

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7358388号
(P7358388)

(45)発行日 令和5年10月10日(2023.10.10)

(24)登録日 令和5年9月29日(2023.9.29)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 Q	1/6806(2018.01)	C 1 2 Q	1/6806	Z
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 Q	1/6853(2018.01)	C 1 2 Q	1/6853	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	C 1 2 Q	1/6876	Z
請求項の数 15 (全63頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2020-561800(P2020-561800)	(73)特許権者	595117091	
(86)(22)出願日	令和1年5月1日(2019.5.1)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カン	
(65)公表番号	特表2021-522796(P2021-522796		パニー	
	A)		BECTON, DICKINSON A	
(43)公表日	令和3年9月2日(2021.9.2)		ND COMPANY	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/030175		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 0	
(87)国際公開番号	WO2019/213237		7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レ	
(87)国際公開日	令和1年11月7日(2019.11.7)		イクス ベクトン・ドライブ 1	
審査請求日	令和4年5月2日(2022.5.2)		1 BECTON DRIVE, FRA	
(31)優先権主張番号	62/666,506		NKLIN LAKES, NEW JE	
(32)優先日	平成30年5月3日(2018.5.3)		RSEY 0 7 4 1 7 - 1 8 8 0, UN	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100094569	
			弁理士 田中 伸一郎	
		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 反対側の転写物末端における分子バーコーディング

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中の核酸標的にオリゴヌクレオチドバーコードを結合させるための方法であって、

複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の前記核酸標的のコピーにバーコードを付けて、前記核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程、ここで、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む；

前記標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを前記複数のバーコード付き核酸分子に結合させて、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程、ここで、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを結合させる工程は、

(a) 前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを前記複数のバーコード付き核酸分子にライゲートする工程、及び／又は

(b) 末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、複数のアデノシンーリン酸を前記複数のバーコード付き核酸分子に付加する工程、ここで、前記標的結合領域は、ポリ(dT)配列を含む、を含む；

前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程；及び

前記複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程を含む方法。

【請求項2】

(a) 前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識、その相補体又はそれらの組合せの数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する、又は

(b) 前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する

工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の方法であって、

(a) 前記複数の標的の前記コピーにバーコードを付ける工程は、

(i) 前記核酸標的のコピーを前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させる工程、ここで、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、前記核酸標的にハイブリダイズすることが可能な前記標的結合領域を含む；及び

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長して、前記複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含むか、又は

(ii) 前記核酸標的のコピーを前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させる工程、ここで、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、前記標的結合領域を含み、前記標的結合領域は、前記核酸標的にハイブリダイズする；及び

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長して、前記複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み、

及び／又は

(b) 前記方法が、前記複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み、

ここで、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを結合させる工程は、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを前記複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合させて、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の相補体をそれぞれ含む前記複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含む、前記方法。

【請求項4】

請求項2又は3に記載の方法であって、

(a) 前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記分子標識の前記相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程を含み、ここで、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程は、前記複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程を含む、

又は

(b) 前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記複数の伸長したバーコード付き核酸分子のコピーを生成する工程を含み、ここで、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子の前記コピーに関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程を含む、

前記方法。

【請求項5】

10

20

30

40

50

サンプル中の核酸標的の数を決定するための方法であって、

サンプル中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工程、ここで、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び前記核酸標的にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域を含み、且つ、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む；

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長して、前記核酸標的の少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数の核酸分子を生成する工程；

前記複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程；

前記標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを前記複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合させて、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程、ここで、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを結合させる工程は、

(a) 前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを前記複数のバーコード付き核酸分子にライゲートする工程、及び／又は

(b) 末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、複数のアデノシンリン酸を前記複数のバーコード付き核酸分子に付加する工程、ここで、前記標的結合領域は、ポリ(dT)配列を含む工程、

を含む；

前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程、；

前記複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程；

前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記分子標識の前記相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程；並びに

前記複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程を含む方法。

【請求項6】

前記分子標識は、前記複数のバーコード付き核酸分子の前記3'末端を伸長した後に前記分子標識の前記相補体にハイブリダイズされ、前記方法は、前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記複数の単一標識核酸分子を生成する前に、前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を変性する工程を含む、請求項4又は5に記載の方法。

【請求項7】

請求項5又は6に記載の方法であって、

前記サンプル中の前記核酸標的のコピーを接触させる工程は、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工程を含み、

前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程は、前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記複数の核酸標的の前記コピーを伸長して、前記複数の核酸標的の1つの少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み、且つ

前記核酸標的の数を決定する工程は、前記複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む前記複数の単一標識核酸分子の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する前記分子標識の前記相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記複数の核酸標的のそれぞれの数を決定する工程を含み、

前記複数の核酸標的の前記それぞれの前記配列は、前記複数の核酸標的の前記それぞれの部分配列を含む、

前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法であって、

(i) 前記複数のバーコード付き核酸分子中の前記核酸標的の前記配列は、前記核酸標的の部分配列を含む、及び／又は

(ii) 前記標的結合領域は、遺伝子特異的配列を含む、

前記方法。

【請求項 9】

請求項 3～8 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程は、

(a) 前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを逆転写して、複数のバーコード付き相補的デオキシリボ核酸 (cDNA) 分子を生成する工程を含むか、又は

(b) 5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性及び 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも 1 つが欠如した DNA ポリメラーゼを用いて、前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程を含む、

前記方法。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の方法であって、

(a) 前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子の配列情報を得る工程を含み、ここで、前記配列情報を得る工程は、シーケンシングアダプターを前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に結合させる工程を含む；

(b) 前記標的結合領域の前記相補体は、

(i) 前記標的結合領域の逆相補的配列を含むか、又は

(ii) 前記標的結合領域の相補的配列を含む；

(c) 前記分子標識の前記相補体は、

(i) 前記分子標識の逆相補的配列を含むか、又は

(ii) 前記分子標識の相補的配列を含む；

(d) 以下：

(i) 前記複数のバーコード付き核酸分子は、バーコード付きデオキシリボ核酸 (DNA) 分子を含むか、又は

(ii) 前記バーコード付き核酸分子は、バーコード付きリボ核酸 (RNA) 分子を含む；

(e) 前記核酸標的は、核酸分子を含むか、それから本質的になるか又はそれからなり、ここで、

(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) テールを含む RNA 又はそれらの任意の組合せを含む、及び／又は

(ii) 前記核酸標的は、細胞成分結合試薬を含む、ここで、前記核酸分子は、前記細胞成分結合試薬に関連付けられている；

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

(g) 前記オリゴヌクレオチドバーコードは、同一のサンプル標識を含む；

(h) 前記オリゴヌクレオチドバーコードは、同一の細胞標識を含む；及び／又は

(j) 前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも 1 つは、

(i) 前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられているか、

(ii) 前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき

10

20

30

40

50

、固体担体から解離するか、

(i i i) 前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられていないか、

(i v) 前記複数のバーコード付き核酸分子の前記 3' 末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、固体担体に関連付けられているか、

(v) 前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体から解離するか、又は

(v i) 前記複数のバーコード付き核酸分子の前記 3' 末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、固体担体に関連付けられていない、前記方法。

【請求項 1 1】

請求項 1 0 に記載の方法であって、前記固体担体は、

(a) 合成粒子を含むか、又は

(b) 平坦な表面を含む、

前記方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法であって、

(a) 前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも 1 つは、

(i) 前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、溶液中にあるか、又は

(i i) 前記複数のバーコード付き核酸分子の前記 3' 末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、溶液中にあり、及び／又は

(b) 前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも 1 つは溶液中にあり、前記溶液は、1 つ以下の細胞を含む区画中に分配されており、且つ前記区画は、マイクロドロップ、マイクロウェル又は流体デバイスのチャンバの少なくとも 1 つを含む、

前記方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記サンプルは、単一細胞を含み、前記方法は、前記複数の前記オリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を前記サンプル中の前記単一細胞に関連付ける工程を含む、前記方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の方法であって、

(a) 前記合成粒子及び前記単一細胞は、同じウェル中にある、

(b) 前記合成粒子及び前記単一細胞は、同じドロップレット中にある、

(c) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも 1 つは、

(i) 前記合成粒子上に固定されるか、

(i i) 前記合成粒子上に部分的に固定されるか、

(i i i) 前記合成粒子に封入されるか、又は

(i v) 前記合成粒子に部分的に封入される、

及び／又は

(d) 前記合成粒子は、崩壊性である、

(e) 前記合成粒子は、ビーズを含む、

(f) 前記合成粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、

10

20

30

40

50

(g) 前記方法は、前記合成粒子を前記単一細胞に関連付けた後、前記単一細胞を溶解することを含む、及び／又は

(h) 前記合成粒子は、ポリジメチルシロキサン（P D M S）、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、常磁性材料、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、シリコン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、

前記方法。

【請求項 15】

請求項 13 又は 14 に記載の方法であって、

(a) 前記合成粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテイン A コンジュゲートビーズ、プロテイン G コンジュゲートビーズ、プロテイン A / G コンジュゲートビーズ、プロテイン L コンジュゲートビーズ、オリゴ（d T）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ又はそれらの任意の組合せを含む、及び／又は

(b) 前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、リンカー官能基を含み、前記合成粒子は、固体担体官能基を含み、

前記担体官能基及び前記リンカー官能基は、互いに関連付けられ、且つ

前記リンカー官能基及び前記担体官能基は、個別に、C 6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、

前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2018年5月3日に出願された米国仮特許出願第62／666，506号明細書の利益を主張するものであり、この仮特許出願は、全体が参照により本明細書に援用される。

【0002】

本開示は、概して、分子生物学の分野、特に分子バーコーディングを用いたマルチオミクス解析に関する。

【背景技術】

【0003】

分子バーコーディングなどの方法及び技術は、例えば、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅及び次世代シーケンシング（NGS）を用いて、細胞の状態を決定するために遺伝子発現プロファイルを解読することを含む単一細胞トランスクリプトミクス解析に有用である。分子バーコーディングは、単一細胞プロテオミクス解析にも有用である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の標的にオリゴヌクレオチドバーコードを結合するための方法が含まれる。例として、標的は、核酸標的を含むか、それから本質的になるか又はそれからなり得る。いくつかの実施形態において、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の核酸標的のコピーにバーコードを付けて、核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体

10

20

30

40

50

をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程とを含む。任意選択的に、本方法は、複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程をさらに含む。標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程は、オリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み得る。任意選択的に、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅する工程をさらに含む。サンプル中の核酸標的の数は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅する工程後に決定され得る。いくつかの実施形態において、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識、その相補体又はそれらの組合せの数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程を含む。

【0005】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の標的の数を決定するための方法が含まれる。例として、標的は、核酸を含むか、それから本質的になるか又はそれからなり得る。いくつかの実施形態において、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の核酸標的のコピーにバーコードを付けて、核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程とを含む。任意選択的に、本方法は、複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程をさらに含む。標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程は、オリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み得る。任意選択的に、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅する工程をさらに含む。サンプル中の核酸標的の数は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅する工程後に決定され得る。いくつかの実施形態において、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識、その相補体又はそれらの組合せの数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程を含む。

【0006】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかは、複数の標的のコピーにバーコードを付ける工程を含み、この工程は、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工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、核酸標的にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域を含む、工程と；オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長して、複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程とを含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかは、複数の標的のコピーにバーコードを付ける工

程を含み、この工程は、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工程を含み、ここで、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、標的結合領域を含む。標的結合領域は、核酸標的にハイブリダイズし得る。本方法は、オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長して、複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程をさらに含み得る。

【0007】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかは、複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み、ここで、標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程は、標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含む。

【0008】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかは、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程を含み、ここで、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程は、複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程を含む。

【0009】

いくつかの実施形態において、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子のコピーを生成する工程を含み、ここで、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子のコピーに関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程を含む。

【0010】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の核酸標的の数を決定するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、サンプル中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工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び核酸標的にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長して、核酸標的の少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数の核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程と；複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程とを含む。

【0011】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、分子標識は、複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長した後、分子標識の相補体にハイブリダイズされ、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の単一標識核酸分子を生成する前に、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を変性する工程を含む。サンプル中の核酸標的のコピーを接触させる工程は、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工程を含み得る。核酸標的のコピー

ーを伸長する工程は、オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた複数の核酸標的のコピーを伸長して、複数の核酸標的の1つの少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み得る。核酸標的の数を決定する工程は、複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む複数の単一標識核酸分子の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の複数の核酸標的のそれぞれの数を決定する工程を含み得る。複数の核酸標的のそれぞれの配列は、複数の核酸標的のそれぞれの部分配列を含み得る。

【0012】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、複数のバーコード付き核酸分子中の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含む。標的結合領域は、遺伝子特異的配列を含み得る。標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程は、標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子にライゲートする工程を含み得る。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、標的結合領域は、ポリ(dT)配列を含むことができ、ここで、標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、複数のアデノシンリン酸を複数のバーコード付き核酸分子に付加する工程を含む。

【0014】

20

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長する工程は、オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを逆転写して、複数のバーコード付き相補的デオキシリボ核酸(cDNA)分子を生成する工程を含み得る。オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長する工程は、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性及び3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも1つが欠如したDNAポリメラーゼを用いて、オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長する工程を含み得る。DNAポリメラーゼは、クレノウ断片を含み得る。

【0015】

30

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかは、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子の配列情報を得る工程を含む。配列情報を得る工程は、シーケンシングアダプターを複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に結合する工程を含み得る。

【0016】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、標的結合領域の相補体は、標的結合領域の逆相補的配列を含み得る。標的結合領域の相補体は、標的結合領域の相補的配列を含み得る。分子標識の相補体は、分子標識の逆相補的配列を含み得る。分子標識の相補体は、分子標識の相補的配列を含み得る。

【0017】

40

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、複数のバーコード付き核酸分子は、バーコード付きデオキシリボ核酸(DNA)分子を含み得る。バーコード付き核酸分子は、バーコード付きリボ核酸(RNA)分子を含み得る。核酸標的は、核酸分子を含み得る。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)テールを含むRNA又はそれらの任意の組合せを含み得る。

【0018】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、核酸標的は、細胞成分結合試薬を含み得る。核酸分子は、細胞成分結合試薬に関連付けられ得る。本方法は、核酸分子及び細胞成分結合試薬を解離させる工程を含み得る。

50

【0019】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、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ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドバーコードは、同一のサンプル標識を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各サンプル標識は、少なくとも6ヌクレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドバーコードは、同一の細胞標識を含み得る。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ヌクレオチドを含み得る。

【0020】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられる。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成するとき、固体担体から解離し得る。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられ得る。

【0021】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、固体担体に関連付けられる。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、固体担体から解離し得る。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、固体担体に関連付けられ得る。固体担体は、合成粒子を含み得る。固体担体は、平坦な表面（例えば、顕微鏡スライドなどのスライド及びカバースリップ）を含み得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される溶液は、1つ以下の細胞を含む区画中に分配され得る。区画は、マイクロドロプレット、基材上などのウェル（例えば、マイクロウェル）又はマイクロ流体デバイスなどの流体デバイスのチャンバの少なくとも1つを含み得る。マイクロドロプレットは、ヒドロゲルを含み得る。

【0022】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成するとき、溶液中にある。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、溶液中にあり得る。

【0023】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、サンプルは、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サンプル中の単一細胞に関連付ける工程を含む。本方法は、合成粒子を単一細胞に関連付けた後、単一細胞を溶解させる工程を含み得る。単一細胞を溶解させる工程は、サンプルを加熱する工程、サンプルを洗浄剤と接触させる工程、サンプルのpHを変化させる工程又はそれらの任意の組合せを含み得る。合成粒子及び単一細胞は、同じウェル中にあり得る。合成粒子及び単一細胞は、同じドロプレット中にあり得る。

【0024】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される方法のいずれかについて、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子上に固定され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子上に部分的に固定され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子に封入され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子に部分的に封入され得る。合成粒子は、崩壊性であり得る。合成粒子は、ビーズを含み得る。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、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又はそれらの任意の組合せを含み得る。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、常磁性材料、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、シリコン及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み得る。合成粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、リンカー官能基を含み得る。合成粒子は、固体担体官能基を含み得る。担体官能基及びリンカー官能基は、互いに関連付けられ得る。リンカー官能基及び担体官能基は、個別に、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、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

10

20

【0025】

本明細書に開示されるものには、オリゴヌクレオチドバーコードをサンプル中の標的に結合し、サンプル中の標的の数を決定し、且つ／又はサンプル中の核酸標的の数を決定するためのキットが含まれる。いくつかの実施形態において、キットは、複数のオリゴヌクレオチドバーコードであって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び標的結合領域を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、複数のオリゴヌクレオチドバーコードと；末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ又はリガーゼと；5'－3'エキソヌクレアーゼ活性及び3'－5'エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも1つが欠如したDNAポリメラーゼとを含む。キットは、標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドをさらに含み得る。標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドは、cDNA分子などのDNA分子の3'末端への結合のために構成される。DNAポリメラーゼは、クレノウ断片を含み得る。キットは、緩衝液を含み得る。キットは、カートリッジを含み得る。キットは、逆転写反応のための1つ以上の試薬を含み得る。キットは、増幅反応のための1つ以上の試薬を含み得る。

30

【0026】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるいずれかのキット又は方法について、標的結合領域は、遺伝子特異的配列、オリゴ（dT）配列、ランダムマルチマー又はそれらの任意の組合せを含む。オリゴヌクレオチドバーコードは、同一のサンプル標識及び／又は同一の細胞標識を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各サンプル標識及び／又は細胞標識は、少なくとも6ヌクレオチドを含み得る。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ヌクレオチドを含み得る。

40

【0027】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるいずれかのキット又は方法について、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子上に固定される。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子上に部分的に固定され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子に封入され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子に部分的に封入され得る。合成粒子は、崩壊性であり得る。合成粒子は、ビーズを含み得る。ビーズ

50

は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA/Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ(dT)コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ又はそれらの任意の組合せを含み得る。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、常磁性材料、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、シリコン及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み得る。合成粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、リンカー官能基を含み得る。合成粒子は、固体担体官能基を含み得る。担体官能基及びリンカー官能基は、互いに関連付けられ得る。リンカー官能基及び担体官能基は、個別に、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、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】いくつかの実施形態の非限定的な例示的なバーコードを示す。

【図2】いくつかの実施形態のバーコーディング及びデジタルカウンティングの非限定的な例示的なワークフローを示す。

【図3】いくつかの実施形態に係る、複数の標的からの3'末端にバーコードを付けられた標的のインデックス付加ライブラリーを作製するための非限定的な例示的なプロセスを示す概略図である。

【図4A】いくつかの実施形態の、5'末端における核酸標的を遺伝子特異的に標識する非限定的な例示的な方法の概略図を示す。

【図4B】いくつかの実施形態の、5'末端における核酸標的を遺伝子特異的に標識する非限定的な例示的な方法の概略図を示す。

【図5A】いくつかの実施形態の全トランスクリプトーム解析のための、5'末端における核酸標的を標識する非限定的な例示的な方法の概略図を示す。

【図5B】いくつかの実施形態の全トランスクリプトーム解析のための、5'末端における核酸標的を標識する非限定的な例示的な方法の概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0029】

以下の詳細な説明において、その一部を成す添付の図面が参照される。これらの図面において、類似の符号は、典型的に、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、類似の構成要素を特定する。詳細な説明、図面及び特許請求の範囲に記載される例示的な実施形態は、限定的であることが意図されていない。本明細書に示される主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく他の実施形態が用いられ得、他の変更形態がなされ得る。本明細書に一般に記載され、図に示されるように、本開示の態様は、多様な異なる構成で配置され、置き換えられ、組み合わされ、分離され、且つ設計され得、それらは、全て本明細書において明示的に考えられ、本開示の一部を成すことが容易に理解されるであろう。

【0030】

本明細書において言及される全ての特許、公開特許出願、他の刊行物並びにGenBank及び他のデータベースからの配列は、関連技術に関して、その全体が参照により援用される。

【0031】

少数の核酸、例えばメッセンジャーリボ核酸(mRNA)分子を定量することは、例えば、異なる発生段階又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临床上重要である。しかしながら、特に分子数がごく少ない場合、核酸分子(例えば、mRNA分子)の絶対数を決定することは、非常に困難でもあり得る。サンプル中の分子の絶対数を決定するための一方法は、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分子の同一のコピーを産生する。しかしながら、PCRは、各分子が確率論的確率で複製し、この確率がPCRサイクル及び遺伝子配列によって変動するため、増幅バイアス及び不正確な遺伝子発現測定値が生じるといった欠点を有し得る。ユニーク分子標識（分子指標（MI）とも呼ばれる）を有する確率バーコードを用いて、分子をカウントし、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.（Palo Alto, CA））及びRhapsody（商標）アッセイ（Becton, Dickinson and Company（Franklin Lakes, NJ））などの確率バーコーディングは、逆転写（RT）中にmRNAを標識するために、分子標識（ML）を用いることにより、PCR及びライブラリー作製工程によって誘発されるバイアスを補正することができる。5'末端及び3'末端の一方又は両方における核酸標的の分子バーコーディングのための方法及び技術が必要とされている。

10

【0032】

Precise（商標）アッセイは、ポリ（T）オリゴヌクレオチド上に多数（例えば、6561～65536）のユニーク分子標識配列を有する確率バーコードの非枯渇プールを用いて、RT工程中、サンプル中の全てのポリ（A）-mRNAをハイブリダイズさせることができる。確率バーコードは、ユニバーサルPCRプライミング部位を含み得る。RT中、標的遺伝子分子は、確率バーコードとランダムに反応する。各標的分子は、確率バーコードとハイブリダイズして、確率バーコード付きの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。標識した後、マイクロウェルプレートのマイクロウェルからの確率バーコード付きcDNA分子を、PCR増幅及びシーケンシングのために単一チューブ中にプールすることができる。未補正のシーケンシングデータを分析して、リードの数、ユニーク分子標識配列を有する確率バーコードの数及びmRNA分子の数を得ることができる。

20

【0033】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の標的にオリゴヌクレオチドバーコードを結合するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の核酸標的のコピーにバーコードを付けて、核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程とを含む。

30

【0034】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の標的の数を決定するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の核酸標的のコピーにバーコードを付けて、核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有

40

50

の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程とを含む。

【0035】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の核酸標的の数を決定するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、サンプル中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工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び核酸標的にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた核酸標的のコピーを伸長して、核酸標的の少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数の核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域及び標的結合領域の相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、ステムループを伸長して、分子標識及び分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程と；複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程とを含む。

【0036】

本明細書に開示されるものには、オリゴヌクレオチドバーコードをサンプル中の標的に結合し、サンプル中の標的の数を決定し、且つ／又はサンプル中の核酸標的の数を決定するためのキットが含まれる。いくつかの実施形態において、キットは、複数のオリゴヌクレオチドバーコードであって、複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び標的結合領域を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、複数のオリゴヌクレオチドバーコードと；末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ又はリガーゼと；5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性及び3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも1つが欠如したDNAポリメラーゼとを含む。DNAポリメラーゼは、クレノウ断片を含み得る。キットは、緩衝液を含み得る。キットは、カートリッジを含み得る。キットは、逆転写反応のための1つ以上の試薬を含み得る。キットは、増幅反応のための1つ以上の試薬を含み得る。

【0037】

特に定義されない限り、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。当業者に入手可能な参考文献の例としては、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) が挙げられる。

【0038】

本明細書において使用される際、「アダプター」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、関連核酸の増幅又はシーケンシングを促進するための配列を指し得る。関連核酸は、標的核酸を含み得る。関連核酸は、空間標識、標的標識、サンプル標識、指標標識又はバーコード配列（例えば、分子標識）の1つ以上を含み得る。アダプターは、線状であり得る。アダプターは、予めアデニル化されたアダプターであり得る。アダプターは、二本鎖又は一本鎖であり得る。1つ以上のアダプターは、核酸の5' 又は3' 末端に位置し得る。アダプターが5' 及び3' 末

50

端に既知の配列を含む場合、既知の配列は、同じであるか又は異なる配列であり得る。ポリヌクレオチドの5'及び／又は3'末端に位置するアダプターは、表面上に固定された1つ以上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり得る。アダプターは、いくつかの実施形態において、ユニバーサル配列を含み得る。ユニバーサル配列は、2つ以上の核酸分子と共通のヌクレオチド配列の領域であり得る。2つ以上の核酸分子は、異なる配列の領域も有し得る。したがって、例えば、5'アダプターは、同一及び／又はユニバーサル核酸配列を含むことができ、3'アダプターは、同一及び／又はユニバーサル配列を含み得る。複数の核酸分子の異なるメンバー中に存在し得る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用いて、複数の異なる配列の複製又は増幅を可能にし得る。同様に、核酸分子のコレクションの異なるメンバー中に存在し得る少なくとも1つ、2つ（例えば、対）若しくはそれを超える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、対）若しくはそれを超える単一のユニバーサルプライマーを用いて、複数の異なる配列の複製又は増幅を可能にし得る。したがって、ユニバーサルプライマーは、このようなユニバーサル配列にハイブリダイズし得る配列を含む。標的核酸配列担持分子は、修飾されて、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端又は両端に結合させ得る。標的核酸に結合された1つ以上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のための部位を提供することができる。標的核酸に結合された1つ以上のユニバーサルプライマーは、互いに同じであるか又は異なり得る。

【0039】

本明細書において使用される際、「関連付けられる」又は「に関連付けられる」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、2つ以上の種がある時点で共配置されているとして同定可能であることを意味する。関連付けは、2つ以上の種が類似の容器内にあるか又はあったことを意味する。関連付けは、インフォーマティクス関連付けであり得る。例えば、2つ以上の種に関連するデジタル情報が記憶され得、それを用いて、これらの種の1つ以上がある時点で共配置されたことを決定することができる。関連付けは、物理的関連付けでもあり得る。いくつかの実施形態において、2つ以上の関連付けられる種は、互いに又は共通の固体若しくは半固体の表面に「テザー連結」、「結合」又は「固定」される。関連付けは、ビーズなどの固体又は半固体の担体に標識を結合するための共有結合手段又は非共有結合手段を指し得る。関連付けは、標的と標識との間の共有結合であり得る。関連付けは、2つの分子（標的分子及び標識など）間のハイブリダイゼーションを含み得る。

【0040】

本明細書において使用される際、「相補的」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、2つのヌクレオチド間の精密なペアリングの能力を指し得る。例えば、核酸の所与の位置のヌクレオチドが別の核酸のヌクレオチドと水素結合可能である場合、2つの核酸は、その位置で互いに相補的であると見なされる。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場合に「部分的」であり得るか、又はそれは、一本鎖分子間の全体的な相補性が存在する場合に完全であり得る。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1のヌクレオチド配列は、第2の配列の「相補体」とであるといえる。第1のヌクレオチド配列が第2の配列の逆（すなわちヌクレオチドの順序が逆）の配列に相補的である場合、第1のヌクレオチド配列は、第2の配列の「逆相補体」とであるといえる。本明細書において使用される際、「相補的」配列は、配列の「相補体」又は「逆相補体」を指し得る。ある分子が別の分子にハイブリダイズし得る場合、それは、ハイブリダイズしている分子に相補的であるか又は部分的に相補的であり得ることが本開示から理解される。

【0041】

本明細書において使用される際、「デジタルカウンティング」という用語は、サンプル中の標的分子の数を推定する方法を指し得る。デジタルカウンティングは、サンプル中の

10

20

30

40

50

標的に関連付けられたユニーク標識の数を決定する工程を含み得る。この方法は、本質的に確率的であり得、分子をカウントする問題を、同一の分子の位置決定及び同定の問題から、所定の標識のセットの検出に関する一連のあり／なしのデジタル問題に変換する。

【0042】

本明細書において使用される際、1つ又は複数の「標識」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、サンプル内の標的に関連付けられる核酸コードを指し得る。標識は、例えば、核酸標識であり得る。標識は、全体的に又は部分的に増幅可能な標識であり得る。標識は、全体的に又は部分的にシーケンシング可能な標識であり得る。標識は、固有であると同定可能な天然核酸の一部であり得る。標識は、既知の配列であり得る。標識は、核酸配列の接合、例えば天然及び非天然配列の接合を含み得る。本明細書において使用される際、「標識」という用語は、「インデックス」、「タグ」又は「標識タグ」という用語と同義的に使用され得る。標識は、情報を伝達することができる。例えば、様々な実施形態において、標識は、サンプルの同一性、サンプル源、細胞の同一性及び／又は標的を決定するのに使用され得る。

【0043】

本明細書において使用される際、「非枯渇リザーバ」という用語は、多くの異なる標識から構成されたバーコード（例えば、確率バーコード）のプールを指し得る。非枯渇リザーバは、非枯渇リザーバが標的のプールに関連付けられる場合、各標的がユニークバーコードに関連付けられる可能性が高くなるように、多数の異なるバーコードを含み得る。各標識標的分子のユニーク性は、ランダム選択の統計により決定可能であり、標識の多様性と比較してコレクション中の同一の標的分子のコピー数に依存する。得られる標識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的性質によって決定可能であり、次に、検出されたバーコードの数の解析は、元のコレクション又はサンプル中に存在する標的分子の数の計算を可能にする。存在する標的分子のコピー数とユニークバーコードの数との比率が低い場合、標識標的分子は、非常にユニークである（すなわち2つ以上の標的分子が所与の標識で標識される確率が非常に低い）。

【0044】

本明細書において使用される際、「核酸」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、ポリヌクレオチド配列又はそのフラグメントを指す。核酸は、ヌクレオチドを含み得る。核酸は、細胞に対して外因性又は内因性であり得る。核酸は、無細胞環境中に存在し得る。核酸は、遺伝子又はそのフラグメントであり得る。核酸は、DNAであり得る。核酸は、RNAであり得る。核酸は、1つ以上のアナログ（例えば、改変された骨格、糖又は核酸塩基）を含み得る。アナログのいくつかの非限定的な例としては、5-ブロモウラシル、ペプチド核酸、ゼノ核酸、モルホリノ体、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、コルジセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に結合されたローダミン又はフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基アナログ、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、クエオシン及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」及び「標的核酸」は、同義的に使用され得る。

【0045】

核酸は、新たな又は向上した特徴（例えば、向上した安定性）を有する核酸を提供するために、1つ以上の修飾（例えば、塩基修飾、骨格修飾）を含み得る。核酸は、核酸アフィニティータグを含み得る。ヌクレオシドは、塩基-糖の組合せであり得る。ヌクレオシドの塩基部分は、複素環式塩基であり得る。このような複素環式塩基の2つの最も一般的なクラスは、プリン及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されたリン酸基をさらに含むヌクレオシドであり得る。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドでは、リン酸基は、糖の2'、3'又は5'ヒドロキシル部分に結合され得る。核酸を形成する際、リン酸基は、隣接ヌクレオシドを互いに共有結合して、直鎖状ポリマ

10

20

30

40

50

一化合物を形成し得る。したがって、この直鎖状ポリマー化合物のそれぞれの末端は、さらに連結されて、環状化合物を形成し得るが；直鎖状化合物が一般に好適である。さらに、直鎖状化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有し得るため、完全に又は部分的に二本鎖の化合物を生成するようにフォールディングし得る。核酸内では、リン酸基は、核酸のヌクレオシド間骨格を形成するものとして一般的に示され得る。結合又は骨格は、3' - 5' ホスホジエステル結合であり得る。

【0046】

核酸は、修飾骨格及び／又は修飾ヌクレオシド間結合を含み得る。修飾骨格は、骨格中にリン原子を保持するもの及び骨格中にリン原子を有さないものを含み得る。リン原子の中に含有する好適な修飾核酸骨格は、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、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば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、ホスフィネート、3' - アミノホスホルアミデート及びアミノアルキルホスホルアミデートを含むホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チエノホスホルアミデート、チエノアルキルホスホネート、チエノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート及び通常の3' - 5' 結合、2' - 5' 結合アナログを有するボラノホスフェート並びに1つ以上のヌクレオチド間結合が3' - 3'、5' - 5' 又は2' - 2' 結合である逆極性を有するものを含み得る。

【0047】

核酸は、短鎖アルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル又はシクロアルキルヌクレオシド間結合又は1つ以上の短鎖ヘテロ原子又は複素環式ヌクレオシド間結合によって形成されるポリヌクレオチド骨格を含み得る。これらは、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）；シロキサ骨格；スルフィド、スルホキシド及びスルホン骨格；ホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチル及びチオホルムアセチル骨格；リボアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノ及びメチレンヒドラジノ骨格；スルホネート及びスルホンアミド骨格；アミド骨格を有するもの；並びに混合N、O、S及びCH₂構成部分を有する他のものを含み得る。

【0048】

核酸は、核酸ミメティックを含み得る。「ミメティック」という用語は、フラノース環のみ又はフラノース環及びヌクレオチド間結合の両方が非フラノース基で置換されているポリヌクレオチドを含むことが意図され得、フラノース環のみの置換は、糖サロゲートであるとも示され得る。複素環式塩基部分又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保持され得る。1つのこのような核酸は、ペプチド核酸（PNA）であり得る。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換され得る。ヌクレオチドは、保持され得、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合される。PNA化合物中の骨格は、PNAにアミド含有骨格を与える2つ以上の結合されたアミノエチルグリシン単位を含み得る。複素環式塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接又は間接的に結合され得る。

【0049】

核酸は、モルホリノ骨格構造を含み得る。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み得る。これらの実施形態のいくつかにおいて、ホスホロジアミデート又は他の非ホスホジエステルヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル結合を置換し得る。

【0050】

核酸は、モルホリノ環に結合された複素環式塩基を有する結合されたモルホリノ単位（例えば、モルホリノ核酸）を含み得る。結合基は、モルホリノ核酸中のモルホリノモノマー単位を結合し得る。非イオン性モルホリノ系オリゴマー化合物は、細胞タンパク質とのより少ない望ましくない相互作用を有し得る。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、核酸の非イオン性ミミックであり得る。モルホリノクラス内の様々な化合物は、異なる結合基を

用いて連結され得る。ポリヌクレオチドミメティックのさらなるクラスは、シクロヘキセニル核酸 (CeNA) と呼ばれ得る。核酸分子中に通常存在するフラノース環は、シクロヘキセニル環で置換され得る。CeNA DMT 保護ホスホロアミダイトモノマーは、ホスホロアミダイト化学を用いたオリゴマー化合物合成のために調製及び使用され得る。核酸鎖中への CeNA モノマーの組み込みにより、DNA/RNA ハイブリッドの安定性を高めることができる。CeNA オリゴアデニレートは、天然複合体に類似した安定性を有する核酸相補体との複合体を形成し得る。さらなる修飾は、2'-ヒドロキシル基が糖環の 4' 炭素原子に結合され、2'-C、4'-C-オキシメチレン結合を形成することによって二環式糖部分を形成するロックド核酸 (LNA) を含み得る。結合は、2' 炭素原子と 4' 炭素原子とを架橋するメチレン (-CH₂) 基 (式中、n は、1 又は 2 である) であり得る。LNA 及び LNA アナログは、相補的核酸との非常に高い二本鎖熱安定性 (T_m = +3 ~ +10 °C)、3'-エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性及び良好な溶解性を示し得る。

10

【0051】

核酸は、核酸塩基 (単に「塩基」と呼ばれることが多い) 修飾又は置換も含み得る。本明細書において使用される際、「非修飾」又は「天然」の核酸塩基は、プリン塩基、(例えば、アデニン (A) 及びグアニン (G)) 及びピリミジン塩基、(例えば、チミン (T)、シトシン (C) 及びウラシル (U)) を含み得る。修飾核酸塩基は、他の合成及び天然の核酸塩基、例えば 5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの 6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの 2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び 2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、5-プロピニル (-C=C-CH₃) ウラシル及びシトシン及びピリミジン塩基の他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、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-ヒドロキシル及び他の 8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に 5-ブロモ、5-トリフルオロメチル及び他の 5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び 7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニン及び 8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び 7-デアザアデニン及び 3-デアザグアニン及び 3-デアザアデニンを含み得る。修飾核酸塩基は、三環式ピリミジン、例えばフェノキサジンシチジン (1H-ピリミド (5, 4-b) (1, 4) ベンゾオキサジン-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)、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) ベンゾオキサジン-2 (3H)-オン) などの G-クランプ、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)、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) ベンゾオキサジン-2 (3H)-オン) などの G-クランプ、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) を含み得る。

20

30

40

【0052】

本明細書において使用される際、「サンプル」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、標的を含む組成物を指し得る。開示される方法、デバイス及びシステムによる分析に好適なサンプルとしては、細胞、組織、器官又は生物が挙げられる。いくつかの実施形態において、サンプルは、単一細胞を含む。いくつかの実施形態において、サンプルは、少なくとも 100,000、200,000、300,000、500,000、800,000 又は 1,000,000 個の単一細胞を含むか、それから本質的になるか又はそれからなる。

【0053】

本明細書において使用される際、「サンプリングデバイス」又は「デバイス」という用

50

語は、サンプルのセクションの採取及び／又は基材上へのセクションの配置を行い得るデバイスを指し得る。サンプルデバイスは、例えば、蛍光活性化細胞選別（FACS）機、セルソーター機、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、ブレードグリッド及び／又はマイクロトームを指し得る。

【0054】

本明細書において使用される際、「固体担体」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、複数のバーコード（例えば、確率バーコード）が結合され得る離散した固体又は半固体の表面を指し得る。固体担体は、核酸が（例えば、共有結合又は非共有結合で）固定され得るプラスチック、セラミック、金属又はポリマー材料（例えば、ヒドロゲル）から構成された任意のタイプの中実、多孔性若しくは中空のスフェア、ボール、ベアリング、シリンダー又は他の類似の構成を包含し得る。固体担体は、球状（例えば、マイクロスフェア）であり得るか又は非球状若しくは不規則形状、例えば立方体形、直方体形、角錐形、円柱形、円錐形、楕円形又はディスク形などを有し得る離散粒子を含み得る。ビーズは、非球状の形状であり得る。アレイ状に離間して配置された複数の固体担体は、基材を含まないこともあり得る。固体担体は、「ビーズ」という用語と同義的に使用され得る。粒子又は表面などの固体担体は、本明細書のいずれの箇所に記載されていても（例えば、バーコードが固体担体、粒子、ビーズなどの上に固定される場合）、別の選択肢は、細胞標識を区画に1対1で関連付ける（したがって細胞標識を区画中の単一細胞に1対1で関連付ける）ように区画中に溶液を分配することであると考えられる。区画の例としては、マイクロドロップレットなどのドロップレット、マルチウェルプレートなどの基材上にあり得るウェル（例えば、マイクロウェル）及び流体デバイス（マイクロ流体デバイスなど）中のチャンバが挙げられ得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される溶液は、1つ以下の細胞を含む区画中に分配され得る。区画は、マイクロドロップレット、マイクロウェル又はマイクロ流体デバイスなどの流体デバイスのチャンバの少なくとも1つを含み得る。マイクロドロップレットは、ヒドロゲルを含み得る。バーコードは、基材区画上に固定され得るか又は区画中の溶液中で遊離状態であり得る。

【0055】

本明細書において使用される際、「確率バーコード」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し得る。確率バーコードは、確率バーコーディングに使用され得るポリヌクレオチド配列であり得る。確率バーコードは、サンプル中の標的を定量するのに使用され得る。確率バーコードは、標識を標的に関連付けた後に起こり得るエラーを制御するのに使用され得る。例えば、確率バーコードは、増幅又はシーケンシングのエラーを評価するのに使用され得る。標的に関連付けられた確率バーコードは、確率バーコード標的又は確率バーコードタグ標的と呼ばれ得る。

【0056】

本明細書において使用される際、「遺伝子特異的確率バーコード」という用語は、標識及び遺伝子特異的である標的結合領域を含むポリヌクレオチド配列を指し得る。確率バーコードは、確率バーコーディングに使用され得るポリヌクレオチド配列であり得る。確率バーコードは、サンプル中の標的を定量するのに使用され得る。確率バーコードは、標識を標的に関連付けた後に起こり得るエラーを制御するのに使用され得る。例えば、確率バーコードは、増幅又はシーケンシングのエラーを評価するのに使用され得る。標的に関連付けられた確率バーコードは、確率バーコード標的又は確率バーコードタグ標的と呼ばれ得る。

【0057】

本明細書において使用される際、「確率バーコーディング」という用語は、核酸のランダム標識化（例えば、バーコーディング）を指し得る。確率バーコーディングは、標識を標的に関連付けて、標的に関連付けられた標識を定量するために再帰的ポアソンストラテジーを用いることができる。本明細書において使用される際、「確率バーコーディング」という用語は、「確率標識化」と同義的に使用され得る。

【0058】

本明細書において使用される際、「標的」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、バーコード（例えば、確率バーコード）に関連付けられ得る組成物を指し得る。開示される方法、デバイス及びシステムによる分析に好適な例示的な標的としては、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、mRNA、マイクロRNA、tRNAなどが挙げられる。標的は、一本鎖又は二本鎖であり得る。いくつかの実施形態において、標的は、タンパク質、ペプチド又はポリペプチドであり得る。いくつかの実施形態において、標的は、脂質である。本明細書において使用される際、「標的」は、「種」と同義的に使用され得る。

【0059】

本明細書において使用される際、「逆転写酵素」という用語は、本明細書を考慮して、当技術分野におけるその慣例的な及び通常の意味を有する。それは、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し得る。一般に、このような酵素としては、限定はされないが、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及びそれらの突然変異体、変異体又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、レトロ逆転写酵素及びグループ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*) L1、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又はゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*) GsII-ICC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（すなわちレトロ、グループIIイントロン及び特に多様性生成レトロエレメント）が挙げられ得る。

【0060】

「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」又は「ユニバーサルアダプター配列」という用語は、同義的に使用されて、バーコード（例えば、確率バーコード）を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され得るヌクレオチド配列を指す。ユニバーサルアダプター配列は、例えば、本開示の方法に使用される全てのバーコードに対してユニバーサルである既知の配列であり得る。例えば、複数の標的が、本明細書に開示される方法を用いて標識される場合、標的特異的配列のそれぞれは、同じユニバーサルアダプター配列に結合され得る。いくつかの実施形態において、2つ以上のユニバーサルアダプター配列は、本明細書に開示される方法に使用され得る。例えば、複数の標的が、本明細書に開示される方法を用いて標識される場合、標的特異的配列の少なくとも2つは、異なるユニバーサルアダプター配列に結合される。ユニバーサルアダプタープライマー及びその相補体は、2つのオリゴヌクレオチドに含まれ得、その1つは、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、標的核酸と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り得る。バーコード及びユニバーサルアダプター配列の相補的配列を含む第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て、標的特異的バーコード（例えば、標的特異的確率バーコード）を生成し得る。いくつかの実施形態において、ユニバーサルアダプタープライマーは、本開示の方法に使用されるユニバーサルPCRプライマーと異なる配列を有する。

【0061】

バーコード

確率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2015/0299784号明細書、国際公開第2015/031691号パンフレット及びFuet al, Proc Natl Acad Sci U. S. A. 2011 May

10

20

30

40

50

31;108(22):9026-31に記載されている(これらの刊行物のそれぞれの内容は、全体が参照により本明細書に援用される)。いくつかの実施形態において、本明細書に開示されるバーコードは、標的に確率標識(例えば、バーコード、タグ)を付けるのに使用され得るポリヌクレオチド配列であり得る確率バーコードであり得る。確率バーコードの異なるバーコード配列の数と、標識される標的のいずれかの存在の数との比率が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又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る場合、バーコードは、確率バーコードと呼ばれ得る。標的は、同一又はほぼ同一の配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であり得る。確率バーコードの異なるバーコード配列の数と、標識される標的のいずれかの存在の数との比率が少なくとも又は多くとも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若しくは100:1である場合、バーコードは、確率バーコードと呼ばれ得る。確率バーコードのバーコード配列は、分子標識と呼ばれ得る。

【0062】

バーコード、例えば確率バーコードは、1つ以上の標識を含み得る。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)、サンプル標識、プレート標識、空間標識及び／又はプレ空間標識が挙げられ得る。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、バーコードを固体担体105に連結し得る5'アミンを含み得る。バーコードは、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識及び／又は分子標識を含み得る。バーコードは、ユニバーサル標識、細胞標識及び分子標識を含み得る。バーコードは、ユニバーサル標識、空間標識、細胞標識及び分子標識を含み得る。バーコード中の様々な標識(限定はされないが、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識及び／又は分子標識を含む)の順序は、変動し得る。例えば、図1に示されるように、ユニバーサル標識は、最も5'側の標識であり得、分子標識は、最も3'側の標識であり得る。空間標識、次元標識及び細胞標識は、任意の順序であり得る。いくつかの実施形態において、ユニバーサル標識、空間標識、次元標識、細胞標識及び分子標識は、任意の順序であり得る。バーコードは、標的結合領域を含み得る。標的結合領域は、サンプル中の標的(例えば、標的核酸、RNA、mRNA、DNA)と相互作用し得る。例えば、標的結合領域は、mRNAのポリ(A)テールと相互作用し得るオリゴ(dT)配列を含み得る。ある場合には、バーコードの標識(例えば、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識及びバーコード配列)は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20又はそれを超えるヌクレオチドによって隔てられ得る。

【0063】

標識、例えば細胞標識は、規定の長さ、例えばそれぞれ7ヌクレオチド(いくつかのハミングエラー訂正コードに使用されるビット数に相当する)の核酸部分配列の固有のセットを含むことができ、これらは、エラー訂正能力を与えるように設計され得る。エラー訂正部分配列のセットは、7つのヌクレオチド配列を含み、これらは、セット内の配列の任意のペア組合せが規定の「遺伝子距離」(又はミスマッチ塩基の数)を示すように設計され得、例えば、エラー訂正部分配列のセットは、3つのヌクレオチドの遺伝子距離を示すように設計され得る。この場合、標識化標的核酸分子(以下により詳細に説明される)についての配列データのセット内のエラー訂正配列の見直しにより、増幅又はシーケンシングエラーを検出又は訂正することが可能になる。いくつかの実施形態において、エラー訂正コードを作製するのに使用される核酸部分配列の長さは、変動し得、例えば、それらは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、31、40、50又

クレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態において、他の長さの核酸部分配列は、エラー訂正コードを作製するのに使用され得る。

【0064】

バーコードは、標的結合領域を含み得る。標的結合領域は、サンプル中の標的と相互作用し得る。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、ポリ（A）テールをそれぞれ含むRNA又はそれらの任意の組合せであるか又はそれを含み得る。いくつかの実施形態において、複数の標的は、デオキシリボ核酸（DNA）を含み得る。

【0065】

いくつかの実施形態において、標的結合領域は、mRNAのポリ（A）テールと相互作用し得るオリゴ（dT）配列を含み得る。バーコードの標識（例えば、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識及びバーコード配列（例えば、分子標識））の1つ以上は、バーコードの残りの標識の別の1つ又は2つからスペーサによって隔てられ得る。スペーサは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19若しくは20又はそれを超えるヌクレオチドであり得る。いくつかの実施形態において、バーコードの標識のいずれもスペーサによって隔てられない。

【0066】

ユニバーサル標識

バーコードは、1つ以上のユニバーサル標識を含み得る。いくつかの実施形態において、1つ以上のユニバーサル標識は、所与の固体担体に結合されるバーコードのセット中の全てのバーコードについて同じであり得る。いくつかの実施形態において、1つ以上のユニバーサル標識は、複数のビーズに結合される全てのバーコードについて同じであり得る。いくつかの実施形態において、ユニバーサル標識は、シーケンシング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み得る。シーケンシングプライマーは、ユニバーサル標識を含むバーコードをシーケンシングするために使用され得る。シーケンシングプライマー（例えば、ユニバーサルシーケンシングプライマー）は、ハイスループットシーケンシングプラットフォームに関連付けられるシーケンシングプライマーを含み得る。いくつかの実施形態において、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み得る。いくつかの実施形態において、ユニバーサル標識は、シーケンシングプライマー及び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み得る。シーケンシングプライマー又は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得る。ユニバーサル標識は、バーコードの転写を開始するのに使用され得る配列を含み得る。ユニバーサル標識は、バーコード又はバーコード内の領域の伸長に使用され得る配列を含み得る。ユニバーサル標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。例えば、ユニバーサル標識は、少なくとも約10ヌクレオチドを含み得る。ユニバーサル標識は、少なくとも又は多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200又は300ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態において、切断性リンカー又は修飾ヌクレオチドは、担体からバーコードを切断して除去することを可能にするユニバーサル標識配列の一部であり得る。

【0067】

次元標識

バーコードは、1つ以上の次元標識を含み得る。いくつかの実施形態において、次元標識は、標識化（例えば、確率標識化）が行われた次元に関する情報を提供する核酸配列を含み得る。例えば、次元標識は、標的にバーコードが付けられた時点に関する情報を提供することができる。次元標識は、サンプルのバーコーディング（例えば、確率バーコード

10

20

30

40

50

イング)の時点に関連付けられ得る。次元標識は、標識化の時点で活性化され得る。異なる次元標識は、異なる時点で活性化され得る。次元標識は、標的、標的のグループ及び／又はサンプルにバーコードを付けた順序に関する情報を提供する。例えば、細胞集団は、細胞周期のG0期にバーコードを付けられ得る。細胞は、細胞周期のG1期にバーコード(例えば、確率バーコード)で再びパルスされ得る。細胞は、細胞周期のS期にバーコードで再びパルスされ得、他の時期も同様である。各パルス時(例えば、細胞周期の各期)のバーコードは、異なる次元標識を含み得る。このように、次元標識は、細胞周期のいずれの期に標的に標識したかに関する情報を提供する。次元標識は、多くの異なる生物時間を精査することができる。例示的な生物時間としては、限定はされないが、細胞周期、転写(例えば、転写開始)及び転写物分解が挙げられ得る。別の例において、サンプル(例えば、細胞、細胞集団)は、薬剤治療及び／又は療法前及び／又は後に標識を付けられ得る。固有の標的のコピー数の変化は、薬剤及び／又は療法に対するサンプルの反応の指標であり得る。

【0068】

次元標識は、活性化可能であり得る。活性化可能な次元標識は、特定の時点で活性化され得る。活性化可能な標識は、例えば、構成的に活性化され得る(例えば、オフに切り替わらない)。活性化可能な次元標識は、例えば、可逆的に活性化され得る(例えば、活性化可能な次元標識は、オン及びオフの切替えが可能である)。次元標識は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回又はそれを超えて可逆的に活性化可能であり得る。次元標識は、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10回又はそれを超えて可逆的に活性化可能であり得る。いくつかの実施形態において、次元標識は、蛍光、光、化学的イベント(例えば、切断、別の分子のライゲーシオン、修飾(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)の付加、光化学的イベント(例えば、光ケージング)及び非天然ヌクレオチドの導入により活性化され得る。

【0069】

次元標識は、いくつかの実施形態において、所与の固体担体(例えば、ビーズ)に結合される全てのバーコード(例えば、確率バーコード)について同一であり得るが、異なる固体担体(例えば、ビーズ)について異なり得る。いくつかの実施形態において、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%又は100%が同じ次元標識を含み得る。いくつかの実施形態において、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも60%が同じ次元標識を含み得る。いくつかの実施形態において、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも95%が同じ次元標識を含み得る。

【0070】

複数の固体担体(例えば、ビーズ)には、 10^6 程度又はそれを超えるユニーク次元標識配列が存在し得る。次元標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。次元標識は、少なくとも又は多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200又は300ヌクレオチド長であり得る。次元標識は、約5～約200ヌクレオチドを含み得る。次元標識は、約10～約150ヌクレオチドを含み得る。次元標識は、約20～約125ヌクレオチド長を含み得る。

【0071】

空間標識

バーコードは、1つ以上の空間標識を含み得る。いくつかの実施形態において、空間標識は、バーコードに関連付けられる標的分子の空間配向に関する情報を提供する核酸配列を含み得る。空間標識は、サンプル中の座標に関連付けられ得る。座標は固定座標であり得る。例えば、座標は、基材を基準にして固定され得る。空間標識は、二次元又は三次元のグリッドを基準にし得る。座標は、ランドマークを基準にして固定され得る。ランドマ

10

20

30

40

50

ークは、空間内で同定可能であり得る。ランドマークは、イメージング可能な構造であり得る。ランドマークは、生物学的構造体、例えば解剖学的ランドマークであり得る。ランドマークは、細胞ランドマーク、例えば細胞小器官であり得る。ランドマークは、色コード、バーコード、磁性、蛍光、放射能又はユニークなサイズ若しくは形状などの同定可能な識別子を有する構造体などの非天然ランドマークであり得る。空間標識は、物理的区画（例えば、ウェル、容器又はドロップレット）に関連付けられ得る。いくつかの実施形態において、空間内の1つ以上の位置にコードを付けるために、複数の空間標識が一緒に使用される。

【0072】

空間標識は、所与の固体担体（例えば、ビーズ）に結合される全てのバーコードについて同一であり得るが、異なる固体担体（例えば、ビーズ）について異なり得る。いくつかの実施形態において、同じ空間標識を含む同じ固体担体上のバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る。いくつかの実施形態において、同じ空間標識を含む同じ固体担体上のバーコードのパーセンテージは、少なくとも又は多くとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%若しくは100%であり得る。いくつかの実施形態において、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも60%が同じ空間標識を含み得る。いくつかの実施形態において、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも95%が同じ空間標識を含み得る。

【0073】

複数の固体担体（例えば、ビーズ）には、 10^6 程度又はそれを超えるユニーク空間標識配列が存在し得る。空間標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。空間標識は、少なくとも又は多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200若しくは300ヌクレオチド長であり得る。空間標識は、約5～約200ヌクレオチドを含み得る。空間標識は、約10～約150ヌクレオチドを含み得る。空間標識は、約20～約125ヌクレオチド長を含み得る。

【0074】

細胞標識

バーコード（例えば、確率バーコード）は、1つ以上の細胞標識を含み得る。いくつかの実施形態において、細胞標識は、いずれの標的核酸がいずれの細胞に由来するかを決定するための情報を提供する核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、細胞標識は、所与の固体担体（例えば、ビーズ）に結合される全てのバーコードについて同一であるが、異なる固体担体（例えば、ビーズ）について異なる。いくつかの実施形態において、同じ細胞標識を含む同じ固体担体上のバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る。いくつかの実施形態において、同じ細胞標識を含む同じ固体担体上のバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%若しくは100%又はそのような値の近似値であり得る。例えば、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも60%が同じ細胞標識を含み得る。別の例として、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも95%が同じ細胞標識を含み得る。

【0075】

複数の固体担体（例えば、ビーズ）には、 10^6 程度又はそれを超えるユニーク細胞標識配列が存在し得る。細胞標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。細胞標識は、少なくとも又は多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200若しくは300ヌクレオチド長であり得る。例えば、細胞標識は、

約5～約200ヌクレオチドを含み得る。別の例として、細胞標識は、約10～約150ヌクレオチドを含み得る。さらに別の例として、細胞標識は、約20～約125ヌクレオチド長を含み得る。

【0076】

バーコード配列

バーコードは、1つ以上のバーコード配列を含み得る。いくつかの実施形態において、バーコード配列は、バーコードにハイブリダイズされた標的核酸種の特定のタイプを同定するための情報を提供する核酸配列を含み得る。バーコード配列は、バーコード（例えば、標的結合領域）にハイブリダイズされた標的核酸種の特定の存在に対するカウンターを提供する（例えば、概算を提供する）核酸配列を含み得る。

10

【0077】

いくつかの実施形態において、バーコード配列の多様なセットが所与の固体担体（例えば、ビーズ）に結合される。いくつかの実施形態において、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のユニーク分子標識配列が存在し得る。例えば、複数のバーコードは、固有の配列を有する約6561のバーコード配列を含み得る。別の例として、複数のバーコードは、固有の配列を有する約65536のバーコード配列を含み得る。いくつかの実施形態において、少なくとも又は多くとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 又は 10^9 のユニークバーコード配列が存在し得る。ユニーク分子標識配列は、所与の固体担体（例えば、ビーズ）に結合され得る。いくつかの実施形態において、ユニーク分子標識配列は、粒子（例えば、ヒドロゲルビーズ）によって部分的に又は全体的に包含される。

20

【0078】

バーコードの長さは、異なる実装において異なり得る。例えば、バーコードは、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。別の例として、バーコードは、少なくとも又は多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200若しくは300ヌクレオチド長であり得る。

【0079】

分子標識

バーコード（例えば、確率バーコード）は、1つ以上の分子標識を含み得る。分子標識は、バーコード配列を含み得る。いくつかの実施形態において、分子標識は、バーコードにハイブリダイズされた標的核酸種の特定のタイプを同定するための情報を提供する核酸配列を含み得る。分子標識は、バーコード（例えば、標的結合領域）にハイブリダイズされた標的核酸種の特定の存在に対するカウンターを提供する核酸配列を含み得る。

30

【0080】

いくつかの実施形態において、分子標識の多様なセットが所与の固体担体（例えば、ビーズ）に結合される。いくつかの実施形態において、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のユニーク分子標識配列が存在し得る。例えば、複数のバーコードは、固有の配列を有する約6561の分子標識を含み得る。別の例として、複数のバーコードは、固有の配列を有する約65536の分子標識を含み得る。いくつかの実施形態において、少なくとも又は多くとも 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 又は 10^9 のユニーク分子標識配列が存在し得る。ユニーク分子標識配列を有するバーコードは、所与の固体担体（例えば、ビーズ）に結合され得る。

40

【0081】

複数の確率バーコードを用いたバーコーディング（例えば、確率バーコーディング）では、異なる分子標識配列の数と、標的のいずれかの存在の数との比率は、1：1、2：1、3：1、4：1、5：1、6：1、7：1、8：1、9：1、10：1、11：1、1

50

2 : 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又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る。標的は、同一又はほぼ同一の配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であり得る。いくつかの実施形態において、異なる分子標識配列の数と、標的のいずれかの存在の数との比率は、少なくとも又は多くとも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若しくは100 : 1である。

【0082】

分子標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。分子標識は、少なくとも又は多くとも1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200若しくは300ヌクレオチド長であり得る。

【0083】

標的結合領域

バーコードは、捕捉プローブなどの1つ以上の標的結合領域を含み得る。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、対象の標的とハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、標的（例えば、標的核酸、標的分子、例えば分析される細胞核酸）、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み得る。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、特定の標的核酸の特定の位置に結合（例えば、ハイブリダイズ）し得る核酸配列を含み得る。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、制限酵素部位オーバーハング（例えば、EcoRI付着末端オーバーハング）への特異的なハイブリダイゼーションが可能な核酸配列を含み得る。次に、バーコードは、制限部位オーバーハングに相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートし得る。

【0084】

いくつかの実施形態において、標的結合領域は、非特異的標的核酸配列を含み得る。非特異的標的核酸配列は、標的核酸の特定の配列に関係なく、複数の標的核酸に結合し得る配列を指し得る。例えば、標的結合領域は、ランダムマルチマー配列又はmRNA分子のポリ(A)テールにハイブリダイズするオリゴ(dT)配列を含み得る。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、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマー又は任意の長さのより高次のマルチマー配列であり得る。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、所与のビーズに結合された全てのバーコードについて同じである。いくつかの実施形態において、所与のビーズに結合された複数のバーコードの標的結合領域は、2つ以上の異なる標的結合配列を含み得る。標的結合領域は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。標的結合領域は、多くとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド長又はそれを超え得る。

【0085】

いくつかの実施形態において、標的結合領域は、ポリアデニル化末端を含むmRNAとハイブリダイズし得るオリゴ(dT)を含み得る。標的結合領域は、遺伝子特異的であり得る。例えば、標的結合領域は、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得る。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、オリゴ(dT)を含まない。標的結合領域は、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ヌクレオチド長又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。標的結合領域は、少なくとも又は多

10

20

30

40

50

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若しくは30ヌクレオチド長であり得る。標的結合領域は、約5〜30ヌクレオチド長であり得る。バーコードが遺伝子特異的標的結合領域を含む場合、このバーコードは、本明細書において遺伝子特異的バーコードと呼ばれ得る。

【0086】

配向性

確率バーコード（例えば、確率バーコード）は、バーコードを配向（例えば、アラインメント）するのに使用され得る1つ以上の配向性を含み得る。バーコードは、等電点電気泳動用の部分を含み得る。異なるバーコードは、異なる等電点電気泳動点を含み得る。これらのバーコードがサンプルに導入される場合、サンプルは、バーコードを既知の形態に配向するために等電点電気泳動を行い得る。このように、配向性は、サンプルにおいてバーコードの既知のマップを作成するのに使用され得る。例示的な配向性としては、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、伝導率及び／又はセルフアセンブリが挙げられる。例えば、セルフアセンブリの配向性を有するバーコードは、活性化時に特定の配向に自己集合し得る（例えば、核酸ナノ構造）。

【0087】

親和性

バーコード（例えば、確率バーコード）は、1つ以上の親和性を含み得る。例えば、空間標識は、親和性を含み得る。親和性は、別のエンティティ（例えば、細胞受容体）へのバーコードの結合を促進し得る化学的及び／又は生物学的部分を含み得る。例えば、親和性は、抗体、例えばサンプル上の特定の部分（例えば、受容体）に特異的な抗体を含み得る。いくつかの実施形態において、抗体は、バーコードを特定の細胞型又は分子に誘導し得る。特定の細胞型若しくは分子及び／又はその近傍にある標的が標識化され得る（例えば、確率標識化される）。抗体はバーコードを特定の位置に誘導することができるため、親和性は、いくつかの実施形態において、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又はポリクローナル抗体であり得る。抗体は、ヒト化されているか又はキメラであり得る。抗体は、ネイキッド抗体又は融合抗体であり得る。

【0088】

抗体は、全長（すなわち天然であるか若しくは通常の免疫グロブリン遺伝子フラグメント組み換えプロセスによって形成される）免疫グロブリン分子（例えば、IgG抗体）又は抗体フラグメントのような、免疫グロブリン分子の免疫活性（すなわち特異的結合）部分であり得る。

【0089】

抗体フラグメントは、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、sFvなどの抗体の一部であり得る。いくつかの実施形態において、抗体フラグメントは、全長抗体によって認識される同じ抗原に結合し得る。抗体フラグメントは、抗体の可変領域からなる単離されたフラグメント、例えば重鎖及び軽鎖の可変領域からなる「Fv」フラグメント並びに軽鎖及び重鎖の可変領域がペプチドリンカーによって接続された組み換え一本鎖ポリペプチド分子（「scFvタンパク質」）を含み得る。例示的な抗体としては、限定はされないが、癌細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面受容体（CD8、CD34、CD45）に結合する抗体及び治療用抗体が挙げられ得る。

【0090】

ユニバーサルアダプタープライマー

バーコードは、1つ以上のユニバーサルアダプタープライマーを含み得る。例えば、遺伝子特異的確率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み得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、全てのバーコードに対してユニバーサルであるヌクレオチド配列を指し得る。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のに使用され得る。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ヌクレオチド長又はこれらのヌクレオチド長のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値のヌクレオチド長であり得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、少なくとも又は多くとも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若しくは30ヌクレオチド長であり得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、5～30ヌクレオチド長であり得る。

【0091】

リンカー

バーコードが2つ以上のタイプの標識（例えば、2つ以上の細胞標識又は2つ以上のバーコード配列、例えば1つの分子標識）を含む場合、標識には、リンカー標識配列が組み入れられ得る。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又はそれを超えるヌクレオチド長であり得る。リンカー標識配列は、多くとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50又はそれを超えるヌクレオチド長であり得る。ある場合には、リンカー標識配列は、12ヌクレオチド長である。リンカー標識配列は、バーコードの合成を促進するのに使用され得る。リンカー標識は、エラー訂正（例えば、ハミング）コードを含み得る。

【0092】

固体担体

本明細書に開示される確率バーコードなどのバーコードは、いくつかの実施形態において、固体担体と結合され得る。固体担体は、例えば、合成粒子であり得る。いくつかの実施形態において、固体担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）の確率バーコードの分子標識などのバーコード配列（例えば、第1のバーコード配列）の一部又は全てが少なくとも1ヌクレオチド異なる。同じ固体担体上のバーコードの細胞標識は、同じであり得る。異なる固体担体上のバーコードの細胞標識は、少なくとも1ヌクレオチド異なり得る。例えば、第1の固体担体上の第1の複数のバーコードの第1の細胞標識は、同じ配列を有し得、第2の固体担体上の第2の複数のバーコードの第2の細胞標識は、同じ配列を有し得る。第1の固体担体上の第1の複数のバーコードの第1の細胞標識及び第2の固体担体上の第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ヌクレオチド異なり得る。細胞標識は、例えば、約5～20ヌクレオチド長であり得る。バーコード配列は、例えば、約5～20ヌクレオチド長であり得る。合成粒子は、例えば、ビーズであり得る。

【0093】

ビーズは、例えば、シリカゲルビーズ、制御細孔ガラスビーズ、磁気ビーズ、Dyna bead、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又はそれらの任意の組合せであり得る。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、常磁性材料、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、シリコン又はそれらの任意の組合せなどの材料を含み得る。

【0094】

いくつかの実施形態において、ビーズは、バーコード又は確率バーコードで官能化された、ポリマービーズ、例えば変形性ビーズ又はゲルビーズ（例えば、10X Genomics（San Francisco, CA）製のゲルビーズなど）であり得る。いくつかの実装において、ゲルビーズは、ポリマーベースのゲルを含み得る。ゲルビーズは、例えば、1つ以上のポリマー前駆体をドロップレット中に封入することによって作製され得る。促進剤（例えば、テトラメチルエチレンジアミン（TEMED））にポリマー前駆体を曝露すると、ゲルビーズが作製され得る。

【0095】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、粒子は、崩壊性（例えば、溶解性、分解性）であり得る。例えば、ポリマービーズは、例えば、所望の条件下で、溶解、溶融又は分解し得る。所望の条件は、環境条件を含み得る。所望の条件は、制御された様式で、ポリマービーズの溶解、溶融又は分解をもたらし得る。ゲルビーズは、化学的刺激、物理的刺激、生物学的刺激、熱刺激、磁気刺激、電気刺激、光刺激又はそれらの任意の組合せにより、溶解、溶融又は分解し得る。

【0096】

例えば、オリゴヌクレオチドバーコードなどの被検物質及び／又は試薬は、ゲルビーズの内側表面（例えば、オリゴヌクレオチドバーコード及び／又はオリゴヌクレオチドバーコードを作製するのに使用される材料の拡散によってアクセス可能な内部）及び／又はゲルビーズの外側表面又は本明細書に記載される任意の他のマイクロカプセルにカップリング／固定され得る。カップリング／固定は、化学結合（例えば、共有結合、イオン結合）又は物理的現象（例えば、ファン・デル・ワールス力、双極子間相互作用など）の任意の形態を介するものであり得る。いくつかの実施形態において、ゲルビーズ又は本明細書に記載される任意の他のマイクロカプセルに対する試薬のカップリング／固定は、例えば、不安定部分（例えば、本明細書に記載される化学架橋剤を含む化学架橋剤）を介するなど、可逆性であり得る。刺激を適用すると、不安定部分は、切断されて、固定された試薬が遊離され得る。いくつかの実施形態において、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される場合、還元剤へのジスルフィド結合の曝露により、ジスルフィド結合が切断され、オリゴヌクレオチドバーコードがビーズから遊離され得る。不安定部分は、ゲルビーズ若しくはマイクロカプセルの一部として、試薬若しくは被検物質をゲルビーズ若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且つ／又は試薬若しくは被検物質の一部として含まれ得る。いくつかの実施形態において、複数のバーコードの少なくとも1つのバーコードは、粒子上に固定されるか、粒子上に部分的に固定されるか、粒子に封入されるか、粒子に部分的に封入されるか又はそれらの任意の組合せであり得る。

【0097】

いくつかの実施形態において、ゲルビーズは、限定はされないが、ポリマー、熱感受性ポリマー、感光性ポリマー、磁気ポリマー、pH感受性ポリマー、塩感受性ポリマー、化学的感受性ポリマー、高分子電解質、多糖類、ペプチド、タンパク質及び／又はプラスチックを含む様々な異なるポリマーを含み得る。ポリマーとしては、限定はされないが、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）、ポリ（スルホン酸スチレン）（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（ジアリルジメチル塩化アンモニウム）（PDADMAC）、ポリ（ピロール）（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）（PTHF）、ポリ（ヘキシルビオロゲン）（PHV）、ポリ（L-リジン）（PLL）、ポリ（L-アルギニン）（PARG）、ポリ（乳酸-グリコール酸共重合体）（PLGA）などの材料が挙げられ得る。

【0098】

多くの化学的刺激がビーズの破壊、溶解又は分解を引き起こすのに使用される。これらの化学的変化の例としては、限定はされないが、ビーズ壁に対するpH媒介による変化、架橋結合の化学的切断を介したビーズ壁の崩壊、ビーズ壁の解重合のトリガー及びビーズ壁スイッチング反応が挙げられ得る。また、バルク変化は、ビーズの破壊をトリガーするのに使用され得る。

【0099】

様々な刺激を介したマイクロカプセルに対するバルク又は物理的変化も、試薬を放出するようにカプセルを設計する上で多くの利点を提供する。バルク又は物理的変化は、巨視的規模で起こり、その際、ビーズ破断は、刺激によって誘導される機械物理的力の結果で

ある。これらのプロセスとしては、限定はされないが、圧力誘導破断、ビーズ壁溶融又はビーズ壁の多孔性変化が挙げられ得る。

【0100】

生物学的刺激も、ビーズの破壊、溶解又は分解をトリガーするのに使用され得る。一般に、生物学的トリガーは、化学的トリガーと類似しているが、多くの例では、生体分子又は酵素、ペプチド、糖類、脂肪酸、核酸などの生物系に一般的に存在す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のペプチド架橋を有するポリマーを含み得る。より具体的には、一例は、G F L G Kペプチド架橋を含むマイクロカプセルを含み得る。プロテアーゼカテプシンBなどの生物学的トリガーを加えると、シェル壁のペプチド架橋が切断され、ビーズの内容物が放出される。他の場合、プロテアーゼは、熱活性化され得る。別の例において、ビーズは、セルロースを含むシェル壁を含む。加水分解性酵素キトサンの添加は、セルロース結合の切断、シェル壁の解重合及びその内部内容物の放出のための生物学的トリガーとして役立つ。

10

【0101】

ビーズは、熱刺激の適用時にその内容物を放出するようにも誘導され得る。温度の変化は、ビーズに様々な変化を引き起こし得る。熱の変化は、ビーズ壁が崩壊するように、ビーズの溶融を引き起こし得る。他の場合、熱は、ビーズが破断又は破裂するように、ビーズの内部成分の内圧を高め得る。さらに他の場合、熱は、ビーズを収縮した脱水状態に変形させ得る。熱は、ビーズの壁内の熱感受性ポリマーにも作用して、ビーズの破壊を引き起こし得る。

20

【0102】

マイクロカプセルのビーズ壁に磁気ナノ粒子を含めると、ビーズの破断のトリガー並びに多くのビーズの誘導を可能にし得る。本開示のデバイスは、いずれの目的で電磁ビーズを含み得る。一例において、高分子電解質含有ビーズ中に Fe_3O_4 ナノ粒子に組み込むと、振動磁界刺激の存在下で破断がトリガーされる。

【0103】

ビーズはまた、電気刺激の結果として破壊、溶解又は分解され得る。前の項に記載される磁気粒子と同様に、電気感受性ビーズも、ビーズの破断のトリガー並びに電界下でのアラインメント、導電性又はレドックス反応などの他の機能を可能にし得る。一例において、電気感受性材料を含有するビーズは、内部試薬の放出を制御することができるように、電界下でアラインメントされる。他の例において、電界は、ビーズ壁自体の内部でレドックス反応を誘導することができ、それにより、多孔性を増加させ得る。

30

【0104】

光刺激も、ビーズを破壊するのに使用され得る。多数の光トリガーが可能であり、特定の範囲の波長の光子を吸収することができるナノ粒子及び発色団などの様々な分子を使用するシステムが挙げられる。例えば、金属酸化物コーティングがカプセルトリガーとして使用され得る。 SiO_2 で被覆された高分子電解質カプセルのUV照射は、ビーズ壁の崩壊をもたらし得る。さらに別の例において、アゾベンゼン基などのフォトスイッチ材料がビーズ壁に組み込まれ得る。UV又は可視光を適用すると、これらなどの化学物質は、光子の吸収時に、可逆的シストランス異性化を起こす。この態様において、光子スイッチの組み込みにより、光トリガーの適用時、ビーズ壁が崩壊するか又はより多孔性になり得る。

40

【0105】

例えば、図2に示されるバーコーディング（例えば、確率バーコーディング）の非限定的な例において、ブロック208で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、ビーズは、ブロック212でマイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに導入され得る。各マイクロウェルは、1つのビーズを含み得る。ビーズは、複数のバーコードを含み得る。バーコードは、ビーズに結合された5'アミン領域を含み得る。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）、標的結合領域又はそれらの任意の組合せを含み得る。

【0106】

50

本明細書に開示されるバーコードは、固体担体（例えば、ビーズ）に関連付けられ得る（例えば、結合され得る）。固体担体と結合されたバーコードは、それぞれユニーク配列を有する少なくとも100又は1000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み得る。いくつかの実施形態において、固体担体と結合された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み得る。いくつかの実施形態において、固体担体と結合された、あるパーセンテージのバーコードが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%又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る。別の例として、パーセンテージは、少なくとも又は多くとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%若しくは100%であり得る。いくつかの実施形態において、固体担体と結合されたバーコードは、同じ細胞標識を有し得る。異なる固体担体と結合されたバーコードは、ユニーク配列を有する少なくとも100又は1000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得る。

【0107】

本明細書に開示されるバーコードは、固体担体（例えば、ビーズ）に関連付けられ得る（例えば、結合され得る）。いくつかの実施形態において、サンプル中の複数の標的にバーコードを付ける工程は、複数のバーコードに関連付けられた複数の合成粒子を含む固体担体を用いて行われ得る。いくつかの実施形態において、固体担体は、複数のバーコードに関連付けられ複数の合成粒子を含み得る。異なる固体担体上の複数のバーコードの空間標識は、少なくとも1ヌクレオチド異なり得る。固体担体は、例えば、二次元又は三次元の複数のバーコードを含み得る。合成粒子は、ビーズであり得る。ビーズは、シリカゲルビーズ、制御細孔ガラスビーズ、電磁ビーズ、Dynabeads、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又はそれらの任意の組合せであり得る。固体担体は、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、抗体又はそれらの任意の組合せを含み得る。いくつかの実施形態において、固体担体は、浮動性であり得る。いくつかの実施形態において、固体担体は、半固体又は固体アレイに埋め込まれ得る。バーコードは、固体担体と結合されていなくてもよい。バーコードは、個別のヌクレオチドであり得る。バーコードは、基材と結合され得る。

【0108】

本明細書において使用される際、「テザー連結される」、「結合される」及び「固定される」という用語は、同義的に使用され、バーコードを固体担体に結合するための共有結合又は非共有結合の手段を指し得る。様々な異なる固体担体のいずれも、予め合成されたバーコードを結合するか又はバーコードのインサイチュ固相合成のための固体担体として使用され得る。

【0109】

いくつかの実施形態において、固体担体はビーズである。ビーズは、核酸が（例えば、共有結合又は非共有結合で）固定され得る、固体、多孔性若しくは中空のスフェア、ボール、ベアリング、シリンダー又は他の類似の構成の1つ以上のタイプを含み得る。ビーズは、例えば、プラスチック、セラミック、金属、ポリマー材料又はそれらの任意の組合せから構成され得る。ビーズは、球状（例えば、マイクロスフェア）であるか又は非球状若しくは不規則形状、例えば立方体形、直方体形、角錐形、円柱形、円錐形、楕円形又はディスク形などを有する離散粒子であるか又はそれを含み得る。いくつかの実施形態において、ビーズは、非球状の形状であり得る。

【0110】

ビーズは、限定はされないが、常磁性材料（例えば、マグネシウム、モリブデン、リチウム及びタンタル）、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、それらのいくつかの合金及びいくつか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、ナイロン又はそれらの任意の組合せを含む様

々な材料を含み得る。

【0111】

いくつかの実施形態において、ビーズ（例えば、標識が結合されたビーズ）は、ヒドロゲルビーズである。いくつかの実施形態において、ビーズは、ヒドロゲルを含む。

【0112】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、1つ以上の粒子（例えば、ビーズ）を含む。粒子のそれぞれは、複数のオリゴヌクレオチド（例えば、バーコード）を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、バーコード配列（例えば、分子標識配列）、細胞標識及び標的結合領域（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又はそれらの組合せ）を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれの細胞標識配列は、同じであり得る。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同定することができるように、異なり得る。異なる細胞標識配列の数は、異なる実装において異なり得る。いくつかの実施形態において、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 、これらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲又はそれを超えるか或いはそのような値の近似値であり得る。いくつかの実施形態において、細胞標識配列の数は、少なくとも又は多くとも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 若しくは 10^9 であり得る。いくつかの実施形態において、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以下又はそれを超えるものは、同じ細胞配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、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、多くとも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%又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、複数の粒子のいずれも、同じ細胞標識配列を含まない。

【0113】

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）を含み得る。いくつかの実施形態において、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 又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る。いくつかの実施形態において、バーコード配列の数は、少なくとも又は多くとも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 若しくは 10^9 であり得る。例えば、複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも100は、異なるバーコード配列を含む。別の例として、単一の粒子において、複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも100、500、1000、5000、10000、15000、20000、50000、これらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲又はそれを超えるものが異なるバーコード配列を含む。いくつかの実施形態は、バーコードを含む複数の粒子を提供する。いくつかの実施形態に

において、標識される標的の存在（又はコピー若しくは数）と、異なるバーコード配列との比率は、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又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、サンプル標識、ユニバーサル標識又はその両方をさらに含む。粒子は、例えば、ナノ粒子又は微小粒子であり得る。

【0114】

ビーズのサイズは、変動し得る。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り得る。いくつかの実施形態において、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マイクロメートル又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値であり得る。

【0115】

ビーズの直径は、基材のウェルの直径に関連し得る。いくつかの実施形態において、ビーズの直径は、ウェルの直径より、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値だけ長い又は若しくは短い長さであり得る。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た単一細胞）の直径に関連し得る。いくつかの実施形態において、ビーズの直径は、ウェルの直径より、少なくとも又は多くとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%若しくは100%長い又は短い長さであり得る。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た単一細胞）の直径に関連し得る。いくつかの実施形態において、ビーズの直径は、細胞の直径より、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%又はこれらの値のいずれか2つの間の数若しくは範囲或いはそのような値の近似値だけ長い又は若しくは短い長さであり得る。いくつかの実施形態において、ビーズの直径は、細胞の直径より、少なくとも又は多くとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%若しくは300%長い又は短い長さであり得る。

【0116】

ビーズは、基材に結合されるか及び／又は埋め込まれ得る。ビーズは、ゲル、ヒドロゲル、ポリマー及び／又はマトリックスに結合されるか及び／又は埋め込まれ得る。基材（例えば、ゲル、マトリックス、骨格又はポリマー）内のビーズの空間位置は、位置アドレスとして機能し得るビーズ上のバーコードに存在する空間標識を用いて同定され得る。

【0117】

ビーズの例としては、限定はされないが、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、電磁ビーズ、Dyna beads（登録商標）、MACS（登録商標）マイクロビーズ、抗体コンジュゲートビーズ（例えば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ）、プロテインAコンジュゲートビーズ、プロテインGコンジュゲートビーズ、プロテインA／Gコンジュゲートビーズ、プロテインLコンジュゲートビーズ、オリゴ（dT）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ及びBcmag（商標）カルボキシル末端電磁ビーズが挙げられ得る。

【0118】

ビーズは、1つの蛍光光学チャネル又は複数の光学チャネルで蛍光を発するように量子ドット又は蛍光色素に関連付けられ得る（例えば、それらに含浸され得る）。ビーズは、常磁性又は強磁性にするために、酸化鉄又は酸化クロムに関連付けられ得る。ビーズは、同定可能であり得る。例えば、ビーズは、カメラを用いてイメージングされ得る。ビーズは、ビーズに関連付けられた検出可能なコードを有し得る。例えば、ビーズは、バーコードを含み得る。ビーズは、例えば、有機又は無機溶液中での膨潤に起因してサイズ変化し

10

20

30

40

50

得る。ビーズは、疎水性であり得る。ビーズは、親水性であり得る。ビーズは、生体適合性であり得る。

【0119】

固体担体（例えば、ビーズ）は可視化され得る。固体担体は、可視化タグ（例えば、蛍光色素）を含み得る。固体担体（例えば、ビーズ）は、識別子（例えば、数）でエッチングされ得る。識別子は、ビーズをイメージングすることによって可視化され得る。

【0120】

固体担体は、不溶性、半溶解性又は不溶性材料を含み得る。固体担体は、それに結合されたリンカー、骨格、構成単位又は他の反応性部分を含む場合、「官能化された」と示され得る一方、固体担体は、それに結合されたこのような反応性部分を含まない場合、「非官能化」であり得る。固体担体は、マイクロタイターウェル形式；カラム中などでの流水式；又はディップスティック式（*d i p s t i c k*）などで、溶液中で遊離させた状態で用いられ得る。

【0121】

固体担体は、膜、紙、プラスチック、被覆表面、平坦な表面、ガラス、スライド、チップ又はそれらの任意の組合せを含み得る。固体担体は、樹脂、ゲル、ミクロスフェア又は他の幾何学形状の形態を取り得る。固体担体は、シリカチップ、微粒子、ナノ粒子、プレート、アレイ、毛細管、平坦な担体、例えばガラス繊維フィルタ、ガラス表面、金属表面（銅、金、銀、アルミニウム、ケイ素及び銅）、ガラス担体、プラスチック担体、ケイ素担体、チップ、フィルタ、膜、マイクロウェルプレート、スライド、プラスチック材料（マルチウェルプレート又は膜（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリニフッ化ビニリデンで形成される）を含む）及び／又はウエハー、コーム、ピン又はニードル（例えば、コンビナトリアル合成若しくは分析に好適なピンのアレイ）又はウエハー（例えば、シリコンウエハー）、フィルタ底部を有するか若しくは有さない窪みを備えたウエハーなどの平坦な表面の一連の窪み若しくはナノリットルウェル中のビーズを含み得る。

【0122】

固体担体は、ポリマーマトリックス（例えば、ゲル、ヒドロゲル）を含み得る。ポリマーマトリックスは、細胞内空間（例えば、細胞小器官の周り）を透過することが可能であり得る。ポリマーマトリックスは、循環系全体にわたって送られることも可能であり得る。

【0123】

基材及びマイクロウェルアレイ

本明細書において使用される際、基材は、あるタイプの固体担体を指し得る。基材は、本開示のバーコード又は確率バーコードを含み得る固体担体を指し得る。基材は、例えば、複数のマイクロウェルを含み得る。例えば、基材は、2つ以上のマイクロウェルを含むウェルアレイであり得る。いくつかの実施形態において、マイクロウェルは、規定の体積の小さい反応チャンバを含み得る。いくつかの実施形態において、マイクロウェルは、1つ以上の細胞を閉じ込めることができる。いくつかの実施形態において、マイクロウェルは、1つの細胞のみを閉じ込めることができる。いくつかの実施形態において、マイクロウェルは、1つ以上の固体担体を閉じ込めることができる。いくつかの実施形態において、マイクロウェルは、1つの固体担体のみを閉じ込めることができる。いくつかの実施形態において、マイクロウェルは、単一細胞及び単一固体担体（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み得る。

【0124】

バーコーディングの方法

本開示は、身体サンプル（例えば、組織、器官、腫瘍、細胞）の固有の位置における固有の標的の数を推定するための方法を提供する。本方法は、サンプルと近接させてバーコード（例えば、確率バーコード）を配置する工程、サンプルを溶解させる工程、固有の標的を、バーコードに関連付ける工程、標的を増幅する工程及び／又は標的をデジタルカウントする工程を含み得る。本方法は、バーコードの空間標識から得られた情報を分析す

る工程及び／又は視覚化する工程をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、本方法は、サンプル中の複数の標的を視覚化する工程を含む。サンプルのマップに複数の標的をマッピングする工程は、サンプルの二次元マップ又は三次元マップを作製する工程を含み得る。二次元マップ及び三次元マップは、サンプル中の複数の標的にバーコードを付ける（例えば、確率バーコードを付ける）前又は後に作製され得る。サンプル中の複数の標的を視覚化する工程は、サンプルのマップに複数の標的をマッピングする工程を含み得る。サンプルのマップに複数の標的をマッピングする工程は、サンプルの二次元マップ又は三次元マップを作製する工程を含み得る。二次元マップ及び三次元マップは、サンプル中の複数の標的にバーコードを付ける前又は後に作製され得る。いくつかの実施形態において、二次元マップ及び三次元マップは、サンプルを溶解させる前又は後に作製され得る。二次元マップ又は三次元マップを作製する前又は後にサンプルを溶解させる工程は、サンプルを加熱する工程、サンプルを洗浄剤と接触させる工程、サンプルのpHを変化させる工程又はそれらの任意の組合せを含み得る。

10

【0125】

いくつかの実施形態において、複数の標的にバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを複数の標的とハイブリダイズさせて、バーコード付き標的（例えば、確率バーコード付き標的）を生成する工程を含む。複数の標的にバーコードを付ける工程は、バーコード付き標的のインデックス付加ライブラリーを作製する工程を含み得る。バーコード付き標的のインデックス付加ライブラリーを作製する工程は、複数のバーコード（例えば、確率バーコード）を含む固体担体を用いて行われ得る。

20

【0126】

サンプル及びバーコードの接触

本開示は、サンプル（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、器官又は組織薄片を含むサンプルは、バーコード（例えば、確率バーコード）と接触され得る。細胞は、例えば、重力流によって接触され得、その場合、細胞は沈殿して単層を形成し得る。サンプルは、組織薄片であり得る。薄片は、基材上に配置され得る。サンプルは、一次元（例えば、平面表面を形成する）。サンプル（例えば、細胞）は、例えば、基材上に細胞を増殖させる／培養することによって基材全体に広げることができる。

【0127】

バーコードが標的と近接している場合、標的は、バーコードにハイブリダイズし得る。バーコードは、各固有の標的が本開示の固有のバーコードと結合し得るように、非枯渴的比率で接触され得る。標的とバーコードとの効率的な結合を確実にするために、標的は、バーコードに架橋され得る。

30

【0128】

細胞溶解

細胞及びバーコードの分配後、細胞は、標的分子を遊離するように溶解され得る。細胞溶解は、様々な手段のいずれかにより、例えば化学的若しくは生化学的手段、浸透圧ショック又は熱溶解、機械溶解若しくは光学溶解により達成され得る。細胞は、洗浄剤（例えば、SDS、ドデシル硫酸Li、Triton X-100、Tween-20若しくはNP-40）、有機溶媒（例えば、メタノール若しくはアセトン）又は消化酵素（例えば、プロテイナーゼK、ペプシン若しくはトリプシン）或い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って溶解され得る。標的及びバーコードの関連付けを向上させるために、標的分子の拡散速度は、例えば、温度の低下及び／又は溶解物の粘度の増加によって変化され得る。

40

【0129】

いくつかの実施形態において、サンプルは、ろ紙を用いて溶解され得る。ろ紙は、ろ紙の上を溶解緩衝液で浸漬可能である。ろ紙は、サンプルの溶解及び基材へのサンプルの標的のハイブリダイゼーションを促進し得る圧力でサンプルに適用され得る。

【0130】

50

いくつかの実施形態において、機械溶解、熱溶解、光学溶解及び／又は化学溶解によって行われ得る。化学溶解は、プロテイナーゼK、ペプシン及びトリプシンなどの消化酵素の使用を含み得る。溶解は、基材への溶解緩衝液の添加によって行われ得る。溶解緩衝液は、トリスHClを含み得る。溶解緩衝液は、少なくとも約0.01、0.05、0.1、0.5若しくは1M又はそれを超えるトリスHClを含み得る。溶解緩衝液は、多くとも約0.01、0.05、0.1、0.5若しくは1M又はそれを超えるトリスHClを含み得る。溶解緩衝液は、約0.1MのトリスHClを含み得る。溶解緩衝液のpHは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれを超え得る。溶解緩衝液のpHは、多くとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、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）を含み得る。溶解緩衝液中の塩の濃度は、少なくとも約0.1、0.5若しくは1M又はそれを超え得る。溶解緩衝液中の塩の濃度は、多くとも約0.1、0.5若しくは1M又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、溶解緩衝液中の塩の濃度は、約0.5Mである。溶解緩衝液は、洗浄剤（例えば、SDS、ドデシル硫酸Li、triton X、tween、NP-40）を含み得る。溶解緩衝液中の洗浄剤の濃度は、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%若しくは7%又はそれを超え得る。溶解緩衝液中の洗浄剤の濃度は、多くとも約0.0001%、0.0005%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%若しくは7%又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、溶解緩衝液中の洗浄剤の濃度は、約1%のドデシル硫酸Liである。溶解のための方法に使用される時間は、使用される洗浄剤の量に依存性し得る。いくつかの実施形態において、使用される洗浄剤が多くなるほど、溶解に必要な時間は短くなる。溶解緩衝液は、キレート剤（例えば、EDTA、EGTA）を含み得る。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若しくは30mM又はそれを超え得る。溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、多くとも約1、5、10、15、20、25若しくは30mM又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、約10mMである。溶解緩衝液は、還元試薬（例えば、β-メルカプトエタノール、DTT）を含み得る。溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は、少なくとも約1、5、10、15若しくは20mM又はそれを超え得る。溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は、多くとも約1、5、10、15若しくは20mM又はそれを超え得る。いくつかの実施形態において、溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は、約5mMである。いくつかの実施形態において、溶解緩衝液は、約0.1MのトリスHCl、約pH7.5、約0.5MのLiCl、約1%のドデシル硫酸リチウム、約10mMのEDTA及び約5mMのDTTを含み得る。

【0131】

溶解は、約4、10、15、20、25又は30℃の温度で行われ得る。溶解は、約1、5、10、15若しくは20分間又はそれを超えて行われ得る。溶解細胞は、少なくとも約100000、200000、300000、400000、500000、600000若しくは700000又はそれを超える標的核酸分子を含み得る。溶解細胞は、多くとも約100000、200000、300000、400000、500000、600000若しくは700000又はそれを超える標的核酸分子を含み得る。

【0132】

標的核酸分子へのバーコードの結合

細胞の溶解及びそれからの核酸分子の放出後、核酸分子は、共局在化された固体担体のバーコードにランダムに関連付けられ得る。関連付けは、標的核酸分子の相補的部分へのバーコードの標的認識領域のハイブリダイゼーションを含み得る（例えば、バーコードのオリゴ（dT）は、標的のポリ（A）テールと相互作用し得る）。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、特定の安定なハイブリッドの形成を促進するように選択され得る。いくつかの実施形態において

、溶解した細胞から放出された核酸分子は、基材上の複数のプローブに関連付けする（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て、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1鎖合成のためのプライマーとして作用し得る。例えば、図2、ブロック216に示されるバーコーディングの非限定的な例において、mRNA分子は、ビーズ上のバーコードにハイブリダイズし得る。例えば、一本鎖ヌクレオチドフラグメントは、バーコードの標的結合領域にハイブリダイズし得る。

【0133】

結合は、バーコードの標的認識領域及び標的核酸分子の一部のライゲーションをさらに含み得る。例えば、標的結合領域は、制限部位オーバーハング（例えば、EcoRI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であり得る核酸配列を含み得る。アッセイ手順は、標的核酸を制限酵素（例えば、EcoRI）で処理して、制限部位オーバーハングを生成する工程をさらに含み得る。次に、バーコードは、制限部位オーバーハングに相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートされ得る。リガーゼ（例えば、T4 DNAリガーゼ）は、2つのフラグメントを連結するために使用され得る。

【0134】

例えば、図2、ブロック220に示されるバーコーディングの非限定的な例において、複数の細胞（又は複数のサンプル）からの標識標的（例えば、標的バーコード分子）は、続いて、例えばチューブ中にプールされ得る。標識標的は、例えば、バーコード及び／又は標的バーコード分子が結合されるビーズを回収することによってプールされ得る。

【0135】

結合された標的バーコード分子の固体担体ベースのコレクションの回収は、電磁ビーズ及び外部印加磁界の使用によって実現され得る。標的バーコード分子がプールされた後、全てのさらなる処理が単一反応容器中で進行させることができる。さらなる処理は、例えば、逆転写反応、増幅反応、切断反応、解離反応及び／又は核酸伸長反応を含み得る。さらなる処理反応は、マイクロウェル内において、すなわち複数の細胞からの標識標的核酸分子を最初にプールせずに行われ得る。

【0136】

逆転写

本開示は、（例えば、図2のブロック224で）逆転写を用いて、標的バーコードコンジュゲートを生成するための方法を提供する。標的バーコードコンジュゲートは、バーコードと、標的核酸の全て又は一部の相補的配列（すなわち確率バーコード付きcDNA分子などのバーコード付きcDNA分子）とを含み得る。関連付けられたRNA分子の逆転写は、逆転写酵素とともに逆転写プライマーを添加することによって起こり得る。逆転写プライマーは、オリゴ（dT）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー又は標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーであり得る。オリゴ（dT）プライマーは、12～18ヌクレオチド長又は概ねそのようなヌクレオチド長であり得、哺乳動物mRNAの3'末端で内因性ポリ（A）テールに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、様々な相補的部位でmRNAに結合し得る。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的に、対象のmRNAを選択的にプライミングする。

【0137】

いくつかの実施形態において、標識RNA分子の逆転写は、逆転写プライマーの添加によって起こり得る。いくつかの実施形態において、逆転写プライマーは、オリゴ（dT）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー又は標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーである。一般に、オリゴ（dT）プライマーは、12～18ヌクレオチド長であり、哺乳動物mRNAの3'末端の内因性ポリ（A）テールに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、様々な相補的部位でmRNAに結合し得る。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的に、対象のmRNAを選択的にプライミングする。

【0138】

逆転写は、繰返し行うことにより、複数の標識 cDNA 分子を生成することができる。本明細書に開示される方法は、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 又は 20 回の逆転写反応を行う工程を含み得る。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 又は 100 回の逆転写反応を行う工程を含み得る。

【0139】

増幅

1 回以上の核酸増幅反応（例えば、図 2 のブロック 228 で）は、標識標的核酸分子の複数のコピーを生成するために行われ得る。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される、多重方式で行われ得る。増幅反応は、核酸分子にシーケンシングアダプターを付加するのに使用され得る。増幅反応は、存在する場合、サンプル標識の少なくとも一部を増幅する工程を含み得る。増幅反応は、細胞標識及び／又はバーコード配列（例えば、分子標識）の少なくとも一部を増幅する工程を含み得る。増幅反応は、サンプルタグ、細胞標識、空間標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的核酸又はそれらの組合せの少なくとも一部を増幅する工程を含み得る。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% 又はこれらの値のいずれか 2 つの間の範囲若しくは数を増幅する工程を含み得る。本方法は、サンプル標識、細胞標識、空間標識及び／又はバーコード配列（例えば、分子標識）を含む標的バーコード分子の 1 つ以上の cDNA コピーを生成するために 1 回以上の cDNA 合成反応を行う工程をさらに含み得る。

【0140】

いくつかの実施形態において、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて行われ得る。本明細書において使用される際、PCR は、DNA の相補鎖の同時のプライマー伸長による特定の DNA 配列のインビトロ増幅のための反応を指し得る。本明細書において使用される際、PCR は、限定はされないが、RT-PCR、リアルタイム PCR、ネステッド PCR、定量 PCR、多重 PCR、デジタル PCR 及びアセンブリ PCR を含む反応の派生形を包含し得る。

【0141】

標識核酸の増幅は、非 PCR ベースの方法を含み得る。非 PCR ベースの方法の例としては、限定はされないが、多重置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベースの増幅（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又はサークルサークル増幅が挙げられる。他の非 PCR ベースの増幅方法としては、DNA 若しくは RNA 標的を増幅するための DNA 依存性 RNA ポリメラーゼ駆動 RNA 転写増幅又は RNA 指向 DNA 合成及び転写の多重サイクル、リガーゼ連鎖反応（LCR）及び 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用いたオリゴヌクレオチド駆動増幅、プライマーが核酸配列にハイブリダイズされ且つ得られた二本鎖が伸長反応及び増幅前に切断される増幅方法、5' エキソヌクレアーゼ活性の欠如した核酸ポリメラーゼを用いた鎖置換増幅、ローリングサークル増幅及び分岐伸長増幅（RAM）が挙げられる。いくつかの実施形態において、増幅は、環化転写物を生成しない。

【0142】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、標識核酸（例えば、標識 RNA、標識 DNA、標識 cDNA）上でポリメラーゼ連鎖反応を行って、標識アンプリコン（例えば、確率標識アンプリコン）を生成する工程をさらに含む。標識アンプリコンは、二本鎖分子であり得る。二本鎖分子は、二本鎖 RNA 分子、二本鎖 DNA 分子又は DNA 分子にハイブリダイズされた RNA 分子を含み得る。二本鎖分子の鎖の一方又は両方は、サンプル標識、空間標識、細胞標識及び／又はバーコード配列（例えば、分子標識）

を含み得る。標識アンプリコンは、一本鎖分子であり得る。一本鎖分子は、DNA、RNA又はそれらの組合せを含み得る。本開示の核酸は、合成又は改変核酸を含み得る。

【0143】

増幅は、1つ以上の非天然ヌクレオチドの使用を含み得る。非天然ヌクレオチドは、光不安定性又はトリガー性のヌクレオチドを含み得る。非天然ヌクレオチドの例としては、限定はされないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ及びロックド核酸（LNA）並びにグリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）が挙げられ得る。非天然ヌクレオチドは、増幅反応の1サイクル以上に添加され得る。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又は時点で産物を同定するのに使用され得る。

【0144】

1回以上の増幅反応を行う工程は、1つ以上のプライマーの使用を含み得る。1つ以上のプライマーは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15ヌクレオチド又はそれを超えるものを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15ヌクレオチド又はそれを超えるものを含み得る。1つ以上のプライマーは、12～15ヌクレオチド未満を含み得る。1つ以上のプライマーは、複数の標識標的（例えば、確率標識標的）の少なくとも一部にアニールし得る。1つ以上のプライマーは、複数の標識標的の3'末端又は5'末端にアニールし得る。1つ以上のプライマーは、複数の標識標的の内部領域にアニールし得る。内部領域は、複数の標識標的の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又は1000ヌクレオチドであり得る。1つ以上のプライマーは、プライマーの一定パネルを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも1つ以上のカスタムプライマーを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも1つ以上の対照プライマーを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも1つ以上の遺伝子特異的プライマーを含み得る。

【0145】

1つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含み得る。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ルし得る。1つ以上のカスタムプライマーは、第1のサンプル標識、第2のサンプル標識、空間標識、細胞標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的又はそれらの任意の組合せにアニールし得る。1つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマー及びカスタムプライマーを含み得る。カスタムプライマーは、1つ以上の標的を増幅するように設計され得る。標的は、1つ以上のサンプル中の全核酸のサブセットを含み得る。標的は、1つ以上のサンプル中の全標識標的のサブセットを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも96又はそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも960又はそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1つ以上のプライマーは、少なくとも9600又はそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1つ以上のカスタムプライマーは、2つ以上の異なる標識核酸にアニールし得る。2つ以上の異なる標識核酸は、1つ以上の遺伝子に相当し得る。

【0146】

任意の増幅スキームが本開示の方法に使用され得る。例えば、一スキームにおいて、第1ラウンドのPCRは、遺伝子特異的プライマー及びユニバーサルIlluminaシーケンシングプライマー1配列に対するプライマーを用いて、ビーズに結合された分子を増幅することができる。第2ラウンドのPCRは、Illuminaシーケンシングプライマー2配列が隣接するネステッド遺伝子特異的プライマー及びユニバーサルIlluminaシーケンシングプライマー1配列に対するプライマーを用いて、第1のPCR産物を増幅することができる。第3ラウンドのPCRは、P5及びP7及びサンプルインデック

10

20

30

40

50

スを付加して、PCR産物をIlluminaシーケンシングライブラリーにする。150 bp x 2シーケンシングを用いたシーケンシングは、リード1上の細胞標識及びバーコード配列（例えば、分子標識）、リード2の遺伝子及びインデックス1リード上のサンプルインデックスを明らかにし得る。

【0147】

いくつかの実施形態において、核酸は、化学切断を用いて基材から除去され得る。例えば、核酸中に存在する化学基又は修飾塩基は、固体担体からのその除去を促進するのに使用され得る。例えば、酵素は、基材から核酸を除去するのに使用され得る。例えば、核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化によって基材から除去され得る。例えば、ウラシルーdegリコシラーゼ（UDG）によるdUTP又はddUTPを含有する核酸の処理は、基材から核酸を除去するのに使用され得る。例えば、核酸は、ヌクレオチド切除を行う酵素、例えば塩基除去修復酵素、例えば脱プリン／脱ピリミジン（AP）エンドヌクレアーゼを用いて、基材から除去され得る。いくつかの実施形態において、核酸は、光切断性基及び光を用いて、基材から除去され得る。いくつかの実施形態において、切断性リンカーは、基材から核酸を除去するのに使用され得る。例えば、切断性リンカーは、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／ニュートラビジン、IgープロテインA、光不安定性リンカー、酸又は塩基不安定性リンカー基又はアプタマーの少なくとも1つを含み得る。

【0148】

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、逆転写及び／又は増幅され得る。いくつかの実施形態において、核酸が合成された後（例えば、逆転写された後）、それは増幅され得る。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される、多重方式で行われ得る。増幅は、核酸にシーケンシングアダプターを付加し得る。

【0149】

いくつかの実施形態において、増幅は、例えば、ブリッジ増幅を用いて、基材上で行われ得る。cDNAは、基材上でオリゴ（dT）プローブを用いてブリッジ増幅するのに適合する末端を生成するためにテールを付加されたホモポリマーであり得る。ブリッジ増幅では、テンプレート核酸の3'末端に相補的なプライマーは、固体粒子に共有結合された各対の第1のプライマーであり得る。テンプレート核酸を含有するサンプルが粒子と接触され、1回の熱サイクルが行われる場合、テンプレート分子は、第1のプライマーにアニールされ得、第1のプライマーは、ヌクレオチドの付加によって順方向に伸長されて、テンプレート分子及びテンプレートに相補的な新たに形成されたDNA鎖からなる二本鎖分子を形成する。次のサイクルの加熱工程では、二本鎖分子は、変性されて、粒子からテンプレート分子を放出し、第1のプライマーを介して粒子に結合された相補的DNA鎖を残し得る。続くアニーリング及び伸長工程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し得る。このハイブリダイゼーションにより、相補鎖は、共有結合によって第1のプライマーに及びハイブリダイゼーションによって第2のプライマーに固定された第1及び第2のプライマーの間にブリッジを形成し得る。伸長段階では、第2のプライマーは、同じ反応混合物中へのヌクレオチドの添加によって逆方向に伸長され、それによりブリッジを二本鎖ブリッジに変換することができる。次に、次のサイクルが開始し、二本鎖ブリッジは、変性されて、2つの一本鎖核酸分子をもたらす、一本鎖核酸分子は、第1及び第2のプライマーを介して粒子表面に結合された一方の末端と、それぞれ結合されていない他方の末端とをそれぞれ有する。この第2のサイクルのアニーリング及び伸長工程では、各鎖は、同じ粒子上のこれまで未使用であったさらなる相補的プライマーにハイブリダイズして、新しい一本鎖ブリッジを形成することができる。この時点でハイブリダイズされる2つのこれまで未使用であったプライマーは、伸長して、2つの新しいブリッジを二本鎖ブリッジに変換することができる。

【0150】

増幅反応は、複数の核酸の少なくとも1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8

10

20

30

40

50

%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%又は100%を増幅する工程を含み得る。

【0151】

標識核酸の増幅は、PCRベースの方法又は非PCRベースの方法を含み得る。標識核酸の増幅は、標識核酸の指数関数的増幅を含み得る。標識核酸の増幅は、標識核酸の線形増幅を含み得る。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって行われ得る。PCRは、DNAの相補鎖の同時のプライマー伸長により、特定のDNA配列のインビトロ増幅のための反応を指し得る。PCRは、限定はされないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量PCR、多重PCR、デジタルPCR、サブプレッションPCR、セミサブプレシブPCR及びアセンブリPCRを含む反応の派生形を包含し得る。

10

【0152】

いくつかの実施形態において、標識核酸の増幅は、非PCRベースの方法を含む。非PCRベースの方法の例としては、限定はされないが、多重置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベースの増幅（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又はサークル-サークル増幅が挙げられる。他の非PCRベースの増幅方法としては、DNA若しくはRNA標的を増幅するためのDNA依存性RNAポリメラーゼ駆動RNA転写増幅又はRNA指向DNA合成及び転写の多重サイクル、リガーゼ連鎖反応（LCR）、Q β レプリカーゼ（Q β ）、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用いたオリゴヌクレオチド駆動増幅、プライマーが核酸配列にハイブリダイズされ且つ得られた二本鎖が伸長反応及び増幅前に切断される増幅方法、5'エキソヌクレアーゼ活性の欠如した核酸ポリメラーゼを用いた鎖置換増幅、ローリングサークル増幅及び／又は分岐伸長増幅（RAM）が挙げられる。

20

【0153】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される方法は、増幅アンプリコン（例えば、標的）上でネステッドポリメラーゼ連鎖反応を行う工程をさらに含む。アンプリコンは、二本鎖分子であり得る。二本鎖分子は、二本鎖RNA分子、二本鎖DNA分子又はDNA分子にハイブリダイズされたRNA分子を含み得る。二本鎖分子の鎖の一方又は両方は、サンプルタグ又は分子識別子標識を含み得る。代わりに、アンプリコンは、一本鎖分子であり得る。一本鎖分子は、DNA、RNA又はそれらの組合せを含み得る。本明細書に記載される核酸は、合成又は改変核酸を含み得る。

30

【0154】

いくつかの実施形態において、本方法は、標識核酸を繰返し増幅して、複数のアンプリコンを生成する工程を含む。本明細書に開示される方法は、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又は20回の増幅反応を行う工程を含み得る。代わりに、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又は100回の増幅反応を行う工程を含む。

【0155】

増幅は、複数の核酸を含む1つ以上のサンプルに1つ以上の対照核酸を添加する工程をさらに含み得る。増幅は、複数の核酸に1つ以上の対照核酸を添加する工程をさらに含み得る。対照核酸は、対照標識を含み得る。

40

【0156】

増幅は、1つ以上の非天然ヌクレオチドの使用を含み得る。非天然ヌクレオチドは、光不安定性及び／又はトリガー性ヌクレオチドを含み得る。非天然ヌクレオチドの例としては、限定はされないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ及びロックド核酸（LNA）並びにグリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）が挙げられる。非天然ヌクレオチドは、増幅反応の1サイクル以上に添加され得る。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又は時点で産物を同定するのに使用され得る。

【0157】

50

1 回以上の増幅反応を行う工程は、1 つ以上のプライマーの使用を含み得る。1 つ以上のプライマーは、1 つ以上のオリゴヌクレオチドを含み得る。1 つ以上のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約 7 ～ 9 ヌクレオチドを含み得る。1 つ以上のオリゴヌクレオチドは、12 ～ 15 ヌクレオチド未満を含み得る。1 つ以上のプライマーは、複数の標識核酸の少なくとも一部にアニールし得る。1 つ以上のプライマーは、複数の標識核酸の 3' 末端及び／又は 5' 末端にアニールし得る。1 つ以上のプライマーは、複数の標識核酸の内部領域にアニールし得る。内部領域は、複数の標識核酸の 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 又は 1000 ヌクレオチドであり得る。1 つ以上のプライマーは、プライマーの一定パネルを含み得る。1 つ以上のプライマーは、少なくとも 1 つ以上のカスタムプライマーを含み得る。1 つ以上のプライマーは、少なくとも 1 つ以上の対照プライマーを含み得る。1 つ以上のプライマーは、少なくとも 1 つ以上のハウスキーピング遺伝子プライマーを含み得る。1 つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含み得る。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ルし得る。1 つ以上のカスタムプライマーは、第 1 のサンプルタグ、第 2 のサンプルタグ、分子識別子標識、核酸又はその産物にアニールし得る。1 つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマー及びカスタムプライマーを含み得る。カスタムプライマーは、1 つ以上の標的核酸を増幅するように設計され得る。標的核酸は、1 つ以上のサンプル中の全核酸のサブセットを含み得る。いくつかの実施形態において、プライマーは、本開示のアレイに結合されたプローブである。

【0158】

いくつかの実施形態において、サンプル中の複数の標的にバーコードを付ける工程（例えば、確率バーコードを付ける工程）は、バーコード付き標的（例えば、確率バーコード付き標的）又は標的のバーコード付きフラグメントのインデックス付加ライブラリーを作製する工程をさらに含む。異なるバーコード（例えば、異なる確率バーコードの分子標識）のバーコード配列は、互いに異なり得る。バーコード付き標的のインデックス付加ライブラリーを作製する工程は、サンプル中の複数の標的から複数のインデックス付加ポリヌクレオチドを作製する工程を含む。例えば、第 1 のインデックス付加標的及び第 2 のインデックス付加標的を含むバーコード付き標的のインデックス付加ライブラリーについて、第 1 のインデックス付加ポリヌクレオチドの標識領域は、第 2 のインデックス付加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 ヌクレオチドだけ異なるか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値又はこれらの値のいずれか 2 つの間の数若しくは範囲のヌクレオチドだけ異なり得る。いくつかの実施形態において、バーコード付き標的のインデックス付加ライブラリーを作製する工程は、複数の標的、例えば mRNA 分子を、ポリ（T）領域及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工程と；逆転写酵素を用いて第 1 鎖合成を行って、cDNA 領域及び標識領域をそれぞれ含む一本鎖標識 cDNA 分子を生成する工程とを含み、ここで、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。バーコード付き標的のインデックス付加ライブラリーを作製する工程は、一本鎖標識 cDNA 分子を増幅して、二本鎖標識 cDNA 分子を生成する工程と；二本鎖標識 cDNA 分子上でネステッド PCR を行って、標識アンプリコンを生成する工程とをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、本方法は、アダプター標識アンプリコンを作製する工程を含み得る。

【0159】

バーコーディング（例えば、確率バーコーディング）は、個々の核酸（例えば、DNA 又は RNA）分子を標識するために、核酸バーコード又はタグを使用する工程を含み得る

。いくつかの実施形態において、それは、DNAバーコード又はタグがmRNAから生成される際に、cDNA分子にそれらを付加する工程を含む。ネステッドPCRは、PCR増幅バイアスを最小限に抑えるために行われ得る。アダプターは、例えば、次世代シーケンシング(NGS)を用いるシーケンシングのために付加され得る。シーケンシング結果を用いて、例えば図2のブロック232で、標的の1つ以上のコピーの細胞標識、分子標識及びヌクレオチドフラグメントの配列を決定することができる。

【0160】

図3は、バーコード付き標的(例えば、確率バーコード付き標的)、例えばバーコード付きmRNAs又はそのフラグメントのインデックス付加ライブラリーを作製する非限定的な例示的なプロセスを示す概略図である。工程1に示されるように、逆転写プロセスは、ユニーク分子標識配列、細胞標識配列及びユニバーサルPCR部位を含む各mRNA分子をコードし得る。特に、RNA分子302は、RNA分子302のポリ(A)テール領域308へのバーコードのセット(例えば、確率バーコード)310の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)によって逆転写されて、cDNA領域306を含む標識cDNA分子304を生成することができる。バーコード310のそれぞれは、標的結合領域、例えばポリ(dT)領域312、標識領域314(例えば、バーコード配列又は分子)及びユニバーサルPCR領域316を含み得る。

【0161】

いくつかの実施形態において、細胞標識配列は、3〜20ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、分子標識配列は、3〜20ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、複数の確率バーコードのそれぞれは、ユニバーサル標識及び細胞標識の1つ以上をさらに含み、ここで、ユニバーサル標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じであり、細胞標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じである。いくつかの実施形態において、ユニバーサル標識は、3〜20ヌクレオチドを含み得る。いくつかの実施形態において、細胞標識は、3〜20ヌクレオチドを含む。

【0162】

いくつかの実施形態において、標識領域314は、バーコード配列又は分子標識318及び細胞標識320を含み得る。いくつかの実施形態において、標識領域314は、ユニバーサル標識、次元標識及び細胞標識の1つ以上を含み得る。バーコード配列又は分子標識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るか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値のヌクレオチド長又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲のヌクレオチド長であり得る。細胞標識320は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であるか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値のヌクレオチド長又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲のヌクレオチド長であり得る。ユニバーサル標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であるか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値のヌクレオチド長又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲のヌクレオチド長であり得る。ユニバーサル標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じであり得、細胞標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じである。次元標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長であるか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値のヌクレオチド長又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲であり得る。

【0163】

いくつかの実施形態において、標識領域314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の異なる標識を含むか、概ねそのような値の異なる標識を含むか、少なくとも若しくは多くともそのような値の異なる標識又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲の異なる標識、例えばバーコー

ド配列又は分子標識 318 及び細胞標識 320 を含み得る。各標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 ヌクレオチド長であるか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値のヌクレオチド長又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲のヌクレオチド長であり得る。バーコード又は確率バーコード 310 のセットは、10、20、40、50、70、80、90、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{20} のバーコード又は確率バーコード 310 を含むか、概ね少なくとも若しくは多くともそのような値のバーコード又は確率バーコード 310 を含むか、又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲のバーコード又は確率バーコード 310 を含み得る。バーコード又は確率バーコード 310 のセットは、例えば、ユニーク標識領域 314 をそれぞれ含み得る。標識 cDNA 分子 304 は、過剰なバーコード又は確率バーコード 310 を除去するために、精製され得る。精製は、Ampure ビーズ精製を含み得る。

【0164】

工程 2 に示されるように、工程 1 の逆転写プロセスからの産物が 1 チューブ中にプールされ、第 1 の PCR プライマープール及び第 1 のユニバーサル PCR プライマーを用いて PCR 増幅され得る。プールする工程は、ユニーク標識領域 314 によって可能である。特に、標識 cDNA 分子 304 は、増幅されて、ネステッド PCR 標識アンプリコン 322 を生成することができる。増幅は、多重 PCR 増幅を含み得る。増幅は、単一反応量で 96 多重プライマーを用いた多重 PCR 増幅を含み得る。いくつかの実施形態において、多重 PCR 増幅は、単一反応量で 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} の多重プライマーを用いるか、概ねそのような値の多重プライマーを用いるか、少なくとも若しくは多くともそのような値の多重プライマーを用いるか、又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲の多重プライマーを用い得る。増幅は、特定の遺伝子を標的とするカスタムプライマー 326A~C を含む第 1 の PCR プライマープール 324 及びユニバーサルプライマー 328 を使用する工程を含み得る。カスタムプライマー 326 は、標識 cDNA 分子 304 の cDNA 部分 306' 内の領域にハイブリダイズし得る。ユニバーサルプライマー 328 は、標識 cDNA 分子 304 のユニバーサル PCR 領域 316 にハイブリダイズし得る。

【0165】

図 3 の工程 3 に示されるように、工程 2 の PCR 増幅からの産物がネステッド PCR プライマープール及び第 2 のユニバーサル PCR プライマーを用いて増幅され得る。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 は、ネステッド PCR によってさらに増幅され得る。ネステッド PCR は、単一反応量でネステッド PCR プライマー 332a~c のネステッド PCR プライマープール 330 及び第 2 のユニバーサル PCR プライマー 328' を含む多重 PCR を含み得る。ネステッド PCR プライマープール 328 は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 の異なるネステッド PCR プライマー 330 を含むか、概ねそのような値の異なるネステッド PCR プライマー 330 を含むか、少なくとも若しくは多くともそのような値の異なるネステッド PCR プライマー 330 を含むか、又はこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲の異なるネステッド PCR プライマー 330 を含み得る。ネステッド PCR プライマー 332 は、アダプター 334 を含有して、標識アンプリコン 322 の cDNA 部分 306' 内の領域にハイブリダイズし得る。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 にハイブリダイズし得る。したがって、工程 3 は、アダプター-標識アンプリコン 338 を生成する。いくつかの実施形態において、ネステッド PCR プライマー 332 及び第 2 のユニバーサル PCR プライマー 328' は、アダプター 334 及び 336 を含有しなくてもよい。その代わりに、

アダプター 334 及び 336 は、ネステッド PCR の産物にライゲートされて、アダプター標識アンプリコン 338 を生成し得る。

【0166】

工程 4 に示されるように、工程 3 からの PCR 産物は、ライブラリー増幅プライマーを用いたシーケンシングのために PCR 増幅され得る。特に、アダプター 334 及び 336 を用いて、アダプター標識アンプリコン 338 に対する 1 回以上のさらなるアッセイを行うことができる。アダプター 334 及び 336 は、プライマー 340 及び 342 にハイブリダイズされ得る。1 つ以上のプライマー 340 及び 342 は、PCR 増幅プライマーであり得る。1 つ以上のプライマー 340 及び 342 は、シーケンシングプライマーであり得る。1 つ以上のアダプター 334 及び 336 は、アダプター標識アンプリコン 338 のさらなる増幅のために使用され得る。1 つ以上のアダプター 334 及び 336 は、アダプター標識アンプリコン 338 のシーケンシングのために使用され得る。バーコードの同じセットを用いて生成されたアンプリコン又は確率バーコード 310 が、次世代シーケンシング (NGS) を用いた 1 回のシーケンシング反応でシーケンシングされ得るように、プライマー 342 は、プレート指標 344 を含有し得る。

【0167】

核酸標的の 5' 末端におけるバーコーディング

本明細書に開示されるものには、バーコード又は標識を付けられる核酸標的 (例えば、デオキシリボ核酸分子及びリボ核酸分子) の 5' 末端への、分子標識 (又は分子指標) を有するバーコード (例えば、確率バーコード) の結合のためのシステム、方法、組成物及びキットが含まれる。本明細書に開示される 5' ベースの転写物カウンティング方法は、例えば、3' ベースの転写物カウンティング方法 (例えば、Rhapsody (商標) アッセイ (Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ)), Chromium (商標) Single Cell 3' Solution (10X Genomics (San Francisco, CA))) を補うか又は補完することができる。バーコード付き核酸標的は、ハイスループットな方式での配列同定、転写物カウンティング、選択的スプライシング分析、突然変異スクリーニング及び／又は全長シーケンシングに使用され得る。5' 末端 (標識される標的核酸標的に対して 5' 側) における転写物カウンティングにより、核酸分子の 5' 末端又はその近傍における選択的スプライシングアイソフォーム及び変異体 (限定はされないが、スプライス変異、一塩基多型 (SNP)、挿入、欠失、置換を含む) が明らかになり得る。いくつかの実施形態において、本方法は、分子内ハイブリダイゼーションを含み得る。

【0168】

図 4A ~ 4B は、5' 末端における核酸標的の遺伝子特異的標識化の非限定的な例示的な方法 400 の概略図を示す。標的結合領域 (例えば、ポリ (dT) テール 422) を有するバーコード 420 (例えば、確率バーコード) は、標識化又はバーコーディング (例えば、ユニーク標識化) のために、ポリ (dA) テール 426 を介してポリアデニル化 RNA 転写物 424 又は他の核酸標的に結合し得る。バーコード 420 は、後続の反応のために、各バーコード 420 の分子標識 428 / サンプル標識 430 領域に隣接する、1 つ以上の追加の配列 (例えば、アダプター配列 432 などのコンセンサス配列) とともに、転写物 424 を標識し、RNA 転写物 424 のサンプル起源を追跡するために、分子標識 (ML) 428 及びサンプル標識 (SL) 430 を含み得る。サンプルごとのバーコード中の分子標識の配列のレパートリーは、RNA 転写物の確率標識化のために十分に大きくなり得る。

【0169】

RNA 転写物 424 (又はその部分) を含むバーコード付き cDNA 分子 434 を生成するための、ブロック 402 における cDNA 合成後、遺伝子特異的な方法は、5' 分子バーコーディングのために使用され得る。任意選択的であり得る、ブロック 404 における遺伝子特異的増幅後、末端トランスフェラーゼ及びデオキシアデノシン三リン酸 (dATP) は、ポリ (A) テール 438 を有するアンプリコン 436 を生成する 3' ポリ (dA) テ

ーリングを促進するために、ブロック406において加えられ得る。ブロック408における短い変性工程は、アンプリコン436の順方向鎖436m及び逆鎖436c（例えば、ポリ（dA）テールを有するバーコード付きcDNA分子）の分離を可能にする。ブロック410において、アンプリコン436の逆鎖436cは、鎖の3'末端及びポリ（dT）領域422末端においてそのポリ（dA）テール438を介して分子内でハイブリダイズして、ヘアピン又はステムループ440を形成し得る。次に、ブロック412において、ポリメラーゼ（例えば、クレノウ断片）は、ポリ（dA）テール438から伸長して、バーコードを複製して、伸長されたバーコード付き逆鎖442を形成するのに使用され得る。ブロック414における遺伝子特異的増幅が（例えば、任意選択的に）行われて、対象の遺伝子を増幅して、ブロック416におけるシーケンシングのために5'末端（RNA転写物424に対して）におけるバーコードを有するアンプリコン444を生成し得る。いくつかの実施形態において、方法400は、ブロック404におけるバーコード付きcDNA分子434の遺伝子特異的増幅及びブロック414における伸長されたバーコード付き逆鎖442の遺伝子特異的増幅の一方又は両方を含む。

【0170】

図5A～5Bは、全トランスクリプトーム解析のための5'末端における核酸標的の標識化の非限定的な例示的な方法500の概略図を示す。標的結合領域（例えば、ポリ（dT）テール422）を有するバーコード420（例えば、確率バーコード）は、標識化又はバーコーディング（例えば、ユニークバーコーディング）のために、ポリ（dA）テール426を介してポリアデニル化RNA転写物424又は他の核酸標的に結合し得る。例えば、標的結合領域を有するバーコード420は、標識化又はバーコーディングのために、核酸標的に結合し得る。バーコード420は、分子標識（ML）428及びサンプル標識（SL）430を含み得る。分子標識428及びサンプル標識430は、後続の反応のために、各バーコード420の分子標識428／サンプル標識430領域に隣接する、1つ以上の追加の配列（例えば、アダプター配列432などのコンセンサス配列）とともに、転写物424又は核酸標的（例えば、抗体に関連付けられているか又は抗体から解離しているかにかかわらず、抗体オリゴヌクレオチド）を標識し、転写物424のサンプル起源を追跡するために使用され得る。サンプルごとのバーコード中の分子標識428の配列のレパートリーは、RNA転写物424又は核酸標的の確率標識化のために十分に大きくなり得る。

【0171】

ブロック402における、バーコード付きcDNA分子434を生成するためのcDNA合成後、ブロック406において、末端トランスフェラーゼ酵素は、バーコード付きcDNA分子434の3'末端（標識されたRNA転写物の5'末端に相当する）のAターミングのために使用されて、3'ポリ（dA）テール438をそれぞれ有するcDNA分子436cを生成し得る。3'ポリ（dA）テール438を有するcDNA分子436cの分子内ハイブリダイゼーションは、（例えば、加熱及び冷却サイクルにより、又はポリ（dA）テール438を有するバーコード付きcDNA分子436cを希釈することにより）開始され得、それにより、新たな3'ポリ（dA）テール438は、同じ標識cDNA分子のポリ（dT）テール422（ポリ（dA）以外の標的結合領域配列では、関連する標的結合配列の対応する相補体は、標的結合領域にアニールされ得るものと考えられるが）とともにアニールされて、ブロック410において、バーコード付きcDNA分子のヘアピン又はステムループ構造440を生成する。dNTPを有するポリメラーゼ（例えば、クレノウ酵素）が加えられて、新たな3'ポリ（dA）テール438を越えて3'伸長を促進して、ブロック412において、ステムループ440を有する標識cDNA分子の5'末端におけるバーコード（例えば、分子標識428）を複製し得る。全トランスクリプトーム増幅（WTA）は、鏡像の（mirrored）アダプター432、432rc又はアダプター432、432rcの配列（又は部分配列）を含むプライマーを用いて、ブロック414において行われ得る。タグ付け又はランダムプライミングなどの方法を用いて、（例えば、Illumina（San Diego, CA, U.S.）シーケンサーを用いた

10

20

30

40

50

）ブロック 418 におけるシーケンシングのために、シーケンシングアダプター（例えば、P5 446 及び P7 448 配列）を有するアンプリコン 444 のより小さいフラグメントを生成し得る。いくつかの実施形態において、他のシーケンシング方法のためのシーケンシングアダプター又はシーケンサー（例えば、Pacific Biosciences of California, Inc. (Menlo Park, CA, US) 又は Oxford Nanopore Technologies Limited (Oxford, UK) 製のシーケンサー）が直接ライゲートされて、シーケンシングのためのアンプリコンを生成し得る。

【0172】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の核酸標的の数を決定するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、サンプル中の核酸標的 424 のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコード 420 と接触させる工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 420 のそれぞれは、分子標識配列 428 及び核酸標的 424 にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域（例えば、ポリ（dT）配列 422）を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 420 の少なくとも 10 個は、異なる分子標識配列 428 を含む、工程と；ブロック 402 において、オリゴヌクレオチドバーコード 420 にハイブリダイズされた核酸標的 424 のコピーを伸長して、核酸標的 424 の少なくとも一部に相補的な配列 450c をそれぞれ含む複数の核酸分子 434 を生成する工程と；ブロック 404 において、複数のバーコード付き核酸分子 434 を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子 436 を生成する工程と；ブロック 406 において、標的結合領域 422 の相補体 438 を含むオリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子 436 に結合して、標的結合領域 422 及び標的結合領域の相補体 438 をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子 436c を生成する工程と；ブロック 410 において、複数のバーコード付き核酸分子 436c のそれぞれの中の標的結合領域 422 及び標的結合領域 422 の相補体 438 をハイブリダイズして、ステムループ 440 を形成する工程と；ブロック 412 において、ステムループ 440 をそれぞれ有する複数のバーコード付き核酸分子の 3' 末端を伸長して、ステムループ 440 を伸長して、分子標識 428 及び分子標識の相補体 428rc をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 442 を生成する工程と；ブロック 414 において、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 442 を増幅して、分子標識の相補体 428rc をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子 444c を生成する工程と；複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体 428rc の数に基づいて、サンプル中の核酸標的の数を決定する工程とを含む。

【0173】

いくつかの実施形態において、ステムループ 440 を有する複数のバーコード付き核酸分子の 3' 末端を伸長した後、分子標識 428 は、分子標識の相補体 428rc にハイブリダイズされる。本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 442 を増幅して、複数の単一標識核酸分子 444c（アンプリコン 444c の一部であり得る）を生成する前に、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 442 を変性する工程を含み得る。サンプル中の核酸標的 424 のコピーを接触させる工程は、複数の核酸標的 424 のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコード 420 と接触させる工程を含み得る。核酸標的 424 のコピーを伸長する工程は、オリゴヌクレオチドバーコード 420 にハイブリダイズされた複数の核酸標的 424 のコピーを伸長して、複数の核酸標的 424 の 1 つの少なくとも一部に相補的な配列 450c をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子 436c を生成する工程を含み得る。核酸標的 424 の数を決定する工程は、複数の核酸標的 424 のそれぞれの配列 452c を含む複数の単一標識核酸分子 444c の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体 428rc の数に基づいて、サンプル中の複数の核酸標的 424 のそれぞれの数を決定する工程を含み得る。複数の核酸標的のそれぞれの配列 452c は、複数の核酸標的 424 のそれぞれの部分配列（相補体又は逆相補体を含む）を含み得る。

【0174】

本明細書に開示されるものには、サンプル中の標的の数を決定するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコード420を用いて、サンプル中の核酸標的424のコピーにバーコードを付けて402、核酸標的424の配列450c（例えば、相補的配列、逆相補的配列又はそれらの組合せ）、分子標識428及び標的結合領域（例えば、ポリ（dT）領域422）をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子434を生成する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコード420の少なくとも10個は、異なる分子標識配列428を含む、工程と；標的結合領域422の相補体438を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子434に結合して406、標的結合領域422及び標的結合領域422の相補体438をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子436を生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子436cのそれぞれの中の標的結合領域422及び標的結合領域の相補体438をハイブリダイズして410、ステムループ440を形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して412、ステムループ440を伸長して、分子標識428及び分子標識の相補体428rcをそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子442を生成する工程と；複数の伸長されたバーコード付き核酸分子442に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体428rcの数に基づいて、サンプル中の核酸標的424の数を決定する工程とを含む。

10

【0175】

本明細書に開示されるものには、オリゴヌクレオチドバーコードをサンプル中の標的に結合するための方法が含まれる。いくつかの実施形態において、本方法は、複数のオリゴヌクレオチドバーコード420を用いて、サンプル中の核酸標的424のコピーにバーコードを付けて402、核酸標的424の配列450c、分子標識428及び標的結合領域422をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子434を生成する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコード420の少なくとも10個は、異なる分子標識配列428を含む、工程と；標的結合領域422の相補体438を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子434に結合して、標的結合領域422及び標的結合領域422の相補体438をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子436cを生成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子436cのそれぞれの中の標的結合領域422及び標的結合領域422の相補体438をハイブリダイズして410、ステムループ440を形成する工程と；複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して412、ステムループ440を伸長して、分子標識428及び分子標識428の相補体428rcをそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子442を生成する工程とを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子442に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識428、その相補体428rc又はそれらの組合せの数に基づいて、サンプル中の核酸標的424の数を決定する工程を含む。例えば、核酸標的424の数は、固有の配列を有する分子標識428、その相補体428rcの一方又は両方に基づいて決定され得る。

20

30

【0176】

いくつかの実施形態において、本方法は、複数の標的424のコピーにバーコードを付ける工程402を含み、この工程は、核酸標的424のコピーを複数のオリゴヌクレオチドバーコード420と接触させる工程であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコード420のそれぞれは、核酸標的424にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域422を含む、工程と；オリゴヌクレオチドバーコード420にハイブリダイズされた核酸標的424のコピーを伸長して402、複数のバーコード付き核酸分子434を生成する工程とを含む。

40

【0177】

いくつかの実施形態において、本方法は、複数のバーコード付き核酸分子434を増幅して404、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子436cを生成する工程を含み、標的結合領域422の相補体438を含むオリゴヌクレオチドを結合させる工程は、標的

50

結合領域の相補体 4 3 8 を含むオリゴヌクレオチドを複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、標的結合領域 4 2 2 及び標的結合領域の相補体 4 3 8 をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 r を生成する工程を含む。

【0178】

遺伝子特異的解析。いくつかの実施形態において、本方法（例えば、方法 4 0 0）は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 を増幅して 4 1 4、分子標識 4 2 8 の相補体 4 2 8 r c をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子 4 4 4 c を生成する工程を含む。単一標識核酸分子 4 4 4 c は、それらを含むアンプリコン 4 4 4 が変性されるとき、生成され得る。サンプル中の核酸標的 4 2 4 の数を決定する工程は、複数の単一標識核酸分子 4 4 4 c に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識 4 2 8 の相補体 4 2 8 r c の数に基づいて、サンプル中の核酸標的 4 2 4 の数を決定する工程を含み得る。

10

【0179】

全トランスクリプトーム解析。いくつかの実施形態において、本方法（例えば、方法 5 0 0）は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 を増幅して 4 1 4、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子のコピー 4 4 4 c を生成する工程を含む。サンプル中の核酸標的 4 2 4 の数を決定する工程は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子のコピー 4 4 4 c に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識 4 2 8 の相補体 4 2 8 r c の数に基づいて、サンプル中の核酸標的 4 2 4 の数を決定する工程を含む。複数の伸長されたバーコード付き核酸分子のコピー 4 4 4 c は、それらを含むアンプリコン 4 4 4 が変性されるとき、形成され得る。

20

【0180】

いくつかの実施形態において、複数のバーコード付き核酸分子中の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列 4 5 2 c を含む。標的結合領域は、遺伝子特異的配列を含み得る。標的結合領域 4 2 2 の相補体 4 3 8 を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程 4 0 6 は、標的結合領域 4 2 2 の相補体 4 3 8 を含むオリゴヌクレオチドを複数のバーコード付き核酸分子 4 3 4 にライゲートする工程を含み得る。

【0181】

いくつかの実施形態において、標的結合領域は、ポリ（dT）配列 4 2 2（本明細書においてオリゴ（dT）配列と呼ばれることもある）を含み得る。標的結合領域 4 2 2 の相補体 4 3 8 を含むオリゴヌクレオチドを結合する工程は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、複数のアデノシンリン酸を複数のバーコード付き核酸分子 4 3 4 に付加する工程を含む。いくつかの実施形態において、標的結合領域は、ポリ（dT）配列を含まない。

30

【0182】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 にハイブリダイズされた核酸標的 4 2 4 のコピーを伸長する工程は、オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 にハイブリダイズされた核酸標的 4 2 4 のコピーを逆転写して、複数のバーコード付き相補的デオキシリボ核酸（cDNA）分子 4 3 4 を生成する工程を含み得る。オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 にハイブリダイズされた核酸標的 4 2 4 のコピーを伸長する工程は、5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性及び 3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性の少なくとも 1 つが欠如した DNA ポリメラーゼを用いて、オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 にハイブリダイズされた核酸標的 4 2 4 のコピーを伸長する工程 4 0 2 を含み得る。DNA ポリメラーゼは、クレノウ断片を含み得る。

40

【0183】

いくつかの実施形態において、本方法は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 の配列情報を得る工程を含む。配列情報を得る工程は、シーケンシングアダプター（例えば、P5 4 4 6 及び P7 4 4 8 アダプター）を複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 に結合する工程を含み得る。

【0184】

いくつかの実施形態において、標的結合領域の相補体 4 3 8 は、標的結合領域の逆相補

50

的配列を含み得る。標的結合領域の相補体 4 3 8 は、標的結合領域の相補的配列を含み得る。分子標識の相補体 4 2 8 r c は、分子標識の逆相補的配列を含み得る。分子標識の相補体は、分子標識の相補的配列を含み得る。

【0185】

いくつかの実施形態において、複数のバーコード付き核酸分子 4 3 4 は、バーコード付きデオキシリボ核酸（DNA）分子を含み得る。バーコード付き核酸分子 4 3 4 は、バーコード付きリボ核酸（RNA）分子を含み得る。核酸標的 4 2 4 は、核酸分子を含み得る。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）テールを含む RNA 又はそれらの任意の組合せを含み得る。

10

【0186】

抗体オリゴヌクレオチド。いくつかの実施形態において、核酸標的は、細胞成分結合試薬を含み得る。核酸標的（例えば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドなどの抗体オリゴヌクレオチド）に関連付けられた細胞結合試薬は、米国特許出願公開第 2 0 1 8 / 0 0 8 8 1 1 2 号明細書；及び 2 0 1 8 年 3 月 2 7 日に出願された米国特許出願第 1 5 / 9 3 7 , 7 1 3 号明細書（これらの出願のそれぞれの内容は、全体が参照により本明細書に援用される）に記載されている。いくつかの実施形態において、単一細胞のゲノミクス、クロマチンアクセシビリティ、メチロミクス、トランスクリプトミクス及びプロテオミクスなどのマルチオミクス情報は、本開示の 5 ' バーコーディング方法を用いて得られる。核酸分子は、細胞成分結合試薬に関連付けられ得る。本方法は、核酸分子及び細胞成分結合試薬を解離させる工程を含み得る。

20

【0187】

いくつかの実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の各分子標識 4 2 8 は、少なくとも 6 ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 は、同一のサンプル標識 4 3 0 を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の各サンプル標識 4 3 0 は、少なくとも 6 ヌクレオチドを含み得る。オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 は、同一の細胞標識を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の各細胞標識は、少なくとも 6 ヌクレオチドを含み得る。

【0188】

いくつかの実施形態において、複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の標的結合領域及び標的結合領域の相補体をハイブリダイズして 4 1 0、ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられる。複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c のそれぞれの中の標的結合領域 4 2 2 及び標的結合領域 4 2 2 の相補体 4 3 8 をハイブリダイズして 4 1 0、ステムループ 4 4 0 を形成するとき、固体担体から解離し得る。複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c のそれぞれの中の標的結合領域 4 2 2 及び標的結合領域の相補体 4 3 8 をハイブリダイズして 4 1 0、ステムループ 4 4 0 を形成するとき、固体担体に関連付けられ得る。

30

【0189】

いくつかの実施形態において、複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子の 3 ' 末端を伸長して 4 1 2、ステムループ 4 4 0 を伸長して、分子標識 4 2 8 及び分子標識の相補体 4 2 8 r c をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 を生成するとき、固体担体に関連付けられる。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子の 3 ' 末端を伸長して 4 1 2、ステムループ 4 4 0 を伸長して、分子標識 4 2 8 及び分子標識の相補体 4 2 8 r c をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 を生成するとき、固体担体から解離し得る。複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子の 3 ' 末端を伸長して 4 1 2、ステムループ 4 4 0 を伸長して、分子標識 4 2 8 及び分子標識の相補体 4 2 8 r c をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコ

40

50

ード付き核酸分子 4 4 2 を生成するとき、固体担体に関連付けられ得る。固体担体は、合成粒子 4 5 4 を含み得る。固体担体は、平坦な表面又は実質的に平坦な表面（例えば、顕微鏡スライドなどのスライド又はカバースリップ）を含み得る。

【0190】

いくつかの実施形態において、複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c のそれぞれの中の標的結合領域 4 2 2 及び標的結合領域 4 2 2 の相補体 4 3 8 をハイブリダイズして 4 1 0、ステムループ 4 4 0 を形成するとき、溶液中にある。例えば、溶液中の複数のバーコード付き核酸分子 4 3 6 c の濃度が十分に低い場合、このような分子内ハイブリダイゼーションが起こり得る。複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも 1 つは、複数のバーコード付き核酸分子の 3' 末端を伸長して 4 1 2、ステムループ 4 4 0 を伸長して、分子標識 4 2 8 及び分子標識の相補体 4 2 8 r c をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子 4 4 2 を生成するとき、溶液中にあり得る。

10

【0191】

いくつかの実施形態において、サンプルは、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 4 2 0 を含む合成粒子 4 5 4 をサンプル中の単一細胞に関連付ける工程を含む。本方法は、合成粒子 4 5 4 を単一細胞に関連付けた後、単一細胞を溶解させる工程を含み得る。単一細胞を溶解させる工程は、サンプルを加熱する工程、サンプルを洗浄剤と接触させる工程、サンプルの pH を変化させる工程又はそれらの任意の組合せを含み得る。合成粒子及び単一細胞は、同じウェル中にあり得る。合成粒子及び単一細胞は、同じドロップレット中にあり得る。

20

【0192】

いくつかの実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 上に固定され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 上に部分的に固定され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 に封入され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 に部分的に封入され得る。合成粒子 4 5 4 は、崩壊性であり得る。合成粒子 4 5 4 は、ビーズを含み得る。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、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又はそれらの任意の組合せを含み得る。合成粒子 4 5 4 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、常磁性材料、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、シリコン及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み得る。合成粒子 4 5 4 は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 のそれぞれは、リンカー官能基を含み得る。合成粒子 4 5 4 は、固体担体官能基を含み得る。担体官能基及びリンカー官能基は、互いに関連付けられ得る。リンカー官能基及び担体官能基は、個別に、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、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

30

40

【0193】

核酸標的の 5' 末端におけるバーコーディングのためのキット

本明細書に開示されるものには、オリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 をサンプル中の標的 4 2 4 に結合し、サンプル中の標的 4 2 4 の数を決定し、且つ／又はサンプル中の核酸標的 4 2 4 の数を決定するためのキットが含まれる。いくつかの実施形態において、キットは、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 であって、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 のそれぞれは、分子標識 4 2 8 及び標的結合領域（例えば、ポリ（d

50

T) 配列 4 2 2) を含み、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 0 個は、異なる分子標識配列 4 2 8 を含む、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 と；末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ又はリガーゼと；5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性及び 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも 1 つが欠如した DNA ポリメラーゼとを含む。キットは、標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドは、複数のオリゴヌクレオチドバーコードから分離され得る。いくつかの実施形態において、標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドは、c DNA 分子などの DNA 分子の 3' 末端への結合のために構成される。標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドは、DNA 分子が、本明細書に記載されるヘアピンを形成するように、標的結合領域にハイブリダイズするために使用され得る。DNA ポリメラーゼは、クレノウ断片を含み得る。キットは、緩衝液を含み得る。キットは、カートリッジを含み得る。キットは、逆転写反応のための 1 つ以上の試薬を含み得る。キットは、増幅反応のための 1 つ以上の試薬を含み得る。

【0194】

いくつかの実施形態において、標的結合領域は、遺伝子特異的配列、オリゴ (d T) 配列、ランダムマルチマー又はそれらの任意の組合せを含む。オリゴヌクレオチドバーコードは、同一のサンプル標識及び／又は同一の細胞標識を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各サンプル標識及び／又は細胞標識は、少なくとも 6 ヌクレオチドを含み得る。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 ヌクレオチドを含み得る。

【0195】

いくつかの実施形態において、複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 上に固定される。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 上に部分的に固定され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 に封入され得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコード 4 2 0 の少なくとも 1 つは、合成粒子 4 5 4 に部分的に封入され得る。合成粒子 4 5 4 は、崩壊性であり得る。合成粒子 4 5 4 は、ビーズを含み得る。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 (d T) コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ又はそれらの任意の組合せを含み得る。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、常磁性材料、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、シリコン及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み得る。合成粒子 4 5 4 は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、リンカー官能基を含み得る。合成粒子 4 5 4 は、固体担体官能基を含み得る。担体官能基及びリンカー官能基は、互いに関連付けられ得る。リンカー官能基及び担体官能基は、個別に、C 6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択され得る。

【0196】

様々な態様及び実施形態が本明細書に開示されているが、他の態様及び実施形態が当業者に明らかであろう。本明細書に開示される様々な態様及び実施形態は、例示を目的としたものであり、限定を意図したものではなく、真の範囲及び趣旨は、以下の特許請求の範囲により示される。

【0197】

当業者は、本明細書に開示されるこの及び他のプロセス及び方法について、これらのプロセス及び方法において実施される機能が異なる順序で実施され得ることを理解するであ

10

20

30

40

50

ろう。さらに、概説した工程及び操作は、あくまでも例として示され、工程及び操作の一部は、開示される実施形態の本質から逸脱することなく、任意選択的であり、組み合わせて、より少ない工程及び操作にするか又は追加工程及び操作に拡張することができる。

【0198】

本明細書における実質的に全ての複数形及び／又は単数形の用語の使用に関連して、文脈上及び／又は適用上適切であれば、当業者は、複数形から単数形へ及び／又は単数形から複数形への変換が可能である。明確にするために様々な単数形／複数形の置き換えが本明細書に明示的に記載され得る。

【0199】

一般に、本明細書、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主部）において使用される用語が「オープン」な用語であることが一般に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」という用語は、「限定はされないが、含む」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも～を有する」と解釈されるべきであり、「含む」という用語は、「限定はされないが、含む」と解釈されるべきであるなど）。特定数の導入クレームレシテーションが意図される場合、このような意図は、請求項に明示的に記載され、このような記載の不在下では、このような意図は存在しないことが当業者によってさらに理解されるであろう。例えば、理解の補助として、以下の添付の特許請求の範囲は、クレームレシテーションを導入するために導入語句「少なくとも1つの」及び「1つ以上」の使用を含み得る。しかしながら、このような語句の使用は、同じ請求項が導入語句「1つ以上」又は「少なくとも1つ」及び「1つの（a）」又は「1つの（an）」などの不定冠詞を含む場合でも（例えば、「1つの（a）」及び／又は「1つの（an）」は、「少なくとも1つ」又は「1つ以上」を意味するものと解釈されるべきである）、不定冠詞「1つの（a）」又は「1つの（an）」によるクレームレシテーションの導入は、このような導入クレームレシテーションを含む任意の特定の請求項を、1つのみのこのような記載を含む実施形態に限定することを意味するものと解釈されるべきではなく；同じことは、クレームレシテーションを導入するのに使用される定冠詞の使用についても当てはまる。さらに、特定数の導入クレームレシテーションが明示的に記載される場合でも、当業者は、このような記載が、少なくとも記載された数を意味する（例えば、他の修飾語を含まない、「2つの記載」の最低限の記載は、少なくとも2つの記載又は2つ以上の記載を意味する）と解釈されるべきであることを認識するであろう。さらに、「A、B及びCなどの少なくとも1つ」に類似した条件が使用される場合、一般に、このような構成は、当業者がその条件を理解する意味であることが意図される（例えば、「A、B及びCの少なくとも1つを有する系」は、限定はされないが、A単独、B単独、C単独、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、且つ／又はA、B及びCと一緒に有する系などを含むであろう）。「A、B又はCなどの少なくとも1つ」に類似した条件が使用される場合、一般に、このような構成は、当業者がその条件を理解する意味であることが意図される（例えば、「A、B又はCの少なくとも1つを有する系」は、限定はされないが、A単独、B単独、C単独、A及びBと一緒に、A及びCと一緒に、B及びCと一緒に、且つ／又はA、B及びCと一緒に有する系などを含むであろう）。2つ以上の代替用語を表す実質的に全ての離接語及び／又は語句は、本明細書、特許請求の範囲又は図面中にかかわらず、用語の1つ、用語のいずれか又は両方の用語を含む可能性を企図すると理解されるべきであることが当業者によってさらに理解されるであろう。例えば、「A又はB」という語句は、「A」若しくは「B」又は「A及びB」の可能性を含むことが理解されるであろう。

【0200】

さらに、本開示の特徴又は態様がマーカッシュグループに関して記載される場合、当業者は、本開示がマーカッシュグループの任意の個々のメンバー又はサブグループに関してのもそれによって記載されることを認識するであろう。

【0201】

当業者によって理解されるように、あらゆる目的のために、例えば明細書の提供に関し

10

20

30

40

50

て、本明細書に開示される全ての範囲は、あらゆる可能な部分範囲及びその部分範囲の組合せも包含する。いずれの列挙された範囲も、同一範囲が少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分などされ得ることを十分に記載し、可能にすることが容易に認識され得る。非限定的な例として、本明細書に記載される各範囲は、下3分の1、中3分の1及び上3分の1などに容易に分けられ得る。当業者によってさらに理解されるように、「～まで」、「少なくとも」などの全ての文言は、記載される数を含み、上記の部分範囲に続いて分けられ得る範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は、それぞれの個々のメンバーを含む。したがって、例えば、1～3個の細胞を有する群は、1、2又は3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1、2、3、4又は5個の細胞を有する群を指すなどである。

10

【0202】

上記から、本開示の様々な実施形態が例示の目的のために本明細書に記載されていること及び様々な変更形態が本開示の範囲及び趣旨を逸脱することなくなされ得ることが理解されるであろう。したがって、本明細書に開示される様々な実施形態は、限定を意図したものではなく、真の範囲及び趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示される。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔1〕 サンプル中の核酸標的にオリゴヌクレオチドバーコードを結合するための方法であって、

複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の前記核酸標的のコピーにバーコードを付けて、前記核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；

20

前記標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを前記複数のバーコード付き核酸分子に結合して、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；

前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；

前記複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と

30

を含む方法。

〔2〕 前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識、その相補体又はそれらの組合せの数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程をさらに含む、前記〔1〕に記載の方法。

〔3〕 サンプル中の標的の数を決定するための方法であって、

複数のオリゴヌクレオチドバーコードを用いて、サンプル中の核酸標的のコピーにバーコードを付けて、前記核酸標的の配列、分子標識及び標的結合領域をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；

前記標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを前記複数のバーコード付き核酸分子に結合して、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；

40

前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；

前記複数のバーコード付き核酸分子の3'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の前記相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；

前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程と

50

を含む方法。

〔４〕前記複数の標的の前記コピーにバーコードを付ける工程は、

前記核酸標的のコピーを前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させる工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、前記核酸標的にハイブリダイズすることが可能な前記標的結合領域を含む、工程と；

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長して、前記複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程とを含む、前記〔１〕～〔３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５〕前記複数の標的の前記コピーにバーコードを付ける工程は、

前記核酸標的のコピーを前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させる工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、前記標的結合領域を含み、前記標的結合領域は、前記核酸標的にハイブリダイズする、工程と；

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長して、前記複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程とを含む、前記〔１〕～〔３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６〕前記複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程

を含み、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを結合する工程は、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを前記複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の相補体をそれぞれ含む前記複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含む、前記〔１〕～〔５〕のいずれか一項に記載の方法。

〔７〕前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記分子標識の前記相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程

を含み、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程は、前記複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程を含む、前記〔２〕～〔６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔８〕前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子のコピーを生成する工程

を含み、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程は、複数の伸長されたバーコード付き核酸分子の前記コピーに関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程を含む、前記〔２〕～〔６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔９〕サンプル中の核酸標的の数を決定するための方法であって、

サンプル中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工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び前記核酸標的にハイブリダイズすることが可能な標的結合領域を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも１０個は、異なる分子標識配列を含む、工程と；

前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長して、前記核酸標的の少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数の核酸分子を生成する工程と；

前記複数のバーコード付き核酸分子を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；

前記標的結合領域の相補体を含むオリゴヌクレオチドを前記複数の増幅されたバーコード付き核酸分子に結合して、前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程と；

前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、ステムループを形成する工程と；

前記複数のバーコード付き核酸分子の３'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して

10

20

30

40

50

、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成する工程と；

前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記分子標識の前記相補体をそれぞれ含む複数の単一標識核酸分子を生成する工程と；

前記複数の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する分子標識の相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記核酸標的の数を決定する工程とを含む方法。

〔10〕前記分子標識は、前記複数のバーコード付き核酸分子の前記3'末端を伸長した後、前記分子標識の前記相補体にハイブリダイズされ、前記方法は、前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を増幅して、前記複数の単一標識核酸分子を生成する前に、前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を変性する工程を含む、前記〔7〕～〔9〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔11〕前記サンプル中の前記核酸標的のコピーを接触させる工程は、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工程を含み、

前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程は、前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記複数の核酸標的の前記コピーを伸長して、前記複数の核酸標的の1つの少なくとも一部に相補的な配列をそれぞれ含む複数のバーコード付き核酸分子を生成する工程を含み、

前記核酸標的の数を決定する工程は、前記複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む前記複数の単一標識核酸分子の単一標識核酸分子に関連付けられている、固有の配列を有する前記分子標識の前記相補体の数に基づいて、前記サンプル中の前記複数の核酸標的のそれぞれの数を決定する工程を含む、前記〔9〕又は〔10〕に記載の方法。

20

〔12〕前記複数の核酸標的の前記それぞれの前記配列は、前記複数の核酸標的の前記それぞれの部分配列を含む、前記〔11〕に記載の方法。

〔13〕前記複数のバーコード付き核酸分子中の前記核酸標的の前記配列は、前記核酸標的の部分配列を含む、前記〔1〕～〔12〕のいずれか一項に記載の方法。

〔14〕前記標的結合領域は、遺伝子特異的配列を含む、前記〔1〕～〔13〕のいずれか一項に記載の方法。

〔15〕前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを結合する工程は、前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを前記複数のバーコード付き核酸分子にライゲートする工程を含む、前記〔1〕～〔14〕のいずれか一項に記載の方法。

30

〔16〕前記標的結合領域は、ポリ（dT）配列を含み、

前記標的結合領域の前記相補体を含む前記オリゴヌクレオチドを結合する工程は、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて、複数のアデノシンリン酸を前記複数のバーコード付き核酸分子に付加する工程を含む、前記〔1〕～〔12〕のいずれか一項に記載の方法。

〔17〕前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程は、前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを逆転写して、複数のバーコード付き相補的デオキシリボ核酸（cDNA）分子を生成する工程を含む、前記〔4〕～〔16〕のいずれか一項に記載の方法。

40

〔18〕前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程は、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性及び3'→5'エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも1つが欠如したDNAポリメラーゼを用いて、前記オリゴヌクレオチドバーコードにハイブリダイズされた前記核酸標的の前記コピーを伸長する工程を含む、前記〔4〕～〔16〕のいずれか一項に記載の方法。

〔19〕前記DNAポリメラーゼは、クレノウ断片を含む、前記〔18〕に記載の方法。

〔20〕前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子の配列情報を得る工程を含む、前記〔1〕～〔19〕のいずれか一項に記載の方法。

50

〔21〕前記配列情報を得る工程は、シーケンシングアダプターを前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子に結合する工程を含む、前記〔20〕に記載の方法。

〔22〕前記標的結合領域の前記相補体は、前記標的結合領域の逆相補的配列を含む、前記〔1〕～〔21〕のいずれか一項に記載の方法。

〔23〕前記標的結合領域の前記相補体は、前記標的結合領域の相補的配列を含む、前記〔1〕～〔21〕のいずれか一項に記載の方法。

〔24〕前記分子標識の前記相補体は、前記分子標識の逆相補的配列を含む、前記〔1〕～〔23〕のいずれか一項に記載の方法。

〔25〕前記分子標識の前記相補体は、前記分子標識の相補的配列を含む、前記〔1〕～〔23〕のいずれか一項に記載の方法。

〔26〕前記複数のバーコード付き核酸分子は、バーコード付きデオキシリボ核酸（DNA）分子を含む、前記〔1〕～〔25〕のいずれか一項に記載の方法。

〔27〕前記バーコード付き核酸分子は、バーコード付きリボ核酸（RNA）分子を含む、前記〔1〕～〔25〕のいずれか一項に記載の方法。

〔28〕前記核酸標的は、核酸分子を含むか、それから本質的になるか又はそれからなる、前記〔1〕～〔27〕のいずれか一項に記載の方法。

〔29〕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）テールを含むRNA又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔28〕に記載の方法。

〔30〕前記核酸標的は、細胞成分結合試薬を含む、前記〔28〕又は〔29〕に記載の方法。

〔31〕前記核酸分子は、前記細胞成分結合試薬に関連付けられる、前記〔30〕に記載の方法。

〔32〕前記核酸分子及び前記細胞成分結合試薬を解離させる工程を含む、前記〔31〕に記載の方法。

〔33〕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ヌクレオチドを含む、前記〔1〕～〔32〕のいずれか一項に記載の方法。

〔34〕前記オリゴヌクレオチドバーコードは、同一のサンプル標識を含む、前記〔1〕～〔33〕のいずれか一項に記載の方法。

〔35〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各サンプル標識は、少なくとも6ヌクレオチドを含む、前記〔34〕に記載の方法。

〔36〕前記オリゴヌクレオチドバーコードは、同一の細胞標識を含む、前記〔1〕～〔35〕のいずれか一項に記載の方法。

〔37〕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ヌクレオチドを含む、前記〔36〕に記載の方法。

〔38〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられる、前記〔1〕～〔37〕のいずれか一項に記載の方法。

〔39〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体から解離する、前記〔1〕～〔37〕のいずれか一項に記載の方法。

〔40〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体に関連付けられる、前記〔1〕～〔37〕のいずれか一項に記載の方法。

〔41〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも1つは、前記複数のバーコード付き核酸分子の前記3'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生

10

20

30

40

50

成するとき、固体担体に関連付けられる、前記〔１〕～〔３７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４２〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも１つは、前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、固体担体から解離する、前記〔１〕～〔３７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも１つは、前記複数のバーコード付き核酸分子の前記３'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、固体担体に関連付けられない、前記〔１〕～〔３７〕のいずれか一項に記載の方法。

10

〔４４〕前記固体担体は、合成粒子を含む、前記〔３８〕～〔４３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４５〕前記固体担体は、平坦な表面を含む、前記〔３８〕～〔４３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４６〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも１つは、前記複数のバーコード付き核酸分子のそれぞれの中の前記標的結合領域及び前記標的結合領域の前記相補体をハイブリダイズして、前記ステムループを形成するとき、溶液中にある、前記〔１〕～〔３７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４７〕前記複数のバーコード付き核酸分子の少なくとも１つは、前記複数のバーコード付き核酸分子の前記３'末端を伸長して、前記ステムループを伸長して、前記分子標識及び前記分子標識の相補体をそれぞれ含む前記複数の伸長されたバーコード付き核酸分子を生成するとき、溶液中にある、前記〔１〕～〔３７〕のいずれか一項に記載の方法。

20

〔４８〕前記溶液は、１つ以下の細胞を含む区画中に分配される、前記〔４６〕又は〔４７〕に記載の方法。

〔４９〕前記区画は、マイクロドロップ、マイクロウェル又は流体デバイスのチャンバの少なくとも１つを含む、前記〔４８〕に記載の方法。

〔５０〕前記サンプルは、単一細胞を含み、前記方法は、前記複数の前記オリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を前記サンプル中の前記単一細胞に関連付ける工程を含む、前記〔１〕～〔４９〕のいずれか一項に記載の方法。

30

〔５１〕前記合成粒子を前記単一細胞に関連付けた後、前記単一細胞を溶解させる工程を含む、前記〔５０〕に記載の方法。

〔５２〕前記単一細胞を溶解させる工程は、前記サンプルを加熱する工程、前記サンプルを洗浄剤と接触させる工程、前記サンプルのpHを変化させる工程又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔５１〕に記載の方法。

〔５３〕前記合成粒子及び前記単一細胞は、同じウェル中にある、前記〔５０〕～〔５２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５４〕前記合成粒子及び前記単一細胞は、同じドロップレット中にある、前記〔５０〕～〔５３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５５〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも１つは、前記合成粒子上に固定される、前記〔５０〕～〔５４〕のいずれか一項に記載の方法。

40

〔５６〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも１つは、前記合成粒子上に部分的に固定される、前記〔５０〕～〔５４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５７〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも１つは、前記合成粒子に封入される、前記〔５０〕～〔５４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５８〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも１つは、前記合成粒子に部分的に封入される、前記〔５０〕～〔５４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５９〕前記合成粒子は、崩壊性である、前記〔５０〕～〔５８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６０〕前記合成粒子は、ビーズを含む、前記〔５０〕～〔５９〕のいずれか一項に記載

50

の方法。

〔61〕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、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又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔60〕に記載の方法。

〔62〕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、常磁性材料、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、シリコン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、前記〔60〕又は〔61〕に記載の方法。

10

〔63〕前記合成粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔50〕～〔62〕のいずれか一項に記載の方法。

〔64〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、リンカー官能基を含み、前記合成粒子は、固体担体官能基を含み、

前記担体官能基及び前記リンカー官能基は、互いに関連付けられる、前記〔50〕～〔63〕のいずれか一項に記載の方法。

〔65〕前記リンカー官能基及び前記担体官能基は、個別に、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、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、前記〔64〕に記載の方法。

20

〔66〕キットであって、

複数のオリゴヌクレオチドバーコードであって、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、分子標識及び標的結合領域を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む、複数のオリゴヌクレオチドバーコードと；

末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ又はリガーゼと；

5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性及び3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性の少なくとも1つが欠如したDNAポリメラーゼとを含むキット。

30

〔67〕前記標的結合領域の相補体を含む複数のオリゴヌクレオチドをさらに含む、前記〔66〕に記載のキット。

〔68〕前記標的結合領域の前記相補体を含む前記複数のオリゴヌクレオチドは、cDNA分子などのDNA分子の3'末端への結合のために構成される、前記〔67〕に記載のキット。

〔69〕前記DNAポリメラーゼは、クレノウ断片を含む、前記〔66〕に記載のキット。

〔70〕緩衝液を含む、前記〔66〕又は〔67〕に記載のキット。

〔71〕カートリッジを含む、前記〔66〕～〔68〕のいずれか一項に記載のキット。

〔72〕逆転写反応のための1つ以上の試薬を含む、前記〔66〕～〔71〕のいずれか一項に記載のキット。

40

〔73〕増幅反応のための1つ以上の試薬を含む、前記〔66〕～〔72〕のいずれか一項に記載のキット。

〔74〕前記標的結合領域は、遺伝子特異的配列、オリゴ（dT）配列、ランダムマルチマー又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔66〕～〔73〕のいずれか一項に記載のキット。

〔75〕前記オリゴヌクレオチドバーコードは、同一のサンプル標識及び／又は同一の細胞標識を含む、前記〔66〕～〔74〕のいずれか一項に記載のキット。

〔76〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各サンプル標識及び／又は細胞標識は、少なくとも6ヌクレオチドを含む、前記〔75〕に記載のキット。

〔77〕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ヌクレ

50

オチドを含む、前記〔66〕～〔75〕のいずれか一項に記載のキット。

〔78〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、合成粒子上に固定される、前記〔66〕～〔77〕のいずれか一項に記載のキット。

〔79〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、前記合成粒子上に部分的に固定される、前記〔66〕～〔78〕のいずれか一項に記載のキット。

〔80〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、前記合成粒子に封入される、前記〔66〕～〔79〕のいずれか一項に記載のキット。

〔81〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つは、前記合成粒子に部分的に封入される、前記〔66〕～〔80〕のいずれか一項に記載のキット。

〔82〕前記合成粒子は、崩壊性である、前記〔66〕～〔81〕のいずれか一項に記載のキット。

10

〔83〕前記合成粒子は、ビーズを含む、前記〔66〕～〔82〕のいずれか一項に記載のキット。

〔84〕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、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又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔83〕に記載のキット。

〔85〕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、常磁性材料、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、シリコーン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、前記〔66〕～〔84〕のいずれか一項に記載のキット。

20

〔86〕前記合成粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔66〕～〔85〕のいずれか一項に記載のキット。

〔87〕前記複数のオリゴヌクレオチドバーコードのそれぞれは、リンカー官能基を含み、前記合成粒子は、固体担体官能基を含み、

前記担体官能基及び前記リンカー官能基は、互いに関連付けられる、前記〔66〕～〔86〕のいずれか一項に記載のキット。

30

〔88〕前記リンカー官能基及び前記担体官能基は、個別に、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、ケトン及びそれらの任意の組合せからなる群から選択される、前記〔87〕に記載のキット。

40

50

【図面】
【図 1】

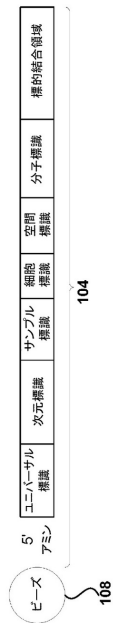


図 1

【図 3】

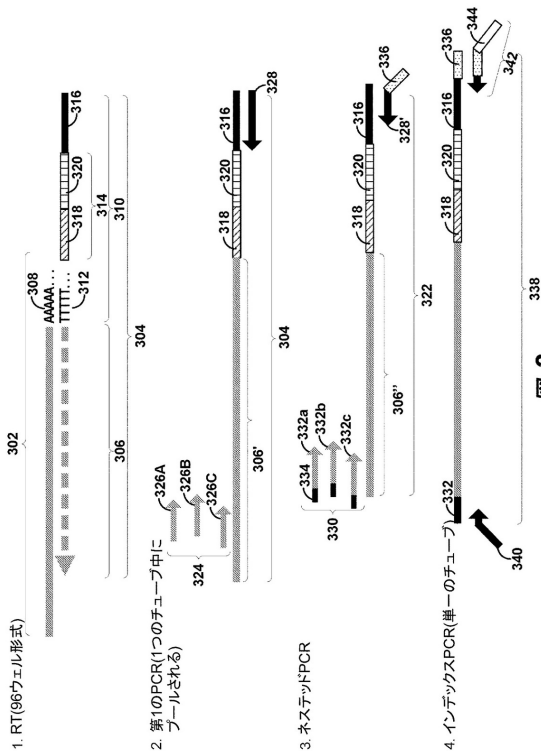


図 3

【図 2】

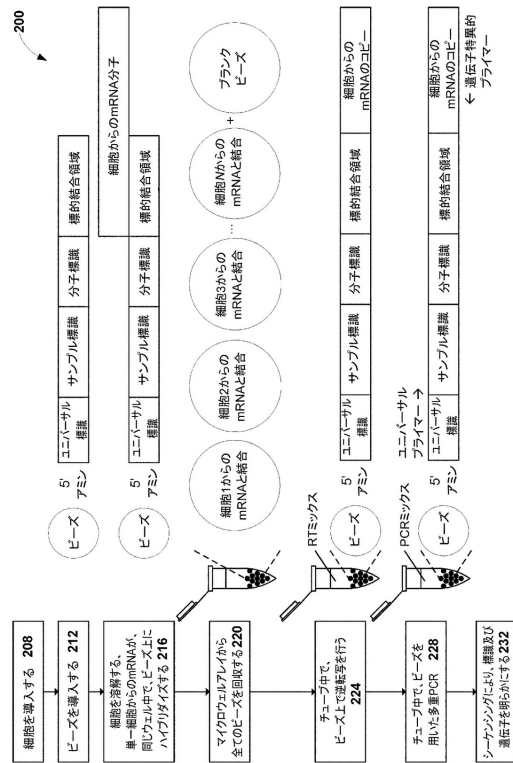


図 2

【図 4 A】

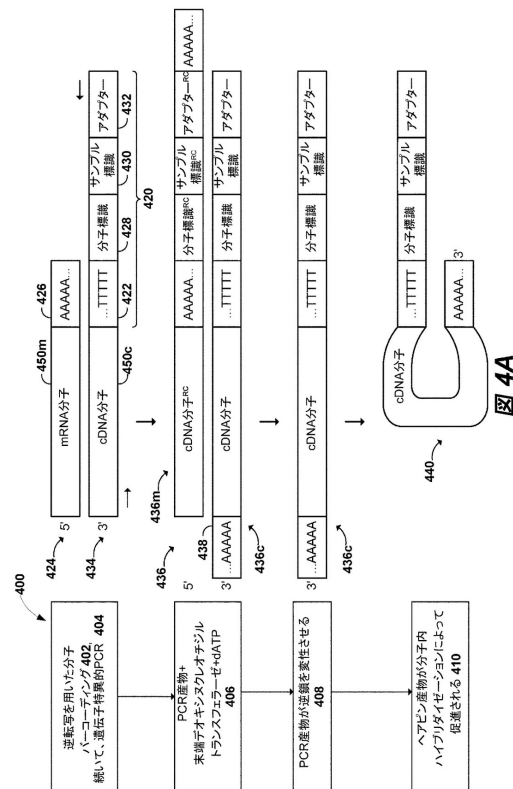
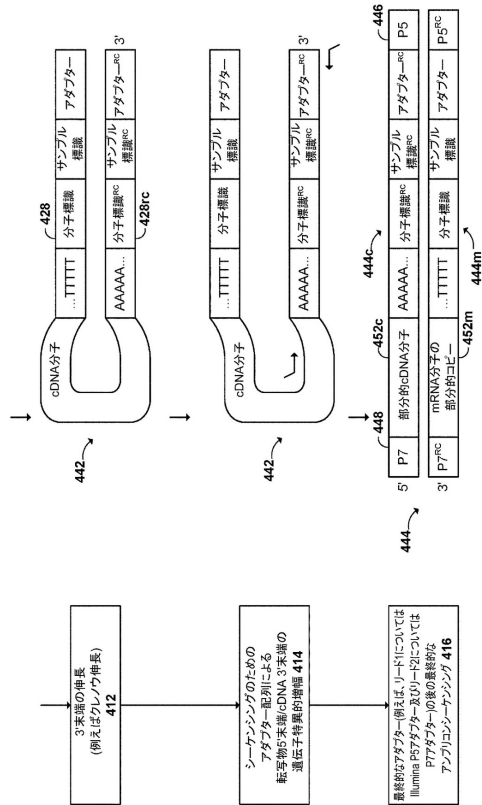
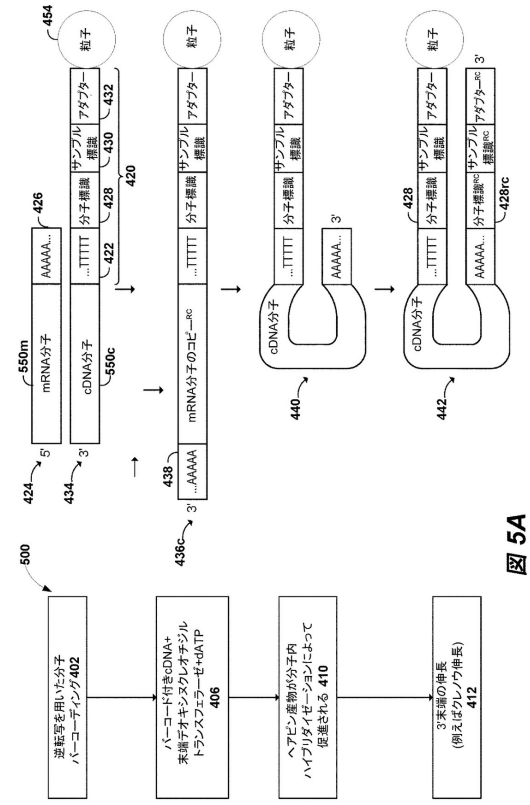


図 4A

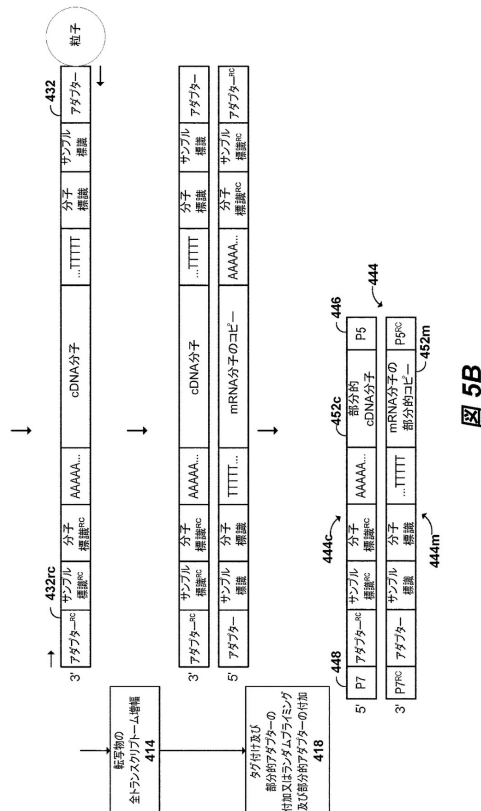
【図 4 B】



【図 5 A】



【図 5 B】



☒ 5B

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6855(2018.01)

C 1 2 Q 1/6855 Z

(74)代理人 100103610

弁理士 ▲吉▼田 和彦

(74)代理人 100109070

弁理士 須田 洋之

(74)代理人 100119013

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 100168631

弁理士 佐々木 康匡

(72)発明者 シャム エリーン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 4 1 7 フランクリン レイクス ベクトン ドライブ 1

(72)発明者 ファン クリスティーナ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 0 7 4 1 7 フランクリン レイクス ベクトン ドライブ 1

審査官 太田 雄三

(56)参考文献 国際公開第2018/058073 (WO, A2)

特表2015-533296 (JP, A)

国際公開第2018/015365 (WO, A2)

国際公開第2016/176091 (WO, A2)

OGAWA, T., et al., The efficacy and further functional advantages of random-base molecular barcodes for absolute and digital quantification of nucleic acid molecules, SCIENTIFIC REPORTS, 2017年10月19日, 7:13576, p. 1-9, DOI:10.1038/s41598-017-13529-3

SHIROGUCHI, K., et.al., Digital RNA sequencing minimizes sequencedependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012年01月24日, Vol. 109, p. 1347-1352, DOI:10.1073/pnas.1118018109

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)