

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 024 383**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6837 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2020** **PCT/US2020/060474**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.05.2021** **WO21097255**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2020** **E 20833994 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2025** **EP 4058598**

54 Título: **Generación de sondas de captura para el análisis espacial**

30 Prioridad:

13.11.2019 US 201962935043 P
27.11.2019 US 201962941581 P
20.05.2020 US 202063027558 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2025

73 Titular/es:

10X GENOMICS, INC. (100.00%)
6230 Stoneridge Mall Road
Pleasanton, CA 94588-3260, US

72 Inventor/es:

STOECKIUS, MARLON;
GIACOMELLO, STEFANIA;
BENT, ZACHARY;
FREY, MEGHAN L. F.;
GAGNON, ALEXANDER y
BORGSTROM, ERIK LEONARD HENRIK

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 024 383 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Generación de sondas de captura para el análisis espacial

5 Esta solicitud reivindica la prioridad a: La solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 62/935,043, presentada el 13 de noviembre de 2019, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 62/941,581 presentada el 27 de noviembre de 2019, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 63/027,558 presentada el 20 de mayo de 2020.

10 Antecedentes

Las células dentro de un tejido de un sujeto tienen diferencias en la morfología y/o función celular debido a niveles variados de analito (por ejemplo, expresión génica y/o proteica) dentro de las diferentes células. La posición específica de una célula dentro de un tejido (por ejemplo, la posición de la célula con relación a las células vecinas o la posición de la célula con relación al microentorno del tejido) puede afectar, por ejemplo, la morfología, la diferenciación, el destino, la viabilidad, la proliferación, el comportamiento, y la señalización y el intercambio de la célula con otras células en el tejido.

La heterogeneidad espacial se ha estudiado previamente mediante el uso de técnicas que solo proporcionan datos para un pequeño número de analitos en el contexto de un tejido intacto o una porción de un tejido, o proporcionan muchos datos de analitos para células individuales, pero no proporcionan información con respecto a la posición de la célula individual en una muestra biológica parental (por ejemplo, muestra de tejido).

Las matrices que capturan información espacial de analitos dentro de una muestra biológica pueden prepararse de varias maneras. Las matrices pueden diseñarse con una pluralidad de sondas de captura. Las sondas de captura pueden diseñarse para capturar una población sustancial de analitos (por ejemplo, ARNm) o para capturar analitos específicos (por ejemplo, específicos de genes). Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan formas de preparar matrices con sondas de captura para capturar analitos.

El documento núm. WO2018/091676 describe métodos para el etiquetado espacial de moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas. El documento núm. WO2020/123305 describe composiciones y métodos para generar sondas de captura en un sustrato para identificar la ubicación de los analitos en una muestra biológica.

Resumen

La presente invención proporciona un método para generar una matriz espacial, el método que comprende:

(a) proporcionar un sustrato que comprende una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, en donde un primer oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores comprende un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y en donde el extremo 5' del primer oligonucleótido aceptor se une al sustrato;

(b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal, en donde un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal comprende una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a una segunda asa de ligación;

(c) ligar una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes, en donde un primer oligonucleótido donante de la primera pluralidad de oligonucleótidos donantes comprende la segunda asa de ligación, un primer código de barras de ligación y un primer dominio de captura, al extremo 3' de un primer oligonucleótido aceptor para generar una primera sonda de captura, en donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación;

(d) ligar una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes, en donde un segundo oligonucleótido donante de la pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes comprende la segunda asa de ligación, un segundo código de barras de ligación y un segundo dominio de captura, al extremo 3' de un segundo oligonucleótido aceptor para generar una segunda sonda de captura, en donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación, para generar de esta manera una matriz espacial; y

medir cuantitativamente la presencia del primer código de barras de ligación, o un complemento del mismo, y el segundo código de barras de ligación, o un complemento del mismo, en donde medir cuantitativamente la presencia del primer código de barras de ligación y el segundo código de barras de ligación indica la eficiencia de la primera reacción de ligación.

Las matrices que capturan información espacial de analitos dentro de una muestra biológica pueden prepararse de varias maneras. Las matrices pueden diseñarse con una pluralidad de sondas de captura. Las sondas de captura pueden diseñarse para capturar una población sustancial de analitos (por ejemplo, ARNm) o para capturar analitos específicos (por ejemplo, específicos de genes). Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan formas de preparar matrices con sondas de captura para capturar analitos.

Generalmente, las matrices pueden fabricarse de varias maneras, incluso mediante varios métodos de impresión como se describe en la presente descripción. Sin embargo, los métodos de impresión pueden llevar mucho tiempo y ser intensos en cuanto a recursos. Las matrices que incluyen sondas de captura generalmente incluyen el mismo dominio de captura (por ejemplo, un dominio de captura poli(T)), sin embargo, las sondas de captura que incluyen diferentes dominios de captura permiten la multiplexación (por ejemplo, la captura simultánea de diferentes tipos de analitos o diferentes especies del mismo tipo de analito). Por lo tanto, por ejemplo, una primera sonda de captura puede ser capaz de capturar un analito particular (por ejemplo, ARNm) y una segunda sonda de captura puede ser capaz de capturar una especie particular de ARNm, otro ARN, ADN genómico, ADNc o un analito (por ejemplo, proteína) indirectamente a través de una secuencia de captura de analito.

La presente descripción presenta métodos, composiciones y kits para generar una sonda de captura mediante la ligación de una pluralidad de oligonucleótidos donantes a una pluralidad de oligonucleótidos aceptores que incluyen un código de barras espacial. En algunas modalidades, la reacción de ligación se facilita mediante un oligonucleótido de soporte, donde el oligonucleótido de soporte incluye una secuencia complementaria a una porción del oligonucleótido aceptor (por ejemplo, una primera asa de ligación) y una porción del oligonucleótido donante (por ejemplo, una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye un dominio de captura para detectar un analito (por ejemplo, directa o indirectamente). En algunas modalidades, una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes que incluyen un primer dominio de captura se liga a oligonucleótidos aceptores. En algunas modalidades, una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes que incluyen un segundo dominio se liga a oligonucleótidos aceptores. En algunas modalidades, el primer dominio de captura y el segundo dominio de captura son diferentes (por ejemplo, capturan diferentes analitos). Por lo tanto, puede generarse una matriz con dos o más especies de sondas de captura (por ejemplo, una primera sonda de captura con un primer dominio de captura y una segunda sonda de captura con un segundo dominio de captura) que permite la detección multiplexada de analitos en una muestra biológica.

En la presente descripción se describen métodos para generar una matriz espacial que incluye (a) proporcionar un sustrato que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un primer oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y donde el extremo 5' del primer oligonucleótido aceptor se une al sustrato; (b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal, donde un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a una segunda asa de ligación; (c) unir una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes, donde un primer oligonucleótido donante de la primera pluralidad de oligonucleótidos donantes incluye la segunda asa de ligación y un primer dominio de captura, al extremo 3' de un primer oligonucleótido aceptor para generar una primera sonda de captura, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación; y (d) ligar una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes, donde un segundo oligonucleótido donante de la pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes incluye la segunda asa de ligación y un segundo dominio de captura, al extremo 3' de un segundo oligonucleótido aceptor para generar una segunda sonda de captura, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación, para generar de esta manera una matriz espacial.

En algunas modalidades, la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un dominio de escisión, un identificador molecular único, un dominio funcional o sus combinaciones.

En algunas modalidades, el primer dominio de captura incluye una secuencia poli(T).

En algunas modalidades, el segundo dominio de captura incluye una secuencia específica de genes. En algunas modalidades, el segundo dominio de captura incluye una secuencia al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el segundo dominio de captura incluye una secuencia al menos 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el segundo dominio de captura incluye una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el segundo dominio de captura incluye una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el segundo dominio de captura incluye la SEQ ID NO: 20. En algunas modalidades, el primer dominio de captura incluye una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, la secuencia aleatoria es un hexámero.

En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia al menos 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la primera asa de ligación incluye una secuencia al menos 85 % complementaria a los primeros 7 nucleótidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la primera asa de ligación incluye una secuencia complementaria a los primeros 7 nucleótidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la segunda asa de ligación incluye una secuencia al menos 85 % complementaria a los nucleótidos 8-14 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la segunda asa de ligación incluye una secuencia complementaria a los nucleótidos 8-14 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una base invertida en el extremo 3'. En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye uno o más enlaces fosforotioato en el extremo 3'.

En algunas modalidades, el método incluye poner en contacto una muestra biológica con la matriz espacial después de la etapa (c). En algunas modalidades, el método incluye permeabilizar la muestra biológica para permitir que un analito en la muestra biológica interactúe con la primera sonda de captura o la segunda sonda de captura.

- 5 En algunas modalidades, el método incluye migrar el analito en la muestra biológica a la primera sonda de captura y la segunda sonda de captura. En algunas modalidades, la migración incluye migración pasiva. En algunas modalidades, la migración incluye la migración activa.

- 10 También se describen en la presente descripción métodos para generar una matriz espacial que incluye (a) proporcionar un sustrato que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y donde el extremo 5' del oligonucleótido aceptor se une al sustrato; (b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal, donde un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a una segunda asa de ligación presente en un oligonucleótido donante de una pluralidad de oligonucleótidos donantes; y (c) ligar el oligonucleótido donante que incluye un dominio de captura al extremo 3' del oligonucleótido aceptor para generar una sonda de captura, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación, para generar de esta manera una matriz espacial.

- 20 En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor incluye un dominio de escisión, un identificador molecular único, una secuencia funcional o sus combinaciones.

- 25 En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia al menos 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el oligonucleótidos de soporte universal incluye la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la primera asa de ligación incluye una secuencia al menos 85 % complementaria a los primeros 7 nucleótidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la primera asa de ligación incluye una secuencia complementaria a los primeros 7 nucleótidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la segunda asa de ligación incluye una secuencia al menos 85 % complementaria a los nucleótidos 8-14 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, la segunda asa de ligación incluye una secuencia complementaria a los nucleótidos 8-14 de la SEQ ID NO: 13.

- 35 En algunas modalidades, el método incluye poner en contacto una muestra biológica con la matriz espacial después de la etapa (c). En algunas modalidades, el método incluye permeabilizar la muestra biológica para permitir que un analito en la muestra biológica interactúe con la sonda de captura.

En algunas modalidades, el método incluye migrar el analito en la muestra biológica a la sonda de captura. En algunas modalidades, la migración incluye migración pasiva o migración activa.

- 40 También se describen en la presente descripción pero no forma parte de la invención reivindicada, kits que incluyen (a) una matriz que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación; (b) una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal; y (c) una ligasa.

- 45 En algunos kits, el oligonucleótido aceptor incluye la SEQ ID NO: 12. En algunos kits, un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal incluye una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunos kits, el oligonucleótido de soporte incluye la SEQ ID NO: 13.

- 50 En algunos kits, la ligasa es la T4 ligasa. En algunos kits, el kit incluye una transcriptasa inversa. En algunos kits, el kit incluye una ADN polimerasa.

- 55 En algunos kits, el kit incluye uno o más reactivos de permeabilización. En algunos kits, el kit incluye uno o más inhibidores de ARNasa. En algunos kits, el kit incluye instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

- 60 También se describen en la presente descripción pero no forman parte de la invención reivindicada, composiciones que incluyen (i) un oligonucleótido aceptor que incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, donde el extremo 5' del oligonucleótido aceptor se une a un sustrato; (ii) un primer oligonucleótido donante que incluye una segunda asa de ligación y un dominio de captura poli(T); y (iii) un oligonucleótido de soporte universal que incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a la segunda asa de ligación, y donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación del oligonucleótido aceptor y la segunda asa de ligación del oligonucleótido donante.

- 65 También se describen en la presente descripción pero no forman parte de la invención reivindicada, composiciones que incluyen (i) un primer oligonucleótido aceptor que incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, donde el extremo 5' del oligonucleótido aceptor se une a un sustrato; (ii) un primer oligonucleótido donante

que incluye una segunda asa de ligación y un dominio de captura poli(T); (iii) un segundo oligonucleótido donante que incluye la segunda asa de ligación y una secuencia que incluye la SEQ ID NO: 20; (iv) un primer oligonucleótido de soporte universal que incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a la segunda asa de ligación, y donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación del primer oligonucleótido aceptor y la segunda asa de ligación del primer oligonucleótido donante; y (v) un segundo oligonucleótido de soporte universal que incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a la segunda asa de ligación, y donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación del segundo oligonucleótido aceptor y la segunda asa de ligación del segundo oligonucleótido donante.

También se describen en la presente descripción pero no forman parte de la invención reivindicada, composiciones que incluyen al menos uno de una pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores que incluyen un código de barras espacial ligado a al menos uno de una pluralidad de primeros oligonucleótidos donantes que incluyen un primer dominio de captura, donde la pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores se une a un sustrato, al menos uno de la pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores que incluyen un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y al menos uno de una pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes que incluyen una segunda asa de ligación y un segundo dominio de captura, y un oligonucleótido de soporte universal, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con una primera asa de ligación de al menos uno de una pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores y la segunda asa de ligación de al menos uno de la pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes.

Cuando los valores se describen en términos de intervalos, debe entenderse que la descripción incluye la descripción de todos los posibles subintervalos dentro de tales intervalos, así como también valores numéricos específicos que caen dentro de tales intervalos independientemente de si se indica expresamente un valor numérico específico o un subintervalo específico.

El término "cada uno", cuando se usa en referencia a una recopilación de artículos, pretende identificar un artículo individual en la recopilación, pero no necesariamente se refiere a cada artículo en la recopilación, a menos que se indique expresamente de cualquier otra manera, o a menos que el contexto del uso indique claramente de cualquier otra manera.

En la presente descripción se describen diversas modalidades de los elementos de esta descripción.

Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran ciertas modalidades de los elementos y ventajas de esta descripción. Los símbolos de referencia similares en los dibujos indican elementos similares.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura con código de barras, como se describe en la presente descripción.

La Figura 2 muestra un método ilustrativo para generar una sonda de captura.

La Figura 3 es un gráfico ilustrativo que muestra la detección del ADNc con dominios de captura específicos de genes poli(T) y Penk ligados y no ligados.

Las Figuras 4A-B son imágenes fluorescentes que muestran la detección del ARNm de Penk con una sonda de captura específica de Penk generada mediante el método mostrado en la Figura 2 (Figura 4A) en comparación con un portaobjetos de optimización del tejido de control (TO) (Figura 4B).

La Figura 5 muestra un método basado en ligación ilustrativo para generar una sonda de captura mediante el uso de dos asas de ligación y un oligonucleótido de soporte universal.

Las Figuras 6A-B muestran la tinción con H&E (Figura 6A) de una muestra biológica y la captura de analito con dominios de captura poli(T) ligados (Figura 6B).

Las Figuras 7A-B son gráficos ilustrativos que muestran la detección del ADNc con dominios de captura poli(T) ligados (Figura 7A) y controles (Figura 7B).

La Figura 8 muestra correlaciones ilustrativas de Spearman y Pearson entre los recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) 1 ligada (eje Y) y los recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) impresa (eje X).

Las Figuras 9A-B muestran la expresión génica espacial para la proencefalina (Penk) (Figura 9A) y captura de Penk en un portaobjetos de optimización de tejidos mediante el uso de un dominio de captura específico de Penk ligado (Figura 9B).

La Figura 10 es un gráfico ilustrativo que muestra la captura de analito para analitos diana Penk con dominios de captura poli(T) ligados.

Las Figuras 11A-B muestran los resultados ilustrativos de correlación de Spearman y Pearson de dos submatrices separadas (Figuras 11A-B) entre recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) impresa y recuentos sin procesar de la submatriz de sonda de Penk ligada.

La Figura 12 muestra la distribución de lectura de secuenciación para un experimento mediante el uso de sondas poli(T) ligadas, sondas poli(T) impresas (control positivo), sonda de Penk 3' ligada, sonda de Penk intermedia 3' ligada y una sonda de control negativo ligada a plantas.

La Figura 13 muestra la captura de un dominio doble similar a C2 que contiene el gen de proteína gamma (Doc2g) mediante el uso de un dominio de captura específico Doc2g ligado (Doc2g-1 y Doc2g-2).

La Figura 14 muestra la captura del dominio de tetramerización del canal de potasio que contiene el gen 12 (Kctd12) mediante el uso de un dominio de captura Kctd12 ligado (Kctd12-1 y Kctd12-2).

La Figura 15 muestra los resultados de la correlación de Pearson entre los recuentos sin procesar del área de captura 1 (eje y) y los recuentos sin procesar del área de captura 2 (eje x) para los dominios de captura ligados en el tejido cerebral de ratón.

La Figura 16 muestra los resultados de la correlación de Pearson entre los recuentos sin procesar del área de captura 1 (eje y) y los recuentos sin procesar del área de captura 2 (eje x) para los dominios de captura ligados en el tejido cardíaco humano.

La Figura 17 muestra los resultados de agrupamiento espacial mediante el uso de sondas de captura ligadas (arriba) y sondas de captura impresas (parte inferior) en tejido cerebral de ratón.

Las Figuras 18A-B muestran conformaciones de base de nucleótidos invertida que incluyen un enlace invertido de 3' a 3' (Figura 18A) y un enlace inverso de 5' a 5' (Figura 18B).

Las Figuras 19A-B muestran la ligación exitosa de un oligonucleótido donante marcado con Cy5 a un oligonucleótido aceptor en un sustrato a través de una imagen (Figura 19A) y un gráfico (Figura 19B).

Las Figuras 20A-B muestran la ligación exitosa de un oligonucleótido donante marcado con Cy3 a un oligonucleótido aceptor en un sustrato a través de una imagen (Figura 20A) y un gráfico (Figura 20B).

Las Figuras 21A-D muestran un esquema de ligación ilustrativo con un primer oligonucleótido donante (Figura 21A) ligado a un oligonucleótido aceptor (Figura 21B), un segundo oligonucleótido donante ligado a otro oligonucleótido aceptor (Figura 21C), y seguido de un esquema de qPCR ilustrativo para detectar una ligación exitosa (Figura 21D).

La Figura 22 muestra un esquema de prueba de eficiencia de ligación ilustrativo.

Las Figuras 23A-B muestran los productos de ADN detectados después de la ligación (Figura 23A) y un gráfico que muestra la eficiencia de la ligación a 22 °C y 37 °C (Figura 23B).

La Figura 24 es un gráfico que muestra los UMI medios a 50k lecturas/punto sin procesar con matrices generadas por reacciones de ligación a 22 °C, 30 °C o 37 °C. Una matriz impresa sirve como control.

Descripción detallada

I. Introducción

Esta descripción describe aparatos, sistemas, métodos y composiciones para el análisis espacial de muestras biológicas. Esta sección describe cierta terminología general, analitos, tipos de muestras y etapas preparativas a las que se hace referencia en las secciones posteriores de la descripción.

(a) Análisis espacial

Los tejidos y las células pueden obtenerse a partir de cualquier fuente. Por ejemplo, los tejidos y las células pueden obtenerse a partir de organismos monocelulares o multicelulares (por ejemplo, un mamífero). Los tejidos y células obtenidos de un mamífero, por ejemplo, un ser humano, frecuentemente tienen niveles variados de analito (por ejemplo, expresión génica y/o proteica) lo que puede dar como resultado diferencias en la morfología y/o función celular. La posición de una célula o un subconjunto de células (por ejemplo, células vecinas y/o células no vecinas) dentro de un tejido puede afectar, por ejemplo, el destino, el comportamiento, la morfología y la señalización y la diafonía de la célula con otras células en el tejido. La información con respecto a las diferencias en los niveles de analitos (expresión génica y/o proteica) dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero también puede ayudar a los médicos a seleccionar o administrar un tratamiento que será efectivo y puede permitir a los investigadores identificar y esclarecer las diferencias en la morfología celular y/o la función celular en los organismos monocelulares o multicelulares (por ejemplo, un mamífero) en base a las diferencias detectadas en los niveles de analitos dentro de diferentes células en el tejido. Las diferencias en los niveles de analito dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero también pueden proporcionar información sobre cómo funcionan y/o se desarrollan los tejidos (por ejemplo, tejidos sanos y enfermos). Las diferencias en los niveles de analito dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero también pueden proporcionar información de diferentes mecanismos de patogénesis de la enfermedad en un tejido y mecanismo de acción de un tratamiento terapéutico dentro de un tejido. Las diferencias en los niveles de analito dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero también pueden proporcionar información sobre los mecanismos de resistencia a fármacos y el desarrollo de los mismos en un tejido de un mamífero. Las diferencias en la presencia o ausencia de analitos dentro de diferentes células en un tejido de un organismo multicelular (por ejemplo, un mamífero) pueden proporcionar información sobre los mecanismos de resistencia a fármacos y el desarrollo de los mismos en un tejido de un organismo multicelular.

Las metodologías de análisis espacial en la presente descripción proporcionan la detección de diferencias en un nivel de analito (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) dentro de diferentes células en un tejido de un mamífero o dentro de una célula única de un mamífero. Por ejemplo, las metodologías de análisis espacial pueden usarse para detectar las diferencias en los niveles de analito (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) dentro de diferentes células en muestras histológicas, cuyos datos pueden reensamblarse para generar un mapa tridimensional de niveles

de analito (por ejemplo, expresión de genes y/o proteínas) de una muestra de tejido obtenida de un mamífero, por ejemplo, con un grado de resolución espacial (por ejemplo, resolución de células individuales).

La heterogeneidad espacial en sistemas en desarrollo se ha estudiado típicamente mediante hibridación de ARN, inmunohistoquímica, indicadores fluorescentes, o purificación o inducción de subpoblaciones predefinidas y perfiles genómicos posteriores (por ejemplo, RNA-seq). Tales enfoques, sin embargo, se basan en un conjunto relativamente pequeño de marcadores predefinidos, lo que introduce por lo tanto un sesgo de selección que limita el descubrimiento. Estos enfoques anteriores también dependen del conocimiento *a priori*. Los ensayos de ARN tradicionalmente se basaban en la tinción para un número limitado de especies de ARN. Por el contrario, la secuenciación de ARN de células individuales permite un perfil profundo de la expresión génica celular (que incluye ARN no codificante), pero los métodos establecidos separan las células de su contexto espacial nativo.

Las metodologías de análisis espacial descritas en la presente descripción proporcionan una gran cantidad de datos de nivel de analito y/o expresión para una variedad de múltiples analitos dentro de una muestra a alta resolución espacial, por ejemplo, mientras retienen el contexto espacial nativo. Los métodos de análisis espacial incluyen, por ejemplo, el uso de una sonda de captura que incluye un código de barras espacial (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que proporciona información sobre la posición de la sonda de captura dentro de una célula o una muestra de tejido (por ejemplo, una célula de mamífero o una muestra de tejido de mamífero) y un dominio de captura que es capaz de unirse a un analito (por ejemplo, una proteína y/o ácido nucleico) producido por y/o presente en una célula. Como se describe en la presente descripción, el código de barras espacial puede ser un ácido nucleico que tiene una secuencia única, un fluoróforo único o una combinación de fluoróforos única, una secuencia de aminoácidos única, un metal pesado único o una combinación única de metales pesados, o cualquier otro agente detectable único. El dominio de captura puede ser cualquier agente que sea capaz de unirse a un analito producido por y/o presente en una célula (por ejemplo, un ácido nucleico que sea capaz de hibridarse con un ácido nucleico de una célula (por ejemplo, un ARNm, ADN genómico, ADN mitocondrial, o miARN), un sustrato que incluye un analito, una pareja de unión de un analito, o un anticuerpo que se une específicamente a un analito). Una sonda de captura también puede incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de un cebador directo universal y/o inverso universal. Una sonda de captura también puede incluir un sitio de escisión (por ejemplo, un sitio de reconocimiento de escisión de una endonucleasa de restricción), un enlace fotolábil, un enlace termosensible o un enlace sensible a productos químicos.

La unión de un analito a una sonda de captura puede detectarse mediante el uso de una serie de métodos diferentes, por ejemplo, secuenciación de ácidos nucleicos, detección de fluoróforos, amplificación de ácidos nucleicos, detección de la ligación de ácidos nucleicos y/o detección de productos de escisión de ácidos nucleicos. En algunos ejemplos, la detección se usa para asociar un código de barras espacial específico con un analito específico producido por y/o presente en una célula (por ejemplo, una célula de mamífero).

Las sondas de captura pueden unirse, por ejemplo, a una superficie, por ejemplo, una matriz sólida, una perla o un cubreobjetos. En algunos ejemplos, las sondas de captura no están unidas a una superficie. En algunos ejemplos, las sondas de captura pueden encapsularse dentro de, incorporarse dentro de, o estratificarse sobre una superficie de una composición permeable (por ejemplo, cualquiera de los sustratos descritos en la presente descripción). Por ejemplo, las sondas de captura pueden encapsularse o disponerse dentro de una perla permeable (por ejemplo, una perla de gel). En algunos ejemplos, las sondas de captura pueden encapsularse dentro de, incorporarse dentro de, o estratificarse sobre una superficie de un sustrato (por ejemplo, cualquiera de los sustratos ilustrativos descritos en la presente descripción, tal como un hidrogel o una membrana porosa).

En algunos ejemplos, una célula o una muestra de tejido que incluye una célula se pone en contacto con sondas de captura unidas a un sustrato (por ejemplo, una superficie de un sustrato), y la muestra de célula o tejido se permeabiliza para permitir que los analitos se liberen de la célula y se unan a las sondas de captura unidas al sustrato. En algunos ejemplos, los analitos liberados de una célula pueden dirigirse activamente a las sondas de captura unidas a un sustrato mediante el uso de una variedad de métodos, por ejemplo, electroforesis, gradiente químico, gradiente de presión, flujo de fluido o campo magnético.

En otros ejemplos, una sonda de captura puede dirigirse para interactuar con una célula o una muestra de tejido mediante el uso de una variedad de métodos, por ejemplo, la inclusión de un agente de anclaje de lípidos en la sonda de captura, la inclusión de un agente que se une específicamente a, o forma un enlace covalente con una proteína de membrana en la sonda de captura, flujo de fluido, gradiente de presión, gradiente químico, o campo magnético.

Los aspectos no limitantes de las metodologías de análisis espacial se describen en los documentos WO 2011/127099, WO 2014/210233, WO 2014/210225, WO 2016/162309, WO 2018/091676, WO 2012/140224, WO 2014/060483, patente de Estados Unidos núm. 10,002,316, patente de Estados Unidos núm. 9,727,810, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2017/0016053, Rodriques y otros, *Science* 363(6434):1463-1467, 2019; WO 2018/045186, Lee y otros, *Nat. Protoc.* 10(3):442-458, 2015; WO 2016/007839, WO 2018/045181, WO 2014/163886, Trejo y otros, *PLoS ONE* 14(2):e0212031, 2019, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2018/0245142, Chen y otros, *Science* 348(6233):aa6090, 2015, Gao y otros, *BMC Biol.* 15:50, 2017, WO 2017/144338, WO 2018/107054, WO 2017/222453, WO 2019/068880, WO 2011/094669, patente de Estados Unidos núm.

7,709,198, patente de Estados Unidos núm. 8,604,182, patente de Estados Unidos núm. 8,951,726, patente de Estados Unidos núm. 9,783,841, patente de Estados Unidos núm. 10,041,949, WO 2016/057552, WO 2017/147483, WO 2018/022809, WO 2016/166128, WO 2017/027367, WO 2017/027368, WO 2018/136856, WO 2019/075091, patente de Estados Unidos núm. 10,059,990, WO 2018/057999, WO 2015/161173, y Gupta y otros, *Nature Biotechnol.* 36:1197-1202, 2018, y puede usarse en la presente descripción en cualquier combinación. En la presente descripción se describen aspectos adicionales no limitantes de las metodologías de análisis espacial.

(b) Terminología general

Se usa terminología específica a lo largo de esta descripción para explicar diversos aspectos de los aparatos, sistemas, métodos y composiciones que se describen. Esta subsección incluye explicaciones de ciertos términos que aparecen en las secciones posteriores de la descripción. En la medida en que las descripciones de esta sección estén en conflicto aparente con el uso en otras secciones de esta descripción, las definiciones de esta sección prevalecerán.

(i) Código de barras

Un “código de barras” es una marca, o identificador, que transmite o que es capaz de transmitir información (por ejemplo, información sobre un analito en una muestra, una perla y/o una sonda de captura). Un código de barras puede ser parte de un analito o independiente de un analito. Un código de barras puede unirse a un analito. Un código de barras en particular puede ser único con relación a otros códigos de barras.

Los códigos de barras pueden tener una variedad de formatos diferentes. Por ejemplo, los códigos de barras pueden incluir secuencias de aminoácidos y/o ácido nucleico aleatorias, semialeatorias y no aleatorias, y secuencias de aminoácidos y/o ácido nucleico sintéticas. Un código de barras puede unirse a un analito o a otro resto o estructura de manera reversible o irreversible. Un código de barras puede añadirse, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) antes o durante la secuenciación de la muestra. Los códigos de barras pueden permitir la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un identificador molecular único o “UMI”).

Los códigos de barras pueden resolver espacialmente los componentes moleculares encontrados en muestras biológicas, por ejemplo, en la resolución de una célula única (por ejemplo, un código de barras puede ser o puede incluir un “código de barras espacial”). En algunas modalidades, un código de barras incluye tanto un UMI como un código de barras espacial. En algunas modalidades, un código de barras incluye dos o más subcódigos de barras que funcionan juntos como un único código de barras (por ejemplo, un código de barras de polinucleótidos). Por ejemplo, un código de barras de polinucleótidos puede incluir dos o más secuencias de polinucleótidos (por ejemplo, subcódigos de barras) que están separadas por una o más secuencias que no son de código de barras.

(ii) Sonda y diana

Una “sonda” o una “diana”, cuando se usa en referencia a un ácido nucleico o secuencia de un ácido nucleico, pretenden ser un identificador semántico para el ácido nucleico o secuencia en el contexto de un método o composición, y no limita la estructura o función del ácido nucleico o secuencia más allá de lo que se indica expresamente.

(iii) Adaptador, acoplador y etiqueta

Un “adaptador”, un “acoplador” y una “etiqueta” son términos que se usan indistintamente en esta descripción, y se refieren a especies que pueden acoplarse a una secuencia de polinucleótidos (en un proceso denominado “etiquetado”) mediante el uso de una cualquiera de muchas técnicas diferentes que incluyen (pero no se limitan a) ligación, hibridación y etiquetado. Los adaptadores también pueden ser secuencias de ácido nucleico que añaden una función, por ejemplo, secuencias separadoras, secuencias/sitios cebadores, secuencias de código de barras, secuencias de identificadores moleculares únicos.

(iv) Hibridación, hibridar, aparear y asociar

Los términos “hibridación” e “hibridar”, “apareamiento” y “aparear”, se usan indistintamente en esta descripción, y se refieren al apareamiento de secuencias de ácido nucleico sustancialmente complementarias o complementarias dentro de dos moléculas diferentes. El apareamiento puede lograrse mediante cualquier proceso en el que una secuencia de ácido nucleico se une a una secuencia sustancial o completamente complementaria a través del apareamiento de bases para formar un complejo de hibridación. Para los propósitos de hibridación, dos secuencias de ácido nucleico son “sustancialmente complementarias” si al menos el 60 % (por ejemplo, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 %) de sus bases individuales son complementarias entre sí.

(v) Cebador

Un “cebador” es una secuencia de ácido nucleico de única hebra que tiene un extremo 3' que puede usarse como un sustrato para una polimerasa de ácido nucleico en una reacción de extensión de ácido nucleico. Los cebadores de ARN están formados de nucleótidos de ARN, y se usan en la síntesis de ARN, mientras que los cebadores de ADN están formados de nucleótidos de ADN y se usan en la síntesis de ADN. Los cebadores pueden incluir además tanto nucleótidos de ARN como nucleótidos de ADN (por ejemplo, en un patrón aleatorio o diseñado). Los cebadores pueden incluir además otros nucleótidos naturales o sintéticos descritos en la presente descripción que pueden tener una funcionalidad adicional. En algunos ejemplos, los cebadores de ADN pueden usarse para el cebado de la síntesis de ARN y viceversa (por ejemplo, los cebadores de ARN pueden usarse para el cebado de la síntesis de ADN). Los cebadores pueden variar en longitud. Por ejemplo, los cebadores pueden tener de aproximadamente 6 bases a aproximadamente 120 bases. Por ejemplo, los cebadores pueden incluir hasta aproximadamente 25 bases.

(vi) Oligonucleótido que conmuta de molde

Un “oligonucleótido que conmuta de molde” es un oligonucleótido que se hibrida con nucleótidos no templados añadidos por una transcriptasa inversa (por ejemplo, enzima con actividad transferasa terminal) durante la transcripción inversa. En algunas modalidades, un oligonucleótido que conmuta de molde hibrida con nucleótidos poli(C) no templados añadidos por una transcriptasa inversa. En algunas modalidades, el oligonucleótido que conmuta de molde añade una secuencia 5' común al ADNc de longitud completa que se usa para la amplificación del ADNc.

En algunas modalidades, el oligonucleótido que conmuta de molde añade una secuencia común sobre el extremo 5' del ARN que se transcribe de manera inversa. Por ejemplo, un oligonucleótido que conmuta de molde puede hibridarse con nucleótidos poli(C) no templados que se añaden al extremo de una molécula de ADNc y proporcionar un molde para que la transcriptasa inversa continúe la replicación al extremo 5' del oligonucleótido que conmuta de molde, de esta manera se genera un ADNc de longitud completa listo para amplificación adicional. En algunas modalidades, una vez que se genera una molécula de ADNc de longitud completa, el oligonucleótido que conmuta de molde puede servir como un cebador en una reacción de amplificación de ADNc.

En algunas modalidades, se añade un oligonucleótido que conmuta de molde antes, simultáneamente con, o después de una transcripción inversa, u otra reacción terminal basada en transferasa. Por ejemplo, en algunas modalidades, un oligonucleótido que conmuta de molde se incluye en la sonda de captura. En determinadas modalidades, los métodos de análisis de muestras mediante el uso de oligonucleótidos que conmutan de molde pueden involucrar la generación de productos de ácido nucleico a partir de analitos de la muestra de tejido, seguido del procesamiento posterior de los productos de ácido nucleico con el oligonucleótido que conmuta de molde.

Los oligonucleótidos que conmutan de molde pueden incluir una región de hibridación y una región de molde. La región de hibridación puede incluir cualquier secuencia capaz de hibridarse con la diana. En algunas modalidades, la región de hibridación puede incluir, por ejemplo, una serie de bases G para complementar las bases C salientes en el extremo 3' de una molécula de ADNc. La serie de bases G puede incluir 1 base G, 2 bases G, 3 bases G, 4 bases G, 5 bases G o más de 5 bases G. La secuencia molde puede incluir cualquier secuencia que se incorpore en el ADNc. En otras modalidades, la región de hibridación puede incluir al menos una base además de al menos una base G. En otras modalidades, la hibridación puede incluir bases que no son una base G. En algunas modalidades, la región del molde incluye al menos 1 (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5 o más) secuencias de etiquetas y/o secuencias funcionales. En algunas modalidades, la región del molde y la región de hibridación se separan por un separador.

En algunas modalidades, las regiones del molde incluyen una secuencia de código de barras. La secuencia de código de barras puede actuar como un código de barras espacial y/o como un identificador molecular único (UMI). Los oligonucleótidos que conmutan de molde pueden incluir ácidos desoxirribonucleicos; ácidos ribonucleicos; ácidos nucleicos modificados que incluyen 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina (2-amino-dA), dT invertido, 5-metil dC, 2'-desoxiinosina, Super T (5-hidroxibutini-2'-desoxiuridina), Super G (8-aza-7-deazaguanosina), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos desbloqueados (UNA, por ejemplo, UNA-A, UNA-U, UNA-C, UNA-G), Iso-dG, Iso-dC, Bases de flúor 2' (por ejemplo, Fluoro C, Fluoro U, Fluoro A, y Fluoro G), o cualquier combinación de lo anterior.

En algunas modalidades, la longitud de un oligonucleótido que conmuta de molde puede ser al menos aproximadamente 1, 2, 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200 o 250 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la longitud de un oligonucleótido que conmuta de molde puede ser a lo máximo de aproximadamente 2, 10, 20, 50, 100, 150, 200 o 250 nucleótidos o más larga.

(vii) Oligonucleótido de soporte

Un “oligonucleótido de soporte” es un oligonucleótido que, cuando se hibrida, actúa como un “soporte” para posicionar los polinucleótidos próximos entre sí de manera que puedan ligarse juntos. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte es ADN o ARN. El oligonucleótido de soporte puede incluir una secuencia de nucleótidos que es parcialmente complementaria a las secuencias de nucleótidos de dos o más oligonucleótidos diferentes. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte participa en la ligación de un oligonucleótido “donante” y un oligonucleótido “aceptor”. Generalmente, se usa una ARN ligasa, una ADN ligasa, u otra variedad o combinación de ligasas para ligar dos secuencias de nucleótidos soportadas.

En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte tiene entre 10 y 50 nucleótidos de longitud, por ejemplo, entre 10 y 45, 10 y 40, 10 y 35, 10 y 30, 10 y 25, o 10 y 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte tiene entre 15 y 50, 15 y 45, 15 y 40, 15 y 35, 15 y 30, 15 y 25, o 15 y 20 nucleótidos de longitud.

5 (c) Analitos

Los aparatos, sistemas, métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para detectar y analizar una amplia variedad de analitos diferentes. A los efectos de esta descripción, un "analito" puede incluir cualquier sustancia, estructura, resto o componente biológico a analizar. El término "diana" puede referirse de manera similar a un analito de interés.

Los analitos pueden clasificarse en términos generales en uno de dos grupos: analitos de ácidos nucleicos y analitos no ácidos nucleicos. Los ejemplos de analitos que no son ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, lípidos, carbohidratos, péptidos, proteínas, glucoproteínas (unidas a N o unidas a O), lipoproteínas, fosfoproteínas, variantes fosforiladas o acetiladas de proteínas específicas, variantes de amidación de proteínas, variantes de hidroxilación de proteínas, variantes de metilación de proteínas, variantes de ubiquitinación de proteínas, variantes de sulfatación de proteínas, proteínas de recubrimiento viral, proteínas extracelulares e intracelulares, anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno. En algunas modalidades, el analito puede ser un orgánulo (por ejemplo, núcleos o mitocondrias).

Los elementos de superficie celular que corresponden a analitos pueden incluir, pero no se limitan a, un receptor, un antígeno, una proteína de superficie, una proteína transmembrana, un conglomerado de proteínas de diferenciación, un canal proteico, una bomba de proteínas, una proteína portadora, un fosfolípido, una glucoproteína, un glucolípido, un complejo proteico de interacción célula-célula, un complejo presentador de antígenos, un complejo mayor de histocompatibilidad, un receptor de linfocitos T manipulado genéticamente, un receptor de linfocitos T, un receptor de linfocitos B, un receptor de antígeno quimérico, una proteína de la matriz extracelular, una modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación) del estado de una proteína de superficie celular, una unión en hendidura, y una unión adherente.

Los analitos pueden derivarse de un tipo específico de célula y/o de una región subcelular específica. Por ejemplo, los analitos pueden derivarse del citosol, de núcleos celulares, de mitocondrias, de microsomas, y más generalmente, de cualquier otro compartimiento, orgánulo, o porción de una célula. Los agentes permeabilizantes que se dirigen específicamente a ciertos compartimentos celulares y organelos pueden usarse para liberar selectivamente analitos de las células para su análisis.

Los ejemplos de analitos de ácido nucleico incluyen analitos de ADN tales como ADN genómico, ADN metilado, secuencias de ADN metilado específicas, ADN fragmentado, ADN mitocondrial, productos de PCR sintetizados in situ y ADN viral.

Los ejemplos de analitos de ácidos nucleicos incluyen además analitos de ARN tales como diversos tipos de ARN codificante y no codificante. Los ejemplos de los diferentes tipos de analitos de ARN incluyen ARN mensajero (ARNm), ARN ribosómico (ARNr), ARN de transferencia (ARNt), microARN (miARN) y ARN viral. El ARN puede ser un transcrito (por ejemplo, presente en una sección de tejido). El ARN puede ser pequeño (por ejemplo, menor que 200 bases de ácido nucleico de longitud) o grande (por ejemplo, ARN mayor que 200 bases de ácido nucleico de longitud). Los ARN pequeños incluyen principalmente ARN ribosómico (ARNr) 5.8S, ARNr 5S, ARN de transferencia (ARNt), microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN nucleolar pequeño (ARNnp), ARN de interacción Piwi (ARNp), ARN derivado de ARNt pequeño (ARNatp) y ARN derivado de ARNr pequeño (ARNarp). El ARN puede ser ARN bicatenario o ARN monocatenario. El ARN puede ser ARN circular. El ARN puede ser un ARNr bacteriano (por ejemplo, ARNr 16s o ARNr 23s).

Los ejemplos adicionales de analitos incluyen ARNm y elementos de superficie celular (por ejemplo, mediante el uso de los agentes de marcaje descritos en la presente descripción), ARNm y proteínas intracelulares (por ejemplo, factores de transcripción), ARNm y estado de metilación celular, ARNm y cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNase-seq y/o MNase-seq), ARNm y metabolitos (por ejemplo, mediante el uso de los agentes de marcaje descritos en la presente descripción), un agente de marcaje con código de barras (por ejemplo, los anticuerpos etiquetados con oligonucleótidos descritos en la presente descripción) y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T), ARNm y un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNgc CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc, y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción). En algunas modalidades, un agente de perturbación puede ser una molécula pequeña, un anticuerpo, un fármaco, un aptámero, un miARN, un entorno físico (por ejemplo, cambio de temperatura) o cualquier otro agente de perturbación conocido.

Los analitos pueden incluir una molécula de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una porción de una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, un TCR o BCR). En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico es ADNc generado primero a partir de la transcripción inversa del ARNm correspondiente, mediante el uso de un cebador que contiene poli(T). Al ADNc generado se le puede incorporar a continuación un código de barras mediante el uso de una sonda de captura, que presenta una secuencia de código

de barras (y opcionalmente, una secuencia de UMI) que se hibrida con al menos una porción del ADNc generado. En algunas modalidades, un oligonucleótido que conmuta de molde se hibrida con una cola poli(C) añadida a un extremo 3' del ADNc mediante una enzima transcriptasa inversa. Después, el molde de ARNm original y el oligonucleótido que conmuta de molde pueden desnaturalizarse del ADNc y la sonda de captura con código de barras puede después hibridarse con el ADNc y puede generarse un complemento del ADNc. Los métodos y composiciones adicionales adecuados para codificar con barras el ADNc generado a partir de transcritos de ARNm que incluyen aquellos que codifican las regiones V(D)J de un receptor de células inmunitarias y/o los métodos y composiciones de códigos de barras que incluyen un oligonucleótido que conmuta de molde se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente PCT núm. PCT/US2017/057269, presentada el 18 de octubre de 2017, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2018/0105808, presentada el 29 de noviembre de 2017. El análisis V(D)J también puede completarse con el uso de uno o más agentes de marcaje que se unen a elementos de superficie particulares de células inmunitarias y se asocian con secuencias de código de barras. El uno o más agentes de marcaje pueden incluir un MHC o multímero de MHC.

Como se describió anteriormente, el analito puede incluir un ácido nucleico capaz de funcionar como un componente de una reacción de edición de genes, tal como, por ejemplo, la edición de genes basada en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR). En consecuencia, la sonda de captura puede incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria al analito (por ejemplo, una secuencia que puede hibridarse con el ARN de CRISPR (ARNcr), ARN guía único (ARNgu) o una secuencia acopladora manipulada genéticamente en un ARNcr o un ARNgu).

En ciertas modalidades, un analito puede extraerse a partir de una célula viva. Las condiciones de procesamiento pueden ajustarse para asegurar que una muestra biológica permanezca viable durante el análisis, y que los analitos se extraigan (o se liberen) de células vivas de la muestra. Los analitos derivados de células vivas pueden obtenerse solo una vez a partir de la muestra, o pueden obtenerse a intervalos a partir de una muestra que permanece en una condición viable.

En general, los sistemas, aparatos, métodos y composiciones pueden usarse para analizar cualquier número de analitos. Por ejemplo, la cantidad de analitos que se analizan puede ser al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 11, al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 10 000, al menos aproximadamente 100 000 o más analitos diferentes presentes en una región de la muestra o dentro de un elemento individual del sustrato. Los métodos para realizar ensayos multiplexados para analizar dos o más analitos diferentes se discutirán en una sección posterior de esta descripción.

(d) Muestras biológicas

(i) Tipos de muestras biológicas

Una "muestra biológica" se obtiene del sujeto para su análisis mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, biopsia, cirugía y microscopía de captura láser (LCM), y generalmente incluye células y/u otro material biológico del sujeto. Además de los sujetos descritos anteriormente, puede obtenerse una muestra biológica de organismos no mamíferos (por ejemplo, una planta, un insecto, un arácnido, un nematodo (por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*), un hongo, un anfibio o un pescado (por ejemplo, pez cebra)). Una muestra biológica puede obtenerse a partir de un procariota tal como una bacteria, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Staphylococci* o *Mycoplasma pneumoniae*; una archaea; un virus tal como el virus de la hepatitis C o el virus de la inmunodeficiencia humana; o un viroide. Puede obtenerse una muestra biológica de un eucariota, tal como un organoide derivado del paciente (PDO) o un xenoinjerto derivado del paciente (PDX). La muestra biológica puede incluir organoides, una versión miniaturizada y simplificada de un órgano producido in vitro en tres dimensiones que muestran una microanatomía realista. Los organoides pueden generarse a partir de una o más células de un tejido, células madre embrionarias y/o células madre pluripotentes inducidas, que pueden autoorganizarse en cultivo tridimensional debido a sus capacidades de autorrenovación y diferenciación. En algunas modalidades, un organoide es un organoide cerebral, un organoide intestinal, un organoide estomacal, un organoide lingual, un organoide tiroideo, un organoide tímico, un organoide testicular, un organoide hepático, un organoide pancreático, un organoide epitelial, un organoide pulmonar, un organoide renal, un gastruloide, un organoide cardíaco o un organoide retiniano. Los sujetos a partir de los cuales se pueden obtener muestras biológicas pueden ser individuos sanos o asintomáticos, individuos que tienen o se sospecha que tienen una enfermedad (por ejemplo, cáncer) o una predisposición a una enfermedad, y/o individuos que necesitan terapia o se sospecha que necesitan terapia.

Las muestras biológicas pueden derivarse de un cultivo o población homogénea de los sujetos u organismos mencionados en la presente descripción o alternativamente de una recopilación de varios organismos diferentes, por ejemplo, en una comunidad o ecosistema.

Las muestras biológicas pueden incluir una o más células enfermas. Una célula enferma puede tener propiedades metabólicas, expresión génica, expresión proteica y/o elementos morfológicos alterados. Los ejemplos de enfermedades incluyen trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos, trastornos del sistema nervioso y cáncer. Las células cancerosas pueden derivarse de tumores sólidos, neoplasias hematológicas, líneas celulares u obtenerse como células tumorales circulantes.

Las muestras biológicas también pueden incluir células fetales. Por ejemplo, puede realizarse un procedimiento tal como la amniocentesis para obtener una muestra de células fetales de la circulación materna. La secuenciación de células fetales puede usarse para identificar cualquiera de una serie de trastornos genéticos, que incluyen, por ejemplo, aneuploidía tal como síndrome de Down, síndrome de Edwards y síndrome de Patau. Además, los elementos de superficie celular de las células fetales pueden usarse para identificar cualquiera de una serie de trastornos o enfermedades.

Las muestras biológicas también pueden incluir células inmunitarias. El análisis de secuencias del repertorio inmunitario de tales células, que incluye elementos genómicos, proteómicos y de superficie celular, puede proporcionar una gran cantidad de información para facilitar la comprensión del estado y función del sistema inmunitario. A manera de ejemplo, determinar el estado (por ejemplo, negativo o positivo) de la enfermedad de residuos mínimos (EMR) en un paciente con mieloma múltiple (MM) después de un trasplante autólogo de células madre se considera un factor predictivo de EMR en el paciente con MM (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2018/0156784).

Los ejemplos de células inmunitarias en una muestra biológica incluyen, pero no se limitan a, linfocitos B, linfocitos T (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos, linfocitos T asesinos naturales, linfocitos T reguladores y linfocitos T colaboradores), células asesinas naturales, células asesinas inducidas por citocinas (CIK), células mieloides, tales como granulocitos (granulocitos basófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos neutrófilos/neutrófilos hipersegmentados), monocitos/macrófagos, mastocitos, trombocitos/megacariocitos y células dendríticas.

La muestra biológica puede incluir cualquier número de macromoléculas, por ejemplo, macromoléculas celulares y organelos (por ejemplo, mitocondrias y núcleos). La muestra biológica puede ser una muestra de ácido nucleico y/o una muestra de proteína. La muestra biológica puede ser una muestra de carbohidratos o una muestra de lípidos. La muestra biológica puede obtenerse como una muestra de tejido, tal como una sección de tejido, biopsia, una biopsia con aguja gruesa, aspirado con aguja, o aspirado con aguja fina. La muestra puede ser una muestra de fluido, tal como una muestra de sangre, una muestra de orina, o una muestra de saliva. La muestra puede ser una muestra de piel, una muestra de colon, un raspado bucal, una muestra de histología, una muestra de histopatología, una muestra de plasma o suero, una muestra de tumor, células vivas, células cultivadas, una muestra clínica tal como, por ejemplo, sangre completa o productos derivados de la sangre, células sanguíneas, o tejidos o células cultivados, lo que incluye suspensiones celulares.

Las muestras biológicas libres de células pueden incluir polinucleótidos extracelulares. Los polinucleótidos extracelulares pueden aislarse a partir de una muestra corporal, por ejemplo, sangre, plasma, suero, orina, saliva, excreciones mucosales, esputo, heces y lágrimas.

Como se discutió anteriormente, una muestra biológica puede incluir un único analito de interés, o más de un analito de interés. Los métodos para realizar ensayos multiplexados para analizar dos o más analitos diferentes en una única muestra biológica se discutirán en una sección posterior de esta descripción.

(ii) Preparación de muestras biológicas

Pueden realizarse una variedad de etapas para preparar una muestra biológica para el análisis. Excepto cuando se indique de cualquier otra manera, las etapas de preparación descritas más abajo pueden combinarse generalmente de cualquier manera para preparar o procesar apropiadamente una muestra en particular para el análisis.

(1) Congelación

En algunas modalidades, la muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido como se describió anteriormente) puede prepararse mediante ultracongelación a una temperatura adecuada para mantener o preservar la integridad (por ejemplo, las características físicas) de la estructura del tejido. Tal temperatura puede ser, por ejemplo, menor que -20 °C, o menor que -25 °C, -30 °C, -40 °C, -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C, -90 °C, -100 °C, -110 °C, -120 °C, -130 °C, -140 °C, -150 °C, -160 °C, -170 °C, -180 °C, -190 °C o -200 °C. La muestra de tejido congelado puede cortarse en secciones, por ejemplo, cortarse finamente, sobre una superficie de sustrato mediante el uso de cualquier número de métodos adecuados. Por ejemplo, una muestra de tejido puede prepararse mediante el uso de un micrótopo de congelación (por ejemplo, un criostato) configurado a una temperatura adecuada para mantener tanto la integridad estructural de la muestra de tejido como las propiedades químicas de los ácidos nucleicos en la muestra. Tal temperatura puede ser, por ejemplo, menor que -15 °C, menor que -20 °C, o menor que -25 °C. Una muestra puede congelarse a presión en isopentano y nitrógeno líquido. Las muestras congeladas pueden almacenarse en un contenedor sellado antes de la inclusión.

(2) Fijación en formalina e inclusión en parafina

En algunas modalidades, la muestra biológica puede prepararse mediante el uso de fijación con formalina e inclusión en parafina (FFPE), que son métodos establecidos. En algunas modalidades, las suspensiones celulares y otras muestras no tisulares pueden prepararse mediante el uso de fijación con formalina e inclusión en parafina. Después de la fijación de la muestra y su inclusión en un bloque de parafina o resina, la muestra puede cortarse en secciones como se describió anteriormente. Antes del análisis, el material que se incluye en parafina puede eliminarse de la sección de tejido (por ejemplo, desparafinación) mediante la incubación de la sección de tejido en un solvente apropiado (por ejemplo, xileno) seguido de un enjuague (por ejemplo, etanol al 99,5 % durante 2 minutos, etanol al 96 % durante 2 minutos, y etanol al 70 % durante 2 minutos).

(3) Fijación

Como una alternativa a la fijación con formalina descrita anteriormente, una muestra biológica puede fijarse en cualquiera de una variedad de otros fijadores para conservar la estructura biológica de la muestra previa al análisis. Por ejemplo, una muestra puede fijarse mediante inmersión en etanol, metanol, acetona, formaldehído (por ejemplo, 2 % de formaldehído), paraformaldehído-Tritón, y sus combinaciones.

En algunas modalidades, la fijación en acetona se usa con muestras congeladas frescas, que pueden incluir, pero no se limitan a, muestras de tejido de corteza, bulbo olfatorio de ratón, tumor cerebral humano, cerebro humano post mortem, y cáncer de mama. En algunas modalidades, se elige y/u optimiza un método de fijación compatible en función del flujo de trabajo deseado. Por ejemplo, la fijación en formaldehído puede elegirse como compatible para flujos de trabajo mediante el uso de protocolos IHC/IF para la visualización de proteínas. Como otro ejemplo, la fijación en metanol puede elegirse para flujos de trabajo que enfatizan la calidad de la biblioteca de ARN/ADN. La fijación en acetona puede elegirse en algunas aplicaciones para permeabilizar el tejido. Cuando se realiza la fijación en acetona, pueden no realizarse las etapas de pre-permeabilización (descritas más abajo). Alternativamente, la fijación en acetona puede realizarse junto con las etapas de permeabilización.

(4) Tinción

Para facilitar la visualización, las muestras biológicas pueden teñirse mediante el uso de una amplia variedad de tinciones y técnicas de tinción. En algunas modalidades, una muestra puede teñirse mediante el uso de cualquier número de tinciones biológicas, que incluyen, pero no se limitan a, naranja acridina, marrón Bismarck, carmín, azul coomassie, violeta cresílica, DAPI, eosina, bromuro de etidio, fucsina ácida, hematoxilina, tinciones Hoechst, yodo, verde metilo, azul de metileno, rojo neutro, azul Nilo, rojo Nilo, tetróxido de osmio, yoduro de propidio, rodamina o safranina.

La muestra puede teñirse mediante el uso de técnicas de tinción conocidas, que incluyen Can-Grunwald, Giemsa, hematoxilina y eosina (H&E), Jenner, Leishman, tricrómica de Masson, Papanicolaou, Romanowsky, plata, Sudán, Wright, y/o técnicas de tinción con Ácido Periódico Schiff (PAS). La tinción con PAS se realiza típicamente después de la fijación en formalina o acetona.

En algunas modalidades, la muestra biológica puede teñirse mediante el uso de una etiqueta detectable (por ejemplo, radioisótopos, fluoróforos, compuestos quimioluminiscentes, compuestos bioluminiscentes y colorantes) como se describió en otra parte en la presente descripción. En algunas modalidades, una muestra biológica se tiñe mediante el uso de solo un tipo de tinción o una técnica. En algunas modalidades, la tinción incluye técnicas de tinción biológica tales como la tinción con H&E. En algunas modalidades, la tinción incluye identificar analitos mediante el uso de anticuerpos conjugados con fluorescencia. En algunas modalidades, una muestra biológica se tiñe mediante el uso de dos o más tipos diferentes de tinciones, o dos o más técnicas diferentes de tinción. Por ejemplo, una muestra biológica puede prepararse mediante tinción y obtención de imágenes mediante el uso de una técnica (por ejemplo, tinción con H&E y obtención de imágenes de campo claro), seguido de tinción y obtención de imágenes mediante el uso de otra técnica (por ejemplo, tinción con IHC/IF y microscopía de fluorescencia) para la misma muestra biológica.

En algunas modalidades, las muestras biológicas pueden decolorarse. Los métodos para destañar o decolorar una muestra biológica se conocen en la técnica, y generalmente dependen de la naturaleza de la(s) tinción(es) aplicada(s) a la muestra. Por ejemplo, la tinción con H&E puede decolorarse al lavar la muestra en HCl, o cualquier otro ácido (por ejemplo, ácido selénico, ácido sulfúrico, ácido hidroxídico, ácido benzoico, ácido carbónico, ácido málico, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido salicílico, ácido tartárico, ácido sulfuroso, ácido tricloroacético, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido ortofosfórico, ácido arsénico, ácido selenoso, ácido crómico, ácido cítrico, ácido fluorhídrico, ácido nitroso, ácido isociánico, ácido fórmico, selenuro de hidrógeno, ácido molibídico, ácido láctico, ácido acético, ácido carbónico, sulfuro de hidrógeno, o sus combinaciones). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir 1, 2, 3, 4, 5 o más lavados en un ácido (por ejemplo, HCl). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir añadir HCl a una solución aguas abajo (por ejemplo, solución de permeabilización). En algunas modalidades, la decoloración puede incluir disolver una enzima usada en los métodos descritos (por ejemplo, pepsina) en una solución ácida (por ejemplo, HCl). En algunas modalidades, después de decolorar la hematoxilina con un ácido, pueden añadirse otros reactivos a la solución de decoloración para elevar el pH para usar en otras

aplicaciones. Por ejemplo, puede añadirse SDS a una solución ácida de decoloración con el fin de elevar el pH en comparación con la solución de decoloración de ácido sola. Como otro ejemplo, en algunas modalidades, se aplican una o más tinciones de inmunofluorescencia a la muestra mediante acoplamiento de anticuerpos. Tales tinciones pueden eliminarse mediante el uso de técnicas tales como escisión de enlaces disulfuro mediante el tratamiento con un agente reductor y lavado con detergente, tratamiento con sal caotrópica, tratamiento con solución de recuperación de antígeno y tratamiento con un tampón de glicina ácida. Los métodos para teñir y destañir multiplexados se describen, por ejemplo, en Bolognesi y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2017; 65(8): 431-444, Lin y otros, *Nat Commun.* 2015; 6:8390, Pirici y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:567-75, y Glass y otros, *J. Histochem. Cytochem.* 2009; 57:899-905.

(6) Permeabilización de tejido

En algunas modalidades, una muestra biológica puede permeabilizarse para facilitar la transferencia de analitos fuera de la muestra, y/o para facilitar la transferencia de especies (tales como sondas de captura) en la muestra. Si una muestra no se permeabiliza lo suficiente, la cantidad del analito capturado en la muestra puede ser demasiado baja para permitir un análisis adecuado. Por el contrario, si la muestra de tejido es demasiado permeable, puede perderse la relación espacial relativa de los analitos dentro de la muestra de tejido. Por tanto, es conveniente un equilibrio entre permeabilizar la muestra de tejido lo suficiente como para obtener una buena intensidad de señal, al tiempo que se mantiene aún la resolución espacial de la distribución del analito en la muestra.

En general, una muestra biológica puede permeabilizarse al exponer la muestra a uno o más agentes permeabilizantes. Los agentes adecuados para este propósito incluyen, pero no se limitan a, solventes orgánicos (por ejemplo, acetona, etanol, y metanol), agentes reticulantes (por ejemplo, paraformaldehído), detergentes (por ejemplo, saponina, Tritón X-100™, Tween-20™, o dodecilsulfato de sodio (SDS)) y enzimas (por ejemplo, tripsina, proteasas (por ejemplo, proteinasa K)). En algunas modalidades, el detergente es un detergente aniónico (por ejemplo, solución salina de sodio de SDS o N-lauroilsarcosina). En algunas modalidades, la muestra biológica puede permeabilizarse mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los detergentes descritos en la presente descripción, por ejemplo, SDS y/o solución salina de sodio de N-lauroilsarcosina) antes o después del tratamiento enzimático (por ejemplo, tratamiento con cualquiera de las enzimas descritas en la presente descripción, por ejemplo, tripsina, proteasas (por ejemplo, pepsina y/o proteinasa K)).

En algunas modalidades, una muestra biológica puede permeabilizarse al exponer la muestra a más de aproximadamente 1,0 % p/v (por ejemplo, mayor que aproximadamente 2,0 % p/v, mayor que aproximadamente 3,0 % p/v, mayor que aproximadamente 4,0 % p/v, mayor que aproximadamente 5,0 % p/v, mayor que aproximadamente 6,0 % p/v, mayor que aproximadamente 7,0 % p/v, mayor que aproximadamente 8,0 % p/v, mayor que aproximadamente 9,0 % p/v, mayor que aproximadamente 10,0 % p/v, mayor que aproximadamente 11,0 % p/v, mayor que aproximadamente 12,0 % p/v o mayor que aproximadamente 13,0 % p/v) de dodecilsarcosina de sodio (SDS) y/o sal de sodio de N-lauroilsarcosina o N-lauroilsarcosina. En algunas modalidades, una muestra biológica puede permeabilizarse al exponer la muestra (por ejemplo, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 1 hora, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 40 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 20 minutos o de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos) de aproximadamente 1,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v (por ejemplo, de aproximadamente 2,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v, de aproximadamente 2,0 % p/v a aproximadamente 12,0 % p/v, de aproximadamente 2,0 % p/v a aproximadamente 10,0 % p/v, de aproximadamente 4,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v, de aproximadamente 4,0 % p/v a aproximadamente 12,0 % p/v, de aproximadamente 4,0 % p/v a aproximadamente 10,0 % p/v, de aproximadamente 6,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v, de aproximadamente 6,0 % p/v a aproximadamente 12,0 % p/v, de aproximadamente 6,0 % p/v a aproximadamente 10,0 % p/v, de aproximadamente 8,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v, de aproximadamente 8,0 % p/v a aproximadamente 12,0 % p/v, de aproximadamente 8,0 % p/v a aproximadamente 10,0 % p/v, de aproximadamente 10,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v, de aproximadamente 10,0 % p/v a aproximadamente 12,0 % p/v o de aproximadamente 12,0 % p/v a aproximadamente 14,0 % p/v) SDS y/o solución de sal de N-lauroilsarcosina y/o proteinasa K (por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 35 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 25 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 50 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 45 °C, de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 40 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 45 °C o de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C).

En algunas modalidades, la muestra biológica puede incubarse con un agente permeabilizante para facilitar la permeabilización de la muestra. Se describen métodos adicionales para la permeabilización de las muestras, por ejemplo, en Jamur y otros, *Method Mol. Biol.* 588:63-66, 2010.

Reactivos de lisis

En algunas modalidades, la muestra biológica puede permeabilizarse mediante la adición de uno o más reactivos de lisis a la muestra. Los ejemplos de agentes de lisis adecuados incluyen, pero no se limitan a, reactivos bioactivos tales como enzimas de lisis que se usan para la lisis de diferentes tipos de células, por ejemplo, bacterias grampositivas o gramnegativas, plantas, levaduras, mamíferos, tales como lisozimas, acromopeptidasa, lisostafina, labiasa, kitalasa, lítica, y una variedad de otras enzimas de lisis disponibles comercialmente.

Pueden añadirse adicional o alternativamente otros agentes de lisis a la muestra biológica para facilitar la permeabilización. Por ejemplo, pueden usarse soluciones de lisis basadas en surfactantes para lisar las células de la muestra. Las soluciones de lisis pueden incluir surfactantes iónicos tales como, por ejemplo, sarcosilo y dodecilsulfato de sodio (SDS). Más generalmente, los agentes de lisis química pueden incluir, sin limitación, solventes orgánicos, agentes quelantes, detergentes, surfactantes y agentes caotrópicos.

En algunas modalidades, la muestra biológica puede permeabilizarse mediante métodos de permeabilización no químicos. Los métodos de permeabilización no químicos se conocen en la técnica. Por ejemplo, los métodos de permeabilización no químicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, técnicas de lisis física tales como electroporación, métodos de permeabilización mecánica (por ejemplo, agitación con perlas mediante el uso de un homogeneizador y bolas de trituración para romper mecánicamente las estructuras de tejido de la muestra), permeabilización acústica (por ejemplo, sonicación), y técnicas de lisis térmica tales como calentamiento para inducir la permeabilización térmica de la muestra.

Proteasas

En algunas modalidades, un medio, solución o solución de permeabilización puede contener una o más proteasas. En algunas modalidades, se trató una muestra biológica con una proteasa capaz de degradar proteínas histonas lo que resulta en la generación del ADN genómico fragmentado. El ADN genómico fragmentado puede capturarse mediante el uso del mismo dominio de captura (por ejemplo, dominio de captura que tiene una secuencia poli(T)) usado para capturar ARNm. En algunas modalidades, una muestra biológica se trata con una proteasa capaz de degradar las proteínas histonas y un protector de ARN antes del perfil espacial para facilitar la captura tanto del ADN genómico como del ARNm.

Adicionalmente, la proteasa puede contenerse en una mezcla de reacción (solución), que también incluye otros componentes (por ejemplo, tampón, sal, quelante (por ejemplo, EDTA), y/o detergente (por ejemplo, SDS, solución de sal de sodio de lauroilsarcosina)). La mezcla de reacción puede tamponarse con un pH de aproximadamente 6,5-8,5, por ejemplo, de aproximadamente 7,0-8,0. Adicionalmente, la mezcla de reacción puede usarse a cualquier temperatura adecuada, tal como aproximadamente 10-50 °C, por ejemplo, aproximadamente 10-44 °C, 11-43 °C, 12-42 °C, 13-41 °C, 14-40 °C, 15-39 °C, 16-38 °C, 17-37 °C, por ejemplo, aproximadamente 10 °C, 12 °C, 15 °C, 18 °C, 20 °C, 22 °C, 25 °C, 28 °C, 30 °C, 33 °C, 35 °C o 37 °C, preferentemente aproximadamente 35-45 °C, por ejemplo, aproximadamente 37 °C.

Otros reactivos

En algunas modalidades, una solución de permeabilización puede contener reactivos adicionales o una muestra biológica puede tratarse con reactivos adicionales para optimizar la permeabilización de las muestras biológicas. En algunas modalidades, un reactivo adicional es un protector de ARN. Como se usa en la presente descripción, el término "protector de ARN" se refiere típicamente a un reactivo que protege el ARN de nucleasas de ARN (por ejemplo, ARNasas). Puede usarse cualquier protector de ARN apropiado que proteja el ARN de la degradación. Un ejemplo no limitante de un protector de ARN incluye solventes orgánicos (por ejemplo, al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % v/v de solvente orgánico), que incluyen, sin limitación, etanol, metanol, propan-2-ol, acetona, ácido tricloroacético, propanol, polietilenglicol, ácido acético, o sus combinaciones. En algunas modalidades, un protector de ARN incluye etanol, metanol y/o propan-2-ol, o sus combinaciones. En algunas modalidades, un protector de ARN incluye RNAlater ICE (ThermoFisher Scientific). En algunas modalidades, el protector de ARN comprende al menos aproximadamente 60 % de etanol. En algunas modalidades, el protector de ARN comprende aproximadamente 60-95 % de etanol, aproximadamente 0-35 % de metanol y aproximadamente 0-35 % de propan-2-ol, en donde la cantidad total de solvente orgánico en el medio no es superior a aproximadamente 95 %. En algunas modalidades, el protector de ARN comprende aproximadamente 60-95 % de etanol, aproximadamente 5-20 % de metanol y aproximadamente 5-20 % de propan-2-ol, en donde la cantidad total de solvente orgánico en el medio no es superior a aproximadamente 95 %.

En algunas modalidades, el protector de ARN incluye una sal. La sal puede incluir sulfato de amonio, bisulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, sulfato de cesio, sulfato de cadmio, sulfato de hierro cesio (II), sulfato de cromo (III), sulfato de cobalto (II), sulfato de cobre (II), cloruro de litio, acetato de litio, sulfato de litio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, sulfato de manganeso, cloruro de manganeso, cloruro de potasio, sulfato de potasio, cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de zinc, acetato de zinc y sulfato de zinc. En algunas modalidades, la sal es una sal de sulfato, por ejemplo, sulfato de amonio, bisulfato de amonio, sulfato de cesio, sulfato de cadmio, sulfato de hierro cesio (II), sulfato de cromo (III), sulfato de cobalto (II), sulfato de cobre (II), sulfato de litio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato de potasio, sulfato de sodio o sulfato de zinc. En algunas

modalidades, la sal es sulfato de amonio. La sal puede estar presente a una concentración de aproximadamente 20 g/100 ml de medio o menos, tal como aproximadamente 15 g/100 ml, 10 g/100 ml, 9 g/100 ml, 8 g/100 ml, 7 g/100 ml, 6 g/100 ml, 5 g/100 ml o menos, por ejemplo, aproximadamente 4 g, 3 g, 2 g o 1 g/100 ml.

- 5 Adicionalmente, el protector de ARN puede contenerse en un medio que incluye además un quelante (por ejemplo, EDTA), un tampón (por ejemplo, citrato de sodio, acetato de sodio, citrato de potasio, o acetato de potasio, preferentemente acetato de sodio) y/o tamponado a un pH entre aproximadamente 4-8 (por ejemplo, aproximadamente 5).
- 10 En algunas modalidades, la muestra biológica se trata con uno o más protectores de ARN antes, simultáneamente con o después de la permeabilización. Por ejemplo, una muestra biológica se trata con uno o más protectores de ARN antes del tratamiento con uno o más reactivos de permeabilización (por ejemplo, una o más proteasas). En otro ejemplo, una muestra biológica se trata con una solución que incluye uno o más protectores de ARN y uno o más reactivos de permeabilización (por ejemplo, una o más proteasas). En aún otro ejemplo, una muestra biológica se trata
- 15 con uno o más protectores de ARN después de que la muestra biológica se ha tratado con uno o más reactivos de permeabilización (por ejemplo, una o más proteasas). En algunas modalidades, una muestra biológica se trata con uno o más protectores de ARN antes de la fijación.
- 20 En algunas modalidades, identificar la ubicación del analito capturado en la muestra biológica incluye una reacción de extensión de ácido nucleico. En algunas modalidades donde una sonda de captura captura una molécula de ADN genómico fragmentada, una reacción de extensión de ácido nucleico incluye ADN polimerasa. Por ejemplo, una reacción de extensión de ácido nucleico incluye usar una ADN polimerasa para extender la sonda de captura que se hibrida con el analito capturado (por ejemplo, ADN genómico fragmentado) mediante el uso del analito capturado (por ejemplo, ADN genómico fragmentado) como molde. El producto de la reacción de extensión incluye un analito con
- 25 código de barras espacial (por ejemplo, ADN genómico fragmentado con código de barras espacial). El analito con código de barras espacial (por ejemplo, ADN genómico fragmentado con código de barras espacial) puede usarse para identificar la ubicación espacial del analito en la muestra biológica. Cualquier ADN polimerasa que sea capaz de extender la sonda de captura mediante el uso del analito capturado como molde puede usarse para los métodos descritos en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen ADN polimerasa T7; ADN polimerasa Bsu; y ADN polimerasa E. coli pol I.
- 30

Permeabilización selectiva/lisis selectiva

- 35 En algunas modalidades, las muestras biológicas pueden procesarse para liberar selectivamente un analito de una región subcelular de una célula de acuerdo con métodos establecidos. En algunas modalidades, un método proporcionado en la presente descripción puede incluir detectar al menos un analito biológico presente en una región subcelular de una célula en una muestra biológica. Como se usa en la presente descripción, una "región subcelular" puede referirse a cualquier región subcelular. Por ejemplo, una región subcelular puede referirse a citosol, una mitocondria, un núcleo, un núcleo, un retículo endoplasmático, un lisosoma, una vesícula, un aparato Golgi, un
- 40 plastidio, una vacuola, un ribosoma, citoesqueleto o sus combinaciones. En algunas modalidades, la región subcelular comprende al menos uno de citosol, un núcleo, una mitocondria y un microsoma. En algunas modalidades, la región subcelular es citosol. En algunas modalidades, la región subcelular es un núcleo. En algunas modalidades, la región subcelular es una mitocondria. En algunas modalidades, la región subcelular es un microsoma.
- 45 Por ejemplo, un analito biológico puede liberarse selectivamente de una región subcelular de una célula mediante permeabilización selectiva o lisado selectivo. En algunas modalidades, "permeabilización selectiva" puede referirse a un método de permeabilización que puede permeabilizar una membrana de una región subcelular mientras deja una región subcelular diferente sustancialmente intacta (por ejemplo, los analitos biológicos no se liberan de la región subcelular debido al método de permeabilización aplicado). Los ejemplos no limitantes de métodos de
- 50 permeabilización selectiva incluyen usar electroforesis y/o aplicar un reactivo de permeabilización. En algunas modalidades, "lisis selectiva" puede referirse a un método de lisis que puede lisar una membrana de una región subcelular mientras deja una región subcelular diferente sustancialmente intacta (por ejemplo, los analitos biológicos no se liberan de la región subcelular debido al método de lisis aplicado). Los expertos en la técnica conocen varios métodos para la permeabilización o lisis selectiva, que incluyen los métodos descritos en Lu y otros. *Lab Chip*. Enero de 2005;5(1):23-9; Niklas y otros. *Anal Biochem*. 15 de septiembre de 2011;416(2):218-27; Cox y Emili. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1872-8; Chiang y otros. *J Biochem. Biophys. Methods*. 20 de noviembre de 2000;46(1-2):53-68; y Yamauchi y Herr y otros. *Microsyst. Nanoeng*. 2017;3. pii: 16079.
- 55 En algunas modalidades, "permeabilización selectiva" o "lisis selectiva" se refiere a la permeabilización selectiva o lisis selectiva de un tipo de célula específico. Por ejemplo, "permeabilización selectiva" o "lisis selectiva" puede referirse al lisado de un tipo de célula mientras se deja un tipo de célula diferente sustancialmente intacto (por ejemplo, los analitos biológicos no se liberan de la célula debido al método de permeabilización o lisis aplicado). Una célula que es un "tipo de célula diferente" que otra célula puede referirse a una célula de un reino taxonómico diferente, una célula procariota frente a una célula eucariota, una célula de un tipo de tejido diferente, etc. Un experto en la técnica conoce muchos
- 60 métodos para permeabilizar o lisar selectivamente diferentes tipos de células. Los ejemplos no limitantes incluyen aplicar un reactivo de permeabilización, electroporación y/o sonicación. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional
- 65

núm. WO 2012/168003; Han y otros. *Microsyst Nanoeng.* 17 de junio de 2019;5:30; Gould y otros. *Oncotarget.* 20 de marzo de 2018; 9(21): 15606–15615; Oren y Shai. *Biochemistry.* 18 de febrero de 1997;36(7):1826-35; Algayer y otros. *Molecules.* 31 de mayo de 2019;24(11). pii: E2079; Hipp y otros. *Leukemia.* Octubre de 2017;31(10):2278; solicitud internacional núm. WO 2012/168003; y patente de Estados Unidos núm. 7,785,869.

En algunas modalidades, aplicar un reactivo de lisis o permeabilización selectiva comprende poner en contacto la muestra biológica con un hidrogel que comprende el reactivo de lisis o permeabilización selectiva.

En algunas modalidades, la muestra biológica se pone en contacto con dos o más matrices (por ejemplo, matrices flexibles, como se describe en la presente descripción). Por ejemplo, después de que una región subcelular se permeabiliza y un analito biológico de la región subcelular se captura en una primera matriz, la primera matriz puede eliminarse, y un analito biológico de una región subcelular diferente puede capturarse en una segunda matriz.

(7) Otros reactivos

Pueden añadirse reactivos adicionales a una muestra biológica para realizar diversas funciones previo al análisis de la muestra biológica. En algunas modalidades, pueden añadirse a la muestra biológica inhibidores de nucleasas tales como agentes inactivadores de ADNasa y ARNasa o inhibidores de proteasas y/o agentes quelantes tales como EDTA. En otras modalidades, se añaden a la muestra nucleasas, tales como DNasa o ARNasa, o proteasas, tales como pepsina o proteinasa K. En algunas modalidades, los reactivos adicionales pueden disolverse en una solución o aplicarse como un medio a la muestra. En algunas modalidades, pueden disolverse reactivos adicionales (por ejemplo, pepsina) en HCl antes de aplicarlos a la muestra. Por ejemplo, la hematoxilina, de una tinción con H&E, puede eliminarse opcionalmente de la muestra biológica mediante lavado en HCl diluido (de 0,001 M a 0,1 M) antes del procesamiento posterior. En algunas modalidades, la pepsina puede disolverse en HCl diluido (de 0,001 M a 0,1 M) antes del procesamiento posterior. En algunas modalidades, las muestras biológicas pueden lavarse veces adicionales (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más veces) en HCl diluido antes de la incubación con una proteasa (por ejemplo, pepsina), pero después del tratamiento con proteinasa K.

En algunas modalidades, la muestra biológica puede tratarse con una o más enzimas. Por ejemplo, pueden añadirse una o más endonucleasas para fragmentar ADN, enzimas ADN polimerasa y dNTP usados para amplificar ácidos nucleicos. Otras enzimas que también pueden añadirse a la muestra biológica incluyen, pero no se limitan a, polimerasa, transposasa, ligasa y ADNasa y ARNasa.

En algunas modalidades, pueden añadirse a la muestra enzimas transcriptasa inversa, que incluyen enzimas con actividad transferasa terminal, cebadores y oligonucleótidos que conmutan de molde (TSO). La conmutación de molde puede usarse para aumentar la longitud de un ADNc, por ejemplo, mediante la adición de una secuencia de ácido nucleico predefinida al ADNc. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico adjunta comprende uno o más ribonucleótidos.

En algunas modalidades, pueden añadirse reactivos adicionales para mejorar la recuperación de una o más moléculas diana (por ejemplo, moléculas de ADNc, transcritos de ARNm). Por ejemplo, la adición de ARN portador a un proceso de flujo de trabajo de muestra de ARN puede aumentar el rendimiento de híbridos de ARN/ADN extraídos de la muestra biológica. En algunas modalidades, las moléculas portadoras son útiles cuando la concentración de moléculas de entrada o diana es baja en comparación con las moléculas restantes. Generalmente, las moléculas de diana única no pueden formar un precipitado, y la adición de las moléculas portadoras puede ayudar a formar un precipitado. Algunos protocolos de recuperación de moléculas diana usan ARN portador para evitar que pequeñas cantidades de ácidos nucleicos diana presentes en la muestra se unan irremediablemente. En algunas modalidades, el ARN portador puede añadirse inmediatamente antes de una segunda etapa de síntesis de hebra. En algunas modalidades, el ARN portador puede añadirse inmediatamente antes de una síntesis de ADNc de la segunda hebra en oligonucleótidos liberados de una matriz. En algunas modalidades, el ARN portador puede añadirse inmediatamente antes de una etapa de limpieza posterior a la transcripción in vitro. En algunas modalidades, el ARN portador puede añadirse antes de la purificación y cuantificación del ARN amplificado. En algunas modalidades, el ARN portador puede añadirse antes de la cuantificación del ARN. En algunas modalidades, el ARN portador puede añadirse inmediatamente antes de una segunda síntesis de ADNc de la hebra y una etapa de limpieza de la transcripción posterior in vitro.

II. Metodología analítica espacial general basada en matrices

En la presente descripción se describen métodos, aparatos, sistemas y composiciones para el análisis de muestras biológicas basado en matrices espaciales.

(a) Métodos de análisis espacial

Los métodos de análisis espaciales basados en matrices implican la transferencia de uno o más analitos de una muestra biológica a una matriz de elementos en un sustrato, donde cada elemento está asociado con una ubicación espacial única en la matriz. El análisis subsecuente de los analitos transferidos incluye determinar la identidad de los analitos y la ubicación espacial de cada analito dentro de la muestra biológica. La ubicación espacial de cada analito

dentro de la muestra biológica se determina sobre la base del elemento a la que está unido el analito en la matriz y la ubicación espacial relativa del elemento dentro de la matriz.

Existen al menos dos métodos generales para asociar un código de barras espacial con una o más células vecinas, de manera que el código de barras espacial identifique una o más células, y/o el contenido de una o más células, como asociado con una ubicación espacial particular. Un método general es llevar los analitos fuera de una célula y hacia la matriz con código de barras espacial.

Otro método general es escindir sondas de captura con códigos de barras espaciales de una matriz y promover las sondas de captura con códigos de barras espaciales hacia adentro y/o sobre la muestra biológica.

Mediante el uso de los métodos, composiciones, sistemas, kits y dispositivos descritos en la presente descripción, los transcritos de ARN presentes en muestras biológicas (por ejemplo, muestras de tejido) pueden usarse para el análisis del transcriptoma espacial. En particular, en algunos casos, los oligonucleótidos con código de barras pueden configurarse para preparar, replicar y, en consecuencia, producir productos de extensión con código de barras a partir de un molde de ARN, o derivados de estos. Por ejemplo, en algunos casos, los oligonucleótidos con código de barras pueden incluir secuencias de cebado específicas del ARNm, por ejemplo, segmentos de cebadores poli-T que permiten el cebado y la replicación del ARNm en una reacción de transcripción inversa u otras secuencias de cebado dirigidas. Alternativa o adicionalmente, la imprimación aleatoria de ARN puede llevarse a cabo mediante el uso de segmentos de cebadores N-mer aleatorios de los oligonucleótidos con código de barras. Las transcriptasas inversas (RT) pueden usar un molde de ARN y un cebador complementario al extremo 3' del molde de ARN para dirigir la síntesis del ADN complementario de la primera hebra (ADNc). Muchos RT pueden usarse en estas reacciones de transcripción inversa, que incluyen, por ejemplo, transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV), virus de la leucemia murina del Moloney (M-MuLV o MMLV) y otras variantes de los mismos. Algunas transcriptasas inversas recombinantes M-MuLV, tales como, por ejemplo, PROTOCOLSCRIPT® II transcriptasa inversa, pueden tener una actividad reducida de RNasa H y una mayor termoestabilidad en comparación con su contraparte de tipo natural, y proporcionar una mayor especificidad, un mayor rendimiento de ADNc y más productos de ADNc de longitud completa con hasta 12 kilobases (kb) de longitud. En algunas modalidades, la enzima de transcriptasa inversa es una enzima de transcriptasa inversa mutante tal como, pero no se limita a, la transcriptasa inversa de MMLV mutante. En otra modalidad, la transcriptasa inversa es una transcriptasa inversa de MMLV mutante tal como, pero sin limitarse a, una o más variantes descritas en la publicación de patente de Estados Unidos núm. 20180312822 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 62/946,885 presentada el 11 de diciembre de 2019.

En un ejemplo no limitante de flujos de trabajo descritos anteriormente, una muestra biológica (por ejemplo, sección de tejido) puede fijarse con metanol, teñirse con hematoxilina y eosina, y obtener imágenes. Opcionalmente, la muestra puede desteñirse antes de la permeabilización. Las imágenes pueden usarse para mapear patrones de expresión génica espacial de regreso a la muestra biológica. Una enzima de permeabilización puede usarse para permeabilizar la muestra biológica directamente en el portaobjetos. Los analitos (por ejemplo, ARNm poliadenilado) liberados de las células superpuestas de la muestra biológica pueden capturarse mediante sondas de captura dentro de un área de captura en un sustrato. Los reactivos de transcripción inversa (RT) pueden añadirse a muestras biológicas permeabilizadas. La incubación con los reactivos de RT puede producir ADNc de longitud completa con código de barras espacial a partir de los analitos capturados (por ejemplo, ARNm poliadenilado). Los reactivos de la segunda hebra (por ejemplo, cebadores de la segunda hebra, enzimas) pueden añadirse a la muestra biológica en el portaobjetos para iniciar la síntesis de la segunda hebra. El ADNc resultante puede desnaturalizarse desde el molde de la sonda de captura y transferirse (por ejemplo, a un tubo limpio) para la amplificación, y/o construcción de la biblioteca. El ADNc de longitud completa, con código de barras espacial, puede amplificarse mediante PCR antes de la construcción de la biblioteca. Los amplicones pueden entonces fragmentarse enzimáticamente y/o seleccionarse por tamaño para proporcionar el tamaño del amplicón deseado. En algunas modalidades, cuando se utiliza una metodología de preparación de biblioteca Illumina®, pueden añadirse secuencias P5 y P7 a los amplicones, lo que permite de esta manera la captura de la preparación de la biblioteca en una celda de flujo de secuenciación (por ejemplo, en instrumentos de secuenciación Illumina). Adicionalmente, i7 e i5 pueden añadirse secuencias de índices como índices de muestra si se van a combinar y secuenciar múltiples bibliotecas juntas. Además, pueden añadirse secuencias Lectura 1 y Lectura 2 a la preparación de la biblioteca con fines de secuenciación. Las secuencias antes mencionadas pueden añadirse a una muestra de preparación de biblioteca, por ejemplo, mediante reparación final, cola A, ligación adaptadora y/o PCR. Los fragmentos de ADNc pueden entonces secuenciarse mediante el uso, por ejemplo, de secuenciación de extremo emparejado mediante el uso de TruSeq Lectura 1 y TruSeq Lectura 2 como sitios de cebadores de secuenciación.

En algunas modalidades, la realización de un análisis correlativo de los datos producidos por este flujo de trabajo, y otros flujos de trabajo descritos en la presente descripción, puede producir más del 95 % de correlación de genes expresados en dos áreas de captura (por ejemplo, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más o 99 % o más). Cuando se realizan los flujos de trabajo descritos mediante el uso de secuenciación de ARN de células individuales de núcleos, en algunas modalidades, el análisis correlativo de los datos puede producir más del 90 % (por ejemplo, más del 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %) de correlación de genes expresados en dos áreas de captura.

En algunas modalidades, después de que se genera el ADNc (por ejemplo, por transcripción inversa) el ADNc puede amplificarse directamente sobre la superficie del sustrato. La generación de múltiples copias del ADNc (por ejemplo, ADNc sintetizado a partir de analitos capturados) mediante amplificación directamente sobre la superficie del sustrato puede mejorar la complejidad final de la biblioteca de secuenciación. Por lo tanto, en algunas modalidades, el ADNc puede amplificarse directamente sobre la superficie del sustrato mediante amplificación de ácidos nucleicos isotérmica. En algunas modalidades, la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica puede amplificar el ARN o ADN.

En algunas modalidades, la amplificación isotérmica puede ser más rápida que una reacción de PCR estándar. En algunas modalidades, la amplificación isotérmica puede ser amplificación lineal (por ejemplo, asimétrica con un único cebador) o amplificación exponencial (por ejemplo, con dos cebadores). En algunas modalidades, la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica puede realizarse mediante un cebador de oligonucleótido que conmuta de molde. En algunas modalidades, el oligonucleótido que conmuta de molde añade una secuencia común sobre el extremo 5' del ARN que se transcribe de manera inversa. Por ejemplo, después de que una sonda de captura interactúa con un analito (por ejemplo, ARNm) y se realiza la transcripción inversa de manera que se añaden nucleótidos adicionales al final del ADNc para generar un saliente en 3' como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, un oligonucleótido que conmuta de molde puede hibridarse con nucleótidos poli(C) no templados que se añaden por una transcriptasa inversa para continuar la replicación al extremo 5' del oligonucleótido que conmuta de molde, para generar de esta manera un ADNc de longitud completa listo para amplificación adicional. En algunas modalidades, el oligonucleótido que conmuta de molde añade una secuencia 5' común al ADNc de longitud completa que se usa para la amplificación del ADNc (por ejemplo, un complemento inverso del oligonucleótido que conmuta de molde).

En algunas modalidades, una vez que se genera una molécula de ADNc de longitud completa, el oligonucleótido que conmuta de molde puede servir como un cebador en una reacción de amplificación de ADNc (por ejemplo, con una ADN polimerasa). En algunas modalidades, el ADNc de doble hebra (por ejemplo, ADNc de la primera hebra y ADNc del complemento inverso de la segunda hebra) puede amplificarse mediante amplificación isotérmica con una helicasa o recombinasa, seguido de una hebra que desplaza la ADN polimerasa. La hebra que desplaza la ADN polimerasa puede generar una segunda hebra desplazada lo que da como resultado un producto amplificado.

En cualquiera de los métodos de amplificación isotérmica descritos en la presente descripción, el intercambio de código de barras (por ejemplo, código de barras espacial) puede ocurrir después del primer ciclo de amplificación donde hay sondas de captura no usadas en la superficie del sustrato. En algunas modalidades, el extremo 3'OH libre de las sondas de captura no usadas puede bloquearse mediante cualquier método adecuado de bloqueo de 3'OH. En algunas modalidades, el 3'OH puede bloquearse mediante ligación en horquilla.

La amplificación de ácidos nucleicos isotérmica puede usarse además de, o como alternativa a las reacciones de PCR estándar (por ejemplo, una reacción de PCR que requiere calentar hasta aproximadamente 95 °C para desnaturalizar el ADN de doble hebra). La amplificación de ácidos nucleicos isotérmica generalmente no requiere el uso de un termociclador, sin embargo, en algunas modalidades, la amplificación isotérmica puede realizarse en un termociclador. En algunas modalidades, la amplificación isotérmica puede realizarse de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 75 °C. En algunas modalidades, la amplificación isotérmica puede realizarse a partir de aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, o aproximadamente 70 °C o en cualquier punto intermedio en dependencia de la polimerasa y las enzimas auxiliares usadas.

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos isotérmicos se conocen en la técnica y pueden usarse solas o en combinación con cualquiera de los métodos espaciales descritos en la presente descripción. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de técnicas adecuadas de amplificación de ácidos nucleicos isotérmica incluyen amplificación mediada por transcripción, amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos, amplificación mediada por señal de la tecnología de ARN, amplificación de desplazamiento de hebra, amplificación de círculo rodante, amplificación isotérmica mediada por lazo de ADN (LAMP), amplificación de desplazamiento múltiple isotérmica, amplificación de la recombinasa polimerasa, amplificación dependiente de helicasa, amplificación isotérmica de cebador único, y amplificación circular dependiente de helicasa (ver, por ejemplo, Gill y Ghaemi, Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review, *Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids*, 27(3), 224-43, doi: 10.1080/15257770701845204 (2008)).

En algunas modalidades, la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica es la amplificación de ácidos nucleicos dependiente de helicasa. La amplificación de ácidos nucleicos isotérmica dependiente de helicoidal se describe en Vincent, y otros, Helicase-dependent isothermal DNA amplification, *EMBO Rep.*, 795-800 (2004) y la patente de Estados Unidos núm. 7,282,328. Además, la amplificación de ácidos nucleicos dependiente de helicasa en un sustrato (por ejemplo, en el chip) se describe en Andresen, y otros, Helicase-dependent amplification: use in OnChip amplification and potential for point-of-care diagnostics, *Expert Rev Mol Diagn.*, 9, 645-650, doi: 10.1586/erm.09.46 (2009). En algunas modalidades, la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica es la amplificación de ácidos nucleicos de recombinasa polimerasa. La amplificación de ácidos nucleicos de polimerasa recombinante se describe en Piepenburg, y otros, DNA Detection Using Recombinant Proteins, *PLoS Biol.*, 4, 7 e204 (2006) y Li, y otros, Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification, *Analyst*, 144, 31-67, doi: 10.1039/C8AN01621F (2019).

Generalmente, las técnicas de amplificación isotérmica usan reactivos de PCR estándar (por ejemplo, tampón, dNTP, etc.) conocidos en la técnica. Algunas técnicas de amplificación isotérmica pueden requerir reactivos adicionales. Por ejemplo, la amplificación de ácidos nucleicos dependiente de helicasa usa una proteína de unión de única hebra y una proteína complementaria. En otro ejemplo, la amplificación de ácidos nucleicos de recombinasa polimerasa usa recombinasa (por ejemplo, T4 UvsX), factor de carga de recombinasa (por ejemplo, TF UvsY), proteína de unión de única hebra (por ejemplo, T4 gp32), agente de apiñamiento (por ejemplo, PEG-35K) y ATP.

Después de la amplificación de ácidos nucleicos isotérmica del ADNc de longitud completa descrito por cualquiera de los métodos en la presente descripción, los ADNc amplificados isotérmicamente (por ejemplo, de única hebra o doble hebra) pueden recuperarse del sustrato y, opcionalmente, seguido de amplificación con PCR de ADNc típica en tubos de microcentrifuga. La muestra puede usarse con cualquiera de los métodos de espaciales descritos en la presente descripción.

(i) Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

En algunas modalidades, los protocolos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica (técnicas de tinción directa e indirecta) pueden realizarse como parte de, o además de, los flujos de trabajo espaciales ilustrativos presentados en la presente descripción. Por ejemplo, las secciones de tejido pueden fijarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. La muestra biológica puede transferirse a una matriz (por ejemplo, matriz de sondas de captura), en donde los analitos (por ejemplo, proteínas) se sondean mediante el uso de protocolos de inmunofluorescencia. Por ejemplo, la muestra puede rehidratarse, bloquearse y permeabilizarse (SSC 3X, BSA 2 %, Tritón X 0,1 %, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 10 minutos a 4 °C) antes de teñirse con anticuerpos primarios fluorescentes (1:100 en 3XSSC, BSA 2 %, Tritón X 0,1 %, inhibidor de ARNasa 1 U/μl durante 30 minutos a 4 °C). La muestra biológica puede lavarse, cubrirse con cubreobjetos (en glicerol + inhibidor de ARNasa de 1 U/μl), obtener imágenes (por ejemplo, mediante el uso de un microscopio confocal u otro aparato capaz de detección fluorescente), lavarse y procesarse de acuerdo con la captura de analito o flujos de trabajo espaciales descritos en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, un "tampón de recuperación de antígeno" puede mejorar la captura por anticuerpos en protocolos IF/IHC. Un protocolo ilustrativo para la recuperación de antígeno puede ser precalentar el tampón de recuperación de antígeno (por ejemplo, a 95 °C), sumergir la muestra biológica en el tampón de recuperación de antígeno calentado durante un tiempo predeterminado y luego eliminar la muestra biológica del tampón de recuperación de antígeno y lavar la muestra biológica.

En algunas modalidades, la optimización de la permeabilización puede usarse para identificar analitos intracelulares. La optimización de la permeabilización puede incluir la selección de agentes de permeabilización, la concentración de agentes de permeabilización y la duración de la permeabilización. La permeabilización del tejido se discute en otra parte en la presente descripción.

En algunas modalidades, el bloqueo de una matriz y/o una muestra biológica en una preparación para marcar la muestra biológica disminuye la unión inespecífica de los anticuerpos a la matriz y/o muestra biológica (disminuye el fondo). Algunas modalidades proporcionan tampones de bloqueo/soluciones de bloqueo que pueden aplicarse antes y/o durante la aplicación de la etiqueta, en donde el tampón de bloqueo puede incluir un agente de bloqueo y opcionalmente un surfactante y/o una solución salina. En algunas modalidades, un agente de bloqueo puede ser albúmina sérica bovina (BSA), suero, gelatina (por ejemplo, gelatina de pescado), leche (por ejemplo, leche seca sin grasa), caseína, polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), o polivinilpirrolidona (PVP), reactivo de bloqueo de biotina, un reactivo de bloqueo de peroxidasa, levamisol, solución de Carnoy, glicina, lisina, borohidruro de sodio, azul cielo de pontamina, negro de Sudán, azul de tripán, agente de bloqueo de FITC y/o ácido acético. El tampón de bloqueo/solución de bloqueo puede aplicarse a la matriz y/o muestra biológica antes y/o durante el marcaje (por ejemplo, la aplicación de anticuerpos conjugados con fluoróforo) a la muestra biológica.

En algunas modalidades, pueden incluirse etapas u optimizaciones adicionales en la realización de protocolos de IF/IHC junto con matrices espaciales. Pueden incluirse etapas u optimizaciones adicionales en la realización de flujos de trabajo de agentes de captura de analito etiquetados espacialmente discutidos en la presente descripción.

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, un analito presente en una muestra biológica, tal como una sección de tejido) que incluyen: (a) proporcionar una muestra biológica en un sustrato; (b) teñir la muestra biológica en el sustrato, obtener imágenes de la muestra biológica teñida, y seleccionar la muestra biológica o subsección de la muestra biológica (por ejemplo, región de interés) a someter a análisis; (c) proporcionar una matriz que comprende una o más pluralidades de sondas de captura en un sustrato; (d) poner en contacto la muestra biológica con la matriz, para permitir de esta manera una sonda de captura de una o más pluralidades de sondas de captura para capturar el analito de interés; y (e) analizar el analito capturado, para detectar espacialmente de esta manera el analito de interés. Cualquier variedad de técnicas de tinción e imágenes como se describe en la presente descripción o se conoce en la técnica puede usarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la tinción incluye marcajes ópticos como se

describe en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, marcajes detectables fluorescentes, radiactivos, quimioluminiscentes, calorimétricos o colorimétricos. En algunas modalidades, la tinción incluye un anticuerpo fluorescente dirigido a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas modalidades, la tinción incluye una tinción inmunohistoquímica dirigida a un analito diana (por ejemplo, proteínas de la superficie celular o intracelulares) en la muestra biológica. En algunas modalidades, la tinción incluye una tinción química, tal como hematoxilina y eosina (H&E) o ácido peryódico de Schiff (PAS). En algunas modalidades, puede transcurrir un tiempo significativo (por ejemplo, días, meses o años) entre la tinción y/o la obtención de imágenes de la muestra biológica y la realización de análisis. En algunas modalidades, los reactivos para realizar el análisis se añaden a la muestra biológica antes, simultáneamente con, o después de que la matriz se pone en contacto con la muestra biológica. En algunas modalidades, la etapa (d) incluye colocar la matriz sobre la muestra biológica. En algunas modalidades, la matriz es una matriz flexible donde la pluralidad de elementos con código de barras espacial (por ejemplo, un sustrato con sondas de captura, una perla con sondas de captura) se unen a un sustrato flexible. En algunas modalidades, se toman medidas para ralentizar una reacción (por ejemplo, enfriar la temperatura de la muestra biológica o usar enzimas que realizan preferentemente su función principal a una temperatura más baja o más alta en comparación con su temperatura funcional óptima) antes de que la matriz se ponga en contacto con la muestra biológica. En algunas modalidades, la etapa (e) se realiza sin llevar la muestra biológica fuera de contacto con la matriz. En algunas modalidades, la etapa (e) se realiza después de que la muestra biológica ya no esté en contacto con la matriz. En algunas modalidades, la muestra biológica se etiqueta con un agente de captura de analito antes, simultáneamente con, o después de la tinción y/o la obtención de imágenes de la muestra biológica. En tales casos, puede transcurrir un tiempo significativo (por ejemplo, días, meses o años) entre la tinción y/o la obtención de imágenes y la realización del análisis. En algunas modalidades, la matriz se adapta para facilitar la migración de analitos biológicos desde la muestra biológica teñida y/o capturada en imágenes sobre la matriz (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los materiales o métodos descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, una muestra biológica se permeabiliza antes de entrar en contacto con una matriz. En algunas modalidades, la velocidad de permeabilización se ralentiza antes de poner en contacto una muestra biológica con una matriz (por ejemplo, para limitar la difusión de analitos lejos de sus ubicaciones originales en la muestra biológica). En algunas modalidades, la modulación de la velocidad de permeabilización (por ejemplo, la modulación de la actividad de un reactivo de permeabilización) puede producirse mediante la modulación de una condición a la que se expone la muestra biológica (por ejemplo, la modulación de la temperatura, el pH y/o la luz). En algunas modalidades, modular la velocidad de permeabilización incluye el uso de estímulos externos (por ejemplo, moléculas pequeñas, enzimas y/o reactivos activadores) para modular la velocidad de permeabilización. Por ejemplo, un reactivo de permeabilización puede proporcionarse a una muestra biológica antes de entrar en contacto con una matriz, cuyo reactivo de permeabilización está inactivo hasta que se cambie una condición (por ejemplo, temperatura, pH y/o luz) o se proporcione un estímulo externo (por ejemplo, una molécula pequeña, una enzima y/o un reactivo activador).

En algunas modalidades, se proporcionan en la presente descripción métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, presente en una muestra biológica, tal como una sección de tejido) que incluyen: (a) proporcionar una muestra biológica en un sustrato; (b) teñir la muestra biológica en el sustrato, obtener imágenes de la muestra biológica teñida, y seleccionar la muestra biológica o subsección de la muestra biológica (por ejemplo, región de interés) a someter a análisis transcriptómico espacial; (c) proporcionar una matriz que comprende una o más pluralidades de sondas de captura en un sustrato; (d) poner en contacto la muestra biológica con la matriz, para permitir de esta manera una sonda de captura de una o más pluralidades de sondas de captura para capturar el analito biológico de interés; y (e) analizar el analito biológico capturado, para detectar espacialmente de esta manera el analito biológico de interés.

(b) Sondas de captura

Una "sonda de captura" se refiere a cualquier molécula capaz de capturar (directa o indirectamente) y/o marcar un analito (por ejemplo, un analito de interés) en una muestra biológica. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura es un conjugado (por ejemplo, un conjugado oligonucleótido-anticuerpo). En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura.

(i) Dominio de captura

Como se analizó anteriormente, cada sonda de captura incluye al menos un dominio de captura. El "dominio de captura" puede ser un oligonucleótido, un polipéptido, una molécula pequeña, o cualquiera de sus combinaciones, que se une específicamente a un analito deseado. En algunas modalidades, puede usarse un dominio de captura para capturar o detectar un analito deseado.

En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia de ácido nucleico funcional configurada para interactuar con uno o más analitos, tales como uno o más tipos diferentes de ácidos nucleicos (por ejemplo, moléculas de ARN y moléculas de ADN). En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico funcional puede incluir una secuencia de N-mer (por ejemplo, una secuencia de N-mer aleatoria), cuyas secuencias de N-mer se configuran para interactuar con una pluralidad de moléculas de ADN. En algunas modalidades, la secuencia funcional puede incluir una secuencia poli(T), cuyas secuencias poli(T) se configuran para interactuar con moléculas de ARN mensajero

(ARNm) a través de la cola poli(A) de un transcrito de ARNm. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico funcional es la diana de unión de una proteína (por ejemplo, un factor de transcripción, una proteína de unión a ADN o una proteína de unión a ARN), donde el analito de interés es una proteína.

- 5 Las sondas de captura pueden incluir ribonucleótidos y/o desoxirribonucleótidos, así como también residuos de nucleótidos sintéticos que son capaces de participar en interacciones de tipo Watson-Crick o de pares de bases análogas. En algunas modalidades, el dominio de captura es capaz de imprimir una reacción de transcripción inversa para generar ADNc que es complementario a las moléculas de ARN capturadas. En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura puede cebar una reacción de extensión de ADN (polimerasa) para generar ADN
- 10 que es complementario a las moléculas de ADN capturadas. En algunas modalidades, el dominio de captura puede servir de molde a una reacción de ligación entre las moléculas de ADN capturadas y una sonda de superficie que se inmoviliza directa o indirectamente sobre el sustrato. En algunas modalidades, el dominio de captura puede ligarse a una hebra de las moléculas de ADN capturadas. Por ejemplo, la ligasa SplintR junto con secuencias de ARN o ADN (por ejemplo, ARN degenerado) puede usarse para ligar un ADN o ARN monocatenario al dominio de captura. En
- 15 algunas modalidades, las ligasas con actividad de ligasa con molde de ARN, por ejemplo, ligasa SplintR, ARN ligasa T4 2 o ligasa KOD, pueden usarse para ligar un ADN o ARN monocatenario al dominio de captura. En algunas modalidades, un dominio de captura incluye un oligonucleótido de soporte. En algunas modalidades, un dominio de captura, captura un oligonucleótido de soporte.
- 20 En algunas modalidades, el dominio de captura se ubica en el extremo 3' de la sonda de captura e incluye un extremo 3' libre que puede extenderse, por ejemplo, mediante polimerización dependiente del molde, para formar una sonda de captura extendida como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura incluye una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con ácido nucleico, por ejemplo ARN u otro analito, presente en las células de la muestra biológica en contacto con la matriz. En algunas modalidades, el dominio de
- 25 captura puede seleccionarse o diseñarse para unirse selectiva o específicamente a un ácido nucleico diana. Por ejemplo, el dominio de captura puede seleccionarse o diseñarse para capturar ARNm por medio de hibridación con la cola poli(A) de ARNm. Por lo tanto, en algunas modalidades, el dominio de captura incluye un oligonucleótido de ADN poli(T), por ejemplo, una serie de residuos consecutivos de desoxitimidina que se unen por enlaces fosfodiéster, que es capaz de hibridarse con la cola poli(A) del ARNm. En algunas modalidades, el dominio de captura puede incluir nucleótidos que son funcional o estructuralmente análogos a una cola poli(T). Por ejemplo, un oligonucleótido poli(U) o un oligonucleótido que se incluye de análogos de desoxitimidina. En algunas modalidades, el dominio de captura incluye al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. En algunas modalidades, el dominio de captura incluye al menos 25, 30 o 35 nucleótidos.
- 35 En algunas modalidades, una sonda de captura incluye un dominio de captura que tiene una secuencia que es capaz de unirse al ARNm y/o ADN genómico. Por ejemplo, la sonda de captura puede incluir un dominio de captura que incluye una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia poli(T)) capaz de unirse a una cola poli(A) de un ARNm y/o a una secuencia poli(A) homopolimérica presente en el ADN genómico. En algunas modalidades, se añade una secuencia homopolimérica a una molécula de ARNm o una molécula de ADN genómico mediante el uso de una
- 40 enzima terminal transferasa para producir un analito que tiene una secuencia poli(A) o poli(T). Por ejemplo, una secuencia poli(A) puede añadirse a un analito (por ejemplo, un fragmento de ADN genómico) lo que hace de esta manera que el analito sea capaz de capturarse por un dominio de captura poli(T).
- 45 En algunas modalidades, pueden usarse secuencias aleatorias, por ejemplo, hexámeros aleatorios o secuencias similares, para formar todo o una parte del dominio de captura. Por ejemplo, las secuencias aleatorias pueden usarse junto con las secuencias poli(T) (o análogo poli(T)). Por lo tanto, cuando un dominio de captura incluye un oligonucleótido poli(T) (o un oligonucleótido "similar a poli(T)"), también puede incluir una secuencia de oligonucleótidos aleatoria (por ejemplo, sonda de "secuencia aleatoria de poli(T)"). Esto puede, por ejemplo, ubicarse 5' o 3' de la secuencia poli(T), por ejemplo, en el extremo 3' del dominio de captura. La sonda de secuencia aleatoria de poli(T) puede facilitar la captura de la cola poli(A) de ARNm. En algunas modalidades, el dominio de captura puede ser una secuencia aleatoria completamente. En algunas modalidades, pueden usarse dominios de captura degenerados.
- 50 En algunas modalidades, un conjunto de dos o más sondas de captura forman una mezcla, donde el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye una secuencia poli(T) y el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye secuencias aleatorias. En algunas modalidades, un conjunto de dos o más sondas de captura forman una mezcla donde el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye una secuencia similar a poli(T) y el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye secuencias aleatorias. En algunas modalidades, un conjunto de dos o más sondas de captura forman una mezcla donde el dominio de captura de una o
- 55 más sondas de captura incluye secuencias poli(T) aleatorias y el dominio de captura de una o más sondas de captura incluye secuencias aleatorias. En algunas modalidades, las sondas con dominios de captura degenerados pueden añadirse a cualquiera de las combinaciones anteriores enumeradas en la presente descripción. En algunas modalidades, las sondas con dominios de captura degenerados pueden sustituirse por una de las sondas en cada uno de los pares descritos en la presente descripción.
- 60
- 65

El dominio de captura puede basarse en una secuencia génica particular o secuencia de motivo particular o secuencia común/conservada, que se diseña para capturar (es decir, un dominio de captura específico de secuencia). Por lo tanto, en algunas modalidades, el dominio de captura es capaz de unirse selectivamente a un subtipo o subconjunto de ácido nucleico deseado, por ejemplo, un tipo particular de ARN, tal como ARNm, ARNr, ARNt, ARN SRP, ARNtm, ARNpn, ARNpno, ARN SmY, ARNacc, ARNg, ARNasa P, ARNasa MRP, TERC, ARN SL, ARNa, cis-NAT, ARNcr, ARNinc, miARN, ARNpi, ARNip, ARNc, ARNtasi, ARNrasi, 7SK, ARNp, ARNnc u otros tipos de ARN. En un ejemplo no limitante, el dominio de captura puede ser capaz de unirse selectivamente a un subconjunto deseado de ácidos ribonucleicos, por ejemplo, ARN de microbioma, tal como ARNr 16S. En otros ejemplos no limitantes, el dominio de captura puede ser capaz de unirse selectivamente a una secuencia en una molécula de ADN, por ejemplo, una molécula de ADNc o ADNg. Por ejemplo, un dominio de captura podría unirse selectivamente a un ADN de interés en estados de cáncer o enfermedad.

En algunas modalidades, un dominio de captura incluye un “anclaje” o “secuencia de anclaje”, que es una secuencia de nucleótidos que se diseña para garantizar que el dominio de captura se hibride con el analito previsto. En algunas modalidades, una secuencia de anclaje incluye una secuencia de nucleótidos, que incluye una secuencia de 1-mer, 2-mer, 3-mer o más larga. En algunas modalidades, la secuencia corta es aleatoria. Por ejemplo, un dominio de captura que incluye una secuencia poli(T) puede diseñarse para capturar un ARNm. En tales modalidades, una secuencia de anclaje puede incluir un 3-mer aleatorio (por ejemplo, GGG) que ayuda a garantizar que el dominio de captura poli(T) se hibride con un ARNm. En algunas modalidades, una secuencia de anclaje puede ser VN, N o NN. Alternativamente, la secuencia puede diseñarse mediante el uso de una secuencia específica de nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia de anclaje está en el extremo 3' del dominio de captura. En algunas modalidades, la secuencia de anclaje está en el extremo 5' del dominio de captura.

En algunas modalidades, los dominios de captura de las sondas de captura se bloquean previo a poner en contacto la muestra biológica con la matriz, y las sondas de bloqueo pueden usarse cuando el ácido nucleico en la muestra biológica se modifica previo a su captura sobre la matriz. En algunas modalidades, se usa la sonda de bloqueo para bloquear o modificar el extremo 3' libre del dominio de captura. En algunas modalidades, las sondas de bloqueo pueden hibridarse con las sondas de captura para enmascarar el extremo 3' libre del dominio de captura, por ejemplo, sondas en horquilla, sondas parcialmente de doble hebra o secuencias complementarias. En algunas modalidades, el extremo 3' libre del dominio de captura puede bloquearse mediante modificación química, por ejemplo, la adición de un grupo azidometilo como un resto protector químicamente reversible, de manera que las sondas de captura no incluyen un extremo 3' libre. El bloqueo o modificación de las sondas de captura, particularmente en el extremo 3' libre del dominio de captura, previo a poner en contacto la muestra biológica con la matriz, evita la modificación de las sondas de captura, por ejemplo, evita la adición de una cola poli(A) al extremo 3' libre de las sondas de captura.

Los ejemplos no limitantes de modificaciones 3' incluyen didesoxi C-3' (3'-ddC), dT invertido 3', separador C3 3', amino 3' y fosforilación 3'. En algunas modalidades, el ácido nucleico en la muestra biológica puede modificarse de manera que pueda capturarse por el dominio de captura. Por ejemplo, una secuencia adaptadora (que incluye un dominio de unión capaz de unirse al dominio de captura de la sonda de captura) puede añadirse al extremo del ácido nucleico, por ejemplo, ADN genómico fragmentado. En algunas modalidades, esto se logra mediante la ligación de la secuencia adaptadora o la extensión del ácido nucleico. En algunas modalidades, se usa una enzima para incorporar nucleótidos adicionales en el extremo de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, una cola poli(A). En algunas modalidades, las sondas de captura pueden enmascararse o modificarse reversiblemente de manera que el dominio de captura de la sonda de captura no incluya un extremo 3' libre. En algunas modalidades, el extremo 3' se elimina, se modifica o se hace inaccesible de manera que el dominio de captura no sea susceptible al proceso que se usa para modificar el ácido nucleico de la muestra biológica, por ejemplo, ligación o extensión.

En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura se modifica para permitir la eliminación de cualquiera de las modificaciones de la sonda de captura que ocurra durante la modificación de las moléculas de ácido nucleico de la muestra biológica. En algunas modalidades, las sondas de captura pueden incluir una secuencia adicional aguas abajo del dominio de captura, por ejemplo, 3' con respecto al dominio de captura, específicamente un dominio de bloqueo.

En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura puede ser un dominio que no es ácido nucleico. Los ejemplos de dominios de captura adecuados que no se basan exclusivamente en ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, aptámeros, antígenos, anticuerpos y análogos moleculares que imitan la funcionalidad de cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción.

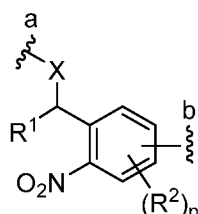
(ii) Dominio de escisión

Cada sonda de captura puede incluir opcionalmente al menos un dominio de escisión. El dominio de escisión representa la porción de la sonda que se usa para unir reversiblemente la sonda a un elemento de matriz, como se describirá en la presente descripción. Además, uno o más segmentos o regiones de la sonda de captura pueden liberarse opcionalmente desde el elemento de matriz mediante escisión del dominio de escisión. Como un ejemplo, los códigos de barras espaciales y/o los identificadores moleculares universales (UMI) pueden liberarse mediante escisión del dominio de escisión.

En algunas modalidades, el dominio de escisión que une la sonda de captura a un elemento es un enlace capaz de escindirse por una enzima. Se puede añadir una enzima para escindir el dominio de escisión, lo que da como resultado la liberación de la sonda de captura del elemento. Como otro ejemplo, el calentamiento también puede resultar en la degradación del dominio de escisión y la liberación de la sonda de captura unida del elemento de matriz. En algunas modalidades, la radiación láser se usa para calentar y degradar los dominios de escisión de sondas de captura en ubicaciones específicas. En algunas modalidades, el dominio de escisión es un enlace químico fotosensible (por ejemplo, un enlace químico que se disocia cuando se expone a la luz tal como la luz ultravioleta). En algunas modalidades, el dominio de escisión puede ser un dominio de escisión ultrasónica. Por ejemplo, la escisión ultrasónica puede depender de la secuencia de nucleótidos, la longitud, el pH, la resistencia iónica, la temperatura y la frecuencia ultrasónica (por ejemplo, 22 kHz, 44 kHz) (Grokhovsky, S.L., Specificity of DNA cleavage by ultrasound, *Molecular Biology*, 40(2), 276-283 (2006)).

Los oligonucleótidos con enlaces químicos fotosensibles (por ejemplo, enlazadores fotoescindibles) tienen varias ventajas. Pueden escindirse de manera eficiente y rápida (por ejemplo, en nanosegundos y milisegundos). En algunos casos, las fotomascarillas pueden usarse de manera que solo las regiones específicas de la matriz se exponen a estímulos escindibles (por ejemplo, exposición a la luz UV, exposición a la luz, exposición al calor inducido por el láser). Cuando se usa un enlazador fotoescindible, la reacción escindible se activa mediante la luz, y puede ser altamente selectiva al enlazador y consecuentemente biortogonal. Típicamente, la absorción de la longitud de onda para el enlazador fotoescindible se ubica en el intervalo UV cercano del espectro. En algunas modalidades, $\lambda_{\text{máx}}$ del enlazador fotoescindible es de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm, o de aproximadamente 310 nm a aproximadamente 365 nm. En algunas modalidades, $\lambda_{\text{máx}}$ del enlazador fotoescindible es aproximadamente 300 nm, aproximadamente 312 nm, aproximadamente 325 nm, aproximadamente 330 nm, aproximadamente 340 nm, aproximadamente 345 nm, aproximadamente 355 nm, aproximadamente 365 nm o aproximadamente 400 nm.

Los ejemplos no limitantes de un enlace químico fotosensible que puede usarse en un dominio de escisión incluyen los descritos en Leriche y otros. *Bioorg Med Chem.* 15 de enero de 2012;20(2):571-82 y publicación de los Estados Unidos núm. 2017/0275669. Por ejemplo, los enlazadores que comprenden enlaces químicos fotosensibles incluyen ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (ANP), derivados de ésteres de fenacilo, bencenosulfonato de 8-quinolinilo, dicumarina, 6-bromo-7-alkixicumarin-4-ilmetoxicarbonilo, un enlazador a base de bimano y un enlazador a base de bisarilhidrazona. En algunas modalidades, el enlace fotosensible es parte de un enlazador escindible tal como un enlazador ortonitrobencilo (ONB) más abajo:



en donde:

X se selecciona de O y NH;

R¹ se selecciona de H y alquilo C₁₋₃;

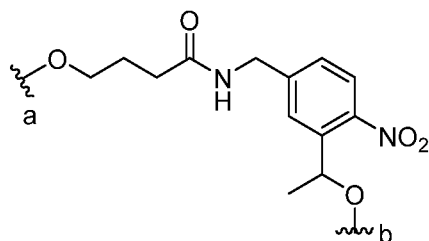
R² se selecciona de H y alcoxi C₁₋₃;

n es 1, 2 o 3; y

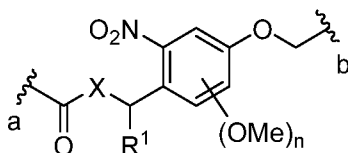
a y b representan cada uno el punto de unión del enlazador al sustrato, o el punto de unión del enlazador a la sonda de captura.

En algunas modalidades, al menos un separador se incluye entre el sustrato y el enlazador de orto-nitrobencilo (ONB), y al menos un separador se incluye entre el enlazador de orto-nitrobencilo (ONB) y la sonda de captura. En algunos aspectos de estas modalidades, el separador comprende al menos un grupo seleccionado de alquileo C₁₋₆, alquilenilo C₂₋₆, alquilenilo C₂₋₆, C=O, O, S, NH, -(C=O)O-, -(C=O)NH-, -S-S-, etilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, y polipropilenglicol, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas modalidades, X es O. En algunas modalidades, X es NH. En algunas modalidades, R¹ es H. En algunas modalidades, R¹ es alquilo C₁₋₃. En algunas modalidades, R¹ es metilo. En algunas modalidades, R² es H. En algunas modalidades, R² es alcoxi C₁₋₃. En algunas modalidades, R² es metoxi. En algunas modalidades, R¹ es H y R² es H. En algunas modalidades, R¹ es H y R² es metoxi. En algunas modalidades, R¹ es metilo y R² es H. En algunas modalidades, R¹ es metilo y R² es metoxi.

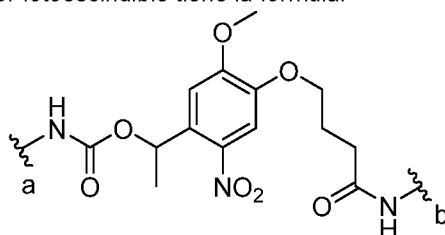
En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible tiene la fórmula:



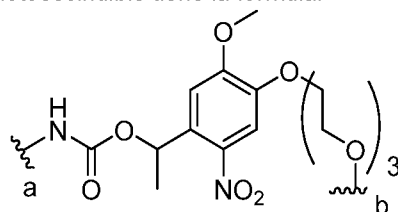
En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible tiene la fórmula:



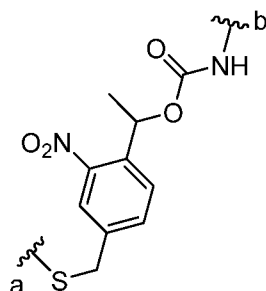
En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible tiene la fórmula:



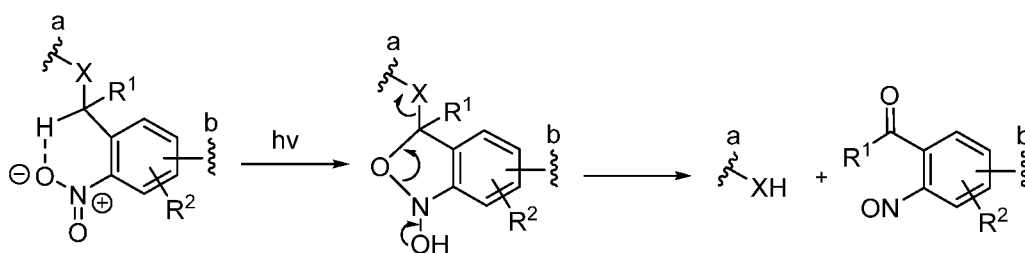
En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible tiene la fórmula:



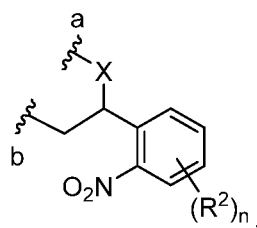
En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible tiene la fórmula:



Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la excitación del enlazador orto-nitrobencilo (ONB) conduce a la abstracción de hidrógeno de tipo Norrish en la posición γ , seguida de la formación de ácido azínico, que es altamente reactivo y se reorganiza en un compuesto nitroso, lo que da como resultado la escisión completa del enlazador, como se muestra en el siguiente esquema:

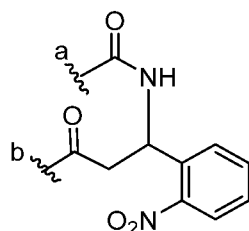


En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible es el enlazador de ácido 3-amino-3-(2-nitrofenil)propiónico (ANP):

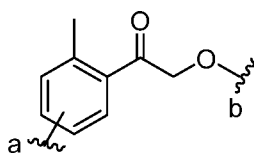


en donde X, R², n, a, y b son como se describe en la presente descripción para el enlazador orto-nitrobencilo (ONB).

En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible tiene la fórmula:



En algunas modalidades, el enlazador fotoescindible es un enlazador de éster de fenacilo:



en donde a y b son como se describe en la presente descripción para el enlazador de orto-nitrobencilo (ONB).

Otros ejemplos de enlaces químicos fotosensibles que pueden usarse en un dominio de escisión incluyen nucleósidos halogenados tales como bromodesoxiuridina (BrdU). BrdU es un análogo de timidina que puede incorporarse fácilmente en oligonucleótidos (por ejemplo, en el dominio de escisión de una sonda de captura), y es sensible a la luz UVB (intervalo de 280-320 nm). Tras la exposición a la luz UVB, se produce una reacción de fotoescisión (por ejemplo, en un nucleósido inmediatamente 5' al sitio de incorporación de BrdU (Doddridge y otros. Chem. Comm., 1998, 18:1997-1998 y Cook y otros. Chemistry and Biology. 1999, 6:451-459)) que da como resultado la liberación de la sonda de captura del elemento.

Otros ejemplos de dominios de escisión incluyen enlaces químicos lábiles tales como, pero no se limitan a, enlaces éster (por ejemplo, escindible con un ácido, una base o hidroxilamina), un enlace diol cercano (por ejemplo, escindible mediante peryodato de sodio), un enlace Diels-Alder (por ejemplo, escindible mediante calor), un enlace de sulfona (por ejemplo, escindible mediante una base), un enlace de éter silílico (por ejemplo, escindible mediante un ácido), un enlace glucosídico (por ejemplo, escindible mediante una amilasa), un enlace peptídico (por ejemplo, escindible mediante una proteasa), un sitio abásico o apurínico/apirimidínico (AP) (por ejemplo, escindible con un álcali o un endonucleasa AP) o un enlace fosfodiéster (por ejemplo, escindible mediante una nucleasa (por ejemplo, ADNasa)).

En algunas modalidades, el dominio de escisión incluye una secuencia que se reconoce por una o más enzimas capaces de escindir una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, capaz de romper el enlace fosfodiéster entre dos o más nucleótidos. Un enlace puede ser escindible mediante otras enzimas que se dirigen a moléculas de ácido nucleico, tales como enzimas de restricción (por ejemplo, endonucleasas de restricción). Por ejemplo, el dominio de escisión puede incluir una secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción (enzima de restricción). Las enzimas de restricción cortan el ADN de doble hebra o de hebra única en secuencias de nucleótidos de reconocimiento específicas conocidas como sitios de restricción. En algunas modalidades, una enzima de restricción de corte raro, por ejemplo, enzimas con un sitio de reconocimiento largo (al menos 8 pares de bases de longitud), se usa para reducir la posibilidad de escindir en otra parte en la sonda de captura.

En algunas modalidades, el dominio de escisión incluye una secuencia de poli(U) que puede escindirse mediante una mezcla de uracil ADN glucosilasa (UDG) y la endonucleasa ADN glucosilasa-liasa VIII, conocida comercialmente como la enzima USER™. Las sondas de captura liberables pueden estar disponibles para la reacción una vez liberadas. Por lo tanto, por ejemplo, una sonda de captura activable puede activarse mediante la liberación de las sondas de captura de un elemento.

En algunas modalidades, donde la sonda de captura se une indirectamente a un sustrato, por ejemplo, mediante una sonda de superficie, el dominio de escisión incluye uno o más nucleótidos no apareados, de manera que las partes

complementarias de la sonda de superficie y la sonda de captura no son complementarias al 100 % (por ejemplo, el número de pares de bases no apareadas puede ser uno, dos o tres pares de bases). Tal error de apareamiento se reconoce, por ejemplo, por las enzimas endonucleasa I de MutY y T7, lo que resulta en la escisión de la molécula de ácido nucleico en la posición del error de apareamiento. Como se describe en la presente descripción una "sonda de superficie" puede ser cualquier resto presente en la superficie del sustrato capaz de unirse a un agente (por ejemplo, una sonda de captura). En algunas modalidades, la sonda de superficie es un oligonucleótido. En algunas modalidades, la sonda de superficie es parte de la sonda de captura.

En algunas modalidades, donde la sonda de captura se une (por ejemplo, inmovilizado) a un elemento indirectamente, por ejemplo, mediante una sonda de superficie, el dominio de escisión incluye una secuencia o sitio de reconocimiento de nickasa. Las nickasas son endonucleasas que escinden solo una única hebra de un dúplex de ADN. Por lo tanto, el dominio de escisión puede incluir un sitio de reconocimiento de nickasa cerca del extremo 5' de la sonda de superficie (y/o el extremo 5' de la sonda de captura) de manera que la escisión de la sonda de superficie o sonda de captura desestabiliza el dúplex entre la sonda de superficie y la sonda de captura, de esta manera se libera la sonda de captura del elemento.

Las enzimas nickasas pueden usarse además en algunas modalidades donde la sonda de captura se une (por ejemplo, inmovilizado) directamente al elemento. Por ejemplo, el sustrato puede ponerse en contacto con una molécula de ácido nucleico que se hibrida con el dominio de escisión de la sonda de captura para proporcionar o reconstituir un sitio de reconocimiento de nickasa, por ejemplo, una sonda auxiliar de escisión. Por lo tanto, el contacto con una enzima nickasa resultará en la escisión del dominio de escisión, de esta manera se libera la sonda de captura del elemento. Tales sondas auxiliares de escisión pueden usarse además para proporcionar o reconstituir sitios de reconocimiento de escisión para otras enzimas de escisión, por ejemplo, enzimas de restricción.

Algunas nickasas introducen mellas de hebra única solo en sitios particulares en una molécula de ADN, al unirse y reconocer una secuencia de reconocimiento de nucleótidos particular. Se ha descubierto un número de nickasas de origen natural, de las cuales se han determinado en la actualidad las propiedades de reconocimiento de secuencias para al menos cuatro. Las nickasas se describen en la patente de Estados Unidos núm. 6,867,028. En general, cualquier nickasa adecuada puede usarse para unirse a un sitio de reconocimiento de nickasa complementario de un dominio de escisión. Después del uso, la enzima nickasa puede eliminarse del ensayo o inactivarse después de la liberación de las sondas de captura para evitar la escisión no deseada de las sondas de captura.

Los ejemplos de dominios de captura adecuados que no se basan exclusivamente en ácido nucleico incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, aptámeros, antígenos, anticuerpos y análogos moleculares que imitan la funcionalidad de cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, un dominio de escisión está ausente de la sonda de captura. Los ejemplos de sustratos con sondas de captura unidas que carecen de un dominio de escisión se describen, por ejemplo, en Macosko y otros, (2015) Cell 161, 1202–1214.

En algunas modalidades, la región de la sonda de captura correspondiente al dominio de escisión puede usarse para alguna otra función. Por ejemplo, puede incluirse una región adicional para la extensión o la amplificación del ácido nucleico donde normalmente se colocaría el dominio de escisión. En tales modalidades, la región puede complementar el dominio funcional o incluso existir como un dominio funcional adicional. En algunas modalidades, el dominio de escisión está presente pero su uso es opcional.

(iii) Dominio funcional

Cada sonda de captura puede incluir opcionalmente al menos un dominio funcional. Cada dominio funcional incluye típicamente una secuencia de nucleótidos funcional para una etapa analítica aguas abajo en el procedimiento de análisis general.

En algunas modalidades, la sonda de captura puede incluir un dominio funcional para la unión a una celda de flujo de secuenciación, tal como, por ejemplo, una secuencia P5 para la secuenciación con Illumina®. En algunas modalidades, la sonda de captura o derivado de la misma puede incluir otro dominio funcional, tal como, por ejemplo, una secuencia P7 para unirse a una celda de flujo de secuenciación para la secuenciación con Illumina®. Los dominios funcionales pueden seleccionarse para compatibilidad con una variedad de sistemas de secuenciación diferentes, por ejemplo, Secuenciación 454, Ion Torrent Proton o PGM, Illumina X10, etc. y requerimientos de los mismos.

En algunas modalidades, el dominio funcional incluye un cebador. El cebador puede incluir una secuencia de cebador R1 para la secuenciación con Illumina® y, en algunas modalidades, una secuencia de cebador R2 para la secuenciación con Illumina®. Ejemplos de tales sondas de captura y usos de las mismas se describen en las publicaciones de patente de Estados Unidos núms. 2014/0378345 y 2015/0376609.

(iv) Código de barras espacial

Como se discutió anteriormente, la sonda de captura puede incluir uno o más códigos de barras espacial (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más códigos de barras espacial). Un "código de barras espacial" es un segmento de ácido nucleico contiguo o dos o más segmentos de ácido nucleico no contiguos que funcionan como una marca o identificador que transmite o es capaz de transmitir información espacial. En algunas modalidades, una sonda de captura incluye un código de barras espacial que posee un aspecto espacial, donde el código de barras se asocia con una ubicación particular dentro de una matriz o una ubicación particular sobre un sustrato.

Un código de barras espacial puede ser parte de un analito o independiente de un analito (por ejemplo, parte de una sonda de captura). Un código de barras espacial puede ser una etiqueta que se une a un analito (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico) o una combinación de una etiqueta además de una característica endógena del analito (por ejemplo, tamaño del analito o secuencia(s) de extremo). Un código de barras espacial puede ser único. En algunas modalidades donde el código de barras espacial es único, el código de barras espacial funciona tanto como un código de barras espacial y como un identificador molecular único (UMI), asociado con una sonda de captura particular.

Los códigos de barras espaciales pueden tener una variedad de formatos diferentes. Por ejemplo, los códigos de barras espaciales pueden incluir códigos de barras espaciales de polinucleótidos, secuencias de aminoácidos y/o ácido nucleico aleatorias, y secuencias de aminoácidos y/o ácido nucleico sintéticas. En algunas modalidades, un código de barras espacial se une a un analito de manera reversible o irreversible. En algunas modalidades, se añade un código de barras espacial, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ADN o ARN antes, durante y/o después de la secuenciación de la muestra. En algunas modalidades, un código de barras espacial permite la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales. En algunas modalidades, un código de barras espacial es un código de barras fluorescente para el que las sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia se hibridan con el código de barras espacial.

En algunas modalidades, el código de barras espacial es una secuencia de ácido nucleico que no se hibrida sustancialmente con moléculas de ácido nucleico del analito en una muestra biológica. En algunas modalidades, el código de barras espacial tiene menos del 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, menos del 70 %, 60 %, 50 % o menos del 40 % de identidad de secuencia) con las secuencias de ácido nucleico a través de una parte sustancial (por ejemplo, 80 % o más) de las moléculas de ácido nucleico en la muestra biológica.

Las secuencias de código de barras espaciales pueden incluir de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o más nucleótidos dentro de la secuencia de las sondas de captura. En algunas modalidades, la longitud de una secuencia de código de barras espacial puede ser de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la longitud de una secuencia de código de barras espacial puede ser al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la longitud de una secuencia de código de barras espacial es a lo máximo aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más corta.

Estos nucleótidos pueden ser completamente contiguos, por ejemplo, en un único tramo de nucleótidos adyacentes, o pueden separarse en dos o más subsecuencias separadas que se separan por 1 o más nucleótidos. Las subsecuencias de código de barras espacial separadas pueden ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 16 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la subsecuencia del código de barras espacial puede ser aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la subsecuencia del código de barras espacial puede ser al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la subsecuencia del código de barras espacial puede ser a lo máximo aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más corta.

Para múltiples sondas de captura que se unen a un elemento de matriz común, una o más secuencias de código de barras espaciales de las múltiples sondas de captura pueden incluir secuencias que son las mismas para todas las sondas de captura acopladas al elemento, y/o secuencias que son diferentes en todas las sondas de captura acopladas al elemento.

Las sondas de captura que se unen a un único elemento de matriz pueden incluir secuencias de código de barras espaciales idénticas (o comunes), secuencias de código de barras espaciales diferentes o una combinación de ambas. Las sondas de captura que se unen a un elemento pueden incluir múltiples conjuntos de sondas de captura. Las sondas de captura de un conjunto dado pueden incluir secuencias de códigos de barras espaciales idénticas. Las secuencias de códigos de barras espaciales idénticas pueden ser diferentes de las secuencias de códigos de barras espaciales de sondas de captura de otro conjunto.

La pluralidad de sondas de captura puede incluir secuencias de códigos de barras espaciales (por ejemplo, secuencias de códigos de barras de ácido nucleico) que están asociadas con ubicaciones específicas sobre una matriz espacial. Por ejemplo, una primera pluralidad de sondas de captura puede asociarse con una primera región, basándose en una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la primera región, y una segunda pluralidad de sondas de captura puede asociarse con una segunda región, basándose en una secuencia de código de barras espacial común a las sondas de captura dentro de la segunda región. La segunda región puede estar asociada o no con la primera región. Pueden asociarse pluralidades adicionales de sondas de captura con secuencias de

códigos de barras espaciales comunes a las sondas de captura dentro de otras regiones. En algunas modalidades, las secuencias de códigos de barras espaciales pueden ser las mismas en una pluralidad de moléculas de sonda de captura.

En algunas modalidades, se incorporan múltiples códigos de barras espaciales diferentes en una única matriz de sonda de captura. Por ejemplo, un conjunto mixto pero conocido de secuencias de códigos de barras espaciales puede proporcionar una dirección o atribución más sólida de los códigos de barras espaciales a un lugar o ubicación determinados, al proporcionar una confirmación duplicada o independiente de la identidad de la ubicación. En algunas modalidades, los múltiples códigos de barras espaciales representan una especificidad creciente de la ubicación del punto de la matriz particular.

(v) Identificador molecular único

La sonda de captura puede incluir uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más) identificadores moleculares únicos (UMI). Un identificador molecular único es un segmento de ácido nucleico contiguo o dos o más segmentos de ácido nucleico no contiguos que funcionan como una marca o identificador para un analito particular, o para una sonda de captura que se une a un analito particular (por ejemplo, mediante el dominio de captura).

Un UMI puede ser único. Un UMI puede incluir una o más secuencias de polinucleótidos específicas, una o más secuencias de aminoácidos y/o ácido nucleico aleatorias, y/o una o más secuencias de aminoácidos y/o ácido nucleico sintéticas, o sus combinaciones.

En algunas modalidades, el UMI es una secuencia de ácido nucleico que no se hibrida sustancialmente con moléculas de ácido nucleico del analito en una muestra biológica. En algunas modalidades, el UMI tiene menos del 80 % de identidad de secuencia (por ejemplo, menos del 70 %, 60 %, 50 % o menos del 40 % de identidad de secuencia) con las secuencias de ácido nucleico a través de una parte sustancial (por ejemplo, 80 % o más) de las moléculas de ácido nucleico en la muestra biológica.

El UMI puede incluir de aproximadamente 6 a aproximadamente 20 o más nucleótidos dentro de la secuencia de las sondas de captura. En algunas modalidades, la longitud de una secuencia de UMI puede ser de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la longitud de una secuencia de UMI puede ser al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la longitud de una secuencia de UMI es a lo máximo aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 nucleótidos o más corta.

Estos nucleótidos pueden ser completamente contiguos, es decir, en un único tramo de nucleótidos adyacentes, o pueden separarse en dos o más subsecuencias separadas que se separan por 1 o más nucleótidos. Las subsecuencias de UMI separadas pueden ser de aproximadamente 4 a aproximadamente 16 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la subsecuencia del UMI puede ser de aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la subsecuencia del UMI puede ser al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más larga. En algunas modalidades, la subsecuencia del UMI puede ser a lo máximo aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 nucleótidos o más corta.

En algunas modalidades, un UMI se une a un analito de manera reversible o irreversible. En algunas modalidades, se añade un UMI, por ejemplo, a un fragmento de una muestra de ADN o ARN antes, durante y/o después de la secuenciación del analito. En algunas modalidades, un UMI permite la identificación y/o cuantificación de lecturas de secuenciación individuales. En algunas modalidades, un UMI se usa como un código de barras fluorescente para el cual las sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorescencia se hibridan con el UMI.

(vi) Otros aspectos de las sondas de captura

Para las sondas de captura que se unen a un elemento de matriz, un elemento de matriz individual puede incluir una o más sondas de captura. En algunas modalidades, un elemento de matriz individual incluye cientos o miles de sondas de captura. En algunas modalidades, las sondas de captura se asocian con un elemento individual particular, donde el elemento individual contiene una sonda de captura que incluye un código de barras espacial único para una región o ubicación definida sobre la matriz.

En algunas modalidades, un elemento particular puede contener sondas de captura que incluyen más de un código de barras espacial (por ejemplo, una sonda de captura en un elemento particular puede incluir un código de barras espacial que es diferente al código de barras espacial que se incluye en otra sonda de captura en el mismo elemento particular, mientras que ambas sondas de captura incluyen un segundo código de barras espacial común), donde cada código de barras espacial corresponde a una región o ubicación definida particular sobre la matriz. Por ejemplo, múltiples secuencias de código de barras espaciales asociadas con un elemento particular sobre una matriz pueden proporcionar una dirección o atribución más fuerte a una ubicación dada al proporcionar una confirmación duplicada

o independiente de la ubicación. En algunas modalidades, los múltiples códigos de barras espaciales representan una especificidad creciente de la ubicación del punto de la matriz particular. En un ejemplo no limitante, un punto de matriz particular puede codificarse con dos códigos de barras espaciales diferentes, donde cada código de barras espacial identifica una región definida particular dentro de la matriz, y un punto de matriz que posee ambos códigos de barras espaciales identifica la subregión donde dos regiones definidas se solapan, por ejemplo, tal como la porción de solapamiento de un diagrama de Venn.

En otro ejemplo no limitante, un punto de matriz particular puede codificarse con tres códigos de barras espaciales diferentes, donde el primer código de barras espacial identifica una primera región dentro de la matriz, el segundo código de barras espacial identifica una segunda región, donde la segunda región es una subregión completamente dentro de la primera región, y el tercer código de barras espacial identifica una tercera región, donde la tercera región es una subregión completamente dentro de la primera y la segunda subregiones.

En algunas modalidades, las sondas de captura que se unen a los elementos de matriz se liberan de los elementos de matriz para la secuenciación. Alternativamente, en algunas modalidades, las sondas de captura permanecen unidas a los elementos de matriz, y las sondas se secuencian mientras permanecen unidas a los elementos de matriz (por ejemplo, mediante secuenciación in situ). Otros aspectos de la secuenciación de sondas de captura se describen en las secciones subsecuentes de esta descripción.

En algunas modalidades, un elemento de matriz puede incluir diferentes tipos de sondas de captura que se unen al elemento. Por ejemplo, el elemento de matriz puede incluir un primer tipo de sonda de captura con un dominio de captura diseñado para unirse a un tipo de analito, y un segundo tipo de sonda de captura con un dominio de captura diseñado para unirse a un segundo tipo de analito. En general, los elementos de matriz pueden incluir uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, ocho o más, diez o más, 12 o más, 15 o más, 20 o más, 30 o más, 50 o más) tipos diferentes de sondas de captura que se unen a un único elemento de matriz.

En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico. En algunas modalidades, la sonda de captura se une al elemento de matriz mediante su extremo 5'. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 5' hasta 3': uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 5' hasta 3': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 5' hasta 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 5' hasta 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), un segundo dominio funcional y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 5' hasta 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura no incluye un código de barras espacial. En algunas modalidades, la sonda de captura no incluye un UMI. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye una secuencia para iniciar una reacción de secuenciación.

En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza en un elemento a través de su extremo 3'. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 5' hasta 3': uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' hasta 5': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' hasta 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye desde el extremo 3' hasta 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI y un dominio de captura.

En algunas modalidades, una sonda de captura incluye un oligonucleótido sintetizado in situ. El oligonucleótido sintetizado in situ puede unirse a un sustrato, o a un elemento en un sustrato. En algunas modalidades, el oligonucleótido sintetizado in situ incluye una o más secuencias constantes, una o más de las cuales sirven como una secuencia de cebado (por ejemplo, un cebador para amplificar los ácidos nucleicos diana). El oligonucleótido sintetizado in situ puede, por ejemplo, incluir una secuencia constante en el extremo 3' que se une a un sustrato, o se une a un elemento en un sustrato. Alternativa o adicionalmente, el oligonucleótido sintetizado in situ puede incluir una secuencia constante en el extremo 5' libre. En algunas modalidades, una o más secuencias constantes pueden ser una secuencia escindible. En algunas modalidades, el oligonucleótido sintetizado in situ incluye una secuencia de código de barras, por ejemplo, una secuencia de código de barras variable. El código de barras puede ser cualquier código de barras descrito en la presente descripción. La longitud del código de barras puede ser de aproximadamente 8 a 16 nucleótidos (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos). La longitud del oligonucleótido sintetizado in situ puede ser menor que 100 nucleótidos (por ejemplo, menor que 90, 80, 75, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25 o 20 nucleótidos). En algunos casos, la longitud del oligonucleótido sintetizado in situ es de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. Los oligonucleótidos sintetizados in situ ilustrativos se producen por Affymetrix. En algunas modalidades, el oligonucleótido sintetizado in situ se une a un elemento de una matriz.

Los oligonucleótidos adicionales pueden ligarse a un oligonucleótido sintetizado in situ para generar una sonda de captura. Por ejemplo, un cebador complementario a una porción del oligonucleótido sintetizado in situ (por ejemplo, una secuencia constante en el oligonucleótido) puede usarse para hibridar un oligonucleótido adicional y extenderse (mediante el uso del oligonucleótido sintetizado in situ como un molde, por ejemplo, una reacción de extensión del cebador) para formar un oligonucleótido de doble hebra y para generar además un saliente en 3'. En algunas modalidades, el saliente 3' puede generarse mediante ligasas independientes de molde (por ejemplo, desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) o poli(A) polimerasa). Un oligonucleótido adicional que comprende uno o más dominios de captura puede ligarse al saliente 3' mediante el uso de una enzima adecuada (por ejemplo, una ligasa) y un oligonucleótido de soporte, para generar una sonda de captura. Por lo tanto, en algunas modalidades, una sonda de captura es un producto de dos o más secuencias de oligonucleótidos, (por ejemplo, el oligonucleótido sintetizado in situ y el oligonucleótido adicional) que se ligan entre sí. En algunas modalidades, una de las secuencias de oligonucleótidos es un oligonucleótido sintetizado in situ.

En algunas modalidades, la sonda de captura puede prepararse mediante el uso de un oligonucleótido de soporte (por ejemplo, cualquiera de los oligonucleótidos de soporte descritos en la presente descripción). Dos o más oligonucleótidos pueden ligarse juntos mediante el uso de un oligonucleótido de soporte y cualquier variedad de ligasas conocidas en la técnica o descritas en la presente descripción (por ejemplo, ligasa SplintR).

Uno de los oligonucleótidos incluye: una secuencia constante (por ejemplo, una secuencia complementaria a una porción de un oligonucleótido de soporte), una secuencia degenerada y/o un dominio de captura (por ejemplo, como se describe en la presente descripción). Uno de los oligonucleótidos puede incluir además una secuencia compatible para ligar o hibridar con un analito de interés en la muestra biológica. Un analito de interés (por ejemplo, un ARNm) también puede usarse como un oligonucleótido de soporte para ligar oligonucleótidos adicionales en la sonda de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se genera al tener una enzima que añade polinucleótidos en el extremo de una secuencia de oligonucleótidos. La sonda de captura puede incluir una secuencia degenerada, que puede funcionar como un identificador molecular único.

Una secuencia degenerada, que es una secuencia en la que algunas posiciones de una secuencia de nucleótidos contienen un número de bases posibles. Una secuencia degenerada puede ser una secuencia de nucleótidos degenerada que incluye aproximadamente o al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos. En algunas modalidades, una secuencia de nucleótidos contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más posiciones degeneradas dentro de la secuencia de nucleótidos. En algunas modalidades, la secuencia degenerada se usa como un UMI.

En algunas modalidades, una sonda de captura incluye una secuencia de reconocimiento de endonucleasa de restricción o una secuencia de nucleótidos escindibles mediante actividades enzimáticas específicas. Por ejemplo, las secuencias de uracilo pueden escindirse enzimáticamente de una secuencia de nucleótidos mediante el uso de uracil ADN glucosilasa (UDG) o reactivo de escisión específica de uracilo (USER). Como otro ejemplo, otras bases modificadas (por ejemplo, modificadas mediante metilación) pueden reconocerse y escindirse mediante endonucleasas específicas. Las sondas de captura pueden someterse a una escisión enzimática, que elimina el dominio de bloqueo y cualquiera de los nucleótidos adicionales que se añaden al extremo 3' de la sonda de captura durante el proceso de modificación. La eliminación del dominio de bloqueo revela y/o restaura el extremo 3' libre del dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, pueden eliminarse nucleótidos adicionales para revelar y/o restaurar el extremo 3' del dominio de captura de la sonda de captura.

En algunas modalidades, un dominio de bloqueo puede incorporarse en la sonda de captura cuando se sintetiza, o después de su síntesis. El nucleótido terminal del dominio de captura es un nucleótido terminador reversible (por ejemplo, terminador reversible bloqueado en 3'-O y terminador reversible desbloqueado en 3'), y puede incluirse en la sonda de captura durante o después de la síntesis de la sonda.

(vii) Sondas de captura extendidas

Una "sonda de captura extendida" es una sonda de captura con una secuencia de ácido nucleico ampliada. Por ejemplo, donde la sonda de captura incluye ácido nucleico, un "extremo 3' extendido" indica que se añadieron nucleótidos adicionales al nucleótido más cerca del 3' de la sonda de captura para extender la longitud de la sonda de captura, por ejemplo, mediante reacciones de polimerización estándar utilizadas para extender moléculas de ácido nucleico, que incluye la polimerización con molde catalizada por una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa).

En algunas modalidades, la extensión de la sonda de captura incluye generar ADNc a partir del ARN capturado (hibridado). Este proceso involucra la síntesis de una hebra complementaria del ácido nucleico hibridado, por ejemplo, que genera ADNc en base al molde de ARN capturado (el ARN que se hibrida con el dominio de captura de la sonda de captura). Por lo tanto, en una etapa inicial de extensión de la sonda de captura, por ejemplo, la generación de ADNc, el ácido nucleico capturado (hibridado), por ejemplo ARN, actúa como un molde para la etapa de extensión, por ejemplo, transcripción inversa.

En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de transcripción inversa. Por ejemplo, la transcripción inversa incluye sintetizar ADNc (ADN complementario o copia) a partir de ARN, por ejemplo, (ARN mensajero), mediante el uso de una transcriptasa inversa. En algunas modalidades, la transcripción inversa se realiza mientras el tejido aún está en su lugar, lo que genera una biblioteca de analitos, donde la biblioteca de analitos incluye los códigos de barras espaciales de las sondas de captura adyacentes. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una o más ADN polimerasas.

En algunas modalidades, el dominio de captura de la sonda de captura incluye un cebador para producir la hebra complementaria del ácido nucleico hibridado a la sonda de captura, por ejemplo, un cebador para la ADN polimerasa y/o la transcripción inversa. Las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ADN y/o ADNc, generadas por la reacción de extensión incorporan la secuencia de la sonda de captura. La extensión de la sonda de captura, por ejemplo, una reacción de ADN polimerasa y/o transcripción inversa, puede realizarse mediante el uso de una variedad de enzimas y protocolos adecuados.

En algunas modalidades, se genera una molécula de ADN de longitud completa, por ejemplo, ADNc. En algunas modalidades, una molécula de ADN de "longitud completa" se refiere a la totalidad de la molécula de ácido nucleico capturada. Sin embargo, si el ácido nucleico, por ejemplo, ARN, se degrada parcialmente en la muestra de tejido, entonces las moléculas de ácido nucleico capturadas no tendrán la misma longitud que el ARN inicial en la muestra de tejido. En algunas modalidades, se modifica el extremo 3' de las sondas extendidas, por ejemplo, las moléculas de ADNc de la primera hebra. Por ejemplo, un enlazador o adaptador puede ligarse al extremo 3' de las sondas extendidas. Esto puede lograrse mediante el uso de enzimas de ligación de una sola hebra tales como ligasa de ARN de T4 o Circligase™ (disponible de Lucigen, Middleton, WI). En algunas modalidades, los oligonucleótidos que conmutan de molde se usan para extender el ADNc con el fin de generar un ADNc de longitud completa (o lo más cerca posible de un ADNc de longitud completa). En algunas modalidades, una sonda auxiliar de síntesis de la segunda hebra (una molécula de ADN de doble hebra parcialmente capaz de hibridarse con el extremo 3' de la sonda de captura extendida), puede ligarse al extremo 3' de la sonda extendida, por ejemplo, molécula de ADNc de la primera hebra, mediante el uso de una enzima de ligación de doble hebra tal como ligasa de ADN de T4. Otras enzimas apropiadas para la etapa de ligación se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, Tth ADN ligasa, Taq ADN ligasa, ADN ligasa de *Thermococcus* sp. (cepa 9°N) (ADN ligasa 9°N™ New England Biolabs), Ampligase™ (disponible de Lucigen, Middleton, WI), y SplintR (disponible de New England Biolabs, Ipswich, MA). En algunas modalidades, una cola de polinucleótido, por ejemplo, una cola poli(A), se incorpora en el extremo 3' de las moléculas de sonda extendida. En algunas modalidades, la cola de polinucleótido se incorpora mediante el uso de una enzima activa terminal transferasa.

En algunas modalidades se tratan las sondas de captura extendidas de doble hebra para eliminar cualquier sonda de captura no extendida antes de la amplificación y/o el análisis, por ejemplo, el análisis de secuencias. Esto puede lograrse mediante una variedad de métodos, por ejemplo, mediante el uso de una enzima para degradar las sondas no extendidas, tales como, una enzima exonucleasa o columnas de purificación.

En algunas modalidades, las sondas de captura extendidas se amplifican para producir cantidades que son suficientes para el análisis, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. En algunas modalidades, la primera hebra de las sondas de captura extendidas, (por ejemplo moléculas de ADN y/o ADNc) actúa como un molde para la reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

En algunas modalidades, la reacción de amplificación incorpora un grupo de afinidad sobre la sonda de captura extendida (por ejemplo, el híbrido ARN-ADNc) mediante el uso de un cebador que incluye el grupo de afinidad. En algunas modalidades, el cebador incluye un grupo de afinidad y las sondas de captura extendida incluyen el grupo de afinidad. El grupo de afinidad puede corresponder a cualquiera de los grupos de afinidad descritos anteriormente.

En algunas modalidades, las sondas de captura extendida que incluyen el grupo de afinidad pueden acoplarse a un elemento de matriz específico para el grupo de afinidad. En algunas modalidades, el sustrato puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, el elemento de matriz incluye avidina o estreptavidina y el grupo de afinidad incluye biotina. En algunas modalidades, el elemento de matriz incluye maltosa y el grupo de afinidad incluye proteína de unión a maltosa. En algunas modalidades, el elemento de matriz incluye proteína de unión a maltosa y el grupo de afinidad incluye maltosa. En algunas modalidades, la amplificación de las sondas de captura extendida puede funcionar para liberar las sondas extendidas del elemento de matriz, en la medida en que las copias de las sondas extendidas no se unan al elemento de matriz.

En algunas modalidades, la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de esta se libera de un elemento de matriz. La etapa de liberación de la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma de la superficie de un elemento de matriz puede lograrse de varias maneras. En algunas modalidades, una sonda de captura extendida o un complemento de la misma se libera del elemento mediante escisión de ácido nucleico y/o por desnaturalización (por ejemplo, mediante calentamiento para desnaturalizar una molécula de doble hebra).

En algunas modalidades, la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma se libera del elemento de matriz por medios físicos. Por ejemplo, los métodos para inducir la liberación física incluyen desnaturalizar moléculas de ácido nucleico de doble hebra. Otro método para liberar las sondas de captura extendidas es usar una

solución que interfiera con los enlaces de hidrógeno de las moléculas de doble hebra. En algunas modalidades, la sonda de captura extendida se libera mediante la aplicación de agua calentada tal como agua o tampón, de al menos 85 °C, por ejemplo, al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 °C. En algunas modalidades, se añade una solución que incluye sales, surfactantes, etc. que puede desestabilizar aún más la interacción entre las moléculas de ácido nucleico para liberar la sonda de captura extendida del elemento de matriz. En algunas modalidades, puede usarse una solución de formamida para desestabilizar la interacción entre moléculas de ácido nucleico para liberar la sonda de captura extendida del elemento de matriz.

(viii) Amplificación de sondas de captura

En algunas modalidades, en la presente descripción se describen métodos para amplificar una sonda de captura fija a una matriz espacial, donde la amplificación de la sonda de captura aumenta el número de dominios de captura y códigos de barras espaciales en la matriz espacial. En algunas modalidades donde se amplifica una sonda de captura, la amplificación se realiza mediante la amplificación de círculo rodante. En algunas modalidades, la sonda de captura a amplificar incluye secuencias (por ejemplo, secuencias de acoplamiento, secuencias funcionales y/o secuencias de cebadores) que permiten la amplificación de círculo rodante. En un ejemplo, la sonda de captura puede incluir una secuencia funcional que es capaz de unirse a un cebador usado para la amplificación. En otro ejemplo, la sonda de captura puede incluir una o más secuencias de acoplamiento (por ejemplo, una primera secuencia de acoplamiento y una segunda secuencia de acoplamiento) que pueden hibridarse con uno o más oligonucleótidos (por ejemplo, sonda(s) de bloqueo) usados para la amplificación de círculo rodante. En algunas modalidades, se fijan sondas adicionales al sustrato, donde las sondas adicionales incluyen secuencias (por ejemplo, secuencia(s) de bloqueo, secuencia(s) funcional(es) y/o secuencia(s)) de cebador que permiten la amplificación de círculo rodante. En algunas modalidades, la matriz espacial se pone en contacto con un oligonucleótido (por ejemplo, una sonda de bloqueo). Como se usa en la presente descripción, una "sonda de bloqueo" se refiere a un oligonucleótido que tiene, en sus extremos 5' y 3', secuencias que son complementarias a secuencias diana adyacentes o cercanas (por ejemplo, secuencias de acoplamiento) o una sonda de captura. Tras la hibridación con las secuencias diana (por ejemplo, secuencias de acoplamiento), los dos extremos de la sonda de bloqueo se ponen en contacto o un extremo se extiende hasta que los dos extremos se ponen en contacto, lo que permite la circularización de la sonda de bloqueo mediante ligación (por ejemplo, ligación mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, después de la circularización del oligonucleótido, puede usarse la amplificación de círculo rodante para amplificar el producto de ligación, que incluye al menos un dominio de captura y un código de barras espacial de la sonda de captura. En algunas modalidades, la amplificación de la sonda de captura mediante el uso de un oligonucleótido de bloqueo y la amplificación de círculo rodante aumenta el número de dominios de captura y el número de códigos de barras espaciales en la matriz espacial.

En algunas modalidades, un método para aumentar la eficiencia de captura de una matriz espacial incluye amplificar toda o una parte de una sonda de captura fija a un sustrato. Por ejemplo, la amplificación de toda o una parte de las sondas de captura fijas al sustrato puede aumentar la eficiencia de captura de la matriz espacial al aumentar el número de dominios de captura y códigos de barras espaciales. En algunas modalidades, un método para determinar una ubicación de un analito en una muestra biológica incluye usar una matriz espacial que tiene mayor eficiencia de captura (por ejemplo, una matriz espacial donde se ha amplificado una sonda de captura como se describe en la presente descripción). Por ejemplo, la eficiencia de captura de una matriz espacial puede aumentarse mediante la amplificación de toda o una parte de la sonda de captura antes de entrar en contacto con una muestra biológica. La amplificación da como resultado un mayor número de dominios de captura que permiten la captura de más analitos en comparación con una matriz espacial donde la sonda de captura no se amplificó antes de entrar en contacto con la muestra biológica. En algunas modalidades, un método para producir una matriz espacial que tiene una mayor eficiencia de captura incluye amplificar toda o una parte de una sonda de captura. En algunas modalidades donde se produce una matriz espacial que tiene mayor eficiencia de captura al amplificar toda o una parte de una sonda de captura, la amplificación aumenta el número de dominios de captura y el número de códigos de barras espaciales en la matriz espacial. En algunas modalidades, un método para determinar la ubicación de una sonda de captura (es decir, una sonda de captura en un elemento) en una matriz espacial incluye amplificar toda o una parte de una sonda de captura. Por ejemplo, la amplificación de la sonda de captura fija al sustrato puede aumentar el número de códigos de barras espaciales usados para la decodificación directa (por ejemplo, la decodificación directa mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción que incluyen, sin limitación, secuenciación in situ) de la ubicación de la sonda de captura.

(ix) Agentes de captura de analito

Esta descripción también describe métodos y materiales para usar agentes de captura de analito para el perfil espacial de analitos biológicos (por ejemplo, ARNm, ADN genómico, cromatina accesible y superficie celular o proteínas y/o metabolitos intracelulares). Como se usa en la presente descripción, un "agente de captura de analito" (también denominado previamente por momentos "agente de marcaje celular") se refiere a un agente que interactúa con un analito (por ejemplo, un analito en una muestra) y con una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un sustrato) para identificar el analito. En algunas modalidades, el agente de captura de analito incluye un resto de unión al analito y un dominio con código de barras del agente de captura.

Como se usa en la presente, la expresión “resto de unión al analito” se refiere a una molécula o resto capaz de unirse a un constituyente macromolecular (por ejemplo, un analito, por ejemplo, un analito biológico). En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de perfilamiento espacial descritos en la presente descripción, el resto de unión al analito del agente de captura de analito que se une a un analito biológico puede incluir, pero no se limita a, un anticuerpo, o un fragmento de unión al epítipo del mismo, una molécula de unión al receptor de superficie celular, un ligando del receptor, una molécula pequeña, un anticuerpo biespecífico, un activador de linfocitos T biespecífico, un activador de receptores de linfocitos T, un activador de receptores de linfocitos B, un procuerpo, un aptámero, un monocuerpo, un afímero, una darpina, y un andamio de proteínas, o cualquiera de sus combinaciones. El resto de unión al analito puede unirse al constituyente macromolecular (por ejemplo, analito) con alta afinidad y/o con alta especificidad. El resto de unión al analito puede incluir una secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un oligonucleótido), que puede corresponder a al menos una porción o a la totalidad del resto de unión al analito. El resto de unión al analito puede incluir un polipéptido y/o un aptámero (por ejemplo, un polipéptido y/o un aptámero que se une a una molécula diana específica, por ejemplo, un analito). El resto de unión al analito puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno) que se une a un analito específico (por ejemplo, un polipéptido).

En algunas modalidades, un resto de unión al analito de un agente de captura de analito incluye uno o más anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que incluyen el resto de unión al analito pueden unirse específicamente a un analito diana. En algunas modalidades, el analito es una proteína (por ejemplo, una proteína sobre una superficie de la muestra biológica (por ejemplo, una célula) o una proteína intracelular). En algunas modalidades, una pluralidad de agentes de captura de analito que comprenden una pluralidad de restos de unión al analito se une a una pluralidad de analitos presentes en una muestra biológica. En algunas modalidades, la pluralidad de analitos incluye una única especie del analito (por ejemplo, una única especie de polipéptido). En algunas modalidades en las que la pluralidad de analitos incluye una única especie del analito, los restos de unión al analito de la pluralidad de agentes de captura de analito son los mismos. En algunas modalidades en las que la pluralidad de analitos incluye una única especie del analito, los restos de unión al analito de la pluralidad de agentes de captura de analito son diferentes (por ejemplo, los miembros de la pluralidad de agentes de captura de analito pueden tener dos o más especies de restos de unión al analito, en donde cada una de las dos o más especies de restos de unión al analito se unen a una única especie del analito, por ejemplo, en sitios de unión diferentes). En algunas modalidades, la pluralidad de analitos incluye múltiples especies diferentes de analitos (por ejemplo, múltiples especies diferentes de polipéptidos).

Un agente de captura de analito puede incluir un resto de unión al analito. El resto de unión al analito puede ser un anticuerpo. Los anticuerpos ilustrativos no limitantes que pueden usarse como restos de unión al analito en un agente de captura de analito o que pueden usarse en las aplicaciones de IHC/IF descritas en la presente descripción incluyen cualquiera de los siguientes, incluidas las variaciones de los mismos: A-ACT, A-AT, ACTH, actina-músculo-específico, actina-músculo liso (SMA), AE1, AE1/AE3, AE3, AFP, AKT fosfato, ALK-1, amiloide A, receptor de andrógeno, anexina A1, B72.3, BCA-225, BCL-1 (Ciclina D1), BCL-1/CD20, BCL-2, BCL-2/BCL-6, BCL-6, Ber-EP4, beta-amiloide, beta-catenina, BG8 (Lewis Y), BOB-1, CA 19.9, CA 125, CAIX, calcitonina, caldesmon, calponina, calretinina, CAM 5.2, CAM 5.2/AE1, CD1a, CD2, CD3 (M), CD3 (P), CD3/CD20, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD14, CD15, CD20, CD21, CD22, CD 23, CD25, CD30, CD31, CD33, CD34, CD35, CD43, CD45 (LCA), CD45RA, CD56, CD57, CD61, CD68, CD71, CD74, CD79a, CD99, CD117 (c-KIT), CD123, CD138, CD163, CDX-2, CDX-2/CK-7, CEA (M), CEA (P), cromogranina A, quimotripsina, CK-5, CK-5/6, CK-7, CK-7/TTF-1, CK-14, CK-17, CK-18, CK-19, CK-20, CK-HMW, CK-LMW, CMV-IH, COLL-IV, COX-2, D2-40, DBA44, desmina, DOG1, EBER-ISH, EBV (LMP1), E-cadherina, EGFR, EMA, ER, ERCC1, factor VIII (vWF), factor XIIIa, fascina, FLI-1, FHS, galectina-3, gastrina, GCDFP-15, GFAP, glucagón, glicoforina A, glipican-3, granzima B, hormona del crecimiento (GH), GSTi, HAM 56, HMBE-1, HBP, HCAg, HCG, hemoglobina A, HEP B CORE (HBcAg), HEP B SURF, (HBsAg), HepPar1, HER2, Herpes I, Herpes II, HHV-8, HLA-DR, HMB 45, HPL, HPV-IHC, HPV (6/11)-ISH, HPV (16/18)-ISH, HPV (31/33)-ISH, HPV WSS-ISH, HPV ISH alto, HPV ISH bajo, HPV ISH alto y bajo, IgA, IgD, IgG, IgG4, IgM, inhibina, insulina, JC Virus-ISH, Kappa-ISH, KER PAN, Ki-67, Lambda-IHC, Lambda-ISH, LH, lipasa, lisozima (MURA), mamaglobina, MART-1, MBP, tripsina de célula M, MEL-5, Melan-A, Melan-A/Ki-67, mesotelina, MiTF, MLH-1, MOC-31, MOC-31, MPO, MSH-2, MSH-6, MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUM-1, MYO D1, miogenina, mioglobina, cadena pesada de miosina, napsina A, NB84a, NEW-N, NF, NK1-C3, NPM, NSE, OCT-2, OCT-3/4, OSCAR, p16, p21, p27/Kip1, p53, p57, p63, p120, P504S, Pan melanoma, PANC.POLY, Parvovirus B19, PAX-2, PAX-5, PAX-5/CD43, PAX-5/CD5, PAX-8, PC, PD1, perforina, PGP 9.5, PLAP, PMS-2, PR, prolactina, PSA, PSAP, PSMA, PTEN, PTH, PTS, RB, RCC, S6, S100, serotonina, somatostatina, surfactante (SP-A), sinaptofisina, sinucleína, TAU, TCL-1, TCR beta, TdT, trombomodulina, tiroglobulina, TIA-1, TOXO, TRAP, TriView™ mama, TriView™ próstata, tripsina, TS, TSH, TTF-1, tirosinasa, ubiquitina, uroplaquina, VEGF, villina, vimentina (VIM), VIP, VZV, WT1 (M) en extremo N, WT1 (P) en extremo C, ZAP-70.

Además, los anticuerpos no limitantes ilustrativos que pueden usarse como restos de unión al analito en un agente de captura de analito o que pueden usarse en las aplicaciones de IHC/IF descritas en la presente descripción incluyen cualquiera de los siguientes anticuerpos (y variaciones de los mismos) para: proteínas de la superficie celular, proteínas intracelulares, cinasas (por ejemplo, familia AGC cinasa (por ejemplo, AKT1, AKT2, PDK1, proteína cinasa C, ROCK1, ROCK2, SGK3), familia CAMK cinasa (por ejemplo, AMPK1, AMPK2, CAMK, Chk1, Chk2, Zip), familia CK1 cinasa, familia TK cinasa (por ejemplo, Abl2, AXL, CD167, CD246/ALK, c-Met, CSK, c-Src, EGFR, ErbB2 (HER2/neu), ErbB3, ErbB4, FAK, Fyn, LCK, Lyn, PTK7, Syk, Zap70), familia STE cinasa (por ejemplo, ASK1, MAPK, MEK1, MEK2, MEK3 MEK4, MEK5, PAK1, PAK2, PAK4, PAK6), familia CMGC cinasa (por ejemplo, Cdk2, Cdk4,

Cdk5, Cdk6, Cdk7, Cdk9, Erk1, GSK3, Jnk/MAPK8, Jnk2/MAPK9, JNK3/MAPK10, p38/MAPK) y familia TKL cinasa (por ejemplo, ALK1, ILK1, IRAK1, IRAK2, IRAK3, IRAK4, LIMK1, LIMK2, M3K11, RAF1, RIP1, RIP3, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), Aurora A cinasa, Aurora B cinasa, IKK, cinasa similar a Nemo, PINK, PLK3, ULK2, WEE1, factores de transcripción (por ejemplo, FOXP3, ATF3, BACH1, EGR, ELF3, FOXA1, FOXA2, FOXO1, GATA), receptores del factor de crecimiento, supresores de tumor (por ejemplo, anti-p53, anti-BLM, anti-Cdk2, anti-Chk2, anti-BRCA-1, anti-NBS1, anti-BRCA-2, anti-WRN, anti-PTEN, anti-WT1, anti-p38).

En algunas modalidades, los agentes de captura de analito son capaces de unirse a analitos presentes dentro de una célula. En algunas modalidades, los agentes de captura de analito son capaces de unirse a analitos de la superficie celular que pueden incluir, sin limitación, un receptor, un antígeno, una proteína de superficie, una proteína transmembrana, un conglomerado de proteínas de diferenciación, una proteína canal, una proteína bomba, una proteína portadora, un fosfolípido, una glucoproteína, un glucolípido, un complejo de proteína de interacción célula-célula, un complejo presentador de antígenos, un complejo mayor de histocompatibilidad, un receptor de linfocitos T manipulado genéticamente, un receptor de linfocitos T, un receptor de linfocitos B, un receptor de antígeno quimérico, una proteína de la matriz extracelular, una modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación) del estado de una proteína de la superficie celular, una unión en hendidura, y una unión adherente. En algunas modalidades, los agentes de captura de analito son capaces de unirse a analitos de la superficie celular que se modifican postraduccionalmente. En tales modalidades, los agentes de captura de analito pueden ser específicos para los analitos de la superficie celular en base a un estado dado de modificación postraduccional (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación), de manera que un perfil del analito de la superficie celular puede incluir información de modificación postraduccional de uno o más analitos.

En algunas modalidades, el agente de captura de analito incluye un dominio con código de barras del agente de captura que se conjuga o se une de cualquier otra manera al resto de unión al analito. En algunas modalidades, el dominio con código de barras del agente de captura se une covalentemente al resto de unión al analito. En algunas modalidades, un dominio con código de barras del agente de captura es una secuencia de ácido nucleico. En algunas modalidades, un dominio con código de barras del agente de captura incluye un código de barras del resto de unión al analito y una secuencia de captura de analito.

Como se usa en la presente, el término “código de barras del resto de unión al analito” se refiere a un código de barras que se asocia con, o de cualquier otra manera, identifica el resto de unión al analito. En algunas modalidades, al identificar un resto de unión al analito mediante la identificación de su código de barras del resto de unión al analito asociado, también puede identificarse el analito al que se une el resto de unión al analito. Un código de barras del resto de unión al analito puede ser una secuencia de ácido nucleico de una longitud y/o secuencia dadas que se asocia con el resto de unión al analito. Un código de barras del resto de unión al analito puede incluir generalmente cualquiera de la variedad de aspectos de códigos de barras descritos en la presente descripción. Por ejemplo, un agente de captura de analito que es específico para un tipo de analito puede tener acoplado a este un primer dominio con código de barras del agente de captura (por ejemplo, que incluye un primer código de barras del resto de unión al analito), mientras que un agente de captura del analito que es específico para un analito diferente puede tener un dominio con código de barras del agente de captura diferente (por ejemplo, que incluye un segundo código de barras del resto de unión al analito) que se acopla al mismo. En algunos aspectos, tal dominio con código de barras del agente de captura puede incluir un código de barras del resto de unión al analito que permite la identificación del resto de unión al analito al que se acopla el dominio con código de barras del agente de captura. La selección del dominio con código de barras del agente de captura puede permitir una diversidad significativa en términos de secuencia, mientras que también puede unirse fácilmente a la mayoría de los restos de unión al analito (por ejemplo, anticuerpos) así como también detectarse fácilmente (por ejemplo, mediante el uso de tecnologías de secuenciación o matriz).

En algunas modalidades, el dominio con código de barras del agente de captura de un agente de captura de analito incluye una secuencia de captura de analito. Como se usa en la presente, el término “secuencia de captura de analito” se refiere a una región o resto configurado para hibridarse, unirse, acoplarse o interactuar de cualquier otra manera con un dominio de captura de una sonda de captura. En algunas modalidades, una secuencia de captura de analito incluye una secuencia de ácido nucleico que es complementaria o sustancialmente complementaria al dominio de captura de una sonda de captura de manera que la secuencia de captura de analito se hibrida con el dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, una secuencia de captura de analito comprende una secuencia de ácido nucleico poli(A) que se hibrida con un dominio de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico poli(T). En algunas modalidades, una secuencia de captura de analito comprende una secuencia de ácido nucleico poli(T) que se hibrida con un dominio de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico poli(A). En algunas modalidades, una secuencia de captura de analito comprende una secuencia de ácido nucleico que no es homopolimérica que se hibrida con un dominio de captura que comprende una secuencia de ácido nucleico que no es homopolimérica que es complementaria (o sustancialmente complementaria) a la secuencia de ácido nucleico que no es homopolimérica de la región de captura de analito.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción que emplean un agente de captura de analito, el dominio con código de barras del agente de captura puede acoplarse directamente al resto de unión al analito, o pueden unirse a una perla, red molecular, por ejemplo, una linear, globular,

reticulado, u otro polímero, u otro armazón que se une o se asocia de cualquier otra manera con el resto de unión al analito, lo que permite la unión de múltiples dominios con código de barras del agente de captura a un único resto de unión al analito. La unión (acoplamiento) de los dominios con código de barras del agente de captura a los restos de unión al analito puede lograrse a través de cualquiera de una variedad de asociaciones o uniones directas o indirectas, covalentes o no covalentes. Por ejemplo, en el caso de un dominio con código de barras del agente de captura que se acopla a un resto de unión al analito que incluye un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, tales dominios con código de barras del agente de captura pueden unirse covalentemente a una porción del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante el uso de técnicas de conjugación química (por ejemplo, kits de marcaje de anticuerpos Lightning-Link® disponibles en Innova Biosciences). En algunas modalidades, un dominio con código de barras del agente de captura puede acoplarse a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno mediante el uso de mecanismos de unión no covalentes (por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos biotinilados y oligonucleótidos o perlas que incluyen uno o más enlazadores biotinilados, que se acoplan a oligonucleótidos con un enlazador de avidina o estreptavidina). Pueden usarse técnicas de biotinilación de anticuerpos y oligonucleótidos, y se describen por ejemplo en Fang y otros, *Nucleic Acids Res.* (2003), 31(2): 708-715. Igualmente, se han desarrollado técnicas de biotinilación de proteínas y péptidos y pueden usarse, y se describen por ejemplo en la patente de Estados Unidos núm. 6,265,552. Además, la química de la reacción clic tal como una reacción de éster de metiltetrazina-PEG5-NHS, una reacción de éster de TCO-PEG4-NHS, o similares, puede usarse para acoplar dominios con código de barras del agente de captura a restos de unión al analito. El resto reactivo en el resto de unión al analito también puede incluir amina para dirigirse a aldehídos, amina para dirigirse a maleimida (por ejemplo, tioles libres), azida para dirigirse a compuestos químicos clic (por ejemplo, alquinos), biotina para dirigirse a estreptavidina, fosfatos para dirigirse a EDC, que a su vez se dirige al éster activo (por ejemplo, NH₂). El resto reactivo en el resto de unión al analito puede ser un compuesto químico o grupo que se une al resto reactivo sobre el resto de unión al analito. Las estrategias ilustrativas para conjugar el resto de unión al analito al dominio con código de barras del agente de captura incluyen el uso de kits comerciales (por ejemplo, Solulink, Thunder link), conjugación de reducción leve de la región de bisagra y marcaje de maleimida, reacción química clic promovida por tinción a amidas marcadas (por ejemplo, sin cobre) y conjugación de oxidación peryodada de cadena de azúcar y conjugación de amina. En los casos en los que el resto de unión al analito es un anticuerpo, el anticuerpo puede modificarse previo a, o simultáneamente con la conjugación del oligonucleótido. Por ejemplo, el anticuerpo puede glicosilarse con un mutante que permite el sustrato químico de β -1,4-galactosiltransferasa, GalT (Y289L) y uridina difosfato de N-acetilgalactosamina análogo de uridina difosfato de - GalNAz que porta azida. El anticuerpo modificado puede conjugarse a un oligonucleótido con un grupo dibenzociclooctina-PEG4-NHS. En algunas modalidades, pueden evitarse determinadas etapas (por ejemplo, activación de COOH (por ejemplo, EDC) y reticuladores homobifuncionales) para evitar que los restos de unión al analito se conjuguen a sí mismos. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de perfilamiento espacial descritos en la presente descripción, el agente de captura de analito (por ejemplo, un resto de unión al analito que se acopla a un oligonucleótido) puede suministrarse en la célula, por ejemplo, mediante transfección (por ejemplo, mediante el uso de transfectamina, polímeros catiónicos, fosfato cálcico o electroporación), mediante transducción (por ejemplo, mediante el uso de un bacteriófago o vector viral recombinante), mediante suministro mecánico (por ejemplo, perlas magnéticas), mediante lípidos (por ejemplo, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC)), o mediante proteínas transportadoras. Un agente de captura de analito puede suministrarse a una célula mediante el uso de exosomas. Por ejemplo, puede generarse una primera célula que libera exosomas que comprenden un agente de captura de analito. Un agente de captura de analito puede unirse a una membrana del exosoma. Un agente de captura de analito puede estar contenido dentro del citosol de un exosoma. Los exosomas que se liberan pueden cosecharse y proporcionarse a una segunda célula, de esta manera se suministra el agente de captura de analito en la segunda célula. Un agente de captura de analito puede liberarse de una membrana del exosoma antes, durante o después del suministro a una célula. En algunas modalidades, la célula se permeabiliza para permitir que el agente de captura de analito se acople con constituyentes intracelulares (tales como, sin limitación, proteínas intracelulares, metabolitos y proteínas de la membrana nuclear). Después del suministro intracelular, pueden usarse agentes de captura de analito para analizar los constituyentes intracelulares como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de perfilamiento espacial descritos en la presente descripción, el dominio con código de barras del agente de captura que se acopla a un agente de captura de analito puede incluir modificaciones que lo hacen no extensible por una polimerasa. En algunas modalidades, cuando se une a un dominio de captura de una sonda de captura o ácido nucleico en una muestra para una reacción de extensión del cebador, el dominio con código de barras del agente de captura puede servir como un molde, no como un cebador. Cuando el dominio con código de barras del agente de captura también incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras del resto de unión al analito), tal diseño puede aumentar la eficiencia de la codificación molecular mediante código de barras por el aumento de la afinidad entre el dominio con código de barras del agente de captura y los ácidos nucleicos de la muestra sin codificar, y elimina la formación potencial de artefactos de adaptadores. En algunas modalidades, el dominio con código de barras del agente de captura puede incluir una secuencia de N-mer aleatoria que se protege con modificaciones que la hacen no extensible por una polimerasa. En algunos casos, la composición de la secuencia de N-mer aleatoria puede diseñarse para maximizar la eficiencia de unión a moléculas de ADNmc libres, no codificadas mediante código de barras. El diseño puede incluir una composición de secuencia aleatoria con un mayor contenido de GC, una secuencia aleatoria parcial con G o C fija en posiciones específicas, el uso de guanosinas, el uso de ácidos nucleicos bloqueados o cualquiera de sus combinaciones.

Una modificación para bloquear la extensión del cebador por una polimerasa puede ser un grupo separador de carbono de diferentes longitudes o un didesoxinucleótido. En algunas modalidades, la modificación puede ser un sitio abásico que tiene una estructura de apurina o apirimidina, un análogo de base o un análogo de una cadena principal de fosfato, tal como una cadena principal de N-(2-aminoetil)-glicina que se une mediante enlaces amida, tetrahidrofurano o 1',2'-Didesoxirribosa. La modificación puede ser, además, una base de uracilo, ARN modificado 2'OMe, separadores C3-18 (por ejemplo, estructuras con átomos de carbono consecutivos 3-18, tales como separador C3), separadores de multímeros de etilenglicol (por ejemplo, separador 18 (separador de hexa-etilenglicol), biotina, trifosfato de didesoxinucleótido, etilenglicol, amina o fosfato.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de caracterización espacial descritos en la presente descripción, el dominio con código de barras del agente de captura que se acopla al resto de unión al analito incluye un dominio escindible. Por ejemplo, después de que el agente de captura de analito se une a un analito (por ejemplo, un analito de la superficie celular), el dominio con código de barras del agente de captura puede escindirse y recolectarse para el análisis aguas abajo de acuerdo con los métodos como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el dominio escindible del dominio con código de barras del agente de captura incluye un elemento de escisión en U que permite que las especies se liberen de la perla. En algunas modalidades, el elemento de escisión en U puede incluir una secuencia de ADN de única hebra (ADNmc) que contiene al menos un uracilo. Las especies pueden unirse a una perla mediante la secuencia de ADNmc. Las especies pueden liberarse mediante una combinación de uracil-ADN glucosilasa (por ejemplo, para eliminar el uracilo) y una endonucleasa (por ejemplo, para inducir una ruptura del ADNmc). Si la endonucleasa genera un grupo fosfato 5' a partir de la escisión, después puede incluirse un tratamiento enzimático adicional en el procesamiento aguas abajo para eliminar el grupo fosfato, por ejemplo, previo a la ligación de elementos adicionales de manejo de secuenciación, por ejemplo, secuencia de P5 completa de Illumina, secuencia parcial de P5, secuencia completa de R1 y/o secuencia parcial de R1.

En algunas modalidades, múltiples especies diferentes de analitos (por ejemplo, polipéptidos) de la muestra biológica pueden asociarse subsecuentemente con una o más propiedades físicas de la muestra biológica. Por ejemplo, las múltiples especies diferentes de analitos pueden asociarse con ubicaciones de los analitos en la muestra biológica. Tal información (por ejemplo, información proteómica cuando el/los resto(es) de unión al analito reconocen polipéptido(s)) puede usarse en asociación con otra información espacial (por ejemplo, información genética de la muestra biológica, tal como información de la secuencia de ADN, información del transcriptoma (es decir, secuencias de transcritos), o ambas). Por ejemplo, una proteína de la superficie celular de una célula puede asociarse con una o más propiedades físicas de la célula (por ejemplo, una forma, tamaño, actividad, o un tipo de célula). La una o más propiedades físicas pueden caracterizarse mediante la obtención de imágenes de la célula. La célula puede unirse mediante un agente de captura de analito que comprende un resto de unión al analito que se une a la proteína de la superficie celular y un código de barras del resto de unión al analito que identifica ese resto de unión al analito, y la célula puede someterse a análisis espacial (por ejemplo, cualquiera de la variedad de métodos de análisis espacial descrito en la presente descripción). Por ejemplo, el agente de captura de analito que se une a la proteína de la superficie celular puede unirse a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura sobre una matriz), dicha sonda de captura incluye un dominio de captura que interactúa con una secuencia de captura de analito presente sobre el dominio con código de barras del agente de captura del agente de captura del analito. Todo o una parte del dominio con código de barras del agente de captura (que incluye el código de barras del resto de unión al analito) puede copiarse con una polimerasa mediante el uso de un extremo 3' del dominio de captura como un sitio de imprimación, lo que genera una sonda de captura extendida que incluye toda o una parte de la secuencia complementaria que corresponde a la sonda de captura (que incluye un código de barras espacial presente sobre la sonda de captura) y una copia del código de barras del resto de unión al analito. En algunas modalidades, un agente de captura de analito con un dominio con código de barras del agente de captura extendido que incluye una secuencia complementaria a un código de barras espacial de una sonda de captura se denomina un "agente de captura de analito etiquetado espacialmente".

En algunas modalidades, la matriz espacial con los agentes de captura de analito etiquetados espacialmente puede ponerse en contacto con una muestra, donde el/los agente(s) de captura de analito asociados con la matriz espacial capturan el/los analito(s) diana. El/los agente(s) de captura de analito que contiene(n) la(s) sonda(s) de captura extendida, que incluye una secuencia complementaria a el/los código(s) de barras espacial(es) de la(s) sonda(s) de captura y el/los código(s) de barras del resto de unión al analito, pueden después desnaturalizarse de la(s) sonda(s) de captura de la matriz espacial. Esto permite que la matriz espacial se reutilice. La muestra puede disociarse en células no agregadas (por ejemplo, células únicas) y analizarse mediante los métodos de célula única/gota descritos en la presente descripción. El agente de captura de analito etiquetado espacialmente puede secuenciarse para obtener la secuencia de ácido nucleico del código de barras espacial de la sonda de captura se asocia y el códigos de barras del resto de unión al analito del agente de captura de analito. La secuencia de ácido nucleico de la sonda de captura extendida puede asociarse con el analito (por ejemplo, proteína de la superficie celular) y, a su vez, con una o más propiedades físicas de la célula (por ejemplo, una forma o tipo de célula). En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico de la sonda de captura extendida puede asociarse con un analito intracelular de una célula cercana, donde el analito intracelular se libera mediante el uso de cualquiera de las técnicas de permeabilización celular o migración del analito descritas en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de caracterización espacial descritos en la presente descripción, los dominios con código de barras del agente de captura que se liberan de los agentes de captura de analito pueden someterse después al análisis de secuencia para identificar qué agentes de captura de analito se unieron a los analitos. En base a los dominios con código de barras del agente de captura que se asocian con un elemento (por ejemplo, un elemento en una ubicación particular) sobre una matriz espacial y la presencia de la secuencia de código de barras del resto de unión al analito, puede crearse un perfil del analito para una muestra biológica. Los perfiles de células individuales o poblaciones de células pueden compararse con perfiles de otras células, por ejemplo, células 'normales', para identificar variaciones en los analitos, que pueden proporcionar información diagnóstica relevante. En algunas modalidades, estos perfiles pueden ser útiles en el diagnóstico de una variedad de trastornos que se caracterizan por variaciones en los receptores de la superficie celular, tales como el cáncer y otros trastornos.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de caracterización espacial descritos en la presente descripción, los métodos se usan para identificar perfiles de células inmunitarias. Las células inmunitarias expresan varios receptores inmunitarios adaptativos relacionados con la función inmunitaria, tales como los receptores de linfocitos T (TCR) y los receptores de linfocitos B (BCR). Los receptores de linfocitos T y los receptores de linfocitos B desempeñan un papel en la respuesta inmunitaria al reconocer y unirse específicamente a antígenos y ayudar en su destrucción.

El receptor de linfocitos T, o TCR, es una molécula que se encuentra en la superficie de linfocitos T que es generalmente responsable de reconocer fragmentos de antígeno como péptidos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El TCR es generalmente un heterodímero de dos cadenas, cada una de las cuales es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, que posee un dominio variable en extremo N (V) y un dominio constante en extremo C. En seres humanos, en el 95 % de los linfocitos T, el TCR consiste en una cadena alfa (α) y beta (β), mientras que en el 5 % de los linfocitos T, el TCR consiste en cadenas gamma y delta (γ/δ). Esta relación puede cambiar durante la ontogenia y en estados enfermos, así como también en diferentes especies. Cuando el TCR se acopla con el péptido antigénico y el MHC (péptido/MHC o pMHC), el linfocito T se activa mediante transducción de señales.

Cada una de las dos cadenas de un TCR contiene múltiples copias de segmentos génicos – un segmento génico variable 'V', un segmento génico 'D' de diversidad y un segmento génico 'J' de unión. La cadena alfa de TCR (TCRa) se genera mediante la recombinación de segmentos V y J, mientras que la cadena beta (TCRb) se genera mediante la recombinación de segmentos V, D y J. De manera similar, la generación de la cadena gamma de TCR implica la recombinación de segmentos de genes de V y J, mientras que la generación de la cadena delta de TCR se produce mediante la recombinación de segmentos de genes de V, D y J. La intersección de estas regiones específicas (V y J para la cadena alfa o gamma, o V, D y J para la cadena beta o delta) corresponde a la región CDR3 que es importante para el reconocimiento antígeno-MHC. Las regiones determinantes de complementariedad (*por ejemplo*, CDR1, CDR2 y CDR3), o regiones hipervariables, son secuencias en los dominios variables de los receptores de antígeno (por ejemplo, receptor de linfocitos T e inmunoglobulina) que pueden complementar un antígeno. La mayoría de la diversidad de CDR se encuentra en CDR3, donde la diversidad se genera por eventos de recombinación somática durante el desarrollo de linfocitos T. Una secuencia de nucleótidos única que surge durante el proceso de arreglo génico puede denominarse clonotipo.

El receptor de linfocitos B, o BCR, es una molécula encontrada en la superficie de los linfocitos B. La porción de unión a antígeno de un BCR se compone de un anticuerpo unido a membrana que, al igual que la mayoría de los anticuerpos (por ejemplo, inmunoglobulinas), tiene un sitio de unión a antígeno único y determinado aleatoriamente. La porción de unión a antígeno de un BCR incluye una molécula de inmunoglobulina unida a la membrana de un isotipo (*por ejemplo*, IgD, IgM, IgA, IgG o IgE). Cuando un linfocito B se activa por su primer encuentro con un antígeno afín, la célula prolifera y se diferencia para generar una población de linfocitos B plasmáticos secretores de anticuerpos y linfocitos B de memoria. Los diversos isotipos de inmunoglobulina difieren en sus elementos biológicos, estructura, especificidad de diana y distribución. Existen una variedad de mecanismos moleculares para generar diversidad inicial, que incluye la recombinación genética en múltiples sitios.

El BCR se compone de dos genes IgH e IgK (o IgL) que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos. Las inmunoglobulinas se forman por recombinación entre segmentos génicos, diversificación de secuencias en las uniones de estos segmentos y mutaciones puntuales en todo el gen. Cada gen de cadena pesada contiene múltiples copias de tres segmentos génicos diferentes – un segmento génico 'V' variable, un segmento génico 'D' de diversidad y un segmento génico 'J' de unión. Cada gen de cadena ligera contiene múltiples copias de dos segmentos génicos diferentes para la región variable de la proteína – un segmento génico 'V' variable y un segmento génico 'J' de unión.

La recombinación puede generar una molécula con uno de cada uno de los segmentos V, D y J. Además, pueden eliminarse varias bases y añadirse otras (llamadas nucleótidos de N y P) en cada una de las dos uniones, lo que genera de esta manera más diversidad. Después de la activación de los linfocitos B, se produce un proceso de maduración por afinidad a través de la hipermutación somática. En este proceso, las células de progenie de los linfocitos B activadas acumulan distintas mutaciones somáticas a lo largo del gen con una concentración de mutación más alta en las regiones CDR, lo que conduce a la generación de anticuerpos con mayor afinidad por los antígenos.

Además de la hipermutación somática, los linfocitos B activados experimentan el proceso de conmutación de isotipo. Los anticuerpos con los mismos segmentos variables pueden tener diferentes formas (isotipos) en dependencia del segmento constante. Mientras que todos los linfocitos B vírgenes expresan IgM (o IgD), los linfocitos B activados expresan principalmente IgG pero también IgM, IgA e IgE. Esta conmutación de expresión de IgM (y/o IgD) a IgG, IgA o IgE se produce a través de un evento de recombinación que provoca que una célula se especialice en producir un isotipo específico. Una secuencia de nucleótidos única que surge durante el proceso de disposición génica puede denominarse de manera similar un clonotipo.

Ciertos métodos descritos en la presente descripción se utilizan para analizar las diversas secuencias de TCR y BCR de células inmunitarias, por ejemplo, diversos clonotipos. En algunas modalidades, los métodos se usan para analizar la secuencia de una cadena alfa de TCR, una cadena beta de TCR, una cadena delta de TCR, una cadena gamma de TCR o cualquier fragmento de la misma (por ejemplo, regiones variables que incluyen las regiones V(D)J o VJ, regiones constantes, regiones transmembrana, fragmentos de la misma, sus combinaciones y combinaciones de fragmentos de las mismas). En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para analizar la secuencia de una cadena pesada de receptor de linfocitos B, cadena ligera de receptor de linfocitos B, o cualquier fragmento de la misma (por ejemplo, regiones variables que incluyen regiones V(D)J o VJ, regiones constantes, regiones transmembrana, fragmentos de las mismas, sus combinaciones, y combinaciones de fragmentos de las mismas).

Cuando se van a analizar las células inmunitarias, las secuencias de cebadores útiles en cualquiera de las diversas operaciones para unir secuencias de código de barras y/o reacciones de amplificación pueden incluir secuencias específicas de genes que se dirigen a genes o regiones de genes de proteínas de células inmunitarias, por ejemplo, receptores inmunitarios. Tales secuencias génicas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de varios genes variables del receptor alfa de linfocitos T (genes TRAV), genes de unión al receptor alfa de linfocitos T (genes TRAJ), genes constantes del receptor alfa de linfocitos T (genes TRAC), genes variables del receptor beta de linfocitos T (genes TRBV), genes de diversidad del receptor beta de linfocitos T (genes TRBD), genes de unión del receptor beta de linfocitos T (genes TRBJ), genes constantes del receptor beta de linfocitos T (genes TRBC), genes variables del receptor gamma de linfocitos T (genes TRGV), genes de unión del receptor gamma de linfocitos T (genes TRGJ), genes constantes gamma del receptor de linfocitos T (genes TRGC), genes variables del receptor delta de linfocitos T (genes TRDV), genes de diversidad del receptor delta de linfocitos T (genes TRDD), genes de unión del receptor delta de linfocitos T (genes TRDJ) y genes constantes del receptor delta de linfocitos T (genes TRDC).

En algunas modalidades, el resto de unión al analito se basa en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II. En algunas modalidades, el resto de unión al analito es un multímero de MHC que incluye, sin limitación, dextrámeros de MHC, tetrámeros de MHC y pentámeros de MHC (ver, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núms. US 2018/0180601 y US 2017/0343545. Los MHC (por ejemplo, una molécula de monómero de MHC soluble), que incluye péptidos de MHC completos o parciales, pueden usarse como restos de unión al analito de agentes de captura de analito que se acoplan a dominios con código de barras del agente de captura que incluyen un código de barras del resto de unión al analito que identifica su MHC asociado (y, por lo tanto, por ejemplo, la pareja de unión a TCR del MHC). En algunas modalidades, los MHC se usan para analizar uno o más elementos de superficie de la célula de un linfocito T, tal como un TCR. En algunos casos, múltiples MHC se asocian juntos en un complejo más grande (multímero de MHC) para mejorar la afinidad de unión de los MHC a los TCR a través de múltiples sinergias de unión al ligando.

(c) Sustratos

Para los métodos analíticos basados en matrices espaciales descritos en la presente descripción, el sustrato funciona como un soporte para la unión directa o indirecta de sondas de captura a elementos de la matriz. Además, en algunas modalidades, un sustrato (por ejemplo, el mismo sustrato o un sustrato diferente) puede usarse para proporcionar soporte a una muestra biológica, particularmente, por ejemplo, una sección de tejido delgado. En consecuencia, un "sustrato" es un soporte que es insoluble en líquido acuoso y que permite el posicionamiento de muestras biológicas, analitos, elementos y/o sondas de captura sobre el sustrato.

Además, un "sustrato" como se usa en la presente descripción, y cuando no está precedido por el modificador "químico", se refiere a un miembro con al menos una superficie que generalmente funciona para proporcionar soporte físico para muestras biológicas, analitos y/o cualquiera de los otros restos, agentes y estructuras químicas y/o físicas descritos en la presente descripción. Los sustratos pueden formarse a partir de una variedad de materiales sólidos, materiales a base de gel, materiales coloidales, materiales semisólidos (por ejemplo, materiales que están al menos parcialmente reticulados), materiales que están curados total o parcialmente, y materiales que experimentan un cambio de fase o transición para proporcionar soporte físico. Los ejemplos de sustratos que pueden usarse en los métodos y sistemas descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos (por ejemplo, portaobjetos formados a partir de varios vidrios, portaobjetos formados a partir de varios polímeros), hidrogeles, capas y/o películas, membranas (por ejemplo, membranas porosas), celdas de flujo, cubetas, láminas, placas, o sus combinaciones. En algunas modalidades, los sustratos pueden incluir opcionalmente elementos funcionales tales como cavidades, estructuras sobresalientes, elementos microfluídicos (por ejemplo, canales, depósitos, electrodos, válvulas, sellos) y varias marcas, como se discutirá con más detalle más abajo.

(i) Atributos del sustrato

- 5 Un sustrato puede tener generalmente cualquier forma o formato adecuado. Por ejemplo, un sustrato puede ser plano, curvado, por ejemplo, curvado de forma convexa o cóncava hacia el área donde tiene lugar la interacción entre la muestra biológica, por ejemplo, muestra de tejido, y el sustrato. En algunas modalidades, un sustrato es plano, por ejemplo, plano, chip o portaobjetos. Un sustrato puede contener una o más superficies con patrones dentro del sustrato (por ejemplo, canales, pocillos, proyecciones, crestas, hendiduras, etc.).
- 10 Un sustrato puede tener cualquier forma deseada. Por ejemplo, un sustrato puede tener típicamente una forma delgada y plana (por ejemplo, un cuadrado o un rectángulo). En algunas modalidades, una estructura de sustrato tiene esquinas redondas (por ejemplo, para una mayor seguridad o robustez). En algunas modalidades, una estructura de sustrato tiene una o más esquinas cortadas (por ejemplo, para su uso con una abrazadera deslizante o mesa transversal). En algunas modalidades, donde una estructura de sustrato es plana, la estructura de sustrato puede ser
- 15 cualquier tipo apropiado de soporte que tenga una superficie plana (por ejemplo, un chip o un portaobjetos tal como un portaobjetos de microscopio).
- Los sustratos pueden incluir opcionalmente varias estructuras tales como, pero no se limitan a, proyecciones, crestas, y canales. Un sustrato tener micropatrones para limitar la difusión lateral (por ejemplo, para evitar el solapamiento de
- 20 códigos de barras espaciales). Un sustrato modificado con tales estructuras puede modificarse para permitir la asociación de analitos, elementos (por ejemplo, perlas) o sondas en sitios individuales. Por ejemplo, los sitios donde un sustrato se modifica con varias estructuras pueden ser contiguos o no contiguos con otros sitios.
- En algunas modalidades, la superficie de un sustrato puede modificarse de manera que se forman sitios discretos que solo pueden tener o acomodar un único elemento. En algunas modalidades, la superficie de un sustrato puede
- 25 modificarse de manera que los elementos se adhieran a sitios aleatorios.
- En algunas modalidades, la superficie de un sustrato se modifica para contener uno o más pocillos, mediante el uso de técnicas tales como (pero sin limitarse a) técnicas de estampado, micrograbado o moldeo. En algunas modalidades
- 30 en las que un sustrato incluye uno o más pocillos, el sustrato puede ser un portaobjetos de concavidad o portaobjetos de cavidad. Por ejemplo, los pocillos pueden formarse por una o más depresiones poco profundas en la superficie del sustrato. En algunas modalidades, donde un sustrato incluye uno o más pocillos, los pocillos pueden formarse uniendo un casete (por ejemplo, un casete que contiene una o más cámaras) a una superficie de la estructura de sustrato.
- 35 En algunas modalidades, cada una de las estructuras de un sustrato, (por ejemplo, pocillos o elementos) pueden tener una sonda de captura diferente. Pueden identificarse diferentes sondas de captura que se unen a cada estructura de acuerdo con las ubicaciones de las estructuras en o sobre la superficie del sustrato. Los sustratos ilustrativos incluyen matrices en las que las estructuras separadas se localizan sobre el sustrato que incluye, por ejemplo, aquellos que
- 40 tienen pocillos que acomodan los elementos.
- En algunas modalidades donde el sustrato se modifica para contener una o más estructuras, que incluyen pero no se limitan a, pocillos, proyecciones, crestas, elementos, o marcas, las estructuras pueden incluir sitios físicamente alterados. Por ejemplo, un sustrato modificado con varias estructuras puede incluir propiedades físicas, que incluyen,
- 45 pero no se limitan a, configuraciones físicas, fuerzas magnéticas o de compresión, sitios químicamente funcionalizados, sitios químicamente alterados y/o sitios alterados electrostáticamente. En algunas modalidades donde el sustrato se modifica para contener varias estructuras, que incluyen pero no se limitan a pocillos, proyecciones, crestas, elementos, o marcas, las estructuras se aplican en un patrón. Alternativamente, las estructuras pueden distribuirse aleatoriamente.
- 50 El sustrato (por ejemplo, o una perla o un elemento en una matriz) puede incluir decenas a cientos de miles o millones de moléculas de oligonucleótidos individuales (por ejemplo, al menos aproximadamente 10 000, 50 000, 100 000, 500 000, 1 000 000, 10 000 000, 100 000 000, 1 000 000 000 o 10 000 000 000 moléculas de oligonucleótidos).
- En algunas modalidades, un sustrato incluye una o más marcas en una superficie de un sustrato, por ejemplo, para proporcionar orientación para correlacionar la información espacial con la caracterización del analito de interés. Por
- 55 ejemplo, un sustrato puede marcarse con una rejilla de líneas (por ejemplo, para permitir que el tamaño de los objetos vistos con aumento se calcule fácilmente y/o para proporcionar áreas de referencia para contar objetos). En algunas modalidades, los marcadores fiduciales pueden incluirse en un sustrato. Tales marcas pueden hacerse mediante el uso de técnicas que incluyen, pero sin limitarse a, impresión, pulimento y deposición sobre la superficie.
- 60 En algunas modalidades, las imágenes pueden realizarse mediante el uso de uno o más marcadores fiduciales, es decir, objetos colocados en el campo visual de un sistema de obtención de imágenes que aparecen en la imagen producida. Los marcadores fiduciales se usan típicamente como un punto de referencia o escala de medición. Los marcadores fiduciales pueden incluir, pero no se limitan a, marcas detectables tales como marcas fluorescentes,
- 65 radiactivas, quimioluminiscentes y colorimétricas. El uso de marcadores fiduciales para estabilizar y orientar muestras biológicas se describe, por ejemplo, en Carter y otros, *Applied Optics* 46:421-427, 2007). En algunas modalidades, un

marcador fiducial puede ser una partícula física (por ejemplo, una nanopartícula, una microesfera, una nanoesfera, una perla, un poste o cualquiera de las otras partículas físicas ilustrativas descritas en la presente descripción o conocidas en la técnica).

5 En algunas modalidades, un marcador fiducial puede estar presente sobre un sustrato para proporcionar la orientación de la muestra biológica. En algunas modalidades, una microesfera puede acoplarse a un sustrato para ayudar en la orientación de la muestra biológica. En algunos ejemplos, una microesfera que se acopla a un sustrato puede producir una señal óptica (por ejemplo, fluorescencia). En otro ejemplo, una microesfera puede unirse a una porción (por ejemplo, esquina) de una matriz en un patrón o diseño específico (por ejemplo, diseño hexagonal) para ayudar en la orientación de una muestra biológica sobre una matriz de elementos sobre el sustrato. En algunas modalidades, un punto de cuantificación puede acoplarse al sustrato para ayudar en la orientación de la muestra biológica. En algunos ejemplos, un punto de cuantificación que se acopla a un sustrato puede producir una señal óptica.

15 En algunas modalidades, un marcador fiducial puede ser una molécula inmovilizada con la que una molécula señal detectable puede interactuar para generar una señal. Por ejemplo, un ácido nucleico marcador puede enlazarse o acoplarse a un resto químico capaz de fluorescer cuando se somete a la luz de una longitud de onda específica (o intervalo de longitudes de onda). Tal molécula de ácido nucleico marcadora puede ponerse en contacto con una matriz antes, al mismo tiempo con, o después de que la muestra de tejido se tiñe para visualizar o tomar imágenes de la sección de tejido. Aunque no se requiere, puede ser ventajoso usar un marcador que pueda detectarse mediante el uso de las mismas condiciones (por ejemplo, condiciones de obtención de imágenes) usadas para detectar un ADNc marcado.

25 En algunas modalidades, los marcadores fiduciales se incluyen para facilitar la orientación de una muestra de tejido o una imagen de esta en relación con una sonda de captura que se inmoviliza sobre un sustrato. Puede usarse cualquier número de métodos para marcar una matriz de manera que un marcador sea detectable solo cuando se obtienen imágenes de una sección de tejido. Por ejemplo, una molécula, por ejemplo una molécula fluorescente, que genera una señal, puede inmovilizarse directa o indirectamente sobre la superficie de un sustrato. Los marcadores pueden proporcionarse sobre un sustrato en un patrón (por ejemplo, un borde, una o más hileras, una o más líneas, etc.).

30 En algunas modalidades, un marcador fiducial puede colocarse aleatoriamente en el campo visual. Por ejemplo, un oligonucleótido que contiene un fluoróforo puede imprimirse, estamparse, sintetizarse o unirse aleatoriamente a un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) en una posición aleatoria sobre el sustrato. Una sección de tejido puede ponerse en contacto con el sustrato de manera que el oligonucleótido que contiene el fluoróforo entre en contacto, o esté cerca de, una célula de la sección de tejido o un componente de la célula (por ejemplo, una molécula de ARNm o de ADN). Puede obtenerse una imagen del sustrato y de la sección de tejido, y puede determinarse la posición del fluoróforo dentro de la imagen de la sección de tejido (por ejemplo, al revisar una imagen óptica de la sección de tejido superpuesta con la detección del fluoróforo). En algunas modalidades, los marcadores fiduciales pueden colocarse con precisión en el campo visual (por ejemplo, en ubicaciones conocidas sobre un sustrato). En este caso, un marcador fiducial puede estamparse, unirse o sintetizarse sobre el sustrato y ponerse en contacto con una muestra biológica. Típicamente, se toma una imagen de la muestra y del marcador fiducial, y la posición del marcador fiducial sobre el sustrato puede confirmarse al ver la imagen.

45 En algunas modalidades, un marcador fiducial puede ser una molécula inmovilizada (por ejemplo, una partícula física) que se une al sustrato. Por ejemplo, un marcador fiducial puede ser una nanopartícula, por ejemplo, una nanovarilla, un nanoalambre, un nanocubo, una nanopirámide, o una nanopartícula esférica. En algunos ejemplos, la nanopartícula puede fabricarse de un metal pesado (por ejemplo, oro). En algunas modalidades, la nanopartícula puede fabricarse de diamante. En algunas modalidades, el marcador fiducial puede ser visible a simple vista.

50 Como se señala en la presente descripción, cualquiera de los marcadores fiduciales descritos en la presente descripción (por ejemplo, microesferas, perlas o cualquiera de las otras partículas físicas descritas en la presente descripción) puede ubicarse en una porción (por ejemplo, esquina) de una matriz en un patrón o diseño específico (por ejemplo, diseño hexagonal) para ayudar en la orientación de una muestra biológica en una matriz de elementos sobre el sustrato. En algunas modalidades, los marcadores fiduciales ubicados en una porción (por ejemplo, esquina) de una matriz (por ejemplo, una matriz sobre un sustrato) pueden estar en patrones o diseñarse en al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 patrones únicos. En algunos ejemplos, los marcadores fiduciales ubicados en las esquinas de la matriz (por ejemplo, una matriz sobre un sustrato) pueden tener cuatro patrones únicos de marcadores fiduciales.

60 En algunos ejemplos, los marcadores fiduciales pueden rodear la matriz. En algunas modalidades los marcadores fiduciales permiten la detección de, por ejemplo, espejismo. En algunas modalidades, los marcadores fiduciales pueden rodear completamente la matriz. En algunas modalidades, los marcadores fiduciales pueden no rodear completamente la matriz. En algunas modalidades, los marcadores fiduciales identifican las esquinas de la matriz. En algunas modalidades, uno o más marcadores fiduciales identifican el centro de la matriz. En algunas modalidades, los marcadores fiduciales comprenden puntos con patrones, en donde el diámetro de uno o más marcadores fiduciales de puntos en patrones es de aproximadamente 100 micrómetros. El diámetro de los marcadores fiduciales puede ser cualquier diámetro útil que incluye, pero no se limita a, 50 micrómetros a 500 micrómetros de diámetro. Los marcadores

fiduciales pueden disponerse de tal manera que el centro de un marcador fiducial esté entre 100 micrómetros y 200 micrómetros desde el centro de uno o más de otros marcadores fiduciales que rodean la matriz. En algunas modalidades, la matriz con los marcadores fiduciales circundantes es de aproximadamente 8 mm por 8 mm. En algunas modalidades, la matriz sin los marcadores fiduciales circundantes es menor que 8 mm por 50 mm.

En algunas modalidades, una matriz puede encerrarse dentro de un marco. Dicho de otra manera, el perímetro de una matriz puede tener marcadores fiduciales de manera que la matriz esté encerrada o sustancialmente encerrada. En algunas modalidades, el perímetro de una matriz puede ser marcadores fiduciales (por ejemplo, cualquier marcador fiducial descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, el perímetro de una matriz puede ser uniforme. Por ejemplo, los marcadores fiduciales pueden conectar, o conectar sustancialmente, esquinas consecutivas de una matriz de tal manera que la porción que no es de esquina del perímetro de la matriz es la misma en todos los lados (por ejemplo, cuatro lados) de la matriz. En algunas modalidades, los marcadores fiduciales unidos a las porciones que no son de esquina del perímetro pueden ubicarse en patrones o diseñarse para ayudar en la orientación de la muestra biológica en la matriz. En algunas modalidades, las partículas unidas a las porciones que no son de esquina del perímetro pueden ubicarse en patrones o diseñarse en al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 4 patrones. En algunas modalidades, los patrones pueden tener al menos 2, al menos 3 o al menos 4 patrones únicos de marcadores fiduciales en la porción que no es de esquina del perímetro de la matriz.

En algunas modalidades, una matriz puede incluir al menos dos marcadores fiduciales (por ejemplo, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100 marcadores fiduciales o más (por ejemplo, varios cientos, varios miles o decenas de miles de marcadores fiduciales)) en distintas posiciones en la superficie de un sustrato. Los marcadores fiduciales pueden proporcionarse sobre un sustrato en un patrón (por ejemplo, un borde, una o más hileras, una o más líneas, etc.).

Una amplia variedad de diferentes sustratos puede usarse para los propósitos anteriores. En general, un sustrato puede ser cualquier material de soporte adecuado. Los primeros sustratos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, vidrio modificado y/o funcionalizado, hidrogeles, películas, membranas, plásticos (que incluyen, por ejemplo, acrílicos, poliestireno, copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, Teflon™, olefinas cíclicas, poliimidas, etc.), nailon, cerámicas, resinas, Zeonor, sílice o materiales a base de sílice, que incluyen silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, haces de fibra óptica y polímeros, tales como poliestireno, copolímeros de olefinas cíclicas (COC), polímeros de olefinas cíclicas (COP), polipropileno, policarbonato de polietileno o sus combinaciones.

Entre los ejemplos de materiales de sustrato mencionados anteriormente, el poliestireno es un material hidrófobo adecuado para unir macromoléculas cargadas negativamente porque normalmente contiene pocos grupos hidrófilos. Para los ácidos nucleicos que se inmovilizan sobre portaobjetos de vidrio, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie vítrea puede aumentarse la inmovilización del ácido nucleico. Tal mejora puede permitir una formación relativamente más densamente empaquetada (por ejemplo, proporcionar una especificidad y resolución mejoradas).

En otro ejemplo, un sustrato puede ser una celda de flujo. Las celdas de flujo pueden formarse de cualquiera de los materiales anteriores, y pueden incluir canales que permiten que los reactivos, solventes, elementos, y analitos pasen a través de la celda de flujo. En algunas modalidades, una muestra biológica embebida en hidrogel se ensambla en una celda de flujo (por ejemplo, la celda de flujo se utiliza para introducir el hidrogel en la muestra biológica). En algunas modalidades, una muestra biológica embebida en hidrogel no se ensambla en una celda de flujo. En algunas modalidades, la muestra biológica embebida en hidrogel puede prepararse y/o expandirse isométricamente como se describe en la presente descripción.

(ii) Sustratos conductores

Los sustratos conductores (por ejemplo, matrices compatibles electroforéticas) generados como se describe en la presente descripción pueden usarse en la detección espacial de analitos. Por ejemplo, puede aplicarse un campo electroforético para facilitar la migración de analitos hacia los oligonucleótidos con código de barras (por ejemplo, sondas de captura) en la matriz (por ejemplo, sondas de captura inmovilizadas en papel, sondas de captura inmovilizadas en una película de hidrogel, o sondas de captura inmovilizadas en un portaobjetos de vidrio que tiene un recubrimiento conductor). En algunas modalidades, puede disponerse un conjunto de electroforesis. Por ejemplo, un ánodo y un cátodo pueden disponerse de manera que una matriz de sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura inmovilizadas en papel, sondas de captura inmovilizadas en una película de hidrogel, o sondas de captura inmovilizadas en un portaobjetos de vidrio que tiene un recubrimiento conductor) y una muestra biológica se colocan entre el ánodo y el cátodo. En tales modalidades, los analitos en la muestra biológica se migran activamente hacia las sondas de captura en el sustrato conductor y se capturan. La muestra biológica puede prepararse (por ejemplo, permeabilizarse) de acuerdo con cualquier método descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, después de la captura asistida por electroforesis de los analitos, los oligonucleótidos con código de barras (por ejemplo, sondas de captura) y los analitos capturados pueden recolectarse, procesarse y/o analizarse (por ejemplo, secuenciarse) mediante el uso de cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, un sustrato conductor puede incluir vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) que se ha recubierto con una sustancia o modificado de cualquier otra manera para conferir propiedades conductoras al vidrio. En algunas modalidades, un portaobjetos de vidrio puede recubrirse con un recubrimiento conductor. En algunas modalidades, un recubrimiento conductor incluye óxido de estaño (TO) u óxido de estaño indio (ITO). En algunas modalidades, un recubrimiento conductor incluye un óxido conductor transparente (TCO). En algunas modalidades, un recubrimiento conductor incluye óxido de zinc dopado con aluminio (AZO). En algunas modalidades, un recubrimiento conductor incluye óxido de estaño dopado con flúor (FTO).

En algunas modalidades, las matrices que se motean o imprimen con oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura, por ejemplo, cualquier variedad de sondas de captura descritas en la presente descripción) pueden generarse en un sustrato conductor (por ejemplo, cualquiera de los sustratos conductores descritos en la presente descripción). Por ejemplo, las matrices descritas en la presente descripción pueden ser compatibles con métodos activos de captura de analito (por ejemplo, cualquiera de los métodos de captura de analito descritos en la presente descripción, que incluyen, sin limitación, métodos de captura electroforética). En algunas modalidades, un sustrato conductor es un medio poroso. Los ejemplos no limitantes de medios porosos que pueden usarse en métodos descritos en la presente descripción que emplean la captura de analito activa incluyen una membrana de nitrocelulosa o nailon. En algunas modalidades, un medio poroso que puede usarse en los métodos descritos en la presente descripción que emplean la captura de analito activa incluye papel. En algunas modalidades, los oligonucleótidos pueden imprimirse sobre un sustrato de papel. En algunas modalidades, los oligonucleótidos impresos pueden interactuar con el sustrato (por ejemplo, interactuar con fibras del papel). En algunas modalidades, los oligonucleótidos impresos pueden unirse covalentemente al sustrato (por ejemplo, a las fibras del papel). En algunas modalidades, los oligonucleótidos en una solución precursora molecular pueden imprimirse en un sustrato conductor (por ejemplo, papel). En algunas modalidades, una solución precursora molecular puede polimerizarse, generando de esta manera almohadillas de gel sobre el sustrato conductor (por ejemplo, papel). En algunas modalidades, una solución precursora molecular puede polimerizarse mediante luz (por ejemplo, fotocurarse). En algunas modalidades, las perlas de gel (por ejemplo, cualquiera de la variedad de perlas de gel descritas en la presente descripción) que contienen oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos con código de barras tales como sondas de captura) pueden imprimirse en un sustrato conductor (por ejemplo, papel). En algunas modalidades, los oligonucleótidos impresos pueden unirse covalentemente a la matriz de gel.

(iii) Recubrimientos

En algunas modalidades, un sustrato se recubre con un tratamiento superficial tal como poli(L)-lisina. Alternativa o adicionalmente, el sustrato puede tratarse mediante silanación, por ejemplo, con epoxi-silano, amino-silano, y/o mediante un tratamiento con poliacrilamida.

En algunas modalidades, un sustrato se trata para minimizar o reducir la hibridación inespecífica de analito dentro o entre elementos. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir recubrir el sustrato con un hidrogel, película y/o membrana que crea una barrera física a la hibridación inespecífica. Puede usarse cualquier hidrogel adecuado. Por ejemplo, pueden usarse matrices de hidrogel preparadas de acuerdo con los métodos establecidos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,391,937, 9,512,422 y 9,889,422, y las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núms. U.S. 2017/0253918 y U.S. 2018/0052081.

El tratamiento puede incluir añadir un grupo funcional que sea reactivo o capaz de activarse de manera que se vuelva reactivo después de la aplicación de un estímulo (por ejemplo, grupos funcionales fotorreactivos). El tratamiento puede incluir tratar con polímeros que tienen una o más propiedades físicas (por ejemplo, mecánicas, eléctricas, magnéticas y/o térmicas) que minimizan la unión inespecífica (por ejemplo, que activan un sustrato en ciertas ubicaciones para permitir la hibridación de analitos en esas ubicaciones).

Un “recubrimiento extraíble” es un recubrimiento que puede retirarse de la superficie de un sustrato tras la aplicación de un agente de liberación. En algunas modalidades, un recubrimiento extraíble incluye un hidrogel como se describe en la presente descripción, por ejemplo, un hidrogel que incluye un material basado en polipéptidos. Los ejemplos no limitantes de un hidrogel que presenta un material basado en polipéptidos incluyen un material sintético basado en péptidos que presenta una combinación de seda araña y un segmento transmembrana del canal de calcio de tipo L del músculo humano (por ejemplo, PEPGEL®), un péptido anfifílico de 16 residuos que contiene una secuencia repetitiva de arginina-alanina-aspartato-alanina (RADARADARADARA) (por ejemplo, PURAMATRIX®), EAK16 (AEAEAKAKAEAEAKAK), KLD12 (KLDLKLKLDL) y PGMATRIX™.

En algunas modalidades, el hidrogel en el recubrimiento extraíble es un hidrogel que responde al estímulo. Un hidrogel que responde al estímulo puede someterse a una transición de gel a solución y/o gel a sólido tras la aplicación de uno o más desencadenantes externos (por ejemplo, un agente de liberación). Véase, por ejemplo, Willner, *Acc. Chem. Res.* 50:657–658, 2017. Los ejemplos no limitantes de un hidrogel que responde al estímulo incluyen un hidrogel que responde al calor, un hidrogel que responde al pH, un hidrogel que responde a la luz, un hidrogel que responde al redox, un hidrogel que responde al analito, o una de sus combinaciones. En algunas modalidades, un hidrogel que responde a estímulos puede ser un hidrogel que responde a múltiples estímulos.

Un “agente de liberación” o “desencadenante externo” es un agente que permite la eliminación de un recubrimiento extraíble de un sustrato cuando el agente de liberación se aplica al recubrimiento extraíble. Un desencadenante externo o agente de liberación puede incluir activadores físicos tales como estímulos térmicos, magnéticos, ultrasónicos, electroquímicos y/o de luz, así como también activadores químicos tales como pH, reacciones redox, complejos supramoleculares y/o reacciones dirigidas biocatalíticamente. Véase, por ejemplo, Echeverría, y otros, *Gels* (2018), 4, 54; doi:10.3390/gels4020054. El tipo de “agente de liberación” o “desencadenante externo” puede depender del tipo de recubrimiento extraíble. Por ejemplo, un recubrimiento extraíble que presenta un hidrogel sensible al redox puede retirarse tras la aplicación de un agente de liberación que incluye un agente reductor tal como ditioneitol (DTT). Como otro ejemplo, un hidrogel que responde al pH puede eliminarse tras la aplicación de un agente de liberación que cambia el pH.

(iv) Sustratos de gel

En algunas modalidades, las perlas de gel que contienen oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos con código de barras tales como sondas de captura) pueden depositarse en un sustrato (por ejemplo, portaobjetos de vidrio). En algunas modalidades, las almohadillas de gel pueden depositarse sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). En algunas modalidades, las almohadillas de gel o perlas de gel se depositan sobre un sustrato en un formato dispuesto. En algunas modalidades en las que las almohadillas de gel o las perlas de gel se depositan sobre un sustrato en un formato dispuesto, puede aplicarse una solución precursora molecular de hidrogel sobre la parte superior de la matriz (por ejemplo, la matriz de almohadillas de gel o perlas de gel en un portaobjetos de vidrio). En algunas modalidades, una solución precursora molecular de hidrogel puede polimerizarse de manera que las almohadillas de gel depositadas o perlas de gel se inmovilizan dentro del hidrogel polimerizado. Puede usarse cualquier método adecuado de polimerización o (por ejemplo, cualquiera de la variedad de métodos descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, un hidrogel polimerizado que incluye las almohadillas de gel o perlas de gel puede retirarse (por ejemplo, despegarse) del sustrato (por ejemplo, portaobjetos de vidrio) de manera que las perlas de gel o las almohadillas de gel se aseguran en el hidrogel. En algunas modalidades, un hidrogel polimerizado que incluye las almohadillas de gel o perlas de gel es un sustrato conductor (como se describe en la presente descripción) que puede usarse de acuerdo con cualquiera de la variedad de métodos de captura de analito descritos en la presente descripción (por ejemplo, migración electroforética de analitos para la captura).

Las matrices pueden prepararse al depositar elementos (por ejemplo, gotitas, perlas) en una superficie de sustrato para producir una matriz con código de barras espacial. Los métodos para depositar (por ejemplo, manipulación de gotas) elementos se conocen en la técnica (ver, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2008/0132429, Rubina, A.Y., y otros, *Biotechniques*. Mayo de 2003; 34(5):1008-14, 1016-20, 1022 y Vasiliskov y otros *Biotechniques*. Septiembre de 1999; 27(3):592-4, 596-8, 600 passim.). Un elemento puede imprimirse o depositarse en una ubicación específica sobre el sustrato (por ejemplo, impresión por chorro de tinta). En algunas modalidades, cada elemento puede tener un oligonucleótido único que funciona como un código de barras espacial. En algunas modalidades, cada elemento puede tener sondas de captura para la multiplexación (por ejemplo, capturar múltiples analitos o múltiples tipos de analitos, por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos). En algunas modalidades, un elemento puede imprimirse o depositarse en la ubicación específica mediante el uso de un campo eléctrico. Un elemento puede contener un precursor de polímero fotorreticulable y un oligonucleótido. En algunas modalidades, el precursor de polímero fotorreticulable puede depositarse en un elemento con patrones en el sustrato (por ejemplo, pocillo).

Un “precursor de polímero fotorreticulable” se refiere a un compuesto que se reticula y/o polimeriza tras la exposición a la luz. En algunas modalidades, uno o más fotoiniciadores también pueden incluirse para inducir y/o promover la polimerización y/o la reticulación. Véase, por ejemplo, Choi y otros. *Biotechniques*. Enero de 2019;66(1):40-53.

Los ejemplos no limitantes de precursores de polímeros fotorreticulados incluyen diacrilato de polietileno (glicol) (PEGDA), gelatina-metacrilato (GelMA) y ácido hialurónico metacrilado (MeHA). En algunas modalidades, un precursor de polímero fotorreticulable comprende diacrilato de polietileno (glicol) (PEGDA), gelatina-metacrilato (GelMA), ácido hialurónico metacrilado (MeHA), o sus combinaciones. En algunas modalidades, un precursor de polímero fotorreticulable (por ejemplo, PAZAM) puede unirse covalentemente (por ejemplo, reticulado) a un sustrato. En algunas modalidades, un precursor de polímero fotorreticulable no se une covalentemente a una superficie de sustrato. Por ejemplo, puede usarse una acrilamida sin silano (ver la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2011/0059865). El precursor de polímero fotorreticulable en un elemento (por ejemplo, gota o perla) puede polimerizarse mediante cualquier método conocido. Los oligonucleótidos pueden polimerizarse en una matriz de gel reticulada (por ejemplo, copolimerizada o polimerizada simultáneamente). En algunas modalidades, los elementos que contienen el precursor de polímero fotorreticulable depositado en la superficie del sustrato pueden exponerse a la luz UV. La luz UV puede inducir la polimerización del precursor de polímero fotorreticulable y resultar en que los elementos se conviertan en una matriz de gel (por ejemplo, almohadillas de gel) en la superficie del sustrato (por ejemplo, matriz).

Los métodos de polimerización para las subunidades de hidrogel pueden seleccionarse para formar hidrogeles con diferentes propiedades (por ejemplo, volumen de los poros, propiedades de inflado, biodegradabilidad, conducción, transparencia y/o permeabilidad del hidrogel). Por ejemplo, un hidrogel puede incluir poros de volumen suficiente para permitir el paso de macromoléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, cromatina, metabolitos, ARNg,

anticuerpos, carbohidratos, péptidos, metabolitos y/o moléculas pequeñas) hacia la muestra (por ejemplo, sección de tejido). Se conoce que el volumen de los poros generalmente disminuye con el aumento de la concentración de las subunidades de hidrogel y generalmente aumenta con una relación creciente de las subunidades de hidrogel con respecto al reticulador. Por lo tanto, puede prepararse una composición de hidrogel que incluye una concentración de subunidades de hidrogel que permite el paso de tales macromoléculas biológicas.

En algunas modalidades, la formación de hidrogel sobre un sustrato se produce antes, simultáneamente con, o después de que se unan los elementos (por ejemplo, perlas) al sustrato. Por ejemplo, cuando se une una sonda de captura (por ejemplo, directa o indirectamente) a un sustrato, la formación de hidrogel puede realizarse en el sustrato que ya contiene las sondas de captura.

(d) Matrices

En muchos de los métodos descritos en la presente descripción, los elementos (como se describe posteriormente más abajo) se posicionan colectivamente sobre un sustrato. Una "matriz" es un arreglo específico de una pluralidad de elementos que es irregular o forma un patrón regular. Los elementos individuales en la matriz difieren entre sí sobre la base de sus ubicaciones espaciales relativas. En general, al menos dos de la pluralidad de elementos en la matriz incluyen una sonda de captura distinta (por ejemplo, cualquiera de los ejemplos de sondas de captura descritas en la presente descripción).

Las matrices pueden usarse para medir un gran número de analitos simultáneamente. En algunas modalidades, los oligonucleótidos se usan, al menos en parte, para crear una matriz. Por ejemplo, una o más copias de una única especie de oligonucleótido (por ejemplo, sonda de captura) pueden corresponder o unirse directa o indirectamente a un elemento dado en la matriz. En algunas modalidades, un elemento dado en la matriz incluye dos o más especies de oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura). En algunas modalidades, las dos o más especies de oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura) que se unen directa o indirectamente a un elemento dado sobre la matriz incluyen un código de barras espacial común (por ejemplo, idéntico).

(i) Matrices para captura de analito

En algunas modalidades, una matriz puede incluir una sonda de captura que se une directa o indirectamente al sustrato. La sonda de captura puede incluir un dominio de captura (por ejemplo, una secuencia de nucleótidos) que puede unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a un analito diana (por ejemplo, ARNm, ADN o proteína) dentro de una muestra. En algunas modalidades, la unión de la sonda de captura a la diana (por ejemplo, hibridación) puede detectarse y cuantificarse mediante la detección de una señal visual, por ejemplo, un fluoróforo, un metal pesado (por ejemplo, ion de plata) o una etiqueta quimioluminiscente, que se ha incorporado en la diana. En algunas modalidades, la intensidad de la señal visual se correlaciona con la abundancia relativa de cada analito en la muestra biológica. Dado que una matriz puede contener miles o millones de sondas de captura (o más), una matriz puede interrogar muchos analitos en paralelo.

En algunas modalidades, un sustrato incluye una o más sondas de captura que se diseñan para capturar analitos de uno o más organismos. En un ejemplo no limitante, un sustrato puede contener una o más sondas de captura diseñadas para capturar ARNm de un organismo (por ejemplo, un humano) y una o más sondas de captura diseñadas para capturar ADN de un segundo organismo (por ejemplo, una bacteria).

Las sondas de captura pueden unirse a un sustrato o elemento mediante el uso de una variedad de técnicas. En algunas modalidades, la sonda de captura se une directamente a un elemento que se fija sobre una matriz. En algunas modalidades, las sondas de captura se inmovilizan a un sustrato mediante inmovilización química. Por ejemplo, puede tener lugar una inmovilización química entre los grupos funcionales sobre el sustrato y los elementos funcionales correspondientes sobre las sondas de captura. Los elementos funcionales correspondientes ilustrativos en las sondas de captura pueden ser un grupo químico inherente de la sonda de captura, por ejemplo, un grupo hidroxilo, o puede introducirse un elemento funcional sobre la sonda de captura. Un ejemplo de un grupo funcional sobre el sustrato es un grupo amina. En algunas modalidades, la sonda de captura a inmovilizar incluye un grupo amina funcional o se modifica químicamente para incluir un grupo amina funcional. Los medios y métodos para tal una modificación química se conocen bien en la técnica.

En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5'. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' e incluye desde el extremo 5' hasta 3': uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' e incluye desde el extremo 5' hasta 3': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' e incluye desde el extremo 5' hasta 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura.

En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' e incluye desde el extremo 5' hasta 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), un segundo dominio funcional y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' e incluye desde el extremo 5' hasta 3': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' y no incluye un código de barras espacial. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 5' y no incluye un UMI. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye una secuencia para iniciar una reacción de secuenciación.

En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 3'. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' hasta 5': uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI) y uno o más dominios de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' hasta 5': un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial o un UMI) y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' hasta 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, uno o más códigos de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un UMI), y un dominio de captura. En algunas modalidades, la sonda de captura se inmoviliza sobre un elemento o un sustrato mediante su extremo 3' e incluye desde el extremo 3' hasta 5': un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI y un dominio de captura.

La localización del grupo funcional dentro de la sonda de captura a inmovilizar puede usarse para controlar y dar forma al comportamiento de unión y/u orientación de la sonda de captura, por ejemplo, el grupo funcional puede colocarse en el extremo 5' o 3' de la sonda de captura o dentro de la secuencia de la sonda de captura. En algunas modalidades, una sonda de captura puede incluir además un sustrato. Un sustrato típico para que una sonda de captura se inmovilice incluye restos que son capaces de unirse a tales sondas de captura, por ejemplo, a ácidos nucleicos funcionalizados con amina. Ejemplos de tales sustratos son sustratos carboxi, aldehído o epoxi.

En algunas modalidades, los sustratos sobre los cuales las sondas de captura pueden inmovilizarse pueden activarse químicamente, por ejemplo mediante la activación de grupos funcionales, disponibles sobre el sustrato. El término "sustrato activado" se refiere a un material en el que se establecieron o habilitaron grupos funcionales químicos reactivos o interactivos mediante procedimientos de modificación química. Por ejemplo, un sustrato que incluye grupos carboxilo puede activarse antes de usar. Además, determinados sustratos contienen grupos funcionales que pueden reaccionar con restos específicos ya presentes en las sondas de captura.

En algunas modalidades, se usa un enlace covalente para acoplar directamente una sonda de captura a un sustrato. En algunas modalidades una sonda de captura se acopla indirectamente a un sustrato a través de un enlazador que separa el "primer" nucleótido de la sonda de captura del sustrato, por ejemplo, un enlazador químico. En algunas modalidades, una sonda de captura no se une directamente al sustrato, sino que interactúa indirectamente, por ejemplo, mediante la unión a una molécula que se une directa o indirectamente al sustrato. En algunas modalidades, la sonda de captura se une indirectamente a un sustrato (por ejemplo, se une a un sustrato mediante una solución que incluye un polímero).

En algunas modalidades donde la sonda de captura se inmoviliza sobre el elemento de la matriz indirectamente, por ejemplo, mediante hibridación con una sonda de superficie capaz de unirse a la sonda de captura, la sonda de captura puede incluir además una secuencia en dirección 5' (5' con respecto a la secuencia que se hibrida con el ácido nucleico, por ejemplo, ARN de la muestra de tejido) que es capaz de hibridarse con el extremo 5' de la sonda de superficie. Solo, el dominio de captura de la sonda de captura puede verse como un oligonucleótido del dominio de captura, que puede usarse en la síntesis de la sonda de captura en modalidades donde la sonda de captura se inmoviliza sobre la matriz indirectamente.

En algunas modalidades, un sustrato comprende un material o matriz inerte (por ejemplo, portaobjetos de vidrio) que se ha funcionalizado, por ejemplo, mediante tratamiento con el sustrato con un material que comprende grupos reactivos que facilitan la inmovilización de las sondas de captura. Véase, por ejemplo, el documento WO 2017/019456. Los ejemplos no limitantes incluyen hidrogeles de poliacrilamida soportados sobre un sustrato inerte (por ejemplo, portaobjetos de vidrio; véase el documento WO 2005/065814 y la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2008/0280773).

En algunas modalidades, un oligonucleótido (por ejemplo, una sonda de captura) puede unirse a un sustrato o elemento de acuerdo con los métodos establecidos en las patentes de Estados Unidos núms. 6,737,236, 7,259,258, 7,375,234, 7,427,678, 5,610,287, 5,807,522, 5,837,860, y 5,472,881; las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos núms. 2008/0280773 y 2011/0059865; Shalon y otros, (1996) *Genome Research*, 639–645; Rogers y otros, (1999) *Analytical Biochemistry* 266, 23–30; Stimpson y otros, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6379–6383; Beattie y otros, (1995) *Clin. Chem.* 45, 700–706; Lamture y otros, (1994) *Nucleic Acids Research* 22, 2121–2125; Beier y otros, (1999) *Nucleic Acids Research* 27, 1970–1977; Joos y otros, (1997) *Analytical Biochemistry* 247, 96–101;

Nikiforov y otros. (1995) *Analytical Biochemistry* 227, 201–209; Timofeev y otros. (1996) *Nucleic Acids Research* 24, 3142–3148; Chrisey y otros. (1996) *Nucleic Acids Research* 24, 3031–3039; Guo y otros. (1994) *Nucleic Acids Research* 22, 5456–5465; Running y Urdea (1990) *BioTechniques* 8, 276–279; Fahy y otros. (1993) *Nucleic Acids Research* 21, 1819–1826; Zhang y otros. (1991) 19, 3929–3933; y Rogers y otros. (1997) *Gene Therapy* 4, 1387–1392.

(ii) Generación de sondas de captura en un formato de matriz

Las matrices pueden prepararse mediante una variedad de métodos. En algunas modalidades, las matrices se preparan a través de la síntesis (por ejemplo, síntesis in situ) de oligonucleótidos en la matriz, o mediante impresión por chorro o litografía. Por ejemplo, la síntesis dirigida por luz de oligonucleótidos de ADN de alta densidad puede lograrse mediante fotolitografía o síntesis de ADN en fase sólida. Para implementar la síntesis fotolitográfica, los enlazadores sintéticos modificados con grupos protectores fotoquímicos pueden unirse a un sustrato y los grupos protectores fotoquímicos pueden modificarse mediante el uso de una máscara fotolitográfica (aplicada a áreas específicas del sustrato) y luz, de esta manera se produce una matriz que tiene fotodesprotección localizada. Muchos de estos métodos se conocen en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Miller y otros, “Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology.” *Clinical Microbiology Reviews* 22.4 (2009): 611-633; US201314111482A; US9593365B2; US2019203275; y WO2018091676.

(1) Localización o impresión

En algunas modalidades, los oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura) pueden “mancharse” o “imprimirse” sobre un sustrato para formar una matriz. Los oligonucleótidos pueden aplicarse ya sea mediante impresión por contacto o sin contacto. Una impresora sin contacto puede usar el mismo método que las impresoras de computadoras (por ejemplo, chorro de burbujas o chorro de tinta) para expulsar pequeñas gotitas de la solución de la sonda sobre el sustrato. La impresora especializada tipo chorro de tinta puede expulsar un volumen de gotas de la solución de oligonucleótidos, en lugar de tinta, de nanolitros a picolitros sobre el sustrato. En la impresión por contacto, cada pasador de impresión aplica directamente la solución de oligonucleótidos sobre una ubicación específica sobre la superficie. Los oligonucleótidos pueden unirse a la superficie del sustrato mediante la interacción electrostática de la carga negativa de la cadena principal de fosfato del ADN con un recubrimiento cargado positivamente de la superficie del sustrato o mediante enlaces covalentes reticulados por UV entre las bases de timidina en el ADN y los grupos de amina sobre la superficie del sustrato tratado. En algunas modalidades, el sustrato es un portaobjetos de vidrio. En algunas modalidades, los oligonucleótidos (por ejemplo, sondas de captura) se unen a un sustrato mediante un enlace covalente a una matriz química, por ejemplo, epoxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida, etc.

(2) Síntesis in situ

Las matrices de sondas de captura pueden prepararse mediante síntesis in situ. En algunas modalidades, las matrices de sonda de captura pueden prepararse mediante el uso de fotolitografía. La fotolitografía típicamente se basa en el enmascaramiento UV y la síntesis química combinatoria dirigida por la luz sobre un sustrato para sintetizar selectivamente sondas directamente sobre la superficie de una matriz, un nucleótido a la vez por punto, para muchos puntos simultáneamente. En algunas modalidades, un sustrato contiene moléculas enlazadoras covalentes que tienen un grupo protector sobre el extremo libre que puede eliminarse mediante la luz. La luz UV se dirige a través de una máscara fotolitográfica para desproteger y activar sitios seleccionados con grupos hidroxilo que inician el acoplamiento con nucleótidos protegidos entrantes que se unen a los sitios activados. La máscara se diseña de tal manera que los sitios expuestos pueden seleccionarse, y por lo tanto se especifican las coordenadas sobre la matriz donde puede unirse cada nucleótido. El proceso puede repetirse, se aplica una nueva máscara que activa diferentes conjuntos de sitios y acopla diferentes bases, lo que permite construir oligonucleótidos diferentes en cada sitio. Este proceso puede usarse para sintetizar cientos de miles de diferentes oligonucleótidos. En algunas modalidades, puede usarse la tecnología de síntesis de matriz sin máscara. Los microespejos programables pueden generar máscaras digitales que reflejan el patrón deseado de luz UV para desproteger los elementos.

En algunas modalidades, el proceso de formar puntos por chorro de tinta puede usarse, además, para la síntesis de oligonucleótidos in situ. Los diferentes precursores de nucleótidos más el catalizador pueden imprimirse sobre el sustrato, y después se combinan con las etapas de acoplamiento y desprotección. Este método se basa en imprimir volúmenes de picolitros de nucleótidos sobre la superficie de la matriz en rondas repetidas de impresión base por base que extienden la longitud de las sondas de oligonucleótidos sobre la matriz.

(3) Ligación

En algunas modalidades, puede generarse una matriz que comprende sondas con código de barras mediante la ligación de una pluralidad de oligonucleótidos. En algunos casos, un oligonucleótido de la pluralidad contiene una porción de un código de barras, y el código de barras completo se genera tras la ligación de la pluralidad de oligonucleótidos. Por ejemplo, un primer oligonucleótido que contiene una primera porción de un código de barras puede unirse a un sustrato (por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los métodos para unir un oligonucleótido a un sustrato descrito en la presente descripción), y un segundo oligonucleótido que contiene una segunda porción del

código de barras puede ligarse después al primer oligonucleótido para generar un código de barras completo. Pueden usarse diferentes combinaciones de la primera, segunda y cualquier porción adicional de un código de barras para aumentar la diversidad de los códigos de barras. En los casos donde el segundo oligonucleótido también se une al sustrato previo a la ligación, el primer y/o el segundo oligonucleótido pueden unirse al sustrato mediante un enlazador de superficie que contiene un sitio de escisión. Después de la ligación, el oligonucleótido ligado puede linealizarse mediante la escisión en el sitio de escisión.

Para aumentar la diversidad de los códigos de barras, una pluralidad de segundos oligonucleótidos que comprenden dos o más secuencias de código de barras diferentes puede ligarse a una pluralidad de primeros oligonucleótidos que comprenden la misma secuencia de código de barras, de esta manera se generan dos o más especies diferentes de códigos de barras. Para lograr la ligación selectiva, un primer oligonucleótido que se une a un sustrato que contiene una primera porción de un código de barras puede protegerse inicialmente con un grupo protector (por ejemplo, un grupo protector fotoescindible), y el grupo protector puede eliminarse previo a la ligación entre el primer y el segundo oligonucleótido. En los casos donde las sondas con código de barras sobre una matriz se generan mediante la ligación de dos o más oligonucleótidos, puede aplicarse un gradiente de concentración de los oligonucleótidos a un sustrato de manera que diferentes combinaciones de los oligonucleótidos se incorporan en una sonda con código de barras en dependencia de su ubicación sobre el sustrato.

Las sondas pueden generarse mediante la ligación directa de oligonucleótidos adicionales a oligonucleótidos existentes mediante un oligonucleótido de soporte. En algunas modalidades, los oligonucleótidos en una matriz existente pueden incluir una secuencia de reconocimiento que puede hibridarse con un oligonucleótido de soporte. La secuencia de reconocimiento puede estar en el extremo 5' libre o en el extremo 3' libre de un oligonucleótido sobre la matriz existente. Las secuencias de reconocimiento útiles para los métodos de la presente descripción pueden no contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o estructuras secundarias (por ejemplo, horquillas), y pueden incluir altos contenidos de nucleótidos de guanina y citosina.

(4) Polimerasas

Las sondas con código de barras sobre una matriz pueden generarse, además, mediante la adición de nucleótidos únicos a oligonucleótidos existentes sobre una matriz, por ejemplo, mediante el uso de polimerasas que funcionan de una manera independiente del molde. Pueden añadirse nucleótidos únicos a los oligonucleótidos existentes en un gradiente de concentración, de esta manera se generan las sondas con longitud variable, en dependencia de la ubicación de las sondas sobre la matriz.

(iii) Elementos

Un "elemento" es una entidad que actúa como soporte o depósito para varias entidades moleculares usadas en el análisis de muestras. En algunas modalidades, algunos o todos los elementos de una matriz se funcionalizan para la captura de analitos. En algunas modalidades, los elementos funcionalizados incluyen una o más sonda(s) de captura. Los ejemplos de elementos incluyen, pero no se limitan a, una perla, un punto de cualquier geometría bi- o tridimensional (por ejemplo, un punto de chorro de tinta, un punto enmascarado, un cuadrado en una rejilla), un pocillo, y una almohadilla de hidrogel. En algunas modalidades, los elementos se unen o se fijan directa o indirectamente a un sustrato. En algunas modalidades, los elementos no se unen o se fijan directa o indirectamente a un sustrato, sino que, por ejemplo, se disponen dentro de un espacio tridimensional cerrado o parcialmente cerrado (por ejemplo, pocillos o hendiduras).

Además de los anteriores, puede usarse una amplia variedad de otros elementos para formar las matrices descritas en la presente descripción. Por ejemplo, en algunas modalidades, pueden usarse elementos que se forman a partir de polímeros y/o biopolímeros que se imprimen por chorro, se serigrafían o se depositan electrostáticamente sobre un sustrato para formar matrices. La impresión por chorro de biopolímeros se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2014/085725. La impresión por chorro de polímeros se describe, por ejemplo, en de Gans y otros, *Adv Mater.* 16(3): 203-213 (2004). Los métodos para la deposición electrostática de polímeros y biopolímeros se describen, por ejemplo, en Hoyer y otros, *Anal. Chem.* 68(21): 3840-3844 (1996).

Como otro ejemplo, en algunas modalidades, los elementos se forman por micropartículas o nanopartículas metálicas. Los métodos adecuados para depositar tales partículas para formar matrices se describen, por ejemplo, en Lee y otros, *Beilstein J. Nanotechnol.* 8: 1049-1055 (2017).

Como un ejemplo adicional, en algunas modalidades, los elementos se forman mediante partículas magnéticas que se ensamblan sobre un sustrato. Ejemplos de tales partículas y métodos para ensamblar matrices se describen en Ye y otros, *Scientific Reports* 6: 23145 (2016).

Como otro ejemplo, en algunas modalidades, los elementos corresponden a regiones de un sustrato en las que se han incorporado una o más marcas ópticas, y/o que se han alterado mediante un proceso tal como fotoblanqueo permanente. Los sustratos adecuados para implementar elementos de esta manera incluyen una amplia variedad de

polímeros, por ejemplo. Los métodos para formar tales elementos se describen, por ejemplo, en Moshrefzadeh y otros, *Appl. Phys. Lett.* 62: 16 (1993).

Como otro ejemplo más, en algunas modalidades, los elementos pueden corresponder a partículas coloidales ensambladas (por ejemplo, mediante autoensamble) para formar una matriz. Las partículas coloidales adecuadas se describen, por ejemplo, en Sharma, *Resonance* 23(3): 263-275 (2018).

Como un ejemplo adicional, en algunas modalidades, los elementos pueden formarse mediante fotopolimerización de matriz de puntos de una solución de monómero sobre un sustrato. En particular, la polimerización de dos fotones y tres fotones puede usarse para fabricar elementos de dimensiones relativamente pequeñas (por ejemplo, submicrónicas). Los métodos adecuados para preparar elementos sobre un sustrato de esta manera se describen, por ejemplo, en Nguyen y otros, *Materials Today* 20(6): 314-322 (2017).

En algunas modalidades, los elementos se unen o se fijan directa o indirectamente a un sustrato que es permeable a los líquidos. En algunas modalidades, los elementos se unen o se fijan directa o indirectamente a un sustrato que es biocompatible. En algunas modalidades, los elementos se unen o se fijan directa o indirectamente a un sustrato que es un hidrogel.

(e) Captura de analito

En esta sección, se describen aspectos generales de los métodos y sistemas para capturar analitos. Las etapas individuales del método y los elementos del sistema pueden presentarse en combinación en muchas modalidades diferentes; las combinaciones específicas descritas en la presente descripción no limitan de ninguna manera otras combinaciones de etapas o elementos.

(i) Condiciones de captura

Generalmente, los analitos pueden capturarse cuando se pone en contacto una muestra biológica con un sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, sustrato con sondas de captura incorporadas, colocadas, impresas sobre el sustrato o un sustrato con elementos (por ejemplo, perlas, pocillos) que comprenden sondas de captura).

Como se usa en la presente, "contacto", "contactado" y/o "poner en contacto", una muestra biológica con un sustrato se refiere a cualquier contacto (por ejemplo, directo o indirecto) de manera que las sondas de captura puedan interactuar (por ejemplo, capturar) con analitos de la muestra biológica. Por ejemplo, un sustrato puede estar cerca o adyacente a la muestra biológica sin contacto físico directo, pero capaz de capturar analitos de la muestra biológica. En algunas modalidades una muestra biológica está en contacto físico directo con un sustrato. En algunas modalidades, una muestra biológica está en contacto físico indirecto con un sustrato. Por ejemplo, una capa líquida puede estar entre la muestra biológica y el sustrato. En algunas modalidades, los analitos difunden a través de una capa líquida. En algunas modalidades, las sondas de captura difunden a través de una capa líquida. En algunas modalidades, los reactivos pueden suministrarse mediante una capa líquida entre una muestra biológica y un sustrato. En algunas modalidades, el contacto físico indirecto puede incluir un segundo sustrato (por ejemplo, un hidrogel, una película, una membrana porosa) entre la muestra biológica y el primer sustrato que comprende sondas de captura. En algunas modalidades, los reactivos pueden suministrarse por un segundo sustrato a una muestra biológica.

En algunas modalidades, un agente de inmovilización de células puede usarse para entrar en contacto con una muestra biológica con un sustrato (por ejemplo, al inmovilizar una muestra no agregada o desagregada en una matriz con código de barras espacial antes de la captura de analito). Un "agente de inmovilización de células" como se usa en la presente descripción puede referirse a un agente (por ejemplo, un anticuerpo), unido a un sustrato, que puede unirse a un marcador de superficie celular. Los ejemplos no limitantes de un marcador de superficie celular incluyen CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, CD20, CD11c, CD14, CD33, CD66b, CD34, CD41, CD61, CD235a, CD146 y molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM). Un agente de inmovilización de células puede incluir cualquier sonda o componente que puede unirse a (por ejemplo, inmovilizar) una célula o tejido cuando está sobre un sustrato. Un agente de inmovilización de células unido a la superficie de un sustrato puede usarse para unir una célula que tiene un marcador de superficie celular. El marcador de superficie celular puede ser un marcador de superficie celular ubicua, en donde el propósito del agente de inmovilización de células es capturar un alto porcentaje de células dentro de la muestra. El marcador de superficie celular puede ser un marcador de superficie celular específico, o que se expresa más raramente, en donde el propósito del agente de inmovilización de células es capturar una población de células específica que expresa el marcador de superficie celular diana. En consecuencia, puede usarse un agente de inmovilización de células para capturar selectivamente una célula que expresa el marcador de superficie celular diana de una población de células que no tienen el mismo marcador de superficie celular.

Las sondas de captura sobre un sustrato (o en un elemento sobre el sustrato) pueden interactuar con los analitos liberados a través de un dominio de captura, descrito en otra parte, para capturar los analitos. En algunas modalidades, se realizan ciertas etapas para mejorar la transferencia o captura de los analitos hacia las sondas de captura de la matriz. Ejemplos de tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, condiciones de ajuste para poner en contacto el sustrato con una muestra biológica (por ejemplo, tiempo, temperatura, orientación, niveles de pH, tratamiento previo

de muestras biológicas, etc.), usar la fuerza para transportar analitos (por ejemplo, electroforética, centrífuga, mecánico, etc.), realizar reacciones de amplificación para aumentar la cantidad de analitos biológicos (por ejemplo, amplificación por PCR, amplificación in situ, amplificación clonal), y/o usar sondas marcadas para detectar amplicones y códigos de barras.

En algunas modalidades, una matriz se adapta para facilitar la migración de analitos biológicos. Los ejemplos no limitantes de adaptación de una matriz para facilitar la migración de analitos biológicos incluyen matrices con sustratos que contienen nanoporos, nanopocillos y/o canales microfluídicos; matrices con membranas porosas; y matrices con sustratos que están hechos de hidrogel. En algunos casos, el sustrato de la matriz es permeable a los líquidos. En algunos casos, la matriz es un cubreobjetos o portaobjetos que incluye nanopocillos o patrones (por ejemplo, mediante fabricación). En algunos casos donde el sustrato incluye nanoporos, nanopocillos y/o canales microfluídicos, estas estructuras pueden facilitar la exposición de la muestra biológica a reactivos (por ejemplo, reactivos para la permeabilización, captura de analito biológico y/o una reacción de extensión de ácido nucleico), para aumentar de esta manera la eficiencia de captura de analitos en comparación con un sustrato que carece de tales características.

En algunas modalidades, la captura de analito se facilita mediante el tratamiento de una muestra biológica con reactivos de permeabilización. Si una muestra biológica no se permeabiliza lo suficiente, la cantidad del analito capturado sobre un sustrato puede ser demasiado baja para permitir un análisis adecuado. Por el contrario, si una muestra biológica es demasiado permeable, un analito puede difundirse lejos de su origen en la muestra biológica, de manera que se pierde la relación espacial relativa de los analitos dentro de la muestra biológica. Por tanto, es deseado un equilibrio entre permeabilizar la muestra biológica lo suficiente como para obtener una buena intensidad de señal, al tiempo que se mantiene aún la resolución espacial de la distribución del analito en la muestra. Los métodos para preparar muestras biológicas para facilitar la captura de analito se conocen en la técnica y pueden modificarse en dependencia de la muestra biológica y de cómo se prepara la muestra biológica (por ejemplo, congelada fresca, FFPE, etc.).

(ii) Métodos de captura pasivos

En algunas modalidades, los analitos pueden migrar desde una muestra a un sustrato. Los métodos para facilitar la migración pueden ser pasivos (por ejemplo, difusión) y/o activos (por ejemplo, migración electroforética de ácidos nucleicos). Los ejemplos no limitantes de migración pasiva pueden incluir difusión simple y presión osmótica creada por la rehidratación de objetos deshidratados.

La migración pasiva mediante difusión usa gradientes de concentración. La difusión es el movimiento de objetos no atados hacia el equilibrio. Por lo tanto, cuando hay una región de alta concentración del objeto y una región de baja concentración del objeto, el objeto (por ejemplo, una sonda de captura, un analito, etc.) se mueve a un área de menor concentración. En algunas modalidades, los analitos no atados se mueven hacia abajo en un gradiente de concentración.

En algunas modalidades, pueden añadirse diferentes reactivos a la muestra biológica, de manera que la muestra biológica se rehidrate mientras mejora la captura de los analitos. En algunas modalidades, la muestra biológica puede ponerse en contacto con una matriz de fragmentos como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la muestra biológica y/o la matriz reducida pueden rehidratarse con reactivos de permeabilización. En algunas modalidades, la muestra biológica y/o la matriz reducida pueden rehidratarse con una solución de tinción (por ejemplo, tinción con hematoxilina y eosina).

(iii) Medios / Cubiertas resistentes a la difusión

Para aumentar la eficiencia al fomentar la difusión de analitos hacia las sondas de captura con código de barras espacial, puede usarse un medio resistente a la difusión. En general, la difusión molecular de analitos biológicos ocurre en todas las direcciones, que incluye hacia las sondas de captura (es decir, hacia la matriz con código de barras espacial) y lejos de las sondas de captura (es decir, hacia la solución a granel). El aumento de la difusión hacia la matriz con código de barras espacial reduce la difusión del analito lejos de la matriz con código de barras espacial y aumenta la eficiencia de captura de las sondas de captura.

En algunas modalidades, una muestra biológica se coloca sobre la parte superior de un sustrato con código de barras espacial y un medio resistente a la difusión se coloca sobre la parte superior de la muestra biológica. Por ejemplo, el medio resistente a la difusión puede colocarse sobre una matriz que se ha colocado en contacto con una muestra biológica. En algunas modalidades, el medio resistente a la difusión y la matriz con código de barras espacial son el mismo componente. Por ejemplo, el medio resistente a la difusión puede contener sondas de captura con código de barras espacial dentro o sobre el medio resistente a la difusión (por ejemplo, cubreobjetos, portaobjetos, hidrogel o membrana). En algunas modalidades, una muestra se coloca sobre un sustrato y un medio resistente a la difusión se coloca en la parte superior de la muestra biológica. Adicionalmente, una matriz de sondas de captura con código de barras espacial puede colocarse muy cerca sobre un medio resistente a la difusión. Por ejemplo, un medio resistente a la difusión puede intercalarse entre una matriz con código de barras espacial y una muestra en un sustrato. En

algunas modalidades, un medio resistente a la difusión se dispone o se aplica sobre una muestra. En otras modalidades, un medio resistente a la difusión se coloca cerca de una muestra.

En general, un medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido por limitar la difusividad de los analitos biológicos. Por ejemplo, un medio resistente a la difusión puede ser una cubierta sólida (por ejemplo, un cubreobjetos o un portaobjetos de vidrio). En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede fabricarse de vidrio, silicio, papel, monolitos de polímero de hidrogel u otro material. En algunas modalidades, el portaobjetos de vidrio puede ser un portaobjetos de vidrio acrilado. En algunas modalidades, el medio resistente a la difusión es una membrana porosa. En algunas modalidades, el material puede ser naturalmente poroso. En algunas modalidades, el material puede tener poros o pocillos grabados en material sólido. En algunas modalidades, el volumen de los poros puede manipularse para minimizar la pérdida de analitos diana. En algunas modalidades, la composición química de la membrana puede manipularse para minimizar la pérdida de analitos diana. En algunas modalidades, el medio resistente a la difusión (por ejemplo, hidrogel) se une de manera covalente a un sustrato (por ejemplo, portaobjetos de vidrio). En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido por limitar la difusividad de los transcritos de poli(A). En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido por limitar la difusividad de las proteínas. En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede ser cualquier material conocido para limitar la difusividad de los constituyentes macromoleculares.

En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión incluye uno o más medios resistentes a la difusión. Por ejemplo, uno o más medios resistentes a la difusión pueden combinarse de diversas maneras previo a colocar el medio en contacto con una muestra biológica que incluye, sin limitación, recubrimiento, estratificación o aplicación de puntos. Como otro ejemplo, un hidrogel puede colocarse sobre una muestra biológica seguida de la colocación de una cubierta (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) sobre el hidrogel.

En algunas modalidades, se aplica una fuerza (por ejemplo, presión hidrodinámica, vibración ultrasónica, contrastes de solutos, radiación con microondas, circulación vascular u otras fuerzas eléctricas, mecánicas, magnéticas, centrífugas y/o térmicas) para controlar la difusión y mejorar la captura de analito. En algunas modalidades, una o más fuerzas y uno o más medios resistentes a la difusión se usan para controlar la difusión y mejorar la captura. Por ejemplo, una fuerza centrífuga y un portaobjetos de vidrio pueden usarse simultáneamente. Cualquiera de una variedad de combinaciones de una fuerza y un medio resistente a la difusión puede usarse para controlar o mitigar la difusión y mejorar la captura de analito.

En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión, junto con la matriz con código de barras espacial y la muestra, se sumerge en una solución a granel. En algunas modalidades, una solución a granel incluye reactivos de permeabilización. En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión incluye al menos un reactivo de permeabilización. En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión (es decir, hidrogel) se empapa en reactivos de permeabilización antes de poner en contacto el medio resistente a la difusión con la muestra. En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede incluir pocillos (por ejemplo, micro, nano o picopocillos) que contienen un tampón o reactivos de permeabilización. En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede incluir reactivos de permeabilización. En algunas modalidades, un medio resistente a la difusión puede contener reactivos o monómeros secos para suministrar reactivos de permeabilización cuando el medio resistente a la difusión se aplica a una muestra biológica. En algunas modalidades, se añade un medio resistente a la difusión al conjunto de matriz con código de barras espacial y muestra antes de que el conjunto se sumerja en una solución a granel. En algunas modalidades, se añade un medio resistente a la difusión al conjunto de matriz con código de barras espacial y muestra después de que la muestra se haya expuesto a reactivos de permeabilización. En algunas modalidades, los reactivos de permeabilización se hacen fluir a través de una cámara o canal microfluídico sobre el medio resistente a la difusión. En algunas modalidades, el flujo controla el acceso de la muestra a los reactivos de permeabilización. En algunas modalidades, los analitos diana se difunden fuera de la muestra y hacia una solución a granel y se incorporan en un medio resistente a la difusión incorporado en la sonda de captura con código de barras espacial. En algunas modalidades, se intercala una solución libre entre la muestra biológica y un medio resistente a la difusión.

(iv) Métodos de captura activa

En algunos de los métodos descritos en la presente descripción, un analito en una muestra biológica (por ejemplo, en una célula o sección de tejido) puede transportarse (por ejemplo, de manera pasiva o activa) a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura fija a un sustrato (por ejemplo, un sustrato o perla)).

Por ejemplo, los analitos pueden transportarse a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada) mediante el uso de un campo eléctrico (por ejemplo, mediante el uso de electroforesis), presión, flujo de fluido, gravedad, temperatura y/o un campo magnético. Por ejemplo, los analitos pueden transportarse a través de, por ejemplo, un gel (por ejemplo, hidrogel), un fluido, o una célula permeabilizada, a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada) mediante el uso de un gradiente de presión, un gradiente de concentración química, un gradiente de temperatura, y/o un gradiente de pH. Por ejemplo, los analitos pueden transportarse a través de un gel (por ejemplo, hidrogel), un fluido, o una célula permeabilizada, a una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura inmovilizada).

En algunos ejemplos, puede aplicarse un campo electroforético a los analitos para facilitar la migración de los analitos hacia una sonda de captura. En algunos ejemplos, una muestra que contiene analitos entra en contacto con un sustrato que tiene sondas de captura fijadas sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos, un cubreobjetos o una perla), y se aplica una corriente eléctrica para promover la migración direccional de analitos cargados hacia las sondas de captura fijadas sobre un sustrato. Puede usarse un conjunto de electroforesis (por ejemplo, una cámara electroforética), donde una muestra biológica está en contacto con un cátodo y las sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura fijadas sobre un sustrato), y donde las sondas de captura están en contacto con la muestra biológica y un ánodo, para aplicar la corriente.

En algunas modalidades, los métodos que utilizan un método de captura activo pueden emplear un sustrato conductor (por ejemplo, cualquiera de los sustratos conductores descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, un sustrato conductor incluye papel, una película de hidrogel, o un portaobjetos de vidrio que tiene un recubrimiento conductor. En algunas modalidades, un sustrato conductor (por ejemplo, cualquiera de los sustratos conductores descritos en la presente descripción) incluye una o más sondas de captura.

Los ejemplos no limitantes de soluciones de permeabilización incluyen enzimas (por ejemplo, proteinasa K, pepsina y colagenasa), detergentes (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), polietilenglicol terc-octilfenil éter, polisorbato 80 y polisorbato 20), inhibidores de ribonucleasa, tampones optimizados para electroforesis, tampones optimizados para permeabilización, tampones optimizados para hibridación, o sus combinaciones. Los reactivos de permeabilización también pueden incluir, pero no se limitan a, un reactivo de permeabilización seco, un tampón de permeabilización, un tampón sin un reactivo de permeabilización, un gel de permeabilización y una solución de permeabilización. En algunos ejemplos, las muestras biológicas (por ejemplo, muestras de tejido) pueden permeabilizarse primero y luego someterse a electroforesis.

En algunas modalidades, pueden colocarse 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más muestras biológicas en un mismo sustrato y someterse a electroforesis simultáneamente. En algunas modalidades, pueden colocarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustratos superiores por encima de un mismo sustrato inferior que contiene una o más muestras para someter simultáneamente una o más muestras a electroforesis. En algunas modalidades, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustratos superiores pueden colocarse perpendicularmente (por ejemplo, a aproximadamente 90 grados) por encima de un mismo sustrato inferior que contiene una o más muestras para someter simultáneamente una o más muestras a electroforesis. En algunas modalidades, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustratos superiores pueden colocarse en una orientación paralela por encima de un mismo sustrato inferior que contiene una o más muestras biológicas para someter simultáneamente una o más muestras a electroforesis. En algunas modalidades, una configuración de sustratos superiores puede disponerse sobre un mismo sustrato inferior que contiene una o más muestras biológicas para someter simultáneamente una o más muestras a electroforesis. En algunas modalidades, una primera configuración de sustratos superiores puede disponerse por encima de una segunda matriz de sustratos inferiores que contienen una o más muestras biológicas para someter simultáneamente una o más muestras biológicas a electroforesis. En algunas modalidades, someter simultáneamente dos o más muestras biológicas en un mismo sustrato a electroforesis puede proporcionar la ventaja de un flujo de trabajo más efectivo. En algunas modalidades, uno o más de los sustratos superiores pueden contener la muestra biológica.

En algunas modalidades, los métodos que utilizan un método de captura activo pueden incluir una o más soluciones entre la muestra biológica y el sustrato (por ejemplo, un sustrato que incluye sondas de captura). En algunas modalidades, una o más soluciones entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un tampón de permeabilización (por ejemplo, cualquiera de los tampones de permeabilización descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, una o más soluciones entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un tampón de electroforesis.

En algunas modalidades, la captura activa de analitos puede incluir uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura. En algunas modalidades, el uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un papel o una membrana de transferencia. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un gel que contiene una o más soluciones. Por ejemplo, de manera no limitante, el gel puede ser un gel SDS-PAGE. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden contener un tampón de permeabilización. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden contener un tampón de electroforesis. En algunas modalidades, la captura activa de analitos puede incluir una o más soluciones y uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura.

En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, una matriz) pueden actuar como un filtro para separar analitos (por ejemplo, analitos de interés) de otras moléculas o analitos presentes en la muestra biológica. En algunas modalidades, los analitos (por ejemplo, analitos de interés) son transcritos de ARN. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden actuar como un filtro para separar transcritos de ARN de otras moléculas (por ejemplo, analitos) tales como proteínas, lípidos y/u otros ácidos nucleicos. En algunas

modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden actuar como un filtro para separar los analitos y otras moléculas en base a las propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, de manera no limitante, los analitos pueden separarse en propiedades tales como carga, tamaño (por ejemplo, longitud, radio de giro, diámetros efectivos, etc.), hidrofobicidad, hidrofiliicidad, unión molecular (por ejemplo, inmunoafinidad) y sus combinaciones. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden separar los analitos de otras moléculas para reducir la unión inespecífica cerca de las sondas de captura y, por lo tanto, mejorar la unión entre los analitos y las sondas de captura, lo que mejora así el rendimiento posterior del ensayo.

En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden actuar como matrices de tamizado molecular para la separación de analitos electroforéticos. Por ejemplo, de una manera no limitante, la separación de analitos puede ocurrir en base a propiedades fisicoquímicas tales como carga, tamaño (por ejemplo, longitud, radio de giro, y diámetros efectivos, etc.), movilidad electroforética, potencial zeta, punto isoelectrico, hidrofobicidad, hidrofiliicidad, unión molecular (por ejemplo, inmunoafinidad), y sus combinaciones. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden ser de un tamaño de los poros uniforme. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden tener discontinuidades en los tamaños de los poros, como se usa generalmente en diferentes esquemas de electroforesis en gel. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden tener gradientes en tamaños de los poros. Por ejemplo, uno o más materiales porosos (por ejemplo, un hidrogel) pueden tener un gradiente de tamaños de los poros de manera que el gradiente separe los analitos a medida que los analitos migran al sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, una matriz).

En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden separar los analitos en base a la longitud. Por ejemplo, los analitos más cortos tendrán una mayor movilidad electroforética y, por lo tanto, migrarán más rápido hacia las sondas de captura con relación a los analitos más largos en una configuración electroforética. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura separan los analitos en base a la longitud, de manera que solo los analitos más cortos pueden migrar a través de uno o más materiales porosos para alcanzar las sondas de captura, mientras que los analitos más largos no pueden alcanzar las sondas de captura.

En algunas modalidades, pueden capturarse subconjuntos específicos de analitos (por ejemplo, un subconjunto de transcritos) al aplicar un campo electroforético durante una cierta cantidad de tiempo. En algunas modalidades, pueden capturarse subconjuntos específicos de analitos (por ejemplo, un subconjunto de transcritos) mediante la selección de diferentes materiales porosos (por ejemplo, materiales porosos con diferentes composiciones) entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura. En algunas modalidades, pueden capturarse subconjuntos específicos de analitos (por ejemplo, un subconjunto de transcritos) al aplicar un campo electroforético durante una cierta cantidad de tiempo y seleccionar diferentes materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, una matriz).

En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden tener discontinuidades en los tamaños de los poros que pueden provocar un aumento en la concentración de los analitos que migran (por ejemplo, "apilamiento"). Por ejemplo, uno o más materiales porosos (por ejemplo, un hidrogel) entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden tener discontinuidades en los tamaños de los poros que pueden provocar un aumento en la concentración de los analitos cerca de las sondas de captura lo que resulta en una cinética de unión favorable y un aumento de la sensibilidad. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden tener discontinuidades en los tamaños de los poros que mejoran la separación entre analitos que migran de diferentes tamaños y/o longitudes. En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un primer material poroso y un segundo material poroso, con el primer material poroso que tiene un tamaño de los poros mayor que el segundo material poroso. En algunas modalidades, el primer material poroso se localiza en la superficie, o cerca de la superficie, de la muestra biológica. En algunas modalidades, el segundo material poroso (por ejemplo, el segundo material poroso con un tamaño de los poros menor que el primer material poroso) puede colocarse sobre la superficie, o cerca de la superficie, del primer material poroso. En algunas modalidades, a medida que los analitos migran (por ejemplo, migran a través de la electroforesis) desde la muestra biológica a través del primer material poroso y el segundo material poroso secuencialmente, los analitos que migran pueden recogerse (por ejemplo, "apilamiento") en la interfaz entre el primer material poroso y el segundo material poroso.

En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un gradiente en los tamaños de los poros para el apilamiento continuo a medida que los analitos migran a través de la disminución de los tamaños de los poros (por ejemplo, la disminución del diámetro de los poros). En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un gradiente en los tamaños de los poros de manera que los poros disminuyen de diámetro a medida que los analitos migran desde la muestra biológica al sustrato que incluye sondas de captura. En algunas modalidades, el gradiente de tamaño de los poros puede aumentar la resolución entre analitos de diferentes

tamaños. En algunas modalidades, el gradiente de tamaño de los poros puede aumentar la concentración de los analitos cerca de las sondas de captura. En algunas modalidades, el gradiente de tamaño de los poros puede reducir continuamente la velocidad a la que los analitos migran y recolectan (por ejemplo, "apilamiento") a medida que los analitos migran a través del gradiente de disminución de los tamaños de los poros (por ejemplo, disminución del diámetro de los poros).

En algunas modalidades, uno o más materiales porosos entre la muestra biológica y el sustrato que incluye sondas de captura pueden incluir un gel gradiente para el apilamiento continuo a medida que los analitos migran a través de la disminución de los tamaños de los poros (por ejemplo, la disminución del diámetro de los poros) del gel gradiente. En algunas modalidades, el gel gradiente puede tener poros con un diámetro decreciente a medida que los analitos migran hacia las sondas de captura. En algunas modalidades, el gel gradiente puede aumentar la resolución de separación entre analitos de diferentes tamaños. En algunas modalidades, el gel gradiente puede aumentar la concentración de analitos cerca de las sondas de captura. En algunas modalidades, el gel gradiente puede reducir continuamente la velocidad a la que los analitos migran y recolectan (por ejemplo, "apilamiento") a medida que los analitos migran a través del gel gradiente de tamaños de los poros decrecientes (por ejemplo, decreciente en diámetro).

En algunas modalidades, una muestra biológica puede colocarse en un primer soporte del sustrato (por ejemplo, un soporte del sustrato descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, una matriz de sondas de captura con código de barras espacial (por ejemplo, sondas de captura, matriz con código de barras) puede colocarse en un segundo soporte del sustrato (por ejemplo, un soporte del sustrato descrito en la presente descripción). En algunas modalidades, una muestra biológica puede colocarse en un primer soporte del sustrato que también contiene sondas de captura. En algunas modalidades, el primer soporte del sustrato, el segundo soporte del sustrato, o ambos pueden ser conductores (por ejemplo, cualquiera de los sustratos conductores descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, el primer soporte del sustrato que incluye la muestra biológica, el segundo soporte del sustrato que incluye sondas de captura, o ambas, pueden ponerse en contacto con reactivos de permeabilización (por ejemplo, un tampón de permeabilización) y los analitos pueden migrar desde la muestra biológica hacia la matriz con código de barras mediante el uso de un campo eléctrico.

En algunas modalidades, la electroforesis puede aplicarse a una muestra biológica en una matriz con código de barras mientras está en contacto con un tampón de permeabilización. En algunas modalidades, la electroforesis puede aplicarse a una muestra biológica en una matriz con código de barras mientras está en contacto con un tampón de electroforesis (por ejemplo, un tampón que carece de reactivos de permeabilización). En algunas modalidades, el tampón de permeabilización puede reemplazarse con un tampón de electroforesis después de una cantidad de tiempo deseada. En algunas modalidades, la electroforesis puede aplicarse simultáneamente con el tampón de permeabilización o el tampón de electroforesis. En algunas modalidades, la electroforesis puede aplicarse después de una cantidad deseada de tiempo de contacto entre la muestra biológica y el tampón de permeabilización o tampón de electroforesis.

En algunas modalidades, la muestra biológica puede colocarse sobre un sustrato (por ejemplo, una membrana porosa, un hidrogel, papel, etc.). En algunas modalidades, la muestra biológica colocada sobre el sustrato puede tener un espacio (por ejemplo, un espacio) entre el sustrato y el soporte del sustrato (por ejemplo, soporte del sustrato conductor). En algunas modalidades, la matriz con código de barras puede colocarse sobre un sustrato (por ejemplo, una membrana porosa, un hidrogel, papel, etc.). En algunas modalidades, la matriz con código de barras puede tener un espacio entre el sustrato y el soporte del sustrato (por ejemplo, el soporte del sustrato conductor). En algunas modalidades, la matriz con código de barras puede colocarse cerca de la muestra biológica o a una distancia deseada de la muestra biológica. En algunas modalidades, puede usarse un depósito tampón entre el soporte del sustrato (por ejemplo, el soporte del sustrato conductor) y la matriz con código de barras, la muestra biológica o ambas. Esta configuración permite que los analitos se migren a una matriz con código de barras mientras no están cerca de los electrodos (por ejemplo, el soporte del sustrato conductor), lo que resulta en una electroforesis más estable.

En algunas modalidades, puede usarse una combinación de al menos dos tampones con diferentes composiciones iónicas para migrar diferencialmente analitos en base a su movilidad iónica (por ejemplo, isotacoforesis (ITP)). Por ejemplo, el uso de dos o más tampones con diferentes composiciones iónicas puede aumentar la concentración de analitos antes de entrar en contacto con una matriz con código de barras. La isotacoforesis incluye al menos dos tampones que contienen un contraión común (por ejemplo, iones que tienen un signo de carga diferente al de los analitos) y diferentes coiones (por ejemplo, iones que tienen el mismo signo de carga que los analitos) (Smejkal P., y otros, Microfluidic isotachophoresis: A review, Electrophoresis, 34, 11 1493-1509, (2013)). En algunas modalidades, un tampón puede contener un coión con una movilidad iónica más alta (por ejemplo, velocidad a la que viajan a través de la solución en un campo eléctrico) que los analitos (por ejemplo, el tampón "conductor"). En algunas modalidades, un segundo tampón puede contener un coión con una movilidad iónica más baja que los analitos (por ejemplo, el tampón "de arrastre"). En algunas modalidades, un tercer tampón puede contener un coión con una movilidad iónica que está entre la movilidad eléctrica de los analitos. En algunas modalidades, una muestra biológica puede colocarse en un primer soporte del sustrato (por ejemplo, un soporte del sustrato conductor) y la matriz con código de barras puede colocarse en un segundo soporte del sustrato (por ejemplo, un segundo soporte del sustrato conductor) y ponerse en contacto con un tampón de permeabilización y los analitos pueden migrar lejos de la muestra biológica y

hacia la matriz con código de barras mediante el uso de un campo eléctrico. A medida que el campo eléctrico se aplica a la muestra biológica, los analitos pueden concentrarse en el tampón a medida que se migran hacia las sondas de captura. En algunas modalidades, la isotacoforesis puede usarse con separaciones basadas en gel (por ejemplo, cualquiera de las separaciones basadas en gel descritas en la presente descripción).

En algunas modalidades, un tampón de permeabilización puede aplicarse a una región de interés (por ejemplo, región de interés como se describe en la presente descripción) en una muestra biológica. En algunas modalidades, los reactivos de permeabilización (por ejemplo, un hidrogel que contiene reactivos de permeabilización) pueden aplicarse a una región de interés en una muestra biológica. Por ejemplo, una región de interés puede ser una región que tiene un área más pequeña con relación al área total de la muestra biológica. En algunas modalidades, el tampón de permeabilización o los reactivos de permeabilización pueden ponerse en contacto con la muestra biológica y un sustrato que incluye sondas de captura (por ejemplo, una matriz). En algunas modalidades, la muestra biológica puede tener más de una región de interés (por ejemplo, dos, tres). En algunas modalidades, la muestra biológica, el sustrato que incluye sondas de captura, o ambas, puede colocarse en un soporte del sustrato conductor. En algunas modalidades, los analitos pueden liberarse desde la(s) región(es) de interés y migrar desde la muestra biológica hacia las sondas de captura con un campo eléctrico.

En algunas modalidades, la transferencia electroforética de analitos puede realizarse mientras se retienen las ubicaciones espaciales relativas de los analitos en una muestra biológica mientras se minimiza la difusión pasiva de un analito lejos de su ubicación en una muestra biológica. En algunas modalidades, un analito capturado por una sonda de captura (por ejemplo, sondas de captura en un sustrato) retienen la ubicación espacial del analito presente en la muestra biológica de la que se obtuvo (por ejemplo, la ubicación espacial del analito que se captura mediante una sonda de captura en un sustrato cuando el analito se migra activamente a la sonda de captura mediante transferencia electroforética puede ser más precisa o representativa de la ubicación espacial del analito en la muestra biológica que cuando el analito no se migra activamente a la sonda de captura). En algunas modalidades, el proceso de transporte y unión electroforéticos se describe por el número Damköhler (Da), que es una relación de velocidades de reacción y transporte de masa. La fracción de analitos unida y la forma de la muestra biológica dependerán de los parámetros en el Da . Los parámetros incluyen la velocidad de electromigración U_e (en dependencia de la movilidad electroforética del analito μ_e y la resistencia del campo eléctrico E), la densidad de las sondas de captura (por ejemplo, oligonucleótidos con código de barras) p_0 , la tasa de unión entre las sondas (por ejemplo, oligonucleótidos con código de barras) y los analitos k_{on} , y el grosor del área de captura L .

$$Da \sim \frac{k_{on} p_0 L}{\mu_e E}$$

La migración rápida (por ejemplo, electromigración) puede reducir el tiempo de ensayo y puede minimizar la difusión molecular de analitos.

En algunas modalidades, la transferencia electroforética de analitos puede realizarse mientras se mantiene la alineación espacial relativa de los analitos en la muestra. Como tal, un analito capturado por las sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura en un sustrato) retiene la información espacial de la célula o la muestra biológica de la que se obtuvo. La aplicación de un campo electroforético a analitos también puede dar como resultado un aumento de la temperatura (por ejemplo, calor). En algunas modalidades, el aumento de temperatura (por ejemplo, calor) puede facilitar la migración de los analitos hacia una sonda de captura.

En algunos ejemplos, se usa una matriz de microelectrodos direccionables espacialmente para la captura con limitaciones espaciales de al menos un analito de interés cargado por una sonda de captura. Por ejemplo, una matriz de microelectrodos que puede abordarse espacialmente puede permitir la aplicación discreta (por ejemplo, localizada) de un campo eléctrico en lugar de un campo eléctrico uniforme. La matriz de microelectrodos direccionables espacialmente puede abordarse independientemente. En algunas modalidades, el campo eléctrico puede aplicarse a una o más regiones de interés en una muestra biológica. Los electrodos pueden ser adyacentes entre sí o distantes entre sí. La matriz de microelectrodos puede configurarse para incluir una alta densidad de sitios discretos que tienen un área pequeña para aplicar un campo eléctrico para promover la migración de analito(s) cargado(s) de interés. Por ejemplo, la captura electroforética puede realizarse en una región de interés mediante el uso de una matriz de microelectrodos direccionables espacialmente.

Puede usarse una alta densidad de sitios discretos en una matriz de microelectrodos. La superficie puede incluir cualquier densidad adecuada de sitios discretos (por ejemplo, una densidad adecuada para procesar la muestra en el sustrato conductor en una cantidad de tiempo dada). En una modalidad, la superficie tiene una densidad de sitios discretos mayor que o igual a aproximadamente 500 sitios por 1 mm². En algunas modalidades, la superficie tiene una densidad de sitios discretos de aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1000, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000, aproximadamente 5000, aproximadamente 6000, aproximadamente 7000, aproximadamente 8000, aproximadamente 9000, aproximadamente 10 000, aproximadamente 20 000, aproximadamente 40 000,

aproximadamente 60 000, aproximadamente 80 000, aproximadamente 100 000 o aproximadamente 500 000 sitios por 1 mm². En algunas modalidades, la superficie tiene una densidad de sitios discretos de al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 600, al menos aproximadamente 700, al menos aproximadamente 800, al menos aproximadamente 900, al menos aproximadamente 1000, al menos aproximadamente 2000, al menos aproximadamente 3000, al menos aproximadamente 4000, al menos aproximadamente 5000, al menos aproximadamente 6000, al menos aproximadamente 7000, al menos aproximadamente 8000, al menos aproximadamente 9000, al menos aproximadamente 10 000, al menos aproximadamente 20 000, al menos aproximadamente 40 000, al menos aproximadamente 60 000, al menos aproximadamente 80 000, al menos aproximadamente 100 000, o al menos aproximadamente 500 000 sitios por 1 mm².

(v) Análisis dirigido

En algunos aspectos, las matrices incluyen una pluralidad de sondas de captura que se unen a una o más dianas biológicas específicas en una muestra. Las sondas de captura pueden unirse directa o indirectamente a un sustrato. La sonda de captura puede ser o incluir, por ejemplo, ADN o ARN. En algunos aspectos, las sondas de captura sobre una matriz pueden inmovilizarse, por ejemplo, unirse o enlazarse, a la matriz mediante el extremo 5' o 3', en dependencia de la matriz química de la matriz. En algunos aspectos, las sondas se unen a través de un enlace 3', para dejar de esta manera un extremo 5' libre. En algunos aspectos, las sondas se unen a través de un enlace 5', para dejar de esta manera un extremo 3' libre. En algunos aspectos, las sondas se inmovilizan indirectamente. Por ejemplo, una sonda puede unirse a una perla, cuya perla puede depositarse sobre un sustrato. Una sonda de captura como se describe en esta sección puede incluir cualquiera de los diversos componentes de una sonda de captura como se proporciona a lo largo de esta descripción (por ejemplo, códigos de barras espaciales, UMI, dominios funcionales, dominios de escisión, etc.).

En algunos aspectos, una sonda de captura o pluralidad de sondas de captura interactúan con un analito específico para una especie u organismo particular (por ejemplo, huésped u patógeno). En algunos aspectos, la sonda o pluralidad de sondas puede usarse para detectar una proteína o ácido nucleico viral, bacteriana o vegetal. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden usarse para detectar la presencia de un patógeno (por ejemplo, bacterias o virus) en la muestra biológica. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden usarse para detectar la expresión de un ácido nucleico particular asociado con un patógeno (por ejemplo, presencia de ARN ribosómico 16S o ARN del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en una muestra humana).

En algunos aspectos, el dominio de captura en la sonda de captura puede interactuar con uno o más analitos específicos (por ejemplo, un analito o un subconjunto de analitos del conjunto de analitos totales). El/los analito(s) específicos que se detectan pueden ser cualquiera de una variedad de moléculas biológicas que incluyen, pero no se limitan a, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, iones, moléculas pequeñas, dianas subcelulares o complejos multicomponentes que contienen cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, el/los analito(s) puede(n) localizarse en ubicación(ones) subcelular(es), incluidas, por ejemplo, orgánulos, por ejemplo, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, cloroplastos, vesículas endocíticas, vesículas exocíticas, vacuolas, lisosomas, etc. En algunas modalidades, el/los analito(s) puede(n) ser péptidos o proteínas, incluidos sin limitación, anticuerpos y enzimas.

En algunos aspectos, los analitos de una muestra biológica interactúan con una o más sondas de captura (por ejemplo, una o más sondas de captura inmovilizadas directa o indirectamente sobre un sustrato), y las sondas de captura interactúan con analitos específicos en la muestra biológica. En algunos aspectos, se permite que las sondas de captura interactúen con (por ejemplo, se hibriden con) analitos específicos, por ejemplo, en condiciones apropiadas donde las sondas de captura de oligonucleótidos pueden hibridar con los ácidos nucleicos diana. En algunos aspectos, se eliminan los analitos que no se hibridaron para capturar sondas (por ejemplo, los analitos que no interactúan con los dominios de captura de las sondas de captura). En algunas modalidades, la eliminación de analitos que no interactuaron con una sonda de captura puede lograrse, por ejemplo, al lavar la muestra para eliminar tales analitos.

En algunos aspectos, una sonda de captura o pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura que interactúa con un analito o analitos presentes en una muestra biológica. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura que detecta la presencia o cantidad de nivel (por ejemplo, nivel de expresión) de un analito o analitos particulares de interés. El dominio de captura de una sonda de captura (inmovilizada directa o indirectamente sobre un sustrato) puede ser capaz de unirse selectivamente a un subtipo o subconjunto deseado de ácido nucleico. En algunos aspectos, por ejemplo, el dominio de captura se une a un subconjunto de ácidos nucleicos en un genoma o un subconjunto de ácidos nucleicos en un transcriptoma. En algunos aspectos, el/los analito(s) pueden incluir uno o más ácidos nucleicos. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden usarse para detectar la expresión de un transcrito particular (por ejemplo, un ARNm particular). En algunos aspectos, una sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden ser específicas para (por ejemplo, unirse a) un cambio individual en un ácido nucleico o proteína (por ejemplo, una mutación o polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)).

En algunos aspectos, la muestra biológica incluye un analito que es o incluye un ácido nucleico. El ácido nucleico puede ser ARN o ADN. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura detecta el número de copias de ADN de un conjunto particular de analitos o analitos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura descritas en la presente descripción pueden usarse para detectar el número de copias de ADN de ácidos nucleicos que comparten homología entre sí.

En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura que detecta la presencia o cantidad de nivel (por ejemplo, nivel de expresión) de uno o más transcritos de ARN (por ejemplo, transcritos de ARN específicos). En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura incluye un dominio de captura que detecta la presencia o cantidad (por ejemplo, nivel de expresión) de uno o más ARN no codificantes (por ejemplo, microARN, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), ARN de interferencia pequeño (ARNip) y ARN nucleolar pequeño (ARNnp). En algunos aspectos, la sonda o pluralidad de sondas incluye un dominio de captura que detecta la presencia o cantidad de nivel (por ejemplo, nivel de expresión) de una o más proteínas (por ejemplo, proteínas expresadas de un ácido nucleico de interés).

En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden ser específicas para una proteína particular. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden usarse para detectar la presencia de una proteína particular de interés. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden usarse para detectar la traducción de una proteína particular. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden interactuar específicamente con una región activa de una enzima, un dominio de unión de una inmunoglobulina, dominios definidos de proteínas, proteínas completas, péptidos sintéticos, péptidos con mutaciones introducidas, aptámero o cualquiera de sus combinaciones. En algunos aspectos, el/los analito(s) pueden incluir una o más proteínas. En algunos aspectos, el/los analito(s) pueden incluir uno o más ácidos nucleicos y una o más proteínas.

En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden usarse para detectar modificaciones postraduccionales particulares de una proteína particular. En tales modalidades, los agentes de captura de analito pueden ser específicos para los analitos de la superficie celular que tienen un estado dado de modificación postraducciona (por ejemplo, fosforilación, glucosilación, ubiquitinación, nitrosilación, metilación, acetilación o lipidación), de manera que un perfil del analito de la superficie celular puede incluir información de modificación postraducciona de uno o más analitos.

En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden ser específicas para un conjunto particular de ácidos nucleicos (por ejemplo, ácidos nucleicos que se asocian con una vía o vías celulares específicas). En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos es ADN. En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos es ARN. En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos tiene secuencias similares y/u homólogas. En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos codifica analitos que funcionan en una vía celular similar. En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos codifica analitos que se expresan en un cierto estado patológico (por ejemplo, cáncer, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson). En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos codifica analitos que se sobreexpresan en un cierto estado patológico. En algunos aspectos, el conjunto de ácidos nucleicos codifica analitos que están infraexpresados en un cierto estado patológico.

En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura pueden ser específicas para un ácido nucleico particular, o detección o expresión de un conjunto particular de proteínas (por ejemplo, en una vía celular similar). En algunos aspectos, el conjunto de proteínas tiene dominios funcionales similares. En algunos aspectos, el conjunto de proteínas funciona en una vía celular similar. En algunos aspectos, el conjunto de proteínas se expresa en un cierto estado patológico (por ejemplo, cáncer, enfermedad de Alzheimer o de Parkinson). En algunos aspectos, el conjunto de proteínas se sobreexpresa en un cierto estado patológico. En algunos aspectos, el conjunto de proteínas está infraexpresado en un cierto estado patológico.

En algunas modalidades, una sonda de captura incluye un dominio de captura que es capaz de unirse a más de un analito. En algunas modalidades, un dominio de captura puede unirse a uno o más analitos que son aproximadamente 80 % idénticos, aproximadamente 85 % idénticos, aproximadamente 90 % idénticos, aproximadamente 95 % idénticos, aproximadamente 96 % idénticos, aproximadamente 97 % idénticos, aproximadamente 98 % idénticos, aproximadamente 99 % idénticos, 100 % idénticos al analito diana. En algunos aspectos, la sonda de captura puede unirse a un analito que es aproximadamente 80 % idéntico, aproximadamente 85 % idéntico, aproximadamente 90 % idéntico, aproximadamente 95 % idéntico, aproximadamente 96 % idéntico, aproximadamente 97 % idéntico, aproximadamente 98 % idéntico o aproximadamente 99 % idéntico entre sí. En algunas modalidades, un dominio de captura puede unirse a una región conservada de uno o más analitos, en la que las regiones conservadas son aproximadamente 80 % idénticas, aproximadamente 85 % idénticas, aproximadamente 90 % idénticas, aproximadamente 95 % idénticas, aproximadamente 96 % idénticas, aproximadamente 97 % idénticas, aproximadamente 98 % idénticas, aproximadamente 99 % idénticas, 100 % idénticas al analito diana.

En algunos aspectos, una sonda de captura o pluralidad de sondas de captura interactúan con dos o más analitos (por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas) que no son similares en secuencia y/o no comparten un dominio conservado. En algunas modalidades, una sonda de captura incluye dos o más dominios de captura, cada uno de los cuales

interactúa con un analito diferente. En tales modalidades, los miembros de los dos o más dominios de captura pueden estar adyacentes entre sí en la sonda de captura y/o los miembros de los dos o más dominios de captura pueden separarse entre sí en la sonda de captura por uno o más dominios (por ejemplo, dominios de ácido nucleico). Por ejemplo, en algunos aspectos, los conjuntos de analitos que se detectan incluyen cambios mutacionales en los ácidos nucleicos o proteínas diana. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura detecta conjuntos de ácidos nucleicos o proteínas (por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas no homólogos) que se mutan individualmente durante un estado patógeno. En algunos aspectos, el estado patógeno es el cáncer.

En algunos aspectos, una sonda de captura o pluralidad de sondas de captura incluyen dominios de captura que pueden usarse para detectar analitos que se detectan típicamente mediante el uso de paneles de diagnóstico. En algunos aspectos, la sonda de captura o pluralidad de sondas de captura se usan para detectar cambios en uno o más analitos. En algunos aspectos, los cambios de analito incluyen uno o más de expresión aumentada de analito, expresión disminuida de analito, secuencias de ácidos nucleicos mutadas o cualquiera de sus combinaciones. En algunos aspectos, los cambios en los analitos se asocian con y/o conducen a la manifestación de un estado patógeno en un sujeto. En algunos aspectos, los cambios detectados se comparan con un analito o analitos de referencia.

(vi) Captura de polipéptido

En la presente descripción se describen métodos y materiales para identificar la ubicación de un polipéptido en una muestra biológica. En algunas modalidades, un analito (por ejemplo, un analito polipeptídico) puede capturarse directamente en un sustrato. Por ejemplo, los analitos polipeptídicos pueden capturarse por grupos aminos en un sustrato funcionalizado. En otros ejemplos, un analito (por ejemplo, un analito polipeptídico) puede capturarse a través de un resto de unión al analito directamente unido a un sustrato. En algunas modalidades, el sustrato puede estar poblado con restos fijadores de analito directamente unidos al sustrato, así como también sondas de captura con código de barras espacial unidas directamente al sustrato. En otras modalidades, un analito (por ejemplo, un analito polipeptídico) puede capturarse a través de un resto de unión al analito unido indirectamente a un sustrato. En un ejemplo, el sustrato puede rellenarse con sondas de captura que se unen a un agente de captura de analito, en donde el dominio de captura de analito del agente de captura de analito se une al dominio de captura de la sonda de captura y el resto de unión al analito se une al analito polipeptídico.

En algunas modalidades, un analito (por ejemplo, un analito polipeptídico) puede capturarse o inmovilizarse directamente sobre un sustrato. La inmovilización directa puede lograrse al acoplar covalentemente el analito polipeptídico al sustrato mediante enlaces amida entre el ácido carboxílico del residuo de aminoácido en extremo C y una superficie de sustrato funcionalizada. Por ejemplo, un sustrato (por ejemplo, un cubreobjetos o portaobjetos de vidrio) puede funcionalizarse a través de la aminosilanización con aminopropiltrietoxisilano. Las superficies del sustrato se someten además a incubación durante toda la noche con solución de polietilenglicol (PEG)-NHS, y los portaobjetos funcionalizados pueden almacenarse en un secador de vacío hasta su uso. Los grupos protectores de t-butiloxycarbonilo pueden eliminarse al incubar el sustrato con TFA al 90 % (v/v en agua) durante 5 horas antes del uso, para exponer así los grupos de amina libres para la inmovilización de péptidos. El sustrato funcionalizado resultante es estable a múltiples ciclos de degradación de Edman y etapas de lavado.

En algunas modalidades, los métodos para capturar polipéptidos en una muestra biológica incluyen proporcionar un sustrato donde un resto de unión al analito se inmoviliza directamente en el sustrato. En algunas modalidades, la inmovilización directa se logra mediante modificación química del sustrato y/o modificación química del resto de unión al analito. Por ejemplo, un sustrato puede prepararse con aminos libres en la superficie. Cuando se exponen a un resto de unión al analito con un ácido carboxílico libre en el residuo en extremo C, las aminos libres pueden formar enlaces amida con el ácido carboxílico al acoplar de esta manera covalentemente el resto de unión al analito al sustrato. Los sustratos y/o restos de unión al analito pueden modificarse de cualquier manera que facilite la unión covalente del resto de unión al analito al sustrato. Los ejemplos no limitantes de modificación química que pueden usarse para unir covalentemente el resto de unión al analito al sustrato incluyen en la presente descripción.

En algunas modalidades, los métodos para capturar polipéptidos analitos incluyen proporcionar un sustrato (por ejemplo, una matriz) donde el resto de unión al analito se une indirectamente al sustrato. Por ejemplo, un resto de unión al analito puede unirse indirectamente a un sustrato a través de un oligonucleótido (por ejemplo, un dominio con código de barras del agente de captura o un dominio con código de barras del agente de captura hibridado a una sonda de captura) u otro dominio capaz de unirse tanto al sustrato como al dominio de unión al analito. El dominio con código de barras del agente de captura se describe en otra parte en la presente descripción. El dominio con código de barras del agente de captura puede modificarse para incluir un dominio de escisión, que puede unirse a un sustrato mediante el uso de cualquiera de las químicas descritas en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio con código de barras del agente de captura puede incluir una secuencia de captura de analito como se describe en la presente descripción, en donde la secuencia de captura de analito puede hibridarse con el dominio de captura de una sonda de captura. En algunas modalidades, un sustrato (por ejemplo, una matriz) que contiene sondas de captura puede modificarse para capturar analitos polipeptídicos al hibridar la secuencia de captura de analito del agente de captura de analito al dominio de captura de una sonda de captura.

En algunas modalidades, los métodos para capturar analitos polipeptídicos incluyen proporcionar un sustrato (por ejemplo, una matriz) y proporcionar un agente de captura de analito a la muestra biológica. Por ejemplo, después de secar y fijar muestras de tejido seccionadas, las muestras de tejido pueden colocarse en un sustrato (por ejemplo, una matriz espacial), rehidratarse, bloquearse y permeabilizarse (por ejemplo, 3XSSC, BSA al 2 %, Tritón X al 0,1 %, 1 U/μl de inhibidor de ARNasa durante 10 min a 4 °C) antes de teñirse con anticuerpos primarios fluorescentes (1:100) y un grupo de agentes de captura de analito (en 3XSSC, BSA al 2 %, Tritón X al 0,1 %, 1 U/μl de inhibidor de ARNasa durante 30 min a 4 °C). La muestra biológica puede lavarse, cubrirse con cubreobjetos (en glicerol + inhibidor de ARNasa de 1 U/μl), obtener imágenes del analito detectado (por ejemplo, mediante el uso de un microscopio confocal u otro aparato capaz de detección fluorescente) y lavarse nuevamente. Los agentes de captura de analito unidos al analito pueden liberarse de la muestra biológica (por ejemplo, la muestra biológica puede tratarse con proteinasa, por ejemplo, proteinasa K) y migrar a la matriz espacial. Una secuencia de captura de analito del agente de captura de analito unido al analito puede capturarse mediante un dominio de captura de sonda de captura, y el dominio con código de barras del agente de captura puede extenderse para producir un agente de captura de analito etiquetado espacialmente. Los agentes de captura de analito etiquetados espacialmente pueden procesarse de acuerdo con los flujos de trabajo espaciales descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, los métodos para capturar polipéptidos analitos incluyen proporcionar sondas de bloqueo a agentes de captura de analito antes de introducir los agentes de captura de analito en una muestra biológica. En algunas modalidades, las sondas de bloqueo pueden proporcionarse alternativa o adicionalmente en cualquiera de los tampones de rehidratación o bloqueo descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de captura de analito del agente de captura de analito puede bloquearse antes de la unión al dominio de captura de la sonda de captura mediante el uso de una secuencia complementaria de la sonda de bloqueo a la secuencia de captura de analito. Bloquear el dominio con código de barras del agente de captura, particularmente el extremo 3' libre del dominio con código de barras del agente de captura (por ejemplo, secuencia de captura de analito), antes de poner en contacto los agentes de captura de analito con la muestra biológica y/o sustrato, puede evitar la unión de la secuencia de captura de analito de los dominios con código de barras del agente de captura, por ejemplo, evita la unión de una cola poli(A) al dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, el bloqueo del dominio de captura de analito del agente de captura de analito reduce la tinción de fondo inespecífica. En algunas modalidades, las sondas de bloqueo son reversibles, de manera que las sondas de bloqueo pueden retirarse de la secuencia de captura de analito durante o después del tiempo que los agentes de captura de analito se pongan en contacto con la muestra biológica. En algunas modalidades, la sonda de bloqueo puede eliminarse con el tratamiento con ARNasa (por ejemplo, tratamiento con ARNasa H).

En algunas modalidades, los métodos para capturar polipéptidos en una muestra biológica incluyen la transferencia activa (por ejemplo, electroforesis). Por ejemplo, la muestra biológica se coloca sobre un sustrato conductor y se pone en contacto con una matriz espacial que incluye uno o más restos de unión al analito. Un archivo eléctrico puede aplicarse al sustrato conductor para promover la migración de los polipéptidos hacia los restos de unión al analito, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, los métodos para identificar la ubicación espacial de un polipéptido en una muestra biológica incluyen determinar la secuencia de un polipéptido capturado. En algunas modalidades, la secuencia del polipéptido capturado se determina mediante la detección de residuos de aminoácidos marcados con una etiqueta detectable (por ejemplo, radiomarcación de un fluoróforo). Los ejemplos no limitantes de marcajes detectables que pueden usarse para marcar el polipéptido capturado incluyen fluoróforos y radioetiquetas. En algunas modalidades, los polipéptidos se marcan solo en residuos de aminoácidos específicos (por ejemplo, no todos los residuos de aminoácidos se marcan). En algunas modalidades, el polipéptido se marca antes de poner en contacto la muestra biológica con el sustrato. En algunas modalidades, un polipéptido capturado se marca con fluoróforos mediante el uso de esquemas de acoplamiento estándar (ver Hernández y otros, *New J. Chem.* 41:462-469 (2017)). Por ejemplo, los polipéptidos pueden marcarse mediante reacción con Atto647N-NHS, Atto647Niodoacetamida, TMR-NHS o JF549-NHS, según corresponda, para marcar lisinas (a través de NHS) o cisteínas (a través de yodoacetamida). Además, los sitios de fosforilación de serina o treonina pueden marcarse selectivamente mediante eliminación beta seguido de la adición de conjugados mediante tioles para sustituir los fluoróforos unidos a tiol en lugar de los fosfatos (ver Stevens y otros, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 15: 2157-2162 (2005)). El número de fluoróforos incorporados en un polipéptido es cualquier número que puede resolverse espectralmente. En algunos casos, se utilizan cuatro o más fluoróforos.

En algunas modalidades, un polipéptido capturado está radiomarcado. En algunas modalidades, los aminoácidos específicos pueden marcarse con un isótopo. Los ejemplos no limitantes de isótopos usados para marcar aminoácidos incluyen ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³²P y ¹²⁵I. En algunas modalidades, el isótopo se incorpora en el aminoácido seleccionado antes de su incorporación en un polipéptido. En algunas modalidades, el aminoácido radiomarcado puede incorporarse en el polipéptido después de la formación del polipéptido.

En algunas modalidades, la secuencia del polipéptido capturado se determina mediante el uso de la degradación de Edman (y en algunas modalidades rondas sucesivas de degradación de Edman). En tales casos, se captura un polipéptido, y la secuencia polipeptídica puede resolverse mediante la obtención de imágenes del sustrato después de rondas repetidas de degradación de Edman. Por ejemplo, se obtienen imágenes del sustrato después de cada reacción de Edman para capturar los marcajes detectables que se producen debido a la eliminación de aminoácidos

que son un subproducto de la reacción. La información obtenida por la degradación de Edman puede cumplirse para identificar un polipéptido. En algunas modalidades, se visualiza o se obtienen imágenes de la muestra biológica mediante el uso de microscopía de luz o fluorescencia.

5 (vii) Región de interés

Una muestra biológica puede tener regiones que muestran elemento(s) morfológico(s) que puede(n) indicar la presencia de enfermedad o el desarrollo de un fenotipo de enfermedad. Por ejemplo, los elementos morfológicos en un sitio específico dentro de una muestra de biopsia tumoral pueden indicar la agresividad, resistencia terapéutica, potencial metastásico, migración, etapa, diagnóstico y/o pronóstico de cáncer en un sujeto. Un cambio en los elementos morfológicos en un sitio específico dentro de una muestra de biopsia tumoral a menudo se correlaciona con un cambio en el nivel o la expresión de un analito en una célula dentro del sitio específico, que puede, a su vez, usarse para proporcionar información con respecto a la agresividad, resistencia terapéutica, potencial metastásico, migración, etapa, diagnóstico y/o pronóstico de cáncer en un sujeto. Una región o área dentro de una muestra biológica que se selecciona para un análisis específico (por ejemplo, una región en una muestra biológica que tiene elementos morfológicos de interés) se describe frecuentemente como “una región de interés”.

Una región de interés en una muestra biológica puede usarse para analizar un área específica de interés dentro de una muestra biológica y, de esta manera, enfocar la experimentación y la recogida de datos en una región específica de una muestra biológica (en lugar de una muestra biológica completa). Esto resulta en una mayor eficiencia en el tiempo del análisis de una muestra biológica.

Una región de interés puede identificarse en una muestra biológica mediante el uso de una variedad de diferentes técnicas, por ejemplo, microscopía de expansión, microscopía de campo claro, microscopía de campo oscuro, microscopía de contraste de fase, microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia, microscopía de reflexión, microscopía de interferencia, microscopía confocal e identificación visual (por ejemplo, a simple vista) y sus combinaciones. Por ejemplo, la tinción y la obtención de imágenes de una muestra biológica pueden realizarse para identificar una región de interés. En algunos ejemplos, la región de interés puede corresponder a una estructura específica de la citoarquitectura. En algunas modalidades, una muestra biológica puede teñirse previo a la visualización para proporcionar contraste entre las diferentes regiones de la muestra biológica. El tipo de tinción puede elegirse en dependencia del tipo de muestra biológica y de la región de las células a teñir. En algunas modalidades puede usarse más de una tinción para visualizar diferentes aspectos de la muestra biológica, por ejemplo, diferentes regiones de la muestra, estructuras celulares específicas (por ejemplo, organelos) o diferentes tipos de células. En otras modalidades, la muestra biológica puede visualizarse u obtenerse imágenes sin teñir la muestra biológica.

En algunas modalidades, la tinción y la obtención de imágenes de una muestra biológica previo a poner en contacto la muestra biológica con una matriz espacial se realiza para seleccionar muestras para el análisis espacial. En algunas modalidades, la tinción incluye aplicar un marcador fiducial como se describió en la presente descripción, que incluye marcadores detectables fluorescentes, radiactivos, quimioluminiscentes o colorimétricos. En algunas modalidades, la tinción y la obtención de imágenes de muestras biológicas permite al usuario identificar la muestra específica (o región de interés) que el usuario desea evaluar.

En algunos ejemplos, una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices ilustrativas descritas en la presente descripción) puede ponerse en contacto con solo una porción de una muestra biológica (por ejemplo, una célula, una sección de tejido o una región de interés). En algunos ejemplos, una muestra biológica se pone en contacto con solo una porción de una matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices ilustrativas descritas en la presente descripción). En algunas modalidades, las sondas de captura en una matriz correspondiente a las regiones de interés de una muestra biológica (por ejemplo, proximal a la región de interés) pueden cortarse y analizarse selectivamente. Por ejemplo, las sondas de captura en una matriz pueden desactivarse o eliminarse fuera de las áreas correspondientes a las regiones de interés de una muestra biológica. En algunas modalidades, las sondas de captura que incluyen un enlace fotoescindible y en la matriz en áreas correspondientes a las regiones de interés de una muestra biológica pueden escindir selectivamente mediante el uso de luz. Puede usarse un espejo, una matriz de espejos, una lente, una etapa móvil y/o una fotomascarilla para dirigir la luz a regiones de la matriz que corresponden a áreas fuera de una o más regiones de interés en la muestra biológica. Algunas modalidades incluyen desactivar o eliminar sondas de captura, por ejemplo, sondas de captura que comprenden un enlace fotoescindible como se describe en la presente descripción, mediante el uso de luz. En algunas modalidades, puede usarse un láser, por ejemplo, un láser de escaneo, para desactivar o eliminar sondas de captura. En algunas modalidades, el miembro eliminado de la pluralidad de sondas de captura puede lavarse. En algunas modalidades, las regiones de interés pueden marcarse con diferentes metales pesados, y un láser puede extirpar secuencialmente estas regiones de interés antes de la identificación por espectrometría de masa. Un láser puede, por ejemplo, desactivar o eliminar sondas de captura a través de la destrucción de ADN por luz UV, calor, inducir una reacción química que evita que las sondas de captura se muevan a la siguiente etapa, lo que induce la fotoescisión de un enlace fotoescindible, o sus combinaciones. En algunos ejemplos, una porción de la matriz puede desactivarse de manera que no interactúe con los analitos en la muestra biológica (por ejemplo, desactivación óptica, desactivación química, desactivación térmica o bloqueo de las sondas de captura en la matriz (por ejemplo, mediante el uso de sondas de bloqueo)). En algunas modalidades, las sondas de captura pueden bloquearse (por ejemplo, cubrirse o modificarse) antes de poner en contacto la muestra biológica con

la matriz. Por ejemplo, el extremo 3' libre de la sonda de captura puede bloquearse o modificarse antes de poner en contacto la muestra biológica con la matriz para evitar la modificación de las sondas de captura (por ejemplo, para evitar la eliminación o modificación o el grupo 3' OH libre en el extremo de las sondas de captura). En algunas modalidades, las sondas de captura pueden bloquearse antes de poner en contacto la muestra biológica con la matriz.

En algunas modalidades, se usa la sonda de bloqueo para bloquear o modificar el extremo 3' libre del dominio de captura de la sonda de captura. En algunas modalidades, las sondas de bloqueo pueden hibridarse con la sonda de captura. En algunas modalidades, el extremo 3' libre del dominio de captura puede bloquearse mediante modificación química.

En algunos ejemplos, una región de interés puede eliminarse de una muestra biológica y después la región de interés puede ponerse en contacto con la matriz (por ejemplo, cualquiera de las matrices descritas en la presente descripción). Una región de interés puede eliminarse de una muestra biológica mediante el uso de microcirugía, microdissección de captura láser, corte, un micrótopo, troceado, tripsinización, marcaje y/o clasificación celular asistida por fluorescencia y similares. En algunas modalidades, la muestra biológica se disecciona mediante el uso de microdissección de captura láser, que retiene una o más porciones de la muestra biológica para el análisis y/o desecha una o más porciones de la muestra biológica. En algunas modalidades, la muestra biológica se disecciona sobre la matriz. En algunas modalidades, una o más regiones de interés se seleccionan mediante el uso de matrices de microelectrodos direccionables espacialmente.

En algunos ejemplos, una región de interés puede permeabilizarse o lisarse mientras que las áreas fuera de la región de interés no se permeabilizan o lisan (por ejemplo, Kashyap y otros *Sci Rep.* 2016; 6: 29579). Por ejemplo, en algunas modalidades, una región de interés puede ponerse en contacto con un hidrogel que comprende un reactivo de permeabilización o lisado. En algunas modalidades, el/la(s) área(s) fuera de la región de interés no se ponen en contacto con el hidrogel que comprende el reactivo de permeabilización o lisado. En algunas modalidades, los miembros eliminados de la pluralidad de sondas de captura se lavan después de la permeabilización de la muestra biológica.

(g) Análisis de analitos capturados

(i) Extracción de muestras de una matriz

En algunas modalidades, después de poner en contacto una muestra biológica con un sustrato que incluye sondas de captura, puede realizarse opcionalmente una etapa de eliminación para eliminar toda o una porción de la muestra biológica del sustrato. En algunas modalidades, la etapa de eliminación incluye la degradación enzimática y/o química de las células de la muestra biológica. Por ejemplo, la etapa de eliminación puede incluir tratar la muestra biológica con una enzima (por ejemplo, una proteinasa, por ejemplo, proteinasa K) para eliminar al menos una porción de la muestra biológica del sustrato. En algunas modalidades, la etapa de eliminación puede incluir la ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser).

En algunas modalidades, se describen en la presente descripción métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, presente en una muestra biológica), el método que comprende: (a) opcionalmente teñir y/u obtener imágenes de una muestra biológica sobre un sustrato; (b) permeabilizar (por ejemplo, proporcionar una solución que comprende un reactivo de permeabilización a) la muestra biológica sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad captura el analito biológico; y (d) analizar el analito biológico capturado, para detectar espacialmente de esta manera el analito biológico; en donde la muestra biológica se elimina total o parcialmente del sustrato.

En algunas modalidades, una muestra biológica no se elimina del sustrato. Por ejemplo, la muestra biológica no se elimina del sustrato antes de liberar una sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura unida a un analito) del sustrato. En algunas modalidades, tal liberación comprende la escisión de la sonda de captura del sustrato (por ejemplo, mediante un dominio de escisión). En algunas modalidades, tal liberación no comprende liberar la sonda de captura del sustrato (por ejemplo, puede realizarse una copia de la sonda de captura unida a un analito y la copia puede liberarse del sustrato, por ejemplo, mediante desnaturalización). En algunas modalidades, la muestra biológica no se elimina del sustrato antes del análisis de un analito unido a una sonda de captura después de que se libera del sustrato. En algunas modalidades, la muestra biológica permanece en el sustrato durante la eliminación de una sonda de captura del sustrato y/o el análisis de un analito unido a la sonda de captura después de que se libera del sustrato. En algunas modalidades, la muestra biológica permanece en el sustrato durante la eliminación (por ejemplo, mediante desnaturalización) de una copia de la sonda de captura (por ejemplo, complemento). En algunas modalidades, el análisis de un analito unido a la sonda de captura del sustrato puede realizarse sin someter la muestra biológica a degradación enzimática y/o química de las células (por ejemplo, células permeabilizadas) o ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser).

En algunas modalidades, al menos una porción de la muestra biológica no se elimina del sustrato. Por ejemplo, una porción de la muestra biológica puede permanecer en el sustrato antes de liberar una sonda de captura (por ejemplo, una captura se demuestra unida a un analito) del sustrato y/o analizar un analito unido a una sonda de captura liberada del sustrato. En algunas modalidades, al menos una porción de la muestra biológica no se somete a degradación

enzimática y/o química de las células (por ejemplo, células permeabilizadas) o ablación del tejido (por ejemplo, ablación láser) antes del análisis de un analito unido a una sonda de captura del sustrato.

En algunas modalidades, se describen en la presente descripción métodos para detectar espacialmente un analito (por ejemplo, detectar la ubicación de un analito, por ejemplo, un analito biológico) de una muestra biológica (por ejemplo, presente en una muestra biológica) que incluyen: (a) opcionalmente teñir y/u obtener imágenes de una muestra biológica sobre un sustrato; (b) permeabilizar (por ejemplo, proporcionar una solución que comprende un reactivo de permeabilización a) la muestra biológica sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra biológica con una matriz que comprende una pluralidad de sondas de captura, en donde una sonda de captura de la pluralidad captura el analito biológico; y (d) analizar el analito biológico capturado, para detectar espacialmente de esta manera el analito biológico; donde la muestra biológica no se elimina del sustrato.

En algunas modalidades, se describen en la presente descripción métodos para detectar espacialmente un analito biológico de interés a partir de una muestra biológica que incluyen: (a) teñir y obtener imágenes de una muestra biológica sobre un sustrato; (b) proporcionar una solución que comprende un reactivo de permeabilización a la muestra biológica sobre el sustrato; (c) poner en contacto la muestra biológica con una matriz sobre un sustrato, en donde la matriz comprende una o más pluralidades de sondas de captura, lo que permite de esta manera que una o más pluralidades de sondas de captura capturen el analito biológico de interés; y (d) analizar el analito biológico capturado, para detectar espacialmente de esta manera el analito biológico de interés; donde la muestra biológica no se elimina del sustrato.

En algunas modalidades, el método incluye además seleccionar una región de interés en la muestra biológica al sujeto a análisis transcriptómico espacial. En algunas modalidades, una o más de una o más sondas de captura incluyen un dominio de captura. En algunas modalidades, una o más de una o más pluralidades de sondas de captura comprenden un identificador molecular único (UMI). En algunas modalidades, una o más de una o más sondas de captura comprenden un dominio de escisión. En algunas modalidades, el dominio de escisión comprende una secuencia reconocida y escindida por una uracilo-ADN glucosilasa, apurínica/apirimidínica (AP) endonucleasa (APE1), reactivo de escisión específico de uracilo U (USER) y/o una endonucleasa VIII. En algunas modalidades, una o más sondas de captura no comprenden un dominio de escisión y no se escinden de la matriz.

(ii) Sondas de captura extendidas

En algunas modalidades, una sonda de captura puede extenderse (una "sonda de captura extendida," por ejemplo, como se describe en la presente descripción (por ejemplo, Sección II(b)(vii))). Por ejemplo, la extensión de una sonda de captura puede incluir generar ADNc a partir de un ARN capturado (hibridado). Este proceso involucra la síntesis de una hebra complementaria del ácido nucleico hibridado, por ejemplo, que genera ADNc en base al molde de ARN capturado (el ARN que se hibrida con el dominio de captura de la sonda de captura). Por lo tanto, en una etapa inicial de extensión de la sonda de captura, por ejemplo, la generación de ADNc, el ácido nucleico capturado (hibridado), por ejemplo, ARN, actúa como un molde para la etapa de extensión, por ejemplo, transcripción inversa.

En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de transcripción inversa. Por ejemplo, la transcripción inversa incluye sintetizar ADNc (ADN complementario o copia) a partir de ARN, por ejemplo, (ARN mensajero), mediante el uso de una transcriptasa inversa. En algunas modalidades, la transcripción inversa se realiza mientras el tejido aún está en su lugar, lo que genera una biblioteca de analitos, donde la biblioteca de analitos incluye los códigos de barras espaciales de las sondas de captura adyacentes. En algunas modalidades, la sonda de captura se extiende mediante el uso de una o más ADN polimerasas.

En algunas modalidades, un dominio de captura de una sonda de captura incluye un cebador para producir la hebra complementaria de un ácido nucleico hibridado con la sonda de captura, por ejemplo, un cebador para la ADN polimerasa y/o la transcripción inversa. Las moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, ADN y/o ADNc, generadas por la reacción de extensión incorporan la secuencia de la sonda de captura. La extensión de la sonda de captura, por ejemplo, una reacción de ADN polimerasa y/o transcripción inversa, puede realizarse mediante el uso de una variedad de enzimas y protocolos adecuados.

En algunas modalidades, se genera una molécula de ADN de longitud completa (por ejemplo, ADNc). En algunas modalidades, una molécula de ADN de "longitud completa" se refiere a la totalidad de la molécula de ácido nucleico capturada. Sin embargo, si un ácido nucleico (por ejemplo, ARN) se degrada parcialmente en la muestra de tejido, entonces las moléculas de ácido nucleico capturadas no tendrán la misma longitud que el ARN inicial en la muestra de tejido. En algunas modalidades, se modifica el extremo 3' de las sondas extendidas, por ejemplo, las moléculas de ADNc de la primera hebra. Por ejemplo, un enlazador o adaptador puede ligarse al extremo 3' de las sondas extendidas. Esto puede lograrse mediante el uso de enzimas de ligación de una sola hebra tales como ligasa de ARN de T4 o Circligase™ (disponible de Lucigen, Middleton, WI). En algunas modalidades, los oligonucleótidos que conmutan de molde se usan para extender el ADNc con el fin de generar un ADNc de longitud completa (o lo más cerca posible de un ADNc de longitud completa). En algunas modalidades, una sonda auxiliar de síntesis de la segunda hebra (una molécula de ADN de doble hebra parcialmente capaz de hibridarse con el extremo 3' de la sonda de captura extendida), puede ligarse al extremo 3' de la sonda extendida, por ejemplo, molécula de ADNc de la primera hebra,

mediante el uso de una enzima de ligación de doble hebra tal como ligasa de ADN de T4. Otras enzimas apropiadas para la etapa de ligación se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, Tth ADN ligasa, Taq ADN ligasa, ADN ligasa de *Thermococcus* sp. (cepa 9°N) (ADN ligasa 9°N™ New England Biolabs), Ampligase™ (disponible de Lucigen, Middleton, WI), y SplintR (disponible de New England Biolabs, Ipswich, MA). En algunas modalidades, una cola de polinucleótido, por ejemplo, una cola poli(A), se incorpora en el extremo 3' de las moléculas de sonda extendida. En algunas modalidades, la cola de polinucleótido se incorpora mediante el uso de una enzima activa terminal transferasa.

En algunas modalidades se tratan las sondas de captura extendidas de doble hebra para eliminar cualquier sonda de captura no extendida antes de la amplificación y/o el análisis, por ejemplo, el análisis de secuencias. Esto puede lograrse mediante una variedad de métodos, por ejemplo, mediante el uso de una enzima para degradar las sondas no extendidas, tales como, una enzima exonucleasa o columnas de purificación.

En algunas modalidades, las sondas de captura extendidas se amplifican para producir cantidades que son suficientes para el análisis, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. En algunas modalidades, la primera hebra de las sondas de captura extendidas, (por ejemplo moléculas de ADN y/o ADNc) actúa como un molde para la reacción de amplificación (por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa).

En algunas modalidades, la reacción de amplificación incorpora un grupo de afinidad sobre la sonda de captura extendida (por ejemplo, el híbrido ARN-ADNc) mediante el uso de un cebador que incluye el grupo de afinidad. En algunas modalidades, el cebador incluye un grupo de afinidad y las sondas de captura extendida incluyen el grupo de afinidad. El grupo de afinidad puede corresponder a cualquiera de los grupos de afinidad descritos anteriormente.

En algunas modalidades, las sondas de captura extendida que incluyen el grupo de afinidad pueden acoplarse a un sustrato específico para el grupo de afinidad. En algunas modalidades, el sustrato puede incluir un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En algunas modalidades, el sustrato incluye avidina o estreptavidina y el grupo de afinidad incluye biotina. En algunas modalidades, el sustrato incluye maltosa y el grupo de afinidad incluye proteína de unión a maltosa. En algunas modalidades, el sustrato incluye proteína de unión a maltosa y el grupo de afinidad incluye maltosa. En algunas modalidades, la amplificación de las sondas de captura extendida puede funcionar para liberar las sondas extendidas de la superficie del sustrato, en la medida en que las copias de las sondas extendidas no se inmovilizan en el sustrato.

En algunas modalidades, se libera la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma. La etapa de liberación de la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma de la superficie del sustrato puede lograrse de varias maneras. En algunas modalidades, una sonda de captura extendida o un complemento de la misma se libera de la matriz mediante escisión de ácido nucleico y/o por desnaturalización (por ejemplo, mediante calentamiento para desnaturalizar una molécula de doble hebra).

En algunas modalidades, la sonda de captura extendida o complemento o amplicón de la misma se libera de la superficie del sustrato (por ejemplo, matriz) por medios físicos. Por ejemplo, cuando la sonda de captura extendida se inmoviliza indirectamente en el sustrato de la matriz, por ejemplo, mediante hibridación con una sonda de superficie, puede ser suficiente para interrumpir la interacción entre la sonda de captura extendida y la sonda de superficie. Los métodos para interrumpir la interacción entre moléculas de ácido nucleico incluyen desnaturalizar moléculas de ácido nucleico de doble hebra que se conocen en la técnica. Un método sencillo para liberar las moléculas de ADN (es decir, para despojar la matriz de sondas extendidas) es usar una solución que interfiera con los enlaces de hidrógeno de las moléculas de doble hebra. En algunas modalidades, la sonda de captura extendida se libera mediante una solución calentada aplicada, tal como agua o tampón, de al menos 85 °C, por ejemplo, al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 °C. En algunas modalidades, se añade una solución que incluye sales, surfactantes, etc., que puede desestabilizar aún más la interacción entre las moléculas de ácido nucleico para liberar la sonda de captura extendida del sustrato.

En algunas modalidades, donde la sonda de captura extendida incluye un dominio de escisión, la sonda de captura extendida se libera de la superficie del sustrato por escisión. Por ejemplo, el dominio de escisión de la sonda de captura extendida puede escindirse mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la sonda de captura extendida se libera de la superficie del sustrato, por ejemplo, mediante la escisión de un dominio de escisión en la sonda de captura extendida, antes de la etapa de amplificar la sonda de captura extendida.

En algunas modalidades, las sondas complementarias a la sonda de captura extendida pueden ponerse en contacto con el sustrato. En algunas modalidades, la muestra biológica puede estar en contacto con el sustrato cuando las sondas se ponen en contacto con el sustrato. En algunas modalidades, la muestra biológica puede eliminarse del sustrato antes de poner en contacto el sustrato con sondas. En algunas modalidades, las sondas pueden marcarse con una etiqueta detectable (por ejemplo, cualquiera de las etiquetas detectables descritas en la presente descripción). En algunas modalidades, las sondas que no se unen especialmente (por ejemplo, se hibridan) a una sonda de captura extendida pueden lavarse. En algunas modalidades, las sondas complementarias a la sonda de captura extendida pueden detectarse en el sustrato (por ejemplo, obtención de imágenes, cualquiera de los métodos de detección descritos en la presente descripción).

aproximadamente 97, aproximadamente 98, y aproximadamente 99 sondas pueden ponerse en contacto con el sustrato y unirse específicamente (por ejemplo, hibridar) a una sonda de captura extendida.

En algunas modalidades, las sondas pueden ser complementarias a un único analito (por ejemplo, un único gen). En algunas modalidades, las sondas pueden ser complementarias a uno o más analitos (por ejemplo, analitos en una familia de genes). En algunas modalidades, las sondas (por ejemplo, sondas detectables) pueden ser para un panel de genes asociados con una enfermedad (por ejemplo, cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson).

(iii) Dominio de escisión

Las sondas de captura pueden incluir opcionalmente un "dominio de escisión", donde uno o más segmentos o regiones de la sonda de captura (por ejemplo, los códigos de barras espaciales y/o los UMI) pueden ser de manera liberable, escindibles, o estar unidos reversiblemente a un elemento, o algún otro sustrato, para que los códigos de barras espaciales y/o los UMI puedan liberarse o ser liberables mediante la escisión de un enlace entre la sonda de captura y el elemento, o liberarse a través de la degradación del sustrato subyacente o sustrato químico, para permitir el acceso al(a los) código(s) de barras espacial(es) y/o UMI(s) de la sonda de captura escindida o el acceso mediante otros reactivos, o ambos. Los aspectos no limitantes de los dominios de escisión se describen en la presente descripción (por ejemplo, en la Sección II(b)(ii)).

En algunas modalidades, la sonda de captura se une, (por ejemplo, mediante un enlace disulfuro) a un elemento. En algunas modalidades, la sonda de captura se une a un elemento a través de un grupo propileno (por ejemplo, Separador C3). Puede añadirse un agente reductor para romper los diversos enlaces disulfuro, lo que da como resultado la liberación de la sonda de captura que incluye la secuencia de código de barras espacial. En otro ejemplo, el calentamiento también puede dar como resultado la degradación y liberación de la sonda de captura unida. En algunas modalidades, el calentamiento se realiza mediante láser (por ejemplo, ablación láser) y los elementos en ubicaciones específicas pueden degradarse. Además de los enlaces que pueden escindirse térmicamente, enlaces disulfuro, enlaces fotosensibles, y enlaces sensibles a UV, otros ejemplos no limitantes de enlaces lábiles que pueden acoplarse a una sonda de captura (por ejemplo, código de barras espacial) incluye un enlace éster (por ejemplo, escindible con un ácido, una base, o hidroxilamina), un enlace diol cercano (por ejemplo, escindible mediante peryodato de sodio), un enlace Diels-Alder (por ejemplo, escindible por calor), un enlace de sulfona (por ejemplo, escindible a través de una base), un enlace de éter de sililo (por ejemplo, escindible mediante un ácido), un enlace glucosídico (por ejemplo, escindible mediante una amilasa), un enlace peptídico (por ejemplo, escindible a través de una proteasa), o un enlace fosfodiéster (por ejemplo, escindible a través de una nucleasa (por ejemplo, ADNasa)).

En algunas modalidades, el dominio de escisión incluye una secuencia de poli(U) que puede escindirse mediante una mezcla de uracil ADN glucosilasa (UDG) y la endonucleasa ADN glucosilasa-liasa VIII, conocida comercialmente como la enzima USER™. En algunas modalidades, el dominio de escisión puede ser un único U. En algunas modalidades, el dominio de escisión puede ser un sitio abásico que puede escindirse con una endonucleasa específica de sitio abásico (por ejemplo, endonucleasa IV o endonucleasa VIII).

En algunas modalidades, el dominio de escisión de la sonda de captura es una secuencia de nucleótidos dentro de la sonda de captura que se escinde específicamente, por ejemplo, físicamente por luz o calor, químicamente o enzimáticamente. La ubicación del dominio de escisión dentro de la sonda de captura dependerá de si la sonda de captura se inmoviliza o no en el sustrato de manera que tenga un extremo 3' libre capaz de funcionar como un cebador de extensión (por ejemplo, por su extremo 5' o 3'). Por ejemplo, si la sonda de captura se inmoviliza por su extremo 5', el dominio de escisión se ubicará 5' con respecto al código de barras espacial y/o UMI, y la escisión de dicho dominio da como resultado la liberación de parte de la sonda de captura que incluye el código de barras espacial y/o UMI y la secuencia 3' con respecto al código de barras espacial, y opcionalmente parte del dominio de escisión, de un elemento. Alternativamente, si la sonda de captura se inmoviliza por su extremo 3', el dominio de escisión se ubicará 3' al dominio de captura (y al código de barras espacial) y la escisión de dicho dominio resultado la liberación de parte de la sonda de captura que incluye el código de barras espacial y la secuencia 3' al código de barras espacial desde un elemento. En algunas modalidades, la escisión da como resultado la eliminación parcial del dominio de escisión. En algunas modalidades, la escisión da como resultado la eliminación completa del dominio de escisión, particularmente cuando las sondas de captura se inmovilizan por medio de su extremo 3' ya que la presencia de una parte del dominio de escisión puede interferir con la hibridación del dominio de captura y el ácido nucleico diana y/o su extensión subsecuente.

III. Multiplexación

(a) Multiplexación general

En varias modalidades del análisis espacial como se describe en la presente descripción, los elementos pueden incluir diferentes tipos de sondas de captura para analizar tanto la información intrínseca como extrínseca para células individuales. Por ejemplo, un elemento puede incluir uno o más de los siguientes: 1) una sonda de captura que presenta un dominio de captura que se une a uno o más ácidos nucleicos endógenos en la célula; 2) una sonda de captura que presenta un dominio de captura que se une a uno o más ácidos nucleicos exógenos en la célula (por

ejemplo, ácidos nucleicos de un microorganismo (por ejemplo, un virus, una bacteria)) que infecta la célula, ácidos nucleicos introducidos en la célula (por ejemplo, tales como plásmidos o ácido nucleico derivado de los mismos), ácidos nucleicos para la edición de genes (por ejemplo, ARN relacionado con CRISPR tal como ARNcr, ARN guía); 3) una sonda de captura que presenta un dominio de captura que se une a un agente de captura de analito (por ejemplo, un anticuerpo acoplado a un oligonucleótido que incluye un dominio con código de barras del agente de captura que tiene una secuencia de captura de analito que se une al dominio de captura), y 4) un resto de captura que presenta un dominio que se une a una proteína (por ejemplo, una proteína exógena expresada en la célula, una proteína de un microorganismo (por ejemplo, un virus, una bacteria)) que infecta la célula, o una pareja de unión para una proteína de la célula (por ejemplo, un antígeno para un receptor de células inmunitarias).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial como se describe en la presente descripción, el perfilamiento espacial incluye el análisis en paralelo de dos tipos diferentes de analitos. Un elemento puede ser una perla de gel, que se acopla (*por ejemplo*, se acopla reversiblemente) a una o más sondas de captura. Las sondas de captura pueden incluir una secuencia de código de barras espacial y una secuencia de cebado poli(T) que puede hibridarse con la cola poli(A) de un transcrito de ARNm. La sonda de captura también puede incluir una secuencia de UMI que puede identificar de manera única un transcrito dado. La sonda de captura también puede incluir una secuencia de código de barras espacial y una secuencia de cebado aleatoria de N-mer que es capaz de hibridarse aleatoriamente con ADNg. En esta configuración, las sondas de captura pueden incluir la misma secuencia de código de barras espacial, lo que permite la asociación de lecturas de secuenciación aguas abajo con el elemento.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial como se describe en la presente descripción, un elemento puede ser una perla de gel, que se acopla (*por ejemplo*, se acopla reversiblemente) a sondas de captura. La sonda de captura puede incluir una secuencia de código de barras espacial y una secuencia de cebado poli(T) que puede hibridarse con la cola poli(A) de un transcrito de ARNm. La sonda de captura también puede incluir una secuencia de UMI que puede identificar de manera única un transcrito dado. La sonda de captura puede incluir una secuencia de código de barras espacial y un dominio de captura que es capaz de hibridarse específicamente con un agente de captura de analito. El agente de captura de analito puede incluir un oligonucleótido que incluye una secuencia de captura de analito que interactúa con el dominio de captura acoplado al elemento. El oligonucleótido del agente de captura de analito puede acoplarse a un anticuerpo que se une a la superficie de una célula. El oligonucleótido incluye una secuencia de código de barras (*por ejemplo*, un código de barras del resto de unión al analito) que identifica de manera única el anticuerpo (y por lo tanto, el elemento de superficie celular particular al que se une). En esta configuración, las sondas de captura incluyen la misma secuencia de código de barras espacial, que permite la asociación aguas abajo de ácidos nucleicos con código de barras con la ubicación en la matriz espacial. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de caracterización espacial descritos en la presente descripción, los agentes de captura de analito pueden producirse por cualquier ruta adecuada, incluso mediante esquemas de acoplamiento ilustrativos descritos en otra parte en la presente descripción.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, otras combinaciones de dos o más analitos biológicos que pueden medirse simultáneamente incluyen, sin limitación: (a) ADN genómico y elementos de superficie celular (*por ejemplo*, a través de agentes de captura de analito que se unen a un elemento de superficie celular), (b) ARNm y una construcción de trazado de linaje, (c) ARNm y estado de metilación celular, (d) ARNm y cromatina accesible (*por ejemplo*, ATAC-seq, DNase-seq, y/o MNase-seq), (e) ARNm y proteínas y/o metabolitos de superficie celular o intracelulares, (f) ARNm y cromatina (organización espacial de la cromatina en una célula), (g) un agente de captura de analito (*por ejemplo*, cualquiera de los multímeros de MHC descritos en la presente descripción) y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (*por ejemplo*, receptor de linfocitos T), (h) ARNm y un agente de perturbación (*por ejemplo*, un ARNcr/ARNgu de CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc, y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción), (i) ADN genómico y un agente de perturbación, (j) un agente de captura de analito y reactivos de perturbación, (k) cromatina accesible y un agente de perturbación, (l) cromatina (*por ejemplo*, organización espacial de la cromatina en una célula) y un agente de perturbación, y (m) proteínas y/o metabolitos de superficie celular o intracelulares y un agente de perturbación (*por ejemplo*, cualquiera de los agentes de perturbación descritos en la presente descripción), o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, el primer analito puede incluir una molécula de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, ARNm, ADN complementario derivado de la transcripción inversa del ARNm) que codifica al menos una porción de una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (*por ejemplo*, un TCR o BCR). En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una porción de una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias es ADNc generado primero a partir de la transcripción inversa del ARNm correspondiente, mediante el uso de un cebador que contiene poli(T). El ADNc que se genera puede entonces codificarse mediante el uso de un cebador, que presenta una secuencia de código de barras espacial (y opcionalmente, una secuencia de UMI) que se hibrida con al menos una porción del ADNc que se genera. En algunas modalidades, puede emplearse un oligonucleótido que conmuta de molde junto con una transferasa terminal o una transcriptasa inversa que tiene actividad transferasa terminal para generar una región de cebado en el ADNc a la que puede hibridarse un cebador con código de barras durante la generación de ADNc. La actividad transferasa terminal puede, *por ejemplo*, añadir una cola poli(C) a un extremo 3' del ADNc de manera que el oligonucleótido que conmuta de molde

puede unirse mediante una secuencia de cebado poli(G) y el extremo 3' del ADNc puede extenderse aún más. A continuación, el molde de ARNm original y el oligonucleótido que conmuta de molde pueden desnaturalizarse del ADNc y el cebador con código de barras que comprende una secuencia complementaria a al menos una porción de la región de cebado generada en el ADNc puede entonces hibridarse con el ADNc y un constructo con código de barras que comprende la secuencia de código de barras (y cualquier secuencia de UMI opcional) y un complemento del ADNc generado. Los métodos y composiciones adicionales adecuados para codificar el ADNc generado a partir de transcritos de ARNm que incluyen aquellos que codifican las regiones V(D)J de un receptor de células inmunitarias y/o los métodos y composiciones de códigos de barras que incluyen un oligonucleótido que conmuta de molde se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente PCT núm. WO 2018/075693, y en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2018/0105808.

En algunas modalidades, el análisis de V(D)J puede realizarse mediante el uso de métodos similares a los descritos en la presente descripción. Por ejemplo, el análisis de V(D)J puede completarse con el uso de uno o más agentes de captura de analito que se unen a elementos de superficie particulares de células inmunitarias y se asocian con secuencias de código de barras (por ejemplo, códigos de barras de resto de unión al analito). El uno o más agentes de captura de analito pueden incluir un MHC o multímero de MHC. Un oligonucleótido con código de barras se acopla a una perla que puede usarse para el análisis de V(D)J. El oligonucleótido se acopla a una perla mediante un enlace liberable, tal como un enlazador disulfuro. El oligonucleótido puede incluir secuencias funcionales que son útiles para el procesamiento subsecuente, tal como la secuencia funcional, que puede incluir una secuencia de unión a la celda de flujo específica del secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5, así como también la secuencia funcional, que puede incluir secuencias de cebadores de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión del cebador R1. En algunas modalidades, la secuencia puede incluir una secuencia P7 y un sitio de unión al cebador R2. Una secuencia de código de barras puede incluirse dentro de la estructura para su uso en la codificación del polinucleótido molde. Las secuencias funcionales pueden seleccionarse para compatibilidad con una variedad de sistemas de secuenciación diferentes, por ejemplo, instrumentos de secuenciación Ion Torrent Proton o PGM, Illumina, etc. y requerimientos de los mismos. En algunas modalidades, la secuencia de código de barras, las secuencias funcionales (por ejemplo, secuencia de unión a celda de flujo) y secuencias adicionales (por ejemplo, secuencias de cebadores de secuenciación) pueden ser comunes a todos los oligonucleótidos unidos a un elemento dado. El oligonucleótido con código de barras también puede incluir una secuencia para facilitar la conmutación de molde (por ejemplo, una secuencia poli(G)). En algunas modalidades, la secuencia adicional proporciona un segmento de secuencia del identificador molecular único (UMI), como se describe en otra parte en la presente descripción.

En un método ilustrativo de análisis de polinucleótidos celulares mediante el uso de un oligonucleótido con código de barras, una célula se coparticipa junto con una perla que tiene un oligonucleótido con código de barras y reactivos adicionales tales como una transcriptasa inversa, cebadores, oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos que conmutan de molde), dNTP y un agente reductor en una partición (por ejemplo, una gotita en una emulsión). Dentro de la partición, la célula puede lisarse para producir una pluralidad de polinucleótidos molde (por ejemplo, ADN tal como ADN genómico, ARN tal como ARNm, etc.).

Una mezcla de reacción que presenta un polinucleótido molde de una célula y (i) el cebador que tiene una secuencia hacia un extremo 3' que se hibrida con el polinucleótido molde (por ejemplo, poli(T)) y (ii) un oligonucleótido que conmuta de molde que incluye un primer oligonucleótido hacia un extremo 5' puede someterse a una reacción de amplificación para producir un primer producto de amplificación. En algunas modalidades, el polinucleótido molde es un ARNm con una cola poli(A) y el cebador que se hibrida con el polinucleótido molde incluye una secuencia poli(T) hacia un extremo 3', que es complementaria al segmento poli(A). El primer oligonucleótido puede incluir al menos una de una secuencia adaptadora, una secuencia de código de barras, una secuencia identificadora molecular única (UMI), un sitio de unión al cebador y un sitio de unión al cebador de secuenciación o cualquiera de sus combinaciones. En algunos casos, un primer oligonucleótido es una secuencia que puede ser común a todas las particiones de una pluralidad de particiones. Por ejemplo, el primer oligonucleótido puede incluir una secuencia de unión a celda de flujo, un sitio de unión al cebador de amplificación, o un sitio de unión al cebador de secuenciación y la primera reacción de amplificación facilita la unión del oligonucleótido al polinucleótido molde de la célula. En algunas modalidades, el primer oligonucleótido incluye un sitio de unión al cebador. En algunas modalidades, el primer oligonucleótido incluye un sitio de unión al cebador de secuenciación.

La secuencia hacia un extremo 3' (por ejemplo, poli(T)) del cebador se hibrida con el polinucleótido molde. En una primera reacción de amplificación, los reactivos de reacción de extensión, por ejemplo, transcriptasa inversa, nucleósidos trifosfatos, cofactores (por ejemplo, Mg^{2+} o Mn^{2+}), que también se coparticipan, pueden extender la secuencia de cebador mediante el uso del ácido nucleico de la célula como un molde, para producir un transcrito, por ejemplo, ADNc, que tiene un fragmento complementario a la hebra del ácido nucleico de la célula al cual el cebador se hibridó. En algunas modalidades, la transcriptasa inversa tiene actividad transferasa terminal y la transcriptasa inversa añade nucleótidos adicionales, por ejemplo, poli(C), al ADNc de una manera independiente de molde.

El oligonucleótido que conmuta de molde, por ejemplo un oligonucleótido que conmuta de molde que incluye una secuencia poli(G), puede hibridarse con el ADNc y facilitar la conmutación de molde en la primera reacción de amplificación. El transcrito, por lo tanto, puede incluir la secuencia del cebador, una secuencia complementaria al polinucleótido molde de la célula y una secuencia complementaria al oligonucleótido que conmuta de molde.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, después de la primera reacción de amplificación, el primer producto o transcrito de amplificación puede someterse a una segunda reacción de amplificación para generar un segundo producto de amplificación. En algunas modalidades, se unen secuencias adicionales (por ejemplo, secuencias funcionales tales como secuencias de unión a celda de flujo, secuencias de unión a cebadores de secuenciación, secuencias de códigos de barras, etc.). La primera y segunda reacciones de amplificación pueden realizarse en el mismo volumen, tal como por ejemplo en una gotita. En algunas modalidades, el primer producto de amplificación se somete a una segunda reacción de amplificación en presencia de un oligonucleótido con código de barras para generar un segundo producto de amplificación que tiene una secuencia de código de barras. La secuencia de código de barras puede ser única para una partición, es decir, cada partición puede tener una secuencia de código de barras única. El oligonucleótido con código de barras puede incluir una secuencia de al menos un segmento del oligonucleótido que conmuta de molde y al menos un segundo oligonucleótido. El segmento del oligonucleótido que conmuta de molde en el oligonucleótido con código de barras puede facilitar la hibridación del oligonucleótido con código de barras con el transcrito, por ejemplo, ADNc, para facilitar la generación de un segundo producto de amplificación. Además de una secuencia de código de barras, el oligonucleótido con código de barras puede incluir un segundo oligonucleótido tal como al menos uno de una secuencia adaptadora, una secuencia de identificador molecular único (UMI), un sitio de unión al cebador y un sitio de unión al cebador de secuenciación, o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, la segunda reacción de amplificación usa el primer producto de amplificación como un molde y el oligonucleótido con código de barras como un cebador. En algunas modalidades, el segmento del oligonucleótido que conmuta de molde en el oligonucleótido con código de barras puede hibridarse con la porción del ADNc o fragmento complementario que tiene una secuencia complementaria al oligonucleótido que conmuta de molde o la que se copió del oligonucleótido que conmuta de molde. En la segunda reacción de amplificación, los reactivos de reacción de extensión, por ejemplo, polimerasa, nucleósidos trifosfatos, cofactores (por ejemplo, Mg^{2+} o Mn^{2+}), que también se coparticionan, pueden extender la secuencia del cebador mediante el uso del primer producto de amplificación como molde. El segundo producto de amplificación puede incluir un segundo oligonucleótido, una secuencia de un segmento del polinucleótido molde (por ejemplo, ARNm) y una secuencia complementaria al cebador.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, el segundo producto de amplificación usa el oligonucleótido con código de barras como un molde y al menos una porción del primer producto de amplificación como un cebador. El segmento del primer producto de amplificación (por ejemplo, ADNc) que tiene una secuencia complementaria al oligonucleótido que conmuta de molde puede hibridarse con el segmento del oligonucleótido con código de barras que comprende una secuencia de al menos un segmento del oligonucleótido que conmuta de molde. En la segunda reacción de amplificación, los reactivos de reacción de extensión, por ejemplo, polimerasa, nucleósidos trifosfato, cofactores (por ejemplo, Mg^{2+} o Mn^{2+}), que también se coparticionan, pueden extender la secuencia del cebador (por ejemplo, el primer producto de amplificación) mediante el uso del oligonucleótido con código de barras como molde. El segundo producto de amplificación puede incluir la secuencia del cebador, una secuencia que es complementaria a la secuencia del polinucleótido molde (por ejemplo, ARNm) y una secuencia complementaria al segundo oligonucleótido.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, pueden medirse simultáneamente tres o más clases de analitos biológicos. Por ejemplo, un elemento puede incluir sondas de captura que pueden participar en un ensayo de al menos tres tipos diferentes de analitos a través de tres dominios de captura diferentes. Una perla puede acoplarse a un oligonucleótido con código de barras que incluye un dominio de captura que incluye una secuencia de cebado de poli(T) para el análisis de ARNm; un oligonucleótido con código de barras que incluye un dominio de captura que incluye una secuencia de cebado de N-mer aleatoria para el análisis de ADN; y un oligonucleótido con código de barras que incluye un dominio de captura que puede unirse específicamente a un agente de captura de analito (por ejemplo, un anticuerpo con un código de barras espacial), a través de su secuencia de captura de analito.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, otras combinaciones de tres o más analitos biológicos que pueden medirse simultáneamente incluyen, sin limitación: (a) ARNm, una construcción de trazado de linaje, y proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares; (b) ARNm, cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNase-seq, y/o MNase-seq), y proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares; (c) ARNm, ADN genómico, y un reactivo de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNgc de CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc, y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción); (d) ARNm, cromatina accesible, y un reactivo de perturbación; (e) ARNm, un agente de captura de analito (por ejemplo, cualquiera de los multímeros de MHC descritos en la presente descripción), y un reactivo de perturbación; (f) ARNm, proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares, y un agente de perturbación; (g) ARNm, una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T), y un reactivo de perturbación; (h) ARNm, un agente de captura de analito, y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias; (i) proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares, un agente de captura de analito (por ejemplo, los multímeros de MHC descritos en la presente descripción), y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias; (j) estado de metilación, ARNm, y proteínas y/o metabolitos de superficie celular

e/o intracelulares; (k) ARNm, cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula), y un reactivo de perturbación; (l) una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias, cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula); y un reactivo de perturbación; y (m) ARNm, una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias, y cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula), o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, pueden medirse simultáneamente cuatro o más clases de analitos biológicos. Un elemento puede ser una perla que se acopla a cebadores con código de barras que pueden participar cada uno en un ensayo de un tipo diferente de analito. El elemento se acopla (por ejemplo, se acopla reversiblemente) a una sonda de captura que incluye un dominio de captura que incluye una secuencia de cebado poli(T) para el análisis de ARNm y también se acopla (por ejemplo, se acopla reversiblemente) a una sonda de captura que incluye un dominio de captura que incluye una secuencia de cebado de N-mer aleatoria para el análisis de ADNg. Además, el elemento también se acopla (por ejemplo, se acopla reversiblemente) a una sonda de captura que se une a una secuencia de captura de analito de un agente de captura de analito a través de su dominio de captura. El elemento también puede acoplarse (por ejemplo, acoplarse reversiblemente) a una sonda de captura que puede unirse específicamente a una molécula de ácido nucleico que puede funcionar como un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNgc de CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción), a través de su dominio de captura.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, cada una de las diversas sondas de captura con código de barras espacial presente en un elemento dado o en una perla dada incluye la misma secuencia de código de barras espacial. En algunas modalidades, cada sonda de captura con código de barras puede liberarse del elemento de una manera adecuada para el análisis de su analito respectivo. Por ejemplo, los constructos con código de barras A, B, C y D pueden generarse como se describe en otra parte en la presente descripción y analizarse. El constructo con código de barras A puede incluir una secuencia correspondiente a la secuencia de código de barras de la perla (por ejemplo, un código de barras espacial) y una secuencia de ADN correspondiente a un ARNm diana. El constructo con código de barras B puede incluir una secuencia correspondiente a la secuencia de código de barras de la perla (por ejemplo, un código de barras espacial) y una secuencia correspondiente al ADN genómico. El constructo con código de barras C puede incluir una secuencia correspondiente a la secuencia de código de barras de la perla (por ejemplo, un código de barras espacial) y una secuencia correspondiente a la secuencia de código de barras asociada con un agente de captura de analito (por ejemplo, un código de barras de resto de unión al analito). El constructo con código de barras D puede incluir una secuencia correspondiente a la secuencia de código de barras de la perla (por ejemplo, un código de barras espacial) y una secuencia correspondiente a un ácido nucleico de CRISPR (que, en algunas modalidades, también incluye una secuencia de código de barras). Cada constructo puede analizarse (por ejemplo, mediante cualquiera de una variedad de métodos de secuenciación) y los resultados pueden asociarse con la célula dada a partir de la cual se originaron los diversos analitos. Los constructos con código de barras (o incluso sin código de barras) pueden adaptarse para análisis de cualquier analito dado asociado con un ácido nucleico y capaz de unirse con tal constructo.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción, otras combinaciones de cuatro o más analitos biológicos que pueden medirse simultáneamente incluyen, sin limitación: (a) ARNm, una construcción de trazado de linaje, proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares, y ADNg; (b) ARNm, cromatina accesible (por ejemplo, ATAC-seq, DNase-seq, y/o MNase-seq), proteínas y/o metabolitos de superficie celular y/o intracelulares, y un agente de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNgc de CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc, y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción); (c) ARNm, proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares, un agente de captura de analito (por ejemplo, los multímeros de MHC descritos en la presente descripción), y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T); (d) ARNm, ADN genómico, un reactivo de perturbación, y cromatina accesible; (e) ARNm, proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares, un agente de captura de analito (por ejemplo, los multímeros de MHC descritos en la presente descripción), y un reactivo de perturbación; (f) ARNm, proteínas y/o metabolitos de superficie celular e/o intracelulares, un reactivo de perturbación, y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T); (g) ARNm, un reactivo de perturbación, un agente de captura de analitos (por ejemplo, los multímeros de MHC descritos en la presente descripción), y una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T); (h) ARNm, cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula), y un reactivo de perturbación; (i) una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias, cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula); y un reactivo de perturbación; (j) ARNm, una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias, cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula), y ADN genómico; (k) ARNm, una secuencia V(D)J de un receptor de células inmunitarias, cromatina (por ejemplo, organización espacial de la cromatina en una célula), y un reactivo de perturbación, o cualquiera de sus combinaciones.

(b) Construcción de matrices espaciales para el análisis de múltiples analitos

Esta descripción también describe métodos y materiales para construir una matriz espacial capaz de análisis de múltiples analitos. En algunas modalidades, una matriz espacial incluye una pluralidad de elementos en un sustrato

donde uno o más miembros de la pluralidad de elementos incluyen una pluralidad de oligonucleótidos que tienen un primer tipo de secuencia funcional y oligonucleótidos que tienen un segundo tipo diferente de secuencia funcional. En algunas modalidades, un elemento puede incluir oligonucleótidos con dos tipos de secuencias funcionales. Un elemento puede acoplarse a oligonucleótidos que comprenden una secuencia TruSeq y también a oligonucleótidos que comprenden una secuencia Nextera. En algunas modalidades, una secuencia funcional puede incluir una secuencia de unión a la celda de flujo específica del secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5, así como también una secuencia funcional, que puede incluir secuencias de cebadores de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión al cebador R1. En algunas modalidades, uno o más miembros de la pluralidad de elementos comprenden ambos tipos de secuencias funcionales. En algunas modalidades, uno o más miembros de la pluralidad de múltiples elementos incluyen un primer tipo de secuencia funcional. En algunas modalidades, uno o más miembros de la pluralidad de elementos incluyen un segundo tipo de secuencia funcional. En algunas modalidades, puede añadirse un oligonucleótido adicional a la secuencia funcional para generar un oligonucleótido completo donde el oligonucleótido completo incluye una secuencia de código de barras espacial, una secuencia de UMI opcional, una secuencia de cebado y un dominio de captura. La unión de estas secuencias puede ser mediante ligación (que incluye mediante ligación en puente como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 20140378345), o cualquier otra vía adecuada. Como se describe en la presente descripción, los oligonucleótidos pueden hibridarse con secuencias de soporte que pueden ser útiles para construir oligonucleótidos completos (por ejemplo, oligonucleótidos que son capaces de análisis espacial).

En algunas modalidades, los oligonucleótidos que se hibridan con las secuencias (por ejemplo, TruSeq y Nextera) ubicadas en los elementos incluyen dominios de captura capaces de capturar diferentes tipos de analitos (por ejemplo, ARNm, ADN genómico, proteínas de superficie celular o cromatina accesible). En algunos ejemplos, los oligonucleótidos que pueden unirse a las secuencias TruSeq pueden incluir dominios de captura que incluyen secuencias de captura poli(T). Además de las secuencias de captura poli(T), los oligonucleótidos que pueden unirse a los grupos TruSeq también pueden incluir un dominio de captura que incluye una secuencia de N-mer aleatoria para capturar ADN genómico (por ejemplo, o cualquier otra secuencia o dominio como se describe en la presente descripción capaz de capturar cualquiera de los analitos biológicos descritos en la presente descripción). En tales casos, las matrices espaciales pueden construirse al aplicar relaciones de oligonucleótidos TruSeq-poli(T) y TruSeq-N-mer a los elementos que comprenden las secuencias funcionales TruSeq. Esto puede producir matrices espaciales donde una porción de los oligonucleótidos puede capturar ARNm y una porción diferente de oligonucleótidos puede capturar ADN genómico. En algunas modalidades, uno o más miembros de una pluralidad de elementos incluyen tanto secuencias TruSeq como Nextera. En tales casos, un elemento que incluye ambos tipos de secuencias funcionales es capaz de unirse a oligonucleótidos específicos para cada secuencia funcional. Por ejemplo, un oligonucleótido capaz de unirse a una secuencia TruSeq podría usarse para suministrar un oligonucleótido que incluye un dominio de captura poli(T) y un oligonucleótido capaz de unirse a una secuencia Nextera podría usarse para suministrar un oligonucleótido que incluye un dominio de captura N-mer para capturar ADN genómico. Un experto en la técnica apreciará que cualquier combinación de dominios de captura (por ejemplo, dominios de captura que tienen cualquiera de la variedad de secuencias de captura descritas en la presente descripción capaces de unirse a cualquiera de los diferentes tipos de analitos como se describe en la presente descripción) podría combinarse con oligonucleótidos capaces de unirse a secuencias TruSeq y Nextera para construir una matriz espacial.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que incluye un dominio de captura (por ejemplo, un oligonucleótido capaz de acoplarse a un analito) o un agente de captura de analito puede incluir una secuencia de oligonucleótidos que es capaz de unirse o unirse a un cebador de ensayo. El adaptador puede permitir que la sonda de captura o el agente de captura de analito se unan a cualquier cebador de ensayo adecuado y se usen en cualquier ensayo adecuado. El cebador de ensayo puede incluir una región de cebado y una secuencia que es capaz de unirse o ligarse al acoplador. En algunas modalidades, el acoplador puede ser un cebador inespecífico (por ejemplo, una protuberancia 5') y el cebador de ensayo puede incluir una protuberancia 3' que puede ligarse a la protuberancia 5'. La región de cebado en el cebador de ensayo puede ser cualquier cebador descrito en la presente descripción, por ejemplo, un cebador poli (T), un cebador N-mer aleatorio, un cebador específico de la diana o una secuencia de captura del agente de captura de analito.

En algunos ejemplos, un oligonucleótido puede incluir un acoplador, por ejemplo, una protuberancia 5' con 10 nucleótidos. El acoplador puede ligarse a cebadores de ensayo, cada uno de los cuales incluye una protuberancia 3' con 10 nucleótidos que complementan la protuberancia 5' del acoplador. La sonda de captura puede usarse en cualquier ensayo al unirse al cebador de ensayo diseñado para ese ensayo.

Pueden usarse adaptadores y cebadores de ensayo para permitir que la sonda de captura o el agente de captura de analito se unan a cualquier cebador de ensayo adecuado y se usen en cualquier ensayo adecuado. Una sonda de captura que incluye un código de barras espacial puede unirse a una perla que incluye una secuencia poli(dT). Una sonda de captura que incluye un código de barras espacial y una secuencia poli(T) puede usarse para analizar múltiples analitos biológicos como se describe generalmente en la presente descripción (por ejemplo, el analito biológico incluye una secuencia poli(A) o se acopla o se asocia de cualquier otra manera con un agente de captura de analito que comprende una secuencia poli(A) como la secuencia de captura de analito).

Un oligonucleótido de soporte con una secuencia poli(A) puede usarse para facilitar el acoplamiento a una sonda de captura que incluye un código de barras espacial y una segunda secuencia que facilita el acoplamiento con un cebador de ensayo. Los cebadores de ensayo incluyen una secuencia complementaria a la segunda secuencia del oligonucleótido de soporte y una secuencia específica del ensayo que determina la funcionalidad del cebador del ensayo (por ejemplo, un cebador poli(T), un cebador N-mer aleatorio, un cebador específico de la diana o una secuencia de captura del agente de captura de analito como se describe en la presente descripción).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos de perfilamiento espacial descritos en la presente descripción, un elemento puede incluir una sonda de captura que incluye un código de barras espacial que comprende un oligonucleótido conmutador, por ejemplo, con un extremo 3' 3rG. Por ejemplo, puede usarse un elemento (por ejemplo, una perla de gel) con un código de barras espacial funcionalizado con una secuencia 3rG que permite la conmutación de molde (por ejemplo, conmutación de molde de transcriptasa inversa), pero no es específico para ningún ensayo particular. En algunas modalidades, los cebadores de ensayo añadidos a la reacción pueden determinar qué tipo de analitos se analizan. Por ejemplo, los cebadores de ensayo pueden incluir dominios de unión capaces de unirse a analitos biológicos diana (por ejemplo, poli (T) para ARNm, N-mer para ADN genómico, etc.). Puede generarse una sonda de captura (por ejemplo, un oligonucleótido capaz de perfilamiento espacial) mediante el uso de una enzima transcriptasa inversa/polimerasa para extenderse, que sigue a la conmutación de molde al oligonucleótido acoplador con código de barras para incorporar el código de barras y otras secuencias funcionales. En algunas modalidades, los cebadores de ensayo incluyen dominios de captura capaces de unirse a una secuencia poli(T) para el análisis de ARNm, cebadores aleatorios para el análisis genómico de ADN, o una secuencia de captura que puede unirse a una molécula de ácido nucleico acoplada a un resto de unión al analito (por ejemplo, una secuencia de captura de analito de un agente de captura de analito) o una molécula de ácido nucleico que puede funcionar como un reactivo de perturbación (por ejemplo, un ARNcr/ARNgc de CRISPR, TALEN, nucleasa con dedos de zinc, y/u oligonucleótido antisentido como se describe en la presente descripción).

IV. Métodos, composiciones y kits para generar matrices espaciales

Las matrices que capturan información espacial de analitos dentro de una muestra biológica pueden prepararse de varias maneras. Las matrices pueden diseñarse con una pluralidad de sondas de captura. Las sondas de captura pueden diseñarse para capturar una población sustancial de analitos (por ejemplo, ARNm) o para capturar analitos específicos (por ejemplo, específicos de genes). Los métodos descritos en la presente descripción proporcionan formas de preparar matrices con sondas de captura para capturar analitos.

Generalmente, las matrices pueden fabricarse de varias maneras, incluso mediante varios métodos de impresión como se describe en la presente descripción. Sin embargo, los métodos de impresión pueden llevar mucho tiempo y ser intensos en cuanto a recursos. Las matrices que incluyen sondas de captura generalmente incluyen el mismo dominio de captura (por ejemplo, un dominio de captura poli(T)), sin embargo, las sondas de captura que incluyen diferentes dominios de captura permiten la multiplexación (por ejemplo, la captura simultánea de diferentes tipos de analitos o diferentes especies del mismo tipo de analito). Por lo tanto, por ejemplo, una primera sonda de captura puede ser capaz de capturar un analito particular (por ejemplo, ARNm) y una segunda sonda de captura puede ser capaz de capturar una especie particular de ARNm, otro ARN, ADN genómico, ADNc o un analito (por ejemplo, proteína) indirectamente a través de una secuencia de captura de analito.

La presente descripción presenta métodos, composiciones y kits para generar una sonda de captura mediante la ligación de una pluralidad de oligonucleótidos donantes a una pluralidad de oligonucleótidos aceptores que incluyen un código de barras espacial. En algunas modalidades, la reacción de ligación se facilita mediante un oligonucleótido de soporte, donde el oligonucleótido de soporte incluye una secuencia complementaria a una porción del oligonucleótido aceptor (por ejemplo, una primera asa de ligación) y una porción del oligonucleótido donante (por ejemplo, una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye un dominio de captura para detectar un analito (por ejemplo, directa o indirectamente). En algunas modalidades, una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes que incluyen un primer dominio de captura se liga a oligonucleótidos aceptores. En algunas modalidades, una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes que incluyen un segundo dominio se liga a oligonucleótidos aceptores. En algunas modalidades, el primer dominio de captura y el segundo dominio de captura son diferentes (por ejemplo, capturan diferentes analitos). Por lo tanto, las matrices pueden generarse con dos o más especies de sondas de captura (por ejemplo, una primera sonda de captura con un primer dominio de captura y una segunda sonda de captura con un segundo dominio de captura) con una estrategia de ligación que permite la detección multiplexada de analitos en una muestra biológica. Las estrategias de ligación descritas en la presente descripción permiten la generación de matrices con múltiples especies de sondas de captura (por ejemplo, sondas de captura con diferentes dominios de captura para diferentes analitos de interés).

En la presente descripción se proporcionan métodos para generar matrices para el análisis espacial (por ejemplo, matrices espaciales). Las matrices espaciales pueden tener sondas de captura que pueden interactuar con analitos presentes en una muestra biológica ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, los analitos pueden ser ARN, ADN, proteína, lípidos o cualquier otro analito descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura puede interactuar con un conjugado (por ejemplo, un conjugado oligonucleótido-anticuerpo). En algunas modalidades, la sonda de captura

incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunas modalidades, una sonda de captura incluye un dominio de escisión.

En la presente descripción se proporcionan métodos para generar matrices para el análisis espacial (por ejemplo, matrices espaciales). Las matrices espaciales pueden tener sondas de captura que pueden interactuar con analitos presentes en una muestra biológica ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, los analitos pueden ser ARN, ADN, proteína, lípidos o cualquier otro analito descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, la sonda de captura es un ácido nucleico o un polipéptido. En algunas modalidades, la sonda de captura interactúa con un conjugado (por ejemplo, un conjugado oligonucleótido-anticuerpo). En algunas modalidades, la sonda de captura incluye un código de barras (por ejemplo, un código de barras espacial y/o un identificador molecular único (UMI)) y un dominio de captura. En algunas modalidades, una sonda de captura incluye un dominio de escisión.

Por lo tanto, se describen en la presente descripción métodos para generar una matriz espacial que incluye (a) proporcionar un sustrato que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un primer oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y donde el extremo 5' del primer oligonucleótido aceptor se une al sustrato; (b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal, donde un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a una segunda asa de ligación; (c) unir una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes, donde un primer oligonucleótido donante de la primera pluralidad de oligonucleótidos donantes incluye la segunda asa de ligación y un primer dominio de captura, al extremo 3' de un primer oligonucleótido aceptor para generar una primera sonda de captura, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación; y (d) ligar una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes, donde un segundo oligonucleótido donante de la pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes incluye la segunda asa de ligación y un segundo dominio de captura, al extremo 3' de un segundo oligonucleótido aceptor para generar una segunda sonda de captura, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación, para generar de esta manera una matriz espacial.

También se describen en la presente descripción métodos para generar una matriz espacial que incluye (a) proporcionar un sustrato que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y donde el extremo 5' del oligonucleótido aceptor se une al sustrato; (b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal, donde un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a una segunda asa de ligación presente en un oligonucleótido donante de una pluralidad de oligonucleótidos donantes; y (c) ligar el oligonucleótido donante que incluye un dominio de captura al extremo 3' del oligonucleótido aceptor para generar una sonda de captura, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación, para generar de esta manera una matriz espacial.

En algunas modalidades, las sondas de captura se unen a un elemento de matriz y un elemento de matriz individual puede incluir una o más sondas de captura. En algunas modalidades, un elemento de matriz individual incluye cientos o miles de sondas de captura. En algunas modalidades, las sondas de captura se asocian con un elemento individual particular, donde el elemento individual contiene una sonda de captura que incluye un código de barras espacial único para el elemento individual (por ejemplo, una región o ubicación definida sobre la matriz).

En algunas modalidades, un elemento particular puede contener sondas de captura que incluyen más de un código de barras espacial (por ejemplo, una sonda de captura en un elemento particular puede incluir un código de barras espacial no común que es diferente al código de barras espacial no común que se incluye en otra sonda de captura en el mismo elemento particular, mientras que ambas sondas de captura incluyen un segundo código de barras espacial común), donde cada código de barras espacial no común corresponde a una región o ubicación definida particular sobre la matriz. Por ejemplo, múltiples secuencias de código de barras espaciales no comunes asociadas con un elemento particular sobre una matriz pueden proporcionar una dirección o atribución más fuerte a una ubicación dada al proporcionar una confirmación duplicada o independiente de la ubicación. En algunas modalidades, los múltiples códigos de barras espaciales no comunes representan una especificidad creciente de la ubicación del punto de la matriz particular.

Como se usa en la presente descripción, la captura de analito espacial puede utilizar sondas de ácido nucleico (por ejemplo, sondas de captura) que incluyen secuencias de código de barras espaciales, que se inmovilizan en un sustrato (por ejemplo, directa o indirectamente) para generar una matriz. Las secuencias de código de barras espaciales pueden corresponder a la ubicación de las sondas de captura en la matriz. En algunas modalidades, las muestras biológicas, tales como las secciones de tejido, se colocan en la matriz y se captura un analito de la muestra biológica. En algunas modalidades, el analito capturado es una proteína. En algunas modalidades, el analito capturado es un ácido nucleico. En algunas modalidades, el analito capturado es ARN (por ejemplo, ARN mensajero). En algunas modalidades, el analito capturado es ADN (por ejemplo, ADN genómico). En algunas modalidades, el ADN de la muestra biológica se procesa, por ejemplo, se fragmenta y/o se proporciona con un dominio de unión que se hibrida con las sondas de captura en la matriz. En algunas modalidades, la reacción de extensión o ligación de la ADN

polimerasa se realiza en la muestra biológica en la matriz. En algunas modalidades, las sondas a las que se unen los ácidos nucleicos en la muestra biológica se extienden mediante el uso del ácido nucleico unido a la sonda de captura como un molde para generar hebras de ácidos nucleicos complementarias, que se inmovilizan en la superficie de la matriz. En algunas modalidades, las sondas extendidas (por ejemplo, sondas de captura que se someten a polimerización de ácido nucleico dirigida por molde mediante el uso de un analito de ácido nucleico capturado como molde) llevan información sobre la posición del analito “capturado” en la muestra biológica, por ejemplo, sección de tejido. En algunas modalidades, las sondas extendidas pueden liberarse de la superficie de la matriz, y una “biblioteca” de analitos de ácidos nucleicos capturados generados que se asocian con la información espacial, la biblioteca que luego puede analizarse, por ejemplo mediante secuenciación. En algunas modalidades, los datos de secuencia pueden entonces coincidir con una ubicación en la muestra biológica, por ejemplo, la sección de tejido. Por ejemplo, la muestra biológica puede visualizarse u obtenerse imágenes, por ejemplo, teñida y/o fotografiada, antes o después de la captura de analito para facilitar la correlación del código de barras espacial en la sonda de captura (por ejemplo, una sonda de captura extendida que se asocia con un analito dado) con una posición dentro de la muestra biológica y los datos de secuencia pueden superponerse a una imagen de la muestra biológica, por ejemplo, mediante el uso de un ordenador, mostrar el patrón de distribución de cualquier analito de interés a través de la muestra biológica. La etapa de visualización no es esencial ya que los analitos etiquetados pueden correlacionarse con una ubicación en la muestra biológica mediante el uso de otros medios, por ejemplo, el perfil único de los analitos capturados con el mismo código de barras espacial, por ejemplo, en la misma posición en la matriz, puede permitir que el analito se correlacione con una ubicación dentro de la muestra biológica en base a las características de las células o áreas de células dentro de la muestra biológica (por ejemplo, una sección de tejido). Cualquiera de una variedad de analitos puede capturarse y analizarse de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente descripción, que incluyen pero no se limitan a ARN, subtipos específicos de ARN, proteínas, anticuerpos, ADN genómico, receptores de linfocitos T, moléculas pequeñas u otros analitos.

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra un ejemplo de una sonda de captura, como se describe en la presente descripción. Como se muestra, la sonda de captura 102 está acoplada opcionalmente a un elemento 101 por un dominio de escisión 103, tal como un enlazador disulfuro. La sonda de captura puede incluir secuencias funcionales que son útiles para el procesamiento subsecuente, tales como la secuencia funcional 104, que puede incluir una secuencia de unión a la celda de flujo específica del secuenciador, por ejemplo, una secuencia P5 o P7, así como también la secuencia funcional 106, que puede incluir secuencias de cebadores de secuenciación, por ejemplo, un sitio de unión al cebador R1, un sitio de unión al cebador R2. En algunas modalidades, la secuencia 104 es una secuencia P7 y la secuencia 106 es un sitio de unión al cebador R2. Puede incluirse un código de barras espacial 105 dentro de la sonda de captura para usar en la codificación mediante código de barras del analito diana. También puede incluirse un identificador molecular único en combinación con un código de barras espacial 105. Las secuencias funcionales generalmente pueden seleccionarse para compatibilidad con cualquiera de una variedad de sistemas de secuenciación diferentes, por ejemplo, Ion Torrent Proton o PGM, instrumentos de secuenciación Illumina, PacBio, Oxford Nanopore, etc., y los requisitos de los mismos. En algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para compatibilidad con sistemas de secuenciación no comercializados. Ejemplos de tales sistemas y técnicas de secuenciación, para los cuales pueden usarse secuencias funcionales adecuadas, incluyen (pero no se limitan a) secuenciación Ion Torrent Proton o PGM, secuenciación Illumina, secuenciación PacBio SMRT y secuenciación Oxford Nanopore. Además, en algunas modalidades, las secuencias funcionales pueden seleccionarse para que sean compatibles con otros sistemas de secuenciación, incluidos sistemas de secuenciación no comercializados.

En algunas modalidades, el código de barras espacial 105, las secuencias funcionales 104 (por ejemplo, la secuencia de unión a la celda de flujo) y 106 (por ejemplo, secuencias de cebadores de secuenciación) pueden ser comunes a todas las sondas unidas a un elemento dado. La sonda de captura también puede incluir un dominio de captura 107 para facilitar la captura de un analito diana.

Sondas de captura a través de oligonucleótidos de soporte

Las sondas de captura para el análisis espacial pueden generarse mediante diferentes métodos. En algunas modalidades, la sonda de captura se genera a partir de dos o más secuencias de oligonucleótidos. En algunas modalidades, dos o más secuencias de oligonucleótidos se ligan entre sí para generar una sonda de captura. En algunas modalidades, la generación de sondas de captura puede facilitarse mediante un oligonucleótido de soporte. En algunas modalidades, una pluralidad de oligonucleótidos se une a un elemento sobre el sustrato. En algunas modalidades, los oligonucleótidos de la matriz pueden ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, los oligonucleótidos de la matriz pueden ser de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, los oligonucleótidos de la matriz pueden ser de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, los oligonucleótidos de la matriz pueden ser de aproximadamente 45 a aproximadamente 55 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, la sonda de captura incluye una o más secuencias constantes (por ejemplo, cualquiera de la variedad de secuencias constantes descritas en la presente descripción). Por ejemplo, el oligonucleótido puede tener un dominio funcional (por ejemplo, cualquiera de la variedad de dominios funcionales descritos en la presente descripción) y/o un dominio de escisión (por ejemplo, cualquiera de la variedad de dominios de escisión descritos en la presente descripción).

Generación de sondas de captura

Las sondas de captura descritas en la presente descripción pueden contener varias secuencias funcionales y un dominio de captura. En algunas modalidades, el dominio de captura captura analitos de manera imparcial. Por ejemplo, si el dominio de captura es una secuencia poli(T), el dominio de captura puede interactuar con (por ejemplo, hibridar con) la cola poli(A) de cualquier ARN poliadenilado dado, tal como ARNm o un analito o analito sustituto que se modifica para incluir una secuencia poli(A), presente en la muestra biológica, independientemente de la identidad de ese ARN poliadenilado. En algunas modalidades, el dominio de captura puede capturar analitos de manera imparcial a través de un dominio de captura que incluye una secuencia degenerada o aleatoria. Como ejemplos no limitantes, un dominio de captura puede incluir una secuencia de hexámero, octámero, nonámero o 12-mer aleatoria para una captura no sesgada.

En algunas modalidades, el dominio de captura captura analitos de manera sesgada. Por ejemplo, el dominio de captura puede ser específico de genes, de manera que puede capturarse un analito específico (por ejemplo, un ácido nucleico específico, por ejemplo, un ARNm específico o una secuencia de ADN) o un conjunto de analitos (por ejemplo, un conjunto de ácidos nucleicos, por ejemplo, un conjunto de ARNm o un conjunto de ADN, por ejemplo, un conjunto de ARNm o un conjunto de ADN que comparten una secuencia común o similar) para el análisis espacial en la muestra biológica. En algunas modalidades, el dominio de captura puede capturar analitos de ARNr. En algunas modalidades, el dominio de captura puede capturar ARNr microbiano. Por ejemplo, el dominio de captura puede contener una secuencia degenerada capaz de interactuar (por ejemplo, hibridar) con el ARNr 16S, que incluye el ARNr 16S microbiano. En algunas modalidades, la identificación del ARNr microbiano en una muestra biológica puede conducir a la identificación de especies microbianas particulares presentes en la muestra biológica. En algunas modalidades, la identificación del ARNr microbiano en una muestra biológica puede revelar si una o más especies microbianas pueden encontrarse cerca entre sí. En algunas modalidades, la identificación del ARNr microbiano puede ser indicativa de la presencia de un patógeno.

En algunas modalidades, el dominio de captura puede interactuar con analitos que contienen secuencias V(D)J, por ejemplo, una secuencia V(D)J asociada con un receptor de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T, receptor de linfocitos B). En algunas modalidades, identificar secuencias V(D)J puede identificar secuencias novedosas en las regiones receptoras de unión al antígeno de los receptores de células inmunitarias (por ejemplo, receptor de linfocitos T, receptor de linfocitos B).

En algunas modalidades, el dominio de captura puede interactuar con un dominio con código de barras del agente de captura asociado con un agente de captura de analito (por ejemplo, una secuencia de captura de analito).

Pueden generarse sondas de captura tanto para la captura de analito no sesgada como para la captura sesgada a partir de una matriz existente. En algunas modalidades, una matriz que contiene una pluralidad de oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos impresos o sintetizados in situ) puede modificarse para generar una variedad de sondas de captura. Los oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos aceptores) pueden incluir varios dominios tales como códigos de barras espaciales, UMI, dominios funcionales (por ejemplo, dominio de secuenciación), dominios de escisión y/o asas de ligación. Como se usa en la presente descripción, el término “asa de ligación” o “dominio de ligación” se refiere a una porción de un oligonucleótido aceptor que es complementario a una porción de un segundo oligonucleótido. En algunas modalidades, el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido de soporte universal que comprende una secuencia complementaria a (o sustancialmente complementaria a) una porción de un oligonucleótido donante, de manera que el oligonucleótido de soporte universal puede posicionar adyacentemente el oligonucleótido aceptor y el oligonucleótido donante para ligar el oligonucleótido donante al oligonucleótido aceptor. En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye un dominio de captura. Por ejemplo, la Figura 2 muestra un oligonucleótido aceptor en un sustrato inmovilizado (por ejemplo, una matriz), que contiene de 5' a 3' un enlazador, un dominio de escisión, un dominio funcional, un código de barras espacial, un UMI, un segundo dominio funcional y un dominio de ligación. En algunas modalidades, un oligonucleótido de soporte universal con una secuencia complementaria a (o sustancialmente complementaria a) el dominio de ligación o asa de ligación del oligonucleótido aceptor y una secuencia adicional complementaria a (o sustancialmente complementaria a (por ejemplo, una segunda asa de ligación)) un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido donante) que contiene un dominio de captura poli(T) facilita la ligación del oligonucleótido aceptor y el oligonucleótido donante que contiene el dominio de captura. En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia poli(T). En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia específica a un ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ARNm o ADN). En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia específica de genes. En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia única (por ejemplo, una secuencia diseñada para capturar indirectamente un analito). En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia específica para un subconjunto de ácidos nucleicos (por ejemplo, un subconjunto de secuencias de ARNm o ADN que comparten una secuencia común o similar). En modalidades donde la secuencia de oligonucleótidos de soporte complementaria a (o sustancialmente complementaria a) el dominio de captura es una secuencia poli(A), el oligonucleótido de soporte puede facilitar la ligación de un oligonucleótido donante que comprende un dominio de captura poli(T) al oligonucleótido. En modalidades donde la secuencia de oligonucleótidos de soporte complementaria a (o sustancialmente complementaria a) el dominio de captura es una secuencia específica de un ácido nucleico, el oligonucleótido de soporte puede facilitar la ligación de ese oligonucleótido donante con el dominio de captura específico al oligonucleótido aceptor. En modalidades donde

la secuencia de oligonucleótidos de soporte complementaria a (o sustancialmente complementaria a) el dominio de captura es una secuencia específica para un subconjunto de ácidos nucleicos, el oligonucleótido de soporte puede facilitar la ligación de ese dominio de captura al oligonucleótido aceptor. El ARNm de Penk se usa en la presente descripción solo con fines ilustrativos y la presente descripción no se limita al ensayo de la expresión del gen Penk.

En algunas modalidades, una matriz que contiene una pluralidad de oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos impresos o sintetizados in situ) puede modificarse para generar una variedad de sondas de captura. Los oligonucleótidos aceptores pueden incluir varios dominios tales como, sin limitarse a, códigos de barras espaciales, UMI, dominios funcionales (por ejemplo, dominios de secuenciación, dominios de amplificación, etc.), dominios de escisión y/o dominios de ligación. Por ejemplo, la Figura 5 muestra una estrategia ilustrativa donde un oligonucleótido aceptor que tiene un dominio de ligación se inmoviliza en un sustrato (por ejemplo, una matriz). En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor mostrado en la Figura 5 contiene de 5' a 3' uno o más de (por ejemplo, cada uno de) un modificador amino C6, una secuencia de politimina (por ejemplo, 5 timinas), un dominio de secuenciación (por ejemplo, R1), un código de barras espacial (por ejemplo, un código de barras espacial de 16 pares de bases), un UMI (por ejemplo, un UMI de 12 pares de bases) y un dominio de ligación (por ejemplo, una primera asa de ligación de 7 pares de bases que comprende la SEQ ID NO: 9). La Figura 5 muestra el dominio de ligación en el extremo 3' del oligonucleótido aceptor. En algunas modalidades, el dominio de ligación puede ser complementario a (o sustancialmente complementario a) una secuencia en el oligonucleótido de soporte (por ejemplo, un oligonucleótido de soporte universal). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte puede tener una secuencia complementaria a (o sustancialmente complementaria a) un segundo dominio de ligación que está presente en un oligonucleótido que también incluye un dominio de captura. En algunas modalidades, el dominio de captura puede ser cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, puede generarse una pluralidad de sondas de captura mediante el uso de un oligonucleótido de soporte universal. Un oligonucleótido de soporte universal permite generar cualquier sonda de captura con un dominio de captura de interés. Por ejemplo, un oligonucleótido de soporte universal puede diseñarse para ser complementario a (o sustancialmente complementario a) una primera asa de ligación (por ejemplo, una primera asa de ligación constante) y una segunda asa de ligación (por ejemplo, una segunda asa de ligación constante), en donde la primera asa de ligación está presente en una pluralidad de oligonucleótidos aceptores y en donde la segunda asa de ligación está presente en una pluralidad de oligonucleótidos donantes. En algunas modalidades, la eficiencia de ligar un primer oligonucleótido donante que tiene un primer dominio de captura a un oligonucleótido aceptor (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor que tiene un código de barras espacial) mediante el uso de un oligonucleótido de soporte universal es el mismo o aproximadamente el mismo que la eficiencia de ligar un segundo oligonucleótido donante que incluye tener un segundo dominio de captura a un oligonucleótido aceptor mediante el uso del oligonucleótido de soporte universal (por ejemplo, la eficiencia de la ligación es la misma o aproximadamente la misma independientemente del dominio de captura presente en el oligonucleótido donante). El uso de un oligonucleótido de soporte universal puede reducir el costo y la complejidad en la generación de sondas de captura en un sustrato (por ejemplo, una matriz). Alternativa o adicionalmente, un oligonucleótido de soporte universal puede facilitar la ligación de dos o más oligonucleótidos donantes diferentes a dos o más oligonucleótidos aceptores. Por ejemplo, los oligonucleótidos donantes pueden tener dominios de captura específicos para dos o más analitos diferentes (por ejemplo, ARN, ADN, proteína, cualquier otro analito descrito en la presente descripción). Como tal, el uso de un oligonucleótido de soporte universal puede usarse para ligar cualquiera de uno, dos, tres o cuatro o más dominios de captura como se encuentra en oligonucleótidos donantes a oligonucleótidos aceptores en una matriz, lo que genera de esta manera una matriz que es capaz de capturar múltiples analitos diana diferentes en una matriz.

En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es comparable en la captura de un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente en el soporte). En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es aproximadamente un 80 % eficiente para capturar un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente sobre el soporte). En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es aproximadamente un 85 % eficiente para capturar un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente en el soporte). En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es aproximadamente un 90 % eficiente para capturar un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente sobre el soporte). En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es aproximadamente un 95 % eficiente para capturar un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente sobre el soporte). En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es aproximadamente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % eficiente para capturar un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente sobre el soporte). En algunas modalidades, una sonda de captura generada a través de la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal es tan eficiente para capturar un analito como una sonda de captura generada por otros medios (por ejemplo, impresa directamente sobre el soporte).

12 y b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, en donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxiadenina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'). En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12 y b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, en donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxicitosina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'). En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12 y b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, en donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxiguanina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5').

En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12 y b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, y c) un oligonucleótido donante que tiene la SEQ ID NO: 19. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12, b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxitimina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende una de las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 o 19. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12, b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, en donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxiadenina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende una de las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 o 19. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12, b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, en donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxicitosina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende una de las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 o 19. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 12, b) un oligonucleótido de soporte universal que tiene la SEQ ID NO: 13, en donde el oligonucleótido de soporte universal incluye un nucleótido de didesoxiguanina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende una de las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 o 19.

En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 30 b) un oligonucleótido de soporte de SEQ ID NO: 21, y c) un oligonucleótido donante de SEQ ID NO: 25. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 31 b) un oligonucleótido de soporte de SEQ ID NO: 22, y c) un oligonucleótido donante de SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 32 b) un oligonucleótido de soporte de SEQ ID NO: 23, y c) un oligonucleótido donante de SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que incluye a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 33 b) un oligonucleótido de soporte de SEQ ID NO: 24, y c) un oligonucleótido donante de SEQ ID NO: 28.

En cualquiera de las composiciones descritas anteriormente, los oligonucleótidos donantes (por ejemplo, un oligonucleótido donante que tiene las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 y 19) pueden incluir uno o más enlaces fosforotioato en su extremo 3'. Por ejemplo, en cualquiera de las composiciones descritas anteriormente, un enlace fosforotioato puede estar entre el último nucleótido y del segundo al último nucleótido del oligonucleótido donante (por ejemplo, un oligonucleótido donante que tiene las SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18 y 19), entre el segundo al último nucleótido y del tercer al último nucleótido del oligonucleótido donante, entre el tercer al último nucleótido y del cuarto al último nucleótido, y sus combinaciones.

La Figura 5 muestra un ejemplo de una estrategia de ligación con un oligonucleótido aceptor que incluye una primera asa de ligación en el extremo 3' del oligonucleótido aceptor. En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor mostrado en la Figura 5 incluye un dominio de escisión (por ejemplo, una secuencia de politimina, por ejemplo, una secuencia de pentatimina). En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor mostrado en la Figura 5 incluye un dominio funcional (por ejemplo, un asa de secuenciación, por ejemplo, R1, por ejemplo, un dominio de amplificación). En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor mostrado en la Figura 5 incluye un identificador molecular único. La SEQ ID NO: 12 es un ejemplo de una primera asa de ligación de un oligonucleótido aceptor. La Figura 5 también muestra un oligonucleótido donante que incluye una segunda asa de ligación y un dominio de captura. La ligación del oligonucleótido aceptor y el oligonucleótido donante puede facilitarse mediante un oligonucleótido de soporte (por ejemplo, un oligonucleótido de soporte universal que comprende la SEQ ID NO: 13). En algunas modalidades, un oligonucleótido de soporte universal difiere de la SEQ ID NO: 13 por uno, dos, tres o cuatro nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia que es al menos 80 %, 85 %, 90 % o 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades donde el oligonucleótido de soporte universal difiere de la SEQ ID NO: 13, la primera asa de ligación, la segunda asa de ligación, o ambos pueden alterarse para incluir los correspondientes cambios complementarios de nucleótidos. En algunas modalidades donde el oligonucleótido de soporte universal difiere de la SEQ ID NO: 13, la primera asa de ligación, la segunda asa de ligación, o ambos pueden no alterarse de manera que aunque hay errores de apareamiento entre el oligonucleótido de soporte universal y la

primera asa de ligación, la segunda asa de ligación, o ambos, el oligonucleótido de soporte aún es capaz de hibridarse con la primera y segunda asas de ligación.

En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal puede tener una secuencia sustancialmente complementaria a un asa de ligación (por ejemplo, una primera asa de ligación) presente en el oligonucleótido aceptor. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal puede tener una secuencia sustancialmente complementaria a un asa de ligación (por ejemplo, una segunda asa de ligación) presente en el oligonucleótido donante. En algunas modalidades, el dominio de captura del oligonucleótido donante puede ser cualquier dominio de captura descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, el dominio de captura del oligonucleótido donante puede interactuar con analitos que contienen una secuencia poli(A), secuencia(s) específica(s) de genes, una secuencia V(D)J, secuencias de captura de analito, secuencias ribosómicas (por ejemplo, 16s) o cualquier otro analito descrito en la presente descripción. En algunas modalidades, una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes que incluyen un primer dominio de captura se liga a una primera pluralidad de oligonucleótidos aceptores. En algunas modalidades, una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes que inducen un segundo dominio de captura se liga a una segunda pluralidad de oligonucleótidos aceptores. En algunas modalidades, el primer dominio de captura y el segundo dominio de captura son diferentes (por ejemplo, el primer dominio de captura y el segundo dominio de captura capturan diferentes analitos).

En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye una segunda asa de ligación sustancialmente complementaria o complementaria a una porción del oligonucleótido de soporte universal (por ejemplo, los nucleótidos 1-7 de la SEQ ID NO: 15) y el dominio de captura incluye una secuencia poli(T) (por ejemplo, los nucleótidos 8 a 37 de la SEQ ID NO: 15). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye una segunda asa de ligación sustancialmente complementaria o complementaria a una porción del oligonucleótido de soporte universal (por ejemplo, los nucleótidos 1-7 de la SEQ ID NO: 16) y el dominio de captura incluye una secuencia de hexámero aleatoria (por ejemplo, los nucleótidos 8-13 de la SEQ ID NO: 16). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye una segunda asa de ligación sustancialmente complementaria o complementaria a una porción del oligonucleótido de soporte universal (por ejemplo, los nucleótidos 1-7 de la SEQ ID NO: 17) y el dominio de captura incluye una secuencia de nonámero aleatorio (por ejemplo, los nucleótidos 8-16 de la SEQ ID NO: 17). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye una segunda asa de ligación sustancialmente complementaria o complementaria a una porción del oligonucleótido de soporte universal (por ejemplo, los nucleótidos 1-7 de la SEQ ID NO: 18) y el dominio de captura incluye una secuencia aleatoria de 12-mer (por ejemplo, los nucleótidos 8-19 de la SEQ ID NO: 18). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye una segunda asa de ligación sustancialmente complementaria o complementaria a una porción del oligonucleótido de soporte universal (por ejemplo, los nucleótidos 1-7 de la SEQ ID NO: 18) y el dominio de captura incluye la secuencia de captura 1 (por ejemplo, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 19). En algunas modalidades, el dominio de captura incluye la secuencia de captura 2 (SEQ ID NO: 20). En algunas modalidades, la secuencia de captura 2 puede ser complementaria a una secuencia de captura de analito como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye el identificador molecular único en lugar del oligonucleótido aceptor. Por ejemplo, en una dirección 5' a 3' el oligonucleótido donante puede incluir la segunda asa de ligación, el identificador molecular único (UMI) y el dominio de captura (por ejemplo, cualquiera de los dominios de captura descritos en la presente descripción). En algunas modalidades, el oligonucleótido donante puede tener una asa de ligación (por ejemplo, una segunda asa de ligación) que es sustancialmente complementaria a una secuencia en el oligonucleótido de soporte. En algunas modalidades, la segunda asa de ligación es de aproximadamente 5 a 15 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la segunda asa de ligación puede tener aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la segunda asa de ligación presente en el oligonucleótido donante puede ser los primeros 11 nucleótidos (posiciones de nucleótidos 1 a 11) en las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29. En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia aleatoria. En algunas modalidades, el dominio de captura es una secuencia específica de genes. En algunas modalidades, el dominio de captura incluye una secuencia poli(T). En algunas modalidades, la secuencia poli(T) puede ser de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia poli(T) puede ser de aproximadamente 20 nucleótidos a aproximadamente 45 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia poli(T) puede ser de aproximadamente 25 nucleótidos a aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia poli(T) puede ser de aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia poli(T) (por ejemplo, dominio de captura) puede ser 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 o más nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el identificador molecular único es una secuencia de 12-mer. Por ejemplo, en oligonucleótidos donantes con las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 y 29, el UMI se denota por la secuencia "N" de 12-mer que sigue a la segunda asa de ligación. En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye un marcaje fluorescente. En algunas modalidades, el oligonucleótido donante incluye un marcaje fluorescente en su extremo 3'.

En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor se prepara mediante síntesis *in situ* en la matriz. Los ejemplos no limitantes de síntesis de oligonucleótidos *in situ* (por ejemplo, oligonucleótidos aceptores) incluyen síntesis dirigida a la luz o síntesis en fase sólida. En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor puede tener una asa de ligación (por ejemplo, una primera asa de ligación) que es sustancialmente complementaria a una secuencia en el

oligonucleótido de soporte. En algunas modalidades, la primera asa de ligación es de aproximadamente 5 a 15 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la primera asa de ligación puede tener aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor puede ser los 11 nucleótidos finales en el extremo 3' de un oligonucleótido aceptor como se encuentra en las SEQ ID NO: 30, 31, 32 y 33. En algunas modalidades, el oligonucleótido aceptor incluye un dominio de escisión, uno o más dominios funcionales, un código de barras espacial o cualquiera de sus combinaciones.

En algunas modalidades, un oligonucleótido de soporte facilita la ligación del oligonucleótido "donante" y el oligonucleótido "aceptor". En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte es de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte tiene aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte es de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte tiene 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte se libera del oligonucleótido aceptor y del oligonucleótido donante. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte incluye una secuencia sustancialmente complementaria a la primera asa de ligación del nucleótido aceptor. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte incluye una secuencia sustancialmente complementaria a la segunda asa de ligación del oligonucleótido donante. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte puede hibridar tanto la primera asa de ligación del oligonucleótido aceptor como la segunda asa de ligación del oligonucleótido donante al mismo tiempo. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte facilita la ligación del oligonucleótido "aceptor" y el oligonucleótido "donante". En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte se libera después de la ligación del oligonucleótido "aceptor" y el oligonucleótido "donante".

En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte V2-1 (SEQ ID NO: 21) facilita la ligación del asa de ligación del oligonucleótido aceptor V2-1 (SEQ ID NO: 30) al oligonucleótido donante UMI-V2-1 (SEQ ID NO: 25). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte V2-1 (SEQ ID NO: 21) facilita la ligación del asa de ligación del oligonucleótido aceptor V2-1 (SEQ ID NO: 30) al oligonucleótido donante UMI-Cy3 (SEQ ID NO: 29). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte V2-2 (SEQ ID NO: 22) facilita la ligación del asa de ligación del oligonucleótido aceptor V2-2 (SEQ ID NO: 31) al oligonucleótido donante UMI-V2-2 (SEQ ID NO: 26). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte V2-3 (SEQ ID NO: 23) facilita la ligación del asa de ligación del oligonucleótido aceptor V2-3 (SEQ ID NO: 32) al oligonucleótido donante UMI-V2-3 (SEQ ID NO: 27). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte V2-4 (SEQ ID NO: 24) facilita la ligación del asa de ligación del oligonucleótido aceptor V2-4 (SEQ ID NO: 33) al oligonucleótido donante UMI-V2-4 (SEQ ID NO: 28).

En algunas modalidades, un oligonucleótido donante (por ejemplo, un oligonucleótido donante que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 o 29) puede incluir uno o más enlaces fosforotioato en su extremo 3'. Por ejemplo, en algunas modalidades, un enlace fosforotioato puede estar entre el último nucleótido y del segundo al último nucleótido del oligonucleótido donante (por ejemplo, un oligonucleótido donante que comprende una secuencia de las SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28 o 29), entre el segundo al último nucleótido y del tercer al último nucleótido del oligonucleótido donante, entre el tercer al último nucleótido y del cuarto al último nucleótido, o cualquiera de sus combinaciones.

Composiciones y kits

También se describen en la presente descripción pero no forma parte de la invención reivindicada, kits que incluyen (a) una matriz que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación; (b) una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal; y (c) una ligasa.

En algunos kits, el oligonucleótido aceptor incluye la SEQ ID NO: 12. En algunos kits, un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal incluye una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunos kits, el oligonucleótido de soporte incluye la SEQ ID NO: 13.

En algunos kits, la ligasa es la T4 ligasa. En algunos kits, el kit incluye una transcriptasa inversa. En algunos kits, el kit incluye una ADN polimerasa.

En algunos kits, el kit incluye uno o más reactivos de permeabilización. En algunos kits, el kit incluye uno o más inhibidores de ARNasa. En algunos kits, el kit incluye instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

También se describen en la presente descripción pero no forman parte de la invención reivindicada, composiciones que incluyen (i) un oligonucleótido aceptor que incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, donde el extremo 5' del oligonucleótido aceptor se une a un sustrato; (ii) un primer oligonucleótido donante que incluye una segunda asa de ligación y un dominio de captura poli(T); y (iii) un oligonucleótido de soporte universal que incluye

una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a la segunda asa de ligación, y donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación del oligonucleótido aceptor y la segunda asa de ligación del oligonucleótido donante.

También se describen en la presente descripción pero no forman parte de la invención reivindicada, composiciones que incluyen (i) un primer oligonucleótido aceptor que incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación, donde el extremo 5' del oligonucleótido aceptor se une a un sustrato; (ii) un primer oligonucleótido donante que incluye una segunda asa de ligación y un dominio de captura poli(T); (iii) un segundo oligonucleótido donante que incluye la segunda asa de ligación y una secuencia que incluye la SEQ ID NO: 20; (iv) un primer oligonucleótido de soporte universal que incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a la segunda asa de ligación, y donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación del primer oligonucleótido aceptor y la segunda asa de ligación del primer oligonucleótido donante; y (v) un segundo oligonucleótido de soporte universal que incluye una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a la segunda asa de ligación, y donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación del segundo oligonucleótido aceptor y la segunda asa de ligación del segundo oligonucleótido donante.

También se describen en la presente descripción pero no forman parte de la invención reivindicada, composiciones que incluyen al menos uno de una pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores que incluyen un código de barras espacial ligado a al menos uno de una pluralidad de primeros oligonucleótidos donantes que incluyen un primer dominio de captura, donde la pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores se une a un sustrato, al menos uno de la pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores que incluyen un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y al menos uno de una pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes que incluyen una segunda asa de ligación y un segundo dominio de captura, y un oligonucleótido de soporte universal, donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con una primera asa de ligación de al menos uno de una pluralidad de primeros oligonucleótidos aceptores y la segunda asa de ligación de al menos uno de la pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes.

En la presente descripción, pero no forma parte de la invención reivindicada, se describen kits que incluyen (a) una matriz que comprende una pluralidad de oligonucleótidos aceptores, donde un oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial y una primera asa de ligación; (b) una pluralidad de oligonucleótidos de soporte; y (c) una ligasa. En algunos kits, el oligonucleótido aceptor comprende el asa de ligación de SEQ ID NO: 12. En algunos kits, un oligonucleótido de soporte de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13. En algunos kits, el oligonucleótido de soporte comprende la SEQ ID NO: 13. En algunos kits, la ligasa es la T4 ligasa. En algunos kits, el kit incluye una transcriptasa inversa. En algunos kits, el kit incluye una ADN polimerasa. En algunos kits, el kit incluye uno o más reactivos de permeabilización. En algunos kits, el kit incluye además uno o más inhibidores de ARNasa. En algunos kits, el kit incluye instrucciones para realizar cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 30, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 21, donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de timina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 25 y/o 29. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 31, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 22, donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de timina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 32, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 23, donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de timina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 33, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 24, donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de timina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 28.

En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 30 b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 21, en donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de adenina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 25 y/o 29. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 31 b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 22, donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de adenina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 32 b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 23, en donde el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte es un nucleótido de adenina invertido (por ejemplo, enlace inverso 3' a 3'), y c) un oligonucleótido donante

oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxiadenuína invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 28.

En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 30, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 21, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxicitosina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 25 y/o 29. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 31, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 22, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxicitosina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 32, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 23, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxicitosina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 33, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 24, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxicitosina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 28.

En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 30, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 21, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxiguanina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 25 y/o 29. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 31, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 22, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxiguanina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 26. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 32, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 23, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxiguanina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 27. En algunas modalidades, se describe una composición o un kit que comprende a) un oligonucleótido aceptor que comprende un asa de ligación de SEQ ID NO: 33, b) un oligonucleótido de soporte que comprende la SEQ ID NO: 24, donde el oligonucleótido de soporte incluye un nucleótido de didesoxiguanina invertido (por ejemplo, enlace inverso 5' a 5'), y c) un oligonucleótido donante que comprende la SEQ ID NO: 28.

Multiplexación

Como se describe en la presente descripción, las sondas de captura pueden generarse mediante la ligación mediada por oligonucleótidos de soporte universal para generar matrices con dos o más dominios de captura (por ejemplo, dos o más dominios de captura específicos para diferentes analitos). En algunas modalidades, puede generarse una matriz (por ejemplo, un elemento en la matriz) con sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 15 y sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 16. En algunas modalidades, puede generarse una matriz (por ejemplo, un elemento en la matriz) con sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 15 y sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, puede generarse una matriz (por ejemplo, un elemento en la matriz) con sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 15 y sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 18. En algunas modalidades, puede generarse una matriz (por ejemplo, un elemento en la matriz) con sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 15 y sondas de captura que incluyen la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, la matriz (por ejemplo, un elemento en la matriz) incluye aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 16 (por ejemplo, nucleótidos 8-13 de la SEQ ID NO: 16) y aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, los nucleótidos 8 a 37 de la SEQ ID NO: 15). En algunas modalidades, la matriz incluye aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 17 (por ejemplo, los nucleótidos 8-16 de la SEQ ID NO: 17) y aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, los nucleótidos 8 a 37 de la SEQ ID NO: 15). En algunas modalidades, la matriz incluye aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 18 (por ejemplo, los nucleótidos 8-19 de la SEQ ID NO: 18) y aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, los nucleótidos 8 a 37 de la SEQ ID NO: 15). En algunas modalidades, la matriz incluye aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 19 (por ejemplo, los nucleótidos 8-28 de la SEQ ID NO: 19) y aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 % de sondas de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, los nucleótidos 8 a 37 de la SEQ ID NO: 15). En algunas modalidades, la matriz incluye aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 % de sondas de captura con sondas de captura específicas de genes y aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 % de sondas

de captura con dominios de captura que comprenden la SEQ ID NO: 15 (por ejemplo, los nucleótidos 8 a 37 de la SEQ ID NO: 15).

En algunas modalidades, la matriz (por ejemplo, un elemento en la matriz) incluye una relación de sondas de captura con un segundo dominio de captura para capturar sondas con un primer dominio de captura de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:15, de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:12, de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 1:10, de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:8, o de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 1:7. En algunas modalidades, el primer dominio de captura y el segundo dominio de captura son diferentes. Por ejemplo, el primer dominio de captura puede incluir una secuencia poli(T) y el segundo dominio de captura puede incluir una secuencia única, tal secuencia específica de genes. Además, el primer dominio de captura puede ser una primera secuencia única y la segunda sonda de captura puede ser una segunda secuencia única, ambas capaces de capturar, por ejemplo, diferentes secuencias específicas de genes. Sin embargo, se apreciará que puede lograrse una relación deseada de cualquier combinación de dominios de captura (por ejemplo, un primer dominio de captura, un segundo dominio de captura) mediante los métodos descritos en la presente descripción.

Para reducir o eliminar reacciones de ligación no deseadas (por ejemplo, para asegurar que la ligación ocurra solo o principalmente entre un oligonucleótido aceptor y un oligonucleótido donante), el oligonucleótido de soporte universal, el oligonucleótido donante, o ambos pueden modificarse. Por ejemplo, el extremo 3' del oligonucleótido de soporte universal puede modificarse con una base invertida para evitar eventos de ligación no deseados (por ejemplo, ligación de oligonucleótidos de soporte universal entre sí o ligación de oligonucleótidos de soporte universal a un oligonucleótido donante). En algunas modalidades, la base invertida es un enlace inverso de 3' a 3' (Figura 18A). En algunas modalidades, el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte universal es un nucleótido de timina invertido. En algunas modalidades, el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte universal es un nucleótido de adenina invertido. En algunas modalidades, el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte universal es un nucleótido de citosina invertido. En algunas modalidades, el nucleótido más 3' del oligonucleótido de soporte universal es un nucleótido de guanina invertido. En algunas modalidades, la base invertida es un enlace inverso de 5' a 5' (Figura 18B). En algunas modalidades, la base invertida en un enlace inverso 5' a 5' es un nucleótido de didesoxitimina. En algunas modalidades, la base invertida en un enlace inverso 5' a 5' es un nucleótido de didesoxiadenina. En algunas modalidades, la base invertida en un enlace inverso 5' a 5' es un nucleótido de didesoxicitosina. En algunas modalidades, la base invertida en un enlace inverso 5' a 5' es un nucleótido de didesoxiguanina. Otros métodos adecuados pueden usarse para evitar la ligación no deseada y se conocen en la técnica. Por ejemplo, un 3'ddC, un dT invertido 3', un separador de C3 3', un amino 3' y una fosforilación 3' son otros métodos que pueden usarse para evitar una ligación no deseada.

En algunas modalidades, el extremo 3' del oligonucleótido donante (por ejemplo, cualquiera de los oligonucleótidos donantes que incluyen un dominio de captura descrito en la presente descripción) puede modificarse con enlaces fosforotioato entre nucleótidos para evitar la degradación por una nucleasa (por ejemplo, una exonucleasa). En algunas modalidades, puede estar presente un enlace fosforotioato entre el último y segundo hasta el último nucleótido en el extremo 3'. Alternativa o adicionalmente, un enlace fosforotioato puede estar presente entre el segundo al último nucleótido y del tercero al último nucleótido en el extremo 3'. En algunas modalidades, un enlace fosforotioato puede estar presente entre el segundo al último nucleótido y del tercero al último y del cuarto al último nucleótido en el extremo 3'. En algunas modalidades, un enlace fosforotioato puede estar presente entre el último y segundo al último nucleótido, entre el segundo y último nucleótido y del tercero al último nucleótido, entre el tercer y último nucleótido y del cuarto al último nucleótido en el extremo 3', y sus combinaciones.

En algunas modalidades, el extremo 3' del oligonucleótido aceptor (por ejemplo, cualquiera de los oligonucleótidos aceptores que incluyen un dominio de captura descrito en la presente descripción) puede modificarse con enlaces fosforotioato entre nucleótidos para evitar la degradación por una nucleasa (por ejemplo, una exonucleasa). En algunas modalidades, puede estar presente un enlace fosforotioato entre el último y segundo hasta el último nucleótido en el extremo 3'. Alternativa o adicionalmente, un enlace fosforotioato puede estar presente entre el segundo al último nucleótido y del tercero al último nucleótido en el extremo 3'. En algunas modalidades, un enlace fosforotioato puede estar presente entre el segundo al último nucleótido y del tercero al último y del cuarto al último nucleótido en el extremo 3'. En algunas modalidades, un enlace de fosforotioato puede estar presente entre el último y segundo al último nucleótido, entre el segundo al último nucleótido y del tercero al último nucleótido, entre el tercer al último nucleótido y del cuarto al último nucleótido en el extremo 3', y sus combinaciones en el oligonucleótido aceptor.

En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia que es complementaria a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, y una secuencia que es complementaria a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido donante) que contiene un dominio de captura, o una porción de la misma (por ejemplo, complementaria al dominio de captura o una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia que es perfectamente complementaria (por ejemplo, es 100 % complementario) a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, y/o una secuencia que es perfectamente complementaria a un oligonucleótido que contiene un dominio de captura, o una

porción de la misma (por ejemplo, perfectamente complementaria al dominio de captura o una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia que no es perfectamente complementaria (por ejemplo, no es 100 % complementaria) a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, y/o una secuencia que no es perfectamente complementaria a un oligonucleótido que contiene un dominio de captura, o una porción de la misma (por ejemplo, no es perfectamente complementaria al dominio de captura o a una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal, que incluye el oligonucleótido de soporte universal, incluye una secuencia que es al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % complementaria a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, y/o una secuencia que es complementaria a un oligonucleótido que contiene un dominio de captura, o una porción de la misma (por ejemplo, al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % complementaria al dominio de captura o una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia que es perfectamente complementaria (por ejemplo, es 100 % complementaria) a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, pero no es perfectamente complementaria a una secuencia que es complementaria a un oligonucleótido que contiene un dominio de captura, o una porción de la misma (por ejemplo, no es perfectamente complementaria al dominio de captura o a una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación). En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal incluye una secuencia que no es perfectamente complementaria (por ejemplo, no es 100 % complementaria) a un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, pero es perfectamente complementaria a una secuencia que es complementaria a un oligonucleótido que contiene un dominio de captura, o una porción de la misma (por ejemplo, perfectamente complementaria al dominio de captura o una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación). Siempre que el oligonucleótido de soporte universal sea capaz de hibridarse con un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor, por ejemplo, una primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor), o una porción de la misma, y a una secuencia que es complementaria a un oligonucleótido que contiene un dominio de captura, o una porción de la misma (por ejemplo, al dominio de captura o una porción del dominio de captura en sí o a una segunda asa de ligación), el oligonucleótido de soporte universal no necesita tener una secuencia que sea perfectamente complementaria al oligonucleótido aceptor o al oligonucleótido donante.

El oligonucleótido de soporte universal puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal puede ser de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal puede ser de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 nucleótidos de largo. En algunas modalidades, el oligonucleótido de soporte universal puede tener 14 nucleótidos de largo.

En algunas modalidades, se genera la matriz espacial mediante ligar oligonucleótidos donantes que incluyen dominios de captura (por ejemplo, dominios de captura poli(T) o específicos de genes) a los oligonucleótidos aceptores, para generar una matriz que tiene una pluralidad de sondas de captura. La matriz espacial puede usarse con cualquiera de los métodos de análisis espacial descritos en la presente descripción. Por ejemplo, una muestra biológica puede proporcionarse a la matriz espacial generada. En algunas modalidades, la muestra biológica se permeabiliza. En algunas modalidades, la muestra biológica se permeabiliza en condiciones suficientes para permitir que uno o más analitos presentes en la muestra biológica interactúen con las sondas de captura generadas de la matriz espacial. Después de la captura de analitos en la muestra biológica, los analitos pueden analizarse (por ejemplo, transcribirse, amplificarse y/o secuenciarse de manera inversa) mediante el uso de cualquiera de la variedad de métodos descritos en la presente descripción.

Eficiencia de ligación

Como se usa en la presente descripción, el término “código de barras de ligación” se refiere a una secuencia única presente en el oligonucleótido donante. En algunas modalidades, una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes tiene un primer código de barras de ligación. En algunas modalidades, una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes tiene un segundo código de barras de ligación. En algunas modalidades, una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes tiene un tercer código de barras de ligación. En algunas modalidades, una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes tiene un cuarto código de barras de ligación. En algunas modalidades, el primer código de barras de ligación, el segundo código de barras de ligación, el tercer código de barras de ligación y el cuarto código de barras de ligación son diferentes. En algunas modalidades, detectar la presencia del primer código de barras de ligación y el segundo código de barras de ligación indica la eficiencia de la primera reacción de ligación.

En algunas modalidades, el oligonucleótido donante de la segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes se liga al extremo 3' de un segundo oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores para generar un segundo producto de ligación mediante el uso de un segundo oligonucleótido de soporte de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte (por ejemplo, cualquiera de los oligonucleótidos de soporte descritos en la presente

descripción), donde el segundo oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores incluye un código de barras espacial, el primer dominio adaptador, y la primera asa de ligación y el segundo oligonucleótido de soporte de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte incluyen una secuencia sustancialmente complementaria a al menos una porción del segundo oligonucleótido aceptor y una secuencia sustancialmente complementaria a al menos una porción del oligonucleótido donante de la segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes.

En algunas modalidades, se genera una segunda hebra que es sustancialmente complementaria al segundo producto de ligación y se mide cuantitativamente para detectar la presencia del segundo código de barras de ligación, o un complemento del mismo, para determinar de esta manera la presencia del segundo oligonucleótido aceptor en el sustrato.

En algunas modalidades, se genera una segunda hebra que es sustancialmente complementaria al primer producto de ligación, al segundo producto de ligación, o a ambos, e incluye el uso de una ADN polimerasa (por ejemplo, cualquiera de las ADN polimerasas descritas en la presente descripción). En algunas modalidades, la polimerasa es una T4 ADN polimerasa.

En algunas modalidades, la eficiencia de ligar una pluralidad de primeros oligonucleótidos donantes que tienen un primer código de barras de ligación a un oligonucleótido aceptor (por ejemplo, un oligonucleótido aceptor que tiene un código de barras espacial) mediante el uso de un oligonucleótido de soporte es de aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 %, de aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 % o aproximadamente 80 %. En algunas modalidades, la eficiencia de ligar una pluralidad de primeros oligonucleótidos donantes a una pluralidad de oligonucleótidos aceptores mediante el uso de un oligonucleótido de soporte es aproximadamente 60 %, aproximadamente 61 %, aproximadamente 62 %, aproximadamente 63 %, aproximadamente 64 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 66 %, aproximadamente 67 %, aproximadamente 68 %, aproximadamente 69 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 71 %, aproximadamente 72 %, aproximadamente 73 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % o aproximadamente 100 %.

En algunas modalidades, la primera reacción de ligación procede durante una cierta cantidad de tiempo antes de que se produzca la segunda reacción de ligación (por ejemplo, un segundo oligonucleótido donante ligado a un segundo oligonucleótido aceptor). En algunas modalidades, la segunda reacción de ligación continúa durante una cierta cantidad de tiempo antes de que ocurra la tercera reacción de ligación. En algunas modalidades, la tercera reacción de ligación continúa durante una cierta cantidad de tiempo antes de que ocurra la cuarta reacción de ligación. En algunas modalidades, la primera reacción de ligación, la segunda reacción de ligación, la tercera reacción de ligación, o la cuarta reacción de ligación procede de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 10 horas, de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 40 minutos a aproximadamente 5,5 horas, de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 5 horas, de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 4,5 horas, de aproximadamente 1,5 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3,5 horas, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3 horas.

Un oligonucleótido de soporte puede reducir el costo y la complejidad de los productos de ligación en un sustrato. Por ejemplo, un oligonucleótido de soporte puede facilitar la ligación de dos o más oligonucleótidos donantes diferentes a la pluralidad de oligonucleótidos aceptores. La eficiencia de la ligación de la primera reacción de ligación (por ejemplo, la primera pluralidad de oligonucleótidos donantes ligados a los oligonucleótidos aceptores) puede medirse. Por ejemplo, una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes puede tener un código de barras de ligación diferente (por ejemplo, un primer código de barras de ligación) que un código de barras de ligación (por ejemplo, un segundo código de barras de ligación) presente en un oligonucleótido donante de una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes.

En algunas modalidades, medir cuantitativamente la presencia del primer código de barras de ligación o un complemento del mismo, el segundo código de barras de ligación o un complemento del mismo, o ambos, incluye el uso de PCR cuantitativa. En algunas modalidades, la amplificación mediante PCR incluye la amplificación con un cebador sustancialmente complementario a un primer adaptador y un cebador sustancialmente complementario a un segundo adaptador. En algunas modalidades, la PCR cuantitativa incluye un ensayo "TAQMAN™". En algunas modalidades, la PCR cuantitativa incluye el uso de un colorante. En algunas modalidades, el colorante es un colorante de intercalación de ADN tal como un colorante "SYBR®" (por ejemplo, SYBR Green). En algunas modalidades, la PCR cuantitativa se realiza en capilares ("LightCycler® Capillaries"). En algunas modalidades, la cuantificación del material genético se determina por absorbancia óptica junto con PCR en tiempo real. En algunas modalidades, la cuantificación del material genético se determina mediante PCR digital.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Generación de sondas de captura específicas de genes

Se generaron sondas de captura que contenían varias secuencias funcionales y dominios de captura específicos de genes o generales (por ejemplo, poli(T)) con una estrategia de ligación. La Figura 2 muestra un oligonucleótido inmovilizado, oligonucleótido aceptor, en un sustrato, de 3' a 5' que contiene un enlazador de C6 modificador amino en su extremo 3', seguido de un dominio de escisión (por ejemplo, uracilos), un dominio funcional de asa de secuenciación (por ejemplo, R1), una secuencia de código de barras espacial, una secuencia UMI y un asa de ligación (SEQ ID NO: 9). Un oligonucleótido de soporte (SEQ ID NO: 10) con una secuencia complementaria al asa de ligación y una secuencia adicional (por ejemplo, secuencia específica de gen o poli(A)) facilita la ligación del oligonucleótido y el dominio de captura (SEQ ID NO: 11). La ligación de ambos dominios de captura poli(T) (por ejemplo, ARNm) y un ARNm específico (por ejemplo, Penk) al oligonucleótido inmovilizado se completó mediante el uso de una mezcla que contenía 30 µM de Poli dT o secuencia de captura (por ejemplo, Penk), 30 µM de oligonucleótido de soporte y 100 unidades de ligasa. La Figura 3 muestra la detección de ADNc con dominios de captura poli(T) y específicos de genes ligados y no ligados, por ejemplo, gen Penk. La mezcla se colocó sobre el portaobjetos durante 60 minutos y luego se retiró antes de lavar y añadir el tejido. Todos los tejidos se permeabilizaron sin prepermeabilización durante una duración de 3, 6 o 9 minutos (Figuras 4A-B). Los datos muestran que la Poli dT se ligó con éxito al oligonucleótido inmovilizado y es capaz de capturar el ARNm de una manera sesgada. Adicionalmente, un dominio de captura para el ARNm de Penk se ligó exitosamente y fue capaz de capturar el ARNm de Penk. Como se muestra en la Tabla 1 más abajo, la unión de un dominio de captura Poli dT no afectó la eficiencia de secuenciación. Las lecturas mapeadas al transcriptoma para datos específicos de genes son relativamente altas para una captura de un solo gen (por ejemplo, Penk), pero es posible la estrategia de ligación y la captura de ARNm específica de genes posterior.

Tabla 1.

Nombre	Lecturas confidentes mapeadas al transcriptoma	Lecturas confidentes mapeadas al genoma	Lecturas de fracción con secuencia de cebador u homopolímero	Lecturas con cualquier secuencia poliA	Recuentos de UMI de la fracción ribosomal	Recuentos de UMI de fracción mitocondrial
Poli(T) ligado (N=6)	81,42 %	90,94 %	13,58 %	4,30 %	9,84 %	25,80 %
Promedio sin ligar (N=6)	83,12 %	92,67 %	13,37 %	2,52 %	10,18 %	26,15 %
Promedio de Penk (N=6)	13,33 %	53,07 %	10,78 %	0,28 %	1,18 %	2,78 %

Ejemplo 2 – Ligación de dominios de captura a oligonucleótidos inmovilizados

El siguiente protocolo y reactivos de ligación proporcionan la ligación de oligonucleótidos donantes que incluyen un dominio de captura a matrices existentes. Una porción de un oligonucleótido de soporte es complementaria al asa de ligación de un oligonucleótido aceptor, (por ejemplo, oligonucleótido aceptor 2), en la superficie de la matriz. Otra porción del oligonucleótido de soporte es complementaria a una segunda secuencia de asa de ligación presente en un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido donante) que también incluye el dominio de captura. El oligonucleótido de soporte facilita la ligación del dominio de captura (por ejemplo, mediante hibridación con la segunda asa de ligación) al oligonucleótido aceptor (por ejemplo, asa de ligación del oligonucleótido aceptor).

Protocolo de ligación:

La mezcla maestra de reacción de ligación se preparó de acuerdo con la Tabla 2 más abajo. Se incuban cantidades iguales de un oligonucleótido de soporte y un dominio de captura a temperatura ambiente durante toda la noche. Alternativamente, cantidades iguales de un oligonucleótido de soporte y una sonda de ligación se mezclan y calientan hasta 98 °C durante 2 minutos, y luego se enfrían hasta 4 °C a una velocidad de 0,1 °C/segundo.

A continuación, se añaden 100 µl de mezcla de sonda y ligasa a cada pocillo, y se incuban a 22 °C durante 60 minutos. Después de 60 minutos, se retiran y desechan 100 µl de volumen. Se añaden 100 µl de tampón SSC 2X que se ha calentado hasta 50 °C a cada pocillo y se incuban durante 2 minutos. Después de 2 minutos, 100 µl del tampón SSC 2X se retira del pocillo y se desecha. Este proceso se repite 2 veces para un total de 3 lavados en tampón SSC 2X a 50 °C.

Después de las 3 lavadas en tampón SSC 2X, se añaden 100 µl de tampón SSC 0,2X a temperatura ambiente a cada pocillo y se incuban durante 1 minuto. A continuación, se eliminan 100 µl de tampón SSC 0,2X, seguido de la adición de 100 µl de tampón SSC 0,1X.

El portaobjetos se puede almacenar a 4 °C hasta que esté listo para la hibridación de la sonda fluorescente y la obtención de imágenes.

Tabla 2. Mezcla de reactivos de reacción de ligación:

	Concentración stock	Concentración deseada	Volumen (µl)
Volumen final deseado			100

H ₂ O			55
ATP 100 mM	100 mM	2,5 mM	2,5
Tampón de ligación 5X	5X	1X	20
Ligasa	1000	100	10
PoliT + oligonucleótido de soporte	250	30	12

Reactivos en la tabla de mezcla de reactivos de reacción de ligación:

Artículo	Número de parte 10x	Origen	Composición
Tampón de ligación 5X	210007	10 veces fabricada (formulación a granel)	35 % de glicerol, Tris-HCl 250 mM pH 7,5, MgCl ₂ 50 mM
A granel, ATP 100 mM	210010	10 veces fabricada (formulación a granel)	100 mM (sal de disodio en polvo disuelta en agua sin nucleasas). pH ajustado a 6,8-7,2 mediante el uso de NaOH 10 M
Ligasa T4 sin DTT	310280	Enzimática (Qiagen)	Tampón: Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol 50 %, pH 7,5

Ejemplo 3 Ligación de dominios de captura a oligonucleótidos inmovilizados

Una porción del oligonucleótido de soporte universal (SEQ ID NO: 13) es complementaria a la primera asa de ligación del oligonucleótido aceptor (SEQ ID NO: 12) en la superficie de la matriz. Otra porción del oligonucleótido de soporte universal (SEQ ID NO: 13) es complementaria a una segunda secuencia del asa de ligación presente en un oligonucleótido que también incluye el dominio de captura. Se realizaron experimentos para determinar las condiciones de ligación y se determinó que una reacción de ligación que contenía 100 U de ligasa, 30 µM de oligonucleótido donante y 30 µM de oligonucleótido de soporte universal fue óptima en este caso para ligar el oligonucleótido donante al oligonucleótido aceptor en una matriz. Brevemente, una matriz que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores se pone en contacto con 30 µM de un oligonucleótido de soporte universal (SEQ ID NO: 12). El oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación presente en el oligonucleótido aceptor. La ligasa (100 U) y un oligonucleótido donante (30 µM) que incluye una segunda asa de ligación sustancialmente complementaria a una porción del oligonucleótido de soporte universal (SEQ ID NO: 12) se incuban en la matriz durante 60 minutos. El oligonucleótido de soporte universal facilita la ligación del oligonucleótido aceptor y el oligonucleótido donante que incluye un dominio de captura para un analito de interés. Después de la incubación, la matriz se lava durante 35 minutos. La matriz se funcionaliza con sondas de captura que incluyen el oligonucleótido donante con un dominio de captura para un analito de interés.

Los dominios de captura poli(T) se ligaron a oligonucleótidos aceptores facilitados por un oligonucleótido de soporte universal (SEQ ID NO: 13). La matriz que incluye dominios de captura poli(T) se pone en contacto con una muestra biológica y se capturan y extienden los analitos de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. La Figura 6B muestra una captura cualitativa ilustrativa de analitos de poli(A) (ARNm) con sondas de captura poli(T) ligadas y la Figura 6A muestra la misma muestra biológica teñida con tinción con H&E. Las Figuras 7A-B muestran una detección cuantitativa ilustrativa del ADNc con los dominios de captura poli(T) ligados (Figura 7A) y sondas de control (Figura 7B).

La Tabla 3 más abajo muestra lecturas mapeadas del transcriptoma comparables y lecturas mapeadas del genoma con sondas de captura poli(T) ligadas (30 Ts) o sondas de captura poli(T) impresas (20Ts). La Figura 8 también muestra los recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) 1 ligada por los recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) impresos con un coeficiente de correlación de Spearman = 0,911 y un coeficiente de correlación de Pearson = 0,999. Como tal, los datos demuestran que la ligación de oligonucleótidos donantes con dominios de captura a oligonucleótidos aceptores mediante un oligonucleótido de soporte universal puede usarse para construir una matriz espacial para capturar analitos diana, lo que da como resultado una captura diana que es comparable a las matrices espaciales impresas.

Tabla 3.

	Lecturas mapeadas del transcriptoma	Lecturas mapeadas del genoma
Poli(T) ligado (30 Ts)	81,42 %	90,94 %
Poli(T) impreso (20 Ts)	83,12 %	92,67 %

Ejemplo 4 Generación de sondas de captura específicas de Penk con un oligonucleótido de soporte universal

Las matrices que incluyen sondas de captura para el ARNm de Penk se prepararon de acuerdo con el protocolo de ligación descrito en el Ejemplo 2. La Figura 9 muestra la detección de la expresión génica espacial de Penk en la Figura 9A y la expresión génica espacial de Penk con sondas de captura ligadas a Penk en la Figura 9B. La Figura 10 es un gráfico que muestra la detección del ADNc marcado con sondas de captura específicas de Penk ligadas. La tabla más abajo muestra las lecturas mapeadas del transcriptoma y las lecturas mapeadas del genoma con sondas de captura específicas de Penk ligadas.

	Lecturas mapeadas del transcriptoma	Lecturas mapeadas del genoma
Penk ligado	13,33 %	53,07 %

Las Figuras 11A-B muestran los resultados de submatrices separadas donde los recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) 1 impresa por los recuentos sin procesar de la submatriz Penk 1 con un coeficiente de correlación de Spearman = 0,7597 y un coeficiente de correlación de Pearson = 0,0563 (Figura 11A) y Figura 11B muestra los resultados de submatrices separadas donde los recuentos sin procesar de la submatriz poli(T) 2 impresa por los recuentos sin procesar de la submatriz Penk 2 con un coeficiente de correlación de Spearman = 0,7585 y un coeficiente de correlación de Pearson = 0,0593.

La Tabla 4 más abajo muestra el por ciento de lectura de Penk (%) para diferentes sondas de captura poli(T) ligadas (30Ts), sondas de captura poli(T) impresas (20 Ts) y sondas de captura ligadas específicas de Penk. Los resultados muestran que las sondas específicas de Penk ligadas capturaron un mayor por ciento de lectura que las sondas de captura poli(T) ligadas o impresas.

Tabla 4.

Tipo de biblioteca	% de lectura de Penk
Sondas poli(T) ligadas (30 Ts)	0,045
Sondas poli(T) impresas (20 Ts)	0,043
Sondas ligadas específicas de Penk	0,062

Se generaron dos matrices separadas específicas de analito con dominios de captura específicos de Penk. La primera matriz específica de analito incluía un dominio de captura cerca del extremo 3' del transcrito de Penk ("sonda 3'") y la segunda matriz específica de analito incluía un dominio de captura cerca del medio del transcrito de Penk ("sonda intermedia") (Figura 12). La distribución de lectura de los cebadores específicos de Penk ("sonda 3'" y "sonda intermedia") se correlaciona con su diseño. Es decir, los montones de lectura de la sonda central Penk se ubicaron cerca del centro del transcrito Penk anotado y los montones de lectura de la sonda 3' se distribuyeron más a lo largo del transcrito Penk. También se muestra un cebador de transcriptasa inversa dT20 de control positivo (parte superior) y una sonda de gen de plantas de control negativo (parte inferior).

Ejemplo 5 Sondas de captura específicas de genes con un oligonucleótido de soporte universal

La Figura 13 muestra la captura exitosa de Doc2g con un dominio de captura Doc2g ligado. De manera similar, la Figura 14 muestra la captura exitosa de Kctd12 con un dominio de captura de Kctd12 ligado. Los controles para los dominios de captura Doc2g y Kctd12 incluyen: sin ligación (por ejemplo, sin producto esperado), poli(A) y Todo sonda-1. En ambos experimentos, las sondas de captura específicas de genes para otros genes (por ejemplo, Gad1-1, Gad1-2, Nrgn-1 y Nrgn-2) fueron controles para verificar la captura específica de genes.

Ejemplo 6 Matrices ligadas en comparación con las matrices impresas

Las Figuras 15 y 16 muestran los resultados de los recuentos sin procesar del área de captura 1 por los recuentos sin procesar del área de captura 2 con dominios de captura ligados en el tejido cerebral de ratón y el corazón humano. El coeficiente de Pearson en el tejido cerebral de ratón fue de 0,9992 y 0,9998 en el tejido cardíaco humano, respectivamente. Los datos muestran que las matrices generadas con dominios de captura ligados capturan analitos aproximadamente con la misma eficiencia que las matrices con sondas de captura impresas. La Figura 17 muestra una agrupación espacial exitosa tanto con sondas de captura ligadas como con sondas de captura impresas en tejido cerebral de ratón.

Ejemplo 7 Matrices ligadas con UMI en Oligonucleótido Donante.

Las Figuras 19A-B y 20A-B muestran una ligación exitosa de un oligonucleótido donante marcado (oligonucleótido donante UMI-Cy5, SEQ ID NO: 28) que incluye un identificador molecular único (UMI) a un oligonucleótido aceptor, (oligonucleótido aceptor V2-1, SEQ ID NO: 29), en el portaobjetos. La ligación se facilitó mediante un oligonucleótido de soporte (oligonucleótido de soporte V2-1, SEQ ID NO: 21). La reacción se realizó con 42 μ M de oligonucleótido donante marcado con Cy5 UMI-Cy5 (SEQ ID NO: 28) y se incubó y se ligó al oligonucleótido aceptor V2-1 (SEQ ID NO: 29) durante 2 horas en presencia del oligonucleótido de soporte V2-1 (SEQ ID NO: 21). Los portaobjetos con las sondas de captura ligadas se lavaron y se obtuvieron imágenes para el control de calidad. Las Figuras 20A y 20B muestran una ligación exitosa de una mezcla de oligonucleótidos (100 μ M) ligada durante toda la noche a temperatura ambiente. Las manchas alternativas se ligaron con el oligonucleótido donante fluorescente UMI-Cy3 (SEQ ID NO: 28) como un control de calidad de la ligación.

Los datos muestran la ligación exitosa de un oligonucleótido donante que contiene un UMI y un dominio de captura poli(T) a un oligonucleótido aceptor para la síntesis de una matriz espacial. Se observó una alta uniformidad espacial general de la intensidad del elemento con una señal/ruido alto.

Ejemplo 8 Eficiencia de ligación

Las Figuras 21A-D muestra un esquema de ligación ilustrativo donde se realizan dos reacciones de ligación para generar un primer producto de ligación y un segundo producto de ligación. Una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes y una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal se proporcionan a un sustrato que incluye una pluralidad de oligonucleótidos aceptores (Figura 21A). La primera pluralidad de oligonucleótidos donantes incluye un primer código de barras de ligación (BC1) y un segundo adaptador. Después de la reacción de ligación, una población de primeros productos de ligación y oligonucleótidos aceptores no ligados están presentes en el sustrato (Figura 21B).

Puede realizarse una segunda reacción de ligación donde una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes incluye un segundo código de barras de ligación (por ejemplo, BC2) y un segundo adaptador. La segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes puede ligarse al segundo oligonucleótido aceptor (por ejemplo, no ligado) mediante un segundo oligonucleótido de soporte para generar un segundo producto de ligación (Figura 21C). Después de la segunda reacción de ligación, la síntesis de la segunda hebra puede realizarse tanto en el primer producto de ligación como en el segundo producto de ligación, seguido de la desnaturalización, por ejemplo con KOH, NaOH, calor y/o formamida para liberar la segunda hebra. El primer código de barras de ligación y el segundo código de barras de ligación pueden detectarse subsecuentemente mediante una reacción de qPCR. El primer producto de ligación y el segundo producto de ligación pueden detectarse cuantitativamente (por ejemplo, el ensayo TaqMan) con sondas específicas para el primer código de barras de ligación (BC1) o el segundo código de barras de ligación (BC2) como se muestra en la Figura 21D. El porcentaje de segundos códigos de barras de ligación detectados informa la eficiencia de la ligación de la primera reacción de ligación (por ejemplo, reacción de ligación para formar el primer producto de ligación).

La eficiencia de la ligación se probó tanto a 22 °C como a 37 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 5 más abajo. Los datos demuestran eficiencias de ligación sorprendentes e inesperadas medidas mediante qPCR (por ejemplo, ensayo TaqMan) tanto a 22 °C como a 37 °C.

Tabla 5.

Temperatura de ligación	Experimento 1	Experimento 2
22 °C	94,2 %	99,4 %
37 °C	N/P	99,3 %

La eficiencia de la ligación también se probó mediante una prueba de enzima de restricción. La Figura 22 muestra un esquema de prueba de eficiencia de ligación ilustrativo. Por ejemplo, los oligonucleótidos donantes que incluyen un dominio de captura que incluye un dominio de captura poli(T) (SEQ ID NO: 15) o un dominio de captura que incluye la SEQ ID NO: 19 se ligaron a oligonucleótidos aceptores. Después de realizar la ligación, un oligonucleótido de bloqueo (sonda de bloqueo (SEQ ID NO: 34)) se hibridó con una porción del oligonucleótido aceptor. La porción de doble hebra mostrada en la Figura 22 incluye un sitio de enzima de restricción para SapI. La enzima de restricción generó un producto de 79 nucleótidos (dominio de captura poli(T)) o un producto de 69 nucleótidos (dominio de captura de la SEQ ID NO: 19). En el caso de oligonucleótidos aceptores no ligados se generó un producto de 40 nucleótidos.

Las Figuras 23A-B muestran los productos detectados después de la ligación e incubación con la enzima de restricción (Figura 23A). La sonda de bloqueo también se detecta (por ejemplo, producto de 20 nucleótidos). La Figura 23B es un gráfico que muestra la eficiencia de la ligación a 22 °C y 37 °C tanto para poli(T) como para un dominio de captura que incluye la SEQ ID NO: 19 (por ejemplo, X22_ligado).

La Figura 24 es un gráfico que muestra los UMI medios a 50k lecturas/punto sin procesar con matrices generadas por reacciones de ligación a 22 °C, 30 °C o 37 °C. En conjunto, los datos demuestran que la ligación puede realizarse en un intervalo de temperaturas y las matrices resultantes pueden compararse con, si no son superiores a, las matrices impresas.

Lista de secuencias

Secuencia de polipéptidos sintéticos PURAMATRIX
SEQ ID NO: 1 RADARADARADARA

Secuencia del polipéptido EAK16 sintético
SEQ ID NO: 2 AEAEAKAKAEAEAKAK

Secuencia del polipéptido KLD12 sintético
SEQ ID NO: 3 KLDLKLDLKLDL

18s sonda 1 de ADNc (P1)
SEQ ID NO: 4 GAGGAATTCCCAGTAAGT

18s sonda 2 de ADNc (P2)
SEQ ID NO: 5 GAGATTGAGCAATAACAG

- 18s sonda 3 de ADNc (P3)
SEQ ID NO: 6 GTAGTTCCGACCATAAAC
- 5 18s sonda 4 de ADNc (P4)
SEQ ID NO: 7 GGTGACTCTAGATAACCT
Cola poli(A) de analito a partir de una muestra biológica
SEQ ID NO: 8 AAAAAAAAAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
- 10 Asa de ligación de oligonucleótido aceptor
SEQ ID NO: 9 GCGGCCCG
- Oligonucleótido de soporte
SEQ ID NO: 10 AAAAAAAAAACGGGCCGC
- 15 Secuencia poli(T) de dominio de captura
SEQ ID NO: 11 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
- 20 Asa de ligación 2 de oligonucleótido aceptor
SEQ ID NO: 12
CGCTACG
- Oligonucleótido de soporte universal
SEQ ID NO: 13
- 25 TCGACTACGTAGCG
- Asa de ligación 3 de oligonucleótido aceptor
SEQ ID NO: 14
CGCTACG
- 30 T30VN
SEQ ID NO: 15
TAGTCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
- 35 N6 aleatorio
SEQ ID NO: 16
TAGTCGANNNNNN
- 40 N9 aleatorio
SEQ ID NO: 17
TAGTCGANNNNNNNNNN
- N12 aleatorio
SEQ ID NO: 18
- 45 TAGTCGANNNNNNNNNNNN
- Secuencia de captura con asa de ligación
SEQ ID NO: 19
TAGTCGATTGCTAGGACCGCCTTAAGC
- 50 Dominio de captura de secuencia de captura
SEQ ID NO: 20
TTGCTAGGACCGCCTTAAGC
- 55 Oligonucleótido de soporte V2-1
SEQ ID NO: 21
GCTAGTAAGGTGCGCAATCCTC
- Oligonucleótido de soporte V2-2
SEQ ID NO: 22
GCACCTTGGACCGCTAAAGTTG
- 60 Oligonucleótido de soporte V2-3
SEQ ID NO: 23
GCTAGTCGAGCCGACAATTGTC
- 65 Oligonucleótido de soporte V2-4

ES 3 024 383 T3

SEQ ID NO: 24
GCCTGACGAACCGGTTTTGCAA

5 Oligonucleótido donante UMI-V2-1
SEQ ID NO: 25
ACCTTACTAGCNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN

10 Oligonucleótido donante UMI-V2-2
SEQ ID NO: 26
GTCCAAGGTGCNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN

15 Oligonucleótido donante UMI-V2-3
SEQ ID NO: 27
GCTCGACTAGCNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN

Oligonucleótido donante UMI-V2-4
SEQ ID NO: 28
GTTTCGTCAGGCNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN

20 Oligonucleótido donante UMI-Cy3
SEQ ID NO: 29
ACCTTACTAGCNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN/3Cy3

25 Asa de ligación de oligonucleótido aceptor V2-1
SEQ ID NO: 30
GAGGATTGCGC

30 Asa de ligación de oligonucleótido aceptor V2-2
SEQ ID NO: 31
CAACTTTAGCG

35 Asa de ligación de oligonucleótido aceptor V2-3
SEQ ID NO: 32
GACAATTGTCG

Asa de ligación de oligonucleótido aceptor V2-4
SEQ ID NO: 33
GCAAAACCG

40 Sonda de bloqueo
SEQ ID NO: 34
AGATCGGAAGAGCGTCGTGTAG

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar una matriz espacial que comprende:

(a) proporcionar un sustrato que comprende una pluralidad de oligonucleótidos aceptores,

en donde un primer oligonucleótido aceptor de la pluralidad de oligonucleótidos aceptores comprende un código de barras espacial y una primera asa de ligación, y en donde el extremo 5' del primer oligonucleótido aceptor se une al sustrato;

(b) proporcionar una pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal, en donde un oligonucleótido de soporte universal de la pluralidad de oligonucleótidos de soporte universal comprende una secuencia complementaria a la primera asa de ligación y una secuencia complementaria a una segunda asa de ligación;

(c) ligar una primera pluralidad de oligonucleótidos donantes, en donde un primer oligonucleótido donante de la primera pluralidad de oligonucleótidos donantes comprende la segunda asa de ligación, un primer código de barras de ligación y un primer dominio de captura, al extremo 3' de un primer oligonucleótido aceptor para generar una primera sonda de captura, en donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación;

(d) ligar una segunda pluralidad de oligonucleótidos donantes, en donde un segundo oligonucleótido donante de la pluralidad de segundos oligonucleótidos donantes comprende la segunda asa de ligación, un segundo código de barras de ligación y un segundo dominio de captura, al extremo 3' de un segundo oligonucleótido aceptor para generar una segunda sonda de captura, en donde el oligonucleótido de soporte universal se hibrida con la primera asa de ligación y la segunda asa de ligación, para generar de esta manera una matriz espacial; y

medir cuantitativamente la presencia del primer código de barras de ligación, o un complemento del mismo, y el segundo código de barras de ligación, o un complemento del mismo, en donde medir cuantitativamente la presencia del primer código de barras de ligación y el segundo código de barras de ligación indica la eficiencia de la primera reacción de ligación.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el primer dominio de captura comprende una secuencia poli(T).

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el segundo dominio de captura comprende una secuencia específica de genes.

4. El método de la reivindicación 1, en donde el segundo dominio de captura comprende una secuencia al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 20, comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 20, o comprende la SEQ ID NO: 20.

5. El método de la reivindicación 1, en donde el primer dominio de captura comprende una secuencia aleatoria y, opcionalmente, en donde la secuencia aleatoria es un hexámero.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el oligonucleótido de soporte universal comprende una secuencia al menos 85 % idéntica a la SEQ ID NO: 13, comprende una secuencia al menos 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 13, o comprende la SEQ ID NO: 13.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligonucleótido de soporte universal comprende una base invertida en el extremo 3'.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el oligonucleótido donante comprende uno o más enlaces fosforotioato en el extremo 3'.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el método comprende además poner en contacto una muestra biológica con la matriz espacial después de la etapa (c).

10. El método de la reivindicación 9, en donde el método comprende además permeabilizar la muestra biológica para permitir que un analito en la muestra biológica interactúe con la primera sonda de captura o la segunda sonda de captura.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el método comprende además migrar el analito en la muestra biológica a la primera sonda de captura y la segunda sonda de captura, y opcionalmente, en donde la migración comprende migración pasiva o migración activa.

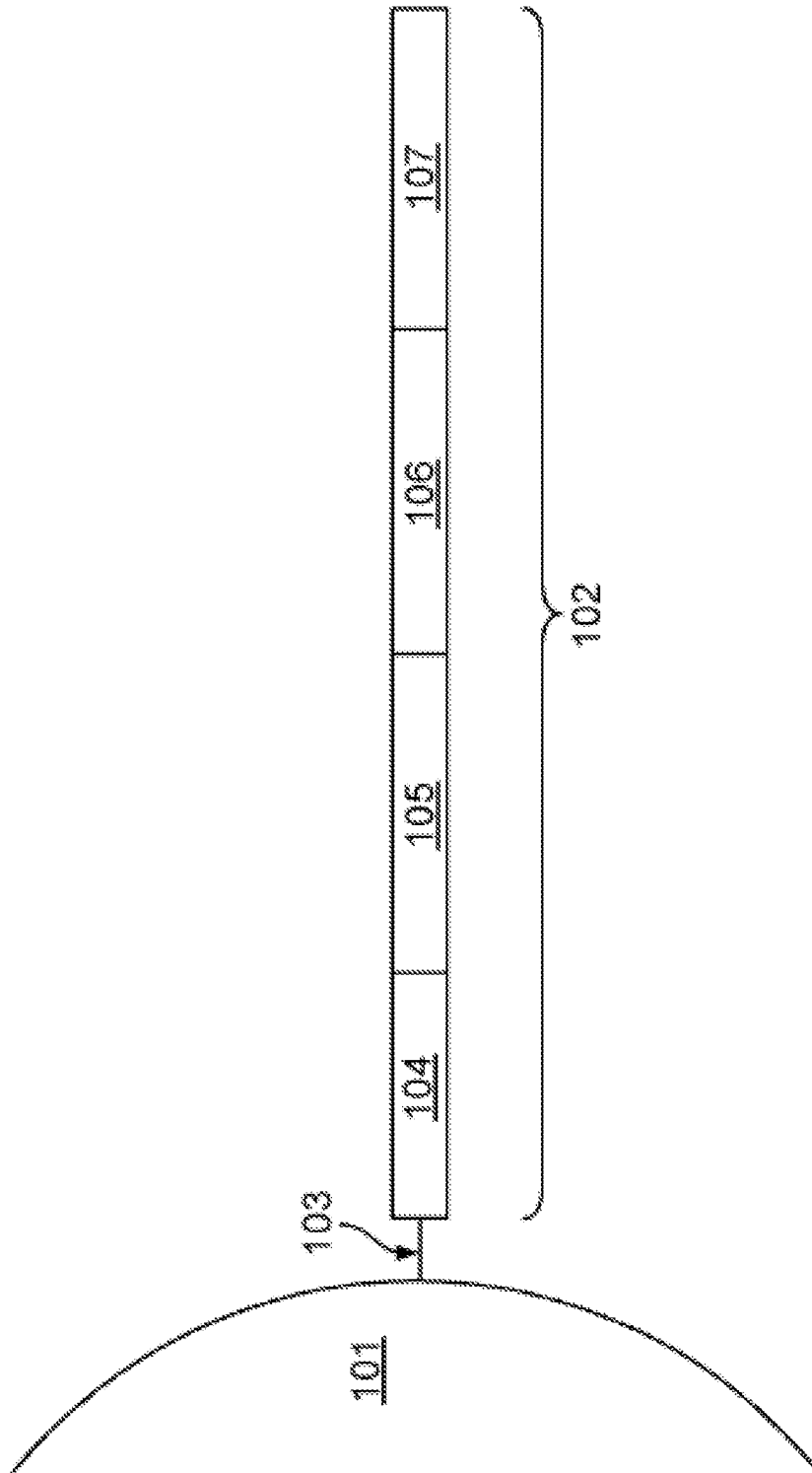


FIGURA 1

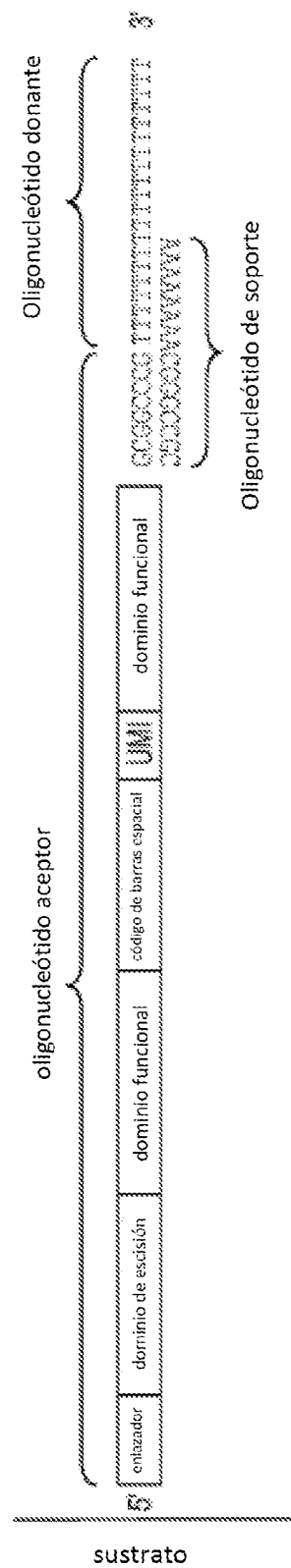


FIGURA 2

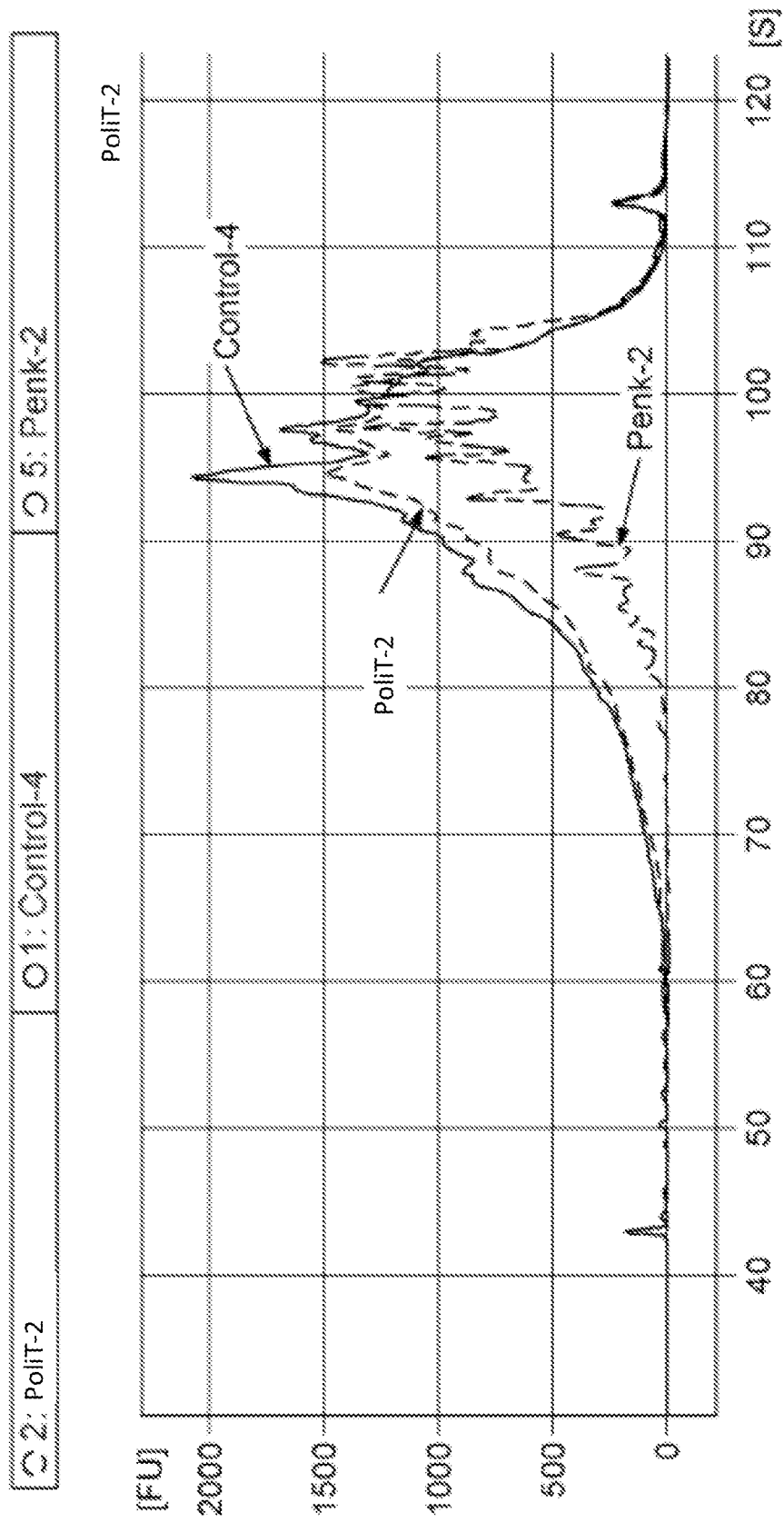
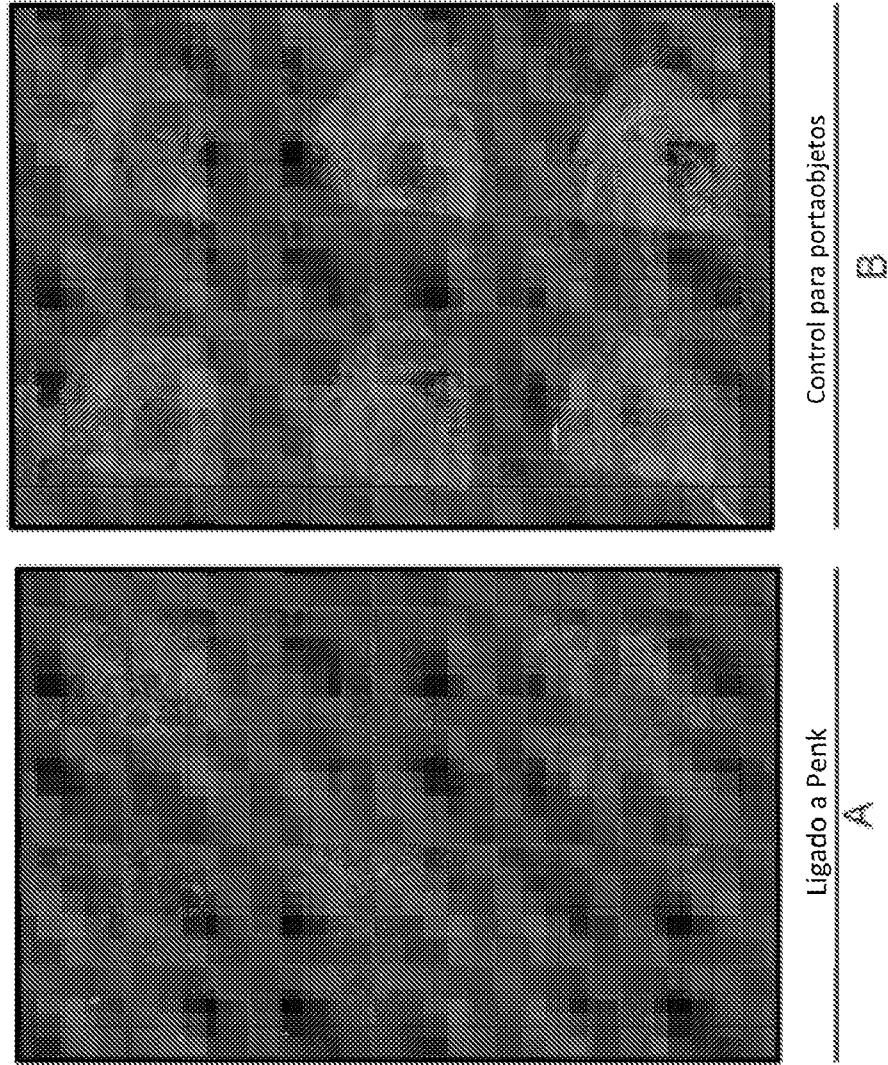


FIGURA 3



9 minutos	9 minutos
6 minutos	6 minutos
3 minutos	3 minutos

FIGURA 4

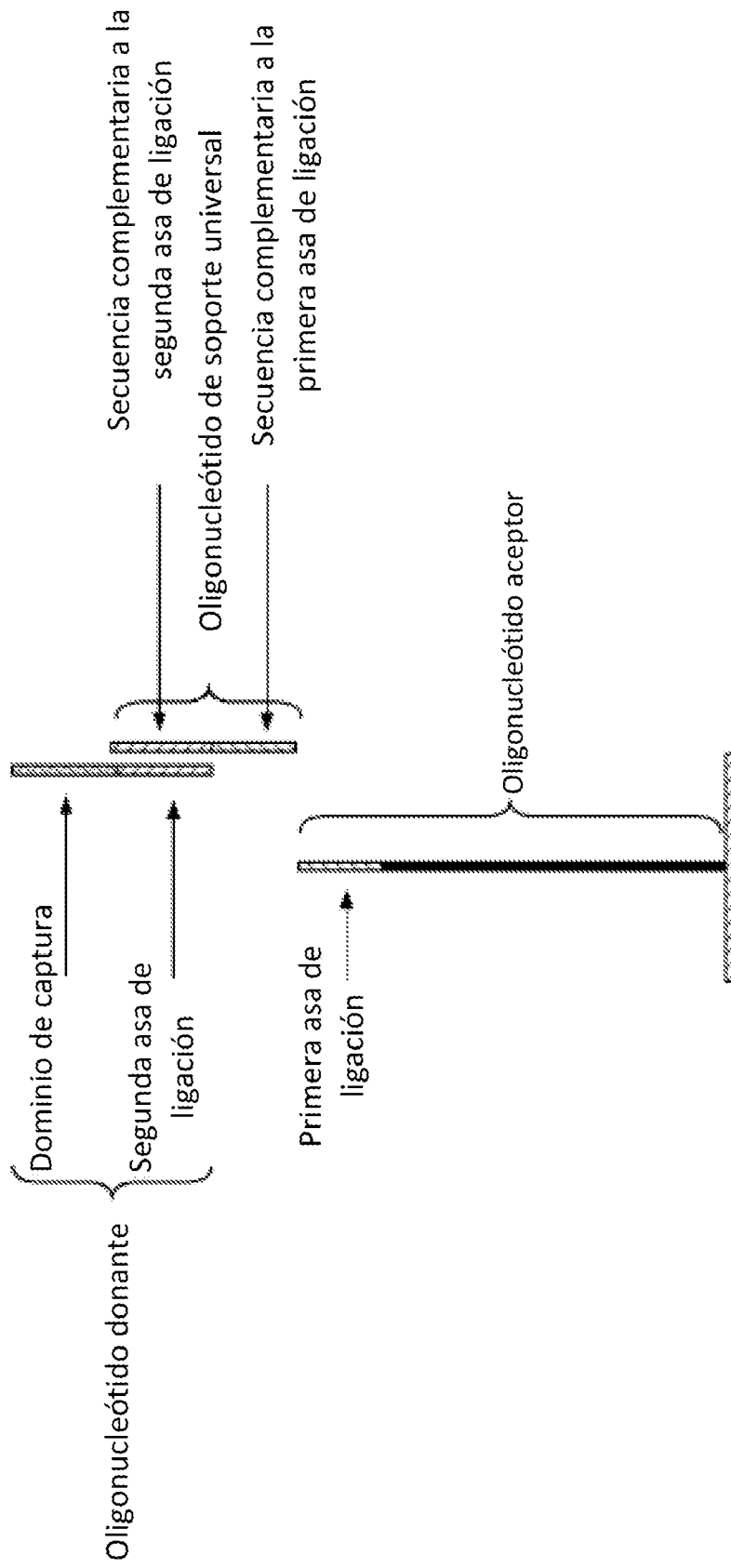


FIGURA 5

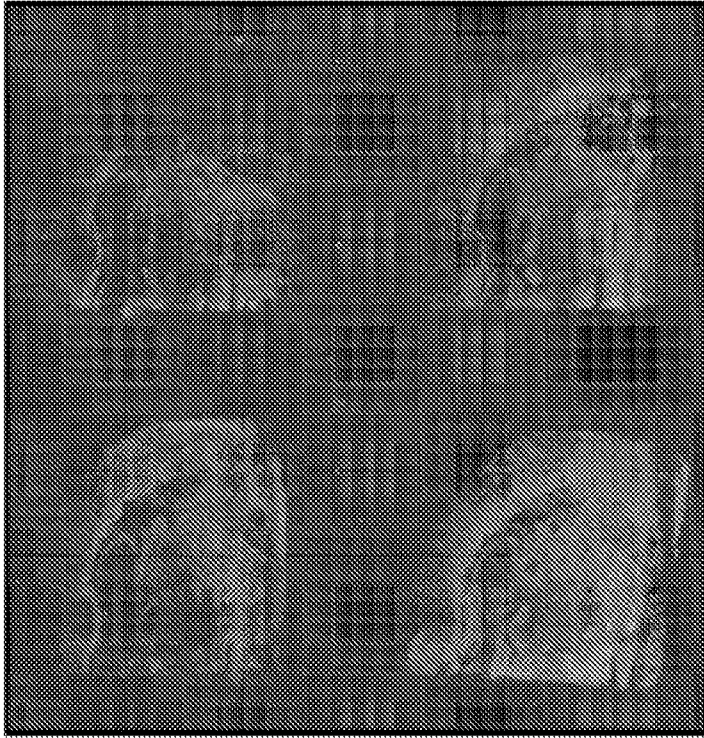


FIGURA 6B

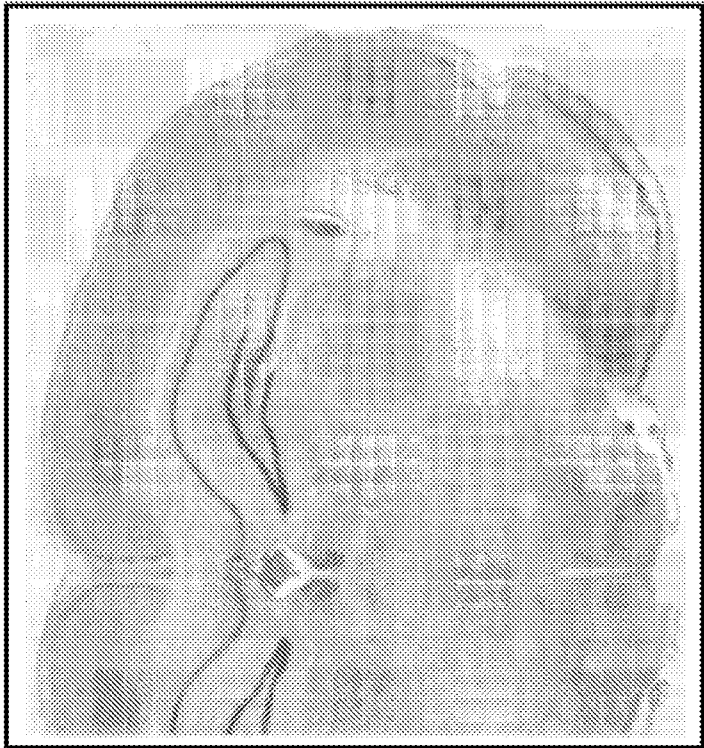


FIGURA 6A

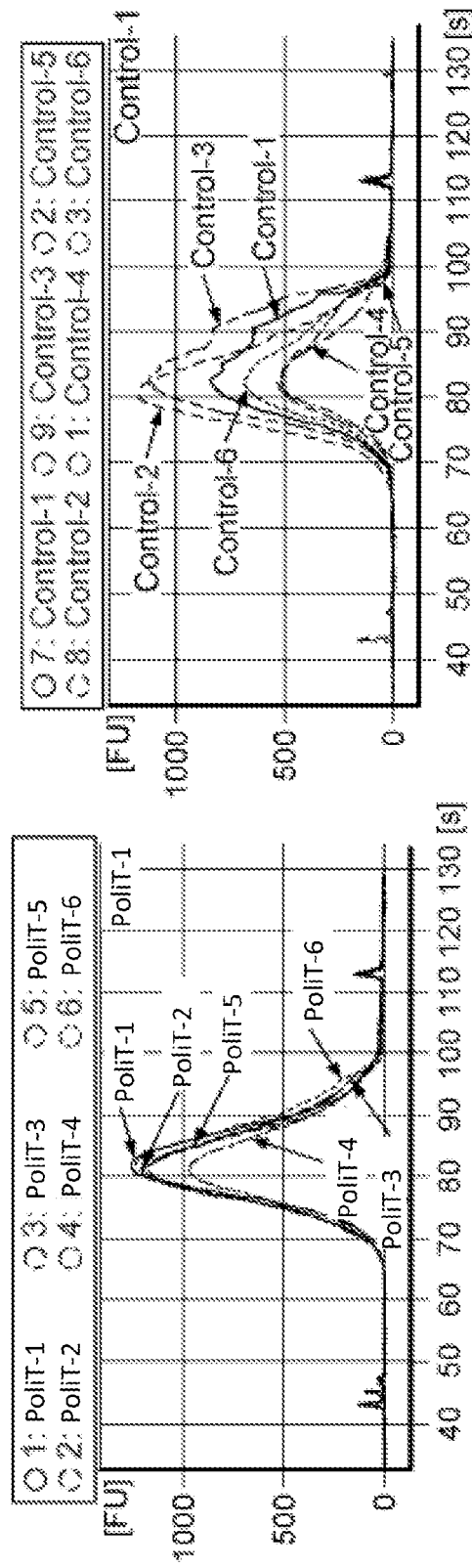


FIGURA 7B

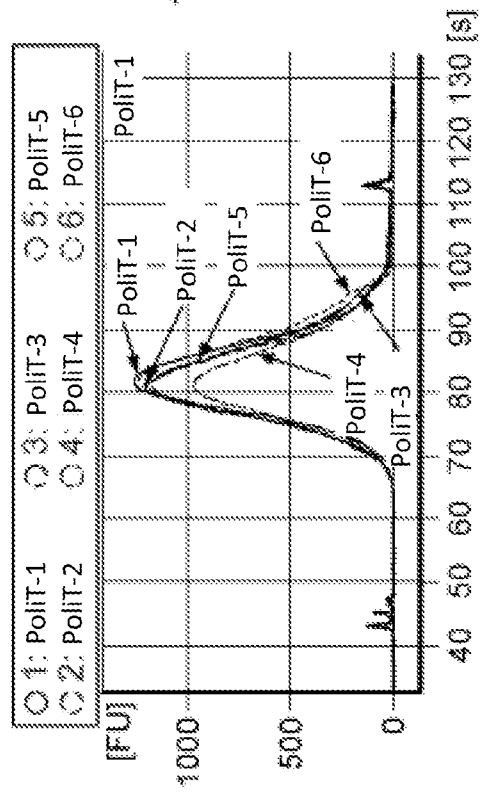
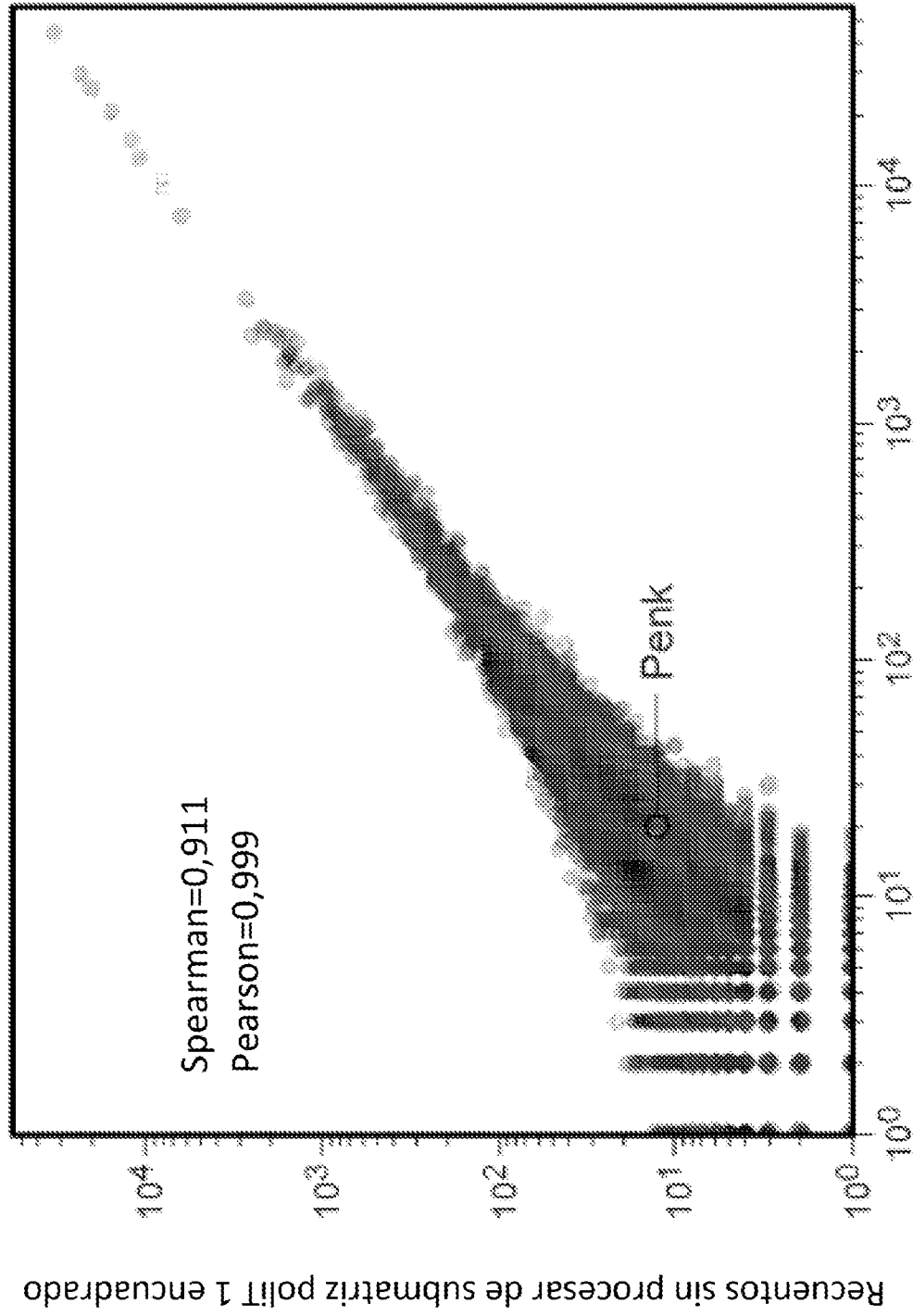


FIGURA 7A



Recuentos sin procesar de submatriz poliT 1 impresa

FIGURA 8

Ligado a Penk
para experimento

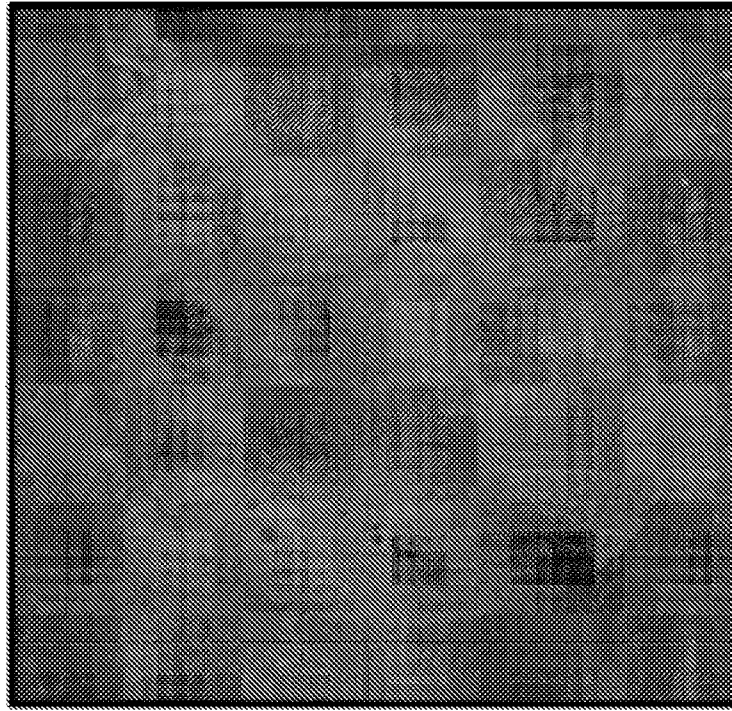


FIGURA 9B

Penk
Expresión génica espacial

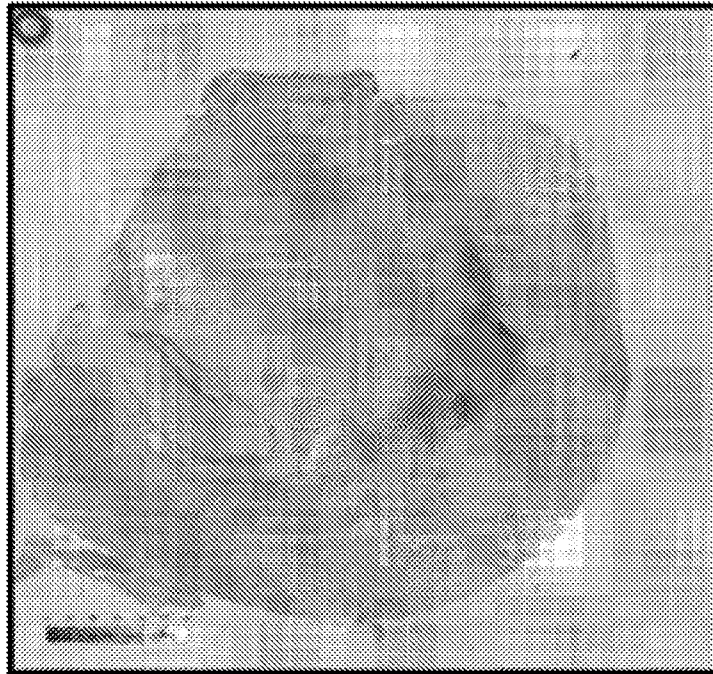


FIGURA 9A

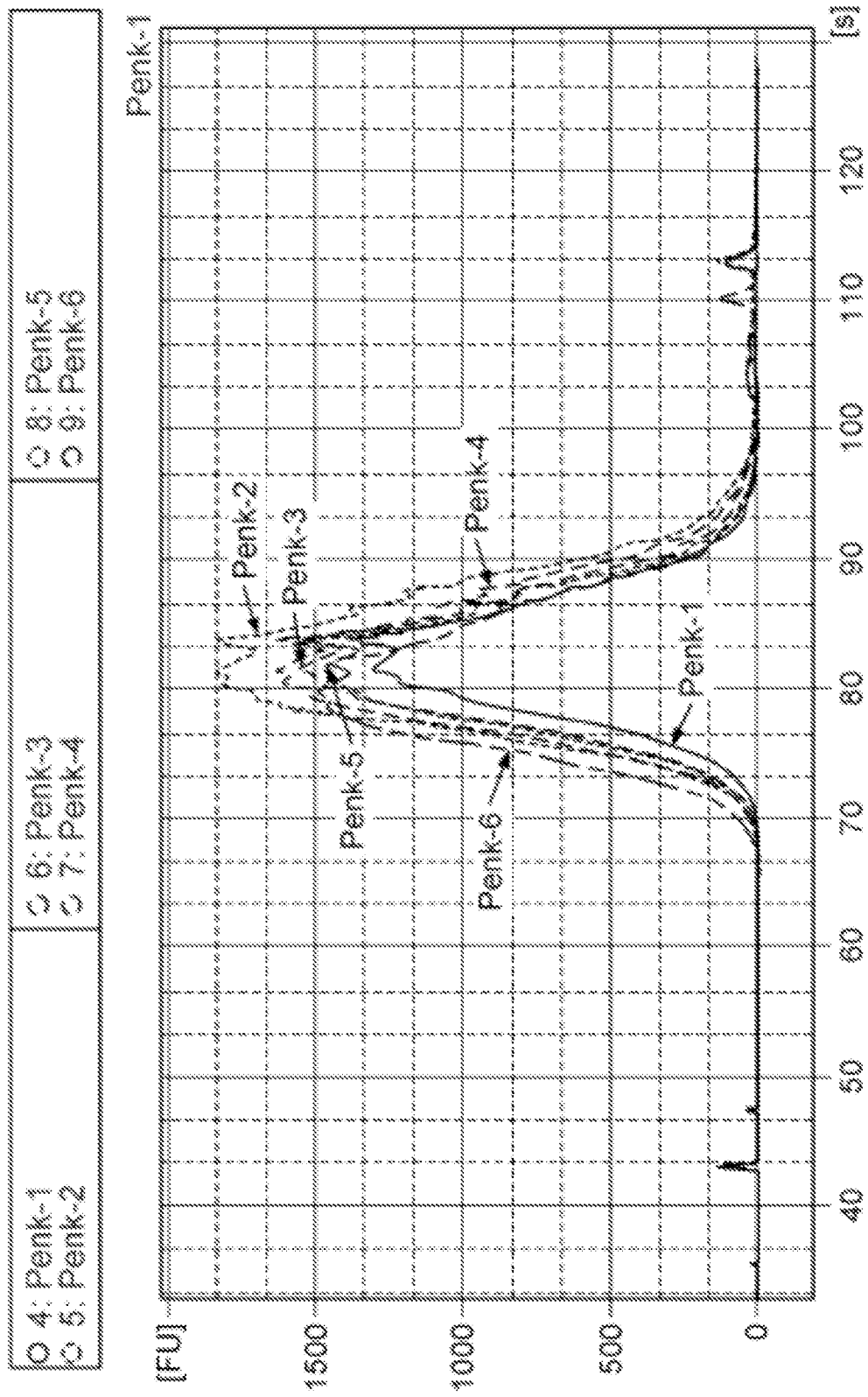
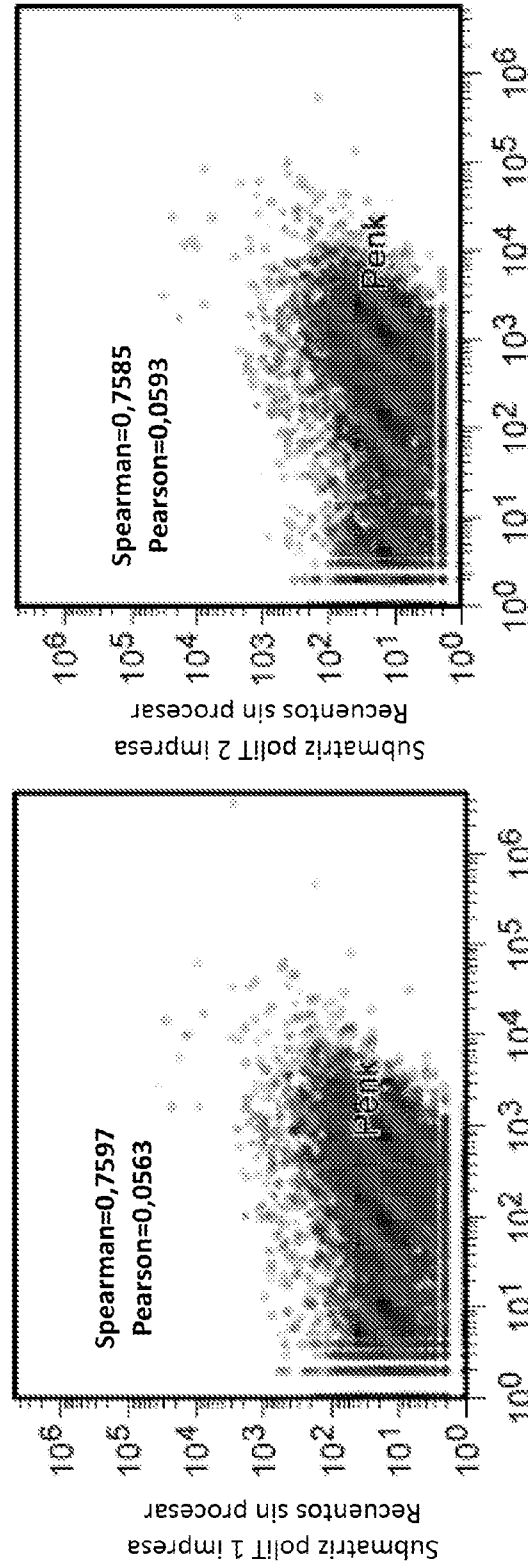


FIGURA 10



Recuentos sin procesar de submatriz Penk 1

FIGURA 11A

Recuentos sin procesar de submatriz Penk 2

FIGURA 11B

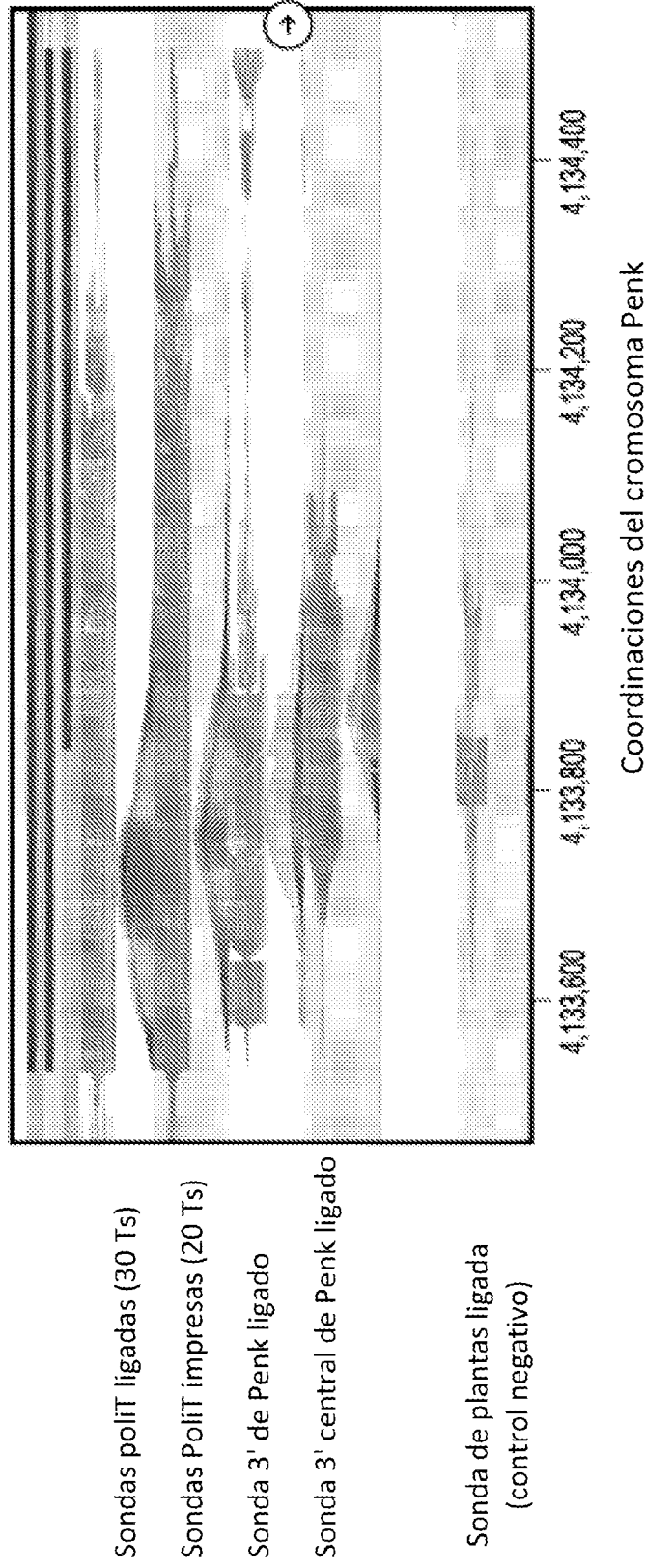


FIGURA 12

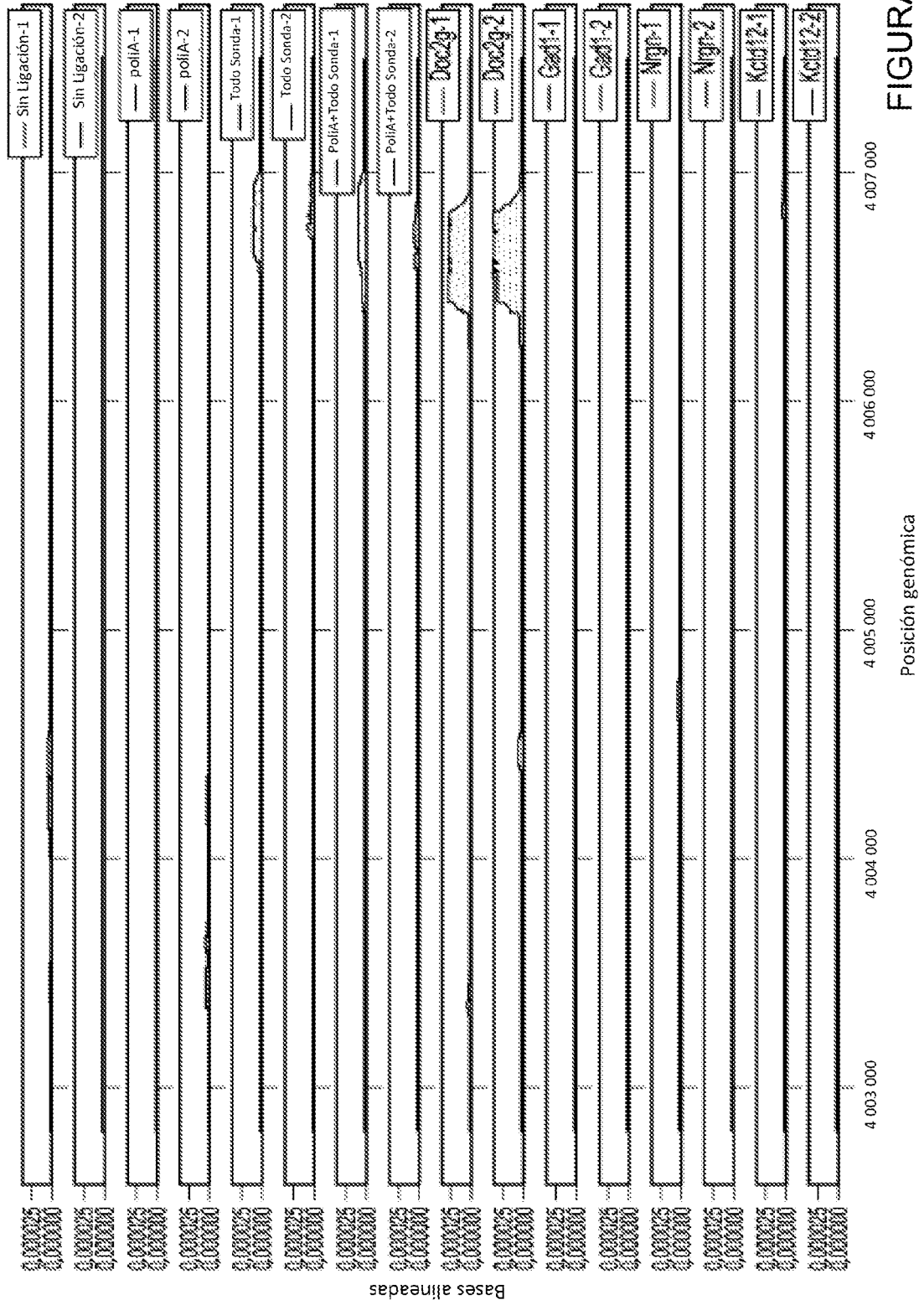


FIGURA 13

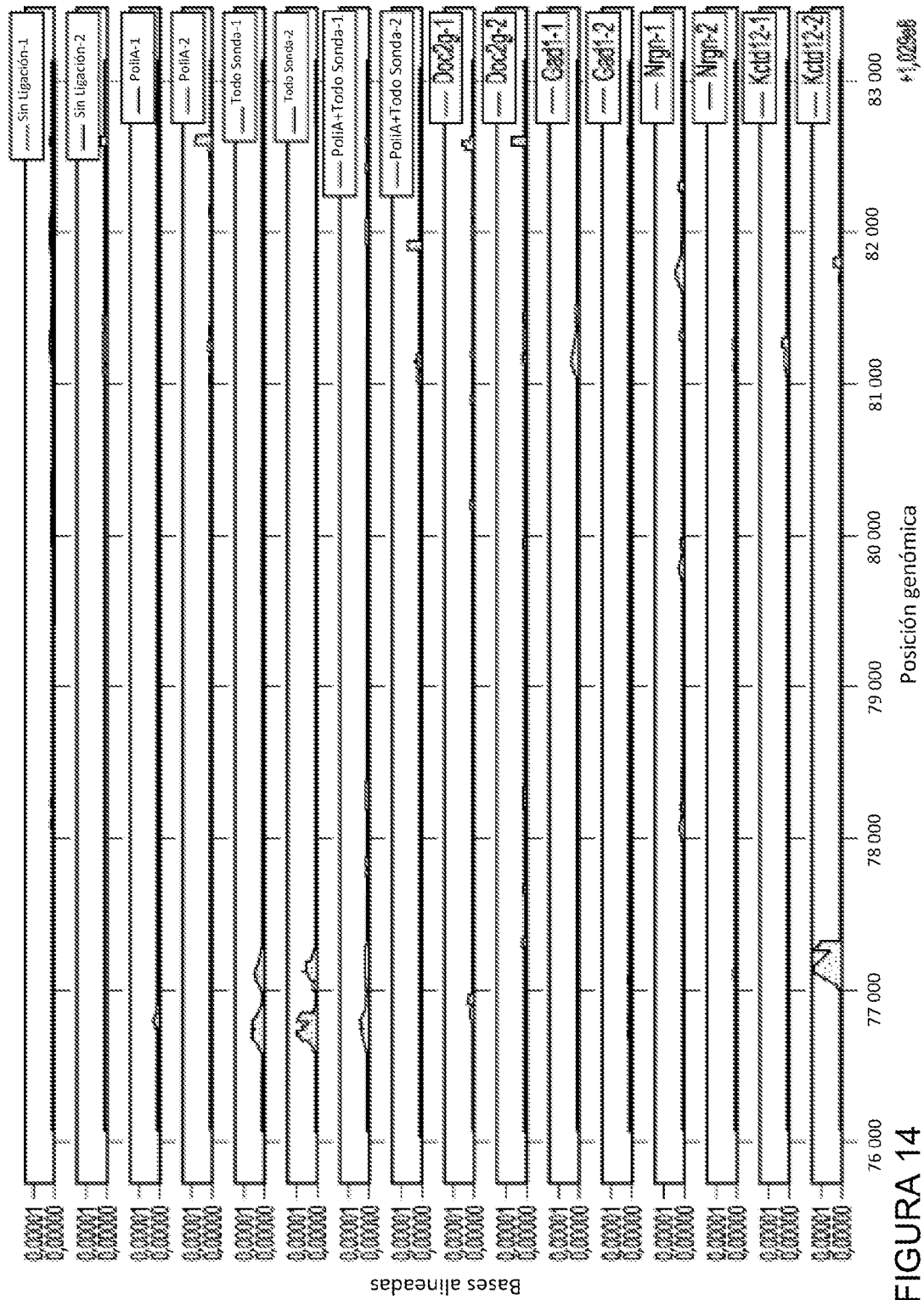


FIGURA 14

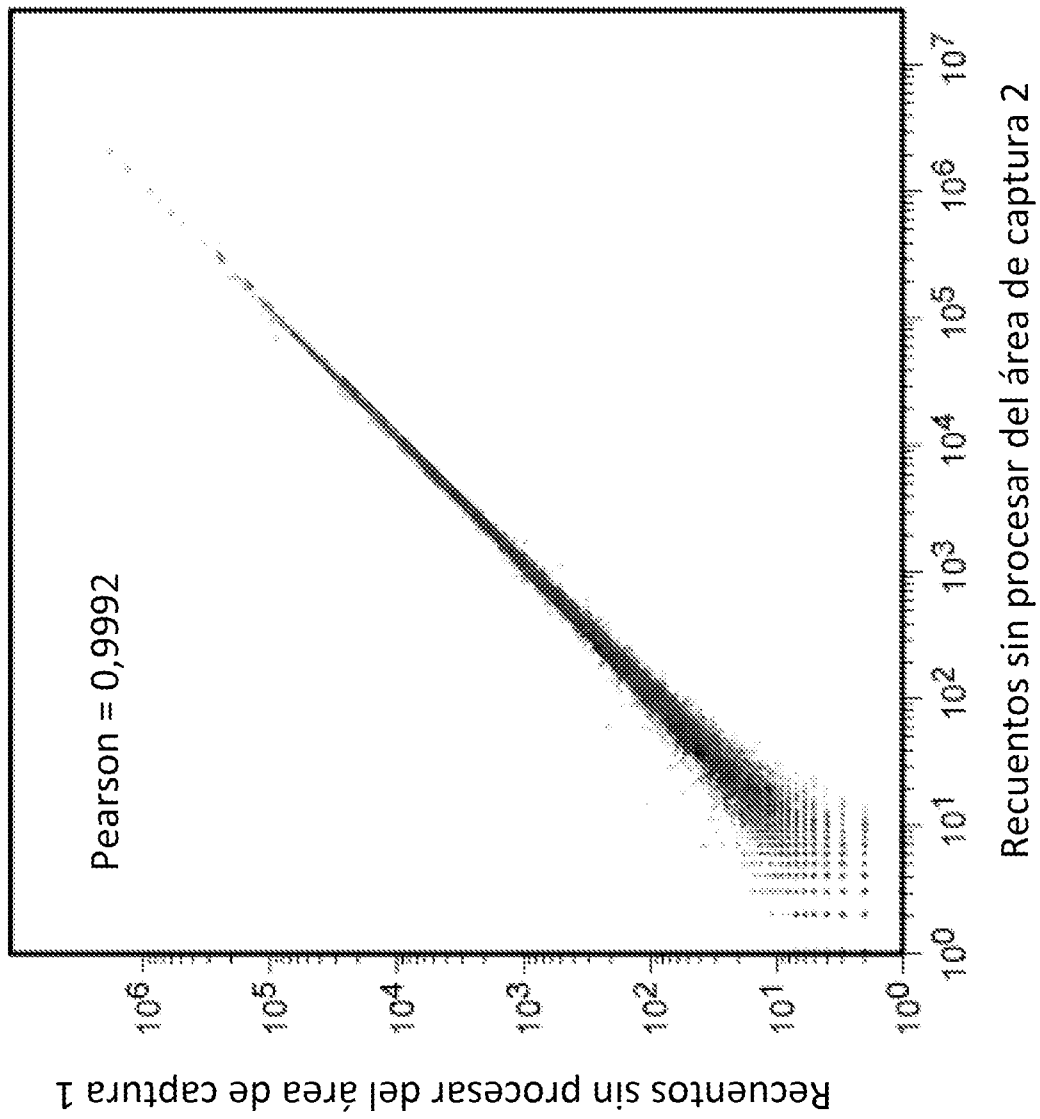


FIGURA 15

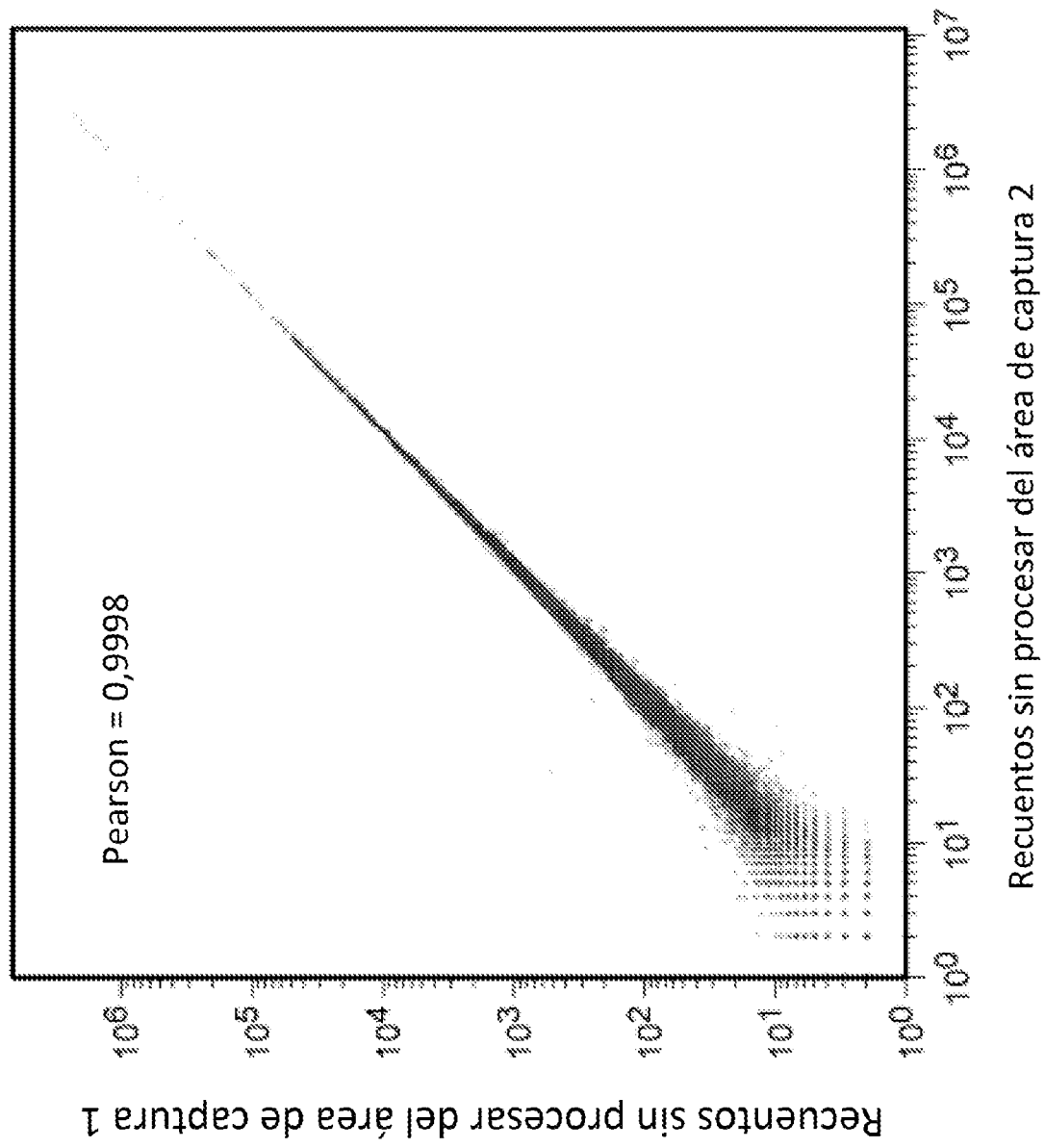


FIGURA 16

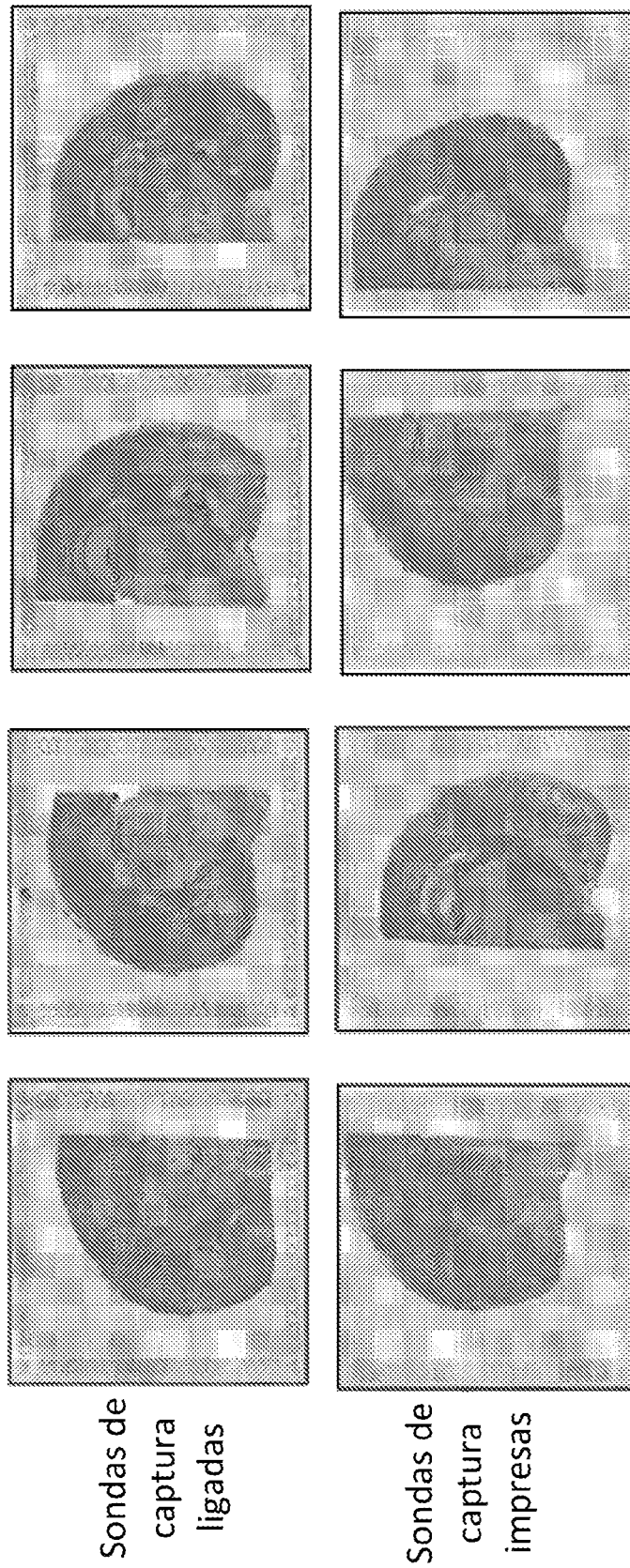


FIGURA 17

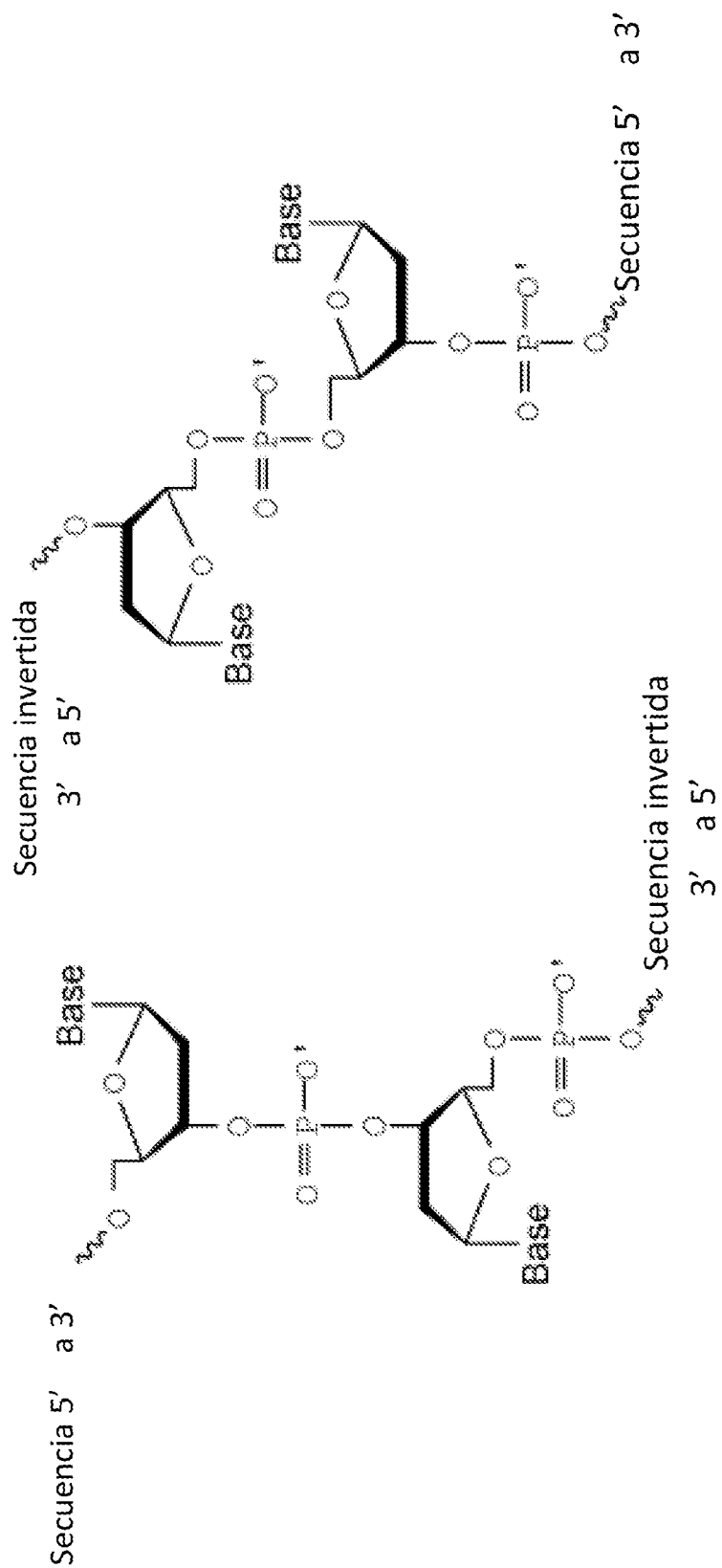


FIGURA 18A

FIGURA 18B

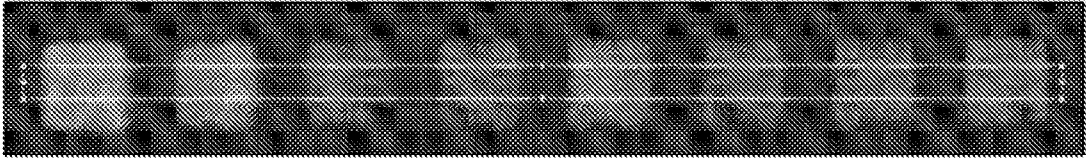


FIGURA 19A

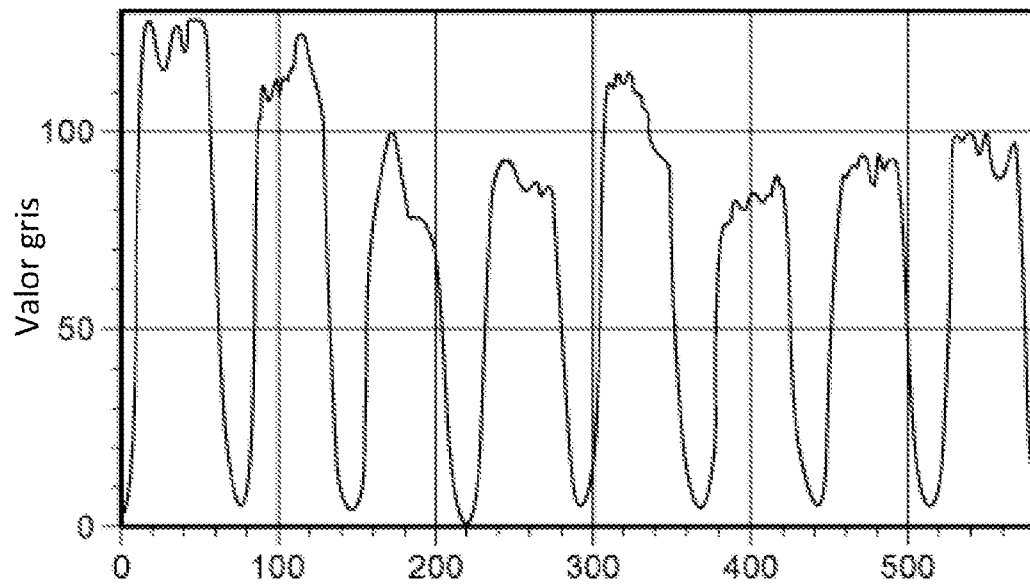


FIGURA 19B

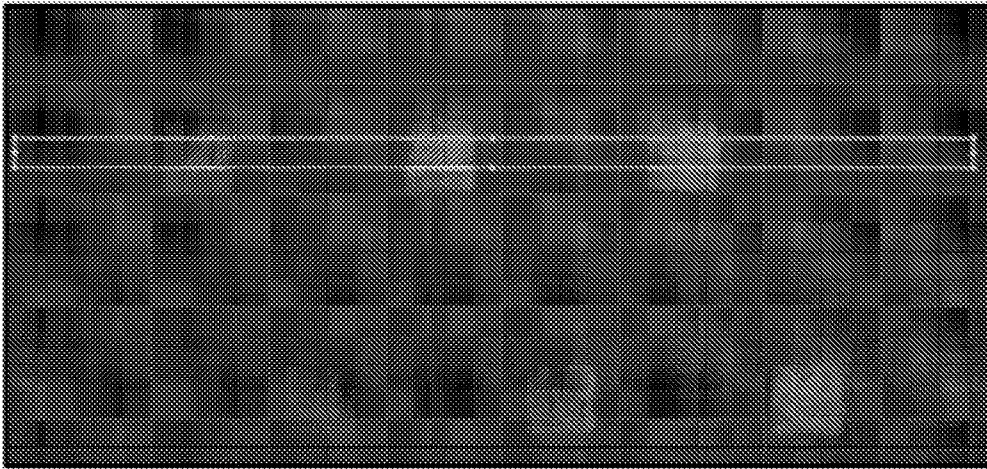


FIGURA 20A

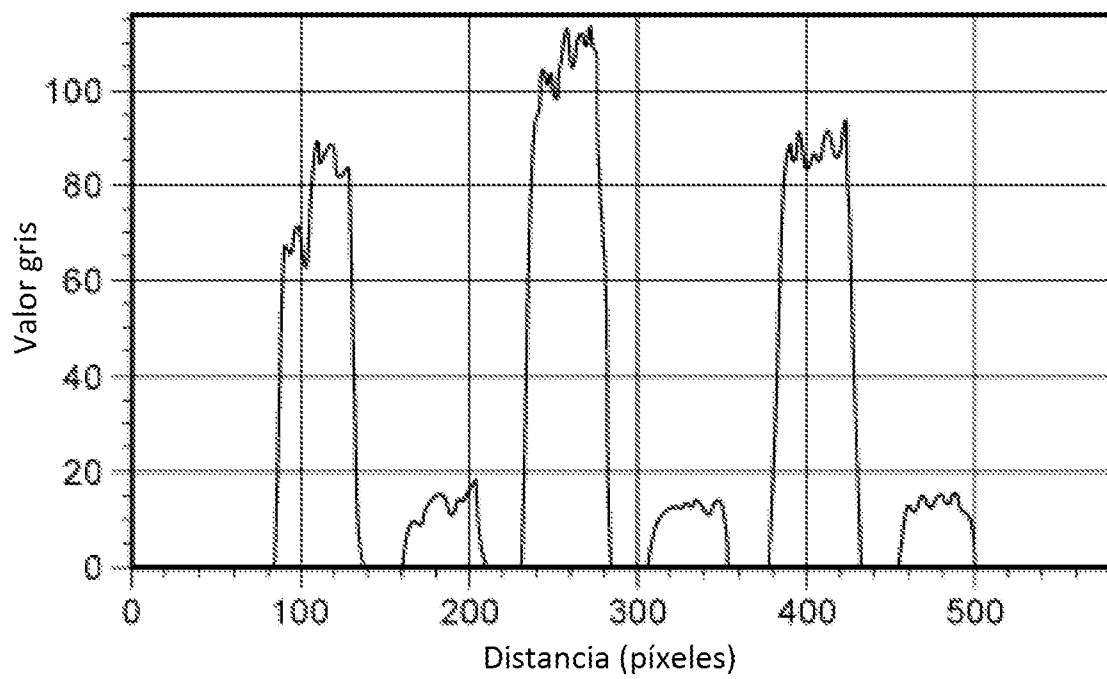


FIGURA 20B

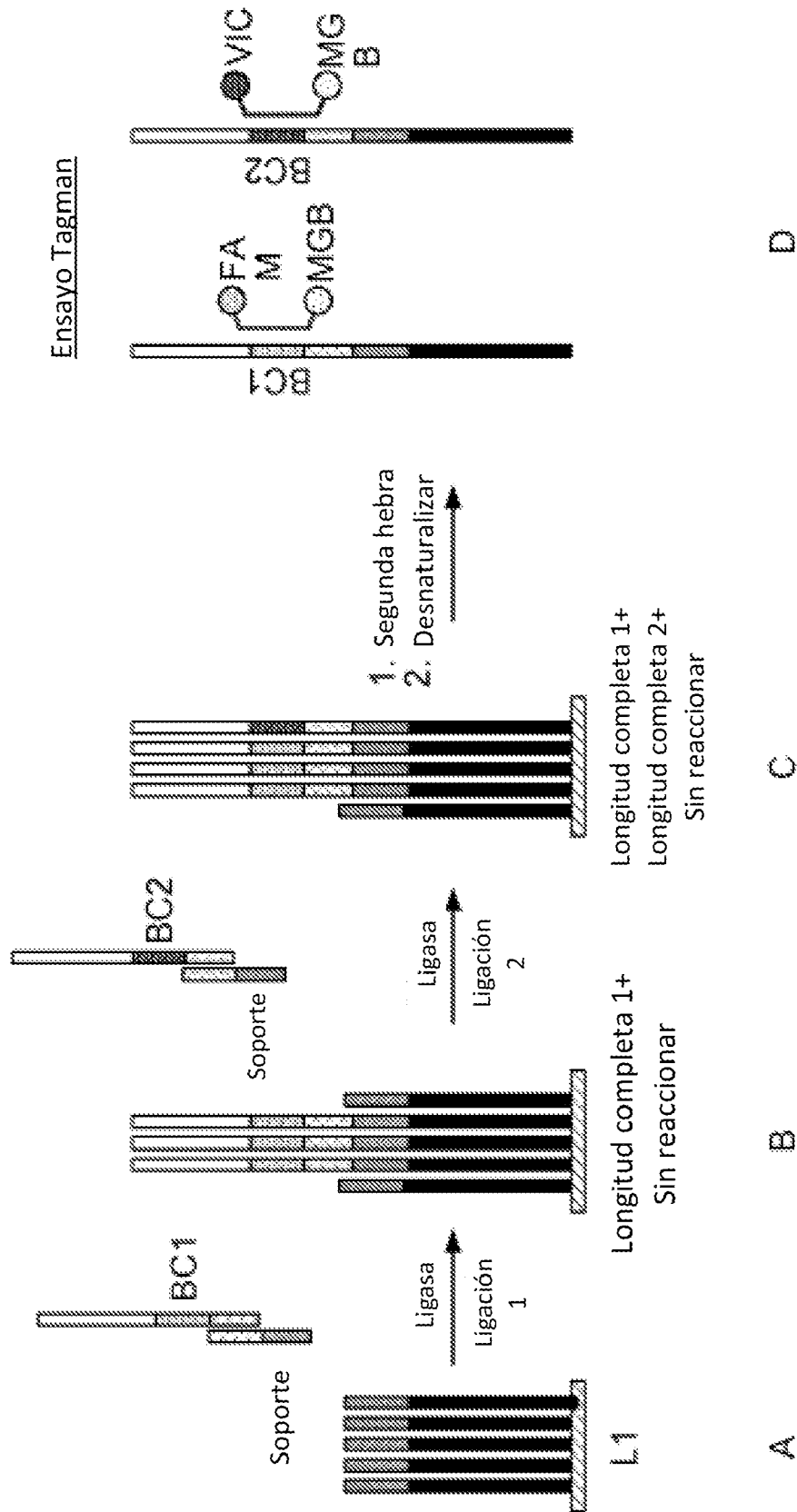


FIGURA 21

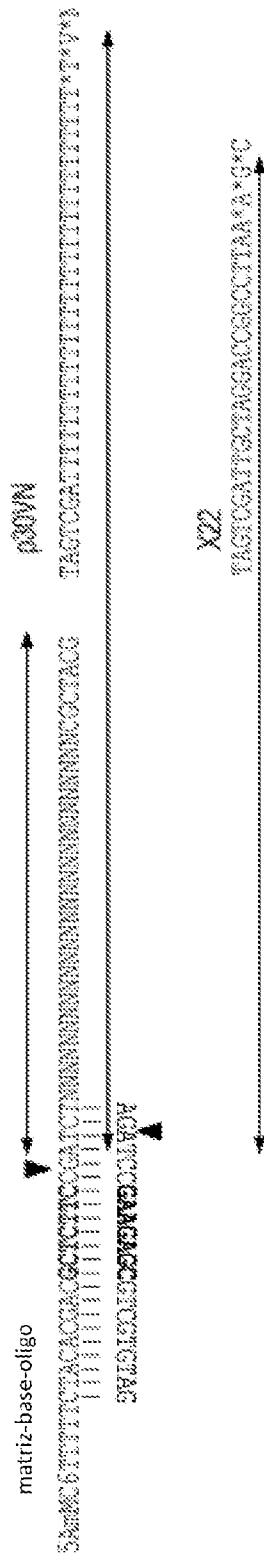
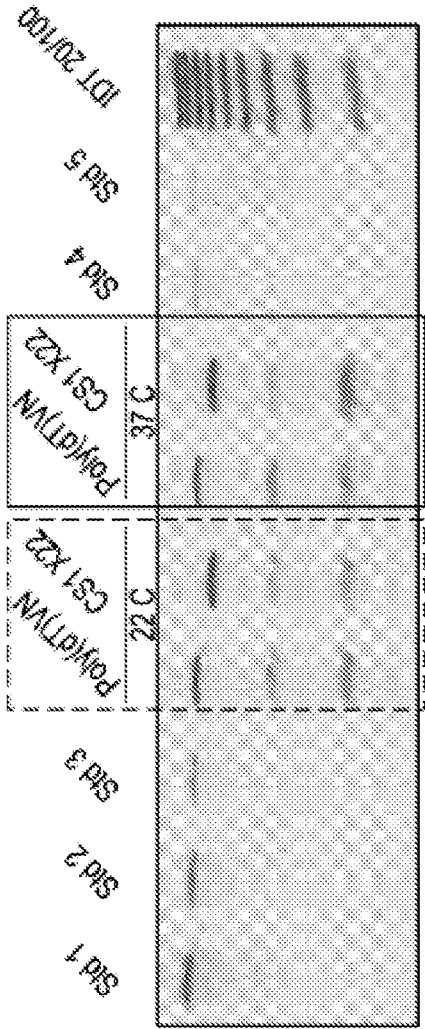


FIGURA 22



Productos escindidos ligados, 69-79 nt

Producto escindido sin ligar, 40 nt

Bloque, 20 nt

FIGURA 23A

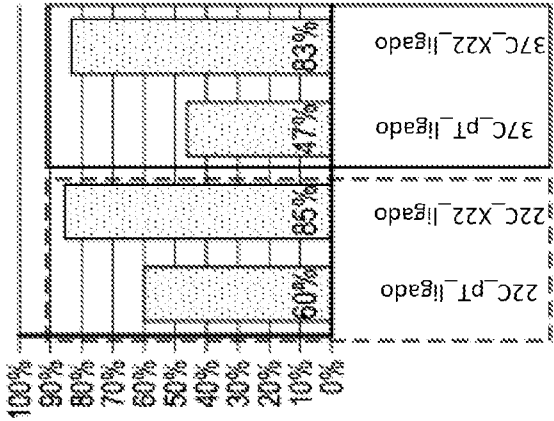


FIGURA 23B

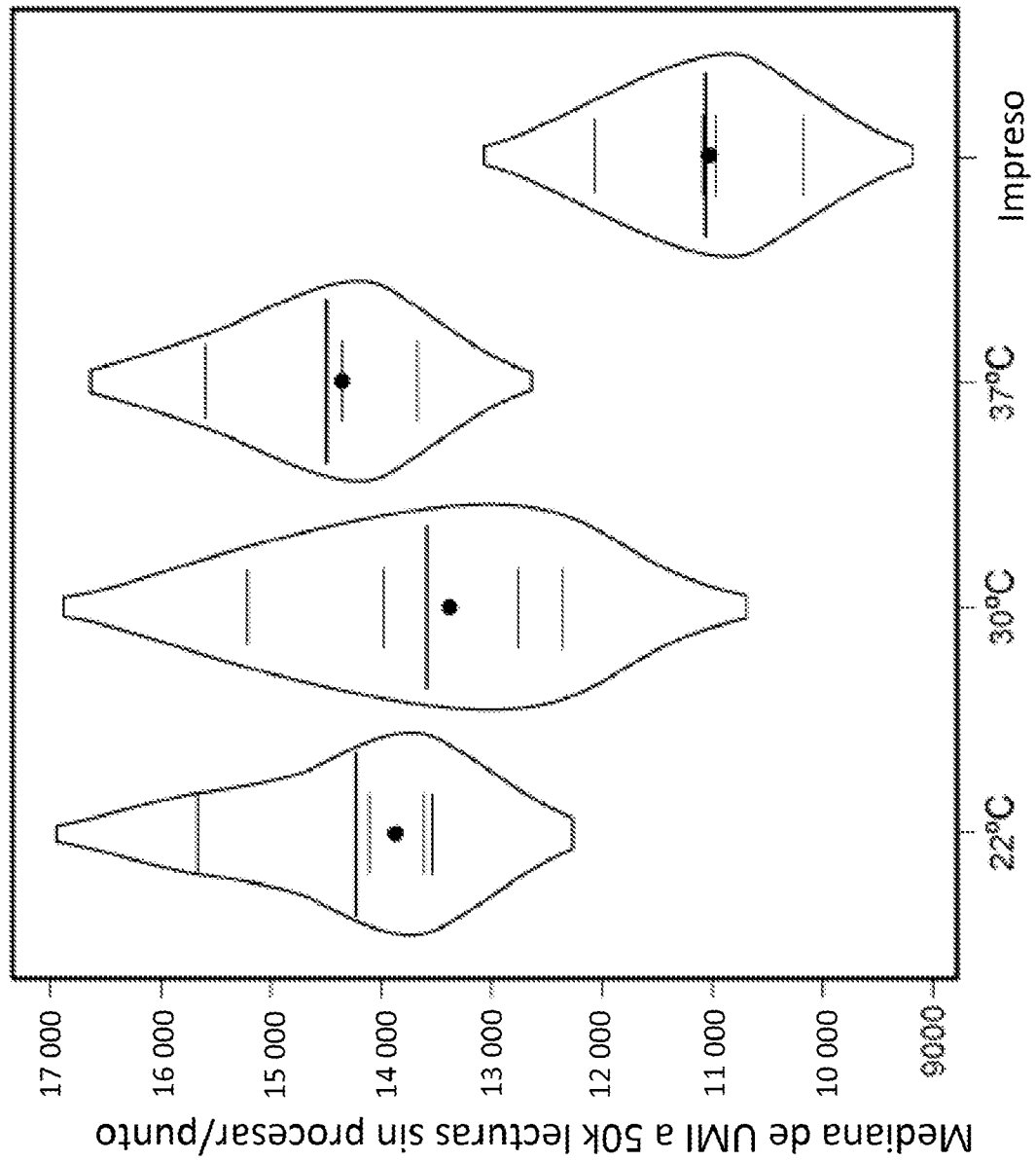


FIGURA 24