(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7536450号
(P7536450)

(45)発行日　令和6年8月20日(2024.8.20)

(24)登録日　令和6年8月9日(2024.8.9)

(51)国際特許分類		FI		
C12Q 1/6869(2018.01)		C12Q	1/6869	Z
C12N 15/11 (2006.01)		C12N	15/11	Z
C12Q 1/68 (2018.01)		C12Q	1/68	100Z
C12Q 1/6809(2018.01)		C12Q	1/68	ZNA
C12Q 1/6813(2018.01)		C12Q	1/6809	Z

請求項の数　47　（全276頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-566787(P2019-566787)
(86)(22)出願日　平成30年3月27日(2018.3.27)
(65)公表番号　特表2020-522262(P2020-522262A)
(43)公表日　令和2年7月30日(2020.7.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2018/024602
(87)国際公開番号　WO2018/226293
(87)国際公開日　平成30年12月13日(2018.12.13)
審査請求日　令和3年3月29日(2021.3.29)
審判番号　不服2022-6137(P2022-6137/J1)
審判請求日　令和4年4月22日(2022.4.22)
(31)優先権主張番号　62/515,285
(32)優先日　平成29年6月5日(2017.6.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
最終頁に続く

(73)特許権者　595117091
ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
ＢＥＣＴＯＮ，ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ ＡＮＤ ＣＯＭＰＡＮＹ
アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー ０７４１７－１８８０ フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ １
(74)代理人　100094569
弁理士　田中 伸一郎
(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
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　単一細胞用のサンプルインデックス付加

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

以下の工程：

（ａ）　第１の複数の細胞を含む第１のサンプル及び第２の複数の細胞を含む第２のサンプルを、それぞれ第１のオリゴヌクレオチド結合抗体及び第２のオリゴヌクレオチド結合抗体と接触させて、それぞれ第１のバーコード化サンプル及び第２のバーコード化サンプルを形成する工程、

ここで、第１のバーコード化サンプルは、第１のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた細胞を含み、第２のバーコード化サンプルは、第２のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた細胞を含み、

前記第１の抗体は、第１の複数の細胞の各々のタンパク質標的に特異的に結合することができ、且つ、ポリ（ｄＡ）領域と第１のサンプルインデックス用配列とを含む第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドと結合されており、

前記第２の抗体は、第２の複数の細胞の各々のタンパク質標的に特異的に結合することができ、且つ、ポリ（ｄＡ）領域と第２のサンプルインデックス用配列とを含む第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドと結合されており、

第１のサンプルインデックス用配列及び第２のサンプルインデックス用配列は、異なる配列を含み、且つ

第１の複数の細胞の各々のタンパク質標的及び第２の複数の細胞の各々のタンパク質標的は、同一である、

（ｂ）　第１のバーコード化サンプルと第２のバーコード化サンプルをプールして、第１のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた第１の複数の細胞と第２のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた第２の複数の細胞とを含む、組み合わされたバーコード化サンプルを形成する工程、
（ｃ）　組み合わされたバーコード化サンプルの第１のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた第１の複数の細胞と第２のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた第２の複数の細胞とを、複数の区画に分ける工程、ここで、複数の区画の各区画は、組み合わされたバーコード化サンプルの１つの細胞を含む、
（ｄ）　複数の区画の各区画において、バーコーディング粒子を第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドと接触させる工程、ここで、バーコーディング粒子は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、その各々は、ポリ（Ｔ）領域とバーコーディング粒子の複数のオリゴヌクレオチドプローブに共通のバーコード配列とを含む、
（ｅ）　第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドのポリ（ｄＡ）領域とオリゴヌクレオチドプローブのポリ（Ｔ）領域との間のハイブリダイゼーションを介して第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドにハイブリダイズした各オリゴヌクレオチドプローブを伸長させて、第１の標識化核酸又は第２の標識化核酸を生成する工程、ここで、第１の標識化核酸は、第１のサンプルインデックス用配列又はその相補配列とバーコード配列とを含み、第２の標識化核酸は、第２のサンプルインデックス用配列又はその相補配列とバーコード配列とを含む、
（ｆ）　第１のサンプルインデックス用配列を含む第１の標識化核酸又は第２のサンプルインデックス用配列を含む第２の標識化核酸、或いはそれらの一部の配列情報を得る工程、並びに
（ｇ）　組み合わされたバーコード化サンプルの複数の区画の各区画にある１つの細胞が、第１のサンプル由来であるか第２のサンプル由来であるかを、工程（ｆ）で得られた前記配列情報における、それぞれ第１のサンプルインデックス用配列又は第２のサンプルインデックス用配列、又はそれらの相補配列、又はそれらの一部に基づき、決定する工程
を含む、サンプル同定のための方法。
【請求項２】
　工程（ａ）の後に、第１の複数の細胞に関連付けられていない第１のオリゴヌクレオチド結合抗体及び第２の複数の細胞に関連付けられていない第２のオリゴヌクレオチド結合抗体を除く工程を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
　第１の複数の細胞の各々のタンパク質標的に特異的に結合することのできる第１の抗体及び第２の複数の細胞の各々のタンパク質標的に特異的に結合することのできる第２の抗体が同一である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
　第１のオリゴヌクレオチド結合抗体及び第２のオリゴヌクレオチド結合抗体から、それぞれ第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド及び第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
　第１のサンプルインデックス用配列及び第２のサンプルインデックス用配列の少なくとも１つが、６～６０ヌクレオチド長である、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
　第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド及び第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、５０～５００ヌクレオチド長である、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
　第１の複数の細胞の各々のタンパク質標的及び第２の複数の細胞の各々のタンパク質標

的の少なくとも１つが、細胞表面タンパク質、細胞内タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター又はそれらの組み合わせである、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
工程（ｃ）において組み合わされたバーコード化サンプルの第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を分ける工程が、組み合わされたサンプルの、第１のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた第１の複数の細胞及び第２のオリゴヌクレオチド結合抗体に関連付けられた第２の複数の細胞と、前記バーコーディング粒子を含む複数のバーコーディング粒子とを、複数の区画に分けることを含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
第１の標識化核酸又は第２の標識化核酸或いはそれらの一部の配列情報を得る工程（ｆ）が、第１の標識化核酸又は第２の標識化核酸を１つ以上の核酸増幅反応に供して、核酸シーケンシング用の第１セットの核酸又は第２セットの核酸を生成することを含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマー用の結合部位、増幅アダプター、シーケンシングアダプター、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
複数のオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも１つのオリゴヌクレオチドプローブが、バーコーディング粒子上に固定されているか、部分的に前記粒子上に固定されているか、前記粒子内に封入されているか、部分的に前記粒子内に封入されているか、それらの組み合わせである、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
工程（ｄ）が、１つの細胞を含む区画内で、複数のオリゴヌクレオチドプローブをバーコーディング粒子から遊離させることを含む、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
バーコーディング粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、ヒドロゲルビーズ、又は崩壊性ヒドロゲルビーズである、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
複数の区画がウェル又はドロップレットを含む、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１５】
第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、腫瘍細胞、骨髄細胞、血液細胞、正常細胞、胎児細胞、母体細胞、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
複数の区画のうちの１区画の１つの細胞が、関心のある複数のタンパク質を含み、且つ
工程（ａ）が、第３の複数のオリゴヌクレオチド結合抗体を前記１つの細胞と接触させることを更に含み、ここで、第３の複数のオリゴヌクレオチド結合抗体の各々は、ユニーク識別子及びポリ（ｄＡ）領域を含む抗体特異的オリゴヌクレオチドと結合した抗体を含み、ユニーク識別子は前記抗体特異的オリゴヌクレオチドと結合した抗体用のユニーク識別子であり、且つ前記抗体は関心のある前記複数のタンパク質の少なくとも１つと特異的に結合することができ、
工程（ｅ）が、抗体特異的オリゴヌクレオチドのポリ（ｄＡ）領域とオリゴヌクレオチドプローブのポリ（Ｔ）領域との間のハイブリダイゼーションを介して、抗体特異的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長させて、複数の

標識化核酸を生成することを更に含み、ここで、複数の標識化核酸の各々は、ユニーク識別子又はその相補配列とバーコード配列とを含み、且つ
工程（ｆ）が、複数の標識化核酸又はその一部の配列情報を得て、１つの細胞内の関心のある複数のタンパク質のうちの１つ以上の量を決定することを更に含む、
請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
抗体特異的オリゴヌクレオチドが、分子標識、細胞標識、ユニバーサルプライマー用の結合部位、増幅アダプター、シーケンシングアダプター、又はそれらの組み合わせを含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
関心のある複数のタンパク質のうちの関心のある各タンパク質が、細胞表面タンパク質、細胞内タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの組み合わせである、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
前記１つの細胞が、複数のｍＲＮＡ標的分子を含み、且つ
工程（ｄ）が、ｍＲＮＡ標的分子のポリ（Ａ）テールとオリゴヌクレオチドプローブのポリ（Ｔ）領域との間で、１つの細胞由来のｍＲＮＡ標的分子を、複数のオリゴヌクレオチドプローブのオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせることを更に含み、
工程（ｅ）が、ｍＲＮＡ標的分子のポリ（Ａ）テールとオリゴヌクレオチドプローブのポリ（Ｔ）領域との間のハイブリダイゼーションを介してｍＲＮＡ標的分子にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプローブを伸長させて、複数の標識化核酸を生成することを更に含み、ここで、複数の標識化核酸の各々は、ｍＲＮＡ標的分子の１つの相補的配列とバーコード配列とを含み、且つ
工程（ｆ）が、複数の標識化核酸又はその一部の配列情報を得て、１つの細胞内における複数のｍＲＮＡ標的分子のうちの１つ以上の量を決定することを更に含む、
請求項１６に記載の方法。
【請求項２０】
以下の工程：
（ａ） 第１の複数の細胞を含む第１のサンプル及び第２の複数の細胞を含む第２のサンプルを、それぞれ第１のサンプルインデックス用組成物及び第２のサンプルインデックス用組成物と接触させて、それぞれ第１の標識化サンプル及び第２の標識化サンプルを形成する工程、ここで、第１の標識化サンプルは、第１のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた細胞を含み、第２の標識化サンプルは第２のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた細胞を含み、
第１のサンプルインデックス用組成物は、第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドに関連付けられた第１の細胞成分結合用試薬を含み、第１の細胞成分結合用試薬は、第１の複数の細胞の各々の細胞成分標的に特異的に結合することができ、且つ、第１の細胞成分結合用試薬は、抗体又は機能的抗体フラグメントであり、
第２のサンプルインデックス用組成物は、第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドに関連付けられた第２の細胞成分結合用試薬を含み、第２の細胞成分結合用試薬は、第２の複数の細胞の各々の細胞成分標的に特異的に結合することができ、且つ、第２の細胞成分結合用試薬は、抗体又は機能的抗体フラグメントであり、
第１及び第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドは、それぞれ第１のサンプルインデックス用配列及び第２のサンプルインデックス用配列を含み、且つ第１のサンプルインデックス用配列及び第２のサンプルインデックス用配列は、異なる配列を含み、且つ
第１の複数の細胞の各々の細胞成分標的及び第２の複数の細胞の各々の細胞成分標的は、同じである、
（ｂ） 第１の標識化サンプル及び第２の標識化サンプルをプールして、第１のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた細胞及び第２のサンプルインデックス用組成物に

関連付けられた細胞をそれぞれ含む、組み合わされた標識化サンプルを形成する工程、
（ｃ） 組み合わされた標識化サンプルの第１のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた細胞及び第２のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた細胞を、複数の区画に分ける工程、ここで、複数の区画の各区画は、組み合わされた標識化サンプルの１つの細胞を含む、
（ｄ） 第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを１つ以上の核酸増幅反応に供し、第１のサンプルインデックス用配列又はその相補体を含む第１のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチド或いは第２のサンプルインデックス用配列又はその相補体を含む第２のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを生成する工程、
（ｅ） 第１のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチド或いはそれらの一部の配列情報を得る工程、
（ｆ） 組み合わされた標識化サンプル内の１又は複数の細胞が、第１のサンプル由来であるか第２のサンプル由来であるかを、工程（ｅ）において得られた配列情報内のそれぞれ第１のサンプルインデックス用配列又は第２のサンプルインデックス用配列、それらの相補配列又はそれらの一部に基づいて決定する工程
を含む、サンプル同定のための方法。
【請求項２１】
細胞成分結合用試薬が、タンパク質結合用試薬を含み、ここで、タンパク質結合用試薬は、サンプルインデックス用オリゴヌクレオチドに関連付けられており、且つ、細胞成分標的はタンパク質標的を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
工程（ｄ）において、第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを１つ以上の核酸増幅反応に供して、第１のサンプルインデックス用配列又はその相補体を含む第１のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチド、或いは第２のサンプルインデックス用配列又はその相補体を含む第２のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを生成する工程が、
複数のバーコードを用いて、第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドをバーコード化して、第１のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを生成することを含む、
請求項２０又は２１に記載の方法。
【請求項２３】
組み合わされた標識化サンプル中の細胞が第１サンプル由来であるか第２サンプル由来であるかを決定する工程が、バーコード化サンプルインデックス用組成物内における第１サンプルインデックス用配列、第２サンプルインデックス用配列、それらの相補配列又はそれらの一部の存在の有無を同定することを含む、請求項２０～２２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２４】
第１のサンプルインデックス用配列及び第２のサンプルインデックス用配列の少なくとも１つが、６～６０ヌクレオチド長である、請求項２０～２３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２５】
第１の複数の細胞の各々の細胞成分標的及び第２の複数の細胞の各々の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面上にある、請求項２０～２４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２６】
第１の複数の細胞に関連付けられていない第１のサンプルインデックス用組成物及び第２の複数の細胞に関連付けられていない第２のサンプルインデックス用組成物を除く工程を含む、請求項２０～２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２７】
第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドが、第１の細胞成分結合用試薬から切り離せないように構成されているか、第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドが、第２の細胞成分結合用試薬から切り離せないように構成されているか、或いはその両方である、請求項２０～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
第１の細胞成分結合用試薬から第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを切り離すこと、第２の細胞成分結合用試薬から第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを切り離すこと、或いはその両方を含む、請求項２０～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２９】
第１及び／又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドが、第１及び／又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドの配列を捕捉するように構成されている捕捉配列に相補的な配列を含み、且つ
前記バーコードの各々が、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、
請求項２０～２８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３０】
標的結合領域がポリ（ｄＴ）領域を含み、且つ捕捉配列に相補的なサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドの配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド及び第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、分子標識配列、ユニバーサルプライマー用の結合部位、又はその両方を含む、請求項２０～３０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３２】
第１の複数の細胞の各々の細胞成分標的、第２の複数の細胞の各々の細胞成分標的、又はその両方が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質、又はそれらの組み合わせを含む、請求項２０～３１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３３】
複数のバーコードが、粒子に関連付けられている、請求項２２に記載の方法。
【請求項３４】
複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、粒子上に固定化されているか、部分的に粒子上に固定化されているか、粒子内に封入されているか、部分的に粒子内に封入されているか、これらの組み合わせである、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
粒子が、崩壊性ビーズ又は崩壊性ヒドロゲルビーズである、請求項３３又は３４に記載の方法。
【請求項３６】
複数のバーコードを用いて第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドをバーコード化することが、
複数のバーコードを第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドと接触させて、バーコードを第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる工程、ここで、前記バーコードの各々は、第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用ヌクレオチド或いはそれらの両方に特異的に結合することのできる標的結合領域を含む、並びに
第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたバーコードを伸長させて、第１のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のバーコード化サンプルインデック

ス用オリゴヌクレオチドを生成する工程、
を含む、請求項３３～３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
複数のバーコードの各々が、同一のバーコード配列を含む、請求項３３～３６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３８】
第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド及び第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、５０～５００ヌクレオチド長である、請求項２０～３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】
第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドがリンカーを介して第１の細胞成分結合用試薬に結合されているか、第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドがリンカーを介して第２の細胞成分結合用試薬と結合されているか、或いはその両方である、請求項２０～３８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４０】
第１の細胞成分結合用試薬及び第２の細胞成分結合用試薬が同一である、請求項２０～３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
第１の複数の細胞の各々の細胞成分標的及び第２の複数の細胞の各々の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面タンパク質、細胞内タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はこれらの組み合わせを含む、請求項２０～４０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４２】
複数の区画がウェル又はドロップレットを含む、請求項２０～４１のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４３】
第１の複数の細胞、第２の複数の細胞、又はその両方が、Ｔ細胞、Ｂ細胞、腫瘍細胞、骨髄細胞、血液細胞、正常細胞、胎児細胞、母体細胞、又はこれらの組み合わせを含む、請求項２０～４２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４４】
複数のバーコードの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、増幅アダプター、シーケンシングアダプター、又はその組み合わせを含む、請求項２２に記載の方法。
【請求項４５】
工程（ｃ）における、組み合わされたバーコード化サンプルの第１のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた第１の複数の細胞及び第２のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた第２の複数の細胞を、複数の区画に分ける工程が、組み合わされたバーコード化サンプルの、第１のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた第１の複数の細胞、第２のサンプルインデックス用組成物に関連付けられた第２の複数の細胞、及び前記複数のバーコードを含む前記粒子を含む複数の粒子を複数の区画に分けることを含む、請求項３３に記載の方法。
【請求項４６】
工程（ｄ）の前に、前記１つの細胞を含む区画において、前記粒子から複数のバーコードのうちの１つ以上を遊離させることを含む、請求項３３又は４５に記載の方法。
【請求項４７】
第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを１つ以上の核酸増幅反応に供することが、複数の区画の各区画において、第１のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチド又は第２のサンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを１つ以上の核酸増幅反応に供して、第１のサンプルインデックス用配列又はその相補体を含む第１のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレ

オチド、又は第２のサンプルインデックス用配列又はその相補体を含む第２のバーコード化サンプルインデックス用オリゴヌクレオチドを生成することを含む、請求項２０～４６のいずれか１項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願

本出願は、２０１７年６月５日出願の米国仮特許出願第６２／５１５，２８５号明細書；２０１７年７月１４日出願の米国仮特許出願第６２／５３２，９０５号明細書；２０１７年７月１４日出願の米国仮特許出願第６２／５３２，９４９号明細書；２０１７年７月１４日出願の米国仮特許出願第６２／５３２，９７１号明細書；２０１７年９月５日出願の米国仮特許出願第６２／５５４，４２５号明細書；２０１７年１０月３０日出願の米国仮特許出願第６２／５７８，９５７号明細書；及び２０１８年３月２０日出願の米国仮特許出願第６２／６４５，７０３号明細書に基づく優先権を主張する。これらの関連出願の各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

配列表の参照

本出願は、電子フォーマットで配列表とともに出願される。配列表は、２０１８年３月２０日に作成された、３，１８１バイトのサイズのＳｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＢＤＣＲＩ＿０３３Ａ．ｔｘｔという名称のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマットでの情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００３】

本開示は、概して、分子生物学の分野、たとえば、分子バーコーディングを用いて、さまざまなサンプルの細胞を同定し、細胞成分間の相互作用を検出することに関する。

【背景技術】

【０００４】

現在の技術は、細胞の各々を、区画中でバーコード付き試薬ビーズと共局在化（ｃｏ－ｌｏｃａｌｉｚｅｄ）させながら、細胞特異的オリゴヌクレオチドバーコードを、個々の細胞からのポリ（Ａ）ｍＲＮＡ分子に結合することによって、超並列的に（たとえば、１００００個を超える細胞で）単一細胞の遺伝子発現の測定を可能にする。遺伝子発現は、タンパク質発現に影響を与えうる。タンパク質間相互作用は、遺伝子発現及びタンパク質発現に影響を与えうる。タンパク質発現を定量的に分析し、細胞中のタンパク質発現及び遺伝子発現を同時に測定し、細胞中のタンパク質間相互作用を決定しうるシステム及び方法が求められる。

【発明の概要】

【０００５】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物（サンプルインデックス用組成物、sample indexing composition）のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞が、１つ以上の抗原標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加組成物が、２つ以上の抗原結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬及び抗体）を含み、２つ以上の抗原結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、２つ以上の抗原結合試薬の少なくとも１つが、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数

のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程（たとえば、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程）と、を含む。本方法は、たとえば、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含みうる。

【０００６】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば、４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長である。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１００又は１０００のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。

【０００７】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して抗原結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、抗原結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０００８】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上の抗原標的の少なくとも１つは、細胞表面上又は細胞の内部にありうる。複数のサンプルのうちの１つのサンプルは、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。複数のサンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０００９】

いくつかの実施形態では、未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解させる工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、抗原結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。本方法は、抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【００１０】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のサンプルの細胞のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【００１１】

いくつかの実施形態では、抗原標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。抗原標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。抗原結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬及び第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。

【００１２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【００１３】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられる。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うる。粒子は、分解性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、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、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、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。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みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００又は１００００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。

【００１４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【００１５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリ

メラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【００１６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【００１７】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、本方法は、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【００１８】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、抗原結合試薬を含む。２つ以上の抗原結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、同一でありうる。２つ以上の抗原結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の抗原結合試薬を含みうる。

【００１９】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加組成物が、２つ以上の細胞成分結合試薬（たとえば、抗原結合試薬又は抗体）を含み、２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、

異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。本方法は、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含みうる。

【００２０】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば、４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長である。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。

【００２１】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、細胞表面結合試薬、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【００２２】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つは、細胞表面上で発現されうる。複数のサンプルのうちの１つのサンプルは、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。複数のサンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００２３】

いくつかの実施形態では、未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解させる工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。本方法は、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【００２４】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のサンプルの細胞のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサ

ンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【００２５】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。細胞成分標的は、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬及び第２の細胞結合試薬は、同一でありうる。

【００２６】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含みうる。バーコードは、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【００２７】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に封入される。粒子はビーズでありうる。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うる。粒子は、分解性でありうる。ビーズは、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、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、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。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みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００又は１００００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。

【００２８】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【００２９】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバ

ーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【００３０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【００３１】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【００３２】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、細胞成分結合試薬を含む。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、同一でありうる。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。

【００３３】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加組成物が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含み、２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列

を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。本方法は、たとえば、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含み得る。

【００３４】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば、４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長である。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１００又は１０００のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。

【００３５】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して抗原結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、抗原結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【００３６】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上の抗原標的の少なくとも１つは、細胞表面上で発現されうる。複数のサンプルのうちの１つのサンプルは、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。複数のサンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００３７】

いくつかの実施形態では、未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解させる工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、抗原結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。本方法は、抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【００３８】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のサンプルの細胞のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【００３９】

いくつかの実施形態では、抗原標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組

織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。抗原結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬及び第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。

【００４０】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のバーコードを用いて、複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【００４１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含みうる。バーコードは、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【００４２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子上に固定される。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うる。粒子は、分解性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、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、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、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。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みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００又は１００００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。

【００４３】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含みうる。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード

付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【００４４】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【００４５】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程を含みうる。サンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程は、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中の少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに対応する複数のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含みうる。

【００４６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製アダプターを、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートする工程を含む。少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートされた複製アダプターを用いて、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【００４７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを伸長して、捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程は、捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製された

サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。
【００４８】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。
【００４９】
いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、抗原結合試薬を含む。２つ以上の抗原結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、同一でありうる。２つ以上の抗原結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の抗原結合試薬を含みうる。
【００５０】
本明細書に開示されるものには、複数のサンプルインデックス付加組成物が含まれる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の抗原結合試薬を含みうる。２つ以上の抗原結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。２つ以上の抗原結合試薬の少なくとも１つは、少なくとも１つの抗原標的に特異的に結合することが可能でありうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。
【００５１】
いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば、４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、又は１０００のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。
【００５２】
いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して抗原結合試薬に結合されうる。少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、抗原結合試薬の分子に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【００５３】
いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。
【００５４】
いくつかの実施形態では、抗原標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。抗原結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬及び第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。
【００５５】
本明細書に開示されるものには、コントロール粒子組成物が含まれる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々は、コントロールバーコード配列及びポリ（ｄＡ）領域を含む。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、分子標識配列を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含みうる。
【００５６】
いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５、１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３、５、１０、１００、又はそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。
【００５７】
いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含み、第１のコントロールバーコード配列及び第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有する。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、又はそれ以上多くなりうる。
【００５８】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【００５９】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを介してコントロール粒子に関連付けられる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００６０】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、７．５マイクロメートル、又はそれらの組合せである。

【００６１】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に固定される。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に部分的に固定されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に封入されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に部分的に封入されうる。コントロール粒子は、崩壊性でありうる。コントロール粒子は、ビーズでありうる。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うる。コントロール粒子は、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００６２】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられうる。

【００６３】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる。第１のタンパク質結合試薬は、第１の抗体を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタンパク質結合試薬に結合されうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００６４】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる。第１のタンパク質結合試薬は、異なるコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられうる。いくつかの実施形態では、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれかに関連付けられない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドに

関連付けられる第１のタンパク質結合試薬及びいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない第１のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。

【００６５】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第２のタンパク質結合試薬に関連付けられる。複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチド及び第２のタンパク質結合試薬に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。第１のタンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。

【００６６】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬と関連付けられ、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬を用いてコントロール粒子に関連付けられる。パートナー結合試薬は、パートナー抗体を含みうる。パートナー抗体は、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、又はそれらの組合せを含みうる。パートナー抗体は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、それらの組合せ、又はそれらのフラグメントを含みうる。

【００６７】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。第２のタンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【００６８】

本明細書に開示されるものには、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では、本方法は、複数の確率バーコードを用いて、複数の細胞のうちの１つの細胞の複数の標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを生成する工程を含み、複数の確率バーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードが、同一の細胞標識配列を含み、コントロール粒子組成物が、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられたコントロール粒子を含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列、及び複数の確率バーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む。本方法は、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と、を含みうる。本方法は、複数の標的の少なくとも１つの標的について：シーケンシングデータ中の標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と；標的の数を推定する工程であって、推定された標的の数が、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数と相関する工程と、を含みうる。

【００６９】

いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。擬似標的領域は、標的の部分配列を含みうる。いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、

少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの任意の組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５、１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３、５、１０、１００、又はそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。

【００７０】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含む。第１のコントロールバーコード配列及び第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有しうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、又はそれ以上多くなりうる。

【００７１】

いくつかの実施形態では、シーケンシングデータ中のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程は、シーケンシングデータ中の第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と；シーケンシングデータ中の前記第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と、を含む。推定された標的の数は、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列列を有する分子標識配列の数、及び第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数と相関しうる。推定された標的の数は、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、及びコントロールバーコード配列を含む複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と相関しうる。推定された標的の数は、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、並びにコントロールバーコード配列を含む複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数の比率と相関しうる。

【００７２】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、上記の細胞のゲノム配列に対して相同でない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、上記の種のゲノム配列に対して相同でないことがある。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【００７３】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してコントロール粒子に結合されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを介してコントロール粒子に関連付けられうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを含みうる。化学基は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合されうる。化学基

は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００７４】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、約７．５マイクロメートル、又はそれらの組合せである。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に固定される。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に部分的に固定されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に封入されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に部分的に封入されうる。

【００７５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数の標的及びコントロール粒子及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付ける前に、前記コントロール粒子から複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つを放出する工程を含む。

【００７６】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は崩壊性である。コントロール粒子は、コントロール粒子ビーズでありうる。コントロール粒子ビーズは、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うる。コントロール粒子は、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００７７】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられうる。

【００７８】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬は、第１の抗体を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタンパク質結合試薬に結合されうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００７９】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬は、異なるコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられうる。複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれにも関連付けることができない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた第１のタンパク質結合試薬及びいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない第１のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。コントロール粒子は、複数の第２のタンパク質結合試薬に関連付けられうる。複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つ

に関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチド及び第２のタンパク質結合試薬に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。第１のタンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。

【００８０】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬に関連付けられ、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬を用いてコントロール粒子に関連付けられる。パートナー結合試薬は、パートナー抗体を含みうる。パートナー抗体は、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、又はそれらの組合せを含みうる。パートナー抗体は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、それらの組合せ、又はそれらのフラグメントを含みうる。

【００８１】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。第２のタンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【００８２】

いくつかの実施形態では、確率バーコードは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【００８３】

いくつかの実施形態では、複数の確率バーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。たとえば、複数の確率バーコードの少なくとも１つの確率バーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数の確率バーコードの少なくとも１つの確率バーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数の確率バーコードの少なくとも１つの確率バーコードは、バーコーディング粒子に封入されうる。複数の確率バーコードの少なくとも１つの確率バーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入されうる。

【００８４】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は崩壊性である。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。バーコーディングビーズは、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うる。バーコーディング粒子は、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００８５】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子の確率バーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。いくつかの実施形態では、確率バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、少なくとも１００００の確率バーコードを含む。

【００８６】

いくつかの実施形態では、複数の確率バーコードを用いて、複数の標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付ける工程は、複数の確率バーコー

ドを、複数の標的の標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのコントロール粒子オリゴヌクレオチドと接触させて、標的及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた確率バーコードを生成する工程と；標的及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた確率バーコードを伸長して、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。確率バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを用いて、確率バーコードを伸長する工程を含みうる。

【００８７】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部又は分子標識配列の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部、又は分子標識配列の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【００８８】

配列制御のためのキットも本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、キットは、コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子組成物を含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々は、コントロールバーコード配列及びポリ（ｄＡ）領域を含む。

【００８９】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの任意の組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５、１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３、５、１０、１００、又はそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。

【００９０】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含む。第１のコントロールバーコード配列及び第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有しうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、又はそれ以上多くなりうる。

【００９１】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、上記の細胞のゲノム配列に対して相同でない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、上記の種のゲノム

配列に対して相同でないことがある。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【００９２】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してコントロール粒子に結合されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを介してコントロール粒子に関連付けられうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを含みうる。化学基は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【００９３】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、約７．５マイクロメートル、又はそれらの組合せである。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に固定される。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に部分的に固定されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に封入されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に部分的に封入されうる。

【００９４】

いくつかの実施形態では、キットは、複数のバーコードを含む。複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含むことができ、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含みうる。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含む。

【００９５】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定される。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入されうる。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、第２のビーズでありうる。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であるか、又はそれを含みうる。バーコーディング粒子は、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みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００９６】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。バーコーディング粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。キットは、ＤＮＡポリメラーゼを含みうる。キットは、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）のための試薬を含みうる。

【００９７】
細胞同定のための本明細書に開示される方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上のタンパク質標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に関連付けられた細胞標識配列を同定する工程と；得られたシーケンシングデータから、細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程と、を含みうる。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。本明細書に記載されるように、第１の複数の細胞は、第２の複数の細胞と異なる組織又は器官から取得されるか又はそれに由来することができ、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞は、同じ又は異なる対象（たとえば、哺乳動物）に由来しうる。たとえば、第１の複数の細胞は、第２の複数の細胞と異なるヒト対象から取得されるか又はそれに由来し得る。いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞は、同じヒト対象の異なる組織から取得されるか又はそれに由来する。
【００９８】
いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む。
【００９９】
本明細書に記載されるように、サンプルインデックス付加配列は、たとえば、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれ以上のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。
【０１００】
いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。
【０１０１】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つのサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つのサンプルインデックス付加組成物のうちの少なくとも１つのタンパク質結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々から１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、タンパク質結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せによりタンパク質結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でなくてもよい。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せである。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルのうちの１つのサンプルが、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含む。複数のサンプルは、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。タンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。タンパク質標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。タンパク質標的は、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択されうる。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる。タンパク質結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬を含みうる。タンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一でありうる。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子は、ビーズでありうる。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でありうるか、又はそれらを含む。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みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられる。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取

得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０１１７】

シーケンシングコントロールに使用されうる方法及び組成物も本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、シーケンシングコントロールのための方法は、複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数のタンパク質標的を含み、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び複数のバーコードの少なくとも１つの標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；複数のバーコードを用いて、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数と複数の細胞の数の比に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの特徴を使用して１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程と；細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含みうる。細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程を含みうる。細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程は、最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数に関連付けられたシーケンシングデータにおいて、細胞標識の数と最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数のプロットを作製する工程と；１つ以上の細胞の数としてプロットにおけるカットオフを決定する工程と、を含みうる。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドは、複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールオリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、本方法は、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、タンパク質結合試薬からコントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のコントロール組成物の未結合のコントロール組成物を除去する工程を含む。未結合のコントロール組成物を除去する工程は、複数の細胞の１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、コントロール組成物の少なくとも１つのタンパク質結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。

【０１２３】
いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にある。複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せを含みうる。タンパク質結合試薬は、抗体を含みうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。
【０１２４】
いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる。タンパク質結合試薬は、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール組成物の第２のタンパク質結合試薬は、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない。タンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一でありうる。
【０１２５】
いくつかの実施形態では、バーコードは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入される。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入される。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。バーコーディングビーズは、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うる。バーコーディング粒子は、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。
【０１２６】
いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、光学的部分に関連付けられる。コントロールオリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられうる。
【０１２７】
いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含む。
【０１２８】
いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数の確率バーコードを用いて、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数の確率バーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、複数のコントロールオリゴヌク

レオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた確率バーコードを伸長して、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを用いて、バーコードを伸長する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、シーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０１２９】

本明細書に開示されるものには、シーケンシングコントロールのための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数の結合標的を含み、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、複数の結合標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び複数のバーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；複数のバーコードを用いて、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を用いて、１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む。いくつかの実

施形態では、本方法は、決定された１つ以上の細胞の数に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、決定された１つ以上の細胞の数及び複数の細胞の数の比率に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータ中の各細胞標識について、細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列及びコントロールバーコード配列の数を決定する工程と；細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列及びコントロールバーコード配列の数を用いて、１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む。細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列及びコントロールバーコード配列の数を決定する工程は、シーケンシングデータ中の各細胞標識について、細胞標識に関連付けられた最高数の識別可能な配列を有する分子標識配列及びコントロールバーコード配列の数を決定する工程を含みうる。細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列及びコントロールバーコード配列の数を用いて、１つ以上の細胞の数を決定する工程は、最高数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数に関連付けられたシーケンシングデータ中の細胞標識の数を用いて、最高数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数のプロットを作成する工程と；１つ以上の細胞の数としてプロットにおけるカットオフを決定する工程と、を含みうる。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドは、複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールオリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、本方法は、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、細胞成分結合試薬からコントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む。複数の結合標的の少なくとも１つは、細胞表面上で発現されうる。複数の結合標的の少なくとも１つは、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せを含みうる。細胞成分結合試薬は、細胞表面結合試薬、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、浸潤（ｉｎｖａｓｉｏｎ）、又はそれらの組合せを含みうる。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬の結合標的は１０～１００の異なる結合標的を含む群から選択される。細胞成分結合試薬の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せを含みうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１の細胞成分結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール組成物の第２の細胞成分結合試薬は、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない。細胞成分結合試薬及び第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、バーコードは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入されうる。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。いくつかの実施形態では、バーコーディングビーズは、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。バーコーディング粒子は、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、及びそれらの組合せからなる群から選択される材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。バーコーディング粒子は、光学的部分に関連付けられうる。

【０１３９】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられうる。いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含む。バーコーディング粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数の確率バーコードを用いて、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数の確率バーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。複数のバーコードを用いて、複数のコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた確率バーコードを伸長して、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含みうる。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを用いて、バーコードを伸長する工程を含みうる。ある実施形態において、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０１４１】

シーケンシングコントロールのための方法は、いくつかの実施形態では、複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数のタンパク

質標的を含み、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び複数のバーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；複数のコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含みうる。擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数と複数の細胞の数の比に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの特徴を使用して１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程と；細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む。細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程を含みうる。細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程は、最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数に関連付けられたシーケンシングデータにおいて、細胞標識の数と最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数のプロットを作製する工程と；１つ以上の細胞の数としてプロットにおけるカットオフを決定する工程と、を含みうる。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドは、複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールオリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【０１４６】
いくつかの実施形態では、本方法は、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、タンパク質結合試薬からコントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のコントロール組成物の未結合のコントロール組成物を除去する工程を含む。未結合のコントロール組成物を除去する工程は、複数の細胞の１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、コントロール組成物の少なくとも１つのタンパク質結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。
【０１４７】
いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にある。複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せを含みうる。タンパク質結合試薬は、抗体を含みうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。
【０１４８】
いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる。タンパク質結合試薬は、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール組成物の第２のタンパク質結合試薬は、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない。タンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一でありうる。
【０１４９】
いくつかの実施形態では、バーコードは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入される。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入される。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。バーコーディングビーズは、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うる。バーコーディング粒子は、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。
【０１５０】
いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、光学的部分に関連付けられる。コントロールオリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられうる。
【０１５１】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；を含む。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含む。

【０１５３】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数の確率バーコードを用いて、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数の確率バーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、複数のコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを用いて、バーコードを伸長する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、シーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０１５４】

細胞同定のための方法は、いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物のそれぞれと接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、及び／又は標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に関連付けられた細胞標識配列を同定する工程と；得られたシーケンシングデータから、細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又はその後の分析から、細胞標識配列に関連付けら

れたシーケンシングデータを除外する工程と、を含みうる。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、バーコード配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０１５５】

本明細書に開示されるものには、マルチプレットの同定のための方法も含まれる。マルチプレットの発現プロフィール、又はマルチプレットは、多細胞の発現プロフィールを含む発現プロフィールでありうる。単一細胞の発現プロフィールを決定する場合、ｎ個の細胞が、１つの細胞として同定されてもよく、ｎ個の細胞の発現プロフィールが、１つの細胞の発現プロフィール（マルチプレット又はｎ－プレット発現プロフィールと呼ばれる）として同定されうる。たとえば、バーコーディング（たとえば、確率バーコーディング）を用いて２つの細胞の発現プロフィールを決定する場合、２つの細胞のｍＲＮＡ分子が、同じ細胞標識を有するバーコードに関連付けられうる。別の例として、２つの細胞が、１つの粒子（たとえば、ビーズ）に関連付けられうる。粒子は、同じ細胞標識をバーコードを含みうる。細胞を溶解させた後、２つの細胞中のｍＲＮＡ分子が、粒子、ひいては同じ細胞標識のバーコードに関連付けられうる。ダブレットの発現プロフィールが、発現プロフィールの解釈を歪めることがある。マルチプレットは、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、複数のマルチプレットは、ダブレット、トリプレット、カルテット、クインテット、セクステット、セプテット、オクテット、ノネット、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１５６】

マルチプレットは、任意のｎ－プレットでありうる。いくつかの実施形態では、ｎは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又はこれらの値のいずれか２つの間の範囲、又はこれらの近似値である。いくつかの実施形態では、ｎは、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、若しくは２０である。シングレットは、マルチプレットの発現プロフィールでない発現プロフィールでありうる。

【０１５７】

サンプルにインデックスを付加し、マルチプレットを同定するために、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを使用することの成果は、マルチプレットを同定するために合成マルチプレットの発現プロフィールを使用することの成果（「ＳＹＮＴＨＥＴＩＣ ＭＵＬＴＩＰＬＥＴＳ ＦＯＲ ＭＵＬＴＩＰＬＥＴＳ ＤＥＴＥＲＭＩＮＡＴＩＯＮ」という発明の名称の、２０１８年３月２０日出願の米国特許出願第１５／９２６９７７号明細書（その内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される）と同等でありうる。いくつかの実施形態では、マルチプレットは、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド及び合成マルチプレットの発現プロフィールの両方を用いて同定されうる。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるマルチプレットの同定の方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細

胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、得られたシーケンシングデータから、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又はその後の分析から、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含む。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、たとえば分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０１５９】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物のそれぞれと接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれ以上のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して抗原結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、抗原結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含む。１つ以上の抗原標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つのサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つのサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つの抗原結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、抗原結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれ

らの任意の組合せにより抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でなくてもよい。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せである。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞は、腫瘍細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、抗原標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。抗原標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる。抗原結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬及び第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子はビーズでありうる。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であるか、又はそれを含みうる。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みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０１７２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０１７７】

細胞同定のための方法は、いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程；得られたシーケンシングデータから、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又はその後の分析から、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０１７８】

本明細書に開示されるものには、マルチプレットの同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細

胞標識配列を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、得られたシーケンシングデータから、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又はその後の分析から、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含む。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０１７９】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば、４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれ以上のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１８２】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含む。１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。

【０１８３】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つのサンプルインデックス付加組成物の結合されていないサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む。結合されていないサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。結合されていないサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つのサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を溶解する工程を含む。

【０１８４】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学的処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元試薬を用いて）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せによって、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でないことがある。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せである。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞は、腫瘍細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、抗原標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。抗原標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる。細胞成分結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬及び第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子はビーズでありうる。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であるか、又はそれを含みうる。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みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０１９１】
いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられる。
【０１９２】
いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。
【０１９３】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。
【０１９４】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む。
【０１９５】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。
【０１９６】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。
【０１９７】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０１９８】

本明細書に開示されるものには、細胞同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の各々に由来する１つ以上の細胞を、それぞれ複数の２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０１９９】

本明細書に開示されるものには、マルチプレットの同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の各々に由来する１つ以上の細胞を、それぞれ複数の２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；多細胞として２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、を含む。

【０２００】

いくつかの実施形態では、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた細胞を同定する工程は、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と、を含む。本方法は、得られたシーケンシングデータから、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又はその後の分析から、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含みうる。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば、４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれ以上のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して抗原結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、抗原結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０２０４】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含む。１つ以上の抗原標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。いくつかの実施形態では、本方法は、２つのサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つのサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つの抗原結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、抗原結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより抗原結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でなくてもよい。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せである。

【０２０７】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞は、腫瘍細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを

含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０２０８】

いくつかの実施形態では、抗原標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。抗原標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せでありうるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せでありうるか、又はそれを含みうる。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。

【０２０９】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる。抗原結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬及び第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。

【０２１０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子はビーズでありうる。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でありうるか、又はそれを含みうる。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みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる。

【０２１３】

いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコード

を含みうる。
【０２１４】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。
【０２１５】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む。
【０２１６】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。
【０２１７】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。
【０２１８】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０２１９】
本明細書に開示されるものには、細胞成分標的間の相互作用、たとえばタンパク質間の相互作用を決定するためのシステム、方法、及びキットが含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、細胞が、第１のタンパク質標的及び第２のタンパク質標的を含み、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む工程と；架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；複数のバーコードを用いて、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きの相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、バーコード配列及び捕捉配列を含む工程と；複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列の関連付けに基づいて、第１及び第２のタンパク質標的の間の相互作用を決定する工程と、を含む。
【０２２０】
本明細書に開示されるものには、細胞成分標的間の相互作用を決定するためのシステム、方法、及びキットが含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、細胞が、第１の細胞成分標的及び第２の細胞成分標的を含み、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方の細胞成分結合試薬が、第１の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方の細胞成分結合試薬が、第２の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む工程と；架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；複数のバーコードを用いて、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きの相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、バーコード配列及び捕捉配列を含む工程と；複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列の関連付けに基づいて、第１及び第２の細胞成分標的の間の相互作用を決定する工程と、を含む。２つの細胞成分結合試薬の少なくとも１つは、タンパク質結合試薬を含みうる。タンパク質結合試薬は、２つの相互作用決定オリゴヌクレオチドのうちの１つに関連付けられうる。１つ以上の細胞成分標的は、少なくとも１つのタンパク質標的を含みうる。
【０２２１】
いくつかの実施形態では、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対の各々と、連続的に又は同時に接触させる工程

を含む。第１のタンパク質標的は、第２のタンパク質標的と同じでありうるか、または第１のタンパク質標的は、第２のタンパク質標的と異なりうる。

【０２２２】

相互作用決定配列の長さは、変化しうる。たとえば、相互作用決定配列は、２ヌクレオチド～約１０００ヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長、約４５ヌクレオチド長、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの任意の組合せでありうる。

【０２２３】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第２の対と接触させる工程であって、細胞が、第３のタンパク質標的及び第４のタンパク質標的を含み、相互作用決定組成物の第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第２の対の一方のタンパク質結合試薬が、第３のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第２の対の他方のタンパク質結合試薬が、第４のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である工程を含む。第３及び第４のタンパク質標的の少なくとも１つは、第１及び第２のタンパク質標的のうちの１つと異なりうる。いくつかの実施形態では、第３及び第４のタンパク質標的の少なくとも１つ並びに第１及び第２のタンパク質標的の少なくとも１つは、同一でありうる。

【０２２４】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の３つ以上の対と接触させる工程を含む。相互作用決定組成物の複数の対の少なくとも１０の相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、異なる配列を含みうる。相互作用決定組成物の複数の対の少なくとも１００の相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、異なる配列を含みうる。相互作用決定組成物の複数の対の少なくとも１０００の相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、異なる配列を含みうる。

【０２２５】

いくつかの実施形態では、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域は、異なる配列を含む。架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つは、架橋オリゴヌクレオチドの２つのハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つに相補的でありうる。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートする工程は、架橋オリゴヌクレオチドの第１のハイブリダイゼーション領域を、相互作用決定オリゴヌクレオチドの架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の第１の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域とハイブリダイズさせる工程と；架橋オリゴヌクレオチドの第２のハイブリダイゼーション領域を、相互作用決定オリゴヌクレオチドの架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の第２の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域とハイブリダイズさせる工程と；架橋オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。

【０２２７】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、又はそれらの組合せを含む。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、スト

レプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０２２８】

細胞中のタンパク質標的の位置は、たとえば、細胞表面上か又は細胞の内部かに応じて変化しうる。いくつかの実施形態では、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にある。いくつかの実施形態では、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞内タンパク質である。いくつかの実施形態では、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つは、膜貫通タンパクである。いくつかの実施形態では、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞外タンパク質である。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を相互作用決定組成物の第１の対と接触させる前に、細胞を固定する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、相互作用決定組成物の第１の対の結合されていない相互作用決定組成物を除去する工程を含みうる。結合されていない相互作用決定組成物を除去する工程は、細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。結合されていない相互作用決定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を溶解する工程を含みうる。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、タンパク質結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学的処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せによって、タンパク質結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、細胞のゲノム配列に対して相同でないこともある。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定組成物の第１の対の一方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、捕捉配列に相補的な配列を含む。捕捉配列は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。捕捉配列に相補的な相互作用決定オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、第２のバーコード配列を含む。相互作用同定組成物の第１の対の他方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０２３０】

タンパク質結合試薬は、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。いくつかの実施形態では、複数の相互作用決定組成物のうちの１つは、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２のタンパク質結合試薬を含む。タンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一でありうる。タンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞又は非腫瘍細胞である。たとえば、細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せでありうる。いくつかの実施形態では、本方法は、２つ以上の細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程を含み、２つ以上の細胞の各々が、第１及び第２のタンパク質標的を含む。２つ以上の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含みうる。

【０２３２】

いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。タンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。タンパク質標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又

はそれを含みうる。タンパク質標的は、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択されうる。タンパク質結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。

【０２３３】

いくつかの実施形態では、バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、１つの粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子は、ビーズを含みうる。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、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うる。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みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。粒子は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０２３４】

いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む。粒子のバーコードは、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含みうる。バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０２３５】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、相互作用決定オリゴヌクレオチドと接触させて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素又はＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、架橋オリゴヌクレオチドを、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドから移動させる工程を含みうる。

【０２３６】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、バーコード配列の少なくとも一部及び相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシング

データを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部及び相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０２３７】

いくつかの実施形態では、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドの部分的及び／又は完全な配列を取得する工程を含む。

【０２３８】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、複数の確率バーコードを含む。複数の確率バーコードの各々のバーコード配列は、分子標識配列を含みうる。複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの分子標識配列は、異なる配列を含みうる。複数のバーコードを用いて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、相互作用決定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きの相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２３９】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程とを含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０２４０】

本明細書に開示されるものには、細胞成分間の相互作用、たとえば、タンパク質間相互作用を同定するためのキットが含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、相互作用決定組成物の第１の対であって、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む、相互作用決定組成物の第１の対と；相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を各々含む複数の架橋オリゴヌクレオチドと、を含む。

【０２４１】

相互作用決定配列の長さは、変化しうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長、約４５ヌクレオチド長、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの任意の組合せである。

【０２４２】

いくつかの実施形態では、キットはさらに、相互作用決定組成物の第２の対であって、相互作用決定組成物の第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第２の対の一方のタンパク質結合試薬が、第３のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第２の対の他方のタンパク質結合試薬が、第４のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である、相互作用決定組成物の第２の対を含む。第３及び第４のタンパク質標的の少なくとも１つは、第１及び第２のタンパク質標的のうちの１つと異なりうる。第３及び第４のタンパク質標的の少なくとも１つ及び第１及び第２のタンパク質標的の少なくとも１つは、同一でありうる。

【０２４３】

いくつかの実施形態では、キットは、相互作用決定組成物の３つ以上の対を含みうる。相互作用決定組成物の３つ以上の対の少なくとも１０の相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、異なる配列を含みうる。相互作用決定組成物の３つ以上の対の少なくとも１００の相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、異なる配列を含みうる。相互作用決定組成物の３つ以上の対の少なくとも１０００の相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、異なる配列を含みうる。

【０２４４】

いくつかの実施形態では、複数の相互作用決定組成物の２つの相互作用決定組成物の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域は、異なる配列を含む。架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つは、架橋オリゴヌクレオチドの２つのハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つに相補的でありうる。

【０２４５】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。少なくとも１つの相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、又はそれらの任意の組合せを含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、対象の任意の細胞のゲノム配列に対して相同でない。対象の細胞は、腫瘍細胞又は非腫瘍細胞を含みうる。対象の細胞は、単一細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せでありうる。

【０２４６】

いくつかの実施形態では、キットはさらに、複数のバーコードを含み、複数のバーコードの各々が、バーコード配列及び捕捉配列を含む。相互作用決定組成物の第１の対の一方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。捕捉配列は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的な相互作用決定オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。相互作用同定組成物の第１の対の他方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。複数のバーコードは、複数の確率バーコードを含むことができ、複数の確率バーコードの各々のバーコード配列が、分子標識配列を含み、複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの分子標識配列が、異なる配列を含む。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、またはそれを含む。タンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せでありうるか、又はそれを含みうる。タンパク質標的は、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択されうる。いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の相互作

用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。タンパク質結合試薬は、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０２４８】

いくつかの実施形態では、相互作用決定組成物の第１の対の一方は、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２のタンパク質結合試薬を含む。第１のタンパク質結合試薬及び第２のタンパク質結合試薬は、同一でありうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられてもよい。

【０２４９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、１つの粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子は、ビーズを含みうる。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、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うる。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みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。粒子は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０２５０】

いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む。粒子のバーコードは、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含みうる。バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０２５１】

いくつかの実施形態では、キットは、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素、Ｔａｑ　ＤＮＡポリメラーゼ、又はそれらの任意の組合せを含む。キットは、固定剤を含みうる。

【０２５２】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬（たとえば、抗体）を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的（たとえば、タンパク質）の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリ

ゴヌクレオチドを増幅する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを含む複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。本方法は、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含みうる。

【０２５３】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約２００～５００ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１００又は１０００のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。

【０２５４】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０２５５】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。複数のサンプルのうちの１つのサンプルは、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。複数のサンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０２５６】

いくつかの実施形態では、未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解させる工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。本方法は、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０２５７】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のサンプルの細胞のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサ

ンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【０２５８】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。細胞成分標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。細胞成分標的は、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬及び第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。

【０２５９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０２６０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられる。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うる。粒子は、分解性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、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、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、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。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みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００又は１００００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。

【０２６１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２６２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０２６３】

いくつかの実施形態では、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの各デイジーチェーン接続増幅プライマーは、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、少なくとも２０ヌクレオチド長、少なくとも３０ヌクレオチド長、約４０ヌクレオチド長、少なくとも４０ヌクレオチド長、約５０ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。オーバーハング領域は、少なくとも５０ヌクレオチド長、少なくとも１００ヌクレオチド長、少なくとも１５０ヌクレオチド長、約１５０ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。オーバーハング領域は、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域は、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンは、少なくとも２５０ヌクレオチド長、少なくとも３００ヌクレオチド長、少なくとも３５０ヌクレオチド長、少なくとも４００ヌクレオチド長、約４００ヌクレオチド長、少なくとも４５０ヌクレオチド長、少なくとも５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。

【０２６４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２６５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同

一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、本方法は、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０２６６】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、細胞成分結合試薬を含む。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、同一でありうる。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。いくつかの実施形態では、細胞成分は抗原である。細胞成分結合試薬は抗体でありうる。

【０２６７】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の結合標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の結合標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。本方法は、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含みうる。

【０２６８】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約２００～５００ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０

のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。

【０２６９】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、細胞表面結合試薬、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０２７０】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つは、細胞表面上で発現されうる。複数のサンプルのうちの１つのサンプルは、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。複数のサンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０２７１】

いくつかの実施形態では、未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解させる工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。本方法は、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０２７２】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のサンプルの細胞のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【０２７３】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。細胞成分標的は、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬及び第２の細胞結合試薬は、同一でありうる。

【０２７４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標

識配列を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含みうる。バーコードは、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０２７５】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に封入される。粒子はビーズでありうる。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うる。粒子は、分解性でありうる。ビーズは、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、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、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。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みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００又は１００００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。

【０２７６】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２７７】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０２７８】

いくつかの実施形態では、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、バーコード付きサンプルインデックス付加オ

リゴヌクレオチド結合領域は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、少なくとも２０ヌクレオチド長、少なくとも３０ヌクレオチド長、約４０ヌクレオチド長、少なくとも４０ヌクレオチド長、約５０ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。オーバーハング領域は、少なくとも５０ヌクレオチド長、少なくとも１００ヌクレオチド長、少なくとも１５０ヌクレオチド長、約１５０ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。オーバーハング領域は、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域は、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンは、少なくとも２５０ヌクレオチド長、少なくとも３００ヌクレオチド長、少なくとも３５０ヌクレオチド長、少なくとも４００ヌクレオチド長、約４００ヌクレオチド長、少なくとも４５０ヌクレオチド長、少なくとも５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。

【０２７９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２８０】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０２８１】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、細胞成分

結合試薬を含む。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、同一でありうる。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。

【０２８２】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列及び複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーに基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のバーコードを用いて、複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含みうる。本方法は、たとえば、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含みうる。

【０２８３】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約２００～５００ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１００又は１０００のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。

【０２８４】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞を含む。１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つは、細胞表面上で発現されうる。複数のサンプルのうちの１つのサンプルは、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任

意の組合せを含みうる。複数のサンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０２８６】

いくつかの実施形態では、未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解させる工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。本方法は、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０２８７】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のサンプルの細胞のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【０２８８】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。細胞成分標的は、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬及び第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。

【０２８９】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のバーコードを用いて、複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【０２９０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域及び分子標識配列を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列は、異なる分子標識配列を含みうる。バーコードは、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０２９１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子上に固定される。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うる。粒子は、分解性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、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、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、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。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みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００又は１００００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含みうる。バーコードの分子標識配列は、ランダム配列を含みうる。

【０２９２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含みうる。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２９３】

いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０２９４】

いくつかの実施形態では、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、少なくとも２０ヌクレオチド長、少なくとも３０ヌクレオチド長、約４０ヌクレオチド長、少なくとも４０ヌクレオ

チド長、約５０ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。オーバーハング領域は、少なくとも５０ヌクレオチド長、少なくとも１００ヌクレオチド長、少なくとも１５０ヌクレオチド長、約１５０ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。オーバーハング領域は、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域は、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンは、少なくとも２５０ヌクレオチド長、少なくとも３００ヌクレオチド長、少なくとも３５０ヌクレオチド長、少なくとも４００ヌクレオチド長、少なくとも４５０ヌクレオチド長、少なくとも５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンは、約２００ヌクレオチド長、約２５０ヌクレオチド長、約３００ヌクレオチド長、約３５０ヌクレオチド長、約４００ヌクレオチド長、約４５０ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、約６００ヌクレオチド長、又はこれらの値のいずれか２つの間の範囲でありうる。

【０２９５】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程を含みうる。サンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程が、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中の少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに対応する複数のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含みうる。

【０２９６】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製アダプターを、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートする工程を含む。少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートされた複製アダプターを用いて、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオ

チドを生成する工程を含みうる。

【０２９７】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを伸長して、捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程は、捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０２９８】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０２９９】

いくつかの実施形態では、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、細胞成分結合試薬を含む。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、同一でありうる。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。

【０３００】

本明細書に開示されるものには、複数のサンプルインデックス付加組成物と；複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーと、を含むキットが含まれる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つは、少なくとも１つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能でありうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる

配列を含みうる。

【０３０１】

複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含むことができ、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、少なくとも２０ヌクレオチド長、少なくとも３０ヌクレオチド長、約４０ヌクレオチド長、少なくとも４０ヌクレオチド長、約５０ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、異なる配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含みうる。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域は、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列、その相補体、その逆相補体、又はそれらの組合せを含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列は、同一の配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列は、異なる配列を含みうる。オーバーハング領域は、少なくとも５０ヌクレオチド長、少なくとも１００ヌクレオチド長、少なくとも１５０ヌクレオチド長、約１５０ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。オーバーハング領域は、少なくとも２００ヌクレオチド長でありうる。オーバーハング領域は、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーは、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含みうる。複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域は、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。

【０３０２】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、又は少なくとも１２８ヌクレオチド長、又はそれらの組合せである。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約２００～５００ヌクレオチド長、約５００ヌクレオチド長、又はそれらの組合せでありうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、又は１０００のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含む。

【０３０３】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬に結合されうる。少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬の分子に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０３０４】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つの種

のゲノム配列に対して相同でない。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ポリ（Ａ）領域、又はそれらの組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。細胞成分標的は、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬及び第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。

【図面の簡単な説明】

【０３０６】

【図１】非限定的な例示的確率バーコードを示す。

【図２】確率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ワークフローを示す。

【図３】複数の標的からの確率バーコード付き標的のインデックス付きライブラリーを作製するための非限定的な例示的プロセスを示す概略図である。

【図４】タンパク質結合試薬のための一意識別子を含むオリゴヌクレオチドと結合された例示的タンパク質結合試薬（本明細書に示される抗体）の概略図を示す。

【図５】同じ又は異なるサンプルからの細胞を決定するためのサンプルインデックス付加のための一意識別子を含むオリゴヌクレオチドと結合された例示的結合試薬（本明細書に示される抗体）の概略図を示す。

【図６】ハイスループットでタンパク質発現及び遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体を用いた例示的ワークフローの概略図を示す。

【図７】サンプルインデックス付加のためのオリゴヌクレオチド結合抗体を用いた例示的ワークフローの概略図を示す。

【図８Ａ１】デイジーチェーン接続バーコード付きオリゴヌクレオチドの例示的ワークフローの概略図を示す。

【図８Ａ２】デイジーチェーン接続バーコード付きオリゴヌクレオチドの例示的ワークフローの概略図を示す。

【図８Ｂ１】デイジーチェーン接続バーコード付きオリゴヌクレオチドの別の例示的ワークフローの概略図を示す。

【図８Ｂ２】デイジーチェーン接続バーコード付きオリゴヌクレオチドの別の例示的ワークフローの概略図を示す。

【図９Ａ】オリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図を示す。

【図９Ｂ】オリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図を示す。

【図９Ｃ】オリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図を示す。

【図９Ｄ】オリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図を示す。

【図９Ｅ】オリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図を示す。

【図１０Ａ】単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子の使用の例示的ワークフローの概略図である。

【図１０Ｂ】単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子の使用の別の例示的ワークフローの概略図である。

【図１１】単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド結合抗体の使用の例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１２】単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド結合抗体の使用の例示的ワークフローの別の概略図を示す。
【図１３Ａ－１３Ｂ】コントロールオリゴヌクレオチドが細胞計数に使用されうることを示すプロットである。
【図１３Ｃ】コントロールオリゴヌクレオチドが細胞計数に使用されうることを示すプロットである。
【図１４Ａ】相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１４Ｂ】相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１４Ｃ】相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１４Ｄ】相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１４Ｅ】相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１４Ｆ】相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１５Ａ－１５Ｂ】タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に決定するため、及びサンプルインデックス付加のための、オリゴヌクレオチドの非限定的な例示的設計を示す。
【図１５Ｃ－１５Ｄ】タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に決定するため、及びサンプルインデックス付加のための、オリゴヌクレオチドの非限定的な例示的設計を示す。
【図１６】タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に決定するためのおよびサンプルインデックス付加のための非限定的な例示的オリゴヌクレオチド配列の概略図を示す。
【図１７Ａ－１７Ｂ】ハイスループットでＣＤ４タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体の使用の結果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図１７Ｃ－１７Ｄ】ハイスループットでＣＤ４タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体の使用の結果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図１７Ｅ－１７Ｆ】ハイスループットでＣＤ４タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体の使用の結果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図１８Ａ－１８Ｆ】ＣＤ４　Ｔ細胞、ＣＤ８　Ｔ細胞、及び骨髄細胞におけるＣＤ４　ｍＲＮＡ及びタンパク質の発現を示す非限定的な例示的棒グラフである。
【図１９】同様のシーケンシング深度で、抗体：オリゴヌクレオチドのより高い比率で増加されたＣＤ４タンパク質レベルについての検出感度を示す非限定的な例示的棒グラフであり、１：３の比率は、１：１及び１：２の比率より結果が良好である。
【図２０Ａ－２０Ｄ】フローサイトメトリーを用いてソーティングされた細胞の細胞表面におけるＣＤ４タンパク質発現を示すプロットである。
【図２１Ａ－２１Ｆ】２つのサンプルのＣＤ４　Ｔ細胞、ＣＤ８　Ｔ細胞、及び骨髄細胞におけるＣＤ４　ｍＲＮＡ及びタンパク質の発現を示す非限定的な例示的棒グラフである。
【図２２】１：３の抗体：オリゴヌクレオチドの比率で、異なるサンプル調製プロトコルを用いて決定されるＣＤ４タンパク質レベルについての検出感度を示す非限定的な例示的棒グラフである。
【図２３】サンプルインデックス付加を行い、サンプルインデックス付加に対する、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの長さ及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの切断性の影響を決定するための非限定的な例示的実験設計を示す。

【図２４Ａ】さまざまなサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（切断性９５量体、非切断性９５量体、及び切断性２００量体）と結合された３つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体が、ＣＤ１４７のタンパク質発現レベルを決定するのに使用されうることを示す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図２４Ｂ】さまざまなサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（切断性９５量体、非切断性９５量体、及び切断性２００量体）と結合された３つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体が、ＣＤ１４７のタンパク質発現レベルを決定するのに使用されうることを示す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図２４Ｃ】さまざまなサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（切断性９５量体、非切断性９５量体、及び切断性２００量体）と結合された３つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体が、ＣＤ１４７のタンパク質発現レベルを決定するのに使用されうることを示す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図２５】細胞当たりのＧＡＰＤＨ発現のオーバーレイを有する非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図２６Ａ】３つのタイプのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて検出されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２６Ｂ】３つのタイプのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて検出されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２６Ｃ】３つのタイプのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて検出されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２７Ａ】ＣＤ１４７発現が分割細胞においてより高かったことを示す、非限定的な例示的プロット及び棒グラフである。
【図２７Ｂ】ＣＤ１４７発現が分割細胞においてより高かったことを示す、非限定的な例示的プロット及び棒グラフである。
【図２７Ｃ】ＣＤ１４７発現が分割細胞においてより高かったことを示す、非限定的な例示的プロット及び棒グラフである。
【図２８Ａ】サンプルインデックス付加が、さまざまなサンプルの細胞を同定するのに使用されうることを示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図２８Ｂ】サンプルインデックス付加が、さまざまなサンプルの細胞を同定するのに使用されうることを示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図２８Ｃ】サンプルインデックス付加が、さまざまなサンプルの細胞を同定するのに使用されうることを示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図２９Ａ】決定されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数に基づいた、細胞当たりのサンプルインデックス付加配列の非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２９Ｂ】決定されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数に基づいた、細胞当たりのサンプルインデックス付加配列の非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２９Ｃ】決定されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数に基づいた、細胞当たりのサンプルインデックス付加配列の非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図３０Ａ】ＣＤ３Ｄ（Ｊｕｒｋａｔ細胞の場合）及びＪＣＨＡＩＮ（Ｒａｍｏｓ細胞の場合）のｍＲＮＡ発現並びにＪｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のサンプルインデックス付加に基づいて決定された細胞型の注釈を比較する非限定的な例示的プロットである。
【図３０Ｂ】ＣＤ３Ｄ（Ｊｕｒｋａｔ細胞の場合）及びＪＣＨＡＩＮ（Ｒａｍｏｓ細胞の場合）のｍＲＮＡ発現並びにＪｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のサンプルインデックス付加に基づいて決定された細胞型の注釈を比較する非限定的な例示的プロットである。

【図３０Ｃ】ＣＤ３Ｄ（Ｊｕｒｋａｔ細胞の場合）及びＪＣＨＡＩＮ（Ｒａｍｏｓ細胞の場合）のｍＲＮＡ発現並びにＪｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のサンプルインデックス付加に基づいて決定された細胞型の注釈を比較する非限定的な例示的プロットである。
【図３０Ｄ】ＣＤ３Ｄ（Ｊｕｒｋａｔ細胞の場合）及びＪＣＨＡＩＮ（Ｒａｍｏｓ細胞の場合）のｍＲＮＡ発現並びにＪｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のサンプルインデックス付加に基づいて決定された細胞型の注釈を比較する非限定的な例示的プロットである。
【図３１Ａ】ＣＤ３Ｄ及びＪＣＨＡＩＮ（図３１Ａ）、ＪＣＨＡＩＮ（図３１Ｂ）、及びＣＤ３Ｄ（図３１Ｃ）のｍＲＮＡ発現のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールの非限定的なｔＳＮＥ投射プロットである。
【図３１Ｂ】ＣＤ３Ｄ及びＪＣＨＡＩＮ（図３１Ａ）、ＪＣＨＡＩＮ（図３１Ｂ）、及びＣＤ３Ｄ（図３１Ｃ）のｍＲＮＡ発現のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールの非限定的なｔＳＮＥ投射プロットである。
【図３１Ｃ】ＣＤ３Ｄ及びＪＣＨＡＩＮ（図３１Ａ）、ＪＣＨＡＩＮ（図３１Ｂ）、及びＣＤ３Ｄ（図３１Ｃ）のｍＲＮＡ発現のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールの非限定的なｔＳＮＥ投射プロットである。
【図３２】２５０のＤＢＥＣカットオフを有するサンプルインデックス付加を用いて決定された細胞型のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図３３Ａ】非標識又は「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、及び「ショート２」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識されたＲａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３）、Ｒａｍｏｓ細胞（図３３Ｂ）、及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３Ｃ）についての、細胞当たりのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数の非限定的な例示的棒グラフである。
【図３３Ｂ】非標識又は「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、及び「ショート２」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識されたＲａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３）、Ｒａｍｏｓ細胞（図３３Ｂ）、及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３Ｃ）についての、細胞当たりのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数の非限定的な例示的棒グラフである。
【図３３Ｃ】非標識又は「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、及び「ショート２」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識されたＲａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３）、Ｒａｍｏｓ細胞（図３３Ｂ）、及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３Ｃ）についての、細胞当たりのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数の非限定的な例示的棒グラフである。
【図３４Ａ】１％未満の単一細胞が、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの両方で標識されたことを示す非限定的な例示的プロットである。
【図３４Ｂ－３４Ｃ】１％未満の単一細胞が、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの両方で標識されたことを示す非限定的な例示的プロットである。
【図３５Ａ】図２３に概説されるようにさまざまなフローセルを用いて調製されたサンプルの間の、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールに対するバッチ影響を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図３５Ｂ】図２３に概説されるようにさまざまなフローセルを用いて調製されたサンプルの間の、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールに対するバッチ影響を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図３５Ｃ】図２３に概説されるようにさまざまなフローセルを用いて調製されたサンプルの間の、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールに対するバッチ影響を示

す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。
【図３６Ａ１－３６Ａ３】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図３６Ａ４－３６Ａ６】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図３６Ａ７－３６Ａ９】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図３６Ｂ】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図３６Ｃ】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図３７】抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータ中の全リードにおける所望のパーセンテージを占めるように、オリゴヌクレオチド結合抗体の染色濃度を決定するための非限定的な例示的実験設計を示す。
【図３８Ａ－３８Ｄ】抗体オリゴヌクレオチドの予測されるサイズと一致するピーク（矢印によって示される）を示す非限定的な例示的バイオアナライザトレースである。
【図３９Ａ１－３９Ｂ１】抗体オリゴヌクレオチド（「高温抗体」）と結合された、異なる抗体希釈及び異なるパーセンテージの抗体分子で染色されたサンプルについて検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図３９Ａ２－３９Ｂ２】抗体オリゴヌクレオチド（「高温抗体」）と結合された、異なる抗体希釈及び異なるパーセンテージの抗体分子で染色されたサンプルについて検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図３９Ａ３－３９Ｂ３】抗体オリゴヌクレオチド（「高温抗体」）と結合された、異なる抗体希釈及び異なるパーセンテージの抗体分子で染色されたサンプルについて検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図４０Ａ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４０Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１０％の高温抗体：９０％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４０Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４０Ｃに示される。
【図４０Ｂ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４０Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１０％の高温抗体：９０％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４０Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４０Ｃに示される。
【図４０Ｃ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４０Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１０％の高温抗体：９０％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４０Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４０Ｃに示される。
【図４１Ａ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４１Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１％の高温抗体：９９％の低温抗体の混

合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４１Ｂ）における明らかなシグナルが得られなかった。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４１Ｃに示される。
【図４１Ｂ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４１Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１％の高温抗体：９９％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４１Ｂ）における明らかなシグナルが得られなかった。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４１Ｃに示される。
【図４１Ｃ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４１Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１％の高温抗体：９９％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４１Ｂ）における明らかなシグナルが得られなかった。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４１Ｃに示される。
【図４２Ａ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４２Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：８００に希釈されたストックで染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４２Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４２Ｃに示される。
【図４２Ｂ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４２Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：８００に希釈されたストックで染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４２Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４２Ｃに示される。
【図４２Ｃ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図４２Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：８００に希釈されたストックで染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図４２Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図４２Ｃに示される。
【図４３Ａ－４３Ｂ】図１０に示されるワークフローを用いた、染色緩衝液中のコントロール粒子オリゴヌクレオチド及び検出されたコントロール粒子に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチドの組成物を示すプロットである。
【図４４Ａ－４４Ｂ】血球計における細胞（図４４Ａ、白丸）及びコントロール粒子（図４４Ｂ、黒丸）の明視野像である。
【図４５Ａ－４５Ｂ】フルオロフォアに関連付けられたオリゴヌクレオチド結合抗体に結合されたコントロール粒子の位相差（図４５Ａ、１０倍）及び蛍光（図４５Ｂ、１０倍）画像である。
【図４６】細胞及びコントロール粒子が、カートリッジのマイクロウェル中に充填されていることを示す画像である。
【図４７Ａ】サンプルインデックス付加のための抗体カクテルの使用が標識感度を高めうることを示すプロットである。
【図４７Ｂ】サンプルインデックス付加のための抗体カクテルの使用が標識感度を高めうることを示すプロットである。
【図４７Ｃ】サンプルインデックス付加のための抗体カクテルの使用が標識感度を高めう

ることを示すプロットである。
【図４８】マルチプレットが、サンプルインデックス付加を用いて同定され、シーケンシングデータから除去されうることを示す非限定的な例示的プロットである。
【図４９Ａ】サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いてシングレット又はマルチプレットとして同定される２匹のマウスからの６つの組織の１２のサンプルのＣＤ４５＋単一細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図４９Ｂ】マルチプレットがサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定され、図４９Ａ中で除去されて示される２匹のマウスからの６つの組織の１２のサンプルのＣＤ４５＋単一細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図５０Ａ】サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定されたマルチプレットが除去された２匹のマウスからのＣＤ４５＋単一細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図５０Ｂ－５０Ｃ】マルチプレットの発現プロフィールを除去した後、生物学的複製である２匹のマウスが、類似の発現プロフィールを示したことを示す非限定的な例示的円グラフである。
【図５１Ａ－５１Ｆ】サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定及び除去されるシーケンシングデータにおけるマルチプレットの発現プロフィールを有する６つの異なる組織の免疫細胞プロフィールを示す非限定的な例示的円グラフである。
【図５２Ａ】シーケンシングデータにおけるマルチプレットの発現プロフィールが、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定及び除去された後の６つの異なる組織からのマクロファージ、Ｔ細胞、及びＢ細胞の発現プロフィールを示す非限定的な例示的グラフである。
【図５２Ｂ】シーケンシングデータにおけるマルチプレットの発現プロフィールが、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定及び除去された後の６つの異なる組織からのマクロファージ、Ｔ細胞、及びＢ細胞の発現プロフィールを示す非限定的な例示的グラフである。
【図５２Ｃ】シーケンシングデータにおけるマルチプレットの発現プロフィールが、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定及び除去された後の６つの異なる組織からのマクロファージ、Ｔ細胞、及びＢ細胞の発現プロフィールを示す非限定的な例示的グラフである。
【図５３Ａ】結腸及び脾臓におけるマクロファージを比較する非限定的な例示的プロットである。
【図５３Ｂ】結腸及び脾臓におけるマクロファージを比較する非限定的な例示的プロットである。
【図５３Ｃ】結腸及び脾臓におけるマクロファージを比較する非限定的な例示的プロットである。
【図５３Ｄ】結腸及び脾臓におけるマクロファージを比較する非限定的な例示的プロットである。
【図５４】サンプルインデックス付加組成物による細胞のタグ付けが、ＰＢＭＣにおけるｍＲＮＡ発現プロフィールを変化させなかったことを示す非限定的な例示的プロットである。
【発明を実施するための形態】
【０３０７】
以下の詳細な説明では、その一部を成す添付の図面を参照にする。これら図面において、類似する符号は、文脈から他の解釈が要求されない限り、一般に、類似の構成要素を同一のものとみなす。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、限定的であることを意味しない。本明細書に提示される主題の精神又は範囲から逸脱することなく、他の実施形態を使用してもよく、また他の変更を実施してもよい。本明細書に概略的に記載され、図面に図示されるように、本開示の態様は、非常に多様な異な

る構成で配置、代替、組合せ、分離、及び設計することができ、それらのすべては、本明細書において明示的に考慮され、本開示の一部を成すものとすることを理解されたい。

【０３０８】

本明細書で参照にされるすべての特許、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を参照により組み込むものとする。

【０３０９】

少数の核酸、たとえば、メッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）分子などの定量は、たとえば、さまざまな発生段階又はさまざまな環境条件下で発現される遺伝子を決定するために、臨床上重要である。しかし、特に、分子数が非常に小さい場合、核酸分子（たとえば、ｍＲＮＡ分子）の絶対数を決定するのは極めて困難となりうる。サンプル中の分子の絶対数を決定する一方法は、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、各サイクルで分子の同一コピーを産生する。しかしながら、ＰＣＲは、各分子は、推計学的確率で複製し、この確率は、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問題を有しうる。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、分子数をカウントし、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））などの確率バーコーディングは、分子標識（ＭＬ）を用いて、逆転写（ＲＴ）中にｍＲＮＡに標識することによって、ＰＣＲ及びライブラリー作製工程により誘導されるバイアスを補正することができる。

【０３１０】

Ｐｒｅｃｉｓｅ（商標）アッセイは、ＲＴ工程中に、サンプル中のすべてのポリ（Ａ）－ｍＲＮＡとハイブリダイズさせるために、ポリ（Ｔ）オリゴヌクレオチド上に多数（たとえば、６５６１～６５５３６）のユニーク分子標識を有する確率バーコードの非枯渇プールを使用することができる。確率バーコードは、ユニバーサルＰＣＲプライミング部位を含んでもよい。ＲＴの最中に、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、得られた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）分子を生成しうる）。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、ユニーク分子標識を有する確率バーコードの数、ｍＲＮＡ分子の数を取得しうる。

【０３１１】

単一細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールを決定するための方法が、超並列的に行われうる。たとえば、Ｐｒｅｃｉｓｅ（商標）アッセイを用いて、１００００個を超える細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールを同時に決定することができる。サンプルごとの分析のための単一細胞の数（たとえば、１００個又は１０００個の単一細胞）を、現在の単一細胞技術の能力より少なくしうる。さまざまなサンプルからの細胞をプールすることは、現在の単一の技術の能力の向上した利用を可能にし、したがって、無駄な試薬及び単一細胞分析のコストを減少させる。本開示は、単一細胞分析などの細胞分析のためのｃＤＮＡライブラリー作製のための、さまざまなサンプルの細胞を区別するためのサンプルインデックス付加の方法を提供する。さまざまなサンプルからの細胞をプールすることは、さまざまなサンプルの細胞のｃＤＮＡライブラリー作製の変動を最小限に抑えることができ、したがって、異なるサンプルのより正確な比較を可能にする。

【０３１２】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、複数のサンプル

インデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程と；複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（たとえば、確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）を生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【０３１３】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるサンプル同定のための方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程と；複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（たとえば、確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）を生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【０３１４】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【０３１５】
複数のサンプルインデックス付加組成物が本明細書に開示される。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含みうる。タンパク質結合試薬は、少なくとも１つの抗原標的に特異的に結合することが可能でありうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。
【０３１６】
本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬（たとえば、抗体）を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的（たとえば、タンパク質）の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを含む複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。本方法は、複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含みうる。
【０３１７】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるサンプルインデックス付加方法、キット、及び組成物は、サンプルスループット（たとえば、低い細胞数の稀なサンプルの場合、細胞、及び不均一の細胞を単離しにくい）を増大させ、試薬コストを低下させ、単一チューブ反応においてライブラリー作製を行うことによって、技術的エラー及びバッチ効果を減少させ、及び／又はデータ分析中にサンプル間の多細胞を同定することができる。いくつかの実施形態では、さまざまなリンパ器官及び非リンパ器官からの組織の細胞は、たとえば、サンプルスループットを増大させ、バッチ効果を減少させるか、又は最小限に抑えるために、さまざまなサンプルインデックス付加組成物を用いてタグ付けされうる。いくつかの実施形態では、免疫防御並びに組織の恒常性及び機能が、本開示の方法、キット、及び組成物を用いて調べられうる。
【０３１８】
定義
特に定義がない限り、本明細書で用いられる技術用語及び科学用語は、本開示が属する分野の当業者により一般に理解されているものと同一の意味を有する。たとえば、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ２ｎｄ ｅｄ．，Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ １９９４）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐ

ｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ １９８９）を参照されたい。本開示の趣旨では、以下の用語が、以下に定義される。

【０３１９】

本明細書で用いられる場合、「アダプター」という用語は、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意味しうる。関連核酸は、標的核酸を含みうる。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（たとえば、分子標識）の１つ以上を含みうる。アダプターは、線状であってよい。アダプターは、事前にアデニル化されたアダプターであってよい。アダプターは、二本鎖又は一本鎖であってよい。１つ以上のアダプターは、核酸の５’又は３’末端に配置することができる。アダプターが５’及び３’末端に既知の配列を含む場合、既知の配列は、同じ配列でも、異なる配列でもよい。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能力を有しうる。アダプターは、いくつかの実施形態では、ユニバーサル配列を含む。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１領域であってよい。２つ以上の核酸分子は、異なる配列の領域を有しうる。従って、たとえば、５’アダプターは、同一配列及び／又はユニバーサル核酸配列を含み、３’アダプターは、同一配列及び／又はユニバーサル配列を含みうる。複数の核酸分子の異なるメンバー中に存在しうるユニバーサル配列は、ユニバーサル配列と相補的な単一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うる。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うる少なくとも１つ、２つ（たとえば、ペア）若しくはそれ以上のユニバーサル配列は、ユニバーサル配列と相補的な少なくとも１つ、２つ（たとえば、一対）若しくはそれ以上の単一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うる。従って、ユニバーサルプライマーは、こうしたユニバーサル配列とハイブリダイズすることができる配列を含む。標的核酸配列担持分子を修飾して、ユニバーサルアダプター（たとえば、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ることができる。標的核酸に結合した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。標的核酸に結合した１つ以上のユニバーサルプライマーは、同じでも、互いに異なってもよい。

【０３２０】

本明細書で用いられる場合、抗体は、全長（たとえば、天然に存在するか若しくは通常の免疫グロブリン遺伝子断片組換えプロセスにより形成される）免疫グロブリン分子（たとえばＩｇＧ抗体）又は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、たとえば抗体フラグメントでありうる。

【０３２１】

いくつかの実施形態では、抗体は、機能的抗体フラグメントである。たとえば、抗体フラグメントは、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓＦｖなどの抗体の一部でありうる。抗体フラグメントは、全長抗体により認識される同一の抗原に結合可能である。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断片、たとえば、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（「ｓｃＦｖタンパク質」）により接続された組換え一本鎖ポリペプチド分子を含みうる。例示的な抗体としては、限定されるものではないが、癌細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面レセプター（たとえば、ＣＤ８、ＣＤ３４、及びＣＤ４５）に結合する抗体、及び治療用抗体が挙げられうる。

【０３２２】

本明細書で用いられる場合、「関連付けられる」又は「～に関連付けられる」という用語は、ある時点で２つ以上の種が共配置されているとして同定可能であることを意味しうる。関連付けは、２つ以上の種が類似の容器内にあることを意味しうる。関連付けは、インフォマティクス的関連付けでありうる。たとえば、２つ以上の種に関するデジタル情報が記憶され、且つその情報を用いてこれらの種の１つ以上が共配置されたことを決定可能である。関連付けはまた、物理的関連付けでありうる。いくつかの実施形態では、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支持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意味しうる。関連付けは、標的と標識との間の共有結合でありうる。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うる。

【０３２３】

本明細書で用いられる場合、「相補的」という用語は、２つのヌクレオチド間の精密なペアリングの能力を意味しうる。たとえば、核酸の所与の位置のヌクレオチドが他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みなされる。２つの一本鎖核酸分子間の相補性は、ヌクレオチドの一部のみが結合する場合には「部分的」でありうるし、一本鎖分子間のすべてに相補性が存在する場合には完全でありうる。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」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」であるといえる。本明細書で用いられる場合、「相補体」、「相補的」、及び「逆相補体」という用語は、同義的に用いることが可能である。ある分子が他の分子にハイブリダイズしうる場合、それはハイブリダイズしている分子の相補体でありうることが、本開示から理解される。

【０３２４】

本明細書で用いられる場合、「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意味しうる。デジタルカウンティングは、サンプル中の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うる。この方法は、本来確率的であってもよく、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。

【０３２５】

本明細書で用いられる場合、「標識」という用語は、サンプル内の標的に関連付けられる核酸コードを意味しうる。標識は、たとえば、核酸標識でありうる。標識は、全体又は一部が増幅可能な標識でありうる。標識は、全体又は一部がシーケンス可能標識でありうる。標識は、個別に同定可能な天然核酸の一部でありうる。標識は、既知の配列でありうる。標識は、核酸配列の接合（たとえば、天然配列と非天然配列との接合）を含みうる。本明細書で用いられる場合、「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用いうる。標識は、情報を伝達可能である。たとえば、種々の実施形態では、標識は、サンプル同一性、サンプル源、細胞同一性、及び／又は標的を決定するために使用可能である。

【０３２６】

本明細書で用いられる場合、「非枯渇リザーバー」という用語は、多種多様な標識から構成されたバーコード（たとえば、確率バーコード）のプールを意味しうる。非枯渇リザーバーは、非枯渇リザーバー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うる。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り決定可能であり、次いで、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が低い場合、標識標的分子はきわめてユニークである（すなわち、２つ以上の標的分子が１つの所与の標識で標識される確率は非常に低い）。

【０３２７】

本明細書で用いられる場合、「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド配列又はその断片を意味する。核酸はヌクレオチドを含みうる。核酸は細胞に対して外因性又は内因性でありうる。核酸は細胞フリー環境中に存在しうる。核酸は遺伝子又はその断片でありうる

。核酸はＤＮＡでありうる。核酸はＲＮＡでありうる。核酸は１つ以上のアナログ（たとえば、修飾された骨格、糖又は核酸塩基）を含みうる。アナログのいくつかの例としては、限定されるものではないが、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（たとえば、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、キューオシン、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、同義的に用いうる。

【０３２８】

核酸は、新しい又は向上した特徴（たとえば、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（たとえば、塩基修飾、骨格修飾）を含みうる。核酸は核酸アフィニティータグを含みうる。ヌクレオシドは塩基－糖の組合せでありうる。ヌクレオシドの塩基部分はヘテロ環塩基でありうる。かかるヘテロ環塩基の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うる。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可能である。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線状高分子化合物を形成可能である。ひいては、この線状高分子化合物のそれぞれの末端をさらに連結して環状化合物を形成可能である。しかしながら、線状化合物が一般に好適である。そのほかに、線状化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有しうるので、完全二本鎖又は部分二本鎖の化合物を生成するようにフォールディングしうる。核酸内では、リン酸基は、通常、核酸のヌクレオシド間骨格を形成するものとして参照可能である。結合又は骨格は、３’→５’ホスホジエステル結合でありうる。

【０３２９】

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うる。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していないものを含みうる。リン原子を中に含有する好適な修飾核酸骨格は、たとえば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’－アルキレンホスホネートや５’－アルキレンホスホネートなどのメチルや他のアルキルのホスホネート、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やアミノアルキルホスホルアミデートなどのホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、及び通常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うる。

【０３３０】

核酸は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、又は１つ以上の短鎖ヘテロ原子若しくはヘテロ環のヌクレオシド間結合により形成されるポリヌクレオチド骨格を含みうる。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）、シロキサン骨格、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CH_2構成部分を有する他のものを含みうる。

【０３３１】

核酸は核酸ミメティックを含みうる。「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とヌクレオチド間結合の両方が非フラノース基で置き換えられている

ポリヌクレオチドを含むことを意図し得、フラノース環のみの置換えは、糖サロゲートであるとして参照可能である。ヘテロ環塩基部分又は修飾ヘテロ環塩基部分は、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可能である。かかる核酸の１つはペプチド核酸（ＰＮＡ）でありうる。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え可能である。ヌクレオチドは保持可能であり、且つ骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的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うる。ヘテロ環塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的又は間接的に結合可能である。

【０３３２】

核酸はモルホリノ骨格構造を含みうる。たとえば、核酸は、リボース環の代わりに６員モルホリノ環を含みうる。これらの実施形態のいくつかでは、ホスホロジアミデート又は他の非ホスホジエステルのヌクレオシド間結合によりホスホジエステル結合を置換え可能である。

【０３３３】

核酸は、モルホリノ環に結合されたヘテロ環塩基を有する結合されたモルホリノ単位（たとえばモルホリノ核酸）を含みうる。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可能である。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うる。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うる。モルホリノクラス内のさまざまな化合物は、異なる結合基を用いて連結可能である。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）として参照可能である。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え可能である。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が可能である。核酸鎖中へのＣｅＮＡモノマーの取込みは、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドの安定性を増加可能である。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可能である。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て２’－Ｃ，４’－Ｃ－オキシメチレン結合を形成することにより二環式糖部分を形成するロックド核酸（ＬＮＡ）を含みうる。結合は、２’酸素原子と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）でありうる。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（Ｔｍ＝＋３～＋１０℃）、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うる。

【０３３４】

核酸はまた、核酸塩基（単に「塩基」ということが多い）の修飾又は置換を含みうる。本明細書で用いられる場合、「非修飾」又は「天然」の核酸塩基は、プリン塩基（たとえば、アデニン（Ａ）及びグアニン（Ｇ））、並びにピリミジン塩基（たとえば、チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）及びウラシル（Ｕ））を含みうる。修飾核酸塩基は、他の合成及び天然の核酸塩基、たとえば、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、並びにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシン及びチミン、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、並びに他の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、並びに３－デアザグアニン及び３－デアアデニンを含みうる。修飾核酸塩基は、三環

式ピリミジン、たとえば、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（たとえば、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（たとえば、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）を含みうる。

【０３３５】

本明細書で用いられる場合、「サンプル」という用語は、標的を含む組成物を意味しうる。本開示の方法、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。

【０３３６】

本明細書で用いられる場合、「サンプリングデバイス」又は「デバイス」という用語は、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うるデバイスを意味しうる。サンプルデバイスとは、たとえば、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／又はミクロトームを意味しうる。

【０３３７】

本明細書で用いられる場合、「固体担体」という用語は、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を結合しうる離散した固体又は半固体の表面を意味しうる。固体担体は、核酸を（たとえば共有結合又は非共有結合で）固定しうるプラスチック、セラミック、金属、又は高分子材料（たとえばヒドロゲル）で構成された任意のタイプの中実、多孔性、又は中空のスフェア、ボール、ベアリング、シリンダー、又は他の類似の構成体を包含しうる。固体担体は、球状（たとえばマイクロスフェア）でありうるか又は非球状若しくは不規則形状、たとえば、立方体形、直方体形、角錐形、円柱形、円錐形、扁球形、ディスク形などを有しうる離散粒子を含みうる。ビーズは、非球状の形状でありうる。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うる。固体担体は、「ビーズ」という用語と同義的に用いられうる。

【０３３８】

本明細書で用いられる場合、「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意味しうる。確率バーコードは、確率バーコーディングに使用可能なポリヌクレオチド配列でありうる。確率バーコードは、サンプル中の標的を定量可能である。確率バーコードは、標識を標的に関連付けた後に起こりうるエラーの制御に使用可能である。たとえば、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可能である。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ぶことが可能である。

【０３３９】

本明細書で用いられる場合、「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な標的結合領域を含むポリヌクレオチド配列を意味しうる。確率バーコードは、確率バーコーディングに使用可能なポリヌクレオチド配列でありうる。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可能である。確率バーコードは、標識を標的に関連付けた後に起こりうるエラーの制御に使用可能である。たとえば、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可能である。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ぶことが可能である。

【０３４０】

本明細書で用いられる場合、「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（たとえばバーコーディング）を意味する。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利用することができる。本明細書で用いられる場合、「確率バーコーディング」という用語は、「確率標識化」と同義的に用いられうる。

【０３４１】

本明細書で用いられる場合、「標的」という用語は、バーコード（たとえば確率バーコード）に関連付け可能な組成物を意味しうる。本開示の方法、デバイス、及びシステムによる分析に例示的な好適な標的としては、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｔＲＮＡなどが挙げられる。標的は一本鎖又は二本鎖でありうる。いくつかの実施形態では、標的は、タンパク質、ペプチド、又はポリペプチドでありうる。いくつかの実施形態では、標的は脂質である。本明細書で用いられる場合、「標的」は、「種」と同義的に用いられうる。

【０３４２】

本明細書で用いられる場合、「逆転写酵素」という用語は、逆転写酵素活性を有する（すなわち、ＲＮＡ鋳型からのＤＮＡの合成を触媒する）酵素のグループを意味しうる。一般的には、かかる酵素としては、限定されるものではないが、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、レトロン逆転写酵素、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、レトロン逆転写酵素、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・ラクティス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃ ｓ ｌａｃｔｉｓ）Ｌｌ．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、又はジオバチルス・ステアロサーモフィラス（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＧｓＩ－ＩＩＣイントロン逆転写酵素が挙げられる。他のクラスの逆転写酵素としては、多くのクラスの非レトロウイルス逆転写酵素（すなわち、レトロン、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）が挙げられうる。

【０３４３】

「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、置き換え可能に用いられて、バーコード（たとえば、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作製するために使用することができるヌクレオチド配列を指す。ユニバーサルアダプター配列は、たとえば、本開示の方法に用いられるすべ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ってよい。たとえば、本明細書に開示する方法を用いて複数の標的が標識される場合、標的特異的配列の各々を同じユニバーサルアダプター配列に連結させてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示する方法に、２つ以上のユニバーサルアダプター配列を使用することができる。たとえば、本明細書に開示する方法を用いて複数の標的が標識される場合、標的特異的配列の少なくとも２つを異なるユニバーサルアダプター配列と連結させる。ユニバーサルアダプタープライマー及びその補体は、２つのオリゴヌクレオチドに含有させてもよく、そのうちの１つは、標的特異的配列を含み、他方は、バーコードを含む。たとえば、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ってもよい。バーコードと、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（たとえば、標的特異的確率バーコード）を生成しうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサルアダプタープライマーは、本開示の方法で使用されるユニバーサルＰＣＲプライマーとは異なる配列を有する。

【０３４４】

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、たとえば、米国特許出願公開第２０１５０２９９７８４号明細書、国際公開第２０１５０３１６９１号パンフレット、及びＦｕ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．２０１１ Ｍａｙ３１；１０８（２２）：９０２６－３１に記載されており、これらの刊行物の内容は、その全体を参照により本明細書に組み込む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるバーコードは、標的に確率標識（たとえば、バーコード、タグ）を付けるために使用することができるポリヌクレオチド配列でありうる確率バーコードでありうる。バーコードは、確率バーコードの異なるバーコード配列の数及び標識される標的のいずれかの出現の回数の比率が、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、或いはそうした近似値でありうる場合、確率バーコードと呼ばれうる。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種でありうる。バーコードは、確率バーコードの異なるバーコード配列の数及び標識される標的のいずれかの出現の回数の比率が、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、又は１００：１である場合、確率バーコードと呼ばれうる。確率バーコードのバーコード配列は、分子標識と呼ばれうる。

【０３４５】

バーコード、たとえば確率バーコードは、１つ以上の標識を含みうる。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（たとえば分子標識）、サンプル標識、プレート標識、空間標識、及び／又はプレ空間標識を挙げることができる。図１は、空間標識を有する例示的なバーコード１０４を示す。バーコード１０４は、バーコードを固体担体１０５に連結しうる５’アミンを含んでよい。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うる。バーコード中のさまざまな標識（限定するものではないが、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、及び分子標識など）の順序は変動しうる。たとえば、図１に示すように、ユニバーサル標識は、最も５’側の標識であってよく、分子標識は、最も３’側の標識であってもよい。空間標識、次元標識、及び細胞標識は、任意の順序であってよい。いくつかの実施形態では、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、任意の順序であってよい。バーコードは、標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、サンプル中の標的（たとえば、標的核酸、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ）と相互作用することができる。たとえば、標的結合領域は、ｍＲＮＡのポリ（Ａ）テールと相互作用することができるオリゴ（ｄＴ）配列を含みうる。ある場合、バーコードの標識（たとえば、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ヌクレオチド又はそれ以上によって隔てられうる。

【０３４６】

標識、たとえば、細胞標識は、規定長さ、たとえば、各々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んでもよく、これらは、エラー訂正能力を賦与するように設計することができる。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）を呈示するように、設計することができ、たとえば、３ヌクレオチドの遺伝子距離を呈示するように、１セットのエラー訂正部分配列を設計することができる。この場合、標識化標的核酸分子についてのシーケンシングデータのセット内のエラー訂正配列の見直しによって、増幅若しく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

施形態では、エラー訂正コードを作製するために用いられる核酸部分配列の長さは、たとえば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、３０、３１、４０、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であってよい。いくつかの実施形態では、エラー訂正コードを作製するために、他の長さの核酸部分配列を使用することも可能である。

【０３４７】

バーコードは、標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、サンプル中の標的と相互作用することができる。標的は、リボ核酸（ＲＮＡ）、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ｍｉｃｒｏＲＮＡ、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、ＲＮＡ分解産物、各々がポリ（Ａ）テールを含有するＲＮＡ、又はそれらの任意の組合せであってもよいし、これらを含んでもよい。いくつかの実施形態では、複数の標的は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を含みうる。

【０３４８】

いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ｍＲＮＡのポリ（Ａ）テールと相互作用することができるオリゴ（ｄＴ）配列を含みうる。バーコードの標識（たとえば、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（たとえば、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ることができる。スペーサは、たとえば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、若しくは２０ヌクレオチド又はそれ以上であってよい。いくつかの実施形態では、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。

【０３４９】

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うる。いくつかの実施形態では、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すべてのバーコードで同一でありうる。いくつかの実施形態では、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すべてのバーコードで同一でありうる。いくつかの実施形態では、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可能な核酸配列を含みうる。シークエ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スするために使用可能である。シークエンシングプライマー（たとえば、ユニバーサルシークエンシングプライマー）は、高スループットシークエンシングプラットフォームに関連付けられるシークエンシングプライマーを含みうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識は、ＰＣＲプライマーにハイブリダイズ可能な核酸配列を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識は、シークエ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可能な核酸配列を含みうる。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して参照しうる。ユニバーサル標識は、バーコードの転写を開始するために使用しうる配列を含みうる。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のために、使用しうる配列を含みうる。ユニバーサル標識は、約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であってよい。たとえば、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うる。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、若しくは３００ヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、切断可能な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ってよい。

【０３５０】

次元標識

バーコードは１つ以上の次元標識を含みうる。いくつかの実施形態では、次元標識は、標識化（たとえば、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

うる。たとえば、次元標識は、標的に確率バーコードが付された時点に関する情報を提供可能である。次元標識は、サンプルのバーコーディング（たとえば、確率バーコーディング）の時点に関連付け可能である。次元標識は、標識化の時点で活性化可能である。異なる時点で異なる次元標識を活性化可能である。次元標識は、標的、標的のグループ、及び／又はサンプルに確率バーコードを付けた順序に関する情報を提供する。たとえば、細胞集団は、細胞周期のＧ０期に確率バーコードを付けることが可能である。細胞は、細胞周期のＧ１期にバーコード（たとえば、確率バーコード）で再びパルスすることが可能である。細胞は、細胞周期のＳ期にバーコードで再びパルスすることが可能であり、他の時期も同様である。各パルス時（たとえば、細胞周期の各期）のバーコードは、異なる次元標識を含みうる。こうして、次元標識は、細胞周期のど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、多種多様な生物時間を精査することが可能である。例示的な生物時間としては、限定されるものではないが、細胞周期、転写（たとえば転写開始）、及び転写物分解が挙げられうる。他の例として、薬剤治療及び／又は療法の前及び／又は後にサンプル（たとえば、細胞、細胞集団）に確率標識を付けることが可能である。識別可能な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うる。

【０３５１】

次元標識は、活性化可能であってよい。活性化可能な次元標識は、特定の時点で活性化可能でありうる。活性化可能な標識は、たとえば、構成的に活性化することができる（たとえば、オフに切り替わらない）。活性化可能な次元標識は、たとえば、可逆的に活性化可能である（たとえば、活性化可能な次元標識は、オン・オフの切替えが可能である）。たとえば、次元標識は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０回又はそれ以上可逆的に活性化可能でありうる。次元標識は、たとえば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、若しくは１０回又はそれ以上可逆的に活性化可能でありうる。いくつかの実施形態では、次元標識は、蛍光、光、化学的イベント（たとえば、切断、他の分子のライゲーション、修飾（たとえば、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（たとえば、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可能である。

【０３５２】

次元標識は、いくつかの実施形態では、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されるすべてのバーコード（たとえば、確率バーコード）で同一でありうるが、異なる固体担体（たとえばビーズ）では異なりうる。いくつかの実施形態では、同一の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％は、同一の次元標識を含みうる。いくつかの実施形態では、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも６０％は、同一の次元標識を含みうる。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも９５％は、同一の次元標識を含みうる。

【０３５３】

複数の固体担体（たとえばビーズ）には、10^6程度又はそれ以上のユニーク次元標識配列が存在可能である。次元標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。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、若しくは３００ヌクレオチド長でありうる。次元標識は、約５～約２００ヌクレオチドを含みうる。次元標識は、約１０～約１５０ヌクレオチドを含みうる。次元標識は、約２０～約１２５ヌクレオチドを含みうる。

【０３５４】

空間標識

バーコードは１つ以上の空間標識を含みうる。いくつかの実施形態では、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

うる。空間標識は、サンプル中の座標に関連付け可能である。座標は固定座標でありうる。たとえば、座標は基材を基準にして固定可能である。空間標識は二次元又は三次元のグリッドを基準にしうる。座標はランドマークを基準にして固定可能である。ランドマークは空間内で同定可能である。ランドマークはイメージング可能な構造体でありうる。ランドマークは生物学的構造体たとえば解剖学的ランドマークでありうる。ランドマークは細胞ランドマーク（たとえばオルガネラ）でありうる。ランドマークは、非天然ランドマーク、たとえば、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のような同定可能な識別子を有する構造体でありうる。空間標識は、物理的パーティション（たとえば、ウェル、容器、又はドロップレット）に関連付け可能である。いくつかの実施形態では、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。

【０３５５】

空間標識は、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されるすべてのバーコードで同一であってよいが、異なる固体担体（たとえばビーズ）については異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、同一の空間標識を含む、同一の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、或いはそうした近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の空間標識を含む、同一の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％でありうる。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも６０％が、同一の空間標識を含んでよい。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも９５％が、同一の空間標識を含んでよい。

【０３５６】

複数の固体担体（たとえばビーズ）には、10^6程度又はそれ以上のユニーク空間標識配列が存在可能である。空間標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。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うる。空間標識は、約５～約２００ヌクレオチドを含みうる。空間標識は、約１０～約１５０ヌクレオチドを含みうる。空間標識は、約２０～約１２５ヌクレオチドを含みうる。

【０３５７】

細胞標識

バーコードは、１つ以上の細胞標識を含みうる。いくつかの実施形態では、細胞標識は、どの標的核酸がど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うる。いくつかの実施形態では、細胞標識は、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されるすべてのバーコードで同一であるが、異なる固体担体（たとえばビーズ）については異なっている。いくつかの実施形態では、同一の細胞標識を含む、同一の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、或いはそうした近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の細胞標識を含む、同一の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％、又はそうした近似値であってよい。たとえば、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも６０％が、同一の細胞標識を含みうる。別の例として、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも９５％が、同一の細胞標識を含んでもよい。

【０３５８】

複数の固体担体（たとえばビーズ）には、10^6程度又はそれ以上のユニーク細胞標識配列が存在可能である。細胞標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０

、３５、４０、４５、５０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。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うる。たとえば、細胞標識は、約５～約２００ヌクレオチドを含みうる。別の例として、細胞標識は、約１０～約１５０ヌクレオチドを含みうる。さらに別の例として、細胞標識は、約２０～約１２５ヌクレオチドを含みうる。

【０３５９】

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うる。いくつかの実施形態では、バーコード配列は、バーコードにハイブリダイズされた標的核酸種の特定のタイプについての情報の同定を提供する核酸配列を含みうる。バーコード配列は、バーコード（たとえば標的結合領域）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（たとえば、概算を提供する）核酸配列を含みうる。

【０３６０】

いくつかの実施形態では、バーコード配列の多様なセットが、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合される。いくつかの実施形態では、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、或いはそうした近似値のユニーク分子標識配列が存在しうる。たとえば、複数のバーコードは、識別可能な配列を有する約６５６１のバーコード配列を含みうる。別の例として、複数のバーコードは、識別可能な配列を有する約６５５３６のバーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、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うる。ユニーク分子標識配列は、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されうる。

【０３６１】

バーコードの長さは、さまざまな履行において異なるものであってよい。バーコードは、約、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。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うる。

【０３６２】

分子標識

確率バーコードは、１つ以上の分子標識を含みうる。分子標識は、バーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、分子標識は、確率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うる。分子標識は、確率バーコード（たとえば標的結合領域）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うる。

【０３６３】

いくつかの実施形態では、分子標識の多様なセットが所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合される。いくつかの実施形態では、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、或いはそうした近似値のユニーク分子標識配列が存在しうる。たとえば、複数の確率バーコードは、識別可能な配列を有する約６５６１の分子標識を含みうる。別の例として、複数の確率バーコードは、識別可能な配列を有する約６５５３６の分子標識を含みうる。いくつかの実施形態では、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、若しくは10^9のユニーク分子標識配列が存在しうる。ユニーク分子標識配列の確率バーコードは、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されうる。

【０３６４】

複数の確率バーコードを用いた確率バーコーディングでは、異なる分子標識配列の数及

び標的のいずれかの出現の回数の比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、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、或いはそうした近似値でありうる。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種でありうる。いくつかの実施形態では、異なる分子標識配列の数及び標的のいずれかの出現の回数の比率は、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。

【０３６５】

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、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。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うる。

【０３６６】

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うる。いくつかの実施形態では、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では、標的結合領域は、標的（たとえば、標的核酸、標的分子、たとえば、分析される細胞核酸）、たとえば、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うる。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、特定の標的核酸の特定の位置に結合（たとえばハイブリダイズ）しうる核酸配列を含みうる。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、制限酵素部位オーバーハング（たとえば、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うる。次いで、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うる。

【０３６７】

いくつかの実施形態では、標的結合領域は非特異的標的核酸配列を含みうる。非特異的標的核酸配列は、標的核酸の特定の配列に依存せずに複数の標的核酸に結合しうる配列を意味しうる。たとえば、標的結合領域は、ランダムマルチマー配列を含みうるか又はｍＲＮＡ分子のポリ（Ａ）テールにハイブリダイズするオリゴ（ｄＴ）配列を含みうる。ランダムマルチマー配列は、たとえば、ランダムダイマー、ランダムトリマー、ランダムクアトラマー、ランダムペンタマー、ランダムヘキサマー、ランダムセプタマー、ランダムオクタマー、ランダムノナマー、ランダムデカマー、又は任意の長さのより高次のランダムマルチマーの配列でありうる。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、所与のビーズに結合されたすべてのバーコードで同一である。いくつかの実施形態では、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む。標的結合領域は、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。若しくはそれ以上又は概略で少なくともそうしたヌクレオチド長でありうる。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以上でありうる。

【０３６８】

いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ポリアデニル化末端を含むｍＲＮＡにハイブリダイズすることができるオリゴ（ｄＴ）を含みうる。標的結合領域は、遺伝子特異的でありうる。たとえば、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することができる。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、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。標的結合領域は、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うる。標的結合領域は、約５～３０ヌクレオチド長であってもよい。バーコードが、遺伝子特異的標的結合領域を含む場合、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ぶことができる。

【０３６９】

配向性

バーコードは、バーコードの配向（たとえばアライメント）のために使用することができる１つ以上の配向性を含みうる。バーコードは、等電点電気泳動用の部分を含みうる。異なるバーコードは、異なる等電点電気泳動点を含みうる。こうしたバーコードをサンプルに導入した場合、サンプルは、バーコードを既知の形態にオリエントするために等電点電気泳動を行うことが可能である。こうして、オリエント性は、サンプルでバーコードの既知のマップを作成するために使用可能である。例示的なオリエント性としては、電気泳動移動度（たとえば、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ーが挙げられうる。たとえば、セルフアセンブリーのオリエント性を含むバーコードは、活性化時に特定のオリエンテーションにセルフアセンブル可能である（たとえば、核酸ナノ構造）。

【０３７０】

親和性

バーコードは、１つ以上の親和性を含みうる。たとえば、空間標識は、親和性を含みうる。親和性は、他のエンティティー（たとえば細胞レセプター）とのバーコードの結合を促進することができる化学的及び／又は生物学的部分を含みうる。たとえば、親和性は、抗体、たとえば、サンプル上の特定の部分（たとえばレセプター）に特異的な抗体を含みうる。いくつかの実施形態では、抗体は、バーコードを特定の細胞型又は分子に誘導することができる。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を確率標識化することができる。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ので、いくつかの実施形態において、親和性は、空間標識のヌクレオチド配列に加え、空間情報も提供することができる。抗体は、治療用抗体、たとえば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、ヒト化されていても、又はキメラであってもよい。抗体は、ネイキッド抗体又は融合抗体であってもよい。

【０３７１】

抗体は、全長（すなわち、天然に存在するか若しくは通常の免疫グロブリン遺伝子断片組換えプロセスにより形成される）免疫グロブリン分子（たとえばＩｇＧ抗体）又は免疫グロブリン分子の免疫活性（すなわち特異的結合）部分たとえば抗体フラグメントでありうる。

【０３７２】

抗体フラグメントは、たとえば、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓＦｖなどの抗体の一部でありうる。いくつかの実施形態において、抗体フラグメントは、全長抗体により認識される同一の抗原に結合可能である。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断片、たとえば、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り接続された組換え一本鎖ポリペプチド分子（「ｓｃＦｖタンパク質」）を含みうる。例示的な抗体としては、限定されるものではないが、癌細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面レセプター（ＣＤ８、ＣＤ３４、ＣＤ４５）に結合する抗体、及び治療用抗体が挙げられうる。

【０３７３】

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うる。たとえば、

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うる。ユニバーサルアダプタープライマーは、すべてのバーコードに対してユニバーサルであるヌクレオチド配列を意味しうる。ユニバーサルアダプタープライマーは、遺伝子特異的バーコードを構築するために使用することができる。ユニバーサルアダプタープライマーは、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。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うる。ユニバーサルアダプタープライマーは、約５～３０ヌクレオチド長であってもよい。

【０３７４】

リンカー

バーコードが、２つ以上のタイプの標識（たとえば、２つ以上の細胞標識又は２つ以上のバーコード配列、たとえば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うる。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又はそれ以上のヌクレオチド長でありうる。リンカー標識配列は、多くとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０又はそれ以上のヌクレオチド長でありうる。ある場合、リンカー標識配列は、１２ヌクレオチド長である。リンカー標識配列を用いて、バーコードの合成を容易にすることができる。リンカー標識は、エラー訂正（たとえばハミング）コードを含みうる。

【０３７５】

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、固体担体と結合することができる。固体担体は、たとえば、合成粒子であってよい。いくつかの実施形態では、固体担体上の複数のバーコード（たとえば、第１の複数のバーコード）の確立バーコードの分子標識などのバーコード配列（たとえば、第１のバーコード配列）の一部又は全部が、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、同じであってもよい。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うる。たとえば、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、同じ配列を有してよく、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、同じ配列を有してよい。第１の固体担体上の第１の複数のバーコードの第１の細胞標識と、第２の固体担体上の第２の複数のバーコードの第２の細胞標識とは、少なくとも１ヌクレオチド異なりうる。細胞標識は、たとえば、約５～２０ヌクレオチド長でありうる。バーコード配列は、たとえば、約５～２０ヌクレオチド長でありうる。合成粒子は、たとえば、ビーズであってよい。

【０３７６】

ビーズは、たとえば、シリカゲルビーズ、調節多孔性ガラスビーズ、磁気ビーズ、ダイナビーズ、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、又はそれらの任意の組合せであってよい。ビーズは、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、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、又はそれらの任意の組合せなどの材料を含みうる。

【０３７７】

いくつかの実施形態では、ビーズは、ポリマービーズ、たとえば、変形性ビーズ又はゲルビーズであってよく、これらは、バーコード又は確率バーコードで官能化されている（たとえば、１０Ｘ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）からのゲルビーズなど）。いくつかの実施形態では、ゲルビーズは、ポリマーベースのゲルを含みうる

。ゲルビーズは、たとえば、１つ以上のポリマー前駆体を液滴中に封入することによって作製することができる。促進剤（たとえば、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うる。

【０３７８】

いくつかの実施形態では、粒子は、分解性でありうる。たとえば、ポリマービーズは、たとえば、所望の条件下で、溶解、溶融、又は分解しうる。所望の条件は、環境条件を含みうる。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、又は分解を引き起こしうる。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って、溶解、溶融、又は分解しうる。

【０３７９】

たとえば、オリゴヌクレオチドバーコードなどの被検物質及び／若しくは試薬を、ゲルビーズの内側表面（たとえば、オリゴヌクレオチドバーコード及び／若しくはオリゴヌクレオチドバーコードを作製するために用いられる材料の拡散を介して進入可能な内部）並びに／又はゲルビーズの外側表面、或いは本明細書に記載されるいずれか他のマイクロカプセルにカップリング／固定してもよい。カップリング／固定は、化学結合（たとえば、共有結合、イオン結合）又は物理的現象（たとえば、ファンデルワールス力、双極子－双極子相互作用など）の任意の形態を介するものであってよい。いくつかの実施形態では、ゲルビーズ又は本明細書に記載す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、たとえば、不安定部分（たとえば、本明細書に記載の化学架橋剤をはじめとする、化学架橋剤）を介するなど、可逆性であってもよい。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うる。いくつかの実施形態では、不安定部分は、ジスルフィド結合である。たとえば、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ている場合、ジスルフィド結合を還元剤に曝露することにより、ジスルフィド結合を切断して、オリゴヌクレオチドバーコードをビーズから遊離させることができる。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、及び／又は試薬若しくは被検物質の一部として含有させてもよい。いくつかの実施形態では、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、粒子上に部分的に固定され、粒子に封入され、粒子に部分的に封入され、又はそれらの任意の組合せでありうる。

【０３８０】

いくつかの実施形態では、ゲルビーズは、限定するものではないが、以下のものをはじめとする、極めて多様なポリマーを含みうる：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、ペプチド、タンパク質、及び／又はプラスチック。ポリマーとしては、限定するものではないが、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－リシン）（ＰＬＬ）、ポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＡＲＧ）、乳酸－グリコール酸共重合体（ＰＬＧＡ）などの材料が挙げられる。

【０３８１】

多数の化学的刺激を用いて、ビーズの破壊、溶解、又は分解をトリガーすることができる。これらの化学的変化の例として、限定するものではないが、ビーズ壁に対するｐＨ媒介による変化、架橋の化学的切断を介したビーズ壁の崩壊、ビーズ壁の解重合トリガー、

及びビーズ壁スイッチング反応が挙げられる。また、バルク変化を用いて、ビーズの破壊をトリガーしてもよい。

【０３８２】

また、さまざま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もたらす。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、刺激により誘導された機械物理的力の結果による。こうしたプロセスとしては、限定するものではないが、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る。

【０３８３】

生物学的刺激を用いて、ビーズの破壊、溶解、又は分解をトリガーすることもできる。概して、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、核酸などの生存系に一般的に存在する分子が使用される。たとえば、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んでもよい。さらに具体的には、一例は、ＧＦＬＧＫペプチド架橋を含むマイクロカプセルを含んでもよい。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、シェルウェルのペプチド架橋が切断されて、ビーズの内容物が放出される。他の事例では、プロテアーゼを熱活性化してもよい。別の例では、ビーズは、セルロースを含有するシェル壁を含む。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。

【０３８４】

さらに、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誘導することもできる。温度の変化は、ビーズにさまざまな変化を引き起こしうる。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うる。別の事例では、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うる。また別の事例では、熱は、ビーズを収縮した脱水状態に変形させうる。さらに、熱は、ビーズの壁内の熱感受性ポリマーに作用して、ビーズの破壊を引き起こしうる。

【０３８５】

マイクロカプセルのビーズ壁に磁気ナノ粒子を含有させると、ビーズの破断トリガー、並びに多数のビーズの誘導を可能にしうる。本開示のデバイスは、いずれの目的で磁気ビーズを含んでもよい。一例では、高分子電解質含有ビーズにFe_3O_4ナノ粒子を組み込むと、振動磁界刺激の存在下で破断がトリガーされる。

【０３８６】

ビーズはまた、電気刺激の結果として破壊、溶解、又は分解することもできる。前のセクションに記載した磁気粒子と同様に、電気感受性ビーズも、ビーズの破断トリガー、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する。一例では、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。他の例では、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もでき、これにより、多孔性が増加しうる。

【０３８７】

また、光刺激を用いて、ビーズを破壊することもできる。多数の光トリガーが考えられ、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さまざまな分子を用いるシステムが挙げられる。たとえば、金属酸化物コーティングをカプセルトリガーとして用いることができる。SiO_2でコーティングされた高分子電解質カプセルのＵＶ照射は、ビーズ壁の崩壊を引き起こしうる。また別の例では、アゾベンゼン基などのフォトスイッチ材料をビーズ壁に組み込んでもよい。ＵＶ又は可視光線を適用すると、こうした化学物質は、光子の吸収時に、可逆的シス－トランス異性化を被る。この態様では、光子スイッチの組込みによって、光トリガー適用の際に、崩壊するか、又はより多孔性になりうるビーズ壁が得られる。

【０３８８】

たとえば、図２に示すバーコード（たとえば、確率バーコード）の非限定的な例におい

て、ブロック２０８での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、ビーズをブロック２１２のマイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに導入することができる。各マイクロウェルは、１つのビーズを含みうる。ビーズは、複数のバーコードを含みうる。バーコードは、ビーズに結合した５’アミン領域を含みうる。バーコードは、ユニバーサル標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、標的結合領域、又はそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【０３８９】

本明細書に開示するバーコードは、固体担体（たとえば、ビーズ）に関連（たとえば、結合）させることができる。固体担体と結合したバーコードは、各々、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うる。いくつかの実施形態では、固体担体と結合した異なるバーコードは、異なる配列の配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、固体担体と結合した、特定のパーセンテージのバーコードが、同じ細胞標識を含む。たとえば、そ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、或いはそうした近似値でありうる。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％でありうる。いくつかの実施形態では、固体担体と結合したバーコードは、同じ細胞標識を含みうる。異なる固体担体と結合したバーコードは、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、異なる細胞標識を含んでもよい。

【０３９０】

本明細書に開示するバーコードは、固体担体（たとえば、ビーズ）に関連（たとえば、結合）させることができる。いくつかの実施形態では、サンプル中の複数の標的にバーコードを付ける工程は、複数のバーコードと結合した複数の合成粒子を含む固体担体を用いて、実施することができる。いくつかの実施形態では、固体担体は、複数のバーコードと結合した複数の合成粒子を含みうる。さまざまな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うる。固体担体は、たとえば、２次元又は３次元の複数のバーコードを含みうる。合成粒子は、ビーズであってよい。ビーズは、シリカゲルビーズ、調節多孔性ガラスビーズ、磁気ビーズ、ダイナビーズ、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、又はそれらの任意の組合せであってよい。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うる。いくつかの実施形態では、固体担体は、浮動性であってよい。いくつかの実施形態では、固体担体は、半固体又は固体アレイに埋め込むことができる。バーコードは、固体担体と結合していなくてもよい。バーコードは、個別のヌクレオチドであってもよい。バーコードは、基材と結合してもよい。

【０３９１】

本明細書で用いられる場合、「テザー連結」、「結合」、及び「固定」という用語は、同義的に用いられて、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意味しうる。さまざまな異なるいずれの固体担体も、プレ合成されたバーコードを結合するための、又はバーコードをｉｎ　ｓｉｔｕ固相合成するための固体担体として使用することができる。

【０３９２】

いくつかの実施形態では、固体担体はビーズである。ビーズは、核酸を（たとえば共有結合又は非共有結合で）固定することができる、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体の１つ以上のタイプを包含しうる。ビーズは、たとえば、プラスチック、セラミック、金属、若しくは高分子材料、又はそれらの任意の組合せから構成されうる。ビーズは、離散粒子であるか、又はそれを含んでもよく、離散粒子は、球状（たと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、たとえば、立方体形、直方体形、角錐形、円柱形、円錐形、扁球形、ディスク形などを有する。いくつかの実施形態では、ビーズは、非球状の形状でありうる。

【０３９３】
ビーズは、限定されるものではないが、常磁性材料（たとえば、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（たとえば、フェライト（Fe_3O_4、マグネタイト）ナノ粒子）、強磁性材料（たとえば、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、並びにそれらの任意の組合せなどのさまざまな材料を含みうる。
【０３９４】
いくつかの実施形態では、ビーズ（たとえば、バーコード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では、ビーズは、ヒドロゲルを含む。
【０３９５】
本明細書に開示するいくつかの実施形態は、１つ以上の粒子（たとえば、ビーズ）を含む。粒子は各々、複数のオリゴヌクレオチド（たとえば、バーコード）を含みうる。複数のオリゴヌクレオチドは各々、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、細胞標識、及び標的結合領域（たとえば、オリゴ（ｄＴ）配列、遺伝子特異的配列、ランダム多量体、又はそれらの組合せ）を含みうる。複数のオリゴヌクレオチドの各々の細胞標識配列は、同じであってもよい。異なる粒子上のオリゴヌクレオチドの細胞標識配列は、異なる粒子上のオリゴヌクレオチドを同定できるように、相違してもよい。異なる細胞標識配列の数は、異なる実装において相違してもよい。いくつかの実施形態では、細胞標識配列の数は、１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、10^6、10^7、10^8、10^9、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はそれ以上、或いはそうした近似値でありうる。いくつかの実施形態では、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でありうる。いくつかの実施形態では、複数の粒子の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００以下、又はそれ以上が、同じ細胞配列のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、同じ細胞配列の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％、０．７％、０．８％、０．９％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％又はそれ以上であってよい。いくつかの実施形態では、複数の粒子のいずれも同じ細胞標識配列を含まない。
【０３９６】
各粒子の複数のオリゴヌクレオチドは、異なるバーコード配列（たとえば、分子標識）を含みうる。いくつかの実施形態では、バーコード配列の数は、１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、10^6、10^7、10^8、10^9、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値でありうる。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}でありうる。たとえば、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、又はそれ以上が、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では、標的の発生率（又はコピー若しくは数）と異なるバーコード配列の比は、少なくとも、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：３０、１：４０、１：５０、１：６０、１：７０、１：８０、１：９０、又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドの各々は、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、たとえば、ナノ粒子又はミクロ粒子であってよい。

【０３９７】

ビーズのサイズは、変動しうる。たとえば、ビーズの直径は、０．１マイクロメートル～５０マイクロメートルの範囲であってよい。いくつかの実施形態では、ビーズの直径は、０．１、０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０マイクロメートル、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値でありうる。

【０３９８】

ビーズの直径は、基材のウェルの直径と関連させることができる。いくつかの実施形態では、ビーズの直径は、ウェルの直径よりも、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値だけ長い若しくは短い長さであってよい。ビーズの直径は、細胞（たとえば、基材のウェルに閉じ込められた単一細胞）の直径に関連させることができる。いくつかの実施形態では、ビーズの直径は、ウェルの直径よりも、少なくとも、又は多くとも、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、若しくは１００％だけ長い若しくは短い長さであってよい。ビーズの直径は、細胞（たとえば、基材のウェルに閉じ込められた単一細胞）の直径に関連させることができる。いくつかの実施形態では、ビーズの直径は、細胞の直径よりも、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、３００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いはそうした近似値だけ長い若しくは短い長さであってよい。いくつかの実施形態では、ビーズの直径は、細胞の直径よりも、少なくとも、又は多くとも、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、１５０％、２００％、２５０％、若しくは３００％だけ長い若しくは短い長さであってもよい。

【０３９９】

ビーズは、基材への埋込み及び／又は結合が可能である。ビーズは、ゲル、ヒドロゲル、ポリマー、及び／又はマトリックスへの埋込み及び／又は結合が可能である。基材（たとえば、ゲル、マトリックス、スキャフォールド、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可能な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可能である。

【０４００】

ビーズの例としては、限定されるものではないが、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、Ｄｙｎａｂｅａｄ（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（たとえば、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）カルボキシル末端磁気ビーズが挙げられうる。

【０４０１】
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への関連付け（たとえばそれらによる含浸）が可能である。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への関連付けが可能である。ビーズは同定可能でありうる。たとえば、ビーズは、カメラを用いてイメージング可能である。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うる。たとえば、ビーズは、バーコードを含みうる。ビーズは、たとえば、有機又は無機の溶液中での膨潤に起因してサイズ変化しうる。ビーズは疎水性でありうる。ビーズは親水性でありうる。ビーズは生体適合性でありうる。
【０４０２】
固体担体（たとえばビーズ）は可視化可能である。固体担体は可視化タグ（たとえば蛍光色素）を含みうる。固体担体（たとえばビーズ）は識別子（たとえば数）でエッチング可能である。識別子はビーズのイメージングにより可視化可能である。
【０４０３】
固体担体は、不溶性、半溶解性、又は不溶性材料を含みうる。固体担体は、それに結合されたリンカー、スキャフォールド、構成単位、又は他の反応性部分を含む場合、「官能化された」と示されうる一方、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」でありうる。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（ｄｉｐｓｔｉｃｋ）などで、溶液中で遊離させた状態で用いられうる。
【０４０４】
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うる。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うる。固体担体は、シリカチップ、ミクロ粒子、ナノ粒子、プレート、アレイ、毛細管、平坦な担体、たとえば、ガラス繊維フィルター、ガラス表面、金属表面（鋼、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、フィルター、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（たとえば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリ二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（たとえば、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）、又はたとえばウエハー（たとえばシリコンウエハー）、フィルター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うる。
【０４０５】
固体担体は、ポリマーマトリックス（たとえば、ゲル、ヒドロゲル）を含みうる。ポリマーマトリックスは、細胞内空間（たとえば、オルガネラの周り）を透過することが可能でありうる。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が可能でありうる。
【０４０６】
基材及びマイクロウェルアレイ
本明細書で用いられる場合、基材はあるタイプの固体担体を意味しうる。基材は、本開示のバーコード又は確率バーコードを含みうる固体担体を意味しうる。基材は、たとえば、複数のマイクロウェルを含みうる。たとえば、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ってよい。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、規定の体積の小さい反応チャンバーを含みうる。いくつかの実施形態では、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では、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では、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では、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では、マイクロウェルは、単一細胞及び単一固体担体（たとえば、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うる。
【０４０７】
確率バーコーディングの方法
本開示は、身体サンプル（たとえば、組織、器官、腫瘍、細胞）における識別可能な位置の識別可能な標的の数を推定する方法を提供する。本方法は、サンプルと接近させてバーコード（たとえば、確率バーコード）を配置する工程と、サンプルを溶解させる工程と、識別可能な標的をバーコードと関連させる工程と、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と、を含みうる。本方法は、さらに、バーコード上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うる。いくつかの実施形態では、一方法は、サンプル中の複数の標識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の作製を含みうる。二次元マップ又は三次元マップは、サンプル中の複数の標的にバーコード（たとえば、確率バーコード）を付ける前又は後に作製することができる。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うる。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ステップを含みうる。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することができる。いくつかの実施形態では、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することができる。二次元マップ又は三次元マップの作製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と、サンプルを洗剤と接触させる工程と、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うる。
【０４０８】
いくつかの実施形態では、複数の標的に確率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（たとえば、確率バーコード付き標的）を作製する工程を含む。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きライブラリーを作製する工程を含みうる。バーコード付き標的のインデックス付きライブラリーを作製する工程は、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を含む固体担体を用いて実施することができる。
【０４０９】
サンプルとバーコードの接触
本開示は、サンプル（たとえば、細胞）を本開示の基材と接触させる方法を提供する。たとえば、細胞、器官、又は組織薄片を含むサンプルをバーコード（たとえば、確率バーコード）と接触させることができる。たとえば、重力流によって、細胞を接触させることができ、その場合、細胞は沈殿して単層を形成しうる。サンプルは、組織薄片であってよい。薄片を基材の上に配置することができる。サンプルは、一次元（たとえば、平面表面を形成する）であってよい。サンプル（たとえば、細胞）は、たとえば、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。
【０４１０】
バーコードが標的と近接して位置すると、標的は、バーコードとハイブリダイズしうる。識別可能な標的の各々が、本開示の識別可能なバーコードと結合しうるように、バーコードを非枯渇的比率で接触させることができる。標的とバーコード同士の効率的な結合を確実にするために、標的をバーコードと架橋させることができる。
【０４１１】
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可能である。細胞溶解は、さまざまな手段のいずれかにより、たとえば、化学的若しくは生化学的手段により、浸透圧ショックにより、又は熱溶解、機械溶解、若しくは光学溶解により達成可能である。細胞は、界面活性剤（たとえば、ＳＤＳ、Ｌｉドデシルスルフェート、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、Ｔｗｅｅｎ－２０、若しくはＮＰ－４０）、有機溶媒（たとえば、メタノール若しくはアセトン）、又は消化酵素（たとえば、プロテイナーゼＫ、ペプシン又は

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り溶解可能である。標的とバーコードとの関連付けを向上させるために、たとえば、温度の低下及び／又はライセートの粘度の増加により、標的分子の拡散速度を変化させることが可能である。

【０４１２】

いくつかの実施形態では、サンプルは濾紙を用いて溶解可能である。濾紙は濾紙の上を溶解緩衝液で浸漬可能である。濾紙は、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可能な加圧でサンプルに適用可能である。

【０４１３】

いくつかの実施形態では、溶解は、機械溶解、熱溶解、光学溶解、及び／又は化学溶解により行うことが可能である。化学溶解は、プロテイナーゼＫ、ペプシン、トリプシンなどの消化酵素の使用を含みうる。溶解は、基材への溶解緩衝液の添加により行うことが可能である。溶解緩衝液はトリスＨＣｌを含みうる。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又はそれ以上のトリスＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液は、多くとも約０．０１、０．０５、０．１、０．５、若しくは１Ｍ又はそれ以上のトリスＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液は約０．１Ｍトリス ＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液のｐＨは、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上でありうる。溶解緩衝液のｐＨは、多くとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液のｐＨは約７．５である。溶解緩衝液は塩（たとえばＬｉＣｌ）を含みうる。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又はそれ以上でありうる。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又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中の塩の濃度は約０．５Ｍである。溶解緩衝液は、界面活性剤（たとえば、ＳＤＳ、Ｌｉドデシルスルフェート、トリトンＸ、トゥイーン、ＮＰ－４０）を含みうる。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、少なくとも約０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、若しくは７％又はそれ以上でありうる。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、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％又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は約１％Ｌｉドデシルスルフェートである。本方法で溶解に使用される時間は、使用される界面活性剤の量に依存性しうる。いくつかの実施形態では、界面活性剤を多く使用するほど、溶解に必要な時間は短くなる。溶解緩衝液はキレート化剤（たとえば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ）を含みうる。溶解緩衝液中のキレート化剤の濃度は、少なくとも約１、５、１０、１５、２０、２５、若しくは３０ｍＭ又はそれ以上でありうる。溶解緩衝液中のキレート化剤の濃度は、多くとも約１、５、１０、１５、２０、２５、若しくは３０ｍＭ又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中のキレート化剤の濃度は約１０ｍＭである。溶解緩衝液は還元試薬（たとえば、βメルカプトエタノール、ＤＴＴ）を含みうる。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、２０ｍＭ又はそれ以上でありうる。溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は多くとも約１、５、１０、１５、２０ｍＭ又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、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では、溶解緩衝液は、約０．１Ｍのトリス ＨＣｌ、約ｐＨ７．５、約０．５Ｍ ＬｉＣｌ、約１％リチウムドデシルスルフェート、約１０ｍＭ ＥＤＴＡ、及び約５ｍＭ ＤＴＴを含みうる。

【０４１４】

溶解は、約４、１０、１５、２０、２５、又は３０℃の温度で行うことが可能である。溶解は、約１、５、１０、１５、若しくは２０分間又はそれ以上行うことが可能である。溶解細胞は、少なくとも約１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、若しくは７００００標的核酸分子又はそれ以上を含みうる。溶解細胞は、多くとも約１００００、２００００、３００００、４００００

、５０００００、６０００００、若しくは７０００００標的核酸分子又はそれ以上を含みうる。

【０４１５】

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の後、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することができる。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うる（たとえば、バーコードのオリゴ（ｄＴ）は、標的のポリ（Ａ）テールと相互作用可能である）。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（たとえば、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可能である。いくつかの実施形態では、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（たとえば、基板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）を含むとき、ｍＲＮＡ分子は、プローブにハイブリダイズして、逆転写されうる。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うる。たとえば、図２、ブロック２１６に示すバーコード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をハイブリダイズすることができる。たとえば、一本鎖ヌクレオチド断片は、バーコードの標的結合領域にハイブリダイズすることができる。

【０４１６】

結合は、バーコードの標的認識領域と標的核酸分子の一部とのライゲーションをさらに含みうる。たとえば、標的結合領域は、制限部位オーバーハング（たとえば、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うる核酸配列を含みうる。アッセイ手順は、制限部位オーバーハングを生成するために制限酵素（たとえばＥｃｏＲＩ）で標的核酸を処置する工程をさらに含みうる。次いで、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うる。リガーゼ（たとえばＴ４ＤＮＡリガーゼ）は２つの断片を連結するために使用しうる。

【０４１７】

たとえば、図２、ブロック２２０に図示するバーコードの非限定的な例では、複数の細胞（又は複数のサンプル）からの標識標的（たとえば、標的－バーコード分子）は、続いて、たとえば、チューブ中にプールすることができる。たとえば、バーコード及び／又は標的－バーコード分子が結合したビーズを回収することにより、標識標的をプールすることができる。

【０４１８】

結合した標的－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、磁気ビーズ及び外部印加磁界の使用により実現しうる。標的－バーコード分子をプールした後、すべてのさらなる処理を単一反応槽内で進行させることができる。さらなる処理は、たとえば、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うる。さらなる処理反応は、マイクロウェル内で、すなわち、複数の細胞の標識標的核酸分子を最初にプールすることなく、実施することができる。

【０４１９】

逆転写

本開示は、（たとえば、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部又は一部の相補的配列と（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）を含みうる。関連付けられたＲＮＡ分子の逆転写は、逆転写酵素と共に逆転写プライマーを添加することによって起こりうる。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うる。オリゴ（ｄＴ）プライマーは、１２～１８ヌクレオチド長、又は概ねそうしたヌクレオチド長であってよく、哺乳動物ｍＲＮＡの３’末端の内因性ポリ（Ａ）テールに結合することができる。ランダムヘキサヌクレオ

チドプライマーは、さまざまな相補的部位でｍＲＮＡと結合しうる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には対象のｍＲＮＡを選択的にプライミングする。

【０４２０】

いくつかの実施形態では標識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うる。いくつかの実施形態では、逆転写プライマーは、オリゴ（ｄＴ）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、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、さまざまな相補的部位でｍＲＮＡと結合しうる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には対象のｍＲＮＡを選択的にプライミングする。

【０４２１】

逆転写は、繰返し行うことにより複数の標識ｃＤＮＡ分子を生成可能である。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うる。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うる。

【０４２２】

増幅

核酸増幅反応（たとえば、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１回以上実施することができる。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される、多重方式で実施してよい。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ために使用することができる。増幅反応は、存在するのであれば、サンプル標識の少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。増幅反応は、細胞標識及び／又はバーコード配列（たとえば、分子標識）の少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。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（たとえば、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うる。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うる。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（たとえば、分子標識）を含む標的－バーコード分子のｃＤＮＡコピーを１つ以上生成するために、ｃＤＮＡ合成反応を１回以上行う工程をさらに含みうる。

【０４２３】

いくつかの実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、増幅を実施することができる。本明細書で用いられる場合、ＰＣＲとは、ＤＮＡの相補鎖の同時プライマー伸長により特定のＤＮＡ配列のｉｎ　ｖｉｔｒｏ増幅を行う反応を意味しうる。本明細書で用いられる場合、ＰＣＲは、その反応の派生形、たとえば、限定されるものではないが、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、及びアセンブリーＰＣＲを包含しうる。

【０４２４】

標識核酸の増幅は、非ＰＣＲベースの方法を含みうる。非ＰＣＲベースの方法の例としては、限定されるものではないが、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Ｑβレプリカーゼ（Ｑβ）法、パリンドロームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを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の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では、増幅は、環化転写物を生成しうる。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示する方法は、標識アンプリコン（たとえば、確率標識アンプリコン）を生成するために標識核酸（たとえば、標識ＲＮＡ、標識ＤＮＡ、標識ｃＤＮＡ）上でポリメラーゼ連鎖反応を実施する工程をさらに含む。標識アンプリコンは、二本鎖分子であってよい。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分子を含みうる。二本鎖分子の一方又は両方の鎖は、サンプル標識、空間標識、細胞標識、及び／又はバーコード（たとえば、分子標識）を含みうる。標識アンプリコンは、一本鎖分子でありうる。一本鎖分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はそれらの組合せを含みうる。本開示の核酸は、合成核酸又は改変核酸を含みうる。

【０４２６】

増幅は、１つ以上の非天然ヌクレオチドの使用を含みうる。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うる。非天然ヌクレオチドの例としては、限定されるものではないが、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ核酸、及びロックド核酸（ＬＮＡ）、さらにはグリコール核酸（ＧＮＡ）及びトレオース核酸（ＴＮＡ）が挙げられうる。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することができる。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ために使用しうる。

【０４２７】

増幅反応を１回以上行う工程は、１つ以上のプライマーの使用を含みうる。１つ以上のプライマーは、たとえば、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以上を含みうる。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以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、１２～１５ヌクレオチド未満を含みうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識標的（たとえば、確率標識標的）の少なくとも一部にアニールしうる。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’末端にアニールしうる。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うる。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うる。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うる。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うる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のコントロールプライマーを含みうる。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うる。

【０４２８】

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うる。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うる。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（たとえば、分子標識）、標的、又はそれらの任意の組合せにアニールしうる。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うる。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しうる。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うる。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うる。１つ以上のプライマーは、少なくとも９６カスタムプライマー又はそれ

以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも９６０カスタムプライマー又はそれ以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも９６００カスタムプライマー又はそれ以上を含みうる。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うる。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うる。

【０４２９】

任意の増幅スキームを本開示の方法で使用することができる。たとえば、一スキームでは、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配列がフランキングするネステッド遺伝子特異的プライマーとユニバーサル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とを用いて第１のＰＣＲ産物を増幅可能である。第３ラウンドのＰＣＲは、Ｐ５及びＰ７とサンプルインデックスを付加して、ＰＣＲ産物をＩｌｌｕｍｉｎａシーケンシングライブラリーにする。１５０ｂｐ×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（たとえば、分子標識）、リード２上の遺伝子、並びにインデックス１リード上のサンプルインデックスを明らかにしうる。

【０４３０】

いくつかの実施形態では、核酸は、化学切断を用いて基材から除去可能である。たとえば、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ために使用可能である。たとえば、酵素は、基材から核酸を除去するために使用可能である。たとえば、核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化による基材からの除去が可能である。たとえば、ｄＵＴＰ又はｄｄＵＴＰを含有する核酸のウラシル－ｄ－グリコシラーゼ（ＵＤＧ）処理は、基材から核酸を除去するために使用可能である。たとえば、核酸は、ヌクレオチド切除を行う酵素、たとえば、塩基除去修復酵素、たとえば、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可能である。いくつかの実施形態では、核酸は、光切断性基と光とを用いて基材から除去可能である。いくつかの実施形態では、切断性リンカーは、基材から核酸を除去するために使用可能である。たとえば、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－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つを含みうる。

【０４３１】

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／又は増幅が可能である。いくつかの実施形態では、核酸が合成された後（たとえば、逆転写された後）、増幅が可能である。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される条件で、多重方式で行いうる。増幅は、核酸にシーケンシングアダプターを付加しうる。

【０４３２】

いくつかの実施形態では、増幅は、たとえばブリッジ増幅を用いて基材上に行うことが可能である。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していた末端を生成するために、ｃＤＮＡにホモポリマーテールを付加することが可能である。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ペアの第１のプライマーでありうる。テンプレート核酸を含有するサンプルが粒子に接触して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し、且つ第１のプライマーはヌクレオチドの付加により順方向に伸長して、テンプレート分子とテンプレートに相補的な新たに形成されたＤＮＡ鎖と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鎖を残存させる。続くアニーリング・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可能である。このハイブリダイゼーションにより、相補鎖は、共有結合により第１のプライマーに且つハイブリダイゼーションにより第２のプライマーに固定されたブリッ

ジを第１及び第２のプライマー間に形成可能である。伸長段階では、第２のプライマーは、同一の反応混合物中にヌクレオチドを添加することにより反対方向に伸長し、それによりブリッジを二本鎖ブリッジに変換可能である。次いで、次のサイクルが開始され、二本鎖ブリッジは変性されて、それぞれ第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、それぞれ未結合の状態の他方の末端と、を有する２つの一本鎖核酸分子を与えることが可能である。この第２のサイクルのアニーリング・伸長工程では、各鎖は同一の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可能である。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可能である。

【０４３３】

増幅反応は、複数の核酸の少なくとも１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、又は１００％を増幅する工程を含みうる。

【０４３４】

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うる。標識核酸の増幅は、標識核酸の指数関数的増幅を含みうる。標識核酸の増幅は、標識核酸の線形増幅を含みうる。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により行うことが可能である。ＰＣＲは、ＤＮＡの相補鎖の同時プライマー伸長により特定のＤＮＡ配列のｉｎ　ｖｉｔｒｏ増幅を行う反応を意味しうる。ＰＣＲは、その反応の派生形、たとえば、限定されるものではないが、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、サプレッションＰＣＲ、セミサプレッシブＰＣＲ、及びアセンブリーＰＣＲを包含しうる。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、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、限定されるものではないが、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）、Ｑβレプリカーゼ（Ｑβ）、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の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。

【０４３６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、増幅アンプリコン（たとえば標的）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うる。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分子を含みうる。二本鎖分子の一方又は両方の鎖は、サンプルタグ又は分子識別子標識を含みうる。代替的に、アンプリコンは一本鎖分子でありうる。一本鎖分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、又はそれらの組合せを含みうる。本発明の核酸は、合成核酸又は改変核酸を含みうる。

【０４３７】

いくつかの実施形態では、本方法は、多数のアンプリコンを生成するために標識核酸を繰返し増幅する工程を含む。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うる。代替的に、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。

【０４３８】

増幅工程は、複数の核酸を含む１つ以上のサンプルに１つ以上のコントロール核酸を添加する工程をさらに含みうる。増幅工程は、複数の核酸に１つ以上のコントロール核酸を添加する工程をさらに含みうる。コントロール核酸は、コントロール標識を含みうる。

【０４３９】

増幅は、１つ以上の非天然ヌクレオチドの使用を含みうる。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うる。非天然ヌクレオチドの例としては、限定されるものではないが、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ核酸及びロックド核酸（ＬＮＡ）、さらにはグリコール核酸（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しうる。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ために使用しうる。

【０４４０】

増幅反応を１回以上行う工程は、１つ以上のプライマーの使用を含みうる。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うる。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うる。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うる。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うる。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’末端にアニールしうる。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うる。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うる。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うる。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うる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のコントロールプライマーを含みうる。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うる。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うる。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うる。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うる。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うる。カスタムプライマー、１つ以上の標的核酸を増幅するように設計しうる。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うる。いくつかの実施形態では、プライマーには、本開示のアレイに結合されたプローブである。

【０４４１】

いくつかの実施形態では、サンプル中の複数の標的にバーコード（たとえば、確率バーコード）を付ける工程は、バーコード付き標的（たとえば、確率バーコード付き標的）又は標的のバーコード付き断片の指標インデックスライブラリーを作製する工程をさらに含む。異なるバーコードのバーコード配列（たとえば、異なる確率バーコードの分子標識）は、互いに異なっていてもよい。バーコード付き標的の指標インデックス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指標インデックスポリヌクレオチドを作製する工程を含む。たとえば、第１の指標インデックス標的と第２の指標インデックス標的とを含むバーコード標的の指標インデックスライブラリーの場合、第１の指標インデックスポリヌクレオチドの標識領域は、第２の指標インデックス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ヌクレオチド異なって、概ね、少なくとも、若しくは多くともこうした値、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異なってもよい。いくつかの実施形態では、バーコード付き標的の指標インデックスライブラリーを作製する工程は、ポリ（Ｔ）領域及び標識領域などの複数のオリゴヌクレオチドと、複数の標識、たとえば、ｍＲＮＡ分子を接触させる工程と；各々がｃＤＮＡ領域及び標識領域を含む一本鎖標識ｃＤＮＡ分子を生成するために、逆転写酵素を用いて、第１鎖合成を実施する工程と、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指標インデックスライブラリーを作製する工程は、さらに、二本鎖標識ｃＤＮＡ分子を生成するために、一本鎖標識ｃＤＮＡ分子を増幅する工程と；標識アンプリコンを生成するために、二本鎖標識ｃＤＮＡ分子上でネステッドＰＣＲを実施する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、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うる。

【０４４２】

バーコーディング（たとえば、確率バーコーディング）は、個々の核酸（たとえば、ＤＮＡ又はＲＮＡ）分子を標識するために、核酸バーコード若しくはタグを使用することを含む。いくつかの実施形態では、これは、ＤＮＡバーコード若しくはタグがｍＲＮＡから生成される際に、ｃＤＮＡ分子にこれらを付加する工程を含む。ネステッドＰＣＲは、ＰＣＲ増幅バイアスの最小限化を実施することができる。アダプターは、たとえば、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することができる。シーケンシング結果を用いて、たとえば、図２のブロック２３２に位置する標的の１つ以上のコピーの細胞標識、分子標識、及びヌクレオチド断片の配列を決定することができる。

【０４４３】

図３は、バーコード付き標的（たとえば確率バーコード付き標的）インデックス付きライブラリー、たとえばバーコード付きｍＲＮＡ又はその断片などを作製する非限定的な例示的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、細胞標識、及びユニバーサルＰＣＲ部位を含む各ｍＲＮＡ分子をコードすることができる。特に、ＲＮＡ分子３０２のポリ（Ａ）テール領域３０８への、バーコード（たとえば確率バーコード）３１０）のセットのハイブリダイゼーション（たとえば確率論的ハイブリダイゼーション）によって、ＲＮＡ分子３０２を逆転写して、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の各々は、標的結合領域、たとえばポリ（ｄＴ）領域３１２、標識領域３１４（たとえば、バーコード配列又は分子）、及びユニバーサルＰＣＲ領域３１６を含みうる。

【０４４４】

いくつかの実施形態では、細胞標識は、３～２０ヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、分子標識は、３～２０ヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、複数の確率バーコードの各々は、１つ以上のユニバーサル標識及び細胞標識をさらに含み、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では、ユニバーサル標識は、３～２０ヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、細胞標識は、３～２０ヌクレオチドを含む。

【０４４５】

いくつかの実施形態では、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を含みうる。いくつかの実施形態では、標識領域３１４は、１つ以上のユニバーサル標識、次元標識、及び細胞標識を含みうる。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っても、概ね、少なくとも、若しくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、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ってもよい。細胞標識３２０は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００ヌクレオチド長であっても、概ね、少なくとも、若しくは多くともそうしたヌクレオチド長であっ

てもよいし、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ってもよい。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っても、概ね、少なくとも、若しくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、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ってもよい。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ってもよく、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ってもよい。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っても、概ね、少なくとも、若しくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、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ってもよい。

【０４４６】

いくつかの実施形態では、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、概ねそうした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うした値の異なる標識、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、たとえば、バーコード配列又は分子標識３１８及び細胞標識３２０などを含みうる。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っても、概ね、少なくとも、若しくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、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ってもよい。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、概ねそうした値のバーコード又は確率バーコード識別子標識３１０を含むか、少なくとも、若しくは多くともそうした値のバーコード又は確率バーコード３１０、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を含みうる。また、バーコード又は確率バーコード３１０のセットは、たとえば、各々、ユニーク標識領域３１４を含みうる。余剰のバーコード又は確率バーコード３１０を除去するために、標識ｃＤＮＡ分子３０４を精製することができる。精製は、Ａｍｐｕｒｅビーズ精製を含みうる。

【０４４７】

工程２に示すように、工程１の逆転写プロセスからの産物を１チューブ中にプールし、第１ＰＣＲプライマープール及び第１ユニバーサルＰＣＲプライマーを用いてＰＣＲ増幅することができる。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、ネステッドＰＣＲ標識アンプリコン３２２を生成するために、標識ｃＤＮＡ分子３０４を増幅することができる。増幅は、多重ＰＣＲ増幅を含みうる。増幅は、単一反応量で９６多重プライマーを用いる多重ＰＣＲ増幅を含みうる。いくつかの実施形態では、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使用するか、概ねそうした値の多重プライマー、少なくとも、若しくは多くともそうした値の多重プライマーを使用するか、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使用することができる。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と、ユニバーサルプライマー３２８とを含む第１ＰＣＲプライマープール３２４を使用することを含みうる。カスタムプライマー３２６は、標識ｃＤＮＡ分子３０４のｃＤＮＡ部分３０６’内の１領域とハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー３２８は、標識ｃＤＮＡ分子３０４のユニバーサルＰＣＲ領域３１６とハイブリダイズすることができる。

【０４４８】

図３の工程３に示すように、工程２のＰＣＲ増幅からの産物は、ネステッドＰＣＲプラ

イマープール及び第２ユニバーサルＰＣＲプライマーを用いて増幅することができる。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によりさらに増幅することもできる。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と、第２ユニバーサルＰＣＲプライマー３２８’とを含む多重ＰＣＲを含みうる。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、概ねそうした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うした値の異なるネステッドＰＣＲプライマー３３０、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を含みうる。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１領域とハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー３２８’は、アダプター３３６を含有して、標識アンプリコン３２２のユニバーサルＰＣＲ領域３１６とハイブリダイズすることができる。このようにして、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では、ネステッドＰＣＲプライマー３３２と第２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。それに代わり、アダプター３３４及び３３６は、アダプター標識アンプリコン３３８を生成するために、ネステッドＰＣＲの産物とライゲートすることができる。

【０４４９】

工程４に示すように、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増幅することができる。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に対するアッセイをさらに１回以上実施することができる。アダプター３３４及び３３６は、プライマー３４０及び３４２とハイブリダイズすることができる。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ってよい。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ってよい。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することができる。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することができる。プライマー３４２は、プレート指標インデックス３４４を含有することができ、これによって、バーコード又は確率バーコード３１０の同じセットを用いて生成されたアンプリコンを、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を用いた１回のシーケンシング反応でシーケンシングすることができる。

【０４５０】

オリゴヌクレオチドに関連する細胞成分結合試薬を含む組成物

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）を各々が含む複数の組成物を提供し、オリゴヌクレオチドは、それがコンジュゲートされている細胞成分結合試薬のためのユニーク識別子を含む。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、細胞成分標的に特異的に結合することが可能である。たとえば、細胞成分結合試薬の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）は、抗原標的又はタンパク質標的に特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、確率バーコードなどのバーコードを含みうる。バーコードは、バーコード配列（たとえば、分子標識）、細胞標識、サンプル標識、又はそれらの任意の組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、ポリ（Ａ）

テールなどのオリゴヌクレオチドプローブに対する結合部位を含みうる。たとえば、ポリ（Ａ）テールは、たとえば、固体担体に固定されていなくても、固体担体に固定されてもよい。ポリ（Ａ）テールは、約１０～５０ヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）テールは、１８ヌクレオチド長でありうる。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、又はその両方を含みうる。

【０４５１】

ユニーク識別子は、たとえば、約４ヌクレオチド～約２００ヌクレオチドの任意の好適な長さを有する、たとえば、ヌクレオチド配列でありうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、２５ヌクレオチド～約４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列である。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、２００ヌクレオチドであるか、概ねそうした値のヌクレオチドであるか、そうした値よりも小さいか、大きいか、又は上の値のいずれか２つの間の範囲の長さを有しうる。

【０４５２】

いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。一意識別子の多様なセットは、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、５０００、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異なる一意識別子を含むか、又はこれらの近似値の異なる一意識別子を含みうる。一意識別子の多様なセットは、少なくとも、又は多くとも、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、若しくは５０００の異なる一意識別子を含みうる。いくつかの実施形態では、一意識別子のセットは、分析されるサンプルのＤＮＡ又はＲＮＡ配列と最小限の配列相同性を有するように設計される。いくつかの実施形態では、一意識別子のセットの配列は、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチドだけ互いに異なるか、又はその相補体である。いくつかの実施形態では、一意識別子のセットの配列は、少なくとも、又は多くとも、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチドだけ互いに異なるか、又はその相補体である。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子のセットの配列は、少なくとも３％、少なくとも５％、少なくとも８％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、若しくはそれ以上互いに異なるか、又はその相補体である。

【０４５３】

いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する結合部位を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する少なくとも２つの結合部位を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する少なくとも３つの結合部位を含みうる。プライマーは、たとえば、ＰＣＲ増幅による、ユニーク識別子の増幅のために使用することができる。いくつかの実施形態では、プライマーは、ネステッドＰＣＲ反応のために使用することができる。

【０４５４】

本開示においては、タンパク質結合試薬、抗体又は若しくはその断片、アプタマー、小分子、リガンド、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど、又はそれらの任意の組合せなど、任意の好適な細胞成分結合試薬が考慮される。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試

薬は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、一本鎖抗体（ｓｃ－Ａｂ）、又はそれらの断片、たとえば、Ｆａｂ、Ｆｖなどでありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬は、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、５０００、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異なる細胞成分試薬を含むか、又はこれらの近似値の異なる細胞成分試薬を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬は、少なくとも、又は多くとも、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、若しくは５０００の異なる細胞成分試薬を含みうる。

【０４５５】

オリゴヌクレオチドは、種々の機構により細胞成分結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、共有結合により細胞成分結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、非共有結合により細胞成分結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬とコンジュゲートされる。リンカーは、たとえば、細胞成分結合試薬及び／若しくはオリゴヌクレオチドから切断可能又は脱離可能でありうる。いくつかの実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドを細胞成分結合試薬に可逆的に結合する化学基を含みうる。化学基は、リンカーに、たとえば、アミノ基を介してコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、リンカーは、細胞成分結合試薬にコンジュゲートされた別の化学基と安定な結合を形成する化学基を含みうる。たとえば、化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミンなどでありうる。いくつかの実施形態では、化学基は、リジンなどのアミノ酸の一級アミン、又はＮ末端を介して細胞成分結合試薬にコンジュゲートされうる。Ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｏｌｉｇｏコンジュゲーションキット（Ｓｏｌｕｌｉｎｋ，Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、Ｔｈｕｎｄｅｒ－Ｌｉｎｋ（登録商標）オリゴコンジュゲーションシステム（Ｉｎｎｏｖａ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ）などの市販のコンジュゲーションキットが、オリゴヌクレオチドを細胞成分結合試薬にコンジュゲートするために使用されうる。

【０４５６】

細胞成分結合試薬とその細胞成分標的との間の特異的な結合に干渉しない限り、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）の任意の好適な部位にコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体などのタンパク質である。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体ではない。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、抗原－結合部位、たとえば、Ｆｃ領域、$C_{H}1$ドメイン、$C_{H}2$ドメイン、$C_{H}3$ドメイン、C_{L}ドメインなど以外の抗体のどの部位にでもコンジュゲートされうる。オリゴヌクレオチドを細胞成分結合試薬（たとえば、抗体）にコンジュゲートする方法は、たとえば、米国特許第６，５３１，２８３号明細書において以前に開示されており、その内容は、全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。細胞成分結合試薬に対するオリゴヌクレオチドの化学量論は変動しうる。シーケンシングにおいて細胞成分結合試薬特異的なオリゴヌクレオチドを検出する感度を増大させるために、コンジュゲーション中に細胞成分結合試薬に対するオリゴヌクレオチドの比を増加させることが有利でありうる。いくつかの実施形態では、各細胞成分結合試薬は、単一のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、各細胞成分結合試薬は、２個以上のオリゴヌクレオチド分子、たとえば、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００個、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オリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうるが、ここで、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じか、又は異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、各細胞成分結合試薬は、２個以上のオリゴヌクレオチド分子、たとえば、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、１０、２０、３０

、４０、５０、１００、１０００個のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうるが、ここで、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じか、又は異なる一意識別子を含む。

【０４５７】

いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬は、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍サンプル、血液サンプルなどのサンプル中において複数の細胞成分標的に特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分は、細胞又は生物におけるすべての細胞成分（たとえば、タンパク質）のうち、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分は、細胞又は生物におけるすべての細胞成分（たとえば、タンパク質）のうち、少なくとも、又は多くとも、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、若しくは９９％でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、１００００、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異なる細胞成分標的を含むか、又はこれらの近似値の異なる細胞成分標的を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、１００００の異なる細胞成分標的を含みうる。

【０４５８】

図４は、例示的な細胞成分結合試薬、たとえば、抗体に対する一意識別子配列を含むオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされている抗体の概略図を示す。細胞成分結合試薬とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド、細胞成分結合試薬とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、又は細胞成分結合試薬と先にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、本明細書で抗体オリゴヌクレオチド（結合試薬オリゴヌクレオチドと省略される）と呼ばれうる。抗体とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド、抗体とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、又は抗体と先にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、本明細書で抗体オリゴヌクレオチド（「Ａｂオリゴ」又は「ＡｂＯ」と省略される）と呼ばれうる。オリゴヌクレオチドはまた、限定されるものではないが、１つ以上のリンカー、抗体に対する１つ以上の一意識別子、任意選択で１つ以上のバーコード配列（たとえば、分子標識）、及びポリ（Ａ）テールを包含する、追加の成分を含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、５’から３’に向かって、リンカー、一意識別子、バーコード配列（たとえば、分子標識）、及びポリ（Ａ）テールを含みうる。抗体オリゴヌクレオチドは、ｍＲＮＡ模倣体でありうる。

【０４５９】

図５は、例示的な細胞成分結合試薬、たとえば、抗体に対する一意識別子配列を含むオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされている抗体の概略図を示す。細胞成分結合試薬は、抗原標的又はタンパク質標的などの少なくとも１つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能でありうる。結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、又は抗体オリゴヌクレオチド）は、本開示の方法を行うための配列（たとえば、サンプルインデックス付加配列）を含みうる。たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列を含みうる。細胞成分結合試薬を含む複数の組成物のうちの２つ細胞成分結合試薬を含む少なくとも２つの組成物（たとえば、サンプルインデックス付加組成物）のインデックス付加配列（たとえば、サンプルインデックス付加配列）は、異なる配列を含みうる。いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチ

ドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でない。結合試薬オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。

【０４６０】

細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、たとえば、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、又はそれらの組合せを含みうる。細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、ｍＲＮＡ模倣体でありうる。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードのうち少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みうる。標的結合領域は、たとえば、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、バーコードの捕捉配列に相補的なサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識を含みうる。

【０４６１】

いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルオリゴヌクレオチド）は、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００ヌクレオチド長、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いは概ねそうしたヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチドは、少なくとも、又は多くとも６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、若しくは１０００ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。

【０４６２】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体、テトラマー、アプタマー、タンパク質スキャフォールド、又はそれらの組合せを含む。結合試薬オリゴヌクレオチドは、たとえば、リンカーを介してタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。結合試薬オリゴヌクレオチドが、そのリンカーを含みうる。リンカーは化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬の分子に可逆的に又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、及びそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０４６３】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、ＡＤＡＭ１０、ＣＤ１５６ｃ、ＡＮＯ

６、ＡＴＰ１Ｂ２、ＡＴＰ１Ｂ３、ＢＳＧ、ＣＤ１４７、ＣＤ１０９、ＣＤ２３０、ＣＤ２９、ＣＤ２９８、ＡＴＰ１Ｂ３、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４７、ＣＤ５１、ＣＤ５９、ＣＤ６３、ＣＤ９７、ＣＤ９８、ＳＬＣ３Ａ２、ＣＬＤＮＤ１、ＨＬＡ－ＡＢＣ、ＩＣＡＭ１、ＩＴＦＧ３、ＭＰＺＬ１、ＮＡ Ｋ ＡＴＰａｓｅ ａｌｐｈａ１、ＡＴＰ１Ａ１、ＮＰＴＮ、ＰＭＣＡ ＡＴＰａｓｅ、ＡＴＰ２Ｂ１、ＳＬＣ１Ａ５、ＳＬＣ２９Ａ１、ＳＬＣ２Ａ１、ＳＬＣ４４Ａ２、又はそれらの任意の組合せに結合することができる。

【０４６４】

いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。いくつかの実施形態では、抗原又はタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合わせであるか、又はそれを含む。抗原又はタンパク質標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せでありうるか、又はそれを含みうる。タンパク質標的は、いくつかのタンパク質標的を含む群から選択されうる。抗原又はタンパク質標的の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。タンパク質標的の数は、少なくとも、又は多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、若しくは１００００でありうる。

【０４６５】

細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）は、同一の配列を有する２つ以上の結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）に関連付けられうる。細胞成分結合試薬は、異なる配列を有する２つ以上の結合試薬オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。細胞成分結合試薬に関連付けられた結合試薬オリゴヌクレオチドの数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチドの数は、同一の配列、又は異なる配列を有するものであろうとなかろうと、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、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００でありうる。

【０４６６】

細胞成分結合試薬を含む複数の組成物（たとえば、複数のサンプルインデックス付加組成物）は、結合試薬オリゴヌクレオチド（サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドなど）とコンジュゲートされていない１つ以上の追加の細胞成分結合試薬（本明細書で結合試薬オリゴヌクレオチドフリー細胞成分結合試薬（サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドフリー細胞成分結合試薬など）とも呼ばれる）を含みうる。複数の組成物における追加の細胞成分結合試薬の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、追加の細胞成分結合試薬の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、追加の細胞成分結合試薬の数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、若しくは１００でありうる。細胞成分結合試薬及び追加の細胞成分結合試薬のうちのい

ずれかは、いくつかの実施形態において、同一でありうる。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、１つ以上の結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）とコンジュゲートされている細胞成分結合試薬及び結合試薬オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない細胞成分結合試薬を含む混合物が提供される。その混合物を本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において使用して、たとえば、サンプル及び／又は細胞を接触させることができる。混合物中の（１）結合試薬オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた細胞成分結合試薬の数と（２）結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）又は他の結合試薬オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない別の細胞成分結合試薬（たとえば、同じ細胞成分結合試薬）の数の比は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、比は、少なくとも、又は多くとも１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：２１、１：２２、１：２３、１：２４、１：２５、１：２６、１：２７、１：２８、１：２９、１：３０、１：３１、１：３２、１：３３、１：３４、１：３５、１：３６、１：３７、１：３８、１：３９、１：４０、１：４１、１：４２、１：４３、１：４４、１：４５、１：４６、１：４７、１：４８、１：４９、１：５０、１：５１、１：５２、１：５３、１：５４、１：５５、１：５６、１：５７、１：５８、１：５９、１：６０、１：６１、１：６２、１：６３、１：６４、１：６５、１：６６、１：６７、１：６８、１：６９、１：７０、１：７１、１：７２、１：７３、１：７４、１：７５、１：７６、１：７７、１：７８、１：７９、１：８０、１：８１、１：８２、１：８３、１：８４、１：８５、１：８６、１：８７、１：８８、１：８９、１：９０、１：９１、１：９２、１：９３、１：９４、１：９５、１：９６、１：９７、１：９８、１：９９、１：１００、１：２００、１：３００、１：４００、１：５００、１：６００、１：７００、１：８００、１：９００、１：１０００、１：２０００、１：３０００、１：４０００、１：５０００、１：６０００、１：７０００、１：８０００、１：９０００、若しくは１：１００００でありうる。

【０４６８】

いくつかの実施形態では、比は、１：１、１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．５：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１、６０：１、６１：１、６２：１、６３：１、６４：１、６５：１、６６：１、６７：１、６８：１、６９：１、７０：１、７１：１、７２：１、７３：１、７４：１、７５：１、７６：１、７７：１、７８：１、７９：１、８０：１、８１：１、８２：１、８３：１、８４：１、８５：１、８６：１、８７：１、８８：１、８９：１、９０：１、９１：１、９２：１、９３：１、９４：１、９５：１、９６：１、９７：１、９８：１、９９：１、１００：１、２００：１、３００：１、４００：１、５００：１、６００：１、７００：１、８００：１、９００：１、１０００：１、２０００：１、３０００：１、４０００：１、５０００：１、６０００：１、７０００：１、８０００：１、９０００：１、１００００：１、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、比は、少なくとも、又は多くとも１：１、１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、

１．８：１、１．９：１、２：１、２．５：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１、６０：１、６１：１、６２：１、６３：１、６４：１、６５：１、６６：１、６７：１、６８：１、６９：１、７０：１、７１：１、７２：１、７３：１、７４：１、７５：１、７６：１、７７：１、７８：１、７９：１、８０：１、８１：１、８２：１、８３：１、８４：１、８５：１、８６：１、８７：１、８８：１、８９：１、９０：１、９１：１、９２：１、９３：１、９４：１、９５：１、９６：１、９７：１、９８：１、９９：１、１００：１、２００：１、３００：１、４００：１、５００：１、６００：１、７００：１、８００：１、９００：１、１０００：１、２０００：１、３０００：１、４０００：１、５０００：１、６０００：１、７０００：１、８０００：１、９０００：１、若しくは１００００：１でありうる。

【０４６９】

細胞成分結合試薬は、結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）とコンジュゲートされても、又はされなくてもよい。いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされている細胞成分結合試薬及び結合試薬オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない細胞成分結合試薬を含む混合物中の結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）とコンジュゲートされた細胞成分結合試薬のパーセンテージは、０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、混合物中のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた細胞成分結合試薬のパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％でありうる。

【０４７０】
いくつかの実施形態では、結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）とコンジュゲートされた細胞成分結合試薬及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない細胞成分結合試薬を含む混合物中の結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）とコンジュゲートされていない細胞成分結合試薬のパーセンテージは、０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、混合物中の結合試薬オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない細胞成分結合試薬のパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％でありうる。

【０４７１】
細胞成分カクテル
いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬のカクテル（たとえば、抗体カクテル）を用いて、本明細書に開示される方法において標識感度を増大させることができる。何らかの特定の理論に制約されるものではないが、これは、細胞成分発現又はタンパク質発現が、細胞型及び細胞状態ごとに変動しうるため、すべての細胞型を標識する汎用の細胞成分結合試薬又は抗体を発見することが困難であるためであると考えられる。たとえば、細胞成分結合試薬のカクテルを用いて、より多くのサンプルタイプのより高感度且つ高効率の標識を可能にする。細胞成分結合試薬のカクテルは、２つ以上の異なるタイプの細胞成分結合試薬、たとえば、より広い範囲の細胞成分結合試薬又は抗体を含みうる。さまざまな細胞成分標的を標識する細胞成分結合試薬が、一緒に合わされて、すべての細胞型、又は対象とする１つ以上の細胞型を十分に標識するカクテルを生成することができる。

【０４７２】
いくつかの実施形態では、複数の組成物（たとえば、サンプルインデックス付加組成物）の各々が、細胞成分結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物の組成物が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含み、２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）に関

連付けられ、２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられた結合試薬オリゴヌクレオチドの配列は、同一でありうる。２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられた結合試薬オリゴヌクレオチドの配列は、異なる配列を含みうる。複数の組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。

【０４７３】

組成物中の異なるタイプの細胞成分結合試薬（たとえば、ＣＤ１４７抗体及びＣＤ４７抗体）の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。２つ以上の異なるタイプの細胞成分結合試薬を含む組成物は、本明細書で細胞成分結合試薬カクテル（たとえば、サンプルインデックス付加組成物カクテル）と呼ばれうる。カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合試薬の数は、変化しうる。いくつかの実施形態では、カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合試薬の数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、カクテル中の異なるタイプの細胞成分結合試薬の数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、若しくは１０００００でありうる。異なるタイプの細胞成分結合試薬は、同じ又は異なる配列（たとえば、サンプルインデックス付加配列）を有する結合試薬オリゴヌクレオチドにコンジュゲートされうる。

【０４７４】

細胞成分標的の定量分析の方法

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法はまた、本明細書に開示される組成物、及びバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）のオリゴヌクレオチドに関連付けすることができるオリゴヌクレオチドプローブを使用する、サンプル中の複数の細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的）の定量分析に使用されうる。細胞成分結合試薬のオリゴヌクレオチドは、抗体オリゴヌクレオチド、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、細胞同定オリゴヌクレオチド、コントロール粒子オリゴヌクレオチド、コントロールオリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなどであるか、又はそれを含みうる。いくつかの実施形態では、サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍サンプル、血液サンプルなどでありうる。いくつかの実施形態では、サンプルは、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、母体細胞、胎児細胞などの細胞型の混合物、又は異なる対象由来の細胞の混合物を含みうる。

【０４７５】

いくつかの実施形態では、サンプルは、マイクロウェルアレイ中のマイクロウェルなどの個別の区画に分離された複数の単一細胞を含みうる。

【０４７６】

いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的（すなわち、細胞成分標的）の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、タンパク質標的である。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分は、生物におけるすべてのコードされた細胞成分のうち、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、

少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１０００、少なくとも１００００、又はそれ以上の異なる細胞成分標的を含みうる。

【０４７７】

いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬は、複数の細胞成分標的との特異的な結合のためのサンプルと接触する。未結合の細胞成分結合試薬は、たとえば、洗浄によって、除去されうる。サンプルが細胞を含む実施形態では、細胞に特異的に結合されないあらゆる細胞成分結合試薬が除去されうる。

【０４７８】

いくつかの例では、細胞集団に由来する細胞は、本開示の基材のウェルに分離（たとえば、単離）されうる。細胞集団は、分離の前に希釈されうる。細胞集団は、基材のウェルの少なくとも１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％又は１００％が単一細胞を受け入れるように希釈されうる。細胞集団は、基材のウェルの多くとも１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、又は１００％が単一細胞を受け入れるように希釈されうる。細胞集団は、希釈された集団中の細胞の数が、基材上のウェルの数の１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは１００％、又は少なくともこれらの値であるように希釈されうる。細胞集団は、希釈された集団中の細胞の数が、基材上のウェルの数の１％、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、若しくは１００％、又は少なくともこれらの値であるように希釈されうる。いくつかの例では、細胞集団は、細胞の数が、基材中のウェルの数の約１０％であるように希釈される。

【０４７９】

単一細胞の基材のウェルへの分布は、ポアソン分布に従いうる。たとえば、基材のウェルが２つ以上の細胞を有する、少なくとも０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、又は１０％以上の確率がありうる。基材のウェルが２つ以上の細胞を有する、少なくとも０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、又は１０％以上の確率がありうる。単一細胞の基材のウェルへの分布は、ランダムでありうる。単一細胞の基材のウェルへの分布は、非ランダムでありうる。細胞は、基材のウェルがただ１つの細胞を受け入れるように分離されうる。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬はさらに、個別の区画への細胞のフローソーティングを可能にする蛍光分子とコンジュゲートされうる。

【０４８１】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、複数の細胞成分標的との特異的な結合のために複数の組成物をサンプルと接触させる工程を提供する。使用される条件は、細胞成分結合試薬、たとえば、抗体の、細胞成分標的に対する特異的な結合を可能にすることが分かるであろう。接触させる工程の後に、未結合の組成物は除去されうる。たとえば、サンプルが細胞を含み、且つ組成物が、細胞表面タンパク質などの細胞表面細胞成分である細胞成分標的に特異的に結合する実施形態では、細胞成分標的に特異的に結合する組成物のみが細胞とともに残るように、未結合の組成物は、緩衝液により細胞を洗浄することにより除去されうる。

【０４８２】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、バーコード配列（分子標識など）、細胞標識、サンプル標識など、又はそれらの任意の組合せを含むオリゴヌクレオチド（たとえば、バーコード、又は確率バーコード）を、細胞成分結合試薬に関連付けられた複数のオリゴヌクレオチドに関連付けする工程を含みうる。たとえば、バーコードを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを使用して、組成物の複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。
【０４８３】
いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定されうる。固体担体は、浮動性であってもよく、たとえば、溶液中のビーズであってもよい。固体担体は、半固体又は固体アレイに埋め込むことができる。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定されなくてもよい。複数のオリゴヌクレオチドプローブが、細胞成分結合試薬のオリゴヌクレオチドに関連付けられた複数に近接して位置するとき、細胞成分結合試薬の複数のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズしうる。細胞成分結合試薬の識別可能な各々のオリゴヌクレオチドが、本開示の種々のバーコード配列（たとえば、分子標識）を有するオリゴヌクレオチドプローブと結合しうるように、オリゴヌクレオチドプローブを非枯渇的比率で接触させることができる。
【０４８４】
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、細胞成分標的に特異的に結合されている細胞成分結合試薬からオリゴヌクレオチドを切り離す工程を提供する。切り離しは、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトール処理）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せなどの、細胞成分結合試薬から化学基を分離するためのさまざま方法において実施することができる。細胞成分結合試薬からオリゴヌクレオチドを切り離す工程は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを組成物の複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする工程の前、後、又は間のいずれかに実施することができる。
【０４８５】
細胞成分及び核酸標的の同時定量分析の方法
いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法はまた、本明細書に開示される組成物、及びバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を細胞成分結合試薬のオリゴヌクレオチド及び核酸標的分子の両方に関連付けすることができるオリゴヌクレオチドプローブを使用する、サンプル中の複数の細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的）及び複数の核酸標的分子の同時定量分析に使用されうる。複数の細胞成分標的及び複数の核酸標的分子の同時定量分析の他の方法が、２０１７年９月２５日出願の米国特許出願第１５／７１５０２８号明細書（その内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍サンプル、血液サンプルなどでありうる。いくつかの実施形態では、サンプルは、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、母体細胞、胎児細胞などの細胞型の混合物、又は異なる対象由来の細胞の混合物を含みうる。
【０４８６】
いくつかの実施形態では、サンプルは、マイクロウェルアレイ中のマイクロウェルなどの個別の区画に分離された複数の単一細胞を含みうる。
【０４８７】
いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内細胞成分を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分は、生物、又は生物の１つ以上の細胞において発現されるタンパク質などのすべての細胞成分のうち、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、又はこれ

らの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分は、生物、又は生物の１つ以上の細胞において発現されうるタンパク質などのすべての細胞成分のうち、少なくとも、又は多くとも、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、若しくは９９％でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、１００００、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異なる細胞成分標的を含むか、又はこれらの近似値の異なる細胞成分標的を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、若しくは１０００の異なる細胞成分標的を含みうる。

【０４８８】

いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬は、複数の細胞成分標的との特異的な結合のためのサンプルと接触する。未結合の細胞成分結合試薬は、たとえば、洗浄によって、除去されうる。サンプルが細胞を含む実施形態では、細胞に特異的に結合されないあらゆる細胞成分結合試薬が除去されうる。

【０４８９】

いくつかの例では、細胞集団に由来する細胞は、本開示の基材のウェルに分離（たとえば、単離）されうる。細胞集団は、分離の前に希釈されうる。細胞集団は、基材のウェルの少なくとも１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５又は１００％が単一細胞を受け入れるように希釈されうる。細胞集団は、基材のウェルの多くとも１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５又は１００％が単一細胞を受け入れるように希釈されうる。細胞集団は、希釈された集団中の細胞の数が、基材上のウェルの数の１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５若しくは１００％、又は少なくともこれらの値であるように希釈されうる。細胞集団は、希釈された集団中の細胞の数が、基材上のウェルの数の１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５若しくは１００％、又は少なくともこれらの値であるように希釈されうる。いくつかの例では、細胞集団は、細胞の数が、基材中のウェルの数の約１０％であるように希釈される。

【０４９０】

単一細胞の基材のウェルへの分布は、ポアソン分布に従いうる。たとえば、基材のウェルが２つ以上の細胞を有する、少なくとも０．１、０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０％以上の確率がありうる。基材のウェルが２つ以上の細胞を有する、少なくとも０．１、０．５、１、２、３、４、５、６、７、８、９又は１０％以上の確率がありうる。単一細胞の基材のウェルへの分布は、ランダムでありうる。単一細胞の基材のウェルへの分布は、非ランダムでありうる。細胞は、基材のセルがただ１つの細胞を受け入れるように分離されうる。

【０４９１】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬はさらに、個別の区画への細胞のフローソーティングを可能にする蛍光分子とコンジュゲートされうる。

【０４９２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、複数の細胞成分標的との特異的な結合のために複数の組成物をサンプルと接触させる工程を提供する。使用される条件は、細胞成分結合試薬、たとえば、抗体のタンパク質標的に対する特異的な結合を可能にしうることが分かるであろう。接触させる工程の後に、未結合の組成物は除去されうる。たとえば、サンプルが細胞を含み、且つ組成物が、細胞表面タンパク質など、細胞表面上にある細胞成分標的に特異的に結合する実施形態では、細胞成分標的に特異的に結合する

組成物のみが細胞とともに残るように、未結合の組成物は、緩衝液により細胞を洗浄することにより除去されうる。

【０４９３】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル、たとえば、細胞から複数の核酸標的分子を放出する工程を提供しうる。たとえば、細胞を溶解して、複数の核酸標的分子を放出することができる。細胞溶解は、さまざまな手段のいずれかにより、たとえば、化学処理、浸透圧ショック、熱処理、機械的処理、光学的処理、又はそれらの任意の組合せにより達成されうる。細胞は、界面活性剤（たとえば、ＳＤＳ、Ｌｉドデシルスルフェート、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、Ｔｗｅｅｎ－２０、若しくはＮＰ－４０）、有機溶媒（たとえば、メタノール若しくはアセトン）、又は消化酵素（たとえば、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り溶解されうる。

【０４９４】

複数の核酸分子がさまざまな核酸分子を含みうることは、当業者であれば分かるであろう。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、ＤＮＡ分子、ＲＮＡ分子、ゲノムＤＮＡ分子、ｍＲＮＡ分子、ｒＲＮＡ分子、ｓｉＲＮＡ分子、又はそれらの組合せを含むことができ、且つ二本鎖又は一本鎖でありうる。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、１００、１０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、１０００００、１０００００００、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種を含むか、又はこれらの近似値の種を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、少なくとも、又は多くとも、１００、１０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、１０００００、若しくは１０００００００の種を含む。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、単一細胞又は複数の細胞などのサンプルに由来してもよい。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、複数の単一細胞などの複数のサンプルからプールされてもよい。

【０４９５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、バーコード配列（分子標識など）、細胞標識、サンプル標識など、又はそれらの任意の組合せを含みうるバーコード（たとえば、確率バーコード）を、複数の核酸標的分子及び細胞成分結合試薬の複数のオリゴヌクレオチドに関連付けする工程を含みうる。たとえば、確率バーコードを含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを使用して、複数の核酸標的分子及び組成物の複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。

【０４９６】

いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定されうる。固体担体は、浮動性であってもよく、たとえば、溶液中のビーズであってもよい。固体担体は、半固体又は固体アレイに埋め込むことができる。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定されなくてもよい。複数のオリゴヌクレオチドプローブが複数の核酸標的分子及び細胞成分結合試薬の複数のオリゴヌクレオチドに近接して位置するとき、複数の核酸標的分子及び細胞成分結合試薬の複数のオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズしうる。識別可能な各々の核酸標的分子及び細胞成分結合試薬のオリゴヌクレオチドが、本開示の種々のバーコード配列（たとえば、分子標識）を有するオリゴヌクレオチドプローブと結合しうるように、オリゴヌクレオチドプローブを非枯渇的比率で接触させることができる。

【０４９７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、細胞成分標的に特異的に結合されている細胞成分結合試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させる工程を提供する。脱離は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトール処理）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せなどの、細胞成分結合試薬から化学基を分離するためのさまざま方法において実施することができる。細胞成分結合試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させる工程は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを複数の核酸標的分子及び組成物の複数

のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする工程の前、後、又は間のいずれかに実施することができる。

【０４９８】

タンパク質及び核酸標的の同時定量分析

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法はまた、複数のタイプの標的分子、たとえば、タンパク質及び核酸標的の同時定量分析に使用されうる。たとえば、標的分子は、細胞成分であるか、又はそれを含みうる。図６は、単一細胞における核酸標的及び他の細胞成分標的（たとえば、タンパク質）の両方の同時定量分析の例示的方法の概略図を示す。いくつかの実施形態では、抗体などの細胞成分結合試薬を各々が含む複数の組成物６０５、６０５ｂ、６０５ｃなどが提供される。さまざまな細胞成分標的に結合する、抗体などのさまざまな細胞成分結合試薬が、さまざまな一意識別子とコンジュゲートされる。次に、細胞成分結合試薬は、複数の細胞６１０を含有するサンプルとインキュベートされうる。さまざまな細胞成分結合試薬は、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せなどの細胞表面上の細胞成分に特異的に結合することができる。未結合の細胞成分結合試薬は、たとえば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去されうる。次に、細胞成分結合試薬を伴う細胞は、単一の区画６１５が、単一細胞及び単一ビーズ６２０に適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイなどの複数の区画に分離されうる。各ビーズは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、及びバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド６２５は、化学的、光学的又は他の手段を用いて細胞成分結合試薬から切り離されうる。細胞は溶解されて（６３５）、ゲノムＤＮＡ又は細胞のｍＲＮＡ６３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　６３０、オリゴヌクレオチド６２５又はその両方は、ビーズ６２０上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　６３０及びオリゴヌクレオチド６２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを、細胞のｍＲＮＡ　６３０及びオリゴヌクレオチド６２５を鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅及びシーケンシングに付されうる。シーケンシングリードは、サンプル中の各単一細胞の細胞成分及び遺伝子発現のデジタルな表現をもたらすことができる、細胞標識、バーコード（たとえば、分子標識）、遺伝子、細胞成分結合試薬特異的オリゴヌクレオチド（たとえば、抗体特異的オリゴヌクレオチド）などの配列又は同一性のデマルチプレクシングに付されうる。

【０４９９】

バーコードの関連付け

細胞成分結合試薬（たとえば、抗原結合試薬又はタンパク質結合試薬）及び／又は核酸分子に関連付けられたオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドプローブにランダムに関連付けしてもよい。本明細書で結合試薬オリゴヌクレオチドと呼ばれる、細胞成分結合試薬に関連付けられたオリゴヌクレオチドは、抗体オリゴヌクレオチド、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、細胞同定オリゴヌクレオチド、コントロール粒子オリゴヌクレオチド、コントロールオリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなどの、本開示のオリゴヌクレオチドであるか、又はそれを含みうる。関連付けは、たとえば、標的核酸分子及び／又はタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドの相補的部分へのオリゴヌクレオチドプローブの標的結合領域のハイブリダイゼーションを含む（たとえば、バーコード（たとえば、確率バーコード）のオリゴ（ｄＴ）領域は、標的核酸分子のポリ（Ａ）テール及び／又はタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドのポリ（Ａ）テールと相互作用可能である）。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（たとえば、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

うに選択可能である。

【０５００】

本開示は、逆転写を用いて、分子標識を、細胞成分結合試薬に関連付けられた標的核酸及び／又はオリゴヌクレオチドと関連付けする方法を提供する。逆転写酵素は、ＲＮＡ及びＤＮＡの両方を鋳型として使用することができるため、たとえば、細胞成分結合試薬に元来コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、ＲＮＡ若しくはＤＮＡ塩基のいずれか、又はその両方でありうる。結合試薬オリゴヌクレオチドは、コピーされうるし、結合試薬配列の配列、又はその部分に加えて、細胞標識及びバーコード配列（たとえば、分子標識）に結合（たとえば、共有結合）されうる。別の例として、ｍＲＮＡ分子は、コピーされうるし、ｍＲＮＡ分子の配列、又はその部分に加えて細胞標識及びバーコード配列（たとえば、分子標識）に結合（たとえば、共有結合）されうる。

【０５０１】

いくつかの実施形態では、分子標識は、オリゴヌクレオチドプローブ標的結合領域及び標的核酸分子の部分及び／又は細胞成分結合試薬に関連付けられた（たとえば、現在、又は以前に、それに関連付けられた）オリゴヌクレオチドのライゲーションにより追加されうる。たとえば、標的結合領域は、制限部位オーバーハング（たとえば、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うる核酸配列を含みうる。本方法は、制限部位オーバーハングを生成するために制限酵素（たとえば、ＥｃｏＲＩ）で標的核酸及び／又は細胞成分結合試薬に関連付けられたオリゴヌクレオチドを処置する工程をさらに含みうる。リガーゼ（たとえば、Ｔ４　ＤＮＡリガーゼ）は２つの断片を連結するために使用されうる。

【０５０２】

ユニークな分子標識配列の数又は存在の決定

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、各一意識別子、各核酸標的分子、及び／又は各結合試薬オリゴヌクレオチド（たとえば、抗体オリゴヌクレオチド）のためのユニークな分子標識配列の数又は存在を決定する工程を含む。たとえば、シーケンシングリードを使用して、各一意識別子、各核酸標的分子、及び／又は各結合試薬オリゴヌクレオチドのためのユニークな分子標識配列の数を決定することができる。別の例として、シーケンシングリードを使用して、分子標識配列（シーケンシングリード中の標的、結合試薬オリゴヌクレオチド、抗体オリゴヌクレオチド、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、細胞同定オリゴヌクレオチド、コントロール粒子オリゴヌクレオチド、コントロールオリゴヌクレオチド、相互作用決定オリゴヌクレオチドなどに関連付けられた分子標識配列など）の存在又は非存在を決定することができる。

【０５０３】

いくつかの実施形態では、各一意識別子、各核酸標的分子、及び／又は各結合試薬オリゴヌクレオチドのためのユニークな分子標識配列の数は、サンプル中の各細胞成分標的（たとえば、抗原標的又はタンパク質標的）及び／又は各核酸標的分子の量を示す。いくつかの実施形態では、細胞成分標的の量及びその対応する核酸標的分子、たとえば、ｍＲＮＡ分子の量は、互いに比較されうる。いくつかの実施形態では、細胞成分標的の量及びその対応する核酸標的分子、たとえば、ｍＲＮＡ分子の量の比率を計算することができる。細胞成分標的は、たとえば、細胞表面タンパク質マーカーでありうる。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質マーカーのタンパク質レベルと細胞表面タンパク質マーカーのｍＲＮＡのレベルとの比率は低い。

【０５０４】

本明細書に開示される方法は、さまざまな用途のために使用されうる。たとえば、本明細書に開示される方法は、サンプルのプロテオーム及び／又はトランスクリプトーム分析のために使用されうる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル中の細胞成分標的及び／又は核酸標的、すなわち、バイオマーカーを同定するために使用されうる。いくつかの実施形態では、細胞成分標的及び核酸標的は互いに対応する、すなわち、核酸標的は細胞成分標的をコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に開

示される方法は、サンプル中の細胞成分標的の量とその対応する核酸標的分子、たとえば、ｍＲＮＡ分子の量との間で所望の比率を有する細胞成分標的を同定するために使用されうる。いくつかの実施形態では、その比率は、０．００１、０．０１、０．１、１、１０、１００、１０００、又は上の値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値である。いくつかの実施形態では、その比率は、少なくとも、又は多くとも、０．００１、０．０１、０．１、１、１０、１００、若しくは１０００である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル中のその対応する核酸標的分子の量が、１０００、１００、１０、５、２　１、０、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値である、サンプル中の細胞成分標的を同定するために使用されうる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル中のその対応する核酸標的分子の量が、１０００、１００、１０、５、２　１、若しくは0より大きいか、又は小さい、サンプル中の細胞成分標的を同定するために使用されうる。

【０５０５】

組成物及びキット

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、サンプル中の複数の細胞成分（たとえば、タンパク質）及び／又は複数の核酸標的分子の同時定量分析のためのキット及び組成物を提供する。キット及び組成物は、いくつかの実施形態では、各々がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた複数の細胞成分結合試薬（たとえば、複数のタンパク質結合試薬）を含むことができ、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬のための一意識別子、及び複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含み、バーコード配列は、ユニークなバーコード配列の多様なセットからのものである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々が、分子標識、細胞標識、サンプル標識、又はそれらの任意の組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々が、リンカーを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々が、ポリ（Ａ）テールなどの、オリゴヌクレオチドプローブに対する結合部位を含みうる。たとえば、ポリ（Ａ）テールは、たとえば、オリゴｄA_{18}（固体担体に固定されていない）又はオリゴA_{18}Ｖ（固体担体に固定される）でありうる。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ残基、ＲＮＡ残基、又はその両方を含みうる。

【０５０６】

本明細書に開示されるものには、複数のサンプルインデックス付加組成物が含まれる。複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含みうる。２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つは、少なくとも１つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能でありうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列を含みうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列は、異なる配列を含みうる。

【０５０７】

本明細書に開示されるものには、コントロール粒子組成物を含むキットが含まれる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列及びポリ（ｄＡ）領域を含む。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、分子標識配列を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含みうる。また、本明細書に開示されるものには、シーケンシングコントロールのためのキットが含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子組成物を含み、複数

のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列及びポリ（ｄＡ）領域を含む。

【０５０８】

本明細書に開示されるものには、シーケンシングコントロールのための複数のコントロール組成物を含むキットが含まれる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、複数の結合標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び複数のバーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む。いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。

【０５０９】

本明細書に開示されるものには、細胞同定のためのサンプルインデックス付加組成物を含むキットが含まれる。いくつかの実施形態では、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的（たとえば、１つ以上のタンパク質標的）の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０５１０】

本明細書に開示されるものには、細胞同定のためのキットが含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、２つ以上のサンプルインデックス付加組成物を含む。２つ以上のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬（たとえば、抗原結合試薬）を含むことができ、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。本明細書に開示されるものには、マルチプレットの同定のためのキットが含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、２つのサンプルインデックス付加組成物を含む。２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬（たとえば、抗原結合試薬）を含むことができ、抗原結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的（たとえば、抗原標的）の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む。

【０５１１】

本明細書に開示されるものには、細胞成分間の相互作用、たとえば、タンパク質間相互作用を同定するためのキットが含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、相互作用決定組成物の第１の対であって、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む、相互作用決定組成物の第１の対と；相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダ

イゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を各々が含む複数の架橋オリゴヌクレオチドと、を含む。

【０５１２】

一意識別子（又は結合試薬オリゴヌクレオチド、抗体オリゴヌクレオチド、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、細胞同定オリゴヌクレオチド、コントロール粒子オリゴヌクレオチド、コントロールオリゴヌクレオチド、若しくは相互作用決定オリゴヌクレオチドなどの、細胞成分結合試薬に関連付けられたオリゴヌクレオチド）は、任意の好適な長さ、たとえば、約２５ヌクレオチド～約４５ヌクレオチド長を有しうる。いくつかの実施形態では、一意識別子は、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、１５ヌクレオチド、２０ヌクレオチド、２５ヌクレオチド、３０ヌクレオチド、３５ヌクレオチド、４０ヌクレオチド、４５ヌクレオチド、５０ヌクレオチド、５５ヌクレオチド、６０ヌクレオチド、７０ヌクレオチド、８０ヌクレオチド、９０ヌクレオチド、１００ヌクレオチド、２００ヌクレオチド、又は上の値のいずれか２つの間の範囲、これらの近似値、これらの値より小さい、これらの値より大きい長さを有しうる。

【０５１３】

いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。一意識別子の多様なセットは、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、５０００、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異なる一意識別子を含むか、又はこれらの近似値の異なる一意識別子を含みうる。一意識別子の多様なセットは、少なくとも、又は多くとも、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、若しくは５０００の異なる一意識別子を含みうる。いくつかの実施形態では、一意識別子のセットは、分析されるサンプルのＤＮＡ又はＲＮＡ配列と最小限の配列相同性を有するように設計される。いくつかの実施形態では、一意識別子のセットの配列は、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、１０ヌクレオチド、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチドだけ互いに異なるか、又はその相補体である。いくつかの実施形態では、一意識別子のセットの配列は、少なくとも、又は多くとも、１ヌクレオチド、２ヌクレオチド、３ヌクレオチド、４ヌクレオチド、５ヌクレオチド、６ヌクレオチド、７ヌクレオチド、８ヌクレオチド、９ヌクレオチド、若しくは１０ヌクレオチドだけ互いに異なるか、又はその相補体である。

【０５１４】

いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する結合部位を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する少なくとも２つの結合部位を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニバーサルプライマーなどのプライマーに対する少なくとも３つの結合部位を含みうる。プライマーは、たとえば、ＰＣＲ増幅による、ユニーク識別子の増幅のために使用することができる。いくつかの実施形態では、プライマーは、ネステッドＰＣＲ反応のために使用することができる。

【０５１５】

本開示においては、任意のタンパク質結合試薬（たとえば、抗体若しくはその断片、アプタマー、小分子、リガンド、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど、又はそれらの任意の組合せ）など、任意の好適な細胞成分結合試薬が考慮される。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、一本鎖抗体（ｓｃＡｂ）、又はそれらの断片、たとえば、Ｆａｂ、Ｆｖなどのでありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質結合試薬は、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９

００、１０００、２０００、５０００、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異なるタンパク質結合試薬を含むか、又はこれらの近似値の異なるタンパク質結合試薬を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質結合試薬は、少なくとも、又は多くとも、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、若しくは５０００の異なるタンパク質結合試薬を含みうる。

【０５１６】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、共有結合によりタンパク質結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、非共有結合によりタンパク質結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドをタンパク質結合試薬に可逆的に又は不可逆的に結合する化学基を含みうる。化学基は、リンカーに、たとえば、アミノ基を介してコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、リンカーは、タンパク質結合試薬にコンジュゲートされた別の化学基と安定な結合を形成する化学基を含みうる。たとえば、化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミンなどでありうる。いくつかの実施形態では、化学基は、リジンなどのアミノ酸の一級アミン、又はＮ末端を介してタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。タンパク質結合試薬とそのタンパク質標的との間の特異的な結合と干渉しない限り、オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬の任意の好適な部位にコンジュゲートされうる。タンパク質結合試薬が抗体である実施形態では、オリゴヌクレオチドは、抗原結合部位、たとえば、Ｆｃ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、ＣＬドメインなど以外の抗体のどの部位にでもコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、単一のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲート可能であり、オリゴヌクレオチド分子の各々が、同じ一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、２つ以上のオリゴヌクレオチド分子、たとえば、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、若しくは１０００のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲート可能であり、オリゴヌクレオチド分子の各々が、同じ一意識別子を含む。

【０５１７】

いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）は、サンプル中の複数の細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的）に特異的に結合することが可能である。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織試料、腫瘍サンプル、血液サンプルなどであるか、又はそれを含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、生物におけるすべての細胞成分標的（たとえば、発現される又は発現されうるタンパク質）のうち、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、９９％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、生物におけるすべての細胞成分標的（たとえば、発現される又は発現されうるタンパク質）のうち、少なくとも、又は多くとも、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９８％、若しくは９９％でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成

分標的は、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、１００００、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異なる細胞成分標的を含むか、又はこれらの近似値の異なる細胞成分標的を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞成分標的は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、１００、１０００、若しくは１００００の異なる細胞成分標的を含みうる。

【０５１８】

オリゴヌクレオチド結合細胞成分結合試薬を用いたサンプルインデックス付加

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程と；複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【０５１９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０５２０】

抗体とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド、抗体とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、又は抗体と先にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、本明細書で抗体オリゴヌクレオチド（「Ａｂオリゴ」）と呼ばれる。サンプルインデックス付加に関連する抗体オリゴヌクレオチドは、本明細書でサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと呼ばれる。抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた抗体は、本明細書で高温抗体又はオリゴヌクレオチド抗体と呼ばれる。抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない抗体は、本明細書で低温抗体又はオリゴヌクレオチドフリー抗体と呼ばれる。結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド、結合試薬とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、又は結合試薬と先にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、本明細書で試薬オリゴヌクレオチドと呼ばれる。サンプルインデックス付加に関連する試薬オリゴヌクレオチドは、本明細書でサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと呼ばれる。抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた結合試薬は、本明細書で高温結合試薬又はオリゴヌクレオチド

結合試薬と呼ばれる。抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない結合試薬は、本明細書で低温結合試薬又はオリゴヌクレオチドフリー結合試薬と呼ばれる。

【０５２１】

図７は、サンプルインデックス付加のためのオリゴヌクレオチド結合細胞成分結合試薬を用いた例示的ワークフローの概略図を示す。いくつかの実施形態では、結合試薬を各々が含む複数の組成物７０５ａ、７０５ｂなどが提供される。結合試薬は、抗体などのタンパク質結合試薬でありうる。細胞成分結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含みうる。複数の組成物７０５ａ、７０５ｂの結合試薬は、同一の細胞成分標的に結合しうる。たとえば、複数の組成物７０５、７０５ｂの結合試薬は、（結合試薬に関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを除いて）同一でありうる。

【０５２２】

異なる組成物は、異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた結合試薬を含みうる。異なる組成物の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、異なる組成物の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なる組成物の数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、若しくは１００００でありうる。

【０５２３】

いくつかの実施形態では、１つの組成物中の結合試薬のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、同一のサンプルインデックス付加配列を含みうる。１つの組成物中の結合試薬のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、同一でなくてもよい。いくつかの実施形態では、同一のサンプルインデックス付加配列を有する１つの組成物中の結合試薬のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのパーセンテージは、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、９９．９％、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一のサンプルインデックス付加配列を有する１つの組成物中の結合試薬のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは９９．９％でありうる。

【０５２４】

組成物７０５ａ及び７０５ｂは、異なるサンプルのサンプルを標識するのに使用されうる。たとえば、組成物７０５ａ中の細胞成分結合試薬のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、１つのサンプルインデックス付加配列を有することができ、患者のサンプルなどのサンプル７０７ａ中で、黒丸として示される細胞７１０ａを標識するのに使用されうる。組成物７０５ｂ中の細胞成分結合試薬のサンプルインデックス付加オリゴヌク

レオチドは、別のサンプルインデックス付加配列を有することができ、別の患者のサンプル又は同じ患者の別のサンプルなどのサンプル７０７ｂ中で、斜線の入った丸として示されるように、細胞７１０ｂを標識するのに使用されうる。細胞成分結合試薬は、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せなどの細胞表面上の細胞成分標的又はタンパク質に特異的に結合することができる。未結合の細胞成分結合試薬は、たとえば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去されうる。

【０５２５】

細胞成分結合試薬を伴う細胞は、単一の区画７１５ａ、７１５ｂが単一細胞７１０ａ及び単一ビーズ７２０ａ又は単一細胞７１０ｂ及び単一ビーズ７２０ｂに適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイなどの複数の区画に分離されうる。各ビーズ７２０ａ、７２０ｂは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、及び分子標識配列を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。組成物７０５ａの細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ａは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。組成物７０５ａの細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ａは、化学的、光学的又は他の手段を用いて、細胞成分結合試薬から切り離されうる。組成物７０５ｂの細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ｂは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成されうる。組成物７０５ｂの細胞成分結合試薬にコンジュゲートされたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ｂは、化学的、光学的又は他の手段を用いて、細胞成分結合試薬から切り離されうる。

【０５２６】

細胞７１０ａは溶解されて、ゲノムＤＮＡ又は細胞のｍＲＮＡ　７３０ａなどの、細胞７１０ａ内の核酸を放出しうる。溶解された細胞７３５ａは、点線の丸として示される。細胞のｍＲＮＡ　７３０ａ、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ａ、又はその両方は、ビーズ７２０ａ上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　７３０ａ及びオリゴヌクレオチド７２５ａにハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを、細胞のｍＲＮＡ　７３０ａ及びオリゴヌクレオチド７２５ａを鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅及びシーケンシングに付されうる。

【０５２７】

同様に、細胞７１０ｂは溶解されて、ゲノムＤＮＡ又は細胞のｍＲＮＡ　７３０ｂなどの、細胞７１０ｂ内の核酸を放出しうる。溶解された細胞７３５ｂは、点線の丸として示される。細胞のｍＲＮＡ　７３０ｂ、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ｂ、又はその両方は、ビーズ７２０ｂ上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　７３０ｂ及びオリゴヌクレオチド７２５ｂにハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを、細胞のｍＲＮＡ　７３０ｂ及びオリゴヌクレオチド７２５ｂを鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素より生成された伸長産物は、増幅及びシーケンシングに付されうる。

【０５２８】

シーケンシングリードは、（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド７２５ａ及び７２５ｂのサンプルインデックス付加配列について）細胞標識、分子標識、遺伝子同一性、及びサンプル同一性のデマルチプレクシングに付されうる。細胞標識、分子標識、及び遺伝子同一性のデマルチプレクシングは、サンプル中の各単一細胞の遺伝子発現のデジタルな表現をもたらすことができる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレ

オチドのサンプルインデックス付加配列を用いた、細胞標識、分子標識、及びサンプル同一性のデマルチプレクシングを使用して、サンプル起源を決定することができる。

【０５２９】

いくつかの実施形態では、細胞表面上の細胞成分結合試薬に対する細胞成分結合試薬は、ユニークなサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのライブラリーにコンジュゲートされて、細胞にサンプル同一性を保持させうる。たとえば、細胞表面マーカーに対する抗体は、ユニークなサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのライブラリーにコンジュゲートされて、細胞にサンプル同一性を保持させうる。これにより、サンプル源に関連する情報がライブラリー作製及びシーケンシング全体を通して保持されるため、複数のサンプルが、同じＲｈａｐｓｏｄｙ（商標）カートリッジにロードされるのを可能にする。サンプルインデックス付加は、複数のサンプルが、単一の実験においてまとめられるのを可能にし、簡略化し、実験時間を短縮し、バッチ効果をなくしうる。

【０５３０】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程と、を含む。本方法は、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含みうる。

【０５３１】

いくつかの実施形態では、サンプル同定のための方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程と；複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。

【０５３２】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を用いて、複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえ

ば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０５３３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程を含みうる。サンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程が、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中の少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに対応する複数のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含みうる。

【０５３４】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製アダプターを、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートする工程を含む。少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートされた複製アダプターを用いて、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０５３５】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、捕捉プローブを、少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを伸長して、捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程は、捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０５３６】

デイジーチェーン接続オリゴヌクレオチド

本明細書に開示されるものには、長いオーバーハング（たとえば、１６０以上のヌクレオチド長）を有するプライマーを用いたバーコード付きオリゴヌクレオチドのＰＣＲ増幅

によって、バーコード付きオリゴヌクレオチド（サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、コントロール粒子オリゴヌクレオチド、コントロールオリゴヌクレオチド、又はタンパク質発現を決定するための抗体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドなど）を伸長するためのシステム、方法、キット、及び組成物が含まれる。このようなプライマーは、Ｕｌｔｒａｍｅｒ（登録商標）ＤＮＡオリゴヌクレオチド、Ｍｅｇａｍｅｒ（登録商標）一本鎖ＤＮＡ断片、又はｇＢｌｏｃｋｓ（登録商標）遺伝子断片（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ＤＮＡ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｃｏｒａｌｖｉｌｌｅ，Ｉｏｗａ））の一本鎖ＤＮＡ断片など、たとえば、２００以上のヌクレオチド長でありうる。バーコード付きオリゴヌクレオチドは、長いプライマーがＰＣＲ中に結合及び伸長するために共通の配列（たとえば、４０ヌクレオチド長の共通の配列）を含有しうる。いくつかの実施形態では、長いオーバーハングは、サンプルに複雑性を加えるために二次バーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる。したがって、バーコード付きオリゴヌクレオチドの長さは、たとえば、２００～３００ヌクレオチドから、４００ヌクレオチド超まで増加されうる。このようなより長いバーコード付きオリゴヌクレオチドは、たとえば、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｒｅｖｅｒｓｉｂｌｅ Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ（ＳＰＲＩ）＿電磁ビーズ（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｔｅｒｉａｌｓ Ｉｎｃ．（Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｃｏｌｕｍｂｉａ，Ｃａｎａｄａ））を用いたＤＮＡ精製中に増加し続けるサイズ選択に耐えうる。

【０５３７】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬（たとえば、抗体分子）に関連付けられた（たとえば、結合された）オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬からの解離後に、バーコードを付けられて（たとえば、確率バーコードを付けられて）、バーコード付きオリゴヌクレオチドを生成しうる。バーコード付きオリゴヌクレオチドは、長いオーバーハングを有するプライマーを用いて、さらに延長されうる。したがって、ＤＮＡ合成技術又は実験設計考慮事項によって制限されうる、細胞成分結合試薬に関連付けられたオリゴヌクレオチドの長さ及びバーコード付きオリゴヌクレオチドの長さは、次のワークフロー（たとえば、ＤＮＡ精製中のサイズ選択）を制限しない。１つの非限定的な例示的実験設計考慮事項は、試薬の結合特異性及び／又は有効性に対する、細胞成分結合試薬に結合された長いオリゴヌクレオチドの影響である。バーコード付きオリゴヌクレオチドのＰＣＲデイジーチェーン接続は、抗体特異性及び／又は有効性を維持しながら、ＤＮＡ合成技術の制限を克服するか、又はそれに対処しうる。長いオーバーハングを有するプライマーを用いて、共通の配列を有するバーコード付きオリゴヌクレオチドを延長するための本開示の方法は、デイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するための、デイジーチェーン接続増幅プライマーを用いたバーコード付きオリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続と本明細書で呼ばれる。

【０５３８】

本明細書に開示されるものには、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（又はコントロール粒子オリゴヌクレオチドなどの他のバーコード付きオリゴヌクレオチド）を伸長するための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させた後、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードを用いて、バーコードを付けられて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成しうる（図７を参照）。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、長いオーバーハングを有する複数のプライマー（本明細書でデイジーチェーン接続増幅プライマーと呼ばれる）を用いて増幅されて、複数のより長いアンプリコン（本明細書でデイジーチェーン接続伸長アンプリコンと呼ばれる）を生成しうる。このようなより長いアンプリコンは、たとえば、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドよりかなり長くてもよい（たとえば、１６０ヌクレオチドより長い）。

【０５３９】

図８Ａ８及び８Ａ２は、デイジーチェーン接続バーコード付きオリゴヌクレオチドの例示的ワークフローの概略図を示す。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加組成物８０５は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５に関連付けられた、抗体などの細胞成分結合試薬を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５は、サンプルインデックス付加配列８２５ｓ、デイジーチェーン接続増幅プライマーに結合するための共通の領域８２５ｄ（本明細書でデイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域又は配列８２５ｄと呼ばれる）、及びポリ（Ａ）テール８２５ａを含みうる。いくつかの実施形態では、デイジーチェーン接続増幅プライマーに結合するための共通の領域８２５ｄは、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５のすべて又はいくつかについて同じでありうる。いくつかの実施形態では、異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄは、異なる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５は、ｍＲＮＡ模倣体でありうる。複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物８０５のサンプルインデックス付加配列８２５ｓは、異なる配列を含みうる。

【０５４０】

デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄは、１０～２００ヌクレオチド長の範囲で、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄは、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄは、少なくとも、又は多くとも、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、若しくは２００ヌクレオチド長でありうる。

【０５４１】

サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５は、複数のバーコード８１５（たとえば、ビーズ８１などの、粒子に関連付けられたバーコード８１５）を用いて、バーコードを付けられて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０を生成しうる。いくつかの実施形態では、バーコード８１５は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５に結合するためのポリ（ｄＴ）領域８１５ｔ、任意選択で、分子標識８１５ｍ（たとえば、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの出現回数を決定するための）、細胞標識８１５ｃ、及びユニバーサル標識８１５ｕを含みうる。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０は、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄの逆相補体８２５ｄ＿ｒｔを含みうる。

【０５４２】

バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０は、複数のデイジ

ーチェーン接続増幅プライマー８４５を含む、フォワード及びリバースプライマー８４５、８５０を用いて増幅されて、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０を生成しうる。デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５は、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄ（本明細書でバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄと呼ばれる）の、配列８４５ｄ、相補体、逆相補体、又はそれらの組合せを含みうる。デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄ及びバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄは、同じ長さ、又は異なる長さでありうる。デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄは、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０上のその逆相補的配列８２５ｄ＿ｒｔに結合しうる。デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５は、オーバーハング領域８４５ｏ（デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５がバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８５０に結合する場合、オーバーハング領域８４５ｏは、デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５のオーバーハングである）を含みうる。複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０、又はその部分は、サンプル同定（又はタンパク質発現プロファイリング、シーケンシングコントロールなど）のためにシーケンシングされうる。図８Ａ１～８Ａ２に示されるように、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５は、２００ヌクレオチド長であってもよく、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０は、２４０ヌクレオチド長であってもよく、デイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０は、４００ヌクレオチド長でありうる。

【０５４３】

バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄは、たとえば、１０～２００ヌクレオチド長の範囲で、さまざまな履行において異なる長さを有しうる。いくつかの実施形態では、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄは、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄは、少なくとも、又は多くとも、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、若しくは２００ヌクレオチド長でありうる。

【０５４４】

いくつかの実施形態では、少なくとも２つのデイジーチェーン接続増幅プライマー８４５は、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄを含みうる。２つ以上のデイジーチェーン接続増幅プライマー８４５は、異なる配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄを含みうる。デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５のいくつか又はす

べては、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄを含みうる。バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域８４５ｄは、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列８２５ｄ、その相補体、その逆相補体、又はそれらの組合せを含みうる。少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物８０５のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列８２５ｄは、同一の配列を含みうる。少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物８０５のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列８２５ｄは、異なる配列を含みうる。

【０５４５】

いくつかの実施形態では、オーバーハング領域８４５ｏは、分子標識などのバーコード配列（本明細書でデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列と呼ばれる）を含みうる。たとえば、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマー８４５ｏは、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域８４５ｏを含みうる。別の例として、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマー８４５は、２つの異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域８４５ｏを含みうる。デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５のオーバーハング領域８４５ｏは、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含みうる。

【０５４６】

オーバーハング領域８４５は、たとえば、５０～１０００ヌクレオチド長の範囲で、さまざまな履行において異なる長さを有しうる。いくつかの実施形態では、オーバーハング領域８４５は、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、オーバーハング領域８４５は、少なくとも、又は多くとも、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、若しくは１０００でありうる。

【０５４７】

デイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０は、たとえば、５０～１０００ヌクレオチド長の範囲で、さまざまな履行において異なる長さを有しうる。いくつかの実施形態では、デイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０は、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、

６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、デイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０は、少なくとも、又は多くとも、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、若しくは１０００でありうる。

【０５４８】

図８Ｂ１及び８Ｂ２は、デイジーチェーン接続バーコード付きオリゴヌクレオチドの別の例示的ワークフローの概略図を示す。このワークフローにおいて、スイッチオリゴヌクレオチド８６０の逆相補的配列が、任意選択で、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０に加えられうる。逆転写中、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２４の５’末端に到達すると、酵素（たとえば、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）などの逆転写酵素）の末端トランスフェラーゼ活性が、いくつかのさらなるヌクレオチド（大部分はデオキシシチジン）を、新たに合成される鎖８４０の３’末端に加える。これらの塩基は、鋳型スイッチ（ＴＳ）オリゴヌクレオチド８６０の固定部位として機能しうる。鋳型スイッチオリゴヌクレオチド８６０と付加されたデオキシシチジン伸長部との間での塩基対合により、酵素は、鋳型鎖を、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５から鋳型スイッチオリゴヌクレオチド８６０へと「切り替え」、ＴＳオリゴヌクレオチド８６０の５’末端への複製を続ける。したがって、得られるバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５及び鋳型スイッチオリゴヌクレオチド８６０の逆相補体を含有する。

【０５４９】

鋳型スイッチオリゴヌクレオチド８６０の逆相補体配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０は、フォワード及びリバースプライマー８４５、８５０を用いて増幅されて、鋳型スイッチオリゴヌクレオチド８６０の逆相補体を有するデイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０を生成しうる。２つのプライマーのうちの１つは、図８Ａ１～８Ａ２中のユニバーサル標識８４５ｕに相当しうる増幅のためのユニバーサル配列である、リード１配列８４５ｒ１に結合しうる。第２のプライマーである、デイジーチェーン接続増幅プライマー８４５は、デイジーチェーン接続増幅プライマー結合領域８２５ｄの逆相補体配列８２５ｄ＿ｒｔに結合しうる。したがって、長いテールが、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８６０に加えられうる。酵素断片化、末端修復、Ａ－テーリング、及び任意選択でサンプルインデックスＰＣＲの後、得られるアンプリコンは、Ｐ５配列８６５ｐ５、Ｐ７配列８６５ｐ７、リード１配列８１５ｒ１、及び（たとえば、テーリング増幅を用いた）次世代シーケンシングのためのリード２配列８６５ｒ２を含みうる。図８Ａ１～８Ａ２に示されるように、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８２５は、２００ヌクレオチド長であってもよく、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド８４０は、約２６０ヌクレオチド長であってもよく、デイジーチェーン接続伸長アンプリコン８６０は、４０６ヌ

クレオチド長超でありうる。

【０５５０】

単一細胞シーケンシングコントロール粒子

本明細書には、たとえば、単一細胞シーケンシングコントロールのために使用されうるコントロール粒子組成物が開示される。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子と結合した複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含む。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合したコントロール粒子は、本明細書では官能化コントロール粒子とも呼ばれる。図９Ａは、複数のオリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図である。図９Ａは、コントロール粒子と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列及びｍＲＮＡポリ（Ａ）テールを模倣するポリ（ｄＡ）領域を含みうることを示す。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、分子標識配列、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、又はそれらの組合せを含みうる。コントロール粒子と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、同じでも、互いに異なってもよい。いくつかの実施形態では、コントロール粒子と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を有する。いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチド及び複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子と結合し、第１及び第２の粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を有する。

【０５５１】

ＣｏｍｐＢｅａｄ（商標）Ｐｌｕｓ（ＢＤ（Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ））などのビーズは、オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた抗体により官能化されうる。ＣｏｍｐＢｅａｄ Ｐｌｕｓは、約７．５ミクロンサイズであり、免疫細胞のサイズに類似している。オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた抗体により官能化されるとき、ＣｏｍｐＢｅａｄ Ｐｌｕｓは、単一細胞ワークフローのためのコントロール細胞又はコントロール粒子として使用されうる。ＡｂＯにより官能化されたビーズは、単一細胞シーケンシングコントロールとして任意の単一細胞ワークフローとともに使用することができる。

【０５５２】

コントロール粒子オリゴヌクレオチド

コントロールバーコード配列の長さは、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００ヌクレオチド長、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、或いは概ねそうしたヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも、又は多くとも、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、

４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、若しくは１０００ヌクレオチド長である。

【０５５３】

コントロール粒子オリゴヌクレオチドの長さは、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、少なくとも、又は多くとも、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、若しくは１０００ヌクレオチド長である。

【０５５４】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、１０００００００、１００００００００、１０００００００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、１０００００００、１００００００００、１０００００００００、若しくは１０００００００００でありうる。

【０５５５】

複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、同じ又は異なるコントロールバーコード配列を含みうる。たとえば、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも、又は多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、１００００００、１０００００００、１００００００００、若しくは１０００００００００のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの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、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、１００００００、１０００００００、１００００００００、１０００００００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。

【０５５６】

複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも、又は多くとも０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、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コントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、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、又はこれらの近似値のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。

【０５５７】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、種のゲノム配列と相同ではない。コントロールバーコード配列は、種のゲノム配列と相同でありうる。種は、非哺乳

動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、又はそれらの組合せでありうる。

【０５５８】

コントロール粒子

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを介してコントロール粒子と結合する。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを含みうる。リンカーは化学基を含みうる。化学基は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに、可逆的又は不可逆的に結合しうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド連結、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０５５９】

コントロール粒子の直径は、１０～１００マイクロメートル若しくは７．５マイクロメートルなど、１～１０００又はその近似値でありうる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、少なくとも、又は多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００マイクロメートルでありうる。

【０５６０】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に固定される。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に部分的に固定されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子中に封入されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子中に部分的に封入されうる。コントロール粒子は、崩壊可能でありうる。

【０５６１】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子はビーズでありうるか、またはそれを含みうる。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うる。コントロール粒子は、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊可能なヒドロゲル粒子を含みうる。

【０５６２】

タンパク質結合試薬

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬と結合し、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つと結合する。図９Ｂは、オリゴヌクレオチドで官能化されたいくつかの抗体により覆われた非限定的な例示的粒子を示す。第１のタンパク質結合試薬は、第１の抗体（たとえば、一次抗体又は二次抗体）を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的又は不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミ

ン、ジスルフィド連結、又はそれらの任意の組合せを含みうる。

【０５６３】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第２のタンパク質結合試薬と結合する。複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つと結合しうる。図９Ｃは、オリゴヌクレオチドで官能化された複数の第１の抗体及びオリゴヌクレオチドで官能化されていない複数の第２の抗体により覆われた非限定的な例示的粒子を示す。コントロール粒子上の抗体を、高温抗体（たとえば、コントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合した）及び低温抗体（たとえば、コントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合していない）の比により用量設定して、コントロール粒子から得られるシーケンシングリードの量を変えることができる。第１の抗体及び第２の抗体は、同じでも、異なってもよい。

【０５６４】

図９Ｄは、高い、中程度、及び低い相対存在量で複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチド、複数の第２の抗体にコンジュゲートされた複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチド、及び複数の第３のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにより官能化された粒子の非限定的な例示的概略図である。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、複数の第１のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、複数の第２のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。複数の第３のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、複数の第３のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。

【０５６５】

第１、第２、及び第３のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの相対存在量は、さまざまな発現レベルを有するｍＲＮＡを模倣しうる。第１のタンパク質結合試薬と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチド及び第２のタンパク質結合試薬と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。抗体などの各種タンパク質結合試薬、及びコントロール粒子上の各種コントロール粒子オリゴヌクレオチドを用量設定して、標準曲線を生成することができる。第１のタンパク質結合試薬、第２のタンパク質結合試薬、又は第３のタンパク質結合試薬は、同一又は異なるタンパク質結合試薬でありうる。

【０５６６】

いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２（又は第３）のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の比は、１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：２１、１：２２、１：２３、１：２４、１：２５、１：２６、１：２７、１：２８、１：２９、１：３０、１：３１、１：３２、１：３３、１：３４、１：３５、１：３６、１：３７、１：３８、１：３９、１：４０、１：４１、１：４２、１：４３、１：４４、１：４５、１：４６、１：４７、１：４８、１：４９、１：５０、１：５１、１：５２、１：５３、１：５４、１：５５、１：５６、１：５７、１：５８、１：５９、１：６０、１：６１、１：６２、１：６３、１：６４、１：６５、１：６６、１：６７、１：６８、１：６９、１：７０、１：７１、１：７２、１：７３、１：７４、１：７５、１：７６、１：７７、１：７８、１：７９、１：８０、１：８１、１：８２、１：８３、１：８４、１：８５、１：８６、１：８７、１：８８、１：８９、１：９０、１：９１、１：９２、１：９３、１：９４、１：９５、１：９６、１：９７、１：９８、１：９９、１：１００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２（又は第３）のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の比は、少なくとも、又は多くとも１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１

．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：２１、１：２２、１：２３、１：２４、１：２５、１：２６、１：２７、１：２８、１：２９、１：３０、１：３１、１：３２、１：３３、１：３４、１：３５、１：３６、１：３７、１：３８、１：３９、１：４０、１：４１、１：４２、１：４３、１：４４、１：４５、１：４６、１：４７、１：４８、１：４９、１：５０、１：５１、１：５２、１：５３、１：５４、１：５５、１：５６、１：５７、１：５８、１：５９、１：６０、１：６１、１：６２、１：６３、１：６４、１：６５、１：６６、１：６７、１：６８、１：６９、１：７０、１：７１、１：７２、１：７３、１：７４、１：７５、１：７６、１：７７、１：７８、１：７９、１：８０、１：８１、１：８２、１：８３、１：８４、１：８５、１：８６、１：８７、１：８８、１：８９、１：９０、１：９１、１：９２、１：９３、１：９４、１：９５、１：９６、１：９７、１：９８、１：９９、若しくは１：１００でありうる。

【０５６７】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬（たとえば、二次抗体）と結合しうるし、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬を使用してコントロール粒子と結合する。パートナー結合試薬は、パートナー抗体を含みうる。パートナー抗体は、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗雌ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、又はそれらの組合せを含みうる。パートナー抗体は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、それらの組合せ、又はそれらの断片を含みうる。

【０５６８】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上と結合する。第１のタンパク質結合試薬は、異なるコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上と結合しうる。いくつかの実施形態では、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれとも結合しない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合した第１のタンパク質結合試薬及びいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドとも結合していない第１のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。

【０５６９】

コントロールバーコードの多様性

１つのコントロール粒子と結合した複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を有するいくつかのコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドが有するコントロールバーコード配列の数は、さまざまな履行で異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドが有するコントロールバーコード配列の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１０００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドが有するコントロールバーコード配列の数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、若しくは１００００００でありうる。

【０５７０】

いくつかの実施形態では、同じコントロール粒子オリゴヌクレオチド配列を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、

２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１０００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同じコントロール粒子オリゴヌクレオチド配列を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、若しくは１０００００００でありうる。

【０５７１】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、各々が第１のコントロールバーコード配列を含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチド、及び各々が第２のコントロールバーコード配列を含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含み、第１のコントロールバーコード配列及び第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有する。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の少なくとも２倍、１０倍、１００倍、又はそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の比は、１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：２１、１：２２、１：２３、１：２４、１：２５、１：２６、１：２７、１：２８、１：２９、１：３０、１：３１、１：３２、１：３３、１：３４、１：３５、１：３６、１：３７、１：３８、１：３９、１：４０、１：４１、１：４２、１：４３、１：４４、１：４５、１：４６、１：４７、１：４８、１：４９、１：５０、１：５１、１：５２、１：５３、１：５４、１：５５、１：５６、１：５７、１：５８、１：５９、１：６０、１：６１、１：６２、１：６３、１：６４、１：６５、１：６６、１：６７、１：６８、１：６９、１：７０、１：７１、１：７２、１：７３、１：７４、１：７５、１：７６、１：７７、１：７８、１：７９、１：８０、１：８１、１：８２、１：８３、１：８４、１：８５、１：８６、１：８７、１：８８、１：８９、１：９０、１：９１、１：９２、１：９３、１：９４、１：９５、１：９６、１：９７、１：９８、１：９９、１：１００、１：２００、１：３００、１：４００、１：５００、１：６００、１：７００、１：８００、１：９００、１：１０００、１：２０００、１：３０００、１：４０００、１：５０００、１：６０００、１：７０００、１：８０００、１：９０００、１：１００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の比は、少なくとも、又は多くとも１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：２１、１：２２、１：２３、１：２４、１：２５、１：２６、１：２７、１：２８、１：２９、１：３０、１：３１、１：３２、１：３３、１：３４、１：３５、１：３６、１：３７、１：３８、１：３９、１：４０、１：４１、１：４２、１：４３、１：４４、１：４５、１：４６、１：４７、１：４８、１：４９、１：５０、１：５１、１：５２、１：５３、１：５４、１：５５、１：５６、１：５７、１：５８、１：５９、１：６０、１：６１、１：６２、１：６３、１：６４、１：６５、１：６６、１：６７、１：６８、１：６９、１：７０、

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

【０５７２】

検出可能な部分

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、検出可能な部分、たとえば、フルオロフォア又は発色団などの光学部分と結合する。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分、たとえば、光学部分と結合しうる。いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、光学部分と結合しうる（図９Ｅ）。第２のタンパク質結合試薬は、光学部分と結合しうる。光学部分（たとえば、蛍光性タグを付けられたビーズ）と結合したコントロール粒子はまた、イメージング及びフローサイトメトリーのために使用することができる。

【０５７３】

検出可能な部分は、スペクトルの異なる検出可能な部分の群から選択されうる。スペクトルの異なる検出可能な部分は、たとえそれらの発光スペクトルが重なり合うことがあるとしても、識別可能な発光スペクトルを有する検出可能な部分を含む。検出可能な部分の非限定的な例としては、キサンテン誘導体：フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシン及びテキサスレッド；シアニン誘導体：シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、及びメロシアニン；スクアライン誘導体及び環置換スクアライン、たとえば、Ｓｅｔａ、ＳｅＴａｕ、及びＳｑｕａｒｅ色素；ナフタレン誘導体（ダンシル及びプロダン誘導体）；クマリン誘導体；オキサジアゾール誘導体：ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、及びベンゾオキサジアゾール；アントラセン誘導体：アントラキノン、たとえば、ＤＲＡＱ５、ＤＲＡＱ７及びＣｙＴＲＡＫオレンジ；ピレン誘導体：カスケードブルー；オキサジン誘導体：ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン１７０；アクリジン誘導体：プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー；アリールメチン誘導体：オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン；並びにテトラピロール誘導体：ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビンが挙げられる。検出可能な部分の他の非限定的な例としては、ヒドロキシクマリン、アミノクマリン、メトキシクマリン、カスケードブルー、パシフィックブルー、パシフィックオレンジ、ルシファーイエロー、ＮＢＤ、Ｒ－フィリコエリトリン（ＰＥ）、ＰＥ－Ｃｙ５コンジュゲート、ＰＥ－Ｃｙ７コンジュゲート、レッド６１３、ＰｅｒＣＰ、ＴｒｕＲｅｄ、ＦｌｕｏｒＸ、フルオレセイン、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３Ｂ、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、ＴＲＩＴＣ、Ｘ－ローダミン、リサミンローダミンＢ、テキサスレッド、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）、ＡＰＣ－Ｃｙ７コンジュゲート、ヘキスト３３３４２、ＤＡＰＩ、ヘキスト３３２５８、ＳＹＴＯＸブルー、クロモマイシンＡ３、ミトラマイシン、ＹＯＹＯ－１、エチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ、ＳＹＴＯＸグリーン、ＴＯＴＯ－１、ＴＯ－ＰＲＯ－１、ＴＯ－ＰＲＯ：シアニンモノマー、チアゾールオレンジ、ＣｙＴＲＡＫオレンジ、プロピジウムイオダイド（ＰＩ）、ＬＤＳ７５１、７－ＡＡＤ、ＳＹＴＯＸオレンジ、ＴＯＴＯ－３、ＴＯ－ＰＲＯ－３、ＤＲＡＱ５、ＤＲＡＱ７、Ｉｎｄｏ－１、Ｆｌｕｏ－３、Ｆｌｕｏ－４、ＤＣＦＨ、ＤＨＲ、及びＳＮＡＲＦが挙げられる。

【０５７４】

検出可能な部分の励起波長は変動してもよく、たとえば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６

０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００ナノメートル、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。検出可能な部分の発光波長もまた変動してもよく、たとえば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００ナノメートル、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。

【０５７５】

検出可能な部分の分子量は変動してもよく、たとえば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００ダルトン（Ｄａ）、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。検出可能な部分の分子量もまた変動してもよく、たとえば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００キロダルトン（ｋＤａ）、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。

【０５７６】

スペクトルの異なる検出可能な部分の基は、たとえば、５つの異なるフルオロフォア、５つの異なる発色団、５つのフルオロフォアと発色団の組合せ、４つの異なるフルオロフォアと１つの非フルオロフォアの組合せ、４つの発色団と１つの非発色団の組合せ、又は４つのフルオロフォアと発色団及び１つの非フルオロフォア非発色団の組合せでありうる

。いくつかの実施形態では、検出可能な部分は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、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スペクトルの異なる部分のうちの１つでありうる。

【０５７７】

コントロール粒子のワークフロー

ＡｂＯにより官能化されたビーズは、単一細胞シーケンシングコントロールとして任意の単一細胞ワークフローとともに使用することができる。単一細胞ワークフローは、マイクロウェルアレイ又はマイクロウェルカートリッジ（たとえば、ＢＤ Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標））又はマイクロフルイディクスデバイス（たとえば、１０Ｘ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）、Ｄｒｏｐ－ｓｅｑ（ＭｃＣａｒｒｏｌｌ Ｌａｂ、Ｈａｒｖａｒｄ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｃｈｏｏｌ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔ）；Ｍａｃｏｓｋｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２０１５ Ｍａｙ ２１ １６；５：１２０２、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、又はＡｂｓｅｑ（Ｍｉｓｓｉｏｎ Ｂｉｏ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）；Ｓｈａｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉ Ｒｅｐ．２０１７ Ｍａｒ １４；７：４４４４７、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を利用することができ、これらは確率バーコードと結合した固体若しくは半固体粒子（たとえば、ＢＤ Ｒｈａｐｓｏｄｙ若しくはＤｒｏｐ－ｓｅｑ）、又は放出可能な確率バーコードを封入する崩壊可能なヒドロゲル粒子（たとえば、１０Ｘ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ若しくはＡｂｓｅｑ）と組み合わされる。官能化ビーズは、バルクＲＮＡｓｅｑ又はマイクロアレイ研究のために使用されている外部ＲＮＡ標準コンソーシアム（ｅｘｔｅｒｎａｌ ＲＮＡ ｃｏｎｔｒｏｌ ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ）（ＥＲＣＣ）と類似した、単一細胞ワークフローの効率を決定するためのコントロールとなりうる。

【０５７８】

本明細書には、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを使用して標的の数を決定するための方法が開示される。標的（たとえば、遺伝子発現）の数を決定するための方法は、本明細書に開示される他の方法とともに使用することができる。たとえば、ワークフローを、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを使用してタンパク質発現及び遺伝子発現を決定するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を使用して複数の細胞のうちの１つの細胞の複数の標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード標的（たとえば、確率バーコード付き標的）及び複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチド（たとえば、確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチド）を生成する工程を含み、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識）、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードが異なるバーコード配列（たとえば、分子標識）を含み、且つ複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードが同一の細胞標識配列を含み、コントロール粒子組成物が複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合したコントロール粒子を含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列及び複数のバーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む。本方法は、複数のバーコード付き標的及び複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータにおいてコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数をカウントする工程とを含むことができる。本方法は、複数の標的のうちの少なくとも１つの標的に関して：シーケンシングデータにおいて標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数をカウントする工程と；標的の数を推定する

工程とを含むことができ、推定された標的の数が、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数と相関する。いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。擬似標的領域は、標的の部分配列を含みうる。

【０５７９】

いくつかの実施形態では、推定された標的の数は、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数、コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数、及びコントロールバーコード配列を含む複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と相関しうる。推定された標的の数は、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数、及びコントロールバーコード配列を含む複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数とコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数の比と相関しうる。

【０５８０】

たとえば、コントロール粒子が、特定のコントロールバーコード配列を有する１００個のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを有し、コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数（たとえば、ライブラリー作製プロセス後も残存するコントロールバーコード配列を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数）が８０個である場合、ライブラリー作製（たとえば、逆転写、増幅など）の効率は８０％である。したがって、異なるライブラリー作製からのデータは、ライブラリー作製効率を用いて正規化することにより比較することができる。

【０５８１】

別の例として、コントロール粒子は、低発現遺伝子を模倣する特定のコントロールバーコードシーケンシングを有する５つのコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含みうる。コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数が５つであり、低発現遺伝子が検出されない場合、低発現遺伝子は発現されていない（又は細胞は遺伝子の５つ未満のｍＲＮＡを有する）という結論を下すことができる。しかし、コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数が０であり、低発現遺伝子が検出されない場合、低発現遺伝子は発現されていないという結論を下すことはできない。

【０５８２】

捕捉効率は、異なる存在量を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドについて決定されうる。正規化は、２つ以上のコントロールバーコード配列を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドの捕捉効率に基づいて実施されうる。いくつかの実施形態では、シーケンシングデータにおいてコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数をカウントする工程は、シーケンシングデータにおいて第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数をカウントする工程と；シーケンシングデータにおいて第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数をカウントする工程とを含む。推定された標的の数は、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数、第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数、及び第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識）の数と相関しうる。

【０５８３】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数の標的及びコントロール粒子並びに複数のコ

ントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付ける工程の前に、コントロール粒子から複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つを放出する工程を含む。

【０５８４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を用いて、複数の標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける（たとえば、確率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のうちの標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのうちのコントロール粒子オリゴヌクレオチドと接触させて、標的及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；標的及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付き標的及び複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチド（たとえば、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチド）を生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを使用してバーコードを伸長する工程を含みうる。

【０５８５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成する工程を含む。複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、バーコード配列（たとえば、分子標識）の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部、又はバーコード配列（たとえば、分子標識）の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列（たとえば、分子標識）の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部、又はバーコード配列（たとえば、分子標識）の少なくとも一部及びコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０５８６】

マイクロウェルカートリッジ又はアレイのワークフロー

図１０は、単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子を用いた例示的なワークフローの概略図である。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子１００４と結合した複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含む。たとえば、コントロール粒子１０４０は、コントロール粒子１０４０に結合される抗体１００５にコンジュゲートされたコントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５と結合しうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５で官能化された複数のコントロール粒子１０４０は、複数の細胞に、たとえば、５％で添加されうる。コントロール粒子１０４０は、次のワークフローにおいて「細胞」として処理されうる。コントロール粒子１０４０はまた、コントロール細胞又はコントロール細胞粒子と呼ばれる場合もある。続いて、細胞１０１０及びコントロール粒子１０４０は、単一の区画１０１５ａ、１０１５ｂが単一細胞又はコントロール粒子及び単一ビーズ１０２０ａ、１０２０ｂに適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイのウェルなどの複数の区画に分離されうる。ビーズ１０２０ａ、１０２０ｂは、区画１０１５ａ、１０１５ｂにロードされうる。

【０５８７】

各ビーズは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、及びバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。抗体１００５にコンジュゲートされたオリ

ゴヌクレオチド１０２５は、化学的、光学的又は他の手段を用いて抗体１００５から脱離されうる。細胞１０１０は溶解されて（１０３５）、ゲノムＤＮＡ又は細胞のｍＲＮＡ　５３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　１０３０及びコントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５は、それぞれビーズ１０２０ａ、１０２０ｂ上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。ビーズを回収することができ、捕捉された細胞のｍＲＮＡ　１０３０及びコントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５（たとえば、全体で５０００個前後の細胞に相当する）がプールされうる。

【０５８８】

逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　１０３０及びコントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　１０３０及びオリゴヌクレオチド１０２５を鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅及びシーケンシングに付されうる。シーケンシングリードは、単一細胞の遺伝子発現プロフィール及びワークフローの全体又は一部の量的な効率（たとえば、細胞捕捉効率）を決定するために使用されうる細胞標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、遺伝子同一性、コントロール粒子オリゴヌクレオチド配列などのデマルチプレクシングに付されうる。たとえば、捕捉されたコントロール粒子の数は、データにおいてコントロールバーコード配列に関連付けられた細胞標識の数に基づいて決定されうる。ワークフローの効率は、捕捉されたコントロール粒子の数と添加されたコントロール粒子の数の比率でありうる。

【０５８９】

マイクロフルイディクスのワークフロー

図１０は、単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子を用いた別の例示的なワークフローの概略図である。コントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５で官能化された複数のコントロール粒子１０４０は、複数の細胞に、たとえば、５％で添加されうる。コントロール粒子１０４０は、次のワークフローにおいて「細胞」として処理されうる。コントロール粒子１０４０はまた、コントロール細胞又はコントロール細胞粒子と呼ばれる場合もある。続いて、細胞１０１０及びコントロール粒子１０４０は、マイクロフルイディクスデバイスを用いてドロップレット１０４５ａ、１０４５などの複数の区画に分離されうる。各ドロップレット１０４５ａ、１０４５ｂは、１つの細胞１０１０又は１つのコントロール粒子１０４０、及びヒドロゲルビーズ１０２０ａ、１０２０ｂを含みうる。

【０５９０】

各ビーズ１０２０ａ、１０２０ｂは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、及びバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。ビーズ１０２０ａ、１０２０ｂは、次のワークフロー（たとえば、逆転写）のための試薬を含みうる。抗体１００５にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド１０２５は、化学的、光学的又は他の手段を用いて抗体１００５から脱離されうる。細胞１０１０は溶解されて（１０３５）、ゲノムＤＮＡ又は細胞のｍＲＮＡ　１０３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　６３０及びコントロール粒子オリゴヌクレオチド１０２５は、それぞれビーズ１０２０ａ、１０２０ｂから放出されたオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　１０３０及びオリゴヌクレオチド１０２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　１０３０及びオリゴヌクレオチド１０２５を鋳型として用いて伸長することができる。

【０５９１】

ドロップレット１０４５ａ、１０４５ｂの細分化後、逆転写酵素により生成された伸長産物をプールし、且つ増幅及びシーケンシングに付すことができる。シーケンシングリー

ドは、単一細胞の遺伝子発現プロフィール及びワークフローの全体又は一部の量的な効率を決定するための細胞標識、分子標識、遺伝子同一性、コントロール粒子オリゴヌクレオチド配列などのデマルチプレクシングに付されうる。

【０５９２】

単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド

また、本明細書に開示されるものには、単一細胞シーケンシング効率を決定するための方法、キット及びシステムが含まれる。このような方法、キット及びシステムは、オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を用いて、細胞成分の発現レベル（たとえばタンパク質発現レベル）を測定するための方法、キット及びシステムなどの、本明細書に開示される任意の好適な方法、キット及びシステムにおいて、又はそれらと組み合わせて使用されうる。

【０５９３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた抗体（たとえば、ユニバーサル抗体又はバイオマーカー抗体）を有する単一細胞を標識化し、それらとともに次世代シーケンシングライブラリーを作製することにより、ＮＧＳリード中のオリゴヌクレオチド由来のシグナルを使用して、単一細胞ＮＧＳ効率を決定することができる。続いて、これは、ＱＣ工程又は異なる単一細胞シーケンシングプラットフォームに関する有効性に関する評価ツールとして使用されうる。たとえば、コントロールオリゴヌクレオチドは、たとえば、オリゴヌクレオチドと結合した細胞成分結合試薬を用いて細胞成分の発現レベル（たとえば、タンパク質発現レベル）を測定するための方法、キット及びシステムなどの、本明細書に開示される任意の好適な方法、キット及びシステムにおいて使用されうる。

【０５９４】

オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた抗体（本明細書では「ＡｂＯ」として参照される）は、単一細胞シーケンシングコントロールとして任意の単一細胞ワークフローとともに使用することができる。単一細胞ワークフローは、マイクロウェルアレイ又はマイクロウェルカートリッジ（たとえば、ＢＤ　Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標））又はマイクロフルイディクスデバイス（たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）、Ｄｒｏｐ－ｓｅｑ（ＭｃＣａｒｒｏｌｌ　Ｌａｂ、Ｈａｒｖａｒｄ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｈｏｏｌ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）；Ｍａｃｏｓｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２０１５　Ｍａｙ　２１　１６；５：１２０２、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、又はＡｂｓｅｑ（ＭｉｓｓｉｏｎＢｉｏ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）；Ｓｈａｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．２０１７　Ｍａｒ　１４；７：４４４４７、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を利用することができ、これらは確率バーコードなどのバーコードと結合した固体若しくは半固体粒子（たとえば、ＢＤ　Ｒｈａｐｓｏｄｙ若しくはＤｒｏｐ－ｓｅｑ）、又は放出可能な確率バーコードなどのバーコードを封入する崩壊可能なヒドロゲル粒子（たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ若しくはＡｂｓｅｑ）と組み合わされる。ＡｂＯは、単一細胞ワークフローの効率を決定するためのコントロールとなりうる。たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓの単一細胞シーケンシングプラットフォームは、エマルションを用いて単一細胞の捕捉を行って、ドロップレット中に単一細胞を封入する。これらのドロップレットは容易に可視化できないため、単一細胞の捕捉効率を容易に決定することができない。このような単一細胞シーケンシングワークフローの上流でのＡｂＯの使用により、ユーザはシーケンシング後の単一細胞捕捉効率及びドロップレット形成率を評価することが可能になる。

【０５９５】

図１１は、単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド－コンジュゲート抗体を用いた例示的ワークフローの概略図を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞（たとえば、５０００個）９００は、マイクロウェルカートリッジ又はアレイのマイクロウェル１１１５にロードする前に、コントロールオリゴヌクレ

オチド１１２５とコンジュゲートされた抗体１１０５により染色されうる。続いて、細胞１１１０は、単一の区画１１１５が単一細胞及び単一ビーズ１１２０に適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイのウェルなどの複数の区画に分離されうる。

【０５９６】

ビーズは、たとえば、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、及びバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。抗体１１０５にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド１１２５は、化学的、光学的又は他の手段を用いて抗体１１０５から脱離されうる。細胞１１１０は溶解されて（１１３５）、ゲノムＤＮＡ又は細胞のｍＲＮＡ　１１３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　１１３０及びコントロール粒子オリゴヌクレオチド１１２５は、ビーズ１１２０上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。ビーズを回収することができ、捕捉された細胞のｍＲＮＡ　１１３０（たとえば、全体で５０００個前後の細胞に相当する）がプールされうる。

【０５９７】

逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　１１３０及びオリゴヌクレオチド１１２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　１１３０及びオリゴヌクレオチド１１２５を鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅及びシーケンシングに付されうる。シーケンシングリードは、単一細胞の遺伝子発現プロフィール及びワークフローの全体又は一部の量的な効率（たとえば、細胞捕捉効率）を決定するための細胞標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、遺伝子同一性、コントロールオリゴヌクレオチド配列などのデマルチプレクシングに付されうる。順調に捕捉され、ライブラリー作製を経る細胞の数（たとえば、５０００個未満の細胞）が決定されうる。

【０５９８】

図１２は、単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド－コンジュゲート抗体を用いた例示的ワークフローの別の概略図を示す。図１２では、単一細胞１２１０ａ、１２１０ｂを含有するドロップレット１２４５ａ、１２４５ｂ及び単一粒子１２２０ａ、１２２０ｂがマイクロ流体デバイスを用いて形成されうる。単一細胞１２１０ａ、１２１０ｂは、コントロールオリゴヌクレオチド１２２５ａ、１２２５ｂとコンジュゲートされた抗体１２０５ａ、１２０５ｂに結合されうる。ドロップレット１２４５ａ、１２４５ｂ中における細胞溶解及び逆転写後、ドロップレットは細分化され、内容物はライブラリー作製のためにプールされうる。順調に捕捉され、ライブラリー作製を経る細胞の数が決定されうる。

【０５９９】

図１３Ａ～１３Ｃは、コントロールオリゴヌクレオチドが細胞のカウントのために使用されうることを示すプロットである。図１３Ａ～１３Ｂは、ＡｂＯのコントロールオリゴヌクレオチドが細胞のカウントのためのコントロールとして使用されうることを示す。１００％の捕捉及びライブラリー作製効率が達成される場合、ｍＲＮＡカウントプロット及びコントロールオリゴヌクレオチドカウントプロットの下降点は一致しうる。図１３Ｃは、従来のｍＲＮＡのみの細胞標識コーリングを使用することにより、転写性の高い細胞に隠れて転写性の低い細胞を見逃す可能性があることを示す。この方法は、ｎ個の細胞の標識でカットオフを要求しうる。これは、多数の活性化Ｔ細胞内に休止状態のＴ細胞がある場合に起こりうるが、ここで、活性化Ｔ細胞は、数倍高いＲＮＡ転写を有しうる。これはまた、標的化パネル（たとえば、癌パネル）において、標的化遺伝子の発現の低い非標的化細胞（非癌細胞）が減少することになる場合に起こりうる。しかし、タンパク質発現ははるかに高いため、転写性の低い細胞は依然としてコールされる確率が高い。この方法は、ｍ個の細胞の標識でカットオフを要求しうる（ｍ＞ｎ）。

【０６００】
本明細書では、シーケンシングコントロールのための方法が開示される。たとえば、単一細胞シーケンシング効率を決定する単一細胞シーケンシング効率を決定するための方法は、本明細書に開示される他の方法とともに使用することができる。たとえば、単一細胞シーケンシング効率のために使用される方法は、タンパク質発現を決定するための方法とともに使用することができる。別の例として、ワークフローを、単一細胞シーケンシング効率、タンパク質発現及び／又は遺伝子発現を決定するために使用することができる。
【０６０１】
いくつかの実施形態では、本方法は、複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数のタンパク質標的を含み、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドと結合したタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的のうち少なくとも１つに特異的に結合可能であり、且つコントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列及び複数のバーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；複数のバーコードを使用してコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列（たとえば、分子標識配列）が、異なる配列を含み、且つ複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータにおいて複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特徴を使用して、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特徴（たとえば、順調に捕捉され、ライブラリー作製を経る細胞の数）を決定する工程とを含む。いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。
【０６０２】
いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特徴を決定する工程は、シーケンシングデータにおいて複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程とを含む。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数と複数の細胞の数の比に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む工程を含みうる。
【０６０３】
いくつかの実施形態では、シーケンシングデータにおいて複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの特徴を使用して１つ以上の細胞の少なくとも１つの特徴を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識配列）の数を決定する工程と；細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程とを含む。細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた最多数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数を決定する工程を含む。細胞標識及びコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数を使用して、１つ以上の細胞の数を決定する工程は、最多数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数に関連付けられたシーケンシングデータにおいて、細胞標識の数と最多数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数のプロットを作製する工程と；１つ

以上の細胞の数としてプロットにおけるカットオフを決定する工程とを含みうる。

【０６０４】

いくつかの実施形態では、本方法は、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、細胞成分結合試薬（タンパク質結合試薬）からコントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のコントロール組成物のうちの未結合のコントロール組成物を除去する工程を含む。未結合のコントロール組成物を除去する工程は、洗浄緩衝液により複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を洗浄する工程を含みうる。未結合の未結合組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを使用してコントロール組成物の少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合した細胞を選択する工程を含みうる。

【０６０５】

いくつかの実施形態では、コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、確率バーコードを使用してコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数の確率バーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、複数のバーコードを使用して複数のコントロールオリゴヌクレオチド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コントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた確率バーコードを伸長して、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程とを含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを使用してバーコードを伸長する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成する工程を含む。複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、確率バーコード配列（たとえば、分子標識配列）の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、シーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む。シーケンシングデータを取得する工程は、分子標識配列の少なくとも一部及びコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【０６０６】

細胞のオーバーローディング及びマルチプレットの同定

本明細書の開示には、細胞のオーバーローディング及びマルチプレットを同定するための方法、キット及びシステムも含まれる。このような方法、キット及びシステムは、たとえば、オリゴヌクレオチドと結合した細胞成分結合試薬を用いて細胞成分の発現レベル（たとえば、タンパク質発現レベル）を測定するための方法、キット及びシステムなどの、本明細書に開示される任意の好適な方法、キット及びシステムと組み合わせて使用されうる。

【０６０７】

現在の細胞ローディング技術を使用すると、約２００００個の細胞が約６００００個のマイクロウェルを有するマイクロウェルカートリッジ又はアレイにロードされる場合に、２つ以上の細胞を有するマイクロウェル又はドロップレットの数（ダブレット又はマルチプレットと呼ばれる）が最小限になりうる。しかし、ロードされた細胞の数が増加すると、複数の細胞を有するマイクロウェル又はドロップレットの数が著しく増加する場合がある。たとえば、約５００００個の細胞がマイクロウェルカートリッジ又はアレイの約６００００個のマイクロウェルにロードされる場合、複数の細胞を有するマイクロウェルのパーセンテージは、かなり高く（たとえば、１１～１４％）なりうる。このように多数の細胞をマイクロウェルにロードすることは、細胞のオーバーローディングと呼ばれる場合がある。しかし、細胞を、いくつかの群（たとえば、５つ）に区分し、各群中の細胞を、識別可能なサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレ

オチドで標識する場合、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に関連付けられた細胞標識（たとえば、確率バーコードなどの、バーコードの細胞標識）は、シーケンシングデータにおいて同定され、且つ次の処理から除去されうる。いくつかの実施形態では、細胞を、多数の群（たとえば、１００００）に区分し、各群中の細胞を、識別可能なサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識し、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に関連付けられたサンプル標識は、シーケンシングデータにおいて同定され、且つ次の処理から除去されうる。いくつかの実施形態では、さまざまな細胞を、識別可能な細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドで標識し、２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞同定配列は、シーケンシングデータにおいて同定され、且つ次の処理から除去されうる。マイクロウェルカートリッジ又はアレイにおけるマイクロウェルの数に対して、このような多数の細胞を、マイクロウェルにロードすることができる。

【０６０８】

本明細書に開示されるものには、サンプル同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程；得られたシーケンシングデータから、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又はその後の分析（たとえば、単一細胞ｍＲＮＡプロファイリング、又は全トランスクリプトーム分析）から、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含む。いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０６０９】

たとえば、本方法は、サンプルインデックス付加を使用して５００００個以上の細胞（１００００～２００００個の細胞と比較して）をロードするために使用されうる。サンプルインデックス付加は、細胞成分（たとえば、ユニバーサルタンパク質マーカー）に対するオリゴヌクレオチド結合細胞成分結合試薬（たとえば、抗体）又は細胞成分結合試薬を使用して、異なるサンプル由来の細胞を、ユニークなサンプルインデックスで標識することができる。異なるサンプル由来の２つ以上の細胞、サンプルの異なる細胞集団由来の２つ以上の細胞、又はサンプルの２つ以上の細胞が、同じマイクロウェル又はドロップレットにおいて捕捉される場合、合わせた「細胞」（又は２つ以上の細胞の内容物）は、異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（又は細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチド）に関連付け可能である。異なる細胞集団の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形

態では、異なる集団の数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なる集団の数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、若しくは１００でありうる。各集団中の細胞の数、又は平均数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、各集団中の細胞の数、又は平均数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、各集団中の細胞の数、又は平均数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、若しくは１００でありうる。各集団中の細胞の数、又は平均数が、十分に少ない（たとえば、集団当たり５０、２５、１０、５、４、３、２、又は１個の細胞に等しいか、又はそれ未満である）場合、細胞オーバーローディング及びマルチプレットの同定のためのサンプルインデックス付加組成物は、細胞同定組成物と呼ばれうる。

【０６１０】

サンプルの細胞は、サンプルの細胞を複数の集団に等分することにより複数の集団に区分されうる。シーケンシングデータにおいて２つ以上のサンプルインデックス付加配列に関連付けられた「細胞」は、シーケンシングデータにおいて１つの細胞標識配列（たとえば、確率バーコードなどの、バーコードの細胞標識配列）に関連付けられた２つ以上のサンプルインデックス付加配列に基づいて、「マルチプレット」として同定されうる。合わせた「細胞」のシーケンシングデータもまた、本明細書でマルチプレットと呼ばれる。マルチプレットは、ダブレット、トリプレット、カルテット、クインテット、セクステット、セプテット、オクテット、ノネット、又はそれらの任意の組合せでありうる。マルチプレットは、任意のｎ－プレットでありうる。いくつかの実施形態では、ｎは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、又はこれらの値のいずれか２つの間の範囲、又はこれらの近似値である。いくつかの実施形態では、ｎは、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、若しくは２０である。

【０６１１】

単一細胞の発現プロフィールを決定する場合、２つの細胞が、１つの細胞として同定されてもよく、２つの細胞の発現プロフィールは、１つの細胞についての発現プロフィール（ダブレットの発現プロフィールと呼ばれる）として同定されてもよい。たとえば、バーコーディング（たとえば、確率バーコーディング）を用いて２つの細胞の発現プロフィールを決定する場合、２つの細胞のｍＲＮＡ分子は、同じ細胞標識を有するバーコードに関連付けられうる。別の例として、２つの細胞が、１つの粒子（たとえば、ビーズ）に関連付けられうる。粒子は、同じ細胞標識のバーコードを含みうる。細胞を溶解させた後、２つの細胞中のｍＲＮＡ分子が、粒子、ひいては同じ細胞標識のバーコードに関連付けられうる。ダブレットの発現プロフィールが、発現プロフィールの解釈を歪めることがある。

【０６１２】

ダブレットは、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。ダブレットはまた、２つのサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。異なる配列の２つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つの細胞（又は２つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つ以上の細胞）が、同じマイクロウェル又はドロップレット中に捕捉される場合にダブレットが起こる可能性があり、合わせた「細胞」は、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。トリプレットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を

有する３つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は３つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。カルテットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を有する４つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は４つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。クインテットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を有する５つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は５つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。セクステットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を有する６つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は６つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。セプテットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を有する７つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は７つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。オクテットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を有する８つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は８つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。ノネットは、すべてが異なるサンプルインデックス付加配列を有する９つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」、又は９つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。異なる配列の２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つ以上の細胞（又は２つ以上の異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つ以上の細胞）が、同じマイクロウェル又はドロップレット中に捕捉される場合にマルチプレットが起こる可能性があり、合わせた「細胞」は、２つ以上の異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。

【０６１３】

他の例として、本方法は、マルチプレットの同定のために用いられ得、サンプルのオーバーローディングする状況であるかにかかわらず、又はマイクロウェルアレイのマイクロウェル上に細胞をローディングするか、もしくは細胞を含むドロップレット（液滴）を生成する状況であるかにかかわらず用いられ得る。２以上の細胞が１つのマイクロウェルにロードされると、組み合わされた「細胞」（又は２以上の細胞の内容物）から得られるデータは、異常な遺伝子発現プロファイルを有するマルチプレットである。サンプルインデックス付加を使用することにより、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（又は２つ以上のサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド）に各々が関連付けられているか、又は割り当てられている細胞標識を探すことにより、これらのマルチプレットのいくつかを認識することができる。サンプルインデックス付加配列とともに、本明細書に開示される方法を、マルチプレットの同定のために使用することができる（サンプルをオーバーローディングするかしないかの状況、又はマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするか、若しくは細胞を含有するドロップレットを生成する状況であるかにかかわらず）。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々及び第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌ

クレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、を含む。

【０６１４】

マイクロウェルカートリッジのマイクロウェル又はマイクロフルイディクスデバイスを用いて生成されたドロップレットにロードされうる細胞の数は、マルチプレット率によって制限されうる。より多くの細胞をロードすることによって、同定するのが困難で、単一細胞データにおいてノイズを生成しうるより多くのマルチプレットを引き起こす可能性がある。サンプルインデックス付加とともに、本方法は、マルチプレットをより正確に標識するか、又は同定し、且つシーケンシングデータ又は次の分析からマルチプレットを除去するために使用することができる。より高い信頼度でマルチプレットを同定できることによって、マルチプレット率に関するユーザ許容度を増大させることができ、且つ各マイクロウェルカートリッジ又は各々が少なくとも１つの細胞を有する生成しているドロップレットにより多くの細胞をロードすることができる。

【０６１５】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む。複数の細胞の数及び複数のサンプルインデックス付加組成物の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、複数の細胞及び／又はサンプルインデックス付加組成物の数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１００００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞及び／又はサンプルインデックス付加組成物の数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、若しくは１００００００でありうる。細胞の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、細胞の数、又は平均数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１００００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、細胞の数、又は平均数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、若しくは１００００００でありうる。

【０６１６】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つのサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つのサンプルインデックス付加組成物のうちの少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々から１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む。

【０６１７】

いくつかの実施形態では、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬からサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０６１８】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０６１９】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む。複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む。

【０６２０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０６２１】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、複数のバーコ

ードの各々が、細胞標識配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。

【０６２２】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０６２３】

いくつかの実施形態では、細胞同定のための方法は、第１の複数の１つ以上の細胞及び第２の複数の１つ以上の細胞を、それぞれ２つの細胞同定組成物と接触させる工程であって、第１の複数の１つ以上の細胞の各々及び第２の複数の１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程；複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程；得られたシーケンシングデータから、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程及び／又は次の分析（たとえば、単一細胞ｍＲＮＡプロファイリング、又は全トランスクリプトーム分析）から、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの組合せを含む。

【０６２４】

異なる配列の２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つ以上の細胞（又は２つ以上の異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つ以上の細胞）が、同じマイクロウェル又はドロップレット中に捕捉される場合にマルチプレット（たとえば、ダブレット、トリプレットなど）が起こる可能性があり、合わせた「細胞」は、２つ以上の異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。

【０６２５】

細胞をオーバーローディングする状況、又はマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするか、若しくは細胞を含有するドロップレットを生成する状況であるかにかかわらず、細胞同定組成物は、マルチプレットの同定のために使用することができる。２つ以上の細胞が、１つのマイクロウェルにロードされる場合、合わせた「細胞」（又は

２つ以上の細胞の内容物）から得られるデータは、異常な遺伝子発現プロフィールを有するマルチプレットである。細胞同定を使用することにより、異なる細胞同定配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチド（又は２つ以上の細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチド）に各々が関連付けられているか、又は割り当てられている細胞標識（たとえば、確率バーコードなどの、バーコードの細胞標識）を探すことにより、これらのマルチプレットのいくつかを認識することができる。細胞同定配列とともに、本明細書に開示される方法を、マルチプレットの同定のために使用することができる（サンプルをオーバーローディングするかしないかの状況、又はマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするか、若しくは細胞を含有するドロップレットを生成する状況であるかにかかわらず）。いくつかの実施形態では、本方法は、それぞれ２つの細胞同定組成物を有する第１の複数の１つ以上の細胞と第２の複数の１つ以上の細胞を接触させる工程であって、第１の複数の１つ以上の細胞の各々と第２の複数の１つ以上の細胞の各々が、１つ以上のタンパク質標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドと結合した細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分の少なくとも１つに特異的に結合可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、且つ２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを使用して細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、及び標的結合領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が異なる配列を含み、且つ複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータにおいて各々が２つ以上の細胞同定配列に関連付けられた１つ以上のマルチプレット細胞標識配列を同定する工程とを含む。

【０６２６】

マイクロウェルカートリッジのマイクロウェル又はマイクロフルイディクスデバイスを用いて生成されたドロップレットにロードされうる細胞の数は、マルチプレット率によって制限されうる。より多くの細胞をロードすることによって、同定するのが困難で、単一細胞データにおいてノイズを生成しうるより多くのマルチプレットを引き起こす可能性がある。細胞同定とともに、本方法は、マルチプレットをより正確に標識するか、又は同定し、且つシーケンシングデータ又は次の分析からマルチプレットを除去するために使用することができる。より高い信頼度でマルチプレットを同定できることによって、マルチプレット率に関するユーザ許容度を増大させることができ、且つ各マイクロウェルカートリッジ又は各々が少なくとも１つの細胞を有する生成しているドロップレットにより多くの細胞をロードすることができる。

【０６２７】

いくつかの実施形態では、第１の複数の１つ以上の細胞及び第２の複数の１つ以上の細胞をそれぞれ２つの細胞同定組成物と接触させる工程は、第１の複数の１つ以上の細胞を、２つの細胞同定組成物のうちの第１の細胞同定組成物と接触させる工程と；第１の複数の１つ以上の細胞を、２つの細胞同定組成物のうちの第２の細胞同定組成物と接触させる工程とを含む。複数の細胞同定組成物の数は、さまざまな履行で異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、細胞同定組成物の数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１００００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、細胞同定組成物の数は、少なくとも、又は多くとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、若しくは１００００００でありうる。各複

数の１つ以上の細胞中の細胞の数、又は平均数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、各複数の１つ以上の細胞中の細胞の数、又は平均数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１０００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、各複数の１つ以上の細胞中の細胞の数、又は平均数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、若しくは１０００００００でありうる。

【０６２８】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つの細胞同定組成物のうちの未結合の細胞同定組成物を除去する工程を含む。未結合の細胞同定組成物を除去する工程は、洗浄緩衝液により第１の複数の１つ以上の細胞及び第２の複数の１つ以上の細胞のうちの細胞を洗浄する工程を含みうる。未結合の細胞同定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを使用して２つの細胞同定組成物の少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合した細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を溶解する工程を含む。

【０６２９】

いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から脱離可能又は脱離不可能なように構成される。本方法は、細胞成分結合試薬から細胞同定オリゴヌクレオチドを脱離させる工程を含みうる。細胞同定オリゴヌクレオチドを脱離させる工程は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元剤を使用すること）、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬から細胞同定オリゴヌクレオチドを脱離させる工程を含みうる。

【０６３０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを使用して細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを細胞同定オリゴヌクレオチドと接触させて、細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程とを含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０６３１】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成する工程を含む。複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）の少なくとも一部及び細胞同定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部及び細胞同定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程は、少なくとも１つのバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドの細胞同定配列に基づいて、複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む。

【０６３２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを使用して細胞同定オリゴヌクレオチドに

バーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを使用して細胞同定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０６３３】

細胞成分間相互作用の決定

本明細書に開示されるものには、細胞成分間の相互作用を決定するための方法、たとえば、多重化された近接ライゲーション方法が含まれる。このような方法、キット及びシステムは、本明細書に開示される任意の好適な方法、キット及びシステム、たとえば、オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を用いて、細胞成分の発現レベル（タンパク質発現レベルなど）を測定するための方法、キット及びシステムと組み合わせて使用されうる。

【０６３４】

本明細書に開示される方法は、１つ又は複数の細胞成分（たとえば、タンパク質）間の相互作用を検出、同定、決定、及び／又は測定するのに使用することができる。たとえば、本方法は、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、１０、２０、３０、４０、５０、１００、２００、３００、又はそれ以上の対の細胞成分間の相互作用を検出、同定、決定、及び／又は測定するのに使用することができる。１つの対の細胞成分標的における細胞成分標的は、別の対の細胞成分標的における細胞成分標的と重複しうる。たとえば、細胞成分標的の第１の対は、プロテインＡ及びプロテインＢを含むことができ、細胞成分標的の第２の対は、プロテインＡ及びプロテインＣを含みうる。

【０６３５】

いくつかの実施形態では、本方法は、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を使用して、細胞成分結合試薬の標的（本明細書で細胞成分標的と呼ばれる）間の相互作用を決定する。たとえば、本方法は、抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを使用して、単一細胞におけるタンパク質間相互作用を検出することができる。抗体は、ホモ二量体又はヘテロ二量体でありうる。各細胞成分結合試薬は、ユニークな相互作用決定配列を含有する相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる（たとえば、結合される又は結合する）。たとえば、各抗体は、ユニークなバーコード配列を含有するオリゴヌクレオチドにコンジュゲートされうる。一緒にライゲートされる相互作用決定オリゴヌクレオチドの対を決定することにより、互いに相互作用する細胞成分標的を明らかにすることができる。たとえば、一緒にライゲートされるバーコード対を決定することにより、互いに相互作用するタンパク質を明らかにすることができる。この方法はまた、ウェルベースの及びドロップレットベースの単一細胞ｍＲＮＡシーケンシング方法などの単一細胞ｍＲＮＡシーケンシング方法と組み合わせて使用されうる。

【０６３６】

いくつかの実施形態では、本方法は、線形増幅を用いて、シーケンシングのためのアンプリコンを生成することができる。本方法は、蛍光プローブ、又は他の方法による下流検出のために十分な鋳型を生成するために、環状鋳型を生成したり、ローリングサークル増幅を使用したりしなくてもよい。本方法を使用して、単一細胞における細胞成分標的間の相互作用を決定することができる。たとえば、本方法は、数万個の単一細胞にわたる数百の細胞成分間相互作用（たとえば、タンパク質間相互作用）を検出するのに使用することができ、読み出しとしてシーケンシングを使用する。同じタンパク質又は細胞成分標的の間の相互作用も決定されうる。本方法は、読み出しとして蛍光及び定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）に依存せず、蛍光及び定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）は、インプットとしてバルクＲＮＡを必要とし、一度にごく少ない細胞（たとえば、１００個未満の細胞）しか処理することができず、一度に限られた量の細胞成分間相互作用を検出することができる。多重化された方法は、抗体又は細胞成分結合試薬に関連付けられるか又はコンジュゲートされたバーコード付きオリゴヌクレオチドを用いて、ハイスループットで多数の単一細胞における細胞成分間相互作用を決定することができる。

【０６３７】

さらに、本方法はまた他の単一細胞ＲＮＡシーケンシング方法とともに使用されうる。たとえば、１つの単一ワークフローを使用して、ｍＲＮＡ発現レベル、タンパク質発現レベル（又は細胞成分標的のレベル）、及び／又はタンパク質間相互作用（又は細胞成分間の相互作用）を決定することができる。結果として、単一の実験において、単一細胞（又は複数の単一細胞）におけるｍＲＮＡ発現、タンパク質発現、及びタンパク質間相互作用についてのデータを得ることができる。

【０６３８】

いくつかの実施形態では、本方法を使用して、２つの細胞の間の細胞成分間相互作用及び細胞内細胞成分間相互作用を検出することができる。たとえば、本方法を使用して、２つの細胞の間のタンパク質間相互作用、並びに細胞内タンパク質間相互作用を検出することができる。本方法は、抗体染色又はインキュベーション（たとえば、細胞内タンパク質又は標的への抗体の結合を可能にするための細胞固定）の前にさらなる細胞調製を必要としうる。

【０６３９】

図１４Ａ～１４Ｆは、相互作用決定組成物の対を用いて細胞成分間の相互作用（たとえば、タンパク質）を決定する例示的ワークフローの概略図を示す。本方法は、図１４Ａに示される２つのタイプの抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂ（たとえば、抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート）を用いることができる。２つのタイプの抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂは、２つのタイプのオリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられた２つの同一又は異なる抗体１４０８ａ、１４０８ｂを含みうる。関連付け（たとえば、コンジュゲーション）は、可逆的又は不可逆的（たとえば、切断性又は非切断性）でありうる。１つのタイプのオリゴヌクレオチド１４１２ａ（本明細書でタイプ１オリゴヌクレオチド１４１２ａと呼ばれる）は、ユニバーサルシーケンシング領域１４１６を有しうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサルシーケンシング領域１４１６は、ユニバーサルプライマーを用いた増幅のためにすべての抗体－オリゴヌクレオチド組成物に共通でありうる。他のタイプのオリゴヌクレオチド１４１２ｂ（本明細書でタイプ２オリゴヌクレオチド１４１２ｂと呼ばれる）は、確率バーコードなどのバーコードへのハイブリダイゼーションのためにポリ（ｄＡ）配列１４２０を有しうる。たとえば、タイプ２オリゴヌクレオチド１４１２ｂのポリ（ｄＡ）配列１４２０は、ビーズに関連付けられた（たとえば、ビーズ上に固定された、ビーズ上に部分的に固定された、ビーズに解放可能に封入された、ビーズに部分的に封入された、又はそれらの任意の組合せ）確率バーコードにハイブリダイズすることができる。両方のオリゴヌクレオチドタイプ１４１２ａ、１４１２ｂはまた、各抗体１４０４ａ、１４０４ｂに固有のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを含みうる。２つのオリゴヌクレオチドタイプ１４１２ａ、１４１２ｂは、図１４Ｂに示される架橋オリゴ１４３２へのハイブリダイゼーションのために異なる配列１４２８ａ、１４２８ｂを含みうる。タイプ１オリゴヌクレオチド１４１２ａ及びタイプ２オリゴヌクレオチド１４１２ｂが、５’から３’方向及び３’から５’方向に抗体１４０８ａ、１４０８ｂに関連付けられているように示されているが、それらは、例示であるに過ぎず、限定を意図したものではない。いくつかの実施形態では、タイプ１オリゴヌクレオチド１４１２ａ及びタイプ２オリゴヌクレオチド１４１２ｂは、３’から５’方向及び５’から３’方向に抗体１４０８ａ、１４０８ｂに関連付けられうる。

【０６４０】

図１４Ｂを参照すると、架橋オリゴヌクレオチド１４３２は、架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂに結合して、ライゲーションのために抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂを一緒にしうる。架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂの配列は、各組成物１４０４ａ、１４０４ｂについて異なりうる。いくつかの実施形態では、異なる架橋オリゴヌクレオチド１４３２が、各抗体対に使用されうる。

【０６４１】

本方法は、関連付けられたオリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂが、一緒に結合されるか又は互いにライゲートされ、後にシーケンシングのためにビーズに関連付けられたバーコード（たとえば、確率バーコード）によって捕捉されうるように、抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂの対を一緒にすることに基づきうる。抗体１４０８ａ、１４０８ｂの標的１４３６ａ、１４３６ｂが、３０～４０ｎｍなどの、互いの特定の閾値距離又は範囲内にある場合、オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、互いにライゲートされうる。

【０６４２】

多重化された方法は、抗体又は細胞成分結合試薬に関連付けられた又はコンジュゲートされたバーコード付きオリゴヌクレオチドを用いて、ハイスループットで多数の単一細胞において、タンパク質間相互作用、又は細胞成分間の相互作用を決定することができる。いくつかの実施形態では、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、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、又はこれらの近似値の細胞における細胞成分間の相互作用は、細胞ワークフローにおいて決定されうる。いくつかの実施形態では、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、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の細胞における細胞成分間の相互作用は、細胞ワークフローにおいて決定されうる。

【０６４３】

染色

アッセイを行うために、細胞は、抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂ又は抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂ（又は細胞成分結合試薬－オリゴヌクレオチド組成物）の対でまず染色されうる。抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂ（又は細胞成分結合試薬）の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂの数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂの数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００でありうる。

【０６４４】

異なる組成物１４０４ａ、１４０４ｂの抗体１４０８ａ、１４０８ｂ（又は細胞成分結合試薬）は、異なる又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合しうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａ、１４０４ｂの抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９

００、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａ、１４０４ｂの抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００でありうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａ、１４０４ｂの抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａ、１４０４ｂの抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、若しくは１００％でありうる。

【０６４５】

抗体１４０８ａ、１４０８ｂ（又は細胞成分結合試薬）のいくつか、全て、又は０個が、同一の配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合しうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、０、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、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、少なくとも、又は多くとも、０、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、若しくは１０００でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、若しくは１００％でありうる。

【０６４６】
抗体１４０８ａ（又は細胞成分結合試薬）のいくつか、すべて、又は０個が、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域を有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合しうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａの数は、０、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、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａの数は、少なくとも、又は多くとも、０、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、若しくは１０００でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａのパーセンテージは、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する抗体１４０８ａの数は、少なくとも、又は多くとも、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、若しくは１００％でありうる。

【０６４７】
抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂ（細胞成分結合試薬－オリゴヌクレオチド組成物）の対の数は、さまざまな履行で異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂの対の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａ、１４０４ｂの対の数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００でありうる。

【０６４８】
組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂ（又は細胞成分結合試薬）は、異なる又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合しうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる

対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、少なくとも、又は多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００でありうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なるバーコード配列又は同一のバーコード配列１４２４ａ、１４２４ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、若しくは１００％でありうる。

【０６４９】

組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂ（又は細胞成分結合試薬）のいくつか、すべて、又は０個が、同一の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合しうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、０、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、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂの数は、少なくとも、又は多くとも、０、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、若しくは１０００でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂの％は、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有する架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられるか又は結合する組成物１４０４ａ、１４０４ｂの異なる対の抗体１４０８ａ、１４０８ｂのパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、若しくは１００％でありうる。

【０６５０】

異なる組成物１４０４ａの抗体１４０８ａ（又は細胞成分結合試薬）のいくつか、すべて、又は０個が、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域を

有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合しうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａの抗体１４０８ａの数は、０、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、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａの抗体１４０８ａの数は、少なくとも、又は多くとも、０、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、若しくは１０００でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａの抗体１４０８ａのパーセンテージは、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、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、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の配列又は異なる配列を有するユニバーサルシーケンシング領域１４１６ａを有する相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａに関連付けられるか又は結合する異なる組成物１４０４ａの抗体１４０８ａのパーセンテージは、少なくとも、又は多くとも、０％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、２０％、３３％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９９．９％、９９．９９％、若しくは１００％でありうる。

【０６５１】

標的１４３６ａ、１４３６ｂの数は、２つから少なくとも５０～１００のタンパク質標的など、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、標的１４３６ａ、１４３６ｂの数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、標的１４３６ａ、１４３６ｂの数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００でありうる。

【０６５２】

ライゲーション

未結合の組成物１４０４ａ、１４０４ｂを洗い流した後、架橋オリゴヌクレオチド１４３２が加えられうる。タイプ１及びタイプ２組成物１４０４ａ、１４０４ｂで構成される対が、架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域にハイブリダイズしうる架橋オリゴヌクレオチド１４３２を介して一緒に連結されうる。対応するタンパク質標的１４３６ａ、１４３６ｂが、３０～４０ｎｍなど、閾値距離内にある場合、たとえば、タイプ１及びタイプ２組成物１４０４ａ、１４０４ｂで構成される対は、架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域にハイブリダイズしうる架橋オリゴヌクレオチド１４３２を介して一緒に連結されうる。次に、ＤＮＡリガーゼが、２つのオリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂをライゲートするように加えられて、ライゲートされたオリゴヌクレオチド１４１２を形成し、一緒にライゲートされた組成物１４３６ａ、１４３６ｂが得られる。たとえば、架橋オリゴヌクレオチド１４３２は、ライゲーション領域を二本鎖にして、ライゲーションを促進しうる。架橋オリゴヌクレオチド１４３２は、各オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂ上のハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂ

に結合することができ、これにより、ＤＮＡリガーゼが、２つのオリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂを一緒にライゲートすることが可能になる。

【０６５３】

閾値距離は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、閾値距離は、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、１０００ｎｍ、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。たとえば、距離は、３０～４０ｎｍの範囲でありうる。いくつかの実施形態では、閾値距離は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、若しくは１０００ｎｍでありうる。閾値距離は、オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂの長さ、抗体１４０８ａ、１４０８ｂに対するオリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂの関連付け又は結合の位置、標的１４３６ａ、１４３６ｂのサイズ、又はそれらの任意の組合せによって影響されうる。

【０６５４】

細胞溶解及びバーコードに対するライゲートされたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション

次に、細胞が溶解されて、図１４Ｃに示されるように、ライゲートされたオリゴヌクレオチド１４１２の捕捉を可能にする。たとえば、ポリ（ｄＴ）領域１４４４を有するバーコード１４４０（たとえば、確率バーコード）を有するビーズ１４３８が、ポリ（ｄＡ）領域を介してライゲートされたオリゴヌクレオチド１４１２を捕捉しうる。ビーズ１４３８は、細胞及び／又は分子標識１４４８などの標識及び部分配列増幅のためのユニバーサル配列１４５２をさらに含みうる。

【０６５５】

逆転写

次に、逆転写が行われて、図１４Ｄに示されるライゲートされたオリゴヌクレオチド１４１２の相補的な配列１４５６を生成しうる。たとえば、モロニーマウス白血病ウイルス（ＭＭＬＶ）ベースの又はＴａｑベースの逆転写酵素を使用して、ライゲートされたオリゴヌクレオチド１４１２の相補的な配列を生成しうる。ＭＭＬＶベースの逆転写酵素は、相補鎖の生成中に架橋オリゴヌクレオチド１４３２を置換するための鎖置換機構を有する。Ｔａｑベースの逆転写酵素は、架橋オリゴヌクレオチド１４３２を除去するために５’－３’エキソヌクレアーゼ活性を有する。

【０６５６】

ライブラリー作製

逆転写の後、シーケンシングライブラリーが、たとえば、単一細胞ｍＲＮＡシーケンシングのための標準的なプロトコルにしたがって作製されうる。図１４Ｅを参照すると、相補的な配列１４５６（又はその逆相補体１４５６ｒ）は、タイプ１抗体－オリゴヌクレオチド組成物１４０４ａのバーコード１４４０及びユニバーサルシーケンシング領域１４１６（たとえば、ユニバーサルＮ１配列）上のユニバーサル配列１４５２（たとえば、ユニバーサルＰ５配列又は部分的なユニバーサルＰ５配列）を介して増幅されうる。上付きのｒは、逆相補体を示す。１回目のＰＣＲ（本明細書でＰＣＲ１と呼ばれる）は、ユニバーサルプライマー（たとえば、Ｐ５及びＮ１配列、又はその逆相補体を有するプライマー）を使用して、１つ以上の標識及びユニバーサル配列を有するライゲートされたオリゴヌクレオチド１４５６ｒに対応する完全長（又はほぼ完全長）アンプリコンを生成しうる。

【０６５７】

同じプライマーが、本明細書でＰＣＲ２と呼ばれる２回目のＰＣＲ増幅）に使用可能であり、又はＮ１プライマーが、図１４Ｆに示されるように、さらなる特異性のために架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂの両方に結合するＮ２プライマーで置換されうる。このＮ２プライマーが使用される場合、ユニバーサル

シーケンシング領域１４１６及びユニバーサル配列１４５２の両方を有するライゲートされたオリゴヌクレオチド１４５６ｒの大部分が増幅されうる。いくつかの実施形態では、このＮ２プライマーが、２回目のＰＣＲに使用される場合、ユニバーサルシーケンシング領域１４１６及びユニバーサル配列１４５２の両方を有するライゲートされたオリゴヌクレオチド１４５６ｒの大部分が増幅されうる。

【０６５８】

細胞成分間の相互作用を決定するための相互作用決定組成物の対の使用

本明細書に開示されるものには、タンパク質間相互作用を決定するためのシステム、方法、及びキットが含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、図１４Ａに示される、細胞を、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対と接触させる工程を含む。細胞は、第１のタンパク質標的１４３６ａ及び第２のタンパク質標的１４３６ｂを含みうる。相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられたタンパク質結合試薬１４０８ａ、１４０８ｂを含む。相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬１４０８ａ、１４０８ｂは、第１のタンパク質標的１４３６ａに特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬１４０８ｂは、第２のタンパク質標的１４３６ｂに特異的に結合することが可能である。相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、相互作用決定配列１４２４ａ、１４３４ｂ及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを含む。相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定配列１４２４ａ、１４２４ｂは、異なる配列を含みうる。

【０６５９】

図１４Ｂを参照すると、本方法は、架橋オリゴヌクレオチド１４３２を用いて、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２を生成する工程を含みうる。架橋オリゴヌクレオチド１４３２は、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂに特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含みうる。

【０６６０】

図１４Ｃを参照すると、本方法は、複数のバーコード１４４０を用いて、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２にバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を生成する工程を含みうる。複数のバーコード１４４０の各々が、バーコード配列１４４８及び捕捉配列１４４４を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６のシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。本方法は、得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定配列１４２４ａ、１４２４ｂの関連付けに基づいて、第１及び第２のタンパク質標的１４３６ａ、１４３６ｂの間の相互作用を決定する工程を含みうる。

【０６６１】

本明細書に開示されるものには、細胞成分標的間の相互作用を決定するためのシステム、方法、及びキットが含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、図１４Ａに示される、細胞を、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対と接触させる工程を含む。細胞は、第１の細胞成分標的及び第２の細胞成分標的（たとえば、第１のタンパク質標的１４３６ａ及び第２のタンパク質標的１４３６ｂ）を含みうる。相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられた細胞成分結合試薬（たとえば、抗体１４０８ａ、１４０８ｂ）を含みうる。相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の一方の細胞成分結合試薬は、第１の細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的１４３６ａ）に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方１４０４ｂの細胞成分結合試薬は、第２の

細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的１４３６ｂ）に特異的に結合することが可能である。相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、相互作用決定配列１４２４ａ、１４２４ｂ及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂを含みうる。相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定配列１４２４ａ、１４２４ｂは、異なる配列を含みうる。

【０６６２】

図１４Ｂを参照すると、本方法は、架橋オリゴヌクレオチド１４３２を用いて、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２を生成する工程を含みうる。架橋オリゴヌクレオチド１４３２は、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂに特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含みうる。

【０６６３】

図１４Ｃを参照すると、本方法は、複数のバーコード１４４０を用いて、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２にバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を生成する工程を含みうる。複数のバーコード１４４０の各々が、バーコード配列１４４８及び捕捉配列１４４４を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６のシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。本方法は、得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定配列１４２４ａ、１４２４ｂの関連付けに基づいて、第１及び第２の細胞成分標的１４３６ａ、１４３６ｂの間の相互作用を決定する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、２つの細胞成分結合試薬の少なくとも１つは、タンパク質結合試薬を含みうる。タンパク質結合試薬は、２つの相互作用決定オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられうる。１つ以上の細胞成分標的は、少なくとも１つのタンパク質標的を含みうる。

【０６６４】

いくつかの実施形態では、細胞を、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対と接触させる工程は、細胞を、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の各々と連続的に又は同時に接触させる工程を含む。第１のタンパク質標的１４３６ａは、第２のタンパク質標的１４３６ｂと同じでありうる。第１のタンパク質標的１４３６ａは、第２のタンパク質標的１４３６ｂと異なりうる。第１及び第２の細胞成分標的は、同じか又は異なりうる。

【０６６５】

相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂｅは、さまざまな履行において異なる長さを有しうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、１０００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値のヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、少なくとも、又は多くとも、６、７、８、９、１

０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１２８、１３０、１４０、１５０、１６０、１７０、１８０、１９０、２００、２１０、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６１０、６２０、６３０、６４０、６５０、６６０、６７０、６８０、６９０、７００、７１０、７２０、７３０、７４０、７５０、７６０、７７０、７８０、７９０、８００、８１０、８２０、８３０、８４０、８５０、８６０、８７０、８８０、８９０、９００、９１０、９２０、９３０、９４０、９５０、９６０、９７０、９８０、９９０、若しくは１０００ヌクレオチド長である。

【０６６６】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第２の対と接触させる工程を含む。細胞は、第３の細胞成分標的及び第４の細胞成分標的（たとえば、第３のタンパク質標的及び第４のタンパク質標的）を含みうる。相互作用決定組成物の第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含みうる。相互作用決定組成物の第２の対の一方の細胞成分結合試薬は、第３の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第２の対の他方の細胞成分結合試薬は、第４の細胞成分標的に結合することが可能でありうる。いくつかの実施形態では、第３及び第４の細胞成分標的の少なくとも１つは、第１及び第２の細胞成分標的の１つと異なりうる。いくつかの実施形態では、第３及び第４の細胞成分標的の少なくとも１つ及び第１及び第２の細胞成分標的の少なくとも１つは、同一でありうる。

【０６６７】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の３つ以上の対と接触させる工程を含む。相互作用決定組成物の複数の対のいくつかの相互作用決定組成物の相互作用決定配列は、同じ又は異なる配列を含みうる。いくつかの実施形態では、同じ又は異なる配列を有する相互作用決定配列を有する相互作用決定組成物の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、又はこれらの値のいずれか２つの間の数若しくは範囲、又はこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同じ又は異なる配列を有する相互作用決定配列を有する相互作用決定組成物の数は、少なくとも、又は多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、若しくは１００００でありうる。

【０６６８】

いくつかの実施形態では、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂは、異なる配列を含む。架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ａ、１４２８ｂの少なくとも１つは、架橋オリゴヌクレオチド１４３２の２つのハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つと相補的でありうる。

【０６６９】

いくつかの実施形態では、架橋オリゴヌクレオチド１４３２を使用して相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂをライゲートする工程は、架橋オリゴヌクレオチド１４３２の第１のハイブリダイゼーション領域を相互作用決定オリゴヌクレオチドの架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の第１の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４

２８ａとハイブリダイズする工程と；架橋オリゴヌクレオチドの第２のハイブリダイゼーション領域を相互作用決定オリゴヌクレオチドの架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の第２の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域１４２８ｂとハイブリダイズする工程と；架橋オリゴヌクレオチド１４３２にハイブリダイズされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４２８ａ、１４２８ｂをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程とを含む。

【０６７０】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的１４３６ａ、１４３６ｂ）の少なくとも１つは、細胞表面上にある。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対と接触させる工程の前に、細胞を固定する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の未結合の相互作用決定組成物を除去する工程を含みうる。未結合の相互作用決定組成物を除去する工程は、細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合の相互作用決定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を溶解させる工程を含みうる。

【０６７１】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される。本方法は、細胞成分結合試薬から、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂ又はライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２を切り離す工程を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂを切り離す工程を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、細胞のゲノム配列に対して相同でなくてもよい。相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。

【０６７２】

いくつかの実施形態では、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の一方の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ｂは、捕捉配列１４４４に相補的な配列１４２０を含む。捕捉配列１４４４は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。捕捉配列１４４４に相補的な相互作用決定オリゴヌクレオチドの配列１４２０は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂは、第２のバーコード配列を含む。相互作用同定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対の他方の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａは、ユニバーサルプライマーのための結合部位１４１６を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチド１４０４ａ、１４０４ｂは、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０６７３】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、同じ又は異なる相互作用決定配列１４２８ａ、１４２８ｂを有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられうる。いくつかの実施形態では、複数の相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの一方は、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられていない第２のタンパク質結合試薬を含む。細胞成分結合試薬及び第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。細胞成分結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。細胞成分結合試薬１４０４ａ、１４０４ｂは、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２ａ、１４１２ｂに関連付けられうる。

【０６７４】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つ以上の細胞を、相互作用決定組成物１４０４ａ、１４０４ｂの第１の対と接触させる工程を含む。２つ以上の細胞の各々が、第１及び第２の細胞成分標的（たとえば、第１及び第２のタンパク質標的１４３６ａ、１４３６ｂ

）を含みうる。２つ以上の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含みうる。
【０６７５】
図１４Ｂを参照すると、バーコード１４４０は、細胞標識配列１４４８、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードは、同一の細胞標識配列１４４８を含みうる。
【０６７６】
いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含む。細胞成分標的は、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せであるか、又はそれを含みうる。細胞成分標的は、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。
【０６７７】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子（たとえば、ビーズ１４３８）に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、又はそれ以上の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む。
【０６７８】
図１４Ｃを参照すると、複数のバーコード１４４０を使用して相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２にバーコードを付ける工程は、複数のバーコード１４４０を相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２と接触させて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を生成する工程とを含む。バーコードを伸長する工程１４４０は、ＤＮＡポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して１４４０、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程１４４０は、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して１４４０、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４を生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程１４は、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素又はＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を生成する工程１４を含みうる。バーコードを伸長する工程１４は、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２から架橋オリゴヌクレオチド１４３２を取り除く工程を含みうる。
【０６７９】
図１４Ｄ及び１４Ｅを参照すると、本方法は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を増幅して、複数のアンプリコンを生成する工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を増幅する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、バーコード配列１４４８の少なくとも一部及び相互作用決定オリゴヌクレオチド１４２８ａ、１４２８ｂの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６のシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列１４４８の少なくとも一部及び相互作用決定オリゴヌクレオチド１４２８ａ、１４２８ｂの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６のシーケンシングデータを取得する工程は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６の部分的及び／又は完全な配列（又は逆（ｒｅｖｅｒｓｅ）、相補体、逆相補体１４５６ｒ、又はそれらの任意の組合せ）を取得する工程を含む。
【０６８０】

図１４Ｃを参照すると、複数のバーコード１４４０は、複数の確率バーコードを含みうる。複数の確率バーコードの各々のバーコード配列は、分子標識配列１４４８を含みうる。複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの分子標識配列１４４８は、異なる配列を含みうる。複数のバーコード１４４０を用いて、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２にバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、相互作用決定オリゴヌクレオチド１４１２に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０６８１】

本方法はまた、他の単一細胞ＲＮＡシーケンシング方法とともに使用されうる。たとえば、１つの単一ワークフローを使用して、ｍＲＮＡ発現レベル、タンパク質発現レベル（又は細胞成分標的の発現レベル）、及び／又はタンパク質間相互作用（又は細胞成分間の相互作用）を決定することができる。結果として、単一の実験において、単一細胞（又は複数の単一細胞）におけるｍＲＮＡ発現、タンパク質発現、及びタンパク質間相互作用についてのデータを得ることができる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード１４４０を用いて、細胞の複数の標的（たとえば、対象のｍＲＮＡ種）にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む。複数のバーコード１４４０を用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコード１４４０の標的結合領域（たとえば、ポリ（ｄＴ）領域１４４４）と接触させる工程と；複数のバーコード１４４０を用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程の前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程（図１４Ｅ及び１４Ｆに示されるバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチド１４５６を増幅する工程に類似している）を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によりバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコード１４４０を使用して細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを使用して細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０６８２】

本明細書に開示される実施形態は、細胞成分－細胞成分相互作用（たとえば、タンパク質－タンパク質相互作用）を同定するためのキットも含む。いくつかの実施形態では、本キットは、相互作用決定組成物の第１の対であって、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに結合した細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方の細胞成分結合試薬が、第１の細胞成分標的に特異的に結合可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方の細胞成分結合試薬が、第２の細胞成分標的に特異的に結合可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、且つ相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が異なる配列を含む相互作用決定組成物の第１の対と；相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合可能な２つのハイブリダイゼーション領域を各々が含む複数の架橋オリゴヌクレオチドとを含む。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、本キットは、相互作用決定組成物の第２の対を含み、相互作用決定組成物の第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに結合した細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第２の対の一方の細胞成分結合試薬が、第３の細胞成分標的に特異的に結合可能であり、相互作用決定組成物の第２の対の他方の細胞成分結合試薬が、第４の細胞成分標的に特異的に結合可能である。いくつかの実施形態では、

本キットは、相互作用決定組成物の３つ以上の対を含む。
【０６８４】
いくつかの実施形態では、本キットは、複数のバーコードを含み、複数のバーコードの各々は、バーコード配列及び捕捉配列を含む。複数のバーコードは、複数の確率バーコードを含むことができ、複数の確率バーコードの各々のバーコード配列は、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含み、複数の確率バーコードのうちの少なくとも２つの確率バーコードのバーコード配列は、異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、複数のバーコードが粒子と関連付けられる。複数のバーコードのうちの少なくとも１つのバーコードは、粒子に固定されうるか、粒子に部分的に固定されうるか、粒子に封入されうるか、粒子に部分的に封入されうるか、又はそれらの任意の組合せでありうる。粒子は、崩壊可能でありうる。粒子は、ビーズを包含しうる。
【０６８５】
いくつかの実施形態では、本キットは、ＤＮＡポリメラーゼを含む。本キットは、逆転写酵素を含みうる。本キットは、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素又はＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、固定剤（たとえば、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド／四酸化オスミウム、アルコール系固定液、Ｈｅｐｅｓ－グルタミン酸緩衝液媒介性有機溶媒保護効果（ＨＯＰＥ）、ブアン溶液、又はそれらの任意の組合せ）を含む。
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〕サンプル同定のための方法であって、
複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記１つ以上の細胞が、１つ以上のタンパク質標的を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加組成物が、２つ以上のタンパク質結合試薬を含み、前記２つ以上のタンパク質結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記２つ以上のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、
を含む、方法。
〔２〕サンプル同定のための方法であって、
複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加組成物が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含み、前記２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、

前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、
を含む、方法。
〔３〕前記２つ以上の細胞成分結合試薬が、２つ以上のタンパク質結合試薬を含み、前記２つ以上のタンパク質結合試薬の各々が、対応する細胞成分結合試薬に関連付けられた前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記１つ以上の細胞成分標的が、１つ以上のタンパク質標的を含む、前記〔２〕に記載の方法。
〔４〕前記少なくとも１つの細胞の前記サンプル起源を同定する工程が、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む、前記〔１〕～〔３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５〕サンプル同定のための方法であって、
複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加組成物が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含み、前記２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む、方法。
〔６〕前記２つ以上の細胞成分結合試薬が、２つ以上のタンパク質結合試薬を含み、前記２つ以上のタンパク質結合試薬の各々が、対応する細胞成分結合試薬に関連付けられた前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記１つ以上の細胞成分標的が、１つ以上のタンパク質標的を含む、前記〔５〕に記載の方法。
〔７〕前記少なくとも１つの細胞の前記サンプル起源を同定する工程が、
複数のバーコードを用いて、前記複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記細胞の前記サンプル起源を同定する工程と、を含む、前記〔５〕～〔６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔８〕前記少なくとも１つの細胞の前記サンプル起源を同定する工程が、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程を含む、前記〔５〕～〔７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔９〕前記サンプルインデックス付加配列の存在又は非存在を同定する工程が、
前記少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
前記複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに対応する前記複数のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記細胞の前記サンプル起源を同定する工程と、を含む、前記〔８〕に記載の方法。
〔１０〕前記少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、複製アダプターを、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートする工程を含み、
前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程が、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにライゲートされた前記複製アダプターを用いて、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔９〕に記載の方法。
〔１１〕前記少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する前に、
捕捉プローブを、前記少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた捕捉プローブを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記捕捉プローブを伸長して、前記捕捉プローブに関連付けられたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含み、
前記少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製する工程が、前記捕捉プローブに関連付けられた前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを複製して、前記複数の複製されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔９〕に記載の方法。
〔１２〕前記サンプルインデックス付加配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔１〕～〔１１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１３〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔１〕～〔１２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１４〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、前記〔１〕～〔１３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む、前記〔１〕～〔１４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記細

胞成分結合試薬に結合される、前記〔１〕～〔１５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７〕前記複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルが、単一細胞を含む、前記〔１〕～〔１６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１８〕前記１つ以上のタンパク質標的、又は前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面上にある、前記〔１〕～〔１７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１９〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む、前記〔１〕～〔１８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、前記複数のサンプルの各々に由来する前記１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、前記〔１９〕に記載の方法。
〔２１〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のうちの少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、前記〔１９〕に記載の方法。
〔２２〕前記複数のサンプルの各々から前記１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む、前記〔１〕～〔２１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される、前記〔１〕～〔２２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２４〕前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔１〕～〔２３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２５〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔２４〕に記載の方法。
〔２６〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でないか、１つの種のゲノム配列に対して相同であるか、又はそれらの組合せである、前記〔１〕～〔２５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７〕前記種が、非哺乳動物種である、前記〔２６〕に記載の方法。
〔２８〕前記複数のサンプルのうちの１つのサンプルが、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１〕～〔２７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９〕前記複数のサンプルが、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１〕～〔２８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３０〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔１〕～〔２９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１〕前記バーコードが、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、前記〔３０〕に記載の方法。
〔３２〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔３１〕に記載の方法。
〔３３〕前記捕捉配列に相補的な前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔３０〕～〔３２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はその両方を含む、前記〔１〕～〔３３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５〕前記タンパク質標的、又は前記細胞成分標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１〕～〔３４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔３６〕前記タンパク質標的、又は前記細胞成分標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的、又は細胞成分標的を含む群から選択される、前記〔１〕～〔３５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３７〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔１〕～〔３６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔１〕～〔３６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の前記サンプルインデックス付加組成物が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２のタンパク質結合試薬、又は前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２の細胞成分結合試薬を含む、前記〔１〕～〔３８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４０〕前記タンパク質結合試薬及び前記第２のタンパク質結合試薬が同一であるか、又は前記細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が同一である、前記〔３９〕に記載の方法。
〔４１〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬を含む、前記〔１〕～〔４０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２〕前記２つ以上のタンパク質結合試薬、又は前記２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられた前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列が、同一である、前記〔１〕～〔４０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４３〕２つ以上のタンパク質結合試薬、又は前記２つ以上の細胞成分結合試薬に関連付けられた前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、前記〔１〕～〔４０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４４〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、前記２つ以上のタンパク質結合試薬、又は前記２つ以上の細胞成分結合試薬を含む、前記〔１〕～〔４３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４５〕前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域及び分子標識配列を含み、
前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる分子標識配列を含む、前記〔１〕～〔４４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４６〕前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔４５〕に記載の方法。
〔４７〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔４５〕～〔４６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４８〕前記複数のバーコードが、粒子に関連付けられる、前記〔４５〕～〔４７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４９〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定されるか、前記粒子上に部分的に固定されるか、前記粒子に封入されるか、前記粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔４８〕に記載の方法。
〔５０〕前記粒子が崩壊性である、前記〔４８〕～〔４９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１〕前記粒子がビーズを含む、前記〔４８〕～〔５０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２〕前記粒子が、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、又は前記粒子が、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〔４８〕～〔５１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３〕前記粒子が、崩壊性ヒドロゲルビーズを含む、前記〔４８〕～〔５２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５４〕前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００、１００００、又はそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔４８〕～〔５３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５〕前記バーコードの前記分子標識配列が、ランダム配列を含む、前記〔５４〕に記載の方法。
〔５６〕前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔４８〕～〔５５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔４８〕～〔５６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５８〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５７〕に記載の方法。
〔５９〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５７〕に記載の方法。
〔６０〕複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５７〕～〔５９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔６１〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔６０〕に記載の方法。
〔６２〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔６０〕～〔６１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔６３〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、前記〔６２〕に記載の方法。
〔６４〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔１〕～〔６３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔６５〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む、前記〔１〕～〔６４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６６〕前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、
前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含む、前記〔６５〕に記載の方法。
〔６７〕前記複数のバーコード付き標的の前記シーケンシングデータを取得する工程の前に、前記バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔６５〕～〔６６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔６８〕前記バーコード付き標的を増幅して、前記複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって前記バーコード付き標的を増幅する工程を含む、前記〔６７〕に記載の方法。
〔６９〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔６５〕～〔６８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔７０〕複数のサンプルインデックス付加組成物であって、
前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、２つ以上の細胞成分結合試薬を含み、
前記２つ以上の細胞成分結合試薬の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、
前記２つ以上の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、少なくとも１つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列を含み、
前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７１〕前記サンプルインデックス付加配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔７０〕に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７２〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔７０〕～〔７１〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７３〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、前記〔７０〕～〔７２〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７４〕前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む、前記〔７０〕～〔７３〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７５〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記細胞成分結合試薬に結合される、前記〔７０〕～〔７４〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７６〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、前記〔７０〕～〔７５〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７７〕前記複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔７６〕に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７８〕前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔７６〕～〔７７〕のい

ずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔７９〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、分子標識配列、ポリ（ｄＡ）領域、又はそれらの組合せを含む、前記〔７０〕～〔７８〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８０〕前記細胞成分標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔７０〕～〔７９〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８１〕前記細胞成分標的が、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択される、前記〔７０〕～〔８０〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８２〕前記細胞成分結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔７０〕～〔８１〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８３〕前記細胞成分結合試薬が、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔７０〕～〔８１〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８４〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の前記サンプルインデックス付加組成物が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２の細胞成分結合試薬を含む、前記〔７０〕～〔８３〕のいずれか一項に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８５〕前記細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が、同一である、前記〔８４〕に記載の複数のサンプルインデックス付加組成物。
〔８６〕コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子組成物であって、
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列及びポリ（ｄＡ）領域を含む、コントロール粒子組成物。
〔８７〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、前記〔８６〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔８８〕前記コントロールバーコード配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔８６〕～〔８７〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔８９〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔８６〕～〔８８〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５、１０、１００、１０００、又はそれらの組合せの前記コントロールバーコード配列が同一である、前記〔８６〕～〔８９〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔９０〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３、５、１０、１００、又はそれらの組合せが、異なるコントロールバーコード配列を含む、前記〔８６〕～〔８９〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔９１〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、
第１のコントロールバーコード配列を各々が含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
第２のコントロールバーコード配列を各々が含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含み、
前記第１のコントロールバーコード配列及び前記第２のコントロールバーコード配列が、異なる配列を有する、前記〔８６〕～〔９０〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔９２〕前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数がほぼ同じである、前記〔９１〕に記載のコントロール粒子組成物。

〔９３〕前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が異なる、前記〔９１〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔９４〕前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、又はそれらの組合せだけ多い、前記〔９３〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔９５〕前記コントロールバーコード配列が、１つの種のゲノム配列に対して相同でない、前記〔８６〕～〔９４〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔９６〕前記コントロールバーコード配列が、１つの種のゲノム配列に対して相同である、前記〔８６〕～〔９４〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔９７〕前記種が、非哺乳動物種である、前記〔９６〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔９８〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はその両方を含む、前記〔８６〕～〔９７〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔９９〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、リンカーを介して前記コントロール粒子に関連付けられる、前記〔８６〕～〔９８〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１００〕前記コントロール粒子の直径が、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、約７．５マイクロメートル、又はそれらの組合せである、前記〔８６〕～〔９９〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０１〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に固定されるか、前記コントロール粒子上に部分的に固定されるか、前記コントロール粒子に封入されるか、前記コントロール粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔８６〕～〔１００〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０２〕前記コントロール粒子が崩壊性である、前記〔８６〕～〔１０１〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０３〕前記コントロール粒子が、ビーズを含む、前記〔８６〕～〔１０２〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０４〕前記コントロール粒子が、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、又は前記コントロール粒子が、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含む、前記〔８６〕～〔１０３〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０５〕前記コントロール粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔８６〕～〔１０４〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０６〕前記コントロール粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔８６〕～〔１０５〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０７〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔８６〕～〔１０６〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０８〕前記コントロール粒子が、複数の第１の細胞成分結合試薬に関連付けられ、
前記複数の第１の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、前記〔８６〕～〔１０７〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１０９〕前記第１の細胞成分結合試薬が、第１の抗体を含む、前記〔１０８〕に記載の

コントロール粒子組成物。
〔１１０〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記第１の細胞成分結合試薬に結合される、前記〔１０８〕～〔１０９〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１１〕前記第１の細胞成分結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、前記〔１０８〕～〔１１０〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１２〕前記第１の細胞成分結合試薬が、異なるコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、前記〔１０８〕～〔１１１〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１３〕前記複数の第１の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれにも関連付けられない、前記〔１０８〕～〔１１２〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１４〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた前記第１の細胞成分結合試薬及びいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない前記第１の細胞成分結合試薬が、同一の細胞成分結合試薬である、前記〔１１３〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１５〕前記コントロール粒子が、複数の第２の細胞成分結合試薬に関連付けられる、前記〔１０８〕～〔１１４〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１６〕前記複数の第２の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、前記〔１１５〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１７〕前記第１の細胞成分結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチド及び前記第２の細胞成分結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、異なるコントロールバーコード配列を含む、前記〔１１６〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１８〕前記第１の細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が、同一の細胞成分結合試薬である、前記〔１１６〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔１１９〕前記第１の細胞成分結合試薬が、パートナー結合試薬に関連付けられ、前記第１の細胞成分結合試薬が、前記パートナー結合試薬を用いて前記コントロール粒子に関連付けられる、前記〔１０８〕～〔１１８〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１２０〕前記パートナー結合試薬が、パートナー抗体を含む、前記〔１１９〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔１２１〕前記パートナー抗体が、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、又はそれらの組合せを含む、前記〔１２０〕に記載のコントロール粒子組成物。
〔１２２〕前記パートナー抗体が、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、それらの組合せ、又はそれらのフラグメントを含む、前記〔１２０〕～〔１２１〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１２３〕前記第１の細胞成分結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔１０８〕～〔１２２〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１２４〕前記第２の細胞成分結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔１０８〕～〔１２３〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔１２５〕前記〔８６〕～〔１２４〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物と；
複数のバーコードと、
を含む、キット。
〔１２６〕前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域及び分子標識配列を含み、

前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる分子標識配列を含む、前記〔１２５〕に記載のキット。
〔１２７〕前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１２６〕に記載のキット。
〔１２８〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔１２６〕～〔１２７〕のいずれか一項に記載のキット。
〔１２９〕前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、前記〔１２５〕～〔１２８〕のいずれか一項に記載のキット。
〔１３０〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定されるか、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定されるか、前記バーコーディング粒子に封入されるか、前記バーコーディング粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔１２９〕に記載のキット。
〔１３１〕前記バーコーディング粒子が崩壊性である、前記〔１２９〕～〔１３０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔１３２〕標的の数を決定するための方法であって、
複数の確率バーコードを用いて、複数の細胞のうちの１つの細胞の複数の標的及び複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的及び複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数の確率バーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードが、同一の細胞標識配列を含み、
コントロール粒子組成物が、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられたコントロール粒子を含み、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列、及び前記複数の確率バーコードの少なくとも１つの標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
前記複数の確率バーコード付き標的及び前記複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記コントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と；
前記複数の標的の少なくとも１つの標的について：
前記シーケンシングデータ中の前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と；
前記標的の数を推定する工程と、を含み、推定された前記標的の数が、カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数及び前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数に相関している、方法。
〔１３３〕前記擬似標的領域が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔１３２〕に記載の方法。
〔１３４〕前記擬似標的領域が、前記標的の部分配列を含む、前記〔１３２〕～〔１３３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１３５〕前記コントロールバーコード配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔１３２〕～〔１３４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１３６〕前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔１３２〕～〔１３５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１３７〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５、１０、１００、１０００、又はそれらの組合せの前記コントロールバーコード配列が同一である、前記〔１３２〕～〔１３６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１３８〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３、５、１０、

１００、又はそれらの組合せが、異なるコントロールバーコード配列を含む、前記〔１３２〕～〔１３７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１３９〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、
第１のコントロールバーコード配列を各々が含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
第２のコントロールバーコード配列を各々が含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含み、
前記第１のコントロールバーコード配列及び前記第２のコントロールバーコード配列が、異なる配列を有する、前記〔１３２〕～〔１３８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１４０〕前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、ほぼ同じである、前記〔１３９〕に記載の方法。
〔１４１〕前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数及び前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、異なる、前記〔１３９〕に記載の方法。
〔１４２〕前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、又はそれらの組合せだけ多い、前記〔１４１〕に記載の方法。
〔１４３〕前記シーケンシングデータ中の前記コントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程が、
前記シーケンシングデータ中の前記第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数をカウントする工程と、を含む、前記〔１３９〕～〔１４２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１４４〕推定された前記標的の数が、
カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、
前記第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、及び
前記第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数
に相関している、前記〔１４３〕に記載の方法。
〔１４５〕推定された前記標的の数が、
カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、
前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、及び
前記コントロールバーコード配列を含む前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数
に相関している、前記〔１３２〕～〔１４４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１４６〕推定された前記標的の数が、
カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数、及び
前記コントロールバーコード配列を含む前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と、
前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数と、
の比率に相関している、前記〔１４５〕に記載の方法。
〔１４７〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記細胞のゲノム配列に対して相同でないか、１つの種のゲノム配列に対して相同でないか、１つの種のゲノム配列に対して相同であるか、又はそれらの組合せである、前記〔１３２〕～〔１４６〕のいずれか

一項に記載の方法。
〔１４８〕前記種が、非哺乳動物種である、前記〔１４７〕に記載の方法。
〔１４９〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記コントロール粒子に結合される、前記〔１３２〕～〔１４８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５０〕前記コントロール粒子の直径が、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、約７．５マイクロメートル、又はそれらの組合せである、前記〔１３２〕～〔１４９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５１〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に固定されるか、前記コントロール粒子上に部分的に固定されるか、前記コントロール粒子に封入されるか、前記コントロール粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔１３２〕～〔１５０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５２〕前記複数の標的及び前記コントロール粒子及び前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付ける工程の前に、前記コントロール粒子から前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つを放出する工程を含む、前記〔１３２〕～〔１５１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５３〕前記コントロール粒子が崩壊性である、前記〔１３２〕～〔１５２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５４〕前記コントロール粒子が、コントロール粒子ビーズを含む、前記〔１３２〕～〔１５３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５５〕前記コントロール粒子が、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、又は前記コントロール粒子が、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含む、前記〔１３２〕～〔１５４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５６〕前記コントロール粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔１３２〕～〔１５５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５７〕前記コントロール粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔１３２〕～〔１５６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５８〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔１３２〕～〔１５７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１５９〕前記コントロール粒子が、複数の第１の細胞成分結合試薬に関連付けられ、
前記複数の第１の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、前記〔１３２〕～〔１５８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６０〕前記第１の細胞成分結合試薬が、第１の抗体を含む、前記〔１５９〕に記載の方法。
〔１６１〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記第１の細胞成分結合試薬に結合される、前記〔１５９〕～〔１６０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６２〕前記第１の細胞成分結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、前記〔１５９〕～〔１６１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６３〕前記第１の細胞成分結合試薬が、異なるコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、前記〔１５９〕～〔１６２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６４〕前記複数の第１の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロ

ール粒子オリゴヌクレオチドのいずれにも関連付けられない、前記〔１５９〕～〔１６３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６５〕前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた前記第１の細胞成分結合試薬及びいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない前記第１の細胞成分結合試薬が、同一の細胞成分結合試薬である、前記〔１６４〕に記載の方法。
〔１６６〕前記コントロール粒子が、複数の第２の細胞成分結合試薬に関連付けられる、前記〔１６４〕～〔１６５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１６７〕前記複数の第２の細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、前記〔１６６〕に記載の方法。
〔１６８〕前記第１の細胞成分結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチド及び前記第２の細胞成分結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、異なるコントロールバーコード配列を含む、前記〔１６７〕に記載の方法。
〔１６９〕前記第１の細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が、同一の細胞成分結合試薬である、前記〔１６７〕に記載の方法。
〔１７０〕前記第１の細胞成分結合試薬が、パートナー結合試薬に関連付けられ、前記第１の細胞成分結合試薬が、前記パートナー結合試薬を用いて前記コントロール粒子に関連付けられる、前記〔１５９〕～〔１６９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７１〕前記パートナー結合試薬が、パートナー抗体を含む、前記〔１７０〕に記載の方法。
〔１７２〕前記パートナー抗体が、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、又はそれらの組合せを含む、前記〔１７１〕に記載の方法。
〔１７３〕前記パートナー抗体が、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、$F(ab')_2$フラグメント、それらの組合せ、又はそれらのフラグメントを含む、前記〔１７１〕～〔１７２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７４〕前記第１の細胞成分結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔１５９〕～〔１７３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７５〕前記第２の細胞成分結合試薬が、検出可能な部分、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はその両方に関連付けられる、前記〔１５９〕～〔１７４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７６〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔１３２〕～〔１７５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７７〕前記複数の確率バーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、前記〔１３２〕～〔１７６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１７８〕前記複数の確率バーコードの少なくとも１つの確率バーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定されるか、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定されるか、前記バーコーディング粒子に封入されるか、前記バーコーディング粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔１７７〕に記載の方法。
〔１７９〕前記バーコーディング粒子が崩壊性である、前記〔１７７〕～〔１７８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１８０〕前記バーコーディング粒子が、バーコーディングビーズを含む、前記〔１７７〕～〔１７９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１８１〕前記バーコーディングビーズが、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、又は前記バーコーディング粒子が、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含む、前記〔１７７〕～〔１８０〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８２〕前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔１７７〕～〔１８１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８３〕前記バーコーディング粒子の前記確率バーコードが、少なくとも１０００、１００００、又はそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔１７７〕～〔１８２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８４〕前記確率バーコードの前記分子標識配列が、ランダム配列を含む、前記〔１７７〕～〔１８３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８５〕前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００の確率バーコードを含む、前記〔１７７〕～〔１８４〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８６〕前記複数の確率バーコードを用いて、前記複数の標的及び前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付ける工程が、

前記複数の確率バーコードを、前記複数の標的の標的及び前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのコントロール粒子オリゴヌクレオチドと接触させて、前記標的及び前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた確率バーコードを生成する工程と；

前記標的及び前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記確率バーコードを伸長して、前記複数の確率バーコード付き標的及び前記複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔１３２〕～〔１８５〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８７〕前記確率バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを用いて、前記確率バーコードを伸長する工程を含む、前記〔１８６〕に記載の方法。

〔１８８〕複数のアンプリコンを生成するために、前記複数の確率バーコード付き標的及び前記複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔１３２〕～〔１８７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１８９〕前記複数の確率バーコード付き標的及び前記複数の確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、

前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部、又は

前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部

を増幅する工程を含む、前記〔１８８〕に記載の方法。

〔１９０〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔１８８〕～〔１８９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔１９１〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、

前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部、又は

前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部

をシーケンシングする工程を含む、前記〔１９０〕に記載の方法。

〔１９２〕細胞同定のための方法であって、

第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ２つのサンプルインデックス付加

組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に関連付けられた細胞標識配列を同定する工程と；
得られた前記シーケンシングデータから、前記細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程と、を含む、方法。
〔１９３〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞を、それぞれ前記２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程が、
前記第１の複数の細胞を、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；
前記第１の複数の細胞を、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む、前記〔１９２〕に記載の方法。
〔１９４〕前記サンプルインデックス付加配列が、６５６０ヌクレオチド長である、前記〔１９２〕～〔１９３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１９５〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔１９２〕～〔１９４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１９６〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、前記〔１９２〕～〔１９５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１９７〕前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む、前記〔１９２〕～〔１９６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１９８〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記細胞成分結合試薬に結合される、前記〔１９２〕～〔１９７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔１９９〕前記複数のサンプルの少なくとも１つのサンプルが、単一細胞を含む、前記〔１９２〕～〔１９８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２００〕前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面上にある、前記〔１９２〕～〔１９９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０１〕前記２つのサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む、前記〔１９２〕～〔２００〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０２〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、前記〔２０１〕に記載の方法。

〔２０３〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のうちの少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、前記〔２０１〕に記載の方法。
〔２０４〕前記複数のサンプルの各々から前記１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む、前記〔１９２〕～〔２０３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０５〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される、前記〔１９２〕～〔２０４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０６〕前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔１９２〕～〔２０５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０７〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔２０６〕に記載の方法。
〔２０８〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でないか、又は１つの種のゲノム配列に対して相同であるか、又はそれらの組合せである、前記〔１９２〕～〔２０７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２０９〕前記種が、非哺乳動物種である、前記〔２０８〕に記載の方法。
〔２１０〕前記複数のサンプルのうちの１つのサンプルが、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１９２〕～〔２０９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１１〕前記複数のサンプルが、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１９２〕～〔２１０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１２〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔１９２〕～〔２１１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１３〕前記バーコードが、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、前記〔２１２〕に記載の方法。
〔２１４〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔２１３〕に記載の方法。
〔２１５〕前記バーコードの前記捕捉配列に相補的な前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔２１２〕～〔２１４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１６〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はその両方を含む、前記〔１９２〕～〔２１５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１７〕前記細胞成分標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔１９２〕～〔２１６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１８〕前記細胞成分標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択される、前記〔１９２〕～〔２１７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２１９〕前記細胞成分結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔１９２〕～〔２１８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２２０〕前記細胞成分結合試薬が、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔１９２〕～〔２１８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２２１〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の前記サンプルインデックス付加組成物が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含む、前記〔１９２〕～〔２２０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２２２〕前記細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が、同一である、前記〔２２１〕に記載の方法。
〔２２３〕前記細胞成分結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔１９２〕～〔２２２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２２４〕前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域及び分子標識配列を含み、
前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる分子標識配列を含む、前記〔１９２〕～〔２２３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２２５〕前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔２２４〕に記載の方法。
〔２２６〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔２２４〕～〔２２５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２２７〕前記複数のバーコードが、粒子に関連付けられる、前記〔２２４〕～〔２２６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２２８〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定されるか、前記粒子上に部分的に固定されるか、前記粒子に封入されるか、前記粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔２２７〕に記載の方法。
〔２２９〕前記粒子が崩壊性である、前記〔２２７〕～〔２２８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３０〕前記粒子がビーズを含む、前記〔２２７〕～〔２２９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３１〕前記ビーズが、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、又は前記粒子が、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〔２２７〕～〔２３０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３２〕前記粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔２２７〕～〔２３１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３３〕前記粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔２２７〕～〔２３２〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔２３４〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔２２７〕～〔２３２〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔２３５〕前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００、１００００、又はそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔２２７〕～〔２３４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３６〕前記バーコードの前記分子標識配列が、ランダム配列を含む、前記〔２３５〕に記載の方法。
〔２３７〕前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔２２７〕～〔２３６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３８〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触さ

せて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔１９２〕～〔２３７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２３９〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔２３８〕に記載の方法。
〔２４０〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔２３８〕に記載の方法。
〔２４１〕複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔２３８〕～〔２４０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２４２〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔２４１〕に記載の方法。
〔２４３〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔２４１〕～〔２４２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２４４〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、前記〔２４３〕に記載の方法。
〔２４５〕前記少なくとも１つの細胞の前記サンプル起源を同定する工程が、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む、前記〔１９２〕～〔２４４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２４６〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔１９２〕～〔２４５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２４７〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む、前記〔１９２〕～〔２４６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２４８〕前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、
前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含む、前記〔２４７〕に記載の方法。
〔２４９〕前記複数のバーコード付き標的の前記シーケンシングデータを取得する工程の前に、前記バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔２４７〕～〔２４８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２５０〕前記バーコード付き標的を増幅して、前記複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって前記バーコード付き標的を

増幅する工程を含む、前記〔２４９〕に記載の方法。
〔２５１〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔２４７〕～〔２５０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２５２〕シーケンシングコントロールのための方法であって、
複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、
前記複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数のタンパク質標的を含み、
前記複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、前記コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び前記複数のバーコードのうちの少なくとも１つの前記標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含む、方法。
〔２５３〕シーケンシングコントロールのための方法であって、
複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、
前記複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数の細胞成分標的を含み、
前記複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記複数の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、前記コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び前記複数のバーコードのうちの少なくとも１つの前記標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含む、方法。
〔２５４〕前記細胞成分標的が、タンパク質標的を含む、前記〔２５３〕に記載の方法。
〔２５５〕シーケンシングコントロールのための方法であって、
複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、
前記複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的及び複数の細胞成分標的を含み、

前記複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記複数の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、前記コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、及び前記複数のバーコードのうちの少なくとも１つの前記標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
前記複数のコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含む、方法。
〔２５６〕前記細胞成分標的が、タンパク質標的を含む、前記〔２５５〕に記載の方法。
〔２５７〕複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と、を含む、前記〔２５５〕～〔２５６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２５８〕前記擬似標的領域が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔２５２〕～〔２５７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２５９〕前記コントロールバーコード配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔２５２〕～〔２５８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２６０〕前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔２５２〕～〔２５９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２６１〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれらの組合せの前記コントロールバーコード配列が同一である、前記〔２５２〕～〔２６０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２６２〕前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２、１０、１００、１０００、又はそれらの組合せが、異なるコントロールバーコード配列を含む、前記〔２５２〕～〔２６１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２６３〕前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；
前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を使用して前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む、前記〔２５２〕～〔２６２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２６４〕決定された前記１つ以上の細胞の数に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、前記〔２６３〕に記載の方法。
〔２６５〕決定された前記１つ以上の細胞の数と前記複数の細胞の数の比に基づいて単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、前記〔２６３〕に記載の方法。
〔２６６〕前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータにおける各細胞標識について、前記細胞標識及び前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程と；
前記細胞標識及び前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を使用して前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む、前記〔２５２〕～〔２６５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２６７〕前記細胞標識及び前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程が、
前記シーケンシングデータにおける各細胞標識について、前記細胞標識及び前記コントロールバーコード配列に関連付けられた最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数を決定する工程を含む、前記〔２６６〕に記載の方法。

〔２６８〕前記細胞標識及び前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有する分子標識配列の数を使用して前記１つ以上の細胞の数を決定する工程が、
最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数に関連付けられた前記シーケンシングデータにおいて、細胞標識の数と最多数の識別可能な配列を有する分子標識配列の数のプロットを作製する工程と；
前記１つ以上の細胞の数として前記プロットにおけるカットオフを決定する工程と、を含む、前記〔２６７〕に記載の方法。
〔２６９〕前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でなく、又は前記コントロールオリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、前記〔２５２〕～〔２６８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７０〕前記種が、非哺乳動物種である、前記〔２６９〕に記載の方法。
〔２７１〕前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程の前に、前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬から前記コントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む、前記〔２５２〕～〔２７０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７２〕前記複数のコントロール組成物の未結合のコントロール組成物を除去する工程を含む、前記〔２５２〕～〔２７１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７３〕前記未結合のコントロール組成物を除去する工程が、前記複数の細胞の前記１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、前記〔２７２〕に記載の方法。
〔２７４〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記コントロール組成物の、少なくとも１つのタンパク質結合試薬、又は少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、前記〔２７３〕に記載の方法。
〔２７５〕前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つ、又は前記複数の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面上で発現される、前記〔２５２〕～〔２７４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７６〕前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つ、又は前記複数の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔２５２〕～〔２７５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７７〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、浸潤、又はそれらの組合せを含む、前記〔２５２〕～〔２７６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７８〕前記タンパク質結合試薬のタンパク質標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択され、又は前記細胞成分結合試薬の細胞成分標的が、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択される、前記〔２５２〕～〔２７７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２７９〕前記タンパク質結合試薬のタンパク質標的、又は前記細胞成分結合試薬の細胞成分標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔２７８〕に記載の方法。
〔２８０〕前記コントロールオリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬に結合される、前記〔２５２〕～〔２７９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２８１〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔２５２〕～〔２８０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２８２〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔２５２〕～〔２８１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔２８３〕前記複数のコントロール組成物のタンパク質結合試薬、又は第２の細胞成分結合試薬が、前記コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない、前記〔２５２〕～〔２８２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２８４〕前記タンパク質結合試薬及び前記第２のタンパク質結合試薬が、同一であるか、又は前記細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が、同一である、前記〔２８３〕に記載の方法。
〔２８５〕前記バーコードが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、前記〔２５２〕～〔２８４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２８６〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔２５２〕～〔２８５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２８７〕前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、前記〔２５２〕～〔２８６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２８８〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定されるか、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定されるか、前記バーコーディング粒子に封入されるか、前記バーコーディング粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔２８７〕に記載の方法。
〔２８９〕前記バーコーディング粒子が崩壊性である、前記〔２８７〕～〔２８８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９０〕前記バーコーディング粒子が、バーコーディングビーズを含む、前記〔２８７〕～〔２８９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９１〕前記バーコーディング粒子が、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、又は前記バーコーディング粒子が、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、又はそれらの任意の組合せの材料を含む、前記〔２８７〕～〔２９０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９２〕前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔２８７〕～〔２９１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９３〕前記バーコーディング粒子が、光学的部分に関連付けられる、前記〔２８７〕～〔２９２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９４〕前記コントロールオリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる、前記〔２８７〕～〔２９３〕のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
〔２９５〕前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００、１００００、又はそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔２８７〕～〔２９４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９６〕前記バーコードの前記分子標識配列が、ランダム配列を含む、前記〔２８７〕～〔２９５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９７〕前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔２８７〕～〔２９６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９８〕前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数の確率バーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔２５２〕～〔２９７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔２９９〕前記複数のバーコードを用いて、前記複数のコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、

前記複数のバーコードを、前記複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記確率バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔２５２〕～〔２９８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３００〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又はそれらの組合せを用いて、前記バーコードを伸長する工程を含む、前記〔２９９〕に記載の方法。
〔３０１〕複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔２５２〕～〔３００〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３０２〕前記複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔３０１〕に記載の方法。
〔３０３〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔３０１〕～〔３０２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３０４〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、前記〔３０３〕に記載の方法。
〔３０５〕細胞同定のための方法であって、
第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ、複数のサンプルインデックス付加組成物の２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上のタンパク質標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって，
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と；
得られた前記シーケンシングデータから、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除去する工程と、を含む、方法。
〔３０６〕マルチプレットの同定のための方法であって、
第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ、複数のサンプルインデックス付加組成物の２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、

前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上のタンパク質標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、

前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；

複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、

前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；

前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；

得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、を含む、方法。

〔３０７〕細胞同定のための方法であって、

第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ、複数のサンプルインデックス付加組成物の２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、

前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、

前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；

複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、

前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；

前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；

得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と；

得られた前記シーケンシングデータから、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除去する工程と、を含む、方法。

〔３０８〕マルチプレットの同定のための方法であって、

第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞を、それぞれ、複数のサンプルインデックス付加組成物の２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、

前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合

試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、を含む、方法。
〔３０９〕前記細胞成分結合試薬が、タンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記１つ以上の細胞成分標的が、１つ以上のタンパク質標的を含む、前記〔３０７〕～〔３０８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１０〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞を、それぞれ前記２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程が、
前記第１の複数の細胞を、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；
前記第１の複数の細胞を、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む、前記〔３０５〕～〔３０９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１１〕サンプル同定のための方法であって、
第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の各々に由来する１つ以上の細胞を、それぞれ複数の２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、を含む、方法。
〔３１２〕マルチプレットの同定のための方法であって、
第１の複数の細胞及び第２の複数の細胞の各々に由来する１つ以上の細胞を、それぞれ複数の２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々及び前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、

前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
多細胞として２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、を含む、方法。
〔３１３〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞を、それぞれ前記２つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程が、
前記第１の複数の細胞を、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の第１のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と；
前記第１の複数の細胞を、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の第２のサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程と、を含む、前記〔３０５〕～〔３１２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１４〕２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞を同定する工程が、
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程であって，
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、分子標識配列、及び標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と、を含む、前記〔３０５〕～〔３１３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１５〕得られた前記シーケンシングデータから、２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除去する工程を含む、前記〔３１４〕に記載の方法。
〔３１６〕その後の分析から、前記２つ以上のサンプルインデックス付加配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除外する工程を含む、前記〔３１４〕に記載の方法。
〔３１７〕前記サンプルインデックス付加配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔３０５〕～〔３１６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１８〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔３０５〕～〔３１７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３１９〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、前記〔３０５〕～〔３１８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２０〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、又はそれらの組合せを含む、前記〔３０５〕～〔３１９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２１〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬に結合される、前記〔３０５〕～〔３２０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２２〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、単一細胞を含む、前記〔３０５〕～〔３２１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２３〕前記少なくとも１つ以上のタンパク質標的、又は前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つが、細胞表面上にある、前記〔３０５〕～〔３２２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔３２４〕前記２つのサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む、前記〔３０５〕～〔３２３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２５〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、前記〔３２４〕に記載の方法。
〔３２６〕前記未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記２つのサンプルインデックス付加組成物の、少なくとも１つのタンパク質結合試薬、又は少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、前記〔３２４〕に記載の方法。
〔３２７〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞の細胞を溶解させる工程を含む、前記〔３０５〕～〔３２６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２８〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される、前記〔３０５〕～〔３２７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３２９〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔３０５〕～〔３２８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３０〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより、前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔３２９〕に記載の方法。
〔３３１〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、前記〔３０５〕～〔３３０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３２〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、前記〔３０５〕～〔３３１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３３〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、腫瘍細胞又は非腫瘍細胞を含む、前記〔３０５〕～〔３３２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３４〕前記第１の複数の細胞及び前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３０５〕～〔３３３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３５〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔３０５〕～〔３３４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３６〕前記バーコードが、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、前記〔３３５〕に記載の方法。
〔３３７〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔３３６〕に記載の方法。
〔３３８〕前記バーコードの前記捕捉配列に相補的な前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔３０５〕～〔３３７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３３９〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、分子標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はその両方を含む、前記〔３０５〕～〔３３８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４０〕前記タンパク質標的、又は前記細胞成分標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３０５〕～〔３３９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４１〕前記タンパク質標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択され、又は前記細胞成分標的が、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択

される、前記〔３０５〕～〔３４０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４２〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔３０５〕～〔３４１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４３〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔３０５〕～〔３４１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４４〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の前記サンプルインデックス付加組成物が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合されない、第２のタンパク質結合試薬、又は第２の細胞成分結合試薬を含む、前記〔３０５〕～〔３４３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４５〕前記タンパク質結合試薬及び前記第２のタンパク質結合試薬が同一であるか、又は前記細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が同一である、前記〔３４４〕に記載の方法。
〔３４６〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔３０５〕～〔３４５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４７〕前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域及び分子標識配列を含み、
前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる分子標識配列を含む、前記〔３０５〕～〔３４６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３４８〕前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３４７〕に記載の方法。
〔３４９〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔３４７〕～〔３４８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５０〕前記複数のバーコードが、粒子に関連付けられる、前記〔３４７〕～〔３４９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５１〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定されるか、前記粒子上に部分的に固定されるか、前記粒子に封入されるか、前記粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔３５０〕に記載の方法。
〔３５２〕前記粒子が崩壊性である、前記〔３５０〕～〔３５１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５３〕前記粒子がビーズを含む、前記〔３５０〕～〔３５２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５４〕前記粒子が、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、又は前記粒子が、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〔３５０〕～〔３５３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５５〕前記粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔３５０〕～〔３５４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５６〕前記粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔３５０〕～〔３５５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５７〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔３５０〕～〔３５６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５８〕前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００、１００００、又はそれらの組合せの異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔３５０〕～〔

３５７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３５９〕前記バーコードの前記分子標識配列が、ランダム配列を含む、前記〔３５０〕～〔３５８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３６０〕前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔３５０〕～〔３５９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３６１〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔３０５〕～〔３６０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３６２〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔３６１〕に記載の方法。
〔３６３〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔３６１〕に記載の方法。
〔３６４〕複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔３６１〕～〔３６３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３６５〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔３６４〕に記載の方法。
〔３６６〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔３６４〕～〔３６５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３６７〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、前記〔３６６〕に記載の方法。
〔３６８〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔３０５〕～〔３６７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３６９〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む、前記〔３０５〕～〔３６８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３７０〕前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、
前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含む、前記〔３６９〕に記載の方法。
〔３７１〕前記複数のバーコード付き標的の前記シーケンシングデータを取得する工程の

前に、前記バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔３６９〕～〔３７０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３７２〕前記バーコード付き標的を増幅して、前記複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって前記バーコード付き標的を増幅する工程を含む、前記〔３７１〕に記載の方法。
〔３７３〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔３６９〕～〔３７２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３７４〕タンパク質間相互作用を決定するための方法であって、
細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、
前記細胞が、第１のタンパク質標的及び第２のタンパク質標的を含み、
相互作用決定組成物の前記第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の前記第１の対の一方の前記タンパク質結合試薬が、前記第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の前記第１の対の他方の前記タンパク質結合試薬が、前記第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、
前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定配列が、異なる配列を含む工程と；
架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、前記架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する方法であって、
前記複数のバーコードの各々が、バーコード配列及び捕捉配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定配列の関連付けに基づいて、前記第１及び第２のタンパク質標的間の相互作用を決定する工程と、を含む、方法。
〔３７５〕細胞成分標的間の相互作用を決定するための方法であって、
細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、
前記細胞が、第１の細胞成分標的及び第２の細胞成分標的を含み、
相互作用決定組成物の前記第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の前記第１の対の一方の前記細胞成分結合試薬が、前記第１の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の前記第１の対の他方の前記細胞成分結合試薬が、前記第２の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、
前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定配列が、異なる配列を含む工程と；
架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、前記架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；

複数のバーコードを用いて、前記ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する方法であって、
前記複数のバーコードの各々が、バーコード配列及び捕捉配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定配列の関連付けに基づいて、前記第１及び第２の細胞成分標的間の相互作用を決定する工程と、を含む、方法。
〔３７６〕前記２つの細胞成分結合試薬の少なくとも１つが、タンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記２つの相互作用決定オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられ、前記１つ以上の細胞成分標的が、少なくとも１つのタンパク質標的を含む、前記〔３７５〕に記載の方法。
〔３７７〕前記細胞を、相互作用決定組成物の前記第１の対と接触させる工程が、
前記細胞を、相互作用決定組成物の前記第１の対の各々と連続的に又は同時に接触させる工程を含む、前記〔３７４〕～〔３７６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３７８〕前記第１のタンパク質標的が、前記第２のタンパク質標的と同じである、前記〔３７４〕～〔３７７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３７９〕前記第１のタンパク質標的が、前記第２のタンパク質標的と異なる、前記〔３７４〕～〔３７８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８０〕前記相互作用決定配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔３７４〕～〔３７９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８１〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔３７４〕～〔３８０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔３８２〕前記細胞を、相互作用決定組成物の第２の対と接触させる工程を含み、
前記細胞が、第３のタンパク質標的及び第４のタンパク質標的を含み、
相互作用決定組成物の前記第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の前記第２の対の一方の前記タンパク質結合試薬が、前記第３のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の前記第２の対の他方の前記タンパク質結合試薬が、前記第４のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である、前記〔３７４〕～〔３８１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８３〕前記第３及び第４のタンパク質標的の少なくとも１つが、前記第１及び第２のタンパク質標的の１つと異なる、前記〔３８２〕に記載の方法。
〔３８４〕前記第３及び第４のタンパク質標的の少なくとも１つ及び前記第１及び第２のタンパク質標的の少なくとも１つが、同一である、前記〔３８２〕に記載の方法。
〔３８５〕前記細胞を、相互作用決定組成物の３つ以上の対と接触させる工程を含む、前記〔３７４〕～〔３８４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８６〕相互作用決定組成物の前記複数の対の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せの相互作用決定組成物の前記相互作用決定配列が、異なる配列を含む、前記〔３８５〕に記載の方法。
〔３８７〕相互作用決定組成物の前記第１の対の前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域が、異なる配列を含む、前記〔３７４〕～〔３８６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８８〕前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つが、前記架橋オリゴヌクレオチドの前記２つのハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つに相補的である、前記〔３７４〕～〔３８７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３８９〕前記架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートする工程が、
前記架橋オリゴヌクレオチドの第１のハイブリダイゼーション領域を、前記相互作用決

定オリゴヌクレオチドの前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の第１の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域とハイブリダイズする工程と；
前記架橋オリゴヌクレオチドの第２のハイブリダイゼーション領域を、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドの前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の第２の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域とハイブリダイズする工程と；
前記架橋オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔３７４〕～〔３８８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９０〕前記タンパク質結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、又はそれらの組合せを含む、前記〔３７４〕～〔３８９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９１〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、前記〔３７４〕～〔３９０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９２〕前記１つ以上のタンパク質標的の前記少なくとも１つが、細胞表面上にある、前記〔３７４〕～〔３９１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９３〕前記細胞を、相互作用決定組成物の前記第１の対と接触させる工程の前に、前記細胞を固定する工程を含む、前記〔３７４〕～〔３９２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９４〕相互作用決定組成物の前記第１の対の未結合の相互作用決定組成物を除去する工程を含む、前記〔３７４〕～〔３９３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９５〕前記未結合の相互作用決定組成物を除去する工程が、前記細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、前記〔３９４〕に記載の方法。
〔３９６〕前記未結合の相互作用決定組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記細胞を選択する工程を含む、前記〔３９４〕に記載の方法。
〔３９７〕前記細胞を溶解させる工程を含む、前記〔３７４〕～〔３９６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９８〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、前記タンパク質結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される、前記〔３７４〕～〔３９７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔３９９〕前記タンパク質結合試薬から前記相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔３７４〕～〔３９８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４００〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより前記タンパク質結合試薬から前記相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔３９９〕に記載の方法。
〔４０１〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、前記細胞のゲノム配列に対して相同でなく、又は前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、前記〔３７４〕～〔４００〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４０２〕前記種が、非哺乳動物種である、前記〔４０１〕に記載の方法。
〔４０３〕前記細胞が、腫瘍細胞又は非腫瘍細胞である、前記〔３７４〕～〔４０２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４０４〕前記細胞が、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３７４〕～〔４０３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４０５〕２つ以上の細胞を、相互作用決定組成物の前記第１の対と接触させる工程を含み、前記２つ以上の細胞の各々が、前記第１及び第２のタンパク質標的を含む、前記〔３７４〕～〔４０４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４０６〕前記２つ以上の細胞の少なくとも１つが、単一細胞を含む、前記〔４０５〕に記載の方法。
〔４０７〕前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３７４〕～〔４０６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４０８〕前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む、前記〔４０７〕に記載の方法。
〔４０９〕相互作用決定組成物の前記第１の対の一方の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、前記捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔３７４〕～〔４０８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１０〕前記捕捉配列が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔４０９〕に記載の方法。
〔４１１〕前記捕捉配列に相補的な前記相互作用決定オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔４０９〕～〔４１０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１２〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、第２のバーコード配列を含む、前記〔３７４〕～〔４１１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１３〕相互作用同定組成物の前記第１の対の他方の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、前記〔３７４〕～〔４１２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１４〕前記タンパク質標的が、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３７４〕～〔４１３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１５〕前記タンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔４１４〕に記載の方法。
〔４１６〕前記タンパク質標的が、脂質、炭水化物、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔３７４〕～〔４１５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１７〕前記タンパク質標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択される、前記〔３７４〕～〔４１６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１８〕前記タンパク質結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔３７４〕～〔４１７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４１９〕前記タンパク質結合試薬が、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔３７４〕～〔４１８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２０〕前記複数の相互作用決定組成物の１つが、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２のタンパク質結合試薬を含む、前記〔３７４〕～〔４１９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２１〕前記タンパク質結合試薬及び前記第２のタンパク質結合試薬が、同一である、前記〔４２０〕に記載の方法。
〔４２２〕前記タンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔３７４〕～〔４２１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２３〕前記複数のバーコードが、粒子に関連付けられる、前記〔３７４〕～〔４２２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２４〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定されるか、前記粒子上に部分的に固定されるか、前記粒子に封入されるか、前記粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔４２３〕に記載の方法。
〔４２５〕前記粒子が崩壊性である、前記〔４２３〕～〔４２４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２６〕前記粒子がビーズを含む、前記〔４２３〕～〔４２５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４２７〕前記粒子が、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、又は前記粒子が、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〔４２３〕～〔４２６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４２８〕前記粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔４２３〕～〔４２７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４２９〕前記粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔４２３〕～〔４２８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３０〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔４２３〕～〔４２９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３１〕前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００、１００００、又はそれらの組合せの異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、前記〔４２３〕～〔４３０〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３２〕前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、前記〔３７４〕～〔４３１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３３〕前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔４２３〕～〔４３２〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３４〕前記複数のバーコードを用いて、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、

前記複数のバーコードを、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドと接触させて、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；

前記相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔３７４〕～〔４３３〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３５〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔４３４〕に記載の方法。

〔４３６〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔４３４〕に記載の方法。

〔４３７〕前記バーコードを伸長する工程が、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素又はＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔４３４〕に記載の方法。

〔４３８〕前記バーコードを伸長する工程が、前記架橋オリゴヌクレオチドを、前記ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドから移動させる工程を含む、前記〔４３４〕～〔４３７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４３９〕複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔４３４〕～〔４３８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４４０〕前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記バーコード配列の少なくとも一部及び前記相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔４３９〕に記載の方法。

〔４４１〕前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔４３９〕～〔４４０〕のいずれか一項に記載の方法。

〔４４２〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記バーコード配列の少なくとも一部及び前記相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、前記〔４４１〕に記載の方法。

〔４４３〕前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドの部分的及び／又は完全な配列を取得する工程を含む、前記〔３７４〕～〔４４２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４４４〕前記複数のバーコードが、複数の確率バーコードを含み、
前記複数の確率バーコードの各々の前記バーコード配列が、分子標識配列を含み、
前記複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含み、
前記複数のバーコードを用いて、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程が、前記複数の確率バーコードを用いて、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔３７４〕～〔４４３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４４５〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程と；
前記バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む、前記〔３７４〕～〔４４４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４４６〕前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、
前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含む、前記〔４４５〕に記載の方法。
〔４４７〕前記複数のバーコード付き標的の前記シーケンシングデータを取得する工程の前に、前記バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔４４５〕～〔４４６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４４８〕前記バーコード付き標的を増幅して、前記複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって前記バーコード付き標的を増幅する工程を含む、前記〔４４７〕に記載の方法。
〔４４９〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、前記複数の確率バーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔４４５〕～〔４４８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４５０〕タンパク質間相互作用を同定するためのキットであって、
相互作用決定組成物の第１の対であって、
相互作用決定組成物の前記第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、
相互作用決定組成物の前記第１の対の一方の前記タンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の前記第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、前記第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、
前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、
相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定配列が、異なる配列を含む、相互作用決定組成物の第１の対と；
相互作用決定組成物の前記第１の対の前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を各々が含む複数の架橋オリゴヌクレオチドと、を含む、キット。
〔４５１〕細胞成分間相互作用を同定するためのキットであって、
相互作用決定組成物の第１の対であって、
相互作用決定組成物の前記第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連

付けられた細胞成分結合試薬を含み、
相互作用決定組成物の前記第１の対の一方の前記細胞成分結合試薬が、第１の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の前記第１の対の他方の細胞成分結合試薬が、前記第２の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、
前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列及び架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、
相互作用決定組成物の前記第１の対の前記相互作用決定配列が、異なる配列を含む、相互作用決定組成物の第１の対と；
相互作用決定組成物の前記第１の対の前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を各々が含む複数の架橋オリゴヌクレオチドと、を含む、キット。
〔４５２〕前記細胞成分結合試薬が、タンパク質結合試薬を含み、前記第１の細胞成分標的が、第１のタンパク質標的を含み、前記第２の細胞成分標的が、第２のタンパク質標的を含む、前記〔４５１〕に記載のキット。
〔４５３〕前記相互作用決定配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔４５０〕～〔４５２〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４５４〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔４５０〕～〔４５３〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４５５〕相互作用決定組成物の第２の対をさらに含み、相互作用決定組成物の前記第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の前記第２の対の一方の前記細胞成分結合試薬が、第３の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の前記第２の対の他方の前記細胞成分結合試薬が、第４の細胞成分標的に特異的に結合することが可能である、前記〔４５０〕～〔４５４〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４５６〕前記第３の細胞成分標的が、第３のタンパク質標的を含み、前記第４の細胞成分標的が、第４のタンパク質標的を含む、いずれかの前記〔４５５〕に記載のキット。
〔４５７〕前記第３及び第４の細胞成分標的の少なくとも１つが、前記第１及び第２の細胞成分標的の１つと異なる、前記〔４５５〕～〔４５６〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４５８〕前記第３及び第４の細胞成分標的の少なくとも１つ及び前記第１及び第２の細胞成分標的の少なくとも１つが、同一である、前記〔４５５〕～〔４５６〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４５９〕前記キットが、相互作用決定組成物の３つ以上の対を含む、前記〔４５０〕～〔４５８〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６０〕相互作用決定組成物の前記３つ以上の対の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せの相互作用決定組成物の前記相互作用決定配列が、異なる配列を含む、前記〔４５９〕に記載のキット。
〔４６１〕前記複数の相互作用決定組成物の２つの相互作用決定組成物の前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域が、異なる配列を含む、前記〔４５０〕～〔４６０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６２〕前記架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つが、前記架橋オリゴヌクレオチドの前記２つのハイブリダイゼーション領域の少なくとも１つに相補的である、前記〔４５０〕～〔４６１〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６３〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む、前記〔４５０〕～〔４６２〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６４〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬に結合される、前記〔４５０〕～〔４６３〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６５〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、対象の任意の細胞のゲノム配列に対して相同でない、前記〔４５０〕～〔４６４〕のいずれか一項に記載のキット。

〔４６６〕前記対象の細胞が、腫瘍細胞又は非腫瘍細胞である、前記〔４６５〕に記載のキット。
〔４６７〕前記対象の細胞が、単一細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、又はそれらの任意の組合せである、前記〔４６５〕～〔４６６〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６８〕複数のバーコードをさらに含み、前記複数のバーコードの各々が、バーコード配列及び捕捉配列を含む、前記〔４５０〕～〔４６７〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４６９〕相互作用決定組成物の前記第１の対の一方の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの前記捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔４６８〕に記載のキット。
〔４７０〕前記捕捉配列が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔４６８〕～〔４６９〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７１〕前記バーコードの前記捕捉配列に相補的な前記相互作用決定オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔４６９〕～〔４７０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７２〕相互作用同定組成物の前記第１の対の他方の前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔４６８〕～〔４７１〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７３〕前記複数のバーコードが、複数の確率バーコードを含み、
前記複数の確率バーコードの各々の前記バーコード配列が、分子標識配列を含み、
前記複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードの前記分子標識配列が、異なる配列を含む、前記〔４６８〕～〔４７２〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７４〕前記タンパク質標的、又は前記細胞成分標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔４５０〕～〔４７３〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７５〕前記タンパク質標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択され、又は前記細胞成分標的が、１０～１００の異なる細胞成分標的を含む群から選択される、前記〔４５０〕～〔４７４〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７６〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔４５０〕～〔４７５〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７７〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔４５０〕～〔４７７〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７８〕相互作用決定組成物の前記第１の対の一方が、前記相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられない、第２のタンパク質結合試薬、又は第２の細胞成分結合試薬を含む、前記〔４５０〕～〔４７７〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４７９〕前記第１のタンパク質結合試薬及び前記第２のタンパク質結合試薬が同一であるか、又は前記第１の細胞成分結合試薬及び前記第２の細胞成分結合試薬が同一である、前記〔４７８〕に記載のキット。
〔４８０〕前記タンパク質結合試薬、又は前記細胞成分結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔４５０〕～〔４７９〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８１〕前記複数のバーコードが、粒子に関連付けられる、前記〔４５０〕～〔４８０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８２〕前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定されるか、前記粒子上に部分的に固定されるか、前記粒子に封入されるか、前記粒子に部分的に封入されるか、又はそれらの組合せである、前記〔４８１〕に記載のキット。
〔４８３〕前記粒子が崩壊性である、前記〔４８１〕～〔４８２〕のいずれか一項に記載のキット。

〔４８４〕前記粒子がビーズを含む、前記〔４８１〕～〔４８３〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８５〕前記粒子が、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、又は前記粒子が、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〔４８１〕～〔４８４〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８６〕前記粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、前記〔４８１〕～〔４８５〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８７〕前記粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔４８１〕～〔４８６〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８８〕前記相互作用決定オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、前記〔４８１〕～〔４８７〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４８９〕前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００、１０００、又はそれらの組合せの異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、前記〔４８１〕～〔４８８〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４９０〕前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、前記〔４８１〕～〔４８９〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４９１〕前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔４８１〕～〔４９０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４９２〕ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、又は固定剤、又はそれらの組合せを含む、前記〔４５０〕～〔４９１〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４９３〕モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素又はＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを含む、前記〔４５０〕～〔４９２〕のいずれか一項に記載のキット。
〔４９４〕サンプル同定のための方法であって、
複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記１つ以上の細胞が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを含む前記複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルイン

デックス付加配列に基づいて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む、方法。
〔４９５〕前記サンプルインデックス付加配列が、６～６０ヌクレオチド長である、前記〔４９４〕に記載の方法。
〔４９６〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔４９４〕～〔４９５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４９７〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１０、１００、１０００、又はそれらの組合せのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、前記〔４９４〕～〔４９６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４９８〕前記細胞成分結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、又はそれらの組合せを含む、前記〔４９４〕～〔４９７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔４９９〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の未結合のサンプルインデックス付加組成物を除去する工程を含む、前記〔４９４〕～〔４９８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５００〕前記複数のサンプルの各々から前記１つ以上の細胞を溶解させる工程を含む、前記〔４９４〕～〔４９９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５０１〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記細胞成分結合試薬から切り離し可能又は切り離し不可能であるように構成される、前記〔４９４〕～〔５００〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５０２〕前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔４９４〕～〔５０１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５０３〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、又はそれらの任意の組合せにより前記細胞成分結合試薬から前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、前記〔５０２〕に記載の方法。
〔５０４〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、前記〔４９４〕～〔５０３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５０５〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、前記〔４９４〕～〔５０３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５０６〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む、前記〔４９４〕～〔５０５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５０７〕前記バーコードが、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、前記〔５０６〕に記載の方法。
〔５０８〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔５０７〕に記載の方法。
〔５０９〕前記バーコードの前記捕捉配列に相補的な前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、前記〔５０６〕～〔５０８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１０〕前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、分子標識配列、ユニバーサルのための結合部位を含む、前記〔４９４〕～〔５０９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１１〕前記細胞成分標的が、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔４９４〕～〔５１０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１２〕前記細胞成分結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔４９４〕～〔５１１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１３〕前記細胞成分結合試薬が、異なるサンプルインデックス付加配列を有する２つ以上のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられる、前記〔４９４〕～〔５１１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５１４〕前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域及び分子標識配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの分子標識配列が、異なる分子標識配列を含む、前記〔４９４〕～〔５１３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１５〕前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、又はそれらの任意の組合せを含む、前記〔５１４〕に記載の方法。
〔５１６〕前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、前記〔５１４〕～〔５１５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１７〕前記複数のバーコードが、粒子に関連付けられる、前記〔５１４〕～〔５１６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５１８〕前記粒子が、崩壊性ヒドロゲルビーズを含む、前記〔５１７〕に記載の方法。
〔５１９〕前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なる分子標識配列から選択される分子標識配列を含む、前記〔５１７〕～〔５１８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２０〕前記バーコードの前記分子標識配列が、ランダム配列を含む、前記〔５１９〕に記載の方法。
〔５２１〕前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、前記〔５１７〕～〔５２０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２２〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔４９４〕～〔５２１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２３〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５２２〕に記載の方法。
〔５２４〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５２２〕に記載の方法。
〔５２５〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔４９４〕～〔５２４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２６〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔４９４〕～〔５２５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２７〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの各デイジーチェーン接続増幅プライマーが、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である、前記〔４９４〕～〔５２６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５２８〕前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、２０～２００ヌクレオチド長である、前記〔５２７〕に記載の方法。
〔５２９〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５２７〕～〔５２８〕のいずれか一項に記載の方

法。
〔５３０〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５２７〕～〔５２９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３１〕前記オーバーハング領域が、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔５２７〕～〔５３０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３２〕前記オーバーハング領域が、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、前記〔５２７〕～〔５３１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３３〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５３２〕に記載の方法。
〔５３４〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５３２〕に記載の方法。
〔５３５〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域が、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、いずれかの前記〔５３２〕に記載の方法。
〔５３６〕前記複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンが、２５０～１０００ヌクレオチド長である、前記〔５２７〕～〔５３５〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３７〕前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、前記〔４９４〕～〔５３６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３８〕前記少なくとも１つの細胞の前記サンプル起源を同定する工程が、前記少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記複数のバーコード付き標的のサンプル起源を同定する工程を含む、前記〔４９４〕～〔５３７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５３９〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔４９４〕～〔５３８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５４０〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、を含む、前記〔４９４〕～〔５３９〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５４１〕前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、
前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含む、前記〔５４０〕に記載の方法。
〔５４２〕前記複数のバーコード付き標的の前記シーケンシングデータを取得する工程の前に、前記バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔５４０〕～〔５４１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５４３〕前記バーコード付き標的を増幅して、前記複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって前記バーコード付き標的を増幅する工程を含む、前記〔５４２〕に記載の方法。

〔５４４〕前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、複数の確率バーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含む、前記〔５４０〕～〔５４３〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５４５〕サンプル同定のための方法であって、
複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の結合標的を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の結合標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプル起源を同定する工程と、を含む、方法。
〔５４６〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔５４５〕に記載の方法。
〔５４７〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５４６〕に記載の方法。
〔５４８〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５４６〕に記載の方法。
〔５４９〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５４６〕～〔５４８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５０〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５４９〕に記載の方法。
〔５５１〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔５４９〕～〔５５０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５２〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、前記複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、前記複数のバーコード付きサン

プルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５４９〕～〔５５１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５３〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である、前記〔５５２〕に記載の方法。
〔５５４〕前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、２０～２００ヌクレオチド長である、前記〔５５３〕に記載の方法。
〔５５５〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５５３〕～〔５５４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５６〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５５３〕～〔５５４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５７〕前記オーバーハング領域が、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔５５３〕～〔５５６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５８〕前記オーバーハング領域が、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、前記〔５５３〕～〔５５７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５５９〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５５８〕に記載の方法。
〔５６０〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５５８〕に記載の方法。
〔５６１〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域が、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、いずれかの前記〔５５８〕に記載の方法。
〔５６２〕前記複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンが、２５０～１０００ヌクレオチド長である、前記〔５５３〕～〔５６１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５６３〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、前記〔５４５〕～〔５６２〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５６４〕サンプル同定のための方法であって、
複数のサンプルの各々に由来する１つ以上の細胞を、複数のサンプルインデックス付加組成物のうちの１つのサンプルインデックス付加組成物と接触させる工程であって、
前記１つ以上の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルインデックス付加配列を含み、前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む工程と；
前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも１つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列及び複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーに基づいて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの細胞のサンプ

ル起源を同定する工程と、を含む、方法。
〔５６５〕前記少なくとも１つの細胞の前記サンプル起源を同定する工程が、
複数のバーコードを用いて、前記複数のサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と；
前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも１つのバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの前記サンプルインデックス付加配列に基づいて、前記細胞の前記サンプル起源を同定する工程と、を含む、前記〔５６４〕に記載の方法。
〔５６６〕前記複数のバーコードを用いて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと接触させて、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む、前記〔５６５〕に記載の方法。
〔５６７〕前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５６６〕に記載の方法。
〔５６８〕前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、前記〔５６６〕に記載の方法。
〔５６９〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５６５〕～〔５６８〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７０〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５６９〕に記載の方法。
〔５７１〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、前記分子標識配列の少なくとも一部及び前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、前記〔５６９〕～〔５７０〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７２〕前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンを生成するために、前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーを用いて、前記複数のバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、前記〔５６９〕～〔５７１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７３〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である、前記〔５７２〕に記載の方法。
〔５７４〕前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、２０～２００ヌクレオチド長である、前記〔５７３〕に記載の方法。
〔５７５〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリ

ゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５７３〕～〔５７４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７６〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５７３〕～〔５７４〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７７〕前記オーバーハング領域が、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔５７３〕～〔５７６〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７８〕前記オーバーハング領域が、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、前記〔５７３〕～〔５７７〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５７９〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５７８〕に記載の方法。
〔５８０〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５７８〕に記載の方法。
〔５８１〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域が、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、いずれかの前記〔５７８〕に記載の方法。
〔５８２〕前記複数のデイジーチェーン接続伸長アンプリコンのデイジーチェーン接続伸長アンプリコンが、２５０～１０００ヌクレオチド長である、前記〔５７３〕～〔５８１〕のいずれか一項に記載の方法。
〔５８３〕複数のサンプルインデックス付加組成物であって、
前記複数のサンプルインデックス付加組成物の各々が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、
前記細胞成分結合試薬が、少なくとも１つの細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、
前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドが、サンプルの１つ以上の細胞のサンプル起源を同定するためのサンプルインデックス付加配列及びデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列を含み、
前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のサンプルインデックス付加配列が、異なる配列を含む、複数のサンプルインデックス付加組成物と；
複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーと、を含む、キット。
〔５８４〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域及びオーバーハング領域を含み、前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、前記サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのデイジーチェーン接続サンプルインデックス付加領域に結合することが可能である、前記〔５８３〕に記載のキット。
〔５８５〕前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が、２０～２００ヌクレオチド長である、前記〔５８４〕に記載のキット。
〔５８６〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一の配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５８４〕～〔５８５〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５８７〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、異なる配列を有するバーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域を含む、前記〔５８４〕～〔５８５〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５８８〕前記バーコード付きサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド結合領域が

、前記デイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列、その相補体、その逆相補体、又はそれらの組合せを含む、前記〔５８６〕～〔５８７〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５８９〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列が、同一の配列を含む、前記〔５８４〕～〔５８８〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５９０〕前記複数のサンプルインデックス付加組成物の少なくとも２つのサンプルインデックス付加組成物のデイジーチェーン接続増幅プライマー結合配列が、異なる配列を含む、前記〔５８４〕～〔５８８〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５９１〕前記オーバーハング領域が、５０～５００ヌクレオチド長である、前記〔５８４〕～〔５９０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５９２〕前記オーバーハング領域が、デイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、前記〔５８４〕～〔５９０〕のいずれか一項に記載のキット。
〔５９３〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、同一のデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５９２〕に記載のキット。
〔５９４〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーの２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーが、２つのデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を有するオーバーハング領域を含む、いずれかの前記〔５９２〕に記載のキット。
〔５９５〕前記複数のデイジーチェーン接続増幅プライマーのオーバーハング領域が、異なるデイジーチェーン接続増幅プライマーバーコード配列を含む、いずれかの前記〔５９２〕に記載のキット。

【実施例】

【０６８６】

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

【０６８７】

実施例１

タンパク質結合試薬との共役のためのオリゴヌクレオチド

この実施例は、タンパク質結合試薬と共役させることができるオリゴヌクレオチドの設計を説明する。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に決定することができる。また、これらのオリゴヌクレオチドを、サンプルインデックス付加に使用して、同じ又は異なるサンプルの細胞を決定することができる。

【０６８８】

９５量体オリゴヌクレオチド設計

以下の方法を用いて、タンパク質発現及び遺伝子発現又はサンプルインデックス付加の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列及び対応するプライマー配列を生成した。

【０６８９】

１．配列生成及び排除

以下のプロセスを用いて、タンパク質発現及び遺伝子発現の同時決定のための又はサンプルインデックス付加のための候補オリゴヌクレオチド配列を生成した。
工程１ａ．所望の長さ（４５ｂｐ）を有するいくつかの候補配列（５０，０００配列）をランダムに生成する。
工程１ｂ．生成された配列の５’末端に転写調節ＬＳＲＲ配列を、また、生成された配列の３’末端にポリ（Ａ）配列（２５ｂｐ）を付加する。
工程１ｃ．生成され、付加された配列で、４０％～５０％の範囲のＧＣ含量を含まない配列を除去する。
工程１ｄ．残る配列で、各々１つ又は複数のヘアピン構造を有する配列を除去する。

【０６９０】

残った候補オリゴヌクレオチド配列の数は、４２３であった。

【０６９１】

２．プライマー設計
残る４２３の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。
【０６９２】
２．１　Ｎ１プライマー：Ｎ１プライマーとして、ユニバーサルＮ１配列：５’－ＧＴＴＧＴＣＡＡＧＡＴＧＣＴＡＣＣＧＴＴＣＡＧＡＧ－３’（ＬＳＲＲ配列；配列番号５）を使用する。
【０６９３】
２．２　Ｎ２プライマー（特定のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；たとえば、図１５Ｂ－１５ＤのＮ２プライマー）：
２．２ａ．Ｎ１配列の下流で開始しない候補Ｎ２プライマーを除去する。
２．２ｂ．候補オリゴヌクレオチド配列の最後の３５ｂｐにおいて重複する候補Ｎ２プライマーを除去する。２．２ｃ．オリゴヌクレオチドを用いて試験される細胞の種のトランスクリプトーム（たとえば、ヒトトランスクリプトーム又はマウストランスクリプトーム）とアラインメントするプライマー候補を除去する。
２．２ｄ．プライマー－プライマー相互作用を最小限にするか、又は回避するために、デフォルトコントロールとしてＩＬＲ２配列（ＡＣＡＣＧＡＣＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴ；配列番号８）を使用する。
【０６９４】
４２３の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、３９０候補に対するＮ２プライマーが設計された。
【０６９５】
３．フィルタリング
残った３９０の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下の方法を使用した。
３ａ．全バーコードについてポリ（Ａ）テールを同じ長さに維持するために、Ａで終わるランダム配列を有する（すなわち、ポリ（Ａ）配列の有効長さが２５ｂｐを超える）あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。
３ｂ．Ｇが連続するオリゴ合成の場合、コストが余分にかかり、しかも収率が低い可能性があるため、４以上の連続したＧ（＞３Ｇ）を含むあらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。
【０６９６】
図１５Ａは、前述の方法を用いて生成された非限定的な例示的候補オリゴヌクレオチド配列を示す。
【０６９７】
２００量体オリゴヌクレオチド設計
以下の方法を使用して、タンパク質発現及び遺伝子発現及びサンプルインデックス付加の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列及び対応するプライマー配列を生成した。
【０６９８】
１．配列生成及び排除
以下の方法を使用して、タンパク質発現及び遺伝子発現及びサンプルインデックス付加の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列を生成した。
１ａ．所望の長さ（１２８ｂｐ）を有するいくつかの候補配列（１０００００配列）をランダムに生成する。
１ｂ．生成された配列の５’末端に、転写調節ＬＳＲＲ配列と、非ヒト、非マウスの追加アンカー配列を、また、生成された配列の３’末端にポリ（Ａ）配列（２５ｂｐ）を付加する。
１ｃ．生成され、付加された配列で、４０％～５０％の範囲のＧＣ含量を含まない配列を除去する。
１ｄ．ヘアピン構造スコアに基づき、残った候補オリゴヌクレオチド配列を選別する。

１ｅ．残った候補オリゴヌクレオチド配列のうち、最も低いヘアピンスコアを有する１００００の配列を選択する。

【０６９９】

２．プライマー設計

最も低いヘアピンスコアを有する４００の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。

【０７００】

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

【０７０１】

２．２　Ｎ２プライマー（特定のサンプルインデックスオリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；たとえば、図１５Ｂ及び１５ＣのＮ２プライマー）：

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

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

２．２ｃ．オリゴヌクレオチドを用いて試験される細胞の種のトランスクリプトーム（たとえば、ヒトトランスクリプトーム又はマウストランスクリプトーム）とアラインメントするプライマー候補を除去する。

２．２ｄ．プライマー－プライマー相互作用を最小限にするか、又は回避するために、デフォルトコントロールとしてＩＬＲ２配列５’－ＡＣＡＣＧＡＣＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴ－３’（配列番号８）を使用する。

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

【０７０２】

４００の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、３９２候補に対するＮ２プライマーが設計された。

【０７０３】

３．フィルタリング

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

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

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

【０７０４】

図１５Ｂは、前述の方法を用いて生成された非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す。図１５Ｂに示すネステッドＮ２プライマーは、標的増幅のための抗体又はサンプル特異的配列に結合することができる。図１５Ｃは、標的増幅のためのアンカー配列に対応するネステッドユニバーサルＮ２プライマーを有する同じ非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す。図１５Ｄは、ワンステップ標的増幅のためのＮ２プライマーを有する同じ非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す。

【０７０５】

総合すると、これらのデータは、タンパク質発現及び遺伝子発現の同時決定又はサンプルインデックス付加のために、異なる長さのオリゴヌクレオチド配列を設計できることを示している。オリゴヌクレオチド配列は、ユニバーサルプライマー配列と、抗体特異的オリゴヌクレオチド配列と、ポリ（Ａ）配列と、を含みうる。

【０７０６】

実施例２
様々な抗体：オリゴヌクレオチド比を用いた検出感度の比較
この実施例は、１つ、２つ、又は３つのオリゴヌクレオチドと共役した抗ＣＤ４抗体を用いたＣＤ４タンパク質の検出感度を明らかにする。
【０７０７】
被験者の凍結した末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を解凍した。解凍されたＰＢＭＣを室温で２０分間、０．０６μｇ／１００μｌ（オリゴヌクレオチド－共役抗体ストックの１：３３３希釈物）の３種類の抗ＣＤ４抗体で染色した。各種の抗ＣＤ４抗体を１つ、２つ、又は３つのオリゴヌクレオチドと共役させた（「抗体オリゴヌクレオチド」）。抗体オリゴヌクレオチドの配列を図１６に示す。細胞を洗浄して、結合していない抗ＣＤ４抗体を除去した。フローサイトメトリーにより選別して、生存細胞を取得するために、細胞をＣａｌｃｅｉｎ ＡＭ（ＢＤ（Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ））及びＤｒａｑ７（商標）（Ａｂｃａｍ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ））で染色した。細胞を洗浄して、余剰のＣａｌｃｅｉｎ ＡＭ及びＤｒａｑ７（商標）を除去した。フローサイトメトリーを用いて、Ｃａｌｃｅｉｎ ＡＭで染色され（生存細胞）、Ｄｒａｑ７（商標）では染色されていない単一細胞（死滅していない、又は透過されていない細胞）を、ＢＤ Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）カートリッジ中に選別した。
【０７０８】
単一細胞とビーズを含むウェルのうち、ウェル内の３５００の単一細胞を５ｍＭ ＤＴＴを含む溶解緩衝液中に溶解させた。ＢＤ Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）ビーズを用いて、ＣＤ４ｍＲＮＡ発現プロフィールを決定した。ＢＤ Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）ビーズ及び抗体オリゴヌクレオチドを用いて、ＣＤ４タンパク質発現プロフィールを決定した。手短には、細胞溶解の後、ｍＲＮＡ分子を放出させた。Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）ビーズを、各々が分子標識、細胞標識、及びポリＴ領域を含む確率バーコードと結合させた。溶解細胞から放出したｍＲＮＡ分子のポリ（Ａ）領域は、確率バーコードのポリＴ領域とハイブリダイズした。オリゴヌクレオチドのポリ（Ａ）領域は、確率バーコードのポリＴ領域とハイブリダイズした。確率バーコードを用いて、ｍＲＮＡ分子を逆転写させた。確率バーコードを用いて、抗体オリゴヌクレオチドを複製した。逆転写と複製は、１つのサンプルアリコート中で同時に実施した。
【０７０９】
血液パネルＮ１プライマーを用いて４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを、また抗体オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いてＣＤ４タンパク質の発現プロフィールを決定するために、プライマーを用い、逆転写産物と複製産物を６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ１」）。Ａｍｐｕｒｅクリーンアップを用いて、余剰の確率バーコードを除去した。ＰＣＲ１からの産物を２つのアリコートに分割したが、一方のアリコートは、血液パネルＮ２プライマーを用いて、４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを決定するために、またもう１つのアリコートは、抗体オリゴヌクレオチドＮ２プライマーを用いて、ＣＤ４タンパク質の発現プロフィールを決定することを目的とした（「ＰＣＲ２」）。いずれのアリコートも、６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたってＰＣＲ増幅した。図１６に示すように、抗体オリゴヌクレオチドに基づいて溶解細胞中のＣＤ４タンパク質の発現を決定した（「ＰＣＲ２」）。シーケンシングアダプターライゲーション反応後、シーケンシングデータを取得し、分析した（「ＰＣＲ３」）。４８８の血液パネル遺伝子の発現プロフィールに基づいて細胞型を決定した。
【０７１０】
図１７Ａ～１７Ｆは、非限定的なｔ分布型確率的近傍埋め込み（ｔ－Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｅｄ Ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ Ｎｅｉｇｈｂｏｒ Ｅｍｂｅｄｄｉｎｇ）（ｔＳＮＥ）投影プロットの例であり、オリゴヌクレオチド共役抗体を用いて、ハイスループット様式でＣＤ４タンパク質発現及び遺伝子発現を同時に測定した結果を示す。ＣＤ４タンパク質発現は、１つ、２つ、又は３つの抗体オリゴヌクレオチドに共役した抗ＣＤ４抗体を含む、

ＣＤ４発現細胞型（たとえば、ＣＤ４Ｔ細胞）中で明瞭且つ確実に検出された（それぞれ、図１７Ｂ，１７Ｄ、及び１７Ｆ）。図１８Ａ～１８Ｆは、非限定的な棒グラフの例であり、ＣＤ４Ｔ細胞（高度ＣＤ４発現）、ＣＤ８Ｔ細胞（最小ＣＤ４発現）、及び骨髄細胞（幾分のＣＤ４発現）におけるＣＤ４ｍＲＮＡ及びタンパク質の発現を示す。同様のシーケンシング深度の場合、ＣＤ４タンパク質レベルの検出感度は、抗体：オリゴヌクレオチドの比が高いほど上昇し、１：３比は、１：１及び１：２比よりも高性能であった（図１９）。フローサイトメトリーを用いて選別された細胞の細胞表面でのＣＤ４タンパク質の発現を、図２０Ａ～２０Ｄに示すように、ＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ（Ａｓｈｌａｎｄ，ＯＲ））を用いて確認した。図２１Ａ～２１Ｆは、非限定的な棒グラフの例であり、２つのサンプルのＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ８Ｔ細胞、及び骨髄細胞中のＣＤ４ｍＲＮＡ及びＣＤ４タンパク質の発現を示す。第２のサンプルは、２つの異なるサンプル調製プロトコルを用いて調製した。図２２は、非限定的な棒グラフの例であり、抗体：オリゴヌクレオチド比が１：３の様々なサンプル調製プロトコルを用いて決定されたＣＤ４タンパク質レベルの検出感度を示す。

【０７１１】

総合すると、これらのデータは、ＣＤ４タンパク質発現が、抗ＣＤ４抗体と共役したオリゴヌクレオチドに基づいて、明瞭且つ確実に検出されうることを示している。ＣＤ４タンパク質レベルの検出感度は、抗体：オリゴヌクレオチドの比が高いほど上昇しうる。

【０７１２】

実施例３

サンプルインデックス付加

この実施例は、高い標識効率及び低い非特異的標識又はスピルオーバー（ｓｐｉｌｌｏｖｅｒ）を有するサンプルインデックス付加を用いて、さまざまなサンプルの細胞を同定する工程を説明する。この実施例はまた、サンプルインデックス付加に対する、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの長さ及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの切断性の影響を説明する。

【０７１３】

図２３は、サンプルインデックス付加を行い、サンプルインデックス付加に対する、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの長さ及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの切断性の影響を決定するための非限定的な例示的実験設計を示す。図２３の左欄は、サンプルインデックス付加に対する、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの長さ及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの切断性の影響を決定するために、Ｊｕｒｋａｔ細胞を、異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを有する抗ＣＤ１４７抗体で標識したことを示す。抗ＣＤ１４７抗体と結合されたオリゴヌクレオチドは、抗体から切断可能な２００ヌクレオチド長（Ｔ－リンカー）、切断可能な９５ヌクレオチド長（Ｔ－リンカー）、及び切断不可能な９５ヌクレオチド長であった。さらなるサンプル調製の後、サンプルインデックス付加に対する、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの長さ及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの切断性の影響を、Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）フローセル（図２３中で「フローセル１」と表示され、「ＦＣ１」と略記される）を用いて決定した。サンプル調製は、ＣａｌｃｅｉｎＡＭ及びＤｒａｑ７（商標）染色、フローサイトメトリーを用いた細胞選別、及び確率バーコーディングを含んでいた。

【０７１４】

図２３の真ん中の欄は、細胞を、切断可能な３つの異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（図２３中で「ショート１」、「ショート２」、及び「ショート３」と表示されるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、Ｓ１、Ｓ２、及びＳ３と略記されうる）と結合された抗ＣＤ１４７抗体で標識したことを示す。Ｒａｍｏｓ細胞を、切断可能な異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（このサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、図２３中で「ショート１」及び「ショート２」と表示される）と結合された２つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体で標識した。Ｊｕｒｋａｔ細胞を、

切断可能な異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（このサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、図２３中で「ショート１」及び「ショート３」と表示される）と結合された２つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体で標識した。標識された細胞を、１：１の比率で混合した後、さらなるサンプル調製、並びにＲｈａｐｓｏｄｙ（商標）フローセル（図２３中で「フローセル２」と表示され、「ＦＣ２」と略記される）を用いたサンプルインデックス付加の効率及び特異性の決定を行った。図２３の右欄は、さらなるサンプル調製及びＲｈａｐｓｏｄｙ（商標）フローセル（図２３中で「フローセル３」と表示され、「ＦＣ３」と略記される）を用いた分析の前に、標識されていないＪｕｒｋａｔ細胞及びＲａｍｏｓ細胞を、１：１の比率で混合したコントロール実験を示す。

【０７１５】

細胞を、１：３の抗体：オリゴヌクレオチド比でサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと結合された抗体で、室温で２０分間染色した。抗体は、オリゴヌクレオチド結合抗体ストックから、ｐＨ７．５希釈剤を用いて１００μｌ中で、１：２０希釈度で希釈した。細胞を洗浄して、未結合の抗ＣＤ１４７抗体を除去した。生細胞を得るためのフローサイトメトリーによる選別のために、細胞を、Ｃａｌｃｅｉｎ　ＡＭ（生細胞を染色する）及びＤｒａｑ７（商標）（死細胞又は透過性細胞を染色する））で染色した。細胞を洗浄して、過剰なＣａｌｃｅｉｎ　ＡＭ及びＤｒａｑ７（商標）を除去した。フローサイトメトリーを用いて、Ｃａｌｃｅｉｎ　ＡＭで染色され、Ｄｒａｑ７（商標）で染色されなかった単一細胞を、フローセルを含むＢＤ　Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）カートリッジ中に選別した。

【０７１６】

単一細胞とビーズを含むウェルのうち、ウェル内の１０００個の単一細胞を溶解緩衝液中に溶解させた。ＢＤ　Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）ビーズを用いて、ＣＤ１４７　ｍＲＮＡ発現プロフィールを決定した。簡潔に述べると、ｍＲＮＡ分子を、細胞溶解の後に放出した。Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）ビーズを、分子標識、細胞標識、及びポリＴ領域を各々が含有する確率バーコードに関連付けた。溶解された細胞から放出されたｍＲＮＡ分子のポリ（Ａ）領域は、確率バーコードのポリＴ領域にハイブリダイズした。切断可能な場合、抗体から切断されるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのポリ（Ａ）領域は、確率バーコードのポリＴ領域にハイブリダイズした。確率バーコードを用いて、ｍＲＮＡ分子を逆転写した。確率バーコードを用いて、抗体オリゴヌクレオチドを複製した。逆転写及び複製は、６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたり、１つのサンプルアリコート中で同時に実施した。

【０７１７】

血液パネルＮ１プライマーを用いて４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを、またサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いてＣＤ１４７タンパク質の発現を決定するために、プライマーを用いて、逆転写産物及び複製産物を６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ　１」）。Ａｍｐｕｒｅクリーンアップを用いて、余剰のプライマーを除去した。ＰＣＲ１からの産物は、アダプターライゲーションのための隣接配列とともに血液パネルＮ２プライマー及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いて、６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりさらにＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ　２」）。シーケンシングアダプターライゲーションの後、シーケンシングデータを取得し、分析した（「ＰＣＲ　３」）。細胞型を、４８８の血液パネル遺伝子の発現プロフィールに基づいて決定した。

【０７１８】

表１は、図２３に示される実験設計を用いて得られたシーケンシングデータのメトリクスを示す。３つのタイプのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（図２３の左欄に示される切断性９５量体、非切断性９５量体、及び切断性２００量体）のいずれか１つと結合された３つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体を、サンプルインデックス付加に首尾よく使用した。シーケンシングデータにおける総リード数の１１％超が、サンプルインデック

ス付加オリゴヌクレオチドによるものであった。

【０７１９】

【表１】

表 1. サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのシーケンシングメトリクス。

	FC1 (オリゴ)			FC2 (サンプルインデックス付加)		
サンプル	Jurkat (J)			J 及び R	Ramos (R)	J
オリゴタイプ	切断性 95 量体	非切断性 95 量体	切断性 200 量体	切断性 95 量体		
総リード数における%	11.4	22.4	11.8	16.7	12.9	11
総分子数における%	29	41.4	7.5	28.1	20.3	16.3
細胞当たりの平均分子数	1043	1679	303	NA	NA	NA
細胞当たりの中央分子数	895	1536	256	NA	NA	NA
オリゴ RSEC シーケンシング深度	3.9	4.6	11.54	1.74	1.87	2
血液パネル RSEC シーケンシング深度	10.72	10.72	10.72	4.1	4.1	4.1

【０７２０】

３つの切断性９５量体（図２３の真ん中の欄において「ショート１」、「ショート２」、及び「ショート３」と表示される）のいずれか１つと結合された３つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体を、サンプルインデックス付加に首尾よく使用して、異なるサンプルのＲａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔ細胞を区別した。シーケンシングデータにおける総リード数の１１%超が、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドによるものであった。パーセンテージは、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の両方を含有するサンプルについて最も高かった（１６．７%）。

【０７２１】

図２４Ａ～２４Ｃは、さまざまなサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（切断性９５量体、非切断性９５量体、及び切断性２００量体）と結合された３つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体が、ＣＤ１４７のタンパク質発現レベルを決定するのに使用されうることを示す、細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。細胞の発現プロフィールのｔＳＮＥ投射プロットにおける、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて決定された、ＣＤ１４７発現のオーバーレイは、異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて決定されたＣＤ１４７発現パターンが類似していたことを示す。３つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの検出は、１００%であった。図２５は、細胞当たりのＧＡＰＤＨ発現のオーバーレイを有する非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。プロットの右上隅における「細胞」は、ＧＡＰＤＨにおいて低く、これは、それらが本物の細胞でなかったことを示唆している。これらの「細胞」は、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドにおいて高かった。

【０７２２】

図２６Ａ～２６Ｃは、３つのタイプのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて検出されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。非切断性サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、検出された分子の数について最も感度が高かった。

【０７２３】

図２７Ａ～２７Ｃは、ＣＤ１４７発現が分割細胞においてより高かった（図２３中で「

フローセル１」を用いて決定された）ことを示すプロット及び棒グラフである。ＣＤ１４７発現は、Ｊｕｒｋａｔ細胞のサンプルにおいて細胞にわたって均一でなかった。細胞は、細胞周期遺伝子ＡＵＲＫＢに基づいて分類されうる。ＡＵＲＫＢ遺伝子のｍＲＮＡ発現は、サンプルインデックス付加を用いて決定されたＣＤ１４７タンパク質発現と相関していた。図２７Ｃは、ＡＵＲＫＢ＋及びＡＵＲＫＢ－細胞において、３つのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて決定された、ＣＤ１４７発現の比較を示す。

【０７２４】

図２８Ａ～２８Ｃは、サンプルインデックス付加が、さまざまなサンプルの細胞を同定するのに使用されうることを示す、細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。４８８の血液パネル遺伝子の発現プロフィールを含有するシーケンシングデータ中のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのリードをフィルタリングした。フィルタリングされたシーケンシングデータを用いて、図２８Ａ～２８Ｃ中のｔＳＮＥ投射プロットを作成した。Ｊｕｒｋａｔ細胞に対応するクラスター及びＲａｍｏｓ細胞に対応するクラスター（図２３中で「ショート１」と表示されるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの存在度に基づいて決定された）は、図２８Ａ（図２８Ｂ～２８Ｃについて同様に）のｔＳＮＥ投射プロットにおいて明らかに分離していた。

【０７２５】

サンプルインデックス付加は、細胞型に正確に適合した。たとえば、図２８Ｂは、図２３中で「ショート２」と表示されるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識されたＲａｍｏｓ細胞が、ＣＤ１４７の高い発現を有していた一方、標識されなかったＪｕｒｋａｔ細胞は、ＣＤ１４７の最小の発現を有していたことを示す。図２８Ｃは、図２３中で「ショート３」と表示されるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識されたＪｕｒｋａｔ細胞が、ＣＤ１４７の高い発現を有していた一方、標識されなかったＲａｍｏｓ細胞は、ＣＤ１４７の低い発現を有していたことを示す。３．６％の頻度における小さいダブレットクラスターは、ウェルの占有率の画像分析から、３．９２％の予想ダブレット率にほぼ一致した。

【０７２６】

図２９Ａ～２９Ｃは、決定されたサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子の数に基づいた、細胞当たりのサンプルインデックス付加配列の非限定的な例示的ヒストグラムである。シーケンシングデータは、２５０のカットオフを有する分布に基づくエラー補正（ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ ｂａｓｅｄ ｅｒｒｏｒ ｃｏｒｒｅｃｔｉｏｎ）（ＤＢＥＣ）と相関していた。ＤＢＥＣは、２０１７年５月２５日出願の米国特許出願第１５／６０５８７４号明細書に記載されており、その内容は、全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＤＢＥＣの後、１０００ｓにおける「シグナル」ピーク（図２９Ｂ～２９Ｃ）と区別される１００ｓにおける明瞭な「ノイズ」ピークが存在するようであった。図２９Ｂ～２９Ｃはまた、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの検出が、２５０のノイズ除去（ｎｏｉｓｅ ｓｕｂｔｒａｃｔｉｏｎ）の後、最高で１００ｓにあることを示す。

【０７２７】

図３０Ａ～３０Ｄは、ＣＤ３Ｄ（Ｊｕｒｋａｔ細胞の場合）及びＪＣＨＡＩＮ（Ｒａｍｏｓ細胞の場合）のｍＲＮＡ発現並びにＪｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のサンプルインデックス付加に基づいて決定された細胞型の注釈を比較する非限定的な例示的プロットである。図３０Ａは、細胞当たりのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの低い分子数とともに、ＪＣＨＡＩＮ発現のシグナルピーク及びノイズシグナルの明瞭な分離を示す、非限定的な例示的ヒストグラムである。図３０Ｂは、細胞当たりのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの低い分子数とともにＲａｍｏｓ発現のシグナルピーク及びノイズシグナルの明瞭な分離を示す、非限定的な例示的ヒストグラムである。ダブレットを、２５０超のカウントで、２つ以上のサンプルインデックス付加配列を有する細胞として同定した。図３０Ｃにおいて、Ｒａｍｏｓ細胞を、ＪＣＨＡＩＮのｍＲＮＡ発現を用いて同定し、Ｊｕｒｋａｔ細胞を、ＣＤ３ＤのｍＲＮＡ発現を用いて同定した。

【０７２８】
Ｒａｍｏｓ細胞を、切断可能な異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（このサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、図２３中で「ショート１」及び「ショート２」と表示される）と結合された２つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体で標識した。Ｊｕｒｋａｔ細胞を、切断可能な異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（このサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドは、図２３中で「ショート１」及び「ショート３」と表示される）と結合された２つのタイプの抗ＣＤ１４７抗体で標識した。図３０Ｄにおいて、Ｒａｍｏｓ細胞の同一性を、シーケンシングデータ中の「ショート２」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのカウント数（２５０超）に基づいて同定し、Ｊｕｒｋａｔ細胞の同一性を、シーケンシングデータ中の「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのカウント数（２５０超）に基づいて同定した。
【０７２９】
図３１Ａ～３１Ｃは、ＣＤ３Ｄ及びＪＣＨＡＩＮ（図３１Ａ）、ＪＣＨＡＩＮ（図３１Ｂ）、及びＣＤ３Ｄ（図３１Ｃ）のｍＲＮＡ発現のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールの非限定的なｔＳＮＥ投射プロットである。ＪＣＨＡＩＮのｍＲＮＡ発現は、予想通りに、Ｒａｍｏｓ細胞においてより高く（図３１Ｂ）、Ｊｕｒｋａｔ細胞において最小であった（図３１Ｃ）。ＣＤ３ＤのｍＲＮＡ発現は、Ｊｕｒｋａｔ細胞においてより高く（図３１Ｃ）、Ｒａｍｏｓ細胞において最小であった（図３１Ｂ）。
【０７３０】
図２８Ｂ～２８Ｃと、図３１Ｂ～３１Ｃとの比較により、異なるサンプルの細胞を区別する際のサンプルインデックス付加の高性能が明らかになった。サンプル起源を決定する際のサンプルインデックス付加の性能が、図３２に示される。図３２は、２５０のＤＢＥＣカットオフを有するサンプルインデックス付加を用いて決定された細胞型のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。表２は、図３２に示されるサンプルインデックス付加を用いて決定された細胞型の概要である。表３は、サンプル起源を決定する際の、サンプルインデックス付加（表２中のダブレット及び未定義の細胞を除いた）の感度及び特異性を示す。
【０７３１】
【表２】

表 2. サンプルインデックス付加を用いたサンプル起源決定の概要。

	S2	S2+S3	S3	非標識
ダブレット	0	36	1	0
Jurkat	0	5	658	12
Ramos	833	4	0	0
不明	30	0	17	0

【０７３２】
【表３】

表 3. サンプル起源を決定する際のサンプルインデックス付加の特異性及び感度。

	特異性	感度
S2 (Ramos)	99.5% (833/(833+4))	100% (833/(833+0))
S3 (Jurkat)	99.25% (658/(658+4))	98.2% (658/(658+12))

【０７３３】
図３３Ａ～３３Ｃは、標識されていないか、又は「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド、及び「ショート２」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識された、Ｒａｍｏｓ及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３）、Ｒａｍｏｓ細胞（図３３Ｂ）、及びＪｕｒｋａｔ細胞（図３３Ｃ）についての細胞当たりのサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの分子数の非限定的な例示的棒グラフである。１％未満の単一細胞を、「ショート２」及び「ショート３」サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドの両方で標識した（図３４Ａ～３４Ｃ）。
【０７３４】
図３５Ａ～３５Ｃは、図２３に概説されるように異なるフローセルを用いて調製されたサンプル間のＪｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールに対するバッチ効果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥプロットである。図３５Ａは、細胞の異なるサンプル調製物のオーバーレイを有する、Ｊｕｒｋａｔ及びＲａｍｏｓ細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットを示す。異なるサンプル調製物間の４８８の血液パネル遺伝子（図３５Ｂ）及びＣＤ３Ｄ遺伝子（図３５Ｃ）におけるｍＲＮＡ発現プロフィールの変化は、異なるフローセルを用いて調製されたサンプルの異なるシーケンシング深度に起因するバッチ効果の結果でありうる。
【０７３５】
総合すると、これらのデータは、すべての３つの形態のサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチド（切断性９５量体、非切断性９５量体、及び切断性２００量体）が、サンプルインデックス付加に使用可能であり、非切断性９５量体が最も高い効率を有することを示す。サンプル起源を決定するためのサンプルインデックス付加は、高い特異性及び感度を有しうる。
【０７３６】
実施例４
高温：低温抗体滴定
この実施例は、抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータにおける総リード数の所望のパーセンテージ（たとえば、２％）を占めるように、オリゴヌクレオチド共役抗体（「高温抗体」）及びオリゴヌクレオチドと共役していない抗体（「低温抗体」）の比を決定する工程を説明する。
【０７３７】
抗ＣＤ１４７抗体ストックは、ＰＥ緩衝液で１：２０、１：１００、１：２００、１：３００、１：４００、１：６００、１：８００、及び１：１０００希釈度に希釈した。１００μｌの染色緩衝液（ＦＢＳ）（ＢＤ（（Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ））中に約１５００００個のＪｕｒｋａｔ細胞を様々な抗体希釈度で、室温にて２０分間染色した。染色後、細胞を５００μｌの染色緩衝液で１回洗浄し、蛍光強度の測定のために２００μｌ中に再懸濁させた。Ｍｕｓｅ（商標）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ ＬＣ３－ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＥＭＤ Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ））を用いて、Ｊｕｒｋａｔ細胞に結合した抗ＣＤ１４７抗体を検出した。様々な抗ＣＤ１４７抗体希釈度で染色された細胞又は染色されていない細胞からの蛍光強度を決定して比較することにより、抗体の最適希釈度を決定した（図３６Ａ１～３６Ａ９、３６Ｂ、及び３６Ｃ）。蛍光強度は、希釈度が高いほど低下した。９９％超の細胞は、１：８００の希釈度で染色された。蛍光シグナルは、１：８００で下降し始めた。細胞は最大１：２００の希釈度で飽和まで染色された。細胞は最大１：４００の希釈率で飽和付近まで染色された。
【０７３８】
図３７は、抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータにおける総リード数の所望のパーセンテージを占めるように、オリゴヌクレオチド共役抗体の染色濃度を決定するための非限定的な実験設計の例を示す。抗ＣＤ１４７抗体を、切断可能な９５ｍｅｒ抗体オリゴヌクレオチドと、１：３の抗体：オリゴヌクレオチド比で共役させた（「高温抗体

」）。高温抗体は、１：１００比又は１：８００比で、ｐＨ７．５希釈剤を用いて希釈した。９μｌの低温抗ＣＤ１４７抗体と１μｌの高温抗体を用いて、１０％高温抗体：９０％低温抗体の混合物を調製した。９μｌの低温抗ＣＤ１４７抗体と、１０％高温抗体：９０％低温抗体の１μｌの混合物を用いて、１％高温抗体：９０％低温抗体の混合物を調製した。

【０７３９】

約５０万個の細胞を含む、解凍した末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、１００％高温抗体含有の１：１００希釈ストック（ストック高温抗体の１％）、１０％高温抗体：９０％低温抗体の混合物（ストック高温抗体の０．１％）、１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物（ストック高温抗体の０．０１％）、及び１００％高温抗体含有の１：８００希釈ストック（ストック高温抗体の０．０１２５％）と共に、１００μｌの染色緩衝液（ＦＢＳ）中で染色した。染色後、細胞を洗浄して、結合していない抗体分子を除去した。フローサイトメトリーにより選別して、生存細胞を取得するために、細胞をＣａｌｃｅｉｎ　ＡＭ及びＤｒａｑ７（商標）で染色した。細胞を洗浄して、余剰のＣａｌｃｅｉｎ　ＡＭ及びＤｒａｑ７（商標）を除去した。フローサイトメトリーを用いて、Ｃａｌｃｅｉｎ　ＡＭで染色され（生存細胞）、且つＤｒａｑ７（商標）では染色されていない単一細胞（死滅していない、又は透過されていない細胞）を、ＢＤ　Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）カートリッジ中に選別した。

【０７４０】

単一細胞とビーズを含むウェルのうち、ウェル内の１０００個の単一細胞を溶解緩衝液中に溶解させた。各単一細胞について、細胞のビーズと共役した確率バーコードを用いて、ｍＲＮＡ分子を逆転写させ、抗体オリゴヌクレオチドを複製した。血液パネルＮ１プライマーを用いて４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを、またサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いてＣＤ１４７タンパク質発現を決定するために、プライマーを用いて、逆転写及び複写後のサンプルを６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ１」）。Ａｍｐｕｒｅクリーンアップを用いて、余剰のプライマーを除去した。ＰＣＲ１からの産物は、アダプターライゲーション反応のための隣接配列と共に血液パネルＮ２プライマー及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いて、６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりさらにＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ２」）。シーケンシングアダプターライゲーション反応後、シーケンシングデータを取得し、分析した（「ＰＣＲ３」）。

【０７４１】

図３８Ａ～３８Ｄは、予想されるサイズの抗体オリゴヌクレオチドと一致するピーク（矢印で示される）を示す非限定的なバイオアナライザトレースの例である。抗体オリゴヌクレオチドのピークは、高温抗体を低温抗体で滴定すると低下した。

【０７４２】

表４は、シーケンシングデータメトリクスの概要である。１：１００希釈ストックを用いて調製された１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物で細胞を染色することによって、抗体オリゴヌクレオチドは、シーケンシングデータ中の総未補正リード数の２．４％を占めた。しかし、図３９Ａ１～３９Ａ３及び３９Ｂ１～３９Ｂ３及び図４０Ｂ、４１Ｂ、及び４２Ｂに示すように、１：１００希釈ストックを用いて調製された１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物で細胞を染色した場合、再帰的置換エラー補正（ＲＳＥＣ）又は分布に基づくエラー補正（ＤＢＥＣ）後に検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子数の分布ヒストグラムは、明瞭なシグナルピークを含まなかった。ＲＳＥＣは、２０１７年5月２５日に提出された米国特許出願公開第１５／６０５８７４号明細書に記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【０７４３】

図４０Ａ～４０Ｃは、オリゴヌクレオチド共役抗ＣＤ１４７抗体分子を用いて、様々な細胞型を標識できることを示す非限定的なプロット例である。血液パネル中の４８８遺伝子の発現プロフィールを用いて細胞型を決定した（図４０Ａ）。１：１００希釈ストック

を用いて調製した１０％高温抗体：９０％低温抗体の混合物で細胞を染色したところ、検出した抗体オリゴヌクレオチドの分子数を示すヒストグラムに明瞭なシグナルが得られた（図４０Ｂ）。抗体オリゴヌクレオチドによる様々な細胞型の標識は、図４０Ｃに示す。

【０７４４】

図４１Ａ～４１Ｃは、オリゴヌクレオチド共役抗ＣＤ１４７抗体分子を用いて、様々な細胞型を標識できることを示す非限定的なプロット例である。血液パネル中の４８８遺伝子の発現プロフィールを用いて細胞型を決定した（図４１Ａ）。１：１００希釈ストックを用いて調製した１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物で細胞を染色したところ、検出した抗体オリゴヌクレオチドの分子数を示すヒストグラムに明瞭なシグナルは得られなかった（図４１Ｂ）。抗体オリゴヌクレオチドによる様々な細胞型の標識は、図４１Ｃに示す。

【０７４５】

図４２Ａ～４２Ｃは、オリゴヌクレオチド共役抗ＣＤ１４７抗体分子を用いて、様々な細胞型を標識できることを示す非限定的なプロット例である。血液パネル中の４８８遺伝子の発現プロフィールを用いて細胞型を決定した（図４２Ａ）。１：８００希釈ストックを用い細胞を染色したところ、検出した抗体オリゴヌクレオチドの分子数を示すヒストグラムに明瞭なシグナルが得られた（図４２Ｂ）。抗体オリゴヌクレオチドによる様々な細胞型の標識は、図４２Ｃに示す。

【０７４６】

【表４】

表4. シーケンシングデータメトリクスの概要。

サンプル	FC4 - 1:800 希釈、低温抗体なし	FC3 - 1:100 希釈、1:100 低温抗体	FC2 - 1:100 希釈、1:10 低温抗体
総未補正リード数	31.3M	27.3M	29.2M
オリゴに割当てられた総未補正リード数	9161642 (29.2%)	660044 (2.4%)	4013438 (13.7%)
検出された細胞	1010	983	907
RSEC オリゴ MI	577110	20054	170742
DBEC オリゴ MI	477216	9319	110629
% Q30	76.45	71.89	73.45
細胞標識に割当てられた%	84.63	79.47	82.58
アンプリコンと特異的にアラインメントした%	73.19	65.4	69.58
平均未補正シーケンシング深度	5.58	6.52	6.4
平均 RSEC シーケンシング深度	8.69	10.41	10.25
平均 DBEC シーケンシング深度	15.96	23.29	22.48
Ab オリゴ RSEC シーケンシング深度	8.08	12.9	11.2
Ab オリゴ DBEC シーケンシング深度	12.4	30.9	21.2
細胞当たりの平均リード数	11257	14414	15150
細胞当たりの平均分子数	553.8	608.3	647.1
細胞当たりの中央分子数	246.5	279	278
パネル中の遺伝子の数	489	489	489
検出された遺伝子総数	438	439	441
細胞当たりの平均遺伝子数	68.39	73.6	73.12

【０７４７】

総合すると、これらのデータは、オリゴヌクレオチド共役抗体（「高温抗体」）とオリゴヌクレオチドと共役していない抗体（「低温抗体」）の比を調節することによって、抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータにおける総リード数の所望のパーセンテージを占め、しかもシグナル抗体オリゴヌクレオチドを表すデータが、ノイズ抗体オリゴヌクレオチドを表すデータから明らかに区別されるようにすることができることを示している。

【０７４８】

実施例５

正規化

この実施例は、どのようにして、オリゴヌクレオチド共役抗体（「高温抗体」）とオリゴヌクレオチドと共役していない抗体（「低温抗体」）の混合物を用いた正規化により、抗体のタンパク質標的の存在量とは関係なく、所望の適用範囲で、シーケンシングデータ中の総リード数の所望のパーセンテージを占める抗体オリゴヌクレオチドを達成することができるかを説明する。

【０７４９】

表５は、高温抗体を用いて、１００００個のＢ細胞中の様々な存在量の３つの細胞表面マーカーの定量の比較を示す。３つの細胞表面マーカーの相対発現レベルを分析するのに

必要なリードの総数は、４７５２万リードであった。

【０７５０】

【表５】

表5. 高温抗体を用いたタンパク質定量例。

抗原	細胞当たりの分子数	相対存在量	高温:低温抗体の比	シーケンシングにより検出された細胞当たりの分子数	シーケンシング深度4でのリード数
CD21	210000	105	1:0	840	33.6M
HLA-DR	85000	42.5	1:0	340	13.6M
CD40	2000	1	1:0	8	0.32M

【０７５１】

【表６】

表6. 高温及び低温抗体を用いたタンパク質定量例。

抗原	細胞当たりの分子数	相対存在量	高温:低温抗体の比	シーケンシングにより検出された細胞当たりの分子数	シーケンシング深度4でのリード数	抗体比に基づく予想分子数	シーケンシングによる相対存在量
CD21	210000	105	1:100	8.3	0.33M	8.3x100 =830	103.75
HLA-DR	85000	42.5	1:40	8.5	0.34M	8.5x40 =340	42.5
CD40	2000	1	1:0	8	0.32M	8x1 =8	1

【０７５２】

表６は、高温抗体：低温抗体の混合物を用いた３つの細胞表面マーカーの相対発現レベルを分析するのに必要なリード総数が、１００万リードであったことを示す。また、３つの細胞表面マーカーの発現レベルを定量するために高温抗体：低温抗体の混合物を用いた場合、全３つのタンパク質マーカーの最適適用範囲（たとえば、シーケンシング深度４）を達成するのに、表５に示す定量結果と比較して、リード数のわずか２％（４７５２万リードに対して１００万リード）しか必要としない。より高いパーセンテージの低温抗体の混合物を用いて、高度発現タンパク質分子を正規化すると、低存在量タンパク質の検出、パラメータの数、及びシーケンシングコストの間のトレードオフが減少し、このアッセイをツールとしてさらに魅力的にする。

【０７５３】

総合して、これらのデータは、所望の適用範囲を有するシーケンシングデータにおける総リード数の所望の数が、高温抗体：低温抗体の混合物を用いて、様々な存在量のタンパク質標的（たとえば、抗原）について達成されうることを示している。

【０７５４】

実施例６

コントロール粒子

この実施例は、異なる配列を含むコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子の作製と、捕捉効率を決定するための官能基化コントロール粒子の使用を説明する。

【０７５５】

材料

ＢＤ ＣｏｍｐＢｅａｄ Ｐｌｕｓ Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ Ｉｇ（７．５ｕｍ）Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ Ｓｅｔ（５１－９００６２７４）

ＢＤ染色緩衝液（ＦＢＳ）

【０７５６】

手順

１．使用前に、ＢＤ ＣｏｍｐＢｅａｄ Ｐｌｕｓを入念にボルテックスする。（少なくとも１分間）

２．８００ｕＬの染色緩衝液をチューブに添加する（表７は、異なる存在量の５つの配列を有するオリゴヌクレオチドと共役したＣＤ１４７を含む染色緩衝液の組成物を示す。図４３Ａは、染色緩衝液の組成物を示すプロットである）。

３．５滴（約３００ｕＬ）のＣｏｍｐＢｅａｄ Ｐｌｕｓ Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅを添加する。

４．チューブに２０ｕＬの下記染色カクテルを添加する。ボルテックスする。

５．光を遮断し、室温で３０分間インキュベートする。

６．ビーズを２００ｇで１０分間スピンする。

７．上澄みを注意深く除去し、１ｍＬの染色緩衝液と一緒に再懸濁させる。

８．ビーズを２００ｇで１０分間スピンする。

９．上澄みを注意深く除去し、１ｍＬの染色緩衝液と一緒に再懸濁させて、官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄストック溶液を作製する。

１０．ビーズをカウントする。

【０７５７】

【表７】

表７．染色カクテル組成物

抗体	染色緩衝液中の最終%	希釈前	染色溶液(μl)
CD147-LZ15	1	1:1	1
CD147-LZ16	0.2	1:5	1
CD147-LZ17	0.1	1:10	1
CD147-LZ18	0.02	1:50	1
CD147-LZ19	0.01	1:100	1
染色緩衝液			95

【０７５８】

結果

図４４Ａ～４４Ｂは、血球計算盤における細胞（図４４Ａ、白い丸）とコントロール粒子（図４４Ｂ、黒い丸）の明視野画像である。図４５Ａ～４５Ｂは、蛍光団と結合したオリゴヌクレオチド共役抗体に結合したコントロール粒子の位相差（図４５Ａ、１０×）及び蛍光（図４５Ｂ、１０×）画像である。蛍光顕微鏡を使用して、５ｕｌの官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄストック溶液が、作製された約４０００００の官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄと共に約２０００個の細胞（全投入の４％）を含有することを決定した。

【０７５９】
図４６は、カートリッジのマイクロウェル中にロードされる細胞及び粒子を示すコントロール粒子の画像である。ＣｏｍｐＢｅａｄは、通常のＲｈａｐｓｏｄｙ実験に使用することができる。５２２の官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄを複数の細胞に添加した。２００００個の細胞（コントロール粒子を含む）配列のうち、１５６個は、全コントロール粒子オリゴヌクレオチドの合計が２０を超えた。従って、１５６個のコントロール粒子は配列であった。図４４Ｂは、５つの異なるコントロールバーコード配列（ＬＺ１５－ＬＺ１９）を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、染色緩衝液中のそれらの存在量と相関することを示すプロットである。

【０７６０】
総合すると、これらのデータは、粒子（たとえば、ＣｏｍｐＢｅａｄ　Ｐｌｕｓ）が、オリゴヌクレオチド（たとえば、コントロール粒子オリゴヌクレオチド）で官能基化されうることを示している。官能基化粒子を単一細胞ワークフローに使用して、捕捉され、配列した粒子の数を決定することができる。

【０７６１】
実施例７
サンプルインデックス付加用の抗体カクテル
この実施例は、サンプルインデックス付加のための抗体カクテルの使用が標識感度を高めうることを説明する。

【０７６２】
サンプルインデックス付加は、複数のタンパク質標的に対するオリゴヌクレオチド結合抗体を用いて、サンプルを標識することができる。この実施例において、単一の抗体を用いる代わりに、２つの抗体のカクテルを代わりに使用した。抗体のカクテルを、同じサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識した。図４７Ａ～４７Ｃは、サンプルインデックス付加のための抗体カクテルの使用が標識感度を高めうることを示すプロットである。図４７Ａ～４７Ｃは、ＣＤ１４７抗体、ＣＤ４７抗体、及びＣＤ１４７及びＣＤ４７抗体の両方による、ＰＢＭＣの標識感度を示す。図４７Ｃは、ＣＤ１４７及びＣＤ４７抗体の両方が使用され、より良好なシグナル・ノイズ分離が達成されたとき、より多くの細胞が標識されたことを示す。表８は、ＣＤ１４７及びＣＤ４７抗体の両方が使用されたとき、増大した標識感度を示す。ＣＤ１４７及びＣＤ４７抗体の両方の使用により、不均一のサンプルタイプを標識するためのより高い感度が得られた。

【０７６３】
【表８】

表 8. CD147、CD47、又は CD147 及び CD47 抗体の両方による標識感度。

抗体	感度
CD147	86.2%
CD47	82.5%
CD147+CD47	92.6%

【０７６４】
総合すると、データは、抗体カクテルを用いて、標識感度を増大させることができることを示す。これは、タンパク質発現が細胞型及び細胞状態ごとに変動しうるため、すべての細胞型を標識する汎用の抗体を発見することが困難であるためでありうる。抗体カクテルを用いて、より多いサンプルタイプのより高感度且つ高効率の標識を可能にする。抗体カクテルは、より広い範囲の抗体も含みうる。異なるサンプルタイプを十分に標識する抗体が、一緒に合わされて、すべての細胞型又は対象とする細胞型を十分に標識するカクテ

ルを生成することができる。
【０７６５】
実施例８
データセットにおけるマルチプレットの存在
この実施例は、シーケンシングデータ中のマルチプレットが、異なるサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで細胞をタグ付けすることによって、同定及び除去されうることを説明する。
【０７６６】
図４８は、マルチプレットが、サンプルインデックス付加を用いて同定され、シーケンシングデータから除去されうることを示す非限定的な例示的プロットである。図４８に示されるように、ドロップレット及び単一細胞発現データにおけるマルチプレットの率は、２００００の単一細胞を含むサンプルが、ドロップレットベースのプラットフォームを用いてドロップレット中に分配される場合、ほぼ８パーセントでありうる。マイクロウェルアレイ及び単一細胞発現データにおけるマルチプレットの率は、２００００の単一細胞を含むサンプルが、Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）（Ｂｅｃｔｏｎ，Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ））のウェル中に分配される場合、はるかに低くなりうる（たとえば、ほぼわずか４パーセント）。シーケンシングデータにおけるマルチプレットは、異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定及び除去されうる。たとえば、２００００の単一細胞を含むサンプルが、２つの部分集団に分けられる場合、各部分集団中の細胞は、同一のサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識され、異なる部分集団中の細胞は、２つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識され、マルチプレットに関連付けられた配列データは、同定及び除去することができ、得られるシーケンシングデータは、約２％のマルチプレットを含有する。８つの異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドでは、２００００の単一細胞のシーケンシングデータは、わずか約０．５％のマルチプレットを含みうる。より多い数のサンプルインデックス付加配列では、シーケンシングデータ中のマルチプレットの率は、さらに低くなりうる。
【０７６７】
したがって、単一細胞シーケンシングデータに残っているマルチプレットの率は、細胞を、異なるサンプルインデックス付加配列を有するサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドで標識することによって、かなり低下されるか、又はなくされうる。
【０７６８】
実施例９
マルチプレットを同定するためのサンプルインデックス付加
この実施例は、シーケンシングデータ中のマルチプレットを同定及び除去するためのサンプルタグの使用を説明する。
【０７６９】
２匹のマウスからの６つの組織（骨髄、脂肪（性腺白色脂肪組織（ｇＷＡＴ））、結腸、肝臓、肺、及び脾臓）を取得した。単離された組織からのＣＤ４５＋単一細胞を単離し、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を用いて選別して、１２のサンプルを生成した。１２のサンプルのＣＤ４５＋単一細胞を、ＲＮＡシーケンシングのためのＢＤ（商標）Ｓｉｎｇｌｅ－Ｃｅｌｌ Ｍｕｌｔｉｐｌｅｘｉｎｇ Ｋｉｔを用いて１２の異なるサンプルタグ（本明細書でサンプルインデックス付加組成物と呼ばれる）でタグ付けし、Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）カートリッジにロードした。サンプルタグは、３’ＲＮＡ－ｓｅｑアッセイ（ＢＤ Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）アッセイなど）において捕捉及び増幅されうるオリゴヌクレオチド（本明細書でサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドと呼ばれる）に結合された抗体であった。このようなサンプルタグは、高い特異性及び感度（＞９９％）を有していた。細胞及びサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドからのｍＲＮＡ分子

を、Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）電磁ビーズを用いて捕捉し、Ｒｈａｐｓｏｄｙ（商標）Ｉｍｍｕｎｅ　Ｒｅｓｐｏｎｓｅ　Ｐａｎｅｌ－Ｍｏｕｓｅ（Ｍｏｕｓｅ）を用いて、バーコードを付け、増幅した。細胞の発現プロフィールを決定し、合成マルチプレットの発現プロフィールを用いて、シングレットの発現プロフィール及びマルチプレットの発現プロフィールとして同定した。

【０７７０】

図４９は、サンプルタグを用いてシングレット又はマルチプレットとして同定された２匹のマウスからの６つの組織の１２のサンプルからのＣＤ４５＋単一細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。図４９は、複数のクラスターとしてマルチプレットの発現プロフィールを示す。異なる組織をタグ付けするためのサンプルタグ配列（本明細書でサンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドのサンプルインデックス付加インデックスとも呼ばれる）を用いて、２つ以上の細胞型又は亜型の細胞の発現プロフィールを各々が含むマルチプレットの発現プロフィールを同定した。２つの異なる組織からのＣＤ４５＋細胞のマルチプレットを、細胞から得られた配列データにおけるサンプルタグ配列の存在に基づいて同定した。サンプルにインデックスを付加し、マルチプレットを同定するために、核酸サンプルタグを使用することの成果は、マルチプレットを同定するために合成マルチプレットの発現プロフィールを使用することの成果と同等であった。図４９Ｂは、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定されたマルチプレットが除去された２匹のマウスからの６つの組織の１２のサンプルのＣＤ４５＋単一細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。

【０７７１】

図５０Ａは、サンプルインデックス付加オリゴヌクレオチドを用いて同定されたマルチプレットが除去された２匹のマウスからのＣＤ４５＋単一細胞の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。図５０Ａ～５０Ｃに示されるように、マルチプレットの発現プロフィールが除去されると、生物学的複製である２匹のマウスが、類似の発現プロフィールを示した。マルチプレットの発現プロフィールを除去した後の、６つの異なる組織の免疫プロファイリングの結果が、図５１Ａ～５１Ｆに示される。図５１Ａ～５１Ｆに示される６つのサンプル中の異なる細胞型（たとえば、Ｂ細胞、マクロファージなど）を、細胞の発現プロフィールに基づいて同定した。

【０７７２】

６つの異なる組織からのマクロファージ、Ｔ細胞、及びＢ細胞の例示的な発現プロフィールが、図５２Ａ～５２Ｃに示される。図５２Ａ～５２Ｃは、異なる組織における同じ細胞型が、ユニークな発現プロフィールを示し、結腸免疫集団が、６つの組織のうち最も独特であったことを示す。図５３Ａ～５３Ｄは、結腸及び脾臓におけるマクロファージを比較する非限定的な例示的プロットである。図５３Ａは、結腸及び脾臓におけるマクロファージの発現プロフィールを比較する非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットであり、２つの組織におけるマクロファージが、識別可能な発現プロフィールを有していたことを示す。図５３Ｂは、結腸及び脾臓におけるマクロファージの発現プロフィールが、低い相関を有していたことを示す、非限定的な例示的プロットである。低い相関は、２つの組織におけるマクロファージが、図５３Ａに示される識別可能な発現プロフィールを有していたことをさらに裏付けた。図５３Ｃ及び５３Ｄは、結腸及び脾臓におけるマクロファージ中のＡｒｅｇ遺伝子及びＲｏｒａ遺伝子の発現プロフィールの非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。これらの２つの遺伝子は、結腸及び脾臓におけるマクロファージの５．２％及び９．５％で発現された。図５３Ａ、５３Ｃ、及び５３Ｄは、これらの２つの遺伝子が、結腸におけるマクロファージのみで発現されたことを示す。図５２Ａ～５２Ｃ及び５３Ａ～５３Ｄに示されるような６つの異なる組織からの２８０００超のマウス免疫細胞の単一細胞プロファイリングにより、主な免疫細胞型についての組織特異的遺伝子発現シグネチャが明らかになった。

【０７７３】

総合すると、これらのデータは、サンプルタグ付けが、同じ単一細胞実験への複数のサ

ンプルのプールを可能にすることを示す。サンプルタグ付けは、サンプルスループットを増大させ、技術的エラーに起因するサンプル間のバッチ効果をなくし、マルチプレットの検出を可能にする。

【０７７４】

実施例１０

サンプルインデックス付加及び発現プロフィール

この実施例は、細胞のサンプルタグ付けの使用が、細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールを変化させないことを説明する。

【０７７５】

図５４は、サンプルインデックス付加組成物で細胞をタグ付け又は染色することが、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）においてｍＲＮＡ発現プロフィールを変化させなかったことを示す、非限定的な例示的プロットである。図５４は、サンプルタグ付けを用いた又は用いない、ＰＢＭＣの発現プロフィールのｔＳＮＥ投射プロットのオーバーレイを示す。この重複は、サンプルタグ付けが、ＰＢＭＣにおいてｍＲＮＡ発現プロフィールを変化させなかったことを示す。

【０７７６】

総合すると、データは、オリゴヌクレオチドと結合された抗体によるサンプルタグ付け又は染色が、細胞の発現プロフィールを変化させないことを示す。したがって、サンプルタグ付けは、タグ付けされた細胞の発現プロフィールを変化させずに、複数のサンプルのプールを可能にし、サンプルスループットを増大させ、サンプル間のバッチ効果をなくし、及び／又はマルチプレットの検出を可能にする。

【０７７７】

用語

上述される実施形態の少なくともいくつかにおいて、一実施形態に使用される１つ以上の要素が、置き換えが技術的に実行不可能でない限り、別の実施形態において交換可能に使用されうる。さまざまな他の省略、追加及び変更が、権利請求される主題の範囲から逸脱せずに、上述される方法及び構造に対して行われうることが、当業者によって理解されるであろう。すべてのこのような変更及び変形が、添付の特許請求の範囲によって規定される主題の範囲に含まれることが意図される。

【０７７８】

本明細書に記載の実質的に任意の複数形及び／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。明確にするために種々の単数形／複数形の入替えを本明細書に明示的に記述しうる。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される際、単数形（「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」）は、文脈上特に明記されない限り、複数形の指示対象を含む。本明細書における「又は」への言及は、特に記載しない限り、「及び／又は」を包含することが意図される。

【０７７９】

一般的には、本明細書特に添付の特許請求の範囲（たとえば添付の特許請求の範囲の本文）で用いられる用語は「オープン」用語であることが一般に意図されることは当業者であれば理解されよう（たとえば、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（～を含む）」という用語は「～を含むがこれらに限定されるものではない」と解釈すべきであり、「ｈａｖｉｎｇ（～を有する）」という用語は「少なくとも～を有する」と解釈すべきであり、「ｉｎｃｌｕｄｅｓ（～を含む）」という用語は「～を含むがこれらに限定されるものではない」と解釈すべきであるなど）。さらに、導入クレームレシテーションの特定数が意図される場合、かかる意図は請求項で明示的にリサイトされ、かかるレシテーションの不在下ではかかる意図は存在しないことは当業者であれば理解されよう。たとえば、理解の一助として、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「ａｔ ｌｅａｓｔ ｏｎｅ（少なくとも１つ）」及び「ｏｎｅ ｏｒ ｍｏｒｅ（１つ以上）」の使用を含みうる。しかしながら、かかる語句が用いられたとしても、不定冠詞「ａ」又は

「ａｎ」によるクレームレシテーションの導入が、かかる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、一方のかかるレシテーションを含む実施形態のみに限定することを意味するものと解釈すべきでない。たとえ同一の請求項が導入語句「ｏｎｅ　ｏｒ　ｍｏｒｅ（１つ以上）」又は「ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ（少なくとも１つ）」と不定冠詞たとえば「ａ」又は「ａｎ」とを含む場合でさえも、そのように解釈すべきでない（たとえば、「ａ」及び／又は「ａｎ」は「ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ（少なくとも１つ）」又は「ｏｎｅ　ｏｒ　ｍｏｒｅ（１つ以上）」を意味するものと解釈すべきである）。定冠詞を用いてクレームレシテーションを導入する場合にも、同じことが当てはまる。そのほかに、たとえ特定数の導入クレームレシテーションが明示的にリサイトされたとしても、かかるレシテーションは少なくともリサイトされた数を意味すると解釈すべきであることは当業者であれば分かるであろう（たとえば、「２つのレシテーション」という他の修飾語を含まないベアのレシテーションは、少なくとも２つのレシテーション又は２つ以上レシテーションを意味する）。さらに、「Ａ、Ｂ、及びＣの少なくとも１つ」に類似した条件が用いられる場合、一般的には、かかる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（たとえば、「Ａ、Ｂ、及びＣの少なくとも１つを有する系」は、限定されるものではないが、Ａ単独、Ｂ単独、Ｃ単独、ＡとＢの両方、ＡとＣの両方、ＢとＣの両方、及び／又はＡとＢとＣの全部などを有する系を含であろう）。「Ａ、Ｂ、又はＣの少なくとも１つなど」に類似した条件が用いられる場合、一般的には、かかる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（たとえば、「Ａ、Ｂ、又はＣの少なくとも１つを有する系」は、限定されるものではないが、Ａ単独、Ｂ単独、Ｃ単独、ＡとＢの両方、ＡとＣの両方、ＢとＣの両方、及び／又はＡとＢとＣの全部などを有する系を含であろう）。さらに、２つ以上の代替用語を表す実質上任意の選言的な語及び／又は語句は、明細書、請求項、又は図面にかかわらず、用語の１つ、用語のいずれか、又は用語の両方を含む可能性が企図されると理解すべきであることは当業者であれば理解されよう。たとえば、「Ａ又はＢ」という語句は「Ａ」又は「Ｂ」又は「Ａ及びＢ」の可能性を含むものと理解されよう。

【０７８０】

そのほかに、本開示の特徴又は態様がマーカッシュグループにより記述される場合、それにより、本開示は、マーカッシュグループの任意の個別のメンバー又はメンバーのサブグループにより記述されることは当業者であれば分かるであろう。

【０７８１】

当業者であれば理解されるであろうが、あらゆる目的で、たとえば、明細書の提供に関して、本明細書に開示された範囲はすべて、あらゆる可能なサブ範囲及びそのサブ範囲の組合せをも包含する。いずれの列挙された範囲も、十分に記述されたものとして且つその範囲が少なくとも２等分、３等分、４等分、５等分、１０等分などされうるものとして容易に認識可能である。たとえば、限定されるものではないが、本明細書で考察した各範囲は、下３分の１、中３分の１、上３分の１に容易に分解可能である。同様に、当業者であれば理解されるであろうが、「～まで」、「少なくとも～」、「～超」、「～未満」などの表現はすべて、リサイトされた数を含み、以上で考察したように後続的にサブ範囲に分解可能な範囲を意味する。最終的に、当業者であれば理解されるであろうが、範囲は各個別のメンバーを含む。したがって、たとえば、１～３個の項目を有するグループは、１、２、又は３個の項目を有するグループを意味する。同様に、１～５個の項目を有するグループは、１、２、３、４、又は５個の項目を有するグループを意味し、他も同様である。

【０７８２】

さまざま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さまざま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。

【図面】

【図１】

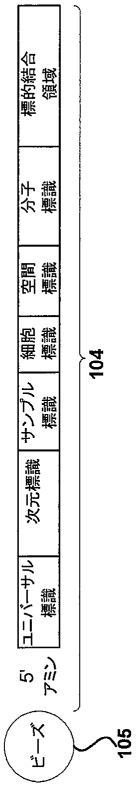


図１

【図２】

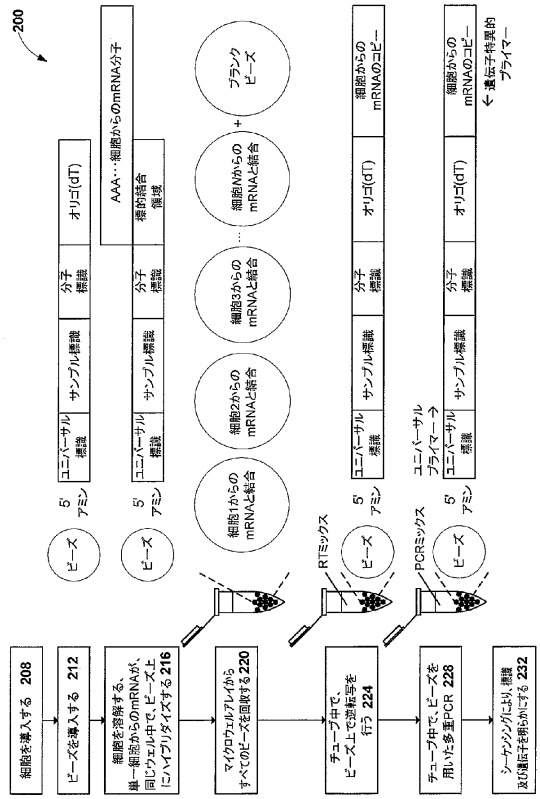


図２

【図３】

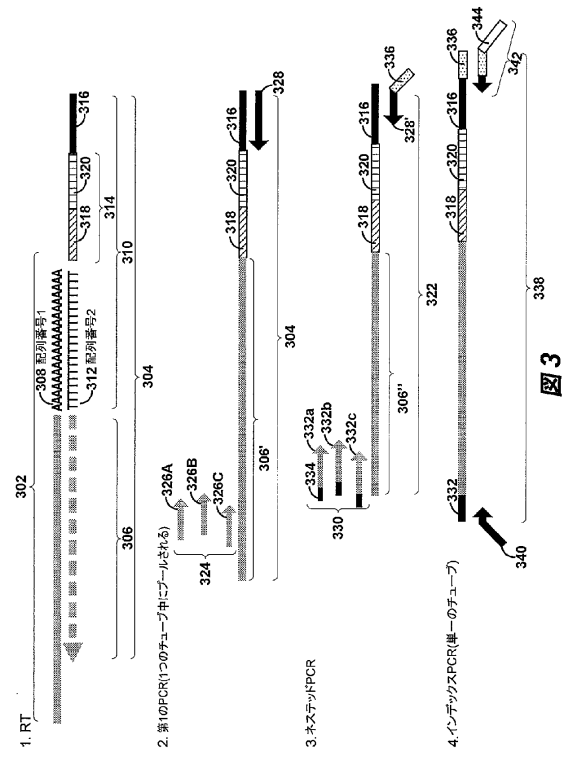


図３

【図４】

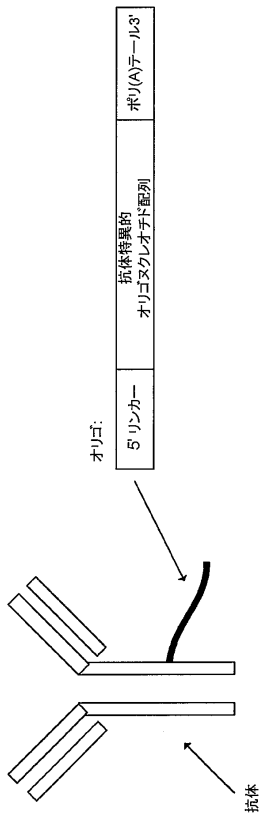


図４

【図５】

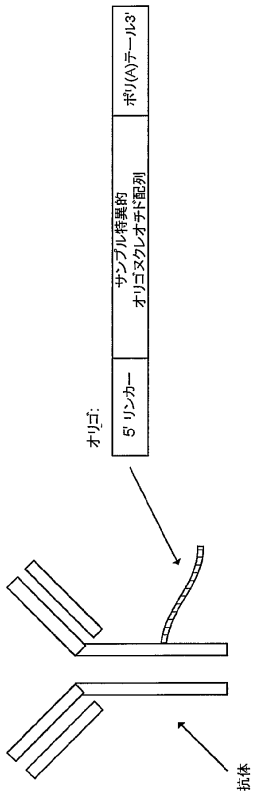


図5

【図６】

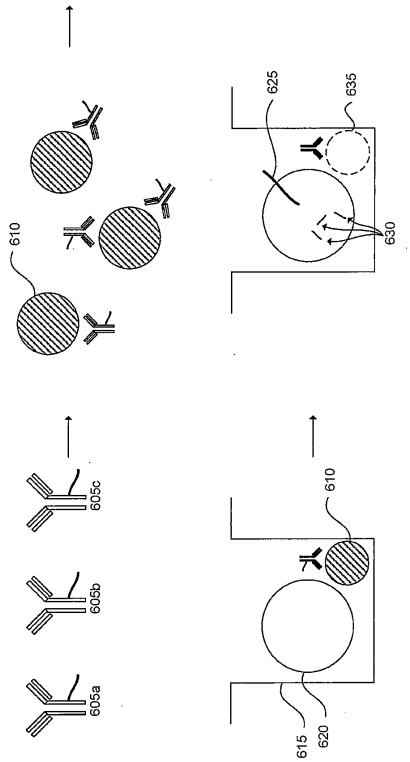


FIG. 6

【図７】

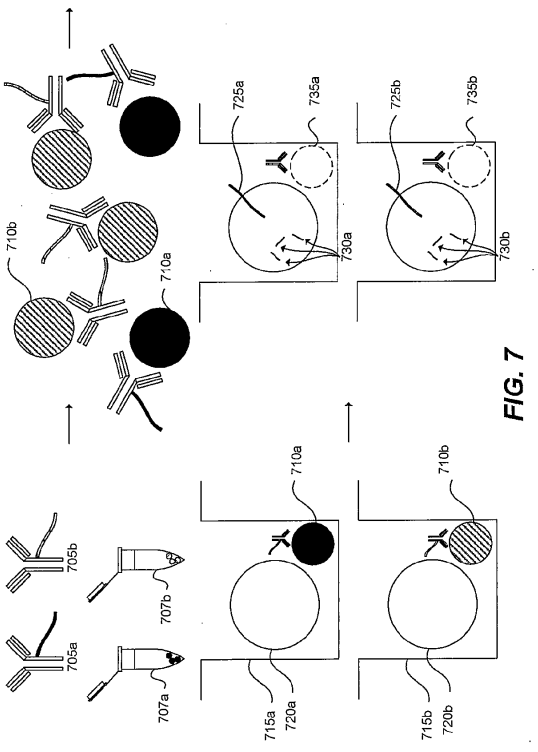


FIG. 7

【図８Ａ１】

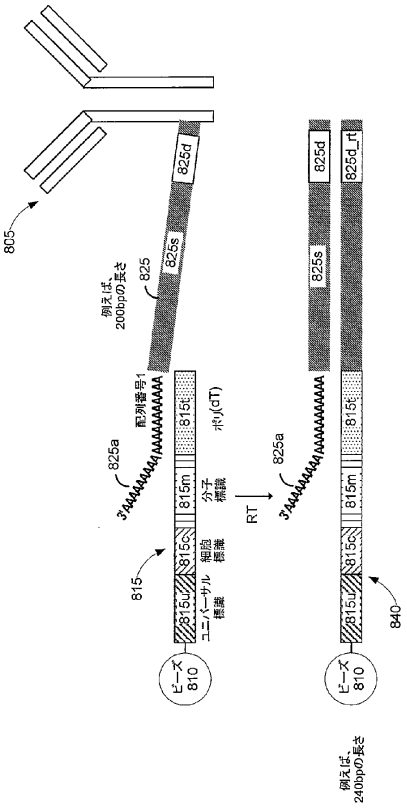


図8A1

【図８Ａ２】

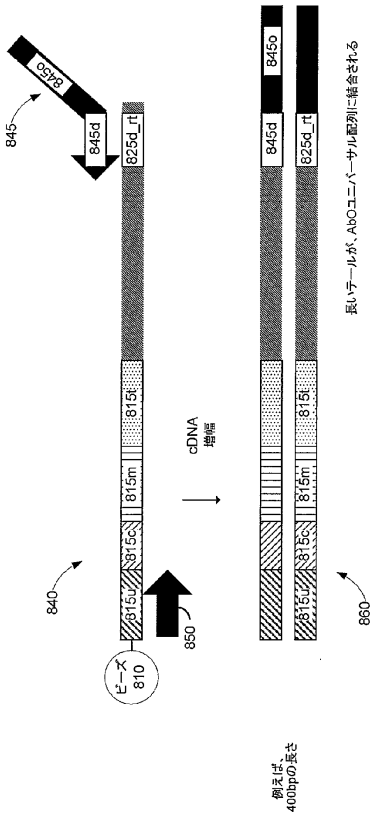


図 8A2

【図８Ｂ１】

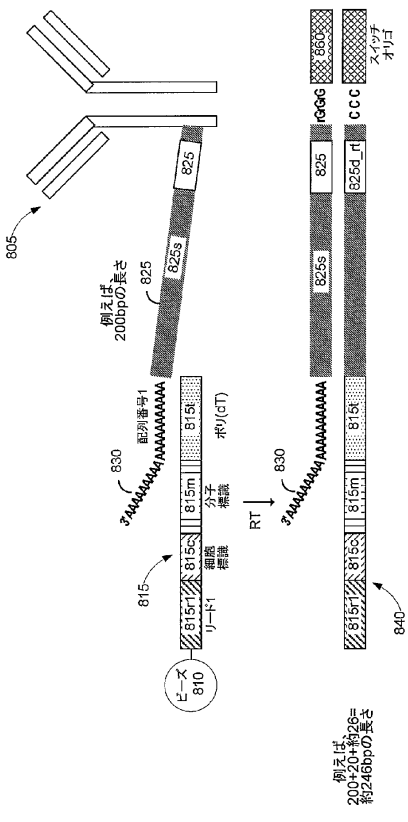


図 8B1

【図８Ｂ２】

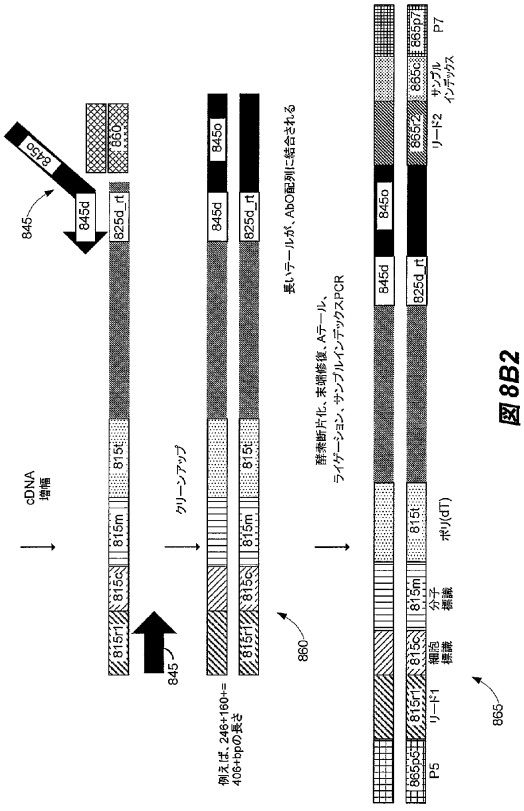


図 8B2

【図９Ａ】

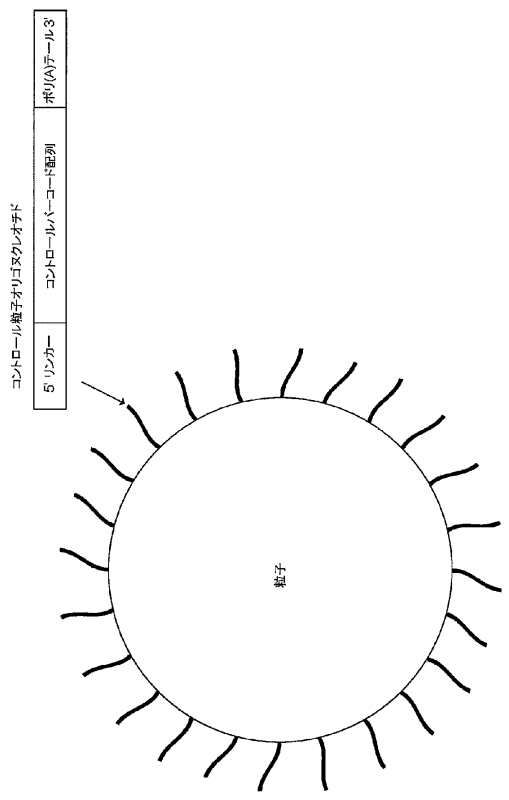


図 9A

【図９Ｂ】

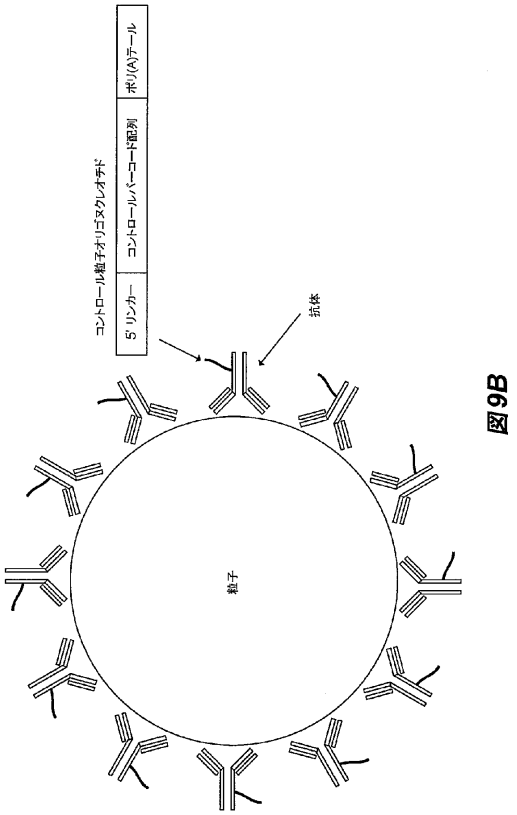


図9B

【図９Ｃ】

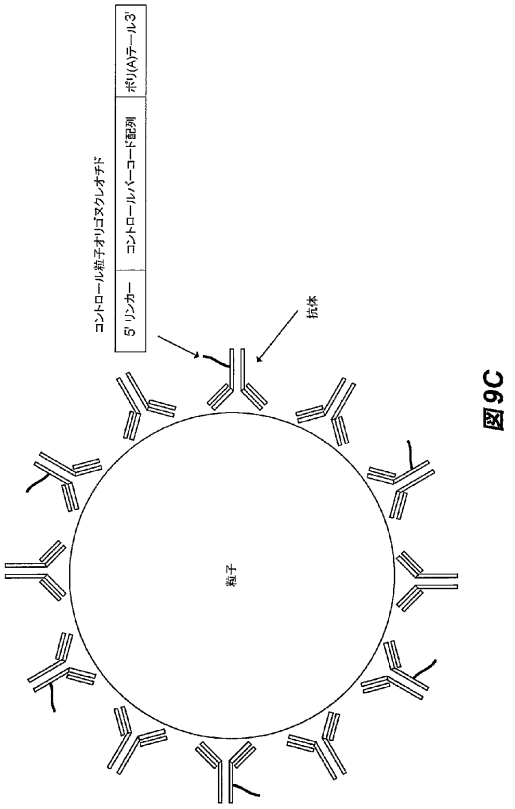


図9C

【図９Ｄ】

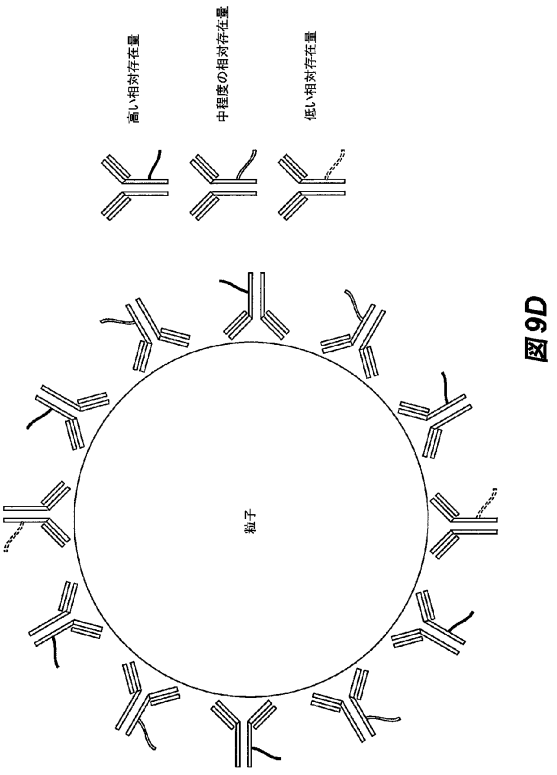


図9D

【図９Ｅ】

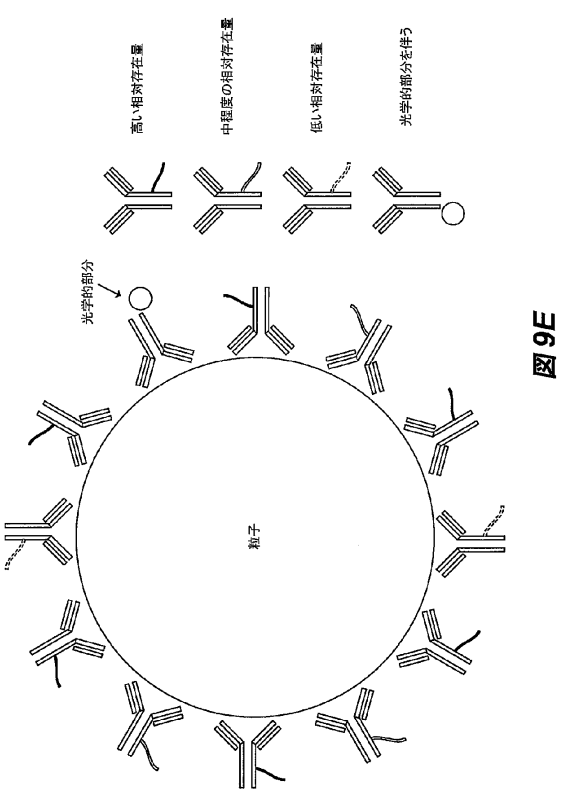


図9E

【図１０Ａ】

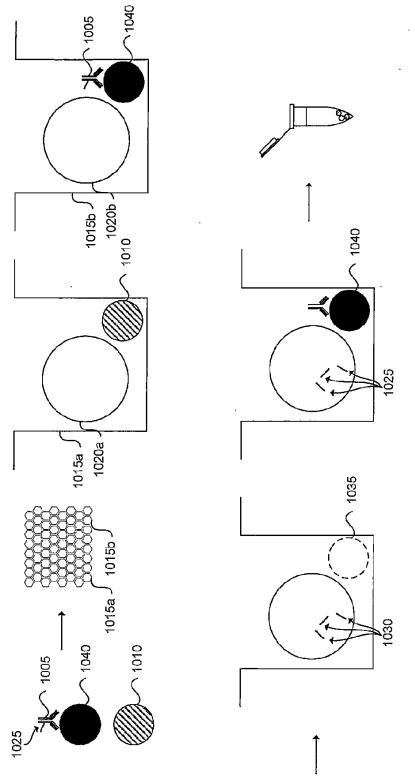


FIG. 10A

【図１０Ｂ】

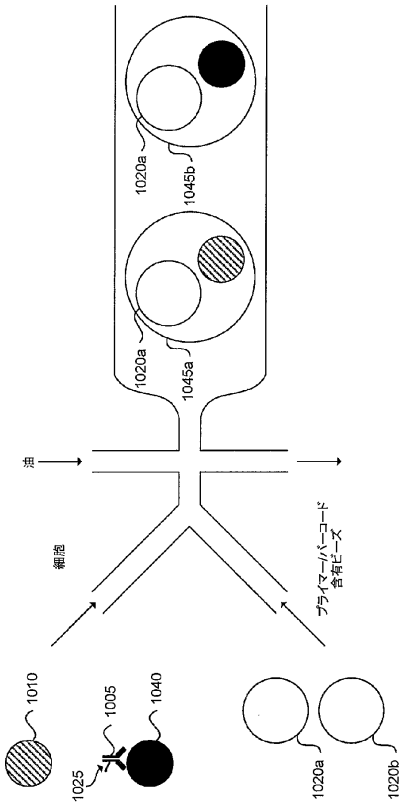


図10B

【図１１】

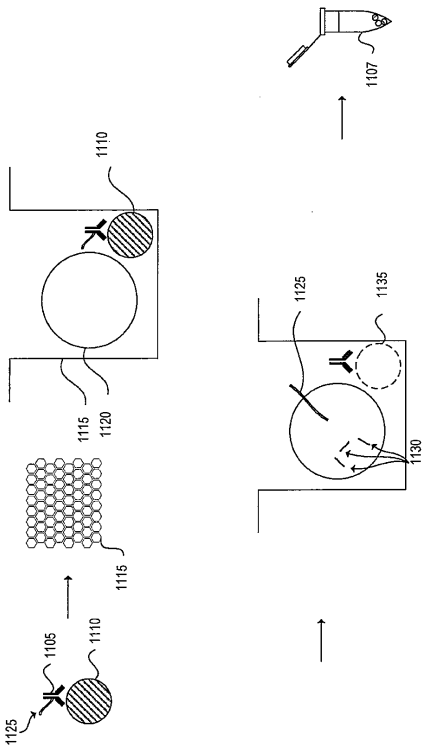


FIG. 11

【図１２】

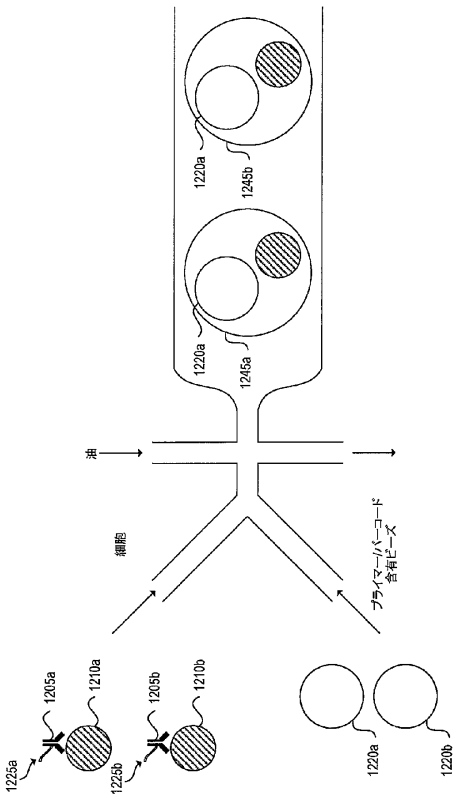


図12

【図１３Ａ－１３Ｂ】

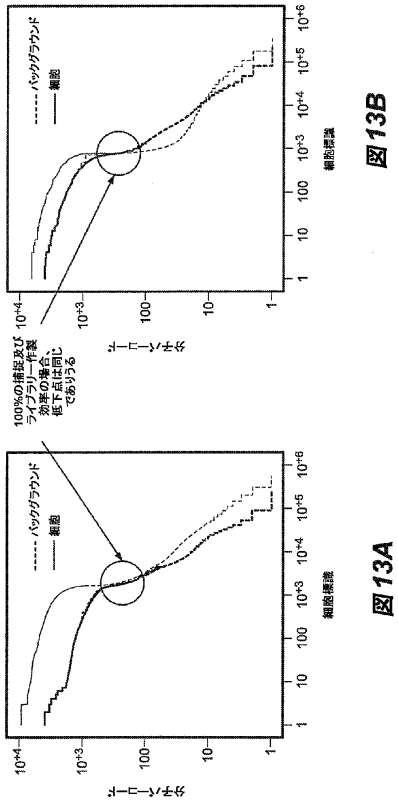


図13B

図13A

【図１３Ｃ】

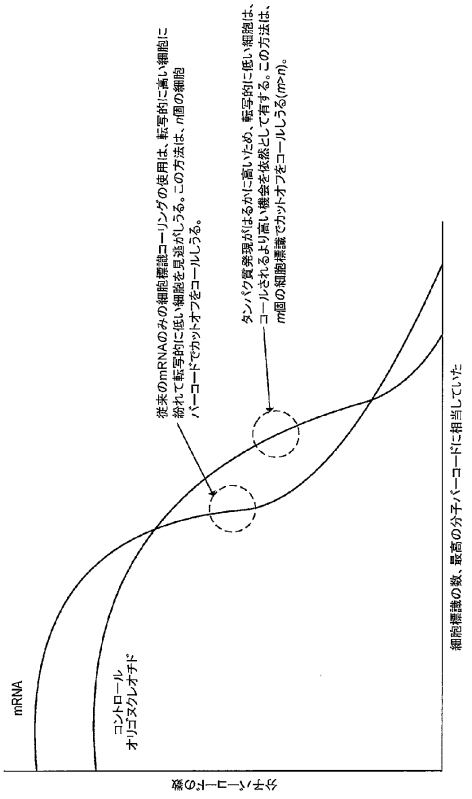


図13C

【図１４Ａ】

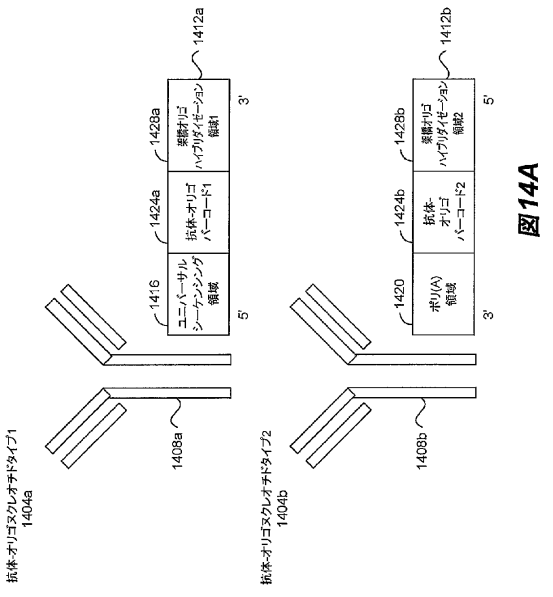


図14A

【図１４Ｂ】

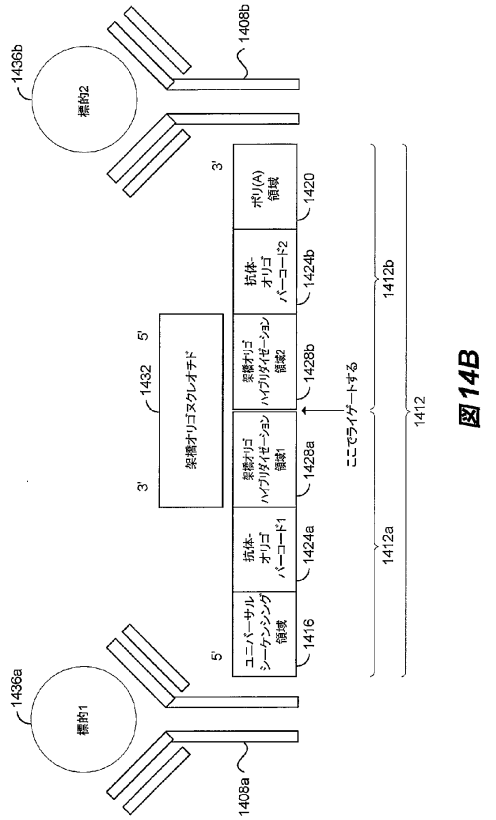


図14B

【図１４Ｃ】

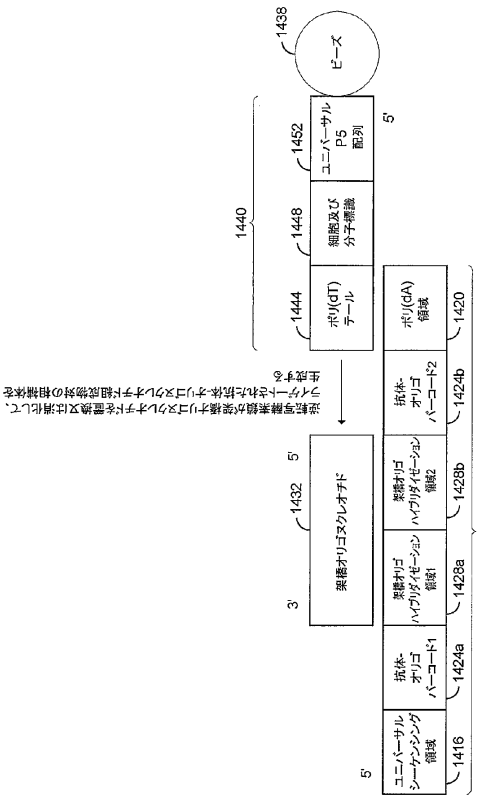


図14C

【図１４Ｄ】

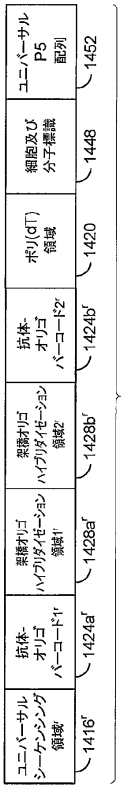


図14D

【図１４Ｅ】

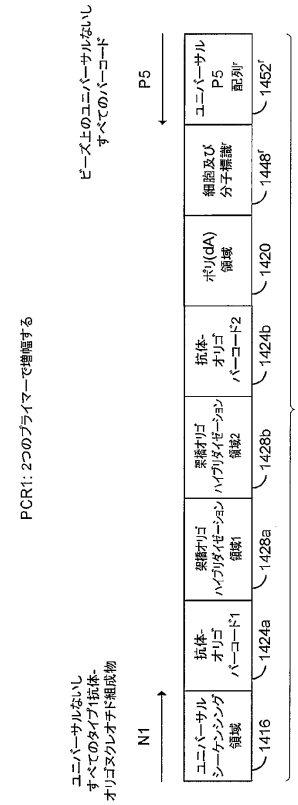


図14E

【図１４Ｆ】

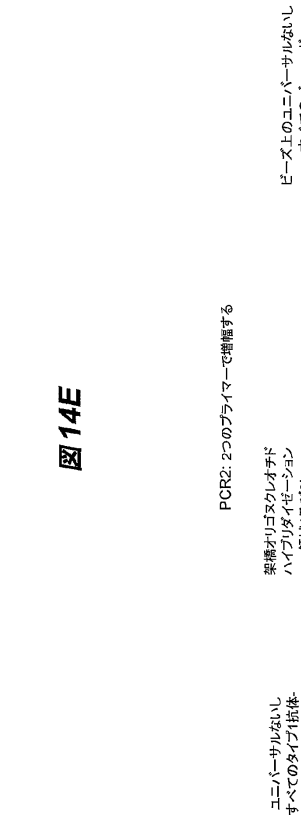
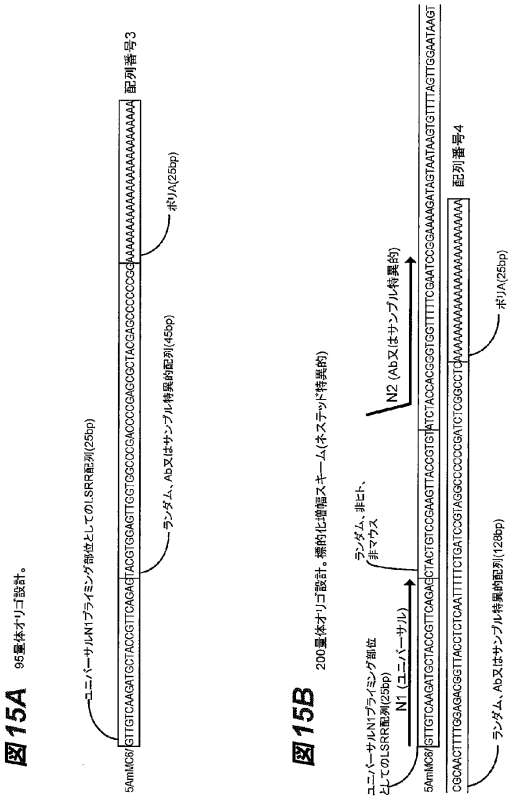
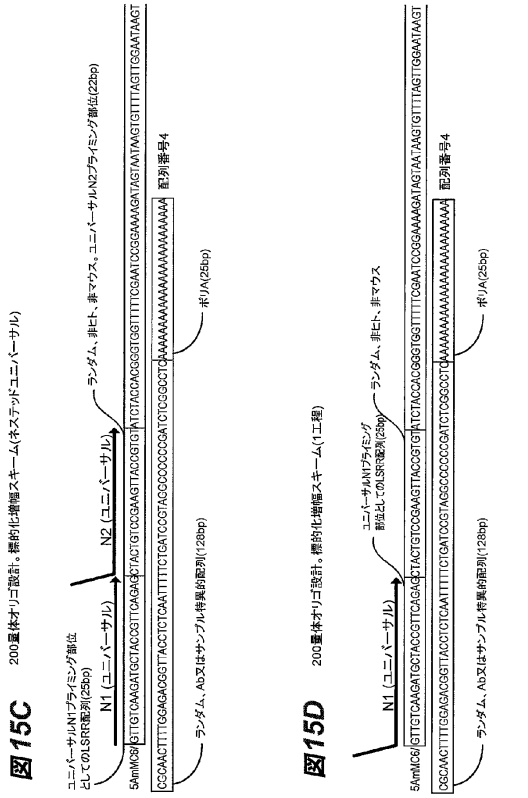


図14F

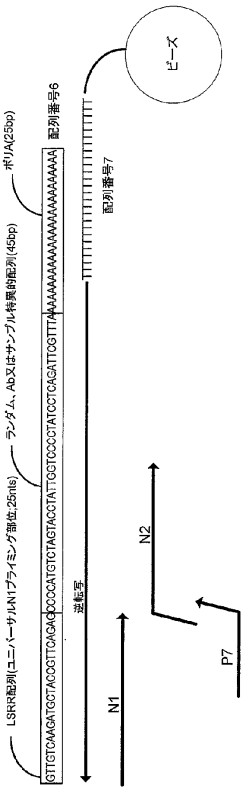
【図１５Ａ－１５Ｂ】



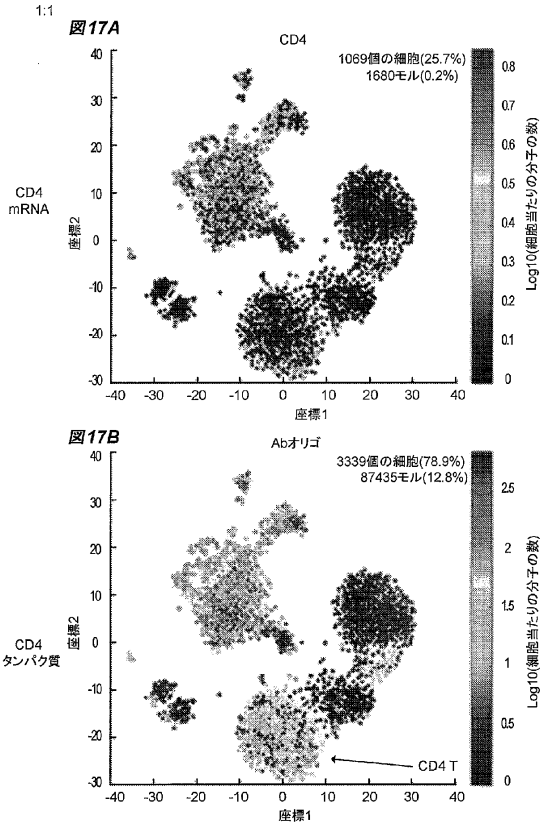
【図１５Ｃ－１５Ｄ】



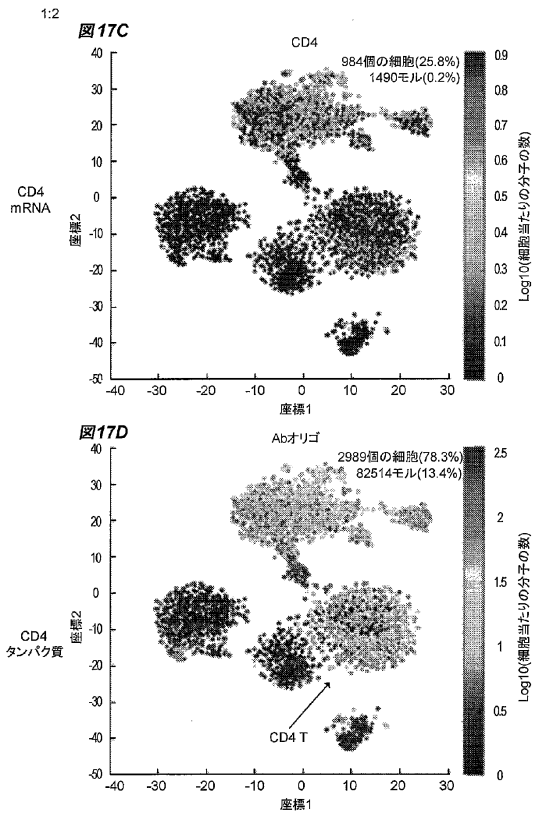
【図１６】



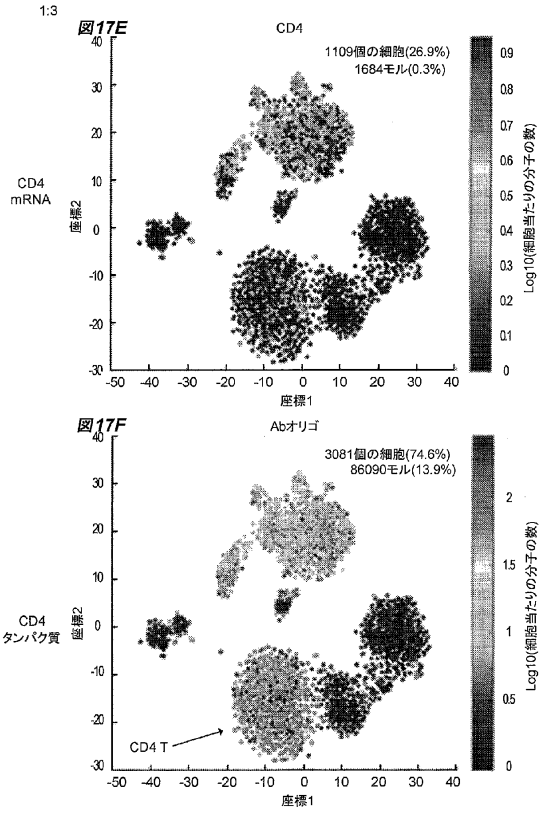
【図１７Ａ－１７Ｂ】



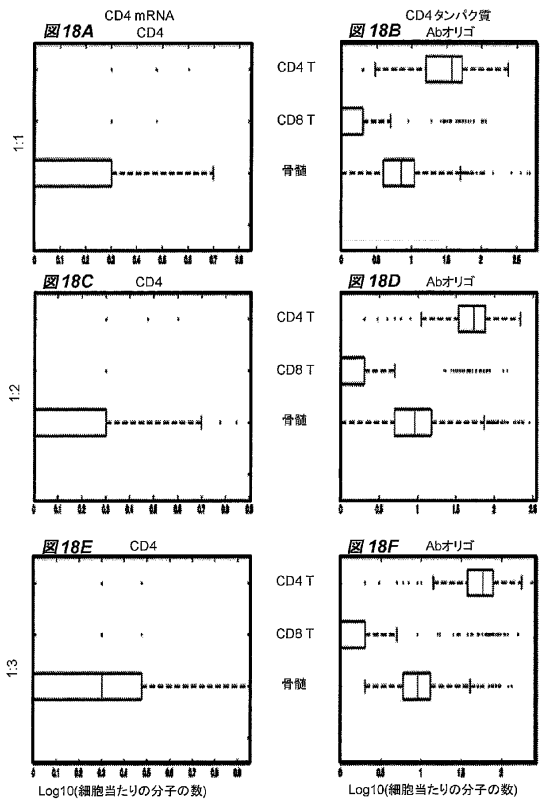
【図１７Ｃ－１７Ｄ】



【図１７Ｅ－１７Ｆ】



【図１８Ａ－１８Ｆ】



【図１９】

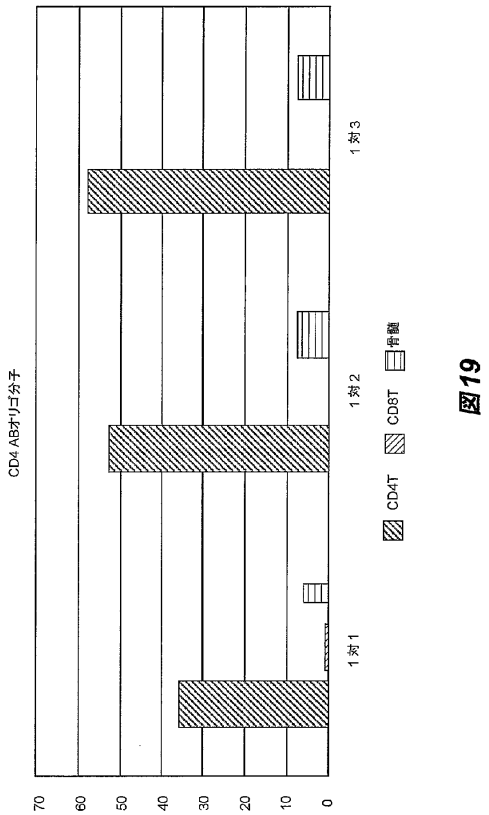
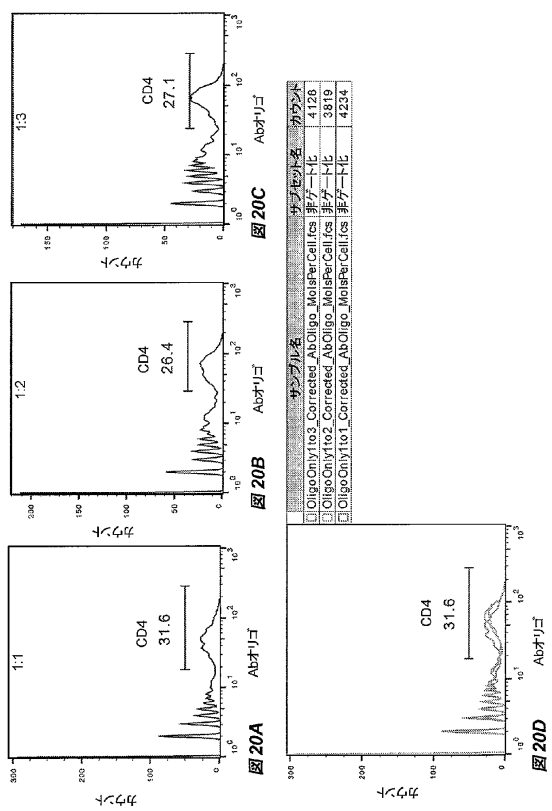
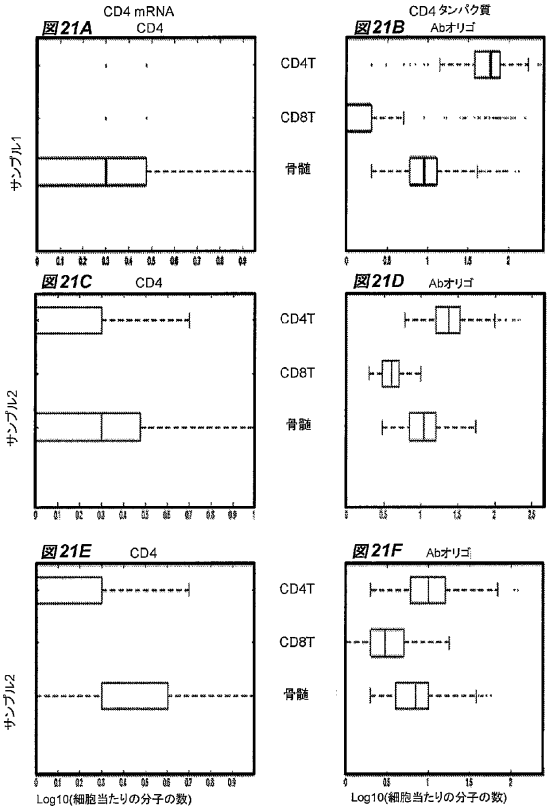


図19

【図２０Ａ－２０Ｄ】



【図２１Ａ－２１Ｆ】



【図２２】

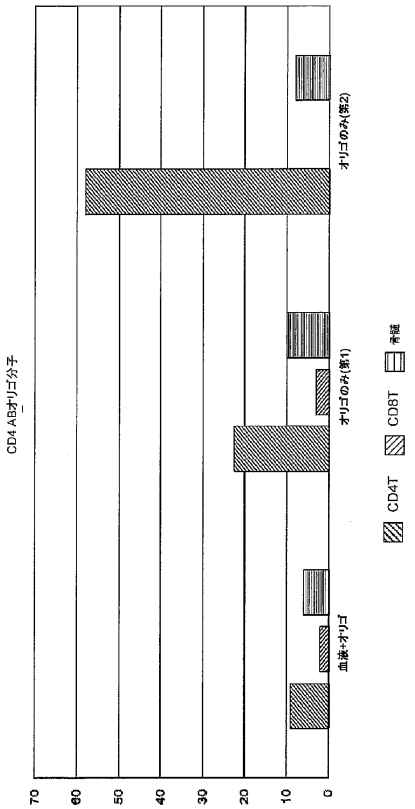


図 22

【図２３】

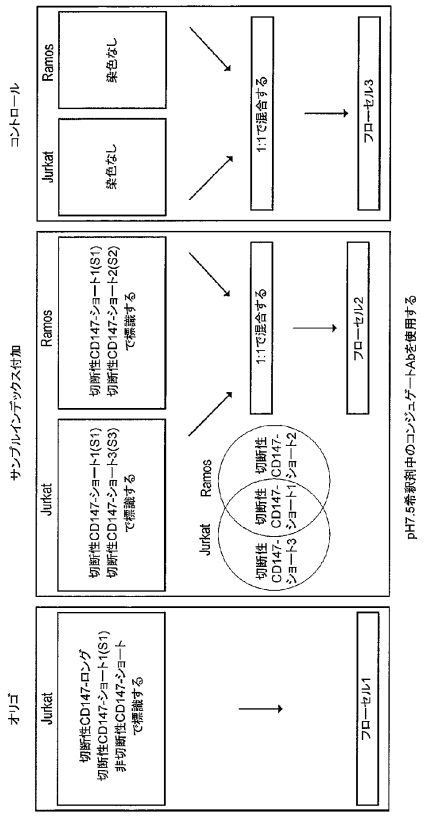


図 23

【図２４Ａ】

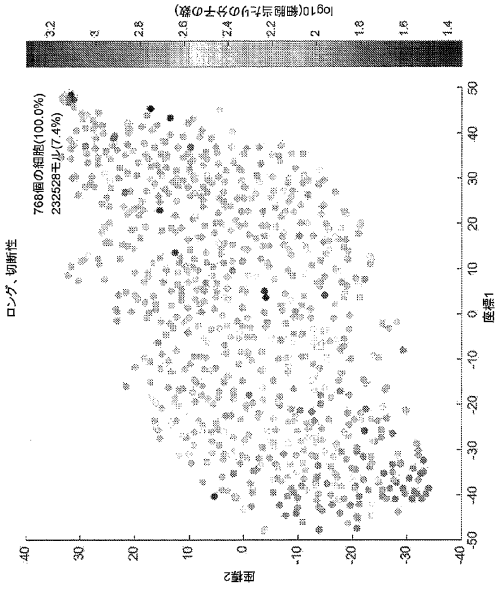


図 24A

【図２４Ｂ】

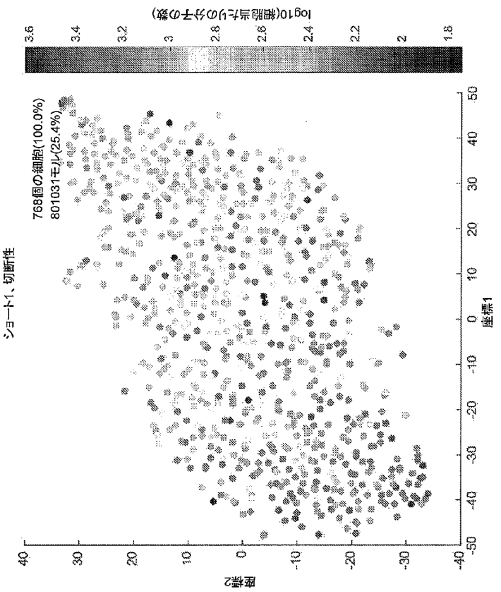


図 24B

【図２４Ｃ】

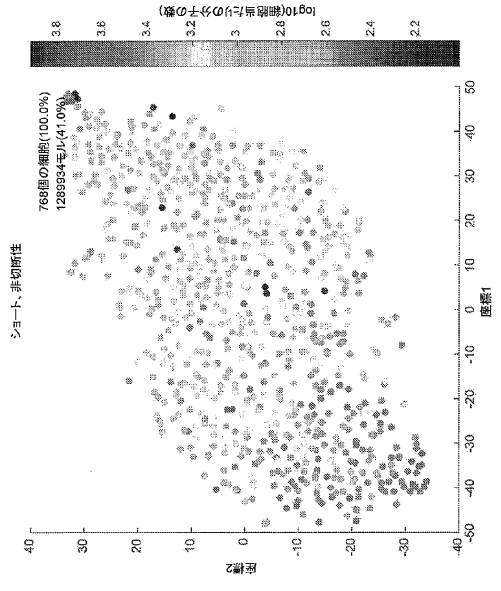


図 24C

【図２５】

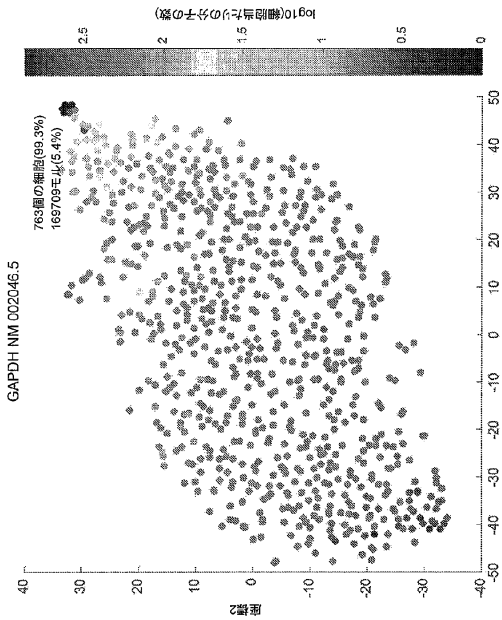


図 25

【図２６Ａ】

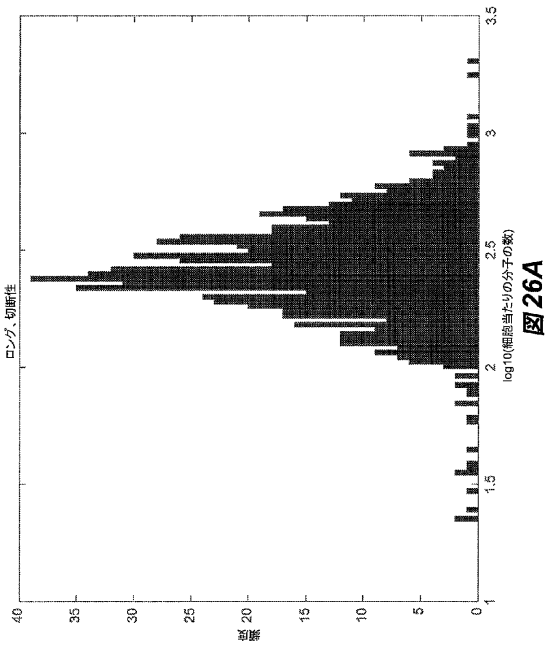


図 26A

【図２６Ｂ】

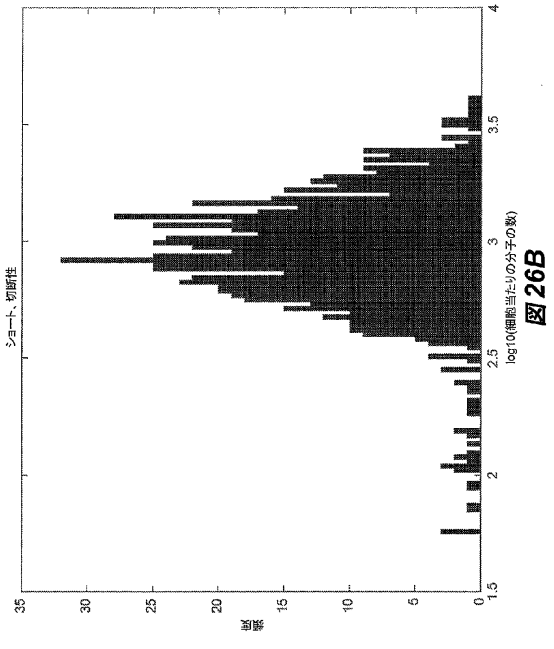


図 26B

【図２６Ｃ】

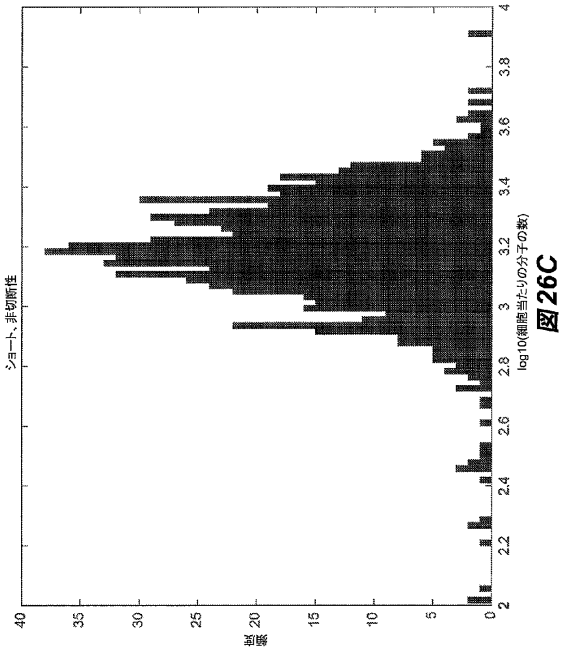


図 26C

【図２７Ａ】

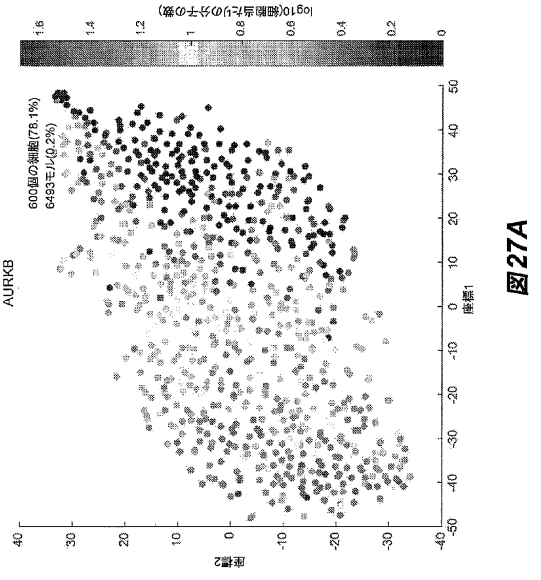


図 27A

【図２７Ｂ】

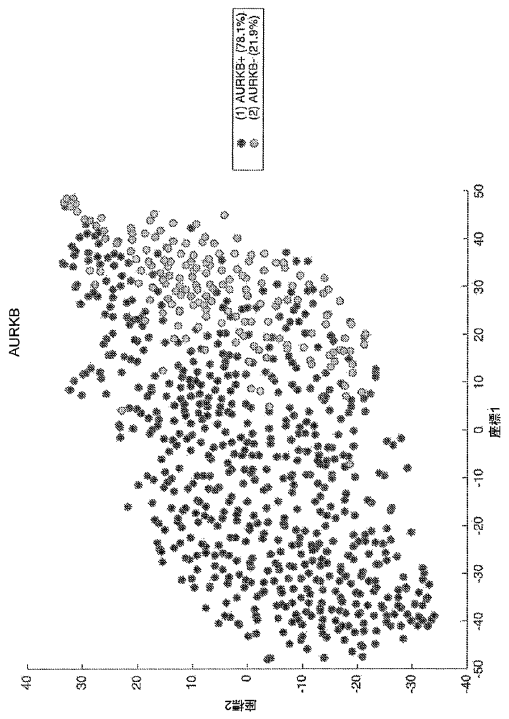


図 27B

【図２７Ｃ】

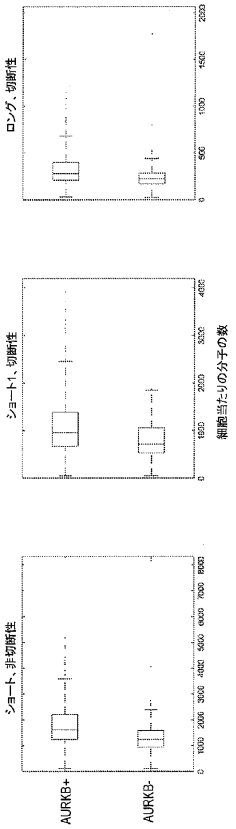


図 27C

【図２８Ａ】

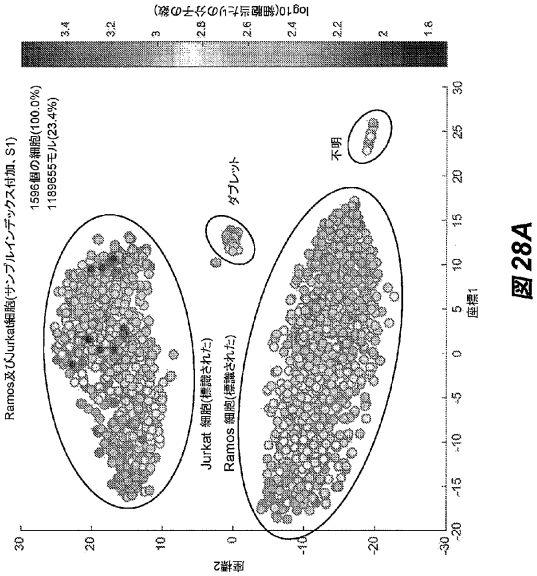


図 28A

【図２８Ｂ】

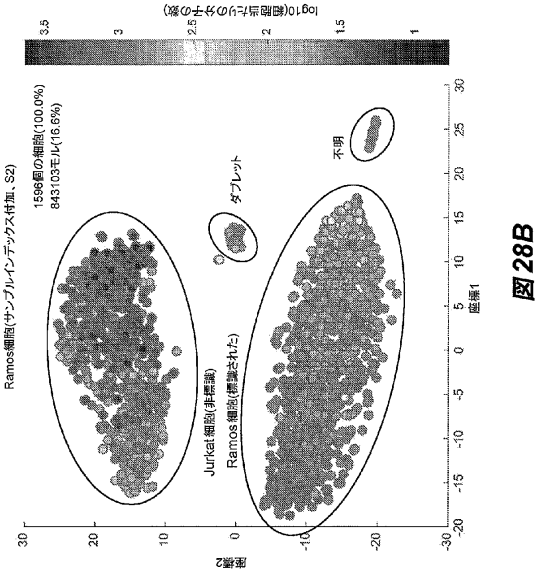


図 28B

【図２８Ｃ】

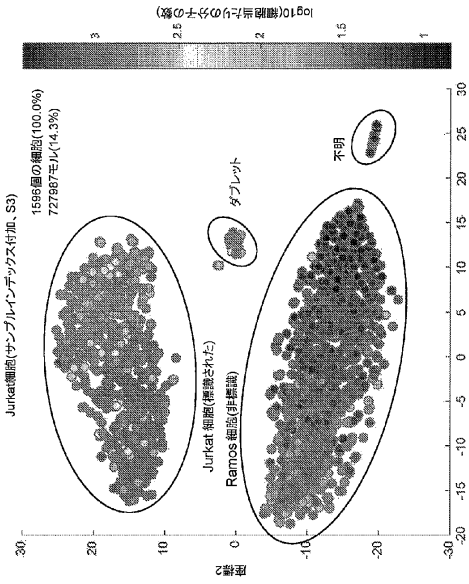


図 28C

【図２９Ａ】

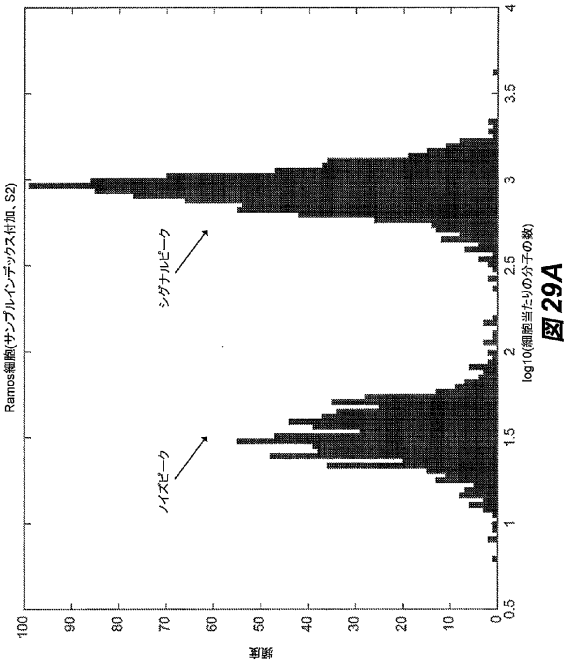


図 29A

【図２９Ｂ】

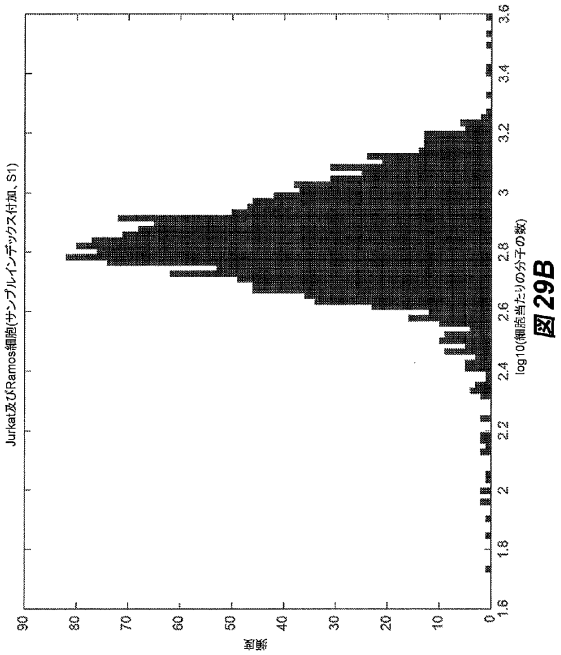


図 29B

【図２９Ｃ】

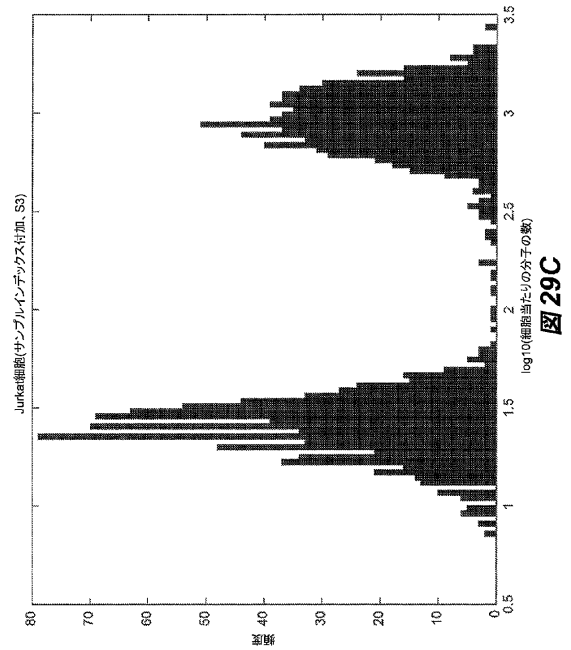


図 29C

【図３０Ａ】

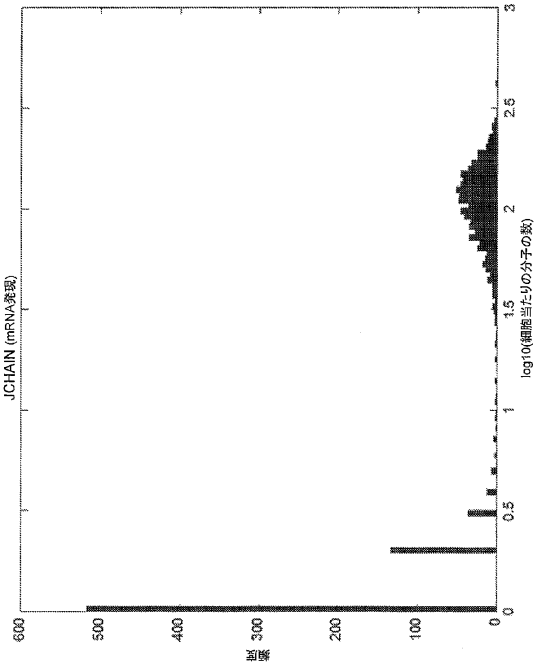


図30A

【図３０Ｂ】

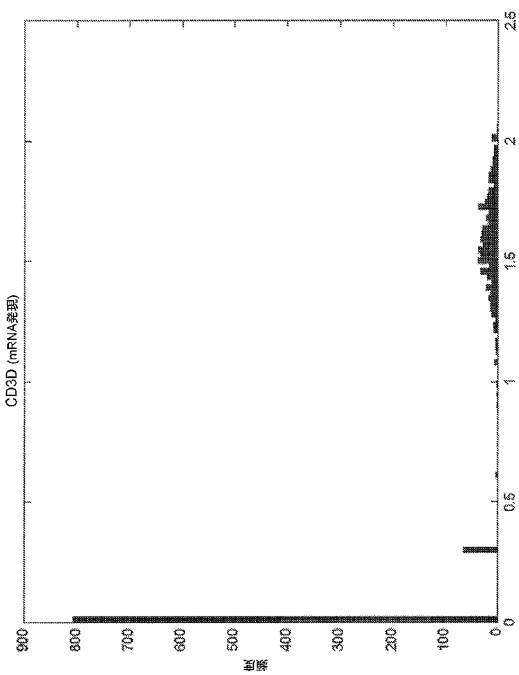


図30B

【図３０Ｃ】

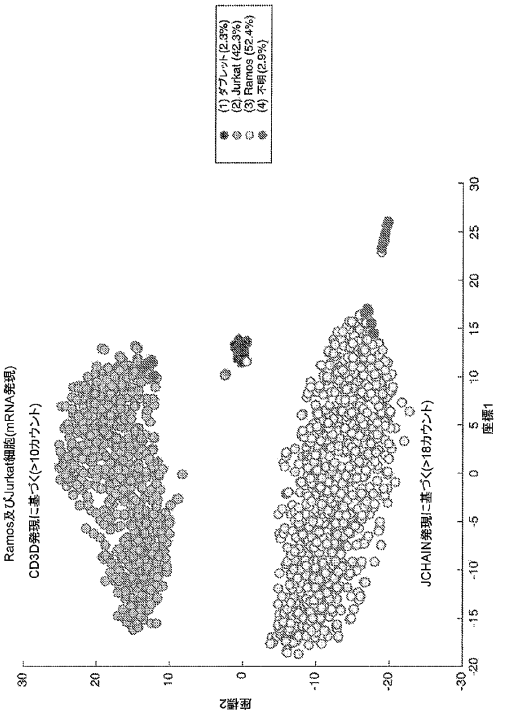


図30C

【図３０Ｄ】

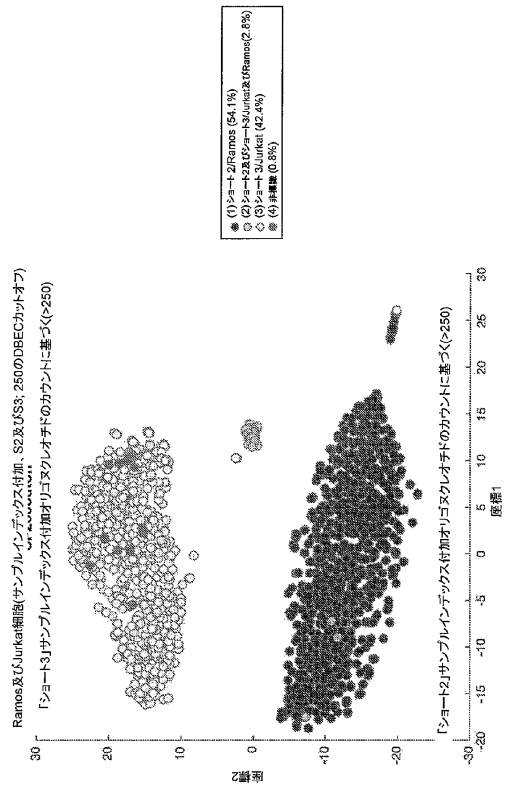


図30D

【図３１Ａ】

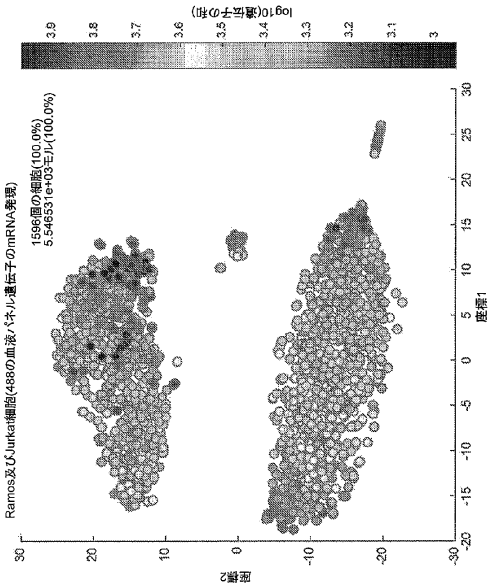


図31A

【図３１Ｂ】

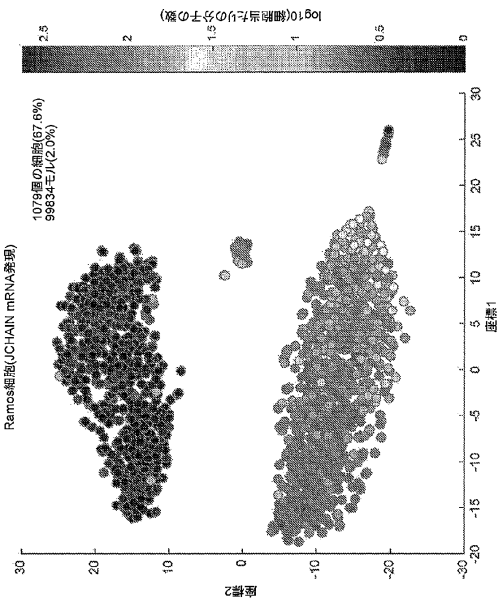


図31B

【図３１Ｃ】

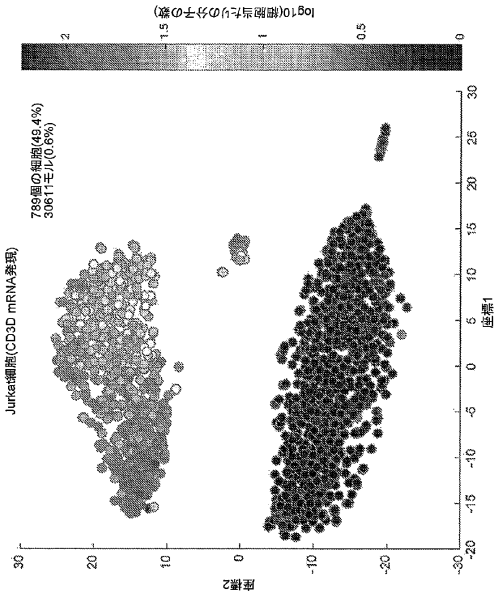


図31C

【図３２】

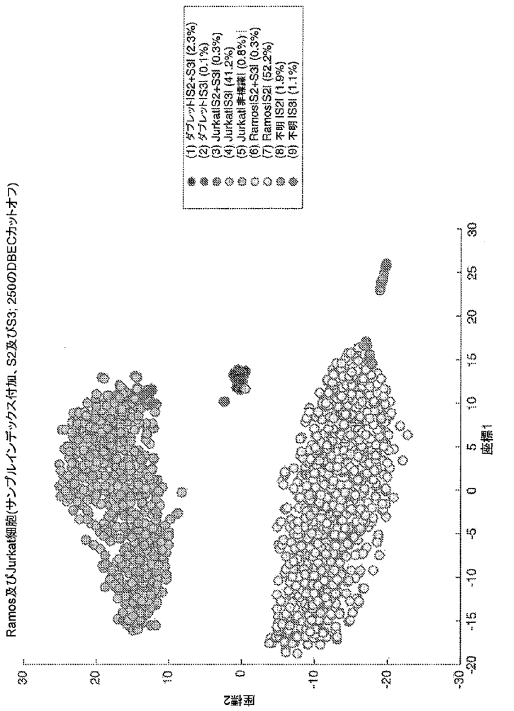


図32

【図３３Ａ】

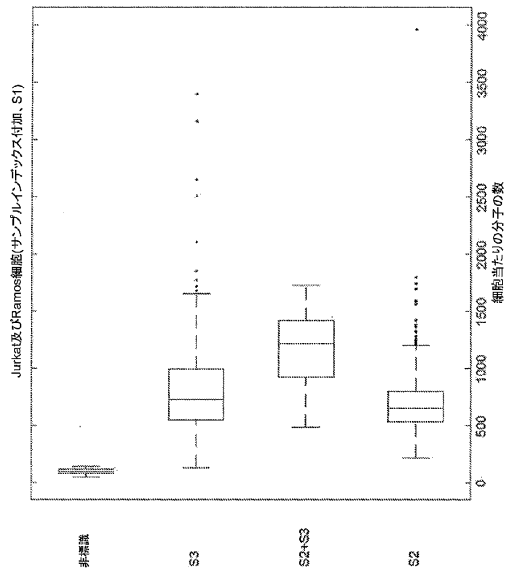


図33A

【図３３Ｂ】

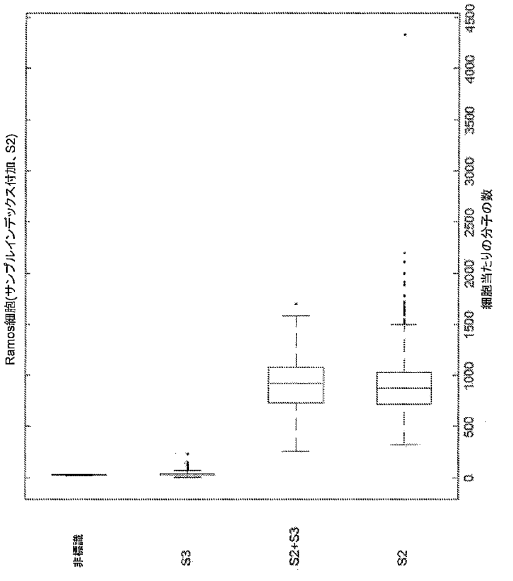


図33B

【図３３Ｃ】

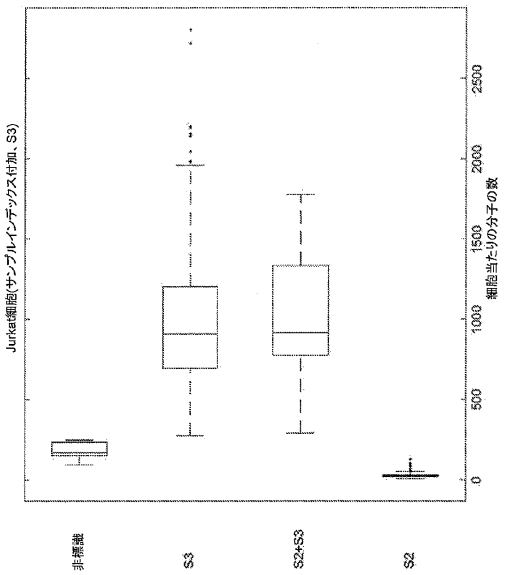


図33C

【図３４Ａ】

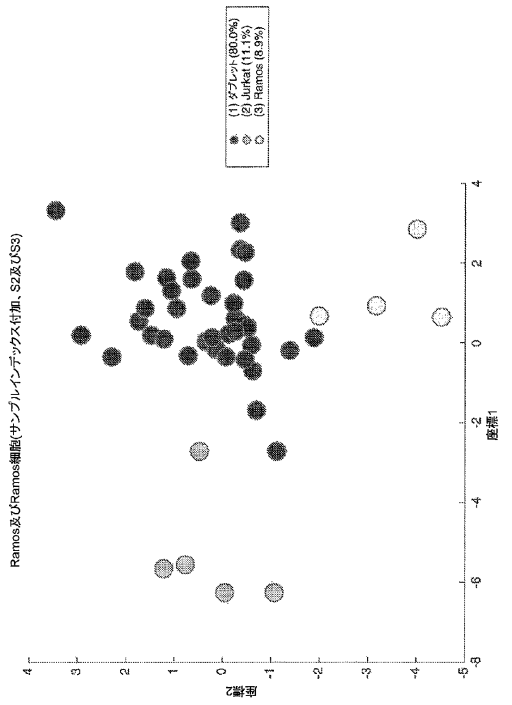


図34A

【図３４Ｂ－３４Ｃ】

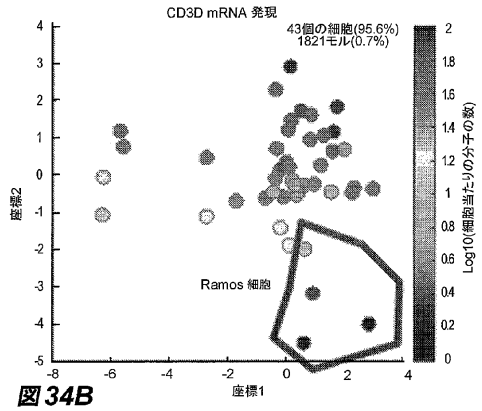


図34B

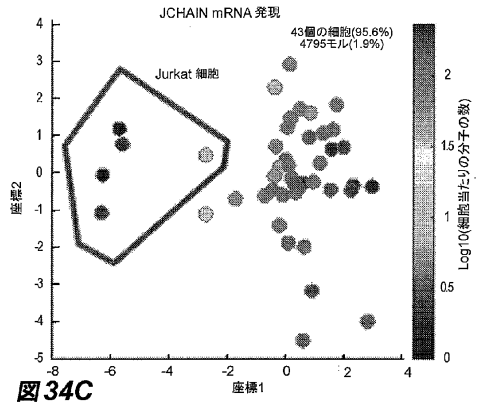


図34C

【図３５Ａ】

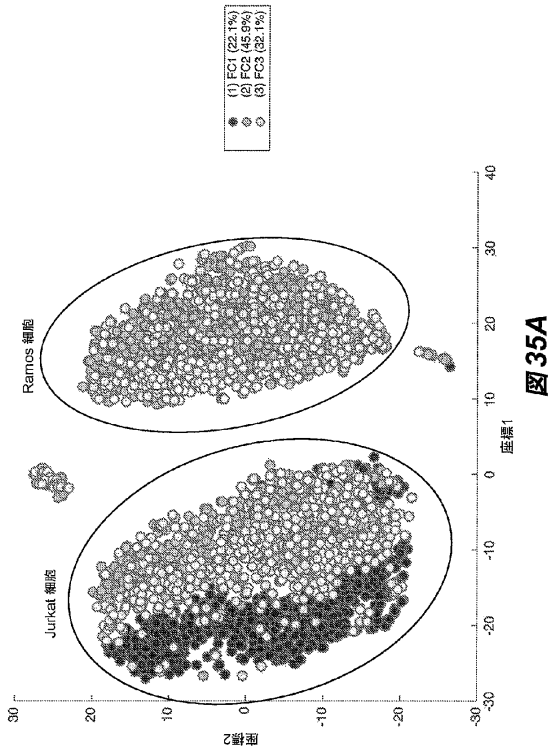


図35A

【図３５Ｂ】

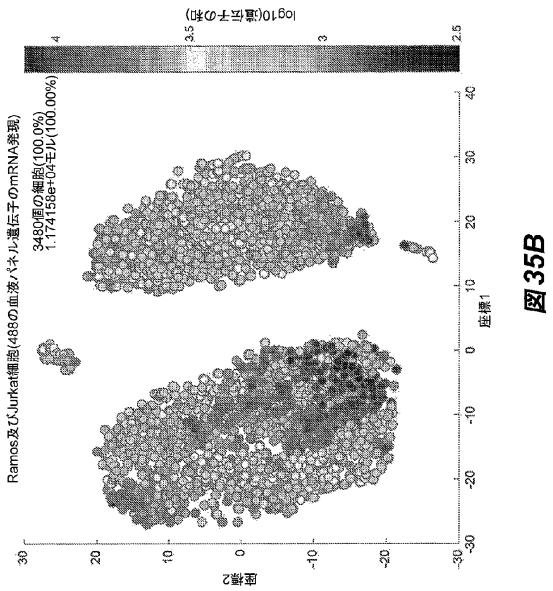


図35B

【図３５Ｃ】

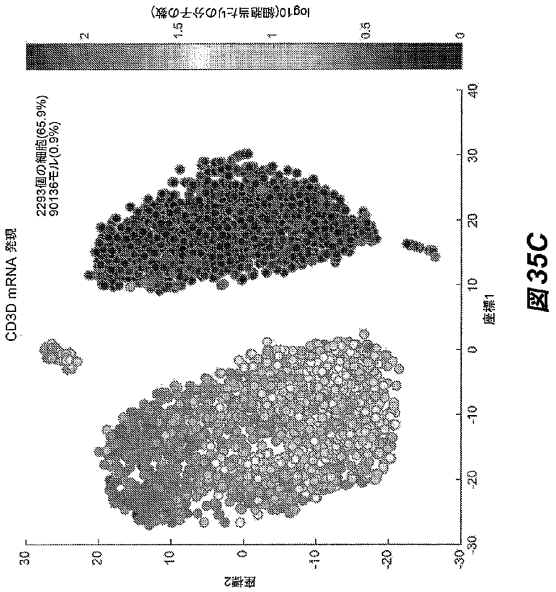
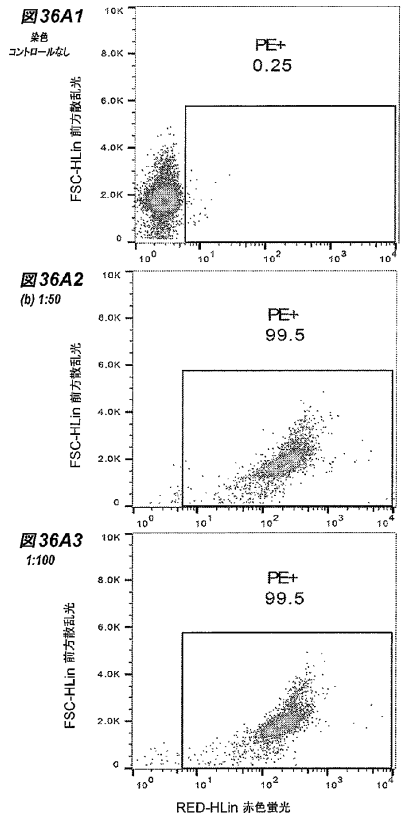
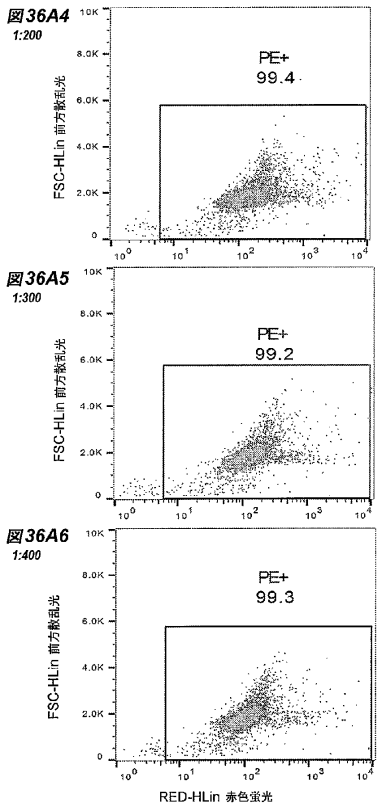


図35C

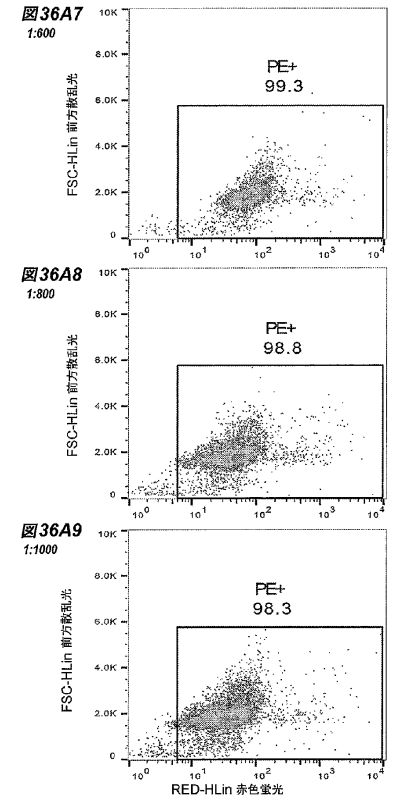
【図３６Ａ１－３６Ａ３】



【図３６Ａ４－３６Ａ６】



【図３６Ａ７－３６Ａ９】



【図３６Ｂ】

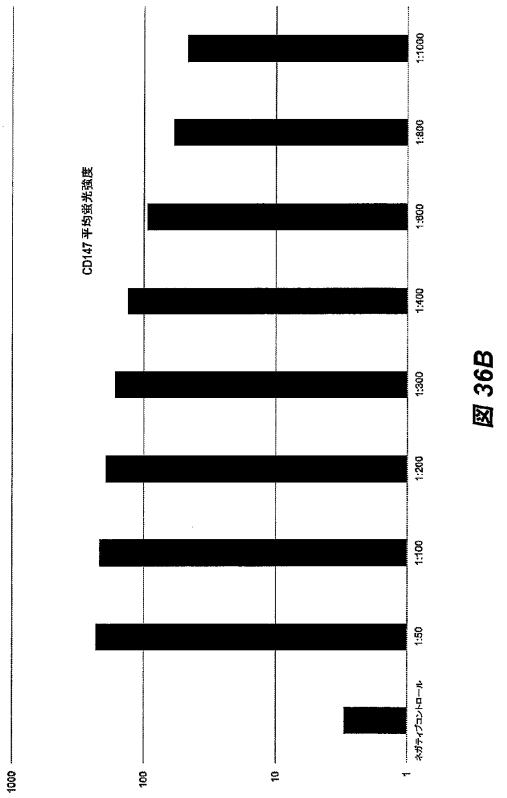


図 36B

【図３６Ｃ】

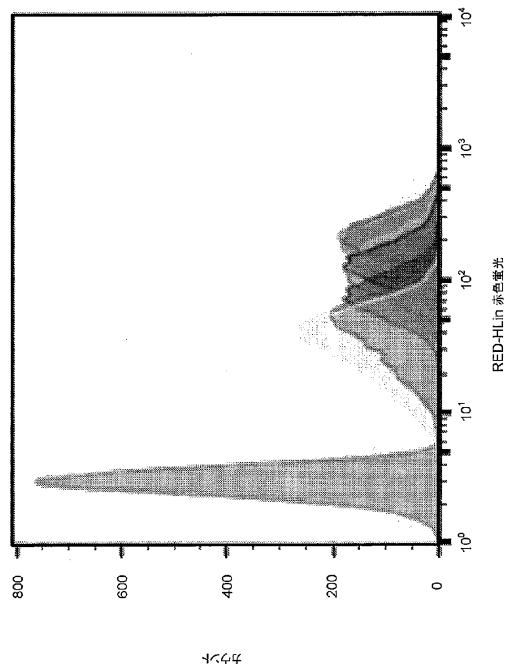


図36C

【図３７】

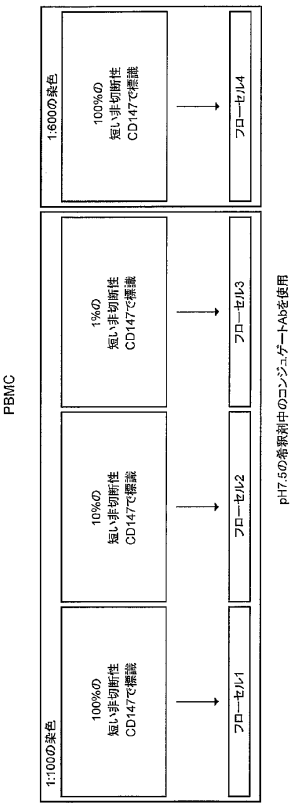
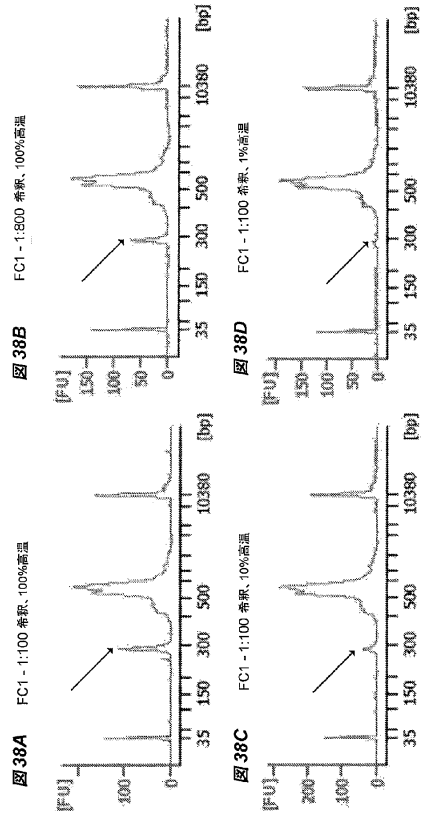
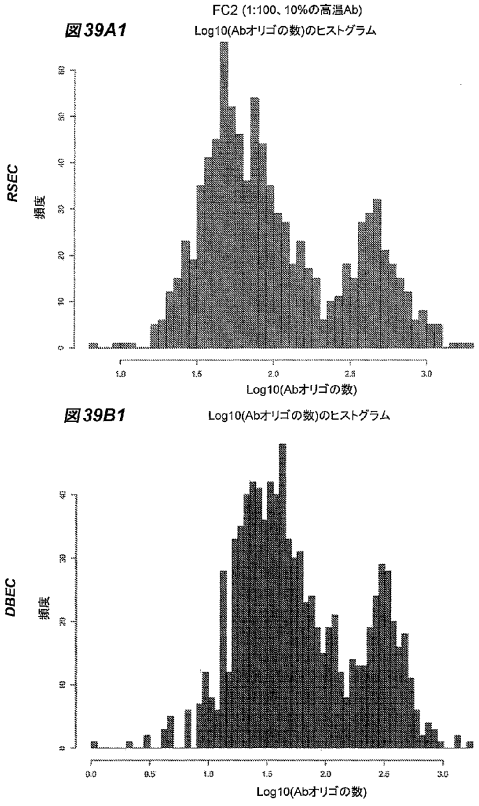


図37

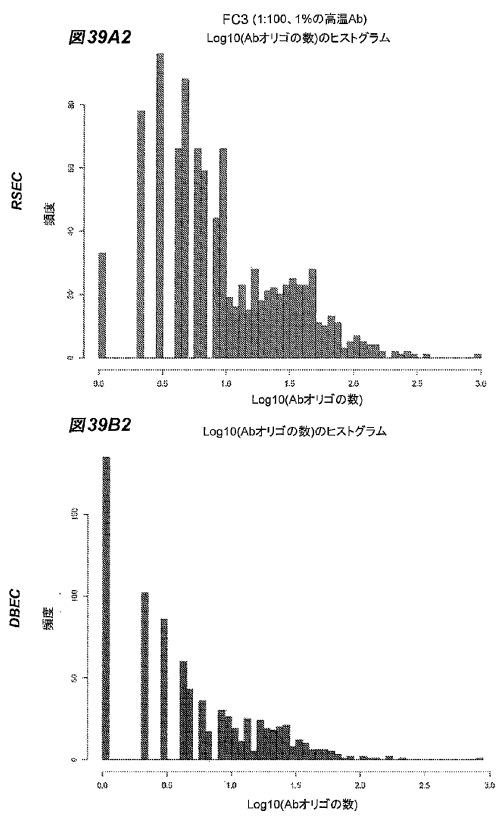
【図３８Ａ－３８Ｄ】



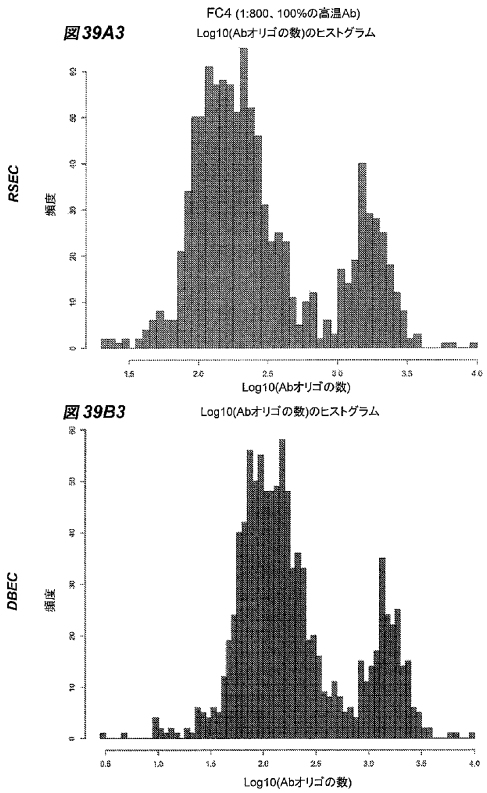
【図３９Ａ１－３９Ｂ１】



【図３９Ａ２－３９Ｂ２】



【図３９Ａ３－３９Ｂ３】



【図４０Ａ】

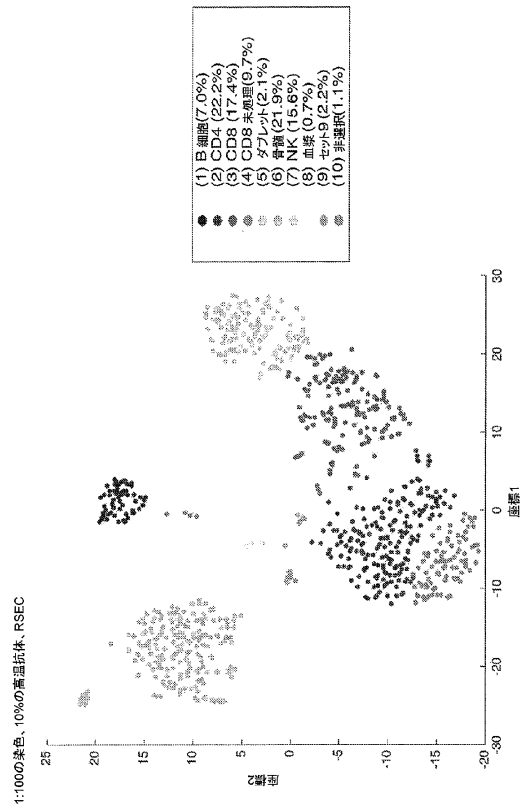


図40A

【図４０Ｂ】

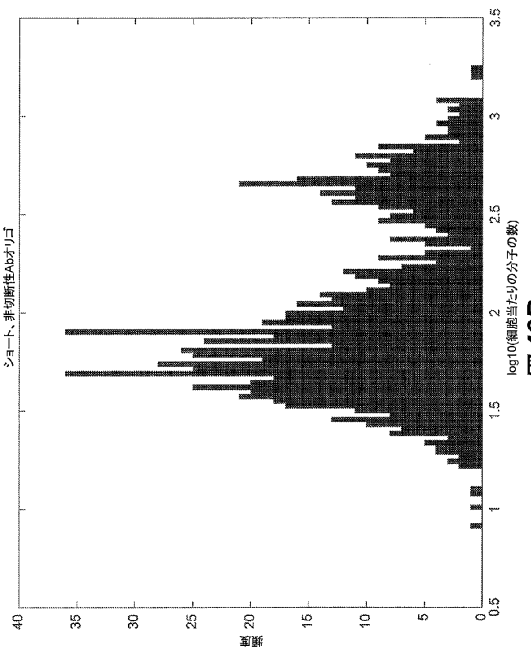


図40B

【図４０Ｃ】

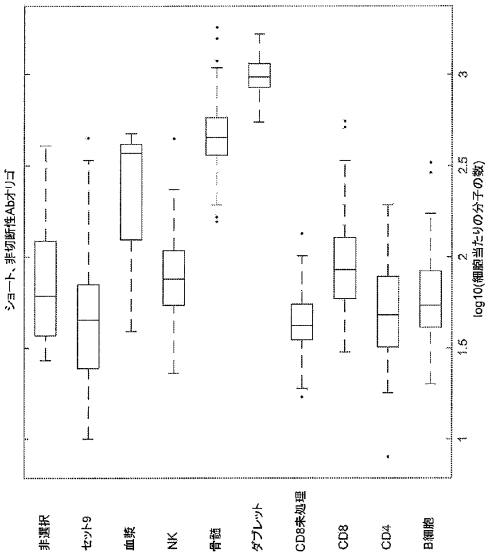


図 40C

【図４１Ａ】

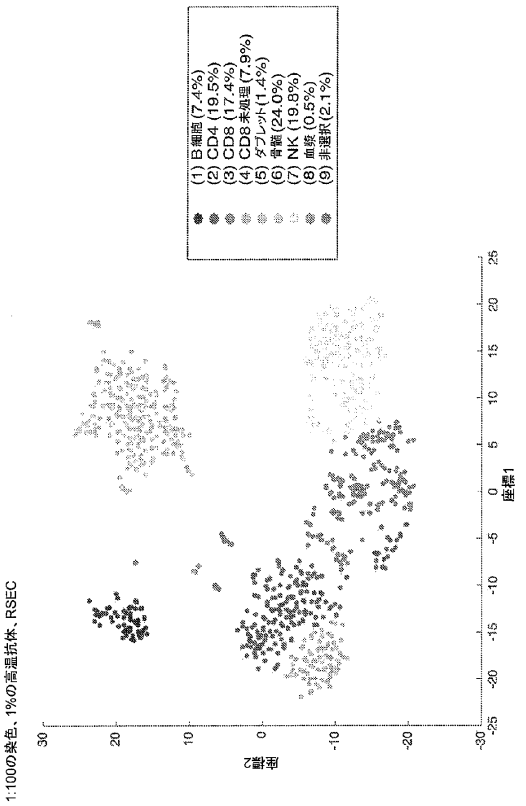


図 41A

【図４１Ｂ】

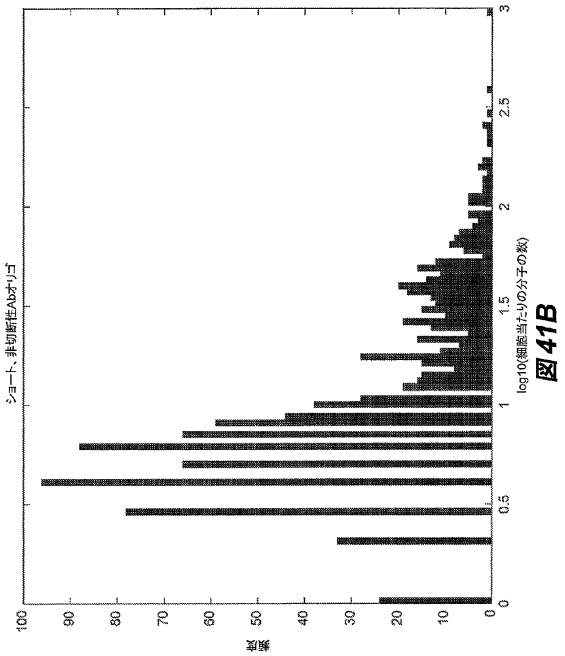


図 41B

【図４１Ｃ】

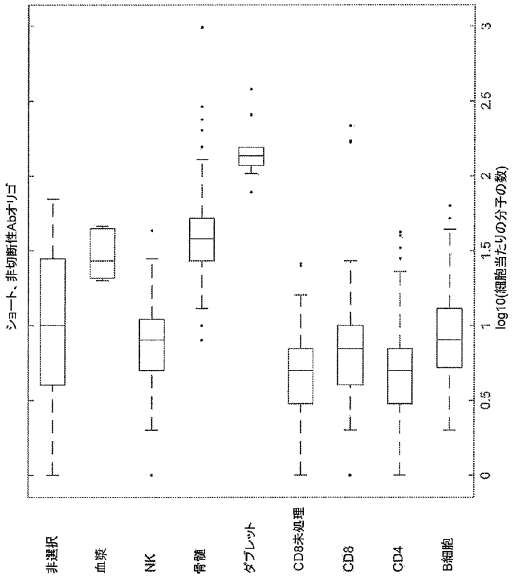


図 41C

【図４２Ａ】

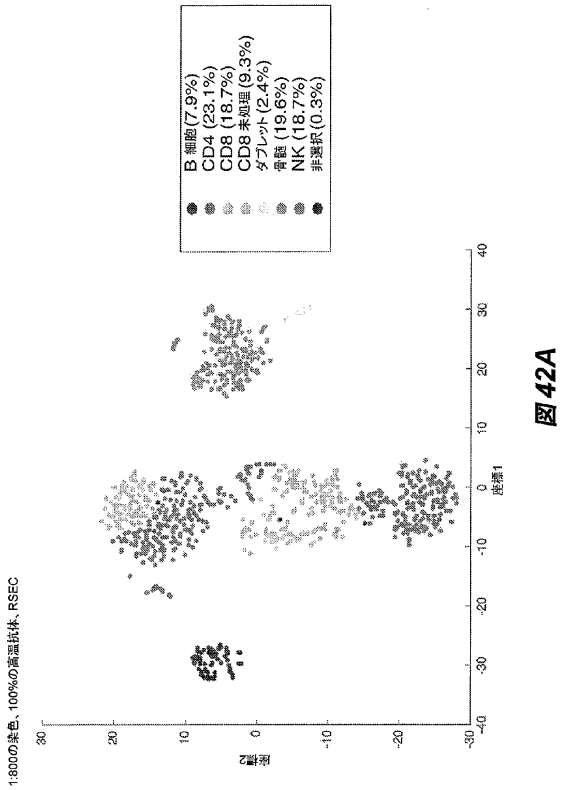


図 42A

【図４２Ｂ】

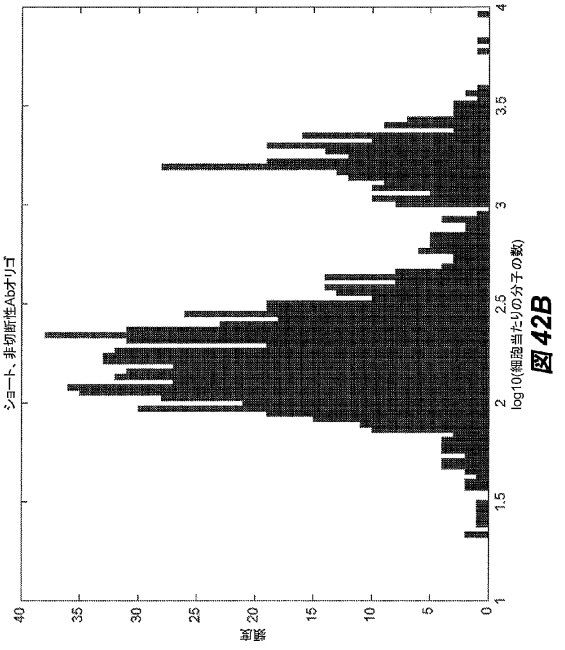


図 42B

【図４２Ｃ】

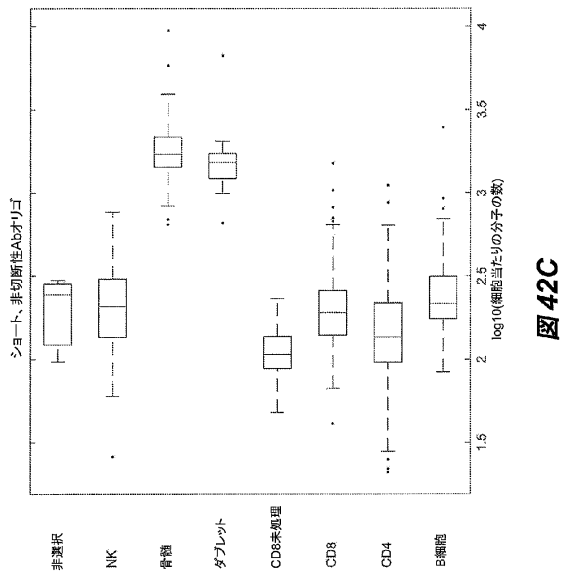


図 42C

【図４３Ａ－４３Ｂ】

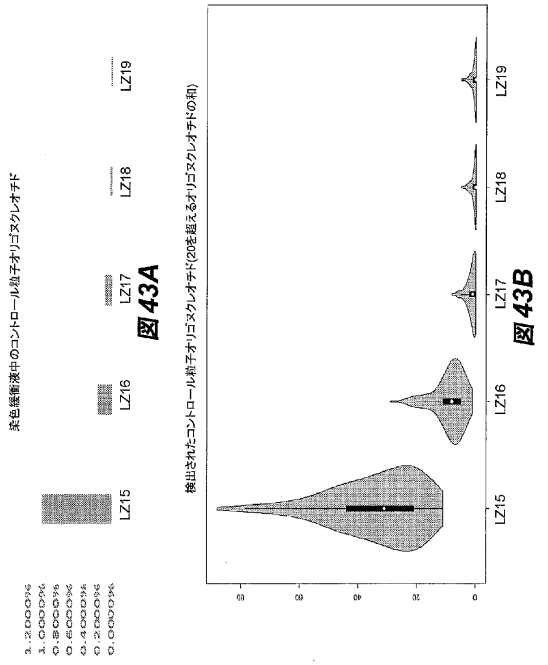


図 43A

図 43B

【図４４Ａ－４４Ｂ】

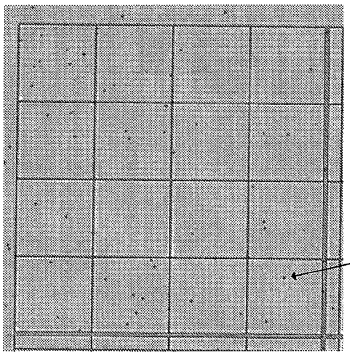


図44B

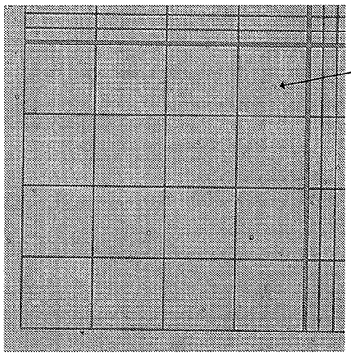


図44A

【図４５Ａ－４５Ｂ】

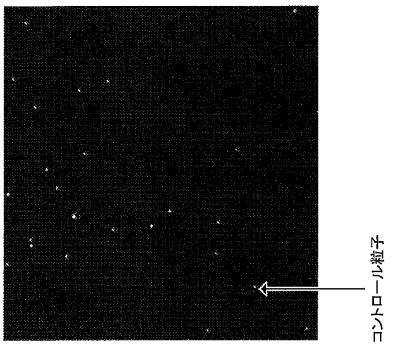


図45B

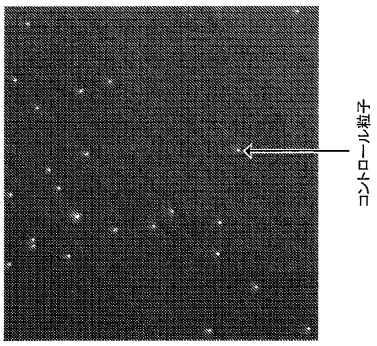


図45A

【図４６】

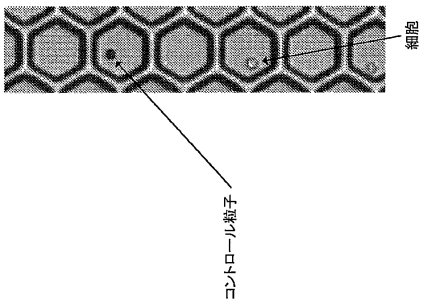


図46

【図４７Ａ】

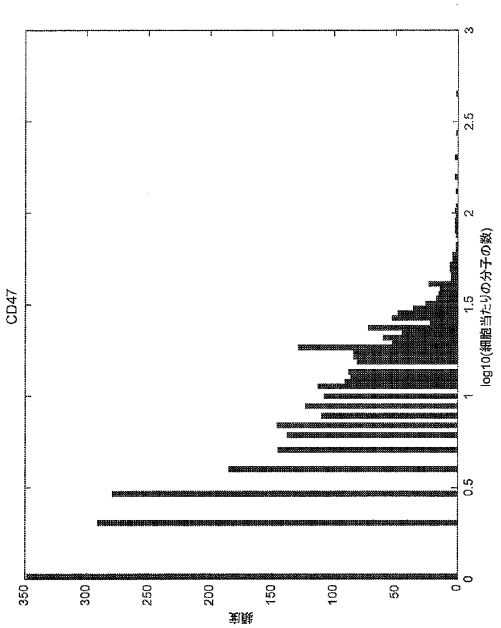


図47A

【図４７Ｂ】

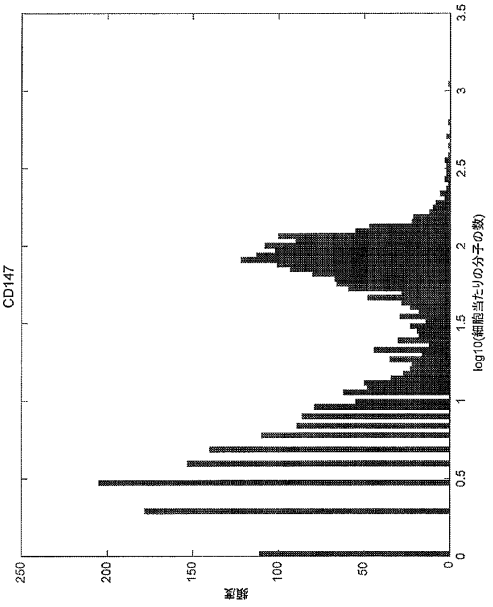


図 47B

【図４７Ｃ】

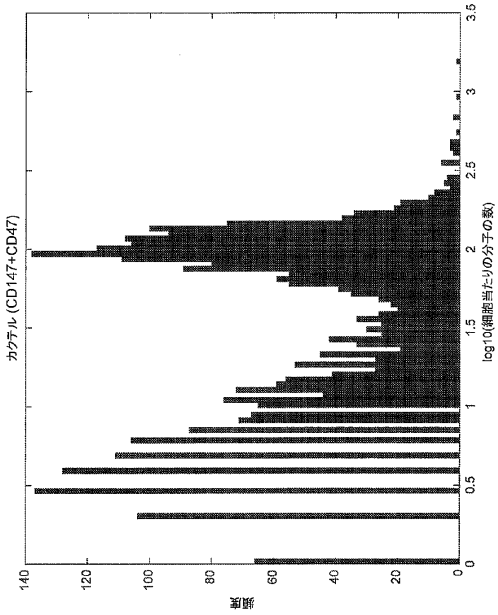


図 47C

【図４８】

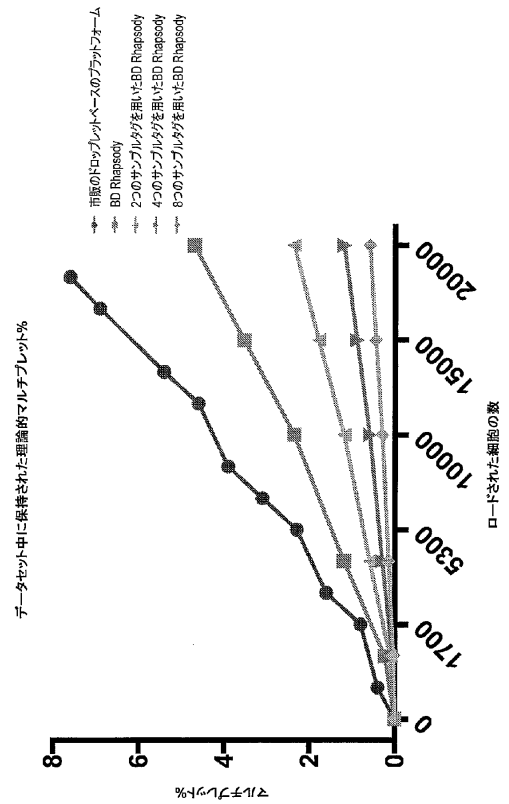


図 48

【図４９Ａ】

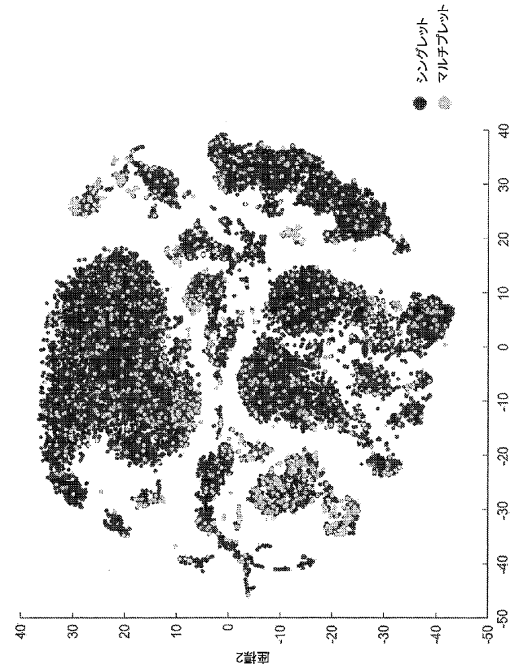


図 49A

【図４９Ｂ】

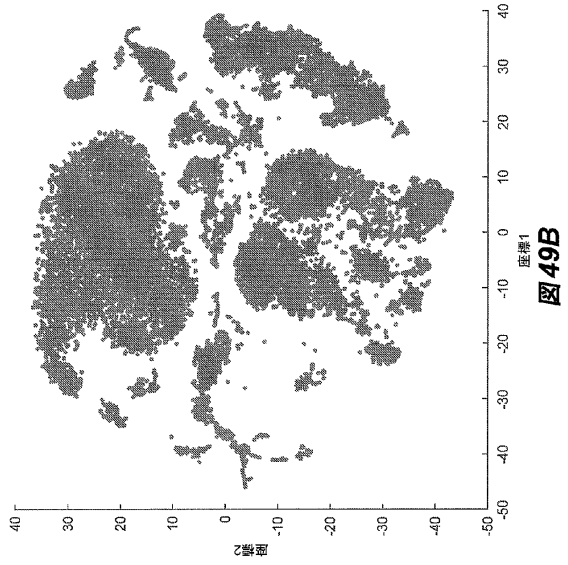


図49B

【図５０Ａ】

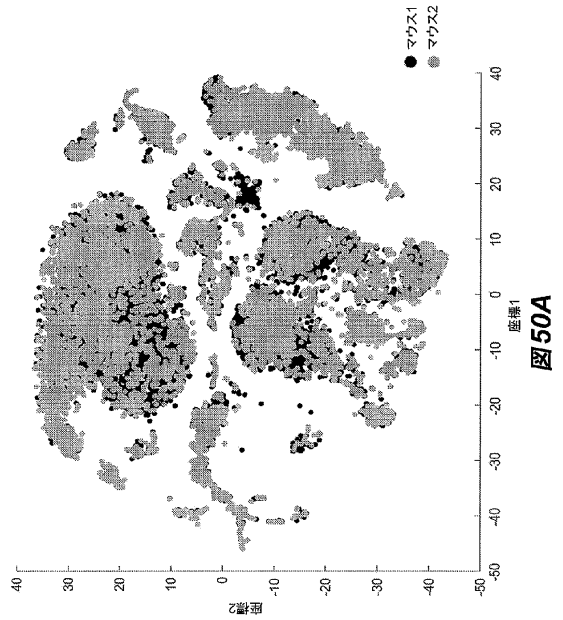


図50A

【図５０Ｂ－５０Ｃ】

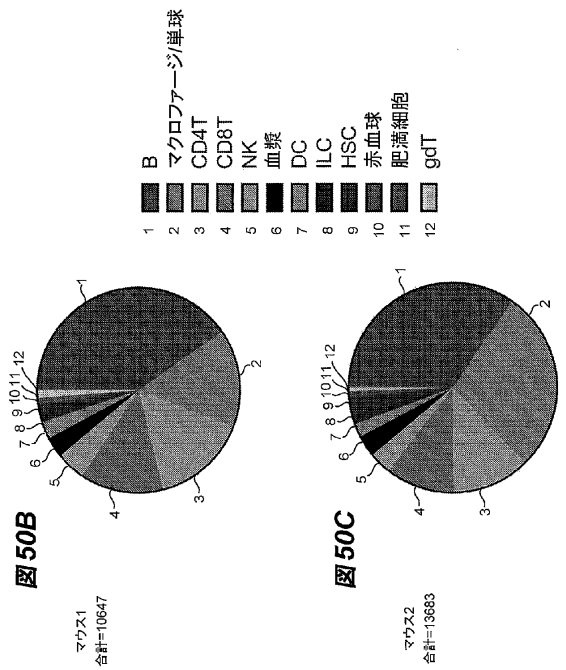


図50B

図50C

【図５１Ａ－５１Ｆ】

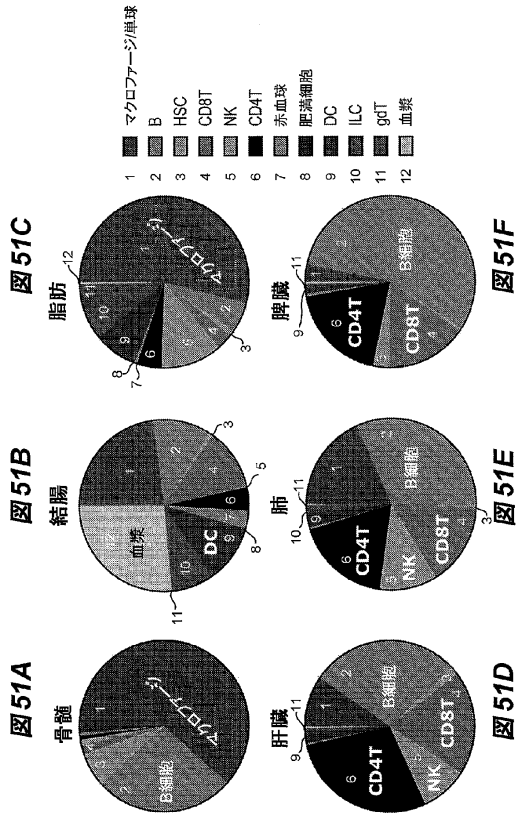


図51A

図51B

図51C

図51D

図51E

図51F

【図５２Ａ】

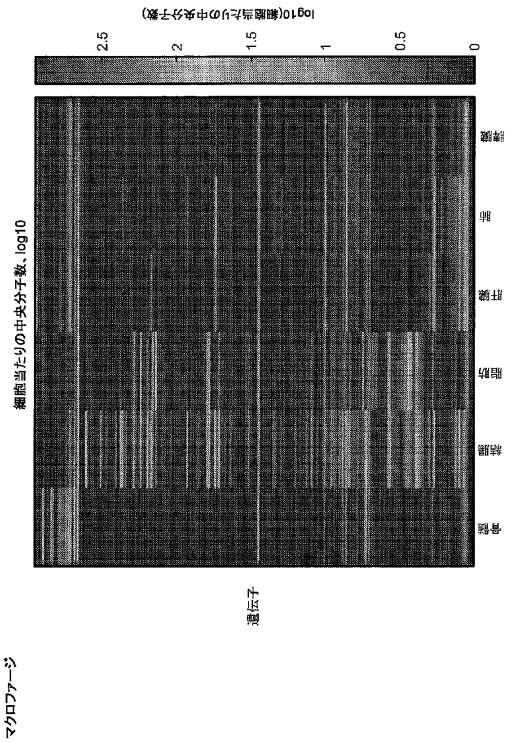


図52A

【図５２Ｂ】

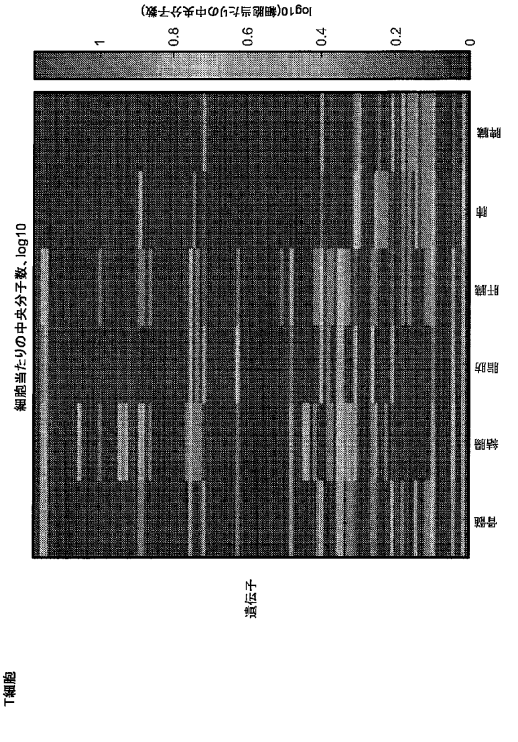


図52B

【図５２Ｃ】

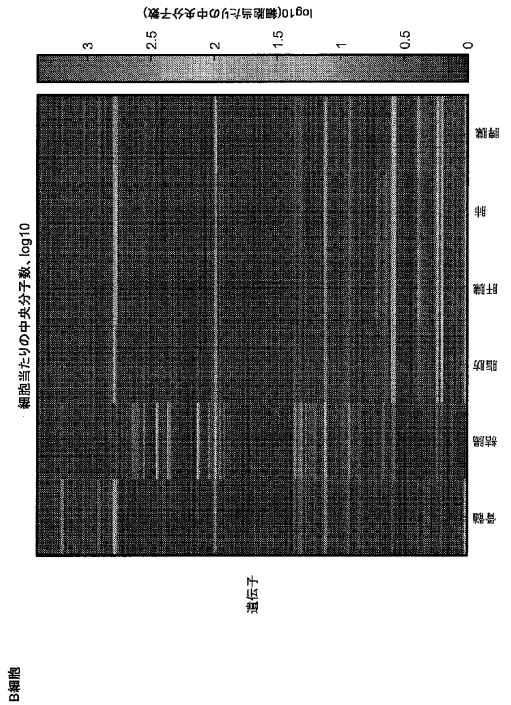


図52C

【図５３Ａ】

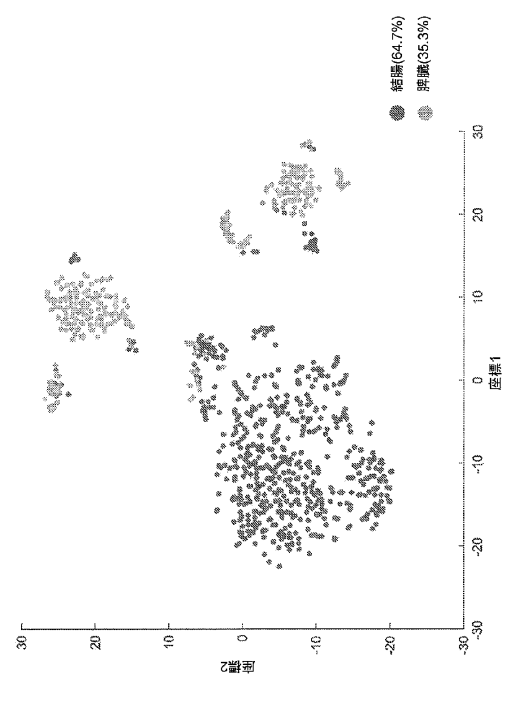


図53A

【図５３Ｂ】

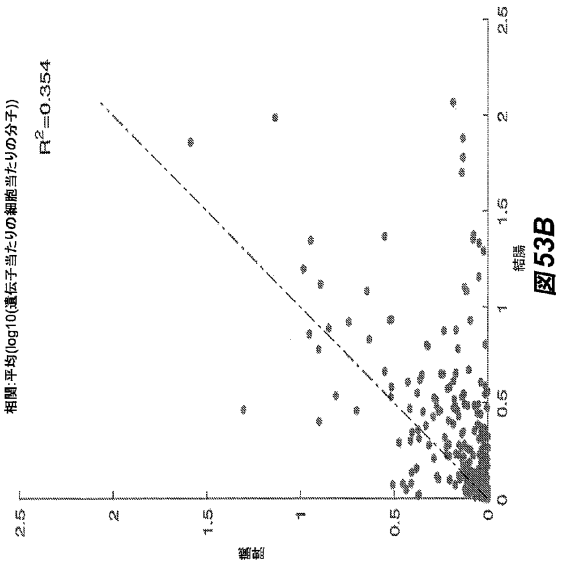


図53B

【図５３Ｃ】

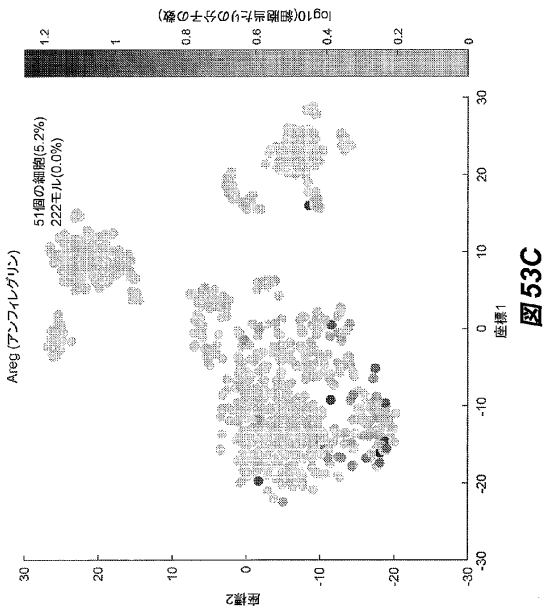


図53C

【図５３Ｄ】

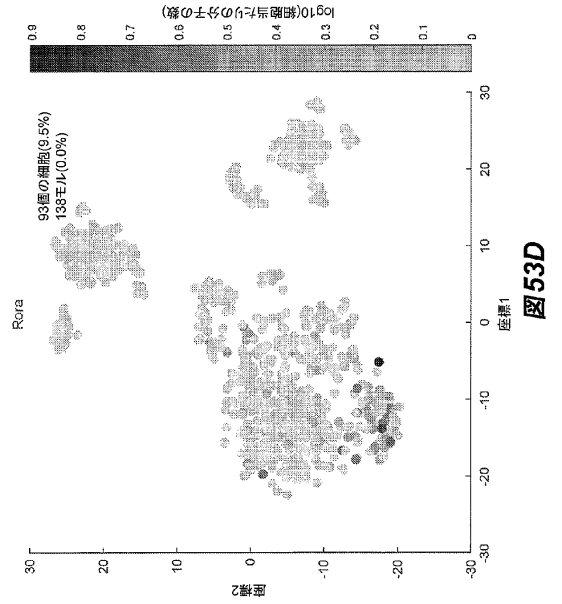


図53D

【図５４】

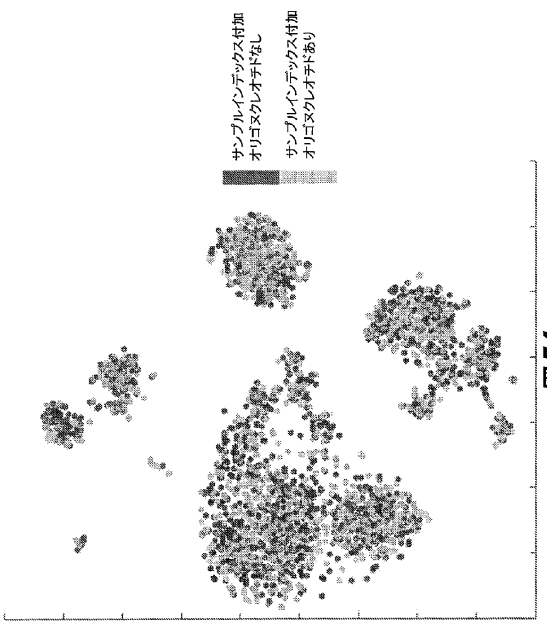


図54

【配列表】
0007536450000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12Q 1/686(2018.01)		C12Q	1/6813	Z
C12Q 1/6874(2018.01)		C12Q	1/686	Z
G01N 33/48 (2006.01)		C12Q	1/6874	Z
G01N 33/53 (2006.01)		G01N	33/48	P
G01N 33/543(2006.01)		G01N	33/53	D
G01N 33/566(2006.01)		G01N	33/53	Y
		G01N	33/543	501D
		G01N	33/566	

(31)優先権主張番号　62/532,905
(32)優先日　平成29年7月14日(2017.7.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/532,949
(32)優先日　平成29年7月14日(2017.7.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/532,971
(32)優先日　平成29年7月14日(2017.7.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/554,425
(32)優先日　平成29年9月5日(2017.9.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/578,957
(32)優先日　平成29年10月30日(2017.10.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/645,703
(32)優先日　平成30年3月20日(2018.3.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
早期審査対象出願

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　100123766
弁理士　松田 七重
(74)代理人　100168631
弁理士　佐々木 康匡
(72)発明者　チャン クリスティーナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者　ファン クリスティーナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者　シャム エリーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者 マーティン ジョディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者 バンサル ニダンジャリ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者 ガディアリ ジェイムズ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者 ラザルク キャサリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０
(72)発明者 ラム グレッチェン インボン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９４０２５ メンロー パーク キャンベル アベニュー ４０４０ スイート １１０

合議体
審判長 上條 肇
審判官 福井 悟
審判官 北田 祐介
(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１５／０３７６６０９（ＵＳ，Ａ１）
(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q1/00-3/00
C12N15/00-15/90
ＣＡＰＬＵＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）