(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2020-502255
(P2020-502255A)
(43)公表日　令和2年1月23日(2020.1.23)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C07K	1/13	(2006.01)	C07K	1/13	ZNA	4B029
C12Q	1/6816	(2018.01)	C12Q	1/6816	Z	4B063
C12Q	1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4H045
C12M	1/00	(2006.01)	C12M	1/00	A	
G01N	33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 310 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-540515 (P2019-540515)
(86)(22)出願日　平成29年9月25日 (2017.9.25)
(85)翻訳文提出日　平成31年3月26日 (2019.3.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/053331
(87)国際公開番号　WO2018/058073
(87)国際公開日　平成30年3月29日 (2018.3.29)
(31)優先権主張番号　62/515,952
(32)優先日　平成29年6月6日 (2017.6.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/464,279
(32)優先日　平成29年2月27日 (2017.2.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　514215893
セルラー　リサーチ，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】バーコード付きオリゴヌクレオチド配列を有する試薬を用いたタンパク質発現の測定

(57)【要約】
本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物を提供する。オリゴヌクレオチドは、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬は、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である。サンプル中の複数のタンパク質標的の定量分析のため、およびサンプル中のタンパク質および核酸標的の同時の定量分析のための方法およびキットがさらに開示される。オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を含む標識生体分子剤を含む、標識生体分子試薬を調製するためのシステムおよび方法も、本明細書に開示される。

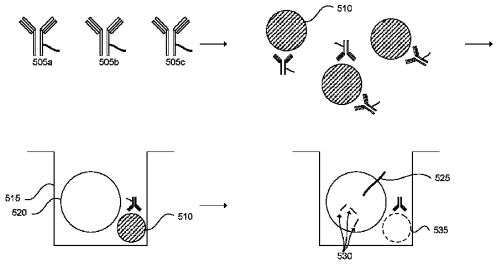


FIG. 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物。
【請求項２】
前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項１に記載の複数の組成物。
【請求項３】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項１または２に記載の複数の組成物。
【請求項４】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項３に記載の複数の組成物。
【請求項５】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項３に記載の複数の組成物。
【請求項６】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項３に記載の複数の組成物。
【請求項７】
複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項１～６のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項８】
前記オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項１～７のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項９】
前記リンカーが化学基を含む、請求項８に記載の複数の組成物。
【請求項１０】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項８に記載の複数の組成物。
【請求項１１】
前記化学基が、前記タンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項９または１０に記載の複数の組成物。
【請求項１２】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項８～１１のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項１３】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項１～１２のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項１４】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１３に記載の複数の組成物。
【請求項１５】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１３または１４に記載の複数の組成物。
【請求項１６】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合

せを含む、請求項１～１５のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項１７】
少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む、請求項１～１６のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項１８】
少なくとも１，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む、請求項１～１６のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項１９】
少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む、請求項１～１６のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項２０】
各タンパク質結合試薬が、少なくとも１０の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される、請求項１７～１９のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項２１】
各タンパク質結合試薬が、少なくとも１００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される、請求項１７～１９のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項２２】
各タンパク質結合試薬が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される、請求項１７～１９のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項２３】
前記複数の組成物が、前記オリゴヌクレオチドと結合されない１つ以上の第２のタンパク質結合試薬をさらに含む、請求項１～２２のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項２４】
前記タンパク質結合試薬および前記１つ以上の第２のタンパク質結合試薬が同じである、請求項２３に記載の複数の組成物。
【請求項２５】
複数のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である、請求項１～２４のいずれか一項に複数の組成物。
【請求項２６】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項２５に記載の複数の組成物。
【請求項２７】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項２５に記載の複数の組成物。
【請求項２８】
サンプル中の複数のタンパク質標的の定量分析の方法であって、
複数のタンパク質標的を含むサンプルを提供する工程と；
オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する工程と；
前記複数のタンパク質標的との特異的結合のために、前記複数の組成物を前記サンプルと接触させる工程と；
結合されていない組成物を除去する工程と；
複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列を含み、前記バーコード配

列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する工程と；
前記複数のオリゴヌクレオチドプローブを、前記複数の組成物の前記オリゴヌクレオチドと接触させる工程と；
前記オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記オリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識核酸を生成する工程であって、前記標識核酸の各々が、一意識別子およびバーコード配列を含む工程と；
各一意識別子のためのユニークバーコード配列の数を決定し、
それによって、前記サンプル中の各タンパク質標的の量が決定される工程と、
を含む、方法。
【請求項２９】
前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項２８または２９に記載の方法。
【請求項３１】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項３０に記載の方法。
【請求項３４】
前記複数の組成物が、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項２８～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項２８～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記リンカーが化学基を含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
前記化学基が、前記タンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項３６または３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項３５～３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０】
前記サンプルが単一細胞を含む、請求項２８～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１】
前記複数のタンパク質標的が、前記単一細胞の表面上で発現される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
前記結合されていない組成物を除去する工程が、前記単一細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、請求項４０または４１に記載の方法。
【請求項４３】

前記単一細胞を溶解する工程を含む、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記タンパク質結合試薬から前記オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項２８～４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
前記オリゴヌクレオチドが、ＵＶ光切断、化学的処理（ジチオスレイトール）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、前記タンパク質結合試薬から切り離される、請求項４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項２８～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）を含む、請求項２８～４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
前記複数のオリゴヌクレオチドプローブが、固体担体上に固定される、請求項２８～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９】
前記固体担体がビーズである、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数の標識核酸を増幅する工程をさらに含む、請求項２８～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記増幅が、前記バーコード配列の少なくとも一部、および前記一意識別子の少なくとも一部のＰＣＲ増幅を含む、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１００のユニークバーコード配列を含む、請求項２８～５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１，０００のユニークバーコード配列を含む、請求項２８～５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１０，０００のユニークバーコード配列を含む、請求項２８～５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
前記複数の組成物が、前記オリゴヌクレオチドと結合されない１つ以上の第２のタンパク質結合試薬をさらに含む、請求項２８～５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記タンパク質結合試薬および前記１つ以上の第２のタンパク質結合試薬が同じである、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記複数のアンプリコンをシーケンシングする工程をさらに含む、請求項５０～５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
前記シーケンシングが、前記バーコード配列の少なくとも一部、および前記一意識別子の少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析の方法であって、

複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子を含むサンプルを提供する工程と；
オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する工程と；
前記複数のタンパク質標的との特異的結合のために、前記複数の組成物を前記サンプルと接触させる工程と；
結合されていない組成物を除去する工程と；
複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列を含み、前記バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する工程と；
前記複数のオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリダイゼーションのために、前記組成物の前記オリゴヌクレオチドおよび前記複数の核酸標的分子と接触させる工程と；
前記オリゴヌクレオチドおよび核酸標的分子にハイブリダイズされた前記オリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識核酸を生成する工程であって、前記標識核酸の各々が、一意識別子または核酸標的分子、およびバーコード配列を含む工程と；
各一意識別子および各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列の数を決定し、
それによって、前記サンプル中の各タンパク質標的および各核酸標的分子の量が決定される工程と、
を含む、方法。

【請求項６０】
前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項５９または６０に記載の方法。

【請求項６２】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項６３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項６４】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項６１に記載の方法。

【請求項６５】
前記複数の組成物が、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項５９～６４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６】
前記オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項５９～６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６７】
前記リンカーが化学基を含む、請求項６６に記載の方法。

【請求項６８】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項６６に記載の方法。

【請求項６９】
前記化学基が、前記タンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項６７または６８に記載の方法。

【請求項７０】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれ

らの任意の組合せからなる群から選択される、請求項６７～６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１】
前記サンプルが単一細胞を含む、請求項５９～７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２】
前記複数のタンパク質標的が、前記単一細胞の表面上で発現される、請求項７１に記載の方法。
【請求項７３】
前記結合されていない組成物を除去する工程が、前記単一細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、請求項７１または７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記単一細胞を溶解する工程を含む、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記タンパク質結合試薬から前記オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項５９～７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６】
前記オリゴヌクレオチドが、ＵＶ光切断、化学的処理（ジチオスレイトール）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、前記タンパク質結合試薬から切り離される、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５９～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）を含む、請求項５９～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９】
前記複数のオリゴヌクレオチドプローブが、固体担体上に固定される、請求項５９～７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
前記固体担体がビーズである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数の標識核酸を増幅する工程をさらに含む、請求項５９～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記増幅が、前記バーコード配列の少なくとも一部、前記一意識別子の少なくとも一部、および前記核酸標的分子の少なくとも一部のＰＣＲ増幅を含む、請求項８１に記載の方法。
【請求項８３】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１００のユニークバーコード配列を含む、請求項５９～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１，０００のユニークバーコード配列を含む、請求項５９～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１０，０００のユニークバーコード配列を含む、請求項５９～８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６】
前記複数の組成物が、前記オリゴヌクレオチドと結合されない１つ以上の第２のタンパク質結合試薬をさらに含む、請求項５９～８５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８７】
前記タンパク質結合試薬および前記１つ以上の第２のタンパク質結合試薬が同じである、請求項８６に記載の方法。
【請求項８８】
前記複数のアンプリコンをシーケンシングする工程をさらに含む、請求項８１～８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９】
前記シーケンシングが、前記バーコード配列の少なくとも一部、前記一意識別子の少なくとも一部、および前記核酸標的分子の少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析のためのキットであって、オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物と、複数のオリゴヌクレオチドプローブと、を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列を含み、前記バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する、キット。
【請求項９１】
サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析のためのキットであって、オリゴヌクレオチドと各々が結合された２つ以上のタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記２つ以上のタンパク質結合試薬のうちの１つのための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物と、複数のオリゴヌクレオチドプローブと、を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列を含み、前記バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する、キット。
【請求項９２】
サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析のためのキットであって、オリゴヌクレオチドと各々が結合された２つ以上のタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物と、複数のオリゴヌクレオチドプローブと、を含み、前記複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列を含み、前記バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する、キット。
【請求項９３】
前記オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９０～９２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９４】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）を含む、請求項９０～９３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９５】
前記複数のオリゴヌクレオチドプローブが、固体担体上に固定される、請求項９０～９４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９６】
前記固体担体がビーズである、請求項９５に記載のキット。
【請求項９７】

ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１００のユニークバーコード配列を含む、請求項９０～９６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９８】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１，０００のユニークバーコード配列を含む、請求項９０～９６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項９９】
ユニークバーコード配列の前記多様なセットが、少なくとも１０，０００のユニークバーコード配列を含む、請求項９０～９６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１００】
少なくとも１，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項９０～９９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０１】
少なくとも１０，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項９０～９９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０２】
少なくとも１００，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項９０～９９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０３】
少なくとも１，０００，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項９０～９９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０４】
前記一意識別子が、２５～４５のヌクレオチドを含む、請求項９０～１０３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０５】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項９０～１０４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１０６】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項１０５に記載のキット。
【請求項１０７】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０５に記載のキット。
【請求項１０８】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０５に記載のキット。
【請求項１０９】
前記複数の組成物が、前記オリゴヌクレオチドと結合されない１つ以上の第２のタンパク質結合試薬をさらに含む、請求項９０～１０８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１１０】
前記タンパク質結合試薬および前記１つ以上の第２のタンパク質結合試薬が同じである、請求項１０９に記載のキット。
【請求項１１１】
前記複数の組成物が、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項９０～１１０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１１２】
前記オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項９０～１１１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１１３】
前記リンカーが化学基を含む、請求項１１２に記載のキット。
【請求項１１４】

前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項１１２に記載のキット。
【請求項１１５】
前記化学基が、前記タンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項１１３または１１４に記載のキット。
【請求項１１６】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項１１２～１１５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１１７】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項９０～１１６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１１８】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１１７に記載のキット。
【請求項１１９】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１１７または１１８に記載のキット。
【請求項１２０】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項９０～１１９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２１】
少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む、請求項９０～１２０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２２】
少なくとも１，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む、請求項９０～１２０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２３】
少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む、請求項９０～１２０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２４】
各タンパク質結合試薬が、少なくとも１０の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される、請求項１２１～１２３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２５】
各タンパク質結合試薬が、少なくとも１００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される、請求項１２１～１２３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２６】
各タンパク質結合試薬が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される、請求項１２１～１２３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２７】
複数のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である、請求項９０～１２６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項１２８】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１２７に記載のキット。
【請求項１２９】

前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項１２７に記載のキット。

【請求項１３０】

サンプル中のバイオマーカーを同定する方法であって、

複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子を含むサンプルを提供する工程と；

オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する工程と；

前記複数のタンパク質標的との特異的結合のために、前記複数の組成物を前記サンプルと接触させる工程と；

結合されていない組成物を除去する工程と；

複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、前記複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列を含み、前記バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する工程と；

前記複数のオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリダイゼーションのために、前記組成物の前記オリゴヌクレオチドおよび前記複数の核酸標的分子と接触させる工程と；

前記オリゴヌクレオチドおよび核酸標的分子にハイブリダイズされた前記オリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識核酸を生成する工程であって、前記標識核酸の各々が、一意識別子または核酸標的分子、およびバーコード配列を含む工程と；

各一意識別子および各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列の数を決定する工程と；

タンパク質標的の量または核酸標的分子の量を用いて、バイオマーカーを同定する工程と、

を含む、方法。

【請求項１３１】

少なくとも１つのタンパク質標的および少なくとも１つの核酸標的分子の量を決定する工程を含む、請求項１３０に記載の方法。

【請求項１３２】

少なくとも１つのタンパク質標的およびその対応する核酸標的分子の量を比較する工程を含む、請求項１３０に記載の方法。

【請求項１３３】

タンパク質標的の量が、その対応する核酸標的分子より多い場合、バイオマーカーを同定する工程を含む、請求項１３２に記載の方法。

【請求項１３４】

タンパク質標的の量が、その対応する核酸標的分子より少なくとも１０倍多い場合、バイオマーカーを同定する工程を含む、請求項１３２に記載の方法。

【請求項１３５】

タンパク質標的の対応する核酸標的分子の量が１０未満である場合、バイオマーカーを同定する工程を含む、請求項１３２に記載の方法。

【請求項１３６】

タンパク質標的の対応する核酸標的分子の量が０である場合、バイオマーカーを同定する工程を含む、請求項１３２に記載の方法。

【請求項１３７】

コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子組成物であって、

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列およびポリ（ｄＡ）領域を含む、コントロール粒子組成物。

【請求項１３８】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つが、異なるコントロ

ールバーコード配列を含む、請求項１３７に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１３９】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項１３７～１３８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４０】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項１３７～１３８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４１】
前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項１３７～１３８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４２】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項１３７～１３８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４３】
前記コントロールバーコード配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項１３７～１３８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４４】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項１３７～１４０のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４５】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項１３７～１４０のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４６】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項１３７～１４２のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４７】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項１３７～１４２のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４８】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項１３７～１４３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１４９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項１３７～１４３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５つの前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項１３７～１４９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項１３７～１４９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項１３７～１４９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５３】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項１３７～１４９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。

【請求項１５４】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項１３７～１５３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５５】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５つが、異なる配列を含む、請求項１３７～１５３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０個が、異なる配列を含む、請求項１３７～１５３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１００個が、異なる配列を含む、請求項１３７～１５３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５８】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、
第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
を含み、
前記第１のコントロールバーコード配列および前記第２のコントロールバーコード配列が、異なる配列を有する、請求項１３７～１５７のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１５９】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数がほぼ同じである、請求項１５８に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６０】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が異なる、請求項１５８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６１】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍多い、請求項１６０に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６２】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも１０倍多い、請求項１６０に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６３】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より約１００倍多い、請求項１６０に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６４】
前記コントロールバーコード配列が、１つの種のゲノム配列に対して相同でない、請求項１３７～１６３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６５】
前記コントロールバーコード配列が、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項１３７～１６３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６６】

前記種が非哺乳動物種である、請求項１６５に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６７】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項１６６に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６８】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項１６７に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１６９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、バーコード配列を含む、請求項１３７～１６８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７０】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項１３７～１６９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、リンカーを介して前記コントロール粒子に関連付けられる、請求項１３７～１７０のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、前記リンカーを含む、請求項１７１に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７３】
前記リンカーが化学基を含む、請求項１７１～１７２のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７４】
前記化学基が、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合される、請求項１７３に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７５】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１７３～１７４のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７６】
前記コントロール粒子の直径が、約１～１０００マイクロメートルである、請求項１３７～１７５のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７７】
前記コントロール粒子の直径が、約１０～１００マイクロメートルである、請求項１３７～１７５のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７８】
前記コントロール粒子の直径が、約７．５マイクロメートルである、請求項１３７～１７５のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１７９】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に固定される、請求項１３７～１７８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に部分的に固定される、請求項１３７～１７８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子に封入される、請求項１３７～１７８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子に部分的に

封入される、請求項１３７～１７８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８３】
前記コントロール粒子が崩壊性である、請求項１３７～１８２のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８４】
前記コントロール粒子が、ビーズを含む、請求項１３７～１８３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８５】
前記コントロール粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１３７～１８４のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８６】
前記コントロール粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含む、請求項１３７～１８５のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８７】
前記コントロール粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項１３７～１８６のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８８】
前記コントロール粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項１３７～１８７のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１８９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、請求項１３７～１８８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９０】
前記コントロール粒子が、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、
前記複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、請求項１３７～１８９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９１】
前記第１のタンパク質結合試薬が、第１の抗体を含む、請求項１９０に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９２】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記第１のタンパク質結合試薬に結合される、請求項１９０～１９１のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９３】
前記第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記リンカーを含む、請求項１９２に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９４】
前記リンカーが化学基を含む、請求項１９２～１９３のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９５】
前記化学基が、前記第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項１９４に

記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９６】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１９４～１９５のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９７】
前記第１のタンパク質結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、請求項１９０～１９６のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９８】
前記第１のタンパク質結合試薬が、異なるコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、請求項１９０～１９７のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項１９９】
前記複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれかに関連付けられない、請求項１９０～１９８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２００】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた前記第１のタンパク質結合試薬およびいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない前記第１のタンパク質結合試薬が、同一のタンパク質結合試薬である、請求項１９９に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０１】
前記コントロール粒子が、複数の第２のタンパク質結合試薬に関連付けられる、請求項１９０～２００のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０２】
前記複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、請求項２０１に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０３】
前記第１のタンパク質結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび前記第２のタンパク質結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項２０２に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０４】
前記第１のタンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が、同一のタンパク質結合試薬である、請求項２０２に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０５】
前記第１のタンパク質結合試薬が、パートナー結合試薬に関連付けられ、前記第１のタンパク質結合試薬が、前記パートナー結合試薬を用いて前記コントロール粒子に関連付けられる、請求項１９０～２０４のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０６】
前記パートナー結合試薬が、パートナー抗体を含む、請求項２０５に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０７】
前記パートナー抗体が、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、またはそれらの組合せを含む、請求項２０６に記載のコントロール粒子組成物。

【請求項２０８】
前記パートナー抗体が、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、それらの組合せ、またはそれらのフラグメントを含む、請求項２０６～２０７のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２０９】
前記第１のタンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項１９０～２０８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２１０】
前記第２のタンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項１９０～２０９のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項２１１】
標的の数を決定するための方法であって、
複数のバーコードを用いて、複数の細胞のうちの１つの細胞の複数の標的および複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的および複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含み、
コントロール粒子組成物が、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられたコントロール粒子を含み、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列、および前記複数のバーコードの少なくとも１つの前記標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
前記複数のバーコード付き標的および前記複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記コントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程と；
前記複数の標的の少なくとも１つの標的について：
前記シーケンシングデータ中の前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程と；
前記標的の数を推定する工程であって、推定された前記標的の数が、カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数および前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数と相関する工程と、
を含む、方法。
【請求項２１２】
前記擬似標的領域が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項２１１に記載の方法。
【請求項２１３】
前記擬似標的領域が、前記標的の部分配列を含む、請求項２１１～２１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１４】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１５】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１６】
前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項２１１～

２１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１７】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１８】
前記コントロールバーコード配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２０】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２１】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２２】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２３】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項２１１～２１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２４】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項２１１～２１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２５】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５つの前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項２１１～２２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項２１１～２２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項２１１～２２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２８】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項２１１～２２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２９】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項２１１～２２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５つが、異なる配列を含む、請求項２１１～２２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０個が、異なる配列を含む、請求項２１１～２２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１００個が、異なる配列を含む、請求項２１１～２２８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３３】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、
第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
を含み、
前記第１のコントロールバーコード配列および前記第２のコントロールバーコード配列が、異なる配列を有する、請求項２１１～２３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３４】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数がほぼ同じである、請求項２３３に記載の方法。
【請求項２３５】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が異なる、請求項２３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３６】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍多い、請求項２３５に記載の方法。
【請求項２３７】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも１０倍多い、請求項２３５に記載の方法。
【請求項２３８】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも１００倍多い、請求項２３５に記載の方法。
【請求項２３９】
前記シーケンシングデータ中の前記コントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程が、
前記シーケンシングデータ中の前記第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程と、
を含む、請求項２３３～２３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４０】
推定された前記標的の数が、
カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数、
前記第１のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数、および
前記第２のコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数と相関する、請求項２３９に記載の方法。
【請求項２４１】
推定された前記標的の数が、
カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数、
前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数、および

前記コントロールバーコード配列を含む前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と相関する、請求項２１１～２３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４２】
推定された前記標的の数が、
カウントされた前記標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数、ならびに
前記コントロールバーコード配列を含む前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数、および
前記コントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数
の比率と相関する、請求項２４１に記載の方法。
【請求項２４３】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記細胞のゲノム配列に対して相同でない、請求項２１１～２４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４４】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記種のゲノム配列に対して相同でない、請求項２１１～２４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４５】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項２１１～２４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４６】
前記種が非哺乳動物種である、請求項２４５に記載の方法。
【請求項２４７】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項２４６に記載の方法。
【請求項２４８】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項２４７に記載の方法。
【請求項２４９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記コントロール粒子に結合される、請求項２１１～２４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、リンカーを介して前記コントロール粒子に関連付けられる、請求項２４９に記載の方法。
【請求項２５１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、前記リンカーを含む、請求項２４９～２５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５２】
前記化学基が、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合される、請求項２５１に記載の方法。
【請求項２５３】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項２５１～２５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５４】
前記コントロール粒子の直径が、約１～１０００マイクロメートルである、請求項２１１～２５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５５】
前記コントロール粒子の直径が、約１０～１００マイクロメートルである、請求項２１１～２５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５６】

前記コントロール粒子の直径が、約７．５マイクロメートルである、請求項２１１～２５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５７】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に固定される、請求項２１１～２５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５８】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に部分的に固定される、請求項２１１～２５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５９】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子に封入される、請求項２１１～２５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６０】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子に部分的に封入される、請求項２１１～２５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６１】

前記複数の標的および前記コントロール粒子および前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、前記コントロール粒子から前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つを放出する工程を含む、請求項２１１～２６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６２】

前記コントロール粒子が崩壊性である、請求項２１１～２６１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６３】

前記コントロール粒子が、コントロール粒子ビーズを含む、請求項２１１～２６２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６４】

前記コントロール粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項２１１～２６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６５】

前記コントロール粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含む、請求項２１１～２６４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６６】

前記コントロール粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項２１１～２６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６７】

前記コントロール粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項２１１～２６６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６８】

前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、請求項２１１～２６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２６９】

前記コントロール粒子が、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、

前記複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒

子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、請求項２１１～２６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７０】
前記第１のタンパク質結合試薬が、第１の抗体を含む、請求項２６９に記載の方法。
【請求項２７１】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記第１のタンパク質結合試薬に結合される、請求項２６９～２７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７２】
前記第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記リンカーを含む、請求項２７１に記載の方法。
【請求項２７３】
前記リンカーが化学基を含む、請求項２７１～２７２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７４】
前記化学基が、前記第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項２７３に記載の方法。
【請求項２７５】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項２７３～２７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７６】
前記第１のタンパク質結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、請求項２６９～２７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７７】
前記第１のタンパク質結合試薬が、異なるコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、請求項２６９～２７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７８】
前記複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれかに関連付けられない、請求項２６９～２７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた前記第１のタンパク質結合試薬およびいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない前記第１のタンパク質結合試薬が、同一のタンパク質結合試薬である、請求項２７８に記載の方法。
【請求項２８０】
前記コントロール粒子が、複数の第２のタンパク質結合試薬に関連付けられる、請求項２７８～２７９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８１】
前記複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、請求項２８０に記載の方法。
【請求項２８２】
前記第１のタンパク質結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび前記第２のタンパク質結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項２８１に記載の方法。
【請求項２８３】
前記第１のタンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が、同一のタンパク質結合試薬である、請求項２８１に記載の方法。

【請求項２８４】
前記第１のタンパク質結合試薬が、パートナー結合試薬に関連付けられ、前記第１のタンパク質結合試薬が、前記パートナー結合試薬を用いて前記コントロール粒子に関連付けられる、請求項２６９～２８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８５】
前記パートナー結合試薬が、パートナー抗体を含む、請求項２８４に記載の方法。
【請求項２８６】
前記パートナー抗体が、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、またはそれらの組合せを含む、請求項２８５に記載の方法。
【請求項２８７】
前記パートナー抗体が、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、それらの組合せ、またはそれらのフラグメントを含む、請求項２８５～２８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８８】
前記第１のタンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項２６９～２８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２８９】
前記第２のタンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項２６９～２８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９０】
前記バーコードが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項２１１～２８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９１】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項２１１～２９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９２】
前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、請求項２１１～２９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９３】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定される、請求項２９２に記載の方法。
【請求項２９４】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定される、請求項２９２に記載の方法。
【請求項２９５】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に封入される、請求項２９２に記載の方法。
【請求項２９６】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に部分的に封入される、請求項２９２に記載の方法。
【請求項２９７】
前記バーコーディング粒子が崩壊性である、請求項２９２～２９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９８】
前記バーコーディング粒子が、バーコーディングビーズを含む、請求項２９２～２９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２９９】
前記バーコーディングビーズが、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、ア

ガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項２９２～２９８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３００】

前記バーコーディング粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含む、請求項２９２～２９９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０１】

前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項２９２～３００のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０２】

前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項２９２～３０１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０３】

前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項２９２～３０２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０４】

前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項２９２～３０３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０５】

前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項２９２～３０４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０６】

前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的および前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、

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

前記標的および前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き標的および前記複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを生成する工程と、

を含む、請求項２１１～３０５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０７】

前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、またはそれらの組合せを用いて、前記バーコードを伸長する工程を含む、請求項３０６に記載の方法。

【請求項３０８】

複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付き標的および前記複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、請求項２１１～３０７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３０９】

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

前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロール粒子オリゴヌクレオチド

の少なくとも一部または
前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部
を増幅する工程を含む、請求項３０８に記載の方法。
【請求項３１０】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、請求項３０８～３０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１１】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、
前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部、または
前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも一部
をシーケンシングする工程を含む、請求項３１０に記載の方法。
【請求項３１２】
コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子組成物を含むキットであって、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々が、コントロールバーコード配列およびポリ（ｄＡ）領域を含む、キット。
【請求項３１３】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項３１２に記載のキット。
【請求項３１４】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３１５】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３１６】
前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３１７】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３１８】
前記コントロールバーコード配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３１９】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２０】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２１】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２２】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２３】

前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項３１２～３１８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２４】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項３１２～３１８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２５】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５つの前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項３１２～３２４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項３１２～３２４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項３１２～３２４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２８】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項３１２～３２４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３２９】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項３１２～３２８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５つが、異なる配列を含む、請求項３１２～３２８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０個が、異なる配列を含む、請求項３１２～３２８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１００個が、異なる配列を含む、請求項３１２～３２８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３３】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、
第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、
第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと
を含み、
前記第１のコントロールバーコード配列および前記第２のコントロールバーコード配列が、異なる配列を有する、請求項３１２～３３２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３４】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数がほぼ同じである、請求項３３３に記載のキット。
【請求項３３５】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が異なる、請求項３３３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３３６】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍多い、請求項３３５に記載のキット。

【請求項３３７】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも１０倍多い、請求項３３５に記載のキット。
【請求項３３８】
前記複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、前記複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より約１００倍多い、請求項３３５に記載のキット。
【請求項３３９】
前記コントロールバーコード配列が、１つの種のゲノム配列に対して相同でない、請求項３１２～３３８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４０】
前記コントロールバーコード配列が、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項３１２～３３８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４１】
前記種が非哺乳動物種である、請求項３４０に記載のキット。
【請求項３４２】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項３４１に記載のキット。
【請求項３４３】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項３４２に記載のキット。
【請求項３４４】
前記第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、バーコード配列を含む、請求項３１２～３４３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４５】
前記第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項３１２～３４４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、リンカーを介して前記コントロール粒子に関連付けられる、請求項３１２～３４５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つが、前記リンカーを含む、請求項３４６に記載のキット。
【請求項３４８】
前記リンカーが化学基を含む、請求項３４６～３４７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３４９】
前記化学基が、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合される、請求項３４８に記載のキット。
【請求項３５０】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項３４８～３４９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５１】
前記コントロール粒子の直径が、約１～１０００マイクロメートルである、請求項３１２～３５０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５２】
前記コントロール粒子の直径が、約１０～１００マイクロメートルである、請求項３１２～３５０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５３】

前記コントロール粒子の直径が、約７．５マイクロメートルである、請求項３１２～３５０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５４】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に固定される、請求項３１２～３５３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５５】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子上に部分的に固定される、請求項３１２～３５３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子に封入される、請求項３１２～３５３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記コントロール粒子に部分的に封入される、請求項３１２～３５３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５８】
前記コントロール粒子が崩壊性である、請求項３１２～３５７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３５９】
前記コントロール粒子が、ビーズを含む、請求項３１２～３５８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６０】
前記ビーズが、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項３５９に記載のキット。
【請求項３６１】
前記コントロール粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、請求項３１２～３６０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６２】
前記コントロール粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項３１２～３６１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６３】
前記コントロール粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項３１２～３６２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６４】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、請求項３１２～３６３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６５】
前記コントロール粒子が、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、
前記複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、請求項３１２～３６４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６６】
前記第１のタンパク質結合試薬が、第１の抗体を含む、請求項３６５に記載のキット。
【請求項３６７】

前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記第１のタンパク質結合試薬に結合される、請求項３６５～３６６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３６８】
前記第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、前記リンカーを含む、請求項３６７に記載のキット。
【請求項３６９】
前記リンカーが化学基を含む、請求項３６７～３６８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７０】
前記化学基が、前記第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項３６９に記載のキット。
【請求項３７１】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項３６９～３７０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７２】
前記第１のタンパク質結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、請求項３６５～３７１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７３】
前記第１のタンパク質結合試薬が、異なるコントロールバーコード配列を有する前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられる、請求項３６５～３７２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７４】
前記複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれかに関連付けられない、請求項３６５～３７３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７５】
前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた前記第１のタンパク質結合試薬およびいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない前記第１のタンパク質結合試薬が、同一のタンパク質結合試薬である、請求項３７４に記載のキット。
【請求項３７６】
前記コントロール粒子が、複数の第２のタンパク質結合試薬に関連付けられる、請求項３６５～３７５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３７７】
前記複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つが、前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる、請求項３７６に記載のキット。
【請求項３７８】
前記第１のタンパク質結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび前記第２のタンパク質結合試薬に関連付けられた前記コントロール粒子オリゴヌクレオチドが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項３７７に記載のキット。
【請求項３７９】
前記第１のタンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が、同一のタンパク質結合試薬である、請求項３７７に記載のキット。
【請求項３８０】
前記第１のタンパク質結合試薬が、パートナー結合試薬に関連付けられ、前記第１のタンパク質結合試薬が、前記パートナー結合試薬を用いて前記コントロール粒子に関連付けられる、請求項３６５～３７５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３８１】

前記パートナータンパク質結合試薬が、パートナー抗体を含む、請求項３８０に記載のキット。

【請求項３８２】

前記パートナー抗体が、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、またはそれらの組合せを含む、請求項３８１に記載のキット。

【請求項３８３】

前記第２の抗体が、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント、それらの組合せ、またはそれらのフラグメントを含む、請求項３８１～３８２のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３８４】

前記第１のタンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項３１２～３８３のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３８５】

前記第２のタンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項３１２～３８４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３８６】

複数のバーコードを含む、請求項３１２～３８３のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３８７】

前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域およびバーコード配列を含み、

前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる分子標識配列を含む、請求項３８６に記載のキット。

【請求項３８８】

前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項３８７に記載のキット。

【請求項３８９】

前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項３８７～３８８のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３９０】

前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、請求項３８６～３８９のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３９１】

前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定される、請求項３９０に記載のキット。

【請求項３９２】

前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定される、請求項３９０に記載のキット。

【請求項３９３】

前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に封入される、請求項３９０に記載のキット。

【請求項３９４】

前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に部分的に封入される、請求項３９０に記載のキット。

【請求項３９５】

前記バーコーディング粒子が崩壊性である、請求項３９０～３９４のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３９６】

前記バーコーディング粒子が、第２のビーズを含む、請求項３９０～３９５のいずれか一項に記載のキット。

【請求項３９７】
前記バーコーディング粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項３９０～３９６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３９８】
前記バーコーディング粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、請求項３９０～３９７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項３９９】
前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項３９０～３９８のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４００】
前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項３９０～３９９のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０１】
前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項３９０～４００のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０２】
前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項３９０～４０１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０３】
前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項３９０～４０２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０４】
ＤＮＡポリメラーゼを含む、請求項３０６～４０３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０５】
ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）用の試薬を含む、請求項３０６～４０４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４０６】
シーケンシングコントロールのための方法であって、
複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、
前記複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的および複数のタンパク質標的を含み、
前記複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、前記コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、および前記複数のバーコードの少なくとも１つの前記標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、

異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、
を含む、方法。
【請求項４０７】
前記擬似標的領域が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項４０６に記載の方法。
【請求項４０８】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４０９】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１０】
前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１１】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１２】
前記コントロールバーコード配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１３】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１４】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項４０６～４０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１５】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項４０６～４１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１６】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項４０６～４１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１７】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項４０６～４１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１８】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項４０６～４１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４１９】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つの前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４０６～４１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４０６～４１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２１】

前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４０６～４１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４０６～４１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２３】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項４０６～４２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２４】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０個が、異なる配列を含む、請求項４０６～４２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２５】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１００個が、異なる配列を含む、請求項４０６～４２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０００個が、異なる配列を含む、請求項４０６～４２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２７】
前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程とを含む、請求項４０６～４２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２８】
決定された前記１つ以上の細胞の数に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、請求項４２７に記載の方法。
【請求項４２９】
決定された前記１つ以上の細胞の数および前記複数の細胞の数の比率に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、請求項４２７に記載の方法。
【請求項４３０】
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドの前記特性を用いて、前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の各細胞標識について、前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程と；
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、
を含む、請求項４０６～４２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３１】
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の各細胞標識について、前記細胞標識に関連付けられた最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程を含む、請求項４３０に記載の方法。
【請求項４３２】
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程が、
最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数に関連付けられた前記シーケンシ

ングデータ中の細胞標識の数を用いて、最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数のプロットを作成する工程と；
前記１つ以上の細胞の数として前記プロットにおけるカットオフを決定する工程と、
を含む、請求項４３１に記載の方法。
【請求項４３３】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、請求項４０６～４３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３４】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項４０６～４３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３５】
前記種が非哺乳動物種である、請求項４３４に記載の方法。
【請求項４３６】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項４３５に記載の方法。
【請求項４３７】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項４３６に記載の方法。
【請求項４３８】
前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、前記タンパク質結合試薬から前記コントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む、請求項４０６～４３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３９】
前記複数のコントロール組成物の結合されていないコントロール組成物を除去する工程を含む、請求項４０６～４３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４０】
前記結合されていないコントロール組成物を除去する工程が、前記複数の細胞の前記１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、請求項４３９に記載の方法。
【請求項４４１】
前記結合されていない細胞同定組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記コントロール組成物の少なくとも１つのタンパク質結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、請求項４３９に記載の方法。
【請求項４４２】
前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つが、細胞表面上にある、請求項４０６～４３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４３】
前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つが、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項４０６～４４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４４】
前記タンパク質結合試薬が、抗体を含む、請求項４０６～４４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４５】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項４０６～４４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４６】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記リンカーを含む、請求項４４５に記載の方法。
【請求項４４７】
前記リンカーが化学基を含む、請求項４４５～４４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４４８】
前記化学基が、前記第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項４４７に記載の方法。
【請求項４４９】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項４４７～４４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５０】
前記タンパク質結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項４０６～４４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５１】
前記タンパク質結合試薬が、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項４０６～４４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５２】
前記複数のコントロール組成物の第２のタンパク質結合試薬は、前記コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない、請求項４０６～４５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５３】
前記タンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が同一である、請求項４５２に記載の方法。
【請求項４５４】
前記バーコードが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項４０６～４５３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５５】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項４０６～４５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５６】
前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、請求項４０６～４５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５７】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定される、請求項４５６に記載の方法。
【請求項４５８】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定される、請求項４５６に記載の方法。
【請求項４５９】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に封入される、請求項４５６に記載の方法。
【請求項４６０】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に部分的に封入される、請求項４５６に記載の方法。
【請求項４６１】
前記バーコーディング粒子が崩壊性である、請求項４５６～４６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６２】
前記バーコーディング粒子が、バーコーディングビーズを含む、請求項４５６～４６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６３】

前記バーコーディングビーズが、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項４５６～４６２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６４】

前記バーコーディング粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含む、請求項４５６～４６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６５】

前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項４５６～４６４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６６】

前記バーコーディング粒子が、光学的部分に関連付けられる、請求項４５６～４６５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６７】

前記コントロールオリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる、請求項４５６～４６６のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。

【請求項４６８】

前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項４５６～４６７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４６９】

前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項４５６～４６８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７０】

前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項４５６～４６９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７１】

前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項４５６～４７０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７２】

前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項４０６～４７１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７３】

前記複数のバーコードを用いて、前記複数のコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、

前記複数のバーコードを、前記複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；

前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、

を含む、請求項４０６～４７２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７４】

前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、またはそれらの組合せを用いて、前記バーコードを伸長する工程を含む、請求項４７３に記載の方法。
【請求項４７５】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、請求項４０６～４７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７６】
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、請求項４７５に記載の方法。
【請求項４７７】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、請求項４７５～４７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７８】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項４７７に記載の方法。
【請求項４７９】
シーケンシングコントロールのための方法であって、
複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、
前記複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的および複数の結合標的を含み、
前記複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記複数の結合標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、前記コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、および前記複数のバーコードの少なくとも１つの前記標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、
を含む、方法。
【請求項４８０】
前記擬似標的領域が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項４７９に記載の方法。
【請求項４８１】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８２】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８３】
前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項４７９～

４８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８４】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８５】
前記コントロールバーコード配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８６】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８７】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８８】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８９】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９０】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項４７９～４８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９１】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項４７９～４８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つの前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４７９～４９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９３】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４７９～４９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９４】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４７９～４９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９５】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項４７９～４９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９６】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項４７９～４９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０個が、異なる配列を含む、請求項４７９～４９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９８】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１００個が、異なる配列を含む、請求項４７９～４９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４９９】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０００個が、異なる配列を含む、請求項４７９～４９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５００】

前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、
を含む、請求項４７９～４９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０１】
決定された前記１つ以上の細胞の数に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、請求項５００に記載の方法。
【請求項５０２】
決定された前記１つ以上の細胞の数および前記複数の細胞の数の比率に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、請求項５００に記載の方法。
【請求項５０３】
前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の各細胞標識について、前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程と；
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、
を含む、請求項４７９～４９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０４】
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の各細胞標識について、前記細胞標識に関連付けられた最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程を含む、請求項５０３に記載の方法。
【請求項５０５】
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程が、
最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数に関連付けられた前記シーケンシングデータ中の細胞標識の数を用いて、最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数のプロットを作成する工程と；
前記１つ以上の細胞の数として前記プロットにおけるカットオフを決定する工程と、
を含む、請求項５０４に記載の方法。
【請求項５０６】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、請求項４７９～５０５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０７】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項４７９～５０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５０８】
前記種が非哺乳動物種である、請求項５０７に記載の方法。
【請求項５０９】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項５０８に記載の方法。
【請求項５１０】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項５０９に記載の方法。
【請求項５１１】
前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、前記細胞成分結合試

薬から前記コントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む、請求項４７９～５０６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１２】

前記複数の結合標的の少なくとも１つが、細胞表面上で発現される、請求項４７９～５１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１３】

前記複数の結合標的の少なくとも１つが、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項４７９～５１２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１４】

前記細胞成分結合試薬が、細胞表面結合試薬、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、浸潤、またはそれらの組合せを含む、請求項４７９～５１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１５】

前記細胞成分結合試薬の結合標的が、１０～１００の異なる結合標的を含む群から選択される、請求項４７９～５１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１６】

前記細胞成分結合試薬の結合標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５１５に記載の方法。

【請求項５１７】

前記コントロールオリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記細胞成分結合試薬に結合される、請求項４７９～５１６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１８】

前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記リンカーを含む、請求項５１７に記載の方法。

【請求項５１９】

前記リンカーが化学基を含む、請求項５１７～５１８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２０】

前記化学基が、前記第１の細胞成分結合試薬に可逆的に結合される、請求項５１９に記載の方法。

【請求項５２１】

前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５１９～５２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２２】

前記細胞成分結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項４７９～５２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２３】

前記細胞成分結合試薬が、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項４７９～５２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２４】

前記複数のコントロール組成物の第２の細胞成分結合試薬は、前記コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない、請求項４７９～５２３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２５】

前記細胞成分結合試薬および前記第２の細胞成分結合試薬が同一である、請求項５２４

に記載の方法。
【請求項５２６】
前記バーコードが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項４７９～５２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２７】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項４７９～５２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２８】
前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、請求項４７９～５２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５２９】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定される、請求項５２８に記載の方法。
【請求項５３０】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定される、請求項５２８に記載の方法。
【請求項５３１】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に封入される、請求項５２８に記載の方法。
【請求項５３２】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に部分的に封入される、請求項５２８に記載の方法。
【請求項５３３】
前記バーコーディング粒子が崩壊性である、請求項５２９～５３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３４】
前記バーコーディング粒子が、バーコーディングビーズを含む、請求項５２８～５３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３５】
前記バーコーディング粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５２８～５３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３６】
前記バーコーディング粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含む、請求項５２８～５３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３７】
前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項５２８～５３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３８】
前記バーコーディング粒子が、光学的部分に関連付けられる、請求項５２８～５３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３９】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる、請求項５２８～５３８のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。

【請求項５４０】
前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項５２８～５３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４１】
前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項５２８～５４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４２】
前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項５２８～５４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４３】
前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項５２８～５４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４４】
前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項４７９～５４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４５】
前記複数のバーコードを用いて、前記複数のコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、
を含む、請求項４７９～５４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４６】
前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、またはそれらの組合せを用いて、前記バーコードを伸長する工程を含む、請求項５４５に記載の方法。
【請求項５４７】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、請求項４７９～５４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４８】
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、請求項５４７に記載の方法。
【請求項５４９】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、請求項５４７～５４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５０】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項５４９に記載の方法。
【請求項５５１】
シーケンシングコントロールのための方法であって、
複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロー

ル組成物と接触させる工程であって、
前記複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的および複数のタンパク質標的を含み、
前記複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、前記コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、および前記複数のバーコードの少なくとも１つの前記標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；
前記複数のコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、前記１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、
を含む、方法。
【請求項５５２】
前記擬似標的領域が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項５５１に記載の方法。
【請求項５５３】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５４】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５５】
前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５６】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５７】
前記コントロールバーコード配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５８】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５９】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６０】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６１】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６２】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項５５１～５５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６３】
前記コントロールバーコードオリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６４】
前記コントロールバーコード配列が、２５～４５ヌクレオチド長である、請求項５５１～５６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６５】

前記コントロールバーコード配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６６】
前記コントロールバーコード配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項５５１～５５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６７】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つの前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項５５１～５６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６８】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項５５１～５６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６９】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項５５１～５６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７０】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０００の前記コントロールバーコード配列が同一である、請求項５５１～５６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７１】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つが、異なるコントロールバーコード配列を含む、請求項５５１～５７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７２】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０個が、異なる配列を含む、請求項５５１～５７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７３】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１００個が、異なる配列を含む、請求項５５１～５７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７４】
前記複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１０００個が、異なる配列を含む、請求項５５１～５７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７５】
前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、
を含む、請求項５５１～５７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７６】
決定された前記１つ以上の細胞の数に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、請求項５７５に記載の方法。
【請求項５７７】
決定された前記１つ以上の細胞の数および前記複数の細胞の数の比率に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含む、請求項５７５に記載の方法。
【請求項５７８】
前記１つ以上の細胞の前記少なくとも１つの特性を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の各細胞標識について、前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程と；
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程と、

を含む、請求項５５１～５７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７９】
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程が、
前記シーケンシングデータ中の各細胞標識について、前記細胞標識に関連付けられた最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を決定する工程を含む、請求項５７８に記載の方法。
【請求項５８０】
前記細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列および前記コントロールバーコード配列の数を用いて、前記１つ以上の細胞の数を決定する工程が、
最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数に関連付けられた前記シーケンシングデータ中の細胞標識の数を用いて、最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数のプロットを作成する工程と；
前記１つ以上の細胞の数として前記プロットにおけるカットオフを決定する工程と、
を含む、請求項５７９に記載の方法。
【請求項５８１】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記複数の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、請求項５５１～５８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８２】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項５５１～５８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８３】
前記種が非哺乳動物種である、請求項５８２に記載の方法。
【請求項５８４】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項５８３に記載の方法。
【請求項５８５】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項５８４に記載の方法。
【請求項５８６】
前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける前に、前記タンパク質結合試薬から前記コントロールオリゴヌクレオチドを放出する工程を含む、請求項５５１～５８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８７】
前記複数のコントロール組成物の結合されていないコントロール組成物を除去する工程を含む、請求項５５１～５８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８８】
前記結合されていないコントロール組成物を除去する工程が、前記複数の細胞の前記１つ以上の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、請求項５８７に記載の方法。
【請求項５８９】
前記結合されていない細胞同定組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記コントロール組成物の少なくとも１つのタンパク質結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、請求項５８８に記載の方法。
【請求項５９０】
前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つが、細胞表面上で発現される、請求項５５１～５８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９１】
前記複数のタンパク質標的の少なくとも１つが、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５５１～５９０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５９２】
前記タンパク質結合試薬が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５５１～５９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９３】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項５９２に記載の方法。
【請求項５９４】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、前記リンカーを含む、請求項５９３に記載の方法。
【請求項５９５】
前記リンカーが化学基を含む、請求項５９３～５９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９６】
前記化学基が、前記第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合される、請求項５９５に記載の方法。
【請求項５９７】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項５９５～５９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９８】
前記タンパク質結合試薬が、同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項５５１～５９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９９】
前記タンパク質結合試薬が、異なる同一のコントロールバーコード配列を有する２つ以上のコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項５５１～５９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６００】
前記複数のコントロール組成物の第２のタンパク質結合試薬は、前記コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられない、請求項５５１～５９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０１】
前記タンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が同一である、請求項６００に記載の方法。
【請求項６０２】
前記バーコードが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項５５１～６０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０３】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項５５１～６０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０４】
前記複数のバーコードが、バーコーディング粒子に関連付けられる、請求項５５１～６０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０５】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に固定される、請求項６０４に記載の方法。
【請求項６０６】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子上に部分的に固定される、請求項６０４に記載の方法。

【請求項６０７】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に封入される、請求項６０４に記載の方法。
【請求項６０８】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記バーコーディング粒子に部分的に封入される、請求項６０４に記載の方法。
【請求項６０９】
前記バーコーディング粒子が崩壊性である、請求項６０４～６０８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１０】
前記バーコーディング粒子が、バーコーディングビーズを含む、請求項６０４～６０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１１】
前記バーコーディング粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６０４～６１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１２】
前記バーコーディング粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含む、請求項６０４～６１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１３】
前記バーコーディング粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項６０４～６１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１４】
前記バーコーディング粒子が、光学的部分に関連付けられる、請求項６０４～６１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１５】
前記コントロールオリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる、請求項６０４～６１４のいずれか一項に記載のコントロール粒子組成物。
【請求項６１６】
複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
を含む、請求項６０４～６１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１７】
前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項６１６～６１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１８】
前記バーコーディング粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコ

ード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項６１６～６１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１９】
前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項６１６～６１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２０】
前記バーコーディング粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項６１６～６１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２１】
前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、複数のバーコードを用いて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項６１６～６２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２２】
前記複数のバーコードを用いて、前記複数のコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記複数のコントロール組成物のコントロールオリゴヌクレオチドと接触させて、前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記コントロールオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程と、
を含む、請求項６１６～６２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２３】
前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼ、逆転写酵素、またはそれらの組合せを用いて、前記バーコードを伸長する工程を含む、請求項６２２に記載の方法。
【請求項６２４】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、請求項６１６～６２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２５】
前記複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、請求項６２４に記載の方法。
【請求項６２６】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、請求項６２４～６２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２７】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記コントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項６２６に記載の方法。
【請求項６２８】
細胞同定のための方法であって、
第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、それぞれ複数の細胞同定組成物の２つの細胞同定組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々および前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上のタンパク質標的を含み、前記２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、前記２つの細胞同定組成物

の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と；
得られた前記シーケンシングデータから、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除去する工程と、
を含む、方法。
【請求項６２９】
多重同定のための方法であって、
第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、それぞれ複数の細胞同定組成物の２つの細胞同定組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々および前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上のタンパク質標的を含み、前記２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、前記２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、
を含む、方法。
【請求項６３０】
細胞同定のための方法であって、
第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、それぞれ複数の細胞同定組成物の２つの細胞同定組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々および前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、前記２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、

異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と；
得られた前記シーケンシングデータから、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除去する工程と、
を含む、方法。
【請求項６３１】
多重同定のための方法であって、
第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、それぞれ複数の細胞同定組成物の２つの細胞同定組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々および前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、前記２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、前記細胞成分結合試薬が、前記１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、前記２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；
複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
前記シーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、
を含む、方法。
【請求項６３２】
前記細胞成分結合試薬が、タンパク質結合試薬を含み、前記タンパク質結合試薬が、前記細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられ、前記１つ以上の細胞成分標的が、１つ以上のタンパク質標的を含む、請求項６３０～６３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３３】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞を、前記２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程が、
前記第１の複数の細胞を、前記２つの細胞同定組成物の第１の細胞同定組成物と接触させる工程と；
前記第１の複数の細胞を、前記２つの細胞同定組成物の第２の細胞同定組成物と接触させる工程と、
を含む、請求項６２８～６３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３４】
前記細胞同定配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３５】
前記細胞同定配列が、２５～６０ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３６】

前記細胞同定配列が、約４５ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３７】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３８】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３９】
前記細胞同定配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４０】
前記細胞同定配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４１】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４２】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４３】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４４】
前記細胞同定配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４５】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項６２８～６３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４６】
前記複数の細胞同定組成物の少なくとも１０の細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む、請求項６２８～６４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４７】
前記複数の細胞同定組成物の少なくとも１００の細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む、請求項６２８～６４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４８】
前記複数の細胞同定組成物の少なくとも１０００の細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む、請求項６２８～６４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４９】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、またはそれらの組合せを含む、請求項６２８および６３２～６４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５０】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記タンパク質結合試薬に結合される、請求項６２８および６３２～６４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５１】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項６５０に記載の方法。
【請求項６５２】
前記リンカーが化学基を含む、請求項６５０～６５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５３】

前記化学基が、前記タンパク質結合試薬に可逆的にまたは不可逆的に結合される、請求項６５２に記載の方法。

【請求項６５４】

前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６５２～６５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６５５】

前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、単一細胞を含む、請求項６２８～６５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６５６】

前記１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つが、細胞表面上にある、請求項６２８～６２９および６３２～６５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６５７】

前記２つの細胞同定組成物の結合されていない細胞同定組成物を除去する工程を含む、請求項６２８～６５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６５８】

前記結合されていない細胞同定組成物を除去する工程が、前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、請求項６５７に記載の方法。

【請求項６５９】

前記結合されていない細胞同定組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記２つの細胞同定組成物の少なくとも１つの細胞成分結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、請求項６５７に記載の方法。

【請求項６６０】

前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の細胞を溶解する工程を含む、請求項６２８～６５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６１】

前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、前記タンパク質結合試薬から切り離し可能または切り離し不可能であるように構成される、請求項６２８～６２９および６３２～６６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６２】

前記タンパク質結合試薬から前記細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項６２８～６２９および６３２～６６１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６３】

前記細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学的処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、前記タンパク質結合試薬から前記細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項６６２に記載の方法。

【請求項６６４】

前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、請求項６２８～６６３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６５】

前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項６２８～６６４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６６】

前記種が非哺乳動物種である、請求項６６５に記載の方法。

【請求項６６７】

前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項６６６に記載の方法。

【請求項６６８】

前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項６６７に記載の方法。

【請求項６６９】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、腫瘍細胞または非腫瘍細胞を含む、請求項６２８～６６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７０】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６２８～６６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７１】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む、請求項６２８～６７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７２】
前記バーコードが、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、請求項６７１に記載の方法。
【請求項６７３】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項６７２に記載の方法。
【請求項６７４】
前記バーコードの前記捕捉配列に相補的な前記細胞同定オリゴヌクレオチドの配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項６７１～６７３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７５】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、バーコード配列を含む、請求項６２８～６７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７６】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項６２８～６７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７７】
前記タンパク質標的が、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６２８～６２９および６３２～６７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７８】
前記タンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６７７に記載の方法。
【請求項６７９】
前記タンパク質標的が、脂質、炭水化物、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６２８～６２９および６３２～６７８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８０】
前記タンパク質標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択される、請求項６２８～６２９および６３２～６７９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８１】
前記タンパク質結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項６２８～６２９および６３２～６８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８２】
前記タンパク質結合試薬が、異なる細胞同定配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項６２８～６２９および６３２～６８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８３】
前記複数の細胞同定組成物の前記細胞同定組成物が、前記細胞同定オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬を含む、請求項６２８～６２９および６３２～

６８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８４】
前記タンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が同一である、請求項６８３に記載の方法。
【請求項６８５】
前記タンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項６２８～６２９および６３２～６８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８６】
前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域およびバーコード配列を含み、
前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる分子標識配列を含む、請求項６２８～６８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８７】
前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６８６に記載の方法。
【請求項６８８】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項６８６～６８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６８９】
前記複数のバーコードが、１つの粒子に関連付けられる、請求項６８６～６８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９０】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定される、請求項６８９に記載の方法。
【請求項６９１】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に部分的に固定される、請求項６８９に記載の方法。
【請求項６９２】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子に封入される、請求項６８９に記載の方法。
【請求項６９３】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子に部分的に封入される、請求項６８９に記載の方法。
【請求項６９４】
前記粒子が崩壊性である、請求項６８９～６９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９５】
前記粒子がビーズを含む、請求項６８９～６９４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９６】
前記粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項６８９～６９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９７】
前記粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、請求項６８９～６９６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９８】

前記粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項６８９～６９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６９９】
前記粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項６８９～６９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７００】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、請求項６８９～６９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０１】
前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項６８９～７００のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０２】
前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項６８９～７０１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０３】
前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項６８９～７０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０４】
前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項６８９～７０３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０５】
前記複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記細胞同定オリゴヌクレオチドと接触させて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、
を含む、請求項６２８～７０４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０６】
前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項７０５に記載の方法。
【請求項７０７】
前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項７０５に記載の方法。
【請求項７０８】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、請求項７０５～７０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０９】
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記細胞同定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、請求項７０８に記載の方法。
【請求項７１０】
複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、請求項７０８～７０９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１１】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記バーコード配列の少なくとも一部お

よび前記細胞同定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項７１０に記載の方法。
【請求項７１２】
前記複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程が、複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項６２８～７１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１３】
前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程であって、前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と、
を含む、請求項６２８～７１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１４】
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、
前記標的のコピーを、前記バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；
前記複数のバーコードを用いて、前記複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、
を含む、請求項７１３に記載の方法。
【請求項７１５】
前記複数のバーコード付き標的の前記シーケンシングデータを取得する前に、前記バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む、請求項７１３～７１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１６】
前記バーコード付き標的を増幅して、前記複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によって前記バーコード付き標的を増幅する工程を含む、請求項７１５に記載の方法。
【請求項７１７】
前記複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き標的を生成する工程が、複数のバーコードを用いて、前記細胞の前記複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程を含む、請求項７１３～７１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７１８】
細胞同定のための方法であって、
第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の各々からの１つ以上の細胞を、複数の２つの細胞同定組成物のそれぞれの細胞同定組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々および前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、前記２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、前記抗原結合試薬が、前記１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、前記２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；
２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、
を含む、方法。
【請求項７１９】
多重同定のための方法であって、
第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の各々からの１つ以上の細胞を、複数の２つ

の細胞同定組成物のそれぞれの細胞同定組成物と接触させる工程であって、
前記第１の複数の細胞の各々および前記第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、前記２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、前記抗原結合試薬が、前記１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、前記２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；
多細胞として２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、
を含む、方法。
【請求項７２０】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞を、前記２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程が、
前記第１の複数の細胞を、前記２つの細胞同定組成物の第１の細胞同定組成物と接触させる工程と；
前記第１の複数の細胞を、前記２つの細胞同定組成物の第２の細胞同定組成物と接触させる工程と、
を含む、請求項７１８～７１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２１】
前記細胞同定配列が、少なくとも６ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２２】
前記細胞同定配列が、２５～６０ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２３】
前記細胞同定配列が、約４５ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２４】
前記細胞同定配列が、約１２８ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２５】
前記細胞同定配列が、少なくとも１２８ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２６】
前記細胞同定配列が、約２００～５００ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２７】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約５０ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２８】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約１００ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７２９】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約２００ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３０】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、少なくとも２００ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３１】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約２００～３００ヌクレオチド長未満である、請

求項７１８～７２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３２】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、約５００ヌクレオチド長である、請求項７１８～７２６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３３】
前記複数の細胞同定組成物の少なくとも１０の細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む、請求項７１８～７３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３４】
前記複数の細胞同定組成物の少なくとも１００の細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む、請求項７１８～７３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３５】
前記複数の細胞同定組成物の少なくとも１０００の細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む、請求項７１８～７３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３６】
前記抗原結合試薬が、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、またはそれらの組合せを含む、請求項７１８～７３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３７】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記抗原結合試薬に結合される、請求項７１８～７３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７３８】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項７３７に記載の方法。
【請求項７３９】
前記リンカーが化学基を含む、請求項７３７～７３８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４０】
前記化学基が、前記抗原結合試薬に可逆的にまたは不可逆的に結合される、請求項７３９に記載の方法。
【請求項７４１】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項７３９～７４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４２】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、単一細胞を含む、請求項７１８～７４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４３】
前記１つ以上の抗原標的の少なくとも１つが、細胞表面上で発現される、請求項７４２に記載の方法。
【請求項７４４】
前記２つの細胞同定組成物の結合されていない細胞同定組成物を除去する工程を含む、請求項７１８～７４３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４５】
前記結合されていない細胞同定組成物を除去する工程が、前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む、請求項７４４に記載の方法。
【請求項７４６】
前記結合されていない細胞同定組成物を除去する工程が、フローサイトメトリーを用いて、前記２つの細胞同定組成物の少なくとも１つの抗原結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含む、請求項７４４に記載の方法。
【請求項７４７】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を溶解する工程を含む、請求項７１８～７４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７４８】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、前記抗原結合試薬から切り離し可能または切り離し不可能であるように構成される、請求項７１８～７４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７４９】
前記抗原結合試薬から前記細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項７１８～７４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５０】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程が、ＵＶ光切断、化学的処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、前記抗原結合試薬から前記細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含む、請求項７４９に記載の方法。
【請求項７５１】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、前記１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない、請求項７１８～７５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５２】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、１つの種のゲノム配列に対して相同である、請求項７１８～７５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５３】
前記種が非哺乳動物種である、請求項７５２に記載の方法。
【請求項７５４】
前記非哺乳動物種がファージ種である、請求項７５３に記載の方法。
【請求項７５５】
前記ファージ種が、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである、請求項７５４に記載の方法。
【請求項７５６】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、腫瘍細胞または非腫瘍細胞を含む、請求項７１８～７５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５７】
前記第１の複数の細胞および前記第２の複数の細胞の少なくとも１つが、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項７１８～７５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５８】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、前記細胞同定オリゴヌクレオチドの前記配列を捕捉するように構成された捕捉配列に相補的な配列を含む、請求項７１８～７５７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７５９】
前記バーコードが、前記捕捉配列を含む標的結合領域を含む、請求項７５８に記載の方法。
【請求項７６０】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項７５９に記載の方法。
【請求項７６１】
前記捕捉配列に相補的な前記細胞同定オリゴヌクレオチドの前記配列が、ポリ（ｄＡ）領域を含む、請求項７５８～７６０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６２】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、バーコード配列を含む、請求項７５８～７６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６３】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む、請求項７５８～７６２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６４】
前記タンパク質標的が、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タ

ンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、細胞内タンパク質またはそれらの任意の組合せを含む、請求項７１８～７６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６５】
前記タンパク質標的が、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択される、請求項７１８～７６４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６６】
前記タンパク質結合試薬が、同一の配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項７１８～７６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６７】
前記タンパク質結合試薬が、異なる細胞同定配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる、請求項７１８～７６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６８】
前記複数の細胞同定組成物の前記細胞同定組成物が、前記細胞同定オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬を含む、請求項７１８～７６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７６９】
前記タンパク質結合試薬および前記第２のタンパク質結合試薬が同一である、請求項７６８に記載の方法。
【請求項７７０】
前記タンパク質結合試薬が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項７１８～７６９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７１】
２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞を同定する工程が、
複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、
前記複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列、および標的結合領域を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードの前記バーコード配列が、異なる配列を含み、前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；
得られた前記シーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と、
を含む、請求項７１８～７７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７２】
得られた前記シーケンシングデータから、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除去する工程を含む、請求項７７１に記載の方法。
【請求項７７３】
その後の分析から、前記２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた前記１つ以上の細胞標識配列に関連付けられた前記シーケンシングデータを除外する工程を含む、請求項７７１に記載の方法。
【請求項７７４】
前記複数のバーコードのバーコードが、標的結合領域およびバーコード配列を含み、
前記複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる分子標識配列を含む、請求項７１８～７７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７５】
前記バーコードが、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、または

それらの任意の組合せを含む、請求項７７４に記載の方法。
【請求項７７６】
前記標的結合領域が、ポリ（ｄＴ）領域を含む、請求項７７１～７７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７７】
前記複数のバーコードが、１つの粒子に関連付けられる、請求項７７１～７７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７７８】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に固定される、請求項７７７に記載の方法。
【請求項７７９】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子上に部分的に固定される、請求項７７７に記載の方法。
【請求項７８０】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子に封入される、請求項７７７に記載の方法。
【請求項７８１】
前記複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードが、前記粒子に部分的に封入される、請求項７７７に記載の方法。
【請求項７８２】
前記粒子が崩壊性である、請求項７７７～７８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８３】
前記粒子がビーズを含む、請求項７７７～７８２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８４】
前記粒子が、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項７７７～７８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８５】
前記粒子が、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含む、請求項７７７～７８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８６】
前記粒子が、崩壊性ヒドロゲル粒子を含む、請求項７７７～７８５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８７】
前記粒子が、検出可能な部分に関連付けられる、請求項７７７～７８６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８８】
前記細胞同定オリゴヌクレオチドが、検出可能な部分に関連付けられる、請求項７７７～７８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８９】
前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含む、請求項７７７～７８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９０】
前記粒子の前記バーコードが、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択

されるバーコード配列を含む、請求項７７７～７８９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９１】
前記バーコードの前記バーコード配列が、ランダム配列を含む、請求項７８９～７９０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９２】
前記粒子が、少なくとも１００００のバーコードを含む、請求項７７７～７９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９３】
前記複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程が、
前記複数のバーコードを、前記細胞同定オリゴヌクレオチドと接触させて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；
前記細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされた前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、
を含む、請求項７７１～７９２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９４】
前記バーコードを伸長する工程が、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項７９３に記載の方法。
【請求項７９５】
前記バーコードを伸長する工程が、逆転写酵素を用いて、前記バーコードを伸長して、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項７９３に記載の方法。
【請求項７９６】
複数のアンプリコンを生成するために、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含む、請求項７９３～７９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９７】
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを増幅する工程が、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記細胞同定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含む、請求項７９６に記載の方法。
【請求項７９８】
前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドの前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む、請求項７９６～７９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７９９】
前記シーケンシングデータを取得する工程が、前記バーコード配列の少なくとも一部および前記細胞同定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む、請求項７９８に記載の方法。
【請求項８００】
前記複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、前記複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程が、複数のバーコードを用いて、前記細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む、請求項７７１～７９９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０１】
標識生体分子試薬を調製するのに使用するためのシステムであって、
標識生体分子試薬に対するリクエストを受信するための入力マネージャと；
複数の標識生体分子ストレージ識別子を含むデータセットを記憶するためのメモリと；
前記メモリに通信可能に連結され、前記標識生体分子試薬リクエストの前記構成要素に

対応する前記データセットからの１つ以上の標識生体分子ストレージ識別子を同定するように構成される処理モジュールと；
前記同定された標識生体分子ストレージ識別子を提供するための出力マネージャと、
を含む、システム。
【請求項８０２】
標識生体分子試薬に対する前記リクエストが、生体分子リクエストおよび標識リクエストを含む、請求項８０１に記載のシステム。
【請求項８０３】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８０１～８０２のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８０４】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項８０３に記載のシステム。
【請求項８０５】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項８０３に記載のシステム。
【請求項８０６】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項８０５に記載のシステム。
【請求項８０７】
前記標識と結合された前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項８０５に記載のシステム。
【請求項８０８】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８０７に記載のシステム。
【請求項８０９】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項８０７に記載のシステム。
【請求項８１０】
前記生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項８０１～８０９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８１１】
前記生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項８０１～８０９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８１２】
前記生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる生体分子から選択される、請求項８０１～８０９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８１３】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８０１～８１２のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８１４】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項８１３に記載のシステム。
【請求項８１５】
前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項８１４に記載のシステム。

【請求項８１６】
前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項８１５に記載のシステム。
【請求項８１７】
前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項８１４～８１６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８１８】
前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８１４～８１７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８１９】
前記標識リクエストが、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む、請求項８１４～８１８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８２０】
前記オリゴヌクレオチドが、前記生体分子のための一意識別子を含む、請求項８１３に記載のシステム。
【請求項８２１】
前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項８２０に記載のシステム。
【請求項８２２】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項８２０～８２１

のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８２３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項８２２に記載のシステム。
【請求項８２４】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項８２２に記載のシステム。
【請求項８２５】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項８２２に記載のシステム。
【請求項８２６】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項８１３～８２５のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８２７】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項８２６に記載のシステム。
【請求項８２８】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項８２６または８２７に記載のシステム。
【請求項８２９】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項８１３～８２８のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８３０】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項８１３～８２９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８３１】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項８１３～８２９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８３２】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項８１３～８２９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８３３】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項８０１～８３２のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８３４】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項８３３に記載のシステム。
【請求項８３５】
前記リンカーが化学基を含む、請求項８３４に記載のシステム。
【請求項８３６】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項８３５に記載のシステム。
【請求項８３７】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項８３５～８３６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項８３８】
標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程であって、前記リクエストが、
標識生体分子リクエスト；ならびに
生体分子リクエストおよび標識リクエスト
のうちの１つ以上を含む工程と；

１つ以上の標識生体分子試薬を受信する工程であって、各標識生体分子試薬が、リンカーを介して標識に共有結合された生体分子を含む工程と、
を含む、方法。
【請求項８３９】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８３８に記載の方法。
【請求項８４０】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項８３９に記載の方法。
【請求項８４１】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項８３９に記載の方法。
【請求項８４２】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項８４１に記載の方法。
【請求項８４３】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項８４１に記載の方法。
【請求項８４４】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８４３に記載の方法。
【請求項８４５】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項８４３に記載の方法。
【請求項８４６】
各生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項８３８～８４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４７】
各生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項８３８～８４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４８】
各生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる分子から選択される、請求項８３８～８４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８４９】
前記１つ以上の標識生体分子試薬が、前記標識に共有結合されない１つ以上の第２の生体分子をさらに含む、請求項８３８～８４８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５０】
前記生体分子および前記１つ以上の第２の生体分子が同じである、請求項８４９に記載の方法。
【請求項８５１】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、およびオリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８３８～８５０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８５２】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項８５１に記載の方法。
【請求項８５３】

前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項８５２に記載の方法。

【請求項８５４】

前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項８５３に記載の方法。

【請求項８５５】

前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項８５２～８５４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８５６】

前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８５２～８５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８５７】

前記標識リクエストが、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む、請求項８５２～８５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８５８】

前記オリゴヌクレオチドが、前記生体分子のための一意識別子を含む、請求項８５１に記載の方法。

【請求項８５９】

前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項８５８に記載の方法。

【請求項８６０】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項８５８～８５９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６１】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項８６０に記載の方法。
【請求項８６２】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項８６０に記載の方法。
【請求項８６３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項８６０に記載の方法。
【請求項８６４】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項８５８～８６３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６５】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項８６４に記載の方法。
【請求項８６６】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項８６４または８６５に記載の方法。
【請求項８６７】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項８５８～８６６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６８】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項８５８～８６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８６９】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項８５８～８６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７０】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項８５８～８６７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７１】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項８３８～８７０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７２】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項８７１に記載の方法。
【請求項８７３】
前記リンカーが化学基を含む、請求項８７２に記載の方法。
【請求項８７４】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項８７３に記載の方法。
【請求項８７５】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項８７３～８７４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７６】
標識生体分子試薬リクエストを受信するための入力マネージャ；
複数の標識生体分子ストレージ識別子を含むデータセットを記憶するためのメモリ；

前記メモリに通信可能に連結され、前記標識生体分子試薬リクエストの前記構成要素に対応する前記データセットからの１つ以上の標識生体分子ストレージ識別子を同定するように構成される処理モジュール；および
前記同定された標識生体分子ストレージ識別子を提供するための出力マネージャ
を含むシステムに、標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程と；
標識に共有結合された生体分子を含む標識生体分子試薬を受信する工程と、
を含む、方法。
【請求項８７７】
標識生体分子試薬に対する前記リクエストが、生体分子リクエストおよび標識リクエストを含む、請求項８７６に記載の方法。
【請求項８７８】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、および多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８７６～８７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８７９】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項８７８に記載の方法。
【請求項８８０】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項８７８に記載の方法。
【請求項８８１】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項８８０に記載の方法。
【請求項８８２】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項８８０に記載のシステム。
【請求項８８３】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８８２に記載のシステム。
【請求項８８４】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項８８２に記載のシステム。
【請求項８８５】
前記生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項８７６～８８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８６】
前記生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項８７６～８８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８７】
前記生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる生体分子から選択される、請求項８７６～８８４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８８】
前記標識生体分子試薬を受信する工程が、前記標識に共有結合された前記標識生体分子および前記標識に共有結合されない１つ以上の第２の生体分子を受信する工程を含む、請求項８７６～８８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８８９】
前記標識生体分子および前記１つ以上の第２の生体分子が同じである、請求項８８８に記載の方法。
【請求項８９０】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、

触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８７６～８８９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８９１】

前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、

前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項８９０に記載の方法。

【請求項８９２】

前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項８９１に記載の方法。

【請求項８９３】

前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項８９２に記載の方法。

【請求項８９４】

前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項８９１～８９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８９５】

前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項８９１～８９４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項８９６】

前記標識リクエストが、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む、請求項８９１～８９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８９７】
前記オリゴヌクレオチドが、前記生体分子のための一意識別子を含む、請求項８９０に記載の方法。
【請求項８９８】
前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項８９７に記載の方法。
【請求項８９９】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項８９７～８９８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９００】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項８９９に記載の方法。
【請求項９０１】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項８９９に記載の方法。
【請求項９０２】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項８９９に記載の方法。
【請求項９０３】
前記オリゴヌクレオチドが、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項８９７～９０２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０４】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項９０３に記載の方法。
【請求項９０５】
前記リンカーが化学基を含む、請求項９０３に記載の方法。
【請求項９０６】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項９０５に記載の方法。
【請求項９０７】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項９０５～９０６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０８】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項８９７～９０７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９０９】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項９０８に記載の方法。
【請求項９１０】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項９０８または９０９に記載の方法。
【請求項９１１】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項８９７～９１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１２】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項８９７～９１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１３】

前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項８９７～９１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１４】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項８９７～９１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１５】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項８７６～９１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９１６】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項９１５に記載の方法。
【請求項９１７】
前記リンカーが化学基を含む、請求項９１６に記載の方法。
【請求項９１８】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項９１７に記載の方法。
【請求項９１９】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項９１７～９１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２０】
標識生体分子試薬に対するリクエストを受信する工程であって、前記リクエストが、
標識生体分子リクエスト；ならびに
生体分子リクエストおよび標識リクエスト
のうちの１つ以上を含む工程と；
活性化生体分子を、活性化標識と接触させて、前記標識生体分子試薬を生成することによって、前記標識生体分子試薬リクエストに対応する標識生体分子試薬を調製する工程と、
を含む方法であって、
前記調製する工程が、複数の活性化生体分子および複数の活性化標識を含むストレージから、活性化生体分子および活性化標識を選択する工程を含む、方法。
【請求項９２１】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、および多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９２０に記載の方法。
【請求項９２２】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項９２１に記載の方法。
【請求項９２３】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項９２１に記載の方法。
【請求項９２４】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項９２３に記載の方法。
【請求項９２５】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項９２３に記載のシステム。
【請求項９２６】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９２５に記載のシステム。
【請求項９２７】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項９

２５に記載のシステム。
【請求項９２８】
前記生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項９２０～９２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９２９】
前記生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項９２０～９２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３０】
前記生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる生体分子から選択される、請求項９２０～９２７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３１】
前記標識生体分子を調製する工程が、前記標識生体分子試薬リクエストに対応する前記標識生体分子試薬を調製する工程と、前記標識に関連付けられない１つ以上の第２の生体分子試薬を調製する工程と、を含む、請求項９２０～９３０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３２】
前記生体分子および前記１つ以上の第２の生体分子が同じである、請求項９３１に記載の方法。
【請求項９３３】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９２０～９３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３４】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項９３３に記載の方法。
【請求項９３５】
前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項９３４に記載の方法。
【請求項９３６】
前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項９３５に記載の方法。
【請求項９３７】
前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、

グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項９３３～９３６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９３８】

前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９３３～９３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９３９】

前記標識リクエストが、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む、請求項９３３～９３８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４０】

前記オリゴヌクレオチドが、前記生体分子のための一意識別子を含む、請求項９３３に記載の方法。

【請求項９４１】

前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項９４０に記載の方法。

【請求項９４２】

前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項９４０～９４１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４３】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項９４２に記載の方法。

【請求項９４４】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項９４３に記載の方法。

【請求項９４５】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項９４３に記載の方法。

【請求項９４６】

前記１つ以上の標識生体分子試薬の生体分子が、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項９４０～９４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４７】

前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項９４０～９４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９４８】

前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項９４７に記載の方法。

【請求項９４９】

前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項９４７または９４８に記載の方法。

【請求項９５０】

前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項９４０～９４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５１】

前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項９４０～９５０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５２】

前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項９４０～９５０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５３】

前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項９４０～９５０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５４】

前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項９２０～９５３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５５】

前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項９５４に記載の方法。

【請求項９５６】

前記リンカーが化学基を含む、請求項９５５に記載の方法。

【請求項９５７】

前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項９５６に記載の方法。

【請求項９５８】

前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項９５６～９５７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９５９】

標識生体分子試薬リクエストを受信する入力マネージャ；

複数の標識生体分子ストレージ識別子を含むデータセットを記憶するためのメモリ；

前記メモリに通信可能に連結され、前記標識生体分子試薬リクエストの前記構成要素に対応する前記データセットからの１つ以上の標識生体分子ストレージ識別子を同定するように構成される処理モジュール；および

出力マネージャ

を含むシステムを用いて、標識生体分子試薬に対するリクエストを受信する工程と；

前記標識生体分子試薬リクエストに対応する前記標識生体分子ストレージ識別子を同定する工程と；

前記同定された標識生体分子試薬ストレージ識別子を出力する工程と、

を含む、方法。

【請求項９６０】

標識生体分子試薬に対する前記リクエストが、生体分子リクエストおよび標識リクエストを含む、請求項９５９に記載の方法。

【請求項９６１】

前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、および多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９５９～９６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９６２】

前記生体分子が核酸である、請求項９６１に記載の方法。

【請求項９６３】

前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項９６２に記載の

方法。
【請求項９６４】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素、またはタンパク質結合試薬である、請求項９６１に記載の方法。
【請求項９６５】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項９６４に記載の方法。
【請求項９６６】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項９６４に記載のシステム。
【請求項９６７】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９６６に記載のシステム。
【請求項９６８】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項９６４に記載のシステム。
【請求項９６９】
前記生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項９５９～９６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７０】
前記生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項９５９～９６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７１】
前記生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる生体分子から選択される、請求項９５９～９６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７２】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、およびオリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９５９～９７１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７３】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項９７２に記載の方法。
【請求項９７４】
前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項９７３に記載の方法。
【請求項９７５】
前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート

、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項９７４に記載の方法。
【請求項９７６】
前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項９７３～９７５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７７】
前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９７３～９７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７８】
前記標識リクエストが、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む、請求項９７３～９７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９７９】
前記オリゴヌクレオチドが、前記生体分子のための一意識別子を含む、請求項９７２に記載の方法。
【請求項９８０】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項９７９に記載の方法。
【請求項９８１】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項９８０に記載の方法。
【請求項９８２】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項９８０に記載の方法。
【請求項９８３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項９８０に記載の方法。
【請求項９８４】
前記１つ以上の標識生体分子試薬の生体分子が、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項９７９～９８３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９８５】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項９７９～９８４

のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９８６】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項９８５に記載の方法。
【請求項９８７】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項９８５または９８６に記載の方法。
【請求項９８８】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項９７９～９８７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９８９】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項９７９～９８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９０】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項９７９～９８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９１】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項９７９～９８８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９２】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項９５９～９９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９３】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項９９２に記載の方法。
【請求項９９４】
前記リンカーが化学基を含む、請求項９９３に記載の方法。
【請求項９９５】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項９９４に記載の方法。
【請求項９９６】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項９９４～９９５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９７】
複数の活性化タンパク質結合試薬を含む複数の活性化生体分子と；
複数の活性化標識と；
標識生体分子試薬を調製するための試薬調製装置と、
を含むシステムであって、
前記試薬調製装置が、
同定された生体分子ストレージ識別子および標識ストレージ識別子を受信し；
前記受信された生体分子ストレージ識別子および前記標識ストレージ識別子に対応する標識生体分子試薬を生成するように構成される、システム。
【請求項９９８】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、および多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９９７に記載のシステム。
【請求項９９９】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項９９８に記載のシステム。
【請求項１０００】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項９９

８に記載のシステム。
【請求項１００１】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項１０００に記載のシステム。
【請求項１００２】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項１０００に記載のシステム。
【請求項１００３】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１００２に記載のシステム。
【請求項１００４】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項１００２に記載のシステム。
【請求項１００５】
各生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項９９７～１００４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１００６】
各生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項９９７～１００４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１００７】
各生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる生体分子から選択される、請求項９９７～１００４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１００８】
各活性化生体分子が、反応性リンカーを含む、請求項９９７～１００７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１００９】
前記システムが、１００以上の異なる活性化標識を含む、請求項９９７～１００７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０１０】
活性化標識が、反応性リンカーを含む、請求項９９７～１００９のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０１１】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項９９７～１０１０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０１２】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項１０１１に記載のシステム。
【請求項１０１３】
前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項１０１２に記載のシステム。
【請求項１０１４】
前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル

、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０１３に記載のシステム。

【請求項１０１５】

前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項１０１１～１０１４のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項１０１６】

前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０１１～１０１５のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項１０１７】

前記標識リクエストが、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む、請求項１０１１～１０１６のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項１０１８】

前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含む、請求項１０１１に記載のシステム。

【請求項１０１９】

前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項１０１８に記載のシステム。

【請求項１０２０】

前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項１０１８～１０１９のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項１０２１】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項１０２０に記載のシステム。

【請求項１０２２】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０２０に記載のシステム。
【請求項１０２３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０２０に記載のシステム。
【請求項１０２４】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項１０１８～１０２３のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０２５】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０２４に記載のシステム。
【請求項１０２６】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０２４または１０２５に記載のシステム。
【請求項１０２７】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項１０１８～１０２６のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０２８】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される配列を有する、請求項１０１８～１０２７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０２９】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０１８～１０２７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０３０】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０１８～１０２７のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０３１】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項９９７～１０３０のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０３２】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項１０３１に記載のシステム。
【請求項１０３３】
前記リンカーが化学基を含む、請求項１０３２に記載のシステム。
【請求項１０３４】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項１０３３に記載のシステム。
【請求項１０３５】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項１０３３～１０３４のいずれか一項に記載のシステム。
【請求項１０３６】
複数の活性化生体分子；および複数の活性化標識を含む、ストレージ。
【請求項１０３７】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、および多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０３６に記載のストレージ。
【請求項１０３８】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項１０３７に記載

のストレージ。
【請求項１０３９】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項１０３７に記載のストレージ。
【請求項１０４０】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項１０３９に記載のストレージ。
【請求項１０４１】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項１０３９に記載のストレージ。
【請求項１０４２】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０４１に記載のストレージ。
【請求項１０４３】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項１０４１に記載のストレージ。
【請求項１０４４】
各生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項１０３６～１０４３のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０４５】
各生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項１０３６～１０４３のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０４６】
各生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる分子から選択される、請求項１０３６～１０４３のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０４７】
各活性化生体分子が、反応性リンカーを含む、請求項１０３６～１０４６のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０４８】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、およびナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０３６～１０４７のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０４９】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項１０４８に記載のストレージ。
【請求項１０５０】
前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項１０４９に記載のストレージ。
【請求項１０５１】
前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリ

ル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０５０に記載のストレージ。

【請求項１０５２】

前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項１０４８～１０５１のいずれか一項に記載のストレージ。

【請求項１０５３】

前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０４８～１０５２のいずれか一項に記載のストレージ。

【請求項１０５４】

前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含む、請求項１０４８に記載のストレージ。

【請求項１０５５】

前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項１０５４に記載のストレージ。

【請求項１０５６】

前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項１０５４～１０５５のいずれか一項に記載のストレージ。

【請求項１０５７】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項１０５６に記載のストレージ。

【請求項１０５８】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０５６に記載のストレージ。

【請求項１０５９】

前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０５６に記載のストレージ。

【請求項１０６０】

前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項１０５４～１０５９のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０６１】
前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０６０に記載のストレージ。
【請求項１０６２】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０６０または１０６１に記載のストレージ。
【請求項１０６３】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項１０５４～１０６２のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０６４】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０５４～１０６３のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０６５】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０５４～１０６３のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０６６】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０５４～１０６３のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０６７】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項１０３６～１０６６のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０６８】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項１０６７に記載のストレージ。
【請求項１０６９】
前記リンカーが化学基を含む、請求項１０６８に記載のストレージ。
【請求項１０７０】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項１０６９に記載のストレージ。
【請求項１０７１】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項１０６９～１０７０のいずれか一項に記載のストレージ。
【請求項１０７２】
標識生体分子試薬に対するリクエストを受信するための入力モジュールと；
試薬調製装置と；
包装された標識生体分子を出力するための分配モジュールと、
を含む標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０７３】
前記生体分子が、ポリペプチド、核酸、および多糖、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０７２に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０７４】
前記核酸が、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである、請求項１０７３に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０７５】
前記ポリペプチドが、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬である、請求項１０７３に記載の標識生体分子試薬分配システム。

【請求項１０７６】
前記タンパク質結合試薬が、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含む、請求項１０７５に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０７７】
前記タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、請求項１０７５に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０７８】
前記複数のタンパク質標的が、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０７７に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０７９】
前記複数のタンパク質標的が、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む、請求項１０７７に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８０】
各生体分子が、少なくとも１００の異なる生体分子から選択される、請求項１０７２～１０７９のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８１】
各生体分子が、少なくとも１，０００の異なる生体分子から選択される、請求項１０７２～１０７９のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８２】
各生体分子が、少なくとも１０，０００の異なる分子から選択される、請求項１０７２～１０７９のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８３】
各活性化生体分子が、反応性リンカーを含む、請求項１０７２～１０８２のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８４】
前記標識が、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、およびオリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０７２～１０８３のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８５】
前記標識が、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、
前記酵素が、前記酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である、請求項１０８４に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８６】
前記酵素基質が、少なくとも１つの官能基によって、前記対応する修飾酵素基質と異なる、請求項１０８５に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８７】
前記少なくとも１つの官能基が、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート

、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０８６に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８８】
前記酵素が、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む、請求項１０８４～１０８７のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０８９】
前記酵素基質が、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む、請求項１０８４～１０８８のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９０】
前記オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記タンパク質結合試薬のための一意識別子を含む、請求項１０８４に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９１】
前記一意識別子が、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む、請求項１０９０に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９２】
前記一意識別子が、一意識別子の多様なセットから選択される、請求項１０９０～１０９１のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９３】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む、請求項１０９２に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９４】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０９２に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９５】
前記一意識別子の多様なセットが、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む、請求項１０９２に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９６】
前記一意識別子が、サンプルのゲノム配列に対して相同でない、請求項１０９０～１０９５のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９７】

前記サンプルが、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０９６に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９８】
前記サンプルが、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである、請求項１０９６または１０９７に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１０９９】
前記オリゴヌクレオチドが、バーコード配列、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む、請求項１０９０～１０９８のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１００】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１０の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０９０～１０９９のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０１】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１００の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０９０～１０９９のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０２】
前記オリゴヌクレオチドの前記バーコード配列が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列から選択される、請求項１０９０～１０９９のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０３】
前記標識が、リンカーを介して前記生体分子に結合される、請求項１０７２～１１０２のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０４】
前記オリゴヌクレオチドが前記リンカーを含む、請求項１１０３に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０５】
前記リンカーが化学基を含む、請求項１１０４に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０６】
前記化学基が、前記生体分子に可逆的に結合される、請求項１１０５に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【請求項１１０７】
前記化学基が、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項１１０５～１１０６のいずれか一項に記載の標識生体分子試薬分配システム。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本出願は、米国特許法第１１９条（ｅ）に従い、２０１６年９月２６日出願の米国仮特許出願第６２／３９９，７９５号明細書；２０１７年２月２７日出願の米国仮特許出願第６２／４６４２７９号明細書；および２０１７年６月６日出願の米国仮特許出願第６２／５１５，９５２号明細書に基づく優先権を主張する。これらの関連出願の各々の内容は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。
【０００２】
配列表の参照
本出願は、電子フォーマットで配列表とともに出願される。配列表は、２０１７年９月

２４日に作成された、２，９８８バイトのサイズのＳｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＢＤＣＲＩ＿０２５Ａ．ｔｘｔという名称のファイルとして提供される。配列表の電子フォーマットでの情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００３】

本開示は、概して、分子生物学、より具体的には、タンパク質発現および遺伝子発現の同時測定に関する。

【背景技術】

【０００４】

現在の技術は、細胞の各々を、ピコリットルマイクロウェル中でバーコード付き試薬ビーズと共局在化（ｃｏ－ｌｏｃａｌｉｚｅｄ）させながら、細胞特異的オリゴヌクレオチドバーコードを、個々の細胞からのポリ（Ａ）ｍＲＮＡ分子に結合することによって、超並列的に（たとえば、１０，０００個を超える細胞で）単一細胞の遺伝子発現の測定を可能にする。他の利用可能な技術は、同時に９６～３８４個の単一細胞の遺伝子発現の測定を可能にする。インデックスソーティングは、まず、細胞を蛍光抗体で標識し、フローソーター（ｆｌｏｗ　ｓｏｒｔｅｒ）、たとえば、ＢＤ　ＦＡＣＳｓｅｑ機械によってソーティングすることによって行われうる。ＦＡＣＳｓｅｑは、１つのパラメータソーティングを可能にする手頃なフローソーターである。多数のタンパク質の発現を調べたい研究者の場合、より複雑な多色フローソーターを必要とするであろう。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

タンパク質発現を定量的に分析する方法およびシステム、ならびに細胞中のタンパク質発現および遺伝子発現の同時測定を可能にする方法およびシステムが求められる。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する。いくつかの実施形態では、一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは化学基を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはリンカーを含む。いくつかの実施形態では、化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に結合される。いくつかの実施形態では、化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子は、サンプルのゲノム配列に対して相同でない。いくつかの実施形態では、サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである。いくつかの実施形態では、サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１，０００の異なるタンパク

質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１０の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。複数の組成物は、オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬をさらに含みうる。タンパク質結合試薬および第２のタンパク質結合試薬は、同じでありうる。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む。

【０００７】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、サンプル中の複数のタンパク質標的の定量分析の方法であって、複数のタンパク質標的を含むサンプルを提供する工程と；オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する工程と；複数のタンパク質標的との特異的結合のために、複数の組成物をサンプルと接触させる工程と；結合されていない組成物を除去する工程と；複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する工程と；複数のオリゴヌクレオチドプローブを、複数の組成物のオリゴヌクレオチドと接触させる工程と；オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識核酸を生成する工程であって、標識核酸の各々が、一意識別子およびバーコード配列を含む工程と；各一意識別子のためのユニークバーコード配列の数を決定し、それによって、サンプル中の各タンパク質標的の量が決定される工程と、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは化学基を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはリンカーを含む。いくつかの実施形態では、化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に結合される。いくつかの実施形態では、化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サンプルは単一細胞を含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、単一細胞の表面上で発現される。いくつかの実施形態では、結合されていない組成物を除去する工程は、単一細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、単一細胞を溶解する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、オリゴヌクレオチドをタンパク質結合試薬から切り離す工程を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＵＶ光切断、化学

的処理（ジチオスレイトール）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、タンパク質結合試薬から切り離される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）を含む。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定される。いくつかの実施形態では、固体担体はビーズである。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数の標識核酸を増幅する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、増幅は、バーコード配列の少なくとも一部、および一意識別子の少なくとも一部のＰＣＲ増幅を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１，０００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１０，０００のユニークバーコード配列を含む。複数の組成物は、オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬をさらに含みうる。タンパク質結合試薬および第２のタンパク質結合試薬は、同じでありうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンをシーケンシングする工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、シーケンシングは、バーコード配列の少なくとも一部、および一意識別子の少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。

【０００８】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析の方法であって、複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子を含むサンプルを提供する工程と；オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する工程と；複数のタンパク質標的との特異的結合のために、複数の組成物をサンプルと接触させる工程と；結合されていない組成物を除去する工程と；複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する工程と；複数のオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリダイゼーションのために、組成物のオリゴヌクレオチドおよび複数の核酸標的分子と接触させる工程と；オリゴヌクレオチドおよび核酸標的分子にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識核酸を生成する工程であって、標識核酸の各々が、一意識別子または核酸標的分子、およびバーコード配列を含む工程と；各一意識別子および各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列の数を決定し、それによって、サンプル中の各タンパク質標的および各核酸標的分子の量が決定される工程と、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは化学基を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはリンカーを含む。いくつかの実施形態では、化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に結合される。いくつかの実施形態では、化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サンプルは単一細胞を含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、単一細胞の表面上

で発現される。いくつかの実施形態では、結合されていない組成物を除去する工程は、単一細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、単一細胞を溶解する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、オリゴヌクレオチドをタンパク質結合試薬から切り離す工程を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、ＵＶ光切断、化学的処理（ジチオスレイトール）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、タンパク質結合試薬から切り離される。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）を含む。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定される。いくつかの実施形態では、固体担体はビーズである。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数の標識核酸を増幅する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、増幅は、バーコード配列の少なくとも一部、一意識別子の少なくとも一部、および核酸標的分子の少なくとも一部のＰＣＲ増幅を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１，０００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１０，０００のユニークバーコード配列を含む。複数の組成物は、オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬をさらに含みうる。タンパク質結合試薬および第２のタンパク質結合試薬は、同じでありうる。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のアンプリコンをシーケンシングする工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、シーケンシングは、バーコード配列の少なくとも一部、一意識別子の少なくとも一部、および核酸標的分子の少なくとも一部をシーケンシングする工程を含む。

【０００９】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析のためのキットであって、オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物と、複数のオリゴヌクレオチドプローブと、を含み、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する、キットを提供する。本明細書に開示されるものには、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析のためのキットであって、オリゴヌクレオチドと各々が結合された２つ以上のタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合される前記２つ以上のタンパク質結合試薬のうちの１つのための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物と、複数のオリゴヌクレオチドプローブと、を含み、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する、キットが含まれる。本明細書に開示されるものには、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時の定量分析のためのキットであって、オリゴヌクレオチドと各々が結合された２つ以上のタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物と、複数のオリゴヌクレオチドプローブとを含み、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する、キットが含まれる。

【００１０】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブの各々が、細胞標識、ユニバー

サルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）を含む。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドプローブは、固体担体上に固定される。いくつかの実施形態では、固体担体はビーズである。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１，０００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、ユニークバーコード配列の多様なセットは、少なくとも１０，０００のユニークバーコード配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１０，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１００，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも１，０００，０００のオリゴヌクレオチドプローブを含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む。複数の組成物は、オリゴヌクレオチドと結合されない第２のタンパク質結合試薬をさらに含みうる。タンパク質結合試薬および第２のタンパク質結合試薬は、同じでありうる。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは化学基を含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドはリンカーを含む。いくつかの実施形態では、化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的に結合される。いくつかの実施形態では、化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子は、サンプルのゲノム配列に対して相同でない。いくつかの実施形態では、サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せである。いくつかの実施形態では、サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１０の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む。

【００１１】
本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、サンプル中のバイオマーカーを同定する方法であって、複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子を含むサンプルを提供する工程と；オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する工程と；複数のタンパク質標的との特異的結合のために、複数の組成物をサンプルと接触させる工程と；結合されていない組成物を除去する工程と；複数のオリゴヌクレオチドプローブを提供する工程であって、複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々が、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、バーコード配列が、ユニークバーコード配列の多様なセットに由来する工程と；複数のオリゴヌクレオチドプローブを、ハイブリダイゼーションのために、組成物のオリゴヌクレオチドおよび複数の核酸標的分子と接触させる工程と；オリゴヌクレオチドおよび核酸標的分子にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを伸長して、複数の標識核酸を生成する工程であって、前記標識核酸の各々が、一意識別子または核酸標的分子、およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含む工程と；各一意識別子および各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列の数を決定する工程と；タンパク質標的の量または核酸標的分子の量を用いて、バイオマーカーを同定する工程と、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも１つのタンパク質標的および少なくとも１つの核酸標的分子の量を決定する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも１つのタンパク質標的およびその対応する核酸標的分子の量を比較する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、タンパク質標的の量が、その対応する核酸標的分子より多い場合、バイオマーカーを同定する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、タンパク質標的の量が、その対応する核酸標的分子より少なくとも１０倍多い場合、バイオマーカーを同定する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、タンパク質標的の対応する核酸標的分子の量が１０未満である場合、バイオマーカーを同定する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、タンパク質標的の対応する核酸標的分子の量が０である場合、バイオマーカーを同定する工程を含む。

【００１２】
本明細書に開示されるものには、コントロール粒子組成物が含まれる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子に関連付けられた複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々は、コントロールバーコード配列およびポリ（ｄＡ）領域を含む。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含みうる。

【００１３】
いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～４５ヌクレオチド長、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せである。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せでありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも５、１０、１００、１０００、またはそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの約１０、１００、１０００、またはそれ以上のコントロールバーコード配列は、同一でありうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも３、５、１０、１００、またはそれ以上は、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。

【００１４】
いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含み、第１のコントロールバーコード配列および第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有する。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、またはそれ以上多くなりうる。
【００１５】
いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せでありうる。
【００１６】
いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを介してコントロール粒子に関連付けられる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。
【００１７】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、７．５マイクロメートル、またはそれらの組合せである。
【００１８】
いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に固定される。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に部分的に固定されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に封入されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に部分的に封入されうる。コントロール粒子は、崩壊性でありうる。コントロール粒子は、ビーズでありうる。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。コントロール粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。
【００１９】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられうる。
【００２０】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられる。第１のタンパク質結合試薬は、第１の

抗体を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタンパク質結合試薬に結合されうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【００２１】

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

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

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

【００２５】

標的の数を決定するための方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード（たとえば確率バーコード）を用いて、複数の細胞のうちの１つの細胞の複数の標的および複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付き標的（たとえば確率バーコード付き標的）および複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチド（たとえば、確率バーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチド）を生成する工程を含む。いくつかの実施形態では、複数の確率バーコードの各々は、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、および標的結合領域のうちの１つ以上を含む。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列は、異なる配列を含みうる。複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含みうる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられたコントロール粒子を含み、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの各々は、コントロールバーコード配列、および複数のバーコードの少な

くとも１つの標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む。本方法は、複数のバーコード付き標的および複数のバーコード付きコントロール粒子オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータ中のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程と、を含みうる。本方法は、複数の標的の少なくとも１つの標的について：シーケンシングデータ中の標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数をカウントする工程と；標的の数を推定する工程であって、推定された標的の数が、カウントされた標的に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数およびコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数と相関する工程と、を含みうる。

【００２６】

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

【００２７】

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

【００２８】

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

けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数の比率と相関しうる。

【００２９】

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

【００３０】

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

【００３１】

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

【００３２】

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

【００３３】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は崩壊性である。コントロール粒子は、コントロール粒子ビーズでありうる。コントロール粒子ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。コントロール粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００３４】

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

【００３５】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬は、第１の抗体を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタ

ンパク質結合試薬に結合されうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【００３６】

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

【００３７】

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

【００３８】

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

【００３９】

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

【００４０】

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

【００４１】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は崩壊性である。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。バーコーディングビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。バーコーディング粒子

は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００４２】

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

【００４３】

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

【００４４】

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

【００４５】

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

【００４６】

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

【００４７】
いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、第１のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、第２のコントロールバーコード配列を各々含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと、を含む。第１のコントロールバーコード配列および第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有しうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数および複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数より少なくとも２倍、１０倍、１００倍、またはそれ以上多くなりうる。

【００４８】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、上記の細胞のゲノム配列に対して相同でない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、上記の種のゲノム配列に対して相同でないことがある。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せでありうる。

【００４９】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してコントロール粒子に結合されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを介してコントロール粒子に関連付けられうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つは、リンカーを含みうる。化学基は、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも１つに可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【００５０】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子の直径は、約１～１０００マイクロメートル、約１０～１００マイクロメートル、約７．５マイクロメートル、またはそれらの組合せである。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に固定される。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子上に部分的に固定されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に封入されうる。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子に部分的に封入されうる。

【００５１】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子は崩壊性である。コントロール粒子は、コントロール粒子ビーズでありうる。コントロール粒子ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。コントロール粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００５２】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられうる。

【００５３】
いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬に関連付けられ、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬は、第１の抗体を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタンパク質結合試薬に結合されうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【００５４】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬は、異なるコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上に関連付けられうる。複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドのいずれにも関連付けることができない。コントロール粒子オリゴヌクレオチドに関連付けられた第１のタンパク質結合試薬およびいずれのコントロール粒子オリゴヌクレオチドにも関連付けられない第１のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。コントロール粒子は、複数の第２のタンパク質結合試薬に関連付けられうる。複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つに関連付けられうる。第１のタンパク質結合試薬に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび第２のタンパク質結合試薬に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。第１のタンパク質結合試薬および第２のタンパク質結合試薬は、同一のタンパク質結合試薬でありうる。

【００５５】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬に関連付けられ、第１のタンパク質結合試薬は、パートナー結合試薬を用いてコントロール粒子に関連付けられる。パートナー結合試薬は、パートナー抗体を含みうる。パートナー抗体は、抗ネコ抗体、抗ニワトリ抗体、抗ウシ抗体、抗イヌ抗体、抗ロバ抗体、抗ヤギ抗体、抗モルモット抗体、抗ハムスター抗体、抗ウマ抗体、抗ヒト抗体、抗ラマ抗体、抗サル抗体、抗マウス抗体、抗ブタ抗体、抗ウサギ抗体、抗ラット抗体、抗ヒツジ抗体、またはそれらの組合せを含みうる。パートナー抗体は、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）、Ｆ（ａｂ’）フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、それらの組合せ、またはそれらのフラグメントを含みうる。

【００５６】
いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。第２のタンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【００５７】
いくつかの実施形態では、キットは、複数のバーコードを含む。複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含むことができ、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列は、異なる分子標識配列を含みうる。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含む。

【００５８】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定される。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バー

コーディング粒子に部分的に封入されうる。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、第２のビーズでありうる。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。バーコーディング粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００５９】

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

【００６０】

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

【００６１】

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

【００６２】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、

シーケンシングデータ中の複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を決定する工程と；複数のバーコード付きのコントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられた識別可能な配列を有する細胞標識配列の数を用いて、１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含む。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。本方法は、決定された１つ以上の細胞の数および複数の細胞の数の比率に基づいて、単一細胞捕捉効率を決定する工程を含みうる。

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

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

【００６６】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にある。複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含みうる。タンパク質結合試薬は、抗体を含みうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【００６７】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列

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

【００６８】

いくつかの実施形態では、バーコードは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入される。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入される。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。バーコーディングビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。バーコーディング粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００６９】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、光学的部分に関連付けられる。コントロールオリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられうる。

【００７０】

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

【００７１】

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

タを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含む。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部およびコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。

【００７２】

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

【００７３】

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

【００７４】

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

【００７５】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程は、シーケンシングデータ中の各細胞標識について、細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列およびコントロールバーコード配列の数を決定する工程と；細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列およびコントロールバーコード配列の数を用いて、１つ以上の細胞の数を決定する工程と、を含みうる。細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列およびコントロールバーコード配列の数を決定する工程は、シーケンシングデータ中の各細胞標識について、細胞標識に

関連付けられた最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列およびコントロールバーコード配列の数を決定する工程を含む。細胞標識に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列およびコントロールバーコード配列の数を用いて、１つ以上の細胞の数を決定する工程は、最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数に関連付けられたシーケンシングデータ中の細胞標識の数を用いて、最高数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数のプロットを作成する工程と；１つ以上の細胞の数としてプロットにおけるカットオフを決定する工程と、を含みうる。

【００７６】

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

【００７７】

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

【００７８】

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

【００７９】

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

【００８０】

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

【００８１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入されうる。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。いくつかの実施形態で

は、バーコーディングビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含む。バーコーディング粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。バーコーディング粒子は、光学的部分に関連付けられうる。

【００８２】

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

【００８３】

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

【００８４】

シーケンシングコントロールのための方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、複数の細胞の１つ以上の細胞を、複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的および複数のタンパク質標的を含み、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、コントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列、および複数のバーコードの少なくとも１つの標的結合領域に実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；複数のコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特性を用いて、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特性を決定する工程と、を含む。擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【００８５】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、少なくとも６ヌクレオチド

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

【００８６】

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

【００８７】

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

【００８８】

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

【００８９】

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

【００９０】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にある。複数のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含みうる。タンパク質結合試薬は、抗体を含みうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。コントロールオリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【００９１】

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

【００９２】

いくつかの実施形態では、バーコードは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含む。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、バーコーディング粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に封入される。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、バーコーディング粒子に部分的に封入される。バーコーディング粒子は、崩壊性でありうる。バーコーディング粒子は、バーコーディングビーズでありうる。バーコーディングビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。バーコーディング粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。バーコーディング粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【００９３】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、光学的部分に関連付けられる。コントロールオリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられうる。

【００９４】

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

【００９５】

いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、またはそれ以上の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を

含む。いくつかの実施形態では、バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含む。いくつかの実施形態では、バーコーディング粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含む。

【００９６】

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

【００９７】

本明細書に開示されるものには、細胞同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々および第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、および／または標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に関連付けられた細胞標識配列を同定する工程と；得られたシーケンシングデータから、細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程および／またはその後の分析から、細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【００９８】

本明細書に開示されるものには、多重同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々および第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工

程と；複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、および／または標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、得られたシーケンシングデータから、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程および／またはその後の分析から、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【００９９】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物の第１の細胞同定組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物の第２の細胞同定組成物と接触させる工程と、を含む。

【０１００】

いくつかの実施形態では、細胞同定配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せである。細胞同定オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞同定組成物の少なくとも１０、１００、１０００、またはそれ以上の細胞同定組成物の細胞同定配列は、異なる配列を含む。

【０１０１】

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

【０１０２】

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

【０１０３】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つの細胞同定組成物の結合されていない細胞同定組成物を除去する工程を含む。結合されていない細胞同定組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。結合されていない細胞同定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つの細胞同定組成物の少なくとも１つの抗原結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を溶解する工程を含む。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、抗原結合試薬から切り離し可能または切り離し不可能であるように構成される。本方法は、抗原結合試薬から細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離

す工程は、ＵＶ光切断、化学的処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元試薬を用いて）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、抗原結合試薬から細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０１０５】

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

【０１０６】

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

【０１０７】

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

【０１０８】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる。抗原結合試薬は、異なる細胞同定配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数の細胞同定組成物の細胞同定組成物は、細胞同定オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬および第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。

【０１０９】

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

【０１１０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。粒子は、ポリジメチルシロキサン／（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群か

ら選択される材料を含みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。細胞同定オリゴヌクレオチドは、光学的部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子のバーコードは、少なくとも１０００、１００００、またはそれ以上の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含みうる。バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０１１５】

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

【０１１６】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含む。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）によってバーコード付き標的

を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０１１７】

本明細書に開示されるものには、細胞同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々および第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、複数の細胞同定組成物の２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、および／または標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と；得られたシーケンシングデータから、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程および／またはその後の分析から、２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程と、含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【０１１８】

本明細書に開示されるものには、多重同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々および第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の細胞成分標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、細胞成分結合試薬が、１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、複数の細胞同定組成物の２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、および／または標的結合領域を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の多細胞標識配列を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、得られたシーケンシングデータから、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去する工程および／またはその後の分析から、１つ以上の多細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除外する工程を含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物の第１の細胞同定組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物の第２の細胞同定組成物と接触させる工程と、を含む。

【０１２０】

いくつかの実施形態では、細胞同定配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せである。細胞同定オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞同定組成物の少なくとも１０、１００、１０００、またはそれ以上の細胞同定組成物の細胞同定配列は、異なる配列を含む。

【０１２１】

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

【０１２２】

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

【０１２３】

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

【０１２４】

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

【０１２５】

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

【０１２６】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞は、腫瘍細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む。細胞同定オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合領域

を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的な細胞同定オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０１２７】

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

【０１２８】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる。細胞成分結合試薬は、異なる細胞同定配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数の細胞同定組成物の細胞同定組成物は、細胞同定オリゴヌクレオチドと結合されない第２の細胞成分結合試薬を含みうる。細胞成分結合試薬および第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。

【０１２９】

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

【０１３０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。細胞同定オリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる。

【０１３２】

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

【０１３３】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、細胞同定オリゴヌクレオチドと接触させて、細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と

；細胞同定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。

【０１３４】

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

【０１３５】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０１３６】

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

【０１３７】

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

【０１３８】

本明細書に開示されるものには、細胞同定のための方法が含まれる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の各々からの１つ以上の細胞を、複数の２つの細胞同定組成物のそれぞれの細胞同定組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々および第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、２つの細

胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【０１３９】

多重同定のための方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の各々からの１つ以上の細胞を、複数の２つの細胞同定組成物のそれぞれの細胞同定組成物と接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々および第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた抗原結合試薬を含み、抗原結合試薬が、１つ以上の抗原標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が、異なる配列を含む工程と；多細胞として２つ以上の細胞同定配列に各々が関連付けられた１つ以上の細胞を同定する工程と、を含む。

【０１４０】

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

【０１４１】

いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物のそれぞれと接触させる工程は、第１の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物の第１の細胞同定組成物と接触させる工程と；第１の複数の細胞を、２つの細胞同定組成物の第２の細胞同定組成物と接触させる工程と、を含む。

【０１４２】

いくつかの実施形態では、細胞同定配列は、少なくとも６ヌクレオチド長、２５～６０ヌクレオチド長（たとえば４５ヌクレオチド長）、約１２８ヌクレオチド長、少なくとも１２８ヌクレオチド長、約２００～５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せである。細胞同定オリゴヌクレオチドは、約５０ヌクレオチド長、約１００ヌクレオチド長、約２００ヌクレオチド長、少なくとも２００ヌクレオチド長、約２００～３００ヌクレオチド長未満、約５００ヌクレオチド長、またはそれらの組合せでありうる。いくつかの実施形態では、複数の細胞同定組成物の少なくとも１０、１００、１０００、またはそれ以上の細胞同定組成物の細胞同定配列は、異なる配列を含む。

【０１４３】

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

【０１４４】
いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含む。１つ以上の抗原標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。いくつかの実施形態では、本方法は、２つの細胞同定組成物の結合されていない細胞同定組成物を除去する工程を含む。結合されていない細胞同定組成物を除去する工程は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞の細胞を、洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。結合されていない細胞同定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、２つの細胞同定組成物の少なくとも１つの抗原結合試薬に結合された細胞を選択する工程を含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を溶解する工程を含む。

【０１４５】
いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、抗原結合試薬から切り離し可能または切り離し不可能であるように構成される。本方法は、抗原結合試薬から細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学的処理（たとえば、ジチオスレイトールなどの還元試薬を用いて）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、抗原結合試薬から細胞同定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０１４６】
いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、１つ以上の細胞のいずれかのゲノム配列に対して相同でない。コントロールバーコード配列は、１つの種のゲノム配列に対して相同でないことがある。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せである。

【０１４７】
いくつかの実施形態では、第１の複数の細胞および第２の複数の細胞は、腫瘍細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含む。細胞同定オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含みうる。バーコードは、捕捉配列を含む標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。バーコードの捕捉配列に相補的な細胞同定オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。

【０１４８】
いくつかの実施形態では、抗原標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む。抗原標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合せを含みうる。抗原標的は、脂質、炭水化物、またはそれらの任意の組合せを含みうる。抗原標的は、１０～１００の異なる抗原標的を含む群から選択されうる。

【０１４９】
いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられる。抗原結合試薬は、異なる細胞同定配列を有する２つ以上の細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。複数の細胞同定組成物の細胞同定組成物は、細胞同定オリゴヌクレオチドと結合されない第２の抗原結合試薬を含みうる。抗原結合試薬および第２の抗原結合試薬は、同一でありうる。

【０１５０】
いくつかの実施形態では、複数のバーコードのバーコードは、標的結合領域およびバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含み、複数のバーコードの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列は、異なる分子標識配列を含む。バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含みうる。標的結合領域は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、粒子に関連付けられうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子はビーズでありうる。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。

【０１５２】

いくつかの実施形態では、抗原結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられる。いくつかの実施形態では、粒子は、検出可能な部分に関連付けられる。細胞同定オリゴヌクレオチドが、光学的部分に関連付けられる。

【０１５３】

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

【０１５４】

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

【０１５５】

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

【０１５６】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程

は、複数の確率バーコードを用いて、細胞同定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０１５７】

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

【０１５８】

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

【０１５９】

タンパク質間相互作用を決定するための方法が本明細書に開示される。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、細胞が、第１のタンパク質標的および第２のタンパク質標的を含み、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられたタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列および架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む工程と；架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；複数のバーコードを用いて、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きの相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、バーコード配列および捕捉配列を含む工程と；複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列の関連付けに基づいて、第１および第２のタンパク質標的の間の相互作用を決定する工程と、を含む。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、細胞が、第１の細胞成分標的および第２の細胞成分標的を含み、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられた細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方の細胞成分結合試薬が、第１の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方の細胞成分結合試薬が、第２の細胞成分標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列および架橋オリゴヌクレオチ

ドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む工程と；架橋オリゴヌクレオチドを用いて、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；複数のバーコードを用いて、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きの相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、バーコード配列および捕捉配列を含む工程と；複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータ中の相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列の関連付けに基づいて、第１および第２の細胞成分標的の間の相互作用を決定する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、２つの細胞成分結合試薬の少なくとも１つは、タンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬は、２つの相互作用決定オリゴヌクレオチドのうちの１つに関連付けられ、１つ以上の細胞成分標的は、少なくとも１つのタンパク質標的を含む。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対の各々と、連続的にまたは同時に接触させる工程を含む。第１のタンパク質標的は、第２のタンパク質標的と同じでありうる。第１のタンパク質標的は、第２のタンパク質標的と異なりうる。

【０１６２】

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

【０１６３】

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

【０１６４】

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

【０１６５】

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

【０１６６】

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

【０１６７】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、インテグリン、またはそれらの組合せを含む。

【０１６８】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合される。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的にまたは不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合またはそれらの任意の組合せを含みうる。１つ以上のタンパク質標的の少なくとも１つは、細胞表面上にありうる。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる前に、細胞を固定する工程を含む。本方法は、相互作用決定組成物の第１の対の結合されていない相互作用決定組成物を除去する工程を含みうる。結合されていない相互作用決定組成物を除去する工程は、細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。結合されていない相互作用決定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを用いて、細胞を選択する工程を含みうる。本方法は、細胞を溶解する工程を含みうる。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬から切り離し可能または切り離し不可能であるように構成される。本方法は、タンパク質結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程は、ＵＶ光切断、化学的処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せによって、タンパク質結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチドを切り離す工程を含みうる。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、細胞のゲノム配列に対して相同でない。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、１つの種のゲノム配列に対して相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せでありうる。

【０１７２】

ある実施形態において、細胞は、腫瘍細胞または非腫瘍細胞を含む。細胞は、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１７３】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つ以上の細胞を、相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、２つ以上の細胞の各々が、第１および第２のタンパク質標的を含む工程を含む。２つ以上の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含みうる。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーのための結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む。複数のバーコードの少なくとも２つ

のバーコードは、同一の細胞標識配列を含みうる。相互作用決定組成物の第１の対の一方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、捕捉配列に相補的な配列を含みうる。捕捉配列は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。捕捉配列に相補的な相互作用決定オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、第２のバーコード配列を含みうる。相互作用同定組成物の第１の対の他方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマーのための結合部位を含みうる。

【０１７５】

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

【０１７６】

いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、脂質、炭水化物、またはそれらの任意の組合せを含む。タンパク質標的は、１０～１００の異なるタンパク質標的を含む群から選択されうる。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられる。タンパク質結合試薬は、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。

【０１７８】

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

【０１７９】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、１つの粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子は、ビーズを含みうる。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。粒子は、検出可能な部分に関連付けられうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられうる。粒子のバーコードは、約、少なくとも、多くとも、１０００、１００００、またはそれ以上、またはそれ以下、またはそれらの任意の組合せの異なるバーコード配列から選択されうるバーコード配列を含む。バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０１８０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを、相互作用決定オリゴヌクレオチドと接触させて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸

長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程と、を含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素またはＴａｑ ＤＮＡポリメラーゼを用いて、バーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、架橋オリゴヌクレオチドを、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドから移動させる工程を含みうる。本方法は、複数のアンプリコンを生成するために、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、バーコード配列の少なくとも一部および相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。

【０１８１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部および相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドの部分的および／または完全な配列を取得する工程を含みうる。

【０１８２】

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

【０１８３】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを用いて、細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程と；バーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程と。複数のバーコードを用いて、複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーを、バーコードの標的結合領域と接触させる工程と；複数のバーコードを用いて、複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程と、を含みうる。

【０１８４】

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

【０１８５】

本明細書に開示される実施形態には、タンパク質間相互作用を同定するためのキットを含む。いくつかの実施形態では、キットは、相互作用決定組成物の第１の対であって、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられ

たタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、第２のタンパク質標的に特異的に結合することが可能であり、相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列および架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が、異なる配列を含む、相互作用決定組成物の第１の対と；相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合することが可能な２つのハイブリダイゼーション領域を各々含む複数の架橋オリゴヌクレオチドと、を含む。

【０１８６】

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

【０１８７】

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

【０１８８】

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

【０１８９】

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

【０１９０】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、抗体、四量体、アプタマー、タンパク質骨格、またはそれらの組合せを含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬に結合されうる。少なくとも１つの相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、タンパク質結合試薬に可逆的にまたは不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド結合、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、対象の任意の細胞のゲノム配列に対して相同でない。対象の細胞は、腫瘍細胞または非腫瘍細胞を含みうる。対象の細胞は、単一細胞、哺乳動物細胞、細菌細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、

またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０１９２】

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

【０１９３】

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

【０１９４】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。タンパク質結合試薬は、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、相互作用決定組成物の第１の対の一方は、相互作用決定オリゴヌクレオチドに関連付けられない第２のタンパク質結合試薬を含む。第１のタンパク質結合試薬および第２のタンパク質結合試薬は、同一または異なりうる。タンパク質結合試薬は、検出可能な部分に関連付けられうる。いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分に関連付けられる。

【０１９６】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは、１つの粒子に関連付けられる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に部分的に固定されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に封入されうる。複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子に部分的に封入されうる。粒子は、崩壊性でありうる。粒子は、ビーズを含みうる。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含みうる。粒子は、崩壊性ヒドロゲル粒子を含みうる。粒子は、検出可能な部分に関連付けられうる。

【０１９７】

粒子のバーコードは、少なくとも１０００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含みうる。粒子のバーコードは、少なくとも１００００の異なるバーコード配列から選択されるバーコード配列を含みうる。バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００のバーコードを含みうる。

【０１９８】
いくつかの実施形態では、キットは、ＤＮＡポリメラーゼを含む。キットは、逆転写酵素を含みうる。キットは、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素またはＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、固化剤（たとえば、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド／四酸化オスミウム、アルコール系固定液、Ｈｅｐｅｓ－グルタミン酸緩衝液媒介有機溶媒保護効果（ＨＯＰＥ）、ブアン液、またはそれらの任意の組合せ）を含む。
【０１９９】
迅速、効率的および高度にスケーラブルな方法で、広範囲の生体分子および検出可能な標識のポートフォリオにわたる高品質および高性能の特定の製品を提供するためのシステムおよび方法が本明細書に開示される。本発明の実施形態では、標識生体分子に対するリクエストがなされ、このリクエストに応答して、標識生体分子は、活性化生体分子および活性化標識の既存のコレクションから調製される。
【０２００】
ある実施形態において、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはそれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡでありうる。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬でありうる。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含みうる。標識と結合されたタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能でありうる。
【０２０１】
いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択されうる。１つ以上の標識生体分子試薬は、標識に共有結合されない第２の生体分子をさらに含みうる。生体分子および第２の生体分子は、同じでありうる。
【０２０２】
いくつかの実施形態では、標識は、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標識は、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、酵素は、酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である。
【０２０３】
いくつかの実施形態では、酵素基質は、少なくとも１つの官能基によって、対応する修飾酵素基質と異なる。少なくとも１つの官能基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン（ｃａｒｂｏｎｏｔｈｉｏｎｅ）、カルボノチアール（ｃａｒｂｏｎｏｔｈｉａｌ）、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ（ｂｏｒｉｎｏ）、ボリネート（ｂｏｒｉｎａ

ｔｅ）、またはそれらの任意の組合せでありうる。
【０２０４】
いくつかの実施形態では、酵素は、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ（ｃｉｔｒｉｎａｓｅ）、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ（ｉｎｏｓｉｄａｓｅ）、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ（ｏｃｔｕｌｏｓｏｎａｓｅ）、オクツロソニダーゼ（ｏｃｔｕｌｏｓｏｎｉｄａｓｅ）、プリメベロシダーゼ（ｐｒｉｍｅｖｅｒｏｓｉｄａｓｅ）、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ（ｔｕｒｏｎｉｄａｓｅ）、ツロノシダーゼ（ｔｕｒｏｎｏｓｉｄａｓｅ）、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む。
【０２０５】
いくつかの実施形態では、酵素基質は、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース（ｌｅｖａｎｏｓｅ）、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む。
【０２０６】
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のための一意識別子を含む。一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択されうる。一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる一意識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列から選択される配列を有しうる。
【０２０７】
いくつかの実施形態では、標識は、リンカーを介して生体分子に結合される。標識は、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。
【０２０８】
一意識別子は、サンプルのゲノム配列に対して相同でないことがある。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せでありうる。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せでありうる。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含みうる。
【０２０９】
本開示の態様は、標識生体分子試薬を調製するのに使用するためのシステムも含む。いくつかの実施形態によるシステムは、標識生体分子試薬に対するリクエストを受信するための入力マネージャと、複数の標識生体分子試薬ストレージ識別子（ｓｔｏｒａｇｅ　ｉ

ｄｅｎｔｉｆｉｅｒ）を有するデータセットを記憶するためのメモリと、メモリに通信可能に連結され、標識生体分子試薬リクエストに対応するデータセットからの１つ以上の標識生体分子試薬ストレージ識別子を同定するように構成される処理モジュールと、１つ以上の同定された標識生体分子試薬ストレージ識別子を提供するための出力マネージャと、を含む。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストは、生体分子リクエストおよび標識リクエストを含む。他の実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストは、標識生体分子リクエストである。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む。

【０２１０】

ある実施形態において、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはそれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡでありうる。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬でありうる。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含みうる。標識と結合されたタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能でありうる。

【０２１１】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択されうる。

【０２１２】

いくつかの実施形態では、標識は、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標識は、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、酵素は、酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である。

【０２１３】

いくつかの実施形態では、酵素基質は、少なくとも１つの官能基によって、対応する修飾酵素基質と異なる。少なくとも１つの官能基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはそれらの任意の組合せでありうる。

【０２１４】

いくつかの実施形態では、酵素は、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロ

ラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む。

【０２１５】

いくつかの実施形態では、酵素基質は、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む。

【０２１６】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のための一意識別子を含む。一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択されうる。一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる一意識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列から選択される配列を有しうる。

【０２１７】

いくつかの実施形態では、標識は、リンカーを介して生体分子に結合される。標識は、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０２１８】

一意識別子は、サンプルのゲノム配列に対して相同でないことがある。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せでありうる。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せでありうる。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含みうる。

【０２１９】

入力マネージャは、標識生体分子試薬に対するリクエストがインターネットウェブサイトに入力されるウェブサイトメニューインターフェースなどのグラフィカルユーザインターフェースに操作可能に連結されうる。いくつかの実施形態では、入力マネージャは、標識生体分子リクエストを受信するように構成される。他の実施形態では、入力マネージャは、生体分子リクエストおよび標識リクエストを受信するように構成される。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む。入力マネージャは、単一のユーザまたは複数のユーザなどから、複数の標識生体分子試薬リクエストを受信しうる。

【０２２０】

本発明のシステムは、標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識および反応性リンカーのためのストレージ識別子を含む、１つ以上のデータセットを記憶するためのメモリを含む。システムは、標識生体分子試薬リクエストの構成要素（たとえば、生体分子リクエスト、標識リクエスト、標識生体分子リクエストなど）に対応する１つ以上のデータセットからのストレージ識別子を同定するメモリに通信可能に連結された処

理モジュールも含む。いくつかの実施形態では、出力マネージャは、電子ディスプレイなどに、同定されたストレージ識別子を表示するために、またはプリンタでストレージ識別子を印刷するために、通信構成要素に操作可能に連結される。

【０２２１】

いくつかの実施形態では、対象のシステムは、標識生体分子試薬を調製するための、出力マネージャと操作可能に通信した試薬調製装置をさらに含む。試薬調製マネージャは、出力マネージャから同定されたストレージ識別子を受信し、標識生体分子試薬リクエストに対応する標識生体分子試薬を生成するように構成される。

【０２２２】

実施形態では、試薬調製装置は、複数の活性化生体分子と、複数の活性化標識と、活性化生体分子および活性化標識を接触装置に提供するためのサンプリングデバイスと、を含む。いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、生成された標識生体分子試薬を、固相液体クロマトグラフィーなどによって、特性決定、配合または精製するのに使用されうる試薬分析装置を含む。

【０２２３】

生体分子は、ポリペプチド、核酸または多糖でありうる。いくつかの実施形態では、生体分子は、核酸、たとえば、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡである。他の実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、たとえば、タンパク質、酵素または抗体である。標識は、フルオロフォア、発色団、酵素、酵素基質、触媒、化学発光基質、電気化学発光基質、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ（たとえば、同位体的に純粋な希土類元素）、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０２２４】

標識生体分子試薬は、活性化生体分子を、活性化標識と結合することによって調製される。活性化生体分子および活性化標識は、各々、反応性リンカーを含む。実施形態では、反応性リンカーは、活性化生体分子と活性化リンカーとの間の化学結合を形成するように反応する。

【０２２５】

本開示の態様は、標識生体分子試薬を調製するための方法も含む。いくつかの実施形態による方法は、標識生体分子試薬に対するリクエストを受信する工程と、標識生体分子試薬リクエストの構成要素に対応するストレージ識別子（たとえば、生体分子リクエストおよび標識リクエストに対応するストレージ識別子）を同定する工程と、１つ以上の同定されたストレージ識別子を出力する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、同定された生体分子ストレージ識別子および標識ストレージ識別子は、電子ディスプレイ上に出力されるか、またはプリンタで印刷される。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対する複数のリクエストは、単一のユーザまたは複数のユーザなどから受信される。ある場合、標識生体分子試薬に対するリクエストは、複数の生体分子リクエストおよび複数の標識リクエストを含みうる。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストは、複数の生体分子リクエストおよび単一の標識リクエストを含みうる。さらにいくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストは、単一の生体分子リクエストおよび複数の標識リクエストを含みうる。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、方法は、活性化生体分子を活性化標識と接触させて、標識生体分子試薬を生成する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、活性化生体分子および活性化標識は、試薬調製装置中で接触される。ある場合、標識生体分子試薬は、さらに精製される。調製の後、標識生体分子試薬は、包装され、遠隔地に輸送されうる。

【０２２７】

本開示の態様は、標識生体分子試薬をリクエストおよび受信するための方法も含む。いくつかの実施形態による方法は、（たとえば、本明細書に記載される本発明のシステムの

１つに）標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程と、標識に共有結合された生体分子を含む標識生体分子試薬を受信する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程は、生体分子リクエストおよび標識リクエストを、インターネットウェブサイト上のウェブサイトメニューインターフェースなどのグラフィカルユーザインターフェースに入力する工程を含む。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程は、複数の生体分子リクエストおよび複数の標識リクエストを入力する工程を含む。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む。他の実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程は、単一の生体分子リクエストおよび複数の標識リクエスト入力する工程を含む。さらに他の実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程は、複数の生体分子リクエスト入力する工程と、単一の標識リクエスト入力する工程と、を含む。さらに他の実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストを通信する工程は、標識生体分子リクエストを入力する工程を含む。

【０２２８】

ある実施形態において、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはそれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡでありうる。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬でありうる。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはそれらの組合せを含みうる。標識と結合されたタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することが可能でありうる。

【０２２９】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択されうる。標識生体分子試薬を受信する工程は、標識に共有結合された標識生体分子および標識に共有結合されない第２の生体分子を受信する工程を含みうる。標識生体分子および第２の生体分子は、同じでありうる。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、標識は、フルオロフォア、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、酸化還元標識、放射性標識、音響標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁性粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標識は、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含み、酵素は、酵素基質を、対応する修飾酵素基質へと修飾することが可能である。

【０２３１】

いくつかの実施形態では、酵素基質は、少なくとも１つの官能基によって、対応する修飾酵素基質と異なる。少なくとも１つの官能基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、または

それらの任意の組合せでありうる。
【０２３２】
いくつかの実施形態では、酵素は、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはそれらの組合せを含む。
【０２３３】
いくつかの実施形態では、酵素基質は、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミノ酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキソシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソネート、オリゴ糖、ペクテート、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはそれらの任意の組合せを含む。
【０２３４】
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のための一意識別子を含む。一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択されうる。一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる一意識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に結合される。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。
【０２３５】
一意識別子は、サンプルのゲノム配列に対して相同でないことがある。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはそれらの任意の組合せでありうる。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはそれらの任意の組合せでありうる。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含みうる。
【図面の簡単な説明】
【０２３６】
【図１】非限定的な例示的確率バーコードを示す。
【図２】確率バーコーディングおよびデジタルカウンティングの非限定的な例示的ワークフローを示す。
【図３】複数の標的からの確率バーコード付き標的のインデックス付きライブラリーを作製するための非限定的な例示的プロセスを示す概略図である。
【図４】タンパク質結合試薬のための一意識別子を含むオリゴヌクレオチドと結合された

例示的タンパク質結合試薬（本明細書に示される抗体）の概略図を示す。
【図５】ハイスループットでタンパク質発現および遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体を用いた例示的ワークフローの概略図を示す。
【図６Ａ－６Ｅ】オリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図を示す。
【図７】単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子の使用の例示的ワークフローの概略図である。
【図８】単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子の使用の別の例示的ワークフローの概略図である。
【図９】単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド結合抗体の使用の例示的ワークフローの概略図を示す。
【図１０】単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド結合抗体の使用の例示的ワークフローの別の概略図を示す。
【図１１Ａ－１１Ｃ】コントロールオリゴヌクレオチドが細胞計数に使用されうることを示すプロットである。
【図１２】一実施形態による実験室および臨床アッセイのための標識生体分子試薬組成物を提供するのに使用される標識生体分子試薬の調製の工程を示す。
【図１３】本発明の一実施形態による方法の例示を提供する。
【図１４】カスタマイズ可能な標識生体分子試薬をオンデマンドで提供するための本開示の方法を示す。
【図１５】本発明のいくつかの実施形態に従って標識生体分子試薬に対するリクエストを通信するためのグラフィカルユーザインターフェースを示す。
【図１６】本発明のいくつかの実施形態による本開示のコンピュータシステムを示す。
【図１７】本発明のいくつかの実施形態による標識生体分子試薬に対するリクエスト受信、処理および出力するためのフローチャートを示す。
【図１８－１】パネル（ａ）～（ｄ）は、タンパク質発現および遺伝子発現を同時に決定するためのオリゴヌクレオチドの非限定的な例示的設計を示す。
【図１８－２】パネル（ａ）～（ｄ）は、タンパク質発現および遺伝子発現を同時に決定するためのオリゴヌクレオチドの非限定的な例示的設計を示す。
【図１９】タンパク質発現および遺伝子発現を同時に決定するための非限定的な例示的オリゴヌクレオチド配列の概略図を示す。
【図２０－１】パネル（ａ）～（ｆ）は、ハイスループットでＣＤ４タンパク質発現および遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体の使用の結果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図２０－２】パネル（ａ）～（ｆ）は、ハイスループットでＣＤ４タンパク質発現および遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体の使用の結果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図２０－３】パネル（ａ）～（ｆ）は、ハイスループットでＣＤ４タンパク質発現および遺伝子発現を同時に測定するための、オリゴヌクレオチド結合抗体の使用の結果を示す非限定的な例示的ｔＳＮＥ投射プロットである。
【図２１】パネル（ａ）～（ｆ）は、ＣＤ４　Ｔ細胞、ＣＤ８　Ｔ細胞、および骨髄細胞におけるＣＤ４　ｍＲＮＡおよびタンパク質の発現を示す非限定的な例示的棒グラフである。
【図２２】同様のシーケンシング深度で、抗体：オリゴヌクレオチドのより高い比率で増加されたＣＤ４タンパク質レベルについての検出感度を示す非限定的な例示的棒グラフであり、１：３の比率は、１：１および１：２の比率より結果が良好である。
【図２３】パネル（ａ）～（ｄ）は、フローサイトメトリーを用いてソーティングされた細胞の細胞表面におけるＣＤ４タンパク質発現を示すプロットである。
【図２４】パネル（ａ）～（ｆ）は、２つのサンプルのＣＤ４　Ｔ細胞、ＣＤ８　Ｔ細胞、および骨髄細胞におけるＣＤ４　ｍＲＮＡおよびタンパク質の発現を示す非限定的な例

示的棒グラフである。
【図２５】１：３の抗体：オリゴヌクレオチドの比率で、異なるサンプル調製プロトコルを用いて決定されるＣＤ４タンパク質レベルについての検出感度を示す非限定的な例示的棒グラフである。
【図２６Ａ－１】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図２６Ａ－２】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図２６Ａ－３】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図２６Ｂ－２６Ｃ】希釈滴定を用いた抗体ストックの最適な希釈の決定を示す非限定的な例示的プロットである。
【図２７】抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータ中の全リードにおける所望のパーセンテージを占めるように、オリゴヌクレオチド結合抗体の染色濃度を決定するための非限定的な例示的実験設計を示す。
【図２８】パネル（ａ）～（ｄ）は、抗体オリゴヌクレオチドの予測されるサイズと一致するピーク（矢印によって示される）を示す非限定的な例示的バイオアナライザトレースである。
【図２９－１】パネル（ａ）～（ｆ）は、抗体オリゴヌクレオチド（「高温抗体」）と結合された、異なる抗体希釈および異なるパーセンテージの抗体分子で染色されたサンプルについて検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２９－２】パネル（ａ）～（ｆ）は、抗体オリゴヌクレオチド（「高温抗体」）と結合された、異なる抗体希釈および異なるパーセンテージの抗体分子で染色されたサンプルについて検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図２９－３】パネル（ａ）～（ｆ）は、抗体オリゴヌクレオチド（「高温抗体」）と結合された、異なる抗体希釈および異なるパーセンテージの抗体分子で染色されたサンプルについて検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示す非限定的な例示的ヒストグラムである。
【図３０Ａ－３０Ｃ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図３０Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１０％の高温抗体：９０％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図３０Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図３０Ｃに示される。
【図３１Ａ－３１Ｃ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図３１Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：１００に希釈されたストックを用いて調製された１％の高温抗体：９９％の低温抗体の混合物で染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図３１Ｂ）における明らかなシグナルが得られなかった。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図３１Ｃに示される。
【図３２Ａ－３２Ｃ】オリゴヌクレオチド結合抗ＣＤ１４７抗体分子が、さまざまな細胞型を標識するのに使用されうることを示す非限定的な例示的プロットである。細胞型を、血液パネル（図３２Ａ）における４８８の遺伝子の発現プロフィールを用いて決定した。細胞を、１：８００に希釈されたストックで染色したところ、検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子の数を示すヒストグラム（図３２Ｂ）における明らかなシグナルが得られた。抗体オリゴヌクレオチドによるさまざまな細胞型の標識が、図３２Ｃに示される。

【図３３Ａ－３３Ｂ】図７に示されるワークフローを用いた、染色緩衝液中のコントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび検出されたコントロール粒子に関連付けられたコントロール粒子オリゴヌクレオチドの組成物を示すプロットである。
【図３４Ａ－３４Ｂ】血球計における細胞（図３４Ａ、白丸）およびコントロール粒子（図３４Ｂ、黒丸）の明視野像である。
【図３５Ａ－３５Ｂ】フルオロフォアに関連付けられたオリゴヌクレオチド結合抗体に結合されたコントロール粒子の位相差（図３５Ａ、１０倍）および蛍光（図３５Ｂ、１０倍）画像である。
【図３６】細胞およびコントロール粒子が、カートリッジのマイクロウェル中に充填されていることを示す画像である。
【発明を実施するための形態】
【０２３７】
以下の詳細な説明では、その一部を成す添付の図面を参照にする。これら図面において、類似する符号は、文脈から他の解釈が要求されない限り、一般に、類似の構成要素を同一のものとみなす。詳細な説明、図面、および特許請求の範囲に記載される例示的な実施形態は、限定的であることを意味しない。本明細書に提示される主題の精神または範囲から逸脱することなく、他の実施形態を使用してもよく、また他の変更を実施してもよい。本明細書に概略的に記載され、図面に図示されるように、本開示の態様は、非常に多様な異なる構成で配置、代替、組合せ、分離、および設計することができ、それらのすべては、本明細書において明示的に考慮され、本開示の一部を成すものとすることを理解されたい。
【０２３８】
本明細書で参照にされるすべての特許、公開特許出願、他の刊行物、ならびにＧｅｎＢａｎｋおよび他のデータベースからの配列は、関連技術に関してその全体を参照により組み込むものとする。
【０２３９】
少数の核酸、たとえば、メッセンジャーリボ核酸（ｍＲＮＡ）分子などの定量は、たとえば、さまざまな発生段階またはさまざまな環境条件下で発現される遺伝子を決定するために、臨床上重要である。しかし、特に、分子数が非常に小さい場合、核酸分子（たとえば、ｍＲＮＡ分子）の絶対数を決定するのは極めて困難となりうる。サンプル中の分子の絶対数を決定する一方法は、デジタルポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）である。理想的には、ＰＣＲは、各サイクルで分子の同一コピーを産生する。しかしながら、ＰＣＲは、各分子は、推計学的確率で複製し、この確率は、ＰＣＲサイクルおよび遺伝子配列によって変動するため、増幅バイアスおよび不正確な遺伝子発現測定値が生じるといった問題を有しうる。ユニーク分子標識（分子指標（ＭＩ）とも呼ばれる）を有する確率バーコードを用いて、分子数をカウントし、増幅バイアスを補正することができる。Ｐｒｅｃｉｓｅ（商標）アッセイ（Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｉｎｃ．（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ））などの確率バーコーディングは、分子標識（ＭＬ）を用いて、逆転写（ＲＴ）中にｍＲＮＡに標識することによって、ＰＣＲおよびライブラリー作製工程により誘導されるバイアスを補正することができる。
【０２４０】
Ｐｒｅｃｉｓｅ（商標）アッセイは、ＲＴ工程中に、サンプル中のすべてのポリ（Ａ）－ｍＲＮＡとハイブリダイズさせるために、ポリ（Ｔ）オリゴヌクレオチド上に多数（たとえば、６５６１～６５５３６）のユニーク分子標識を有する確率バーコードの非枯渇プールを使用することができる。確率バーコードは、ユニバーサルＰＣＲプライミング部位を含んでもよい。ＲＴの最中に、標的遺伝子分子は、確率バーコードとランダムに反応する。各標的分子は、得られた確率バーコードとハイブリダイズして、確率バーコード付きの相補的リボヌクレオチド酸（ｃＤＮＡ）分子を生成しうる）。標識した後、マイクロウェルプレートのマイクロウェルからの確率バーコード付きｃＤＮＡ分子を、ＰＣＲ増幅およびシーケンシングのために単一チューブ中にプールすることができる。未補正のシーケ

ンシングデータを分析して、リードの数、ユニーク分子標識を有する確率バーコードの数、ｍＲＮＡ分子の数を取得しうる。

【０２４１】

単一細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールを決定するための方法が、超並列的に行われうる。たとえば、Ｐｒｅｃｉｓｅ（商標）アッセイを用いて、１０，０００個を超える細胞のｍＲＮＡ発現プロフィールを同時に決定することができる。サンプルごとの分析のための単一細胞の数（たとえば、１００個または１，０００個の単一細胞）を、現在の単一細胞技術の能力より少なくしうる。さまざまなサンプルからの細胞をプールすることは、現在の単一の技術の能力の向上した利用を可能にし、したがって、無駄な試薬および単一細胞分析のコストを減少させる。さまざまなサンプルからの細胞をプールすることは、さまざまなサンプルの細胞のｃＤＮＡライブラリー作製の変動を最小限に抑えることができ、したがって、異なるサンプルのより正確な比較を可能にする。

【０２４２】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する。いくつかの実施形態では、一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、少なくとも１０の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列（たとえば、１つの分子標識配列）を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む。

【０２４３】

定義

特に定義がない限り、本明細書で用いられる技術用語はすべて、本開示が属する分野の当業者により一般に理解されているものと同一の意味を有する。本明細書および添付の特許請求の範囲で用いられる場合、特に文脈上明確に規定されていない限り、単数形の「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」には、複数の参照語が包含される。本明細書での「または」の意味はいずれも、特に明記されていない限り、「および／または」を包含することが意図される。

【０２４４】
本明細書で用いられる場合、「アダプター」という用語は、関連核酸の増幅またはシーケンシングを促進するための配列を意味しうる。関連核酸は、標的核酸を含みうる。関連核酸は、空間標識、標的標識、サンプル標識、指標標識、またはバーコード配列（たとえば、分子標識）の１つ以上を含みうる。アダプターは、線状であってよい。アダプターは、事前にアデニル化されたアダプターであってよい。アダプターは、二本鎖または一本鎖であってよい。１つ以上のアダプターは、核酸の５’または３’末端に配置することができる。アダプターが５’および３’末端に既知の配列を含む場合、既知の配列は、同じ配列でも、異なる配列でもよい。ポリヌクレオチドの５’および／または３’末端に位置するアダプターは、表面上に固定された１つ以上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする能力を有しうる。アダプターは、いくつかの実施形態では、ユニバーサル配列を含む。ユニバーサル配列は、２つ以上の核酸分子と共通のヌクレオチド配列の１領域であってよい。２つ以上の核酸分子は、異なる配列の領域を有しうる。従って、たとえば、５’アダプターは、同一配列および／またはユニバーサル核酸配列を含み、３’アダプターは、同一配列および／またはユニバーサル配列を含みうる。複数の核酸分子の異なるメンバー中に存在しうるユニバーサル配列は、ユニバーサル配列と相補的な単一ユニバーサルプライマーを用いて、複数の異なる配列の複製または増幅を可能にしうる。同様に、核酸分子のコレクションの異なるメンバー中に存在しうる少なくとも１つ、２つ（たとえば、ペア）若しくはそれ以上のユニバーサル配列は、ユニバーサル配列と相補的な少なくとも１つ、２つ（たとえば、一対）若しくはそれ以上の単一ユニバーサルプライマーを用いて、複数の異なる配列の複製または増幅を可能にしうる。従って、ユニバーサルプライマーは、こうしたユニバーサル配列とハイブリダイズすることができる配列を含む。標的核酸配列担持分子を修飾して、ユニバーサルアダプター（たとえば、非標的核酸配列）を異なる標的核酸配列の一端または両端に結合させることができる。標的核酸に結合した１つ以上のユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマーのハイブリダイゼーションのための部位を提供することができる。標的核酸に結合した１つ以上のユニバーサルプライマーは、同じでも、互いに異なってもよい。

【０２４５】
本明細書で用いられる場合、抗体は、全長（たとえば、天然に存在するかもしくは通常の免疫グロブリン遺伝子断片組換えプロセスにより形成される）免疫グロブリン分子（たとえばＩｇＧ抗体）または免疫グロブリン分子の免疫活性（すなわち特異的結合）部分、たとえば抗体フラグメントでありうる。

【０２４６】
いくつかの実施形態では、抗体は、機能的抗体フラグメントである。たとえば、抗体フラグメントは、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓＦｖなどの抗体の一部でありうる。抗体フラグメントは、全長抗体により認識される同一の抗原に結合可能である。抗体フラグメントは、抗体の可変領域からなる単離された断片、たとえば、重鎖および軽鎖の可変領域からなる「Ｆｖ」フラグメントならびに軽鎖および重鎖の可変領域がペプチドリンカー（「ｓｃＦｖタンパク質」）により接続された組換え一本鎖ポリペプチド分子を含みうる。例示的な抗体としては、限定されるものではないが、癌細胞に対する抗体、ウイルスに対する抗体、細胞表面レセプター（たとえば、ＣＤ８、ＣＤ３４、およびＣＤ４５）に結合する抗体、および治療用抗体が挙げられうる。

【０２４７】
本明細書で用いられる場合、「関連付けられる」または「～に関連付けられる」という用語は、ある時点で２つ以上の種が共配置されているとして同定可能であることを意味しうる。関連付けは、２つ以上の種が類似の容器内にあることを意味しうる。関連付けは、インフォマティクス的関連付けでありうる。この場合、たとえば、２つ以上の種に関するデジタル情報が記憶され、かつその情報を用いてこれらの種の１つ以上が共配置されたことを決定可能である。関連付けはまた、物理的関連付けでありうる。いくつかの例では、２つ以上の関連付けられる種は、互いにまたは共通の固体もしくは半固体の表面に「テザ

ー連結」、「結合」、または「固定」される。関連付けは、ビーズなどの固体または半固体の支持体に標識を結合するための共有結合手段または非共有結合手段を意味しうる。関連付けは、標的と標識とのハイブリダイゼーションを含みうる。

【０２４８】

本明細書で用いられる場合、「相補的」という用語は、２つのヌクレオチド間の精密なペアリングの能力を意味しうる。たとえば、核酸の所与の位置のヌクレオチドが他の核酸のヌクレオチドと水素結合可能である場合、２つの核酸はその位置で互いに相補的であるとみなされる。２つの一本鎖核酸分子間の相補性は、ヌクレオチドの一部のみが結合する場合には「部分的」でありうるし、一本鎖分子間のすべてに相補性が存在する場合には完全でありうる。第１のヌクレオチド配列が第２のヌクレオチド配列に相補的である場合、第１のヌクレオチド配列は第２の配列の「相補体」であるといえる。第１のヌクレオチド配列が第２の配列の逆（すなわち、ヌクレオチドの順序が逆）の配列に相補的である場合、第１のヌクレオチド配列は第２の配列の「逆相補体」であるといえる。本明細書で用いられる場合、「相補体」、「相補的」、および「逆相補体」という用語は、同義的に用いることが可能である。ある分子が他の分子にハイブリダイズしうる場合、それはハイブリダイズしている分子の相補体でありうることが、本開示から理解される。

【０２４９】

本明細書で用いられる場合、「デジタルカウンティング」という用語は、サンプル中の標的分子の数を推定する方法を意味しうる。デジタルカウンティングは、サンプル中の標的に関連付けられたユニーク標識の数を決定する工程を含みうる。この確率的方法は、分子をカウントする問題を、同一の分子の位置決定および同定の問題から、所定の標識のセットの検出に関する一連のあり／なしのデジタル問題に変換する。

【０２５０】

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

【０２５１】

本明細書で用いられる場合、「非枯渇リザーバー」という用語は、多種多様な標識から構成されたバーコード（たとえば、確率バーコード）のプールを意味しうる。非枯渇リザーバーは、非枯渇リザーバーが標的のプールに関連付けられる場合、各標的がユニーク確率バーコードに関連付けられる可能性が高くなるように、多数の異なる確率バーコードを含みうる。各標識標的分子のユニーク性は、ランダム選択の統計により決定可能であり、標識の多様性と比較してコレクション中の同一の標的分子のコピー数に依存する。得られる標識標的分子のセットのサイズは、バーコーディングプロセスの確率的性質により決定可能であり、次いで、検出された確率バーコードの数の解析は、元のコレクションまたはサンプル中に存在する標的分子の数の計算を可能にする。存在する標的分子のコピー数とユニーク確率バーコードの数との比が低い場合、標識標的分子はきわめてユニークである（すなわち、２つ以上の標的分子が１つの所与の標識で標識される確率は非常に低い）。

【０２５２】

本明細書で用いられる場合、「核酸」という用語は、ポリヌクレオチド配列またはその断片を意味する。核酸はヌクレオチドを含みうる。核酸は細胞に対して外因性または内因性でありうる。核酸は細胞フリー環境中に存在しうる。核酸は遺伝子またはその断片でありうる。核酸はＤＮＡでありうる。核酸はＲＮＡでありうる。核酸は１つ以上のアナログ（たとえば、修飾された骨格、糖または核酸塩基）を含みうる。アナログのいくつかの例

としては、限定されるものではないが、５－ブロモウラシル、ペプチド核酸、ゼノ核酸、モルホリノ体、ロックド核酸、グリコール核酸、トレオース核酸、ジデオキシヌクレオチド、コルジセピン、７－デアザ－ＧＴＰ、フルオロフォア（たとえば、糖に結合されたローダミンまたはフルオレセイン）、チオール含有ヌクレオチド、ビオチン結合ヌクレオチド、蛍光塩基アナログ、ＣｐＧアイランド、メチル－７－グアノシン、メチル化ヌクレオチド、イノシン、チオウリジン、プソイドウリジン、ジヒドロウリジン、キューオシン、およびワイオシンが挙げられる。「核酸」、「ポリヌクレオチド、「標的ポリヌクレオチド」、および「標的核酸」は、同義的に用いうる。

【０２５３】

核酸は、新しいまたは向上した特徴（たとえば、向上した安定性）を有する核酸を提供するために１つ以上の修飾（たとえば、塩基修飾、骨格修飾）を含みうる。核酸は核酸アフィニティータグを含みうる。ヌクレオシドは塩基－糖の組合せでありうる。ヌクレオシドの塩基部分はヘテロ環塩基でありうる。かかるヘテロ環塩基の２つの最も一般的なクラスはプリンおよびピリミジンである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドの糖部分に共有結合されたリン酸基をさらに含むヌクレオシドでありうる。ペントフラノシル糖を含むヌクレオシドでは、リン酸基は、糖の２’、３’、または５’ヒドロキシル部分に結合可能である。核酸を形成する際、リン酸基は、隣接ヌクレオシドを互いに共有結合して線状高分子化合物を形成可能である。ひいては、この線状高分子化合物のそれぞれの末端をさらに連結して環状化合物を形成可能である。しかしながら、線状化合物が一般に好適である。そのほかに、線状化合物は、内部ヌクレオチド塩基相補性を有しうるので、完全二本鎖または部分二本鎖の化合物を生成するようにフォールディングしうる。核酸内では、リン酸基は、通常、核酸のヌクレオシド間骨格を形成するものとして参照可能である。結合または骨格は、３’→５’ホスホジエステル結合でありうる。

【０２５４】

核酸は、修飾骨格および／または修飾ヌクレオシド間結合を含みうる。修飾骨格は、骨格中にリン原子を保持するものおよび骨格中にリン原子を有していないものを含みうる。リン原子を中に含有する好適な修飾核酸骨格は、たとえば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、３’－アルキレンホスホネートや５’－アルキレンホスホネートなどのメチルや他のアルキルのホスホネート、キラルホスホネート、ホスフィネート、３’－アミノホスホルアミデートやアミノアルキルホスホルアミデートなどのホスホルアミデート、ホスホロジアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、セレノホスフェート、および通常３’－５’結合、２’－５’結合アナログを有するボラノホスフェート、ならびに１つ以上のヌクレオチド間結合が３’→３’、５’→５’、または２’→２’結合である逆極性を有するものを含みうる。

【０２５５】

核酸は、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルのヌクレオシド間結合、または１つ以上の短鎖ヘテロ原子もしくはヘテロ環のヌクレオシド間結合により形成されるポリヌクレオチド骨格を含みうる。これらは、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）、シロキサン骨格、スルフィド、スルホキシド、およびスルホン骨格、ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格、リボアセチル骨格、アルケン含有骨格、スルファメート骨格、メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格、スルホネートおよびスルホンアミド骨格、アミド骨格を有するもの、ならびに混合Ｎ、Ｏ、Ｓ、およびCH_2構成部分を有する他のものを含みうる。

【０２５６】

核酸は核酸ミメティックを含みうる。「ミメティック」という用語は、フラノース環のみまたはフラノース環とヌクレオチド間結合の両方が非フラノース基で置き換えられているポリヌクレオチドを含むことを意図し得、フラノース環のみの置換えは、糖サロゲート

であるとして参照可能である。ヘテロ環塩基部分または修飾ヘテロ環塩基部分は、適切な標的核酸とのハイブリダイゼーションのために保持可能である。かかる核酸の１つはペプチド核酸（ＰＮＡ）でありうる。ＰＮＡでは、ポリヌクレオチドの糖骨格は、アミド含有骨格特にアミノエチルグリシン骨格で置換え可能である。ヌクレオチドは保持可能であり、かつ骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合される。ＰＮＡ化合物中の骨格は、ＰＮＡにアミド含有骨格を与える２つ以上の結合されたアミノエチルグリシン単位を含みうる。ヘテロ環塩基部分は、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接的または間接的に結合可能である。

【０２５７】

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

【０２５８】

核酸は、モルホリノ環に結合されたヘテロ環塩基を有する結合されたモルホリノ単位（すなわちモルホリノ核酸）を含みうる。結合基は、モルホリノ核酸中のモルホリノモノマー単位を結合可能である。非イオン性モルホリノ系オリゴマー化合物は、細胞タンパク質とのより少ない望ましくない相互作用を有しうる。モルホリノ系ポリヌクレオチドは、核酸の非イオン性ミミックでありうる。モルホリノクラス内のさまざまな化合物は、異なる結合基を用いて連結可能である。ポリヌクレオチドミメティックのさらなるクラスは、シクロヘキセニル核酸（ＣｅＮＡ）として参照可能である。核酸分子中に通常存在するフラノース環は、シクロヘキセニル環で置換え可能である。ＣｅＮＡ　ＤＭＴ保護ホスホロアミダイトモノマーは、ホスホロアミダイト化学を用いたオリゴマー化合物合成のために調製および使用が可能である。核酸鎖中へのＣｅＮＡモノマーの取込みは、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッドの安定性を増加可能である。ＣｅＮＡオリゴアデニレートは、天然複合体に類似した安定性を有する核酸相補体との複合体を形成可能である。さらなる修飾は、２’－ヒドロキシル基が糖環の４’炭素原子に結合されて２’－Ｃ，４’－Ｃ－オキシメチレン結合を形成することにより二環式糖部分を形成するロックド核酸（ＬＮＡ）を含みうる。結合は、２’酸素原子と４’炭素原子とを架橋するメチレン（－ＣＨ２），基（式中、ｎは１または２である）でありうる。ＬＮＡおよびＬＮＡアナログは、相補的核酸との非常に高い二本鎖熱安定性（Ｔｍ＝＋３～＋１０℃）、３’－エキソヌクレアーゼ分解に対する安定性、および良好な溶解性を示しうる。

【０２５９】

核酸はまた、核酸塩基（単に「塩基」ということが多い）の修飾または置換を含みうる。本明細書で用いられる場合、「非修飾」または「天然」の核酸塩基は、プリン塩基（たとえば、アデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ））、ならびにピリミジン塩基（たとえば、チミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）およびウラシル（Ｕ））を含みうる。修飾核酸塩基は、他の合成および天然の核酸塩基、たとえば、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピニル（－Ｃ＝Ｃ－ＣＨ３）ウラシルおよびシトシン、ならびにピリミジン塩基の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシル、ならびに他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニン、ならびに３－デアザグアニンおよび３－デアアデニンを含みうる。修飾核酸塩基は、三環式ピリミジン、たとえば、フェノキ

サジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、置換フェノキサジンシチジン（たとえば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド（５，４－（ｂ）（１，４）ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）などのＧ－クランプ、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド（５，４－ｂ）（１，４）ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、置換フェノキサジンシチジン（たとえば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド（５，４－（ｂ）（１，４）ベンゾオキサジン－２（３Ｈ）－オン）などのＧ－クランプ、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド（４，５－ｂ）インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド（３’，’：４，５）ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－２－オン）を含みうる。

【０２６０】

本明細書で用いられる場合、「サンプル」という用語は、標的を含む組成物を意味しうる。本開示の方法、デバイス、およびシステムによる分析に好適なサンプルとしては、細胞、組織、器官、または生物が挙げられる。

【０２６１】

本明細書で用いられる場合、「サンプリングデバイス」または「デバイス」という用語は、サンプルのセクションの採取および／または基材上へのセクションの配置を行いうるデバイスを意味しうる。サンプルデバイスとは、たとえば、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）機、セルソーター機、生検針、生検デバイス、組織切片化デバイス、マイクロ流体デバイス、ブレードグリッド、および／またはミクロトームを意味しうる。

【０２６２】

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

【０２６３】

本明細書で用いられる場合、「確率バーコード」という用語は、本開示の標識を含むポリヌクレオチド配列を意味する。確率バーコードは、確率バーコーディングに使用可能なポリヌクレオチド配列でありうる。確率バーコードは、サンプル中の標的を定量可能である。確率バーコードは、標識を標的に関連付けた後に起こりうるエラーの制御に使用可能である。たとえば、確率バーコードは、増幅またはシーケンシングのエラーを評価可能である。標的に関連付けられた確率バーコードは、確率バーコード標的または確率バーコードタグ標的と呼ぶことが可能である。

【０２６４】

本明細書で用いられる場合、「確率バーコーディング」という用語は、核酸のランダム標識化（たとえばバーコーディング）を意味する。確率バーコーディングは、標識を標的に関連付けて、標的に関連付けられた標識を定量するために再帰的ポアソンストラテジーを利用することができる。本明細書で用いられる場合、「確率バーコーディング」という用語は、「確率標識化」と同義的に用いられうる。

【０２６５】

本明細書で用いられる場合、「標的」という用語は、バーコード（たとえば確率バーコード）に関連付け可能な組成物を意味しうる。本開示の方法、デバイス、およびシステムによる分析に例示的な好適な標的としては、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、マイクロＲＮＡ、ｔＲＮＡなどが挙げられる。標的は一本鎖または二本鎖でありう

る。いくつかの実施形態では、標的は、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドでありうる。いくつかの実施形態では、標的は脂質である。本明細書で用いられる場合、「標的」は、「種」と同義的に用いられうる。

【０２６６】

「逆転写酵素」という用語は、逆転写酵素活性を有する（すなわち、ＲＮＡ鋳型からのＤＮＡの合成を触媒する）酵素のグループを意味しうる。一般的には、かかる酵素としては、限定されるものではないが、レトロウイルス逆転写酵素、レトロトランスポゾン逆転写酵素、レトロプラスミド逆転写酵素、レトロン逆転写酵素、細菌逆転写酵素、グループＩＩイントロン由来逆転写酵素、およびそれらの突然変異体、変異体、または誘導体が挙げられる。非レトロウイルス逆転写酵素としては、非ＬＴＲレトロトランスポゾン逆転写酵素、レトロプラスミド逆転写酵素、レトロン逆転写酵素、およびグループＩＩイントロン逆転写酵素が挙げられる。グループＩＩイントロン逆転写酵素の例としては、ラクトコッカス・ラクティス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃ ｓ ｌａｃｔｉｓ）Ｌｌ．ＬｔｒＢイントロン逆転写酵素、サーモシネココッカス・エロンガツス（Ｔｈｅｒｍｏｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＴｅＩ４ｃイントロン逆転写酵素、またはジオバチルス・ステアロサーモフィラス（Ｇｅｏｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ＧｓＩ－ＩＩＣイントロン逆転写酵素が挙げられる。他のクラスの逆転写酵素としては、多くのクラスの非レトロウイルス逆転写酵素（すなわち、レトロン、グループＩＩイントロン、および特に多様性生成レトロエレメント）が挙げられうる。

【０２６７】

「ユニバーサルアダプタープライマー」、「ユニバーサルプライマーアダプター」または「ユニバーサルアダプター配列」という用語は、置き換え可能に用いられて、バーコード（たとえば、確率バーコード）をハイブリダイズして、遺伝子特異的バーコードを作製するために使用することができるヌクレオチド配列を指す。ユニバーサルアダプター配列は、たとえば、本開示の方法に用いられるすべてのバーコードに対してユニバーサルである既知の配列であってよい。たとえば、本明細書に開示する方法を用いて複数の標的が標識される場合、標的特異的配列の各々を同じユニバーサルアダプター配列に連結させてもよい。いくつかの実施形態では、本明細書に開示する方法に、２つ以上のユニバーサルアダプター配列を使用することができる。たとえば、本明細書に開示する方法を用いて複数の標的が標識される場合、標的特異的配列の少なくとも２つを異なるユニバーサルアダプター配列と連結させる。ユニバーサルアダプタープライマーおよびその補体は、２つのオリゴヌクレオチドに含有させてもよく、そのうちの１つは、標的特異的配列を含み、他方は、バーコードを含む。たとえば、ユニバーサルアダプター配列は、標的核酸と相補的なヌクレオチド配列を生成するための標的特異的配列を含むオリゴヌクレオチドの一部であってもよい。バーコードと、ユニバーサルアダプター配列の相補的配列を含む第２のオリゴヌクレオチドは、ヌクレオチド配列とハイブリダイズして、標的特異的バーコード（たとえば、標的特異的確率バーコード）を生成しうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサルアダプタープライマーは、本開示の方法で使用されるユニバーサルＰＣＲプライマーとは異なる配列を有する。

【０２６８】

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、オリゴヌクレオチドと結合されたタンパク質結合試薬を各々含む複数の組成物であって、オリゴヌクレオチドが、それが結合されるタンパク質結合試薬のための一意識別子を含み、タンパク質結合試薬が、タンパク質標的に特異的に結合することが可能である、複数の組成物を提供する。いくつかの実施形態では、一意識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子は、一意識別子の多様なセットから選択される。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、一意識別子の多様なセットは、少なくとも１０，０００の異なる一意識別子を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、

複数の抗体、複数のアプタマー、またはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、少なくとも１０，０００の異なるタンパク質結合試薬を含む。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、少なくとも１０の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列（たとえば分子標識配列）を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬が、少なくとも１，０００の異なるバーコード配列のセットから選択される少なくとも１つのバーコード配列を含む１つ以上のオリゴヌクレオチドと結合される。いくつかの実施形態では、複数の組成物は、複数のタンパク質標的に特異的に結合することが可能である。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合性複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、１０～４００の異なるタンパク質標的を含む。

【０２６９】

バーコード

確率バーコーディングなどのバーコーディングは、たとえば、米国特許出願公開第２０１５０２９９７８４号明細書、国際公開第２０１５０３１６９１号パンフレット、およびＦｕ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ．Ｓ．Ａ．２０１１ Ｍａｙ ３１；１０８（２２）：９０２６－３１に記載されており、これらの刊行物の内容は、その全体を参照により本明細書に組み込む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるバーコードは、標的に確率標識（たとえば、バーコード、タグ）を付けるために使用することができるポリヌクレオチド配列でありうる確率バーコードでありうる。バーコードは、確率バーコードの異なるバーコード配列の数および標識される標的のいずれかの出現の回数の比率が、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１、９０：１、１００：１、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値でありうる場合、確率バーコードと呼ばれうる。標的は、同一またはほぼ同一の配列を有するｍＲＮＡ分子を含むｍＲＮＡ種でありうる。バーコードは、確率バーコードの異なるバーコード配列の数および標識される標的のいずれかの出現の回数の比率が、少なくとも、または多くとも、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１、９０：１、または１００：１である場合、確率バーコードと呼ばれうる。確率バーコードのバーコード配列は、分子標識と呼ばれうる。

【０２７０】

バーコード、たとえば確率バーコードは、１つ以上の標識を含みうる。例示的な標識としては、ユニバーサル標識、細胞標識、バーコード配列（たとえば分子標識）、サンプル標識、プレート標識、空間標識、および／またはプレ空間標識を挙げることができる。図１は、空間標識を有する例示的なバーコード１０４を示す。バーコード１０４は、バーコードを固体担体１０５に連結しうる５’アミンを含んでよい。バーコードは、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、および／または分子標識を含みうる。バーコード中のさまざまな標識（限定するものではないが、ユニバーサル標識、次元標識、空間標

識、細胞標識、および分子標識など）の順序は変動しうる。たとえば、図１に示すように、ユニバーサル標識は、最も５’側の標識であってよく、分子標識は、最も３’側の標識であってもよい。空間標識、次元標識、および細胞標識は、任意の順序であってよい。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識、空間標識、次元標識、細胞標識、および分子標識は、任意の順序であってよい。バーコードは、標的結合領域を含みうる。標的結合領域は、サンプル中の標的（たとえば、標的核酸、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ）と相互作用することができる。たとえば、標的結合領域は、ｍＲＮＡのポリ（Ａ）テールと相互作用することができるオリゴ（ｄＴ）配列を含みうる。ある場合、バーコードの標識（たとえば、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、およびバーコード配列）は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０ヌクレオチドまたはそれ以上によって隔てられうる。

【０２７１】

標識、たとえば、細胞標識は、規定長さ、たとえば、各々７ヌクレオチド（いくつかのハミングエラー訂正コードに使用されるビット数に相当する）の核酸部分配列の固有のセットを含んでもよく、これらは、エラー訂正能力を賦与するように設計することができる。エラー訂正部分配列のセットは、７つのヌクレオチド配列を含み、これらは、セット内の配列の任意のペア組合せが、規定の「遺伝子距離」（またはミスマッチ塩基の数）を呈示するように、設計することができ、たとえば、３ヌクレオチドの遺伝子距離を呈示するように、１セットのエラー訂正部分配列を設計することができる。この場合、標識化標的核酸分子についてのシーケンシングデータのセット内のエラー訂正配列の見直しによって、増幅若しくはシーケンシングエラーを検出または訂正することが可能になる。いくつかの実施形態では、エラー訂正コードを作製するために用いられる核酸部分配列の長さは、たとえば、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１５、２０、３０、３１、４０、５０ヌクレオチド長、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲であってよい。いくつかの実施形態では、エラー訂正コードを作製するために、他の長さの核酸部分配列を使用することも可能である。

【０２７２】

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

【０２７３】

いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ｍＲＮＡのポリ（Ａ）テールと相互作用することができるオリゴ（ｄＴ）配列を含みうる。バーコードの標識（たとえば、ユニバーサル標識、次元標識、空間標識、細胞標識、およびバーコード（たとえば、分子標識））の１つ以上は、バーコードの残りの標識の別の１つまたは２つからスペーサによって隔てることができる。スペーサは、たとえば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０ヌクレオチドまたはそれ以上であってよい。いくつかの実施形態では、バーコードの標識のいずれもスペーサによって隔てられない。

【０２７４】

ユニバーサル標識

バーコードは１つ以上のユニバーサル標識を含みうる。いくつかの実施形態では、１つ以上のユニバーサル標識は、所与の固体担体に結合されるバーコードのセット中のすべてのバーコードで同一でありうる。いくつかの実施形態では、１つ以上のユニバーサル標識は、複数のビーズに結合されるすべてのバーコードで同一でありうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識は、シーケンシングプライマーにハイブリダイズ可能な核酸配列を含みうる。シークエンシングプライマーは、ユニバーサル標識を含むバーコードをシ

ーケンスするために使用可能である。シークエンシングプライマー（たとえば、ユニバーサルシークエンシングプライマー）は、高スループットシークエンシングプラットフォームに関連付けられるシークエンシングプライマーを含みうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識は、ＰＣＲプライマーにハイブリダイズ可能な核酸配列を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識は、シークエンシングプライマーおよびＰＣＲプライマーにハイブリダイズ可能な核酸配列を含みうる。シーケンシングプライマーまたはＰＣＲプライマーにハイブリダイズ可能なユニバーサル標識の核酸配列は、プライマー結合部位として参照しうる。ユニバーサル標識は、バーコードの転写を開始するために使用しうる配列を含みうる。ユニバーサル標識は、バーコードまたはバーコード内の領域の伸長のために、使用しうる配列を含みうる。ユニバーサル標識は、約１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０ヌクレオチド長、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲であってよい。たとえば、ユニバーサル標識は、少なくとも約１０ヌクレオチドを含みうる。ユニバーサル標識は、少なくとも、または多くとも、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、２００、もしくは３００ヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーまたは修飾ヌクレオチドは、担体からバーコードを切断して除去することを可能にするユニバーサル標識配列の一部であってよい。

【０２７５】

次元標識

バーコードは１つ以上の次元標識を含みうる。いくつかの実施形態では、次元標識は、標識化（たとえば、確率標識化）が行われた次元に関する情報を提供する核酸配列を含みうる。たとえば、次元標識は、標的に確率バーコードが付された時点に関する情報を提供可能である。次元標識は、サンプルのバーコーディング（たとえば、確率バーコーディング）の時点に関連付け可能である。次元標識は、標識化の時点で活性化可能である。異なる時点で異なる次元標識を活性化可能である。次元標識は、標的、標的のグループ、および／またはサンプルに確率バーコードを付けた順序に関する情報を提供する。たとえば、細胞集団は、細胞周期のＧ０期に確率バーコードを付けることが可能である。細胞は、細胞周期のＧ１期にバーコード（たとえば、確率バーコード）で再びパルスすることが可能である。細胞は、細胞周期のＳ期にバーコードで再びパルスすることが可能であり、他の時期も同様である。各パルス時（たとえば、細胞周期の各期）のバーコードは、異なる次元標識を含みうる。こうして、次元標識は、細胞周期のどの期に標的に標識したかに関する情報を提供する。次元標識は、多種多様な生物時間を精査することが可能である。例示的な生物時間としては、限定されるものではないが、細胞周期、転写（たとえば転写開始）、および転写物分解が挙げられうる。他の例として、薬剤治療および／または療法の前および／または後にサンプル（たとえば、細胞、細胞集団）に確率標識を付けることが可能である。識別可能な標的のコピー数の変化は、薬剤および／または療法に対するサンプルの反応の指標でありうる。

【０２７６】

次元標識は、活性化可能であってよい。活性化可能な次元標識は、特定の時点で活性化可能でありうる。活性化可能な標識は、たとえば、構成的に活性化することができる（たとえば、オフに切り替わらない）。活性化可能な次元標識は、たとえば、可逆的に活性化可能である（たとえば、活性化可能な次元標識は、オン・オフの切替えが可能である）。たとえば、次元標識は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０回またはそれ以上可逆的に活性化可能でありうる。次元標識は、たとえば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０回またはそれ以上可逆的に活性化可能でありうる。いくつかの実施形態では、次元標識は、蛍光、光、化学的イベント（たとえば、切断、他の分子のライゲーション、修飾（たとえば、ペグ化、ＳＵＭＯ化、アセチル化、メチル化、脱アセチル化、脱メチル化）の付加、光化学的イベント（たとえば、光ケージング）、および非天然ヌクレオチドの導入により活性化可能である。

【０２７７】

次元標識は、いくつかの実施形態では、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されるすべてのバーコード（たとえば、確率バーコード）で同一でありうるが、異なる固体担体（たとえばビーズ）では異なりうる。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、または１００％は、同一の次元標識を含みうる。いくつかの実施形態では、同じ固体担体上のバーコードの少なくとも６０％は、同一の次元標識を含みうる。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも９５％は、同一の次元標識を含みうる。

【０２７８】

複数の固体担体（たとえばビーズ）には、10^6程度またはそれ以上のユニーク次元標識配列が存在可能である。次元標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。次元標識は、少なくとも、または多くとも、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、２００、もしくは３００ヌクレオチド長でありうる。次元標識は、約５～約２００ヌクレオチドを含みうる。次元標識は、約１０～約１５０ヌクレオチドを含みうる。次元標識は、約２０～約１２５ヌクレオチドを含みうる。

【０２７９】

空間標識

バーコードは１つ以上の空間標識を含みうる。いくつかの実施形態では、空間標識は、バーコードに関連付けられる標的分子の空間配向に関する情報を提供する核酸配列を含みうる。空間標識は、サンプル中の座標に関連付け可能である。座標は固定座標でありうる。たとえば、座標は基材を基準にして固定可能である。空間標識は二次元または三次元のグリッドを基準にしうる。座標はランドマークを基準にして固定可能である。ランドマークは空間内で同定可能である。ランドマークはイメージング可能な構造体でありうる。ランドマークは生物学的構造体たとえば解剖学的ランドマークでありうる。ランドマークは細胞ランドマーク（たとえばオルガネラ）でありうる。ランドマークは、非天然ランドマーク、たとえば、色コード、バーコード、磁性、蛍光、放射能、またはユニークなサイズもしくは形状のような同定可能な識別子を有する構造体でありうる。空間標識は、物理的パーティション（たとえば、ウェル、容器、またはドロップレット）に関連付け可能である。いくつかの実施形態では、空間内の１つ以上の位置にコードを付けるために複数の空間標識が一緒に使用される。

【０２８０】

空間標識は、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されるすべてのバーコードで同一であってよいが、異なる固体担体（たとえばビーズ）については異なっていてもよい。いくつかの実施形態では、同一の空間標識を含む、同一の固体担体上のバーコードのパーセンテージは、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、１００％、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の空間標識を含む、同一の固体担体上のバーコードのパーセンテージは、少なくとも、または多くとも、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、もしくは１００％でありうる。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも６０％が、同一の空間標識を含んでよい。いくつかの実施形態では、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも９５％が、同一の空間標識を含んでよい。

【０２８１】

複数の固体担体（たとえばビーズ）には、10^6程度またはそれ以上のユニーク空間標識配列が存在可能である。空間標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。空間標識は、少なくとも、または多くとも１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５

０、１００、２００、もしくは３００ヌクレオチド長でありうる。空間標識は、約５～約２００ヌクレオチドを含みうる。空間標識は、約１０～約１５０ヌクレオチドを含みうる。空間標識は、約２０～約１２５ヌクレオチドを含みうる。

【０２８２】

細胞標識

バーコードは、１つ以上の細胞標識を含みうる。いくつかの実施形態では、細胞標識は、どの標的核酸がどの細胞に由来するかを決定するための情報を提供する核酸配列を含みうる。いくつかの実施形態では、細胞標識は、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されるすべてのバーコードで同一であるが、異なる固体担体（たとえばビーズ）については異なっている。いくつかの実施形態では、同一の細胞標識を含む、同一の固体担体上のバーコードのパーセンテージは、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、１００％、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値でありうる。いくつかの実施形態では、同一の細胞標識を含む、同一の固体担体上のバーコードのパーセンテージは、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、もしくは１００％、またはそうした近似値であってよい。たとえば、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも６０％が、同一の細胞標識を含みうる。別の例として、同一の固体担体上のバーコードの少なくとも９５％が、同一の細胞標識を含んでもよい。

【０２８３】

複数の固体担体（たとえばビーズ）には、10^6程度またはそれ以上のユニーク細胞標識配列が存在可能である。細胞標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。細胞標識は、少なくとも、または多くとも、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、２００、もしくは３００ヌクレオチド長でありうる。たとえば、細胞標識は、約５～約２００ヌクレオチドを含みうる。別の例として、細胞標識は、約１０～約１５０ヌクレオチドを含みうる。さらに別の例として、細胞標識は、約２０～約１２５ヌクレオチドを含みうる。

【０２８４】

バーコード配列

バーコードは、１つ以上のバーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、バーコード配列は、バーコードにハイブリダイズされた標的核酸種の特定のタイプについての情報の同定を提供する核酸配列を含みうる。バーコード配列は、バーコード（たとえば標的結合領域）にハイブリダイズされた標的核酸種の特定の存在に対するカウンターを提供する（たとえば、概算を提供する）核酸配列を含みうる。

【０２８５】

いくつかの実施形態では、バーコード配列の多様なセットが、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合される。いくつかの実施形態では、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のユニーク分子標識配列が存在しうる。たとえば、複数のバーコードは、識別可能な配列を有する約６５６１のバーコード配列を含みうる。別の例として、複数のバーコードは、識別可能な配列を有する約６５５３６のバーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、少なくとも、または多くとも、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、または10^9のユニークバーコード配列が存在しうる。ユニーク分子標識配列は、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されうる。

【０２８６】

バーコードは、約、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。バーコードは、少なくとも、または多くとも、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、

２００、もしくは３００ヌクレオチド長でありうる。
【０２８７】
分子標識
確率バーコードは、１つ以上の分子標識を含みうる。分子標識は、バーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、分子標識は、確率バーコードにハイブリダイズされた標的核酸種の特定のタイプを同定するための情報を提供する核酸配列を含みうる。分子標識は、確率バーコード（たとえば標的結合領域）にハイブリダイズされた標的核酸種の特定の存在に対するカウンターを提供する核酸配列を含みうる。
【０２８８】
いくつかの実施形態では、分子標識の多様なセットが所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合される。いくつかの実施形態では、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、10^9、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のユニーク分子標識配列が存在しうる。たとえば、複数の確率バーコードは、識別可能な配列を有する約６５６１の分子標識を含みうる。別の例として、複数の確率バーコードは、識別可能な配列を有する約６５５３６の分子標識を含みうる。いくつかの実施形態では、少なくとも、または多くとも、10^2、10^3、10^4、10^5、10^6、10^7、10^8、もしくは10^9のユニーク分子標識配列が存在しうる。ユニーク分子標識配列の確率バーコードは、所与の固体担体（たとえばビーズ）に結合されうる。
【０２８９】
複数の確率バーコードを用いた確率バーコーディングでは、異なる分子標識配列の数および標的のいずれかの出現の回数の比率は、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１、９０：１、１００：１、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値でありうる。標的は、同一またはほぼ同一の配列を有するｍＲＮＡ分子を含むｍＲＮＡ種でありうる。いくつかの実施形態では、異なる分子標識配列の数および標的のいずれかの出現の回数の比率は、少なくとも、または多くとも、１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、３０：１、４０：１、５０：１、６０：１、７０：１、８０：１、９０：１、もしくは１００：１である。
【０２９０】
分子標識は、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０ヌクレオチド長、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。分子標識は、少なくとも、または多くとも、１、２、３、４、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、１００、２００、もしくは３００ヌクレオチド長でありうる。
【０２９１】
標的結合領域
バーコードは、捕捉プローブなどの１つ以上の標的結合領域を含みうる。
いくつかの実施形態では、標的結合領域は、対象の標的とハイブリダイズすることができる。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、標的（たとえば、標的核酸、標的分子、たとえば、分析される細胞核酸）、たとえば、特定の遺伝子配列に特異的にハイブリダイズする核酸配列を含みうる。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、特定の標的核酸の特定の位置に結合（たとえばハイブリダイズ）しうる核酸配列を含みうる。いくつかの実施形態では、標的結合領域は、制限酵素部位オーバーハング（たとえば、ＥｃｏＲＩ付着末端オーバーハング）への特異的なハイブリダイゼーションが可能な核酸配列を含みうる。次いで、バーコードは、制限部位オーバーハングに相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートしうる。
【０２９２】

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

【０２９３】

いくつかの実施形態では、標的結合領域は、ポリアデニル化末端を含むｍＲＮＡにハイブリダイズすることができるオリゴ（ｄＴ）を含みうる。標的結合領域は、遺伝子特異的でありうる。たとえば、標的結合領域は、標的の特定の領域にハイブリダイズするように構成することができる。標的結合領域は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値のヌクレオチド長でありうる。標的結合領域は、少なくとも、または多くとも、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、もしくは３０ヌクレオチド長でありうる。標的結合領域は、約５～３０ヌクレオチド長であってもよい。バーコードが、遺伝子特異的標的結合領域を含む場合、このバーコードは、本明細書において遺伝子特異的バーコードと呼ぶことができる。

【０２９４】

配向性

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

【０２９５】

親和性

バーコードは、１つ以上の親和性を含みうる。たとえば、空間標識は、親和性を含みうる。親和性は、他のエンティティー（たとえば細胞レセプター）とのバーコードの結合を促進することができる化学的および／または生物学的部分を含みうる。たとえば、親和性は、抗体、たとえば、サンプル上の特定の部分（たとえばレセプター）に特異的な抗体を含みうる。いくつかの実施形態では、抗体は、バーコードを特定の細胞型または分子に誘導することができる。特定の細胞型もしくは分子および／またはその近傍にある標的を確率標識化することができる。抗体はバーコードを特定の位置に誘導することができるので

、いくつかの実施形態において、親和性は、空間標識のヌクレオチド配列に加え、空間情報も提供することができる。抗体は、治療用抗体、たとえば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、ヒト化されていても、またはキメラであってもよい。抗体は、ネイキッド抗体または融合抗体であってもよい。

【０２９６】

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

【０２９７】

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

【０２９８】

ユニバーサルアダプタープライマー

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

【０２９９】

エラーの訂正

本開示の細胞標識および／または任意の標識は、規定長さ、たとえば、各々７ヌクレオチド（いくつかのハミングエラー訂正コードに使用されるビット数に相当する）の核酸部分配列の固有のセットをさらに含んでもよく、これらは、エラー訂正能力を賦与するように設計される。ハミングコードは、他のエラー訂正コードと同様に、冗長性の原理に基づいており、ノイジー媒体にわたって伝送されるデータに冗長パリティビットを加えることによって構築されうる。このようなエラー訂正コードは、冗長パリティビットでサンプル識別子をコードし、これらのサンプル識別子を符号語として「伝送する」ことができる。ハミングコードは、シングルビットエラーを訂正することが可能な、固有の冗長性に基づいて固有のバイナリコードを識別する計算プロセスを意味しうる。たとえば、ハミングコードは、核酸増幅中に発生する単一ヌクレオチドエラーをスクリーニングするために、核酸バーコードと一致されうる。ハミングコードを用いることによる単一のヌクレオチドエラーの同定は、それによって、核酸バーコードの訂正を可能にしうる。

【０３００】

ハミングコードは、バイナリ部分空間における多次元球（すなわち、たとえば、超球）

の中心から選択される可能な符号語のサブセットによって表されうる。シングルビットエラーは、特定の符号語に関連付けられた超球に含まれうるため、訂正されうる。一方、特定の符号語に関連付けられていないダブルビットエラーは、検出可能であるが、訂正することができない。任意のシングルビットエラーが、中心座標から１半径以内に入ることによって訂正されうる、座標（０，０，０）（すなわち、たとえば、ｘ－ｙ－ｚ座標系を用いた）を中心とする第１の超球；すなわち、たとえば、（０，０，０）；（０，１，０）；（０，０，１）；（１，０，０）、または（１，１，０）の座標を有するシングルビットエラーを考える。同様に、シングルビットエラーが、その中心座標（１，１，１）（すなわち、たとえば、（１，１，１）；（１，０，１）；（０，１，０）；または（０，１，１））の１半径以内に入ることによって訂正されうる、第２の超球が構築されうる。

【０３０１】

いくつかの実施形態では、エラー訂正コードを作製するために用いられる核酸部分配列の長さは、変動してもよく、たとえば、それらは、少なくとも３ヌクレオチド、少なくとも７ヌクレオチド、少なくとも１５ヌクレオチド、または少なくとも３１ヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、他の長さの核酸部分配列は、エラー訂正コードを作製するために用いられうる。

【０３０２】

リンカー

バーコードが、２つ以上のタイプの標識（たとえば、２つ以上の細胞標識または２つ以上のバーコード配列、たとえば１つの分子標識）を含む場合、標識には、リンカー標識配列が組み入れられうる。リンカー標識配列は、少なくとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれ以上のヌクレオチド長でありうる。リンカー標識配列は、多くとも約５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれ以上のヌクレオチド長でありうる。ある場合、リンカー標識配列は、１２ヌクレオチド長である。リンカー標識配列を用いて、バーコードの合成を容易にすることができる。リンカー標識は、エラー訂正（たとえばハミング）コードを含みうる。

【０３０３】

固体担体

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

【０３０４】

ビーズは、たとえば、シリカゲルビーズ、調節多孔性ガラスビーズ、磁気ビーズ、ダイナビーズ、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、またはそれらの任意の組合せであってよい。ビーズは、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せなどの材料を含みうる。

【０３０５】

いくつかの実施形態では、ビーズは、ポリマービーズ、たとえば、変形性ビーズまたはゲルビーズであってよく、これらは、バーコードまたは確率バーコードで官能化されている（たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）からのゲルビーズなど）。いくつかの実施形態では、ゲルビーズは、ポリマーベースのゲルを含みうる。ゲルビーズは、たとえば、１つ以上のポリマー前駆体を液滴中に封入することによって作製することができる。促進剤（たとえば、テトラメチルエチレンジアミン（ＴＥＭＥＤ））にポリマー前駆体を曝露すると、ゲルビーズが作製されうる。

【０３０６】

いくつかの実施形態では、粒子は、分解性でありうる。たとえば、ポリマービーズは、たとえば、所望の条件下で、溶解、溶融、または分解しうる。所望の条件は、環境条件を含みうる。所望の条件は、制御された様式で、ポリマービーズの溶解、溶融、または分解を引き起こしうる。ゲルビーズは、化学的刺激、物理的刺激、生物学的刺激、熱刺激、磁気刺激、電気刺激、光刺激、またはそれらの任意の組合せによって、溶解、溶融、または分解しうる。

【０３０７】

たとえば、オリゴヌクレオチドバーコードなどの被検物質および／もしくは試薬を、ゲルビーズの内側表面（たとえば、オリゴヌクレオチドバーコードおよび／もしくはオリゴヌクレオチドバーコードを作製するために用いられる材料の拡散を介して進入可能な内部）ならびに／またはゲルビーズの外側表面、あるいは本明細書に記載されるいずれか他のマイクロカプセルにカップリング／固定してもよい。カップリング／固定は、化学結合（たとえば、共有結合、イオン結合）または物理的現象（たとえば、ファンデルワールス力、双極子－双極子相互作用など）の任意の形態を介するものであってよい。いくつかの実施形態では、ゲルビーズまたは本明細書に記載する任意の他のマイクロカプセルに対する試薬のカップリング／固定は、たとえば、不安定部分（たとえば、本明細書に記載の化学架橋剤をはじめとする、化学架橋剤）を介するなど、可逆性であってもよい。刺激を適用すると、不安定部分は、切断されて、固定された試薬が遊離されうる。いくつかの実施形態では、不安定部分は、ジスルフィド結合である。たとえば、オリゴヌクレオチドバーコードが、ジスルフィド結合を介してゲルビーズに固定されている場合、ジスルフィド結合を還元剤に曝露することにより、ジスルフィド結合を切断して、オリゴヌクレオチドバーコードをビーズから遊離させることができる。不安定部分は、ゲルビーズもしくはマイクロカプセルの一部として、試薬もしくは被検物質をゲルビーズもしくはマイクロカプセルに連結する化学リンカーの一部として、および／または試薬もしくは被検物質の一部として含有させてもよい。いくつかの実施形態では、複数のバーコードの少なくとも１つのバーコードは、粒子上に固定され、粒子上に部分的に固定され、粒子に封入され、粒子に部分的に封入され、またはそれらの任意の組合せでありうる。

【０３０８】

いくつかの実施形態では、ゲルビーズは、限定するものではないが、以下のものをはじめとする、極めて多様なポリマーを含みうる：ポリマー、熱感受性ポリマー、感光性ポリマー、磁気ポリマー、ｐＨ感受性ポリマー、塩感受性ポリマー、化学的感受性ポリマー、高分子電解質、多糖、ペプチド、タンパク質、および／またはプラスチック。ポリマーとしては、限定するものではないが、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）（ＰＮＩＰＡＡｍ）、ポリ（スルホン酸スチレン）（ＰＳＳ）、ポリ（アリルアミン）（ＰＡＡｍ）、ポリ（アクリル酸）（ＰＡＡ）、ポリ（エチレンイミン）（ＰＥＩ）、ポリ（ジアリルジメチル－塩化アンモニウム）（ＰＤＡＤＭＡＣ）、ポリ（ピロール）（ＰＰｙ）、ポリ（ビニルピロリドン）（ＰＶＰＯＮ）、ポリ（ビニルピリジン）（ＰＶＰ）、ポリ（メタクリル酸）（ＰＭＡＡ）、ポリ（メチルメタクリレート）（ＰＭＭＡ）、ポリスチレン（ＰＳ）、ポリ（テトラヒドロフラン）（ＰＴＨＦ）、ポリ（フタルアルデヒド）（ＰＴＨＦ）、ポリ（ヘキシルビオロゲン）（ＰＨＶ）、ポリ（Ｌ－リシン）（ＰＬＬ）、ポリ（Ｌ－アルギニン）（ＰＡＲＧ）、乳酸－グリコール酸共重合体（ＰＬＧＡ）などの材料が挙げられる。

【０３０９】
多数の化学的刺激を用いて、ビーズの破壊、溶解、または分解をトリガーすることができる。これらの化学的変化の例として、限定するものではないが、ビーズ壁に対するｐＨ媒介による変化、架橋の化学的切断を介したビーズ壁の崩壊、ビーズ壁の解重合トリガー、およびビーズ壁スイッチング反応が挙げられる。また、バルク変化を用いて、ビーズの破壊をトリガーしてもよい。
【０３１０】
また、さまざまな刺激を介したマイクロカプセルに対するバルクまたは物理的変化も、試薬を放出するようにカプセルを設計する上で多くの利点をもたらす。バルクまたは物理的変化は、巨視的規模で起こり、その際、ビーズ破断は、刺激により誘導された機械物理的力の結果による。こうしたプロセスとしては、限定するものではないが、圧力誘導破断、ビーズ壁溶融、またはビーズ壁の多孔性変化が挙げられる。
【０３１１】
生物学的刺激を用いて、ビーズの破壊、溶解、または分解をトリガーすることもできる。概して、生物学的トリガーは、化学的トリガーと類似しているが、多くの例では、生体分子、または酵素、ペプチド、糖類、核酸などの生存系に一般的に存在する分子が使用される。たとえば、ビーズは、特定のプロテアーゼによる切断に感受性のペプチド架橋を有するポリマーを含んでもよい。さらに具体的には、一例は、ＧＦＬＧＫペプチド架橋を含むマイクロカプセルを含んでもよい。プロテアーゼカテプシンＢなどの生物学的トリガーを加えると、シェルウェルのペプチド架橋が切断されて、ビーズの内容物が放出される。他の事例では、プロテアーゼを熱活性化してもよい。別の例では、ビーズは、セルロースを含有するシェル壁を含む。加水分解性酵素キトサンの添加は、セルロース結合の切断、シェル壁の解重合、およびその内部内容物の放出のための生物学的トリガーとして役立つ。
【０３１２】
さらに、ビーズは、熱刺激の適用時にその内容物を放出するように誘導することもできる。温度の変化は、ビーズにさまざまな変化を引き起こしうる。熱の変化は、ビーズ壁が崩壊するように、ビーズの溶融を引き起こしうる。別の事例では、熱は、ビーズが破断または破裂するように、ビーズの内部成分の内圧を高めうる。また別の事例では、熱は、ビーズを収縮した脱水状態に変形させうる。さらに、熱は、ビーズの壁内の熱感受性ポリマーに作用して、ビーズの破壊を引き起こしうる。
【０３１３】
マイクロカプセルのビーズ壁に磁気ナノ粒子を含有させると、ビーズの破断トリガー、ならびに多数のビーズの誘導を可能にしうる。本開示のデバイスは、いずれの目的で磁気ビーズを含んでもよい。一例では、高分子電解質含有ビーズにFe_3O_4ナノ粒子を組み込むと、振動磁界刺激の存在下で破断がトリガーされる。
【０３１４】
ビーズはまた、電気刺激の結果として破壊、溶解、または分解することもできる。前のセクションに記載した磁気粒子と同様に、電気感受性ビーズも、ビーズの破断トリガー、ならびに電界下でのアラインメント、導電性またはレドックス反応などの他の機能を可能にする。一例では、電気感受性材料を含有するビーズは、内部試薬の放出を制御することができるように、電界下でアラインメントされる。他の例では、電界は、ビーズ壁自体の内部でレドックス反応を誘導することもでき、これにより、多孔性が増加しうる。
【０３１５】
また、光刺激を用いて、ビーズを破壊することもできる。多数の光トリガーが考えられ、特定の範囲の波長の光子を吸収することができるナノ粒子および発色団などのさまざまな分子を用いるシステムが挙げられる。たとえば、金属酸化物コーティングをカプセルトリガーとして用いることができる。SiO_2でコーティングされた高分子電解質カプセルのＵＶ照射は、ビーズ壁の崩壊を引き起こしうる。また別の例では、アゾベンゼン基などのフォトスイッチ材料をビーズ壁に組み込んでもよい。ＵＶまたは可視光線を適用すると

、こうした化学物質は、光子の吸収時に、可逆的シス－トランス異性化を被る。この態様では、光子スイッチの組込みによって、光トリガー適用の際に、崩壊するか、またはより多孔性になりうるビーズ壁が得られる。

【０３１６】

たとえば、図２に示すバーコード（たとえば、確率バーコード）の非限定的な例において、ブロック２０８でのマイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに、単一細胞などの細胞を導入した後、ビーズをブロック２１２のマイクロウェルアレイの複数のマイクロウェルに導入することができる。各マイクロウェルは、１つのビーズを含みうる。ビーズは、複数のバーコードを含みうる。バーコードは、ビーズに結合した５’アミン領域を含みうる。バーコードは、ユニバーサル標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、標的結合領域、またはそれらの任意の組合せを含んでもよい。

【０３１７】

本明細書に開示するバーコードは、固体担体（たとえば、ビーズ）に関連（たとえば、結合）させることができる。固体担体と結合したバーコードは、各々、ユニーク配列を有する少なくとも１００または１０００のバーコード配列を含む群から選択されるバーコード配列を含みうる。いくつかの実施形態では、固体担体と結合した異なるバーコードは、異なる配列のバーコード配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、固体担体と結合した、特定のパーセンテージのバーコードが、同じ細胞標識を含む。たとえば、そのパーセンテージは、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、１００％、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値でありうる。別の例として、パーセンテージは、少なくとも、または多くとも６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％、もしくは１００％でありうる。いくつかの実施形態では、固体担体と結合したバーコードは、同じ細胞標識を含みうる。異なる固体担体と結合したバーコードは、ユニーク配列を有する少なくとも１００または１０００の細胞標識を含む群から選択される、異なる細胞標識を含んでもよい。

【０３１８】

本明細書に開示するバーコードは、固体担体（たとえば、ビーズ）に関連（たとえば、結合）させることができる。いくつかの実施形態では、サンプル中の複数の標的に確率バーコードを付ける工程は、複数のバーコードと結合した複数の合成粒子を含む固体担体を用いて、実施することができる。いくつかの実施形態では、固体担体は、複数のバーコードと結合した複数の合成粒子を含みうる。さまざまな固体担体上の複数のバーコードの空間標識は、少なくとも１ヌクレオチド異なりうる。固体担体は、たとえば、２次元または３次元の複数のバーコードを含みうる。合成粒子は、ビーズであってよい。ビーズは、シリカゲルビーズ、調節多孔性ガラスビーズ、磁気ビーズ、ダイナビーズ、セファデックス／セファロースビーズ、セルロースビーズ、ポリスチレンビーズ、またはそれらの任意の組合せであってよい。固体担体は、ポリマー、マトリックス、ヒドロゲル、ニードルアレイデバイス、抗体、またはそれらの任意の組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、固体担体は、浮動性であってよい。いくつかの実施形態では、固体担体は、半固体または固体アレイに埋め込むことができる。バーコードは、固体担体と結合していなくてもよい。バーコードは、個別のヌクレオチドであってもよい。バーコードは、基材と結合してもよい。

【０３１９】

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

【０３２０】

いくつかの実施形態では、固体担体はビーズである。ビーズは、核酸を（たとえば共有結合または非共有結合で）固定することができる、固体、多孔性、もしくは中空のスフェ

ア、ボール、ベアリング、シリンダー、または他の類似の構成体の１つ以上のタイプを包含しうる。ビーズは、たとえば、プラスチック、セラミック、金属、もしくは高分子材料、またはそれらの任意の組合せから構成されうる。ビーズは、離散粒子であるか、またはそれを含んでもよく、離散粒子は、球状（たとえばマイクロスフェア）であるか、または非球状もしくは不規則形状、たとえば、立方体形、直方体形、角錐形、円柱形、円錐形、扁球形、ディスク形などを有する。いくつかの実施形態では、ビーズは、非球状の形状でありうる。

【０３２１】

ビーズは、限定されるものではないが、常磁性材料（たとえば、マグネシウム、モリブデン、リチウム、およびタンタル）、超常磁性材料（たとえば、フェライト（Fe_3O_4、マグネタイト）ナノ粒子）、強磁性材料（たとえば、鉄、ニッケル、コバルト、それらのいくつかの合金、およびいくつかの希土類金属化合物）、セラミック、プラスチック、ガラス、ポリスチレン、シリカ、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、アガロース、ヒドロゲル、ポリマー、セルロース、ナイロン、ならびにそれらの任意の組合せなどのさまざまな材料を含みうる。

【０３２２】

いくつかの実施形態では、ビーズ（たとえば、バーコードが結合されたビーズ）は、ヒドロゲルビーズである。いくつかの実施形態では、ビーズは、ヒドロゲルを含む。

【０３２３】

本明細書に開示するいくつかの実施形態は、１つ以上の粒子（たとえば、ビーズ）を含む。粒子は各々、複数のオリゴヌクレオチド（たとえば、バーコード）を含みうる。複数のオリゴヌクレオチドは各々、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、細胞標識、および標的結合領域（たとえば、オリゴ（ｄＴ）配列、遺伝子特異的配列、ランダム多量体、またはそれらの組合せ）を含みうる。複数のオリゴヌクレオチドの各々の細胞標識配列は、同じであってもよい。異なる粒子上のオリゴヌクレオチドの細胞標識配列は、異なる粒子上のオリゴヌクレオチドを同定できるように、相違してもよい。異なる細胞標識配列の数は、異なる実装において相違してもよい。いくつかの実施形態では、細胞標識配列の数は、１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、10^6、10^7、10^8、10^9、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはそれ以上、あるいはそうした近似値でありうる。いくつかの実施形態では、細胞標識配列の数は、少なくとも、または多くとも１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、10^6、10^7、10^8、もしくは10^9でありうる。いくつかの実施形態では、複数の粒子の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００以下、またはそれ以上が、同じ細胞配列のオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、同じ細胞配列のオリゴヌクレオチドを含む複数の粒子は、多くとも０．１％、０．２％、０．３％、０．４％、０．５％、０．７％、０．８％、０．９％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％またはそれ以上であってよい。いくつかの実施形態では、複数の粒子のいずれも同じ細胞標識配列を含まない。

【０３２４】

各粒子の複数のオリゴヌクレオチドは、異なるバーコード配列（たとえば、分子標識）を含みうる。いくつかの実施形態では、バーコード配列の数は、１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２

０００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、10^6、10^7、10^8、10^9、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、あるいはそうした近似値でありうる。バーコード配列の数は、少なくとも、または多くとも１０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、10^6、10^7、10^8、もしくは10^9でありうる。たとえば、複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも１００は、異なるバーコード配列を含む。別の例として、単一粒子において、複数のオリゴヌクレオチドの少なくとも１００、５００、１０００、５０００、１００００、１５０００、２００００、５００００、これらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはそれ以上が、異なるバーコード配列を含む。いくつかの実施形態は、バーコードを含む複数の粒子を提供する。いくつかの実施形態では、標的の発生率（またはコピーもしくは数）と異なるバーコード配列の比は、少なくとも、１：１、１：２、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：３０、１：４０、１：５０、１：６０、１：７０、１：８０、１：９０、またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数のオリゴヌクレオチドの各々は、サンプル標識、ユニバーサル標識、またはその両方をさらに含む。粒子は、たとえば、ナノ粒子またはミクロ粒子であってよい。

【０３２５】

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

【０３２６】

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

【０３２７】

ビーズは、基材への埋込みおよび／または結合が可能である。ビーズは、ゲル、ヒドロゲル、ポリマー、および／またはマトリックスへの埋込みおよび／または結合が可能である。基材（たとえば、ゲル、マトリックス、スキャフォールド、またはポリマー）内のビーズの空間位置は、位置アドレスとして機能可能なビーズ上のバーコードに存在する空間標識を用いて同定可能である。

【０３２８】

ビーズの例としては、限定されるものではないが、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、Ｄｙｎａｂｅａｄ（登録商標）、ＭＡＣＳ（登録商標）マイクロビーズ、抗体コンジュゲートビーズ（たとえば、抗免疫グロブリンマイクロビーズ）、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、およびＢｃＭａｇ（商標）カルボキシル末端磁気ビーズが挙げられうる。

【０３２９】

ビーズは、１つの蛍光光学チャネルまたは複数の光学チャネルで蛍光を発するように量子ドットまたは蛍光色素への関連付け（たとえばそれらによる含浸）が可能である。ビーズは、常磁性または強磁性にするために酸化鉄または酸化クロムへの関連付けが可能である。ビーズは同定可能でありうる。たとえば、ビーズは、カメラを用いてイメージング可能である。ビーズは、ビーズに関連付けられた検出可能なコードを有しうる。たとえば、ビーズは、バーコードを含みうる。ビーズは、たとえば、有機または無機の溶液中での膨潤に起因してサイズ変化しうる。ビーズは疎水性でありうる。ビーズは親水性でありうる。ビーズは生体適合性でありうる。

【０３３０】

固体担体（たとえばビーズ）は可視化可能である。固体担体は可視化タグ（たとえば蛍光色素）を含みうる。固体担体（たとえばビーズ）は識別子（たとえば数）でエッチング可能である。識別子はビーズのイメージングにより可視化可能である。

【０３３１】

固体担体は、不溶性、半溶解性、または不溶性材料を含みうる。固体担体は、それに結合されたリンカー、スキャフォールド、構成単位、または他の反応性部分を含む場合、「官能化された」と示されうる一方、固体担体は、それに結合されたこのような反応性部分を含まない場合、「非官能化」でありうる。固体担体は、マイクロタイターウェル形式；カラム中などでの流水式；またはディップスティック式（ｄｉｐｓｔｉｃｋ）などで、溶液中で遊離させた状態で用いられうる。

【０３３２】

固体担体は、膜、紙、プラスチック、被覆表面、平坦な表面、ガラス、スライド、チップ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。固体担体は、樹脂、ゲル、ミクロスフェア、または他の幾何学形状の形態を取りうる。固体担体は、シリカチップ、ミクロ粒子、ナノ粒子、プレート、アレイ、毛細管、平坦な担体、たとえば、ガラス繊維フィルター、ガラス表面、金属表面（鋼、金、銀、アルミニウム、ケイ素および銅）、ガラス担体、プラスチック担体、ケイ素担体、チップ、フィルター、膜、マイクロウェルプレート、スライド、プラスチック材料（マルチウェルプレートまたは膜（たとえば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリ二フッ化ビニリデンで形成される）を含む）、および／またはウエハー、コーム、ピンまたはニードル（たとえば、コンビナトリアル合成もしくは分析に好適なピンのアレイ）、またはたとえばウエハー（たとえばシリコンウエハー）、フィルター底部を有するかもしくは有さない窪みを備えたウエハーなどの平坦な表面の一連の窪みもしくはナノリットルウェル中のビーズを含みうる。

【０３３３】

固体担体は、ポリマーマトリックス（たとえば、ゲル、ヒドロゲル）を含みうる。ポリマーマトリックスは、細胞内空間（たとえば、オルガネラの周り）を透過することが可能でありうる。ポリマーマトリックスは、循環系全体にわたって送られることが可能でありうる。

【０３３４】

固体担体は、生体分子でありうる。たとえば、固体担体は、核酸、タンパク質、抗体、ヒストン、細胞コンパートメント、脂質、炭水化物などでありうる。生体分子である固体担体は、増幅、翻訳、転写、分解、および／または修飾（たとえば、ペグ化、ＳＵＭＯ化

、アセチル化、メチル化）されうる。生体分子である固体担体は、生体分子に結合される空間標識に加えて、空間および時間情報を提供することができる。たとえば、生体分子は、修飾されない場合、第１の立体構造を含みうるが、修飾される場合、第２の立体構造に変化しうる。異なる立体構造は、本開示のバーコード（たとえば確率バーコード）を標的に露出しうる。たとえば、生体分子は、生体分子の折りたたみによりアクセスできないバーコードを含みうる。生体分子の修飾（たとえばアセチル化）後、生体分子は、バーコードを露出するように立体構造を変化させうる。修飾のタイミングは、本開示のバーコーディングの方法に別の時間次元を提供することができる。

【０３３５】

いくつかの実施形態では、本開示のバーコード試薬を含む生体分子は、細胞の細胞質に位置しうる。活性化後、生体分子は、核に移動することができ、その直後に、バーコーディングを行うことができる。このように、生体分子の修飾は、バーコードによって同定される標的のためのさらなる空間－時間情報をコードすることができる。

【０３３６】

基材およびマイクロウェルアレイ

本明細書で用いられる場合、基材はあるタイプの固体担体を意味しうる。基材は、本開示のバーコードおよび確率バーコードを含みうる固体担体を意味しうる。基材は、たとえば、複数のマイクロウェルを含みうる。たとえば、基材は、２つ以上のマイクロウェルを含むウェルアレイであってよい。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、規定の体積の小さい反応チャンバーを含みうる。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、１つ以上の細胞を閉じ込めることができる。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、１つの細胞のみを閉じ込めることができる。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、１つ以上の固体担体を閉じ込めることができる。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、１つの固体担体のみを閉じ込めることができる。いくつかの実施形態では、マイクロウェルは、単一細胞および単一固体担体（たとえば、ビーズ）を閉じ込める。マイクロウェルは、本開示の組合せバーコード試薬を含みうる。

【０３３７】

アレイのマイクロウェルは、さまざまな形状およびサイズで作製されうる。ウェルの幾何学形状としては、限定されるものではないが、円柱形、円錐形、半球形、長方形、または多面体（たとえば、いくつかの平面で構成される三次元形状、たとえば、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）が挙げられうる。マイクロウェルは、これらの幾何学形状の２つ以上を組み合わせた形状を含みうる。たとえば、マイクロウェルは、部分的に円柱形であってもよく、残りの部分は、逆円錐の形状を有する。マイクロウェルは、２つの並んだ円柱を含むことができ、一方が他方の直径（たとえば、細胞の直径にほぼ相当する）より大きい直径（たとえば、ビーズの直径にほぼ相当する）を有し、これらは、円柱の全長（深さ）に延びる垂直なチャネル（すなわち、円柱の軸に平行な）によって連結される。マイクロウェルの開口部は、基材の上面にありうる。マイクロウェルの開口部は、基材の下面にありうる。マイクロウェルの閉口端部（または底部）は、平坦でありうる。マイクロウェルの閉口端部（または底部）は、曲面（たとえば、凸面または凹面）を有しうる。マイクロウェルの形状および／またはサイズは、マイクロウェル内に閉じ込められる細胞または固体担体のタイプに基づいて決定されうる。

【０３３８】

ウェル間の基材の部分は、トポロジーを有しうる。たとえば、ウェル間の基材の部分は、丸みを帯びていてもよい。ウェル間の基材の部分は、尖っていてもよい。ウェル間の基材の間隔部分は、平坦でありうる。ウェル間の基材の部分は、平坦でないことがある。ある場合、ウェル間の基材の部分は、丸みを帯びている。言い換えると、ウェルを含まない基材の部分は、曲面を有しうる。曲面は、曲面の最も高い点（たとえば頂点）が２つ以上のウェルの縁部間の最も遠い点（たとえば、ウェルから等距離）にありうるように作製されうる。曲面は、曲面の出発点が、第１のマイクロウェルの縁部にあり、第２のマイクロウェルの端部で終端する放物線を形成するように作製されうる。この放物線は、ウェルの

六角格子の近くでマイクロウェルを捕捉するように二次元に延在されうる。曲面は、ウェル間の表面が、ウェルの開口部の面より高いか、および／または湾曲しているように作製されうる。曲面の高さは、０．１、０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、もしくは７マイクロメートルまたはそれ以上でありうるか、あるいは少なくともそのような値でありうる。いくつかの実施形態では、曲面の高さは、多くとも０．１、０．５、１、１．５、２、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、もしくは７マイクロメートルまたはそれ以上でありうる。

【０３３９】

マイクロウェル寸法は、ウェルの直径および深さに関して特徴付けられうる。本明細書で用いられる場合、マイクロウェルの直径は、マイクロウェルの幾何学形状の面の断面に内接されうる最大の円を意味する。マイクロウェルの直径は、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の約１倍～約１０倍の範囲でありうる。マイクロウェル直径は、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の、以下の倍数でありうるか、または少なくとも、１倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、もしくは少なくとも１０倍でありうる。いくつかの実施形態では、マイクロウェル直径は、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の、多くとも１０倍、多くとも５倍、多くとも４倍、多くとも３倍、多くとも２倍、多くとも１．５倍、もしくは多くとも１倍でありうる。マイクロウェル直径は、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の約２．５倍でありうる。

【０３４０】

マイクロウェルの直径は、絶対寸法に関して規定されうる。マイクロウェルの直径は、約５～約６０マイクロメートルの範囲でありうる。マイクロウェル直径は、以下の値でありうるか、または少なくとも、５マイクロメートル、少なくとも１０マイクロメートル、少なくとも１５マイクロメートル、少なくとも２０マイクロメートル、少なくとも２５マイクロメートル、少なくとも３０マイクロメートル、少なくとも３５マイクロメートル、少なくとも４０マイクロメートル、少なくとも４５マイクロメートル、少なくとも５０マイクロメートル、もしくは少なくとも６０マイクロメートルでありうる。マイクロウェル直径は、多くとも６０マイクロメートル、多くとも５０マイクロメートル、多くとも４５マイクロメートル、多くとも４０マイクロメートル、多くとも３５マイクロメートル、多くとも３０マイクロメートル、多くとも２５マイクロメートル、多くとも２０マイクロメートル、多くとも１５マイクロメートル、多くとも１０マイクロメートル、もしくは多くとも５マイクロメートルでありうる。マイクロウェル直径は、約３０マイクロメートルでありうる。

【０３４１】

マイクロウェル深さは、細胞および固体担体の効率的な閉じ込めを提供するように選択されうる。マイクロウェル深さは、アッセイ緩衝液およびウェル内に含まれる他の試薬の効率的な交換を提供するように選択されうる。直径対高さの比率（すなわち、アスペクト比）は、細胞および固体担体がマイクロウェルの内部に沈降した後、それらが、マイクロウェルの上の流体の動きによって移動されないように選択されうる。マイクロウェルの寸法は、マイクロウェルが、マイクロウェルの上の流体の動きによって除去されずに、さまざまなサイズの固体担体および細胞を収容するのに十分な空間を有するように選択されうる。マイクロウェルの深さは、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の約１倍～約１０倍の範囲でありうる。マイクロウェル深さは、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の、以下の倍数でありうるか、または少なくとも、１倍、少なくとも１．５倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、もしくは少なくとも１０倍でありうる。マイクロウェル深さは、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の、多くとも１０倍、多くとも５倍、多くとも４倍、多くとも３倍、多くとも２倍、多くとも１．５倍、または多くとも１倍でありうる。マイクロウェル深さは、マイクロウェルに閉じ込められる細胞または固体担体の直径の約２．５倍でありうる。

【０３４２】
マイクロウェルの深さは、絶対寸法に関して規定されうる。マイクロウェルの深さは、約１０～約６０マイクロメートルの範囲でありうる。マイクロウェル深さは、以下の値でありうるか、または少なくとも、１０マイクロメートル、少なくとも２０マイクロメートル、少なくとも２５マイクロメートル、少なくとも３０マイクロメートル、少なくとも３５マイクロメートル、少なくとも４０マイクロメートル、少なくとも５０マイクロメートル、もしくは少なくとも６０マイクロメートルでありうる。マイクロウェル深さは、多くとも６０マイクロメートル、多くとも５０マイクロメートル、多くとも４０マイクロメートル、多くとも３５マイクロメートル、多くとも３０マイクロメートル、多くとも２５マイクロメートル、多くとも２０マイクロメートル、もしくは多くとも１０マイクロメートルでありうる。マイクロウェル深さは、約３０マイクロメートルでありうる。

【０３４３】
本開示の方法、デバイス、およびシステムに使用されるマイクロウェルの体積は、約２００マイクロメートル^3～約１２０，０００マイクロメートル^{3}の範囲でありうる。マイクロウェル体積は、少なくとも２００マイクロメートル^3、少なくとも５００マイクロメートル^3、少なくとも１，０００マイクロメートル^3、少なくとも１０，０００マイクロメートル^3、少なくとも２５，０００マイクロメートル^3、少なくとも５０，０００マイクロメートル^3、少なくとも１００，０００マイクロメートル^3、または少なくとも１２０，０００マイクロメートル^{3}でありうる。マイクロウェル体積は、多くとも１２０，０００マイクロメートル^3、多くとも１００，０００マイクロメートル^3、多くとも５０，０００マイクロメートル^3、多くとも２５，０００マイクロメートル^3、多くとも１０，０００マイクロメートル^3、多くとも１，０００マイクロメートル^3、多くとも５００マイクロメートル^3、または多くとも２００マイクロメートル^{3}でありうる。マイクロウェル体積は、約２５，０００マイクロメートル^{3}でありうる。マイクロウェル体積は、これらの値のいずれかによって境界される任意の範囲（たとえば約１８，０００マイクロメートル^3～約３０，０００マイクロメートル^3）内にありうる。

【０３４４】
マイクロウェルの体積は、以下の値でありうるか、または少なくとも、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ナノリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルの体積は、多くとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ナノリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルに適合しうる液体の体積は、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ナノリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルに適合しうる液体の体積は、多くとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ナノリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルの体積は、以下の値でありうるか、または少なくとも、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ピコリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルの体積は、多くとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ピコリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルに適合しうる液体の体積は、少なくとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ピコリットル^{3}またはそれ以上でありうる。マイクロウェルに適合しうる液体の体積は、多くとも５、１０、１５、２０、２５、３０、３５　４０、４５もしくは５０ピコリットル^{3}またはそれ以上でありうる。

【０３４５】
本開示の方法、デバイス、およびシステムに使用されるマイクロウェルの体積は、あるマイクロウェルと別のマイクロウェルの体積の変動に関してさらに特徴付けられうる。マイクロウェル体積の変動係数（パーセンテージとして表される）は、約１％～約１０％の範囲でありうる。マイクロウェル体積の変動係数は、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、少なくとも９％、または少なくとも１０％でありうる。マイクロウェル

体積の変動係数は、多くとも１０％、多くとも９％、多くとも８％、多くとも７％、多くとも６％、多くとも５％、多くとも４％、多くとも３％、多くとも２％、または多くとも１％でありうる。マイクロウェル体積の変動係数は、これらの値によって囲まれる範囲内の任意の値、たとえば、約１．５％～約６．５％を有しうる。いくつかの実施形態では、マイクロウェル体積の変動係数は、約２．５％でありうる。

【０３４６】

本開示の方法、デバイス、およびシステムに使用されるビーズの表面積（またはバーコードオリゴヌクレオチドが結合されうる固体担体の表面積）に対するマイクロウェルの体積の比率は、約２．５～約１，５２０マイクロメートルの範囲でありうる。比率は、少なくとも２．５、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも１００、少なくとも５００、少なくとも７５０、少なくとも１，０００、または少なくとも１，５２０でありうる。比率は、多くとも１，５２０、多くとも１，０００、多くとも７５０、多くとも５００、多くとも１００、多くとも１０、多くとも５、または多くとも２．５でありうる。比率は、約６７．５でありうる。ビーズ（または固定化に使用される固体担体）の表面積に対するマイクロウェル体積の比率は、これらの値のいずれかによって境界される任意の範囲（たとえば約３０～約１２０）内にありうる。

【０３４７】

マイクロウェルアレイ中のウェルは、一次元、二次元、または三次元アレイで配置されうる。いくつかの実施形態では、三次元アレイは、たとえば、一連の２つ以上の二次元アレイを積層することによって（すなわち、マイクロウェルアレイを含む２つ以上の基材を積層することによって）実現されうる。

【０３４８】

マイクロウェル間のパターンおよび間隔は、各ウェル中への単一細胞および単一の固体担体（たとえばビーズ）の閉じ込めの効率性を最適化するように、ならびにアレイの単位面積当たりのウェルの数を最大にするように選択されうる。マイクロウェルは、さまざまなランダムまたは非ランダムパターンに従って分配されうる。たとえば、それらは、アレイ基材の表面にわたってランダムに全体的に分配されてもよく、またはそれらは、正方格子、長方形格子、六角格子などで配置されうる。ある場合、マイクロウェルは、六角形に配置される。ウェル間の中心間距離（または間隔）は、約５マイクロメートル～約７５マイクロメートルで変化しうる。ある場合、マイクロウェル間の間隔は、約１０マイクロメートルである。他の実施形態では、ウェル間の間隔は、少なくとも５マイクロメートル、少なくとも１０マイクロメートル、少なくとも１５マイクロメートル、少なくとも２０マイクロメートル、少なくとも２５マイクロメートル、少なくとも３０マイクロメートル、少なくとも３５マイクロメートル、少なくとも４０マイクロメートル、少なくとも４５マイクロメートル、少なくとも５０マイクロメートル、少なくとも５５マイクロメートル、少なくとも６０マイクロメートル、少なくとも６５マイクロメートル、少なくとも７０マイクロメートル、または少なくとも７５マイクロメートルである。マイクロウェル間隔は、多くとも７５マイクロメートル、多くとも７０マイクロメートル、多くとも６５マイクロメートル、多くとも６０マイクロメートル、多くとも５５マイクロメートル、多くとも５０マイクロメートル、多くとも４５マイクロメートル、多くとも４０マイクロメートル、多くとも３５マイクロメートル、多くとも３０マイクロメートル、多くとも２５マイクロメートル、多くとも２０マイクロメートル、多くとも１５マイクロメートル、多くとも１０マイクロメートル、多くとも５マイクロメートルでありうる。マイクロウェル間隔は、約５５マイクロメートルでありうる。マイクロウェル間隔は、これらの値のいずれかによって境界される任意の範囲（たとえば、約１８マイクロメートル～約７２マイクロメートル）内にありうる。

【０３４９】

マイクロウェルアレイは、細胞および固体担体をウェル中に導き、および／またはそれらがウェル間の表面に沈降するのを防ぐのを助けるように設計された、マイクロウェル間の表面特徴を含みうる。好適な表面特徴の例としては、限定されるものではないが、ウェ

ルを取り囲むかまたはウェル間の表面をまたぐ、ドーム状、畝のある、または尖った表面特徴が挙げられうる。

【０３５０】

マイクロウェルアレイ中のウェルの総数は、ウェルのパターンおよび間隔ならびにアレイの全体寸法によって決定されうる。アレイ中のマイクロウェルの数は、約９６～約５，０００，０００またはそれ以上の範囲でありうる。アレイ中の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でありうる。アレイ中のマイクロウェルの数は、多くとも５，０００，０００、多くとも１，０００，０００、多くとも７５，０００、多くとも５０，０００、多くとも２５，０００、多くとも１０，０００、多くとも５，０００、多くとも１，５３６、多くとも３８４、または多くとも９６ウェルでありうる。アレイ中のマイクロウェルの数は、約９６、３８４、および／または１５３６でありうる。マイクロウェルの数は、約１５０，０００でありうる。アレイ中のマイクロウェルの数は、これらの値のいずれかによって境界される任意の範囲（たとえば約１００～３２５，０００）内にありうる。

【０３５１】

マイクロウェルアレイは、いくつかの作製技術のいずれかを用いて作製されうる。使用されうる作製方法の例としては、限定されるものではないが、フォトリソグラフィーおよび湿式化学エッチング、プラズマエッチング、または深掘り反応性イオンエッチングなどのバルクマイクロマシニング技術；マイクロ成形およびマイクロエンボス加工；レーザーマイクロマシニング；３Ｄ印刷または硬化性材料を用いた他の直接描画作製プロセス；および同様の技術が挙げられる。

【０３５２】

マイクロウェルアレイは、いくつかの基材材料のいずれかから作製されうる。材料の選択は、作製技術の選択に応じて決まり、逆もまた同様である。好適な材料の例としては、限定されるものではないが、ケイ素、石英ガラス、ガラス、ポリマー（たとえば、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）、ポリメチルメタクリレート（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、チオール－エンベースの樹脂、金属または金属フィルム（たとえば、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）などが挙げられうる。ある場合、マイクロウェルは、光学接着剤を含む。ある場合、マイクロウェルは、光学接着剤で作製される。ある場合、マイクロウェルアレイは、ＰＤＭＳを含み、および／またはＰＤＭＳで作製される。ある場合、マイクロウェルは、プラスチックで作製される。親水性材料が、マイクロウェルアレイの作製に望ましいことがある（たとえば、細胞および他の生体物質の湿潤性を促進し、非特異的結合を最小限に抑えるため）。（たとえば、酸素プラズマ処理、またはポリエチレンオキシド表面層のグラフトによって）処理または被覆されうる疎水性材料も使用されうる。マイクロウェルアレイの作製のための多孔性親水性材料の使用が、デバイスに閉じ込められた気泡の毛細管ウィッキング／通気を促進するために望ましいことがある。マイクロウェルアレイは、単一の材料から作製されうる。マイクロウェルアレイは、一緒に結合されたまたは機械的に接合された２つ以上の異なる材料を含みうる。

【０３５３】

マイクロウェルアレイは、さまざまなサイズおよび形状のいずれかの基材を用いて作製されうる。たとえば、マイクロウェルが中に作製される基材の形状（またはフットプリント）は、四角形、長方形、円形、または不規則な形状でありうる。マイクロウェルアレイ基材のフットプリントは、マイクロタイタープレートのものと類似しうる。マイクロウェ

ルアレイ基材のフットプリントは、標準的な顕微鏡スライドのものと類似していてもよく、たとえば、約７５ｍｍ長さ×２５ｍｍ幅（約３インチ長さ×１インチ幅）、または約７５ｍｍ長さ×５０ｍｍ幅（約３インチ長さ×２インチ幅）でありうる。マイクロウェルが中に作製される基材の厚さは、約０．１ｍｍ厚さ～約１０ｍｍ厚さ、またはそれ以上の範囲でありうる。マイクロウェルアレイ基材の厚さは、少なくとも０．１ｍｍ厚さ、少なくとも０．５ｍｍ厚さ、少なくとも１ｍｍ厚さ、少なくとも２ｍｍ厚さ、少なくとも３ｍｍ厚さ、少なくとも４ｍｍ厚さ、少なくとも５ｍｍ厚さ、少なくとも６ｍｍ厚さ、少なくとも７ｍｍ厚さ、少なくとも８ｍｍ厚さ、少なくとも９ｍｍ厚さ、または少なくとも１０ｍｍ厚さでありうる。マイクロウェルアレイ基材の厚さは、多くとも１０ｍｍ厚さ、多くとも９ｍｍ厚さ、多くとも８ｍｍ厚さ、多くとも７ｍｍ厚さ、多くとも６ｍｍ厚さ、多くとも５ｍｍ厚さ、多くとも４ｍｍ厚さ、多くとも３ｍｍ厚さ、多くとも２ｍｍ厚さ、多くとも１ｍｍ厚さ、多くとも０．５ｍｍ厚さ、または多くとも０．１ｍｍ厚さでありうる。マイクロウェルアレイ基材の厚さは、約１ｍｍ厚さでありうる。マイクロウェルアレイ基材の厚さは、これらの範囲内の任意の値であってもよく、たとえば、マイクロウェルアレイ基材の厚さは、約０．２ｍｍ～約９．５ｍｍでありうる。マイクロウェルアレイ基材の厚さは、均一でありうる。

【０３５４】

さまざまな表面処理および表面改質技術を用いて、マイクロウェルアレイ表面の特性を変化させることができる。例としては、限定されるものではないが、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、ガラスおよびケイ素表面を滑らかにする（または粗面化する）ための湿式もしくは乾式エッチング技術の使用、ポリエチレンオキシドまたは他のポリマー層（ｐｌｕｒｏｎｉｃなど）の吸着もしくはグラフト、または基材表面をより親水性にし、生体分子および細胞の非特異的吸着を起こしにくくするための基材表面へのウシ血清アルブミン、化学反応性官能基を、本来は不活性のケイ素およびガラス表面にグラフトするためのシラン反応の使用などが挙げられうる。光脱保護技術を用いて、アレイ構造中の特定の位置における化学反応性官能基を選択的に活性化することができ、たとえば、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などの化学反応性官能基の選択的付加または活性化を用いて、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、マイクロウェルの壁に共有結合することができる。用いられる表面処理または表面改質の選択は、所望の表面特性のタイプおよびマイクロウェルアレイを構成する材料のタイプの両方またはいずれかに応じて決まる。

【０３５５】

マイクロウェルの開口部は、たとえば、隣接する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、細胞溶解工程中、封止されうる。マイクロウェル（またはマイクロウェルのアレイ）は、マイクロウェルアレイ基材、または好適なビーズの表面に対して固定する固体材料の可撓性の膜またはシート（すなわち、プレートまたはプラテン）を用いて封止またはキャップされてもよく、ここで、ビーズの直径は、マイクロウェルの直径より大きい。

【０３５６】

固体材料の可撓性の膜またはシートを用いて形成されるシールは、たとえば、無機ナノ細孔膜（たとえば酸化アルミニウム）、透析膜、ガラススライド、カバースリップ、エラストマーフィルム（たとえばＰＤＭＳ）、または親水性ポリマーフィルム（たとえば、溶解緩衝液で水和されたアガロースの薄膜で被覆されたポリマーフィルム）を含みうる。

【０３５７】

マイクロウェルをキャッピングするのに使用される固体担体（たとえばビーズ）は、本開示の固体担体（たとえばビーズ）のいずれかを含みうる。ある場合、固体担体は、架橋デキストランビーズ（たとえばＳｅｐｈａｄｅｘ）である。架橋デキストランは、約１０マイクロメートル～約８０マイクロメートルの範囲でありうる。キャッピングに使用される架橋デキストランビーズは、２０マイクロメートル～約５０マイクロメートルでありうる。いくつかの実施形態では、ビーズは、マイクロウェルの直径よりも、少なくとも約１

０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０または９０％だけ大きくてもよい。キャッピングに使用されるビーズは、マイクロウェルの直径よりも、多くとも約１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０または９０％だけ大きくてもよい。

【０３５８】

シールまたはキャップは、高分子（たとえば核酸）がウェルから出るのを防ぎながら、緩衝液がマイクロウェルに出入りするのを可能にしうる。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またはそれ以上のヌクレオチドの高分子は、シールまたはキャップによって、マイクロウェルに出入りするのを阻止されうる。多くとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、もしくは２０またはそれ以上のヌクレオチドの高分子は、シールまたはキャップによって、マイクロウェルに出入りするのを阻止されうる。

【０３５９】

固体担体（たとえばビーズ）は、基材の中に分配されうる。固体担体（たとえばビーズ）は、基材のウェルの中に分配され、基材のウェルから取り出され、あるいは遠心分離または他の非磁性手段によって、１つ以上のマイクロウェルアレイを含むデバイスを介して輸送されうる。基材のマイクロウェルには、固体担体が予め充填されうる。基材のマイクロウェルは、少なくとも１、２、３、４、もしくは５、またはそれ以上の固体担体を保持しうる。基材のマイクロウェルは、多くとも１、２、３、４、もしくは５またはそれ以上の固体担体を保持しうる。ある場合、基材のマイクロウェルは、１つの固体担体を保持しうる。

【０３６０】

個々の細胞およびビーズは、マイクロウェルの代替物を用いて区切られてもよく、たとえば、単一の固体担体および単一細胞は、（たとえば、ドロップレットデジタルマイクロ流体力学システムにおいて）エマルジョン中の単一のドロップレット内に閉じ込められうる。

【０３６１】

細胞は、複数のテザー連結バーコードをそれ自体が含む多孔性ビーズ内に潜在的に閉じ込められうる。個々の細胞および固体担体は、任意のタイプの容器、マイクロコンテナ、反応チャンバ、反応容器などの中で区切られうる。

【０３６２】

単一細胞組合せバーコーディングは、マイクロウェルを使用せずに行われるか、または行われてもよい。単一細胞、組合せバーコーディングアッセイは、任意の物理的容器を使用せずに行われてもよい。たとえば、物理的容器を用いない組合せバーコーディングは、細胞およびビーズを、ポリマー層またはゲル層内に互いに近接して埋め込んで、異なる細胞／ビーズ対の間の拡散障壁を形成することによって行われうる。別の例では、物理的容器を用いない組合せバーコーディングは、ｉｎ　ｓｉｔｕで、インビボで、無傷の固体組織で、無傷の細胞で、および／または細胞以下で行われうる。

【０３６３】

マイクロウェルアレイは、アッセイシステムの消耗部品でありうる。マイクロウェルアレイは、再利用可能でありうる。マイクロウェルアレイは、手作業でアッセイを行うためのスタンドアロンデバイスとして使用するために構成可能であり、またはそれらは、アッセイ手順の完全または部分的な自動化を提供する機器システムの固定されたまたは着脱可能な構成要素を含むように構成されうる。開示される方法のいくつかの実施形態では、バーコード（たとえば確率バーコード）のビーズベースのライブラリーは、アッセイ手順の一環としてマイクロウェルアレイのウェルに付着されうる。いくつかの実施形態では、ビーズは、マイクロウェルアレイのウェル中に予め充填され、たとえば、核酸標的のバーコーディング（たとえば確率バーコーディング）およびデジタルカウンティングを行うためのキットの一部として、ユーザに提供されうる。

【０３６４】

いくつかの実施形態では、対になった２つのマイクロウェルアレイが提供され、一方には、第１の磁石によって適切な位置に保持されたビーズが予め充填され、他方は、個々の細胞を充填する際にユーザによって使用されるためのものである。第２のマイクロウェルアレイ中への細胞の分配の後、２つのアレイは、対向して、第１の磁石が外された状態で配置されうる一方、第２の磁石を用いて、ビーズを、第１のアレイから、第２のアレイの対応するマイクロウェル中に引き込み、それによって、ビーズが、第２のマイクロウェルアレイ中の細胞の上で確実に静止し、それによって、ビーズにおけるバーコードへの標的分子の効率的な結合を最大にしながら、細胞溶解後の標的分子の拡散損失を最小限に抑える。

【０３６５】

本開示のマイクロウェルアレイには、固体担体（たとえばビーズ）が予め充填されうる。マイクロウェルアレイの各ウェルは、単一の固体担体を含みうる。マイクロウェルアレイ中のウェルの少なくとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％には、単一の固体担体が予め充填されうる。マイクロウェルアレイ中のウェルの多くとも１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、または１００％には、単一の固体担体が予め充填されうる。固体担体は、本開示のバーコード（たとえば確率バーコード）を含みうる。異なる固体担体におけるバーコードの細胞標識は、異なりうる。同じ固体担体におけるバーコードの細胞標識は、同じでありうる。

【０３６６】

確率バーコーディングの方法

本開示は、身体サンプル（たとえば、組織、器官、腫瘍、細胞）における識別可能な位置の識別可能な標的の数を推定する方法を提供する。本方法は、サンプルと接近させてバーコード（たとえば、確率バーコード）を配置する工程と、サンプルを溶解させる工程と、識別可能な標的をバーコードと関連させる工程と、標的を増幅する工程および／または標的をデジタルカウントする工程と、を含みうる。本方法は、さらに、バーコード上の空間標識から得られた情報を分析する工程および／または視覚化する工程をさらに含みうる。いくつかの実施形態では、一方法は、サンプル中の複数の標識を視覚化する工程を含む。サンプルのマップに複数の標的をマッピングする工程は、サンプルの二次元マップまたは三次元マップの作製を含みうる。二次元マップまたは三次元マップは、サンプル中の複数の標的にバーコード（たとえば、確率バーコード）を付ける前または後に作製することができる。サンプル中の複数の標的を視覚化する工程は、サンプルのマップに複数の標的をマッピングする工程を含みうる。サンプルのマップに複数の標的をマッピングする工程は、サンプルの二次元マップまたは三次元マップを作製するステップを含みうる。二次元マップおよび三次元マップは、サンプル中の複数の標的にバーコードを付ける前または後に作製することができる。いくつかの実施形態では、二次元マップおよび三次元マップは、サンプルを溶解させる前または後に作製することができる。二次元マップまたは三次元マップの作製前または後にサンプルを溶解させる工程は、サンプルを加熱する工程と、サンプルを洗剤と接触させる工程と、サンプルのｐＨを変化させる工程、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０３６７】

いくつかの実施形態では、複数の標的に確率バーコードを付ける工程は、複数のバーコードを複数の標的とハイブリダイズさせて、バーコード付き標的（たとえば、確率バーコード付き標的）を作製する工程を含む。複数の標的にバーコードを付ける工程は、バーコード付き標的のインデックス付きライブラリーを作製する工程を含みうる。バーコード付き標的のインデックス付きライブラリーを作製する工程は、複数のバーコード（たとえば、確率バーコード）を含む固体担体を用いて実施することができる。

【０３６８】

サンプルとバーコードの接触

本開示は、サンプル（たとえば、細胞）を本開示の基材と接触させる方法を提供する。たとえば、細胞、器官、または組織薄片を含むサンプルをバーコード（たとえば、確率バ

ーコード）と接触させることができる。たとえば、重力流によって、細胞を接触させることができ、その場合、細胞は沈殿して単層を形成しうる。サンプルは、組織薄片であってよい。薄片を基材の上に配置することができる。サンプルは、一次元（たとえば、平面表面を形成する）であってよい。サンプル（たとえば、細胞）は、たとえば、基材上に細胞を増殖させる／培養することによって、基材全体に広げることができる。

【０３６９】

バーコードが標的と近接して位置すると、標的は、バーコードとハイブリダイズしうる。識別可能な標的の各々が、本開示の識別可能なバーコードと結合しうるように、バーコードを非枯渇的比率で接触させることができる。標的とバーコード同士の効率的な結合を確実にするために、標的をバーコードと架橋させることができる。

【０３７０】

細胞溶解

細胞およびバーコードの分配後、細胞は標的分子を遊離するように溶解可能である。細胞溶解は、さまざまな手段のいずれかにより、たとえば、化学的もしくは生化学的手段により、浸透圧ショックにより、または熱溶解、機械溶解、もしくは光学溶解により達成可能である。細胞は、界面活性剤（たとえば、ＳＤＳ、Ｌｉドデシルスルフェート、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００、Ｔｗｅｅｎ－２０、もしくはＮＰ－４０）、有機溶媒（たとえば、メタノールもしくはアセトン）、または消化酵素（たとえば、プロテイナーゼＫ、ペプシンまたはトリプシン）、あるいはそれらの任意の組合せを含む細胞溶解緩衝液の添加により溶解可能である。標的とバーコードとの関連付けを向上させるために、たとえば、温度の低下および／またはライセートの粘度の増加により、標的分子の拡散速度を変化させることが可能である。

【０３７１】

いくつかの実施形態では、サンプルは濾紙を用いて溶解可能である。濾紙は濾紙の上を溶解緩衝液で浸漬可能である。濾紙は、サンプルの溶解および基材へのサンプルの標的のハイブリダイゼーションを促進可能な加圧でサンプルに適用可能である。

【０３７２】

いくつかの実施形態では、溶解は、機械溶解、熱溶解、光学溶解、および／または化学溶解により行うことが可能である。化学溶解は、プロテイナーゼＫ、ペプシン、トリプシンなどの消化酵素の使用を含みうる。溶解は、基材への溶解緩衝液の添加により行うことが可能である。溶解緩衝液はトリスＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液は、少なくとも約０．０１、０．０５、０．１、０．５、もしくは１Ｍまたはそれ以上のトリスＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液は、多くとも約０．０１、０．０５、０．１、０．５、もしくは１Ｍまたはそれ以上のトリスＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液は約０．１Ｍトリス ＨＣｌを含みうる。溶解緩衝液のｐＨは、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０またはそれ以上でありうる。溶解緩衝液のｐＨは、多くとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、もしくは１０またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液のｐＨは約７．５である。溶解緩衝液は塩（たとえばＬｉＣｌ）を含みうる。溶解緩衝液中の塩の濃度は、少なくとも約０．１、０．５、もしくは１Ｍまたはそれ以上でありうる。溶解緩衝液中の塩の濃度は、多くとも約０．１、０．５、もしくは１Ｍまたはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中の塩の濃度は約０．５Ｍである。溶解緩衝液は、界面活性剤（たとえば、ＳＤＳ、Ｌｉドデシルスルフェート、トリトンＸ、トゥイーン、ＮＰ－４０）を含みうる。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、少なくとも約０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、もしくは７％またはそれ以上でありうる。溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は、多くとも約０．０００１％、０．０００５％、０．００１％、０．００５％、０．０１％、０．０５％、０．１％、０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、もしくは７％またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中の界面活性剤の濃度は約１％Ｌｉドデシルスルフェートである。本方法で溶解に使用される時間は、使用される界面活性剤の量に

依存性しうる。いくつかの実施形態では、界面活性剤を多く使用するほど、溶解に必要な時間は短くなる。溶解緩衝液はキレート化剤（たとえば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡ）を含みうる。溶解緩衝液中のキレート化剤の濃度は、少なくとも約１、５、１０、１５、２０、２５、もしくは３０ｍＭまたはそれ以上でありうる。溶解緩衝液中のキレート化剤の濃度は、多くとも約１、５、１０、１５、２０、２５、もしくは３０ｍＭまたはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中のキレート化剤の濃度は約１０ｍＭである。溶解緩衝液は還元試薬（たとえば、βメルカプトエタノール、ＤＴＴ）を含みうる。溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は少なくとも約１、５、１０、１５、２０ｍＭまたはそれ以上でありうる。溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は多くとも約１、５、１０、１５、２０ｍＭまたはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液中の還元試薬の濃度は約５ｍＭである。いくつかの実施形態では、溶解緩衝液は、約０．１ＭのトリスＨＣｌ、約ｐＨ７．５、約０．５Ｍ　ＬｉＣｌ、約１％リチウムドデシルスルフェート、約１０ｍＭ　ＥＤＴＡ、および約５ｍＭ　ＤＴＴを含みうる。

【０３７３】

溶解は、約４、１０、１５、２０、２５、または３０℃の温度で行うことが可能である。溶解は、約１、５、１０、１５、もしくは２０分間またはそれ以上行うことが可能である。溶解細胞は、少なくとも約１０００００、２０００００、３０００００、４０００００、５０００００、６０００００、もしくは７０００００標的核酸分子またはそれ以上を含みうる。溶解細胞は、多くとも約１０００００、２０００００、３０００００、４０００００、５０００００、６０００００、もしくは７０００００標的核酸分子またはそれ以上を含みうる。

【０３７４】

標的核酸分子へのバーコードの結合

細胞の溶解およびそれからの核酸分子の放出の後、核酸分子は、共局在化された固体担体のバーコードにランダムに関連付けすることができる。関連付けは、標的核酸分子の相補的部分へのバーコードの標的認識領域のハイブリダイゼーションを含みうる（たとえば、バーコードのオリゴ（ｄＴ）は、標的のポリ（Ａ）テールと相互作用可能である）。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（たとえば、緩衝液ｐＨ、イオン強度、温度など）は、特定の安定なハイブリッドの形成を促進するように選択可能である。いくつかの実施形態では、溶解した細胞から放出された核酸分子は、基材上の複数のプローブに関連付けする（たとえば、基板上のプローブとハイブリダイズする）ことができる。プローブが、オリゴ（ｄＴ）を含むとき、ｍＲＮＡ分子は、プローブにハイブリダイズして、逆転写されうる。オリゴヌクレオチドのオリゴ（ｄＴ）部分は、ｃＤＮＡ分子の第１鎖合成のためのプライマーとして作用しうる。たとえば、図２、ブロック２１６に示すバーコードの非限定的な例において、ｍＲＮＡ分子は、ビーズ上のバーコードをハイブリダイズすることができる。たとえば、一本鎖ヌクレオチド断片は、バーコードの標的結合領域にハイブリダイズすることができる。

【０３７５】

結合は、バーコードの標的認識領域と標的核酸分子の一部とのライゲーションをさらに含みうる。たとえば、標的結合領域は、制限部位オーバーハング（たとえば、ＥｃｏＲＩ付着末端オーバーハング）への特異的ハイブリダイゼーションが可能でありうる核酸配列を含みうる。アッセイ手順は、制限部位オーバーハングを生成するために制限酵素（たとえばＥｃｏＲＩ）で標的核酸を処置する工程をさらに含みうる。次いで、バーコードは、制限部位オーバーハングに相補的な配列を含む任意の核酸分子にライゲートしうる。リガーゼ（たとえばＴ４ＤＮＡリガーゼ）は２つの断片を連結するために使用しうる。

【０３７６】

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

することができる。

【０３７７】

結合した標的－バーコード分子の固体担体ベースのコレクションの回収は、磁気ビーズおよび外部印加磁界の使用により実現しうる。標的－バーコード分子をプールした後、すべてのさらなる処理を単一反応槽内で進行させることができる。さらなる処理は、たとえば、逆転写反応、増幅反応、切断反応、解離反応、および／または核酸伸長反応を含みうる。さらなる処理反応は、マイクロウェル内で、すなわち、複数の細胞の標識標的核酸分子を最初にプールすることなく、実施することができる。

【０３７８】

逆転写

本開示は、（たとえば、図２のブロック２２４で）逆転写を用いて標的－バーコードコンジュゲートを生成する方法を提供する。標的－バーコードコンジュゲートは、バーコードと標的核酸の全部または一部の相補的配列と（すなわち、確率バーコード付きｃＤＮＡ分子などのバーコード付きｃＤＮＡ分子）を含みうる。関連付けられたＲＮＡ分子の逆転写は、逆転写酵素と共に逆転写プライマーを添加することによって起こりうる。逆転写プライマーは、オリゴ（ｄＴ）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、または標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーでありうる。オリゴ（ｄＴ）プライマーは、１２～１８ヌクレオチド長、または概ねそうしたヌクレオチド長であってよく、哺乳動物ｍＲＮＡの３’末端の内因性ポリ（Ａ）テールに結合することができる。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、さまざまな相補的部位でｍＲＮＡと結合しうる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には対象のｍＲＮＡを選択的にプライミングする。

【０３７９】

いくつかの実施形態では標識ＲＮＡ分子の逆転写は、逆転写プライマーの添加によって起こりうる。いくつかの実施形態では、逆転写プライマーは、オリゴ（ｄＴ）プライマー、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー、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ヌクレオチド長であり、哺乳動物ｍＲＮＡの３’末端の内因性ポリ（Ａ）＋テールに結合する。ランダムヘキサヌクレオチドプライマーは、さまざまな相補的部位でｍＲＮＡと結合しうる。標的特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、典型的には対象のｍＲＮＡを選択的にプライミングする。

【０３８０】

逆転写は、繰返し行うことにより複数の標識ｃＤＮＡ分子を生成可能である。本明細書に開示される方法は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０回の逆転写反応を行う工程を含みうる。本方法は、少なくとも約２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００回の逆転写反応を行う工程を含みうる。

【０３８１】

増幅

核酸増幅反応（たとえば、図２のブロック２２８で）は、標識標的核酸分子の複数のコピーを生成するために１回以上実施することができる。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される、多重方式で実施してよい。増幅反応は、核酸分子にシーケンシングアダプターを付加するために使用することができる。増幅反応は、存在するのであれば、サンプル標識の少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。増幅反応は、細胞標識および／またはバーコード配列（たとえば、分子標識）の少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。増幅反応は、サンプルタグ、細胞標識、空間標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、標的核酸、またはそれらの組合せの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。増幅反応は、複数の核酸の０．５％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５

５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、１００％、またはこれらの値のいずれか２つの間の範囲もしくは数を増幅する工程を含みうる。本方法は、サンプル標識、細胞標識、空間標識、および／またはバーコード配列（たとえば、分子標識）を含む標的－バーコード分子のｃＤＮＡコピーを１つ以上生成するために、ｃＤＮＡ合成反応を１回以上行う工程をさらに含みうる。

【０３８２】

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

【０３８３】

標識核酸の増幅は、非ＰＣＲベースの方法を含みうる。非ＰＣＲベースの方法の例としては、限定されるものではないが、多重置換増幅（ＭＤＡ）、転写媒介増幅（ＴＭＡ）、核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、リアルタイムＳＤＡ、ローリングサークル増幅、またはサークル－サークル増幅が挙げられる。他の非ＰＣＲベースの増幅方法としては、ＤＮＡもしくはＲＮＡ標的を増幅するためのＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ駆動ＲＮＡ転写増幅またはＲＮＡ指向ＤＮＡ合成および転写の多重サイクル、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、およびＱβレプリカーゼ（Ｑβ）法、パリンドロームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを用いたオリゴヌクレオチド駆動増幅、プライマーが核酸配列にハイブリダイズされかつ得られた二本鎖が伸長反応および増幅の前に切断される増幅方法、５’エキソヌクレアーゼ活性の欠如した核酸ポリメラーゼを用いた鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、および分岐伸長増幅（ＲＡＭ）が挙げられる。いくつかの実施形態では、増幅は、環化転写物を生成しうる。

【０３８４】

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

【０３８５】

増幅は、１つ以上の非天然ヌクレオチドの使用を含みうる。非天然ヌクレオチドは、光不安定性またはトリガー性のヌクレオチドを含みうる。非天然ヌクレオチドの例としては、限定されるものではないが、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ核酸、およびロックド核酸（ＬＮＡ）、さらにはグリコール核酸（ＧＮＡ）およびトレオース核酸（ＴＮＡ）が挙げられうる。非天然ヌクレオチドは、増幅反応の１サイクル以上に添加することができる。非天然ヌクレオチドの添加は、増幅反応の特定のサイクルまたは時点で産物を同定するために使用しうる。

【０３８６】

増幅反応を１回以上行う工程は、１つ以上のプライマーの使用を含みうる。１つ以上のプライマーは、たとえば、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、もしくは１５ヌクレオチドまたはそれ以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、もしくは１５ヌクレオチドまたはそれ以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、１２～１５ヌクレオチド未満を含みうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識標的

（たとえば、確率標識標的）の少なくとも一部にアニールしうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識標的の３’末端または５’末端にアニールしうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識標的の内部領域にアニールしうる。内部領域は、複数の標識標的の３’末端から少なくとも約５０、１００、１５０、２００、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、または１０００ヌクレオチドでありうる。１つ以上のプライマーは、プライマーの一定パネルを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のカスタムプライマーを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のコントロールプライマーを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上の遺伝子特異的プライマーを含みうる。

【０３８７】

１つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含みうる。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニールしうる。１つ以上のカスタムプライマーは、第１のサンプル標識、第２のサンプル標識、空間標識、細胞標識、バーコード（たとえば、分子標識）、標的、またはそれらの任意の組合せにアニールしうる。１つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマーおよびカスタムプライマーを含みうる。カスタムプライマーは、１つ以上の標的を増幅するように設計しうる。標的は、１つ以上のサンプル中の全核酸のサブセットを含みうる。標的は、１つ以上のサンプル中の全標識標的のサブセットを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも９６カスタムプライマーまたはそれ以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも９６０カスタムプライマーまたはそれ以上を含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも９６００カスタムプライマーまたはそれ以上を含みうる。１つ以上のカスタムプライマーは、２つ以上の異なる標識核酸にアニールしうる。２つ以上の異なる標識核酸は、１つ以上の遺伝子に相当しうる。

【０３８８】

任意の増幅スキームを本開示の方法で使用することができる。たとえば、一スキームでは、第１ラウンドのＰＣＲは、遺伝子特異的プライマーおよびユニバーサルＩｌｌｕｍｉｎａシーケンシングプライマー１配列に対するプライマーを用いて、ビーズに結合された分子を増幅することができる。第２ラウンドのＰＣＲは、Ｉｌｌｕｍｉｎａシーケンシングプライマー２配列がフランキングするネステッド遺伝子特異的プライマーとユニバーサルＩｌｌｕｍｉｎａシーケンシングプライマー１配列に対するプライマーとを用いて第１のＰＣＲ産物を増幅可能である。第３ラウンドのＰＣＲは、Ｐ５およびＰ７とサンプルインデックスを付加して、ＰＣＲ産物をＩｌｌｕｍｉｎａシーケンシングライブラリーにする。１５０ｂｐ×２シーケンシングを用いたシーケンシングは、リード１上の細胞標識およびバーコード配列（たとえば、分子標識）、リード２上の遺伝子、ならびにインデックス１リード上のサンプルインデックスを明らかにしうる。

【０３８９】

いくつかの実施形態では、核酸は、化学切断を用いて基材から除去可能である。たとえば、核酸中に存在する化学基または修飾塩基は、固体担体からのその除去を促進するために使用可能である。たとえば、酵素は、基材から核酸を除去するために使用可能である。たとえば、核酸は、制限エンドヌクレアーゼ消化による基材からの除去が可能である。たとえば、ｄＵＴＰまたはｄｄＵＴＰを含有する核酸のウラシル－ｄ－グリコシラーゼ（ＵＤＧ）処理は、基材から核酸を除去するために使用可能である。たとえば、核酸は、ヌクレオチド切除を行う酵素、たとえば、塩基除去修復酵素、たとえば、脱プリン／脱ピリミジン（ＡＰ）エンドヌクレアーゼを用いて基材から除去可能である。いくつかの実施形態では、核酸は、光切断性基と光とを用いて基材から除去可能である。いくつかの実施形態では、切断性リンカーは、基材から核酸を除去するために使用可能である。たとえば、切

断性リンカーは、ビオチン／アビジン、ビオチン／ストレプトアビジン、ビオチン／ニュートラビジン、Ｉｇ－プロテインＡ、光不安定性リンカー、酸または塩基不安定性リンカー基、またはアプタマーの少なくとも１つを含みうる。

【０３９０】

プローブが遺伝子特異的である場合、分子は、プローブにハイブリダイズし、逆転写および／または増幅が可能である。いくつかの実施形態では、核酸が合成された後（たとえば、逆転写された後）、増幅が可能である。増幅は、複数の標的核酸配列が同時に増幅される条件で、多重方式で行いうる。増幅は、核酸にシーケンシングアダプターを付加しうる。

【０３９１】

いくつかの実施形態では、増幅は、たとえばブリッジ増幅を用いて基材上に行うことが可能である。基材上でオリゴ（ｄＴ）プローブを用いてブリッジ増幅するのに適合していた末端を生成するために、ｃＤＮＡにホモポリマーテールを付加することが可能である。ブリッジ増幅では、テンプレート核酸の３’末端に相補的なプライマーは、固体粒子に共有結合された各ペアの第１のプライマーでありうる。テンプレート核酸を含有するサンプルが粒子に接触して１回の熱サイクルが行われる場合、テンプレート分子は第１のプライマーにアニールし、かつ第１のプライマーはヌクレオチドの付加により順方向に伸長して、テンプレート分子とテンプレートに相補的な新たに形成されたＤＮＡ鎖とからなる二本鎖分子を形成する。次のサイクルの加熱工程では、二本鎖分子は変性されて、粒子からテンプレート分子を放出し、第１のプライマーを介して粒子に結合された相補的ＤＮＡ鎖を残存させる。続くアニーリング・伸長工程のアニーリング段階では、相補鎖は、第１のプライマーから除去された位置の相補鎖のセグメントに相補的な第２のプライマーにハイブリダイズ可能である。このハイブリダイゼーションにより、相補鎖は、共有結合により第１のプライマーにかつハイブリダイゼーションにより第２のプライマーに固定されたブリッジを第１および第２のプライマー間に形成可能である。伸長段階では、第２のプライマーは、同一の反応混合物中にヌクレオチドを添加することにより反対方向に伸長し、それによりブリッジを二本鎖ブリッジに変換可能である。次いで、次のサイクルが開始され、二本鎖ブリッジは変性されて、それぞれ第１および第２のプライマーを介して粒子表面に結合された一方の末端と、それぞれ未結合の状態の他方の末端と、を有する２つの一本鎖核酸分子を与えることが可能である。この第２のサイクルのアニーリング・伸長工程では、各鎖は同一の粒子上のこれまで未使用であったさらなる相補的プライマーにハイブリダイズして新しい一本鎖ブリッジを形成可能である。この時点でハイブリダイズされる２つのこれまで未使用であったプライマーは伸長して２つの新しいブリッジを二本鎖ブリッジに変換可能である。

【０３９２】

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％を増幅する工程を含みうる。

【０３９３】

標識核酸の増幅は、ＰＣＲベースの方法または非ＰＣＲベースの方法を含みうる。標識核酸の増幅は、標識核酸の指数関数的増幅を含みうる。標識核酸の増幅は、標識核酸の線形増幅を含みうる。増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）により行うことが可能である。ＰＣＲは、ＤＮＡの相補鎖の同時プライマー伸長により特定のＤＮＡ配列のｉｎ ｖｉｔｒｏ増幅を行う反応を意味しうる。ＰＣＲは、その反応の派生形、たとえば、限定されるものではないが、ＲＴ－ＰＣＲ、リアルタイムＰＣＲ、ネステッドＰＣＲ、定量ＰＣＲ、多重ＰＣＲ、デジタルＰＣＲ、サプレッションＰＣＲ、セミサプレッシブＰＣＲ、およびアセンブリーＰＣＲを包含しうる。

【０３９４】

いくつかの実施形態では、標識核酸の増幅は非ＰＣＲベースの方法を含む。非ＰＣＲベ

ースの方法の例としては、限定されるものではないが、多重置換増幅（ＭＤＡ）、転写媒介増幅（ＴＭＡ）、核酸配列ベースの増幅（ＮＡＳＢＡ）、鎖置換増幅（ＳＤＡ）、リアルタイムＳＤＡ、ローリングサークル増幅、またはサークルーサークル増幅が挙げられる。他の非ＰＣＲベースの増幅方法としては、ＤＮＡもしくはＲＮＡ標的を増幅するためのＤＮＡ依存性ＲＮＡポリメラーゼ駆動ＲＮＡ転写増幅またはＲＮＡ指向ＤＮＡ合成および転写の多重サイクル、リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）、Ｑβレプリカーゼ（Ｑβ）、パリンドロームプローブの使用、鎖置換増幅、制限エンドヌクレアーゼを用いたオリゴヌクレオチド駆動増幅、プライマーが核酸配列にハイブリダイズされかつ得られた二本鎖が伸長反応および増幅の前に切断される増幅方法、５’エキソヌクレアーゼ活性の欠如した核酸ポリメラーゼを用いた鎖置換増幅、ローリングサークル増幅、および／または分岐伸長増幅（ＲＡＭ）が挙げられる。

【０３９５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、増幅アンプリコン（たとえば標的）上でネステッドポリメラーゼ連鎖反応を行う工程をさらに含む。アンプリコンは二本鎖分子でありうる。二本鎖分子は、二本鎖ＲＮＡ分子、二本鎖ＤＮＡ分子、またはＤＮＡ分子にハイブリダイズされたＲＮＡ分子を含みうる。二本鎖分子の一方または両方の鎖は、サンプルタグまたは分子識別子標識を含みうる。代替的に、アンプリコンは一本鎖分子でありうる。一本鎖分子は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、またはそれらの組合せを含みうる。本発明の核酸は、合成核酸または改変核酸を含みうる。

【０３９６】

いくつかの実施形態では、本方法は、多数のアンプリコンを生成するために標識核酸を繰返し増幅する工程を含む。本明細書に開示される方法は、少なくとも約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０回の増幅反応を行う工程を含みうる。代替的に、本方法は、少なくとも約２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または１００回の増幅反応を行う工程を含む。

【０３９７】

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

【０３９８】

増幅は、１つ以上の非天然ヌクレオチドの使用を含みうる。非天然ヌクレオチドは、光不安定性および／またはトリガー性ヌクレオチドを含みうる。非天然ヌクレオチドの例としては、限定されるものではないが、ペプチド核酸（ＰＮＡ）、モルホリノ核酸およびロックド核酸（ＬＮＡ）、さらにはグリコール核酸（ＧＮＡ）およびトレオース核酸（ＴＮＡ）が挙げられる。非天然ヌクレオチドは、増幅反応の１サイクル以上に添加しうる。非天然ヌクレオチドの添加は、増幅反応の特定のサイクルまたは時点で産物を同定するために使用しうる。

【０３９９】

増幅反応を１回以上行う工程は、１つ以上のプライマーの使用を含みうる。１つ以上のプライマーは１つ以上のオリゴヌクレオチドを含みうる。１つ以上のオリゴヌクレオチドは少なくとも約７～９ヌクレオチドを含みうる。１つ以上のオリゴヌクレオチドは１２～１５ヌクレオチド未満を含みうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識核酸の少なくとも一部にアニールしうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識核酸の３’末端および／または５’末端にアニールしうる。１つ以上のプライマーは、複数の標識核酸の内部領域にアニールしうる。内部領域は、複数の標識核酸の３’末端から少なくとも約５０、１００、１５０、２００、２２０、２３０、２４０、２５０、２６０、２７０、２８０、２９０、３００、３１０、３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、３９０、４００、４１０、４２０、４３０、４４０、４５０、４６０、４７０、４８０、４９０、５００、５１０、５２０、５３０、５４０、５５０、５６０、５７０、５８０、５９

０、６００、６５０、７００、７５０、８００、８５０、９００、または１０００ヌクレオチドでありうる。１つ以上のプライマーは、プライマーの一定パネルを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のカスタムプライマーを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のコントロールプライマーを含みうる。１つ以上のプライマーは、少なくとも１つ以上のハウスキーピング遺伝子プライマーを含みうる。１つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマーを含みうる。ユニバーサルプライマーは、ユニバーサルプライマー結合部位にアニールしうる。１つ以上のカスタムプライマーは、第１のサンプルタグ、第２のサンプルタグ、分子識別子標識、核酸、またはその産物にアニールしうる。１つ以上のプライマーは、ユニバーサルプライマーおよびカスタムプライマーを含みうる。カスタムプライマー、１つ以上の標的核酸を増幅するように設計しうる。標的核酸は、１つ以上のサンプル中の全核酸のサブセットを含みうる。いくつかの実施形態では、プライマーには、本開示のアレイに結合されたプローブである。

【０４００】

いくつかの実施形態では、サンプル中の複数の標的にバーコード（たとえば、確率バーコード）を付ける工程は、バーコード付き断片の指標インデックスライブラリーを作製する工程をさらに含む。異なるバーコードのバーコード配列（たとえば、異なる確率バーコードの分子標識）は、互いに異なっていてもよい。バーコード付き標的（たとえば、確率バーコード付き標的）の指標インデックスライブラリーを作製する工程は、サンプル中の複数の標的から複数の指標インデックスポリヌクレオチドを作製する工程を含む。たとえば、第１の指標インデックス標的と第２の指標インデックス標的とを含むバーコード標的の指標インデックスライブラリーの場合、第１の指標インデックスポリヌクレオチドの標識領域は、第２の指標インデックスポリヌクレオチドの標識領域と、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０ヌクレオチド異なって、概ね、少なくとも、もしくは多くともこうした値、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲のヌクレオチド異なってもよい。いくつかの実施形態では、バーコード付き標的の指標インデックスライブラリーを作製する工程は、ポリ（Ｔ）領域および標識領域などの複数のオリゴヌクレオチドと、複数の標識、たとえば、ｍＲＮＡ分子を接触させる工程と；各々がｃＤＮＡ領域および標識領域を含む一本鎖標識ｃＤＮＡ分子を生成するために、逆転写酵素を用いて、第１鎖合成を実施する工程と、を含み、ここで、複数の標的は、異なる配列の少なくとも２つのｍＲＮＡ分子を含み、複数のオリゴヌクレオチドは、異なる配列の少なくとも２つのオリゴヌクレオチドを含む。バーコード付き標的の指標インデックスライブラリーを作製する工程は、さらに、二本鎖標識ｃＤＮＡ分子を生成するために、一本鎖標識ｃＤＮＡ分子を増幅する工程と；標識アンプリコンを生成するために、二本鎖標識ｃＤＮＡ分子上でネステッドＰＣＲを実施する工程と、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、アダプター－標識アンプリコンを作製する工程を含みうる。

【０４０１】

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

【０４０２】

図３は、バーコード付き標的（たとえば確率バーコード付き標的）、たとえばｍＲＮＡのインデックス付きライブラリーを作製する非限定的な例示的プロセスを示す概略図である。工程１に示されるように、逆転写プロセスは、ユニークバーコード配列（たとえば分子標識）、細胞標識、およびユニバーサルＰＣＲ部位を含む各ｍＲＮＡ分子をコードすることができる。特に、ＲＮＡ分子３０２のポリ（Ａ）テール領域３０８への、バーコード

（たとえば確率バーコード）３１０）のセットのハイブリダイゼーション（たとえば確率論的ハイブリダイゼーション）によって、ＲＮＡ分子３０２を逆転写して、ｃＤＮＡ領域３０６を含む標識ｃＤＮＡ分子３０４を生成することができる。バーコード３１０の各々は、標的結合領域、たとえばポリ（ｄＴ）領域３１２、バーコード配列または分子標識３１４、およびユニバーサルＰＣＲ領域３１６を含みうる。

【０４０３】

いくつかの実施形態では、細胞標識は、３～２０ヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、バーコード配列（たとえば、分子標識）は、３～２０ヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、複数の確率バーコードの各々は、１つ以上のユニバーサル標識および細胞標識をさらに含み、ユニバーサル標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じであり、細胞標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じである。いくつかの実施形態では、ユニバーサル標識は、３～２０ヌクレオチドを含みうる。いくつかの実施形態では、細胞標識は、３～２０ヌクレオチドを含む。

【０４０４】

いくつかの実施形態では、標識領域３１４は、バーコード配列または分子標識３１８および細胞標識３２０を含みうる。いくつかの実施形態では、標識領域３１４は、１つ以上のユニバーサル標識、次元標識、および細胞標識を含みうる。バーコード配列または分子標識３１８は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００ヌクレオチド長であっても、概ね、少なくとも、もしくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。細胞標識３２０は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００ヌクレオチド長であっても、概ね、少なくとも、もしくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサル標識は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００ヌクレオチド長であっても、概ね、少なくとも、もしくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。ユニバーサル標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じであってもよく、細胞標識は、固体担体上の複数の確率バーコードについて同じであってもよい。次元標識は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００ヌクレオチド長であっても、概ね、少なくとも、もしくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。

【０４０５】

いくつかの実施形態では、標識領域３１４は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００の異なる標識を含むか、概ねそうした値の異なる標識を含むか、少なくとも、もしくは多くともそうした値の異なる標識、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲の異なる標識、たとえば、バーコード配列または分子標識３１８および細胞標識３２０などを含みうる。各標識は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００ヌクレオチド長であっても、概ね、少なくとも、もしくは多くともそうしたヌクレオチド長であってもよいし、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲のヌクレオチド長であってもよい。バーコードまたは確率バーコード３１０のセットは、１０、２０、４０、５０、７０、８０、９０、10^{2}、10^{3}、10^{4}、10^{5}、10^{6}、10^{7}、10^{8}、10^{9}、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{20}のバーコードまたは確率バーコード３１０を含むか、概ねそうした値のバーコードまたは確率バーコード識別子標識３１０を含むか、少なくとも、もしくは多くともそうした値のバーコードまたは確率バーコード３１０、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲のバーコ

ードまたは確率バーコード３１０を含みうる。また、バーコードまたは確率バーコード３１０のセットは、たとえば、各々、ユニーク標識領域３１４を含みうる。余剰のバーコードまたは確率バーコード３１０を除去するために、標識ｃＤＮＡ分子３０４を精製することができる。精製は、Ａｍｐｕｒｅビーズ精製を含みうる。

【０４０６】

工程２に示すように、工程１の逆転写プロセスからの産物を１チューブ中にプールし、第１ＰＣＲプライマープールおよび第１ユニバーサルＰＣＲプライマーを用いてＰＣＲ増幅することができる。プールする工程は、ユニーク標識領域３１４によって可能である。特に、ネステッドＰＣＲ標識アンプリコン３２２を生成するために、標識ｃＤＮＡ分子３０４を増幅することができる。増幅は、多重ＰＣＲ増幅を含みうる。増幅は、単一反応量で９６多重プライマーを用いる多重ＰＣＲ増幅を含みうる。いくつかの実施形態では、多重ＰＣＲ増幅は単一反応量で１０、２０、４０、５０、７０、８０、９０、10^{2}、10^{3}、10^{4}、10^{5}、10^{6}、10^{7}、10^{8}、10^{9}、10^{10}、10^{11}、10^{12}、10^{13}、10^{14}、10^{15}、10^{20}の多重プライマーを使用するか、概ねそうした値の多重プライマー、少なくとも、もしくは多くともそうした値の多重プライマーを使用するか、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲の多重プライマーを使用することができる。増幅は、特定の遺伝子を標的とするカスタムプライマー３２６Ａ～Ｃの第１ＰＣＲプライマープール３２４と、ユニバーサルプライマー３２８とを含みうる。カスタムプライマー３２６は、標識ｃＤＮＡ分子３０４のｃＤＮＡ部分３０６’内の１領域とハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー３２８は、標識ｃＤＮＡ分子３０４のユニバーサルＰＣＲ領域３１６とハイブリダイズすることができる。

【０４０７】

図３の工程３に示すように、工程２のＰＣＲ増幅からの産物は、ネステッドＰＣＲプライマープールおよび第２ユニバーサルＰＣＲプライマーを用いて増幅することができる。ネステッドＰＣＲは、ＰＣＲ増幅バイアスを最小限に抑えることができる。特に、ネステッドＰＣＲ標識アンプリコン３２２は、ネステッドＰＣＲによりさらに増幅することもできる。ネステッドＰＣＲは、単一反応量でネステッドＰＣＲプライマー３３２ａ～ｃのネステッドＰＣＲプライマープール３３０と、第２ユニバーサルＰＣＲプライマー３２８’とを含む多重ＰＣＲを含みうる。ネステッドＰＣＲプライマープール３２８は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００の異なるネステッドＰＣＲプライマー３３０を含むか、概ねそうした値の異なるネステッドＰＣＲプライマー３３０を含むか、少なくとも、もしくは多くともそうした値の異なるネステッドＰＣＲプライマー３３０、またはこれらの値のいずれかの間の数もしくは範囲の異なるネステッドＰＣＲプライマー３３０を含みうる。ネステッドＰＣＲプライマー３３２は、アダプター３３４を含有して、標識アンプリコン３２２のｃＤＮＡ部分３０６’内の１領域とハイブリダイズすることができる。ユニバーサルプライマー３２８’は、アダプター３３６を含有して、標識アンプリコン３２２のユニバーサルＰＣＲ領域３１６とハイブリダイズすることができる。このようにして、工程３は、アダプター標識アンプリコン３３８を生成する。いくつかの実施形態では、ネステッドＰＣＲプライマー３３２と第２ユニバーサルＰＣＲプライマー３２８’は、アダプター３３４および３３６を含有しなくてもよい。それに代わり、アダプター３３４および３３６は、アダプター標識アンプリコン３３８を生成するために、ネステッドＰＣＲの産物とライゲートすることができる。

【０４０８】

工程４に示すように、工程３からのＰＣＲ産物は、ライブラリー増幅プライマーを用いたシーケンシングのためにＰＣＲ増幅することができる。特に、アダプター３３４および３３６を用いて、アダプター標識アンプリコン３３８に対するアッセイをさらに１回以上実施することができる。アダプター３３４および３３６は、プライマー３４０および３４２とハイブリダイズすることができる。１つ以上のプライマー３４０および３４２は、Ｐ

ＣＲ増幅プライマーであってよい。１つ以上のプライマー３４０および３４２は、シーケンシングプライマーであってよい。１つ以上のアダプター３３４および３３６は、アダプター標識アンプリコン３３８のさらなる増幅のために使用することができる。１つ以上のアダプター３３４および３３６は、アダプター標識アンプリコン３３８のシーケンシングのために使用することができる。プライマー３４２は、プレート指標インデックス３４４を含有することができ、これによって、バーコードまたは確率バーコード３１０の同じセットを用いて生成されたアンプリコンを、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を用いた１回のシーケンシング反応でシーケンシングすることができる。

【０４０９】

オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた細胞成分結合試薬を含む組成物

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）を各々が含む複数の組成物を提供し、オリゴヌクレオチドは、それがコンジュゲートされている細胞成分結合試薬のためのユニーク識別子を含む。細胞成分結合試薬の結合標的は、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合わせであるか、またはそれを含んでもよい。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）は、タンパク質標的に特異的に結合可能である。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、確率バーコードなどのバーコードを含みうる。バーコードは、バーコード配列（たとえば、分子標識）、細胞標識、サンプル標識、またはそれらの任意の組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、ポリ（Ａ）テールなどのオリゴヌクレオチドプローブに対する結合部位を含みうる。たとえば、ポリ（Ａ）テールは、たとえば、固体担体に固定されていなくても、固体担体に固定されてもよい。ポリ（Ａ）テールは、約１０～５０ヌクレオチド長でありうる。いくつかの実施形態では、ポリ（Ａ）テールは、１８ヌクレオチド長でありうる。オリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、またはその両方を含みうる。

【０４１０】

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

【０４１１】

いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニーク識別子の多様なセットから選択される。ユニーク識別子の多様なセットは、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも５，０００、またはそれ以上の異なるユニーク識別子を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子のセットは、分析されるサンプルのＤＮＡまたはＲＮＡ配列と最小限の配列相同性を有するように設計される。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子のセットの配列は、少

なくとも１ヌクレオチド、少なくとも２ヌクレオチド、少なくとも３ヌクレオチド、少なくとも４ヌクレオチド、少なくとも５ヌクレオチド、少なくとも６ヌクレオチド、少なくとも７ヌクレオチド、少なくとも８ヌクレオチド、少なくとも９ヌクレオチド、少なくとも１０ヌクレオチド、もしくはそれ以上互いに異なるか、またはその相補体である。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子のセットの配列は、少なくとも３％、少なくとも５％、少なくとも８％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、もしくはそれ以上互いに異なるか、またはその相補体である。

【０４１２】

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

【０４１３】

本開示においては、抗体もしくはその断片、アプタマー、小分子、リガンド、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど、またはそれらの任意の組合せなど、任意の好適なタンパク質結合試薬が考慮される。いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、一本鎖抗体（ｓｃ－Ａｂ）、またはそれらの断片、たとえば、Ｆａｂ、Ｆｖなどのでありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質結合試薬は、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも５，０００、またはそれ以上の異なるタンパク質結合試薬を含みうる。

【０４１４】

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

【０４１５】

細胞成分結合試薬とその細胞成分標的との間の特異的な結合に干渉しない限り、オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）の任意の好適な部位にコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬はタンパク質

である。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は抗体ではない。タンパク質結合試薬が抗体である実施形態では、オリゴヌクレオチドは、抗原結合部位、たとえば、Ｆｃ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、ＣＬドメインなど以外の抗体のどの部位にでもコンジュゲートされうる。オリゴヌクレオチドを抗体にコンジュゲートする方法は、たとえば、米国特許第６，５３１，２８３号明細書において以前に開示されており、この内容は、その全体が参照により本明細書に明示的に組み込まれる。タンパク質結合試薬に対するオリゴヌクレオチドの化学量論は変動しうる。シーケンシングにおいてタンパク質結合試薬特異的なオリゴヌクレオチドを検出する感度を増大させるために、コンジュゲーション中にタンパク質結合試薬に対するオリゴヌクレオチドの比を増加させることが有利でありうる。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、単一のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、２個以上のオリゴヌクレオチド分子、たとえば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも１０個、少なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも４０個、少なくとも５０個、少なくとも１００個、少なくとも１，０００個、またはそれ以上のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうるが、ここで、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じユニーク識別子を含む。

【０４１６】

図４は、例示的なタンパク質結合試薬、たとえば、抗体に対するユニーク識別子配列を含むオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされている抗体、の概略図を示す。抗体とコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド、抗体とのコンジュゲーションのためのオリゴヌクレオチド、または抗体と先にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、本明細書で抗体オリゴヌクレオチド（「Ａｂオリゴ」または「ＡｂＯ」と省略される）として参照されうる。オリゴヌクレオチドはまた、限定されるものではないが、１つ以上のリンカー、抗体に対する１つ以上のユニーク識別子、任意選択で１つ以上のバーコード配列（たとえば、分子標識）、およびポリ（Ａ）テールを包含する、追加の成分を含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、５’から３’に向かって、リンカー、ユニーク識別子、バーコード配列（たとえば、分子標識）、およびポリ（Ａ）テールを含みうる。

【０４１７】

いくつかの実施形態では、複数の細胞成分結合試薬は、単一細胞、複数の細胞、組織サンプル、腫瘍サンプル、血液サンプルなどのサンプル中において複数の細胞成分標的に特異的に結合可能である。いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬はタンパク質結合試薬であり、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合わせを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質は、生物におけるすべてのコードされたタンパク質のうち、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１，０００、少なくとも１０，０００、またはそれ以上の異なるタンパク質標的を含みうる。

【０４１８】

本明細書に開示される抗体オリゴヌクレオチドは、たとえば、バーコード配列（たとえば、分子標識）、ポリ（Ａ）テール、またはそれらの組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、抗体オリゴヌクレオチドは、複数のバーコードのうち少なくとも１つのバーコードの捕捉配列に相補的な配列を含む。バーコードの標的結合領域は、捕捉配列を含みう

る。標的結合領域は、たとえば、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。いくつかの実施形態では、バーコードの捕捉配列に相補的な抗体オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（Ａ）テールを含みうる。抗体オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識）を含みうる。

【０４１９】

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

【０４２０】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、抗体、テトラマー、アプタマー、タンパク質スキャフォールド、またはそれらの組合せを含む。抗体オリゴヌクレオチドは、たとえば、リンカーを介してタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。１つの抗体オリゴヌクレオチドが、そのリンカーを含みうる。リンカーは化学基を含みうる。化学基は、タンパク質結合試薬の分子に可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されうる。

【０４２１】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、ＡＤＡＭ１０、ＣＤ１５６ｃ、ＡＮＯ６、ＡＴＰ１Ｂ２、ＡＴＰ１Ｂ３、ＢＳＧ、ＣＤ１４７、ＣＤ１０９、ＣＤ２３０、ＣＤ２９、ＣＤ２９８、ＡＴＰ１Ｂ３、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４７、ＣＤ５１、ＣＤ５９、ＣＤ６３、ＣＤ９７、ＣＤ９８、ＳＬＣ３Ａ２、ＣＬＤＮＤ１、ＨＬＡ－ＡＢＣ、ＩＣＡＭ１、ＩＴＦＧ３、ＭＰＺＬ１、ＮＡ　Ｋ　ＡＴＰａｓｅ　ａｌｐｈａ１、ＡＴＰ１Ａ１、ＮＰＴＮ、ＰＭＣＡ　ＡＴＰａｓｅ、ＡＴＰ２Ｂ１、ＳＬＣ１Ａ５、ＳＬＣ２９Ａ１、ＳＬＣ２Ａ１、ＳＬＣ４４Ａ２、またはそれらの任意の組合せに結合することができる。

【０４２２】

いくつかの実施形態では、タンパク質標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、

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

【０４２３】

タンパク質結合試薬は、同じ配列を有する２つ以上の抗体オリゴヌクレオチドと結合しうる。タンパク質結合試薬は、異なる抗体オリゴヌクレオチド配列を有する２つ以上の抗体オリゴヌクレオチドと結合しうる。タンパク質結合試薬に結合される抗体オリゴヌクレオチドの数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、抗体オリゴヌクレオチドの数は、同じまたは異なる配列を有するものであろうとなかろうと、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、抗体オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも、または多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、もしくは１０００でありうる。

【０４２４】

複数の組成物は、抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない１つ以上の追加のタンパク質結合試薬（本明細書で抗体オリゴヌクレオチドフリータンパク質結合試薬とも呼ばれる）を含みうる。複数の組成物における追加のタンパク質結合試薬の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、追加のタンパク質結合試薬の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、追加のタンパク質結合試薬の数は、少なくとも、または多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００でありうる。タンパク質結合試薬および追加のタンパク質結合試薬のうちのいずれかは、いくつかの実施形態において、同じでありうる。

【０４２５】

いくつかの実施形態では、１つ以上の抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされているタンパク質結合試薬および抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていないタンパク質結合試薬を含む混合物が提供される。その混合物を本明細書に開示される方法のいくつかの実施形態において使用して、たとえば、サンプルまたは細胞を接触させることができる。混合物中の（１）抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされたタンパク質結合試薬の数と（２）抗体オリゴヌクレオチドまたは他の抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていない別のタンパク質結合試薬（たとえば、同じタンパク質結合試薬）の数の比は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、比は、１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、

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

【０４２６】

いくつかの実施形態では、比は、１：１、１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．５：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１、６０：１、６１：１、６２：１、６３：１、６４：１、６５：１、６６：１、６７：１、６８：１、６９：１、７０：１、７１：１、７２：１、７３：１、７４：１、７５：１、７６：１、７７：１、７８：１、７９：１、８０：１、８１：１、８２：１、８３：１、８４：１、８５：１、８６：１、８７：１、８８：１、８９：１、９０：１、９１：１、９２：１、９３：１、９４：１、９５：１、９６：１、９７：１、９８：１、９９：１、１００：１、２００：１、３００：１、４００：１、５００：１、６００：１、７０

０：１、８００：１、９００：１、１０００：１、２０００：１、３０００：１、４０００：１、５０００：１、６０００：１、７０００：１、８０００：１、９０００：１、１００００：１、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、比は、少なくとも、または多くとも１：１、１．１：１、１．２：１、１．３：１、１．４：１、１．５：１、１．６：１、１．７：１、１．８：１、１．９：１、２：１、２．５：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１、１２：１、１３：１、１４：１、１５：１、１６：１、１７：１、１８：１、１９：１、２０：１、２１：１、２２：１、２３：１、２４：１、２５：１、２６：１、２７：１、２８：１、２９：１、３０：１、３１：１、３２：１、３３：１、３４：１、３５：１、３６：１、３７：１、３８：１、３９：１、４０：１、４１：１、４２：１、４３：１、４４：１、４５：１、４６：１、４７：１、４８：１、４９：１、５０：１、５１：１、５２：１、５３：１、５４：１、５５：１、５６：１、５７：１、５８：１、５９：１、６０：１、６１：１、６２：１、６３：１、６４：１、６５：１、６６：１、６７：１、６８：１、６９：１、７０：１、７１：１、７２：１、７３：１、７４：１、７５：１、７６：１、７７：１、７８：１、７９：１、８０：１、８１：１、８２：１、８３：１、８４：１、８５：１、８６：１、８７：１、８８：１、８９：１、９０：１、９１：１、９２：１、９３：１、９４：１、９５：１、９６：１、９７：１、９８：１、９９：１、１００：１、２００：１、３００：１、４００：１、５００：１、６００：１、７００：１、８００：１、９００：１、１０００：１、２０００：１、３０００：１、４０００：１、５０００：１、６０００：１、７０００：１、８０００：１、９０００：１、もしくは１００００：１でありうる。

【０４２７】

タンパク質結合試薬は、抗体オリゴヌクレオチドまたはそれでないものとコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされているタンパク質結合試薬および抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていないタンパク質結合試薬を含む混合物中の抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされたタンパク質結合試薬のパーセンテージは、０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、混合物中の抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされたタンパク質結合試薬のパーセンテージは、少なくとも、または多くとも０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７

２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％でありうる。

【０４２８】

いくつかの実施形態では、抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされたタンパク質結合試薬および抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていないタンパク質結合試薬を含む混合物中の抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていないタンパク質結合試薬のパーセンテージは、０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、１００％、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、混合物中の抗体オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされていないタンパク質結合試薬のパーセンテージは、少なくとも、または多くとも０．０００００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４４％、４５％、４６％、４７％、４８％、４９％、５０％、５１％、５２％、５３％、５４％、５５％、５６％、５７％、５８％、５９％、６０％、６１％、６２％、６３％、６４％、６５％、６６％、６７％、６８％、６９％、７０％、７１％、７２％、７３％、７４％、７５％、７６％、７７％、７８％、７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、もしくは１００％でありうる。

【０４２９】

細胞成分標的の定量分析の方法

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、本明細書に開示される組成物、およびバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を細胞成分結合試薬（たとえば、タンパク質結合試薬）のオリゴヌクレオチドに関連付けすることができるオリゴヌクレオチドプローブを使用する、サンプル中の複数の細胞成分標的（たとえば、タンパク質標的）の定量分析の方法を提供する。いくつかの実施形態では、サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織サンプル、腫瘍サンプル、血液サンプルなどでありうる。いくつかの実施形態では、サンプルは、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、母体細胞、胎児細胞などの細胞型の混合物、または異なる対象由来の細胞の混合物を含みうる。

【０４３０】

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

【０４３１】

細胞成分結合試薬の結合標的（すなわち、細胞成分標的）は、たとえば、炭水化物、脂質、タンパク質、細胞外タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合わせであるか、またはそれを含んでもよい。いくつかの実施形態では、細胞成分標的はタンパク質標的である。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合わせを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質は、生物におけるすべてのコードされたタンパク質のうち、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１，０００、少なくとも１０，０００、またはそれ以上の異なるタンパク質標的を含みうる。

【０４３２】

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

【０４３３】

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

【０４３４】

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

【０４３５】

いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬はさらに、個別の区画への細胞のフロー

ソーティングを可能にする蛍光分子とコンジュゲートされうる。

【０４３６】

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

【０４３７】

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

【０４３８】

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

【０４３９】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、タンパク質標的に特異的に結合されているタンパク質結合試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させる工程を提供する。脱離は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトール）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せなどの、タンパク質結合試薬から化学基を分離するためのさまざま方法において実施することができる。タンパク質結合試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させる工程は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを組成物の複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする工程の前、後、または間のいずれかに実施することができる。

【０４４０】

タンパク質および核酸標的の同時定量分析の方法

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、本明細書に開示される組成物、およびバーコード配列（たとえば、分子標識配列）をタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドと核酸標的分子の両方に関連付けすることができるオリゴヌクレオチドプローブを使用する、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時定量分析の方法を提供する。いくつかの実施形態では、サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織サンプル、腫瘍サンプル、血液サンプルなどでありうる。いくつかの実施形態では、サンプルは、正常細胞、腫瘍細胞、血液細胞、Ｂ細胞、Ｔ細胞、母体細胞、胎児細胞などの細胞型の混合物、または異なる対象由来の細胞の混合物を含みうる。

【０４４１】

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

【０４４２】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合わせを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質は、生物におけるすべてのコードされたタンパク質のうち、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１，０００、少なくとも１０，０００、またはそれ以上の異なるタンパク質標的を含みうる。

【０４４３】

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

【０４４４】

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

【０４４５】

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

【０４４６】

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

【０４４７】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、複数のタンパク質標的との特異的な結合のために複数の組成物をサンプルと接触させる工程を提供する。使用される条件は、タンパク質結合試薬、たとえば、抗体のタンパク質標的に対する特異的な結合を可

能にしうることが分かるであろう。接触させる工程の後に、未結合の組成物は除去されうる。たとえば、サンプルが細胞を含み、かつ組成物が、細胞表面タンパク質であるタンパク質標的に特異的に結合する実施形態では、タンパク質標的に特異的に結合する組成物のみが細胞とともに残るように、未結合の組成物は、緩衝液により細胞を洗浄することにより除去されうる。

【０４４８】

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

【０４４９】

複数の核酸分子がさまざまな核酸分子を含みうることは、当業者であれば分かるであろう。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、ＤＮＡ分子、ＲＮＡ分子、ゲノムＤＮＡ分子、ｍＲＮＡ分子、ｒＲＮＡ分子、ｓｉＲＮＡ分子、またはそれらの組合せを含むことができ、かつ二本鎖または一本鎖でありうる。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、少なくとも１００、少なくとも１，０００、少なくとも１０，０００、少なくとも２０，０００、少なくとも３０，０００、少なくとも４０，０００、少なくとも５０，０００、少なくとも１００，０００、少なくとも１０００，０００、またはそれ以上の種を含む。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、単一細胞または複数の細胞などのサンプルに由来してもよい。いくつかの実施形態では、複数の核酸分子は、複数の単一細胞などの複数のサンプルからプールされてもよい。

【０４５０】

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

【０４５１】

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

【０４５２】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、タンパク質標的に特異的に結合されているタンパク質結合試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させる工程を提供する。脱離は、ＵＶ光切断、化学処理（たとえば、ジチオスレイトール）、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せなどの、タンパク質結合試薬から化学基を分離するためのさま

ざま方法において実施することができる。タンパク質結合試薬からオリゴヌクレオチドを脱離させる工程は、複数のオリゴヌクレオチドプローブを複数の核酸標的分子および組成物の複数のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする工程の前、後、または間のいずれかに実施することができる。

【０４５３】

バーコードの関連付け

タンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドおよび／または核酸分子は、オリゴヌクレオチドプローブにランダムに関連付けしてもよい。関連付けは、たとえば、標的核酸分子および／またはタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドの相補的部分へのオリゴヌクレオチドプローブの標的結合領域のハイブリダイゼーションを含む（たとえば、バーコードのオリゴ（ｄＴ）は、標的核酸分子のポリ（Ａ）テールおよび／またはタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドのポリ（Ａ）テールと相互作用可能である）。ハイブリダイゼーションに使用されるアッセイ条件（たとえば、緩衝液ｐＨ、イオン強度、温度など）は、特定の安定なハイブリッドの形成を促進するように選択可能である。

【０４５４】

本開示は、逆転写を用いてバーコード配列（たとえば、分子標識）を標的核酸および／またはタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドと関連付けする方法を提供する。逆転写酵素はＲＮＡおよびＤＮＡの両方を鋳型として使用することができるため、タンパク質結合試薬に元来コンジュゲートされたオリゴヌクレオチドは、ＲＮＡもしくはＤＮＡ塩基のいずれかまたはその両方から構成されてもよい。タンパク質結合試薬特異的オリゴヌクレオチドは、コピーされうるし、細胞のｍＲＮＡ分子に加えて細胞標識およびバーコード配列（たとえば、分子標識）に共有結合されうる。

【０４５５】

いくつかの実施形態では、バーコード配列（たとえば、分子標識）は、オリゴヌクレオチドプローブ標的結合領域と標的核酸分子の部分および／またはタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドのライゲーションにより追加されうる。たとえば、標的結合領域は、制限部位オーバーハング（たとえば、ＥｃｏＲＩ付着末端オーバーハング）への特異的ハイブリダイゼーションが可能でありうる核酸配列を含みうる。本方法は、制限部位オーバーハングを生成するために制限酵素（たとえば、ＥｃｏＲＩ）で標的核酸および／またはタンパク質結合試薬のオリゴヌクレオチドを処置する工程をさらに含みうる。リガーゼ（たとえば、Ｔ４ＤＮＡリガーゼ）は２つの断片を連結するために使用されうる。

【０４５６】

タンパク質および核酸標的の同時定量分析

図５は、単一細胞におけるタンパク質と核酸標的の両方の同時定量分析の例示的方法の概略図を示す。いくつかの実施形態では、各々が抗体などのタンパク質結合試薬を含む複数の組成物５０５、５０５ｂ、５０５ｃなどが提供される。異なるタンパク質標的に結合する、抗体などの各種タンパク質結合試薬が、異なるユニーク識別子とコンジュゲートされる。次に、タンパク質結合試薬は、複数の細胞５１０を含有するサンプルとインキュベートされうる。各種タンパク質結合試薬は、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合わせなどの細胞表面のタンパク質に特異的に結合することができる。未結合のタンパク質結合試薬は、たとえば、緩衝液で細胞を洗浄することにより、除去されうる。続いて、タンパク質結合試薬を伴う細胞は、単一の区画５１５が単一細胞および単一ビーズ５２０に適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイなどの複数の区画に分離されうる。各ビーズは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、およびバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。抗体にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド５２５は、化学的、光学的または他の手段を用いて抗体から脱離されうる。細胞は溶解されて（５３５）、ゲノムＤＮＡまたは細胞のｍＲＮＡ　５３０

などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　５３０、オリゴヌクレオチド５２５、またはその両方は、ビーズ５２０上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　５３０およびオリゴヌクレオチド５２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　５３０およびオリゴヌクレオチド５２５を鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅およびシーケンシングに付されうる。シーケンシングリードは、サンプル中の各単一細胞のタンパク質および遺伝子発現のデジタルな表現をもたらすことができる、細胞標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、遺伝子同一性、抗体特異的オリゴ同一性などのデマルチプレクシングに付されうる。

【０４５７】

ユニークバーコード配列（たとえば、細胞標識配列）の数の決定

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、各ユニーク識別子および／または各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列（たとえば、分子標識配列）の数を決定する工程を含む。たとえば、シーケンシングリードを使用して、各ユニーク識別子および／または各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列の数を決定することができる。

【０４５８】

いくつかの実施形態では、各ユニーク識別子および／または各核酸標的分子のためのユニークバーコード配列の数は、サンプル中の各タンパク質標的および／または各核酸標的分子の量を示す。いくつかの実施形態では、タンパク質標的の量およびその対応する核酸標的分子、たとえば、ｍＲＮＡ分子の量は、互いに比較されうる。いくつかの実施形態では、タンパク質標的の量およびその対応する核酸標的分子、たとえば、ｍＲＮＡ分子の量の比率を計算することができる。タンパク質標的は、たとえば、細胞表面タンパク質マーカーでありうる。いくつかの実施形態では、細胞表面タンパク質マーカーのタンパク質レベルと細胞表面タンパク質マーカーのｍＲＮＡのレベルとの比率は低い。

【０４５９】

本明細書に開示される方法は、さまざまな用途のために使用されうる。たとえば、本明細書に開示される方法は、サンプルのプロテオームおよび／またはトランスクリプトーム分析のために使用されうる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル中のタンパク質標的および／または核酸標的、すなわち、バイオマーカーを同定するために使用されうる。いくつかの実施形態では、タンパク質標的および核酸標的は互いに対応する、すなわち、核酸標的はタンパク質標的をコードする。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル中のタンパク質標的の量とその対応する核酸標的分子、たとえば、ｍＲＮＡ分子の量との間で所望の比率を有するタンパク質標的を同定するために使用されうる。いくつかの実施形態では、その比率は、少なくとも０．００１、少なくとも０．０１、少なくとも０．１、少なくとも１、少なくとも１０、少なくとも１００、少なくとも１０００、もしくはそれ以上、または上の値のいずれか２つの間の範囲である。いくつかの実施形態では、その比率は、多くとも０．００１、多くとも０．０１、多くとも０．１、多くとも１、多くとも１０、多くとも１００、多くとも１０００、もしくはそれ以下、または上の値のいずれか２つの間の範囲である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、サンプル中の対応する核酸標的分子の量が１０００未満、１００未満、１０未満、５未満、２未満、１未満、または０である、サンプル中のタンパク質標的を同定するために使用されうる。

【０４６０】

キット

本明細書に開示されるいくつかの実施形態は、各々がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた複数のタンパク質結合試薬を含む、サンプル中の複数のタンパク質および複数の核酸標的分子の同時定量分析のためのキットを提供し、オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬に対するユニーク識別子および複数のオリゴヌクレオチドプローブを含み、

複数のオリゴヌクレオチドプローブの各々は、タンパク質結合領域、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含み、バーコード配列は、ユニークバーコード配列（たとえば、分子標識配列）の多様なセットから選択される。本明細書には、各々がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた複数のタンパク質結合試薬を各々が含む複数の組成物を含む、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時定量分析のためのキットが開示され、オリゴヌクレオチドは、それとコンジュゲートされている複数のタンパク質結合試薬のうちの１つに対するユニーク識別子を含み、タンパク質結合試薬は、タンパク質標的（たとえば、タンパク質標的の各種部分、タンパク質標的の各種断片、またはタンパク質標的の各種アイソフォーム）および複数のオリゴヌクレオチドプローブと特異的に結合可能である。本明細書には、各々がオリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた複数のタンパク質結合試薬を各々が含む複数の組成物を含む、サンプル中の複数のタンパク質標的および複数の核酸標的分子の同時定量分析のためのキットが開示され、オリゴヌクレオチドは、それとコンジュゲートされているタンパク質結合試薬に対するユニーク識別子を含み、タンパク質結合試薬は、タンパク質標的および複数のオリゴヌクレオチドプローブと特異的に結合可能である。

【０４６１】

タンパク質標的に特異的に結合可能な複数のタンパク質結合試薬のうちのタンパク質結合試薬の数は、さまざまな履行で異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、タンパク質標的に特異的に結合可能なタンパク質結合試薬の数は、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、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、タンパク質標的に特異的に結合可能なタンパク質結合試薬の数は、少なくとも、または多くとも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、もしくは１００でありうる。

【０４６２】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、バーコード配列（たとえば、分子標識）、細胞標識、サンプル標識、またはそれらの任意の組合せを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、リンカーを含みうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの各々は、ポリ（Ａ）テールなどのオリゴヌクレオチドプローブに対する結合部位を含みうる。たとえば、ポリ（Ａ）テールは、たとえば、オリゴＡ１８（固体担体に固定されていない）またはオリゴＡ１８Ｖ（固体担体に固定される）でありうる。オリゴヌクレオチドは、ＤＮＡ残基、ＲＮＡ残基、またはその両方を含みうる。

【０４６３】

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

【０４６４】

いくつかの実施形態では、ユニーク識別子は、ユニーク識別子の多様なセットから選択される。ユニーク識別子の多様なセットは、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、

少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも５，０００、またはそれ以上の異なるユニーク識別子を含みうる。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子のセットは、分析されるサンプルのＤＮＡまたはＲＮＡ配列と最小限の配列相同性を有するように設計される。いくつかの実施形態では、ユニーク識別子のセットの配列は、少なくとも１ヌクレオチド、少なくとも２ヌクレオチド、少なくとも３ヌクレオチド、少なくとも４ヌクレオチド、少なくとも５ヌクレオチド、少なくとも６ヌクレオチド、少なくとも７ヌクレオチド、少なくとも８ヌクレオチド、少なくとも９ヌクレオチド、少なくとも１０ヌクレオチド、もしくはそれ以上互いに異なるか、またはその相補体である。

【０４６５】

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

【０４６６】

本開示においては、抗体もしくはその断片、アプタマー、小分子、リガンド、ペプチド、オリゴヌクレオチドなど、またはそれらの任意の組合せなど、任意の好適なタンパク質結合試薬が考慮される。いくつかの実施形態では、タンパク質結合試薬は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、組換え抗体、一本鎖抗体（ｓｃＡｂ）、またはそれらの断片、たとえば、Ｆａｂ、Ｆｖなどのでありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質結合試薬は、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも６０、少なくとも７０、少なくとも８０、少なくとも９０、少なくとも１００、少なくとも２００、少なくとも３００、少なくとも４００、少なくとも５００、少なくとも６００、少なくとも７００、少なくとも８００、少なくとも９００、少なくとも１，０００、少なくとも２，０００、少なくとも５，０００、またはそれ以上の異なるタンパク質結合試薬を含みうる。

【０４６７】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介してタンパク質結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、共有結合によりタンパク質結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、非共有結合によりタンパク質結合試薬とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドをタンパク質結合試薬に可逆的に結合する化学基を含みうる。化学基は、リンカーに、たとえば、アミノ基を介してコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、リンカーは、タンパク質結合試薬にコンジュゲートされた別の化学基と安定な結合を形成する化学基を含みうる。たとえば、化学基は、ＵＶ光切断性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミンなどでありうる。いくつかの実施形態では、化学基は、リジンなどのアミノ酸の一級アミン、またはＮ末端を介してタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。タンパク質結合試薬とそのタンパク質標的との間の特異的な結合と干渉しない限り、オリゴヌクレオチドは、タンパク質結合試薬の任意の好適な部位にコンジュゲートされうる。タンパク質結合試薬が抗体である実施形態では、オリゴヌクレオチドは、抗原結合部位、たとえば、Ｆｃ領域、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、ＣＬドメインなど以外の抗体のどの部位にでもコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、単一のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうる。いくつかの実施形態では、各タンパク質結合試薬は、２個以上のオリゴヌクレオチド分子、たとえば、少なくとも２個、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも１０個、少なくとも２０個、少なくとも３０個、少なくとも４０個、少なくとも５０個、少なくとも１００個、少なくとも１

，０００個、またはそれ以上のオリゴヌクレオチド分子とコンジュゲートされうるが、ここで、オリゴヌクレオチド分子の各々は、同じユニーク識別子を含む。

【０４６８】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質結合試薬は、単一細胞、複数の細胞、組織サンプル、腫瘍サンプル、血液サンプルなどのサンプル中において複数のタンパク質標的に特異的に結合可能である。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、抗体、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、またはそれらの任意の組合わせを含む。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞内タンパク質を含みうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質は、生物におけるすべてのコードされたタンパク質のうち、少なくとも１％、少なくとも２％、少なくとも３％、少なくとも４％、少なくとも５％、少なくとも６％、少なくとも７％、少なくとも８％、少なくとも９％、少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、少なくとも２、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも１０、少なくとも２０、少なくとも３０、少なくとも４０、少なくとも５０、少なくとも１００、少なくとも１，０００、少なくとも１０，０００、またはそれ以上の異なるタンパク質標的を含みうる。

【０４６９】

単一細胞シーケンシングコントロール粒子

本明細書には、たとえば、単一細胞シーケンシングコントロールのために使用されうるコントロール粒子組成物が開示される。コントロール粒子組成物は、たとえば、オリゴヌクレオチドと結合した細胞成分結合試薬を用いて細胞成分の発現レベル（たとえば、タンパク質発現レベル）を測定するための方法、キットおよびシステムなどの、本明細書に開示される任意の好適な方法、キットおよびシステムにおいて使用されうる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子と結合した複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含む。複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合したコントロール粒子は、本明細書では官能化コントロール粒子とも呼ばれる。図６Ａは、複数のオリゴヌクレオチドで官能化された粒子の非限定的な例示的概略図である。図６Ａは、コントロール粒子と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列およびｍＲＮＡポリ（Ａ）テールを模倣するポリ（ｄＡ）領域を含みうることを示す。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含みうる。コントロール粒子と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、同じでも、互いに異なってもよい。いくつかの実施形態では、コントロール粒子と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも２つは、異なるコントロールバーコード配列を有する。いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、コントロール粒子と結合し、第１および第２の粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を有する。

【０４７０】

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

使用することができる。

【０４７１】

コントロール粒子オリゴヌクレオチド

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

【０４７２】

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

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

【０４７３】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、１００００００、１０００００００、１００００００００、１０００００００００、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、少なくとも、または多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、２００００、３００００、４００００、５００００、６００００、７００００、８００００、９００００、１０００００、１００００００、１０００００００、もしくは１０００００００００でありうる。

【０４７４】

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

【０４７５】

複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの少なくとも、または多くとも０．００００００１％、０．０００００００１％、０．０００００１％、０．００００１％、０．０００１％、０．００１％、０．０１％、０．１％、１％、２％、３％、４％、５％、６％、７％、８％、９％、１０％、１１％、１２％、１３％、１４％、１５％、１６％、１７％、１８％、１９％、２０％、２１％、２２％、２３％、２４％、２５％、２６％、２７％、２８％、２９％、３０％、３１％、３２％、３３％、３４％、３５％、３６％、３７％、３８％、３９％、４０％、４１％、４２％、４３％、４

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

【０４７６】

いくつかの実施形態では、コントロールバーコード配列は、種のゲノム配列と相同ではない。コントロールバーコード配列は、種のゲノム配列と相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せでありうる。

【０４７７】

コントロール粒子

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

【０４７８】

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

【０４７９】

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

ル粒子中に部分的に封入されうる。コントロール粒子は、崩壊可能でありうる。

【０４８０】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子はビーズであってよい。ビーズは、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。コントロール粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、またはそれらの任意の組合せの材料を含みうる。コントロール粒子は、崩壊可能なヒドロゲル粒子を含みうる。

【０４８１】

タンパク質結合試薬

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第１のタンパク質結合試薬と結合し、複数の第１のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つと結合する。図６Ｂは、オリゴヌクレオチドで官能化されたいくつかの抗体により覆われた非限定的な例示的粒子を示す。第１のタンパク質結合試薬は、第１の抗体（たとえば、一次抗体または二次抗体）を含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して第１のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは化学基を含みうる。化学基は、第１のタンパク質結合試薬に可逆的または不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド連結、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０４８２】

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、複数の第２のタンパク質結合試薬と結合する。複数の第２のタンパク質結合試薬の少なくとも１つは、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの１つと結合しうる。図６Ｃは、オリゴヌクレオチドで官能化された複数の第１の抗体およびオリゴヌクレオチドで官能化されていない複数の第２の抗体により覆われた非限定的な例示的粒子を示す。コントロール粒子上の抗体を、高温抗体（たとえば、コントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合した）および低温抗体（たとえば、コントロール粒子オリゴヌクレオチドと結合していない）の比により用量設定して、コントロール粒子から得られるシーケンシングリードの量を変えることができる。第１の抗体および第２の抗体は、同じでも、異なってもよい。

【０４８３】

図６Ｄは、高い、中程度、および低い相対存在量で複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチド、複数の第２の抗体にコンジュゲートされた複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチド、および複数の第３のコントロール粒子オリゴヌクレオチドにより官能化された粒子の非限定的な例示的概略図である。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、複数の第１のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、複数の第２のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。複数の第３のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、複数の第３のタンパク質結合試薬にコンジュゲートされうる。

【０４８４】

第１、第２、および第３のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの相対存在量は、さまざまな発現レベルを有するｍＲＮＡを模倣しうる。第１のタンパク質結合試薬と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドおよび第２のタンパク質結合試薬と結合したコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を含みうる。抗体などの各種タンパク質結合試薬、およびコントロール粒子上の各種コントロール粒子オリ

ゴヌクレオチドを用量設定して、標準曲線を生成することができる。第１のタンパク質結合試薬、第２のタンパク質結合試薬、または第３のタンパク質結合試薬は、同一または異なるタンパク質結合試薬でありうる。

【０４８５】

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

【０４８６】

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

【０４８７】

いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、同一のコントロールバーコード配列を有する複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの２つ以上と結合する。第１

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

【０４８８】

コントロールバーコードの多様性

１つのコントロール粒子と結合した複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、異なるコントロールバーコード配列を有するいくつかのコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含みうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチドが有するコントロールバーコード配列の数は、さまざまな履行で異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドが有するコントロールバーコード配列の数は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、１０００００００、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、コントロール粒子オリゴヌクレオチドが有するコントロールバーコード配列の数は、少なくとも、または多くとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、もしくは１０００００００でありうる。

【０４８９】

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

【０４９０】

いくつかの実施形態では、複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドは、各々が第１のコントロールバーコード配列を含む複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチド、および各々が第２のコントロールバーコード配列を含む複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含み、第１のコントロールバーコード配列および第２のコントロールバーコード配列は、異なる配列を有する。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、ほぼ同じでありうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、異なりうる。複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数は、複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の少なくとも２倍、１０倍、１００倍、またはそれ以上でありうる。いくつかの実施形態では、複数の第１のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数と複数の第２のコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数の比は、１：１、１：１．１、１：１．２、１：１．３、１：１．４、１：１．５、１：１．６、１：１．７、１：１．８、１：１．９、１：２、１：２．５、１：３、１：４、１：５、１：６、１：７、１：８、１：９、１：１０、１：１１、１：１２、１：１３、１：１４、１：１５、１：１６、１：１７、１：１８、１：１９、１：２０、１：２１、１：２２、１：２３、１：２４、１：２５、１：２６、１：２７、１：

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

【０４９１】

検出可能な部分

いくつかの実施形態では、コントロール粒子は、検出可能な部分、たとえば、フルオロフォアまたは発色団などの光学部分と結合する。コントロール粒子オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分、たとえば、光学部分と結合しうる。いくつかの実施形態では、第１のタンパク質結合試薬は、光学部分と結合しうる（図６Ｅ）。第２のタンパク質結合試薬は、光学部分と結合しうる。光学部分（たとえば、蛍光性タグを付けられたビーズ）と結合したコントロール粒子はまた、イメージングおよびフローサイトメトリーのために使用することができる。

【０４９２】

検出可能な部分は、スペクトルの異なる検出可能な部分の群から選択されうる。スペクトルの異なる検出可能な部分は、たとえそれらの発光スペクトルが重なり合うことがあるとしても、識別可能な発光スペクトルを有する検出可能な部分を含む。検出可能な部分の非限定的な例としては、キサンテン誘導体：フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシンおよびテキサスレッド；シアニン誘導体：シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニン、およびメロシアニン；スクアライン誘導体および環置換スクアライン、たとえば、Ｓｅｔａ、ＳｅＴａｕ、およびＳｑｕａｒｅ

色素；ナフタレン誘導体（ダンシルおよびプロダン誘導体）；クマリン誘導体；オキサジアゾール誘導体：ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾール、およびベンゾオキサジアゾール；アントラセン誘導体：アントラキノン、たとえば、ＤＲＡＱ５、ＤＲＡＱ７およびＣｙＴＲＡＫオレンジ；ピレン誘導体：カスケードブルー；オキサジン誘導体：ナイルレッド、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン１７０；アクリジン誘導体：プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー；アリールメチン誘導体：オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン；ならびにテトラピロール誘導体：ポルフィン、フタロシアニン、ビリルビンが挙げられる。検出可能な部分の他の非限定的な例としては、ヒドロキシクマリン、アミノクマリン、メトキシクマリン、カスケードブルー、パシフィックブルー、パシフィックオレンジ、ルシファーイエロー、ＮＢＤ、Ｒ－フィリコエリトリン（ＰＥ）、ＰＥ－Ｃｙ５コンジュゲート、ＰＥ－Ｃｙ７コンジュゲート、レッド６１３、ＰｅｒＣＰ、ＴｒｕＲｅｄ、ＦｌｕｏｒＸ、フルオレセイン、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ、Ｃｙ２、Ｃｙ３、Ｃｙ３Ｂ、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７、ＴＲＩＴＣ、Ｘ－ローダミン、リサミンローダミンＢ、テキサスレッド、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）、ＡＰＣ－Ｃｙ７コンジュゲート、ヘキスト３３３４２、ＤＡＰＩ、ヘキスト３３２５８、ＳＹＴＯＸブルー、クロモマイシンＡ３、ミトラマイシン、ＹＯＹＯ－１、エチジウムブロマイド、アクリジンオレンジ、ＳＹＴＯＸグリーン、ＴＯＴＯ－１、ＴＯ－ＰＲＯ－１、ＴＯ－ＰＲＯ：シアニンモノマー、チアゾールオレンジ、ＣｙＴＲＡＫオレンジ、プロピジウムイオダイド（ＰＩ）、ＬＤＳ７５１、７－ＡＡＤ、ＳＹＴＯＸオレンジ、ＴＯＴＯ－３、ＴＯ－ＰＲＯ－３、ＤＲＡＱ５、ＤＲＡＱ７、Ｉｎｄｏ－１、Ｆｌｕｏ－３、Ｆｌｕｏ－４、ＤＣＦＨ、ＤＨＲ、およびＳＮＡＲＦが挙げられる。

【０４９３】

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

【０４９４】

検出可能な部分の分子量は変動してもよく、たとえば、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１３０、１４０、１５０、１６０

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

【０４９５】

スペクトルの異なる検出可能な部分の基は、たとえば、５つの異なるフルオロフォア、５つの異なる発色団、５つのフルオロフォアと発色団の組合せ、４つの異なるフルオロフォアと１つの非フルオロフォアの組合せ、４つの発色団と１つの非発色団の組合せ、または４つのフルオロフォアと発色団および１つの非フルオロフォア非発色団の組合せでありうる。いくつかの実施形態では、検出可能な部分は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１０００、２０００、３０００、４０００、５０００、６０００、７０００、８０００、９０００、１００００、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲のスペクトルの異なる部分のうちの１つでありうる。

【０４９６】

コントロール粒子のワークフロー

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

ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ）（ＥＲＣＣ）と類似した、単一細胞ワークフローの効率を決定するためのコントロールとなりうる。

【０４９７】

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

【０４９８】

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

【０４９９】

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

【０５００】

別の例として、コントロール粒子は、低発現遺伝子を模倣する特定のコントロールバー

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

【０５０１】

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

【０５０２】

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

【０５０３】

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

【０５０４】

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

【０５０５】
マイクロウェルカートリッジまたはアレイのワークフロー
図７は、単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子を用いた例示的なワークフローの概略図である。いくつかの実施形態では、コントロール粒子組成物は、コントロール粒子７０４と結合した複数のコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含む。たとえば、コントロール粒子７４０は、コントロール粒子７４０に結合される抗体７０５にコンジュゲートされたコントロール粒子オリゴヌクレオチド７２５と結合しうる。コントロール粒子オリゴヌクレオチド７２５で官能化された複数のコントロール粒子７４０は、複数の細胞に、たとえば、５％で添加されうる。コントロール粒子７４０は、次のワークフローにおいて「細胞」として処理されうる。コントロール粒子７４０はまた、コントロール細胞またはコントロール細胞粒子と呼ばれる場合もある。続いて、細胞７１０およびコントロール粒子７４０は、単一の区画７１５ａ、７１５ｂが単一細胞またはコントロール粒子および単一ビーズ７２０ａ、７２０ｂに適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイのウェルなどの複数の区画に分離されうる。ビーズ７２０ａ、７２０ｂは、区画７１５ａ、７１５ｂにロードされうる。
【０５０６】
各ビーズは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、およびバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。抗体７０５にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド７２５は、化学的、光学的または他の手段を用いて抗体７０５から脱離されうる。細胞７１０は溶解されて（７３５）、ゲノムＤＮＡまたは細胞のｍＲＮＡ　５３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　７３０およびコントロール粒子オリゴヌクレオチド７２５は、それぞれビーズ７２０ａ、７２０ｂ上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。ビーズを回収することができ、捕捉された細胞のｍＲＮＡ　７３０およびコントロール粒子オリゴヌクレオチド７２５（たとえば、全体で５０００個前後の細胞に相当する）がプールされうる。
【０５０７】
逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　７３０およびオリゴヌクレオチド７２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　７３０およびオリゴヌクレオチド７２５を鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅およびシーケンシングに付されうる。シーケンシングリードは、単一細胞の遺伝子発現プロフィールおよびワークフローの全体または一部の量的な効率（たとえば、細胞捕捉効率）を決定するために使用されうる細胞標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、遺伝子同一性、コントロール粒子オリゴヌクレオチド配列などのデマルチプレクシングに付されうる。たとえば、捕捉されたコントロール粒子の数は、データにおいてコントロールバーコード配列に関連付けられた細胞標識の数に基づいて決定されうる。ワークフローの効率は、捕捉されたコントロール粒子の数と添加されたコントロール粒子の数の比率でありうる。
【０５０８】
マイクロフルイディクスのワークフロー
図８は、単一細胞シーケンシングコントロールのためのオリゴヌクレオチドで官能化された粒子を用いた別の例示的なワークフローの概略図である。コントロール粒子オリゴヌクレオチド７２５で官能化された複数のコントロール粒子７４０は、複数の細胞に、たとえば、５％で添加されうる。コントロール粒子７４０は、次のワークフローにおいて「細胞」として処理されうる。コントロール粒子７４０はまた、コントロール細胞またはコントロール細胞粒子と呼ばれる場合もある。続いて、細胞７１０およびコントロール粒子７４０は、マイクロフルイディクスデバイスを用いてドロップレット７４５ａ、７４５などの複数の区画に分離されうる。各ドロップレット７４５ａ、７４５ｂは、１つの細胞７１

０または１つのコントロール粒子７４０、およびヒドロゲルビーズ７２０ａ、７２０ｂを含みうる。

【０５０９】

各ビーズ７２０ａ、７２０ｂは、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、およびバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。ビーズ７２０ａ、７２０ｂは、次のワークフロー（たとえば、逆転写）のための試薬を含みうる。抗体７０５にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド７２５は、化学的、光学的または他の手段を用いて抗体７０５から脱離されうる。細胞７１０は溶解されて（７３５）、ゲノムＤＮＡまたは細胞のｍＲＮＡ　７３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　５３０およびコントロール粒子オリゴヌクレオチド７２５は、それぞれビーズ７２０ａ、７２０ｂから放出されたオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　７３０およびオリゴヌクレオチド７２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　７３０およびオリゴヌクレオチド７２５を鋳型として用いて伸長することができる。

【０５１０】

ドロップレット７４５ａ、７４５ｂの細分化後、逆転写酵素により生成された伸長産物をプールし、かつ増幅およびシーケンシングに付すことができる。シーケンシングリードは、単一細胞の遺伝子発現プロフィールおよびワークフローの全体または一部の量的な効率を決定するための細胞標識、分子標識、遺伝子同一性、コントロール粒子オリゴヌクレオチド配列などのデマルチプレクシングに付されうる。

【０５１１】

単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド

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

【０５１２】

オリゴヌクレオチドとコンジュゲートされた抗体（本明細書では「ＡｂＯ」として参照される）は、単一細胞シーケンシングコントロールとして任意の単一細胞ワークフローとともに使用することができる。単一細胞ワークフローは、マイクロウェルアレイまたはマイクロウェルカートリッジ（たとえば、ＢＤ　Ｒｅｓｏｌｖｅ（商標））またはマイクロフルイディクスデバイス（たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）、Ｄｒｏｐ－ｓｅｑ（ＭｃＣａｒｒｏｌｌ　Ｌａｂ、Ｈａｒｖａｒｄ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｃｈｏｏｌ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｍａｓｓａｃｈｕｓｅｔｔｓ）；Ｍａｃｏｓｋｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，２０１５　Ｍａｙ　２１　１６；５：１２０２、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）、またはＡｂｓｅｑ（Ｍｉｓｓｉｏｎ　Ｂｉｏ（Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）；Ｓｈａｈｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．２０１７　Ｍａｒ　１４；７：４４４４７、その内容はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を利用することができ、これらは確率バーコードなどのバーコードと結合した固体もしくは半固体粒子（たとえば、ＢＤ　ＲｅｓｏｌｖｅもしくはＤｒｏｐ－ｓｅｑ）、または放出可能な確率バーコードなどのバーコードを封入する

崩壊可能なヒドロゲル粒子（たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓもしくは Ａｂｓｅｑ）と組み合わされる。ＡｂＯは、単一細胞ワークフローの効率を決定するためのコントロールとなりうる。たとえば、１０Ｘ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓの単一細胞シーケンシングプラットフォームは、エマルションを用いて単一細胞の捕捉を行って、ドロップレット中に単一細胞を封入する。これらのドロップレットは容易に可視化できないため、単一細胞の捕捉効率を容易に決定することができない。このような単一細胞シーケンシングワークフローの上流でのＡｂＯの使用により、ユーザはシーケンシング後の単一細胞捕捉効率およびドロップレット形成率を評価することが可能になる。

【０５１３】

図９は、単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド－コンジュゲート抗体を用いた例示的ワークフローの概略図を示す。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞（たとえば、５０００個）９００は、マイクロウェルカートリッジまたはアレイのマイクロウェル９１５にロードする前に、コントロールオリゴヌクレオチド９２５とコンジュゲートされた抗体９０５により染色されうる。続いて、細胞９１０は、単一の区画９１５が単一細胞および単一ビーズ９２０に適合するように所定の寸法に調整されているマイクロウェルアレイのウェルなどの複数の区画に分離されうる。

【０５１４】

ビーズは、たとえば、ビーズ上のすべてのオリゴヌクレオチドプローブと共通の細胞標識、およびバーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含みうる複数のオリゴヌクレオチドプローブを含みうる。いくつかの実施形態では、各オリゴヌクレオチドプローブは、標的結合領域、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列を含みうる。抗体９０５にコンジュゲートされたオリゴヌクレオチド９２５は、化学的、光学的または他の手段を用いて抗体９０５から脱離されうる。細胞９１０は溶解されて（９３５）、ゲノムＤＮＡまたは細胞のｍＲＮＡ　９３０などの細胞内の核酸を放出しうる。細胞のｍＲＮＡ　９３０およびコントロール粒子オリゴヌクレオチド９２５は、ビーズ９２０上のオリゴヌクレオチドプローブにより、たとえば、ポリ（ｄＴ）配列にハイブリダイズすることにより、捕捉されうる。ビーズを回収することができ、捕捉された細胞のｍＲＮＡ　９３０（たとえば、全体で５０００個前後の細胞に相当する）がプールされうる。

【０５１５】

逆転写酵素を使用して、細胞のｍＲＮＡ　９３０およびオリゴヌクレオチド９２５にハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドプローブを細胞のｍＲＮＡ　９３０およびオリゴヌクレオチド９２５を鋳型として用いて伸長することができる。逆転写酵素により生成された伸長産物は、増幅およびシーケンシングに付されうる。シーケンシングリードは、単一細胞の遺伝子発現プロフィールおよびワークフローの全体または一部の量的な効率（たとえば、細胞捕捉効率）を決定するための細胞標識、バーコード配列（たとえば、分子標識）、遺伝子同一性、コントロールオリゴヌクレオチド配列などのデマルチプレクシングに付されうる。順調に捕捉され、ライブラリー作製を経る細胞の数（たとえば、５０００個未満の細胞）が決定されうる。

【０５１６】

図１０は、単一細胞シーケンシング効率を決定するためのコントロールオリゴヌクレオチド－コンジュゲート抗体を用いた例示的ワークフローの別の概略図を示す。図１０では、単一細胞１０１０ａ、１０１０ｂを含有するドロップレット１０４５ａ、１０４５ｂおよび単一粒子１０２０ａ、１０２０ｂがマイクロ流体デバイスを用いて形成されうる。単一細胞１０１０ａ、１０１０ｂは、コントロールオリゴヌクレオチド１０２５ａ、１０２５ｂとコンジュゲートされた抗体１００５ａ、１００５ｂに結合されうる。ドロップレット１０４５ａ、１０４５ｂ中における細胞溶解および逆転写後、ドロップレットは細分化され、内容物はライブラリー作製のためにプールされうる。順調に捕捉され、ライブラリー作製を経る細胞の数が決定されうる。

【０５１７】

図１１Ａ～１１Ｃは、コントロールオリゴヌクレオチドが細胞のカウントのために使用

されうることを示すプロットである。図１１Ａ～１１Ｂは、ＡｂＯのコントロールオリゴヌクレオチドが細胞のカウントのためのコントロールとして使用されうることを示す。１００％の捕捉およびライブラリー作製効率が達成される場合、ｍＲＮＡカウントプロットおよびコントロールオリゴヌクレオチドカウントプロットの下降点は一致しうる。図１１Ｃは、従来のｍＲＮＡのみの細胞標識コーリングを使用することにより、転写性の高い細胞に隠れて転写性の低い細胞を見逃す可能性があることを示す。この方法は、ｎ個の細胞のバーコードでカットオフを要求しうる。これは、多数の活性化Ｔ細胞内に休止状態のＴ細胞がある場合に起こりうるが、ここで、活性化Ｔ細胞は、数倍高いＲＮＡ転写を有しうる。これはまた、標的化パネル（たとえば、癌パネル）において、標的化遺伝子の発現の低い非標的化細胞（非癌細胞）が減少することになる場合に起こりうる。しかし、タンパク質発現ははるかに高いため、転写性の低い細胞は依然としてコールされる確率が高い。この方法は、ｍ個の細胞のバーコードでカットオフを要求しうる（ｍ＞ｎ）。

【０５１８】

本明細書では、シーケンシングコントロール（たとえば、単一細胞シーケンシング効率を決定する）のための方法が開示される。単一細胞シーケンシング効率を決定するための方法は、本明細書に開示される他の方法とともに使用することができる。たとえば、単一細胞シーケンシング効率のために使用される方法は、タンパク質発現を決定するための方法とともに使用することができる。別の例として、ワークフローを、単一細胞シーケンシング効率、タンパク質発現および／または遺伝子発現を決定するために使用することができる。

【０５１９】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数の細胞のうちの１つ以上の細胞を複数のコントロール組成物のうちの１つのコントロール組成物と接触させる工程であって、複数の細胞のうちの１つの細胞が、複数の標的および複数のタンパク質標的を含み、複数のコントロール組成物の各々が、コントロールオリゴヌクレオチドと結合したタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、複数のタンパク質標的のうち少なくとも１つに特異的に結合可能であり、かつコントロールオリゴヌクレオチドが、コントロールバーコード配列および複数のバーコードのうちの少なくとも１つの標的結合領域と実質的に相補的な配列を含む擬似標的領域を含む工程と；複数のバーコードを使用してコントロールオリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、および標的結合領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が、異なる配列を含み、かつ複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；シーケンシングデータにおいて複数のバーコード付きコントロールオリゴヌクレオチドの少なくとも１つの特徴を使用して、１つ以上の細胞の少なくとも１つの特徴（たとえば、順調に捕捉され、ライブラリー作製を経る細胞の数）を決定する工程とを含む。いくつかの実施形態では、擬似標的領域は、ポリ（ｄＡ）領域を含む。

【０５２０】

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

【０５２１】

いくつかの実施形態では、シーケンシングデータにおいて複数のバーコード付きコント

ロールオリゴヌクレオチドの特徴を使用して１つ以上の細胞の少なくとも１つの特徴を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識およびコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列（たとえば、分子標識配列）の数を決定する工程と；細胞標識およびコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数を使用して１つ以上の細胞の数を決定する工程とを含む。細胞標識およびコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数を決定する工程は、シーケンシングデータにおける各細胞標識について、細胞標識およびコントロールバーコード配列に関連付けられた最多数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数を決定する工程を含む。細胞標識およびコントロールバーコード配列に関連付けられた識別可能な配列を有するバーコード配列の数を使用して、１つ以上の細胞の数を決定する工程は、最多数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数に関連付けられたシーケンシングデータにおいて、細胞標識の数と最多数の識別可能な配列を有するバーコード配列の数のプロットを作製する工程と；１つ以上の細胞の数としてプロットにおけるカットオフを決定する工程とを含みうる。

【０５２２】

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

【０５２３】

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

【０５２４】

細胞のオーバーローディングおよびマルチプレットの同定

本明細書では、細胞のオーバーローディングおよびマルチプレットを同定するための方法、キットおよびシステムも開示される。このような方法、キットおよびシステムは、たとえば、オリゴヌクレオチドと結合した細胞成分結合試薬を用いて細胞成分の発現レベル（たとえば、タンパク質発現レベル）を測定するための方法、キットおよびシステムなど

の、本明細書に開示される任意の好適な方法、キットおよびシステムと組み合わせて使用されうる。現在の細胞ローディング技術を使用すると、約２００００個の細胞が約６００００個のマイクロウェルを有するマイクロウェルカートリッジまたはアレイにロードされる場合に、２つ以上の細胞を有するマイクロウェルまたはドロップレットの数（ダブレットまたはマルチプレットと呼ばれる）が最小限になりうる。しかし、ロードされた細胞の数が増加すると、複数の細胞を有するマイクロウェルまたはドロップレットの数が著しく増加する場合がある。たとえば、約５００００個の細胞がマイクロウェルカートリッジまたはアレイの約６００００個のマイクロウェルにロードされる場合、複数の細胞を有するマイクロウェルのパーセンテージは、かなり高く（たとえば、１１～１４％）なりうる。このように多数の細胞をマイクロウェルにロードすることは、細胞のオーバーローディングと呼ばれる場合がある。しかし、細胞を、識別可能な細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドで標識されたいくつかの群（たとえば、５つ）に区分する場合、２つ以上の細胞同定配列に関連付けられた細胞標識は、シーケンシングデータにおいて同定され、かつ次の処理から除去されうる。マイクロウェルカートリッジまたはアレイにおけるマイクロウェルの数に対して、このような多数の細胞をマイクロウェルにロードすることができる。

【０５２５】

本明細書には、細胞の同定またはダブレットの同定のための方法が開示される。細胞同定またはダブレットの同定のための方法は、本明細書に開示される他の方法とともに使用することができる。たとえば、ダブレットの同定のための方法は、タンパク質発現を決定するための方法とともに使用することができる。別の例として、ワークフローを、単一細胞のダブレット、タンパク質発現および／または遺伝子発現を決定するために使用することができる。

【０５２６】

いくつかの実施形態では、細胞の同定またはダブレットの同定のための方法は、それぞれ２つの細胞同定組成物を有する第１の複数の細胞と第２の複数の細胞を接触させる工程であって、第１の複数の細胞の各々と第２の複数の細胞の各々が、１つ以上の抗原標的またはタンパク質標的を含み、２つの細胞同定組成物の各々が、細胞同定オリゴヌクレオチドと結合したタンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬が、１つ以上の抗原標的またはタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合可能であり、細胞同定オリゴヌクレオチドが、細胞同定配列を含み、かつ２つの細胞同定組成物の細胞同定配列が異なる配列を含む工程と；複数のバーコードを使用して細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、細胞標識配列、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、および標的結合領域を含み、複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードのバーコード配列が異なる配列を含み、かつ複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードが、同一の細胞標識配列を含む工程と；複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータにおいて各々が２つ以上の細胞同定配列に関連付けられる１つ以上の細胞標識配列を同定する工程と；得られたシーケンシングデータから、各々が２つ以上の細胞同定配列に関連付けられる１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除去し、かつ／または次の分析（たとえば、単一細胞ｍＲＮＡプロファイリング、または全トランスクリプトーム分析）から、各々が２つ以上の細胞同定配列に関連付けられる１つ以上の細胞標識配列に関連付けられたシーケンシングデータを除く工程とを含む。いくつかの実施形態では、細胞同定オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの組合せを含む。

【０５２７】

たとえば、本方法は、細胞同定を使用して５０，０００個以上の細胞（１０，０００～２０，０００個の細胞と比較して）をロードするために使用されうる。細胞同定では、ユニバーサルタンパク質マーカーに対するオリゴヌクレオチドコンジュゲートタンパク質結

合試薬（たとえば、抗体）または細胞成分結合試薬を使用して、異なるサンプル由来の細胞をユニークな細胞成分結合試薬で標識することができる。異なるサンプル由来の２つ以上の細胞、またはサンプルの異なる細胞集団由来の２つ以上の細胞が同じマイクロウェルまたはドロップレットにおいて捕捉される場合、合わせた「細胞」（または２つ以上の細胞の内容物）は、異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付け可能である。異なる細胞集団の数は、さまざまな履行において異なるものであってよい。いくつかの実施形態では、異なる細胞集団の数は、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、またはこれらの値のいずれか２つの間の数もしくは範囲、またはこれらの近似値でありうる。いくつかの実施形態では、異なる細胞集団の数は、少なくとも、または多くとも、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、もしくは１００でありうる。サンプルの細胞は、サンプルの細胞を複数の集団に等分することにより複数の集団に区分されうる。２つ以上の細胞同定配列に関連付けられた細胞は、シーケンシングデータにおいて１つの細胞標識配列に関連付けられた２つ以上の細胞同定配列に基づいて、「マルチプレット」として同定されうる。合わせた「細胞」のシーケンシングデータもまた、マルチプレットと呼ばれる。マルチプレットは、ダブレット、トリプレット、カルテット、クインテット、セクステット、セプテット、オクテット、ノネット、またはそれらの任意の組合せでありうる。

【０５２８】

ダブレットは、異なる細胞同定配列を有する２つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。ダブレットはまた、２つの細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた、合わせた「細胞」を意味しうる。異なる配列の２つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つの細胞（または２つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた２つ以上の細胞）が、同じマイクロウェルまたはドロップレット中に捕捉される場合にダブレットが起こる可能性があり、合わせた「細胞」は、異なる細胞同定配列を有する２つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられうる。トリプレットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する３つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または３つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。カルテットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する４つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または４つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。クインテットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する５つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または５つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。セクステットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する６つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または６つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。セプテットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する７つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または７つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。オクテットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する８つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または８つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。ノネットは、すべてが異なる細胞同定配列を有する９つの細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」、または９つの異なる細胞同定配列を有する細胞同定オリゴヌクレオチドに関連付けられた合わせた「細胞」を意味しうる。

【０５２９】

別の例として、サンプルをオーバーローディングする状況、またはマイクロウェルアレイのマイクロウェルに細胞をロードするか、もしくは細胞を含有するドロップレットを生

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

【０５３０】

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

【０５３１】

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

００、６００、７００、８００、９００、１０００、１００００、１０００００、もしくは１０００００００でありうる。

【０５３２】

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

【０５３３】

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

【０５３４】

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

【０５３５】

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

【０５３６】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを使用して細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数のバーコード（たとえば、複数の確率バーコード）を使用して細胞同定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて（たとえば、確率バーコードを付けて）、複数のバーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチド（たとえば、複数の確率バーコード付き細胞同定オリゴヌクレオチド）を生成する工程を含む。

【０５３７】

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

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

【０５３８】

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

【０５３９】

細胞成分－細胞成分相互作用の決定

本明細書には、タンパク質－タンパク質相互作用を決定するための方法が開示される。タンパク質－タンパク質相互作用を決定するための方法は、本明細書に開示される他の方法とともに使用することができる。たとえば、タンパク質－タンパク質相互作用を決定するための方法は、タンパク質発現を決定するための方法とともに使用することができる。別の例として、ワークフローを、単一細胞のタンパク質－タンパク質相互作用、タンパク質発現および／または遺伝子発現を決定するために使用することができる。このような方法は、たとえば、オリゴヌクレオチドと結合した細胞成分結合試薬を用いて細胞成分の発現レベル（たとえば、タンパク質発現レベル）を測定するための方法、キットおよびシステムなどの、本明細書に開示される任意の好適な方法、キットおよびシステムと組み合わせて使用されうる。

【０５４０】

いくつかの実施形態では、タンパク質－タンパク質相互作用を決定するための方法は、細胞を相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、細胞が、第１の細胞成分標的および第２の細胞成分標的を含み、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに結合した細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方の細胞成分結合試薬が、第１の細胞成分標的に特異的に結合可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方の細胞成分結合試薬が、第２の細胞成分標的に特異的に結合可能であり、かつ相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列および架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、かつ相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が異なる配列を含む工程と；架橋オリゴヌクレオチドを使用して相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；複数のバーコードを使用してライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、バーコード配列および捕捉配列を含む工程と；複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータにおける相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列の関連付けに基づいて、第１および第２の細胞成分標的間の相互作用を決定する工程とを含む。いくつかの実施形態では、２つの細胞成分結合試薬の少なくとも１つは、タンパク質結合試薬を含み、タンパク質結合試薬は、２つの相互作用決定オリゴヌクレ

オチドのうちの１つに結合し、かつ１つ以上の細胞成分標的は、少なくとも１つのタンパク質標的を含む。

【０５４１】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程であって、細胞が、第１のタンパク質標的および第２のタンパク質標的を含み、相互作用決定組成物の第１の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに結合したタンパク質結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第１の対の一方のタンパク質結合試薬が、第１のタンパク質標的に特異的に結合可能であり、相互作用決定組成物の第１の対の他方のタンパク質結合試薬が、第２のタンパク質標的に特異的に結合可能であり、かつ相互作用決定オリゴヌクレオチドが、相互作用決定配列および架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域を含み、かつ相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列が異なる配列を含む工程と；架橋オリゴヌクレオチドを使用して相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定オリゴヌクレオチドをライゲートして、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、架橋オリゴヌクレオチドが、相互作用決定組成物の第１の対の架橋オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション領域に特異的に結合可能な２つのハイブリダイゼーション領域を含む工程と；複数のバーコードを使用してライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程であって、複数のバーコードの各々が、バーコード配列および捕捉配列を含む工程と；複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程と；得られたシーケンシングデータにおける相互作用決定組成物の第１の対の相互作用決定配列の関連付けに基づいて、第１および第２のタンパク質標的間の相互作用を決定する工程とを含む。

【０５４２】

いくつかの実施形態では、細胞を相互作用決定組成物の第１の対と接触させる工程は、細胞を相互作用決定組成物の第１の対の各々と連続的にまたは同時に接触させる工程を含む。第１の細胞成分標的は、第２の細胞成分標的と同じでありうる。第１の細胞成分標的は、第２の細胞成分標的と異なりうる。

【０５４３】

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

【０５４４】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を相互作用決定組成物の第２の対と接触させる工程を含み、細胞が、第３の細胞成分標的および第４の細胞成分標的を含み、相互作用決定組成物の第２の対の各々が、相互作用決定オリゴヌクレオチドに結合した細胞成分結合試薬を含み、相互作用決定組成物の第２の対の一方の細胞成分結合試薬が、第３の細胞成分標的に特異的に結合可能であり、相互作用決定組成物の第２の対の他方の細胞成分結合試薬が、第４の細胞成分標的に特異的に結合可能である。第３および第４の細胞成分標的の少なくとも１つは、第１および第２の細胞成分標的の１つと異なりうる。第３および第４の細胞成分標的の少なくとも１つはと第１および第２の細胞成分標的の少なくとも１つは、同一でありうる。

【０５４５】

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

【０５４６】

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

【０５４７】

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

【０５４８】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、抗体、テトラマー、アプタマー、タンパク質スキャフォールド、インテグリン、またはそれらの組合せを含む。

【０５４９】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して細胞成分結合試薬にコンジュゲートされる。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは化学基を含みうる。化学基は、細胞成分結合試薬に可逆的または不可逆的に結合されうる。化学基は、ＵＶ光切断性基、ジスルフィド結合、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、ジスルフィド連結、またはそれらの任意の組合せを含みうる。１つ以上の細胞成分標的の少なくとも１つは、細胞表面に存在しうる。

【０５５０】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を相互作用決定組成物の第１の対と接触させる前に、細胞を固定する工程を含む。本方法は、相互作用決定組成物の第１の対のうちの未結合の相互作用決定組成物を除去する工程を含みうる。未結合の相互作用決定組成物を除去する工程は、細胞を洗浄緩衝液で洗浄する工程を含みうる。未結合の相互作用決定組成物を除去する工程は、フローサイトメトリーを使用して細胞を選択する工程を含みうる。本方法は、細胞を溶解する工程を含みうる。

【０５５１】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、細胞成分結合試薬から脱離可能または脱離不可能なように構成される。本方法は、細胞成分結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチドを脱離させる工程を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドを脱離させる工程は、ＵＶ光切断、化学処理、加熱、酵素処理、またはそれらの任意の組合せにより細胞成分結合試薬から相互作用決定オリゴヌクレオチドを脱離させる工程を含みうる。

【０５５２】

いくつかの実施形態では、相互作用決定オリゴヌクレオチドは、細胞のゲノム配列と相同ではない。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、種のゲノム配列と相同でありうる。種は、非哺乳動物種でありうる。非哺乳動物種は、ファージ種でありうる。ファージ種は、Ｔ７ファージ、ＰｈｉＸファージ、またはそれらの組合せでありうる。

【０５５３】

いくつかの実施形態では、細胞は、腫瘍細胞または非腫瘍細胞を含む。細胞は、哺乳動物細胞、バクテリア細胞、ウイルス細胞、酵母細胞、真菌細胞、またはそれらの任意の組合せを含みうる。

【０５５４】

いくつかの実施形態では、本方法は、２つ以上の細胞を相互作用決定組成物の第１の対

と接触させる工程を含み、２つ以上の細胞の各々は、第１および第２の細胞成分標的を含む。２つ以上の細胞の少なくとも１つは、単一細胞を含みうる。

【０５５５】

いくつかの実施形態では、バーコードは、細胞標識配列、ユニバーサルプライマーに対する結合部位、またはそれらの任意の組合せを含む。複数のバーコードのうちの少なくとも２つのバーコードは、同一の細胞標識配列を含みうる。相互作用決定組成物の第１の対の一方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、捕捉配列に相補的な配列を含みうる。捕捉配列は、ポリ（ｄＴ）領域を含みうる。捕捉配列に相補的な相互作用決定オリゴヌクレオチドの配列は、ポリ（ｄＡ）領域を含みうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、第２のバーコード配列を含みうる。相互作用同定組成物の第１の対の他方の相互作用決定オリゴヌクレオチドは、ユニバーサルプライマーに対する結合部位を含みうる。

【０５５６】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、細胞外タンパク質、細胞内タンパク質、またはそれらの任意の組合せを含む。細胞成分標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞レセプター、Ｔ細胞レセプター、主要組織適合抗原複合体、腫瘍抗原、レセプター、インテグリン、またはそれらの任意の組合わせを含みうる。

【０５５７】

いくつかの実施形態では、細胞成分標的は、脂質、炭水化物、またはそれらの任意の組合せを含む。細胞成分標的は、１０～１００個の異なる細胞成分標的を含む群から選択されうる。

【０５５８】

いくつかの実施形態では、細胞成分結合試薬は、同一の配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドと結合する。細胞成分結合試薬は、異なる相互作用決定配列を有する２つ以上の相互作用決定オリゴヌクレオチドと結合しうる。

【０５５９】

いくつかの実施形態では、複数の相互作用決定組成物のうちの１つが、相互作用決定オリゴヌクレオチドに結合していない第２の細胞成分結合試薬を含む。細胞成分結合試薬および第２の細胞成分結合試薬は、同一でありうる。細胞成分質結合試薬は、検出可能な部分と結合しうる。

【０５６０】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードが粒子と関連付けられる。複数のバーコードのうちの少なくとも１つのバーコードを粒子に固定することができる。複数のバーコードのうちの少なくとも１つのバーコードを粒子に部分的に固定することができる。複数のバーコードのうちの少なくとも１つのバーコードを粒子に封入することができる。複数のバーコードのうちの少なくとも１つのバーコードを粒子に部分的に封入することができる。粒子は、崩壊可能でありうる。粒子は、ビーズを包含しうる。粒子は、セファロースビーズ、ストレプトアビジンビーズ、アガロースビーズ、磁気ビーズ、コンジュゲートビーズ、プロテインＡコンジュゲートビーズ、プロテインＧコンジュゲートビーズ、プロテインＡ／Ｇコンジュゲートビーズ、プロテインＬコンジュゲートビーズ、オリゴ（ｄＴ）コンジュゲートビーズ、シリカビーズ、シリカ様ビーズ、抗ビオチンマイクロビーズ、抗蛍光色素マイクロビーズ、またはそれらの任意の組合せを含みうる。粒子は、ポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）、ポリスチレン、ガラス、ポリプロピレン、アガロース、ゼラチン、ヒドロゲル、常磁性材料、セラミック、プラスチック、ガラス、メチルスチレン、アクリルポリマー、チタン、ラテックス、セファロース、セルロース、ナイロン、シリコーン、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される材料を含みうる。粒子は、崩壊可能なヒドロゲル粒子を含みうる。粒子は、検出可能な部分と結合しうる。相互作用決定オリゴヌクレオチドは、検出可能な部分と結合しうる。粒子のバーコードは、約、少なくとも、多くとも１０００、１００００、それ以上、それ以下、またはそれらの任意の組合せの異なるバーコード配列から選択されうるバーコード配列を含む。バーコードのバーコード配列は、ランダム配列を含みうる。粒子は、少なくとも１００００個のバーコード

を含みうる。

【０５６１】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを使用して相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付ける工程は、複数のバーコードを相互作用決定オリゴヌクレオチドと接触させて、相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを生成する工程と；相互作用決定オリゴヌクレオチドにハイブリダイズされたバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程とを含む。バーコードを伸長する工程は、ＤＮＡポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、逆転写酵素を使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素またはＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを使用してバーコードを伸長して、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含みうる。バーコードを伸長する工程は、ライゲートされた相互作用決定オリゴヌクレオチドから架橋オリゴヌクレオチドを取り除く工程を含みうる。本方法は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅して、複数のアンプリコンを生成する工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを増幅する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を使用して、バーコード配列の少なくとも一部および相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部を増幅する工程を含みうる。

【０５６２】

いくつかの実施形態では、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のアンプリコンのシーケンシングデータを取得する工程を含みうる。シーケンシングデータを取得する工程は、バーコード配列の少なくとも一部および相互作用決定オリゴヌクレオチドの少なくとも一部をシーケンシングする工程を含みうる。複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドのシーケンシングデータを取得する工程は、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドの一部および／または完全な配列を取得する工程を含みうる。

【０５６３】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードは複数の確率バーコードを含み、複数の確率バーコードの各々のバーコード配列は、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含み、複数の確率バーコードの少なくとも２つの確率バーコードのバーコード配列は、異なる配列を含み、かつ複数のバーコードを使用して相互作用決定オリゴヌクレオチドにバーコードを付けて、複数のバーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程は、複数の確率バーコードを使用して相互作用決定オリゴヌクレオチドに確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き相互作用決定オリゴヌクレオチドを生成する工程を含む。

【０５６４】

いくつかの実施形態では、複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程；およびバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する工程。複数のバーコードを使用して複数の標的にバーコードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、標的のコピーとバーコードの標的結合領域を接触させる工程と；複数のバーコードを使用して複数の標的を逆転写して、複数の逆転写された標的を生成する工程とを含みうる。

【０５６５】

いくつかの実施形態では、本方法は、複数のバーコード付き標的のシーケンシングデータを取得する前に、バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程を含みうる。バーコード付き標的を増幅して、複数の増幅されたバーコード付き標的を生成する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によりバーコード付き標的を増幅する工程を含みうる。複数のバーコードを使用して細胞の複数の標的にバーコ

ードを付けて、複数のバーコード付き標的を生成する工程は、複数の確率バーコードを使用して細胞の複数の標的に確率バーコードを付けて、複数の確率バーコード付き標的を生成する工程を含みうる。

【０５６６】

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

【０５６７】

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

【０５６８】

いくつかの実施形態では、本キットは、複数のバーコードを含み、複数のバーコードの各々は、バーコード配列および捕捉配列を含む。複数のバーコードは、複数の確率バーコードを含むことができ、複数の確率バーコードの各々のバーコード配列は、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）を含み、複数の確率バーコードのうちの少なくとも２つの確率バーコードのバーコード配列は、異なる配列を含む。いくつかの実施形態では、複数のバーコードが粒子と関連付けられる。複数のバーコードのうちの少なくとも１つのバーコードは、粒子に固定されうるか、粒子に部分的に固定されうるか、粒子に封入されうるか、粒子に部分的に封入されうるか、またはそれらの任意の組合せでありうる。粒子は、崩壊可能でありうる。粒子は、ビーズを包含しうる。

【０５６９】

いくつかの実施形態では、本キットは、ＤＮＡポリメラーゼを含む。本キットは、逆転写酵素を含みうる。本キットは、モロニーマウス白血病ウイルス（Ｍ－ＭＬＶ）逆転写酵素またはＴａｑ　ＤＮＡポリメラーゼを含みうる。いくつかの実施形態では、本方法は、固定剤（たとえば、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド／四酸化オスミウム、アルコール系固定液、Ｈｅｐｅｓ－グルタミン酸緩衝液媒介性有機溶媒保護効果（ＨＯＰＥ）、ブアン溶液、またはそれらの任意の組合せ）を含む。

【０５７０】

標識生体分子試薬の調製に使用するためのシステム

多くの被検体分析アッセイに使用されている標識生体分子試薬組成物は、検出可能なマーカー化合物に共役した生体分子を含む。生体分子は、生体分子の骨格もしくは側鎖に１つ以上の共有結合により検出可能なマーカーに共役しているか、またはイオンもしくは他の非共有相互作用により結合していてもよい。多くの場合、生体分子は、目的の被検体に対する特異的な結合領域を有するプローブ化合物であり、検出可能なマーカーは、たとえば、顕微鏡の下で、肉眼で、または光学分光のいくつかの形態（たとえば、ＵＶ－ｖｉｓ、蛍光分光など）によって視覚化することができる化合物である。いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸

は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０５７１】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０５７２】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０５７３】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０５７４】

生体体液中の被検体の存在および濃度を決定するためのアッセイは、プローブ化合物の特異的結合に依存することが多い。目的の被検体に応じて、プローブ化合物は、抗体またはオリゴヌクレオチドなどのポリペプチドであってよく、その各々が特異的結合領域を有する。標的被検体の結合を検出するために、視覚化することができる（たとえば、分光法によって検出可能な）マーカーをプローブ化合物に共役させる。現在、標識生体分子試薬を調製するために、個別の合成プロトコルによって、各生体分子（たとえば、ＣＤ４－ＲＰＡ－Ｔ４）を検出可能な標識（ＰＥ－Ｃｙ５）に個別に共役させた後、精製（たとえば、カラムクロマトグラフィー）に付す。標識生体分子試薬は各々個別に調製され、精製されることから、アッセイ即応（ａｓｓａｙ－ｒｅａｄｙ）特異的結合プローブ組成物を用意する方法は、特に小規模な顧客リクエストの場合に、高価で、しかも大きな労力を要する。加えて、標識生体分子の合成および続く精製に必要なリードタイムの量のために、性能特異的および高品質プローブ組成物のオンデマンド調製は不可能である。商業的に、一般に使用される標識生体分子試薬が事前に調製および貯蔵されており、顧客は、予め合成された標識生体分子試薬組成物の限定的なデータベースから選択することしかできない。

【０５７５】

図１２は、一実施形態に従って、実験室および臨床アッセイ用の標識生体分子試薬組成物を提供するために使用される標識生体分子試薬の調製の工程を示す。目的の生体分子（抗体プローブ）は、まず精製されて（工程１２０１）、５つの異なる検出可能なマーカーと生体分子を共役させるのに十分な反応条件（工程１２０２）に付して、標識生体分子１２００ａ、１２００ｂ、１２００ｃ、１２００ｄおよび１２００ｅを生成する。次に、標

識生体分子１２００ａ、１２００ｂ、１２００ｃ、１２００ｄおよび１２００ｅは、各々精製されて（工程１２０３）、貯蔵される。顧客のリクエストに応じて、標識生体分子１２００ａ、１２００ｂ、１２００ｃ、１２００ｄおよび１２００ｅは、標識生体分子試薬組成物に製剤化され、顧客への配達のためにパッケージングされる。

【０５７６】

いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０５７７】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０５７８】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０５７９】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０５８０】

本明細書には、多種多様な生体分子および検出可能な標識ポートフォリオに及ぶ高品質および高性能の特定製品を、高速、効率的かつ高度に拡張可能な様式で送達するシステムおよび方法が開示される。本発明の実施形態では、標識生体分子に対応するリクエストが行われると、リクエストに応じて、活性化生体分子および活性化標識の既存のコレクションから標識生体分子が調製される。図１３は、本発明の実施形態の方法を描く図を提供する。図１３では、まず、生体分子のコレクション（１３０１ａ）と検出可能な標識またはマーカーのコレクション（１３０１ｂ）とを精製する（工程１３０１）。次に、生体分子を各々、反応性リンカーに共役させて、生体分子を反応性部分で官能基化する（すなわち、反応性リンカーＬ１で生体分子を活性化する、１３０２ａ）。次に、活性化生体分子のコレクションを精製し、貯蔵する。これとは別に、検出可能なマーカーのコレクションも、反応性リンカーに共役させて、検出可能なマーカーのコレクションを反応性部分で官能基化する（すなわち、反応性リンカーＬ２で標識を活性化する、１３０２ｂ）。活性化標識のコレクションも精製し、貯蔵する（工程１３０２）。顧客から標識生体分子試薬がリ

クエストされると、活性化生体分子（Ｌ１）を活性化標識（Ｌ２）と反応させることにより、生体分子を標識に共役させて（工程１３０３）、標識生体分子（結合Ｌ１－Ｌ２を介して結合された）を形成する。このように、活性化生体分子を活性化標識と単純に混合することにより、生体分子と検出可能なマーカーの任意の所望の組合せをオンデマンドで調製することができる。

【０５８１】

図１４は、カスタマイズ可能な標識生体分子試薬をオンデマンドで提供するための本開示のユニークかつ新規の方法を示す。目的の生体分子を精製（工程１４０１）した後、反応性リンカーで官能基化する（工程１４０２）ことにより、活性化生体分子１４００ａを生成することができる。活性化標識１４００ｂ、１４００ｃ、１４００ｄ、および１４００ｅは、検出可能なマーカーを反応性リンカーで官能基化することによって個別に調製される。顧客からのリクエストを受けると、活性化生体分子５００ａの反応性リンカーと活性化標識１４００ｂ、１４００ｃ、１４００ｄ、および１４００ｅの反応性リンカーとの反応により、活性化生体分子１４００ａと活性化標識１４００ｂ、１４００ｃ、１４００ｄ、および１４００ｅとのあらゆる組合せをオンデマンドで調製することができる。一旦共役したら、標識生体分子１４００ａ－１４００ｂ、１４００ａ－１４００ｃ、１４００ａ－１４００ｄおよび１４００ａ－１４００ｅを標識生体分子試薬組成物中に製剤化して、顧客への配達のためにパッケージングする。いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０５８２】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０５８３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０５８４】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０５８５】

本開示は、標識生体分子試薬の調製に使用するためのシステムを提供する。本開示の実

施形態のさらなる説明では、標識生体分子試薬のリクエストを受けるための入力マネージャと、生体分子および標識ストレージ識別子を提供するための出力マネージャとを有するシステムが初めにさらに詳しく説明される。次に、活性化生体分子と活性化標識から標識生体分子試薬を調製するための試薬調製装置が説明される。また、標識生体分子試薬リクエストを伝達し、これを受けて、対象の標識生体分子試薬を調製する方法も提供される。

【０５８６】

いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０５８７】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０５８８】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０５８９】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０５９０】

本開示の態様は、標識生体分子試薬の調製に使用するためのシステムを含む。いくつかの実施形態に従うシステムは、標識生体分子試薬のリクエストを受ける入力マネージャと、標識生体分子試薬リクエスト（たとえば、生体分子、標識など）の１つ以上の構成要素に対応する複数のストレージ識別子を有するデータセットを記憶するメモリと、メモリに通信可能に結合され、かつデータセットから、標識生体分子試薬リクエストの構成要素に対応するストレージ識別子を識別するように構成された処理モジュールと、識別されたストレージ識別子を提供する出力マネージャと、を含む。以下に、より詳しく説明するように、「標識生体分子」試薬という用語は、検出可能なマーカーに（たとえば、共有結合を介して）結合した生体高分子を指す。生体高分子は、バイオポリマーであってもよい。「バイオポリマー」は、１つ以上の反復単位から成るポリマーである。バイオポリマーは、典型的に、生物系に見出され、そのようなものとして、特に、多糖（炭水化物など）、およびペプチド（この用語が用いられる場合、多糖への結合の有無にかかわらず、ポリペプ

チド、およびタンパク質を包含する）ならびにポリヌクレオチド、さらにはアミノ酸類似体もしくは非アミノ酸基、またはヌクレオチド類似体もしくは非ヌクレオチド基から構成されるか、またはそれらを含有する化合物などのそれらの類似体が挙げられる。これは、通常の骨格が非天然または合成骨格で置換されたポリヌクレオチド、ならびに１つ以上の通常の塩基が、ワトソン－クリック型水素結合相互作用に参加することができる基（天然または合成）で置換された核酸（または合成もしくは天然の類似体）を含む。ポリヌクレオチドは、一本鎖または複数鎖の構成を含み、ここで、１つ以上の鎖は、別の鎖と完全に一致しても、しなくてもよい。具体的には、「バイオポリマー」は、供給源とは関係なく、ＤＮＡ（ｃＤＮＡを含む）、ＲＮＡおよびオリゴヌクレオチドを含む。従って、生体分子は、多糖、核酸およびポリペプチドを含みうる。たとえば、核酸は、オリゴヌクレオチド、短縮型もしくは完全長ＤＮＡまたはＲＮＡであってもよい。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド、短縮型および完全長ＤＮＡまたはＲＮＡは、１０以上のヌクレオチドモノマー、たとえば１５以上、たとえば２５以上、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上で、５００以上も含まれる、ヌクレオチドモノマーから成る。たとえば、目的のオリゴヌクレオチド、短縮型および完全長ＤＮＡまたはＲＮＡは、長さが１０ヌクレオチド～10^8ヌクレオチド、たとえば10^2ヌクレオチド～10^7ヌクレオチドで、10^3ヌクレオチド～10^6ヌクレオチドを含む範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、バイオポリマーは、単一ヌクレオチドまたは短鎖オリゴヌクレオチド（たとえば、１０ヌクレオチド未満）ではない。「完全長」とは、ＤＮＡまたはＲＮＡが、その完全配列（天然に存在するものなど）の７０％以上、たとえばＤＮＡまたはＲＮＡ（天然に存在するものなど）の完全長配列の７５％以上、たとえば８０％以上、たとえば８５％以上、たとえば９０％以上、たとえば９５％以上、たとえば９７％以上、たとえば９９％以上で、１００％も含まれる、核酸ポリマーであることを意味する。

【０５９１】

いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０５９２】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０５９３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０５９４】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単

一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０５９５】

ポリペプチドは、いくつかの実施形態において、短縮型もしくは完全長タンパク質、酵素または抗体であってよい。いくつかの実施形態では、ポリペプチド、短縮型および完全長タンパク質、酵素または抗体は、１０以上のアミノ酸モノマー、たとえば１５以上、たとえば２５以上、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上で、５００以上も含まれる、アミノ酸モノマーから成る。たとえば、目的のポリペプチド、短縮型および完全長タンパク質、酵素または抗体は、長さが１０アミノ酸～10^8アミノ酸、たとえば10^2アミノ酸～10^7アミノ酸で、10^3アミノ酸～10^6アミノ酸も含まれる、範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、バイオポリマーは、単一アミノ酸または短鎖ポリペプチド（たとえば、１０アミノ酸未満）ではない。「完全長」とは、タンパク質、酵素または抗体が、その完全配列（天然に存在するものなど）の７０％以上、たとえば、タンパク質、酵素または抗体（天然に存在するものなど）の完全長配列の７５％以上、たとえば８０％以上、たとえば８５％以上、たとえば９０％以上、たとえば９５％以上、たとえば９７％以上、たとえば１００％を含め、９９％以上を有するポリペプチドポリマーであることを意味する。本開示のいくつかの実施形態では、標識は、検出可能な部分またはマーカーであり、これらは、たとえば、蛍光発光、吸光度、蛍光偏光、蛍光寿命、蛍光波長、吸収極大、吸収波長、ストークス（Ｓｔｏｋｅｓ）シフト、光散乱、質量、分子量、酸化還元、音波、ラマン（Ｒａｍａｎ）、磁気、無線周波数、酵素反応（化学発光および電気－化学発光を含む）またはこれらの組合せに基づいて検出することができる。たとえば、標識は、蛍光団、発色団、酵素、酵素基質、触媒、レドックス標識、放射標識、音波標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ（たとえば、同位体として純粋な希土類元素）、磁気粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはこれらの任意の組合せであってもよい。

【０５９６】

本明細書に記載するシステムは、標識生体分子試薬リクエストを受ける入力マネージャを含みうる。標識生体分子試薬リクエストは、１つ以上の構成要素を含みうる。いくつかの事例では、標識生体分子試薬リクエストは、単一の構成要素を含み、それは標識生体分子リクエスト（すなわち、反応性リンカーを介して標識に共有結合した生体分子のリクエスト）である。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、２つ以上の構成要素を含む。たとえば、標識生体分子試薬リクエストは、生体分子リクエストと標識リクエストを含む。いくつかの実施形態では、生体分子リクエストは、生体分子と反応性リンカーを含む活性化生体分子リクエストであり、標識リクエストは、標識と反応性リンカーを含む活性化標識リクエストである。一部の実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。

【０５９７】

いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０５９８】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４０

０の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０５９９】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０６００】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０６０１】

「標識生体分子リクエスト」、「生体分子リクエスト」および「標識リクエスト」という語句は、本明細書で用いられる場合、それぞれ、特定の標識生体分子、生体分子もしくは標識に関連する情報またはデータを指す。リクエストは、特定の標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカーに関連する、一連の１つまたは複数の文字（たとえば、英数字）、記号、イメージもしくはその他のグラフ表示を含みうる。いくつかの事例では、リクエストは、標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカーの「簡潔な」呼称である。たとえば、リクエストは、アクセッション番号または省略型プローブ配列を含みうる。リクエストはまた、化学構造または反応性などの記述情報も含みうる。情報またはデータは、一部の実施形態では、標識生体分子、生体分子または標識のいずれかの好適な識別子であってもよく、こうしたものとして、限定されないが、生体分子の名称、モノマー配列、配列識別番号、アクセッション番号または生物学的供給源、ならびに標識の名称、化学構造、ケミカル・アブストラクツ・サービス（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ）（ＣＡＳ）登録番号またはマーカークラス（たとえば、蛍光、磁気）を挙げることができる。

【０６０２】

いくつかの実施形態では、生体分子は、目的の被検体の生物学的プローブであり、生体分子リクエストは、目的の被検体に結合する特異的結合ドメインに関する情報またはデータを含む。目的の特異的結合ドメインとして、限定されないが、抗体結合剤、タンパク質、ペプチド、ハプテン、核酸などが挙げられる。本明細書で使用される「抗体結合剤」という用語は、目的の被検体に結合する上で十分なポリクローナルまたはモノクローナル抗体もしくはフラグメントを含む。抗体フラグメントは、たとえば、モノマーＦａｂフラグメント、モノマーＦａｂ’フラグメント、または二量体Ｆ（ａｂ）’２フラグメントであってよい。さらに、「抗体結合剤」という用語の範囲には、抗体操作により生成される分子、たとえば、重鎖および軽鎖の定常領域の置換によりキメラ抗体を生成するか、または定常領域と、可変領域のフレーシフト部分との両方の置換によりヒト化抗体を生成することによって、モノクローナル抗体から生成される一本鎖抗体分子（ｓｃＦｖ）またはヒト化もしくはキメラ抗体も含まれる。

【０６０３】

いくつかの事例では、生体分子は、ポリペプチドであり、生体分子リクエストは、ポリペプチド名、タンパク質名、酵素名、抗体名またはタンパク質、酵素もしくはその抗体フラグメント、特定の生体体液（たとえば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、気管支肺胞洗浄液、羊水、臍帯血、尿、膣液および精液）由来のポリペプチド、特定の種由来のポリペプチド（たとえば、マウスモノクローナル抗体）の名称、ならびにアミノ酸配列識別番号などの情報を含みうる。

【０６０４】

いくつかの実施形態では、生体分子は核酸であり、生体分子リクエストは、オリゴヌクレオチド名、遺伝子名により識別されるオリゴヌクレオチド、アクセッション番号により識別されるオリゴヌクレオチド、特定の種（たとえば、マウス、ヒト）由来の遺伝子のオリゴヌクレオチド、特定の組織（たとえば、肝臓、脳、心臓）に関連する遺伝子のオリゴヌクレオチド、特定の生理機能（たとえば、アポトーシス、ストレス応答）に関連する遺伝子のオリゴヌクレオチド、特定の病態（たとえば、癌、心臓血管疾患）に関連する遺伝子のオリゴヌクレオチド、ならびにヌクレオチド配列などの情報を含みうる。

【０６０５】

いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。酵素リクエストとしては、限定されないが、酵素名、ポリペプチド配列、酵素のクラス、ＥＣ番号、ポリペプチド共通配列、保存ドメイン名および／もしくは配列または複数の関連タンパク質（たとえば、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質）、あるいはこれらの任意の組合せを挙げることができる。基質リクエストとしては、限定されないが、基質名、基質の官能基、基質のクラス、特定のＥＣ番号を有する１つ以上の酵素に対する１つ以上の基質、またはこれらの任意の組合せを挙げることができる。

【０６０６】

上記のように、標識は、検出可能な部分またはマーカーを含んでよく、これらは、たとえば、蛍光発光、吸光度、蛍光偏光、蛍光寿命、蛍光波長、吸収波長、ストークス（Ｓｔｏｋｅｓ）シフト、光散乱、質量、分子量、酸化還元、音波、ラマン（Ｒａｍａｎ）、磁気、無線周波数、酵素反応（化学発光および電気－化学発光を含む）またはこれらの組合せに基づいて検出することができる。たとえば、標識は、蛍光団、発色団、酵素、酵素基質、触媒、レドックス標識、放射標識、音波標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ（たとえば、同位体として純粋な希土類元素）、磁気粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはこれらの任意の組合せであってもよい。いくつかの実施形態では、標識は、蛍光団（すなわち、蛍光標識、蛍光色素など）である。目的の蛍光団としては、限定されないが、分析用途（たとえば、フローサイトメトリー、イメージなど）での使用に好適な色素、たとえば、アクリジン色素、アントラキノン色素、アリールメタン色素、ジアリールメタン色素（たとえば、ジフェニールメタン色素）、クロロフィル含有色素、トリアリールメタン色素（たとえば、トリフェニルメタン色素）、アゾ色素、ジアゾニウム色素、ニトロ色素、ニトロソ色素、フタロシアニン色素、シアニン色素、不斉シアニン色素、キノン－イミン色素、アジン色素、ユーロジン（ｅｕｒｈｏｄｉｎ）色素、サフラニン色素、インダミン、インドフェノール色素、フッ素色素、オキサジン色素、オキサゾン色素、チアジン色素、チアゾール色素、キサンテン色素、フルオレン色素、ピロニン色素、フッ素色素、ローダミン色素、フェナントリジン色素、ならびに前述の色素の２つ以上を組み合わせた色素（たとえば、同時に）、１つ以上のモノマー色素単位を有するポリマー色素ならびに前述の色素の２つ以上の混合物が挙げられる。多数の色素が、たとえば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ（Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）、Ｄｙｏｍｉｃｓ ＧｍｂＨ（Ｊｅｎａ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ（Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、Ｓｉｒｉｇｅｎ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎｔａ Ｂａｒｂａｒａ，ＣＡ）およびＥｘｃｉｔｏｎ（Ｄａｙｔｏｎ，ＯＨ）などの様々な供給元から市販されている。たとえば、蛍光団としては、以下のものが挙げられる：４－アセタミド－４’－イソチオシアナトスチルベン－２，２’－ジスルホン酸；アクリジンならびにアクリジン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アクリジンレッド、およびアクリジンイソチオシアネ

ートなどの誘導体；アロフィコシアニン、フィコエリスリン、ペリジニン－クロロフィルタンパク質、５－（２’－アミノエチル）アミノナフタレン－１－スルホン酸（ＥＤＡＮＳ）；４－アミノ－Ｎ－［３－ビニルスルホニル）フェニル］ナフタリミド－３，５ジスルホネート（ルシファーイエロー（Ｌｕｃｉｆｅｒ　Ｙｅｌｌｏｗ）ＶＳ）；Ｎ－（４－アニリノ－１－ナフチル）マレイミド；アントラニルアミド；ブリリアントイエロー（Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｙｅｌｌｏｗ）；クマリンおよびクマリン、７－アミノ－４－メチルクマリン（ＡＭＣ、Ｃｏｕｍａｒｉｎ　１２０）、７－アミノ－４－トリフルオロメチルクルアリン（Ｃｏｕｍａｒａｎ　１５１）などの誘導体；シアニンならびにシアノシン、Ｃｙ３、Ｃｙ３．５、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、およびＣｙ７などの誘導体；４’，６－ジアミニジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）；５’，５’’－ジブロモピロガロール－スルホンフタレイン（ブロモピロガロールレッド（Ｂｒｏｍｏｐｙｒｏｇａｌｌｏｌ　Ｒｅｄ）；７－ジエチルアミノ－３－（４’－イソチオシアナトフェニル）－４－メチルクマリン；ジエチルアミノクマリン；ジエチレントリアミンペンタアセテート；４，４’－ジイソチオシアナトジヒドロ－スチルベン－２，２’－ジスルホン酸；４，４’－ジイソチオシアナトスチルベン－２，２’－ジスルホン酸；５－［ジメチルアミノ］ナフタレン－１－スルホニル塩化物（ＤＮＳ、塩化ダンシル）；４－（４’－ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸（ＤＡＢＣＹＬ）；４－ジメチルアミノフェニルアゾフェニル－４’－イソチオシアネート（ＤＡＢＩＴＣ）；エオシン、ならびにエオシンおよびエオシンイソチオシアネートなどの誘導体；エリスロシン、ならびにエリスロシンＢおよびエリスロシンイソチオシアネートなどの誘導体；エチジウム；フルオレセイン、ならびに５－カルボキシフルオレセイン（ＦＡＭ）、５－（４，６－ジクロロトリアジン－２－イル）アミノフルオレセイン（ＤＴＡＦ）、２’７’－ジメトキシ－４’５’－ジクロロ－６－カルボキシフルオレセイン（ＪＯＥ）、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フルオレセインクロロトリアジニル、ナフトフルオレセイン、およびＱＦＩＴＣ（ＸＲＩＴＣ）などの誘導体；フルオレサミン；ＩＲ１４４；ＩＲ１４４６；緑色蛍光タンパク質（Ｇｒｅｅｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＧＦＰ）；リーフコーラル蛍光タンパク質（Ｒｅｅｆ　Ｃｏｒａｌ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＲＣＦＰ）；Ｌｉｓｓａｍｉｎｅ（商標）；リサミンローダミン（Ｌｉｓｓａｍｉｎｅ　ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）、ルシファーイエロー（Ｌｕｃｉｆｅｒ　Ｙｅｌｌｏｗ）；マラカイトグリーン（Ｍａｌａｃｈｉｔｅ　Ｇｒｅｅｎ）イソチオシアネート；４－メチルウムベリフェロン；オルトクレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラローザニリン；ナイルレッド（Ｎｉｌｅ　Ｒｅｄ）；オレゴングリーン（Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ）；フェノールレッド（Ｐｈｅｎｏｌ　Ｒｅｄ）；Ｂ－フィコエリスリン；ｏ－フタルジアルデヒド；ピレン、ならびにピレン、ピレンブチレートおよびスクシンイミジル１－ピレンブチレートなどの誘導体；Ｒｅａｃｔｉｖｅ　Ｒｅｄ　４（Ｃｉｂａｃｒｏｎ（登録商標）Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｒｅｄ　３Ｂ－Ａ）；ローダミン、ならびに６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、６－カルボキシローダミン（Ｒ６Ｇ）、４，７－ジクロローダミンリザミン（ｌｉｓｓａｍｉｎｅ）、ローダミンＢスルホニル塩化物、ローダミン（Ｒｈｏｄ）、ローダミンＢ、ローダミン１２３、ローダミンＸイソチオシアネート、スルホローダミンＢ、スルホローダミン１０１、スルホローダミン１０１のスルホニルクロリド誘導体（Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－６－カルボキシローダミン（ＴＡＭＲＡ）、テトラメチルローダミン、およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）などの誘導体；リボフラビン；ロゾール酸およびテルビウムキレート誘導体；キサンテン；フルオレセインイソチオシアネート－デキストランなどの色素共役ポリマー（すなわち、ポリマー結合色素）、ならびに２つ以上の色素を組み合わせた色素（たとえば、同時に）、１つ以上のモノマー色素単位を有するポリマー色素および前述した色素の２つ以上の混合物またはこれらの組合せ。

【０６０７】

いくつかの事例では、蛍光団（すなわち、色素）は、蛍光ポリマー色素である。対象の方法およびシステムで有用な蛍光ポリマー色素は変わりうる。本方法のいくつかの事例で

は、ポリマー色素は、共役ポリマーを含む。

【０６０８】

共役ポリマー（ＣＰ）は、不飽和結合（たとえば、二重および／または三重結合）と飽和結合（たとえば、単一結合）が交互に並ぶ骨格を含む非局在化電子構造を特徴とし、ここで、π－電子は、１つの結合から他の結合へと移動することができる。従って、共役骨格は、ポリマー色素上に長い線状構造を付与することができ、ポリマーの反復単位間の結合角度は限定される。たとえば、タンパク質と核酸は、ポリマーでもあるが、いくつかのケースでは、長いロッド構造を形成するのではなく、高次三次元形状に折り畳まれる。さらに、ＣＰは、「剛体ロッド」ポリマー骨格を形成して、ポリマー骨格鎖に沿って、モノマー反復単位の間に限定的なねじり角度（たとえば、ねじれ）を被りうる。いくつかの事例では、ポリマー色素は、剛体ロッド構造を有するＣＰを含む。上に要約したように、ポリマー色素の構造特性は、分子の蛍光特性に影響を及ぼしうる。

【０６０９】

任意の好都合なポリマー色素を対象の方法およびシステムで使用することができる。いくつかの事例では、ポリマー色素は、蛍光団の蛍光出力を増幅するために光を捕集することができる構造を有する多発色団である。いくつかの事例では、ポリマー色素は、光を捕集して、それをより長い波長の放射光に効率的に変換することができる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、エネルギーを近接する発光種（たとえば、「シグナル伝達発色団」）に効率的に移動することができる集光多発色団システムを有する。エネルギー移動のための機構としては、たとえば、共鳴エネルギー移動（たとえば、フェルスター（Ｆｏｒｓｔｅｒ）（または蛍光）共鳴エネルギー移動、ＦＲＥＴ）、量子荷電交換反応（デクスター（Ｄｅｘｔｅｒ）エネルギー移動）などが挙げられる。いくつかの事例では、これらのエネルギー移動機構は、相対的に短距離である；すなわち、シグナル伝達発色団に対して集光多発色団システムが近接しているために、効率的なエネルギー移動が可能になる。効率的エネルギー移動のための条件下で、集光多発色団システム中に個々の発色団の数が多いとき、シグナル伝達発色団からの発光の増幅が起こる；すなわち、シグナル伝達発色団からの発光は、入射光（「励起光」）が、集光多発色団システムによって吸収される波長であるとき、シグナル伝達発色団がポンプ光によって直接励起されるときよりも強度が高くなる。

【０６１０】

多発色団は、共役ポリマーであってもよい。共役ポリマー（ＣＰ）は、非局在化電子構造を特徴とし、化学および生物学的標的の高度応答性の光リポータとして用いることができる。有効な共役長さは、ポリマー鎖の長さより実質的に短いため、骨格は、密接した多数の共役セグメントを含む。従って、共役ポリマーは、集光する上で効率的であり、エネルギー移動を介した光増幅を可能にする。

【０６１１】

いくつかの事例では、ポリマーは、直接蛍光リポータ、たとえば、高い消散係数、高い輝度などを有する蛍光ポリマーとして使用することもできる。一部の事例では、ポリマーは、強力な発色団として使用することもでき、この場合、色または光学密度が指標として用いられる。

【０６１２】

目的のポリマー色素としては、限定されないが、米国特許出願公開第２００４０１４２３４４号明細書、同第２００８０２９３１６４号明細書、同第２００８００６４０４２号明細書、同第２０１００１３６７０２号明細書、同第２０１１０２５６５４９号明細書、同第２０１２００２８８２８号明細書、同第２０１２０２５２９８６号明細書、同第２０１３０１９０１９３号明細書および同第２０１６００２５７３５号明細書（その開示内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる）においてＧａｙｌｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．により；ならびにＧａｙｌｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，２００１，１２３（２６），ｐｐ　６４１７－６４１８；Ｆｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．，２０１０，３９，２４１１－２４１９；およびＴｒａｉｎａ

ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，２０１１，１３３（３２），ｐｐ １２６００－１２６０７（その開示内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている色素が挙げられる。

【０６１３】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、共役系を形成する複数の第１光学活性ユニットを含む共役ポリマーを含み、これは、第１光学活性ユニットが、光を吸収して、励起状態を形成する第１吸収波長（たとえば、本明細書に記載するもの）を有する。共役ポリマー（ＣＰ）は、ポリカチオン性、ポリアニオン性および／または電荷中性共役ポリマーであってもよい。

【０６１４】

ＣＰは、生物学的サンプルに使用するために水溶性であってもよい。水溶性を高めるために、ポリマー色素中に、親水性置換基、たとえば、親水性ポリマー、または荷電置換基、たとえば、水溶液中、たとえば、生理的条件下で、正もしくは負の電荷を帯びた基などの任意の好都合な置換基を含有させてもよい。対象の集光多発色団に任意の好都合な水溶性基（ＷＳＧ）を使用してもよい。「水溶性基」という用語は、水性環境において十分に溶媒和され、しかも、それが結合する分子に改善された水溶性を付与する官能基を指す。いくつかの実施形態では、ＷＳＧは、ＷＳＧが欠如した多発色団と比較して、ほぼ水性の溶液（たとえば、本明細書に記載するもの）中での多発色団の溶解度を高める。水溶性基は、水性環境中に十分に溶媒和されるいずれの好都合な親水性基であってもよい。いくつかの実施形態では、水溶性基は荷電されており、たとえば、正もしくは負荷電されているか、または双性イオン性である。いくつかの実施形態では、親水性基は、中性親水性基である。いくつかの実施形態では、ＷＳＧは、親水性ポリマー、たとえば、ポリエチレングリコール、セルロース、キトサン、またはそれらの誘導体である。

【０６１５】

本明細書で用いられる場合、「ポリエチレンオキシド」、「ＰＥＯ」、「ポリエチレングリコール」および「ＰＥＧ」という用語は、置き換え可能に用いられて、式－（CH_2－CH_2－Ｏ－）$_n$－により表される鎖を含むポリマーまたはその誘導体を指す。いくつかの実施形態では、「ｎ」は、５０００以下、たとえば、１０００以下、５００以下、２００以下、１００以下、５０以下、４０以下、３０以下、２０以下、１５以下、たとえば５～１５、または１０～１５である。ＰＥＧポリマーは、任意の好都合な長さであってよく、限定されないが、アルキル、アリール、ヒドロキシル、アミノ、アシル、アシルオキシ、およびアミノ末端基をはじめとする様々な末端基を含みうることは理解される。対象の多発色団での使用に合わせて改変されうる官能基化ＰＥＧとして、Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙにより“Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ ｇｌｙｃｏｌ）ｆｏｒ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ｒｅｌｅｖａｎｔ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ”，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １９９５，６（２），１５０－１６５に記載されているＰＥＧが挙げられる。目的の水溶性基としては、限定されないが、以下のものが挙げられる：カルボン酸塩、ホスホン酸塩、リン酸塩、スルホン酸塩、硫酸塩、スルフィン酸塩、エステル、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）および修飾ＰＥＧ、ヒドロキシル、アミン、アンモニウム、グアニジニウム、ポリアミンおよびスルホニウム、ポリアルコール、直鎖もしくは環状糖、１級、２級、３級、もしくは４級アミンおよびポリアミン、ホスホン酸基、ホスフィン酸基、アスコルビン酸基、グリコール、たとえば、ポリエーテル、－ＣＯＯＭ’、－SO_3Ｍ’、－PO_3Ｍ’、－NR_3^+、Ｙ’、（CH_2CH_2O）$_p$Ｒおよびそれらの混合物（ここで、Ｙ’は、任意のハロゲン、硫酸塩、スルホン酸塩、もしくは酸素含有アニオンであってよく、ｐは、１～５００であってよく、各Ｒは、独立にＨもしくはアルキル（メチルなど）であってよく、Ｍ’は、カチオン性対イオンもしくは水素、－（CH_2CH_2O）$_{yy}$$CH_2CH_2XR^{yy}$、－（$CH_2CH_2O$）$_{yy}$$CH_2CH_2X$－、－Ｘ（$CH_2CH_2O$）$_{yy}$$CH_2CH_2$－、グリコール、およびポリエチレングリコールであってよく、式中、ｙｙは、１～１０００から選択され、Ｘは、Ｏ、Ｓ、およびNR^{ZZ}から選択され、R^{ZZ}およびR^{YY}は、独立にＨおよびＣ１

～３アルキルから選択される）。

【０６１６】

ポリマー色素は、任意の好都合な長さを有してよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素のモノマー反復単位もしくはセグメントの具体的な数は、２～５００，０００、たとえば、２～１００，０００、２～３０，０００、２～１０，０００、２～３，０００または２～１，０００単位もしくはセグメント、あるいは１００～１００，０００、２００～１００，０００、または５００～５０，０００単位もしくはセグメントの範囲内であってよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素のモノマー反復単位もしくはセグメントの数は、２～１０００単位もしくはセグメント、たとえば２～７５０単位もしくはセグメント、たとえば２～５００単位もしくはセグメント、たとえば２～２５０単位もしくはセグメント、たとえば２～１５０単位もしくはセグメント、たとえば２～１００単位もしくはセグメント、たとえば２～７５単位もしくはセグメント、たとえば２～５０単位もしくはセグメント、ならびに２～２５単位もしくはセグメントを含む範囲内であってよい。

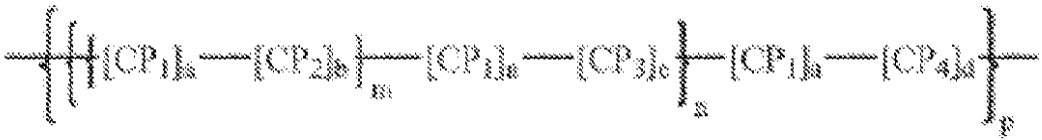
【０６１７】

ポリマー色素は、任意の好都合な分子量（ＭＷ）であってよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素のＭＷは、平均分子量として表すことができる。いくつかの事例では、ポリマー色素は、５００～５００，０００、たとえば１，０００～１００，０００、２，０００～１００，０００、１０，０００～１００，０００の平均分子量、あるいは５０，０００～１００，０００の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７０，０００の平均分子量を有する。

【０６１８】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、下記の構造：

【化１】



を含み、

式中、CP_1、CP_2、CP_3およびCP_4は、独立に共役ポリマーセグメントまたはオリゴマー構造であり、ここで、１つ以上のCP_1、CP_2、CP_3およびCP_4は、バンドギャップ修飾ｎ共役反復単位である。

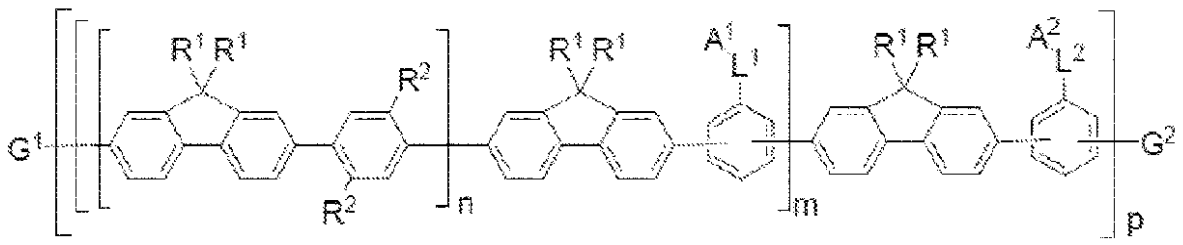
【０６１９】

いくつかの実施形態では、共役ポリマーは、種々の共役ポリマーの中でも、ポリフルオレン共役ポリマー、ポリフェニレンビニレン共役ポリマー、ポリフェニレンエーテル共役ポリマー、ポリフェニレンポリマーである。

【０６２０】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、下記の構造：

【化２】



を含み、

式中、各R^1は、独立に、可溶化基またはリンカー色素であり；L^1およびL^2は、任意選択のリンカーであり；各R^2は、独立に、Ｈまたはアリール置換基であり；各A^1および

A^2は、独立に、Ｈ、アリール置換基または蛍光団であり；G^1およびG^2は、各々独立に、末端基、π共役セグメント、リンカーおよびリンカー特異的結合メンバーからなる群から選択され；各ｎおよび各ｍは、独立に、０または１～１０，０００の整数であり；ｐは、１～１００，０００の整数である。目的の可溶化基として、限定されないが、親水性ポリマー（たとえば、ポリアルキレンオキシド、セルロース、キトサンなど）といった水溶性官能基、ならびにポリアルキレンオキシド（たとえば、２～２０単位のＰＥＧを含むポリエチルグリコール）、アンモニウム、スルホニウム、ホスホニウム、ならびに荷電（正、負荷電もしくは双性イオン性）親水性水溶性基などの親水性基でさらに置換されたアルキル、アリールおよび複素環基などが挙げられる。

【０６２１】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、ポリマー骨格の一部として、下記の構造：

【化３】

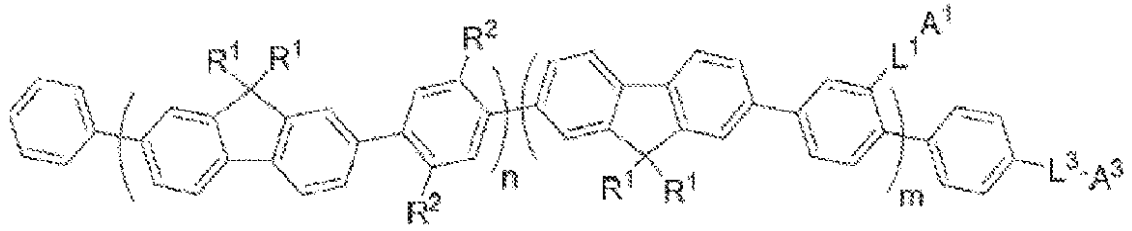
の１つを有する共役セグメントを含み、

式中、各R^3は、独立に、親水性ポリマー（たとえば、ポリアルキレンオキシド、セルロース、キトサンなど）といった任意選択で置換された水溶性官能基、またはポリアルキレンオキシド（たとえば、２～２０単位のＰＥＧを含むポリエチルグリコール）、アンモニウム、スルホニウム、ホスホニウム、ならびに荷電（正、負荷電もしくは双性イオン性）親水性水溶性基などの親水性基でさらに置換されたアルキルもしくはアリール基であり；Ａｒは、任意選択で置換されたアリールまたはヘテロアリール基であり；ｎは、１～１０００００である。いくつかの実施形態では、Ｒ３は、任意選択で置換されたアルキル基である。いくつかの実施形態では、R^3は、任意選択で置換されたアリール基である。いくつかの実施形態では、R^3は、ポリエチレングリコール、色素、化学選択的官能基または特異的結合部分で置換される。いくつかの実施形態では、Ａｒは、ポリエチレングリコール、色素、化学選択的官能基または特異的結合部分で置換される。

【０６２２】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、下記の構造：

【化４】



を含み、

式中、各R^1は、可溶化基またはリンカー色素基であり；各R^2は、独立に、Ｈまたはアリール置換基であり；L_1およびL_2は、任意選択のリンカーであり；各Ａ１およびＡ３は、独立に、Ｈ、蛍光団、官能基または特異的結合部分（たとえば、抗体）であり；ｎおよびｍは、各々独立に、０～１０，０００の整数であり、ここで、ｎ＋ｍ＞１である。

【０６２３】

ポリマー色素は、特定の吸収最大波長、特定の発光極大波長、消散係数、量子収量などの１つまたは複数の望ましい分光特性を有しうる（たとえば、Ｃｈａｔｔｏｐａｄｈｙａｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ ｖｉｏｌｅｔ ｆｌｕｏｒｏｐｈｏｒｅｓ：

Ａ ｎｅｗ ｃｌａｓｓ ｏｆ ｕｌｔｒａｂｒｉｇｈｔ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔｓ．”Ｃｙｔｏｍｅｔｒｙ Ｐａｒｔ Ａ，８１Ａ（６），４５６－４６６，２０１２を参照されたい）。

【０６２４】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、２８０～８５０ｎｍの間に吸収曲線を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、２８０～８５０ｎｍの範囲内に吸収極大を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、２８０～８５０ｎｍの範囲内の波長を有する入射光を吸収し、目的の吸収極大の具体的な例として、限定されないが、３４８ｎｍ、３５５ｎｍ、４０５ｎｍ、４０７ｎｍ、４４５ｎｍ、４８８ｎｍ、６４０ｎｍおよび６５２ｎｍが挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、２８０～３１０ｎｍ、３０５～３２５ｎｍ、３２０～３５０ｎｍ、３４０～３７５ｎｍ、３７０～４２５ｎｍ、４００～４５０ｎｍ、４４０～５００ｎｍ、４７５～５５０ｎｍ、５２５～６２５ｎｍ、６２５～６７５ｎｍおよび６５０～７５０ｎｍからなる群から選択される範囲内の吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３４８ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３５５ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４０５ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４０７ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４４５ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４８８ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６４０ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６５２ｎｍの吸収極大波長を有する。

【０６２５】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４００～８５０ｎｍ、たとえば４１５～８００ｎｍの発光極大波長を有し、目的の吸収極大の具体的な例として、限定されないが、以下：３９５ｎｍ、４２１ｎｍ、４４５ｎｍ、４４８ｎｍ、４５２ｎｍ、４７８ｎｍ、４８０ｎｍ、４８５ｎｍ、４９１ｎｍ、４９６ｎｍ、５００ｎｍ、５１０ｎｍ、５１５ｎｍ、５１９ｎｍ、５２０ｎｍ、５６３ｎｍ、５７０ｎｍ、５７８ｎｍ、６０２ｎｍ、６１２ｎｍ、６５０ｎｍ、６６１ｎｍ、６６７ｎｍ、６６８ｎｍ、６７８ｎｍ、６９５ｎｍ、７０２ｎｍ、７１１ｎｍ、７１９ｎｍ、７３７ｎｍ、７８５ｎｍ、７８６ｎｍ、８０５ｎｍが挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３８０～４００ｎｍ、４１０～４３０ｎｍ、４７０～４９０ｎｍ、４９０～５１０ｎｍ、５００～５２０ｎｍ、５６０～５８０ｎｍ、５７０～５９５ｎｍ、５９０～６１０ｎｍ、６１０～６５０ｎｍ、６４０～６６０ｎｍ、６５０～７００ｎｍ、７００～７２０ｎｍ、７１０～７５０ｎｍ、７４０～７８０ｎｍおよび７７５～７９５ｎｍからなる群から選択される範囲内の発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３９５ｎｍの発光極大を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４２１ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４７８ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４８０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４８５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４９６ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５１０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５７０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６０２ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６５０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７１１ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７３７ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７５０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７８６ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４２１±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５１０±５ｎｍの発光極大波長を有する。い

くつかの実施形態では、ポリマー色素は、５７０±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６０２±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６５０±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７１１±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７８６±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４２１ｎｍ、５１０ｎｍ、５７０ｎｍ、６０２ｎｍ、６５０ｎｍ、７１１ｎｍおよび７８６ｎｍからなる群から選択される発光極大を有する。

【０６２６】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、１×１０６ｃｍ－１Ｍ－１以上、たとえば２×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、２．５×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、３×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、４×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、５×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、６×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、７×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上、または８×１０^{6}ｃｍ$^{-1}$Ｍ$^{-1}$以上の消散係数を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．０５以上の量子収量、たとえば０．１以上、０．１５以上、０．２以上、０．２５以上、０．３以上、０．３５以上、０．４以上、０．４５以上、０．５以上、０．６以上、０．７以上、０．８以上、０．９以上、０．９５以上、０．９９以上で、０．９９９以上も含まれる、量子収量を有する。たとえば、目的のポリマー色素の量子収量は、０．０５～１、たとえば０．１～０．９５、たとえば０．１５～０．９、たとえば０．２～０．８５、たとえば０．２５～０．７５、たとえば０．３～０．７で、０．４～０．６の量子収量も含まれる、範囲であってよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．１以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．３以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．５以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．６以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．７以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．８以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．９以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．９５以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、１×１０^{6}以上の消散係数および０．３以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、２×１０６以上の消散係数および０．５以上の量子収量を有する。

【０６２７】

いくつかの実施形態では、標識は、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含む。酵素は、酵素基質を対応する修飾酵素基質に修飾することができる。いくつかの実施形態では、酵素は、以下：Ｅｎｚｙｍｅ　Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎ（ＥＣ）１オキシドレダクターゼ（たとえば、デヒドロゲナーゼもしくはオキシダーゼ）；ＥＣ２トランスフェラーゼ（たとえば、トランスアミナーゼもしくはキナーゼ）；ＥＣ３ヒドロラーゼ（たとえば、リパーゼ、アミラーゼ、もしくはペプチダーゼ）；ＥＣ４リアーゼ（たとえば、デカルボキシラーゼ）；ＥＣ５イソメラーゼ（たとえば、イソメラーゼもしくはムターゼ）；またはＥＣ６リガーゼ（たとえば、シンテターゼ）であるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６２８】

いくつかの実施形態では、酵素は、供与体のＣＨ－ＯＨ基に作用するＥＣ１．１オキシドレダクターゼ；供与体のアルデヒドもしくはオキソ基に作用するＥＣ１．２オキシドレダクターゼ；供与体のＣＨ－ＣＨ基に作用するＥＣ１．３オキシドレダクターゼ；供与体のＣＨ－ＮＨ（２）基に作用するＥＣ１．４オキシドレダクターゼ；供与体のＣＨ－ＮＨ基に作用するＥＣ１．５オキシドレダクターゼ；ＮＡＤＨもしくはＮＡＤＰＨに作用するＥＣ１．６オキシドレダクターゼ；供与体としての他の窒素化合物に作用するＥＣ１．７オキシドレダクターゼ；供与体のイオウ基に作用するＥＣ１．８オキシドレダクターゼ；供与体のヘメ基に作用するＥＣ１．９オキシドレダクターゼ；供与体としてのジフェノールおよび関連物質に作用するＥＣ１．１０オキシドレダクターゼ；金属イオンを酸化するＥＣ１．１６オキシドレダクターゼ；ＣＨもしくはＣＨ（２）基に作用するＥＣ１．１７オキシドレダクターゼ；供与体としての鉄－イオウタンパク質に作用するＥＣ１．１８オ

キシドレダクターゼ；供与体としての還元フラボドキシンに作用するＥＣ１．１９オキシドレダクターゼ；供与体中のリンもしくはヒ素に作用するＥＣ１．２０オキシドレダクターゼ；反応Ｘ－Ｈ＋Ｙ－Ｈ＝‘Ｘ－Ｙ’を触媒するＥＣ１．２１オキシドレダクターゼ；供与体中のハロゲンに作用するＥＣ１．２２オキシドレダクターゼ；受容体としてのＣ－Ｏ－Ｃ基を還元するＥＣ１．２３オキシドレダクターゼ；またはＥＣ１．９７の他のオキシドレダクターゼであるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６２９】

いくつかの実施形態では、酵素は、基質と共に１炭素基を転移させるＥＣ２．１トランスフェラーゼ；ＤＮＡ、ＲＮＡ、カテコール；アルデヒドもしくはケトン基を転移させるＥＣ２．２トランスフェラーゼ；ＥＣ２．３アシルトランスフェラーゼ；ＥＣ２．４グリコシルトランスフェラーゼ；メチル基以外のアルキルもしくはアリール基を転移させるＥＣ２．５トランスフェラーゼ；窒素基を転移させるＥＣ２．６トランスフェラーゼ；リン含有基を転移させるＥＣ２．７トランスフェラーゼ；イオウ含有基を転移させるＥＣ２．８トランスフェラーゼ；セレニウム含有基を転移させるＥＣ２．９トランスフェラーゼ；またはモリブデンもしくはタングステン含有基を転移させるＥＣ２．１０トランスフェラーゼであるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６３０】

いくつかの実施形態では、酵素は、エステル結合に作用するＥＣ３．１ヒドロラーゼ；ＥＣ３．２グリコシラーゼ；エーテル結合に作用するＥＣ３．３ヒドロラーゼ；ペプチド結合（ペプチダーゼ）に作用するＥＣ３．４ヒドロラーゼ；ペプチド結合以外の炭素－窒素結合に作用するＥＣ３．５ヒドロラーゼ；酸無水物に作用するＥＣ３．６ヒドロラーゼ；炭素－炭素結合に作用するＥＣ３．７ヒドロラーゼ；ハライド結合に作用するＥＣ３．８ヒドロラーゼ；リン－窒素結合に作用するＥＣ３．９ヒドロラーゼ；イオウ－窒素結合に作用するＥＣ３．１０ヒドロラーゼ；炭素－リン結合に作用するＥＣ３．１１ヒドロラーゼ；イオウ－イオウ結合に作用するＥＣ３．１２ヒドロラーゼ；または炭素－イオウ結合に作用するＥＣ３．１３ヒドロラーゼであるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６３１】

いくつかの実施形態では、酵素は、グリコシルヒドロラーゼ（バイオ燃料の生産のために植物バイオマスを分解する上で有用な酵素）、アミノトランスフェラーゼ（バイオマニュファクチャリングに重要な有機小分子もしくはタンパク質の結合および輸送に関与するタンパク質）、ＡＴＰ結合カセット（ＡＢＣ）輸送タンパク質（バイオレメディエーションに潜在的な影響を有する土壌微生物の代謝に関与するタンパク質）の溶質結合タンパク質、またはこれらの任意の組合せであるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６３２】

いくつかの実施形態では、酵素は、ＥＣ４．１炭素－炭素リアーゼ；ＥＣ４．２炭素－酸素リアーゼ；ＥＣ４．３炭素－窒素リアーゼ；ＥＣ４．４炭素－イオウリアーゼ；ＥＣ４．５炭素－ハライドリアーゼ；ＥＣ４．６リン－酸素リアーゼ；ＥＣ４．７炭素－リンリアーゼ；またはＥＣ４．９９の他のリアーゼであるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６３３】

いくつかの実施形態では、酵素は、炭素－酸素結合を形成するＥＣ６．１リアーゼ；炭素－イオウ結合を形成するＥＣ６．２リアーゼ；炭素－窒素結合を形成するＥＣ６．３リアーゼ；炭素－炭素結合を形成するＥＣ６．４リアーゼ；リン酸エステル結合を形成するＥＣ６．５リアーゼ；または窒素－金属結合を形成するＥＣ６．６リアーゼであるか、あるいはこれらを含みうる。

【０６３４】

いくつかの実施形態では、酵素基質は、対応する修飾酵素基質とは、少なくとも１つの官能基が異なりうる。少なくとも１つの官能基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケ

ター ル、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはこれらの任意の組合せでありうる。

【０６３５】

いくつかの実施形態では、酵素は、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはこれらの組合せを含みうる。

【０６３６】

いくつかの実施形態では、酵素基質は、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミン（ａｍｉｎｉｃ）酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキサオシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソン酸塩、オリゴ糖、ペクチン酸塩、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはこれらの任意の組合せを含みうる。標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含みうる。

【０６３７】

標識生体分子試薬は、活性化生体分子を活性化標識に結合させることによって調製される。「活性化」という用語は、本明細書で用いられる場合、反応性リンカーもしくは反応性部分を有する生体分子または標識を指し、これは、適切な条件下で実施されると、第２反応性リンカーもしくは第２反応性部分と反応して、たとえば、イオン結合（電荷－電荷相互作用）、非共有結合（たとえば、双極子－双極子もしくは電荷－双極子）または共有結合などの化学結合を形成する。いくつかの実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、イオン結合を生成する。別の実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、非共有結合を生成する。また別の実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、共有結合を生成する。

【０６３８】

いくつかの実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、共有結合を生成する。活性化生体分子の反応性リンカーと活性化標識の反応性リンカーとの間に共有結合を形成するための任意の好都合

なプロトコルを使用してよく、そうしたものとして、限定されないが、種々の結合形成反応の中でも、付加反応、脱離反応、置換反応、ペリ環状反応、光化学反応、酸化還元反応、ラジカル反応、カルベン（ｃａｒｂｅｎｅ）中間体を介した反応、メタセシス反応が挙げられる。いくつかの実施形態では、活性化生体分子は、反応性結合ケミストリーによって活性化標識に共役させてもよく、たとえば、この場合、反応性リンカーペアとして、限定されないが、以下のものが挙げられる：マレイミド／チオール；チオール／チオール；ピリジルジチオール／チオール；ヨード酢酸スクシンイミジル／チオール；Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＮＨＳエステル）、スルホジクロロフェノール（ｓｕｌｆｏｄｉｃｈｏｌｏｒｐｈｅｎｏｌ）エステル（ＳＤＰエステル）、またはペンタフルオロフェニル－エステル（ＰＦＰエステル）／アミン；ビススクシンイミジルエステル／アミン；イミドエステル／アミン；ヒドラジンもしくはアミン／アルデヒド、ジアルデヒドまたはベンズアルデヒド；イソシアネート／ヒドロキシルまたはアミン；炭水化物－過ヨウ素酸塩／ヒドラジンまたはアミン；ジアジリン／アリールアジドケミストリー；ピリジルジチオール／アリールアジドケミストリー；アルキン／アジド；カルボキシ－カルボジイミド／アミン；アミン／スルホ－ＳＭＣＣ（スルホスクシンイミジル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）／チオールおよびアミン／ＢＭＰＨ（Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド．ＴＦＡ）／チオール；アジド／トリアリールホスフィン；ニトロン／シクロオクチン；アジド／テトラジンおよびホルミルベンズアミド／ヒドラジノ－ニコチンアミド。いくつかの実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーと活性化標識の反応性リンカーは、環状付加反応、たとえば、［１＋２］－環状付加反応、［２＋２］－環状付加、［３＋２］－環状付加反応、［２＋４］－環状付加、［４＋６］－環状付加、または１，３－双極性環状付加（たとえば、アジド－アルキンヒュスゲン環状付加）を被るリンカーを含むキレトロピー反応、ディールス・アルダー（Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ）反応、逆電子要請型ディールス・アルダー（Ｄｉｅｌｓ－Ａｌｄｅｒ）環状付加、エン反応または［２＋２］光化学環状付加反応を被る。

【０６３９】

いくつかの実施形態では、生体分子リクエストおよび標識リクエストは、活性化生体分子および活性化標識の反応性リンカーに関する情報またはデータを含む。たとえば、生体分子リクエストおよび標識リクエストは、反応性リンカーの名称、化学構造、反応性リンカーの構造記述もしくは反応性リンカーＣＡＳ番号に関する情報またはデータを含みうる。いくつかの実施形態では、生体分子リクエストおよび標識リクエストは、反応性リンカーペアの名称を含み、たとえば、反応性リンカーペアは、以下：マレイミド／チオール；チオール／チオール；ピリジルジチオール／チオール；ヨード酢酸スクシンイミジル／チオール；Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＮＨＳエステル）、スルホジクロロフェノール（ｓｕｌｆｏｄｉｃｈｏｌｏｒｐｈｅｎｏｌ）エステル（ＳＤＰエステル）、またはペンタフルオロフェニル－エステル（ＰＦＰエステル）／アミン；ビススクシンイミジルエステル／アミン；イミドエステル／アミン；ヒドラジンもしくはアミン／アルデヒド、ジアルデヒドまたはベンズアルデヒド；イソシアネート／ヒドロキシルまたはアミン；炭水化物－過ヨウ素酸塩／ヒドラジンまたはアミン；ジアジリン／アリールアジドケミストリー；ピリジルジチオール／アリールアジドケミストリー；アルキン／アジド；カルボキシ－カルボジイミド／アミン；アミン／スルホ－ＳＭＣＣ（スルホスクシンイミジル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）／チオールおよびアミン／ＢＭＰＨ（Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド．ＴＦＡ）／チオール；アジド／トリアリールホスフィン；ニトロン／シクロオクチン；アジド／テトラジンおよびホルミルベンズアミド／ヒドラジノ－ニコチンアミド；ジエン／ジエノフィル；ならびに１，３－双極子／親双極子から選択されてもよい。

【０６４０】

いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む。酵素リクエストとしては、限定されないが、酵素名、ポリペプチド配列、酵素のクラス、ＥＣ番号、ポリペプチド共通配列、保存ドメイン名および／もしくは配列または複

数の関連タンパク質（たとえば、同じタンパク質ファミリーに属するタンパク質）、あるいはこれらの任意の組合せを挙げることができる。基質リクエストとしては、限定されないが、基質名、基質の官能基、基質のクラス、特定のＥＣ番号を有する１つ以上の酵素に対する１つ以上の基質、またはこれらの任意の組合せを挙げることができる。

【０６４１】

入力マネージャは、標識生体分子のリクエストを受けるように構成される。標識生体分子試薬リクエストを受けるために、入力マネージャは、グラフィカルユーザインターフェースに作動的に接続されており、ここに１つまたは複数の標識生体分子試薬リクエストが入力される。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、インターネットウェブサイトメニューインターフェースに（たとえば、遠隔地で）入力され、インターネットまたはローカルエリアネットワークを通じて入力マネージャに伝達される。いくつかの実施形態では、入力マネージャは、複数の標識生体分子試薬リクエストを受けるように構成される。たとえば、入力マネージャは、２つ以上の標識生体分子試薬リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば１０以上、ならびにたとえば２５以上の標識生体分子試薬リクエストを受けるように構成されうる。

【０６４２】

標識生体分子試薬のリクエストが、単一の構成要素しか含まず、それが標識生体分子リクエストである場合、入力マネージャは、２つ以上の標識生体分子リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば２５以上を含め、１０以上の標識生体分子リクエストを受けるように構成されうる。標識生体分子試薬リクエストが、２つの構成要素、たとえば、生体分子リクエストと標識リクエストを含む場合、入力マネージャは、２つ以上の生体分子リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば２５以上を含め、１０以上の生体分子リクエストを受けるように構成され、かつ２つ以上の標識リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば２５以上を含め、１０以上の標識リクエストを受けるように構成されうる。いくつかの実施形態では、入力マネージャは、単一の生体分子リクエストと単一の標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受けるように構成される。いくつかの実施形態では、入力マネージャは、単一の生体分子リクエストと複数の異なる標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受けるように構成される。またいくつかの実施形態では、入力マネージャは、複数の異なる生体分子リクエストと単一の標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受けるように構成される。さらにいくつかの実施形態では、入力マネージャは、複数の異なる生体分子リクエストと複数の異なる標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受けるように構成される。入力マネージャは、１人ユーザまたは複数の異なるユーザ、たとえば２人以上の異なるユーザ、たとえば５人以上の異なるユーザ、たとえば１０人以上の異なるユーザ、たとえば１００人以上の異なるユーザを含め、２５人以上の異なるユーザからの標識生体分子リクエストを受けるように構成される。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストおよび基質リクエストを含む。

【０６４３】

いくつかの実施形態では、入力マネージャは、リクエストされる標識生体分子試薬の所望量に対応する数量リクエストを受けるように構成される。数量リクエストは、数値および単位（たとえば、μｇ、μモル、μＭなど）値をテキストボックスに分類し、適切な数値および単位値に対応するチェックボックスを選択するか、または第１ドロップダウンメニューから数値を、第２ドロップダウンメニューから単位値を選択することによって入力されうる。

【０６４４】

いくつかの実施形態では、入力マネージャは、標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーの１つまたは複数の検索可能なデータベース（たとえば、カタログ）に作動的に接続される。いくつかの実施形態では、入力マネージャは、標識生体分子のデータベースを含む。いくつかの実施形態では、入力マネージャは、活性化生体分子および活性化標識のデータベースを含む。またいくつかの実施形態では

、入力マネージャは、生体分子、標識および反応性リンカーのデータベースを含む。

【０６４５】

標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーの各データベースの全部または一部は、リスト、ドロップダウンメニューもしくはその他の構成（たとえば、タイル）などのグラフィカルユーザインターフェース上に表示することができる。たとえば、グラフィカルユーザインターフェースは、各々標識された生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのリストを同時に（たとえば、単一スクリーンに）表示しうるか、または標識生体分子試薬リクエストの各構成要素についてのドロップダウンメニューを含みうる。別の実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、情報を適切なテキストフィールドに入力し、チェックボックスを選択し、ドロップダウンメニューから１つ以上の項目を選択することにより、またはこれらの組合せを使用して提供される。

【０６４６】

一例において、グラフィカルユーザインターフェースは、ドロップダウンメニューから１つまたは複数の標識生体分子を選択することによって標識生体分子試薬リクエストを入力するためのドロップダウンメニューを含む。別の例では、グラフィカルユーザインターフェースは、第１および第２ドロップダウンメニューから１つまたは複数の生体分子および１つまたは複数の標識を選択することによって生体分子リクエストを入力するための第１ドロップダウンメニューと、標識リクエストを入力するための第２ドロップダウンメニューとを含む。また別の例では、グラフィカルユーザインターフェースは、ドロップダウンメニューから１つまたは複数の生体分子、１つまたは複数の標識および１つまたは複数の反応性リンカーを選択することによって生体分子リクエストを入力するための第１ドロップダウンメニューと、標識リクエストを入力するための第２ドロップダウンメニューと、反応性リンカーを入力するための第３ドロップダウンメニューとを含む。

【０６４７】

さらに別の例では、グラフィカルユーザインターフェースは、第１および第２ドロップダウンメニューから１つまたは複数の活性化生体分子および１つまたは複数の活性化リンカーを選択することによって活性化生体分子リクエストを入力するための第１ドロップダウンメニューと、活性化標識リクエストを入力するための第２ドロップダウンメニューとを含む。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。グラフィカルユーザインターフェースは、活性化生体分子リクエストを入力するための第１ドロップダウンメニューと、活性化酵素リクエストを入力するための第２ドロップダウンメニューと、酵素基質を入力するための第３ドロップダウンメニューとを含みうる。グラフィカルユーザインターフェースは、活性化生体分子リクエストを入力するための第１ドロップダウンメニューと、活性化基質を入力するための第２ドロップダウンメニューと、酵素を入力するための第３ドロップダウンメニューとを含みうる。

【０６４８】

別の例において、グラフィカルユーザインターフェースは、データベースで入手可能な標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのリストを含む。たとえば、グラフィカルユーザインターフェースは、１つ以上のスクリーンに、各標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのリストを同時に表示しうるか、または標識生体分子試薬リクエストの各構成要素についてのドロップダウンメニューを含みうる。いくつかの実施形態では、全ての入手可能な標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのリストは、単一ページに表示される。いくつかの実施形態では、全ての入手可能な標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのリストは、複数のページ、たとえば２ページ以上、たとえば３ページ以上、たとえば５ページ以上、たとえば２５ページ以上を含め、１０ページ以上に表示される。またいくつかの実施形態では、全ての入手可能な標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのリストは、各々、個別のドロップダウンメニューにおいて単一ペー

ジに表示される。
【０６４９】
図１５は、いくつかの実施形態に従う標識生体分子試薬のリクエストを伝達するためのグラフィカルユーザインターフェースを描く。標識生体分子試薬リクエストを伝達するために、ユーザは、リクエストフォーム１５００に生体分子リクエストと標識リクエストを入力する。標識リクエストは、ドロップダウンメニュー１５０１ａから検出可能なマーカー（たとえば、蛍光団）を選択することによって入力され、生体分子リクエストは、ドロップダウンメニュー１５０１ｂから生体分子（たとえば、抗体プローブ）を選択することによって入力される。リクエストフォーム１５００はまた、微生物中の所望量の標識生体分子試薬に対応する数量リクエスト１５０２を入力するためのテキストボックスも含む。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。
【０６５０】
いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。
【０６５１】
いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。
【０６５２】
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。
【０６５３】
ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。
【０６５４】
いくつかの実施形態では、入力マネージャは、標的生体分子試薬リクエストを検索する、付加もしくは修飾するため、ならびにユーザクエリー（たとえば、グラフィカルユーザインターフェースにローカルで入力されたか、またはインターネットもしくはローカルエリアネットワークで、遠隔地から入力される）に応答するための検索エンジンを含む。いくつかの実施形態では、システムメモリ中の各永続的オブジェクトは、システムデータベース内の関連表を有し、オブジェクト属性が表コラムにマッピングされる。さらに別の態

様では、各オブジェクトは、そのオブジェクトをデータベース内の表に結合するオブジェクト関係マッピングファイルを有する。

【０６５５】

オブジェクトはまた、相互にも関連付けられ、この関連付けは、表同士の関係としてマッピングされる。さらに、オブジェクトは、たとえば１対１、１対多、多対１および多対多などの多数の異なる関係によっても互いに関連付けられる。ユーザクエリーに提供される検索基準は、あるオブジェクトに関連する属性もしくは特性の記述またはこれらの属性に対応する値による記述を含みうる。

【０６５６】

また、関係は、検索基準として使用することもできる。基本的な検索基準は、オブジェクトの属性に依存する可能性があり、アドバンス検索基準は、たとえば関連オブジェクトの特性を検索することによって、オブジェクトと他のオブジェクトとの関連に依存しうる。いくつかの実施形態では、目的の検索エンジンは、ファインダーフレームワークを含み、これは、複数の検索可能な条件（たとえば、全ての考えられるクエリー可能な条件）を構築することになる。ユーザが、検索しようとする実体またはオブジェクトを指定すると、フレームワークは、そのオブジェクトについて全ての考えられる検索条件を生成した後、ユーザにより選択された条件通りの結果を付与する。

【０６５７】

検索エンジンを用いて、システムのユーザは、入手可能な標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識および反応性リンカーを検索することができる。検索エンジンはまた、ペンディングまたは完了した標識生体分子試薬リクエストを検索するようにも構成される。加えて、ユーザは、興味深いと思われる標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識および反応性リンカーを問い合わせ、見出すために、検索エンジンを使用することができる。たとえば、ユーザは、光の予定波長の蛍光により検出可能な特異抗原プローブまたは標識として機能する特定の生体分子を検索することができる。検索条件は、様々なオブジェクトで異なる可能性があり、一事例では、一般的ファインダーフレームワークは、そうした検索のための一般的回答を付与する。

【０６５８】

いくつかの実施形態では、検索エンジンは、標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーを識別するために用いられるクエリーを構築し、クエリーを保存し、クエリーを修正し、および／またはクエリーを更新することができる。いくつかの実施形態では、検索結果は、共有、比較または修正されうる。いくつかの実施形態では、システムは、検索基準に適合する最大限の検索結果をグラフィカルユーザインターフェース上に表示するように構成される。いくつかの実施形態では、検索結果は、ウェブページに表示され、これは、考えられる動作を可能にする能力を有する。こうした能力は、限定されないが、ユーザからの情報を受けるためのリンク、ボタン、ドロップダウンメニュー、フィールドなどを含みうる。特定の態様では、システムは、さらに、検索結果をフォーマットするための結果フォーマッタも含む（たとえば、ウェブページなどの適切なユーザインターフェースを構築する、リンクを指定し、動作（たとえば、「削除」、「編集」など）を画像、テキスト、ハイパーリンクおよび／または他の表示と関連付ける方法を提供する目的で。

【０６５９】

本システムは、検索対象のオブジェクトの検索基準もウェブページ上に表示しうる。一態様では、本システムは、ファインダーフレームワークから入力データを取得し、そのオブジェクトの検索基準を動的に示すウェブページを作成する。別の態様では、ファインダーフレームワークは、検索対象のオブジェクトの全ての考えられるクエリー可能な条件を作成する。これらの条件は、異なるフィールドとして検索ウェブページ上に表示される。ユーザは、これらのフィールドを選択することができ、それに対する値を指定して、検索を実行する。表示しようとするフィールドは、局在化された形態でそれらの標識を有する。フィールドは、「選択」ボックス、またはテキストボックスまたはテキストを入力する

ための他のエリアの形態であってもよい。たとえば、ユーザは、生体分子を検索することを要望しうる。検索可能なデータベース内の生体分子は、化合物名または配列番号（たとえば、アクセッション番号）などのクエリー可能な条件を含む。

【０６６０】

一実施形態では、検索エンジンは、データベース内の標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識および反応性リンカーの各々の検索を支援する。いくつかの実施形態では、本システムは、検索対象のオブジェクトの全てのクエリー可能な条件を作成するための一般的ファインダーフレームワークを提供する。こうした条件は、一般に、オブジェクトの特性および他のオブジェクトとのその関係に応じて変わりうる。別の実施形態では、ファインダーフレームワークは、これらの条件およびその順序について局在化されたフィールド名を検索し、それらをシステムメモリ（たとえば、ｏｂｊｅｃｔｄｅｆｉｎｉｔｉｏｎ．ｘｍｌファイル）に記憶する。一例では、フィールドは、ユーザが値を選択または入力することができる検索パラメータの集合としてファイルにそれらが記憶される順序で、検索ページ上に表示される。検索パラメータは、オブジェクトのリストの形態であってもよく、パラメータは、属性カテゴリーに関連しうる。たとえば、ユーザによる標識生体分子の検索に応答して、システムは、クエリー可能な条件：「標識生体分子の名称」、「検索に用いられるキーワード」、「作成者」、「修正者」、「修正日」、「アノテーション」などを表示しうる。ファインダーフレームワークは、クエリー可能な条件をコレクションの形態（これは、検索ページ上に表示することができる）に戻すことができ、これは、局在化された形態で、属性カテゴリーに対応する様々な検索フィールドを列記または表示する。ユーザは、これらのフィールドの値を入力し、たとえば、具体的な名称、構造、登録番号などを有する標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識および反応性リンカーの１つまたは複数の選択、具体的なキーワードの提供、所望のドメイン、作成者、修正日、アノテーションなどの識別を実施することができる。次に、システムは、検索条件を満たす標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーのリストを表示する。いくつかの実施形態では、本システムは、検索を実施するために用いられる基準に関する情報を表示する。

【０６６１】

一実施形態では、入力マネージャは、１つまたは複数の生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーを選択するための推奨を提供するように構成された標識生体分子設計プラットフォームを含む。いくつかの実施形態では、設計プラットフォームは、所望の標識生体分子の１つまたは複数のパラメータのユーザ入力に基づいて、１つまたは複数の生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーを選択するための推奨を提供するように構成される。たとえば、ユーザによって設計プラットフォームに入力されうる所望の標的生体分子のパラメータとしては、限定されないが、標識生体分子の所望の物理的特性（たとえば、分子量、融点、純度など）；標識生体分子の所望の化学的特性（たとえば、化学構造、第２の標識生体分子に対する構造類似性、イオン性、溶媒和、加水分解、化学反応性、酵素反応性、結合親和性など）；分光特性（たとえば、吸収波長範囲、吸収極大、発光波長範囲、発光極大、ストークスシフト、量子収量、モル消散係数など）が挙げられる。いくつかの実施形態では、設計プラットフォームは、標識生体分子の適用に基づいて、１つまたは複数の生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーを選択するための推奨を提供するように構成される。たとえば、設計プラットフォームは、使用される計器（たとえば、フローサイトメータ、蛍光分光計など）、計器構成、ならびに実験パラメータ（たとえば、細胞上の抗原密度などの標的存在量）に基づいて、標識生体分子の各構成要素を選択するための推奨を提供するように構成されうる。グラフィカルユーザインターフェースは、１つまたは複数の生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーを選択するための推奨を提供する目的で、設計プラットフォームにより使用されるデータを入力するための１つまたは複数のテキスト入力フィールドまたはドロップダウンメニューを含みうる。

【０６６２】

標識生体分子設計プラットフォームは、ユーザによって入力される情報（たとえば、標識生体分子の特性または標識生体分子の予想される用途）に基づいて、複数の異なる生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーについての推奨事項を提供するように構成されうる。

【０６６３】

たとえば、設計プラットフォームは、ユーザによって入力される情報に基づいて、２つ以上の異なる生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカー、たとえば３つ以上、たとえば４つ以上、たとえば５つ以上、たとえば１０以上で、２５以上も含まれる、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーを推奨するように構成されうる。

【０６６４】

いくつかの実施形態では、標識生体分子設計プラットフォームは、特定の用途（たとえば、フローサイトメータの構成）に最も適した生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーの組合せに関する推奨を提供するように構成されうる。設計プラットフォームは、たとえば、ユーザが、１つまたは複数の生体分子と１つまたは複数の標識ならびに用途情報（たとえば、計器構成、標的存在量など）とのリストを入力すると、設計プラットフォームが、表明された用途に最も適した生体分子、標識、活性化標識および反応性リンカーの組合せに関する推奨を出力するように構成されうる。いくつかの実施形態では、標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーについての推奨は、ディスプレイ（たとえば、電子ディスプレイ）上に表示されるか、またはプリンタで、対人可読媒体（紙）上に、もしくは機械可読フォーマットで（たとえば、バーコードとして）印刷されうる。別の実施形態では、標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーについての推奨は、入力マネージャに伝達され、推奨された標識生体分子が前述のように調製されうる。

【０６６５】

本開示のシステムは、標識生体分子試薬リクエストの構成要素と対応する複数のストレージ識別子を有するデータセットを記憶するためのメモリも含む。「メモリ」という用語は、本明細書ではその一般的な意味で使用されて、プロセッサによる逐次検索のための情報を記憶するデバイスを指し、そうしたものとして、磁気または光学デバイス（たとえば、ハードディスク、フロッピーディスク、ＣＤ、もしくはＤＶＤなど）、またはソリッドステートメモリデバイス（たとえば、揮発性もしくは不揮発性ＲＡＭ）が挙げられる。メモリまたはメモリユニットは、同じもしくは異なるタイプの２つ以上の物理的メモリデバイスを含んでもよい（たとえば、メモリは、複数のハードドライブもしくは複数のソリッドステートメモリデバイス、またはハードドライブとソリッドステートメモリデバイスの何らかの組合せなどの複数のメモリデバイスを含みうる）。メモリは、コンピュータ可読媒体または固定メモリであってもよい。いくつかの実施形態では、メモリは、システムデータベース内の各標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識および反応性リンカーに対応する複数のストレージ識別子を有する１つまたは複数のデータセットを含みうる。

【０６６６】

メモリに記憶されるデータセットは、各標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカーと対応するストレージ識別子を含む。ストレージ識別子は、特定の標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識またはリンカーに関連する、一連の１つまたは複数の文字（たとえば、英数字）、記号、イメージもしくはその他のグラフ表示としてデータセットにおいて提示されうる。いくつかの実施形態では、ストレージ識別子は、標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識またはリンカーの略称である。たとえば、ストレージ識別子は、アクセッション番号、配列識別番号、識別可能なプローブ配列、ＣＡＳ登録番号への言及を含むか、またはカスタム識別コードであってもよい。

【０６６７】

メモリに記憶される各データセット内のストレージ識別子の数は、ストレージ識別子の種類に応じて変動しうる。たとえば、複数の標識生体分子ストレージ識別子を有するメモリに記憶されるデータセットは、１０以上の標識生体分子ストレージ識別子、たとえば２５以上、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、標識生体分子ストレージ識別子を含みうる。複数の生体分子または活性化生体分子を有するメモリに記憶されるデータセットは、２５以上の生体分子または活性化生体分子ストレージ識別子、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、生体分子または活性化生体分子ストレージ識別子を含みうる。複数の標識または活性化標識ストレージ識別子を有するメモリに記憶されるデータセットは、５以上の標識または活性化標識ストレージ識別子、たとえば１０以上、たとえば１５以上、たとえば２５以上で、５０以上も含まれる、標識または活性化標識ストレージ識別子を含みうる。いくつかの実施形態では、複数の反応性リンカーを有するメモリに記憶されるデータセットは、２つ以上の反応性リンカーストレージ識別子、たとえば３つ以上、たとえば５つ以上、たとえば１０以上、たとえば１５以上の反応性リンカーストレージ識別子を含む。

【０６６８】

メモリは、入力マネージャが受けたリクエストに対応するデータセットから１つまたは複数のストレージ識別子を識別する処理モジュールと作動的に通信している。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬に対応するリクエストは、標識生体分子リクエストであり、処理モジュールは、複数の生体分子ストレージ識別子を有するメモリ中のデータセットから標識生体分子ストレージ識別子を識別する。別の実施形態では、標識生体分子試薬に対するリクエストは、生体分子リクエストと標識リクエストを含み、処理モジュールは、以下：１）複数の生体分子ストレージ識別子を有するメモリ中の第１データセットからの生体分子ストレージ識別子と；２）複数の標識ストレージ識別子を有するメモリ中の第２データセットからの標識ストレージ識別子と、を識別する。また別の実施形態では、標識生体分子試薬のリクエストは、生体分子リクエストと、標識リクエストと反応性リンカーリクエストとを含み、処理モジュールは、以下：１）複数の生体分子ストレージ識別子を有するメモリ中の第１データセットからの生体分子ストレージ識別子と；２）複数の標識ストレージ識別子を有するメモリ中の第２データセットからの標識ストレージ識別子と；３）複数の反応性リンカーストレージ識別子を有するメモリ中の第３データセットからの反応性リンカーストレージ識別子と、を識別する。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。

【０６６９】

標識生体分子リクエスト、生体分子リクエスト、標識リクエスト、活性化生体分子リクエスト、活性化標識リクエストまたは反応性リンカーリクエストに対応する特定のストレージ識別子が入手できない（すなわち、メモリ中のいずれのデータセットからも処理モジュールによって識別することができない）場合、メモリは、代替的標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカーについての推奨を提供するアルゴリズムを含みうる。推奨は、リクエストされた標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカーとの化学構造、反応性、プローブ標的、結合親和性、標的存在量、標的密度、標的クロストーク、サイズ、価格などの類似性に基づいてなされうる。メモリは、リクエスされた構成要素および入手可能な標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカー同士の類似性に応じて、１つまたは複数の代替物、たとえば２つ以上の代替物、たとえば５つ以上の代替物を含め、３つ以上の代替物の推奨を提供するように構成されうる。

【０６７０】

処理モジュールは、Ｉｎｔｅｌ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ製プロセッサ、Ｓｕｎ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ製のＳＰＡＲＣ（登録商標）プロセッサなどの市販のプロセッサを含むか、または現在入手可能か、もしくは将来入手可能になる他のプロセッサの１つであってもよい。

【０６７１】
プロセッサは、オペレーティングシステムを実行するが、これは、たとえば、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ製のＷＩＮＤＯＷＳ（登録商標）タイプのオペレーティングシステム；Ｕｎｉｘ（登録商標）もしくはＬｉｎｕｘタイプのオペレーティングシステム、または将来のオペレーティングシステム；あるいはこれらいずれかの組合せであってもよい。オペレーティングシステムは、ファームウェアおよびハードウェアと公知の様式で連動し、当技術分野で公知のように、Ｊａｖａ、Ｐｅｒｌ、Ｃ＋＋、その他の高水準もしくは低水準言語、ならびにそれらの組合せなどの多様なプログラミング言語で書かれうる多様なコンピュータプログラムの機能を調整および実行する上でプロセッサを促進する。オペレーティングシステムは、典型的にプロセッサと共同して、コンピュータの他の構成要素の機能を調整および実行する。オペレーティングシステムはまた、スケジューリング、入力－出力制御、ファイルおよびデータ管理、メモリ管理、ならびに通信制御および関連サービスも提供し、これらは全て公知の技術に従う。

【０６７２】
対象のシステムの処理モジュールは、ハードウェアおよびソフトウェアの両方を含み、ここで、ハードウェア要素は、たとえば、サーバの形態で、１つまたは複数のプラットフォームの形態を取ってよく、これにより、機能エレメント、すなわち、システムの特定のタスク（たとえば、情報の入力および出力管理、情報の処理など）を実施するシステムのエレメントが、システムの表示された１つまたは複数のコンピュータプラットフォーム上および全体で、ソフトウェアアプリケーションの実行により実施されることができるようにする。対象のシステムに存在する１つまたは複数のプラットフォームは、あらゆるタイプの公知のコンピュータプラットフォームまたは将来開発されるタイプであってよいが、これらは、典型的に、一般にサーバと呼ばれるクラスのコンピュータでありうる。

【０６７３】
しかしながら、これらは、メインフレームコンピュータ、ワークステーション、または他のコンピュータタイプであってもよい。これらは、任意の既知もしくは将来のタイプのケーブル配線、またはネットワーク化もしくはそれ以外の無線システムをはじめとする他の通信システムを介して接続されうる。これらは、共同設置されても、または物理的に離れていてもよい。恐らく、選択されたコンピュータプラットフォームのタイプおよび／または構造に応じて、コンピュータプラットフォームのいずれかで、様々なオペレーティングシステムを使用することができる。適切なオペレーティングシステムとして、ＷＩＮＤＯＷＳ ＮＵＣＬＥＯＴＩＤＥＳ（登録商標）、Ｓｕｎ Ｓｏｌａｒｉｓ、Ｌｉｎｕｘ、ＯＳ／４００、Ｃｏｍｐａｑ Ｔｒｕ６４ Ｕｎｉｘ、ＳＧＩ ＩＲＩＸ、Ｓｉｅｍｅｎｓ Ｒｅｌｉａｎｔ Ｕｎｉｘおよびその他が挙げられる。中でも、拡張可能かつ安全な構成要素のインプリメンテーションを増強するアプリケーションプログラミングインターフェース（ＡＰＩ）のスイートを提供するために、Ｓｕｎ Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ．製のＪａｖａ（商標）２プラットフォームなどの他の開発製品を対象のシステムのプロセッサに使用してもよい。当業者には理解されるように、様々な他のソフトウェア開発アプローチまたはアーキテクチャを用いて、システムの機能エレメントおよびそれらの相互接続をインプリメントしてもよい。

【０６７４】
本開示のシステムは、処理モジュールからの識別されたストレージ識別子を提供する出力マネージャも含む。いくつかの実施形態では、出力マネージャは、電子ディスプレイを含み、識別されたストレージ識別子は、電子ディスプレイ上に出力される。１つまたは複数のストレージ識別子、たとえば２つ以上、たとえば３つ以上、たとえば５つ以上、たとえば１０以上、たとえば２５以上、たとえば１００以上で、５００以上も含まれる、ストレージ識別子が電子ディスプレイ上に同時に出力されうる。出力マネージャは、単独のユーザ、または複数のユーザ、たとえば２人以上のユーザ、たとえば５人以上のユーザ、たとえば１０人以上のユーザ、たとえば１００人以上のユーザを含め、２５人以上のユーザからの標識生体分子試薬リクエストのストレージ識別子を表示しうる。出力マネージャは

、ユーザによる、またはストレージ識別子の種類（たとえば、標識生体分子ストレージ識別子、生体分子ストレージ識別子、標識ストレージ識別子、反応性リンカーストレージ識別子）による、標識生体分子に対する各リクエストに応じて、ストレージ識別子を分類するなど、要望通りに、表示されるストレージ識別子を整理するように構成されうる。別の実施形態では、出力マネージャは、プリンタを含み、識別されたストレージ識別子は、対人可読媒体（紙）上に、または機械可読フォーマットとして（たとえば、バーコードとして）印刷される。

【０６７５】

いくつかの実施形態では、出力マネージャは、処理モジュールによりアセンブルされたストレージ識別子、たとえば、電子フォーマットの１つ以上の標識生体分子ストレージ識別子、生体分子ストレージ識別子、標識ストレージ識別子、反応性リンカーストレージ識別子を、たとえばローカルエリアネットワークまたはインターネットなどを通じてユーザに伝達する。出力マネージャによるデータの電子通信は、限定されないが、ＳＱＬ、ＨＴＭＬもしくはＸＭＬドキュメント、電子メールもしくは他のファイル、またはその他の形態のデータを含む一般的プロトコルに従ってインプリメントされうる。

【０６７６】

データはまた、ユーザが、さらに別のＳＱＬ、ＨＴＭＬ、ＸＭＬ、または他のドキュメントもしくはデータをリモートソースから検索できるように、インターネットＵＲＬアドレスを含んでもよい。

【０６７７】

標識生体分子試薬リクエストを入力し、標識生体分子試薬リクエストの構成要素に対応する複数のストレージ識別子を記憶し、１つまたは複数のストレージ識別子を識別し、識別されたストレージ識別子を出力するための本開示のシステムは、コンピュータを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に開示する方法およびプログラムの機能的配置に汎用コンピュータを構成することができる。こうしたコンピュータのハードウェアアーキテクチャは、当業者には公知であり、１つまたは複数のプロセッサ（ＣＰＵ）、ランダムアクセスメモリ（ＲＡＭ）、リードオンリーメモリ（ＲＯＭ）、内部および外部データストレージ媒体（たとえば、ハードディスクドライブ）をはじめとするハードウェア構成機器を含みうる。コンピュータシステムは、図形情報を処理し、ディスプレイ手段に出力するための１つまたは複数のグラフィックボードも含みうる。

【０６７８】

前述の構成機器は、好適には、コンピュータ内部でバスを介して相互に接続することができる。コンピュータは、汎用外部構成機器と通信するための好適なインターフェース、たとえば、モニター、キーボード、マウス、ネットワークなどをさらに含みうる。いくつかの実施形態では、コンピュータは、本方法およびプログラムのための処理能力を増大する目的で、並列処理が可能であってもよいし、または並列もしくは分散コンピューティングのために構成されたネットワークの一部であってもよい。いくつかの実施形態では、記憶媒体内から読み出されたプログラムコードは、コンピュータ内に挿入された増設ボード、またはコンピュータに接続された増設ユニット内に設けられたメモリ中に書き込まれ、増設ボードまたは増設ユニット内に設けられたＣＰＵなどは、プログラムコードの指示に従うオペレーションの一部もしくは全部を実際に実施することができるため、後述する機能を達成することができる。別の実施形態では、本方法は、クラウド計算システムを用いて実施することができる。これらの実施形態では、データファイルおよびプログラミングは、プログラムを実施して、出力をユーザに戻すクラウドコンピュータにエクスポートすることができる。

【０６７９】

システムは、いくつかの実施形態において、以下：ａ）中央処理装置と；ｂ）ソフトウェアおよびデータを記憶するための、１つもしくは複数のハードドライブを含みうるメイン不揮発性記憶ドライブであって、記憶ドライブが、ディスクコントローラにより制御される、メイン不揮発性記憶ドライブと；ｃ）不揮発性記憶ドライブからロードされたプロ

グラムおよびデータをはじめとする、システム制御プログラム、データ、およびアプリケーションプログラムを記憶するためのシステムメモリ、たとえば、高速ランダムアクセスメモリ（ＲＡＭ）であって、読み取り専用メモリ（ＲＯＭ）も含みうるシステムメモリと；ｄ）マウス、キーパッド、およびディスプレイなどの１つまたは複数の入力もしくは出力装置をはじめとするユーザインターフェース；ｅ）有線または無線通信ネットワーク、たとえば、プリンタなどに接続するための任意選択のネットワークインターフェースカードと；ｆ）前述したシステムのエレメントと相互接続するための内部バスと、を含むコンピュータを含みうる。

【０６８０】

コンピュータシステムのメモリは、プロセッサによる検索のための情報を記憶することができる任意のデバイスであってよく、磁気もしくは任意選択のデバイス、またはソリッドステートメモリデバイス（たとえば、揮発性もしくは不揮発性ＲＡＭ）を含みうる。メモリまたはメモリユニットは、同じもしくは異なるタイプの２つ以上の物理メモリデバイスを含む（たとえば、メモリは、複数のドライブ、カード、もしくは複数のソリッドステートメモリデバイスまたはこれらのいずれかの組合せなどの複数のメモリデバイスを有しうる）。コンピュータ可読媒体に関して、「固定メモリ」は、永続的なメモリを指す。

【０６８１】

固定メモリは、コンピュータまたはプロセッサに対する電気供給の停止によって消去されない。コンピュータハードドライブＲＯＭ（すなわち、仮想メモリとして使用されないＲＯＭ）、ＣＤ－ＲＯＭ、フロッピーディスクおよびＤＶＤは全て、固定メモリの例である。ランダムアクセスメモリ（ＲＡＭ）は、非固定（すなわち、揮発性）メモリの一例である。固定メモリ内のファイルは、編集可能および書換え可能であってよい。

【０６８２】

コンピュータのオペレーションは、主にオペレーティングシステムによって制御され、これは、中央処理装置により実行される。オペレーティングシステムは、システムメモリ内に記憶することができる。いくつかの実施形態では、オペレーティングシステムは、ファイルシステムを含む。オペレーティングシステム以外に、システムメモリの１つの可能なインプリメンテーションは、後述する方法を実現するための多様なプログラミングファイルおよびデータファイルを含む。いくつかの実施形態では、プログラミングは、１プログラムを含みうるが、このプログラムは、様々なモジュールとユーザインターフェースモジュールとから構成されうるが、ユーザインターフェースモジュールは、ユーザが、プログラムへの入力、またはプログラムにより使用されるパラメータを手動で選択もしくは変更することを可能にする。データファイルは、プログラムに対する様々な入力を含みうる。

【０６８３】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載する方法に従う指示は、「プログラミング」の形態でコンピュータ可読媒体にコード化することができ、ここで、「コンピュータ可読媒体」という用語は、本明細書で用いられる場合、指示および／またはデータを、実行および／または処理のためにコンピュータに供給することに参加するあらゆる記憶または伝送媒体を指す。記憶媒体の例として、そうしたデバイスがコンピュータに対して内部もしくは外部であるかにかかわらず、フロッピーディスク、ハードディスク、光ディスク、光磁気ディスク、ＣＤ－ＲＯＭ、ＣＤ－Ｒ、磁気テープ、不揮発性メモリカード、ＲＯＭ、ＤＶＤ－ＲＯＭ、ブルーレイディスク、ソリッドステートディスク、およびネットワーク接続ストレージ（ＮＡＳ）が挙げられる。情報を含むファイルは、コンピュータ可読媒体に「記憶する」ことができ、ここで、「記憶する」とは、情報を記録して、それが後日コンピュータによりアクセス可能かつ検索可能であるようにすることを意味する。

【０６８４】

本明細書に記載されるコンピュータインプリメント方法は、任意の数のコンピュータプログラミング言語の１つまたは複数で書かれうるプログラムを用いて実行することができる。こうした言語として、たとえば、Ｊａｖａ（Ｓｕｎ　Ｍｉｃｒｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉ

ｎｃ．，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）、Ｖｉｓｕａｌ Ｂａｓｉｃ（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｃｏｒｐ．，Ｒｅｄｍｏｎｄ，ＷＡ）、およびＣ＋＋（ＡＴ＆Ｔ Ｃｏｒｐ．，Ｂｅｄｍｉｎｓｔｅｒ，ＮＪ）、他多数を含む。

【０６８５】

任意の実施形態において、データは、「遠隔地」に転送することができ、ここで、「遠隔地」とは、プログラムが実行される位置以外の位置を意味する。

【０６８６】

たとえば、遠隔地は、同じ市内の別の位置（たとえば、オフィス、研究所など）、異なる市内の別の位置、異なる州内の別の位置、異なる国内の別の位置などでありうる。従って、１つの項目が別の項目から「リモート」であると示される場合、２つの項目が、同じ室内にあるが、離れている、または少なくとも異なる部屋もしくは異なる建物内に存在する可能性があり、さらには、少なくとも１マイル、１０マイル、または少なくとも１００マイル離れている可能性があることを意味する。情報を「伝達する」とは、好適な通信チャンネル（たとえば、民間もしくは公共ネットワーク）を通じて、電気信号としてその情報を呈示するデータを伝送することを示す。項目を「転送する」とは、その項目を物理的に輸送するか、またはそれ以外（それが可能である場合）によるかのいずれにかかわらず、項目をある位置から次の位置に移動させる任意の手段を指し、少なくともデータの場合、データを保有する媒体を物理的に輸送するか、またはデータを通信することを含む。通信媒体の例として、無線または赤外線伝送チャンネル、ならびに別のコンピュータもしくはネットワークデバイスとのネットワーク接続、およびインターネットまたは電子メール伝送およびウェブサイトに記録された情報などが挙げられる。

【０６８７】

いくつかの実施形態は、単一コンピュータで、またはコンピュータのネットワークを介して、またはコンピュータのネットワークのネットワークを介して、たとえば、ネットワーククラウドを介して、ローカルエリアネットワークを介して、ハンドヘルドコンピュータデバイスなどでのインプリメンテーションを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載する工程の１つまたは複数は、コンピュータプログラムでインプリメントされる。こうしたコンピュータプログラムは、本明細書に記載する工程の１つまたは複数を実行する。いくつかの実施形態では、対象の方法の履行は、本明細書に記載され、コンピュータ可読媒体でコード化されると共に、通信ネットワークを通じて伝送可能である様々なデータ構造、カテゴリー、および修飾子を含む。

【０６８８】

本発明のソフトウェア、ウェブ、インターネット、クラウド、またはその他の記憶およびコンピュータネットワークインプリメンテーションは、様々な割当、計算、識別、スコアリング、アクセス、生成または廃棄工程を実施するための標準的なプログラミング技術を用いて達成することができる。

【０６８９】

図１６は、いくつかの実施形態に従う本開示のコンピュータシステム１６００を描く。コンピュータシステムは、ユーザインターフェース１６０１を含み、これは、標識生体分子試薬リクエストを入力するためのキーボード１６０１ａ、マウス１６０１ｂおよびモニター１６０１ｃを含む。ユーザインターフェース１６０１は、メモリ１６０２に作動的に接続され、メモリ１６０２は、オペレーティングシステム１６０２ａ、システムファイル１６０２ｂおよびデータセットを含み、データセットは、標識生体分子試薬リクエストの構成要素：１）標識生体分子リクエスト１６０２ｄ；２）生体分子リクエスト１６０２ｅ；３）標識リクエスト１６０２ｆ；４）活性化生体分子リクエスト１６０２ｇ；５）活性化標識リクエスト１６０２ｈ；および６）反応性リンカーリクエスト１６０２ｉに対応する複数のストレージ識別子を含む。メモリ１６０２はまた、標識生体分子リクエスト１６０２ｋ、生体分子１６０２ｌ、標識１６０２ｍおよび反応性リンカー１６０２ｎの検索可能な目録一覧を含むデータベース１６０２ｊも含む。一部の実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。

【０６９０】
メモリおよびユーザインターフェースは、ディスクコントローラ１６０５に制御される記憶ドライブ１６０６を含む接続１６０４を介して、プロセッサ１６０３に作動的に接続されている。前述したように、プロセッサは、入力マネージャが受けたリクエストに対応するデータセットから１つまたは複数のストレージ識別子を識別する。
【０６９１】
識別されたストレージ識別子を出力するために、この実施形態に従う目的のシステムは、ストレージ識別子を出力するネットワークインターフェースコントローラ１６０７を含む。ネットワークインターフェースコントローラ１６０７は、識別されたストレージ識別子を視覚的に表示するための電子ディスプレイと連動してもよいし、または識別されたストレージ識別子を対人可読媒体（紙）上に、もしくは機械可読フォーマットで（たとえば、バーコードとして）表示するためのプリンタと連動してもよい。いくつかの実施形態では、ネットワークインターフェースコントローラ１６０７は、ストレージ識別子を電子フォーマットで、たとえばローカルエリアネットワークもしくはインターネットを介して伝達し、これは、限定されないが、ＳＱＬ、ＨＴＭＬもしくはＸＭＬドキュメント、電子メールもしくは他のファイル、またはその他の形態のデータをはじめとする任意の電子フォーマットに従ってインプリメントされうる。
【０６９２】
図１７は、いくつかの実施形態に従う標識生体分子試薬に対するリクエストを受け、処理し、出力する工程系統図１７００を示す。リクエストを受けて、処理する工程１７０１は、標識生体分子試薬リクエストの１つまたは複数の構成要素を入力する工程（１７０２）から開始する。上記のように、標識生体分子試薬リクエストは、１）標識生体分子リクエストと；２）生体分子リクエストおよび標識リクエストの１つまたは複数を含みうる。いくつかの実施形態では、生体分子リクエストは、活性化生体分子リクエストであり、ここで、生体分子は、反応性リンカーに接続されている。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、活性化標識リクエストであり、ここで、標識は、反応性リンカーに接続されている。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。
【０６９３】
いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含みうる。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つに特異的に結合することができる。
【０６９４】
いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。
【０６９５】
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みう

る。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０６９６】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０６９７】

システムが標識生体分子試薬リクエストを受けた後、プロセッサが、リクエストの構成要素（すなわち、標識生体分子リクエスト；または生体分子リクエストと標識リクエスト）を決定し、システムは、特定のリクエストに対応するストレージ識別子のメモリを検索する（１７０３）。適切なデータセットが受け取られると、処理モジュールは、標識生体分子試薬リクエストの構成要素と対応する１つまたは複数のストレージ識別子を識別する（１７０４）。２つ以上の標識生体分子試薬リクエストが単一のユーザによって入力される場合、システムは、プロセッサによりユーザのリクエストからの全てのストレージ識別子が配置され、識別されるまで、上記の工程を繰り返しうる（１７０５）。

【０６９８】

システムは、一旦ユーザからの標識生体分子試薬リクエストが処理されたら、識別されたストレージ識別子を出力する（１７０６）ように構成されている。出力マネージャは、ストレージ識別子を電子ディスプレイ上に表示するか、またはストレージ識別子を印刷する（１７０７）。また、たとえば試薬調製装置に、またはインターネットを介してストレージ識別子をサードパーティーメーカに電子伝達する（１７０８）こともできる。

【０６９９】

いくつかの実施形態では、システムは、入力マネージャが受けたリクエスされた標識生体分子に対応する標識生体分子試薬を調製するための試薬調製装置を含む。試薬調製装置は、出力マネージャに作動的に接続され、識別されたストレージ識別子（たとえば、標識生体分子ストレージ識別子、生体分子ストレージ識別子、標識ストレージ識別子、反応性リンカーストレージ識別子）を受け取り、受け取ったストレージ識別子に従い、標識生体分子試薬を生成するように構成される。これらの実施形態では、試薬調製装置は、局所的に、たとえばケーブルもしくはローカルエリアネットワークを通じて出力マネージャと通信してもよいし、または遠隔地にあって、ワイドエリアネットワークもしくはインターネットを介して出力マネージャと接続されていてもよい。試薬調製装置および出力マネージャ同士のコネクティビティを促進するために、システムは、ケーブル、トランスミッタ、中継局、ネットワークサーバ、ネットワークインターフェースカード、イーサネット（Ｅｔｈｅｒｎｅｔ）モデム、電話ネットワーク接続ならびに衛星ネットワーク接続などのいずれかの好適なコネクティビティ・プロトコルを含みうる。いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、グラフィカルユーザインターフェースを含み、ここで、出力マネージャからのストレージ識別子は、試薬調製装置のグラフィカルユーザインターフェースに作動的に接続された入力マネージャ中に手動で入力される。

【０７００】

いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、完全に自動化されている。

【０７０１】

「完全に自動化された」とは、試薬調製装置が、出力マネージャから識別されたストレージ識別子を受け取り、人の介入または対象システムへの手動の入力をほとんどもしくは全く伴わずに、標識生体分子試薬を調製、製剤化およびパッケージングすることを意味する。いくつかの実施形態では、対象システムは、一切人の介入なしに、活性化生体分子と活性化標識から標識生体分子試薬を調製、精製およびパッケージングするように構成され

る。

【０７０２】

試薬調製装置は、活性化生体分子および活性化標識を接触装置に供給するサンプリング装置を含む。サンプリング装置は、活性化生体分子および活性化標識の各々の供給源と流体連通したいずれか好都合な装置、たとえば、活性化生体分子および活性化標識を含有する複数の試薬バイアルを有するハイスループットサンプル交換器などであってよい。サンプリング装置はまた、種々のサンプリング装置の中でも、マイクロ流路、シリンジ、針、ピペット、吸引器も含みうる。接触装置は、活性化生体分子が活性化標識と接触することを可能にするいずれの好適な装置であってもよい。たとえば、いくつかの実施形態では、接触装置は、サンプルチャンバー（たとえば、封入、密封、気密、開放、プレートなど）である。別の実施形態では、接触装置は、マイクロチューブである。別の実施形態では、接触装置は、試験管である。また別の実施形態では、接触装置は、ガラス製フラスコ（たとえば、ビーカ、メスフラスコ、三角フラスコなど）である。さらに別の実施形態では、接触装置は、９６ウェルプレートである。いくつかの実施形態では、対象システムは、接触装置（たとえば、マイクロチューブ、試験管など）内に生成された標識生体分子試薬を密封するように構成されたパッケージングユニットをさらに含んでもよい。他の実施形態では、生成された標識生体分子試薬は、まず特性決定され、さらに精製、希釈、濃縮または再製剤化された後、容器内に密封されて、パッケージングユニットによりパッケージングされる。

【０７０３】

接触装置は、組み合わされた活性化生体分子および活性化標識を混合するための攪拌機をさらに含みうる。攪拌機は、対象組成物を混合するのに十分ないずれの好都合な攪拌機であってもよく、こうしたものとして、限定されないが、種々の攪拌プロトコルの中でも、ボルテキサー、超音波発生機、振盪機（たとえば、手動、機械、または電動振盪機）、ロッカー、振動平板、マグネチックスターラ、スタティックミキサ、ローテータ、ブレンダー、ミキサー、タンブラー、オービタルシェーカ、バブル、マイクロ流体フローが挙げられる。

【０７０４】

いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、活性化生体分子と活性化標識の供給源も含む。供給源は、複数の活性化生体分子と活性化標識を含みうる。いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、５以上の異なる種類の活性化生体分子、たとえば１０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、異なる種類の活性化生体分子を含有する供給源を含む。たとえば、試薬調製装置は、５以上の異なる種類の活性化抗体プローブもしくは活性化オリゴヌクレオチドプローブ、たとえば１０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、異なる種類の活性化抗体プローブもしくは活性化オリゴヌクレオチドプローブを含有する供給源を含みうる。

【０７０５】

いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、５以上の異なる種類の活性化標識、たとえば１０以上、たとえば１５以上、たとえば２５以上、たとえば５０以上で、１００以上も含まれる、異なる種類の活性化標識を含有する供給源を含む。たとえば、試薬調製装置は、５以上の異なる種類の活性化蛍光団、たとえば１０以上、たとえば１５以上、たとえば２５以上、たとえば５０以上、１００以上も含まれる、異なる種類の活性化蛍光団を含有する供給源を含みうる。

【０７０６】

活性化生体分子および活性化標識の供給源は、１つ以上の活性化生体分子および活性化標識を貯蔵し、これらを接触装置に供給することができる任意の好適な貯蔵器であってよい。一例において、供給源は、複数の異なる種類の活性化生体分子および活性化標識を個別の仕切られた試薬チャンバー内に貯蔵する単一のハイスループット貯蔵器である。別の例では、活性化生体分子および活性化標識の供給源は、活性化生体分子および活性化標識

各々の複数の個別のバイアルである。また別の例では、活性化生体分子および活性化標識の供給源は、各活性化生体分子および各活性化標識の予め計測されたアリコートを含む貯蔵器である。たとえば、貯蔵器は、１つ以上の標識生体分子、たとえば２つ以上、たとえば５つ以上、たとえば１０以上、たとえば２５以上、たとえば１００以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、標識生体分子を調製するのに十分な各活性化生体分子および各活性化標識の予め計測されたアリコートを含みうる貯蔵器である。

【０７０７】

活性化生体分子および活性化標識を含有する貯蔵器の具体的な設計に応じて、試薬調製装置は、活性化生体分子および活性化標識を接触装置に送達するための１つまたは複数の注入口をさらに含みうる。

【０７０８】

試薬調製装置はまた、１つ以上の試薬精製器を含んでもよい。目的の試薬精製プロトコルとしては、限定されないが、種々の精製プロトコルの中でも、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、濾過（たとえば、膜フィルター、サイズカットオフ濾過）、液液抽出、受動透析、能動透析、遠心分離、沈殿を挙げることができる。

【０７０９】

試薬調製装置は、さらに、試薬分析装置を含んでもよい。いくつかの実施形態では、サンプル分析装置は、マスサイトメトリー、質量分析法（たとえば、ＴＯＦ質量分析法、誘導結合親和性プラズマ質量分析法）、吸光分析法、蛍光分析法、容量分析、伝導度分析、核磁気共鳴分光法、赤外分光法、紫外可視分光法、比色分析、元素分析、液体クロマトグラフィー－質量分析法またはガスクロマトグラフィー－質量分析システムであってよい。たとえば、調製装置は、液体クロマトグラフ（ＬＣ）などの分析分離装置を含んでもよく、そうしたものとして、高性能液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）、ミクロもしくはナノ－液体クロマトグラフまたは超高圧液体クロマトグラフ（ＵＨＰＬＣ）装置、キャピラリー電気泳動（ＣＥ）、またはキャピラリー電気泳動クロマトグラフ（ＣＥＣ）装置が挙げられる。しかし、任意の手動もしくは自動噴射または吐出しポンプシステムを使用してもよい。たとえば、いくつかの実施形態では、ナノ－またはマイクロポンプを使用することによって、対象サンプルをＬＣ－ＭＳシステムに適用してもよい。質量分析システムは、いずれの好都合な質量分析システムであってもよく、一般に、サンプルをイオン化するためのイオン源と、イオンを分離するための質量分析計と、イオンを検出するための検出器とを含む。いくつかの実施形態では、質量分析計は、前駆イオンを単離し、前駆イオンをフラグメント化して、フラグメント化された前駆イオンを分析することができる、いわゆる「タンデム」質量分析計であってよい。イオン供給源は、いずれのタイプのイオン化方法であってもよく、そうしたものとして、限定されないが、たとえば、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）、大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ）、電子衝撃（ＥＩ）、大気圧光イオン化（ＡＰＰＩ）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）もしくは誘導結合プラズマ（ＩＣＰ）イオン化、またはこれらの任意の組合せ（いわゆる「マルチモード」イオン化供給源を提供するために）が挙げられる。一実施形態では、前駆イオンは、ＥＩ、ＥＳＩもしくはＭＡＬＤＩにより製造され、選択された前駆イオンは、衝突によって、または光子を用いてフラグメント化して、生成物イオンを生成することができ、そのイオンを分析する。同様に、様々な異なる質量分析計のいずれを使用してもよく、そうしたものとして、飛行時間（ＴＯＦ）、フーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴（ＦＴＩＣＲ）、イオントラップ、四重極型もしくは二重収束電磁場セクター質量分析計、またはこれらの任意のハイブリッドが挙げられる。一実施形態では、質量分析計は、セクター、透過型四重極、または飛行時間質量分析計であってよい。

【０７１０】

試薬調製装置は、さらに、緩衝液、防腐剤、乾燥剤などの１つ以上の賦形剤と一緒に標識生体分子試薬を製剤化するように構成してもよい。いくつかの実施形態では、試薬調製装置は、１つ以上の緩衝液と一緒に標識生体分子試薬を製剤化するように構成される。

【０７１１】
例示的な緩衝液として、限定されないが、種々の緩衝液の中でも、ＰＢＳ（リン酸塩）緩衝液、酢酸塩緩衝液、Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）グリシン（Ｂｉｃｉｎｅ）緩衝液、３－｛［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］アミノ｝プロパンスルホン酸（ＴＡＰＳ）緩衝液、２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液、クエン酸塩緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン（Ｔｒｉｓ）緩衝液、Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（Ｔｒｉｃｉｎｅ）緩衝液、３－［Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ］－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸（ＴＡＰＳＯ）緩衝液、４，２－ヒドロキシエチル－１－ピペラジンエタンスルホン酸（ＨＥＰＥＳ）緩衝液、２－｛［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］アミノ｝エタンスルホン酸（ＴＥＳ）緩衝液、ピペラジン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－エタンスルホン酸）（ＰＩＰＥＳ）緩衝液、ジメチルアルシン酸（Ｃａｃｏｄｙｌａｔｅ）緩衝液、クエン酸ナトリウム食塩（ＳＳＣ）緩衝液、２（Ｒ）－２－（メチルアミノ）コハク酸（コハク酸）緩衝液、リン酸カリウム緩衝液、Ｎ－シクロヘキシル－２－アミノエタンスルホン酸（ＣＨＥＳ）緩衝液が挙げられる。
【０７１２】
試薬調製装置は、さらに、標識生体分子試薬をパッケージングするためのパッケージングユニットも含みうる。いくつかの実施形態では、パッケージングユニットは、調製された標識生体分子試薬をパッケージングして、郵便などによる発送のための標識生体分子試薬を用意することができる。いくつかの実施形態では、調製された標識生体分子試薬は、容器に分注されて、密封される。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬は、容器に分注され、密封された後、ポーチ、バッグ、チューブ、バイアル、マイクロチューブ、またはボトルなどにパッケージングされる。要望されれば、パッケージングは、滅菌されていてもよい。
【０７１３】
いくつかの実施形態では、目的のシステムは、以下：１）標識生体分子試薬の１つまたは複数のリクエストを受け；２）リクエストされた標識生体分子試薬を調製し、３）調製された標識生体分子試薬をリクエスター（たとえば、顧客）に配達するように構成された、オンデマンドスタンドアローン型標識生体分子試薬分注ステーションを含む。たとえば、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、自動販売機であってもよく、これは、顧客から１つまたは複数の標識生体分子試薬リクエストを受け；リクエスされた標識生体分子を調製し、調製された標識生体分子をオンデマンドで顧客に販売するように構成されている。標識生体分子試薬リクエストの数およびリクエストされた各標識生体分子試薬の量に応じて、目的のスタンドアローン型試薬分注ステーションは、標識生体分子リクエストの入力から１０秒以上、たとえば１５秒以上、たとえば３０秒以上、たとえば１分以上、たとえば５分以上、たとえば１０分以上、たとえば１５分以上、たとえば３０分以上、たとえば６０分以上、たとえば１．５時間以上、たとえば２時間以上、たとえば２．５時間以上、たとえば３時間以上、たとえば４時間以上、たとえば５時間以上、たとえば６時間以上、たとえば８時間以上、たとえば１０時間以上、たとえば１２時間以上、たとえば１６時間以上、たとえば１８時間以上で、２４時間以上も含まれる時間内に、標識生体分子をオンデマンドで調製して、リクエスターに販売することができる。いくつかの実施形態では、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、５秒～６０秒の範囲、たとえば１０秒～５０秒で、１５秒～４５秒も含まれる範囲の時間内に、標識生体分子をオンデマンドで調製して、リクエスターに販売するように構成される。いくつかの実施形態では、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、１分～６０分の範囲、たとえば２分～５５分、たとえば５分～５０分、たとえば１５分～４５分の範囲で、２０分～４０分も含まれる範囲の時間内に、標識生体分子をオンデマンドで調製して、リクエスターに販売するように構成され、たとえば、３０分で標識生体分子を調製して、リクエスターに販売する。また別の実施形態では、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、０．５時間～２４時間の範囲、たとえば１時間～２０時間、たとえば１．５時間～１８時間、たとえば２時間～

１６時間、たとえば２．５時間～１２時間、たとえば３時間～１０時間、たとえば３．５時間～８時間で、４時間～６時間も含まれる範囲の時間内に、標識生体分子をオンデマンドで調製して、リクエスターに販売するように構成される。

【０７１４】

これらの実施形態では、対象のスタンドアローン型試薬分注ステーションは、前述のように、標識生体分子試薬リクエストを受けて、リクエストされた標識生体分子試薬を調製する構成要素を含みうる。たとえば、スタンドアローン型標識生体分子試薬分注ステーションは、標識生体分子のリクエストを受けるための入力モジュールと；試薬調製装置と；パッケージングされた標識生体分子を出力するための分注モジュールとを含みうる。これらの実施形態では、入力モジュールは、標識生体分子試薬のリクエストを受ける入力マネージャと、標識生体分子試薬リクエスト（たとえば、生体分子、標識など）の１つ以上の構成要素に対応する複数のストレージ識別子を有するデータセットを記憶するメモリと、メモリに通信可能に接続され、かつデータセットから、標識生体分子試薬リクエストの構成要素に対応するストレージ識別子を識別するように構成された処理モジュールと、識別されたストレージ識別子を付与する出力マネージャと、を含みうる。スタンドアローン型ステーションはまた、前述したように、スタンドアローン型分注ステーションの入力マネージャに、標識生体分子リクエストを伝達するためのグラフィカルユーザインターフェースならびにユーザ入力デバイスも含む。

【０７１５】

いくつかの実施形態では、出力マネージャは、スタンドアローン型試薬分注ステーション内の試薬調製装置と通信可能に接続されており、これは、生体分子、標識、反応性リンカー、活性化生体分子および活性化標識の１つ以上の供給源、ならびに活性化生体分子および活性化標識を結合させて、リクエスされた標識生体分子を生成するための接触ステーションと一緒に構成される。いくつかの実施形態では、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、複数の予め合成された標識生体分子を含み、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、所定量の予め合成された標識生体分子試薬を容器中に等分して、標識生体分子試薬をリクエスターに販売するように構成されている。

【０７１６】

スタンドアローン型標識生体分子試薬分注ステーションは、パッケージングされた標識生体分子試薬を提供するように構成された分注モジュールも含む。いくつかの実施形態では、分注モジュールは、調製された標識生体分子試薬をパッケージングするためのパッケージングユニットを含みうる。いくつかの実施形態では、調製された標識生体分子試薬は、容器中に分注され、密封される。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬は、容器中に分注され、密封された後、ポーチ、バッグ、チューブ、バイアル、マイクロチューブ、またはボトルなどにパッケージングされる。要望されれば、パッケージングは、滅菌されていてもよい。

【０７１７】

いくつかの実施形態では、スタンドアローン型試薬分注ステーションは、完全に自動化されており、この場合、標識生体分子リクエスが受け取られると、ステーションは、人の介入または標識生体分子リクエスト以外の対象システムへの手動の入力をほとんどもしくは全く伴わずに、標識生体分子試薬を調製、精製およびパッケージングする。

【０７１８】

標識生体分子試薬を調製する方法

本開示のいくつかの態様は、標識生体分子試薬を調製する方法も含む。いくつかの実施形態に従う方法は、標識生体分子試薬のリクエストを受ける工程と、標識生体分子を調製する工程と、を含む。別の実施形態では、方法は、前述した１つ以上の入力マネージャによって標識生体分子試薬のリクエストを受ける工程と、標識生体分子試薬リクエストと一致するストレージ識別子を識別する工程と；１つ以上の識別されたストレージ識別子を出力する工程と、識別されたストレージ識別子から標識生体分子を調製する工程と、を含む。

【０７１９】
いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチドＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０７２０】
いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０７２１】
いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０７２２】
ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０７２３】
上記のように、標識生体分子試薬は、検出可能なマーカーに結合（たとえば、共有結合）した生体高分子である。いくつかの実施形態では、方法は、検出可能なマーカーに結合したポリペプチド、検出可能なマーカーに結合した核酸、検出可能なマーカーに結合した多糖、またはこれらの組合せを調製することを含む。一例では、生体分子は、オリゴヌクレオチド、短縮型もしくは完全長ＤＮＡまたはＲＮＡである。別の実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、タンパク質、酵素または抗体である。いくつかの実施形態では、生体分子は、目的の被検体に結合するのに十分な特異的結合ドメインを有する生物学的プローブである。目的の特異的結合ドメインとして、限定されないが、抗体結合剤、タンパク質、ペプチド、ハプテン、核酸などが挙げられる。本明細書で使用される「抗体結合剤」という用語は、目的の被検体に結合する上で十分なポリクローナルまたはモノクローナル抗体もしくはフラグメントを含む。抗体フラグメントは、たとえば、モノマーＦａｂフラグメント、モノマーＦａｂ’フラグメント、または二量体Ｆ（ａｂ）’２フラグメント、ならびに抗体操作により生成される分子、たとえば、重鎖および軽鎖の定常領域の置換によりキメラ抗体を生成するか、または定常領域と、可変領域のフレームワーク部分との両方の置換によりヒト化抗体を生成することによって、モノクローナル抗体から生成される一本鎖抗体分子（ｓｃＦｖ）またはヒト化もしくはキメラ抗体であってよい。

【０７２４】

目的の標識には、たとえば、蛍光発光、蛍光偏光、蛍光寿命、蛍光波長、吸収極大、吸収波長、ストークス（Ｓｔｏｋｅｓ）シフト、光散乱、質量、分子量、酸化還元、音波、ラマン（ｒａｍａｎ）、磁気、無線周波数、酵素反応（化学発光および電気－化学発光を含む）またはこれらの組合せに基づいて検出することができる検出可能なマーカーを含む。目的の標識として、限定されないが、蛍光団、発色団、酵素、酵素基質、触媒、レドックス標識、放射標識、音波標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ（たとえば、同位体として純粋な希土類元素）、磁気粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはこれらの任意の組合せが挙げられる。

【０７２５】

方法は、標識生体分子試薬のリクエストを受ける工程を含む。本開示の実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、１）標識生体分子リクエスト；および２）生体分子リクエストと標識リクエストの１つまたは複数を含む。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。いくつかの実施形態では、生体分子リクエストは、活性化生体分子リクエストであり、ここで、生体分子は、反応性リンカーに結合している。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、活性化標識リクエストであり、ここで、標識は、反応性リンカーに結合している。標識生体分子試薬リクエストは、任意の好都合な通信プロトコルによって受けることができ、こうしたものとして、限定されないが、電話により、ファクシミリ、電子メールまたは郵便により、標識生体分子試薬リクエストを受ける、が挙げられる。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、インターネットウェブサイトを介するなど、コンピュータでグラフィカルユーザインターフェースに標識生体分子試薬リクエストを入力することによって伝達される。

【０７２６】

１つ以上の標識生体分子試薬リクエストを（同時または順次）受けることができ、たとえば２つ以上の標識生体分子試薬リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば１０以上で、２５以上も含まれる、標識生体分子試薬リクエストを受けることができる。標識生体分子試薬のリクエストが、ただ１つの構成要素を含み、それが標識生体分子リクエストである場合、方法は、２つ以上の標識生体分子リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば１０以上で、２５以上も含まれる、標識生体分子リクエストを受ける工程を含みうる。標識生体分子試薬リクエストが、生体分子リクエストと標識リクエストなど、２つの構成要素を含む場合、方法は、２つ以上の生体分子リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば１０以上で、２５以上も含まれる、生体分子リクエストを受ける工程を含み、かつ、２つ以上の標識リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば１０以上で、２５以上も含まれる、標識リクエストを受けるように構成されうる。いくつかの実施形態では、方法は、単一の生体分子リクエストと単一の標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受ける工程を含む。いくつかの実施形態では、方法は、単一の生体分子リクエストと複数の異なる標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受ける工程を含む。またいくつかの実施形態では、方法は、複数の異なる生体分子リクエストと単一の標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受ける工程を含む。またいくつかの実施形態では、方法は、複数の異なる生体分子リクエストと複数の異なる標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを受ける工程を含む。

【０７２７】

標識生体分子試薬リクエストは、単一のユーザ、または複数のユーザ、たとえば２人以上のユーザ、たとえば５人以上のユーザ、たとえば１０人以上のユーザ、たとえば２５人以上のユーザから受けることができ、１００人以上のユーザからの標識生体分子リクエストを受けることが含まれる。

【０７２８】

いくつかの実施形態では、方法は、標識生体分子試薬のリクエストを受ける工程と、入力を受ける入力マネージャ（前述の通り）のグラフィカルユーザインターフェース中にリクエストを入力する工程と、を含む。別の実施形態では、標識生体分子試薬リクエストを行うユーザは、グラフィカルユーザインターフェースに直接リクエストを入力する。標識

生体分子リクエストは、これらの実施形態において、グラフィカルユーザインターフェースに入力されて、標識生体分子の一連の１つ以上の文字（たとえば、英数字）、記号、イメージまたはその他のグラフ表示として、入力マネージャに伝達されうる。いくつかの実施形態では、リクエストは、標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識または反応性リンカーの「簡潔な」呼称またはその他の好適な識別子である。たとえば、リクエストは、生体分子名、標識名、アクセッション番号、配列識別番号、省略型プローブ配列、化学構造またはケミカル・アブストラクツ・サービス（Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ａｂｓｔｒａｃｔｓ　Ｓｅｒｖｉｃｅ）（ＣＡＳ）登録番号を含みうる。

【０７２９】

前述したように、標識生体分子リクエストを入力マネージャが受けた後、対象システムの処理モジュールが、受けた標識生体分子試薬リクエストの構成要素に対応する、メモリ内に記憶されたデータセットから１つまたは複数のストレージ識別子（たとえば、標識生体分子ストレージ識別子、生体分子ストレージ識別子、標識ストレージ識別子、反応性リンカーストレージ識別子など）を識別する。受けた標識生体分子試薬リクエストの各構成要素に対応するストレージ識別子が出力マネージャから出力される。いくつかの実施形態では、各標識生体分子ストレージ識別子は、モニター上に表示される。いくつかの実施形態では、ストレージ識別子は、機械（たとえば、バーコードとして）または対人可読フォーマットで印刷することによって出力される。標識生体分子試薬が、コンピュータ制御試薬調製装置（以下に詳述する通り）によって調製される場合、出力マネージャは、試薬調製装置に作動的に接続され、各ストレージ識別子は、たとえば、限定されないが、ＳＱＬ、ＨＴＭＬもしくはＸＭＬドキュメント、電子メールもしくは他のファイル、またはその他の形態のデータを含むインターネットプロトコルを介して、試薬調製装置に電子的に伝達されうる。

【０７３０】

受けた標識生体分子リクエストの数に応じて、１つまたは複数のストレージ識別子、たとえば２つ以上、たとえば３つ以上、たとえば３つ以上、たとえば５つ以上、たとえば１０以上、たとえば２５以上、たとえば１００以上で、および５００以上の出力も含まれる、ストレージ識別子が、出力マネージャにより同時に出力されうる。出力されたストレージ識別子の各集合は、単一のユーザまたは複数のユーザからの標識生体分子リクエストと対応しうる。

【０７３１】

いくつかの実施形態では、出力マネージャは、ストレージ識別子を表示または印刷する前に、予め決定された基準に基づいてストレージ識別子を整理する（たとえば、１つにまとめる）。一例では、出力マネージャは、特定のユーザからのストレージ識別子を全て１つにまとめる。別の例では、出力マネージャは、同じ標識生体分子ストレージ識別子を全て１つにまとめる。また別の例では、出力マネージャは、生体分子の名称または種類（たとえば、抗体、オリゴヌクレオチド）に基づいてストレージ識別子を整理する。また別の例では、出力マネージャは、標識の名称または種類（たとえば、蛍光、クマリン）に基づいてストレージ識別子を整理する。

【０７３２】

いくつかの実施形態では、方法は、受けたリクエストおよび／または出力されたストレージ識別子に従って、標識生体分子試薬を調製する工程を含む。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬を調製する工程は、複数の活性化生体分子と複数の活性化標識を有するストレージから活性化生体分子と活性化標識を選択する工程を含む。各標識生体分子試薬は、たとえば実験室において、１人もしくは複数の個人により手動で調製することもできるし、または前述のようなコンピュータ制御試薬調製装置（たとえば、ハイスループット調製システム）を用いて調製することもできる。出力されたストレージ識別子が標識生体分子ストレージ識別子であるいくつかの実施形態では、方法は、出力された標識生体分子ストレージ識別子に対応するストレージから標識生体分子を回収する工程を含む。これらの例では、方法は、要望されれば、ストレージから標識生体分子を精製する工程または

１つ以上の別の試薬（たとえば、緩衝液、抗酸化剤など）を添加する工程をさらに含みうる。いくつかの実施形態では、回収された標識生体分子をパッケージングした後、組成物にそれ以上の精製もしくは添加を実施することなく、ユーザに発送してもよい。

【０７３３】

他の実施形態では、出力された標識生体分子ストレージ識別子と対応する活性化生体分子を、出力された標識ストレージ識別子と対応する活性化標識と接触させることにより、標識生体分子を調製する。反応が、活性化生体分子の反応性リンカーと活性化標識の反応性リンカー同士の共有結合を形成するのに十分である限り、いずれの好都合な反応プロトコルを使用して活性化生体分子と活性化標識を混合してもよい。いくつかの実施形態において、混合工程は、磁気攪拌棒を用いて混合物を攪拌する、または混合物を手で攪拌する、ならびに手動（すなわち、手で）もしくは機械的（すなわち、機械式もしくは電動振盪装置により）のいずれかで混合物をボルテックスもしくは攪拌する工程を含みうる。活性化生体分子と活性化標識は、活性化生体分子を活性化標識に結合させるのに十分な時間、たとえば１分以上、たとえば５分以上、たとえば１０分以上で、３０分以上も含まれる、時間にわたって接触させる。

【０７３４】

上記のように、活性化生体分子と活性化標識は各々、反応性リンカーを含み、これは、適切な条件下で実施されると、一緒に反応して、たとえばイオン結合（電荷－電荷相互作用）、非共有結合（たとえば、双極子－双極子もしくは電荷－双極子）または共有結合などの化学結合を形成する。いくつかの実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、イオン結合を生成する。別の実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、非共有結合を生成する。また別の実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーまたは部分は、活性化標識の反応性リンカーまたは部分と反応して、共有結合を生成する。いくつかの実施形態では、活性化生体分子の反応性リンカーと活性化標識の反応性リンカーは反応して、共有結合を生成する。活性化生体分子の反応性リンカーと活性化標識の反応性リンカーとの間に共有結合を形成するためのいずれの好都合なプロトコルを使用してもよく、そうしたものとして、限定されないが、種々の結合形成反応の中でも、付加反応、脱離反応、置換反応、ペリ環状反応、光化学反応、酸化還元反応、ラジカル反応、カルビン（ｃａｒｂｉｎｅ）中間体を介した反応、メタセシス反応が挙げられる。いくつかの実施形態では、活性化生体分子は、反応性結合ケミストリーによって活性化標識に共役させてもよく、たとえば、そうした場合、反応性リンカーペアとして、限定されないが、以下のものが挙げられる：マレイミド／チオール；チオール／チオール；ピリジルジチオール／チオール；ヨード酢酸スクシンイミジル／チオール；Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＮＨＳエステル）、スルホジクロロフェノール（ｓｕｌｆｏｄｉｃｈｏｌｏｒｐｈｅｎｏｌ）エステル（ＳＤＰエステル）、またはペンタフルオロフェニル－エステル（ＰＦＰエステル）／アミン；ビススクシンイミジルエステル／アミン；イミドエステル／アミン；ヒドラジンもしくはアミン／アルデヒド、ジアルデヒドまたはベンズアルデヒド；イソシアネート／ヒドロキシルまたはアミン；炭水化物－過ヨウ素酸塩／ヒドラジンまたはアミン；ジアジリン／アリールアジドケミストリー；ピリジルジチオール／アリールアジドケミストリー；アルキン／アジド；カルボキシ－カルボジイミド／アミン；アミン／スルホ－ＳＭＣＣ（スルホスクシンイミジル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）／チオールおよびアミン／ＢＭＰＨ（Ｎ－［β－マレイミドプロピオン酸］ヒドラジド．ＴＦＡ）／チオール；アジド／トリアリールホスフィン；ニトロン／シクロオクチン；アジド／テトラジンおよびホルミルベンズアミド／ヒドラジノ－ニコチンアミド。

【０７３５】

活性化生体分子と活性化標識を、それぞれの反応性リンカー同士の間に化学結合（たとえば、共有結合）を形成するのに十分な時間にわたって接触させた後、たとえば、種々の精製プロトコルの中でも、マイクロ抽出、ゲル電気泳動、液液抽出、遠心分離、沈殿、受

動もしくは能動透析、または、限定されないが、イオン交換クロマトグラフィーをはじめとする固相クロマトグラフィー、逆相固定カラムを用いた液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィーおよび分取薄層クロマトグラフィー、限外濾過（サイズカットオフを有する膜フィルター）によって標識生体分子をさらに精製してもよい。

【０７３６】

方法はまた、調製された標識生体分子試薬の分析を含んでもよい。

【０７３７】

分析されるとは、限定されないが、調製された試薬組成物中の化合物の量および種類、ならびに存在するあらゆる不純物を含め、標識生体分子試薬の化学組成を特性決定することを意味する。調製された標識生体分子試薬の分析は、たとえば、物理的測定（たとえば、質量分析、密度分析、容量分析など）、質量分析法（たとえば、ＴＯＦ質量分析法、誘導結合親和性プラズマ質量分析法）、マスサイトメトリー、吸光分光法、蛍光分光法、伝導度分析、赤外分光法、紫外可視分光法、比色分析、元素分析、および核磁気共鳴分光法などのいずれの好都合なプロトコルを使用して実施してもよい。いくつかの実施形態では、標識生体分子の分析は、質量分析法により実施される。いくつかの実施形態では、標識生体分子の分析は、蛍光分光法により実施される。いくつかの実施形態では、標識生体分子の分析は、ガスクロマトグラフィーにより実施される。いくつかの実施形態では、標識生体分子の分析は、液体クロマトグラフィーにより実施される。いくつかの実施形態では、標識生体分子の分析は、元素分析により実施される。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬の分析は、ガスクロマトグラフィー－質量分析法により実施される。別の実施形態では、標識生体分子試薬の分析は、液体クロマトグラフィー－質量分析法により実施される。たとえば、この装置は、液体クロマトグラフ（ＬＣ）などの分析分離装置を含んでもよく、そうしたものとして、高性能液体クロマトグラフ（ＨＰＬＣ）、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（ＦＰＬＣ）、ミクロもしくはナノ－液体クロマトグラフまたは超高圧液体クロマトグラフ（ＵＨＰＬＣ）装置、キャピラリー電気泳動（ＣＥ）、またはキャピラリー電気泳動クロマトグラフ（ＣＥＣ）装置が挙げられる。しかし、任意の手動もしくは自動噴射または吐出しポンプシステムを使用してもよい。たとえば、いくつかの実施形態では、ナノ－またはマイクロポンプを使用することによって、対象サンプルをＬＣ－ＭＳシステムに適用してもよい。質量分析システムは、いずれの好都合な質量分析システムであってもよく、一般に、サンプルをイオン化するためのイオン源、イオンを分離するための質量分析計、およびイオンを検出する検出器を含む。いくつかの実施形態では、質量分析計は、前駆イオンを単離して、前駆イオンをフラグメント化して、フラグメント化した前駆イオンを分析することができる、いわゆる「タンデム」質量分析計であってよい。イオン供給源は、いずれのタイプのイオン化方法であってもよく、そうしたものとして、限定されないが、たとえば、エレクトロスプレーイオン化（ＥＳＩ）、大気圧化学イオン化（ＡＰＣＩ）、電子衝撃（ＥＩ）、大気圧光イオン化（ＡＰＰＩ）、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（ＭＡＬＤＩ）もしくは誘導結合プラズマ（ＩＣＰ）イオン化、またはこれらの任意の組合せ（いわゆる「マルチモード」イオン化供給源を提供するもの）が挙げられる。一実施形態では、前駆イオンは、ＥＩ、ＥＳＩもしくはＭＡＬＤＩにより製造されてもよく、選択された前駆イオンは、衝突によって、または光子を用いてフラグメント化して、生成物イオンを生成することができ、その後、イオンを分析する。同様に、様々な異なる質量分析計のいずれを使用してもよく、そうしたものとして、飛行時間（ＴＯＦ）、フーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴（ＦＴＩＣＲ）、イオントラップ、四重極型もしくは二重収束電磁場セクター質量分析計、またはこれらの任意のハイブリッドが挙げられる。一実施形態では、質量分析計は、セクター、透過型四重極、または飛行時間質量分析計であってもよい。

【０７３８】

標識生体分子試薬の調製（ならびに要望されれば、精製および分析）後、調製された標識生体分子試薬の各々を、標識生体分子リクエストに応じて、パッケージングおよび配達

（すなわち、標識生体分子リクエストをもたらしたユーザに輸送される）のために容器中にロードしてよい。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬は調製された後、活性化生体分子を活性化標識と接触させるために用いられる容器に入れてユーザに配達される。たとえば、標識生体分子試薬は、活性化生体分子を活性化標識と接触させるために用いられるマイクロチューブ中にパッケージングして、配達することができる。また、これらの方法は、パッケージングされた標識生体分子試薬を、たとえば郵便でリクエスターに配達する工程も含みうる。

【０７３９】

調製された標識生体分子試薬は、たとえば標識生体分子試薬を使用もしくは保存するための他の構成要素と一緒にパッケージングしてもよく、そうしたものとして、限定されないが、緩衝液、シリンジ、針、マイクロピペット、ガラススライド、乾燥剤などが挙げられる。これに加えて、パッケージングされた標識生体分子試薬はさらに、標識生体分子試薬を保存および使用するための指示を含んでもよい。指示は、好適な記録媒体に記録したものでよく、たとえば紙またはプラスチックなどに印刷される。指示は、容器のラベルなどに、パッケージ挿入片として存在してもよい。別の実施形態では、指示は、好適なコンピュータ可読媒体、たとえば、ＣＤ－ＲＯＭ、ＳＤカード、ＵＳＢドライブなどに存在する電子記憶データファイルとして存在してもよい。また別の実施形態では、実際の指示はパッケージ内に存在しないが、リモートソースから、たとえば、インターネットを介して、指示を取得する手段が提供される。この実施形態の例として、ウェブアドレスを有する紙またはプラスチック挿入片があり、そのアドレスから指示を閲覧することができ、かつ／または指示をダウンロードすることができる。

【０７４０】

標識生体分子試薬をリクエストし、受け取る方法

本開示の態様は、標識生体分子試薬をリクエストし、受け取る方法も含む。いくつかの実施形態に従う方法は、標識生体分子試薬のリクエストを伝達する工程であって、標識生体分子リクエストが、以下：１）標識生体分子リクエスト；および２）生体分子リクエストと標識リクエストの１つまたは複数を含む工程と、標識に共有結合した生体分子を含む標識生体分子試薬を受け取る工程と、を含む。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストを含む。対象の方法を実施する際、標識生体分子リクエスト任意の好都合な通信プロトコルによって伝達することができ、こうしたものとして、限定されないが、電話により、ファクシミリ、電子メールまたは郵便により、標識生体分子リクエストを伝達する、などが挙げられる。いくつかの実施形態では、標識生体分子リクエストは、インターネットウェブサイトを介するなど、コンピュータでグラフィカルユーザインターフェースに標識生体分子試薬リクエストを入力することによって伝達される。

【０７４１】

いくつかの実施形態では、生体分子は、ポリペプチド、核酸、多糖、またはこれらの任意の組合せを含む。核酸は、オリゴヌクレオチド、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。ポリペプチドは、タンパク質、酵素またはタンパク質結合試薬であってよい。タンパク質結合試薬は、抗体、アプタマー、またはこれらの組合せを含んでよい。標識と共役したタンパク質結合試薬は、複数のタンパク質標的の少なくとも１つと特異的に結合することができる。

【０７４２】

いくつかの実施形態では、複数のタンパク質標的は、細胞表面タンパク質、細胞マーカー、Ｂ細胞受容体、Ｔ細胞受容体、抗体、主要組織適合遺伝子複合体、腫瘍抗原、受容体、またはこれらの任意の組合せを含む。複数のタンパク質標的は、たとえば、１０～４００の異なるタンパク質標的を含みうる。生体分子は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なる生体分子から選択することができる。

【０７４３】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、生体分子のユニークな識別子を含む

。ユニークな識別子は、２５～４５ヌクレオチド長のヌクレオチド配列を含みうる。ユニークな識別子は、ユニークな識別子の多様な集合から選択することができる。ユニークな識別子の多様な集合は、少なくとも１００、１，０００、または１０，０００の異なるユニークな識別子を含みうる。オリゴヌクレオチドは、少なくとも１０、１００、または１，０００の異なるバーコード配列（たとえば、分子標識配列）から選択される配列を有しうる。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、リンカーを介して生体分子に共役している。オリゴヌクレオチドは、リンカーを含みうる。リンカーは、化学基を含みうる。化学基は、生体分子と可逆的に結合させることができる。化学基は、ＵＶ光開裂性基、ストレプトアビジン、ビオチン、アミン、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択することができる。

【０７４４】

ユニークな識別子は、サンプルのゲノム配列と相同性でなくてもよい。サンプルは、単一細胞、複数の細胞、組織、腫瘍サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。サンプルは、哺乳動物サンプル、細菌サンプル、ウイルスサンプル、酵母サンプル、真菌サンプル、またはこれらの任意の組合せであってよい。オリゴヌクレオチドは、バーコード配列（たとえば、分子標識配列）、ポリ（Ａ）テール、またはこれらの組合せを含みうる。

【０７４５】

１つ以上の標識生体分子試薬リクエストを伝達することができ、たとえば２つ以上の標識生体分子試薬リクエスト、たとえば５つ以上、たとえば１０以上を伝達することができ、２５以上の標識生体分子試薬リクエストの伝達が含まれる。いくつかの実施形態では、方法は、単一の生体分子リクエストと単一の標識リクエストとを含む標識生体分子試薬リクエストを伝達する工程を含む。別の実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、単一の生体分子リクエストと複数の標識リクエストとを含む。また別の実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、複数の生体分子リクエストと単一の標識リクエストとを含む。さらに別の実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、複数の生体分子リクエストと複数の標識リクエストとを含む。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、１つ以上の標識生体分子リクエストを含む。いくつかの実施形態では、標識リクエストは、酵素リクエストと基質リクエストとを含む。

【０７４６】

いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬リクエストは、たとえばインターネットウェブサイトで、グラフィカルユーザインターフェースにリクエストを入力することによって伝達される。グラフィカルユーザインターフェースは、標識生体分子、活性化生体分子、生体分子、活性化標識、標識および反応性リンカーのデータベース（たとえば、カタログ）の全部または一部を表示することができる。データベースからの各カテゴリーは、リスト、ドロップダウンメニューまたはその他の構成として表示することができる。標識生体分子試薬リクエストは、生体分子および標識に関連する情報もしくはデータを適切なテキストフィールドに入力することにより、またはチェックボックスを選択することにより、もしくはドロップダウンメニューから１つ以上の項目を選択することにより、またはこれらの組合せを使用することにより、入力されうる。

【０７４７】

一例において、標識生体分子試薬リクエストは、ドロップダウンメニューから標識生体分子を選択することによってグラフィカルユーザインターフェースに入力される。別の例では、標識生体分子試薬リクエストは、第１ドロップダウンメニューから１つまたは複数の生体分子を、また第２ドロップダウンメニューから１つまたは複数の標識を選択することによってグラフィカルユーザインターフェースに入力される。また別の例では、標識生体分子試薬リクエストは、第１ドロップダウンメニューから１つまたは複数の生体分子を、第２ドロップダウンメニューから１つまたは複数の標識を、また第３ドロップダウンメニューから１つまたは複数の反応性リンカーを選択することによってグラフィカルユーザインターフェースに入力される。

【０７４８】
標識生体分子試薬リクエストを入力するために、特定の標識生体分子、生体分子もしくは標識に関連する情報またはデータをグラフィカルユーザインターフェースに入力する。入力される情報またはデータは、標識生体分子の一連の１つ以上の文字（たとえば、英数字）、記号、イメージまたはその他のグラフ表示であってよい。いくつかの実施形態では、標識生体分子、生体分子、標識、活性化生体分子、活性化標識もしくは反応性リンカーの「簡潔な」呼称またはその他の好適な識別子が入力される。たとえば、生体分子名、標識名、アクセッション番号、配列識別番号、省略型プローブ配列、化学構造またはケミカル・アブストラクツ・サービス（Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｓｅｒｖｉｃｅ）（ＣＡＳ）登録番号が入力されうる。

【０７４９】
いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬は、ポリペプチドを含み、リクエストは、ポリペプチド名、タンパク質名、酵素名、抗体名またはタンパク質、酵素もしくはその抗体フラグメント、特定の生体体液（たとえば、血液、粘液、リンパ液、滑液、脳脊髄液、唾液、気管支肺胞洗浄液、羊水、臍帯血、尿、膣液および精液）由来のポリペプチド、特定の種由来のポリペプチド（たとえば、マウスモノクローナル抗体）の名称、ならびにアミノ酸配列識別番号などの情報を含みうる。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬は、生物学的プローブを含み、リクエストは、特定の結合ドメインに関連する情報またはデータを含む。

【０７５０】
別の実施形態では、標識生体分子試薬は核酸を含み、リクエストは、オリゴヌクレオチド名、遺伝子名により識別されるオリゴヌクレオチド、アクセッション番号により識別されるオリゴヌクレオチド、特定の種（たとえば、マウス、ヒト）由来の遺伝子のオリゴヌクレオチド、特定の組織（たとえば、肝臓、脳、心臓）に関連する遺伝子のオリゴヌクレオチド、特定の生理機能（たとえば、アポトーシス、ストレス応答）に関連する遺伝子のオリゴヌクレオチド、特定の病態（たとえば、癌、心臓血管疾患）に関連する遺伝子のオリゴヌクレオチド、ならびにヌクレオチド配列識別番号などの情報を含みうる。

【０７５１】
いくつかの実施形態では、標識生体分子をリクエストする方法は、標識生体分子リクエストに関する質問票またはアンケートを完了する工程をさらに含む。これらの実施形態では、標識生体分子のリクエスターは、標識生体分子リクエストに関する一連の質問、または質問票もしくはアンケート形式での記入が要求される。たとえば、質問票またはアンケートは、標識生体分子リクエストに関する１つの質問、たとえば標識生体分子リクエストに関する２つ以上の質問、たとえば３つ以上の質問、たとえば４つ以上の質問、ならびにたとえば５つ以上の質問を含みうる。質問票またはアンケートの内容は、要望される情報に応じて変動しうる。たとえば、質問票またはアンケート中の質問は、限定されないが、リクエスターの試薬目録の内容、標的生体分子を用いて実施される実験の種類、ならびに標的生体分子試薬の使用の時期を提供する要求を含みうる。質問票は、入力のための１つまたは複数のオープンテキストフィールドを含んでもよい。たとえば、質問票は、オープンテキストフィールドバックフォームであってもよい。

【０７５２】
いくつかの実施形態では、方法は、リクエスターに、標識生体分子リクエストを伝達する（すなわち、グラフィカルユーザインターフェースに入力する）前に、一連の質問またはアンケートを完了することを促すことを含む。別の実施形態では、方法は、リクエスターに、標識生体分子リクエストを完了後に、一連の質問またはアンケートを完了することを促すことを含む。また別の実施形態では、リクエスターは、標識生体分子リクエストを伝達するのと同時に、標識生体分子リクエストに関する質問が促されうる。たとえば、方法は、標識生体分子リクエストを伝達するとき、標識生体分子の具体的用途（たとえば、実験の実施など）に関する質問をリクエスターに要求する工程を含みうる。

【０７５３】

前述したように、完了された一連の質問またはアンケートは、１つまたは複数の標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーについての推奨を提供するために、設計プラットフォームによって使用されうる。たとえば、質問またはアンケートに対する回答は、特定の分析計器（たとえば、フローサイトメータ、蛍光分光計）での使用に最も適した、または標識生体分子の意図される適用に最も適した標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識もしくは反応性リンカーを推奨するために、設計プラットフォームによって使用されうる。設計プラットフォームは、いくつかの実施形態において、完了された一連の質問またはアンケートに対する回答を用いて、標的密度（たとえば、細胞上の抗原密度）に基づき、標識生体分子、生体分子、活性化生体分子、標識、活性化標識または反応性リンカーについての推奨を提供するように構成されている。

【０７５４】

一連の質問またはアンケートに対する回答は、標識生体分子リクエストを伝達するのに用いられるものと同じか、もしくは異なるプロトコル（たとえば、電話、ファクシミリ、電子メール、スタンドアローン型ステーションでのグラフィカルユーザインターフェース、インターネットを介したグラフィカルユーザインターフェース）を使用して伝達することができる。たとえば、標識生体分子リクエストが、インターネットを介したグラフィカルユーザインターフェースを通じて伝達される場合、一連の質問に対する回答も、たとえば、ドロップダウンメニューまたはテキストフィールドなどを用い、グラフィカルユーザインターフェースを通じて入力してよい。

【０７５５】

本開示の実施形態に従う方法は、標識生体分子試薬を受け取る工程も含む。標識生体分子試薬は、容器内にロードされて受け取られ、たとえば、対象組成物を使用または保存するための１つ以上の補助成分と一緒にパッケージングされてもよい。いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬は、緩衝液、シリンジ、針、マイクロピペット、ガラススライド、乾燥剤などと一緒に受け取られる。パッケージングされた標識生体分子試薬は、標識生体分子試薬の保存および使用に関する指示、たとえば、紙、プラスチックに印刷されるか、またはコンピュータ可読媒体（たとえば、ＣＤ－ＲＯＭ、ＳＤカード、ＵＳＢドライブ）上の指示、あるいはリモートソースから、たとえば、インターネットを介して、対象組成物の保存および使用に関する指示を検索する指示を提供する挿入片としての指示などと一緒に受け取られる場合もある。

【０７５６】

複数の活性化生体分子と複数の活性化標識とを含むストレージ

本開示の態様は、複数の活性化生体分子と複数の活性化標識とを含むストレージも含む。上に詳述したように、対象の標識生体分子試薬は、活性化生体分子（たとえば、活性化タンパク質結合試薬であり、タンパク質結合試薬は、タンパク質標的に特異的に結合することができる）を、活性化標識（たとえば、活性化オリゴヌクレオチドであり、オリゴヌクレオチドは、それが共役されるタンパク質結合試薬のユニークな識別子を含む）と接触させることによって調製される。いくつかの実施形態では、ストレージ内の活性化生体分子は、反応性リンカーに結合したポリペプチド、核酸、ポリペプチドまたはそれらの組合せである。いくつかの実施形態では、ストレージ内の活性化生体分子は、反応性リンカーに結合した生物学的プローブであり、ここで、プローブは、たとえば、抗体結合剤、タンパク質、ペプチド、ハプテン、核酸などの目的の被検体に対して特異的な結合ドメインを含む。活性化標識は、たとえば、蛍光発光、吸光度、蛍光偏光、蛍光寿命、蛍光波長、吸収極大、吸収波長、ストークス（Ｓｔｏｋｅｓ）シフト、光散乱、質量、分子量、酸化還元、音波、ラマン（ｒａｍａｎ）、磁気、無線周波数、酵素反応（化学発光および電気－化学発光を含む）またはこれらの組合せに基づいて検出することができるマーカー化合物である。たとえば、標識は、蛍光団、発色団、酵素、酵素基質、触媒、レドックス標識、放射標識、音波標識、ラマン（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ（たとえば、同位体として純粋な希土類元素）、磁気粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、

またはこれらの任意の組合せであってもよい。

【０７５７】

いくつかの実施形態では、ストレージ内の活性化標識は、反応性リンカーに結合した蛍光団である。目的の蛍光団としては、限定されないが、分析用途（たとえば、フローサイトメトリー、イメージングなど）での使用に好適な色素、たとえば、アクリジン色素、アントラキノン色素、アリールメタン色素、ジアリールメタン色素（たとえば、ジフェニルメタン色素）、クロロフィル含有色素、トリアリールメタン色素（たとえば、トリフェニルメタン色素）、アゾ色素、ジアゾニウム色素、ニトロ色素、ニトロソ色素、フタロシアニン色素、シアニン色素、不斉シアニン色素、キノン－イミン色素、アジン色素、ユーロジン（ｅｕｒｈｏｄｉｎ）色素、サフラニン色素、インダミン、インドフェノール色素、フッ素色素、オキサジン色素、オキサゾン色素、チアジン色素、チアゾール色素、キサンテン色素、フルオレン色素、ピロニン色素、フッ素色素、ローダミン色素、フェナントリジン色素、ならびに２つ以上の色素を組み合わせた色素（たとえば、同時に）ならびに１つ以上のモノマー色素単位を有するポリマー色素、ならびにこれらの色素の２つ以上の混合物が挙げられる。たとえば、蛍光団は、以下のものであってもよい：４－アセタミド－４’－イソチオシアナトスチルベン－２，２’－ジスルホン酸；アクリジンならびにアクリジン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエロー、アクリジンレッド、およびアクリジンイソチオシアネートなどの誘導体；アロフィコシアニン、フィコエリスリン、ペリジニン－クロロフィルタンパク質、５－（２’－アミノエチル）アミノナフタレン－１－スルホン酸（ＥＤＡＮＳ）；４－アミノ－Ｎ－［３－ビニルスルホニル）フェニル］ナフタリミド－３，５ジスルホネート（ルシファーイエロー（Ｌｕｃｉｆｅｒ　Ｙｅｌｌｏｗ）ＶＳ）；Ｎ－（４－アニリノ－１－ナフチル）マレイミド；アントラニルアミド；ブリリアントイエロー（Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ　Ｙｅｌｌｏｗ）；クマリンおよびクマリン、７－アミノ－４－メチルクマリン（ＡＭＣ、Ｃｏｕｍａｒｉｎ　１２０）、７－アミノ－４－トリフルオロメチルクルアリン（Ｃｏｕｍａｒａｎ　１５１）などの誘導体；シアニンならびにシアノシン、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、およびＣｙ７などの誘導体；４’，６－ジアミニジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）；５’，５’’－ジブロモピロガロール－スルホンフタレイン（ブロモピロガロールレッド（Ｂｒｏｍｏｐｙｒｏｇａｌｌｏｌ　Ｒｅｄ））；７－ジエチルアミノ－３－（４’－イソチオシアナトフェニル）－４－メチルクマリン；ジエチルアミノクマリン；ジエチレントリアミンペンタアセテート；４，４’－ジイソチオシアナトジヒドロ－スチルベン－２，２’－ジスルホン酸；４，４’－ジイソチオシアナトスチルベン－２，２’－ジスルホン酸；５－［ジメチルアミノ］ナフタレン－１－スルホニル塩化物（ＤＮＳ、塩化ダンシル）；４－（４’－ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸（ＤＡＢＣＹＬ）；４－ジメチルアミノフェニルアゾフェニル－４’－イソチオシアネート（ＤＡＢＩＴＣ）；エオシン、ならびにエオシンおよびエオシンイソチオシアネートなどの誘導体；エリスロシン、ならびにエリスロシンＢおよびエリスロシンイソチオシアネートなどの誘導体；エチジウム；フルオレセイン、ならびに５－カルボキシフルオレセイン（ＦＡＭ）、５－（４，６－ジクロロトリアジン－２－イル）アミノフルオレセイン（ＤＴＡＦ）、２’７’－ジメトキシ－４’５’－ジクロロ－６－カルボキシフルオレセイン（ＪＯＥ）、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フルオレセインクロロトリアジニル、ナフトフルオレセイン、およびＱＦＩＴＣ（ＸＲＩＴＣ）などの誘導体；フルオレサミン；ＩＲ１４４；ＩＲ１４４６；緑色蛍光タンパク質（Ｇｒｅｅｎ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＧＦＰ）；リーフコーラル蛍光タンパク質（Ｒｅｅｆ　Ｃｏｒａｌ　Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ　Ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＲＣＦＰ）；Ｌｉｓｓａｍｉｎｅ（商標）；リサミンローダミン（Ｌｉｓｓａｍｉｎｅ　ｒｈｏｄａｍｉｎｅ）、ルシファーイエロー（Ｌｕｃｉｆｅｒ　ｙｅｌｌｏｗ）；マラカイトグリーン（Ｍａｌａｃｈｉｔｅ　Ｇｒｅｅｎ）イソチオシアネート；４－メチルウムベリフェロン；オルトクレゾールフタレイン；ニトロチロシン；パラローザニリン；ナイルレッド（Ｎｉｌｅ　Ｒｅｄ）；オレゴングリーン（Ｏｒｅｇｏｎ　Ｇｒｅｅｎ）；フェノールレッド（Ｐｈｅｎｏｌ　Ｒｅｄ）；Ｂ－フィコエリスリン；ｏ－フタルジアル

デヒド；ピレン、ならびにピレン、ピレンブチレートおよびスクシンイミジル１－ピレンブチレートなどの誘導体；Ｒｅａｃｔｉｖｅ Ｒｅｄ ４（Ｃｉｂａｃｒｏｎ（商標）Ｂｒｉｌｌｉａｎｔ Ｒｅｄ ３Ｂ－Ａ）；ローダミン、ならびに６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、６－カルボキシローダミン（Ｒ６Ｇ）、４，７－ジクロローダミンリザミン（ｌｉｓｓａｍｉｎｅ）、ローダミンＢスルホニル塩化物、ローダミン（Ｒｈｏｄ）、ローダミンＢ、ローダミン１２３、ローダミンＸイソチオシアネート、スルホローダミンＢ、スルホローダミン１０１、スルホローダミン１０１のスルホニルクロリド誘導体（Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ）、Ｎ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－６－カルボキシローダミン（ＴＡＭＲＡ）、テトラメチルローダミン、およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート（ＴＲＩＴＣ）などの誘導体；リボフラビン；ロゾール酸およびテルビウムキレート誘導体；キサンテン；フルオレセインイソチオシアネート－デキストランなどの色素共役ポリマー（すなわち、ポリマー結合色素）、ならびに前述したその色素の２つ以上を組み合わせた色素（たとえば、同時に）、１つ以上のモノマー色素単位を有するポリマー色素および前述した色素の２つ以上の混合物。

【０７５８】

いくつかの実施形態では、蛍光団（すなわち、色素）は、蛍光ポリマー色素である。対象の方法およびシステムで有用な蛍光ポリマー色素は様々である。本方法のいくつかの実施形態では、ポリマー色素は、共役ポリマーを含む。

【０７５９】

共役ポリマー（ＣＰ）は、不飽和結合（たとえば、二重および／または三重結合）と飽和結合（たとえば、単一結合）が交互に並ぶ骨格を含む非局在化電子構造を特徴とし、ここで、π－電子は、１つの結合から他の結合へと移動することができる。従って、共役骨格は、ポリマー色素上に長い線状構造を付与することができ、ポリマーの反復単位間の結合角度が限定される。たとえば、タンパク質と核酸は、ポリマーでもあるが、いくつかのケースでは、長いロッド構造を形成するのではなく、高次三次元形状に折り畳まれる。さらに、ＣＰは、「剛体ロッド」ポリマー骨格を形成して、ポリマー骨格鎖に沿って、モノマー反復単位の間に限定的なねじり角度（たとえば、ねじれ）を被りうる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、剛体ロッド構造を有するＣＰを含む。上に要約したように、ポリマー色素の構造特性は、分子の蛍光特性に影響を及ぼしうる。

【０７６０】

任意の好都合なポリマー色素を対象の方法およびシステムで使用することができる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、蛍光団の蛍光出力を増幅するために光を捕集することができる構造を有する多発色団である。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、光を捕集して、それをより長い波長の放射光に効率的に変換することができる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、エネルギーを近接する発光種（たとえば、「シグナル伝達発色団」）に効率的に移動することができる集光多発色団システムを有する。エネルギー移動のための機構としては、たとえば、共鳴エネルギー移動（たとえば、フェルスター（Ｆｏｒｓｔｅｒ）（または蛍光）共鳴エネルギー移動、ＦＲＥＴ）、量子荷電交換反応（デクスター（Ｄｅｘｔｅｒ）エネルギー移動）などが挙げられる。いくつかの実施形態では、これらのエネルギー移動機構は、相対的に短距離である；すなわち、シグナル伝達発色団に対して集光多発色団システムが近接しているために、効率的なエネルギー移動が可能になる。効率的エネルギー移動のための条件下で、集光多発色団システム中の個々の発色団の数が多くなると、シグナル伝達発色団からの発光の増幅が起こる；すなわち、シグナル伝達発色団からの発光は、入射光（「励起光」）が、集光多発色団システムによって吸収される波長であるとき、シグナル伝達発色団がポンプ光によって直接励起されるときよりも強度が大きくなる。

【０７６１】

多発色団は、共役ポリマーであってもよい。共役ポリマー（ＣＰ）は、非局在化電子構造を特徴とし、化学および生物学的標的の高度応答性光リポータとして用いることができる。有効な共役長さは、ポリマー鎖の長さより実質的に短いため、骨格は、多数の共役セ

グメントを密接して含む。従って、共役ポリマーは、集光するのに効率的であり、エネルギー移動を介した光増幅を可能にする。

【０７６２】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、直接蛍光リポータ、たとえば、高い消散係数、高い輝度などを有する蛍光ポリマーとして使用することもできる。一部の実施形態では、ポリマーは、強力な発色団として使用することもでき、この場合、色または光学密度が指標として用いられる。

【０７６３】

目的のポリマー色素としては、限定されないが、米国特許出願公開第２００４０１４２３４４号明細書、同第２００８０２９３１６４号明細書、同第２００８００６４０４２号明細書、同第２０１００１３６７０２号明細書、同第２０１１０２５６５４９号明細書、同第２０１２００２８８２８号明細書、同第２０１２０２５２９８６号明細書、および同第２０１３０１９０１９３号明細書（その開示内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる）においてＧａｙｌｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．により；ならびにＧａｙｌｏｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，２００１，１２３（２６），ｐｐ６４１７－６４１８；Ｆｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｒｅｖ．，２０１０，３９，２４１１－２４１９；およびＴｒａｉｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，２０１１，１３３（３２），ｐｐ　１２６００－１２６０７（その開示内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている色素が挙げられる。

【０７６４】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、共役系を形成する複数の第１光学活性ユニットを含む共役ポリマーを含み、これは、第１光学活性ユニットが、光を吸収して、励起状態を形成する第１吸収波長（たとえば、本明細書に記載するもの）を有する。共役ポリマー（ＣＰ）は、ポリカチオン性、ポリアニオン性および／または電荷中性共役ポリマーであってもよい。

【０７６５】

ＣＰは、生物学的サンプルに使用するために水溶性であってもよい。水溶性を高めるために、ポリマー色素中に、親水性置換基、たとえば、親水性ポリマー、または荷電置換基、たとえば、水溶液中、たとえば、生理的条件下で、正もしくは負荷電基などのいずれか好都合な置換基を含有させてもよい。対象の集光多発色団にいずれか好都合な水溶性基（ＷＳＧ）を使用してもよい。「水溶性基」という用語は、水性環境において十分に溶媒和され、しかも、それが結合する分子に改善された水溶性を付与する官能基を指す。いくつかの実施形態では、ＷＳＧは、ＷＳＧが欠如した多発色団と比較して、ほぼ水性の溶液（たとえば、本明細書に記載するもの）中での多発色団の溶解度を高める。水溶性基は、水性環境中に十分に溶媒和されるいずれの好都合な親水性基であってもよい。いくつかの実施形態では、親水性水溶性基は荷電されており、たとえば、正もしくは負荷電されているか、または双性イオン性である。いくつかの実施形態では、親水性水溶性基は、中性親水性基である。いくつかの実施形態では、ＷＳＧは、親水性ポリマー、たとえば、ポリエチレングリコール、セルロース、キトサン、またはそれらの誘導体である。

【０７６６】

本明細書で用いられる場合、「ポリエチレンオキシド」、「ＰＥＯ」、「ポリエチレングリコール」および「ＰＥＧ」という用語は、置き換え可能に用いられて、式－（CH_2－CH_2－Ｏ－）$_n$－により表される鎖を含むポリマーまたはその誘導体を指す。いくつかの実施形態では、「ｎ」は、５０００以下、たとえば１０００以下、５００以下、２００以下、１００以下、５０以下、４０以下、３０以下、２０以下、１５以下、たとえば５～１５、または１０～１５である。ＰＥＧポリマーは、任意の好都合な長さであってよく、限定されないが、アルキル、アリール、ヒドロキシル、アミノ、アシル、アシルオキシ、およびアミノ末端基をはじめとする様々な末端基を含みうることは理解される。対象の多発色団での使用に合わせて改変されうる官能基化ＰＥＧとしては、Ｓ．Ｚａｌｉｐｓｋｙにより“Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｉｚｅｄ　ｐｏｌｙ（ｅｔｈｙｌｅｎｅ　ｇｌｙｃｏｌ）

ｆｏｒ ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｌｙ ｒｅｌｅｖａｎｔ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ”，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １９９５，６（２），１５０－１６５に記載されているＰＥＧを含む。目的の水溶性基として、限定されないが、以下のものが挙げられる：カルボン酸塩、ホスホン酸塩、リン酸塩、スルホン酸塩、硫酸塩、スルフィン酸塩、エステル、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）および修飾ＰＥＧ、ヒドロキシル、アミン、アンモニウム、グアニジニウム、ポリアミンおよびスルホニウム、ポリアルコール、直鎖もしくは環状糖、１級、２級、３級、もしくは４級アミンおよびポリアミン、ホスホン酸基、ホスフィン酸基、アスコルビン酸基、グリコール、たとえば、ポリエーテル、－ＣＯＯＭ’、－SO_3Ｍ’、－PO_3Ｍ’、－NR_3、Ｙ’、（CH_2CH_2O）$_p$Ｒおよびそれらの混合物（ここで、Ｙ’は、任意のハロゲン、硫酸塩、スルホン酸塩、もしくは酸素含有アニオンであってよく、ｐは、１～５００であってよく、各Ｒは、独立に、Ｈもしくはアルキル（メチルなど）であってよく、Ｍ’は、カチオン性対イオンもしくは水素、－（CH_2CH_2O）$_{yy}CH_2CH_2XR^{yy}$、－（CH_2CH_2O）$_{yy}CH_2CH_2X$－、－Ｘ（CH_2CH_2O）$_{yy}CH_2CH_2$－、グリコール、およびポリエチレングリコールであってよく、式中、ｙｙは、１～１０００から選択され、Ｘは、Ｏ、Ｓ、およびＮR^{ZZ}から選択され、R^{ZZ}およびR^{YY}は、独立に、ＨおよびＣ１～３アルキルから選択される）。

【０７６７】

ポリマー色素は、任意の好都合な長さを有してよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素のモノマー反復単位もしくはセグメントの具体的な数は、２～５００，０００、たとえば２～１００，０００、２～３０，０００、２～１０，０００、２～３，０００もしくは２～１，０００単位もしくはセグメント、またはたとえば１００～１００，０００、２００～１００，０００、または５００～５０，０００単位もしくはセグメントの範囲内であってよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素のモノマー反復単位もしくはセグメントの数は、２～１０００単位もしくはセグメント、たとえば２～７５０単位もしくはセグメント、たとえば２～５００単位もしくはセグメント、たとえば２～２５０単位もしくはセグメント、たとえば２～１５０単位もしくはセグメント、たとえば２～１００単位もしくはセグメント、たとえば２～７５単位もしくはセグメント、たとえば２～５０単位もしくはセグメントで、２～２５単位もしくはセグメントも含まれる、範囲内であってよい。

【０７６８】

ポリマー色素は、任意の好都合な分子量（ＭＷ）であってよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素のＭＷは、平均分子量として表すことができる。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５００～５００，０００、たとえば１，０００～１００，０００、２，０００～１００，０００、１０，０００～１００，０００の平均分子量、あるいは５０，０００～１００，０００の平均分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７０，０００の平均分子量を有する。

【０７６９】

ポリマー色素は、特定の吸収極大波長、特定の発光極大波長、消散係数、量子収量などの１つまたは複数の望ましい分光学的特性を有しうる。

【０７７０】

一部の実施形態では、ポリマー色素は、２８０～８５０ｎｍの吸収曲線を有する。一部の実施形態では、ポリマー色素は、２８０～８５０ｎｍの範囲で吸収極大を有する。一部の実施形態では、ポリマー色素は、２８０～８５０ｎｍの範囲の波長を有する入射光を吸収し、この場合、目的の吸収極大の具体的な例として、限定されないが、以下：３４８ｎｍ、３５５ｎｍ、４０５ｎｍ、４０７ｎｍ、４４５ｎｍ、４８８ｎｍ、６４０ｎｍおよび６５２ｎｍが挙げられる。一部の実施形態では、ポリマー色素は、２８０～３１０ｎｍ、３０５～３２５ｎｍ、３２０～３５０ｎｍ、３４０～３７５ｎｍ、３７０～４２５ｎｍ、４００～４５０ｎｍ、４４０～５００ｎｍ、４７５～５５０ｎｍ、５２５～６２５ｎｍ、６２５～６７５ｎｍおよび６５０～７５０ｎｍからなる群から選択される範囲の吸収極大

波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３４８ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３５５ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４０５ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４０７ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４４５ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４８８ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６４０ｎｍの吸収極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６５２ｎｍの吸収極大波長を有する。

【０７７１】

一部の実施形態では、ポリマー色素は、４００～８５０ｎｍ、たとえば４１５～８００ｎｍの範囲の発光極大波長を有し、ここで、目的の発光極大の具体的な例として、限定されないが、以下：３９５ｎｍ、４２１ｎｍ、４４５ｎｍ、４４８ｎｍ、４５２ｎｍ、４７８ｎｍ、４８０ｎｍ、４８５ｎｍ、４９１ｎｍ、４９６ｎｍ、５００ｎｍ、５１０ｎｍ、５１５ｎｍ、５１９ｎｍ、５２０ｎｍ、５６３ｎｍ、５７０ｎｍ、５７８ｎｍ、６０２ｎｍ、６１２ｎｍ、６５０ｎｍ、６６１ｎｍ、６６７ｎｍ、６６８ｎｍ、６７８ｎｍ、６９５ｎｍ、７０２ｎｍ、７１１ｎｍ、７１９ｎｍ、７３７ｎｍ、７８５ｎｍ、７８６ｎｍ、８０５ｎｍが挙げられる。一部の実施形態では、ポリマー色素は、以下：３８０～４００ｎｍ、４１０～４３０ｎｍ、４７０～４９０ｎｍ、４９０～５１０ｎｍ、５００～５２０ｎｍ、５６０～５８０ｎｍ、５７０～５９５ｎｍ、５９０～６１０ｎｍ、６１０～６５０ｎｍ、６４０～６６０ｎｍ、６５０～７００ｎｍ、７００～７２０ｎｍ、７１０～７５０ｎｍ、７４０～７８０ｎｍおよび７７５～７９５ｎｍからなる群から選択される範囲の発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、３９５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４２１ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４７８ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４８０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４８５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４９６ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５１０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５７０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６０２ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６５０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７１１ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７３７ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７５０ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７８６ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４２１ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５１０ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、５７０ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６０２ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、６５０ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７１１ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、７８６ｎｍ±５ｎｍの発光極大波長を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、４２１ｎｍ、５１０ｎｍ、５７０ｎｍ、６０２ｎｍ、６５０ｎｍ、７１１ｎｍおよび７８６ｎｍからなる群から選択される発光極大を有する。

【０７７２】

いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、$1\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、たとえば$2\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、$2.5\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、$3\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、$4\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、$5\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、$6\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、$7\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上、または$8\times10^{6}cm^{-1}M^{-1}$以上の消散係数を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．０５以上の量子収量、たとえば０．１以上、０．１５以

上、以上、０．２５以上、０．３以上、０．３５以上、０．４以上、０．４５以上、０．５以上、０．６以上、０．７以上、０．８以上、０．９以上、０．９５以上、０．９９以上で、０．９９９以上も含まれる、量子収量を有する。たとえば、目的のポリマー色素の量子収量は、０．０５～１、たとえば０．１～０．９５、たとえば０．１５～０．９、たとえば０．２～０．８５、たとえば０．２５～０．７５、たとえば０．３～０．７の範囲で、０．４～０．６の量子収量も含まれる、範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．１以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．５以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．６以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．７以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．８以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．９以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、０．９５以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、1×10^{6}以上の消散係数および０．３以上の量子収量を有する。いくつかの実施形態では、ポリマー色素は、2×10^{6}以上の消散係数および０．５以上の量子収量を有する。

【０７７３】

いくつかの実施形態では、標識は、蛍光団、発色団、ポリペプチド、タンパク質、酵素、酵素基質、触媒、レドックス標識、放射標識、音波標識、ラマン（Ｒａｍａｎ）（ＳＥＲＳ）タグ、質量タグ、同位体タグ、磁気粒子、ミクロ粒子、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、またはこれらの任意の組合せを含む。いくつかの実施形態では、標識は、酵素、酵素基質、またはそれらの組合せを含む。酵素は、酵素基質を対応する修飾酵素基質に修飾することができる。

【０７７４】

いくつかの実施形態では、酵素基質は、対応する修飾酵素基質とは、少なくとも１つの官能基が異なる。少なくとも１つの官能基は、アルキル、アルケニル、アルキニル、フェニル、ベンジル、ハロ、フルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード、ヒドロキシル、カルボニル、アルデヒド、ハロホルミル、炭酸エステル、カルボキシレート、カルボキシル、エステル、メトキシ、ヒドロペルオキシ、ペルオキシ、エーテル、ヘミアセタール、ヘミケタール、アセタール、ケタール、アセタール、オルトエステル、メチレンジオキシ、オルト炭酸エステル、カルボキサミド、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、第四級アンモニウム、第一級ケタミン、第二級ケタミン、第一級アルジミン、第二級アルジミン、イミド、アジド、アゾ、ジイミド、シアネート、イソシアネート、ニトレート、ニトリル、イソニトリル、ニトロソオキシ、ニトロ、ニトロソ、ピリジル、スルフヒドリル、スルフィド、ジスルフィド、スルフィニル、スルホニル、スルフィノ、スルホ、チオシアネート、イソチオシアネート、カルボノチオン、カルボノチアール、ホスフィノ、ホスホノ、ホスフェート、ホスホジエステル、ボロノ、ボロネート、ボリノ、ボリネート、またはこれらの任意の組合せであってよい。

【０７７５】

いくつかの実施形態では、酵素は、メチルトランスフェラーゼ、グリコシドヒドロラーゼ、アガラーゼ、アミニダーゼ、アミラーゼ、ビオシダーゼ、カラギナーゼ、セルラーゼ、セラミダーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、キトリナーゼ、デキストラナーゼ、デキストリナーゼ、フルクトシダーゼ、フコイダナーゼ、フコシダーゼ、フラノシダーゼ、ガラクトシダーゼ、ガラクツロナーゼ、グルカナーゼ、グルコシダーゼ、グルクロニダーゼ、グルクロノシダーゼ、グリコヒドロラーゼ、グリコシダーゼ、ヘキサオシダーゼ、ヒドロラーゼ、イズロニダーゼ、イノシダーゼ、イヌリナーゼ、ラクターゼ、レバナーゼ、リケニナーゼ、リガーゼ、リアーゼ、リゾチーム、マルトシダーゼ、マルトトリオシダーゼ、マンノビオシダーゼ、マンノシダーゼ、ムラミダーゼ、オクツロソナーゼ、オクツロソニダーゼ、プリメベロシダーゼ、プロテアーゼ、プルラナーゼ、ラムノシダーゼ、サミニダーゼ、シアリダーゼ、シンターゼ、トランスフェラーゼ、トレハラーゼ、ツロニダーゼ、

ツロノシダーゼ、キシラナーゼ、キシロシダーゼ、またはこれらの組合せを含む。
【０７７６】
いくつかの実施形態では、酵素基質は、６－メルカプトプリン、セロビオース、セロテトラオース、キシロテトラオース、イソプリメベロース、β－Ｄ－ゲンチオビオース、キシログルカンおよびマンノトリオース、アガロース、アミン（ａｍｉｎｉｃ）酸、デンプン、オリゴ糖、多糖、セルロース、セラミド、キチン、キトサン、デキストロース、デキストリン、フルクトース、フコイダン、フコース、フラノシド、ガラクトシド、グルカン、グルコピラノシド、グルコシド、グルクロン酸、グルクロノシド、グリコース、グリコシド、グリコサミノグリカン、ヘキサオシド、イヌリン、ラクトース、レバノース、リポ多糖、マンノース、マルトシド、マルトトリオシド、マンノース、オクツロソン酸塩、オリゴ糖、ペクチン酸塩、ペクチン、ペプチド、ポリガラクツロニド、ポリヌクレオチド、プルラン、ラムノシド、キシラン、またはこれらの任意の組合せを含む。
【０７７７】
いくつかの実施形態では、標識生体分子試薬リクエストに従って標識生体分子試薬を調製するための活性化生体分子と活性化標識をストレージから取得する。ストレージは、１０以上の異なる活性化生体分子、たとえば２５以上、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、活性化生体分子を有しうる。一例では、ストレージは、１０以上の異なる活性化オリゴヌクレオチド、たとえば２５以上、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、活性化オリゴヌクレオチドを含む。別の例では、ストレージは、１０以上の異なる活性化ポリペプチド、たとえば２５以上、たとえば５０以上、たとえば１００以上、たとえば２５０以上、たとえば５００以上で、１０００以上も含まれる、活性化ポリペプチドを含む。
【０７７８】
ストレージはまた、１０以上の異なる活性化標識、たとえば１５以上、たとえば２０以上、たとえば３０以上、たとえば４０以上で、５０以上も含まれる、異なる活性化標識も含みうる。
【０７７９】
複数の活性化生体分子および活性化標識の各々は、要望される場合、ストレージ内で、活性化生体分子または活性化標識を保存し、提供することができるいずれか好都合な容器中に保存されて存在してもよい。いくつかの実施形態では、複数の異なる活性化生体分子と複数の異なる活性化標識は、個別の試薬チャンバーに仕切られた単一の貯蔵器内に保存される。別の実施形態では、複数の異なる活性化生体分子と複数の異なる活性化標識の各々は、個別の容器（たとえば、ボトル、ジャグなど）中に保存される。また別の実施形態では、複数の異なる活性化生体分子と複数の異なる活性化標識の各々は、複数のバイアル中に保存され、この場合、各バイアルは、各々活性化された生体分子および各々活性化された標識の予め計測されたアリコートを含む。ストレージ内の各容器はまた、活性化生体分子または活性化標識の構成要素を識別するラベル（たとえば、生体分子、標識および反応性リンカーの名称、構造、ＣＡＳ番号、アクセッション番号、プローブ配列など）を含んでもよい。標識は、さらに１つまたは複数の機械可読コンポーネント、たとえばＱｕｉｃｋ　Ｒｅｓｐｏｎｓｅ（ＱＲ）コードまたはバーコードなどを含んでもよい。
【０７８０】
いくつかの実施形態では、ストレージはまた、入手可能な活性化生体分子および活性化標識のデータベースも含む。データベースは、紙もしくは電子形態の印刷カタログであってもよいし、または検索可能な（たとえばキーボードにより検索可能な）電子データベース、化学構造、アクセッション番号、モノマー配列（たとえば、アミノ酸もしくはヌクレオチド配列）またはＣＡＳ化学登録番号であってもよい。
【０７８１】
有用性
対象のシステムおよび方法は、複雑な生物学的試薬（たとえば、検出可能なマーカーに

結合した生体高分子）の調製－大規模に実施される場合、一般に、時間がかかり、経済的に非効率的で、しかも極めて大きな労力を要するプロセスに有用である。本開示は、広範な生体分子および検出可能標識ポートフォリオに及ぶ高品質かつ高性能の特定製品を配達するための高速、効率的かつ高度に拡張性の方法を提供する。

【０７８２】

本明細書に記載のシステムおよび方法は、カスタマイズされた生物学的試薬をリクエストおよび提供するためのユニークかつ新規の方法も提供する。広範なデータベース（たとえば、オンラインデータベース）から、事前に合成された試薬を選択することができる以外に、対象のシステムおよび方法は、ユーザカスタマイズが可能であり、この場合、ユーザは、あらゆる所望の標識生体分子をオンデマンドで作製することができる。使いやすいグラフィカルインターフェースで生体高分子および検出可能なマーカーを単純に選択することによって、ユーザは、多種多様な研究用途および医学的診断に使用されるあらゆる標識生体分子をリクエストすることができる。

【０７８３】

本開示は、小規模合成により調製される場合に不可能である複雑な生物学的試薬の大きなポートフォリオの利用も可能にする。対象のシステムおよび方法は、拡張可能であり、生体分子および検出可能なマーカーの数千もの異なる組合せのオンデマンドでの調製を容易にする。いくつかの実施形態では、対象のシステムは、カスタマイズされた検出可能な生体分子プローブの調製に、人による入力を、たとえあったとしても、ほとんど必要としないように、完全に自動化されたプロトコルを提供する。

【０７８４】

本開示はまた、研究目的、実験室での試験または治療法での使用のために、生体サンプルからの細胞分析が要望されうる用途においても有用である。いくつかの実施形態では、対象の方法およびシステムは、がんなどの疾患のための試料などの体液もしくは組織サンプルから得られる細胞の分析を容易にしうる。本開示の方法およびシステムは、新たに合成されるプローブ組成物の使用と比較して、より高い効率および低コストで、生体サンプル（たとえば、臓器、組織、組織断片、体液）から細胞を分析することも可能にする。

【実施例】

【０７８５】

上記の実施形態のいくつかの態様を以下の実施例でさらに詳しく開示するが、これらの実施例は、本開示の範囲を制限することを何ら意図しない。

【０７８６】

実施例１

タンパク質結合試薬との共役のためのオリゴヌクレオチド

この実施例は、タンパク質結合試薬と共役させることができるオリゴヌクレオチドの設計を説明する。これらのオリゴヌクレオチドを用いて、タンパク質発現および遺伝子発現を同時に決定することができる。

【０７８７】

９５ｍｅｒオリゴヌクレオチドの設計

以下の方法を用いて、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列および対応するプライマー配列を生成した。

【０７８８】

１．配列生成および排除

以下の方法を用いて、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列を生成した。

１ａ．所望の長さ（４５ｂｐ）を有するいくつかの候補配列（５０，０００配列）をランダムに生成する。

１ｂ．生成された配列の５’末端に転写調節ＬＳＲＲ配列を、また、生成された配列の３’末端にポリ（Ａ）配列（２５ｂｐ）を付加する。

１ｃ．生成され、付加された配列で、４０％～５０％の範囲のＧＣ含量を含まない配列を

除去する。
１ｄ．残る配列で、各々１つまたは複数のヘアピン構造を有する配列を除去する。
【０７８９】
残った候補オリゴヌクレオチド配列の数は、４２３であった。
【０７９０】
２．プライマー設計
残る４２３の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。
【０７９１】
２．１　Ｎ１プライマー：Ｎ１プライマーとして、ユニバーサルＮ１配列：ＧＴＴＧＴＣＡＡＧＡＴＧＣＴＡＣＣＧＴＴＣＡＧＡＧ（ＬＳＲＲ配列；配列番号５）を使用する。
【０７９２】
２．２　Ｎ２プライマー（特定の抗体オリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；たとえば、図１８のＮ２プライマー）：
２．２ａ．Ｎ１配列の下流で開始しない候補Ｎ２プライマーを除去する。
２．２ｂ．候補オリゴヌクレオチド配列の最後の３５ｂｐにおいて重複する候補Ｎ２プライマーを除去する。
２．２ｃ．オリゴヌクレオチドを用いて試験される細胞の種のトランスクリプトーム（たとえば、ヒトトランスクリプトームまたはマウストランスクリプトーム）とアラインメントするプライマー候補を除去する。
２．２ｄ．プライマー－プライマー相互作用を最小限にするか、または回避するために、デフォルトコントロールとしてＩＬＲ２配列（ＡＣＡＣＧＡＣＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴ）を使用する。
【０７９３】
４２３の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、３９０候補に対するＮ２プライマーが設計された。
【０７９４】
３．フィルタリング
残った３９０の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下の方法を使用した。
３ａ．全バーコードについてポリ（Ａ）テールを同じ長さに維持するために、Ａで終わるランダム配列を有する（すなわち、ポリ（Ａ）配列の有効長さが２５ｂｐを超える）あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。
３ｂ．Ｇが連続するオリゴ合成の場合、コストが余分にかかり、しかも収率が低い可能性があるため、４以上の連続したＧ（＞３Ｇ）を含むあらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。
【０７９５】
図１８のパネル（ａ）は、前述の方法を用いて生成された非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す。
【０７９６】
２００ｍｅｒオリゴヌクレオチド設計
以下の方法を使用して、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列および対応するプライマー配列を生成した。
【０７９７】
１．配列生成および排除
以下の方法を用いて、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定のための候補オリゴヌクレオチド配列を生成した。
１ａ．所望の長さ（１２８ｂｐ）を有するいくつかの候補配列（１００，０００配列）をランダムに生成する。
１ｂ．生成された配列の５’末端に転写調節ＬＳＲＲ配列と、非ヒト、非マウスの追加ア

ンカー配列を、また、生成された配列の３’末端にポリ（Ａ）配列（２５ｂｐ）を付加する。
１ｃ．生成され、付加された配列で、４０％～５０％の範囲のＧＣ含量を含まない配列を除去する。
１ｄ．ヘアピン構造スコアに基づき、残った候補オリゴヌクレオチド配列を分類する。
１ｅ．残った候補オリゴヌクレオチド配列のうち、最も低いヘアピンスコアを有する１，０００の配列を選択する。
【０７９８】
２．プライマー設計
最も低いヘアピンスコアを有する４００の候補オリゴヌクレオチド配列のプライマーを設計するために、以下の方法を使用した。
【０７９９】
２．１　Ｎ１プライマー：Ｎ１プライマーとして、ユニバーサルＮ１配列：ＧＴＴＧＴＣＡＡＧＡＴＧＣＴＡＣＣＧＴＴＣＡＧＡＧ（ＬＳＲＲ配列；配列番号５）を使用する。
【０８００】
２．２　Ｎ２プライマー（特定の抗体オリゴヌクレオチドの増幅を目的とする；たとえば、図１８のＮ２プライマー）：
２．２ａ．Ｎ１配列の２３ｎｔ下流で開始しない候補Ｎ２プライマーを除去する（アンカー配列は、全ての候補オリゴヌクレオチド配列についてユニバーサルであった）。
２．２ｂ．標的配列の最後の１００ｂｐにおいて重複する候補Ｎ２プライマーを除去する。得られたプライマー候補は、標的配列の４８番目のヌクレオチドと１００番目のヌクレオチドの間に位置しうる。
２．２ｃ．オリゴヌクレオチドを用いて試験される細胞の種のトランスクリプトーム（たとえば、ヒトトランスクリプトームまたはマウストランスクリプトーム）とアラインメントするプライマー候補を除去する。
２．２ｄ．プライマー－プライマー相互作用を最小限にするか、または回避するために、デフォルトコントロールとしてＩＬＲ２配列（ＡＣＡＣＧＡＣＧＣＴＣＴＴＣＣＧＡＴＣＴ）を使用する。
２．２ｅ．標的配列の最後の１００ｂｐにおいて重複するＮ２プライマー候補を除去する。
【０８０１】
４００の候補オリゴヌクレオチド配列のうち、３９２候補に対するＮ２プライマーが設計された。
【０８０２】
３．フィルタリング
残った３９２の候補プライマー配列をフィルタリングするために、以下の方法を使用した。
３ａ．全バーコードについてポリ（Ａ）テールを同じ長さに保持するために、Ａで終わるランダム配列を有する（すなわち、ポリ（Ａ）配列の有効長さが２５ｂｐを超える）あらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。
３ｂ．Ｇが連続するオリゴ合成ではコストが余分にかかり、しかも収率が低い可能性があるため、４以上の連続したＧ（＞３Ｇ）を含むあらゆる候補オリゴヌクレオチド配列を排除する。
【０８０３】
図１８のパネル（ｂ）は、前述の方法を用いて生成された非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す。図１８パネル（ｂ）に示すネステッドＮ２プライマーは、標的増幅のための抗体配列に結合することができる。図１８パネル（ｃ）は、標的増幅のためのアンカー配列に対応するネステッドユニバーサルＮ２プライマーを有する同じ非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す。図１８パネル（ｄ）は、ワンステップ標的増幅のためのＮ２プライマーを有する同じ非限定的な候補オリゴヌクレオチド配列の例を示す

。

【０８０４】

総合すると、これらのデータは、タンパク質発現および遺伝子発現の同時決定のために、異なる長さのオリゴヌクレオチド配列を設計できることを示している。オリゴヌクレオチド配列は、ユニバーサルプライマー配列と、抗体特異的オリゴヌクレオチド配列と、ポリ（Ａ）配列と、を含みうる。

【０８０５】

実施例２

様々な抗体：オリゴヌクレオチド比を用いた検出感度の比較

この実施例は、１つ、２つ、または３つのオリゴヌクレオチドと共役した抗ＣＤ４抗体を用いたＣＤ４タンパク質の検出感度を明らかにする。

【０８０６】

被験者の凍結した末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を解凍した。解凍されたＰＢＭＣを室温で２０分間、０．０６μｇ／１００μｌ（オリゴヌクレオチド－共役抗体ストックの１：３３３希釈物）の３種類の抗ＣＤ４抗体で染色した。各種の抗ＣＤ４抗体を１つ、２つ、または３つのオリゴヌクレオチドと共役させた（「抗体オリゴヌクレオチド」）。抗体オリゴヌクレオチドの配列を図１９に示す。細胞を洗浄して、結合していない抗ＣＤ４抗体を除去した。フローサイトメトリーにより選別して、生存細胞を取得するために、細胞をＣａｌｃｅｉｎ　ＡＭ（ＢＤ（Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ））およびＤｒａｑ７（商標）（Ａｂｃａｍ（Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ））で染色した。細胞を洗浄して、余剰のＣａｌｃｅｉｎ　ＡＭおよびＤｒａｑ７（商標）を除去した。フローサイトメトリーを用いて、Ｃａｌｃｅｉｎ　ＡＭで染色され（生存細胞）、Ｄｒａｑ７（商標）では染色されていない単一細胞（死滅していない、または透過されていない細胞）を、ＢＤ　Ｒｅｓｏｌｖｅ（商標）カートリッジ中に選別した。

【０８０７】

単一細胞とビーズを含むウェルのうち、ウェル内の３５００の単一細胞を５ｍＭ　ＤＴＴを含む溶解緩衝液中に溶解させた。ＢＤ　Ｒｅｓｏｌｖｅ（商標）ビーズを用いて、ＣＤ４ｍＲＮＡ発現プロフィールを決定した。ＢＤ　Ｒｅｓｏｌｖｅ（商標）ビーズおよび抗体オリゴヌクレオチドを用いて、ＣＤ４タンパク質発現プロフィールを決定した。手短には、細胞溶解の後、ｍＲＮＡ分子を放出させた。Ｒｅｓｏｌｖｅ（商標）ビーズを、各々が分子標識、細胞標識、およびポリＴ領域を含む確率バーコードと結合させた。溶解細胞から放出したｍＲＮＡ分子のポリ（Ａ）領域は、確率バーコードのポリＴ領域とハイブリダイズした。オリゴヌクレオチドのポリ（Ａ）領域は、確率バーコードのポリＴ領域とハイブリダイズした。確率バーコードを用いて、ｍＲＮＡ分子を逆転写させた。確率バーコードを用いて、抗体オリゴヌクレオチドを複製した。逆転写と複製は、１つのサンプルアリコート中で同時に実施した。

【０８０８】

血液パネルＮ１プライマーを用いて４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを、また抗体オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いてＣＤ４タンパク質の発現プロフィールを決定するために、プライマーを用い、逆転写産物と複製産物を６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ１」）。Ａｍｐｕｒｅクリーンアップを用いて、余剰の確率バーコードを除去した。ＰＣＲ１からの産物を２つのアリコートに分割したが、一方のアリコートは、血液パネルＮ２プライマーを用いて、４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを決定するために、またもう１つのアリコートは、抗体オリゴヌクレオチドＮ２プライマーを用いて、ＣＤ４タンパク質の発現プロフィールを決定することを目的とした（「ＰＣＲ２」）。いずれのアリコートも、６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたってＰＣＲ増幅した。図１９に示すように、抗体オリゴヌクレオチドに基づいて溶解細胞中のＣＤ４タンパク質の発現を決定した（「ＰＣＲ２」）。シーケンシングアダプターライゲーション反応後、シーケンシングデ

ータを取得し、分析した（「ＰＣＲ３」）。４８８の血液パネル遺伝子の発現プロフィールに基づいて細胞型を決定した。

【０８０９】

図２０のパネル（ａ）～（ｆ）は、非限定的なｔ分布型確率的近傍埋め込み（ｔ－Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｅｄ　Ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ　Ｎｅｉｇｈｂｏｒ　Ｅｍｂｅｄｄｉｎｇ）（ｔＳＮＥ）投影プロットの例であり、オリゴヌクレオチド共役抗体を用いて、ハイスループット様式でＣＤ４タンパク質発現および遺伝子発現を同時に測定した結果を示す。ＣＤ４タンパク質発現は、１つ、２つ、または３つの抗体オリゴヌクレオチドに共役した抗ＣＤ４抗体を含む、ＣＤ４発現細胞型（たとえば、ＣＤ４Ｔ細胞）中で明瞭かつ確実に検出された（それぞれ、図２０パネル（ｂ）、（ｄ）、および（ｆ））。図２１、パネル（ａ）～（ｆ）は、非限定的な棒グラフの例であり、ＣＤ４Ｔ細胞（高度ＣＤ４発現）、ＣＤ８Ｔ細胞（最小ＣＤ４発現）、および骨髄細胞（幾分のＣＤ４発現）におけるＣＤ４ｍＲＮＡおよびタンパク質の発現を示す。同様のシーケンシング深度の場合、ＣＤ４タンパク質レベルの検出感度は、抗体：オリゴヌクレオチドの比が高いほど上昇し、１：３比は、１：１および１：２比よりも高性能であった（図２２）。フローサイトメトリーを用いて選別された細胞の細胞表面でのＣＤ４タンパク質の発現を、図２３パネル（ａ）～（ｄ）に示すように、ＦｌｏｗＪｏ（ＦｌｏｗＪｏ（Ａｓｈｌａｎｄ，ＯＲ））を用いて確認した。図２４パネル（ａ）～（ｆ）は、非限定的な棒グラフの例であり、２つのサンプルのＣＤ４Ｔ細胞、ＣＤ８Ｔ細胞、および骨髄細胞中のＣＤ４ｍＲＮＡおよびＣＤ４タンパク質の発現を示す。第２のサンプルは、２つの異なるサンプル調製プロトコルを用いて調製した。図２５は、非限定的な棒グラフの例であり、抗体：オリゴヌクレオチド比が１：３の様々なサンプル調製プロトコルを用いて決定されたＣＤ４タンパク質レベルの検出感度を示す。

【０８１０】

総合すると、これらのデータは、ＣＤ４タンパク質発現が、抗ＣＤ４抗体と共役したオリゴヌクレオチドに基づいて、明瞭かつ確実に検出されうることを示している。ＣＤ４タンパク質レベルの検出感度は、抗体：オリゴヌクレオチドの比が高いほど上昇しうる。

【０８１１】

実施例３

高温：低温抗体滴定

この実施例は、抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータにおける総リード数の所望のパーセンテージ（たとえば、２％）を占めるように、オリゴヌクレオチド共役抗体（「高温抗体」）およびオリゴヌクレオチドと共役していない抗体（「低温抗体」）の比を決定する工程を説明する。

【０８１２】

抗ＣＤ１４７抗体ストックは、ＰＥ緩衝液で１：２０、１：１００、１：２００、１：３００、１：４００、１：６００、１：８００、および１：１０００希釈度に希釈した。１００μｌの染色緩衝液（ＦＢＳ）（ＢＤ（（Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅ，Ｎｅｗ　Ｊｅｒｓｅｙ））中に約１５０，０００個のＪｕｒｋａｔ細胞を様々な抗体希釈度で、室温にて２０分間染色した。染色後、細胞を５００μｌの染色緩衝液で１回洗浄し、蛍光強度の測定のために２００μｌ中に再懸濁させた。Ｍｕｓｅ（商標）Ａｕｔｏｐｈａｇｙ　ＬＣ３－ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＥＭＤ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ））を用いて、Ｊｕｒｋａｔ細胞に結合した抗ＣＤ１４７抗体を検出した。様々な抗ＣＤ１４７抗体希釈度で染色された細胞または染色されていない細胞からの蛍光強度を決定して比較することにより、抗体の最適希釈度を決定した（図２６Ａ～２６Ｃ）。蛍光強度は、希釈度が高いほど低下した。９９％超の細胞は、１：８００の希釈度で染色された。蛍光シグナルは、１：８００で下降し始めた。細胞は最大１：２００の希釈度で飽和まで染色された。細胞は最大１：４００の希釈率で飽和付近まで染色された。

【０８１３】

図２７は、抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータにおける総リード数の所

望のパーセンテージを占めるように、オリゴヌクレオチド共役抗体の染色濃度を決定するための非限定的な実験設計の例を示す。抗ＣＤ１４７抗体を、切断可能な９５ｍｅｒ抗体オリゴヌクレオチドと、１：３の抗体：オリゴヌクレオチド比で共役させた（「高温抗体」）。高温抗体は、１：１００比または１：８００比で、ｐＨ７．５希釈剤を用いて希釈した。９μｌの低温抗ＣＤ１４７抗体と１μｌの高温抗体を用いて、１０％高温抗体：９０％低温抗体の混合物を調製した。９μｌの低温抗ＣＤ１４７抗体と、１０％高温抗体：９０％低温抗体の１μｌの混合物を用いて、１％高温抗体：９０％低温抗体の混合物を調製した。

【０８１４】

約５０万個の細胞を含む、解凍した末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、１００％高温抗体含有の１：１００希釈ストック（ストック高温抗体の１％）、１０％高温抗体：９０％低温抗体の混合物（ストック高温抗体の０．１％）、１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物（ストック高温抗体の０．０１％）、および１００％高温抗体含有の１：８００希釈ストック（ストック高温抗体の０．０１２５％）と共に、１００μｌの染色緩衝液（ＦＢＳ）中で染色した。染色後、細胞を洗浄して、結合していない抗体分子を除去した。フローサイトメトリーにより選別して、生存細胞を取得するために、細胞をＣａｌｃｅｉｎ ＡＭおよびＤｒａｑ７（商標）で染色した。細胞を洗浄して、余剰のＣａｌｃｅｉｎ ＡＭおよびＤｒａｑ７（商標）を除去した。フローサイトメトリーを用いて、Ｃａｌｃｅｉｎ ＡＭで染色され（生存細胞）、かつＤｒａｑ７（商標）では染色されていない単一細胞（死滅していない、または透過されていない細胞）を、ＢＤ Ｒｅｓｏｌｖｅ（商標）カートリッジ中に選別した。

【０８１５】

単一細胞とビーズを含むウェルのうち、ウェル内の１０００個の単一細胞を溶解緩衝液中に溶解させた。各単一細胞について、細胞のビーズと共役した確率バーコードを用いて、ｍＲＮＡ分子を逆転写させ、抗体オリゴヌクレオチドを複製した。血液パネルＮ１プライマーを用いて４８８の血液パネル遺伝子のｍＲＮＡ発現プロフィールを、また抗体オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いてＣＤ１４７タンパク質発現を決定するために、プライマーを用いて、逆転写および複写後のサンプルを６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ１」）。Ａｍｐｕｒｅクリーンアップを用いて、余剰のプライマーを除去した。ＰＣＲ１からの産物は、アダプターライゲーション反応のための隣接配列と共に血液パネルＮ２プライマーおよび抗体オリゴヌクレオチドＮ１プライマーを用いて、６０℃のアニーリング温度で１５サイクルにわたりさらにＰＣＲ増幅した（「ＰＣＲ２」）。シーケンシングアダプターライゲーション反応後、シーケンシングデータを取得し、分析した（「ＰＣＲ３」）。

【０８１６】

図２８パネル（ａ）～（ｄ）は、予想されるサイズの抗体オリゴヌクレオチドと一致するピーク（矢印で示される）を示す非限定的なバイオアナライザトレースの例である。抗体オリゴヌクレオチドのピークは、高温抗体を低温抗体で滴定すると低下した。

【０８１７】

表１は、シーケンシングデータメトリクスの概要である。１：１００希釈ストックを用いて調製された１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物で細胞を染色することによって、抗体オリゴヌクレオチドは、シーケンシングデータ中の総未補正リード数の２．４％を占めた。しかし、図２９（ａ）～（ｆ）ならびに図３０Ｂ、３１Ｂ、および３２Ｂに示すように、１：１００希釈ストックを用いて調製された１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物で細胞を染色した場合、再帰的置換エラー補正（ＲＳＥＣ）または分布に基づくエラー補正（ＤＢＥＣ）後に検出された抗体オリゴヌクレオチドの分子数の分布ヒストグラムは、明瞭なシグナルピークを含まなかった。ＲＳＥＣは、２０１７年５月２５日に提出された米国特許出願公開第１５／６０５８７４号明細書に記載されており、その内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【０８１８】

図３０Ａ～３０Ｃは、オリゴヌクレオチド共役抗ＣＤ１４７抗体分子を用いて、様々な細胞型を標識できることを示す非限定的なプロット例である。血液パネル中の４８８遺伝子の発現プロフィールを用いて細胞型を決定した（図３０Ａ）。１：１００希釈ストックを用いて調製した１０％高温抗体：９０％低温抗体の混合物で細胞を染色したところ、検出した抗体オリゴヌクレオチドの分子数を示すヒストグラムに明瞭なシグナルが得られた（図３０Ｂ）。抗体オリゴヌクレオチドによる様々な細胞型の標識は、図３０Ｃに示す。

【０８１９】

図３１Ａ～３１Ｃは、オリゴヌクレオチド共役抗ＣＤ１４７抗体分子を用いて、様々な細胞型を標識できることを示す非限定的なプロット例である。血液パネル中の４８８遺伝子の発現プロフィールを用いて細胞型を決定した（図３１Ａ）。１：１００希釈ストックを用いて調製した１％高温抗体：９９％低温抗体の混合物で細胞を染色したところ、検出した抗体オリゴヌクレオチドの分子数を示すヒストグラムに明瞭なシグナルは得られなかった（図３１Ｂ）。抗体オリゴヌクレオチドによる様々な細胞型の標識は、図３１Ｃに示す。

【０８２０】

図３２Ａ～３２Ｃは、オリゴヌクレオチド共役抗ＣＤ１４７抗体分子を用いて、様々な細胞型を標識できることを示す非限定的なプロット例である。血液パネル中の４８８遺伝子の発現プロフィールを用いて細胞型を決定した（図３２Ａ）。１：８００希釈ストックを用い細胞を染色したところ、検出した抗体オリゴヌクレオチドの分子数を示すヒストグラムに明瞭なシグナルが得られた（図３２Ｂ）。抗体オリゴヌクレオチドによる様々な細胞型の標識は、図３２Ｃに示す。

【０８２１】

【表１】

表 1. シーケンシングデータメトリクスの概要

サンプル	FC4 - 1:800 希釈、低温抗体 なし	FC3 - 1:100 希釈、1:100 低温抗体	FC2 - 1:100 希釈、1:10 低温抗体
総未補正リード数	31.3M	27.3M	29.2M
オリゴに割当てられた 総未補正リード数	9161642 (29.2%)	660044 (2.4%)	4013438 (13.7%)
検出された細胞	1010	983	907
RSEC オリゴ MI	577110	20054	170742
DBEC オリゴ MI	477216	9319	110629
% Q30	76.45	71.89	73.45
細胞標識に 割合てられた%	84.63	79.47	82.58
アンプリコンと特異的に アラインメントした%	73.19	65.4	69.58
平均未補正 シーケンシング深度	5.58	6.52	6.4
平均 RSEC シーケンシング深度	**8.69**	**10.41**	**10.25**
平均 DBEC シーケンシング深度	15.96	23.29	22.48
Ab オリゴ RSEC シーケンシング深度	**8.08**	**12.9**	**11.2**
Ab オリゴ DBEC シーケンシング深度	12.4	30.9	21.2
細胞当たりの 平均リード数	11257	14414	15150
細胞当たりの 平均分子数	553.8	608.3	647.1
細胞当たりの 中央分子数	246.5	279	278
パネル中の遺伝子の数	489	489	489
検出された遺伝子総数	438	439	441
細胞当たりの 平均遺伝子数	68.39	73.6	73.12

【０８２２】

総合すると、これらのデータは、オリゴヌクレオチド共役抗体（「高温抗体」）とオリゴヌクレオチドと共役していない抗体（「低温抗体」）の比を調節することによって、抗体オリゴヌクレオチドが、シーケンシングデータにおける総リード数の所望のパーセンテージを占め、しかもシグナル抗体オリゴヌクレオチドを表すデータが、ノイズ抗体オリゴヌクレオチドを表すデータから明らかに区別されるようにすることができることを示している。

【０８２３】

実施例４

正規化

この実施例は、どのようにして、オリゴヌクレオチド共役抗体（「高温抗体」）とオリゴヌクレオチドと共役していない抗体（「低温抗体」）の混合物を用いた正規化により、

抗体のタンパク質標的の存在量とは関係なく、所望の適用範囲で、シーケンシングデータ中の総リード数の所望のパーセンテージを占める抗体オリゴヌクレオチドを達成することができるかを説明する。

【０８２４】

表２は、高温抗体を用いて、１０，０００個のＢ細胞中の様々な存在量の３つの細胞表面マーカーの定量の比較を示す。３つの細胞表面マーカーの相対発現レベルを分析するのに必要なリードの総数は、４７５２万リードであった。

【０８２５】

【表２】

表2. 高温抗体を用いたタンパク質定量例

抗原	細胞当たりの分子数	相対存在量	高温:低温抗体の比	シーケンシングにより検出された細胞当たりの分子数	シーケンシング深度４でのリード数
CD21	210,000	105	1:0	840	33.6M
HLA-DR	85,000	42.5	1:0	340	13.6M
CD40	2000	1	1:0	8	0.32M

【０８２６】

【表３】

表3. 高温および低温抗体を用いたタンパク質定量例

抗原	細胞当たりの分子数	相対存在量	高温:低温抗体の比	シーケンシングにより検出された細胞当たりの分子数	シーケンシング深度４でのリード数	抗体比に基づく予想分子数	シーケンシングによる相対存在量
CD21	210,000	105	1:100	8.3	0.33M	8.3x100=830	103.75
HLA-DR	85,000	42.5	1:40	8.5	0.34M	8.5x40=340	42.5
CD40	2000	1	1:0	8	0.32M	8x1=8	1

【０８２７】

表３は、高温抗体：低温抗体の混合物を用いた３つの細胞表面マーカーの相対発現レベルを分析するのに必要なリード総数が、１００万リードであったことを示す。また、３つの細胞表面マーカーの発現レベルを定量するために高温抗体：低温抗体の混合物を用いた場合、全３つのタンパク質マーカーの最適適用範囲（たとえば、シーケンシング深度４）を達成するのに、表２に示す定量結果と比較して、リード数のわずか２％（４７５２万リードに対して１００万リード）しか必要としない。より高いパーセンテージの低温抗体の混合物を用いて、高度発現タンパク質分子を正規化すると、低存在量タンパク質の検出、パラメータの数、およびシーケンシングコストの間のトレードオフが減少し、このアッセイをツールとしてさらに魅力的にする。

【０８２８】

総合して、これらのデータは、所望の適用範囲を有するシーケンシングデータにおける

総リード数の所望の数が、高温抗体：低温抗体の混合物を用いて、様々な存在量のタンパク質標的（たとえば、抗原）について達成されうることを示している。

【０８２９】

実施例５

Ｔ細胞サブセットの識別

この実施例は、Ｔ細胞サブセットをよりよく識別するための大規模並列単一細胞シーケンシングによるタンパク質およびｍＲＮＡ含量の同時デジタル測定を説明する。

【０８３０】

複雑かつ異種の細胞集団および動力学をプロファイリングするために、ハイスループット単一細胞ＲＮＡシーケンシングが使用されている。しかし、ｍＲＮＡおよびタンパク質発現は密接に相関しない場合もあることから、タンパク質発現に関する情報が不足すると、これまで細胞表面マーカーによって決定されていた細胞型の識別が困難となりうる。特にＴ細胞は、比較的低い存在量の転写物を含むため、様々なＴ細胞サブセットは、非常に類似した転写物プロフィールを呈示することが多い。この実施例は、オリゴヌクレオチド共役抗体を用いて、シーケンシングによりタンパク質発現を測定する方法を明らかにし、この方法は、単一細胞におけるタンパク質およびｍＲＮＡ発現の同時検出を可能にする。

【０８３１】

大規模並列単一細胞分析システムであるＢＤ（商標）Ｒｅｓｏｌｖｅを用いて、単一ワークフローで、ｍＲＮＡと並行して抗体特異的オリゴを捕捉、増幅およびシーケンシングした。この方法の能力を実証するために、多数の共通Ｔ細胞マーカーを含むオリゴヌクレオチド共役抗体パネルを作製した。このパネルをヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に適用した。オリゴヌクレオチド共役抗体によるタンパク質発現の検出は、高感度かつ高度に特異的であった。次に、タンパク質マーカー測定の添加によって、特にＴ細胞コンパートメントにおける単一細胞発現プロフィールのより明瞭かつ頑健なクラスター化、たとえば、ナイーブＣＤ４　Ｔ細胞とＣＤ８　Ｔ細胞、およびナイーブＴ細胞とメモリＴ細胞の区別が達成された。とりわけ、希少で、近年記載されたＴ細胞サブセットであるステムメモリＴ細胞が識別された。ステムメモリＴ細胞は、幹細胞様の特性を備える長期生存メモリＴ細胞集団を構成する。

【０８３２】

総合すると、データは、大規模並列単一細胞シーケンシングによるタンパク質およびｍＲＮＡ含量の同時デジタル測定が、単一細胞転写物プロファイリングと高度パラメータプロテオミクスの両方を、複雑な生物学的系統の解明、病態の理解およびより有効なバイオマーカー発見を達成する上でのさらなる成果に変換しうることを証明している。

【０８３３】

実施例６

コントロール粒子

この実施例は、異なる配列を含むコントロール粒子オリゴヌクレオチドを含むコントロール粒子の作製と、捕捉効率を決定するための官能基化コントロール粒子の使用を説明する。

【０８３４】

材料

ＢＤ　ＣｏｍｐＢｅａｄ　Ｐｌｕｓ　Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　Ｉｇ（７．５ｕｍ）Ｐａｒｔｉｃｌｅｓ　Ｓｅｔ（５１－９００６２７４）

ＢＤ染色緩衝液（ＦＢＳ）

【０８３５】

手順

１．使用前に、ＢＤ　ＣｏｍｐＢｅａｄ　Ｐｌｕｓを入念にボルテックスする。（少なくとも１分間）

２．８００ｕＬの染色緩衝液をチューブに添加する（表７は、異なる存在量の５つの配列を有するオリゴヌクレオチドと共役したＣＤ１４７を含む染色緩衝液の組成物を示す。

図３３Ａは、染色緩衝液の組成物を示すプロットである）。

３．５滴（約３００ｕＬ）のＣｏｍｐＢｅａｄ　Ｐｌｕｓ　Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅを添加する。

４．チューブに２０ｕＬの下記染色カクテルを添加する。ボルテックスする。

５．光を遮断し、室温で３０分間インキュベートする。

６．ビーズを２００ｇで１０分間スピンする。

７．上澄みを注意深く除去し、１ｍＬの染色緩衝液と一緒に再懸濁させる。

８．ビーズを２００ｇで１０分間スピンする。

９．上澄みを注意深く除去し、１ｍＬの染色緩衝液と一緒に再懸濁させて、官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄストック溶液を作製する。

１０．ビーズをカウントする。

【０８３６】

【表４】

表 7. 染色カクテル組成物

抗体	染色緩衝液中の最終%	希釈前	染色溶液(µl)
CD147-LZ15	1	1:1	1
CD147-LZ16	0.2	1:5	1
CD147-LZ17	0.1	1:10	1
CD147-LZ18	0.02	1:50	1
CD147-LZ19	0.01	1:100	1
染色緩衝液			95

【０８３７】

結果

図３４Ａ～３４Ｂは、血球計算盤における細胞（図３４Ａ、白い丸）とコントロール粒子（図３４Ｂ、黒い丸）の明視野画像である。図３５Ａ～３５Ｂは、蛍光団と結合したオリゴヌクレオチド共役抗体に結合したコントロール粒子の位相差（図３５Ａ、１０×）および蛍光（図３５Ｂ、１０×）画像である。蛍光顕微鏡を使用して、５ｕｌの官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄストック溶液が、作製された約４０００００の官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄと共に約２０００個の細胞（全投入の４％）を含有することを決定した。

【０８３８】

図３６は、カートリッジのマイクロウェル中にロードされる細胞および粒子を示すコントロール粒子の画像である。ＣｏｍｐＢｅａｄは、通常のＲｅｓｏｌｖｅ実験に使用することができる。５２２の官能基化ＣｏｍｐＢｅａｄを複数の細胞に添加した。２００００個の細胞（コントロール粒子を含む）配列のうち、１５６個は、全コントロール粒子オリゴヌクレオチドの合計が２０を超えた。従って、１５６個のコントロール粒子は配列であった。図３３Ｂは、５つの異なるコントロールバーコード配列（ＬＺ１５－ＬＺ１９）を有するコントロール粒子オリゴヌクレオチドの数が、染色緩衝液中のそれらの存在量と相関することを示すプロットである。

【０８３９】

総合すると、これらのデータは、粒子（たとえば、ＣｏｍｐＢｅａｄ　Ｐｌｕｓ）が、オリゴヌクレオチド（たとえば、コントロール粒子オリゴヌクレオチド）で官能基化されうることを示している。官能基化粒子を単一細胞ワークフローに使用して、捕捉され、配列した粒子の数を決定することができる。

【０８４０】

種々の態様および実施形態を本明細書に開示してきたが、他の態様および実施形態は当業者には自明であろう。本明細書に開示される種々の態様および実施形態は、例示を目的としたものであり、限定を意図したものではなく、真の範囲および趣旨は、以下の特許請求の範囲により示される。

【０８４１】

当業者であれば、本明細書に開示される上記およびその他のプロセスならびに方法について、これらのプロセスおよび方法で実施される機能が、異なる順序で実施されうることは理解されよう。さらに、概説した工程および操作は、あくまでも例として付与され、工程および操作の一部は、開示される実施形態の本質から逸れることなく、任意選択であり、組み合わせて、より少ない工程および操作にするか、または追加工程および操作に拡張することができる。

【０８４２】

本明細書に記載の実質的に任意の複数形および／または単数形の用語の使用に関連して、文脈上および／または適用上適切であれば、当業者は複数形から単数形へおよび／または単数形から複数形への変換が可能である。明確にするために種々の単数形／複数形の入替えを本明細書に明示的に記述しうる。

【０８４３】

一般的には、本明細書特に添付の特許請求の範囲（たとえば添付の特許請求の範囲の本文）で用いられる用語は「オープン」用語であることが一般に意図されることは当業者であれば理解されよう（たとえば、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（～を含む）」という用語は「～を含むがこれらに限定されるものではない」と解釈すべきであり、「ｈａｖｉｎｇ（～を有する）」という用語は「少なくとも～を有する」と解釈すべきであり、「ｉｎｃｌｕｄｅｓ（～を含む）」という用語は「～を含むがこれらに限定されるものではない」と解釈すべきであるなど）。さらに、導入クレームレシテーションの特定数が意図される場合、かかる意図は請求項で明示的にリサイトされ、かかるレシテーションの不在下ではかかる意図は存在しないことは当業者であれば理解されよう。たとえば、理解の一助として、以下の添付の特許請求の範囲は、クレームレシテーションを導入するために導入語句「ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ（少なくとも１つ）」および「ｏｎｅ　ｏｒ　ｍｏｒｅ（１つ以上）」の使用を含みうる。しかしながら、かかる語句が用いられたとしても、不定冠詞「ａ」または「ａｎ」によるクレームレシテーションの導入が、かかる導入クレームレシテーションを含む任意の特定の請求項を、一方のかかるレシテーションを含む実施形態のみに限定することを意味するものと解釈すべきでない。たとえ同一の請求項が導入語句「ｏｎｅ　ｏｒ　ｍｏｒｅ（１つ以上）」または「ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ（少なくとも１つ）」と不定冠詞たとえば「ａ」または「ａｎ」とを含む場合でさえも、そのように解釈すべきでない（たとえば、「ａ」および／または「ａｎ」は「ａｔ　ｌｅａｓｔ　ｏｎｅ（少なくとも１つ）」または「ｏｎｅ　ｏｒ　ｍｏｒｅ（１つ以上）」を意味するものと解釈すべきである）。定冠詞を用いてクレームレシテーションを導入する場合にも、同じことが当てはまる。そのほかに、たとえ特定数の導入クレームレシテーションが明示的にリサイトされたとしても、かかるレシテーションは少なくともリサイトされた数を意味すると解釈すべきであることは当業者であれば分かるであろう（たとえば、「２つのレシテーション」という他の修飾語を含まないベアのレシテーションは、少なくとも２つのレシテーションまたは２つ以上レシテーションを意味する）。さらに、「Ａ、Ｂ、およびＣの少なくとも１つ」に類似した条件が用いられる場合、一般的には、かかる構成は当業者がその条件を理解する意味であることが意図される（たとえば、「Ａ、Ｂ、およびＣの少なくとも１つを有する系」は、限定されるものではないが、Ａ単独、Ｂ単独、Ｃ単独、ＡとＢの両方、ＡとＣの両方、ＢとＣの両方、および／またはＡとＢとＣの全部などを有する系を含であろう）。「Ａ、Ｂ、またはＣの少なくとも１つなど」に類似した条件が用いられる場合、一般的には、かかる構成は当業者がその条件を理解する意味であることが意図される（たとえば、「Ａ、Ｂ、またはＣの少なくとも１つを有する系」は、限定されるものではないが、Ａ単独、Ｂ単独、Ｃ単独、ＡとＢの両方、ＡとＣの両方、ＢとＣの両方、お

よび／またはＡとＢとＣの全部などを有する系を含であろう）。さらに、２つ以上の代替用語を表す実質上任意の選言的な語および／または語句は、明細書、請求項、または図面にかかわらず、用語の１つ、用語のいずれか、または用語の両方を含む可能性が企図されると理解すべきであることは当業者であれば理解されよう。たとえば、「ＡまたはＢ」という語句は「Ａ」または「Ｂ」または「ＡおよびＢ」の可能性を含むものと理解されよう。

【０８４４】

そのほかに、本開示の特徴または態様がマーカッシュグループにより記述される場合、それにより、本開示は、マーカッシュグループの任意の個別のメンバーまたはメンバーのサブグループにより記述されることは当業者であれば分かるであろう。

【０８４５】

当業者であれば理解されるであろうが、あらゆる目的で、たとえば、明細書の提供に関して、本明細書に開示された範囲はすべて、あらゆる可能なサブ範囲およびそのサブ範囲の組合せをも包含する。いずれの列挙された範囲も、十分に記述されたものとしてかつその範囲が少なくとも２等分、３等分、４等分、５等分、１０等分などされうるものとして容易に認識可能である。たとえば、限定されるものではないが、本明細書で考察した各範囲は、下３分の１、中３分の１、上３分の１に容易に分解可能である。同様に、当業者であれば理解されるであろうが、「～まで」、「少なくとも～」などの表現はすべて、リサイトされた数を含み、以上で考察したように後続的にサブ範囲に分解可能な範囲を意味する。最終的に、当業者であれば理解されるであろうが、範囲は各個別のメンバーを含む。したがって、たとえば、１～３個の細胞を有するグループは、１、２、または３個の細胞を有するグループを意味する。同様に、１～５個の細胞を有するグループは、１、２、３、４、または５個の細胞を有するグループを意味し、他も同様である。

【０８４６】

以上のことから、本開示の種々の実施形態が、例示を目的としたものであり、本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、様々な変更が実施されうることは理解されよう。従って、本明細書に開示される種々の実施形態は、限定を意図したものではなく、真の範囲および趣旨は、以下の特許請求の範囲により示される。

【図１】

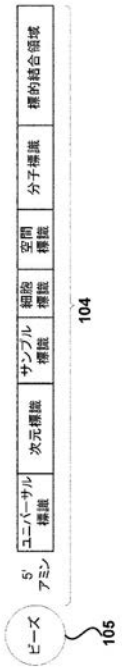


図1

【図２】

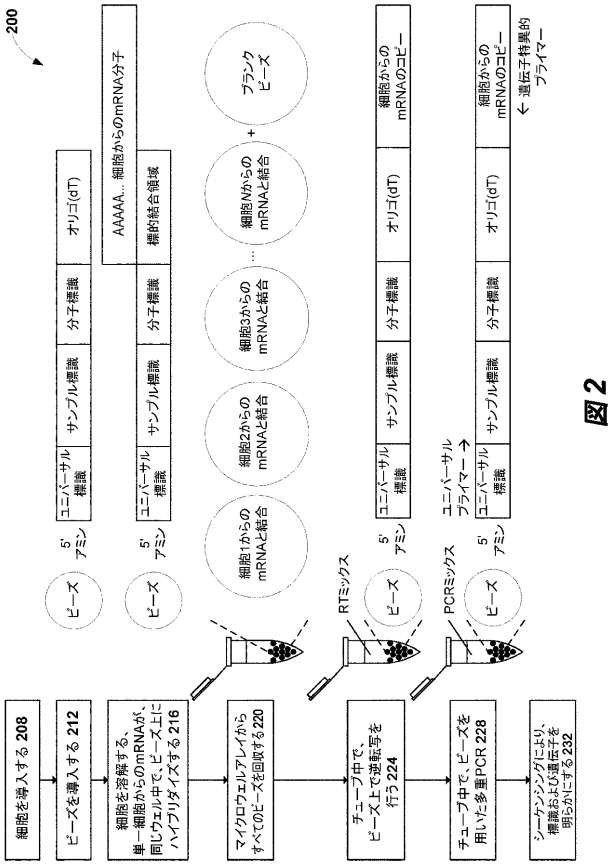


図2

【図３】

図3

【図４】

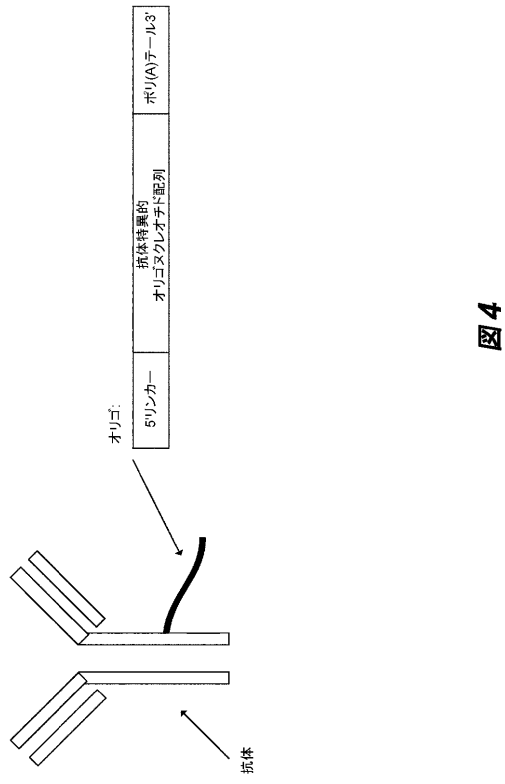


図4

【図５】

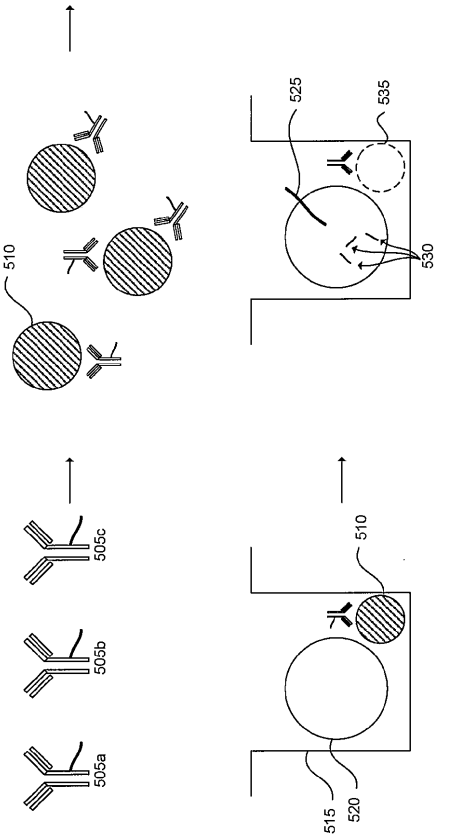


図5

【図６Ａ】

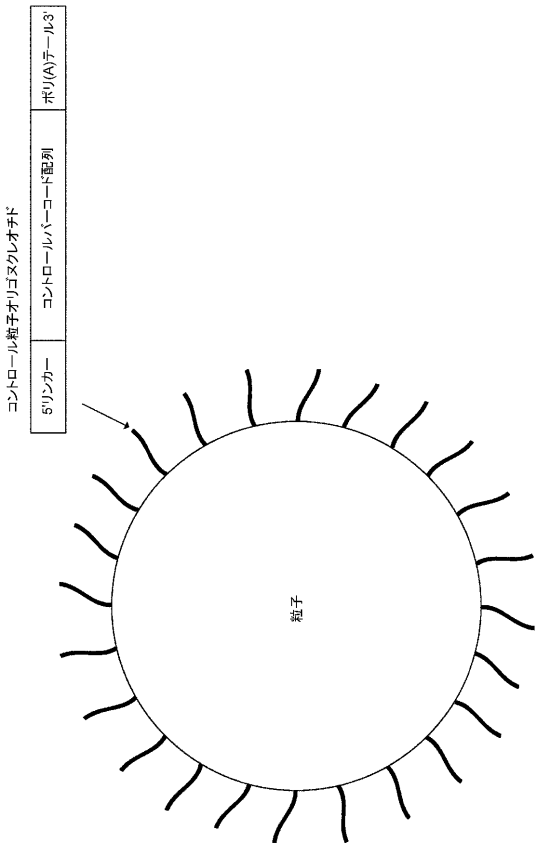


図6A

【図６Ｂ】

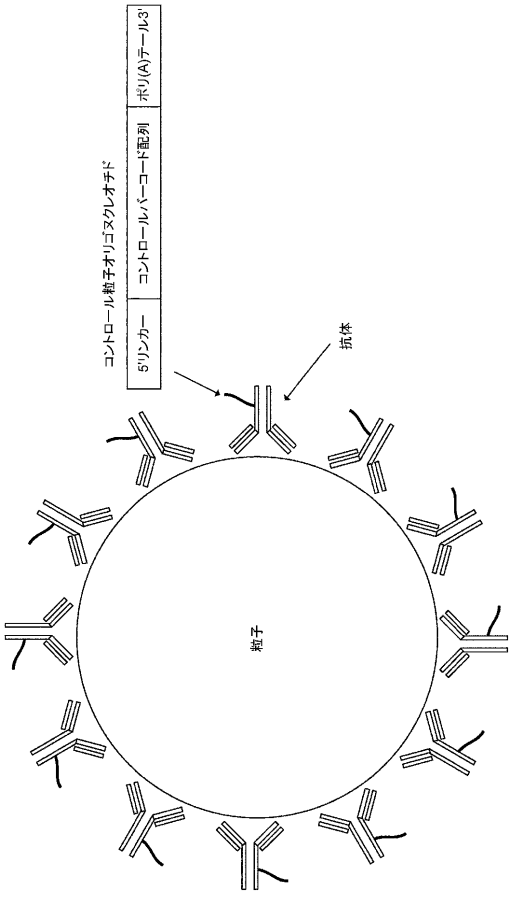


図6B

【図６Ｃ】

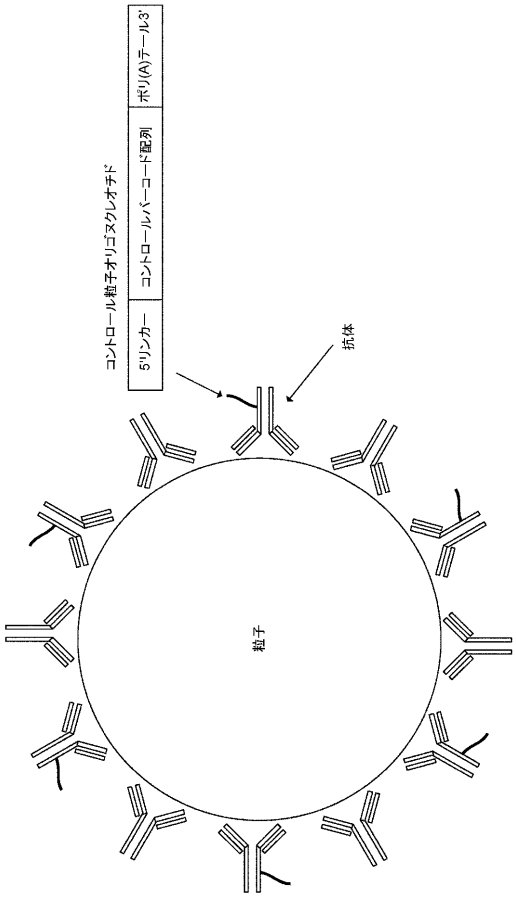


図6C

【図６Ｄ】

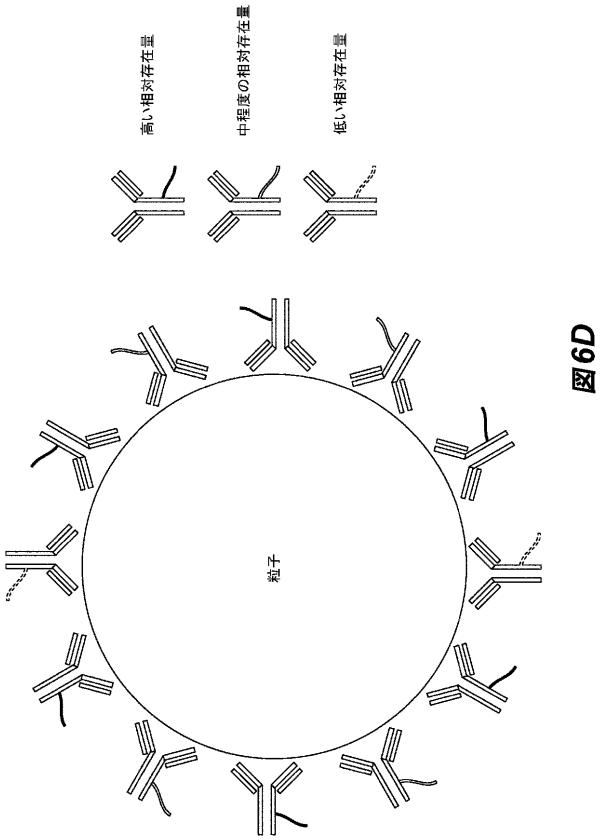


図6D

【図６Ｅ】

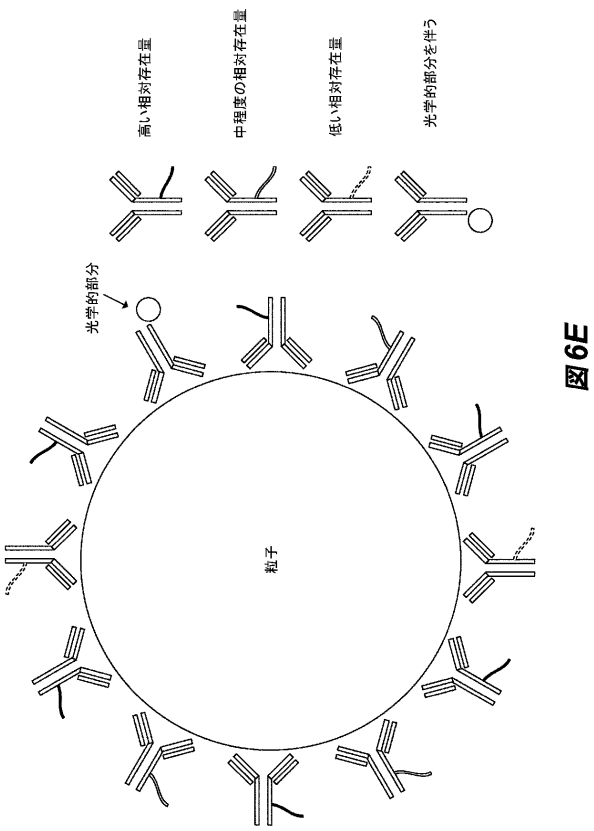


図6E

【図７】

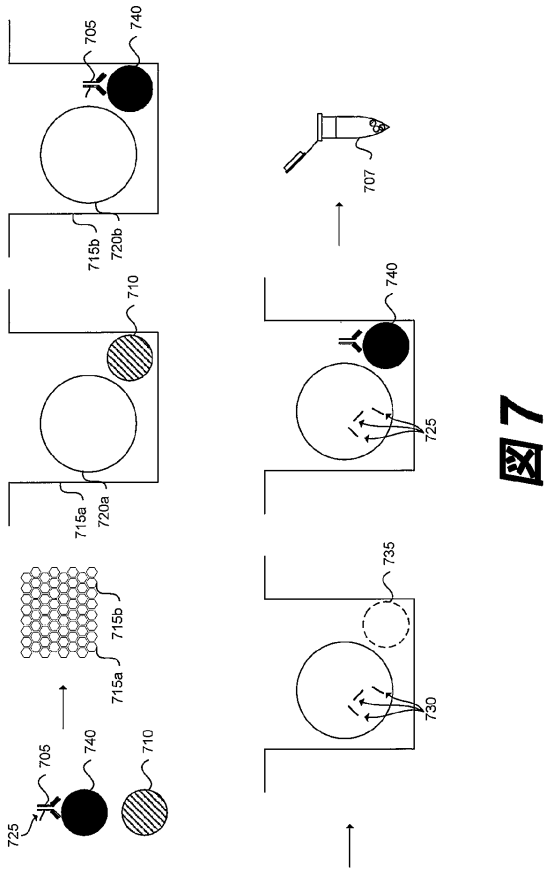


図7

【図８】

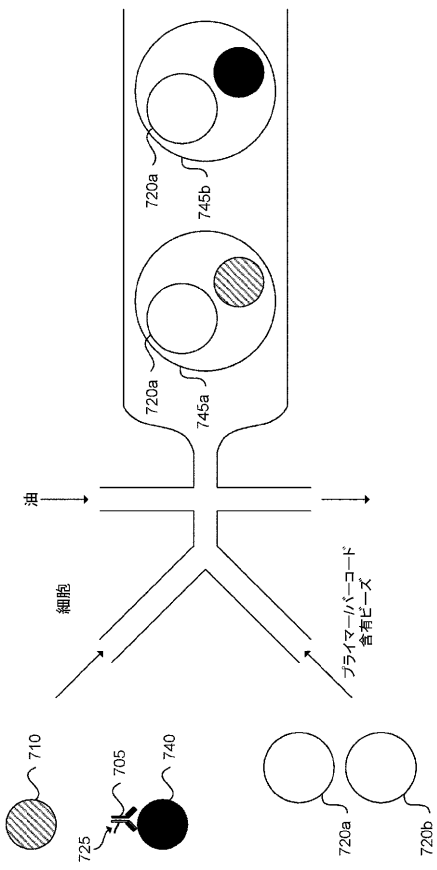


図8

【図９】

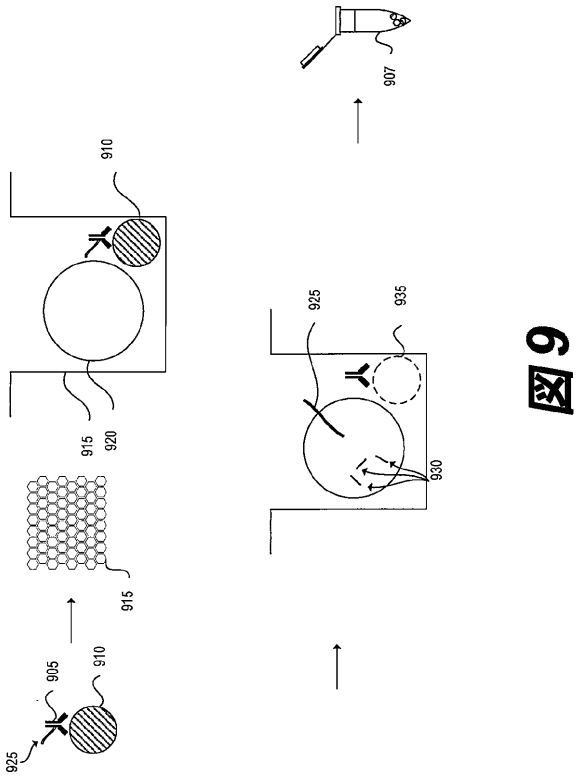


図9

【図１０】

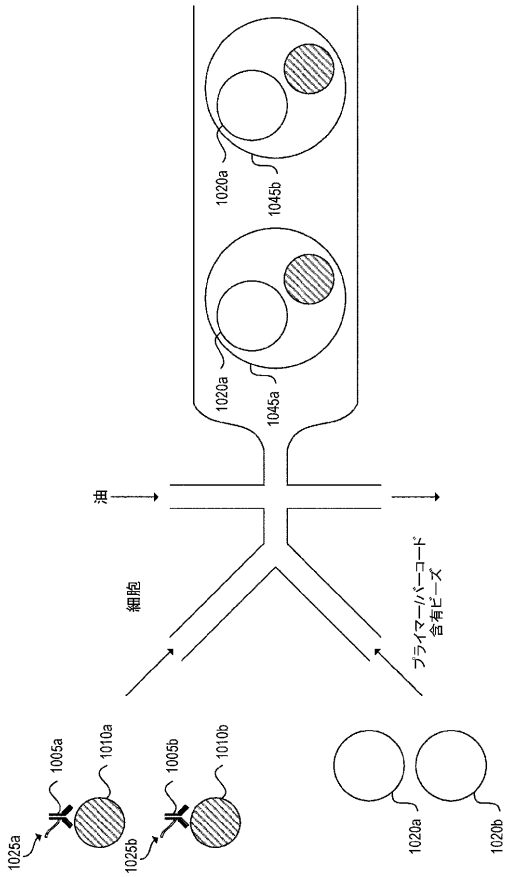


図10

【図１１Ａ－１１Ｂ】

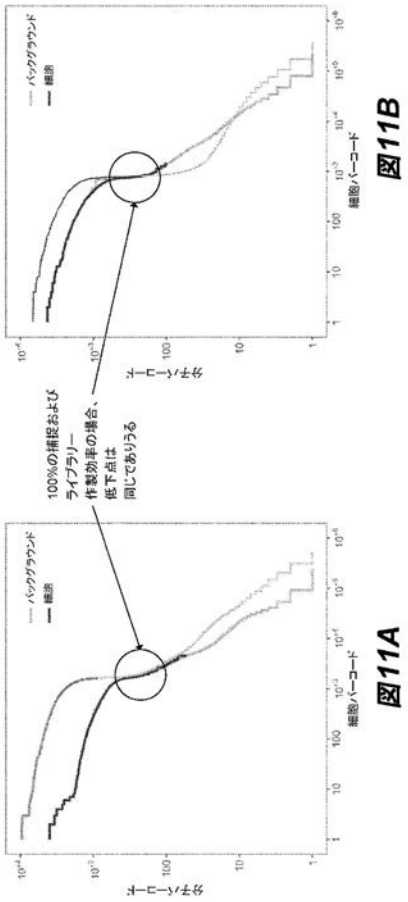


図11A

図11B

【図１１Ｃ】

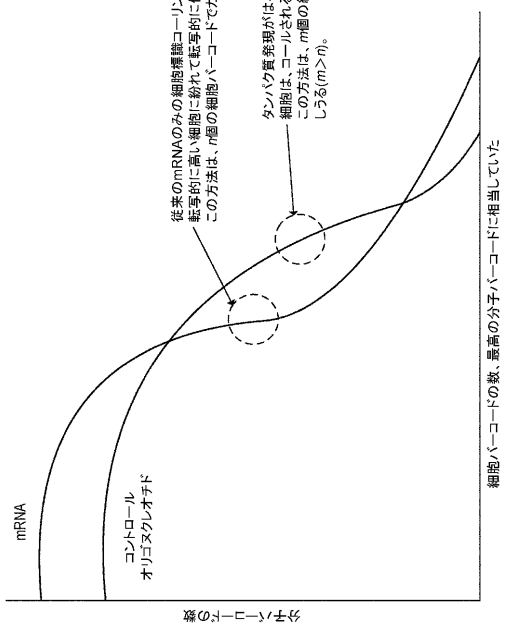


図11C

【図１２】

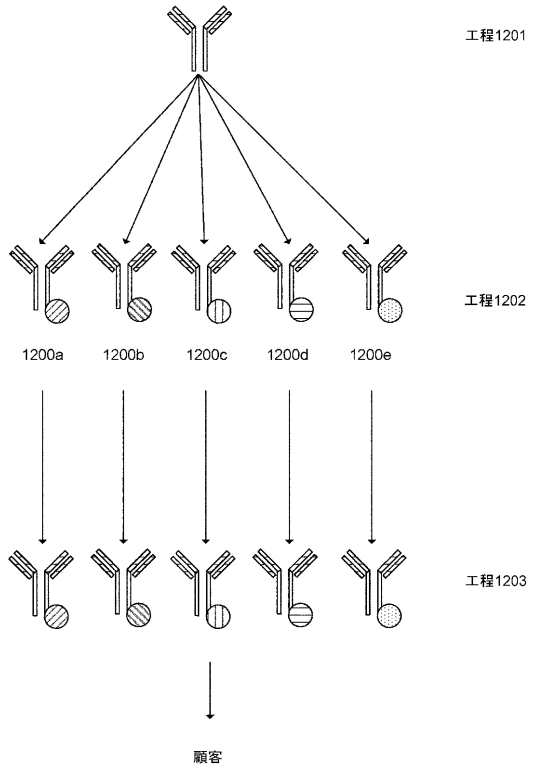


図12

【図１３】

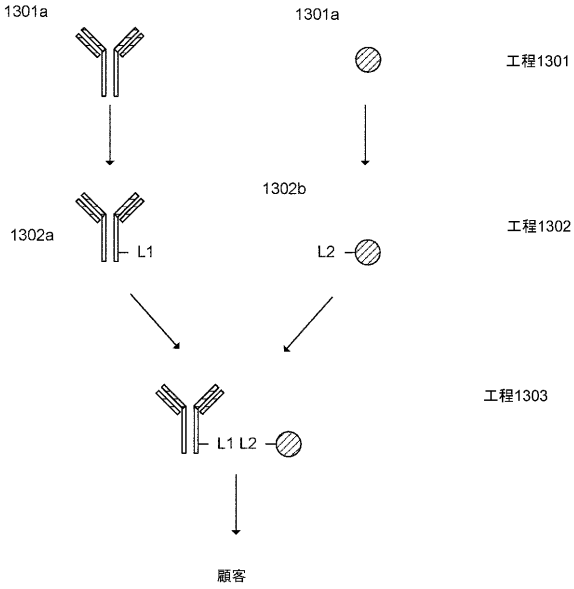


図13

【図１４】

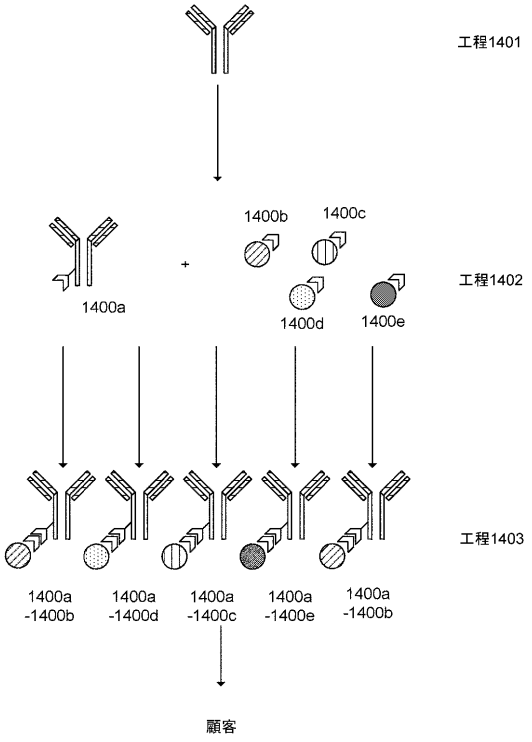


図14

【図１５】

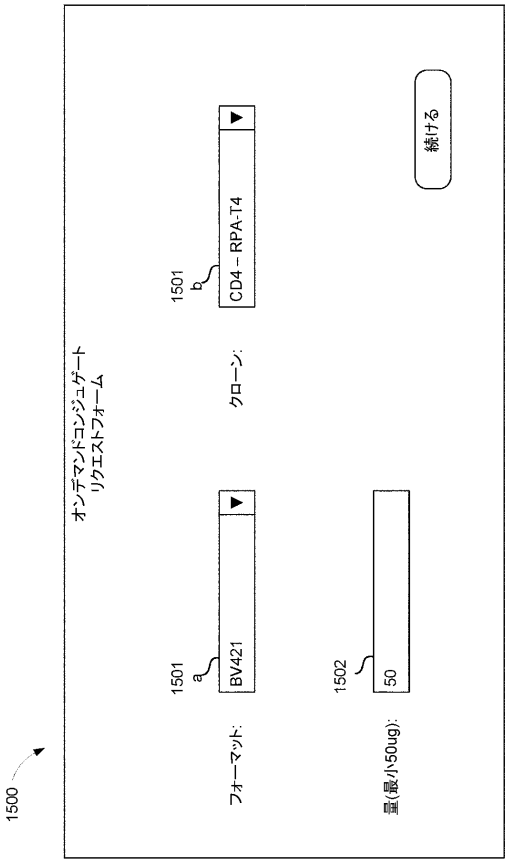


図15

【図１６】

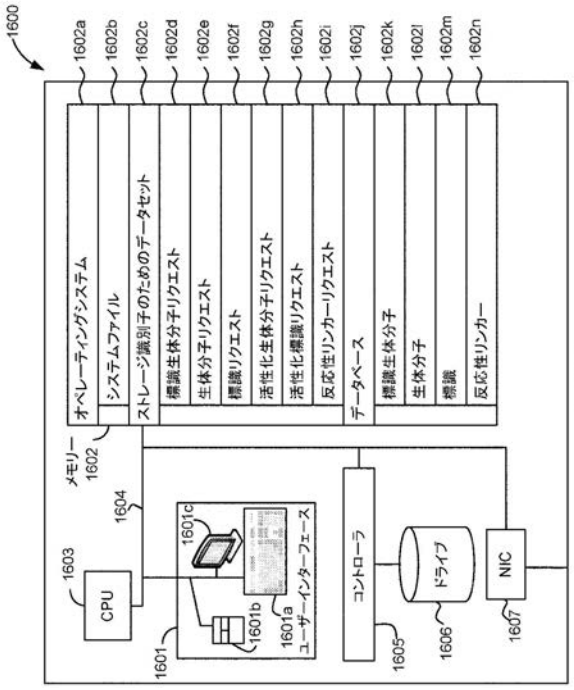


図16

【図１７】

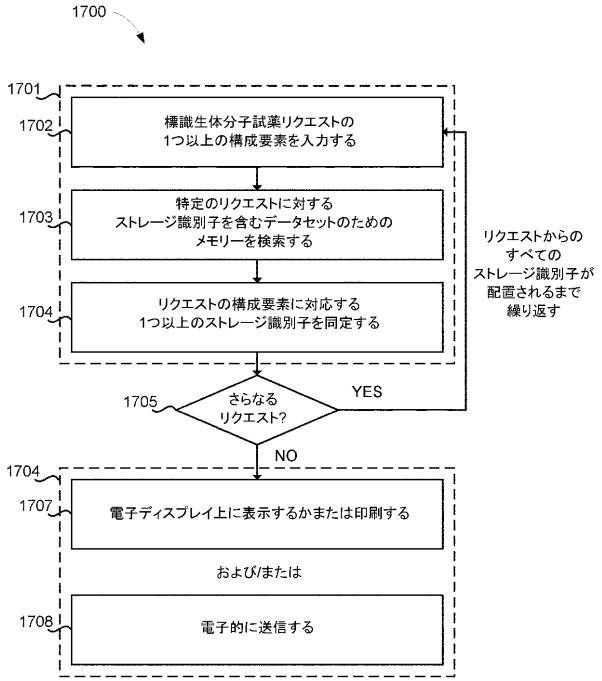


図17

【図１８－１】

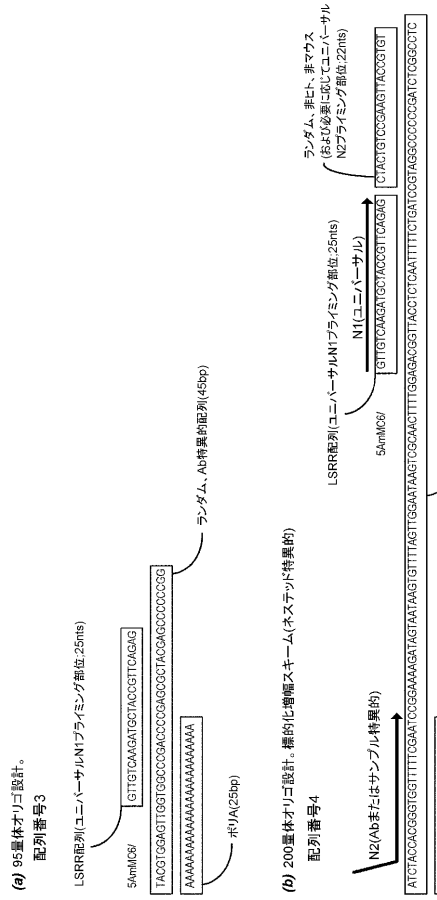


図18

【図１８－２】

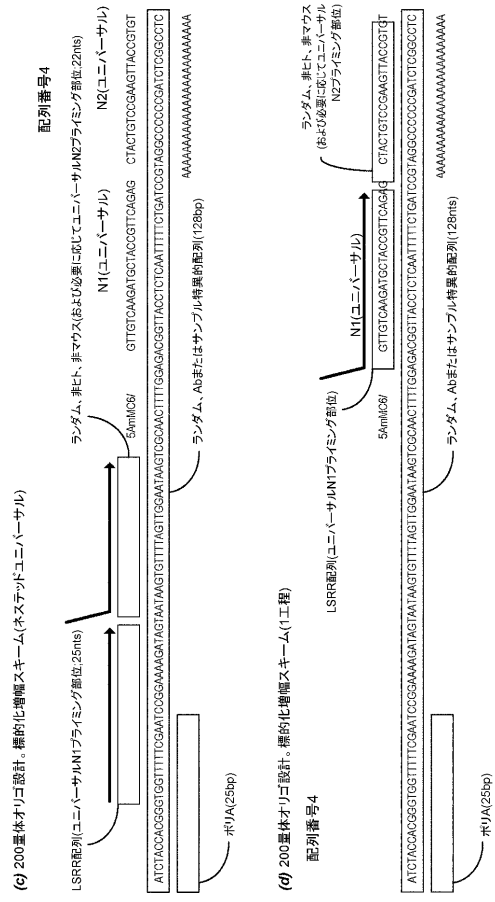


図18（続き）

【図１９】

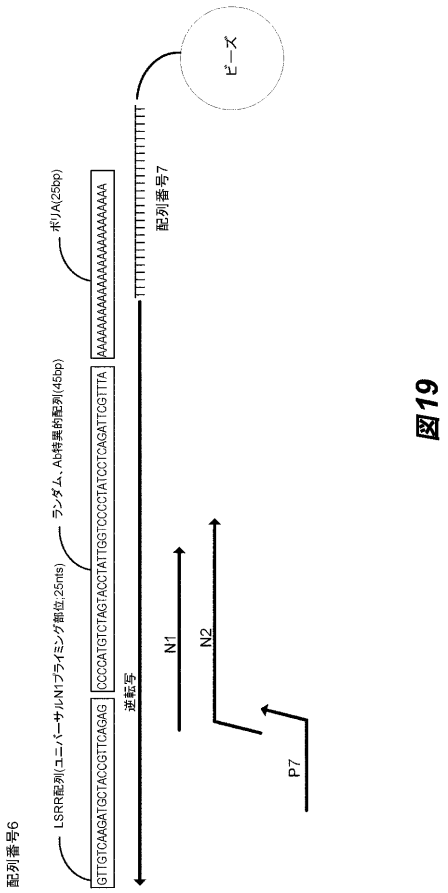


図19

【図２０－１】

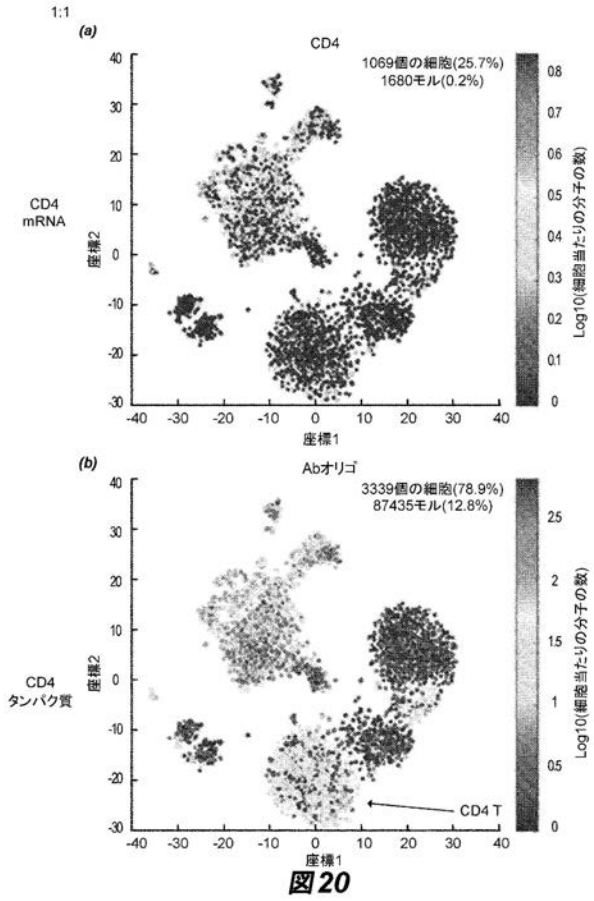


図20

【図２０－２】

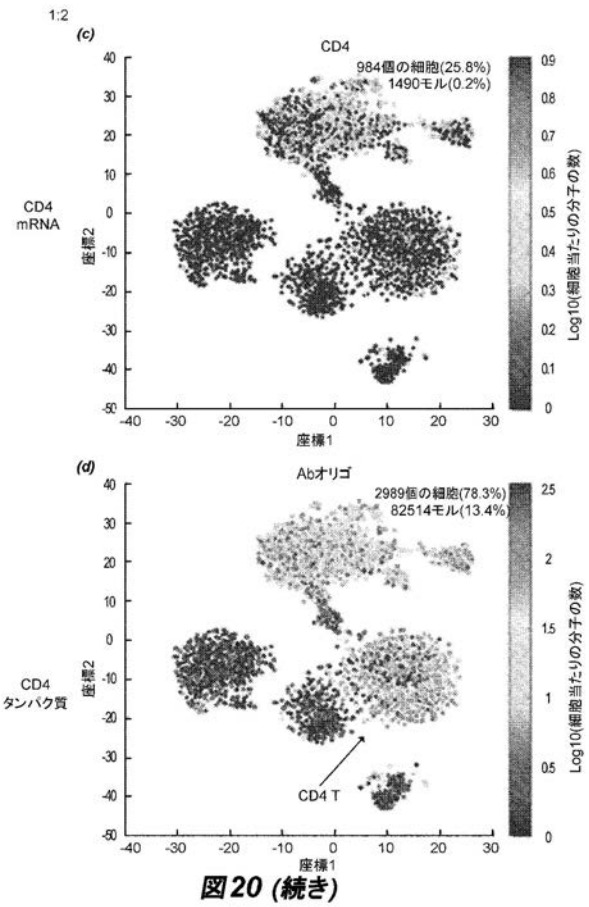


図20 (続き)

【図２０－３】

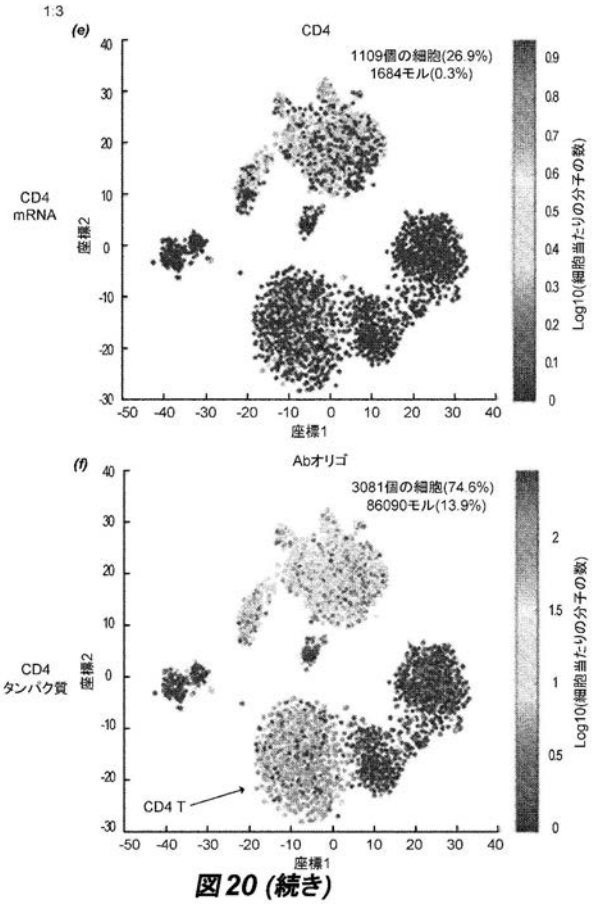


図20 (続き)

【図２１】

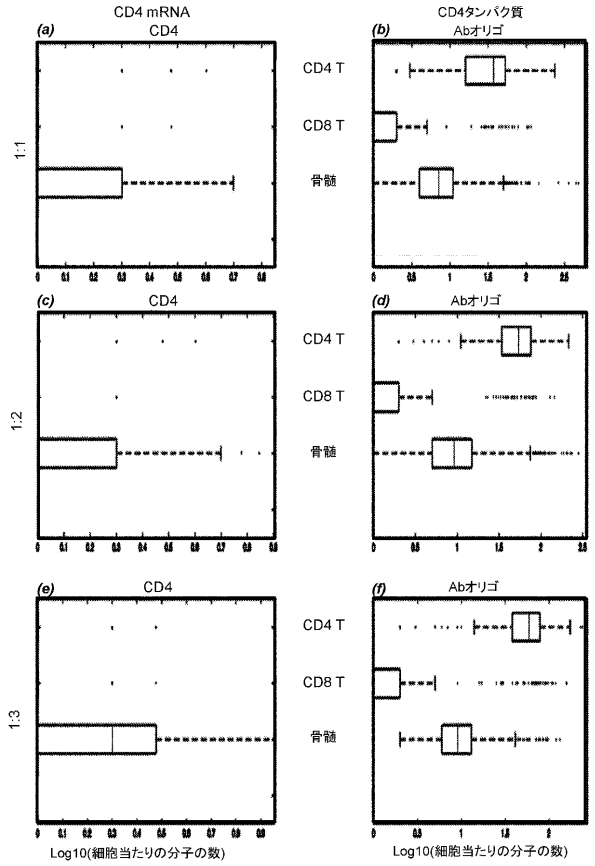


図21

【図２２】

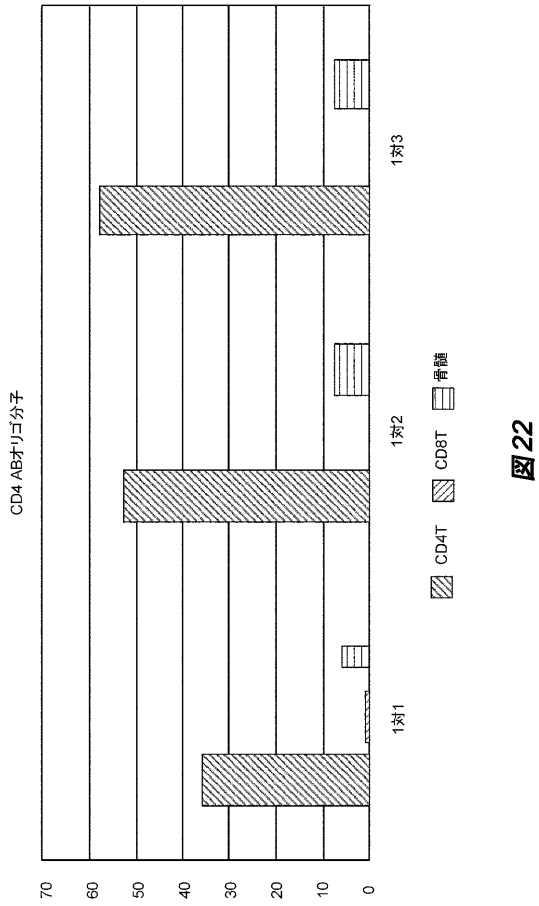


図22

【図２３】

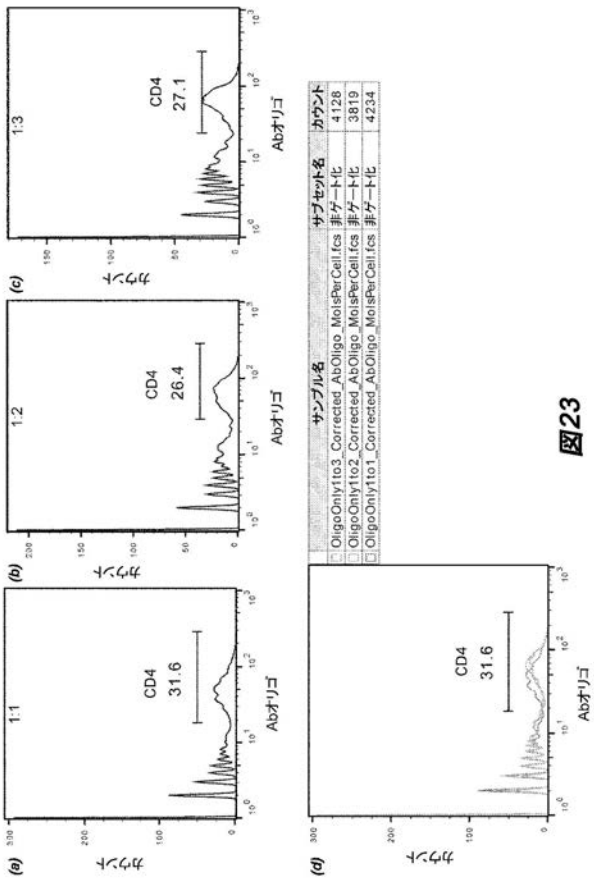


図23

【図２４】

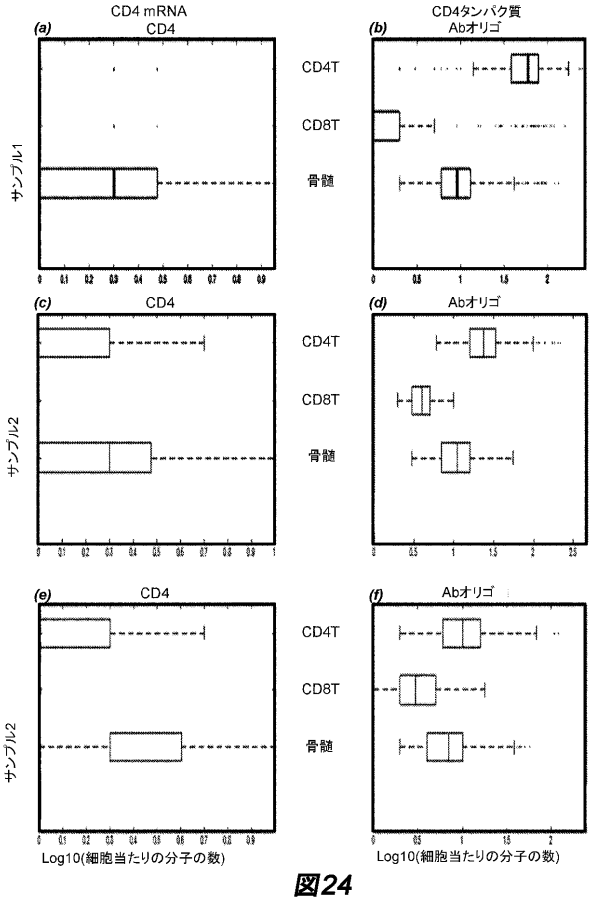


図24

【図２５】

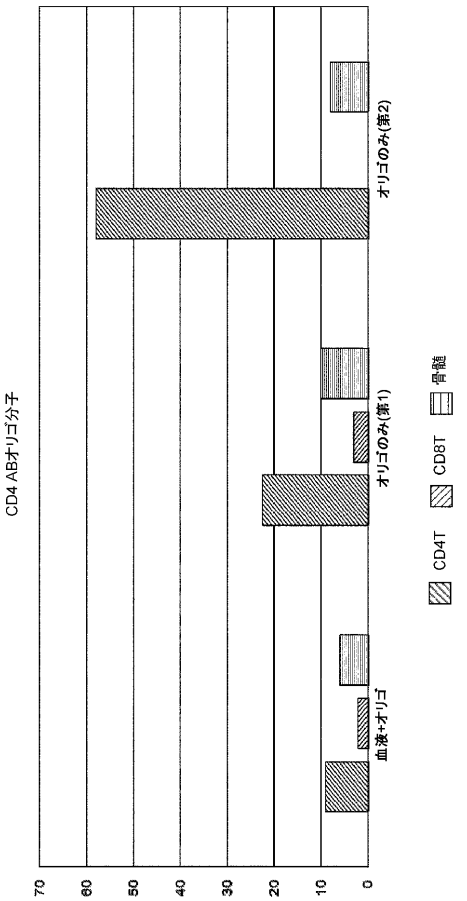


図25

【図２６Ａ－１】

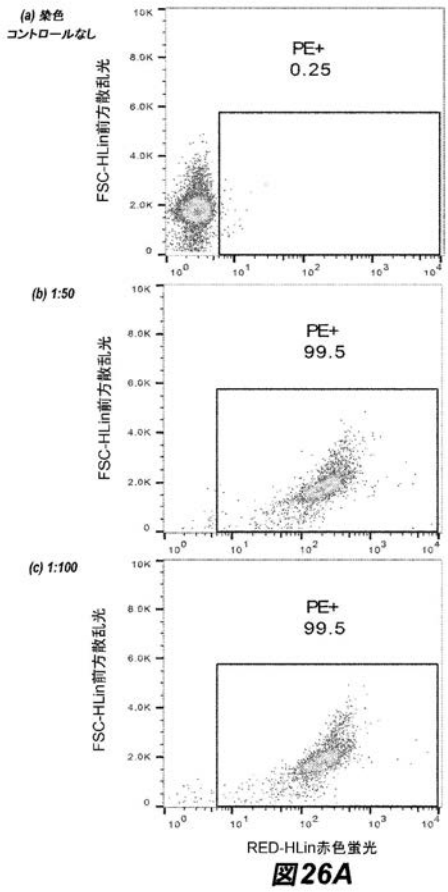


図26A

【図２６Ａ－２】

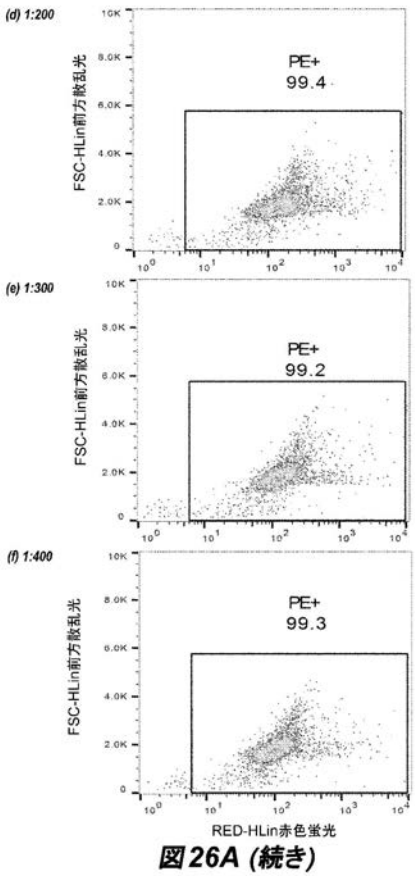


図26A (続き)

【図２６Ａ－３】

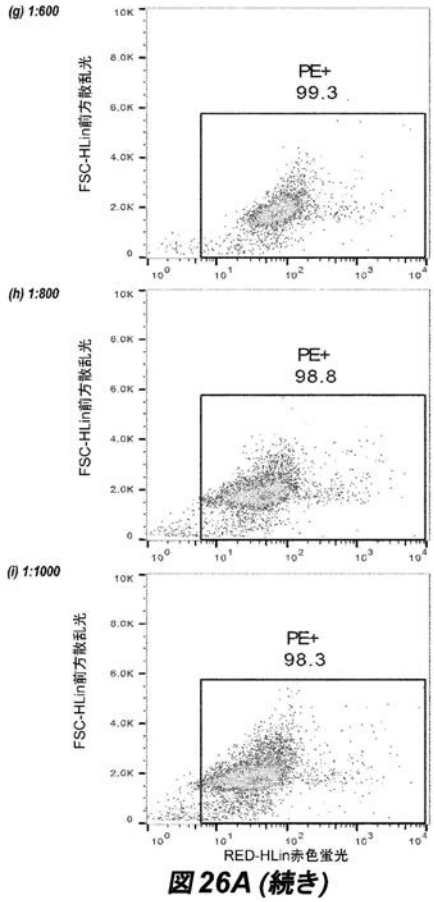


図26A (続き)

【図２６Ｂ】

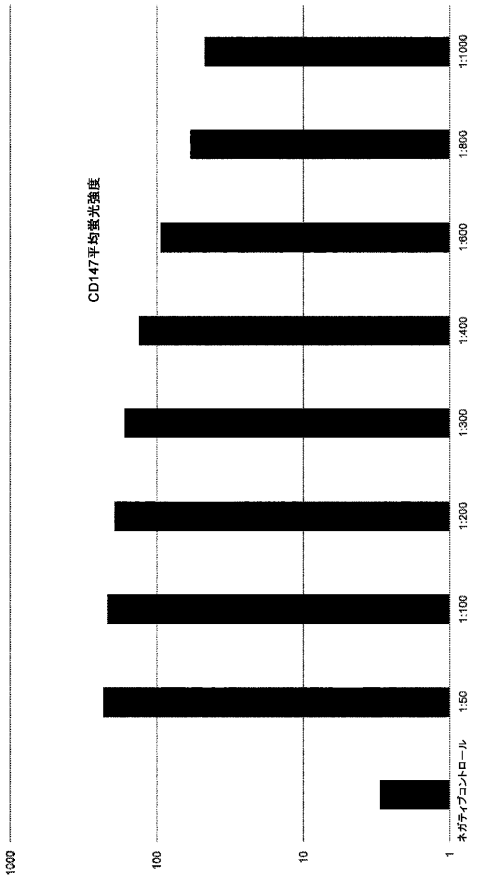


図26B

【図２６Ｃ】

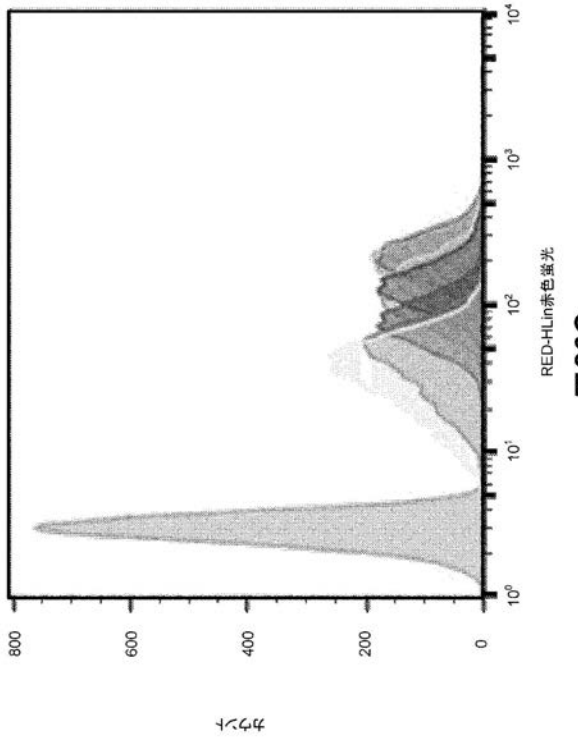


図26C

【図２７】

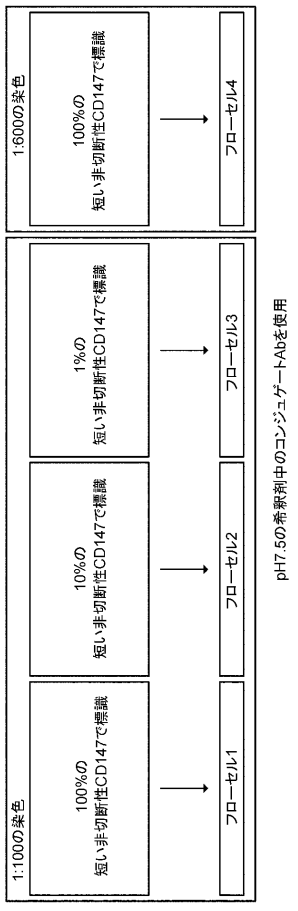


図27

【図２８】

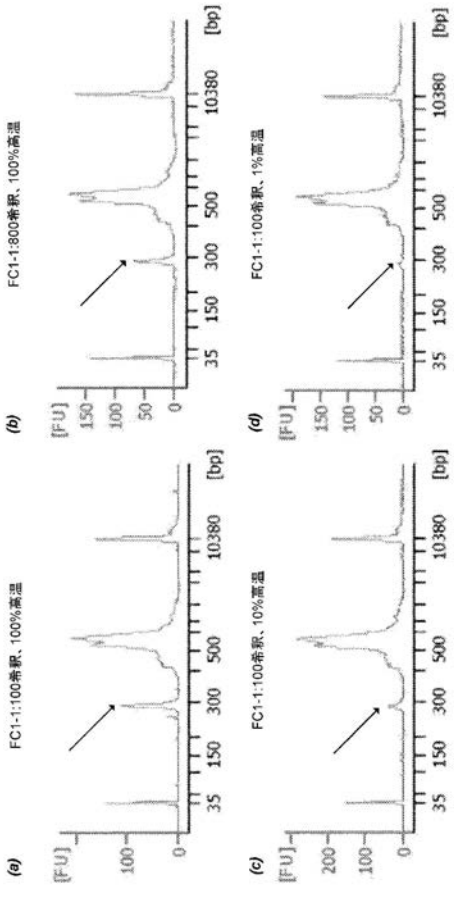


図28

【図２９－１】

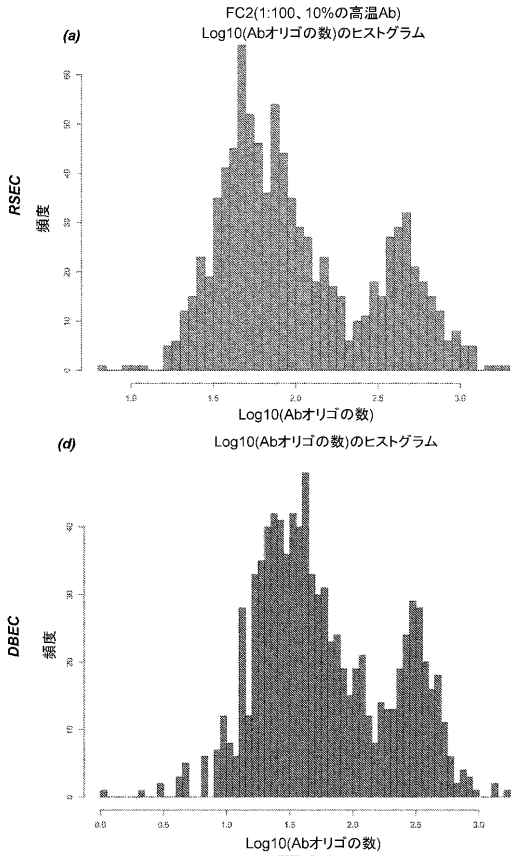


図29

【図２９－２】

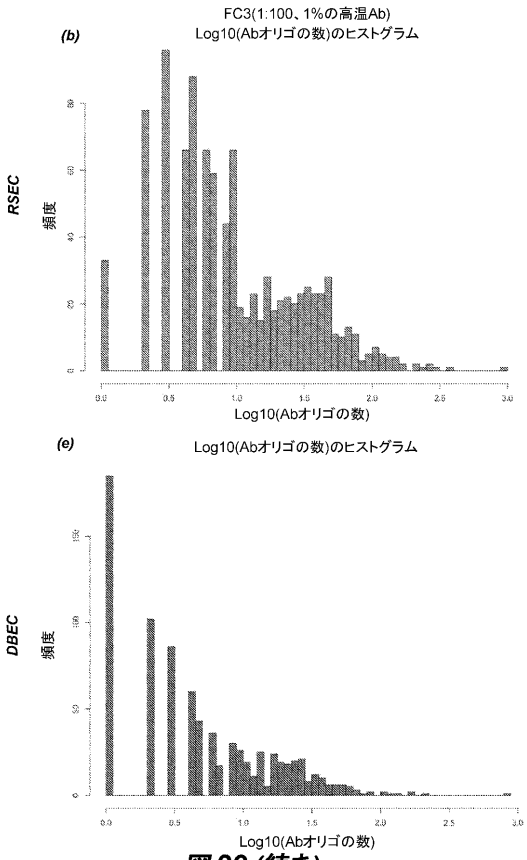


図29 (続き)

【図２９－３】

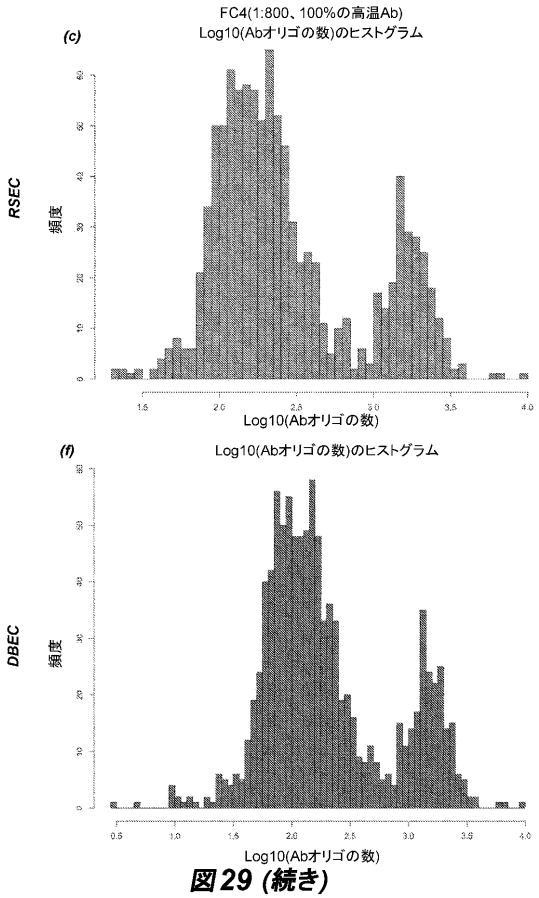


図29 (続き)

【図３０Ａ】

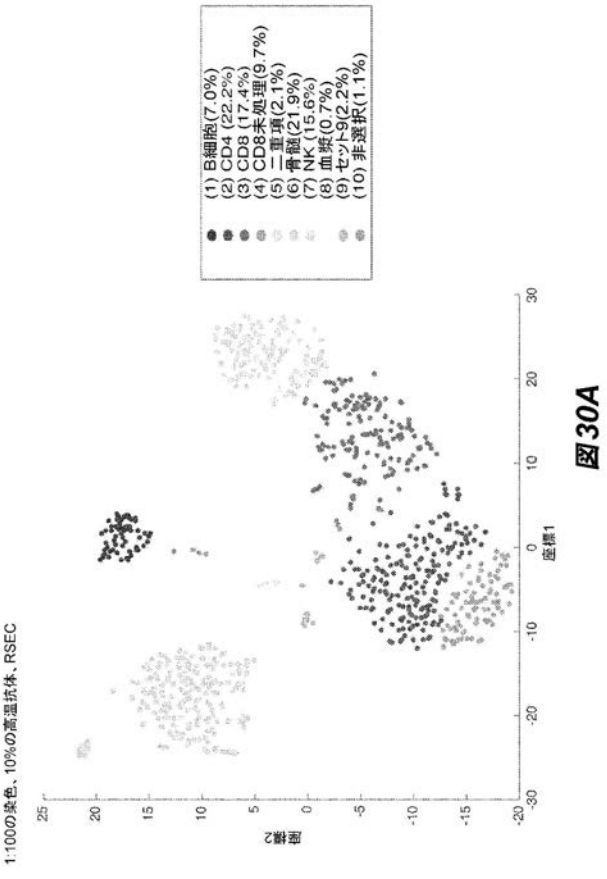


図30A

【図３０Ｂ】

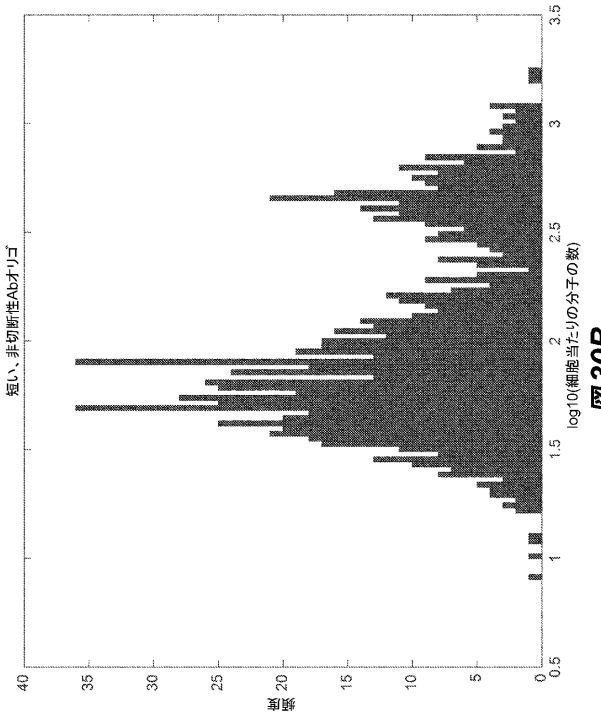


図30B

【図３０Ｃ】

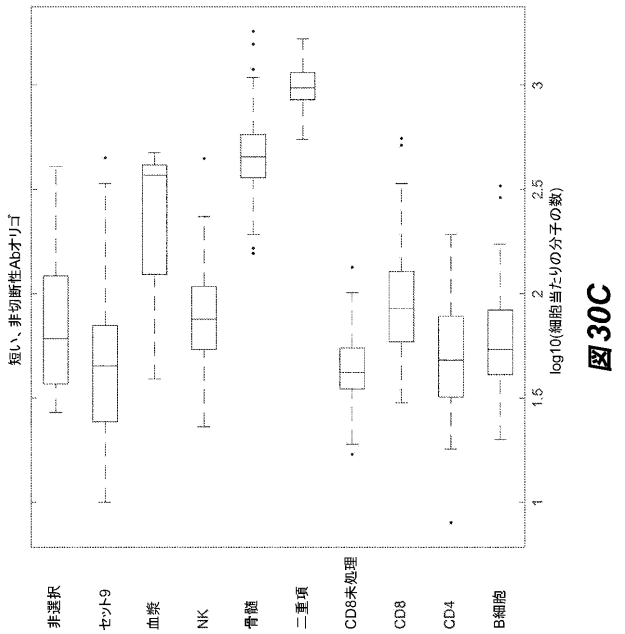


図30C

【図３１Ａ】

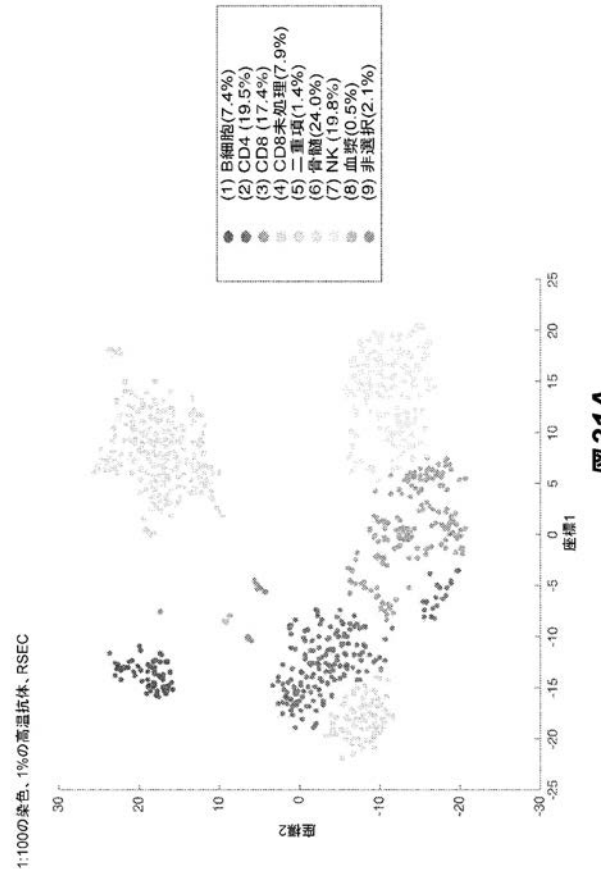


図31A

【図３１Ｂ】

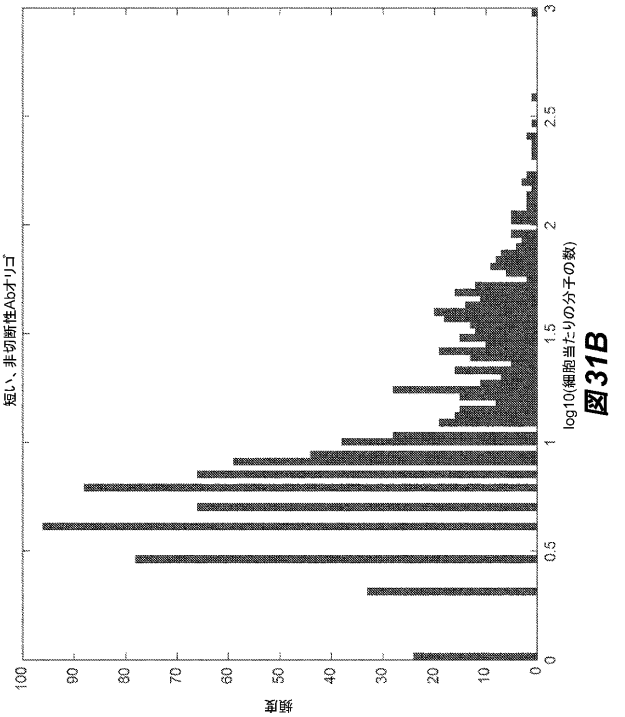


図31B

【図３１Ｃ】

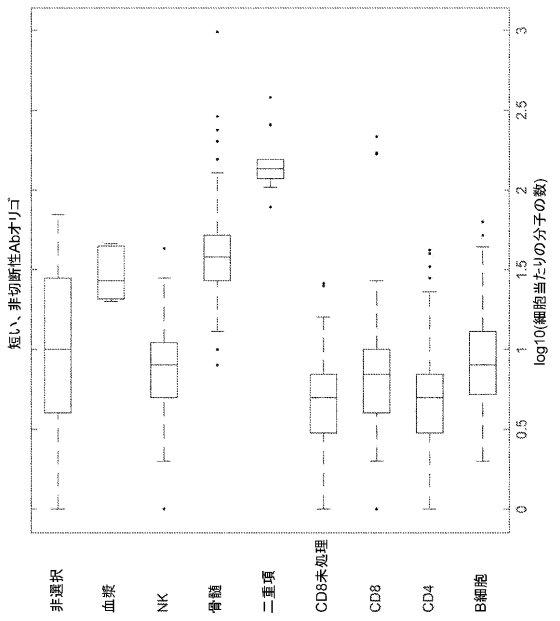


図31C

【図３２Ａ】

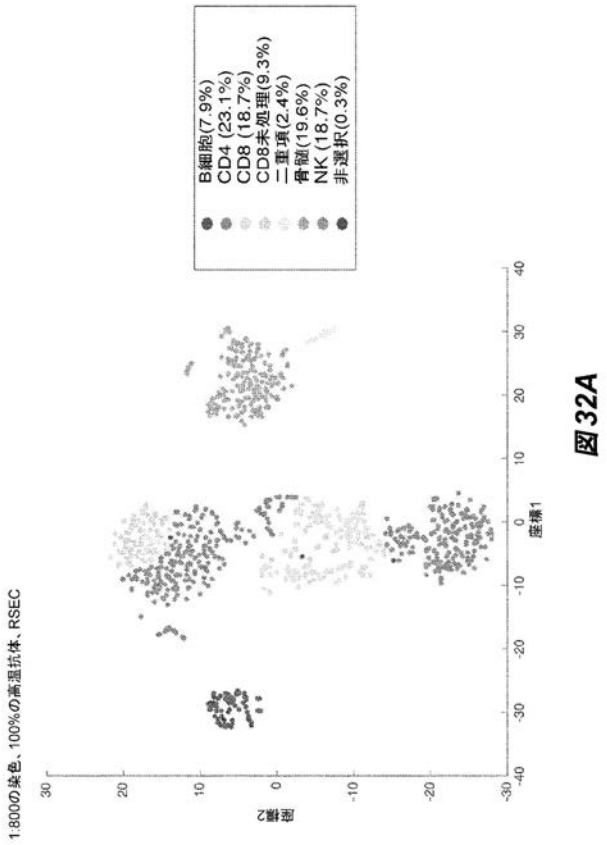


図32A

【図３２Ｂ】

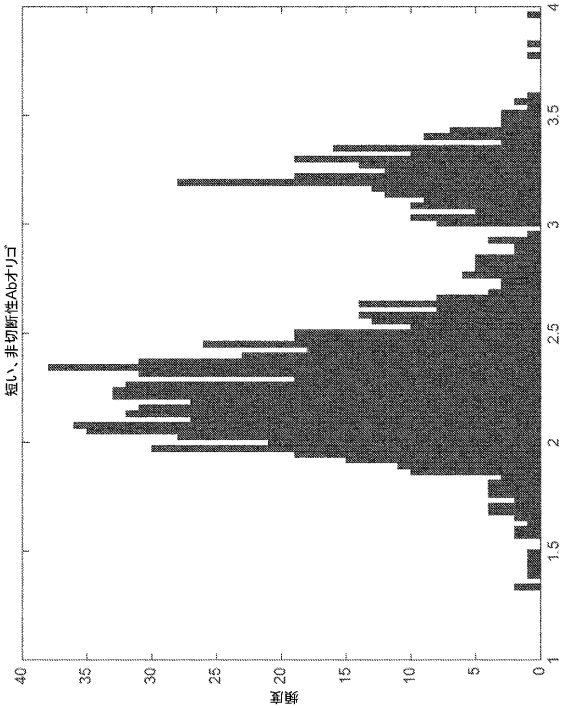


図32B

【図３２Ｃ】

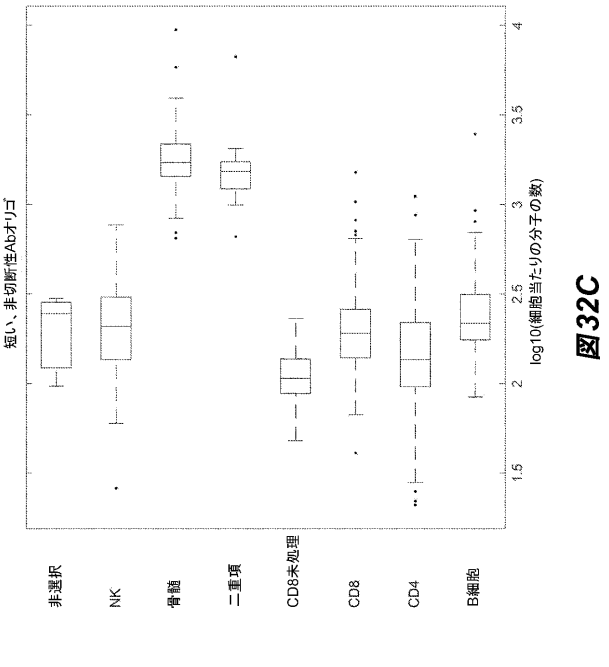


図32C

【図３３Ａ－３３Ｂ】

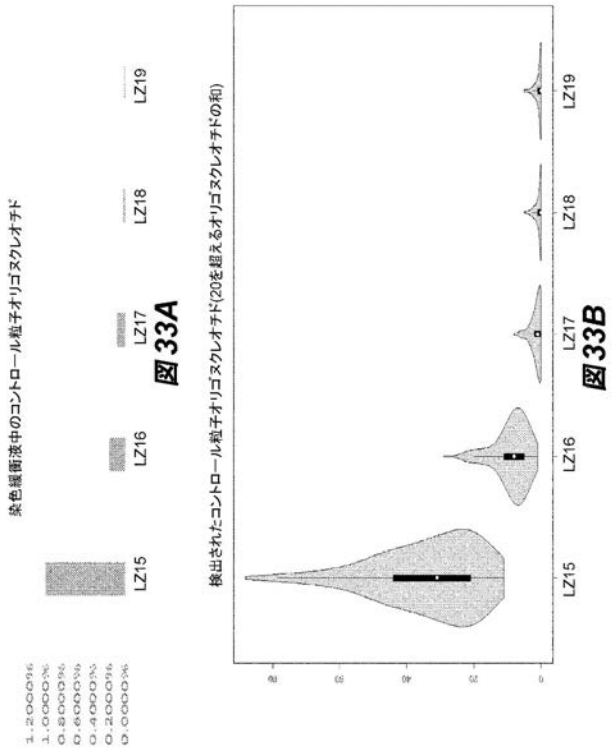


図33A

図33B

【図３４Ａ－３４Ｂ】

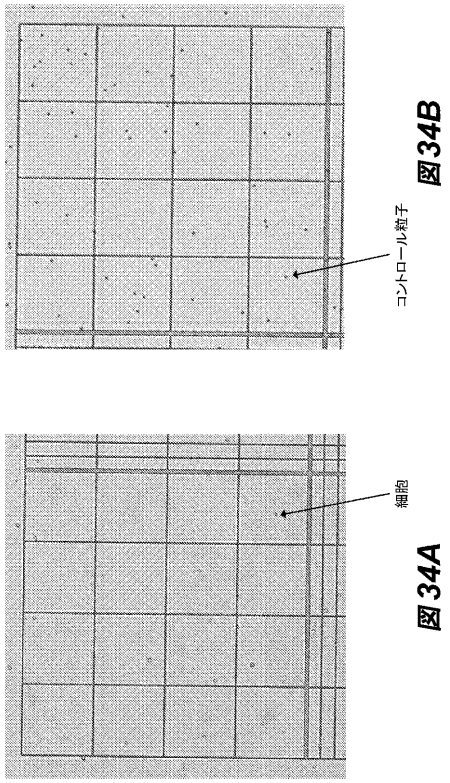


図34B

図34A

【図３５Ａ－３５Ｂ】

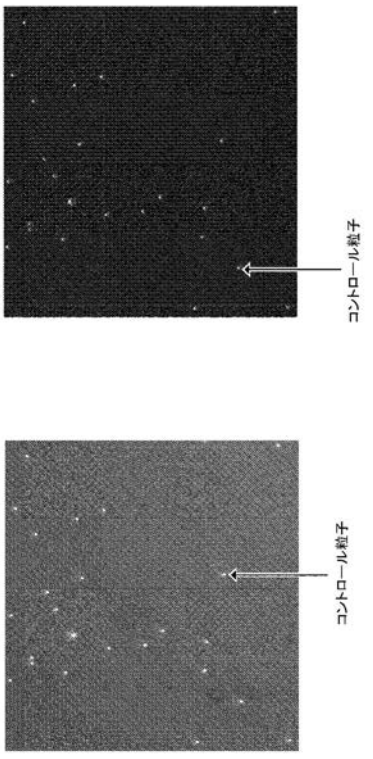


図35B

図35A

【図３６】

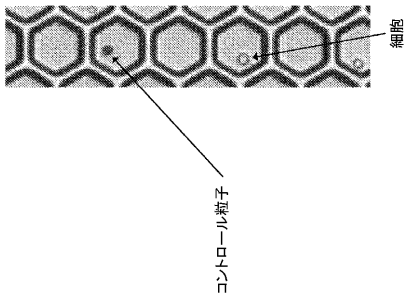


図36

【配列表】
2020502255000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/053331

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/68 G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/543 G06F19/00
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N C12Q G06F

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/065756 A1 (UNIV SINGAPORE [SG]) 1 May 2014 (2014-05-01)	1-12, 14-23, 25-27
Y	the whole document in particular: abstract page 3, line 4 - page 4, line 7 claims 1-25 bridging par.; page 16 - page 17 figure 1 page 15, line 11 - line 19 page 6, paragraph 1 page 10, paragraph 2 ----- -/--	13,24

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 January 2018	20/03/2018

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

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/053331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/204939 A2 (LEWIS KIM [US]) 24 December 2014 (2014-12-24)	1-12, 14-23, 25-27
Y	the whole document in particular: abstract examples 2,3 claims 1-26 paragraphs [0003], [00011], [00036], [00037], [00043]	13,24

X	US 2002/192687 A1 (MIRKIN CHAD A [US] ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19)	1-3,8,9, 14-16,25
Y	figures 1a,1b,3 claims 1-41	4-7, 10-13, 17-24, 26,27

X	JAMES FLANIGON ET AL: "Multiplex protein detection with DNA readout via mass spectrometry", NEW BIOTECHNOLOGY, vol. 30, no. 2, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 153-158, XP055432152, NL ISSN: 1871-6784, DOI: 10.1016/j.nbt.2012.11.003 figure 1 abstract	1,24

X	AGNIESZKA LASS-NAPIORKOWSKA ET AL: "Detection Methodology Based on Target Molecule-Induced Sequence-Specific Binding to a Single-Stranded Oligonucleotide", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 84, no. 7, 3 April 2012 (2012-04-03), pages 3382-3389, XP055061104, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac3001034	1,2,8,9, 12-16, 25-27
Y	the whole document in particular: abstract figures 1,2,6 Experimental Section; page 3383 - page 3384	3-7,10, 11,17-24

	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/053331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ilona Holcomb ET AL: "Abstract 1853: Single-cell multiplexed profiling of protein-level changes induced by EGFR inhibitor gefitinib ¦ Cancer Research", Cancer Research, 1 July 2016 (2016-07-01), page 1853, XP055432169, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-1853 Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/14_Supplement/1853 [retrieved on 2017-12-05]	1
Y	the whole document	2-27
X	HAIBIAO GONG ET AL: "Simple Method To Prepare Oligonucleotide-Conjugated Antibodies and Its Application in Multiplex Protein Detection in Single Cells", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 27, no. 1, 20 January 2016 (2016-01-20), pages 217-225, XP055408616, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00613	1-9, 13-23, 25-27
Y	the whole document in particular: abstract figures 1,2	10-12,24
Y	GUANGCHANG ZHOU ET AL: "Photocleavable peptide-oligonucleotide conjugates for protein kinase assays by MALDI-TOF MS", MOLECULAR BIOSYSTEMS, vol. 8, no. 9, 1 January 2012 (2012-01-01), page 2395, XP055432174, GB ISSN: 1742-206X, DOI: 10.1039/c2mb25163a the whole document	2-27

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/053331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KI-CHEOL HAN ET AL: "An Approach to Multiplexing an Immunosorbent Assay with Antibody-Oligonucleotide Conjugates", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 21, no. 12, 15 December 2010 (2010-12-15), pages 2190-2196, XP055159581, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc100147a	1,3, 7-10, 13-16, 23,25,26
Y	the whole document in particular: abstract Scheme 2; page 2192 page 2193, left-hand column, line 17 - page 2194, left-hand column, line 14 Scheme 3; page 2195 page 2194, right-hand column, last paragraph - page 2195, right-hand column, line 10 Table 1; page 2191	2,4-6, 11,12, 17-22, 24,27

X	XIANSONG WANG ET AL: "Combining Gold Nanoparticles with Real-Time Immuno-PCR for Analysis of HIV p24 Antigens", PROCEEDINGS OF ICBBE 2007, IEEE, PISCATAWAY, NJ, USA, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 1198-1201, XP031116278, ISBN: 978-1-4244-1120-7	1
Y	the whole document in particular: abstract page 1198; figure 1	2-27

X	STEVEN W COTTEN ET AL: "Selection of proteins with desired properties from natural proteome libraries using mRNA display", NATURE PROTOCOLS, vol. 6, no. 8, 21 July 2011 (2011-07-21), pages 1163-1182, XP055151614, ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2011.354	1
Y	abstract	2-27

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/053331

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IRENE WEIBRECHT ET AL: "Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox", EXPERT REVIEW OF PROTEO, FUTURE DRUGS LTD., LONDON, GB, vol. 7, no. 3, 1 January 2010 (2010-01-01) , pages 401-409, XP008163362, ISSN: 1478-9450, DOI: 10.1586/EPR.10.10	1
Y	the whole document in particular: page 404; figure 1	2-27

X	MICHAL LEBL ET AL: "A High-Complexity, Multiplexed Solution-Phase Assay for Profiling Protease Activity on Microarrays", COMBINATORIAL CHEMISTRY AND HIGH THROUGHPUT SCREENING, vol. 11, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 24-35, XP055432708, NL ISSN: 1386-2073, DOI: 10.2174/138620708783398304	1,8-12
Y	the whole document in particular: abstract figures 1,3	2-7, 13-27

Y	EP 2 036 989 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]) 18 March 2009 (2009-03-18) paragraphs [0048], [0097] claim 15	16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/053331

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-27

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2017/053331

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-27

Pluralities of compositions per se each comprising a protein binding reagent conjugated with an oligonucleotide, wherein the oligonucleotide comprises a unique identifier for the protein binding reagent that it is conjugated therewith, and the protein binding reagent is capable of specifically binding to a protein target.

---

2. claims: 28-136, 211-311, 406-550, 628-717

Quantitative analysis methods, methods of sequence control, cell identification and kits using plurality of oligonucleotide probes comprises a target binding region and a barcode sequence, wherein the barcode sequence is from a diverse set of unique barcode sequences.

---

3. claims: 137-210, 312-405

Control compositions and kits comprising a plurality of control particle oligonucleotides associated with a control particle, wherein each of the plurality of control particle oligonucleotides comprises a control barcode sequence and a poly(dA) region.

---

4. claims: 551-627

Methods for sequencing control involving a control oligonucleotide which comprises a control barcode sequence and a pseudo-target region comprising a sequence substantially complementary to the target-binding region of at least one of the plurality of barcodes.

---

5. claims: 718-800

Methods for cell or multiplet identification involving an antigen binding reagent associated with a cell identification oligonucleotide.

---

6. claims: 801-996

Computer implemented systems and methods for labelling compounds.

---

7. claims: 997-1117

International Application No. PCT/US2017/053331

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Methods and Systems for preparing labelled reagents.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/053331

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014065756 A1	01-05-2014	AU 2013335321 A1	21-05-2015
		CN 104812915 A	29-07-2015
		EP 2909347 A1	26-08-2015
		JP 2015533282 A	24-11-2015
		US 2015275295 A1	01-10-2015
		WO 2014065756 A1	01-05-2014
WO 2014204939 A2	24-12-2014	US 2015011397 A1	08-01-2015
		US 2015011398 A1	08-01-2015
		WO 2014204939 A2	24-12-2014
US 2002192687 A1	19-12-2002	US 2002192687 A1	19-12-2002
		US 2006051798 A1	09-03-2006
EP 2036989 A1	18-03-2009	AU 2008328177 A1	28-05-2009
		CA 2699358 A1	28-05-2009
		DK 2036989 T3	22-10-2012
		DK 2195457 T3	29-10-2012
		EP 2036989 A1	18-03-2009
		EP 2195457 A1	16-06-2010
		ES 2391906 T3	30-11-2012
		ES 2392005 T3	03-12-2012
		JP 2010538628 A	16-12-2010
		US 2011021369 A1	27-01-2011
		WO 2009065635 A1	28-05-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
G01N	*33/531*	*(2006.01)*	G01N	33/53	M	
C12Q	*1/6876*	*(2018.01)*	G01N	33/531	Z	
C12N	*15/11*	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y	
			C12Q	1/6876		
			C12N	15/11	Z	

(31)優先権主張番号　62/399,795
(32)優先日　平成28年9月26日(2016.9.26)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
1．ＰＬＵＲＯＮＩＣ
2．ＴＲＩＴＯＮ
3．ＴＷＥＥＮ
4．Ｌｉｎｕｘ

(71)出願人　595117091
ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
ＢＥＣＴＯＮ，　ＤＩＣＫＩＮＳＯＮ　ＡＮＤ　ＣＯＭＰＡＮＹ
アメリカ合衆国　ニュー・ジャージー　０７４１７－１８８０　フランクリン・レイクス　ベクトン・ドライブ　１
１　ＢＥＣＴＯＮ　ＤＲＩＶＥ，　ＦＲＡＮＫＬＩＮ　ＬＡＫＥＳ，　ＮＥＷ　ＪＥＲＳＥＹ　０７４１７－１８８０，　ＵＮＩＴＥＤ　ＳＴＡＴＥＳ　ＯＦ　ＡＭＥＲＩＣＡ
(74)代理人　100094569
弁理士　田中　伸一郎
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田　和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田　洋之
(74)代理人　100119013
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　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　チャン　クリスティーナ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　シャム　エリーン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　ツェルナー　オラフ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　バンサル　ニダンジャリ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　ガディアリ　ジェイムズ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　ラム　グレッチェン　インボン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０２５，　メンロー　パーク，　キャンベル　アベニュー　４０４０，　スイート　１１０
(72)発明者　ジェンセン　エリック
アメリカ合衆国　ニュー・ジャージー　０７４１７　フランクリン・レイクス　ベクトン・ドライブ　１
(72)発明者　ローラー　ジュルグ
アメリカ合衆国　ニュー・ジャージー　０７４１７　フランクリン・レイクス　ベクトン・ドライブ　１
(72)発明者　ゲイロード　ブレント
アメリカ合衆国　ニュー・ジャージー　０７４１７　フランクリン・レイクス　ベクトン・ドライブ　１
(72)発明者　マーティン　ジョディ
アメリカ合衆国　ニュー・ジャージー　０７４１７　フランクリン・レイクス　ベクトン・ドライブ　１
(72)発明者　ヴィダル　ジェイソン　ジー
アメリカ合衆国　ニュー・ジャージー　０７４１７　フランクリン・レイクス　ベクトン・ドライブ　１

Ｆターム(参考)　4B029 AA27 BB01 BB15 CC13 FA01
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ05 QQ42 QQ79 QR08 QR32 QR36 QR55
QR83 QS03 QS25 QS34 QS39
4H045 AA10 AA30 BA54 EA50 EA60

专利名称(译)	使用具有条形码化寡核苷酸序列的试剂测量蛋白质表达		
公开(公告)号	JP2020502255A	公开(公告)日	2020-01-23
申请号	JP2019540515	申请日	2017-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	赛卢拉研究公司 贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	细胞研究公司 碧迪公司		
[标]发明人	ファンクリスティーナ ジェンセンエリック		
发明人	ファン クリスティーナ チャン クリスティーナ シャム エリーン ツェルナー オラフ バンサル ニダンジャリ ガディアリ ジェイムズ ラム グレッチェン インボン ジェンセン エリック ローラー ジュルグ ゲイロード ブレント マーティン ジョディ ヴィダル ジェイソン ジー		
IPC分类号	C07K1/13 C12Q1/6816 C12Q1/02 C12M1/00 G01N33/53 G01N33/531 C12Q1/6876 C12N15/11		
CPC分类号	B01J2219/00646 B01J2219/00722 B01J2219/00725 C12Q1/6804 G01N33/505 G01N33/54313 G01N33/6842 G01N33/6857 G16B25/10 G16H10/20 G16H20/13 C12Q2525/161 C12Q2525/173 C12Q2563/179 C12Q2565/514 C07K2319/01 C12N15/1006 C12N15/1096 C12Q1/68 C12Q1/6806 C12Q1/6823 C12Q1/6869 G01N33/54306 G01N33/566 G06F19/00 G16B99/00		
FI分类号	C07K1/13.ZNA C12Q1/6816.Z C12Q1/02 C12M1/00.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/531.Z G01N33/53.Y C12Q1/6876 C12N15/11.Z		
F-TERM分类号	4B029/AA27 4B029/BB01 4B029/BB15 4B029/CC13 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR83 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA54 4H045/EA50 4H045/EA60		
代理人(译)	田中真一郎 ▲▼吉尔场和彦 须田博之 山崎 一夫 服部博信		
优先权	62/515952 2017-06-06 US 62/464279 2017-02-27 US 62/399795 2016-09-26 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开的一些实施方案提供了多个组合物，每个组合物包括缀合至寡核苷酸的蛋白质结合试剂。 寡核苷酸包含与其连接的蛋白结合试剂的唯一标识符，该蛋白结合试剂能够特异性结合蛋白靶标。 还公开了用于定量分析样品中多种蛋白质靶标和同时定量分析样品中蛋白质和核酸靶标的方法和试剂盒。 本文还公开了用于制备标记的生物分子试剂的系统和方法，所述系统和方法包括标记的生物分子试剂，所述标记的生物分子试剂包括与寡核苷酸偶联的蛋白质结合试剂。

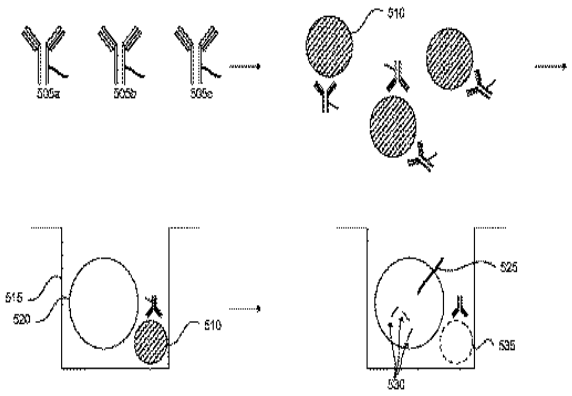


FIG. 5