するものとする。

【0163】

本明細書および特許請求の範囲で用いる用語“少なくとも1つ”は、1以上の要素のリストを参照して、該要素のリストにおける要素の任意の1以上から選択される少なくとも1要素を意味するが、要素のリスト内に具体的に列記された各々および全ての要素の少なくとも1つを必ずしも含む必要はなく、要素のリストにおける要素のあらゆる組み合わせを除外しない。この定義はまた、要素が、具体的に特定した要素と関係していても、していなくても、“少なくとも1つ”と言及した要素のリスト内に具体的に特定された以外の要素が所望により存在し得ることを可能にする。従って、非限定的例として、“AおよびBの少なくとも1つ”(または、同等に、“AまたはBの少なくとも1つ”、または、同等に“Aおよび/またはBの少なくとも1つ”)は、ある態様において、少なくとも1つ、所望により2以上のAを含み、Bが存在しない(所望によりB以外の要素を含んでよい)；他の態様において、少なくとも1つ、所望により2以上のBを含み、Aが存在しない(所望によりA以外の要素を含んでよい)；さらに別の態様において、少なくとも1つ、所望により2以上のAおよび少なくとも1つ、所望により2以上のBを含む(所望により他の要素を含んでよい)などを意味し得る。

【0164】

本明細書中、数字に関して用語“約”を用いるとき、本発明のさらに別の態様は、用語“約”の存在により修飾されない数字を含むと理解されるべきである。

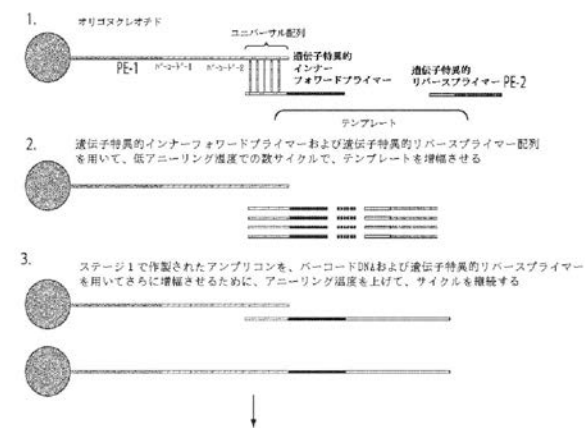
【0165】

明らかに矛盾する記載がない限り、2以上の複数の工程または行為を含むあらゆる方法において、該方法の工程または行為の順番は、方法の工程または行為が言及されている順番に必ずしも限定されないことが理解されるべきである。

【0166】

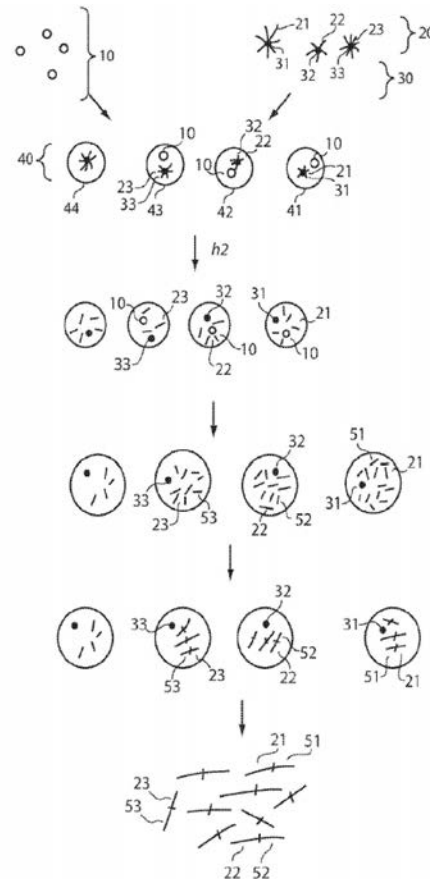
特許請求の範囲ならびに上記明細書において、“含む (comprising)”、“包含する (including)”、“担持する (carrying)”、“有する (having)”、“含有する (containing)”、“伴う (involving)”、“保持する (holding)”、“構成される (composed of)”などのような全ての移行句はオープンエンド型であり、すなわち、含むが、それに限定されないと理解されるべきである。“～からなる”および“～本質的になる”の移行句のみが、それぞれ、United States Patent Office Manual of Patent Examining Procedures, Section 2111.03に記載されるように、クローズ型またはセミクローズ型の移行句である。

【図 1 A】



PE-1	ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	配列番号 1
PE-2	GTCTCGGCAATCTCTGTAAC	配列番号 2
ユニバーサルプライマー	GCTCTGTGCTCTCG	配列番号 3
逆方向プライマーD (例)	GCTCTGTGCTCTCGTAGAGGAGTCATCGCAGTG	配列番号 4
逆方向プライマーE (例)	GTCTCGGCAATCTCTGTAAC GACCTACCAATCCATTCCTT	配列番号 5
バーコード-1 (例)	AAACAAC	
バーコード-2 (例)	TCGGTCATTCA	配列番号 6

【図 1 B】



【配列表】

2018511341000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/027734																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 15/10; C12P 19/34; C12Q 1/68 (2016.01) CPC - B01F 13/0069; B01L 3/5027; B01L 3/502784; C12N 15/1037; C12N 15/1065; C12Q 1/680 (2016.05) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - C12N 15/10; C12P 19/34; C12Q 1/68 (2016.01) CPC - B01F 13/0069; B01L 3/5027; B01L 3/502784; C12N 15/1037; C12N 15/1065; C12Q 1/6806 (2016.05) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 506/4; 506/28; 506/41 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar, Google. Search terms used: barcode, oligonucleotide, droplet, nucleic acid sequence, primer, amplification, adapter, microfluidic, hydrogel																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2015/0011432 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 08 January 2015 (08.01.2015) entire document</td> <td>95, 96</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>3, 46-49, 92-94</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2015/0051117 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 February 2015 (19.02.2015)</td> <td>1-3, 46-49, 92-94</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2015/0057163 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al) 26 February 2015 (26.02.2015) entire document</td> <td>1-3, 46-49</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008/000090 A1 (UNIVERSITY OF GUELPH et al) 03 January 2008 (03.01.2008) entire document</td> <td>1-3, 46-49, 92-96</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0130919 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document</td> <td>1-3, 46-49, 92-96</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2015/0011432 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 08 January 2015 (08.01.2015) entire document	95, 96	Y		3, 46-49, 92-94	Y	US 2015/0051117 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 February 2015 (19.02.2015)	1-3, 46-49, 92-94	Y	US 2015/0057163 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al) 26 February 2015 (26.02.2015) entire document	1-3, 46-49	A	WO 2008/000090 A1 (UNIVERSITY OF GUELPH et al) 03 January 2008 (03.01.2008) entire document	1-3, 46-49, 92-96	A	US 2013/0130919 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document	1-3, 46-49, 92-96
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	US 2015/0011432 A1 (BIO-RAD LABORATORIES, INC.) 08 January 2015 (08.01.2015) entire document	95, 96																					
Y		3, 46-49, 92-94																					
Y	US 2015/0051117 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 19 February 2015 (19.02.2015)	1-3, 46-49, 92-94																					
Y	US 2015/0057163 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION et al) 26 February 2015 (26.02.2015) entire document	1-3, 46-49																					
A	WO 2008/000090 A1 (UNIVERSITY OF GUELPH et al) 03 January 2008 (03.01.2008) entire document	1-3, 46-49, 92-96																					
A	US 2013/0130919 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 23 May 2013 (23.05.2013) entire document	1-3, 46-49, 92-96																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 15 June 2016		Date of mailing of the international search report 14 JUL 2016																					
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT DSP: 571-272-7774																					

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2018/027734

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/027734

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-46, 50-91
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ファイダン・ジャン

アメリカ合衆国 0 2 1 3 8 マサチューセッツ州ケンブリッジ、カーkland・ストリート 7 4 番

(72)発明者 ジョン・ハイマン

アメリカ合衆国 0 2 1 4 3 マサチューセッツ州サマービル、ローレル・テラス 1 8 番、アパートメント 2

(72)発明者 アロン・モシュ・クライン

アメリカ合衆国 0 2 1 1 5 マサチューセッツ州ボストン、ロングウッド・アベニュー 2 0 0 番、ウォレン・アルパート 5 3 6

Fターム(参考) 4B063 QA13 QQ01 QQ42 QQ52 QR07 QR08 QR20 QR32 QR62 QS02
QS25