

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-506418
(P2025-506418A)

(43)公表日 令和7年3月11日(2025.3.11)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
C 1 2 Q	1/48 (2006.01)	C 1 2 Q	1/48	Z	
C 1 2 Q	1/6874(2018.01)	C 1 2 Q	1/6874	Z	

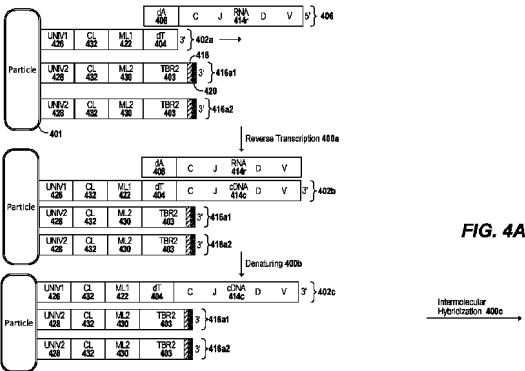
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全75頁)

(21)出願番号	特願2024-546189(P2024-546189)	(71)出願人	595117091
(86)(22)出願日	令和5年2月6日(2023.2.6)		ベクトン・ディキンソン・アンド・カン
(85)翻訳文提出日	令和6年8月2日(2024.8.2)		パニー
(86)国際出願番号	PCT/US2023/062070		BECTON, DICKINSON A
(87)国際公開番号	WO2023/150763		ND COMPANY
(87)国際公開日	令和5年8月10日(2023.8.10)		アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー 0
(31)優先権主張番号	63/307,559		7 4 1 7-1 8 8 0 フランクリン・レ
(32)優先日	令和4年2月7日(2022.2.7)		イクス ベクトン・ドライブ 1
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100109070
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),		弁理士 須田 洋之
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(	(74)代理人	100119013
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		弁理士 山崎 一夫
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100123777
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸の配列をさらに分析するための核酸の調製

(57)【要約】

本明細書の開示は、完全長全トランスクリプトーム分析 (WTA) のためのシステム、方法、組成物、及びキットを含む。一部の実施形態は、5' ベース、3' ベース、及び内部ベースの遺伝子発現プロファイリングを含む。一部の実施形態では、免疫レパートリープロファイリング方法も提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の核酸標的を標識するための方法であって、

核酸標的のコピーを第 1 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させるステップであって、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第 1 のユニバーサル配列、第 1 の分子標識、及び核酸標的にハイブリダイズすることが可能な第 1 の標的結合領域を含む、ステップと；

核酸標的のコピーにハイブリダイズした第 1 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させて、それぞれが第 1 のユニバーサル配列、第 1 の分子標識、及び核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子を生成するステップと；

10

バーコード化された核酸分子を、第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと、ハイブリダイゼーションのために接触させるステップであって、

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第 2 のユニバーサル配列、切断ドメイン、及びブロッキング基を含み、

ブロッキング基により、オリゴヌクレオチドバーコードの伸長を防止することが可能であり、ブロッキング基に対して 5' 側に切断ドメインが位置しており、切断ドメインがバーコード化された核酸分子にハイブリダイズすると、オリゴヌクレオチドバーコードを切断ドメインの内部又は切断ドメインに隣接した点において切断酵素により切断することが可能である、ステップと；

20

バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを切断酵素と接触させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドバーコードからブロッキング基を除去するステップと；

バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端を伸長させて、複数の伸長したバーコード化された核酸分子を生成するステップと、を含む、方法。

【請求項 2】

複数の伸長したバーコード化された核酸分子の各伸長したバーコード化された核酸分子が、核酸標的の少なくとも一部分の配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 3】

切断酵素が、リボヌクレアーゼ H 酵素及び／又はリボヌクレアーゼ H 2 酵素であり、リボヌクレアーゼ H 2 酵素が、パイロコッカス・アビシ (Pyrococcus abyssi) リボヌクレアーゼ H 2 酵素であってもよい、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

切断酵素が、耐熱性であり、且つ低温において活性が低下するホットスタート切断酵素である、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

ホットスタート切断酵素が、(a) G12A アミノ酸置換；(b) P13T アミノ酸置換；(c) G169A アミノ酸置換；又は (d) これらの組合せを含むパイロコッカス・アビシリボヌクレアーゼ H 2 である、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 6】

切断酵素が、化学修飾されたものである、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

切断酵素が、耐熱性であり、且つ低温において活性が低下する、化学修飾されたホットスタート切断酵素であり、切断酵素が、低温において抗体との相互作用によって可逆的に不活化するものであってもよい、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

切断ドメインが、リボヌクレアーゼ H 酵素によって切断することが可能な 1 つ又は複数

50

のリボヌクレオチドを含む、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

切断ドメインが、以下の部分：DNA 残基、脱塩基残基、修飾ヌクレオシド、又は修飾リン酸ヌクレオチド間連結のうちの 1 つ又は複数を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

切断ドメインが、少なくとも 1 つの RNA 塩基を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

切断ドメインが、1 つ又は複数の 2' - 修飾ヌクレオシドを含み、1 つ又は複数の修飾ヌクレオシドが、2' - フルオロヌクレオシドであってもよい、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

ブロッキング基が、オリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端ヌクレオチドに結合している、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

ブロッキング基が、オリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端にある又はその近傍にある、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

ブロッキング基が、2' , 3' - ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド残基、2' , 3' - SHヌクレオチド、又は 2' - O - P O 3ヌクレオチドである、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

ブロッキング基が、非ヌクレオチド修飾を含む、請求項 1～14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

ブロッキング基が、ナフチル-アゾ化合物、スペーサー及び／又はビオチンをさらに含む、請求項 1～15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端を伸長させるステップが、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼを用いて第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端を伸長させるステップを含む、請求項 1～16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼを用いて第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端を伸長させるステップにより、第 1 の分子標識の相補体及び第 1 のユニバーサル配列の相補体を含む伸長したバーコード化された核酸分子を生成することが可能である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端を伸長させるステップが、鎖置換活性を有さない DNA ポリメラーゼを用いて第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの 3' 末端を伸長させるステップを含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

ポリメラーゼが、Phi 29 DNA ポリメラーゼ、E. coli DNA ポリメラーゼ I、Bsu DNA ポリメラーゼ、Bst DNA ポリメラーゼ、Taq DNA ポリメラーゼ、VENT (商標) DNA ポリメラーゼ、DEEP VENT (商標) DNA ポリメラーゼ、Long Amp (登録商標) Taq DNA ポリメラーゼ、Long Amp (登録商標) Hot Start Taq DNA ポリメラーゼ、Crimson Long Amp (登録商標) Taq DNA ポリメラーゼ、Crimson Taq DNA ポ

10

20

30

40

50

リメラーゼ、OneTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、OneTaq（登録商標）Quick-Load（登録商標）DNAポリメラーゼ、Hemo KlenTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、REDTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ、Phusion（登録商標）High-Fidelity DNAポリメラーゼ、Platinum Pfx DNAポリメラーゼ、AccuPrime Pfx DNAポリメラーゼ、Klenow断片、Pwo DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、これらの誘導体、又はこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項1～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップが、中温性DNAポリメラーゼ、好熱性DNAポリメラーゼ、好冷性DNAポリメラーゼ、又はこれらの任意の組合せを使用してオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む、請求項1～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップが、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性及び3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠くDNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含み、DNAポリメラーゼが、Klenow断片を含んでもよい、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップが、逆転写酵素を使用して第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップを含む、請求項1～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

逆転写酵素が、末端転移酵素活性の能力がある、請求項1～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

鎖置換活性を有する逆転写酵素が、PrimeScript逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素、SmartScribe逆転写酵素、Maxima H Minus逆転写酵素、及び／又はSuperscript II逆転写酵素である、請求項1～24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

逆転写酵素が、ウイルス逆転写酵素を含み、ウイルス逆転写酵素が、マウス白血病ウイルス（MLV）逆転写酵素又はモロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素であってもよい、請求項1～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第2の分子標識を含み、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個が、異なる第2の分子標識配列を含み、各第2の分子標識が少なくとも6個のヌクレオチドを含んでもよく、さらに、第2の分子標識配列がランダム配列であってもよい、請求項1～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードが、バーコード化された核酸分子に、第2の分子標識と核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列との間のハイブリダイゼーションによってハイブリダイズしている、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第2の標的結合領域を含む、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

10

20

30

40

50

第 1 の標的結合領域及び／又は第 2 の標的結合領域が、ポリ（d A）領域、ポリ（d T）領域、ランダム配列、遺伝子特異的配列、又はこれらの任意の組合せを含む、請求項 1 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードが、バーコード化された核酸分子に、第 2 の標的結合領域と核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列との間のハイブリダイゼーションによってハイブリダイズしている、請求項 1 ～ 30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも 10 個が、異なる第 2 の標的結合領域を含み、標的結合領域のうちの少なくとも 2 つが、異なる核酸標的の相補体に結合することが可能であってもよく、さらに、標的結合領域のうちの少なくとも 2 つが、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズすることが可能であってもよい、請求項 1 ～ 31 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 3 3】

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの 2 つ以上のオリゴヌクレオチドバーコードが、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズして、2 つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子を生成することが可能である、請求項 1 ～ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

20

前記 2 つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子が、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズする第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの 2 つ以上のオリゴヌクレオチドバーコードによって生成することが可能である、請求項 1 ～ 33 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 2 つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子が、核酸標的の少なくとも約 50 % 全体の配列を合わせて含む、請求項 1 ～ 34 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 6】

複数のバーコード化された核酸分子を変性させるステップを含む、請求項 1 ～ 35 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 3 7】

複数の伸長したバーコード化された核酸分子を変性させるステップを含む、請求項 1 ～ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

複数のバーコード化された核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第 1 の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第 1 の分子標識、別個の配列を有する第 2 の分子標識、又はそれらの組合せの数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 4 0】

核酸標的のコピー数を決定するステップが、

複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子のうちのバーコード化された核酸分子、若しくはその産物と会合した、別個の配列を有する第 1 の分子標識の数；及び／又は

複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む、複数の伸長したバーコード化された核酸分子のうちの伸長したバーコード化された核酸分子と会合した、別個の配列を有する第 1 の分子標識、別個の配列を有する第 2 の分子標識、若しくはそれらの組合せの数

50

に基づいて、試料中の複数の核酸標的のそれぞれのコピー数を決定するステップを含む、請求項 1～39 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 41】

複数の核酸標的のそれぞれの配列が、複数の核酸標的のそれぞれの部分配列を含む、請求項 1～40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

複数のバーコード化された核酸分子内の核酸標的の配列が、核酸標的の部分配列を含む、請求項 1～41 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 43】

核酸標的が、mRNA を含む、請求項 1～42 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 44】

試料が、単一細胞、任意に、免疫細胞、さらに任意に、B 細胞又は T 細胞を含む、請求項 1～43 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 45】

試料が、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、又はこれらの任意の組合せを含む、請求項 1～44 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 46】

単一細胞が、循環腫瘍細胞を含む、請求項 44～45 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 47】

第 1 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードの第 1 のユニバーサル配列が、第 1 の分子標識及び第 1 の標的結合領域に対して 5' 側にある；並びに／又は

20

第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードの第 2 のユニバーサル配列が、第 2 の分子標識及び／若しくは第 2 の標的結合領域に対して 5' 側にある、

請求項 1～46 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 48】

増幅プライマー及び第 1 のユニバーサル配列を含むプライマー又はその一部を使用して複数のバーコード化された核酸分子を増幅させて、それによって、核酸標的の配列又はその一部を含む第 1 の複数の単一標識核酸分子を生成するステップを含み、

30

試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップが、第 1 の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第 1 の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む、請求項 1～47 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 49】

増幅プライマー及び第 2 のユニバーサル配列又はその一部を含むプライマーを使用して複数の伸長したバーコード化された核酸分子を増幅させて、それによって、核酸標的の配列又はその一部を含む第 2 の複数の単一標識核酸分子を生成するステップを含み、

試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップが、第 2 の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第 2 の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む、

40

請求項 1～48 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 50】

増幅プライマーが、第 4 のユニバーサル配列を含む、請求項 48～49 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 51】

増幅プライマーが、標的特異的プライマーである、請求項 48～50 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 52】

標的特異的プライマーが、免疫受容体、免疫受容体の定常領域、免疫受容体の可変領域

50

、免疫受容体の多様性領域、及び／又は免疫受容体の可変領域と多様性領域の接合部に特異的にハイブリダイズする、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

免疫受容体が、T 細胞受容体（TCR）及び／又は B 細胞受容体（BCR）受容体であり、

TCR が、TCR アルファ鎖、TCR ベータ鎖、TCR ガンマ鎖、TCR デルタ鎖、又はこれらの任意の組合せを含んでもよく、

BCR 受容体が、BCR 重鎖及び／又は BCR 軽鎖を含んでもよい、
請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ランダムプライマーを複数のバーコード化された核酸分子にハイブリダイズさせ、ランダムプライマーを伸長させて、第 1 の複数の伸長産物を生成するステップであって、ランダムプライマーが、第 3 のユニバーサル配列又はその相補体を含む、ステップと；

第 3 のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、及び第 1 のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第 1 の複数の伸長産物を増幅させて、それによって、第 3 の複数の単一標識核酸分子又はその産物を生成するステップと、
を含む、請求項 1 ～ 5 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップが、第 3 の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第 1 の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む、請求項 1 ～ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

ランダムプライマーを複数の伸長したバーコード化された核酸分子にハイブリダイズさせ、ランダムプライマーを伸長させて第 2 の複数の伸長産物を生成するステップであって、ランダムプライマーが、第 3 のユニバーサル配列又はその相補体を含む、ステップと；

第 3 のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、及び第 2 のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第 2 の複数の伸長産物を増幅させて、それによって、第 4 の複数の単一標識核酸分子又はその産物を生成するステップと、
を含む、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 7】

試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップが、第 4 の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第 2 の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む、請求項 1 ～ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 8】

第 1 のユニバーサル配列、第 2 のユニバーサル配列、第 3 のユニバーサル配列、及び／又は第 4 のユニバーサル配列が、同じである、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 9】

第 1 のユニバーサル配列、第 2 のユニバーサル配列、第 3 のユニバーサル配列、及び／又は第 4 のユニバーサル配列が、異なる、請求項 1 ～ 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 0】

第 1 のユニバーサル配列、第 2 のユニバーサル配列、第 3 のユニバーサル配列、及び／又は第 4 のユニバーサル配列が、シーケンシングプライマー及び／又はシーケンシングアダプターの結合性部位、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部を含む、請求項 1 ～ 5 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 1】

シーケンシングアダプターが、P 5 配列、P 7 配列、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部を含む、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

シーケンシングプライマーが、リード 1 シーケンシングプライマー、リード 2 シーケンシングプライマー、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部を含む、請求項 6 0 ～ 6 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

複数のバーコード化された核酸分子又はその産物の配列情報を得るステップを含む、請求項 1 ～ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

配列情報を得るステップが、シーケンシングアダプターを、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物に結合させるステップを含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物の配列情報を得るステップを含む、請求項 1 ～ 6 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

配列情報を得るステップが、シーケンシングアダプターを、伸長したバーコード化された核酸分子、バーコード化された核酸分子、その産物、又はこれらの任意の組合せに結合させるステップを含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

第 1、第 2、第 3、及び第 4 の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの 1 つ又は複数の配列情報を得るステップを含む、請求項 1 ～ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法

【請求項 6 8】

配列情報を得るステップが、シーケンシングアダプターを、第 1、第 2、第 3、及び第 4 の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの 1 つ又は複数の結合させるステップを含む、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

第 1、第 2、第 3、及び第 4 の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの 1 つ又は複数の配列情報を得るステップが、

第 1、第 2、第 3、及び第 4 の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの 1 つ又は複数の複数のシーケンシングリードを含むシーケンシングデータを得るステップを含み、

複数のシーケンシングリードのそれぞれが、(1) 細胞標識配列、(2) 分子標識配列、及び／又は(3) 核酸標的の部分配列を含む、請求項 6 7 ～ 6 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 0】

試料の単一細胞を示す、それぞれ固有の細胞標識配列について、

核酸標的の複数のシーケンシングリードのそれぞれをアライメントさせて、核酸標的のアライメントされた配列を生成するステップを含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

核酸標的のアライメントされた配列が、核酸標的の c D N A 配列の少なくとも 5 0 %、核酸標的の c D N A 配列の少なくとも 7 0 %、核酸標的の c D N A 配列の少なくとも 9 0 %、又は核酸標的の c D N A 配列の完全長を含む、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

核酸標的が、免疫受容体であり、免疫受容体が、B C R 軽鎖、B C R 重鎖、T C R アルファ鎖、T C R ベータ鎖、T C R ガンマ鎖、T C R デルタ鎖、又はこれらの任意の組合せを含んでもよい、請求項 1 ～ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

核酸標的のアライメントされた配列が、相補性決定領域 1 (C D R 1)、相補性決定領域 2 (C D R 2)、相補性決定領域 3 (C D R 3)、可変領域、可変領域の完全長、又はこれらの組合せを含む、請求項 7 0 ～ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 74】

核酸標的のアライメントされた配列が、可変領域、多様性領域、可変領域、多様性領域及び／又は定常領域の接合部、又はこれらの任意の組合せを含む、請求項 70～73 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 75】

配列情報を得るステップが、単一細胞の B C R 軽鎖及び B C R 重鎖の配列情報を得るステップを含み、

B C R 軽鎖及び B C R 重鎖の配列情報が、B C R 軽鎖及び／若しくは B C R 重鎖の、相補性決定領域 1 (C D R 1)、C D R 2、C D R 3、若しくはこれらの任意の組合せの配列を含み、

方法が、得られた配列情報に基づいて、単一細胞の B C R 軽鎖と B C R 重鎖を対合させるステップを含む；並びに／又は

試料が、複数の単一細胞を含み、方法が、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも 50 % の B C R 軽鎖と B C R 重鎖を対合させるステップを含む、請求項 63～74 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 76】

配列情報を得るステップが、単一細胞の T C R アルファ鎖及び T C R ベータ鎖の配列情報を得るステップを含み、

T C R アルファ鎖及び T C R ベータ鎖の配列情報が、T C R アルファ鎖及び／若しくは T C R ベータ鎖の、相補性決定領域 1 (C D R 1)、C D R 2、C D R 3、若しくはこれらの任意の組合せの配列を含み、

方法が、得られた配列情報に基づいて、単一細胞の T C R アルファ鎖と T C R ベータ鎖を対合させるステップを含む；並びに／又は

試料が、複数の単一細胞を含み、方法が、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも 50 % の T C R アルファ鎖と T C R ベータ鎖を対合させるステップを含む、請求項 63～75 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 77】

配列情報を得るステップが、単一細胞の T C R ガンマ鎖及び T C R デルタ鎖の配列情報を得るステップを含み；

T C R ガンマ鎖及び T C R デルタ鎖の配列情報が、T C R ガンマ鎖及び／若しくは T C R デルタ鎖の、相補性決定領域 1 (C D R 1)、C D R 2、C D R 3、若しくはこれらの任意の組合せの配列を含み；

方法が、得られた配列情報に基づいて、単一細胞の T C R ガンマ鎖と T C R デルタ鎖を対合させるステップを含む；並びに／又は

試料が、複数の単一細胞を含み、方法が、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも 50 % の T C R ガンマ鎖と T C R デルタ鎖を対合させるステップを含む、請求項 63～76 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 78】

分子標識の相補体が、分子標識の逆相補配列又は分子標識の相補配列を含む、請求項 1～77 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 79】

複数のバーコード化された核酸分子が、バーコード化されたデオキシリボ核酸 (D N A) 分子、バーコード化されたリボ核酸 (R N A) 分子、又はこれらの組合せを含む、請求項 1～78 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 80】

核酸標的が、核酸分子を含み、核酸分子が、リボ核酸 (R N A)、メッセンジャー R N A (m R N A)、マイクロ R N A、低分子干渉 R N A (s i R N A)、R N A 分解産物、ポリ (A) テールを含む R N A、又はこれらの任意の組合せを含んでもよく、さらに、m R N A が免疫受容体をコードしてもよい、請求項 1～79 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 81】

核酸標的が、細胞成分結合試薬を含む、且つ／又は、核酸分子が、細胞成分結合試薬に会合しており、方法が、核酸分子と細胞成分結合試薬を解離させるステップをさらに含んでもよい、請求項 1～80 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 82】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも 10 個が、異なる分子標識配列を含む、請求項 1～81 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 83】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識が、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む、請求項 1～82 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 84】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードが、固体支持体と会合している、請求項 1～83 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 85】

同じ固体支持体に会合している第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードがそれぞれ、同一の試料標識を含む、請求項 1～84 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 86】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識が、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む、請求項 1～85 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 87】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードがそれぞれ、細胞標識を含む、請求項 1～86 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 88】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識が、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む、請求項 1～87 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 89】

同じ固体支持体に会合している第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードが、同じ細胞標識を含む、請求項 1～88 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 90】

異なる固体支持体に会合している第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードが、異なる細胞標識を含む、請求項 1～89 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 91】

エチレングリコール、ポリエチレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、グリセロール、ホルムアミド、7-デアザ-GTP、アセトアミド、塩化テトラメチルアンモニウム塩、ベタイン、又はこれらの任意の組合せのうちの 1 つ又は複数の存在下で、オリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップを含む、請求項 1～90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 92】

固体支持体が、合成粒子、平面表面、又はこれらの組合せを含む、請求項 1～91 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

試料が、単一細胞を含み、方法が、第 1 及び第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、試料中の単一細胞と会合させるステップを含む、請求項 1～92 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 94】

合成粒子を単一細胞と会合させた後に、単一細胞を溶解させるステップを含み、単一細胞を溶解させるステップが、試料を加熱するステップ、試料を界面活性剤と接触させるステップ、試料の pH を変更するステップ、又はこれらの任意の組合せを含んでもよい、請求項 1～93 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 95】

合成粒子と単一細胞が、同じ区画中にあり、区画がウェル又は液滴であってもよい、請求項 1～94 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 96】

第 1 及び／若しくは第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドバーコードが、合成粒子上に固定化されているか若しくは部分的に固定化されている、又は第 1 及び／若しくは第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドバーコードが、合成粒子内に封入されているか若しくは部分的に封入されている、請求項 1～95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

合成粒子が、崩壊可能であり、崩壊可能なハイドロゲル粒子であってもよく、

合成粒子が、ビーズを含み、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、磁性ビーズ、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若しくはこれらの任意の組合せであってもよい；及び／又は

合成粒子が、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、ハイドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、及びこ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、

請求項 1～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 98】

第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、リンカー官能基を含み、

合成粒子が、固体支持体官能基を含み、

支持体官能基及びリンカー官能基が、互いに会合しており、リンカー官能基及び支持体官能基が、それぞれに、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択されてもよい、

請求項 1～97 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

請求項 1～98 のいずれか 1 項に記載の第 1 及び第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの一方又は両方に会合した固体支持体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. § 119 (e) のもとに、2022 年 2 月 7 日に出願された米国仮特許出願第 63／307,559 号の利益を主張し、この関連出願の内容は、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

本開示は、概して、分子生物学の分野に関し、より具体的には、分子バーコード化を使用するマルチオミクス分析に関する。

分子バーコード化の方法及び技法は、例えば、逆転写、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅、及び次世代シーケンシング（NGS）を使用して、細胞の状態を決定するために、遺伝子発現プロファイルを解読することなど、単一細胞トランスクリプトミクス分析に有用である。分子バーコード化はまた、単一細胞プロテオミクス分析にも有用である。核酸標的の 5' 末端及び 3' 末端の一方又は両方における分子バーコード化のための方法及び

10

20

30

40

50

技法に対する必要性が存在する。細胞の遺伝子発現を効率的に定量的に分析することができる組成物、システム及び方法に対する必要性が存在する。核酸標的の内部領域の配列を得ることができる組成物、システム及び方法に対する必要性が存在する。核酸標的の完全長配列を得ることができる組成物、システム及び方法に対する必要性が存在する。

【発明の概要】

【0003】

本明細書の開示は、試料中の核酸標的を標識するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させるステップであって、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第1のユニバーサル配列、第1の分子標識、及び核酸標的にハイブリダイズすることが可能な第1の標的結合領域を含む、ステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーにハイブリダイズした第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させて、それぞれが第1のユニバーサル配列、第1の分子標識、及び核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子を生成するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子を、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと、ハイブリダイゼーションのために接触させるステップを含む。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2のユニバーサル配列、切断ドメイン、及びブロッキング基 (blocking group) を含む。一部の実施形態では、ブロッキング基により、オリゴヌクレオチドバーコードの伸長を防止することが可能であり、ブロッキング基に対して5'側に切断ドメインが位置しており、切断ドメインがバーコード化された核酸分子にハイブリダイズすると、オリゴヌクレオチドバーコードを切断ドメインの内部又は切断ドメインに隣接した点において切断酵素により切断することが可能である。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを切断酵素と接触させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドバーコードからブロッキング基を除去するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させて、複数の伸長したバーコード化された核酸分子を生成するステップを含む。

【0004】

一部の実施形態では、複数の伸長したバーコード化された核酸分子の各伸長したバーコード化された核酸分子は、核酸標的の少なくとも一部分の配列を含む。一部の実施形態では、切断酵素は、リボヌクレアーゼH酵素及び／又はリボヌクレアーゼH2酵素であり、リボヌクレアーゼH2酵素は、パイロコッカス・アビシ (Pyrococcus abyssi) リボヌクレアーゼH2酵素であってもよい。一部の実施形態では、切断酵素は、耐熱性であり、且つ低温において活性が低下するホットスタート切断酵素である。一部の実施形態では、ホットスタート切断酵素は、(a) G12Aアミノ酸置換；(b) P13Tアミノ酸置換；(c) G169Aアミノ酸置換；又は(d) これらの組合せを含むパイロコッカス・アビシリボヌクレアーゼH2である。一部の実施形態では、切断酵素は、化学修飾されたものである。一部の実施形態では、切断酵素は、耐熱性であり、且つ低温において活性が低下する、化学修飾されたホットスタート切断酵素であり、切断酵素は、低温において抗体との相互作用によって可逆的に不活化するものであってもよい。一部の実施形態では、切断ドメインは、リボヌクレアーゼH酵素によって切断することが可能な1つ又は複数のリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、以下の部分：DNA残基、脱塩基残基、修飾ヌクレオシド、又は修飾リン酸ヌクレオチド間連結のうちの1つ又は複数を含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、少なくとも1つのRNA塩基を含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、1つ又は複数の2'-修飾ヌクレオシドを含み、1つ又は複数の修飾ヌクレオシドは2'-フルオロヌクレオシドであってもよい。一部の実施形態では、ブロッキング基は、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端ヌクレオチドに結合している。一部の実施形態では、ブロッキング基は、オリゴヌ

クレオチドバーコードの3'末端にある又はその近傍にある。一部の実施形態では、ブロッキング基は、2', 3'-ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド残基、2', 3'-SHヌクレオチド、又は2'-O-PQヌクレオチドである。一部の実施形態では、ブロッキング基は、非ヌクレオチド修飾を含む。一部の実施形態では、ブロッキング基は、ナフチルアゾ化合物、スパーサー及び／又はビオチンをさらに含む。

【0005】

一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを用いて第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを用いて第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップにより、第1の分子標識の相補体及び第1のユニバーサル配列の相補体を含む伸長したバーコード化された核酸分子を生成することが可能である。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、鎖置換活性を有さないDNAポリメラーゼを用いて第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Phi29 DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼI、Bsu DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、VENT (商標) DNAポリメラーゼ、DEEPVENT (商標) DNAポリメラーゼ、LongAmp (登録商標) Taq DNAポリメラーゼ、LongAmp (登録商標) Hot Start Taq DNAポリメラーゼ、Crimson LongAmp (登録商標) Taq DNAポリメラーゼ、Crimson Taq DNAポリメラーゼ、OneTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、OneTaq (登録商標) Quick-Load (登録商標) DNAポリメラーゼ、HemoKlenTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、REDTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ、Phusion (登録商標) High-Fidelity DNAポリメラーゼ、Platinum Pfx DNAポリメラーゼ、AccuPrime Pfx DNAポリメラーゼ、Klenow断片、Pwo DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、これらの誘導体、又はこれらの任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、中温性DNAポリメラーゼ、好熱性DNAポリメラーゼ、好冷性DNAポリメラーゼ、又はこれらの任意の組合せを使用してオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性及び3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠くDNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含み、DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含んでもよい。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップは、逆転写酵素を使用して第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、逆転写酵素は、末端転移酵素活性の能力がある。一部の実施形態では、鎖置換活性を有する逆転写酵素は、PrimeScript逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素、SmartScribe逆転写酵素、Maxima H Minus逆転写酵素、及び／又はSuperscript II逆転写酵素である。一部の実施形態では、逆転写酵素は、ウイルス逆転写酵素を含み、ウイルス逆転写酵素は、マウス白血病ウイルス (MLV) 逆転写酵素又はモロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 逆転写酵素であってもよい。

【0006】

一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2の分子標識を含み、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコード

のうちの少なくとも10個は、異なる第2の分子標識配列を含み、各第2の分子標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含んでもよく、さらに、第2の分子標識配列は、ランダム配列であってもよい。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、バーコード化された核酸分子に、第2の分子標識と核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列との間のハイブリダイゼーションによってハイブリダイズしている。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2の標的結合領域を含む。一部の実施形態では、第1の標的結合領域及び／又は第2の標的結合領域は、ポリ(dA)領域、ポリ(dT)領域、ランダム配列、遺伝子特異的配列、又はこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードは、バーコード化された核酸分子に、第2の標的結合領域と核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列との間のハイブリダイゼーションによってハイブリダイズしている。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる第2の標的結合領域を含み、標的結合領域のうちの少なくとも2つは、異なる核酸標的の相補体に結合することが可能であってもよく、さらに、標的結合領域のうちの少なくとも2つは、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズすることが可能であってもよい。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの2つ以上のオリゴヌクレオチドバーコードが、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズして、2つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子を生成することが可能である。一部の実施形態では、前記2つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子は、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズする第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの2つ以上のオリゴヌクレオチドバーコードによって生成することが可能である。一部の実施形態では、前記2つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子は、核酸標的の少なくとも約50%全体の配列を合わせて含む。

10

20

30

40

50

【0007】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化された核酸分子を変性させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の伸長したバーコード化された核酸分子を変性させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化された核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識、別個の配列を有する第2の分子標識、又はそれらの組合せの数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、核酸標的のコピー数を決定するステップは、複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子のうちのバーコード化された核酸分子、若しくはその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数；及び／又は複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む、複数の伸長したバーコード化された核酸分子のうちの伸長したバーコード化された核酸分子と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識、別個の配列を有する第2の分子標識、若しくはそれらの組合せの数に基づいて、試料中の複数の核酸標的のそれぞれのコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、複数の核酸標的のそれぞれの配列は、複数の核酸標的のそれぞれの部分配列を含む。一部の実施形態では、複数のバーコード化された核酸分子内の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含む。一部の実施形態では、核酸標的は、mRNAを含む。一部の実施形態では、試料は、単一細胞、任意に、免疫細胞、さらに任意に、B細胞又はT細胞を含む。一部の実施形態では、試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、又はこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、単一細胞は、循環腫瘍細胞を含む。

【0008】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードの第1のユニバーサル配列は、第1の分子標識及び第1の標的結合領域に対して5'側にある；及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴ

ヌクレオチドバーコードの第2のユニバーサル配列は、第2の分子標識及び／又は第2の標的結合領域に対して5'側にある。

【0009】

一部の実施形態では、本方法は、増幅プライマー及び第1のユニバーサル配列を含むプライマー又はその一部を使用して複数のバーコード化された核酸分子を増幅させて、それによって、核酸標的の配列又はその一部を含む第1の複数の単一標識核酸分子を生成するステップを含み、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第1の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、増幅プライマー及び第2のユニバーサル配列又はその一部を含むプライマーを使用して複数の伸長したバーコード化された核酸分子を増幅させて、それによって、核酸標的の配列又はその一部を含む第2の複数の単一標識核酸分子を生成するステップを含み、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第2の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第2の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、増幅プライマーは、第4のユニバーサル配列を含む。一部の実施形態では、増幅プライマーは、標的特異的プライマーである。一部の実施形態では、標的特異的プライマーは、免疫受容体、免疫受容体の定常領域、免疫受容体の可変領域、免疫受容体の多様性領域、及び／又は免疫受容体の可変領域と多様性領域の接合部に特異的にハイブリダイズする。一部の実施形態では、免疫受容体は、T細胞受容体（TCR）及び／又はB細胞受容体（BCR）受容体であり、TCRは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、又はこれらの任意の組合せを含んでもよく、BCR受容体は、BCR重鎖及び／又はBCR軽鎖を含む。

10

20

【0010】

一部の実施形態では、本方法は、ランダムプライマーを複数のバーコード化された核酸分子にハイブリダイズさせ、ランダムプライマーを伸長させて、第1の複数の伸長産物を生成するステップであって、ランダムプライマーが、第3のユニバーサル配列又はその相補体を含む、ステップと；第3のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、及び第1のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第1の複数の伸長産物を増幅させて、それによって、第3の複数の単一標識核酸分子又はその産物を生成するステップとを含む。一部の実施形態では、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第3の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、ランダムプライマーを複数の伸長したバーコード化された核酸分子にハイブリダイズさせ、ランダムプライマーを伸長させて第2の複数の伸長産物を生成するステップであって、ランダムプライマーが、第3のユニバーサル配列又はその相補体を含む、ステップと；第3のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、及び第2のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第2の複数の伸長産物を増幅させて、それによって、第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物を生成するステップとを含む。一部の実施形態では、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第2の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。

30

40

【0011】

一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、第3のユニバーサル配列、及び／又は第4のユニバーサル配列は、同じである。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、第3のユニバーサル配列、及び／又は第4のユニバーサル配列は、異なる。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、第3のユニバーサル配列、及び／又は第4のユニバーサル配

50

列は、シーケンシングプライマー及び／又はシーケンシングアダプターの結合性部位、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部分を含む。一部の実施形態では、シーケンシングアダプターは、P5配列、P7配列、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部分を含む。一部の実施形態では、シーケンシングプライマーは、リード1シーケンシングプライマー、リード2シーケンシングプライマー、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部分を含む。

【0012】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化された核酸分子又はその産物の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、シーケンシングアダプターを、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物に結合させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、シーケンシングアダプターを、伸長したバーコード化された核酸分子、バーコード化された核酸分子、その産物、又はこれらの任意の組合せに結合させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、シーケンシングアダプターを、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の組合せに結合させるステップを含む。一部の実施形態では、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の配列情報を得るステップは、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の複数のシーケンシングリードを含むシーケンシングデータを得るステップを含み、複数のシーケンシングリードのそれぞれが、(1)細胞標識配列、(2)分子標識配列、及び／又は(3)核酸標的の部分配列を含む。

【0013】

一部の実施形態では、本方法は、試料の単一細胞を示す、それぞれ固有の細胞標識配列について、核酸標的の複数のシーケンシングリードのそれぞれをアライメントさせて、核酸標的のアライメントされた配列を生成するステップを含む。一部の実施形態では、核酸標的のアライメントされた配列は、核酸標的のcDNA配列の少なくとも50%、核酸標的のcDNA配列の少なくとも70%、核酸標的のcDNA配列の少なくとも90%、又は核酸標的のcDNA配列の完全長を含む。一部の実施形態では、核酸標的は免疫受容体であり、免疫受容体は、BCR軽鎖、BCR重鎖、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、又はこれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、核酸標的のアライメントされた配列は、相補性決定領域1(CDR1)、相補性決定領域2(CDR2)、相補性決定領域3(CDR3)、可変領域、可変領域の完全長、又はこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、核酸標的のアライメントされた配列は、可変領域、多様性領域、可変領域、多様性領域及び／若しくは定常領域の接合部、又はこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、単一細胞のBCR軽鎖及びBCR重鎖の配列情報を得るステップを含み、BCR軽鎖及びBCR重鎖の配列情報は、BCR軽鎖及び／又はBCR重鎖の、相補性決定領域1(CDR1)、CDR2、CDR3、又はこれらの任意の組合せの配列を含んでもよい。一部の実施形態では、方法は、得られた配列情報に基づいて、単一細胞のBCR軽鎖とBCR重鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、試料は、複数の単一細胞を含み、本方法は、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも50%のBCR軽鎖とBCR重鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、単一細胞のTCRアルファ鎖及びTCRベータ鎖の配列情報を得るステップを含み、TCRアルファ鎖及びTCRベータ鎖の配列情報は、TCRアルファ鎖及び／又はTCRベータ鎖の、相補性決定領域1(CDR1)、CDR2、CDR3、又はこれらの任意の組合せの配列を含んでもよい。一部の実施形態では、本方法は、得られた配列情報に基づいて、単一細胞のTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖を対合させるステップを含む。一

部の実施形態では、試料は、複数の単一細胞を含み、本方法は、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも50%のTCRアルファ鎖とTCRベータ鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、単一細胞のTCRガンマ鎖及びTCRデルタ鎖の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、TCRガンマ鎖及びTCRデルタ鎖の配列情報は、TCRガンマ鎖及び／又はTCRデルタ鎖の、相補性決定領域1(CDR1)、CDR2、CDR3、又はこれらの任意の組合せの配列を含む。一部の実施形態では、本方法は、得られた配列情報に基づいて、単一細胞のTCRガンマ鎖とTCRデルタ鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、試料は、複数の単一細胞を含み、本方法は、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも50%のTCRガンマ鎖とTCRデルタ鎖を対合させるステップを含む。

10

【0014】

一部の実施形態では、分子標識の相補体は、分子標識の逆相補配列、又は分子標識の相補配列を含む。一部の実施形態では、複数のバーコード化された核酸分子は、バーコード化されたデオキシリボ核酸(DNA)分子、バーコード化されたりボ核酸(RNA)分子、又はこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、核酸標的は、核酸分子を含み、核酸分子は、リボ核酸(RNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)、マイクロRNA、低分子干渉RNA(siRNA)、RNA分解生成物、ポリ(A)テールを含むRNA、又はこれらの任意の組合せを含んでもよく、さらに、mRNAは、免疫受容体をコードしてもよい。一部の実施形態では、核酸標的は、細胞成分結合試薬を含む、且つ／又は、核酸分子は、細胞成分結合試薬に会合しており、方法は、核酸分子と細胞成分結合試薬を解離させるステップをさらに含んでもよい。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる分子標識配列を含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体と会合している。一部の実施形態では、同じ固体支持体に会合している第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードがそれぞれ、同一の試料標識を含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードはそれぞれ、細胞標識を含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、同じ固体支持体に会合している第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードは、同じ細胞標識を含む。一部の実施形態では、異なる固体支持体に会合している第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードは、異なる細胞標識を含む。一部の実施形態では、本方法は、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、1,2-プロパンジオール、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール、ホルムアミド、7-デアザ-GTP、アセトアミド、塩化テトラメチルアンモニウム塩、ベタイン、又はこれらの任意の組合せのうちの1つ又は複数の存在下で、オリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップを含む。

20

30

40

【0015】

一部の実施形態では、固体支持体は、合成粒子、平面表面、又はこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、試料は、単一細胞を含み、本方法は、第1及び第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、試料中の単一細胞と会合させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、合成粒子を単一細胞と会合させた後に、単一細胞を溶解させるステップを含み、単一細胞を溶解させるステップは、試料を加熱するステップ、試料を界面活性剤と接触させるステップ、試料のpHを変更するステップ、又はこれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、合成粒子と単一細胞は同じ区画中にあり、区画はウェル又は液滴であってもよい。一部の実施形態では、第1及び／若しくは第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つのオリゴヌクレオチド

50

バーコードは、合成粒子上に固定化されているか若しくは部分的に固定化されている、又は第1及び／若しくは第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つのオリゴヌクレオチドバーコードは、合成粒子内に封入されているか若しくは部分的に封入されている。一部の実施形態では、合成粒子は、崩壊可能であり、崩壊可能なハイドロゲル粒子であってもよい。一部の実施形態では、合成粒子が、ビーズを含み、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、磁性ビーズ、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若しくはこれらの任意の組合せであってもよい。一部の
10 実施形態では、合成粒子は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ハイドロゲル、常磁性体(paramagnetic)、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、又はこれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、リンカー官能基を含む。一部の実施形態では、合成粒子は、固体支持体官能基を含む。一部の実施形態では、支持体官能基及びリンカー官能基は、互いに会合しており、リンカー官能基及び支持体官能基は、それぞれに、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択されてもよい。
20

【0016】

一部の実施形態では、固体支持体が提供される。一部の実施形態では、第1及び第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの一方又は両方に会合した固体支持体が本明細書に開示される。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】非限定的な例示的バーコードを示す図である。

【図2】バーコード化及び電子計数の非限定的な例示的ワークフローを示す図である。

【図3】複数の標的から3'末端でバーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーを生成するための非限定的な例示的プロセスを示す略図である。
30

【図4A】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図4B】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図4C】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図4D】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。
40

【図4E】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図4F】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図4G】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列(例えば、免疫受容体のV(D)J領域)の決定及び完全長全トランスクリプト
50

ーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図 4 H】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体の V (D) J 領域) の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図 5 A】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体の V (D) J 領域) の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図 5 B】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体の V (D) J 領域) の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

10

【図 5 C】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体の V (D) J 領域) の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図 5 D】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体の V (D) J 領域) の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【図 5 E】本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体の V (D) J 領域) の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析 (W T A) の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0018】

以下の詳細な説明において、本明細書の一部を形成する添付の図面への参照がなされる。図面では、類似の記号は、文脈により別途示されない限り、典型的には類似の構成要素を特定する。詳細な説明、図面、及び特許請求の範囲に記載される例示的な実施形態は、制限することを意味するものではない。本明細書に提示される主題の趣旨又は範囲から逸脱することなく、他の実施形態を用いることができ、他の変更を行うことができる。概して本明細書に記載され、図面で図示されている本開示の態様は、広範な異なる構成で配置、置換え、組合せ、分離、及び設計がなされてもよく、それらのすべてが、本明細書において明示的に企図され、本明細書の開示の一部をなすことが、容易に理解される。

本明細書において参照されるすべての特許、公開特許出願、他の刊行物、及び G e n B a n k からの配列、並びに他のデータベースは、関連技術に関してその全体が参照により組み込まれる。

30

【0019】

少数の核酸、例えば、メッセンジャーリボヌクレオチド酸 (m R N A) 分子を定量することは、例えば、異なる発生段階にあるか又は異なる環境条件下にある細胞において発現される遺伝子を決定するために、臨床上重要である。しかしながら、特に分子の数が非常に少ない場合には、核酸分子 (例えば、m R N A 分子) の絶対数を決定することも非常に困難であり得る。試料中の分子の絶対数を決定する 1 つの方法は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) である。理想的には、P C R により、それぞれのサイクルで同一の分子コピーが得られる。しかしながら、P C R は、それぞれの分子が確率的な見込みで複製し、この見込みは、P C R サイクル及び遺伝子配列によって変動し、増幅バイアス及び不正確な遺伝子発現測定値をもたらすため、欠点を有し得る。固有の分子標識 (分子インデックス (M I) とも称される) を有する確率的バーコードを使用して、分子数を計数し、増幅バイアスを補正することができる。P r e c i s e (商標) アッセイ (C e l l u l a r R e s e a r c h , I n c . (P a l o A l t o , C A)) 及び R h a p s o d y (商標) アッセイ (B e c t o n , D i c k i n s o n a n d C o m p a n y (F r a n k l i n L a k e s , N J)) などの確率的バーコード化によって、P C R 及び逆転写 (R T) の間に m R N A を標識するために分子標識 (M L) を使用することによるライブラリー調製ステップによって誘導されるバイアスを補正することができる。

40

【0020】

50

P r e c i s e (商標) アッセイは、ポリ (T) オリゴヌクレオチドに、多数の、例えば、6561～65536個の固有の分子標識配列を有する確率的バーコードの枯渇しないプールを利用して、RTステップの間に試料中のすべてのポリ (A) -mRNAにハイブリダイズさせることができる。確率的バーコードは、ユニバーサルPCRプライミング部位を含み得る。RTの間に、標的遺伝子分子は、確率的バーコードとランダムに反応する。それぞれの標的分子は、確率的バーコードにハイブリダイズし、その結果、確率的にバーコード化された相補リボヌクレオチド酸 (cDNA) 分子を生成し得る。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得られた確率的にバーコード化されたcDNA分子を、PCR増幅及びシーケンシングのために単一のチューブにプールしてもよい。生のシーケンシングデータを分析して、リードの数、固有の分子標識配列を有する確率的バーコードの数、及びmRNA分子の数を得ることができる。

10

【0021】

本明細書の開示は、試料中の核酸標的を標識するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させるステップであって、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第1のユニバーサル配列、第1の分子標識、及び核酸標的にハイブリダイズすることが可能な第1の標的結合領域を含む、ステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーにハイブリダイズした第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させて、それぞれが第1のユニバーサル配列、第1の分子標識、及び核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子を生成するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子を、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと、ハイブリダイゼーションのために接触させるステップを含む。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2のユニバーサル配列、切断ドメイン、及びブロッキング基を含む。一部の実施形態では、ブロッキング基により、オリゴヌクレオチドバーコードの伸長を防止することが可能であり、ブロッキング基に対して5'側に切断ドメインが位置しており、切断ドメインがバーコード化された核酸分子にハイブリダイズすると、オリゴヌクレオチドバーコードを切断ドメインの内部又は切断ドメインに隣接した点において切断酵素により切断することが可能である。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを切断酵素と接触させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドバーコードからブロッキング基を除去するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させて、複数の伸長したバーコード化された核酸分子を生成するステップを含む。一部の実施形態では、固体支持体が提供される。一部の実施形態では、第1及び第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの一方又は両方に会合した固体支持体が本明細書に開示される。

20

30

【0022】

定義

別途定義されない限り、本明細書に使用さ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って広く理解されているものと同じ意味を有する。例えば、Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY 1989)を参照されたい。本開示の目的で、次の用語を、以下に定義する。

40

【0023】

本明細書で使用される場合、「アダプター」という用語は、会合した核酸の増幅又はシーケンシングを容易にするための配列を意味し得る。会合した核酸は、標的核酸を含み得る。会合した核酸は、空間標識、標的標識、試料標識、インデックス化標識、又はバーコード配列 (例えば、分子標識) のうちの1つ又は複数を含み得る。アダプターは、線形で

50

あり得る。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もよい。アダプターは、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。1つ又は複数のアダプターが、核酸の5'末端又は3'末端に配置され得る。アダプターが5'末端及び3'末端に公知の配列を含む場合、公知の配列は、同じ配列であっても異なる配列であってもよい。ポリヌクレオチドの5'末端及び／又は3'末端に配置されるアダプターは、表面に固定化された1つ又は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可能であり得る。アダプターは、一部の実施形態では、ユニバーサル配列を含み得る。ユニバーサル配列は、2つ以上の核酸分子に共通しているヌクレオチド配列の領域であり得る。2つ以上の核酸分子はまた、異なる配列の領域を有し得る。したがって、例えば、5'アダプターは、同一及び／又はユニバーサル核酸配列を含み得、3'アダプターは、同一及び／又はユニバーサル配列を含み得る。複数の核酸分子の異なるメンバーにユニバーサル配列が存在し得ることにより、ユニバーサル配列に相補的である単一のユニバーサルプライマーを使用した複数の異なる配列の複製又は増幅が可能となり得る。同様に、少なくとも1つ、2つ（例えば、1対）、又はそれ以上のユニバーサル配列が、核酸分子の集合体の異なるメンバーに存在し得ることにより、ユニバーサル配列に相補的である少なくとも1つ、2つ（例えば、1対）、又はそれ以上の単一のユニバーサルプライマーを使用した複数の異なる配列の複製又は増幅が可能となり得る。したがって、ユニバーサルプライマーには、そのようなユニバーサル配列にハイブリダイズすることができる配列が含まれる。標的核酸配列を有する分子を、異なる標的核酸配列の一方又は両方の末端にユニバーサルアダプター（例えば、非標的核酸配列）を付加するように改変してもよい。標的核酸に結合した1つ又は複数のユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマーのハイブリダイゼーションのための部位を提供し得る。標的核酸に結合した1つ又は複数のユニバーサルプライマーは、互いに同じであっても異なってもよい。

10

20

30

40

50

【0024】

本明細書で使用される場合、「会合した」又は「と会合した」という用語は、2つ以上の種が、ある時点で一緒に位置しているとして特定可能であることを意味し得る。会合は、2つ以上の種が、類似の容器内にあるか又はそこにあったことを意味し得る。会合は、情報的会合であってもよい。例えば、2つ以上の種に関するデジタル情報は、記憶され得、種のうちの1つ又は複数がある時点で一緒に位置していたことを決定するために使用され得る。会合はまた、物理的会合であってもよい。一部の実施形態では、2つ以上の会合した種は、互いに又は共通の固体若しくは半固体表面に「係留されている」、「結合している」、又は「固定化されている」。会合は、ビーズなどの固体又は半固体支持体に標識を結合させるための共有結合的又は非共有結合的手段を指し得る。会合は、標的と標識との間の共有結合であってもよい。会合は、2つの分子（例えば、標的分子及び標識）間のハイブリダイゼーションを含み得る。

【0025】

本明細書で使用される場合、「相補的」という用語は、2つのヌクレオチド間の正確な対合の能力を指し得る。例えば、核酸の所与の位置にあるヌクレオチドが、別の核酸のヌクレオチドと水素結合することができる場合、2つの核酸は、その位置において互いに相補的であると考えられる。2つの一本鎖核酸分子間の相補性は、ヌクレオチドのうちのいくつかが結合する「部分的」であってもよく、又は一本鎖分子間に全相補性が存在する完全なものであってもよい。第1のヌクレオチド配列は、第1のヌクレオチド配列が第2のヌクレオチド配列に相補的である場合、第2の配列の「相補体」とであると称され得る。第1のヌクレオチド配列は、第1のヌクレオチド配列が第2の配列の逆転物である（すなわち、ヌクレオチドの順序が逆転している）配列に相補的である場合、第2の配列の「逆相補体」とであると称され得る。本明細書で使用される場合、「相補」配列は、配列の「相補体」又は「逆相補体」を指し得る。ある分子が別の分子にハイブリダイズすることができる場合、それは、ハイブリダイズしている分子に相補的であるか、又は部分的に相補的であり得ることが、本開示から理解される。

【0026】

本明細書で使用される場合、「デジタル計数」という用語は、試料中の標的分子の数を概算するための方法を指し得る。デジタル計数は、試料中の標的と会合している固有の標識の数を決定するステップを含み得る。本質的に確率的であり得るこの方法論は、分子計数の問題を、同一の分子の位置決定及び同定のうちの1つを、事前に定義した標識セットの検出に関する一連のはい／いい式のデジタル質問に変換する。

【0027】

本明細書で使用される場合、「標識」又は「複数の標識」という用語は、試料内の標的と会合した核酸コードを指し得る。標識は、例えば、核酸標識であり得る。標識は、全体的又は部分的に増幅可能な標識であってもよい。標識は、全体的又は部分的にシーケンシング可能な標識であってもよい。標識は、異なるものとして特定可能な天然の核酸の一部
10
分であってもよい。標識は、公知の配列であってもよい。標識は、核酸配列の接合部、例えば、天然及び非天然の配列の接合部を含み得る。本明細書で使用される場合、「標識」という用語は、「インデックス」、「タグ」、又は「標識タグ」という用語と互換可能に使用することができる。標識は、情報を運ぶことができる。例えば、様々な実施形態では、標識は、試料の同一性、試料の供給源、細胞の同一性、及び／又は標的を判定するために使用することができる。

【0028】

本明細書で使用される場合、「枯渇しないリザーバ」という用語は、多数の異なる標識で構成されるバーコード（例えば、確率的バーコード）のプールを指し得る。枯渇しないリザーバは、枯渇しないリザーバを標的のプールと会合させたときに、それぞれの標的が
20
固有のバーコードと会合する可能性が高くなるように、多数の異なるバーコードを含み得る。それぞれの標識した標的分子の固有性は、ランダム選択の統計学によって決定することができ、標識の多様性と比較して、集団内の同一な標的分子のコピー数に依存する。結果として得られる標識した標的分子のサイズは、バーコード化プロセスの確率的性質によって決定することができ、次いで、検出されたバーコードの数の分析により、もともとの集団又は試料中に存在している標的分子数の計算が可能となる。存在する標的分子の数対固有のバーコードの数の比が、低い場合、標識した標的分子は、固有性が高い（すなわち、1つを上回る標的分子が1つの所与の標識で標識されることになる確率は非常に低い）。

【0029】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド配列又はその断片を指す。核酸は、ヌクレオチドを含み得る。核酸は、細胞に対して外因性であっても内因性であってもよい。核酸は、無細胞環境で存在してもよい。核酸は、遺伝子又はその断片であり得る。核酸は、DNAであり得る。核酸は、RNAであり得る。核酸は、1つ又は複数のアナログ（例えば、改変された骨格、糖、又は核酸塩基）を含み得る。アナログの一部の非限定的な例としては、5-ブロモウラシル、ペプチド核酸、ゼノ核酸、モルホリノ、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コーディセピン、7-デアザ-GTP、フルオロフォア（例えば、糖に連結し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、ビオチン連結ヌクレオチド、蛍光塩基
40
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、シュードウリジン、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、互換可能に使用することができる。

【0030】

核酸は、新しいか又は亢進された特性（例えば、改善された安定性）を有する核酸をもたらすように、1つ又は複数の改変（例えば、塩基改変、骨格改変）を含んでもよい。核酸は、核酸親和性タグを含んでもよい。ヌクレオシドは、塩基-糖の組合せであり得る。ヌクレオシドの塩基部分は、複素環式塩基であり得る。そのような複素環式塩基の2つのもっと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で連結されたリン酸基をさらに含んだヌクレオシドであり得る。ペ
50

ントフラノシル糖を含むヌクレオシドについては、リン酸基は、糖の2'、3'、又は5'ヒドロキシル部分に連結され得る。核酸を形成する際、リン酸基は、隣接するヌクレオシドを互いに共有結合的に連結させて、線形ポリマー化合物を形成し得る。次に、この線形ポリマー化合物のそれぞれの末端が、さらに結合されて、環状化合物が形成され得るが、線形化合物が、一般的には好適である。加えて、線形化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有し得、したがって、完全又は部分的に二本鎖の化合物が生じるような様式でフォールディングし得る。核酸内において、リン酸基は、一般に、核酸のヌクレオシド間骨格を形成すると称され得る。連結又は骨格は、3'と5'のホスホジエステル連結であり得る。

【0031】

核酸は、改変された骨格及び／又は改変されたヌクレオシド間連結を含み得る。改変された骨格には、骨格にリン原子を保持するもの及び骨格にリン原子を有さないものが含まれ得る。リン原子の中に含む好適な改変された核酸骨格としては、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチル及び他のアルキルホスホネート、例えば、3'-アルキレンホスホネート、5'-アルキレンホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、ホスホロアミデート、例えば、3'-アミノホスホロアミデート及びアミノアルキルホスホロアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホロアミデート、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、及びノルマル3'-5'連結を有するボラノホスフェート、2'-5'連結アナログ、並びに逆極性を有するものを挙げることができ、ここで、1つ又は複数のヌクレオチド間連結は、3'と3'、5'と5'、又は2'と2'の連結である。

【0032】

核酸は、短鎖アルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子及びアルキル若しくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、又は1つ若しくは複数のヘテロ原子若しくは複素環式ヌクレオシド間連結によって形成されるポリヌクレオチド骨格を含み得る。これらには、モルホリノ連結（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）を有するもの、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、並びに混合N、O、S、及びCH₂成分部分を有するその他のものを挙げることができる。

【0033】

核酸は、核酸模倣体を含み得る。「模倣体」という用語は、フラノース環のみ、又はフラノース環及びヌクレオチド間連結の両方が、非フラノース基で置き換えられた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また、糖代理物であると称され得る。複素環式塩基部分又は改変された複素環式塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために維持され得る。1つのそのような核酸は、ペプチド核酸（PNA）であり得る。PNAでは、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格、特に、アミノエチルグリシン骨格で置き換えられ得る。ヌクレオチドは保持されてもよく、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化合物における骨格は、2つ以上の連結されたアミノエチルグリシン単位を含み得、これにより、PNAにアミド含有骨格が提供される。複素環式塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的又は間接的に結合され得る。

核酸は、モルホリノ骨格構造を含み得る。例えば、核酸は、リボース環の代わりに6員モルホリノ環を含み得る。これらの実施形態のうちのいくつかでは、ホスホロジアミデート又は他の非ホスホジエステルヌクレオシド間連結により、ホスホジエステル連結を置き換えることができる。

【0034】

核酸は、モルホリノ環に結合した複素環式塩基を有する連結されたモルホリノ単位（例

10

逆極

30

40

50

例えば、モルホリノ核酸)を含み得る。連結基は、モルホリノ核酸においてモルホリノモノマー単位を連結し得る。非イオン性モルホリノベースのオリゴマー化合物は、細胞内タンパク質との望ましくない相互作用をあまり有さない可能性がある。モルホリノベースのポリヌクレオチドは、核酸の非イオン性模倣体であり得る。モルホリノクラス内の様々な化合物は、異なる連結基を使用して結合することができる。ポリヌクレオチド模倣体のさらなるクラスは、シクロヘキセニル核酸 (CeNA) と称され得る。核酸分子に通常存在するフラノース環を、シクロヘキセニル環で置き換えることができる。CeNA DMTで保護されたホスホロアミダイトモノマーを調製し、ホスホロアミダイトケミストリーを使用したオリゴマー化合物の合成に使用することができる。CeNAモノマーを核酸鎖に組み込むことにより、DNA/RNAハイブリッドの安定性を増加させることができる。CeNAオリゴアデニレートは、天然の複合体に類似する安定性で、核酸相補体と複合体を形成することができる。さらなる改変には、2'-ヒドロキシル基が糖環の4'炭素原子に連結され、それによって2'-C, 4'-C-オキシメチレン連結が形成され、それによって二環式糖部分が形成される、ロックド核酸 (LNA) を挙げることができる。連結は、2'酸素原子及び4'炭素原子を架橋するメチレン (-C₂H₄) 基であり得、ここで、nは、1又は2である。LNA及びLNAアナログは、相補性核酸との非常に高い二重鎖熱安定性 (T_m=+3~+10℃)、3'-エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、及び良好な可溶性特性を示し得る。

10

【0035】

核酸はまた、核酸塩基 (単純に「塩基」と称されることが多い) 改変又は置換も含み得る。本明細書で使用される場合、「改変されていない」又は「天然の」核酸塩基としては、プリン塩基 (例えば、アデニン (A) 及びグアニン (G))、並びにピリミジン塩基 (例えば、チミン (T)、シトシン (C)、及びウラシル (U)) を挙げることができる。改変された核酸塩基としては、他の合成及び天然の核酸塩基、例えば、5-メチルシトシン (5-me-C)、5-ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、2-アミノアデニン、アデニン及びグアニンの6-メチル及び他のアルキル誘導体、アデニン及びグアニンの2-プロピル及び他のアルキル誘導体、2-チオウラシル、2-チオチミン及び2-チオシトシン、5-ハロウラシル及びシトシン、ピリミジン塩基の5-プロピニル (-C≡C-CH₃) ウラシル及びシトシン、並びに他のアルキル誘導体、6-アゾウラシル、シトシン及びチミン、5-ウラシル (シュドウラシル)、4-チオウラシル、8-ハロ、8-アミノ、8-チオール、8-チオアルキル、8-ヒドロキシル、及び他の8-置換アデニン及びグアニン、5-ハロ、特に5-ブロモ、5-トリフルオロメチル、及び他の5-置換ウラシル及びシトシン、7-メチルグアニン及び7-メチルアデニン、2-F-アデニン、2-アミノアデニン、8-アザグアニン及び8-アザアデニン、7-デアザグアニン及び7-デアザアデニン、並びに3-デアザグアニン及び3-デアザアデニンを挙げることができる。改変された核酸塩基としては、三環式ピリミジン、例えば、フェノキサジンシチジン (1H-ピリミド (5, 4-b) (1, 4) ベンゾキサジン-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)、G-クランプ、例えば、置換フェノキサジンシチジン (例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド (5, 4-(b) (1, 4) ベンゾキサジン-2 (3H)-オン)、フェノチアジンシチジン (1H-ピリミド (5, 4-b) (1, 4) ベンゾチアジン-2 (3H)-オン)、G-クランプ、例えば、置換フェノキサジンシチジン (例えば、9-(2-アミノエトキシ)-H-ピリミド (5, 4-(b) (1, 4) ベンゾキサジン-2 (3H)-オン)、カルバゾールシチジン (2H-ピリミド (4, 5-b) インドール-2-オン)、ピリドインドールシチジン (H-ピリド (3', 2': 4, 5) ピロロ [2, 3-d] ピリミジン-2-オン) を挙げることができる。

20

30

40

【0036】

本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、標的を含む組成物を指し得る。開示される方法、デバイス、及びシステムによる分析に好適な試料としては、細胞、組織、

50

器官、又は生物が挙げられる。

本明細書で使用される場合、「試料採取デバイス」又は「デバイス」という用語は、試料の切片を採取し、かつ／又は基質上に切片を配置することができる、デバイスを指し得る。試料デバイスは、例えば、蛍光活性化細胞分取（FACS）機、細胞分取機、生検ニードル、生検デバイス、組織切片化デバイス、マイクロ流体デバイス、ブレードグリッド、及び／又はマイクロトームを指し得る。

本明細書で使用される場合、「固体支持体」という用語は、複数のバーコード（例えば、確率的バーコード）が結合され得る別々の固体又は半固体表面を指し得る。固体支持体は、核酸を（例えば、共有結合的又は非共有結合的に）固定化することができる、プラスチック、セラミック、金属、又はポリマー材料（例えば、ハイドロゲル）で構成される任意の種類の固体、多孔質、又は中空の球体、ボール、ベアリング、シリンダー、又は他の類似の構成を包含し得る。固体支持体は、球状（例えば、マイクロスフェア）であり得る別個の粒子を含み得るか、又は非球状若しくは不規則な形状、例えば、立方体、立方体様、ピラミッド形、円筒形、円錐形、長方形、若しくは円盤形などを有し得る。ビーズは、非球体の形状であり得る。アレイに離間配置された複数の固体支持体は、基質を含まない場合がある。固体支持体は、「ビーズ」という用語と互換可能に使用することができる。

10

【0037】

本明細書で使用される場合、「確率的バーコード」という用語は、本開示の標識を含むポリヌクレオチド配列を指し得る。確率的バーコードは、確率的バーコード化に使用することができるポリヌクレオチド配列であり得る。確率的バーコードは、試料内の標的を定量するために使用することができる。確率的バーコードは、標識を標的に会合させた後に発生し得るエラーを制御するために使用することができる。例えば、確率的バーコードは、増幅又はシーケンシングエラーを評価するために使用することができる。標的と会合した確率的バーコードは、確率的バーコードー標的又は確率的バーコードータグー標的と称され得る。

20

本明細書で使用される場合、「遺伝子特異的確率的バーコード」という用語は、標識及び遺伝子特異的である標的結合領域を含むポリヌクレオチド配列を指し得る。確率的バーコードは、確率的バーコード化に使用することができるポリヌクレオチド配列であり得る。確率的バーコードは、試料内の標的を定量するために使用することができる。確率的バーコードは、標識を標的に会合させた後に発生し得るエラーを制御するために使用することができる。例えば、確率的バーコードは、増幅又はシーケンシングエラーを評価するために使用することができる。標的と会合した確率的バーコードは、確率的バーコードー標的又は確率的バーコードータグー標的と称され得る。

30

【0038】

本明細書で使用される場合、「確率的バーコード化」という用語は、核酸のランダムな標識化（例えば、バーコード化）を指し得る。確率的バーコード化は、ポアソン再帰戦略を利用して、標識を会合させ、標的と会合した標識を定量することができる。本明細書で使用される場合、「確率的バーコード化」という用語は、「確率的標識化」と互換可能に使用することができる。

本明細書で使用される場合、「標的」という用語は、バーコード（例えば、確率的バーコード）と会合され得る組成物を指し得る。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例示的な標的としては、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、mRNA、マイクロRNA、tRNAなどが挙げられる。標的は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。一部の実施形態では、標的は、タンパク質、ペプチド、又はポリペプチドであってもよい。一部の実施形態では、標的は、脂質である。本明細書で使用される場合、「標的」は、「種」と互換可能に使用することができる。

40

【0039】

本明細書で使用される場合、「逆転写酵素」という用語は、逆転写酵素活性を有する（すなわち、RNA鋳型からのDNAの合成を触媒する）酵素の群を指し得る。一般に、そのような酵素としては、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、

50

レトロプラスミド逆転写酵素、レトロ逆転写酵素、細菌逆転写酵素、II群イントロン由来逆転写酵素、及びこれらの変異体、バリエーション、又は誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。非レトロウイルス逆転写酵素としては、非LTRレトロトランスポゾン逆転写酵素、レトロプラスミド逆転写酵素、レトロ逆転写酵素、及びII群イントロン逆転写酵素が挙げられる。II群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 (*Lactococcus lactis*) LI. LtrBイントロン逆転写酵素、サーモシネコッカス・エロンガタス (*Thermosynechococcus elongatus*) TeI4cイントロン逆転写酵素、又はゲオバチルス・ステアロサーモフィルス (*Geobacillus stearothermophilus*) GsIE-IIICイントロン逆転写酵素が挙げられる。逆転写酵素の他のクラスとしては、非レトロウイルス逆転写酵素の多数のクラス（すなわち、とりわけ、レトロ、II群イントロン、及び多様性発生レトロエレメント）を挙げることができる。

10

【0040】

「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、バーコード（例えば、確率的バーコード）にハイブリダイズし、遺伝子特異的バーコードを生成するために使用することができるヌクレオチド配列を指すために、互換可能に使用される。ユニバーサルアダプター配列は、例えば、本開示の方法において使用されるすべてのバーコードにわたりユニバーサルである公知の配列であり得る。例えば、複数の標的が、本明細書に開示される方法を使用して標識される場合、標的特異的配列のそれぞれは、同じユニバーサルアダプター配列に連結され得る。一部の実施形態では、2つ以上のユニバーサルアダプター配列は、本明細書に開示される方法において使用することができる。例えば、複数の標的が、本明細書に開示される方法を使用して標識される場合、標的特異的配列のうちの少なくとも2つは、異なるユニバーサルアダプター配列に連結される。ユニバーサルアダプタープライマー及びその相補体は、2つのオリゴヌクレオチド中に含まれてもよく、そのうちの一方は標的特異的配列を含み、他方はバーコードを含む。例えば、ユニバーサルアダプター配列は、標的核酸に相補的であるヌクレオチド配列を生成するために、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。バーコード及びユニバーサルアダプター配列の相補配列を含む第2のオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列とハイブリダイズし、標的特異的バーコード（標的特異的な確率的バーコード）を生成し得る。一部の実施形態では、ユニバーサルアダプタープライマーは、本開示の方法において使用されるユニバーサルPCRプライマーと異なる配列を有する。

20

30

【0041】

バーコード

バーコード化、例えば、確率的バーコード化は、例えば、米国特許出願公開第US2015/0299784号、国際公開第WO2015/031691号、及びFu et al, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011 May 31;108(22):9026-31に記載されており、これらの刊行物の内容は、その全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるバーコードは、標的を確率的に標識する（例えば、バーコード化する、タグ付けする）ために使用することができるポリヌクレオチド配列であり得る、確率的バーコードであり得る。バーコードは、確率的バーコードの異なるバーコード配列の数と、標識しようとする標的のうちの任意のものの発生数との比が、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲であり得るか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る場合に、確率的バーコードと称され得る。標的は、同一又はほぼ同一な配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であり得る。バーコードは、確率的バーコードの異なるバーコード配列の数と、標識しようとする標的のうちの任意のものの発生数との比が、少なくとも、又は最大で1:1、

40

50

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である場合に、確率的バーコードと称され得る。確率的バーコードのバーコード配列は、分子標識と称され得る。

【0042】

バーコード、例えば、確率的バーコードは、1つ又は複数の標識を含み得る。例示的な標識としては、ユニバーサル標識、細胞標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、試料標識、プレート標識、空間標識、及び／又は空間前（*pre-spatial*）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、バーコードを固体支持体105に連結させることができる5'アミンを含み得る。バーコードは、ユニバーサル標識、次元標識（*dimension label*）、空間標識、細胞標識、及び／又は分子標識を含み得る。バーコード内の異なる標識（ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、及び分子標識を含むがこれらに限定されない）の順序は、変動し得る。例えば、図1に示されるように、ユニバーサル標識がもっとも5'側の標識であってもよく、分子標識がもっとも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。一部の実施形態では、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、任意の順序である。バーコードは、標的結合領域を含み得る。標的結合領域は、試料内の標的（例えば、標的核酸、RNA、mRNA、DNA）と相互作用し得る。例えば、標的結合領域は、mRNAのポリ（A）尾部と相互作用することができるオリゴ（dT）配列を含み得る。一部の事例では、バーコードの標識（例えば、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、及びバーコード配列）は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20ヌクレオチド、又はそれ以上離間していてもよい。

【0043】

標識、例えば、細胞標識は、エラー補正能力を提供するように設計され得る、定義された長さ、例えば、それぞれが7ヌクレオチドずつの（一部のハミングエラー補正コードにおいて使用されるビット数と同等の）固有の核酸部分配列セットを含み得る。7ヌクレオチドの配列を含むエラー補正用部分配列セットは、セット内の配列の任意の対での組合せが、定義された「遺伝子距離」（又はミスマッチ塩基数）を呈するように設計することができる。この場合、標識した標的核酸分子の配列データセットにおけるエラー補正配列の考察（以下により詳細に記載される）により、増幅又はシーケンシングエラーを検出又は補正することが可能となり得る。一部の実施形態では、エラー補正コードを作成するために使用される核酸部分配列の長さは、変動し得、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、31、40、50ヌクレオチド、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。一部の実施形態では、他の長さの核酸部分配列が、エラー補正コードを作成するために使用されてもよい。

【0044】

バーコードは、標的結合領域を含み得る。標的結合領域は、試料内の標的と相互作用し得る。標的は、リボ核酸（RNA）、メッセンジャーRNA（mRNA）、マイクロRNA、低分子干渉RNA（siRNA）、RNA分解産物、それぞれがポリ（A）尾部を含むRNA、又はこれらの任意の組合せであり得るか、又はこれらを含み得る。一部の実施形態では、複数の標的は、デオキシリボ核酸（DNA）を含み得る。

【0045】

一部の実施形態では、標的結合領域は、mRNAのポリ（A）尾部と相互作用することができるオリゴ（dT）配列を含み得る。バーコードの標識（例えば、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、及びバーコード配列（例えば、分子標識））のうちの

1つ又は複数は、バーコードの残りの標識のうちの別の1つ又は2つから、スペーサーによって離間していてもよい。スペーサーは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20ヌクレオチド、又はそれ以上であり得る。一部の実施形態では、バーコードの標識のいずれも、スペーサーによって離間していない。

【0046】

ユニバーサル標識

バーコードは、1つ又は複数のユニバーサル標識を含み得る。一部の実施形態では、1つ又は複数のユニバーサル標識は、所与の固体支持体に結合したバーコードのセットにおいて、すべてのバーコードについて同じであり得る。一部の実施形態では、1つ又は複数のユニバーサル標識は、複数のビーズに結合したすべてのバーコードについて同じであり得る。一部の実施形態では、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することができる核酸配列を含み得る。シーケンシングプライマーは、ユニバーサル標識を含むバーコードをシーケンシングするために使用することができる。シーケンシングプライマー（例えば、ユニバーサルシーケンシングプライマー）は、高スループットのシーケンシングプラットフォームと会合したシーケンシングプライマーを含み得る。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、PCRプライマーにハイブリダイズすることができる核酸配列を含み得る。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、シーケンシングプライマー及びPCRプライマーにハイブリダイズすることができる核酸配列を含み得る。シーケンシングプライマー又はPCRプライマーにハイブリダイズすることができるユニバーサル標識の核酸配列は、プライマー結合部位と称され得る。ユニバーサル標識は、バーコードの転写を開始させるために使用することができる配列を含み得る。ユニバーサル標識は、バーコード又はバーコード内の領域の伸長のために使用することができる配列を含み得る。ユニバーサル標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。例えば、ユニバーサル標識は、少なくとも約10個のヌクレオチドを含み得る。ユニバーサル標識は、例えば、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、又は300ヌクレオチドの長さであり得る。一部の実施形態では、バーコードを支持体から切断することを可能にするために、切断可能なリンカー又は改変されたヌクレオチドが、ユニバーサル標識配列の一部となっていてよい。

【0047】

次元標識

バーコードは、1つ又は複数の次元標識を含み得る。一部の実施形態では、次元標識は、標識化（例えば、確率的標識化）が発生した次元に関する情報を提供する核酸配列を含み得る。例えば、次元標識は、標的がバーコード化された時間に関する情報を提供することができる。次元標識は、試料におけるバーコード化（例えば、確率的バーコード化）の時間と関連付けられてもよい。次元標識は、標識化の時点で活性化され得る。異なる次元標識は、異なる時点で活性化され得る。次元標識は、標的、標的の群、及び／又は試料がバーコード化された順序に関する情報を提供する。例えば、細胞集団は、細胞周期のG0期に、バーコード化され得る。細胞は、細胞周期のG1期に、バーコード（例えば、確率的バーコード）で再びパルスされ得る。細胞は、細胞周期のS期に、バーコードで再びパルスされ得るなどとなり得る。それぞれのパルス（例えば、細胞周期のそれぞれの段階）におけるバーコードは、異なる次元標識を含み得る。このようにすると、次元標識により、細胞周期のどの段階でどの標的が標識されたかに関する情報が得られる。次元標識は、多くの異なる生物学的時間を調べることができる。例示的な生物学的時間としては、細胞周期、転写（例えば、転写開始）、及び転写物分解を挙げることができるが、これらに限定されない。別の例では、試料（例えば、細胞、細胞集団）は、薬物及び／又は治療法の処置の前及び／又は後に、確率的に標識され得る。別個の標的のコピー数の変化により

、薬物及び／又は治療法に対する試料の応答を示すことができる。

【0048】

次元標識は、活性化可能であり得る。活性化可能な次元標識は、特定の時点で活性化させることができる。活性化可能な標識は、例えば、継続的に活性化させることができる（例えば、停止されない）。活性化可能な次元標識は、例えば、可逆的に活性化可能であってもよい（例えば、活性化可能な次元標識は、作動させることができ、停止させることができる）。次元標識は、例えば、少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、又はそれ以上、可逆的に活性化可能であってもよい。次元標識は、例えば、少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、又はそれ以上、可逆的に活性化可能であってもよい。一部の実施形態では、次元標識は、蛍光、光、化学的事象（例えば、切断、別の分子のライゲーシオン、改変の付加（例えば、ペグ化、SUMO化、アセチル化、脱アセチル化、脱メチル化）、光化学的事象（例えば、光ケーシング）、及び非天然のヌクレオチドの導入により活性化させることができる。

10

【0049】

次元標識は、一部の実施形態では、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合したすべてのバーコード（例えば、確率的バーコード）について同一であってもよいが、異なる固体支持体（例えば、ビーズ）については異なり得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、又は100%が、同じ次元標識を含み得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%が、同じ次元標識を含み得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも95%が、同じ次元標識を含み得る。

20

複数の固体支持体（例えば、ビーズ）に、 10^6 個以上もの多くの固有の次元標識配列が提示されてもよい。次元標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。次元標識は、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、又は300ヌクレオチド長であり得る。次元標識は、約5～約200個のヌクレオチドを含み得る。次元標識は、約10～約150個のヌクレオチドを含み得る。次元標識は、約20～約125ヌクレオチドの長さを含み得る。

30

【0050】

空間標識

バーコードは、1つ又は複数の空間標識を含み得る。一部の実施形態では、空間標識は、バーコードと会合した標的分子の空間配向に関する情報を提供する、核酸配列を含み得る。空間標識は、試料における座標と関連付けられ得る。座標は、固定座標であってもよい。例えば、座標は、基質に関連して固定され得る。空間標識は、二次元又は三次元グリッドを参照するものであってもよい。座標は、ランドマークに対して固定され得る。ランドマークは、空間内で特定可能であり得る。ランドマークは、画像化することができる構造体であり得る。ランドマークは、生物学的構造体、例えば、解剖学的ランドマークであり得る。ランドマークは、細胞ランドマーク、例えば、オルガネラであり得る。ランドマークは、非天然のランドマーク、例えば、特定可能な識別子、例えば、カラーコード、バーコード、磁気特性、蛍光、放射性、若しくは固有のサイズ若しくは形状を有する構造体であってもよい。空間標識は、物理的区画（例えば、ウェル、容器、又は液滴）と関連付けられていてもよい。一部の実施形態では、複数の空間標識が、空間内の1つ又は複数の位置をコードするために、一緒に使用される。

40

【0051】

空間標識は、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合したすべてのバーコードについて同一であってもよいが、異なる固体支持体（例えば、ビーズ）については異なり得る

50

。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の同じ空間標識を含むバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲であり得るか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の同じ空間標識を含むバーコードのパーセンテージは、少なくとも、又は最大で60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、又は100%であり得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも60%が、同じ空間標識を含み得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上のバーコードのうちの少なくとも95%が、同じ空間標識を含み得る。

【0052】

複数の固体支持体（例えば、ビーズ）に、 10^6 個以上もの多くの固有の空間標識配列が提示されてもよい。空間標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。空間標識は、例えば、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、又は300ヌクレオチドの長さであり得る。空間標識は、約5～約200の間のヌクレオチドを含み得る。空間標識は、約10～約150ヌクレオチドを含み得る。空間標識は、約20～約125ヌクレオチドの長さを含み得る。

【0053】

細胞標識

バーコード（例えば、確率的バーコード）は、1つ又は複数の細胞標識を含み得る。一部の実施形態では、細胞標識は、どの標的核酸がどの細胞を起源としているかを決定するための情報を提供する、核酸配列を含み得る。一部の実施形態では、細胞標識は、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合したすべてのバーコードについて同一であるが、異なる固体支持体（例えば、ビーズ）については異なる。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の同じ細胞標識を含むバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る。一部の実施形態では、同じ固体支持体上の同じ細胞標識を含むバーコードのパーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、又は100%であり得るか、又はおよそでこれらの値であり得る。例えば、同じ固体支持体上のバーコードの少なくとも60%が同じ細胞標識を含み得る。別の例として、同じ固体支持体上のバーコードの少なくとも95%が同じ細胞標識を含み得る。

複数の固体支持体（例えば、ビーズ）に、 10^6 個以上もの多くの固有の細胞標識配列が提示されてもよい。細胞標識は、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。細胞標識は、例えば、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、又は300ヌクレオチドの長さであり得る。例えば、細胞標識は、約5～約200の間のヌクレオチドを含み得る。別の例として、細胞標識は、約10～約150ヌクレオチドを含み得る。さらに別の例として、細胞標識は、約20～約125ヌクレオチドの長さを含み得る。

【0054】

バーコード配列

バーコードは、1つ又は複数のバーコード配列を含み得る。一部の実施形態では、バーコード配列は、バーコードにハイブリダイズした標的核酸種の特定の種類に関する情報の特定をもたらす、核酸配列を含み得る。バーコード配列は、バーコード（例えば、標的結合領域）にハイブリダイズした標的核酸種の特定の発生に関するカウンタを提供する（例えば、およその近似値を提供する）、核酸配列を含む。

【0055】

一部の実施形態では、バーコード配列の多様なセットが、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合される。一部の実施形態では、 10^2 個、 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の固有の分子標識配列が存在し得る。例えば、複数のバーコードは、別個の配列を有する約6561個のバーコード配列を含み得る。別の例として、複数のバーコードは、別個の配列を有する約65536個のバーコード配列を含み得る。一部の実施形態では、少なくとも、又は最大で 10^2 個、 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、又は 10^9 個の固有のバーコード配列が存在し得る。固有の分子標識配列は、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合していてもよい。一部の実施形態では、固有の分子標識配列は、粒子（例えば、ハイドロゲルビーズ）によって部分的又は全体的に包含される。

10

【0056】

バーコードの長さは、異なるインプリメンテーションにおいて異なってもよい。例えば、バーコードは、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つ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。別の例として、バーコードは、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、又は300ヌクレオチド長であってもよい。

20

【0057】

分子標識

バーコード（例えば、確率的バーコード）は、1つ又は複数の分子標識を含み得る。分子標識は、バーコード配列を含み得る。一部の実施形態では、分子標識は、バーコードにハイブリダイズした標的核酸種の特定の種類に関する情報の特定をもたらす、核酸配列を含み得る。分子標識は、バーコード（例えば、標的結合領域）にハイブリダイズした標的核酸種の特定の発生に対するカウンタを提供する、核酸配列を含む。

一部の実施形態では、分子標識の多様なセットが、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合される。一部の実施形態では、 10^2 個、 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲の固有の分子標識配列、又は約 10^2 個、 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲の固有の分子標識配列が存在し得る。例えば、複数のバーコードは、別個の配列を有する約6561個の分子標識を含み得る。別の例として、複数のバーコードは、別個の配列を有する約65536個の分子標識を含み得る。一部の実施形態では、少なくとも、又は最大で 10^2 個、 10^3 個、 10^4 個、 10^5 個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、若しくは 10^9 個の固有の分子標識配列が存在し得る。固有の分子標識配列を有するバーコードは、所与の固体支持体（例えば、ビーズ）に結合していてもよい。

30

【0058】

複数の確率的バーコードを使用するバーコード化（例えば、確率的バーコード化）については、異なる分子標識配列の数と、標的のうちのいずれかの発生の数との比は、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲であってもよく、又は約1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、100:1、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つ

40

50

の間の数若しくは範囲であってもよい。標的は、同一又はほぼ同一な配列を有するmRNA分子を含むmRNA種であり得る。一部の実施形態では、異なる分子標識配列の数と、標的のうちのいずれかの発生の数との比は、少なくとも、又は最大で1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、30:1、40:1、50:1、60:1、70:1、80:1、90:1、若しくは100:1である。

【0059】

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、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。分子標識は、例えば、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100、200、又は300ヌクレオチドの長さであり得る。

10

【0060】

標的結合領域

バーコードは、1つ又は複数の標的結合領域、例えば、捕捉プローブを含み得る。一部の実施形態では、標的結合領域は、目的の標的とハイブリダイズし得る。一部の実施形態では、標的結合領域は、標的（例えば、標的核酸、標的分子、例えば、分析しようとする細胞核酸）、例えば、特定の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする核酸配列を含み得る。一部の実施形態では、標的結合領域は、特定の標的核酸の特定の位置に結合（例えば、ハイブリダイズ）することができる核酸配列を含み得る。一部の実施形態では、標的結合領域は、制限酵素部位オーバーハング（例えば、EcoRI粘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る核酸配列を含み得る。バーコードは、次いで、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ションすることができる。

20

【0061】

一部の実施形態では、標的結合領域は、非特異的標的核酸配列を含み得る。非特異的標的核酸配列は、標的核酸の特定の配列とは独立して、複数の標的核酸に結合することができる配列を指し得る。例えば、標的結合領域は、ランダム多量体配列、又はmRNA分子上のポリ(A)尾部にハイブリダイズするオリゴ(dT)配列を含み得る。ランダム多量体配列は、例えば、ランダム二量体、三量体、四量体、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体、十量体、又は任意の長さのそれ以上の多量体配列であり得る。一部の実施形態では、標的結合領域は、所与のビーズに結合したすべてのバーコードについて、同じである。一部の実施形態では、所与のビーズに結合した複数のバーコードの標的結合領域は、2つ以上の異なる標的結合配列を含み得る。標的結合領域は、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。標的結合領域は、最大で約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はそれ以上のヌクレオチドの長さであり得る。

30

40

【0062】

一部の実施形態では、標的結合領域は、ポリアデニル化末端を含むmRNAとハイブリダイズすることができるオリゴ(dT)を含み得る。標的結合領域は、遺伝子特異的であり得る。例えば、標的結合領域は、標的の特定の領域にハイブリダイズするように構成され得る。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、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。標的結合領域は、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、

50

10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチドの長さであり得る。標的結合領域は、約5〜30ヌクレオチドの長さであり得る。バーコードが遺伝子特異的標的結合領域を含む場合、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称され得る。

【0063】

配向特性

確率的バーコード（例えば、確率的バーコード）は、バーコードを配向する（例えば、アライメント）するために使用することができる1つ又は複数の配向特性を含み得る。バーコードは、等電点電気泳動のための部分を含み得る。異なるバーコードは、異なる等電点電気泳動点を含み得る。これらのバーコードを試料に導入すると、試料は、バーコードを公知の様式で配向するために、等電点電気泳動を受け得る。このようにして、配向特性を使用して、試料におけるバーコードの公知のマップを展開することができる。例示的な配向特性としては、電気泳動移動度（例えば、バーコードのサイズに基づく）、等電点、スピン、導電性、及び／又は自己アセンブリを挙げることができる。例えば、自己アセンブリの配向特性を有するバーコードは、活性化されると、特定の配向（例えば、核酸ナノ構造）に自己アセンブルし得る。

【0064】

親和性特性

バーコード（例えば、確率的バーコード）は、1つ又は複数の親和性特性を含み得る。例えば、空間標識は、親和性特性を含み得る。親和性特性としては、別の実体（例えば、細胞受容体）へ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挙げることができる。例えば、親和性特性は、抗体、例えば、試料上の特定の部分（例えば、受容体）に特異的な抗体を含み得る。一部の実施形態では、抗体は、バーコードを、特定の細胞種又は分子へと誘導し得る。特定の細胞種又は分子にある及び／又はその近傍にある標的を、標識（例えば、確率的に標識）することができる。親和性特性は、一部の実施形態では、抗体がバーコードを特定の位置へと誘導し得るため、空間標識のヌクレオチド配列に加えて、空間情報を提供することができる。抗体は、治療用抗体、例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体であり得る。抗体は、ヒト化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。

【0065】

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って形成される）免疫グロブリン分子（例えば、IgG抗体）、又は免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な（すなわち、特異的結合）部分、例えば、抗体断片であり得る。

抗体断片は、例えば、抗体の一部、例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、sFvなどであり得る。一部の実施形態では、抗体断片は、全長抗体によって認識されるものと同じ抗原に結合することができる。抗体断片としては、抗体の可変領域からなる単離された断片、例えば、重鎖及び軽鎖の可変領域からなる「Fv」断片、並びに軽鎖及び重鎖の可変領域がペプチドリンカーによって接続された組換え一本鎖ポリペプチド分子（「scFvタンパク質」）を挙げることができる。例示的な抗体としては、がん細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面受容体（CD8、CD34、CD45）に結合する抗体、及び治療用抗体を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0066】

ユニバーサルアダプタープライマー

バーコードは、1つ又は複数のユニバーサルアダプタープライマーを含み得る。例えば、遺伝子特異的バーコード、例えば、遺伝子特異的確率的バーコードは、ユニバーサルアダプタープライマーを含み得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、すべてのバーコードにわたってユニバーサルなヌクレオチド配列を指し得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、遺伝子特異的バーコードを構築するために使用することができる。ユニバー

サルアダプタープライマーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30ヌクレオチド、又はこれらのうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであり得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、少なくとも、又は最大で1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、又は30ヌクレオチドの長さであり得る。ユニバーサルアダプタープライマーは、5～30ヌクレオチドの長さであり得る。

【0067】

リンカー

バーコードが、1つを上回る種類の標識（例えば、1つを上回る細胞標識又は1つを上回るバーコード配列、例えば、1つの分子標識）を含む場合、標識には、リンカー標識配列が散在していてもよい。リンカー標識配列は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はそれ以上のヌクレオチドの長さであり得る。リンカー標識配列は、最大で約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50ヌクレオチド、又はそれ以上のヌクレオチドの長さであり得る。一部の事例では、リンカー標識配列は、12ヌクレオチドの長さである。リンカー標識配列は、バーコードの合成を容易にするために使用することができる。リンカー標識は、エラー補正（例えば、ハミング）コードを含み得る。

【0068】

固体支持体

本明細書において開示されるバーコード、例えば、確率的バーコードは、一部の実施形態では、固体支持体と会合していてもよい。固体支持体は、例えば、合成粒子であり得る。一部の実施形態では、バーコード配列の一部又はすべて、例えば、固体支持体上の複数のバーコード（例えば、第1の複数のバーコード）の確率的バーコード（例えば、第1のバーコード配列）の分子標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なる。同じ固体支持体上のバーコードの細胞標識は、同じであり得る。異なる固体支持体上のバーコードの細胞標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なり得る。例えば、第1の固体支持体上の第1の複数のバーコードの第1の細胞標識は、同じ配列を有してもよく、第2の固体支持体上の第2の複数のバーコードの第2の細胞標識は、同じ配列を有してもよい。第1の固体支持体上の第1の複数のバーコードの第1の細胞標識及び第2の固体支持体上の第2の複数のバーコードの第2の細胞標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なり得る。細胞標識は、例えば、約5～20ヌクレオチド長であり得る。バーコード配列は、例えば、約5～20ヌクレオチド長であり得る。合成粒子は、例えば、ビーズであり得る。

【0069】

ビーズは、例えば、シリカゲルビーズ、細孔制御ガラスビーズ、磁性ビーズ、Dyna bead、sephadex/sepharoseビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、又はこれらの任意の組合せであり得る。ビーズは、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ハイドロゲル、常磁性体、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、又はこれらの任意の組合せなどの材料を含み得る。

一部の実施形態では、ビーズは、ポリマービーズ、例えば、バーコード又は確率的バーコードで官能化された変形可能なビーズ又はゲルビーズ（例えば、10X Genomics（San Francisco, CA）からのゲルビーズ）であり得る。一部の実施形態では、ゲルビーズは、ポリマー系ゲルを含み得る。ゲルビーズは、例えば、1つ又は複数のポリマー前駆体を液滴に封入することによって、生成することができる。ポリマー前駆体を、促進剤（例えば、テトラメチルエチレンジアミン（TEMED））に曝露すると、ゲルビーズが生成され得る。

10

20

30

40

50

【0070】

一部の実施形態では、粒子は、崩壊可能（例えば、溶解可能、分解可能）であり得る。例えば、ポリマービーズは、例えば、所望される条件下において、溶解、融解、又は分解し得る。所望される条件には、環境条件が含まれ得る。所望される条件は、制御された様式で、ポリマービーズの溶解、融解、又は分解をもたらし得る。ゲルビーズは、化学的刺激、物理的刺激、生物学的刺激、熱刺激、磁気刺激、電気刺激、光刺激、又はこれらの任意の組合せに起因して、溶解、融解、又は分解し得る。

【0071】

分析物及び／又は試薬、例えば、オリゴヌクレオチドバーコードは、例えば、ゲルビーズの内部表面（例えば、オリゴヌクレオチドバーコード及び／又はオリゴヌクレオチドバーコードを生成するために使用される材料の拡散を通じてアクセス可能な内部）、及び／又はゲルビーズ若しくは本明細書に記載の任意の他のマイクロカプセルの外部表面に連結／固定化されていてもよい。連結／固定化は、任意の形態の化学結合（例えば、共有結合、イオン結合）又は物理的現象（例えば、ファンデルワールス力、双極子間相互作用など）を介してもよい。一部の実施形態では、試薬の、ゲルビーズ又は本明細書に記載の任意の他のマイクロカプセルへの連結／固定化は、例えば、不安定性部分を介する（例えば、本明細書に記載の化学的架橋剤を含む、化学的架橋剤を介する）ものなど、可逆的であってもよい。刺激を適用すると、不安定性部分は、切断され、固定化された試薬が遊離され得る。一部の実施形態では、不安定性部分は、ジスルフィド結合である。例えば、オリゴヌクレオチドバーコードがジスルフィド結合を介してゲルビーズに固定化されている事例では、ジスルフィド結合を還元剤に曝露することにより、ジスルフィド結合が切断され、オリゴヌクレオチドバーコードがビーズから遊離され得る。不安定性部分は、ゲルビーズ若しくはマイクロカプセルの一部として、試薬若しくは分析物をゲルビーズ若しくはマイクロカプセルに連結させる化学的リンカーの一部として、及び／又は試薬若しくは分析物の一部として含まれてもよい。一部の実施形態では、複数のバーコードのうちの少なくとも1つのバーコードは、粒子に固定化されていてもよく、粒子に部分的に固定化されていてもよく、粒子に封入されていてもよく、粒子に部分的に封入されていてもよく、又はこれらの任意の組合せであってもよい。

【0072】

一部の実施形態では、ゲルビーズは、ポリマー、熱感受性ポリマー、光感受性ポリマー、磁性ポリマー、pH感受性ポリマー、塩感受性ポリマー、化学感受性ポリマー、高分子電解質、多糖、ペプチド、タンパク質、及び／又はプラスチックを含むがこれらに限定されない、広範な異なるポリマーを含み得る。ポリマーとしては、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）、ポリ（スチレンスルホネート）（PSS）、ポリ（アリルアミン）（PAAm）、ポリ（アクリル酸）（PAA）、ポリ（エチレンイミン）（PEI）、ポリ（ジアリルジメチルアンモニウムクロリド）（PDADMAC）、ポリ（ピロール）（PPy）、ポリ（ビニルピロリドン）（PVPO）、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）（PPA）、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）、ポリ（乳酸-コグリコール酸）（PLGA）などの材料を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0073】

多数の化学的刺激を使用して、ビーズの崩壊、溶解、又は分解をトリガーすることができる。これらの化学変化の例としては、ビーズ壁へのpHに媒介される変化、架橋結合の化学的切断を介したビーズ壁の崩壊、ビーズ壁の脱重合のトリガー、及びビーズ壁のスイッチング反応を挙げることができるが、これらに限定されない。バルク変化を使用して、ビーズの崩壊をトリガーすることもできる。

様々な刺激を通じたマイクロカプセルに対するバルク変化又は物理的变化はまた、試薬を放出するためのカプセルの設計において、多くの利点を提供する。バルク変化又は物理

10

20

30

40

50

的变化は、巨視的規模で発生し、ビーズの破裂は、刺激によって誘導される機械－物理力の結果である。これらのプロセスとしては、圧力に誘導される破裂、ビーズ壁の融解、又はビーズ壁の多孔性の変化を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0074】

生物学的刺激もまた、ビーズの崩壊、溶解、又は分解をトリガーするために使用することができる。一般に、生物学的トリガーは、化学的トリガーに似ているが、多くの例では、生体分子、又は酵素、ペプチド、糖、脂肪酸、核酸などといった生体系において一般に見出される分子を使用する。例えば、ビーズは、特定のプロテアーゼによる切断に対して感受性であるペプチド架橋を有するポリマーを含み得る。より具体的には、1つの例では、G F L G K ペプチド架橋を含むマイクロカプセルを含み得る。プロテアーゼカテプシン B などの生物学的トリガーを添加すると、シェル壁のペプチド架橋が切断され、ビーズの内容物が放出される。他の事例では、プロテアーゼは、熱活性化され得る。別の例では、ビーズは、セルロースを含むシェル壁を含む。加水分解性酵素であるキトサンの添加が、セルロース結合の切断、シェル壁の脱重合、及びその内部の内容物の放出の生物学的トリガーとしての機能を果たす。

10

【0075】

ビーズはまた、熱刺激を適用すると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、ビーズに様々な変化を引き起こし得る。熱の変化は、ビーズ壁が崩壊するようにビーズの融解を引き起こし得る。一部の実施形態では、熱は、ビーズが崩壊又は爆発するように、ビーズの内部成分の内圧を増加させ得る。一部の実施形態では、熱は、ビーズを圧縮され脱水された状態へと変換させ得る。熱はまた、ビーズの壁内の熱感受性ポリマーに対して作用して、ビーズの崩壊を引き起こすことができる。

20

マイクロカプセルのビーズ壁に磁性ナノ粒子を含めることにより、ビーズの崩壊をトリガーすること、並びにビーズをアレイにおいて誘導することができる。本開示のデバイスは、いずれかの目的で磁性ビーズを含み得る。1つの例では、 Fe_3O_4 ナノ粒子を高分子電解質含有ビーズに組み込むことにより、振動磁界刺激の存在下において崩壊がトリガーされる。

【0076】

ビーズはまた、電気刺激の結果として、崩壊、溶解、又は分解され得る。前の節に記載されている磁性粒子と同様に、電気感受性ビーズにより、ビーズの崩壊、並びに電界におけるアライメント、電気伝導、又は酸化還元反応などの他の機能の両方をトリガーすることが可能となり得る。1つの例では、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、電界においてアライメントされる。他の例では、電界は、ビーズ壁自体内における酸化還元反応を誘導し得、これにより多孔性が増加し得る。

30

光刺激もまた、ビーズを崩壊させるために使用することができる。多数の光トリガーが、可能であり、これには、特定の範囲の波長の光子を吸収することができるナノ粒子及び発色団などの様々な分子を使用するシステムが含まれ得る。例えば、金属酸化物コーティングを、カプセルトリガーとして使用することができる。 SiO_2 をコーティングした高分子電解質カプセルのUV照射は、ビーズ壁の崩壊をもたらし得る。さらに別の例では、光スイッチ可能な材料、例えば、アゾベンゼン基を、ビーズ壁に組み込んでもよい。UV又は可視光を適用すると、これらのような化学物質は、光子を吸収して可逆的なシスからトランスへの異性化を受ける。この態様では、光スイッチの組み込みにより、光トリガーを適用すると崩壊し得るか又はより多孔性となり得るビーズ壁が得られる。

40

【0077】

例えば、図2に示されるバーコード化（例えば、確率的バーコード化）の非限定的な例では、ブロック208において、細胞、例えば、単一細胞を、マイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに導入した後、ブロック212において、ビーズを、マイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに導入することができる。それぞれのマイクロウェルは、1つのビーズを含み得る。ビーズは、複数のバーコードを含み得る。バーコードは、ビーズに結合した5'アミン領域を含み得る。バーコードは、ユニバーサル標識、バーコード

50

配列（例えば、分子標識）、標的結合領域、又はこれらの任意の組合せを含み得る。

【0078】

本明細書において開示されるバーコードは、固体支持体（例えば、ビーズ）と会合していてもよい（例えば、それに結合していてもよい）。固体支持体と会合しているバーコードは、それぞれが、固有の配列を有する少なくとも100又は1000個のバーコード配列を含む群から選択される、バーコード配列を含み得る。一部の実施形態では、固体支持体と会合した異なるバーコードは、異なる配列を有するバーコードを含み得る。一部の実施形態では、固体支持体と会合しているあるパーセンテージのバーコードは、同じ細胞標識を含む。例えば、パーセンテージは、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、100%、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲であり得るか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る。別の例として、パーセンテージは、少なくとも、又は最大で60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、又は100%であり得る。一部の実施形態では、固体支持体と会合しているバーコードは、同じ細胞標識を有し得る。異なる固体支持体と会合しているバーコードは、固有の配列を有する少なくとも100又は1000個の細胞標識を含む群から選択される、異なる細胞標識を有し得る。

10

【0079】

本明細書において開示されるバーコードは、固体支持体（例えば、ビーズ）に会合していてもよい（例えば、それに結合していてもよい）。一部の実施形態では、試料における複数の標識をバーコード化するステップは、複数のバーコードと会合した複数の合成粒子を含む固体支持体を用いて行うことができる。一部の実施形態では、固体支持体は、複数のバーコードと会合した複数の合成粒子を含み得る。異なる固体支持体上の複数のバーコードの空間標識は、少なくとも1つのヌクレオチドが異なり得る。固体支持体は、例えば、二次元又は三次元で複数のバーコードを含み得る。合成粒子は、ビーズであり得る。ビーズは、シリカゲルビーズ、細孔制御ガラスビーズ、磁性ビーズ、Dynabead、Sephadex / sepharoseビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、又はこれらの任意の組合せであり得る。固体支持体としては、ポリマー、マトリックス、ハイドロゲル、ニードルアレイデバイス、抗体、又はこれらの任意の組合せを挙げることができる。一部の実施形態では、固体支持体は、自由に浮動することができる。一部の実施形態では、固体支持体は、半固体又は固体アレイに包埋されていてもよい。バーコードは、固体支持体と会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、基質と会合していてもよい。

20

30

【0080】

本明細書で使用される場合、「係留された」、「結合した」、及び「固定化された」という用語は、互換可能に使用され、バーコードを固体支持体に結合させるための共有結合的又は非共有結合的手段を指し得る。様々な異なる固体支持体のうちのいずれかを、事前に合成したバーコードを結合させるため、又はバーコードのインサイツでの固相合成のための固体支持体として使用することができる。

一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズである。ビーズは、核酸を（例えば、共有結合的又は非共有結合的に）固定化することができる1つ又は複数の種類の固体、多孔質、又は中空の球体、ボール、ベアリング、シリンダー、又は他の類似の構成を含み得る。ビーズは、例えば、プラスチック、セラミック、金属、ポリマー材料、又はこれらの任意の組合せから構成され得る。ビーズは、球状（例えば、マイクロスフェア）である別個の粒子であるか、若しくはそれを含み得るか、又は非球状若しくは不規則な形状、例えば、立方体、立方体様、ピラミッド形、円筒形、円錐形、長方形、若しくは円盤形などを有し得る。一部の実施形態では、ビーズは、非球体の形状であり得る。

40

【0081】

ビーズは、常磁性材料（例えば、マグネシウム、モリブデン、リチウム、及びタンタル）、超常磁性材料（例えば、フェライト（ Fe_3O_4 、マグネタイト）ナノ粒子）、強磁性材料（例えば、鉄、ニッケル、コバルト、これらの一部の合金、及び一部の希土類金属

50

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、ハイドロゲル、ポリマー、セルロース、ナイロン、又はこれらの任意の組合せを含むがこれらに限定されない、様々な材料を含み得る。

一部の実施形態では、ビーズ(例えば、標識が結合されるビーズ)は、ハイドロゲルビーズである。一部の実施形態では、ビーズは、ハイドロゲルを含む。

【0082】

本明細書において開示される一部の実施形態は、1つ又は複数の粒子(例えば、ビーズ)を含む。粒子のそれぞれは、複数のオリゴヌクレオチド(例えば、バーコード)を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、バーコード配列(例えば、分子標識配列)、細胞標識、及び標的結合領域(例えば、オリゴ(dT)配列、遺伝子特異的配列、ランダム多量体、又はこれらの組合せ)を含み得る。複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれの細胞標識配列は、同じであってもよい。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特定することができるように、異なってもよい。異なる細胞標識配列の数は、異なる実装形態では異なり得る。一部の実施形態では、細胞標識配列の数は、10個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個、2000個、3000個、4000個、5000個、6000個、7000個、8000個、9000個、10000個、20000個、30000個、40000個、50000個、60000個、70000個、80000個、90000個、100000個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、これらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、若しくはそれ以上であり得るか、およそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得るか、少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得るか、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る。一部の実施形態では、複数の粒子のうちの1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、20個以下、30個以下、40個以下、50個以下、60個以下、70個以下、80個以下、90個以下、100個以下、200個以下、300個以下、400個以下、500個以下、600個以下、700個以下、800個以下、900個以下、1000個以下、又はそれ以上を上回らないものが、同じ細胞配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、同じ細胞配列を有するオリゴヌクレオチドを含む複数の粒子は、最大で0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%、0.8%、0.9%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、又はそれ以上であり得る。一部の実施形態では、複数の粒子のうちのいずれもが、同じ細胞標識配列を有さない。

【0083】

それぞれの粒子上の複数のオリゴヌクレオチドは、異なるバーコード配列(例えば、分子標識)を含み得る。一部の実施形態では、バーコード配列の数は、10個、100個、200個、300個、400個、500個、600個、700個、800個、900個、1000個、2000個、3000個、4000個、5000個、6000個、7000個、8000個、9000個、10000個、20000個、30000個、40000個、50000個、60000個、70000個、80000個、90000個、100000個、 10^6 個、 10^7 個、 10^8 個、 10^9 個、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲であり得るか、およそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得るか、少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得るか、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る。例えば、複数のオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも100個は、異なるバーコード配列を含む。別の例として、単一の粒子において、複数のオリゴヌクレオチドのうちの少なくとも100個、500個、1000個、5000個、10000個、15000個、20000個、50000個、これらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はそれよりも多くが、異なるバーコード配列を含む。一部の実施形態は、バーコードを含む複数の粒

子を提供する。一部の実施形態では、標識しようとする標的の発生（又はコピー若しくは数）と、異なるバーコード配列との比は、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得る。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドのそれぞれは、試料標識、ユニバーサル標識、又は両方をさらに含む。粒子は、例えば、ナノ粒子又はマイクロ粒子であり得る。

【0084】

ビーズのサイズは、変動し得る。例えば、ビーズの径は、0.1マイクロメートル～50マイクロメートルの範囲に及び得る。一部の実施形態では、ビーズの径は、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、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲であり得るか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲であり得る。

ビーズの径は、基質のウェルの径に関連し得る。一部の実施形態では、ビーズの径は、ウェルの径よりも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい、およそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい、少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい。ビーズの径は、細胞（例えば、基質のウェルによって包囲される単一細胞）の径に関連し得る。ビーズの径は、細胞（例えば、基質のウェルによって包囲される単一細胞）の径に関連し得る。一部の実施形態では、ビーズの径は、細胞の径よりも、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、250%、300%又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい、およそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい、少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、長いか若しくは短くてもよい。

【0085】

ビーズは、基質に結合及び／又は包埋されていてもよい。ビーズは、ゲル、ハイドロゲル、ポリマー、及び／又はマトリックスに結合及び／又は包埋されていてもよい。基質（例えば、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の機能を果たし得るビーズ上のバーコードに存在する空間標識を使用して特定することができる。

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

【0086】

ビーズは、量子ドット又は蛍光色素と会合（例えば、それを含浸）させて、それを1つの蛍光光学チャネル又は複数の光学チャネルにおいて蛍光性にすることができる。ビーズは、酸化鉄又は酸化クロムと会合させて、それを常磁性又は強磁性にすることができる。ビーズは、特定可能であり得る。例えば、ビーズは、カメラを使用してイメージングすることができる。ビーズは、ビーズと会合した検出可能なコードを有し得る。例えば、ビーズは、バーコードを含み得る。ビーズは、例えば、有機又は無機溶液中での膨張に起因し

て、サイズが変化し得る。ビーズは、疎水性であり得る。ビーズは、親水性であり得る。ビーズは、生体適合性であり得る。

固体支持体（例えば、ビーズ）は、視覚化することができる。固体支持体は、視覚化タグ（例えば、蛍光色素）を含み得る。固体支持体（例えば、ビーズ）は、識別子（例えば、数字）をエッチングすることができる。識別子は、ビーズのイメージングを通じて視覚化することができる。

【0087】

固体支持体は、不溶性、半可溶性、又は不溶性材料を含み得る。固体支持体は、そこに結合したリンカー、スキャフォールド、構築ブロック、又は他の反応性部分が含まれる場合、「官能化」されたと称され得るが、固体支持体は、そこに結合したそのような反応性部分が欠如している場合、「非官能化」であり得る。固体支持体は、溶液中、例えばマイクロタイターウェル形式において、フロースルー形式、例えばカラムにおいて、又はディップスティックにおいて、自由に用いることができる。

【0088】

固体支持体は、膜、紙、プラスチック、コーティング表面、平坦面、ガラス、スライド、チップ、又はこれらの任意の組合せを含み得る。固体支持体は、樹脂、ゲル、マイクロスフェア、又は他の幾何構成の形態をとり得る。固体支持体は、シリカチップ、マイクロ粒子、ナノ粒子、プレート、アレイ、キャリパー、平坦支持体、例えば、ガラス繊維フィルタ、ガラス面、金属面、金属面（銅、金銀、アルミニウム、シリコン、及び銅）、ガラス支持体、プラスチック支持体、シリコン支持体、チップ、フィルタ、膜、マイクロウェルプレート、スライド、多重ウェルプレート若しくは膜を含むプラスチック材料（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ニフッ化ポリビニリデンが形成される）、及び／又はウエハ、コーム、ピン若しくはニードル（例えば、コンビナトリアル合成若しくは分析に好適なピンのアレイ）、又は平坦面の穴若しくはナノリットルウェルのアレイ、例えば、ウエハ（例えば、シリコンウエハ）、底部がフィルタになっているか、若しくはなっていない穴を有するウエハにおけるビーズを含み得る。

固体支持体は、ポリマーマトリックス（例えば、ゲル、ハイドロゲル）を含み得る。ポリマーマトリックスは、細胞内空間（例えば、オルガネラの周囲）に浸透することが可能であり得る。ポリマーマトリックスは、循環系を通して送り出すことが可能であり得る。

【0089】

基質及びマイクロウェルアレイ

本明細書で使用される場合、基質は、ある種の固体支持体を指し得る。基質は、本開示のバーコード又は確率的バーコードを含み得る固体支持体を指し得る。基質は、例えば、複数のマイクロウェルを含み得る。例えば、基質は、2つ以上のマイクロウェルを含むウェルアレイであり得る。一部の実施形態では、マイクロウェルは、容積が定義されている小さな反応チャンバを含み得る。一部の実施形態では、マイクロウェルは、1つ又は複数の細胞を取り込むことができる。一部の実施形態では、マイクロウェルは、1つのみの細胞を取り込むことができる。一部の実施形態では、マイクロウェルは、1つ又は複数の固体支持体を取り込むことができる。一部の実施形態では、マイクロウェルは、1つのみの固体支持体を取り込むことができる。一部の実施形態では、マイクロウェルは、単一の細胞及び単一の固体支持体（例えば、ビーズ）を取り込む。マイクロウェルは、本開示のバーコード試薬を含み得る。

【0090】

バーコード化の方法

本開示は、身体試料（例えば、組織、器官、腫瘍、細胞）の別個の位置における別個の標的の数を概算するための方法を提供する。本方法は、試料に近接してバーコード（例えば、確率的バーコード）を配置するステップ、試料を溶解させるステップ、別個の標的をバーコードと会合させるステップ、標的を増幅させるステップ、及び／又は標的をデジタル計数するステップを含み得る。本方法は、バーコードの空間標識から得られる情報を分析及び／又は視覚化するステップをさらに含み得る。一部の実施形態では、方法は、試料

中の複数の標的を視覚化するステップを含む。複数の標的を試料のマップにマッピングするステップは、試料の二次元マップ又は三次元マップを作成するステップを含み得る。二次元マップ及び三次元マップは、試料中の複数の標的をバーコード化（例えば、確率的バーコード化）する前又は後に作成され得る。試料中の複数の標的を視覚化するステップは、複数の標的を試料のマップにマッピングするステップを含み得る。複数の標的を試料のマップにマッピングするステップは、試料の二次元マップ又は三次元マップを作成するステップを含み得る。二次元マップ及び三次元マップは、試料中の複数の標的をバーコード化する前又は後に作成され得る。一部の実施形態では、二次元マップ及び三次元マップは、試料を溶解させるステップの前又は後に作成され得る。二次元マップ又は三次元マップを作成する前又は後に試料を溶解させるステップは、試料を加熱するステップ、試料を界面活性剤と接触させるステップ、試料のpHを変更するステップ、又はこれらの任意の組合せを含み得る。

10

【0091】

一部の実施形態では、複数の標的をバーコード化するステップは、複数のバーコードを複数の標的にハイブリダイズさせ、バーコード化された標的（例えば、確率的にバーコード化された標的）を作製するステップを含む。複数の標的をバーコード化するステップは、バーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーを生成するステップを含み得る。バーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーを生成するステップは、複数のバーコード（例えば、確率的バーコード）を含む固体支持体を用いて実施され得る。

20

【0092】

試料とバーコードを接触させるステップ

本開示は、試料（例えば、細胞）を本開示の基質に接触させるための方法を提供する。例えば、細胞、臓器、又は組織の薄片を含む試料を、バーコード（例えば、確率的バーコード）に接触させることができる。例えば、重力流によって、細胞を接触させることができ、その場合、細胞は定着して単層を形成し得る。試料は、組織薄片であってもよい。薄片を基質上に配置することができる。試料は、一次元であってもよい（例えば、平面表面を形成してもよい）。例えば、基質上で細胞を増殖させる／培養することによって、試料（例えば、細胞）を基質全体に広げることができる。

バーコードが標的と近接して存在する場合、標的は、バーコードにハイブリダイズし得る。それぞれ別個の標的が、本開示の別個のバーコードと会合し得るように、バーコードを、非枯渴的比率で接触させることができる。標的とバーコードとの間の効率的な会合を確実にするために、標的をバーコードと架橋させてもよい。

30

【0093】

細胞溶解

細胞及びバーコードの分配後に、細胞を溶解させて、標的分子を遊離させることができる。細胞溶解は、種々の手段のいずれかによって、例えば、化学的若しくは生化学的手段によって、浸透圧ショックによって、又は熱溶解、機械溶解、若しくは光学溶解によって達成することができる。界面活性剤（例えば、SDS、Liドデシルスルフェート、Triton X-100、Tween-20、又はNP-40）、有機溶媒（例えば、メタノール又はアセトン）、若しくは消化酵素（例えば、プロテイナーゼK、ペプシン、又はトリプシン）、又はこれらの任意の組合せを含む細胞溶解緩衝液を添加することによって、細胞を溶解させてもよい。標的とバーコードとの会合を増加させるために、例えば、温度を低下させる及び／又はライセートの粘度を増加させることによって、標的分子の拡散速度を変化させてもよい。

40

【0094】

一部の実施形態では、濾紙を使用することによって、試料を溶解させてもよい。濾紙は、濾紙の上を溶解緩衝液で浸漬可能である。試料の溶解及び基質への試料の標的のハイブリダイゼーションを促進可能な圧力で試料に適用することができる。

一部の実施形態では、溶解は、機械溶解、熱溶解、光学溶解、及び／又は化学溶解によ

50

って実施することができる。化学溶解には、プロテイナーゼ K、ペプシン、及びトリプシンなどの消化酵素の使用が含まれてもよい。溶解は、基質への溶解緩衝液の添加によって実施することができる。溶解緩衝液は、トリス HCl を含んでもよい。溶解緩衝液は、少なくとも約 0.01、0.05、0.1、0.5、若しくは 1 M 又はそれより多いトリス HCl を含んでもよい。溶解緩衝液は、最大で約 0.01、0.05、0.1、0.5、若しくは 1 M 又はそれより多いトリス HCl を含んでもよい。溶解緩衝液は、約 0.1 M のトリス HCl を含んでもよい。溶解緩衝液の pH は、少なくとも約又は最大で約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれより高くてもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液の pH は、約 7.5 である。溶解緩衝液は、塩（例えば、LiCl）を含んでもよい。溶解緩衝液中の塩濃度は、少なくとも約又は最大約 0.1、0.5、若しくは 1 M 又はそれより高くてもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の塩濃度は、約 0.5 M である。溶解緩衝液は、界面活性剤（例えば、SDS、Liドデシルスルフェート、triton X、tween、NP-40）を含んでもよい。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、少なくとも約、最大約、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%、又はそれより高い割合であってもよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、約 1% の Liドデシルスルフェートである。溶解のための方法において使用される時間は、使用される界面活性剤の量に依存し得る。一部の実施形態では、使用される界面活性剤が多いほど、溶解のために必要とされる時間は少ない。溶解緩衝液は、キレート剤（例えば、EDTA、EGTA）を含んでもよい。溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、少なくとも約、又は最大約 1、5、10、15、20、25、若しくは 30 mM であってよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中のキレート剤の濃度は、約 10 mM である。溶解緩衝液は、還元試薬（例えば、ベーターメルカプトエタノール、DTT）を含んでもよい。溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は、少なくとも約、又は最大約 1、5、10、15、若しくは 20 mM であってよい。一部の実施形態では、溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は、約 5 mM である。一部の実施形態では、溶解緩衝液は、約 0.1 M のトリス HCl（約 pH 7.5）、約 0.5 M の LiCl、約 1% のリチウムドデシルスルフェート、約 10 mM の EDTA、及び約 5 mM の DTT を含んでもよい。

【0095】

溶解は、約 4、10、15、20、25、又は 30 °C の温度で実施することができる。溶解は、約 1、5、10、15、20 分、又はそれより長い時間実施することができる。溶解された細胞は、少なくとも約 100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000 個、又はそれより多い標的核酸分子を含んでもよい。溶解された細胞は、最大約 100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000 個、又はそれより多い標的核酸分子を含んでもよい。

【0096】

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に、核酸分子は、共局在化された固体支持体のバーコードとランダムに会合し得る。会合には、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が含まれ得る（例えば、バーコードのオリゴ（dT）は、標的のポリ（A）テールと相互作用し得る）。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（例えば、緩衝液の pH、イオン強度、温度など）は、特定の安定なハイブリッドの形成を促進するように選択することができる。一部の実施形態では、溶解された細胞から放出された核酸分子は、基質上の複数のプローブと会合し得る（例えば、基板上のプローブとハイブリダイズする）。プローブが、オリゴ（dT）を含む場合、mRNA 分子は、プローブにハイブリダイズし、逆転写され得る。オリゴヌクレオチドのオリゴ（dT）部分は、cDNA 分子の第 1 鎖合成のためのプライマーとして作用し得る。例えば、図 2 のブロック 216 に示すバーコード化の非限定的な例において、m

R N A 分子は、ビーズ上のバーコードにハイブリダイズし得る。例えば、一本鎖ヌクレオチド断片は、バーコードの標的結合領域にハイブリダイズし得る。

【0097】

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得る。例えば、標的結合領域は、制限部位オーバーハング（例えば、E c o R I 付着末端オーバーハング）への特異的ハイブリダイゼーションが可能となり得る核酸配列を含み得る。アッセイの手順は、制限酵素（例えば、E c o R I）で標的核酸を処置して、制限部位オーバーハングを生成することをさらに含み得る。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され得る。2つの断片を接続するために、リガーゼ（例えば、T 4 D N A リガーゼ）を使用することができる。

10

【0098】

例えば、図2のブロック220に示すバーコード化の非限定的な例では、複数の細胞（又は複数の試料）に由来する標識標的（例えば、標的バーコード分子）を、次に、例えば、チューブ中にプールすることができる。例えば、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って、標識標的をプールすることができる。

結合した標的バーコード分子の固体支持体ベースのコレクションの回収は、磁性ビーズ及び外部から印加された磁界の使用によって実現され得る。標的バーコード分子がプールされたら、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。さらなる処理としては、例えば、逆転写反応、増幅反応、切断反応、解離反応、及び／又は核酸伸長反応が挙げることができる。さらなる処理反応は、マイクロウェル内で、すなわち、複数の細胞から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。

20

【0099】

逆転写

本開示は、逆転写（例えば、図2のブロック224）を使用して、標的バーコードコンジュゲートを作製するための方法を提供する。標的バーコードコンジュゲートは、バーコードと標的核酸のすべて又は一部分の相補配列（すなわち、バーコード化されたc D N A 分子、例えば、確率的にバーコード化されたc D N A 分子）とを含み得る。会合したR N A 分子の逆転写は、逆転写酵素と一緒に逆転写プライマーを添加することによって起こり得る。逆転写プライマーは、オリゴ（d T）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、又は標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーであってもよい。オリゴ（d T）プライマーは、12～18ヌクレオチド長であってもよく、又は約12～18ヌクレオチド長であってもよく、哺乳動物m R N A の3'末端の内在性ポリ（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、種々の相補部位でm R N A に結合し得る。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、目的のm R N A を選択的にプライミングする。

30

【0100】

一部の実施形態では、標識R N A 分子の逆転写は、逆転写プライマーの添加によって起こり得る。一部の実施形態では、逆転写プライマーは、オリゴ（d T）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、又は標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーである。一般的に、オリゴ（d T）プライマーは、12～18ヌクレオチド長であり、哺乳動物m R N A の3'末端の内在性ポリ（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、種々の相補部位でm R N A に結合し得る。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には、目的のm R N A を選択的にプライミングする。

40

逆転写は、繰返し起こり、複数の標識c D N A 分子を生じ得る。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ステップを含み得る。本方法は、少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、又は100回の逆転写反応を行うステップを含み

50

得る。

【0101】

増幅

標識標的核酸分子の複数のコピーを作製するために、1又は複数回の核酸増幅反応（例えば、図2のブロック228）を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、多重方式で実施することができる。増幅反応を使用して、核酸分子にシーケンシングアダプターを付加することができる。増幅反応は、存在する場合、試料標識のうちの少なくとも一部分を増幅することを含み得る。増幅反応は、細胞標識及び／又はバーコード配列（例えば、分子標識）の少なくとも一部分を増幅させるステップを含み得る。増幅反応は、試料タグ、細胞標識、空間標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的核酸、又はこれらの組合せのうちの少なくとも一部分を増幅することを含み得る。増幅反応は、複数の核酸の0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、100%、又はこれらの値のいずれか2つの間の範囲若しくは数を増幅することを含み得る。本方法は、試料標識、細胞標識、空間標識、及び／又はバーコード配列（例えば、分子標識）を含む標的バーコード分子のcDNAコピーを1つ又は複数生成するために、1又は複数回のcDNA合成反応を行うステップをさらに含み得る。

10

【0102】

一部の実施形態では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を使用して、増幅を実施することができる。本明細書で使用する場合、PCRは、DNAの相補鎖の同時プライマー伸長により特定のDNA配列を*in vitro*で増幅するための反応を指し得る。本明細書で使用する場合、PCRは、以下に限定されないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量PCR、多重PCR、デジタルPCR、及びアセンブリPCRを含む、反応の派生形を包含し得る。

20

【0103】

標識核酸の増幅は、非PCRベースの方法を含み得る。非PCRベースの方法の例としては、以下に限定されないが、多重置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、鎖置換増幅（SDA）、リアルタイムSDA、ローリングサークル増幅、又はサークルー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又は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）、並びにQ β レプリカーゼ（Q β ）法、パリンドロームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを使用する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か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を欠く核酸ポリメラーゼを使用する鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、並びに分岐伸長増幅（RAM）が挙げられる。一部の実施形態では、増幅は、環化転写物を生成しない。

30

【0104】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、標識核酸（例えば、標識RNA、標識DNA、標識cDNA）上でポリメラーゼ連鎖反応を行い、標識アンプリコン（例えば、確率標識アンプリコン）を生成するステップをさらに含む。標識アンプリコンは、二本鎖分子であってもよい。二本鎖分子は、二本鎖RNA分子、二本鎖DNA分子、又はDNA分子にハイブリダイズされたRNA分子を含み得る。二本鎖分子の一方又は両方の鎖は、試料標識、空間標識、細胞標識、及び／又はバーコード配列（例えば、分子標識）を含み得る。標識アンプリコンは、一本鎖分子であってもよい。一本鎖分子は、DNA、RNA、又はこれらの組合せを含み得る。本開示の核酸は、合成核酸又は改変核酸を含み得る。

40

【0105】

増幅は、1つ又は複数の非天然ヌクレオチドの使用を含み得る。非天然ヌクレオチドは

50

、光不安定性又はトリガー性のヌクレオチドを含み得る。非天然ヌクレオチドの例としては、以下に限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ核酸及びロックド核酸（LNA）、並びにグリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）を挙げることができる。非天然ヌクレオチドを増幅反応の1又は複数回のサイクルに添加することができる。非天然ヌクレオチドの添加を使用して、増幅反応の特定のサイクル又は時点として産物を同定することができる。

【0106】

1又は複数回の増幅反応を行うことは、1つ又は複数のプライマーの使用を含み得る。1つ又は複数のプライマーは、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、若しくは15又はそれより多いヌクレオチドを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、若しくは15又はそれより多いヌクレオチドを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、12未満〜15ヌクレオチドを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、複数の標識標的（例えば、確率標識標的）のうちの少なくとも一部分にアニールし得る。1つ又は複数のプライマーは、複数の標識標的の3'末端又は5'末端にアニールし得る。1つ又は複数のプライマーは、複数の標識標的の内部領域にアニールし得る。内部領域は、複数の標識標的の3'末端から少なくとも約50、100、150、200、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900又は1000ヌクレオチドであってもよい。1つ又は複数のプライマーは、プライマーの一定パネルを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1つ又は複数のカスタムプライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1つ又は複数の対照プライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1つ又は複数の遺伝子特異的プライマーを含み得る。

【0107】

1つ又は複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含み得る。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニールし得る。1つ又は複数のカスタムプライマーは、第1の試料標識、第2の試料標識、空間標識、細胞標識、バーコード配列（例えば、分子標識）、標的、又はこれらの任意の組合せにアニールし得る。1つ又は複数のプライマーは、ユニバーサルプライマー及びカスタムプライマーを含み得る。カスタムプライマーは、1つ又は複数の標的を増幅するように設計され得る。標的は、1つ又は複数の試料中の全核酸のサブセットを含み得る。標的は、1つ又は複数の試料中の全標識標的のサブセットを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも96個又はそれより多いカスタムプライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも960個又はそれより多いカスタムプライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも9600個又はそれより多いカスタムプライマーを含み得る。1つ又は複数のカスタムプライマーは、2つ以上の異なる標識核酸にアニールし得る。2つ以上の異なる標識核酸は、1つ又は複数の遺伝子に対応し得る。

【0108】

任意の増幅スキームを本開示の方法において使用することができる。例えば、一スキームでは、1回目のPCRによって、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の配列に対するプライマーを使用して、ビーズに結合した分子を増幅することができる。2回目のPCRでは、Illuminaシーケンシングプライマー2の配列に隣接するネステッド遺伝子特異的プライマー、及びユニバーサルIlluminaシーケンシングプライマー1の配列に対するプライマーを使用して、第1のPCR産物を増幅することができる。3回目のPCRでは、P5及びP7並びに試料インデックスが付加されて、PCR産物をIlluminaシーケンシングライブラリーに入れる。150bp×2シーケンシングを使用するシーケンシングは、リード1上の細

胞標識及びバーコード配列（例えば、分子標識）、リード 2 上の遺伝子、並びにインデックス 1 リード上の試料インデックスを明らかにし得る。

【0109】

一部の実施形態では、化学的切断を使用して基質から核酸を除去することができる。例えば、核酸中に存在する化学基又は修飾塩基を使用して、固体支持体からのその除去を促進することができる。例えば、酵素を使用して、核酸を基質から除去することができる。例えば、核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化によって、基質から除去することができる。例えば、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）による処理を使用して、核酸を基質から除去することができる。例えば、ヌクレオチド切除を実施する酵素、例えば、塩基除去修復酵素、例えば、脱プリン/脱ピリミジン（AP）エンドヌクレアーゼを使用して、核酸を基質から除去することができる。一部の実施形態では、光切断可能な基と光とを使用して、核酸を基質から除去することができる。一部の実施形態では、切断可能なリンカーを、核酸を基質から除去するために使用することができる。例えば、切断可能なリンカーは、ビオチン/アビジン、ビオチン/ストレプトアビジン、ビオチン/ニュートラアビジン、Ig-プロテイン A、光不安定性リンカー、酸若しくは塩基不安定性リンカー基、又はアプタマーのうちの少なくとも 1 つを含み得る。

10

【0110】

プローブが遺伝子特異的である場合、分子は、プローブにハイブリダイズし、逆転写及び/又は増幅され得る。一部の実施形態では、核酸が合成された（例えば、逆転写された）後に、増幅され得る。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される多重方式で実施することができる。増幅によって、核酸にシーケンシングアダプターを付加し得る。

20

【0111】

一部の実施形態では、増幅は、例えば、ブリッジ増幅を用いて基質上で実施することができる。基質上でオリゴ（dT）プローブを使用するブリッジ増幅に適合する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できる。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る各対の第 1 のプライマーであってもよい。テンプレート核酸を含有する試料が粒子に接触しており、かつ 1 回の熱サイクルが実施される場合、テンプレート分子は第 1 のプライマーにアニールされ、かつ第 1 のプライマーはヌクレオチドの添加によって順方向に伸長して、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し得る。次のサイクルの加熱ステップでは、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 のプライマーを通じて粒子に結合した相補的 DNA 鎖を残存させ得る。続くアニーリング及び伸長ステップのアニーリング段階では、相補鎖は、第 1 のプライマーから除去された位置の相補鎖のセグメントに相補的な第 2 のプライマーにハイブリダイズし得る。このハイブリダイゼーションにより、相補鎖は、共有結合により第 1 のプライマーにか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化されたブリッジを第 1 及び第 2 のプライマー間に形成し得る。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逆方向に伸長し、それにより、ブリッジを二本鎖ブリッジに変換し得る。次いで、次のサイクルが開始し、二本鎖ブリッジは変性されて、それぞれ第 1 及び第 2 のプライマーを通じて粒子表面に結合した一方の末端と、それぞれ未結合の他方の末端とを有する 2 つの一本鎖核酸分子を得ることができる。この第 2 のサイクルのアニーリング及び伸長ステップでは、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、新たな一本鎖ブリッジを形成し得る。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 つの新たなブリッジを二本鎖ブリッジに変換する。

30

40

【0112】

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 %

50

、又は100%を増幅することを含み得る。

標識核酸の増幅は、PCRベースの方法又は非PCRベースの方法を含み得る。標識核酸の増幅は、標識核酸の指数関数的増幅を含み得る。標識核酸の増幅は、標識核酸の線形増幅を含み得る。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって実施することができる。PCRは、DNAの相補鎖の同時プライマー伸長による特定のDNA配列の*in vitro*増幅のための反応を指し得る。PCRは、以下に限定されないが、RT-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量PCR、多重PCR、デジタルPCR、サブプレッションPCR、セミサブプレシブPCR、及びアセンブリPCRを含む、反応の派生形を包含し得る。

【0113】

一部の実施形態では、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、以下に限定されないが、多重置換増幅（MDA）、転写媒介増幅（TMA）、核酸配列ベースの増幅（NASBA）、鎖置換増幅（SDA）、リアルタイムSDA、ローリングサークル増幅、又はサークル-サークル増幅が挙げられる。他の非PCRベースの増幅方法としては、DNA若しくはRNA標的を増幅するためのDNA依存性RNAポリメラーゼ駆動RNA転写増幅若しくは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）、にQ β レプリカーゼ（Q β ）法、パリンδροームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを使用する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か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を欠く核酸ポリメラーゼを使用する鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、並びに／又は分岐伸長増幅（RAM）が挙げられる。

【0114】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、増幅アンプリコン（例えば、標的）上でネステッドポリメラーゼ連鎖反応を行うステップをさらに含む。アンプリコンは二本鎖分子であってもよい。二本鎖分子は、二本鎖RNA分子、二本鎖DNA分子、又はDNA分子にハイブリダイズされたRNA分子を含み得る。二本鎖分子の一方又は両方の鎖は、試料タグ又は分子識別子標識を含み得る。代替的に、アンプリコンは、一本鎖分子であってもよい。一本鎖分子は、DNA、RNA、又はこれらの組合せを含み得る。本発明の核酸は、合成核酸又は改変核酸を含み得る。

一部の実施形態では、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ステップを含む。本明細書に開示される方法は、約、又は少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100回、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲の回数の増幅反応を行うステップを含み得る。

【0115】

増幅は、複数の核酸を含む1つ又は複数の試料に1つ又は複数の対照核酸を添加することをさらに含み得る。増幅は、複数の核酸に1つ又は複数の対照核酸を添加することをさらに含み得る。対照核酸は、対照標識を含み得る。

増幅は、1つ又は複数の非天然ヌクレオチドの使用を含み得る。非天然ヌクレオチドは、光不安定性及び／又はトリガー性ヌクレオチドを含み得る。非天然ヌクレオチドの例としては、以下に限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ核酸及びロックド核酸（LNA）、並びにグリコール核酸（GNA）及びトレオース核酸（TNA）が挙げられる。非天然ヌクレオチドを増幅反応の1又は複数回のサイクルに添加することができる。非天然ヌクレオチドの添加を使用して、増幅反応の特定のサイクル又は時点として産物を同定することができる。

【0116】

増幅反応を1又は複数回行うことは、1つ又は複数のプライマーの使用を含み得る。1つ又は複数のプライマーは、1つ又は複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。1つ又は複

10

20

30

40

50

数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約7～9ヌクレオチドを含み得る。1つ又は複数のオリゴヌクレオチドは、12未満～15ヌクレオチドを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、複数の標識核酸のうちの少なくとも一部分にアニールし得る。1つ又は複数のプライマーは、複数の標識核酸の3'末端及び／又は5'末端にアニールし得る。1つ又は複数のプライマーは、複数の標識核酸の内部領域にアニールし得る。内部領域は、複数の標識核酸の3'末端から少なくとも約50、100、150、200、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、650、700、750、800、850、900、又は1000ヌクレオチドであってもよい。1種又は複数のプライマーは、プライマーの一定パネルを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1つ又は複数のカスタムプライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1つ又は複数の対照プライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、少なくとも1つ又は複数のハウスキーピング遺伝子プライマーを含み得る。1つ又は複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含み得る。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニールし得る。1つ又は複数のカスタムプライマーは、第1の試料タグ、第2の試料タグ、分子識別子標識、核酸又はその産物にアニールし得る。1つ又は複数のプライマーは、ユニバーサルプライマー及びカスタムプライマーを含み得る。カスタムプライマーは、1つ又は複数の標的核酸を増幅するように設計され得る。標的核酸は、1つ又は複数の試料中の全核酸のサブセットを含み得る。一部の実施形態では、プライマーは、本開示のアレイに結合したプローブである。

10

20

30

40

50

【0117】

一部の実施形態では、試料中の複数の標的をバーコード化するステップ（例えば、確率的にバーコード化するステップ）は、バーコード化された標的（例えば、確率的にバーコード化された標的）又はそれらの標的のバーコード化された断片のインデックス化されたライブラリーを生成するステップをさらに含む。異なるバーコードのバーコード配列（例えば、異なる確率的バーコードの分子標識）は、互いに異なってもよい。バーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーを生成するステップは、試料中の複数の標的から複数のインデックス化されたポリヌクレオチドを生成するステップを含む。例えば、第1のインデックス化された標的と第2のインデックス化された標的とを含むバーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーについて、第1のインデックス化されたポリヌクレオチドの標識領域は、第2のインデックス化された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、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲、又はおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲で異なってもよい。一部の実施形態では、バーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーを生成するステップは、複数の標的、例えば、mRNA分子を、ポリ（T）領域及び標識領域を含む複数のオリゴヌクレオチドと接触させるステップと、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、逆転写酵素を使用して第1鎖合成を行うステップとを含み、ここで、複数の標的は、異なる配列のうちの少なくとも2つのmRNA分子を含み、複数のオリゴヌクレオチドは、異なる配列のうちの少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。バーコード化された標的のインデックス化されたライブラリーを生成するステップは、一本鎖標識cDNA分子を増幅して、二本鎖標識cDNA分子を生成するステップと、二本鎖標識cDNA分子上でネステッドPCRを行って、標識アンプリコンを生成するステップとをさらに含む得る。一部の実施形態では、本方法は、アダプター-標識アンプリコンを生成するステップを含み得る。

【0118】

バーコード化するステップ（例えば、確率的にバーコード化するステップ）は、核酸バ

ーコード又はタグを使用して、個々の核酸（例えば、DNA又はRNA）分子を標識するステップを含み得る。一部の実施形態では、これは、DNAバーコード又はタグがmRNAから生成される際に、cDNA分子にこれらを付加するステップを含む。ネステッドPCRは、PCR増幅バイアスの最小化を実施することができる。例えば、NGSを使用するシーケンシングのためにアダプターを付加することができる。例えば、図2のブロック232の標的の1つ又は複数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ために、シーケンシング結果を使用することができる。

【0119】

図3は、バーコード化された標的（例えば、確率的にバーコード化された標的）、例えば、バーコード化されたmRNA又はその断片のインデックス化されたライブラリーを生成する非限定的な例示のプロセスを示す略図である。ステップ1に示されるように、逆転写プロセスによって、固有の分子標識配列、細胞標識配列、及びユニバーサルPCR部位を含む各mRNA分子がコードされ得る。特に、RNA分子302のポリ（A）テール領域308への、バーコード（例えば、確率的バーコード）310のセットのハイブリダイゼーション（例えば、確率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のそれぞれは、標的結合領域、例えば、ポリ（dT）領域312、標識領域314（例えば、バーコード配列又は分子）、及びユニバーサルPCR領域316を含み得る。

【0120】

一部の実施形態では、細胞標識配列は、3～20ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、分子標識配列は、3～20ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、複数の確率的バーコードのそれぞれは、ユニバーサル標識及び細胞標識のうちの1つ又は複数をさらに含み、ユニバーサル標識は、固体支持体上の複数の確率的バーコードについて同じであり、細胞標識は、固体支持体上の複数の確率的バーコードについて同じである。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、3～20ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、細胞標識は、3～20ヌクレオチドを含む。

【0121】

一部の実施形態では、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を含み得る。一部の実施形態では、標識領域314は、ユニバーサル標識、次元標識、及び細胞標識のうちの1つ又は複数を含み得る。バーコード配列又は分子標識318は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、又はこれらの値のうち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く、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は最大でこれらの値若しくはそのような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、又はこれらの値のうち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く、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は最大でこれらの値若しくはそのような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、又はこれらの値のうち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く、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。

10

20

30

40

50

次元標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、又はこれらの値のうち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く、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。

【0122】

一部の実施形態では、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、若しくはこれらの値のいずれかの間の数若しくは範囲の異なる標識、例えば、バーコード配列若しくは分子標識318及び細胞標識320を含むか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の異なる標識、例えば、バーコード配列若しくは分子標識318及び細胞標識320を含むか、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の異なる標識、例えば、バーコード配列若しくは分子標識318及び細胞標識320を含むか、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の異なる標識、例えば、バーコード配列若しくは分子標識318及び細胞標識320を含み得る。各標識は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、又はこれらの値のうち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く、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のヌクレオチド長であってもよく、又は最大でこれらの値若しくはそのような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的バーコード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} 、又はこれらの値のうちのいずれかの間の数若しくは範囲のバーコード若しくは確率的バーコード310を含有するか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のバーコード若しくは確率的バーコード310を含有するか、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のバーコード若しくは確率的バーコード310を含有するか、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲のバーコード若しくは確率的バーコード310であり得る。また、バーコード又は確率的バーコード310のセットは、例えば、それぞれ、特有の標識領域314を含有し得る。過剰なバーコード又は確率的バーコード310を除去するために、標識cDNA分子304は精製されてもよい。精製には、Ampureビーズ精製が含まれてもよい。

【0123】

ステップ2に示すように、ステップ1の逆転写プロセスからの産物は、1チューブ中にプールされ、第1のPCRプライマープール及び第1のユニバーサルPCRプライマーを用いてPCR増幅され得る。プールすることは、特有の標識領域314によって可能である。特に、標識cDNA分子304を増幅して、ネステッドPCR標識アンプリコン322を生成することができる。増幅は、多重PCR増幅を含み得る。増幅は、単一反応量で96多重プライマーを用いる多重PCR増幅を含み得る。一部の実施形態では、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} 、又はこれらの値のうちのいずれかの間の数若しくは範囲の多重プライマーを利用するか、又はおよそでこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の多重プライマーを利用するか、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の多重プライマーを利用するか、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の多重プライマーを利用することができる。増幅は、特定の遺伝子を標的化するカスタムプライマー326A～Cを含む第1のPCRプライマープール324及びユニバーサルプライマー328を含み得る。カスタムプライマー326は、標識cDNA分子3

04のcDNA部分306'内の領域とハイブリダイズし得る。ユニバーサルプライマー328は、標識cDNA分子304のユニバーサルPCR領域316とハイブリダイズし得る。

【0124】

図3のステップ3に示すように、ステップ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のユニバーサルPCRプライマーを用いて増幅され得る。ネステッドPCRは、PCR増幅バイアスを最小限に抑えることができる。特に、ネステッドPCR標識アンプリコン322は、ネステッドPCRによってさらに増幅することができる。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のユニバーサルPCRプライマー328'とを含む多重PCRを含み得る。ネステッドPCRプライマープール328は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、又はこれらの値のうち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を含有するか、又はおよそこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の異なるネステッドPCRプライマー330を含有するか、又は少なくともこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の異なるネステッドPCRプライマー330を含有するか、又は最大でこれらの値若しくはそのような数若しくは範囲の異なるネステッドPCRプライマー330を含有し得る。ネステッドPCRプライマー332は、アダプター334を含有し、標識アンプリコン322のcDNA部分306'内の領域とハイブリダイズし得る。ユニバーサルプライマー328'は、アダプター336を含有し、標識アンプリコン322のユニバーサルPCR領域316とハイブリダイズし得る。よって、ステップ3は、アダプター標識アンプリコン338を生成する。一部の実施形態では、ネステッドPCRプライマー332と第2のユニバーサルPCRプライマー328'は、アダプター334及び336を含有しなくてもよい。代わりに、アダプター334及び336は、ネステッドPCRの産物とライゲートして、アダプター標識アンプリコン338を生成することができる。

【0125】

ステップ4に示すように、ステップ3からのPCR産物は、ライブラリー増幅プライマーを使用するシーケンシングのためにPCR増幅され得る。特に、アダプター334及び336を使用して、アダプター標識アンプリコン338に関する1又は複数回の追加のアッセイを行うことができる。アダプター334及び336は、プライマー340及び342とハイブリダイズされ得る。1つ又は複数のプライマー340及び342は、PCR増幅プライマーであってもよい。1つ又は複数のプライマー340及び342は、シーケンシングプライマーであってもよい。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、1つ又は複数のアダプター334及び336を使用することができる。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、1つ又は複数のアダプター334及び336を使用することができる。プライマー342は、プレートインデックス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的バーコード310の同じセットを使用して生成されたアンプリコンを、NGSを使用する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。

【0126】

完全長単一細胞RNAシーケンシング

ハイスループット単一細胞RNAシーケンシングによって、複雑かつ不均一な生体試料についての理解は変化した。しかし、ほとんどの方法はmRNA転写物情報の3'のみの分析しか可能にせず、スプライスバリエーション、選択的転写開始部位及びT細胞及びB細胞の受容体と抗体とのVDJ接合などの再編成による可変性の高い遺伝子座の分析が制限される場合がある。T細胞とB細胞の両方に関して、現在利用可能なCプライミングベースのアプローチは、V(D)J中へと読み進むことができるが、上流のV領域を失う。よって、現在利用可能な方法は、完全長核酸標的（例えば、V(D)Jを含有する転写物）の

情報を得るための能力を限定する場合がある。当技術分野における特定の問題は、多数の再構成事象が起こり得ることにより多くのVDJが存在するため、より長いリードとしてVDJ配列を知る必要があるということである。配列（例えば、V（D）Jを含有する転写物）の計数と前記配列の同定（特に、完全長配列の同定）の両方の方法に対する必要性が存在する。

【0127】

一部の実施形態では、完全長V（D）J情報を得るための方法（例えば、RhapsodyシステムでのIlluminaシーケンシングによる）が提供される。T及びB細胞受容体は、Vセグメント、Dセグメント（TCRベータ及びBCR重鎖のみに関する）、Jセグメント及びmRNAの3'末端の定常領域を含有する。V（D）J接合部により構成されたCDR3は、レパートリー多様性のバルクを含有し、Illuminaショートリードプラットフォームでシーケンシングされるのに十分短い。しかし、Illuminaショートリードの性能では完全長V（D）J情報を得るための能力が限定されるため、完全長Vセグメント及びDセグメント及びJセグメント情報も有用であり、ロングリードシーケンシング技術を用いなければ容易に得ることができない。本明細書において提供される方法は、ユーザーが、単一のライブラリー及びIlluminaシーケンサーに対応するシーケンシングのランから、CDR3情報と、完全長Vセグメント、完全長Dセグメント配列及び／又は完全長Jセグメント配列の両方を得ることを可能にするものである。よって、本明細書において提供される方法の一部の実施形態により、完全長免疫受容体mRNA配列が得られる。

【0128】

本明細書の開示は、対応するシーケンサー（例えば、Illumina（登録商標）シーケンサー）でシーケンシングするために、DNA製品（例えば、BD Rhapsody Single Cell Analysis SystemのDNA製品）から全トランスクリプトーム分析（WTA）ライブラリーを生成するための方法を含む。一部の実施形態では、標的化RNA分析により、一般に、低発現標的に対してより高い感度が得られ、一方、WTA RNA分析により、調べられる遺伝子がより幅広くなる。一部の実施形態では、所望の標的の増幅を成功させるには、各RNAの3'末端及び目的のモデル系における各RNAの3'末端のポリアデニル化部位の使用の徹底的な理解が必要になり得る。WTA法は、例えばBD Rhapsodyと共に使用した場合、1）興味深いRNA標的をそれらのモデル系において同定して、設計のための遺伝子のパネルを同定すること；2）トランスクリプトームの3'末端をそれらのモデル系においてBD Rhapsodyに対する新しい世代のPCRパネル設計へのインプットとして特徴付けること、及び3）ユーザーが、標準的なBD Rhapsody標的化アプローチと比較してより幅広い遺伝子をアッセイすることによって生物学的発見をなすことを可能にすることを含め、いくつかのレベルの情報を得ることを可能にする。

【0129】

一部の実施形態では、3'ベース、内部ベース、及び／又は5'ベースの全トランスクリプトーム分析（WTA）のためのシステム、方法、組成物、及びキットが提供される。本明細書の開示は、5'、3'、及び内部WTAライブラリー生成のための方法及び組成物を含む。本開示の方法及び組成物は、例えばRhapsodyシステムを使用する完全長単一細胞RNAシーケンシングに使用することができる。本開示の方法及び組成物は、BD Rhapsody Systemを使用した、単一細胞におけるmRNAの完全長全トランスクリプトーム分析（WTA）のシーケンシングを可能にする。現在利用可能なWTAアッセイでは、mRNAの3'末端のポリAテールを捕捉し、固有の分子インデックス（UMI）及び細胞標識（CL）を付加することにより、mRNAの3'末端をシーケンシングする。さらに、現在利用可能な方法では、cDNAの5'末端に、ビーズにまた架橋する配列を付加し、転写物の5'末端にUMI及びCLを付加することにより、mRNAの5'末端をプロファイリングすることができる。しかし、シーケンサーによりプロファイリングすることができるのは小さな断片（通常約300～600塩基対）のみである。

これは、UMI及びCLを内部領域に付加するための利用可能な方法がないので、3'又は5'末端から約750塩基を超えるいかなる領域もプロファイリングすることができないことを意味する。現在利用可能なハイスループットscRNAseq法は、転写物の3'又は5'末端のシーケンシングを提供するものである。現在利用可能な方法のいくつかは、3'又は5'のいずれかの解決を可能にするが、両方同時ではない。完全長RNAは他の方法では捕捉されない。現在利用可能なロースループットscRNAseq法は、完全長シーケンシングを提供し得るが、最大細胞数ははるかに少なく、また、高度に労働集約的なプロセスである。Illuminaデバイスでは長い配列のシーケンシングが限定されるので、新しい方法及び組成物が必要である。本明細書において提供される方法及び組成物は、現在利用可能な方法のこれらの不都合を克服することができる。一部の実施形態では、ハイスループット実験のための完全長scRNAseq解決法が提供される。本明細書において提供されるシステム、方法、組成物、及びキットは、一部の実施形態では、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる2022年9月13日に出願された「完全長単一細胞RNAシーケンシング(FULL LENGTH SINGLE CELL RNA SEQUENCING)」という表題のPCT特許出願第PCT/US 22/76366号に記載されている方法及び組成物と一緒に使用することができる。

10

【0130】

一部の実施形態では、完全長RNAシーケンシングを実施するための組成物及び方法（例えば、Rhapsodyシステムを使用する）が提供される。現在利用可能なワークフローでは、単一細胞レベルで3'又は5'mRNAシーケンシング分析が提供されるが、完全長ではない。前記現在利用可能な方法でRNAの内部配列を提供することができない理由は、1) Illuminaシーケンサーでシーケンシングすることができるライブラリーのサイズが限定されているから、2) 単一細胞情報を得るために、細胞標識及びUMI（例えば、分子標識）がライブラリーの末端に存在すべきであるからである。RNA/cDNAに対する現行の捕捉配列は、ポリA（mRNAの3'末端）又はテンプレートスイッチオリゴヌクレオチド（mRNAの5'末端）を通じたものである。したがって、これらのアプローチでは、3'及び5'末端配列しか提供されない。内部配列に細胞標識を連結するためには、オリゴヌクレオチドを内部領域の近傍に置くことが重要である。本明細書において提供される方法及び組成物の一部の実施形態では、ビーズ上の標的化パネル配列のランダムー／内部seqを使用して、内部mRNA配列と関連付けられる細胞標識情報を付加する。一部の実施形態では、本明細書に記載のアプローチは、鎖置換活性を有するポリメラーゼを利用して、内部配列の多数のコピーを生成する、及び／又は、鎖置換活性を有さないポリメラーゼを利用して、内部配列の少数の領域を生成する。これらの2つのアプローチを、完全長シーケンシングの目的に応じて利用することができる。ユーザーが完全なカバレッジのcDNA配列を望む場合、1つ目のアプローチを使用することができる。ユーザーが、内部領域のシーケンシングを望むが、シーケンシングの費用が高いことから完全カバレッジは求めない場合、後者の方法が適する。ユーザーがすべてのmRNAの内部配列を望む場合、ランダムーを使用することができる。ユーザーが内部配列として特定の標的化遺伝子セット（すなわち、変異ホットスポット）を望む場合、標的化遺伝子特異的配列を付加することができる。図4A～4Hは、本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列（例えば、免疫受容体のV(D)J領域）の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析(WTA)の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。ワークフローは、以下のステップのうちの1つ又は複数を含み得る：逆転写400a、変性400b、分子間ハイブリダイゼーション400c、切断剤との接触400d、鎖置換活性を有さないポリメラーゼとの接触400e、鎖置換活性を有するポリメラーゼとの接触400f、変性及びプライマーハイブリダイゼーション400g、変性及びプライマーハイブリダイゼーション400h、プライマー伸長、ライブラリー生成、及びシーケンシング400i、並びにプライマー伸長、ライブラリー生成、及びシーケンシング400j。核酸標的406（例えば、mRNA）は、コード配列（例えば、414r）及びポリAテール（例えば、408）を含み得る。第1の複数のオリゴヌ

20

30

40

50

クレオチドバーコード 402a は、第1のユニバーサル配列 426、第1の分子標識 422、及び核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列（例えば、第1の標的結合領域 404）を含み得る。第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコード 416（例えば、416a1、416a2）は、第2のユニバーサル配列 428、切断ドメイン 418、及びブロッキング基 420、第2の分子標識 430、第2の標的結合領域（403）を含み得る。ブロッキング基に対して5'側に切断ドメインが位置していてもよい。オリゴヌクレオチドバーコードは、細胞標識 432を含み得る。オリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体 401に付着していてもよい。ワークフローは、以下の産物：402b、402c、414c、402c、416c、416d、及び416eのうちの1つ又は複数の生成を含み得る。産物は、本明細書に記載のエLEMENT逆相補体（rc）を含み得る。ワークフローは、産物をランダムプライマー 446と接触させるステップを含み得、ランダムプライマー 446は、第3のユニバーサル配列 448を含み得る。

10

【0131】

一部の実施形態では、本明細書において提供される固体支持体（例えば、Rhapsodyビーズ）は、mRNA/cDNAの3'又は5'末端を通じた捕捉のために、オリゴdT捕捉配列及び／又はテンプレートスイッチオリゴ捕捉配列をビーズ上に有する。固体支持体（例えば、Rhapsodyビーズ）においてオリゴヌクレオチドを捕捉するためのランダム／遺伝子特異的配列の付加は使用されていない。しかし、本明細書に記載の通り、これらのオリゴを固体支持体（例えば、Rhapsodyビーズ）に存在させることにより、完全長RNAseqを可能にするために、内部配列を含有するライブラリーを生成することが可能になり得る。ブロッキングされたプライマーを付加することにより、ユーザーがプライマーの使用時間を制御することができ、それにより、ライブラリー調製の間のノイズ生成が低減し得る。

20

【0132】

図5A～5Eは、本明細書において提供されるバーコード化方法及び組成物を使用した、核酸標的の配列（例えば、免疫受容体のV(D)J領域）の決定及び完全長全トランスクリプトーム分析（WTA）の非限定的な例示的ワークフローの概略図を示す。

【0133】

図5Aは、非限定的な例示的固体支持体（例えば、ビーズ）を示す。完全長RNAseqは、示されているビーズ（例えば、rhapsodyビーズ）及び会合したオリゴヌクレオチドを含み得る。ワークフローは、mRNA捕捉及び逆転写と、それに続く、RNA（上のオリゴヌクレオチド）を除去するためのmRNA変性又はリボヌクレアーゼHの使用を含み得る。ランダム（UMI、分子標識）又は遺伝子特異的配列は、この配列がRNAに結合すること及び逆転写を防止するためにrhAmp末端を有してもよい（下のオリゴヌクレオチド）。rhAmp PCRは、ブロッキングされた不活性プライマーの標的とのアニーリングを含み得る。前記プライマーは、ブロッキング部分に対して5'側に突出及び内部RNA塩基を有してもよい。リボヌクレアーゼH2は、ハイブリダイズした内部RNA塩基を認識し得、標的DNAにプライマーがハイブリダイズすると、RNA塩基の5'側で切断が起こり得る。すると、DNAポリメラーゼが新たに脱ブロッキングされたプライマーを伸長させることができるようになる。

30

40

【0134】

図5Bは、本明細書において提供される第1及び第2のワークフローの非限定的な例示の実施形態を示す。一部の実施形態では、ワークフローは、鎖置換活性を有さない完全長RNAseqを含む第1のワークフローである。第1のワークフローは、cDNA上のランダマーのハイブリダイゼーションを含み得る。第1のワークフローは、ブロッカーを遊離させるためのリボヌクレアーゼH2処理及びポリメラーゼ反応を含み得る。第1のワークフローの一部の実施形態では、鎖置換活性がないことに起因して、他のランダム結合領域の最後で重合が停止する。この第1のワークフローにより、cDNAの異なる領域のDNA片を生成することができる。この第1のワークフローは、ユーザーが中レベルの完

50

全長カバレッジを所望する場合に理想的であり得る。一部の実施形態では、ワークフローは、鎖置換活性を有する完全長RNAseqを含む第2のワークフローである。第2のワークフローは、cDNA上のランダムなハイブリダイゼーションを含み得る。第2のワークフローは、ブロッカーを遊離させるためのリボヌクレアーゼH2処理及びポリメラーゼ反応を含み得る。一部の実施形態では、第2のワークフローでは、鎖置換活性に起因して、重合が進み続け、多数の異なるサイズのDNAが生成される。図5Cは、本明細書において提供される第2のワークフロー（完全長RNAseq（鎖置換活性を有する））の非限定的な例示的实施形態を示す。第2のワークフローでは、鎖置換活性に起因して、重合が進み続け、多数の異なるサイズのDNAが生成される。これは、ユーザーが完全長配列の完全なカバレッジを所望する場合に理想的である。

10

【0135】

図5Dは、PTAを伴わない完全長RNAseqの非限定的な例示的实施形態を示す。一部の実施形態では、重合により、異なるサイズの産物が生成される。図5Eは、RPE-PCR（R2配列を用いたランダムを使用する）の非限定的な例示的实施形態を示す。T1オリゴ由来のUMIをランダムとして使用することができ、さらにPCRアンプリコンをフィルタリングするために使用することができる。一部の実施形態では、T1オリゴ由来のUMIを分子数の計数に使用することができる。一部の実施形態では、T1オリゴ由来のUMIを分子数の計数に使用しない（例えば、1種よりも多くのUMI/mRNA転写物が存在する）。一部の実施形態では、R2アダプターを持たせるために、RPEを繰り返す。一部の実施形態では、他のビーズ由来のランダムをcDNAに結合させることができる。一部の実施形態では、ランダムを使用する代わりに、配列特異的プライマーを使用して、目的の特定の遺伝子（例えば、遺伝子候補におけるがん関連変異検出）の完全なカバレッジを単一細胞レベルで生じさせることができる。

20

【0136】

本明細書の開示は、試料中の核酸標的を標識するための方法を含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーを第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと接触させるステップであって、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードが、第1のユニバーサル配列、第1の分子標識、及び核酸標的にハイブリダイズすることが可能な第1の標的結合領域を含む、ステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、核酸標的のコピーにハイブリダイズした第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させて、それぞれが第1のユニバーサル配列、第1の分子標識、及び核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子を生成するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子を、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードと、ハイブリダイゼーションのために接触させるステップを含む。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2のユニバーサル配列、切断ドメイン、及びブロッキング基を含む。一部の実施形態では、ブロッキング基により、オリゴヌクレオチドバーコードの伸長を防止することが可能であり、ブロッキング基に対して5'側に切断ドメインが位置しており、切断ドメインがバーコード化された核酸分子にハイブリダイズすると、オリゴヌクレオチドバーコードを切断ドメインの内部又は切断ドメインに隣接した点において切断酵素により切断することが可能である。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを切断酵素と接触させ、それによって、前記オリゴヌクレオチドバーコードからブロッキング基を除去するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、バーコード化された核酸分子にハイブリダイズした第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させて、複数の伸長したバーコード化された核酸分子を生成するステップを含む。

30

40

【0137】

一部の実施形態では、複数の伸長したバーコード化された核酸分子の各伸長したバーコード化された核酸分子は、核酸標的の少なくとも一部分の配列を含む。一部の実施形態で

50

は、切断酵素は、リボヌクレアーゼH酵素及び／又はリボヌクレアーゼH2酵素であり、リボヌクレアーゼH2酵素は、パイロコッカス・アビシリボヌクレアーゼH2酵素であってもよい。一部の実施形態では、切断酵素は、耐熱性であり、且つ低温において活性が低下するホットスタート切断酵素である。一部の実施形態では、ホットスタート切断酵素は、(a) G12Aアミノ酸置換；(b) P13Tアミノ酸置換；(c) G169Aアミノ酸置換；又は(d) これらの組合せを含むパイロコッカス・アビシリボヌクレアーゼH2である。一部の実施形態では、切断酵素は、化学修飾されたものである。一部の実施形態では、切断酵素は、耐熱性であり、且つ低温において活性が低下する、化学修飾されたホットスタート切断酵素であり、切断酵素は、低温において抗体との相互作用によって可逆的に不活化するものであってもよい。一部の実施形態では、切断ドメインは、リボヌクレアーゼH酵素によって切断することが可能な1つ又は複数のリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、以下の部分：DNA残基、脱塩基残基、修飾ヌクレオシド、又は修飾リン酸ヌクレオチド間連結のうちの1つ又は複数を含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、少なくとも1つのRNA塩基を含む。一部の実施形態では、切断ドメインは、1つ又は複数の2'-修飾ヌクレオシドを含み、1つ又は複数の修飾ヌクレオシドは、2'-フルオロヌクレオシドであってもよい。一部の実施形態では、ブロッキング基は、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端ヌクレオチドに結合している。一部の実施形態では、ブロッキング基は、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端にある又はその近傍にある。一部の実施形態では、ブロッキング基が、2', 3'-ジデオキシヌクレオチド、リボヌクレオチド残基、2', 3'-SHヌクレオチド、又は2'-O-PO3ヌクレオチドである。一部の実施形態では、ブロッキング基は、非ヌクレオチド修飾を含む。一部の実施形態では、ブロッキング基は、ナフチル-アゾ化合物、スペーサー及び／又はビオチンをさらに含む。

【0138】

一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを用いて第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼを用いて第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップにより、第1の分子標識の相補体及び第1のユニバーサル配列の相補体を含む伸長したバーコード化された核酸分子を生成することが可能である。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、鎖置換活性を有さないDNAポリメラーゼを用いて第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、ポリメラーゼは、Phi29 DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼI、Bsu DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、VENT (商標) DNAポリメラーゼ、DEEPVENT (商標) DNAポリメラーゼ、LongAmp (登録商標) Taq DNAポリメラーゼ、LongAmp (登録商標) Hot Start Taq DNAポリメラーゼ、Crimson LongAmp (登録商標) Taq DNAポリメラーゼ、Crimson Taq DNAポリメラーゼ、OneTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、OneTaq (登録商標) Quick-Load (登録商標) DNAポリメラーゼ、HemoKlenTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、REDTaq (登録商標) DNAポリメラーゼ、Phusion (登録商標) DNAポリメラーゼ、Phusion (登録商標) High-Fidelity DNAポリメラーゼ、Platinum Pfx DNAポリメラーゼ、AccuPrime Pfx DNAポリメラーゼ、Klenow断片、Pwo DNAポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、これらの誘導体、又はこれらの任意の組合せからなる群から選択される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長

させるステップは、中温性DNAポリメラーゼ、好熱性DNAポリメラーゼ、好冷性DNAポリメラーゼ、又はこれらの任意の組合せを使用してオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップは、5'から3'へのエキソヌクレアーゼ活性及び3'から5'へのエキソヌクレアーゼ活性のうちの少なくとも1つを欠くDNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドバーコードの3'末端を伸長させるステップを含み、DNAポリメラーゼは、Klenow断片を含んでもよい。一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップは、逆転写酵素を使用して第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップを含む。一部の実施形態では、逆転写酵素は、末端転移酵素活性の能力がある。一部の実施形態では、鎖置換活性を有する逆転写酵素は、PrimeScript逆転写酵素、M-MuLV逆転写酵素、SmartScribe逆転写酵素、Maxima H Minus逆転写酵素、及び／又はSuperscript II逆転写酵素である。一部の実施形態では、逆転写酵素は、ウイルス逆転写酵素を含み、ウイルス逆転写酵素は、マウス白血病ウイルス（MLV）逆転写酵素又はモロニー Maus 白血病ウイルス（MMLV）逆転写酵素であってもよい。

10

20

30

40

50

【0139】

一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2の分子標識を含み、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる第2の分子標識配列を含み、各第2の分子標識は、少なくとも6個のヌクレオチドを含んでもよく、さらに、第2の分子標識配列は、ランダム配列であってもよい。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、バーコード化された核酸分子に、第2の分子標識と核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列との間のハイブリダイゼーションによってハイブリダイズしている。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、第2の標的結合領域を含む。一部の実施形態では、第1の標的結合領域及び／又は第2の標的結合領域は、ポリ（dA）領域、ポリ（dT）領域、ランダム配列、遺伝子特異的配列、又はこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードは、バーコード化された核酸分子に、第2の標的結合領域と核酸標的の少なくとも一部分に相補的な配列との間のハイブリダイゼーションによってハイブリダイズしている。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも10個は、異なる第2の標的結合領域を含み、標的結合領域のうちの少なくとも2つは、異なる核酸標的の相補体に結合することが可能であってもよく、さらに、標的結合領域のうちの少なくとも2つは、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズすることが可能であってもよい。一部の実施形態では、第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの2つ以上のオリゴヌクレオチドバーコードが、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズして、2つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子を生成することが可能である。一部の実施形態では、前記2つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子は、同じ核酸標的の相補体の異なる領域にハイブリダイズする第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの2つ以上のオリゴヌクレオチドバーコードによって生成することが可能である。一部の実施形態では、前記2つ以上の伸長したバーコード化された核酸分子は、核酸標的の少なくとも約50%全体の配列を合わせて含む。

【0140】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化された核酸分子を変性させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の伸長したバーコード化された核酸分子を変性させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化された核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識、別個の配列を有する第2の分子標識、又はそれらの組合せの数

に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、核酸標的のコピー数を決定するステップは、複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む、複数のバーコード化された核酸分子のうちのバーコード化された核酸分子、若しくはその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数；及び／又は複数の核酸標的のそれぞれの配列を含む、複数の伸長したバーコード化された核酸分子のうちの伸長したバーコード化された核酸分子と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識、別個の配列を有する第2の分子標識、若しくはそれらの組合せの数に基づいて、試料中の複数の核酸標的のそれぞれのコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、複数の核酸標的のそれぞれの配列は、複数の核酸標的のそれぞれの部分配列を含む。一部の実施形態では、複数のバーコード化された核酸分子内の核酸標的の配列は、核酸標的の部分配列を含む。一部の実施形態では、核酸標的は、mRNAを含む。一部の実施形態では、試料は、単一細胞、任意に、免疫細胞、さらに任意に、B細胞又はT細胞を含む。一部の実施形態では、試料は、複数の細胞、複数の単一細胞、組織、腫瘍試料、又はこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、単一細胞は、循環腫瘍細胞を含む。

10

20

30

40

50

【0141】

一部の実施形態では、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードの第1のユニバーサル配列は、第1の分子標識及び第1の標的結合領域に対して5'側にある；及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードの第2のユニバーサル配列は、第2の分子標識及び／又は第2の標的結合領域に対して5'側にある。

【0142】

一部の実施形態では、本方法は、増幅プライマー及び第1のユニバーサル配列を含むプライマー又はその一部を使用して複数のバーコード化された核酸分子を増幅させて、それによって、核酸標的の配列又はその一部を含む第1の複数の単一標識核酸分子を生成するステップを含み、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第1の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、増幅プライマー及び第2のユニバーサル配列又はその一部を含むプライマーを使用して複数の伸長したバーコード化された核酸分子を増幅させて、それによって、核酸標的の配列又はその一部を含む第2の複数の単一標識核酸分子を生成するステップを含み、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第2の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第2の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、増幅プライマーは、第4のユニバーサル配列を含む。一部の実施形態では、増幅プライマーは、標的特異的プライマーである。一部の実施形態では、標的特異的プライマーは、免疫受容体、免疫受容体の定常領域、免疫受容体の可変領域、免疫受容体の多様性領域、及び／又は免疫受容体の可変領域と多様性領域の接合部に特異的にハイブリダイズする。一部の実施形態では、免疫受容体は、TCR及び／又はBCR受容体であり、TCRは、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、又はこれらの任意の組合せを含んでもよく、BCR受容体は、BCR重鎖及び／又はBCR軽鎖を含む。

【0143】

一部の実施形態では、本方法は、ランダムプライマーを複数のバーコード化された核酸分子にハイブリダイズさせ、ランダムプライマーを伸長させて、第1の複数の伸長産物を生成するステップであって、ランダムプライマーが、第3のユニバーサル配列又はその相補体を含む、ステップと；第3のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、及び第1のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第1の複数の伸長産物を増幅させて、それによって、第3の複数の単一標識核酸分子又はその産物を生成するステップとを含む。一部の実施形態では、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第3の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第1の分子標識の数に基づいて、

試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、ランダムプライマーを複数の伸長したバーコード化された核酸分子にハイブリダイズさせ、ランダムプライマーを伸長させて第2の複数の伸長産物を生成するステップであって、ランダムプライマーが、第3のユニバーサル配列又はその相補体を含む、ステップと；第3のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマー、及び第2のユニバーサル配列又はその相補体にハイブリダイズすることが可能なプライマーを使用して第2の複数の伸長産物を増幅させて、それによって、第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物を生成するステップとを含む。一部の実施形態では、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップは、第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物と会合した、別個の配列を有する第2の分子標識の数に基づいて、試料中の核酸標的のコピー数を決定するステップを含む。

10

【0144】

一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、第3のユニバーサル配列、及び／又は第4のユニバーサル配列は、同じである。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、第3のユニバーサル配列、及び／又は第4のユニバーサル配列は、異なる。一部の実施形態では、第1のユニバーサル配列、第2のユニバーサル配列、第3のユニバーサル配列、及び／又は第4のユニバーサル配列は、シーケンシングプライマー及び／又はシーケンシングアダプターの結合性部位、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部分を含む。一部の実施形態では、シーケンシングアダプターは、P5配列、P7配列、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部分を含む。一部の実施形態では、シーケンシングプライマーは、リード1シーケンシングプライマー、リード2シーケンシングプライマー、それらの相補配列、及び／又はそれらの一部分を含む。

20

【0145】

一部の実施形態では、本方法は、複数のバーコード化された核酸分子又はその産物の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、シーケンシングアダプターを、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物に結合させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、複数の伸長したバーコード化された核酸分子又はその産物の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、シーケンシングアダプターを、伸長したバーコード化された核酸分子、バーコード化された核酸分子、その産物、又はこれらの任意の組合せに結合させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、シーケンシングアダプターを、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の組合せに結合させるステップを含む。一部の実施形態では、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の配列情報を得るステップは、第1、第2、第3、及び第4の複数の単一標識核酸分子又はその産物のうちの1つ又は複数の複数のシーケンシングリードを含むシーケンシングデータを得るステップを含み、複数のシーケンシングリードのそれぞれが、(1)細胞標識配列、(2)分子標識配列、及び／又は(3)核酸標的の部分配列を含む。

30

40

【0146】

一部の実施形態では、本方法は、試料の単一細胞を示す、それぞれ固有の細胞標識配列について、核酸標的の複数のシーケンシングリードのそれぞれをアライメントさせて、核酸標的のアライメントされた配列を生成するステップを含む。一部の実施形態では、核酸標的のアライメントされた配列は、核酸標的のcDNA配列の少なくとも50%、核酸標的のcDNA配列の少なくとも70%、核酸標的のcDNA配列の少なくとも90%、又は核酸標的のcDNA配列の完全長を含む。一部の実施形態では、核酸標的は免疫受容体であり、免疫受容体は、BCR軽鎖、BCR重鎖、TCRアルファ鎖、TCRベータ鎖、TCRガンマ鎖、TCRデルタ鎖、又はこれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実

50

施形態では、核酸標的のアライメントされた配列は、相補性決定領域 1 (CDR1)、相補性決定領域 2 (CDR2)、相補性決定領域 3 (CDR3)、可変領域、可変領域の完全長、又はこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、核酸標的のアライメントされた配列は、可変領域、多様性領域、可変領域、多様性領域及び／若しくは定常領域の接合部、又はこれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、単一細胞の BCR 軽鎖及び BCR 重鎖の配列情報を得るステップを含み、BCR 軽鎖及び BCR 重鎖の配列情報は、BCR 軽鎖及び／又は BCR 重鎖の、相補性決定領域 1 (CDR1)、CDR2、CDR3、又はこれらの任意の組合せの配列を含んでもよい。一部の実施形態では、本方法は、得られた配列情報に基づいて、単一細胞の BCR 軽鎖と BCR 重鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、試料は、複数の単一細胞を含み、本方法は、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも 50% の BCR 軽鎖と BCR 重鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、単一細胞の TCR アルファ鎖及び TCR ベータ鎖の配列情報を得るステップを含み、TCR アルファ鎖及び TCR ベータ鎖の配列情報は、TCR アルファ鎖及び／又は TCR ベータ鎖の、相補性決定領域 1 (CDR1)、CDR2、CDR3、又はこれらの任意の組合せの配列を含んでもよい。一部の実施形態では、本方法は、得られた配列情報に基づいて、単一細胞の TCR アルファ鎖と TCR ベータ鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、試料は、複数の単一細胞を含み、本方法は、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも 50% の TCR アルファ鎖と TCR ベータ鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、配列情報を得るステップは、単一細胞の TCR ガンマ鎖及び TCR デルタ鎖の配列情報を得るステップを含む。一部の実施形態では、TCR ガンマ鎖及び TCR デルタ鎖の配列情報は、TCR ガンマ鎖及び／又は TCR デルタ鎖の、相補性決定領域 1 (CDR1)、CDR2、CDR3、又はこれらの任意の組合せの配列を含む。一部の実施形態では、本方法は、得られた配列情報に基づいて、単一細胞の TCR ガンマ鎖と TCR デルタ鎖を対合させるステップを含む。一部の実施形態では、試料は、複数の単一細胞を含み、本方法は、得られた配列情報に基づいて、前記単一細胞の少なくとも 50% の TCR ガンマ鎖と TCR デルタ鎖を対合させるステップを含む。

10

20

30

40

50

【0147】

一部の実施形態では、分子標識の相補体は、分子標識の逆相補配列又は分子標識の相補配列を含む。一部の実施形態では、複数のバーコード化された核酸分子は、バーコード化されたデオキシリボ核酸 (DNA) 分子、バーコード化されたリボ核酸 (RNA) 分子、又はそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、核酸標的は、核酸分子を含み、核酸分子は、リボ核酸 (RNA)、メッセンジャー RNA (mRNA)、マイクロ RNA、低分子干渉 RNA (siRNA)、RNA 分解生成物、ポリ (A) テールを含む RNA、又はこれらの任意の組合せを含んでもよく、さらに、mRNA は、免疫受容体をコードしてもよい。一部の実施形態では、核酸標的は、細胞成分結合試薬を含む、且つ／又は、核酸分子は、細胞成分結合試薬に会合しており、方法は、核酸分子と細胞成分結合試薬を解離させるステップをさらに含んでもよい。一部の実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちの少なくとも 10 個は、異なる分子標識配列を含む。一部の実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各分子標識は、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードは、固体支持体と会合している。一部の実施形態では、同じ固体支持体に会合している第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードはそれぞれ、同一の試料標識を含む。一部の実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各試料標識は、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードはそれぞれ、細胞標識を含む。一部の実施形態では、第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各細胞標識は、少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、同じ固体支持体に会合している第 1 及び／又は第 2 の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードは、同じ細胞標識を含

む。一部の実施形態では、異なる固体支持体に会合している第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードのうちのオリゴヌクレオチドバーコードは、異なる細胞標識を含む。一部の実施形態では、本方法は、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、1, 2-プロパンジオール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、グリセロール、ホルムアミド、7-デアザ-GTP、アセトアミド、塩化テトラメチルアンモニウム塩、ベタイン、又はこれらの任意の組合せのうちの1つ又は複数の存在下で、オリゴヌクレオチドバーコードを伸長させるステップを含む。

【0148】

一部の実施形態では、固体支持体は、合成粒子、平面表面、又はこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、試料は、単一細胞を含み、本方法は、第1及び第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含む合成粒子を、試料中の単一細胞と会合させるステップを含む。一部の実施形態では、本方法は、合成粒子を単一細胞と会合させた後に、単一細胞を溶解させるステップを含み、単一細胞を溶解させるステップは、試料を加熱するステップ、試料を界面活性剤と接触させるステップ、試料のpHを変更するステップ、又はこれらの任意の組合せを含んでもよい。一部の実施形態では、合成粒子と単一細胞は同じ区画中にあり、区画はウェル又は液滴であってもよい。一部の実施形態では、第1及び／若しくは第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つのオリゴヌクレオチドバーコードは、合成粒子上に固定化されているか若しくは部分的に固定化されている、又は第1及び／若しくは第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの少なくとも1つのオリゴヌクレオチドバーコードは、合成粒子内に封入されているか若しくは部分的に封入されている。一部の実施形態では、合成粒子は、崩壊可能であり、崩壊可能なハイドロゲル粒子であってもよい。一部の実施形態では、合成粒子が、ビーズを含み、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、磁性ビーズ、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若しくはこれらの任意の組合せであってもよい。一部の実施形態では、合成粒子は、ポリジメチルシロキサン (PDMS)、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ハイドロゲル、常磁性体 (paramagnetic)、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコン、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む。一部の実施形態では、第1及び／又は第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの各オリゴヌクレオチドバーコードは、リンカー官能基を含む。一部の実施形態では、合成粒子は、固体支持体官能基を含む。一部の実施形態では、支持体官能基及びリンカー官能基は、互いに会合しており、リンカー官能基及び支持体官能基は、それぞれに、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒド、ケトン、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択されてもよい。

【0149】

一部の実施形態では、固体支持体が提供される。一部の実施形態では、第1及び第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードの一方又は両方に会合した固体支持体が本明細書に開示される。

【0150】

本明細書に記載の方法及びシステムは、オリゴヌクレオチドと会合した（例えば、それに結合した、又はそれとコンジュゲートした）抗体（本明細書において、AbO又はAbOligoとも称される）を使用する、方法及びシステムに関して使用することができる。単一細胞におけるタンパク質発現プロファイルを決定するためにAbOを使用し、試料起源を追跡する一部の実施形態については、米国特許出願公開第2018/0088112号、及び米国特許出願公開第2018/0346970号に記載されており、そのそれぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、T細胞及びB細胞のV(D)Jプロファイリング、3'標的

10

20

30

40

50

化、5' 標的化、3' 全トランスクリプトーム増幅 (WTA)、5' WTA、AbOを用いるタンパク質発現プロファイリング、並びに／又は単回実験での試料多重化を可能にする。5' バーコード化及び／又は3' バーコード化を使用して核酸標的の配列 (例えば、免疫受容体のV (D) J領域) を決定するための方法は、米国特許出願公開第2020/0109437号に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。核酸標的の5' 末端における分子バーコード化のためのシステム、方法、組成物、及びキットは、例えば、米国特許出願公開第2019/0338278号に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書において提供される内部ベースの遺伝子発現プロファイリングのためのシステム、方法、組成物、及びキットは、一部の実施形態では、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2020年11月6日に出願された「免疫レパートリーシーケンシングのための完全長V (D) J情報を得るためのランダムプライミングの使用 (USING RANDOM PRIMING TO OBTAIN FULL-LENGTH V (D) J INFORMATION FOR IMMUNE REPERTOIRE SEQUENCING)」という表題の米国特許出願第17/091, 639号に記載されている5' バーコード化とランダムプライミングアプローチの組合せを使用して完全長V (D) J情報を得るための方法 (例えば、RhapsodyシステムでのIlluminaシーケンシングによる) と一緒に使用することができる。本明細書において提供される内部ベースの遺伝子発現プロファイリングのためのシステム、方法、組成物、及びキットは、一部の実施形態では、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第16/677, 012号に記載されているランダムプライミング及び伸長 (RPE) ベースの全トランスクリプトーム分析方法及び組成物と一緒に使用することができる。本明細書において提供される内部ベースの遺伝子発現プロファイリングのためのシステム、方法、組成物、及びキットは、一部の実施形態では、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20210238661号に記載されているブロッカーオリゴヌクレオチドと一緒に使用することができる。本明細書に開示される組成物及び方法の一部の実施形態は、第1の複数のオリゴヌクレオチドバーコード及び第2の複数のオリゴヌクレオチドバーコードを含み、それらは、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第20210371909号に記載されている。本明細書において提供されるシステム、方法、組成物、及びキットは、一部の実施形態では、一部の実施形態ではライブラリー調製の間の望ましくない伸長産物の生成を低減させることができ、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、2022年8月29日に出願された「mRNA 5' 分析のためのテンプレートスイッチオリゴヌクレオチド (TSO) (TEMPLATE SWITCH OLIGONUCLEOTIDE (TSO) FOR MRNA 5' ANALYSIS)」という表題のPCT特許出願第PCT/US22/75577号に記載されているブロッキング配列を含むテンプレートスイッチオリゴヌクレオチドと一緒に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0151】

一部の実施形態では、本明細書に開示される伸長産物及び／又は増幅産物をシーケンシングのために使用することができる。当技術分野で公知の任意の好適なシーケンシング方法、好ましくはハイスループットアプローチを使用することができる。例えば、Roche 454、Illumina Solexa、ABI-SOLID、ION Torrent、Complete Genomics、Pacific Bioscience、Helicos、又はPolonatorプラットフォームなどのプラットフォームを使用する環状アレイシーケンシングも利用することができる。シーケンシングは、MiSeqシーケンシング及び／又はHiSeqシーケンシングを含み得る。

【0152】

本明細書の開示は、分子標識 (又は分子インデックス) を有するバーコード (例えば、確率的バーコード) の、バーコード化又は標識化されている核酸標的 (例えば、デオキシリボ核酸分子、及びリボ核酸分子) の5' 末端への結合のための、システム、方法、組成

物、及びキットを含む。本明細書に開示される5'ベース及び内部ベースの転写物計数方法は、例えば、3'ベースの転写物計数方法（例えば、Rhapsody（商標）アッセイ（Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ）、Chromium（商標）Single Cell 3' Solution（10X Genomics, San Francisco, CA））を補完するか、又は補足することができる。バーコード化された核酸標的は、配列同定、転写物の計数、選択的スプライシング分析、変異スクリーニング、及び／又はハイスループット方式の全長シーケンシングのために使用され得る。5'末端（標識されている標的核酸標的に対して5'側）での転写物計数によって、核酸分子の5'末端における、又はそれにより近い選択的スプライシングアイソフォーム及びバリエーション（以下に限定されないが、スプライスバリエーション、一塩基多型（SNP）、挿入、欠失、置換を含む）が明らかとなり得る。一部の実施形態では、本方法は、分子内ハイブリダイゼーションに関与し得る。5'バーコード化及び／又は3'バーコード化を使用して、核酸標的（例えば、免疫受容体のV（D）J領域）の配列を決定するための方法は、その内容が参照によりその全体として本明細書に組み込まれる、US 2020/0109437に記載されている。核酸標的の5'末端における分子バーコード化のためのシステム、方法、組成物、及びキットは、その内容が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2019/0338278号に記載されている。

10

【0153】

BCR、TCR、及び抗体のVDJ領域を同定するために、本開示の方法を使用することができる。体細胞組換えとしても公知の、VDJ組換えは、免疫系の免疫グロブリン（Ig）（例えば、BCR）及びTCR産生の初期段階における遺伝子組換えの機序である。VDJ組換えによって、可変（V）、多様性（D）及び接合性（J）遺伝子セグメントが、ほぼランダムに組み合わせられ得る。様々な遺伝子を選択する際のそのランダム性のために、細菌、ウイルス、寄生生物、腫瘍細胞などの機能不全細胞及び花粉に由来する抗原に適合するタンパク質を多様にコードすることが可能となる。

20

【0154】

VDJ領域は、可変（V）遺伝子、多様性（D）遺伝子及び接合性（J）遺伝子を含む3Mbの大きな遺伝子座を含み得る。これらは、VDJ組換えに関与し得るセグメントである。VDJ組換えを受けない可能性もある定常遺伝子も存在し得る。この遺伝子座のVDJ組換えにおける最初の事象は、D遺伝子のうちの1つをJ遺伝子のうちの1つに対して再編成することであり得る。この後に、V遺伝子のうちの1つがこのDJ再編成に付加されて、後に重鎖タンパク質の可変セグメントをコードする機能的なVDJ再編成遺伝子を形成することができる。これらのステップの両方が、介在DNAを欠失し得るリコンビナーゼ酵素によって触媒され得る。

30

【0155】

この組換えプロセスは、前駆体B細胞において段階的に起こり、抗体レパートリーに必要とされる多様性をもたらす。各B細胞は、1つの抗体（例えば、BCR）のみを生じ得る。この特異性は、1つの対立遺伝子の機能的再編成によって、第2の対立遺伝子のさらなる組換えを防ぐためのシグナルが伝達されるような、対立遺伝子排除によって達成され得る。

40

一部の実施形態では、試料は、免疫細胞を含む。免疫細胞としては、例えば、T細胞、B細胞、リンパ球系幹細胞、骨髄前駆細胞、リンパ球、顆粒球、B細胞前駆体、T細胞前駆体、ナチュラルキラー細胞、Tc細胞、Th細胞、形質細胞、メモリー細胞、好中球、好酸球、好塩基球、マスト細胞、単球、樹状細胞及び／若しくはマクロファージ、又はこれらの任意の組合せを挙げることができる。

【0156】

T細胞は、単一T細胞に由来するか、又は同一のTCRを有するT細胞を指し得るT細胞クローンであってもよい。T細胞は、T細胞クローン及び異なるTCRであるが、そのすべてが同じ標的（例えば、抗原、腫瘍、ウイルス）を認識することができる、TCRを

50

有するT細胞の混合集団を含み得るT細胞株の一部であってもよい。末梢血単核細胞、骨髓、リンパ節組織、脾組織、及び腫瘍を含む、いくつかの供給源からT細胞を得ることができる。F i c o l l 分離を使用するなどして、対象から採取された血液単位からT細胞を得ることができる。アフエーシス又は白血球アフエーシスによって、個体の循環血に由来する細胞を得ることができる。アフエーシス産物は、T細胞、単球、顆粒球、B細胞を含むリンパ球、他の有核白血球、赤血球、及び血小板を含み得る。細胞を洗浄し、培地中に再懸濁させて、目的の細胞を単離することができる。

【0157】

赤血球を溶解させ、例えば、PERCOLL（商標）勾配による遠心分離によって単球を枯渇させることによって、末梢血リンパ球からT細胞を単離することができる。ポジティブ又はネガティブ選択技法によって、T細胞の特異的亜集団、例えば、CD28+、CD4、CDC、CD45RA+、及びCD45RO+ T細胞をさらに単離することができる。例えば、所望のT細胞のポジティブ選択に十分な時間、抗CD3／抗CD28（すなわち、3×28）コンジュゲートビーズ、例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3／CD28 T、又はXCYTE DYNABEADS（商標）とのインキュベーションによって、T細胞を単離することができる。免疫細胞（例えば、T細胞及びB細胞）は、抗原特異的（例えば、腫瘍に対して特異的）であり得る。

一部の実施形態では、細胞は、B細胞、リンパ節由来の活性化B細胞、リンパ芽球様細胞、休止B細胞、又は例えば、リンパ腫由来の新生物B細胞などの抗原提示細胞（APC）であってもよい。APCは、表面にBCRCタンパク質のうちの少なくとも1つを発現するB細胞又は濾胞樹状細胞を指し得る。

【0158】

本開示の方法を使用して、単一T細胞の分子表現型を追跡することができる。T細胞の様々なサブタイプは、様々な分子マーカーの発現によって識別することができる。T細胞は、TCRの多様なレパートリーから固有のTCRを発現する。ほとんどのT細胞では、TCRは、 α 及び β 鎖のヘテロ二量体から構成されてもよく、各機能鎖は、T細胞発生中の体細胞DNA組換え事象の産物であってもよく、単一の個体において100万を超える異なるTCRの発現を可能にする。TCRを使用して、個々のT細胞の同一性を定義することができ、免疫応答中のT細胞クローン増殖の系統追跡が可能となる。本開示の免疫学的方法は、以下に限定されないが、単一T細胞における固有のTCR α 鎖とTCR β 鎖の対合を特定すること、単一細胞レベルでTCR及びマーカーの発現を定量すること、個体におけるTCRの多様性を特定すること、異なるT細胞集団において発現されるTCRレパートリーを特徴付けること、TCRのアルファ鎖及びベータ鎖の対立遺伝子の機能性を決定すること、及び免疫応答の間のT細胞のクローン増殖を特定することを含む、様々な方法で使用され得る。

【0159】

T細胞受容体鎖の対合

TCRは、Tリンパ球表面に存在する認識分子である。T細胞表面に見られるT細胞受容体は、アルファ鎖及びベータ鎖と称される2つの糖タンパク質サブユニットから構成され得る。両鎖は、約40kDaの分子量を含み、可変ドメイン及び定常ドメインを有し得る。アルファ鎖とベータ鎖をコードする遺伝子は、遺伝子再編成によって遺伝子が形成されるV、D及びJ領域のライブラリーにおいて編成され得る。TCRは、組織適合遺伝子によってコードされる特異的自己分子との複合体の一部としての抗原提示細胞によって提示される抗原を認識し得る。ほとんどの有力な組織適合遺伝子は、主要組織適合複合体（MHC）として公知である。したがって、T細胞受容体によって認識される複合体は、MHC／ペプチドリガンドからなる。

【0160】

一部の実施形態では、本開示の方法、デバイス、及びシステムは、TCRのシーケンシング及び対合に使用することができる。本開示の方法、デバイス、及びシステムは、T細胞受容体アルファ鎖及びベータ鎖をシーケンシングする、アルファ鎖及びベータ鎖を対合

させる、並びに／又はT細胞受容体アルファ鎖の機能的コピーを決定するために使用することができる。単一細胞を単一の固体支持体（例えば、ビーズ）を含む単一の区画（例えば、ウェル）に含有させることができる。細胞は溶解されてもよい。ビーズは、TCRのアルファ鎖及び／又はベータ鎖内の特定の位置に結合することができる確率的標識を含み得る。固体支持体に会合したTCRのアルファ分子及びベータ分子は、逆転写、増幅、及びシーケンシングを含む本開示の分子生物学的方法に供することができる。同じ細胞標識を含むTCRのアルファ鎖及びベータ鎖は、同じ単一細胞に由来すると考えられ、それによって、TCRのアルファ鎖とベータ鎖を対合させることができる。

【0161】

抗体レパートリーにおける重鎖と軽鎖の対合

10

本開示の方法、デバイス及びシステムは、BCRの受容体及び抗体の重鎖と軽鎖の対合に使用することができる。本開示の方法は、決定される個々の生物又は細胞集団における免疫受容体及び抗体のレパートリーを可能にする。本開示の方法は、免疫受容体を構成するポリペプチド鎖の対を決定するのを助け得る。B細胞及びT細胞はそれぞれ、免疫受容体を発現し、B細胞は、免疫グロブリン及びBCRを発現し、T細胞は、TCRを発現する。両タイプの免疫受容体は、2つのポリペプチド鎖を含み得る。免疫グロブリンは、可変重（VH）鎖及び可変軽（VL）鎖を含み得る。2つのタイプのTCRが存在し、1つは、アルファ鎖及びベータ鎖からなり、1つは、デルタ鎖及びガンマ鎖からなる。免疫受容体におけるポリペプチドは、定常領域及び可変領域を含み得る。可変領域は、B細胞又はT細胞の染色体における遺伝子断片の組換え及び末端接合再編成から生じ得る。B細胞では、可変領域のさらなる多様化が体細胞超変異によって生じ得る。

20

【0162】

免疫系は、受容体の大きなレパートリーを有し、リンパ球によって発現される任意の所与の受容体対は、別々の、固有の転写物の対によってコードされ得る。単一細胞において発現される免疫受容体鎖の対の配列についての知識を使用して、所与の個体又は細胞集団の免疫レパートリーを確認することができる。

一部の実施形態では、本開示の方法、デバイス、及びシステムは、抗体のシーケンシング及び対合に使用することができる。本開示の方法、デバイス、及びシステムは、抗体重鎖及び軽鎖のシーケンシング（例えば、B細胞における）、並びに／又は重鎖及び軽鎖の対合に使用することができる。単一細胞を単一の固体支持体（例えば、ビーズ）を含む単一の区画（例えば、ウェル）に含有させることができる。細胞は溶解されてもよい。

30

ビーズは、抗体の重鎖及び／又は軽鎖（例えば、B細胞における）内の特異的位置に結合することができる確率的標識を含み得る。固体支持体に会合した重鎖及び軽鎖の分子は、逆転写、増幅、及びシーケンシングを含む本開示の分子生物学的方法に供することができる。同じ細胞標識を含む抗体の重鎖及び軽鎖は、同じ単一細胞に由来すると考えられ、それによって、抗体の重鎖と軽鎖を対合させることができる。

【0163】

本明細書に開示される方法は、3'ベース、内部ベース、及び／又は5'ベースの配列決定を可能にすることができる。この方法は、配列決定に柔軟性を与えることを可能にすることができる。一部の実施形態では、本方法は、試料、例えば、マウス及びヒトの試料について、Rhapsody（商標）システムにおけるT細胞とB細胞の両方の免疫レパートリーのプロファイリングを可能にすることができる。一部の実施形態では、V(D)Jの3'、内部、及び／又は5'発現プロファイリングを実施することができる。一部の実施形態では、表現型マーカーと単一細胞プラットフォームにおけるT細胞及びB細胞のV(D)J配列の両方が調査され得る。一部の実施形態では、それらの転写物の3'、内部、及び5'の情報、単回実験で捕捉され得る。本明細書に開示される方法は、T細胞とB細胞の両方のV(D)J検出を可能にすることができる（例えば、超変異）。

40

【0164】

本明細書に記載の方法及びシステムは、オリゴヌクレオチド（本明細書において、AbO又はAbOligoとも称される）と会合した（例えば、それに結合した、又はそれと

50

コンジュゲートした)抗体を使用する、方法及びシステムに関して使用することができる。単一細胞におけるタンパク質発現プロファイルを決定するためにA b Oを使用し、試料起源を追跡する実施形態については、米国特許出願公開第2018/0088112号として公開された米国特許出願第15/715,028号、及び米国特許出願第15/937,713号に記載されており、それぞれの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、T細胞及びB細胞のV(D)Jプロファイリング、3'標的化、5'標的化、3'全トランスクリプトーム増幅(WTA)、5'WTA、A b Oを用いるタンパク質発現プロファイリング、並びに／又は単回実験での試料多重化を可能にする。

【0165】

一部の実施形態では、ランダムプライマーを伸長させるステップをほぼ一定の温度で行う。一部の実施形態では、ランダムプライマーを伸長させるステップを不変温度で行う。一部の実施形態では、ランダムプライマーを伸長させるステップを第1の伸長温度で開始する。一部の実施形態では、ランダムプライマーを伸長させるステップを第1の伸長温度とは異なる1つ又は複数の温度で行う(例えば、第2の伸長温度及び／又は第3の伸長温度)。第2の伸長温度及び／又は第3の伸長温度は、第1の伸長温度よりも高くてもよく、低くてもよい。一部の実施形態では、第1の伸長温度及び／又は第2の伸長温度は約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℃、又はこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲である。一部の実施形態では、第1の伸長温度は約37℃である。一部の実施形態では、第2の伸長温度は約55℃である。一部の実施形態では、第2の伸長温度は約45℃である。

【0166】

ランダムプライミング及び伸長のサイクル数は、異なる実装形態では異なり得る。一部の実施形態では、ランダムプライミング及び伸長のサイクル数は、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、10回、11回、12回、13回、14回、15回、16回、17回、18回、19回、20回、21回、22回、23回、24回、25回、26回、27回、28回、29回、30回、31回、32回、33回、34回、35回、36回、37回、38回、39回、40回、41回、42回、43回、44回、45回、46回、47回、48回、49回、50回、60回、70回、80回、90回、100回の、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲の、ランダムプライミング及び伸長のサイクルを含み得るか、およそでこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のランダムプライミング及び伸長のサイクルを含み得るか、少なくともこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のランダムプライミング及び伸長のサイクルを含み得るか、又は最大でこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のランダムプライミング及び伸長のサイクルを含み得る。

【0167】

ランダムプライマーは、ヌクレオチドのランダム配列を含み得る。ヌクレオチドのランダム配列は、約4～約30ヌクレオチドの長さであり得る。一部の実施形態では、ヌクレオチドの前記ランダム配列は、6又は9ヌクレオチドの長さである。ヌクレオチドのランダム配列は、異なる実装形態では異なる長さを有し得る。一部の実施形態では、ランダムプライマー内のヌクレオチドのランダム配列は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであるか、およそでこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のヌクレオチドの長さで

あるか、少なくともこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のヌクレオチドの長さであるか、又は最大でこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のヌクレオチドの長さである。ランダムプライマーは、異なる実装形態におけるランダムプライミングステップの間に異なる濃度を有し得る。一部の実施形態では、ランダムプライマーは、ランダムプライミングの間1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、128、若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のuMの濃度であるか、およそでこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のuMの濃度であるか、少なくともこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のuMの濃度であるか、又は最大でこれらの値若しくはこれらの値のうちのいずれか2つの間の数若しくは範囲のuMの濃度である。

10

【0168】

オリゴヌクレオチドバーコード及びバーコード化された粒子を製造するための方法は、例えば、米国特許出願公開第2015/0299784号、国際公開第WO2015/031691号、Fu et al, PNAS U.S.A. 2011 May 31;108(22):9026-31、及び2021年6月1日出願された「5プライム遺伝子発現アッセイのためのオリゴヌクレオチド及びビーズ (OLIGONUCLEOTIDES AND BEADS FOR 5 PRIME GENE EXPRESSION ASSAY)」という表題の米国特許出願第17/336,055号に記載されており、これらの出願及び刊行物の内容は、その全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0169】

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

当業者は、本明細書に開示されるこの及び他のプロセス及び方法について、そのプロセス及び方法において実施される機能が、異なる順序で実現され得ることを認識するであろう。さらに、概説されるステップ及び操作は例として与えられるに過ぎず、ステップ及び操作のいくつかは、より少ないステップ及び操作へと任意に組み合わせられてもよく、又は本開示の実施形態の根本的要素を減じることなく追加のステップ及び操作に拡大されてもよい。

30

【0170】

本明細書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得る。

【0171】

一般的には、本明細書において、特に添付の特許請求の範囲（例えば、添付の特許請求の範囲の本文）で使用される用語は、全般的に、「オープン」用語であることが意図されることが当業者によって理解されるであろう（例えば、「含む (including)」という用語は、「以下に限定されないが、～を含む (including but not limited to)」と解釈されるべきであり、「有する (having)」という用語は、「少なくとも～を有する (having at least)」と解釈されるべきであり、「含む (includes)」という用語は「以下に限定されないが、～を含む (includes but is not limited to)」と解釈されるべきであるなど）。さらに、導入された請求項の記載の特定数が意図される場合、このような意図は請求項で明示的に記載され、このような記載の非存在下では、このような意図は存在しないことが、当業者によって理解されるであろう。例えば、理解の一助として、以下の添付の特許請求の範囲は、請求項の記載を導入するために、導入語句「少なく

40

50

とも1つの (at least one)」及び「1つ又は複数の (one or more)」の使用を含み得る。しかし、このような語句の使用は、たとえ同一の請求項が、「1つ又は複数の (one or more)」又は「少なくとも1つの (at least one)」という導入語句及び「a」又は「an」のような不定冠詞を含む場合でも、「a」又は「an」という不定冠詞による請求項の記載の導入がこのような導入された請求項の記載を含むいかなる特定の請求項もそのような記載を1つのみ含む実施形態に限定することを意味するものと解釈させるべきではなく（例えば、「a」及び／又は「an」は、「少なくとも1つの (at least one)」又は「1つ又は複数の (one or more)」を意味すると解釈されるべきである）、請求項の記載を導入するために使用される定冠詞の使用についても同様である。さらに、たとえ特定数の導入された請求項の記載が明示的に記載されたとしても、このような記載は少なくとも記載された数を意味すると解釈されるべきであることを当業者は認識するであろう（例えば、「2つの記載」という他の修飾語を含まない無修飾の記載は、少なくとも2つの記載、又は2つ以上の記載を意味する）。さらに、「A、B、及びCのうちの少なくとも1つなど」に類似した慣例が使用される場合、一般的には、このような構成は当業者がその慣例を理解する意味であることが意図される（例えば、「A、B、及びCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、以下に限定されないが、A単独、B単独、C単独、AとBの両方、AとCの両方、BとCの両方、及び／又はAとBとCの全部などを有するシステムを含むことになる）。「A、B、又はCのうちの少なくとも1つなど」に類似した慣例が使用される場合、一般的には、このような構成は当業者がその慣例を理解する意味であることが意図される（例えば、「A、B、又はCのうちの少なくとも1つを有するシステム」は、以下に限定されないが、A単独、B単独、C単独、AとBの両方、AとCの両方、BとCの両方、及び／又はAとBとCの全部などを有するシステムを含むことになる）。さらに、2つ以上の代替用語を表す実質上任意の選言的な語及び／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されるべきであることが当業者によって理解されるであろう。例えば、語句「A又はB」は、「A」若しくは「B」又は「A及びB」の可能性を含むことが理解される。

10

20

30

40

【0172】

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

【0173】

当業者に理解されるように、あらゆる目的で、例えば、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、あらゆる可能な下位範囲及びその下位範囲の組合せも包含する。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かつその範囲が少なくとも2等分、3等分、4等分、5等分、10等分などされ得るものとして容易に認識可能である。非限定的な例として、本明細書で考察した各範囲は、下3分の1、中3分の1、上3分の1などに容易に分解可能である。同様に、当業者に理解されるように、「最大」、「少なくとも」などの表現はすべて、記載された数を含み、以上で考察したように後続的に下位範囲に分解可能な範囲を指す。最後に、当業者によって理解されるように、範囲は、それぞれ個々のメンバーを含む。よって、例えば、1～3個の細胞を有する群は、1、2、又は3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1、2、3、4、又は5個の細胞を有する群を指し、他も同様である。

【0174】

前記内容から、本開示の様々な実施形態が例証のために本明細書に記載されており、本開示の範囲及び精神を逸脱することなく様々な修正がなされ得ることが認識されよう。したがって、本明細書に開示される様々な実施形態は、限定を意図するものではなく、以下の請求項によって示されている真の範囲及び精神を有する。

50

【図面】
【図 1】

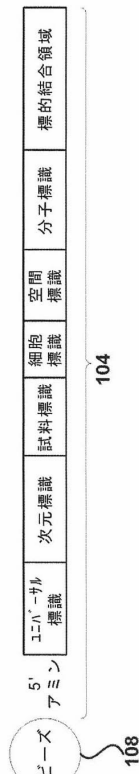


FIG. 1

【図 3】

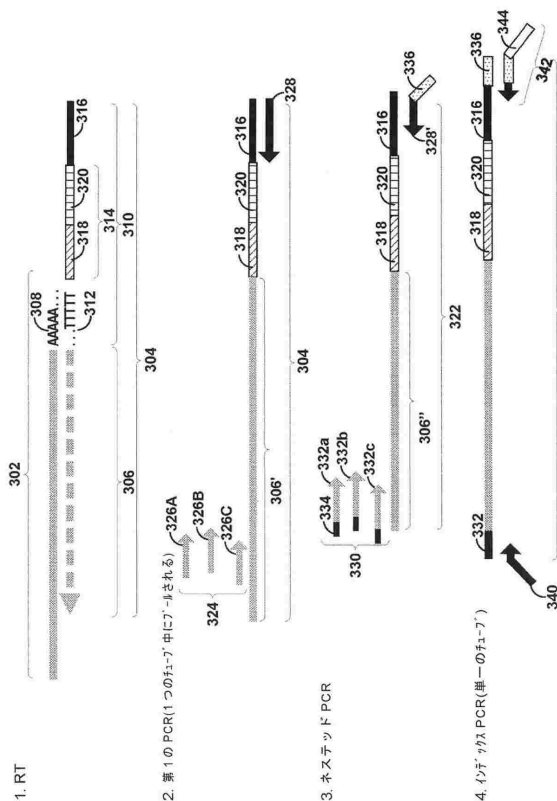


FIG. 3

【図 2】

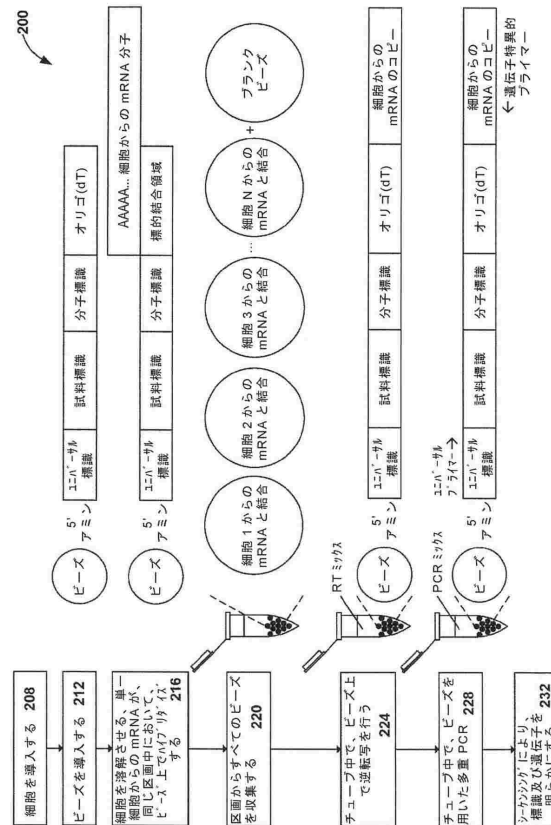


FIG. 2

【図 4 A】

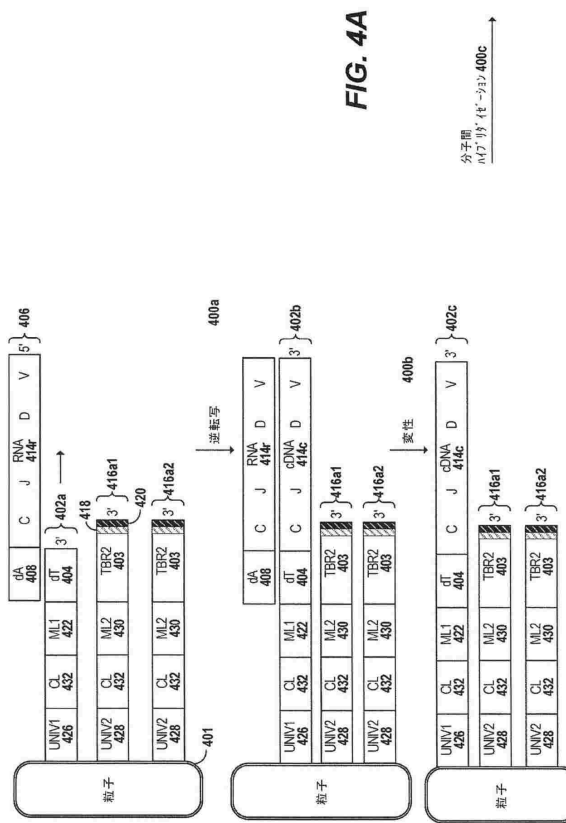
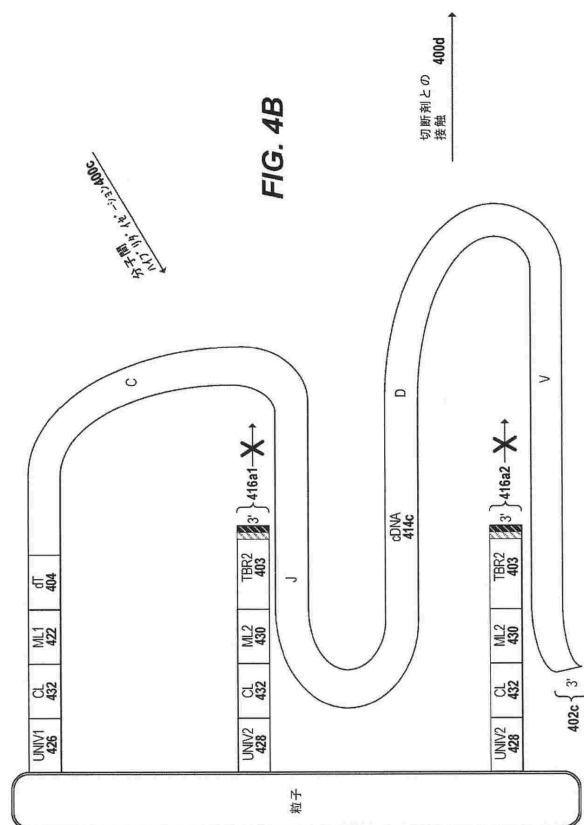
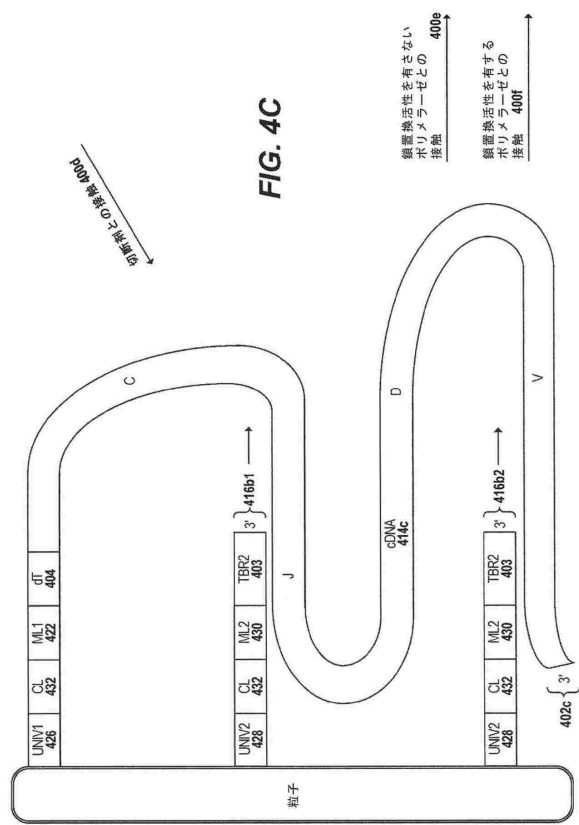


FIG. 4A

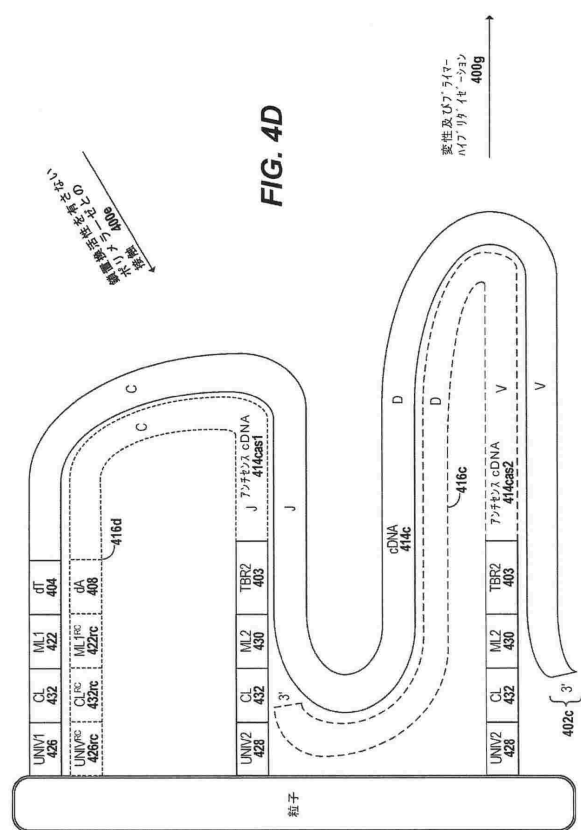
【図 4 B】



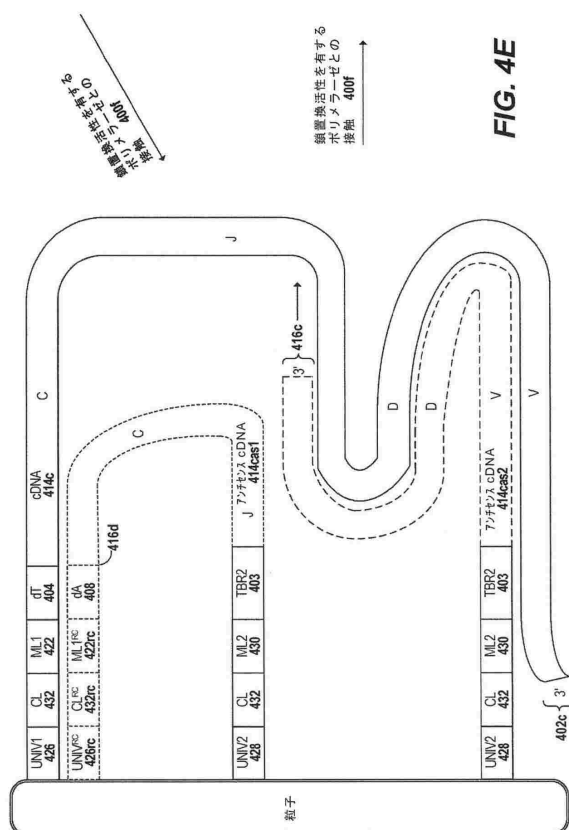
【図 4 C】



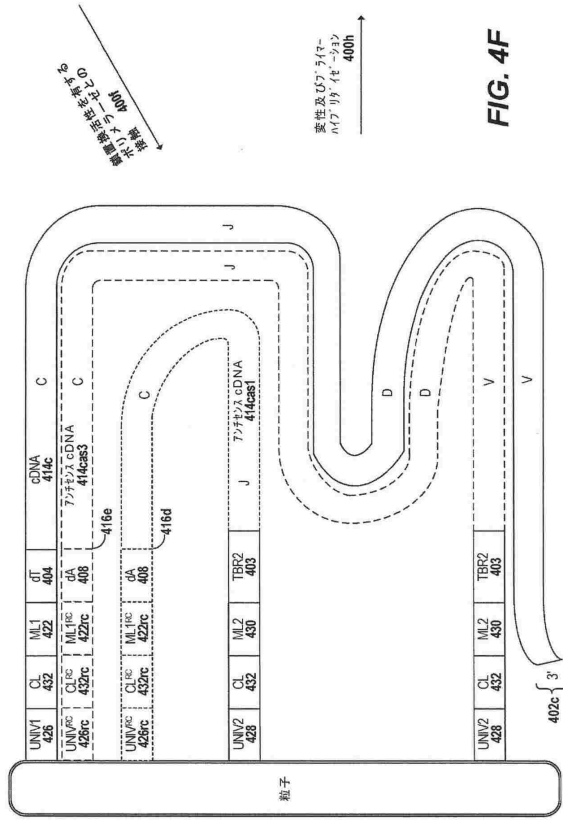
【図 4 D】



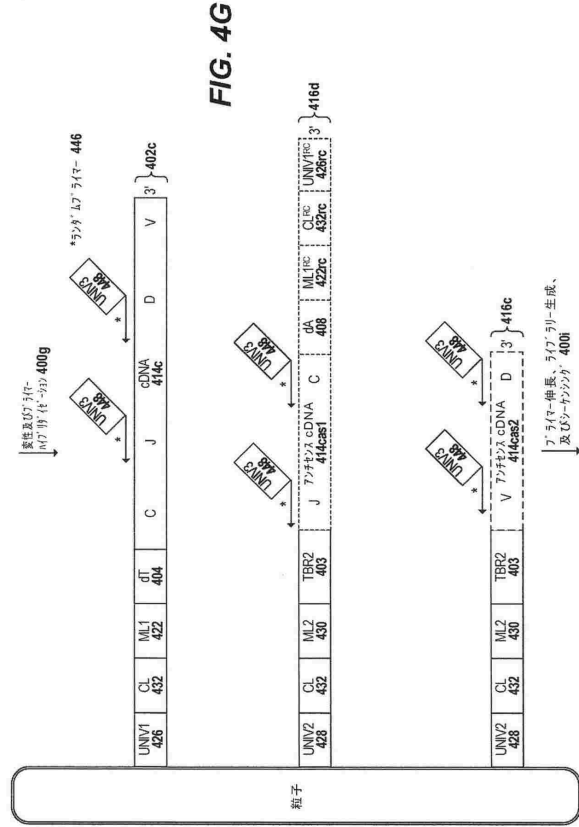
【図 4 E】



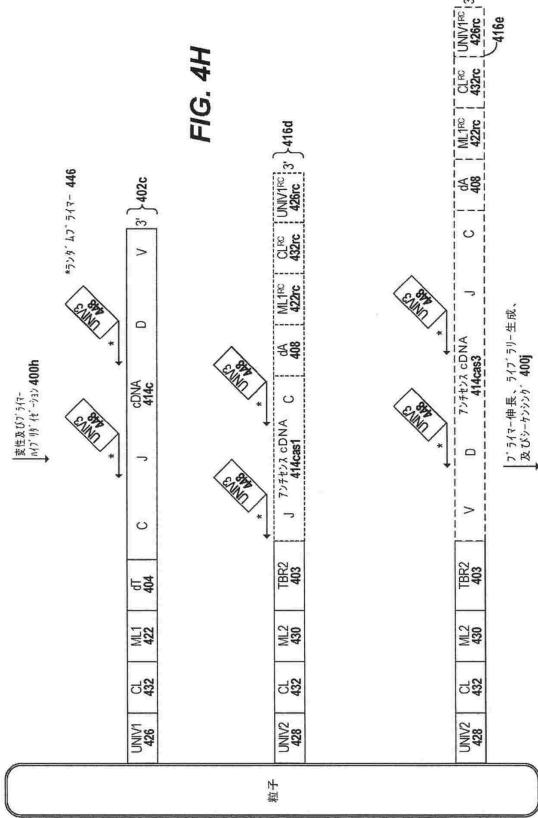
【図 4 F】



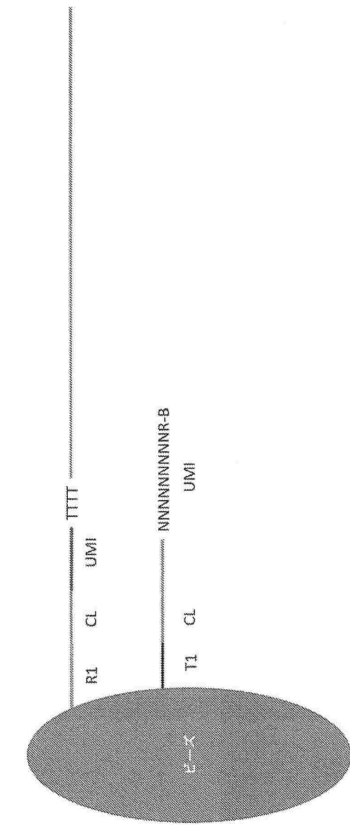
【図 4 G】



【図 4 H】



【図 5 A】



【図 5 B】

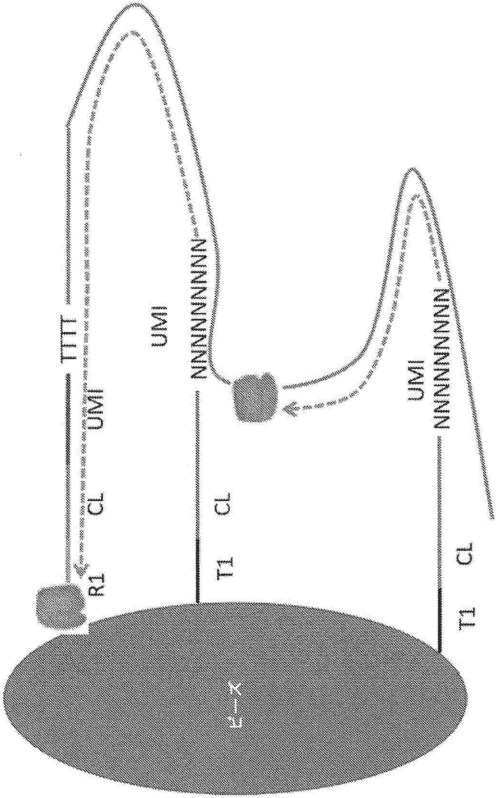


FIG. 5B

【図 5 C】

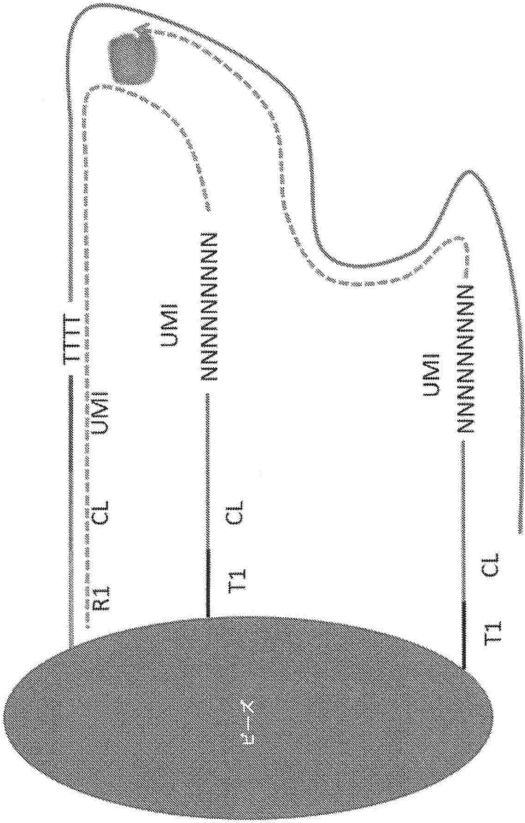


FIG. 5C

【図 5 D】

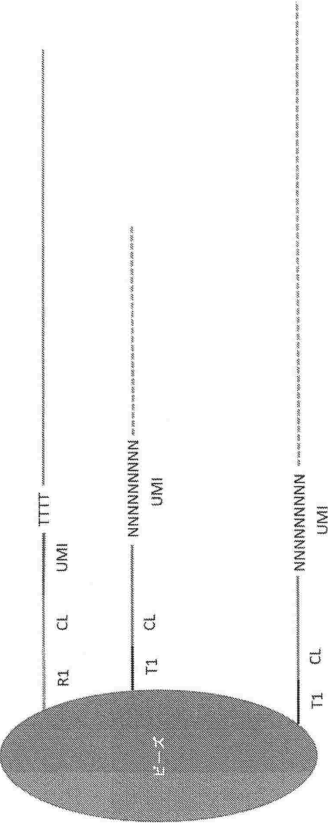


FIG. 5D

【図 5 E】

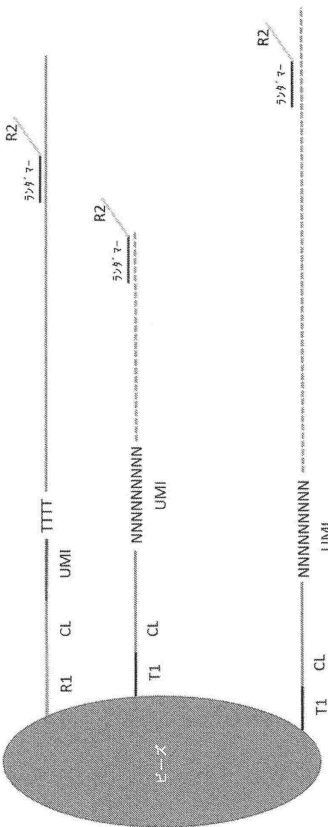


FIG. 5E

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/062070

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6806
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021/139970 A1 (CHANG CHRISTINA [US] ET AL) 13 May 2021 (2021-05-13)	99
A	abstract; claims 1,13	1-98
	paragraphs [0216], [0217]	

A	US 2015/167060 A1 (CHUN JONG YOON [KR] ET AL) 18 June 2015 (2015-06-18)	1-99
	abstract; claims 1, 15	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2023

Date of mailing of the international search report

23/06/2023

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Celler, Jakub

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					
Information on patent family members				International application No	
				PCT/US2023/062070	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 2021139970	A1	13-05-2021	CN	114729350 A	08-07-2022
			EP	4055160 A1	14-09-2022
			JP	2023500679 A	10-01-2023
			US	2021139970 A1	13-05-2021
			WO	2021092386 A1	14-05-2021

US 2015167060	A1	18-06-2015	EP	2839031 A1	25-02-2015
			JP	6096885 B2	15-03-2017
			JP	2015514415 A	21-05-2015
			KR	20140139535 A	05-12-2014
			US	2015167060 A1	18-06-2015
			WO	2013157821 A1	24-10-2013

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

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

(72)発明者 ソン ヘーウォン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 1 サンノゼ クム ドライヴ 2 3 5 0

(72)発明者 プロセン デニス エドワード

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 5 1 3 1 サンノゼ クム ドライヴ 2 3 5 0

F ターム (参考) 4B063 QA13 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34

QX02 QX10