

【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】令和 3 年 7 月 26 日 (2021.7.26)

【公表番号】特表 2020-523034 (P2020-523034A)

【公表日】令和 2 年 8 月 6 日 (2020.8.6)

【年通号数】公開・登録公報 2020-031

【出願番号】特願 2020-515835 (P2020-515835)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6855 (2018.01)

C 4 0 B 40/06 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6855 Z

C 4 0 B 40/06 Z N A

C 1 2 N 15/10 Z

C 1 2 Q 1/6806 Z

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/13

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6851 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 5 月 20 日 (2021.5.20)

【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】

以下の工程を含む、ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法：

(a) ベッセルのそれぞれが細胞の集団からの細胞を含む複数のベッセルのそれぞれの中で、細胞を溶解する工程；および

(b) 各ベッセル中で複数の相補的ポリヌクレオチドを作製する工程であって、該作製工程が、(i) 前記細胞中に存在する 1 つまたは複数の標的ポリヌクレオチド転写物に相補的である 1 つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを、1 つまたは複数の標的的特異的プライマーを使って作製することと (ii) それぞれが前記細胞中のポリヌクレオチド転写物に個別に相補的であるポリヌクレオチドの集合体を作製することを含む、工程。

【請求項 2】

前記 (ii) におけるポリヌクレオチドの集合体が、ランダムオリゴマープライマーを使って作製される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

ベッセルのそれぞれが、複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチド、1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドまたはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプール、および第1アダプターまたは第1アダプターのプールをさらに含み、

(c) 複数の相補的ポリヌクレオチドを、任意で複数の相補的ポリヌクレオチドのそれぞれを、前記複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドのうちの1つに、取り付ける工程であって、それによって、分子バーコードをそれぞれが含む複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドを生成させる、工程、任意で、ここで前記分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの分子バーコードは、前記複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチド内の他の分子バーコード化ポリヌクレオチドに含まれる分子バーコードとは相異なり、またはユニークな分子バーコードである；

(d) 前記1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールのうちの1つまたはその増幅産物、および第1アダプターもしくは第1アダプターのプールの1つまたはその増幅産物を、複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドに、任意で分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれに、取り付ける工程であって、それによって、それぞれが分子バーコードとベッセルバーコードとを含む複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドを、任意で二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドを、生成させる、工程、ここで同じベッセル内の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれは同じベッセルバーコードを含むをさらに含む、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

(e) 複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドの、任意で複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの、一本鎖アンプリコンを作製する工程；および

(f) 一本鎖アンプリコンのそれぞれに第2アダプターを付加する工程であって、第1アダプターと第2アダプターとが二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれの反対の端またはその近傍に存在する、工程をさらに含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】

以下の工程を含む、ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法：

(a) ベッセルのそれぞれが、細胞の集団からの細胞、複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチド、1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドまたはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプール、および第1アダプターまたは第1アダプターのプールを含む、複数のベッセルのそれぞれの中で、細胞を溶解する工程；

(b) (i) 前記細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチド転写産物に相補的である1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを、1つまたは複数の標的的特異的プライマーを使って作製することと(ii) それぞれが前記細胞中のポリヌクレオチド転写産物に個別に相補的であるポリヌクレオチドの集合体を作製することを含む、各ベッセル中で複数の相補的ポリヌクレオチドを作製する工程；

(c) 各相補的ポリヌクレオチドを前記複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドのうちの1つに取り付ける工程であって、それによって、ユニークな分子バーコードをそれぞれが含む複数のバーコード化ポリヌクレオチドを生成させる、工程；

(d) 前記1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールのうちの1つまたはその増幅産物および前記第1アダプターもしくは第1アダプターのプールの1つまたはその増幅産物を、前記バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれに取り付ける工程であって、それによって、複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドを、任意で二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドを、生成させる、工程、ここで二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれは分子バーコードとベッセルバーコードとを含み、かつ同じベッセル内の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれは同じベッセルバーコードを含む；

(e) 前記複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの一本鎖アンプリコンを作製する工程；および

(f) 前記一本鎖アンプリコンのそれぞれに第2アダプターを付加することによって、二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドに第2アダプターを付加する工程であって、第1アダプターと第2アダプターとが二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれの反対の端またはその近傍に存在する、工程。

【請求項6】

第1アダプターがベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドを含む、請求項4または5記載の方法。

【請求項7】

複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれの、バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれに取り付けられた第1アダプターとは反対側の末端またはその近傍に、第2アダプターを付加する工程を含む、ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法であって、

第1アダプターはベッセルバーコードを含み、

前記複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドは、

(i) 細胞の集団の細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチド転写物のアンプリコンまたはその相補体を含む、1つまたは複数の標的一本鎖ポリヌクレオチドと、

(ii) それぞれが前記細胞の集団の細胞中のポリヌクレオチドのアンプリコンまたはその相補体を含む、一本鎖ポリヌクレオチドの集合体とを含む、

前記細胞の集団の同じ細胞に由来する(i)および(ii)からのポリヌクレオチドのそれぞれが同じベッセルバーコード配列を含む、方法。

【請求項8】

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが標的遺伝子の全長コーディング配列を含む、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれが、各一本鎖ポリヌクレオチドまたはその増幅産物にユニークである分子バーコードをさらに含む、請求項3～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

ベッセルの各細胞からのバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの集合体が、全体として、各細胞のトランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームの相補的DNA(cDNA)鎖を含む、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

ベッセルの各細胞からのポリヌクレオチドの集合体が、全体として、各細胞のトランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームのポリヌクレオチド転写産物に相補的な配列を含む、請求項1～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームが、全体として、細胞のゲノムに存在する転写産物のうちの少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を含む、請求項11記載の方法。

【請求項13】

前記(b)の相補的ポリヌクレオチドのそれぞれまたは(b)の相補的ポリヌクレオチドのうちの1つもしくは複数がcDNAである、かつ/または

バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれまたはバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのうちの1つもしくは複数がcDNAの鎖である、

請求項1～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

第1アダプターおよび/または第2アダプターが少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位を含む、請求項1～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

第2アダプターを付加する工程が、スプリントオリゴヌクレオチドを、バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれに、第2ユニバーサルプライミング部位を含むオリゴヌクレオチドの存在下でハイブリダイズさせることを含み、スプリントオリゴヌクレオチドは (i) 第2ユニバーサルプライミング部位に相補的な配列と (ii) バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの3' 端にランダムにアニールする能力を有する縮重オーバーハング配列とを含み、かつ、

ハイブリダイゼーションに先だって、スプリントオリゴヌクレオチドと、第2ユニバーサルプライミング部位を含むオリゴヌクレオチドとをアニールさせることで、スプリント-アダプター二重鎖を形成させる、

請求項4~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

縮重オーバーハング配列が配列NNNNNN (SEQ ID NO:24) を含み、ここでNは任意のヌクレオチドである、

スプリントオリゴヌクレオチドが配列
ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNN

(SEQ ID NO:26) を含み、ここでNは任意のアミノ酸である、かつ/または

第2ユニバーサルプライミング部位を含むオリゴヌクレオチドが配列
AGATCGGAAGAGCGTCGTGT (SEQ ID NO:25)

を含む、

請求項15記載の方法。

【請求項 17】

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが、

縮重配列；

配列 (N)_{14~17}、ここでNは任意のヌクレオチドであり、任意で、配列中の少なくとも1つまたは2つのNはWであり、ここでWはアデニンまたはチミンである、かつ/または
配列

NNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:80),

WNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:81), NWNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:82)または

NNWNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:83)

、ここでNは任意のヌクレオチドであり、Wはアデニンまたはチミンである、
を含む、請求項3~16のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

各ベッセルは、ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールを含む第1アダプターのプールを含み、第1アダプターのプールの各ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドは、前記プール中の他のベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの少なくとも1つと比較して、少なくとも1つの塩基シフトまたは塩基付加を含む、請求項3~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

工程 (d) において、

(i) 1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプール、または

1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールを含む、1つの第1アダプターもしくは第1アダプターのプールを増幅することをさらに含み、

前記増幅が、ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの取り付けに先だってまたはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの取り付けと同時に実施される；かつ/または

(ii) 取り付ける工程の後に、複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれを伸

長して複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドを生成させることを含む、
請求項3～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

工程(b)において、

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドは、逆転写酵素および標的ポリヌクレオチドの標的配列に相補的な1つまたは複数の標的特定のプライマーの存在下で、標的ポリヌクレオチド転写産物の逆転写によって作製され、かつ/または

ポリヌクレオチドの集合体は、逆転写酵素および細胞中のポリヌクレオチド転写産物に相補的な1つまたは複数のトランスクリプトームプライマーの存在下で、細胞中のポリヌクレオチド転写産物の逆転写によって作製され、

ここで、1つもしくは複数の標的特定のプライマーおよび/または1つもしくは複数のトランスクリプトームプライマーがポリ(T)配列、またはランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドプライマーの混合物を含む、かつ/または

複数の相補的ポリヌクレオチドを作製する工程は、非テンプレートターミナルトランスフェラーゼの使用を含み、3つ以上の非テンプレートヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはその類似体が、作製された各相補的ポリヌクレオチドの3'端に付加される、

請求項1～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがT細胞受容体アルファ(TCR)をコードする第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体(TCR)をコードする第2ポリヌクレオチド；

T細胞受容体ガンマ(TCR)をコードする第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体デルタ(TCR)をコードする第2ポリヌクレオチド；または

重鎖免疫グロブリン(IgH)をコードする第1ポリヌクレオチドおよび軽鎖免疫グロブリン(IgL)をコードする第2ポリヌクレオチドを含む、

請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの集合体が、同じ反応体積中のベッセル内で作製される、請求項1～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

工程(c)において、取り付ける工程は、複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドのうちの1つの一領域を、相補的ポリヌクレオチドのそれぞれの3つ以上の非テンプレートヌクレオチドにハイブリダイズさせることを含む、

複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドは、それぞれが3つ以上の非テンプレートヌクレオチドに相補的な3'部分を含む複数のテンプレートスイッチオリゴヌクレオチドとして提供される、かつ/または

テンプレートスイッチオリゴヌクレオチドは第1アダプターの一部に相補的である5'末領域をさらに含み、第1アダプターはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドを含む

、
請求項3～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

ベッセルが、ウェル、エマルジョン、液滴、またはマイクロカプセルである、請求項1～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドが、順に(5'から3'へ)、第1アダプター、ベッセルバーコード、分子バーコードおよび第2アダプターを含む、請求項1～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】

工程(a)～(f)のうちの1つまたは複数が、
溶解状態で実行され、かつ/または
固体支持体の存在下では実行されず、

少なくとも工程(c)および(d)が、
溶解状態で実行され、かつ/または
固体支持体の存在下では実行されず、かつ/または
工程(a)～(e)のそれぞれが、
溶解状態で実行され、かつ/または
固体支持体の存在下では実行されない、
 請求項4～25のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】

細胞の集団が、少なくとも 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、または 5×10^6 細胞を含む、またはおよそ少なくとも 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、または 5×10^6 細胞を含む、請求項1～26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

細胞の集団が、リンパ球もしくはそのサブタイプ、B細胞もしくはそのサブタイプ、T細胞もしくはそのサブタイプ、またはそれらの組合せを含む、請求項1～27のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

細胞の集団が、CD4 + T細胞またはCD8 + T細胞を含む、請求項28記載の方法。

【請求項30】

複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドを増幅する工程であって、それによって、複数のポリヌクレオチドテンプレートを生成させる、工程であって、
複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの増幅が、第1アダプター配列に相補的な第1プライマーと第2アダプター配列に相補的な第2プライマーとを含む第1プライマーセットの存在下で実行される、工程
 をさらに含む、請求項1～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

請求項1～30のいずれか一項記載の方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項32】

複数のバーコード化ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリーであって、前記複数のバーコード化ポリヌクレオチドは、(i)細胞の集団の細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのアンプリコンを含む1つまたは複数の標的ポリヌクレオチド転写物と(ii)それぞれが前記細胞中のポリヌクレオチド転写物のアンプリコンを含むポリヌクレオチドの集合体とを含み、
 各バーコード化ポリヌクレオチドは、

第1ユニバーサルプライマーに相補的である第1ユニバーサルプライミング部位を含む第1アダプター、

前記細胞の集団の同じ細胞に由来する(i)および(ii)からのすべてのバーコード化ポリヌクレオチドについて同じであるベッセルバーコードを含むベッセルバーコード化オリゴヌクレオチド、ならびに

第2ユニバーサルプライマーに相補的である第2ユニバーサルプライミング部位を含む第2アダプター配列
 を含む、ポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項33】

複数のバーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれが、各ポリヌクレオチドにユニークである分子バーコードを含む、請求項32記載のポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項34】

細胞の集団の各細胞からのバーコード化ポリヌクレオチドテンプレートの集合体が、全体として、トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームに対応する相補的DNA(cDNA)鎖を含む、請求項32または33記載のポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 35】

第1アダプターがベッセルバーコードを含む、請求項32～34のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 36】

バーコード化ポリヌクレオチドが一本鎖である、請求項32～35のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 37】

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが、
T細胞受容体アルファ（TCR）をコードする第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体（TCR）をコードする第2ポリヌクレオチド；
T細胞受容体ガンマ（TCR）をコードする第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体デルタ（TCR）をコードする第2ポリヌクレオチド；または
重鎖免疫グロブリン（IgH）をコードする第1ポリヌクレオチドおよび軽鎖免疫グロブリン（IgL）をコードする第2ポリヌクレオチドを含む、
請求項32～36のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 38】

バーコード化ポリヌクレオチドが、順に（5'から3'へ）、第1アダプター、ベッセルバーコードオリゴヌクレオチド、分子バーコードおよび第2アダプターを含む、請求項32～37のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリー。

【請求項 39】

1つもしくは複数の標的ポリヌクレオチドおよび/または1つもしくは複数の細胞の完全なもしくは部分的なトランスクリプトームをシーケンシングするための方法であって、請求項1～30のいずれか一項によって作製される、または請求項32～38のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリーからの、複数のバーコード化ポリヌクレオチド、任意で二重バーコード化ポリヌクレオチドのうちの1つまたは複数のシーケンシングする工程を含む、方法。

【請求項 40】

シーケンシングに先だって、完全なトランスクリプトームまたはその一部分を増幅する工程であって、それぞれ第1アダプター配列と第2アダプター配列に特異的な第1プライマーと第2プライマーとを含む第1プライマーセットを使って実行される、工程；

シーケンシングに先だって、複数のバーコード化ポリヌクレオチドから1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを増幅する工程であって、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドの全長配列が増幅される、工程；

1つまたは複数のバーコード化ポリヌクレオチドの細胞起源を決定する工程；かつ/または

同じバーコードを持つポリヌクレオチドの数を、定量または決定する工程、
をさらに含む、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

以下の工程を含む、トランスクリプトーム解析のための方法：

（a）請求項1～30のいずれか一項記載の方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、または請求項32～38のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドをシーケンシングする工程であって、それによって、複数の細胞から標的ポリヌクレオチドに関する配列情報を生成させる、工程、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである；

（b）請求項1～30のいずれか一項記載の方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、または請求項32～38のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、全トランスクリプトームまたはその一部分をシーケンシングする工程であって、それによって、前記複数の細胞からトランスクリプトームデータを生成させる、工程、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バ

ーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである；および

(c) 同じベッセルバーコードを有する(a)からの配列情報および(b)からの配列情報を、同じ細胞からのものであると同定する工程。

【請求項42】

以下の工程を含む、選択された単一細胞のトランスクリプトームを解析する方法：

(a) 請求項1～30のいずれか一項記載の方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、または請求項32～38のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを増幅する、かつシーケンシングする工程であって、それによって、複数の細胞のうちの少なくとも1つにおける標的ポリヌクレオチドのそれぞれに関する配列情報を生成させる、工程、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである；

(b) (a)においてシーケンシングされた標的ポリヌクレオチド配列のうちの1つに関連するベッセルバーコードを同定する工程であって、それによって、前記標的ポリヌクレオチドを保持する選択された単一細胞を同定する、工程；

(c) (b)において同定されたベッセルバーコードを保持する細胞の複数のバーコード化ポリヌクレオチドからトランスクリプトームまたはその一部分を増幅する、かつシーケンシングする工程であって、それによって、選択された標的ポリペプチド発現細胞からトランスクリプトームデータを生成させる、工程。

【請求項43】

トランスクリプトームまたはその一部分が、選択された細胞から、(b)において同定されたベッセルバーコードに特異的なプライマーとバーコード化ポリヌクレオチドの第2アダプター配列に特異的なプライマーとを使って増幅またはシーケンシングされる、請求項42記載の方法。

【請求項44】

同じ細胞からのトランスクリプトームまたはその一部分の配列情報と標的ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つの配列情報とをマッピングさせる工程を含む、トランスクリプトーム解析のための方法であって、配列情報が、請求項1～30のいずれか一項記載の方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから決定されるか、請求項32～38のいずれか一項記載のポリヌクレオチドライブラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから決定され、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドであり、または請求項39または40記載の方法から決定される、方法。

【請求項45】

同じベッセルバーコードを有する配列は、同じ細胞からのものであるとしてマッピングされる、請求項44記載の方法。

【請求項46】

トランスクリプトームデータが、細胞の機能または活性に関連するパラメータ、特性、特徴または表現型を含む、かつ/または

トランスクリプトームデータが、細胞の活性化、疲弊または増殖活性に関連する、
請求項41～45のいずれか一項記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

いくつかの態様において、本方法は、同じ細胞からのトランスクリプトームまたはその一部分の配列情報と標的ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つの配列情報とをマッ

ングさせる工程を含み、配列情報は、記載する方法のいずれかによって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、もしくは記載するポリヌクレオチドライブラリーのいずれかの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから決定されるか、または記載する方法のいずれかから決定され、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである。場合により、同じベッセルバーコードを有する配列は、同じ細胞からのものであるとしてマッチングされる。いくつかの態様において、トランスクリプトームデータは、細胞の機能または活性に関連するパラメータ、特性、特徴または表現型を含む。場合により、トランスクリプトームデータは、細胞の活性化、疲弊または増殖活性に関連する。

[本発明1001]

複数の一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの、一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれに取り付けられた第1アダプターとは反対側の末端またはその近傍に、第2アダプターを付加する工程を含む、ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法であって、

第1アダプターはベッセルバーコードを含み、

前記複数の一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドは、

(i) 細胞の集団の細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのアンプリコンまたはその相補体を含む、1つまたは複数の標的一本鎖ポリヌクレオチドと、

(ii) それぞれが前記細胞の集団の細胞中のポリヌクレオチドのアンプリコンまたはその相補体を含む、一本鎖ポリヌクレオチドの集合体と

を含み、

前記細胞の集団の同じ細胞に由来する(i)および(ii)からのポリヌクレオチドのそれぞれが同じベッセルバーコード配列を含む、方法。

[本発明1002]

複数の一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドが細胞の集団中の複数の細胞の(i)および(ii)のポリヌクレオチドを含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

複数の一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれが、各一本鎖ポリヌクレオチドまたはその増幅産物にユニークである分子バーコードをさらに含む、本発明1001または本発明1002の方法。

[本発明1004]

細胞の集団の各細胞からの一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドの集合体が、全体として、トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームの相補的DNA(cDNA)鎖を含む、本発明1001~1003のいずれかの方法。

[本発明1005]

トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームが、全体として、細胞のゲノムに存在する転写産物のうちの少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を含む、本発明1004の方法。

[本発明1006]

一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれが、50塩基対超もしくは約50塩基対超、100塩基対超もしくは約100塩基対長、または200塩基対超もしくは約200塩基対長であるサイズを有する、本発明1001~1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれが、50塩基対(bp)~1500bpもしくは約50bp~1500bp、50bp~1250bpもしくは約50bp~1250bp、50bp~1000bpもしくは約50bp~1000bp、50bp~750bpもしくは約50bp~750bp、50bp~500bpもしくは約50bp~500bp、100bp~1500bpもしくは約100bp~1500bp、100bp~1250bpもしくは約100bp~1250bp、100bp~1000bpもしくは約100bp~1000bp、100bp~750bpもしくは約100bp~750bp、100bp~500bpもしくは約100bp~500bp、200bp~1500bpもしくは約200bp~1500bp、200bp~1250bpもしくは約200bp~1250bp、200bp~1000bpもしくは約200bp~1000bp、200bp~750bpもしくは約200bp~750bp

00bp ~ 750bpまたは250bp ~ 500bpもしくは約250bp ~ 500bpのサイズを有する、本発明1001 ~ 1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

第2アダプターを付加する工程が、複数の一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドを含む均一混合物において実行される、本発明1001 ~ 1007のいずれかの方法。

[本発明1009]

以下の工程を含む、ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法：

(a) ベッセルのそれぞれが細胞の集団からの細胞を含む複数のベッセルのそれぞれの中で、細胞を溶解する工程；

(b) 各ベッセル中で複数の相補的ポリヌクレオチドを作製する工程であって、該作製工程が、(i) 前記細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドに相補的である1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを、1つまたは複数の標的特異的プライマーを使って作製することと(ii) それぞれが前記細胞中のポリヌクレオチド転写物に相補的であるポリヌクレオチドの集合体を作製することを含む、工程。

[本発明1010]

前記(ii)におけるポリヌクレオチドの集合体が、ランダムオリゴプライマーを使って作製される、本発明1009の方法。

[本発明1011]

ベッセルのそれぞれが、複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチド、1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドまたはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプール、および第1アダプターまたは第1アダプターのプールをさらに含み、

(c) 複数の相補的ポリヌクレオチドに、任意で複数の相補的ポリヌクレオチドのそれぞれに、前記複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドのうちの1つを取り付ける工程であって、それによって、分子バーコードをそれぞれが含む複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドを生成させる、工程、任意で、ここで前記分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの分子バーコードは、前記複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチド内の他の分子バーコード化ポリヌクレオチドに含まれる分子バーコードとは相異なり、かつ/またはユニークな分子バーコードである；

(d) 前記1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールのうちの1つまたはその増幅産物、および第1アダプターもしくは第1アダプターのプールの1つまたはその増幅産物を、複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドに、任意で分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれに、取り付ける工程であって、それによって、それぞれが分子バーコードとベッセルバーコードとを含む複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドを、任意で一本鎖二重バーコード化ポリヌクレオチドを、生成させる、工程、ここで同じベッセル内の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれは同じベッセルバーコードを含む

をさらに含む、本発明1009または本発明1010の方法。

[本発明1012]

(e) 複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドの、任意で複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの、一本鎖アンプリコンを作製する工程をさらに含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

(f) 一本鎖アンプリコンのそれぞれに第2アダプターを付加する工程であって、第1アダプターと第2アダプターとが二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれの反対の端またはその近傍に存在する、工程をさらに含む、本発明1012の方法。

[本発明1014]

以下の工程を含む、ポリヌクレオチドライブラリーを作製する方法：

(a) ベッセルのそれぞれが、細胞の集団を含む試料からの細胞、複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチド、1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドまたはベッセ

ルバーコード化オリゴヌクレオチドのプール、および第1アダプターまたは第1アダプターのプールを含む、複数のベッセルのそれぞれの中で、細胞を溶解する工程；

(b) (i) 前記細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチド転写産物に相補的である1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを作製することと (ii) それぞれが前記細胞中のポリヌクレオチド転写産物に個別に相補的であるポリヌクレオチドの集合体を作製することとを含む、各ベッセル中で複数の相補的ポリヌクレオチドを作製する工程；

(c) 各相補的ポリヌクレオチドに前記複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドのうちの1つを取り付ける工程であって、それによって、ユニークな分子バーコードをそれぞれが含む複数のバーコード化ポリヌクレオチドを生成させる、工程；

(d) 前記1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールのうちの1つまたはその増幅産物および前記第1アダプターもしくは第1アダプターのプールの1つまたはその増幅産物を、前記バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれに取り付ける工程であって、それによって、複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドを、任意で一本鎖二重バーコード化ポリヌクレオチドを、生成させる、工程、ここで二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれは分子バーコードとベッセルバーコードとを含み、かつ同じベッセル内の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれは同じベッセルバーコードを含む；

(e) 前記複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの一本鎖アンプリコンを作製する工程；および

(f) 前記一本鎖アンプリコンのそれぞれに第2アダプターを付加することによって、二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドに第2アダプターを付加する工程であって、第1アダプターと第2アダプターとが二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれの反対の端またはその近傍に存在する、工程。

[本発明1015]

第1アダプターがベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドを含む、本発明1011～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

細胞の集団の各細胞からのポリヌクレオチドの集合体が、全体として、細胞のトランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームの転写産物に相補的な配列を含む、本発明1009～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームが、細胞のゲノムに存在する転写産物のうちの少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を含む、本発明1016の方法。

[本発明1018]

前記 (i) におけるアンプリコンおよび/または (ii) におけるアンプリコンが由来する、(i) からの1つもしくは複数の標的ポリヌクレオチドおよび/または (ii) からのポリヌクレオチドがDNAである、本発明1001～1017のいずれかの方法。

[本発明1019]

前記 (i) におけるアンプリコンおよび/または (ii) におけるアンプリコンが由来する、(i) からの1つもしくは複数の標的ポリヌクレオチドおよび/または (ii) からのポリヌクレオチドがRNAである、本発明1001～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

RNAがmRNAである、本発明1019の方法。

[本発明1021]

前記 (b) の相補的ポリヌクレオチドのそれぞれまたは (b) の相補的ポリヌクレオチドのうちの1つもしくは複数のcDNAである、本発明1009～1020のいずれかの方法。

[本発明1022]

バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれまたはバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのうちの1つもしくは複数のcDNAの鎖である、本発明1001～1021のいずれかの方法

。

[本発明1023]

第1アダプターおよび/または第2アダプターが少なくとも1つのユニバーサルプライミング部位を含む、本発明1001～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

第1アダプターと第2アダプターとは異なり、かつ/または

第1アダプターは第1ユニバーサルプライミング部位を含み、第2アダプターは第2ユニバーサルプライミング部位を含み、任意で第1ユニバーサルプライミング部位と第2ユニバーサルプライミング部位とは異なる、
本発明1001～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

第1ユニバーサルプライミング部位および/または第2ユニバーサルプライミング部位は、P7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分またはP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分であるか、P7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分またはP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分を含み、任意で前記その連続する一部分は相補的配列にアニールするのに十分である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

第1ユニバーサルプライミング部位はP7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分であるか、またはP7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分を含み、第2ユニバーサルプライミング部位はP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分であるか、またはP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分を含む、本発明1024または本発明1025の方法。

[本発明1027]

P7プライミング部位（C7）が配列

AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCA (SEQ ID NO:77)

を含むか、またはその連続する一部分である、本発明1025または本発明1026の方法。

[本発明1028]

P5プライミング部位が配列

AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCA
TT (SEQ ID NO:78)

を含むか、またはその連続する一部分である、本発明1025または本発明1026の方法。

[本発明1029]

連続する一部分が少なくとも15、20、25もしくは30ヌクレオチド長を含む、または少なくとも約15、20、25もしくは30ヌクレオチド長を含む、本発明1025～1028のいずれかの方法。

[本発明1030]

P5プライミング部位がSEQ ID NO:25

(AGATCGGAAGAGCGTCGTGT)

に示す連続する一部分である、本発明1025、1026、1028または1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

第2アダプターを付加する工程が、スプリントオリゴヌクレオチドを、バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドのそれぞれに、第2ユニバーサルプライミング部位を含むオリゴヌクレオチドの存在下でハイブリダイズさせることを含み、スプリントオリゴヌクレオチドは（i）第2ユニバーサルプライミング部位に相補的な配列と（ii）バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの3'端にランダムにアニールする能力を有する縮重オーバーハング配列とを含む、本発明1001～1008および本発明1013～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

ハイブリダイゼーションに先だって、スプリントオリゴヌクレオチドと、第2ユニバーサルプライミング部位を含むオリゴヌクレオチドとをアニールさせることで、スプリント

-アダプター二重鎖を形成させる、本発明1031の方法。

[本発明1033]

縮重オーバーハング配列が配列 $(N)_{3 \sim 12}$ を含み、ここでNは任意のヌクレオチドである、本発明1031または本発明1032の方法。

[本発明1034]

縮重オーバーハング配列が配列NNNNNN (SEQ ID NO:24)を含み、ここでNは任意のヌクレオチドである、本発明1031～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

スプリントオリゴヌクレオチドが配列

ACACGACGCTCTTCCGATCTNNNNNN

(SEQ ID NO:26)を含み、ここでNは任意のアミノ酸である、本発明1031～1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

第2ユニバーサルプライミング部位を含むオリゴヌクレオチドが配列

AGATCGGAAGAGCGTCGTGT (SEQ ID NO:25)

を含む、本発明1031～1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40または50ヌクレオチドを含む、またはおよそ少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40または50ヌクレオチドを含む、本発明1001～1008および本発明1011～1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが10～30ヌクレオチドまたは約10～30ヌクレオチドを含む、本発明1001～1008および本発明1011～1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが縮重配列を含む、本発明1001～1008および本発明1011～1038のいずれかの方法。

[本発明1040]

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが配列 $(N)_{14 \sim 17}$ を含み、ここでNは任意のヌクレオチドであり、任意で、配列中の少なくとも1つまたは2つのNはWであり、ここでWはアデニンまたはチミンである、本発明1001～1008および本発明1011～1039のいずれかの方法。

[本発明1041]

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが配列

NNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:80),

WNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:81), NWNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:82)または

NNWNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:83)

を含み、ここでNは任意のヌクレオチドであり、Wはアデニンまたはチミンである、本発明1001～1008および本発明1011～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

各ベッセルは、ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールを含む第1アダプターのプールを含み、第1アダプターのプールの各ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドは、前記プール中の他のベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの少なくとも1つと比較して、少なくとも1つの塩基シフトまたは塩基付加を含む、本発明1011～1041のいずれかの方法。

[本発明1043]

第1アダプターのプールのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが配列

NNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:80),

WNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:81), NNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:82)

およびNNWNNNNWNNNNWNNNN (SEQ ID NO:83)

を含み、ここでNは任意のヌクレオチドであり、Wはアデニンまたはチミンである、本発明1042の方法。

[本発明1044]

工程(d)において、

1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプール、または

1つのベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドもしくはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドのプールを含む、1つの第1アダプターもしくは第1アダプターのプールを増幅することをさらに含み、

前記増幅が、ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの取り付けに先だってまたはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの取り付けと同時に実施される、本発明1011～1043のいずれかの方法。

[本発明1045]

ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドを取り付ける工程が、ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドの一領域を、相補的ポリヌクレオチドのそれぞれの一領域に、または分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれの一領域に、ハイブリダイズさせることを含む、本発明1011～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

前記領域が、分子バーコード化ポリヌクレオチドの分子バーコードの3'末領域に相補的である3'タグ付けポリヌクレオチドを含む、本発明1045の方法。

[本発明1047]

工程(b)において、

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドは、逆転写酵素および標的ポリヌクレオチドの標的配列に相補的な1つまたは複数の標的特定のプライマーの存在下で、標的ポリヌクレオチドの逆転写によって作製され、かつ/または

ポリヌクレオチドの集合体は、逆転写酵素および細胞中のポリヌクレオチド転写産物に相補的な1つまたは複数のトランスクリプトームプライマーの存在下で、細胞中のポリヌクレオチド転写産物の逆転写によって作製される、
本発明1009～1046のいずれかの方法。

[本発明1048]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが免疫分子またはその鎖のポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドは、それぞれが免疫分子鎖のポリヌクレオチドを含む少なくとも2つの標的ポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1048のいずれかの方法。

[本発明1050]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがTCRまたはその鎖のポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1049のいずれかの方法。

[本発明1051]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがT細胞受容体アルファ(TCR)の第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体(TCR)の第2ポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1050のいずれかの方法。

[本発明1052]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがT細胞受容体ガンマ(TCR)の第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体デルタ(TCRデルタ、TCR)の第2ポリヌクレオチドを含む、本

発明1001～1050のいずれかの方法。

[本発明1053]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが抗体またはその鎖のポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1049のいずれかの方法。

[本発明1054]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが重鎖免疫グロブリン（IgH）ポリヌクレオチドの第1ポリヌクレオチドおよび軽鎖免疫グロブリン（IgL）ポリヌクレオチドの第2ポリヌクレオチドを含む、本発明1001～1049および本発明1053のいずれかの方法。

[本発明1055]

1つもしくは複数の標的特定のプライマーおよび/または1つもしくは複数のトランスクリプトームプライマーがポリ（T）配列を含む、本発明1047～1054のいずれかの方法。

[本発明1056]

1つまたは複数のトランスクリプトームプライマーがランダムヘキサマーオリゴヌクレオチドプライマーの混合物を含む、本発明1047～1054のいずれかの方法。

[本発明1057]

1つまたは複数の標的特定のプライマーが標的ポリヌクレオチドの標的配列の配列に相補的な1つまたは複数のプライマーを含む、本発明1047～1056のいずれかの方法。

[本発明1058]

1つまたは複数の標的特定のプライマーが少なくとも第1プライマーと第2プライマーとを含む、本発明1057の方法。

[本発明1059]

1つまたは複数の標的特定のプライマーは、それぞれが免疫分子またはその鎖をコードする複数の標的ポリヌクレオチドの標的配列に対するプライマーを含む、本発明1057または本発明1058の方法。

[本発明1060]

免疫分子がT細胞受容体または抗体である、本発明1059の方法。

[本発明1061]

少なくとも第1プライマーは、免疫分子の第1鎖のポリヌクレオチドの標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーは、前記免疫分子の第2鎖のポリヌクレオチドの標的配列に相補的である、本発明1058～1060のいずれかの方法。

[本発明1062]

第1プライマーおよび第2プライマーが、あるTCRの異なるTCR鎖ポリヌクレオチドの標的配列に相補的である、本発明1058～1061のいずれかの方法。

[本発明1063]

第1プライマーがTCRアルファポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーがTCRベータポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であるか、または

第1プライマーがTCRガンマポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーがTCRデルタポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的である、本発明1058～1062のいずれかの方法。

[本発明1064]

TCR鎖ポリヌクレオチドの標的配列が定常領域配列である、本発明1062または本発明1063の方法。

[本発明1065]

第1プライマーがTCRアルファ定常領域ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーがTCRベータ定常領域ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であるか、または

第1プライマーがTCRガンマ定常領域ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーがTCRデルタ定常領域ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的である

、本発明1058～1064のいずれかの方法。

[本発明1066]

少なくとも第1プライマーおよび第2プライマーが、抗体の、異なる抗体鎖ポリヌクレオチドの標的配列に相補的である、本発明1058～1061のいずれかの方法。

[本発明1067]

第1プライマーが重鎖免疫グロブリン (IgH) ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーが軽鎖免疫グロブリン (IgL) ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的である、本発明1058～1061および本発明1066のいずれかの方法。

[本発明1068]

抗体鎖ポリヌクレオチドの標的配列が定常領域配列である、本発明1066または本発明1067の方法。

[本発明1069]

第1プライマーが重鎖定常領域 (CH) ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的であり、かつ第2プライマーが軽鎖定常領域 (CL) ポリヌクレオチド配列の標的配列に相補的である、本発明1058～1061および本発明1066～1068のいずれかの方法。

[本発明1070]

C_Hポリヌクレオチドの標的配列がIgM、IgD、IgA、IgEもしくはIgG、またはそれらの組合せに由来し、かつ/あるいは

C_Lポリヌクレオチド配列の標的配列がIgカッパ、Igラムダまたはそれらの組合せに由来する、本発明1068または本発明1069の方法。

[本発明1071]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが全長コーディング配列を含む、本発明1001～1070のいずれかの方法。

[本発明1072]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの集合体が、同じ反応体積中のベッセル内で作製される、本発明1009～1071のいずれかの方法。

[本発明1073]

工程 (b) において、複数の相補的ポリヌクレオチドを作製する工程は、非テンプレートターミナルトランスフェラーゼの使用を含み、3つ以上の非テンプレートヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはその類似体が、作製された各相補的ポリヌクレオチドの3'端に付加される、本発明1009～1072のいずれかの方法。

[本発明1074]

非テンプレートターミナルトランスフェラーゼが逆転写酵素またはポリメラーゼである、本発明1073の方法。

[本発明1075]

非テンプレートターミナルトランスフェラーゼが逆転写酵素であり、逆転写酵素は、Superscript II逆転写酵素、Maxima逆転写酵素、Protoscript II逆転写酵素、マロニー (Maloney) マウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT)、HighScriber逆転写酵素、鳥類骨髄芽球症ウイルス (AMV) 逆転写酵素、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を含む任意の逆転写酵素、およびそれらの組合せから選択される、本発明1073または本発明1074の方法。

[本発明1076]

工程 (c) において、取り付ける工程は、複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドのうちの1つの一領域を、相補的ポリヌクレオチドのそれぞれの3つ以上の非テンプレートヌクレオチドにハイブリダイズさせることを含む、本発明1011～1075のいずれかの方法。

[本発明1077]

複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドは、それぞれが3つ以上の非テンプレートヌクレオチドに相補的な3'部分を含む複数のテンプレートスイッチオリゴヌクレオチドとして提供される、本発明1076の方法。

[本発明1078]

テンプレートスイッチオリゴヌクレオチドは第1アダプターの一部に相補的である5'

末領域をさらに含み、第1アダプターはベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドを含む、本発明1077の方法。

[本発明1079]

逆転写酵素はテンプレートスイッチング活性を有し、

複数の作製された相補的ポリヌクレオチドのうちの少なくともいくつかの鎖は、3つ以上の非テンプレートヌクレオチドを含む3'オーバーハングを含み、

複数の分子バーコード化オリゴヌクレオチドは、それぞれが(1)第1アダプターおよびベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドを含む3'タグ付けオリゴヌクレオチドに相補的である5'末領域、(2)分子バーコードならびに(3)前記3'オーバーハングの前記3つ以上の非テンプレートヌクレオチドに相補的な3'部分を含む複数のテンプレートスイッチオリゴヌクレオチドとして提供され、

テンプレートスイッチオリゴヌクレオチドは、分子バーコードが各相補的ポリヌクレオチドに組み入れられて分子バーコード化ポリヌクレオチドを作製するように、逆転写酵素のテンプレートとして役立つ、

本発明1047～1078のいずれかの方法。

[本発明1080]

3つ以上の非テンプレートヌクレオチドに相補的な3'部分が、ヌクレオチド、リボヌクレオチドまたはそれらの類似体を含む、本発明1077～1079のいずれかの方法。

[本発明1081]

3つ以上の非テンプレートヌクレオチドが3つ以上のCヌクレオチドを含み、3つ以上の非テンプレートヌクレオチドに相補的な3'部分が1つまたは複数のGヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体を含む、本発明1073～1080のいずれかの方法。

[本発明1082]

テンプレートスイッチオリゴヌクレオチドが、逆転写酵素またはDNAポリメラーゼによるテンプレートスイッチオリゴヌクレオチドの伸長を阻止する3'修飾ヌクレオチドをさらに含む、本発明1073～1081のいずれかの方法。

[本発明1083]

修飾が3'末ヌクレオチドのデオキシ、リン酸、アミノ、またはアルキル修飾である、本発明1082の方法。

[本発明1084]

工程(d)は、取り付ける工程の後に、複数の分子バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれを伸長して複数の二重バーコード化ポリヌクレオチドを生成させることをさらに含む、本発明1011～1083のいずれかの方法。

[本発明1085]

ベッセルが、ウェル、エマルジョン、液滴、またはマイクロカプセルである、本発明1001～1084のいずれかの方法。

[本発明1086]

工程(e)の前に、

複数のベッセルのうちの2つまたはそれ以上の内容物を合わせる工程であって、それによって、複数の一本鎖二重バーコード化ポリヌクレオチドのうちの2つまたはそれ以上を含む均一混合物を生成させる、工程を含む、本発明1012～1085のいずれかの方法。

[本発明1087]

複数のベッセルの内容物を合わせる工程が、複数のベッセルの2つまたはそれ以上を破壊して、2つまたはそれ以上の破壊されたベッセルからの一本鎖二重バーコード化ポリヌクレオチドをプールすることを含む、本発明1086の方法。

[本発明1088]

工程(e)の前に、50塩基対超または約50塩基対超、100塩基対超、または200塩基対超であるサイズを有する一本鎖二重バーコード化ポリヌクレオチドを選択または精製する工程を含む、本発明1086または本発明1087の方法。

[本発明1089]

工程(e)の前に、50塩基対(bp)~1500bpもしくは約50bp~1500bp、50bp~1250bpもしくは約50bp~1250bp、50bp~1000bpもしくは約50bp~1000bp、50bp~750bpもしくは約50bp~750bp、50bp~500bpもしくは約50bp~500bp、100bp~1500bpもしくは約100bp~1500bp、100bp~1250bpもしくは約100bp~1250bp、100bp~1000bpもしくは約100bp~1000bp、100bp~750bpもしくは約100bp~750bp、100bp~500bpもしくは約100bp~500bp、200bp~1500bpもしくは約200bp~1500bp、200bp~1250bpもしくは約200bp~1250bp、200bp~1000bpもしくは約200bp~1000bp、200bp~750bpもしくは約200bp~750bpまたは250bp~500bpもしくは約250bp~500bpのサイズを有する一本鎖二重パーコード化ポリヌクレオチドを選択または精製する工程を含む、本発明1086~1088のいずれかの方法。

[本発明1090]

一本鎖二重パーコード化ポリヌクレオチドが、順に(5'から3'へ)、第1アダプター、ベッセルパーコード、分子パーコードおよび第2アダプターを含む、本発明1001~1089のいずれかの方法。

[本発明1091]

第1アダプターが、一本鎖パーコード化ポリヌクレオチドの、任意で一本鎖二重パーコード化ポリヌクレオチドの、5'領域またはその近傍に位置する、本発明1001~1090のいずれかの方法。

[本発明1092]

第2アダプターが、一本鎖パーコード化ポリヌクレオチドの、任意で一本鎖二重パーコード化ポリヌクレオチドの、3'領域またはその近傍に位置する、本発明1001~1091のいずれかの方法。

[本発明1093]

工程(a)~(f)のうちの1つまたは複数が、
溶解状態で実行され、かつ/または
固体支持体の存在下では実行されず、
ここで固体支持体は任意でビーズであるかビーズを含む、
本発明1013~1092のいずれかの方法。

[本発明1094]

少なくとも工程(c)および(d)が、
溶解状態で実行され、かつ/または
固体支持体の存在下では実行されず、
ここで固体支持体は任意でビーズである、
本発明1011~1093のいずれかの方法。

[本発明1095]

工程(a)~(e)のそれぞれが、
溶解状態で実行され、かつ/または
固体支持体の存在下では実行されず、
ここで固体支持体は任意でビーズである、
本発明1012~1094のいずれかの方法。

[本発明1096]

細胞の集団が、少なくとも 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、または 5×10^6 細胞を含む、またはおよそ少なくとも 1×10^3 、 5×10^3 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、または 5×10^6 細胞を含む、本発明1001~1095のいずれかの方法。

[本発明1097]

細胞の集団が、対象からの生物学的試料に由来する、本発明1001~1096のいずれかの方法。

[本発明1098]

生物学的試料が、全血試料、パフィーコート試料、末梢血単核球(PBMC)試料、未分画

T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフェレーシス産物、または白血球アフェレーシス産物であるか、全血試料、パフィーコート試料、末梢血単核球（PBMC）試料、未分画T細胞試料、リンパ球試料、白血球試料、アフェレーシス産物、または白血球アフェレーシス産物を含む、本発明1097の方法。

[本発明1099]

細胞の集団が免疫細胞を含む、本発明1001～1098のいずれかの方法。

[本発明1100]

免疫細胞がリンパ球または抗原提示細胞を含む、本発明1099の方法。

[本発明1101]

免疫細胞が、リンパ球もしくはそのサブタイプ、B細胞もしくはそのサブタイプ、T細胞もしくはそのサブタイプ、またはそれらの組合せである、本発明1099または本発明1100の方法。

[本発明1102]

免疫細胞が、CD4+および/またはCD8+T細胞であるT細胞である、本発明1101の方法。

[本発明1103]

細胞の集団は、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、ナイーブT細胞、幹セントラルメモリーT細胞、エフェクターT細胞および制御性T細胞が濃縮されているか、またはセントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞、ナイーブT細胞、幹セントラルメモリーT細胞、エフェクターT細胞および制御性T細胞を含む、本発明1001～1102のいずれかの方法。

[本発明1104]

細胞の集団は、メモリーB細胞、ナイーブB細胞または形質芽球B細胞が濃縮されている、本発明1001～1101のいずれかの方法。

[本発明1105]

対象がヒト対象である、本発明1097～1104のいずれかの方法。

[本発明1106]

対象が、がん、感染症または自己免疫状態を有する、本発明1097～1105のいずれかの方法。

[本発明1107]

感染症が、ウイルス感染症、細菌感染症または真菌感染症である、本発明1106の方法。

[本発明1108]

複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドを増幅する工程であって、それによって、複数のポリヌクレオチドテンプレートを生成させる、工程をさらに含む、本発明1001～1107のいずれかの方法。

[本発明1109]

複数のバーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの増幅が、第1アダプター配列に相補的な第1プライマーと第2アダプター配列に相補的な第2プライマーとを含む第1プライマーセットの存在下で実行される、本発明1108の方法。

[本発明1110]

第1プライマーおよび/または第2プライマーがユニバーサルプライマーである、本発明1109の方法。

[本発明1111]

第1プライマーおよび/または第2プライマーが、P7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分またはP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分に相補的である、本発明1110の方法。

[本発明1112]

第1プライマーがP7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分に相補的であり、第2プライマーがP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分に相補的である、本発明1110または本発明1111の方法。

[本発明1113]

P7プライミング部位（C7）またはその連続する一部分に相補的であるプライマーが、配列

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT (SEQ ID NO:39)

を有するか、もしくは同配列を含み、かつ/または

P5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分に相補的であるプライマーが、配列

ACACGACGCTCTTCCGATCT (SEQ ID NO:27)

を含む、

本発明1111または本発明1112の方法。

[本発明1114]

第1プライマーおよび/または第2プライマーがシーケンシングアダプターをさらに含む、本発明1109～1113のいずれかの方法。

[本発明1115]

P7プライミング部位（C7）またはその連続する一部分に相補的であるプライマーが配列
CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[NNNNNN]GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCT
CTTCCGATCT (SEQ ID NO:28)

をさらに含み、かつ/または

P5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分に相補的であるプライマーが配列

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCC (SEQ
ID NO:76)

を含む、

本発明1114の方法。

[本発明1116]

一本鎖バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれを、任意で一本鎖二重バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれを、精製する工程をさらに含む、本発明1001～1115のいずれかの方法。

[本発明1117]

本発明1001～1116のいずれかの方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1118]

複数のバーコード化ポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドライブラリーであって、前記複数のバーコード化ポリヌクレオチドは、（i）細胞の集団の細胞中に存在する1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドのアンプリコンを含む1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドと（ii）それぞれが前記細胞中のポリヌクレオチドのアンプリコンを含むポリヌクレオチドの集合体とを含み、

各バーコード化ポリヌクレオチドは、

第1ユニバーサルプライマーに相補的である第1ユニバーサルプライミング部位を含む第1アダプター、

前記細胞の集団の同じ細胞に由来する（i）および（ii）からのすべてのバーコード化ポリヌクレオチドについて同じであるベッセルバーコードを含むベッセルバーコード化オリゴヌクレオチド、ならびに

第2ユニバーサルプライマーに相補的である第2ユニバーサルプライミング部位を含む第2アダプター配列

を含む、ポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1119]

複数のバーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれが、各ポリヌクレオチドにユニークである分子バーコードを含む、本発明1118のポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1120]

細胞の集団の各細胞からのバーコード化ポリヌクレオチドテンプレートの集合体が、全体として、トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームに対応する相補的DNA (cDNA) 鎖を含む、本発明1118または本発明1119のポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1121]

トランスクリプトームまたは部分的トランスクリプトームが、全体として、細胞のゲノムに存在する転写産物のうちの少なくとも60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%を含む、本発明1118~1120のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1122]

バーコード化ポリヌクレオチドテンプレートのそれぞれが、50塩基対超または約50塩基対超、100塩基対超または200塩基対超であるサイズを有する、本発明1118~1121のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1123]

バーコード化ポリヌクレオチドのそれぞれが、50塩基対 (bp) ~ 1500bpもしくは約50bp ~ 1500bp、50bp ~ 1250bpもしくは約50bp ~ 1250bp、50bp ~ 1000bpもしくは約50bp ~ 1000bp、50bp ~ 750bpもしくは約50bp ~ 750bp、50bp ~ 500bpもしくは約50bp ~ 500bp、100bp ~ 1500bpもしくは約100bp ~ 1500bp、100bp ~ 1250bpもしくは約100bp ~ 1250bp、100bp ~ 1000bpもしくは約100bp ~ 1000bp、100bp ~ 750bpもしくは約100bp ~ 750bp、100bp ~ 500bpもしくは約100bp ~ 500bp、200bp ~ 1500bpもしくは約200bp ~ 1500bp、200bp ~ 1250bpもしくは約200bp ~ 1250bp、200bp ~ 1000bpもしくは約200bp ~ 1000bp、200bp ~ 750bpもしくは約200bp ~ 750bpまたは250bp ~ 500bpもしくは約250bp ~ 500bpのサイズを有する、本発明1118~1122のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1124]

第1アダプターがベッセルバーコードを含む、本発明1118~1123のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1125]

バーコード化ポリヌクレオチドが一本鎖である、本発明1118~1124のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1126]

第1アダプターと第2アダプターとが異なる、本発明1118~1125のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1127]

第1ユニバーサルプライミング部位および/または第2ユニバーサルプライミング部位は、P7プライミング部位 (C7) もしくはその連続する一部分またはP5プライミング部位 (C5) もしくはその連続する一部分であるか、P7プライミング部位 (C7) もしくはその連続する一部分またはP5プライミング部位 (C5) もしくはその連続する一部分を含み、任意で前記その連続する一部分は相補的配列にアニールするのに十分である、本発明1118~1126のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1128]

第1ユニバーサルプライミング部位はP7プライミング部位 (C7) もしくはその連続する一部分であるか、またはP7プライミング部位 (C7) もしくはその連続する一部分を含み、第2ユニバーサルプライミング部位はP5プライミング部位 (C5) もしくはその連続する一部分であるか、またはP5プライミング部位 (C5) もしくはその連続する一部分を含む、本発明1118~1127のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1129]

P7プライミング部位 (C7) が配列
AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCA (SEQ ID NO:77)
を含むか、またはその連続する一部分である、本発明1127または本発明1128のポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1130]P5プライミング部位が配列AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGGTCGCCGTATCA
TT (SEQ ID NO:78)を含むか、またはその連続する一部分である、本発明1127～1129のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1131]連続する一部分が少なくとも15、20、25もしくは30ヌクレオチド長を含む、または少なくとも約15、20、25もしくは30ヌクレオチド長を含む、本発明1127～1130のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1132]P5プライミング部位がSEQ ID NO:25(AGATCGGAAGAGCGTCGTGT)に示す連続する一部分である、本発明1127～1131のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1133]ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40または50ヌクレオチドを含む、またはおよそ少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40または50ヌクレオチドを含む、本発明1118～1132のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1134]ベッセルバーコード化オリゴヌクレオチドが10～30ヌクレオチドまたは約10～30ヌクレオチドを含む、本発明1118～1133のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1135]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが免疫分子またはその鎖のポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1134のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1136]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドは、それぞれが免疫分子鎖のポリヌクレオチドを含む少なくとも2つの標的ポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1135のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1137]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがTCRまたはその鎖の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1136のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1138]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがT細胞受容体アルファ（TCR α ）の第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体（TCR β ）の第2ポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1137のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1139]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがT細胞受容体ガンマ（TCR γ ）の第1ポリヌクレオチドおよびT細胞受容体デルタ（TCR δ ）の第2ポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1137のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1140]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが抗体またはその鎖の1つまたは複数のポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1136のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。[本発明1141]1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドが重鎖免疫グロブリン（IgH）ポリヌクレオチドの第1ポリヌクレオチドおよび軽鎖免疫グロブリン（IgL）ポリヌクレオチドの第2ポリヌクレオチドを含む、本発明1118～1136および本発明1140のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1142]

バーコード化ポリヌクレオチドが、順に（5'から3'へ）、第1アダプター、ベッセルバーコードオリゴヌクレオチド、分子バーコードおよび第2アダプターを含む、本発明1118～1141のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1143]

第1アダプターが二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの5'領域またはその近傍に位置する、本発明1118～1142のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1144]

第2アダプターが二重バーコード化一本鎖ポリヌクレオチドの3'領域またはその近傍に位置する、本発明1118～1143のいずれかのポリヌクレオチドライブラリー。

[本発明1145]

1つもしくは複数の標的ポリヌクレオチドおよび/または1つもしくは複数の細胞の完全なもしくは部分的なトランスクリプトームをシーケンシングするための方法であって、本発明1001～1116のいずれかによって作製される、または本発明1117～1142のいずれかのポリヌクレオチドライブラリーからの、複数のバーコード化ポリヌクレオチド、任意で二重バーコード化ポリヌクレオチドのうちの1つまたは複数のシーケンシングする工程を含む、方法。

[本発明1146]

1つまたは複数の細胞の完全なまたは部分的なトランスクリプトームがシーケンシングされる、本発明1145の方法。

[本発明1147]

シーケンシングに先だって、完全なトランスクリプトームまたはその一部分を増幅する工程をさらに含む、本発明1146の方法。

[本発明1148]

増幅が、それぞれ第1アダプター配列と第2アダプター配列に特異的な第1プライマーと第2プライマーとを含む第1プライマーセットを使って実行される、本発明1147の方法。

[本発明1149]

複数のバーコード化ポリヌクレオチドからの1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドがシーケンシングされる、本発明1144～1148のいずれかの方法。

[本発明1150]

シーケンシングに先だって、複数のバーコード化ポリヌクレオチドから1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを増幅する工程をさらに含む、本発明1149の方法。

[本発明1151]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドの全長配列が増幅される、本発明1150の方法。

[本発明1152]

増幅が、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドに相補的な1つまたは複数の第1プライマーと第1アダプター配列に相補的な第2プライマーとを含む第2プライマーセットの存在下で実行される、本発明1150または本発明1151の方法。

[本発明1153]

第2プライマーセットの第2プライマーが、P7プライミング部位（C7）もしくはその連続する一部分またはP5プライミング部位（C5）もしくはその連続する一部分に相補的である、本発明1152の方法。

[本発明1154]

第2プライマーセットの第2プライマーが、P7プライミング部位（C7）またはその連続する一部分に相補的である、本発明1152または本発明1153の方法。

[本発明1155]

第2プライマーセットの第2プライマーが、配列

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT (SEQ ID NO:39) または

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[NNNNNN]GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT (SEQ ID NO:28)

を有するか、または同配列を含む、本発明1152～1154のいずれかの方法。

[本発明1156]

1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドに相補的な1つまたは複数の第1プライマーが、免疫分子またはその鎖の標的配列に特異的である、本発明1152～1155のいずれかの方法。

[本発明1157]

免疫分子がT細胞受容体または抗体である、本発明1156の方法。

[本発明1158]

1つまたは複数の第1プライマーが、免疫分子の定常領域の標的配列に特異的である、本発明1156または本発明1157の方法。

[本発明1159]

免疫分子がTCRであり、かつ1つまたは複数の第1プライマーがAGTCTCTCAGCTGGTACACGG (SEQ ID NO:37),

ATGGCTCAAACACAGCGACCTC (SEQ ID NO:38)

またはそれらの組合せを含む、本発明1156～1158のいずれかの方法。

[本発明1160]

免疫分子が抗体であり、1つまたは複数の第1プライマーがSEQ ID NO:29～36のいずれかまたはそれらの組合せを含む、本発明1156～1159のいずれかの方法。

[本発明1161]

1つまたは複数のバーコード化ポリヌクレオチドの、任意で二重バーコード化ポリヌクレオチドの、細胞起源を決定する工程をさらに含む、本発明1145～1160のいずれかの方法。

[本発明1162]

細胞起源を決定する工程が、同じベッセルバーコードを有する二重バーコード化ポリヌクレオチドの配列を、同じ細胞からのものであると同定することを含む、本発明1161の方法。

[本発明1163]

標的ポリヌクレオチドが、第1ポリヌクレオチド鎖および第2ポリヌクレオチド鎖を含む免疫分子であり、

シーケンシングされた二重バーコード化ポリヌクレオチド中の同じベッセルバーコードの存在によって、第1ポリヌクレオチド鎖と第2ポリヌクレオチド鎖とを同じ細胞にマッチングさせる工程を含む、本発明1161または本発明1162の方法。

[本発明1164]

同じバーコードを持つ、任意で同じ分子バーコードを持つ、ポリヌクレオチドの数を、定量または決定する工程をさらに含む、本発明1155～1163のいずれかの方法。

[本発明1165]

複数のバーコード化ポリヌクレオチドが分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドであり、

同じベッセルバーコードを有するトランスクリプトーム配列および標的ポリヌクレオチド配列を同定する工程であって、それによって、前記標的ポリヌクレオチドを保持する細胞のトランスクリプトーム情報を同定する、工程をさらに含む、本発明1155～1164のいずれかの方法。

[本発明1166]

以下の工程を含む、トランスクリプトーム解析のための方法：

(a) 本発明1001～1116のいずれかの方法によって作製される複数の複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、または本発明1117～1142のいずれかのポリヌクレオチドライブ

ラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドをシーケンシングする工程であって、それによって、複数の細胞から標的ポリヌクレオチドに関する配列情報を生成させる、工程、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである；

(b) 本発明1001～1116のいずれかの方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、または本発明1117～1142のいずれかのポリヌクレオチドライブラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、全トランスクリプトームまたはその一部分をシーケンシングする工程であって、それによって、前記複数の細胞からトランスクリプトームデータを生成させる、工程、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである；および

(c) 同じベッセルバーコードを有する(a)からの配列情報および(b)からの配列情報を、同じ細胞からのものであると同定する工程。

[本発明1167]

以下の工程を含む、選択された単一細胞のトランスクリプトームを解析する方法：

(a) 本発明1001～1116のいずれかの方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、または本発明1117～1142のいずれかのポリヌクレオチドライブラリーの複数の複数のバーコード化ポリヌクレオチドから、1つまたは複数の標的ポリヌクレオチドを増幅する、かつシーケンシングする工程であって、それによって、複数の細胞のうちの少なくとも1つにおける標的ポリヌクレオチドのそれぞれに関する配列情報を生成させる、工程、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドである；

(b) (a)においてシーケンシングされた標的ポリヌクレオチド配列のうちの1つに関連するベッセルバーコードを同定する工程であって、それによって、前記標的ポリヌクレオチドを保持する選択された単一細胞を同定する、工程；

(c) (b)において同定されたベッセルバーコードを保持する細胞の複数のバーコード化ポリヌクレオチドからトランスクリプトームまたはその一部分を増幅する、かつシーケンシングする工程であって、それによって、選択された標的ポリヌクレオチド発現細胞からトランスクリプトームデータを生成させる、工程。

[本発明1168]

トランスクリプトームまたはその一部分が、選択された細胞から、(b)において同定されたベッセルバーコードに特異的なプライマーとバーコード化ポリヌクレオチドの第2アダプター配列に特異的なプライマーとを使って増幅またはシーケンシングされる、本発明1167の方法。

[本発明1169]

同じ細胞からのトランスクリプトームまたはその一部分の配列情報と標的ポリヌクレオチドのうちの少なくとも1つの配列情報とをマッピングさせる工程を含む、トランスクリプトーム解析のための方法であって、配列情報が、本発明1001～1114のいずれかの方法によって作製される複数のバーコード化ポリヌクレオチドから決定されるか、本発明1117～1142のいずれかのポリヌクレオチドライブラリーの複数のバーコード化ポリヌクレオチドから決定され、ここでバーコード化ポリヌクレオチドは分子バーコードとベッセルバーコードとを含む二重バーコード化ポリヌクレオチドであり、または本発明1155～1165のいずれかの方法から決定される、方法。

[本発明1170]

同じベッセルバーコードを有する配列は、同じ細胞からのものであるとしてマッピングされる、本発明1169の方法。

[本発明1171]

トランスクリプトームデータが、細胞の機能または活性に関連するパラメータ、特性、特徴または表現型を含む、本発明1166～1170のいずれかの方法。

[本発明1172]

トランスクリプトームデータが、細胞の活性化、疲弊または増殖活性に関連する、本発

明1171の方法。