

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-106998

(P2019-106998A)

(43) 公開日 令和1年7月4日(2019.7.4)

|                                     |                       |             |
|-------------------------------------|-----------------------|-------------|
| (51) Int.Cl.                        | F I                   | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/10 (2006.01)</b>      | C 1 2 N 15/10 1 1 4 Z | 4 B O 6 3   |
| <b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>      | G O 1 N 33/53 Z N A M |             |
| <b>G O 1 N 37/00 (2006.01)</b>      | G O 1 N 37/00 1 O 2   |             |
| <b>C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)</b>     | C 1 2 Q 1/6869 Z      |             |
| <b>C 1 2 Q 1/686 (2018.01)</b>      | C 1 2 Q 1/686 Z       |             |
| 審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 250 頁) |                       |             |

|                   |                                  |          |                                                                                                                                         |
|-------------------|----------------------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号         | 特願2019-14564 (P2019-14564)       | (71) 出願人 | 595117091                                                                                                                               |
| (22) 出願日          | 平成31年1月30日 (2019.1.30)           |          | ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー                                                                                                                   |
| (62) 分割の表示        | 特願2016-537867 (P2016-537867) の分割 |          | 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                                                                                     |
| 原出願日              | 平成26年8月28日 (2014.8.28)           |          | アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O 7 4 1 7 - 1 8 8 0 フランクリン・レイクス ベクトン・ドライブ 1                                                                           |
| (31) 優先権主張番号      | 61/952, 036                      |          | 1 B E C T O N D R I V E , F R A N K L I N L A K E S , N E W J E R S E Y O 7 4 1 7 - 1 8 8 0 , U N I T E D S T A T E S O F A M E R I C A |
| (32) 優先日          | 平成26年3月12日 (2014.3.12)           |          |                                                                                                                                         |
| (33) 優先権主張国       | 米国 (US)                          |          |                                                                                                                                         |
| (31) 優先権主張番号      | 61/871, 232                      | (74) 代理人 | 100094569                                                                                                                               |
| (32) 優先日          | 平成25年8月28日 (2013.8.28)           |          | 弁理士 田中 伸一郎                                                                                                                              |
| (33) 優先権主張国       | 米国 (US)                          |          | 最終頁に続く                                                                                                                                  |
| (31) 優先権主張番号      | 62/012, 237                      |          |                                                                                                                                         |
| (32) 優先日          | 平成26年6月13日 (2014.6.13)           |          |                                                                                                                                         |
| (33) 優先権主張国       | 米国 (US)                          |          |                                                                                                                                         |
| (特許庁注：以下のものは登録商標) |                                  |          |                                                                                                                                         |

(54) 【発明の名称】 大規模並列単一細胞分析

(57) 【要約】

【課題】単一細胞のマルチプレックス核酸分析のための方法、組成物およびキットを提供すること。方法、組成物およびシステムは、大規模並列単一細胞配列決定のために使用することができる。方法、組成物およびシステムを使用して、数千個の細胞を一斉に分析することができる。この数千個の細胞は、細胞の混合集団（例えば、異なる型またはサブタイプ、異なるサイズの細胞）を含み得る。

【解決手段】本発明の方法は、（a）複数の細胞を含む試料を得るステップと、（b）上記複数の細胞の第1の細胞および上記複数の細胞の第2の細胞由来の2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を、標識で標識するステップとを含む。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下：

(a) 複数の細胞を含む試料を得るステップと、

(b) 前記複数の細胞の第 1 の細胞および前記複数の細胞の第 2 の細胞由来の 2 種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を、以下：

(i) 前記第 1 の細胞に特異的な第 1 の同じ細胞標識および前記第 2 の細胞に特異的な第 2 の同じ細胞標識、ならびに

(i i) 前記 2 種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物のそれぞれに特異的な分子標識  
で標識するステップと

を含む、方法であって、

前記第 1 の細胞由来の前記 2 種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の各分子標識が、互いに対して特有であり、

前記第 2 の細胞由来の前記 2 種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の各分子標識が、互いに対して特有である

方法。

## 【請求項 2】

前記 2 種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を配列決定するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記配列決定するステップからの配列データを分析して、前記細胞のうち特定の 1 個における前記ポリヌクレオチドのうち多数の個々の分子を同定するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記細胞が、がん細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記細胞が、ウイルスポリヌクレオチドに感染している、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記細胞が、細菌または真菌である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記配列決定するステップが、少なくとも 100 塩基のリード長で配列決定するステップを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記配列決定するステップが、少なくとも 500 塩基のリード長で配列決定するステップを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記ポリヌクレオチド分子が、mRNA またはマイクロRNA であり、前記その相補体およびその反応産物が、前記 mRNA または前記マイクロRNA の相補体および反応産物である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記分子標識が、ビーズ上にある、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

個々の細胞に特異的な前記標識が、ビーズ上にある、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

個々の細胞に特異的な前記標識および前記分子標識が、ビーズ上にある、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 13】

少なくとも一部はエマルション中で行われる、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 1 4】

少なくとも一部はアレイのウェルまたはマイクロウェル中で行われる、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

疾患または状態に関連するポリヌクレオチドの存在が検出される、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記疾患または前記状態が、がんである、請求項 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

マイクロRNA、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部が検出される、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記疾患または前記状態が、ウイルス感染症である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記ウイルス感染症が、エンベロープを有するウイルス由来である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記ウイルス感染症が、エンベロープを有さないウイルス由来である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記ウイルスが、二本鎖であるウイルスDNAを含有する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ウイルスが、一本鎖であるウイルスDNAを含有する、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記ウイルスが、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ヘパドナウイルス、パポバウイルス、ポリオーマウイルスおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記第 1 の細胞が、疾患も状態も有さない人物由来であり、前記第 2 の細胞が、前記疾患または前記状態を有する人物由来である、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記人物が異なる、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記人物が同じであるが、細胞が異なる時点で採取される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第 1 の細胞が、前記疾患または前記状態を有する人物由来であり、前記第 2 の細胞が、同じ人物由来である、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記試料における前記細胞が、組織または臓器由来の細胞を含む、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記試料における前記細胞が、胸腺由来の細胞、白血球細胞、赤血球細胞、肝臓細胞、脾臓細胞、肺細胞、心臓細胞、脳細胞、皮膚細胞、膵臓細胞、胃細胞、口腔由来の細胞、鼻腔由来の細胞、結腸細胞、小腸細胞、腎臓細胞、腺由来の細胞、脳細胞、神経細胞、グリア細胞、眼細胞、生殖器細胞、膀胱細胞、配偶子細胞、ヒト細胞、胎児細胞、羊膜細胞またはこれらのいずれかの組合せを含む、請求項 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

10

20

30

40

50

細胞性標識および分子標識をそれぞれ含む複数のオリゴヌクレオチドを含む固体支持体であって、前記複数のオリゴヌクレオチドの各細胞性標識が同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドの各分子標識が異なり、ここで、

(a) 前記固体支持体は、ビーズであり、

(b) 前記細胞性標識は、前記固体支持体に特異的であり、

(c) 前記固体支持体は、三次元デカルト座標系の中心に配置されたときに、8つのオクタントのうち少なくとも7つへと伸長するオリゴヌクレオチドを有し、または

(d) (a) ~ (c) のいずれかの組合せである

固体支持体。

【請求項 3 1】

10

前記複数のオリゴヌクレオチドが、以下：

(a) 試料標識

(b) ユニバーサル標識、および

(c) 標的核酸結合領域

のうち少なくとも1種をさらに含む、請求項 3 0 に記載の固体支持体。

【請求項 3 2】

前記固体支持体が、前記標的核酸結合領域を含み、前記標的核酸結合領域が、遺伝子特異的配列、オリゴ d T 配列、ランダムマルチマーおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む、請求項 3 1 に記載の固体支持体。

【請求項 3 3】

20

標的核酸またはその相補体をさらに含む、請求項 3 1 または 3 2 に記載の固体支持体。

【請求項 3 4】

(a) 生物のトランスクリプトームの転写物もしくはその相補体の約 0.01% ~ 約 100%、または

(b) 生物のゲノムの遺伝子もしくはその相補体の約 0.01% ~ 約 100% を含む複数の標的核酸またはその相補体を含む、請求項 3 3 に記載の固体支持体。

【請求項 3 5】

(a) 前記複数のオリゴヌクレオチドの前記細胞性標識が、第 1 の標識連結配列によって第 2 のランダム配列に接続された第 1 のランダム配列を含み、そして

(b) 前記複数のオリゴヌクレオチドの前記分子標識が、ランダム配列を含む、請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の固体支持体。

30

【請求項 3 6】

ポリジメチルシロキサン (PDMS) 固体支持体、ポリスチレン固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体、プルロニック固体支持体およびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の固体支持体。

【請求項 3 7】

(a) 前記複数のオリゴヌクレオチドが、リンカー官能基を含むリンカーを含み、

(b) 前記固体支持体が、固体支持体官能基を含み、

前記固体支持体官能基および前記リンカー官能基は互いに接続する、請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の固体支持体。

40

【請求項 3 8】

前記リンカー官能基および前記固体支持体官能基が、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン (複数可)、アルデヒド (複数可)、ケトン (複数可) およびこれらのいずれかの組合せからなる群から個々に選択される、請求項 3 7 に記載の固体支持体。

【請求項 3 9】

前記複数のオリゴヌクレオチドの分子標識が、少なくとも 15 個のヌクレオチドを含む、請求項 3 0 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の固体支持体。

【請求項 4 0】

請求項 3 0 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の固体支持体と、使用説明書とを含むキット。

50

## 【請求項 4 1】

ウェルをさらに含む、請求項 4 0 に記載のキット。

## 【請求項 4 2】

前記ウェルが、アレイ中に含まれる、請求項 4 1 に記載のキット。

## 【請求項 4 3】

前記ウェルが、マイクロウェルである、請求項 4 0 ～ 4 2 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 4 4】

バッファをさらに含む、請求項 4 0 ～ 4 3 のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 4 5】

請求項 3 0 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の固体支持体を含むエマルジョン。

## 【請求項 4 6】

ウェルと、請求項 3 0 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の固体支持体とを含む組成物。

## 【請求項 4 7】

細胞と、請求項 3 0 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の固体支持体とを含む組成物。

## 【請求項 4 8】

細胞をさらに含む、請求項 4 5 に記載のエマルジョンまたは請求項 4 6 に記載の組成物。

## 【請求項 4 9】

前記細胞が、単一細胞である、請求項 4 7 または 4 8 のいずれか一項に記載の組成物またはエマルジョン。

## 【請求項 5 0】

前記ウェルが、マイクロウェルである、請求項 4 6 に記載の組成物。

## 【請求項 5 1】

前記マイクロウェルが、約  $1,000 \mu\text{m}^3$  ～ 約  $120,000 \mu\text{m}^3$  に及ぶ容積を有する、請求項 5 0 に記載の組成物。

## 【請求項 5 2】

以下：

(a) 試料を請求項 3 0 ～ 3 2 または 3 5 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の固体支持体と接触させるステップと、

(b) 複数のオリゴヌクレオチドの 1 オリゴヌクレオチドに前記試料由来の標的核酸をハイブリダイズさせるステップとを含む、方法。

## 【請求項 5 3】

(c) 前記標的核酸またはその相補体を増幅するステップをさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

(d) 前記標的核酸またはその相補体を配列決定するステップであって、前記標的核酸またはその相補体が結合される前記オリゴヌクレオチドの分子標識を配列決定することを含む、ステップをさらに含む、請求項 5 3 に記載の方法。

## 【請求項 5 5】

(e) 前記標的核酸またはその相補体の量を決定するステップであって、前記ステップは、以下：

(i) 前記標的核酸またはその相補体のレベルを定量化すること、

(i i) 同じ分子標識を含む配列の数を計数すること、あるいは

(i i i) (i) および (i i) の組合せ

を含む、ステップをさらに含む、請求項 5 4 に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

いずれかの同じ分子標識またはいずれかの同じ細胞性標識を整列するステップを含まな

10

20

30

40

50

い、請求項 54 または 55 に記載の方法。

【請求項 57】

前記増幅するステップが、前記標的核酸を逆転写するステップを含む、請求項 53～56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

前記増幅するステップが、PCR、ネステッドPCR、定量的PCR、リアルタイムPCR、デジタルPCRおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を用いる、請求項 53～57 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 59】

前記増幅するステップが、以下：

- (a) 前記固体支持体上で直接的に、
- (b) 前記固体支持体から転写された鋳型上で、または
- (c) (a) および (b) の組合せで

行われる、請求項 53～58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記試料が、細胞を含む、請求項 52～59 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 61】

前記細胞が、単一細胞である、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記接触させるステップを、ウェル中で行う、請求項 52～61 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

前記ウェルが、マイクロウェルであり、マイクロウェルのアレイ中に含有される、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 64】

複数のマイクロウェルを含むデバイスであって、前記複数のマイクロウェルの各マイクロウェルが、約  $1,000\ \mu\text{m}^3$ ～約  $120,000\ \mu\text{m}^3$  に及ぶ容積を有する、デバイス。

【請求項 65】

前記複数のマイクロウェルの各マイクロウェルが、約  $20,000\ \mu\text{m}^3$  の容積を有する、請求項 64 に記載のデバイス。

【請求項 66】

前記複数のマイクロウェルが、約 96 個～約 200,000 個のマイクロウェルを含む、請求項 64 または 65 に記載のデバイス。

【請求項 67】

前記マイクロウェルが、材料の層中に含まれる、請求項 64～66 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 68】

前記マイクロウェルの少なくとも約 10% が、細胞をさらに含む、請求項 64～67 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 69】

請求項 30～39 のいずれか一項に記載の固体支持体をさらに含む、請求項 64～69 のいずれか一項に記載のデバイス。

【請求項 70】

請求項 64～69 のいずれか一項に記載のデバイスと、液体ハンドラーとを含む装置。

【請求項 71】

前記液体ハンドラーが、約 1 秒間で複数のマイクロウェルに液体を送達する、請求項 70 に記載の装置。

【請求項 72】

前記液体ハンドラーが、単一の入力ポートから前記複数のマイクロウェルに液体を送達

10

20

30

40

50

する、請求項 70 または 71 に記載の装置。

【請求項 73】

磁石をさらに含む、請求項 70～72 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 74】

入口ポート、出口ポート、ポンプ、弁、ベント、リザーバー、試料収集チャンバー、温度制御装置またはこれらのいずれかの組合せのうち少なくとも 1 種をさらに含む、請求項 70～73 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 75】

前記試料収集チャンバーを含む、請求項 74 に記載の装置であって、前記試料収集チャンバーが、前記装置から着脱可能である、装置。

10

【請求項 76】

光学撮像器をさらに含む、請求項 70～75 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 77】

前記光学撮像器が、前記液体ハンドラーの制御に使用される出力シグナルを生成する、請求項 76 に記載の装置。

【請求項 78】

オリゴヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を行うように構成された熱サイクリング機構をさらに含む、請求項 70～77 のいずれか一項に記載の装置。

【請求項 79】

臨床診断検査結果を生成する方法であって、前記方法は、以下：

20

- （a）請求項 70～78 のいずれか一項に記載のデバイスもしくは装置、
- （b）請求項 30～39 のいずれか一項に記載の固体支持体、
- （c）請求項 1～29 もしくは 52～63 のいずれか一項に記載の方法、または
- （d）（a）～（c）のいずれかの組合せ

により前記臨床診断検査結果を生成するステップを含む、方法。

【請求項 80】

前記臨床診断検査結果が、通信媒体を介して伝達される、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

請求項 30～39 のいずれか一項に記載の固体支持体を作製する方法であって、前記方法は、以下：

30

- （a）固体支持体に、以下：
  - （i）細胞性標識の第 1 の部分、および
  - （i i）第 1 のリンカー

を含む第 1 のポリヌクレオチドを付着させるステップと、

- （b）以下：
  - （i）前記細胞性標識の第 2 の部分、
  - （i i）前記第 1 のリンカーに相補的な配列、および
  - （i i i）分子標識

を含む第 2 のポリヌクレオチドを接触させるステップと

を含む、方法。

40

【請求項 82】

第 3 のポリヌクレオチドが、標的核酸結合領域をさらに含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

パッケージ中に含有される、請求項 40～44 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 84】

前記パッケージが、箱である、請求項 83 に記載のキット。

【請求項 85】

前記パッケージまたは前記箱が、2 立方フィートまたはそれに満たない容積を有する、請求項 83 または 84 に記載のキット。

50

**【請求項 86】**

前記パッケージまたは前記箱が、1立方フィートまたはそれに満たない容積を有する、請求項 83 または 84 に記載のキット。

**【請求項 87】**

エマルション、マイクロウェルまたはウェルが、1個の細胞のみを含有する、請求項 1～86 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 88】**

1～2, 000, 000 個のエマルション、マイクロウェルまたはウェルがそれぞれ、1個の細胞のみを含有する、請求項 1～87 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 89】**

各エマルション、マイクロウェルまたはウェルに最大でも1個の細胞を分布させるステップを含む、請求項 1～88 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 90】**

単一の固体支持体および単一細胞が、エマルション、マイクロウェルまたはウェルに分布される、請求項 1～89 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 91】**

1～2, 000, 000 個のエマルション、マイクロウェルまたはウェルにそれぞれ、1個の細胞および1個の固体支持体が分布されている、請求項 1～90 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 92】**

エマルション、マイクロウェルまたはウェル1個当たり最大でも1個の固体支持体を分布させるステップを含む、請求項 1～91 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 93】**

1～2, 000, 000 個のマイクロウェル、エマルションまたはウェルのそれぞれに1個の固体支持体および1個の細胞を分布させるステップを含む、請求項 1～92 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 94】**

細胞分布が、ランダムまたは非ランダムである、請求項 1～93 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 95】**

細胞分布が、確率論的である、請求項 1～94 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 96】**

細胞が、細胞選別機によって分布される、請求項 1～95 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 97】**

1個または複数のウェル、マイクロウェルまたはエマルションに最大でも1個の細胞が分布されるように、希釈された細胞の希釈溶液と前記1個または複数のウェル、マイクロウェルまたはエマルションを接触させることにより、細胞が分布される、請求項 1～96 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 98】**

標的特異的領域、前記複数のオリゴヌクレオチドの標的特異的領域または前記2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子の標的特異的領域が、標的パネルの2種またはそれを超える標的に相補的な配列を含む、請求項 1～97 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 99】**

前記標的パネルの前記2種またはそれを超える標的が、バイオマーカーである、請求項 98 に記載の方法。

**【請求項 100】**

前記バイオマーカーが、疾患または状態のバイオマーカーである、請求項 99 に記載の方法。

**【請求項 101】**

前記疾患または前記状態が、がん、感染症、ウイルス感染症、炎症性疾患、神経変性疾患、真菌疾患、細菌感染症またはこれらのいずれかの組合せである、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

前記パネルが、2～50, 000、2～40, 000、2～30, 000、2～20, 000、2～10, 000、2～9000、2～8, 000、2～7, 000、2～6, 000、2～5, 000、2～1, 000、2～800、2～700、2～600、2～500、2～400、2～300、2～200、2～100、2～75、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10または2～5種のバイオマーカーを含む、請求項98～101のいずれか一項に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

この出願は、2014年6月13日に出願された米国仮出願第62/012, 237号、2014年3月12日に出願された米国仮出願第61/952, 036号および2013年8月28日に出願された米国仮出願第61/871, 232号（これらの出願の各々は、それらの全体が参考として本明細書に援用される）の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

20

組織および腫瘍等、多細胞塊は、不均質性の細胞状況を含み得る。このような複雑な細胞環境は、多くの場合、複数の遺伝子型を示し得る複数の表現型を呈する場合がある。多細胞の複雑さを抜き取って単一細胞の変動性とすることは、多細胞の不均質性の理解に重要な様相である。この理解は、複数の抵抗性遺伝子型を有する疾患に立ち向かうための治療レジメンの開発において重要なものとなり得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

提供されている一態様は、複数の細胞を含む試料を得るステップと、複数の細胞の第1の細胞および複数の細胞の第2の細胞由来の2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を、第1の細胞に特異的な第1の同じ細胞標識および第2の細胞に特異的な第2の同じ細胞標識、ならびに2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物のそれぞれに特異的な分子標識で標識するステップとを含み、第1の細胞由来の2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の各分子標識が、互いに対して特有であり、第2の細胞由来の2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の各分子標識が、互いに対して特有である方法である。一部の実施形態では、方法は、2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を配列決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、配列決定するステップからの配列データを分析して、細胞のうち特定の1個におけるポリヌクレオチドのうち多数の個々の分子を同定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、細胞は、がん細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ウイルスポリヌクレオチドに感染している。一部の実施形態では、細胞は、細菌または真菌である。一部の実施形態では、配列決定するステップは、少なくとも100塩基のリード長で配列決定するステップを含む。一部の実施形態では、配列決定するステップは、少なくとも500塩基のリード長で配列決定するステップを含む。一部の実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、mRNAまたはマイクロRNAであり、その相補体およびその反応産物は、mRNAまたはマイクロRNAの相補体および反応産物である。一部の実施形態では、分子標識は、ビーズ上にある。一部の実施形態では、個々の細胞に特異的な標識は、ビーズ上にある。一部の実施形態では、個々の細胞に特異的な標識および分子標識は、ビーズ上にあ

30

40

50

る。一部の実施形態では、方法は、少なくとも一部はエマルション中で行われる。一部の  
実施形態では、方法は、少なくとも一部はアレイのウェルまたはマイクロウェル中に行わ  
れる。一部の実施形態では、疾患または状態に関連するポリヌクレオチドの存在が検出さ  
れる。一部の実施形態では、疾患または状態は、がんである。一部の実施形態では、マイ  
クロRNA、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部が検出される。一部の実施  
形態では、疾患または状態は、ウイルス感染症である。一部の実施形態では、ウイルス感  
染症は、エンベロープを有するウイルス由来である。一部の実施形態では、ウイルス感  
染症は、エンベロープを有さないウイルス由来である。一部の実施形態では、ウイルスは、  
二本鎖であるウイルスDNAを含有する。一部の実施形態では、ウイルスは、一本鎖であ  
るウイルスDNAを含有する。一部の実施形態では、ウイルスは、ボックスウイルス、ヘル  
ペスウイルス、水痘带状疱疹（*varicella zoster*）ウイルス、サイト  
メガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ヘパドナウイルス、パポバウイルス、ボ  
リオーマウイルスおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の  
実施形態では、第1の細胞は、疾患も状態も有さない人物由来であり、第2の細胞は、疾患  
または状態を有する人物由来である。一部の実施形態では、人物は異なる。一部の実施  
形態では、人物は同じ人物であるが、細胞は異なる時点で採取される。一部の実施形態では、  
第1の細胞は、疾患または状態を有する人物由来であり、第2の細胞は、同じ人物由来  
である。一部の実施形態では、試料における細胞は、組織または臓器由来の細胞を含む。  
一部の実施形態では、試料における細胞は、胸腺由来の細胞、白血球細胞、赤血球細胞、  
肝臓細胞、脾臓細胞、肺細胞、心臓細胞、脳細胞、皮膚細胞、膵臓細胞、胃細胞、口腔由  
来の細胞、鼻腔由来の細胞、結腸細胞、小腸細胞、腎臓細胞、腺由来の細胞、脳細胞、神  
経細胞、グリア細胞、眼細胞、生殖器細胞、膀胱細胞、配偶子細胞、ヒト細胞、胎児細胞  
、羊膜細胞またはこれらのいずれかの組合せを含む。

10

20

#### 【0004】

提供されている一態様は、それぞれ細胞性標識および分子標識を含む複数のオリゴヌ  
クレオチドを含む固体支持体であって、複数のオリゴヌクレオチドの各細胞性標識が同じで  
あり、複数のオリゴヌクレオチドの各分子標識が異なり、固体支持体がビーズであり、細  
胞性標識が、固体支持体に特異的であり、固体支持体が、三次元デカルト座標系の中心に  
配置されたときに、8つのオクタントのうち少なくとも7つへと伸長するオリゴヌクレオ  
チドを有し、またはこれらのいずれかの組合せである固体支持体である。一部の実施形態  
では、複数のオリゴヌクレオチドは、試料標識、ユニバーサル標識、および標的核酸結合  
領域のうち少なくとも1種をさらに含む。一部の実施形態では、固体支持体は、標的核酸  
結合領域を含み、標的核酸結合領域は、遺伝子特異的配列、オリゴdT配列、ランダムマ  
ルチマーおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の  
実施形態では、固体支持体は、標的核酸またはその相補体をさらに含む。一部の実施形態  
では、固体支持体は、生物のトランスクリプトームの転写物もしくはその相補体の約0.  
01%~約100%、または生物のゲノムの遺伝子もしくはその相補体の約0.01%~  
約100%を含む複数の標的核酸またはその相補体を含む。一部の実施形態では、複数の  
オリゴヌクレオチドの細胞性標識は、第1の標識連結配列によって第2のランダム配列に  
接続された第1のランダム配列を含み、複数のオリゴヌクレオチドの分子標識は、ランダ  
ム配列を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリジメチルシロキサン（PDMS）  
固体支持体、ポリスチレン固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体  
、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体、ブルロニック固体支持  
体およびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、複  
数のオリゴヌクレオチドは、リンカー官能基を含むリンカーを含み、固体支持体は、固体  
支持体官能基を含み、固体支持体官能基およびリンカー官能基は互いに接続する。一部の  
実施形態では、リンカー官能基および固体支持体官能基は、C6、ビオチン、ストレプト  
アビジン、第一級アミン（複数可）、アルデヒド（複数可）、ケトン（複数可）およびこ  
れらのいずれかの組合せからなる群から個々に選択される。一部の実施形態では、複数の  
オリゴヌクレオチドの分子標識は、少なくとも15個のヌクレオチドを含む。

30

40

50

## 【0005】

提供されている一態様は、本明細書に記載されている固体支持体のいずれかと、使用説明書とを含むキットである。一部の実施形態では、キットは、ウェルをさらに含む。一部の実施形態では、ウェルは、アレイ中に含まれる。一部の実施形態では、ウェルは、マイクロウェルである。一部の実施形態では、キットは、バッファをさらに含む。一部の実施形態では、キットは、パッケージ中に含有される。一部の実施形態では、パッケージは、箱である。一部の実施形態では、パッケージまたは箱は、2立方フィートまたはそれに満たない容積を有する。一部の実施形態では、パッケージまたは箱は、1立方フィートまたはそれに満たない容積を有する。

## 【0006】

提供されている一態様は、本明細書に記載されている固体支持体のいずれかを含むエマルジョンである。

## 【0007】

提供されている一態様は、ウェルと、本明細書に記載されている固体支持体のいずれかとを含む組成物である。

## 【0008】

提供されている一態様は、細胞と、本明細書に記載されている固体支持体のいずれかとを含む組成物である。

## 【0009】

一部の実施形態では、エマルジョンまたは組成物は、細胞をさらに含む。一部の実施形態では、細胞は、単一細胞である。一部の実施形態では、ウェルは、マイクロウェルである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、約 $1,000\mu\text{m}^3$ ～約 $120,000\mu\text{m}^3$ に及ぶ容積を有する。

## 【0010】

提供されている一態様は、試料を本明細書に開示されているいずれかの固体支持体と接触させて、試料由来の標的核酸を複数のオリゴヌクレオチドの1オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるステップを含む方法である。一部の実施形態では、方法は、標的核酸またはその相補体を増幅するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、標的核酸またはその相補体を配列決定するステップであって、標的核酸またはその相補体が結合されるオリゴヌクレオチドの分子標識を配列決定することを含む、ステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、標的核酸またはその相補体の量を決定するステップであって、標的核酸またはその相補体のレベルを定量化するステップ、同じ分子標識を含む配列の数を計数するステップ、またはこれらの組合せを含むステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、いずれかの同じ分子標識またはいずれかの同じ細胞性標識を整理するステップを含まない。一部の実施形態では、増幅するステップは、標的核酸を逆転写するステップを含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、PCR、ネステッドPCR、定量的PCR、リアルタイムPCR、デジタルPCRおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を用いる。一部の実施形態では、増幅するステップは、固体支持体上で直接的に、固体支持体から転写された鋳型上で、またはこれらの組合せで行われる。一部の実施形態では、試料は、細胞を含む。一部の実施形態では、細胞は、単一細胞である。一部の実施形態では、接触させるステップは、ウェル中で行う。一部の実施形態では、ウェルは、マイクロウェルであり、マイクロウェルのアレイ中に含有される。

## 【0011】

提供されている一態様は、複数のマイクロウェルを含み、複数のマイクロウェルの各マイクロウェルが、約 $1,000\mu\text{m}^3$ ～約 $120,000\mu\text{m}^3$ に及ぶ容積を有するデバイスである。一部の実施形態では、複数のマイクロウェルの各マイクロウェルは、約 $20,000\mu\text{m}^3$ の容積を有する。一部の実施形態では、複数のマイクロウェルは、約 $96\sim 200,000$ 個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、材料の層中に含まれる。一部の実施形態では、マイクロウェルの少なくとも約10%は、

10

20

30

40

50

細胞をさらに含む。一部の実施形態では、デバイスは、本明細書に記載されている固体支持体のいずれかをさらに含む。

#### 【0012】

提供されている一態様は、本明細書に記載されているデバイスのいずれかと、液体ハンドラーとを含む装置である。一部の実施形態では、液体ハンドラーは、約1秒間で複数のマイクロウェルへと液体を送達する。一部の実施形態では、液体ハンドラーは、単一の入力ポートから複数のマイクロウェルへと液体を送達する。一部の実施形態では、装置は、磁石をさらに含む。一部の実施形態では、装置は、入口ポート、出口ポート、ポンプ、弁、ベント、リザーバー、試料収集チャンバー、温度制御装置またはこれらのいずれかの組合せのうち少なくとも1種をさらに含む。一部の実施形態では、装置は、試料収集チャンバーを含み、試料収集チャンバーは、装置から着脱可能である。一部の実施形態では、装置は、光学撮像器をさらに含む。一部の実施形態では、光学撮像器は、液体ハンドラーの制御に使用される出力シグナルを生成する。一部の実施形態では、装置は、オリゴヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を行うように構成された熱サイクリング機構をさらに含む。

10

#### 【0013】

提供されている一態様は、本明細書に記載されているいずれかのデバイスもしくは装置、本明細書に記載されているいずれかの固体支持体、本明細書に記載されているいずれかの方法、またはこれらのいずれかの組合せにより臨床診断検査結果を生成するステップを含む、臨床診断検査結果を生成する方法である。一部の実施形態では、臨床診断検査結果は、通信媒体を介して伝達される。

20

#### 【0014】

提供されている一態様は、細胞性標識の第1の部分および第1のリンカーを含む第1のポリヌクレオチドを固体支持体に付着させるステップと、細胞性標識の第2の部分、第1のリンカー（linker）に相補的な配列および分子標識を含む第2のポリヌクレオチドを接触させるステップとを含む、本明細書に記載されている固体支持体のいずれかを作製する方法である。一部の実施形態では、第3のポリヌクレオチドは、標的核酸結合領域をさらに含む。

#### 【0015】

一部の実施形態では、エマルション、マイクロウェルまたはウェルは、1個の細胞のみを含有する。一部の実施形態では、1～2, 000, 000個のエマルション、マイクロウェルまたはウェルはそれぞれ、1個の細胞のみを含有する。一部の実施形態では、方法は、各エマルション、マイクロウェルまたはウェルに最大でも1個の細胞を分布させるステップを含む。一部の実施形態では、単一の固体支持体および単一細胞が、エマルション、マイクロウェルまたはウェルに分布される。一部の実施形態では、1～2, 000, 000個のエマルション、マイクロウェルまたはウェルにそれぞれ、1個の細胞および1個の固体支持体が分布されている。一部の実施形態では、方法は、エマルション、マイクロウェルまたはウェル1個当たり最大でも1個の固体支持体を分布させるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、1～2, 000, 000個のマイクロウェル、エマルションまたはウェルのそれぞれに1個の固体支持体および1個の細胞を分布させるステップを含む。一部の実施形態では、細胞分布は、ランダムまたは非ランダムである。一部の実施形態では、細胞分布は、確率論的である。一部の実施形態では、細胞は、細胞選別機によって分布される。一部の実施形態では、1個または複数のウェル、マイクロウェルまたはエマルションに最大でも1個の細胞が分布されるように、希釈された細胞の希釈溶液と1個または複数のウェル、マイクロウェルまたはエマルションを接触させることにより、細胞が分布される。

30

40

#### 【0016】

一部の実施形態では、標的特異的領域、複数のオリゴヌクレオチドの標的特異的領域または2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子の標的特異的領域は、標的パネルの2種またはそれを超える標的に相補的な配列を含む。一部の実施形態では、標的パネルの

50

2種またはそれを超える標的は、バイオマーカーである。一部の実施形態では、バイオマーカーは、疾患または状態のバイオマーカーである。一部の実施形態では、疾患または状態は、がん、感染症、ウイルス感染症、炎症性疾患、神経変性疾患、真菌疾患、細菌感染症またはこれらのいずれかの組合せである。一部の実施形態では、パネルは、2～50, 000、2～40, 000、2～30, 000、2～20, 000、2～10, 000、2～9000、2～8, 000、2～7, 000、2～6, 000、2～5, 000、2～1, 000、2～800、2～700、2～600、2～500、2～400、2～300、2～200、2～100、2～75、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10または2～5種のバイオマーカーを含む。

【0017】

10

参照による援用

本明細書に言及されているあらゆる刊行物、特許および特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許または特許出願のそれぞれが、参照により援用されていると特にかつ個々に示されているのと同じ程度まで、ここに参照により援用される。

【0018】

本発明の新規特色は、添付の特許請求の範囲に特に表記されている。本発明の特色および利点のより十分な理解は、本発明の原理が利用されている説明的な実施形態を表記する次の詳細な説明と、次に示す添付の図面を参照することにより得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

20

【図1】図1は、例示的なオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした例示的な固体支持体を描写する。

【図2A】図2A～図2Cは、分割プール合成を使用した、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを合成するための例示的なワークフローを描写する。

【図2B】図2A～図2Cは、分割プール合成を使用した、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを合成するための例示的なワークフローを描写する。

【図2C】図2A～図2Cは、分割プール合成を使用した、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを合成するための例示的なワークフローを描写する。

【図3】図3は、例示的なオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを描写する。

【図4】図4は、マイクロウェルアレイの例示的な実施形態を説明する。

30

【図5】図5は、マイクロウェルアレイにおける固体支持体の例示的な分布を描写する。

【図6A】図6A～図6Cは、マイクロウェルアレイにおける例示的な分布細胞を示す。図6Aは、K562細胞（大型の細胞サイズ）の分布を示す。図6Bは、Ramos細胞（小型の細胞サイズ）の分布を示す。図6Cは、マイクロウェルアレイにおけるRamos細胞およびオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズの分布を示し、実線矢印は、Ramos細胞を指し示し、破線矢印は、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを指し示す。

【図6B】図6A～図6Cは、マイクロウェルアレイにおける例示的な分布細胞を示す。図6Aは、K562細胞（大型の細胞サイズ）の分布を示す。図6Bは、Ramos細胞（小型の細胞サイズ）の分布を示す。図6Cは、マイクロウェルアレイにおけるRamos細胞およびオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズの分布を示し、実線矢印は、Ramos細胞を指し示し、破線矢印は、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを指し示す。

40

【図6C】図6A～図6Cは、マイクロウェルアレイにおける例示的な分布細胞を示す。図6Aは、K562細胞（大型の細胞サイズ）の分布を示す。図6Bは、Ramos細胞（小型の細胞サイズ）の分布を示す。図6Cは、マイクロウェルアレイにおけるRamos細胞およびオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズの分布を示し、実線矢印は、Ramos細胞を指し示し、破線矢印は、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを指し示す。

【図7】図7は、マイクロウェル容積、固体支持体容積および溶解から得られる生物学的

50

材料の量の例示的な統計を示す。

【図 8】図 8 A～図 8 C は、ビーズキャップ封着の例示的な実施形態を説明する。図 8 A～図 8 B は、マイクロアレイウェルのウェル内に細胞およびオリゴヌクレオチドビーズが分布し、より大型のセファデックスビーズがウェルの封着に使用された、マイクロアレイウェルの画像を示す。点線矢印は、細胞を指し示し、破線矢印は、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを指し示し、実線矢印は、セファデックスビーズを指し示す。図 8 C は、セファデックスビーズを使用してウェルを封着した、ウェル内に沈着した細胞およびオリゴヌクレオチドビーズ（例えば、オリゴビーズ）の模式図を描写する。

【図 9】図 9 は、マイクロウェルおよびチューブから増幅された GAPDH および RPL 19 の増幅効率を比較する棒グラフを描写する。灰色バーは、マイクロウェルのデータを表す。白色バーは、チューブのデータを表す。

【図 10】図 10 は、直接的に固体支持体における 3 種の異なる遺伝子の増幅特異性を比較するアガロースゲルを描写する。

【図 11-1】図 11 A～図 11 I は、配列決定結果のグラフによる表現を示す。

【図 11-2】図 11 A～図 11 I は、配列決定結果のグラフによる表現を示す。

【図 11-3】図 11 A～図 11 I は、配列決定結果のグラフによる表現を示す。

【図 11-4】図 11 A～図 11 I は、配列決定結果のグラフによる表現を示す。

【図 11-5】図 11 A～図 11 I は、配列決定結果のグラフによる表現を示す。

【図 12-1】図 12 A～図 12 C は、それぞれ K562 のみの試料、Ramos のみの試料および K562 + Ramos 混合物試料の配列決定結果のヒストグラムを示す。

【図 12-2】図 12 A～図 12 C は、それぞれ K562 のみの試料、Ramos のみの試料および K562 + Ramos 混合物試料の配列決定結果のヒストグラムを示す。

【図 12-3】図 12 D～図 12 E は、それぞれ Ramos のみの細胞試料および K562 のみの細胞試料に関する、表 3 に列挙される遺伝子のコピー数のグラフを示す。

【図 12-4】図 12 F～図 12 I は、個々の遺伝子のコピー数を示す。

【図 12-5】図 12 F～図 12 I は、個々の遺伝子のコピー数を示す。

【図 12-6】図 12 J～図 12 M は、100 種の特有のバーコード組合せを有するビーズに対する、遺伝子 1 種当たりの特有の分子の数（y 軸）のグラフを示す。

【図 12-7】図 12 J～図 12 M は、100 種の特有のバーコード組合せを有するビーズに対する、遺伝子 1 種当たりの特有の分子の数（y 軸）のグラフを示す。

【図 12-8】図 12 J～図 12 M は、100 種の特有のバーコード組合せを有するビーズに対する、遺伝子 1 種当たりの特有の分子の数（y 軸）のグラフを示す。

【図 12-9】図 12 J～図 12 M は、100 種の特有のバーコード組合せを有するビーズに対する、遺伝子 1 種当たりの特有の分子の数（y 軸）のグラフを示す。

【図 12-10】図 12 N～図 12 O は、2 種の細胞型の遺伝子発現プロファイルの全般的パターンを描写する、2 個のビーズの拡大したグラフを示す。

【図 12-11】図 12 P は、K562 + Ramos 混合物試料由来のビーズ 1 個当たり > 30 種の分子を有する 768 個のビーズの遺伝子発現プロファイルの主成分分析に基づく結果の散布図を示す。

【図 12-12】図 12 Q～図 12 R は、それぞれ K562 様細胞（図 12 P に基づく第 1 の主成分の左側のビーズ）および Ramos 様細胞（図 12 P に基づく第 1 の主成分の右側のビーズ）に関する、ビーズ 1 個当たりのアンプリコン 1 種当たりのコピー数のヒストグラムを示す。

【図 12-13】図 12 Q～図 12 R は、それぞれ K562 様細胞（図 12 P に基づく第 1 の主成分の左側のビーズ）および Ramos 様細胞（図 12 P に基づく第 1 の主成分の右側のビーズ）に関する、ビーズ 1 個当たりのアンプリコン 1 種当たりのコピー数のヒストグラムを示す。

【図 12-14】図 12 S～図 12 T は、それぞれ K562 様細胞（図 12 P に基づく第 1 の主成分の左側のビーズ）および Ramos 様細胞（図 12 P に基づく第 1 の主成分の右側のビーズ）に関する、個々の遺伝子のビーズまたは単一細胞 1 個当たりのコピー数を

10

20

30

40

50

示す。

【図 1 2 - 1 5】図 1 2 S ~ 図 1 2 T は、それぞれ K 5 6 2 様細胞（図 1 2 P に基づく第 1 の主成分の左側のピーズ）および R a m o s 様細胞（図 1 2 P に基づく第 1 の主成分の右側のピーズ）に関する、個々の遺伝子のピーズまたは単一細胞 1 個当たりのコピー数を示す。

【図 1 3 - 1】図 1 3 A は、マウスおよび R a m o s 細胞の全般的遺伝子発現パターンを描写する。

【図 1 3 - 2】図 1 3 B ~ 図 1 3 C は、それぞれ高密度試料および低密度試料の遺伝子発現プロファイルの主成分分析に基づく結果の散布図を示す。

【図 1 3 - 3】図 1 3 D ~ 図 1 3 E は、それぞれ高密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード（b c）組合せ 1 種当たりのリード（y 軸） 対 b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ（x 軸）のグラフを描写する。

【図 1 3 - 4】図 1 3 F ~ 図 1 3 G は、それぞれ高密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード（b c）組合せ 1 種当たりの分子の数（y 軸） 対 b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ（x 軸）のグラフを描写する。

【図 1 3 - 5】図 1 3 H ~ 図 1 3 I は、それぞれ低密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード（b c）組合せ 1 種当たりのリード（y 軸） 対 バーコード組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ（x 軸）のグラフを描写する。

【図 1 3 - 6】図 1 3 H ~ 図 1 3 I は、それぞれ低密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード（b c）組合せ 1 種当たりのリード（y 軸） 対 バーコード組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ（x 軸）のグラフを描写する。

【図 1 3 - 7】図 1 3 J ~ 図 1 3 K は、それぞれ低密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード組合せ 1 種当たりの分子の数（y 軸） 対 バーコード組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ（x 軸）のグラフを描写する。

【図 1 3 - 8】図 1 3 J ~ 図 1 3 K は、それぞれ低密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード組合せ 1 種当たりの分子の数（y 軸） 対 バーコード組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ（x 軸）のグラフを描写する。

【図 1 4】図 1 4 は、X 軸における遺伝子およびリードの数の  $\log 10$  を描写するグラフを示す。

【図 1 5】図 1 5 A は、3 部構成（t h r e e - p a r t）細胞標識（例えば、細胞バーコード）1 種当たりの検出される遺伝子の分布のグラフを示す。図 1 5 B は、ピーズ 1 個当たりの検出される特有の分子の分布のグラフを示す（遺伝子パネルを発現）。

【図 1 6】図 1 6 は、細胞バーコードに関連する遺伝子に基づく細胞クラスターを描写する。

【図 1 7】図 1 7 A ~ 図 1 7 D は、単球特異的マーカーの分析を示す。図 1 7 E は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

【図 1 8】図 1 8 A ~ 図 1 8 B は、T 細胞特異的マーカーの分析を示す。図 1 8 C は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

【図 1 9】図 1 9 A ~ 図 1 9 B は、C D 8 + T 細胞特異的マーカーの分析を示す。図 1 9 C は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

【図 2 0】図 2 0 A は、C D 4 + T 細胞特異的マーカーの分析を示す。図 2 0 B は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

【図 2 1】図 2 1 A ~ 図 2 1 D は、ナチュラルキラー（N K）細胞特異的マーカーの分析を示す。図 2 0 E は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

10

20

30

40

50

【図 2 2】図 2 2 A～図 2 2 E は、B 細胞特異的マーカーの分析を示す。図 2 2 F は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

【図 2 3】図 2 3 A～図 2 3 F は、T o l l 様受容体の分析を示す。T o l l 様受容体は、単球および一部の B 細胞によって主に発現される。図 2 3 G は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。

【図 2 4】図 2 4 は、遺伝子 対 リードの数の  $\log 10$  のグラフを描写する。

【図 2 5-1】図 2 5 A～図 2 5 D は、2 種の遺伝子に関する、分子バーコード 対 リードの数またはリードの数の  $\log 10$  のグラフを示す。

【図 2 5-2】図 2 5 A～図 2 5 D は、2 種の遺伝子に関する、分子バーコード 対 リードの数またはリードの数の  $\log 10$  のグラフを示す。

【図 2 6-1】図 2 6 A は、細胞バーコード 1 種当たりの発現されるパネルにおける遺伝子の数 対 特有の細胞バーコードの数／単一細胞のグラフを示す。図 2 6 B は、ビーズ 1 個当たりの検出される特有の分子の数 対 所定の数の分子を保有する特有の細胞バーコード 1 種当たりの細胞の数の頻度のヒストグラムを示す。図 2 6 C は、ビーズ 1 個当たりの検出される特有の G A P D H 分子の数 対 細胞数の頻度／所定の数の分子を保有する特有の細胞バーコードのヒストグラムを示す。

【図 2 6-2】図 2 6 A は、細胞バーコード 1 種当たりの発現されるパネルにおける遺伝子の数 対 特有の細胞バーコードの数／単一細胞のグラフを示す。図 2 6 B は、ビーズ 1 個当たりの検出される特有の分子の数 対 所定の数の分子を保有する特有の細胞バーコード 1 種当たりの細胞の数の頻度のヒストグラムを示す。図 2 6 C は、ビーズ 1 個当たりの検出される特有の G A P D H 分子の数 対 細胞数の頻度／所定の数の分子を保有する特有の細胞バーコードのヒストグラムを示す。

【図 2 7】図 2 7 は、8 5 6 個の細胞の散布図を示す。

【図 2 8】図 2 8 は、上位 1 0 0 個（検出される分子の総数の観点から）の発現のヒートマップを示す。

【図 2 9】図 2 9 は、実施例 1 2 のためのワークフローを示す。

【図 3 0】図 3 0 は、実施例 1 3 のためのワークフローを示す。

【図 3 1-1】図 3 1 A～図 3 1 C は、2 種の明確に異なる細胞型を含有する制御された混合物における単一細胞のクラスタリングを示す。A. 1 2 種の遺伝子の発現の主成分分析による、K 5 6 2 および R a m o s 細胞の 1 : 1 混合物のクラスタリング。パイプロットは、2 種の明確に異なるクラスターを示し、一方のクラスターは、R a m o s 特異的遺伝子を発現し、他方は、K 5 6 2 特異的遺伝子を発現する。B. 1 1 1 種の遺伝子のパネルを使用した、健康な個体由来の初代 B 細胞のバックグラウンドにおいて少ないパーセンテージの R a m o s 細胞を含有する混合物の主成分分析。各データ点の色は、遺伝子パネル全体にわたって検出される特有の転写物分子の総数を示す。1 1 9 8 個の細胞のうち 1 8 個の細胞のセット（丸く囲む）は、明確に異なる遺伝子発現プロファイルを呈し、さらにより高い転写レベルを有する。C. 遺伝子パネルにおける検出される転写物分子の総数によってランク付けされた、図 3 1 B の試料における上位 1 0 0 個の細胞における各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。遺伝子は、相関の観点から階層的クラスタリングにより順序付けされる。水平赤色バーによって示される上位 1 8 個の細胞は、垂直赤色バーによって示される、濾胞性リンパ腫と関連することが公知の遺伝子のセットを優先的に発現した。

【図 3 1-2】図 3 1 A～図 3 1 C は、2 種の明確に異なる細胞型を含有する制御された混合物における単一細胞のクラスタリングを示す。A. 1 2 種の遺伝子の発現の主成分分析による、K 5 6 2 および R a m o s 細胞の 1 : 1 混合物のクラスタリング。パイプロットは、2 種の明確に異なるクラスターを示し、一方のクラスターは、R a m o s 特異的遺伝子を発現し、他方は、K 5 6 2 特異的遺伝子を発現する。B. 1 1 1 種の遺伝子のパネルを使用した、健康な個体由来の初代 B 細胞のバックグラウンドにおいて少ないパーセンテージの R a m o s 細胞を含有する混合物の主成分分析。各データ点の色は、遺伝子パネル全体にわたって検出される特有の転写物分子の総数を示す。1 1 9 8 個の細胞のうち 1

10

20

30

40

50

8 個の細胞のセット（丸く囲む）は、明確に異なる遺伝子発現プロファイルを呈し、さらにより高い転写レベルを有する。C. 遺伝子パネルにおける検出される転写物分子の総数によってランク付けされた、図 3 1 B の試料における上位 1 0 0 個の細胞における各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。遺伝子は、相関の観点から階層的クラスタリングにより順序付けされる。水平赤色バーによって示される上位 1 8 個の細胞は、垂直赤色バーによって示される、濾胞性リンパ腫と関連することが公知の遺伝子のセットを優先的に発現した。

【図 3 1 - 3】図 3 1 D は、初代 B 細胞とスパイクインされた R a m o s 細胞の P C A 分析を示す。各データ点（単一細胞）の色は、特定の遺伝子に関して各細胞が保有する、転写物分子の数の  $\log$  を示す。上位 7 列：R a m o s 細胞である可能性が高い 1 8 個の細胞のサブセットによって優先的に発現される遺伝子。第 1 列遺伝子は（左から右に）、G A P D H、T C L 1 A、M K I 6 7 および B C L 6 を含む。第 2 列遺伝子は（左から右に）、M Y C、C C N D 3、C D 8 1 および G N A I 2 を含む。第 3 列の遺伝子は（左から右に）、I G B P 1、C D 2 0、B L N K および D O C K 8 を含む。第 4 列の遺伝子は（左から右に）、I R F 4、C D 2 2、I G H M および A U R K B を含む。第 5 列の遺伝子は（左から右に）、C D 3 8、C D 1 0、L E F 1 および A I C D A を含む。第 6 列の遺伝子は（左から右に）、C D 4 0、C D 2 7、I L 4 R および P R K C D を含む。第 7 列の遺伝子は（左から右に）、R G S 1、M C L 1、C D 7 9 a および H L A - D R A を含む。最後の列：初代 B 細胞のサブセットによって優先的に発現されるが、これら 1 8 個の細胞においては特に濃縮されない遺伝子。最後の列における遺伝子は（左から右に）、I L 6、C D 2 3 a、C C R 7 および C X C R 5 を含む。

【図 3 2】図 3 2 は、G A P D H の発現を示す。色は、細胞 1 個当たりの観察される特有の転写物分子の数の自然対数を示す。

【図 3 3 - 1】図 3 3 A ~ 図 3 3 F は、単球関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 3 A は、C D 1 6 の P C A を示す。図 3 3 B は、C C R v a r A の P C A を示す。図 3 3 C は、C D 1 4 の P C A を示す。図 3 3 D は、S 1 0 0 A 1 2 の P C A を示す。図 3 3 E は、C D 2 0 9 の P C A を示す。図 3 3 F は、I F N G R 1 の P C A を示す。

【図 3 3 - 2】図 3 3 A ~ 図 3 3 F は、単球関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 3 A は、C D 1 6 の P C A を示す。図 3 3 B は、C C R v a r A の P C A を示す。図 3 3 C は、C D 1 4 の P C A を示す。図 3 3 D は、S 1 0 0 A 1 2 の P C A を示す。図 3 3 E は、C D 2 0 9 の P C A を示す。図 3 3 F は、I F N G R 1 の P C A を示す。

【図 3 4】図 3 4 A ~ 図 3 4 B は、汎 T 細胞マーカー（C D 3）の主成分分析（P C A）を示す。図 3 4 A は、C D 3 D の P C A を示し、図 3 4 B は、C D 3 E の P C A を示す。

【図 3 5 - 1】図 3 5 A ~ 図 3 5 E は、C D 8 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 5 A は、C D 8 A の P C A を示す。図 3 5 B は、E O M E S の P C A を示す。図 3 5 C は、C D 8 B の P C A を示す。図 3 5 D は、P R F 1 の P C A を示す。図 3 5 E は、R U N X 3 の P C A を示す。

【図 3 5 - 2】図 3 5 A ~ 図 3 5 E は、C D 8 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 5 A は、C D 8 A の P C A を示す。図 3 5 B は、E O M E S の P C A を示す。図 3 5 C は、C D 8 B の P C A を示す。図 3 5 D は、P R F 1 の P C A を示す。図 3 5 E は、R U N X 3 の P C A を示す。

【図 3 5 - 3】図 3 5 A ~ 図 3 5 E は、C D 8 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 5 A は、C D 8 A の P C A を示す。図 3 5 B は、E O M E S の P C A を示す。図 3 5 C は、C D 8 B の P C A を示す。図 3 5 D は、P R F 1 の P C A を示す。図 3 5 E は、R U N X 3 の P C A を示す。

【図 3 6 - 1】図 3 6 A ~ 図 3 6 C は、C D 4 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 6 A は、C D 4 の P C A を示す。図 3 6 B は、C C R 7 の P C A を示す。図 3 6 C は、C D 6 2 L の P C A を示す。

【図 3 6 - 2】図 3 6 A ~ 図 3 6 C は、C D 4 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（P C A）を示す。図 3 6 A は、C D 4 の P C A を示す。図 3 6 B は、C C R 7 の P C A を示す。

図 3 6 C は、C D 6 2 L の P C A を示す。

【図 3 7 - 1】図 3 7 A ~ 図 3 7 F は、B 細胞関連遺伝子の主成分分析 (P C A) を示す。図 3 7 A は、C D 2 0 の P C A を示す。図 3 7 B は、I G H D の P C A を示す。図 3 7 C は、P A X 5 の P C A を示す。図 3 7 D は、T C L 1 A の P C A を示す。図 3 7 E は、I G H M の P C A を示す。図 3 7 F は、C D 2 4 の P C A を示す。

【図 3 7 - 2】図 3 7 A ~ 図 3 7 F は、B 細胞関連遺伝子の主成分分析 (P C A) を示す。図 3 7 A は、C D 2 0 の P C A を示す。図 3 7 B は、I G H D の P C A を示す。図 3 7 C は、P A X 5 の P C A を示す。図 3 7 D は、T C L 1 A の P C A を示す。図 3 7 E は、I G H M の P C A を示す。図 3 7 F は、C D 2 4 の P C A を示す。

【図 3 7 - 3】図 3 7 A ~ 図 3 7 F は、B 細胞関連遺伝子の主成分分析 (P C A) を示す。図 3 7 A は、C D 2 0 の P C A を示す。図 3 7 B は、I G H D の P C A を示す。図 3 7 C は、P A X 5 の P C A を示す。図 3 7 D は、T C L 1 A の P C A を示す。図 3 7 E は、I G H M の P C A を示す。図 3 7 F は、C D 2 4 の P C A を示す。

【図 3 8 - 1】図 3 8 A ~ 図 3 8 C は、ナチュラルキラー細胞関連遺伝子の主成分分析 (P C A) を示す。図 3 8 A は、K I R 2 D S 5 の P C A を示す。図 3 8 B は、C D 1 6 の P C A を示す。図 3 8 C は、C D 6 2 L の P C A を示す。

【図 3 8 - 2】図 3 8 A ~ 図 3 8 C は、ナチュラルキラー細胞関連遺伝子の主成分分析 (P C A) を示す。図 3 8 A は、K I R 2 D S 5 の P C A を示す。図 3 8 B は、C D 1 6 の P C A を示す。図 3 8 C は、C D 6 2 L の P C A を示す。

【図 3 9】図 3 9 は、C y t o S e q 細胞によってアッセイされる 8 1 種の遺伝子の P C A 分析によるヒト P B M C 試料 (6 3 2 細胞) における主要細胞型の同時同定を示し、高度に相関する発現プロファイルと同様の色でコードする。

【図 4 0 A】図 4 0 A ~ 図 4 0 B は、P B M C 試料の単一細胞遺伝子発現プロファイルの相関分析を示す。4 0 A. 試料における 6 3 2 細胞にわたるペアワイズ相関係数を示すマトリクス。高度に相関する遺伝子発現プロファイルを有する細胞が共に群分けされるように、細胞を順序付ける。4 0 B. 各細胞による各遺伝子の発現を示すヒートマップ。上述の相関マトリクスと同じ様式で細胞 (段) を順序付ける。細胞にわたり高度に同様の発現パターンを共有する遺伝子が共に群分けされるように、遺伝子 (列) を順序付ける。細胞の各クラスターの細胞型は、細胞が同時発現する遺伝子の群により同定することができる。各主要細胞クラスター内において、遺伝子発現の観点から、相当な程度の不均質性が存在する。

【図 4 0 B】図 4 0 A ~ 図 4 0 B は、P B M C 試料の単一細胞遺伝子発現プロファイルの相関分析を示す。4 0 A. 試料における 6 3 2 細胞にわたるペアワイズ相関係数を示すマトリクス。高度に相関する遺伝子発現プロファイルを有する細胞が共に群分けされるように、細胞を順序付ける。4 0 B. 各細胞による各遺伝子の発現を示すヒートマップ。上述の相関マトリクスと同じ様式で細胞 (段) を順序付ける。細胞にわたり高度に同様の発現パターンを共有する遺伝子が共に群分けされるように、遺伝子 (列) を順序付ける。細胞の各クラスターの細胞型は、細胞が同時発現する遺伝子の群により同定することができる。各主要細胞クラスター内において、遺伝子発現の観点から、相当な程度の不均質性が存在する。

【図 4 1】図 4 1 は、同じドナーに由来する P B M C 試料の再現実験から得られる 7 3 1 細胞のデータを表す。同様の遺伝子発現プロファイル (相関係数を使用した階層的クラスタリングに基づく) を有する細胞を同様の色でプロットする。

【図 4 2】図 4 2 は、遺伝子間の遺伝子発現プロファイルにおける相関を実証するヒートマップを示す。

【図 4 3】図 4 3 は、C y t o S e q を描写する。A. C y t o S e q の実験手順。B. ビーズに付着させたオリゴヌクレオチドの構造。

【図 4 4 A】図 4 4 は、C D 3 + T 細胞の亜集団の精査を示す。A. ドナー 1 無刺激試料の P C A は、細胞の 2 種の主要ブランチ (b r a n c h) を明らかにする。各細胞内の特定の遺伝子の発現レベル (特有の転写物分子の l o g) を色で示す。ヘルパー T 細胞関連

10

20

30

40

50

サイトカインおよびエフェクター遺伝子は、下部（lower）ブランチにおける細胞において濃縮されるが、細胞傷害性T細胞関連遺伝子は、上部（upper）ブランチにおいて濃縮される。代表的な遺伝子をここに示す。第1列は、ヘルパーT細胞関係遺伝子を示し、（左から右に）CD4、SELLおよびCCR7を含む。第2列は、細胞傷害性T細胞関係遺伝子を示し、（左から右に）CD8A、NKG2DおよびEOMESを含む。B. ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞を表す2種の主なブランチの一方に対する表示遺伝子の発現の濃縮を示す、ドナー1抗CD3／抗CD28刺激試料のPCA。これらの遺伝子は、無刺激試料において少量存在する。最初の2列は、活性化T細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）第1列はIRF4、CD69およびMYCを、第2列はGAPDH、TNFおよびIFNGを含む。第3列は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）IL2、LTAおよびCD40LGを含む。第4列は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）CCL4、CCL3およびGZMBを含む。C. 集約データにおける無刺激試料と刺激試料を比較する場合の、大幅の倍数変化を呈する遺伝子の全体的発現レベルに寄与する細胞の数。数種のサイトカイン（赤色矢印）に関して、少数の細胞のみの寄与は、集団全体における大幅な全体的遺伝子発現変化の原因となる。

【図44B】図44は、CD3＋T細胞の亜集団の精査を示す。A. ドナー1無刺激試料のPCAは、細胞の2種の主要ブランチ（branch）を明らかにする。各細胞内の特定の遺伝子の発現レベル（特有の転写物分子のlog）を色で示す。ヘルパーT細胞関連サイトカインおよびエフェクター遺伝子は、下部（lower）ブランチにおける細胞において濃縮されるが、細胞傷害性T細胞関連遺伝子は、上部（upper）ブランチにおいて濃縮される。代表的な遺伝子をここに示す。第1列は、ヘルパーT細胞関係遺伝子を示し、（左から右に）CD4、SELLおよびCCR7を含む。第2列は、細胞傷害性T細胞関係遺伝子を示し、（左から右に）CD8A、NKG2DおよびEOMESを含む。B. ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞を表す2種の主なブランチの一方に対する表示遺伝子の発現の濃縮を示す、ドナー1抗CD3／抗CD28刺激試料のPCA。これらの遺伝子は、無刺激試料において少量存在する。最初の2列は、活性化T細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）第1列はIRF4、CD69およびMYCを、第2列はGAPDH、TNFおよびIFNGを含む。第3列は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）IL2、LTAおよびCD40LGを含む。第4列は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）CCL4、CCL3およびGZMBを含む。C. 集約データにおける無刺激試料と刺激試料を比較する場合の、大幅の倍数変化を呈する遺伝子の全体的発現レベルに寄与する細胞の数。数種のサイトカイン（赤色矢印）に関して、少数の細胞のみの寄与は、集団全体における大幅な全体的遺伝子発現変化の原因となる。

【図44C】図44は、CD3＋T細胞の亜集団の精査を示す。A. ドナー1無刺激試料のPCAは、細胞の2種の主要ブランチ（branch）を明らかにする。各細胞内の特定の遺伝子の発現レベル（特有の転写物分子のlog）を色で示す。ヘルパーT細胞関連サイトカインおよびエフェクター遺伝子は、下部（lower）ブランチにおける細胞において濃縮されるが、細胞傷害性T細胞関連遺伝子は、上部（upper）ブランチにおいて濃縮される。代表的な遺伝子をここに示す。第1列は、ヘルパーT細胞関係遺伝子を示し、（左から右に）CD4、SELLおよびCCR7を含む。第2列は、細胞傷害性T細胞関係遺伝子を示し、（左から右に）CD8A、NKG2DおよびEOMESを含む。B. ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞を表す2種の主なブランチの一方に対する表示遺伝子の発現の濃縮を示す、ドナー1抗CD3／抗CD28刺激試料のPCA。これらの遺伝子は、無刺激試料において少量存在する。最初の2列は、活性化T細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）第1列はIRF4、CD69およびMYCを、第2列はGAPDH、TNFおよびIFNGを含む。第3列は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から右に）IL2、LTAおよびCD40LGを含む。第4列は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知の遺伝子を示し、（左から

10

20

30

40

50

右に) C C L 4、C C L 3およびG Z M Bを含む。C. 集約データにおける無刺激試料と刺激試料を比較する場合の、大幅の倍数変化を呈する遺伝子の全体的発現レベルに寄与する細胞の数。数種のサイトカイン(赤色矢印)に関して、少数の細胞のみの寄与は、集団全体における大幅な全体的遺伝子発現変化の原因となる。

【図45A】図45は、2名のドナーにおける抗C D 2 8 / 抗C D 3 ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のP C Aプロットを示し、無刺激試料におけるヘルパーまたは細胞傷害性サブセットのいずれかにおける優先的発現を明らかに示す遺伝子の発現を強調する。各データ点(単一細胞)の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog(特有の転写物分子の数)を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。A. ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞の両方に関連することが公知の遺伝子。B. 細胞傷害性T細胞に関連することが公知の遺伝子。C. ヘルパーT細胞に関連することが公知の遺伝子。

10

【図45B】図45は、2名のドナーにおける抗C D 2 8 / 抗C D 3 ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のP C Aプロットを示し、無刺激試料におけるヘルパーまたは細胞傷害性サブセットのいずれかにおける優先的発現を明らかに示す遺伝子の発現を強調する。各データ点(単一細胞)の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog(特有の転写物分子の数)を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。A. ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞の両方に関連することが公知の遺伝子。B. 細胞傷害性T細胞に関連することが公知の遺伝子。C. ヘルパーT細胞に関連することが公知の遺伝子。

20

【図45C】図45は、2名のドナーにおける抗C D 2 8 / 抗C D 3 ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のP C Aプロットを示し、無刺激試料におけるヘルパーまたは細胞傷害性サブセットのいずれかにおける優先的発現を明らかに示す遺伝子の発現を強調する。各データ点(単一細胞)の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog(特有の転写物分子の数)を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。A. ヘルパーおよび細胞傷害性T細胞の両方に関連することが公知の遺伝子。B. 細胞傷害性T細胞に関連することが公知の遺伝子。C. ヘルパーT細胞に関連することが公知の遺伝子。

【図46A】図46A~図46Dは、2名のドナーにおける抗C D 2 8 / 抗C D 3 ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のP C Aプロットを示し、刺激試料において発現されるが、無刺激試料においては低または検出不能レベルである遺伝子の発現を強調する。各データ点(単一細胞)の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog(特有の転写物分子の数)を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。46Aおよび46D. 活性化により細胞の両方のブランチによって発現される遺伝子。46B. 活性化により上部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知である。46C. 活性化により下部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知である。

30

【図46B】図46A~図46Dは、2名のドナーにおける抗C D 2 8 / 抗C D 3 ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のP C Aプロットを示し、刺激試料において発現されるが、無刺激試料においては低または検出不能レベルである遺伝子の発現を強調する。各データ点(単一細胞)の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog(特有の転写物分子の数)を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。46Aおよび46D. 活性化により細胞の両方のブランチによって発現される遺伝子。46B. 活性化により上部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知である。46C. 活性化により下部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知である。

40

50

【図46C】図46A～図46Dは、2名のドナーにおける抗CD28／抗CD3ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のPCAプロットを示し、刺激試料において発現されるが、無刺激試料においては低または検出不能レベルである遺伝子の発現を強調する。各データ点（単一細胞）の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog（特有の転写物分子の数）を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。46Aおよび46D、活性化により細胞の両方のブランチによって発現される遺伝子。46B、活性化により上部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知である。46C、活性化により下部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知である。

10

【図46D】図46A～図46Dは、2名のドナーにおける抗CD28／抗CD3ビーズによる刺激を受けたT細胞試料および相当する無刺激試料のPCAプロットを示し、刺激試料において発現されるが、無刺激試料においては低または検出不能レベルである遺伝子の発現を強調する。各データ点（単一細胞）の色は、表示遺伝子に対する細胞1個当たりのlog（特有の転写物分子の数）を示す。各ドナーにおける刺激および無刺激グラフのペア毎に、色範囲は、同じになるように調整されている。46Aおよび46D、活性化により細胞の両方のブランチによって発現される遺伝子。46B、活性化により上部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化細胞傷害性T細胞に関連することが公知である。46C、活性化により下部ブランチにおける細胞によって優先的に発現される遺伝子。これらの遺伝子は、活性化ヘルパーT細胞に関連することが公知である。

20

【図47】図47は、ドナー1の無刺激CD3＋T細胞のデータのクラスタリングが、CD4およびCD8細胞、ならびにグランザイムKおよびグランザイムAを発現するがCD8をほとんど発現しない細胞の群の分離を示すことを示す。上：細胞の各ペア間の相関を示すヒートマップ。高度に相関する細胞を共に群分けする。下：各細胞の各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。細胞および遺伝子を双方向性階層的クラスタリングにより順序付ける。

【図48】図48は、ドナー1の抗CD3／抗CD28刺激CD3＋T細胞試料のデータを示す以外は図47と同様の図を示す。上：細胞の各ペア間の相関を示すヒートマップ。高度に相関する細胞を共に群分けする。下：各細胞の各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。細胞および遺伝子を双方向性階層的クラスタリングにより順序付ける。

30

【図49-1】図49A～図49Cは、ドナー1において、無刺激試料と比較して、抗CD28／抗CD3刺激試料において様々なサイトカインの大幅な全体的倍数変化が観察されたことを示す。A～B：これらのサイトカインの大幅な倍数変化は、数個の単一細胞のみによって大部分は寄与された（四角または丸に囲まれたドット）。多数のこれらのサイトカインは、同じ少数の細胞によって寄与された。C：これらのサイトカインの同時発現パターンは、ヘルパーT細胞のTh2およびTh17サブセットのシグネチャーサイトカインの組合せと一致する。

【図49-2】図49A～図49Cは、ドナー1において、無刺激試料と比較して、抗CD28／抗CD3刺激試料において様々なサイトカインの大幅な全体的倍数変化が観察されたことを示す。A～B：これらのサイトカインの大幅な倍数変化は、数個の単一細胞のみによって大部分は寄与された（四角または丸に囲まれたドット）。多数のこれらのサイトカインは、同じ少数の細胞によって寄与された。C：これらのサイトカインの同時発現パターンは、ヘルパーT細胞のTh2およびTh17サブセットのシグネチャーサイトカインの組合せと一致する。

40

【図50A】図50A～図50Bは、CD8＋T細胞の亜集団の精査を示す。A、CytoSeqデータのクラスタリングは、CD8＋細胞の2種の主要群を定義する。一方の群は、セントラルメモリー／ナイーブ細胞によって共有される遺伝子が発現し、他方の群は、エフェクターメモリー／エフェクター細胞によって共有される遺伝子が発現する。

50

ドナー 2 の無刺激試料のデータをここに示す。上：細胞の各ペア間の相関を示すヒートマップ。下：各細胞における各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。細胞および遺伝子を双方向性階層的クラスタリングにより順序付ける。B. CMV ペプチドプールによる刺激後の 2 名のドナー由来の CD8 + T 細胞における、ガンマインターフェロン (IFN $\gamma$ ) の発現による稀な抗原特異的 T 細胞の同定。各細胞を 2 D 主成分空間にプロットする。IFN $\gamma$  を発現する細胞 (丸く囲む) は通常、パネルにおける大部分の検出された総転写物を有する細胞内のものである (色で示す)。ドナー 2 において、上位の発現細胞 (四角) は、IFN $\gamma$  を生成しないが、サイトカイン IL6 および IL1 $\beta$  を発現する。各丸の隣の数値は、該細胞に検出される特有の転写物分子の総数の降順のランクを示す。

【図 50B】図 50A ~ 図 50B は、CD8 + T 細胞の亜集団の精査を示す。A. CytoSeq データのクラスタリングは、CD8 + 細胞の 2 種の主要群を定義する。一方の群は、セントラルメモリー/ナイーブ細胞によって共有される遺伝子を発現し、他方の群は、エフェクターメモリー/エフェクター細胞によって共有される遺伝子を発現する。ドナー 2 の無刺激試料のデータをここに示す。上：細胞の各ペア間の相関を示すヒートマップ。下：各細胞における各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。細胞および遺伝子を双方向性階層的クラスタリングにより順序付ける。B. CMV ペプチドプールによる刺激後の 2 名のドナー由来の CD8 + T 細胞における、ガンマインターフェロン (IFN $\gamma$ ) の発現による稀な抗原特異的 T 細胞の同定。各細胞を 2 D 主成分空間にプロットする。IFN $\gamma$  を発現する細胞 (丸く囲む) は通常、パネルにおける大部分の検出された総転写物を有する細胞内のものである (色で示す)。ドナー 2 において、上位の発現細胞 (四角) は、IFN $\gamma$  を生成しないが、サイトカイン IL6 および IL1 $\beta$  を発現する。各丸の隣の数値は、該細胞に検出される特有の転写物分子の総数の降順のランクを示す。

【図 51】図 51 は、本図のデータがドナー 2 の CMV 刺激試料のデータを表すことを除いて図 50A と同様の図を示す。A. CytoSeq データのクラスタリングは、CD8 + 細胞の 2 種の主要群を定義する。一方の群は、セントラルメモリー/ナイーブ細胞によって共有される遺伝子を発現し、他方の群は、エフェクターメモリー/エフェクター細胞によって共有される遺伝子を発現する。ドナー 2 の無刺激試料のデータをここに示す。上：細胞の各ペア間の相関を示すヒートマップ。下：各細胞における各遺伝子の発現レベルを示すヒートマップ。細胞および遺伝子を双方向性階層的クラスタリングにより順序付ける。

【図 52-1】図 52 は、データが、主成分空間においてプロットされることを示す。色は、特定の遺伝子の log (検出される特有の転写物分子の数) を示す。A. CMV ペプチドプールによる刺激により、より大きな比率の細胞によって発現されると考えられる遺伝子。B. 細胞の一方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、ナイーブおよびセントラルメモリー CD8 + T 細胞に関連することも公知である。C. 細胞の他方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、エフェクターおよびエフェクターメモリー CD8 + T 細胞に関連することが公知である。D. グランザイム K 発現細胞は、PC 空間におけるナイーブ/セントラルメモリーおよびエフェクター/エフェクターメモリー細胞の間の領域を占有する。E. HLA-DR A 発現細胞は、特殊なサブセットを構成する。F. 細胞の両方のブランチにおいて発現される遺伝子。

【図 52-2】図 52 は、データが、主成分空間においてプロットされることを示す。色は、特定の遺伝子の log (検出される特有の転写物分子の数) を示す。A. CMV ペプチドプールによる刺激により、より大きな比率の細胞によって発現されると考えられる遺伝子。B. 細胞の一方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、ナイーブおよびセントラルメモリー CD8 + T 細胞に関連することも公知である。C. 細胞の他方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、エフェクターおよびエフェクターメモリー CD8 + T 細胞に関連することが公知である。D. グランザイム K 発現細胞は、PC 空間におけるナイーブ/セントラルメモリーおよびエフェクター/エフェクターメモリー細胞の間の領域を占有する。E. HLA-DR A 発現細胞は、特殊なサブセットを構成する。F. 細胞の両方のブランチにおいて発現される遺伝子。

【図 5 2 - 3】図 5 2 は、データが、主成分空間においてプロットされることを示す。色は、特定の遺伝子の log（検出される特有の転写物分子の数）を示す。A. CMV ペプチドプールによる刺激により、より大きな比率の細胞によって発現されると考えられる遺伝子。B. 細胞の一方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、ナイーブおよびセントラルメモリー CD 8 + T 細胞に関連することも公知である。C. 細胞の他方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、エフェクターおよびエフェクターメモリー CD 8 + T 細胞に関連することが公知である。D. グランザイム K 発現細胞は、PC 空間におけるナイーブ／セントラルメモリーおよびエフェクター／エフェクターメモリー細胞の間の領域を占有する。E. HLA-DR A 発現細胞は、特殊なサブセットを構成する。F. 細胞の両方のブランチにおいて発現される遺伝子。

10

【図 5 2 - 4】図 5 2 は、データが、主成分空間においてプロットされることを示す。色は、特定の遺伝子の log（検出される特有の転写物分子の数）を示す。A. CMV ペプチドプールによる刺激により、より大きな比率の細胞によって発現されると考えられる遺伝子。B. 細胞の一方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、ナイーブおよびセントラルメモリー CD 8 + T 細胞に関連することも公知である。C. 細胞の他方のブランチに濃縮される遺伝子。これらの遺伝子は、エフェクターおよびエフェクターメモリー CD 8 + T 細胞に関連することが公知である。D. グランザイム K 発現細胞は、PC 空間におけるナイーブ／セントラルメモリーおよびエフェクター／エフェクターメモリー細胞の間の領域を占有する。E. HLA-DR A 発現細胞は、特殊なサブセットを構成する。F. 細胞の両方のブランチにおいて発現される遺伝子。

20

【図 5 3】図 5 3 は、データが、無刺激対照のデータを表すことを除いて図 5 0 B と同じ図を示す。ドナー 1 の試料における細胞のいずれも IFNG を発現しなかったが、ドナー 2 の試料における 1 個の細胞は、遺伝子パネル全体にわたり全体的に低い発現であったが（ランク 1069）、IFNG を発現した。色目盛は、刺激試料のそれぞれのグラフにマッチするように調整された。

【図 5 4】図 5 4 は、ドナー 1 および 2 の CMV 刺激 CD 8 + T 細胞における、ガンマイインターフェロン（IFNG）を発現する細胞における遺伝子パネルの不均質性発現を示すヒートマップを示す。ドナー 2 において検出される大部分の総転写物を保有する細胞も示す。この特定の細胞は、IFNG を発現しないが、IL6、IL1B および CCL4 を強く発現する。細胞および遺伝子を相関に基づく双方向性階層的クラスタリングにより順序付ける。細胞 ID は、遺伝子パネルの検出された転写物の総数におけるランクを指し、図 5 0 の PCA プロットにおいて示される。

30

【図 5 5】図 5 5 は、増幅スキームを示す。第 1 の PCR は、遺伝子特異的プライマーおよびユニバーサル Illumina 配列決定プライマー 1 配列に対するプライマーを使用して、ビーズに付着させた分子を増幅する。第 2 の PCR は、Illumina 配列決定プライマー 2 配列に隣接するネステッド遺伝子特異的プライマーおよびユニバーサル Illumina 配列決定プライマー 1 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。第 3 の PCR は、P5 ならびに P7 および試料指標を付加して、PCR 産物を Illumina 配列決定ライブラリーとする。150bp × 2 配列決定は、リード 1 における細胞標識および分子の標識、リード 2 における遺伝子、ならびに指標 1 リードにおける試料指標を明らかにする。

40

【図 5 6】図 5 6 は、試料由来の分子を分析するためのワークフローの模式図を描写する。

【図 5 7】図 5 7 は、試料由来の分子を分析するためのワークフローの模式図を描写する。

【図 5 8】図 5 8 A ~ 図 5 8 B は、PCR 産物のアガロースゲルを描写する。

【図 5 9】図 5 9 は、複数の遺伝子の配列決定リードのプロットを描写する。

【図 6 0 - 1】図 6 0 A ~ 図 6 0 D は、それぞれ Lys、Phe、Thr および Dap スパイクイン（spike-in）対照に関する、検出される標識 1 種当たりの観察されるリード（RPLD）のプロットを描写する。図 6 0 E は、リード 対 入力のプロットを

50

描写する。

【図60-2】図60A～図60Dは、それぞれLys、Phe、ThrおよびDapスパイクイン対照に関する、検出される標識1種当たりの観察されるリード（RPLD）のプロットを描写する。図60Eは、リード 対 入力のプロットを描写する。

【図60-3】図60A～図60Dは、それぞれLys、Phe、ThrおよびDapスパイクイン対照に関する、検出される標識1種当たりの観察されるリード（RPLD）のプロットを描写する。図60Eは、リード 対 入力のプロットを描写する。

【図61】図61は、様々な遺伝子に関する、検出される標識1種当たりの観察されるリード（RPLD）のプロットを描写する。

【図62】図62は、様々な遺伝子に関する、検出される標識1種当たりの観察されるリード（RPLD）のプロットを描写する。

【図63】図63は、様々な遺伝子に関する総リード（標識） 対 rpldのプロットを描写する。

【図64】図64は、未検出遺伝子のRPKMのプロットを描写する。

【図65】図65は、分子バーコードの合成のための模式図を描写する。

【図66-1】図66A～図66Cは、分子バーコードの合成のための模式図を描写する。

【図66-2】図66A～図66Cは、分子バーコードの合成のための模式図を描写する。

【図67】図67は、核酸を確率論的に標識するためのワークフローの模式図を示す。

【図68】図68は、核酸を確率論的に標識するためのワークフローの模式図である。

【図69】図69は、その中にマイクロウェルアレイ基材をクランプすることにより、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化実験を行うために試料および試薬をピペットで出し入れすることができる反応チャンバーまたはウェルを形成することができる機械的治具を説明する。上部：治具の上部および下部ならびにマイクロウェルアレイ基材と漏れ止め封着を形成するためのエラストマーガスケットを示す分解組立図。下部：治具の分解側面図。

【図70】図70は、マイクロウェルアレイ基材が治具内にクランプされると、2個の反応チャンバーまたはウェルを作製する機械的治具を説明する。

【図71】図71は、図69および図70に説明されている機械的治具による使用のためのエラストマー（例えば、ポリジメチルシロキサン）ガスケットの2例を説明する。エラストマーガスケットは、マイクロウェルアレイ基材に漏れ止め封着を提供して、マイクロウェルアレイの周りに試薬ウェルを作製する。ガスケットは、試薬ウェルを作製するための1個（上部）、2個（下部）またはそれを超える開口部を含有することができる。

【図72】図72は、その中にマイクロウェルアレイがパッケージされるカートリッジの一実施形態を描写する。左：（下から上に）マイクロウェルアレイ基材、フローセルまたはアレイチャンバーを画定するガスケット、予めロードされたアッセイ試薬を含有するまたは消費した試薬を貯蔵する区画を画定するための試薬および／または廃棄物リザーバー成分、ならびに該試薬および廃棄物リザーバーを封着し、試料入口および出口ポートを画定するためのカバーを説明するカートリッジの分解組立図。右：外部磁石をマイクロウェルアレイに極めて接近させるためのレリーフを説明するカートリッジ設計の一実施形態を組み立てた図。

【図73】図73は、パッケージされたマイクロウェルアレイと共に搭載型アッセイ試薬を含むように設計されたカートリッジの一実施形態を描写する。

【図74】図74は、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化アッセイを行うための機器システムの模式図説明を提供する。機器システムは、種々の制御および分析能力を提供することができ、個々のモジュールまたは完全に統合されたシステムとしてパッケージされ得る。マイクロウェルアレイは、システムの固定された成分であるもしくはは着脱可能であるフローセルと統合することができる、または予めロードされたアッセイ試薬リザーバーおよび他の機能性をさらに含む着脱可能なカートリッジ内にパッケージ

10

20

30

40

50

され得る。

【図 7 5】図 7 5 は、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化アッセイを行うための自動システムによって行われるプロセスステップの一実施形態を説明する。

【図 7 6】図 7 6 は、ここに開示されているアッセイシステムに機器制御およびデータ分析能力を提供するためのコンピュータシステムまたはプロセッサの一実施形態を説明する。

【図 7 7】図 7 7 は、本開示のアッセイシステムの例としての実施形態に関連して使用され得るコンピュータシステムアーキテクチャの一例を説明するブロック図を示す。

【図 7 8】図 7 8 は、本開示のアッセイシステムの例としての実施形態と共に使用され得る複数のコンピュータシステム、携帯電話、パーソナルデータアシスタントおよびネットワーク接続ストレージ（NAS）によるネットワークを示す図表を描写する。

【図 7 9】図 7 9 は、本開示のアッセイシステムの例としての実施形態と共に使用され得るマルチプロセッサコンピュータシステムのブロック図を描写する。

【図 8 0】図 8 0 は、被験試料の分析および該被験試料から得られる検査結果の通信媒体を介した通信の図表を描写する。

【発明を実施するための形態】

#### 【0020】

複数の試料における分子を分析するための方法、キットおよび組成物が本明細書に開示されている。一般に、方法、キットおよび組成物は、（a）2 種またはそれを超える試料における分子を分子バーコードで確率論的に標識して、標識された分子を生成するステップと、（b）標識された分子を検出するステップとを含む。分子バーコードは、1 種または複数の標的特異的領域、標識領域、試料指標領域、ユニバーサル PCR 領域、アダプター、リンカーまたはこれらの組合せを含み得る。標識された分子は、a）分子領域と、b）試料指標領域と、c）標識領域とを含み得る。分子領域は、それに本来は付着させていた分子バーコード由来の分子の少なくとも一部を含み得る。分子領域は、それに本来は付着させていた分子バーコード由来の分子の断片を含み得る。試料指標領域を使用して、分子領域の供給源を決定することができる。試料指標領域を使用して、その試料から、起源をもつ分子領域を決定することができる。試料指標領域を使用して、2 種またはそれを超える異なる試料由来の分子領域を区別することができる。標識領域を使用して、同じ供給源に起源をもつ同一分子領域に、特有の同一性を付与することができる。標識領域を使用して、同じ試料に起源をもつ同一分子領域に、特有の同一性を付与することができる。

#### 【0021】

複数の試料における分子を分析するための方法は、a）i）複数の核酸を含む第 1 の試料を複数の第 1 の試料タグと接触させて、複数の第 1 の試料タグが付いた核酸を生成し、i i）複数の核酸を含む第 2 の試料を複数の第 2 の試料タグと接触させて、複数の第 2 の試料タグが付いた核酸を生成することにより、複数の試料タグが付いた核酸を生成するステップであって、複数の第 2 の試料タグは、第 1 の試料タグとは異なるステップと、b）複数の試料タグが付いた核酸を複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成するステップと、c）標識された核酸の少なくとも一部を検出し、これにより、複数の試料における複数の核酸の計数を決定するステップとを含み得る。複数の試料は、単一細胞を含み得る。

#### 【0022】

あるいは、複数の試料における分子を分析するための方法は、a）i）第 1 の試料を第 1 の複数の試料タグと接触させるステップであって、第 1 の複数の試料タグが、同一核酸配列を含むステップと、i i）第 1 の試料を、異なる核酸配列を含み得る第 1 の複数の分子識別子標識と接触させるステップであって、第 1 の試料と第 1 の複数の試料タグまたは第 1 の複数の分子識別子標識との接触が、同時にまたは逐次的に起こって、複数の第 1 の標識された核酸を生成するステップと、i i i）第 2 の試料を第 2 の複数の試料タグと接触させるステップであって、第 2 の複数の試料タグが、同一核酸配列を含み得るステップと、i v）第 2 の試料を、異なる核酸配列を含み得る第 2 の複数の分子識別子標識と接触

させるステップであって、第2の試料と第2の複数の試料タグまたは第2の複数の分子識別子標識との接触が、同時にまたは逐次的に起こって、複数の第2の標識された核酸を生成するステップとを含む、複数の標識された核酸を生成するステップであって、複数の標識された核酸が、複数の第1の標識された核酸および第2の標識された核酸を含み得るステップと、b) 多数の異なる標識された核酸を決定し、これにより、複数の試料における複数の核酸の計数を決定するステップとを含み得る。

#### 【0023】

複数の試料における分子を分析するための方法は、a) 2種またはそれを超える異なる核酸を含み得る複数の試料を、複数の試料タグおよび複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成するステップであって、i) 複数の標識された核酸が、2種またはそれを超える試料タグおよび2種またはそれを超える分子識別子標識に付着させた2種またはそれを超える核酸を含み得、ii) 複数の試料の第1の試料由来の核酸に付着させた試料タグが、複数の試料の第2の試料由来の核酸分子に付着させた試料タグとは異なり、iii) 同じ試料における2種またはそれを超える同一核酸を、2種またはそれを超える異なる分子識別子標識に付着させるステップと、b) 標識された核酸の少なくとも一部を検出し、これにより、複数の試料における2種またはそれを超える異なる核酸の計数を決定するステップとを含み得る。

#### 【0024】

図56は、試料におけるRNA分子の定量化のための例示的なワークフローを描写する。図56のステップ1に示す通り、RNA分子のポリAテイル領域への分子識別子標識(115)のセットの確率論的ハイブリダイゼーションにより、RNA分子(110)を逆転写してcDNA分子(105)を生成することができる。分子識別子標識(115)は、オリゴdT領域(120)、標識領域(125)およびユニバーサルPCR領域(130)を含み得る。分子識別子標識のセットは、960種の異なる種類の標識領域を含有することができる。図56のステップ2に示す通り、標識されたcDNA分子(170)を精製して、過剰な分子識別子標識(115)を除去することができる。精製は、Ampu r e ビーズ精製を含み得る。図56のステップ3に示す通り、標識されたcDNA分子(170)を増幅して、標識されたアンプリコン(180)を生成することができる。増幅は、マルチプレックスPCR増幅を含み得る。増幅は、単一の反応容積における96種のマルチプレックスプライマーによるマルチプレックスPCR増幅を含み得る。増幅は、カスタム(custom)プライマー(135)およびユニバーサルプライマー(140)を含み得る。カスタムプライマー(135)は、標識されたcDNA分子(170)のcDNA(105)部分内の領域にハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー(140)は、標識されたcDNA分子(170)のユニバーサルPCR領域(130)にハイブリダイズすることができる。ステップ4に示す通り、標識されたアンプリコン(180)は、ネステッドPCRによりさらに増幅することができる。ネステッドPCRは、単一の反応容積における96種のマルチプレックスプライマーによるマルチプレックスPCRを含み得る。ネステッドPCRは、カスタムプライマー(145)およびユニバーサルプライマー(140)を含み得る。カスタムプライマー(135)は、標識されたアンプリコン(180)のcDNA(105)部分内の領域にハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー(140)は、標識されたアンプリコン(180)のユニバーサルPCR領域(130)にハイブリダイズすることができる。ステップ5に示す通り、1種または複数のアダプター(150、155)は、標識されたアンプリコン(180)に付着させて、アダプターで標識されたアンプリコン(190)を生成することができる。1種または複数のアダプターは、ライゲーションにより標識されたアンプリコン(180)に付着させることができる。ステップ6に示す通り、1種または複数のアダプター(150、155)を使用して、アダプターで標識されたアンプリコン(190)において1種または複数の追加的なアッセイを実行することができる。1種または複数のアダプター(150、155)は、1種または複数のプライマー(160、165)にハイブリダイズすることができる。1種または複数のプライマー(160、165)は、P

C R増幅プライマーとなり得る。1種または複数のプライマー（160、165）は、配列決定プライマーとなり得る。1種または複数のアダプター（150、155）は、アダプターで標識されたアンプリコンのさらなる増幅のために使用することができる。1種または複数のアダプター（150、155）は、アダプターで標識されたアンプリコンを配列決定するために使用することができる。

#### 【0025】

図57は、2種またはそれを超える試料由来の核酸を分析するためのワークフローの例示的な模式図を描写する。図57に示す通り、2種またはそれを超える試料由来の核酸を分析するための方法は、分析のための2種またはそれを超える遺伝子を選択するステップと、選択された遺伝子（210）に基づきカスタムプライマーを設計するステップとを含み得る。方法は、核酸（例えば、RNA）を含む1種または複数の試料に、1種または複数のスパイクイン対照（220）を補充するステップをさらに含み得る。試料における核酸は、分子バーコード（または試料タグまたは分子識別子標識）およびカスタムプライマーによるマルチプレックスPCR（230）により増幅して、標識されたアンプリコンを生成することができる。標識されたアンプリコンを1種または複数の配列決定アダプターでさらに処理して、アダプターで標識されたアンプリコン（240）を生成することができる。アダプターで標識されたアンプリコンを分析することができる（250）。図57に示す通り、標識されたアンプリコン（250）の分析は、（1）ユニバーサルPCRプライマーseq、ポリAおよび／または分子バーコード（または試料タグ、分子識別子標識）の検出、（2）アダプターおよび／またはバーコード（例えば、分子バーコード、試料タグ、分子識別子標識）に付着させていないアダプターで標識されたアンプリコン（例えば、96種の遺伝子およびスパイクイン対照）の末端におけるマッピングリード、ならびに（3）異なるアダプターで標識されたアンプリコンの数の計数および／または要約のうち1種または複数を含み得る。

#### 【0026】

図67は、分子バーコード（1220）で核酸を確率論的に標識するためのワークフローの模式図を示す。図67のステップ1に示す通り、RNA分子は、分子バーコード（1220）のセットで確率論的に標識することができる。分子バーコード（1220）は、標的結合領域（1221）、標識領域（1222）、試料指標領域（1223）およびユニバーサルPCR領域（1224）を含み得る。場合によっては、標的結合領域は、RNA分子におけるポリA配列にハイブリダイズするオリゴdT配列を含む。標識領域（1222）は、2種またはそれを超える異なる分子バーコードの識別に使用することができる特有の配列を含有することができる。分子バーコードが、RNA分子にハイブリダイズする際に、標識領域を使用して、同一RNA分子に特有の同一性を付与することができる。試料指標領域（1223）は、分子バーコードのセットに対し同一となり得る。試料指標領域（1223）を使用して、異なる試料から標識された核酸を識別することができる。ユニバーサルPCR領域（1224）は、標識された分子の増幅のためのプライマー結合部位として機能することができる。RNA分子が、分子バーコードで標識されると、RNA分子を逆転写して、RNA分子のcDNAコピー（1210）および分子バーコード（1220）を含有する標識されたcDNA分子（1230）を生成することができる。

#### 【0027】

図67のステップ2に示す通り、過剰なオリゴ（例えば、分子バーコード）は、Ampureビーズ精製により除去することができる。図67のステップ3に示す通り、標識されたcDNA分子は、マルチプレックスPCRにより増幅することができる。標識されたcDNA分子のマルチプレックスPCRは、単一の反応容積においてフォワードプライマー（F1、図67における1235）およびユニバーサルプライマー（1240）の第1のセットを使用して、標識されたアンプリコン（1245）を生成することにより行うことができる。図67のステップ4に示す通り、標識されたアンプリコンは、ネステッドプライマーを使用したマルチプレックスPCRによりさらに増幅することができる。標識されたアンプリコンのネステッドプライマー増幅は、単一の反応容積においてフォワードプ

ライマー（F2、図67における1250）およびユニバーサルプライマー（1240）の第2のセットを使用して、標識されたネステッドPCRアンプリコンを生成することにより行うことができる。場合によっては、F2プライマー（1250）は、アダプター（1251）および標的結合領域（1252）を含有する。F2プライマーの標的結合領域（1252）は、標識されたアンプリコンにハイブリダイズすることができ、標識されたアンプリコンの増幅をプライミングする（prime）ことができる。ネステッドPCRアンプリコンのアダプター（1251）およびユニバーサルPCR領域（1224）は、標識されたネステッドPCRアンプリコンの配列決定において使用することができる。アンプリコンは、MiSeqにより配列決定することができる。あるいは、アンプリコンは、HiSeqにより配列決定することができる。

10

#### 【0028】

図68は、核酸を確率論的に標識するためのワークフローの模式図を示す。図68のステップ1に示す通り、RNA分子（1305）は、分子バーコード（1320）のセットで確率論的に標識することができる。分子バーコードは、標的結合領域（1321）、標識領域（1322）およびユニバーサルPCR領域（1323）を含み得る。分子バーコードを、RNA分子に付着させると、RNA分子（1305）を逆転写して、RNA分子のcDNAコピー（1310）および分子バーコード（1320）を含む標識されたcDNA分子（1325）を生成することができる。図68のステップ2に示す通り、標識されたcDNA分子は、Ampureビーズ精製により精製して、過剰なオリゴ（例えば、分子バーコード）を除去することができる。図68のステップ3に示す通り、標識されたアンプリコンは、マルチプレックスPCRにより増幅することができる。標識されたcDNA分子のマルチプレックスPCRは、単一の反応容積においてフォワードプライマー（F1、図68における1330）およびユニバーサルプライマー（1335）の第1のセットを使用して、標識されたアンプリコン（1360）を生成することにより行うことができる。図67のステップ4に示す通り、標識されたアンプリコンは、ネステッドプライマーを使用してマルチプレックスPCRによりさらに増幅することができる。標識されたアンプリコンのネステッドプライマー増幅は、単一の反応容積においてフォワードプライマー（F2、図68における1340）および試料指標プライマー（1350）の第2のセットを使用して、標識されたネステッドPCRアンプリコンを生成することにより行うことができる。場合によっては、F2プライマー（1340）は、アダプター（1341）および標的結合領域（1342）を含有する。F2プライマーの標的結合領域（1342）は、標識されたアンプリコンにハイブリダイズすることができ、標識されたアンプリコンの増幅をプライミングすることができる。試料指標プライマー（1350）は、ユニバーサルプライマー領域（1351）、試料指標領域（1352）およびアダプター領域（1353）を含み得る。図68のステップ4に示す通り、試料指標プライマーのユニバーサルプライマー領域（1351）は、標識されたアンプリコンのユニバーサルPCR領域にハイブリダイズすることができる。試料指標プライマーの試料指標領域（1352）を使用して、2種またはそれを超える試料を識別することができる。アダプター領域（1341、1353）を使用して、標識されたネステッドPCRアンプリコンを配列決定することができる。アンプリコンは、MiSeqにより配列決定することができる。あるいは、アンプリコンは、HiSeqにより配列決定することができる。

20

30

40

#### 【0029】

1種または複数のライブラリーを生成する方法が本明細書にさらに開示されている。1種または複数のライブラリーは、複数の標識された分子を含み得る。1種または複数のライブラリーは、複数の標識されたアンプリコンを含み得る。1種または複数のライブラリーは、複数の濃縮された分子またはその誘導体（例えば、標識された分子、標識されたアンプリコン）を含み得る。一般に、1種または複数のライブラリーを生成する方法は、（a）2種またはそれを超える試料由来の複数の分子を確率論的に標識して、複数の標識された分子を生成するステップであって、標識された分子が、分子領域、試料指標領域および標識領域を含むステップと、（b）複数の標識された分子から1種または複数のライブ

50

ラリーを生成するステップであって、(i) 1種または複数のライブラリーが、2種またはそれを超える異なる標識された分子を含み、(ii) 2種またはそれを超える異なる標識された分子が、分子領域、試料指標領域、標識領域またはこれらの組合せによって異なる、ステップとを含む。

#### 【0030】

1種または複数のライブラリーを生成するための方法は、a) i) 複数の核酸を含む第1の試料を複数の第1の試料タグと接触させて、複数の第1の試料タグが付いた核酸を生成し、ii) 複数の核酸を含む第2の試料を複数の第2の試料タグと接触させて、複数の第2の試料タグが付いた核酸を生成することにより、複数の試料タグが付いた核酸を生成するステップであって、複数の第1の試料タグが、第2の試料タグとは異なるステップと、b) 複数の試料タグが付いた核酸を複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成し、これにより、標識された核酸ライブラリーを生成するステップとを含む得る。

10

#### 【0031】

試料への接触は、ランダムまたは非ランダムとなり得る。例えば、試料タグと試料との接触は、ランダムまたは非ランダム接触となり得る。一部の実施形態では、試料は、試料タグとランダムに接触される。一部の実施形態では、試料は、試料タグと非ランダムに接触される。複数の核酸への接触は、ランダムまたは非ランダムとなり得る。例えば、試料タグと複数の核酸との接触は、ランダムまたは非ランダム接触となり得る。一部の実施形態では、複数の核酸は、試料タグとランダムに接触される。一部の実施形態では、複数の核酸は、試料タグと非ランダムに接触される。

20

#### 【0032】

標識されたビーズの1または複数のセットを生成する方法が本明細書にさらに開示されている。標識されたビーズの1または複数のセットを生成する方法は、1個または複数のビーズに1種または複数の核酸を付着させ、これにより、標識されたビーズの1または複数のセットを生成するステップを含む得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の分子バーコードを含む得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の試料タグを含む得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の分子識別子標識を含む得る。1種または複数の核酸は、a) プライマー領域；b) 試料指標領域；およびc) リンカーまたはアダプター領域を含む得る。1種または複数の核酸は、a) プライマー領域；b) 標識領域；およびc) リンカーまたはアダプター領域を含む得る。1種または複数の核酸は、a) 試料指標領域；およびb) 標識領域を含む得る。1種または複数の核酸は、プライマー領域をさらに含む得る。1種または複数の核酸は、標的特異的領域をさらに含む得る。1種または複数の核酸は、リンカー領域をさらに含む得る。1種または複数の核酸は、アダプター領域をさらに含む得る。1種または複数の核酸は、試料指標領域をさらに含む得る。1種または複数の核酸は、標識領域をさらに含む得る。

30

#### 【0033】

1種または複数のカスタムプライマーを選択するための方法が本明細書にさらに開示されている。複数の試料における分子を分析するためにカスタムプライマーを選択する方法は、a) 選ばれたプライマーが、i) 3個以下の逐次的グアニン、3個以下の逐次的シトシン、4個以下の逐次的アデニンおよび4個以下の逐次的チミン、ii) グアニンまたはシトシンである少なくとも3、4、5または6個のヌクレオチド、ならびにiii) ヘアピン構造を容易に形成しない配列を含む得る、第1のパスと、b) i) 全転写物の高い被覆度(coverage)を有する複数の配列を選ぶ第1のラウンド、ならびにii) 残る転写物の最高被覆度および4以下の他の選ばれた配列との相補的スコアを有する配列を選択する1回または複数の後続ラウンドを含む第2のパスと、c) 被覆度が飽和するまたはカスタムプライマーの総数が約96未満もしくはそれに等しくなるまで、選定されたセットへの配列の付加とを含む得る。

40

#### 【0034】

2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子の分析における使用の

50

ためのキットが本明細書にさらに開示されている。キットは、(a) (i) 分子バーコードの第1のセットの分子バーコードが、試料指標領域および標識領域を含み、(ii) 分子バーコードの第1のセットの2種またはそれを超えるバーコードの試料指標領域が同じであり、(iii) 分子バーコードの第1のセットの2種またはそれを超えるバーコードの標識領域が異なる分子バーコードの第1のセットを含む第1の容器と、(b) (i) 分子バーコードの第2のセットの分子バーコードが、試料指標領域および標識領域を含み、(ii) 分子バーコードの第2のセットの2種またはそれを超えるバーコードの試料指標領域が同じであり、(iii) 分子バーコードの第2のセットの2種またはそれを超えるバーコードの標識領域が異なり、(iv) 分子バーコードの第2のセットのバーコードの試料指標領域が、分子バーコードの第1のセットのバーコードの試料指標領域とは異なり、(v) 分子バーコードの第2のセットの2種またはそれを超えるバーコードの標識領域が、分子バーコードの第1のセットの2種またはそれを超えるバーコードの標識領域と同一である、分子バーコードの第2のセットを含む第2の容器とを含み得る。

10

**【0035】**

あるいは、キットは、a) 複数のビーズのうち1個または複数のビーズが、複数の核酸のうち少なくとも1種を含み得、複数の核酸のうち少なくとも1種が、i) 複数の核酸のうち少なくとも1種のプライマー配列が、複数のビーズに対し同じである、少なくとも1種のプライマー配列と、ii) 複数の核酸のうちいずれか1種のビーズ特異的配列が同じであり、ビーズ特異的配列が、複数のビーズのうちいずれか1個に対し異なる、ビーズ特異的配列と、iii) 複数の核酸のうちいずれか1種に対し異なる、確率論的配列とを含み得る、複数のビーズと、b) プライマー配列に相補的な配列を含み得るプライマーと、c) 核酸増幅に適した1種または複数の増幅剤とを含む。

20

**【0036】**

あるいは、キットは、a) (i) 試料タグの第1のセットの試料タグが、試料指標領域を含み、(ii) 試料タグの第1のセットの試料タグの試料指標領域が、少なくとも約80%同一である、試料タグの第1のセットを含む第1の容器と、b) (i) 分子識別子標識の第1のセットの分子識別子標識が、標識領域を含み、(ii) 分子識別子標識の第1のセットの総分子識別子標識の標識領域の少なくとも約30%が異なる、分子識別子標識の第1のセットを含む第2の容器とを含む。

**【0037】**

本方法、キットおよび組成物をより詳細に記載する前に、記載されている特定の方法、キットまたは組成物は当然ながら変動することから、本発明が、そのようなものに限定されないことを理解されたい。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書において使用されている用語法は、単に特定の実施形態を記載することが目的であり、限定を目的としていないことも理解されたい。例は、本発明を作製および使用する仕方の完全な開示および記載を当業者に提供するために提示されており、本発明者らが自分の発明として考慮するものの範囲を限定することを目的とせず、後述する実験が、行われた全てまたは唯一の実験であることを表すことも目的としない。使用された数値（例えば、量、温度等）に関する精度を保証する試みが為されたが、ある程度の実験誤差および偏差が説明されるべきである。他に断りがなければ、部は、重量部であり、分子量は、重量平均分子量であり、温度はセ氏温度で表され、圧力は大気圧またはその付近である。

30

40

**【0038】**

複数の試料または複合的核酸調製物における核酸の確率論的標識化のための方法、キットおよび組成物が提供される。このような方法、キットおよび組成物は、細胞応答、分化またはシグナル伝達の機構の解明、および多種多様な臨床測定の実行における使用が見出される。より完全に後述されている方法、キットおよび組成物の詳細を読むことにより、本発明の上述および他の目標、利点および特色は、当業者に明らかとなるであろう。

**【0039】**

本明細書に開示されている方法は、1種または複数の分子バーコード、試料タグおよび

50

／または分子識別子標識を、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に付着させるステップを含む。分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識は、1種または複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。場合によっては、分子への分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識の付着は、分子の確率論的標識化を含む。分子を確率論的に標識するための方法は、例えば、米国特許出願第12／969,581号および同第13／327,526号に見出すことができる。一般に、確率論的標識化方法は、1種または複数の分子への複数のタグおよび標識オリゴヌクレオチドのランダムな付着を含む。分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識は、標識しようとする1種または複数の分子を超過して提供される。確率論的標識化において、標識しようとする個々の分子はそれぞれ、複数の分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識に付着する個々の確率を有する。標識しようとする個々の分子それぞれが特定の分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識に付着する確率は、標識しようとする他のいずれかの個々の分子とほぼ同じものとなり得る。したがって、場合によっては、試料における分子のいずれかがタグおよび標識のいずれかを見出す確率も等しいと仮定され、これは試料における分子の数を推定する数学的計算において使用することができる仮定である。一部の状況では、付着する確率は、例えば、該分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識と個々の分子との結合効率を増加または減少し得る異なる特性を有するタグおよび標識を選出することにより操作することができる。タグおよび標識は、数変動されて、特定の分子バーコード、試料タグおよび／または分子識別子標識が、確率論的標識化の際に結合パートナーを見出す確率を変更することができる。例えば、ある一標識は、標識のプールにおいて大きな比率を占め、これにより、この大きな比率を占めた標識は、少なくとも1個の結合パートナーを見出す機会を増加させる。

10

20

#### 【0040】

本明細書に開示されている方法は、2種またはそれを超える試料を組み合わせるステップをさらに含み得る。本明細書に開示されている方法は、2種またはそれを超える試料由来の1種または複数の分子を組み合わせるステップをさらに含み得る。例えば、本明細書に開示されている方法は、第1の試料および第2の試料を組み合わせるステップを含む。2種またはそれを超える試料は、1種または複数の確率論的標識化手順を実行した後に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に分子バーコードの1または複数のセットを付着させた後に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に試料タグの1または複数のセットを付着させた後に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に分子識別子標識の1または複数のセットを付着させた後に組み合わせることができる。例えば、第1および第2の試料は、複数の分子識別子標識との接触前に組み合わせられる。

30

#### 【0041】

あるいは、2種またはそれを超える試料は、1種または複数の確率論的標識化手順を実行する前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に分子バーコードの1または複数のセットを付着させる前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に試料タグの1または複数のセットを付着させる前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子に分子識別子標識の1または複数のセットを付着させる前に組み合わせることができる。

40

#### 【0042】

2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子またはその誘導体（例えば、標識された分子、アンプリコン）において1種または複数のアッセイを実行した後に組み合わせることができる。1種または複数のアッセイは、1種または複数の増幅反応を含み得る。1種または複数のアッセイは、1種または

50

複数の濃縮アッセイを含み得る。1種または複数のアッセイは、1種または複数の検出アッセイを含み得る。例えば、第1および第2の試料は、標識された核酸を検出した後に組み合わされる。

#### 【0043】

2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子またはその誘導体（例えば、標識された分子、アンプリコン）において1種または複数のアッセイを実行する前に組み合わせることができる。1種または複数のアッセイは、1種または複数の増幅反応を含み得る。1種または複数のアッセイは、1種または複数の濃縮アッセイを含み得る。1種または複数のアッセイは、1種または複数の検出アッセイを含み得る。例えば、第1および第2の試料は、標識された核酸を検出する前に組み合わされる。

10

#### 【0044】

##### 支持体

本開示は、単一細胞からのマルチプレックス配列分析のための組成物および方法を含む。本開示の方法および組成物は、固体支持体の使用を提供する。場合によっては、本明細書に開示されている方法、キットおよび組成物は、支持体を含む。

#### 【0045】

用語「支持体」、「固体支持体」、「半固体支持体」および「基材」は、互換的に使用することができ、硬質または半硬質表面（単数または複数）を有する材料または材料群を指すことができる。支持体は、溶液から溶液へと移動可能である、またはオリゴヌクレオチドに基づくアッセイを実行するための構造を形成するいずれかの表面を指すことができる。支持体または基材は、固体支持体となり得る。あるいは、支持体は、非固体支持体である。支持体は、不溶性、半可溶性または不溶性材料を指すことができる。支持体は、そこにリンカー、足場、構成要素または他の反応性部分が付着している場合、「官能化されている（functionalized）」と称され得るが、一方、固体支持体は、そこにかかる反応性部分を付着させていない場合、「非官能化」状態となり得る。支持体は、マイクロタイターウェルフォーマット等、溶液において遊離させて；カラム等、フロースルーフォーマットにおいて；またはディップスティックにおいて用いることができる。

20

#### 【0046】

支持体または基材は、膜、紙、プラスチック、コーティングされた表面、平坦な表面、ガラス、スライド、チップまたはこれらのいずれかの組合せを含み得る。多くの実施形態では、支持体の少なくとも一表面は、実質的に平坦となり得るが、一部の実施形態では、例えば、ウェル、隆起した領域、ピン、エッチングされた溝その他により、異なる化合物に対し合成領域を物理的に分けることが望ましくなり得る。他の実施形態によれば、固体支持体（複数可）は、樹脂、ゲル、マイクロスフェアまたは他の幾何的構成の形を採ることができる。あるいは、固体支持体（複数可）は、シリカチップ、マイクロ粒子、ナノ粒子、プレートおよびアレイを含む。固体支持体は、ビーズ（例えば、シリカゲル、制御されたポアガラス、磁性ビーズ、Dynabeads、Wang樹脂；Merrifield樹脂、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ等）、キャピラリー、ガラス繊維フィルター等の平坦な支持体、ガラス表面、金属表面（鋼、金、銀、アルミニウム、シリコンおよび銅）、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、フィルター、膜、マイクロウェルプレート、スライドその他を含み得、マルチウェルプレートも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、ポリフッ化ビニリデンでできた）、ウエハ、コーム、ピンもしくは針（例えば、コンビナトリアル合成または分析に適したピンのアレイ）またはウエハ（例えば、シリコンウエハ）等の平坦な表面のピットもしくはナノリットルウェルのアレイにおけるビーズ、フィルター底部ありもしくはなしのピットを有するウエハを含み得る。

30

40

#### 【0047】

ポリマー（タンパク質を含む）アレイ合成に適用可能な方法および技法は、全てここに

50

参照によりそれらの内容全体をあらゆる目的のために援用する、米国特許公開第20050074787号、WO00/58516、米国特許第5,143,854号、同第5,242,974号、同第5,252,743号、同第5,324,633号、同第5,384,261号、同第5,405,783号、同第5,424,186号、同第5,451,683号、同第5,482,867号、同第5,491,074号、同第5,527,681号、同第5,550,215号、同第5,571,639号、同第5,578,832号、同第5,593,839号、同第5,599,695号、同第5,624,711号、同第5,631,734号、同第5,795,716号、同第5,831,070号、同第5,837,832号、同第5,856,101号、同第5,858,659号、同第5,936,324号、同第5,968,740号、同第5,974,164号、同第5,981,185号、同第5,981,956号、同第6,025,601号、同第6,033,860号、同第6,040,193号、同第6,090,555号、同第6,136,269号、同第6,269,846号および同第6,428,752号、PCT公開番号WO99/36760およびWO01/58593に記載されている。特異的な実施形態における合成技法について記載する特許は、米国特許第5,412,087号、同第6,147,205号、同第6,262,216号、同第6,310,189号、同第5,889,165号および同第5,959,098号を含む。核酸アレイは、上述の特許の多くに記載されているが、同技法の多くは、ポリペプチドアレイに適用することができる。追加的な例示的な基材は、米国特許第5,744,305号ならびに米国特許公開第20090149340号および同第20080038559号に開示されている。

#### 【0048】

支持体への標識された核酸の付着は、アミン-チオール架橋、マレイミド架橋、N-ヒドロキシスクシンイミドもしくはN-ヒドロキシスルホスクシンイミド、ZenonまたはSiteClickを含み得る。支持体への標識された核酸の付着は、複数の標識された核酸へのビオチンの付着と、ストレプトアビジン(streptavidin)による1個または複数のビーズのコーティングを含み得る。

#### 【0049】

場合によっては、固体支持体は、分子足場を含み得る。例示的な分子足場は、抗体、抗原、親和性試薬、ポリペプチド、核酸、細胞小器官その他を含み得る。分子足場は、一体に連結することができる(例えば、固体支持体は、複数の接続された分子足場を含み得る)。分子足場は、アミノ酸リンカー、核酸リンカー、小分子連結(例えば、ビオチンおよびアビジン)および/またはマトリクス連結(例えば、PEGまたはグリセロール)により一体に連結することができる。連結は、非共有結合となり得る。連結は、共有結合となり得る。場合によっては、分子足場は、連結されていない場合もある。本開示の方法において、複数の個々の分子足場を使用することができる。

#### 【0050】

場合によっては、支持体は、ナノ粒子を含み得る。ナノ粒子は、ニッケル、金、銀、炭素、銅、シリケート(silicate)、コバルト白金、酸化亜鉛、二酸化ケイ素結晶および/または銀ナノ粒子となり得る。それに代えてまたはそれに加えて、ナノ粒子は、多孔性酸化マンガンに包埋された金ナノ粒子となり得る。ナノ粒子は、鉄ナノ粒子となり得る。ナノ粒子は、炭素のナノ粒子を散りばめたナノテトラポッドとなり得る。

#### 【0051】

支持体は、ポリマーを含み得る。ポリマーは、マトリクスを含み得る。マトリクスは、1個または複数のビーズをさらに含み得る。ポリマーは、PEG、グリセロール、多糖またはこれらの組合せを含み得る。ポリマーは、プラスチック、ゴム、ナイロン、シリコン、ネオプレンおよび/またはポリスチレンとなり得る。ポリマーは、天然ポリマーとなり得る。天然ポリマーの例として、セラック、琥珀、羊毛、絹、セルロースおよび天然ゴムが挙げられるがこれらに限定されない。ポリマーは、合成ポリマーとなり得る。合成ポリマーの例として、合成ゴム、フェノールホルムアルデヒド樹脂(またはBakelite

e)、ネオプレン、ナイロン、ポリ塩化ビニル(PVCまたはビニル)、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアクリロニトリル、PVBおよびシリコンが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0052】

支持体は、半固体支持体となり得る。支持体は、ゲル(例えば、ヒドロゲル)を含み得る。用語「ヒドロゲル」、「ゲル」その他は、本明細書において互換的に使用され、易流動性液体ではなく、固体でもないが、重量で0.5%またはそれを超え、好ましくは40%未満のゲル形成溶質材料および95%またはそれに満たず、好ましくは55%を超える水で構成されるゲルである材料を指すことができる。本発明のゲルは、好ましくは合成溶質であり(ただし、例えばゼラチン形成のために天然溶質となり得る)、水に結合、捕捉、吸収および/または他の仕方で保持し、これにより、結合および非結合水を含む水と組み合わせたゲルを作製する相互接続されたセルを形成する溶質の使用によって形成することができる。ゲルは、本発明のヒドロゲルパッチの基礎構造となることができ、酵素および塩等、ゲル形成溶質材料および水を越えた追加的な成分を含み、このような成分は、本明細書にさらに記載されている。ゲルは、ポリマーゲルとなり得る。

10

#### 【0053】

固体支持体は、構造化されたナノ構造を含み得る。例えば、構造化されたナノ構造は、細胞および/または細胞の内容物を捕捉するためのオリゴヌクレオチドを含み得る捕捉容器(例えば、小型化されたハニカム)を含み得る。場合によっては、構造化されたナノ構造は、外因性試薬の添加を必要としない場合もある。

20

#### 【0054】

場合によっては、支持体は、ビーズを含む。ビーズは、核酸を固定化し得る(例えば、共有結合または非共有結合により)プラスチック、セラミック、金属またはポリマー材料で構成された固体または中空の球、ボール、ベアリング、シリンダーまたは他の同様の構成のいずれかの種類を包含することができる。ビーズは、ナイロン弦(単数または複数)を含み得る。ビーズは、球状の形状となり得る。ビーズは、非球状の形状となり得る。ビーズは研磨加工されていなくてよい、または研磨加工されている場合、研磨加工されたビーズは、処理前(例えば、アルキル化剤による)に粗面化されていてよい。ビーズは、球状(例えば、マイクロスフェア)となり得るまたは不規則な形状を有し得る別々の粒子を含み得る。ビーズは、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、ポリスチレン、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、ナイロンその他等が挙げられるがこれらに限定されない、種々の材料を含み得る。ビーズは、1種または複数の支持体に付着させるまたはその中に包埋することができる。ビーズは、ゲルまたはヒドロゲルに付着させることができる。ビーズは、ゲルまたはヒドロゲルの中に包埋することができる。ビーズは、マトリクスに付着させることができる。ビーズは、マトリクスの中に包埋することができる。ビーズは、ポリマーに付着させることができる。ビーズは、ポリマーの中に包埋することができる。支持体(例えば、ゲル、マトリクス、足場またはポリマー)内におけるビーズの空間的ポジションは、位置アドレスとして機能するビーズに存在するオリゴヌクレオチドを使用して同定することができる。ビーズの例として、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、Dyna beads(登録商標)、MACS(登録商標)マイクロビーズ、抗体がコンジュゲートしたビーズ(例えば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ)、プロテインAがコンジュゲートしたビーズ、プロテインGがコンジュゲートしたビーズ、プロテインA/Gがコンジュゲートしたビーズ、プロテインLがコンジュゲートしたビーズ、オリゴdTがコンジュゲートしたビーズ、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およびBcMag(商標)カルボキシ末端の磁性ビーズが挙げられるがこれらに限定されない。ビーズの直径は、約5 $\mu$ m、10 $\mu$ m、20 $\mu$ m、25 $\mu$ m、30 $\mu$ m、35 $\mu$ m、40 $\mu$ m、45 $\mu$ mまたは50 $\mu$ mとなり得る。ビーズは、DNAおよびRNA等、生物学的粒子および高分子の固定化のための表面積増加をもたらす得るいずれかの三次元構造を指すことができる。

30

40

50

## 【0055】

支持体は、多孔性となり得る。支持体は、透過性または半透性となり得る。支持体は、固体となり得る。支持体は、半固体となり得る。支持体は、可鍛性となり得る。支持体は、可撓性となり得る。場合によっては、支持体は、ある形状に成形することができる。例えば、支持体を物体の上に置くことができ、この支持体は、この物体の形状を採ることができる。場合によっては、支持体は、臓器の上に置かれ、臓器の形状を採る。場合によっては、支持体は、3D印刷により生成される。

## 【0056】

支持体（例えば、ビーズ、ナノ粒子）は、少なくとも約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、100、500、1000もしくは2000マイクロメートルまたはそれを超える直径となり得る。固体支持体（例えば、ビーズ）は、最大でも約0.1、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、100、500、1000もしくは2000マイクロメートルまたはそれを超える直径となり得る。ビーズの直径は、約20ミクロンとなり得る。

## 【0057】

場合によっては、固体支持体は、デンドリマーを含む。デンドリマーは、ビーズよりも小さくなることができる。デンドリマーは、細胞未満（subcellular）となり得る。デンドリマーは、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2または0.1ミクロン未満の直径となり得る。デンドリマーは、0.09、0.08、0.07、0.06、0.05、0.04、0.03または0.01ミクロン未満の直径となり得る。デンドリマーは、3種の主要な部分、コア、内殻および外殻を含み得る。デンドリマーは、これらの部分のそれぞれにおいて異なる機能性を有するように合成することができる。デンドリマーの部分の異なる機能性は、特定の適用のための溶解性、熱安定性および化合物の付着等、特性を制御することができる。デンドリマーは、合成により加工することができる。デンドリマーは、分岐的合成（divergent synthesis）により合成することができる。分岐的合成は、一連の反応によって外向きに伸長される多機能性コアからデンドリマーを組み立てることを含み得る。分岐的合成は、一連のマイケル反応を含み得る。あるいは、デンドリマーは、収束的合成により合成することができる。収束的合成は、最終的に球の表面となる小分子からのデンドリマーの建設を含み得、反応は、内向きに進むことができ、コアに最終的に付着する。デンドリマーは、クリックケミストリーにより調製することもできる。クリックケミストリーは、ディールス・アルダー反応、チオール・イミン反応、アジド・アルキン反応またはこれらの組合せを含み得る。デンドリマーの例として、ポリ（アミドアミン）（PAMAM）デンドリマー、PEG-コアデンドリマー（dendri mer）、亜リン酸デンドリマー、ポリプロピレンイミンデンドリマーおよびポリリシンデンドリマーが挙げられるがこれらに限定されない。デンドリマーは、キラルデンドリマーとなり得る。あるいは、デンドリマーは、アキラルデンドリマーとなり得る。

## 【0058】

固体支持体は、デンドリマーの一部を含み得る。デンドリマーの部分は、デンドロンを含み得る。デンドロンは、焦点において複数の末端基および単一の反応官能基を有する単分散楔型デンドリマーセクションを含み得る。固体支持体は、ポリエステルデンドロン（dendrom）を含み得る。デンドロンの例として、ポリエステル-8-ヒドロキシル-1-アセチレンビス-MPAデンドロン、ポリエステル-16-ヒドロキシル-1-アセチレンビス-MPAデンドロン、ポリエステル-32-ヒドロキシル-1-アセチレンビス-MPAデンドロン、ポリエステル-8-ヒドロキシル-1-カルボキシルビス-MPAデンドロン、ポリエステル-16-ヒドロキシル-1-カルボキシルビス-MPAデンドロンおよびポリエステル-32-ヒドロキシル-1-カルボキシルビス-MPAデンドロンが挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0059】

固体支持体は、超分岐ポリマー（hyperbranched polymer）を含

み得る。超分岐ポリマーは、デンドリマー様特性を保持する多分散樹状高分子を含み得る。多くの場合、超分岐ポリマーは、単一の合成重合ステップにおいて調製される。超分岐ポリマーは、2, 2-ビス(ヒドロキシメチル)プロパン酸(ビス-MPA)モノマーに基づくことができる。超分岐ポリマーの例として、超分岐ビス-MPAポリエステル-16-ヒドロキシル、超分岐ビス-MPAポリエステル-32-ヒドロキシルおよび超分岐ビス-MPAポリエステル-64-ヒドロキシルが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0060】

固体支持体は、アレイまたはマイクロアレイとなり得る。固体支持体は、別々の領域を含み得る。固体支持体は、アドレス可能なアレイとなり得る。場合によっては、アレイは、固体表面に固定された複数のプローブを含む。複数のプローブは、固体表面への標識された分子および／または標識されたアンプリコンのハイブリダイゼーションを可能にする。複数のプローブは、標識された分子および／または標識されたアンプリコンの少なくとも一部に相補的な配列を含む。場合によっては、複数のプローブは、試料タグ、分子識別子標識、核酸またはこれらの組合せの少なくとも一部に相補的な配列を含む。他の事例では、複数のプローブは、核酸への試料タグまたは分子識別子標識の付着によって形成される接合部に相補的な配列を含む。

#### 【0061】

アレイは、1種または複数のプローブを含み得る。プローブは、種々のフォーマットのものとなり得る。アレイは、標的核酸の少なくとも一部に相補的な配列および試料タグまたは分子識別子標識の特有の識別子領域に相補的な配列を含むプローブを含み得、試料タグまたは分子識別子標識は、オリゴヌクレオチドを含む。標的核酸の少なくとも一部に相補的な配列は、アレイに付着させることができる。特有の識別子領域に相補的な配列は、アレイに付着させることができる。アレイは、標的核酸の少なくとも一部に相補的な配列を含む第1のプローブと、特有の識別子領域に相補的な第2のプローブとを含み得る。確率論的に標識された核酸をアレイにハイブリダイズさせることができる様々な仕方がある。例えば、特有の識別子領域および確率論的に標識された核酸の標的核酸の接合部は、アレイにおけるプローブにハイブリダイズすることができる。アレイにおけるプローブにハイブリダイズし得る確率論的に標識された核酸の領域にはギャップが存在し得る。確率論的に標識された核酸の異なる領域は、アレイにおける2種またはそれを超えるプローブにハイブリダイズすることができる。よって、アレイプローブは、多くの異なるフォーマットのものとなり得る。アレイプローブは、特有の識別子領域に相補的な配列、標的核酸に相補的な配列またはこれらの組合せを含み得る。アレイへの確率論的に標識された核酸のハイブリダイゼーションは、種々の仕方で行き得る。例えば、確率論的に標識された核酸の2個またはそれを超えるヌクレオチドは、アレイにおける1種または複数のプローブにハイブリダイズすることができる。プローブにハイブリダイズする確率論的に標識された核酸の2個またはそれを超えるヌクレオチドは、連続的ヌクレオチド、非連続的ヌクレオチドまたはこれらの組合せとなり得る。プローブにハイブリダイズされる確率論的に標識された核酸は、本技術分野において公知のいずれかの方法によって検出することができる。例えば、確率論的に標識された核酸は、直接的に検出することができる。確率論的に標識された核酸の直接的検出は、フルオロフォア、ハプテンまたは検出可能な標識の検出を含み得る。確率論的に標識された分子は、間接的に検出することができる。確率論的に標識された核酸の間接的検出は、ライゲーションまたは他の酵素によるもしくは酵素によらない方法を含み得る。

#### 【0062】

アレイは、種々のフォーマットのものとなり得る。例えば、アレイは、16-、32-、48-、64-、80-、96-、112-、128-、144-、160-、176-、192-、208-、224-、240-、256-、272-、288-、304-、320-、336-、352-、368-、384-または400-フォーマットのものとなり得る。あるいは、アレイは、8×60K、4×180K、2×400K、1×1Mフォーマットのものである。他の事例では、アレイは、8×15K、4×44K、2

×105K、1×244Kフォーマットのものである。

#### 【0063】

アレイは、単一のアレイを含み得る。単一のアレイは、単一の基材上にあり得る。あるいは、アレイは、複数の基材上にあり得る。アレイは、複数のフォーマットを含み得る。アレイは、複数のアレイを含み得る。複数のアレイは、2個またはそれを超えるアレイを含み得る。例えば、複数のアレイは、少なくとも約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または100個のアレイを含み得る。場合によっては、複数のアレイのうち少なくとも2個のアレイは同一である。あるいは、複数のアレイのうち少なくとも2個のアレイは異なる。

10

#### 【0064】

場合によっては、アレイは、対称的なチャンバーを有する区域を含む。例えば、アレイは、0.5×0.5ミリメートル(mm)、1×1mm、1.5×1.5mm、2×2mm、2.5×2.5mm、3×3mm、3.5×3.5mm、4×4mm、4.5×4.5mm、5×5mm、5.5×5.5mm、6×6mm、6.5×6.5mm、7×7mm、7.5×7.5mm、8×8mm、8.5×8.5mm、9×9mm、9.5×9.5mm、10×10mm、10.5×10.5mm、11×11mm、11.5×11.5mm、12×12mm、12.5×12.5mm、13×13mm、13.5×13.5mm、14×14mm、14.5×14.5mm、15×15mm、15.5×15.5mm、16×16mm、16.5×16.5mm、17×17mm、17.5×17.5mm、18×18mm、18.5×18.5mm、19×19mm、19.5×19.5mmまたは20×20mmのチャンバーを有する区域を含む。場合によっては、アレイは、6.5×6.5mmのチャンバーを有する区域を含む。あるいは、アレイは、非対称的なチャンバーを有する区域を含む。例えば、アレイは、6.5×0.5mm、6.5×1mm、6.5×1.5mm、6.5×2mm、6.5×2.5mm、6.5×3mm、6.5×3.5mm、6.5×4mm、6.5×4.5mm、6.5×5mm、6.5×5.5mm、6.5×6mm、6.5×6.5mm、6.5×7mm、6.5×7.5mm、6.5×8mm、6.5×8.5mm、6.5×9mm、6.5×9.5mm、6.5×10mm、6.5×10.5mm、6.5×11mm、6.5×11.5mm、6.5×12mm、6.5×12.5mm、6.5×13mm、6.5×13.5mm、6.5×14mm、6.5×14.5mm、6.5×15mm、6.5×15.5mm、6.5×16mm、6.5×16.5mm、6.5×17mm、6.5×17.5mm、6.5×18mm、6.5×18.5mm、6.5×19mm、6.5×19.5mmまたは6.5×20mmのチャンバーを有する区域を含む。

20

30

#### 【0065】

アレイは、少なくとも約1ミクロン(μm)、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、10μm、15μm、20μm、25μm、30μm、35μm、40μm、45μm、50μm、55μm、60μm、65μm、70μm、75μm、80μm、85μm、90μm、95μm、100μm、125μm、150μm、175μm、200μm、225μm、250μm、275μm、300μm、325μm、350μm、375μm、400μm、425μm、450μm、475μmまたは500μmのスポットを含み得る。場合によっては、アレイは、70μmのスポットを含む。

40

#### 【0066】

アレイは、少なくとも約1μm、2μm、3μm、4μm、5μm、6μm、7μm、8μm、9μm、10μm、15μm、20μm、25μm、30μm、35μm、40μm、45μm、50μm、55μm、60μm、65μm、70μm、75μm、80μm、85μm、90μm、95μm、100μm、125μm、150μm、175μm、200μm、225μm、250μm、275μm、300μm、325μm、350μm、375μm、400μm、425μm、450μm、475μm、500μm、

50

525  $\mu\text{m}$ 、550  $\mu\text{m}$ 、575  $\mu\text{m}$ 、600  $\mu\text{m}$ 、625  $\mu\text{m}$ 、650  $\mu\text{m}$ 、675  $\mu\text{m}$ 、700  $\mu\text{m}$ 、725  $\mu\text{m}$ 、750  $\mu\text{m}$ 、775  $\mu\text{m}$ 、800  $\mu\text{m}$ 、825  $\mu\text{m}$ 、850  $\mu\text{m}$ 、875  $\mu\text{m}$ 、900  $\mu\text{m}$ 、925  $\mu\text{m}$ 、950  $\mu\text{m}$ 、975  $\mu\text{m}$ 、1000  $\mu\text{m}$ の特色ピッチを含み得る。場合によっては、アレイは、161  $\mu\text{m}$ の特色ピッチを含む。

#### 【0067】

アレイは、1種または複数のプローブを含み得る。場合によっては、アレイは、少なくとも約5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90または100種のプローブを含む。あるいは、アレイは、少なくとも約200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900または3000種のプローブを含む。アレイは、少なくとも約3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500または10000種のプローブを含み得る。場合によっては、アレイは、少なくとも約960種のプローブを含む。あるいは、アレイは、少なくとも約2780種のプローブを含む。プローブは、複数のオリゴヌクレオチドタグに特異的となり得る。プローブは、複数のオリゴヌクレオチドタグの少なくとも一部に特異的となり得る。プローブは、複数のオリゴヌクレオチドタグの総数の少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%または100%に特異的となり得る。あるいは、プローブは、複数のオリゴヌクレオチドタグの異なるオリゴヌクレオチドタグの総数の少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%または100%に特異的である。プローブは、オリゴヌクレオチドとなり得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約1、2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100ヌクレオチド長となり得る。他の事例では、プローブは、非特異的プローブである。例えば、プローブは、標識された分子に付着させた検出可能な標識に特異的となり得る。プローブは、ストレプトアビジンとなり得る。

#### 【0068】

アレイは、印刷されたアレイとなり得る。場合によっては、印刷されたアレイは、基材に付着させた1種または複数のオリゴヌクレオチドを含む。例えば、印刷されたアレイは、エポキシシラン基材に付着させた5'アミン修飾オリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0069】

あるいは、アレイは、1個または複数のウェルを有するスライドを含む。スライドは、少なくとも約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または100個のウェルを含み得る。あるいは、スライドは、少なくとも約125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、650、700、750、800、850、900、950または1000個のウェルを含む。場合によっては、スライドは、16個のウェルを含む。あるいは、スライドは、96個のウェルを含む。他の事例では、スライドは、少なくとも約80、160、240、320、400、480、560、640、720、800、880または960個のウェルを含む。

#### 【0070】

場合によっては、固体支持体は、Affymetrix 3Kタグアレイ、Array jet 非接触印刷されたアレイまたはApplied Microarrays Inc (AMI) アレイである。あるいは、支持体は、接触プリンタ、インパクトプリンタ、ドットプリンタまたはピンプリンタを含む。

#### 【0071】

固体支持体は、マイクロウェルにおいて自己集合するビーズの使用を含み得る。例えば、固体支持体は、IlluminaのBead Array Technologyを含む

。あるいは、固体支持体は、Abbott MolecularのBead Array technologyおよびApplied MicroarrayのFlexiPlate (商標) システムを含む。

#### 【0072】

他の事例では、固体支持体は、プレートである。プレートの例として、MSDマルチアレイプレート、MSD Multi-Spot (登録商標) プレート、マイクロプレート、ProteOnマイクロプレート、AlphaPlate、DELTAプレート、IsoPlateおよびLumaPlateが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0073】

方法は、複数の標識された核酸のうち少なくとも1種を支持体に付着させるステップをさらに含み得る。支持体は、複数のビーズを含み得る。支持体は、アレイを含み得る。支持体は、スライドガラスを含み得る。

#### 【0074】

スライドガラスは、1個または複数のウェルを含み得る。1個または複数のウェルは、スライドガラス上にエッチングされ得る。1個または複数のウェルは、少なくとも960個のウェルを含み得る。スライドガラスは、1種または複数のプローブを含み得る。1種または複数のプローブは、スライドガラス上に印刷することができる。1個または複数のウェルは、1種または複数のプローブをさらに含み得る。1種または複数のプローブは、1個または複数のウェル内に印刷することができる。1種または複数のプローブは、960種の核酸を含み得る。

#### 【0075】

本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートにおいて複数の第1の試料タグ、複数の第2の試料タグ、複数の分子識別子標識またはこれらのいずれかの組合せを分布させるステップをさらに含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートにおいて1個または複数のビーズを分布させるステップをさらに含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートの複数のウェルにおいて複数の試料を分布させるステップをさらに含み得る。複数の試料のうち1種または複数の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数の核酸を含み得る。方法は、1個またはそれより少ない細胞を複数のウェルに分布させるステップをさらに含み得る。複数の細胞は、マイクロウェルプレートにおいて溶解することができる。方法は、マイクロウェルプレートにおいてcDNAを合成するステップをさらに含み得る。cDNAの合成は、mRNAの逆転写を含み得る。マイクロウェルプレートは、ソフトリソグラフィーによりPDMSにおいて製作された、シリコンウエハにおいてエッチングされた、スライドガラスにおいてエッチングされた、スライドガラスにおいてパターン形成されたフォトレジストまたはこれらの組合せであるマイクロウェルプレートを含み得る。マイクロウェルは、マイクロキャピラリープレートに孔を含み得る。マイクロウェルプレートは、油中水型エマルジョンを含み得る。マイクロウェルプレートは、少なくとも1個または複数のウェルを含み得る。マイクロウェルプレートは、少なくとも約6個のウェル、12個のウェル、48個のウェル、96個のウェル、384個のウェル、960個のウェルまたは1000個のウェルを含み得る。

#### 【0076】

方法およびキットは、チップをさらに含み得る。マイクロウェルプレートは、チップに付着させることができる。チップは、少なくとも約6個のウェル、12個のウェル、48個のウェル、96個のウェル、384個のウェル、960個のウェル、1000個のウェル、2000個のウェル、3000個のウェル、4000個のウェル、5000個のウェル、6000個のウェル、7000個のウェル、8000個のウェル、9000個のウェル、10,000個のウェル、20,000個のウェル、30,000個のウェル、40,000個のウェル、50,000個のウェル、60,000個のウェル、70,000個のウェル、80,000個のウェル、90,000個のウェル、100,000個のウェル、200,000個のウェル、500,000個のウェルまたは百万個のウェルを含

み得る。ウェルは、少なくとも約300ミクロン<sup>2</sup>、400ミクロン<sup>2</sup>、500ミクロン<sup>2</sup>、600ミクロン<sup>2</sup>、700ミクロン<sup>2</sup>、800ミクロン<sup>2</sup>、900ミクロン<sup>2</sup>、1000ミクロン<sup>2</sup>、1100ミクロン<sup>2</sup>、1200ミクロン<sup>2</sup>、1300ミクロン<sup>2</sup>、1400ミクロン<sup>2</sup>、1500ミクロン<sup>2</sup>の面積を含み得る。方法は、チップに約10,000~30,000種の間の試料を分布させるステップをさらに含み得る。

#### 【0077】

官能化された表面およびオリゴヌクレオチド

ビーズは、官能化された表面を含み得る。官能化された表面は、官能基を含む固体支持体の表面を指すことができる。官能基は、別の官能基との付着を形成することができる基となり得る。例えば、官能基は、ストレプトアビジン（別の官能基）との付着を形成することができるビオチンとなり得る。例示的な官能基として、アルデヒド、ケトン、カルボキシ基、アミノ基、ビオチン、ストレプトアビジン、核酸、小分子（例えば、クリックケミストリーのため）、ホモおよびヘテロ二官能性試薬（例えば、N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノペンゾエート（S I A B）、ジマレイミド、ジチオービスニトロ安息香酸（D T N B）、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート（S A T A）、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（S P D P）、スクシンイミジル4-（N-マレイミド（ma f e i m i d o）メチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（S M C C）および6-ヒドラジノニコチミド（H Y N I C）ならびに抗体を挙げることができるがこれらに限定されない。場合によっては、官能基は、カルボキシ基（例えば、C O O H）である。

#### 【0078】

オリゴヌクレオチド（例えば、核酸）は、官能化された固体支持体に付着させることができる。固体支持体または同様の構造上の固定化されたオリゴヌクレオチドは、核酸プローブとして機能することができ、ハイブリダイゼーションアッセイを実行することができ、複合生物学的試料において特異的な標的核酸を検出することができる。

#### 【0079】

オリゴヌクレオチドの固定化のために、固体支持体（例えば、ビーズ）を官能化することができる。オリゴヌクレオチドは、固体支持体およびオリゴヌクレオチドの間に形成される共有結合性アミド結合により固体支持体にコンジュゲートすることができる。

#### 【0080】

支持体は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900もしくは1000種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも約100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000、1000000、2000000、3000000、4000000、5000000、6000000、7000000、8000000、9000000もしくは10000000、100000000、1000000000種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも約100000、200000、300000、400000、500000、600000、700000、800000、900000、1000000、2000000、3000000、4000000、5000000、6000000、7000000、8000000、9000000もしくは10000000、100000000、500000000、10000000000種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも百万種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも1千万種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも2千5百万種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも5千万種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも1億種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも2億5千万種のオリゴヌクレオチドにコン

ジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも5億種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも7億5千万種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも約10億、20億、30億、40億、50億、60億、70億、80億、90億、100億、110億、120億、130億、140億または150億種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも10億種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。支持体は、少なくとも50億種のオリゴヌクレオチドにコンジュゲートすることができる。

#### 【0081】

オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して支持体（例えば、ビーズ、ポリマー、ゲル）に付着させることができる。コンジュゲーションは、共有結合または非共有結合による付着を含み得る。コンジュゲーションは、ビーズおよび核酸の間に可変スペーサーを導入することができる。支持体およびオリゴヌクレオチドの間のリンカーは、切断可能となり得る（例えば、光切断可能連結、酸に不安定なリンカー、感熱性リンカーおよび酵素により切断可能なリンカー）。

#### 【0082】

支持体に分子をコンジュゲートするための使用のための架橋剤は、固体支持体の表面に存在する官能基および分子に存在する官能基と反応することができる薬剤を含み得る。かかる反応性となり得る試薬は、アルデヒド、ケトン、カルボキシ基、アミノ基、ビオチン、ストレプトアビジン、核酸、小分子（例えば、クリックケミストリーのため）、ホモおよびヘテロ二官能性試薬（例えば、N-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート（S I A B）、ジマレイミド、ジチオービス-ニトロ安息香酸（D T N B）、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート（S A T A）、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（S P D P）、スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（S M C C）および6-ヒドラジノニコチミド（H Y N I C）を含み得る。

#### 【0083】

ビーズは、カルボキシ官能基で官能化することができ、オリゴヌクレオチドは、アミノ官能基で官能化することができる。

#### 【0084】

支持体は、滑らかとなり得る。それに代えてまたはそれに加えて、支持体は、窪み（d i v e t）、隆線またはウェルを含み得る。支持体は、マイクロウェルアレイを含み得る。マイクロウェルアレイは、オリゴヌクレオチドの付着を容易にする官能基で官能化することができる。マイクロウェルアレイにおける官能基は、マイクロウェルアレイにおける異なるポジションに対し異なり得る。マイクロウェルアレイにおける官能基は、マイクロウェルアレイの全領域に対し同じになることができる。

#### 【0085】

アッセイシステム成分

マイクロウェルアレイ

上述の通り、マイクロウェルアレイは、画定された容積の小型の反応チャンバー内における単一細胞およびビーズ（細胞1個当たり1個のビーズ）の捕捉に使用される。各ビーズは、細胞の溶解により放出される細胞mRNA分子の総量全体の確率論的標識化およびデジタル計数における使用のためのオリゴヌクレオチドプローブのライブラリーを含む。本開示の一実施形態では、マイクロウェルアレイは、アッセイシステムの消費可能な成分である。他の実施形態では、マイクロウェルアレイは、再利用可能となり得る。いずれの場合でも、マイクロウェルアレイは、手動によるアッセイの実行における使用のためのスタンドアロン型デバイスとして使用されるように構成することができる、またはアッセイ手順の完全もしくは部分的な自動化をもたらす機器の着脱可能なもしくは固定された成分を含むように構成することができる。

#### 【0086】

アレイのマイクロウェルは、各ウェルにおける単一細胞およびビーズの捕捉効率を最適化するために選ばれる種々の形状およびサイズで製作することができる。適切なウェル幾何学として、円柱状、円錐体、半球状、矩形または多角体（例えば、いくつかの平面で構成された三次元的幾何学、例えば、六角柱、八角柱、逆三角錐、逆四角錐、逆五角錐、逆六角錐または逆角錐台）が挙げられるがこれらに限定されない。マイクロウェルは、これらの幾何学のうち2種またはそれ超を組み合わせた形状を含み得る。例えば、一実施形態では、これは、部分的に円柱状となり、残りが逆円錐の形状を有し得る。別の実施形態では、これは、円柱の全長（深さ）にわたり延在する垂直チャネル（即ち、円柱軸に平行な）により接続された、一方が他方よりも大きい直径の2個の並列した円柱を含み得る。一般に、各マイクロウェルの開口端（または口）は、マイクロウェルアレイの上表面に位置するであろうが、一部の実施形態では、開口部は、アレイの下表面に位置してもよい。一般に、マイクロウェルの閉口端（または底部）は、平坦となるであろうが、湾曲した表面（例えば、凸面または凹面）も可能である。一般に、マイクロウェルの形状（およびサイズ）は、マイクロウェルに捕捉しようとする細胞および／またはビーズの種類に基づき決定されるであろう。

10

#### 【0087】

マイクロウェル寸法は、ウェルの直径および深さの観点から特徴付けることができる。本明細書において、マイクロウェルの直径は、マイクロウェル幾何学の平面断面内に刻むことができる最大の丸を指す。本開示の一実施形態では、マイクロウェルの直径は、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の約0.1～約5倍に及び得る。他の実施形態では、マイクロウェル直径は、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の少なくとも0.1倍、少なくとも0.5倍、少なくとも1倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍または少なくとも5倍である。さらに他の実施形態では、マイクロウェル直径は、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の最大でも5倍、最大でも4倍、最大でも3倍、最大でも2倍、最大でも1倍、最大でも0.5倍または最大でも0.1倍である。一実施形態では、マイクロウェル直径は、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の約2.5倍である。当業者であれば、マイクロウェル直径が、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の約0.2倍～約3.5倍）。あるいは、マイクロウェルの直径は、絶対的寸法の観点から特定することができる。本開示の一実施形態では、マイクロウェルの直径は、約5～約50ミクロンに及び得る。他の実施形態では、マイクロウェル直径は、少なくとも5ミクロン、少なくとも10ミクロン、少なくとも15ミクロン、少なくとも20ミクロン、少なくとも25ミクロン、少なくとも30ミクロン、少なくとも35ミクロン、少なくとも40ミクロン、少なくとも45ミクロンまたは少なくとも50ミクロンである。さらに他の実施形態では、マイクロウェル直径は、最大でも50ミクロン、最大でも45ミクロン、最大でも40ミクロン、最大でも35ミクロン、最大でも30ミクロン、最大でも25ミクロン、最大でも20ミクロン、最大でも15ミクロン、最大でも10ミクロンまたは最大でも5ミクロンである。一実施形態では、マイクロウェル直径は、約30ミクロンである。当業者であれば、マイクロウェル直径が、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約28ミクロン～約34ミクロン）。

20

30

40

#### 【0088】

マイクロウェル深さは、ウェル内に含有されるアッセイバッファーおよび他の試薬の効率的な交換も達成しながら、細胞およびビーズの捕捉効率を最適化するように選ばれる。本開示の一実施形態では、マイクロウェルの深さは、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の約0.1～約5倍に及び得る。他の実施形態では、マイクロウェル深さは、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の少なくとも0.1倍、少なくとも0.5倍、少なくとも1倍、少なくとも2倍、

50

少なくとも3倍、少なくとも4倍または少なくとも5倍である。さらに他の実施形態では、マイクロウェル深さは、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の最大でも5倍、最大でも4倍、最大でも3倍、最大でも2倍、最大でも1倍、最大でも0.5倍または最大でも0.1倍である。一実施形態では、マイクロウェル深さは、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の約2.5倍である。当業者であれば、マイクロウェル深さが、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、マイクロウェル内に捕捉しようとする細胞および／またはビーズの直径の約0.2倍～約3.5倍）。あるいは、マイクロウェルの直径は、絶対的寸法の観点から特定することができる。本開示の一実施形態では、マイクロウェルの深さは、約10～約60ミクロンに及び得る。他の実施形態では、マイクロウェル深さは、少なくとも10ミクロン、少なくとも20ミクロン、少なくとも25ミクロン、少なくとも30ミクロン、少なくとも35ミクロン、少なくとも40ミクロン、少なくとも50ミクロンまたは少なくとも60ミクロンである。さらに他の実施形態では、マイクロウェル深さは、最大でも60ミクロン、最大でも50ミクロン、最大でも40ミクロン、最大でも35ミクロン、最大でも30ミクロン、最大でも25ミクロン、最大でも20ミクロンまたは最大でも10ミクロンである。一実施形態では、マイクロウェル深さは、約30ミクロンである。当業者であれば、マイクロウェル深さが、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約24ミクロン～約36ミクロン）。

10

#### 【0089】

20

マイクロウェルアレイのウェルは、一次元、二次元または三次元アレイに配置され、三次元アレイは、例えば、一連の2個またはそれを超える二次元アレイを積み重ねることにより（即ち、マイクロウェルアレイを含む2個またはそれを超える基材を積み重ねることにより）達成することができる。ウェル間のパターンおよびスペーシングは、各ウェルに単一細胞およびビーズを捕捉する効率を最適化すると共に、アレイの単位面積当たりのウェルの数を最大化するように選ばれる。ウェルは、種々のランダムもしくは非ランダムパターンに従って分布されてよく、例えば、アレイ基材の表面にわたって全体的にランダムに分布されてよい、または正方格子、矩形格子もしくは六角格子状に配置されてよい。本開示の一実施形態では、ウェル間の中心間距離（またはスペーシング）は、約15ミクロン～約75ミクロンに変動し得る。他の実施形態では、ウェル間のスペーシングは、少なくとも15ミクロン、少なくとも20ミクロン、少なくとも25ミクロン、少なくとも30ミクロン、少なくとも35ミクロン、少なくとも40ミクロン、少なくとも45ミクロン、少なくとも50ミクロン、少なくとも55ミクロン、少なくとも60ミクロン、少なくとも65ミクロン、少なくとも70ミクロンまたは少なくとも75ミクロンである。さらに他の実施形態では、マイクロウェルスペーシングは、最大でも75ミクロン、最大でも70ミクロン、最大でも65ミクロン、最大でも60ミクロン、最大でも55ミクロン、最大でも50ミクロン、最大でも45ミクロン、最大でも40ミクロン、最大でも35ミクロン、最大でも30ミクロン、最大でも25ミクロン、最大でも20ミクロンまたは最大でも15ミクロンである。一実施形態では、マイクロウェルスペーシングは、約55ミクロンである。当業者であれば、マイクロウェル深さが、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約18ミクロン～約72ミクロン）。

30

40

#### 【0090】

マイクロウェルアレイは、ウェルへと細胞およびビーズをガイドすることに役立つならびに／またはウェル間の表面に沈降することを防ぐように設計されたマイクロウェル間の表面特色を含み得る。適した表面特色の例として、ウェルを取り囲むおよび／またはウェル間の表面にまたがるドーム、隆線またはピークがある表面特色が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0091】

マイクロウェルアレイにおけるウェルの総数は、ウェルのパターンおよびスペーシング

50

ならびにアレイの全体的寸法により決定される。本開示の一実施形態では、アレイにおけるマイクロウェルの数は、約 96 ～ 約 5,000,000 個またはそれ超に及び得る。他の実施形態では、アレイにおけるマイクロウェルの数は、少なくとも 96、少なくとも 384、少なくとも 1,536、少なくとも 5,000、少なくとも 10,000、少なくとも 25,000、少なくとも 50,000、少なくとも 75,000、少なくとも 100,000、少なくとも 500,000、少なくとも 1,000,000 または少なくとも 5,000,000 個である。さらに他の実施形態では、アレイにおけるマイクロウェルの数は、最大でも 5,000,000、最大でも 1,000,000、最大でも 75,000、最大でも 50,000、最大でも 25,000、最大でも 10,000、最大でも 5,000、最大でも 1,536、最大でも 384 または最大でも 96 ウェルである。一実施形態では、アレイにおけるマイクロウェルの数は、約 96 個である。別の実施形態では、マイクロウェルの数は、約 150,000 個である。当業者であれば、アレイにおけるマイクロウェルの数が、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約 100 ～ 325,000 個）。

10

#### 【0092】

マイクロウェルアレイは、当業者に公知の多数の製作技法のいずれかを使用して製作することができる。使用することができる製作方法の例として、フォトリソグラフィおよび湿式化学エッチング、プラズマエッチングまたはディープ反応性イオンエッチング等、バルク微細加工技法；マイクロ成形およびマイクロエンボス加工；レーザー微細加工；3D 印刷または硬化性材料を使用した他の直接書き込み製作プロセス；ならびに同様の技法

20

#### 【0093】

マイクロウェルアレイは、当業者に公知の多数の基材材料のいずれかから製作することができ、材料の選択は典型的に、製作技法の選択に依存し、その逆もまた同じである。適した材料の例として、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリマー（例えば、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、ポリジメチルシロキサン（PDMS；エラストマー）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリイミド、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）およびエポキシ樹脂）、金属または金属フィルム（例えば、アルミニウム、ステンレス鋼、銅、ニッケル、クロムおよびチタン）その他が挙げられるがこれらに限定されない。典型的には、マイクロウェルアレイの製作には親水性材料が望ましいが（湿潤性を増強し、細胞および他の生物学的材料の非特異的結合を最小化するために）、処理またはコーティングすることができる（例えば、酸素プラズマ処理またはポリエチレンオキシド表層のグラフトによる）疎水性材料を使用することもできる。デバイス中に捕捉された気泡のキャピラリーウィッキング／放出を容易にするために、マイクロウェルアレイの製作のための多孔性親水性材料の使用が望ましくなり得る。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、光学接着剤により製作される。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、プラズマまたはコロナ処理された材料により製作される。プラズマまたはコロナ処理された材料の使用は、材料を親水性にすることができる。一部の実施形態において、親水性材料等、プラズマまたはコロナ処理された材料は、処理されていない材料よりも安定的になることができる。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、単一の材料から製作される。他の実施形態では、マイクロウェルアレイは、一体に結合されたまたは機械的に連結された 2 種またはそれを超える異なる材料を含み得る。

30

40

#### 【0094】

種々の表面処理および表面修飾技法を使用して、マイクロウェルアレイ表面の特性を変更することができる。例として、疎水性材料表面をより親水性にするための酸素プラズマ処理、ガラスおよびシリコン表面を滑面化（または粗面化）するためのウェットまたはドライエッチング技法の使用、より親水性にし、生体分子および細胞が非特異的吸着する傾向を少なくする基材表面へのポリエチレンオキシドまたは他のポリマー層の吸着および／

50

またはグラフト、他の方法で不活性なシリコンおよびガラス表面へと化学的反応性官能基をグラフトするためのシラン反応の使用等が挙げられるがこれらに限定されない。光脱保護技法を使用して、アレイ構造の特異的な位置における化学的反応性官能基を選択的に活性化することができ、例えば、マイクロウェルの内壁における第一級アミンまたはカルボキシル基等、化学的反応性官能基の選択的付加または活性化を使用して、マイクロウェルの壁にオリゴヌクレオチドプローブ、ペプチド、タンパク質または他の生体分子を共有結合によりカップリングすることができる。一般に、利用されている表面処理または表面修飾の選択は、所望の表面特性の種類およびマイクロウェルアレイを作製する材料の種類に両方に依存するであろう。

#### 【0095】

10

一部の実施形態では、例えば、細胞溶解ステップの際にマイクロウェルの開口部を封着して、隣接マイクロウェル間の標的核酸のクロスハイブリダイゼーションを防ぐことが有利になり得る。マイクロウェルは、固体支持体またはビーズ等、キャップを使用して封着することができ、その場合、ビーズの直径は、マイクロウェルの直径よりも大きい。例えば、キャップとして使用されるビーズは、マイクロウェルの直径よりも少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80または90%大きくなり得る。あるいは、キャップは、マイクロウェルの直径よりも最大でも約10、20、30、40、50、60、70、80または90%大きくなり得る。

#### 【0096】

20

キャップとして使用されるビーズは、架橋されたデキストランビーズ（例えば、セファデックス）を含み得る。架橋されたデキストランは、約10マイクロメートル～約80マイクロメートルに及び得る。ビーズキャップの架橋されたデキストランは、20マイクロメートル～約50マイクロメートルとなり得る。キャップは、例えば、無機ナノポア膜（例えば、酸化アルミニウム）、透析膜、スライドガラス、カバーガラスおよび／または親水性プラスチックフィルム（例えば、溶解バッファーで湿潤化したアガロースの薄膜でコーティングされたフィルム）を含み得る。

#### 【0097】

一部の実施形態では、キャップは、ウェルからの高分子（例えば、核酸）の移動を防ぎつつ、マイクロウェルからバッファーを出し入れすることができる。少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個またはそれを超えるヌクレオチドの高分子は、キャップにより、マイクロウェルから出入りする移動を妨害され得る。最大でも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個またはそれを超えるヌクレオチドの高分子は、キャップにより、マイクロウェルから出入りする移動を妨害され得る。

30

#### 【0098】

一部の実施形態では、封着されたマイクロウェルアレイは、マイクロウェルの頂部に単一の層のビーズを含み得る。一部の実施形態では、封着されたマイクロウェルアレイは、マイクロウェルの頂部に複数の層のビーズを含み得る。封着されたマイクロウェルアレイは、約1、2、3、4、5もしくは6つまたはそれを超える層のビーズを含み得る。

40

#### 【0099】

##### 機械的治具

マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化アッセイを手動で行う場合、機械的治具にマイクロウェルアレイを搭載して、反応チャンバーを作製し、アレイへの細胞懸濁液およびアッセイ試薬のピペッティングまたは分注を容易にすることが簡便である（図69および図70）。図69において説明される例では、治具は、1mm厚基材上に製作されたマイクロウェルアレイを受け入れ、16mm幅×35mm長さ×およそ4mm深さの反応チャンバーにアッセイ試薬を限局するためのシリコンガasketの形態の機械的支持体をもたらし、これにより、800マイクロリットル～1ミリリットルの細胞懸濁液およびビーズ懸濁液（ビーズに基づくオリゴヌクレオチド標識を含む）の使用を可能

50

にして、アッセイを行う。

#### 【0100】

治具は、硬質の機械加工された頂部および底部プレート（例えば、アルミニウム）と、チャンバーまたはウェルの壁を作製するための圧縮性の（例えば、シリコン、ポリジメチルシロキサン）ガスケットからなる。設計特色は、次のものを含む：（i）必要に応じて顕微鏡対物レンズを回転してポジションに出し入れするための（異なる拡大率でマイクロウェルアレイを見るため）、面取りしたアパーチャ縁および隙間。（ii）マイクロウェルアレイ基材との漏れ止め封着の均一で反復可能な形成を保証するための、シリコンガスケットの制御された圧縮。（iii）簡便な操作のためのキャプティブファスナ。（iv）アレイの確実かつ反復可能なポジショニングのための位置クランプ機構。（v）リンスステップにおけるアレイの除去のための簡便な解体。

10

#### 【0101】

頂部および底部プレートは、種々の材料（例えば、アルミニウム、陽極処理アルミニウム、ステンレス鋼、テフロン（登録商標）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）または同様の硬質ポリマー材料）を使用して、種々の技法（例えば、従来の機械加工、CNC機械加工、射出成形、3D印刷等）のいずれかを使用して製作することができる。

#### 【0102】

対照および実験（または再現実験もしくは複数の独立の実験）を並行して行うために、シリコン（ポリジメチルシロキサン；PDMS）ガスケットは、複数のチャンバーを作製するように構成することができる（図71を参照）。ガスケットは、優れた放出特徴をもたらすための垂直ガスケット壁のための抜き勾配を含むテフロン（登録商標）金型を使用して、PDMSまたは同様のエラストマー材料から成形される。あるいは、金型は、アルミニウムまたは他の材料（例えば、黒デルリン、ポリエーテルイミド（ウルテム）等）から機械加工し、必要であればテフロン（登録商標）でコーティングして、優れた放出特徴をもたらすことができる。ガスケット金型設計は反転されている、即ち、成形部分の頂部表面（即ち、注型の際に金型を覆うために使用されるスライドガラスまたはシリコンウエハとの接触面側の表面）が、使用の際にマイクロウェルアレイ基材との封着を作製するための表面になり、これにより、金型表面の粗さおよび滑らかなガスケット表面を作製する（アレイ基材との漏れ止め封着を保証するため）際の表面汚染に伴う潜在的な問題を回避し、また、基材材料の柔軟な選択および注型の際に基礎としてマイクロウェルアレイ基材を使用することにより予め組み立てる選択肢をもたらすことができる。ガスケット金型設計は、ウェル面積の境界に力を集中させる隆線（force focusing ridge）を含むこともできる、即ち、充填後に金型の頂部に置かれたカバーが、正確な位置における小さい接触面積に配置されるように、金型における中央メサ（複数可）（ウェル（複数可）を形成する）は、ウェル（複数可）の周囲長となる位置に隆起した隆線を有し、優れた縁プロファイルが、使用の際のガスケットおよび基材の間における漏れ止め封着の形成に重要である。

20

30

#### 【0103】

##### 機器システム

本開示は、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化アッセイの自動化を支持するための機器システムおよび消耗品も含む。かかるシステムは、フローセルと一体化されたマイクロウェルアレイを取り込む消費可能なカートリッジと共に、（i）フルイディクス制御、（ii）温度制御、（iii）細胞および／またはビーズ分布および収集機構、（iv）細胞溶解機構、（v）イメージング能力ならびに（vi）画像処理等、制御および分析機能性の提供に必要な器具類を含み得る。一部の実施形態では、システムのための入力、細胞試料を含み、出力は、試料タグ、細胞タグおよび分子指標化タグを取り込むオリゴヌクレオチドを付着させたビーズを含むビーズ懸濁液を含む。他の実施形態では、システムは、PCR増幅を行うための熱サイクリング能力等、追加的な機能性を含み得、この場合、システムのための入力、細胞試料を含み、出力は、本来はビーズに

40

50

付着させていた試料タグ、細胞タグおよび分子指標化タグを取り込むオリゴヌクレオチドの増幅に起因するオリゴヌクレオチドライブラリーを含む。さらに他の実施形態では、システムは、オリゴヌクレオチド増幅の必要ありまたはなしの、配列決定能力を含むこともでき、この場合、システムのための入力、細胞試料であり、出力は、目的の標的配列に関連した全試料タグ、細胞タグおよび分子指標化タグの配列をさらに含むデータセットを含む。

#### 【0104】

##### マイクロウェルアレイフローセル

自動アッセイシステムの多くの実施形態では、マイクロウェルアレイ基材は、流体取り扱いシステムの残りとの便利なインターフェイスをもたらし、マイクロウェルアレイへと送達される流体、例えば、細胞およびビーズ懸濁液、溶解バッファー、リンスバッファー等の交換を容易にするフローセル内にパッケージされるであろう。設計特色は、(i) 細胞試料、ビーズ懸濁液および／または他のアッセイ試薬を導入するための1個または複数の入口ポート、(ii) 戻り渦 (back eddy) またはデッドゾーンを最小化しつつ、均一な充填および効率的な流体交換をもたらすように設計された1個または複数のマイクロウェルアレイチャンバー、ならびに (iii) 試料収集ポイントおよび／または廃棄物リザーバーへと流体を送達するための1個または複数の出口ポートを含み得る。一部の実施形態では、フローセルの設計は、1種または複数の細胞試料を並行して処理できるように複数のマイクロウェルアレイとインターフェイスする複数のマイクロアレイチャンバーを含み得る。一部の実施形態では、フローセルの設計は、均一な流動速度プロファイルを作製するための特色をさらに含み得る、即ち、例えば、「流動拡散器」として、チャンバー入口近くおよびマイクロウェルアレイの上流に位置する多孔性障壁を使用することにより、または各アレイチャンバーを、同じ総アレイ面積をまとめて覆うが分割された入口流体ストリームが並行して流動する数個のサブセクションに分割することにより、マイクロウェルへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらすための、アレイチャンバー幅にわたる「栓流」である。一部の実施形態では、フローセルは、2個以上のマイクロウェルアレイ基材を包囲または取り込むことができる。一部の実施形態では、統合されたマイクロウェルアレイ／フローセルアセンブリは、システムの固定された成分を構成することができる。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイ／フローセルアセンブリは、機器から着脱可能となり得る。

#### 【0105】

一般に、フローセル設計における流体チャネルおよびアレイチャンバー (複数可) の寸法は、(i) マイクロウェルアレイへと細胞およびビーズの均一な送達をもたらし、(ii) 試料および試薬消費を最小化するように最適化されるであろう。一部の実施形態では、流体チャネルの幅は、50ミクロン～20mmの間となるであろう。他の実施形態では、流体チャネルの幅は、少なくとも50ミクロン、少なくとも100ミクロン、少なくとも200ミクロン、少なくとも300ミクロン、少なくとも400ミクロン、少なくとも500ミクロン、少なくとも750ミクロン、少なくとも1mm、少なくとも2.5mm、少なくとも5mm、少なくとも10mmまたは少なくとも20mmとなり得る。さらに他の実施形態では、流体チャネルの幅は、最大でも20mm、最大でも10mm、最大でも5mm、最大でも2.5mm、最大でも1mm、最大でも750ミクロン、最大でも500ミクロン、最大でも400ミクロン、最大でも300ミクロン、最大でも200ミクロン、最大でも100ミクロンまたは最大でも50ミクロンとなり得る。一実施形態では、流体チャネルの幅は、約2mmである。当業者であれば、流体チャネルの幅が、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう (例えば、約250ミクロン～約3mm)。

#### 【0106】

一部の実施形態では、流体チャネルの深さは、50ミクロン～10mmの間となるであろう。他の実施形態では、流体チャネルの深さは、少なくとも50ミクロン、少なくとも100ミクロン、少なくとも200ミクロン、少なくとも300ミクロン、少なくとも4

00ミクロン、少なくとも500ミクロン、少なくとも750ミクロン、少なくとも1mm、少なくとも1.25mm、少なくとも1.5mm、少なくとも1.75mm、少なくとも2mm、少なくとも2.5mm、少なくとも3mm、少なくとも3.5mm、少なくとも4mm、少なくとも4.5mm、少なくとも5mm、少なくとも5.5mm、少なくとも6mm、少なくとも6.5mm、少なくとも7mm、少なくとも7.5mm、少なくとも8mm、少なくとも8.5mm、少なくとも9mmまたは少なくとも9.5mmとなり得る。他の実施形態では、流体チャネルの深さは、最大でも10mm、最大でも9.5mm、最大でも9mm、最大でも8.5mm、最大でも8mm、最大でも7.5mm、最大でも7mm、最大でも6.5mm、最大でも6mm、最大でも5.5mm、最大でも5mm、最大でも4.5mm、最大でも4mm、最大でも3.5mm、最大でも3mm、最大でも2mm、最大でも1.75mm、最大でも1.5mm、最大でも1.25mm、最大でも1mm、最大でも750ミクロン、最大でも500ミクロン、最大でも400ミクロン、最大でも300ミクロン、最大でも200ミクロン、最大でも100ミクロンまたは最大でも50ミクロンとなり得る。一実施形態では、流体チャネルの深さは、約1mmである。当業者であれば、流体チャネルの深さが、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約800ミクロン～約1mm）。

#### 【0107】

フローセルは、当業者に公知の種々の技法および材料を使用して製作することができる。一般に、フローセルは、別々の部分として製作され、その後、マイクロウェルアレイ基材に機械的にクランプまたは永続的に結合されるであろう。適した製作技法の例として、従来の機械加工、CNC機械加工、射出成形、3D印刷、1つもしくは複数の層のレーザーもしくはダイカットポリマーフィルムの整列および積層、またはフォトリソグラフィおよび湿式化学エッチング、ドライエッチング、ディープ反応性イオンエッチングもしくはレーザー微細加工等、多数の微細加工技法のいずれかが挙げられる。フローセル部分が製作されたら、例えば、これをマイクロウェルアレイ基材に対しクランプすることにより（ガasketの使用ありまたはなし）、これをマイクロウェルアレイ基材に機械的に付着させることができる、あるいは当業者に公知の種々の技法（使用される材料の選択に依存して）のいずれかを使用して、例えば、陽極結合、熱結合、超音波溶接、またはエポキシに基づく、アクリルに基づく、シリコンに基づく、UV硬化性、ポリウレタンに基づくもしくはシアノアクリレートに基づく接着剤を含む種々の接着剤もしくは接着フィルムのいずれかの使用により、これをマイクロウェルアレイ基材に直接的に結合させることができる。

#### 【0108】

フローセルは、当業者に公知の種々の材料を使用して製作することができる。適した材料の例として、シリコン、石英ガラス、ガラス、種々のポリマーのいずれか、例えば、ポリジメチルシロキサン（PDMS；エラストマー）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリイミド、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、エポキシ樹脂、金属（例えば、アルミニウム、ステンレス鋼、銅、ニッケル、クロムおよびチタン）またはこれらの材料の組合せが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0109】

##### カートリッジ

自動アッセイシステムの多くの実施形態では、フローセルを付着させたまたは付着させていないマイクロウェルアレイは、機器システムとインターフェイスし、追加的な機能性を取り込むことができる消費可能なカートリッジ内にパッケージされるであろう。カートリッジの設計特色は、（i）機器との流体接続を作製するための、ならびに／または細胞試料、ビーズ懸濁液および／もしくは他のアッセイ試薬をカートリッジに手動で導入するための1個または複数の入口ポート、（ii）1個または複数のバイパスチャネル、即ち

、細胞試料およびビーズ懸濁液を自己計量して、過充填および／または逆流を回避するためのチャンネル、(i i i) その中にマイクロアレイ基材(複数可)がポジショニングされた、1個もしくは複数の統合されたマイクロウェルアレイ／フローセルアセンブリまたは1個もしくは複数のチャンバー、(i v) デバイスを通る流体の流れを制御するための、統合されたミニチュアポンプまたは他の流体作動機構、(v) 予めロードされた試薬を区画化するためおよび／またはデバイスを通る流体の流れを制御するための統合されたミニチュア弁、(v i) 捕捉された空気のエスケープ通路を提供するためのベント、(v i i) 1個または複数の試料および試薬廃棄物リザーバー、(v i i i) 機器との流体接続を作製するためおよび／または加工された試料収集ポイントを提供するための1個または複数の出口ポート、(i x) 機器システムに関して、着脱可能で消費可能なカートリッジの再現性があるポジショニングを行い、外部磁石がマイクロウェルアレイと極めて接近できるようなアクセスを提供するための、機械的インターフェイス特色、(x) 機器システムとの優れた熱接触を提供するための、統合された温度制御成分および／または熱インターフェイス、ならびに(x i) マイクロウェルアレイの光学照合における使用のための光学インターフェイス特色、例えば、透明窓を含み得る。一部の実施形態では、カートリッジは、2種以上の試料を並行して処理するように設計される。デバイスの一部の実施形態では、カートリッジは、スタンドアロンPCRサーマルサイクラーおよび／または配列決定機器とのインターフェイスに適した1個または複数の着脱可能な試料収集チャンバー(複数可)をさらに含み得る。デバイスの一部の実施形態では、カートリッジそれ自体が、スタンドアロンPCRサーマルサイクラーおよび／または配列決定機器とのインターフェイスに適している。

#### 【0110】

デバイスの一部の実施形態では、カートリッジは、マイクロウェル間の相互汚染を最小化するために、大型分子の拡散を防ぐ(またはその経路長および拡散時間を増加させる)物理的および／または化学的障壁を作製するように設計された成分をさらに含み得る。かかる障壁の例として、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズの送達に使用される蛇行チャンネルのパターン、溶解もしくはインキュベーションステップにおいてマイクロウェルアレイ基材の表面との接触にプレスされる収納できるプラテンもしくは変形可能な膜、マイクロウェルの開口部を遮断するための、以前に記載されている通りのより大型のビーズ、例えば、セファデックスビーズの使用、またはアレイにおける各マイクロウェルを有効に分離および区画化するための、溶解もしくはインキュベーションステップにおけるカートリッジ内のリザーバーからの不混和性の疎水性流体の放出が挙げられるがこれらに限定されない。これらの障壁のいずれかもしくは全て、またはかかる障壁のない実施形態は、例えば、グリセロールまたはポリエチレングリコール等の溶液成分の添加による、マイクロウェルにおけるおよびそれに隣接した溶液の粘性の上昇と組み合わせることができる。

#### 【0111】

一般に、カートリッジ設計における流体チャンネルおよびアレイチャンバー(複数可)の寸法は、(i) マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズの均一な送達をもたらし、(i i) 試料および試薬消費を最小化するように最適化されるであろう。一部の実施形態では、流体チャンネルの幅は、50ミクロン〜20mmの間となるであろう。他の実施形態では、流体チャンネルの幅は、少なくとも50ミクロン、少なくとも100ミクロン、少なくとも200ミクロン、少なくとも300ミクロン、少なくとも400ミクロン、少なくとも500ミクロン、少なくとも750ミクロン、少なくとも1mm、少なくとも2.5mm、少なくとも5mm、少なくとも10mmまたは少なくとも20mmとなり得る。さらに他の実施形態では、流体チャンネルの幅は、最大でも20mm、最大でも10mm、最大でも5mm、最大でも2.5mm、最大でも1mm、最大でも750ミクロン、最大でも500ミクロン、最大でも400ミクロン、最大でも300ミクロン、最大でも200ミクロン、最大でも100ミクロンまたは最大でも50ミクロンとなり得る。一実施形態では、流体チャンネルの幅は、約2mmである。当業者であれば、流体チャンネルの幅が、上述

の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約 250 ミクロン～約 3 mm）。

#### 【0112】

一部の実施形態では、カートリッジ設計における流体チャネルの深さは、50 ミクロン～10 mmの間となるであろう。他の実施形態では、流体チャネルの深さは、少なくとも50 ミクロン、少なくとも100 ミクロン、少なくとも200 ミクロン、少なくとも300 ミクロン、少なくとも400 ミクロン、少なくとも500 ミクロン、少なくとも750 ミクロン、少なくとも1 mm、少なくとも1.25 mm、少なくとも1.5 mm、少なくとも1.75 mm、少なくとも2 mm、少なくとも2.5 mm、少なくとも3 mm、少なくとも3.5 mm、少なくとも4 mm、少なくとも4.5 mm、少なくとも5 mm、少なくとも5.5 mm、少なくとも6 mm、少なくとも6.5 mm、少なくとも7 mm、少なくとも7.5 mm、少なくとも8 mm、少なくとも8.5 mm、少なくとも9 mmまたは少なくとも9.5 mmとなり得る。さらに他の実施形態では、流体チャネルの深さは、最大でも10 mm、最大でも9.5 mm、最大でも9 mm、最大でも8.5 mm、最大でも8 mm、最大でも7.5 mm、最大でも7 mm、最大でも6.5 mm、最大でも6 mm、最大でも5.5 mm、最大でも5 mm、最大でも4.5 mm、最大でも4 mm、最大でも3.5 mm、最大でも3 mm、最大でも2 mm、最大でも1.75 mm、最大でも1.5 mm、最大でも1.25 mm、最大でも1 mm、最大でも750 ミクロン、最大でも500 ミクロン、最大でも400 ミクロン、最大でも300 ミクロン、最大でも200 ミクロン、最大でも100 ミクロンまたは最大でも50 ミクロンとなり得る。一実施形態では、流体チャネルの深さは、約1 mmである。当業者であれば、流体チャネルの深さが、上述の値のいずれかによって画定されたいずれかの範囲内に収まり得ることを認めるであろう（例えば、約800 ミクロン～約1 mm）。

#### 【0113】

カートリッジは、当業者に公知の種々の技法および材料を使用して製作することができる。一般に、カートリッジは、一連の別々の成分部分として製作され（図72）、その後多数の機械的組み立てまたは結合技法のいずれかを使用して組み立てられるであろう（図72および図73）。適した製作技法の例として、従来の機械加工、CNC機械加工、射出成形、熱成形および3D印刷が挙げられるがこれらに限定されない。カートリッジ成分が製作されると、ネジ、クリップその他を使用して、これを機械的に組み立てることができる、あるいは種々の技法（使用される材料の選択に依存して）のいずれかを使用して、例えば、熱もしくは超音波結合／溶接、またはエポキシに基づく、アクリルに基づく、シリコンに基づく、UV硬化性、ポリウレタンに基づくもしくはシアノアクリレートに基づく接着剤を含む種々の接着剤もしくは接着フィルムのいずれかの使用により、永続的に結合させることができる。

#### 【0114】

カートリッジ成分は、シリコン、石英ガラス、ガラス、種々のポリマーのいずれか、例えば、ポリジメチルシロキサン（PDMS；エラストマー）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリイミド、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、エポキシ樹脂または金属（例えば、アルミニウム、ステンレス鋼、銅、ニッケル、クロムおよびチタン）が挙げられるがこれらに限定されない、多数の適した材料のいずれかを使用して製作することができる。

#### 【0115】

上述の通り、カートリッジの入口および出口特色は、機器との便利な漏れ止め流体接続をもたらすように設計することができる、またはカートリッジに試料および試薬を手動ピペッティングで出し入れするための開放リザーバーとして機能することができる。入口および出口ポートコネクタのための便利な機械的設計の例として、ねじ付きコネクタ、加締コネクタ、ルアーロックコネクタ、ルアースリップまたは「スリップチップ（slip

t i p) 」コネクタ、プレスばめコネクタその他が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、カートリッジの入口および出口ポートは、カートリッジが機器にポジショニングされると開放または穿刺することができ、貯蔵の際に内部カートリッジ表面の汚染を防ぐように役立つ、および／またはカートリッジが機器から取り出される際に流体がこぼれることを防ぐ、キャップ、ばね荷重カバーもしくは閉鎖材、相変化材料、またはポリマー膜をさらに含み得る。上に示す通り、一部の実施形態では、カートリッジの1個または複数の出口ポートは、スタンドアロンPCRサーマルサイクラーおよび／または配列決定機器とのインターフェイスに適した着脱可能な試料収集チャンバーをさらに含み得る。

#### 【0116】

10

上に示す通り、一部の実施形態では、カートリッジは、デバイスを通る流体の流れの制御のための統合されたミニチュアポンプまたは他の流体作動機構を含み得る。適したミニチュアポンプまたは流体作動機構の例として、電気機械的もしくは空気圧で作動されるミニチュアシリンジもしくはプランジャ機構、化学的推進剤、空気圧もしくは外部ピストンにより作動される膜ダイヤフラムポンプ、空気圧で作動される試薬ポートもしくは囊または電気浸透ポンプが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0117】

上述の通り、一部の実施形態では、カートリッジは、予めロードされた試薬を区画化するためおよび／またはデバイスを通る流体の流れを制御するためのミニチュア弁を含み得る。適したミニチュア弁の例として、融解もしくは溶解され得るワックスもしくはポリマープラグまたは穿刺され得るポリマー膜を使用して製作されるワンショット「弁」；変形可能な膜を使用して構築されるピンチ弁、および変形可能な膜フラップを使用して構築される空気圧、水力、磁性、電磁気または電気機械的（ソレノイド）作動、一方向弁、およびミニチュアゲート弁が挙げられるがこれらに限定されない。

20

#### 【0118】

上に示す通り、一部の実施形態では、カートリッジは、捕捉された空気のエスケープ通路を提供するためのベントを含み得る。ベントは、当業者に公知の種々の技法に従って、例えば、空気のキャピラリーウィッキングを可能にするが、水による浸透を遮断するポリジメチルシロキサン（PDMS）または他の疎水性材料の多孔性プラグを使用して構築することができる。ベントは、操作の際に使用される圧力ではアパーチャ壁の湿潤が生じないように疎水性障壁材料を通るアパーチャとして構築することもできる。

30

#### 【0119】

一般に、カートリッジの機械的インターフェイス特色は、機器システムに対するカートリッジの容易に着脱可能であるが高度に正確かつ反復可能なポジショニングを提供する。適した機械的インターフェイス特色として、整列ピン、整列ガイド、機械的止め具その他が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、機械的設計特色は、外部装置、例えば、磁石または光学成分をマイクロウェルアレイチャンバーと極めて接近させるためのレリーフ特色を含むであろう（図72）。

#### 【0120】

一部の実施形態では、カートリッジは、外部温度制御モジュールに嵌合させるための温度制御成分または熱インターフェイス特色も含むであろう。適した温度制御要素の例として、抵抗性加熱要素、ミニチュア赤外放射光源、ペルチェ加熱または冷却デバイス、ヒートシンク、サーミスタ、熱電対その他が挙げられるがこれらに限定されない。熱インターフェイス特色は、典型的には、優れた熱導体（例えば、銅、金、銀、アルミニウム等）である材料から製作され、典型的には、外部加熱ブロックまたは冷却ブロックと優れた熱接触を生じることができる1個または複数の平坦な表面を含むであろう。

40

#### 【0121】

多くの実施形態では、カートリッジは、マイクロウェルアレイの光学イメージングまたは分光学的照合における使用のための光学インターフェイス特色を含むであろう。典型的には、カートリッジは、光学的に透明な窓、例えば、マイクロウェルアレイの探索に使用

50

されるイメージングまたは分光学的技法のためのスペクトル要件を満たす材料から製作された、マイクロウェル基材それ自体またはマイクロウェルアレイと対向するフローセルもしくはマイクロアレイチャンバーの側面を含むであろう。適した光学窓材料の例として、ガラス、石英ガラス、ポリメタクリル酸メチル（PMM A）、ポリカーボネート（P C）、環状オレフィンポリマー（C O P）または環状オレフィンコポリマー（C O C）が挙げられるがこれらに限定されない。典型的には、カートリッジは、横断する、反射したまたは傾斜した照明配向性でマイクロウェルアレイを照明するために使用することができる、第2の光学的に透明または半透明な窓または領域を含むであろう。

#### 【0122】

##### 機器

本開示は、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化アッセイの自動化における使用のための機器も含む。上に示す通り、このような機器は、（i）フルイディクス制御、（i i）温度制御、（i i i）細胞および／またはビーズ分布および収集機構、（i v）細胞溶解機構、（v）磁場制御、（v i）イメージング能力ならびに（v i i）画像処理等、制御および分析機能性をもたらしすることができる。一部の実施形態では、機器システムは、1個または複数のモジュールを含み得（その可能な一実施形態は、図74に模式図により説明されている）、各モジュールは、システムに1種または複数の特異的機能的特色セットをもたらし。他の実施形態では、機器システムは、あらゆるシステム機能性が同じパッケージ内に存在するようにパッケージすることができる。図75は、自動システムの一実施形態に含まれるプロセスステップの模式的説明を提示する。上に示す通り、一部の実施形態では、システムは、システムの統合された成分またはモジュラ成分のいずれかとして、P C R増幅（または他の種類のオリゴヌクレオチド増幅技法）およびオリゴヌクレオチド配列決定を含むようにシステムの機能的能力を拡大する、追加的な機能的単位を含み得る。

#### 【0123】

一般に、機器システムは、システムに接続された1個または複数のアッセイカートリッジ（複数可）内の1個または複数のマイクロアレイチャンバー（複数可）またはフローセル（複数可）へと試料および／または試薬を送達するためのフルイディクス能力をもたらし得るであろう。アッセイ試薬およびバッファは、カートリッジ入口に接続されたボトル、試薬およびバッファカートリッジまたは他の適した容器に貯蔵することができる。システムは、アッセイカートリッジ（複数可）下流の流体を収集するためのボトル、廃棄物カートリッジまたは他の適した廃棄物容器の形態の廃棄物リザーバーを含むこともできる。システムを通る流体の流れの制御は、典型的には、ポンプ（または他の流体作動機構）および弁の使用により行われるであろう。適したポンプの例として、シリンジポンプ、プログラム可能なシリンジポンプ、蠕動ポンプ、ダイヤフラムポンプその他が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、システムを通る流体の流れは、試薬およびバッファ容器の1個もしくは複数の入口にまたはアッセイカートリッジ（複数可）の入口に正の空気圧を加えることによって制御することができる。一部の実施形態では、システムを通る流体の流れは、廃棄物リザーバーの1個もしくは複数の出口にまたはアッセイカートリッジ（複数可）の出口において真空吸引することによって制御することができる。適した弁の例として、逆止め弁、電気機械的二方または三方弁、空気圧式二方および三方弁その他が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、アッセイ洗浄／リンスステップの際に拍動流を加えて、1個または複数のマイクロウェルアレイフローセル（複数可）またはチャンバー（複数可）内における流体の完全かつ効率的な交換を容易にすることができる。

#### 【0124】

上に示す通り、一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルアレイにわたる細胞およびビーズの均一な分布をさらに容易にするための機構を含み得る。かかる機構の例として、振動、振盪、回旋、再循環流、低頻度揺動（low frequency agitation）（例えば、ロッカープレートを使用、またはチャンバーもしくは流体

10

20

30

40

50

チャンネル近辺の壁を形成する可撓性（例えば、シリコン）膜のパルス適用による）または高頻度揺動（high frequency agitation）（例えば、圧電変換器の使用による）が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、これらの機構のうち1種または複数は、フローセルまたはアレイチャンバーの内壁における物理的構造または特色、例えば、中2階／最上階構造、シェブロンまたは隆線アレイと組み合わせて利用されて、混合を容易にするおよび／またはアレイチャンバー内における細胞もしくはビーズのプールを防ぐために役立つ。フローセルまたはアレイチャンバーの上または下表面における流動増強リブを使用して、流動速度プロファイルを制御し、マイクロウェル開口部にわたる剪断を低下させる（即ち、試薬交換およびリンスステップの際にマイクロウェルから細胞またはビーズが引き出されることを防ぐ）ことができる。

10

#### 【0125】

一部の実施形態では、機器システムは、洗剤または他の試薬の使用の代替として機械的細胞溶解能力を含み得る。高周波圧電変換器を使用した超音波処理は、適した技法の一例である。

#### 【0126】

一部の実施形態では、機器システムは、アッセイ結果の精度および再現性を容易にすることを目的とする温度制御機能性を含むであろう、例えば、マイクロウェルアレイフローセルまたはチャンバーの冷却は、マイクロウェル間の分子拡散の最小化に有利になり得る。機器システム設計に取り込むことができる温度制御成分の例として、抵抗性加熱要素、赤外光源、ペルチェ加熱または冷却素子、ヒートシンク、サーミスタ、熱電対その他が挙げられるがこれらに限定されない。システムの一部の実施形態では、温度制御器は、特定の時間間隔にわたりプログラム可能な温度変化をもたらすことができる。

20

#### 【0127】

本開示の他の箇所に示す通り、開示されている方法の多くの実施形態は、アッセイの完了後にマイクロウェルからビーズを除去するための磁場を利用する。一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルアレイフローセルまたはチャンバーへとまたはそれからビーズを輸送するための磁場の使用をさらに含み得る。磁場の制御をもたらすための適した手段の例として、カートリッジに対して固定されたポジション（複数可）における電磁石の使用、または必要に応じて機械的に再ポジショニングされた永久磁石の使用が挙げられるがこれらに限定されない。機器システムの一部の実施形態では、印加された磁場（複数可）の強度は、1個または複数の電磁石に印加された電流の量を変動させることにより変動されるであろう。機器システムの一部の実施形態では、印加された磁場の強度は、例えば、ステッパーモーター駆動線形アクチュエータ、サーボモーター駆動線形アクチュエータまたはカムシャフト機構を使用して、マイクロアレイチャンバー（複数可）のポジションに対して1個または複数の永久磁石のポジションを変化させることにより変動されるであろう。機器システムの一部の実施形態では、例えば、磁性ビーズのクラスターリングを防ぐために、パルス磁場の使用が有利となり得る。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイに対して少なくとも2個のポジションの間で、アレイまたはチャンバーに極めて接近した磁石を1回または複数回移動させることができる。磁石の運動は、マイクロウェル内のビーズを揺動させるために、マイクロウェルからのビーズの除去を容易にするために、または所望の位置における磁性ビーズを収集するために役立つことができる。

30

40

#### 【0128】

上に示す通り、多くの実施形態では、機器システムは、光学イメージングおよび／または他の分光学的能力を含むであろう。かかる機能性は、例えば、アレイに細胞および／またはビーズが均一にかつ最適に配置されたか否か決定するためのマイクロウェルアレイ（複数可）の点検に有用となり得る。明視野、暗視野および蛍光／ルミネッセンスイメージングが挙げられるがこれらに限定されない、種々のイメージングモードのいずれを利用してもよい。イメージングモードの選択は、アレイ基材および／またはフローセルもしくはアレイチャンバーの反対側の壁が、目的のスペクトル範囲にわたり必然的に透明または半透明である必要があるという点において、マイクロウェルアレイ、フローセルおよびカー

50

トリッジチャンバーの設計に影響を与えるであろう。一部の実施形態では、各マイクロウェルアレイは、単一の画像内にその全体を画像化することができる。一部の実施形態では、一連の画像を「タイル表示して」、アレイ全体の高分解能画像を作製することができる。一部の実施形態では、アレイのサブセクションを表す単一の画像を使用して、アレイの全体としての特性、例えば、細胞またはビーズ分布を評価することができる。一部の実施形態では、二重波長励起および発光（または多重波長励起および／もしくは発光）イメージングを行うことができる。タングステンランプ、タングステン－ハロゲンランプ、アークランプ、レーザー、発光ダイオード（LED）またはレーザーダイオードが挙げられるがこれらに限定されない、種々の光源のいずれを使用して、イメージングおよび／または励起光を提供してもよい。フォトダイオードアレイ、電荷結合素子（CCD）カメラまたはCMOS画像センサーが挙げられるがこれらに限定されない、種々の画像センサーのいずれをイメージング目的に使用してもよい。光学システムは、典型的には、システムを通る光線を操縦する、形づくる、フィルターをかけるおよび／または焦点を合わせるための種々の光学成分を含むであろう。適した光学成分の例として、レンズ、鏡、プリズム、回折格子、色ガラスフィルター、狭帯域干渉フィルター、広帯域干渉フィルター、二色性反射鏡、光ファイバー、光導波路その他が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルアレイへと励起光を送達するための導波路として光学的に透明なマイクロアレイ基材を使用することができる。イメージングモードの選択は、他の種類のアッセイの確率論的標識化／分子指標化アッセイと並行した実施の使用、例えば、明視野イメージングによるトリパンプル生細胞／死細胞アッセイの使用、蛍光イメージングによる蛍光に基づく生細胞／死細胞アッセイの使用等を可能にすることもできる。関連するマイクロウェルにおける各ビーズに関連した細胞タグと、個々の細胞の生存率データの相関は、マルチプレックス化単一細胞アッセイのデータの分析における判別の追加的なレベルをもたらすことができる。あるいは、複数の細胞の統計の形態の生存率データは、アッセイの分析的能力および品質保証を増強するために用いることができる。

10

20

#### 【0129】

一部の実施形態では、システムは、マイクロウェルアレイを探索するための非イメージングおよび／または非光学能力を含み得る。捕捉された気泡を検出するため、アレイにわたる細胞および／またはビーズ分布を決定するため等の非イメージングおよび／または非光学技法の例として、光散乱の測定、紫外／可視／赤外吸収測定（例えば、染色された細胞および／または色素を取り込むビーズを使用）、コヒーレントラマン散乱およびコンダクタンス測定（例えば、マイクロウェルアレイと一致する電極の微細加工されたアレイを使用）が挙げられるがこれらに限定されない。

30

#### 【0130】

システムプロセッサおよびソフトウェア

一般に、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化／分子指標化アッセイの自動化を支持するように設計された機器システムは、（i）機器制御機能性、（ii）画像処理および分析能力、ならびに（iii）データストレージ、分析およびディスプレイ機能性を提供するためのソフトウェアと共に、プロセッサまたはコンピュータを含むであろう。

40

#### 【0131】

多くの実施形態では、機器システムは、コンピュータ（またはプロセッサ）と、ユーザーインターフェイスならびに全システム機能の手動、半自動または全自動制御、即ち、フルディクスシステム、温度制御システム、細胞および／またはビーズ分布機能、磁性ビーズ操作機能、ならびにイメージングシステムの制御を提供するためのコードを含むコンピュータ可読媒体とを含むであろう。機器制御ソフトウェアによって提供される流体制御機能の例として、容積測定的流体流量、流体流動速度、試料およびビーズ添加、試薬添加ならびにリンスステップのタイミングおよび持続時間が挙げられるがこれらに限定されない。機器制御ソフトウェアによって提供される温度制御機能の例として、温度セットポイント（複数可）の特定、ならびに温度変化のタイミング、持続時間およびランプ速度の制

50

御が挙げられるがこれらに限定されない。機器制御ソフトウェアによって提供される細胞および／またはビーズ分布機能の例として、振幅、頻度および持続時間等、揺動パラメータの制御が挙げられるがこれらに限定されない。機器制御ソフトウェアによって提供される磁場機能の例として、印加された磁場（複数可）のタイミングおよび持続時間、電磁石の場合は、その上、磁場の強度が挙げられるがこれらに限定されない。機器制御ソフトウェアによって提供されるイメージングシステム制御機能の例として、オートフォーカス能力、照明および／または励起光露光時間および強度の制御、画像取得速度、露光時間の制御およびデータストレージオプションが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0132】

機器システムの一部の実施形態では、システムは、画像処理および分析能力を提供するためのコードを含むコンピュータ可読媒体をさらに含むであろう。ソフトウェアによって提供される画像処理および分析能力の例として、手動、半自動または全自動画像露出補正（例えば、ホワイトバランス、コントラスト補正、信号加算平均および他のノイズ低減能力等）、自動物体同定（即ち、画像における細胞およびビーズを同定するための）、自動統計分析（即ち、マイクロウェルアレイの単位面積当たりの同定される細胞および／もしくはビーズの数を決定するため、または2個以上の細胞もしくは2個以上のビーズを含有するウェルを同定するための）および手動測定能力（例えば、物体間の距離を測定するため等の）が挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、機器制御および画像処理／分析ソフトウェアは、別々のソフトウェアモジュールとして書き込まれるであろう。一部の実施形態では、機器制御および画像処理／分析ソフトウェアは、統合されたパッケージに取り込まれるであろう。一部の実施形態では、システムソフトウェアは、最適な細胞／ビーズ分布が達成されるまで細胞およびビーズ試料ロードステップを延長または反復できるように、統合されたリアルタイム画像分析および機器制御を提供することができる。

#### 【0133】

機器システムの一部の実施形態では、システムは、配列データ分析を提供するためのコードを含むコンピュータ可読媒体を含むであろう。データ分析ソフトウェアによって提供され得る配列データ分析機能性の例として、（i）アッセイ実施により作製されるオリゴヌクレオチドライブラリーの配列決定によってもたらされるデータに基づき、細胞1個当たりの遺伝子1種当たりのリードの数および細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの特有の転写物分子の数を決定するためのアルゴリズム、（ii）配列決定データの統計分析、例えば、細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの転写物分子の数の決定のための信頼区間を予測するための主成分分析等、（iii）公知の参照配列と遺伝子配列データの整列のための配列整列能力、（iv）試料バーコード、細胞バーコードおよび分子バーコードのデコード／逆マルチプレックス化（demultiplexing）、ならびに（v）増幅または配列決定誤差を補償するための分子標識の自動クラスタリングが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0134】

一般に、図76に説明する通り、ここに開示されている機器システムに含まれるコンピュータまたはプロセッサは、媒体511、および／または媒体512が固定されたサーバー509に任意選択で接続することができるネットワークポート505から命令を読み取ることができる論理的装置としてさらに理解することができる。図76に示すもの等、システム500は、CPU501と、ディスクドライブ503と、キーボード515および／またはマウス516等、任意選択の入力デバイスと、任意選択のモニタ507とを含み得る。データ通信は、表示の通信媒体により、ローカルまたは遠隔位置におけるサーバーに達成することができる。通信媒体は、データを伝達するおよび／または受け取るいずれかの手段を含み得る。例えば、通信媒体は、ネットワーク接続、無線接続またはインターネット接続となり得る。かかる接続は、ワールドワイドウェブにわたる通信を提供することができる。図76に説明する通り、パーティー522による受信および／または検討のために、かかるネットワークまたは接続にわたって本開示に関するデータを伝達すること

ができることが想定される。

#### 【0135】

図77は、本開示の例としての実施形態に関連して使用することができる、コンピュータシステム100の第1の例としてのアーキテクチャを説明するブロック図である。図77に描写する通り、例としてのコンピュータシステムは、命令を処理するためのプロセッサ102を含み得る。プロセッサの非限定例として、Intel Xeon（商標）プロセッサ、AMD Opteron（商標）プロセッサ、Samsung 32ビットRISC ARM 1176JZ（F）-S v1.0（商標）プロセッサ、ARM Cortex-A8 Samsung S5PC100（商標）プロセッサ、ARM Cortex-A8 Apple A4（商標）プロセッサ、Marvell PXA930（商標）プロセッサまたは機能的に均等なプロセッサが挙げられる。実行の複数のスレッドは、並列処理のために使用することができる。一部の実施形態では、単一のコンピュータシステム内であれ、クラスター内であれ、または複数のコンピュータ、携帯電話および／もしくははパーソナルデータアシスタントデバイスを含むネットワークによりシステムにわたり分布されているのであれ、複数のプロセッサまたは複数のコアを有するプロセッサを使用することもできる。

#### 【0136】

図77に説明する通り、高速キャッシュ104は、プロセッサ102に接続するまたはこれに取り込んで、プロセッサ102によって近年または頻繁に使用される命令またはデータのための高速メモリを提供することができる。プロセッサ102は、プロセッサバス108によってノースブリッジ（north bridge）106に接続される。ノースブリッジ106は、メモリバス112によってランダムアクセスメモリ（RAM）110に接続され、プロセッサ102によりRAM110へのアクセスを管理する。ノースブリッジ106は、チップセットバス（chip set bus）116によってサウスブリッジ（south bridge）114にも接続される。続いてサウスブリッジ114は、周辺バス（peripheral bus）118に接続される。周辺バスは、例えば、PCI、PCI-X、PCI Expressまたは他の周辺バスとなり得る。ノースブリッジおよびサウスブリッジは、多くの場合、プロセッサチップセットと称され、周辺バス118におけるプロセッサ、RAMおよび周辺成分の間のデータ転送を管理する。一部の代替的アーキテクチャにおいて、別々のノースブリッジチップを使用する代わりに、ノースブリッジの機能性をプロセッサに取り込むことができる。

#### 【0137】

一部の実施形態では、システム100は、周辺バス118に付着させたアクセラレータカード122を含み得る。アクセラレータは、ある特定の処理を加速するためのフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）または他のハードウェアを含み得る。例えば、アクセラレータは、適合性データ再構成または伸長されたセット処理において使用される代数式を評価するために使用することができる。

#### 【0138】

ソフトウェアおよびデータは、外部ストレージ124において記憶され、プロセッサによる使用のためにRAM110および／またはキャッシュ104にロードすることができる。システム100は、システムリソースを管理するためのオペレーティングシステムを含む；オペレーティングシステムの非限定例として、Linux（登録商標）、Windows（商標）、MAC OS（商標）、BlackBerry OS（商標）、iOS（商標）および他の機能的に均等なオペレーティングシステム、ならびにデータストレージを管理するためのオペレーティングシステムの上で実行するアプリケーションソフトウェアおよび本発明の例としての実施形態に従った最適化が挙げられる。

#### 【0139】

この例では、システム100は、ネットワーク接続ストレージ（NAS）および分布された並列処理に使用することができる他のコンピュータシステム等、外部ストレージへのネットワークインターフェイスを提供するための周辺バスに接続されたネットワークイン

ターフェイスカード（NIC）120および121も含む。

#### 【0140】

図78は、複数のコンピュータシステム202aおよび202b、複数の携帯電話およびパーソナルデータアシスタント202c、ならびにネットワーク接続ストレージ（NAS）204aおよび204bを有するネットワーク200を示す図表である。例としての実施形態では、システム212a、212bおよび212cは、データストレージを管理し、ネットワーク接続ストレージ（NAS）214aおよび214bに記憶されたデータのためのデータアクセスを最適化することができる。数学的モデルは、データに使用し、コンピュータシステム212aおよび212bならびに携帯電話およびパーソナルデータアシスタントシステム212cにわたる分布された並列処理を使用して評価することができる。コンピュータシステム212aおよび212bならびに携帯電話およびパーソナルデータアシスタントシステム212cは、ネットワーク接続ストレージ（NAS）214aおよび214bに記憶されたデータの適合性データ再構成のための並列処理を提供することもできる。図78は、単なる例を説明し、多種多様な他のコンピュータアーキテクチャおよびシステムを、本発明の様々な実施形態と併せて使用することができる。例えば、ブレードサーバーを使用して、並列処理を提供することができる。プロセッサブレードは、バックプレーンにより接続して、並列処理を提供することができる。ストレージは、バックプレーンに、または別々のネットワークインターフェイスによるネットワーク接続ストレージ（NAS）として接続することもできる。

#### 【0141】

一部の例としての実施形態では、プロセッサは、別々のメモリスペースを維持し、ネットワークインターフェイス、バックプレーンまたは他のプロセッサにより並列処理するための他のコネクタによりデータを伝達することができる。他の実施形態では、プロセッサの一部または全ては、共有されるバーチャルアドレスメモリスペースを使用することができる。

#### 【0142】

図79は、例としての実施形態に従った、共有されるバーチャルアドレスメモリスペースを使用したマルチプロセッサコンピュータシステム300のブロック図である。システムは、共有されるメモリサブシステム304にアクセスすることができる複数のプロセッサ302a～fを含む。システムは、メモリサブシステム304において複数のプログラム可能なハードウェアメモリアルゴリズムプロセッサ（MAP）306a～fを取り込む。各MAP306a～fは、メモリ308a～fおよび1個または複数のフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）310a～fを含み得る。MAPは、設定可能な機能的単位を提供し、特定のアルゴリズムまたはアルゴリズムの部分は、それぞれのプロセッサと密接に協調して処理するためにFPGA310a～fに提供され得る。例えば、MAPを使用して、データモデルに関する代数式を評価し、例としての実施形態における適合性データ再構成を行うことができる。この例では、各MAPは、これらの目的のために全プロセッサによりグローバルにアクセス可能である。一構成において、各MAPは、ダイレクトメモリアccess（DMA）を使用して、関連するメモリ308a～fにアクセスし、これに、それぞれのマイクロプロセッサ302a～fとは独立かつ非同期的にタスクを実行させることができる。この構成において、MAPは、アルゴリズムのパイプライン化および並列実行のために、別のMAPに直接的に結果をフィードすることができる。

#### 【0143】

上述のコンピュータアーキテクチャおよびシステムは、単なる例であり、多種多様な他のコンピュータ、携帯電話ならびにパーソナルデータアシスタントアーキテクチャおよびシステムを、例としての実施形態に関連して使用することができる。一般的プロセッサ、コプロセッサ、FPGAおよび他のプログラム可能な論理デバイス、システムオンチップ（SOC）、特定用途向け集積回路（ASIC）ならびに他の処理および論理要素のいずれかの組合せを使用したシステムが挙げられる。一部の実施形態では、ソフトウェアまたはハードウェアにおいて、コンピュータシステムの全体または部分を実行することができる

。データストレージ媒体のいずれかの変種を、例としての実施形態に関連して使用することができ、ランダムアクセスメモリ、ハードドライブ、フラッシュメモリ、テープドライブ、ディスクアレイ、ネットワーク接続ストレージ（NAS）ならびに他のローカルまたは分布されたデータストレージデバイスおよびシステムが挙げられる。

#### 【0144】

例としての実施形態では、本開示のコンピュータサブシステムは、上述または他のコンピュータアーキテクチャおよびシステムのいずれかにおいて実行するソフトウェアモジュールを使用して実行することができる。他の実施形態では、システムの機能は、ファームウェア、図79に参照されるフィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA）等のプログラム可能な論理デバイス、システムオンチップ（SOC）、特定用途向け集積回路（ASIC）または他の処理および論理要素において部分的にまたは完全に実行することができる。例えば、図77に説明されているアクセラレータカード122等、ハードウェアアクセラレータカードの使用によるハードウェア加速により、Set Processor and Optimizerを実行することができる。

#### 【0145】

オリゴヌクレオチド（例えば、分子バーコード）

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数のオリゴヌクレオチドまたはその使用を含み得る。オリゴヌクレオチドは、本明細書に開示されている固体支持体に付着させることができる。固体支持体へのオリゴヌクレオチドの付着は、固体支持体およびオリゴヌクレオチドにおける官能基の対により起こり得る。オリゴヌクレオチドは、分子バーコードと称され得る。オリゴヌクレオチドは、標識（例えば、分子標識、細胞性標識）またはタグ（例えば、試料タグ）と称され得る。

#### 【0146】

オリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含み得る。ユニバーサル標識は、試料における全オリゴヌクレオチドで同じものとなり得る。ユニバーサル標識は、オリゴヌクレオチドのセットにおけるオリゴヌクレオチドで同じものとなり得る。ユニバーサル標識は、オリゴヌクレオチドの2またはそれを超えるセットで同じものとなり得る。ユニバーサル標識は、配列決定プライマーにハイブリダイズすることができる核酸の配列を含み得る。配列決定プライマーは、ユニバーサル標識を含むオリゴヌクレオチドの配列決定に使用することができる。配列決定プライマー（例えば、ユニバーサル配列決定プライマー）は、ハイスループット配列決定プラットフォームに関連する配列決定プライマーを含み得る。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の配列を含み得る。ユニバーサル標識は、配列決定プライマーおよびPCRプライマーにハイブリダイズすることができる核酸の配列を含み得る。配列決定および／または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の配列は、プライマー結合部位と称され得る。ユニバーサル標識は、オリゴヌクレオチドの転写開始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、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド内の領域の伸長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、少なくとも約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。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、最大でも約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。

#### 【0147】

オリゴヌクレオチドは、細胞性標識を含み得る。細胞性標識は、いずれの細胞にオリゴヌクレオチドが接触されるかに関する情報を提供することができる核酸配列を含み得る（例えば、いずれの核酸がいずれの細胞に起源をもつかを決定する）。同じ固体支持体におけるオリゴヌクレオチドの少なくとも60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、99%または100%は、同じ細胞性標識を含み得る。同じ固体支持体におけるオリゴヌクレオチドの少なくとも60%は、同じ細胞性標識を含み得る。同じ固体支持

体におけるオリゴヌクレオチドの少なくとも95%は、同じ細胞性標識を含み得る。同じ固体支持体における全オリゴヌクレオチドは、同じ細胞性標識を含み得る。第1の固体支持体におけるオリゴヌクレオチドの細胞性標識は、第2の固体支持体におけるオリゴヌクレオチドの細胞性標識とは異なり得る。

#### 【0148】

細胞性標識は、少なくとも約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。細胞性標識は、最大でも約300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4個またはそれより少ないもしくはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。細胞性標識は、約5～約200個の間のヌクレオチドを含み得る。細胞性標識は、約10～約150個の間のヌクレオチドを含み得る。細胞性標識は、約20～約125個の間のヌクレオチドの長さを含み得る。

10

#### 【0149】

オリゴヌクレオチドは、分子標識を含み得る。分子標識は、オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる特異的核酸種に関する情報の同定を提供し得る核酸配列を含み得る。同じ固体支持体にコンジュゲートされるオリゴヌクレオチドは、異なる分子標識を含み得る。このようにして、分子標識は、異なるオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする標的核酸の種類（例えば、遺伝子）を識別することができる。分子標識は、少なくとも約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。分子標識は、最大でも約300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4個またはそれより少ないヌクレオチドの長さとなり得る。

20

#### 【0150】

オリゴヌクレオチドは、試料標識（例えば、試料指標）を含み得る。試料標識は、標的核酸がいずれに起源をもつかに関する情報を提供することができる核酸配列を含み得る。例えば、試料標識は、異なる実験において使用される異なる固体支持体において異なり得る。試料標識は、少なくとも約1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。試料標識は、最大でも約300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4個またはそれより少ないヌクレオチドの長さとなり得る。

30

#### 【0151】

オリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識、細胞性標識、分子標識および試料標識またはこれらのいずれかの組合せを含み得る。組合せにおいて、試料標識を使用して、試料間の標的核酸を識別することができ、細胞性標識を使用して、試料における異なる細胞由来の標的核酸を識別することができ、分子標識を使用して、細胞における異なる標的核酸を識別することができ（例えば、同じ標的核酸の異なるコピー）、ユニバーサル標識を使用して、標的核酸を増幅および配列決定することができる。

#### 【0152】

ユニバーサル標識、分子標識、細胞性標識、リンカー標識および／または試料標識は、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、コンピュータで作成することができる。ヌクレオチドのランダム配列は、これに関連するパターンを持たなくてよい。ユニバーサル標識、分子標識、細胞性標識、リンカー標識および／または試料標識は、ヌクレオチドの非ランダム（例えば、ヌクレオチドは、パターンを含む）配列を含み得る。ユニバーサル標識、分子標識、細胞性標識、リンカー標識および／または試料標識の配列は、市販の配列となり得る。ユニバーサル標識、分子標識、細胞性標識、リンカー標識および／または試料標識の配列は、ランダム（randomer）配列を含み得る。ランダム配列は、所定の長さのランダム（randomer）のあらゆる可能な配列で構成されたオリゴヌクレオチド配列を指すことができる。それに代えてまたはそれに加えて、ユニバーサル標識、分子標識、細胞性標識、リンカー標識および／または試料標識は、ヌクレ

40

50

オチドの既定の配列を含み得る。

【0153】

図1は、ユニバーサル標識、細胞性標識および分子標識を含む、本開示の例示的なオリゴヌクレオチドを示す。

【0154】

図3は、オリゴヌクレオチド(312)にカップリングされた固体支持体(301)を含む、例示的なオリゴヌクレオチドがカップリングされた固体支持体を示す。オリゴヌクレオチド(312)は、化学基(5'アミン、302)、ユニバーサル標識(303)、細胞性標識(311)、分子標識(分子BC、311)および標的結合領域(オリゴdT、310)を含む。この模式図において、細胞性標識(311)は、第1の細胞標識(CLパート1、304)、第1のリンカー(リンカー1、305)、第2の細胞標識(CLパート2、306)、第2のリンカー(リンカー2、307)、第3の細胞標識(CLパート3、308)を含む。細胞性標識(311)は、固体支持体におけるオリゴヌクレオチド毎に共通である。2個またはそれを超えるビーズに対する細胞性標識(311)は、異なり得る。2個またはそれを超えるビーズに対する細胞性標識(311)は、細胞標識(例えば、CLパート1(304)、CLパート2(306)、CLパート3(308))が異なり得る。2個またはそれを超えるビーズに対する細胞性標識(311)は、第1の細胞標識(304)、第2の細胞標識(306)、第3の細胞標識(308)またはこれらの組合せが異なり得る。細胞性標識(311)の第1および第2のリンカー(303、305)は、2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドがカップリングされた固体支持体で同一となり得る。ユニバーサル標識(303)は、2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドがカップリングされた固体支持体で同一となり得る。ユニバーサル標識(303)は、同じ固体支持体における2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドで同一となり得る。分子標識(311)は、固体支持体における少なくとも2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドで異なり得る。固体支持体は、100種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含み得る。固体支持体は、1000種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含み得る。固体支持体は、10000種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含み得る。固体支持体は、100000種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドを含み得る。

【0155】

ユニバーサル標識、細胞性標識および分子標識に加えて、オリゴヌクレオチドは、標的結合領域を含み得る。標的結合領域は、標的核酸(例えば、分析しようとする細胞の核酸)に結合することができる核酸配列を含み得る。標的結合領域は、遺伝子特異的配列となり得る。例えば、標的結合領域は、特異的標的核酸の特異的位置に付着させる(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。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、標的核酸の特異的配列とは独立的に、複数の標的核酸に結合することができる配列を指すことができる。例えば、標的結合領域は、ランダムマルチマー配列またはオリゴdT配列(例えば、mRNAのポリアデニル化テイルにハイブリダイズすることができるひと続きのチミジンヌクレオチド)を含み得る。ランダムマルチマー配列は、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーまたはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列となり得る。標的結合領域は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。標的結合領域は、最大でも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。

【0156】

オリゴヌクレオチドは、複数の標識を含み得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7もしくは8種またはそれを超えるユニバーサル標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、最大でも約1、2、3、4、5、6、7もしくは8種またはそれを超えるユニバーサル標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも

約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える細胞性標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、最大でも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える細胞性標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える分子標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、最大でも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える分子標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える試料標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、最大でも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える試料標識を含み得る。オリゴヌクレオチドは、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える標的結合領域を含み得る。オリゴヌクレオチドは、最大でも約 1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 種またはそれを超える標的結合領域を含み得る。

10

#### 【0157】

オリゴヌクレオチドが、2 種類以上の標識（例えば、2 種以上の細胞性標識または 2 種以上の分子標識）を含む場合、標識は、リンカー標識配列が散在してよい。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 個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。リンカー標識配列は、最大でも約 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 個またはそれを超えるヌクレオチドの長さとなり得る。場合によっては、リンカー標識配列は、12 個のヌクレオチドの長さである。リンカー標識配列を使用して、図 2A の図表に示されているようなオリゴヌクレオチドの合成を容易にすることができる。

20

#### 【0158】

固体支持体にコンジュゲートされるオリゴヌクレオチドの数は、細胞における標的核酸の数よりも 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 倍多くなり得る。場合によっては、オリゴヌクレオチドの少なくとも 10、20、30、40、50、60、70、80、90 または 100 % が、標的核酸によって結合される。場合によっては、オリゴヌクレオチドの最大でも 10、20、30、40、50、60、70、80、90 または 100 % が、標的核酸によって結合される。場合によっては、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90 もしくは 100 種またはそれを超える異なる標的核酸が、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドによって捕捉される。場合によっては、最大でも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90 もしくは 100 種またはそれを超える異なる標的核酸が、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドによって捕捉される。

30

#### 【0159】

ポリマーは、追加的な固体支持体を含み得る。例えば、ポリマーは、ビーズが点在し得る。ビーズは、ポリマーの異なる領域に空間的に位置し得る。本開示のオリゴヌクレオチドを含むビーズまたは支持体は、空間的にアドレスを指定することができる。ビーズまたは支持体は、ポリマーにおける空間的アドレスに相当するバーコードを含み得る。例えば、複数のビーズまたは支持体の各ビーズまたは支持体は、複数のマイクロウェルのアレイまたは特定のマイクロ壁におけるポジション等、ポリマーにおけるポジションに相当するバーコードを含み得る。空間的アドレスをデコードして、ビーズまたは支持体がポジショニングされた位置を決定することができる。例えば、バーコード等、空間的アドレスは、バーコードへのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによりまたはバーコードの配列決定によりデコードすることができる。あるいは、ビーズまたは支持体は、空間的アドレスデコード目的のために、グラフィック特色、化学基、色、蛍光またはこれらのいずれかの組合せ等、他の種類のバーコードを有することができる。

40

#### 【0160】

本明細書に開示されている方法およびキットは、分子バーコードの 1 または複数のセットを含み得る。1 種または複数の分子バーコードは、試料指標領域および標識領域を含み得る。分子バーコードのセットの 2 種またはそれを超える分子バーコードは、同じ試料指標領域および 2 種またはそれを超える異なる標識領域を含み得る。分子バーコードの 2 ま

50

たはそれを超えるセットの2種またはそれを超える分子バーコードは、2種またはそれを超える異なる試料指標領域を含み得る。分子バーコードのセット由来の2種またはそれを超える分子バーコードは、異なる標識領域を含み得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセットの2種またはそれを超える分子バーコードは、同じ標識領域を含み得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセット由来の分子バーコードは、それらの試料指標領域が異なり得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセット由来の分子バーコードは、それらの標識領域に基づき同様となり得る。

#### 【0161】

分子バーコードは、標的特異的領域、アダプター領域、ユニバーサルPCR領域、標的特異的領域またはこれらのいずれかの組合せをさらに含み得る。分子バーコードは、ユニバーサルPCR領域および標的特異的領域を含み得る。分子バーコードは、1種または複数の二次構造を含み得る。分子バーコードは、ヘアピン構造を含み得る。分子バーコードは、標的特異的領域および切断可能システムを含み得る。

10

#### 【0162】

本明細書に開示されている方法およびキットは、試料タグの1または複数のセットを含み得る。1種または複数の試料タグは、試料指標領域を含み得る。1種または複数の試料タグは、試料指標領域を含み得る。試料タグのセットの2種またはそれを超える試料タグは、同じ試料指標領域を含み得る。試料タグの2またはそれを超えるセットの2種またはそれを超える試料タグは、2種またはそれを超える異なる試料指標領域を含み得る。

#### 【0163】

試料タグは、標的特異的領域、アダプター領域、ユニバーサルPCR領域、標的特異的領域またはこれらのいずれかの組合せをさらに含み得る。試料タグは、ユニバーサルPCR領域および標的特異的領域を含み得る。試料タグは、1種または複数の二次構造を含み得る。試料タグは、ヘアピン構造を含み得る。試料タグは、標的特異的領域および切断可能システムを含み得る。

20

#### 【0164】

本明細書に開示されている方法およびキットは、分子識別子標識の1または複数のセットを含み得る。1種または複数の分子識別子標識は、標識領域を含み得る。1種または複数の分子識別子標識は、標識領域を含み得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識は、2種またはそれを超える異なる標識領域を含み得る。分子識別子標識の2またはそれを超えるセットの2種またはそれを超える分子識別子標識は、2種またはそれを超える同一標識領域を含み得る。分子識別子標識は、標的特異的領域、アダプター領域、ユニバーサルPCR領域、標的特異的領域またはこれらのいずれかの組合せをさらに含み得る。分子識別子標識は、ユニバーサルPCR領域および標的特異的領域を含み得る。分子識別子標識は、1種または複数の二次構造を含み得る。分子識別子標識は、ヘアピン構造を含み得る。分子識別子標識は、標的特異的領域および切断可能システムを含み得る。

30

#### 【0165】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、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、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000ヌクレオチドまたは塩基対を含み得る。別の例では、試料タグまたは分子識別子標識は、少なくとも約1500、2,000; 2500、3,000; 3500、4,000; 4500、5,000; 5500、6,000; 6500、7,000; 7500、8,000; 8500、9,000; 9500または10,000ヌクレオチドまたは塩基対を含む。

40

#### 【0166】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、マルチマー、例えば、ランダムマルチマーとなり得る。マルチマー配列は、例えば、非ランダムまたはランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー

50

、デカマーまたはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列となり得る。タグは、モノヌクレオチドのセットからランダムに作製することができる。タグは、モノヌクレオチドをランダムに取り込むことにより組み立てることができる。

#### 【0167】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識を、無作為さがないように組み立て、ランダムに作製されていないが、方法の実施に十分な数の異なるタグを含む異なるタグのライブラリーを作製することもできる。

#### 【0168】

一部の実施形態では、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、標的核酸における削減を含み得る。削減は、例えば、標的核酸の一末端または両末端の酵素消化となり得る。削減は、付加された分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の付加と併せて使用することができる。削減および付加されたタグの組合せは、特定の出発分子に関する情報を含有することができる。検出が、ランダム削減および付加されたオリゴヌクレオチドの両方の決定を可能にする場合、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識にランダム削減を付加することにより、付加されたタグのより小さい多様性が、標的核酸の数の計数に必要となり得る。

10

#### 【0169】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、標的特異的領域を含み得る。標的特異的領域は、分子に相補的な配列を含み得る。場合によっては、分子は、mRNA分子であり、標的特異的領域は、mRNA分子のポリAテイルに相補的なオリゴdT配列を含む。標的特異的領域は、DNAおよび／またはRNA合成のためのプライマーとして作用することもできる。例えば、標的特異的領域のオリゴdT配列は、mRNA分子のcDNAコピーの第1鎖合成のためのプライマーとして作用することができる。あるいは、標的特異的領域は、分子のいずれかの部分に相補的な配列を含む。他の事例では、標的特異的領域は、分子にハイブリダイズまたはライゲーションされ得るランダム配列を含む。標的特異的領域は、分子への試料タグまたは分子識別子標識の付着を可能にすることができる。試料タグまたは分子識別子標識の付着は、本明細書に開示されている方法（例えば、ハイブリダイゼーション、ライゲーション）のいずれかにより起こり得る。場合によっては、標的特異的領域は、1種または複数の制限酵素によって認識される配列を含む。標的特異的領域は、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、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000ヌクレオチドまたは塩基対を含み得る。別の例では、標的特異的領域は、少なくとも約1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500または10000ヌクレオチドまたは塩基対を含む。好ましくは、標的特異的領域は、少なくとも約5～10、10～15、10～20、10～30、15～30または20～30ヌクレオチドまたは塩基対を含む。

20

30

#### 【0170】

場合によっては、標的特異的領域は、特定の遺伝子または遺伝子産物に特異的である。例えば、標的特異的領域は、p53遺伝子または遺伝子産物の領域に相補的な配列を含む。したがって、試料タグおよび分子識別子標識は、p53特異的配列を含む分子に単に付着させることができる。あるいは、標的特異的領域は、複数の異なる遺伝子または遺伝子産物に特異的である。例えば、標的特異的領域は、オリゴdT配列を含む。したがって、試料タグおよび分子識別子標識は、ポリA配列を含むいずれかの分子に付着させることができる。別の例では、標的特異的領域は、複数の異なる遺伝子または遺伝子産物に相補的なランダム配列を含む。よって、試料タグまたは分子識別子標識は、標的特異的領域に相補的な配列を有するいずれかの分子に付着させることができる。他の事例では、標的特異的領域は、制限部位オーバーハング（例えば、EcoRI粘着末端オーバーハング）を含

40

50

む。試料タグまたは分子識別子標識は、制限部位オーバーハングに相補的な配列を含むいずれかの分子にライゲーションすることができる。

#### 【0171】

場合によっては、標的特異的領域は、特定のマイクロRNAまたはマイクロRNA産物に特異的である。例えば、標的特異的領域は、特異的マイクロRNAまたはマイクロRNA産物の領域に相補的な配列を含む。例えば、標的特異的領域は、マイクロRNAの特異的パネルまたはマイクロRNA産物のパネルの領域に相補的な配列を含む。したがって、試料タグおよび分子識別子標識は、マイクロRNA (microRNA) 特異的配列を含む分子に単に付着させることができる。あるいは、標的特異的領域は、複数の異なるマイクロRNAまたはマイクロRNA産物に特異的である。例えば、標的特異的領域は、共通配列を含有するマイクロRNAのパネル等、2種またはそれを超えるマイクロRNAに含まれる領域に相補的な配列を含む。したがって、試料タグおよび分子識別子標識は、共通マイクロRNA配列を含むいずれかの分子に付着させることができる。別の例では、標的特異的領域は、複数の異なるマイクロRNAまたはマイクロRNA産物に相補的なランダム配列を含む。よって、試料タグまたは分子識別子標識は、標的特異的領域に相補的な配列を有するいずれかのマイクロRNA分子に付着させることができる。他の事例では、標的特異的領域は、制限部位オーバーハング (例えば、EcoRI 粘着末端オーバーハング) を含む。試料タグまたは分子識別子標識は、制限部位オーバーハングに相補的な配列を含むいずれかのマイクロRNA分子にライゲーションすることができる。

#### 【0172】

本明細書に開示されている分子バーコードまたは分子識別子標識は、多くの場合、標識領域を含む。標識領域を使用して、標的種の出現を特有に同定し、これにより、2種のそれ以外は同一またはほとんど同一の標的の間の識別に使用することができる識別子により各種をマークすることができる。複数の試料タグおよび分子識別子標識の標識領域は、異なる半導体ナノ結晶、金属化合物、ペプチド、オリゴヌクレオチド、抗体、小分子、同位体、粒子またはそれに関連するもしくは包埋される異なる形状、色、バーコードもしくは回折パターンを有する構造、一連の数、タンパク質または核酸のランダム断片、異なる同位体、あるいはこれらのいずれかの組合せの収集を含み得る。標識領域は、縮重配列を含み得る。標識領域は、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、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000ヌクレオチドまたは塩基対を含み得る。別の例では、標識領域は、少なくとも約1500；2,000；2500、3,000；3500、4,000；4500、5,000；5500、6,000；6500、7,000；7500、8,000；8500、9,000；9500または10,000ヌクレオチドまたは塩基対を含む。好ましくは、標識領域は、少なくとも約10～30、15～40または20～50ヌクレオチドまたは塩基対を含む。

#### 【0173】

場合によっては、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、ユニバーサルプライマー結合部位を含む。ユニバーサルプライマー結合部位は、標識された分子および／または標識されたアンプリコンへのユニバーサルプライマーの付着を可能にする。ユニバーサルプライマーは、本技術分野で周知であり、-47F (M13F)、alfamF、AOX3'、AOX5'、BGH\_\_r、CMV\_\_-30、CMV\_\_-50、CVM\_\_f、LACrm t、ラムダgt10F、ラムダgt10R、ラムダgt11F、ラムダgt11R、M13\_\_rev、M13Forward (-20)、M13Reverse、male、p10SEQP\_\_pQE、pA\_\_-120、pet\_\_4、pGAP\_\_Forward、pGL\_\_RVpr3、pGLpr2\_\_R、pKLAC1\_\_4、pQE\_\_FS、pQE\_\_RS、puc\_\_U1、puc\_\_U2、revers\_\_A、seq\_\_IRES\_\_tam、seq\_\_IRES\_\_zpet、seq\_\_ori、seq\_\_PCR、seq\_\_pIRES-、seq\_\_pIRES+、seq\_\_pSecTag、seq\_\_pSecTag+、se

q \_ r e t r o + P S I、S P 6、T 3 - p r o m、T 7 - p r o m および T 7 - t e r m \_ I n v が挙げられるがこれらに限定されない。ユニバーサルプライマー結合部位へのユニバーサルプライマーの付着は、標識された分子および／または標識されたアンプリコンの増幅、検出および／または配列決定に使用することができる。ユニバーサルプライマー結合部位は、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、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900 または 1000 ヌクレオチドまたは塩基対を含み得る。別の例では、ユニバーサルプライマー結合部位は、少なくとも約 1500；2，000；2500、3，000；3500、4，000；4500、5，000；5500、6，000；6500、7，000；7500、8，000；8500、9，000；9500 または 10，000 ヌクレオチドまたは塩基対を含む。好ましくは、ユニバーサルプライマー結合部位は、10～30 ヌクレオチドまたは塩基対を含む。

10

#### 【0174】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、アダプター領域を含み得る。アダプター領域は、1 種または複数のプローブのハイブリダイゼーションを可能にすることができる。アダプター領域は、1 種または複数の H C R プローブのハイブリダイゼーションを可能にすることができる。

#### 【0175】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、1 種または複数の検出可能な標識を含み得る。

20

#### 【0176】

分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、ハイブリダイゼーション連鎖反応 (H C R) のためのイニシエーターとして作用することができる。試料タグまたは分子識別子標識のアダプター領域は、H C R のためのイニシエーターとして作用することができる。ユニバーサルプライマー結合部位は、H C R のためのイニシエーターとして作用することができる。

#### 【0177】

場合によっては、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、一本鎖である。他の事例では、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、二本鎖である。分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、直鎖状となり得る。あるいは、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、二次構造を含む。本明細書において、「二次構造」は、三次、四次等…構造を含む。場合によっては、二次構造は、ヘアピン、ステムループ構造、内部ループ、バルジループ、分枝状構造もしくはシュードノット、複数のステムループ構造、クローバー型構造またはいずれかの三次元構造である。場合によっては、二次構造は、ヘアピンである。ヘアピンは、オーバーハング配列を含み得る。ヘアピンのオーバーハング配列は、ポリメラーゼ連鎖反応および／または逆転写反応のためのプライマーとして作用することができる。オーバーハング配列は、試料タグまたは分子識別子標識を付着させる分子に相補的な配列を含み、オーバーハング配列は、その分子にハイブリダイズする。オーバーハング配列は、その分子にライゲーションすることができ、ポリメラーゼ連鎖反応および／または逆転写反応のための鋳型として作用する。一部の実施形態では、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、核酸および／または合成核酸および／または修飾された核酸を含む。

30

40

#### 【0178】

場合によっては、複数の分子バーコード、試料タグ (例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識 (例えば、分子標識) は、少なくとも約 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 または 100 種の異なる分子バーコード、試料タグ (例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識 (例えば、分子標識) を含む。他の事例では、複数の分子バーコード、試料タグ (例えば

50

、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)は、少なくとも約200;300;400;500;600;700;800;900;1,000;2,000;3,000;4,000;5,000;6,000;7,000;8,000;9,000;または10000種の異なる分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)を含む。あるいは、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)は、少なくとも約20,000;30,000;40,000;50,000;60,000;70,000;80,000;90,000;または100,000種の異なる分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)を含む。

10

#### 【0179】

複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)における分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)の数は、多くの場合、標識しようとする分子の数を超過する。場合によっては、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)における分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)の数は、標識しようとする分子の数よりも少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90または100倍多い。

20

#### 【0180】

複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)における異なる分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)の数は、多くの場合、標識しようとする異なる分子の数を超過する。場合によっては、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)における異なる分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)の数は、標識しようとする異なる分子の数よりも少なくとも約1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90または100倍多い。

30

#### 【0181】

場合によっては、分子の確率論的標識化は、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)を含み、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)における異なる分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)の濃度は、同じである。かかる事例では、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)は、等しい数の各異なる分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識を含む。

40

#### 【0182】

場合によっては、分子の確率論的標識化は、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)を含み、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)における異なる分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)の濃度は、異なる。かかる事例では、複数の分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)は、異なる数の各異なる分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識を含む。

50

## 【0183】

場合によっては、一部の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）は、複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における他の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）よりも高濃度で存在する。場合によっては、異なる濃度の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）による確率論的標識化は、使用される異なる標識の数を増加させることなく試料測定ダイナミックレンジを伸長させる。例えば、全て等濃度の10種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）による3種の核酸試料分子の確率論的標識化を考慮してみる。3種の異なる標識の観察が予想される。次に、3種の核酸分子の代わりに、30種の核酸分子を考慮してみると、全10種の標識の観察が予想される。対照的に、10種の異なる確率論的標識を同様に使用しつつ、標識の相対比を1:2:3:4...10に変更した場合、3種の核酸分子を用いると、1~3種の間の標識の観察が予想されるが、30種の分子を用いると、およそ5種のみの標識の観察が予想され、よって、同数の確率論的標識による測定の範囲を伸長する。

10

## 【0184】

複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の相対比は、1:Xとなることができ、Xは、少なくとも約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または100である。あるいは、複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における「n」種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の相対比は、1:A:B:C:…Z<sub>n</sub>であり、A、B、C…Z<sub>n</sub>は、少なくとも約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または100である。

20

30

## 【0185】

場合によっては、複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における2種またはそれを超える異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の濃度は、同じである。「n」種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）に関して、少なくとも2、3、4、…n種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の濃度は、同じである。あるいは、複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における2種またはそれを超える異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の濃度は、異なる。「n」種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）に関して、少なくとも2、3、4、…n種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の濃度は、異なる。場合によっては、「n」種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）に関して、少なくとも2、3、4、…n種の異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の濃度の差は、少なくとも約

40

50

0. 1、0. 2、0. 3、0. 4、0. 5、0. 6、0. 7、0. 8、0. 9、1. 1. 25、1. 5、1. 75、2. 25、2. 5、2. 75、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000倍である。

#### 【0186】

場合によっては、複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の少なくとも約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%または100%は、同じ濃度を有する。あるいは、複数の分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）における異なる分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の少なくとも約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%または100%は、異なる濃度を有する。

#### 【0187】

図65に示す通り、分子バーコード（1004）は、別々に合成することができる。分子バーコード（1004）は、ユニバーサルPCR領域（1001）、1種または複数の識別子領域（1002）および標的特異的領域を含み得る。1種または複数の識別子領域は、試料指標領域、標識領域またはこれらの組合せを含み得る。1種または複数の識別子領域は隣接してよい。1種または複数の識別子領域は、隣接していなくてよい。個々の分子バーコードをプールして、複数の異なる識別子領域を含む複数の分子バーコード（1005）を生成することができる。試料タグは、図65に描写されているものと同様の様式で合成することができ、1種または複数の識別子領域は、試料指標領域を含む。分子識別子標識は、図65に描写されているものと同様の様式で合成することができ、1種または複数の識別子領域は、標識領域を含む。

#### 【0188】

標的特異的領域を識別子領域にライゲーションして、標的特異的領域を含む分子バーコードを生成することができる。5'および3'エキソヌクレアーゼを反応に添加して、ライゲーションされていない産物を除去することができる。分子バーコードは、ユニバーサルプライマー結合部位、標識領域および標的特異的領域を含み得、5'および3'エキソヌクレアーゼに対し抵抗性となることができる。本明細書において、用語「ユニバーサルプライマー結合部位」および「ユニバーサルPCR領域」は、互換的に使用することができる。増幅反応のプライミングに使用することができる配列を指すことができる。ライゲーションされた識別子領域由来の3'リン酸基を除去して、3'リン酸基のない分子バーコードを生成することができる。3'リン酸基は、酵素により除去することができる。例えば、T4ポリヌクレオチドキナーゼを使用して、3'リン酸基を除去することができる。

#### 【0189】

分子バーコードを合成する別の方法は、図66Aに描写されている。図66Aに示す通り、分子バーコード（1128）は、2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチド断片（1121および1127）をライゲーションすることにより合成することができる。一方のオリゴヌクレオチド断片（1121）は、ユニバーサルプライマー結合部位（1122）、識別子領域（1123）および第1のスプリント（1123）を含み得る。他方のオリゴヌクレオチド断片（1128）は、第2のスプリント（1125）および標的特異的領域（1126）を含み得る。リガーゼ（例えば、T4 DNAリガーゼ）を使用して、2種のオリゴヌクレオチド断片（1121および1127）を連結して、分子バーコード（1128）を生成することができる。第1のスプリント（1124）および第2のスプ

リント（１１２５）の二本鎖ライゲーションは、ブリッジスプリント（１１２９）を有する分子バーコード（１１２８）を生成することができる。

#### 【０１９０】

２種のオリゴヌクレオチド断片のライゲーションにより分子バーコードを合成する代替的方法是、図６６Ｂに描写されている。図６６Ｂに示す通り、分子バーコード（１１５８）は、２種のオリゴヌクレオチド断片（１１５０および１１５８）のライゲーションにより合成される。一方のオリゴヌクレオチド断片（１１５０）は、ユニバーサルプライマー結合部位（１１５１）、１種または複数の識別子領域（１１５２）およびライゲーション配列（１１５３）を含み得る。他方のオリゴヌクレオチド断片（１１５８）は、第１のオリゴヌクレオチド断片（１１５０）のライゲーション配列（１１５３）に相補的なライゲーション配列（１１５４）、標的特異的領域（１１５５）の相補体および標識（１１５６）を含み得る。オリゴヌクレオチド断片（１１５９）は、オリゴヌクレオチド断片の伸長を防ぐ３'リン酸を含むこともできる。図６６Ｂのステップ１に示す通り、２種のオリゴヌクレオチド断片のライゲーション配列（１１５３および１１５４）は、アニールすることができ、ポリメラーゼを使用して、第１のオリゴヌクレオチド断片（１１５０）の３'末端を伸長させて、分子バーコード（１１５８）を生成することができる。分子バーコード（１１５８）は、ユニバーサルプライマー結合部位（１１５１）、１種または複数の識別子領域（１１５２）、ライゲーション配列（１１５３）および標的特異的配列（１１５７）を含み得る。分子バーコード（１１５８）の標的特異的配列（１１５７）は、第２のオリゴヌクレオチド断片（１１５９）の標的特異的領域（１１５５）の相補体の相補体となり得る。標識（１１５６）を含むオリゴヌクレオチド断片は、分子バーコード（１１５８）から除去することができる。例えば、標識（１１５６）は、ビオチンを含み得、ビオチン標識（１１５６）を含むオリゴヌクレオチド断片（１１５９）は、ストレプトアビジン捕捉により除去することができる。別の例では、標識（１１５６）は、５'リン酸を含み得、５'リン酸（１１５６）を含むオリゴヌクレオチド断片（１１５９）は、エキソヌクレアーゼ（例えば、ラムダエキソヌクレアーゼ）により除去することができる。

#### 【０１９１】

図６６Ｃに描写する通り、ユニバーサルプライマー結合部位（１１７１）、１種または複数の識別子領域（１１７２）、第１のライゲーション配列（１１７３）を含む第１のオリゴヌクレオチド断片（１１７０）は、第２のライゲーション配列（１１７４）および標的配列（１１７５）のRNA相補体を含む第２のオリゴヌクレオチド断片（１１７６）にアニールされる。ステップ１は、第１および第２のライゲーション配列（１１７３および１１７４）のアニールと、続く標的配列（１１７５）のRNA相補体の逆転写とによる、ユニバーサルプライマー結合部位（１１７１）、１種または複数の識別子領域（１１７２）、第１のライゲーション配列（１１７３）および標的特異的領域（１１７８）を含む分子バーコード（１１７７）の生成を含み得る。標的配列のRNA相補体を含むオリゴヌクレオチド断片は、RNAse処理により選択的に分解することができる。

#### 【０１９２】

分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の配列は、分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）のダイマー形成を最小化するように最適化することができる。分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識ダイマーが増幅され、アンプリコンの各末端に２個のユニバーサルプライマー結合部位ならびに標的特異的領域および特有の識別子領域を含むアンプリコンの形成をもたらし得る。分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試料標識）、細胞性標識および分子識別子標識（例えば、分子標識）の濃度は、DNA鋳型の数よりもはるかに大きいため、このような分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識ダイマーは、増幅反応における標識されたDNA分子を凌駕することができる。増幅されないDNAは、偽陰性を生じ、増幅された分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識ダイマーは、高い偽陽性を生じる。よって、分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標領域、試

料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)は、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識ダイマー形成を最小化するように最適化することができる。あるいは、ダイマー形成する分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)は廃棄され、これにより、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識ダイマー形成を排除する。

#### 【0193】

あるいは、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識ダイマー形成は、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識配列に1種または複数の修飾を取り込むことにより排除または低下させることができる。ユニバーサルプライマー結合部位、特有の識別子領域、ならびにウラシルおよび3'リン酸基を含む標的特異的領域を含む分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識は、標的核酸にアニールされる。標的核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化断片となり得る。制限エンドヌクレアーゼは、認識部位を認識することができる。PCR増幅は、1種または複数のフォワードプライマーおよび1種または複数のリバースプライマーを含み得る。PCR増幅は、分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識のユニバーサルプライマー結合部位に特異的なフォワードプライマー、および分子バーコード、試料タグまたは分子識別子標識の標的特異的領域に特異的なフォワードプライマー、ならびに標的核酸に特異的なリバースプライマーによるネステッドPCRを含み得る。標的核酸は、1個または複数のウラシルを含む鋳型を増幅することができないPfu DNAポリメラーゼを使用して増幅することができる。よって、いかなるダイマー形成された分子バーコード、試料タグ(例えば、試料指標領域、試料標識)、細胞性標識および分子識別子標識(例えば、分子標識)も、Pfu DNAポリメラーゼによって増幅することができない。

#### 【0194】

オリゴヌクレオチド(例えば、分子バーコード)を合成する方法

オリゴヌクレオチドを合成することができる。オリゴヌクレオチドは、例えば、官能化された固体支持体のカルボキシル基へのオリゴヌクレオチドにおける5'アミノ基のカップリングにより(例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドによる)合成することができる。

#### 【0195】

カップリングしていないオリゴヌクレオチドは、複数の洗浄により反応混合物から除去することができる。固体支持体は、ウェル(例えば、96ウェル)に分割することができる。各固体支持体は、異なるウェルに分割することができる。オリゴヌクレオチド合成は、合成の分割/プール方法を使用して行うことができる。分割/プール方法は、反応性部分(例えば、合成しようとするオリゴヌクレオチド)を含む固体支持体のプールを利用することができる。このプールは、固体支持体の多数の個々のプールに分割することができる。各プールは、プールのそれぞれにおける固体支持体に異なる修飾をもたらし得る第1の反応に付すことができる(例えば、オリゴヌクレオチドに付加された異なる核酸配列)。反応後に、固体支持体のプールは、組み合わせ、混合し、再度分割することができる。各分割プールは、再度プール毎に異なる第2の反応またはランダム化に付すことができる。プロセスは、標的化合物のライブラリーが形成されるまで継続させることができる。

#### 【0196】

分割/プール合成を使用して、オリゴヌクレオチドに付加しようとする核酸配列は、プライマー伸長(例えば、クレノウ伸長)により取り込むことができる。オリゴヌクレオチドに付加しようとする核酸配列は、プライマー断片と称され得る。個々のプール毎の各プライマー断片は、異なる配列を含み得る(例えば、細胞性標識、分子標識、試料標識またはこれらのいずれかの組合せに)。プライマー断片は、オリゴヌクレオチド(例えば、固体支持体にカップリングされたオリゴヌクレオチド)のリンカー標識配列にハイブリダイズすることができる配列を含み得る。プライマー断片は、第2の細胞標識および第2のリンカー標識配列をさらに含み得る。プライマー伸長を使用して、固体支持体にカップリングされたオリゴヌクレオチドに第2の細胞標識配列および第2のリンカー標識配列を導入

することができる（図 2 Bを参照）。プライマー伸長が新たな配列を取り込んだ後に、固体支持体を組み合わせることができる。組み合わせた固体支持体を加熱して、酵素を変性させることができる。組み合わせた固体支持体を加熱して、ハイブリダイゼーションを破壊することができる。組み合わせた固体支持体は、再度ウェルに分割することができる。このプロセスを反復して、固体支持体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドに追加的な配列を付加することができる。

#### 【0197】

分割／プールプロセスは、少なくとも約1000、10000、100000、500000もしくは1000000種またはそれを超える異なるオリゴヌクレオチドの作製をもたらす得る。このプロセスは、最大でも約1000、10000、100000、500000もしくは1000000種またはそれを超える異なるオリゴヌクレオチドの作製をもたらす得る。

10

#### 【0198】

分割プール合成は、化学合成を含み得る。異なるオリゴヌクレオチドは、個々の反応における固体支持体におけるDMT化学を使用して合成し、続いて合成のための反応へとプールすることができる。分割／プールプロセスは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれを超える回数反復することができる。分割／プールプロセスは、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またはそれを超える回数反復することができる。分割／プールプロセスは、2またはそれを超える回数反復することができる。分割／プールプロセスは、3またはそれを超える回数反復することができる。分割／プールプロセスは、5またはそれを超える回数反復することができる。分割／プールプロセスは、10またはそれを超える回数反復することができる。

20

#### 【0199】

標識されたビーズ（例えば、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ）の1または複数のセットを生成する方法が本明細書にさらに開示されている。標識されたビーズの1または複数のセットを生成する方法は、1個または複数のビーズに1種または複数の核酸を付着させ、これにより、標識されたビーズの1または複数のセットを生成するステップを含み得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の分子バーコードを含み得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の試料タグ（例えば、試料標識、試料指標領域）を含み得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の細胞性標識を含み得る。1種または複数の核酸は、1種または複数の分子識別子標識（例えば、分子標識）を含み得る。1種または複数の核酸は、a) プライマー領域；b) 試料指標領域；およびc) リンカーまたはアダプター領域を含み得る。1種または複数の核酸は、a) プライマー領域；b) 標識領域（例えば、分子標識）；およびc) リンカーまたはアダプター領域を含み得る。1種または複数の核酸は、a) 試料指標領域（例えば、試料タグ）；およびb) 標識領域（例えば、分子標識）を含み得る。1種または複数の核酸は、a) 試料指標領域；およびb) 細胞性標識を含み得る。1種または複数の核酸は、a) 細胞性標識；およびb) 分子標識を含み得る。1種または複数の核酸は、a) 試料指標領域；b) 細胞性標識；およびc) 分子標識を含み得る。1種または複数の核酸は、プライマー領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、標的的特異的領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、リンカー領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、アダプター領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、試料指標領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、標識領域をさらに含み得る。

30

40

#### 【0200】

あるいは、方法は、a) 複数のウェル内に複数の第1の核酸を沈着させるステップであって、複数のウェルのうち2個またはそれを超える異なるウェルが、複数の核酸のうち2種またはそれを超える異なる核酸を含み得るステップと、b) 複数のウェルのうち1個または複数のウェルを1個またはそれより少ないビーズと接触させて、複数の単一の標識ビーズを生成するステップであって、複数の第1の標識されたビーズのうち単一の標識ビー

50

ズが、複数の第1の核酸の1核酸に付着させたビーズを含むステップと、c) 複数のウェル由来の複数の第1の標識されたビーズをプールして、第1の標識されたビーズのプールを生成するステップと、d) 第1の標識されたビーズのプールを後続の複数のウェルに分布させるステップであって、後続の複数のウェルのうち2個またはそれを超えるウェルが、複数の後続の核酸のうち2種またはそれを超える異なる核酸を含むステップと、e) 1個または複数の第1の標識されたビーズに複数の後続の核酸のうち1種または複数の核酸を付着させて、複数の特有に標識されたビーズを生成するステップとを含む。

#### 【0201】

##### ライブラリー

分子ライブラリーを生成する方法が本明細書に開示されている。方法は、(a) 2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子を確率論的に標識して、標識された分子を生成するステップであって、標識された分子が、(i) 2種またはそれを超える分子に基づくまたは由来する分子領域と、(ii) 2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子の区別における使用のための試料指標領域と、(iii) 単一の試料由来の2種またはそれを超える分子の区別における使用のための標識領域とを含むステップを含み得る。確率論的標識化は、分子バーコードの1または複数のセットの使用を含み得る。確率論的標識化は、試料タグの1または複数のセットの使用を含み得る。確率論的標識化は、分子識別子標識の1または複数のセットの使用を含み得る。

10

#### 【0202】

2種またはそれを超える分子の確率論的標識化は、複数の試料タグおよび複数の分子特異的標識と2種またはそれを超える試料を接触させて、複数の標識された核酸を生成することを含み得る。接触は、ランダムとなり得る。方法は、標識された分子のうち1種または複数を増幅し、これにより、ライブラリーの標識された分子の濃縮された集団を生成するステップをさらに含み得る。方法は、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子において1種または複数のアッセイを実行するステップをさらに含み得る。方法は、1種または複数のプルダウンアッセイを実行するステップをさらに含み得る。

20

#### 【0203】

標識された核酸ライブラリーを生成する方法は、2種またはそれを超える試料に1種または複数の対照を加えるステップをさらに含み得る。1種または複数の対照を確率論的に標識して、標識された対照を生成することができる。1種または複数の対照を使用して、標識された分子を生成する効率を測定することができる。

30

#### 【0204】

本明細書に開示されているライブラリーは、種々の適用において使用することができる。例えば、ライブラリーは、配列決定適用のために使用することができる。ライブラリーを貯蔵し、複数回使用して、分析のための試料を作製することができる。一部の適用は、例えば、多型の遺伝子型決定、RNAプロセシングの研究およびの配列決定を行うための代表的なクローン選択を含む。

#### 【0205】

##### 試料調製および適用

本明細書に開示されているオリゴヌクレオチド（例えば、分子バーコード、試料タグ、分子標識、細胞性標識）は、種々の方法において使用することができる。オリゴヌクレオチドは、核酸分析のための方法において使用することができる。核酸分析として、遺伝子型決定、遺伝子発現、コピー数変動および分子計数を挙げることができるがこれらに限定されない。

40

#### 【0206】

本開示は、マルチプレックス核酸分析の方法を提供する。方法は、(a) 支持体に付着させた1種または複数のオリゴヌクレオチドと細胞由来の1種または複数のオリゴヌクレオチドとを接触させるステップであって、支持体に付着させた1種または複数のオリゴヌクレオチドが、(i) 非ランダム配列によって接続された2種またはそれを超えるランダム配列を含む細胞標識領域と、(ii) 分子標識領域とを含むステップと、(b) 細胞

50

由来の1種または複数のオリゴヌクレオチドにおいて1種または複数のアッセイを実行するステップとを含み得る。

#### 【0207】

単一細胞核酸ライブラリーを生成する方法が本明細書にさらに開示されている。方法は、(a) 支持体に付着させた1種または複数のオリゴヌクレオチドと細胞由来の1種または複数のオリゴヌクレオチドとを接触させるステップであって、支持体に付着させた1種または複数のオリゴヌクレオチドが、(i) 非ランダム配列によって接続された2種またはそれを超えるランダム配列を含む細胞標識領域と、(ii) 分子標識領域とを含むステップと、(b) 細胞由来の1種または複数のオリゴヌクレオチドにおいて1種または複数のアッセイを実行するステップとを含み得る。

10

#### 【0208】

場合によっては、方法は、マイクロウェルアレイに1個または複数の細胞を添加するステップを含む。添加しようとする細胞の数は、計数から決定することができる。過剰なまたは非結合細胞は、バッファー（例えば、リン酸緩衝食塩水バッファー、H E P E S、T r i s）を使用して洗浄除去することができる。マイクロウェルアレイのウェルによって捕捉され得る細胞の数は、細胞のサイズに関係し得る。例えば、図6に描写する通り、マイクロウェルの設計に応じて、より大型の細胞は、より小型の細胞よりも容易に捕捉され得る。異なる細胞型を捕捉するために、異なるマイクロウェル（例えば、異なる寸法）を使用することができる。

#### 【0209】

20

本明細書に記載されている方法は、配列決定または他の分子分析のための核酸となり得る配列の付加を可能にする。このような方法は、RNAまたはDNA分子の集団に見出される核酸バリエーション、変異体、多型、逆位、欠失、復帰変異および他の質的事象の検出を可能にすることができる。例えば、方法は、標的頻度（例えば、遺伝子発現または対立遺伝子分布）の同定を可能にすることができる。例えば、方法は、罹患または非罹患被験体等に由来するゲノムまたはトランスクリプトームにおける変異またはSNPの同定も可能にする。方法は、細菌または真菌等、外来性生物またはウイルス等、被験体由来の生物学的試料における汚染または感染の存在または非存在の決定も可能にする。

#### 【0210】

30

細胞は、いずれかの方法によってマイクロウェルに添加することができる。一部の実施形態では、細胞は、希釈された細胞試料としてマイクロウェルに添加される。一部の実施形態では、細胞は、マイクロウェルに添加され、重力によってマイクロウェルに沈降させられる。一部の実施形態では、細胞は、マイクロウェルに添加され、遠心分離を使用して、マイクロウェルに細胞を沈降する。一部の実施形態では、1個または複数のマイクロウェルに1個または複数の細胞を注射することにより、細胞は、マイクロウェルに添加される。例えば、マイクロウェルに単一細胞を注射することにより、単一細胞は、マイクロウェルに添加することができる。細胞の注射は、マイクロマニピュレーターの使用による等、いずれかのデバイスまたは方法の使用により行うことができる。一部の実施形態では、細胞は、磁石を使用してマイクロウェルに添加することができる。例えば、磁性マイクロ粒子または磁性ナノ粒子等、磁性粒子で細胞の表面をコーティングし、磁石または磁場を使用してマイクロウェルに添加することができる。

40

#### 【0211】

細胞を含むマイクロウェルアレイは、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体（例えば、ビーズ）と接触させることができる。捕捉されていないオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体を除去することができる（例えば、バッファーによる洗浄除去）。図5は、捕捉された固体支持体を有するマイクロウェルアレイを描写する。マイクロウェルは、少なくとも1個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、少なくとも2個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、最大でも1個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、最大でも2個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれを超える固体

50

支持体を含み得る。マイクロウェルは、最大でも約1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれを超える固体支持体を含み得る。図5に示す通り、マイクロウェルアレイのマイクロウェルの一部は、1個の固体支持体を含み得、マイクロウェルアレイのマイクロウェルの一部は、2個またはそれを超える固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、本開示の方法のいずれかのために覆われる必要はない場合がある。言い換えれば、マイクロウェルは、方法の際に封着される必要はない場合がある。マイクロウェルが覆われて（例えば、封着されて）いない場合、あるマイクロウェルの内容物が別のマイクロウェルに拡散しないように、ウェルは離間することができる。

#### 【0212】

それに代えてまたはそれに加えて、細胞は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体と接触される前に捕捉および／または精製することができる。細胞を捕捉および／または精製するための方法は、抗体、分子足場および／またはビーズの使用を含み得る。細胞は、フローサイトメトリーにより精製することができる。市販のキットを使用して、細胞を捕捉または精製することができる。例えば、Dynabeads（登録商標）を使用して、細胞を単離することができる。磁性単離を使用して、細胞を精製することができる。細胞は、遠心分離により精製することができる。

#### 【0213】

細胞および支持体を含む懸濁液を作製することにより、細胞をオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体と接触させることができる。懸濁液は、ゲルを含み得る。細胞は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体と接触させる前に、支持体に固定化または溶液中に存在することができる。あるいは、細胞は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体を含む懸濁液に添加することができる。例えば、細胞は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体を包埋したヒドロゲルに添加することができる。

#### 【0214】

単一細胞を、単一のオリゴヌクレオチドがカップリングされた固体支持体と接触させることができる。単一細胞を、複数のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体と接触させることができる。複数の細胞が、単一のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体と相互作用することができる。複数の細胞が、複数のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体と相互作用することができる。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体は、細胞型特異的となり得る。あるいは、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体は、2種またはそれを超える異なる細胞型と相互作用することができる。

#### 【0215】

##### 溶解

マイクロウェルにおける細胞を溶解することができる。溶解は、機械的溶解、熱溶解、光学溶解および／または化学的溶解により行うことができる。化学的溶解は、プロテイナーゼK、ペプシンおよびトリプシン等、消化酵素の使用を含み得る。溶解は、マイクロウェルへの溶解バッファの添加により行うことができる。溶解バッファは、Tris HClを含み得る。溶解バッファは、少なくとも約0.01、0.05、0.1、0.5もしくは1Mまたはそれを超えるTris HClを含み得る。溶解バッファは、最大でも約0.01、0.05、0.1、0.5もしくは1Mまたはそれを超えるTris HClを含み得る。溶解バッファは、約0.1M Tris HClを含み得る。溶解バッファのpHは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれを超えることができる。溶解バッファのpHは、最大でも約1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10またはそれを超えることができる。場合によっては、溶解バッファのpHは、約7.5である。溶解バッファは、塩（例えば、LiCl）を含み得る。溶解バッファにおける塩の濃度は、少なくとも約0.1、0.5もしくは1Mまたはそれを超えることができる。溶解バッファにおける塩の濃度は、最大でも約0.1、0.5もしくは1Mまたはそれを超えることができる。場合によっては、溶解バッファにおける塩の濃度は、約0.5Mである。溶解バッファは、洗剤（例えば、S

D S、ドデシル硫酸 ( s u f a t e ) L i、t r i t o n X、t w e e n、N P-40) を含み得る。溶解バッファーにおける洗剤の濃度は、少なくとも約 0.0001、0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6 もしくは 7 % またはそれを超えることができる。溶解バッファーにおける洗剤の濃度は、最大でも約 0.0001、0.0005、0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、3、4、5、6 もしくは 7 % またはそれを超えることができる。場合によっては、溶解バッファーにおける洗剤の濃度は、約 1 % ドデシル硫酸 L i である。溶解のための方法において使用される時間は、使用される洗剤の量に依存し得る。場合によっては、使用される洗剤が多いほど、溶解に必要とされる時間は少なくなる。溶解バッファーは、キレート剤 (例えば、E D T A、E G T A) を含み得る。溶解バッファーにおけるキレート剤の濃度は、少なくとも約 1、5、10、15、20、25 もしくは 30 m M またはそれを超えることができる。溶解バッファーにおけるキレート剤の濃度は、最大でも約 1、5、10、15、20、25 もしくは 30 m M またはそれを超えることができる。場合によっては、溶解バッファーにおけるキレート剤の濃度は、約 10 m M である。溶解バッファーは、還元試薬 (例えば、ベーターメルカプトエタノール、D T T) を含み得る。溶解バッファーにおける還元試薬の濃度は、少なくとも約 1、5、10、15 もしくは 20 m M またはそれを超えることができる。溶解バッファーにおける還元試薬の濃度は、最大でも約 1、5、10、15 もしくは 20 m M またはそれを超えることができる。場合によっては、溶解バッファーにおける還元試薬の濃度は、約 5 m M である。場合によっては、溶解バッファーは、約 0.1 M T r i s H C l、約 p H 7.5、約 0.5 M L i C l、約 1 % ドデシル硫酸リチウム、約 10 m M E D T A および約 5 m M D T T を含み得る。

10

20

#### 【0216】

溶解は、約 4、10、15、20、25 または 30 C の温度で行うことができる。溶解は、約 1、5、10、15 もしくは 20 分間またはそれを超えて行うことができる。溶解された細胞は、少なくとも約 100000、200000、300000、400000、500000、600000 もしくは 700000 種またはそれを超える標的核酸分子を含み得る。溶解された細胞は、最大でも約 100000、200000、300000、400000、500000、600000 もしくは 700000 種またはそれを超える標的核酸分子を含み得る。図 7 は、溶解から得ることができる標的核酸 (即ち、m R N A) の濃度に関する例示的な統計を説明する。

30

#### 【0217】

##### 封着

マイクロウェルアレイのマイクロウェルは、溶解の際に封着することができる。封着は、隣接マイクロウェル間の標的核酸のクロスハイブリダイゼーションを防ぐために有用となり得る。図 8 A および図 8 B に示す通り、マイクロウェルは、キャップを使用して封着することができる。キャップは、固体支持体となり得る。キャップは、ビーズを含み得る。ビーズの直径は、マイクロウェルの直径よりも大きくなることができる。例えば、キャップは、マイクロウェルの直径よりも少なくとも約 10、20、30、40、50、60、70、80 または 90 % 大きくなることができる。例えば、キャップは、マイクロウェルの直径よりも最大でも約 10、20、30、40、50、60、70、80 または 90 % 大きくなることができる。

40

#### 【0218】

キャップは、架橋されたデキストランビーズ (例えば、セファデックス) を含み得る。架橋されたデキストランは、約 10 マイクロメートル〜約 80 マイクロメートルに及び得る。キャップの架橋されたデキストランは、20 マイクロメートル〜約 50 マイクロメートルとなり得る。キャップは、例えば、ナノポア (a n o p o r e) 無機膜 (例えば、酸化アルミニウム)、透析膜、スライドガラス、カバーガラスおよび/または親水性プラスチックフィルム (例えば、溶解バッファーで湿潤化したアガロースの薄膜でコーティングされたフィルム) を含み得る。

50

## 【0219】

キャップは、バッファーがマイクロウェルを出入りすることを可能にするが、高分子（例えば、核酸）がウェルから移動することを防ぐことができる。少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個またはそれを超えるヌクレオチドの高分子は、キャップによってマイクロウェルを出入りする移動を妨害され得る。最大でも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個またはそれを超えるヌクレオチドの高分子は、キャップによってマイクロウェルを出入りする移動を妨害され得る。

## 【0220】

封着されたマイクロウェルアレイは、マイクロウェルの頂部に単一の層のビーズを含み得る。封着されたマイクロウェルアレイは、マイクロウェルの頂部に複数の層のビーズを含み得る。封着されたマイクロウェルアレイは、約1、2、3、4、5もしくは6またはそれを超える層のビーズを含み得る。

## 【0221】

固体支持体（例えば、マイクロウェルアレイ）におけるビーズまたは複数のビーズの沈着は、ランダムまたは非ランダムとなり得る。例えば、マイクロウェルアレイとビーズとの接触は、ランダムまたは非ランダム接触となり得る。一部の実施形態では、ビーズは、ランダムにマイクロウェルアレイと接触させられる。一部の実施形態では、ビーズは、非ランダムにマイクロウェルアレイと接触させられる。マイクロウェルアレイへの複数のビーズの沈着は、ランダムまたは非ランダムとなり得る。例えば、マイクロウェルアレイへの複数のビーズの接触は、ランダムまたは非ランダム接触となり得る。一部の実施形態では、複数のビーズは、ランダムにマイクロウェルアレイに接触させられる。一部の実施形態では、複数のビーズは、非ランダムにマイクロウェルアレイに接触させられる。

## 【0222】

## 分子の確率論的標識化

試料タグまたは分子識別子標識が、オリゴヌクレオチドである場合、核酸へのオリゴヌクレオチドの付着は、核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションが挙げられるがこれに限定されない、種々の方法によって起こり得る。場合によっては、オリゴヌクレオチドは、標的特異的領域を含む。標的特異的領域は、標識しようとする分子の少なくとも一部に相補的な配列を含み得る。標的特異的領域は、分子にハイブリダイズし、これにより、標識された核酸を生成することができる。核酸へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに続き、核酸伸長反応が行われ得る。核酸伸長反応は、逆転写となり得る。

## 【0223】

試料タグと複数の核酸との付着（あるいは接触とも称される）は、複数の核酸のうち1種または複数への試料タグのハイブリダイゼーションを含み得る。試料タグと複数の核酸との接触は、核酸伸長反応の実施を含み得る。核酸伸長反応は、逆転写反応となり得る。

## 【0224】

分子識別子標識と複数の核酸との接触は、複数の核酸のうち1種または複数への分子識別子標識のハイブリダイゼーションを含み得る。分子識別子標識と複数の核酸との接触は、核酸伸長反応の実施を含み得る。核酸伸長反応は、逆転写を含み得る。

## 【0225】

分子識別子標識と複数の核酸との接触は、複数の核酸のうち1種または複数への試料タグのハイブリダイゼーションを含み得る。分子識別子標識と複数の核酸との接触は、試料タグへの分子識別子標識のハイブリダイゼーションを含み得る。

## 【0226】

試料タグと複数の核酸との接触は、複数の核酸のうち1種または複数への分子識別子標識のハイブリダイゼーションを含み得る。試料タグと複数の核酸との接触は、分子識別子標識への試料タグのハイブリダイゼーションを含み得る。

## 【0227】

核酸への試料タグおよび／または分子識別子標識の付着は、ライゲーションによって起こり得る。試料タグと複数の核酸との接触は、複数の核酸のうちいずれか1種への試料タグのライゲーションを含み得る。分子識別子標識と複数の核酸との接触は、複数の核酸のうち1種または複数への分子識別子標識のライゲーションを含み得る。試料タグと複数の核酸との接触は、核酸のうち1種または複数への分子識別子標識のライゲーションを含み得る。分子識別子標識と複数の核酸との接触は、核酸のうち1種または複数への試料タグのライゲーションを含み得る。ライゲーション技法は、平滑末端ライゲーションおよび粘着末端ライゲーションを含む。ライゲーション反応は、DNAリガーゼI、DNAリガーゼII、DNAリガーゼIVおよびT4 DNAリガーゼ等、DNAリガーゼを含み得る。ライゲーション反応は、T4 RNAリガーゼIおよびT4 RNAリガーゼII等、RNAリガーゼを含み得る。

## 【0228】

ライゲーションの方法は、例えば、あらゆる目的のため、両者共にここに参照により援用するSambrookら(2001年)およびNew England Biolabs catalogに記載されている。方法は、平滑末端および粘着末端を有するデュプレックスDNAまたはRNAにおける並置された5'リン酸および3'ヒドロキシル末端の間のホスホジエステル結合の形成を触媒するT4 DNAリガーゼ；相補的標的DNAにハイブリダイズされた2本の隣接するオリゴヌクレオチドの並置された5'リン酸および3'ヒドロキシル末端の間のホスホジエステル結合の形成を触媒するTaq DNAリガーゼ；付着末端を含有するデュプレックスDNAにおける並置された5'リン酸および3'ヒドロキシル末端の間のホスホジエステル結合の形成を触媒するE. coli DNAリガーゼ；ならびに3'→5'ホスホジエステル結合の形成による、3'ヒドロキシル末端核酸アクセプターへの5'ホスホリル末端核酸ドナーのライゲーションを触媒するT4 RNAリガーゼの使用を含み、基質は、一本鎖RNAおよびDNAならびにジヌクレオシドピロリン酸を含み；または本技術分野に記載されている他のいずれかの方法である。断片化DNAは、一末端または両末端にアダプターをライゲーションする前に、1種または複数の酵素、例えば、エンドヌクレアーゼで処理して、ライゲーションと適合する末端を作製することによりライゲーションを容易にすることができる。

## 【0229】

場合によっては、オリゴヌクレオチドの両末端は、分子に付着させる。例えば、オリゴヌクレオチドの両末端は、分子の1個または複数の末端にハイブリダイズおよび／またはライゲーションすることができる。場合によっては、分子の両末端へのオリゴヌクレオチドの両末端の付着は、環状化された標識された核酸の形成をもたらす。オリゴヌクレオチドの両末端は、分子の同じ末端に付着させることもできる。例えば、オリゴヌクレオチドの5'末端は、分子の3'末端にライゲーションされ、オリゴヌクレオチドの3'末端は、分子の3'末端にハイブリダイズされ、一末端にヘアピン構造を有する標識された核酸をもたらす。場合によっては、オリゴヌクレオチドは、分子の中央に付着させる。

## 【0230】

場合によっては、核酸へのオリゴヌクレオチドの付着は、複数の核酸への1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーの付着を含む。方法は、試料タグが付いた核酸への1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーの付着をさらに含み得る。方法は、標識された核酸への1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーの付着をさらに含み得る。核酸、試料タグまたは分子識別子標識への1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーの付着は、核酸、試料タグまたは分子識別子標識への1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーのライゲーションを含み得る。1種または複数のリンカーは、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、70、80、90、100個のヌクレオチドを含み得る。場合によっては、リンカーは、少なくとも約1000個のヌクレオチドを含み得る。

## 【0231】

場合によっては、分子への分子バーコードの付着は、1種または複数のアダプターの使用を含む。本明細書において、用語「アダプター」および「アダプター領域」は、互換的に使用することができる。アダプターは、分子へのアダプターの付着を可能にする標的特異的領域と、アダプターへの分子バーコードの付着を可能にするオリゴヌクレオチド特異的領域とを含み得る。アダプターは、ユニバーサルプライマーをさらに含み得る。アダプターは、ユニバーサルPCR領域をさらに含み得る。アダプターは、ハイブリダイゼーションおよび／またはライゲーションが挙げられるがこれらに限定されない方法によって分子および／または分子バーコードに付着させることができる。

## 【0232】

核酸の断片にアダプターをライゲーションするための方法は、周知である。アダプターは、二本鎖、一本鎖または部分的に一本鎖となり得る。一部の態様では、2種のオリゴヌクレオチドが共にハイブリダイズすると、二本鎖領域を形成することができるように、アダプターは、相補性の領域、例えば、約10～30または約15～40塩基の完全な相補性を有する2種のオリゴヌクレオチドから形成される。任意選択で、オリゴヌクレオチドのいずれか一方または両方は、他のオリゴヌクレオチドと相補的ではない領域を有することができ、アダプターの一末端または両末端に一本鎖オーバーハングを形成する。一本鎖オーバーハングは、約1～約8塩基または約2～約4となり得る。オーバーハングは、制限酵素による切断によって作製されたオーバーハングに相補的となり、「粘着末端」ライゲーションを容易にすることができる。アダプターは、プライマー結合部位および制限部位等、他の特色を含み得る。一部の態様では、制限部位は、EcoP151等、その認識配列の外側をカットするIIS型制限酵素または別の酵素のためのものとなり得る（Muckeら、J Mol Biol 2001年、312巻（4号）：687～698頁およびここに参照によりその全体を援用する、US5,710,000を参照）。

## 【0233】

場合によっては、複数の試料における核酸のコピー数の確率論的計数は、アダプター、アダプターの相補体、アダプターの逆相補体またはこれらの一部を検出して、異なる標識された核酸の数を決定することを含む。アダプター、アダプターの相補体、アダプターの逆相補体またはこれらの一部を検出は、アダプター、アダプターの相補体、アダプターの逆相補体またはこれらの一部の配列決定を含み得る。

## 【0234】

分子バーコードは、分子のいずれかの領域に付着させることができる。例えば、分子バーコードは、ポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA）の5'または3'末端に付着させることができる。例えば、分子バーコードの標的特異的領域は、分子の5'領域における配列に相補的な配列を含む。分子バーコードの標的特異的領域は、分子の3'領域における配列に相補的な配列を含むこともできる。場合によっては、分子バーコードは、遺伝子または遺伝子産物内の領域に付着させる。例えば、ゲノムDNAを断片化し、試料タグまたは分子識別子標識を、断片化DNAに付着させる。他の事例では、RNA分子が選択的スプライシングを受け、分子バーコードを、その選択的スプライシングを受けたバリエーションに付着させる。別の例では、ポリヌクレオチドが消化され、分子バーコードを、消化されたポリヌクレオチドに付着させる。別の例では、分子バーコードの標的特異的領域は、分子内の配列に相補的な配列を含む。

## 【0235】

ヘアピンを含む分子バーコード、試料タグ（例えば、試料指標）、細胞性標識または分子識別子標識（例えば、分子標識）は、ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）のためのプローブとして作用することができ、よって、HCRプローブと称され得る。HCRプローブは、ヘアピン構造を含む分子バーコードを含み得る。HCRプローブは、ヘアピン構造を含む試料タグを含み得る。HCRプローブは、ヘアピン構造を含む分子識別子標識を含み得る。ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）プローブにより1種または複数の核酸分子を確率論的に標識するステップであって、HCRプローブが、ヘアピンを含

む分子バーコードを含み、1種または複数の核酸分子が、ハイブリダイゼーション連鎖反応のためのイニシエーターとして作用するステップを含む、確率論的標識に基づくHCR方法が本明細書にさらに開示されている。ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）プローブにより1種または複数の核酸分子を確率論的に標識するステップであって、HCRプローブが、ヘアピンを含む試料タグを含み、1種または複数の核酸分子が、ハイブリダイゼーション連鎖反応のためのイニシエーターとして作用するステップを含む、確率論的標識に基づくHCR方法が本明細書にさらに開示されている。ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）プローブにより1種または複数の核酸分子を確率論的に標識するステップであって、HCRプローブが、ヘアピンを含む分子識別子標識を含み、1種または複数の核酸分子が、ハイブリダイゼーション連鎖反応のためのイニシエーターとして作用するステップを含む、確率論的標識に基づくHCR方法が本明細書にさらに開示されている。

#### 【0236】

HCRプローブは、オーバーハング領域を有するヘアピンを含み得る。ヘアピンのオーバーハング領域は、標的特異的領域を含み得る。オーバーハング領域は、オリゴdT配列を含み得る。1種または複数の核酸分子を含む試料は、確率論的標識化前に1種または複数の制限ヌクレアーゼで処理することができる。オーバーハング領域は、制限酵素認識配列を含み得る。1種または複数の核酸分子を含む試料は、確率論的標識化前に1種または複数のアダプターと接触させて、アダプター-核酸分子ハイブリッドを生成することができる。オーバーハング領域およびシステムは、1種または複数のアダプターに相補的となり得る。HCRプローブは、ループを有するヘアピンを含み得る。HCRプローブのループは、標識領域および／または試料指標領域を含み得る。

#### 【0237】

核酸分子への第1のHCRプローブのハイブリダイゼーションは、標識された核酸の形成をもたらすことができ、第1のHCRプローブは、直鎖化されて、第1の直鎖化HCRプローブを生成する。標識された核酸の第1の直鎖化HCRプローブは、標識された核酸への第2のHCRプローブのハイブリダイゼーションのためのイニシエーターとして作用して、2種の直鎖化HCRプローブを有する標識された核酸を生成することができる。第2の直鎖化HCRプローブは、別のハイブリダイゼーション反応のためのイニシエーターとして作用することができる。このプロセスは、複数回反復して、複数の直鎖化HCRプローブを有する標識された核酸を生成することができる。HCRプローブにおける検出可能な標識は、標識された核酸の検出を可能にすることができる。検出可能な標識は、いずれかの種類の標識（例えば、フルオロフォア（fluorophore）、発色団、小分子、ナノ粒子、ハプテン、酵素、抗体、磁石）となり得る。検出可能な標識は、単一の標識の断片を含み得る。検出可能な標識は、極めて接近する場合、検出可能なシグナルを生じることができる。HCRプローブがヘアピンである場合、検出可能な標識は、検出可能なシグナルを生成するには離れすぎていてよい。HCRプローブが直鎖化され、複数の直鎖化HCRプローブが共にハイブリダイズされる場合、検出可能な標識は、検出可能なシグナルを生じるために極めて十分に接近することができる。例えば、HCRプローブは、検出可能な標識として2個のピレン部分を含み得る。あるいは、検出可能な標識は、ナノ粒子となり得る。確率論的標識に基づくHCR方法は、標識された核酸への複数のヘアピンHCRプローブの付着を可能にすることができ、これは、シグナル増幅をもたらすことができる。確率論的標識に基づくHCRは、核酸分子の検出、分析および／または定量化の感度を増加させることができる。確率論的標識に基づくHCRは、1種または複数の核酸分子の検出、分析および／または定量化の精度を増加させることができる。

#### 【0238】

溶解後に、細胞の標的核酸は、固体支持体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる。標的核酸は、オリゴヌクレオチドの標的結合領域にハイブリダイズすることができる。核酸は、オリゴヌクレオチド（oligonucleotide）のいずれかの領域にハイブリダイズすることができる。

#### 【0239】

場合によっては、全オリゴヌクレオチドが、標的核酸に結合できるとは限らない。これは、場合によっては、オリゴヌクレオチドの数が、標的核酸の数よりも多いことが理由である。固体支持体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの数は、細胞における標的核酸の数よりも1、2、3、4、5、6、7、8、9または10倍多くなり得る。オリゴヌクレオチドの少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%は、標的核酸によって結合され得る。オリゴヌクレオチドの最大でも10、20、30、40、50、60、70、80、90または100%は、標的核酸によって結合され得る。場合によっては、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100種またはそれを超える異なる標的核酸が、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドによって捕捉され得る。場合によっては、最大でも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100種またはそれを超える異なる標的核酸が、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドによって捕捉され得る。

10

#### 【0240】

場合によっては、標的核酸のコピー数の少なくとも約40、50、60、70、80、90、95、96、97、98、99または100%が、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドに結合される。場合によっては、標的核酸のコピー数の最大でも約40、50、60、70、80、90、95、96、97、98、99または100%が、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドに結合される。

#### 【0241】

20

##### 回収

溶解後に、固体支持体を回収することができる。固体支持体の回収は、磁石を使用することにより行うことができる。固体支持体の回収は、マイクロウェルアレイを融解することおよび／または超音波処理により行うことができる。固体支持体の回収は、遠心分離を含み得る。固体支持体の回収は、サイズ排除を含み得る。場合によっては、固体支持体の少なくとも約50、60、70、80、90、95または100%が、マイクロウェルから回収される。場合によっては、固体支持体の最大でも約50、60、70、80、90、95または100%が、マイクロウェルから回収される。

#### 【0242】

##### 逆転写

30

本明細書に開示されている方法は、標識されたRNA分子を逆転写して、標識されたcDNA分子を生成することをさらに含み得る。場合によっては、オリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、逆転写反応のためのプライマーとして作用する。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。

#### 【0243】

場合によっては、標識されたcDNA分子は、新たな確率論的標識化反応のための分子として使用することができる。標識されたcDNAは、逆転写前のRNAへの付着由来の第1のタグまたはタグのセットと、cDNA分子に付着させた第2のタグまたはタグのセットを有することができる。これらの複数の標識化反応は、例えば、第1および第2のタグの付着、例えば、任意選択の増幅反応または逆転写反応の間に起こる事象の効率の決定に使用することができる。

40

#### 【0244】

別の例では、オリゴヌクレオチドは、RNA分子の5'末端に付着させて、標識されたRNA分子を生成する。標識されたRNA分子の逆転写は、逆転写プライマーの添加によって起こり得る。場合によっては、逆転写プライマーは、オリゴdTプライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマーまたは標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーである。一般に、オリゴdTプライマーは、12~18個のヌクレオチドの長さであり、哺乳動物mRNAの3'末端における内在性ポリ(A)+テイルに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、種々の相補的部位においてmRNAに結合することができる。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mRNAを選択的にブ

50

ライミングする。

#### 【0245】

場合によっては、方法は、標識されたRNA分子を反復的に逆転写して、複数の標識されたcDNA分子を生成するステップを含む。本明細書に開示されている方法は、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または20回の逆転写反応を実行するステップを含み得る。方法は、少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100回の逆転写反応を実行するステップを含み得る。

#### 【0246】

核酸合成（例えば、cDNA合成）は、回収された固体支持体上で行うことができる。核酸合成は、チューブ内および／または固体支持体の懸濁を維持するためのローター上で行うことができる。その結果得られる合成核酸は、後続の核酸増幅および／または配列決定技術において使用することができる。核酸合成は、固体支持体におけるオリゴヌクレオチドに付着させたRNAにおけるcDNAコピーの作製を含み得る。cDNAコピーの作製は、逆転写酵素（RT）またはRT活性を有するDNAポリメラーゼの使用を含み得る。これは、一本鎖cDNA分子の生成をもたらす。核酸合成後に、未使用のオリゴヌクレオチドは、固体支持体から除去することができる。オリゴヌクレオチドの除去は、エキソヌクレアーゼ処理（例えば、Exo Iによる）によって起こり得る。

#### 【0247】

一部の実施形態では、核酸は、化学的切断を使用して固体支持体から除去することができる。例えば、核酸に存在する化学基または修飾塩基を使用して、固体支持体からのその除去を容易にすることができる。例えば、酵素（enzyme）を使用して、固体支持体から核酸を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（endonuclease）消化により固体支持体から除去することができる。例えば、ウラシルドーグリコシラーゼ（UDG）によるdUTPまたはddUTPを含有する核酸の処理を使用して、固体支持体から核酸を除去することができる。例えば、核酸は、脱プリン／脱ピリミジン（AP）エンドヌクレアーゼ等、塩基切除修復酵素等、ヌクレオチド切除を行う酵素（enzyme）を使用して、固体支持体から除去することができる。一部の実施形態では、核酸は、光切断可能基および光を使用して固体支持体から除去することができる。一部の実施形態では、切断可能リンカーを使用して、固体支持体から核酸を除去することができる。例えば、切断可能リンカーは、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、I gープロテインA、感光性リンカー、酸もしくは塩基に不安定なリンカー基またはアプタマーのうち少なくとも1種を含み得る。

#### 【0248】

一部の実施形態では、核酸は、増幅されない。一部の実施形態では、核酸は、核酸（nucleic acid）の配列決定前に増幅されない。一部の実施形態では、固体支持体に付着させていない核酸は、事前の増幅なしに直接的に配列決定することができる。一部の実施形態では、核酸は、固体支持体に付着させた場合、増幅を行うことなく直接的に配列決定することができる。例えば、固体支持体に付着させた核酸は、固体支持体に付着させたまま直接的に配列決定することができる。一部の実施形態では、固体支持体から除去された核酸は、直接的に配列決定することができる。例えば、固体支持体から除去された核酸は、増幅を行うことなく直接的に配列決定することができる。増幅なしの配列決定の助けとなるいずれかの配列決定プラットフォームを使用して、配列決定を行うことができる。

#### 【0249】

##### 増幅

核酸が合成（例えば、逆転写）された後に、これを増幅することができる。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅されるマルチプレックス様式で行うことができる。増幅は、配列決定アダプターを核酸に加えることができる。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって行うことができる。PCRは、DNA相補鎖の同時プライマー伸長による

特異的DNA配列の *in vitro* 増幅のための反応を指すことができる。PCRは、この反応の派生形を包含することができ、RT-PCR、リアルタイムPCR、ネステッドPCR、定量的PCR、マルチプレックス化PCR、デジタルPCRおよびアセンブリPCRが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0250】

方法は、1回または複数の増幅反応を実行して、標識された核酸アンプリコンを生成するステップをさらに含み得る。標識された核酸を検出する前に、標識された核酸を増幅することができる。方法は、1回または複数の増幅反応を実行する前に、第1および第2の試料を組み合わせるステップをさらに含み得る。

#### 【0251】

増幅反応は、試料タグの少なくとも一部の増幅を含み得る。増幅反応は、標識の少なくとも一部の増幅を含み得る。増幅反応は、試料タグ、標識、核酸またはこれらの組合せの少なくとも一部の増幅を含み得る。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%または100%の増幅を含み得る。方法は、1回または複数のcDNA合成反応を実行して、試料タグが付いた核酸または分子識別子標識が付いた核酸の1種または複数のcDNAコピーを生成するステップをさらに含み得る。

#### 【0252】

標識された核酸の増幅は、PCRに基づく方法またはPCRに基づかない方法を含み得る。標識された核酸の増幅は、標識された核酸の指数関数的増幅を含み得る。標識された核酸の増幅は、標識された核酸の線形増幅を含み得る。

#### 【0253】

場合によっては、標識された核酸の増幅は、PCRに基づかない方法を含む。PCRに基づかない方法の例として、多置換増幅(MDA)、転写増幅法(TMA)、核酸配列ベース増幅(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またはサークル対サークル(circle-to-circle)増幅が挙げられるがこれらに限定されない。他のPCRに基づかない増幅方法として、DNAまたはRNA標的を増幅するための複数サイクルのDNA依存性RNAポリメラーゼ駆動型RNA転写増幅またはRNA依存性DNA合成および転写(WO 89/01050; WO 88/10315; ならびに米国特許第5,130,238号; 同第5,409,818号; 同第5,466,586号; 同第5,514,545号; 同第5,554,517号; 同第5,888,779号; 同第6,063,603号; および同第6,197,554号)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、米国特許第4,786,600号に記載されているQβレプリカーゼ(Qβ)方法、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したオリゴヌクレオチド駆動増幅、伸長反応および増幅前にプライマーが核酸配列にハイブリダイズされてその結果得られるデュプレックスが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した鎖置換増幅(米国特許第6,214,587号)、ローリングサークル増幅、ならびに分岐伸長増幅(ramification extension amplification)(RAM)(米国特許第5,942,391号)が挙げられる。

#### 【0254】

標識された核酸の増幅は、ハイブリダイゼーション連鎖反応(HCR)に基づく方法を含み得る(DirksおよびPierce、PNAS、2004年; Zhangら、Anal Chem、2012年)。HCRに基づく方法は、DNAに基づくHCRを含み得る。HCRに基づく方法は、1種または複数の標識されたプローブを含み得る。1種または複数の標識されたプローブは、本明細書に開示されている1種または複数の試料タグもしくは分子識別子標識またはこれらの相補体を含み得る。

#### 【0255】

場合によっては、本明細書に開示されている方法は、標識された核酸(例えば、標識さ

10

20

30

40

50

れたRNA、標識されたDNA、標識されたcDNA)においてポリメラーゼ連鎖反応を実行して、標識されたアンプリコンを生成するステップをさらに含む。標識されたアンプリコンは、二本鎖分子となり得る。二本鎖分子は、二本鎖RNA分子、二本鎖DNA分子またはDNA分子にハイブリダイズされたRNA分子を含み得る。二本鎖分子の鎖の一方または両方は、試料タグまたは分子識別子標識を含み得る。あるいは、標識されたアンプリコンは、一本鎖分子である。一本鎖分子は、DNA、RNAまたはこれらの組合せを含み得る。本発明の核酸は、合成または変更された核酸を含み得る。

#### 【0256】

ポリメラーゼ連鎖反応は、PCR、HD-PCR、Next Gen PCR、デジタルRTAまたはこれらのいずれかの組合せ等の方法によって行うことができる。追加的なPCR方法として、対立遺伝子特異的PCR、Alu PCR、アセンブリPCR、非対称PCR、ドロップレットPCR、エマルジョンPCR、ヘリカーゼ依存性増幅HDA、ホットスタートPCR、インバースPCR、線形後指数関数的(LATE)-PCR、ロングPCR、マルチプレックスPCR、ネステッドPCR、ヘミネステッドPCR、定量的PCR、RT-PCR、リアルタイムPCR、単一細胞PCR、タッチダウンPCRまたはこれらの組合せが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0257】

マルチプレックスPCR反応は、ネステッドPCR反応を含み得る。方法は、プライマー対を含み得、第1のプライマーが、複数の核酸のうちいずれか1種の3'末端から少なくとも300~400ヌクレオチドにおいて複数の核酸のうちいずれか1種にアニールし、第2のプライマーが、複数の核酸のうちいずれか1種の3'末端から少なくとも200~300ヌクレオチドにおいて複数の核酸のうちいずれか1種にアニールし、第1のプライマーおよび第2のプライマーが、複数の核酸のうちいずれか1種の3'末端に向かう相補的DNA合成を生じる。

#### 【0258】

場合によっては、ポリメラーゼ連鎖反応の実行は、標識された核酸への第1の標的特異的プライマーのアニールリングを含む。それに代えてまたはそれに加えて、ポリメラーゼ連鎖反応の実行は、試料タグまたは分子識別子標識のユニバーサルプライマー結合部位領域へのユニバーサルプライマーのアニールリングをさらに含み、試料タグまたは分子識別子標識は、標識された核酸または標識されたアンプリコン上にある。本明細書に開示されている方法は、標識された核酸および/または標識されたアンプリコンへの第2の標的特異的プライマーのアニールリングをさらに含み得る。

#### 【0259】

場合によっては、方法は、標識された核酸を反復的に増幅して、複数の標識されたアンプリコンを生成するステップを含む。本明細書に開示されている方法は、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または20回の増幅反応を実行するステップを含み得る。あるいは、方法は、少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100回の増幅反応を実行するステップを含む。

#### 【0260】

他の適した増幅方法は、リガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、WuおよびWallace、Genomics 4巻、560頁(1989年)、Landegrenら、Science 241巻、1077頁(1988年)ならびにBarringerら、Gene 89巻:117頁(1990年))、転写増幅(Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86巻、1173頁(1989年)およびW088/10315)、自家持続配列複製(Guatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻、1874頁(1990年)およびW090/06995)、標的ポリヌクレオチド配列の選択的増幅(米国特許第6,410,276号)、コンセンサス配列プライムポリメラーゼ連鎖反応(consensus sequence primed polymerase chain reaction)(CP-PCR)

(米国特許第4, 437, 975号)、任意プライムポリメラーゼ連鎖反応 (arbitrarily primed polymerase chain reaction) (AP-PCR) (米国特許第5, 413, 909号、同第5, 861, 245号)、ローリングサークル増幅 (RCA) (例えば、FireおよびXu、PNAS 92巻: 4641頁 (1995年) ならびにLiuら、J. Am. Chem. Soc. 118巻: 1587頁 (1996年) ならびに米国特許第5, 648, 245号)、鎖置換増幅 (LaskenおよびEgholm、Trends Biotechnol. 2003年21巻 (12号): 531~5頁; Barkerら、Genome Res. 2004年、5月; 14巻 (5号): 901~7頁; Deanら、Proc Natl Acad Sci U S A. 2002年; 99巻 (8号): 5261~6頁; Walkerら、1992年、Nucleic Acids Res. 20巻 (7号): 1691~6頁、1992年ならびにPaezら、Nucleic Acids Res. 2004年; 32巻 (9号): e71頁を参照)、PCT特許出願第PCT/US87/00880号に記載されているQベータレプリカーゼ、および核酸ベース配列増幅 (NABSA) を含む (これらそれぞれここに参照により援用する、米国特許第5, 409, 818号、同第5, 554, 517号および同第6, 063, 603号を参照)。使用することができる他の増幅方法は、これらそれぞれここに参照により援用する、米国特許第6, 582, 938号、同第5, 242, 794号、同第5, 494, 810号、同第4, 988, 617号および米国公開第20030143599号に記載されている。DNAは、マルチプレックス遺伝子座特異的PCRによってまたはアダプターライゲーションおよび単一プライマーPCRを使用して増幅することもできる (KinzlerおよびVogelstein、NAR (1989年) 17巻: 3645~53頁を参照)。バランスPCR (balanced PCR) (Makrigiorgosら (2002年)、Nat Biotechnol. 20巻、936~9頁) 等、他の利用できる増幅方法を使用することもできる。

#### 【0261】

分子反転プローブ (「MIP」) は、選択された標的の増幅のために使用することもできる。MIPは、プレサークルプローブの末端が、増幅しようとする領域に隣接する領域に相補的となるように作製することができる。ギャップは、標的の相補体が、閉鎖環を形成する末端のライゲーション前にMIPに取り込まれるような、プローブの末端の伸長により閉じることができる。閉鎖環は、Hardenbolら、Genome Res. 15巻: 269~275頁 (2005年) および米国特許第6, 858, 412号に以前に開示された通り、配列決定またはハイブリダイゼーションにより増幅および検出することができる。

#### 【0262】

増幅は、複数の核酸を含む1種または複数の試料への1種または複数の対照核酸の添加をさらに含み得る。増幅は、複数の核酸への1種または複数の対照核酸の添加をさらに含み得る。対照核酸は、対照標識を含み得る。

#### 【0263】

増幅は、1種また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、感光性および/または誘発可能な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、ペプチド核酸 (PNA)、モルホリノおよびロクト核酸 (LNA)、ならびにグリコール核酸 (GNA) およびトレオース核酸 (TNA) が挙げられるがこれらに限定されない。非天然ヌクレオチドは、1または複数サイクルの増幅反応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、増幅反応における特異的サイクルまたは時点として産物を同定することができる。

#### 【0264】

1回または複数の増幅反応の実行は、1種または複数のプライマーの使用を含み得る。1種または複数のプライマーは、1種または複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。1種または複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約7~9個のヌクレオチドを含み得る。

1 種または複数のオリゴヌクレオチドは、12～15 個未満のヌクレオチドを含み得る。1 種または複数のプライマーは、複数の標識された核酸の少なくとも一部にアニールすることができる。1 種または複数のプライマーは、複数の標識された核酸の3' 末端および/または5' 末端にアニールすることができる。1 種または複数のプライマーは、複数の標識された核酸の内部領域にアニールすることができる。内部領域は、複数の標識された核酸の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または1000ヌクレオチドとなり得る。1 種または複数のプライマーは、プライマーの固定されたパネルを含み得る。1 種または複数のプライマーは、少なくとも1 種または複数のカスタムプライマーを含み得る。1 種または複数のプライマーは、少なくとも1 種または複数の対照プライマーを含み得る。1 種または複数のプライマーは、少なくとも1 種また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 種または複数のオリゴヌクレオチドは、表23における配列からなる群より選択される配列を含み得る。1 種また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することができる。1 種また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、核酸またはこれらの産物にアニールすることができる。1 種または複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーおよ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 種または複数の標的核酸を増幅するように設計することができる。標的核酸は、1 種または複数の試料における総核酸のサブセットを含み得る。標的核酸は、1 種または複数の試料における標識された核酸全体のサブセットを含み得る。1 種または複数のプライマーは、少なくとも96 種またはそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1 種または複数のプライマーは、少なくとも960 種またはそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1 種または複数のプライマーは、少なくとも9600 種またはそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1 種または複数のカスタムプライマーは、2 種またはそれを超える異なる標識された核酸にアニールすることができる。2 種またはそれを超える異なる標識された核酸は、1 種または複数の遺伝子に相当することができる。

#### 【0265】

a) 選ばれたプライマーが、i) 3 個以下の逐次的グアニン、3 個以下の逐次的シトシン、4 個以下の逐次的アデニンおよび4 個以下の逐次的チミン、ii) グアニンまたはシトシンである少なくとも3、4、5または6 個のヌクレオチド、ならびにiii) ヘアピン構造を容易に形成しない配列を含み得る、第1のパスと、b) i) 全転写物の高い被覆度を有する複数の配列を選ぶ第1のラウンド、ならびにii) 残る転写物の最高被覆度および4 以下の他の選ばれた配列との相補的スコアを有する配列を選択する1 回または複数の後続ラウンドを含む第2のパスと、c) 被覆度が飽和するまたはカスタムプライマーの総数が約96 未満またはそれに等しくなるまでの、選定されたセットへの配列の付加をと含む、カスタムプライマーを選択する方法が本明細書に開示されている。

#### 【0266】

カスタムプライマーを選択する方法は、1 種または複数のmRNA 転写物、構造的RNA を含む非コード転写物、転写される偽遺伝子、ゲノムアノテーションプロセスによって提供されるモデルmRNA、ゲノムコンティグに相当する配列、またはこれらのいずれかの組合せに基づき、少なくとも1 種の共通プライマーを選択するステップをさらに含み得る。

#### 【0267】

カスタムプライマーを選択する方法は、核酸の1 種または複数のサブセットを濃縮するプライマー選択方法をさらに含み得る。1 種または複数のサブセットは、低存在量mRNA を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0268】

カスタムプライマーを選択する方法は、コンピューターによるアルゴリズムをさらに含み得る。方法において使用されるプライマーは、ユーザー定義入力配列に基づきプライマー配列を示唆するコンピュータプログラムであるPrimer 3の使用により設計することができる。他のプライマー設計を使用することもできる、またはプライマーは、コンピュータプログラムの助けなしで目測により選択することができる。プライマー設計を大部分の用途の目的に合わせるための、プログラムにより利用できる多くのオプションが存在する。Primer 3は、オリゴ融解温度、長さ、GC含量、3'安定性、推定される二次構造、望ましくない配列（例えば、散在する反復）にアニーリングまたはこれを増幅する可能性、および同じプライマーの2コピー間のプライマーダイマー形成の可能性が挙げられるがこれらに限定されない、多くの因子を考慮することができる。プライマー対の設計において、Primer 3は、産物サイズおよび融解温度、対となる2種のプライマー間のプライマーダイマー形成の可能性、プライマー融解温度間の差、ならびに回避すべき目的の特定の領域に対するプライマー位置を考慮することができる。

10

## 【0269】

本明細書に開示されている方法、組成物およびキットは、表23～24に開示されている1種または複数のプライマーを含み得る。

## 【0270】

## 配列決定

一部の態様では、異なる標識された核酸の数の決定は、標識された核酸またはそのいずれかの産物（例えば、標識されたアンプリコン、標識されたcDNA分子）の配列の決定を含み得る。場合によっては、増幅された標的核酸は、配列決定に付すことができる。標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列の決定は、配列決定反応を実行して、試料タグ、分子識別子標識の少なくとも一部、標識された核酸の少なくとも一部、これらの相補体、これらの逆相補体、またはこれらのいずれかの組合せの配列を決定することを含み得る。場合によっては、試料タグまたは試料タグの一部のみが配列決定される。場合によっては、分子識別子標識または分子識別子標識の一部のみが配列決定される。

20

## 【0271】

標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列の決定は、Helioscope（商標）単一分子配列決定、ナノポアDNA配列決定、Lynx Therapeuticsの大規模並列特徴配列決定（MPSS）、454ピロシーケンシング、単一分子リアルタイム（RNAP）配列決定、Illumina（Solexa）配列決定、SOLID配列決定、Ion Torrent（商標）、Ion半導体配列決定、単一分子SMRT（商標）配列決定、Polony配列決定、DNAナノボール（nanoball）配列決定およびVisiGen Biotechnologiesアプローチ等、配列決定方法によって行うことができる。あるいは、標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列の決定は、Illuminaによって提供されるゲノムアナライザーIix、HiSeqおよびMiSeq、Pacific Biosciences（California）によって提供されるPacBio RSシステム等の単一分子リアルタイム（SMRT（商標））技術、ならびにSolexaシーケンサー、Helicos Inc.（Cambridge, MA）によって提供されるHeliscope（商標）シーケンサー等のTrue単一分子配列決定（tSMS（商標））技術が挙げられるがこれらに限定されない、配列決定プラットフォームを使用することができる。

30

40

## 【0272】

一部の実施形態では、標識された核酸は、生物のゲノムの遺伝子の約0.01%～生物のゲノムの遺伝子の約100%を表す核酸を含む。例えば、生物のゲノムの遺伝子の約0.01%～生物のゲノムの遺伝子の約100%は、試料由来の相補的配列を含有する遺伝子を捕捉することにより、複数のマルチマーを含む標的相補的領域を使用して配列決定することができる。一部の実施形態では、標識された核酸は、生物のトランスクリプトームの転写物の約0.01%～生物のトランスクリプトームの転写物の約100%を表す核酸

50

を含む。例えば、生物のトランスクリプトームの転写物の約0.501%～生物のトランスクリプトームの転写物の約100%は、試料由来のmRNAを捕捉することにより、ポリTテイルを含む標的相補的領域を使用して配列決定することができる。

#### 【0273】

場合によっては、標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列の決定は、ペアエンド配列決定 (paired-end sequencing)、ナノポア配列決定、ハイスループット配列決定、ショットガン配列決定、ダイターミネーター配列決定、複数プライマーDNA配列決定、プライマーウォーキング (primer walking)、サンガージデオキシ配列決定、Maxim-Gilbert配列決定、ピロシーケンシング、true単一分子配列決定またはこれらのいずれかの組合せを含む。あるいは、標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列は、電子顕微鏡法または化学的高感度電界効果トランジスタ (chemical-sensitive field effect transistor) (chemFET) アレイによって決定することができる。

#### 【0274】

核酸 (例えば、増幅された核酸、標識された核酸、標識された核酸のcDNAコピー等) の配列の決定は、ハイブリダイゼーションによる配列決定 (SBH)、ライゲーションによる配列決定 (SBL)、定量的増加的蛍光ヌクレオチド付加配列決定 (QIFNAS)、段階的ライゲーションおよび切断、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)、分子ビーコン、TaqManレポータープローブ消化、ピロシーケンシング、蛍光in situ配列決定 (FISSEQ)、FISSEQビーズ、ゆらぎ配列決定、マルチプレックス配列決定、重合されたコロニー (POLONY) 配列決定; ナノグリッドローリングサークル配列決定 (ROLONY)、対立遺伝子特異的オリゴライゲーションアッセイ (例えば、オリゴライゲーションアッセイ (OLA)、ライゲーションされた直鎖状プローブおよびローリングサークル増幅 (RCA) 読み出し情報、ライゲーションされたパドロックプローブを使用した単一鋳型分子OLA、ならびに/またはライゲーションされた環状パドロックプローブおよびローリングサークル増幅 (RCA) 読み出し情報を使用した単一鋳型分子OLA) その他が挙げられるがこれらに限定されない、種々の配列決定方法を使用して行うことができる。Roche454、Illumina Solexa、ABI-SOLID、ION Torrents、Complete Genomics、Pacific Bioscience、Helicos、Polonatorプラットフォーム等、プラットフォームを使用した環式アレイ配列決定等、ハイスループット配列決定方法を利用することもできる。配列決定は、MiSeq配列決定を含み得る。配列決定は、HiSeq配列決定を含み得る。配列決定は、本来のオリゴヌクレオチド上にあった細胞標識、分子標識および/または遺伝子を読み取ることができる。

#### 【0275】

別の例では、標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列の決定は、RNA-SeqまたはマイクロRNA配列決定を含む。あるいは、標識された核酸またはそのいずれかの産物の配列の決定は、エドマン分解、ペプチド質量フィンガープリンティング、質量分析またはプロテアーゼ消化等、タンパク質配列決定技法を含む。

#### 【0276】

配列決定反応は、ある特定の実施形態では、固体もしくは半固体支持体、ゲル、エマルション、表面、ビーズ、液滴、連続流、希釈物または1種もしくは複数の物理的に別々の容積において起こり得る。

#### 【0277】

配列決定は、標識された核酸の少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100またはそれを超えるヌクレオチドまたは塩基対の配列決定を含み得る。場合によっては、配列決定は、標識された核酸の少なくとも約200、300、400、500、600、700、800、900、1000またはそれを超えるヌクレオチドまたは塩基対の配列決定を含む。他の事例では、配列決定は、標識された核酸の少なくとも約1500; 2,000; 3,000; 4,000; 5,000; 6,000; 7

， 0 0 0 ； 8 ， 0 0 0 ； 9 ， 0 0 0 ； もしくは 1 0 ， 0 0 0 またはそれを超えるヌクレオチドまたは塩基対の配列決定を含む。

【 0 2 7 8 】

配列決定は、少なくとも約 2 0 0 、 3 0 0 、 4 0 0 、 5 0 0 、 6 0 0 、 7 0 0 、 8 0 0 、 9 0 0 、 1 0 0 0 またはそれを超える 1 ラン当たりの配列決定リードを含み得る。場合によっては、配列決定は、少なくとも約 1 5 0 0 ； 2 ， 0 0 0 ； 3 ， 0 0 0 ； 4 ， 0 0 0 ； 5 ， 0 0 0 ； 6 ， 0 0 0 ； 7 ， 0 0 0 ； 8 ， 0 0 0 ； 9 ， 0 0 0 ； もしくは 1 0 ， 0 0 0 またはそれを超える 1 ラン当たりの配列決定リードの配列決定を含む。配列決定は、約 1 ， 6 0 0 ， 0 0 0 ， 0 0 0 未満またはそれに等しい 1 ラン当たりの配列決定リードを含み得る。配列決定は、約 2 0 0 ， 0 0 0 ， 0 0 0 未満またはそれに等しい 1 ラン当たりのリードを含み得る。

10

【 0 2 7 9 】

異なる標識された核酸の数の決定は、1 種または複数のアレイを含み得る。

【 0 2 8 0 】

異なる標識された核酸の数の決定は、1 種または複数のプローブと標識された核酸との接触を含み得る。

【 0 2 8 1 】

本明細書に記載されているプローブは、標識された核酸または標識されたアンプリコンの少なくとも一部に相補的な配列を含み得る。複数のプローブは、固体支持体の別々の領域に配置することができ、固体支持体の別々の領域は、同一またはほとんど同一の配列のプローブを含む。場合によっては、固体支持体の 2 種またはそれを超える別々の領域は、オリゴヌクレオチドタグの 2 種の異なる特有の識別子領域の配列に相補的な配列を含む 2 種の異なるプローブを含む。

20

【 0 2 8 2 】

場合によっては、複数のプローブは、アレイにハイブリダイズされる。複数のプローブは、アレイへの標識された分子のハイブリダイゼーションを可能にすることができる。複数のプローブは、確率論的標識オリゴ d T に相補的な配列を含み得る。それに代えてまたはそれに加えて、複数のプローブは、分子に相補的な配列を含む。

【 0 2 8 3 】

異なる標識された核酸の数の決定は、複数のプローブのアレイと標識された核酸との接触を含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、複数のプローブのスライドガラスと標識された核酸との接触を含み得る。

30

【 0 2 8 4 】

異なる標識された核酸の数の決定は、標識されたプローブハイブリダイゼーション、標的特異的増幅、標的特異的配列決定、標的一塩基多型に特異的な標識されたヌクレオチドによる配列決定、制限酵素消化パターンに特異的な標識されたヌクレオチドによる配列決定、変異に特異的な標識されたヌクレオチドによる配列決定またはこれらの組合せを含み得る。

【 0 2 8 5 】

異なる標識された核酸の数の決定は、配列特異的標識のフローサイトメトリー選別を含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、ビーズに付着させた標識された核酸の検出を含み得る。ビーズに付着させた標識された核酸の検出は、蛍光検出を含み得る。

40

【 0 2 8 6 】

異なる標識された核酸の数の決定は、標的特異的プローブおよび標識された核酸または標的特異的な標識されたプローブの間の、蛍光共鳴エネルギー移動 ( F R E T ) による複数の標識された核酸の計数を含み得る。

【 0 2 8 7 】

標識された核酸の検出

本明細書に開示されている方法は、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出をさらに含み得る。標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの

50

検出は、表面、例えば、固体支持体への標識された核酸のハイブリダイゼーションを含み得る。方法は、核酸結合タンパク質による標的配列の免疫沈降をさらに含み得る。標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出は、異なる標識された核酸の数の決定を可能にするまたは支援することができる。

#### 【0288】

場合によっては、方法は、検出可能な標識と標識された核酸および／または標識されたアンプリコンと接触させて、検出可能な標識がコンジュゲートした標識された核酸を生成するステップをさらに含む。本明細書に開示されている方法は、検出可能な標識がコンジュゲートした標識された核酸を検出するステップをさらに含み得る。標識された核酸またはそのいずれかの産物（例えば、標識されたアンプリコン、検出可能な標識がコンジュゲートした標識された核酸）の検出は、試料タグもしくは分子識別子標識、分子、検出可能な標識、試料タグもしくは分子識別子標識の相補体、分子の相補体またはこれらのいずれかの組合せの少なくとも一部の検出を含み得る。

#### 【0289】

標識された核酸またはそのいずれかの産物の検出は、エマルションまたは小液滴を含み得る。例えば、標識された核酸またはそのいずれかの産物は、エマルションまたは小液滴中に存在し得る。小液滴は、エマルションの連続相等、不混和性の第2の液体（および／またはより大きい小液滴）に被包された小容積の第1の液体となり得る。小液滴の容積および／またはエマルションにおける小液滴の平均容積は、例えば、とりわけ、約1マイクロリットル未満（または約1マイクロリットル～1ナノリットルの間もしくは約1マイクロリットル～1ピコリットルの間）、約1ナノリットル未満（または約1ナノリットル～1ピコリットルの間）または約1ピコリットル未満（または約1ピコリットル～1フェムトリットルの間）となり得る。小液滴（またはエマルションの小液滴）は、とりわけ、約1000、100もしくは10マイクロメートル未満または約1000～10マイクロメートルの直径（または平均直径）を有し得る。小液滴は、球状または非球状となり得る。約0.001、0.01、0.05、0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、160、180、200、300、400もしくは500ミクロン、約0.001、0.01、0.05、0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、160、180、200、300、400もしくは500ミクロン未満または約0.001、0.01、0.05、0.1、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、100、120、130、140、150、160、180、200、300、400もしくは500ミクロン超の平均直径を有する小液滴を作製することができる。小液滴は、約0.001～約500、約0.01～約500、約0.1～約500、約0.1～約100、約0.01～約100または約1～約100ミクロンの平均直径を有することができる。小液滴は、単純小液滴または複合小液滴となり得る。用語、エマルションは、本明細書において、不混和性の液体（油と水等）の混合物を指すことができる。油相および／または油中水型エマルションは、水性小液滴内における反応混合物の区画化を可能にする。エマルションは、連続的油相内に水性小液滴を含み得る。本明細書に提供されているエマルションは、水中油型エマルションとなることができ、この場合、小液滴は、連続的水相内の油小液滴である。エマルションまたは小液滴を使用して、単一細胞を単離、例えば、空間的に単離する場合、固体支持体を使用しなくてもよい。よって、タグ付けおよび分析しようとする核酸は、固体支持体に結合されていなくてもよく、かかる事例では；細胞性標識は、タグ付けされた場合のエマルションまたは小液滴中に存在する単一細胞または細胞集団に相当し得る。よって、エマルションまたは小液滴は、単一細胞または複数の細胞でタグ付けまたは標識するステップを有効に単離することができ、細胞性標識を使用して、単一細胞または複数の細胞に由来する核酸を同定することができる。一部の実施形態では、小液滴は、例えば、マイクロウェルアレイへのビーズの適用と同様に、マイクロウェルに適用することができる。

#### 【0290】

あるいは、標識された核酸またはそのいずれかの産物の検出は、1種または複数の溶液を含む。他の事例では、標識された核酸の検出は、1種または複数の容器を含む。

#### 【0291】

標識された核酸またはそのいずれかの産物（例えば、標識されたアンプリコン、検出可能な標識がコンジュゲートした標識された核酸）の検出は、各標識された核酸またはその産物の検出を含み得る。例えば、本明細書に開示されている方法は、各標識された核酸の少なくとも一部を配列決定し、これにより、各標識された核酸を検出するステップを含む。

#### 【0292】

場合によっては、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出は、電気泳動、分光法、顕微鏡法、ケミルミネッセンス、ルミネッセンス、蛍光、免疫蛍光、比色分析またはエレクトロケミルミネッセンス方法を含む。例えば、方法は、蛍光色素の検出を含む。標識された核酸またはそのいずれかの産物の検出は、比色分析方法を含み得る。例えば、比色分析方法は、比色計または比色分析リーダーの使用を含む。比色計および比色分析リーダーの非限定リストは、Sensovationの比色分析アレイイメージングリーダー（CLAIR）、ESeQuant側方流動イムノアッセイリーダー、SpectraMax 340PC 38、SpectraMax Plus 384、SpectraMax 190、VersaMax、VMaxおよびEMaxを含む。

#### 【0293】

単独で、または標識された核酸および／もしくはアンプリコンを検出するための他の方法と組み合わせて使用される追加的な方法は、アレイ検出器、蛍光リーダー、非蛍光検出器、CRリーダー、ルミノメータまたはスキャナの使用を含み得る。場合によっては、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出は、アレイ検出器の使用を含む。アレイ検出器の例として、ダイオードアレイ検出器、フォトダイオードアレイ検出器、H LPCフォトダイオードアレイ検出器、アレイ検出器、ゲルマニウムアレイ検出器、CMOSおよびCCDアレイ検出器、ゲート式線形CCDアレイ検出器、InGaAsフォトダイオードアレイシステムならびにTE冷却CCDシステムが挙げられるがこれらに限定されない。アレイ検出器は、マイクロアレイ検出器となり得る。マイクロアレイ検出器の非限定例として、微小電極アレイ検出器、光学DNAマイクロアレイ検出プラットフォーム、DNAマイクロアレイ検出器、RNAマイクロアレイ検出器およびタンパク質マイクロアレイ検出器が挙げられる。

#### 【0294】

場合によっては、蛍光リーダーを使用して、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンを検出する。蛍光リーダーは、バイオチップ、スライドまたはマイクロプレートにおける1、2、3、4、5種もしくはそれを超える色の蛍光マイクロアレイまたは他の構造を読み取ることができる。場合によっては、蛍光リーダーは、Sensovation蛍光アレイイメージングリーダー（FLAIR）である。あるいは、蛍光リーダーは、Gemini XPS蛍光マイクロプレートリーダー、Gemini EM蛍光マイクロプレートリーダー、Finstruments（登録商標）Fluoroskanフィルターに基づく蛍光マイクロプレートリーダー、PHERAstarマイクロプレートリーダー、FLUOstarマイクロプレートリーダー、POLARstarオメガマイクロプレートリーダー、FLUOstar OPTIMAマルチモードマイクロプレートリーダーおよびPOLARstar OPTIMAマルチモードマイクロプレートリーダー等、蛍光マイクロプレートリーダーである。蛍光リーダーの追加的な例として、PharosFX（商標）およびPharosFX Plusシステムが挙げられる。

#### 【0295】

場合によっては、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出は、マイクロプレートリーダーの使用を含む。場合によっては、マイクロプレートリーダーは、xMark（商標）マイクロプレート吸光度分光光度計、iMarkマイクロプレート吸光度リーダー、EnSpire（登録商標）マルチモードプレートリーダー、EnVis

10

20

30

40

50

ion多重標識プレートリーダー、VICTOR X多重標識プレートリーダー、FlexStation、SpectraMax Paradigm、SpectraMax M5e、SpectraMax M5、SpectraMax M4、SpectraMax M3、SpectraMax M2-M2e、FilterMax Fシリーズ、Fluoroskan Ascent FLマイクロプレート蛍光光度計およびルミノメータ、Fluoroskan Ascentマイクロプレート蛍光光度計、Luminoskan Ascentマイクロプレートルミノメータ、Multiskan EXマイクロプレート光度計、Multiskan FCマイクロプレート光度計ならびにMultiskan GOマイクロプレート光度計である。場合によっては、マイクロプレートリーダーは、吸光度、蛍光、ルミネッセンス、時間分解蛍光、光散乱またはこれらのいずれかの組合せを検出する。一部の実施形態では、マイクロプレートリーダーは、動的な光散乱を検出する。マイクロプレートリーダーは、場合によっては、静的な光散乱を検出することができる。場合によっては、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出は、マイクロプレート撮像器の使用を含む。場合によっては、マイクロプレート撮像器は、ViewLux uHTSマイクロプレート撮像器およびBioRadマイクロプレートイメージングシステムを含む。

#### 【0296】

標識された核酸および／またはその産物の検出は、ルミノメータの使用を含み得る。ルミノメータの例として、SpectraMax L、GloMax（登録商標）-96マイクロプレートルミノメータ、GloMax（登録商標）-20/20単一チューブルミノメータ、GloMax（登録商標）-Multi+とInstinct（商標）ソフトウェア、GloMax（登録商標）-Multi Jr単一チューブマルチモードリーダー、LUMIstar OPTIMA、LEADER HC+ルミノメータ、LEADER 450ilルミノメータおよびLEADER 50ilルミノメータが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0297】

場合によっては、標識された核酸および／または標識されたアンプリコンの検出は、スキャナの使用を含む。スキャナは、Cannon、Epson、HP、FujitsuおよびXeroxによって提供されるフラットベッドスキャナ等、フラットベッドスキャナを含む。フラットベッドスキャナの追加的な例は、FMBIO（登録商標）蛍光イメージングスキャナ（例えば、FMBIO（登録商標）II、IIIおよびIII Plusシステム）を含む。スキャナは、Arrayit ArrayPix（商標）マイクロアレイマイクロプレートスキャナ等、マイクロプレートスキャナを含み得る。場合によっては、スキャナは、Bio-radによって提供されるPersonal Molecular Imager（商標）（PMI）システムである。

#### 【0298】

標識された核酸の検出は、荷電粒子の質量対電荷比を測定する分析的技法、例えば、質量分析の使用を含み得る。一部の実施形態では、荷電粒子の質量対電荷比は、クロマトグラフィー分離技法と組み合わせて測定される。一部の実施形態では、配列決定反応は、荷電粒子測定の質量対電荷比と組み合わせて使用される。一部の実施形態では、タグは、同位体を含む。一部の実施形態では、同位体の型または比は、タグライブラリーにおいて制御または操作される。

#### 【0299】

標識された核酸またはそのいずれかの産物の検出は、小粒子および／または光散乱の使用を含む。例えば、増幅された分子（例えば、標識されたアンプリコン）は、ハプテンまたは直接的に小粒子に付着させ、アレイにハイブリダイズさせる。小粒子は、ナノメートルからマイクロメートル範囲のサイズとなり得る。その表面から光が散乱されると、粒子を検出することができる。

#### 【0300】

小粒子が着色された比色分析アッセイを使用することができる、または比色分析検出シ

システムによりハプテンを染色することができる。場合によっては、フラットベッドスキャナを使用して、粒子から散乱された光または着色材料の発色を検出することができる。本明細書に開示されている方法は、光吸収材料の使用をさらに含むことができる。光吸収材料を使用して、望ましくない光散乱または反射を遮断することができる。光吸収材料は、食品着色料または他の材料となり得る。場合によっては、標識された核酸またはそのいずれかの産物の検出は、軸外白色光 (off-axis white light) と標識された核酸との接触を含む。

#### 【0301】

一部の実施形態では、試料由来の2種またはそれを超える異なる種類の生物学的材料は、同時に検出することができる。例えば、試料由来の、DNA、RNA（例えば、マイクロRNA、mRNA等）、ヌクレオチド、タンパク質および炭水化物からなる群より選択される2種またはそれを超える異なる種類の生物学的材料は、同時に検出することができる。例えば、試料由来のDNAおよびRNAは、本明細書に記載されている方法を使用して同時に検出することができる。

10

#### 【0302】

##### データ分析

配列決定データを使用して、細胞における標的核酸分子の数を計数することができる。例えば、細胞における複数コピーの標的核酸は、固体支持体における異なるオリゴヌクレオチドに結合することができる。複数の標的核酸は、増幅および配列決定される場合、異なる分子標識を含む得る。同じ標的核酸のための分子標識の数は、細胞における標的核酸のコピー数を示すことができる。標的核酸のコピー数の決定は、細胞における標的核酸の濃度を決定する際の増幅バイアスの除去に有用となることができる。

20

#### 【0303】

配列決定データを使用して、被験体の遺伝子型を決定することができる。異なる細胞性標識を有する標的核酸を比較することにより、標的核酸のコピー数変動および／または濃度を決定することができる。異なる細胞性標識を有する標的核酸の濃度を比較することにより、配列決定データを使用して、細胞遺伝子型不均質性を決定することができる。例えば、試料の第1の細胞は、高濃度の標的核酸を含む得る一方、試料の第2の細胞は、標的核酸を含まなくてよい、または低濃度の標的核酸を含む得、これにより、細胞試料の不均質性を示す。

30

#### 【0304】

細胞遺伝子型不均質性の決定は、疾患の処置経過の診断、予後および決定に有用となることができる。例えば、試料の第1の細胞が標的核酸を含むが、試料の第2の細胞が標的核酸を含まず、第2の標的核酸を含む場合、処置経過は、第1の遺伝子型を標的化する薬剤（例えば、薬物）および第2の遺伝子型を標的化する薬剤（例えば、薬物）を含む得る。

#### 【0305】

一部の実施形態では、ある特定の配列型は、DNAまたはRNAプロファイルに関連付けることができる。例えば、T細胞受容体および／またはB細胞受容体配列は、単一細胞等、試料の転写プロファイル、マイクロRNAプロファイルまたはゲノム変異プロファイルに関連付けることができる。一部の実施形態では、ある特定の配列型は、抗原性またはタンパク質発現プロファイルに関連付けることができる。例えば、T細胞受容体および／またはB細胞受容体配列は、T細胞受容体および／またはB細胞受容体配列を含む抗体のタンパク質標的等、タンパク質を含む表面等、表面への抗体の結合により、抗原性またはタンパク質発現プロファイルに関連付けることができる。

40

#### 【0306】

一部の実施形態では、ウイルス配列等、配列の存在または非存在は、DNAまたはRNAプロファイルに関連付けることができる。例えば、ウイルス配列等、配列の存在または非存在は、単一細胞等、試料の転写プロファイル、マイクロRNAプロファイルまたはゲノム変異プロファイルに関連付けることができる。

50

## 【0307】

## キット

本開示は、本開示の方法を行うためのキットを提供する。キットは、マイクロウェルアレイ、オリゴヌクレオチドおよび固体支持体のうち1種または複数を含み得る。キットは、オリゴヌクレオチドおよび／または固体支持体を再構成および／または希釈するための試薬を含み得る。キットは、固体支持体にオリゴヌクレオチドをコンジュゲートするための試薬を含み得る。キットは、1種または複数の追加的な試薬をさらに含み得、かかる追加的な試薬は、洗浄バッファー、対照試薬、標的核酸を増幅する（例えば、cDNA合成およびPCRを行う）ための増幅剤、および固体支持体にオリゴヌクレオチドをコンジュゲートするためのコンジュゲーション剤から選択することができる。対象キットの成分は、別々の容器内に存在しても、単一の容器内に組み合わせてもよい。

10

## 【0308】

キットは、対象方法を実施するためのキットの成分を使用するための説明書を含み得る。対象方法を実施するための説明書は、適した記録媒体に記録することができる。例えば、説明書は、紙またはプラスチック等の被印刷物に印刷することができる。したがって、説明書は、キット内に添付文書として、キットまたはその成分（即ち、パッケージングまたはサブパッケージングに付随）等の容器のラベルに存在することができる。一部の実施形態では、説明書は、適したコンピュータ可読ストレージ媒体、例えば、CD-ROM、ディスク、フラッシュドライブ等に存在する電子ストレージデータファイルとして存在することができる。一部の実施形態では、実際の説明書は、キット内に存在しなくてもよいが、例えばインターネットを介して遠隔供給源から説明書を得るための手段が提供される。例えば、キットは、説明書を閲覧することができるおよび／または説明書をダウンロードすることができるウェブアドレスを含み得る。説明書と同様に、説明書を得るためのこのような手段は、適した担体（substrate）に記録される。

20

## 【0309】

2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子の分析において使用するためのキットが本明細書にさらに開示されている。本明細書に開示されているキットは、少なくとも約384種の試料の処理に十分な複数のビーズ、プライマーおよび増幅剤を含み得る。試料のうちいずれか1種は、単一細胞を含み得る。核酸増幅は、試料における約1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000種の標的化核酸の測定をもたらすことができる。核酸増幅は、試料における約1000種の標的化核酸の測定をもたらすことができる。核酸増幅は、試料における約100種の標的化核酸の測定をもたらすことができる。核酸増幅は、単一細胞における総核酸の約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%の測定をもたらすことができる。核酸増幅は、単一細胞における全核酸配列の網羅的測定をもたらすことができる。核酸増幅は、配列決定による単一細胞における標的化核酸配列の測定をもたらすことができる。核酸増幅は、アレイによる単一細胞における標的化核酸配列の測定をもたらすことができる。

30

40

## 【0310】

増幅剤は、プライマーの固定されたパネルを含み得る。増幅剤は、少なくとも一対のカスタムプライマーを含み得る。増幅剤は、少なくとも一対の対照プライマーを含み得る。増幅剤は、少なくとも一対のハウスキーピング遺伝子プライマーを含み得る。適した増幅剤は、PCRマスターミックスを含み得る。キットは、プライマー設計および最適化のための説明書をさらに含み得る。キットは、マイクロウェルプレートにさらに含み得、マイクロウェルプレートは、1個以下のビーズが分布された少なくとも1個のウェルを含み得る。キットは、1個または複数の追加的な容器をさらに含み得る。1個または複数の追加的な容器は、1種または複数の追加的な複数の試料タグを含み得る。1個または複数の追加的な容器内の複数の1種または複数の追加的な試料タグは、第1の容器内の第1の複数

50

の試料タグとは異なる。1個または複数の追加的な容器は、1種または複数の追加的な分子識別子標識を含み得る。1個または複数の追加的な容器の1種または複数の追加的な分子識別子標識は、第2の容器の1種または複数の追加的な分子識別子標識と同じである。

### 【0311】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1個または複数のピペットチップおよび／または容器（例えば、チューブ、バイアル、マルチウェルプレート、マイクロウェルプレート、エッペンドルフチューブ、スライドガラス、ビーズ）の使用を含み得る。場合によっては、ピペットチップは、低結合ピペットチップである。それに代えてまたはそれに加えて、容器は、低結合容器となり得る。低結合ピペットチップおよび低結合容器は、シリコーンに基づくチップおよび非低結合容器に伴う浸出および／または後続の試料分解を低減し得る。低結合ピペットチップおよび低結合容器は、非低結合ピペットチップおよび容器と比較して試料結合を低減し得る。低結合チップの例として、Corning（登録商標）DeckWorx（商標）低結合チップおよびAvant Premium低結合目盛り付きチップが挙げられるがこれらに限定されない。低結合容器の非限定リストは、Corning（登録商標）Costar（登録商標）低結合微量遠心分離チューブならびにCosmobrand低結合PCRチューブおよび微量遠心分離チューブを含む。

10

### 【0312】

本明細書に開示されているキットのいずれかは、ソフトウェアをさらに含み得る。例えば、キットは、バーコードまたは標的配列等、配列を分析するためのソフトウェアを含み得る。例えば、キットは、単一細胞由来の特有の標的分子等、特有の標的分子を計数するためのバーコードまたは標的配列等、配列を分析するためのソフトウェアを含み得る。例えば、キットは、単一細胞由来の遺伝子等、遺伝子由来の特有の標的分子等、特有の標的分子を計数するためのバーコードまたは標的配列等、配列を分析するためのソフトウェアを含み得る。

20

### 【0313】

マイクロウェルおよびマイクロウェルアレイ

場合によっては、本開示の方法は、コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドを含む固体支持体と細胞との接触を提供する。接触させるステップは、表面上で行うことができる。例示的な表面は、マイクロウェル、チューブ、フラスコおよびチップを含み得る。場合によっては、表面は、マイクロウェルを含む。場合によっては、マイクロウェルは、マイクロウェルアレイの一部である。

30

### 【0314】

マイクロウェルアレイのマイクロウェルは、マイクロウェル1個当たり少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれを超える細胞を含有することができるサイズおよび形状のものとなり得る。マイクロウェルは、マイクロウェル1個当たり最大でも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれを超える細胞を含有することができるサイズおよび形状のものとなり得る。マイクロウェルアレイのマイクロウェルは、マイクロウェル1個当たり少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個またはそれを超える固体支持体を含有することができるサイズおよび形状のものとなり得る。マイクロウェルは、最大でも1個の細胞および1個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、最大でも1個の細胞および2個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、少なくとも1個の細胞および最大でも1個の固体支持体を含み得る。マイクロウェルは、少なくとも1個の細胞および最大でも2個の固体支持体を含み得る。

40

### 【0315】

マイクロウェルアレイにおけるマイクロウェルは、水平に配置することができる。マイ

50

クロウエルは、垂直に配置することができる。マイクロウエルは、等しいまたはほとんど等しいスペーシングで配置することができる。マイクロウエルアレイは、1個または複数のマイクロウエルに関連するマーカーを有することができる。例えば、マイクロウエルアレイのマイクロウエルは、それぞれ規定数のマイクロウエルで構成された群に分けることができる。これらの群は、基材の主表面に設置することができる。マーカーは、各群のポジションを決定することができるように設置することができる。マーカーは、肉眼で検出可能となり得る。マーカーは、観察のための光学機器を必要とするマーカーとなり得る（例えば、蛍光マーカー、発光マーカー、UVマーカー）。

#### 【0316】

マイクロウエルアレイは、少なくとも約96、384、1000、5000、10000、15000、100000、150000、500000、1000000もしくは5000000個またはそれを超えるマイクロウエルを含み得る。マイクロウエルアレイは、最大でも約96、384、1000、5000、10000、15000、100000、150000、500000、1000000もしくは5000000個またはそれを超えるマイクロウエルを含み得る。

10

#### 【0317】

マイクロウエルの形状は、円柱状となり得る。マイクロウエルの形状は、複数の面で構成された多面体（例えば、平行六面体、六角柱または八角柱）、逆円錐、逆錐体（逆三角錐、逆四角錐、逆五角錐、逆六角錐または7個もしくはそれを超える角を有する逆多角錐）等、非円柱状となり得る。マイクロウエルは、これらの形状のうち2種またはそれ超を組み合わせた形状を含み得る。例えば、これは、部分的に円柱状となり、残り部分が逆円錐の形状を有することができる。マイクロウエルの形状は、逆円錐または逆錐体の頂部の一部が切り取られた形状となり得る。マイクロウエルの口は、マイクロウエルの頂部またはマイクロウエルの底部に存在し得る。マイクロウエルの底部は、平坦となり得るが、湾曲した表面（例えば、凸面または凹面）も可能である。マイクロウエルの形状およびサイズは、マイクロウエルに貯蔵しようとする細胞および／または固体基材の種類（例えば、形状、サイズ）を考慮して決定することができる。

20

#### 【0318】

マイクロウエルの直径は、マイクロウエルの平面形状に刻まれ得る最大の丸を指すことができる。マイクロウエルの直径は、マイクロウエルに含有しようとする細胞および／または固体支持体の直径の少なくとも約0.1、0.5、1、2もしくは3倍またはそれを超えることができる。マイクロウエルの直径は、マイクロウエルに含有しようとする細胞および／または固体支持体の直径の最大でも約0.1、0.5、1、2もしくは3倍またはそれを超えることができる。マイクロウエルの直径は、固体支持体の直径の少なくとも約10、20、30、40もしくは50%またはそれを超えることができる。マイクロウエルの直径は、固体支持体の直径の最大でも約10、20、30、40もしくは50%またはそれを超えることができる。マイクロウエルの直径は、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45もしくは50またはそれを超えるマイクロメートルとなることができる。マイクロウエルの直径は、最大でも約5、10、15、20、25、30、35、40、45もしくは50またはそれを超えるマイクロメートルとなることができる。マイクロウエルの直径は、約25マイクロメートルである。場合によっては、マイクロウエルの直径は、約30マイクロメートルである。場合によっては、マイクロウエルの直径は、約28マイクロメートルである。

30

40

#### 【0319】

マイクロウエル容積および固体支持体容積の間の差は、少なくとも約 $1 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $1.5 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $1.7 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $2.0 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $2.5 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ もしくは $3.0 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ またはそれを超えることができる。マイクロウエル容積および固体支持体容積の間の差は、最大でも約 $1 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $1.5 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $1.7 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $2.0 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ 、 $2.5 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ もしくは $3.0 \times 10^{(-14)} \text{ m}^3$ またはそれを超えることができる。マイクロウエル容積および固体

50

支持体容積の間の差は、少なくとも約  $1 \times 10^{(-11)}$  L、 $1.5 \times 10^{(-11)}$  L、 $1.7 \times 10^{(-11)}$  L、 $2.0 \times 10^{(-11)}$  L、 $2.5 \times 10^{(-11)}$  L もしくは  $3.0 \times 10^{(-11)}$  L またはそれを超えることができる。マイクロウェル容積および固体支持体容積の間の差は、最大でも約  $1 \times 10^{(-11)}$  L、 $1.5 \times 10^{(-11)}$  L、 $1.7 \times 10^{(-11)}$  L、 $2.0 \times 10^{(-11)}$  L、 $2.5 \times 10^{(-11)}$  L もしくは  $3.0 \times 10^{(-11)}$  L またはそれを超えることができる。図 7 は、マイクロウェル、固体支持体の容積、ならびにマイクロウェルおよび固体支持体容積の間の差に関する例示的な統計を説明する。

### 【0320】

マイクロウェルの深さは、マイクロウェルに含有しようとする細胞および／または固体支持体の直径の少なくとも約 0.1、0.5、1、2、3、4 もしくは 5 倍またはそれを超えることができる。マイクロウェルの深さは、マイクロウェルに含有しようとする細胞および／または固体支持体の直径の最大でも約 0.1、0.5、1、2、3、4 もしくは 5 倍またはそれを超えることができる。マイクロウェルの深さは、固体支持体の深さの少なくとも約 10、20、30、40 もしくは 50 % またはそれを超えることができる。マイクロウェルの深さは、固体支持体の深さの最大でも約 10、20、30、40 もしくは 50 % またはそれを超えることができる。マイクロウェルの深さは、少なくとも約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 もしくは 50 またはそれを超えるマイクロメートルとなることができる。マイクロウェルの深さは、最大でも約 5、10、15、20、25、30、35、40、45 もしくは 50 またはそれを超えるマイクロメートルとなることができる。マイクロウェルの深さは、約 30 マイクロメートルとなることができる。マイクロウェルの深さは、約 28 マイクロメートルとなることができる。マイクロウェルは、平坦または実質的に平坦となることができる。

### 【0321】

マイクロウェルアレイは、ウェル間にスペーシングを含み得る。ウェル間のスペーシングは、少なくとも約 5、10、25、20、25、30、35、40、45 もしくは 50 またはそれを超えるマイクロメートルとなることができる。ウェル間のスペーシングは、最大でも約 5、10、25、20、25、30、35、40、45 もしくは 50 またはそれを超えるマイクロメートルとなることができる。ウェル間のスペーシングは、約 15 マイクロメートルとなることができる。ウェル間のスペーシングは、約 25 マイクロメートルとなることができる。

### 【0322】

マイクロウェルの内壁のいずれかのポジションにおける窪みおよび隆起の高さに差が存在し得る。滑らかにするよう処理されたウェルの内壁の一部に窪みおよび隆起を作製することにより、ウェルに機能性を加えることができる。マイクロウェルの内壁は、エッチングにより滑らかになり得る。エッチングデバイスにおける真空の程度、エッチングガスの種類、エッチングステップその他を適宜選択することができる。例えば、マイクロウェルの内壁の平滑化は、ウェットエッチングによりまたは高温酸化ステップをオキシドフィルムエッチングと組み合わせることにより実行することができる。マイクロウェルの内壁を官能化することができる（例えば、オリゴヌクレオチド、反応基、官能基で官能化）。

### 【0323】

マイクロウェルアレイは、シリコン、金属（例えば、アルミニウム、ステンレス鋼、銅、ニッケル、クロムおよびチタン）、PDMS（エラストマー）、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、プルロニック（*pluronic*）（例えば、プルロニック F127）、プラスチック（例えば、PMMA 等、天然で親水性であるプラスチック）、疎水性であるが、親水性となるよう処理することができるプラスチック（例えば、PP、COP、COC）およびエラストマー（例えば、PDMS）、ヒドロゲル（例えば、ポリアクリルアミド、アルギネート）または樹脂（例えば、ポリイミド、ポリエチレン、塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネート、アクリルおよびポリエチレンテレフタレート）から作製することができる。マイクロウェルアレイは、疎水性の材料から作製することができる。マイクロウェルアレイは、疎水性であるが、親水性となるようにコーティ

ングされた（例えば、酸素プラズマ処理により）材料から作製することができる。マイクロウェルアレイは、親水性であるが、疎水性となるようにコーティングされた材料から作製することができる。

#### 【0324】

マイクロウェルアレイを、組み立てることができる。マイクロウェルアレイアセンブリは、パターンを有するシリコンウエハ（例えば、SU8フォトレジストにより作製されたパターン化ポスト）を得ることと、これをPDMS材料とインキュベートして、ソフトリソグラフィー（例えば、80℃で数時間）によりウェルのアレイを作製することを含み得る。例えば、未硬化PDMSは、液体となり得る。未硬化PDMSは、ポスト間のギャップを充填し得る。PDMSは、熱により硬化されると固体となり、これにより、ウェルのアレイを作製することができる。光学接着剤（例えば、NOA81/NOA63）をPDMS材料（例えば、UV光を使用）に適用して、ポストのアレイ（例えば、複数のアレイ）を作製することができる。適用は、少なくとも約1秒間、2秒間、3秒間、4秒間、5秒間、6秒間、7秒間、8秒間、9秒間、10秒間または1分間、2分間、3分間、4分間もしくは5分間あるいはそれを超えて行うことができる。アガロースを含む層を光学接着剤に適用することができる。アガロース層は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10%またはそれを超えるアガロースとなり得る。アガロース層は、最大でも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10%またはそれを超えるアガロースとなり得る。アガロース層は、約5%アガロースとなり得る。アガロース層は、Gelbondフィルムにまたはアガロースが接着し得るいずれかの親水性基材に設置することができる。光学表面におけるアガロース層のインキュベーションは、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10分間またはそれを超えることができる。光学表面におけるアガロース層のインキュベーションは、最大でも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10分間またはそれを超えることができる。

#### 【0325】

場合によっては、本開示の方法は、マイクロウェルを含まなくてよい表面を使用することができる。表面は、ガラス、プラスチック、金属となり得る。表面は、固体支持体、細胞外マトリクス、ポリマーでコーティングすることができる。表面は、ウェルを含まなくてよい。表面は、分子拡散を限定するように空間的に配置された固体支持体を含み得る。細胞および/または細胞内容物を捕捉する本開示の方法は、平坦な表面上で行われ得る。細胞および/または細胞内容物を捕捉する本開示の方法は、懸濁液中で行われ得る。

#### 【0326】

細胞および試料

本開示の細胞は、動物（例えば、ヒト、ラット、ブタ、ウマ、ウシ、イヌ、マウス）由来の細胞となり得る。場合によっては、細胞は、ヒト細胞である。細胞は、胎児ヒト細胞となり得る。胎児ヒト細胞は、胎児を妊娠した母体から得ることができる。細胞は、妊婦由来の細胞となり得る。細胞は、脊椎動物、無脊椎動物、真菌、古細菌または細菌由来の細胞となり得る。細胞は、多細胞組織（例えば、臓器（例えば、脳、肝臓、肺、腎臓、前立腺、卵巣、脾臓、リンパ節、甲状腺、膵臓、心臓、骨格筋、腸、喉頭、食道および胃）、胚盤胞）に由来し得る。細胞は、細胞培養物由来の細胞となり得る。細胞は、HeLa細胞、K562細胞、Ramos細胞、ハイブリドーマ、幹細胞、未分化細胞、分化細胞、循環細胞、CHO細胞、3T3細胞その他となり得る。

#### 【0327】

場合によっては、細胞は、がん性細胞である。がん細胞の非限定例として、前立腺がん細胞、乳がん細胞、結腸がん細胞、肺がん細胞、脳がん細胞および卵巣がん細胞を挙げることができる。場合によっては、細胞は、がん（例えば、循環腫瘍細胞）由来である。がんの非限定例として、腺腫、腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、小細胞癌、大細胞未分化癌、軟骨肉腫および線維肉腫を挙げることができる。

#### 【0328】

場合によっては、細胞は、稀な細胞である。稀な細胞は、循環腫瘍細胞（CTC）、循

環上皮細胞（CEC）、循環幹細胞（CSC）、幹細胞、未分化幹細胞、がん幹細胞、骨髓細胞、前駆細胞、泡沫細胞、胎児細胞、間葉系細胞、循環内皮細胞、循環子宮内膜細胞、栄養膜、免疫系細胞（宿主またはグラフト）、結合組織細胞、細菌、真菌または病原体（例えば、細菌または原生生物）、マイクロ粒子、細胞断片、タンパク質および核酸、細胞小器官、他の細胞成分（例えば、ミトコンドリアおよび核）ならびにウイルスとなり得る。

### 【0329】

場合によっては、細胞は、腫瘍由来である。場合によっては、腫瘍は、良性または悪性である。腫瘍細胞は、転移性細胞を含み得る。場合によっては、細胞は、複数の異なる細胞型（例えば、異なる遺伝子型）を含む固形組織由来である。

10

### 【0330】

細胞は、ウイルス、細菌、真菌および寄生生物を含み得る。ウイルスとして、DNAまたはRNA動物ウイルス（例えば、Picornaviridae（例えば、ポリオウイルス）、Reoviridae（例えば、ロタウイルス）、Togaviridae（例えば、脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、風疹ウイルス）、Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルス）、Paramyxoviridae（例えば、呼吸器多核体ウイルス、麻疹ウイルス、ムンプスウイルス、パラインフルエンザウイルス）、Rhabdoviridae（例えば、狂犬病ウイルス）、Coronaviridae、Bunyaviridae、Flaviviridae、Filoviridae、Arenaviridae、BunyaviridaeおよびRetroviridae（例えば、ヒトT細胞リンパ球向性ウイルス（HTLV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、Papovaviridae（例えば、パピローマウイルス）、Adenoviridae（例えば、アデノウイルス）、Herpesviridae（例えば、単純ヘルペスウイルス）およびPoxviridae（例えば、痘瘡ウイルス））を挙げることができるがこれらに限定されない。

20

### 【0331】

本開示の方法において使用することができる例示的な細菌は、Actinomedurae、Actinomyces israelii、Bacillus anthracis、Bacillus cereus、Clostridium botulinum、Clostridium difficile、Clostridium perfringens、Clostridium tetani、Corynebacterium、Enterococcus faecalis、Listeria monocytogenes、Nocardia、Propionibacterium acnes、Staphylococcus aureus、Staphylococcus epiderm、Streptococcus mutans、Streptococcus pneumoniaeその他を含み得る。グラム陰性細菌として、Afipia felis、Bacterioides、Bartonella bacilliformis、Bortadella pertussis、Borrelia burgdorferi、Borrelia recurrentis、Brucella、Calymmatobacterium granulomatis、Campylobacter、Escherichia coli、Francisella tularensis、Gardnerella vaginalis、Haemophilus aegyptius、Haemophilus ducreyi、Haemophilus influenzae、Helicobacter pylori、Legionella pneumophila、Leptospira interrogans、Neisseria meningitidis、Porphyromonas gingivalis、Providencia stuarti、Pseudomonas aeruginosa、Salmonella enteridis、Salmonella typhi、Serratia marcescens、Shigella boydii、Streptobacillus moniliformis、Streptococcus

30

40

50

pyogenes、Treponema pallidum、Vibrio cholerae、Yersinia enterocolitica、Yersinia pestisその他が挙げられるがこれらに限定されない。他の細菌は、Mycobacterium avium、Mycobacterium leprae、Mycobacterium tuberculosis、Bartonella henselae、Chlamydia psittaci、Chlamydia trachomatis、Coxiella burnetii、Mycoplasma pneumoniae、Rickettsia akari、Rickettsia prowazekii、Rickettsia rickettsii、Rickettsia tsutsugamushi、Rickettsia typhi、Ureaplasma urealyticum、Diplococcus pneumoniae、Ehrlichia chaffeensis、Enterococcus faecium、Meningococciその他を含み得る。

10

#### 【0332】

本開示の方法において使用しようとする例示的な真菌として、Aspergilli、Candidae、Candida albicans、Coccidioides immitis、Cryptococciおよびこれらの組合せを挙げることができるがこれらに限定されない。

#### 【0333】

本開示の方法において使用しようとする例示的な寄生生物として、Balantidium coli、Cryptosporidium parvum、Cyclospora cayatanensis、Encephalitozoa、Entamoeba histolytica、Enterocytozoon bienersi、Giardia lamblia、Leishmaniae、Plasmodii、Toxoplasma gondii、Trypanosomae、台形（trapezoidal）アメーバ、虫（例えば、蠕虫）、特に、Nematoda（回虫、例えば、鞭虫、鉤虫、蟯虫、ascarids、filaridsその他）、Cestoda（例えば、条虫）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

#### 【0334】

本開示の試料は、動物（例えば、ヒト、ラット、ブタ、ウマ、ウシ、イヌ、マウス）由来の試料となり得る。場合によっては、試料は、ヒト試料である。試料は、胎児ヒト試料となり得る。胎児ヒト試料は、胎児を妊娠した母体から得ることができる。試料は、妊婦由来の試料となり得る。試料は、脊椎動物、無脊椎動物、真菌、古細菌または細菌由来の試料となり得る。試料は、多細胞組織（例えば、臓器（例えば、脳、肝臓、肺、腎臓、前立腺、卵巣、脾臓、リンパ節、甲状腺、膵臓、心臓、骨格筋、腸、喉頭、食道および胃）、胚盤胞）に由来し得る。試料は、細胞培養物由来の細胞となり得る。

30

#### 【0335】

試料は、複数の細胞を含み得る。試料は、複数の同じ種類の細胞を含み得る。試料は、複数の異なる種類の細胞を含み得る。試料は、細胞周期および／または分化経路の同じポイントにおける複数の細胞を含み得る。試料は、細胞周期および／または分化経路の異なるポイントにおける複数の細胞を含み得る。試料は、複数の試料を含み得る。

40

#### 【0336】

複数の試料は、少なくとも5、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100種またはそれを超える試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約100、200、300、400、500、600、700、800、900もしくは1000種またはそれを超える試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000種の試料、9000もしくは10,000種の試料もしくは100,000種の試料もしくは1,000,000種またはそれを超える試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約10,000種の試料を含み得る。

50

## 【0337】

第1の試料における1種または複数の核酸は、第2の試料における1種または複数の核酸とは異なり得る。第1の試料における1種または複数の核酸は、複数の試料における1種または複数の核酸とは異なり得る。1種または複数の核酸は、少なくとも約1個のヌクレオチド、2個のヌクレオチド、5個のヌクレオチド、10個のヌクレオチド、20個のヌクレオチド、50個のヌクレオチド、100個のヌクレオチド、200個のヌクレオチド、300個のヌクレオチド、500個のヌクレオチド、1000個のヌクレオチド、2000個のヌクレオチド、3000個のヌクレオチド、4000個のヌクレオチド、5000個のヌクレオチド、10,000個のヌクレオチド、100,000個のヌクレオチド、1,000,000個のヌクレオチドの長さを含み得る。

10

## 【0338】

第1の試料は、1個または複数の細胞を含み得、第2の試料は、1個または複数の細胞を含み得る。第1の試料の1個または複数の細胞は、第2の試料の1個または複数の細胞と同じ細胞型のものとなり得る。第1の試料の1個または複数の細胞は、複数の試料の1個または複数の異なる細胞とは異なる細胞型のものとなり得る。細胞型は、軟骨細胞、破骨細胞、脂肪細胞、筋芽細胞、幹細胞、内皮細胞または平滑筋細胞となり得る。細胞型は、免疫細胞型となり得る。免疫細胞型は、T細胞、B細胞、血小板、樹状細胞、好中球、マクロファージまたは単球となり得る。

## 【0339】

複数の試料は、1個または複数の悪性細胞を含み得る。1個または複数の悪性細胞は、腫瘍、肉腫または白血病に由来することができる。

20

## 【0340】

複数の試料は、少なくとも1種の体液を含み得る。体液は、血液、尿、リンパ液、唾液を含み得る。複数の試料は、少なくとも1種の血液試料を含み得る。

## 【0341】

複数の試料は、1種または複数の生物学的組織由来の少なくとも1個の細胞を含み得る。1種または複数の生物学的組織は、骨、心臓、胸腺、動脈、血管、肺、筋肉、胃、腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、胆嚢、甲状腺、副腎、乳腺、卵巣、前立腺、精巣、皮膚、脂肪、眼または脳となり得る。

## 【0342】

生物学的組織は、感染した組織、罹患した組織、悪性組織、石灰化した組織または健康な組織を含み得る。

30

## 【0343】

複数の試料は、1種または複数の供給源に由来し得る。複数の試料は、2種またはそれを超える供給源に由来し得る。複数の試料は、1種または複数の被験体に由来し得る。複数の試料は、2種またはそれを超える被験体に由来し得る。複数の試料は、同じ被験体に由来し得る。1種または複数の被験体は、同じ種に由来し得る。1種または複数の被験体は、異なる種に由来し得る。1種または複数の被験体は、健康となり得る。1種または複数の被験体は、疾患、障害または状態に罹患し得る。複数の試料は、哺乳動物、細菌、ウイルス、真菌または植物から選択される起源の細胞を含み得る。1種または複数の試料は、ヒト、ウマ、ウシ、ニワトリ、ブタ、ラット、マウス、サル、ウサギ、モルモット、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、鳥類、魚類、カエルおよびショウジョウバエに由来し得る。

40

## 【0344】

複数の試料は、一斉に得ることができる。複数の試料は、同時に得ることができる。複数の試料は、逐次的に得ることができる。複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る数年間、100年間、10年間、5年間、4年間、3年間、2年間または1年間の経過にわたって得ることができる。1種または複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る約1年間以内に得ることができる。1種または複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る12カ月間、11カ月間、10カ月間、9カ月間、8カ月間、7カ月間、6カ月間、4カ月間、3カ月間、2カ月間または1カ月間以内に得ることができる。1種

50

または複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る30日間、28日間、26日間、24日間、21日間、20日間、18日間、17日間、16日間、15日間、14日間、13日間、12日間、11日間、10日間、9日間、8日間、7日間、6日間、5日間、4日間、3日間、2日間または1日間以内に得ることができる。1種または複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る約24時間、22時間、20時間、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、2時間または1時間以内に得ることができる。1種または複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る約60秒間、45秒間、30秒間、20秒間、10秒間、5秒間、2秒間または1秒間以内に得ることができる。1種または複数の試料は、1種または複数の異なる試料を得る1秒間未満内に得ることができる。

10

### 【0345】

#### 標的分子

本明細書に開示されている方法およびキットは、分子の確率論的標識化において使用することができる。かかる分子として、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。本明細書において、用語「ポリヌクレオチド」および「核酸分子」は、プリンおよびピリミジン塩基あるいは他の天然、化学的もしくは生化学的に修飾された、非天然または誘導体化ヌクレオチド塩基を含む、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、ロクト核酸(LNA)またはペプチド核酸(PNA)のいずれかである、いずれかの長さのポリマー型のヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、単一のヌクレオチドまたは塩基対からなることができる。あるいは、「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、2またはそれを超えるヌクレオチドまたは塩基対を含む。例えば、「ポリヌクレオチド」または「核酸分子」は、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000ヌクレオチドまたは塩基対を含む。別の例では、ポリヌクレオチドは、少なくとも約1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500または10000ヌクレオチドまたは塩基対を含む。ポリヌクレオチドの骨格は、RNAもしくはDNAまたは修飾もしくは置換糖もしくはリン酸基に典型的に見出され得る通りに、糖およびリン酸基を含み得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド等、修飾ヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを含み得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断され得る。よって、用語、ヌクレオシド、ヌクレオチド、デオキシヌクレオシドおよびデオキシヌクレオチドは、一般に、本明細書に記載されているアナログ等、アナログを含む。このようなアナログは、核酸またはオリゴヌクレオシド配列に取り込まれる際に、溶液における天然に存在する核酸配列とのハイブリダイゼーションを可能にするように、天然に存在するヌクレオシドまたはヌクレオチドと共通したいくつかの構造的な特徴を有する分子である。典型的には、このようなアナログは、塩基、リボースまたはホスホジエステル部分を置き換えるおよび／または修飾することによる、天然に存在するヌクレオシドおよびヌクレオチドに由来する。変化は、所望の通りに、ハイブリッド形成を安定化もしくは不安定化する、または相補的核酸配列とのハイブリダイゼーションの特異性を増強するために調整されて作製され得る。場合によっては、分子は、DNA、RNAまたはDNA-RNAハイブリッドである。分子は、一本鎖または二本鎖となり得る。場合によっては、分子は、mRNA、rRNA、tRNA、ncRNA、lncRNA、siRNA、マイクロRNAまたはmiRNA等、RNA分子である。RNA分子は、ポリアデニル化され得る。あるいは、mRNA分子は、ポリアデニル化されていない。あるいは、分子は、DNA分子である。DNA分子は、ゲノムDNAとなり得る。DNA分子は、エクソン、イントロン、非翻訳領域またはこれらのいずれかの組合せを含み得る。場合によっては、分子は、分子のパネルである。

20

30

40

### 【0346】

50

本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、同一もしくはほとんど同一の分子および／または異なる分子の個々の出現を確率論的に標識することができる。場合によっては、本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、同一またはほとんど同一の分子（例えば、分子は、同一またはほとんど同一の配列を含む）を確率論的に標識することができる。例えば、標識しようとする分子は、少なくとも約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%配列同一性を含む。ほとんど同一の分子は、約100、90、80、70、60、50、40、30、25、20、25、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1ヌクレオチドまたは塩基対未満が異なり得る。複数の試料のうち1種または複数の試料における複数の核酸は、2種またはそれを超える同一配列を含み得る。複数の試料のうち1種または複数における総核酸の少なくとも約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%または100%は、同じ配列を含み得る。複数の試料のうち1種または複数の試料における複数の核酸は、少なくとも2種の異なる配列を含み得る。複数の試料のうち1種または複数における総核酸の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%は、少なくとも2種の異なる配列を含み得る。場合によっては、標識しようとする分子は、互いにバリエーションである。例えば、標識しようとする分子は、一塩基多型または他の種類の変異を含有することができる。別の例では、標識しようとする分子は、スプライスバリエーションである。場合によっては、少なくとも1種の分子が確率論的に標識される。他の事例では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10種の同一またはほとんど同一の分子が確率論的に標識される。あるいは、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000種の同一またはほとんど同一の分子が確率論的に標識される。他の事例では、少なくとも1500；2，000；2500；3，000；3500；4，000；4500；5，000；6，000；7，000；8，000；9，000；または10000種の同一またはほとんど同一の分子が確率論的に標識される。他の事例では、少なくとも15，000；20，000；25，000；30，000；35，000；40，000；45，000；50，000；60，000；70，000；80，000；90，000；または100，000種の同一またはほとんど同一の分子が確率論的に標識される。

#### 【0347】

他の事例では、本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、異なる分子を確率論的に標識することができる。例えば、標識しようとする分子は、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%未満の配列同一性を含む。異なる分子は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100またはそれを超えるヌクレオチドまたは塩基対が異なり得る。場合によっては、少なくとも1種の分子が確率論的に標識される。他の事例では、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9または10種の異なる分子が確率論的に標識される。あるいは、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000種の異なる分子が確率論的に標識される。他の事例では、少なくとも1500；2，000；2500；3，000；3500；4，000；4500；5，000；6，000；7，000；8，000；9，000；または10000種の異なる分子が確率論的に標識される。他の事例では、少なくとも15，000；20，000；25，000；30，000；35，000；40，000；45，000；50，000；60，000；70，000；80，000；90，000；または100，000種の異なる分子が確率論的に標識される。

異なる分子が確率論的に標識される。

【0348】

標識しようとする異なる分子は、試料中に異なる濃度または量で存在し得る。例えば、ある分子の濃度または量は、試料中の別の分子の濃度または量よりも大きい。場合によっては、試料中の少なくとも1種の分子の濃度または量は、試料中の他の少なくとも1種の分子の濃度または量よりも少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90もしくは100倍またはそれを超えて大きい。場合によっては、試料中の少なくとも1種の分子の濃度または量は、試料中の他の少なくとも1種の分子の濃度または量よりも少なくとも約1000倍またはそれを超えて大きい。別の例では、ある分子の濃度または量は、試料中の別の分子の濃度または量に満たない。試料中の少なくとも1種の分子の濃度または量は、試料中の他の少なくとも1種の分子の濃度または量よりも少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90もしくは100倍またはそれを超えて少なくなり得る。試料中の少なくとも1種の分子の濃度または量は、試料中の他の少なくとも1種の分子の濃度または量よりも少なくとも約1000倍またはそれを超えて少なくなり得る。

10

【0349】

場合によっては、標識しようとする分子は、1種または複数の試料中に存在する。標識しようとする分子は、2種またはそれを超える試料中に存在し得る。2種またはそれを超える試料は、異なる量または濃度の標識しようとする分子を含有し得る。場合によっては、1種の試料中の1種の分子の濃度または量は、異なる試料中の同じ分子の濃度または量よりも大きくなり得る。例えば、血液試料は、尿試料よりも多い量の特定の分子を含有し得る。あるいは、単一の試料は、2個またはそれを超える部分試料(subsample)に分けられる。部分試料は、異なる量または濃度の同じ分子を含有し得る。ある試料中の少なくとも1種の分子の濃度または量は、別の試料中の同じ分子の濃度または量よりも少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90もしくは100倍またはそれを超えて大きくなり得る。あるいは、1種の試料中の1種の分子の濃度または量は、異なる試料中の同じ分子の濃度または量に満たなくなり得る。例えば、心臓組織試料は、肺組織試料よりも多い量の特定の分子を含有し得る。ある試料中の少なくとも1種の分子の濃度または量は、別の試料中の同じ分子の濃度または量よりも少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90もしくは100倍またはそれを超えて少なくなり得る。場合によっては、2種またはそれを超える異なる試料中の異なる濃度または量の分子は、試料バイアスと称される。

20

30

【0350】

本明細書に開示されている方法およびキットは、2種またはそれを超える試料由来の2種またはそれを超える分子の分析のために使用することができる。2種またはそれを超える分子は、2種またはそれを超えるポリペプチドを含み得る。方法は、2種またはそれを超える標識されたポリペプチドの同一性を決定するステップを含み得る。2種またはそれを超える標識されたポリペプチドの同一性を決定するステップは、質量分析を含み得る。方法は、第1の試料の標識されたポリペプチドを、第2の試料の標識されたポリペプチドと組み合わせるステップをさらに含み得る。標識されたポリペプチドは、異なる標識されたポリペプチドの数を決定する前に組み合わせることができる。方法は、第1の試料タグが付いたポリペプチドおよび第2の試料タグが付いたポリペプチドを組み合わせるステップをさらに含み得る。第1の試料タグが付いたポリペプチドおよび第2の試料タグが付いたポリペプチドは、複数の分子識別子標識との接触前に組み合わせることができる。異なる標識されたポリペプチドの数の決定は、標識されたポリペプチドの少なくとも一部の検出を含み得る。標識されたポリペプチドの少なくとも一部の検出は、試料タグ、分子識別

40

50

子標識、ポリペプチドまたはこれらの組合せの少なくとも一部の検出を含み得る。

#### 【0351】

本明細書において、用語「ポリペプチド」は、少なくとも1種のペプチドを含む分子を指す。場合によっては、ポリペプチドは、単一のペプチドからなる。あるいは、ポリペプチドは、2種またはそれを超えるペプチドを含む。例えば、ポリペプチドは、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000種のペプチドを含む。ポリペプチドの例として、アミノ酸、タンパク質、ペプチド、ホルモン、オリゴ糖、脂質、糖脂質、リン脂質、抗体、酵素、キナーゼ、受容体、転写因子およびリガンドが挙げられるがこれらに限定されない。

10

#### 【0352】

##### 被験体

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の被験体由来の細胞または試料の使用を含み得る。被験体は、ヒトまたは非ヒト被験体となり得る。被験体は、生きていてよい。被験体は、死んでいてよい。被験体は、介護者（例えば、医療従事者）にケアされているヒトとなり得る。被験体は、疾患を有すると疑われ得る。被験体は、疾患を有し得る。被験体は、疾患の症状を有し得る。被験体は、1種または複数の試料を提供する被験体となり得る。被験体は、哺乳動物、爬虫類、両生類および／または鳥類となり得る。被験体は、非ヒト霊長類となり得る。

20

#### 【0353】

##### 酵素

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の酵素を含み得る。酵素の例として、リガーゼ、逆転写酵素、ポリメラーゼおよび制限ヌクレアーゼが挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、分子へのオリゴヌクレオチドタグの付着は、1種または複数のリガーゼの使用を含む。リガーゼの例として、DNAリガーゼI、DNAリガーゼII、DNAリガーゼIVおよびT4 DNAリガーゼ等のDNAリガーゼ、ならびにT4 RNAリガーゼIおよびT4 RNAリガーゼII等のRNAリガーゼが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0354】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の逆転写酵素の使用をさらに含み得る。場合によっては、逆転写酵素は、HIV-1逆転写酵素、M-MLV逆転写酵素、AMV逆転写酵素およびテロメラーゼ逆転写酵素である。場合によっては、逆転写酵素は、M-MLV逆転写酵素である。

30

#### 【0355】

場合によっては、本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数のポリメラーゼの使用を含む。ポリメラーゼの例として、DNAポリメラーゼおよびRNAポリメラーゼが挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、DNAポリメラーゼは、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼII、DNAポリメラーゼIIIホロ酵素およびDNAポリメラーゼIVである。市販のDNAポリメラーゼとして、Bst 2.0 DNAポリメラーゼ、Bst 2.0 WarmStart（商標）DNAポリメラーゼ、Bst DNAポリメラーゼ、Sulfolobus DNAポリメラーゼIV、Taq DNAポリメラーゼ、9°N（商標）m DNAポリメラーゼ、Deep Vent R（商標）（エキソ）DNAポリメラーゼ、Deep Vent R（商標）DNAポリメラーゼ、Hemo KlenTaq（商標）、LongAmp（登録商標）Taq DNAポリメラーゼ、OneTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ、Phusion（登録商標）DNAポリメラーゼ、Q5（商標）高忠実度DNAポリメラーゼ、Therminator（商標）γDNAポリメラーゼ、Therminator（商標）DNAポリメラーゼ、Therminator（商標）II DNAポリメラーゼ、Therminator（商標）III DNAポリメラーゼ、Vent R（登録商標）DNAポ

40

50

リメラーゼ、V e n t R（登録商標）（エキソー）DNAポリメラーゼ、B s u DNAポリメラーゼ、p h i 2 9 DNAポリメラーゼ、T 4 DNAポリメラーゼ、T 7 DNAポリメラーゼ、末端転移酵素、T i t a n i u m（登録商標）T a q ポリメラーゼ、K A P A T a q DNAポリメラーゼおよびK A P A T a q ホットスタートDNAポリメラーゼが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0356】

あるいは、ポリメラーゼは、RNAポリメラーゼI、RNAポリメラーゼII、RNAポリメラーゼIII、E. c o l i ポリ（A）ポリメラーゼ、p h i 6 RNAポリメラーゼ（R d R P）、ポリ（U）ポリメラーゼ、S P 6 RNAポリメラーゼおよびT 7 RNAポリメラーゼ等、RNAポリメラーゼである。

10

#### 【0357】

場合によっては、本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の制限酵素を含む。制限酵素は、I型、II型、III型およびIV型制限酵素を含む。場合によっては、I型酵素は、その認識配列から離れてランダムにDNAをカットする、複合型、多サブユニット、組合せ制限・修飾酵素である。一般に、II型酵素は、その認識配列近くのまたはその内部の定義されたポジションでDNAをカットする。これは、別々の制限断片および明確に異なるゲルバンド形成パターンを生成することができる。III型酵素も、大型の組合せ制限・修飾酵素である。これは多くの場合、その認識配列の外側を切断し、切断を達成するために、同じDNA分子内に対向する配向性の2種のかかる配列を必要とし得る；これは稀に、完全な消化物を生じる。場合によっては、IV型酵素は、修飾された、典型的にはメチル化DNAを認識し、E. c o l i のM c r B CおよびM r r システムによって例証され得る。

20

#### 【0358】

##### 追加的な試薬

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の試薬の使用を含み得る。試薬の例として、PCR試薬、ライゲーション試薬、逆転写試薬、酵素試薬、ハイブリダイゼーション試薬、試料調製試薬、ならびに核酸精製および／または単離のための試薬が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0359】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数のバッファの使用を含み得る。バッファの例として、洗浄バッファ、ライゲーションバッファ、ハイブリダイゼーションバッファ、増幅バッファおよび逆転写バッファが挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、ハイブリダイゼーションバッファは、T M A C H y b 溶液、S S P E ハイブリダイゼーション溶液およびE C O N O（商標）ハイブリダイゼーションバッファ等、市販のバッファである。本明細書に開示されているバッファは、1種または複数の洗剤を含み得る。

30

#### 【0360】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の担体の使用を含み得る。担体は、本明細書に開示されている1種または複数の反応（例えば、ライゲーション反応、逆転写、増幅、ハイブリダイゼーション）の効率を増強または改善することができる。担体は、分子またはそのいずれかの産物（例えば、標識された分子、標識されたc D N A 分子、標識されたアンプリコン）の非特異的損失を減少または防ぐことができる。例えば、担体は、表面への吸収による標識された分子の非特異的損失を減少させることができる。担体は、表面または基材（例えば、容器、エッペンドルフチューブ、ピペットチップ）に対する分子、標識された分子またはそのいずれかの産物の親和性を減少させることができる。あるいは、担体は、表面または基材（例えば、ビーズ、アレイ、ガラス、スライド、チップ）に対する分子またはそのいずれかの産物の親和性を増加させることができる。担体は、分解から分子またはそのいずれかの産物を保護することができる。例えば、担体は、リボヌクレアーゼからRNA分子またはそのいずれかの産物を保護することができる。あるいは、担体は、D N a s e からDNA分子またはそのいずれかの産物を保護す

40

50

ることができる。担体の例として、DNAおよび／もしくはRNA等の核酸分子、またはポリペプチドが挙げられるがこれらに限定されない。DNA担体の例として、プラスミド、ベクター、ポリアデニル化DNAおよびDNAオリゴヌクレオチドが挙げられる。RNA担体の例として、ポリアデニル化RNA、ファージRNA、ファージMS2 RNA、E. coli RNA、酵母RNA、酵母tRNA、哺乳動物RNA、哺乳動物tRNA、短いポリアデニル化合成リボヌクレオチドおよびRNAオリゴヌクレオチドが挙げられる。RNA担体は、ポリアデニル化RNAとなり得る。あるいは、RNA担体は、非ポリアデニル化RNAとなり得る。場合によっては、担体は、細菌、酵母またはウイルス由来である。例えば、担体は、細菌、酵母またはウイルスに由来する核酸分子またはポリペプチドとなり得る。例えば、担体は、*Bacillus subtilis*に由来するタンパク質である。別の例では、担体は、*Escherichia coli*に由来する核酸分子である。あるいは、担体は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ヤギ、ラット、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌまたはウサギ）、トリ、両生類または爬虫類に由来する核酸分子またはペプチドである。

10

### 【0361】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の対照薬剤の使用を含み得る。対照薬剤は、対照オリゴ、不活性酵素、非特異的競合因子を含み得る。あるいは、対照薬剤は、brightハイブリダイゼーション、brightプローブ対照、核酸鋳型、スパイクイン対照、PCR増幅対照を含む。PCR増幅対照は、陽性対照となり得る。他の事例では、PCR増幅対照は、陰性対照である。核酸鋳型対照は、既知濃度のものとなり得る。対照薬剤は、1種または複数の標識を含み得る。

20

### 【0362】

スパイクイン対照は、反応または試料に添加される鋳型となり得る。例えば、スパイクイン鋳型は、増幅反応に添加することができる。スパイクイン鋳型は、第1の増幅サイクル後のいずれかの時点で増幅反応に添加することができる。場合によっては、スパイクイン鋳型は、第2、第3、第4、第5、第6、第7、第8、第9、第10、第11、第12、第13、第14、第15、第20、第25、第30、第35、第40、第45または第50の増幅サイクル後の増幅反応に添加することができる。スパイクイン鋳型は、最後の増幅サイクル前のいずれかの時点で増幅反応に添加することができる。スパイクイン鋳型は、1または複数のヌクレオチドまたは核酸塩基対を含み得る。スパイクイン鋳型は、DNA、RNAまたはこれらのいずれかの組合せを含み得る。スパイクイン鋳型は、1種または複数の標識を含み得る。

30

### 【0363】

#### 検出可能な標識

本明細書に開示されている方法、キットおよび組成物は、検出可能な標識をさらに含み得る。用語「検出可能な標識」、「タグ」または「標識」は、互換的に使用することができる。分子に付着させたいずれかの化学的部分（例えば、ヌクレオチド、ヌクレオチドポリマーまたは核酸結合因子、分子バーコード）を指すことができる。化学的部分は、分子に共有結合により付着させていてよい。化学的部分は、分子に非共有結合により付着させていてよい。分子バーコード、試料タグおよび分子識別子標識は、検出可能な標識、タグまたは標識をさらに含み得る。好ましくは、標識は、検出可能であり、ヌクレオチドまたはヌクレオチドポリマーを本発明の実施者に検出可能なものとする。本明細書に開示されている方法と組み合わせて使用することができる検出可能な標識は、例えば、蛍光標識、ケミルミネッセント標識、クエンチャー、放射性標識、ビオチン、ピレン部分、金またはこれらの組合せを含む。検出可能な標識の非限定例は、ルミネッセント分子、蛍光色素、蛍光クエンチング剤、着色分子、放射性同位体またはシンチラントを含む。

40

### 【0364】

場合によっては、本明細書に開示されている方法は、分子バーコード、分子識別子標識、試料タグ、標識された核酸またはそのいずれかの産物（例えば、標識されたアンプリコン）に1種または複数の検出可能な標識を付着させるステップをさらに含む。方法は、分

50

子バーコード、分子識別子標識、試料タグまたは標識された核酸に2種またはそれを超える検出可能な標識を付着させるステップを含み得る。あるいは、方法は、分子バーコード、分子識別子標識、試料タグまたは標識された核酸に少なくとも約3、4、5、6、7、8、9または10種の検出可能な標識を付着させるステップを含む。場合によっては、検出可能な標識は、Cy（商標）標識である。Cy（商標）標識は、Cy3標識である。それに代えてまたはそれに加えて、検出可能な標識は、ビオチンである。一部の実施形態では、検出可能な標識は、分子バーコード、分子識別子標識、試料タグまたは標識された核酸に結合するプローブに付着させる。これは、例えば、核酸または標識された核酸がアレイにハイブリダイズされた後に行うことができる。一例では、核酸または標識された核酸は、アレイにおけるパートナーに結合される。結合後に、標識された核酸に結合し得るプローブは、アレイにおける分子に結合される。このプロセスを、複数のプローブおよび標識により反復して、シグナルが、アレイへの標識の非特異的結合または分子の非特異的結合の結果である可能性を減少させることができる。

#### 【0365】

ドナーアクセプター対は、検出可能な標識として使用することができる。ドナーまたはアクセプターのいずれかを、核酸に結合するプローブに付着させることができる。プローブは、例えば、核酸または標識された核酸に結合し得る核酸プローブとなり得る。対応するドナーまたはアクセプターを加えて、シグナルを生じることができる。

#### 【0366】

場合によっては、検出可能な標識は、Freedom色素、Alexa Fluor（登録商標）色素、Cy（商標）色素、フルオレセイン色素またはLI-COR IRDyes（登録商標）である。場合によっては、Freedom色素は、フルオレセイン（6-FAM（商標）、6-カルボキシフルオレセイン（fluorescein））、MAX（NHSエステル）、TYE（商標）563、TEX615、TYE（商標）665、TYE705である。検出可能な標識は、Alexa Fluor色素となり得る。Alexa Fluor（登録商標）色素の例として、Alexa Fluor（登録商標）488（NHSエステル）、Alexa Fluor（登録商標）532（NHSエステル）、Alexa Fluor（登録商標）546（NHSエステル）、Alexa Fluor（登録商標）594（NHSエステル）、Alexa Fluor（登録商標）647（NHSエステル）、Alexa Fluor（登録商標）660（NHSエステル）またはAlexa Fluor（登録商標）750（NHSエステル）が挙げられる。あるいは、検出可能な標識は、Cy（商標）色素である。Cy（商標）色素の例として、Cy2、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5およびCy7が挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、検出可能な標識は、フルオレセイン色素である。フルオレセイン色素の非限定例として、6-FAM（商標）（アジド）、6-FAM（商標）（NHSエステル）、フルオレセインdT、JOE（NHSエステル）、TET（商標）およびHEX（商標）が挙げられる。場合によっては、検出可能な標識は、5' IRDye（登録商標）700、5' IRDye（登録商標）800またはIRDye（登録商標）800CW（NHSエステル）等、LI-COR IRDyes（登録商標）である。場合によっては、検出可能な標識は、TYE（商標）563である。あるいは、検出可能な標識は、Cy3である。

#### 【0367】

検出可能な標識は、ローダミン色素となり得る。ローダミン色素の例として、Rhodamine Green（商標）-X（NHSエステル）、TAMRA（商標）、TAMRA（商標）（NHSエステル）、Rhodamine Red（商標）-X（NHSエステル）、ROX（商標）（NHSエステル）および5' TAMRA（商標）（アジド）が挙げられるがこれらに限定されない。他の事例では、検出可能な標識は、Well RED色素である。Well RED色素として、Well RED D4色素、Well RED D3色素およびWell RED D2色素が挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、検出可能な標識は、Texas Red（登録商標）-X（NHSエステル）

）、Lightcycler（登録商標）640（NHSエステル）またはDy750（NHSエステル）である。

#### 【0368】

場合によっては、検出可能な標識は、リンカー分子を含む。リンカー分子の例として、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、HRP、プロテインA、プロテインG、抗体またはその断片、Grb2、ポリヒスチジン、Ni<sup>2+</sup>、FLAGタグ、mycタグが挙げられるがこれらに限定されない。あるいは、検出可能な標識は、重金属、電子供与体／受容体、アクリジニウムエステル、色素および熱量測定基質を含む。他の事例では、検出可能な標識は、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼおよびルシフェラーゼ等、酵素を含む。

10

#### 【0369】

質量の変化は、表面プラズモン共鳴検出の場合と同様に、検出可能な標識と考慮することができる。当業者であれば、本発明の操作において用いることができる、本明細書においては言及されていない有用な検出可能な標識を容易に認識するであろう。

#### 【0370】

場合によっては、検出可能な標識は、プライマーと共に使用される。例えば、ユニバーサルプライマーは、検出可能な標識で標識される（例えば、Cy3標識されたユニバーサルプライマー、フルオロフォア標識されたユニバーサルプライマー）。あるいは、標的特異的プライマーは、検出可能な標識で標識される（例えば、TYE563標識された標的特異的プライマー）。他の事例では、検出可能な標識は、試料タグまたは分子識別子標識と共に使用される。例えば、オリゴヌクレオチドタグは、検出可能な標識で標識される（例えば、ビオチン標識されたオリゴヌクレオチドタグ）。他の事例では、検出可能な標識は、核酸鋳型分子と共に使用される。検出可能な標識を使用して、標識された分子または標識されたアンプリコンを検出することができる。あるいは、検出可能な標識を使用して、核酸鋳型分子を検出する。

20

#### 【0371】

場合によっては、検出可能な標識は、プライマー、分子バーコード、試料タグ、分子識別子標識、標識された分子、標識されたアンプリコン、プローブ、HCRプローブおよび／または標識されていない核酸に付着させる。プライマー、オリゴヌクレオチドタグ、標識された分子、標識されたアンプリコンおよび／または標識されていない核酸に検出可能な標識を付着させるための方法として、化学的標識化および酵素標識化が挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、検出可能な標識は、化学的標識化により付着させる。一部の実施形態では、化学的標識化技法は、化学的反応基を含む。反応基の非限定例として、NHS-フルオレセインまたはNHS-ローダミン等のアミン反応性スクシンイミジルエステル、FITCを含むアミン反応性イソチオシアネート誘導体、およびフルオレセイン-5-マレイミド等のスルフヒドリル反応性マレイミド活性化蛍光（fluor）が挙げられる。一部の実施形態では、これらの反応性色素のいずれかと別の分子との反応は、フルオロフォアならびにリンカーおよび／または薬剤の間に形成される安定的共有結合をもたらす。一部の実施形態では、反応基は、イソチオシアネートである。一部の実施形態では、標識は、リシン側鎖の第一級アミンを介して薬剤に付着させる。一部の実施形態では、化学的標識化は、NHSエステル化学方法を含む。

30

40

#### 【0372】

あるいは、検出可能な標識は、酵素標識化によって付着させる。酵素標識化方法として、ビオチンアクセプターペプチド／ビオチンリガーゼ（AP／BirA）、アシル担体タンパク質／ホスホパンテイトランランスフェラーゼ（ACP／PPTase）、ヒトO6-アルキルグアニトランランスフェラーゼ（hAGT）、Q-タグ／トランスグルタミナーゼ（TGase）、アルデヒドタグ／ホルミルグリシン生成酵素、変異した原核生物デハロゲナーゼ（Halotag（商標））およびファルネシル化モチーフ／タンパク質ファルネシルトランランスフェラーゼ（PFTase）方法を挙げることができるがこれらに限定されない。親和性標識化として、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）およびFK506

50

結合タンパク質 12 の P h e 3 6 V a l 変異体 ( F K B P 1 2 ( F 3 6 V ) ) を利用する非共有結合方法、ならびに金属キレート化方法を挙げることができるがこれらに限定されない。

#### 【0373】

架橋試薬を使用して、プライマー、オリゴヌクレオチドタグ、標識された分子、標識されたアンプリコンおよび／または標識されていない核酸に検出可能な標識を付着させることができる。場合によっては、架橋試薬は、グルタルアルデヒドである。グルタルアルデヒドは、いくつかの経路により、アミン基と反応して架橋を作製することができる。例えば、還元条件下で、グルタルアルデヒドの両末端におけるアルデヒドは、アミンとカップリングして、二級アミン連結を形成する。

10

#### 【0374】

場合によっては、プライマー、オリゴヌクレオチドタグ、標識された分子、標識されたアンプリコンおよび／または標識されていない核酸への検出可能な標識の付着は、過ヨウ素酸塩活性化と、続く還元的アミノ化を含む。場合によっては、スルホ-S M C C または他のヘテロ二官能性架橋剤を使用して、プライマー、オリゴヌクレオチドタグ、標識された分子、標識されたアンプリコンおよび／または標識されていない核酸に検出可能な標識をコンジュゲートする。例えば、スルホ-S M C C を使用して、薬物に酵素をコンジュゲートする。一部の実施形態では、酵素は、1 ステップで活性化および精製され、続いて第2のステップで薬物にコンジュゲートされる。一部の実施形態では、架橋の方向性は、1 種の特異的配向性に限定される (例えば、抗体におけるスルフヒドリル基に対する、酵素におけるアミン)。

20

#### 【0375】

疾患／状態

被験体における疾患または状態の状況または転帰を診断、モニターおよび／または予後診断するための方法、キットおよび組成物が本明細書に開示されている。一般に、方法は、(a) 2 種またはそれを超える試料由来の 2 種またはそれを超える分子を確率論的に標識して、2 種またはそれを超える標識された核酸を生成するステップと、(b) 2 種またはそれを超える標識された核酸を検出および／または定量化するステップと、(c) 2 種またはそれを超える標識された核酸の検出および／または定量化に基づき、被験体における疾患または状態の状況または転帰を診断、モニターおよび／または予後診断するステップとを含む。方法は、治療レジメンを決定するステップをさらに含む。試料のうち 2 種またはそれを超は、疾患または状態を患う被験体由来の 1 種または複数の試料を含む。2 種またはそれを超える試料は、健康な被験体由来の 1 種または複数の試料を含む。2 種またはそれを超える試料は、対照由来の 1 種または複数の試料を含む。

30

#### 【0376】

疾患または状態のモニターは、治療レジメンのモニターをさらに含む。治療レジメンのモニターは、治療レジメンの有効性の決定を含む。場合によっては、治療レジメンのモニターは、治療レジメンの投与、終了、追加または変更を含む。治療レジメンの変更は、治療レジメンの投薬量、投薬頻度または投与モードの増大または低減を含む。治療レジメンは、1 種または複数の治療薬を含む。治療薬は、抗がん薬、抗ウイルス薬、抗細菌薬、抗病原体薬またはこれらのいずれかの組合せとなり得る。

40

#### 【0377】

がん

場合によっては、疾患または状態は、がんである。確率論的に標識しようとする分子は、がん性細胞または組織に由来し得る。場合によっては、がんは、肉腫、癌、リンパ腫または白血病である。肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管または他の結合もしくは支持組織のがんである。肉腫として、骨がん、線維肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、両側性前庭シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫 (例えば、胞状軟部肉腫、血管肉腫、葉状嚢肉腫 (c y s t o s a r c o m a p h y l l o i d e s )、皮膚線維肉腫、類腱腫、類上皮細胞肉腫、骨外性骨肉腫、線維肉腫、血管外皮細胞腫、

50

血管性肉腫、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、リンパ肉腫、悪性線維性組織球腫、神経線維肉腫、横紋筋肉腫および滑膜肉腫）が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0378】

癌は、身体表面を覆い、ホルモンを生成し、腺を形成する細胞である上皮細胞において始まるがんである。非限定例として、癌は、乳がん、膵がん、肺がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、腎臓がん、膀胱がん、胃がん、前立腺がん、肝臓がん、卵巣がん、脳がん、腔がん、外陰部がん、子宮がん、口腔がん、陰茎がん、精巣がん、食道がん、皮膚がん、卵管のがん、頭頸部がん、胃腸管間質性がん、腺癌、皮膚性または眼内メラノーマ、肛門領域のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、尿道のがん、腎盂のがん、尿管のがん、子宮内膜のがん、子宮頸部のがん、下垂体のがん、中枢神経系（CNS）の新生物、原発性CNSリンパ腫、脳幹神経膠腫および脊髄軸腫瘍（spinal axis tumor）を含む。場合によっては、がんは、基底細胞癌、扁平上皮癌、メラノーマ、非メラノーマまたは光線性（日光）角化症等、皮膚がんである。

#### 【0379】

場合によっては、がんは、肺がんである。肺がんは、肺（気管支）または肺の小気嚢（肺胞）に供給する気管から分岐する気道において開始し得る。肺がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）、小細胞肺癌および中皮腫（mesothelioma）を含む。NSCLCの例として、扁平上皮癌、腺癌および大細胞癌が挙げられる。中皮腫は、肺および胸腔（胸膜）の裏層または腹部（腹膜）の裏層のがん性腫瘍となり得る。中皮腫は、アスベスト曝露によるものとなり得る。がんは、神経膠芽腫等、脳がんとなり得る。

#### 【0380】

あるいは、がんは、中枢神経系（CNS）腫瘍となり得る。CNS腫瘍は、神経膠腫または非神経膠腫として分類することができる。神経膠腫は、悪性神経膠腫、高悪性度神経膠腫、びまん性内在橋神経膠腫（diffuse intrinsic pontine glioma）となり得る。神経膠腫の例として、星状細胞腫、乏突起神経膠腫（または乏突起神経膠腫および星状細胞腫（astocytoma）要素の混合物）および上衣腫が挙げられる。星状細胞腫として、低悪性度星状細胞腫、未分化星状細胞腫、多形神経膠芽腫、毛様細胞性星状細胞腫、多形性黄色星状細胞腫および上衣下巨細胞性星状細胞腫が挙げられるがこれらに限定されない。乏突起神経膠腫は、低悪性度乏突起神経膠腫（または乏突起星細胞腫）および低分化乏突起神経膠腫（oligodendriogliomas）を含む。非神経膠腫は、髄膜腫、下垂体腺腫、原発性CNSリンパ腫および髄芽腫を含む。場合によっては、がんは、髄膜腫である。

#### 【0381】

白血病は、急性リンパ球性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病または慢性骨髄球性白血病となり得る。追加的な種類の白血病は、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄単球性白血病および若年性骨髄単球性白血病を含む。

#### 【0382】

リンパ腫は、リンパ球のがんであり、BまたはTリンパ球のいずれかから発生し得る。主要な2種類のリンパ腫は、ホジキン病として以前に知られていたホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫である。ホジキンリンパ腫は、リード・シュテルンベルク細胞の存在によってマークされる。非ホジキンリンパ腫は、ホジキンリンパ腫ではない全てのリンパ腫である。非ホジキンリンパ腫は、緩慢進行性リンパ腫および侵襲性リンパ腫となり得る。非ホジキンリンパ腫として、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫（MALT）、小細胞リンパ球性リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、縦隔大細胞型B細胞リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、節性辺縁帯B細胞リンパ腫（NMZL）、脾臓周辺帯リンパ腫（SMZL）、節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性浸出液リンパ腫およびリンパ腫様肉芽腫症が挙げられるがこれらに限定されない。

## 【0383】

## 病原性感染

場合によっては、疾患または状態は、病原性感染である。確率論的に標識しようとする分子は、病原体に由来し得る。病原体は、ウイルス、細菌、真菌または原生生物となり得る。場合によっては、病原体は、*Acanthamoeba*（例えば、*A. astronyxis*、*A. castellanii*、*A. culbertsoni*、*A. hatchetti*、*A. polyphaga*、*A. rhysodes*、*A. healyi*、*A. divionensis*）、*Brachiola*（例えば、*B. connori*、*B. vesicularum*）、*Cryptosporidium*（例えば、*C. parvum*）、*Cyclospora*（例えば、*C. cayetanensis*）、*Encephalitozoon*（例えば、*E. cuniculi*、*E. hellem*、*E. intestinalis*）、*Entamoeba*（例えば、*E. histolytica*）、*Enterocytozoon*（例えば、*E. bienewisi*）、*Giardia*（例えば、*G. lamblia*）、*Isospora*（例えば、*I. belli*）、*Microsporidium*（例えば、*M. africanum*、*M. ceylonensis*）、*Naegleria*（例えば、*N. fowleri*）、*Nosema*（例えば、*N. algerae*、*N. ocularum*）、*Pleistophora*、*Trachipleistophora*（例えば、*T. anthropophthera*、*T. hominis*）および *Vittiforma*（例えば、*V. corneae*）等、原生生物となり得る。病原体は、*Candida*、*Aspergillus*、*Cryptococcus*、*Histoplasma*、*Pneumocystis* および *Stachybotrys* 等、真菌となり得る。

10

20

## 【0384】

病原体は、細菌となり得る。例示的な細菌として、*Bordetella*、*Borrelia*、*Brucella*、*Campylobacter*、*Chlamydia*、*Chlamydophila*、*Clostridium*、*Corynebacterium*、*Enterococcus*、*Escherichia*、*Francisella*、*Haemophilus*、*Helicobacter*、*Legionella*、*Leptospira*、*Listeria*、*Mycobacterium*、*Mycoplasma*、*Neisseria*、*Pseudomonas*、*Rickettsia*、*Salmonella*、*Shigella*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*、*Treponema*、*Vibrio* または *Yersinia* が挙げられるがこれらに限定されない。

30

## 【0385】

ウイルスは、逆転写ウイルスとなり得る。逆転写ウイルスの例として、一本鎖RNA-RT (ssRNA-RT) ウイルスおよび二本鎖DNA-RT (dsDNA-RT) ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ssRNA-RT ウイルスの非限定例として、レトロウイルス、アルファレトロウイルス、ベータレトロウイルス、ガンマレトロウイルス、デルタレトロウイルス、イプシロンレトロウイルス、レンチウイルス、スプーマウイルス、メタウイルスおよびシュードウイルスが挙げられる。dsDNA-RT ウイルスの非限定例として、ヘパドナウイルスおよびカリモウイルスが挙げられる。ウイルスは、DNAウイルスとなり得る。ウイルスは、RNAウイルスとなり得る。DNAウイルスは、二本鎖DNA (dsDNA) ウイルスとなり得る。場合によっては、dsDNAウイルスは、アデノウイルス、ヘルペスウイルスまたはポックスウイルスである。アデノウイルスの例として、アデノウイルスおよび感染性イヌ肝炎ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ヘルペスウイルスの例として、単純ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルスおよびエプスタイン・バーウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ポックスウイルスの非限定リストは、天然痘ウイルス、ウシポックスウイルス、ヒツジポックスウイルス、サルポックスウイルスおよびワクシニアウイルスを含む。DNAウイルスは、一本鎖DNA (ssDNA) ウイルスとなり得る。ssDNAウイルス

40

50

スは、パルボウイルスとなり得る。パルボウイルスの例として、パルボウイルス B 19、イヌパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ネコ汎白血球減少症およびミンク腸炎ウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0386】

ウイルスは、RNAウイルスとなり得る。RNAウイルスは、二本鎖RNA (dsRNA) ウイルス、(+)センス一本鎖RNAウイルス ((+) ssRNA) ウイルスまたは(-)センス一本鎖((-) ssRNA) ウイルスとなり得る。dsRNAウイルスの非限定リストは、レオウイルス、オルトレオウイルス、サイボウイルス、ロタウイルス、ブルータングウイルスおよびファイトレオウイルスを含む。(+) ssRNAウイルスの例として、ピコルナウイルスおよびトガウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ピコルナウイルスの例として、エンテロウイルス、ライノウイルス、ヘパトウイルス、カルジオウイルス、アフトウイルス、ポリオウイルス、パレコウイルス、エルボウイルス、コブウイルス、テッショウウイルスおよびコクサッキーが挙げられるがこれらに限定されない。場合によっては、トガウイルスは、風疹ウイルス、シンドビスウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、ロスリバーウイルス、オニョンニョン(O'nyong'nyong) ウイルス、チクングニアまたはセムリキ森林ウイルスである。(-) ssRNAウイルスの非限定リストは、オルソミクソウイルスおよびラブドウイルスを含む。オルソミクソウイルスの例として、a型インフルエンザウイルス、B型インフルエンザウイルス、C型インフルエンザウイルス、イサウイルス(isavirus) およびトゴトウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。ラブドウイルスの例として、サイトラブドイルス(cytorhabdovirus)、ディコラブドイルス(dichorhabdovirus)、エフェメロウイルス(ephemerovirus)、リッサウイルス、ノビラブドイルス(novirhabdovirus) およびベジクロウイルスが挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0387】

##### 胎児障害

場合によっては、疾患または状態は、妊娠である。本明細書に開示されている方法およびキットは、妊娠中の被験体における胎児状態を診断するステップを含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、胎児変異または遺伝的異常を同定するステップを含み得る。確率論的に標識しようとする分子は、胎児細胞または組織に由来し得る。それに代えてまたはそれに加えて、標識しようとする分子は、妊娠中の被験体に由来し得る。

#### 【0388】

本明細書に開示されている方法およびキットは、常染色体トリソミー(例えば、トリソミー13、15、16、18、21または22)の診断、予測またはモニターにおいて使用することができる。一部の事例では、トリソミーは、流産の機会増加に関連し得る(例えば、トリソミー15、16または22)。他の事例では、検出されるトリソミーは、乳児が出生時欠損を持って生まれることを示し得る生産トリソミーである(例えば、トリソミー13(パトー症候群)、トリソミー18(エドワード症候群)およびトリソミー21(ダウン症候群))。異常は、性染色体のものとなる場合もある(例えば、XXY(クラインフェルター症候群)、XYY(ヤコブ症候群)またはXXX(トリソミーX))。標識しようとする分子(複数可)は、次の染色体のうち1種または複数に存在するものとなり得る：第13、第18、第21、XまたはY染色体。例えば、分子は、第21染色体および/または第18染色体および/または第13染色体に存在する。

#### 【0389】

本明細書に開示されている方法およびキットに基づき決定され得るさらなる胎児状態は、1種または複数の染色体のモノソミー(X染色体モノソミー、ターナー症候群としても公知)、1種または複数の染色体のトリソミー(第13、第18、第21およびX)、1種または複数の染色体のテトラソミーおよびペンタソミー(ヒトでは性染色体において最も一般的に観察される、例えば、XXXX、XXYY、XXX Y、XYYY、XXXXX、XXXXY、XXXYY、XYYYYおよびXXYYY)、一倍性、三倍性(全染色体

が3本、例えば、ヒトにおいては69本の染色体)、四倍性(全染色体が4本、例えば、ヒトにおいては92本の染色体)、五倍性ならびに多倍数性(multiploidy)を含む。

#### 【0390】

上述の方法のいずれかを含む、法医学的分析方法が本明細書にさらに開示されている。法医学者は、犯罪現場で発見された様々な試料(例えば、血液、精液、皮膚、唾液、毛髪)における核酸を使用して、加害者等、現場におけるある個体の存在を同定することができる。このプロセスは、公式にDNAプロファイリングと称されるが、「遺伝的フィンガープリンティング」と呼ぶこともできる。例えば、DNAプロファイリングは、様々な試料および人々における、短いタンDEM反復およびミニサテライト等、反復性DNAの可変セクションの長さの測定および比較を含む。この方法は通常、ある人物由来のDNA試料を、犯罪現場で発見された試料におけるDNAとマッチさせるための、極めて信頼できる技法である。しかし、現場が複数人のDNAで汚染されている場合、同定は複雑化され得る。この場合、また、他の法医学的適用において、単一細胞または少数の細胞由来の核酸の絶対的定量化を得ることが有利になり得る。

#### 【0391】

場合によっては、疾患または状態は、免疫障害である。免疫障害(disorder)は、炎症性障害、自己免疫性障害、過敏性腸症候群または潰瘍性大腸炎となり得る。自己免疫性疾患の例として、クローン病(Crohn's disease)、ループスおよびグレーブス病が挙げられる。

#### 【0392】

場合によっては、疾患または障害は、神経学的(neurological)状態または障害である。神経学的状態または障害は、後天性てんかん様失語症、急性播種性脳脊髄炎、副腎白質ジストロフィー、脳梁無発育、失認、アイカルディ症候群、アレキサンダー病、アルパース病、交代性片麻痺、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(運動ニューロン疾患を参照)、無脳症、アンジェルマン症候群、血管腫症、無酸素症、失語症、失行症、くも膜嚢胞、くも膜炎、アーノルド・キアリ奇形、動静脈奇形、アスペルガー症候群、毛細血管拡張性運動失調症、注意欠陥多動性障害、自閉症、聴覚処理障害、自律神経機能不全、背部痛(Back Pain)、バッテン病、ベーチェット病、ベル麻痺、良性本態性眼瞼痙攣、良性限局的筋萎縮症、良性頭蓋内圧亢進症、両側性前頭頭頂多小脳回、ピンスワンガー病、眼瞼痙攣、ブロッホ・ズルツベルガー症候群、腕神経叢傷害、脳膿瘍、脳損傷、脳傷害、脳腫瘍、ブラウン・セカール症候群、カナバン病、手根管症候群(CTS)、灼熱痛、中枢痛症候群、橋中央ミエリン溶解、中心核ミオパチー、頭部障害、脳動脈瘤、脳動脈硬化症、大脳萎縮症、脳性巨人症、脳性麻痺、シャルコー・マリー・トゥース病、キアリ奇形、舞蹈病、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパチー(CIDP)、慢性疼痛、慢性領域性疼痛症候群、コフィン・ローリー症候群、遷延性植物状態を含む昏睡、複合体I欠乏症候群、複合体I欠乏症候群、複合体II欠乏症候群、複合体III欠乏症候群、複合体IV/COX欠乏症候群、複合体V欠乏症候群、先天性両側顔面神経麻痺、皮質基底核変性症、頭部動脈炎、頭蓋骨癒合、クロイツフェルト・ヤコブ病、蓄積外傷疾患、クッシング症候群、巨細胞性封入体病(CIBD)、サイトメガロウイルス感染症、ダンディ・ウォーカー症候群、ドーソン病、複合体IのミトコンドリアNADH脱水素酵素成分の欠乏、ドモルシア症候群、デジェリーヌ・クルンプケ麻痺、デジェリーヌ・ソッタス病、睡眠相後退症候群、認知症、皮膚筋炎、神経学的統合運動障害、糖尿病性ニューロパチー、びまん性硬化症、自律神経障害、失算、書字障害、失読症、ジストニア、早期乳児てんかん性脳症、エンブティセラ症候群、脳炎、脳ヘルニア、脳三叉神経領域血管腫症、大便失禁、てんかん、エルブ麻痺、皮膚紅痛症、本態性振戦、ファブリ病、フェール症候群、失神、家族性痙攣性麻痺、熱性けいれん、フィッシャー症候群、フリートライヒ運動失調、FART症候群、ゴーシェ病、ゲルストマン症候群、巨細胞動脈炎、巨細胞封入体病、球様細胞白質萎縮、異所性灰白質、ギラン・バレー症候群、HTLV-1関連ミエロパチー、ハラーホルデン・スパッツ病、頭部傷害、頭痛、片側顔面痙攣、遺伝性痙攣性対麻

痺、遺伝性多発神経炎性失調、耳帯状疱疹、帯状疱疹、平山症候群（Hirayama syndrome）、全前脳症、ハンチントン病、水無脳症、水頭症、副腎皮質ホルモン過剰症、低酸素症、免疫媒介性脳脊髄炎、封入体筋炎、色素失調症、乳児フィタン酸蓄積症、乳児レフサム病、点頭痙攣、炎症性ミオパチー、頭蓋内嚢胞、頭蓋内圧亢進症、ジュベール症候群、カーンズ・セイヤー症候群、ケネディー病、キンスブルン症候群、クリッペル・ファイル症候群、クラッペ病、クフォル・ラケブ症候群、クーゲルベルク・ヴェランダー病、クーラー、ラフォラ病、ランバート・イートン筋無力症候群、ランドウ・クレフナー症候群、延髄外側（ワレンベルク）症候群、学習障害、リー病、レノックス・ガストー症候群、レッシュ・ナイハン症候群、白質ジストロフィー、レビー小体認知症、脳回欠損、閉じ込め症候群、ルー・ゲーリック病、腰部椎間板疾患、ライム病—神経学的続発症、マシャド・ジョセフ病（脊髄小脳運動失調3型）、大脳症、メーブルシロップ尿症、大脳髓症（Megaloencephaly）、メルカーソン・ローゼンタール症候群、メニエール病、髄膜炎、メンケス病、異染色性白質ジストロフィー、小頭症、片頭痛、ミラー・フィッシャー症候群、軽度の脳卒中（Mini-Stroke）、ミトコンドリア病、ミトコンドリア機能障害、ミトコンドリアミオパチー、ミトコンドリア呼吸鎖複合体I欠乏、メビウス症候群、単肢筋萎縮症、運動ニューロン疾患、運動技能障害、もやもや病、ムコ多糖症、多発脳梗塞性認知症、多巣性運動ニューロパチー、多発性硬化症、体位性低血圧による多系統萎縮症、筋ジストロフィー、筋痛性脳脊髄炎、重症筋無力症、ミエリン分解性びまん性硬化症（Myelinoclastic diffuse sclerosis）、乳児のミオクロヌス性脳症（Myoclonic Encephalopathy of infants）、ミオクロヌス、ミオパチー、筋細管ミオパチー、先天性ミオトニー、NADH—補酵素Q還元酵素欠乏、NADH：Q（1）酸化還元酵素欠乏、ナルコレプシー、神経線維腫症、神経弛緩薬性悪性症候群、AIDSの神経学的症状発現、ループスの神経学的続発症、神経性筋強直症、神経セロイドリポフスチノーシス、神経細胞移動障害、ニーマン・ピック病、非24時間睡眠・覚醒症候群（Non 24-hour sleep-wake syndrome）、非言語学習障害（Nonverbal learning disorder）、オサリバン・マクラウド症候群、後頭神経痛、潜在性脊椎癒合不全配列（Occult Spinal Dysraphism Sequence）、大田原症候群（Ohtahara syndrome）、オリーブ橋小脳萎縮症、眼球クロヌス・ミオクロヌス症候群、視神経炎、起立性低血圧、オーバユース症候群（Overuse syndrome）、酸化的リン酸化障害、反復視（Palinopsia）、感覚異常、パーキンソン病、先天性パラミオトニー、傍腫瘍性疾患（Paraneoplastic disease）、発作性発作（Paroxysmal attack）、パリー・ロンベルク症候群（ロンベルク症候群としても公知）、ペリツェウス・メルツバッヘル病、周期性四肢麻痺、末梢性ニューロパチー、遷延性植物状態、広汎性神経学的障害（Pervasive neurological disorder）、光くしゃみ反射（Photoc sneeze reflex）、フィタン酸蓄積症、ピック病、圧迫神経（Pinched Nerve）、下垂体腫瘍、PMG、ポリオ、多小脳回、多発性筋炎、孔脳症、ポリオ後症候群、帯状疱疹後神経痛（PHN）、感染後脳脊髄炎、体位性低血圧、プラダー・ウィリー症候群、原発性側索硬化症、プリオン病、ロンベルク症候群としても公知の進行性片側顔面萎縮症、進行性多巣性白質脳症、進行性硬化性ポリオジストロフィー、進行性核上性麻痺、偽脳腫瘍、ラムゼイ・ハント症候群（I型およびII型）、ラスムッセン脳炎、反射性交感神経性ジストロフィー症候群、レフサム病、反復性運動障害（Repetitive motion disorder）、反復性ストレス傷害（Repetitive stress injury）、不穏下肢症候群、レトロウイルス関連ミエロパチー、レット症候群、ライ症候群、ロンベルク症候群、狂犬病、聖ウィトウス舞踏病（Saint Vitus dance）、サンドホフ病、統合失調症（Schytsophrenia）、シルダー病、脳裂、感覚統合機能障害（Sensory Integration Dysfunction）、中隔視覚異形成症、揺さぶられっ子症候群、帯状疱疹、シャイ・ドレーガー症候群

、シェーグレン症候群、睡眠時無呼吸、睡眠病、心的飽和（S n a t i a t i o n）、ソ  
トス症候群、痙縮、二分脊椎症、脊髄傷害、脊髄腫瘍、脊髄性筋萎縮症、脊柱管狭窄、ス  
ティール・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、進行性核上性麻痺を参照、脊髄小脳  
運動失調、全身硬直症候群、脳卒中、スタージ・ウェーバー症候群、亜急性硬化性汎脳炎  
、皮質下動脈硬化性脳症、表在性鉄沈着症、シデナム舞蹈病、仮死、共感覚、脊髄空洞症  
、遅発性ジスキネジア、テイ・サックス病、側頭動脈炎、脊髄係留症候群、トムゼン病、  
胸郭出口症候群、疼痛性チック、トッド麻痺、トゥレット症候群、一過性脳虚血発作、伝  
達性海綿状脳症、横断性脊髄炎、外傷性脳傷害、振戦、三叉神経痛、熱帯性瘧性不全対麻  
痺、トリパノソーマ症、結節性硬化症、側頭動脈炎を含む血管炎、フォンヒッペル・リン  
ダウ病（V H L）、ビリウス脳脊髄炎（V i l l i u i s k   E n c e p h a l o m y e  
l l i t i s）（V E）、ワレンベルク症候群、ウェルドニッヒ・ホフマン病（W e r d n  
i g - H o f f m a n   d i s e a s e）、ウエスト症候群、むち打ち、ウィリアムズ症  
候群、ウィルソン病、X連鎖球脊髄性筋萎縮症またはツェルウェーガー症候群となり得る  
。

10

### 【0393】

#### 定義

値の範囲が提示されている場合、介在する値のそれぞれが、文脈がそれ以外を明らかに  
指示するのでなければ下限の単位の10分の1まで、該範囲の上限および下限の間も特に  
開示されていることを理解されたい。記述された範囲におけるいずれかの記述された値ま  
たは介在する値と、該記述された範囲における他のいずれかの記述されたまたは介在する  
値との間のより小さい範囲のそれぞれが、本発明の内に包含される。このようなより小  
さい範囲の上限および下限は、この範囲内に独立的に含まれても除外されてもよく、この  
より小さい範囲内に上下限のいずれか一方、両方が含まれるまたはいずれも含まれない各  
範囲も、記述された範囲内のいずれかの特に除外された限界であることを条件として、本  
発明の内に包含される。記述された範囲が、上下限の一方または両方を含む場合、この含  
まれる上下限のいずれか一方または両方を除外する範囲も本発明に含まれる。

20

### 【0394】

他に規定がなければ、本明細書に使用されているあらゆる技術および科学用語は、本発  
明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意義を有する。本明  
細書に記載されているものと同様または均等のいずれかの方法および材料を、本発明の実  
施または検査において使用することができるが、いくつかの潜在的かつ好まれる方法およ  
び材料をここに記載する。本明細書に言及されているあらゆる刊行物は、ここに参照によ  
り援用して、この刊行物が引用されているものに関連する方法および／または材料を開示  
および記載する。本開示が、矛盾が存在する程度まで、援用されている刊行物のいかなる  
開示にも優先することを理解されたい。

30

### 【0395】

当業者であれば、本開示を読むことにより明らかとなるであろうが、本明細書に記載お  
よび説明されている個々の実施形態のそれぞれが、本発明の範囲または精神から逸脱する  
ことなく容易に分離することができるまたは他のいくつかの実施形態のいずれかの特色と  
組み合わせることができる、別々の成分および特色を有する。いずれかの列挙されている  
方法は、列挙されている事象の順序で、または論理的に可能な他のいずれかの順序で実行  
することができる。

40

### 【0396】

本明細書において、また、添付の特許請求の範囲において、文脈がそれ以外を明らかに  
指示するのでなければ、単数形「a」、「an」および「the」が、複数の指示対象を  
含むことに留意する必要がある。よって、例えば、「細胞（a   c e l l）」の言及は、  
複数のかかる細胞を含み、「ペプチド（t h e   p e p t i d e）」の言及は、1種また  
は複数のペプチドおよび当業者に公知のその均等物、例えば、ポリペプチドの参照を含む  
、等々。

### 【0397】

50

本明細書において、用語「標識」は、相当する核酸塩基および／または核酸配列の同定を可能にすることができる特有のオリゴヌクレオチド配列を指すことができる。一部の実施形態では、核酸塩基および／または核酸配列は、より大きいポリヌクレオチド配列（例えば、ビーズに付着させたポリヌクレオチド）における特異的なポジションに位置することができる。

#### 【0398】

本明細書において、用語「ハイブリダイゼーション」は、2本の一本鎖ポリヌクレオチドが、非共有結合により結合して、安定的な二本鎖ポリヌクレオチドを形成するプロセスを指すことができる。用語「ハイブリダイゼーション」は、三本鎖ハイブリダイゼーションを指すこともできる。その結果得られる（通常）二本鎖ポリヌクレオチドは、「ハイブリッド」または「デュプレックス」である。

10

#### 【0399】

本明細書において、「ヌクレオシド」は、2'-デオキシおよび2'-ヒドロキシル型等、天然ヌクレオシドを含み得る。ヌクレオシドに関する「アナログ」は、修飾塩基部分および／または修飾糖部分その他を含む合成ヌクレオシドを含み得る。アナログは、ハイブリダイゼーションすることができる。アナログは、結合特性を増強し、複雑さを低下させ、特異性を増加させる等を行うように設計された合成ヌクレオシドを含み得る。例示的な種類のアナログは、オリゴヌクレオチドホスホロアミデート（本明細書において、「アミデート」と称される）、ペプチド核酸（本明細書において、「PNA」と称される）、オリゴ-2'-O-アルキルリボヌクレオチド、C-5プロピニルピリミジンを含有するポリヌクレオチドおよびロクト核酸（LNA）を含み得る。

20

#### 【0400】

本明細書において、用語「核酸分子」、「核酸配列」、「核酸断片」、「オリゴヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド断片」および「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用することができる。デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはこれらのアナログのいずれかの、様々な長さとなることができるポリマー型のヌクレオチドを含むことを意図し得るがこれらに限定されない。核酸分子は、一本鎖DNA（ssDNA）、二本鎖DNA（dsDNA）、一本鎖RNA（ssRNA）および二本鎖RNA（dsRNA）を含み得る。異なる核酸分子は、異なる三次元構造を有することができ、様々な機能を行うことができる。核酸分子の非限定例として、遺伝子、遺伝子断片、ゲノムギャップ、エクソン、イントロン、遺伝子間DNA（ヘテロクロマチンDNAを限定することなく含む）、メッセンジャーRNA（mRNA）、トランスファーRNA、リボソームRNA、リボザイム、低分子干渉RNA（siRNA）、miRNA、核小体低分子RNA（snRNA）、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、配列の単離されたDNA、配列の単離されたRNA、核酸プローブおよびプライマーを挙げることができる。

30

#### 【0401】

オリゴヌクレオチドは、ホスホジエステル結合またはそのアナログにより連結された天然または修飾ヌクレオシドモノマーの直鎖状ポリマーを指すことができる。「オリゴヌクレオチド断片」は、2種またはそれを超えるより小型のオリゴヌクレオチド配列に切断されたオリゴヌクレオチド配列を指す。オリゴヌクレオチドは、天然であっても合成であってもよい。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドおよびこれらのアナログ型等、これらの非天然アナログ、ペプチド核酸（PNA）その他を含み得る。オリゴヌクレオチドは、ワトソン・クリック型の塩基対形成、塩基の積み重ね、フーグスティーンまたは逆フーグスティーン型の塩基対形成その他等、規則的パターンのモノマー対モノマー相互作用で、標的ゲノムに特異的に結合することができる場合がある。オリゴヌクレオチドおよび用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書において互換的に使用することができる。

40

#### 【0402】

オリゴヌクレオチドが、「ATGCCCTG」等の文字配列で表される場合は常に、他に

50

断りがなければ、ヌクレオチドは、左から右に 5' から 3' の順序であり、「A」がデオキシアデノシンを表示し、「C」がデオキシシチジンを表示し、「G」がデオキシグアノシンを表示し、「T」がデオキシチミジンを表示し、「U」がリボヌクレオチド、ウリジンを表示すると理解することができる。

#### 【0403】

オリゴヌクレオチドは、1 種または複数の非標準ヌクレオチド（複数可）、ヌクレオチドアナログ（複数可）および／または修飾ヌクレオチドを含み得る。修飾ヌクレオチドの例として、ジアミノプリン、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン（xanthine）、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ-D-ガラクトシルキューオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、ベータ-D-マンノシルキューオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-D46-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸（v）、5-メチル-2-チオウラシル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（acp3）w、オリゴヌクレオチドホスホロアミデート（本明細書において、「アミデート」と称される）、ペプチド核酸（本明細書において、「PNA」と称される）、オリゴ-2'-O-アルキルリボヌクレオチド、C-5プロピニルピリミジンを含むポリヌクレオチド、ロクト核酸（LNA）、2, 6-ジアミノプリンその他を挙げることができるがこれらに限定されない。核酸分子は、塩基部分（例えば、典型的に相補的ヌクレオチドとの水素結合の形成に利用できる 1 個もしくは複数の原子および／または典型的に相補的ヌクレオチドと水素結合を形成することができない 1 個もしくは複数の原子における）、糖部分またはリン酸骨格を修飾することもできる。

#### 【0404】

本明細書において、「試料」は、単一細胞または多くの細胞を指すことができる。核酸分子は、1 種または複数の試料から得ることができる。試料は、単一の細胞型または 2 種もしくはそれを超える細胞型の組合せを含み得る。試料は、例えば、組織に見られる機能等、同様の機能を行う細胞の収集物を含み得る。試料は、1 種または複数の組織を含み得る。組織の例として、上皮組織（例えば、皮膚、腺、腸、皮膚および肝臓、肺、腎臓等の臓器の裏層）、内皮（例えば、血管およびリンパ管の裏層）、中皮（例えば、胸膜、腹膜および心膜空間の裏層）、間充織（例えば、脂肪、筋肉、骨、軟骨および腱細胞を含む、臓器間の空間を充填する細胞）、血液細胞（例えば、赤血球、顆粒球、好中球、好酸球、好塩基球、単球、Tリンパ球（T細胞としても公知）、Bリンパ球（B細胞としても公知）、プラズマ細胞、巨核球その他）、ニューロン、生殖細胞（例えば、精子、卵母細胞）、羊水細胞、胎盤、幹細胞その他を挙げることができるがこれらに限定されない。試料は、培養物における単一細胞、メタゲノム試料、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、がん試料、組織切片および生検材料のうち 1 種もしくは複数またはこれらのいずれかの組合せから得ることができる。

#### 【0405】

本明細書において、用語「生物」として、ヒト、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、マウス、ラット、スナネズミ、カエル、ヒキガエル、魚類（例えば、Danio rerio）、回虫（例えば、C. elegans）およびこれらのいずれかのトランスジェニック種を挙げることができるがこれらに限定されない

。用語「生物」として、酵母（例えば、*S. cerevisiae*）細胞、酵母四分子、酵母コロニー、細菌、細菌コロニー、ビリオン、ビロソーム、ウイルス様粒子および／またはこれらの培養物その他を挙げることができるがこれらに限定されない。

#### 【0406】

本明細書において、用語「付着させる」、「コンジュゲートする」および「カップリングする」は、互換的に使用することができ、共有結合相互作用および非共有結合相互作用の両方を指すことができる。

#### 【0407】

本発明の好まれる実施形態を本明細書に示し、記載してきたが、当業者には、かかる実施形態が、単なる例として提示されていることが明らかとなるであろう。そこで、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変種、変化および置換を思い付くであろう。本発明の実施において、本明細書に記載されている本発明の実施形態の様々な代替物を用いることができることを理解されたい。次の特許請求の範囲が、本発明の範囲を定義し、これら特許請求の範囲内の方法および構造ならびにこれらの均等物が、これにより網羅されることが企図される。

#### 【実施例】

#### 【0408】

##### 実施例1：酵素による分割－プール合成

本実施例では、酵素による分割－プール合成方法を使用して、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを生成した。図2Aに示す通り、オリゴヌクレオチドのセットを第1のプレートの各ウェルに添加した。オリゴヌクレオチドのセットにおけるオリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、細胞標識およびリンカーを含む。5'アミン、ユニバーサル配列およびリンカーは、オリゴヌクレオチドのセット毎に同じである。ユニバーサル配列およびリンカーは、互いに異なる。しかし、細胞標識は、オリゴヌクレオチドのセット毎に異なる。よって、各ウェルは、異なる細胞標識を有する。

#### 【0409】

酵素による分割－プール合成のステップ1において、各ウェルに単一のビーズを添加し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)カップリング反応を行うことにより、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを合成した。ステップ1に起因するオリゴヌクレオチドビーズは、複数のオリゴヌクレオチドにカップリングされたビーズを含む。オリゴヌクレオチドは、5'-アミン、ユニバーサル配列、細胞性標識1およびリンカー1を含む(図2Aを参照)。同じビーズにおけるオリゴヌクレオチドは同じである。しかし、第1のビーズにおけるオリゴヌクレオチドは、第2のビーズにおけるオリゴヌクレオチドとは異なる。

#### 【0410】

酵素による分割－プール合成のステップ2において、複数回の洗浄を行って、カップリングされていないオリゴヌクレオチドを除去した。カップリングされていないオリゴヌクレオチドを除去したら、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズをプールした(図2Aを参照)。ステップ2に起因するオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数の一本鎖オリゴヌクレオチドにカップリングされたビーズを含む。一本鎖オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、細胞標識1およびリンカー1を含む。ビーズにおける各オリゴヌクレオチドは同一である。しかし、各ビーズは、異なるオリゴヌクレオチドを含む。異なるビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドは、細胞標識1配列が異なる。

#### 【0411】

図2Bに示す通り、オリゴヌクレオチドのセットを第2のプレートの各ウェルに添加した。オリゴヌクレオチドのセットにおけるオリゴヌクレオチドは、第1のリンカー、細胞標識および第2のリンカーを含む。第1および第2のリンカーは、オリゴヌクレオチドのセット毎に同じである。第1および第2のリンカーは、互いに異なる。しかし、細胞標識は、オリゴヌクレオチドのセット毎に異なる。よって、各ウェルは、異なる細胞標識を有

する。

#### 【0412】

酵素による分割－プール合成のステップ3において、ステップ2においてプールされたオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを、第2のプレートのウェルに分割した。第2のプレートのウェルにおけるオリゴヌクレオチドの第1のリンカーは、ビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドのリンカーに相補的であるため、クレノウ大型断片を使用したプライマー伸長を行って、ステップ2由来のオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズに第2のプレート由来のオリゴヌクレオチドをカップリングした。ステップ3に起因するオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数の二本鎖オリゴヌクレオチドにカップリングされたビーズを含む。二本鎖オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、細胞標識1、リンカー1、細胞標識2およびリンカー2を含む（図2Bを参照）。

10

#### 【0413】

酵素による分割－プール合成のステップ4において、複数回の洗浄を行って、カップリングされていないオリゴヌクレオチドおよびクレノウ大型断片酵素を除去した。第2のプレートを加熱して、二本鎖オリゴヌクレオチドを変性させ、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズをプールした（図2Bを参照）。ステップ4に起因するオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数の一本鎖オリゴヌクレオチドにカップリングされたビーズを含む。一本鎖オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、細胞標識1、リンカー1、細胞標識2およびリンカー2を含む。ビーズにおける各オリゴヌクレオチドは同一である。しかし、各ビーズは、異なるオリゴヌクレオチドを含む。異なるビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドは、組み合わせられた細胞標識配列が異なる。例えば、第1のビーズは、細胞標識Aの第1の細胞標識および細胞標識Cの第2の細胞標識を含むオリゴヌクレオチドを含み得、第2のビーズは、細胞標識Cの第1の細胞標識および細胞標識Dの第2の細胞標識を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。よって、第1のビーズおよび第2のビーズは、同じ細胞標識（この場合、細胞標識C）を含み得るが、第1のビーズおよび第2のビーズの組み合わせられた細胞標識配列は異なる（例えば、第1のビーズに関して、組み合わせられた細胞標識配列は、細胞標識A＋細胞標識Cであり；第2のビーズに関して、組み合わせられた細胞標識配列は、細胞標識C＋細胞標識Aである）。他の事例では、2個のビーズは、異なる細胞標識を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、第1のビーズは、細胞標識Aおよび細胞標識Bを含むオリゴヌクレオチドを含み得、第2のビーズは、細胞標識Cおよび細胞標識Dを含むオリゴヌクレオチドを含み得る。この場合、第1のビーズの細胞標識の両方は、第2のビーズの細胞標識の両方とは異なる。

20

30

#### 【0414】

図2Cに示す通り、オリゴヌクレオチドのセットを第3のプレートの各ウェルに添加した。オリゴヌクレオチドのセットにおけるオリゴヌクレオチドは、リンカー、細胞標識、分子標識およびオリゴdTを含む。リンカーおよびオリゴdT配列は、オリゴヌクレオチドのセット毎に同じである。しかし、細胞標識は、オリゴヌクレオチドのセット毎に異なる。よって、各ウェルは、異なる細胞標識を有する。加えて、分子標識は、セット内のオリゴヌクレオチドに対し異なる。よって、単一のウェルは、同じ細胞標識を有するが異なる分子標識を有する複数のオリゴヌクレオチドを含有する。異なるウェル由来のオリゴヌクレオチドは、同じ分子標識を含有することができる。

40

#### 【0415】

酵素による分割－プール合成のステップ5において、ステップ4においてプールされたオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを、第3のプレートのウェルに分割した。第2のプレートのウェルにおけるオリゴヌクレオチドのリンカーは、ビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドの第2のリンカーに相補的であるため、クレノウ大型断片を使用したプライマー伸長を行って、ステップ4由来のオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズに第3のプレート由来のオリゴヌクレオチドをカップリングした。ステッ

50

プ5に起因するオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数の二本鎖オリゴヌクレオチドにカップリングされたビーズを含む。二本鎖オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、細胞標識1、リンカー1、細胞標識2、リンカー2、細胞標識3、分子標識およびオリゴdTを含む(図2Cを参照)。

#### 【0416】

酵素による分割プール合成のステップ6において、複数回の洗浄を行って、カップリングされていないオリゴヌクレオチドおよびクレノウ大型断片酵素を除去した。第3のプレートを加熱して、二本鎖オリゴヌクレオチドを変性させ、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズをプールした(図2Cを参照)。ステップ4に起因するオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数の一本鎖オリゴヌクレオチドにカップリングされたビーズを含む。一本鎖オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、細胞標識1、リンカー1、細胞標識2、リンカー2、細胞標識3、分子標識およびオリゴdTを含む。単一のビーズにおける複数の一本鎖オリゴヌクレオチドは、分子標識によって区別することができる。単一のビーズにおける複数のオリゴヌクレオチドの細胞標識部分は同一である。各ビーズは、異なるオリゴヌクレオチドを含む。異なるビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドは、細胞標識配列が異なる。異なるビーズ由来のオリゴヌクレオチドにおける分子標識は、同じものとなり得る。異なるビーズ由来のオリゴヌクレオチドにおける分子標識は、異なるものとなり得る。2種またはそれを超えるビーズは、組み合わせられた細胞標識配列が異なり得る。例えば、第1のビーズは、細胞標識A、細胞標識Bおよび細胞標識Cを含むオリゴヌクレオチドを含み得、第2のビーズは、細胞標識B、細胞標識Dおよび細胞標識Aを含むオリゴヌクレオチドを含み得る。この場合、第1および第2のビーズは両者共に、細胞標識Bを含有するが、他の2種の細胞標識は異なる。よって、2個またはそれを超えるビーズは、少なくとも1種の細胞標識が異なるオリゴヌクレオチドを含み得る。2個またはそれを超えるビーズは、少なくとも2種の細胞標識が異なるオリゴヌクレオチドを含み得る。2個またはそれを超えるビーズは、少なくとも3種の細胞標識が異なるオリゴヌクレオチドを含み得る。しかし、ビーズは、2種またはそれを超える同一細胞標識を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、ビーズは、細胞標識A、細胞標識Aおよび細胞標識Dを含むオリゴヌクレオチドを含み得る。ビーズは、少なくとも3種の同一細胞標識を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、ビーズは、細胞標識A、細胞標識Aおよび細胞標識Aを含むオリゴヌクレオチドを含み得る。ビーズは、3種の非同一細胞標識を含むオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、ビーズは、細胞標識A、細胞標識Dおよび細胞標識Eを含むオリゴヌクレオチドを含み得る。ビーズは、少なくとも2種の異なる分子標識を含む少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、ビーズは、分子標識Aを含む第1のオリゴヌクレオチドと、分子標識Dを含む第2のオリゴヌクレオチドとを含み得る。しかし、ビーズは、第1の分子標識を含むオリゴヌクレオチドの複数コピーを含み得る。よって、ビーズは、同じ分子標識を含む少なくとも2種のオリゴヌクレオチドを含み得る。例えば、ビーズは、分子標識Aを含む第1のオリゴヌクレオチドと、分子標識Aを含む第2のオリゴヌクレオチドとを含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの少なくとも30%は、異なる分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの少なくとも40%は、異なる分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの少なくとも50%は、異なる分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの少なくとも60%は、異なる分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの30%未満は、同じ分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの20%未満は、同じ分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの15%未満は、同じ分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの10%未満は、同じ分子標識を含み得る。ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの5%未満は、同じ分子標識を含み得る。

#### 【0417】

酵素による分割プール合成技法を、複数のプレートまたはウェルの数がより多いプレート上で行って、より多数のオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを生成する

ことができる。3種の別々の細胞標識部分の使用は、ビーズにおける総細胞標識部分の多様性を増加させることができる。細胞標識部分毎の96種の異なる配列選択肢により、884, 736種の異なる細胞標識組合せを作製することができる。

#### 【0418】

実施例2：チューブおよびマイクロウェルにおける増幅の比較

本開示は、細胞を捕捉するための方法を提供する。約30ミクロンの直径のマイクロウェルを含むマイクロウェルアレイに、約5,000個のRamos細胞を捕捉した。一部の細胞は、捕捉されなかった。この実験の対照は、チューブに捕捉された等しい数の細胞であった。チューブにおける細胞およびマイクロウェルアレイにおける細胞の両方を溶解した。核酸を、コンジュゲートされたビーズにハイブリダイズさせた。GAPDHおよびRPL19遺伝子のリアルタイムPCRを行った。

10

#### 【0419】

図9は、リアルタイムPCR増幅の結果を示す。マイクロウェルからの収量は、チューブにおける核酸からの収量よりも大きく、オリゴヌクレオチドへの核酸のハイブリダイゼーションが、チューブよりもマイクロウェルにおいてより有効であったことを示した（それぞれ灰色バーおよび白色バーを比較）。

#### 【0420】

実施例3：第2の合成鎖の増幅およびビーズにおける合成の比較

実施例1に記載されている通り、細胞を得て、溶解した。ユニバーサルプライマーを使用して、固体支持体から離れて(off)合成された第2鎖から離れて(off)、または固体支持体において直接的に、RPL19、TUBBおよびGAPDHを増幅した。図10は、固体支持体における直接的な増幅(図10)が、固体支持体から離れて直接的ではない増幅よりも少ないオフターゲット増幅を生じたことを示す。GAPDHおよびTUBB増幅は、方法にかかわらず正確なサイズの産物を生成した(図10における各三つ組の左レーンは、チューブフォーマットにおける固体支持体プラスライセートに相当し、各三つ組の中央レーンは、マイクロウェル由来の固体支持体に相当し、各三つ組の右レーンは、固体支持体プラス精製された核酸に相当する)。RPL19産物は、最小オフターゲット増幅産物を有したが、精製された核酸を固体支持体と共に使用した場合、強い産物のみを生成した。これらの実験は、ビーズにおける直接的な増幅が、固体支持体から離れて合成された第2鎖を使用した増幅よりも少ないオフターゲット増幅産物を生成することを示す。

20

30

#### 【0421】

実施例4：標的核酸のマルチプレックス分析

実施例1に記載されている通り、細胞を得て溶解する。標的核酸を、オリゴヌクレオチドを含む固体支持体にハイブリダイズさせる。複数コピーの標的核酸を、オリゴdT配列を含む標的結合領域にハイブリダイズさせる。逆転写酵素を使用して、複数コピーの標的核酸を逆転写する。逆転写は、標的核酸のコピーがハイブリダイズされるオリゴヌクレオチドの特色(例えば、分子標識、細胞性標識およびユニバーサル標識)を取り込む。PCRを使用して、複数コピーの標的核酸が増幅される。標的核酸の増幅されたコピーを配列決定する。配列決定された標的核酸を計数して、細胞における標的核酸のコピー数を決定する。標的核酸の同じ配列リードのそれぞれの異なる分子標識の数を計数することにより、計数を行う。このようにして、増幅バイアスを縮小することができる。

40

#### 【0422】

実施例5：1種の細胞標識組合せのクローナルコピーを有するビーズを生成するための分割プール合成の有効性の評価

本実施例では、1種の細胞標識組合せのクローナルコピーを有するビーズを生成するための分割プール合成の有効性を評価した。実施例1に記載されている酵素による分割プール合成方法により、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを合成した。25,000個の細胞に由来するRNAに等しい、250ngの全RNAをRamos細胞から精製した。全RNAを、35,000個のオリゴヌクレオチドがカップリングされた

50

ビーズと接触させ、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズへのmRNAのハイブリダイゼーションをもたらした。オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズにハイブリダイズされたmRNAにおいてcDNA合成を行った。さらなる分析のために、18、175および1750個のビーズを含む試料を使用した。18-、175-および1750-ビーズ試料由来のビーズに結合されたcDNAにおいて、GAPDH特異的プライマーおよびIGJ特異的プライマーを使用したPCR増幅反応を行った。ビーズに付着させたcDNA分子を配列決定した。図11A～図11Iは、配列決定結果のグラフによる表現を示す。図11A～図11Cは、それぞれ18-ビーズ、175-ビーズおよび1750-ビーズ試料に関して、ビーズ1個当たりのリードの数がy軸にプロットされ、特有のバーコード（例えば、細胞標識組合せ）がx軸にプロットされている。図11D～図11Fは、それぞれ18-ビーズ、175-ビーズおよび1750-ビーズ試料に関して、ビーズ1個当たりの特有の分子の数がy軸にプロットされ、特有のバーコード（例えば、細胞標識組合せ）がx軸にプロットされている。図11G～図11Iは、それぞれ18-ビーズ、175-ビーズおよび1750-ビーズ試料に関して、ビーズ1個当たりの特有の分子の数がy軸にプロットされ、特有のバーコードがx軸にプロットされている。図11G～図11Iの結果は、分子の総数によって選別される。様々な試料に関するビーズ1個当たりの特有の分子の中位数を表1に示す。配列決定結果の数値を表2に示す。図11J～図11Lは、それぞれ1750-ビーズ試料の細胞標識1、細胞標識2および細胞標識3に関して、指標を使用した特有のバーコード（bc）組合せの数がy軸にプロットされ、バーコード（bc）セグメント指標がx軸にプロットされている。バーコード（bc）は、細胞標識を指す（例えば、bcセグメント1＝細胞標識パート1）。図11J～図11Lに示す通り、各セグメント内のほぼ全ての96種のバーコードの存在を配列決定により検出した。これらの結果は、1種の細胞標識組合せのクロナルコピーを有するビーズを生成するための酵素による分割-プール合成方法の成功を実証する。

【0423】

【表1】

| 表1    |           |         |          |
|-------|-----------|---------|----------|
|       | 特有の分子の中位数 |         |          |
|       | 18 ビーズ    | 175 ビーズ | 1750 ビーズ |
| IGJ   | 78        | 85      | 40       |
| GAPDH | 22        | 45      | 25       |

【0424】

【表2-1】

| 表2                    |         |        |        |
|-----------------------|---------|--------|--------|
| ビーズの予想される数            | 17.5    | 175    | 1750   |
| リードの総数                | 58321   | 60308  | 133043 |
| 定常1における>=8 マッチ        | 56385   | 57615  | 123349 |
| 定常2における>=8 マッチ        | 54117   | 55187  | 115126 |
| 定常1&2における>=8 マッチ      | 54114   | 55185  | 115107 |
| 全3種のサブバーコードにおける完全なマッチ | 38585   | 46066  | 95217  |
| 遺伝子(40bp)における完全なマッチ   | 29968   | 33775  | 72260  |
| 特有のバーコード組合せの総数        | 239     | 407    | 1654   |
| %有用なリード               | 51.388% | 56.00% | 54.31% |
| 特有のバーコード組合せの数>20 リード  | 5       | 26     | 288    |

【0425】

実施例6：オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを使用した単一細胞RNA標識化

本実施例では、オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを使用した単一細胞R

N A 標識化の有効性を評価した。3 種の細胞試料を次の通りに調製した：

【0 4 2 6】

【表 2 - 2】

|            | 試料 1: K562 のみ | 試料 2: Ramos のみ | 試料 3: Ramos+K562<br>混合物 |
|------------|---------------|----------------|-------------------------|
| マイクロウェルの数  | ほぼ 10000      | ほぼ 10000       | ほぼ 10000                |
| Ramos 細胞の数 | 0             | 5000           | 3750                    |
| K562 細胞の数  | 1000          | 0              | 2500                    |

【0 4 2 7】

試料の細胞懸濁液をマイクロウェルの頂部に添加し、マイクロウェルアレイのウェルに細胞を沈降させた。マイクロウェルアレイによって捕捉されていない細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）バスにおいて洗浄除去した。実施例 1 に記載されている酵素による分割ープール合成方法によって調製されたオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを、このマイクロウェルアレイに添加した。オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数のオリゴヌクレオチドを有する磁性ビーズを含む。ビーズにおける各オリゴヌクレオチドは、5' アミン、ユニバーサル配列、細胞標識 1、リンカー 1、細胞標識 2、リンカー 2、細胞標識 3、分子標識およびオリゴ d T を含む。同じビーズにおけるオリゴヌクレオチド毎に、オリゴヌクレオチドの配列は、分子標識を除いて同一である。異なるビーズにおけるオリゴヌクレオチドに対し、細胞標識 1、2 および 3 の組合せが異なる。マイクロウェルアレイのウェル 1 個当たりおよそ 5 ～ 6 個のビーズが添加される。場合によっては、10 個のウェル毎に、アレイ上に 50 個のビーズを沈着させ、0 ～ 2 個のビーズが各ウェル内に入る。ビーズをウェルに沈降させ、捕捉されていないビーズを PBS バスにおいて洗浄除去した。マイクロウェルアレイの下に磁石を置いた。冷溶解バッファの添加により細胞を溶解させた。アレイおよび磁石を冷アルミニウムブロックに 5 分間置いた。溶解された細胞由来の mRNA を、ビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた。過剰な溶解バッファでアレイを洗浄して、非結合 mRNA を除去した。マイクロウェルアレイの頂部に磁石を置くことにより、ウェルからビーズを回収した。回収されたビーズを洗浄した。ローターにおいて 50℃ で 50 分間 Superscript III を使用して、ビーズにおいて cDNA 合成を行った。ローターにおいて 37℃ で 30 分間実行した Exo I 処理により、ビーズにおけるオリゴヌクレオチドから伸長されていないオリゴ d T を除去した。cDNA において遺伝子特異的 PCR 増幅を実行した。遺伝子特異的 PCR のために選択された遺伝子は、細胞型特異的であり、表 3 に示す。PCR 増幅された産物を配列決定した。配列決定の統計を表 4 に示す。図 12A ～図 12C は、それぞれ K562 のみの試料、Ramos のみの試料および K562 + Ramos 混合物試料の配列決定結果のヒストグラムを示す。図 12A ～図 12C に関して、バーコード 1 種当たりの特有の分子を y 軸にプロットし、bc 1 種当たりのリードによって選別された特有の bc 組合せ指標を x 軸にプロットする。

【0 4 2 8】

10

20

30

【表 3】

| 表 3 |       |           |
|-----|-------|-----------|
| 番号  | 遺伝子   | 細胞型       |
| 1   | CD74  | Ramos 特異的 |
| 2   | CD79a | Ramos 特異的 |
| 3   | IGJ   | Ramos 特異的 |
| 4   | TCL1A | Ramos 特異的 |
| 5   | SEPT9 | Ramos 特異的 |
| 6   | CD27  | Ramos 特異的 |
| 7   | CD41  | K562 特異的  |
| 8   | GYPA  | K562 特異的  |
| 9   | GATA1 | K562 特異的  |
| 10  | GATA2 | K562 特異的  |
| 11  | HBG1  | K562 特異的  |
| 12  | GAPDH | 共通        |

【 0 4 2 9 】

【表 4】

| 表 4                      |               |                |                      |
|--------------------------|---------------|----------------|----------------------|
|                          | 試料 1: K562 のみ | 試料 2: Ramos のみ | 試料 3: Ramos+K562 混合物 |
| Ramos 細胞の数               | 0             | 5000           | 3750                 |
| K562 細胞の数                | 1000          | 0              | 2500                 |
| リードの総数                   | 717718        | 1329189        | 2399025              |
| 定常 1 における $\geq 8$ マッチ   | 657911        | 1201081        | 2026726              |
| 定常 2 における $\geq 8$ マッチ   | 581581        | 1071364        | 1513466              |
| 定常 1&2 における $\geq 8$ マッチ | 581508        | 1071153        | 1513102              |
| 全 3 種のサブバーコードにおける完全なマッチ  | 481564        | 862348         | 1248073              |
| 遺伝子(40bp)における完全なマッチ      | 283463        | 575713         | 1004338              |
| %有用なリード                  | 39.50%        | 43.31%         | 41.86%               |
| 特有のバーコード組合せの総数           | 8501          | 29647          | 28783                |
| 特有のバーコード組合せの数 $> 30$ 分子  | 145           | 1072           | 768                  |
| 捕捉効率                     | 0.145         | 0.2144         | 0.12288              |

【 0 4 3 0 】

単一細胞標識化を使用して、単一の細胞型試料（例えば、K 5 6 2 のみの試料、R a m o s のみの試料）に関するコピー数を決定した。図 1 2 D～図 1 2 E は、それぞれ R a m o s のみの細胞試料および K 5 6 2 のみの細胞試料に関する、表 3 に示す遺伝子のコピー数のグラフを示す。図 1 2 D～図 1 2 E に関して、バーコード（b c）組合せ 1 種当たりの分子の数を y 軸にプロットし、b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せを x 軸にプロットする。図 1 2 D～図 1 2 E に示す結果は、 $> 30$  総数の特有の分子を有するビーズ由来の配列決定データに基づいた。これらの結果は、ビーズ 1 個当たりのアンプリコン 1 種当たりの分子の比率が、細胞型の予想にマッチすることを実証する。K 5 6 2 のみの細胞試料に関して、分子数の歪みはより激しく、この細

胞型において高度に豊富なHBG1が、可変コピー数を有することが考えられる。しかし、ビーズ1個当たりの分子の総数が歪んでいるとしても、GAPDHコピー数は、一定であると考えられる。個々の遺伝子のコピー数を図12F～図12Iに示す。図12F～図12Gに関して、コピー数は、それぞれRamosのみ細胞およびK562のみ細胞に関する、ビーズまたは単一細胞1個当たりのコピーとして表される。図12H～図12Iに関して、コピー数は、それぞれRamosのみ細胞およびK562のみ細胞に関する、ビーズまたは単一細胞1個当たりの相対的存在量として表される。

#### 【0431】

単一細胞標識化を使用して、K562+Ramos混合物試料における単一細胞の細胞型を決定した。最も豊富な分子による100種の特有のバーコード組合せの配列決定結果を分析して、単一細胞標識化の有効性を評価して、K562+Ramos混合物試料における単一細胞の細胞型を決定した。図12J～図12Mは、100種の特有のバーコード組合せを有するビーズの、遺伝子1種当たりの特有の分子の数(y軸)のグラフを示す。x軸の数字は、遺伝子を指す(表3を参照)。図12J～図12Mは、K562およびRamos細胞の全般的遺伝子発現パターンを明らかに描写する。図12N～図12Oは、2種の細胞型の遺伝子発現プロファイルの全般的パターンを描写する、2個のビーズの拡大グラフを示す。図12Nは、K562様細胞の遺伝子発現プロファイルの全般的パターンを示し、図12Oは、Ramos様細胞の遺伝子発現プロファイルの全般的パターンを示す。図12Pは、K562+Ramos混合物試料由来の、ビーズ1個当たり>30種の分子を有する768個のビーズの遺伝子発現プロファイルの主成分分析に基づく結果の散布図を示す。x軸にプロットされた成分1は、2種の細胞型を分ける。y軸にプロットされた成分2は、高および低HBG1コピー数を有するK562細胞を分ける。散布図における各ドットは、1個のビーズまたは1個の細胞に等しい1種の特有のバーコード組合せを表す。主成分分析に基づき、409個のビーズは、K562細胞に相当し、347個のビーズは、Ramos細胞に相当した。K562様およびRamos様細胞型に関して、表3の遺伝子のコピー数を決定した。図12Q～図12Rは、それぞれK562様細胞(図12Pに基づく第1の主成分の左側のビーズ)およびRamos様細胞(図12Pに基づく第1の主成分の右側のビーズ)に関する、ビーズ1個当たりのアンプリコン1種当たりのコピー数のヒストグラムを示す。図12Q～図12Rに関して、bc組合せ1種当たりの数をy軸に、bc組合せ1種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せをx軸に示す。図12S～図12Tは、それぞれK562様細胞(図12Pに基づく第1の主成分の左側のビーズ)およびRamos様細胞(図12Pに基づく第1の主成分の右側のビーズ)に関する、個々の遺伝子のビーズまたは単一細胞1個当たりのコピー数を示す。表5は、単一細胞および混合物試料に関する、ビーズ1個当たりの平均コピー数を示す。

#### 【0432】

10

20

30

【表 5 - 1】

| 表 5              |          |          |                  |         |
|------------------|----------|----------|------------------|---------|
| 遺伝子              | 単一の細胞型試料 |          | K562+Ramos 混合物試料 |         |
|                  | K562 のみ  | Ramos のみ | K562 様           | Ramos 様 |
| CD74             | 0.00     | 39.95    | 0.10             | 7.50    |
| CD79a            | 0.02     | 30.97    | 0.84             | 18.88   |
| IGJ              | 0.03     | 42.43    | 0.81             | 27.76   |
| TCL1A            | 0.01     | 31.78    | 0.71             | 19.44   |
| SEPT9            | 0.88     | 3.89     | 1.35             | 1.52    |
| CD27             | 0.00     | 5.31     | 0.03             | 1.30    |
| CD41             | 0.61     | 0.00     | 0.47             | 0.01    |
| GYPA             | 1.92     | 0.00     | 0.73             | 0.02    |
| GATA2            | 1.38     | 0.00     | 0.60             | 0.04    |
| GATA1            | 0.94     | 0.00     | 1.04             | 0.04    |
| HBG1             | 201.09   | 0.00     | 72.27            | 1.37    |
| GAPDH            | 51.77    | 39.13    | 44.94            | 13.53   |
| GAPDH リード<br>冗長性 | 2.04     | 1.47     | 7.67             | 7.22    |

10

## 【0 4 3 3】

実施例 7：ビーズ間のクロストークの評価

本実施例では、ビーズ間のクロストークを評価した。マウス EL 4 細胞および Ramos 細胞の混合物を含む試料を次の通りに調製した：

20

## 【0 4 3 4】

## 【表 5 - 2】

|              | 高密度      | 低密度      |
|--------------|----------|----------|
| マイクロウェルの数    | ほぼ 10000 | ほぼ 10000 |
| マウス EL4 細胞の数 | 2500     | 1500     |
| Ramos 細胞の数   | 3750     | 1500     |

## 【0 4 3 5】

試料の細胞懸濁液をマイクロウェルの頂部に添加し、マイクロウェルアレイのウェルに細胞を沈降させた。マイクロウェルアレイによって捕捉されていない細胞をリン酸緩衝食塩水（PBS）バスにおいて洗浄除去した。実施例 1 に記載されている酵素による分割－プール合成方法によって調製されたオリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズを、このマイクロウェルアレイに添加した。オリゴヌクレオチドがカップリングされたビーズは、複数のオリゴヌクレオチドを有する磁性ビーズを含む。ビーズにおける各オリゴヌクレオチドは、5' アミン、ユニバーサル配列、細胞標識 1、リンカー 1、細胞標識 2、リンカー 2、細胞標識 3、分子標識およびオリゴ d T を含む。同じビーズにおけるオリゴヌクレオチド毎に、オリゴヌクレオチドの配列は、分子標識を除いて同一である。異なるビーズにおけるオリゴヌクレオチドに対し、細胞標識 1、2 および 3 の組合せは異なる。マイクロウェルアレイのウェル 1 個あたりおよそ 5 ～ 6 個のビーズが添加される。ビーズをウェルに沈降させ、捕捉されていないビーズを PBS バスにおいて洗浄除去した。マイクロウェルアレイの下に磁石を置いた。冷溶解バッファの添加により細胞を溶解させた。アレイおよび磁石を冷アルミニウムブロックに 5 分間置いた。溶解された細胞由来の mRNA を、ビーズにカップリングされたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた。過剰な溶解バッファでアレイを洗浄して、非結合 mRNA を除去した。マイクロウェルアレイの頂部に磁石を置くことにより、ウェルからビーズを回収した。回収されたビーズを洗浄した。ローターにおいて 50℃で 50 分間 Superscript III を使用して、ビーズにおいて cDNA 合成を行った。ローターにおいて 37℃で 30 分間実行した Exo I 処理により、ビーズにおけるオリゴヌクレオチドから伸長されていないオリゴ d T を除去した。cDNA において遺伝子特異的 PCR 増幅を実行した。遺伝子特異的 PCR

30

40

50

のために選択された遺伝子は、細胞型特異的であり、表 6 に示す。

【 0 4 3 6 】

【表 6】

| 表 6 |          |     |
|-----|----------|-----|
| 番号  | 遺伝子      | 細胞型 |
| 1   | HS_CD74  | ヒト  |
| 2   | HS_CD79a | ヒト  |
| 3   | HS_IGJ   | ヒト  |
| 4   | HS_TCL1A | ヒト  |
| 5   | HS_SEPT9 | ヒト  |
| 6   | HS_CD27  | ヒト  |
| 7   | HS_GAPDH | ヒト  |
| 8   | MM_B2M   | マウス |
| 9   | MM_ACTM  | マウス |
| 10  | MM_HPRT  | マウス |
| 11  | MM_SHDA  | マウス |

10

【 0 4 3 7 】

P C R 増幅された産物を配列決定した。配列決定統計を表 7 に示す。

【 0 4 3 8 】

【表 7】

20

| 表 7                      |         |         |
|--------------------------|---------|---------|
|                          | 低密度     | 高密度     |
| Ramos 細胞の数               | 15000   | 3750    |
| マウス細胞の数                  | 1500    | 2500    |
| リードの総数                   | 2391780 | 4038217 |
| 定常 1 における $\geq 8$ マッチ   | 2162945 | 3651643 |
| 定常 2 における $\geq 8$ マッチ   | 1981835 | 3356493 |
| 定常 1&2 における $\geq 8$ マッチ | 1981626 | 3355787 |
| 全 3 種のサブバーコードにおける完全なマッチ  | 1645994 | 2790879 |
| 遺伝子(40bp)における完全なマッチ      | 1083013 | 2171930 |
| %有用なリード                  | 45%     | 54%     |
| 特有のバーコード組合せの総数           | 16695   | 36595   |
| 特有のバーコード組合せの数 $> 30$ 分子  | 80      | 281     |
| 捕捉効率                     | 0.03    | 0.04    |

30

【 0 4 3 9 】

高密度および低密度試料に関して、最も豊富な分子による 1 0 0 種の特有のバーコード組合せの遺伝子発現プロファイルを決した。配列決定結果に基づき遺伝子発現プロファイルを作製した。図 1 3 A は、高密度試料由来の 1 0 0 種の特有のバーコード組合せのうち 3 5 種の遺伝子発現プロファイルのグラフを示す。図 1 3 A に関して、特有の分子の数を y 軸に、遺伝子参照番号を x 軸に示す（遺伝子参照番号に相当する遺伝子に関しては表 6 を参照）。図 1 3 A は、マウスおよび R a m o s 細胞の全般的遺伝子発現パターンを明らかに描写する。図 1 3 B ~ 図 1 3 C は、それぞれ高密度試料および低密度試料の遺伝子発現プロファイルの主成分分析に基づく結果の散布図を示す。x 軸にプロットされた成分 1 は、2 種の細胞型を分ける。y 軸にプロットされた成分 2 は、R a m o s 細胞集団内の遺伝子発現における変動性を示す。散布図における各ドットは、1 個のビーズまたは 1 個の細胞に等しい 1 種の特有のバーコード組合せを表す。高密度試料の主成分分析に基づき、1 4 4 個のビーズは、マウス細胞に相当し、1 3 2 個のビーズは、R a m o s 細胞に相当した。低密度試料の主成分分析に基づき、5 2 個のビーズは、マウス細胞に相当し、2

40

50

7 個のビーズは、R a m o s 細胞に相当した。

#### 【0440】

細胞型が決定されたら、異なる細胞型における表 6 の遺伝子を検出することにより、ビーズ間のクロストークを評価した。図 1 3 D～図 1 3 E は、それぞれ高密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード (b c) 組合せ 1 種当たりのリード (y 軸) 対 b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ (x 軸) のグラフを描写する。図 1 3 F～図 1 3 G は、それぞれ高密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、b c 組合せ 1 種当たりの分子の数 (y 軸) 対 b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ (x 軸) のグラフを描写する。図 1 3 H～図 1 3 I は、それぞれ低密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、バーコード (b c) 組合せ 1 種当たりのリード (y 軸) 対 b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ (x 軸) のグラフを描写する。図 1 3 J～図 1 3 K は、それぞれ低密度試料由来の R a m o s 様細胞およびマウス様細胞に関する、b c 組合せ 1 種当たりの分子の数 (y 軸) 対 b c 組合せ 1 種当たりの分子の総数によって選別される特有のバーコード組合せ (x 軸) のグラフを描写する。表 8 は、低および高密度試料に関する、特有の分子 1 種当たりの平均倍数被覆度またはリード冗長性を示す。

#### 【0441】

##### 【表 8】

| 表 8      |           |        |           |        |
|----------|-----------|--------|-----------|--------|
| 遺伝子      | 低密度       |        | 高密度       |        |
|          | Ramos 様細胞 | マウス様細胞 | Ramos 様細胞 | マウス様細胞 |
| HS_CD74  | 29.75     | 3.17   | 23.75     | 2.15   |
| HS_CD79a | 47.2      | 4.09   | 42.30     | 2.67   |
| HS_IGJ   | 29.65     | 1.39   | 30.23     | 2.4    |
| HS_TCL1A | 45.74     | 2.26   | 39.00     | 4.13   |
| HS_SEPT9 | 11.85     | 1.00   | 12.75     | 1.18   |
| HS_CD27  | 37.99     | 1.00   | 32.12     | 1.10   |
| HS_GAPDH | 19.97     | 1.55   | 17.37     | 2.57   |
| MM_B2M   | 1.21      | 31.98  | 3.05      | 31.48  |
| MM_ACTM  | 1.05      | 29.08  | 1.90      | 28.38  |
| MM_HPRT  | 1.02      | 39.96  | 1.03      | 43.65  |
| MM_SHDA  | 1.00      | 39.60  | 1.02      | 29.60  |

#### 【0442】

表 8 における結果は、特有の分子 1 種当たりの平均倍数被覆度が、R a m o s 細胞においてマウス遺伝子よりもヒト遺伝子に関してさらに高く、逆もまた同じであることを示す。

#### 【0443】

対照として、マウスおよびヒト細胞の混合物をチューブにおいて溶解し、ビーズにより c D N A 合成に変換し、c D N A を配列決定した。図 4 X L は、配列決定結果のグラフによる表現を示す。予想される通り、多数の特有のバーコード (b c) 組合せが観察され、大部分のビーズは、合計 1～2 コピーしか持たなかった。

#### 【0444】

これらの結果は、ビーズ間に最小のクロストークが存在し、クロストークをバイオインフォマティクスにより同定することができることを実証する。

#### 【0445】

##### 実施例 8：単一細胞核酸ライブラリー生成

本明細書に開示されているオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体を使用して、単一細胞核酸ライブラリーを生成することができる。本実施例では、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体を有する表面（例えば、格子）に細胞試料を添加すること

により、単一細胞核酸ライブラリーが生成される。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体は、ビーズにコンジュゲートされた複数のオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、(a) リンカーによって接続された、少なくとも2種の明確に異なる領域を含む細胞標識領域と、(b) 分子標識領域とを含む。ビーズにおける2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、同一細胞標識領域を含む。ビーズにおける2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、2種またはそれを超える異なる分子標識領域を含む。2個またはそれを超える異なるビーズにおける2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、2種またはそれを超える異なる細胞標識領域を含む。よって、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体に会合する各細胞は、異なる細胞標識領域を有する。細胞試料における細胞の濃度は、表面における1種のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体への1個またはそれより少ない細胞の会合を可能にするように十分に希釈される。溶解バッファーを使用して、細胞を溶解する。細胞由来のmRNAをオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる。よって、細胞由来の全mRNAを、同一細胞標識領域を含むオリゴヌクレオチドで標識する。細胞由来の2種またはそれを超えるmRNAを、2種またはそれを超える異なる分子標識領域を含む2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドで標識する。磁石を表面に適用して、表面からオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体を精製する。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体は、表面から個々に精製することができる。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体におけるオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたmRNAを逆転写して、標識されたcDNAを生成する。標識されたcDNAは、mRNAの逆相補体およびmRNAがハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドのコピーを含む。標識されたcDNAをPCRにより増幅して、標識されたアンプリコンを生成する。標識されたcDNAおよび／または標識されたアンプリコンは、制限酵素消化によりビーズから除去することができる。標識されたアンプリコンから単一細胞由来の核酸のライブラリーを生成する。

#### 【0446】

あるいは、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体は、共に精製される。mRNAの逆転写は、組み合わされたオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした固体支持体上で行うことができる。異なる細胞由来のmRNAは、異なる細胞標識領域を含むオリゴヌクレオチドで標識されるため、細胞標識領域を使用して、標識されたcDNAまたは標識されたアンプリコンがいずれの細胞に起源をもつか決定することができる。よって、複数の細胞由来の核酸のライブラリーを生成することができ、標識されたアンプリコンが起源をもつ細胞の同一性は、細胞標識領域により決定することができる。

#### 【0447】

単一細胞核酸ライブラリーは、細胞の溶解前に薬剤と細胞を接触させることにより生成することもできる。薬剤は、抗原、薬物、細胞、毒素等となり得る。よって、特殊化された単一細胞核酸ライブラリーを生成することができる。核酸ライブラリーの分析を使用して、単一細胞薬物発現プロファイルを作製することができる。このような核酸ライブラリーから、単一細胞レベルのシグナル伝達経路を決定することもできる。核酸ライブラリーを使用して、特定の細胞型に対する抗原の影響を決定することもできる。

#### 【0448】

##### 実施例9：単一細胞発現プロファイリング

本明細書に開示されているオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体を使用して、単一細胞の発現プロファイルを決定することができる。本実施例では、細胞の混合物を含む細胞試料を、複数の抗体と接触させる。フローサイトメトリーを使用して、細胞のサブセットを精製する。細胞のサブセットをマイクロウェルアレイに添加する。複数のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体をマイクロウェルアレイに添加する。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体は、ナノ粒子にカップリングされた複数のオリゴヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、(a) 2種の既定の配列によって接続された3種の明確に異なる配列を含む細胞標識領域と、(b) 分子標識領域とを含む。ナノ

10

20

30

40

50

粒子における2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、同一細胞標識領域を含む。ナノ粒子における2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、2種またはそれを超える異なる分子標識領域を含む。2種またはそれを超える異なるナノ粒子における2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、2種またはそれを超える異なる細胞標識領域を含む。よって、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体に会合する各細胞は、異なる細胞標識領域を有する。

#### 【0449】

マイクロウェルアレイに磁石を適用し、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートした支持体に会合しない細胞を洗浄除去する。溶解バッファーを含むスポンジをマイクロウェルアレイの頂部に置き、これにより、細胞を溶解する。

10

#### 【0450】

溶解された細胞由来のmRNAを、ビーズにおけるオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせる。mRNAを逆転写して、標識されたcDNAを生成する。標識されたcDNAは、mRNAの逆相補体およびmRNAがハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドのコピーを含む。標識されたcDNAをPCRにより増幅して、標識されたアンプリコンを生成する。標識されたアンプリコンを配列決定する。一細胞由来の各mRNAは同じ細胞標識で標識され、異なる細胞由来のmRNAは異なる細胞標識で標識されているため、標識されたアンプリコンの配列情報を使用して、単一細胞発現プロファイルを作製する。

#### 【0451】

実施例10：単一細胞配列決定による免疫表現型決定

20

被験体から血液試料を収集し、血液試料から末梢血単核細胞(PMBC)を単離した。RPMI1640培地においてPMBCを培養し、インキュベーター内に一晩置いた。PMBCをPBSにおいて複数回洗浄して、血清を除去した。32,400個のウェルを有するマイクロウェルアレイに、およそ7000個のPMBCを沈着させた。よって、マイクロウェルアレイにおける大部分のウェルは、細胞を含有せず、細胞におけるいくつかのウェルは、1個の細胞のみを含有した。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズをマイクロウェルアレイにアプライした。各オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズは、ビーズに付着させたおよそ10億種のオリゴヌクレオチドを含有した。ビーズに付着させた各オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、3部構成細胞性標識(例えば、2個のリンカーによって接続された3個の細胞標識セクション)、分子標識およびオリゴdTを含有した。各ビーズは、3個の細胞標識セクションの特有の組合せの結果である、特有の3部構成細胞性標識を含有した。単一のビーズにおける全オリゴヌクレオチドは、同じ3部構成細胞性標識を含有した。異なるビーズ由来のオリゴヌクレオチドは、異なる3部構成細胞性標識を含有した。各ウェルは、1個またはそれより少ないオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズを含有した。細胞溶解試薬をマイクロウェルアレイにアプライし、細胞の溶解をもたらした。細胞由来のポリアデニル化分子(例えば、mRNA)は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ由来のオリゴヌクレオチドのオリゴdT配列にハイブリダイズした。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ由来のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたポリアデニル化分子を、42℃で90分間ローターにおいてSuperScript IIにより逆転写した。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ由来のオリゴヌクレオチドは、第1鎖cDNA合成のためのプライマーとして機能した。superScript IIが、末端に達すると、cDNAの3'末端にSMARTオリゴ配列の相補体を付加できるように、cDNA合成にSMARTオリゴを取り込んだ。cDNA合成反応は、伸長されていないオリゴヌクレオチド(例えば、細胞由来のポリアデニル化分子に付着させていないオリゴヌクレオチド)および伸長されたオリゴヌクレオチド(例えば、ポリアデニル化分子に付着させ、かつポリアデニル化分子/cDNAハイブリッドを含むオリゴヌクレオチド)がコンジュゲートしたビーズを生成する。

30

40

#### 【0452】

ビーズを組み合わせ、ポリアデニル化分子/cDNAハイブリッドを含むオリゴヌクレ

50

オチドを増幅した。マルチプレックスPCRを行って、ビーズにおけるcDNA由来の98種の遺伝子(表9を参照)のパネルを増幅した。マルチプレックス化PCRのためのプライマーは、mRNAの3'末端由来のおよそ500塩基対を設置するように設計された第1の遺伝子特異的プライマーと、mRNAの3'末端由来のおよそ300塩基対を設置するように設計されたネステッド遺伝子特異的プライマーとを含んだ。マルチプレックスPCRのためのプライマーを、パネルにおけるプライマーの最後の6塩基において有意な相補性を必要としないように設計した。マルチプレックスPCRプライマーにおいて相補性が検出された場合、プライマーを手動で置き換えた。マルチプレックスPCR反応は、次のステップを含んだ: 1) 15サイクルの第1の遺伝子特異的PCR (KAPAマルチプレックスミックス、50 nMの各プライマー — 第1の遺伝子特異的プライマーおよびオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズのユニバーサル配列に相補的なユニバーサルプライマー)、Ampureクリーンアップ(0.7×ビーズ対鑄型比)、15サイクルのネステッド遺伝子特異的PCR (KAPAマルチプレックスミックス、50 nMの各プライマー — ネステッド遺伝子特異的プライマーおよびオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズのユニバーサル配列に相補的なユニバーサルプライマー)、Ampureクリーンアップ(0.7×ビーズ対鑄型比)、全長Illuminaアダプター(KAPA HiFi Ready Mix)を加えるための8サイクルの最終PCR、およびAmpureクリーンアップ(1×ビーズ対鑄型比)。

【0453】

【表 9】

| 表 9. 遺伝子パネル |                   |                                |                              |                                 |                  |                        |                            |
|-------------|-------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|------------------|------------------------|----------------------------|
| 細胞型         | 遺伝子               | 細胞型                            | 遺伝子                          | 細胞型                             | 遺伝子              | 細胞型                    | 遺伝子                        |
| B 細胞        | PAX5              | 単球                             | CD14                         | ナイーブ                            | CD62L (SELL)     | Th17                   | IL17A                      |
|             | CD19              | 古典的単球                          | S100A12                      |                                 | CD45RA           |                        | IL17F                      |
|             | CD20              |                                | CCR2                         | ナイーブ<br>Th                      | THPOK/ZBTB<br>7B |                        | IL21                       |
|             | BCMA/<br>TNFRSF17 |                                | SELL/CD62<br>L (L セレク<br>チン) | ナイーブ<br>Tc                      | RUNX3            |                        | IL22                       |
|             | BAFF              | 非古典的単球                         | CD16/FCGR<br>3B              | メモリー                            | CD45RO/PTPR<br>C |                        | CCL20                      |
|             | TCL1A             |                                | CX3CR1                       |                                 | CD44             |                        | IL23R                      |
|             | TACI              |                                | ITGAL                        | セントラル<br>メモリー                   | CCR7             |                        | RORa/ROR<br>A              |
| B ナイーブ      | IGHD              | 従来の骨髄<br>様<br>(myeoloid)<br>DC | CD1b                         | CD8+/CD4<br>+                   | TXK              | 濾胞性 T<br>ヘルパー          | RORgamat/<br>RORC          |
|             | IGHM              |                                | FOXQ1                        |                                 | MBD2             |                        | OX40L/TN<br>FSF4/CD25<br>2 |
| B メモリー      | CD27              |                                | CD209/<br>DC-SIGN            | エフェク<br>ターメモリー<br>CD8+/CD4<br>+ | BCL6             |                        | CXCR5                      |
|             | CD38              | 形質細胞様<br>樹状細胞<br>(稀な)          | CD1e                         |                                 | BLIMP1           | 活性化 T                  | SLAM/SL<br>AMF1            |
|             | CD24              |                                | CCL17                        | Th1                             | CXCR3            |                        | ICOS                       |
|             | AICDA             |                                | DTNA                         | Th2                             | IFNGR1           |                        | SAP/SH2D<br>1A             |
|             | CD95              |                                | CLEC4C/<br>CD303             |                                 | IL12RB2          |                        | CD69                       |
|             | CD10              | 稀な骨髄樹<br>状細胞<br>(0.02%)        | CD141/TM                     |                                 | IFN ガンマ          | 活性化 T<br>および B         | CD30                       |
| B 移行        | IL10              | NKT                            | PLZF/ZBTB<br>16              | Th2                             | IL33R/IL1RL1     | Toll 様受<br>容体(生得<br>的) | TLR1                       |
| B reg       | RASD1             | T 細胞                           | SLAMF1                       |                                 | IL4R             |                        | TLR2                       |
|             | AMPD1             |                                | CD3 (CD3D)                   |                                 | CCR4             |                        | TLR3                       |
|             | SDC1<br>(CD138)   |                                | CD3 (CD3E)                   | Treg                            | CRTH2/PTGD<br>R2 |                        | TLR4                       |
| NK          | OSBPL5            | 細胞傷害性<br>T                     | CD8 (CD8A)                   |                                 | IL4              |                        | TLR5                       |
|             | CD56/NCA<br>M1    |                                | CD8 (CD8B)                   |                                 | IL5              |                        | TLR6                       |
|             | IGFBP7            |                                | PRF1 (パー<br>フォリン)            |                                 | CD25             |                        | TLR7                       |
|             | KIR2DS5           |                                | EOMES                        |                                 | FOXP1            |                        | TLR8                       |
|             | KIR2DS2           | ヘルパー T                         | CD4                          |                                 | TGF ベータ          |                        | TLR9                       |
|             | RAB4B             |                                |                              |                                 | IL10             |                        | TLR10                      |

## 【0454】

増幅された産物を配列決定した。Bowtie2を使用して、150bpを有する配列リードを、表9に示す98種の遺伝子のmRNA配列全体に対し整列させた。配列整列の結果(表10を参照)は、マルチプレックスPCR反応が、高度に特異的な産物をもたらしたことを実証する。図14は、X軸の遺伝子と、リードの数のlog10を描写するグラフを示す。98種の遺伝子のうち16種の遺伝子は存在しなかった。これらの遺伝子の非存在は、遺伝子のいくつかは、この血液試料中に存在しない可能性がある稀な細胞を標的化するという事実によるものとなり得る。全体的には、98遺伝子パネル由来の遺伝子のおよそ84%が検出された。

## 【0455】

10

20

30

40

【表 1 0】

| 表 10             |         |
|------------------|---------|
| 合計               | 6357075 |
| 0 回整列            | 703616  |
| 正確に 1 回整列        | 5584201 |
| 1 回より多く整列        | 69258   |
| 正確に 1 回整列されたものの% | 88%     |

10

【0 4 5 6】

表 1 1 は、全体的な配列決定統計の結果を示す。リード 1 に関して、総リード 1 マッチ判断基準は、3 部構成細胞性標識（例えば、細胞バーコード）への完全なマッチと、リンカーへの最大でも 1 個のミスマッチを要求した。

【0 4 5 7】

【表 1 1】

| 表 11                   |         |
|------------------------|---------|
| リード総数                  | 6357075 |
| 総リード 1 マッチ判断基準         | 4384245 |
| リード 2 も整列              | 3943667 |
| %リード 2 整列              | 89.95%  |
| 特有の細胞 bc の数            | 31129   |
| 特有の bc1 種当たりのリード計数>100 | 3228    |
| 特有の bc1 種当たりのリード計数>50  | 3721    |
| %有用なリード                | 62.04%  |

20

【0 4 5 8】

図 1 5 A は、3 部構成細胞標識（例えば、細胞バーコード）1 種当たりの検出される遺伝子の分布のグラフを示す。図 1 5 B は、ビーズ 1 個当たりの検出される特有の分子の分布のグラフを示す（遺伝子パネルを発現）。

30

【0 4 5 9】

細胞クラスタリング分析を行って、配列決定結果を使用して、細胞バーコードに基づき細胞集団を分析することができるか否かを決定した。SPADE（CyTOFデータのために Nolan lab によって開発された最小スパニングツリーアルゴリズム）を使用して、17 遺伝子の存在／非存在に基づき細胞をクラスター化した。存在すると考えられる遺伝子に関して、遺伝子（gen）の平均配列決定冗長性は、5 倍よりも大きい必要がある。配列フィルタリング後に、20 種を超える特有の分子に関連するおよそ 500 種の特有の細胞バーコード（例えば、細胞標識）が存在した。各特有の細胞バーコードは、単一細胞に相当する。特有の細胞バーコードに関連する遺伝子に基づき、細胞を細胞型にクラスター化した。表 1 2 は、細胞型の確定的同定に使用することができる遺伝子のリストを示す。よって、CD20、IGHM、TCL1A および CD24 に関連する細胞バーコードは、B 細胞と指定され、一方、CD8A、CD3D、CD3E、CD4 および CD62L に関連する細胞バーコードは、T 細胞と指定された。表 9 の残る遺伝子を細胞クラスターにマッピングした。図 1 6 は、細胞バーコードに関連する遺伝子に基づく細胞クラスターを描写する。クラスターのサイズは、クラスターに割り当てられた細胞の数に比例する。図 1 6 に示す結果は、細胞および分子バーコード化の組合せを使用して、単一細胞由来の分子のコピーを特有に標識することができることを実証し、これは、単一細胞配列決

40

50

定による免疫表現型決定を可能にすることができる。表 1 2 に示す遺伝子に基づく主要細胞型への P M B C のクラスタリングに加えて、9 8 遺伝子パネルを使用して、主要細胞型のサブタイプのクラスターを同定することもできる。表 1 3 は、単一細胞配列決定によって検出される各主要細胞型の頻度を示す。表 1 3 に示す通り、C D 8 + T 細胞を除いて、各細胞型のパーセンテージは、正常細胞パーセンテージ範囲に相当した。P M B C 試料において、僅かにより高いパーセンテージの C D 8 + T 細胞が観察された。図 1 6 に基づく細胞クラスターを使用して、9 8 遺伝子パネル由来の追加的な遺伝子の発現プロファイルを使用して、細胞クラスターをさらに分析した。

【0 4 6 0】

【表 1 2】

| 表 12       |                                  |
|------------|----------------------------------|
| 主要細胞型      | 遺伝子                              |
| B 細胞       | CD20, IGHM, TCL1A, CD24          |
| T 細胞       | CD8A, CD3D, CD3E, CD4, CD62L     |
| NKT 細胞     | ZBTB16                           |
| 樹状細胞       | CD209                            |
| ナチュラルキラー細胞 | KIR2DS5, KIR2DS2, CD16           |
| 単球         | CD16, CD14, CCR2, S100A12, CD62L |

【0 4 6 1】

【表 1 3】

| 表 13       |     |         |        |
|------------|-----|---------|--------|
| 細胞型        | 細胞数 | パーセンテージ | 正常範囲   |
| 単球         | 67  | 13.3%   | 10-30% |
| NK         | 85  | 16.9%   | 最大 15% |
| B          | 47  | 9.3%    | 最大 15% |
| CD8        | 210 | 41.7%   | 5-30%  |
| CD4        | 94  | 18.7%   | 25-60% |
| 総割り当てクラスター | 503 | 100.0%  |        |

【0 4 6 2】

図 1 7 A ~ 図 1 7 D は、単球特異的マーカーの分析を示す。図 1 7 E は、図 1 6 に描写される細胞クラスターを示す。図 1 7 A は、単球特異的マーカーである C D 1 4 の細胞発現プロファイルを示す。「暖色」（例えば、赤色）は、高い遺伝子発現を表し、「寒色」（例えば、青色）は、低い遺伝子発現を表す。図 1 7 A に示す通り、C D 1 4 は、単球集団において高度に発現され、他の細胞型においては低発現から発現なしであった。単球および N K の両方に存在することが公知の C D 1 6 の細胞発現プロファイルを図 1 7 B に示す。図 1 7 B に示す通り、単球および N K 細胞クラスターは、C D 1 6 の高発現を有した一方、他の細胞型は、低発現から発現なしであった。C C R 2 および S 1 0 0 A 1 2 は、単球において高度に発現されることが公知である。C C R 2 および S 1 0 0 A 1 2 単球特異的発現も、それぞれ図 1 7 C および図 1 7 D に示す細胞発現プロファイルにおいて実証された。しかし、C C R 2 および S 1 0 0 A 1 2 の発現は、単球細胞の 2 種のブランチに分かれた。他の細胞型は、C C R 2 および S 1 0 0 A 1 2 の低発現から発現なしを示した。

【0 4 6 3】

図18A～図18Bは、T細胞特異的マーカーの分析を示す。図18Cは、図16に描写される細胞クラスターを示す。図18Aは、CD3分子の鎖であるCD3Dの細胞発現プロファイルを示す。CD3は、汎T細胞マーカーである。図18Aは、CD3Dが、CD8+T細胞の2種のブランチにおいて高度に発現され、CD8+T細胞の第3のブランチにおいて中等度に発現されることを示す。しかし、CD3Dは、CD4+T細胞において高度に発現されない。また、他の細胞型は、CD3Dの低発現から発現なしである。図18Bは、CD3分子の鎖であるCD3Eの細胞発現プロファイルを示す。図18Bは、CD3Dが、CD4+T細胞において高度に発現されることを示す。CD8+T細胞の異なるブランチは、CD3Dの高から中等度発現を示す。CD3Dの発現がほとんどない～全くないことが、他の細胞型において観察される。

10

#### 【0464】

図19A～図19Bは、CD8+T細胞特異的マーカーの分析を示す。図19Cは、図16に描写される細胞クラスターを示す。図19Aは、CD8分子の鎖であるCD8Aの細胞発現プロファイルを示す。図19Aに示す通り、CD8+T細胞の異なるブランチは、様々なレベルのCD8A発現を有し、一部のブランチは、高発現を有し、他のブランチは、中等度発現を有し、1種のブランチは、CD8Aの低発現から発現なしを示す。CD16+NK細胞のブランチにおいて、高いCD8A発現が観察された。文献において、NK細胞の最大80%が、CD8を発現することが報告された。他の細胞型において、CD8A発現がほとんどない～全くないことが観察された。図19Bは、CD8モデルの鎖であるCD8Bの細胞発現プロファイルを示す。図19Bに示す通り、CD8+T細胞の異なるブランチは、様々なレベルのCD8B発現を有し、1種のブランチは、高発現を有し、一部のブランチは、中等度発現を有し、2種のブランチは、CD8Bの低発現から発現なしを示す。CD16+NK細胞のブランチにおいて、高いCD8B発現も観察された。他の細胞型において、CD8B発現がほとんどない～全くないことが観察された。

20

#### 【0465】

図20Aは、CD4+T細胞特異的マーカーの分析を示す。図20Bは、図16に描写される細胞クラスターを示す。図20Aは、CD4の発現プロファイルを示す。CD4+T細胞クラスターにおける細胞のサブセットにおいて、CD4の中等度発現が観察され、単球クラスターのブランチにおいて、CD4の高発現が観察された。文献において、単球もCD4を発現することが以前に記述された。CD8+T細胞のブランチおよびNK細胞において、CD4の中等度発現から低発現が観察された。他の細胞型において、CD4の低発現から発現なしが観察された。

30

#### 【0466】

図21A～図21Dは、ナチュラルキラー（NK）細胞特異的マーカーの分析を示す。図20Eは、図16に描写される細胞クラスターを示す。図20Aは、KIR2DS2の発現プロファイルを示す。全細胞型が、KIR2DS2発現がほとんどない～全くないことを示した。図20Bは、KIR2DS5の発現プロファイルを示す。キラー免疫グロブリン受容体（KIR）は、NK細胞およびT細胞サブセットにおいて発現されることが公知である。NK細胞の2種のブランチにおいて、KIR2DS5の高発現が観察され、NK細胞の1種のブランチにおいて、KIR2DS5の中等度発現から低発現が観察された。CD8+T細胞の2種のブランチにおいて、KIR2DS5の中等度発現から高発現が観察された。他の全細胞型において、KIR2DS5の低発現から発現なしが観察された。OSBP L5およびIGFBP7は、NK細胞において高度に発現されることが公知である。図20Cは、OSBP L5の発現プロファイルを示す。NK細胞の1種のブランチにおいて、OSBP L5が高度に発現された。B細胞のブランチにおいて、OSBP L5の中等度発現から低発現が観察された。他の全細胞型において、OSBP L5の低発現から発現なしが観察された。図20Dは、IGFBP7の発現プロファイルを示す。NK細胞の2種のブランチおよび単球の1種のブランチにおいて、IGFBP7の高発現が観察された。B細胞の1種のブランチにおいて、IGFBP7の中等度発現が観察された。他の全細胞型において、IGFBP7の低発現から発現なしが観察された。

40

50

## 【0467】

図22A～図22Eは、B細胞特異的マーカーの分析を示す。図22Fは、図16に描写される細胞クラスターを示す。図22Aは、IGHM CH4の発現プロファイルを示す。IGHM CH4は、B細胞の1種のブランチにおいて高度に発現され、B細胞の第2のブランチにおいて中等度に発現された。他の全細胞型において、IGHM CH4の低発現から発現なしが観察された。図22Bは、PAX5の発現プロファイルを示す。PAX5は、B細胞の1種のブランチにおいて高度に発現された。他の全細胞型において、PAX5の低発現から発現なしが観察された。図22Cは、CD20の発現プロファイルを示す。CD20は、B細胞の1種のブランチにおいて高度に発現された。他の全細胞型において、CD20の低発現から発現なしが観察された。図22Dは、TCL1Aの発現プロファイルを示す。他の全細胞型において、TCL1Aの低発現から発現なしが観察された。図22Eは、IGHD CH2の発現プロファイルを示す。IGHD CH2は、B細胞の1種のブランチにおいて高度に発現された。他の全細胞型において、IGHD CH2の低発現から発現なしが観察された。

10

## 【0468】

図23A～図23Fは、Toll様受容体の分析を示す。Toll様受容体は、単球および一部のB細胞によって主に発現される。図23Gは、図16に描写される細胞クラスターを示す。図23Aは、TLR1の発現プロファイルを示す。単球の1種のブランチは、TLR1の高発現を示し、単球の2種のブランチは、TLR1の中等度発現を示した。他の全細胞型において、TLR1の低発現から発現なしが観察された。図23Bは、TLR4の発現プロファイルを示す。単球の1種のブランチは、TLR4の高発現を示した。単球の2種のブランチおよびNK細胞の1種のブランチにおいて、中等度TLR4発現が観察された。他の全細胞型において、TLR4の低発現から発現なしが観察された。図23Cは、TLR7の発現プロファイルを示す。単球の1種のブランチにおいて、TLR7の高発現が観察され、NK細胞の1種のブランチにおいて、TLR7の中等度発現が観察された。他の全細胞型において、TLR7の低発現から発現なしが観察された。図23Dは、TLR2の発現プロファイルを示す。B細胞の1種のブランチにおいて、TLR2の高発現が観察された。他の全細胞型において、TLR2の低発現から発現なしが観察された。図23Eは、TLR3の発現プロファイルを示す。B細胞の1種のブランチにおいて、TLR3の高発現が観察された。他の全細胞型において、TLR3の低発現から発現なしが観察された。図23Fは、TLR8の発現プロファイルを示す。単球の3種のブランチにおいて、TLR8の高発現が観察された。単球の2種のブランチおよびNK細胞の1種のブランチにおいて、TLR8の中等度発現から低発現が観察された。他の全細胞型において、TLR8の低発現から発現なしが観察された。

20

30

## 【0469】

これらの結果は、大規模並列単一細胞配列決定が、PMBCにおいて主要細胞型を成功裏に同定することができることを実証する。配列決定結果は、細胞型を同定するためにFACにおいて使用される一部の細胞マーカーが、高いmRNA発現を為さない（例えば、NK細胞に対するCD56、B細胞に対するCD19）ことも決定した。加えて、遺伝子パネルにおける遺伝子の多くは、複数の細胞型にわたって発現された。このような発現プロファイルを使用して、主要細胞型（例えば、活性化された細胞 対 休止した細胞等）内に細胞をサブタイプ決定する(subtype)ことができる。

40

## 【0470】

実施例11：集団における稀な細胞の同定

本実験では、大規模並列単一細胞配列決定を使用して、がんおよび非がん細胞の混合物からがん細胞を同定する。Ramós（パーキットリンパ腫）細胞を、健康な個体から単離されたCD19+B細胞の集団にスパイクした。混合集団におけるRamós細胞の濃度は、約4～5%であった。およそ7000個の正常B細胞および300個のRamós細胞を、25, 200個のウェルを有するマイクロウェルアレイに沈着させた。よって、マイクロウェルアレイにおける大部分のウェルは、細胞を含有せず、細胞におけるいくつ

50

かのウェルは、1個の細胞のみを含有した。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズをマイクロウェルアレイにアプライした。各オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズは、ビーズに付着させたおよそ10億種のオリゴヌクレオチドを含有した。ビーズに付着させた各オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサル配列、3部構成細胞性標識（例えば、2個のリンカーによって接続された3個の細胞標識セクション）、分子標識およびオリゴdTを含有した。各ビーズは、3個の細胞標識セクションの特有の組合せの結果である、特有の3部構成細胞性標識を含有した。単一のビーズにおける全オリゴヌクレオチドは、同じ3部構成細胞性標識を含有した。異なるビーズ由来のオリゴヌクレオチドは、異なる3部構成細胞性標識を含有した。各ウェルは、1個またはそれより少ないオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズを含有した。細胞溶解試薬をマイクロウェルアレイにアプライし、細胞の溶解をもたらした。細胞由来のポリアデニル化分子（例えば、mRNA）は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ由来のオリゴヌクレオチドのオリゴdT配列にハイブリダイズした。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ由来のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたポリアデニル化分子を、42℃で90分間ローターにおいてSuperScript IIにより逆転写した。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ由来のオリゴヌクレオチドは、第1の鎖cDNA合成のためのプライマーとして機能した。superScript IIが、末端に達すると、cDNAの3'末端にSMARTオリゴ配列の相補体を付加できるように、cDNA合成にSMARTオリゴを取り込んだ。cDNA合成反応は、伸長されていないオリゴヌクレオチド（例えば、細胞由来のポリアデニル化分子に付着させていないオリゴヌクレオチド）および伸長されたオリゴヌクレオチド（例えば、ポリアデニル化分子に付着させ、かつポリアデニル化分子/cDNAハイブリッドを含むオリゴヌクレオチド）がコンジュゲートしたビーズを生成する。

#### 【0471】

ビーズを組み合わせ、ポリアデニル化分子/cDNAハイブリッドを含むオリゴヌクレオチドを増幅した。マルチプレックスPCRを行って、ビーズにおけるcDNA由来の111種の遺伝子のパネルを増幅した。111種の遺伝子は、B細胞の異なるサブセットのマーカを表す。マルチプレックス化PCRのためのプライマーは、mRNAの3'末端由来のおよそ500塩基対を設置するように設計された第1の遺伝子特異的プライマーと、mRNAの3'末端由来のおよそ300塩基対を設置するように設計されたネステッド遺伝子特異的プライマーとを含んだ。マルチプレックスPCRのためのプライマーを、パネルにおけるプライマーの最後の6塩基において有意な相補性を必要としないように設計した。マルチプレックスPCRプライマーにおいて相補性が検出された場合、プライマーを手動で置き換えた。マルチプレックスPCR反応は、次のステップを含んだ：1) 15サイクルの第1の遺伝子特異的PCR（KAPAマルチプレックスミックス、50nMの各プライマー — 第1の遺伝子特異的プライマーおよびオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズのユニバーサル配列に相補的なユニバーサルプライマー）、Ampureクリーンアップ（0.7×ビーズ対鑄型比）、15サイクルのネステッド遺伝子特異的PCR（KAPAマルチプレックスミックス、50nMの各プライマー — ネステッド遺伝子特異的プライマーおよびオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズのユニバーサル配列に相補的なユニバーサルプライマー）、Ampureクリーンアップ（0.7×ビーズ対鑄型比）、全長Illuminaアダプター（KAPA HiFi Ready Mix）を加えるための8サイクルの最終PCR、およびAmpureクリーンアップ（1×ビーズ対鑄型比）。

#### 【0472】

増幅された産物を配列決定した。Bowtie2を使用して、150bpを含む配列リードを111種の遺伝子（表17）のmRNA配列全体に対し整列させた。配列整列の結果（表14を参照）は、マルチプレックスPCR反応が、高度に特異的な産物をもたらしたことを実証する。図24は、遺伝子対リードの数のlog10のグラフを描写する。111種の遺伝子のうち24種は存在しなかった。この遺伝子のうち少なくとも2種で

ある、V D J 組換えに関与し、プレ B 細胞のみに存在するべき R A G 1 および R A G 2 は、存在するはずはない。非存在遺伝子のうちいくつかは、凍結細胞においてごく稀に保存されるプラズマ細胞に特異的である。

【 0 4 7 3 】

【表 1 4 - 1 】

| 表 17. |          |        |       |       |         |        |        |
|-------|----------|--------|-------|-------|---------|--------|--------|
| CD19  | AURKB    | FOXP1  | CCND3 | TLR1  | FOXP3   | CXCL12 | GNAI2  |
| CD27  | CD81     | MCL1   | IL12A | TLR2  | LAG3    | CCL3   | RGS1   |
| CD138 | CD80     | IFNB1  | IFNG  | TLR3  | CD73    | CCL14  | CD5    |
| CD38  | CD23a    | BLNK   | TNFA  | TLR4  | CD70    | CCL20  | CD22   |
| CD24  | CD44     | CD40LG | IL2   | TLR5  | CCR7    | CCL18  | PIK3CD |
| CD10  | LEF1     | IGBP1  | IL4   | TLR6  | CD45RA  | TCL1A  | DOCK8  |
| CD95  | CXCR5    | IRF4   | IL6   | TLR7  | PDCD1   | TACI   | CD11b  |
| CD21  | PRKCB    | CD79a  | BAFF  | TLR8  | MYC     | AICDA  | FCGR2B |
| CXCR3 | PRKCD    | LTA    | IGHE  | TLR9  | CD25    | FCRL4  | CD72   |
| CD40  | CD20     | HDAC5  | IGHD  | TLR10 | FCAMR   | BCL2   | BCL11B |
| CD69  | CD30     | RAG1   | IGHM  | GAPDH | CCND2   | FASLG  | CD86   |
| CD1c  | CD30L    | RAG2   | IGHA  | CD9   | MKI67   | BCL6   | TBX21  |
| IL10  | BAFFR    | CD1d   | IGHG1 | CD11c | IL21R   | IGHG2  | PRDM1  |
| IL4R  | CMRF-35H | TGFB1  | IGHG4 | IL6R  | HLA-DRA | IGHG3  |        |

10

20

【 0 4 7 4 】

【表 1 4 - 2 】

| 表 14             |         |
|------------------|---------|
| 合計               | 5711013 |
| 0 回整列            | 504775  |
| 正確に 1 回整列        | 5203308 |
| 1 回より多く整列        | 2930    |
| 正確に 1 回整列されたものの% | 91.6%   |

30

【 0 4 7 5 】

表 1 5 は、全体的配列決定統計の結果を示す。リード 1 に関して、総リード 1 マッチ判断基準は、3 部構成細胞性標識（例えば、細胞バーコード）への完全なマッチと、リンカーへの最大でも 1 個のミスマッチを要求した。

【 0 4 7 6 】

【表 1 5】

| 表 15                   |         |
|------------------------|---------|
| リード総数                  | 5711013 |
| 総リード 1 マッチ判断基準         | 3795915 |
| リード 2 も整列              | 3495392 |
| %リード 2 整列              | 92%     |
| 特有の細胞 bc の数            | 40764   |
| 特有の bc1 種当たりのリード計数>100 | 3313    |
| 特有の bc1 種当たりのリード計数>50  | 4154    |
| %有用なリード                | 61%     |

40

50

## 【0477】

図25A～図25Dは、2種の遺伝子に関する、分子バーコード 対 リードの数またはリードの数のlog10のグラフを示す。図25Aは、CD79に関する分子バーコード（存在量によって選別） 対 リードの数のグラフを示す。図25Bは、CD79に関する分子バーコード（存在量によって選別） 対 リードの数のlog10のグラフを示す。図25Cは、GAPDHに関する分子バーコード（存在量によって選別） 対 リードの数のグラフを示す。図25Dは、GAPDHに関する分子バーコード（存在量によって選別） 対 リードの数のlog10のグラフを示す。

## 【0478】

分析のために856個の細胞を保持した。図26Aは、細胞バーコード1種当たりの発現されるパネルにおける遺伝子の数 対 特有の細胞バーコードの数／単一細胞のグラフを示す。図26Bは、ビーズ1個当たりの検出される特有の分子の数 対 所定の数の分子を保有する特有の細胞バーコード1種当たりの細胞の数の頻度のヒストグラムを示す。細胞の小サブセットは、明確に異なってより多数のmRNA分子および111遺伝子パネルから発現される遺伝子の数（図26A～図26Bの丸く囲まれたセクションを参照）を示した。図26Cは、ビーズ1個当たりの検出される特有のGAPDH分子の数 対 細胞の数の頻度／所定の数の分子を保有する特有の細胞バーコードのヒストグラムを示す。

## 【0479】

主成分分析（PCA）を使用して、細胞の散布図を作成した。図27は、856個の細胞の散布図を示す。PCAは、細胞の大部分とは異なる遺伝子発現パターンを有する細胞の小サブセットを同定した。細胞のサブセットは、18個の細胞を含有し、これは、分析した全細胞のおよそ2%である。このパーセンテージは、集団にスパイクされたRamos細胞のパーセンテージと同様である。

## 【0480】

Ramos細胞は、濾胞性B細胞に由来し、B細胞分化マーカー、CD20、CD22、CD19、CD10およびBCL6を強く発現する。Ramos細胞は、IgMも発現し、c-mycを過剰発現する。図28は、上位100種（検出された分子の総数の観点から）の発現のヒートマップを示す。さらにより高レベルのmRNAを発現する細胞のサブセット（18個の細胞）も、Ramos細胞の公知マーカーである遺伝子（例えば、CD10、Bcl-6、CD22、C-mycおよびIgM）を強く発現する。

## 【0481】

これらの結果は、大規模並列単一細胞配列決定が、細胞懸濁液における異常細胞型の小サブセット（2%の少なさ）を成功裏に同定したことを実証する。大規模並列単一細胞配列決定は、がん診断（例えば、生検材料／循環腫瘍細胞）において使用することができる。がん細胞は、サイズがより大きく、より多くのmRNAを保有するため、正常細胞から容易に区別することができる。

## 【0482】

実施例12：RESOLVEを使用したgDNA標的の大規模並列単一細胞全ゲノムおよびマルチプレックス増幅

図29は、本実施例のワークフローを示す。図29に示す通り、細胞懸濁液をマイクロウェルアレイにアプライする（2901）。マイクロウェルアレイへの細胞懸濁液のアプライが、1個またはそれより少ない細胞を含有するマイクロウェルアレイにおけるウェルをもたらすことができるように、細胞懸濁液における細胞の数は、マイクロウェルアレイにおけるウェルの数に満たない。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ（2905）をマイクロウェルアレイにアプライする。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ（2905）は、5'アミン（2915）、ユニバーサルプライマー配列（2920）、細胞標識（2925）、分子標識（2930）およびランダムマー（2935）を含むオリゴヌクレオチドに付着させたビーズ（2910）を含有する。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズは、およそ10億種のオリゴヌクレオチドを含有する。オリゴヌクレオチドは、5'アミン、ユニバーサルプライマー配列、細胞標識、分子標識お

10

20

30

40

50

よびランダムマーを含有する。単一のビーズにおける各オリゴヌクレオチドは、同じ細胞標識を含有する。しかし、単一のビーズにおける2種またはそれを超えるオリゴヌクレオチドは、2種またはそれを超える異なる分子標識を含有することができる。ビーズは、同じ分子標識を含有するオリゴヌクレオチドの複数コピーを含有することができる。

#### 【0483】

オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズをマイクロウェルアレイに添加した後、細胞溶解バッファーをアレイ表面にアプライする。図29に示す通り、細胞由来のゲノムDNA(2945)は、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズ(2940)のランダムマー配列(2935)にハイブリダイズする。中和バッファーをアレイ表面に添加する。DNAポリメラーゼ(例えば、Phi29)およびdNTPをアレイ表面に添加する。ランダムマー配列(2935)は、ゲノムDNAの増幅のためのプライマーとして作用し、これにより、gDNAがコンジュゲートしたビーズ(2555)を生成する。gDNAがコンジュゲートしたビーズ(2955)は、5'アミン(2915)、ユニバーサルプライマー配列(2920)、細胞標識(2925)、分子標識(2925)、ランダムマー(2935)およびゲノムDNAのコピー(2955)を含むオリゴヌクレオチドを含有する。本来のゲノムDNA(2945)は、ランダムマー(2935)およびゲノムDNAのコピー(2955)にハイブリダイズされる。単一のビーズに関して、オリゴヌクレオチドに付着させた複数の異なるゲノムDNA分子が存在する。

#### 【0484】

図29に示す通り、ウェル由来のgDNAがコンジュゲートしたビーズ(2950)をエッペンドルフチューブ(2960)において組み合わせる。ランダムマー、dNTPおよびDNAポリメラーゼ(例えば、Phi29)を含有するgDNA MDAミックスにおけるゲノムDNAを、組み合わせられたgDNAがコンジュゲートしたビーズを含有するエッペンドルフチューブに添加する。標識されたゲノムDNAをさらに増幅して、溶液における標識されたアンプリコン(2965)を得る。標識されたアンプリコン(2965)は、ユニバーサルプライマー配列(2920)、細胞標識(2925)、分子標識(2930)、ランダムマー(2935)およびゲノムDNAのコピー(2955)を含む。標識されたアンプリコンを剪断して、およそ1kbまたはそれに満たないさらなる小片とする。あるいは、標識されたアンプリコンは、Tagmentation(Nextera)により断片化することができる。標識されたアンプリコンの剪断または断片化は、標識された断片(2980)および標識されていない断片(2985)をもたらす。標識された断片(2980)は、ユニバーサルプライマー配列(2920)、細胞標識(2925)、分子標識(2930)、ランダムマー(2935)およびゲノムDNAのコピーの断片(2955)を含有する。アダプター(2970、7975)を断片に付加する。ユニバーサルプライマー配列を使用して、ユニバーサルプライマー配列およびアダプター(2970、2975)の一方に対するプライマーを使用したハイブリダイゼーションプルダウンまたはPCRにより、標識された断片(2980)を選択することができる。

#### 【0485】

標識された断片を配列決定することができる。細胞標識、分子標識およびゲノム断片の配列を含む配列リードを使用して、細胞懸濁液から細胞集団を同定することができる。主成分分析を使用して、公知細胞マーカーに基づき細胞の散布図を作成することができる。それに代えてまたはそれに加えて、SPADEを使用して、細胞クラスタープロットを生成することができる。コンピュータソフトウェアプログラムを使用して、細胞標識ならびに細胞標識に関連する分子標識およびゲノム断片を含むリストを作成することができる。

#### 【0486】

実施例13：不均質集団における細胞を同定するための大規模並列配列決定

本実施例の実験ワークフローを図30に示す。図30に示す通り、細胞の混合集団をマイクロウェルアレイに確率論的に撒布した。本実施例では、細胞の混合集団は、Ramos細胞およびK562細胞の混合物を含む。アレイにおける各マイクロウェルが、1個またはそれより少ない細胞を含有するように、細胞懸濁液は、低濃度の細胞を含む。細胞を

マイクロウェルアレイにアプライした後に、複数のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズをマイクロウェルアレイに確率論的に撒布した。オリゴヌクレオチドビーズは、5'アミン、ユニバーサルプライマー配列、細胞標識、分子標識およびオリゴdTを含む複数のオリゴヌクレオチドを含有する。単一のビーズ由来の複数のオリゴヌクレオチドの細胞標識は同一である。単一のビーズは、同じ分子標識を含む複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。加えて、単一のビーズは、異なる分子標識を含む複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。第1のビーズにコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの細胞標識は、第2のビーズにコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドの細胞標識とは異なる。よって、細胞標識を使用して、2個またはそれを超えるオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズを区別することができる。細胞を溶解し、単一細胞由来のRNA分子を、同じウェルにおけるオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズに付着させた。図30は、オリゴヌクレオチドのオリゴdT配列へのRNAのポリA配列の付着を示す。同じウェルにおけるオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズへの個々の細胞由来のRNA分子の付着後に、単一の試料においてビーズを組み合わせた。単一の試料中のビーズにおいて、cDNA合成反応を行った。図30は、cDNA合成の産物が、オリゴヌクレオチドに付着させたビーズを含み、オリゴヌクレオチドが、5'アミン、ユニバーサルプライマー配列、細胞標識、分子標識、オリゴdTおよびRNA分子のコピーを含むことを示す。単純にするために、1種のオリゴヌクレオチドのみを図30に描写するが、本実施例では、各オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズは、およそ10億種のオリゴヌクレオチドを含む。図30に示す通り、ユニバーサルプライマー配列にハイブリダイズしたユニバーサルプライマーと、RNA分子のコピーにハイブリダイズした遺伝子特異的プライマーとを使用して、単一の試料におけるビーズにより、マルチプレックス化PCRを行った。表16に示す遺伝子パネル由来のRamos特異的遺伝子またはK562特異的遺伝子に結合するように、遺伝子特異的プライマーを設計した。対照として、マルチプレックス化PCR反応において、GAPDH遺伝子特異的プライマーも使用した。最後に、次世代配列決定を使用して、増幅された産物を配列決定した。配列決定リードは、細胞標識、分子標識および遺伝子に関係する情報を含んだ。主成分分析を使用して、細胞標識、分子標識および遺伝子に関係する配列決定情報に基づき細胞の散布図を構築した。FACが細胞の選別に使用され、表面マーカーに基づく散布図が細胞の群分けに使用される仕方に類似して、細胞標識を使用して単一細胞由来の遺伝子を同定し、分子標識を使用して遺伝子の量を決定する。次に、この組み合わせられた情報を使用して、個々の細胞の遺伝子発現プロファイルに関連付ける。図31Aに示す通り、細胞および分子標識による大規模並列単一細胞配列決定は、混合細胞集団における2種の細胞集団（K562およびRamos細胞）を成功裏に同定することができた。

【0487】

【表16】

| 表 16  |           |       |          |
|-------|-----------|-------|----------|
| 遺伝子   | 細胞        | 遺伝子   | 細胞       |
| CD74  | Ramos 特異的 | CD41  | K562 特異的 |
| CD79a | Ramos 特異的 | GYPA  | K562 特異的 |
| IGJ   | Ramos 特異的 | GATA2 | K562 特異的 |
| TCL1A | Ramos 特異的 | GATA1 | K562 特異的 |
| SEPT9 | Ramos 特異的 | HBG1  | K562 特異的 |
| CD27  | Ramos 特異的 | GAPDH | 共通       |

【0488】

#### 実施例 14：主成分分析による大規模並列単一細胞配列決定

本実施例では、個々の細胞由来の mRNA 分子を、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズで並行して確率論的に標識した。血液から PBMC を単離し、RPMI 1640 プラス FBS および DMSO において 80℃ で凍結した。PBMC を解凍し、PBS で 3 回洗浄した。細胞型の混合物（4000 個の総細胞）を含む PBMC 試料をアガロースマイクロウェルアレイに確率論的にアプライした。アガロースマイクロウェルアレイは、37, 500 個の細胞を含有した。150, 000 個のオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズの混合物を、マイクロウェルアレイを囲む PDMS ガスケットによりマイクロウェルアレイに確率論的にアプライした。オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズを図 1 に描写する。単純にするために、1 種のオリゴヌクレオチドのみをビーズに付着させるように示すが、オリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズは、およそ 10 億種のオリゴヌクレオチドを含有した。

10

#### 【0489】

マイクロウェルアレイを冷ブロックに 10 分間置き、アレイ表面に溶解バッファーをアプライすることにより、細胞を溶解した。ウェルにおける細胞が溶解したら、単一細胞由来の mRNA 分子を、オリゴ dT 配列を介してオリゴヌクレオチドがコンジュゲートしたビーズに付着させた。磁石をアレイに適用し、アレイを洗浄バッファーで 2 回洗浄した。

#### 【0490】

mRNA 分子を付着させたビーズを、エッペンドルフチューブにおいて組み合わせた。ビーズに付着させた mRNA 分子を逆転写して、cDNA を生成した。次の cDNA 合成混合物を次の通りに調製した：

20

#### 【0491】

#### 【表 17-1】

| 成分                  | 容積 (uL) |
|---------------------|---------|
| 水                   | 8       |
| dNTP (10mM)         | 2       |
| 5×第 1 鎖バッファー        | 4       |
| MgCl <sub>2</sub>   | 2.4     |
| SuperRase In        | 1       |
| SMART オリゴ<br>(50uM) | 0.4     |
| 0.1M DTT            | 1       |
| 100×BSA             | 0.2     |
| SSII                | 1       |
| 合計                  | 20      |

30

#### 【0492】

mRNA 分子を付着させたビーズを含有するエッペンドルフチューブに、cDNA 合成混合物を添加した。ローターにおいて 40℃ で 90 分間、エッペンドルフチューブをインキュベートした。cDNA 合成反応がビーズにおいて起こった。90 分後に、磁石をチューブに適用し、cDNA ミックスを除去し、次の ExoI 反応混合物に置き換えた：

40

#### 【0493】

#### 【表 17-2】

| 成分         | 容積 (uL) |
|------------|---------|
| ExoI バッファー | 2       |
| 水          | 17      |
| ExoI       | 1       |

#### 【0494】

50

ローターにおいて 37℃ で 30 分間、チューブをインキュベートした。次に、チューブを 15 分間 80℃ のサーマルサイクラーに移した。チューブを 80℃ で 15 分間インキュベートした後に、70 マイクロリットルの TE+Tween 20 をチューブに添加した。磁石をチューブに適用し、バッファーを除去した。次に、ビーズを 50 マイクロリットルの TE+Tween 20 に再懸濁した。

#### 【0495】

次の増幅混合物を使用したリアルタイム PCR により、ビーズに付着させた cDNA を増幅した：

#### 【0496】

#### 【表 17-3】

10

| 成分                | 容積 (uL) |
|-------------------|---------|
| 2×iTaQ ミックス       | 10      |
| GAPDH ILMN (10uM) | 0.6     |
| ILR2 (10uM)       | 0.6     |
| ビーズ               | 2       |
| 水                 | 6.8     |
| 合計                | 20      |

#### 【0497】

標識された cDNA アンプリコンを配列決定して、細胞標識、分子指標および遺伝子を検出した。配列決定リードを、細胞標識、次に遺伝子、最後に分子標識に対して整理した。4 種もしくはそれを超える遺伝子に関連する細胞標識または 10 種もしくはそれを超える特有の転写物分子（各特有の転写物分子は 2 回以上配列決定された）に関連する細胞標識を、細胞に指定した。検出された表 9 の全遺伝子による主成分分析を使用して、データにおける変動に対し最大の寄与を有した遺伝子のセットを同定した。主成分分析において 632 個の単一細胞を使用した。配列決定結果に基づき、98 種の遺伝子のうち 81 種を検出した。

20

#### 【0498】

図 32 は、GAPDH 発現の主成分分析プロットを示す。図 32 に示す通り、主成分空間の位置に基づき、2 個の細胞クラスターが観察された。

30

#### 【0499】

図 33A～図 33F は、単球関連遺伝子の主成分分析（PCA）を示す。図 33A は、CD16 の PCA を示す。図 33B は、CCR4 の PCA を示す。図 33C は、CD14 の PCA を示す。図 33D は、S100A12 の PCA を示す。図 33E は、CD209 の PCA を示す。図 33F は、IFNGR1 の PCA を示す。

#### 【0500】

図 34A～図 34B は、汎 T 細胞マーカー（CD3）の主成分分析（PCA）を示す。図 34A は、CD3D の PCA を示し、図 34B は、CD3E の PCA を示す。

#### 【0501】

図 35A～図 35E は、CD8 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（PCA）を示す。図 35A は、CD8A の PCA を示す。図 35B は、EOMES の PCA を示す。図 35C は、CD8B の PCA を示す。図 35D は、PRF1 の PCA を示す。図 35E は、RUNX3 の PCA を示す。

40

#### 【0502】

図 36A～図 36C は、CD4 T 細胞関連遺伝子の主成分分析（PCA）を示す。図 36A は、CD4 の PCA を示す。図 36B は、CCR7 の PCA を示す。図 36C は、CD62L の PCA を示す。

#### 【0503】

図 37A～図 37F は、B 細胞関連遺伝子的主成分分析（PCA）を示す。図 37A は、CD20 の PCA を示す。図 37B は、IGHD の PCA を示す。図 37C は、PAX

50

5のPCAを示す。図37Dは、TCL1AのPCAを示す。図37Eは、IGHMのPCAを示す。図37Fは、CD24のPCAを示す。

#### 【0504】

図38A～図38Cは、ナチュラルキラー細胞関連遺伝子の主成分分析（PCA）を示す。図38Aは、KIR2DS5のPCAを示す。図38Bは、CD16のPCAを示す。図38Cは、CD62LのPCAを示す。

#### 【0505】

主成分分析に基づき、単球およびリンパ球は、PC1において2個の明確に異なるクラスターを形成した。B、TおよびNK細胞は、PC2に沿ったクラスターにおける連続体として存在した別のクラスターを形成した。図39は、細胞型および細胞サブタイプのアノテーション付きの、GAPDH発現のPCA分析を示す。図40は、細胞間の遺伝子発現プロファイルにおける相関を示すヒートマップを描写する。左上隅から始まる対角線に沿って、細胞は、単球、ナイーブCD4 T細胞、ナイーブCD8 T細胞、細胞傷害性CD8 T細胞、NK細胞およびB細胞である。図41は、遺伝子発現および細胞型の間の相関を実証するヒートマップの別バージョンを示す。図42は、遺伝子間の遺伝子発現プロファイルにおける相関を実証するヒートマップを示す。

#### 【0506】

実施例15：デジタル遺伝子発現サイトメトリーによる細胞不均質性の解明

次世代配列決定を単一細胞の確率論的バーコード化と組み合わせる、遺伝子発現サイトメトリーのためのアプローチを提示する。およそ150,000個のマイクロウェルのアレイに、数千個の細胞をランダムに沈着させた。特有の細胞バーコードを有するビーズに並んで各細胞が分配されるように、細胞および転写物バーコード化捕捉プローブを有するビーズのライブラリーを添加する。細胞溶解後に、mRNAをビーズにハイブリダイズさせ、逆転写、増幅および配列決定のためにプールした。バーコード化された転写物を計数し、起源の細胞に割り当てる場合、細胞毎のデジタル遺伝子発現プロファイルを再構築した。本発明者らは、細胞亜集団へとヒト造血系を精査し、*in vitro*刺激に対する免疫細胞の不均質性応答を特徴付けるための技術を適用した。さらに、正常細胞の高バックグラウンドにおける抗原特異的T細胞および腫瘍細胞等、稀な細胞の検出により、方法の高感度を実証した。

#### 【0507】

導入

細胞の大規模収集物における細胞の多様性および機能の理解は、個々の細胞によって発現される特異的遺伝子またはタンパク質の測定を必要とする。フローサイトメトリーは、単一細胞のタンパク質発現を測定するために十分に確立されているが、mRNA発現測定は、典型的には、バルク試料において実行され、個々の細胞の寄与は不明瞭である。マイクロタイタープレートまたは市販のマイクロ流体チップを使用した単一細胞mRNA発現測定が近年報告されたが（1～5）、これらのアプローチは、極めてロースループットであり、拡大縮小が困難である。これらの限界により、現在までの大部分の試験は、調べられる細胞の数および探索される条件の数の両方において制限されている。

#### 【0508】

そこで、本発明者らは、任意数の遺伝子にわたる数千個の単一細胞の慣用的なデジタル遺伝子発現プロファイリングを可能にする、高度に拡大縮小が可能（scalable）なアプローチを開発した。マイクロスケールエンジニアリングおよびコンビナトリアル化学を使用して、大規模並列様式において特有の細胞バーコードで細胞における全mRNA分子を標識した。加えて、細胞内の各転写物コピーを分子バーコードでタグ付けし、絶対的デジタル遺伝子発現測定を可能にした（6）。全細胞由来のタグ付けされたmRNA分子をプールし、増幅し、配列決定した。各配列における細胞および分子バーコードを使用して、各細胞のデジタル遺伝子発現プロファイルを再構築した。この高度に拡大縮小が可能な技術は、本発明者らがCytoseqと呼ぶ遺伝子発現サイトメトリーを可能にする。本発明者らは、この技法を造血系のマルチパラメータ遺伝的分類に適用し、細胞不均質

性を試験し、集団における稀な細胞を検出するためのその使用を実証した。

#### 【0509】

結果

#### Cyt o Seq

図43Aに手順の概要を述べた。まず細胞懸濁液を、最大150,000個のマイクロウェルを有する微細加工された表面にロードした。各30ミクロン直径マイクロウェルは、ほぼ20ピコリットルの容積を有する。10個またはそれを超えるウェルのうちほぼ1個のみが、細胞を受け入れることができるように、細胞の数を調整した。細胞は重力によりウェル内に沈降した。

#### 【0510】

ウェル内の各細胞の部分的に頂部に、またはそれに隣接してビーズが位置するように、磁性ビーズを飽和するまでマイクロウェルアレイにロードした。各マイクロウェルが、1個のビーズのみを保持することができるように、ビーズの寸法を選んだ。各磁性ビーズは、図43Bに概要を述べる構造を有するおよそ十億個のオリゴヌクレオチド鋳型を保有した。各オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライミング部位と、続く細胞標識、分子標識およびオリゴ(dT)の捕捉配列を呈した。各ビーズにおける全オリゴヌクレオチドは、同じ細胞標識を有するが、多様な分子標識を含有する。本発明者らは、百万近くの多様性を有するビーズを合成するためのコンビナトリアル分割プール方法を考案した。ウェルのほぼ10%のみが単一細胞に占有されたため、同じ細胞標識によりタグ付けされた2個の単一細胞を有する確率は低かった(およそ $10^{-4}$ )。同様に、単一のビーズにおける分子標識の多様性は、およそ $10^4$ であり、同じ分子標識によりタグ付けされた同じ細胞における同じ遺伝子の2種の転写物分子の可能性も低かった。

#### 【0511】

マイクロウェルアレイの表面に溶解バッファーをアプライし、マイクロウェルへと拡散させる。細胞から放出されたポリ(dA)テイル付きmRNA分子は、ビーズにおけるオリゴヌクレオチドの3'末端におけるオリゴ(dT)にハイブリダイズする。細胞はビーズに隣接したため、溶解バッファーの高塩条件下および高い局所的濃度のmRNA(数十ナノモル濃度)において、mRNA分子はビーズに捕捉された。

#### 【0512】

溶解およびハイブリダイゼーション後に、磁石を使用して、マイクロウェルアレイからチューブへと全ビーズを収集した。これ以降、全反応を単一チューブ内で行った。従来のプロトコル(方法)を使用して、ビーズにおいてcDNA合成を行った。各細胞に由来するcDNA分子を、5'末端において細胞標識および分子標識でそれぞれタグ付けされたその相当するビーズに共有結合により付着させた。ネステッドマルチプレックスPCRを行って、目的の遺伝子を増幅した(図55)。各細胞由来のmRNAは、ビーズにおいてcDNAとしてコピーされているため、ビーズは、例えば、遺伝子の異なるセットのために、反復的に増幅および分析することができる。

#### 【0513】

アンプリコンの配列決定は、細胞標識、分子標識および遺伝子同一性を明らかにした(図55)。コンピューターによる分析は、細胞標識に基づきリードを群分けし、同じ分子標識および遺伝子配列を有するリードを単一のエントリーにまとめて(collapse)、あらゆる増幅バイアスを抑制した。分子標識の使用により、細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの分子の絶対数の測定が可能になり、したがって、異なる深さの配列決定を行うことができる生物学的試料にわたる細胞発現レベルの直接的比較が可能になった。

#### 【0514】

制御された細胞混合物における明確に異なる細胞型の同定

2種の細胞型を分ける方法の能力を測定するために、K562およびRamos細胞のほぼ1:1混合物を、10,000個のウェルを有するマイクロウェルアレイにロードした。およそ6000個の細胞を使用して、ほぼ1000個の細胞を捕捉した。12種の遺伝子のパネルを選択し、ビーズから増幅した。パネルは、K562(骨髄性白血病)細胞

に特異的な5種の遺伝子、R a m o s（濾胞性リンパ腫）細胞に特異的な6種の遺伝子およびハウスキーピング遺伝子G A P D H（表18）からなる。それぞれ単一のビーズを有する10,000ウェルアレイに捕捉されたおよそ1000個の細胞により、ビーズの10%のみが、m R N Aを保有する筈であり、理論上は、配列決定データにおいて最大で1000種の特有の細胞標識のみが観察される筈である。実際、本発明者らは、データフィルタリング（判断基準のフィルタリングのための方法を参照）後に、有意な数のリードに関連した768種の細胞標識を見出した。比較として、同様の数の細胞およびビーズを有する微量遠心分離チューブにおいてバルク細胞溶解およびm R N A捕捉を行ったところ、多数の細胞標識が観察され、大部分は1種のみのものであるが、各細胞標識に関連した。この結果は、同じウェルにおけるビーズへの単一細胞由来のm R N Aのハイブリダイゼーションの限局化において、マイクロウェルアレイが有効であったことを実証する。

10

## 【0515】

主成分分析（PCA）を使用して、768個の単一細胞のそれぞれの遺伝子発現プロファイルをクラスター化した（図31A）。第1の主成分（PC）は、単一細胞を細胞型に基づき2個の主要クラスターに明らかに分けた。第1の主成分のポジティブ面に寄与する遺伝子は、R a m o sに特異的な遺伝子であった一方、同じ主成分のネガティブ面に寄与する遺伝子は、K 5 6 2に特異的な遺伝子であった。その特異的発現に基づく細胞から群へのこのようなクラスタリングの成功は、ウェル間汚染が、あるとしても無視できることを示した。第2の主成分は、以前に観察された（7）K 5 6 2細胞内の胎児ヘモグロビン（H B G 1）における高度の変動性を強調した。

20

## 【0516】

## 【表18】

| 表 18   |                          |                                                |
|--------|--------------------------|------------------------------------------------|
| 遺伝子    | 外側プライマー                  | 共通 5'隣接配列を有するネステッドプライマー                        |
| CD41   | CCCCTGGAAGAAGATGATG A    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCTCCAACAAGTTGC CTCC    |
| GYPD   | GAGGAAATGAAGCCAAACA CA   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAATCGTGACCTTAAAG GCCC    |
| GATA 1 | TTAGCCACCTCATGCCTTTC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTACTGTGGTGGCTCC GCT     |
| GATA 2 | GGAGGAGGATTGTGCTGAT G    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTCCGCATAAGAA AAAGAATC |
| HBG1   | GCAAGAAGGTGCTGACTTC C    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGCATGTGGATCCTG AGAA    |
| CD27   | CTGCAGTCCCATCCTCTTGT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATGAGGTGGAGAGT GGGAA    |
| IGJ    | GGACATAACAGACTTGGA A GCA | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAATCCATTTTGTAACTGAACCTT |
| TCL1A  | AAGCCTCTGGGTCAGTGGT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGAAAAAGGGATAGA GGTTGG   |
| CD74   | TAGACAGATCCCCGTTCTG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAGGGAGAAGGGAT AACCC    |
| SEPT9  | CAGCATCCCAGCCTTGAG       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTCAATGGCCTTTTG CTAC    |
| CD79a  | CCTCTAAACTGCCCCACCTC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTAATCGCTGCCTC TAGG    |
| GAPD H | CACATGGCCUCCAAGGAGU AA   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAAGAGCACAAG AGGAA    |

30

40

## 【0517】

別の実験では、本発明者らは、健康な個体由来の初代B細胞に、数パーセンテージのR a m o s（パーキットリンパ腫）細胞をスパイクした。B細胞の異なる状況を表すように、111種の遺伝子のパネル（表22）を設計した。1198個の単一細胞を分析した。18個の単一細胞（集団のほぼ1.5%）を構成する集団の小群は、残りと比較して、明確に異なる遺伝子発現パターンを有することが判明した（図31B）。この群によって優先的に発現された遺伝子は、M Y CおよびI g M等、パーキットリンパ腫に関連すること

50

が公知であると共に、バーキットリンパ腫が起源をもつB細胞のサブセットである濾胞性B細胞によって特異的に発現されるB細胞分化マーカー（CD10、CD20、CD22、BCL6）である（図31Cおよび図31D）。加えて、この細胞群は、分子指標の分析に基づき検出される特有のmRNA分子の総数によって決定される通り、より高レベルのCCND3およびGAPDHならびに全体的により高いmRNA含量を保有した（図31B）。この知見は、リンパ腫細胞が、正常個体における初代B細胞よりも物理的に大きく、急速に増殖しより多量の転写物を生成するという事実と一致した。

#### 【0518】

ヒトPBMCにおける複数の細胞型の同時同定

制御された実験は、細胞の2種の明確に異なる型の人為的な混合物を含んだが、大部分の天然に存在する生物学的試料は、遺伝子発現プロファイルにより軽微な差を有する、多数の細胞型および状況を有する多様な集団を含有する。顕著な例は血液である。本発明者らは、主要細胞型のそれぞれに特異的である98種の遺伝子のパネル（表19）の発現プロファイルを測定することにより、単球、NK細胞ならびに異なるTおよびB細胞サブセットを含む、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）におけるあらゆる主要細胞型を同時に同定することを目標とする実験を行った。大部分は表面タンパク質マーカーに限定される伝統的な免疫表現型決定とは異なり、本発明者らは、表面タンパク質に加えて、サイトカイン、転写因子および様々な細胞機能の細胞内タンパク質をコードする遺伝子を含めた。本発明者らは、PCAにより、存在する81種の遺伝子を使用した632個の単一PBMCのデジタル遺伝子発現プロファイルを分析した（図32～図39）。第1の主成分は、一方のクラスターにおけるCD16a、CD14、S100A12およびCCR2ならびに他方におけるリンパ球関連遺伝子の発現によって証明される通り、単球およびリンパ球を2個の直交性クラスターへと明らかに分けた。リンパ球の異なるサブタイプは、第2の主成分に沿った連続体に位置し、B細胞（IgM、IgD、TCL1A、CD20、CD24、PAX5を発現）は一末端に、ナイーブT細胞（CD4、CCR7、CD62Lを発現）は中央に、細胞傷害性T細胞（CD8A、CD8B、EOMES、PRF1を発現）は他の一末端に位置する。キラー様免疫グロブリン受容体、CD16aおよびパーフォリン（PRF1）を発現するナチュラルキラー細胞は、単球および細胞傷害性T細胞の間の空間に位置する。本発明者らは、細胞代謝の指標であるGAPDHが、単球において最高レベルで、恐らく大部分は休止したB細胞において最低で発現されたことも観察した。細胞にわたる遺伝子発現プロファイルの相関分析は、PCAによる観察を反復し、各主要細胞型内における追加的なより小さい細胞サブセットを明らかにした（図40A～図40B）。731個の細胞を含む同じPBMC試料の再現実験は、大部分は同様の分離および細胞型頻度を生じた（図41）。

#### 【0519】

10

20

30

【表 19-1】

| 表 22     |                         |                                              |
|----------|-------------------------|----------------------------------------------|
| 遺伝子      | 外側プライマー                 | 共通 5'隣接配列を有するネステッドプライマー                      |
| CD19     | GCAGGGTCCAGTCTCTATG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAATCATGAGGAAGATGCA   |
| CD27     | TCCAGGAGGATTACCGAAAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATCCAAGGGAGAGTGAGA   |
| CD138    | AATGGCAAAGGAAGGTGGAT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGACACCTTGGACATCCT   |
| CD38     | AGATCTGAGCCAGTCGCTGT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGCAGAGCTGAAGATTTT  |
| CD24     | AAAAGTGGGCTTGATTCTGC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTTCGCATGGTCACAC    |
| CD10     | ATATTCTTTGGGCCTCTGC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGTTTGGGTCTGTGCTG   |
| CD95     | CCCCGAAAAATGTTCAATAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTCTTTGTCATACCCCCA    |
| CD21     | TAGCTTCTCTCTGGTGGT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGCCTTTCCATAATCACTCA |
| CXCR3    | CTGGCTCTCCCCAATATCCT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCTGAGGACTGCACCATT   |
| CD40     | GTGGTGTGGGGTATGGTTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATACACAGATGCCCATTTGCA  |
| CD69     | AGACAGGTCTTTTCGATGG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCAATATGTGATGTGGC   |
| CD1c     | TTGAGACAGGCACATACAGCTT  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCTTCTCAATCTGTCCA    |
| IL10     | CCCCAACCATTTCATTCTTG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAATTCTCTGGGAATGTT   |
| IL4R     | TGCCTAGAGGTGCTCATTCA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTGATGCTGGAGGCAGAAT   |
| IL21R    | AGCCTGGGTACAGATCAAG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTAGGAGGGTGGATGGAG   |
| IL6R     | CCAGCACCAGGGAGTTTCTA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAAAGGATTGGAACAGCA   |
| CXCL12   | GGGTTTCAGGTTCCAATCAG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTAACTTTTGTCAAGGCA  |
| CCL3     | GTGAGGAGTGGGTCCAGAAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTGGGGAGGAGCAGGAG     |
| CCL14    | CCATTCCCTTCTTCTCTCTC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCTACAAGATCCCGCGTC   |
| CCL20    | TTGGACATAGCCCCAAGAACA   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCCTCACTGGACTTGTG   |
| CCL18    | ACCTGAAGCTGAATGCCTGA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGAGGCCACTCTTCTAA    |
| TCL1A    | GGTAAACACGCCTGCAAAAC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGACTCAGAAGCCTCTGG   |
| TACI     | CAACAAAGCACAGTGTAAATGAA | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTCAGCTACTGCGGAAA   |
| AICDA    | TGAGCAGATCCACAGGAAAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAATGGAGTCTCAAAGCTTCA |
| FCRL4    | TCCCAACTACGCTGATTTGA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACCAAAAGGAATGTGTGGG   |
| BCL2     | TGCAAGAGTGACAGTGGATTG   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAACCAAGGTTTGTCTTTGT  |
| FASLG    | AGAGGCTGAAAAGAGGCCAAT   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAATATGGGTTGCATTGGTCA   |
| BCL6     | AAATCTGCAGAAGGAAAAATGTG | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTTTTCAATGATGGGCGAG   |
| AURKB    | GCTCAAGGGAGAGCTGAAGA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACCTGCCCCCAGAGAT   |
| CD81     | GTGGCGTGTATGAGTGGAGA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTCGCCCAGAGACTCAG    |
| CD80     | GCACATCTCATGGCAGCTAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTTCACAAACCTTGCTCCT   |
| CD23a    | ACATTTTCTGCCACCCAAAC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACAGCACCCCTCTCCAGATG  |
| CD44     | GCCTGGTAGAATTGGCTTTTC   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTAGCCAACATTCATTCAA |
| LEF1     | CAATTGGCAGCCCTATTTC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTCAGCAGACTGTTTGTCA  |
| CXCR5    | CCGTGAGGATGTCACTCAGA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGAGGAAGCCCTAAGACGT   |
| PRKCB    | TTGAGCCTGGGGTGTAAAGAC   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCTTCCAGGATTACGGTG    |
| PRKCD    | GAGCACCTCCTGGAAGATTG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAAGCACCAGTGGGACTGTG   |
| CD20     | TAGGAGCAGGCCTGAGAAAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTCTCTCCAAACCCATG    |
| CD30     | TGTTTTGGGGAAAGTTGGAG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTTTGCCAGTGTGTTGTG   |
| CD30L    | TGCAACCCAACTGTGTGTTA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTACCAACTGTCTCTGAGC   |
| BAFFR    | GCCCTGAGCAACAATAGCAG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAGCTCTTCACTCCAGCA   |
| CMRF-35H | AGGAAAAGATGTGGCTCACG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAGTTGGGGAGAACTGTCA   |
| PRDM1    | TCGAATAATCCAGGGAAACC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAAAGCATCACGTTGACA   |
| HLA-DRA  | GGCTTTACAAAGCTGGCAAT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATGCCCTCTTCGATTGCTCC  |
| GNAI2    | CCTTGAGTGTGTCTGCGTGT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACAGAATTGGGTCCAAG    |
| RG81     | AACTGGGAAGGCCAGGTAAC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTCTTCAAATTGCCATTGC   |
| CD5      | CTTTCTCCACGCCATTTGAT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTAGGATATGGGGTGGGCT   |
| CD22     | GGGATCTGCTCGTCATCATT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTCTGCCCTCTGAGGGAAA  |
| PIK3CD   | GCGTGC GCGTTATTTATTTA   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTCTGGGGAAGGCAAGTTA   |
| DOCK8    | GCAGTCAGCCAGAAATCACA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTCTCCTCTCTGGGACCA    |
| CD11b    | TGAAAAGTCTCCCTTTCCAGA   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTCAGACAGATTTCCAGGC  |
| FCGR2B   | GGAGAGGAGAGATGGGGATT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTGAGTGCCCTTTTCTT    |
| CD72     | CTCATGCCAACAAGAACCCTG   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGACCCACACCTGACACTTC   |
| BCL11B   | TCGTGGAACACAGGCAAAC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGATTGTACTGGCAAGG    |
| CD86     | TCAAGGCAACCAGAGGAAAC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTAAGGGATGGGGCAGTCT   |
| TBX21    | ACCTTTTCGTTGGCATGTGT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGGAAAGGACTCACCTG   |
| FOXP1    | ATGCTGAAGGCATTCTTGG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTGAGCATGGTGTCTCAT   |
| MCL1     | GAGGGGAGTGGTGGGTTAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAAGGGAAAGGGAGGATT    |
| IFNB1    | AGGGGAAAACATGAGCAG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACTGTGCCTGGACCATAG   |
| BLNK     | TTGGGCAGAAAAGAAAATGG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAAGATTCCACCAGACTGAA  |
| CD40LG   | CCTCCCCCAGTCTCTCTCT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTCAGGCCGTTGCTAGTC   |
| IGBP1    | GGCTGATCTTCCACAACAC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGAGGGCAAAGATGCTAAA   |

【表 19 - 2】

|        |                          |                                                  |
|--------|--------------------------|--------------------------------------------------|
| IRF4   | ATTCCCGTGTGCTTCAAAC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAACTGCCAGCAGGTAGGA       |
| CD79a  | CACCTCCCTGGGACATTCTC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACTCTTCTCCAGGCCAG       |
| LTA    | TGATGTCTGTCTGGCTGAGG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACACACAGAGGAAGAGCA       |
| HDAC5  | CCAGCCTGTAGGAAACCAAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCCTTCTATCTCCAGGGCC       |
| RAG1   | GGATGCAGGTGGTTTTTGAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATTTGTACCCATTTTACATTTTCTT |
| RAG2   | CAAACCTTAAACACCCAGAAGC   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATAACAATTCGGCAGTTGGC       |
| CD1d   | GAACCAGTTTCCTCTGTGC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGATGTGGAGGCTGTTGCT       |
| TGFB1  | GACTGCGGATCTCTGTGTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCACTAATCTTTGCCC        |
| CD9    | TCAGTATGATCTTGTGCTGTGCT  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCCATGAAGATTGGTGGG       |
| CD11c  | CACAGCATGAGAGGCTCTGT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCAGTTCCGATTTCACAG       |
| FOXP3  | TCAGGATCTGAGGTCCCAAC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCTGTGTATCTCACGCA        |
| LAG3   | AGAGCTGTCTAGCCCAGGTG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGICCTTTCTCTGTCTCC      |
| CD73   | CTTAACGTGGGAGTGGAACC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTGCAAATGGCAGCTAGA       |
| CD70   | TCTCAGCTTCCACCAAGGTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACTGGGACACTTTTGCCCT      |
| CCR7   | CAGGGGAGAGTGGTGTGTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACATGCACTCAGCTCTTGG       |
| CD45RA | TGCATAGTTCCTCATGTTAAATCC | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGAATGGATGTGCT        |
| PDCD1  | ACATCCTACGGTCCCAAGGT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGAAGTGCAGGCACCTA        |
| MYC    | TGCATGATCAAATGCAACCT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGGACTTTGGGCATAAAAGA      |
| CD25   | AAATCACGGCAGTTTTTCAGC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCATCTGTGCACTCTCCCC       |
| FCAMR  | GTGGGAAGAGAAGCTGATGC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGCATTATCCACGTCCA       |
| CCND2  | TGTGATGCCATATCAAGTCCA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGTATGCGAAAAGGTTTTT     |
| MKI67  | AGCCTCTCTTGGGCTTTCTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTTTCCCTGCCTGGAACCTT      |
| CCND3  | CTTTGCTGCTGAAGGCTCAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAAGTGGTGGTAACCCCTGG      |
| IL12A  | TGCTTCCTAAAAAGCGAGGT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAACTAGGGAGGGGGGAAAGA      |
| IFNG   | GCAGCCAACCTAAGCAAGAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCAGTTACTGCCGGTTTG       |
| TNFA   | GAATGCTGCAGGACTTGAGA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTCCTTGAGACACGGAGC       |
| IL2    | ACCCAGGGACTTAATCAGCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGATGAGACAGCAACCATT      |
| IL4    | GACATCTTTGCTGCCTCCA      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAGAAGGACACTCGCTGC       |
| IL6    | TTAAGGAGTTTCTGCAGTCCA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCACTGGGCACAGAACCTTA      |
| BAFF   | TCCTTCGCTTTTGCTTGCTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTGGAAAAATAGATGCCAGTC    |
| IGHF   | CCCGGAAGTCTATGCGTTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGACATCTCGGTGCAGTG        |
| IGHD   | TGTGTGAGGTGCTGCTTTC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAGCACCACGTTCTGG         |
| IGHM   | CCCGGAGAAGTATGTGACCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTACTTCGCCCCACAGCATC       |
| IGHA   | CTGAACGAGCTGGTGACG       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTACCTGACTTGGGCATCC       |
| IGHG1  | CAAGGGCCCCATCGGTCTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTGACAAAACCTCACACATGC    |
| IGHG4  | CAAGGGCCCCATCGGTCTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAATATGGTCCCCCATGC        |
| IGHG2  | CAAGGGCCCCATCGGTCTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAAATGTTGTGTGTCAGTGC      |
| IGHG3  | CAAGGGCCCCATCGGTCTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCCCACTTGGTGACACAAC       |
| TLR1   | CCATTCCGCAGTACTCCATT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGAAAAAGAGCAAACGTGG      |
| TLR2   | TTGGTTGACTTCAATGGATGC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAACAGCACAAATGAACCTAA    |
| TLR3   | CATCATGCAGTTCAACAAGC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGCACTCTGTTTGCGAAGA       |
| TLR4   | GGGTGTGTTTCCATGTCTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGAAAGTGTGTGTGTCCGC       |
| TLR5   | TCAGGCTGTTGCATGAAGAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTATGCCCTTGCTGGACCTA       |
| TLR6   | ATGCGCAGTAAAACTCGTG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACAGTTCCACGCTGAGCTG       |
| TLR7   | GCCTGTACTTTCAGCTGGGTA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGTGTTTGTGCCATTTGG       |
| TLR8   | GGTGAGCTCTGATTGCTTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATCAGGAGGCAGGGATCAC       |
| TLR9   | GACCGGGTCAGTGGTCTCT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATCTGAGCCCTGAC         |
| TLR10  | TGCAGTGAGCTGAGATCGAG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGAAAACATCCTCATGGC       |
| GAPDH  | CACATGGCCUCCAAGGAGUAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAAGAGCACAAAGAGGAA      |

10

20

30

【 0 5 2 1 】

【表 19 - 3】

| 表 19   |                          |                                               |
|--------|--------------------------|-----------------------------------------------|
| 遺伝子    | 外側プライマー                  | 共通 5'隣接配列を有するネステッドプライマー                       |
| CD19   | GCAGGGTCCCAGTCCTATG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAATCATGAGGAAGATGCA    |
| CD20   | TAGGAGCAGGCCTGAGAAAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGATTCCCTCTCCAAACCCATG   |
| BAFF   | TCCTTCGCTTTGCTTGICTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTGGAAAAATAGATGCCAGTC |
| TCL1A  | GGTAAACACGCCTGCAAAAC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGGACTCAGAAGCCTCTGG    |
| TACI   | CAACAAAGCACAGTGTTAAATGAA | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTCTAGCTACTGCGGAAA   |
| IGHD   | TGTGTGAGGTGCTGGCTTC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAGCACACGTTCTGG       |
| IGHM   | CCCGGAGAAGTATGTGACCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTACTTCGCCCACAGCATC     |
| CD27   | TCCAGGAGGATTACCGAAAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCATCCAAGGGAGAGTGAGA    |
| CD38   | AGATCTGAGCCAGTCGCTGT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGCAGAGCTGAAGATTTT   |
| CD24   | AAAAGTGGGCTTGATTCTGC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGTTCGCATGGTCACAC    |
| AICDA  | TGAGCAGATCCACAGGAAAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAAATGGAGTCTCAAAGCTTCA  |
| CD95   | CCCCGAAAATGTTCAATAA      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTCTTGTCATACCCCA      |
| CD10   | ATATTCCTTTGGGCTCTGC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAAGTTTGGGCTCTGTGCTG   |
| IL10   | CCCCAACCATTCTATTCTTG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAATTCCTCTGGGAATGTT   |
| CD138  | AATGGCAAAGGAAGGTGGAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGACACCTTGGACATCCT    |
| CD45RA | TGCATAGTTCCCATGTTAAATCC  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGAATGGATGTCGCT    |
| BCL6   | AAATCTGCAGAAGGAAAAATGTG  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTTTCAATGATGGGCGAG     |

10

【 0 5 2 2 】

【表 19-4】

|                     |                          |                                              |
|---------------------|--------------------------|----------------------------------------------|
| PRDM1               | TCGAATAATCCAGGGAAACC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCAAAGCATCACGTTGACA   |
| CXCR3               | CTGGCTCTCCCAATATCCT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTCTGAGGACTGCACCAIT   |
| IFNG                | GCAGCCAACCTAAGCAAGAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCAGTACTGCCGTTTG     |
| IL4R                | TGCCTAGAGGTGCTCATTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTGATGCTGGAGGCAGAAT   |
| IL4                 | GACATCTTTGCTGCCTCCA      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGAGAAGGACACTCGCTGC   |
| CCL20               | TTGGACATAGCCCAAGAACA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCCTCACTGGACTTGTG   |
| CD25                | AAATCACGGCAGTTTTCAGC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCATCTGTGCACTCTCCCC   |
| FOXP1               | ATGCTGAAGGCATTTCTTGG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTGAGCATGGTGCTTCAT   |
| TGFB1               | GACTGCGGATCTCTGTGTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCACTATTCTTTGCCC    |
| CXCR5               | CCGTGAGGATGTCACCTAGA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACGAGGAAGCCCTAAGACGT   |
| CD69                | AGACAGGTCTTTTCGATGG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGCAATATGTGATGTGGC   |
| CD30                | TGTTTTGGGGAAGTTGGAG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGTTTGCCAGTGTGTTGTG   |
| PDCD1               | ACATCTACGGTCCCAAGGT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAGAAGTGCAAGGCACCTA   |
| LAG3                | AGAGCTGTCTAGCCAGGTG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGTGCTTTCTCTGCTCC     |
| PAX5                | TGACGTGTGTTGCTTTGTG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTTGGGAGAAAACAGGGGT   |
| TNFRSF17            | GCTTTCACCTCCAGCTATG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTTTGAGTGCTACGGAGA   |
| RASD1               | GGGGGAGGGATGTGAAGTTA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCTTGCTGTGATTCCGGG    |
| AMPD1               | ACAGATGACCCAATGCAATTC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGCACCTGTGATGTGCG     |
| OSBPL5              | AGACCGATGCACAGTCTTCC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCACGTCTGGCTCAGTC     |
| CD56                | GGAGCACTCAAGTGTGACGA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTCTATGGAGCCTTCCGA   |
| IGFBP7              | CATCCAATTCCCAAGGACAG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGAAGGTGCCGAGCTATA   |
| KIR2DS5             | GCTCTTCTCAAAACCACGAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACACTCCTTTGCTTAGCCC   |
| KIR2DS2             | TCCTCACACCAGAACTGA       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCACTCCTTTGCTTAGCCAC    |
| RAB4B               | CACAAGCACCTGTCTCCAG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAATCCCGTACCTGTGCT     |
| CD14                | CTAAAGGACTGCCAGCCAAG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATAACCTGACACTGGACGGG   |
| S100A12             | CACATTCTGTGCATTGAGG      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATACTCAGTTCCGAAGGGGC   |
| CCR2 バ<br>リアント<br>B | GAAGGAGGGAGACATGAGCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTGGTCTTTAGCCCCATCT   |
| CD62L               | TCAGTTGGCTGACTTCCACA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTAGTTTGGGGGTTTGCTG    |
| CD16                | TCTTGGCCAGGGTAGTAAGAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGAGTTCCAATGAGGTGGG   |
| CX3CR1              | CGTCCAGACCTTGTTCACAC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACAAATAGTGCTCGCTTTC  |
| CD1b                | TAGAGGGGCCAGGACATCATC    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCTCCTTTTGCTATGCCT   |
| FOXQ1               | TGCTATTGACCGATGCTTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCAACGGGCTACAGCTTTAT   |
| CD209               | GCTCTTGTCTTGCCTTTTT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTCCCTCAGTGGAGCAAG   |
| CD1e                | CACAAGCACATTCATCTTCC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATTACAGGGCCAGCTTCATAA  |
| CCL17               | TACTTCAAGGGAGCCATTCC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTAACTGTGCAGGGCAG   |
| DINA                | AGCAACGTGGAGTCAGTCTGT    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACCTTCTCTTGCTTGG    |
| CLEC4C              | TTATTTTCTGGGGCTGTCAGA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATTCTGGCACTCAGGTGAA   |
| ZBTB16              | TGATCAAGCACCTGAGAACG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGTGCACCATCTGCAC   |
| SLAMF1              | TGCAAAACCCAGAAGCTAAAA    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTTCTGTGCAAAATGGCATT   |
| CD3D                | AGAGCTGTGTGGAGCTGGAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAGTCTTCTGCTTTGCTGG   |
| CD3E                | GCCCTCTTGCCAGGATATTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATGTAAGTTGTCCCCAT    |
| CD8A                | CTGGCCTCTGTCAACTAGC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGTACAAGCAATGCCTGC   |
| CD8B                | CAGCTCAAGGGGAAGGTAT      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTTAACCCATGGATCCTG   |
| PRF1                | CCCTGCAGTCACAGCTACAC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAGGGCTGGTCTTTTAGGA   |
| EOMES               | TGGGATAATGTAAAACCTGGTGCT | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATCCCCATGATATTGGGA    |
| CD4                 | AGCTAGCCTGAGAGGGAACC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTCCAGACCAATTCAGGAC   |
| THPOK               | GGCTCTGCCTTGCACTATTT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCTTCTCCCTTCCATGC     |
| RUNX3               | TAAGGCCCAAAGTGGGTACA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGGAAGCACAGGAAAGGA    |
| CD45RO              | ACCCTCTCTCCCTCCCTTTC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGTTGGCTATGCTGGCATG   |
| CD44                | GCTGGTAGAATTGGCTTTTC     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGTAGCCAACATTCATTCAA |
| CCR7                | CAGGGGAGAGTGTGGTGTIT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTCAGCTCTTGGCTCCACT   |
| TXK                 | ACATCAAGCTCCATTGTTTCG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGCTGCACTCTTTGTAGG   |
| MBD2                | GCCTGGCACGTAATAGCTTG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGAAAGAAATGCCCTTGGT   |
| IFNGR1              | GAGGATGTGTGGCATTITCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTTTCTAGGTGAGCAGGTG   |
| IL12RB2             | AGCAGGCTGTACACAGCAGA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGACACTAGGCACATTGGCTG   |
| IL33R               | ACTGTGCCCTATCCAGAAC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACGACGCCAAGGTGATACT   |
| CCR4                | TGGTGAAATGCAGAGTCAATG    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCAGGAGGAAGGCTTACACC   |
| CRTH2               | TGAATTTTGTCTGGTGGATG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGAGTGAAGAAGCAGATG   |
| IL5                 | CAGTGAGAATGAGGGCCAAG     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAATGAGGGCCAAGAAAGAG   |
| IL17A               | AAAATGAAACCCTCCCCAAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTTTGGAGATTAAAGGGCC   |
| IL17F               | CTGCATCAATGCTCAAGGAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAAGGCTGCTCTGTTTCTT   |
| IL21                | AAATCAAGCTCCCAAGGTCA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGAATGACTTGGTCCCTG   |
| IL22                | ATGCCCCAAAGCGATTTT       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAAAGGAAACCAATGCCACT   |
| IL23R               | TCCCTCATTGAAAGATGCAA     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGAATCATTAGGCCAGGCG   |
| RORA                | TGCAAGCCATTTATGGGAAT     | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTGGGTTTCTTTTCAATTC  |
| RORC                | ATTTCATGGTGCTCCAGTC      | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAGAAGCAGAAGTCGCTCG   |
| OX40L               | CTGCTGGCCCTGTACCTG       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCCACCCTGGCCAAGAT     |

10

20

30

40

【表 19-5】

|                     |                       |                                               |
|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| ICOS                | TTCAGCTGACTTGGACAACCT | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACAACCTGACTGGCTTTG    |
| SH2D1A              | GGGTGTGGTGAACCTGGTT   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTAATATGGATGCCGTGGG    |
| CCR2 バ<br>リエント<br>A | GTTGCCCAGTGTGTTTCTGA  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAACCAGGCAACTTGGGAACT    |
| TLR1                | CCATTCCGCAGTACTCCATT  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGAAAAAGAGCAAACGTGG   |
| TLR2                | TTGGTTGACTTCATGGATGC  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAACAGCACAAATGAACITAA |
| TLR3                | CATCATGCAGTTCAACAAGC  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGCACTCTGTTTGC GAAGA   |
| TLR4                | GGGTGTGTTTCCATGTCTCA  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGAAAGTGTGTGTGTCCGC    |
| TLR5                | TCAGGCTGTGTCATGAAGAA  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTATGCCCTTGCTGGACCTA    |
| TLR6                | ATGCGCAGTAAAAACTCGTG  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACAGTTCACGCTGAGCTG     |
| TLR7                | GCCTGTACTTTCAGCTGGGTA | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGGTGTTTGTGCCATTTGG    |
| TLR8                | GGTGAGCTCTGATTGCTTCA  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTATCAGGAGGCAGGGATCAC    |
| TLR9                | GACCGGGTCAGTGGTCTCT   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATCCTGAGCCCTGAC     |
| TLR10               | TGCAGTGAGCTGAGATCGAG  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGGAAAACATCCTCATGGC    |
| GAPDH               | CACATGGCCUCCAAGGAGUAA | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAGCAAGAGCACAAAGAGGAA   |

10

## 【0524】

*in vitro* 刺激に対するヒト T 細胞の応答の多様性の試験

バルク試料の遺伝子発現パターンを検査する場合、観察されるパターンは、試料の細胞組成および各細胞型またはサブタイプにおける各遺伝子の発現レベルの両方に寄与された。これら 2 種の効果は、バルク分析によって逆重畳することはできないが、大規模単一細胞分析によってのみ逆重畳が可能である。説明するために、*in vitro* 刺激に対するヒト T 細胞の応答の変動性を試験するために本発明者らのプラットフォームを利用した。

20

## 【0525】

本発明者らは、血液ドナーからネガティブ選択により CD3+T 細胞を精製し、これを抗 CD28/抗 CD3 ビーズで 6 時間刺激し、刺激および無刺激細胞の別々のアリコートにより実験を行った。異なる T 細胞サブセットによって発現される表面タンパク質、サイトカイン、ケモカインおよびエフェクター分子を包含した 93 種の遺伝子のパネル（表 20）を設計した。それぞれ刺激および無刺激試料に関して、総計 3517 および 1478 個の単一細胞を分析した。

## 【0526】

【表 20 - 1】

| 表 20    |                                                  |                                                                                                 |
|---------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 遺伝子     | 外側プライマー                                          | 共通 5'隣接配列を有するネステッドプライマー                                                                         |
| GAPDH   | GACTTCAACAGCGACACCCA                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCTCAACGACCACTTTGT                                                      |
| CD3D    | GAAAACGCATCCTGGACCC<br>A                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGATGTCATTGCCACTCTGCT                                                     |
| CD3E    | AAGTTGTCCCCCATCCCAA                              | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGGGATGGACTGGGTAAA<br>T                                                 |
| CD8A    | ACTGCTGTCCCAAACATGCA                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGCCTGCCCATTGGAGAGA<br>A                                                 |
| CD8B    | CCACCATCTTTGCAGGTTGC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGTCCAGTTCCCAGAAGG                                                      |
| CD4     | CTGGGAGAGGGGGTAGCTA<br>G                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCACTTCCCTCAGTCCCAA                                                      |
| FOXP3   | ACAGAAGCAGCGTCAGTAC<br>C                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGGCTCTTTGAGTCCCGTG                                                       |
| CCR7    | GGGGAGAGTGTGGTGTITTC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTGGCTCCACTGGGATG                                                       |
| CD5     | ATCAATGGTCCAAGCCGCAT                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTCACAGATCTTCCCCCG                                                      |
| IL32    | CTTTCAGTCTACGGAGCC                               | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTCTGAACCCCAATCCTC                                                      |
| CD28    | ACCATCACAGGCATGTTCT                              | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGATAGATGACCTGGCTTGCC                                                     |
| SELL    | GCATCTCATGAGTGCCAAGC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCCCCCAGACCTTTTATC                                                     |
| CD27    | TGCAGAGCCTTGTCGTTACA                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGTGACAGAGTGCCCTTTTCG                                                     |
| GZMB    | AGGTGAAGATGACAGTGCA<br>GG                        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGCCCTCTTGIGTGTAACA                                                      |
| GZMA    | GGAACCATGTGCCAAGTTGC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTTTGTTGTGCGAGGGTGT                                                      |
| GZMH    | AGTGTTGCTGACAGTGCA                               | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAAAGAAGACACAGACCG<br>GT                                                 |
| GZMK    | TTGCCACAAAGCCTGGAATC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAAGCAACCTTGTCCTCGCT                                                      |
| PRF1    | GGAGTCCAGCGAATGACGT<br>C                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCATGGCCACGTTGTCAITGT                                                      |
| NKG2D   | CAACACCCAGGGGATCAGT<br>G                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCACCCTCCACAGGAAATTG<br>CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTGGAGAAGACAGTGGCG<br>A   |
| LAG3    | AGCTGTACCAGGGGGAGAG<br>GGAAGACAGCCAGATCCAG<br>TG | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTGACAGACCAAGAGCACC                                                     |
| CD160   | GGGCTGAGAATGAGGCAGT<br>T                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAAGCGACAAGGGTGAA<br>C                                                  |
| CD244   |                                                  | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACTAAGTTGAACCGTGTTTA<br>AGG                                               |
| EOMES   | ACTTAACAGCTGCAGGGGC                              | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGAAAAGGGGCTGGAAAGG<br>G                                                  |
| TBX21   | TTATAACCATCAGCCCGCCA                             |                                                                                                 |
| PRDM1   | ACCAAAGCATCACGTTGACA<br>T                        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACATGTGAATGTTGAGCCCA                                                      |
| IRF4    | CTCTTCAGCATCCCCGTAC                              | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCCCAATGAAAGCTTGA                                                       |
| ZNF683  | GGAGAGCGTCCATTCCAGTG                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCCACCTGAAGCTGCACC                                                       |
| ZBED2   | AATGTACCAGCCAGTCAGCG                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTTTGGTGAGCTGACGA                                                        |
| CD30    | TTTACTCATCGGGCAGCCAC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTTTGCCAGTGTTGTGC                                                        |
| CD69    | GCTGTAGACAGGTCCTTTTC<br>G                        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGTGTGGAAAATGTGCAAT<br>ATGTG                                              |
| HLA-DRA | GGGTCTGGTGGGCATCATT                              | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCTCTTCGATTGCTCCGTA                                                      |
| CD38    | AGGTCAATGCCAGAGACGG<br>A                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATCAGCATACCTTTATTGTGA<br>TCTATC                                           |
| TNFRSF9 | TGGCATGTGAGTCATTGCTC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTTGATGTGAGGGGCGGAT                                                      |
| MKI67   | TACTTTTTGCCTCCAGGG                               | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCTGCCCCACCAAGATCAT                                                       |
| BIRC5   | TGCCACGGCCTTTTCCTAAA                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGTCTAAGTGCAACCGCT                                                       |
| FOSL1   | CTCCTGACAGAAGGTGCCAC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGTGATTGGACCAGGCCATT                                                      |
| MCL1    | GACTGGCTACGTAGTTCGGG                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTTGCTTAGAAGGATGGCGC                                                      |
| MYC     | AGCTACGGAACCTTTGTGCG                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCAACCTTGGCTGAGTCTTGA<br>CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGTGCATTTCAATCCCACG<br>TAC |
| TYMS    | TCAGTCTTTAGGGGTTGGGC                             | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATGTAAACCATTGCTGTGCC<br>ATT                                               |
| CDCA7   | CCAGTCTAGTTTCTGGGCAG<br>G                        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAAAGTTTGACGCTATAC<br>C                                                  |
| UHRF1   | CCAGTCTTCTGACACCGG                               | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCACTAGGAGACGTGGAATT<br>G                                                 |
| SAP30   | ACCAACCAGACCAGGACTT<br>A                         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTTTTCTCTTAACGTTAGA<br>CCAC                                              |
| CX3CR1  | CACCCGTCCAGACCTTGTT                              |                                                                                                 |

10

20

30

40

【表 20 - 2】

|                     |                             |                                                       |
|---------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------|
| BCL2                | TGCAAGAGTGACAGTGGATT<br>G   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTGATATTCTGCAACACTG<br>TACA    |
| BCL6                | TGTCCTCACGGTGCCTTTT         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTAGGCAGACACAGGGACTT            |
| FASLG               | CCTCAAGGGGGACTGTCTTT<br>C   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATATCCTGAGCCATCGGT            |
| FAS                 | ATTGCTGGTAGAGACCCCCA        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCCCCATTTCCCCGATGT              |
| CCL4                | CCCAGCCAGCTGTGGTATTC        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGGAACTGAACAGAGCTGCT            |
| IFNG                | CTAGGCAGCCAACCTAAGC<br>A    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCTGCAATCTGAGCCAGTGC            |
| TNF                 | AGTGGACCTTAGGCCCTTCCT       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCTCAGACATGTTTCCGT<br>G        |
| IL2                 | TCACCTAAGACCCAGGGACT<br>T   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAAGCATCATCTCAACACTGA<br>CTT     |
| IL4                 | ACCATGAGAAGGACACTCG<br>C    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCGGGCTTGAATTCCTGTCTT            |
| IL6                 | CGGCAAATGTAGCATGGGC         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAAAAGTGGCTATGCAGTTT<br>G      |
| IL1A                | GGCATCTCCACAATAGCAG<br>A    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATTTTGGTCCAAGITGTGC           |
| IL1B                | CTTAAAGCCCGCCTGACAGA        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACATTCTGATGAGCAACCGC            |
| IL3                 | ACAGACGACTTTGAGCCTCG        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAATTCACCTTTTCCTGCGGC            |
| IL13                | GGAGCCAAGGGTTCAGAGA<br>C    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGCTACCTCACTGGGGTCTT            |
| IL31                | GGCCATCTCTTCCTTTTCGGA       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTGTGGAACTCTGCCGTG              |
| IL24                | CTCACCCCATCATCCCTTTC<br>C   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCAGTGAAGTGTGTGTG              |
| IL26                | TACTGACGGCATGTTAGGTG        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTGTGTGTGGAGTGGGATGTG            |
| LTA                 | AGGCAGGGAGGGGACTATT<br>T    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAGAAACAGAGACAGGCC<br>C        |
| IL5                 | GCAGTGAGAATGAGGGCCA         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGCATACTGACACTTTGCC            |
| CSF2                | AGCCAGTCCAGGAGTGAGA<br>C    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGCCACACTGACCCTGATAC            |
| IL21                | CCCAAGGTCAAGATCGCCAC        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGCCAGCTCCAGAAGATGT            |
| IL22                | TGGGAAGCCAACTCCATCA<br>T    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAACCAATGCCACTTTTG<br>T        |
| IL17A               | GCCTTCAAGACTGAACACCG<br>A   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCCCCCTCAGAGATCAACAGA<br>C      |
| IL17F               | TTGGAGAAGGTGCTGGTGAC        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTACCCAGTGTCTGTCAAC            |
| TGFB1               | TATTCCTTTGCCCGGCATCA        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACCTTGGGCACTGTTGAAGT            |
| CCL20               | ACTTGCACATCATGGAGGGT        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCATAAGCTATTITGGTTTA<br>GTGC   |
| IL12A               | GGTCCCTCCAAACCGTTGTC        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAACTAGGGAGGGGGGAAAG<br>AAG     |
| CXCL12              | TGGGAGTTGATCGCCTTTCC        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCATTCTGAAGGAGCCCCA<br>T       |
| CCL3                | TGGACTGGTGTGTTGCCAAAC       | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCTGAGAGTTCCCTGTCC             |
| CCL14               | TTCTCTCATCACCATCGC          | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTACCACCCCTCAGAGTGC            |
| CCL18               | GAAGCTGAATGCCTGAGGG<br>G    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTCCCATCTGCTATGCCCA             |
| CCL17               | GAGTGTGCTGAGTACTT           | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTCACCCAGACTCCCTGACT            |
| IL12B               | GCTATGGTGAGCCGTGATTG        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCCTACCCCCACCTCTCTA            |
| CXCR3               | GACCTCAGAGGCCTCTACT         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCCAATATCCTCGCTCCCGG             |
| IL33R               | TTCAGGACTCCCTCCAGCAT        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGGTACCAATGCCTGTGCC             |
| IL4R                | TGAACCTCAGGGAGGGTGGT        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCCTCGTATGCATGGAACCC           |
| CCR4                | CCAAAGGGAAGAGTGCAGG<br>G    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTATTCTGTATAACACTCATATC<br>TTTGCC |
| IL23R               | AGAATCATTAGGCCAGGCGT<br>G   | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTCTGGCCAATATGCTGAAACC<br>C       |
| IL21R               | ATTTGAGGCTGCAGTGAGCT        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACAAGAGCTGGCTCACCT            |
| CXCR5               | CCTCCCCAGCCTTTGATCAG        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTCCCTCGCAAGCTGGGTAATC           |
| IL6R                | CCAGACCAGGGAGTTCTA          | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACAGCATGTCACAAGGCTGT            |
| CXCL13              | AGGCAGATGGAACCTGAGC<br>C    | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCATTCTGAAGATCCCCAGAC<br>TT     |
| LIF                 | TCCCCATCGTCCTCTTGTC         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTGCCGGCTCTCCAGAGTA             |
| PTPRCv1<br>(CD45RA) | GTTCCCATGTAAATCCCAT<br>TCAT | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGAATGGATGTCGCT<br>AATCA   |
| PTPRCv2<br>(CD45RO) | ACCCTCTCTCCCTCCCTTTC        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTAGTTGGCTATGCTGGCATG            |
| IL10                | CCCCAACCACTTCATTCTTG        | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTCAATTCCTCTGGGAATGT            |
| CD40LG              | CCTCCCCAGTCTCTCTTCT         | CAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGAGTCAGGCCGTTGCTAGTC            |

10

20

30

40

無刺激試料において、PCA分析は、細胞の2種の主要サブセットを明らかにした。各サブセットにおいて濃縮された遺伝子をより詳細に調べると、一方のサブセットは、CD8A、CD8B、NKG2D、GZMA、GZMH、GZMKおよびEOMESの発現を有するCD8+細胞を表し、他方のサブセットは、CD4、CCR7およびSELLの発現を有するCD4+細胞を表したことが示された（図44Aおよび図45）。

#### 【0529】

刺激試料において、細胞の2種のブランチが、PCAプロットにおいて直ちに明らかになった（図44Bおよび図46A～図46D）。第1の主成分は、IFNG、TNF、CD69およびGAPDHの発現の変動レベルの観点から、刺激薬に対する個々の細胞の応答の程度を表した。細胞傷害性T細胞に関連するサイトカインおよびエフェクター分子であるCCl3、CCl4およびGZMBならびに消耗細胞に関連するマーカーであるLAG3の発現は、上部ブランチにおける細胞に局在化した。ヘルパーT細胞に関連するサイトカインであるIL2、LTA、CD40LGおよびCCl20の発現は、下部ブランチに局在化した。ZBED2、IL4R、PRDM1、TBX21、MYC、FOSL1、CSF2、TNFRSF9、BCL2およびFASLGを含む、活性化T細胞において上方調節されることが公知であった他の遺伝子は、より少数の細胞において様々な程度で発現された（図46A～図46D）。これらのサイトカイン、エフェクター分子および転写因子の大部分は、無刺激試料における細胞によって発現されなかったか、または非常に低レベルで発現された。刺激のこの短い期間内で応答した細胞の大部分は、恐らくメモリ細胞であったが、より低レベルのIL2を生成したが他のサイトカインもエフェクター分子も生成しない、ナイーブ細胞を表すことができる細胞の小集団が観察された（図44B、矢印）。

#### 【0530】

応答における不均質性を十分に理解するために、本発明者らは、ペアワイズ相関係数に基づき細胞をクラスター化した。CD4およびCD8細胞の2つの主要群は明らかであったが、発現される活性化された遺伝子の組合せおよびレベルの観点から、各セット内に相当な多様性があった（図47および図48）。

#### 【0531】

無刺激試料と比較して、全体として刺激試料において数百倍またはそれを超えて上方調節されるが、試料における数個の細胞のみによって寄与される数種のサイトカイン、即ちIL4、IL5、IL13、IL17F、IL22、LIF、IL3およびIL21が存在することが観察された（図44C）。これらのサイトカインのサブセットは、同じ細胞によって発現された（図49A～図49C）。例えば、同じ単一細胞は、Th17細胞のシグネチャーであるIL17FおよびIL22の計数の大部分に寄与した。別の7個の細胞は、Th2細胞のシグネチャーであるIL4、IL5、IL13の様々な組合せを発現し、これらの様々な組合せを発現した。かかる観察は、特に、全体的発現変化に対する寄与が、稀な亜集団に由来した場合、大規模単一細胞分析の重要性を強調する。

#### 【0532】

第2の血液ドナー由来のT細胞により同じ刺激実験を反復し、それぞれ刺激および無刺激試料における669および595個の単一細胞のプロファイル进行分析した。この個体における（恐らく、刺激に対する個体間変動性を示す）活性化の全体的レベルはより低かったが（発現変化の観点からより小さい規模）、刺激に対する個々の細胞の応答における不均質性と共に、PCA分析における同じ傾向が観察された（図48）。

#### 【0533】

稀な抗原特異的T細胞の同定

CD8+T細胞集団における抗原特異的細胞のモデルを使用して、稀な細胞を同定するための本発明者らのプラットフォームの有用性が実証された。サイトメガロウイルス（CMV）に対してセロポジティブである同じ2名の血液ドナーの新鮮血を、CMV pp65ペプチドプールに曝露した。各ドナーの別々の未処理血液アリコート陰性対照とした。その後、CD8+T細胞を単離し、本発明者らのプラットフォームにおける刺激および

無刺激細胞の応答を分析した。それぞれドナー 2 の C M V 刺激および無刺激試料ならびにドナー 1 の C M V 刺激および無刺激試料における 2 2 7 4 個、2 3 3 7 個、5 8 1 個および 2 5 3 個の細胞からデータを得た。

#### 【0534】

クラスタリング分析において明らかなクラスターを形成する比較的少数の細胞を生じたドナー 1 の陰性対照を除いて、残りの試料は全て、細胞の 2 個の主要群を示した（図 5 0 A、図 5 1 および図 5 2）。一方の群における細胞は、ナイーブ細胞およびセントラルメモリー関連マーカー、S E L L、C C R 7 および C D 2 7 を発現した一方、他方の群における細胞は、エフェクターメモリー細胞（C C L 4、C X 3 C R 1、C X C R 3）およびエフェクター細胞関連遺伝子（E O M E S、G Z M A、G Z M B、G Z M H、T B X 2 1、Z N F 6 8 3）を発現した。2 種のブランチの間の空間を占有し、グランザイム K（G Z M K）を発現する細胞の明確に異なる小サブセットと共に、H L A - D R A 発現細胞の別のサブセットが存在した。異なる種類のグランザイムの差次的発現が以前に報告された（8）。本発明者らの結果は、C D 8 + T 細胞による以前の C y T O F 実験において観察された結果を再現した（9）。

#### 【0535】

相当な比率の細胞が、C D 6 9 および M Y C の発現により抗原への曝露に応答すると思われたが（図 5 2）、本発明者らは、活性化された抗原特異的細胞のシグネチャーサイトカインである I F N G を発現した数個の細胞のみを見出した。I F N G 発現細胞の大部分は、活性細胞状況の兆候であり、エフェクターメモリー／エフェクター細胞クラスターに属する遺伝子パネルにおける全体で最も多く検出された転写物分子を保有した細胞の中にも存在した（図 5 0 B および図 5 3）。I F N G 発現および全体的転写レベルに基づき、C M V 特異的である可能性があるそれぞれドナー 1 および 2 における 5 8 1 個のうち 5 個（0.86%）および 2 2 7 4 個のうち 2 個（0.09%）の細胞を同定した。これらの細胞のうち、発現されるエフェクター分子（例えば、グランザイム）およびサイトカイン（例えば、I F N G、I L 2、C C L 3、C C L 4、T N F、C S F 2、I L 4）の組合せおよびレベルの観点から相当量の不均質性が存在した（図 5 4）。興味深いことに、ドナー 2 における大部分の転写物を発現した単一細胞は、I L 6 および I L 1 B の両方を発現したが、I F N G を発現しなかった。

#### 【0536】

##### 考察

本実施例では、本発明者らは、単一細胞を単離し、細胞内容物を特有にバーコード化し、定量的分析のために個々の分子をバーコード化するために、再帰的ポアソン戦略を使用した高度に拡大縮小が可能な m R N A サイトメトリーを提示した。数千個の細胞を含有する試料における各細胞に属する転写物分子を同時に同定および計数することができることを示した。さらに、天然に存在する不均質系におけるその発現プロファイルに基づき個々の細胞を特徴付けるためのこの技法の使用および大きなバックグラウンド集団における稀な細胞の検出を実証した。

#### 【0537】

C y t o S e q のスループットおよび単純さは、単一細胞の遺伝子発現の配列決定に基づく測定のためのマイクロタイタープレートまたはマイクロ流体チップに關与する既存のアプローチを上回る主要な進歩を提示する。実験手順が単純であり、細胞 1 個当たりの試薬消費が低いため（ナノリットル範囲内）、これは、複数の条件にわたり多数の細胞の単一細胞分析を容易に行うことができる。この試験単独で、本発明者らは、1 2 回の実験にわたり総計ほぼ 1 4, 6 0 0 個の単一細胞の遺伝子発現プロファイリングを行ったが、これは、既存のアプローチによって行われた場合、コストおよび時間がかかるであろう。C y t o S e q によって測定した細胞の数は、コンビナトリアル合成によって容易に達成される、マイクロウェルアレイのサイズおよびバーコード化されたビーズのライブラリーサイズを増加させることにより、単純にさらにスケールアップすることができる。加えて、細胞サイズの均一性に制限はないため、事前に選別することなく本実施例に示す P B M C

等、種々の細胞サイズおよび形状を有する細胞を含有する複合的試料の直接的分析を可能にする。

#### 【0538】

CytoSeqデータは、フローサイトメトリー（FC）のデータに似ていたが、重要な差があった。まず、CytoSeqは、試験した遺伝子産物の数および種類の観点からさらなる多用途性をもたらす。少数の表面タンパク質に大部分は限局され、最適に結合する抗体を必要とするフローサイトメトリーとは異なり、CytoSeqは、核酸増幅技法によるいずれかの転写されたmRNAの測定を可能にした。最適なプライマー設計およびアッセイ条件は、100種またはそれを超える遺伝子の任意に選ばれたパネル（表21）のマルチプレックスPCRによるほぼ88%のマッピング率を慣用的に達成させることができる。その上、試料における各単一細胞の全体的トランスクリプトームは、ビーズ結合cDNAのユニバーサル増幅により測定することもできるが、一般的に使用されるユニバーサル増幅技法（7）の相対的に低い効率および数千個の細胞にわたる全トランスクリプトームの測定に必要とされる高い配列決定深度に注意深くなる必要がある。

10

#### 【0539】

第2に、抗体結合の動態学に頼るフローサイトメトリーとは対照的に、CytoSeqは、分子指標化による遺伝子発現レベルのデジタルの絶対的読み出し情報を提供する。稀な細胞に特異的な多数の遺伝子の同時発現によって検出が達成されるため、これは、単一の稀な細胞事象に対しより高い感度および特異性を有する。したがって、これは、ゲーティングのために信頼できるクラスターを形成するために、ある一定数の事象を必要とするフローサイトメトリーと比較して、はるかに少量の試料を消費する。

20

#### 【0540】

本発明者らのデータは、単一細胞対バルク分析の重要性を説明する。例えば、本発明者らは、全体として数千個の細胞の試料における最も高度に発現される遺伝子が、1個または数個の細胞のみによって寄与されたシナリオを示した。最も重要なことに、本発明者らの実験は、以前のアプローチにおいて極めて限定的な能力である、単一細胞遺伝子発現試験における多数の細胞および多数の遺伝子の両方の検査の重要性を説明する。生物学的試料における数千個の単一細胞にわたる発現の慣用的測定のためのかかるツールの利用可能性は、複合的生物学的系の理解の加速に役立ち、循環腫瘍細胞分析および免疫応答モニタリング等、臨床診断における新規適用を駆動することができる。がん生物学および神経科学等の分野における単一細胞ゲノム不安定性を試験するために、本発明者らの大量平行単一細胞バーコード化レジメンを採用して、ゲノムをならびにゲノムおよびトランスクリプトームを同時に測定することもできることが想定される。

30

#### 【0541】

【表 2 1】

| 表 21                       |         |                                 |                             |                                             |                     |                             |                       |
|----------------------------|---------|---------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------|
| 実験                         | リードの総数  | パネルにおける遺伝子に対し正確に 1 マッチを有するリードの数 | パネルにおける 1 種の遺伝子に対し整列されたリード% | 細胞バーコードに対する正確なマッチおよび 1 種の遺伝子に対する整列を有するリードの数 | 遺伝子およびバーコード整列後のリード% | フィルタリング判断基準を満たす特有の細胞バーコードの数 | これらの細胞バーコードに関連するリードの数 |
| K562 + Ramos               | 2399025 | 2154454                         | 90%                         | 1175715                                     | 49%                 | 768                         | 859470                |
| 初代 B+ Ramos                | 5711013 | 5203308                         | 91%                         | 3495392                                     | 61%                 | 1198                        | 2868577               |
| PBMC                       | 1270214 | 1105687                         | 87%                         | 803151                                      | 63%                 | 632                         | 670576                |
| PBMC 複製                    | 3927672 | 3468538                         | 88%                         | 2459367                                     | 63%                 | 731                         | 1920956               |
| ドナー1 抗 CD3/<br>抗 CD28 刺激   | 3529898 | 3249998                         | 92%                         | 2122416                                     | 60%                 | 3517                        | 1466000               |
| ドナー1 抗 CD3/<br>抗 CD28 陰性対照 | 1557996 | 1292211                         | 83%                         | 939094                                      | 60%                 | 1478                        | 719351                |
| ドナー2 抗 CD3/<br>抗 CD28 刺激   | 606865  | 552877                          | 91%                         | 403943                                      | 67%                 | 669                         | 246234                |
| ドナー2 抗 CD3/<br>抗 CD28 陰性対照 | 332951  | 283723                          | 85%                         | 205762                                      | 62%                 | 595                         | 86866                 |
| ドナー1 CMV 刺激                | 1064648 | 958410                          | 90%                         | 697057                                      | 65%                 | 581                         | 401629                |
| ドナー1 CMV 陰性対照              | 619957  | 547259                          | 88%                         | 406801                                      | 66%                 | 253                         | 192605                |
| ドナー2 CMV 刺激                | 1902977 | 1692734                         | 89%                         | 1229667                                     | 65%                 | 2274                        | 688296                |
| ドナー2 CMV 陰性対照              | 1671419 | 1346637                         | 81%                         | 977344                                      | 58%                 | 2337                        | 715453                |

## 【0 5 4 2】

## ビーズライブラリーの合成

分割プールコンビナトリアルアプローチを使用して、Cellular Research, Inc. によってビーズを製造した。簡潔に説明すると、カルボキシル基で官能化した 20 ミクロン磁性ビーズを、5' アミンと、続くユニバーサル配列、異なるチューブで異なる細胞標識の第 1 のパート、およびリンカー配列を有するオリゴを含有する 96 本のチューブに分布させた。カルボジイミド化学によりビーズにオリゴを共有結合によりカップリングした。ビーズをプールし、5' 末端における第 2 のリンカー配列と、続く異なるチューブで異なる細胞標識の第 2 のパート、および第 1 のリンカーに相補的な配列を有するオリゴを含有する 96 本のチューブの第 2 のセットに分割した。第 1 のリンカーを介した溶液におけるオリゴへのハイブリダイゼーションの際に、DNA ポリメラーゼによりビーズにおけるオリゴを伸長させた。ビーズをプールし、5' 末端におけるオリゴ (dA) と、続く分子標識として機能するランダム配列、細胞標識の第 3 のパート、および第 2 のリンカーに相補的な配列を有するオリゴを含有する 96 本のチューブの第 3 のセットに分割した。第 2 のリンカーを介した溶液におけるオリゴへのハイブリダイゼーションの際に、DNA ポリメラーゼによりビーズにおけるオリゴを伸長させた。最終ビーズライブラリーは、 $96 \times 96 \times 96$  (884, 736) 細胞標識のサイズを有する。

## 【0 5 4 3】

## マイクロウェルアレイの製作

標準フォトリソグラフィを使用して、マイクロウェルアレイを製作した。シリコンウエハ上のフォトレジストにおいて柱のアレイをパターン化した。ウエハに PDMS を注いで、マイクロウェルのアレイを作製した。PDMS マイクロウェルアレイを鋳型として使用して、NOA 63 光学接着剤によりウエハのレプリカを作製した。各実験の前に NOA 63 レプリカからアガロース (5%、IX-A 型、Sigma) マイクロウェルアレイを注型した。

## 【0544】

## 試料調製

10% FBSおよび1×抗生物質-抗真菌薬を有するRPMI-1640においてK562およびRamos細胞を培養した。Sanguine Biosciencesから健康なドナー由来の初代B細胞を購入した。Stanford血液センターから取得したヘパリンナトリウムチューブにおける新鮮全血から、Lymphoprep溶液(StemCell)を使用して、健康なドナー由来のPBMCを単離した。

## 【0545】

## T細胞刺激

2名のCMVセロポジティブの血液ドナーのヘパリン処置した全血をStanford血液センターから得た。CMV刺激のため、最終濃度1.81μg/mlのPBS希釈CMV pp65ペプチドプール(Miltenyi Biotec)中、6時間37℃で1mlの全血を刺激した。陰性対照としてPBSと共に各ドナーの全血の別々のアリコートインキュベーターにインキュベートした。RosetteSepカクテル(StemCell)を使用してCD8+T細胞を単離し、その後、マイクロウェルアレイに沈着させた。抗CD3/抗CD28刺激のため、RosetteSep T細胞濃縮カクテルを使用して、同じ2名のドナー由来のT細胞を全血から単離し、10% FBSおよび1×抗生物質-抗真菌薬を有するRPMI-1640に再懸濁した。各ドナー由来の細胞の1種のアリコートを、DynabeadsヒトTアクチベーターCD3/CD28(Life Technologies)と共にほぼ1:1ビーズ対細胞比で37℃にて6時間インキュベーターに置き、陰性対照とした。

## 【0546】

## 単一細胞捕捉

マイクロウェル10個あたりほぼ1個の細胞の密度で、単一細胞懸濁液をピペットでマイクロウェルアレイに置いた。洗浄して、捕捉されていない細胞を除去した後に、ウェル1個あたりほぼ5個のビーズの密度で磁性ビーズをロードして、マイクロウェルアレイを飽和させた。洗浄して、過剰なビーズを除去した後に、冷溶解バッファー(0.1M Tris-HCl pH7.5、0.5M LiCl、1% LiSDS、10mM EDTA、5mM DTT)をマイクロウェルアレイの表面上にピペットで置いた。スライド磁石における10分間のインキュベーション後に、マイクロウェルアレイからビーズを回収した。微量遠心分離チューブにおいてビーズを収集し、洗浄Aバッファー(0.1M Tris-HCl、0.5M LiCl、1mM EDTA)で2回、洗浄Bバッファー(20mM Tris-HCl pH7.5、50mM KCl、3mM MgCl2)で1回洗浄した。これ以降、単一チューブ内で全反応を行った。

## 【0547】

## cDNA合成

洗浄されたビーズを、ハイブリダイゼーションオープン内のローターに置いた微量遠心分離チューブにおいて、温度50℃で50分間(K562およびRamos細胞による初期実験のためにSuperScript IIIを使用した場合)または42℃で90分間(残りの実験のためにSuperScript IIを使用した場合)、40μL RTミックス(1×第1鎖バッファー、1μL Superase阻害剤、1μL SuperScript IIまたはSuperScript III、3mM追加MgCl2、1mM dNTP、0.2μg/μL BSA)に再懸濁した。ビーズを20μLの1×Exo Iバッファーにおける1μLのExo I(NEB)で37℃にて30分間、80℃で15分間、処理した。

## 【0548】

## マルチプレックスPCRおよび配列決定

各遺伝子パネルは、Primer3によって設計された2セットの遺伝子特異的プライマーを含有した。カスタムMATLABスクリプトを書き込んで、セット内のプライマー

10

20

30

40

50

にわたって最小の3'末端相補性が存在するようにPCRプライマーを選択した。各パネルにおけるプライマーを表21に示す。増幅スキームを図55に示す。容積100 $\mu$ Lまたは200 $\mu$ Lにおける第1のプライマーセットにおける各遺伝子特異的プライマー50nMおよび400nMユニバーサルプライマーを有するKAPA Fastマルチプレックスキットによるビーズにより、次のサイクリングプロトコールに従ってPCRを行った：3分間95C；15サイクルの15秒間95C、60秒間60C、90秒間72C；5分間72C。磁性ビーズを回収し、0.7 $\times$ Ampure XPによりPCR産物を精製した。同じKAPAキットおよびサイクリングプロトコールを使用した第2のプライマーセットによるネステッドPCRの次のラウンドのために、精製産物の半分を使用した。0.7 $\times$ Ampure XPによるクリーンアップ後に、最終PCR反応に産物の1/10を入力し、それにより、全長Illuminaアダプターを付属させた（1 $\times$ KAPA HiFi Ready Mix、200nMのP5、200nMのP7。95C5分間；8サイクルの98C15秒間、60C30秒間、72C30秒間；72C5分間）。

10

#### 【0549】

##### データ分析

試料1種当たり160万リードのメジアン深度の150 $\times$ 2bp化学により、Illumina MiSeq機器においてライブラリーの配列決定を行った。配列決定は、各リードの細胞標識、分子標識および遺伝子を明らかにした（図55）。各リードの遺伝子の割り当てを整理ソフトウェア「bowtie」（ref）により行った。カスタムMATLABスクリプトを使用して、各リードの細胞および分子標識を分析した。先ず細胞標識により、次に遺伝子および分子標識によりリードを群分けした。細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの特有の分子の数を計算するために、同じ細胞標識および遺伝子割り当てを有するリードの分子標識をクラスター化した。1塩基を超える編集距離を特有のクラスター、よって特有の転写物分子として考慮した。各細胞のデジタル遺伝子発現情報を含む表を試料毎に構築した。表の各列は、特有の細胞標識を表し、各段は、遺伝子を表し、表の各エントリーは、細胞標識1種当たりの遺伝子内の特有の分子の計数を表した。1回のみ配列決定した特有の分子（即ち、冗長性=1）が除去されるように、表にフィルターをかけた。その後、10未満の特有の分子の和を有するまたはパネルにおける4種もしくははそれに満たない遺伝子の同時発現を有する細胞を除去した。次に、フィルターをかけた表をクラスタリング分析のために使用した。MATLABにおける内蔵型機能により、log変換された転写物計数（シュードカウント1を加えた）において主成分分析および階層的クラスタリングを行った。

20

30

#### 【0550】

実施例15に引用されている参考文献は全て、参照によりそれらの全体を援用する：

#### 【0551】

1. A. K. Shalek *et al.*, Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498, 236 (Jun 13, 2013).
2. S. C. Bendall *et al.*, Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science* 332, 687 (May 6, 2011).
3. A. R. Wu *et al.*, Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nature methods* 11, 41 (Jan, 2014).
4. B. Treutlein *et al.*, Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509, 371 (May 15, 2014). 10
5. S. Islam *et al.*, Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome research* 21, 1160 (Jul, 2011).
6. G. K. Fu, J. Hu, P. H. Wang, S. P. Fodor, Counting individual DNA molecules by the stochastic attachment of diverse labels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 9026 (May 31, 2011).
7. G. K. Fu, J. Wilhelmy, D. Stern, H. C. Fan, S. P. Fodor, Digital encoding of cellular mRNAs enabling precise and absolute gene expression measurement by single-molecule counting. *Analytical chemistry* 86, 2867 (Mar 18, 2014). 20
8. K. Bratke, M. Kuepper, B. Bade, J. C. Virchow, Jr., W. Luttmann, Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8<sup>+</sup> T cell differentiation in peripheral blood. *European journal of immunology* 35, 2608 (Sep, 2005).
9. E. W. Newell, N. Sigal, S. C. Bendall, G. P. Nolan, M. M. Davis, Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8<sup>+</sup> T cell phenotypes. *Immunity* 36, 142 (Jan 27, 2012). 30

#### 【 0 5 5 2 】

実施例 16：単一細胞定量化プロトコルの開発

図 56 は、試料における RNA 分子の定量化のための全般的ワークフローを描写する。本実施例では、試料における RNA 分子の総数は、単一細胞における RNA 分子の総数に等しかった。図 56 のステップ 1 に示す通り、RNA 分子のポリ A テイル領域への分子識別子標識 (115) のセットの確率論的ハイブリダイゼーションにより、RNA 分子 (110) を逆転写して、cDNA 分子 (105) を生成した。分子識別子標識 (115) は、オリゴ dT 領域 (120)、標識領域 (125) およびユニバーサル PCR 領域 (130) を含んだ。分子識別子標識のセットは、960 種の異なる種類の標識領域を含有した。

#### 【 0 5 5 3 】

パート I. RNA 分子の逆転写および標識化

次のものを混合することにより、RNA 試料を調製した：

#### 【 0 5 5 4 】

【表 2 2 - 1】

| 遺伝子             | RNA 分子の数           |
|-----------------|--------------------|
| Lys (スパイクイン対照)  | 456                |
| Phe (スパイクイン対照)  | 912                |
| Thr (スパイクイン対照)  | 1824               |
| Dap (スパイクイン対照)  | 6840               |
| Kan (スパイクイン対照)  | 7352               |
| リンパ球細胞株 RNA     | 10pg(1 細胞相当)       |
| MS2 担体(ポリ A なし) | $6 \times 10^{11}$ |

10

## 【0 5 5 5】

エッペンドルフチューブにおいて次の通りに標識化ミックスを調製することにより、RNA 分子を標識した：

## 【0 5 5 6】

【表 2 2 - 2】

|                      | 量 (μL) |
|----------------------|--------|
| RNA 試料               | 2      |
| ms2 RNA 1μg/μL       | 1      |
| 10mM dNTP            | 1      |
| 960dT オリゴプール(セット #4) |        |
| 10μM                 | 0.4    |
| 水                    | 9.1    |

20

## 【0 5 5 7】

注記：d T オリゴプール（セット # 4）は、分子識別子標識のセットを指す。

## 【0 5 5 8】

6 5 °C で 5 分間のインキュベーションにより、分子識別子標識を RNA 分子にハイブリダイズさせた。標識化ミックスを氷上で少なくとも 1 分間貯蔵した。

## 【0 5 5 9】

後述する逆転写ミックスの添加により、標識された RNA 分子を逆転写した：

30

## 【0 5 6 0】

【表 2 2 - 3】

|                    | 量 (μL) |
|--------------------|--------|
| 5×第 1 鎖バッファー       | 4      |
| 0.1M DTT           | 1      |
| suprase-in 20u/μL  | 0.5    |
| superscript III RT | 1      |

## 【0 5 6 1】

標識化ミックス反応物を含むエッペンドルフチューブに逆転写ミックスを添加したら、試料を 3 7 °C で 5 分間インキュベートし、続いて 5 0 °C で 3 0 分間インキュベーションを行い、最後に 7 5 °C で 1 5 分間インキュベーションを行うことにより逆転写反応を実行した。標識された RNA 分子の逆転写は、標識された c DNA 分子（1 7 0）を生成した。

40

## 【0 5 6 2】

RNA 分子を逆転写および標識したら、Ampure ビーズ精製により試料から過剰なオリゴを除去した（図 1 のステップ 2）。逆転写され、かつ標識された RNA 分子を含むエッペンドルフチューブに 2 0 μ L の ampure ビーズを添加し、室温で 5 分間チューブをインキュベートすることにより、Ampure ビーズ精製を行った。ビーズを 7 0 % エタノールで 2 回洗浄して、過剰なオリゴを除去した。エタノール洗浄によって過剰

50

なオリゴを除去したら、ビーズに結合した標識された c D N A 分子を含有するチューブに 20  $\mu$  L の 10 mM T r i s を添加した。

【0563】

図56のステップ3に示す通り、標識された c D N A 分子 (170) をマルチプレックス P C R により増幅した。カスタムフォワードプライマー (F1、図1の135) およびユニバーサル P C R プライマー (140) を使用することにより、標識された c D N A 分子のカスタム増幅を行った。表23は、単一の反応容積において標識されたアンプリコン (180) を生成するための、96種の異なる遺伝子の増幅に使用された96種の異なるカスタムフォワードプライマーを列挙する。

【0564】

マルチプレックス P C R 反応を最適化するために、3種のマルチプレックス P C R 反応混合物を調製した。マルチプレックス P C R 反応1を次の通りに調製した：

【0565】

【表22-4】

|                         | 反応1<br>量 ( $\mu$ L) |
|-------------------------|---------------------|
| 10 $\times$ titanium    | 5                   |
| 10mM dNTP               | 1.5                 |
| 水                       | 35.5                |
| 1 $\mu$ M 各 F1 プライマープール | 5                   |
| PCR004 10 $\mu$ M       | 1                   |
| 精製 cDNA                 | 1                   |
| Titanium ポリメラーゼ         | 1                   |

【0566】

マルチプレックス P C R 反応のための反応条件は、1サイクルの94 $^{\circ}$ C 2分間と、続く25サイクルの94 $^{\circ}$ C 30秒間、57 $^{\circ}$ C 60秒間および68 $^{\circ}$ C 1分間、次に1サイクルの68 $^{\circ}$ C 7分間と、4 $^{\circ}$ Cでの1保持サイクルであった。

【0567】

マルチプレックス P C R 反応2および3を次の通りに調製した：

【0568】

【表22-5】

|                                | 反応2<br>量 ( $\mu$ L) | 反応3<br>量 ( $\mu$ L) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| 2 $\times$ Qiagen マルチプレックスミックス | 25                  | 25                  |
| 1 $\mu$ M 各 F1 プライマープール        | 5                   | 5                   |
| PCR004 10 $\mu$ M              | 1                   | 1                   |
| Q 溶液                           |                     | 5                   |
| 水                              | 18                  | 13                  |
| 精製 cDNA                        | 1                   | 1                   |

【0569】

反応2および3のためのマルチプレックス P C R 反応条件は、1サイクルの95 $^{\circ}$ C 15分間と、続く25サイクルの94 $^{\circ}$ C 30秒間、57 $^{\circ}$ C 90秒間および72 $^{\circ}$ C 1分間、次に1サイクルの68 $^{\circ}$ C 7分間と、4 $^{\circ}$ Cでの1保持サイクルであった。

【0570】

F1 プライマープールは、次のプライマーを含有した：

【0571】

【表 2 2 - 6】

| F1 PCR プライマー | 配列                   |
|--------------|----------------------|
| 100611KanF2  | CTGCCTCGGTGAGTTTTCTC |
| Lys_L_269    | CTTCCCGTTACGGTTTTGAC |
| phe_L_177    | AAAACCGGATTAGGCCATTA |
| thr_L_332    | TCTCGTCATGACCGAAAAAG |
| dap_L_276    | CAACGCCTACAAAAGCCAGT |

## 【0 5 7 2】

Kan、PheおよびDap対照遺伝子をネステッドPCRにより選択的に増幅した。  
ネステッドPCR増幅反応を次の通りに調製した：

## 【0 5 7 3】

【表 2 2 - 7】

| マルチプレックス PCR<br>Rxn # → | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     | 1     | 2     | 3     |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PCR Rxn # →             | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
|                         | μL    | μL    | μL    | μL    | μL    | μL    | μL    | μL    | μL    |
| 10×Taq                  | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   | 2.5   |
| 10mM dNTP               | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   |
| 水                       | 22.25 | 22.25 | 22.25 | 22.25 | 22.25 | 22.25 | 22.25 | 22.25 | 22.25 |
| Cy3 PCR004<br>10μM      | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   |
| KanF3_5P 5μM            | 1     | 1     | 1     |       |       |       |       |       |       |
| Phe_L_215 5μM           |       |       |       | 1     | 1     | 1     |       |       |       |
| Dap_L_290 5μM           |       |       |       |       |       |       | 1     | 1     | 1     |
| マルチプレックス PCR<br>Rxn     | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   | 0.5   |
| USB taq                 | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  | 0.25  |

## 【0 5 7 4】

注記：PCR反応1、4および7に使用したマルチプレックスPCR反応は、マルチプレックスPCR反応#1であった。PCR反応2、5および8に使用したマルチプレックスPCR反応は、マルチプレックスPCR反応#2であった。PCR反応3、6および9に使用したマルチプレックスPCR反応は、マルチプレックスPCR反応#3であった。

## 【0 5 7 5】

ネステッドPCRに使用したプライマーを次の通りに開示する：

## 【0 5 7 6】

【表 2 2 - 8】

| ネステッドPCR<br>プライマー | 配列                          |
|-------------------|-----------------------------|
| KanF4_5P          | /5Phos/GTGGCAAAGCAAAAGTTCAA |
| Phe_L_215         | TGAGAAAGCGTTTGATGATGTA      |
| Dap_L_290         | GCCAGTTTATCCCGTCAAAG        |

## 【0 5 7 7】

反応1～9のためのPCR増幅反応条件は、1サイクルの94℃2分間と、30サイクルの94℃20秒間、55℃20秒間および72℃20秒間、次に1サイクルの72℃4分間と、4℃での1保持サイクルであった。

## 【0 5 7 8】

PCR増幅反応1～9の4μLのPCR産物をアガロースゲルで泳動した。図58Aに示す通り、反応1～3は、Kan対照遺伝子の存在を示し、反応4～6は、Phe対照遺

伝子の存在を示し、反応 7～9 は、D a p 対照遺伝子の存在を示した。

【 0 5 7 9 】

A p p l i e d M i c r o a r r a y I n c . ( A M I ) アレイへのハイブリダイゼーションのために、P C R 反応 1～9 の P C R 産物を調製した。ハイブリダイゼーション混合物を次の通りに調製した：

【 0 5 8 0 】

【表 2 2 - 9 】

|                                | μL |
|--------------------------------|----|
| PCR 産物                         | 20 |
| 洗浄 A(6×SSPE+0.01%Triton X-100) | 55 |
| Cy3 オリゴ(760pM)                 | 1  |

10

【 0 5 8 1 】

それぞれ P C R 反応 1～9 の P C R 産物を含有する混合物に相当するハイブリダイゼーション混合物 1～9 を 9 5 °C で 5 分間変性させ、次に 4 °C に置いた。ハイブリダイゼーション混合物を A M I アレイスライドに移し、一晩 3 7 °C でインキュベートした。

【 0 5 8 2 】

一晩のハイブリダイゼーション後に、A M I アレイスライドを洗浄し、続いてスキャンした。理論上および実際の測定値ならびにパーセント精度を下に描写する：

20

【 0 5 8 3 】

【表 2 2 - 1 0 】

| ハイブリダイゼーション混合物# →     | 1                | 2          | 3             | 4            | 5          | 6             | 7            | 8          | 9             |
|-----------------------|------------------|------------|---------------|--------------|------------|---------------|--------------|------------|---------------|
| マルチプレックス PCR 条件(Rxn#) | Titanium (1)     | Qiagen (2) | Qiagen +Q (3) | Titanium (1) | Qiagen (2) | Qiagen +Q (3) | Titanium (1) | Qiagen (2) | Qiagen +Q (3) |
| 理論上測定値                | 3676 (バイオアナライザー) |            |               | 912          |            |               | 6840         |            |               |
| 実際の測定値                | 1826             | 1740       | 2116          | 299          | 235        | 251           | 1165         | 1077       | 172           |
| %検出                   | 49.7             | 47.3       | 57.6          | 32.8         | 25.8       | 27.5          | 17           | 15.7       | 2.5           |

30

【 0 5 8 4 】

注記：理論上測定値は、K a n、P h e および D a p 対照遺伝子の 1 0 0 % の検出に基づく。

【 0 5 8 5 】

反応 2 の P C R 産物を A m p u r e 精製により精製した。A m p u r e 精製を次の通りに行った：

【 0 5 8 6 】

【表 2 2 - 1 1 】

|                        | μL |
|------------------------|----|
| X01 試料 2 由来の F1 PCR 産物 | 30 |
| Ampure ビーズ             | 30 |

40

【 0 5 8 7 】

A m p u r e 精製反応物を室温で 5 分間インキュベートし、続いて 7 0 % エタノールにおいて洗浄した。精製された P C R 産物を 3 0 μ L の水においてビーズから溶出させた。N a n o d r o p 分光計によって決定される P C R 産物の濃度は、6 n g / μ L であった。

50

## 【0588】

パート I I : ライブラリー調製プロトコール

X 0 1 試料 2 (実施例 1 を参照) から精製した P C R 産物を使用して、D N A ライブラリーを調製した。次のプライマーの混合から F 2 プライマープールを作製した:

## 【0589】

## 【表 2 2 - 1 2】

| F2 PCR プライマー | 配列                    |
|--------------|-----------------------|
| Lys_L_269    | CTTCCCGTTACGGTTTGTGAC |
| phe_L_177    | AAAACCGGATTAGGCCATTA  |
| thr_L_332    | TCTCGTCATGACCGAAAAAG  |
| dap_L_276    | CAACGCCTACAAAAGCCAGT  |

10

## 【0590】

次のものを混合することにより、F 2 プライマーミックスを調製した。

## 【0591】

## 【表 2 2 - 1 3】

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| F2 プライマーミックス               | μL  |
| 水                          | 750 |
| F2 プライマープール各 1uM /合計 100uM | 100 |

20

## 【0592】

F 2 プライマーミックスを 9 5 °C で 3 分間インキュベートし、続いて氷上で貯蔵した。次のライゲーションミックスを F 2 プライマーミックスに添加して、F 2 プライマーライゲーションミックスを生成した:

## 【0593】

## 【表 2 2 - 1 4】

|                     |     |
|---------------------|-----|
| ライゲーションミックス         | μL  |
| 10×DNA リガーゼバッファーNEB | 100 |
| T4 PNK USB          | 50  |

30

## 【0594】

F 2 プライマーライゲーションミックスを 3 7 °C で 1 時間インキュベートし、続いて 6 5 °C で 2 0 分間インキュベーションを行った。F 2 P C R プライマーをエタノール沈殿し、プライマープールの濃度を N a n o d r o p 分光光度計により決定した。F 2 プライマープールを再懸濁して、最終濃度各 1 u M /合計 1 0 0 u M を生成した。

## 【0595】

図 5 6 のステップ 4 に示す通り、標識されたアンプリコン (1 8 0) をマルチプレックス P C R により増幅した。9 6 種の異なるカスタムフォワードプライマー (F 2、図 1 の 1 4 5) およびユニバーサル P C R プライマー (1 4 0) を使用して、単一の反応容積において標識されたアンプリコン (実施例 1 の X 0 1 試料 2) を増幅した。表 2 4 は、9 6 種の異なるカスタムフォワードプライマーを列挙する。

40

## 【0596】

マルチプレックス P C R 反応を次の通りに調製した:

## 【0597】

【表 2 2 - 1 5】

|                         |    |
|-------------------------|----|
| マルチプレックス PCR ミックス       | μL |
| 2×Qiagen マルチプレックスミックス   | 25 |
| 1μM 各 F2 プライマープールキナーゼ   | 5  |
| PCR004 5'P 10μM         | 1  |
| 水                       | 18 |
| 精製された第 1 の PCR X01 試料 2 | 1  |

## 【 0 5 9 8】

マルチプレックス P C R 条件は、1 サイクルの 9 5 °C 1 5 分間と、続く 1 8 サイクルの 9 4 °C 3 0 秒間、5 7 °C 9 0 秒間および 7 2 °C 1 分間、次に 1 サイクルの 6 8 °C 7 分間と、4 °C での 1 保持サイクルであった。マルチプレックス化アンプリコンを A m p u r e 精製により精製し、5 0 μ L の水により溶出させた。アンプリコンの濃度を N a n o d r o p 分光光度計により 3 0 n g / μ L と決定した。5 μ L のアンプリコンをアガロースゲルで泳動した (図 5 8 B)。

## 【 0 5 9 9】

図 5 6 のステップ 5 に示す通り、標識されたアンプリコン (1 8 0) にアダプター (1 5 0、1 5 5) をライゲーションして、アダプターで標識されたアンプリコン (1 9 0) を生成した。アダプターで標識されたアンプリコンを次の通りに生成した：

## 【 0 6 0 0】

【表 2 2 - 1 6】

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| アダプターミックス                          | μL |
| 10×T4 リガーゼ USB                     | 10 |
| 水                                  | 60 |
| 精製されたネステッド PCR 産物                  | 10 |
| アニールされプールされた 96 ABC ア<br>ダプター 50μM | 10 |
| T4 DNA リガーゼ (3μl neb hc、7μl usb)   | 10 |

## 【 0 6 0 1】

アダプターミックスを 1 6 °C で 4 時間インキュベートした。アダプターで標識されたアンプリコンを A m p u r e 精製により精製し、2 0 μ L の 1 0 m M T r i s において溶出させた。

## 【 0 6 0 2】

精製されたアダプターで標識されたアンプリコンを次の通りにギャップ修復および P C R 増幅した：

## 【 0 6 0 3】

【表 2 2 - 1 7】

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| フィルインおよび PCR ミックス          | μL  |
| 10×thermoPol バッファ          | 5   |
| 10mM dNTP                  | 1.5 |
| 水                          | 32  |
| CR P1 10μM                 | 3   |
| CR IDX D1 10μM             | 3   |
| 精製されたアダプターで標識された<br>アンプリコン | 5   |
| Vent exo-2u/μL             | 0.5 |

## 【 0 6 0 4】

P C R 条件は、1 サイクルの 7 2 °C 2 分間と、続く 9 4 °C 1 分間、1 2 サイクルの 9 4

℃ 15 秒間、60℃ 15 秒間および 72℃ 30 秒間、1 サイクルの 72℃ 4 分間と、4℃での 1 保持サイクルであった。PCR 産物を Ampure 精製により精製し、30 μL の TE において溶出させた。Nanodrop 分光法によって決定される精製された PCR 産物の濃度は、22 ng/μL (83 nM) であった。5 μL の PCR 精製産物を 1% アガロースゲルで泳動した (図 58B)。

#### 【0605】

パート I I I . アダプターで標識されたアンプリコンライブラリーの配列決定

MiSeq シーケンサーを使用して、アダプターで標識されたアンプリコンライブラリーを配列決定した。

#### 【0606】

配列マッピング概要を下に示す：

#### 【0607】

#### 【表 22-18】

|                                   | 完全なマッチを要求       | 1bp ミスマッチを許容    |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| 総リード対                             | 7,724,955       |                 |
| ユニバーサルプライマーおよびポリ A マッチを有する RNA の数 | 2,499,444 (32%) | 4,716,378 (61%) |
| 標的(96 種の遺伝子)にマッピングされた RNA の数      | 2,373,700       | 4,489,485       |

#### 【0608】

上の配列マッピング概要に示す通り、ストリンジェントなポリ A マッチング判断基準により、多くのリードが失われた。図 59 は、あらゆる検出された遺伝子にわたるリードおよび計数を示す。

#### 【0609】

配列決定リードを使用して、特定の遺伝子を定量化もした。図 61～図 62 は、様々な遺伝子の検出される標識 1 種当たりの観察されるリード (RPLD) のプロットを描写する。図 61～図 62 に描写されるプロットにおいて、従来の rpkm 値も示す。図 59 は、様々な遺伝子の RPLD および RPKM の比較を要約する。

#### 【0610】

図 63 は、様々な遺伝子の総リード (標識) 対 rpld のプロットを描写する。

#### 【0611】

図 4、7 および 8 に表されるデータを同様に数的形式で表 25 に示す。

#### 【0612】

図 64 は、未検出遺伝子の RPKM のプロットを描写する。

#### 【0613】

アダプターで標識されたアンプリコンライブラリーにおけるスパイクイン対照の量を MiSeq 配列決定により決定した。スパイクイン対照の MiSeq 配列決定の結果を下の表に示す。

#### 【0614】

#### 【表 22-19】

| スパイクイン対照 | 入力 N(mfg) | リード       | 標識(K) |
|----------|-----------|-----------|-------|
| Dap      | 6840      | 1,920,503 | 893   |
| Phe      | 912       | 470,738   | 859   |
| Thr      | 1824      | 410,664   | 847   |
| Lys      | 456       | 282,174   | 847   |
| Kan      | 7352      | 24        | 23    |

#### 【0615】

上の表において、入力 N は、スパイクイン対照の本来の数を指し；リードは、リード対

10

20

30

40

50

の総数を指し；標識（K）は、配列決定によって検出される異なる標識の数を指す。図 60A～図 60D は、それぞれ Lys、Phe、Thr および Asp スパイクイン対照の、検出される標識 1 種当たりの観察されるリード（RPLD）のプロットを描写する。図 60E は、リード 対 入力のプロットを描写する。

【0616】

【表 2 3 - 1】

| 表 23             |                          |
|------------------|--------------------------|
| 名称               | 配列                       |
| NM_144646.3F1    | TTGACTTTGCCTTGGAGAGC     |
| NR_015342.1F1    | TTTTTCTTACAGTGTCTTGGCATA |
| NM_000193.2F1    | CGTGACCCTAAGCGAGGAG      |
| NM_001777.3F1    | TTTGCAGTGATTTGAAGACCA    |
| NM_000600.3F1    | GGCATTCTCTTCTTCTGGTCA    |
| NM_021127.2F1    | CTGGGCTATATACAGTCCTCAAA  |
| NM_004318.3F1    | GGGGTGATTATGACCAGTTGA    |
| NM_002467.4F1    | TGCATGATCAAATGCAACCT     |
| NM_001773.2F1    | TCTTCCGAAAAATCCTCTTCC    |
| NM_001770.5F1    | CTGGGGTCCCAGTCCTATG      |
| NM_001718.4F1    | TGTACTGGGAAGGCAATTTC     |
| NR_023920.1F1    | GAGCCGCTGGGGTTACTC       |
| NM_000267.3F1    | CAGTTAGTTGCTGCACATGGA    |
| NM_000633.2F1    | TTGCATTTCTTTTGGGGAAG     |
| NM_000314.4F1    | GTCATGCATGCAGATGGAAG     |
| NM_021151.3F1    | GCTGCAGTGAGCTGTGATGT     |
| NM_002415.1F1    | GTTCTCTCCGAGCTCACC       |
| NM_004985.3F1    | TCCGAAAGTTTCCAATTCCA     |
| NM_005375.2F1    | TTGTTTGGGAGACTCTGCATT    |
| NM_000555.3F1    | GACCCCACTTGGACTGGTAG     |
| NM_001668.3F1    | GTGATCTTGATTGCGGCTTT     |
| NM_025237.2F1    | GGGGGAAAAACTACAAGTGC     |
| NM_021117.3F1    | TGATTCCTTTTCTCTGCCTGT    |
| NM_016316.2F1    | AAAAACCTCCAGGCCAGACT     |
| NM_021975.3F1    | AATCAAAATAACGCCCCAGA     |
| NM_004333.4F1    | TTGCTAAAAATTGGCAGAGC     |
| NM_001621.4F1    | TTGTTAAGTGCCAAACAAAGGA   |
| NM_005239.5F1    | AAGCTGGGAAGAGCAAAGC      |
| NM_000485.2F1    | AGGACAGAGGGTGGTCGTC      |
| NM_004048.2F1    | TGAGTGCTGTCTCCATGTTTG    |
| NM_001657.2F1    | CCTCACAGCTGTTGCTGTTATT   |
| NM_012238.4F1    | AAAACACCCAGCTAGGACCA     |
| NM_002055.4F1    | AACTGAGGCACGAGCAAAGT     |
| NM_002392.4F1    | GCTTTATGGGTGGATGCTGA     |
| NM_001625.3F1    | ATAATATCGCCAGCCTCAGC     |
| NM_002110.3F1    | TCCAGAGTGTGCTGGATGAC     |
| NM_002943.3F1    | TGCAAGCCATTTATGGGAAT     |
| NM_000059.3F1    | TGGAATGAGGTCTCTTAGTACAGT |
| NM_018136.4F1    | TCCCAGAAACACCTGTAAGGA    |
| NM_003467.2F1    | TGTCTAGGCAGGACCTGTGG     |
| NM_004958.3F1    | AGTGATGCTGCGACTCACAC     |
| NM_006139.3F1    | GGCTCAGAAAGTCTCTCTTTCC   |
| NM_002693.2F1    | CTCCCAAACCTCAGGCTTTCA    |
| NM_001080432.2F1 | AAAGCGCTGGGATTACAGG      |
| NM_005954.2F1    | CGTCCAGTTGCTTGGAGAAG     |
| NM_024865.2F1    | AATAACCTTGGCTGCCGTCT     |
| NM_001905.2F1    | GGGAATTCTCAGTGCCAACT     |
| NM_002046.4F1    | GCATCCTGGGCTACACTGAG     |
| NM_002253.2F1    | TGCTGGGAACAATGACTATAAGA  |
| NM_002356.5F1    | GCCTAAAACACTTTGGGTGGT    |
| NM_000189.4F1    | GGGTGCCCAACAAAATAGAGA    |
| NM_000546.5F1    | GAGACTGGGTCTCGCTTTGT     |

10

20

30

40

【表 2 3 - 2】

|               |                             |
|---------------|-----------------------------|
| NM_152860.1F1 | TGGGGAAGGCTTTCTCTAGG        |
| NM_016231.4F1 | TTCAACTTGAGTGATCTGAGCTG     |
| NM_000518.4F1 | TATGGGCAACCCTAAGGTGA        |
| NM_000905.3F1 | CGCTGCGACACTACATCAAC        |
| NM_005038.2F1 | TGGAGTCTTGCTCTGTCACC        |
| NM_000041.2F1 | ACGAGGTGAAGGAGCAGGT         |
| NM_005957.4F1 | CGATGCCTTTGGGTAGAGAG        |
| NR_002785.2F1 | ACTGATCGTCCAAGGACTGG        |
| NM_000321.2F1 | AAAAAGAAATCTGGTCTTGTTAGAAAA |
| NM_152756.3F1 | TTGAAAAGTGGTAAGGAATTGTGA    |
| NM_000610.3F1 | CACCAAGAATTGATTTTGTAGCC     |
| NR_033314.1F1 | AAAAATGGGGGAAAATGGTG        |
| NM_017460.5F1 | CATGGTTGAAACCCCATCTC        |
| NR_002196.1F1 | TTCAAAGCCTCCACGACTCT        |
| NM_000591.3F1 | GCTGGAACAGGTGCCTAAAG        |
| NM_000106.5F1 | CCCTAAGGGAACGACACTCA        |
| NM_138712.3F1 | ACCTGCTACAAGCCCTGGA         |
| NM_004304.4F1 | GGATCCCTAAGACCGTGGAG        |
| NM_000754.3F1 | CCACCTCAGAGGCTCCAA          |
| NM_000492.3F1 | TGCTGTATTTTAAAAGAATGATTATGA |
| NM_000444.4F1 | GTAGCTGGGACGCTGGTTTA        |
| NM_002463.1F1 | ATTCCCTTCCCCCTACAAGA        |
| NM_000552.3F1 | CCTGAGTGCAACGACATCAC        |
| NM_005430.3F1 | GGGGGAACCAGCAGAAAT          |
| NM_003150.3F1 | GACCTAGGGCGAGGGTTC          |
| NM_000388.3F1 | AATTCCTGAAGCCAGATCCA        |
| NM_007294.3F1 | AAAATGTTTATTGTTGTAGCTCTGG   |
| NM_005933.3F1 | TTTCAAGAGCTCAACAGATGACA     |
| NM_002343.3F1 | GACTGCCCGGACAAGTTTT         |
| NM_000376.2F1 | GAGAAGGTGCCCCAAAATG         |
| NM_002462.3F1 | AGCCACTGGACTGACGACTT        |
| NM_021005.3F1 | GGAGGACTAGTGAGGGAGGTG       |
| NM_012343.3F1 | GGCAAGTGATGTGGCAATTA        |
| NM_001741.2F1 | GTTGGAGCACCTGGAAAGAA        |
| NM_014417.4F1 | ATGCCTGCCTCACCTTCAT         |
| NM_014009.3F1 | ACAGGGGCACTGTCAACAC         |
| NM_006908.4F1 | AAAAATCATGTGTGTCAGCTTT      |
| NM_005228.3F1 | TGCTTTCACAACATTTGCAG        |
| NM_013994.2F1 | AATGTTTCCTTGTGCCTGCT        |
| NM_000639.1F1 | ATATCCTGAGCCATCGGTGA        |
| NM_002701.4F1 | TTTTGGTACCCCAGGCTATG        |
| NM_000268.3F1 | ACCCCGTGGCATTACATAAC        |
| NM_003140.1F1 | CTTCCAGGAGGCACAGAAAT        |
| NM_000551.3F1 | CTAACCTGGGCGACAGAGTG        |

【 0 6 1 8 】

10

20

30

40

【表 2 4 - 1】

| 表 24             |                            |
|------------------|----------------------------|
| 名称               | 配列                         |
| NM_144646.3F2    | ATATTTGGACATAACAGACTTGGAA  |
| NR_015342.1F2    | TGCTGACTTTTAAAATAAGTGATTCG |
| NM_000193.2F2    | GCGGCAGAGTAGCCCTAAC        |
| NM_001777.3F2    | TGGGCTATTTCTATTGCTGCT      |
| NM_000600.3F2    | AATGGAAAGTGGCTATGCAG       |
| NM_021127.2F2    | GGTTGTAGTCACTTTAGATGGAAAA  |
| NM_004318.3F2    | TTTGTGTTGACTTTGAGCACCA     |
| NM_002467.4F2    | AATGTTTCTCTGTAAATATTGCCATT |
| NM_001773.2F2    | CACCCCATATGGTCATAGC        |
| NM_001770.5F2    | AGCACCAGGTGATCCTCAG        |
| NM_001718.4F2    | TGTTTTGCTGTAAACATTGAAGGA   |
| NR_023920.1F2    | TAATGCCACAGTGGGGATG        |
| NM_000267.3F2    | GGGCCTAAACTTTGGCAGTT       |
| NM_000633.2F2    | TTTTACCTTCCATGGCTCTTTT     |
| NM_000314.4F2    | GCCTTACTCTGATTGAGCCTCTT    |
| NM_021151.3F2    | CGTAACAAAATTCATTGTGGTGT    |
| NM_002415.1F2    | AGAACCGCTCCTACAGCAAG       |
| NM_004985.3F2    | GTGCTTTCTTTTGTGGGACA       |
| NM_005375.2F2    | GGGAGTTCTGCATTTGATCC       |
| NM_000555.3F2    | TGGGTCAGAGGACTTCAAGG       |
| NM_001668.3F2    | AGGGTTCTGATCACATTGCAC      |
| NM_025237.2F2    | CTGCAGGACTGGTCGTTTTT       |
| NM_021117.3F2    | AGGGCAGGGTAGAGAGGGTA       |
| NM_016316.2F2    | TTCTTCCATGCGGAGAAATC       |
| NM_021975.3F2    | CATGGCTGAAGGAAACCAGT       |
| NM_004333.4F2    | TTGCCAGCTATCACATGTCC       |
| NM_001621.4F2    | TCTTTTCCTGTACCAGGTTTTTC    |
| NM_005239.5F2    | TGACTGGGAACATCTTGCTG       |
| NM_000485.2F2    | TGGCACCTGTACCCTTCTTC       |
| NM_004048.2F2    | TTCAATCTCTTGCACTCAAAGC     |
| NM_001657.2F2    | TGGAGTCACTGCCAAGTCAT       |
| NM_012238.4F2    | TTTGCATGATGTTTGTGTGC       |
| NM_002055.4F2    | GCACCCACTCTGCTTTGACT       |
| NM_002392.4F2    | ACCATGTAGCCAGCTTTCAA       |
| NM_001625.3F2    | GCAACTGGGCATGAGTACCT       |
| NM_002110.3F2    | CCACACCCCTTCCTACTC         |
| NM_002943.3F2    | AGTCTGCTTATTTCAGCTGTTT     |
| NM_000059.3F2    | TCCTGTTCAAAAGTCAGGATGA     |
| NM_018136.4F2    | AAATCACAAATCCCCTGCAA       |
| NM_003467.2F2    | CTGAACATTCCAGAGCGTGT       |
| NM_004958.3F2    | CAGTGGGACCACCCTCACT        |
| NM_006139.3F2    | TCTGTAGATGACCTGGCTTGC      |
| NM_002693.2F2    | TCAGAACCAAGATGCCAACA       |
| NM_001080432.2F2 | CATGACCCAGCCTATGGTTT       |
| NM_005954.2F2    | ACCTCCTGCAAGAAGAGCTG       |
| NM_024865.2F2    | TTGGGAGGCTTTGCTTATTTT      |
| NM_001905.2F2    | CTGGGAAACACTCCTTGCAT       |
| NM_002046.4F2    | CAACGAATTTGGCTACAGCA       |
| NM_002253.2F2    | CAAAGGTCATAATGCTTTTCAGC    |
| NM_002356.5F2    | TTTGACGTATCTTTTCATCCAA     |
| NM_000189.4F2    | TGTTGTTGGTTTCCAAAAAGG      |
| NM_000546.5F2    | GCCAACTTTTGCATGTTTGT       |
| NM_152860.1F2    | CCCAAGCTGATCTGGTGGT        |
| NM_016231.4F2    | TGCTGTGAAAGAAACAAACATTG    |

10

20

30

40

【表 2 4 - 2】

|               |                          |
|---------------|--------------------------|
| NM_000518.4F2 | GCACGTGGATCCTGAGAACT     |
| NM_000905.3F2 | CCAGCCCAGAGACACTGATT     |
| NM_005038.2F2 | CACGCCCAGCTAATTTTTGT     |
| NM_000041.2F2 | CCTGGTGGAAGACATGCAG      |
| NM_005957.4F2 | TCACACCTGTAATCCCAGCA     |
| NR_002785.2F2 | CAGAGCTCCGCCTCATTAGT     |
| NM_000321.2F2 | TCCATTTTCATCATTGTTTCTGC  |
| NM_152756.3F2 | TGGTGTTTGTAGGTCAGTGAACA  |
| NM_000610.3F2 | AACATGGTCCATTACCTTTATG   |
| NR_033314.1F2 | AGAGCGAGACTCCGTCTCAA     |
| NM_017460.5F2 | AGTGAGCTGAGATTGCACCA     |
| NR_002196.1F2 | AGACGGCCTTGAGTCTCAGT     |
| NM_000591.3F2 | GGGAATCCCTTCCTGGTC       |
| NM_000106.5F2 | CTTCCTGCCTTTCTCAGCAG     |
| NM_138712.3F2 | TGCAGGTGATCAAGAAGACG     |
| NM_004304.4F2 | GGTTTTGAGCATGGGTTTCAT    |
| NM_000754.3F2 | CCAGCCCAGTCTTATGGAT      |
| NM_000492.3F2 | AAACTGGGACAGGGGAGAAC     |
| NM_000444.4F2 | TTTGGGTAGGTGACCTGCTT     |
| NM_002463.1F2 | TCACTGAACGAATGAGTGCTG    |
| NM_000552.3F2 | ACGATGTGCAGGACCAGTG      |
| NM_005430.3F2 | AATTTGCACTGAAACGTGGA     |
| NM_003150.3F2 | CTGTTGTGGCCCATTAAGAA     |
| NM_000388.3F2 | TTCCCTCCAGCAGTGGTATT     |
| NM_007294.3F2 | CACCAGGAAGGAAGCTGTTG     |
| NM_005933.3F2 | TTTCCTTGTGTTCTTCCAAGC    |
| NM_002343.3F2 | TCGCAGGCATTACTAATCTGAA   |
| NM_000376.2F2 | CTCTGGCTGGCTAACTGGAA     |
| NM_002462.3F2 | AGAGCCCCACCCTCAGAT       |
| NM_021005.3F2 | TGTGCAGAGTTCTCCATCTGA    |
| NM_012343.3F2 | TGCCTGTTACAAATATCAAGGAA  |
| NM_001741.2F2 | TTTCCCTTCTTGCAATCCTTC    |
| NM_014417.4F2 | TGTGACCACTGGCATTTCATT    |
| NM_014009.3F2 | CTCACACACACGGCCTGTTA     |
| NM_006908.4F2 | CACTTGACCAATACTGACCTCT   |
| NM_005228.3F2 | GTGTGTGCCCTGTAACTGA      |
| NM_013994.2F2 | CCACTTCCCACTTGCAGTCT     |
| NM_000639.1F2 | TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT    |
| NM_002701.4F2 | TCTCCCATGCATTCAAACCTG    |
| NM_000268.3F2 | TCTAAGTGTTCCTCACTGACAGG  |
| NM_003140.1F2 | TACTCTGCAGCGAAGTGCAA     |
| NM_000551.3F2 | CCAAGATCACACCATTGCAC     |
| NM_144646.3F2 | ATATTTGGACATAACAGACTTGAA |

【 0 6 2 0 】

10

20

30

【表 2 5】

| 表 25   |        |      |                     |
|--------|--------|------|---------------------|
| 遺伝子    | リードの数  | 標識の数 | kb 当たりのリード/百万(RPKM) |
| APOE   | 1585   | 408  | 0.2                 |
| APRT   | 11280  | 56   | 103.4               |
| AREG   | 147    | 102  | 0.0                 |
| ASPM   | 4683   | 53   | 4.4                 |
| B2M    | 209362 | 698  | 3891.7              |
| BBC3   | 8      | 1    | 0.0                 |
| BCL2   | 3627   | 27   | 33.2                |
| BDNF   | 12778  | 116  | 0.3                 |
| CD19   | 38     | 5    | 43.1                |
| CD44   | 6789   | 47   | 8.1                 |
| COMT   | 2828   | 16   | 10.7                |
| CTPS1  | 3998   | 15   | 25.4                |
| CXCR4  | 10547  | 54   | 19.2                |
| CYP3A4 | 80982  | 267  | 0.1                 |
| DCX    | 28     | 24   | 0.0                 |
| ETS2   | 6      | 5    | 0.0                 |
| FASLG  | 3182   | 565  | 0.2                 |
| FTO    | 8877   | 58   | 11.3                |
| GAPDH  | 227129 | 661  | 3870.8              |
| HCK    | 294    | 2    | 2.4                 |
| HK2    | 593    | 2    | 12.7                |
| IGJ    | 119449 | 454  | 438.9               |
| KDR    | 2      | 2    | 0.0                 |
| KRAS   | 64     | 31   | 6.8                 |
| LTF    | 126    | 90   | 0.0                 |
| MARCKS | 1563   | 12   | 36.9                |
| MIF    | 17775  | 89   | 760.4               |
| MLL    | 72     | 9    | 2.6                 |
| MTHFR  | 4854   | 282  | 3.9                 |
| MX1    | 100701 | 285  | 119.0               |
| MX2    | 2145   | 13   | 45.2                |
| MYB    | 18361  | 100  | 2.8                 |
| MYC    | 6859   | 27   | 130.5               |
| NF1    | 4      | 1    | 3.7                 |
| NNT    | 15673  | 78   | 14.1                |
| PMAIP1 | 50604  | 244  | 126.9               |
| POLG   | 5163   | 46   | 7.4                 |
| POU5F1 | 1924   | 12   | 1.0                 |
| PPID   | 27354  | 303  | 39.0                |
| PTEN   | 20884  | 109  | 51.6                |
| RAC1   | 12454  | 67   | 44.8                |
| RB1    | 1420   | 14   | 46.1                |
| RELA   | 3893   | 26   | 17.9                |
| RICTOR | 898    | 5    | 5.2                 |
| RORA   | 954    | 7    | 0.1                 |
| SOST   | 1      | 1    | 0.0                 |
| SP7    | 1      | 1    | 0.0                 |
| STAT3  | 706    | 28   | 16.9                |
| TP53   | 900    | 34   | 14.6                |
| VHL    | 11576  | 106  | 0.0                 |

【0 6 2 1】

本発明の好まれる実施形態を本明細書に示し、記載してきたが、当業者には、かかる実施形態が単なる例として提供されていることが明らかであろう。そこで、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、多数の変種、変化および置換を思い付くであろう。本明

10

20

30

40

50

細書に記載されている本発明の実施形態の様々な代替物を本発明の実施において用いることができることを理解されたい。

#### 【0622】

本明細書に記載されている刊行物は、単に本願の出願日に先立つその開示のために提供されている。本明細書におけるいかなる記述も、本発明が、先行発明のためにかかる刊行物に先行することに対する権利を与えられていないことの承認として解釈すべきではない。さらに、提供されている刊行物の日付は、実際の刊行物の日付とは異なる場合があり、独立的に確認する必要がある。

#### 【0623】

##### 実施形態

2種またはそれを超える試料における分子を分析するための方法が本明細書に開示されている。方法は、a) i) 複数の核酸を含む第1の試料を複数の第1の試料タグと接触させて、複数の第1の試料タグが付いた核酸を生成し、i i) 複数の核酸を含む第2の試料を複数の第2の試料タグと接触させて、複数の第2の試料タグが付いた核酸を生成することにより、複数の試料タグが付いた核酸を生成するステップであって、複数の第2の試料タグが、第1の試料タグとは異なるステップと、b) 複数の試料タグが付いた核酸を複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成するステップと、c) 標識された核酸のうち少なくとも1種を検出し、これにより、複数の試料における複数の核酸の計数を決定するステップとを含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、単一細胞または細胞ライセートを含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、単一細胞からなることができる。試料タグは、標識された核酸が起源をもつ細胞を同定する細胞性標識を含み得る。単一細胞からなる複数の試料は、1種または複数の供給源に由来し得る。試料タグは、単一細胞の供給源を同定する試料指標領域を含み得る。分子識別子標識は、分子標識と称することができる。複数の試料のうち1種または複数は、1, 000, 000個未満の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、100, 000個未満の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、10, 000個未満の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、1, 000個未満の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、100個未満の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数は、細胞ライセートを含み得る。

#### 【0624】

あるいは、複数の試料における分子を分析するための方法は、a) i) 第1の試料を第1の複数の試料タグと接触させるステップであって、第1の複数の試料タグが、同一核酸配列を含むステップと、i i) 第1の試料を、異なる核酸配列を含む第1の複数の分子識別子標識と接触させて、これにより、複数の第1の標識された核酸を生成するステップと、i i i) 第2の試料を第2の複数の試料タグと接触させるステップであって、第2の複数の試料タグが、同一核酸配列を含むステップと、i v) 第2の試料を、異なる核酸配列を含む第2の複数の分子識別子標識と接触させ、これにより、複数の第2の標識された核酸を生成するステップとを含む、複数の標識された核酸を生成するステップであって、複数の標識された核酸が、複数の第1の標識された核酸および第2の標識された核酸を含むステップと、b) 多数の異なる標識された核酸を決定し、これにより、複数の試料における複数の核酸の計数を決定するステップとを含み得る。試料タグは、標識された核酸が起源をもつ細胞を同定する細胞性標識を含み得る。試料タグは、単一細胞の供給源を同定する試料指標領域を含み得る。分子識別子標識は、分子標識と称することができる。

#### 【0625】

あるいは、複数の試料における分子を分析するための方法は、a) 2種またはそれを超える異なる核酸を含む複数の試料を複数の試料タグおよび複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成するステップであって、i) 複数の標識された核酸が、2種またはそれを超える試料タグおよび2種またはそれを超える分子識別子標識に付着させた2種またはそれを超える核酸を含み、i i) 複数の試料の第1の試料由来の核酸に付着させた試料タグが、複数の試料の第2の試料由来の核酸分子に付着させた試料タグと

は異なり、i i i) 同じ試料における2種またはそれを超える同一核酸を、2種またはそれを超える異なる分子識別子標識に付着させるステップと、b) 標識された核酸の少なくとも一部を検出し、これにより、複数の試料における2種またはそれを超える異なる核酸の計数を決定するステップとを含み得る。試料タグは、標識された核酸が起源をもつ細胞を同定する細胞性標識を含み得る。試料タグは、単一細胞の供給源を同定する試料指標領域を含み得る。分子識別子標識は、分子標識と称することができる。

#### 【0626】

a) 複数の試料の第1の試料由来の第1の複数の分子を、分子バーコードの第1のセットと接触させて、第1の複数の標識された分子を生成するステップであって、第1の複数の分子バーコードの分子バーコードが、標識領域および試料指標領域を含むステップと、  
b) 複数の試料の第2の試料由来の第2の複数の分子を、分子バーコードの第2のセットと接触させて、第2の複数の標識された分子を生成するステップであって、第2の複数の分子バーコードの分子バーコードが、標識領域および試料指標領域を含み、第1の複数の分子バーコードおよび第2の複数の分子バーコードが、少なくとも分子バーコードの試料指標領域によって異なるステップと、  
c) 第1の複数の標識された分子の2種またはそれを超える分子のうち少なくとも一部および第2の複数の標識された分子の2種またはそれを超える分子のうち少なくとも一部を検出し、これにより、複数の試料における2種またはそれを超える分子の計数を決定するステップとを含む、複数の試料における分子を分析するための方法が本明細書にさらに開示されている。第1の複数の分子は、核酸分子を含み得る。第2の複数の分子は、核酸分子を含み得る。標識領域は、分子標識と称することができる。分子バーコードは、細胞性標識をさらに含み得る。複数の試料のうちの1試料が単一細胞からなる事例では、試料指標領域は、細胞性標識を指すことができる。

#### 【0627】

a) 選ばれたプライマーが、i) 3個以下の逐次的グアニン、3個以下の逐次的シトシン、4個以下の逐次的アデニンおよび4個以下の逐次的チミン、i i) グアニンまたはシトシンである少なくとも3、4、5または6個のヌクレオチド、ならびにi i i) ヘアピン構造を容易に形成しない配列を含む、第1のパスと、b) i) 全転写物の高い被覆度を有する複数の配列を選ぶ第1のラウンド、ならびにi i) 残る転写物の最高被覆度および4以下の他の選ばれた配列との相補的スコアを有する配列を選択する1回または複数の後続ラウンドを含む第2のパスと、c) 被覆度が飽和するまたはカスタムプライマーの総数が約96未満またはそれに等しくなるまで、選定されたセットへの配列の付加とを含む、カスタムプライマーを選択する方法が本明細書に開示されている。

#### 【0628】

a) i) 複数の核酸を含む第1の試料を複数の第1の試料タグと接触させて、複数の第1の試料タグが付いた核酸を生成し、i i) 複数の核酸を含む第2の試料を複数の第2の試料タグと接触させて、複数の第2の試料タグが付いた核酸を生成することにより、複数の試料タグが付いた核酸を生成するステップであって、複数の第1の試料タグが、第2の試料タグとは異なるステップと、b) 複数の試料タグが付いた核酸を複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成し、これにより、標識された核酸ライブラリーを生成するステップとを含む、標識された分子ライブラリーを生成するための方法が本明細書にさらに開示されている。

#### 【0629】

複数の試料における分子の分析における使用のためのキットが本明細書に開示されている。キットは、a) 1種または複数の分子バーコードのセットの分子バーコードが、試料指標領域および標識領域を含み、(i) 分子バーコードのセットの分子バーコードの試料指標領域が同じであり、(i i) 分子バーコードの第1のセットの試料指標領域が、分子バーコードの第2のセットの試料指標領域とは異なる、分子バーコードの2またはそれを超えるセットと、b) 複数のビーズとを含み得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセットは、複数のビーズに付着させることができる。分子バーコードの2またはそれを超えるセットは、ビーズにコンジュゲートすることができる。標識領域は、分子標識と称

することができる。分子バーコードは、細胞性標識をさらに含み得る。複数の試料のうちの1試料が単一細胞からなる事例では、試料指標領域は、細胞性標識を指すことができる。

#### 【0630】

複数の試料における分子を分析するためのキットは、a) 第1の複数の分子バーコードを含む第1の容器であって、(i) 分子バーコードが、試料指標領域および標識領域を含み、(ii) 第1の複数の分子バーコードの分子バーコードの総数の少なくとも約80%の試料指標領域が同一であり、(iii) 第1の複数の分子バーコードの2種またはそれを超えるバーコードの標識領域が異なる第1の容器と、(b) 第2の複数の分子バーコードを含む第2の容器であって、(i) 分子バーコードが、試料指標領域および標識領域を含み、(ii) 第1の複数の分子バーコードの分子バーコードの総数の少なくとも約80%の試料指標領域が同一であり、(iii) 第1の複数の分子バーコードの2種またはそれを超えるバーコードの標識領域が異なる第2の容器とを含み得、第1の複数の分子バーコードの試料指標領域は、第2の複数の分子バーコードの試料指標領域とは異なる。標識領域は、分子標識と称することができる。分子バーコードは、細胞性標識をさらに含み得る。複数の試料のうちの1試料が単一細胞からなる事例では、試料指標領域は、細胞性標識を指すことができる。

10

#### 【0631】

あるいは、複数の試料における分子を分析するためのキットは、a) 第1の複数の試料タグを含む第1の容器であって、複数の試料タグが、同じ核酸配列を含む第1の容器と、b) 第1の複数の分子識別子標識を含む第2の容器であって、複数の分子識別子標識が、2種またはそれを超える異なる核酸配列を含む第2の容器とを含む。標識領域は、分子標識と称することができる。複数の試料のうちの1試料が単一細胞からなる事例では、試料タグは、細胞性標識を指すことができる。キットは、第1の複数の細胞性標識を含む第3の容器をさらに含み得、複数の細胞性標識は、2種またはそれを超える異なる核酸配列を含む。

20

#### 【0632】

本明細書に開示されているキットおよび方法は、分子バーコードの1または複数のセットを含み得る。本明細書に開示されているキットおよび方法は、1種または複数の分子バーコードを含み得る。分子バーコードは、試料指標領域、分子標識領域、細胞性標識領域またはこれらの組合せを含み得る。分子バーコードのセットの少なくとも2種の分子バーコードは、2種またはそれを超える異なる標識領域を含み得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセットの2種またはそれを超える分子バーコードの標識領域は、同一となり得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセットは、同じ標識領域を含む分子バーコードを含み得る。複数の試料のうちの1試料が単一細胞からなる事例では、試料タグは、細胞性標識を指すことができる。

30

#### 【0633】

本明細書に開示されている分子バーコードは、試料指標領域を含み得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセットの分子バーコードの試料指標領域は、異なり得る。試料指標領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約80%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約60%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約40%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約20%未満相同となり得る。

40

50

## 【0634】

本明細書に開示されている分子バーコードは、細胞性標識を含み得る。分子バーコードの2またはそれを超えるセットの分子バーコードの細胞性標識は、異なり得る。細胞性標識は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの細胞性標識の2種またはそれを超える配列は、約90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの細胞性標識の2種またはそれを超える配列は、約80%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの細胞性標識の2種またはそれを超える配列は、約60%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの細胞性標識の2種またはそれを超える配列は、約40%未満相同となり得る。分子バーコードの2種またはそれを超える異なるセットの細胞性標識の2種またはそれを超える配列は、約20%未満相同となり得る。

10

## 【0635】

本明細書に開示されている分子バーコードは、ユニバーサルPCR領域をさらに含み得る。分子バーコードは、標的特異的領域をさらに含み得る。分子バーコードは、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。標識領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。試料指標領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。ユニバーサルPCR領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。標的特異的領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。

20

## 【0636】

本明細書に開示されているキットおよび方法は、試料タグの1または複数のセットを含み得る。本明細書に開示されているキットおよび方法は、1種または複数の試料タグを含み得る。試料タグは、試料指標領域を含み得る。試料タグの第1のセットの試料タグの試料指標領域は、試料タグの第2のセットの試料タグの試料指標領域とは異なり得る。試料指標領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。試料タグの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%未満相同となり得る。試料タグの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約80%未満相同となり得る。試料タグの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約60%未満相同となり得る。試料タグの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約40%未満相同となり得る。試料タグの2種またはそれを超える異なるセットの試料指標領域の2種またはそれを超える配列は、約20%未満相同となり得る。

30

## 【0637】

本明細書に開示されているキットおよび方法は、分子識別子標識の1または複数のセットを含み得る。本明細書に開示されているキットおよび方法は、1種または複数の分子識別子標識を含み得る。分子識別子標識は、標識領域を含み得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域は、異なり得る。標識領域は、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域の配列は、約90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%または5%未満相同となり得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域の配列は、約80%未満相同となり得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域の配列は、約60%未満相同となり得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域の配列は、約40%未満相同となり得る。分子識別子標識のセットの2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域の配列は、約20%未満相同となり得る。標識領域は、細胞性標識領域と称することができる。

40

50

## 【0638】

本明細書に開示されているキットおよび方法は、1種または複数のプライマーをさらに含み得る。1種または複数のプライマーは、ユニバーサルPCR領域に対し少なくとも部分的に相補的な配列を含み得る。1種または複数のプライマーは、ユニバーサルPCR領域に対し少なくとも約50%相補的な配列を含み得る。1種または複数のプライマーは、ユニバーサルPCR領域に対し少なくとも約80%相補的な配列を含み得る。

## 【0639】

本明細書に開示されているキットおよび方法は、1種または複数の増幅剤をさらに含み得る。増幅剤は、プライマーの固定されたパネルを含み得る。増幅剤は、1種または複数のカスタムプライマーを含み得る。増幅剤は、1種または複数の対照プライマーを含み得る。増幅剤は、1種また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。増幅剤は、1種または複数のPCR試薬を含み得る。1種または複数のPCR試薬は、ポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)、バッファーまたはこれらの組合せを含み得る。

## 【0640】

本明細書に開示されているキットおよび方法は、1個または複数のビーズをさらに含み得る。分子バーコードは、1個または複数のビーズに付着させることができる。試料タグは、1個または複数のビーズに付着させることができる。分子識別子標識は、1個または複数のビーズに付着させることができる。

## 【0641】

ビーズの1または複数のセットを作製するための方法が本明細書にさらに開示されている。方法は、a) 複数のウェル内に複数の第1の核酸を沈着させるステップであって、複数のウェルのうち2個またはそれを超える異なるウェルが、複数の核酸のうち2種またはそれを超える異なる核酸を含み得るステップと、b) 複数のウェルのうち1個または複数のウェルを1個またはそれより少ないビーズと接触させて、複数の単一の標識ビーズを生成するステップであって、複数の第1の標識されたビーズのうち単一の標識ビーズが、複数の第1の核酸の1核酸に付着させたビーズを含むステップと、c) 複数のウェル由来の複数の第1の標識されたビーズをプールして、第1の標識されたビーズのプールを生成するステップと、d) 第1の標識されたビーズのプールを後続の複数のウェルに分布させるステップであって、後続の複数のウェルのうち2個またはそれを超えるウェルが、複数の後続の核酸のうち2種またはそれを超える異なる核酸を含むステップと、e) 1個または複数の第1の標識されたビーズに複数の後続の核酸のうち1種または複数の核酸を付着させて、複数の特有に標識されたビーズを生成するステップとを含み得る。

## 【0642】

本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、複数の核酸を分析することができる。本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、約100,000,000種未満の核酸を分析することができる。本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、約10,000,000種未満の核酸を分析することができる。本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、約1,000,000種未満の核酸を分析することができる。複数のタンパク質を分析する方法が本明細書にさらに開示されている。方法は、a) i) 複数のポリペプチドを含む第1の試料を複数の第1の試料タグと接触させて、複数の第1の試料タグが付いたポリペプチドを生成し、ii) 複数のポリペプチドを含む第2の試料を複数の第2の試料タグと接触させて、複数の第2の試料タグが付いたポリペプチドを生成することにより、複数の試料タグが付いたポリペプチドを生成するステップであって、複数の第1の試料タグが、複数の第2の試料タグとは異なるステップと、b) 複数の試料タグが付いたポリペプチドを複数の分子識別子標識と接触させて、複数の標識されたポリペプチドを生成するステップと、c) 標識されたポリペプチドの少なくとも一部を検出し、これにより、複数の試料における複数のポリペプチドの計数を決定するステップとを含み得る。

## 【0643】

複数の試料におけるポリペプチドを分析する方法は、1種または複数の標識されたポリペプチドの同一性を決定するステップをさらに含み得る。1種またはそれを超える標識されたポリペプチドの同一性を決定するステップは、質量分析を含み得る。方法は、第1の試料の標識されたポリペプチドを、第2の試料の標識されたポリペプチドと組み合わせるステップをさらに含み得る。標識されたポリペプチドは、異なる標識されたポリペプチドの数の決定前に組み合わせることができる。方法は、第1の試料タグが付いたポリペプチドおよび第2の試料タグが付いたポリペプチドを組み合わせるステップをさらに含み得る。第1の試料タグが付いたポリペプチドおよび第2の試料タグが付いたポリペプチドは、複数の分子識別子標識との接触前に組み合わせることができる。異なる標識されたポリペプチドの数の決定は、タグ付けされた標識されたポリペプチドの少なくとも一部の検出を含み得る。タグ付けされた標識されたポリペプチドの少なくとも一部の検出は、試料タグ、分子特異的タグ、ポリペプチドまたはこれらの組合せの少なくとも一部の検出を含み得る。

10

#### 【0644】

本明細書に開示されている方法は、複数の試料を複数の試料タグおよび複数の分子識別子標識と接触させるステップを含み得る。複数の試料を複数の試料タグおよび複数の分子識別子標識と接触させるステップは、同時に行うことができる。複数の試料を複数の試料タグおよび複数の分子識別子標識と接触させるステップは、一斉に行うことができる。複数の試料を複数の試料タグおよび複数の分子識別子標識と接触させるステップは、逐次的に行うことができる。複数の試料を複数の試料タグと接触させるステップは、複数の試料を複数の分子識別子標識と接触させる前に行うことができる。複数の試料を複数の試料タグと接触させるステップは、複数の試料を複数の分子識別子標識と接触させた後に行うことができる。

20

#### 【0645】

本明細書に開示されている方法は、第1の試料を第1の複数の試料タグおよび第1の複数の分子識別子標識と接触させるステップを含み得る。第1の試料を第1の複数の試料タグおよび第1の複数の分子識別子標識と接触させるステップは、同時に行うことができる。第1の試料を第1の複数の試料タグおよび第1の複数の分子識別子標識と接触させるステップは、一斉に行うことができる。第1の試料を第1の複数の試料タグおよび第1の複数の分子識別子標識と接触させるステップは、逐次的に行うことができる。第1の試料を第1の複数の試料タグと接触させるステップは、第1の試料を第1の複数の分子識別子標識と接触させる前に行うことができる。第1の試料を第1の複数の試料タグと接触させるステップは、第1の試料を第1の複数の分子識別子標識と接触させた後に行うことができる。

30

#### 【0646】

本明細書に開示されている方法は、第2の試料を第2の複数の試料タグおよび第2の複数の分子識別子標識と接触させるステップを含み得る。第2の試料を第2の複数の試料タグおよび第2の複数の分子識別子標識と接触させるステップは、同時に行うことができる。第2の試料を第2の複数の試料タグおよび第2の複数の分子識別子標識と接触させるステップは、一斉に行うことができる。第2の試料を第2の複数の試料タグおよび第2の複数の分子識別子標識と接触させるステップは、逐次的に行うことができる。第2の試料を第2の複数の試料タグと接触させるステップは、第2の試料を第2の複数の分子識別子標識と接触させる前に行うことができる。第2の試料を第2の複数の試料タグと接触させるステップは、第2の試料を第2の複数の分子識別子標識と接触させた後に行うことができる。

40

#### 【0647】

本明細書に開示されている方法およびキットは、2種またはそれを超える試料を組み合わせるステップをさらに含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、第1の試料および第2の試料を組み合わせるステップをさらに含み得る。第1および第2の試料は、複数の分子識別子標識との接触前に組み合わせることができる。第1および第2の

50

試料は、標識された核酸を検出する前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子を確率論的に標識する前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子を確率論的に標識した後に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子を検出する前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料において2種またはそれを超える分子を検出した後に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子を分析する前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子を分析した後に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子において1種または複数のアッセイを実行する前に組み合わせることができる。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子において1種または複数のアッセイを実行した後に組み合わせることができる。

10

**【0648】**

本明細書に開示されている方法およびキットは、試料における2種またはそれを超える分子において1種または複数のアッセイを実行するステップを含み得る。1種または複数のアッセイは、1回または複数の増幅反応を含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、1回または複数の増幅反応を実行して、標識された核酸アンプリコンを生成するステップをさらに含み得る。標識された核酸は、標識された核酸を検出する前に増幅することができる。方法は、1回または複数の増幅反応を実行する前に第1および第2の試料を組み合わせるステップをさらに含み得る。

20

**【0649】**

増幅反応は、試料タグの少なくとも一部の増幅を含み得る。増幅反応は、標識の少なくとも一部の増幅を含み得る。増幅反応は、試料タグ、標識、核酸またはこれらの組合せの少なくとも一部の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の少なくとも約1%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の少なくとも約5%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の少なくとも約1%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の少なくとも約5%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の少なくとも約10%の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の約95%、90%、80%、70%、60%または50%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の約50%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の約20%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の核酸の核酸の総数の約10%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の約95%、90%、80%、70%、60%または50%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の約40%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の約25%未満の増幅を含み得る。増幅反応は、複数の標識された核酸の標識された核酸の総数の約10%未満の増幅を含み得る。

30

40

**【0650】**

1回または複数の増幅反応は、試料における約1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、9

50

5、100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000種の標的化核酸の増幅をもたらすことができる。1回または複数の増幅反応は、試料における約2000種の標的化核酸の増幅をもたらすことができる。1回または複数の増幅反応は、試料における約1000種の標的化核酸の増幅をもたらすことができる。1回または複数の増幅反応は、約2000種の標的化分子の増幅をもたらすことができる。1回または複数の増幅反応は、試料における約100種の標的化核酸の増幅をもたらすことができる。

#### 【0651】

増幅反応は、1回または複数のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含み得る。1回または複数のポリメラーゼ連鎖反応は、マルチプレックスPCR、ネステッドPCR、絶対的PCR、HD-PCR、Next Gen PCR、デジタルRTAまたはこれらのいずれかの組合せを含み得る。1回または複数のポリメラーゼ連鎖反応は、マルチプレックスPCRを含み得る。1回または複数のポリメラーゼ連鎖反応は、ネステッドPCRを含み得る。

#### 【0652】

1回または複数の増幅反応の実行は、1種または複数のプライマーの使用を含み得る。1種または複数のプライマーは、1種または複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。1種または複数のオリゴヌクレオチドは、少なくとも約7～9個のヌクレオチドを含み得る。1種または複数のオリゴヌクレオチドは、12～15個未満のヌクレオチドを含み得る。1種または複数のプライマーは、複数の標識された核酸の少なくとも一部にアニールすることができる。1種または複数のプライマーは、複数の標識された核酸の3'末端および/または5'末端にアニールすることができる。1種または複数のプライマーは、複数の標識された核酸の内部領域にアニールすることができる。内部領域は、複数の標識された核酸の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または1000ヌクレオチドとなり得る。内部領域は、複数の標識された核酸の3'末端から少なくとも約2000ヌクレオチドとなり得る。1種または複数のプライマーは、プライマーの固定されたパネルを含み得る。1種または複数のプライマーは、少なくとも1種または複数のカスタムプライマーを含み得る。1種または複数のプライマーは、少なくとも1種または複数の対照プライマーを含み得る。1種または複数のプライマーは、少なくとも1種また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種または複数のオリゴヌクレオチドは、表1における配列からなる群より選択される配列を含み得る。1種また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することができる。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルPCR領域にアニールすることができる。1種または複数のカスタムプライマーは、試料タグの少なくとも一部にアニールすることができる。1種または複数のカスタムプライマーは、分子識別子標識の少なくとも一部にアニールすることができる。1種または複数のカスタムプライマーは、分子バーコードの少なくとも一部にアニールすることができる。1種また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、核酸またはこれらの産物にアニールすることができる。1種または複数のプライマーは、ユニバーサルプライマーおよびカスタムプライマーを含み得る。1種または複数のプライマーは、少なくとも約96種またはそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1種または複数のプライマーは、少なくとも約960種またはそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1種または複数のプライマーは、少なくとも約9600種またはそれを超えるカスタムプライマーを含み得る。1種または複数のカスタムプライマーは、2種またはそれを超える異なる標識された核酸にアニールすることができる。2種またはそれを超える異なる標識された核酸は、1種

10

20

30

40

50

または複数の遺伝子に相当することができる。

【0653】

マルチプレックスPCR反応は、ネステッドPCR反応を含み得る。ネステッドPCR反応は、第1のプライマーおよび第2のプライマーを含むプライマー対を含み得る。第1のプライマーは、複数の核酸の1種または複数の核酸の領域にアニールすることができる。1種または複数の核酸の領域は、1種または複数の核酸の3'末端から少なくとも約300~400ヌクレオチドとなり得る。第2のプライマーは、複数の核酸の1種または複数の核酸の領域にアニールすることができる。1種または複数の核酸の領域は、1種または複数の核酸の3'末端から少なくとも200~300ヌクレオチドとなり得る。

【0654】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1回または複数のcDNA合成反応を実行して、分子またはその誘導体（例えば、標識された分子）の1種または複数のcDNAコピーを生成するステップをさらに含み得る。1回または複数のcDNA合成反応は、1回または複数の逆転写反応を含み得る。

【0655】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の試料を含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、複数の試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100種またはそれを超える試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約100、200、300、400、500、600、700、800、900もしくは1000種またはそれを超える試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000種の試料、9000もしくは10,000種の試料もしくは100,000種の試料もしくは1,000,000種またはそれを超える試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約10,000種の試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約2種の試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約5種の試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約10種の試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約50種の試料を含み得る。複数の試料は、少なくとも約100種の試料を含み得る。

【0656】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1個または複数の細胞を含む1種または複数の試料を含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、1個または複数の細胞を含む2種またはそれを超える試料を含み得る。第1の試料は、1個または複数の細胞を含み得る。第2の試料は、1個または複数の細胞を含み得る。第1の試料の1個または複数の細胞は、第2の試料の1個または複数の細胞と同じ細胞型のものとなり得る。

【0657】

本明細書に開示されている方法およびキットは、複数の試料を含み得る。複数の試料は、1種または複数の被験体に由来し得る。複数の試料は、2種またはそれを超える被験体に由来し得る。複数の試料は、同じ被験体に由来し得る。2種またはそれを超える被験体は、同じ種に由来し得る。2種またはそれを超える被験体は、異なる種に由来し得る。複数の試料は、1種または複数の供給源に由来し得る。複数の試料は、2種またはそれを超える供給源に由来し得る。複数の試料は、同じ被験体に由来し得る。2種またはそれを超える供給源は、同じ種に由来し得る。2種またはそれを超える供給源は、異なる種に由来し得る。

【0658】

複数の試料は、一斉に得ることができる。複数の試料は、逐次的に得ることができる。複数の試料は、2つまたはそれを超える期間にわたって得ることができる。2つまたはそれを超える期間は、1時間以上離すことができる。2つまたはそれを超える期間は、1日間以上離すことができる。2つまたはそれを超える期間は、1週間以上離すことができる。2つまたはそれを超える期間は、1カ月間以上離すことができる。2つまたはそれを超

10

20

30

40

50

える期間は、1年間以上離すことができる。

【0659】

複数の試料は、1種または複数の体液、組織、細胞、臓器または筋肉に由来し得る。複数の試料は、1種または複数の血液試料を含み得る。

【0660】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の核酸を含む1種または複数の試料を含み得る。2種またはそれを超える試料は、1種または複数の核酸を含み得る。2種またはそれを超える試料は、2種またはそれを超える核酸を含み得る。第1の試料の1種または複数の核酸は、第2の試料の1種または複数の核酸とは異なり得る。第1の試料における核酸は、第2の試料における核酸と少なくとも約50%同一となり得る。第1の試料における核酸は、第2の試料における核酸と少なくとも約70%同一となり得る。第1の試料における核酸は、第2の試料における核酸と少なくとも約80%同一となり得る。

10

【0661】

1種または複数の試料における複数の核酸は、2種またはそれを超える同一配列を含み得る。1種または複数の試料における総核酸の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%は、同じ配列を含み得る。1種または複数の試料における複数の核酸は、少なくとも2種の異なる配列を含み得る。1種または複数の試料における総核酸の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%は、異なる配列を含み得る。

20

【0662】

複数の核酸は、RNA、DNA、cDNA、mRNA、ゲノムDNA、低分子RNA、非コードRNAまたは細胞の他の核酸内容物を含み得る。複数の核酸は、mRNAを含み得る。複数の核酸は、RNAを含み得る。複数の核酸は、mRNAを含み得る。複数の核酸は、DNAを含み得る。

【0663】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の試料タグを含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、1種またはそれより多い複数の試料タグを含み得る。試料タグは、試料指標領域を含み得る。第1の複数の試料タグの試料指標領域は、第2の複数の試料タグの試料指標領域とは異なり得る。試料タグは、1個または複数のヌクレオチドを含み得る。

30

【0664】

試料タグは、少なくとも約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100個のヌクレオチドを含み得る。試料タグは、少なくとも約5個またはそれを超えるヌクレオチドを含み得る。試料タグは、少なくとも約10個またはそれを超えるヌクレオチドを含み得る。試料タグは、約200個未満のヌクレオチドを含み得る。試料タグは、約100個未満のヌクレオチドを含み得る。試料タグは、約60個未満のヌクレオチドを含み得る。

40

【0665】

試料タグは、ユニバーサルプライマー結合部位をさらに含み得る。試料タグは、ユニバーサルPCR領域をさらに含み得る。試料タグは、1種または複数のアダプター領域をさらに含み得る。試料タグは、1種または複数の標的特異的領域をさらに含み得る。

【0666】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の分子識別子標識を含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、1種またはそれより多い複数の分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、2種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、50種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそ

50

れより多い複数の分子識別子標識は、90種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、100種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、300種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、500種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、960種またはそれを超える異なる分子識別子標識を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、1種または複数の分子識別子標識の複数コピーを含み得る。2種またはそれを超える複数の分子識別子標識は、1種または複数の同一分子識別子標識を含み得る。2種またはそれを超える複数の分子識別子標識は、10種またはそれを超える同一分子識別子標識を含み得る。第1の複数の分子識別子標識の分子識別子標識は、第2の複数の分子識別子標識の分子識別子標識と少なくとも約30%同一となり得る。第1の複数の分子識別子標識の分子識別子標識は、第2の複数の分子識別子標識の分子識別子標識と少なくとも約50%同一となり得る。第1の複数の分子識別子標識の分子識別子標識は、第2の複数の分子識別子標識の分子識別子標識と少なくとも約80%同一となり得る。

10

#### 【0667】

分子識別子標識は、標識領域（例えば、分子標識領域、分子指標領域）を含み得る。第1の複数の分子識別子標識の2種またはそれを超える分子識別子標識の標識領域は、異なり得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、少なくとも約20種の異なる標識領域を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、少なくとも約50種の異なる標識領域を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、少なくとも約96種の異なる標識領域を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、少なくとも約200種の異なる標識領域を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、少なくとも約500種の異なる標識領域を含み得る。1種またはそれより多い複数の分子識別子標識は、少なくとも約960種の異なる標識領域を含み得る。

20

#### 【0668】

分子識別子標識は、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれを超えるヌクレオチドを含み得る。分子識別子標識は、少なくとも約20、30、40、50個またはそれを超えるヌクレオチドを含み得る。分子識別子標識は、少なくとも約21個のヌクレオチドを含み得る。

30

#### 【0669】

分子識別子標識は、標的特異的領域をさらに含み得る。標的特異的領域は、オリゴdT配列を含み得る。

#### 【0670】

分子識別子標識は、1種または複数の色素標識をさらに含み得る。分子識別子標識は、Cy3色素をさらに含み得る。分子識別子標識は、Ty63色素をさらに含み得る。

#### 【0671】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の標識された分子を含み得る。1種または複数の標識された分子は、複数の分子を複数の試料タグと接触させることにより生成することができる。1種または複数の標識された分子は、複数の核酸を複数の試料タグと接触させることにより生成することができる。複数の核酸を複数の試料タグと接触させることは、1種または複数の核酸への1種または複数の試料タグのライゲーションを含み得る。複数の核酸を複数の試料タグと接触させることは、1種または複数の核酸への1種または複数の試料タグのハイブリダイゼーションを含み得る。複数の核酸を複数の試料タグと接触させることは、1回または複数の核酸伸長反応の実施を含み得る。1回または複数の核酸伸長反応は、逆転写を含み得る。

40

#### 【0672】

本明細書に開示されている方法およびキットは、複数の核酸に1種または複数のオリゴヌクレオチドリinkerを付着させるステップをさらに含み得る。方法およびキットは、試

50

料タグが付いた核酸に1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーを付着させるステップをさらに含み得る。方法およびキットは、標識された核酸に1種または複数のオリゴヌクレオチドリンカーを付着させるステップをさらに含み得る。1種または複数のリンカーは、少なくとも約10個のヌクレオチドを含み得る。

#### 【0673】

本明細書に開示されている方法およびキットは、支持体に1種または複数の標識された核酸を付着させるステップをさらに含み得る。支持体は、固体支持体を含み得る。支持体は、ビーズを含み得る。支持体は、アレイを含み得る。支持体は、スライドガラスを含み得る。

#### 【0674】

支持体への標識された核酸の付着は、アミン-チオール架橋、マレイミド架橋、N-ヒドロキシスクシンイミドもしくはN-ヒドロキシスルホスクシンイミド、Zenon、Sit e C l i c kまたはこれらの組合せを含み得る。支持体への標識された核酸の付着は、1種または複数の標識された核酸へのビオチンの付着を含み得る。

#### 【0675】

支持体は、1個または複数のビーズを含み得る。1個または複数のビーズは、コーティングされたビーズとなり得る。コーティングされたビーズは、ストレプトアビジンでコーティングすることができる。

#### 【0676】

支持体は、アレイを含み得る。アレイは、1種または複数のプローブを含み得る。標識された核酸は、1種または複数のプローブに付着させることができる。1種または複数のプローブは、1種または複数のオリゴヌクレオチドを含み得る。1種または複数のプローブは、標識された核酸の少なくとも一部に付着させることができる。1種または複数のプローブに付着させた標識された核酸の一部は、試料タグ、分子識別子標識、分子バーコード、核酸またはこれらの組合せの少なくとも一部を含み得る。

#### 【0677】

支持体は、スライドガラスを含み得る。スライドガラスは、1個または複数のウェルを含み得る。1個または複数のウェルは、スライドガラス上にエッチングすることができる。1個または複数のウェルは、少なくとも960個のウェルを含み得る。スライドガラスは、1種または複数のプローブを含み得る。1種または複数のプローブは、スライドガラス上に印刷することができる。1個または複数のウェルは、1種または複数のプローブをさらに含み得る。1種または複数のプローブは、1個または複数のウェル内に印刷することができる。1種または複数のプローブは、960種の核酸を含み得る。核酸は、異なり得る。核酸は、同じになることができる。

#### 【0678】

本明細書に開示されている方法およびキットを使用して、1種または複数の試料における1種または複数の分子の計数を決定することができる。1種または複数の分子の計数の決定は、異なる標識された核酸の数の決定を含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、標識された核酸の少なくとも一部の検出を含み得る。標識された核酸の少なくとも一部の検出は、試料タグ、分子識別子標識、分子バーコード、核酸またはこれらの組合せの少なくとも一部の検出を含み得る。

#### 【0679】

異なる標識された核酸の数の決定は、配列決定を含み得る。配列決定は、M i S e q配列決定を含み得る。配列決定は、H i S e q配列決定を含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、アレイを含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、1種または複数のプローブと標識された核酸との接触を含み得る。

#### 【0680】

異なる標識された核酸の数の決定は、アレイと標識された核酸との接触を含み得る。アレイは、複数のプローブを含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、複数のプローブのスライドガラスと標識された核酸との接触を含み得る。

10

20

30

40

50

## 【0681】

異なる標識された核酸の数の決定は、標識されたプローブハイブリダイゼーション、標的特異的増幅、標的特異的配列決定、標的一塩基多型に特異的な標識されたヌクレオチドによる配列決定、制限酵素消化パターンに特異的な標識されたヌクレオチドによる配列決定、変異に特異的な標識されたヌクレオチドによる配列決定またはこれらの組合せを含み得る。

## 【0682】

異なる標識された核酸の数の決定は、配列特異的標識のフローサイトメトリー選別を含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、ビーズに付着させた標識された核酸の検出を含み得る。ビーズに付着させた標識された核酸の検出は、蛍光検出を含み得る。

10

## 【0683】

異なる標識された核酸の数の決定は、標的特異的プローブおよび標識された核酸または標的特異的な標識されたプローブの間の、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) による複数の標識された核酸の計数を含み得る。異なる標識された核酸の数の決定は、支持体への標識された核酸の付着を含み得る。

## 【0684】

本明細書に開示されている方法およびキットは、核酸結合タンパク質による標的配列の免疫沈降をさらに含み得る。

## 【0685】

本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートの複数のウェルへの複数の試料の分布をさらに含み得る。複数の試料のうち1種または複数の、複数の細胞を含み得る。複数の試料のうち1種または複数の、複数の核酸を含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、複数のウェルへの1個またはそれより少ない細胞の分布をさらに含み得る。複数の細胞は、マイクロウェルプレートにおいて溶解させることができる。本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートにおけるcDNAの合成をさらに含み得る。cDNAの合成は、mRNAの逆転写を含み得る。

20

## 【0686】

本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートへ複数の第1の試料タグ、複数の第2の試料タグ、複数の分子識別子標識またはこれらのいずれかの組合せを分布させるステップをさらに含み得る。

30

## 【0687】

本明細書に開示されている方法およびキットは、マイクロウェルプレートにおいて1個または複数のビーズを分布させるステップをさらに含み得る。マイクロウェルプレートは、ソフトリソグラフィーによりPDMSにおいて製作された、シリコンウエハにおいてエッチングされた、スライドガラスにおいてエッチングされた、スライドガラスにおいてパターン形成されたフォトレジストまたはこれらの組合せであるマイクロウェルプレートを含み得る。マイクロウェルは、マイクロキャピラリープレートに孔を含み得る。マイクロウェルプレートは、油中水型エマルジョンを含み得る。マイクロウェルプレートは、少なくとも1個または複数のウェルを含み得る。マイクロウェルプレートは、少なくとも約6個のウェル、12個のウェル、48個のウェル、96個のウェル、384個のウェル、960個のウェルまたは1000個のウェルを含み得る。

40

## 【0688】

本明細書に開示されている方法およびキットは、チップをさらに含み得る。マイクロウェルプレートは、チップに付着させることができる。チップは、少なくとも約6個のウェル、12個のウェル、48個のウェル、96個のウェル、384個のウェル、960個のウェル、1000個のウェル、2000個のウェル、3000個のウェル、4000個のウェル、5000個のウェル、6000個のウェル、7000個のウェル、8000個のウェル、9000個のウェル、10,000個のウェル、20,000個のウェル、30,000個のウェル、40,000個のウェル、50,000個のウェル、60,000

50

個のウェル、70,000個のウェル、80,000個のウェル、90,000個のウェル、100,000個のウェル、200,000個のウェル、500,000個のウェルまたは百万個のウェルを含み得る。ウェルは、少なくとも約300ミクロン<sup>2</sup>、400ミクロン<sup>2</sup>、500ミクロン<sup>2</sup>、600ミクロン<sup>2</sup>、700ミクロン<sup>2</sup>、800ミクロン<sup>2</sup>、900ミクロン<sup>2</sup>、1000ミクロン<sup>2</sup>、1100ミクロン<sup>2</sup>、1200ミクロン<sup>2</sup>、1300ミクロン<sup>2</sup>、1400ミクロン<sup>2</sup>、1500ミクロン<sup>2</sup>の面積を含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、チップに約10,000〜30,000種の間の試料を分布させるステップをさらに含み得る。

#### 【0689】

本明細書に開示されている方法およびキットは、それを必要とする被験体における状態、疾患または障害の診断をさらに含み得る。

10

#### 【0690】

本明細書に開示されている方法およびキットは、それを必要とする被験体における状態、疾患または障害の予後をさらに含み得る。本明細書に開示されている方法およびキットは、それを必要とする被験体における状態、疾患または障害の処置の決定をさらに含み得る。

#### 【0691】

複数の試料は、疾患または状態を患う被験体由来の1種または複数の試料を含み得る。複数の試料は、健康な被験体由来の1種または複数の試料を含み得る。

#### 【0692】

a) 2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える分子を確率論的に標識して、2種またはそれを超える標識された分子を生成するステップと、b) 2種またはそれを超える標識された分子を検出するステップとを含む、法医学的分析の方法が本明細書にさらに開示されている。

20

#### 【0693】

カスタムプライマーを選択する方法は、1種または複数の核酸に基づきカスタムプライマーを選択するステップをさらに含み得る。1種または複数の核酸は、mRNA転写物、構造的RNAを含む非コード転写物、転写された偽遺伝子、ゲノムアノテーションプロセスによって提供されるモデルmRNA、ゲノムコンティグに相当する配列またはこれらのいずれかの組合せを含み得る。1種または複数の核酸は、RNAとなり得る。1種または複数の核酸は、mRNAとなり得る。1種または複数の核酸は、1種または複数のエクソンを含み得る。カスタムプライマーを選択する方法は、核酸の1種または複数のサブセットを濃縮するステップをさらに含み得る。1種または複数のサブセットは、低存在量mRNAを含む。カスタムプライマーを選択する方法は、コンピューターによるアルゴリズムをさらに含み得る。

30

#### 【0694】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の対照の使用を含み得る。1種または複数の対照を対照にスパイクすることができる。1種または複数の対照は、核酸を含み得る。複数の核酸を含む1種または複数の試料は、1種または複数の対照核酸をスパイクすることができる。1種または複数の対照核酸を使用して、標識された核酸ライブラリーの生成の効率を測定することができる。

40

#### 【0695】

本明細書に開示されている方法およびキットは、1種または複数の核酸ライブラリーの生成において使用することができる。1種または複数の核酸ライブラリーは、複数の標識された核酸またはその誘導体（例えば、標識されたアンプリコン）を含み得る。標識された核酸ライブラリーを生成する方法は、分子バーコードの2またはそれを超えるセットで、2種またはそれを超える試料における2種またはそれを超える核酸を確率論的に標識して、複数の標識された核酸を生成するステップを含み得る。標識された核酸ライブラリーを生成する方法は、2種またはそれを超える試料を複数の試料タグおよび複数の分子特異的標識と接触させて、複数の標識された核酸を生成するステップを含み得る。標識された

50

核酸は、試料指標領域、標識領域および核酸領域を含み得る。試料指標領域を使用して、核酸に試料または部分試料同一性を付与することができる。試料指標領域を使用して、核酸の供給源を決定することができる。標識領域を使用して、核酸に特有の同一性を付与し、これにより、同じ試料または部分試料における２種またはそれを超える同一核酸の区別を可能にすることができる。

#### 【０６９６】

核酸ライブラリーを生成する方法は、１種または複数の標識された核酸を増幅して、１種または複数の濃縮された標識された核酸を生成するステップをさらに含み得る。方法は、１種または複数の濃縮された標識された核酸の１種または複数のプルダウンアッセイを実行するステップをさらに含み得る。方法は、１種または複数の濃縮された標識された核酸を精製するステップをさらに含み得る。

10

#### 【０６９７】

本明細書に開示されているキットは、複数のビーズ、プライマーおよび／または増幅剤を含み得る。１種または複数のキットは、少なくとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０もしくは１００種またはそれを超える試料または部分試料の分析において使用することができる。１種または複数のキットは、少なくとも約９６種の試料の分析において使用することができる。１種または複数のキットは、少なくとも約３８４種の試料の分析において使用することができる。キットは、プライマー設計および最適化のための説明書をさらに含み得る。

#### 【０６９８】

キットは、１種または複数のマイクロウェルプレートにさらに含み得る。１種または複数のマイクロウェルプレートは、１個または複数のビーズの分布に使用することができる。１種または複数のマイクロウェルプレートは、１種または複数の試料からの１種または複数の分子またはその誘導体（例えば、標識された分子、標識されたアンプリコン）の分布に使用することができる。

20

#### 【０６９９】

キットは、１個または複数の追加的な容器にさらに含み得る。１個または複数の追加的な容器は、１種または複数の追加的な複数の試料タグを含み得る。１個または複数の追加的な容器における１種または複数の追加的な複数の試料タグは、第１の容器における第１の複数の試料タグとは異なり得る。１個または複数の追加的な容器は、１種または複数の追加的な複数の分子識別子標識を含み得る。１個または複数の追加的な容器の１種または複数の追加的な複数の分子識別子標識は、第２の容器の１種または複数の追加的な分子識別子標識と少なくとも約５０％同一となり得る。１個または複数の追加的な容器の１種または複数の追加的な複数の分子識別子標識は、第２の容器の１種または複数の追加的な分子識別子標識と少なくとも約８０％同一となり得る。１個または複数の追加的な容器の１種または複数の追加的な複数の分子識別子標識は、第２の容器の１種または複数の追加的な分子識別子標識と少なくとも約９０％同一となり得る。

30

#### 【０７００】

標識されたビーズの１または複数のセットを生成する方法が本明細書にさらに開示されている。標識されたビーズの１または複数のセットを生成する方法は、１個または複数のビーズに１種または複数の核酸を付着させ、これにより、標識されたビーズの１または複数のセットを生成するステップを含み得る。１種または複数の核酸は、１種または複数の分子バーコードを含み得る。１種または複数の核酸は、１種または複数の試料タグを含み得る。１種または複数の核酸は、１種または複数の分子識別子標識を含み得る。１種または複数の核酸は、a) プライマー領域；b) 試料指標領域；およびc) リンカーまたはアダプター領域を含み得る。１種または複数の核酸は、a) プライマー領域；b) 標識領域；およびc) リンカーまたはアダプター領域を含み得る。１種または複数の核酸は、a) 試料指標領域；およびb) 標識領域を含み得る。１種または複数の核酸は、プライマー領域にさらに含み得る。１種または複数の核酸は、標的特異的領域にさらに含み得る。１種または複数の核酸は、リンカー領域にさらに含み得る。１種または複数の核酸は、アダプ

40

50

ター領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、試料指標領域をさらに含み得る。1種または複数の核酸は、標識領域をさらに含み得る。

【0701】

標識されたビーズのセットのための核酸のプライマー領域は、少なくとも約70%同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸のプライマー領域は、少なくとも約90%同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸のプライマー領域は、同じものとなり得る。

【0702】

標識されたビーズのセットのための核酸の試料指標領域は、少なくとも約70%同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸の試料指標領域は、少なくとも約90%同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸の試料指標領域は、同じものとなり得る。試料指標化ビーズ (sample indexed bead) の2またはそれを超えるセットのための核酸の試料指標領域は、約40%未満同一となり得る。試料指標化ビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の試料指標領域は、約50%未満同一となり得る。試料指標化ビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の試料指標領域は、約60%未満同一となり得る。試料指標化ビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の試料指標領域は、異なるものとなり得る。

10

【0703】

標識されたビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の標識領域は、少なくとも約70%同一となり得る。標識されたビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の標識領域は、少なくとも約90%同一となり得る。標識されたビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の標識領域は、同じものとなり得る。標識されたビーズのセットのための核酸の標識領域は、約40%未満同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸の標識領域は、約50%未満同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸の標識領域は、約60%未満同一となり得る。標識されたビーズのセットのための2種またはそれを超える核酸の標識領域は、異なるものとなり得る。

20

【0704】

標識されたビーズのセットのための核酸のリンカーまたはアダプター領域は、少なくとも約70%同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸のリンカーまたはアダプター領域は、少なくとも約90%同一となり得る。標識されたビーズのセットのための核酸のリンカーまたはアダプター領域は、同じものとなり得る。

30

【0705】

標的特定されたビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の標的特異的領域は、少なくとも約70%同一となり得る。標的特定されたビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の標的特異的領域は、少なくとも約90%同一となり得る。標的特定されたビーズの2またはそれを超えるセットのための核酸の標的特異的領域は、同じものとなり得る。標的特定されたビーズのセットのための核酸の標的特異的領域は、約40%未満同一となり得る。標的特定されたビーズのセットのための核酸の標的特異的領域は、約50%未満同一となり得る。標的特定されたビーズのセットのための核酸の標的特異的領域は、約60%未満同一となり得る。標的特定されたビーズのセットのための2種またはそれを超える核酸の標的特異的領域は、異なるものとなり得る。

40

【0706】

標識されたビーズの1または複数のセットは、百万個またはそれを超える標識されたビーズを含み得る。標識されたビーズの1または複数のセットは、一千万個またはそれを超える標識されたビーズを含み得る。

【0707】

ビーズへの1種または複数の核酸の付着は、共有結合性付着を含み得る。ビーズへの1種または複数の核酸の付着は、コンジュゲーションを含み得る。ビーズへの1種または複数の核酸の付着は、イオン性相互作用を含み得る。

【0708】

50

ビーズは、コーティングされたビーズとなり得る。核酸は、1種または複数のタグに付着させることができる。ビーズは、ストレプトアビジンでコーティングすることができる。核酸は、ビオチンに付着させることができる。ビーズは、抗体または核酸でコーティングすることもでき、核酸は、かかる表面コーティングされた材料を介して間接的にビーズに付着させることができる。

#### 【0709】

一態様では、本開示は、固体支持体を含む組成物を提供し、前記固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識および分子標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記細胞性標識は、同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記分子標識は、異なる。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、標的結合領域をさらに含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、標的核酸にハイブリダイズするように適応された配列を含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、ランダムマルチマー、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーもしくはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列；遺伝子特異的プライマー；およびオリゴdT；またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含む。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーの結合部位を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、リンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、官能基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、前記オリゴヌクレオチドに対し5'に位置する。一部の実施形態では、リンカーは、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンで構成される。一部の実施形態では、固体支持体は、磁性である。一部の実施形態では、固体支持体は、PDMS固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体およびブルニック固体支持体またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズを含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約20ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約5ミクロン～約40ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、官能基を含む。一部の実施形態では、官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、細胞性標識は、複数の細胞性標識を含む。一部の実施形態では、複数の細胞性標識は、複数のリンカー標識配列が散在する。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種のオリゴヌクレオチドを含む。

#### 【0710】

一態様では、本開示は、第1のランダム配列、第2のランダム配列および第1のリンカー標識配列を含む第1の細胞性標識であって、前記第1のリンカー標識配列が、前記第1のランダム配列および前記第2のランダム配列を接続する第1の細胞性標識；ならびにランダム配列を含む第1の分子標識を含む第1のオリゴヌクレオチドと、第3のランダム配列、第4のランダム配列および第2のリンカー標識配列を含む第2の細胞性標識であって、前記第2のリンカー標識配列が、前記第3のランダム配列および前記第4のランダム配列を接続する第2の細胞性標識；ならびにランダム配列を含む第2の分子標識を含む第2のオリゴヌクレオチドとを含む固体支持体を提供し、前記第1の細胞性標識および前記第2の細胞性標識は同じであり、前記第1の分子標識および前記第2の分子標識は異なる。一部の実施形態では、第1および第2のオリゴヌクレオチドは、同一試料指標領域をさらに含む。一部の実施形態では、試料指標領域は、ランダム配列を含む。一部の実施形態では、試料指標領域は、4～12個のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、細胞性標識は、前記分子標識に直接的に付着させる。一部の実施形態では、細胞性標識およ

10

20

30

40

50

び前記分子標識は、リンカー標識配列により付着させる。一部の実施形態では、前記細胞性標識のランダム配列は、4～12個のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、細胞性標識の定常配列は、少なくとも4個のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、細胞性標識は、少なくとも12個のヌクレオチドの総計の長さを有する。一部の実施形態では、細胞性標識は、1種または複数の追加的なランダム配列をさらに含む。一部の実施形態では、細胞性標識は、1種または複数の追加的なリンカー標識配列をさらに含む。一部の実施形態では、1種または複数の追加的なリンカー標識配列は、1種または複数の追加的なランダム配列を接続する。一部の実施形態では、分子標識のランダム配列は、4～12個のヌクレオチドの長さである。

#### 【0711】

一態様では、本開示は、固体支持体を含む組成物を提供し、前記固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識、分子標識；および標的結合領域；および複数の標的核酸を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記細胞性標識は同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記分子標識は異なる。一部の実施形態では、標的結合領域は、前記複数の標的核酸のうち少なくとも1種にハイブリダイズするように適応された配列を含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、ランダムマルチマー、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーもしくはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列；遺伝子特異的プライマー；およびオリゴdT；またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、前記複数の標的核酸の標的核酸の数を超える多数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数の標的核酸は、同じ標的核酸の複数コピーを含む。一部の実施形態では、複数の標的核酸は、異なる標的核酸の複数コピーを含む。一部の実施形態では、複数の標的核酸は、前記複数のオリゴヌクレオチドに結合される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含む。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーの結合部位を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、リンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、官能基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、前記オリゴヌクレオチドに対し5'に位置する。一部の実施形態では、官能基は、アミノ基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンで構成される。一部の実施形態では、固体支持体は、磁性である。一部の実施形態では、固体支持体は、PDMS固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体およびプルロニック固体支持体またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズを含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約20ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約5ミクロン～約40ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、官能基を含む。一部の実施形態では、官能基は、カルボキシ基を含む。一部の実施形態では、官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、細胞性標識は、複数の細胞性標識を含む。一部の実施形態では、複数の細胞性標識は、複数のリンカー標識配列が散在する。

#### 【0712】

一態様では、本開示は、第1の固体支持体であって、前記第1の固体支持体が、第1の複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記第1の複数のオリゴヌクレオチドが、同じ第1の細胞性標識を含む第1の固体支持体と、第2の固体支持体であって、前記第2の固体支持体が、第2の複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記第2の複数のオリゴヌクレオチドが

10

20

30

40

50

、同じ第2の細胞性標識を含む第2の固体支持体と、使用説明書とを含むキットを提供し、前記第1の細胞性標識および前記第2の細胞性標識は異なる。一部の実施形態では、前記第1の複数のオリゴヌクレオチドおよび前記第2の複数のオリゴヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドは、分子標識を含む。一部の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの分子標識は異なる。一部の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの分子標識は同じである。一部の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドの一部の分子標識は異なり、一部は同じである。一部の実施形態では、前記第1の複数のオリゴヌクレオチドおよび前記第2の複数のオリゴヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドは、標的結合領域を含む。一部の実施形態では、キットは、マイクロウェルアレイをさらに含む。一部の実施形態では、キットは、バッファーをさらに含む。一部の実施形態では、バッファーは、再構成バッファー、希釈バッファーおよび安定化バッファーまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。

10

### 【0713】

一態様では、本開示は、試料を固体支持体と接触させるステップであって、前記固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識および分子標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記細胞性標識は同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記分子標識は異なるステップと、前記複数のオリゴヌクレオチドの1オリゴヌクレオチドに前記試料由来の前記標的核酸をハイブリダイズさせるステップとを含む、標的核酸の量を決定するための方法を提供する。一部の実施形態では、試料は、細胞を含む。一部の実施形態では、試料は、前記ハイブリダイズさせるステップ前に溶解される。一部の実施形態では、ハイブリダイズさせるステップは、前記複数のオリゴヌクレオチドに同じ標的核酸の複数コピーをハイブリダイズさせるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、前記標的核酸を増幅するステップをさらに含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、前記標的核酸を逆転写するステップを含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、PCR、定量的PCR、リアルタイムPCRおよびデジタルPCRまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を使用した増幅を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、前記固体支持体上で直接的に行われる。一部の実施形態では、増幅するステップは、前記固体支持体から転写された鋳型上で行われる。一部の実施形態では、方法は、前記標的核酸を配列決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、配列決定するステップは、前記標的核酸および前記分子標識を配列決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、前記標的核酸の量を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、決定するステップは、前記標的核酸のレベルを定量化するステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、前記標的核酸のための配列決定された分子標識の数を計数するステップを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、マイクロウェル中で行う。一部の実施形態では、マイクロウェルは、親水性プラスチック、プラスチック、エラストマーおよびヒドロゲルまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される材料から作製される。一部の実施形態では、マイクロウェルは、アガロースを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、マイクロウェルアレイの1個のマイクロウェルである。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、少なくとも90個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、少なくとも150,000個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル1個当たり少なくとも1個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル1個当たり最大でも2個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、前記固体支持体の最大でも2個を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、最大でも1個の固体支持体を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも25ミクロンの深さである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも25ミクロンの直径である。

20

30

40

### 【0714】

50

一態様では、本開示は、固体支持体に試料を接触させるステップであって、前記固体支持体が、複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種が、細胞性標識および分子標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記細胞性標識が同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記分子標識が異なるステップと、前記複数のオリゴヌクレオチドに前記試料由来の標的核酸をハイブリダイズさせるステップと、前記標的核酸を増幅するステップと、前記標的核酸を配列決定するステップであって、前記標的核酸および前記標的核酸が結合されている前記オリゴヌクレオチドの前記分子標識を配列決定するステップと、前記標的核酸の量を決定するステップとを含む、標的核酸の増幅バイアスを低下させる方法を提供する。一部の実施形態では、ハイブリダイズさせるステップは、前記複数のオリゴヌクレオチドに同じ標的核酸の複数コピーをハイブリダイズさせるステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、同じ標的核酸のための多数の配列決定された分子標識を計数するステップを含む。一部の実施形態では、計数するステップは、前記同じ標的核酸のコピーの数を計数する。一部の実施形態では、試料は、細胞を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、前記標的核酸を逆転写するステップを含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、PCR、定量的PCR、リアルタイムPCRおよびデジタルPCRまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を使用した増幅を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、前記固体支持体上で直接的に行われる。一部の実施形態では、増幅するステップは、前記固体支持体から転写された鋳型上で行われる。

10

20

#### 【0715】

一態様では、本開示は、マイクロウェル；細胞；および固体支持体を含む組成物を提供し、前記固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識および分子標識を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記細胞性標識は同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち前記少なくとも2種の前記分子標識は異なる。一部の実施形態では、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、前記複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、標的結合領域をさらに含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、ランダムマルチマー、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーもしくはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列；遺伝子特異的プライマー；およびオリゴdT；またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含む。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーの結合部位を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンで構成される。一部の実施形態では、固体支持体は、磁性である。一部の実施形態では、固体支持体は、PDMS固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体およびプルロニック固体支持体またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズを含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約20ミクロンの直径を有する。一部の実施形態では、固体支持体は、約5ミクロン～約40ミクロンの直径を有する。一部の実施形態では、細胞性標識は、複数の細胞性標識を含む。一部の実施形態では、複数の細胞性標識は、複数のリンカー配列が散在する。一部の実施形態では、マイクロウェルは、親水性プラスチック、プラスチック、エラストマーおよびヒドロゲルまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される材料から作製される。一部の実施形態では、マイクロウェルは、アガロースを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、マイクロウェルアレイのマイクロウェルである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル1個当たり少なくとも1個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル1個当たり最大でも2個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、前記固体支持体の少なくとも1個および前記細胞の少なくとも1個を収容するサイズのものである

30

40

50

。一部の実施形態では、マイクロウェルは、前記固体支持体の最大でも1個および前記細胞の少なくとも1個を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも25ミクロンの深さである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも25ミクロンの直径である。一部の実施形態では、マイクロウェルは平坦である。

#### 【0716】

一態様では、本開示は、第1のマイクロウェルアレイを含む第1の基材であって、前記第1のマイクロウェルアレイが、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成された第1の既定の空間的配置で複数の第1のマイクロウェルを含む第1の基材を含むデバイスを提供する。

10

#### 【0717】

一部の実施形態では、デバイスは、少なくとも第2のマイクロウェルアレイを含む第1の基材であって、前記少なくとも第2のマイクロウェルアレイが、少なくとも第2の既定の空間的配置で複数の少なくとも第2のマイクロウェルを含む第1の基材を含む。一部の実施形態では、第1のマイクロウェルおよび少なくとも第2のマイクロウェルは同じである。一部の実施形態では、第1のマイクロウェルおよび少なくとも第2のマイクロウェルは異なる。一部の実施形態では、第1の既定の空間的配置および少なくとも第2の既定の空間的配置は同じである。一部の実施形態では、第1の既定の空間的配置および少なくとも第2の既定の空間的配置は異なる。一部の実施形態では、既定の空間的配置は、一次元または二次元アレイパターンを含む。一部の実施形態では、二次元アレイパターンは、正  
20  
方格子、矩形格子または六角格子を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、円柱状幾何学、円錐体幾何学、半球状幾何学、矩形幾何学、多角体幾何学またはこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルの直径は、約5ミクロン～約50ミクロンの間である。一部の実施形態では、マイクロウェルの深さは、約10ミクロン～約60ミクロンの間である。一部の実施形態では、2個の隣接マイクロウェルの間の中心間スペーシングは、約15ミクロン～約75ミクロンの間である。一部の実施形態では、第1または少なくとも第2のマイクロウェルアレイにおけるマイクロウェルの総数は、約96～約5,000,000の間である。一部の実施形態では、第1の基材は、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリマー、金属またはこれらの組合せを含む。一部の実施形態では、第1の基材は、アガロースまたはヒドロゲルをさらに含む。一部の実施形態では、マイクロ  
30  
ウェルアレイは、少なくとも1種の表面特色をさらに含み、前記表面特色は、1個もしくは複数の個々のマイクロウェルを囲むまたは個々のマイクロウェル間の表面にまたがり、前記表面特色は、ドーム、隆線またはピークがある。

20

30

#### 【0718】

一態様では、本開示は、少なくとも第1のマイクロウェルアレイを含む第1の基材と、頂部プレート、底部プレートおよびガスケットを含む機械的治具とを含むデバイスを提供し、第1の基材および機械的治具が組み立てられた形態にある場合、第1の基材は、ガスケットおよび底部プレートの間にポジショニングされ、ガスケットは、第1の基材と漏れ止め封着を形成し、頂部プレートおよびガスケットは、細胞試料およびビーズに基づくオリゴヌクレオチド標識が少なくとも第1のチャンバー内に分注されて、マルチプレックス  
40  
化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うことができるように、前記少なくとも第1のマイクロウェルアレイを包含する前記少なくとも第1のチャンバーを形成する。

40

#### 【0719】

一部の実施形態では、少なくとも第1のマイクロウェルアレイは、本明細書に記載されているいずれかである。一部の実施形態では、ガスケットは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)または同様のエラストマー材料から製作される。一部の実施形態では、頂部および底部プレートは、アルミニウム、陽極処理アルミニウム、ステンレス鋼、テフロン(登録商標)、ポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネートまたは同様の硬質ポリマー材料から製作される。

50

## 【0720】

一態様では、本開示は、少なくとも1個のマイクロウェルアレイをさらに含む少なくとも1個の基材と、フローセルを含むデバイスを提供し、フローセルは、前記少なくとも1個の基材を包囲するかまたはそれに付着され、前記マイクロウェルアレイへと流体を送達する目的の少なくとも1個の入口ポートおよび少なくとも1個の出口ポートを含み、デバイスは、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成されている。

## 【0721】

一部の実施形態では、前記少なくとも1個の基材は、本明細書に記載されている少なくとも1個のマイクロウェルアレイを含む。一部の実施形態では、フローセルは、1種または複数の試料を並行して処理することができるように、複数のマイクロウェルアレイとインターフェイスする複数のマイクロアレイチャンバーをさらに含む。一部の実施形態では、フローセルは、少なくとも1個のマイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらすための多孔性障壁または流動拡散器をさらに含む。一部の実施形態では、フローセルは、マイクロウェルアレイを含有する各チャンバーを、同じ総アレイ面積をまとめて覆うサブセクションに分割し、少なくとも1個のマイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらす分割器をさらに含む。一部の実施形態では、デバイスに取り込まれる流体チャネルの幅は、約50ミクロン～20mmの間である。一部の実施形態では、デバイスに取り込まれる流体チャネルの深さは、約50ミクロン～約2mmの間である。一部の実施形態では、フローセルは、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリジメチルシロキサン（PDMS；エラストマー）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリイミド、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、エポキシ樹脂、金属またはこれらの材料の組合せからなる群より選択される材料から製作される。一部の実施形態では、デバイスは、自動マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成された機器システムの固定された成分を含む。一部の実施形態では、デバイスは、自動マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成された機器システムの着脱可能な成分を含む。

## 【0722】

一態様では、本開示は、少なくとも第1のマイクロウェルアレイをさらに含む少なくとも第1の基材と、少なくとも第1のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーと、1種または複数の試料または試薬リザーバーを含むカートリッジを提供し、カートリッジは、前記少なくとも第1のマイクロウェルアレイへと流体を送達する目的の、少なくとも1個の入口ポートおよび少なくとも1個の出口ポートをさらに含み、カートリッジは、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成されている。

## 【0723】

一部の実施形態では、前記少なくとも第1の基材は、本明細書に記載されている少なくとも第1のマイクロウェルアレイを含む。一部の実施形態では、カートリッジは、複数のマイクロウェルアレイを含み、1種または複数の試料を並行して処理するように構成されている。一部の実施形態では、少なくとも第1のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、少なくとも第1のマイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらすための多孔性障壁または流動拡散器をさらに含む。一部の実施形態では、少なくとも第1のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、少なくとも第1のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーを、同じ総アレイ面積をまとめて覆うサブセクションに分割し、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらす分割器をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約50ミクロン～200ミクロンの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約200ミクロン～2mmの間であ

る。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約 2 mm～10 mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約 10 mm～20 mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約 50 ミクロン～約 2 mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約 500 ミクロン～1 mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約 1 mm～約 2 mmの間である。一部の実施形態では、1 個または複数のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリジメチルシロキサン (PDMS; エラストマー)、ポリメタクリル酸メチル (PMMA)、ポリカーボネート (PC)、ポリプロピレン (PP)、ポリエチレン (PE)、高密度ポリエチレン (HDPE)、ポリイミド、環状オレフィンポリマー (COP)、環状オレフィンコポリマー (COC)、ポリエチレンテレフタレート (PET)、エポキシ樹脂、金属またはこれらの材料の組合せからなる群より選択される材料から製作される。一部の実施形態では、デバイスは、自動マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成された機器システムの着脱可能な消費可能な成分を含む。一部の実施形態では、カートリッジは、カートリッジに分注または注射された細胞試料またはビーズ懸濁液の自己計量をもたらすためのバイパスチャネルまたは他の設計特色をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、デバイスを通る流体の流れを制御するための統合されたミニチュアポンプをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、予めロードされた試薬を区画化し、デバイスを通る流体の流れを制御するための統合されたミニチュア弁をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、捕捉された空気のエスケープ通路を提供するためのベントをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、経路長を有効に増加させ、マイクロウェル間の分子の拡散を防ぐまたは最小化する物理的または化学的障壁を作製するための設計要素をさらに含み、設計要素は、少なくとも第 1 のマイクロウェルアレイへの細胞およびビーズの送達のための蛇行チャネルのパターン、少なくとも第 1 のマイクロウェルアレイの表面との接触にプレスされる収納できるプラテンもしくは変形可能な膜、またはカートリッジ内のリザーバーからの不混和性の疎水性流体の放出からなる群より選択される。一部の実施形態では、カートリッジは、外部機器システムとの優れた熱接触を提供するための統合された温度制御成分または統合された熱インターフェイスをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、少なくとも第 1 のマイクロウェルアレイの光学イメージングのための光学インターフェイスまたは窓をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、スタンドアロン PCR サーマルサイクラーおよび/または配列決定機器とインターフェイスするように構成された 1 個または複数の着脱可能な試料収集チャンバーをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジそれ自体が、スタンドアロン PCR サーマルサイクラーおよび/または配列決定機器と直接的にインターフェイスするように構成されている。

#### 【0724】

一態様では、本開示は、少なくとも第 1 のマイクロウェルアレイをさらに含む少なくとも第 1 のフローセルまたはカートリッジと、流動制御器とを含む機器システムを提供し、流動制御器は、少なくとも第 1 のマイクロウェルアレイへの細胞試料、ビーズに基づくオリゴヌクレオチド標識化試薬および他のアッセイ試薬の送達を制御し、機器システムは、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うように構成されている。

#### 【0725】

一部の実施形態では、少なくとも第 1 のマイクロウェルアレイは、本明細書に記載されている。一部の実施形態では、少なくとも第 1 のフローセルは、システムの固定された成分である。一部の実施形態では、少なくとも第 1 のフローセルは、システムの着脱可能な消費可能な成分である。一部の実施形態では、少なくとも第 1 のカートリッジは、システムの着脱可能な消費可能な成分である。一部の実施形態では、細胞試料およびビーズに基づくオリゴヌクレオチド試薬は、ユーザーによってカートリッジに直接的に分注または注

射される。一部の実施形態では、細胞試料以外のアッセイ試薬は、カートリッジに予めロードされている。一部の実施形態では、機器システムは、少なくとも第1のマイクロウェルアレイをイメージングするためのイメージングシステムをさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、少なくとも第1のマイクロウェルアレイにわたる細胞およびビーズの均一な分布を容易にするための細胞またはビーズ分布システムをさらに含み、前記分布システムの根底にある機構は、振動、振盪、回旋、再循環流、低頻度揺動または高頻度揺動からなる群より選択される。一部の実施形態では、機器システムは、細胞溶解システムをさらに含み、システムは、細胞を超音波処理するために高周波圧電変換器を使用する。一部の実施形態では、機器システムは、ユーザーが指定した温度を維持するため、または2種もしくはそれを超える指定された時間間隔にわたり2種もしくはそれを超える指定された温度間の温度に傾斜をつけるための温度制御器をさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルからのビーズの溶出における使用のための磁場制御器をさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、ユーザーインターフェイスおよびシステム機能の制御をもたらすようにプログラムされたコンピュータまたはプロセッサをさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、リアルタイム画像分析能力を提供するためのプログラムコードをさらに含む。一部の実施形態では、最適な細胞／ビーズ分布が達成されるまで、細胞およびビーズ試料ロードステップを延長または反復することができるように、リアルタイム画像分析および機器制御機能はカップリングされる。一部の実施形態では、機器システムは、オリゴヌクレオチド標識の増幅のための統合されたPCRサーマルサイクラーをさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、オリゴヌクレオチドライブラリーを配列決定し、これにより、試料収集から解答までの（sample-to-answer）能力をもたらすための統合されたシーケンサーをさらに含む。一部の実施形態では、細胞試料は、患者試料を含み、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイの結果は、臨床診断適用に使用される。一部の実施形態では、細胞試料は、患者試料を含み、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイの結果は、ヘルスケア提供者によって使用されて、情報に基づくヘルスケア処置判断を下す。

10

20

#### 【0726】

一態様では、本開示は、次の配列データ分析機能のうち1種または複数を行うようにプログラムされたコンピュータ可読媒体に存するソフトウェアを提供する：細胞1個当たりの遺伝子1種当たりのリードの数および細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの特有の転写物分子の数の決定；細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの転写物分子の数の決定のための信頼区間を予測するための主成分分析または他の統計分析；公知参照配列と遺伝子配列データの整列；試料バーコード、細胞バーコードおよび分子バーコードのデコード／逆マルチプレックス化；ならびに増幅または配列決定誤差を補償するための分子標識の自動クラスタリング；配列データは、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うことによって作成される。

30

#### 【0727】

一態様では、本開示は、固体支持体を含む組成物を提供し、固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の細胞性標識は同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の分子標識は異なる。

40

#### 【0728】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、標的結合領域をさらに含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、標的核酸にハイブリダイズするように適応された配列を含む。一部の実施形態では、標的核酸は、生物のトランスクリプトームの転写物の少なくとも0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、

50

35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%または100%を含む複数の標的核酸を含む。一部の実施形態では、標的核酸は、DNAである。一部の実施形態では、標的核酸は、RNAである。一部の実施形態では、標的核酸は、mRNAである。一部の実施形態では、DNAは、ゲノムDNAである。一部の実施形態では、ゲノムDNAは、切断されている。一部の実施形態では、切断されたゲノムDNAは、生物のゲノムの遺伝子の少なくとも0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、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%または100%を含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、ランダムマルチマー、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーもしくはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列；遺伝子特異的プライマー；およびオリゴdT；またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含む。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーの結合部位を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、リンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、官能基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドに対し5'に位置する。一部の実施形態では、リンカーは、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンで構成される。一部の実施形態では、固体支持体は、磁性である。一部の実施形態では、固体支持体は、PDMS固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体およびブルロニック固体支持体またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズを含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約20ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約5ミクロン～約40ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、官能基を含む。一部の実施形態では、官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、細胞性標識は、複数の細胞性標識を含む。一部の実施形態では、複数の細胞性標識は、複数のリンカー標識配列が散在する。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種の標的結合領域を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種の異なる標的結合領域を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種の同じ標的結合領域を含む。一部の実施形態では、異なる標的結合領域は、生物のトランスクリプトームの転写物の少なくとも0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、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%または100%にハイブリダイズすることができる。一部の実施形態では、異なる標的結合領域は、生物のトランスクリプトームの転写物の少なくとも0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、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%または100%にハイブリダイズすることができる。

#### 【0729】

一態様では、本開示は、固体支持体を含む組成物を提供し、固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識

および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも２種の細胞性標識は同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも２種の分子標識は異なる。

#### 【０７３０】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、標的結合領域をさらに含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、標的核酸にハイブリダイズするように適応された配列を含む。一部の実施形態では、標的核酸は、生物のトランスクリプトームの転写物の少なくとも０．０１％、０．０２％、０．０５％、０．１％、０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、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％または１００％を含む複数の標的核酸を含む。一部の実施形態では、標的核酸は、切断されたゲノムDNAを含み、切断されたゲノムDNAは、生物のゲノムの遺伝子の少なくとも０．０１％、０．０２％、０．０５％、０．１％、０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、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％または１００％を含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、オリゴdTを含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも２種は、第１のオリゴヌクレオチドおよび第２のオリゴヌクレオチドを含み、第１のオリゴヌクレオチドは、第１の細胞性標識および第１の分子標識を含み、第１の細胞性標識は、第１のランダム配列、第２のランダム配列および第１のリンカー標識配列を含み、第１のリンカー標識配列は、第１のランダム配列および第２のランダム配列を接続し、第１の分子標識は、ランダム配列を含み、第２のオリゴヌクレオチドは、第２の細胞性標識および第２の分子標識を含み、第２の細胞性標識は、第３のランダム配列、第４のランダム配列および第２のリンカー標識配列を含み、第２のリンカー標識配列は、第３のランダム配列および第４のランダム配列を接続し、第２の分子標識は、ランダム配列を含み、第１の細胞性標識および第２の細胞性標識は同じであり、第１の分子標識および第２の分子標識は異なる。

#### 【０７３１】

一態様では、本開示は、本明細書に記載されているいずれかの組成物と、使用説明書とを含むキットを提供する。

#### 【０７３２】

一態様では、本開示は、試料を固体支持体と接触させるステップであって、固体支持体が、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも２種が、細胞性標識および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも２種の細胞性標識が同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも２種の分子標識が異なるステップと、複数のオリゴヌクレオチドの１オリゴヌクレオチドに試料由来の標的核酸をハイブリダイズさせるステップとを含む方法を提供する。

#### 【０７３３】

一部の実施形態では、試料は、細胞を含む。一部の実施形態では、試料は、ハイブリダイズさせるステップの前に溶解される。一部の実施形態では、ハイブリダイズさせるステップは、複数のオリゴヌクレオチドに同じ標的核酸の複数コピーをハイブリダイズさせるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、標的核酸を逆転写するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチド増幅を行うステップをさらに含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、PCR、定量的PCR、リアルタイムPCRおよびデジタルPCRまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を使用した増幅を含む。

#### 【０７３４】

一態様では、本開示は、第１のランダム配列、第２のランダム配列および第１のリンカー標識配列を含む第１の細胞性標識であって、第１のリンカー標識配列が、第１のランダ

ム配列および第2のランダム配列を接続する第1の細胞性標識；ならびにランダム配列を含む第1の分子標識を含む第1のオリゴヌクレオチドと、第3のランダム配列、第4のランダム配列および第2のリンカー標識配列を含む第2の細胞性標識であって、第2のリンカー標識配列が、第3のランダム配列および第4のランダム配列を接続する第2の細胞性標識；ならびにランダム配列を含む第2の分子標識を含む第2のオリゴヌクレオチドとを含む固体支持体を提供し、第1の細胞性標識および第2の細胞性標識は同じであり、第1の分子標識および第2の分子標識は異なる。一部の実施形態では、第1および第2のオリゴヌクレオチドは、同一試料指標領域をさらに含む。一部の実施形態では、試料指標領域は、ランダム配列を含む。一部の実施形態では、試料指標領域は、4～12個のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、細胞性標識は、分子標識に直接的に付着させる。一部の実施形態では、細胞性標識および分子標識は、リンカー標識配列により付着させる。一部の実施形態では、細胞性標識のランダム配列は、4～12個のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、細胞性標識の定常配列は、少なくとも4個のヌクレオチドの長さである。一部の実施形態では、細胞性標識は、少なくとも12個のヌクレオチドの総計の長さを有する。一部の実施形態では、細胞性標識は、1種または複数の追加的なランダム配列をさらに含む。一部の実施形態では、細胞性標識は、1種または複数の追加的なリンカー標識配列をさらに含む。一部の実施形態では、1種または複数の追加的なリンカー標識配列は、1種または複数の追加的なランダム配列を接続する。一部の実施形態では、分子標識のランダム配列は、4～12個のヌクレオチドの長さである。

#### 【0735】

一態様では、本開示は、固体支持体を含む組成物を提供し、固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識、分子標識；および標的結合領域；および複数の標的核酸を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の細胞性標識は同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の分子標識は異なる。

#### 【0736】

一部の実施形態では、標的結合領域は、複数の標的核酸のうち少なくとも1種にハイブリダイズするように適応された配列を含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、ランダムマルチマー、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーもしくはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列；遺伝子特異的プライマー；およびオリゴdT；またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、10,000～10億種のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、複数の標的核酸の標的核酸の数を超える多数のオリゴヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、複数の標的核酸は、同じ標的核酸の複数コピーを含む。一部の実施形態では、複数の標的核酸は、異なる標的核酸の複数コピーを含む。一部の実施形態では、複数の標的核酸は、複数のオリゴヌクレオチドに結合される。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含む。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマーの結合部位を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、リンカーを含む。一部の実施形態では、リンカーは、官能基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドに対し5'に位置する。一部の実施形態では、官能基は、アミノ基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンで構成される。一部の実施形態では、固体支持体は、磁性である。一部の実施形態では、固体支持体は、PDMS固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体およびブルロニック固体支持体またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズを含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約20ミクロ

10

20

30

40

50

ンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約 5 ミクロン～約 40 ミクロンの直径を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、官能基を含む。一部の実施形態では、官能基は、カルボキシ基を含む。一部の実施形態では、官能基は、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン、アルデヒドおよびケトンまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、細胞性標識は、複数の細胞性標識を含む。一部の実施形態では、複数の細胞性標識は、複数のリンカー標識配列が散在する。

#### 【0737】

一態様では、本開示は、第 1 の固体支持体であって、第 1 の固体支持体が、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドを含み、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドが、同じ第 1 の細胞性標識を含む第 1 の固体支持体と、第 2 の固体支持体であって、第 2 の固体支持体が、第 2 の

10

#### 【0738】

一部の実施形態では、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドおよび第 2 の複数のオリゴヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドは、分子標識を含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの分子標識は異なる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドの分子標識は同じである。一部の実施形態では、一部のオリゴヌクレオチドの分子標識は異なり、一部は同じである。一部の実施形態では、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドおよび第 2 の複数のオリゴヌクレオチド由来のオリゴヌクレオチドは、標的結合領域を含む。一部の実施形態では、キットは、マイクロウェルアレイをさらに含む。一部の実施形態では、キットは、バッファーをさらに含む。一部の実施形態では、バッファーは、再構成バッファー、希釈バッファーおよび安定化バッファーまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。

20

#### 【0739】

一態様では、本開示は、試料を固体支持体と接触させるステップであって、固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 種は、細胞性標識および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 種の細胞性標識は同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 種の分子標識は異なるステップと、複数のオリゴヌクレオチドの 1 オリゴヌクレオチドに試料由来の標的核酸をハイブリダイズさせるステップとを含む、標的核酸の量を決定するための方法を提供する。

30

#### 【0740】

一部の実施形態では、試料は、細胞を含む。一部の実施形態では、試料は、ハイブリダイズさせるステップの前に溶解される。一部の実施形態では、ハイブリダイズさせるステップは、複数のオリゴヌクレオチドに同じ標的核酸の複数コピーをハイブリダイズさせるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、標的核酸を増幅するステップをさらに含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、標的核酸を逆転写するステップを含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、PCR、定量的 PCR、リアルタイム PCR およびデジタル PCR またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を使用した増幅を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、固体支持体上で直接的に行われる。一部の実施形態では、増幅するステップは、固体支持体から転写された鋳型上で行われる。一部の実施形態では、方法は、標的核酸を配列決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、配列決定するステップは、標的核酸および分子標識を配列決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、標的核酸の量を決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、決定するステップは、標的核酸のレベルを定量化するステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、標的核酸のための配列決定された分子標識の数を計数するステップを含む。一部の実施形態では、接触させるステップは、マイクロウェル中で行う。一部の実施形態では、マイクロウェルは、親水性プラスチック、プラスチック、エラストマーおよびヒドロゲルまたはこれらのいずれかの組合

40

50

せからなる群より選択される材料から作製される。一部の実施形態では、マイクロウェルは、アガロースを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、マイクロウェルアレイの1個のマイクロウェルである。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、少なくとも90個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、少なくとも150,000個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル1個当たり少なくとも1個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル1個当たり最大でも2個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、固体支持体の最大でも2個を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、最大でも1個の固体支持体を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも25ミクロンの深さである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも25ミクロンの直径である。

#### 【0741】

一態様では、本開示は、固体支持体に試料を接触させるステップであって、固体支持体が、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種が、細胞性標識および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の細胞性標識が同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の分子標識が異なるステップと、複数のオリゴヌクレオチドに試料由来の標的核酸をハイブリダイズさせるステップと、標的核酸またはその相補体を増幅するステップと、標的核酸またはその相補体を配列決定するステップであって、標的核酸またはその相補体、および標的核酸またはその相補体が結合されるオリゴヌクレオチドの分子標識を配列決定するステップと、標的核酸の量を決定するステップとを含む、標的核酸の増幅バイアスを低下させる方法を提供する。

#### 【0742】

一部の実施形態では、ハイブリダイズさせるステップは、複数のオリゴヌクレオチドに同じ標的核酸の複数コピーをハイブリダイズするステップを含む。一部の実施形態では、決定するステップは、同じ標的核酸のための多数の配列決定された分子標識を計数するステップを含む。一部の実施形態では、計数するステップは、同じ標的核酸のコピーの数を計数する。一部の実施形態では、試料は、細胞を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、標的核酸を逆転写するステップを含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、PCR、定量的PCR、リアルタイムPCRおよびデジタルPCRまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を使用した増幅を含む。一部の実施形態では、増幅するステップは、固体支持体上で直接的に行われる。一部の実施形態では、増幅するステップは、固体支持体から転写される鋳型上で行われる。

#### 【0743】

一態様では、本開示は、マイクロウェル；細胞；および固体支持体を含む組成物を提供し、固体支持体は、複数のオリゴヌクレオチドを含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、細胞性標識および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の細胞性標識は同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種の分子標識は異なる。

#### 【0744】

一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、試料標識をさらに含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも2種は、標的結合領域をさらに含む。一部の実施形態では、標的結合領域は、ランダムマルチマー、例えば、ランダムダイマー、トリマー、クアトラマー、ペンタマー、ヘキサマー、セプタマー、オクタマー、ノナマー、デカマーもしくはいずれかの長さのより高次のマルチマー配列；遺伝子特異的プライマー；およびオリゴdT；またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む。一部の実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドは、ユニバーサル標識を含む。一部の実施形態では、ユニバーサル標識は、配列決定プライマー（primer）のための結合部位を含む。一部の実施形態では、固体支持体は、ポリスチレンで構成される。一部の実施形態では、固体支持体は、磁性である。一部の実

施形態では、固体支持体は、P D M S 固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体およびブルロニック固体支持体またはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される。一部の実施形態では、固体支持体は、ビーズを含む。一部の実施形態では、固体支持体は、約 20 ミクロンの直径を有する。一部の実施形態では、固体支持体は、約 5 ミクロン～約 40 ミクロンの直径を有する。一部の実施形態では、細胞性標識は、複数の細胞性標識を含む。一部の実施形態では、複数の細胞性標識は、複数のリンカー配列が散在する。一部の実施形態では、マイクロウェルは、親水性プラスチック、プラスチック、エラストマーおよびヒドロゲルまたはこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される材料から作製される。一部の実施形態では、マイクロウェルは、アガロースを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、マイクロウェルアレイのマイクロウェルである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル 1 個当たり少なくとも 1 個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、ウェル 1 個当たり最大でも 2 個の固体支持体を含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、固体支持体の少なくとも 1 個および細胞の少なくとも 1 個を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、固体支持体の最大でも 1 個および細胞の少なくとも 1 個を収容するサイズのものである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも 25 ミクロンの深さである。一部の実施形態では、マイクロウェルは、少なくとも 25 ミクロンの直径である。一部の実施形態では、マイクロウェルは平坦である。

10

#### 【0745】

20

一態様では、本開示は、複数のマイクロウェルを含むデバイスを提供し、複数のマイクロウェルは、少なくとも 2 個のマイクロウェルを含み、複数のマイクロウェルの各マイクロウェルは、約  $1,000\ \mu\text{m}^3$ ～約  $120,000\ \mu\text{m}^3$  に及ぶ容積を有する。一部の実施形態では、複数のマイクロウェルの各マイクロウェルは、約  $20,000\ \mu\text{m}^3$  の容積を有する。一部の実施形態では、複数のマイクロウェルは、約 1,000～約 5,000,000 個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、複数のマイクロウェルは、約 100,000～約 200,000 個のマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルは、材料の単一の層中に含まれる。一部の実施形態では、マイクロウェルの少なくとも約 10% は、細胞をさらに含む。一部の実施形態では、マイクロウェルの少なくとも約 10% は、複数のオリゴヌクレオチドを含む固体支持体をさらに含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 種は、細胞性標識および分子標識を含み、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 種の細胞性標識は同じであり、複数のオリゴヌクレオチドのうち少なくとも 2 種の分子標識は異なる。一部の実施形態では、固体支持体は磁化されている。

30

#### 【0746】

一態様では、本開示は、本明細書に記載されているいずれかのデバイスと、液体ハンドラーとを含む装置を提供する。

#### 【0747】

一部の実施形態では、液体ハンドラーは、約 1 秒間で複数のマイクロウェルに液体を送達する。一部の実施形態では、装置は、単一の入力ポートから複数のマイクロウェルに液体を送達する。一部の実施形態では、装置は、磁石をさらに含む。一部の実施形態では、装置は、入口ポート、出口ポート、ポンプ、弁、ベント、リザーバー、試料収集チャンバー、温度制御装置またはこれらのいずれかの組合せのうち少なくとも 1 種をさらに含む。一部の実施形態では、装置は、試料収集チャンバーを含み、試料収集チャンバーは、装置から着脱可能である。一部の実施形態では、装置は、光学撮像器をさらに含む。一部の実施形態では、光学撮像器は、液体ハンドラーの制御に使用される出力シグナルを生成する。一部の実施形態では、装置は、オリゴヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅を行うように構成された熱サイクリング機構をさらに含む。

40

#### 【0748】

一態様では、本開示は、本明細書に記載されているいずれかのデバイスまたは装置によ

50

り臨床診断検査結果を生成するステップを含む、臨床診断検査結果を生成する方法を提供する。一部の実施形態では、臨床診断検査結果は、通信媒体を介して伝達される。

#### 【0749】

一態様では、本開示は、1個または複数のマイクロウェルアレイをさらに含む1個または複数の基材を含むデバイスを提供し、マイクロウェルアレイを使用して、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行う。

#### 【0750】

一部の実施形態では、基材のマイクロウェルアレイは、一次元または二次元アレイパターンに配置されたマイクロウェルを含む。一部の実施形態では、マイクロウェルの二次元アレイパターンは、正方格子、矩形格子または六角格子を含む群より選択される。

10

#### 【0751】

一部の実施形態では、マイクロウェルアレイのマイクロウェルは、円柱状、円錐体、半球状、矩形または多角体を含む群より選択されるウェル幾何学を使用して製作される。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイのマイクロウェルは、円柱状、円錐体、半球状、矩形または多角体を含む群より選択される2種またはそれを超える成分幾何学を含む全体的幾何学を使用して製作される。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイにおけるマイクロウェルの直径は、約5ミクロン～約50ミクロンの間である。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイにおけるマイクロウェルの深さは、約10ミクロン～約60ミクロンの間である。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイにおけるマイクロウェル間の中心間スペーシングは、約15ミクロン～約75ミクロンの間である。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイのそれぞれにおけるマイクロウェルの総数は、約96～約5,000,000個の間である。一部の実施形態では、1個または複数の基材は、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリマーまたは金属を含む群より選択される材料から製作される。一部の実施形態では、1個または複数の基材は、アガロースまたはヒドロゲルから製作される。一部の実施形態では、マイクロウェルアレイは、マイクロウェルを囲むまたはマイクロウェル間の表面にまたがるマイクロウェル間の表面特色をさらに含み、ドーム、隆線またはピークがある表面特色を含む群より選択される。

20

#### 【0752】

一態様では、本開示は、1個または複数のマイクロウェルアレイをさらに含む基材と、頂部プレート、底部プレートおよびガスケットを含む機械的治具とを含むデバイスを提供し、組み立てられると、基材は、ガスケットおよび底部プレートの間にポジショニングされ、ガスケットは、基材と漏れ止め封着を形成し、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行う目的で、1種または複数の細胞試料およびビーズに基づくオリゴヌクレオチド標識をチャンバーに分注することができるよう、頂部プレートおよびガスケットは、マイクロウェルアレイを包含する1個または複数のチャンバーを形成する。

30

#### 【0753】

一部の実施形態では、基材は、本明細書に記載されているいずれか1個または複数のマイクロウェルアレイを含む。一部の実施形態では、ガスケットは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)または同様のエラストマー材料から製作される。一部の実施形態では、頂部および底部プレートは、アルミニウム、陽極処理アルミニウム、ステンレス鋼、テフロン(登録商標)、ポリメタクリル酸メチル、ポリカーボネートまたは同様の硬質ポリマー材料から製作される。

40

#### 【0754】

一態様では、本開示は、1個または複数のマイクロウェルアレイをさらに含む1個または複数の基材と、1個または複数のフローセルとを含むデバイスを提供し、1個または複数のフローセルは、1個または複数の基材を包囲するかまたはこれに付着され、マイクロウェルアレイに流体を送達する目的の少なくとも1個の入口ポートおよび少なくとも1個の出口ポートを含み、デバイスを使用して、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行う。

50

## 【0755】

一部の実施形態では、1個または複数の基材は、本明細書に記載されているいずれか1個または複数のマイクロウェルアレイを含む。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルのそれぞれは、1種または複数の試料を並行して処理することができるように、複数のマイクロウェルアレイとインターフェイスする複数のマイクロアレイチャンバーをさらに含む。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルは、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらすための多孔性障壁または流動拡散器をさらに含む。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルは、マイクロウェルアレイを含有するチャンバーを、同じ総アレイ面積をまとめて覆うサブセクションに分割し、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらす分割器をさらに含む。一部の実施形態では、デバイスに取り込まれる流体チャネルの幅は、約50ミクロン～20mmの間である。一部の実施形態では、デバイスに取り込まれる流体チャネルの深さは、約50ミクロン～約2mmの間である。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルは、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリジメチルシロキサン（PDMS；エラストマー）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリイミド、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、エポキシ樹脂、金属またはこれらの材料の組合せからなる群より選択される材料から製作される。一部の実施形態では、デバイスは、自動マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うための機器システムの固定された成分を含む。一部の実施形態では、デバイスは、自動マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うための機器システムの着脱可能な成分を含む。

10

20

## 【0756】

一態様では、本開示は、1個または複数のマイクロウェルアレイをさらに含む1個または複数の基材；1個または複数のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバー；1個または複数の試料または試薬リザーバーを含むカートリッジを提供し、カートリッジは、マイクロウェルアレイに流体を送達する目的の、少なくとも1個の入口ポートおよび少なくとも1個の出口ポートをさらに含み、カートリッジを使用して、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行う。

30

## 【0757】

一部の実施形態では、1個または複数の基材は、本明細書に記載されているいずれか1個または複数のマイクロウェルアレイを含む。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、1種または複数の試料を並行して処理することができるように、複数のマイクロウェルアレイとインターフェイスする。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらすための多孔性障壁または流動拡散器をさらに含む。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、フローセルまたはチャンバーを、同じ総アレイ面積をまとめて覆うサブセクションに分割し、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズのより均一な送達をもたらす分割器をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約50ミクロン～200ミクロンの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約200ミクロン～2mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの幅は、約2mm～10mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約50ミクロン～約10mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約10mm～20mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約500ミクロン～1mmの間である。一部の実施形態では、カートリッジに取り込まれる流体チャネルの深さは、約1mm～約2mmの間である。一部の実施形態では、1個または複数のフ

40

50

ローセルまたはマイクロウェルアレイチャンバーは、シリコン、石英ガラス、ガラス、ポリジメチルシロキサン（PDMS；エラストマー）、ポリメタクリル酸メチル（PMMA）、ポリカーボネート（PC）、ポリプロピレン（PP）、ポリエチレン（PE）、高密度ポリエチレン（HDPE）、ポリイミド、環状オレフィンポリマー（COP）、環状オレフィンコポリマー（COC）、ポリエチレンテレフタレート（PET）、エポキシ樹脂、金属またはこれらの材料の組合せからなる群より選択される材料から製作される。一部の実施形態では、デバイスは、自動マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うための機器システムの着脱可能な消費可能な成分を含む。一部の実施形態では、カートリッジは、カートリッジに分注または注射された細胞試料またはビーズ懸濁液の自己計量をもたらしするためのバイパスチャネルまたは他の設計特色をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、デバイスを通る流体の流れを制御するための統合されたミニチュアポンプをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、予めロードされた試薬を区画化し、デバイスを通る流体の流れを制御するための統合されたミニチュア弁をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、捕捉された空気のエスケープ通路を提供するためのベントをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、経路長を有効に増加させ、マイクロウェル間の分子の拡散を防ぐまたは最小化する物理的または化学的障壁を作製するための設計要素をさらに含み、設計要素は、マイクロウェルアレイへの細胞およびビーズの送達のための蛇行チャネルのパターン、マイクロウェルアレイの表面との接触にプレスされる収納できるプラテンもしくは変形可能な膜、またはカートリッジ内のリザーバーからの不混和性の疎水性流体の放出からなる群より選択される。一部の実施形態では、カートリッジは、外部機器システムとの優れた熱接触を提供するための統合された温度制御成分または統合された熱インターフェイスをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、1個または複数のマイクロウェルアレイの光学イメージングのための光学インターフェイスまたは窓をさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジは、スタンドアロンPCRサーマルサイクラーおよび／または配列決定機器とインターフェイスするように構成された1個または複数の着脱可能な試料収集チャンバーをさらに含む。一部の実施形態では、カートリッジそれ自体が、スタンドアロンPCRサーマルサイクラーおよび／または配列決定機器と直接的にインターフェイスするように構成されている。

#### 【0758】

一態様では、本開示は、1個または複数のマイクロウェルアレイをさらに含む1個または複数のフローセルまたはカートリッジと、流動制御器とを含む機器システムを提供し、流動制御器は、マイクロウェルアレイへの細胞試料、ビーズに基づくオリゴヌクレオチド標識化試薬および他のアッセイ試薬の送達を制御し、機器システムを使用して、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行う。

#### 【0759】

一部の実施形態では、1個または複数のマイクロウェルアレイは、本明細書に記載されているいずれかである。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルは、システムの固定された成分である。一部の実施形態では、1個または複数のフローセルは、システムの着脱可能な消費可能な成分である。一部の実施形態では、1個または複数のカートリッジは、システムの着脱可能な消費可能な成分である。一部の実施形態では、細胞試料およびビーズに基づくオリゴヌクレオチド試薬は、ユーザーによってカートリッジに直接的に分注または注射される。一部の実施形態では、細胞試料以外のアッセイ試薬は、カートリッジに予めロードされている。一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルアレイをイメージングするためのイメージングシステムをさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルアレイにわたる細胞およびビーズの均一な分布を容易にするための細胞またはビーズ分布システムをさらに含み、分布システムの根底にある機構は、振動、振盪、回旋、再循環流、低頻度揺動または高頻度揺動からなる群より選択される。一部の実施形態では、機器システムは、細胞溶解システムをさらに含み、システムは、細胞を超音波処理するための高周波圧電変換器を使用する。一部の実施形態では、

機器システムは、ユーザーが指定した温度を維持するため、または2種もしくはそれを超える指定された時間間隔にわたり2種もしくはそれを超える指定された温度間の温度に傾斜をつけるための温度制御器をさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、マイクロウェルからのビーズの溶出における使用のための磁場制御器をさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、ユーザーインターフェイスおよびシステム機能の制御をもたらすようにプログラムされたコンピュータまたはプロセッサをさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、リアルタイム画像分析能力をもたらすためのプログラムコードをさらに含む。一部の実施形態では、最適な細胞／ビーズ分布が達成されるまで、細胞およびビーズ試料ロードステップを延長または反復することができるように、リアルタイム画像分析および機器制御機能はカップリングされる。一部の実施形態では、機器システムは、オリゴヌクレオチド標識の増幅のための統合されたPCRサーマルサイクラーをさらに含む。一部の実施形態では、機器システムは、オリゴヌクレオチドライブラリーを配列決定し、これにより、試料収集から解答までの能力をもたらすための統合されたシーケンサーをさらに含む。一部の実施形態では、細胞試料は、患者試料を含み、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイの結果は、臨床診断適用に使用される。一部の実施形態では、細胞試料は、患者試料を含み、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイの結果は、ヘルスケア提供者によって使用されて、情報に基づくヘルスケア処置判断を下す。

10

**【0760】**

一態様では、本開示は、次の配列データ分析のうち1種または複数を行うようにプログラムされたコンピュータ可読媒体に存するソフトウェアを提供する：細胞1個当たりの遺伝子1種当たりのリードの数および細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの特有の転写物分子の数の決定；細胞1個当たりの遺伝子1種当たりの転写物分子の数の決定のための信頼区間を予測するための主成分分析または他の統計分析；公知参照配列と遺伝子配列データの整列；試料バーコード、細胞バーコードおよび分子バーコードのデコード／逆マルチプレックス化；ならびに増幅または配列決定誤差を補償するための分子標識の自動クラスタリング；配列データは、マルチプレックス化単一細胞確率論的標識化および分子指標化アッセイを行うことによって作成される。

20

【図 1】

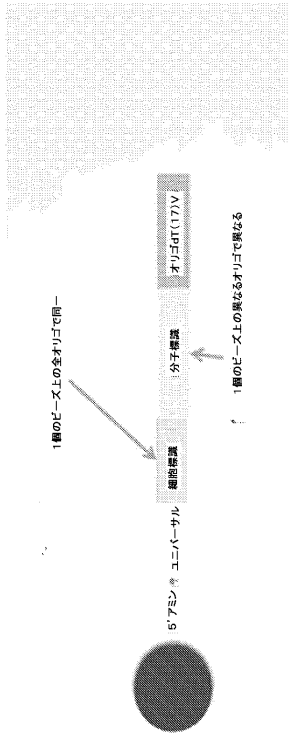


FIG. 1

【図 2 A】

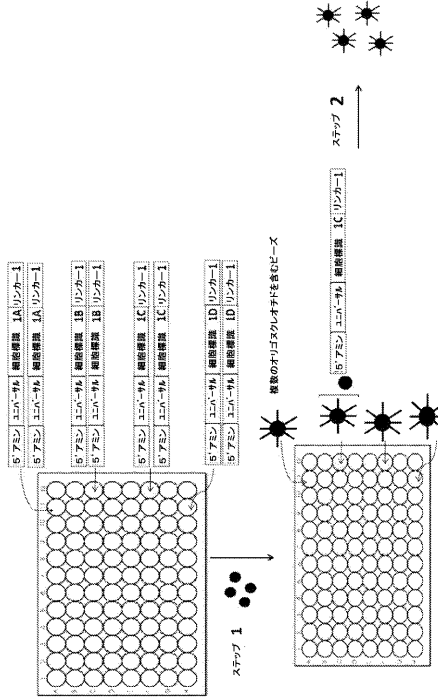


FIG. 2A

【図 2 B】

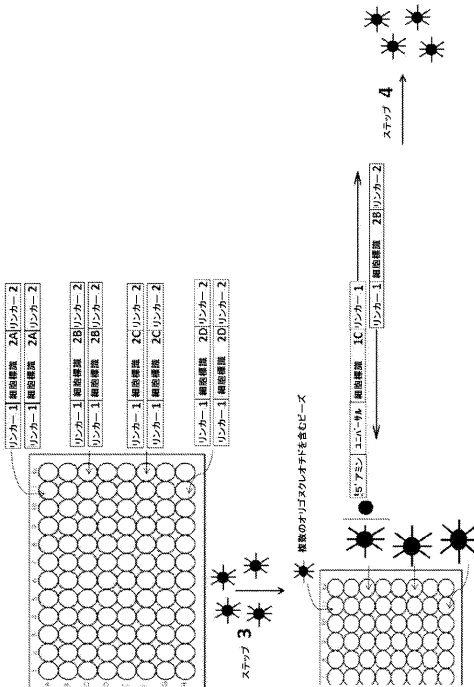


FIG. 2B

【図 2 C】

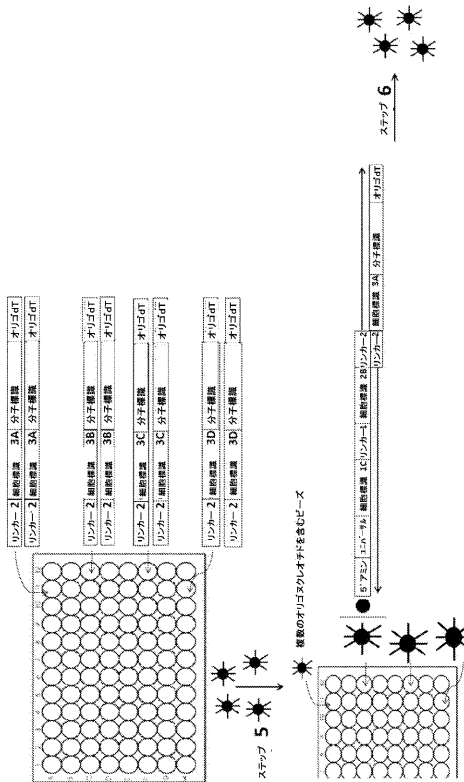


FIG. 2C

【図 3】

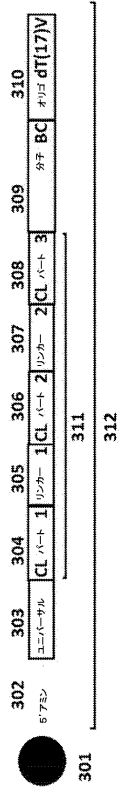


FIG. 3

【図 4】

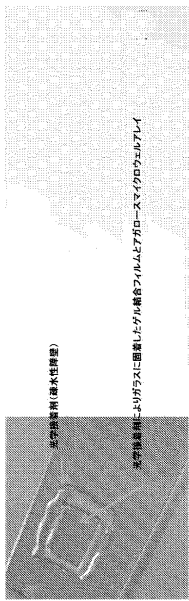


FIG. 4

【図 5】

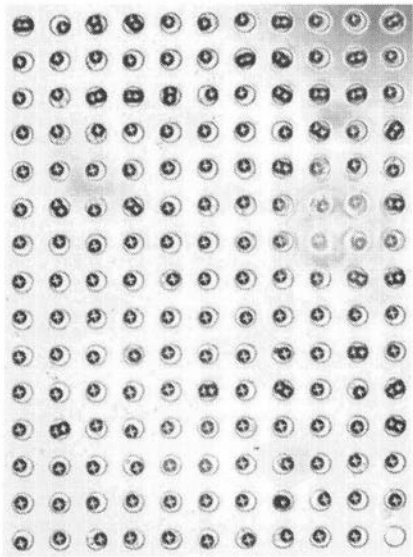


FIG. 5

【図 6 A】



FIG. 6A

【図 6 B】

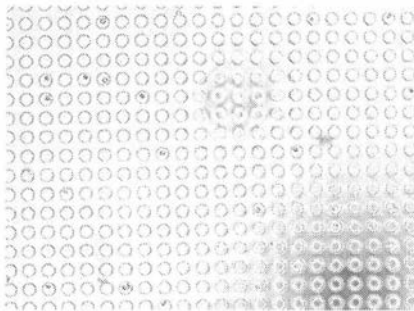


FIG. 6B

【図 6 C】

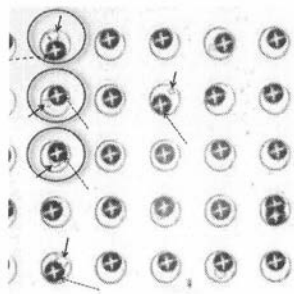


FIG. 6C

【図 7】

|               |          |          |
|---------------|----------|----------|
| ウェル容積         | 2.12E-14 | m3       |
| ビーズ容積         | 4.19E-15 | m3       |
| ウェル容積－ビーズ容積   | 1.70E-14 | m3       |
| ウェル容積－ビーズ容積   | 1.70E-11 | L        |
| 細胞1個当たりの#mRNA | 2.50E+05 | 分子       |
| mRNAの濃度       | 1.47E+16 | 1L当たりの分子 |
| mRNAの濃度       | 2.44E-08 | 1L当たりのモル |
| mRNAの濃度       | 24.40    | nM       |

FIG. 7

【図 8】

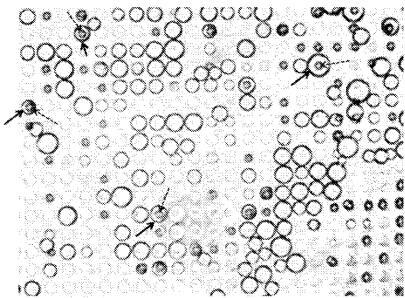


FIG. 8A

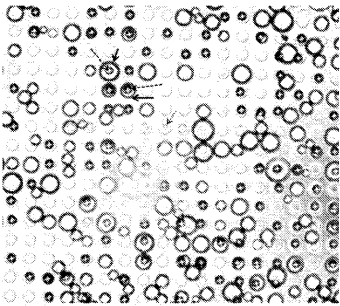


FIG. 8B

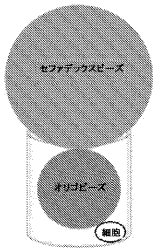


FIG. 8C

【図 9】

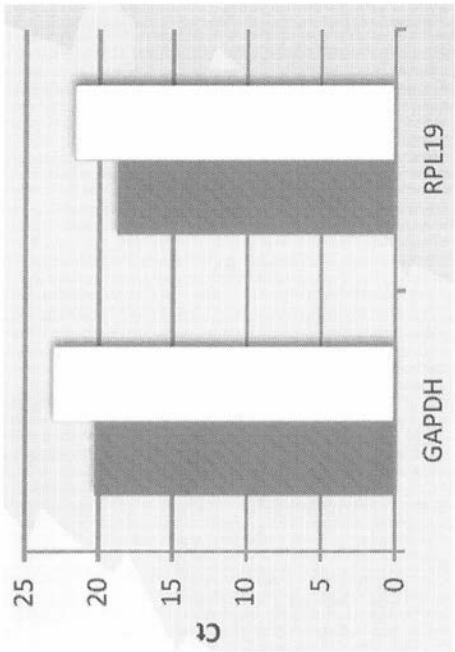


FIG. 9

【図 10】

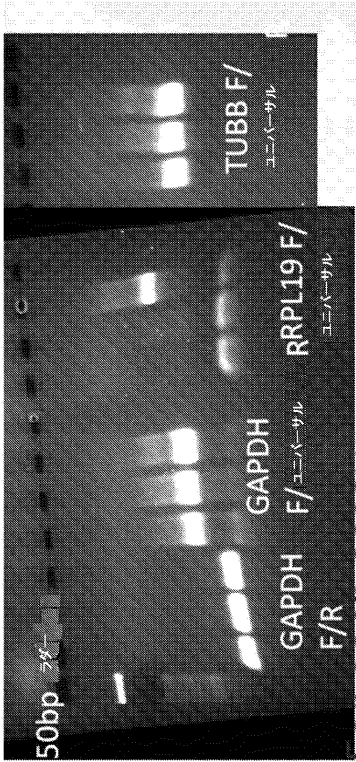


FIG. 10

【図 1 1 - 1】

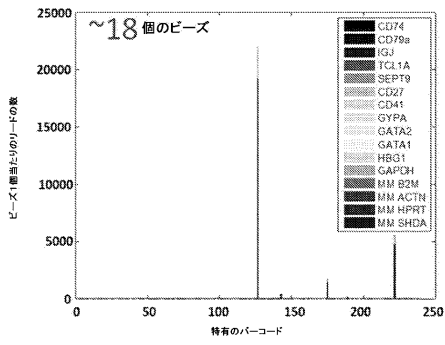


FIG. 11A

【図 1 1 - 2】

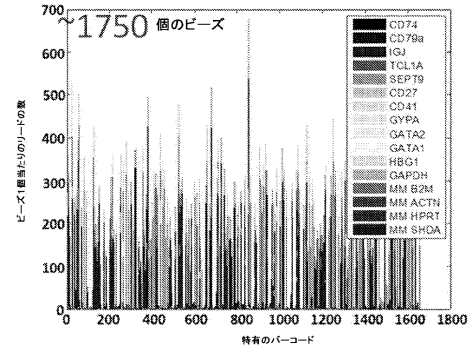


FIG. 11C

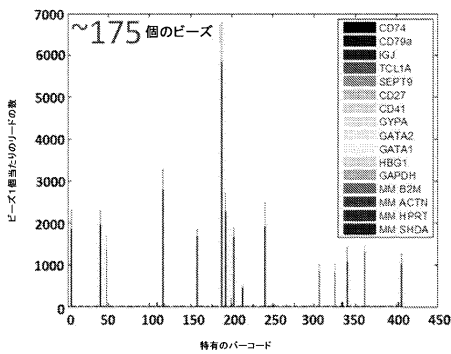


FIG. 11B

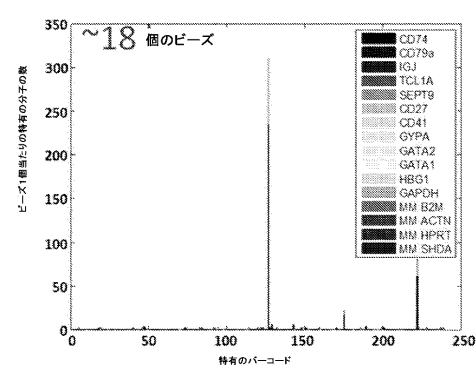


FIG. 11D

【図 1 1 - 3】

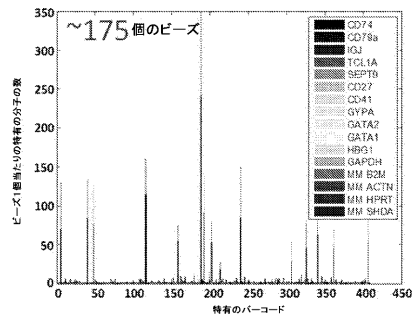


FIG. 11E

【図 1 1 - 4】

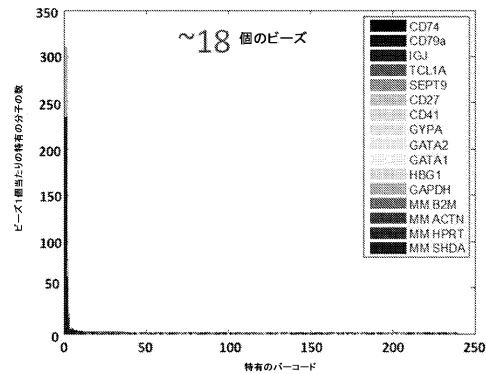


FIG. 11G

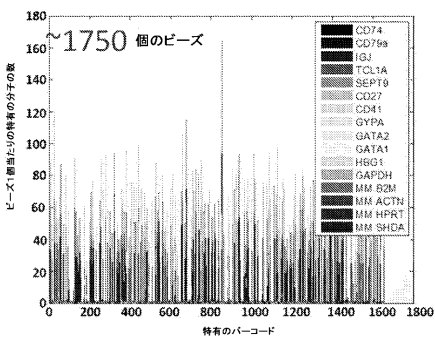


FIG. 11F

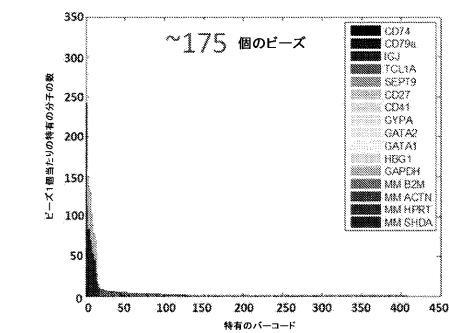


FIG. 11H

【図 1 1 - 5】

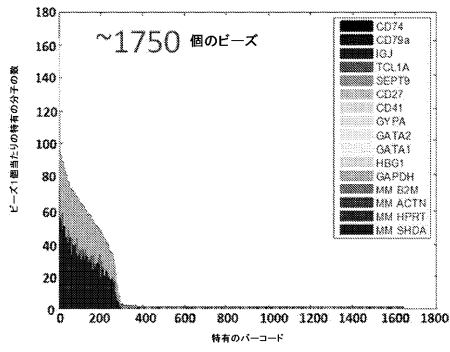


FIG. 11I

【図 1 2 - 1】

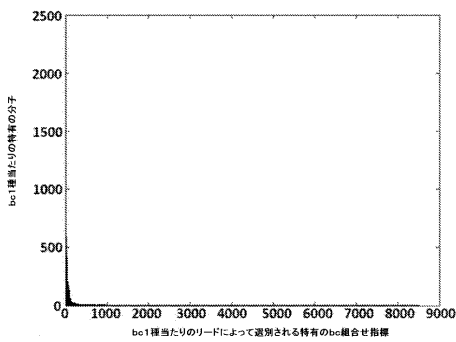


FIG. 12A

【図 1 2 - 3】

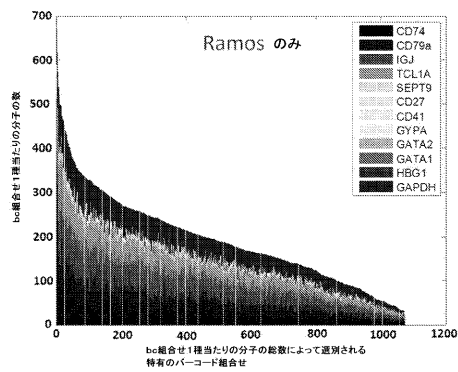


FIG. 12D

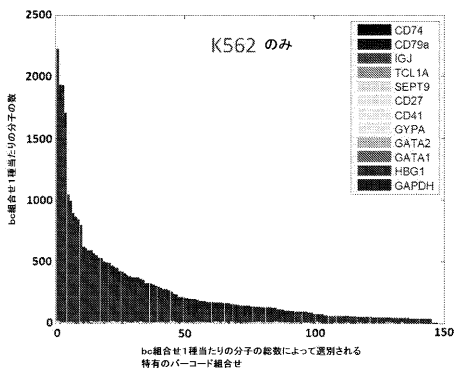


FIG. 12E

【図 1 2 - 2】

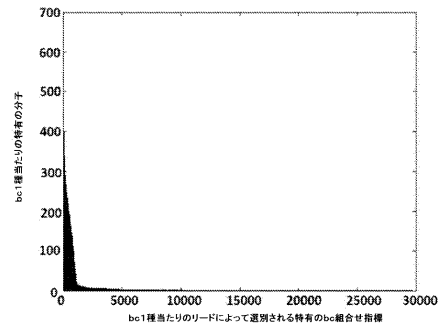


FIG. 12B

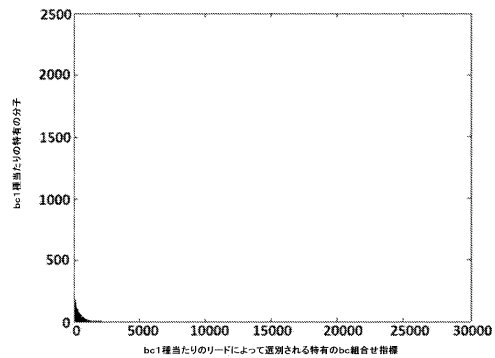


FIG. 12C

【図 1 2 - 4】

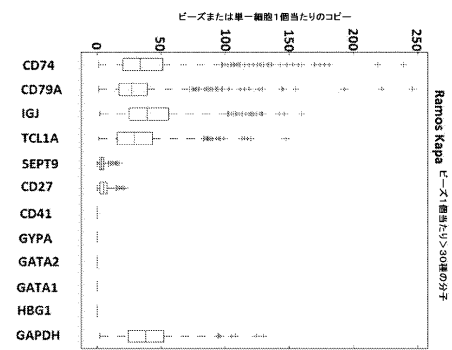


FIG. 12F

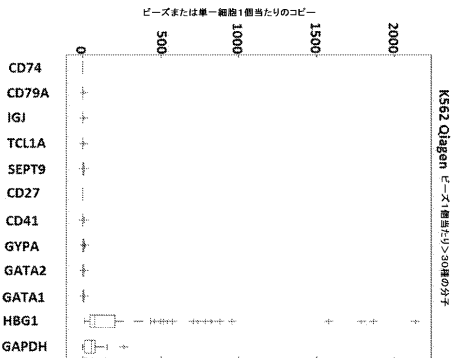


FIG. 12G

【図 12-5】

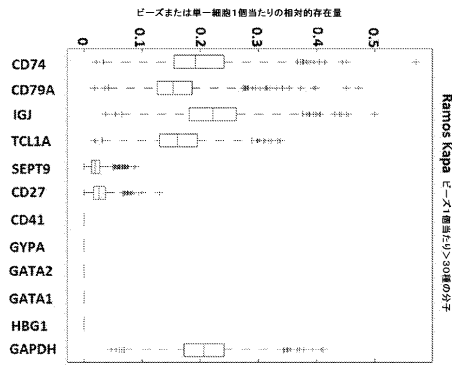


FIG. 12H

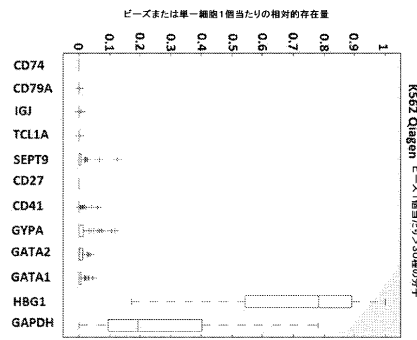


FIG. 12I

【図 12-7】

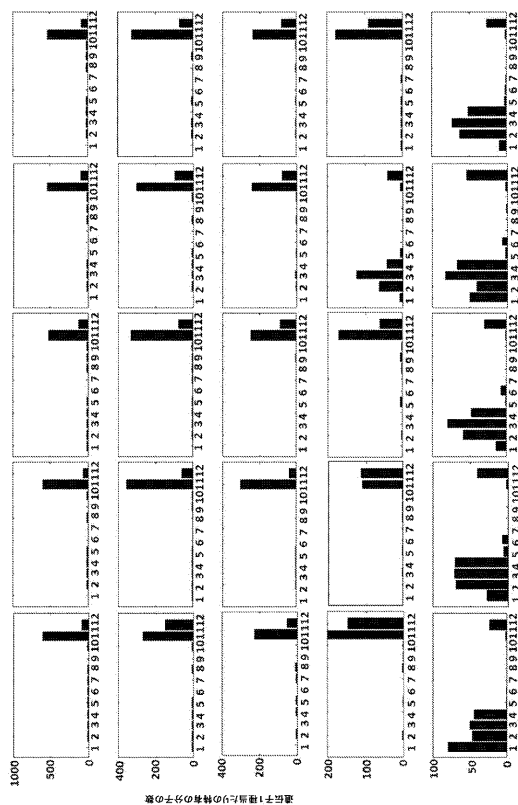


FIG. 12K

【図 12-6】

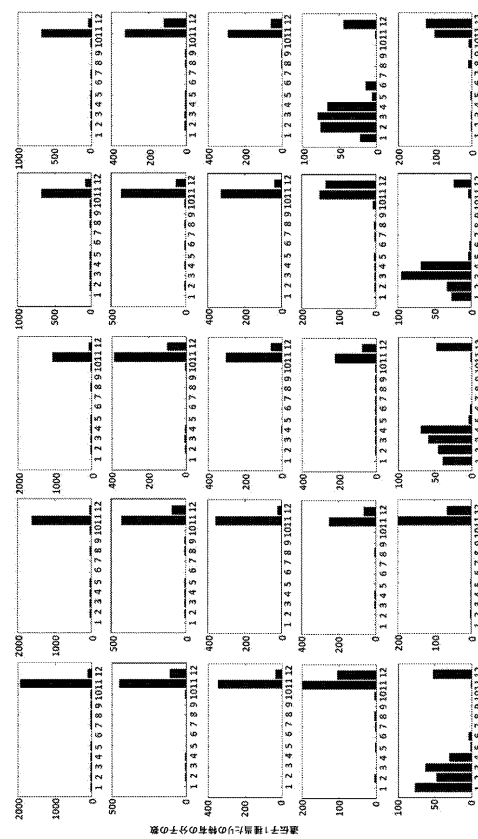


FIG. 12J

【図 12-8】

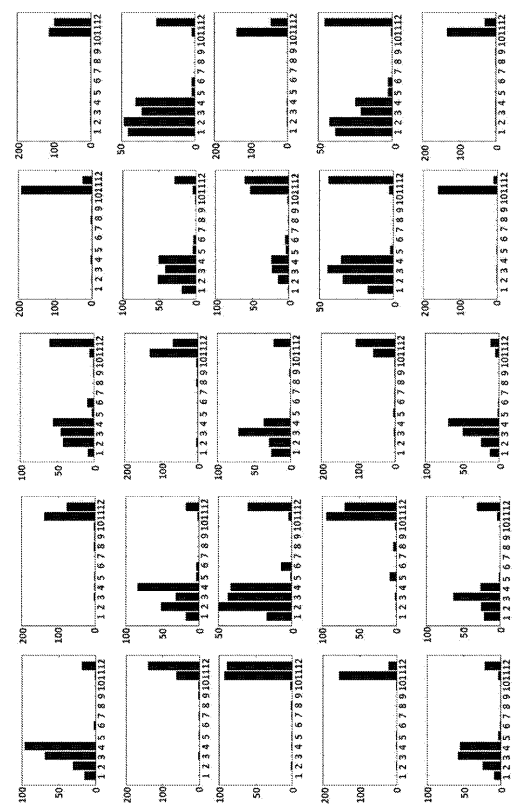


FIG. 12L

【図 12-9】

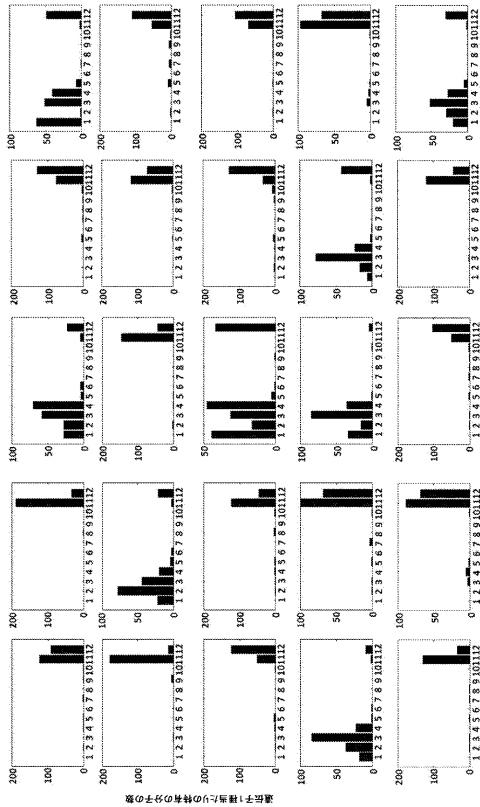


FIG. 12M

【図 12-10】

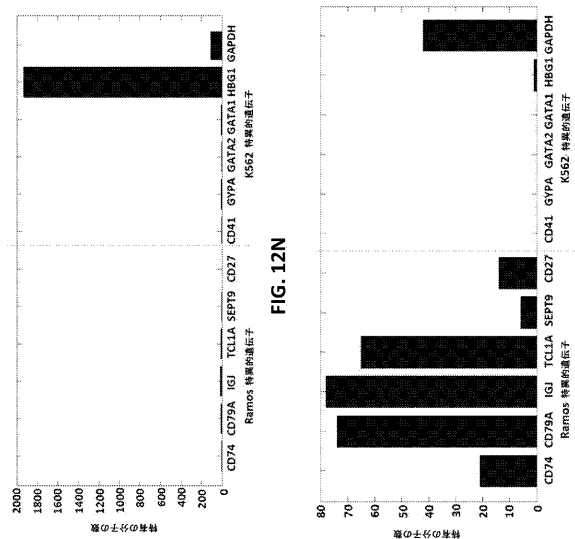


FIG. 12N

FIG. 12O

【図 12-11】

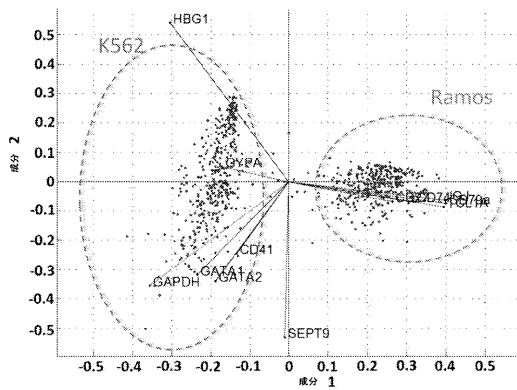


FIG. 12P

【図 12-13】

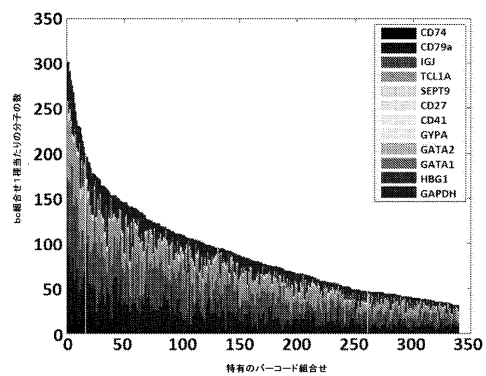


FIG. 12R

【図 12-12】

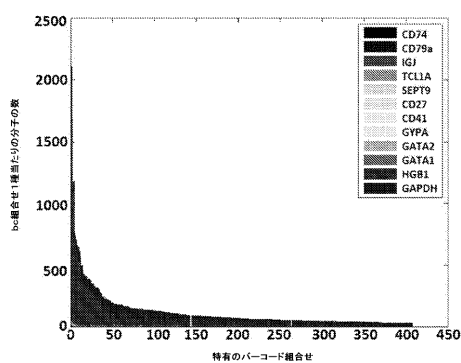


FIG. 12Q

【図 12-14】

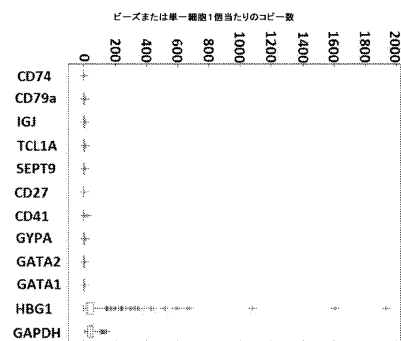


FIG. 12S

【図 12 - 15】

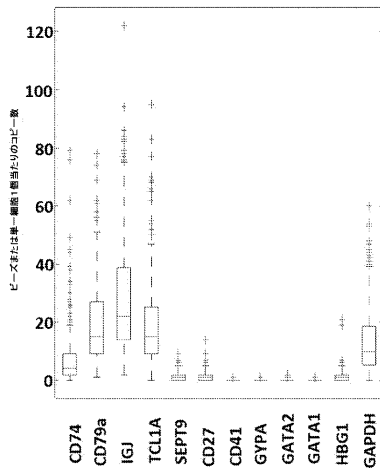


FIG. 12T

【図 13 - 1】

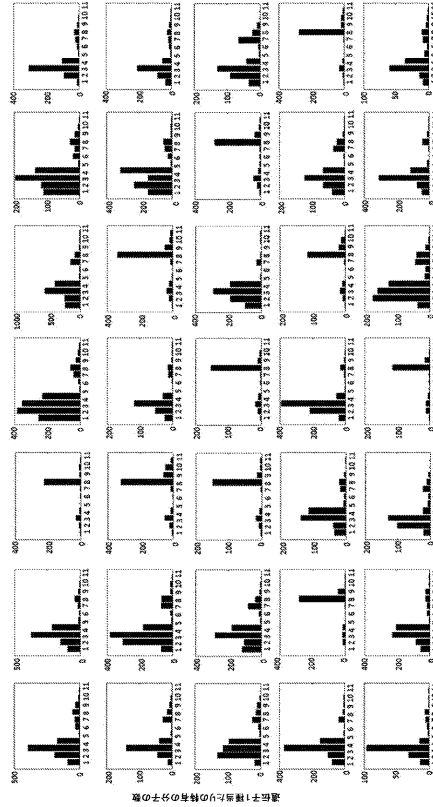


FIG. 13A

【図 13 - 2】

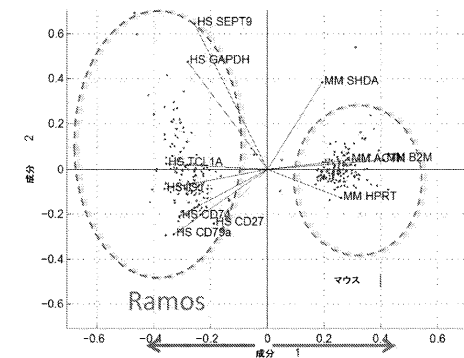


FIG. 13B

【図 13 - 3】

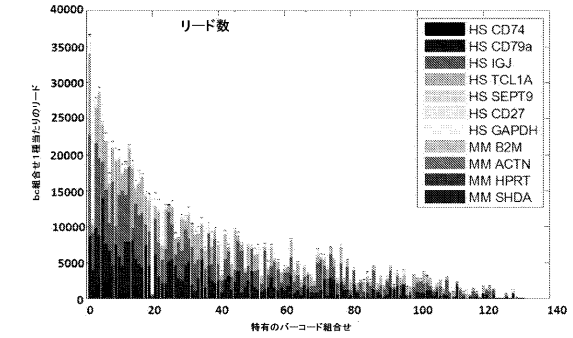


FIG. 13D

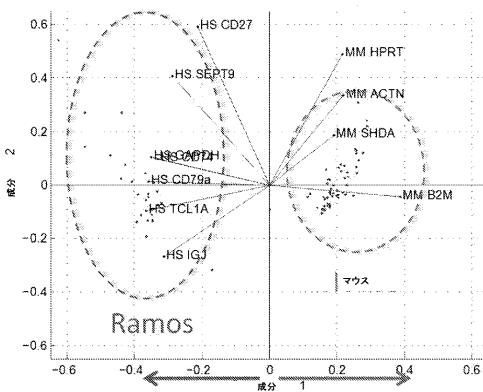


FIG. 13C

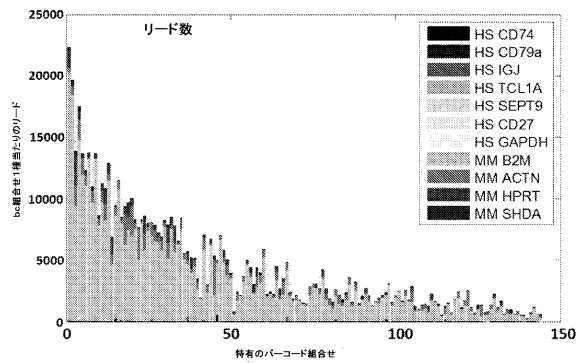


FIG. 13E

【図 13-4】

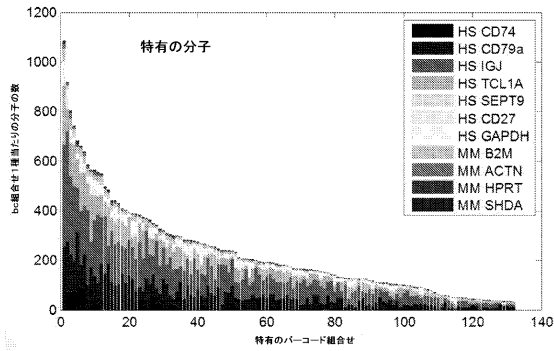


FIG. 13F

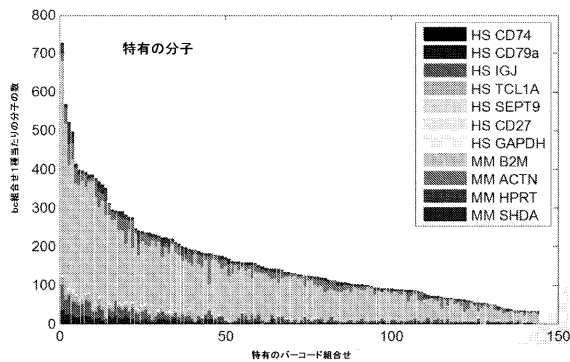


FIG. 13G

【図 13-5】

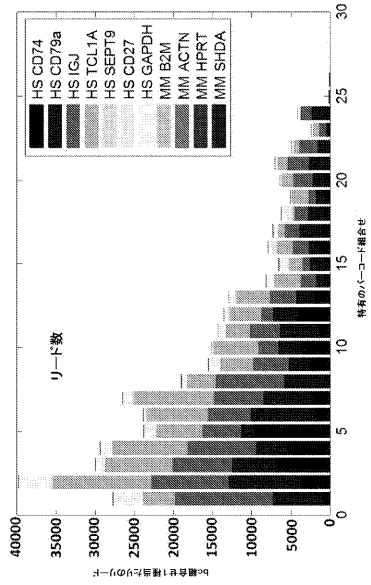


FIG. 13H

【図 13-6】

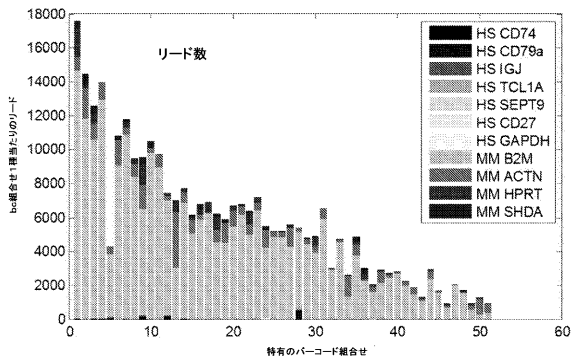


FIG. 13I

【図 13-8】

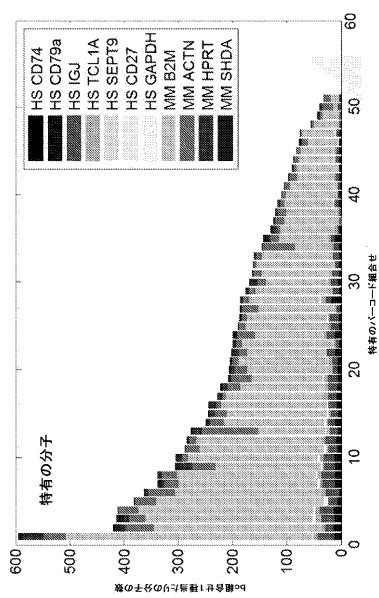


FIG. 13K

【図 13-7】

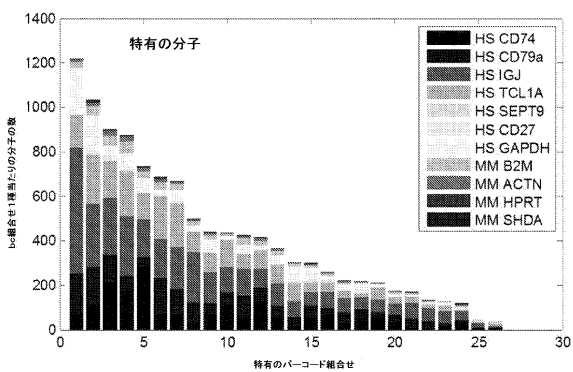


FIG. 13J

【図 14】



FIG. 14

【図 15】

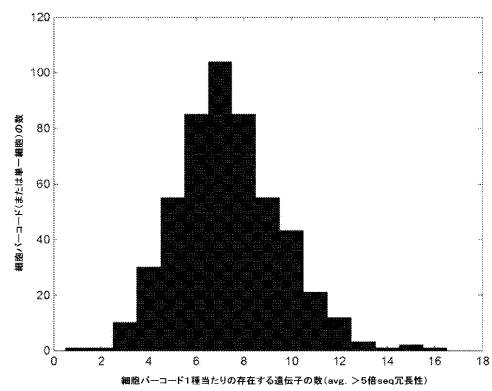


FIG. 15A

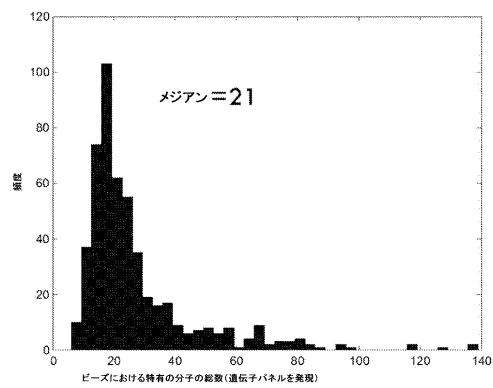


FIG. 15B

【図 16】

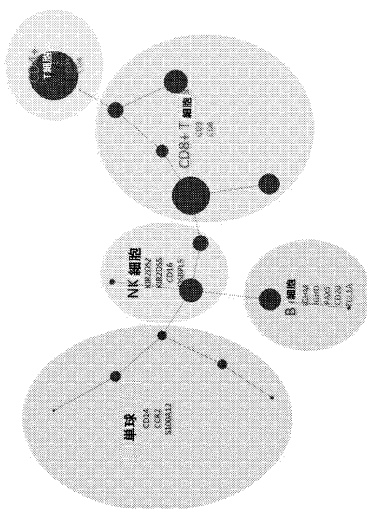


FIG. 16

【図 17】

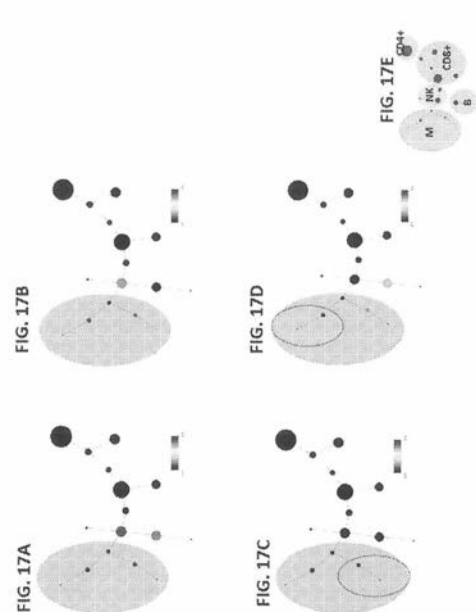
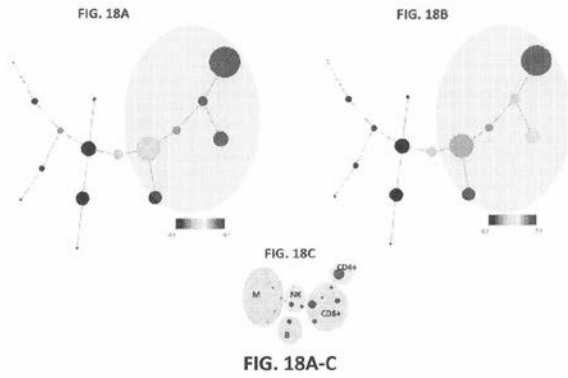
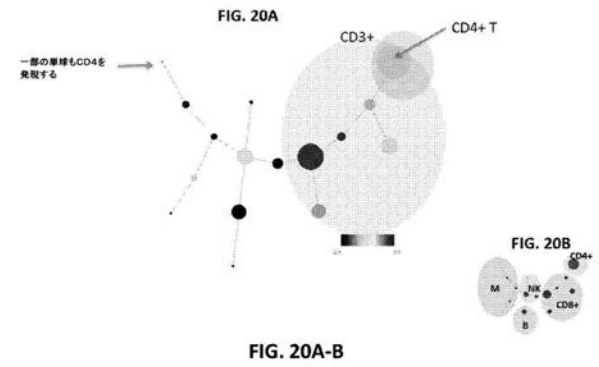


FIG. 17A-E

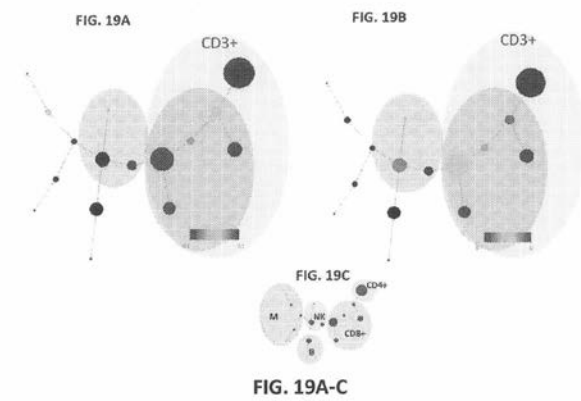
【図 18】



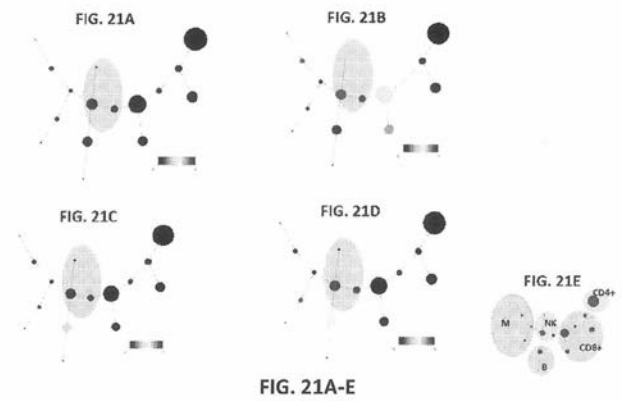
【図 20】



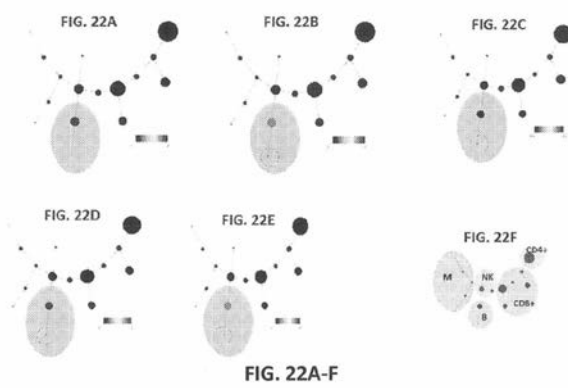
【図 19】



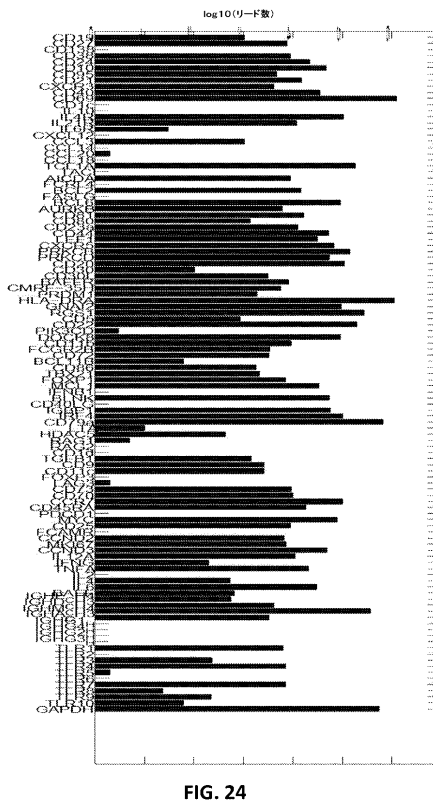
【図 21】



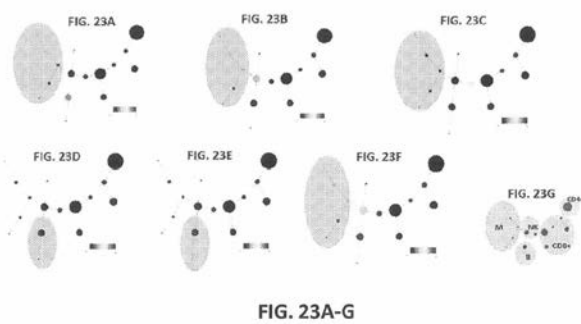
【図 22】



【図 24】



【図 23】



【図 25-1】

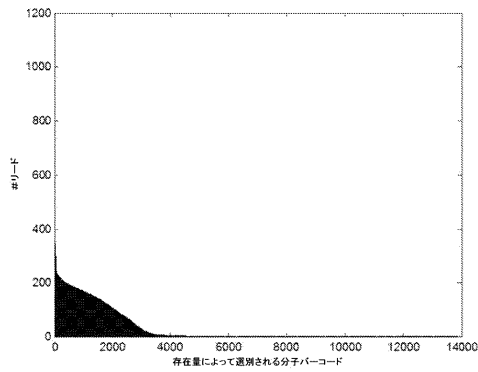


FIG. 25A

【図 25-2】

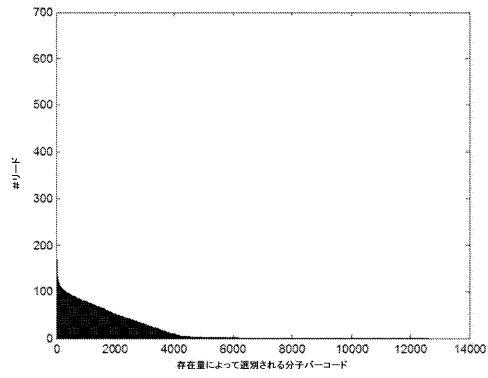


FIG. 25C

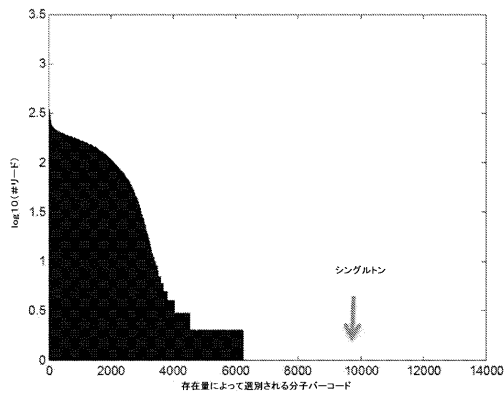


FIG. 25B

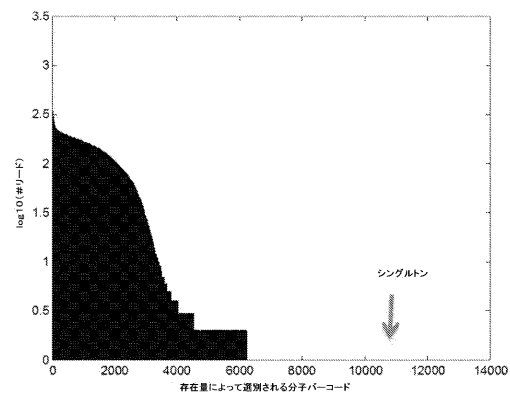


FIG. 25D

【図 26-1】

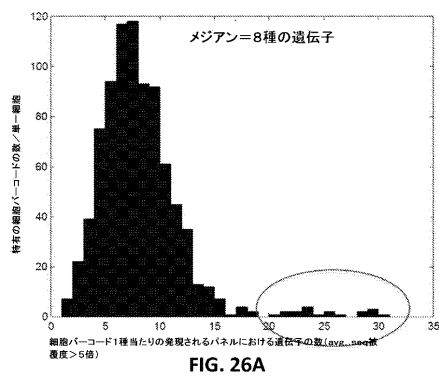


FIG. 26A

【図 26-2】

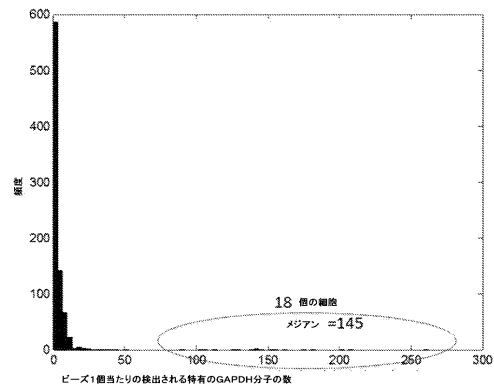


FIG. 26C

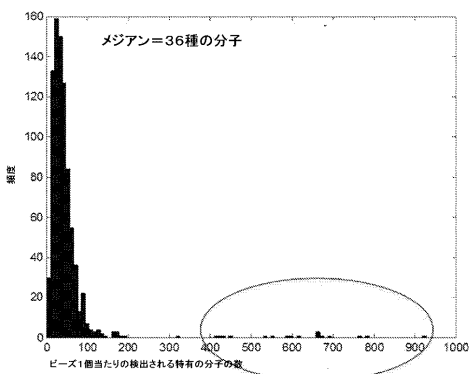


FIG. 26B

【図 27】

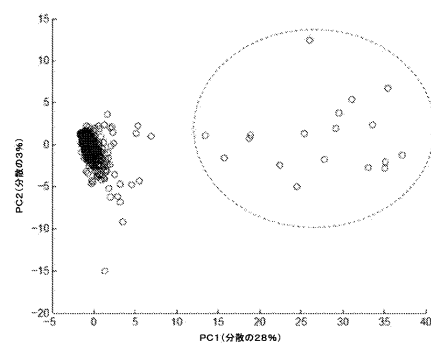


FIG. 27

【图 28】

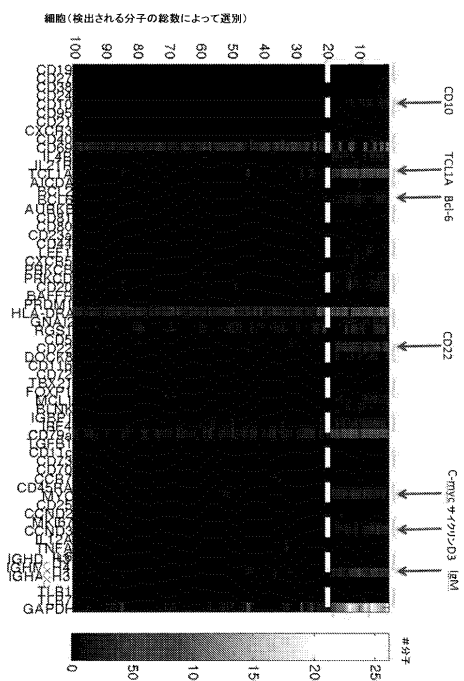


FIG. 28

【图 29】

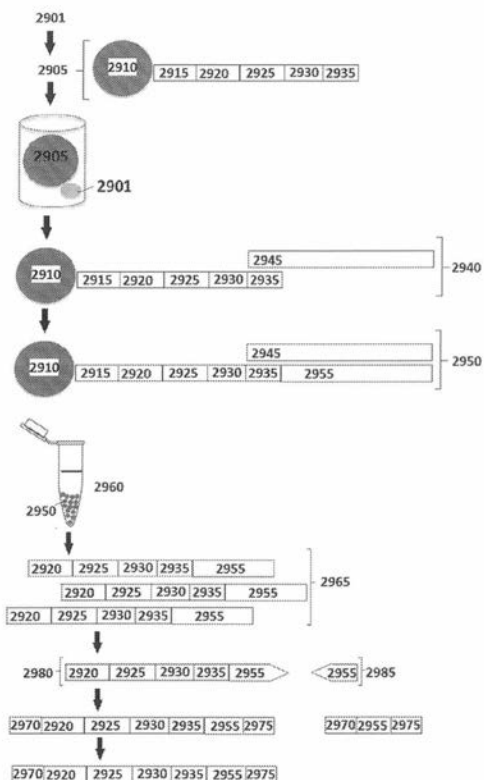


FIG. 29

【图 30】

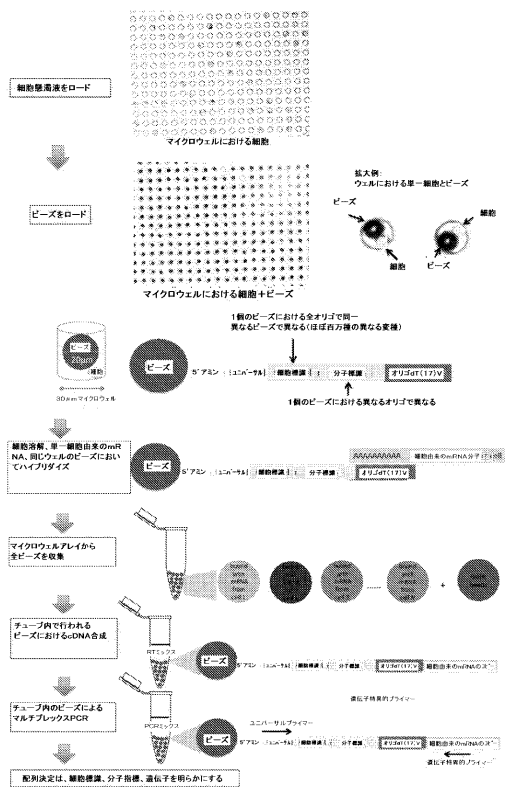


FIG. 30

【図 3 1 - 1】

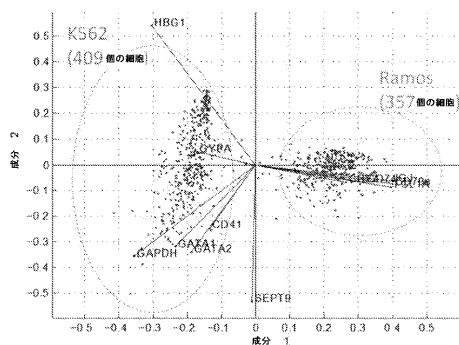


FIG. 31A

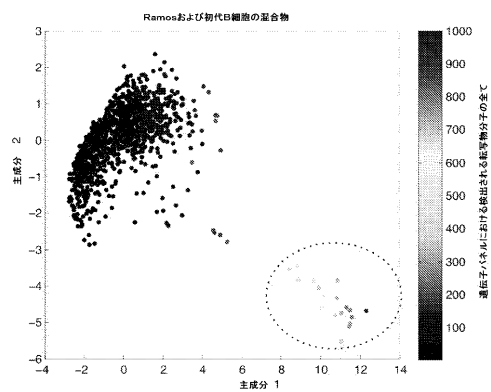


**FIG. 31B**

【図 3 1 - 2】

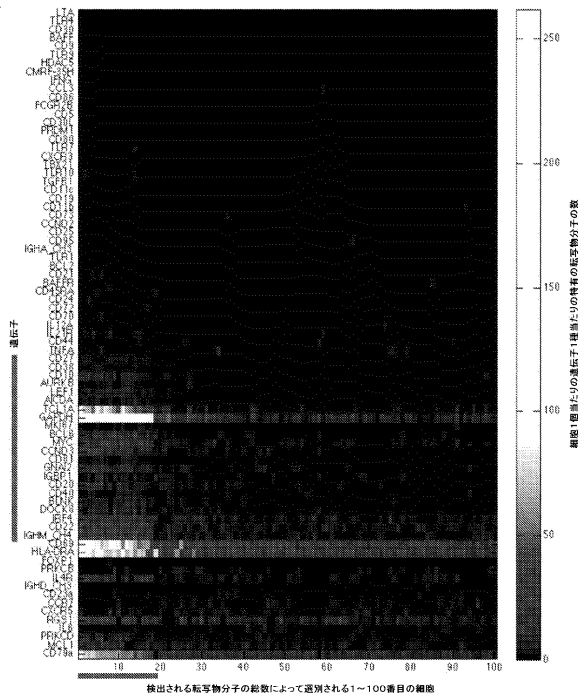


FIG. 31C

【図 3 1 - 3】

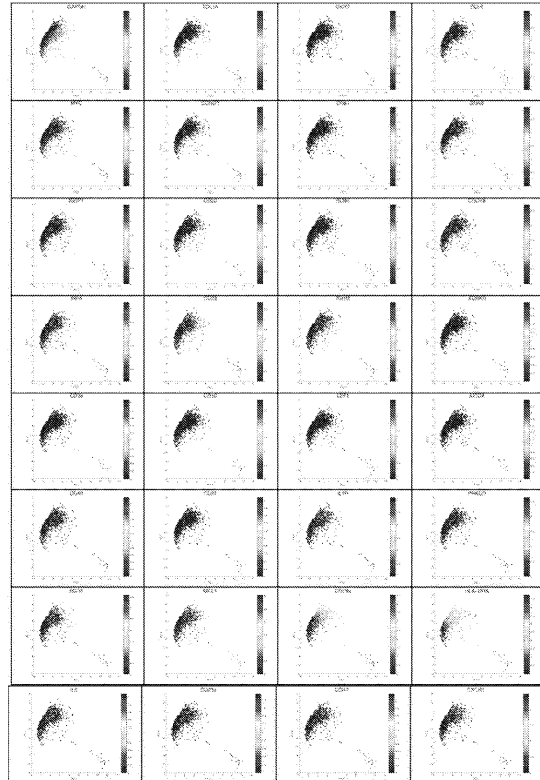


FIG. 31D

【図 3 2】

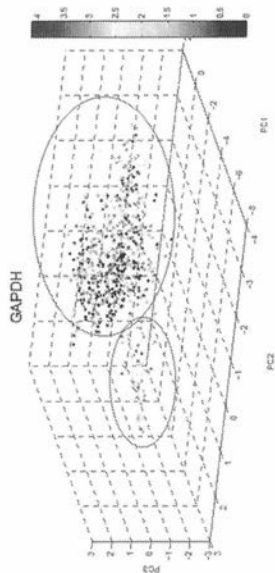


FIG. 32

【図 3 3 - 1】

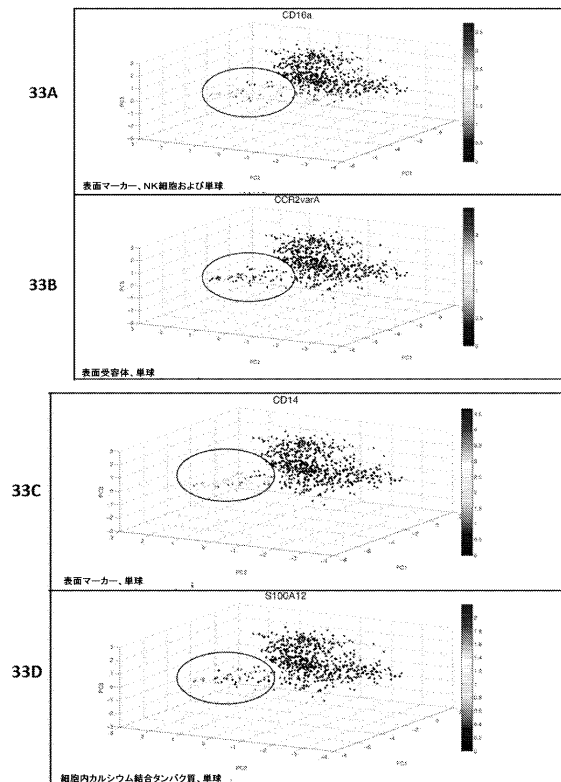


FIG. 33A-D

【図 3 3 - 2】

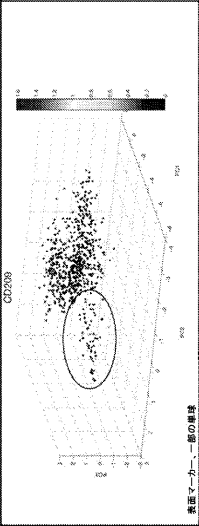


FIG. 33E

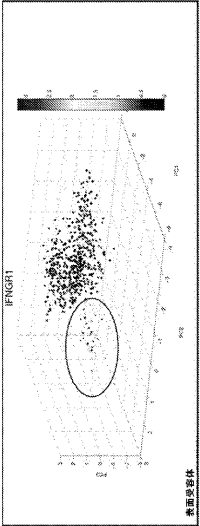


FIG. 33F

【図 3 4】

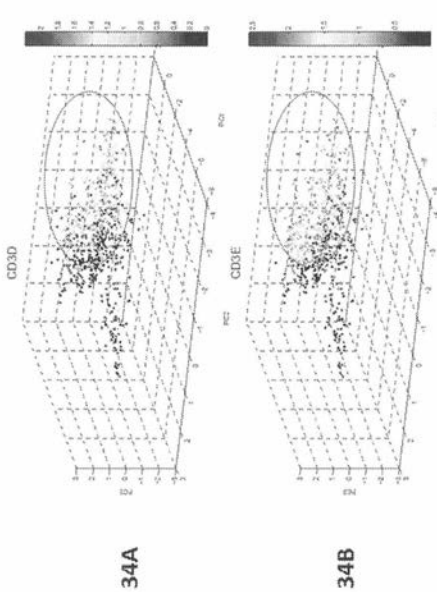


FIG. 34A-B

【図 3 5 - 1】

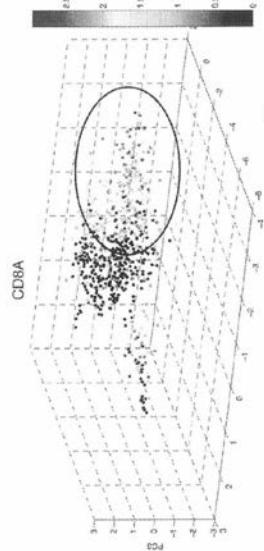


FIG. 35A

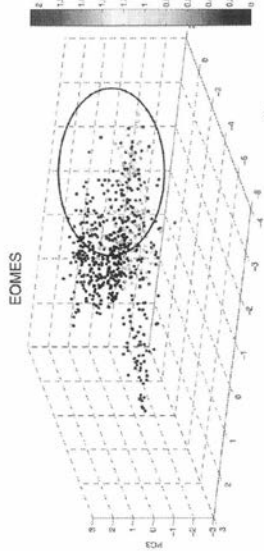


FIG. 35B

【図 3 5 - 2】

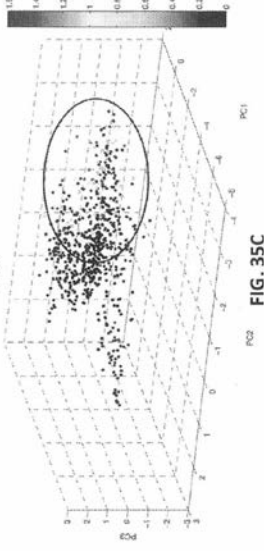


FIG. 35C

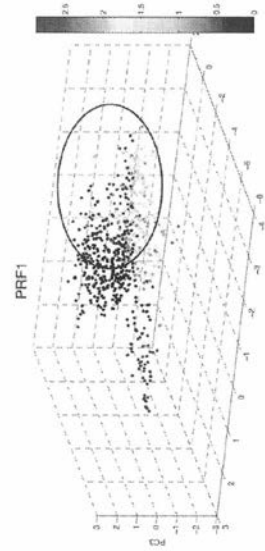
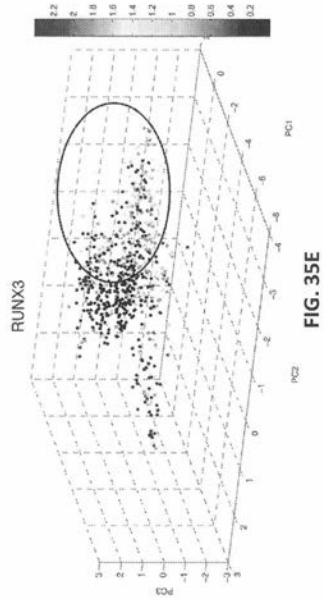
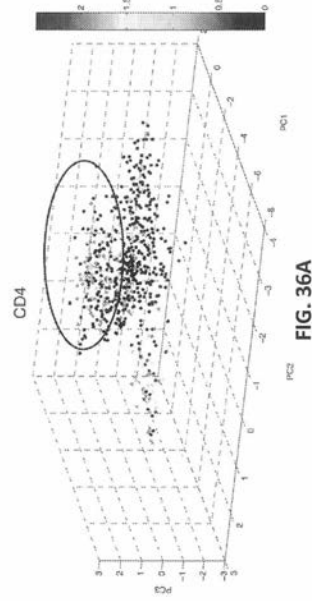


FIG. 35D

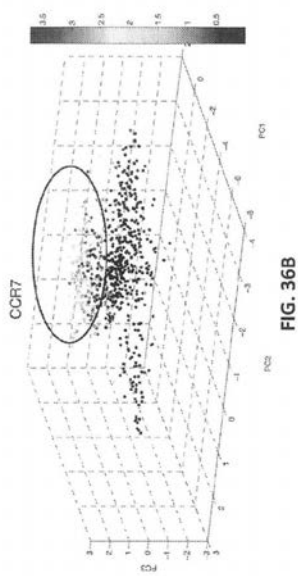
【図 35-3】



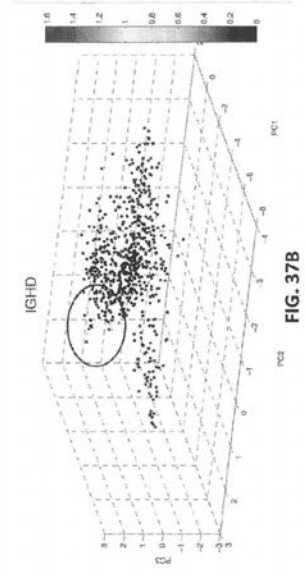
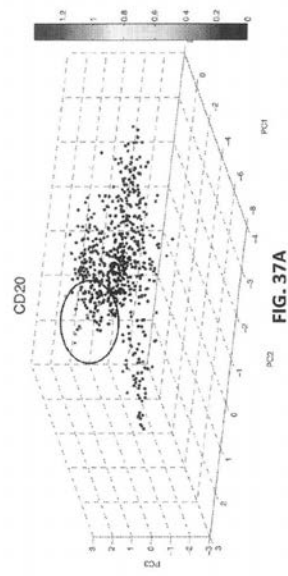
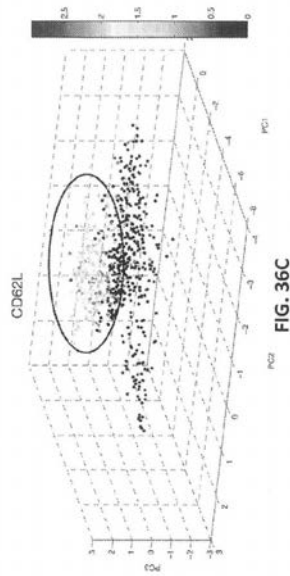
【図 36-1】



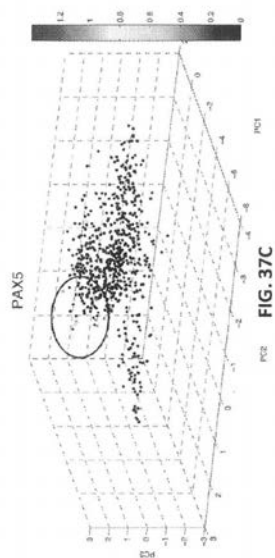
【図 36-2】



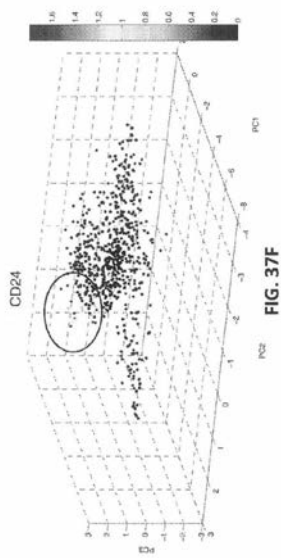
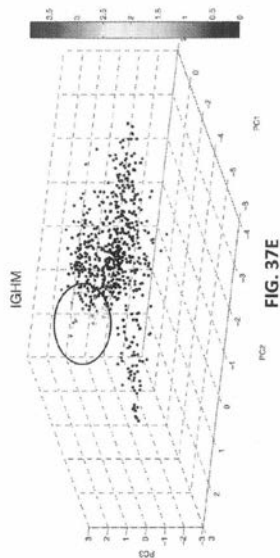
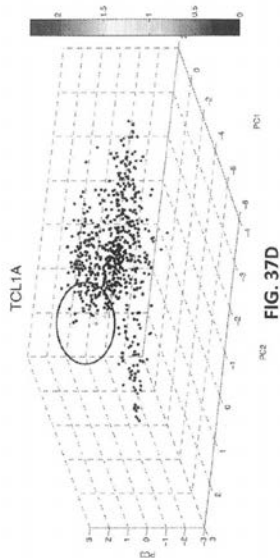
【図 37-1】



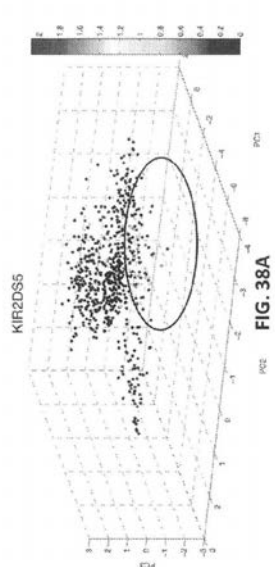
【図 37-2】



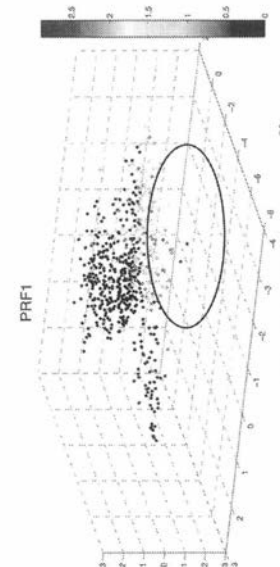
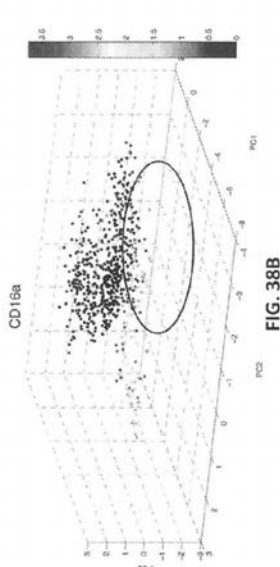
【図 37-3】



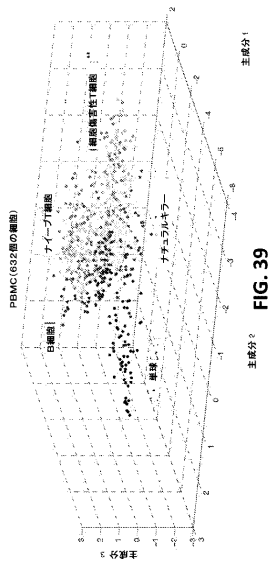
【図 38-1】



【図 38-2】



【図 39】



【図 40 A】

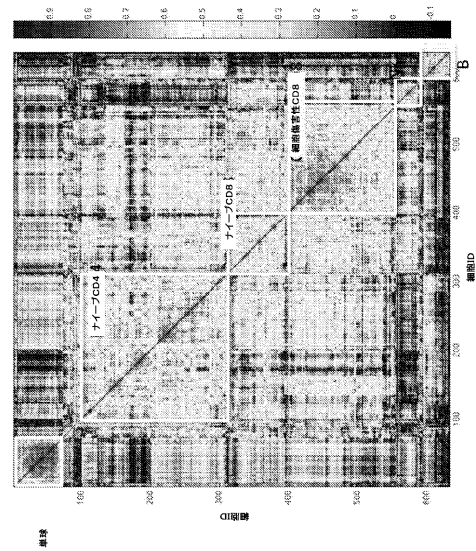


FIG. 40A

【図 40 B】

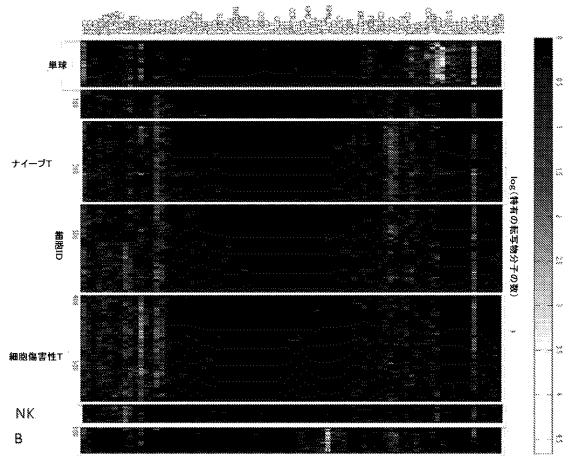


FIG. 40B

【図 42】

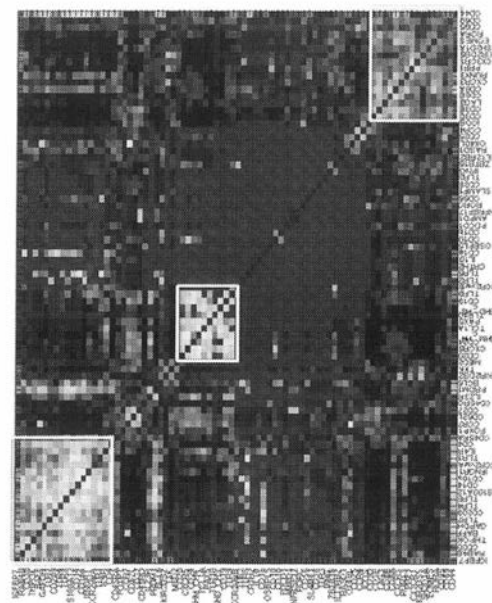


FIG. 42

【図 41】

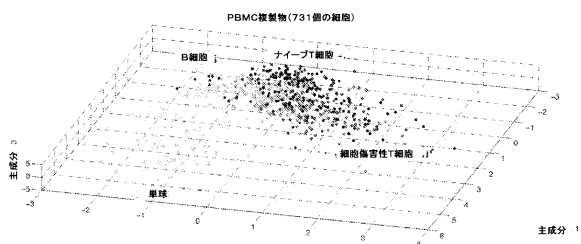


FIG. 41

【図 4 3】

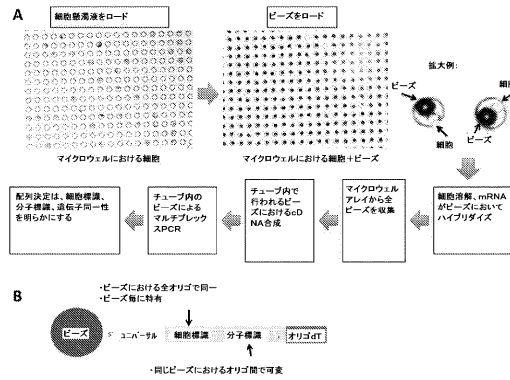


FIG. 43

【図 4 4 A】

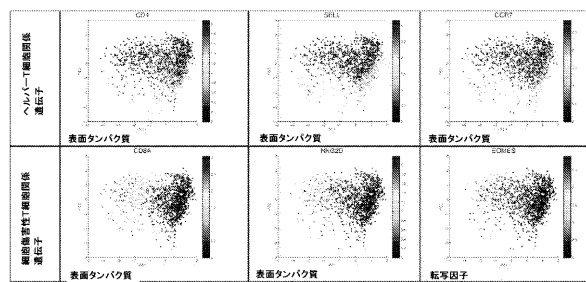


FIG. 44A

【図 4 4 C】

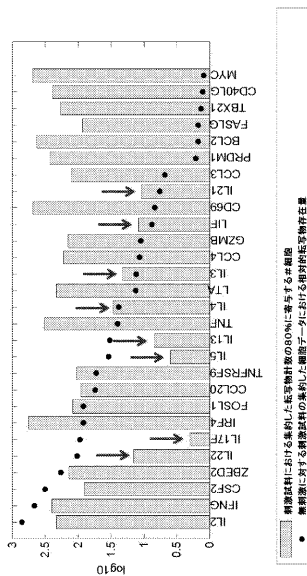


FIG. 44C

【図 4 4 B】

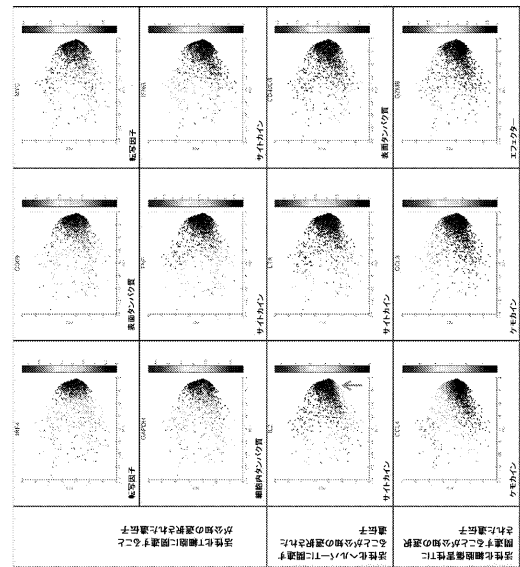


FIG. 44B

【図 4 5 A】

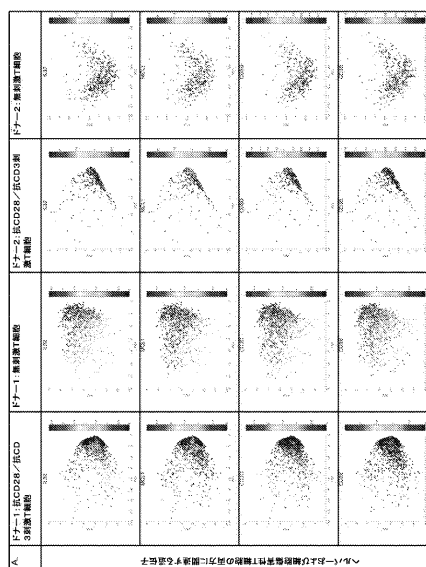


FIG. 45A

【図 4 5 B】

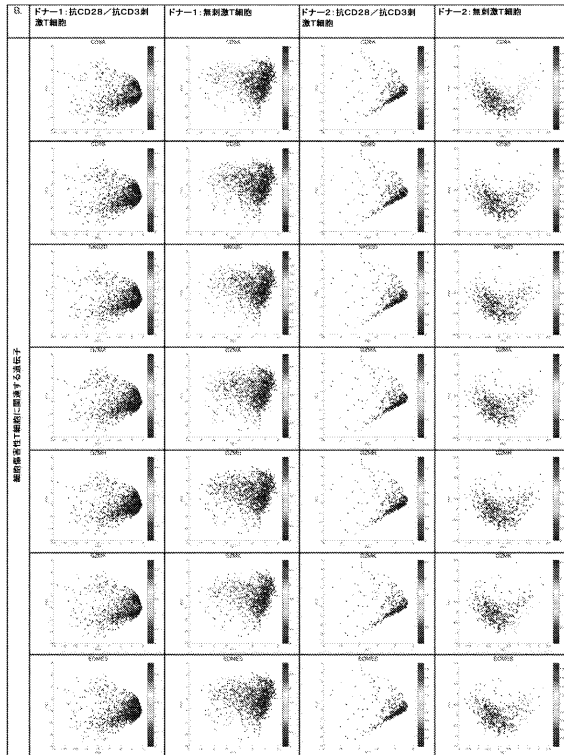


FIG. 45B

【図 4 5 C】

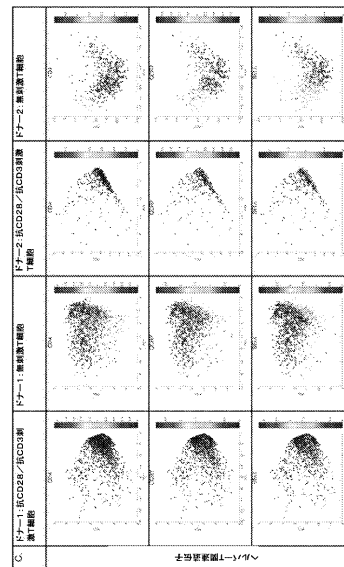


FIG. 45C

【図 4 6 A】

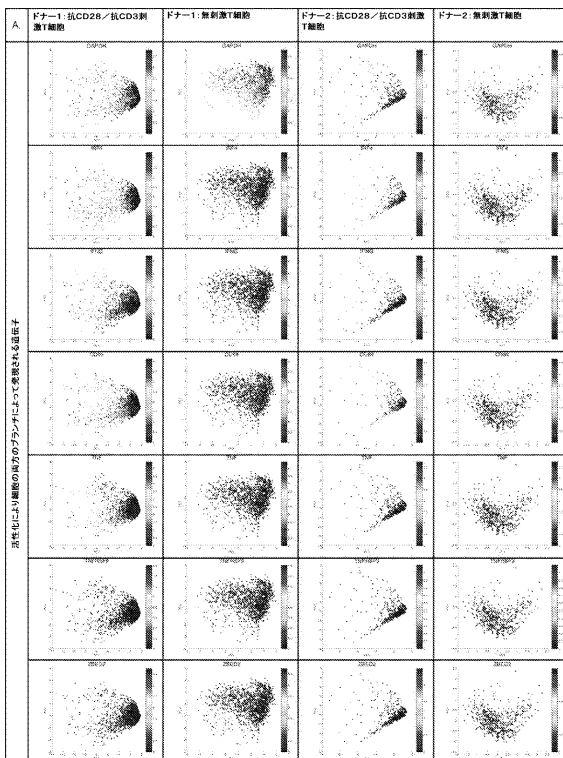


FIG. 46A

【図 4 6 B】

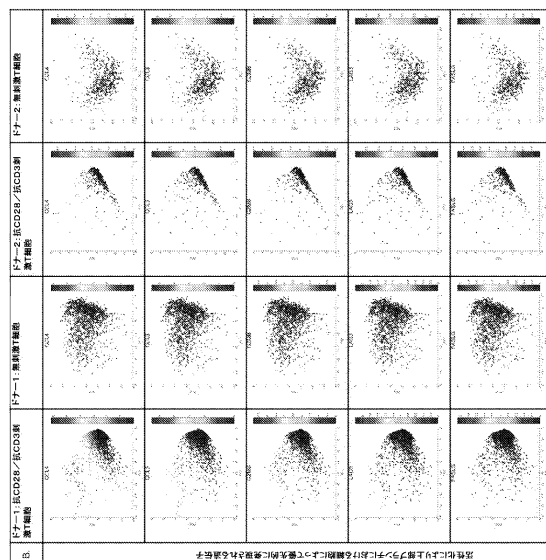


FIG. 46B

【図 4 6 C】

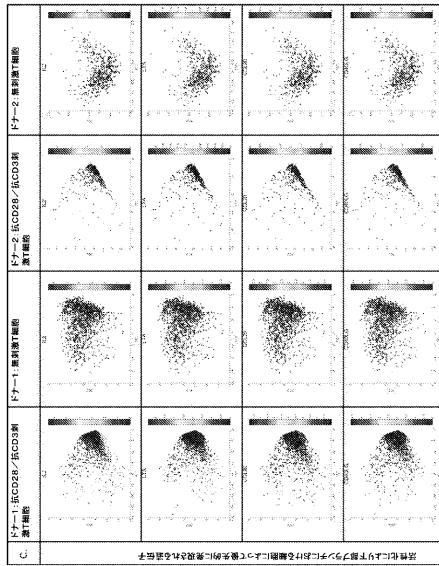


FIG. 46C

【図 4 6 D】

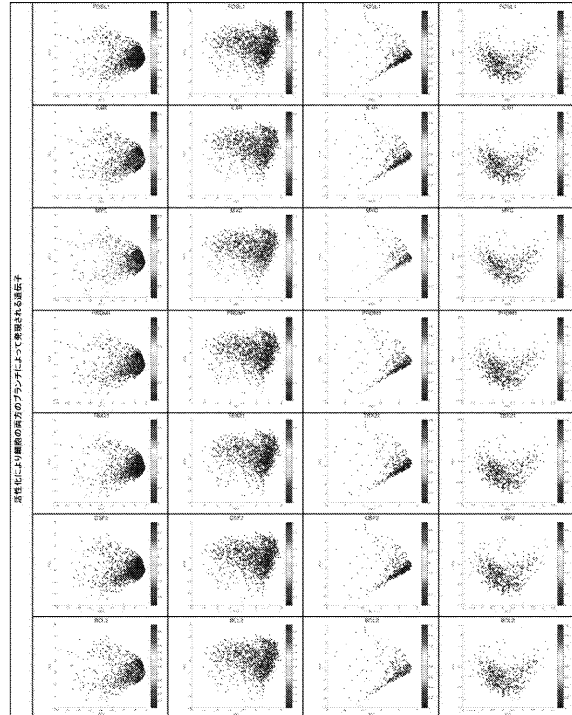


FIG. 46D

【図 4 7】

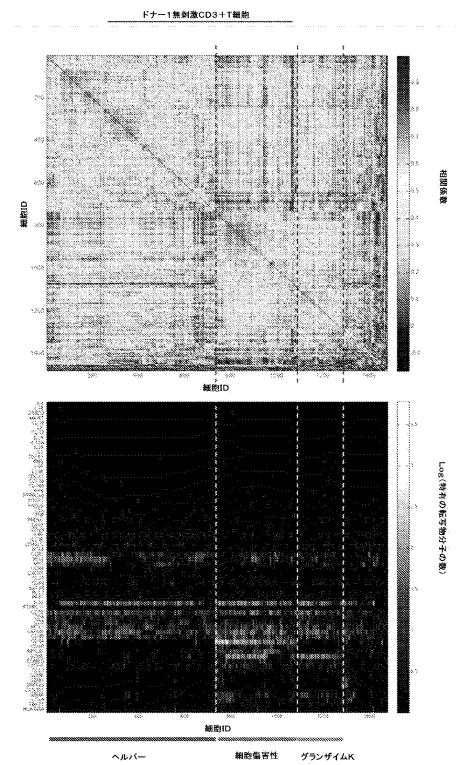


FIG. 47

【図 4 8】

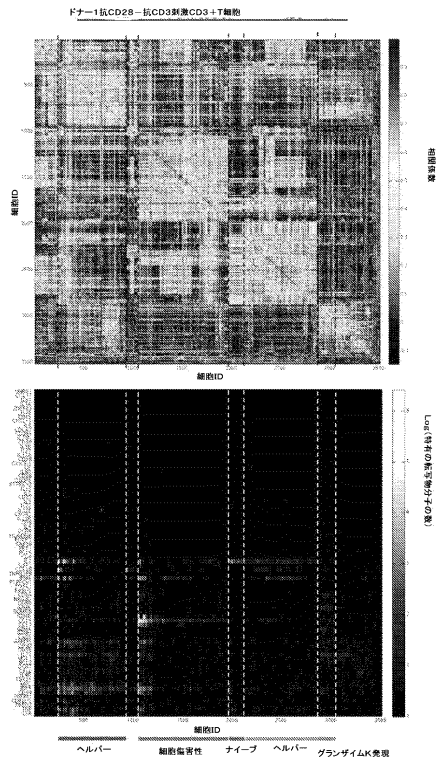


FIG. 48

【図 49-1】

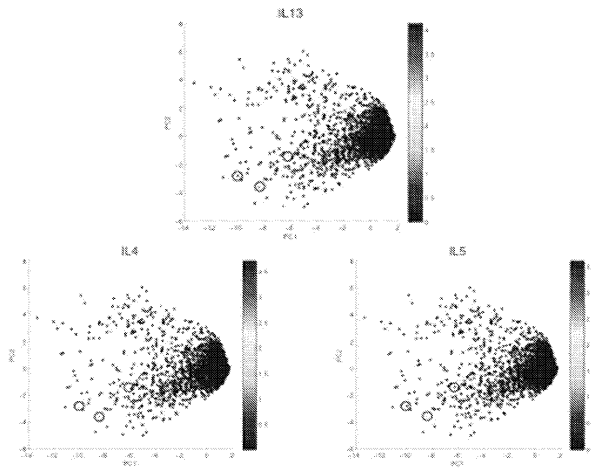


FIG. 49A

○ IL4, IL5, IL13を同時発現した細胞

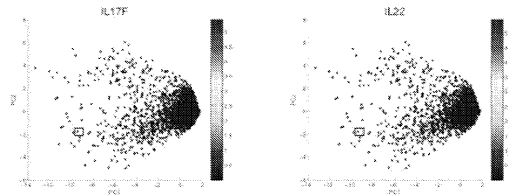


FIG. 49B

□ IL17FおよびIL22を同時発現した単一細胞

【図 49-2】

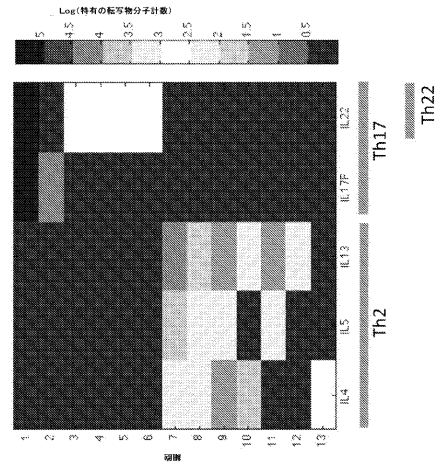


FIG. 49C

【図 50 A】

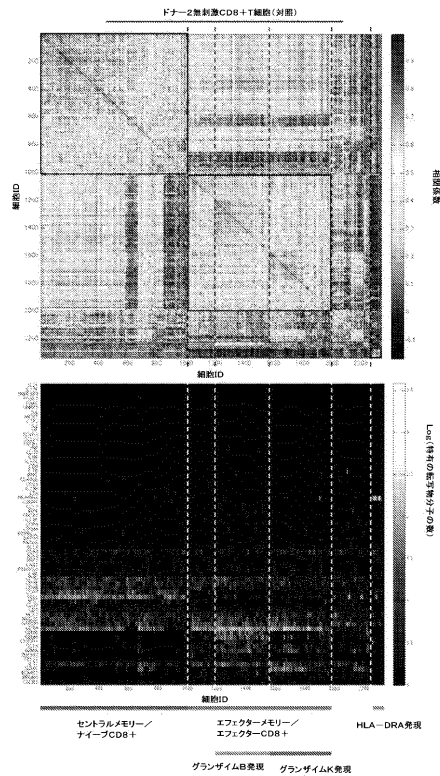


FIG. 50A

【図 50 B】

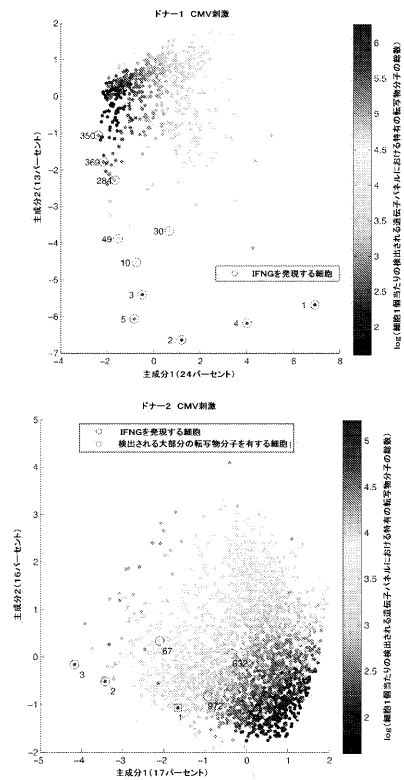


FIG. 50B

【図 5 1】

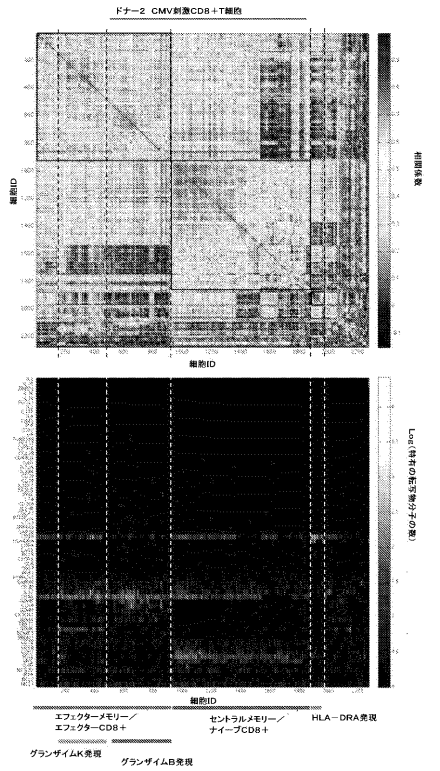


FIG. 51

【図 5 2 - 1】

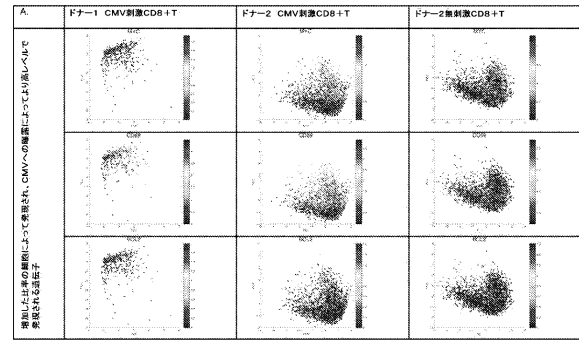


FIG. 52A

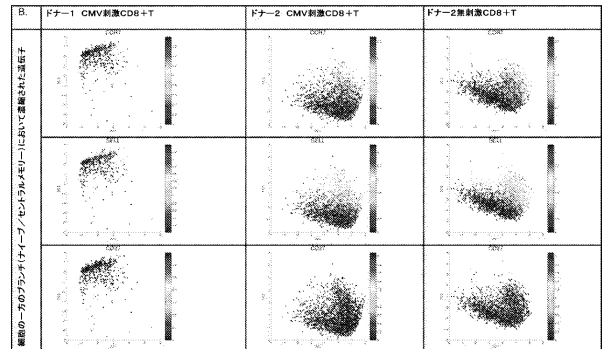
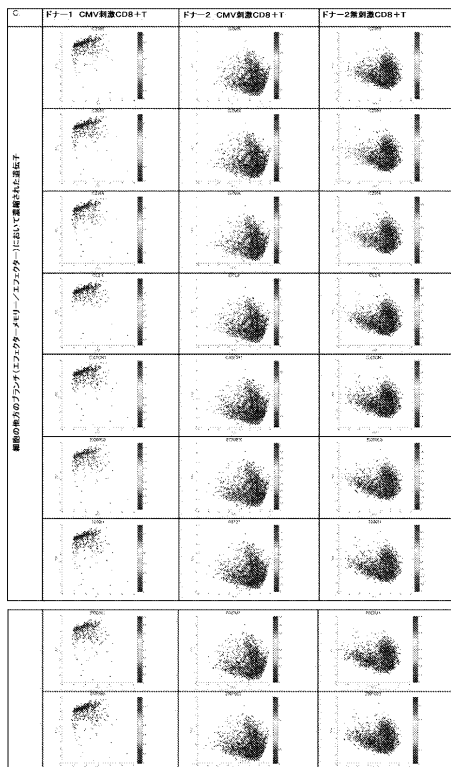


FIG. 52B

【図 5 2 - 2】



【図 5 2 - 4】

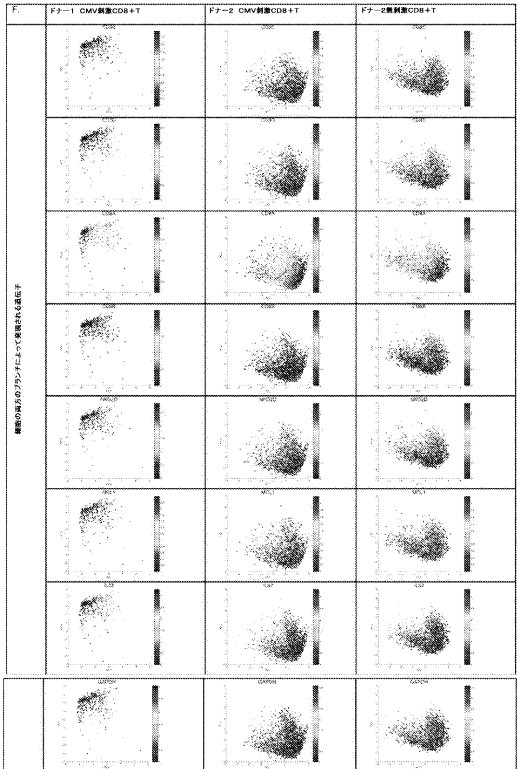


FIG. 52F

【図 5 3】

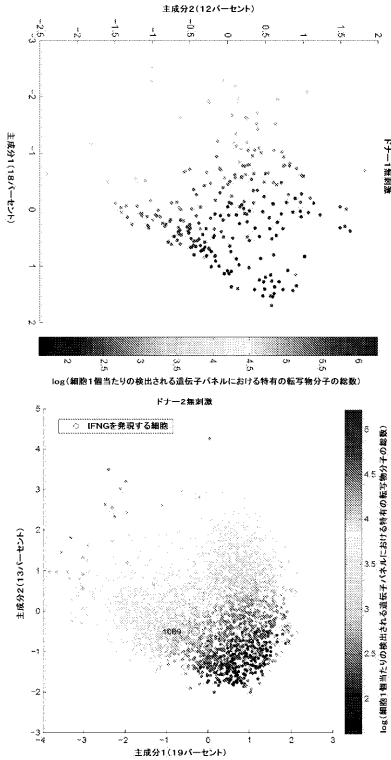


FIG. 53

【図 5 4】

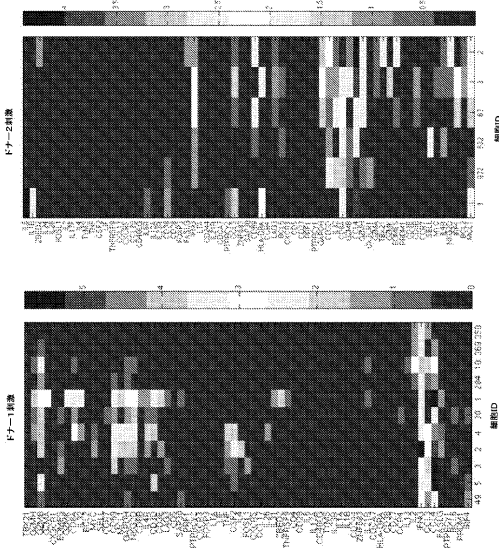


FIG. 54

【図 5 5】

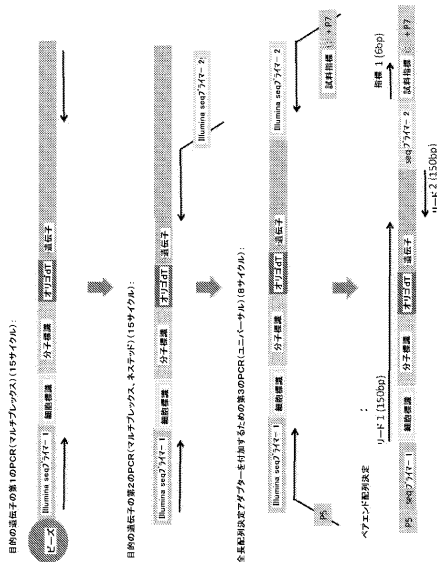


FIG. 55

【图 5 6】

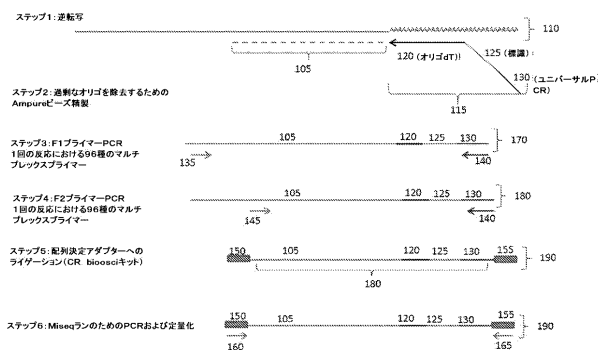


FIG. 56

【図 5 7】

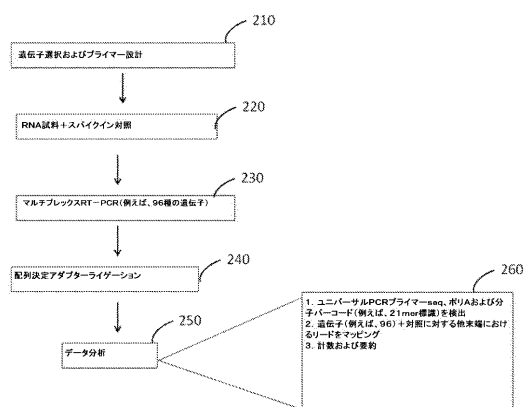


FIG. 57

【图 5 9】

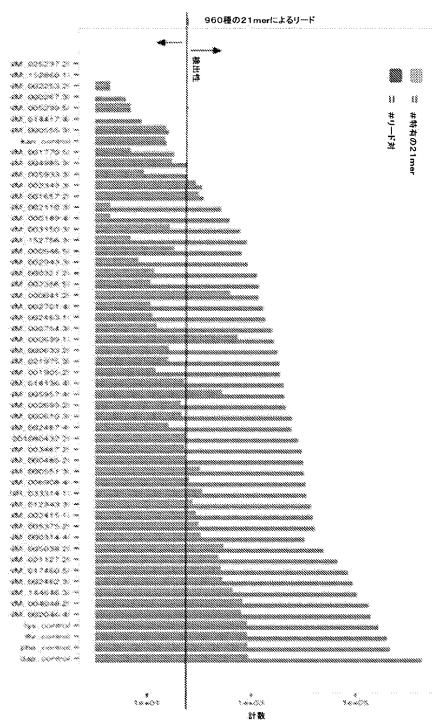


FIG. 59

【図 5 8】

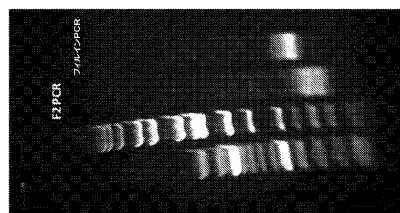


FIG. 58B

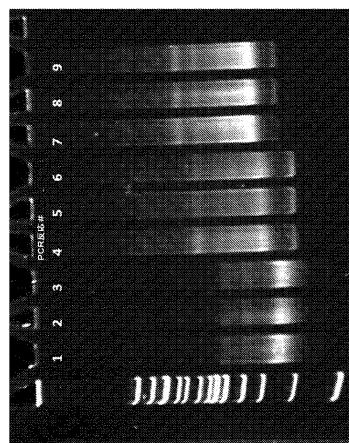


FIG. 58A

【图 60-1】

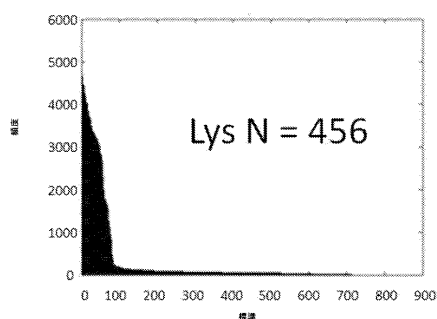


**FIG. 60A**

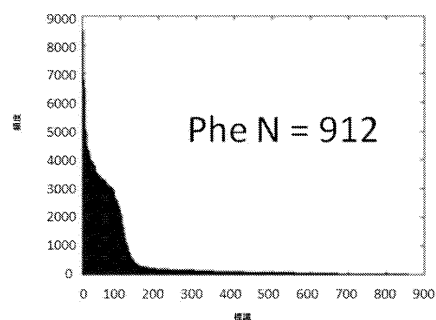
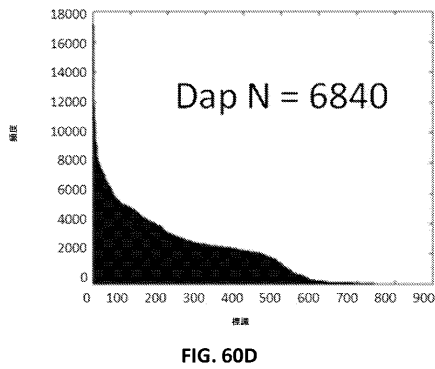
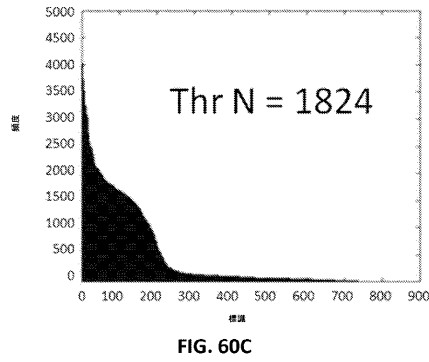
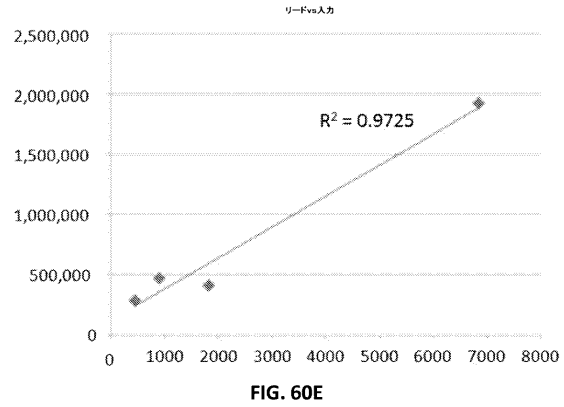


FIG. 60B

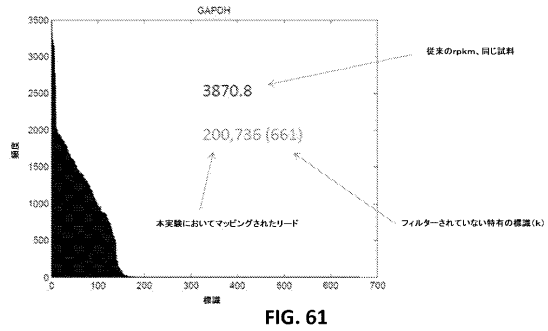
【図 60-2】



【図 60-3】



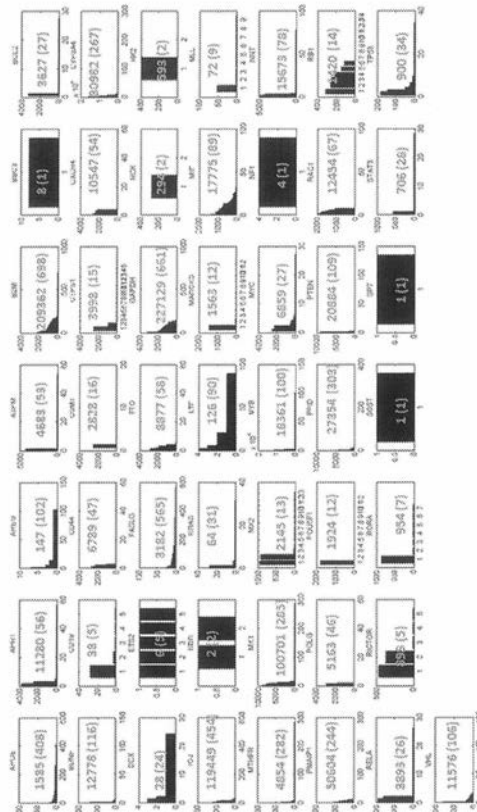
【図 61】



【図 62】



【図 63】



【図 6 4】

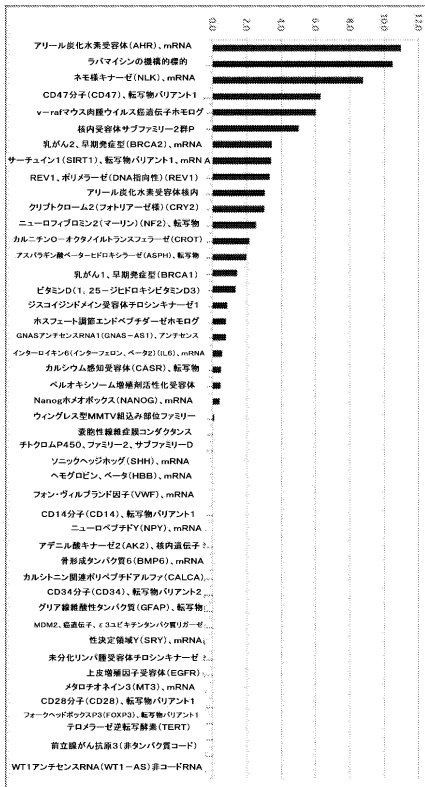


FIG. 64

【図 6 5】

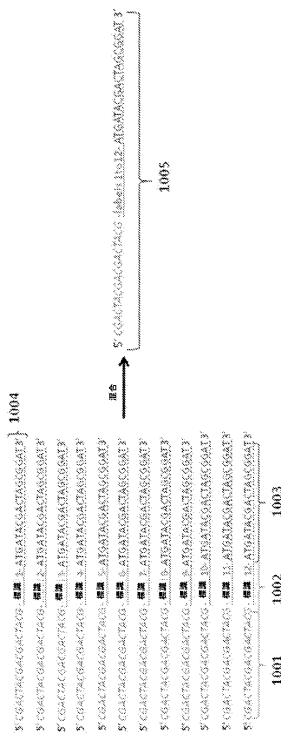


**FIG. 65**

【図 6 6 - 1】

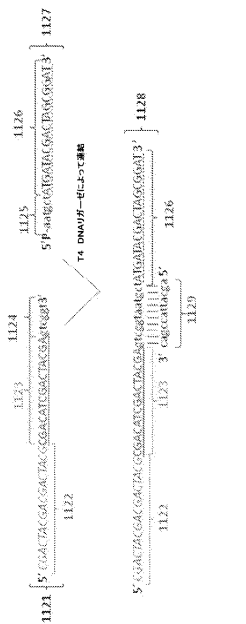


**FIG. 66A**

【图 6 6 - 2】

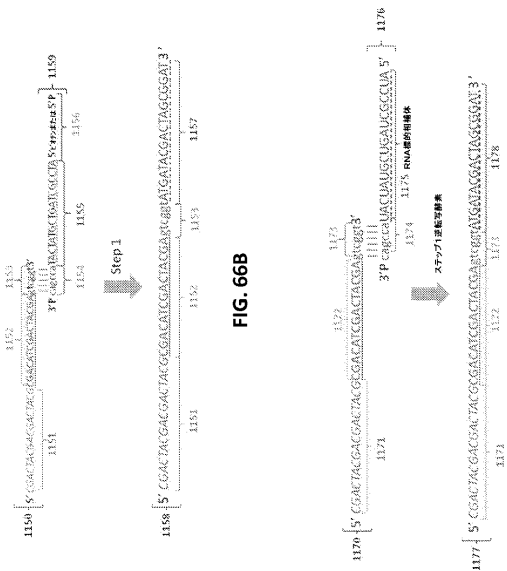


**FIG. 66B**

**FIG. 66C**

【图 6 7】

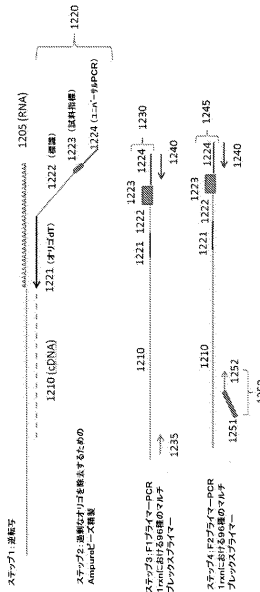


**FIG. 67**

【 図 6 8 】

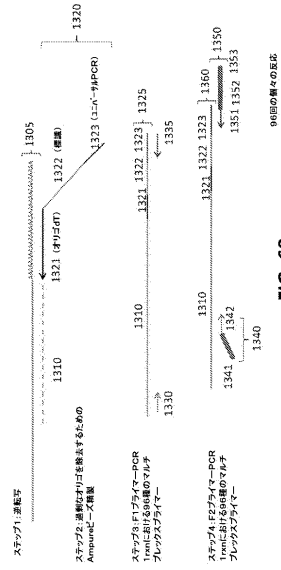


FIG. 68

【图 6 9】

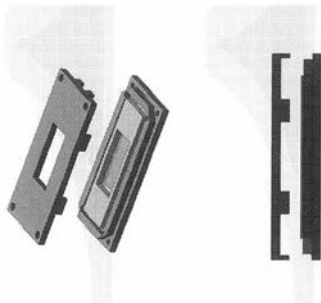


FIG. 69

【图 7 1】



FIG. 71

【图 7 0】

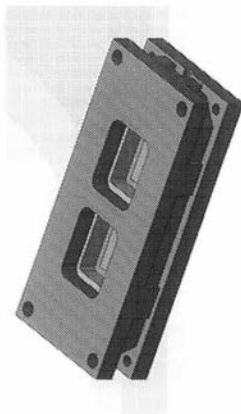


FIG. 70

【图 7 2】

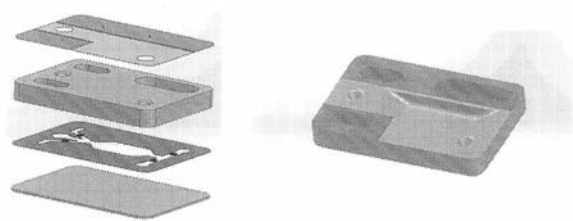


FIG. 72

【图 7 3】

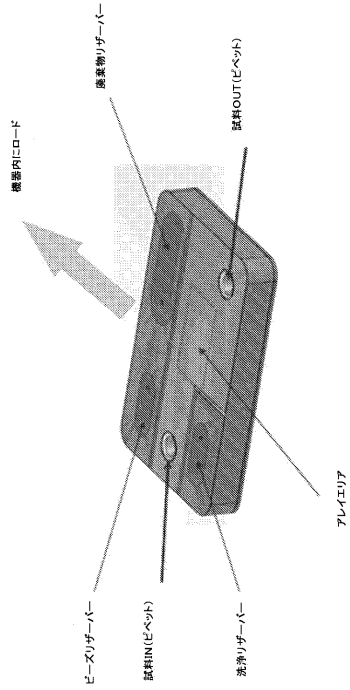


**FIG. 73**

【图 7 4】

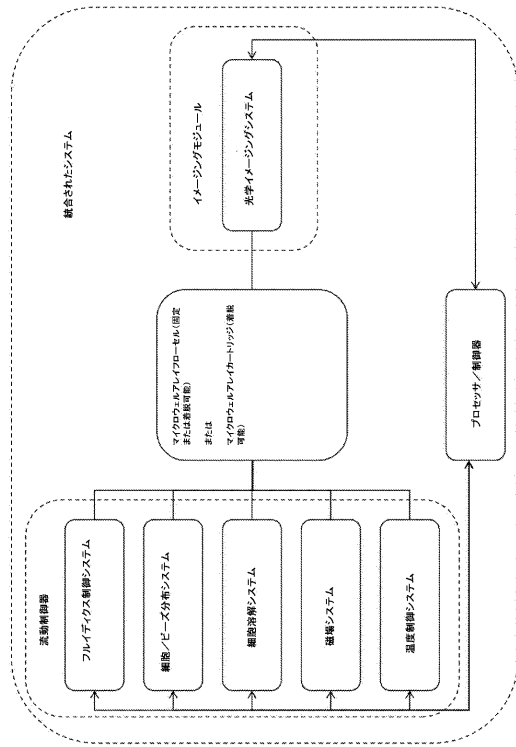


FIG. 74

【图 7 5】

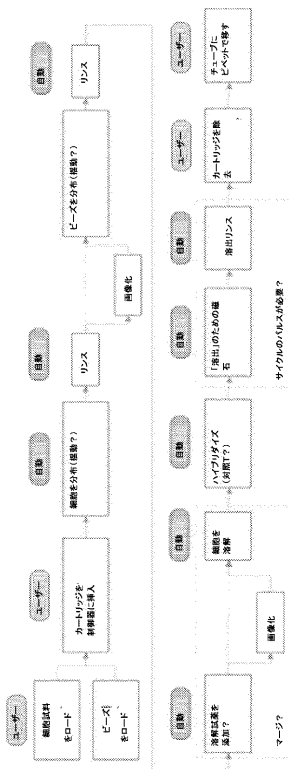


FIG. 75

【 図 7 6 】

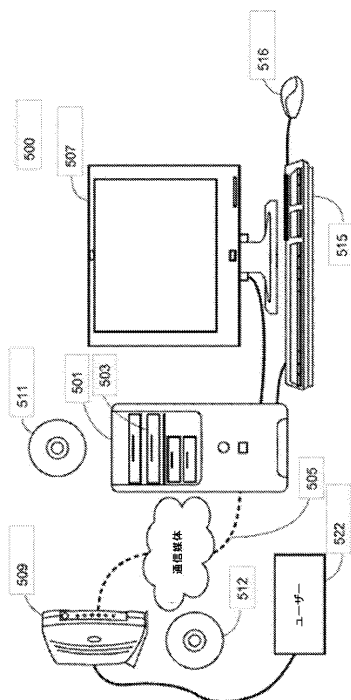


FIG. 76

【図 77】

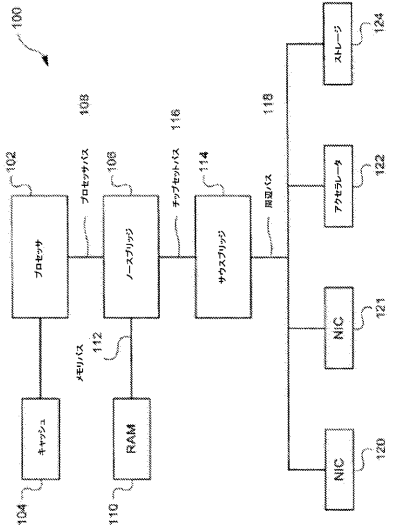


FIG. 77

【図 78】

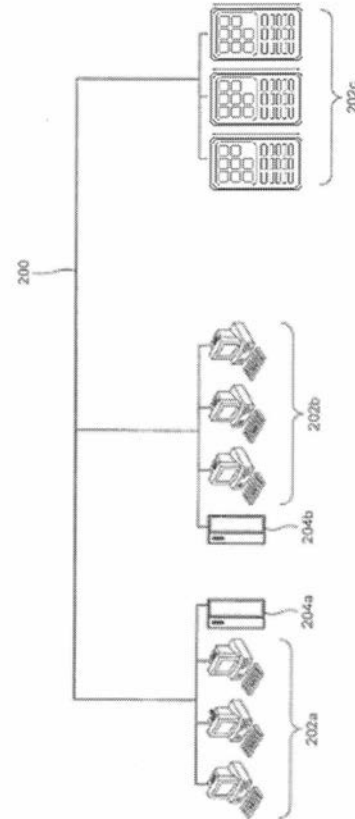


FIG. 78

【図 79】

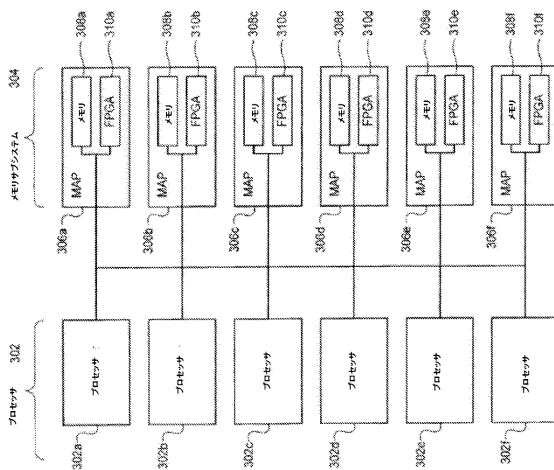


FIG. 79

【図 80】

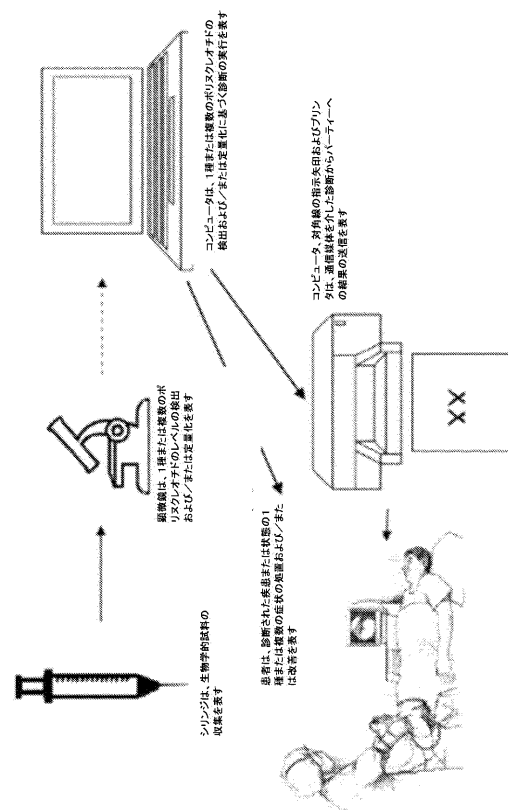


FIG. 80

## 【配列表】

2019106998000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成31年2月28日(2019.2.28)

## 【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】

固体支持体を含む組成物であって、前記固体支持体が、複数のオリゴヌクレオチドを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドの各々が、細胞性標識と分子標識を有し、各細胞標識が同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも100個の前記分子標識が異なり、前記固体支持体がビーズを含み、前記複数のオリゴヌクレオチドが標的結合領域を更に有する、前記組成物。

## 【請求項2】

前記複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも10000個の前記分子標識が異なる、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

前記複数のオリゴヌクレオチドの前記標的結合領域が、オリゴdT配列、遺伝子特異的配列、ランダムマルチマー配列又はその組合せを有する、請求項1又は2に記載の組成物。

## 【請求項4】

前記複数のオリゴヌクレオチドの前記細胞性標識及び／又は分子標識が、少なくとも6個のヌクレオチド及び／又はランダム配列を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項5】

前記複数のオリゴヌクレオチドが、各々、試料標識配列、ユニバーサル標識又はその組合せを有し、ここで、前記ユニバーサル標識がプライマー結合部位を有していてもよい、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項6】

前記複数のオリゴヌクレオチドが、DNAを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項7】

前記ビーズが、磁性ビーズであるか又はヒドロゲルを含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項8】

前記複数のオリゴヌクレオチドが、官能基を介してビーズに結合している、請求項1～7のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項9】

単一細胞又は前記単一細胞のライセートを更に含み、且つ、前記単一細胞は、稀な細胞、がん細胞、腫瘍細胞、免疫細胞、組織由来の細胞、ヒト細胞、ウイルスを含む細胞又はその組合せであってもよい、請求項1～8のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項10】

前記複数のオリゴヌクレオチドが、核酸伸長反応を介して、前記単一細胞又は前記単一細胞のライセートに付随する標的分子の個々の出現を標識することができ、ここで前記核酸伸長反応は逆転写であってよく、及び／又は、

前記複数のオリゴヌクレオチドが、前記単一細胞又は前記単一細胞のライセートに付随する標的分子の個々の出現にハイブリダイズすることができる、請求項9に記載の組成物

。

【請求項 1 1】

前記標的分子は、DNA 分子、RNA 分子又はその組合せを含む、請求項 1 0 に記載の組成物。

【請求項 1 2】

前記標的分子中のある標的分子はポリペプチドに付随するものであり、ここで、前記ポリペプチドは抗体であってよい、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の固体支持体を含む、複数の粒子。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の複数の粒子を含むキットであって、

前記複数の粒子は、少なくとも 3 8 4 個の粒子を含んでいてもよく、且つ

前記複数の粒子は、マイクロ粒子又はナノ粒子を含んでいてもよい、前記キット。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 に記載の複数の粒子を含む、複数の区画であって、

前記複数の区画は、マイクロウェル、小液滴又はその組合せを含んでいてもよく、

前記複数の区画の少なくとも約 1 0 % の各々は、前記複数の粒子の粒子を含んでいてもよく、

前記複数の区画の少なくとも約 1 0 % の各々は、単一細胞を含んでいてもよい、前記複数の区画。

【請求項 1 6】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の第 1 の固体支持体と請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の第 2 の固体支持体とを含むキットであって、

前記第 1 の固体支持体は、第 1 の複数のオリゴヌクレオチドを含み、

前記第 1 の複数のオリゴヌクレオチドは、同じ第 1 の細胞性標識を有し、

前記第 2 の固体支持体は、第 2 の複数のオリゴヌクレオチドを含み、

前記第 2 の複数のオリゴヌクレオチドは、同じ第 2 の細胞性標識を有し、

前記第 1 の細胞性標識及び前記第 2 の細胞性標識は異なるものである、前記キット。

【請求項 1 7】

請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の固体支持体を含む、1 種以上の溶液及び／又は 1 種以上の容器であって、

前記 1 種以上の溶液及び／又は 1 種以上の容器は、1 種以上のマイクロウェル、小液滴又はその組合せであってよく、

前記溶液及び／又は容器の少なくとも約 1 0 % の各々は、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか 1 項に記載の固体支持体を含んでいてもよく、且つ

前記 1 種以上の溶液及び／又は 1 種以上の容器の少なくとも 1 0 % の各々は、単一細胞を含んでいてもよい、前記 1 種以上の溶液及び／又は 1 種以上の容器。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 8】

本発明の新規特色は、添付の特許請求の範囲に特に表記されている。本発明の特色および利点のより十分な理解は、本発明の原理が利用されている説明的な実施形態を表記する次の詳細な説明と、次に示す添付の図面を参照することにより得られるであろう。

例えば、本発明は、以下を提供する。

〔 1 〕

以下：

（a）複数の細胞を含む試料を得るステップと、

(b) 前記複数の細胞の第1の細胞および前記複数の細胞の第2の細胞由来の2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を、以下：

(i) 前記第1の細胞に特異的な第1の同じ細胞標識および前記第2の細胞に特異的な第2の同じ細胞標識、ならびに

(i i) 前記2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物のそれぞれに特異的な分子標識で標識するステップとを含む、方法であって、

前記第1の細胞由来の前記2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の各分子標識が、互いに対して特有であり、

前記第2の細胞由来の前記2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の各分子標識が、互いに対して特有である方法。

[2]

前記2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部を配列決定するステップをさらに含む、[1]に記載の方法。

[3]

前記配列決定するステップからの配列データを分析して、前記細胞のうち特定の1個における前記ポリヌクレオチドのうち多数の個々の分子を同定するステップをさらに含む、[2]に記載の方法。

[4]

前記細胞が、がん細胞である、[1]に記載の方法。

[5]

前記細胞が、ウイルスポリヌクレオチドに感染している、[1]に記載の方法。

[6]

前記細胞が、細菌または真菌である、[1]に記載の方法。

[7]

前記配列決定するステップが、少なくとも100塩基のリード長で配列決定するステップを含む、[2]に記載の方法。

[8]

前記配列決定するステップが、少なくとも500塩基のリード長で配列決定するステップを含む、[2]に記載の方法。

[9]

前記ポリヌクレオチド分子が、mRNAまたはマイクロRNAであり、前記その相補体およびその反応産物が、前記mRNAまたは前記マイクロRNAの相補体および反応産物である、[1]に記載の方法。

[10]

前記分子標識が、ビーズ上にある、[1]に記載の方法。

[11]

個々の細胞に特異的な前記標識が、ビーズ上にある、[1]に記載の方法。

[12]

個々の細胞に特異的な前記標識および前記分子標識が、ビーズ上にある、[1]に記載の方法。

[13]

少なくとも一部はエマルション中で行われる、[1]～[12]のいずれか一項に記載の方法。

[14]

少なくとも一部はアレイのウェルまたはマイクロウェル中で行われる、[1]～[12]のいずれか一項に記載の方法。

〔 1 5 〕

疾患または状態に関連するポリヌクレオチドの存在が検出される、〔 1 〕～〔 1 4 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 1 6 〕

前記疾患または前記状態が、がんである、〔 1 5 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 1 7 〕

マイクロRNA、その相補体またはその反応産物の少なくとも一部が検出される、〔 1 〕～〔 1 6 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 1 8 〕

前記疾患または前記状態が、ウイルス感染症である、〔 1 5 〕に記載の方法。

〔 1 9 〕

前記ウイルス感染症が、エンベロープを有するウイルス由来である、〔 1 8 〕に記載の方法。

〔 2 0 〕

前記ウイルス感染症が、エンベロープを有さないウイルス由来である、〔 1 8 〕に記載の方法。

〔 2 1 〕

前記ウイルスが、二本鎖であるウイルスDNAを含有する、〔 2 0 〕に記載の方法。

〔 2 2 〕

前記ウイルスが、一本鎖であるウイルスDNAを含有する、〔 2 0 〕に記載の方法。

〔 2 3 〕

前記ウイルスが、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ヘパドナウイルス、パポバウイルス、ポリオーマウイルスおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、〔 1 8 〕に記載の方法。

〔 2 4 〕

前記第 1 の細胞が、疾患も状態も有さない人物由来であり、前記第 2 の細胞が、前記疾患または前記状態を有する人物由来である、〔 1 〕～〔 2 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 5 〕

前記人物が異なる、〔 2 4 〕に記載の方法。

〔 2 6 〕

前記人物が同じであるが、細胞が異なる時点で採取される、〔 2 4 〕に記載の方法。

〔 2 7 〕

前記第 1 の細胞が、前記疾患または前記状態を有する人物由来であり、前記第 2 の細胞が、同じ人物由来である、〔 1 〕～〔 2 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 8 〕

前記試料における前記細胞が、組織または臓器由来の細胞を含む、〔 1 〕～〔 2 3 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 2 9 〕

前記試料における前記細胞が、胸腺由来の細胞、白血球細胞、赤血球細胞、肝臓細胞、脾臓細胞、肺細胞、心臓細胞、脳細胞、皮膚細胞、膵臓細胞、胃細胞、口腔由来の細胞、鼻腔由来の細胞、結腸細胞、小腸細胞、腎臓細胞、腺由来の細胞、脳細胞、神経細胞、グリア細胞、眼細胞、生殖器細胞、膀胱細胞、配偶子細胞、ヒト細胞、胎児細胞、羊膜細胞またはこれらのいずれかの組合せを含む、〔 1 〕～〔 2 8 〕のいずれか一項に記載の方法。

。

〔 3 0 〕

細胞性標識および分子標識をそれぞれ含む複数のオリゴヌクレオチドを含む固体支持体であって、前記複数のオリゴヌクレオチドの各細胞性標識が同じであり、前記複数のオリゴヌクレオチドの各分子標識が異なり、ここで、

(a) 前記固体支持体は、ビーズであり、

(b) 前記細胞性標識は、前記固体支持体に特異的であり、

(c) 前記固体支持体は、三次元デカルト座標系の中心に配置されたときに、8つのオクタントのうち少なくとも7つへと伸長するオリゴヌクレオチドを有し、または

(d) (a) ~ (c) のいずれかの組合せである

固体支持体。

[ 3 1 ]

前記複数のオリゴヌクレオチドが、以下：

(a) 試料標識

(b) ユニバーサル標識、および

(c) 標的核酸結合領域

のうち少なくとも1種をさらに含む、[ 3 0 ] に記載の固体支持体。

[ 3 2 ]

前記固体支持体が、前記標的核酸結合領域を含み、前記標的核酸結合領域が、遺伝子特異的配列、オリゴ d T 配列、ランダムマルチマーおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される配列を含む、[ 3 1 ] に記載の固体支持体。

[ 3 3 ]

標的核酸またはその相補体をさらに含む、[ 3 1 ] または [ 3 2 ] に記載の固体支持体。

[ 3 4 ]

(a) 生物のトランスクリプトームの転写物もしくはその相補体の約 0.01% ~ 約 100%、または

(b) 生物のゲノムの遺伝子もしくはその相補体の約 0.01% ~ 約 100% を含む複数の標的核酸またはその相補体を含む、[ 3 3 ] に記載の固体支持体。

[ 3 5 ]

(a) 前記複数のオリゴヌクレオチドの前記細胞性標識が、第1の標識連結配列によって第2のランダム配列に接続された第1のランダム配列を含み、そして

(b) 前記複数のオリゴヌクレオチドの前記分子標識が、ランダム配列を含む、

[ 3 0 ] ~ [ 3 4 ] のいずれか一項に記載の固体支持体。

[ 3 6 ]

ポリジメチルシロキサン (PDMS) 固体支持体、ポリスチレン固体支持体、ガラス固体支持体、ポリプロピレン固体支持体、アガロース固体支持体、ゼラチン固体支持体、磁性固体支持体、プルロニック固体支持体およびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される、[ 3 0 ] ~ [ 3 5 ] のいずれか一項に記載の固体支持体。

[ 3 7 ]

(a) 前記複数のオリゴヌクレオチドが、リンカー官能基を含むリンカーを含み、

(b) 前記固体支持体が、固体支持体官能基を含み、

前記固体支持体官能基および前記リンカー官能基は互いに接続する、

[ 3 0 ] ~ [ 3 5 ] のいずれか一項に記載の固体支持体。

[ 3 8 ]

前記リンカー官能基および前記固体支持体官能基が、C6、ビオチン、ストレプトアビジン、第一級アミン (複数可)、アルデヒド (複数可)、ケトン (複数可) およびこれらのいずれかの組合せからなる群から個々に選択される、[ 3 7 ] に記載の固体支持体。

[ 3 9 ]

前記複数のオリゴヌクレオチドの分子標識が、少なくとも15個のヌクレオチドを含む、[ 3 0 ] ~ [ 3 8 ] のいずれか一項に記載の固体支持体。

[ 4 0 ]

[ 3 0 ] ~ [ 3 9 ] のいずれか一項に記載の固体支持体と、使用説明書とを含むキット

。

[ 4 1 ]

ウェルをさらに含む、〔４０〕に記載のキット。

〔４２〕

前記ウェルが、アレイ中に含まれる、〔４１〕に記載のキット。

〔４３〕

前記ウェルが、マイクロウェルである、〔４０〕～〔４２〕のいずれか一項に記載のキット。

〔４４〕

バッファをさらに含む、〔４０〕～〔４３〕のいずれか一項に記載のキット。

〔４５〕

〔３０〕～〔３９〕のいずれか一項に記載の固体支持体を含むエマルジョン。

〔４６〕

ウェルと、〔３０〕～〔３９〕のいずれか一項に記載の固体支持体とを含む組成物。

〔４７〕

細胞と、〔３０〕～〔３９〕のいずれか一項に記載の固体支持体とを含む組成物。

〔４８〕

細胞をさらに含む、〔４５〕に記載のエマルジョンまたは〔４６〕に記載の組成物。

〔４９〕

前記細胞が、単一細胞である、〔４７〕または〔４８〕のいずれか一項に記載の組成物またはエマルジョン。

〔５０〕

前記ウェルが、マイクロウェルである、〔４６〕に記載の組成物。

〔５１〕

前記マイクロウェルが、約  $1,000\ \mu\text{m}^3$ ～約  $120,000\ \mu\text{m}^3$  に及ぶ容積を有する、〔５０〕に記載の組成物。

〔５２〕

以下：

（ａ）試料を〔３０〕～〔３２〕または〔３５〕～〔３９〕のいずれか一項に記載の固体支持体と接触させるステップと、

（ｂ）複数のオリゴヌクレオチドの１オリゴヌクレオチドに前記試料由来の標的核酸をハイブリダイズさせるステップと  
を含む、方法。

〔５３〕

（ｃ）前記標的核酸またはその相補体を増幅するステップ  
をさらに含む、〔５２〕に記載の方法。

〔５４〕

（ｄ）前記標的核酸またはその相補体を配列決定するステップであって、前記標的核酸またはその相補体が結合される前記オリゴヌクレオチドの分子標識を配列決定することを含む、ステップ  
をさらに含む、〔５３〕に記載の方法。

〔５５〕

（ｅ）前記標的核酸またはその相補体の量を決定するステップであって、前記ステップは、以下：

（ｉ）前記標的核酸またはその相補体のレベルを定量化すること、

（ｉｉ）同じ分子標識を含む配列の数を計数すること、あるいは

（ｉｉｉ）（ｉ）および（ｉｉ）の組合せ

を含む、ステップをさらに含む、〔５４〕に記載の方法。

〔５６〕

いずれかの同じ分子標識またはいずれかの同じ細胞性標識を整列するステップを含まない、〔５４〕または〔５５〕に記載の方法。

〔５７〕

前記増幅するステップが、前記標的核酸を逆転写するステップを含む、〔５３〕～〔５６〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５８〕

前記増幅するステップが、ＰＣＲ、ネステッドＰＣＲ、定量的ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、デジタルＰＣＲおよびこれらのいずれかの組合せからなる群より選択される方法を用いる、〔５３〕～〔５７〕のいずれか一項に記載の方法。

〔５９〕

前記増幅するステップが、以下：

（ａ）前記固体支持体上で直接的に、

（ｂ）前記固体支持体から転写された鋳型上で、または

（ｃ）（ａ）および（ｂ）の組合せで

行われる、〔５３〕～〔５８〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６０〕

前記試料が、細胞を含む、〔５２〕～〔５９〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６１〕

前記細胞が、単一細胞である、〔６０〕に記載の方法。

〔６２〕

前記接触させるステップを、ウェル中で行う、〔５２〕～〔６１〕のいずれか一項に記載の方法。

〔６３〕

前記ウェルが、マイクロウェルであり、マイクロウェルのアレイ中に含有される、〔６２〕に記載の方法。

〔６４〕

複数のマイクロウェルを含むデバイスであって、前記複数のマイクロウェルの各マイクロウェルが、約 $1,000\mu\text{m}^3$ ～約 $120,000\mu\text{m}^3$ に及ぶ容積を有する、デバイス。

〔６５〕

前記複数のマイクロウェルの各マイクロウェルが、約 $20,000\mu\text{m}^3$ の容積を有する、〔６４〕に記載のデバイス。

〔６６〕

前記複数のマイクロウェルが、約９６個～約 $200,000$ 個のマイクロウェルを含む、〔６４〕または〔６５〕に記載のデバイス。

〔６７〕

前記マイクロウェルが、材料の層中に含まれる、〔６４〕～〔６６〕のいずれか一項に記載のデバイス。

〔６８〕

前記マイクロウェルの少なくとも約１０％が、細胞をさらに含む、〔６４〕～〔６７〕のいずれか一項に記載のデバイス。

〔６９〕

〔３０〕～〔３９〕のいずれか一項に記載の固体支持体をさらに含む、〔６４〕～〔６９〕のいずれか一項に記載のデバイス。

〔７０〕

〔６４〕～〔６９〕のいずれか一項に記載のデバイスと、液体ハンドラーとを含む装置。

〔７１〕

前記液体ハンドラーが、約１秒間で複数のマイクロウェルに液体を送達する、〔７０〕に記載の装置。

〔７２〕

前記液体ハンドラーが、単一の入力ポートから前記複数のマイクロウェルに液体を送達する、〔７０〕または〔７１〕に記載の装置。

〔 7 3 〕

磁石をさらに含む、〔 7 0 〕～〔 7 2 〕のいずれか一項に記載の装置。

〔 7 4 〕

入口ポート、出口ポート、ポンプ、弁、ベント、リザーバー、試料収集チャンバー、温度制御装置またはこれらのいずれかの組合せのうち少なくとも 1 種をさらに含む、〔 7 0 〕～〔 7 3 〕のいずれか一項に記載の装置。

〔 7 5 〕

前記試料収集チャンバーを含む、〔 7 4 〕に記載の装置であって、前記試料収集チャンバーが、前記装置から着脱可能である、装置。

〔 7 6 〕

光学撮像器をさらに含む、〔 7 0 〕～〔 7 5 〕のいずれか一項に記載の装置。

〔 7 7 〕

前記光学撮像器が、前記液体ハンドラーの制御に使用される出力シグナルを生成する、〔 7 6 〕に記載の装置。

〔 7 8 〕

オリゴヌクレオチドのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅を行うように構成された熱サイクリング機構をさらに含む、〔 7 0 〕～〔 7 7 〕のいずれか一項に記載の装置。

〔 7 9 〕

臨床診断検査結果を生成する方法であって、前記方法は、以下：

（a）〔 7 0 〕～〔 7 8 〕のいずれか一項に記載のデバイスもしくは装置、

（b）〔 3 0 〕～〔 3 9 〕のいずれか一項に記載の固体支持体、

（c）〔 1 〕～〔 2 9 〕もしくは〔 5 2 〕～〔 6 3 〕のいずれか一項に記載の方法、または

（d）（a）～（c）のいずれかの組合せ

により前記臨床診断検査結果を生成するステップを含む、方法。

〔 8 0 〕

前記臨床診断検査結果が、通信媒体を介して伝達される、〔 7 9 〕に記載の方法。

〔 8 1 〕

〔 3 0 〕～〔 3 9 〕のいずれか一項に記載の固体支持体を作製する方法であって、前記方法は、以下：

（a）固体支持体に、以下：

（i）細胞性標識の第 1 の部分、および

（i i）第 1 のリンカー

を含む第 1 のポリヌクレオチドを付着させるステップと、

（b）以下：

（i）前記細胞性標識の第 2 の部分、

（i i）前記第 1 のリンカーに相補的な配列、および

（i i i）分子標識

を含む第 2 のポリヌクレオチドを接触させるステップと

を含む、方法。

〔 8 2 〕

第 3 のポリヌクレオチドが、標的核酸結合領域をさらに含む、〔 8 1 〕に記載の方法。

〔 8 3 〕

パッケージ中に含有される、〔 4 0 〕～〔 4 4 〕のいずれか一項に記載のキット。

〔 8 4 〕

前記パッケージが、箱である、〔 8 3 〕に記載のキット。

〔 8 5 〕

前記パッケージまたは前記箱が、2 立方フィートまたはそれに満たない容積を有する、〔 8 3 〕または〔 8 4 〕に記載のキット。

〔 8 6 〕

前記パッケージまたは前記箱が、1立方フィートまたはそれに満たない容積を有する、〔83〕または〔84〕に記載のキット。

〔87〕

エマルション、マイクロウェルまたはウェルが、1個の細胞のみを含有する、〔1〕～〔86〕のいずれか一項に記載の方法。

〔88〕

1～2, 000, 000個のエマルション、マイクロウェルまたはウェルがそれぞれ、1個の細胞のみを含有する、〔1〕～〔87〕のいずれか一項に記載の方法。

〔89〕

各エマルション、マイクロウェルまたはウェルに最大でも1個の細胞を分布させるステップを含む、〔1〕～〔88〕のいずれか一項に記載の方法。

〔90〕

単一の固体支持体および単一細胞が、エマルション、マイクロウェルまたはウェルに分布される、〔1〕～〔89〕のいずれか一項に記載の方法。

〔91〕

1～2, 000, 000個のエマルション、マイクロウェルまたはウェルにそれぞれ、1個の細胞および1個の固体支持体が分布されている、〔1〕～〔90〕のいずれか一項に記載の方法。

〔92〕

エマルション、マイクロウェルまたはウェル1個当たり最大でも1個の固体支持体を分布させるステップを含む、〔1〕～〔91〕のいずれか一項に記載の方法。

〔93〕

1～2, 000, 000個のマイクロウェル、エマルションまたはウェルのそれぞれに1個の固体支持体および1個の細胞を分布させるステップを含む、〔1〕～〔92〕のいずれか一項に記載の方法。

〔94〕

細胞分布が、ランダムまたは非ランダムである、〔1〕～〔93〕のいずれか一項に記載の方法。

〔95〕

細胞分布が、確率論的である、〔1〕～〔94〕のいずれか一項に記載の方法。

〔96〕

細胞が、細胞選別機によって分布される、〔1〕～〔95〕のいずれか一項に記載の方法。

〔97〕

1個または複数のウェル、マイクロウェルまたはエマルションに最大でも1個の細胞が分布されるように、希釈された細胞の希釈溶液と前記1個または複数のウェル、マイクロウェルまたはエマルションを接触させることにより、細胞が分布される、〔1〕～〔96〕のいずれか一項に記載の方法。

〔98〕

標的特異的領域、前記複数のオリゴヌクレオチドの標的特異的領域または前記2種もしくはそれを超えるポリヌクレオチド分子の標的特異的領域が、標的パネルの2種またはそれを超える標的に相補的な配列を含む、〔1〕～〔97〕のいずれか一項に記載の方法。

〔99〕

前記標的パネルの前記2種またはそれを超える標的が、バイオマーカーである、〔98〕に記載の方法。

〔100〕

前記バイオマーカーが、疾患または状態のバイオマーカーである、〔99〕に記載の方法。

〔101〕

前記疾患または前記状態が、がん、感染症、ウイルス感染症、炎症性疾患、神経変性疾

患、真菌疾患、細菌感染症またはこれらのいずれかの組合せである、〔100〕に記載の方法。

〔102〕

前記パネルが、2～50、000、2～40、000、2～30、000、2～20、000、2～10、000、2～9000、2～8、000、2～7、000、2～6、000、2～5、000、2～1、000、2～800、2～700、2～600、2～500、2～400、2～300、2～200、2～100、2～75、2～50、2～40、2～30、2～20、2～10または2～5種のバイオマーカーを含む、〔98〕～〔101〕のいずれか一項に記載の方法。

フロントページの続き

1. TRITON
2. TWEEN
3. MATLAB
4. プルロニック

- (74)代理人 100103610  
弁理士 ▲吉▼田 和彦
- (74)代理人 100109070  
弁理士 須田 洋之
- (74)代理人 100119013  
弁理士 山崎 一夫
- (74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき
- (74)代理人 100111796  
弁理士 服部 博信
- (74)代理人 100168631  
弁理士 佐々木 康匡
- (72)発明者 ファン, クリスティーナ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94538, フレモント, インパチェンス コモン 56  
64
- (72)発明者 フォーダー, スティーブン ピー. エー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94301, パロ アルト, パーキンソン アベニュー  
1120
- (72)発明者 フー, グレン ケー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94568, ダブリン, イースト コグ ヒル テラス  
2771
- (72)発明者 フェイサー, ジェフリー リチャード  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, カンザス アベニュー  
1671
- (72)発明者 ウィルヘルミー, ジュリー  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95060, サンタ クルーズ, エスカローン ドライブ  
1726
- Fターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QQ01 QQ03 QQ06 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR42  
QR58 QR62 QS39 QX02

【外国語明細書】  
2019106998000001.pdf

|                |                                                                                                                                                                          |         |            |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 大规模并行单细胞分析                                                                                                                                                               |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2019106998A</a>                                                                                                                                            | 公开(公告)日 | 2019-07-04 |
| 申请号            | JP2019014564                                                                                                                                                             | 申请日     | 2019-01-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 贝克顿·迪金森公司                                                                                                                                                                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 碧迪公司                                                                                                                                                                     |         |            |
| [标]发明人         | ファンクリスティーナ<br>フォーダースティーブンピーエー<br>フーグレンケー<br>フェイスージェフリーリチャード<br>ウィルヘルミージュリー                                                                                               |         |            |
| 发明人            | ファン, クリスティーナ<br>フォーダー, スティーブン ピー.エー.<br>フー, グレン ケー.<br>フェイス, ジェフリー リチャード<br>ウィルヘルミー, ジュリー                                                                                |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/10 G01N33/53 G01N37/00 C12Q1/6869 C12Q1/686                                                                                                                       |         |            |
| CPC分类号         | C12Q1/6874 C12N15/1093 C12Q2563/159 C12Q2563/185 B01L3/50857 C12N15/09 C12Q1/6869<br>C12Q2535/101 C12Q2563/149 C12Q1/6876 C12Q1/6881 C12Q1/6888 C12Q2600/158 C12Q2600/16 |         |            |
| FI分类号          | C12N15/10.114.Z G01N33/53.ZNA.M G01N37/00.102 C12Q1/6869.Z C12Q1/686.Z G01N33/53.MZN.A                                                                                   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QQ01 4B063/QQ03 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063<br>/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR58 4B063/QR62 4B063/QS39 4B063/QX02            |         |            |
| 代理人(译)         | 田中真一郎<br>▲▼吉尔场和彦<br>须田博之<br>山崎 一夫<br>服部博信                                                                                                                                |         |            |
| 优先权            | 61/952036 2014-03-12 US<br>61/871232 2013-08-28 US<br>62/012237 2014-06-13 US                                                                                            |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                                                                                                                                                |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供用于单细胞多重核酸分析的方法，组合物和试剂盒。该方法，组合物和系统可用于大规模并行单细胞测序。可以使用方法，组合物和系统同时分析数千个细胞。数千个细胞可包含混合的细胞群（例如，不同类型或亚型，不同大小的细胞）。本发明的方法包括以下步骤：（a）获得含有多个细胞的样品；和/或标记至少一部分多核苷酸分子，其互补物或其反应产物。【选择图表】  
无

