

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成30年2月15日 (2018.2.15)

【公表番号】特表2017-506877(P2017-506877A)

【公表日】平成29年3月16日 (2017.3.16)

【年通号数】公開・登録公報2017-011

【出願番号】特願2016-544526(P2016-544526)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 11/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 4 0 B 40/06

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 N 11/00

C 1 2 Q 1/68 A

【手続補正書】

【提出日】平成29年12月26日 (2017.12.26)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1 つまたは複数の対象から得られた 1 つまたは複数の試料と関連づけられた複数の R N A を得ることであって、試料と関連づけられた前記 R N A が別個の反応ボリューム内に存在する、こと；

酵素反応を利用して生成されかつユニバーサルプライミング配列、バーコード配列及び結合部位を含むアダプター分子を、前記試料と関連づけられた前記 R N A に付加すること；ならびに

前記バーコード配列を、前記試料と関連づけられた 1 つまたは複数のポリヌクレオチドに組み込み、それにより関心対象の 1 つまたは複数のポリヌクレオチドを生成させることを含む、関心対象の 1 つまたは複数のポリヌクレオチドの生成方法。

【請求項 2】

前記酵素反応を用いて前記アダプター分子を生成させることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記アダプター分子が、鋳型分子を 1 つまたは複数の酵素と接触させることにより生成される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記鋳型分子が、R N A ポリメラーゼ (R N A P) プロモーターを含む D N A 分子であり、前記 1 つまたは複数の酵素が、R N A ポリメラーゼを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 R N A P プロモーターが、T 7、T 3、及び S P 6 からなる群から選択される、請

求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記鑄型分子が、ニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位を含む DNA 分子であり、前記 1 つまたは複数の酵素が、ニッキングエンドヌクレアーゼ及び鎖置換 DNA ポリメラーゼを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記ニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位が、Nt . BbvCI、Nt . BspQI、Nt . BsmAI、Nt . BstNBI、Nt . AlwI、及び Nt . BsmAI からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記鎖置換 DNA ポリメラーゼが、Klenow exo-、Bst Large Fragment、及び Bst Large Fragment の操作された変異体からなる群から選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記鑄型分子が、固体担体に結合されており、
前記固体担体が、水溶液と接触しており、かつ
前記アダプター分子が、生成されると水溶液中に放出される、
請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アダプター分子を 1 つの試料と関連づけられた前記 RNA に付加することが、前記水溶液を、前記 RNA が存在している前記反応ボリュームと混和することを含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記水溶液が、1 つの試料と関連づけられた前記 RNA と同じ反応ボリューム内に存在する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記鑄型分子が、エンドヌクレアーゼ制限部位を含み、
前記 1 つまたは複数の酵素が、制限エンドヌクレアーゼを含み、かつ
前記アダプター分子が、前記鑄型分子の一部を含み、前記鑄型分子が前記制限エンドヌクレアーゼと接触すると前記一部が生成されて前記水溶液中に放出される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

前記固体担体が、ビーズまたは表面である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 14】

前記アダプター分子を 1 つの試料と関連づけられた前記 RNA に付加する前は、前記アダプター分子が溶液中で遊離している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記アダプター分子がコンパートメント内で生成され、前記アダプター分子を 1 つの試料と関連づけられた前記 RNA に付加することが、前記コンパートメントを、前記 RNA が存在している反応ボリュームと混和することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アダプター分子が、前記アダプター分子が付加される前記 RNA が存在している反応ボリューム内で生成される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】

前記アダプター分子が、前記アダプター分子が付加される前記 RNA が存在している反応ボリューム内で生成されない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

前記酵素反応が、等温性反応である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 19】

前記アダプター分子が、固有分子識別子 (UMI) 配列をさらに含む、請求項 1 に記載

の方法。

【請求項 20】

前記アダプター分子が、RNA分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項 21】

前記アダプター分子が、RNAPを利用して生成される、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記アダプター分子が、DNA分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項 23】

前記アダプター分子が、DNAPを利用して生成される、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

関心対象の前記1つまたは複数のポリヌクレオチドを生成させることが、前記試料と関連づけられたRNAを逆転写して、それにより複数の第一鎖cDNAを合成することを含み、

前記試料と関連づけられたRNAの少なくとも幾つかが、前記アダプター分子の結合部位に相補的である配列領域を含み、かつ

前記バーコード配列が、前記試料と関連づけられた第一鎖cDNAに組み込まれるように、前記アダプター分子が逆転写のためのプライマーとして使用される、請求項22に記載の方法。

【請求項 25】

前記結合部位が、ポリ-Tトラクトを含む、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

前記結合部位が、ランダムトラクトを含む、請求項24に記載の方法。

【請求項 27】

前記結合部位が、前記アダプター分子の3'末端に存在する、請求項24に記載の方法。

。

【請求項 28】

前記アダプター分子がコンパートメント内で生成され、前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することが、前記コンパートメントを、前記RNAが存在している前記反応ボリュームと混和すると起こる、請求項24に記載の方法。

【請求項 29】

前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することが、前記RNAに付加された前記アダプター分子が生成されたのと同じ反応ボリューム内で起こる、請求項24に記載の方法。

【請求項 30】

複数のcDNAを得るために、前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することをさらに含み、RNAを逆転写することが、逆転写酵素及び第一鎖プライマーを用いてcDNAの第一鎖を合成することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 31】

前記逆転写酵素が、MMLV⁻逆転写酵素である、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

前記アダプター分子がコンパートメント内で生成され、前記アダプター分子を1つの試料と関連づけられた前記RNAに付加することが、前記コンパートメントを、前記RNAが存在している前記反応ボリュームと混和することを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項 33】

cDNAの第一鎖が、前記コンパートメントを前記反応ボリュームと混和する前に合成される、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

cDNAの第一鎖が、前記コンパートメントを前記反応ボリュームと混和した後に合成される、請求項32に記載の方法。

【請求項 35】

前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することが、前記RNAに付加された前記アダプター分子が生成されたのと同じ反応ボリューム内で起こる、請求項30に記載の方法。

【請求項36】

前記反応ボリューム内の緩衝液が、pH8.0～pH8.8のpH範囲で、トリス、カリウムイオン、塩素イオン、硫酸イオン、アンモニウムイオン、酢酸イオン、またはマグネシウムイオンのうちの少なくとも1種を含む、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記逆転写酵素が、鋳型切替え活性を有し、

前記試料と関連づけられたcDNAの少なくとも幾つかの第一鎖が、3'オーバーハングを含み、

前記アダプター分子の結合部位が、3'オーバーハングに相補的である3'部分を含み、かつ

前記バーコード配列が、前記試料と関連づけられたcDNAの第一鎖に組み込まれるように、前記アダプター分子が前記逆転写酵素のための鋳型として働く、請求項30に記載の方法。

【請求項38】

前記3'オーバーハングが、1つまたは複数のCヌクレオチドを含み、前記結合部位の3'部分が、1つまたは複数のGヌクレオチドを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記第一鎖プライマーが、ポリTトラクトを含む、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

前記第一鎖プライマーが、ランダム配列を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項41】

関心対象のポリヌクレオチドを生成させることが、第一のプライマー及び第二のプライマーを用いて前記試料のcDNAの前記第一鎖を増幅することを含み、前記第二のプライマーが、前記第一鎖プライマーの少なくとも一部と同じ配列を有し、前記第一のプライマーまたは前記第二のプライマーが、前記アダプター分子である、請求項30に記載の方法。

【請求項42】

前記第一のプライマーが、前記アダプター分子である、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記第二のプライマーが、前記アダプター分子である、請求項41に記載の方法。

【請求項44】

前記第一鎖プライマーが、ポリTトラクトを含む、請求項41に記載の方法。

【請求項45】

前記第一鎖プライマーが、ランダム配列を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項46】

前記試料が、細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項47】

前記細胞が、血液細胞、免疫細胞、組織細胞、または腫瘍細胞である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記細胞が、B細胞またはT細胞である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記試料と関連づけられた前記RNAが、mRNAを含む、請求項46に記載の方法。

【請求項50】

前記試料と関連づけられた前記RNAが、少なくとも1、3、10、30、100、300、1,000、3,000、10,000、30,000、100,000、300,000、または1,000,000種のmRNAを含む、請求項49に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記試料と関連づけられた前記 R N A が、細胞のトランスクリプトームの少なくとも一部を含む、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記試料と関連づけられた前記 R N A が、細胞の総 R N A を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 3】

試料あたり少なくとも 1 0、3 0、1 0 0、3 0 0、1, 0 0 0、3, 0 0 0、1 0, 0 0 0、3 0, 0 0 0、1 0 0, 0 0 0、3 0 0, 0 0 0、または 1, 0 0 0, 0 0 0 種の関心対象のポリヌクレオチドが、生成される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 1 つまたは複数の試料が、少なくとも 1 0、3 0、1 0 0、3 0 0、1, 0 0 0、3, 0 0 0、1 0, 0 0 0、3 0, 0 0 0、1 0 0, 0 0 0、3 0 0, 0 0 0、または 1, 0 0 0, 0 0 0 個の細胞を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 1 つまたは複数の試料が、同じ対象から得られる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記試料を溶解緩衝液と接触させることをさらに含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記試料を核酸マーカと接触させ、それにより前記核酸マーカを前記試料のサブセットと結合させること；及び

前記試料を洗浄し、それにより前記核酸マーカが結合していない試料から前記核酸マーカを除去すること
をさらに含み、

前記サブセット内の試料については、前記試料と関連づけられた R N A に付加された前記アダプター分子もまた、前記核酸マーカに付加され、関心対象の 1 つまたは複数のポリヌクレオチドが、前記核酸マーカを用いて生成される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記核酸マーカが、分子標識に連結された核酸を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記分子標識が、抗体、抗原、またはタンパク質である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記分子標識が、1 つまたは複数の細胞表面部分への親和性を有する、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記核酸が、R N A である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記核酸が、D N A である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記 D N A が、R N A P プロモーターを含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記試料が、第一の核酸マーカ及び第二の核酸マーカと接触しており、
前記第一の核酸マーカが、第一の分子標識に連結された第一の核酸を含み、
前記第二の核酸マーカが、第二の分子標識に連結された第二の核酸を含み、
前記第一の核酸及び第二の核酸が、異なる配列領域を含み、かつ
前記第一の分子標識と第二の分子標識が異なっている、
請求項 5 8 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 1 つまたは複数の試料が、同じ対象から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 1 つまたは複数の試料が、少なくとも 3、10、30、または 100 種の異なる対象から得られる、請求項 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

同じく本明細書で開示されるのは、図 17 ~ 19 に示されたマイクロ流体ドロップレットデバイスである。

[本発明1001]

1つまたは複数の対象から得られた1つまたは複数の試料と関連づけられた複数のRNAを得ることであって、試料と関連づけられた前記RNAが別個の反応ボリューム内に存在する、こと；

酵素反応を利用して生成されかつユニバーサルプライミング配列、バーコード配列及び結合部位を含むアダプター分子を、前記試料と関連づけられた前記RNAに付加すること；ならびに

前記バーコード配列を、前記試料と関連づけられた1つまたは複数のポリヌクレオチドに組み込み、それにより関心対象の1つまたは複数のポリヌクレオチドを生成させることを含む、関心対象の1つまたは複数のポリヌクレオチドの生成方法。

[本発明1002]

前記酵素反応を用いて前記アダプター分子を生成させることをさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記アダプター分子が、鋳型分子を1つまたは複数の酵素と接触させることにより生成される、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

前記鋳型分子が、RNAポリメラーゼ(RNAP)プロモーターを含むDNA分子であり、前記1つまたは複数の酵素が、RNAポリメラーゼを含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記RNAPプロモーターが、T7、T3、及びSP6からなる群から選択される、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記鋳型分子が、ニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位を含むDNA分子であり、前記1つまたは複数の酵素が、ニッキングエンドヌクレアーゼ及び鎖置換DNAポリメラーゼを含む、本発明1003の方法。

[本発明1007]

前記ニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位が、Nt.BbvCI、Nt.BspQI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI、Nt.AlwI、及びNt.BsmAIからなる群から選択される、本発明1006の方法。

[本発明1008]

前記鎖置換DNAポリメラーゼが、Klenow exo-、Bst Large Fragment、及びBst Large Fragmentの操作された変異体からなる群から選択される、本発明1006の方法。

[本発明1009]

前記鋳型分子が、固体担体に結合されており、
前記固体担体が、水溶液と接触しており、かつ
前記アダプター分子が、生成されると水溶液中に放出される、
本発明1003の方法。

[本発明1010]

前記アダプター分子を1つの試料と関連づけられた前記RNAに付加することが、前記水溶液を、前記RNAが存在している前記反応ボリュームと混和することを含む、本発明1009の方法。

[本発明1011]

前記水溶液が、1つの試料と関連づけられた前記RNAと同じ反応ボリューム内に存在する、本発明1009の方法。

[本発明1012]

前記鑄型分子が、エンドヌクレアーゼ制限部位を含み、

前記1つまたは複数の酵素が、制限エンドヌクレアーゼを含み、かつ

前記アダプター分子が、前記鑄型分子の一部を含み、前記鑄型分子が前記制限エンドヌクレアーゼと接触すると前記一部が生成されて前記水溶液中に放出される、本発明1009の方法。

[本発明1013]

前記固体担体が、ビーズまたは表面である、本発明1009の方法。

[本発明1014]

前記アダプター分子を1つの試料と関連づけられた前記RNAに付加する前は、前記アダプター分子が溶液中で遊離している、本発明1001の方法。

[本発明1015]

前記アダプター分子がコンパートメント内で生成され、前記アダプター分子を1つの試料と関連づけられた前記RNAに付加することが、前記コンパートメントを、前記RNAが存在している反応ボリュームと混和することを含む、本発明1001の方法。

[本発明1016]

前記アダプター分子が、前記アダプター分子が付加される前記RNAが存在している反応ボリューム内で生成される、本発明1001の方法。

[本発明1017]

前記アダプター分子が、前記アダプター分子が付加される前記RNAが存在している反応ボリューム内で生成されない、本発明1001の方法。

[本発明1018]

前記酵素反応が、等温性反応である、本発明1001の方法。

[本発明1019]

前記アダプター分子が、固有分子識別子(UMI)配列をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1020]

前記アダプター分子が、RNA分子である、本発明1001の方法。

[本発明1021]

前記アダプター分子が、RNAPを利用して生成される、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記アダプター分子が、DNA分子である、本発明1001の方法。

[本発明1023]

前記アダプター分子が、DNAPを利用して生成される、本発明1022の方法。

[本発明1024]

関心対象の前記1つまたは複数のポリヌクレオチドを生成させることが、前記試料と関連づけられたRNAを逆転写して、それにより複数の第一鎖cDNAを合成することを含み、

前記試料と関連づけられたRNAの少なくとも幾つかが、前記アダプター分子の結合部位に相補的である配列領域を含み、かつ

前記バーコード配列が、前記試料と関連づけられた第一鎖cDNAに組み込まれるように、前記アダプター分子が逆転写のためのプライマーとして使用される、本発明1022の方法。

[本発明1025]

前記結合部位が、ポリ - T トラクトを含む、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記結合部位が、ランダムトラクトを含む、本発明1024の方法。

[本発明1027]

前記結合部位が、前記アダプター分子の3'末端に存在する、本発明1024の方法。

[本発明1028]

前記アダプター分子がコンパートメント内で生成され、前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することが、前記コンパートメントを、前記RNAが存在している前記反応ボリュームと混和すると起こる、本発明1024の方法。

[本発明1029]

前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することが、前記RNAに付加された前記アダプター分子が生成されたのと同じ反応ボリューム内で起こる、本発明1024の方法。

[本発明1030]

複数のcDNAを得るために、前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することをさらに含み、RNAを逆転写することが、逆転写酵素及び第一鎖プライマーを用いてcDNAの第一鎖を合成することを含む、本発明1001の方法。

[本発明1031]

前記逆転写酵素が、MMLV⁻H⁻逆転写酵素である、本発明1030の方法。

[本発明1032]

前記アダプター分子がコンパートメント内で生成され、前記アダプター分子を1つの試料と関連づけられた前記RNAに付加することが、前記コンパートメントを、前記RNAが存在している前記反応ボリュームと混和することを含む、本発明1030の方法。

[本発明1033]

cDNAの第一鎖が、前記コンパートメントを前記反応ボリュームと混和する前に合成される、本発明1032の方法。

[本発明1034]

cDNAの第一鎖が、前記コンパートメントを前記反応ボリュームと混和した後に合成される、本発明1032の方法。

[本発明1035]

前記試料と関連づけられた前記RNAを逆転写することが、前記RNAに付加された前記アダプター分子が生成されたのと同じ反応ボリューム内で起こる、本発明1030の方法。

[本発明1036]

前記反応ボリューム内の緩衝液が、pH8.0~pH8.8のpH範囲で、トリス、カリウムイオン、塩素イオン、硫酸イオン、アンモニウムイオン、酢酸イオン、またはマグネシウムイオンのうちの少なくとも1種を含む、本発明1035の方法。

[本発明1037]

前記逆転写酵素が、鋳型切替え活性を有し、

前記試料と関連づけられたcDNAの少なくとも幾つかの第一鎖が、3'オーバーハングを含み、

前記アダプター分子の結合部位が、3'オーバーハングに相補的である3'部分を含み、かつ

前記バーコード配列が、前記試料と関連づけられたcDNAの第一鎖に組み込まれるように、前記アダプター分子が前記逆転写酵素のための鋳型として働く、本発明1030の方法。

[本発明1038]

前記3'オーバーハングが、1つまたは複数のCヌクレオチドを含み、前記結合部位の3'部分が、1つまたは複数のGヌクレオチドを含む、本発明1037の方法。

[本発明1039]

前記第一鎖プライマーが、ポリTトラクトを含む、本発明1037の方法。

[本発明1040]

前記第一鎖プライマーが、ランダム配列を含む、本発明1037の方法。

[本発明1041]

関心対象のポリヌクレオチドを生成させることが、第一のプライマー及び第二のプライマーを用いて前記試料のcDNAの前記第一鎖を増幅することを含み、前記第二のプライマーが、前記第一鎖プライマーの少なくとも一部と同じ配列を有し、前記第一のプライマーまたは前記第二のプライマーが、前記アダプター分子である、本発明1030の方法。

[本発明1042]

前記第一のプライマーが、前記アダプター分子である、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記第二のプライマーが、前記アダプター分子である、本発明1041の方法。

[本発明1044]

前記第一鎖プライマーが、ポリTトラクトを含む、本発明1041の方法。

[本発明1045]

前記第一鎖プライマーが、ランダム配列を含む、本発明1041の方法。

[本発明1046]

前記試料が、細胞を含む、本発明1001の方法。

[本発明1047]

前記細胞が、血液細胞、免疫細胞、組織細胞、または腫瘍細胞である、本発明1046の方法。

[本発明1048]

前記細胞が、B細胞またはT細胞である、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記試料と関連づけられた前記RNAが、mRNAを含む、本発明1046の方法。

[本発明1050]

前記試料と関連づけられた前記RNAが、少なくとも1、3、10、30、100、300、1,000、3,000、10,000、30,000、100,000、300,000、または1,000,000種のmRNAを含む、本発明1049の方法。

[本発明1051]

前記試料と関連づけられた前記RNAが、細胞のトランスクリプトームの少なくとも一部を含む、本発明1049の方法。

[本発明1052]

前記試料と関連づけられた前記RNAが、細胞の総RNAを含む、本発明1046の方法。

[本発明1053]

試料あたり少なくとも10、30、100、300、1,000、3,000、10,000、30,000、100,000、300,000、または1,000,000種の関心対象のポリヌクレオチドが、生成される、本発明1046の方法。

[本発明1054]

前記1つまたは複数の試料が、少なくとも10、30、100、300、1,000、3,000、10,000、30,000、100,000、300,000、または1,000,000個の細胞を含む、本発明1046の方法。

[本発明1055]

前記1つまたは複数の試料が、同じ対象から得られる、本発明1046の方法。

[本発明1056]

前記試料を溶解緩衝液と接触させることをさらに含む、本発明1046の方法。

[本発明1057]

前記試料を核酸マーカーと接触させ、それにより前記核酸マーカーを前記試料のサブセットと結合させること；及び

前記試料を洗浄し、それにより前記核酸マーカーが結合していない試料から前記核酸マーカーを除去すること
をさらに含む、

前記サブセット内の試料については、前記試料と関連づけられたRNAに付加された前記アダプター分子もまた、前記核酸マーカ―に付加され、関心対象の1つまたは複数のポリヌクレオチドが、前記核酸マーカ―を用いて生成される、本発明1046の方法。

[本発明1058]

前記核酸マーカ―が、分子標識に連結された核酸を含む、本発明1057の方法。

[本発明1059]

前記分子標識が、抗体、抗原、またはタンパク質である、本発明1058の方法。

[本発明1060]

前記分子標識が、1つまたは複数の細胞表面部分への親和性を有する、本発明1058の方法。

[本発明1061]

前記核酸が、RNAである、本発明1058の方法。

[本発明1062]

前記核酸が、DNAである、本発明1058の方法。

[本発明1063]

前記DNAが、RNAPプロモーターを含む、本発明1062の方法。

[本発明1064]

前記試料が、第一の核酸マーカ―及び第二の核酸マーカ―と接触しており、

前記第一の核酸マーカ―が、第一の分子標識に連結された第一の核酸を含み、

前記第二の核酸マーカ―が、第二の分子標識に連結された第二の核酸を含み、

前記第一の核酸及び第二の核酸が、異なる配列領域を含み、かつ

前記第一の分子標識と第二の分子標識が異なっている、

本発明1058～1063のいずれかの方法。

[本発明1065]

前記1つまたは複数の試料が、同じ対象から得られる、本発明1001の方法。

[本発明1066]

前記1つまたは複数の試料が、少なくとも3、10、30、または100種の異なる対象から得られる、本発明1001の方法。

[本発明1067]

RNAPプロモーター配列、ユニバーサルプライミング配列、バーコード配列、及び結合部位を含む、アダプター構築物。

[本発明1068]

前記RNAPプロモーターが、T7、T3、及びSP6からなる群から選択される、本発明1067のアダプター構築物。

[本発明1069]

ニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位、ユニバーサルプライミング配列、バーコード配列、及び結合部位を含む、アダプター構築物。

[本発明1070]

前記ニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位が、Nt.BbvCI、Nt.BspQI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI、Nt.AlwI、及びNt.BsmAIからなる群から選択される、本発明1069のアダプター構築物。

[本発明1071]

固有分子識別子(UMI)配列をさらに含む、本発明1067または1069のアダプター構築物。

[本発明1072]

本発明1067、1069または1071のアダプター構築物を含む固体担体。

[本発明1073]

前記アダプター構築物が、共有結合を介して前記固体担体に結合されている、本発明1072の固体担体。

[本発明1074]

前記アダプター構築物の複数のコピーが、前記固体担体に結合されている、本発明1072の固体担体。

[本発明1075]

少なくとも10、30、100、300、1,000、3,000、10,000、30,000、100,000、300,000、または1,000,000コピーの前記アダプター構築物が、前記固体担体に結合されている、本発明1074の固体担体。

[本発明1076]

前記アダプター構築物の各コピーが、同じバーコード配列を含む、本発明1074の固体担体。

[本発明1077]

本発明1072の複数の固体担体を含むアダプター鑄型ライブラリー。

[本発明1078]

前記複数が、少なくとも10、30、100、300、1,000、3,000、10,000、30,000、100,000、300,000、または1,000,000個の固体担体を含む、本発明1077のアダプター鑄型ライブラリー。

[本発明1079]

抗体、抗原、またはタンパク質である分子標識に連結された核酸を含む核酸マーカ。

[本発明1080]

前記分子標識が、1つまたは複数の細胞表面部分への親和性を有する、本発明1079の核酸マーカ。

[本発明1081]

前記核酸が、RNAである、本発明1079の核酸マーカ。

[本発明1082]

前記核酸が、DNAである、本発明1079の核酸マーカ。

[本発明1083]

前記DNAが、RNAPプロモーターを含む、本発明1082の核酸マーカ。

[本発明1084]

少なくとも1つの核酸マーカが、第一の分子標識に連結された第一の核酸を含み、少なくとも1つの核酸マーカが、第二の分子標識に連結された第二の核酸を含み、

前記第一の核酸及び第二の核酸が、異なる配列領域を含み、前記第一の分子標識と第二の分子標識が異なっている、本発明1079～1083のいずれかの複数の核酸マーカ。

[本発明1085]

本発明1067、1069もしくは1071のアダプター構築物、本発明1072の固体担体、本発明1077のアダプター鑄型ライブラリー、または本発明1079～1083のいずれかの核酸マーカを含む、キット。

[本発明1086]

本発明1067または1069のアダプター構築物から、ユニバーサルプライミング配列、バーコード配列及び結合部位を含むアダプター分子を生成させるための酵素をさらに含む、本発明1085のキット。

[本発明1087]

浸透圧保護剤を含む細胞懸濁緩衝液をさらに含む、本発明1085または1086のキット。

[本発明1088]

前記浸透圧保護剤が、ベタイン、または構造的に近いその類似体である、本発明1087のキット。

[本発明1089]

前記浸透圧保護剤が、グリシンベタインである、本発明1088のキット。

[本発明1090]

前記浸透圧保護剤が、糖またはポリオールである、本発明1087のキット。

[本発明1091]

前記浸透圧保護剤が、トレハロースである、本発明1090のキット。

[本発明1092]

前記浸透圧保護剤が、アミノ酸である、本発明1087のキット。

[本発明1093]

前記浸透圧保護剤が、プロリンである、本発明1092のキット。

[本発明1094]

前記緩衝液の浸透圧が、約250～350m O s m / Lである、本発明1087のキット。

[本発明1095]

前記浸透圧保護剤が、前記緩衝液の浸透圧の最大10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%に寄与している、本発明1087のキット。

[本発明1096]

前記緩衝液が、約230～330m M ベタイン及び約10m M N a C lを含む、本発明1087のキット。

[本発明1097]

a) 逆エマルションの親水性コンパートメントを生成させるステップであって、前記親水性コンパートメントが

固体担体と、

バーコード配列を含むバーコードオリゴヌクレオチドと、

捕捉部分を介して前記固体担体の表面に結合されたオリゴヌクレオチドと

を含み、前記結合されたオリゴヌクレオチドが、前記バーコードオリゴヌクレオチドの3'配列に相補的である3'配列を含む、ステップと、

b) 前記固体担体上の前記結合されたオリゴヌクレオチドに前記バーコード配列を組み込むためにポリメラーゼ伸長反応を実施するステップと

を含む、バーコード配列を含むポリヌクレオチドを固体担体に付着させる方法。

[本発明1098]

前記バーコードオリゴヌクレオチドが、P C Rリバースプライマー配列と同一の、または前記P C Rリバースプライマー配列に相補的である5'配列をさらに含む、本発明1097の方法。

[本発明1099]

フルオロフォア標識リバースプライマーを用いてP C R反応を実施することをさらに含む、本発明1098の方法。

[本発明1100]

前記固体担体が、ビーズまたは表面である、本発明1097の方法。

[本発明1101]

前記捕捉部分が、ストレプトアビジンである、本発明1097の方法。

[本発明1102]

前記捕捉部分が、カルボキシル基、エポキシ基、またはヒドロキシル基を含む、本発明1097の方法。

[本発明1103]

前記捕捉部分が、チオール化オリゴヌクレオチドを捕捉するための金を含む、本発明1097の方法。

[本発明1104]

前記バーコードオリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライミング配列及び結合部位をさらに含む、本発明1097の方法。

[本発明1105]

前記バーコードオリゴヌクレオチドが、T7、T3、及びS P6からなる群から選択されるR N A Pプロモーターをさらに含む、本発明1104の方法。

[本発明1106]

前記バーコードオリゴヌクレオチドが、N t . B b v C I、N t . B s p Q I、N t . B s m A I、N t . B s t N B I、N t . A l w I、及びN t . B s m A Iからなる群から選択されるニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位をさらに含む、本発明1104の方法。

[本発明1107]

前記結合部位が、1つまたは複数のGヌクレオチドである、本発明1104の方法。

[本発明1108]

a) 固体担体と、

W配列を含む第一のバーコードオリゴヌクレオチドと、

(i) $S1_x$ 配列、及び(ii) 前記第一のバーコードオリゴヌクレオチドの3'配列に相補的である配列を含む、捕捉部分を介して前記固体担体の表面に結合されたオリゴヌクレオチドと

を提供するステップと；

b) 前記W配列を前記結合されたオリゴヌクレオチドに組み込むためにポリメラーゼ伸長反応またはライゲーション反応を実施するステップと；

c) (i) $S2_y$ 配列、及び(ii) ステップb) から得られた結合されたオリゴヌクレオチドの3'末端に相補的である3'配列を含む第二のバーコードオリゴヌクレオチドを提供するステップと；

d) 前記結合されたオリゴヌクレオチドに前記 $S2_y$ 配列を組み込むためにポリメラーゼ伸長反応またはライゲーション反応を実施するステップであって、それにより、ポリヌクレオチドを前記固体担体に付着させ、前記ポリヌクレオチドが、バーコード配列を含み、前記バーコード配列が、 $S1_x$ 、W、及び $S2_y$ 配列を含む、ステップとを含む、バーコード配列を含むポリヌクレオチドを固体担体に付着させる方法。

[本発明1109]

前記固体担体が、ビーズまたは表面である、本発明1108の方法。

[本発明1110]

前記捕捉部分が、ストレプトアビジンである、本発明1108の方法。

[本発明1111]

前記捕捉部分が、カルボキシル基、エポキシ基、またはヒドロキシル基を含む、本発明1108の方法。

[本発明1112]

前記捕捉部分が、チオール化オリゴヌクレオチドを捕捉するための金を含む、本発明1108の方法。

[本発明1113]

前記第一または第二のバーコードオリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライミング配列及び結合部位をさらに含む、本発明1108の方法。

[本発明1114]

前記第一または第二のバーコードオリゴヌクレオチドが、T7、T3、及びSP6からなる群から選択されるRNAPプロモーターをさらに含む、本発明1113の方法。

[本発明1115]

前記第一または第二のバーコードオリゴヌクレオチドが、Nt.BbvCI、Nt.BspQI、Nt.BsmAI、Nt.BstNBI、Nt.AlwI、及びNt.BsmAIからなる群から選択されるニッキングエンドヌクレアーゼ制限部位をさらに含む、本発明1113の方法。

[本発明1116]

前記結合部位が、1つまたは複数のGヌクレオチドである、本発明1113の方法。

[本発明1117]

バーコード配列を含むポリヌクレオチドに付着されている、本発明1097~1116のいずれかの方法により調製された固体担体。

[本発明1118]

本発明1117の複数の固体担体を含むバーコードライブラリー。

[本発明1119]

(a) 3つの独立して制御される圧力源と、(b) 3つのマイクロ流体経路と、(c) 3つのフローセンサーと、(d) 2つの試料ループと、(e) マイクロ流体ドロップレット

チップと、(f) 試料回収容器とを含み、

(a) ~ (f) が流体連通するように、

各圧力源が前記マイクロ流体経路の1つに連結されて、該マイクロ流体経路を通るように流体を流し、

前記フローセンサーの1つが、前記各圧力源の下流の各マイクロ流体経路に沿って配置され、

第一のマイクロ流体経路が、第一の試料ループを通過し、

第二のマイクロ流体経路が、第二の試料ループを通過し、

前記第一及び前記第二の試料ループが、熱冷却ユニットと接触しており、

前記第一及び第二のマイクロ流体経路が第一のジャンクションで合流して、組み合わせられた経路を形成しており、

前記組み合わせられた経路及び第三のマイクロ流体経路が第二のジャンクションで合流して試料経路を形成しており、前記第二のジャンクションが、前記マイクロ流体ドロップレットチップ内かつ前記第一のジャンクションの下流に存在し、

前記試料経路が、前記第二のジャンクションの下流の前記試料回収容器内に入っている

細胞と、バーコードアダプター鑄型と、関心対象のポリヌクレオチドを生成するための試薬とを封入するためのマイクロ流体ドロップレットデバイス。

[本発明1120]

前記各圧力源が、圧力ポンプを含む、本発明1119のデバイス。

[本発明1121]

前記各圧力源が、シリンジポンプを含む、本発明1119のデバイス。

[本発明1122]

前記第一の試料ループが、前記マイクロ流体ドロップレットチップに向かう水溶液の流れを計量するように構成されており、前記水溶液が、細胞及びバーコードアダプター鑄型を含む、本発明1119のデバイス。

[本発明1123]

前記第二の試料ループが、前記マイクロ流体ドロップレットチップに向かう反応混合物の流れを計量するように構成されており、前記反応混合物が、細胞溶解のための試薬及び関心対象のポリヌクレオチドを生成させるための試薬を含む、本発明1119のデバイス。

[本発明1124]

前記第三のマイクロ流体経路が、油ノ界面活性剤ミックスを前記マイクロ流体ドロップレットチップに送達するように構成されている、本発明1119のデバイス。

[本発明1125]

前記熱冷却ユニットが、ペルティエデバイスを含む、本発明1119のデバイス。

[本発明1126]

前記熱冷却ユニットが、氷の箱を含む、本発明1119のデバイス。

[本発明1127]

前記第一のジャンクションが、前記ドロップレットチップ内に存在する、本発明1119のデバイス。

[本発明1128]

前記第三のマイクロ流体経路が、前記マイクロ流体ドロップレットチップの上流で2つの準経路に分割されており、前記2つの準経路が、前記第二のジャンクションで前記組み合わせられた経路と合流し、前記第二のジャンクションが、フローフォーカシング配置を有する、本発明1119のデバイス。

[本発明1129]

前記第二のジャンクションが、T字形ジャンクション配置を有する、本発明1119のデバイス。

[本発明1130]

前記第一のマイクロ流体経路が、細胞を収容するように構成されており、前記第二のマイクロ流体経路が、固体担体に結合されたバーコードアダプター鑄型を収容するように構成されている、本発明1119のデバイス。

[本発明1131]

前記固体担体の少なくとも2つが、異なるバーコード配列またはUMI配列を有するアダプター構築物を含む、本発明1077のアダプター鑄型ライブラリー。

[本発明1132]

前記複数の固体担体の各固体担体が、異なるバーコード配列または異なるUMI配列を有するアダプター構築物を含む、本発明1131のアダプター鑄型ライブラリー。